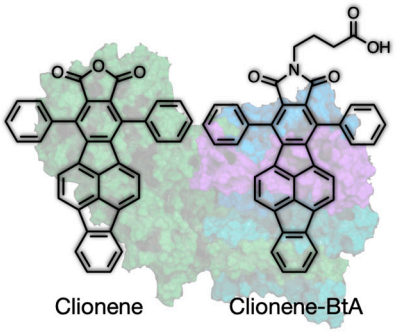
55　生物活性分子ナノカーボンの創製	伊丹　健一郎

【目的】ナノカーボン類は材料科学に革命をもたらしたが、「カーボン＝材料」という固定観念のためバイオ分野への展開はあまりなされていない。本研究の目的は、従来の生体機能分子にはないナノカーボンの特徴を活かした分子設計によって創薬分野に革新をもたらす生物活性分子ナノカーボンを創製することである。これまで、創薬のための経験則として、生物活性分子らしさの基準（リピンスキーの法則）が提唱されてきた。各製薬会社の研究によってリピンスキーの法則に基づく化合物集合体（ケミカルスペース）からの医薬品はほぼ探索し尽くされており、新規医薬品の発見は世界的にも困難な状況にある。ナノカーボンは、リピンスキーの法則から大きく外れた分子の特性を備えているため、本研究の成功は従来のケミカルスペースを大きく拡張することを意味しており、新たな探索領域に基づく創薬研究分野の新潮流が生まれると期待される。

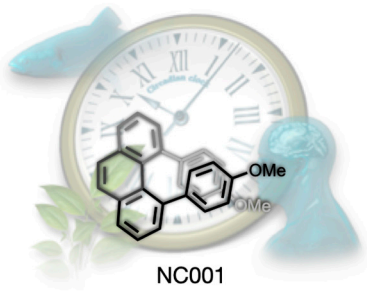
【方法】本研究では主にタンパク質間相互作用、免疫シグナル、体内時計、抗がん作用、バイオフィルム形成を制御する分子ナノカーボンの創製を行った。いずれも既にヒット分子を見出しており、本研究では高活性・選択性分子の開発、制御機構の解明、創薬への応用を行った。

【結果】タンパク質間相互作用（protein-protein interaction：PPI）は生体内の数多の生命現象に関わっており、創薬開発における有力なターゲットとして注目を集めている。タンパク質間相互作用制御のための新しい分子として、最近、クリオネの形をした分子ナノカーボン「クリオネン」を見出している。クリオネンの構造活性相関研究を行うため、合計 7 種類のクリオネン誘導体を合成し、独自に開発したカイコ PND/PND-2 PPI に対する阻害活性の定量評価系 NanoBiT システムで活性を評価した。その結果、クリオネンの無水フタル骨格にブチル酪酸（Butyric acid）を導入したクリオネン誘導体（Clionene-BtA）が、クリオネンに匹敵する生物活性をもつことが明らかになった。生物時計は、地球の自転に伴う環境変化に適応するために生物が獲得した生理システムであり、昼夜の変化に対応した約 24 時間周期の概日リズムや四季の変化に対応した約 1 年周期の概年リズムを制御している。生物時計機構を解明し、自在な人工制御が可能となれば様々な疾患の克服に役立つだけでなく、食糧増産につながる動植物の生産性の向上が期待できる。最近 **NC001** という我々が合成したナノカーボン分子に哺乳細胞の概日リズムを長周期化する活性があることを発見した。そこで **NC001** 誘導体ライブラリーの構築と活性評価を行い、構造と活性との相関関係を見出した。微生物が固相表面に形成する集合体であるバイオフィルムは、細菌が外的要因から身を守るために形成するものだが、感染症や様々な疾患の原因とされており、特に医療現場や生態系における一大問題となっている。これまで、バイオフィルムの化学的、生物的、物理的除去法が開発されてきたが、バイオフィルムのみを選択的に阻害できる非殺菌剤の開発が強く望まれている。今回、738 種の分子を用いたバイオフィルム形成阻害試験を実施した結果、30%以上の阻害を示した分子を 13 種見出した。さらに、これら 13 種の分子のバイオフィルム破壊能を検証したところ、[6]CPP の誘導体である F_{12}[6]CPP が他の分子に比べ活性が高いことを見出した。

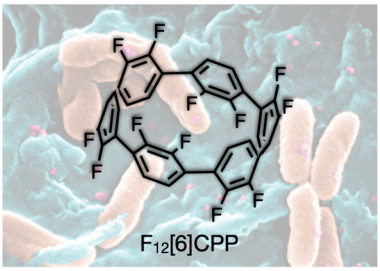
研究の概要



PPI制御・免疫シグナル制御



体内時計制御



バイオフィルム形成制御

55. 生物活性分子ナノカーボンの創製

伊丹　健一郎

*名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所

Key words：分子ナノカーボン，タンパク質間相互作用，体内時計，バイオフィルム

緒　言

フラーレン、カーボンナノチューブ、グラフェンに代表されるナノカーボンは物質科学に革命を起こした。しかし、「カーボン＝材料」という固定観念のためバイオ分野への展開はあまりなされていない。本研究の目的は、分子ナノカーボンをバイオ分野にまでその活躍の場を広げ、新産業創出の起爆剤となるバイオナノカーボン分子を創製することである。これまで我々は、構造的に新奇かつユニークな分子ナノカーボンを数多く合成することができた。また、これら難関分子の合成を新しい化学反応やそれを促進する触媒を開発することで突破してきた。合成と物性の両面で分子ナノカーボンを自在に「設計」できる域に研究レベルが到達した今こそ、ナノカーボンバイオロジーに挑戦するタイミングと思い、本研究を着想した。分子ナノカーボンは、分子構造・集積形態・電子物性の点で、これまでバイオ分野で使われてきた分子（医薬・農薬等）とは明らかに一線を画する。従来の生体機能分子にはない魅力的な特徴がいくつもある。そして何より美しい。「美しいものには機能が宿る」と強く信じる我々は、これらの新しい炭素のカタチに備わっている破格の生体関連機能の一端を本研究で明らかにし、イノベーションにつなげたい。

本研究では主にタンパク質間相互作用、免疫シグナル、体内時計、抗がん作用、バイオフィルム形成などを制御する分子ナノカーボンの創製を目指した。いずれも既にヒット分子を見出しており、本研究では高活性・選択性分子の開発、制御機構の解明、創薬への応用を行った。

方法および結果･考察

1. タンパク質間相互作用の精密制御、免疫シグナル制御

タンパク質間相互作用（protein-protein interaction：PPI）は生体内の数多の生命現象に関わっており、創薬開発における有力なターゲットとして注目を集めている。しかし、PPI が生じるタンパク質同士の接着面の特異的性質から、小分子による PPI 制御は一般に困難であり、PPI 制御のための新しい分子群の開発が求められている。当研究室では最近、クリオネの形をした分子ナノカーボン「クリオネン」がカイコ（蚕）の休眠シグナルに関わる PPI を阻害する活性をもつことを明らかにした。驚くべきことに、カイコの休眠シグナルに関わる PND/PND-2 PPI は、ヒトの自己免疫疾患の発症に関わる IL-17A（interkeuin-17）とその受容体 IL-17RA［1］の PPI とタンパク質の立体構造が類似していた。このことは、クリオネンが IL-17 シグナルの PPI 阻害剤としても機能し、自己免疫疾患の治療薬になりうることを示唆している。本研究では IL-17A/IL-17RA PPI とクリオネンの相互作用を予測するため、ドッキングシミュレーションおよび分子動力学（MD）計算を利用した解析を行った。また。クリオネンの生物活性向上を目指した構造活性相関研究を実施した。

まずタンパク質の立体構造データベース（Protein Data Bank：PDB）から IL-17A/IL-17RA 複合体の結晶構造（PDB ID：7uwm）を取得し、MolDesk ソフトウェアを用いて、クリオネンとのドッキングシミュレーションを実施した。その結果、クリオネンが IL-17A/IL-17RA 複合体の結合面で相互作用することが明らかになった（図 1）。また、得られたドッキングモデルを初期構造として、AMBER ソフトウェアを用いた MD 計算を 100 ns にわたって実施したところ、クリオネンは IL-17A/IL-17RA 複合体との結合を維持し、初期構造とほぼ同じ位置に留まることが明らかにな

*現在の所属：理化学研究所 開拓研究本部

った。これは、クリオネンが IL-17A/IL-17RA の PPI を制御する分子となる可能性を示している。

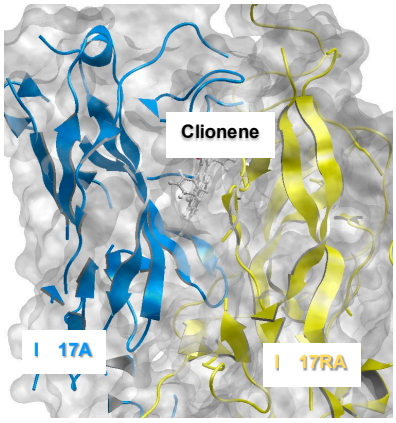


図 1. クリオネンと IL-17/IL-17RA 複合体のドッキングシミュレーション
MolDesk ソフトウェアによるドッキングシミュレーションにより、クリオネンが IL-17A/IL-17RA 複合体の結合面で相互作用することが明らかになった。

クリオネンはまた、カイコ PND/PND-2 PPI に対する阻害活性をもつことが既知であるため、クリオネンと PND/PND-2 複合体のドッキングシミュレーションも同様の方法で実施した。PND および PND-2 タンパク質の結晶構造が得られていないため、タンパク質立体構造予測プログラム AlphaFold を用いて PND/PND-2 複合体構造を予測し、ドッキングシミュレーションに利用したところ、クリオネンは PND/PND-2 複合体の結合面で IL-17A/IL-17RA 複合体の際と同様に相互作用することが明らかになった。

クリオネンの構造活性相関研究を行うため、合計 7 種類のクリオネン誘導体を合成し、独自に開発したカイコ PND/PND-2 PPI に対する阻害活性の定量評価系 NanoBiT システムで活性を評価した。その結果、クリオネンの無水フタル骨格にブチル酪酸（Butyric acid）を導入したクリオネン誘導体（Clionene-BtA）が、クリオネンに匹敵する生物活性をもつことが明らかになった（図 2）。

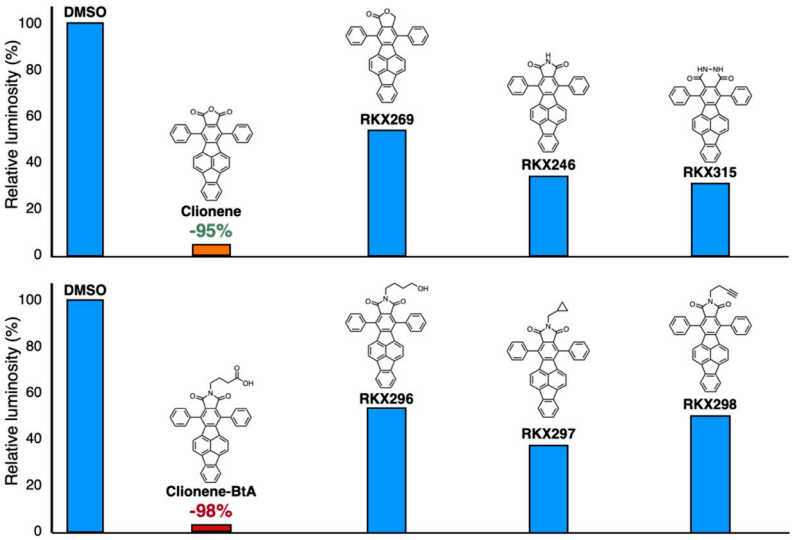


図 2. クリオネンの構造活性相関研究
NanoBiT システムによるクリオネン誘導体の PPI の定量評価。

2. 体内時計の精密制御、抗がん剤への展開

生物時計は、地球の自転に伴う環境変化に適応するために生物が獲得した生理システムであり、昼夜の変化に対応した約 24 時間周期の概日リズムや四季の変化に対応した約 1 年周期の概年リズムを制御している。原核生物からヒトに至るほとんどの生物が有するこのシステムの障害は健康に大きな影響を与え、肥満、精神障害、心血管疾患、さらには癌やアルツハイマー病にも関係する。すなわち生物時計機構を解明し、自在な人工制御が可能となれば様々な疾患の克服に役立つだけでなく、食糧増産につながる動植物の生産性の向上が期待できる。

最近 **NC001** という我々が合成したナノカーボン分子に哺乳細胞の概日リズムを長周期化する活性があることを発見した。これは、いわゆる“薬らしい構造”とは全くかけ離れているために、これまで生物活性がないと広く信じられてきたナノカーボンに生物活性があることを証明する画期的な成果である。そこで本研究では **NC001** の発見を契機に時計制御ナノカーボン分子のもつ無限の可能性を追求するべく、独自の分子合成法を駆使したライブラリー合成、および時計制御機構の解明を目指した。

NC001 は 2019 年に当研究室独自の触媒反応を用いて初めて合成された一連の 4,5-ジアリールフェナントレン分子群の一つである［2］。まず、この反応の出発原料を変えて、4,5 位のアリール基が異なる **NC001** 誘導体を合成した。また、NC001 の各 C–H 結合に対する結合選択的な官能基化反応によっても誘導化を行った。具体的には当研究室で開発している K 領域選択的 C–H アリール化反応［3］により誘導体を合成した。さらに、**NC001** に、*N*-フルオロベンゼンスルホンイミドと臭化ナトリウムを作用させることで、C1 位選択的な臭素化が進行し、続く種々のカップリング反応に付すことで、**NC001** の C1 位に対する誘導体合成を行った。また **NC001** にイリジウム触媒によるホウ素化、続く種々のカップリング反応によって、NC001 の C2 位に対する誘導体合成を行った（図 3a）。

得られた **NC001** 誘導体ライブラリーの活性評価を行った（図 3b）。4,5 位は活性に非常に重要な部位で、C2 位に関しては誘導化により若干の活性の低下が見られた。一方、K 領域および C1 位に関しては誘導化を行っても活性の低下が見られない置換基を見出すことができた。今後のプルダウンアッセイのためのプローブ分子合成においては K 領域および C1 位から誘導化を行う。

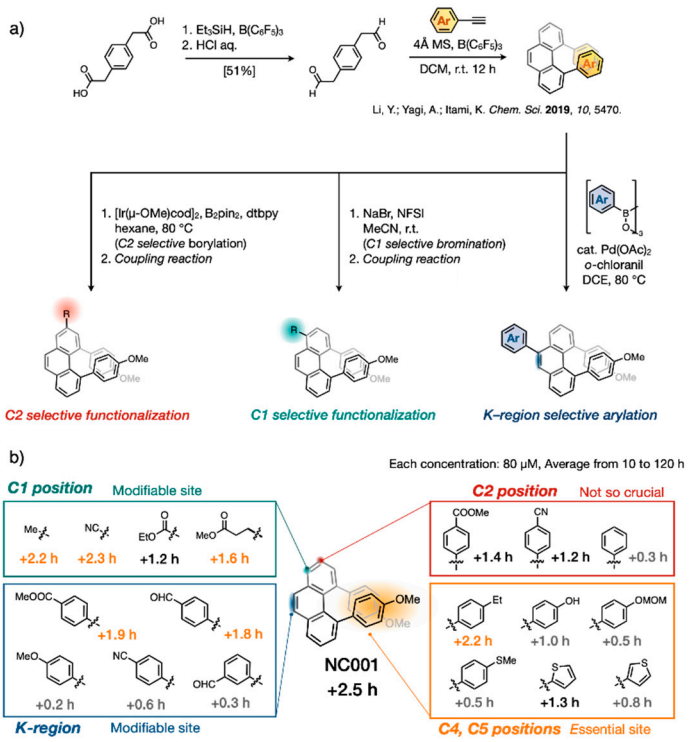


図 3. **NC001** の構造活性相関研究

a) **NC001** 誘導体のライブラリー構築。

b) **NC001** 誘導体の活性評価。

3. バイオフィルムの形成阻害

微生物が固相表面に形成する集合体であるバイオフィルムは、細菌が外的要因から身を守るために形成するものだが、感染症や様々な疾患の原因とされており、特に医療現場や生態系における一大問題となっている。これまで、バイオフィルムの化学的、生物的、物理的除去法が開発されてきたが、バイオフィルムのみを選択的に阻害できる非殺菌剤の開発が強く望まれている。本研究では、分子ナノカーボンの特異な構造が突破口になると着想し、バイオフィルムの形成阻害分子の探索、およびバイオフィルム形成阻害分子の構造最適化や阻害活性発現の分子メカニズムの解明を目指した。

バイオフィルム形成阻害分子の探索には、筆者が開発した分子ナノカーボンおよび市販の分子を 738 種使用した。バイオフィルムには、むし歯（う蝕）の主要な病原性細菌であり、また感染性心内膜炎の起炎菌としても知られている *Streptococcus mutans* のバイオフィルムを選択した。*S. mutans* の培養には、Brain Heart Infusion（BHI）液体培地（Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA）にて 37℃で振盪培養した。バイオフィルム形成阻害試験には、測定キット（Dojindo, Kumamoto, Japan）を使用した。候補分子は、バイオフィルムを形成させるときには培養液にスクロースを 1%（w/v）を添加し、96 ウェルプレートに 200 μL ずつ分注後、1.0、2.5、5.0 μM（DMF または DMSO 溶液）を添加した。添加後、嫌気条件下にて 24 時間静置し、クリスタルバイオレット染色法にて色素の吸光度（590 nm）をプレートリーダーにて計測することで定量した。さらに、バイオフィルムの形成阻害を示した候補分子を使用した。上記同様の測定キットを使用し、予めバイオフィルムを形成させた 96 ウェルプレートへ 5 μM（DMF または DMSO 溶液）を添加し、嫌気条件下にて 24 時間静置した。その後、残存バイオフィルムをプレートリーダーにて計測した。

738 種の分子を用いたバイオフィルム形成阻害試験を実施した結果、30%以上の阻害を示した分子を 13 種見出した。これらはリング状や球状の分子ナノカーボン、アセナフテンを有する分子群だった。さらに、これら 13 種の分子のバイオフィルム破壊能を検証したところ、[6]CPP の誘導体である F_{12}[6]CPP［4］が他の分子に比べ活性が高いことを見出した（図 4）。

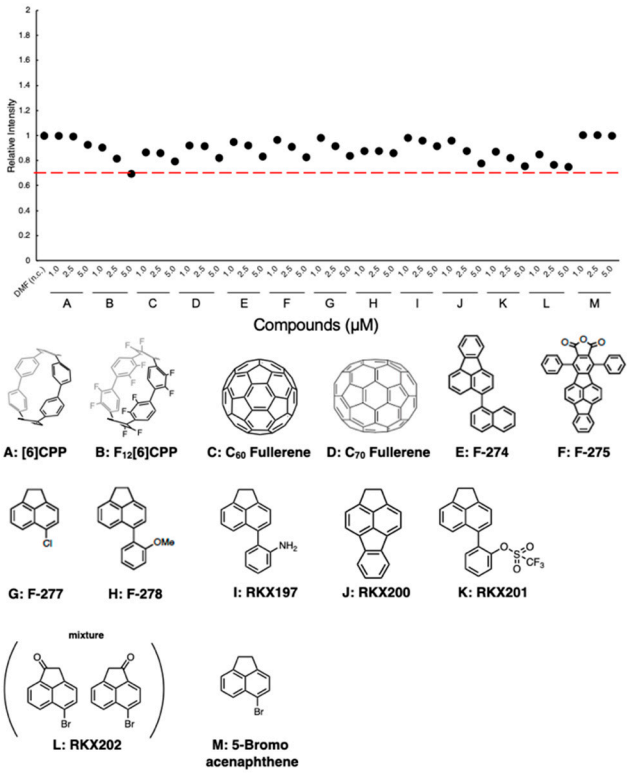


図 4. バイオフィルム形成阻害および破壊能を有する分子ナノカーボン
測定キット（Dojindo, Kumamoto, Japan）を用いて評価を行い、30%以上の阻害を示した分子を A–M で示した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所吉村グループの吉村崇教授、Kay グループの廣田毅特任准教授、名古屋大学大学院理学研究科有機化学研究室の天池一真助教、宇佐見享嗣特任助教、山田早人特任助教である。

文　献

1) McGeachy M J, Cua D J, Gaffen S L. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. Immunity. 2019 Apr 16;50(4):892-906. PMID: 30995505 DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.021

2) Li Y, Yagi A, Itami K. Synthesis of sterically hindered 4,5-diarylphenanthrenes via acid-catalyzed bisannulation of benzenediacetaldehydes with alkynes. Chem Sci. 2019 Apr 17;10(21):5470-5475. PMID: 31293729 DOI: 10.1039/c9sc00334g

3) Mochida K, Kawasumi K, Segawa Y, Itami K. Direct arylation of polycyclic aromatic hydrocarbons through palladium catalysis. Am Chem Soc. 2011 Jul 20;133(28):10716-9. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21699210 DOI: 10.1021/ja202975w

4) Shudo H, Kuwayama M, Segawa Y, Yagi A, Itami K. Half-substituted fluorocycloparaphenylenes with high symmetry: synthesis, properties and derivatization to densely substituted carbon nanorings. Chem Commun (Camb). 2023 Nov 9;59(90):13494-13497. PMID: 37882201 DOI: 10.1039/d3cc04887j