

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：薬用天然物微生物生産系の利活用による革新的次世代型天然物創薬研究

Innovative next-generation natural product drug discovery research by utilizing microbial production systems for medicinal natural products

研究開発実施期間：令和3年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：阿部 郁朗

Ikuro Abe

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学大学院 薬学系研究科 教授

The University of Tokyo, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Professor

II 研究開発の概要

遺伝子発現系や酵素合成系から得られた天然物またはその誘導体より、中枢抗炎症治療薬シーズを探索することを目指し、生物合成系を用いた次世代型の天然物創薬研究を展開した。低分子から中分子に至る薬用天然物の生合成システムにさらに改良を加えることで、天然物を凌ぐ新規有用化合物ライブラリーを拡充し、微生物生産系の利活用による次世代型天然物創薬研究を推進した。その結果、効率的かつ有効なスクリーニング活性評価を展開し、天然資源からの創薬シーズ創出を試みた。ミクログリアでの炎症促進抑制作用の評価とヒト外挿性、脳内移行性の検討を *in vitro*、*in vivo* にて行い、化合物の薬理学的評価を行った。また、脳内移行性が見出された天然物に対して、生合成中間体を化学修飾し、ケミカルスペースを拡張することを目指した。

麹菌 *Aspergillus oryzae* を遺伝子発現宿主として、糸状菌二次代謝酵素遺伝子を異種発現し、ポリケタイドとテルペノイドの融合化合物メロテルペノイドを生合成した。特に、ジメチルオルセリン酸を含む複数種のポリケタイド化合物から構成される多様な生合成経路を構築した。共通の中間体から多様化するテルペン環化反応や酸化反応を触媒する酵素を、既存のメロテルペノイド化合物の生合成酵素配列を用いて、ゲノム情報より選抜して異種発現系に用いることで、非天然型化合物を大量調製した。また、環化ペプチドの生合成酵素遺伝子を麹菌にて発現し、新規生合成経路の再構築、5種のインドールテルペノイド化合物生産系の構築に成功した。その結果、合計32種の生成物を微生物生産し、活性評価することに成功した。そのほか、メロテルペノイド中間体を大量生産し、こちらを投与することで、中間体への酸化反応、修飾反応を適応し、5種の酸化メロテルペノイド化合物を取得することに成功した。また、ステロイド系抗生物質

のいくつかについて、 α KG 酸化酵素を作用することによって、非天然型化合物を合成することに成功した。人工基質や酵素の組み合わせを変えた反応、変異導入による収量の増加など、今後の展開が期待される。メロテルペノイド酸化酵素である、SptF の結晶構造解析を行い、得られた基質酵素複合体中、I63、F133 に注目して、変異導入することで、本来の生成物から複数の非天然型反応を触媒する酵素を創出した。それ以外に、初のトリテルペン二次代謝酵素のクライオ電子顕微鏡解析に成功し、環化に重要なアミノ酸残基を同定し、学术界に大きなインパクトを与えた。また、S-配糖化酵素 LmbT、リグニン生合成酵素、シクロプロパンアミノ酸合成酵素、NAD/SAM を受け入れてアザインダン天然物を合成する PLP 依存性酵素などいくつかの生合成酵素の X 線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析に成功した。質、量共に十分な結果が得られ、酵素構造を基盤として、変異導入や酵素進化法での活性化化合物の大量生産が期待される。本結果より、酵素を用いた新規活性物質創出法の基盤を構築することに成功した。

抗炎症活性を中心に薬理活性を示すファイトケミカルを購入してミクログリア活性化抑制活性を評価した。ミノサイクリンは評価系の基準物質であるが、天然物ではなく、天然テトラサイクリンから半合成で合成されたものである。このように、弱いながらもミクログリア活性化抑制がある場合、母核構造を維持し、わずかな置換基の変換で高活性化が実現できる可能性がある。よって、ファイトケミカルの内、なるべく母核構造が異なる化合物を選択し、ポリフェノール類の化学的な修飾として、O-メチル化以外にベンジル化、エチル化、プロピル化、エチレングリーコールなどメチル基以外置換基を入れることを試みた。その結果、ポリフェノール類の 1 つケルセチンの選択的 O-メチル化の反応を実施し、2 つのメチル化化合物の合成に成功した。

薬理活性試験として、1st スクリーニング系の細胞には評価の迅速性とスループット性を重視し、マウスミクログリア由来 BV2 細胞を用い、①細胞毒性作用、②ミクログリア活性化抑制作用の 2 項目について実施した。本系を用いて、生合成、化学合成によって創出した化合物 44 種類を評価し、ミクログリア活性化抑制薬であるミノサイクリン以上の抑制活性を示す 2 つの構造異性体(T5、and5)を見出した。T5、And5 は、ミノサイクリンと同濃度の 200 mM にて、Lipopolysaccharide (LPS)誘発炎症誘発性サイトカイン mRNA 発現増加を有意に抑制した。また、T5 の酸化体である T9 にも抑制作用が観察された。そこで、T5 と and5 のそれぞれの酸化体(T6、T7、T9、T10、and7、and8、and9、and10)、そして生産前駆体 (T3) に関して追加のスクリーニングを行い、T5、and5、T9 に加えて、and7、and9、and10 にも抑制作用が観察された。

1st スクリーニング系で絞り込んだ化合物 6 種類(T5、T9、and5、and7、and9、and10)について、ラット初代培養ミクログリア細胞の活性化抑制作用の有無について検討した。1st スクリーニング系と同様に、細胞毒性を呈さない最高濃度を検討後、その濃度における LPS 誘発活性化抑制作用を検討した。ラットミクログリア細胞における各化合物の毒性作用検出濃度は、BV2 細胞と比較して、より低濃度側にシフトする化合物が多く見られた。ミクログリア活性化抑制作用についてサイトカイン遊離量を用いて定量した。LPS によって誘発される 4 種類の炎症性サイトカインの培養上清中遊離量を定量し、その結果、1st スクリーニング系において抑制作用を示した T5、T9、and5、and7、and9、and10 について、4 種のサイトカイン遊離量を抑制する傾向を明らかにした。

次に、in vitro 実験 (BV2 細胞 1st スクリーニング系、及び、ラットミクログリア細胞) において、顕著な抑制作用を示した and10 について、in vivo 実験にて検証を行なった。15 日齢ラットの大脳皮質実質内に LPS(100 ng)を微量注入し、反対側には、LPS 及び and10(300 μ M)を同時注入した。注入 24 時間後に LPS 注入領域のミクログリアマーカー Iba1、及び、食細胞マーカーかつ活性化ミクログリアマーカー CD68 の発現

を免疫組織化学的に確認した。LPS 単独注入領域では、分枝が短く Iba1 によって強く染色される陽性細胞が観察された。また、CD68 陽性 Iba1 陽性細胞も観察された。一方、and10 と LPS 同時注入領域では、LPS 単独注入領域と比較して、CD68 陽性 Iba1 陽性細胞が少ない傾向であった。本結果は候補化合物が in vivo でのミクログリア活性化を抑制することを強く示唆するものであり、医薬品として有望な、ポジティブコントロールを凌ぐ活性を持つ化合物が得られたことを示すものであった。

We engineered the biosynthesis system of medicinal natural products such as polyketides, peptides, terpenoids, and alkaloids, ranging from small to medium molecules, to expand the library of new useful substances that surpass natural products, and promoted next-generation natural product drug discovery research by utilizing the microbial production system. We evaluated the pharmacological properties of the compounds by evaluating the inhibition of inflammation promotion by microglia and examining human extravasation, as well as *in vitro* and *in vivo* studies of brain transport. Efficient and effective screening evaluation was developed, and advancement of drug discovery seeds based on natural resources was implemented. We aimed to expand the chemical space of compounds by chemical modification using biosynthetic intermediates expressed and obtained in large quantities as starting materials for natural products that were found to be brain-transferable. We aimed to explore and discover drug discovery seeds from two directions: the use of natural products themselves obtained from biosynthesis machinery as drug seeds and the use of synthetic supernatural product derivatives, and developed ex-natural product drug discovery research that will lead to advanced utilization of natural resources through the identification of natural product-derived seeds for central anti-inflammatory drugs.

As a result, we created 44 compounds by engineered biosynthetic pathway, and tested them for inhibitory activity against microglial activation. We found two structural isomers (T5 and and5) that showed more inhibitory activity than minocycline, an inhibitor of microglial activation, and T5 and And5 significantly inhibited lipopolysaccharide (LPS)-induced increase in inflammatory cytokine mRNA expression at the same concentration as minocycline. Therefore, we performed additional screening of oxidized forms of T5 and and5 (T6, T7, T9, T10, and7, and8, and9, and10), and observed inhibitory effects of and7, and9, and10 in addition to T5, and5, and T9. The inhibitory effects of six compounds (T5, T9, and5, and7, and9, and10) on the activation of primary cultured rat microglial cells were investigated. The results showed that T5, T9, and5, and7, and9, and10, which showed inhibitory effects in the first screening system, tended to inhibit the release of the four cytokines. Next, and10 was tested in an *in vivo* experiment in which a small amount of LPS (100 ng) was injected into the cortical parenchyma of 15-day-old rats, and LPS and and10 were injected simultaneously on the opposite side. Twenty-four hours after injection, the expression of the microglial marker Iba1 and the phagocytic and activated microglial marker CD68 in the LPS-injected area was confirmed by immunohistochemistry. CD68-positive Iba1-positive cells were also observed. On the other hand, fewer CD68-positive Iba1-positive cells were observed in the and10 and LPS co-injected areas than in the LPS alone injected areas. These results strongly suggest that the candidate compound and10 inhibits microglial activation *in vivo*, and indicate that a compound with activity superior to that of positive control has been obtained as a promising drug.