

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 9日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590090

研究課題名（和文）土壌微生物「細胞性粘菌」由来の薬理活性物質 DIF の研究

研究課題名（英文）Study on the bio-active molecule, DIF, found in the soil micro-organism
Dictyostelium discoideum

研究代表者

久保原 禪 (KUBOHARA YUZURU)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00221937

研究成果の概要（和文）：細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-1 およびその誘導体（DIFs）は、複数の薬理活性（抗腫瘍活性、糖代謝促進活性など）を有する低分子化合物である。我々は、DIFs の包括的な研究を行い、以下を明らかにした。①DIF-1 がミトコンドリアの Malate dehydrogenase を阻害すること、②ある種の DIF 誘導体がマウス骨肉腫細胞の浸潤を阻害すること、③DIF-1 が細胞内 TCA サイクルに影響すること、④DIFs が新たにいくつかの薬理活性（T 細胞の IL-2 産生制御活性、心筋様細胞の分化誘導活性、抗トリパノソーマ原虫活性）を有すること、⑤DIFs が粘菌の走化性運動を制御することなどを見出した。

研究成果の概要（英文）：*Dictyostelium* differentiation-inducing factor DIF-1 and its derivatives (DIFs) are low-molecular weight compounds that possess anti-tumor and glucose-consumption-promoting activities. In this study, we performed comprehensive study on DIFs and have found the followings; 1) DIF-1 inhibits mitochondrial malate dehydrogenase activity, 2) some DIF derivatives inhibit the invasion of a mouse osteosarcoma in vitro, 3) DIF-1 affects TCA cycle, 4) DIFs possess novel pharmacological activities, such as regulation of IL-2 production in T cells, induction of cardiomyocytes differentiation, and inhibition of *Trypanosoma* cell growth, and 5) DIFs can regulate *Dictyostelium* chemotaxis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：細胞生物学、生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞性粘菌、分化誘導因子、がん、糖尿病、免疫、トリパノソーマ

1. 研究開始当初の背景

下等真核微生物の1種である細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum* は、ライフサイク

ルの最後に孢子塊と柄細胞より成る子実体を形成する。DIF-1, DIF-2, DIF-3 (次頁図) は、*D. discoideum* の柄細胞分化誘導因子と

して英国の研究グループによって同定された「塩素原子を含む低分子化合物」である (Morris et al. *Nature*, 1987; Mssento et al. *Biochem. J.* 1988)。

粘菌における DIFs の分化誘導活性は、「DIF-1 > DIF-2 >> DIF-3」の順に高いこと、DIF-3 は DIF-1 の分解産物であることも示されている (Kay et al. *Development*, 1989)。

その後、我々は、DIFs が抗腫瘍活性を有することを発見し (Asahi et al. *BBRC*. 1995)、以来、その作用機構の解析と、より有効な DIF 誘導体の開発を進めてきた。そして、DIFs がカルモジュリン依存性 cAMP/cGMP 分解酵素 (PDE1) の阻害剤であること (Shimizu et al. *Cancer Res.* 2004)、DIF-1 よりも DIF-3 の誘導体が強いつ腫瘍活性を有すること等を報告してきた (Gokan et al. *Biochem. Pharmacol.* 2005; 他多数)。

さらに我々は、正常細胞 (non-transformed cells) に対する DIFs の毒性を検討している過程で、「DIF-1 が細胞の糖代謝を促進する」ことを発見した。また、DIF-1 の作用機序の解析を行い、①DIF-1 による糖代謝促進には Akt が関与しないこと (インスリンの作用機序とは異なること)、②DIF-1 は細胞内 GLUT1 (glucose transporter 1) を細胞膜上に移動させることによって糖取り込みを促進すること等を見出した (Omata et al. *FEBS J.* 2007)。以降、DIF-1 の作用機構の解析と、より有効な DIF 誘導体の開発を進めている。

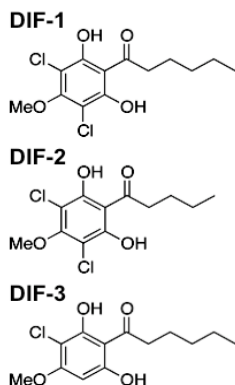
興味深いことに、DIFs の示す抗腫瘍活性と糖代謝促進活性は、DIF の側鎖修飾によって相当に分離できる可能性も示されている (Omata et al. *FEBS J.* 2007; Kubohara et al. *Life Sci.* 2008)。

2. 研究の目的

本研究は、細胞性粘菌由来の薬理活性物質 DIF-1 とその誘導体に関する包括的な研究であり、主に以下の2つを目的としている。

- 1) DIF 様因子の抗腫瘍作用の機構解析、および有用 DIF 誘導体 (抗がん剤候補物質) の開発。
- 2) DIF 様因子の糖代謝促進作用の機構解析、および有用 DIF 誘導体 (肥満・糖尿病治療薬候補物質) の開発。

これらと並行して、DIF 様因子の有する新たな薬理活性の探索、ならびに細胞性粘菌における DIFs の作用機序の解明を進める。

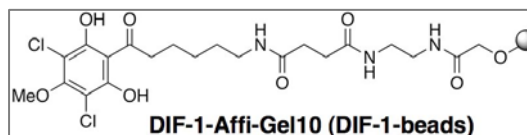


3. 研究の方法

- 1) DIF の薬理的ターゲットタンパク質 (DIF-binding proteins: DBPs) の同定。

DIF-1 を結合した樹脂 (図) を作成し、affinity クロマトグラフィーを行い、細胞抽出物から DBPs を部分精製する。

部分精製された DBPs を SDS-PAGE で展開後、LC/MS/MS 法によって DBPs 遺伝子を同定する。



- 2) がんの増殖、浸潤・転移に対する DIF の作用 (機構) の解析。

各種腫瘍細胞の in vitro 培養系を利用して、細胞増殖や浸潤・転移に対する DIFs の効果を検討し、有効な誘導体をスクリーニングする。また、DIFs 存在下での細胞内シグナル伝達系の変化を Western blot 法などによって解析する。

- 3) DIF の糖代謝促進機構の解析。

正常モデル細胞の in vitro 培養系を利用して、DIFs 存在下での細胞内シグナル伝達系や代謝関連物質の変化を Western blot 法やメタボローム解析法などによって網羅的に検討する。その結果を基に、既知の試薬と、DIFs の作用を比較検討しながら、DIFs の作用点、作用機序を明らかにしていく。

- 4) DIF の有する新規薬理作用の探索。

様々なアッセイ系を利用して、新たな薬理活性を有する DIFs をスクリーニングする。

- ・ In vitro 培養下の Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞のモデル) をコンカナバリン A (ConA) で刺激すると数時間以内にインターロイキン-2 (IL-2) を産生する。この系を利用して、IL-2 産生に影響する DIF 誘導体をスクリーニングする。

- ・ In vitro 培養下の HT1080 細胞 (ヒト線維芽肉腫由来) にトリパノソーマ原虫を感染させると原虫は細胞内に侵入し、増殖する。この系を利用して、トリパノソーマ原虫の感染と増殖を阻害する DIF 誘導体をスクリーニングする。

- ・ In vitro 培養下の P19CL6 細胞 (マウス胚性癌腫由来) を 1% DMSO で刺激すると、心筋様細胞に分化誘導することができる。この系を利用して、心筋様細胞分化を促進する DIF 誘導体をスクリーニングする。

- 5) 細胞性粘菌における DIF の作用機序解析。

粘菌細胞の in vitro 培養系を利用して、DIFs 存在下における細胞分化や走化性運動や細胞内シグナル伝達系の変化などを解析する。

4. 研究成果

1) DIF-binding proteins の同定。

ヒト白血病 K562 細胞を Tween20 とタンパク質分解酵素阻害剤を含む緩衝液で処理し、タンパク質を抽出後、上記の DIF-1-beads とコントロール beads を用いて、affinity 精製を行った。それぞれの精製物を SDS-PAGE で展開後、DIF-1-beads にのみ結合した 3 つのタンパク質バンドを切り出し、LC/MS/MS 法によって、それらを同定した。

その中の 1 つは「ミトコンドリア malate dehydrogenase (mMDH)」であり、実際に DIF-1 が mMDH 活性を阻害することが明らかとなった (Matsuda et al. *J. Pharmacol. Sci.* 2010)。

我々は現在までに、DIFs が PDE1 の阻害剤であることを報告しており (Shimizu et al. *Cancer Res.* 2004)、今回の発見は DIFs の 2 つめのターゲットタンパク質の報告となった。

しかしながら、DIFs の多彩な薬理作用については、DIFs による PDE1 阻害や mMDH 阻害だけでは説明できない面があり、DIFs のターゲットタンパク質は他にもあると考えられる。現在我々は、これらの酵素以外の DBPs の同定/解析を進めている。

2) がん細胞の浸潤に対する DIF の作用解析。

抗腫瘍活性を有する DIF 誘導体は、現在までに調べたすべての腫瘍細胞に対して増殖抑制と、場合によっては分化誘導作用を示す。

今回我々は、ボイデンチャンパーを用いたマウス LM8 骨肉腫細胞の浸潤実験系を利用して、LM8 細胞の浸潤を阻害する DIF 誘導体をスクリーニングした。その結果、30 種類の DIF 誘導体の中から、浸潤阻害活性を有するいくつかの有効な誘導体を見出した (未発表; 特許申請中)。

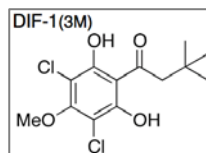
興味深いことに、ある誘導体は、LM8 細胞の浸潤を強く阻害したが、細胞増殖には影響しなかった。また、別の DIF 誘導体は、LM8 細胞の増殖と浸潤の両者を阻害した。

現在我々は、これら誘導体の作用機序の解析を進める一方、がん細胞の浸潤をコントロールする薬剤、ならびにがん細胞の増殖と浸潤を阻害する薬剤の開発を進めている。

3) DIF の糖代謝促進機構の解析。

前述のように、我々は DIF-1 が哺乳類細胞 (3T3L1 fibroblasts, 3T3L1 adipocytes など) の糖代謝促進活性を有することを発見した。さらに、DIF-1 (3M) という誘導体が強力な活性を有することも見出している。

今回我々は、Confluent 状態の 3T3L1 細胞



を用いて、DIF-1 と DIF-1 (3M) の作用機構の解析を進めた。その結果、両薬剤添加後、細胞内の TCA サイクルや代謝関連化合物に大きな変化が喚起されていることが明らかとなった (未発表)。現在、DIF の作用機構の詳細について解析を進めている。

4-1) DIF の有する免疫制御活性の発見。

Jurkat 細胞の in vitro 培養系を利用して、ConA 刺激による IL-2 産生に対する 30 種類の DIF 誘導体の効果を検討した。その結果、ある種の DIF 誘導体が IL-2 産生を阻害すること、また別の DIF 誘導体が IL-2 産生を促進することを見出した (Takahashi et al. *Life Sci.* 2009; 2011)。

現在、我々は、DIF の作用機序の解析と、新規免疫抑制剤/抗炎症剤の開発を進めている。

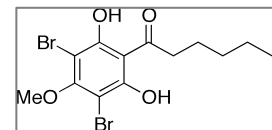
4-2) DIF の有する抗トリパノソーマ原虫活性の発見。

In vitro 培養下でトリパノソーマ原虫の宿主細胞への感染と原虫の増殖を阻害する DIF 誘導体をスクリーニングした結果、ある種の DIF 誘導体に強い活性を見出した (未発表; 特許申請中)。

現在、我々は、DIF の作用機序の解析と、新規抗トリパノソーマ剤の開発を進めている。

4-3) DIF の有する心筋分化促進活性の発見。

DMSO 刺激による P19CL6 細胞の心筋様細胞への分化誘導系を利用して DIF 誘導体の効果を検討した。その結果、Br-DIF-1 という誘導体



(図) がもっとも効率よく心筋様細胞分化を促進することを見出した (Seya et al. *Brit. J. Pharmacol.* 2012)。

5-1) 細胞性粘菌における DIF-1 の作用機序解析。

粘菌における DIF-1 の作用機序を明らかにすることは、哺乳類細胞における DIFs の薬理作用解析の重要な参考事項になると思われる。しかしながら、粘菌における DIF-1 の受容体は未同定であり、作用機序の詳細も不明である。

柄細胞は孢子を持ち上げながら自らは死んでいく細胞であることから、粘菌柄細胞分化はアポトーシスあるいは Autophagic cell death (ACD) と見なされている。したがって、柄細胞分化経路は、ACD の解析モデル系であり、柄細胞分化誘導因子である DIF-1 は ACD 誘導因子でもある、ということになる。

我々は、DIF-1 による粘菌柄細胞分化 (ACD) 誘導機構の解析を行い、Atg1 (様々な生物種においてオートファジーに関与するタンパク質) が粘菌 ACD においても重要

な役割を演じていることを明らかにした (Luciani et al. *Cell Death Differ.* 2009; Calvo-Garrido et al. *Autophagy*, 2010; Luciani et al. *Autophagy*, 2011)。
5-2) 細胞性粘菌における DIF-1 と DIF2 の生理機能の解明。

DIF-1 と DIF-2 には、分化誘導以外にも何らかの生理機能があるのではないかと推測されていたが、その正体は不明であった。とりわけ、粘菌における DIF-2 の分化誘導活性は DIF-1 の 40%ほどであるが、DIF-2 特有の生理機能があるのかどうか不明であった。

そこで、我々は、粘菌の走化性運動 (粘菌細胞は cAMP に対する走化性運動を示す) に対する DIF-1 と DIF-2 の効果を検討した。その結果、低濃度 cAMP に対する粘菌細胞の走化性運動が DIF-1 によって阻害され、DIF-2 によって促進されることを見出した (Kuwayama & Kubohara, *PLoS ONE*, 2009)。つまり、DIF-1 と DIF-2 は、分化誘導因子であると同時に走化性運動の正・負の modulators であることが世界で初めて示された。さらに、我々は、DIF-1 と DIF-2 は、それぞれ異なる受容体を介して粘菌の細胞分化と走化性運動を制御していることも示した (Kuwayama et al. *Cell Struct. Func.* 2011)。

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 12 件)

- 1) Seya K, Kanemaru K, Matsuki M, Hongo K, Kitahara H, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y, Okumura K, Motomura S, & Furukawa K. Br-DIF-1 accelerates dimethyl sulphoxide-induced differentiation of P19CL6 embryonic carcinoma cells into cardiomyocytes. *Brit. J. Pharmacol.* 165(4), 870-879. (2012). 査読有
- 2) Luciani M-F, Giusti C, Harms B, Oshima Y, Kikuchi H, Kubohara Y, & Golstein P. Atg1 allows second-signalled autophagic cell death in *Dictyostelium*. *Autophagy* 7(6), 501-508. (2011). 査読有
- 3) Kuwayama H, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Artificial compounds differentially control *Dictyostelium* chemotaxis and cell differentiation. *Cell Structure and Function* 36(1), 21-26. (2011). 査読有
- 4) Takahashi K, Murakami M, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors promote mitogen-activated IL-2 production via AP-1 in Jurkat cells. *Life Sciences* 88(11-12), 480-485. (2011). 査読有
- 5) 久保原 禪、桑山 秀一 「細胞性粘菌の細胞分化と走化性運動を制御する低分子化合物」 *生化学* 82 巻 12 号, pp.1132-1137. (2010). 査読有
- 6) Calvo-Garrido J, Carilla-Latorre S, Kubohara Y, Santos N, Mesquita A, Soldati T, Golstein P, & Escalante R. Autophagy in *Dictyostelium*: genes and pathways, cell death and infection. *Autophagy*, 6(6), pp.686-701. (2010). 査読有
- 7) Kikuchi H, Ishiko S, Nakamura K, Kubohara Y, & Oshima Y. Novel prenylated and geranylated aromatic compounds isolated from *Polysphondylium* cellular slime molds. *Tetrahedron* 66(32), 6000-6007. (2010). 査読有
- 8) Kubohara Y, Kikuchi H, Nakamura K, Matsuo Y, & Oshima Y. Preparation of an antibody that recognizes and neutralizes *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396(2), 364-369. (2010). 査読有
- 9) Matsuda T, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Maenaka K, Watanabe Y, Miwa Y, Morimoto S, Kubohara Y, Hirata M, & Sasaguri T. *Dictyostelium* differentiation-inducing factor-1 binds to mitochondrial malate dehydrogenase and inhibits its activity. *J. Pharmacol. Sci.* 112(3), 320-326. (2010). 査読有
- 10) Kuwayama H, & Kubohara Y. Differentiation-inducing factor-1 and -2 function also as modulators for *Dictyostelium* chemotaxis. *PLoS ONE* 4(8), e6658. (2009). 査読有
- 11) Takahashi K, Murakami M, Hosaka K, Kikuchi H, Oshima Y, & Kubohara Y. Regulation of IL-2 production in Jurkat cells by *Dictyostelium*-derived factors. *Life Sciences*, 85(11-12), 438-443. (2009). 査読有
- 12) Luciani M-F, Kubohara Y, Kikuchi H, Oshima Y, & Golstein P. Autophagic or necrotic cell death triggered by distinct motifs of the differentiation factor DIF-1. *Cell Death & Differ.* 16(4), 564-570. (2009). 査読有

[学会発表] (計12件)

- 1) 瀬谷和彦, 金丸幸太, 松木瑞穂, 本郷恭子, 北原晴男, 菊地晴久, 大島吉輝, 久保原禪, 奥村 謙, 元村成, 古川賢一「Br-DIF-1による胚性癌腫細胞 (P19CL6) の1% DMSOによる拍動心筋様細胞への分化促進におけるT型カルシウムチャネルの役割」日本薬学会第132年会 2012年3月29日 札幌
- 2) 瀬谷和彦, 金丸幸太, 松木瑞穂, 本郷恭子, 北原晴男, 菊地晴久, 大島吉輝, 久保原禪, 奥村 謙, 元村成, 古川賢一「P19CL6胚性癌腫細胞の1% DMSOによる拍動心筋様細胞への分化誘導に及ぼすBr-DIF-1の作用」第85回日本薬理学会年会 2012年3月16日 京都
- 3) Seya K, Kanemaru K, Matsuki M, Hongo K, Kitahara H, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y, Okumura K, Motomura S, Furukawa K-I. “Br-DIF-1 accelerates 1% dimethyl sulfoxide-induced cardiomyocyte differentiation of P19CL6 embryonic carcinoma cells” The 28th Annual Meeting of ISHR Japanese Section, Dec. 3, 2011. Tokyo.
- 4) 久保原禪, 高橋克典, 村上正巳, 菊地晴久, 大島吉輝 “Derivatives of *Dictyostelium* differentiation-inducing factors regulate mitogen-induced interleukin-2 production in Jurkat cells” 日本細胞生物学会第63回大会 2011年6月29日 札幌
- 5) 久保原禪, 桑山秀一, 菊地晴久, 大島吉輝 「多機能分子DIFの受容体の探索」第13回細胞性粘菌研究会 2010年11月20日 富山
- 6) 久保原禪, 桑山秀一, 菊地晴久, 大島吉輝 「DIFアミド化誘導体による粘菌柄細胞分化と走化性運動の制御」第13回細胞性粘菌研究会 2010年11月20日 富山
- 7) 菊地晴久, 佐藤雄一, 星朋子, 喜多山実, 関谷瑞樹, 磯辺真人, 三原健, 久保原禪, 佐藤大樹, 島津光明, 加藤泰弘, 倉田祥一朗, 大島吉輝「新規生物資源の開拓—昆虫寄生糸状菌と卵菌—」第52回天然有機化合物討論会 2010年9月2日 静岡
- 8) 細井友夏里, 久保原禪, 畑生俊光, 嶋田淳子「細胞性粘菌分化誘導因子DIF-3およびその誘導体による抗Trypanosoma cruzi作用の検討」日本寄生虫学会 2010年5月 旭川
- 9) 桑山秀一, 久保原禪「細胞性粘菌の分化誘導因子DIF-1とDIF-2は走化性運動の制御因子としても機能する」生体運動研究班会議 2010年1月10日 東京
- 10) 久保原禪, 高橋克典, 村上正巳, 菊地晴久, 大島吉輝「Jurkat T細胞における

Interleukin-2 産生に対するDIF誘導体の効果」第12回細胞性粘菌研究会 2009年10月10日 山口

- 11) 桑山秀一, 久保原禪「柄細胞分化誘導因子DIF-1とDIF-2は粘菌走化性運動の制御因子としても機能する」第12回細胞性粘菌研究会 2009年10月10日 山口
- 12) 根津亜季子, 久保原禪, 菊地晴久, 大島吉輝, 山本章嗣 “Induction of autophagy in mouse fibroblast NIH3T3 cells by DIF-1, a stalk cell differentiation inducing factor of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* and its derivatives (DIFs)” 第61回日本細胞生物学会 2009年6月 名古屋

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計3件)

1) 名称: 抗トリパノソーマ剤およびトリパノソーマ症治療薬

発明者: 久保原禪, 嶋田淳子

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-163039

出願年月日: 2010年7月20日

国内外の別: 国内

2) 名称: 走化性運動制御剤

発明者: 久保原禪, 岡島史和, 小町麻由美, 桑山秀一, 大島吉輝, 菊地晴久

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-004319

出願年月日: 2010年1月12日

国内外の別: 国内

3) 名称: インターロイキン-2産生抑制剤

発明者: 久保原禪, 村上正巳, 高橋克典, 大島吉輝, 菊地晴久

権利者: 群馬大学, 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2009-112974

出願年月日: 2009年5月7日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計5件)

1) 名称: Method of lowering blood glucose and method of treating diabetes and obesity

発明者: 久保原禪, 柴田宏

権利者: 群馬大学

種類: 特許

番号：US Patent No: 7,846,974 B2
取得年月日：2010年12月7日
国内外の別：国外

大島吉輝 (OSHIMA YOSHITERU)
東北大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号：00111302

2) 名称：糖代謝促進剤並びに肥満及び糖尿病
治療薬のスクリーニング方法

発明者：久保原禪、柴田宏

権利者：群馬大学

種類：特許

番号：特許第4534039号

取得年月日：2010年6月25日

国内外の別：国内

3) 名称：抗腫瘍剤

発明者：久保原禪、保坂公平

権利者：群馬大学

種類：特許

番号：特許第4496369号

取得年月日：2010年4月23日

国内外の別：国内

4) 名称：細胞性粘菌を利用した医薬候補物質
のスクリーニング法

発明者：久保原禪

権利者：群馬大学

種類：特許

番号：特許第4452829号

取得年月日：2010年2月12日

国内外の別：国内

5) 名称：抗腫瘍剤

発明者：久保原禪、保坂公平

権利者：群馬大学

種類：特許

番号：特許第4389028号

取得年月日：2009年10月16日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molgen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保原 禪 (KUBOHARA YUZURU)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00221937

(2) 研究分担者

小島 至 (KOJIMA ITARU)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：60143492