

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15601

研究課題名(和文)ケミカルバイオロジーによる紅藻由来ポリエーテル類縁体の産生意義の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the biosynthetic significance of red algal-derived polyether analogs through chemical biology

研究代表者

熊谷 百慶 (Momochika, Kumagai)

鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・助教

研究者番号：70863083

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)：ソゾ属の紅藻は、特異な構造を有する含臭素トリテルペンポリエーテルであるチルシフェロール類縁体を産生する。本研究ではこの興味深い物質が特定の細胞種(P388)に対して絶対立体配置特異的に強力な増殖抑制作用を示すことを見出した。さらに、チルシフェロール類縁体の構造活性相関研究から、そのABC環部位が活性発現に極めて重要であることを明らかにした。また、P388細胞に活性物質の両エナンチオマーをそれぞれ添加した際のトランスクリプトーム解析の結果および細胞の形態観察より、チルシフェロール類は細胞周期に関連するタンパク質に作用することが予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物は様々な構造を有する二次代謝産物を生命維持に利用している。我々はそのような天然物を医薬品や食品など様々な形で利用しているが、それは本来生物がその物質を産生する目的とは異なる利用用途であると思われる。そこで、そのような化合物の立体構造にまで踏み込んで特異的な生物活性を明らかにすることで、より本質的な活性をとらえ、産生意義の理解につなげることができると考え本研究を行った。その結果、ソゾ属の紅藻が産生する特異な構造を有するチルシフェロール類について、その絶対立体配置に特異的な活性を見出すことができた。この発見は、海藻が特異な構造を有する天然物を作り出す真の意義の解明に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Red algae of the genus *Laurencia* produce thyriferol analogs, a bromine-containing triterpene polyether with a unique structure. In this study, we found that this interesting substance has a stereo arrangement-specific growth inhibitory effect on a specific cell line (P388). Structure-activity relationship studies of these analogs revealed that the ABC ring site is crucial for the expression of activity. Transcriptome analysis of cells treated with both enantiomers of the active compounds predicted that thyriferol analogs affect on proteins related to the cell cycle. In the future study, affinity purification using the whole molecule as a probe may identify specific binding proteins.

研究分野：天然物化学

キーワード：海藻 二次代謝産物 天然物 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

Laurencia 属の紅藻は特異な構造を有する含臭素トリテルペンポリエーテル類(図1)を産生する。最初の報告が1978年に単離されたチルシフェロール(1)であったことより、一連の類縁体をチルシフェロール類と呼ぶ。共通骨格であるABC環を持つ類縁体はこれまでに30種以上が知られており、抗がん活性が注目されている。天然から得られる量が微量かつ化学構造が複雑なため、これまでに立体化学が明確に決定されていたチルシフェロール類縁体はチルシフェロール(1)をはじめとした4種のみであった。しかし近年これら類縁体の合成法が確立され、デヒドロチルシフェロール(2)や図2のイソデヒドロチルシフェロール(4)の立体構造が明確に決定された[Morimoto Y. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 3064.]. 注目すべき点として、4ではその分子構造におけるABC環部分の絶対配置が類縁体1~3と逆転している(鏡像異性体)ことがある。

生物は複雑な構造を有する2次代謝産物を生体機能分子として産生している。その際、分子構造の一部、またはすべてが光学異性化した化合物を産生することが古くから知られている [Sherman, H. D. *et al. Science* **2015**, 349, 149.].

一般的には、活性のある生体機能分子は純粋な鏡像体の一方であることが多いが、昆虫の性フェロモンであるオレアンのように、一方の鏡像異性体がオスに、他方がメスに作用するなど、その分子構造は立体化学を含めて精密に制御されていることが推察される。一方、*Laurencia* 属の紅藻がなぜこのような複雑な分子の部分構造の両エナンチオマーを合成しているかは不明であり、その生物学的意義に興味をもたれた。

2. 研究の目的

このような複雑・特異な構造を有するチルシフェロール類縁化合物を紅藻が産生することの生物学的な意義を明らかにすることを目的とし、まずはその端緒としてチルシフェロール類の立体配置特異的な生物活性を見出し、その標的分子や作用機序を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

全合成により絶対立体配置が明確に決定された各種チルシフェロール類縁体について、様々な培養細胞に添加した際の細胞生存率を測定した。得られた結果より活性発現に寄与する構造を特定してプローブ分子を設計し、合成品をアフィニティービーズへと結合した。得られたビーズを用いて培養細胞の抽出物から結合タンパクを精製し、結合タンパク質を解析した。天然物およびそのエナンチオマーを添加した際のトランスクリプトーム解析は、次世代シーケンサーによるRNA-seqに供し、遺伝子発現変動を調べた。

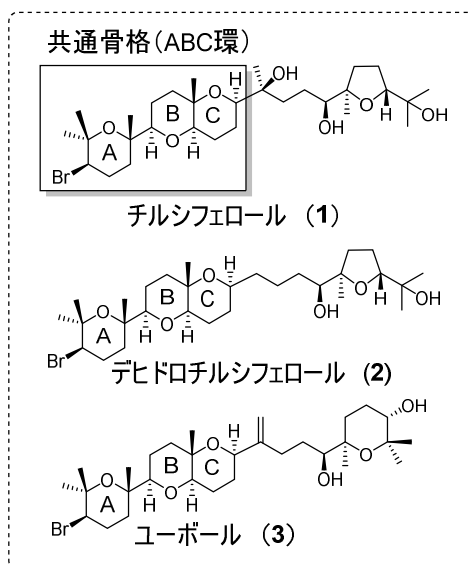


図1 チルシフェロールと同じ立体配置の共通骨格を持つ類縁体

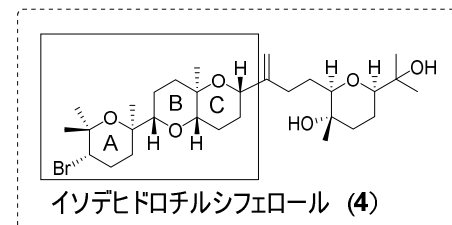


図2 ABC環部分の絶対配置がチルシフェロールと逆になっている類縁体

4. 研究成果

(1) 絶対立体配置に特異的な生物活性の発見

様々な細胞種に対する増殖抑制効果を検証した結果、マウス白血病細胞株 P388 に対してチルシフェロール類の感受性が強いことを見出した。チルシフェロール類縁体のユーボール (3) は、P388 細胞において 5 nM で顕著な細胞増殖抑制効果を示した。次に、ユーボールおよびそのエナンチオマー (5) との細胞増殖抑制効果を比較した結果を図 3 に示した。ユーボールはそのエナンチオマーに対して顕著に強い活性を示したことより、立体配置特異的な活性を確認できた。試験した他の培養細胞 (HeLa、HT-29、K562、HL60 等) において、このような絶対配置選択的な効果は認められず、IC₅₀ 値も 1000 倍以上であった。以上より、本研究で用いた P388 細胞においてユーボールの絶対配置を認識する標的分子の存在が示唆された。

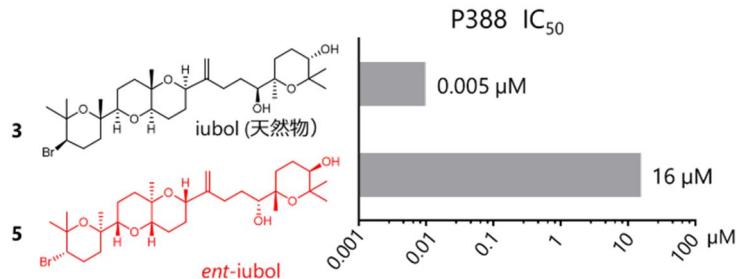


図3 iubilolとそのエナンチオマーの活性比較

次に、チルシフェロール類の構造活性相関を明らかにするための検討を行った。ABC 環部位の重要性を明らかにすることを目的に、ABC 環部位の構造の反転した化合物群について活性を比較した。その結果、天然物と同様の ABC 環の絶対配置を有する化合物では nM レベルの強い活性が認められたのに対し、ABC 環部位が反転した化合物群では IC₅₀ 値は 1000 倍以上高くなった。以上の結果は、チルシフェロール類の連続する ABC 環の絶対配置が活性発現に極めて重要であることを示した。次に、A 環の構造の活性発現への寄与を調べた。その結果、A 環を THF 環へ変換した化合物や直鎖状に変換した化合物で顕著な活性低下が認められ、A 環の構造が活性発現に重要であることが明らかとなった。以上の結果より ABC 環およびその立体配置が活性発現に必要であることが示唆されたため、次に側鎖部位の構造変化が活性に与える影響について調べた。ユーボール (3) および天然物であるデヒドロチルシフェロール (2) が非常に強い活性を示した一方、そのアセチル化体では IC₅₀ 値が 100 倍程度高くなった。一方、ABC 環部位の構造変化に対して側鎖部位の構造変化が IC₅₀ 値に与える影響は小さかったため、活性に本質的に寄与している構造は ABC 環部位であると推察した。また、側鎖部位のみの部分構造を有する化合物を試験したところ、活性は全く認められなかった。本研究における構造活性相関の概略を図 4 に示した。

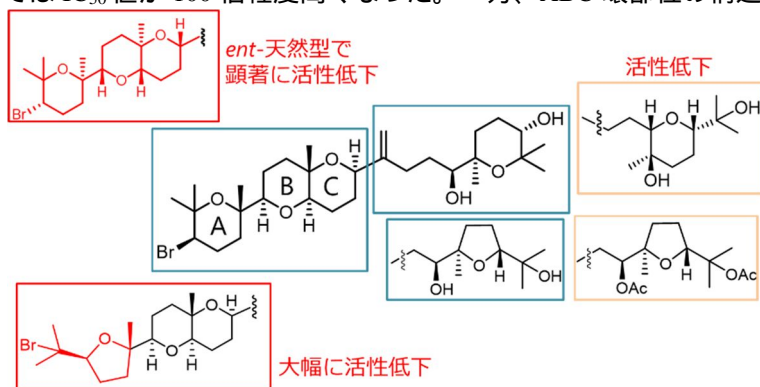


図4 チルシフェロール類の構造活性相関の概略

(2) 分子プローブを用いた標的タンパク質の探索

種々の培養細胞を用いた立体配置選択的な活性の探索と構造活性相関研究により、P388 細胞においてチルシフェロール類縁体の ABC 環構造とその絶対配置が活性発現に重要であることが

示唆された。そこで、この ABC 環部位の構造のみを抽出した分子プローブを設計し、両エナンチオマーの合成品を用いて結合タンパクの検出を試みた。合成分子プローブの両エナンチオマーの活性を測定したところ、チルシフェロール類と同様の絶対配置を有するプローブ（天然体）がそのエナンチオマーに対して 10 倍程度高活性であった。これらをアフィニティービーズに結合して細胞抽出物から結合タンパクを精製した。結合タンパク質を溶出し、SDS-PAGE に供して銀染色を行ったところ、複数のバンドが検出された。しかし、両エナンチオマー間で比較した際に天然体のみの特異的なバンドは認められず、検出されたバンドは非特異的な結合によるものと判断された。

（3）RNA-Seq による遺伝子発現解析

ABC 環部分構造を有する分子プローブを用いた標的タンパク質の精製について条件の最適化を種々試みたが、立体配置特異的な標的タンパクを見出すに至らなかった。そこでトランスクリプトーム解析により作用機構を推定することを検討した。P388 細胞において顕著に活性の差が認められたユーボール類縁体およびそのエナンチオマーを細胞に添加し、経時的に遺伝子発現量を調べた結果、両化合物を添加した細胞で発現に顕著な差のある遺伝子を多数見出した。特に、化合物添加 2 時間後に、細胞周期に関連する多くの遺伝子発現に差が認められた。実際に、両化合物を細胞に添加しトリパンブルー染色後に経時的に細胞の数および形態を観察したところ、ユーボール類縁体添加では添加 96 時間後においても死細胞数はほとんど認められず、細胞増殖が抑制されていた。以上より、チルシフェロール類の標的分子は細胞周期の調節に関連するものであることが示唆された。

本研究の結果、*Laurencia* 属の紅藻が有する含臭素トリテルペンポリエーテル類であるチルシフェロール類縁体における絶対立体配置を精密に認識する生物活性を見出した。また、構造活性相関を検討した結果、チルシフェロールの連続する ABC 環部位が活性発現に極めて重要であることが示唆された。さらに、活性発現機構として細胞周期の調節に関連するタンパク質への作用が示唆された。本研究で見出した P388 細胞を用いた活性試験は、チルシフェロール類を nM レベルの低濃度で検出可能であり、ABC 環の絶対配置を精密に区別することができる。今後、本細胞種を用いた活性試験は活性を指標とした新たな類縁体探索や未だ絶対配置が未解明な類縁体の構造推定等、天然物化学研究の推進に寄与するものと期待できる。一方、活性部位である ABC 環構造を抽出した分子プローブを用いたアフィニティー精製では絶対配置特異的な標的タンパク質を見出すに至らなかったため、今後より親和性の強いと予想される分子全体をプローブとしたアフィニティー精製により標的分子同定を達成したい。そのような分子プローブを用いて特異的な標的分子を同定できれば、紅藻における化合物産生の意義解明や新たな抗がん剤の開発等に貢献する知見が得られる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Keisuke, Taki Naoto, Nishikibe Kento, Kumagai Momochika, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Total Synthesis, Revised Structure, and Cytotoxic Activities of Iubol | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 1000 ~ 1003 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220312 | 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 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Teranishi Tomonori, Nishikawa Keisuke, Matsuura Akihisa, Kumagai Momochika, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 51 |
| 2. 論文標題 Divergent Synthesis of Nerolidol-type Sesquiterpenoids Produced by Soil Bacterium from an Identical Starting Material via Diepoxide Precursors: Stereochemical Revision and Absolute Configuration of a THF Natural Product | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry Letters | 6. 最初と最後の頁 1062 ~ 1066 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220390 | 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 - |

| | |
|--|--------------------------|
| 1. 著者名 Nishikibe Kento, Nishikawa Keisuke, Kumagai Momochika, Doe Matsumi, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Asymmetric Total Syntheses, Stereostructures, and Cytotoxicities of Marine Bromotriterpenoids Aplysiol B (Laurenmariannol) and Saiyacenol A | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry An Asian Journal | 6. 最初と最後の頁 e202101137 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/asia.202101137 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Keisuke, Niwa Toshiki, Nishikibe Kento, Kumagai Momochika, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 27 |
| 2. 論文標題 Establishing a "Ring Size Divergent" Synthetic Strategy: Synthesis, Structural Revision, and Absolute Configuration of Feroniellins | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry A European Journal | 6. 最初と最後の頁 11045 ~ 11049 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202101603 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kumagai Momochika, Yoshida Izumi, Mishima Takashi, Ide Masahiro, Fujita Kazuhiro, Doe Matsumi, Nishikawa Keisuke, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 4 -Hydroxywithanolide E and withanolide E from <i>Physalis peruviana</i> L. inhibit adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells through modulation of mitotic clonal expansion | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines | 6. 最初と最後の頁 232 ~ 239 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-020-01458-x | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishikawa Keisuke, Kumagai Momochika, Matsumura Kunihiro, Nishikibe Kento, Morimoto Yoshiki | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Natural Product Synthesis Strategy Based on the Concept of Directly Constructing the Ring Skeletons from Linear Substrates | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan | 6. 最初と最後の頁 197 ~ 209 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaishi.79.197 | 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 - |

[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 西川 慶祐, 寺西 智徳, 林 幹史郎, 丹羽 俊揮, 森田 健吾, 橋本 統星, 熊谷 百慶, 森本 善樹 |
| 2. 発表標題 “リングサイズ発散” 合成法の確立: 5 ~ 7 員環エーテルをもつテルペノイド類の全合成、構造改訂、絶対配置の決定、生物活性 |
| 3. 学会等名 第 64 回天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西川 慶祐、滝 直人、熊谷 百慶、森本 善樹 |
| 2. 発表標題 細胞毒性含臭素トリテルペノイド、ユーボールの全合成、構造修正、絶対配置の決定、構造活性相関 |
| 3. 学会等名 第 66 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 錦部健人, 西川慶祐, 熊谷百慶, 森本善樹 |
| 2. 発表標題 カリクラドールの不斉全合成と構造決定 |
| 3. 学会等名 第63回 天然有機化合物討論会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 熊谷百慶, 西川慶祐, 錦部健人, 尾方勇太, 森本善樹, 加藤早苗 |
| 2. 発表標題 紅藻由来含臭素ポリエーテル類縁体の絶対立体配置特異的な細胞増殖抑制効果 |
| 3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |