

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 24 年 4 月 28 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580132

研究課題名（和文）がん予防効果を有する微生物代謝産物を利用した細胞分裂制御因子の探索

研究課題名（英文）Discovery of cell division regulating factors using cancer chemopreventive microbial metabolites

研究代表者

飯田 彰 (IIDA AKIRA)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：40202816

研究成果の概要（和文）：*Trichothecium roseum*の生産する抗発がんプロモーター活性ならびに発がんプロモーター活性を同時にもつ二重活性のセスキテルペンであるTTC-Aの量的確保は、菌株の選択と培養条件の工夫で達成された。また、TTC-AによるRaji細胞の多核化は、*ras*遺伝子の関与するシグナル伝達により制御される細胞周期の調節や細胞分化の結果生じたものと推定された。

研究成果の概要（英文）：Sufficient quantities of sesquiterpene TTC-A, which is a metabolite of *Trichothecium roseum* showing anti-tumor promoting and tumor promoting effects simultaneously, were obtained by selecting various strains and modifying cultural conditions. TTC-A is known to be an inducer of multinucleated Raji cells. This was deduced to result from modulation of cell cycles regulated by signal transductions associated with *ras* gene and cell differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：菌類，シグナル伝達，タンパク質，がん，抗発がんプロモーター，
発がんプロモーター，トリコテカン，*Trichothecium roseum*

1. 研究開始当初の背景

Trichothecium roseum から単離した trichothecinol A (TTC-A)が、がん予防活性（＝抗発がんプロモーター活性）を示すと同時に、相反する発がんプロモーター活性をも示す非常に興味深い二重活性化合物であることが分かった。このような二重活性天然物は今

までにも知られていたが、TTC-Aは今までにない質的に新しいタイプの発がんプロモーターであることが強く示唆された。したがって、発がんプロモーター活性と抗発がんプロモーター活性を併せ持つ TTC-A の分子機能をうまく利用できれば、発がんの基礎研究、特にがん予防研究に大きな貢献ができる

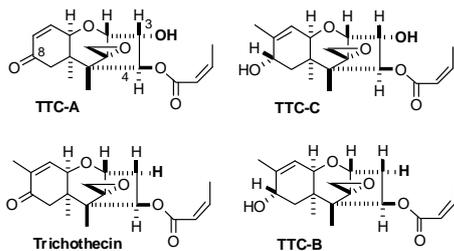
期待した。さらに、Raji 細胞を使ったがん予防の *in vitro* 実験で興味深い現象に出会った。すなわち、がん予防活性試験では、通常実験系にあらかじめ TPA を添加しておくが、TPA の代わりに TTC-A 添加すると、二重活性を示す TTC-A が Raji 細胞に対して、細胞分裂を伴わない核の数だけが増える、いわゆる多核化現象を誘導することを見出した。一方、発がんプロモーター活性しか持たない TPA やフモニジンのような化合物では、ミトコンドリアの数は増加するが、このような細胞の多核化現象は全く観察されなかった。したがって、今まで明らかにしてきた TTC-A と他の発がんプロモーターとの生物学的特性の違い、および TTC-A ががん予防活性を併せ持つことを考慮すると、この細胞の多核化現象を「初期のがん細胞の分裂を抑制する、いわゆるがん予防に関連する情報伝達系の象徴」としてとらえたとしてもそれほど的外れではないであろう。言い換えれば、TTC-A が刺激した情報伝達系を探れば、がん予防機構を解き明かすなら手がかりが得られると考えた。

2. 研究の目的

正常細胞は、高度にかつ精緻に設計された複雑系連鎖反応（情報伝達系）によって分裂する。一方、がん細胞はこの高度に制御された情報伝達系システムのどこかに障害が生じているため、正常細胞には見られない異常な細胞分裂を繰り返す。初期のがん細胞（潜在的腫瘍細胞）がプロモーションを受けて、パピローマ（良性腫瘍）へと分裂を繰り返す原因を突き止めれば、がん予防にもつながるはずである。本研究では、不完全菌 *Trichothecium roseum* の代謝産物 TTC-A, B, C が持つ特異な活性を利用し、初期のがん細胞の分裂を抑制する情報伝達系に関わる因子の発見を目的とする。

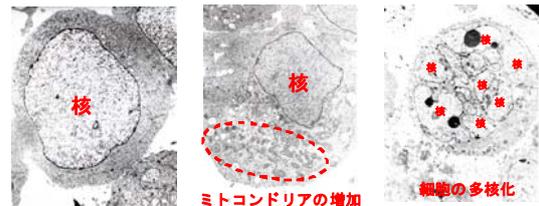
3. 研究の方法

TTC-A の量的確保と多様な類縁体の確保、ならびに多核化した Raji 細胞に関するタンパクレベルでの基礎データ集積に努めるために、まず、入手可能な *T. roseum* の菌株の様々の条件下での培養を行う。菌糸体および培養液を抽出し、TTC 類含有画分を調整するとともに、構造活性相関研究への展開を考慮し、新規 TTC 類の発見に努める。



Trichothecium roseum から単離されたトリコテカン型セスキテルペンの構造

TTC-A の生物学的挙動から関与が疑われる核内と核外の情報伝達系タンパクについては、容易にいくつかの候補を挙げるができる。それぞれの抗体を用いて免疫染色を施し、TTC-A が結果的には Raji 細胞の核の内外、どちらの情報伝達系に作用するのか、あるいは情報伝達系に関与しないタンパクに作用するのかを検討する。また、多核化した Raji 細胞では、薬物未処理の Raji 細胞と比較して、本当に明確なタンパクの過剰発現が起こっているのかを確認する。

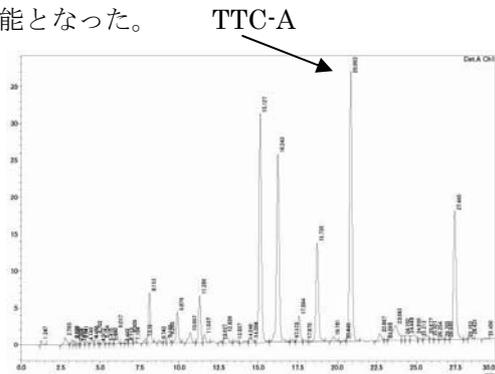


(A) 未処理正常細胞 (B) TPA処理細胞 (C) TTC-A処理細胞
Raji細胞の電子顕微鏡写真

情報伝達系において明確なタンパクの過剰発現が認められない場合は、関与するタンパクのリン酸化あるいは脱リン酸化に問題が起きていると仮定し、抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行う。多核化した Raji 細胞に銀染色で分かる程度にタンパクが過剰発現している場合、そのタンパクを PVDF 膜に転写、トリプシン消化、MS 分析でアミノ酸配列を決定し、データベースと比較する。タンパクの過剰発現が認められない場合は、ウエスタンブロット等の結果を待ち、現れたタンパクについてアミノ酸配列を決定する。

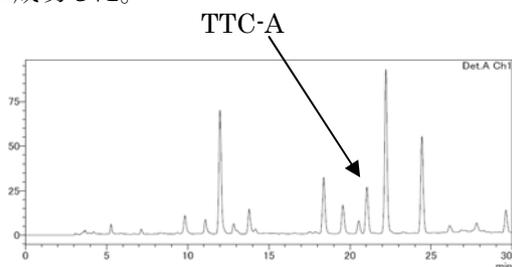
4. 研究成果

課題でもある *Trichothecium roseum* の生産する抗発がんプロモーター活性ならびに発がんプロモーター活性を同時にもつ二重活性のセスキテルペンである TTC-A の量的確保は、菌株の選択 (IFO5772) と培養条件の工夫で達成された。本研究課題のさらなる展開が可能となった。



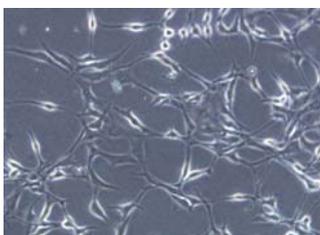
イーストエキス0.5%を含む potato dextrose (PD) 培地 (12g/L) で2週間培養したのちの培地抽出エキスの HPLC 分析結果

また、構造活性相関の基盤となる新規TTC類の発見を目指して行った実験から単離できた化合物群は、既知であるか、あるいはトリコセレン類ではないことが判明した。そこで、新たな培養条件を検討し、既存のTTC類や上記化合物群とはHPLCにおいてその保持時間のさらに異なる多数成分を含むエキスの確保に成功した。

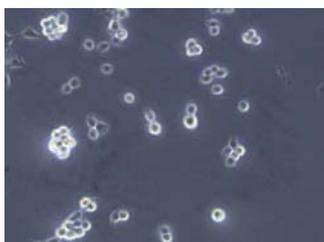


IFO5772菌をジャスモン酸メチルを添加した培地で培養し、その培地の抽出エキスのHPLC分析結果

センカマウス皮膚由来の形態変化の原因追究が、Raji細胞の多核化現象解明の糸口となるという想定のもと、TTC-AをSST細胞に添加した。細胞からタンパクを抽出し、ウエスタンブロッティングを行ったところ、前年度推定した少なくともMAPKを刺激していることは再確認できたが、具体的にどのようなタンパクが発現しているのかを決定するまでには至らなかった。



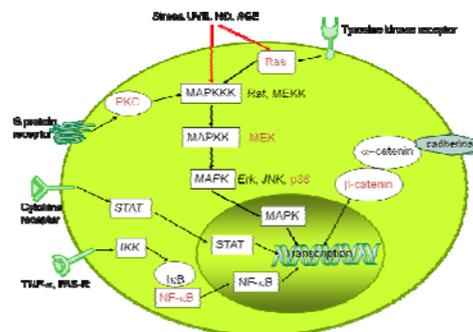
センカマウス皮膚由来SST細胞



TTC-A添加18時間後のSST細胞
(紡錘形の細胞が球状に変化している)

一方、発がんプロモーターではあるがTTC-AのもつRaji細胞の多核化現象を誘発しないフモニシンは、TTC-Aとは異なりras遺伝子には作用せず、セラミド合成酵素を阻害し、その結果、細胞周期の調節や細胞分化に障害をもたらす。この知見と本研究で得られた実

験結果を総合して考察すると、TTC-AによるRaji細胞の多核化は、ras遺伝子の関与するシグナル伝達により制御される細胞周期の調節や細胞分化の結果生じたものと推定された。



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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

①徳田春邦, 鈴木章司, 金澤由佳, 飯田彰, 不完全菌 *Trichothecium roseum* 代謝産物の抗発がんプロモーター作用, がん予防学術大会 2010 札幌, 2010年7月15日, 北海道大学学術交流会館 (北海道)

② (招待講演)

飯田 彰, カビ由来の発がんプロモーター, 日本防菌防黴学会学術講演会2010, 2010年5月26日, 関西大学百周年記念会館 (大阪府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 彰 (IIDA AKIRA)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号: 40202816

(2) 研究分担者

金子 雅文 (KANEKO MASAFUMI)
高崎健康福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号: 50433636

(3) 連携研究者

()

