

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590028

研究課題名(和文) 海洋生物由来菌類の産生する抗がん剤のシーズの探索及びリード化合物の開発

研究課題名(英文) Search of the seeds of an antineoplastic drug and development of a lead compound which marine organism origin fungi produce

研究代表者

山田 剛司 (Yamada, Takeshi)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20278592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：新たに種々の海洋生物から分離した菌類の代謝産物を検討した。カイメンから分離した真菌より、3種の新規物質を単離し、このうちの1つについてその絶対立体構造を決定することができた。ウニより分離した真菌の代謝産物より1種の新規物質を単離し、それらの平面構造を決定した。絶対構造の検討のため、数段階の化学反応を計画し、あと一段階で本品の絶対構造が明らかとなるまで進むことができた。これまで検討してきた細胞毒性物質産生菌について引き続き代謝物の精査を行ったところ、新たに多くの新規物質を単離した。その中には、有意な細胞増殖阻害活性を有する化合物が含まれる。

研究成果の概要(英文)： We studied the metabolites produced the fungi separated from the various marine organization. New three compounds were isolated from the marine sponge-derived fungus, and the absolute stereostructure for one metabolites was established. A novel compound was isolated from a sea urchin-derived fungus, and the planar structure was deduced. In order to the determination for the absolute configuration of it, several chemical reactions were carried out, and will complete soon. We scrutinized successfully about the cytotoxic substance production fungus. Consequently, many new substances were isolated and some of them demonstrated potent activities for the growth inhibition against the cancer cell lines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：化学系薬学

キーワード：海洋生物 真菌 細胞毒性物質 抗腫瘍性物質 海洋天然物

1. 研究開始当初の背景

がんの化学療法の研究開発には、古くから多くの研究者が挑戦し、数多くの抗がん性物質が見出されてきたが、未だ決定的な抗がん剤の開発がなされていない。天然には人知を超えた特異な化学構造をもつ化合物が存在し、それらには思いがけない新しい生理活性が期待できることから天然化合物は古くから薬用資源として注目されてきた。1970年代から植物に加え、海洋の動植物が注目されるようになり、今日まで数多くの生理活性物質が発見されてきた。なかでも抗がん物質の探索対象とした研究がアメリカを中心として活発に行われ、抗がん剤として有望な化合物が数種得られている。しかし、この種の研究では抽出材料の大量収集が困難で莫大な費用がかかる上、同種の動植物でも採集場所や時期により成分が異なることがある難点がある。

一方、テトロドトキシン等これまで発見されてきた海洋生物由来の生理活性物質の一部が体内の細菌により生産されることが報告された。この事実は他の海洋菌類も海洋動植物から得られるような生理活性物質を代謝する可能性を示唆している。このような背景から、申請者は菌類の代謝産物は培養により持続的に補充可能であることに早期から着目し、海洋動植物本体ではなく、それらから分離した菌類を生理活性物質の探索対象として研究を行ってきた。

2. 研究の目的

近年、天然からの新規生理活性物質の発見は、減少の一途を辿っており、有機・天然物分野の学会・学術発表においても、その7割近くを合成研究が占めている。しかし、医薬品の開発の多くは、生理活性天然物をシーズとして発展してきた。その医薬品のシーズになり得る新規化合物の探索は、創薬の基盤として欠くことのできない研究分野であり、衰退させてはならないと考える。また、化学合成の分野においてもこれらの一部が全合成に向け盛んに研究されており、本研究が機能性分子の開発に重要な役割を担っている。菌類の代謝産物から新規化合物を単離し、その細胞増殖阻害を検定するのみでは、より実用的な医薬品の開発には繋がらない。そこで、がんの増殖・転移に関与する分子を標的としたスクリーニングを用い、分子レベルで阻害機構を解明し、構造活性相関を検討していくことで、より機能性を有したリード化合物の創製を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、海洋に棲息する菌類の産生する代謝物より抗腫瘍性及び細胞毒性を有する化合物の探索及びそれらをシーズとした機能性リード化合物の開発を以下の研究方法で進めた。

(1) 有用な菌類の分離

日本近海において海藻、海水魚、節足動物、棘皮動物及び軟体動物などを採取し、各々の切片もしくは内臓及びその内容物を6種類の成分の異なる寒天平板培地に塗布し、生えてきたバクテリア、放線菌及び真菌を随時同じ成分の寒天培地の入った試験管(以下スラント)に分離していく(およそ150~200種類の菌類を分離)。次にこれら菌類をそれぞれ同じ成分の液体培地で3~7週間静置培養後、酢酸エチル-メタノール(5:1)で抽出し、得られたエキスについてP388マウスリンパ性白血病細胞及びHL-60ヒト急性骨髄性白血病細胞に対する増殖阻害活性試験を実施し、強い細胞増殖阻害物質を産生する菌を選別する。菌によっては非常に変性しやすいものも多く、コンピューターにより菌類の性状、継代培養期間及び最適保管温度を厳密に管理することにより、再現性を確保する。

(2) 大量培養による活性本体の探索

(1)の実験において見出した細胞毒性物質産生菌について各々の菌を採取した寒天平板培地と同じ成分で大量培養する(2~4週間静置培養)。培養後、今度はろ過により菌体と培養液に分離し、菌体はMeOHで冷浸、また培養液は酢酸エチルで抽出し、それぞれ2種類のエキスを得る。得られた各2種類のエキスについて先と同様に細胞増殖阻害活性試験を実施し、活性の強く、さらに代謝物の収量が多いものを中心に分離・精製を行う。分離・精製にはShephadex LH-20、シリカゲル及びHPLCなどのクロマトグラフィーを用い、細胞増殖阻害活性試験の活性を指標に進めていき、活性本体を単離する。得られた単一の化合物については、NMR(500MHz)、IR、MASSなどの各種スペクトルを用いて構造解析を行い、改良Mosher法、CDスペクトル及び化学反応を駆使し、その絶対構造まで決定する。微量成分については繰り返し培養することにより補充を行うが[1]で示した菌の管理により分離の再現性は、維持できる。

(3) 活性化合物をリードとしたリード化合物の開発

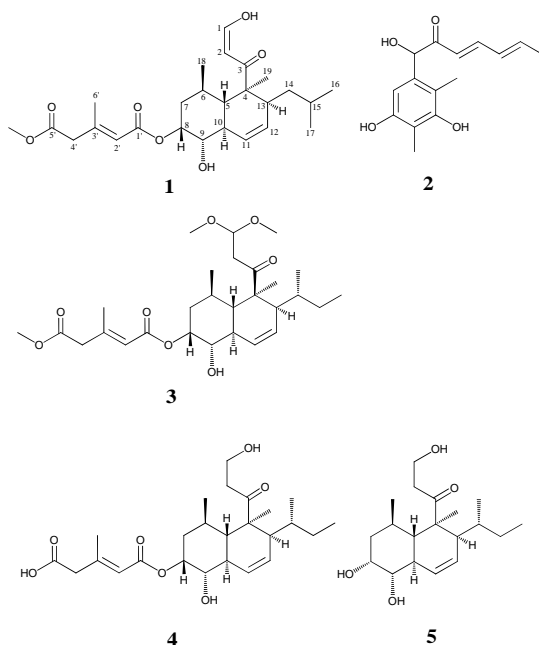
化合物の活性は、基本骨格が同じでも官能基などにより、大きく影響される。[2]の実験により新規生理活性物質だけでなくその類縁体をできうる限り多く単離することにより、構造活性相関を検討することが可能となる。天然化合物の活性発現に必要なコア構造を明らかにするとともに、さらに水酸基など反応性に富む官能基を修飾して新たなリード化合物を創製し、細胞増殖阻害活性試験及び分子標的スクリーニングを実施する。また、代謝物の精製段階において、ユニークな構造を有すると推定される化合物については、細胞増殖阻害活性の有無にかかわらず単離を行い、同様にその構造解析を行い、それらをシーズにリード化合物の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 大阪府泉南郡岬町沿岸において海洋生物を採取し、各々の切片もしくは内臓及びその内容を6種類の成分の異なる寒天平板培地に塗布し、生えてきたバクテリア、放線菌及び真菌を随時同じ成分の寒天培地の入った試験管(以下スラント)に拾い、のべ約160種類の菌類を分離した。次にこれら菌類をそれぞれ同じ成分の液体培地で3~7日間静置培養後、酢酸エチル-メタノール(5:1)で菌体ごと抽出し、得られたエキスについてP388マウスリンパ性白血病細胞及びHL-60ヒト急性骨髄性白血病細胞に対する増殖阻害活性試験を実施し、9種の菌が優位な細胞毒性物質産生菌として見出すことができた。

(2) 得られた細胞毒性物質産生菌について活性本体およびその類縁化合物を探索することを目的とし、大量培養を行った。

クロイツカイメンから分離した真菌より、3種の新規物質1-3及び2種類の既知物質4, 5を単離し、それらの構造を決定した。このうちの1について化学反応及びCDスペクトルを用いてその絶対立体構造を決定することができた(論文及び学会にて公表)。残る二つについても同様の方法を用いてこれらの絶対立体構造を目下検討中である。これらの化合物は緩やかではあるが、培養がん細胞に対し増殖阻害活性が認められた。

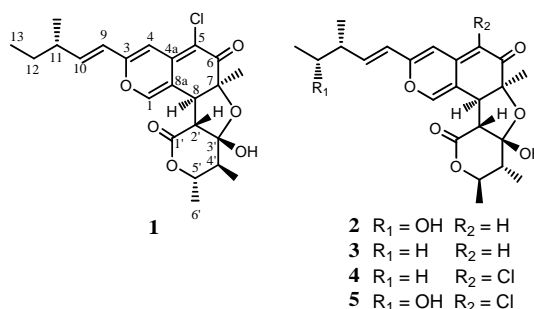


ムラサキウニより分離した真菌の代謝産物より2種の新規物質を単離し、それらの平面構造を決定した。これらは前例が稀有な構造を有しており、絶対構造の検討のため、さらなる培養によりこれらの補充を行った。補充ができた化合物について絶対配置の決定を目的として数段階の化学反応を計画し、実施した。その結果、あと一段階で本品の絶対

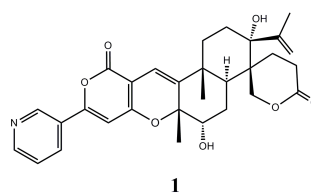
構造が明らかとなるまで進むことができた。これが完了すれば多くの化合物の絶対配置決定に有用な方法になると期待できる。この化合物については、特許出願予定である。

(3) 以前より抗腫瘍性物質のシーズとなり得る化合物の探索対象としている菌の代謝物について精査を行った。

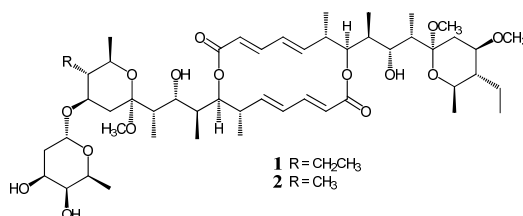
海水魚ボラより分離した真菌の代謝物について精査したところ、新たに7種の新規物質1-3を単離し、すでに絶対構造が判明している4, 5とのCDスペクトルの比較によりそれらの絶対構造を確立した。これらの化合物は、培養がん細胞に対し比較的強い増殖阻害活性が認められた(論文にて公表)。



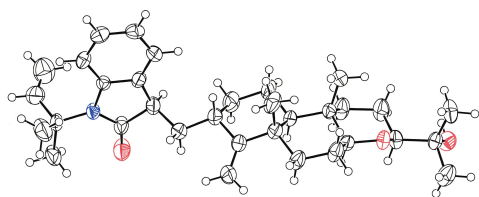
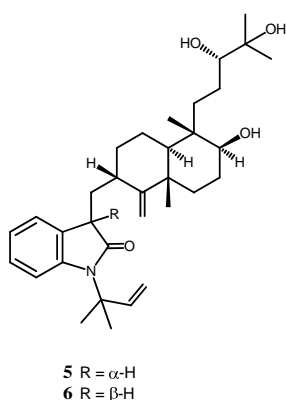
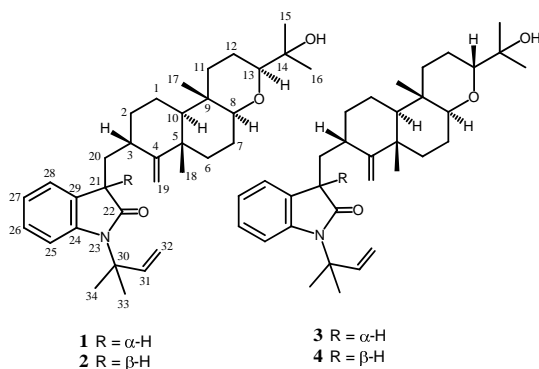
沖縄産ラップウニから分離した真菌より1種の新規細胞毒性物質1を単離した。この化合物は、前例の少ないユニークな炭素骨格を有しており、その相対立体構造を、各種スペクトルの解析により確定した(論文にて公表)。この化合物については微量のため活性試験にかけることができないため今後補充する必要がある。



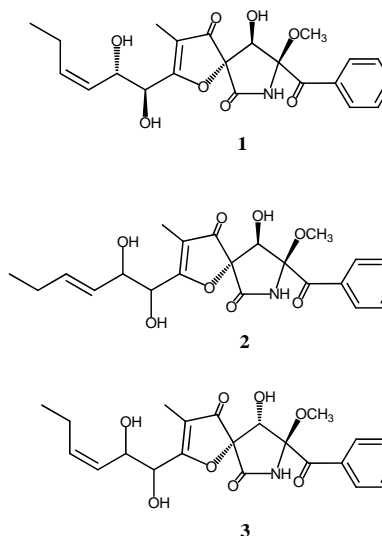
海水魚ササノハベラから分離した放線菌より2種の新規細胞毒性物質4, 5を単離した。これらの細胞増殖阻害活性は非常に強く、39種のヒト培養がん細胞を用いたパネル試験においても有意な結果が得られた(論文にて公表)。



ムラサキウニより分離した真菌の代謝産物より6種の新規物質1-6を単離し、それらの絶対構造をX結晶構造解析及びCDスペクトルを用いて決定した。これらの化合物について培養がん細胞を用いた細胞増殖阻害活性を検定したところ、2, 3及び4に非常に強い活性が認められた。今後、分子レベルで作用機序を解明していく予定である。



海水魚ボラより分離した真菌から得られた化合物の絶対構造を検討していく過程でよりCDスペクトルと絶対配置の相関に有意な規則性を見出した。化合物1の立体異性体2, 3を単離し、その規則性を適用して絶対構造の決定を行った。化合物の量を減らすことなく、簡便に、絶対配置を導くことができた。今後、側鎖のヒドロキシ基の立体化学について検討していく。



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6件)

Takeshi Yamada, Yuki Mizutani, Yoshihide Umabayashi, Naoko Inno, Maiko Kawashima, Takashi Kikuchi, Reiko Tanaka.

Tandyukisin, a novel ketoaldehyde decalin derivative, produced by a marine sponge-derived *Trichoderma harzianum*.

Tetrahedron Lett., **55**, 662–664, 2014.

doi:10.1016/j.tetlet.2013.11.107

査読有

Kyouko Nakanishi, Mitsunobu Doi, Yoshihide Usami, Taro Amagata, Katsuhiko Minoura, Reiko Tanaka, Atsushi Numata, Takeshi Yamada.

Anthcolorins A–F, novel cytotoxic metabolites from a sea urchin-derived *Aspergillus versicolor*.

Tetrahedron, **69**, 4617–4623, 2013.

doi:10.1016/j.tet.2013.04.011

査読有

Takeshi Yamada, Takashi Kikuchi, Reiko Tanaka, Atsushi Numata.

Halichoblelides B and C, potent cytotoxic macrolides from a *Streptomyces* species separated from a marine fish.

Tetrahedron Lett., **53**, 2842–2846, 2012.

doi:10.1016/j.tetlet.2012.03.114

査読有

Mayumi Kitano, Takeshi Yamada, Taro Amagata, Katsuhiko Minoura, Reiko Tanaka, Atsushi Numata.

Novel pyridino- α -pyrone sesquiterpene type pileotin produced by a sea urchin-derived *Aspergillus* sp.

Tetrahedron Lett., **53**, 4192–4194, 2012.

doi:10.1016/j.tetlet.2012.05.144

査読有

Takeshi Yamada, Masaaki Jinno, Takashi Kikuchi, Tetsuya Kajimoto, Atsushi Numata,

Reiko Tanaka.

Three new azaphilones produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*.

Journal of Antibiotics, **65**, 413–417, 2012.

doi:10.1038/ja.2012.40

査読有

Takeshi Yamada, Yasuhide Muroga, Masaaki Jinno, Tetsuya Kajimoto, Yoshihide Usami, Atsushi Numata, Reiko Tanaka.

New class azaphilone produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*. The stereochemistry and biological activities.

Bioorg. Med. Chem. **19**, 4106–4113, 2011.

PMID:21640594

査読有

〔学会発表〕(計3件)

山田 剛司

クロイソカイメン由来真菌の産生する新規代謝物の絶対構造

日本薬学会第134年会

3. 29. 2014

熊本

山田 剛司

海水魚由来真菌の代謝産物の絶対構造

日本薬学会第132年会

3. 29. 2012

札幌

山田 剛司

海水魚由来真菌の代謝産物の絶対構造

第19回天然薬物の開発と応用シンポジウム

11月

大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 剛司 (YAMADA, Takeshi)

大阪薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：20278592