

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12740

研究課題名(和文)抗腫瘍活性天然物の活性制御機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism regulating the function of a natural cytotoxin

研究代表者

脇本 敏幸(WAKIMOTO, Toshiyuki)

北海道大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70363900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：海洋天然物には極めて低濃度で強力な細胞毒性を示す化合物が見出されており、抗がん剤のリード化合物として期待されている化合物が複数存在する。強力な細胞毒性物質は、それを生産する生物自身においても有害な作用を及ぼす可能性があり、その生合成過程には自らが生産した二次代謝産物の毒性に対する自己耐性機構および活性化機構が潜在的に内在している可能性が高い。しかし、強力な細胞毒性を有する海綿由来天然物において、このような耐性・活性化機構を明らかにした研究例はこれまでほとんどない。そこで、本研究では海綿由来細胞毒性物質の組織傷害応答性の活性化機構を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges are prolific sources of highly potent cytotoxic compounds, some of which are promising as anticancer drugs. However, the potent cytotoxicity would be harmful to the host sponge, because marine sponges are also animals. Therefore, it is possible that the self-resistance and activated defense systems underlie their biosynthetic mechanism. Wound-activated chemical defense systems are prevalent among terrestrial plants. The precursor molecule and the activating enzyme are compartmentalized in the tissue, which is readily disrupted by wounding to accomplish chemical defense. The similar activated defense strategy has also been found in a few marine sponges. In previous study, we obtained calyculin biosynthetic gene cluster from the metagenomic DNA of Japanese marine sponge *Discodermia calyx* and the deactivating enzyme was also clustered. The aim of this work is to identify the as-yet unknown enzyme involved in the activating process of the precursor molecule.

研究分野：天然物化学

キーワード：Calyculin A リン酸化 脱リン酸化 海綿動物

1. 研究開始当初の背景

海洋天然物には極めて低濃度で強力な細胞毒性を示す化合物が見出されており、抗がん剤のリード化合物として期待されている化合物が複数存在する。中でもハリコンドリン B やエクテナサイジン¹は海洋天然物由来の抗がん剤開発の成功事例として記憶に新しい。細胞毒性物質の多くがチューブリンやアクチンなどの細胞骨格分子やタンパク質脱リン酸化酵素などを特異的に阻害し、細胞周期に変調をもたらし、増殖阻害活性を發揮する。自然界において極めて精緻に構築された分子構造が特異的な作用を可能にしている。しかし、それらの臨床応用においては、供給方法や選択毒性などの課題が残り、研究用の試薬として利用されている化合物が多いのが現状である。

そこで、申請者は海洋生物より見出されてきたこれらの貴重な天然資源をさらに有効に利用することを目的に研究を行っている。前述の臨床応用への課題として挙げた供給方法の問題においては、海綿由来生物活性物質の生産を担う共生微生物を特定し、その培養あるいは生合成遺伝子の異種発現系の確立によって克服する方法を模索している。これらの研究課題によって生合成遺伝子クラスターや生産微生物の様相が徐々に明らかになってきている。

一方で、もう1つの課題である選択毒性の発現に関して、一連の生合成研究によって新たな知見を見出した。強力な細胞毒性物質は、それを生産する生物自身においても有害な作用を及ぼす可能性があり、その生合成過程には自らが生産した二次代謝産物の毒性に対する自己耐性機構および活性化機構が潜在的に内在している可能性が高い。その自己耐性-活性化機構はすなわち細胞毒性物質の活性制御機構に直結し、活性制御を担う酵素群の特定に繋がる。従来、抗生物質の生産菌や院内感染を引き起こす病原菌においてはアセチル化やリン酸化を経る抗生物質への耐性機構が詳細に研究されてきた。しかし、強力な細胞毒性を有する海洋天然物において、このような耐性-活性化機構を明らかにした研究例はわずかである。

2. 研究の目的

本研究では伊豆半島産チョコガタイシカイメン (*Discodermia calyx*) に含まれる細胞毒性物質である calyculin A の生合成過程における細胞毒性制御機構を明らかにすることを目的とした。Calyculin A はタンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A を特異的に阻害し、各種がん細胞に対して pM オーダーで増殖阻害活性を示す。当初は抗がん剤リード化合物として期待されたが、選択毒性が低く、臨床開発には至っていない。現在特異的なタンパク質脱リン酸化酵素 1 および 2A 阻害剤として和光純薬工業より市販され、生化学研究用試薬として汎用されている。我々は数年前よ

り calyculin A の生合成遺伝子クラスターの探索を進め、伊豆半島産海綿 *Discodermia calyx* よりメタゲノムライブラリーを作成、ポリケチド合成酵素遺伝子に保存性の高い配列を足掛かりとしてスクリーニングを行った。その結果、全長 150 kbp に及ぶ長大な生合成遺伝子クラスターの取得に至った。予想通り、本遺伝子クラスターは型ポリケチド合成酵素と非リボソーム型ペプチド合成酵素をコードしており、それらのモジュールやドメインの構成は calyculin A の構造と良い一致を示した。さらに、遺伝子クラスターの同在を解析することで、calyculin A は海綿共生微生物 *Entotheonella* によって生合成されることを突き止めた。

得られた calyculin A 生合成遺伝子クラスターをもとに、詳細な生合成経路の解析を進めた結果、遺伝子クラスター上流にコードされるリン酸基転移酵素 CalQ が calyculin A にリン酸基を付与し、ピロリン酸基を含む phosphocalyculin A を生成することを明らかにした。Phosphocalyculin A の細胞毒性は calyculin A よりも約 1,000 倍低下しており、calyculin A の prodrug 体であることが示唆された。また、これらのことから、海綿共生微生物はより低毒性な phosphocalyculin A として生合成されており、動物である宿主側への毒性を軽減していることが示唆される。さらに Calyculin A は抗菌活性を示さないことから、生産者である *Eotheonella* に対しては毒性を示さないと考えられる。そのため、この巧妙な物質生産機構には共生微生物と海綿動物間のクロストークが伺える。そこで、本研究では phosphocalyculin A から calyculin A への変換を担う脱リン酸化酵素の同定を試みた。この現象には海綿動物と共生微生物間の巧妙な相互作用が示唆されており、二次代謝産物を介した共生関係を立証する上で、非常に重要な現象である(図1)。鍵酵素の同定によって、組織傷害依存的な Activated chemical defense 現象の解明につながり、*Entotheonella* が海綿動物に不可欠な共生微生物であることを立証できると考えた。

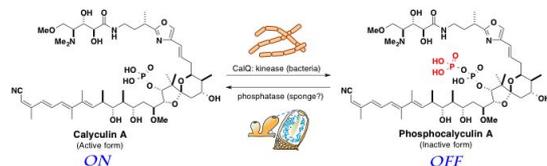


図1 海綿 *D. calyx* に見出された Activated chemical defense の推定機構

3. 研究の方法

海綿動物が示す Activated chemical defense の報告事例は、これまで数例のみである。海綿動物において最初に見出された事例は *Aplysina* 属海綿より単離されたイソオキサゾリンアルカロイドであり、1993年に Prokschらによって報告されている(Proksch et al.

Naturwissenschaften 1993, Vol 80, 369)。Aplysina 属海綿は組織障害に伴い活性化酵素が作動し、前駆体となるイソオキサゾリンアルカロイドのイソオキサゾリン環が開裂し、強力な抗菌活性を有する aeroplysinin-1 などが生成する。Aplysina 属海綿に含まれるイソオキサゾリンアルカロイドとその類縁体は、D. calyx に含まれる calyculin A 同様に、非常に含有量の多い二次代謝産物である。強力な生物活性を示す二次代謝産物の組織内大量蓄積と前駆体を利用した障害応答性の活性化機構との関連を示唆する。1993 年の発見以降、Aplysina 属海綿より単離されたイソオキサゾリンアルカロイドの活性化酵素の精製が進められたが、未だに同定には至っていない (Proksch et al. Mar. Drugs 2013, Vol 11, 3046)。

Aplysina 属海綿に含まれるイソオキサゾリンアルカロイドに関しては、未だその生合成遺伝子は明らかにされていない。一方で我々はすでに calyculin A の生合成遺伝子を取得していることから、活性化酵素の候補遺伝子を生合成遺伝子クラスターから検索することができる。実際に生合成遺伝子クラスターの上流にはタンパク質脱リン酸化酵素に相同性を示すタンパク質である CalL がコードされている。そこで、まず CalL を大腸菌を宿主に用いて異種発現し、その酵素活性を検討した。

さらに我々はすでに海綿より調製した粗酵素が強力な phosphocalyculin A 脱リン酸化活性を有することを見出している。この酵素活性は強力かつ比較的安定であるため、酵素活性を指標に活性化酵素の分画、精製を進めることが可能である。そこで、各種分画方法を検討し、phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素の精製を試みた。また、強力な酵素活性を利用したザイモグラフィーによる分画も試みた。Phosphocalyculin A は採集した海綿 D. calyx を液体窒素で瞬間凍結し、凍結乾燥した海綿より抽出、精製した。

4. 研究成果

まず calyculin 生合成遺伝子クラスター上流にコードされている CalL の大腸菌での発現を試みた。CalL は *Burkholderia cenocepacia* のゲノムにコードされるタンパク質脱リン酸化酵素に対して 52% の相同性を示す。しかし、その機能は明らかにされていない。我々は CalL が phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素として機能する可能性を検討するために、大腸菌を用いた CalL 酵素の異種発現を試みた。シャペロンとの共発現によって可溶性タンパク質を得て、phosphocalyculin A を基質に用いて in vitro で酵素反応を試みた。タンパク質脱リン酸化酵素には 2 価の金属イオンが活性発現に重要な場合が知られているため、Mg、Mn 等の金属イオン存在下、反応を試みた。しかしながら phosphocalyculin A から calyculin A への変換は認められなかった。

次に海綿粗酵素液からの酵素精製を試みた。海綿粗酵素液は海綿 D. calyx を Tris バッファーで抽出し、超遠心によって膜画分を除去し、可溶性画分を得た。すでに予備検討によって脱リン酸化活性は可溶性画分に検出されることがわかっているため、得られた可溶性画分をさらに Sephadex G15 カラムクロマトグラフィーによって脱塩し、粗酵素液とした。この段階で見出された脱リン酸化活性を指標に硫酸分画、アセトン沈殿、エタノール沈殿を試みたが、効率的な分画には至らなかった。

次に、各種クロマトグラフィー法を試みた。ゲル濾過、陰イオン交換カラム、陽イオン交換カラム、アフィニティカラム、等電点電気泳動等の分画方法を試みた。その結果、Sephacryl S200HR と DEAE sephacryl カラムを組み合わせることで約 100 倍の比活性を有する分画を得ることができた。しかしながら、得られた酵素画分は非常に少量であったため SDS-PAGE によって明確なバンドを見出すことができなかった。さらにスケールを上げて海綿 100 g を用いて同様の分画を行った結果、活性画分の SDS-PAGE には複数のバンドが認められた。

そこでさらに、効率的なカラムクロマトグラフィーを行うために、ヒドロキシアパタイトを用いた分画を試みた。その結果、数百倍の比活性の濃縮が認められた。さらに、ゲル濾過の溶出画分から目的とするタンパク質の分子量は非常に大きいことが予想されたため、粗酵素液のプロテアーゼ処理を試みることにした。トリプシン、キモトリプシン、パパイン、プロテイナーゼ K を用いてプロテアーゼ処理を行い、脱リン酸化活性を調べた結果、いずれのプロテアーゼによっても活性は維持されていることが分かった。特にパパイン処理では比活性の向上が認められたため、分画工程に加えることとした。

上記の検討をもとに、再度海綿 100 g より phosphocalyculin A 脱リン酸化酵素の精製を試みた。粗酵素画分を DEAE Sephacel によって分画し、750 mM NaCl 画分をさらにヒドロキシアパタイトカラムによって分画した。得られた活性画分をパパインで処理し、脱リン酸化活性が維持されていることを確認した。さらに Superdex 200 によって分画し、比活性が粗酵素液よりも約 10 万倍濃縮した活性画分を得ることに成功した。

SDS-PAGE によって活性画分に特異的なバンドが確認できたことから、該当するバンドを切り出し、MS/MS 解析に供した。しかしながら、タンパク量が微量であったため、アミノ酸配列の解析には至らなかった。そこで、さらにザイモグラフィーを用いて、ゲルの切り出し、活性試験を繰り返し、該当するバンドの取得を試みた。得られたタンパク質のアミノ酸配列の解析を現在進めている。

Phosphocalyculin A の活性化機構は海綿の組織傷害が引き金になることから、物理的傷

害から瞬時に伝わる下流の情報伝達機構の存在が示唆される。しかし、この複雑な情報伝達経路に関しては本研究では詳細な検討には至らなかった。今後、活性化酵素の同定も含めて引き続き、検討を進めていく予定である。

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9件)

Wakimoto, T., "Toward dark matter of natural products", *Chem. Rec.*, 査読有 *in press* (2017). DOI: 10.1002/tcr.201700009

Zhang, L., Hashimoto, T., Qin, B., Hashimoto, J., Kozono, I., Kawahara, T., Okada, M., Awakawa, T., Ito, T., Asakawa, Y., Ueki, M., Takahashi, S., Osada, H., Wakimoto, T., Ikeda, H., Shin-ya, K., Abe, I., "Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides", *Angew. Chem. Int. Ed.*, 査読有, 56, 1740-1745 (2017). DOI: 10.1002/anie.201611371

Nakashima, Y., Egami, Y., Kimura, M., Wakimoto, T., Abe, I., "Metagenomic analysis of the sponge *Discodermia* reveals the production of the cyanobacterial natural product kasumigamide by 'Entotheonella'", *PLoS ONE*, 査読有 11(10): e0164468 (2016). DOI: 10.1371/journal.pone.0164468

Tan, K. C., Wakimoto, T., Abe, I., "Sulfoureido lipopeptides from the marine sponge *Discodermia kiiensis*", *J. Nat. Prod.*, 査読有 79, 2418-2422 (2016). DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00586

Wakimoto, T., Egami, Y., Abe, I., Nature's way of making sponge-derived bioactive molecules. *Nat. Prod. Rep.* 査読有 33, 751-760 (2016). DOI: 10.1039/C5NP00123D

江上蓉子, 脇本敏幸, 阿部郁朗, 海綿共生微生物による生物活性物質の生産、バイオインダストリー, 査読有 33, 11-17 (2016)

Takeshige, Y., Egami, Y., Wakimoto, T., Abe, I., Production of indole antibiotics induced by exogenous gene derived from sponge metagenome. *Mol. BioSyst.*, 査読有 11, 1290-1294 (2015). DOI: 10.1039/c5mb00131e

江上蓉子, 脇本敏幸, 阿部郁朗, 海綿動物の化学防御を担う共生細菌、細胞工学, 査読有 34, 412-416 (2015)

脇本敏幸, 江上蓉子, 阿部郁朗, 海綿-共生微生物系の化学防御機構、化学と生物, 査読有 53, 479-499 (2015)

[学会発表](計7件)

Wakimoto, T., Toward the dark matter of marine natural products, International Symposium on Marine Natural Products (招待講演), 2017年2月28日, Seoul, Korea

脇本敏幸, 難培養微生物を起源とする海綿由来生物活性物質の生合成研究 (招待講演), 日本農芸化学会 2016年度大会, 2016年3月30日, 北海道札幌市, 札幌コンベンションセンター

Wakimoto, T., Recent topics in natural product-derived protein phosphatase inhibitors (招待講演), 第93回日本生理学会, 2016年3月22日, 北海道札幌市, 札幌コンベンションセンター

Wakimoto, T., Activated chemical defense of a sponge-microbe association (招待講演), Gordon Research Conference of Marine Natural Products, 2016年3月8日, Ventura, CA, USA

脇本敏幸, 海綿-共生微生物系の化学防御機構 (招待講演), 第67回日本生物工学会, 2015年10月27日, 鹿児島県鹿児島市, 城山観光ホテル

脇本敏幸, 海洋天然物化学が明示した難培養微生物の存在 (招待講演), 第50回天然物化学談話会, 2015年7月3日, 宮城県岩沼市, グリーンピア岩沼モンタナリゾート

脇本敏幸, 海綿-共生微生物系の化学防御機構 (招待講演), 第10回化学生態研究会, 2015年6月13日, 北海道函館市, 湯の川プリンスホテル渚亭

[図書](計1件)

脇本敏幸, カリクリンの生合成、天然物の化学—魅力と展望—(上村大輔編) 科学のとびら 60, 東京化学同人, 2016 (分担執筆) p.61-66

[その他]

北海道大学大学院薬学研究院天然物化学研究室

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/tennen/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

脇本 敏幸 (WAKIMOTO, Toshiyuki)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 70363900

(3)連携研究者

江上 蓉子 (EGAMI, Yoko)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 50758612