

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23102007

研究課題名(和文)海洋生物由来の抗腫瘍性リガンド

研究課題名(英文)Antitumor ligands from marine organisms

研究代表者

松永 茂樹(Matsunaga, Shigeki)

東京大学・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60183951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：未開拓の海洋生物資源として深海性海産無脊椎動物と海洋微生物を選抜し、これらの生物種に浅海性海産無脊椎動物を加えて探索源とし、抗腫瘍性を示す低分子リガンドの創出を目的とした。浅海ならびに深海で採取した海産無脊椎動物ならびに海洋微生物の抽出物に対して、細胞試験および酵素阻害活性試験を行い、活性成分を単離しその構造決定を行うとともに、構造活性相関を導出し、活性化合物の構造の最適化を試みた。

研究成果の概要(英文)：Deep-sea marine invertebrates and marine bacteria were chosen as the untapped sources for discovery studies. From these species together with shallow water marine invertebrates, we searched for antitumor small molecules. From the extract of each organism, cytotoxic and enzyme inhibitory activities were examined and the active constituents were isolated and subjected to structural studies. From the isolated compounds we studied structure-activity relationships.

研究分野：marine natural products

キーワード：抗腫瘍性 細胞毒性 酵素阻害 海洋生物 単離 構造決定

1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋生物由来の天然物は、有用物質の探索源として、長く注目を集めてきた。海洋天然物には、植物や土壤微生物とは異なる化学構造上の特徴を有する化合物が多数あり、その中には顕著な生物活性を示すものが少なからず存在する。しかし、化合物の大量供給の困難さのため、海洋生物の医薬品素材としての利用には限界があると考えられていた。長く続いていたこのような状況が、近年打開されつつある(Nat. Rev. Drug Discov., 2009, 8, 69)。まず、イモガイを来源とするペプチドが、モルヒネと異なる機序で、より強い作用を示す鎮痛剤として上市された。次いで、群体ボヤ由来のエクテナシジンが軟組織肉腫に対する抗がん剤として認可された。さらに、最近、カイメン由来の抗腫瘍物質の化学構造を基にして創製された単純化誘導体のエリプリン(商品名ハラベン)が米国で転移性乳がんの治療薬として認可された(Nature, 2010, 468, 608)。他方では、海洋微生物が未利用の探索源として期待されている。実際、海洋性放線菌から発見されたプロテアソーム阻害物質であるサリノスポラマイドの、抗がん剤としての臨床試験が進行中である(Bioorg. Med. Chem., 2009, 17, 2175)。

(2) このような動向の背景には、膨大な数を擁する海洋天然物ライブラリーは、植物および土壤微生物由来の天然物ライブラリーとは、化学構造と発現する生物活性において大きく異なる「集合」を形成する、という事実がある。実際、研究代表者らは関東近海および南西諸島で採取したカイメンを中心とする海産無脊椎動物から、細胞毒性やプロテアーゼ阻害活性等の生物活性を示す化合物の探索を続け、およそ400の新規化合物を発見した。その中には、カリクリン(Chem. Biol., 2002, 9, 309)、ミカロライド(JACS, 1999, 121, 5605)やポリセオナミド(JACS, 2010, 132, 12941)のように、他に例を見ないクラスの化合物が含まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、未開拓の海洋生物資源として深海性海産無脊椎動物と海洋微生物を選抜し、これらの生物種に浅海性海産無脊椎動物を加えて探索源とし、抗腫瘍性を示す低分子リガンドの創出を目的とする。浅海ならびに深海で採取した海産無脊椎動物ならびに海洋微生物の抽出物に対して、細胞試験および酵素阻害活性試験を行い、活性成分を単離しその構造決定を行うとともに、構造活性相関を導出し、活性化合物の構造の最適化を試み、活性成分の分子標的の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 探索源となる試料の取得 浅海性海産無脊椎動物は既存の試料を使い、深海性海産無脊椎動物は新しく採取する。深海性海洋微生物は連携研究者の協力により調達する。

(2) 生物活性試験 化合物探索のために、5種類のがん細胞に対する細胞毒性、白血病細胞の分化誘導活性、がんに関わりの深い酵素に対する酵素阻害活性を用いる。

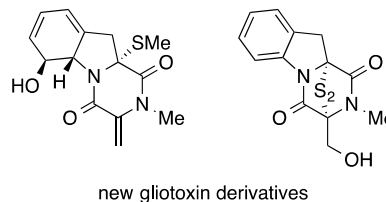
(3) 単離・構造決定 生物活性スクリーニングに基づき、活性検体を選び出し、その中に含まれる生物活性物質(天然物リガンド)を定法により単離しその構造を決定する。得られた化合物の類縁化合物を精査して単離し、併せて天然物ライブラリーとする。

(4) 最適化リガンドの創出 天然物リガンドを化学反応に付し、多様な構造の類縁化合物(化学ライブラリー)を調製する。化学ライブラリーと天然物ライブラリーの生物活性の評価から、構造活性相関を導く。ひとたび得られた構造活性相関の解析により、反応様式を変えて化学誘導体化を行い、新たな化学ライブラリーを発生させ、構造活性相関を洗練させる。この操作を繰り返すことで、天然物リガンドの構造を最適化し「最適化リガンド」を得る。

(5) 最適化リガンドの標的探索 A01 班の班員の協力を得て、最適化リガンドの細胞内標的の探索および生物活性の評価を行う。

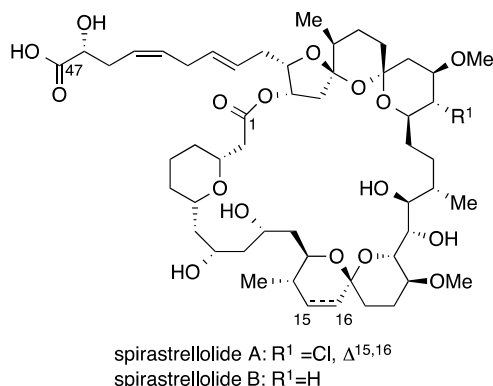
4. 研究成果

(1) 海底泥から分離した真菌 *Penicillium* sp. に含まれるがん細胞に対する細胞毒性成分の探索を行い2種の新規化合物を含む7種のジケトピペラジン誘導体を単離した。これらの化合物にはヒストンメチル基転移酵素阻害活性を示すことが知られているキートシン中の活性部位と共通構造が含まれたため、7種の化合物について同酵素に対する阻害活性を調べ、構造活性相関を明らかにした。すなわち、今回単離されたジケトピペラジン骨格を有する化合物は、いずれも P388 細胞に対して細胞毒性を示したが、ヒストンメチル基転移酵素に対して強い阻害活性を示したのは分子内にジスルフィド結合あるいはテトラスルフィド結合をもつ分子種のみであった。

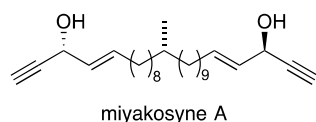


(2) 深海カイメン *Epipolasis* sp. から低濃度でがん細胞に対して細胞毒性を示す化合物を2種単離した。いずれも複雑な構造のマクロライドで、かつ、核磁気共鳴スペクトルにおいてシグナルを与えない部分が含まれるため構造決定は難航した。しかし、部分構造がカイメン由来の既知化合物の spirastrellolide メチルエステル類と似ていたため、メチルエステル化したところ spirastrellolide A メチルエステルおよび spirastrellolide B メチルエ

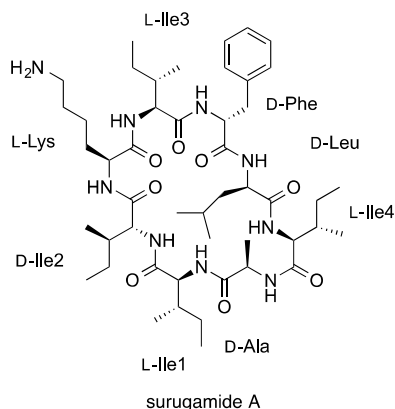
ステルと同一物質を与えた。Spirastrellolide類が遊離カルボン酸型として得られた初めての例であり、本研究において、遊離型のspirastrellolide類の細胞毒性がメチルエステルとほぼ同等であることを明らかにした。



(3) 深海カイメン *Petrosia* sp. から単離した miyakosyne A はがん細胞に対して細胞毒性を示す鎖状アセチレン化合物で鎖中に分岐メチルを有する。この分岐メチル基の絶対配置は未決定であったが、化学分解物と合成標品の赤坂-大類試薬による誘導化物の ¹H NMR データの解析により決定することができた。

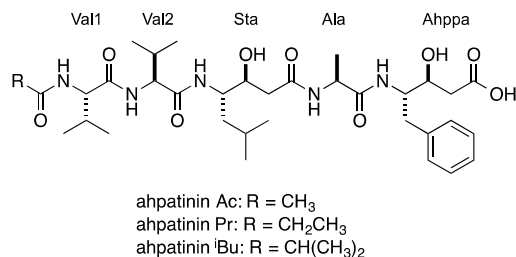


(4) 海洋性放線菌 *Streptomyces* sp. から、cathepsin B 阻害活性を示す 5 種類の環状オクタペプチド surugamide A-E を単離し、その構造決定を行った。Surugamide 類には D 型と L 型のイソロイシン残基が含まれていたが、LCMS によって部分加水分解物のアミノ酸組成を調べることで、効率よくフラグメントペプチドを取得し、ペプチド中の各残基の絶対配置を含め構造決定を行うことができた。Surugamide に類する D 型残基を多数含む環状オクタペプチドは過去に報告例がない。

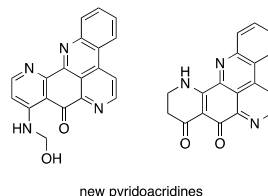


(5) 別種の海洋性放線菌 *Streptomyces* sp. からカテプシン B 阻害を示す化合物として得

られた ahpatinin 類は、ペプスタチンおよびペプスタチン中に 2 つあるスタチン残基の片方が Ahppa 残基(スタチン残基はロイシンが酢酸と縮合した構造を取るが、Ahppa はフェニルアラニンが酢酸と縮合した構造を取る)に置換された ahpatinin 骨格を有していた。今回研究の対象とした真菌からは、N 末端に結合したカルボン酸の鎖長が従来から知られるペプスタチン類より短い点が特徴で、酢酸、プロピオン酸、およびイソ酪酸が結合した化合物のみが得られた。ペプスタチンと同じ母核をもつ化合物と ahpatinin 母核をもつ化合物が計 6 種類得られた。いずれの化合物もカテプシン B に対する阻害活性は弱かったが、ペプスタチンと同様に、アスパラギン酸プロテアーゼであるペプシンに対する阻害活性は強かった。本研究において、スタチンおよび Ahppa が酸加水分解中にロイシンおよびフェニルアラニンにそれぞれ分解することを見出し、この変換反応を利用するとこれらの異常アミノ酸の位の絶対配置を簡便に導けることを示した。

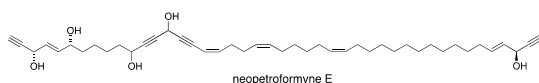
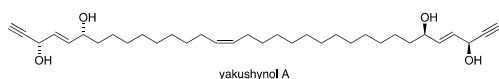


(6) 大島新曾根で採取した深海性カイメン *Biemna* sp. から白血病細胞の分化誘導活性を示す 2 種のピリドアクリジン類を単離し、その構造研究を行った。ピリドアクリジン類は複雑な環構造を有し、炭素原子およびそれ以外のヘテロ原子の数に対する水素原子の数が少ないため、NMR データの解析によると化合構造式の候補が複数出現し、構造式を 1 つに決定できない。そこで、過去に化学合成により構造式が確定している化合物とのスペクトルデータの比較および LCMS による標品との直接比較などにより、それらの構造決定を行った。LCMS のデータを詳細に解析することにより、過去に報告されている類縁化合物の多くがカイメン中に存在する前駆体から加水分解および空気参加により誘導されていることを明らかにした。A1 班の協力を得て、活性の強いピリドアクリジンの標的探索を試みたが、化合物をビーズと結合させる好適な条件を見出すことができなかった。



(7) 屋久新曾根で採取したカイメン

Pleroma sp.から HeLa 細胞に対する細胞毒性を指標にして、鎖状アセチレン yakushynol 類 6 種および neopetroformyne E を単離しこれらの構造決定を行った。このカイメンは過去に数例しか報告のない希少種であった。得られた化合物は既知のポリアセチレンの構造と比べて 2 箇所が新たに酸化されている、過去に報告のない置換様式を示した。得られた化合物の化学構造式の比較に基づき、カイメンに特徴的なポリアセチレン類の生合成仮説を提唱した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

Peddie, V.; *Takada, K.; Okuda, S.; Ise, Y.; Morii, Y.; Yamawaki, N.; Takatani, T.; Arakawa, O.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Cytotoxic Glycosylated Fatty Acid Amides from a *Stelletta* sp Marine Sponge. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2808-2813: DOI:10.1021/acs.jnatprod.5b00795.

Takanashi, E.; *Takada, K.; Hashimoto, M.; Itoh, Y.; Ise, Y.; Ohtsuka, S.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Cytotoxic linear acetylenes from a marine sponge *Pleroma* sp. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 9564-9570: doi:10.1016/j.tet.2015.10.062.

Moran, D. A. P.; *Takada, K.; Ise, Y.; Bontemps, N.; Davis, R. A.; Furihata, K.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Two cell differentiation inducing pyridoacridines from a marine sponge *Biemna* sp and their chemical conversions. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 5013-5018: doi:10.1016/j.tet.2015.05.070.

Fukuhara, K.; *Takada, K.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Nazumazoles A-C, Cyclic Pentapeptides Dimerized through a Disulfide Bond from the Marine Sponge *Theonella swinhoei*. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2646-2648: DOI: 10.1021/acs.orglett.5b01020.

Arita, Y.; *Nishimura, S.; Ishitsuka, R.; Kishimoto, T.; Ikenouchi, J.; Ishii, K.; Umeda, M.; Matsunaga, S.; Kobayashi, T.; *Yoshida, M.: Targeting Cholesterol in a Liquid-Disordered Environment by Theonellamides Modulates Cell Membrane Order and Cell Shape. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 604-610: doi:10.1016/j.chembiol.2015.04.011.

Takada, K.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Structural reappraisal of corticatic acids, biologically active linear polyacetylenes, from a marine sponge of the genus *Petrosia*. *Fish. Sci.* **2014**, *80*, 1057-1064: doi: 10.1007/s12562-014-0776-0.

Sun, Y.; Takada, K.; Nogi, Y.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Lower Homologues of Ahpatinin, Aspartic Protease Inhibitors, from a Marine *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1749-1752: DOI: 10.1021/np500337m.

Hitora, Y.; Takada, K.; *Matsunaga, S.: On the Assignment of the Absolute Configuration at the Isolated Methyl Branch in Miyakosyne A, Cytotoxic Linear Acetylene, from the Deep-Sea Marine Sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 11070-11073: doi:10.1016/j.tet.2013.11.013.

*Nishimura, S.; Ishii, K.; Iwamoto, K.; Arita, Y.; Matsunaga, S.; Ohno-Iwashita, Y.; Sato, S. B.; Kakeya, H.; Kobayashi, T.; *Yoshida, M.: Visualization of Sterol-Rich Membrane Domains with Fluorescently-Labeled Theonellamides. *Plos One* **2013**, *8*, e83716: doi:10.1371/journal.pone.0083716.

Espiritu, R. A.; *Matsumori, N.; Murata, M.; Nishimura, S.; Kakeya, H.; Matsunaga, S.; Yoshida, M.: Interaction between the Marine Sponge Cyclic Peptide Theonellamide A and Sterols in Lipid Bilayers As Viewed by Surface Plasmon Resonance and Solid-State H-2 Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry (N. Y.)* **2013**, *52*, 2410-2418: DOI: 10.1021/bi4000854.

Akiyama, T.; Takada, K.; Oikawa, T.; Matsuura, N.; Ise, Y.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Stimulators of adipogenesis from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 6560-6564: doi:10.1016/j.tet.2013.06.007.

Takada, K.; Ninomiya, A.; Naruse, M.; Sun, Y.; Miyazaki, M.; Nogi, Y.; Okada, S.

*Matsunaga, S.: Surugamides A–E, Cyclic Octapeptides with Four D-Amino Acid Residues, from a Marine *Streptomyces* sp.: LC–MS-Aided Inspection of Partial Hydrolysates for the Distinction of D- and L-Amino Acid Residues in the Sequence. *J. Org. Chem.* **2013**, 78, 6746-6750: DOI: 10.1021/jo400708u.

Imae, Y.; Takada, K.; Okada, S.; Ise, Y.; Yoshimura, H.; Morii, Y.; *Matsunaga, S.: Isolation of Ciliatamide D from a Marine Sponge *Stelletta* sp and a Reinvestigation of the Configuration of Ciliatamide A. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 755-758: DOI: 10.1021/np300878b.

Sun, Y.; Takada, K.; Takemoto, Y.; Yoshida, M.; Nogi, Y.; Okada, S.; *Matsunaga, S.: Gliotoxin Analogues from a Marine-Derived Fungus, *Penicillium* sp., and Their Cytotoxic and Histone Methyltransferase Inhibitory Activities. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 111-114: DOI: 10.1021/np200740e.

Suzuki, M.; Ueoka, R.; Takada, K.; Okada, S.; Ohtsuka, S.; Ise, Y.; *Matsunaga, S.: Isolation of Spirastrellolides A and B from a Marine Sponge *Epipolasis* sp and Their Cytotoxic Activities. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1192-1195: DOI: 10.1021/np2009576.

[学会発表](計 20 件)

入江樂他「大島新曾根産カイメン由来の新規 poecillastrin 類縁体の単離と構造解析」平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 29 日、東京海洋大学。

二宮章洋他「海洋放線菌 *Streptomyces* sp. 由来の新規ペプチドの単離と構造決定」平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 29 日、東京海洋大学。

福原和哉他「カイメン *Theonella swinhoei* 由来の新規細胞毒性ペプチド nazumazoles A-F の単離と構造決定」平成 27 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 30 日、東京海洋大学。

人羅勇氣他「HeLa/Fucci2 細胞を用いたカイメン由来細胞周期停止誘導性物質の探索」平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 30 日、東京海洋大学。

Sun Yi 他「深海底泥から分離された放線菌由来の酵素阻害物質」平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 30 日、東京海洋大学。

Victoria Peddie 他「カイメン *Stelletta* sp. 由来の新規細胞毒性物質の単離と構造決定」平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 30 日、東京海洋大学。

福原和哉他「カイメン *Theonella swinhoei*

由来の新規ペプチドの単離と構造決定」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学。

Daniel Pedrazzoli 他「Cell differentiation inducers isolated from a marine sponge」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学。

二宮章洋他「*Streptomyces* 属放線菌が生産する surugamide 類の生合成と機能に関する研究」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学。

人羅勇氣他「カイメン由来細胞毒性アセチレン化合物 miyakosyne A の遠隔位不斉中心の絶対配置の決定」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学。

高田健太郎他「屋久新曾根産カイメン *Theonella* sp. 由来の新規 HDAC1 阻害化合物の単離と構造決定」平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学。

鈴木真志他「遺伝子組換え酵母を用いた小臥蛇島産カイメンからの新規ステロイド配糖体の単離および構造決定」平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

今榮康文他「カイメン *Stelletta* sp. 由来の ciliatamide D の構造決定および ciliatamide A の絶対配置の精査」平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

高梨笑未他「未同定種カイメン由来の薬剤耐性がん細胞に対する生育阻害物質の構造」平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

二宮章洋他「海洋放線菌 *Streptomyces* sp. 由来の新規ペプチドの単離と構造決定」平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

人羅勇氣他「宮古曾根産カイメン *Petrosia* sp. 由来の分岐メチルアセチレン化合物」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

高田健太郎他「Corticatic acid 類の化学構造に関する研究」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

高梨笑未他「屋久新曾根産未同定種カイメン由来の薬剤耐性がん細胞に対する細胞毒性物質」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

鈴木真志他「ナガンヌ島産カイメン *Epipolasis* sp. からの spirastrellolide A, B の単離および生理活性評価」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

今榮康文他「大島新曾根産カイメン *Stelletta* sp. 由来の新規ペプチドの単離と構造決定」平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012 年 3 月 27 日、東京海洋大学。

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 茂樹 (Matsunaga, Shigeki)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：60183951

(2) 研究分担者

高田 健太郎 (Takada, Kentaro)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：90455353

(3) 連携研究者

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)
理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室・主任研究員
研究者番号：00182791

(4) 連携研究者

能木 裕一 (Nogi, Yuichi)
海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・技術研究主幹
研究者番号：70399559