

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651238

研究課題名(和文)非破壊および化学変換天然物エキス二次元アレイの開発と神経幹細胞の活性化

研究課題名(英文)Development of natural products microarray for search of neural stem cell modulators

研究代表者

荒井 緑 (Arai, Midori)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40373261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、これまで達成されていなかった天然物エキスの非破壊二次元アレイの開発を目的とした。天然物は多様な構造を有するので、1種類の固定化方法では全ての天然物に対応できず、エキスのアレイを作成するのは困難である。これまでカルベン種などを用いて天然物の固定化が試みられてきたが、天然物の構造が変化することが懸念されていた。今回、天然物をそのままアレイ化することを目標に、アレイの担体となる素材や、種々条件を詳細に検討した。ヒトビタミンD受容体と活性型ビタミンDの結合を、膜上にて抗原抗体反応にて検出することを検討した。また、天然物エキスの膜上での展開方法などを検討し、直接展開可能な膜を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Natural product extract microarray would be greatly helpful for search bioactive compounds by incubation with target proteins. Reported method needed the structural change in each natural products. In this study, the material for microarray, method for making array, incubation with target protein etc. were investigated. Poly-ether sulfone (PES) was found to be good membrane for thin-layer chromatography of extract. Vitamin D receptor and its positive control 1 α , 25 (OH) $_2$ VD $_3$ were used for establishment of the method.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：天然物 アレイ ビタミンD3

1. 研究開始当初の背景

化合物のマイクロアレイはこの20年で劇的に発展をとげたが、固定化にはある官能基が必須の場合が多い。天然物は多様な構造を有するので、1種類の固定化方法では全ての天然物に対応できず、エキスのアレイを作成するのは困難である。これまでカルベン種などを用いて天然物の固定化が試みられてきたが、天然物の構造が変化することが懸念されていた。

2. 研究の目的

本研究では、これまで達成されていなかった天然物エキスの非破壊2次元アレイの開発を目的とした。天然物の構造を変化させずにアレイ化し、アレイ上での標的タンパク質との結合を、抗体反応で検出することを目的とした。本方法が可能となれば、多くの天然物がスポットとして現れたアレイ(膜)と標的タンパク質をインキュベートすることで、どの天然物が標的タンパク質と結合するのか、迅速にスクリーニングすることが可能である。

3. 研究の方法

アレイの担体となる素材や、種々条件を詳細に検討した。標的タンパク質としてはまず、ヒトビタミンD受容体(大腸菌にて発現、精製した)と活性型ビタミンDの結合を、膜上にて抗原抗体反応(ビタミンD受容体の1次抗体と続くHRP(horse radish peroxidase)融合の2次抗体を用いて、タンパク質と化合物の結合の検出を検討した。また、天然物エキスの膜上での展開方法などを検討した。また、TLCでエキスを展開した後、膜にアイロンを用いて熱で転写することを検討した。

4. 研究成果

アレイ化の後にはタンパク質との結合および、抗原抗体反応を予定しているので、それに適した膜をまず選択した。ウェスタンブロット等で使用されるPVDF膜、PES(poly-ether sulfone)膜を検討した。前者はTLCでエキスを展開した後、熱による膜への天然物スポットの転写が可能であることを見いだした。後者は通常のTLCのように、有機溶媒にて展開が可能であった。

標的タンパク質との結合を膜状で起こさせるため、膜にビタミンD受容体に強く結合する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ とネガティブコントロールとして、結合の弱い VD_3 をキャピラリー等にてスポットし、ビタミンD受容体溶液にてインキュベーションし、その結合のHRP二次抗体による発光にて検出の検討を行った。ブロッキング条件(時間、温度、濃度)、抗体の種類、濃度、時間等、種々検討したところ、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ との結合のみを検出可能な条件を見いだすことに成功した。

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4件)

- (1) Arai, M. A.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Physalin H from *Solanum nigrum* as Hh signaling inhibitor blocks GLI1-DNA complex formation" *Beil. J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 134-140. (査読有)
- (2) Arai, M. A.; Fujimatsu, T.; Uchida, K.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Hh signaling inhibitors from *Vitex negundo*; naturally occurring inhibitors of the GLI1-DNA complex" *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1012-1018. (査読有)
- (3) Arai, M. A.; Koryudzu, K.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "Naturally Occurring Ngn2 Promoter Activators from *Butea superba*" *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 2489-2497. (査読有)
- (4) Arai, T.; Yamamoto, Y.; Awata, A.; Kamiya, K.; Ishibashi, M.; Arai, M. A. "Catalytic Asymmetric Synthesis of Mixed 3,3'-Bisindoles and Their Evaluation as Wnt Signaling Inhibitors" *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2486-2490. (査読有)

[学会発表](計21件)

- (1) (招待講演) 荒井緑, "bHLH転写因子に作用する神経幹細胞分化活性化剤の探索と創成", 日本薬学会第134年会シンポジウム, 熊本, 2014年3月28日
- (2) 荒井緑, 赤嶺隆太, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Pandanus odoratissimus*からのヘッジホッグシグナル阻害剤の探索", 日本薬学会第134年会, 熊本, 2014年3月28-30日
- (3) 米山達朗, 荒井緑, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Themeda arguens*等からのヘッジホッグ伝達経路阻害剤の探索", 日本薬学会第134年会, 熊本, 2014年3月28-30日
- (4) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Neural Stem Cells Activators based on Natural Products", Asian Chemical Biology Initiative 2014 Manila Meeting; January 25, 2014, ベトナム
- (5) 荒井緑, 藤松輝久, 内田響子, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "*Vitex negundo*から単離したヘッジホッグシグナル阻害作用をもつジテルペン", 第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, さいたま, 2013年10月5-7日
- (6) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Naturally Occurring Neural Stem Cells Activators that modulate bHLH

- Transcriptional Factors", 台湾中山大学 (National Sun Yat-Sen University), 2013年9月27日, 台湾
- (7) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Naturally Occurring Neural Stem Cells Activators that modulate bHLH Transcriptional Factors", 台湾清華大学 (National Tsing Hua University), 2013年9月25日, 台湾
- (8) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Naturally Occurring Neural Stem Cells Activators that modulate bHLH Transcriptional Factors", 台湾中央研究院 (Academia Sinica), 2013年9月23日, 台湾
- (9) 荒井 緑, 石川直樹, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "神経幹細胞で働く転写因子 Hes1 ビーズを用いる迅速的天然物探索", 第55回天然有機化合物討論会, 2013年9月19日, 京都
- (10) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Neural Stem Cells Activators based on Natural Products", 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー:分子標的と活性制御」地区ミニシンポジウム, 慶應大学, 2013年3月21日
- (11) (招待講演) 荒井 緑, 「天然物を基盤とした神経幹細胞活性化小分子の創製に向けて」筑波大学学際研究センター 物質科学第16回機能性分子シンポジウム, 筑波, 2013年1月12日
- (12) (招待講演) M. A. Arai, "Search for Cancer Cells Signaling Inhibitors and Neural Stem Cells Activators based on Natural Products", Asian Chemical Biology Initiative 2013 Bangkok Meeting, January 27, 2013, タイ
- (13) (招待講演) M. A. Arai, "Search for naturally occurring neural stem cells activators that modulate bHLH transcriptional factors", 7th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia; December 11-14, 2012, Singapore (Asian Core Program Lectureship Award 受賞)
- (14) M. A. Arai, N. Ishikawa, T. Koyano, T. Kowithayakorn, M. Ishibashi, "Naturally occurring neural stem cells activators by Hes1-beads-HPLC method", The 12th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (2012) Kyoto, November 12-16
- (15) M. Ishibashi and M. A. Arai, "Search for natural products based ligands targeting signaling pathways of disease and reproduction", 1st International Symposium on Chemical Biology of Natural Products:

- Target ID and Regulation of Bioactivity; (2012) Kyoto, October 31-November 1
- (16) (招待講演) 荒井 緑, "bHLH転写因子に影響する天然由来の神経幹細胞分化活性化小分子", 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー:分子標的と活性制御」第2回若手研究者ワークショップ, 大阪, 2012年10月30日
- (17) 荒井 緑, 浜比嘉望美, S. K. Sadhu, F. Ahmed, 石橋正己, "神経幹細胞で働く Hes1 タンパク質への結合能を指標とする天然物の探索", 日本生薬学会第59年会, 千葉, 2012年9月17-18日
- (18) 小柳津和音, 荒井 緑, 石橋正己, "放線菌からの Ngn2 プロモーター活性化剤の探索", 日本生薬学会第59年会, 千葉, 2012年9月17-18日
- (19) 荒井 緑, 石川直樹, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "*Aquilaria agallocha*からの Hes1 担持ビーズを用いる活性天然物の迅速的探索", 日本生薬学会第59年会, 千葉, 2012年9月17-18日
- (20) 石橋正己, 荒井 緑, 當銘一文, "疾患および再生シグナルに作用する天然物の探索", 新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー~分子標的と活性制御~」第2回公開シンポジウム, 東京, 2012年6月18日
- (21) 荒井 緑, 石川直樹, 小谷野喬, T. Kowithayakorn, 石橋正己, "神経幹細胞分化を活性化する天然物探索: タンパク質担持ビーズを用いる迅速的探索法", 日本ケミカルバイオロジー学会第7回年会, 京都, 2012年6月7日

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: Ngn2 プロモーター活性化剤 inuboshinB
発明者: 荒井 緑, 小柳津和音, 石橋正己
権利者: 千葉大学
種類: 発明
番号: 特願 2013-040146
出願年月日: 2013年2月28日
国内外の別: 国内

名称: フラボノイド由来 Hes1 プロモーター阻害剤
発明者: 荒井 緑, 柳瀬なつき, 小柳津和音, 石橋正己
権利者: 千葉大学
種類: 発明
番号: 外国出願番号 PCT/JP2011/66866 特願 2012-526493 (国内移行日 2012年12月7日)
出願年月日: 2011年7月25日
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/kouzou/index/html>

1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒井 緑 (MIDORI A. ARAI)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：40373261