

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24248022

研究課題名(和文)微生物代謝産物のデータベース構築とその活用研究

研究課題名(英文)Construction of the database of microbial products and its application study

研究代表者

長田 裕之(OSADA, Hiroyuki)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・副センター長

研究者番号：80160836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,400,000円

研究成果の概要(和文)：創薬探索源として天然物が有する欠点を解消する技術基盤の確立を目的として、微生物および植物の抽出物より粗精製物から構成されるフラクションライブラリーを作製した。ライブラリーのLC-MS/MS結果を利用し代謝産物のデータベースNatural Products(NP)プロットを構築した。また、単離された生理活性物質によって誘導されるプロテオームの変化を比較することから活性物質の分子標的を推測する解析システムであるChemProteoBaseを構築した。生理活性を有する天然化合物をより効率的に単離し、その迅速な作用標的予測が可能となったことで、医薬開発・生命工学への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to overcome disadvantage of natural products as a source for drug screening, we established a technical platform based on chemical biology. In this study, we constructed a fraction library from microbial and plant sources based on basic chromatographic techniques, such as MPLC and HPLC, combined with a database named Natural Products Plot (NPPlot). NPPlot is a distribution map of metabolites, which are plotted as a dot in a three-dimensional area with X-, Y-, and Z-axis for retention time, m/z value, and UV absorption, respectively. Using this database, characteristic metabolites are easily found for each of strain. Furthermore, we developed a drug target identification system based on proteomic analysis by 2-D gel electrophoresis, ChemProteoBase. Isolation of novel natural compounds and prediction of their targets would be accelerated by using our systems, NPPlot and ChemProteoBase. Our research is expected to contribute to drug discovery and progress of bioscience.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物活性物質 微生物代謝産物 プロテオーム フラクションライブラリー データベース NPPlot ChemProteoBase

1. 研究開始当初の背景

近年、創薬の基盤技術としてケミカルバイオロジーが注目されているが、スクリーニングを成功に導くためには、多様な化合物ライブラリーの供給が不可欠である。米国の Schreiber らは多様性指向型化学ライブラリーを、ドイツの Waldmann らは生物活性指向型合成ライブラリーを中心とした化合物バンクを整備している。企業では、上記の化合物バンクを上回る化合物ライブラリーを保有しているが、大多数は合成化合物である。我々は、これまでの蓄積（微生物科学の強み）を生かして、天然化合物（特に放線菌や糸状菌の二次代謝産物）を中心とした天然化合物バンク（NPDepo）を構築して、薬理活性物質のスクリーニングを行っている。

微生物抽出液から新規化合物を単離するためには、精製の初期段階で既知化合物と新規化合物を判別する必要がある。Broad 研究所の ChemBank (<http://chembank.broadinstitute.org/>) や、我々が公開している NPEDIA (<http://npd.riken.jp/npedia/>) は、化合物データベースとして有用であるが、精製過程で、抽出液にどのような成分が含まれているかを知りたい時には役に立たない。そこで、我々は、系統的精製法に準拠した独自の Microbial Products (MP) プロット*データベースを構築した。本データベースは、当研究室で収集した 1 万種に及ぶ微生物粗精製フラクション、および純化合物の HPLC 分析（化合物の極性、質量、紫外吸収データを取得）結果を登録しており、既知物質を初期の段階で除外することが可能になる。本データベースを活用することで、新規化合物の発見効率を高めることに成功した (Org Lett 2010)。

天然物を用いた創薬は、量を確保することが障害となることが多かったが、微生物の生合成遺伝子クラスターがクローニングされると、目的化合物の大量生産が可能になるだけでなく高活性な誘導体の生産も可能になっている。これまでの研究で、リベロマイシン A 生合成遺伝子のクローニング (Nature Chem Biol 2011)、標的分子 (イソロイシン tRNA 合成酵素) の同定 (J Biol Chem 2002)、活性評価 (Proc Natl Acad Sci USA 2006) を行ったので、リベロマイシンをモデル化合物として、本研究で開発、拡充するデータベースの有用性を検証する。

薬剤の分子標的を同定するには、アフィニティービーズを用いた方法が有用 (Proc Natl Acad Sci USA 2008) であるが、細胞に対する DNA、トランスクリプトーム、プロテオーム変動を調べる解析法も優れており、作用機作 (標的分子) が同じ薬剤であれば、その影響も同様に現れる。Broad 研究所の Connectivity Map (www.broadinstitute.org/genome_bio/connectivitymap.html) は、薬剤処理によって生じる遺伝子発現パターンおよび疾病との関連を網羅したデータベ

ースである。一方、薬剤の中には、直接タンパク質と結合するものもあるので、遺伝子発現だけでなくタンパク質変動をみることも重要である。我々は、薬剤処理した細胞の全タンパク質を二次元ゲル電気泳動で解析し、そのプロテオーム変動を 2D-DIGE データベース**として構築し (Chem Biol 2010)、作用機作未知の薬剤の標的的同定に成功している (Chem Biol 2011)。

2. 研究の目的

我々は、天然化合物バンク NPDepo を創設し、ケミカルバイオロジー研究を志向する研究者に化合物ライブラリーの提供を行うとともに、独自に新規バイオプローブの開発を行っている。天然物の構造と生理活性は多岐に亘っており、創薬資源として重要であるが、一方では、精製の手間がかかるとか量の確保が難しいなどの欠点があるため、製薬企業では天然物離れが進んでいることも事実である。本研究課題では、創薬探索源として天然物が有する欠点を解消する技術基盤を確立することを目的とする。最新の分析技術とインフォマティクスを統合したデータベースを構築し、新たなバイオプローブを開発する。

3. 研究の方法

(1) 新規微生物代謝物の取得および MP プロットデータベースの構築

微生物培養液から新規化合物を単離する確率を高めるために、HPLC/PDA/MS 分析データを集積した MP プロットデータベースを作製する。このデータベースを活用して、新規生理活性物質の探索、単離、構造決定、活性評価を行う。

(2) 薬剤標的的同定のための 2D-DIGE 解析およびデータベース構築

薬剤処理した HeLa 細胞のプロテオーム変動を二次元ゲル電気泳動 (2D-DIGE) で解析する。作用機作が既知の化合物のデータベースを構築した後、作用機作不明な化合物のプロテオーム解析を行い、2D-DIGE データベースに照合することで分子標的を推定する。

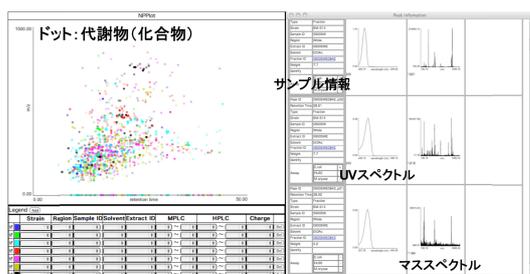
4. 研究成果

(1) 新規微生物代謝物の取得および MP プロットデータベースの構築

放線菌および糸状菌を培養し、その培養抽出物を中間圧液体クロマトグラフィー (MPLC) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により部分精製しフラクションライブラリーを作製した (Pure Appl Chem 2012)。この方法を他の天然資源、すなわち植物にも拡張した。植物としては東日本大震災とそれに伴う原発の風評被害に悩む福島県の農家より、廃棄予定であった大量の非汚染野菜を入手した。さらに、カルビー株式会社よりポテトチップスの原料となるじゃがいもの塊茎、およびその葉や茎などの未利用部位を大量に入手した。これらを用いてフラクションラ

イブラリーの作製を行った。植物にはアルカロイドなどの塩基性化合物が含まれ、このような化合物は生物活性の面からも興味深い化合物群である。そこで、これらを効率的に抽出・分離するために作製方法に改良を加えた。この方法を規格化することで再現性のよい作製条件を確立した。この方法を用いて、植物フラクションとして3,000を超えるフラクションを作製した。微生物代謝産物フラクションと同様に各種生物活性評価に供した。その結果、トマトの茎から作製したフラクションが、がん細胞に対して増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また、じゃがいも塊茎の皮より作製したフラクションが抗マラリア活性を示すことや、花のフラクションががん細胞増殖抑制効果を示すことを明らかにした。

フラクションライブラリーを全てPDA-LC/MSにより分析し、得られた各成分の物性データ(HPLC保持時間、 m/z およびUV吸収スペクトル)を用いて、これら物性を一覧化したデータベースを構築・拡張した。このデータベースは、当初微生物代謝産物のみの情報をもとにしていたので、Microbial Products (MP) プロットとしていたが、植物などの他の天然資源にも応用可能であるため、Natural Products (NP) プロットと一般的な名称に拡張した。NPプロットは、X軸にHPLC保持時間、Y軸に m/z 、Z軸にUVを取り、化合物を三次元上にプロットしたもので、微生物代謝産物に関しては、菌株に共通の代謝産物と、菌株固有の代謝産物が存在することを簡単に確認することができる。



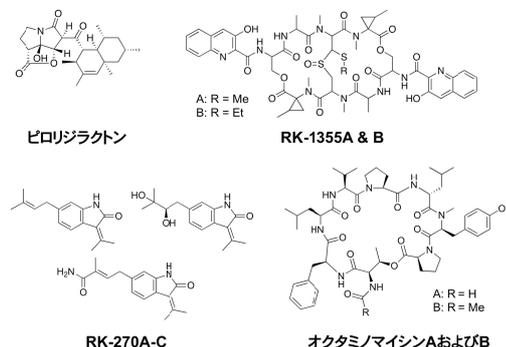
(図1) NPプロット

このNPプロットを利用し新規化合物の探索を行った。その結果、フラクションより新規リペロマイシン誘導体を単離、構造決定し、生物活性評価を行った(J Antibiot 2013)。さらに、糸状菌のフラクションライブラリーよりピロリジジノン骨格を有する新規化合物、ピロリジラクトンを単離、構造決定した(J Antibiot 2013)。この化合物は、ピロリジジノン骨格とデカリン骨格がケトンを通じて結合している非常に特徴的な化合物であった。放線菌のフラクションライブラリーからは、オキシインドール化合物 RK-270A、B および C を単離した(J Antibiot 2014)。これらは、インドール骨格の3位にイソプロピリデン基を有し、1位がプレニル化された

化合物であった。このようなオキシインドール類は天然物として初めてのものではあった。NPプロットの代謝産物分布パターンは菌株固有であるため、複数のプロットを菌株間で比較することから、放線菌のフラクションライブラリーよりキノマイシン系の新規化合物 RK-1355A と B を単離した(J Antibiot 2014)。これら化合物は、3-ヒドトキシキナルジンを有するキノマイシン類として、分子内架橋構造にスルホキドを有する初めての天然キノマイシン類であった。また、ある放線菌のNPプロットにおいて、同様のUV吸収スペクトルを有し m/z の値が14ずつ異なる4つの化合物を見出した。そのうち2つを単離し、それらの構造を新規環状オクタペプチド、オクタミノマイシン A および B と決定した。これらは、D体およびL体の立体の異なる2つのロイシンを含む特徴的なペプチドであった。さらに、プロットで見出した残りの2つの類縁化合物についても物性情報から構造推定を行った。

単離した化合物は、天然化合物バンク(NPDepo)に寄託するとともに、生物活性評価を行った。ピロリジラクトンおよび RK-270A-C は細胞毒性を示した。ピロリジラクトンに関しては、その作用機作解析を行った(後述)。新規キノマイシン、RK-1355A および B は、細胞毒性と抗マラリア活性を示し、抗マラリア活性についてはDNAをインターカレートすることにより活性が発現することを明らかにした(Biosci Biotech Biochem 2014)。オクタミノマイシン A および B は、細胞毒性および抗菌活性は示さなかったが、抗マラリア活性を示した。

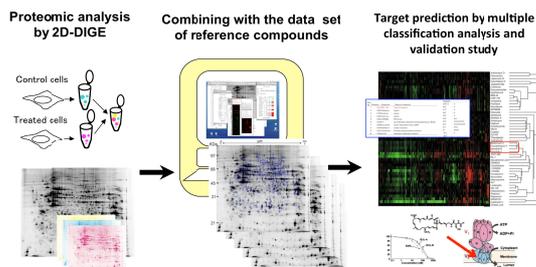
以上のように、フラクションライブラリーとNPプロットデータベースを組み合わせるにより、優位に新規化合物を探索し、単離できることを明らかにした。また、植物に応用することで、今まで報告のなかった活性を見出すことができた。さらに、海洋生物等、他の天然資源にも応用可能である。この方法を広く用いることで、従来法では見落としていた有用天然化合物を発見でき、天然資源のより有効な活用に寄与できると考えられる。



(図2) フラクションライブラリーより単離した化合物

(2) 薬剤標的同定のための 2D-DIGE 解析およびデータベース構築

我々は、薬剤処理した細胞のプロテオーム変動を 2D-DIGE データベースとして構築してきたが、それを発展させてケモプロテオベース (ChemProteoBase) 構築し、それを用いて解析を行った。



(図3) ケモプロテオベース

NP プロットの照合により、新規な菌株固有の化合物として見出されたピロリジラクトンの作用機作 (標的分子) を解析した (ChemBioChem 2013)。薬剤が誘導する細胞形態の変化およびタンパク質の発現変動を、これまでに構築したモルフォベース (MorphoBase) およびケモプロテオベースに照合して、プロテアソーム阻害剤に近いことが示唆された。プロテアソームが阻害されると、ユビキチン化されたタンパク質が分解されずに細胞内に蓄積するが、HeLa 細胞にピロリジラクトンを処理した場合にも、濃度依存的に細胞内にユビキチン化されたタンパク質の顕著な蓄積が認められた。また、細胞周期もプロテアソーム阻害剤 MG-132 と同様に G1 並びに G2/M 期停止を誘導した。精製プロテアソームを用いて、試験管内でのプロテアソーム阻害活性を確認したところ、プロテアソームの持つトリプシン様、キモトリプシン様、カスパーゼ様活性の3つの活性の内、トリプシン様活性に選択的な阻害活性が認められた。天然由来のプロテアソーム阻害剤の多くはキモトリプシン様活性に必要な活性部位に作用することが知られているが、ピロリジラクトンはこれらの化合物とは異なる新規なプロテアソーム阻害剤であることが示された。近年、多発性骨髄腫においてトリプシン様活性を阻害する合成ペプチドが、従来のキモトリプシン様活性の阻害剤の感受性を増加させることが報告されている。天然から得られた新規構造を持つピロリジラクトンは抗がん剤の開発に役立つ他、プロテアソームの機能解析において、有用なバイオプローブとなることが期待される。既知のプロテアソーム阻害剤 proteasome inhibitor II のデータとともにケモプロテオベースならびにモルフォベースに登録した。テルペンドール系化合物を生産する糸状菌の生合成経路を改変することによって、テルペンドールEを蓄積する技術を確認した。その糸状菌を用いて、より低濃度で作用する

新規誘導体である 11 - ケトパスパリン (11-ketopaspaline) を NP プロットの照合により見だし、単離・構造決定することに成功した。得られたテルペンドールEおよび 11 - ケトパスパリンを HeLa 細胞に添加して、薬剤処理によって変化する細胞内タンパク質を 2D-DIGE で解析するとともに、その結果をケモプロテオベースに登録した (ChemBioChem 2014)。これまでの生化学実験により、テルペンドールEの標的タンパク質はマイトティックキネシン Eg5 であることを明らかにしてきたが、ケモプロテオベースによる解析の結果から、11 - ケトパスパリンの標的分子も Eg5 であることが強く示唆された。また、モルフォベースによる解析においても、Eg5 阻害剤と類似していることが明らかとなった。11 - ケトパスパリンはテルペンドールE同様、HeLa 細胞で細胞周期の M 基停止ならびに、極を1つしか持たない異常な紡錘体 (単極紡錘体) を誘導した。また、試験管内で Eg5 の ATP アーゼ活性を阻害することが確認された。

天然化合物バンク NPDepo よりがん細胞株に対して顕著な細胞毒性を示す化合物、NPD926 を見いだした。NPD926 をケモプロテオベースで解析したところ、酸化ストレスを誘導する化合物と類似していることが明らかになった (Biochem J 2014)。NPD926 の化合物ビーズを用いて、NPD926 の結合タンパク質を同定したところ、グルタチオン S トラंसフェラーゼ (GST) が同定された。NPD926 は GST の直接阻害は認められなかったが、詳細な解析の結果、NPD926 が GST の基質になることが明らかになった。すなわち NPD926 はグルタチオンと結合して、細胞内のグルタチオンを枯渇させることにより活性酸素種 (ROS) 産生を誘導し、酸化ストレスを誘導すると考えられる。NPD926 をはじめ、酸化ストレス誘導化剤の解析データについても、ケモプロテオベースに登録した。以上のように、ケモプロテオベースに種々の生理活性物質を登録しデータベースを拡張すること、また、システムを改良することによって、微生物代謝産物から得られた新規化合物の標的的同定を迅速に行うシステムの基盤が構築できた。また、研究を通して、新たなバイオプローブとしての新規化合物を見いだした。

生理活性を有する天然化合物の単離、ならびに、その標的分子をより効率的に予測するシステムが可能となったことで、医薬開発・生命工学への寄与が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計15件)

Kato N, Nogawa T, Hirota H, Jang JH, Takahashi S, Ahn JS, Osada H, A new enzyme involved in the control of the stereochemistry in the decalin

formation during equisetin biosynthesis., *Biochem Biophys Res Commun*, 460 (2): 210-215 (2015), 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.011

Jang JP, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S, Jang JH, Ahn JS, Osada H, RK-270A-C, new oxindole derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library of *Streptomyces* sp. RK85-270., *J Antibiot*, 68 (4): 293-295 (2015), 査読有
DOI: 10.1038/ja.2014.141

Takahashi S, Nagano S, Nogawa T, Kanoh N, Uramoto M, Kawatani M, Shimizu T, Miyazawa T, Shiro Y, Osada H, Structure-function analyses of cytochrome P450revI involved in reveromycin A biosynthesis and evaluation of the biological activity of its substrate, reveromycin T., *J Biol Chem*, 289 (47): 32446-32458 (2014), 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M114.598391

Kawamura T, Kondoh Y, Muroi M, Kawatani M, Osada H, A small molecule that induces reactive oxygen species via cellular glutathione depletion., *Biochem J*, 463 (1): 53-63 (2014), 査読有
DOI: 10.1042/BJ20140669

Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Aono H, Nogawa T, Osada H, Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems., *Chembiochem*, 14 (18): 2456-2463 (2013), 査読有
DOI: 10.1002/cbic.201300499

Nogawa T, Kawatani M, Uramoto M, Okano A, Aono H, Futamura Y, Koshino H, Takahashi S, Osada H, Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus., *J Antibiot*, 66 (10): 621-623 (2013), 査読有
DOI: 10.1038/ja.2013.55

Futamura Y, Kawatani M, Kazami S, Tanaka K, Muroi M, Shimizu T, Tomita K, Watanabe N, Osada H, Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for

drug target identification., *Chemistry & Biology*, 19 (12): 1620-1630 (2012), 査読有
DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.10.014

Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Ueki M, Osada H, Terpendole E, a kinesin Eg5 inhibitor, is a key biosynthetic intermediate of indole-diterpenes in the producing fungus *Chaunopycnis alba*., *Chemistry & Biology*, 19 (12): 1611-1619 (2012), 査読有
DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.10.010

Hullin-Matsuda F, Tomishige N, Sakai S, Ishitsuka R, Ishii K, Makino A, Greimel P, Abe M, Laviad EL, Lagarde M, Vidal H, Saito T, Osada H, Hanada K, Futerman AH, Kobayashi T, Limonoid compounds inhibit sphingomyelin biosynthesis by preventing CERT-dependent extraction of ceramides from the endoplasmic reticulum., *J Biol Chem*, 287 (29): 24397-24411 (2012), 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.344432

[学会発表](計63件)

室井 誠, 田中 美帆, 川谷 誠, 長田 裕之, ChemProteoBase のがん代謝作用薬解析に向けた応用, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日 - 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

野川 俊彦, 高橋 俊二, 高木 海, 関山 恭代, 岡野 亜紀子, 川谷 誠, 清水 猛, 長田 裕之, アルコール添加による新規リペロマイシン誘導体の創製と生合成機構の考察, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日 - 29 日, 岡山大学津島キャンパス(岡山県・岡山市)

長田 裕之, 天然物創薬を目指して, 静岡大学農学部公開講演会(第 214 回静岡ライフサイエンスセミナー), 2014 年 9 月 16 日, 静岡大学農学部(静岡県・静岡市)

長田 裕之, 世界における天然物創薬の現状, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27 日 - 30 日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

室井 誠, 近藤 久恵, 平田 泰子, 井上 堯, 川谷 誠, 長田 裕之, ChemProteoBase による collismycin A の作用機作解析, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27 日 - 30 日, 明

治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

野川 俊彦, リム チュン・リャン, 浦本 昌和, 岡野 亜紀子, 本郷 やよい, 中村 健道, 越野 広雪, 高橋 俊二, イブラヒム ダーラ, 長田 裕之, NPPlot(Natural Products Plot)を用いた新規微生物代謝産物の探索と単離, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 27 日 - 30 日, 明治大学生田キャンパス(神奈川県・川崎市)

Lim Chung Liang, Nogawa Toshihiko, Uramoto Masakazu, Okano Akiko, Hongo Yayoi, Nakamura Takemichi, Koshino Hiroyuki, Takahashi Shunji, Ibrahim Darah and Osada Hiroyuki, Isolation of novel bioactive compounds from fraction library of Microorganisms based on NPPlot screening, 第 55 回天然有機化合物討論会, 2013 年 9 月 19 日, 同志社大学寒梅館(京都府・京都市)

長田 裕之, 化学の力で生命現象の解明に挑む, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 24 日 - 27 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

野川 俊彦, 川谷 誠, 浦本 昌和, 岡野 亜紀子, 青野 晴美, 高橋 俊二, 長田 裕之, 糸状菌より単離した新規ピロリジジノン化合物、ピロリジラクトンの構造, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 24 日 - 27 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

室井 誠, 近藤 久恵, 平田 泰子, 青野 晴美, 川谷 誠, 野川 俊彦, 長田 裕之, Proteobase を用いた新規プロテアソーム阻害剤ピロリジラクトンの標的同定, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 24 日 - 27 日, 東北大学川内北キャンパス(宮城県・仙台市)

長田 裕之, 天然物創薬の難しさ、面白さ, 第 19 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2012 年 11 月 1 日 - 2 日, 大阪大学豊中キャンパス(大阪府・豊中市)

野川 俊彦, 高橋 俊二, 関山 恭代, 高木 海, 岡野 亜紀子, 浦本 昌和, 川谷 誠, 越野 広雪, 清水 猛, 長田 裕之, 新規リペロマイシン誘導体の創製と活性評価, 第 54 回天然有機化合物討論会, 2012 年 9 月 18 日 - 20 日, 東京農業大学世田谷キャンパス(東京都・世田谷区)

〔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:
出願年月日:
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

長田 裕之(OSADA, Hiroyuki)
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・副センター長
研究者番号: 80160836

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

室井 誠(MUROI, Makoto)
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・上級研究員
研究者番号: 30261168

野川 俊彦(NOGAWA, Toshihiko)
独立行政法人理化学研究所・環境資源科学
研究センター・研究員
研究者番号: 40462717