

機関番号：18001
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21710237
 研究課題名(和文) 沖縄産シアノバクテリア由来の腫瘍細胞増殖阻害物質の生物有機化学的研究
 研究課題名(英文) A biochemical study of cancer cell growth inhibitors from marine cyanobacteria
 研究代表者
 照屋 俊明 (TERUYA TOSHIAKI)
 琉球大学・教育学部・准教授
 研究者番号：90375428

研究成果の概要(和文): 沖縄県で採集したリングピア属のシアノバクテリアの抽出物について、腫瘍細胞増殖阻害活性を指標として生理活性物質の探索を行った。その結果 2 種類の細胞毒性物質ビスプロモアミド及びビスリングピアサイドを単離し、それぞれの絶対立体構造を決定した。生物活性について詳細に検討したところ、ビスプロモアミドは非常に強いプロテインキナーゼ阻害活性を示した。特に ERK のリン酸化を 10～0.1 μM において選択的に阻害し、AKT、PKD、PLC γ 1 や S6 リボソームタンパク質などのリン酸化に全く影響しないことがわかった。また、ビスリングピアサイドは HeLa S₃ 腫瘍細胞に対して強い増殖阻害活性を示し(IC₅₀ 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、脳腫瘍細胞 SNB-78 (GI₅₀ 36 nM) 及び肺癌細胞 NCI H522 (GI₅₀ 36 nM) に対して特に強い増殖阻害活性を示した。ビスリングピアサイドは増殖阻害有効濃度が十分低く、また既存の抗癌剤と感受性パターンが異なることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): In our ongoing efforts to isolate novel marine cyanobacterial metabolites with antitumor activity, we found bisbromoamide and biselyngbyaside. Bisbromoamide exhibited potent protein kinase inhibition: the phosphorylation of ERK (extracellular signal regulated protein kinase) in NRK cells by PDGF (platelet-derived growth factor)-stimulation was selectively inhibited by treatment with 10 to 0.1 μM of bisbromoamide. Bisbromoamide had no effect on the phosphorylation of AKT, PKD, PLC γ 1, or S6 ribosomal protein at 10-0.1 μM . Biselyngbyaside exhibited cytotoxicity against HeLa S₃ cells with an IC₅₀ value of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and exhibited differential cytotoxicities: the central nervous system cancer SNB-78 (GI₅₀ 0.036 μM) and lung cancer NCI H522 (GI₅₀ 0.067 μM) were especially sensitive. Biselyngbyaside was COMPARE-negative, indicating that it likely inhibits cancer cell proliferation through a novel mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：シアノバクテリア、ビスリングピアサイド、ビスプロモアミド、プロテインキナーゼ阻害

1. 研究開始当初の背景

海洋生物は新しい生理活性物質の宝庫として考えられており、医薬品のリード化合物を海洋天然物に求める研究も活発に行われている。最近では、海洋生物由来の医薬品候補がいくつか現れ、有用物質素材として注目されている。これらの中には、シアノバクテリア由来であると推定される化合物も多く存在する。以上の理由から、シアノバクテリアは生物活性物質の探索源として有望であると考えた。沖縄県で採集したシアノバクテリア *Lyngbya* sp. を用い、HeLa S₃ 細胞に対する細胞毒性を指標にして新規生理活性物質の探索を行ったところ、2種類の細胞毒性物質、ピセプロモアミドとピセリングピアサイドを単離した。これら化合物の絶対立体構造は未決定である。また、化合物のどの部位が特に活性発現に重要であるかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

ピセリングピアサイドとピセプロモアミドの絶対立体構造を決定する。また、ピセプロモアミドは HeLa S₃ 細胞に対して強力な増殖阻害活性 (IC₅₀ = 40 ng/ml) を示すが、どの部位が特に細胞毒性に重要であるかは明らかになっていない。そこでピセプロモアミドの誘導体を調整し、構造活性相関を調べる。

3. 研究の方法

各種分解反応や誘導反応を行い、ピセプロモアミド、ピセリングピアサイドの絶対立体配置を決定する。ピセプロモアミドを構成する各アミノ酸と α -アミノケトンと比較的簡便に合成可能であり、合成した化合物とのキラルカラム分析により絶対立体配置の決定が可能である。ピセリングピアサイドについては、オゾン分解や加メタノール分解などの各種分解反応や誘導反応を行い、得られたフラグメントのジアステレオ選択的全合成、新 Mosher 法などを用いて絶対立体配置を決定する。また合成研究、誘導反応によりピセプロモアミドの活性部位の同定を行い、標的タンパク質の同定に用いる分子プローブの合成を行う。

4. 研究成果

(1) ピセリングピアサイドの絶対立体構造の決定

ピセリングピアサイドをトリアセチル体へ変換し、オゾンによる分解を行ったところ、フラグメント 1 が得られた。そこでフラグメント 1 の可能なジアステレオマーを合成し、天然物由来のフラグメントと各種スペクトルデータを比較することで C7、C10 位の立体化学を決定した。また、ピセリングピアサイ

ドを加メタノール分解したところ糖部位が脱離した化合物 2 が得られたため、これを MTPA エステルへと誘導することで C17 位の絶対立体化学を決定した。C3 位に関しては、ピセリングピアサイドが酸及び塩基性条件に対して不安定であったため、二重結合を還元し、さらに酸加水分解によりアグリコン部を取り出して MTPA エステルへと誘導することで C3 位の立体化学を決定した。また、同時に得られた糖部位をトリベンゾエート体へと誘導し、D-グルコースから導いた合成標品との ¹H NMR、CD データの比較を行ったところ、糖の絶対配置は D であることが明らかとなった (図 1)。

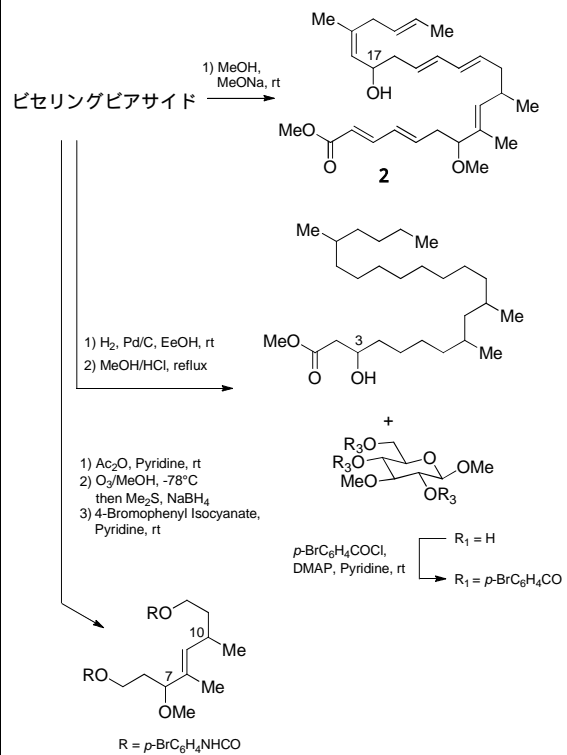


図 1 ピセリングピアサイドの絶対立体構造の決定

以上の結果から、ピセリングピアサイドの絶対立体構造を決定した (図 2)。

(2) ピセプロモアミドの絶対立体構造の決定

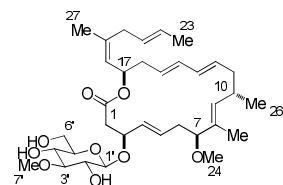


図 2 ピセリングピアサイドの構造

ピセプロモアミドの絶対立体配置を決定す

るため 9 M HCl にて酸加水分解を行った。酸加水分解物を HPLC で分取したところ、leucine (Leu)、*N*-methyltyrosine (*N*-MeTyr)、4-methylproline (4-MePro)、*N*-methylphenylalanine (*N*-MePhe)、2-(1-oxo-propyl)-pyrrolidine (Opp) 及び alanine (Ala) と 2-methylcystine の混合物フラクションをそれぞれ得た。これらのフラグメントを Chiral HPLC にて分析した結果、Leu、*N*-MeTyr、*N*-MePhe の立体配置はそれぞれ D、D、L であることが明らかとなった (図 3)。また 4-MePro、Opp、Ala、2-methylcystine に関しては Marfey 試薬にて誘導体へと導き、逆相 HPLC にて分析した。その結果、Ala の立体配置は L であると判明した。また 2-methylcystine に関しては Marfey 試薬との反応性が悪く、2-methylcystine 由来のピークが観測されていなかったことが後に明らかになった。このとき、夾雑物ピークを誤って D-2-methylcystine であると同定したが、最近になり Tao らによって全合成が達成され、チアゾリン部位の立体化学が訂正された [Org. Lett. 12, 3018-3021 (2010)]。そこで 2-methylcystine を還元した後に再度分析した結果、L-2-methylcysteine 由来のピークが確認され、2-methylcysteine の立体化学は L であることが確かめられた (図 3)。

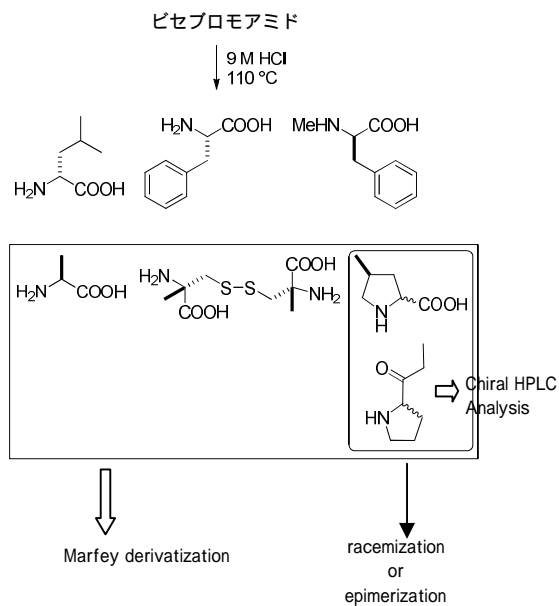


図 3 ビセプロロアミドの加水分解

一方、Opp 及び 4-MePro は酸加水分解中に位が完全にラセミ化/エピ化してしまうことも判明した。そこでまず、Opp のケトンを NaBH₄ にて還元してから酸加水分解を行った。その結果、2位のラセミ化を抑えることができ、2(*S*)-(1-hydroxypropyl)-piperidine が [6*S*:

6*R* = 1:1] で得られ、2位の絶対立体配置は *S* であることが明らかとなった。さらに、4-MePro に関してはオゾン分解にてチアゾリン環を開環した後に酸加水分解を行った。酸加水分解物と標品の ¹H NMR の比較、及び HPLC 分析により (4*S*)-4-MePro が得られ [2*S*:2*R* = 7:3]、4-MePro の絶対立体配置は (2*S*, 4*S*) であるということが明らかとなった (図 4)。

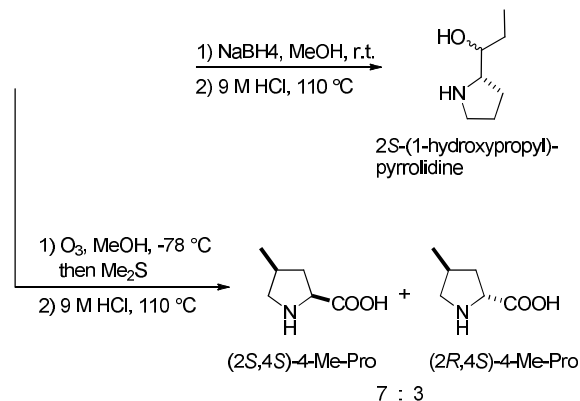


図 4 ビセプロロアミドの絶対立体構造決定

以上の結果から、ビセプロロアミドの絶対立体構造を決定した。(図 5)。

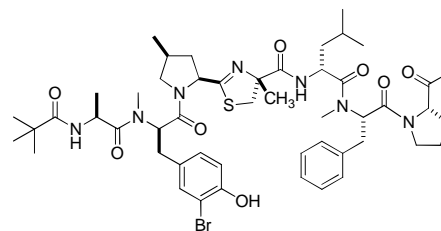


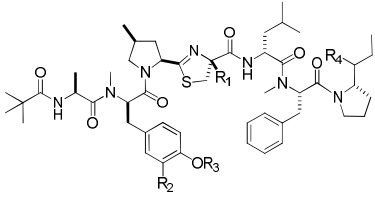
図 5 ビセプロロアミドの構造

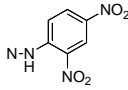
(3) ビセプロロアミドの構造活性相関

ビセプロロアミドのケトン還元したアルコール体 3、ヒドラジンで修飾したヒドラゾン体 4、プロモチロシンのメチルエーテル体 5、脱ハロゲン化したデプロモ体 6 をそれぞれ調整した。

続いて調整した各種誘導体の HeLa S₃ 細胞に対する増殖阻害活性を検討した。その結果、それぞれの誘導体の IC₅₀ 値はほぼ変化せず、強力な細胞毒性は保たれたままであった (表 1)。この結果から、ビセプロロアミドのケトン部位やフェノール性水酸基、Br 基は活性に影響しないことが明らかになった。したがって、これらの官能基を足がかりとしてピオチンなどの機能性分子を導入し、プローブ分子を合成することが可能である。

表 1 ビセプロモアミドおよびその誘導体の細胞毒性



Sample	IC ₅₀ (ng/mL) ^a
R ¹ = Me, R ² = Br, R ³ = H, R ⁴ = O (bisebromoamide)	40
3: R ¹ = Me, R ² = Br, R ³ = H, R ⁴ = H, OH	77
4: R ¹ = Me, R ² = Br, R ³ = H, R ⁴ = 	91
5: R ¹ = Me, R ² = Br, R ³ = Me, R ⁴ = O	72
6: R ¹ = Me, R ² = H, R ³ = H, R ⁴ = O	82

^a Cytotoxicities against HeLa S₃ cells.

(4) ビセプロモアミドの生物活性

ビセプロモアミドは HeLa S₃ 細胞に対して強力な増殖阻害活性を示すが、さらに(財)癌研究会癌化学治療法センターに39種類のヒト癌細胞スクリーニングを行っていたところ、いずれの癌細胞に対しても強い増殖阻害活性を示し、そのGI₅₀の平均値は40 nMであった。

さらに本化合物は非常に強いプロテインキナーゼ阻害活性を示した。特にERKのリン酸化を10~0.1 μMにおいて選択的に阻害し、AKT、PKD、PLCγ1やS6リボソームタンパク質などのリン酸化に全く影響しないことがわかった。

(5) ビセリングピアサイドの生物活性

ビセプロモアミドは HeLa S₃ 細胞に対し、IC₅₀ 0.1 μg/mlの強い増殖阻害活性を持つことが明らかになった。さらに、(財)癌研究会癌化学治療法センターに依頼し39種類のヒト癌細胞パネルスクリーニングを行っていたところ、その平均GI₅₀は0.60 μMであった。また脳腫瘍細胞SNB-78、肺癌細胞NCI H522に対しそれぞれGI₅₀が0.036 μM、0.067 μMと特異的に強力な増殖阻害活性を示すことも明らかとなった。ビセリングピアサイドは各癌細胞に対する平均有効濃度も低く、また既存の抗癌剤と比較しても似た効き方をするものが存在しないことから、新規の作用機序を持つことが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計13件)

- Honokiol inhibits osteoclast differentiation and function in vitro

Hasegawa, S.; Yonezawa, T.; Ahn, J. Y.; Cha, B. Y.; Teruya, T.; Takami, M.; Yagasaki, K.; Nagai, K.; Woo, J. T. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **2010**, *33*, 487-492. (査読有)

- Nobiletin improves hyperglycemia and insulin resistance in obese diabetic ob/ob mice
Lee, Y. Sil.; Cha, B. Y.; Saito, K.; Yamakawa, H.; Choi, S. S.; Yamaguchi, K.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J. T. *Biochemical Pharmacology*, **2010**, *79*, 1674-1683. (査読有)
- Isolation and identification of potent allelopathic substances in rattail fescue
Kato-Noguchi, H.; Yamamoto, M.; Tamura, K.; Teruya, T.; Suenaga, K.; Fujii, Y. *Plant Growth Regulation*, **2010**, *60*, 127-131. (査読有)
- Isolation and structure of koshikalide, a 14-membered macrolide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.
Iwasaki, A.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron Letters*, **2010**, *51*, 959-960. (査読有)
- Isolation of C11 cyclopentenones from two didemnid species, *Lissoclinum* sp. and *Diplosoma* sp.
Ogi, T.; Margiastuti, P.; Teruya, T.; Taira, J.; Suenaga, K.; Ueda, K. *Marine Drugs*, **2009**, *7*, 816-832. (査読有)
- Synthesis of palau'amide and its diastereomers: confirmation of its stereostructure
Sugiyama, H.; Watanabe, A.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron Letters*, **2009**, *50*, 7343-7345. (査読有)
- Bisebromoamide, a potent cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp.: Isolation, stereostructure, and biological activity
Teruya, T.; Sasaki, H.; Fukazawa, H.; Suenaga, K. *Organic Letters*, **2009**, *11*, 5062-5065. (査読有)
- Unusual intramolecular N→O acyl group migration occurring during conjugation of (-)-DHMEQ with cysteine
Kozawa, I.; Kato, K.; Teruya, T.; Suenaga, K.; Umezawa, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 5380-5382. (査読有)
- Synthetic studies on reidispongolide A, an actin-depolymerizing marine macrolide: Synthesis of C11-C22 and C23-C35 segments
Akiyama, S.; Toriihara, E.; Suzuki, K.; Teruya, T.; Suenaga, K. *Tetrahedron Letters*,

- 2009, 50, 5012-5014. (査読有)
10. Magnolol enhances adipocyte differentiation and glucose uptake in 3T3-L1 cells
Choi, S. S.; Cha, B. Y.; Lee, Y. S.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Woo, J. T. *Life Sciences*, **2009**, *84*, 908-914. (査読有)
 11. Biselyngbyaside, a Macrolide Glycoside from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp.
Teruya, T.; Sasaki, H.; Kitamura, K.; Nakayama, T.; Suenaga, K. *Organic Letters*, **2009**, *11*, 2421-2424. (査読有)
 12. Isolation and identification of a potent allelopathic substance in Bangladesh rice
Salam, M. ; Morokuma, M.; Teruya, T.; Suenaga, K.; Kato-Noguchi, H. *Plant Growth Regulation*, **2009**, *58*, 137-140. (査読有)
 13. Synthesis of actin-depolymerizing compounds
Kitamura, K.; Teruya, T.; Kuroda, T.; Kigoshi, H.; Suenaga, K. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 1896-1898. (査読有)

[学会発表](計17件)

- 1 徳住啓太、鳥居原英輔、伊藤嘉昌子、照屋俊明、末永 聖武
抗菌性デブシペプチド ミウラエナミド A の合成研究
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.28
- 2 梶山雄司、末永聖武、大野修、照屋俊明
シアノバクテリア由来の生物活性物質の単離と構造決定
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.28
- 3 渡邊敦、轟星児、照屋俊明、大野修、末永聖武
新規鎖状ペプチド Bisebromoamide 類の合成研究
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.28
- 4 鈴木一司、鳥居原英輔、秋山聡志、照屋俊明、大野修、末永 聖武
アクチン脱重合活性物質レイジスポンジオリド A の合成研究
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.27
- 5 大久保哲史、中島修弥、照屋俊明、大野修、末永聖武
マクロライド配糖体 Biselyngbyaside の合成研究
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.27

- 6 佐名恭平、大野修、照屋俊明、末永聖武
沖縄県産海洋シアノバクテリア由来新規チアゾール化合物の単離・構造決定
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.27
- 7 森田真布、照屋俊明、大野修、末永聖武
海洋シアノバクテリア由来の新規マクロリド配糖体の構造および生物活性
日本化学会第 91 春季年会 (横浜)
2011.3.27
- 8 渡邊敦、杉山弘和、照屋俊明、大野修、末永聖武
海洋産細胞毒性環状デブシペプチド Palau'amide の合成と立体構造
第 5 2 回天然有機化合物討論会 (静岡)
2010.9.29
- 9 佐々木宏明、照屋俊明、末永聖武
沖縄産シアノバクテリア *Lyngbya* sp.由来の新規鎖状ペプチド Bisebromoamide の単離と構造
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 10 佐々木宏明、照屋俊明、末永聖武
沖縄産シアノバクテリア *Lyngbya* sp.由来の Bisebromoamide の生物活性、構造活性相関
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 11 照屋俊明、岩崎有紘、末永聖武
三重産シアノバクテリア *Lyngbya* sp.由来のマクロライド Koshikalide の単離と構造
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 12 秋山聡志、鳥居原英輔、鈴木一司、照屋俊明、末永聖武
アクチン脱重合活性物質レイジスポンジオリド A の合成研究
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 13 渡邊敦、杉山弘和、照屋俊明、末永聖武
海洋産細胞毒性環状デブシペプチド Palau'amide の全合成
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 14 渡邊敦、轟星児、照屋俊明、末永聖武
新規鎖状ペプチド Bisebromoamide の合成研究
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 15 徳住啓太、鳥居原英輔、照屋俊明、末永聖武
抗菌性デブシペプチド ミウラエナミド A の合成研究
日本化学会第 90 春季年会 (千葉)
2010.3.27
- 16 森田真布、照屋俊明、末永聖武

海洋シアノバクテリア由来の新規マクロ
リド配糖体の単離と構造

日本化学会第 90 春季年会 (千葉)

2010.3.27

17 佐々木宏明、北村和大、照屋俊明、末永
聖武

海洋シアノバクテリア由来の新規鎖状ペ
プチド及びマクロリド配糖体の単離と絶
対立体構造

第 51 回天然有機化合物討論会(名古屋)

2009.10.7

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA TOSHIAKI)

琉球大学・教育学部・准教授

研究者番号：90375428

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし