

平成21年5月29日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005年度～2008年度
 課題番号：17390031
 研究課題名（和文） 細胞のストレス応答を制御する微生物代謝産物の探索
 研究課題名（英文） Screening for microbial metabolites that regulate cellular stress response
 研究代表者
 早川 洋一
 東京理科大学・薬学部・教授
 研究者番号：20208606

研究成果の概要：

微生物由来の細胞ストレス応答制御物質を探索した結果、土壌放線菌から versipelostatin、thioviridamide、海洋放線菌から piericidin C₇ および C₈、海洋糸状菌から efrageptin J を単離し、その構造を決定した。Versipelostatin、efrapeptin J は小胞体ストレスを抑制する分子シャペロン GRP78 の発現を阻害し、小胞体ストレス下でがん細胞に対して選択的細胞死を誘導した。Thioviridamide は、細胞ストレス感受性を上昇させるアデノウイルス E1A がん遺伝子を導入した細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導した。Piericidin C₇ および C₈ は、呼吸阻害剤 oligomycin によるストレス下で、がん細胞に対して選択的に細胞死を誘導した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,500,000	0	8,500,000
2006年度	2,200,000	0	2,200,000
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	15,100,000	1,320,000	16,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：小胞体ストレス、分子シャペロン、GRP78、アデノウイルスがん遺伝子、versipelostatin、piericidin、efrapeptin、thioviridamide

1. 研究開始当初の背景

細胞は生体内において様々なストレス環境に曝されており、ストレスに対する細胞応答もまた様々である。代表的なストレス応答としてアポトーシス誘導が知られているが、分子シャペロンや抗酸化酵素などの発現を介して細胞死を抑制するのも典型的なストレス応答である。このように、ストレス応答は細胞の生死のバランスを制御し、生体のホメオスタシスを保つために重要な役割を果

たしている。したがって、ストレス応答制御系の破綻は種々の疾患の発症に繋がると考えられる。

たとえば、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の高発現は濾胞性リンパ腫などのがん化を誘発することが知られている。逆に、アデノウイルス E1A などのがん遺伝子は、細胞のストレス感受性を上昇させる。また、血管系の構築が不十分な環境下で増殖する固形がん細胞では、低酸素ストレスに応答する HIF-1 α

や低グルコースストレスに応答する分子シャペロン GRP78 が発現上昇し、細胞死が抑制されている。GRP78 は抗がん剤耐性にも関与すると報告されている。

細胞のストレス応答低下に起因する疾患も少なくない。活性酸素の消去酵素 SOD の遺伝子変異は筋萎縮性側索硬化症の原因となる。また、家族性アルツハイマー病の原因遺伝子 presenilin 1 の変異は小胞体ストレスに応答する GRP78 の発現を低下させ、神経細胞を脆弱化することが知られている。

このようなストレス応答関連疾患の中で、がんとアルツハイマー病は患者数も多く、その難治性が大きな問題となっている。初期の固形がんに対しては手術療法が有効とされているが、進行がんに対しては有効な治療法はほとんどなく、新しい固形がん治療薬の開発が強く望まれている。アルツハイマー病は老年期認知症の原因の多くを占めているが、アルツハイマー型認知症に関しては有効な治療法がなく、抗アルツハイマー薬の開発が期待されている。

がんやアルツハイマー病のような細胞のストレス応答異常に起因する疾患に対しては、細胞のストレス応答を正常化するような物質が新しい治療薬になりうると考えられる。また、細胞のストレス応答を積極的に制御する化合物には、がん細胞に対するアポトーシス誘導活性や、神経細胞に対する細胞死抑制活性が期待され、抗がん剤や神経疾患治療薬として利用できる可能性がある。このような背景に基づいて本研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞ストレス抑制因子として分子シャペロン GRP78、細胞ストレス亢進因子としてアデノウイルス E1A がん遺伝子、細胞ストレス負荷因子として呼吸阻害剤に着目し、細胞のストレス応答を制御する物質の探索を試みた。すなわち、固形がん細胞において GRP78 の発現を低下させる物質、神経細胞において GRP78 の発現を上昇させる物質、アデノウイルス E1A がん遺伝子導入細胞に対して選択的にアポトーシスを誘導する物質、呼吸阻害剤によるストレス下でがん細胞に対して選択的に細胞死を誘導する物質を微生物代謝産物より探索し、新しいがん治療薬や神経疾患治療薬の発見をめざした。また、得られた化合物の構造を解明し、細胞ストレス応答制御物質の化学的特性を明らかにするとともに、得られた活性物質の作用を解析することにより、がん細胞や神経細胞に特異的なストレス応答制御機構を解明することをも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微生物の分離・同定

土壌および海洋試料より放線菌、糸状菌、細菌を分離し、凍結保存した。これらの菌株の培養抽出物を探索の対象として使用した。また、スクリーニングで活性を示した菌株については種の同定を行った。

(2) GRP78 発現制御物質の探索

GRP78 遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したプラスミドで形質転換した HT1080 ヒト線維肉腫細胞 (HT1080 G-L) を用い、2-デオキシグルコースによる小胞体ストレスに応答して発現上昇するルシフェラーゼの活性を発光法により検出した。小胞体ストレス下でルシフェラーゼ活性を有意に低下させ、細胞毒性の観察されないものを GRP78 発現抑制物質として選択した。また、小胞体ストレス非存在下でルシフェラーゼ活性を有意に上昇させるものを GRP78 発現誘導物質として選択した。

(3) E1A がん遺伝子導入細胞に対する選択的アポトーシスを誘導する物質の探索

ラット胎児大脳皮質より調製した初代培養グリア細胞にアデノウイルス E1A 遺伝子を導入することにより得られた RG-E1A-7 細胞を用い、ラット正常線維芽細胞と比較して選択的にアポトーシスを誘導する物質を探索した。

(4) 呼吸阻害剤存在下でがん細胞に対して選択的に細胞死を誘導する物質の探索

呼吸阻害剤 oligomycin に感受性の RG-E1A-7 細胞から得られた oligomycin 耐性細胞 RG-E1A-R10 を固形がん細胞のモデルとした。RG-E1A-R10 細胞を oligomycin 存在下および非存在下で培養し、oligomycin 存在下の RG-E1A-R10 細胞に対して選択的細胞死を誘導する物質を探索した。

(5) 活性物質の単離・精製

探索系において活性を示した菌株は大量培養し、培養物から抽出および各種クロマトグラフィー操作を組み合わせることにより活性物質を精製した。さらに、単離した化合物が目的の活性を有していることをバイオアッセイで確認した。

(6) 活性物質の構造解析

得られた活性物質について、MS、NMR などの機器分析により化学構造を解析した。新規化合物であることが判明した場合は、二次元 NMR を中心とした詳細な構造解析を行い、平面構造決定を試みた。また、必要に応じて分解実験を行い、構造を確認した。得られた活性物質のうち新規骨格を有する化合物については、NOE やスピン結合定数を利用した NMR 的手法や化学合成などを適用することにより立体構造を解析した。

(7) 活性物質の生物作用解析

GRP78 発現抑制物質については、各種培養がん細胞を用いて、ストレス環境下および通常培養における抗腫瘍活性を測定した。また、

各種小胞体ストレスに対する反応の選択性を調べた。さらに、抗がん剤耐性の克服作用があるかどうか検討した。得られた化合物が活性を示す状況において、細胞のストレス応答パラメーターを解析した。すなわち、ストレス応答経路として知られている MAPK 経路の活性化状態、GRP78 や HSP70 をはじめとする分子シャペロンの発現などをウエスタンブロットにより解析した。また、GRP78 の転写制御に関わる IRE1 α のリン酸化、ATF6 のプロセッシング、XBP1 のスプライシング状態などを解析した。

4. 研究成果

(1) GRP78 発現抑制物質 versipelostatin

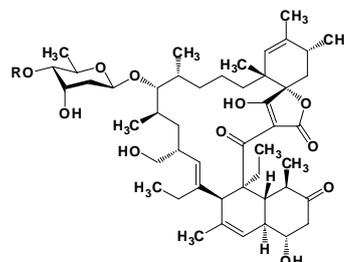
土壌放線菌 *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株の培養液中に GRP78 転写抑制活性を見だし、酢酸エチル抽出物から活性主成分として versipelostatin (VST) を単離した。VST アグリコンの絶対立体配置は、結合している digitoxose (Dig) の絶対立体配置を元に、NMR における NOE とスピン結合定数を利用した解析により図のように決定した。糖鎖部分は、メタノリシスにより得られたメチルグリコシドの比旋光度から、 $-\beta$ -D-Dig- α -D-Ole- β -D-Dig (Ole = oleandrose) であると考えられた。しかし、天然アグリコンに合成糖鎖を結合した化合物は、元の天然体と比較して5倍以上活性が減弱していた。一方、 $-\beta$ -D-Dig- α -L-Ole- β -D-Dig 糖鎖を付加したアグリコンは天然体とほぼ同等の活性を示したことから、VST の糖鎖は $-\beta$ -D-Dig- α -L-Ole- β -D-Dig であることが明らかになり、糖鎖が活性発現に重要な役割を担うことが判明した。

さらに、VST 生産菌の代謝産物を詳細に解析した結果、5種類のVST類縁体の単離に成功した。これらの化合物のアグリコン部分は、各種NMR解析によりVSTと同じく α -アシルテトロン酸を含む17員環構造からなることが明らかになった。次にこれらの化合物について、糖鎖部分について解析を行った。各化合物について、 ^1H NMRのスピン結合定数を解析した結果、VST BおよびCは、それぞれ、図に示す3糖からなる糖鎖を有することが判明した。また、VST DおよびEは、それぞれ2糖からなる糖鎖を有することが明らかになった。さらに、VST Fは、2番目の糖としてoleandroseの代わりに、2位に水酸基が置換したacofriose (3-O-methylrhamnose) が結合していると決定した。

これらのVST類縁体について、HT1080 G-L細胞を用いて、2-デオキシグルコースによるGRP78プロモーターの活性化をルシフェラーゼレポーターで検出し、GRP78発現誘導阻害活性を測定した。その結果、VST FはVSTと比較して約10倍強力な活性を示した。この

ことから、2番目の糖が活性発現に重要な役割を担うことが示された。VST Fはマウス担癌モデルにおいて、シスプラチンとの併用により高い抗腫瘍活性を示したことから、本化合物について開発を進めている。

また、VSTの活性発現機構について解析した結果、小胞体ストレスシグナル伝達経路のうち、ATF6の活性化には影響を与えず、XBP1のスプライシングとATF4の発現を阻害することが明らかになった。



VST類縁体の構造とGRP78発現誘導阻害活性

Compound	R	IC ₅₀ (μM)
VST	$-\alpha$ -oleandrose ⁴ - β -digitoxose	4.0
VST B	$-\alpha$ -oleandrose ⁴ - α -digitoxose	7.8
VST C	$-\beta$ -digitoxose ⁴ - β -digitoxose	17.6
VST D	$-\alpha$ -oleandrose	4.3
VST E	$-\beta$ -digitoxose	> 20
VST F	$-\alpha$ -acofriose ⁴ - β -digitoxose	0.3

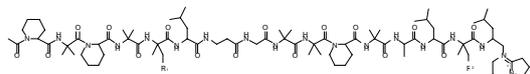
(2) GRP78 発現抑制物質 efrageptin J

海洋性真菌 *Tolypocladium* sp. AMB18 株の培養抽出物中に GRP78 転写抑制活性を見出した。菌体セトン抽出物を酢酸エチルで抽出し、シリカゲルカラム、ODS-HPLC を行うことにより、活性物質として、ペプチド系抗生物質 efrageptin F および G とともに新規誘導体 efrageptin J を単離した。

Efrageptin J の分子式は高分解能 FAB マスペクトルより $\text{C}_{81}\text{H}_{139}\text{N}_{18}\text{O}_{16}^+$ と決定した。COSY および HMBC スペクトル解析により、7 残基の α -アミノイソ酪酸 (Aib)、3 残基のピペコリン酸 (Pip)、2 残基のロイシン (Leu)、各 1 残基ずつのグリシン (Gly)、アラニン (Ala)、 β -アラニン (β -Ala) とともに環状アミノニウム構造を含むアミンの存在が明らかになった。また、Ac-Pip、Aib-Pip、Aib-Leu- β -Ala-Gly、Aib-Pip、Ala-Leu の繋がりも判明した。さらに、FAB マスペクトルにおいて C 末端のアミノニウムイオンを含む各種フラグメントピークが観測され、開裂箇所を N 末端から順に帰属することにより、アミノ酸配列を明らかにした。その結果、Efrageptin J は図に示すような末端アミノニウム構造を有する直鎖ペプチドであることが判明した。

Efrageptin J は HT1080 G-L 細胞における 2-デオキシグルコースによるルシフェラーゼ産生を濃度依存的に阻害し、その IC₅₀ は 18

nMであった。また、同条件でウエスタンブロットにより検出されるGRP78の発現を顕著に抑制した。さらに、Efrageptin Jは、2-デオキシグルコース存在下でHT1080細胞の選択的細胞死を誘導した。



Efrageptin J $R_1 = H, R_2 = H$
 Efrageptin F $R_1 = H, R_2 = CH_3$
 Efrageptin G $R_1 = CH_3, R_2 = CH_3$

(3) E1A がん遺伝子導入細胞に対する選択的アポトーシス誘導物質 thioviridamide

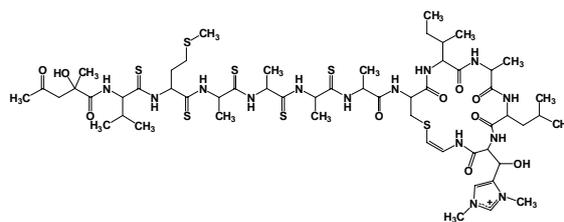
土壌分離菌 *Streptomyces olivoviridis* 3269-SS3 株の培養抽出物中に、E1A がん遺伝子導入細胞に対する選択的アポトーシス誘導活性を見いだした。菌体アセトン抽出物を pH5 で酢酸エチル抽出し、シリカゲルカラムで分画後、5 mM クエン酸二ナトリウムを含む 85%メタノールを展開溶媒とした ODS-HPLC で精製した。得られた活性フラクションを酢酸エチルで抽出し、0.01M 塩酸で洗浄後、濃縮することにより、thioviridamide を単離した。

本化合物の分子式は、高分解能FAB-MSにより、 $C_{56}H_{93}N_{14}O_{10}S_7^+$ と決定した。赤外吸収スペクトルにおいて、アミドに由来する強い吸収が観測され、アミノ酸分析の結果、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシンが検出されたことから、thioviridamideはペプチド系化合物であることが示唆された。COSYおよびHMBCスペクトル解析により、2残基のアラニン、各1残基ずつのロイシン、イソロイシンに加えて、3つのアラニン様構造、各1つずつのバリン様構造、メチオニン様構造が確認された。これらのカルボニル基に相当する炭素は、その化学シフトから、アミド結合ではなく、チオアミド結合していることが示された。アミノ酸分析ではメチオニンは検出されなかったが、 ^{13}C 化学シフトがメチオニンの化学シフトによく一致することから、この部分構造を決定した。さらに、新規アミノ酸である β -hydroxy- N^1, N^3 -dimethylhistidinium 残基、*S*-(2-aminovinyl) cysteine 残基の存在が明らかになった。また、末端に 2-hydroxy-2-methyl-4-oxopentanoyl 基がエステル結合していることが判明した。

α -メチンプロトンから隣接するカルボニル炭素またはチオカルボニル炭素への遠距離スピン結合に基づいて、アミノ酸配列を決定した。一部のアラニン残基の α -メチンプロトンの化学シフトは完全に同じであり、通常の HMBC スペクトルでは識別できなかったが、 α -メチンプロトンの磁化をメチルに

移動させて遠距離スピン結合を観測する HMBC-HOHAHA スペクトルを測定することにより、両者を識別することができた。なお、接近した化学シフトはコンスタントタイム HMBC を測定することにより識別した。以上の解析から、thioviridamide はアシル基および 6 アミノ酸残基から構成される直鎖ユニットと、5 アミノ酸残基から構成される環状ユニットから構成されることが判明した。NMR において、両ユニット間に相関は観測されなかったが、thioviridamide はニンヒドリン反応陰性であり、遊離のアミノ基は存在しないことが示されているため、両ユニットはアミド結合していると決定し、図に示すような thioviridamide の平面構造が明らかになった。Thioviridamide は、分子中に新規アミノ酸 2 分子を含むペプチド化合物であり、直鎖部分に多数のチオアミド結合を有する極めてユニークな微生物代謝産物であった。

ラット正常線維芽細胞 3Y1 および形質転換 3Y1 細胞を用いて、thioviridamide の活性を検討した結果、本化合物はアデノウイルス E1A がん遺伝子を有する 2 種の細胞に対して低濃度でアポトーシスを誘導し、特にアデノウイルス 12 型で形質転換した Ad12-3Y1 細胞は高い感受性を示した (IC_{50} 3.9 ng/ml)。



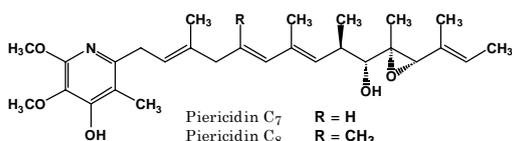
(4) 呼吸阻害剤存在下がん細胞に対する選択的細胞死誘導物質 piericidin C_7 および C_8

海洋放線菌 *Streptomyces* sp. YM14-060 株の培養抽出物に目的の活性を見だし、本菌株から piericidin ファミリーに属する新規化合物 piericidin C_7 および C_8 を単離した。

Piericidin C_7 、 C_8 の分子式は、高分解能 FAB マススペクトルより、それぞれ $C_{25}H_{41}NO_5$ 、 $C_{29}H_{43}NO_5$ と決定した。COSY スペクトル解析により得られた部分構造を HMBC スペクトル解析により結合し、piericidin C_8 の側鎖構造が明らかになった。残った構造中には、5 個の sp^2 炭素と 1 個の窒素原子が存在することから、ピリジン環の存在が示唆され、HMBC により側鎖構造とピリジン環上の置換基の結合位置が判明した。オレフィン部分の幾何異性はアリルメチル炭素の化学シフト値と NOE 解析により、すべて *E* 配置であることが明らかになり、piericidin C_8 の平面構造を決定した。さらに、スピン結合定数と NOE 解析により、すべての相対立体配置を明らかにした。同様にして piericidin C_7 の構造を図のように決

定した。

これらの化合物の活性を測定した結果、piericidin C₇、C₈は呼吸阻害剤oligomycin存在下で、RG-E1A-R10細胞に対して選択的細胞死を誘導し、そのIC₅₀はそれぞれ3.6 nM、1.7 nMであった。一方、oligomycin非存在下では0.5 nM以上で細胞増殖を40~60%程度抑制したが、細胞死は誘導しなかった。また、piericidin C₇、C₈はoligomycin感受性のRG-E1A-7細胞に対して細胞死を誘導し、同じくoligomycin感受性のNeuro-2aマウス神経芽細胞腫細胞に対して増殖抑制作用を示したが、oligomycin耐性のC6細胞、3Y1細胞に対しては活性が認められなかった。



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 12 件)

1. Ishigami, K., Katsuta, R., Shibata, C., Hayakawa, Y., Watanabe, H., Kitahara, T.: Synthesis and structure revision of tyroscherin, and bioactivities of its stereoisomers against IGF-1-dependent tumor cells. *Tetrahedron*, 65, 3629-3638 (2009) 査読有
2. Murakami, R., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kozono, I., Takagi, M., Shin-ya, K., Seto, H., Hayakawa, Y.: Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix* sp. AJ9571. *J. Antibiot.*, 62, 123-127 (2009) 査読有
3. Koyama, N., Inoue, Y., Sekine, M., Hayakawa, Y., Homma, H., Omura, S., Tomoda H.: Relative and absolute stereochemistry of quinadoline B, an inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages. *Org. Lett.*, 10, 5273-5276 (2008) 査読有
4. Kawasaki, T., Sakurai, F., Hayakawa, Y.: A prodigiosin from the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*. *J. Nat. Prod.*, 71, 1265-1267 (2008) 査読有
5. Hayakawa, Y., Hattori, Y., Kawasaki, T., Kanoh, K., Adachi, K., Shizuri, Y., Shin-ya, K.: Efraeptin J, a new down-regulator of the molecular chaperone GRP78 from a marine *Tolypocladium* sp. *J. Antibiot.*, 61, 365-371 (2008) 査読有
6. Mori, T., Yamashita, T., Furihata, K., Nagai, K., Suzuki, K., Hayakawa, Y.,

Shin-ya, K.: Burkholone, a new cytotoxic antibiotic against IGF-I dependent cells from *Burkholderia* sp. *J. Antibiot.*, 60, 713-716 (2007) 査読有

7. Park, H.-R., Chijiwa, S., Furihata, K., Hayakawa, Y., Shin-ya, K.: Relative and absolute configuration of versipelostatin, a down-regulator of molecular chaperone GRP78 expression. *Org. Lett.*, 9, 1457-1460 (2007) 査読有

8. Hayakawa, Y., Shirasaki, S., Kawasaki, T., Matsuo, Y., Adachi, K., Shizuri, Y.: Structures of new cytotoxic antibiotics, piericidins C₇ and C₈. *J. Antibiot.*, 60, 201-203 (2007) 査読有

9. Hayakawa, Y., Shirasaki, S., Shiba, S., Kawasaki, T., Matsuo, Y., Adachi, K., Shizuri, Y.: Piericidins C₇ and C₈, new cytotoxic antibiotics produced by a marine *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 60, 196-200 (2007) 査読有

10. Hayakawa, Y., Sasaki, K., Nagai, K., Shin-ya, K., Furihata, K.: Structure of thioviridamide, a novel apoptosis inducer from *Streptomyces olivoviridis*. *J. Antibiot.*, 59, 6-10 (2006) 査読有

11. Hayakawa, Y., Sasaki, K., Adachi, H., Furihata, K., Nagai, K., Shin-ya, K.: Thioviridamide, a novel apoptosis inducer in transformed cells from *Streptomyces olivoviridis*. *J. Antibiot.*, 59, 1-5 (2006) 査読有

12. Shin-ya, K., Umeda, Y., Chijiwa, S., Furihata, K., Furihata, K., Hayakawa, Y., Seto, H.: Mevashuntin, a novel metabolite produced by inhibition of the mevalonate pathway in *Streptomyces prunicolor*. *Tetrahedron Lett.*, 46, 1273-1276 (2005) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 長塚俊弥、川崎崇、早川洋一: *Streptomyces griseoviridis*の新規代謝産物 Dechloroseophilin 日本薬学会 2009年3月

2. 勝田亮、柴田智恵、石神健、早川洋一、渡邊秀典、北原武: IGF-1 依存性がん細胞に対し選択的増殖抑制活性を示すTyroscherinの合成と構造訂正 日本農芸化学会 2009年3月

3. 櫻井英美、平島麗子、川崎崇、早川洋一: Roseophilin生産菌が生産する新規 Prodigiosin 日本薬学会 2008年3月

4. 服部優希、川崎崇、加納周雄、足立恭子、志津里芳一、早川洋一: GRP78 転写抑制物質 Efraeptin Hの研究 日本薬学会 2008年3月

5. 白崎進吾、柴沙香、川崎崇、松尾嘉英、早川洋一：海洋放線菌が生産する新規 piericidin類の研究 日本薬学会 2007年3月

6. 早川洋一、佐々木佳穂里、足立久、新家一男、降旗一夫、永井浩二：アデノウイルス癌遺伝子導入細胞に対して選択的アポトーシスを誘導する thioviridamideの研究 日本農芸化学会 2006年3月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA YOICHI)
東京理科大学・薬学部・教授
研究者番号：20208606

(2) 研究分担者

新家 一男 (SHIN-YA KAZUO)
産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター・主任研究員
研究者番号：20251481
川崎 崇 (KAWASAKI TAKASHI)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：00408733

(3) 連携研究者

新家 一男 (SHIN-YA KAZUO)
産業技術総合研究所・生物情報解析研究センター・主任研究員
研究者番号：20251481
川崎 崇 (KAWASAKI TAKASHI)
東京理科大学・薬学部・助教
研究者番号：00408733