

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月13日現在

機関番号： 18001
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010-2012
 課題番号： 22603007
 研究課題名（和文）サンゴ礁生物ライブラリーからのヘリケース阻害剤等の探索と作用の解明
 研究課題名（英文）Search and characterization of new helicase inhibitors and others from coral reef organisms
 研究代表者：
 田中 淳一（TANAKA JUNICHI）
 琉球大学・理学部・教授
 研究者番号： 20163529

研究成果の概要（和文）： 主にC型肝炎ウイルスに対して選択的な薬剤の発見を目標に研究を行った。サンゴ礁生物のエキスライブラリーを材料にNS3ヘリケースを標的にした酵素アッセイ、および細胞レベルでのレプリコンアッセイでスクリーニングを行った。これらのアッセイでヒットしたエキスから活性を確認しながら化合物を分離し、活性物質の化学構造の決定・同定をした。さらにその作用メカニズム等について検討した。

研究成果の概要（英文）： To discover lead molecules against hepatitis C virus, we screened extracts of coral reef organisms with PET assay targeting NS3 helicase and with replicon assay utilizing cultured hepatocarcinoma cells transfected with virus-like genes. Hit extracts were subjected to chemical characterization to identify or determine the bioactive molecules. In addition, we examined the mode of action of the hit molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 複合領域

科研費の分科・細目： 生物分子化学・ケミカルバイオロジー

キーワード： C型肝炎ウイルス、NS3ヘリケース、サンゴ礁生物、海綿、ウミシダ

1. 研究開始当初の背景

サンゴ礁生物が微生物や熱帯植物資源などと並び、多様な生理活性物質の宝庫であることは多くの例から明らかで、国内外で海洋生物を素材に新規生理活性物質に関する活発な探索研究が展開されている。地方大学の教員1名の研究室が自前で特異的なスクリーニングを行い、探索、誘導体作成、作用機構の解明まで全てを行うことはかなり困難であることから、当研究室ではそのような優れ

た生理活性の解明手法を有する国内外の研究グループと共同研究を展開してきた。

本研究では標的とする生理活性として、産業技術総合研究所の野田（連携研究者）らとのC型肝炎ウイルスのNS3ヘリケース阻害、McGill大学のPelletier（研究協力者）らとの真核生物のタンパク合成阻害、および広島大学の阿武（連携研究者）らとのテロメラーゼ転写促進因子、を対象とした。これら3種の選択的スクリーニングを用いて、当研究室

に保存しているサンゴ礁生物のエキスイブラリーから新規な生理活性分子の発見を目指し、そのケミカルバイオロジー的研究を展開することにした。

2. 研究の目的

本研究では、C型肝炎のNS3 ヘリケース阻害活性、真核生物に特異的なタンパク合成阻害、テロメラーゼ転写活性化因子などに選択的作用を見せる物質を見出す。特にC型肝炎ウイルスの増殖を抑える生理活性物質の探索を中心に行う。特異的な活性を示すエキスからは、その生理活性物質の単離・同定・構造決定をまず行う。そして、その作用メカニズムの検討、誘導體作成、関連化合物を通じた構造活性相関を含め、ケミカルバイオロジー的研究を目指す。

3. 研究の方法

1) スクリーニング 連携研究者(と研究協力者)による選択的スクリーニング(タンパク合成阻害活性、テロメラーゼ転写促進因子、NS3 ヘリケース阻害)に当研究室で保存している海洋生物エキスイブラリーを提供し、ヒットするエキスを見出す。

2) 生理活性物質の化学構造 活性試験と並行してエキスの分離を行い、活性物質の化学構造を明らかにする。必要に応じて誘導體化を行い、化学構造の決定に加え、生命現象を解明するための分子プローブとして活用できるような分子を探索する。

3) 活性メカニズムの解明 活性物質が明らかになった時点で、標的生体分子との作用メカニズムを各研究グループと共に展開する。

4. 研究成果

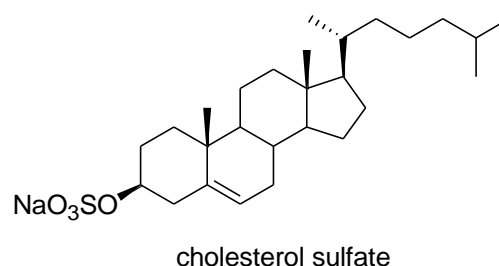
まずタンパク合成阻害では、沖縄産のコケムシ *Calyptotheca* sp. のエキスが阻害活性を示した。分離と並行してアッセイを行った結果、活性化合物は2つの新規ステロイド硫酸エステルであった。立体構造については、NMRでのNOE測定、およびMTPA誘導體の解析等により決定した。しかしながら、生理活性を再度検討したところ、この化合物は真のタンパク合成阻害剤ではなかった。

次にテロメラーゼ転写促進因子のアッセイで有意であったエキスを調べたところ、ある既知物質を同定した。この物質には、HDAC阻害などいくつかの生理活性作用が報告されているとともに、次のNS3ヘリケース阻害作用も示しており、選択的な薬剤とは判断できなかった。

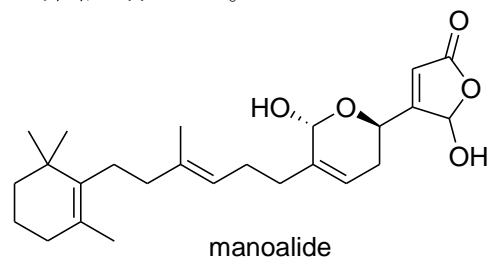
C型肝炎ウイルスのNS3ヘリケース阻害剤の探索は、まず光誘起電子移動PETあるいは蛍光共鳴エネルギー移動FRETを使用した酵素アッセイで行った。その結果、エキス全体

の2割程度が25 µg/mLの濃度で活性を示した。その中から数をしぼって阻害剤の探索を行った。

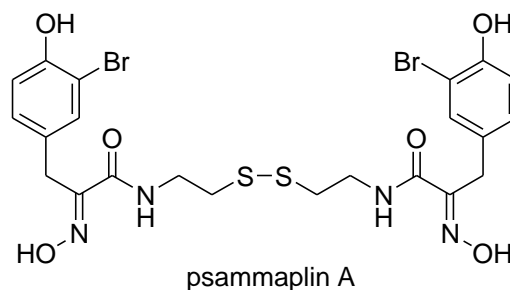
沖縄本島で採集した夜行性のウミシダの一種 *Alloeocomatella polycladia* のエキスからは、新規化合物を含めいくつもの硫酸エステルがPETアッセイで活性物質と判断された。そのうち、既知物質の cholesterol sulfate は、NS3ヘリケースのヘリケース活性を1.3 µMで抑えることが判明した。また、これをヒントにテルペン骨格に sulfate がついた別の化合物をテストしたところ、さらに高い活性を示す一方、cholesterol そのものやSDSなど単純な硫酸エステル類は活性を示さなかった。



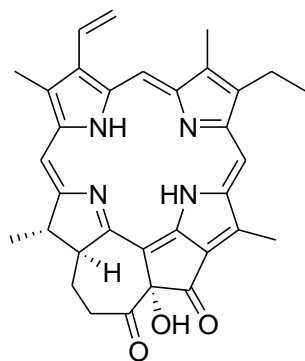
ある海綿のエキスがPETアッセイで弱い活性を示したことから、そのエキスの主成分の manoalide をテストした。その結果、弱いながらもヘリケース阻害、ATPase阻害、ATPに対する非競合阻害、RNA結合阻害などが明らかになった。しかし、実際の細胞での抗ウイルス活性に近いレプリコンアッセイでは活性が非常に弱かった。



また、八重山で採集したある海綿のエキスもヒットしたが、活性成分の psammaphin A は、manoalide とほぼ同程度の活性を示すものの、これもレプリコンアッセイでは非常に弱い活性しか示さなかった。



そこで、エキスのスクリーニングをレプリコンアッセイで行うことにした。その結果、西表島で採集した海綿 *Amphimedon* sp. のエキスが低い細胞毒性と抗ウイルス活性を示した。そこで、その活性成分をアッセイと並行して分離したところ、フェオフォルバイドの一つ chlorophyllone a を同定した。さらにカロテノイドの一つ mytiloxanthin も活性を示すと思われたが、最終的な物質が分解してしまい純品での確認には至っていない。いずれの化合物も食用二枚貝から先に単離されており、これらの餌の植物プランクトンが作り出す物質、あるいはそれが変換された物質と推定される。今回も海綿以外の生物が作り出した可能性が高いと思われる。



chlorophyllone a

さらにこの他にも PET アッセイならびにレプリコンアッセイで活性を示した物質を同定しているが、ここでは省略する。

以上の内容は以下の発表論文あるいは学会発表ですすでに報告したものもあるが、未発表の内容もある。

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 6 件)

①Furuta, A.; Salam, K. A.; Akimitsu, N.; Tanaka, J.; Tani, H.; Yamashita, A.; Moriishi, K.; Tsubuki, M.; Nakakoshi, M.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S.; Noda, N. Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by cholesterol sulfate without inhibition of ATPase and RNA binding. *J. Enz. Inhib. Med. Chem.*, in press. 査読有 DOI: 10.3109/14756366.2013.766607

② Salam, K. A.; Furuta, A.; Noda, N.; Tsuneda, S.; Sekiguchi, Y.; Yamashita, A.; Moriishi, K.; Nakakoshi, M.; Tsubuki, M.; Tani, H.; Tanaka, J.; Akimitsu, N. Psammaphin A inhibits hepatitis C virus NS3 helicase. *J. Nat. Med.* in press. 査読有 DOI: 10.1007/s11418-013-0742-7

③Yamashita, A.; Salam, K. A.; Furuta, A.;

Matsuda, Y.; Fujita, O.; Tani, H.; Fujita, Y.; Fujimoto, Y.; Ikeda, M.; Kato, N.; Sakamoto, N.; Maekawa, S.; Enomoto, N.; Nakakoshi, M.; Tsubuki, M.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S.; Akimitsu, N.; Noda, N.; Tanaka, J.; Moriishi, K. Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2012, 10, 744-761. 査読有 DOI: 10.3390/md10040744

④Fujimoto, Y.; Salam, K. A.; Furuta, A.; Matsuda, Y.; Fujita, O.; Tani, H.; Ikeda, M.; Kato, N.; Sakamoto, N.; Maekawa, S.; Enomoto, N.; de Voogd, N. J.; Nakakoshi, M.; Tsubuki, M.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S.; Akimitsu, N.; Noda, N.; Yamashita, A.; Tanaka, J.; Moriishi, K. Inhibition of both protease and helicase activities of hepatitis C virus NS3 by an ethyl acetate extract of marine sponge *Amphimedon* sp. *PLoS ONE*, 2012, 7, e48685. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0048685

⑤ Salam, K. A.; Noda, N.; Furuta, A.; Tsuneda, S.; Sekiguchi, Y.; Yamashita, A.; Moriishi, K.; Nakakoshi, M.; Tsubuki, M.; Tani, H.; Tanaka, J.; Akimitsu, N. Inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase by manoalide. *J. Nat. Prod.* 2012, 75, 650-654. 査読有 DOI: 10.1021/np200883s

⑥ Tani, H.; Fujita, O.; Furuta, A.; Matsuda, Y.; Miyata, R.; Akimitsu, N.; Tanaka, J.; Tsuneda, S.; Sekiguchi, Y.; Noda, N. Real-time monitoring of RNA helicase activity using fluorescence resonance energy transfer in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010, 393, 131-136. 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.01.100

[学会発表] (計 9 件)

①古田篤史 他、海洋生物抽出物より取得した複数種の硫酸化合物による C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 25 日、神戸国際会議場。

② Salam, K. A., 他, Identification of novel hepatitis C virus NS3 inhibitors: psammaphin A and halisulfate 3. Japan-China Medical Workshop 2012 on Drug

Discoveries and Therapeutics - New Perspectives in Cancer Prevention, Diagnosis, Treatments, and Drug Discoveries. 2012年10月22日, 東京大学

③ Yamashita, A. 他, Inhibition of hepatitis C virus replication and viral helicase by ethyl acetate extract of the marine feather star *Alloeocomatella polycladia*. 25th International Conference on Antiviral Research, 2012年4月18日, Hotel Royton - Sapporo.

④ Tanaka, J. Search for inhibitors against HCV NS3 helicase and chemical and genetic diversity of *Sarcophyton* soft corals. VIIth US-Japan Seminar on Marine Natural Products: Cross-disciplinary Expansions in Marine Bioorganic Chemistry. 2011年12月12日, 沖縄コンベンションセンター.

⑤ 古田篤史他、海洋生物抽出物より取得した cholesterol sulfate による C 型肝炎ウイルス NS3 helicase 阻害作用、第 63 回日本生物工学会大会、2011 年 9 月 27 日、東京農工大学.

⑥ Tanaka, J. 他, Inhibitors against NS3 helicase of hepatitis C virus from coral reef invertebrates. 2011 American Society of Pharmacognosy Meeting, 2011年7月3日, Paradise Point Resort, San Diego, USA.

⑦ Salam, K.A. 他, Identification and biochemical characterization of novel hepatitis C virus NS3 inhibitors, manoalide and psammaphin A. 16th Annual Meeting of the RNA Society, 2011年6月16日, 京都国際会議場.

⑧ 山下篤哉他、海洋生物をライブラリーソースとした HCV NS3 Helicase 活性阻害化合物の探索. 第 21 回抗ウイルス療法研究会、2011 年 5 月 29 日、金沢市文化ホール.

⑨ 山下篤哉他、沖縄産ウミシダ *Alloeocomatella polycladia* 抽出物の抗HCV NS3 helicase阻害作用によるHCV増殖抑制効果、第58回日本ウイルス学会、2010年11月7日、徳島県郷土文化会館.

〔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〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 淳一 (TANAKA JUNICHI)
琉球大学・理学部・教授
研究者番号: 20163529

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

野田 尚宏 (NODA NAOHIRO)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号: 70415727

阿武 久美子 (ANNO KUMIKO)
広島大学・薬学部・助教
研究者番号: 30452585