

令和5年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 一般研究助成金	<input type="checkbox"/>
研究課題名	抗生物質開発を変革する新しい創薬モダリティ: 原核生物のタンパク質分解を制御する化合物の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者: 薬学部医療薬学科・石川文洋 共同研究者:	

1. 研究目的・内容

Streptomyces hawaiiensis から単離されたアシルデプシペプチド (ADEP1) が、薬剤耐性菌を含むさまざまな病原菌に抗菌活性を示す (Brötz-Oesterhelt, H. *et al. Nat. Med.* **2005**, 11, 1082)。ADEP1 の作用機序は、1) ADEP1 のタンパク質分解酵素 ClpP への結合、2) ClpP の活性化、3) ADEP1-ClpP 複合体による細胞分裂タンパク質 FtsZ の分解に基づく。この特異な作用機序のため、ADEP1 は新しい創薬シーズとして期待されている。一方で、ADEP1 側鎖部は代謝安定性の低い求電子的な共役ポリエンを備えたアミド型側鎖を有している。そこで本研究では、ADEP1 側鎖部へ尿素結合を導入することで ClpP との水素結合能を強化し、構造展開を行うことで、代謝安定性、抗菌活性あるいはタンパク質分解活性などの特徴の異なる ADEP1 誘導体を創製する。また、ADEP1 誘導体による ClpP の動的構造への影響とタンパク質分解活性との関係を解明することで、創薬開発だけでなく、ClpP の機能を人為的に制御する技術開発へ展開する。

2. 研究経過及び成果

【目的】 細菌の細胞内タンパク質分解は、基質タンパク質を認識し、アンフォールディングさせ、迅速かつ不可逆的に標的タンパク質を分解するシステムである。細胞内タンパク質分解装置複合体は、ATPase およびタンパク質分解酵素 (ClpP) により形成される。ATPase は基質タンパク質を解きほぐし、ClpP 活性部位への送り込みを、ClpP は基質タンパク質の加水分解を担う。*Streptomyces hawaiiensis* から単離されたアシルデプシペプチド (ADEP1) (Fig. 1) が、薬剤耐性菌を含むさまざまな病原菌に抗菌活性を示すことが報告された。ADEP1 の作用機序は、ADEP1-ClpP 複合体による細胞分裂に必須なタンパク質 FtsZ の分解に基づく。ADEP1 を基盤に、ClpP を自在に操作・制御することができれば、革新的なタンパク質ケミカルノックダウン技術の開発が期待されるだけでなく、次世代型抗生物質開発へ新しい戦略の創出につながる。そこで本研究では、*Bacillus subtilis* をモデルとして ClpP の機能を制御する化合物を開発し、細胞内でのタンパク質分解を人為的に制御することを目的とした。

【方法】 ClpP 活性化剤である ADEP1 (1) 側鎖部は、代謝安定性の低い求電子的な α,β -不飽和カルボニル基を備えたアミド型側鎖を有している (Fig. 1)。そこで、本研究では、ADEP1 側鎖部へ尿素結合を導入することで ClpP との水素結合能を強化し、構造展開を行うことで、抗菌活性、代謝安定性、タンパク質分解活性などが向上した ADEP1 (1) 誘導体を創製することから開始した。また、ADEP1 (1) 誘導体に関して抗菌試験や代謝安定性試験を行った。さらに、化合物および ClpP の濃度を人為的にコントロールできる *in vitro* 条件にてタンパク質分解活性を評価した。*B. subtilis* プロテオーム、大腸菌組換え ClpP、化合物を用いて分解される可能性のあるタンパク質の網羅的同定も行なった。

【結果】 まず、化合物 (1) を Z-Ser-OH から 3 段階で合成した。次に、1 のカップリングパートナー (4) を H-Ala-OBzl から 4 段階で合成した。引き続き、1 および 4 を PyBOP を用いて縮合体 (2) を収率 70% で得た。さらに、2 から 5 段階を経て化合物 (3) に導いた。最後に、3 の Boc 基部分の改変により 21 種類の ADEP1 誘導体を合成した。

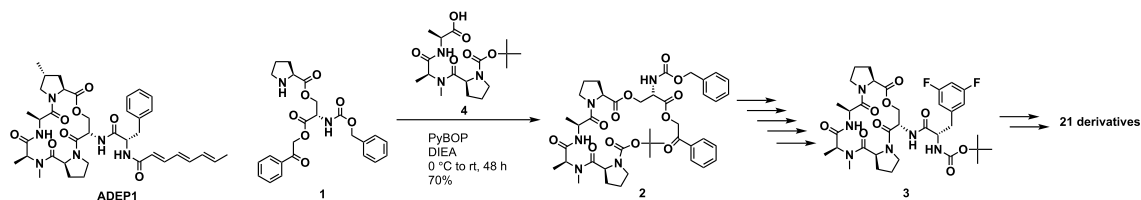


Figure 1. Structure of ADEP1 and synthetic route.

3. 本研究と関連した今後の研究計画

ADEP1 による ClpP の動的構造への影響とタンパク質分解活性との関係を解明することは、創薬開発だけでなく、ClpP の機能を人為的に制御するうえで重要であるが、その詳細な関係はまったく明らかにされていない。今後の研究計画では、代謝安定性、抗菌活性あるいはタンパク質分解活性などの特徴の異なる ADEP1 誘導体を用いて、Bs ClpP の多量体形成およびタンパク質分解機構の理解および、Bs において狙ったタンパク質の分解を誘導する分子技術を確立する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
<i>Chem. Commun.</i>	雑誌	2023年8月
<i>J. Pept. Sci.</i>	雑誌	2023年8月
<i>Beilstein J. Org. Chem.</i>	著書	2024年2月
PEPTIDE NEWSLETTER JAPAN	著書	2023年7月
特願 2023-083850	特許	2023年5月