

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04646

研究課題名(和文) タイにおける薬用資源の調査研究

研究課題名(英文) Research on the medicinal resources in Thailand

研究代表者

塚本 佐知子 (Tsukamoto, Sachiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・教授

研究者番号：40192190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまで本研究代表者は、長年、生物資源の種類や量が豊富なインドネシアにおいて薬用天然資源の調査研究を行ってきた。そして、熊本大学の研究室において、採集した海洋生物、微生物および植物の抽出物を用いて各種生物活性試験を行い、多くの新規生物活性物質の発見に成功した。本研究では、インドネシアとは気候の異なるタイで薬用天然資源の調査研究を行った。そして、植物内生菌を307種類単離し、培養エキスをを用いて生物活性をスクリーニングした。現在、2種類の真菌の共培養により生成した新規物質、細胞内タンパク質の分解を阻害する物質、ならびに破骨細胞の分化・融合を抑制する物質の構造決定を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

古来、人類は、薬用植物などの天然資源を医薬品として活用してきた。現在、世界中で用いられている医薬品の50%は天然物そのもの、あるいは関連化合物である。したがって、創薬研究における天然資源の果たす割合は極めて大きい。そして、世界的に製薬企業が天然資源を基盤とする創薬研究から撤退している現状において、アカデミア研究者が果たす役割は非常に大きいと言える。本研究では、タイの植物内生菌から、ユビキチン-プロテアソームシステムに対する阻害物質、および破骨細胞の分化・融合を抑制する物質を単離することができた。それぞれ、がん、および骨粗鬆症の治療薬シーズと考えられるので、本研究成果の社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have studied the medicinal resources in Indonesia for a long time and discovered many new biologically active compounds from marine organisms, microorganisms and medicinal plants. In this study, we studied the medicinal resources in Thailand and isolated 307 endophytic fungi. We screened the biological activities of the fungal extracts. Now we perform the purification and structure elucidation of new metabolites produced through co-culture of two fungi, inhibitors of degradation of cellular proteins, and inhibitors of differentiation and cell fusion in the osteoclastogenesis.

研究分野：天然物化学

キーワード：調査研究 薬用天然資源 医薬シーズ タイ

1. 研究開始当初の背景

近代的な医薬品が開発される以前から、人類は、薬用植物などの天然資源を医薬品として活用してきた。現在、世界中で用いられている医薬品の 50%は天然物そのもの、その誘導体、あるいは天然物の構造にヒントを得た化合物であると言われていた (Newman DJ *et al.*, *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 770-803)。そして、その中でもがん治療薬における天然物の割合は 60%をしめることから、創薬研究での天然資源の果たす割合は極めて大きい。そして、世界的に製薬企業が天然資源を基盤とする創薬研究から撤退している現状において、アカデミア研究者が果たす役割は非常に大きいと言える。

天然資源に由来する医薬品の多くは、漢方薬あるいは抗生物質として知られているように、従来は植物や微生物から開発されたものが多かった。しかし、近年、海洋生物に由来する化合物の中からも医薬品として認可され、さらに臨床試験が行われる化合物も多く出てきている。そして、海洋生物の場合は、体内に共生・共存している微生物が宿主の生存に役立つような化合物を生成していることも明らかにされた (Newman DJ, *Front. Microbiol.* 2016, 7, 1832)。医薬シーズが植物や海洋生物の場合、シーズとなる化合物を得るためには植物を採集したり、あるいは栽培する必要がある。また、海洋生物の場合は採集する必要がある。その一方で、資源が微生物の場合には必要な時に必要な量を培養により入手できる利点がある。このような天然資源それぞれが有する特性を比較すると、生物に共生・共存する微生物が含有する生物活性物質は、学術的にも医薬品シーズの探索源としても非常に興味深い。

2. 研究の目的

本研究代表者は、優れた創薬候補の発見には「質の高い天然資源」と「優れた評価系」の両方が必要であると考えている。そこで、「質の高い天然資源」を収集するため、科研費基盤研究 (B) (海外学術調査) の支援により、平成 18 年度から 12 回、生物資源の種類や量が豊富なインドネシアにおいて薬用天然資源の調査研究を行ってきた。そして、研究室において、採集した海洋生物、微生物および植物の抽出物を用いて各種生物活性試験を行い、多くの新規生物活性物質を発見することに成功した。これまでの研究成果は 39 報の原著論文で報告し、さらに現在 2 報を執筆中である。そこで本研究では、インドネシアとは気候の異なるタイで薬用天然資源の調査研究を行うことにより、インドネシアの生物資源とは異なる新規医薬品シーズを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タイでの天然資源の採集

2017 年度には、共同研究者である Dr. Pattaravadee Srikoon [ブラパ大学 (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Burapha University, Chonburi)] とともに、タイ南部にある Kung Krabean Bay Mangrove Nature Study Centre 内のマングローブ林において調査研究を行なった。マングローブとは、熱帯および亜熱帯地域において、海水と淡水が混ざり合う汽水域において群落を形成する植物の総称である。Kung Krabean 湾の海岸線には、タイで最も肥沃なマングローブ林が広がっている。

2018 年度には、共同研究者である Dr. Supanimit Teekachunhatean [チェンマイ大学 (Faculty of Medicine, Chiang Mai University)] の協力のもとに、タイ北部のテーサバーンナコーン・チェンマイ地区の山中に位置するシリキット王妃植物園 (Queen Sirikit Botanic Garden) で薬用資源の調査研究を行なった。この植物園では、高低差のある広大な敷地に世界中から集められた多くの珍しい植物が展示されている。

熊本大学の研究代表者の研究室において、採集した植物片を寒天培地に乗せ、その周辺に生えてくる菌を単離し、合計 307 種類の植物内生菌の取得に成功した。

(2) スクリーニング

本研究代表者の研究室では、2003 年にプロテアソーム阻害物質 bortezomib が多発性骨髄腫治療薬として認可される以前から、ユビキチン-プロテアソームシステムの全体ががん治療薬の新規標的になり得ると考え、プロテアソーム、E1、Ubc13 (E2)-Uev1A 結合、p53-Hdm2 (E3) 結合、USP7 の各ステップに対する阻害作用を評価する系を確立し、海綿などの海洋生物、海洋由来真菌などから、数多くの阻害物質を単離し構造決定した (次頁の図 1) (Tsukamoto S, *Chem. Pharm. Bull.* 2016, 64, 112-118)。そして、単離した化合物を用いて、生合成 (Katsuki A *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 2018, 26, 1869-1874) や作用機構に関する研究へと展開してきた。本研究でも、当該研究室においてユビキチン-プロテアソームシステムの各ステップに対する阻害作用の評価を継続するとともに、細胞増殖抑制、細胞周期阻害作用、破骨細胞分化抑制作用 (骨粗鬆症治療薬シーズ探索)、薬剤耐性菌に対する抗菌作用などの評価を行なった。また、熊本大学薬学部の共同研究者により、抗 HIV 活性、潜伏感染 HIV の産生活性化作用 (細胞内に潜伏感染した HIV を活性化させることにより抗 HIV 薬で根治することが可能となる)、IV 型コラーゲン 3 量体形成促進作用 (遺伝性慢性腎臓病であるアルポート症候群治療薬シーズとなる)、アミロイドシス回復作用 (遺伝性難治性神経疾患であるトランスサイレチン型家族性アミロイドニューロパチー、およびアルツハイマー型認知症の治療薬シーズとなる) についても評価を行なった。

また、新規化合物を探索するため、生物活性スクリーニングと並行して、エキスを LCMS 分析しデータベース未記載のイオンピークが存在するかどうかを調べた。

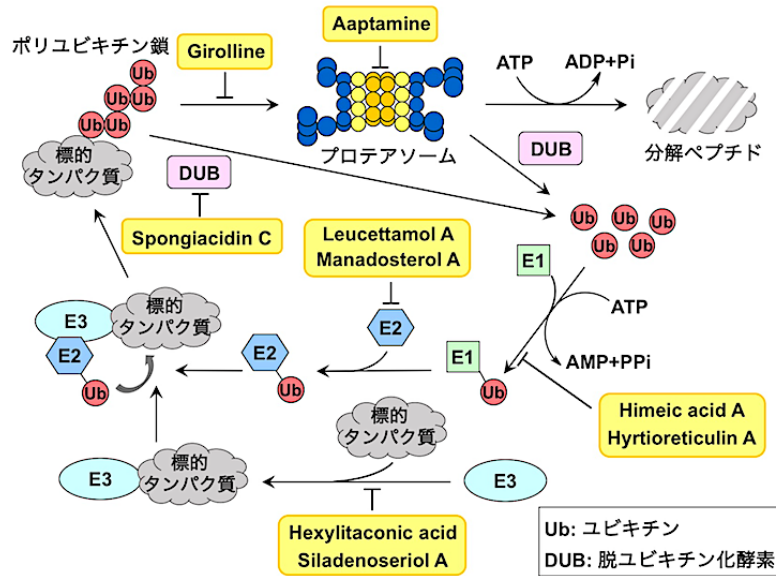


図1. ユビキチン-プロテアソームシステムとこれまでに当該研究室で発見した阻害物質

(3) 活性化合物の精製

上記(2)で示したスクリーニングによりヒットとなった真菌を培養し、エキスから活性物質をカラムクロマトグラフィーや HPLC により精製した。構造決定は、NMR スペクトルなどの各種スペクトル、計算化学、および化学反応により検討した。

4. 研究成果

(1) 共培養による新規物質の生産について

近年の遺伝子解析技術の進歩とともに、微生物において様々な化合物を生合成する遺伝子の多くは休眠していることが明らかになった (Scherlach K *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* 2009, 7, 1753-1760)。そこで、世界中で休眠遺伝子を活性化させることにより新たな物質の取得を試みる研究が活発に行われている (Moon K *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2019, 58, 5973-5977; Katz M *et al.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 43, 129-141)。そして、本研究代表者も 2 種類の真菌を一緒に培養する共培養により、新たな物質の取得を行っている (図 2) (Sadahiro Y *et al.*, *J. Nat. Prod.* 2020, 83, 1368-1373; Murakami S *et al.*, *J. Nat. Med.* 2020, 74, 545-549)。

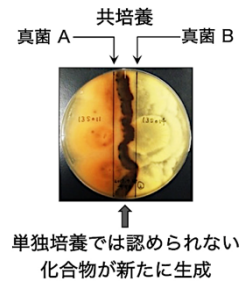


図2. 2種類の真菌の共培養

タイ産の植物から単離した 2 種類の真菌を寒天培地上で共培養したところ、接触面が褐色に変化した。そして、接触している部分を抽出して LCMS 解析したところ、それぞれの真菌を単独で培養した場合には生成していない成分の存在が認められた。そこで、新たに生成した成分の構造を調べるため、大量に共培養して得たエキスから目的の化合物を精製し構造決定している。

(2) 細胞内タンパク質の分解を阻害する物質

ユビキチン-プロテアソームシステムのいずれかのステップが阻害されると、細胞内にタンパク質が蓄積する。HIF1 α の酸素依存的分解ドメイン (oxygen-dependent degradation domain of HIF1 α , ODD) は、ユビキチン依存的にプロテアソームにより分解されることが知られている。そこで、ODD とルシフェラーゼの融合タンパク質 (ODD-Luc) (図 3) を安定発現させた細胞 (Chou TF *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2011, 286, 16546-16554) を用いて、真菌エキス存在下でハイスループットスクリーニングを行った。その結果、2 種類のエキスが阻害活性を示したので、化合物を精製し構造決定した。得られた 2 種類の新規化合物の構造と活性について、現在、論文を執筆中である。

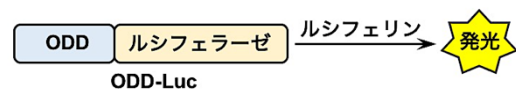


図3. ODD-Lucを用いたタンパク質分解の評価法

(3) 破骨細胞の分化・融合を抑制する物質

骨粗鬆症は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスが崩れ、骨吸収の亢進により骨量が減少し、骨折の危険性が増大する疾患である。骨粗鬆症治療薬の創薬標的として、近年、RANKL/RANK シグナル伝達系が注目されている。しかし、2013年にデノスマブ（RANKL のモノクローナル抗体医薬品）が初めて治療薬として承認されたが、それ以外に有効な治療薬は存在しない。

マクロファージ様細胞は、分化および融合の二段階を経て成熟型多核破骨細胞様細胞へと変化する（図 4）。そこで本研究代表者は、天然資源から分化と細胞融合のそれぞれに注目して阻害物質を探索している。これまでに海綿や真菌から破骨細胞への分化を抑制する化合物を単離し構造決定した（El-Beih AA *et al.*, *Fitoterapia* 2018, 128, 43-49; Kato H *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017, 27, 4975-4978）。本研究で、タイ産の植物内生菌のエキスをスクリーニングしたところ、分化を抑制するエキスを 1 種類、および分化は阻害しないが細胞融合を阻害するエキスを 1 種類得た。現在、大量に培養した真菌エキスから目的の化合物を精製し構造決定している。

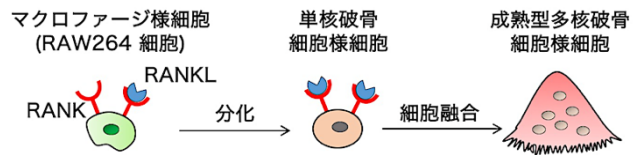


図4. マクロファージ様細胞がRANKL依存的に成熟型多核破骨細胞様細胞へと変化する過程

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 天然有機化合物の構造多様性と生物活性
3. 学会等名 第47回構造活性相関シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 海洋生物からの有用物質の探索
3. 学会等名 第33回海洋生物活性談話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 生命科学における天然物化学の役割
3. 学会等名 化学最前線2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 天然物の構造多様性
3. 学会等名 高磁場・高感度NMR利活用促進のための天然物関連シンポジウム2018（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 海洋天然物の多様な構造と生成に関する研究
3. 学会等名 第32回カロテノイド研究談話会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 非酵素的反応による天然物の構造多様性の拡張
3. 学会等名 日本薬学会第138年会シンポジウム「天然物パワー5：『生物現象を制御する天然分子』」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 海洋天然物化学の魅力
3. 学会等名 第54回数理医学研究会 数理医学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本 佐知子
2. 発表標題 海洋資源からのモニトリ研究
3. 学会等名 第19回マリンバイオテクノロジー学会仙台大会 ミニシンポジウム「出口志向のススメ～基礎研究から実用化に向けて～」（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部 天然薬物学分野
<http://kumamoto-natmed.org/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	加藤 光 (Kato Hikaru) (20547129)	熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教 (17401)	
連携研究者	人羅 勇気 (Hitora Yuki) (00755308)	熊本大学・大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター・助教 (17401)	