

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07116

研究課題名(和文) 海産天然物をシースとした核内受容体PXRアンタゴニストの開発

研究課題名(英文) Development of nuclear receptor PXR antagonists from marine natural products

研究代表者

久保田 高明 (KUBOTA, Takaaki)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：60399954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物を研究材料として、核内受容体PXRに親和性を示す新規化合物の探索を行った。その結果、Amphimedon属の海綿動物から新規マンザミン関連アルカロイド・ザマミフィジンBおよびCを単離し相対立体配置を含めて構造決定した。また、Suberea属の海綿動物から新規プロモチロシンアルカロイド・マエダミンEおよびFを単離し構造決定した。これらに加え、渦鞭毛藻から3個、海綿動物から8個の新規化合物を単離し、一部の立体化学を含めて構造決定した。現在、これらの化合物の立体化学の解析を進めるとともに、新規化合物および同時に単離した既知化合物について、PXRに対する活性評価を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬物代謝は異物を体外に排出する重要な解毒機構であるが、一方で異物とみなした薬物の薬効を減弱させてしまう。核内受容体PXRは、薬物代謝酵素や薬物トランスポーターの発現を誘導し、薬物代謝を亢進させることにより様々な薬物の薬効を減弱させる。PXRの機能を阻害すれば薬物の薬効減弱を防ぐことができるが、選択的な阻害剤は合成化合物のSPA70のみであるため、新しいタイプの阻害剤の開発が求められている。本研究により渦鞭毛藻や海綿動物から15個の新規化合物が得られた。これらの化合物は既存のPXR阻害剤とは異なる化学構造を有していることから、新たなPXR阻害剤のシースとなる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：The search for new marine natural products having affinity for nuclear receptor PXR from marine organisms was performed. As a result, new manzamine-related alkaloids zamamiphidins B and C were isolated from an Amphimedon sp. marine sponge and their structures, including the relative configurations were elucidated. While new bromotyrosine alkaloids ma'edamines E and F were isolated from a Suberea sp. marine sponge and their structures were elucidated. In addition to these, three new marine natural products were isolated from dinoflagellates and eight from sponges, and their structures were elucidated, including their partial stereochemistry. The stereochemistry of these marine natural products were currently being analyzed. In addition, the activity of new and known compounds against PXR being evaluated.

研究分野：天然物化学

キーワード：核内受容体 Pregnane X Receptor アンタゴニスト 海洋生物 海綿動物 渦鞭毛藻 海産天然物 天然有機化合物

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

生体に取り込まれた物質は薬物代謝によって体外に排出される。薬物代謝は第1相～第3相に分類される。第1相ではシトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素によって生体外物質にヒドロキシ基などの極性官能基が導入され、第2相では転移反応を触媒する薬物代謝酵素によって極性官能基に極性化合物が結合し、第3相では構造変換された生体外物質が薬物トランスポーターによって細胞外へ排出される。しかし、薬物代謝が亢進すると、薬物が十分な薬効を発揮する前に体外に排出されてしまったり、構造変換によって毒性が増強されてしまったりと、薬物代謝が望まない結果につながる場合がある。また、薬物を併用する際、ある薬物が別の薬物の排出や毒化を促進させるなどの薬物相互作用が問題となることが多いため、薬物代謝を適切に制御することは非常に重要である。

核内受容体 Pregnane X Receptor (PXR) は、第1相代謝に関わるヒト CYP 分子種のうち薬物代謝への寄与が最も大きい CYP3A4 などの薬物代謝酵素に加えて、第2相代謝に関わる UDP グルクロン酸転移酵素などの薬物代謝酵素や第3相代謝に関わる P 糖タンパク質などの薬物トランスポーターの発現を誘導することから、PXR の機能を適切に制御できれば望まない薬物代謝を抑えることができる。実際、PXR は様々ながん細胞で過剰発現しており、PXR アンタゴニストが抗がん剤の薬剤耐性を抑え治療効果を改善することが明らかになっている。しかし、選択的な PXR アンタゴニストは合成化合物の SPA70 のみであるため、選択的で強力な新しいタイプの PXR アンタゴニストが求められている。

蛋白質構造データバンクには PXR の結晶構造が複数登録されており、他の核内受容体に比べて PXR のリガンド結合部位は非常に大きなポケットを形成していることが明らかになっている。そのため、PXR のリガンド結合ポケットはプレグナンなどのステロイド骨格をもつリガンドだけでなく、多様な構造の化合物が相互作用する。例えば、リファンピシンなどの抗生物質や、ハイパフォリン、フォルスコリン、パクリタキセルなどの植物由来天然物に加え、海綿動物由来のグラシリオエーテル類や渦鞭毛藻由来のオカダ酸などがアゴニスト作用を示す。また、アゴニストに比べると数が少ないものの、ケトコナゾールなどの合成抗真菌薬、カンプトテシン、フェネチルイソチオシアネートなどの植物由来天然物、ホヤ由来のエクテナサイジン 743 (トラベクテジン) など、アンタゴニスト作用を示す化合物も知られている。

しかし、現在知られている化合物だけでは、PXR に特異的に結合する化合物の構造的特徴を捉えるのが難しい。また、他のタンパク質のように *in silico* スクリーニングなどの計算化学的手法を用いて PXR に特異的に結合する化合物の構造を予測することが困難であるため、アゴニスト、アンタゴニスト作用の発現に必要な化合物の構造的特徴も不明である。そのため、実際に PXR に親和性を示す化合物を探索するのが、PXR アンタゴニストを獲得する堅実な方法といえる。しかし、天然物をシーズとした創薬研究において、細胞毒性や抗菌活性などの直接的な生物活性に注目して医薬品シーズの探索が行われる場合が多いことから、ある活性をもつ医薬品が、後になって薬剤耐性克服作用を合わせもつことが明らかになる場合はあるものの、初めから他の薬物の薬効減弱を防ぐ作用に注目し、PXR をターゲットとする化合物の探索は十分に行われていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PXR アンタゴニストの探索源として十分に研究が行われていない海洋生物から核内受容体 PXR に親和性を示す新規海産天然物を見つけ出し、作用解析および構造活性相関の研究を行うことにより、選択的で強力な新しいタイプの PXR アンタゴニストを開発し、様々な薬物の薬効減弱を防ぐ新たな医薬品のリード化合物を創出することである。

3. 研究の方法

(1) 新規海産天然物の単離、構造決定

- ① 渦鞭毛藻を、培地を添加した滅菌海水を用いて、明期 16 時間、暗期 8 時間の光周期下で培養する。
- ② 培養により得られた渦鞭毛藻に含まれる成分を種々の溶媒を用いて抽出する。
- ③ 渦鞭毛藻が培養液に放出した成分については、ポリマー系の担体に吸着させた後、種々の溶媒を用いて抽出する。
- ④ ^1H NMR シグナルや MS の分子イオンピークを指標とし、種々の担体を用いたカラムクロマトグラフィーを用いて抽出物の分離を進め、新規海産天然物を単離する。
- ⑤ 渦鞭毛藻に加えて、研究代表者が保持している海綿動物抽出物についても、同様の方法により分離を進め、新規海産天然物を単離する。
- ⑥ NMR や MS を中心とした分光学的手法により、新規海産天然物の構造を解析する。
- ⑦ 分光学的手法により推定した構造を、有機化学および生合成の観点から検証する。
- ⑧ 必要な場合には化学的手法および計算化学を用いて、立体化学を含めて構造を決定する。

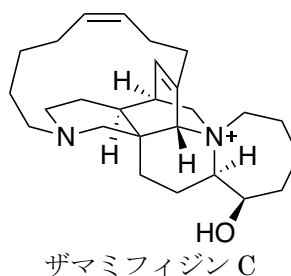
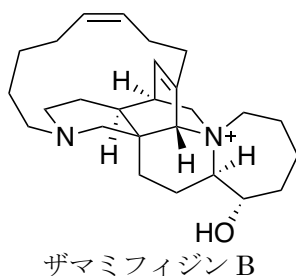
(2) PXR に対する活性評価

- ① 示差走査蛍光定量法を用いた結合評価系により海産天然物の PXR に対する親和性を評価する。
- ② PXR に親和性を示した海産天然物の作用 (アゴニスト、アンタゴニスト) を、レポーターアッセイにより解析する。

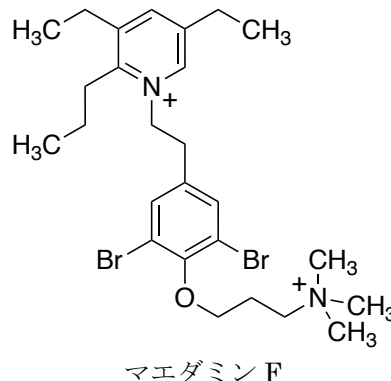
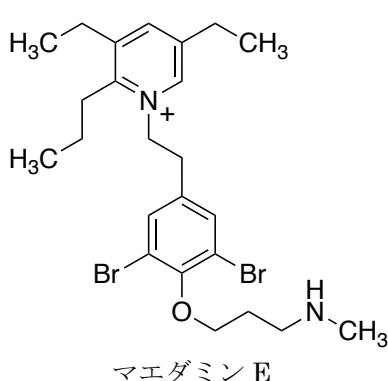
4. 研究成果

(1) 渦鞭毛藻および海綿動物を素材として新規海産天然物の探索を行い、以下の研究成果を得た。

- ① *Amphidinium* 属の渦鞭毛藻 (7-4A-5D 株) の培養液から、1 個の新規 15 員環マクロリド・化合物 1 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ② *Amphidinium* 属の渦鞭毛藻 (14-2-1 株) の培養液から、1 個の新規 19 員環マクロリド・化合物 2 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ③ 以前に *Amphidinium* 属の渦鞭毛藻 (Y-212 株) から単離していた 1 個の新規長鎖ポリケチド・化合物 3 の構造を、一部の立体化学を含めて決定した。
- ④ *Agelas* 属の海綿から、1 個の新規ジテルペンアルカロイド・化合物 4 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ⑤ 以前に *Amphimedon* 属の海綿から単離していた 2 個の新規マンザミン関連アルカロイド・ザマミフィジン B および C の構造を、相対立体配置を含めて決定した。



- ⑥ *Dysidea* 属の海綿から、1 個の新規ポリヒドロキシステロール・化合物 5 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ⑦ *Halichondria* 属の海綿から、5 個の新規メロテルペノイド・化合物 6~10 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ⑧ *Pseudoceratina* 属の海綿から、1 個の新規プロモチロシンアルカロイド・化合物 11 を単離し、一部の立体化学を含めて構造を決定した。
- ⑨ *Suberea* 属の海綿から、2 個の新規プロモチロシンアルカロイド・マエダミン E および F を単離し、構造を決定した。



現在、本研究により得られた新規海産天然物のうち、立体化学が未決定のものについて立体化学の解析を進めるとともに、新規化合物および同時に単離した既知化合物について、PXR に対する活性評価を進めている。なお、これまでに、ザマミフィジン B および C は弱いアセチルコリンエステラーゼ阻害活性を示すことが明らかになっている。また、マエダミン E および F はマウス白血病細胞 L1210 に対して弱い細胞毒性を示すことが明らかになっている。

海産天然物は、特異な構造の化合物が多く多様性にも富んでいるため、新しいタイプの PXR アンタゴニストの探索源として極めて有望である。本研究により見いだされた新規海洋天然物も、既存の PXR アゴニスト、アンタゴニストとは異なるタイプの構造を有している。今後、海産天然物からオリジナリティーの高い PXR アンタゴニストが生まれる可能性が十分にある。新たな PXR アンタゴニストの発見が PXR の機能発現機構の解明につながり、機能発現機構に

基づいた **PXR** アンタゴニストの開発へと研究が展開することも期待できる。

また、多くの発がん物質は、薬物代謝酵素によって発がん性を発現することも知られていることから、**PXR** アンタゴニストの探索は新たながん予防策の立案につながる可能性もある。さらに、**PXR** が潰瘍性大腸炎、糖尿病性腎症、肝肥大および肝発がんなどにも関与していることが報告されていることから、**PXR** アンタゴニストの探索は、これらの疾患の治療に直接有効な医薬品の開発へと発展する可能性も秘めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurimoto Shin-ichiro, Okamoto Ayano, Seino Satsuki, Fromont Jane, Kobayashi Jun'ichi, Kubota Takaaki	4. 巻 103
2. 論文標題 Ma'edamines E and F, rare bromotyrosine alkaloids possessing a 1,2,3,5-tetrasubstituted pyridinium moiety from an Okinawan marine sponge <i>Suberea</i> sp.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153985 ~ 153985
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tetlet.2022.153985	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurimoto Shin-ichiro, Suzuki Shoichi, Ueno Mayumi, Fromont Jane, Kobayashi Jun'ichi, Kubota Takaaki	4. 巻 85
2. 論文標題 Zamamiphidins B and C, Manzamine-Related Alkaloids from an <i>Amphimedon</i> sp. Marine Sponge Collected in Okinawa	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2226 ~ 2231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.2c00395	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗本慎一郎、岡本彩乃、清野皐月、小林淳一、久保田高明
2. 発表標題 沖縄産海綿 <i>Suberea</i> sp.から単離した新規プロモチロシナルカロイドの構造
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗本慎一郎、石塚芽衣菜、武田郁恵、矢口貴志、小林淳一、久保田高明
2. 発表標題 沖縄産 <i>Dysidea</i> 属海綿から単離したポリヒドロキシステロールの構造および活性
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学薬学部・大学院医歯薬学総合研究科（薬学系）天然物化学研究室ホームページ
<https://tenneniyakuhinkaihatsugakubunya.weebly.com>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	栗本 慎一郎 (Kurimoto Shin-ichiro)		
研究協力者	関口 光広 (Sekiguchi Mitsuhiro)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	西オーストラリア州立博物館		
ベトナム	ハイフォン医科薬科大学		