

論文の内容の要旨

論文題目 海綿 *Discodermia calyx* に含まれる新規ペプチド化合物の探索

氏名 木村美紀

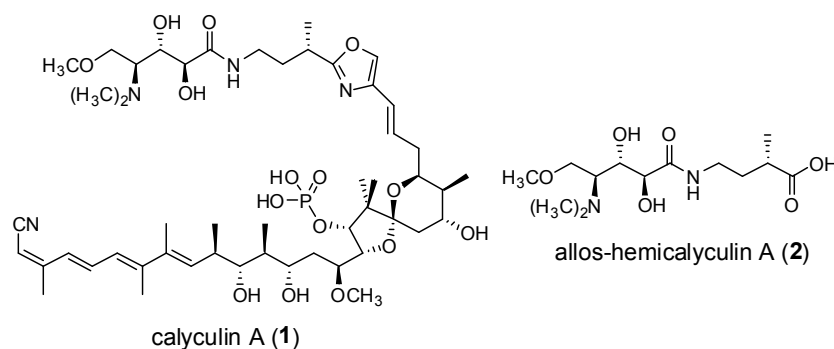
【序論】

海綿動物は halichondrin B など多様なポリケタイドやペプチドなどの生物活性物質を含む天然医薬品資源である。これまでに数千を越える新規化合物が見出され、それらのいくつかは医薬品候補化合物として臨床試験段階にある。最初に臨床試験が行われた海洋天然物はホヤ由来環状ペプチド didemnin B であり、のちにジケト構造を有する類縁体 aplidine (dehydrodidemnin B) が更なる抗腫瘍活性を示す事から臨床開発が進行した例がある。日本近海においては海綿 *Theonella* 属より、polytheonamide をはじめ、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) やポリケタイド合成酵素 (PKS) により生産される多様な代謝物が報告されている。一方で、同じ *Theonellidae* 科に属する *Discodermia* 属からはペプチドの単離報告例は数少なく、伊豆諸島および伊豆半島産の *Discodermia calyx* においては、calyculin 類のようなポリケタイドの単離報告例を除いて、NRPS を主な生合成経路とするペプチドの単離報告例はない。ペプチドは顕著な生理活性や副作用の低さが注目され、現在までに数十種類のペプチド性医薬品が上市されている。近年のペプチド合成やドラッグデリバリー技術が進歩するにつれ市場が拡大してきた。そこで本研究では、*D. calyx* 由来新規ペプチド性化合物の探索を目的とし、さらにそれらの構造活性相関の解明を試みた。また、海綿メタゲノム DNA より生合成遺伝子クラスターを網羅的に解析し、推定生合成産物の構造を予測し、ゲノムマイニングの手法を用いてさらなる生物活性ペプチドの単離を目指した。

【本論】

(1) Allos-hemicalyculin A の単離と構造決定

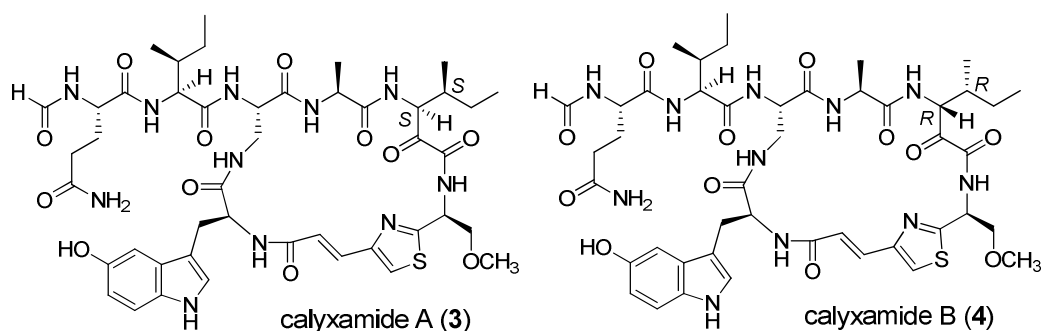
式根島で採集した海綿 *D. calyx* 1.2 kg をメタノールで抽出後、2層分配を行い、hexane 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層、水層へ分配した。*n*-BuOH 抽出物を LH20 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分画後、ODS HPLC により精製し、無色固体 3.6 mg を単離した。NMR スペクトルの解析、および ESI-TOFMS より分子式 $C_{13}H_{26}N_2O_6$ 、分子量 306 で一致したことから、平面構造を決定した。平面構造から calyculin A (1) のオキサゾールが開裂して生じたものと予想し、1 の光酸化反応により半合成した化合物と、NMR スペクトルおよび旋光度を比較して、立体化学を決定した。その結果、allos-hemicalyculin A (2) は、1 のペプチド末端と同一の構造を有する新規 calyculin 類縁体と決定した。



1 の光酸化反応は光増感剤なしでも進行したため、1 のテトラエン部位が光増感剤として機能することが示唆された。2 は、マウス白血病細胞 P388 に対して細胞毒性を示さなかった ($IC_{50} > 100 \mu M$)。1 では、テトラエン、水酸基、リン酸エステル基がタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 および 2A の阻害に関与し、ジメチルアミノ基やオキサゾールを含むペプチド部分構造が膜透過に関与して、強力な細胞毒性を発現すると推測されている。したがって、ペプチド部分構造のみでは細胞毒性の発現に不十分である事を明らかにした。

(2) Calyxamides の単離と構造決定

式根島で採集した海綿 *D. calyx* 2.5 kg をメタノールで抽出後、2層分配を行い、hexane 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層、水層へ分配した。EtOAc 抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画後、ODS HPLC により精製し、calyxamide A (3) を 7.4 mg、calyxamide B (4) を 2.5 mg 単離した。NMR スペクトルの解析、および ESI-TOFMS より分子式 $C_{45}H_{61}N_{11}O_{12}S$ 、分子量 980 で一致したことから、平面構造を決定した。さらに、加水分解物の誘導体化後、キラル GC-MS を用いて立体化学を決定した。



3および**4**は、Gln、Ile、Alaの他に、*O*-メチルセリルチアゾール、5-ヒドロキシトリプトファン、2,3-ジアミノプロピオン酸 (Dpr)、3-アミノ-2-ケト-4-メチルヘキサン酸 (AKMH)といった稀なアミノ酸を含有する環状ペプチド構造を有している。*D. calyx*由来の環状ペプチドとしては、初めての単離例となる。これらはAKMH部分の立体化学のみが異なるジアステレオマーである。**3**と**4**では、Dprのアミドプロトンの化学シフト値に顕著な差が確認されたことから、DprとAKMHの間において水素結合の形成が示唆された。**3**と**4**のメタノール溶液において、AKMHの α -ケトカルボニルに対するメタノール付加体の生成を確認した。

3および**4**は、P388に対してそれぞれIC₅₀が3.9および0.9 μ Mの細胞毒性を示した。 α -ケトアミド構造を有する化合物にはthrombinなどのプロテアーゼ阻害活性物質、cyclotheonamide Aが知られており、thrombinとの複合体のX線結晶解析から、 α -ケトカルボニル基が酵素蛋白活性部位のSer残基と共有結合する事が報告されている。calyxamideにおいても、アミドと平面直交にねじれた α -ケトカルボニル基が、標的タンパク質に結合して阻害活性を示す機構を推測している。**4**は、**3**よりもAKMHによる立体障害が少ないため細胞毒性が強いと考察している。細胞毒性におけるそれら部分構造の重要性を検討するため、**3**をNaBH₄で還元して α -ケトアミド構造のケトカルボニル基を水酸基へと変換したジヒドロ体と、**3**を4 M HClで選択的に加水分解して*N*-ホルミル基をアミノ基へと変換した脱ホルミル化体を半合成した。どちらもP388に対して細胞毒性を示さなかった (IC₅₀>30 μ M)。従って、 α -ケトアミドおよび*N*-ホルミル基が細胞毒性に寄与する事が明らかとなった。

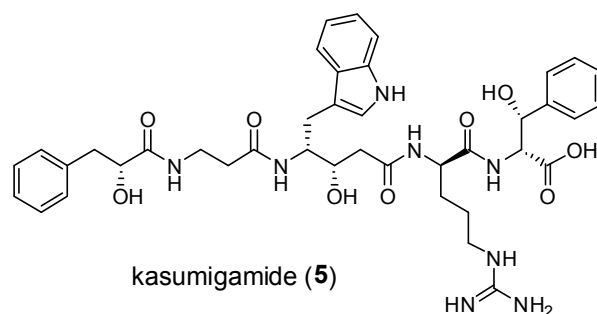
(3) *D. calyx*由来NRPS-PKS生合成遺伝子クラスターの探索

3および**4**の生合成経路、真の生産者について知見を得るため、生合成遺伝子の探索に着手した。**3**および**4**は、海綿*Theonella* sp.由来keramamide F, Gに構造が類似する事から、真の生産者として共生バクテリアの存在が示唆された。海綿共生微生物を含むメタゲノムDNAに含まれるバクテリアの16S rRNA塩基配列の系統解析により、*Theonella*属と*Discodermia*属に共通に存在するフィラメント状バクテリア*Candidatus Entotheonella* sp.が、類似した二次代謝産物を産生している可能性が高いと考えた。そこで、フィラメント状バクテリアのゲノムを抽出し、NRPSのAドメイン縮重プライマーを用いたPCRにより増幅した配列を解析した。しかし、**3**および**4**の生合成遺伝子と予想されるAドメイン配列は得られなかった。一方で、当研究室では、*D. calyx*メタゲノムDNAより、PKSのKSドメイン縮重プライマーを用いたPCRにより増幅した配列を解析した。またメタゲノムDNAよりフォスミドライブラリーを構築し、PKSのKSドメインの塩基配列に特異的なプライマーを用いたPCRを行い、3D-ゲル法による網羅的なスクリーニングを行った。ポジティブクローンに対し、次世代シーケンサーにより遺伝子配列を解析した。

結果、約50 kbpのcalyxamide推定生合成遺伝子クラスターを得た。これはNRPSモジュールを8つ、PKSモジュールを2つ含むNRPS-PKSハイブリッド型生合成遺伝子クラスターであり、 α -ケトアミドの生合成にはPKSおよび酸化ドメインが関与することが示唆された。AKMHのIleについては、別のドメインによりL体からD体が生成する立体制御機構が存在すると推測するが、 α -ケトアミド構造の生合成機構については更なる研究が必要である。

さらに、*D. calyx*メタゲノムDNAから、同様の手法により、未知のNRPS-PKSハイブリッド型生

合成遺伝子クラスターが得られた。4つのNRPSモジュールについて、Aドメインの結合ポケットに位置するアミノ酸残基に着目し、基質選択性を予測した。 β -Alaの他に、L-Phe、L-Tyr、L-Trpのいずれか一つ、さらにArgとPheをコードするAドメインと、それらのモジュール内にEドメインが存在した事から、D-ArgとD-Phe由来のアミノ酸残基を含むと推定した。1つのPKSモジュールは、KRドメインを含む基本構成単位であった。開始モジュールは、開始基質がフェニル乳酸であるaeruginosideの生合成遺伝子配列と類似した。以上の配列情報により、生成物としてkasumigamide (5)を予想した。



(4) メタゲノムマイニングによる kasumigamide の単離

5 はシアノバクテリアより単離報告があるのみで、海綿動物からの単離報告はない。そこで、海綿 *D. calyx* から予想生成物を探索した。海綿 *D. calyx* 2.0 kg をメタノールで抽出後、2層分配を行い、hexane 層、EtOAc 層、*n*-BuOH 層、水層へ分配した。*n*-BuOH 抽出物を LH20 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで分画した。5 はインドール環を含むため、UV 最大吸収波長が 280 nm 付近であると推測し、UV 吸収を指標に探索を行った。UV 吸収画分を ODS HPLC により精製し、黄色固体 2.3 mg を単離した。単離したペプチドの構造解析を行ったところ、ESI-TOFMS および NMR スペクトルが文献値と良い一致を示した事から、5 であると構造決定した。さらに、加水分解物の誘導体化後 ODS HPLC を用いて立体化学を特定し、D-Arg と *erthro*- β -phenyl-D-serine を確認して、生合成経路を支持する結果を得た。5 は、P388 に対して IC₅₀ が 4.8 μ M の細胞毒性を示した。

【結論】

新規ペプチド化合物 calyxamides の単離に成功した。さらに生物活性に重要な α -ケトアミドに隣接する側鎖の立体化学により活性に影響するメカニズムを考察した。また、kasumigamide の単離においては、天然物の探索におけるメタゲノムマイニングの有効性を実証した。メタゲノム解析は、生合成遺伝子の同定、生産菌の特定に有用なツールとなり、膨大に存在する生合成遺伝子に基づき未知代謝物の構造を予測できる事から、含有量の少ない新規化合物の発見にも役立つ優れた手法であると考えられる。今後は、異種発現系の確立による生産性の向上や、新規の構造や機能を有する多様なペプチドを生産する遺伝子エンジニアリングへの発展が期待できる。