

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750386

研究課題名(和文) 海洋シアノバクテリア由来新規マクロリド化合物の機能と応用

研究課題名(英文) The functional analyses of new macrolides isolated from marine cyanobacteria

研究代表者

大野 修 (Ohno, Osamu)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：20436992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. からピセリングピアサイドの新規類縁体であるピセリングピオライドB、CとピセリングピアサイドE、Fを単離し構造を決定した。特に強力な細胞増殖阻害活性を示したピセリングピオライドB、Cについて詳細な解析を試み、それらの小胞体ストレス誘導剤としての特性を明らかにした。また、ピセリングピアサイド類と同じく海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. より単離した新規ペプチド、クラハインについても小胞体ストレス誘導活性を見出した。クラハインの蛍光基及びビオチン導入プローブを用いた解析から、小胞体への局在と小胞体Ca²⁺ポンプが標的分子であることを示す結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：New biselyngbyaside analogs, biselyngbyolides B and C and biselyngbyasides E and F, were isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. Their structures were determined by spectroscopic analyses. These compounds inhibited the growth of human cancer cells, and biselyngbyolides B and C showed stronger activity than other analogs. Based on the detailed analyses of their biological activities, biselyngbyolides B and C were revealed to show potent endoplasmic reticulum (ER) stress-inducing activity. A new lipopeptide, kurahyne, was isolated from a cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. Kurahyne also exhibited ER stress-inducing activity. By the analyses using fluorescent and biotin conjugates of kurahyne, it was likely that kurahyne localized in ER and bound to ER Ca²⁺ pump.

研究分野：生物分子科学

キーワード：biselyngbyaside biselyngbyolide kurahyne シアノバクテリア アポトーシス 小胞体ストレス
カルシウム

1. 研究開始当初の背景

海洋生物は特異な構造を有する有用な生物活性物質を供給し、それらには医薬品等としての応用が期待される化合物が多く存在する。一方、機能が未知である化合物も多く、その解析は応用面における重要な課題となる。申請者らは最近、鹿児島県及び沖縄県で採集した海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. から、複数の新規ピセリングピアサイド類縁体を単離し構造を決定した。続いて、ピセリングピアサイド類ががん細胞に対するアポトーシス誘導活性を示すことを見出し、本活性が小胞体ストレス誘導活性を伴うことを示唆する結果が得られた。しかし、それらの生物活性発現の分子機構は不明であり、その解明が課題であった。そこで、本研究では海洋シアノバクテリア由来の新規ピセリングピアサイド類縁体等が有する小胞体ストレス誘導活性の発現機構の解明を目指す研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

沖縄県他で採集した海洋シアノバクテリアよりピセリングピアサイド類縁体を含む新規化合物を探索し、より強力な小胞体ストレス誘導剤の獲得を目指した。また、それらの作用機構を解析することで活性発現の分子機構の解明を試みた。具体的には、新規ピセリングピアサイド類縁体他を単離し、それらの小胞体ストレスに関連する細胞内シグナル伝達経路への作用を解析した。また、プローブ化の手法を活用しそれらの細胞内局在部位と標的分子を明らかにすることで活性発現機構の解明を目指した。さらに将来的な応用を見据え、生産シアノバクテリアの培養法の確立にも取り組んだ。

3. 研究の方法

海洋シアノバクテリア由来のピセリングピアサイド類等を対象に下記の研究に着手した。

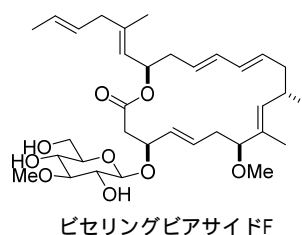
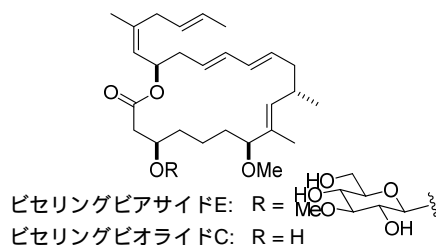
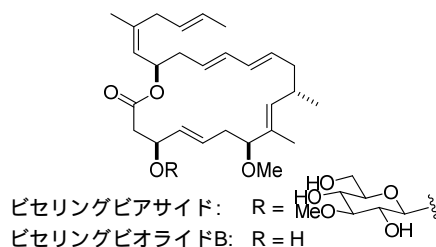
- (1) 新たな類縁体及び新規小胞体ストレス誘導剤の単離・構造解明
- (2) 細胞内シグナル伝達への作用の解析
- (3) プローブ分子の合成と細胞内局在部位及び標的分子の解析
- (4) 生産シアノバクテリア培養法の検討

(1)-(4)の研究を通じ、ピセリングピアサイド類及び新たな小胞体ストレス誘導剤の獲得に取り組み、それらの作用発現機構の解明に取り組んだ。また、さらなる応用を見据え、単離した化合物の生産シアノバクテリアの培養法を検討し、培養による生産を試みた。

4. 研究成果

- (1) 新規ピセリングピアサイド類縁体の単離と機能解析

沖縄県石垣島で採集したシアノバクテリア *Lyngbya* sp. をメタノールで抽出し、HeLa細胞に対する増殖阻害活性を指標に新規化



合物ピセリングピオライド B、C とピセリングピアサイド E、F を単離した。4 種の化合物は MS スペクトル及び各種 NMR スペクトル解析により平面構造を明らかにし、それらがピセリングピアサイドの新規類縁体であることを明らかにした。各類縁体の相対立体配置は NOESY スペクトルと結合定数の解析及びこれまでに単離した化合物のデータとの比較により決定した。絶対立体配置については、ピセリングピアサイドとの CD スペクトルの比較により決定した。

次に、単離したピセリングピアサイド類の生物活性の評価を試みた。各種がん細胞に対する増殖阻害活性を測定し、活性の強弱から以下の傾向を明らかにした。分子内に糖を有さない類縁体は、それぞれ対応する配糖体に比べて 2-6 倍強力な活性を示した。一方、側鎖部の 3 置換オレフィンの幾何配置が E 体であるピセリングピアサイド F は Z 体のピセリングピアサイドに比べて約 10 倍活性が低下することが判明した。また、マクロラクトン部 C4-C5 位の構造の違いは活性に大きな影響を与えないことが明らかとなった。以上の結果から、ピセリングピアサイド類の活性発現に重要な役割を担う構造を明らかにすることができた。続いて、単離した類縁体の中で特に強力な細胞増殖阻害活性を示したピセリングピオライド B、C について生物活性発現機構の解析を試みた。まず、トリパンプルー細胞外排出試験によりそれらががん細胞にカスパーゼ依存的な細胞死を引き起こすことを見出し、DNA ラダー解析により本細胞死がアポトーシスであることを確認した。さらに、RT-PCR 法を用いた解析によりピセリ

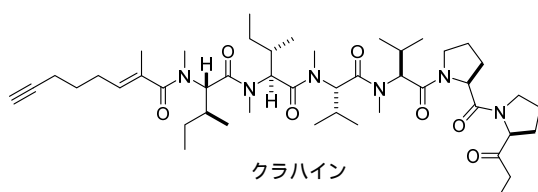
ングピオライド B、C がアポトーシス誘導濃度域において小胞体ストレスマーカーBiP、CHOPの mRNA の発現を誘導することが明らかとなった。これらの結果より、ピセリングピオライド B、C の小胞体ストレス誘導剤としての特性を明らかにした。

また、ピセリングピアサイド類生産シアノバクテリア *Lyngbya* sp. の培養法の確立に取り組み、天然海水をベースとした培地を用いて単一種のシアノバクテリアの培養による増殖を確認した。今後、ピセリングピアサイド類の生産能についての検討が必要であるが、ピセリングピアサイド類の培養生産に向けた重要な知見を得ることができた。

(2) 海洋シアノバクテリア由来クラハインによる小胞体ストレス誘導活性

海洋シアノバクテリア由来の新規化合物の探索により、沖縄県恩納村で採集したシアノバクテリア *Lyngbya* sp. が形成するバイオマットより末端アルキンを含む脂肪酸部を有する新規鎖状ペプチド、クラハインをはじめ、合計 4 種類の新規化合物を単離し構造を決定した。クラハインは HeLa 細胞に対してアポトーシス誘導活性を示し、同濃度域において小胞体ストレスマーカーBiP、CHOP の発現を誘導することが確認されたことから小胞体ストレス誘導活性を有することが明らかとなった。さらに、クラハインの分子内に蛍光基を導入したプローブを合成し、本プローブの細胞内局在部位を蛍光顕微鏡により解析したところ小胞体への局在を示す結果を得た。同様にクラハインの分子内にビオチニル基を導入したプローブを合成し、HeLa 細胞中の結合タンパク質をアフィニティー精製により解析した。その結果、小胞体膜上 Ca^{2+} ポンプである SERCA がクラハインの標的分子であることを示す結果が得られた。続いて、ウサギ背筋より単離した筋小胞体膜上 SERCA の ATPase 活性に対する影響を評価したところ、クラハインは濃度依存的な阻害活性を示すことが明らかになった。これらの結果より、クラハインについてもピセリングピアサイド類と同様に新たな小胞体ストレス誘導剤としての特性を明らかにした。

なお、クラハイン生産シアノバクテリア *Lyngbya* sp. についても培養法の確立に取り組み、単一種のシアノバクテリアの培養による増殖を確認した。今後、クラハインの生産能が最適となる培養条件を検討し、クラハインの培養生産に繋げていきたい。



(3) 海洋シアノバクテリア由来新規チアゾール含有ポリケチド、トムルリンの単離

沖縄県石垣島で採集した海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. より、新規チアゾール含有ポリケチド、トムルリンを単離し構造を決定した。本化合物が各種がん細胞の増殖阻害活性を示すことを見出した。また、合成誘導体を用いた解析により、分子内の活性発現に寄与する構造についての情報を得ることができた。さらに、本化合物ががん細胞に対し栄養飢餓選択的な細胞死誘導活性を有することも明らかにした。栄養飢餓選択的な細胞死誘導活性には小胞体ストレスが関与することが報告されていることから、本化合物についても新たな小胞体ストレス誘導剤としての可能性が期待される成果を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Ayane Watanabe, Osamu Ohno, Maho Morita, Toshiyasu Inuzuka, Kiyotake Suenaga, Structures and biological activities of novel biselyngbyaside analogs isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, in press. DOI: 10.1246/bcsj.20150117 (査読有り)

Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, Kiyotake Suenaga, Maedamide, a novel chymotrypsin inhibitor from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp., *Tetrahedron Letters*, 55, 4126-4128, 2014. DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.05.099 (査読有り)

Arihiro Iwasaki, Shinpei Sumimoto, Osamu Ohno, Shoichiro Suda, Kiyotake Suenaga, Kurahamide, a cyclic depsipeptide analog of dolastatin 13 from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 87, 609-613, 2014. DOI: 10.1246/bcsj.20140008 (査読有り)

Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, Kiyotake Suenaga, Kurahye, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *RSC Advances*, 4, 12840-12843, 2014. DOI: 10.1039/C4RA00132J (査読有り)

Osamu Ohno, Ayane Watanabe, Maho Morita, Kiyotake Suenaga, Biselyngbyolide B, a novel ER stress-inducer isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Chemistry Letters*, 43, 287-289, 2014. DOI: 10.1246/cl.130960 (査読有り)

Osamu Ohno, Toshiaki Teruya, Kiyotake

Suenaga, Daisuke Uemura, Apoptosis as a practical target for identifying anticancer agents of marine origin, *Forum on Immunopathological Diseases and Therapeutics*, Begell House, 4, 33-41, 2013. DOI: 10.1615/ForumImmunDisTher.2013008307 (査読有り)

〔学会発表〕(計 29 件)

Osamu Ohno, Isolation and functional analysis of a novel thiazole containing polyketide with selective cytotoxicity under nutrient starvation conditions, 日本化学会第 95 春季年会アジア国際シンポジウム、2015 年 3 月 27 日、日本大学理工学部船橋キャンパス / 薬学部 (千葉県・船橋市)

大野修、岩崎有紘、旦慎吾、矢守隆夫、末永聖武、海洋シアノバクテリア由来新規小胞体ストレス誘導剤 kurahyne の単離と機能解析、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014 年 6 月 26 日、仙台市情報・産業プラザ (AER) (宮城県・仙台市)

大野修、佐名恭平、工藤千尋、照屋俊明、清水史郎、末永聖武、海洋シアノバクテリア由来新規チアゾール含有ポリケチド tomuruline の単離と機能解析、化学療法基盤支援活動第 3 回シンポジウム、2014 年 5 月 12 日、万国津梁館 (沖縄県・名護市)

大野修、海洋シアノバクテリア由来細胞応答制御物質の探索研究、第 2 回慶應有機化学若手シンポジウム、2014 年 5 月 10 日、慶應義塾大学矢上キャンパス (神奈川県・横浜市)

大野修、海洋生物由来新規二次代謝産物の探索と機能解析、第 37 回星薬科大学大学院研究科助手会・大学院自治会合同公開セミナー、2013 年 10 月 12 日、星薬科大学 (東京都・品川区)

大野修、森田真布、矢守隆夫、末永聖武、海洋産マクロリド biselyngbyaside 類によるアポトーシス誘導機構の解析、第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013 年 6 月 13 日、国立京都国際会館 (京都府・京都市)

大野修、森田真布、渡邊絢音、照屋俊明、矢守隆夫、末永聖武、海洋産マクロリド、ピセリングピアサイド類の作用機構解析、第 27 回海洋生物活性談話会、2013 年 5 月 25 日、東京海洋大学品川キャンパス (東京都・港区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大野 修 (OHNO, Osamu)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号 : 20436992

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

末永 聖武 (SUENAGA, Kiyotake)