

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20248022

研究課題名（和文）遺伝子組換え酵母の生育能回復試験を用いた抗腫瘍性海洋天然物の探索と創製

研究課題名（英文）Search for antitumor marine natural products through growth recovery assay in engineered yeasts

研究代表者

松永 茂樹（MATSUNAGA SHIGEKI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60183951

研究成果の概要（和文）：有用物質探索で重要な点は、ハイスループットな *in vitro* の試験をいかにして細胞を用いた試験系での生理活性に結びつけるかという点である。吉田らが提唱している、遺伝子過剰発現により生育に異常をきたす酵母の生育を正常に戻すことを指標とする試験系は、ハイスループットな点と細胞に対して効果を示すことの両者を同時に満たす優れた試験系である。海産無脊椎動物抽出液をこの試験系で調べ、カイメン *Theonella swinhoei* からチアミンの生合成中間体を 2 種類得た。ついで、別種の未同定種カイメンから 3 種のステロイド配糖体を得た。

研究成果の概要（英文）：Most important issue in the natural products discovery study is how to link the high-throughput *in vitro* assay results and cell-based *in vivo* activities. The growth recovery assay of the otherwise lethal gene-overexpressing mutant yeasts constructed by Dr. Yoshida is a method of choice for such purposes. From the extracts of marine invertebrates we isolated two truncated thiamine derivatives from the marine sponge *Theonella swinhoei* and three steroid glycosides from an unidentified marine sponge.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2012 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	29,400,000	8,820,000	38,220,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：天然物化学

1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因のおよそ 30% はがんによる。その治療の一翼を化学療法は担っており、現在用いられている化学療法剤の多くは、微生物あるいは植物起源の天然有機化合物あるいはその化学誘導体である。同様に、海洋生

物からも抗腫瘍物質を探索しようとして活発に研究が続けられているが、十分な成果は挙げられていない。すなわち、がん細胞に対する細胞毒性物質は多数発見されたが、それらの多くは非選択的毒物で、動物実験で成果を挙げることができず、現時点で海洋生物由来

の抗がん剤はない。

近年の抗がん剤の探索研究では、生化学および遺伝子工学の成果を取り入れた標的指向型の生物試験として、がん細胞で特異的に発現する酵素や受容体を用いた試験がしばしば導入されている。このような試験管内（インビトロ）の試験で望ましい活性を示しても、細胞膜透過性の壁は厚く、そこで見いだされた化合物が細胞を用いた実験では効果を示さない例が多い。

最近になって、連携研究者の吉田らによって、約 5,000 種類の分裂酵母遺伝子を 1 つずつ導入した分裂酵母の組換え株が作成され 15、当該遺伝子の発現に伴うそれぞれの株の生育能が観察された。大多数の遺伝子は過剰発現しても酵母の生育に影響を及ぼさなかったが、169 種類の遺伝子は過剰発現すると分裂酵母の生育が阻害された。ヒトがん細胞の増殖に深く関わる遺伝子（がん化関連遺伝子）を出芽酵母で過剰発現すると、酵母の増殖が阻害されることがすでに知られていたが、吉田らの研究で生育停止を引き起こした遺伝子にも、がん細胞の増殖に深く関わる遺伝子のホモログが多数含まれており、これらの遺伝子産物の阻害剤はがん細胞の増殖を抑えることが期待された。

吉田らは、さらに、sec71 遺伝子の過剰発現による分裂酵母の生育停止が、その遺伝子産物の機能阻害物質であるブレフェルジン A により解消されることをはじめ、他の組換え酵母株においても、遺伝子産物の過剰発現による生育停止がその遺伝子産物の特異的阻害剤により解消されることを示した。すなわち、がん化関連遺伝子の過剰発現株に生育能の回復をもたらす化合物は、抗腫瘍物質の候補となりうることになる。ここで、酵母に対して作用しタンパク質の機能を抑えることができる化合物は、酵母の細胞膜を透過し、非選択的細胞毒性を示さないという性状を併せ持つことが注目された。そこで、本試験系と海産無脊椎動物に含まれる豊かな二次代謝産物ライブラリーを組み合わせて、抗腫瘍物質を探索するためのスクリーニングを行うとの着想を得た。

2. 研究の目的

(1) 日本沿岸の浅海産および深海産の海産無脊椎動物を探索源として、がん化関連遺伝子のホモログの過剰発現のため生育できない分裂酵母の生育回復試験を用いて、活性物質を探索し、それらの単離・構造決定を行う。

(2) 得られた化合物の標的分子に対するインビトロでの作用（標的とする遺伝子産物が

酵素活性を持つ場合）ならびに、がん細胞に対する増殖阻害活性を検定する。

(3) 上記のアッセイ系において良好な活性を示す化合物について、化学誘導化により化合物ライブラリーを調製する。無脊椎動物から得られる一連の活性を有する関連化合物（天然物ライブラリー）と併せて生物活性の評価を行い、活性物質の構造活性相関を明らかにする。

(4) 構造活性相関情報に基づく化合物の改変と生物活性の検定を繰り返し、活性物質を改良する。

3. 研究の方法

(1) 生物活性スクリーニング

1) 組換え分裂酵母の生育回復試験

分裂酵母において強制発現すると組換え酵母が生育能を失うことが示された多数の遺伝子のうち、哺乳動物のがん化と深い関係があることが示されている細胞周期の調節および DNA 複製に関係する遺伝子のホモログを選抜した。すなわち、本研究では、以下の 6 種類の遺伝子をそれぞれ導入した分裂酵母を実験に用いる。

①発ガン遺伝子産物の RAS タンパク質が関わるシグナル伝達経路の下流に位置する MAPKK、②細胞周期のチェックポイントを制御するリン酸化酵素の chk2、③P53 経路の下流にあり細胞周期に関与する chk1、④細胞の増殖や生存に関わる PI3 キナーゼ経路に含まれる tor2 および PI3 キナーゼ、⑤DNA 修復に関わる Rad4。

2) 試料

わが国沿岸各地の浅海で過去 10 年間に採取した約 1000 種類の海産無脊椎動物、および、ドレッジや無人踏査機を用いて、新たに採取を計画している深海産無脊椎動物の抽出物から調製した水溶性画分と脂溶性画分を供する。

(2) 海洋無脊椎動物からの活性物質の単離と天然物ライブラリーの作成

活性検体を抽出後、溶媒分画に付し、得られた活性画分を、逆相、ゲル濾過、順相およびイオン交換などのクロマトグラフィーに付して活性物質を精製する。最終的に、HPLC を用いて活性物質を分離する。なお、すべての分離工程において、生物活性を指標として分画を行う。無脊椎動物に含まれる二次代謝産物には、ほとんど例外なく、化学構造が類似した成分が多数含まれる。そこで、活性物質を含む抽出物から、超高性能 HPLC と LCMS を駆使して類縁化合物を徹底的に分離して、天然物ライブラリーを作成する。

(3) 活性物質の構造決定

単離された活性物質の化学構造を、常法により行う。

(4) 生物活性の検証

1) 酵素阻害活性 組換え分裂酵母の生育を回復させる活性物質が、発現されたタンパク質の機能を阻害するか否かを、インビトロの酵素阻害活性試験により調べる。該当するタンパク質が酵素である場合は、大腸菌を用いて大量発現させた後に、インビトロでの酵素阻害活性を調べる。また、市販されているヒトホモログの MAPKK、chk1、chk2、および PI3 キナーゼについても、同様に酵素反応が阻害されるかどうかを調べる。

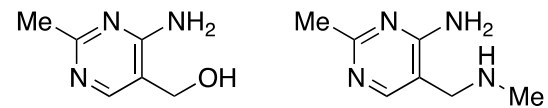
2) 細胞毒性試験 酵母の生育を回復させ、かつ、インビトロで酵素阻害活性を示した化合物は、さらに、P388、HeLa および K562 細胞などのがん細胞に対する細胞毒性を調べる。

4. 研究成果

(1) 生物活性スクリーニング 659 種類の海洋無脊椎動物抽出物ライブラリーを用いて、5 種の組み換え酵母を用いて生育回復試験を行った。288 サンプルに活性が認められた。そのうち 187 サンプルがすべての株に共通して生育回復活性を示した。導入された遺伝子は nmt1 の制限下にあるため、このプロモーターに作用して転写を調節する作用を持つ化合物が多く、海洋無脊椎動物に含まれることがわかった。

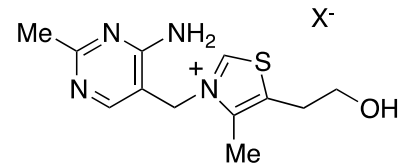
(2) カイメン *Theonella swinhoei* からの活性物質の単離・構造決定 本試験系はポジティブコントロールのチアミンの活性が非常に強く、ごく微量の活性成分の存在下で生育回復活性が認められることが多い。実際、微量成分が活性を示すようで、抽出物を分画し、HPLC で精製をすると、活性は認められるものの、質量分析や核磁気共鳴で化合物を検出できないことが続いた。そこで、大量のカイメン *Theonella swinhoei* を用いて研究を行った。カイメン 10 kg の抽出物を溶媒分画に付し、脂溶性画分から低極性成分を除いた 90%メタノール画分を Sephadex LH-20、シリカゲル、ODS、TSK-G2500PW、ODP、TSK-G2500PW、および TSK Amide-80 (2 回) により順次精製を行い、2 つの活性ピーク (compound 1 および 2) を得た。それらの化学構造を二次元 NMR により下記のように決定した。これらの化合物はいずれもチアミンの生合成中間体であるため、過剰発現したタンパク質ではなく、チアミン

と類似の作用を示すことが示唆された。



compound 1

compound 2



thiamine

(3) 未同定種カイメンからの活性成分の単離・構造決定 スクリーニングの結果、カイメン S08-807 の抽出物にヒト tankyrase1 遺伝子を過剰発現させた分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の生育回復活性が認められたため、活性成分の単離、構造決定を試みた。カイメン 250 g をメタノール、クロロホルムで抽出した後、得られた粗抽出物を溶媒分画に供した。さらに、ODS カラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC で精製し、化合物 3 および 4 を得た。質量分析から、これらの化合物の分子量はそれぞれ 796、782 であることが示された。NMR データの解析から、これらの化合物は過去にカイメン *Pachastrella* sp. から単離、構造決定されたステロイド配糖体 pachastrelloside A の新規類縁体であることが判明した。化合物 4 は pachastrelloside A と同じアグリコンを有し、1 つの糖の構造が異なっていた。酸加水分解により構成糖を遊離させた後にアリアルチオカルバモイル化し、LCMS 分析に付すことで、両化合物に含まれる 2 つの糖を D-glucose と D-xylose であると同定した。化合物 3 および 4 のステロイド骨格の絶対配置は現在検討中である。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

鈴木真志ほか 6 名「遺伝子組換え酵母を用いた小臥蛇島産カイメンからの新規ステロイド配糖体の単離および構造決定」、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 27 日、東京海洋大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 茂樹 (MATSUNAGA SHIGEKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：60183951

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

吉田 稔 (YOSHIDA MINORU)
独立行政法人理化学研究所・吉田化学遺伝
学研究室・主任研究員
研究者番号：80191617