

(要約)

生体膜脂質に作用する天然有機化合物の探索と生物活性発現機序に関する研究

医薬創成情報科学専攻
システムケモセラピー・制御分子学分野
杉山 龍介

序論

生体膜は均一な構造ではなく微小な環境の集合体であり、微小環境では効果的なシグナル伝達や細胞骨格形成など、多くの生命現象が制御される⁽¹⁾。がんなどの疾患とも深く関連し、生体膜微小環境の形成・維持機構の解明は創薬の観点からも重要な課題といえる⁽²⁾。しかし、遺伝学やX線結晶構造解析などの強力な解析法があるタンパク質と比べて、解析手段に乏しい膜脂質の理解は後れをとっているのが現状である。そこで本研究では、脂質に作用しユニークな生物活性を示す新しい低分子化合物を取得し、それらの作用機序解析を通じて生体膜脂質の機能理解を試みた (Figure 1)。

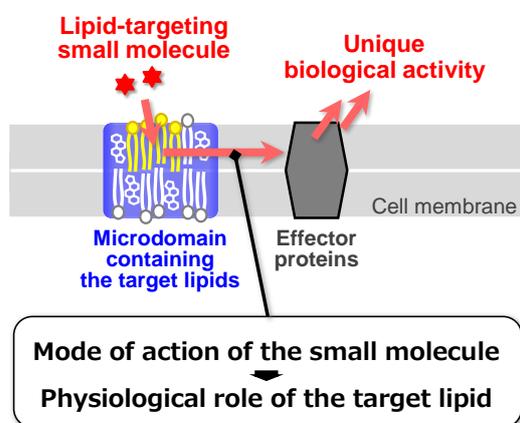


Figure 1. Strategy of this study. The author focuses on small molecules which induce unique phenotypes by binding to membrane lipids. Morphological changes caused by these compounds may be due to perturbation of the protein functions regulated by their target lipid molecules or membrane microdomains. Therefore, mode of actions of these compounds are expected to be linked with physiological functions of their target lipids.

第一章 膜脂質に結合する天然有機化合物の探索

脂質に結合する化合物は、特定の脂質代謝遺伝子を欠損する分裂酵母変異株に対して特徴的な生育阻害パターンを示す⁽³⁾。この現象に着目し、脂質結合性を示す新しい天然物を約2,000の微生物培養液抽出物(ブロス)から探索した (Figure 2)。ヒットブロスについて活性本体の単離・精製を行い、脂質に結合する新しいクラスの天然物として heronamide類、5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline類の取得に成功した。

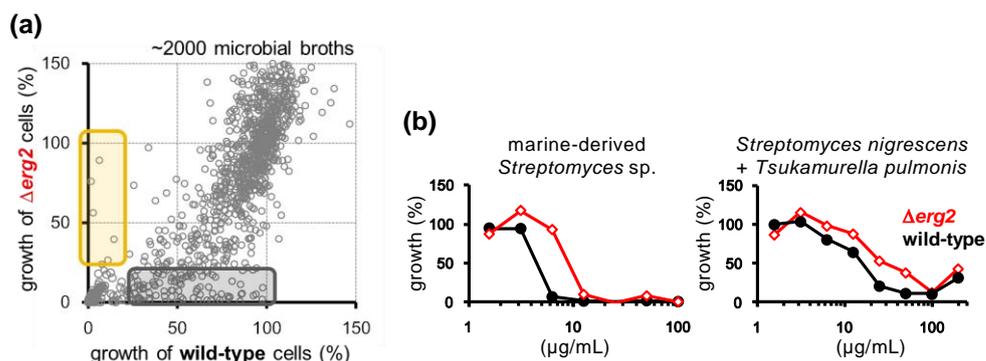


Figure 2. Screening for membrane-targeting natural products using fission yeast. (a) Growth of wild-type and $\Delta erg2$ cells treated with microbial culture extracts for 24 h are plotted. Broths plotted in the yellow square are expected to contain membrane-targeting natural products. **(b)** Growth curves of $\Delta erg2$ (red) and wild-type JY1 (black) cells treated with the hit broths for 24 h are shown. Culture broth of marine-derived *Streptomyces* sp. (left) contained heronamides, while the combined-culture of *S. nigrescens* and *T. pulmonis* (right) produced 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and streptoaminals.

第二章 放線菌が産生するheronamide類に関する研究

海洋由来放線菌*Streptomyces* sp. NSU893のプロスを分画した結果、活性成分として新規ポリエンマクロラクタム8-deoxyheronamide C (8-dHC) (1)が得られた。これは2010年に Capon, R. J.らによって化学構造が報告されたheronamides A (2)-C (4)の類縁体であったが⁽⁴⁾、8-dHCの構造解析の過程でheronamide類の報告構造に矛盾があることが判明した。そこで、スペクトル解析と化学変換からheronamides A (2), C (4)の真の構造を明らかにした (Figure 3)。また、それらの情報をもとに、8-dHC (1)の絶対立体化学を決定した。

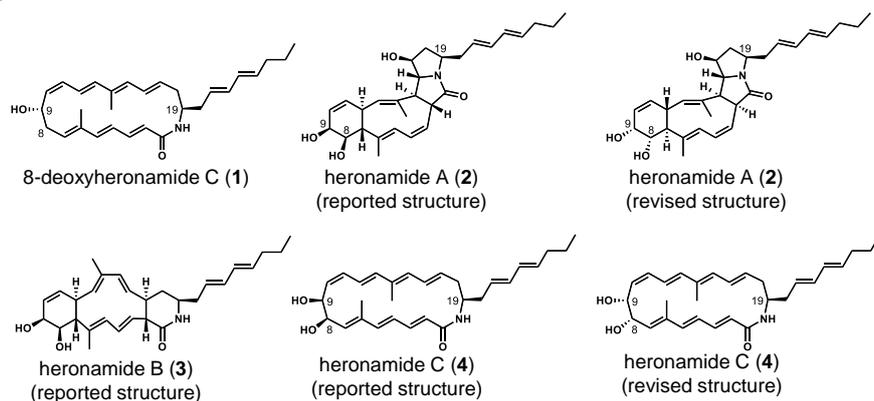


Figure 3. Structures of heronamides.

分裂酵母の変異株に対する生育阻害パターンから、8-dHC (1)が膜脂質を標的とする可能性が示唆された。そこで、表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定⁽⁵⁾により、8-dHC (1)が特異的に結合する標的脂質分子を検証した。その結果、8-dHC (1)およびheronamide C (4)

が飽和アルキル鎖から成る脂質と特異的に結合することが示された。さらに、分裂酵母を用いた遺伝学的解析から、heronamide類は脂質ラフトの構造・機能を破壊させることで細胞壁異常を引き起こすことが示唆され、heronamide類が新しいタイプの脂質結合化合物であることを明らかにした (Figure 4)。

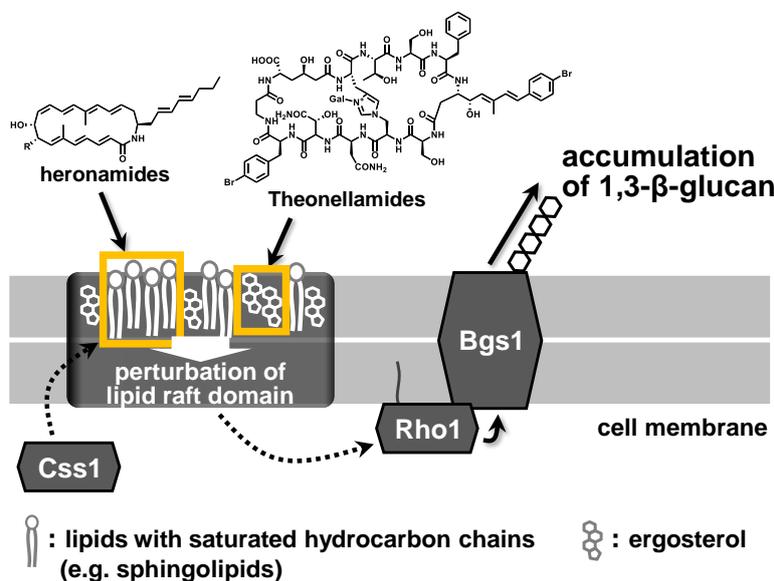


Figure 4. Model for the mechanisms of action of heronamides. Heronamides bind to lipids with saturated hydrocarbon chains, e.g. sphingolipids, while *css1* mutation changes sphingolipid species.⁽⁶⁾ Theonellamides bind to 3β-hydroxysterols.⁽⁷⁾ Membrane domains targeted by heronamides, might also be perturbed by *css1* mutation. In addition, membrane domains recognized by theonellamides can be overlapped with those colored in black, since lipid raft domains consist of lipids with saturated alkyl chains and sterols. All three perturbations induce overproduction of cell wall material, which requires Rho1 and Bgs1 at least in the case of heronamides and theonellamides. How perturbation of membrane domain structures affect the functions of Rho1 and Bgs1 remains to be revealed (dotted lines).

第三章 放線菌の複合培養液から得られる新規アルカロイド群に関する研究

放線菌 *Streptomyces nigrescens* と *Tsukamurella pulmonis* の複合培養液から、多様なアルキル鎖をもつ新規アルカロイド 5-alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ)類を活性本体として見出した (Figure 5)。精製に成功した8成分について、各種スペクトル解析と全合成から分子構造を決定したところ、5aTHQ類は既存の脂質結合化合物とは全く異なる構造を有することが明らかとなり、その活性発現機序に興味を持たれた。まず、分裂酵母のステロール生合成変異株に対する5aTHQ類の生育阻害活性を測定したところ、脂質結合化合物に特徴的な阻害パターンが検出された (Figure 6)。このとき、生育阻害の有効濃度や選択性はアルキル側鎖の構造に大きく依存した。続いて、Biacore T200を用いて人工膜との相互作用を検討すると、5aTHQ類は1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-

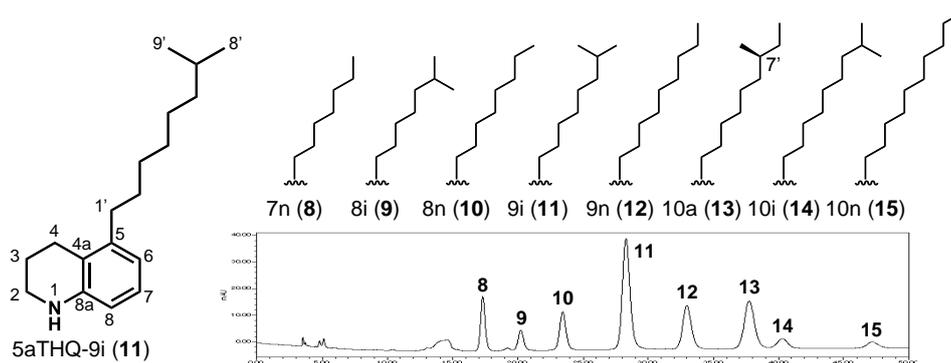


Figure 5. Structures and HPLC profiles of 5aTHQs. Structures of the most abundant metabolite 5aTHQ-9i (11) and the alkyl chains of metabolites 8–15. An HPLC chromatogram of the extract of the combined-culture broth of *S. nigrescens* and *T. pulmonis* acquired at 220 nm is also shown. Fractions containing 5aTHQs (8–15) were analyzed on a COSMOSIL Cholester column by isocratic elution of 90% MeOH.

phosphocholine (POPC)などのホスファチジルコリンから成る脂質膜と強い結合を示した。脂質膜との親和性はリン脂質の不飽和度やステロールの有無にはほとんど影響されなかったが、系中の5aTHQ類が一定濃度以下になると結合能は顕著に低下した。5aTHQ類の水溶液は一定濃度以上で特徴的な光散乱を示したため、5aTHQ類は水中で凝集体を形成することで脂質膜と結合している可能性が示唆された。凝集体形成濃度と生育阻害を示す濃度域に相関が見られたことから、凝集体の形成が5aTHQ類の生物活性においても重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

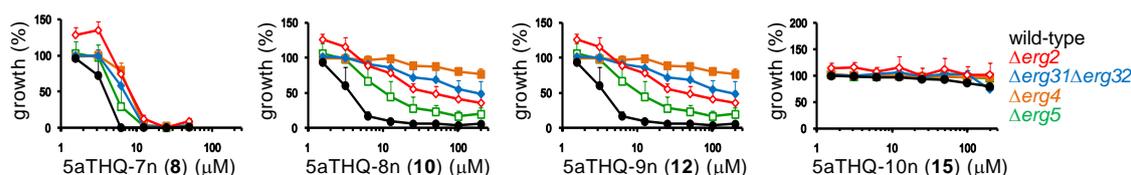


Figure 6. Growth inhibitory activities of 5aTHQs against fission yeast cells. Growth inhibitory activities of 5aTHQs were examined against the wild-type (black), $\Delta erg2$ (red), $\Delta erg31\Delta erg32$ (blue), $\Delta sts1/erg4$ (orange), and $\Delta erg5$ (green) cells. Cells were treated with compounds 8, 10, 12 and 15 for 24 h. Data represent the mean values of three independent experiments. Error bars indicate the SD.

ところで、2種類の細菌を複合培養した場合のみ5aTHQ類が生産されるという実験事実、複合培養⁽⁸⁾によって未発見化合物の生産能が上昇する可能性を支持した。そこでLC-MSによる代謝物解析を行った結果、5aTHQ類と同様のアルキル側鎖パターンをもつ別の化合物群が見出された。精製に成功した3成分について構造解析を行ったところ、

特異なスピロ構造を有する新規環状ヘミアミナル群であった (**Figure 7**)。3か所の不斉炭素の絶対立体化学は、化学変換とNMR解析、および全合成により決定した。Streptoaminal (STAM)類と命名したこの化合物群は、脂質との結合能はほとんど無かったが、様々な微生物に対して抗菌活性を示した。また、*S. nigrescens*のドラフトゲノム解析から5aTHQ類・STAM類の生合成遺伝子クラスターを見出し、¹³C標識実験の結果と合わせ、両者が共通のポリケチド合成酵素によって生産されることを明らかにした。以上より、5aTHQ類・STAM類は異なる骨格構造・生物活性をもつ化合物群でありながら、複合培養条件に応答する同一の生合成酵素群によって生産制御されるという興味深い結果が得られた。

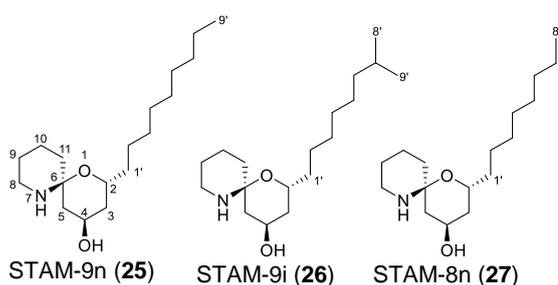


Figure 7. Structure of streptoaminals (STAMs)-9n (25), -9i (26) -8n (27).

結語

本研究では、生体膜脂質に結合する天然物を探索し、ユニークな構造・活性をもつ3種の新規化合物群の取得に成功した。Heronamide類に関する研究成果は、多様な生物活性を示すポリエンマクロラクタム類の分子メカニズムに迫る初の報告である。また、5aTHQ類については、細胞膜と作用する際に凝集体形成が重要という興味深い作用様式を明らかにしつつある。これらの化合物について生物活性発現機序の解明をさらに推し進めることで、生体膜脂質の機能を解析するツールとしての応用が可能になり、細胞膜を標的とした創薬へのヒントが得られると期待される。さらに、複合培養条件における5aTHQ類とSTAM類の生産制御機構の解明は、二次代謝産物生産に関わる微生物間コミュニケーションの理解にもつながると考えられる。

参考文献

- (1) Simons, K. & Ikonen, E. *Nature* **1997**, 387, 569.
- (2) Simons, K. & Ehehalt, R. *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 597.
- (3) Iwaki, T. *et al. Microbiology* **2008**, 154, 830.
- (4) Raju, R. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 4682.
- (5) Espiritu, R. A. *et al. Biochemistry* **2013**, 52, 2410.
- (6) Feoktistova, A. *et al. Genetics* **2001**, 158, 1397.
- (7) Nishimura, S. *et al. Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 519.
- (8) Onaka *et al. Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, 77, 400.