

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14799

研究課題名(和文) 海洋生物に含まれる細胞周期阻害物質のFucci細胞を用いた効率的探索

研究課題名(英文) Efficient search for cell cycle inhibitors from marine organisms by using Fucci cells

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(農学部)・教授

研究者番号：60183951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：HeLa/Fucci2細胞を用いると細胞分裂の進行状況を、生細胞観察することができるため、非選択的な毒性物質と細胞周期に特異的に作用する物質を区別して検出できる。この細胞を用いて、海洋生物からHeLa/Fucci2細胞の細胞分裂に影響を与える化合物を探索した。石垣島産ウデフリクモヒトデからcuracin Eを、八丈島北方の黒瀬産カイメンからピラジン環が2つのインドール環およびグアニジノエチルチオ基で置換されたdragmacidin GおよびHを単離し、それぞれの構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：By using HeLa/Fucci2 cells, it is possible to observe the progression of cell cycle in live cells under microscope, enabling the differentiation of non-specific toxic compounds from specific cell-cycle inhibitors. We applied this technology to search for compounds that affect the cell-cycle of the HeLa/Fucci2 cells. From the brittle star collected at Ishigaki Island we isolated and characterized curacin E and from the marine sponge collected at Kurose, north to Hachijo Island, dragmacidins G and H, pyrazines substituted by two indoles and a guanidinoethylthio group.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海洋生物 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人の死亡原因の第1位はがんで、そのおよそ30%を占める。がんの治療法のひとつに化学療法があるが、一部のがんを除くとがんに対する特效薬はなく、臨床で使われる抗がん剤の種類は限定的で、新規な化学的特性を有する抗がん剤が求められている。既存の抗がん剤の多くは細胞周期の特定の段階に作用し、がん細胞の細胞分裂を阻害する。これまで、化合物が細胞周期に与える影響を簡便に検出する方法がなかった。

(2) 近年開発された HeLa/Fucci2 細胞はこのような状況を打破する画期的な技術といえる。Fucci2 は、G1 期に現れて S/G2/M 期に消失するあるタンパク質を赤色蛍光で標識し、逆に、S/G2/M 期に現れて G1 期に消失する別のタンパク質を緑色蛍光で標識する手法で、これが導入された細胞では、細胞周期の進行に伴い細胞が赤色から緑色に変化する。この細胞を用いれば、細胞周期を特定の段階で止める生物活性を検出できるため、細胞周期停止物質の探索に有用である。

2. 研究の目的

(1) HeLa/Fucci2 細胞を用いて、海洋生物から細胞周期を特定の段階で停止させる化合物の探索を行う。Fucci2 細胞が細胞周期の進行にしたがい発する蛍光は、タイムラプスイメージングにより観察する。タイムラプスイメージングを用いると、細胞周期の進行状況を細胞毎に経時的に観察できるため、多数の細胞それぞれに対して化合物が与える影響を観察することができる。蛍光の色調の変化と同時に細胞形態の変遷も観察できるため、複合的な作用を示す化合物の検出も可能となる。

(2) 天然物の探索研究では、粗抽出物を用いて生物活性スクリーニングを行うことが多い。しかし、粗抽出物には多数の化合物が含まれるため、望むべき活性物質が粗抽出物中にあったとしても、他の生物活性成分の影響(たとえば非選択的な細胞毒性を示す成分が混在する場合は細胞死)により、観察したい活性が検出できないことがある。粗抽出物を用いるスクリーニングに常に付随するこの種の障害を除くために、本研究では、スクリーニングに供する粗抽出物を予備分画し、分画物をスクリーニングに供することとする。

(3) このような生物試験系およびスクリーニング試料の調製法を用いて、海洋生物から細胞周期を特異的に止める作用を示し、抗がん剤の候補となり得る化合物を探索する。Fucci 細胞のタイムラプスイメージング観察とスクリーニング試料の予備分画を組

み合わせて探索研究を行う。

3. 研究の方法

(1) わが国沿岸の浅海および深海で採取した海産無脊椎動物の抽出物および海洋微生物の培養液ライブラリーおよそ 1000 検体を用いて、HeLa/Fucci2 細胞に対する作用をタイムラプスイメージングにより調べた。このスクリーニングで何らかの活性を示した試料を予備分画に付した。

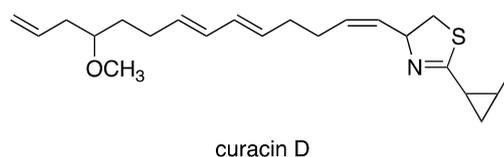
(2) 予備分画は、UHPLC システムを用いて一定の時間毎に分取し、およそ 80 の画分に分画し、マイクロプレート中に分取した。分取した試料はスピードバックを用いてそのまま減圧濃縮し、HeLa/Fucci2 細胞を用いた生物活性試験に供した。この試験で活性を示した試料から、活性成分を単離しその構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 沖縄県石垣島で採取したウデフリクモヒトデの抽出物が HeLa 細胞に対して非常に強い細胞毒性を示すことが判明した。活性成分は微量で不安定であったため、より簡便に生物活性が検定できる MTT 試験を用いて活性成分の追跡を行った。

試料をメタノールとクロロホルムで順次抽出し、得られた抽出液を減圧濃縮後溶媒分画に付したところ、クロロホルム画分に生物活性が濃縮された。これを ODS フラッシュクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、4 度の HPLC (1. ODS カラム/85% MeOH、2. Phenylhexyl カラム/85% MeOH、3. Phenylhexyl カラム/80% MeCN、4. π -nap カラム/60% MeCN) を用いる精製に付し、活性物質の curacin E を 0.2 mg 得た。

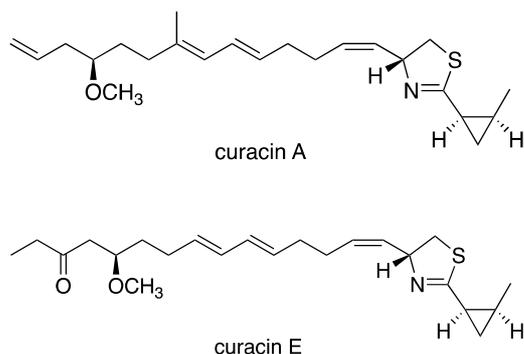
Curacin E の分子式は高分解能 ESIMS データから導き、分子中の 3 つの部分構造は二次元 NMR データ (COSY および HSQC) から明らかにした。これらの部分構造を用いてデータベースを検索したところ、シアノバクテリアが生産する微小管重合阻害物質の curacin 類とよく似ることが判明した。そこで、二次元 NMR の HMBC スペクトルを詳しく調べたところ、側鎖の末端部以外の構造は、既知化合物の curacin D とよく似ていることが判明した。



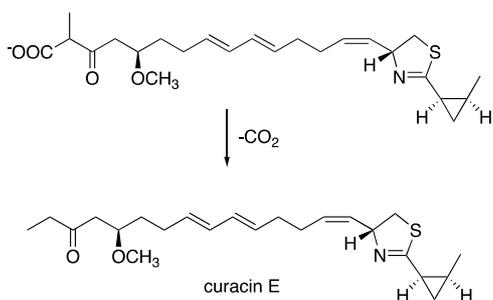
既知の curacin 類は末端部にビニル基が存在するのに対して、本化合物ではエチルケ

トン基が認められた。このようにして、curacin E の平面構造を決定することができた。なお、オレフィン水素が重なって観測されたため、分子中の二重結合の立体配置は ^{13}C NMR データを用いて決定した。

さらに、チアゾリジン環と 2 置換シクロプロパン環の相対配置は、 ^1H NMR データを合成標品のものと比べることにより決定した。最後に、チアゾリジン環の絶対配置は、絶対配置が確定している curacin A と同様なコットン効果が ECD スペクトルにおいて観測されることから決定した。



シアノバクテリア由来の既知の curacin 類の疎水性側鎖の末端はいずれもビニル基であるのに対して、curacin E はエチルケトンであり、どのようにしてエチルケトン基が生成するのか興味を持たれた。Curacin A の生合成中間体の構造を念頭に置き、末端から 3 番目の炭素がケト基であるためカルボキシル基が容易に脱離し、エチルケトンを生じるものとの生合成経路を提唱した。

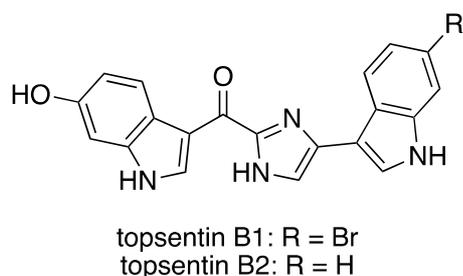


Curacin A はカリブ海のキュラソーで採取されたシアノバクテリアから発見された非常に強い細胞毒性を示すポリケチドとアミノ酸からなる化合物で、コルヒチンと同一の部位に結合して微小管の重合を阻害することが知られており、これが細胞毒性の作用機序と考えられている。Curacin E が非常に強い細胞毒性を示す理由として、末端のエチルケトン基の関与の可能性を検討した。すなわち、末端にエチルケトン基を有するアミノ酸を含む apicidin 類は、エチルケトン基を介してヒストンデアセチラ

ーゼと結合し、酵素阻害活性を示すことが知られる。そこで、curacin E のヒストンデアセチラーゼに対する阻害活性を調べた。部分構造から導かれた予想に反して、curacin E はヒストンデアセチラーゼである HDAC1、HDAC6 および SIRT1 に対して $50\ \mu\text{M}$ の濃度で阻害活性を示さなかった。すなわち、curacin E も curacin A などと同様に微小管の重合を阻害することにより顕著な細胞毒性を発現することが予想された。

様々な curacin A 類縁化合物がシアノバクテリアから発見されていることに加え、100 種類以上のアナログが化学合成により調製され、活性発現機序が報告されている。しかし、curacin E のように側鎖の末端にエチルケトン基が存在する化合物が調製された例はなく、合成化学者が考案できなかった化学構造をもつ化合物が、天然のクモヒトデに含まれる細胞毒性物質の主要成分として見いだされたことは、天然物の豊かな構造多様性を実証するもので、天然物の探索研究の重要性を改めて示している。

(2) 八丈島北方深海の黒瀬において採取したカイメン *Lipastrotethya* sp. の抽出物が特定の細胞周期を標的とすることなく Fucci2/HeLa 細胞の増殖を停止させた。試料を EtOH および $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:1) で順次抽出し、抽出液を減圧濃縮した。得られた抽出物を水と EtOAc を用いて二相分配に付し、EtOAc 画分を ODS フラッシュクロマトグラフィーおよび HPLC (ODS カラム/65% MeOH, 0.5% AcOH) を用いて順次生成し、既知化合物の topsentin B1 および topsentin B2 に加えて、新規細胞毒性物質の dragmacidin G および dragmacidin H を得た。

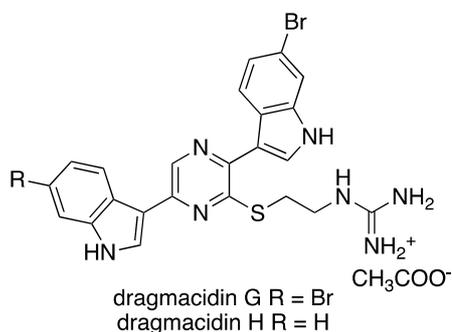


Dragmacidin G の分子式は高分解能 ESIMS から導かれ、分子イオンピークの同位体イオンの強度比から 2 つの臭素原子の存在が示された。390 nm に紫外外部吸収を示すことから、芳香環の存在が示唆された。二次元 NMR データ (COSY、HSQC および HMBC) の解析から、3 位と 6 位が置換されたインドール環が 2 つ存在し、炭素シグナルのケミカルシフト値から、いずれも 6 位が臭素原子で置換されることが判明した。ケミカルシフト値とカップリング定数

を解析することにより両端がヘテロ原子で置換されたエチレン基の存在が示され、HMBC スペクトルにおいて片方のメチレン水素が 156.9 ppm の炭素と相関を示すことから、グアニジル基が結合するものと予想された。

残された部分の組成は C₄H₄N₂S で、NMR データの解析から硫黄原子で置換されたピラジン環またはピリミジン環の存在が予想された。いずれの複素環を含むかを ¹H あるいは ¹³C NMR データから予想することは困難であったため、窒素原子の存在に着目し、¹H-¹⁵N HMBC データを測定した。スペクトルを解析した結果、ピラジン環を含むことが判明した。分子式を満たすために、グアニジノエチル基とピラジン環が硫黄原子を介して結合することとした。

Dragmacidin H は dragmacidin G 中の臭素原子のいずれかが水素で置換された構造を取ることが、質量分析と NMR データの解析から導かれた。両者の二次元 NMR データを比較することにより、dragmacidin H の構造を決定した。



(3) 宮古島近海の宮古曾根で採取した未同定種カイメン (S09-1061-2) の抽出液が HeLa/Fucci2 細胞の増殖を停止させたため、分画後に試験を繰り返したところ、2つの成分が G2/S 期で細胞周期を止めることが判明した。活性成分の単離に成功し、構造研究は現在進行中である。

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2件)

(1) Ueoka, R.; Hitora, Y.; Ito, A.; Yoshida, M.; Okada, S.; Takada, K.; Matsunaga, S.: Curacin E from the brittle star *Ophiocoma scolopendrina*. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 2754-2757. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00701 (査読有り)

(2) Hitora, Y.; Takada, K.; Ise, Y.; Okada, S.; Matsunaga, S.: Dragmacidins G and H, Bisindole Alkaloids Tethered by a Guanidino

Ethylthiopyrazine Moiety, from a *Lipastrotethya* sp. Marine Sponge. *J. Nat. Prod.* 2016, 79, 2973-2976. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00710 (査読有り)

[学会発表](計2件)

(1) 上岡麗子他6名、石垣島川平産ウデフリクモヒトデ由来の細胞毒性物質、平成29年度日本水産学会春季大会、2017年3月28日、東京海洋大学(東京都)

(2) 人羅勇気他4名、細胞毒性ビスインドールアルカロイド dragmacidin G および H の単離と構造決定、平成29年度日本水産学会春季大会、2017年3月27日、東京海洋大学(東京都)

[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

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()