

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460136

研究課題名(和文) 海洋生物由来菌類の産生する抗がん剤のシーズの探索及びリード化合物の開発

研究課題名(英文) Search of the seeds of an antineoplastic drug and development of a lead compound which marine organism origin fungi produce

研究代表者

山田 剛司 (Yamada, Takeshi)

大阪薬科大学・薬学部・准教授(移行)

研究者番号：20278592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新たに種々の海洋生物より分離した菌類の代謝産物について検討した。ワカメ及びイソギンチャクから分離した真菌より強い細胞毒性を示す新規物質をそれぞれ1種単離し、その構造を決定した。これまで検討してきた細胞毒性物質産生菌について引き続き代謝物の検討を行ったところ、新たに多くの新規物質を単離した。今回の研究で、有意な生理活性を示す新規化合物の発見及び立体化学で有用な情報の獲得など十分な成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the metabolites produced the fungi separated from the various marine organization. A new compounds exhibiting potent cytotoxicity was isolated from an algae and a sea anemone, respectively, and we established the structures of new compounds. On the other hand, our continual examination about the cytotoxic substance production fungus led to find many new substances. In this study, we reaped rich harvest including the discovery of novel metabolites exhibiting significant biological activity, and the acquirement of the useful information for the stereochemistry.

研究分野：医歯薬学

キーワード：海洋生物 真菌 細胞毒性物質 抗腫瘍性物質 海洋天然物

1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法の研究開発には、古くから多くの研究者が挑戦し、数多くの抗がん性物質が見出されてきたが、未だ決定的な抗がん剤の開発がなされていない。天然には人知を超えた特異な化学構造をもつ化合物が存在し、それらには思いがけない新しい生理活性が期待できることから天然化合物は古くから薬用資源として注目されてきた。1970年代から植物に加え、海洋の動植物が注目されるようになり、今日まで数多くの生理活性物質が発見されてきた。なかでも抗がん物質の探索対象とした研究がアメリカを中心として活発に行われ、抗がん剤として有望な化合物が数種得られている。しかし、この種の研究では抽出材料の大量収集が困難で莫大な費用がかかる上、同種の動植物でも採集場所や時期により成分が異なることがある難点がある。

一方、テトロドトキシン等これまで発見されてきた海洋生物由来の生理活性物質の一部が体内の細菌により生産されることが報告された。この事実は他の海洋菌類も海洋動植物から得られるような生理活性物質を代謝する可能性を示唆している。このような背景から、申請者は菌類の代謝産物は培養により持続的に補充可能であることに早期から着目し、海洋動植物本体ではなく、それらから分離した菌類を生理活性物質の探索対象として研究を行ってきた。

2. 研究の目的

近年、天然からの新規生理活性物質の発見は、減少の一途を辿っており、有機・天然物分野の学会・学術発表においても、その7割近くを合成研究が占めている。しかし、医薬品の開発の多くは、生理活性天然物をシーズとして発展してきた。その医薬品のシーズになり得る新規化合物の探索は、創薬の基盤として欠くことのできない研究分野であり、衰退させてはならないと考える。また、化学合成の分野においてもこれらの一部が全合成に向け盛んに研究されており、本研究が機能性分子の開発に重要な役割を担っている。菌類の代謝産物から新規化合物を単離し、その細胞増殖阻害を検定するのみでは、より実用的な医薬品の開発には繋がらない。そこで、がんの増殖・転移に関与する分子を標的としたスクリーニングを用い、分子レベルで阻害機構を解明し、構造活性相関を検討していくことで、より機能性を有したリード化合物の創製を目指す。

3. 研究の方法

本研究の課題は、海洋に棲息する菌類の産生する代謝物より抗腫瘍性及び細胞毒性を有する化合物の探索及びそれらをシーズとした機能性リード化合物の開発であり、以下に示す研究方法で進めた。

(1) 有用な菌類の分離

日本近海において海藻、海水魚、節足動物、棘皮動物及び軟体動物などを採取し、各々の切片もしくは内臓及びその内容を5種類の組成の異なる寒天平板培地にそれぞれ塗布し、それらに寄生もしくは付着している菌類を繁生させる。採取可能な大きさにまで生育したバクテリア、放線菌及び真菌を同じ組成の寒天培地の入った試験管(以下スラント)に随時3~5週間にわたりピックアップしていく(海洋生物1検体につき、およそ20~30種類の菌類を分離)。次にこれら菌類をそれぞれ少量の液体培地で培養後(30 mL, 3~7日間静置培養)、酢酸エチル-MeOH(5:1)の混合溶媒で抽出し、得られたエキスについてP388マウスリンパ性白血病細胞及びHL-60ヒト急性骨髄性白血病細胞に対する増殖阻害活性試験を実施し、強い細胞増殖阻害物質を産生する菌を選別する。菌によっては非常に変性しやすいものも多く、コンピューターにより菌類の性状、継代培養期間及び最適保管温度を厳密に管理することにより、菌類の生育および生理活性の再現性を確保する。

(2) 大量培養による活性本体の探索

(1)の実験において見出された細胞毒性物質産生菌について少しスケールアップした培養を行い(10 L, 2~4週間静置培養)、今度はる過により菌体と培養液に分離し、菌体はMeOHで冷浸、また培養液は酢酸エチルで抽出し、それぞれ2種類のエキスを得る。得られた各菌類の2種類のエキスについて細胞増殖阻害活性試験を実施し活性の有無・強さ・再現性さらに代謝物の収量などを検討し、有用菌の候補となるものをさらに絞り込む(この段階で菌の数は3~5種類になる)。これまでの研究は初年度で確実に達成することができると考えており、次に本申請研究の中心である分離・精製による生理活性物質探索過程へと進む。上述の数種類となった探索対象菌についてそれぞれ大容量で培養を行い(60 L, 4週間静置培養)、得られた菌体 MeOH エキスと培養液酢酸エチルエキスのうち細胞毒性の強い方について分離・精製を優先して進める。分離・精製には Shephadex LH-20、シリカゲル及び HPLC などのクロマトグラフィを用い、分離ごとの各分画の細胞増殖阻害活性を指標に進めていき、活性本体の単離へと到達する。得られた単一の化合物については、NMR (500 MHz), IR, MASS などの各種スペクトルを用いて構造解析を行い、改良 Mosher 法, CD スペクトル及び化学反応を駆使し、その絶対構造まで決定する。一つ化合物が特定できれば、続いて類縁体の探索へと移る。生理活性物質の補充および微量成分の補足については、本研究の特徴でもあるが繰り返し培養することにより補充することが可能である。また、既存の細胞毒性物質産生菌を代謝物の検討も行っているため二年目以降も本計画を継続し、多くの新規物質及び

それらの類縁体の単離を行う。

(3) 活性化化合物をリードとしたリード化合物の開発

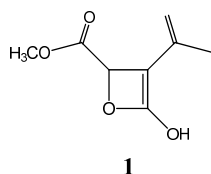
化合物の活性は、基本骨格が同じでも官能基などにより、大きく影響される。(2)の実験により新規生理活性物質だけでなくその類縁体をできる限り多く単離することにより、構造活性相関を検討することが可能となる。天然化合物の活性発現に必要なコア構造を明らかにするとともに、さらに水酸基など反応性に富む官能基を修飾して新たなリード化合物を創製し、細胞増殖阻害活性試験及び分子標的スクリーニング(外部に委託)を実施する。また、代謝物の精製段階において、ユニークな構造を有すると推定される化合物については、細胞増殖阻害活性の有無にかかわらず単離を行い、同様にその構造解析を行い、それらをシーズにリード化合物の検討を行う。

4. 研究成果

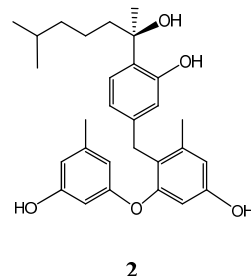
(1) 大阪府泉南郡岬町沿岸において海洋生物を採取し、各々の切片もしくは内臓及びその内容を5種類の成分の異なる寒天平板培地に塗布し、生えてきたバクテリア、放線菌及び真菌を随時同じ成分の寒天培地に入った試験管(以下スラント)に拾い、のべ約80種類の菌類を分離した。次にこれら菌類をそれぞれ同じ成分の液体培地で3~7日間静置培養後、酢酸エチル-メタノール(5:1)で菌体ごと抽出し、得られたエキスについてP388マウスリンパ性白血病細胞及びHL-60ヒト急性骨髄性白血病細胞に対する増殖阻害活性試験を実施し、6種の菌が優位な細胞毒性物質産生菌として見出すことができた。全て真菌であった。

(2) 得られた細胞毒性物質産生菌について活性本体およびその類縁化合物を探索することを目的とし、大量培養を行った。このうち、活性が強く、代謝物収量が多い以下の2種について分離・精製を進めた。

ワカメ表面から分離した真菌 *Stereum* sp. より、1種の新規物質1を単離し、各種スペクトルの解析により、その構造を決定した。絶対立体構造を目下検討中である。本品は複数の培養がん細胞に対し、強い増殖阻害活性を示した。その活性及び構造の新規性を受け、特許出願中である(特願2016-086493)。本品をシーズとした機能分子開発及び類縁体の単離を目的として、培養条件を検討し、最も効率的に代謝物を得ることができる期間を見出した。

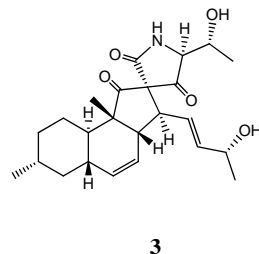


ウメボシイソギンチャクより分離した真菌(未同定)の代謝産物より1種の新規ポリフェノール類2を単離し、その平面構造を決定した。本品は、強い細胞増殖阻害活性を示した。不斉中心の絶対配置は既知物質との比較により推定したが、目下を検討中である。

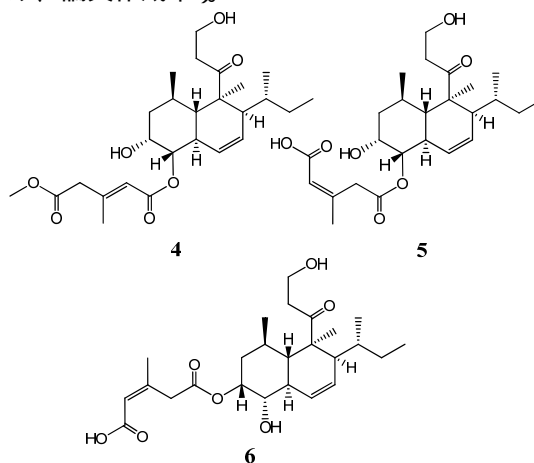


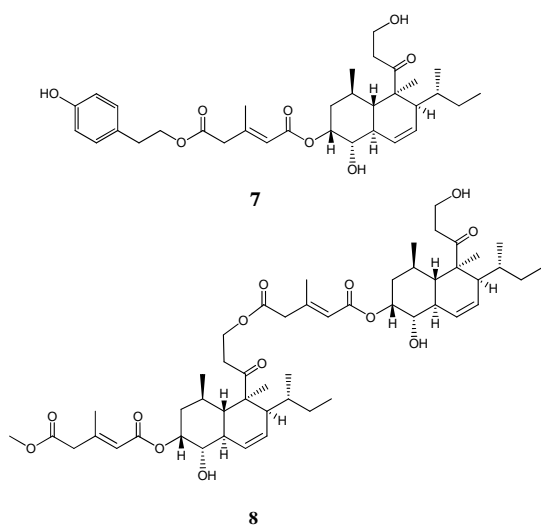
(3) 以前より抗腫瘍性物質のシーズとなり得る化合物の探索対象としている菌の代謝物について精査を行った。

ムラサキウニより分離した真菌 *Alternaria* sp. の代謝物について検討したところ、1種の新規物質3を単離し、その構造を決定した。本品は化学反応と新 Mosher 法によりその絶対構造を確立した(論文にて公表)。

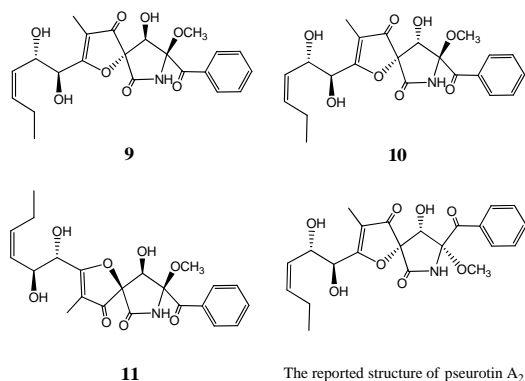


クロイソカイメンから分離した真菌 *Trichoderma harzianum* より5種の新規物質4-8を単離した。化学反応を用い、これらの絶対構造を明らかにした(論文にて公表)。このうち、7は強い増殖阻害活性を示したため、分子プロファイリング支援活動において、分子標的がん化学療法剤の適性を検討している。また、新たに新規ジテルペン2種を得た。これらの絶対構造は化学反応と新 Mosher 法によりその絶対構造を確立した(公表に向け、論文作成中)。





海水魚ボラより分離した真菌 *Aspergillus fumigatus* から既知物質として得られた pseurotin A, A₁ 及び A₂ (9 - 11) の絶対構造を検討していく過程で CD スペクトルと絶対配置の相関に有意な規則性を見出した。その結果、11 の文献記載の立体構造に誤りがあることを発見し、訂正論文を投稿し、掲載受諾された。



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)

Takeshi Yamada, Takashi Kikuchi, and Reiko Tanaka.

Altercrasin A, a novel decalin derivative with spirotetramic acid, produced by a sea urchin-derived *Alternaria* sp.

Tetrahedron Lett., **56**, 1229–1232, 2015.

doi:10.1016/j.tetlet.2015.01.066

査読有

Takeshi Yamada, Yoshihide Umebayashi, Maiko Kawashima, Yuma Sugiura, Takashi Kikuchi, Reiko Tanaka.

Determination of the chemical Structures of tandyukisins B–D, isolated from a marine sponge-derived fungus.

Marine Drugs, **13**, 3231–3240, 2015.

doi:10.3390/md13053231

査読有

Mayo Suzue, Takashi Kikuchi, Reiko Tanaka, Takeshi Yamada.

Tandyukisins E and F, novel cytotoxic decalin derivatives isolated from a marine sponge-derived fungus.

Tetrahedron Lett., **57**, 5070–5073, 2016.

doi: 10.1016/j.tetlet.2016.10.004

査読有

Takeshi Yamada, Mina Ohshima, Kaori Yuasa, Takashi Kikuchi, Reiko Tanaka.

Assignment of the CD Cotton Effect to the Chiral Center in Pseurotins, and the Stereochemical Revision of Pseurotin A₂.

Marine Drugs, **14**, 74–80, 2016.

doi:10.3390/md14040074

査読有

〔学会発表〕(計8件)

山田 剛司

カイメン由来真菌の産生する新規代謝物の絶対構造 (2)

日本薬学会第135年会

2015年3月

神戸

山田 剛司

ムラサキウニ由来真菌の新規代謝産物 altercrasin 類の構造

日本薬学会第136年会

2016年3月

横浜

山田 剛司

カイメン由来真菌の産生する新規細胞毒性物質の絶対構造

日本薬学会第136年会

2016年3月

横浜

山田 剛司

海水魚由来真菌の産生する spiroheterocyclic γ -lactam -Pseurotin A の立体異性体の絶対構造-

第66回 日本薬学会近畿支部大会

2016年10月

大阪

山田 剛司

クロイツカイメン由来真菌の産生する新規ジテルペンの化学構造

第66回 日本薬学会近畿支部大会

2016年10月

大阪

山田 剛司

ワカメ表皮から分離した真菌の産生する新規細胞毒性物質

第66回 日本薬学会近畿支部大会

2016年10月

大阪

山田 剛司

イソギンチャク由来真菌の産生するポリフェノール

第 66 回 日本薬学会近畿支部大会
2016 年 10 月
大阪

山田 剛司
ムラサキウニ由来真菌の産生する新規
decalin 誘導体
第 66 回 日本薬学会近畿支部大会
2016 年 10 月
大阪

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山田 剛司 (YAMADA, Takeshi)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20278592