

# 海洋シアノバクテリア由来中分子に着目した 抗寄生虫薬リード創出

慶應義塾大学 理工学部 化学科

栗澤 尚瑛

## 1. はじめに

マラリア・トリパノソーマ原虫を原因とする寄生虫感染症は、発展途上国を中心として世界的に蔓延している。これまでにいくつかの治療薬が開発されてきたが、近年では既存薬に対する耐性原虫の出現が問題となっている。さらに、地球温暖化の影響により、日本の南西地域も含めた寄生虫の生息範囲の拡大が懸念されている。上記の事態に対応するには、既存薬と全く異なる化学構造・作用メカニズムを有する新規抗寄生虫リード化合物を創出することがきわめて重要である。申請者はこれまで、奄美大島・沖縄地方に生息する海洋シアノバクテリアを対象として、抗寄生虫活性を示す新規天然物の探索研究に一貫して取り組んでいる。その結果、非天然型アミノ酸やポリケチド(脂肪酸)を含む、特殊な部分構造を有する分子量 500~1000、あるいはそれ以上の中分子を多数発見してきた。興味深いことに、これらはいずれもヒト細胞には毒性が低く、寄生虫に選択的な毒性を示す。この結果は、分子量が 500 以下の一般的な抗寄生虫薬よりもはるかに大きく、かつ特殊な部分構造をもつペプチドが、寄生虫特有の生存に必須な生体分子と選択的に相互作用するのに有利な化学構造であることを示唆している。このような化合物群を多彩に産生する海洋シアノバクテリアは、画期的な抗寄生虫薬候補の発見において魅力的な探索資源であり、より優れた抗寄生虫薬リードを生み出すことが十分に期待される。さらに、既存薬と化学的に大きくかけ離れたこれらの化合物群は、その作用メカニズムを詳細に解析することで、効率的に寄生虫を殺傷するための新しい創薬標的を提示する可能性を秘めている。

そこで、本研究課題では「①さらなる新規抗寄生虫中分子の発見」、および「②発見した中分子の作用メカニズム解明」に焦点を当て、研究を実施した。

## 2. 実験方法

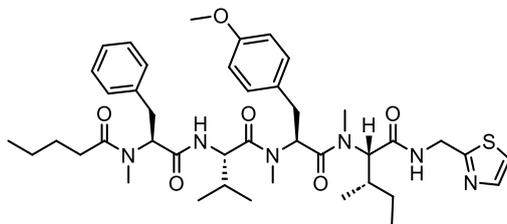
沖縄県の離島を中心として海洋シアノバクテリアを採集し、それらのエタノール抽出物について各種分液・分画・HPLC 精製を行うことで各種天然物を単離した。単離した天然物についてはアフリカ睡眠病を引き起こすトリパノソーマ原虫である *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) およびマラリア原虫である *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) に対する抗トリパノソーマ活性、抗マラリア活性を評価した。また、ヒト子宮頸がん細胞である HeLa に対して細胞毒性を評価し、抗寄生虫活性におけるヒト細胞との選択毒性を確認した。強い抗寄生虫活性を示す新規天然物については構造と生物活性の確認、および量的供給・今後の作用機序研究への展開を見据え全合成研究、および構造活性相関研究を実施した。

### 3. 実験結果

#### ① さらなる新規抗寄生虫中分子の発見

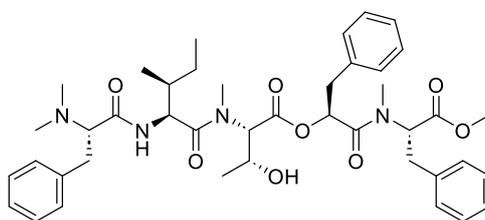
本研究では、海洋シアノバクテリアから以下に示す新規抗寄生虫中分子を発見した。

#### ウカバミド (ukabamide)



沖縄県南城市で採集した *Moorena* 属の海洋シアノバクテリアより、*T. b. rhodesiense* に対し強い抗トリパノソーマ活性を示す微量物質としてウカバミドを単離した。<sup>1)</sup> 本化合物の平面構造は各種 2 次元 NMR 解析と MS/MS 解析を組み合わせることで決定し、各アミノ酸の絶対立体配置はウカバミドを酸加水分解し、得られた各アミノ酸について逆相キラルカラムで標品との保持時間を比較することで決定した。本化合物は、末端チアゾールや多数の *N*-あるいは *O*-メチル化されたアミノ酸を含有し、また *N* 末端側に吉草酸を含む新規直鎖リポペプチドであった。本化合物は強力な抗トリパノソーマ活性 ( $IC_{50} 34 \pm 18$  nM) を示す一方で、HeLa 細胞に対し  $1 \mu\text{M}$  で毒性を示さなかった。そこで、構造の確定および量的供給、今後の構造活性相関研究を見据えた全合成研究を実施した。2-bromothiazole を出発原料として順次官能基変換・縮合を繰り返し、ウカバミドの全合成を達成した(最長直線工程 13 段階、総収率 10.5%)。合成したウカバミドの各種スペクトルは天然物と一致し、また同様の強力な抗トリパノソーマ活性を示した ( $IC_{50} 38 \pm 29$  nM)。

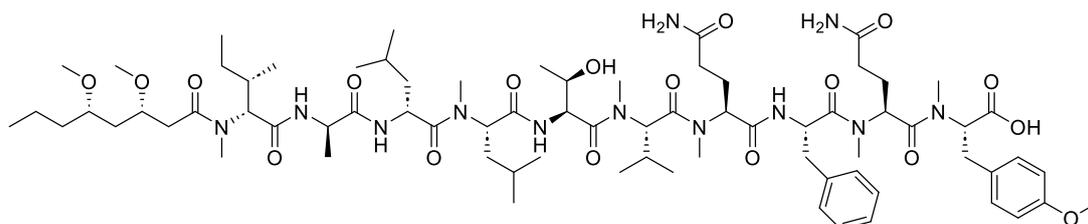
#### ヒヤジャミン (hiyajamine)



沖縄県久米島で採集した種未同定の海洋シアノバクテリアより、*P. falciparum* に対し強い抗マラリア活性を示す微量物質としてヒヤジャミンを単離した。本化合物の平面構造は各種 2 次元 NMR 解析と MS/MS 解析を組み合わせることで決定した。また、各アミノ酸の絶対立体配置はヒヤジャミンを酸加水分解し、得られた各アミノ酸について逆相キラルカラムあるいはマーフィー法で標品との保持時間を比較することで決定した。ヒヤジャミンは、多数の *N*-あるいは *O*-メチル化された芳香族アミノ酸を含有する新規直鎖デプシペプチドであった。本化合物

は強い抗マラリア活性 ( $IC_{50}$  0.60  $\mu$ M) を示す一方で、HeLa 細胞に対し 20  $\mu$ M で毒性を示さなかった。そこで、構造の確定および量的供給、今後の構造活性相関研究を見据えた全合成研究を実施した。L-phenyllactic acid を出発原料として順次官能基変換・縮合を繰り返し、ヒヤジャミンの全合成を達成した(最長直線工程 11 段階、総収率 17.0%)。合成したヒヤジャミンの各種スペクトルは天然物と一致し、また同様の強力な抗マラリア活性を示した( $IC_{50}$  0.61  $\mu$ M)。現在、論文の投稿準備を行っている。

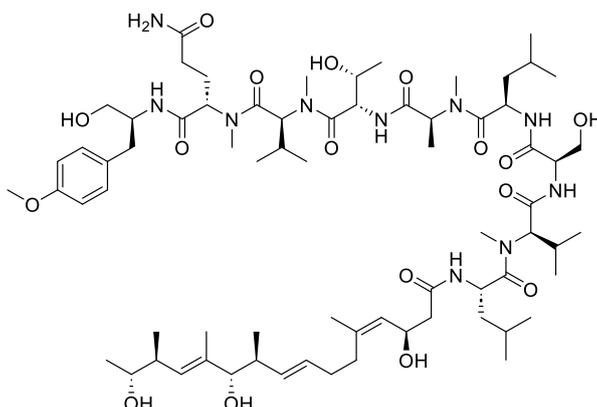
### シルガミド (sealgamide)



沖縄県久米島で採集した *Okeania* 属の海洋シアノバクテリアより、極めて多量に含まれるメジャー成分としてシルガミドを単離した。<sup>2)</sup> シルガミドは分子量 1479 の巨大な分子であり、かつ各種 NMR 測定において顕著な配座異性体が観測されたため、平面構造の決定は困難を要した。そこで化合物を弱い条件で酸加水分解し、得られた各フラグメントを構造決定したのち、それらを天然物の MS/MS 解析を基に繋ぎ合わせることで決定した。結果として、シルガミドは多数の D-アミノ酸、N-あるいは O-メチル化されたアミノ酸を含み、N-末端側に天然では珍しい 3,5-ジメトキシオクタン酸を含む新規鎖状リポペプチドであることを明らかにした。

各アミノ酸の絶対立体配置はシルガミドを酸加水分解し、得られた各アミノ酸について逆相キラルカラム、あるいはマーフィー法で標品との保持時間を比較することで決定した。さらに、3,5-ジメトキシオクタン酸の 2 つの不斉炭素は、可能な 4 つのジアステレオマーをそれぞれ化学合成し、上述した構造を含む部分加水分解物と各種スペクトルを比較することで (3*S*,5*S*) と決定した。本化合物は、HeLa 細胞に対し 30  $\mu$ M、*P. falciparum* に対し 25  $\mu$ M で毒性を示さない一方、*T. b. rhodesiense* に対し選択的な抗トリパノソーマ活性を示した( $IC_{50}$  2.9  $\mu$ M)。

### オーハナミド (ouhanamide)

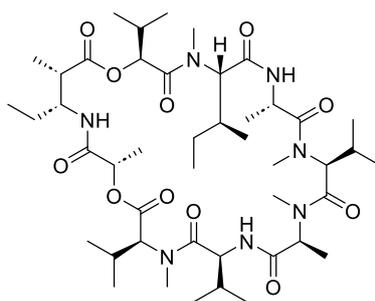


沖縄県久米島で採集した *Okeania* 属の海洋シアノバクテリアより、抽出物に含まれる主要成分の1つとしてオーハナミドを単離した。本化合物は 900 MHz の高分解能 NMR を用いた各種 2 次元 NMR 解析によりその平面構造を決定し、複雑なポリケチドを含む新規鎖状リポペプチドであることを明らかにした。アミノ酸の絶対立体配置は化合物の酸加水分解に続く各アミノ酸の分取・分析により決定した。ポリケチドの不斉炭素の絶対立体配置については、改良モッシャー法、*J*-based configuration analysis、また分解産物と標品との保持時間の比較など様々な手法を組み合わせることで決定した。オーハナミドは HeLa 細胞に対し 10  $\mu$ M で毒性を示さない一方で、*T. b. rhodesiense* (IC<sub>50</sub> 1.2 $\pm$ 0.1  $\mu$ M) および *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> 4.2 $\pm$ 0.9  $\mu$ M) に対し中程度の増殖阻害活性を示した。現在、論文を投稿し、リバイズを行っている。

### ハイミダミド (haimidamide)

沖縄県久米島で採集した種未同定の海洋シアノバクテリアより、抽出物に含まれる多量成分としてハイミダミドを単離した。本化合物は 900 MHz の高分解能 NMR を用いた各種 2 次元 NMR 解析および MS/MS 解析によりその平面構造を決定し、ユニークな部分構造を繰り返すポリケチドを含む新規鎖状リポペプチドであることを明らかにした(論文未発表のため構造は伏せる)。ハイミダミドは *T. b. rhodesiense* (IC<sub>50</sub> 0.44  $\mu$ M) および *P. falciparum* (IC<sub>50</sub> 2.1  $\mu$ M) に対し中程度～強い抗寄生虫活性を示した。現在、本化合物の絶対立体配置の決定に取り組んでいる。また、ハイミダミドを産生する当該のシアノバクテリアが、ハイミダミドを含む多数のユニークな新規抗寄生虫分子を産生していることを発見したため、本シアノバクテリアのゲノム解析および各種分子の生合成遺伝子探索に取り組んでいる。

### ワジーペプチン (wajeepeptin)



沖縄県伊江島で採集した *Moorena* 属の海洋シアノバクテリアより、抽出物に含まれる主要成分の1つとしてワジーペプチンを単離した。<sup>3)</sup> 本化合物の平面構造は、2次元 NMR 解析では一部のシグナルが HMBC 上で激しくオーバーラップすることで一義的に決定できなかったものの、化合物を結晶化し X 線構造解析を行うことで絶対立体配置を含めた全構造の決定に成功した。これにより、本化合物が  $\beta$ -アミノ酸、ヒドロキシ酸、*N*-メチルアミノ酸を含む新規環状デプシペプチドであることを明らかにした。ワジーペプチンは HeLa 細胞 (IC<sub>50</sub> 3.7

μM) および *T. b. rhodesiense* (IC<sub>50</sub> 0.73 ± 0.14 μM) に対しそれぞれ中程度の増殖阻害活性を示す一方で、*P. falciparum* に対し 10 μM で増殖阻害活性を示さなかった。

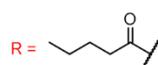
## ② 発見した中分子の作用メカニズム解明

### ウカバミドの構造活性相関研究

ウカバミドに含まれる吉草酸 (C5) の役割を解明するため、脂肪酸鎖長の異なる人工ウカバミド類縁体を合成し、それぞれの細胞毒性・抗トリパノソーマ活性について評価した。ウカバミドの全合成研究により確立した合成法に則り、共通のペプチド中間体に酢酸 (C2) またはカプリン酸 (C10) の酸無水物を縮合することで目的の 2 化合物を合成した。

これらの生物活性を評価したところ、天然のウカバミドよりも脂肪酸鎖長が短いウカバミド C2 類縁体は、抗トリパノソーマ活性・細胞毒性ともに大きく減弱した。一方、天然のウカバミドよりも脂肪酸鎖長が短いウカバミド C10 類縁体は、C2 類縁体よりは各種生物活性を維持する一方、やはり天然のウカバミドよりも活性が低下した。以上の結果から、天然物の鎖長である C5 が最も優れた抗トリパノソーマ活性および選択毒性を発揮することを明らかにした。<sup>1)</sup>

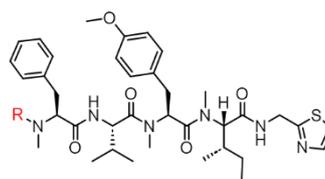
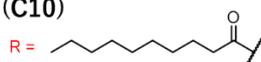
#### ウカバミド (C5)



#### ウカバミド類縁体 (C2)



#### ウカバミド類縁体 (C10)



compound	IC <sub>50</sub> (nM)		
	<i>T. b. rhodesiense</i>	HeLa cells	selectivity index
ウカバミド (C5)	38 ± 29	4240	112
ウカバミド類縁体 (C2)	1200	>20000	>17
ウカバミド類縁体 (C10)	150	8130	54

### ヒヤジャミンの構造活性相関研究

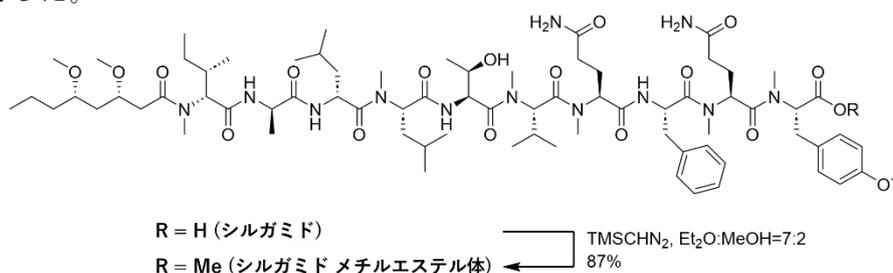
ヒヤジャミンは比較的シンプルなアミノ酸 5 残基から構成されており、その抗マラリア活性の発現機構に興味をもたれた。そこで、活性発現に重要なアミノ酸の同定と、より強力な抗マラリア活性を示す人工類縁体の創出を目的として構造活性相関研究を実施した。

まず、固相合成法による多数の迅速な類縁体の創出を目的として、固相合成において障壁となるヒドロキシ酸 (L-phenyllactic acid) を L-フェニルアラニンに置き換えた類縁体を合成したところ、ヒヤジャミンと同等の抗マラリア活性 (IC<sub>50</sub> 0.70 μM) を示した。そこで、このアミド類縁体を基盤として 5 つの各アミノ酸を対応するアラニンに置き換えた類縁体を固相合成に

より計 5 種類合成し、抗マラリア活性を評価した。その結果、3 つの芳香族アミノ酸は活性発現に重要である一方、分子中央のスレオニンは多少の構造変化を許容することが判明した。

### シルガミドのメチルエステル化による生物活性の向上

所属研究室では以前、シルガミドに似た構造の天然物としてイコアミドを発見している。イコアミドは強い抗マラリア活性 ( $IC_{50}$  0.14  $\mu$ M) を示す一方で、シルガミドは 25  $\mu$ M でも抗マラリア活性を示さないことに興味もたれた。この生物活性の違いの原因の 1 つとして、イコアミドの C 末端はメチルエステルであるのに対し、シルガミドはカルボン酸であるために極性が上昇し、マラリア原虫の細胞膜(あるいはマラリア原虫が感染している赤血球)への透過性が低下しているためと予想した。そこで、シルガミドのカルボン酸について、TMS ジアゾメタンを用いてカルボン酸選択的にメチル化した人工のメチルエステル類縁体を調製し、各種生物活性を評価した(下図)。その結果、メチルエステル体は抗マラリア活性が大幅に上昇し、また抗トリパノソーマ活性についても 4 倍程度の上昇が認められた。さらに、天然物のシルガミドと同様に HeLa 細胞に対し 30  $\mu$ M で毒性を示さず、抗寄生虫活性を向上させた人工類縁体の創出に成功した。<sup>2)</sup>



compounds	$IC_{50}$ values ( $\mu$ M)		
	HeLa cells	<i>T. b. rhodesiense</i>	<i>P. falciparum</i>
シルガミド	>30	2.9	>25
シルガミド メチルエステル体	>30	0.65	2.1

#### 4. まとめ

本研究では、海洋シアノバクテリアに由来する新規抗寄生虫分子を計 5 種類発見し、その構造と抗寄生虫活性、およびヒト細胞との選択毒性を明らかにした。また、そのうち 3 種類の新規抗寄生虫分子について、構造活性相関研究を中心とした作用メカニズムについて検討した。今回発見した各化合物の、分子レベルでの詳細な作用メカニズムの解析は今後の課題である。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

## 参考文献

- 1) Hagihara, M.; Kurisawa, N.; Iwasaki, A.; Taguchi, R.; Jeelani, G.; Nozaki, T.; Suenaga, K. "Isolation and total synthesis of ukabamide, an antitrypanosomal lipopeptide from a marine *Moorena* sp. cyanobacterium." *Organic Letters*, vol. 27, no. 5, pp. 1261–1264, 2025.
- 2) Wakai, K.; Kurisawa, N.; Umeda, K.; Jeelani, G.; Agusta, A. L.; Nozaki, T.; Suenaga, K. "Sealgamide: an antitrypanosomal lipopeptide isolated from a marine *Okeania* sp. cyanobacterium." *Journal of Natural Products*, in press, 2025.
- 3) Kurisawa, N.; Jeelani, G.; Nozaki, T.; Agusta, A. L.; Suenaga, K.; Iwasaki, A. "Wajeceptin, a cytotoxic and antitrypanosomal cyclic depsipeptide from a marine *Moorena* sp. cyanobacterium." *Journal of Natural Products*, vol. 87, no. 7, pp. 1838-1843, 2024.