

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03114

研究課題名(和文) 活性天然物の結合タンパク質同定を基盤にする新規薬剤標的の開拓

研究課題名(英文) Exploring new drug targets based on binding protein identification of bioactive natural products

研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)

大阪大学・薬学研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：80311231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、腫瘍内や感染部位で細胞や病原微生物が示す特異な表現系変化に着目した評価系を用いて、がんおよび結核に有効な活性天然物の探索研究を実施した。その結果、7個の新規化合物を含む14個の活性天然物を見出した。そして、見出した活性天然物の作用機序および結合タンパク質の解析を、分子生物学またはケミカルバイオロジーの手法を利用して進め、新規薬剤標的となることが期待できる複数の分子を創出することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted an exploratory study of bioactive natural products effective for cancer and tuberculosis using established screening systems focusing on unique phenotypic changes of cells and pathogenic microbes in tumor and infected region. As a result, 14 bioactive natural products containing 7 novel compounds were discovered. In addition, we analyzed the action mechanism and binding protein of isolated bioactive natural products using the methods of molecular biology or chemical biology. Then, several molecules that were expected to be new drug targets, were successfully identified.

研究分野：天然物化学 ケミカルバイオロジー

キーワード：活性天然物 標的分子 ケミカルバイオロジー 感染症 がん

1. 研究開始当初の背景

創薬標的となる新規分子の開拓は、細胞、動物、病原体等を用いた、生物または分子生物学的な手法による病態解析から見出される場合がほとんどであり、疾患に有効な活性天然物の探索を実施し、その結合タンパク質解析を通して新たな創薬標的を見出す研究はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍内や感染部位で細胞や病原微生物が示す特異な表現系変化に着目した評価系を用いて、がんおよび結核に有効な活性天然物の探索研究を実施した。また、見出した活性天然物の結合タンパク質の解析を通して、同定した分子を新規薬剤標的として応用展開することを目的とした。

3. 研究の方法

活性天然物の探索では、以下の4つの評価系を用い、独自に保有する底生海洋生物の抽出物および海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを探索源として、活性試験の結果を指標にした分画精製を行った。

低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

がんの病態悪化に寄与している低酸素環境適応がん細胞に対して選択的に増殖阻害活性を示す天然物の創出を目指して、ヒト前立腺がん細胞 DU145 を1%の低酸素条件で培養することにより、低酸素環境に適応させ、通常培養条件と比較して、低酸素培養条件選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

と同様、がんの病態悪化に寄与している栄養飢餓環境適応がん細胞に対して選択的に増殖阻害活性を示す天然物の創出を目指して、炭素源であるグルコースを除去した培地での培養を栄養飢餓環境のモデルとして、ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 を栄養飢餓環境に適応させた後、被験サンプルの増殖阻害活性を測定した。また、通常培養条件と比較して、グルコース飢餓環境選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC 選択的な増殖阻害物質の探索

本スクリーニングでは、がん血管新生阻害物質の創出を目的として、血管新生の全ての過程に関与している血管内皮細胞に着目し、がん細胞(ヒト咽頭上皮がん細胞 KB3-1)の増殖には影響を与えず、HUVEC 選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。

潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索

Mycobacterium smegmatis および *M. bovis* BCG を検定菌として、これらを0.2%の低酸素環境下で培養することにより、既存の抗結核薬 isoniazid に抵抗性を示す潜在状態を誘導した。また探索研究では、潜在状態の検定菌に対しても抗菌活性を示す化合物を探索し

た。

一方、これらの探索研究から見出した活性天然物の標的分子解析は、研究代表者がこれまで構築・実施してきた、合成したプローブ分子を用いる、細胞(または菌体)破碎物やペプチド提示型ファージライブラリーからのプルダウンアッセイ、またはゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する方法を、適宜改変を加えて最適化を行い実施した。

4. 研究成果

(1) 活性天然物の探索研究

保有する底生海洋生物の抽出物および海洋由来微生物の培養抽出物ライブラリーを対象に、前述した評価系での探索研究を実施した。その結果、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索において、新規アルキルピリジナルカロイド *N*-methylniphatyne A、新規ポリケチド biakamides A-D、新規セスキテルペンアルカロイド fasciospyrinadinone および fasciospyrinadinol を見出した。また、20-hydroxyhaterumadienone および polybrominated diphenyl ether 類が本活性を有することを新たに見出した(図1)。潜在性結核菌に有効な抗菌物質の探索では、チオジケトピペラジン verticillin A および B、ナフトキノ誘導体 viomellein、3環性アルカロイド 3-(phenethylamino)dimethyl(oxy)aaptamine (PDOA) に本活性を新たに見出した(図2)。

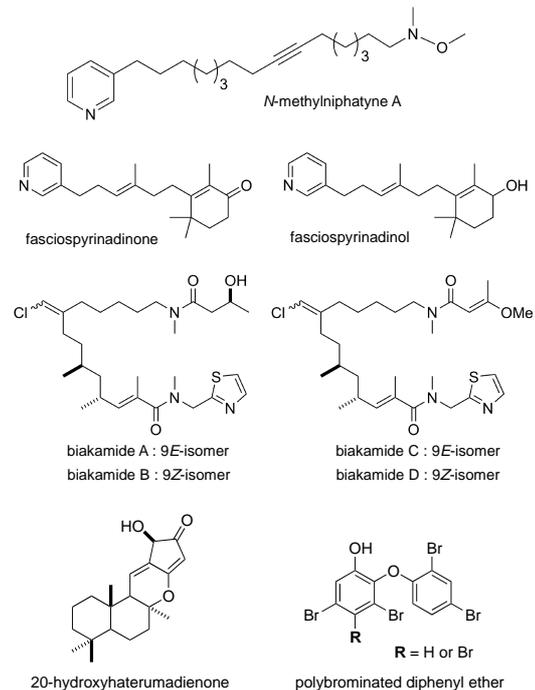


図1 グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質として見出した化合物の構造

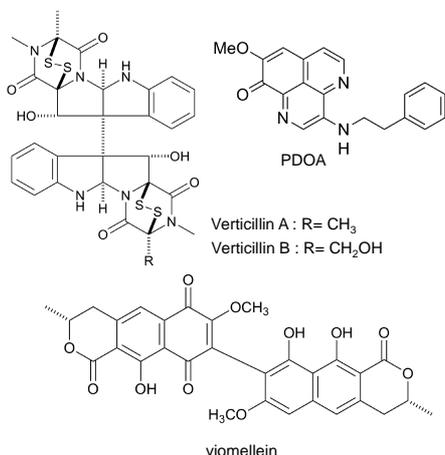


図2 潜在性結核菌に有効な抗菌物質として見出した化合物の構造

(2) 活性天然物の作用機序および結合タンパク質の解析

Dictyoceratin-C に関する研究

Dictyoceratin-C は、低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質として以前に見出した化合物であり、これまでの研究から、がん細胞の低酸素適応に関わる転写因子 HIF-1 α の発現量を低下させることを明らかにしていた。本研究では、HIF-1 α の発現量低下をもたらす dictyoceratin-C の結合タンパク質同定を試みた。まず、合成アナログ化合物を用いた構造活性相関の知見を基に dictyoceratin-C のプローブ分子を作成し、低酸素培養条件選択的な活性を保持するプローブ分子の創出に成功した (図3)。

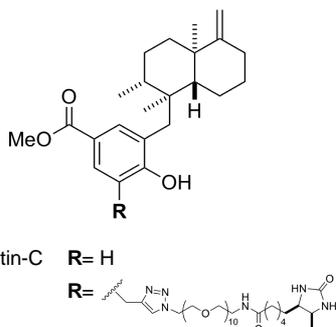


図3 Dictyoceratin-C およびプローブ分子の化学構造

そこで次に、本プローブ分子を利用して、ペプチド提示型ファージライブラリーから dictyoceratin-C の結合タンパク質同定を行った。そして、種々検討した結果、dictyoceratin-C の結合タンパク質が RNA polymerase II associated protein 3 (RPAP3) であることを強く示唆する知見が得られ、さらに、siRNA で RPAP3 の発現を抑制した DU145 細胞の表現型変化を調べたところ、低酸素培養条件選択的な増殖阻害を受けること、ならびに HIF-1 α の発現量の減少が確認された。以

上の結果から、dictyoceratin-C の結合タンパク質は RPAP3 であると結論づけた。

Polybrominated diphenyl ether 類に関する研究

グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質として見出した polybrominated diphenyl ether 類の作用機序および標的分子解析については、まず始めに、がん細胞の低栄養環境適応の際に上昇するリン酸化 Akt と GRP78 に対する影響を調べた。その結果、polybrominated diphenyl ether は、リン酸化 Akt 量、GRP78 の発現量ともに阻害することを明らかにした。また、この効果は、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害活性を示すことが報告されており、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I の阻害剤として知られている antimycin A でも見られる現象であることから、次に本化合物のミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する影響を調べた。その結果、polybrominated diphenyl ether は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II の活性を IC₅₀ 値 6.4 nM で阻害することを明らかにした。以上の結果から、polybrominated diphenyl ether 類は、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 II を標的として、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害活性を示すことが強く示唆された。

Biakamide 類に関する研究

Biakamide 類の作用機序についても、前述の polybrominated diphenyl ether 類と同様、まずリン酸化 Akt および GRP78 への影響を検討した。その結果、biakamide 類 (biakamide C) もリン酸化 Akt 量、GRP78 の発現量ともに阻害することが明らかとなった。また、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体に対する影響を調べたところ、IC₅₀ 値 0.45 μ M でミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I を阻害することが明らかとなった。現在、biakamide プローブを利用した化合物の細胞内局在、ならびにミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I 中の結合部位の解析を進めている。

Melophlin A に関する研究

Melophlin A は (図4) 潜在性結核菌に有効な抗菌物質として、以前に見出した化合物であり、ゲノム DNA ライブラリー形質転換微生物を利用する標的分子解析において、その標的分子が、*M. bovis* BCG ゲノムの 1422.304 ~ 1448.713 kB および 1169.370 ~ 1183.760 kB の2つの領域に存在することが明らかになっていた。そこで、本化合物の標的分子を同定することを目的に、さらに検討を進めた。すなわち、各ゲノム領域を分割後、それらを高発現する形質転換 *M. smegmatis* を作成し、melophlin A に対して耐性となる株をスクリーニングした。そして同操作を繰返すことにより、melophlin A に対して耐性を付与する

遺伝子を明らかにした。その結果、meloplin A の標的分子は、exopolyphosphatase と予想される BCG1083 タンパク質、および HIT-like protein の 1 つと予想される BCG1321c タンパク質であることが明らかとなった。現在、これら 2 つの分子の創薬標的としての有用性を検証している。

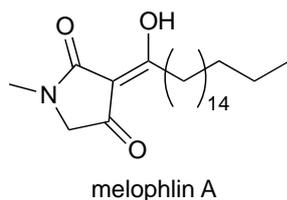


図 4 Meloplin A の化学構造

3-(phenethylamino)dimethyl(oxy)-aaptamine (PDOA) に関する研究。

PDOA については、潜在状態の *M. bovis* BCG に抗菌活性を示すだけでなく、病原性を有する *M. tuberculosis* および多剤耐性株を含む臨床分離株に対しても良好な抗菌活性を示すことを明らかにした。また、その標的分子の解析を目的として、合成した PDOA アナログの構造活性相関をもとに、標的タンパク質と共有結合を形成させることが可能なトリフルオロジアジリン基を持つ下記のプローブ分子の合成に成功した(図 5)。さらに本プローブ分子と *M. bovis* BCG の菌体破砕物を混和後、光照射を行い、PDOA が有する自家蛍光を指標に、標的分子の標識・検出が可能か否かを検討した。その結果、7 つのタンパク質が標識されることが明らかとなった。現在、本手法を用いて、標的タンパク質の精製を進めている。

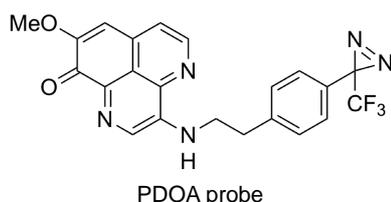


図 5 PDOA プローブの化学構造

その他の研究

前述した①～⑤の検討以外にも、本研究で見出した化合物の作用機序および標的分子の解析を進めている。そして、グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質として見出した、*N*-methylniphatyne A については、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体への影響を検討しており、予試験的な結果として、ミトコンドリア電子伝達系酵素複合体 I を阻害することを示唆する知見を得ている。また、潜在性結核菌に有効な抗菌物質として見出した viomellein は、DNA と結合すること、verticillin A の作用が、Mycobacteria のエピジェネティクス制御に関係していることを示唆する知見を得ている。

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 12 件)

N. Kotoku, R. Ishida, H. Matsumoto, M. Arai, K. Toda, A. Setiawan, O. Muraoka, M. Kobayashi, Biakamides A–D, unique polyketides from a marine sponge, act as selective growth inhibitors of tumor cells adapted to nutrient starvation. *J. Org. Chem.* (2017) 82, 1705-1718. DOI:10.1021/acs.joc.6b02948 査読有

M. Arai, D. Shin, K. Kamiya, R. Ishida, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, Marine spongean polybrominated diphenyl ethers, selective growth inhibitors against the cancer cells adapted to glucose starvation, inhibits mitochondrial complex II. *J. Nat. Med.* (2017) 71, 44-49. DOI: 10.1007/s11418-016-1025-x 査読有

K. Kamiya, M. Arai, A. Setiawan, M. Kobayashi, Anti-dormant mycobacterial activity of viomellein and xanthomegnin, naphthoquinone dimers produced by marine-derived *Aspergillus* sp. *Nat. Prod. Commun.* (2017) 12, 579-582. WEB: <http://www.naturalproduct.us/JournalArchive.asp> 査読有

M. Arai, K. Kamiya, D. Shin, H. Matsumoto, T. Hisa, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, *N*-Methylniphatyne A, a new 3-alkylpyridine alkaloid as an inhibitor of the cancer cells adapted to nutrient starvation, from an Indonesian marine sponge of *Xestospongia* sp. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 766-771. DOI: 10.1248/cpb.c16-00118 査読有

M. Arai, T. Kawachi, N. Kotoku, C. Nakata, H. Kamada, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, H. Endo, M. Inoue, H. Sato, M. Kobayashi, Furospinosulin-1, marine spongean furanosesterterpene, suppresses the growth of hypoxia-adapted cancer cells by binding to transcriptional regulators p54^{nr1b} and LEDGF/p75. *ChemBioChem* (2016) 17, 181-189. DOI: 10.1002/cbic.201500519 査読有

M. Arai, Exploring New Drug Targets through the Identification of Target Molecules of Bioactive Natural Products. *Yakugaku Zasshi* (2016) 136, 669-676. DOI: 10.1248/yakushi.15-00281 査読有

N. Kotoku, M. Arai, M. Kobayashi, Search for anti-angiogenic substances from natural sources. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 128-134. DOI: 10.1248/cpb.c15-00744 査読有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, Structure-activity relationship and in vivo anti-tumor evaluations of dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Mar Drugs* (2015) 13, 7419-7432. DOI: 10.3390/md13127074 査読有

有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, Y. Sumii, M. Arai, M. Kobayashi, Enantioselective synthesis of dictyoceratin-A (smenospondiol) and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Bioorg. Med. Chem.* (2015) 23, 966-975. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.021 査読有

M. Arai, K. Kamiya, P. Pruksakorn, Y. Sumii, N. Kotoku, J.P. Joubert, P. Moodley, C. Han, S. Dayoung, M. Kobayashi, Anti-dormant mycobacterial activity and target analysis of nybomycin produced by a marine-derived *Streptomyces* sp. *Bioorg. Med. Chem.* (2015) 23, 3534-3541. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.033 査読有

〔学会発表〕(計 28 件)

石田良典, 新規海洋天然物 biakamide 類の栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性とその作用メカニズム, 第 21 回日本がん分子治療学会学術集会, 2017 年

荒井雅吉, 海洋天然物の魅力と創薬研究への応用, 第 40 回新適塾「未来創薬への誘い」, 2017 年

Takahiro Jomori, Effect of new marine spongian diterpenes, ceylonamides G-I on cancer cell spheroid, The 10th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium, 2017 年

野中宏起, 抗潜在性結核物質 3-(phenethylamino)dimethyl(oxy)amptamine の構造活性相関研究, 第 67 回日本薬学会近畿支部大会, 2017 年

伊藤みなみ, 海洋由来 Trichoderma 属真菌からの抗潜在性結核物質の探索, 日本生薬学会第 64 年会, 2016 年

神谷謙太郎, 海洋天然物 aaptamine 類の潜在性結核菌に対する抗菌活性, 日本生薬学会第 64 年会, 2016 年

古徳直之, 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 dictyoceratin 類の標的分子解析, 第 58 回天然有機化合物討論会, 2016 年

荒井雅吉, 活性天然物で切拓く新規薬剤標的分子, 第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2016 年

Masayoshi Arai, Exploring new drug target based on chemical biology of marine natural products, The 8th US-Japan Symposium on Marine Natural Products, 2016 年

河内崇志, 低酸素環境選択的がん細胞増殖阻害物質 dictyoceratin-C の標的分子解析, 第 19 回日本がん分子治療学会学術集会, 2015 年

〔図書〕(計 1 件)

荒井雅吉, 小林資正. 化学同人, アルカロイドの科学, 2017 年, 534 頁 (81-97 頁)

〔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

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/index.cgi>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)

大阪大学大学院・薬学研究科・特任教授(常勤)

研究者番号 : 80311231

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

小林 資正 (KOBAYASHI, Motomasa)

大阪大学大学院・薬学研究科・招へい教授
研究者番号 : 40116033

古徳 直之 (KOTOKU, Naoyuki)

立命館大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 20362618

(4) 研究協力者

()