

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月25日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658100

研究課題名（和文）

難治性疾患に対する分子標的薬シードとしての新規 PKC リガンドの探索研究

研究課題名（英文）

Search for novel PKC ligands as therapeutic seeds for intractable diseases

研究代表者

入江 一浩 (IRIE KAZUHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：00168535

研究成果の概要（和文）：細胞内情報伝達の鍵酵素であるプロテインキナーゼ C (PKC) は、がん、アルツハイマー病などの難治性疾患の標的酵素の一つである。本研究では、本研究代表者らが独自に開発した PKC の C1 ドメインを化学合成した C1 ペプチドを用いたスクリーニング系を用いて、日本産フサコケムシ抽出物から抗腫瘍性天然物 bryostatin 類 6 種を単離・同定することに成功した。Bryostatin 4, 10 ならびに 14 を用いた構造活性相関研究により、C20 位のエステル基が PKC への結合ならびに活性化に不要であることが明らかになった。さらに本スクリーニング系を利用して、日本産海綿約 400 サンプルのスクリーニングを行った結果、*Theonella* 属海綿抽出物に、bryostatin 類に匹敵する高い PKC 結合活性を有する化合物の存在を見いだした。

研究成果の概要（英文）：Protein kinase C (PKC) involved in cellular signal transduction is one of the target enzymes for therapeutics of cancer and Alzheimer's disease. To explore PKC ligands with novel skeleton, we employed our screening system utilizing synthetic peptides of PKC C1 domains, to succeed to identify several bryostatins, anti-neoplastic marine macrolides, from Japanese bryozoan *Bugula neritina*. Structure-activity studies of bryostatins 4, 10 and 14 suggested that the ester group at position C20 was not necessary for binding to and activating PKC. Moreover, we screened novel PKC ligands from marine sponges, and found that a marine sponge *Theonella* sp. contains PKC ligands with high binding affinity comparable to bryostatins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：海洋天然物、ブリオスタチン、プロテインキナーゼ C、がん、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C (PKC) は、細胞内情報伝達の鍵酵素であり、発がん促進物質の主要なターゲットとして知られている。天然

の発がん促進物質としては、植物由来の phorbol ester 類や ingenol ester 類, iridol 類, ラン藻及び放線菌由来の teleocidin 類, アメフラシから単離された aplysiatoxin などが知られており (図 1), これらはいずれも強

力な PKC 活性化剤である。一方, Pettit らにより単離された海洋動物フサコケムシ由来の bryostatin 1 (bryo-1) は, 発がん促進活性を持たないユニークな PKC 活性化剤である (G. R. Pettit *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846)。

Bryo-1 は多くのがん細胞に対して増殖抑制活性を示すことから, 抗がん剤として臨床試験が行われている。しかしながら, bryo-1 の天然からの単離収率は極めて低く, 全合成も 50 段階以上を要する。従って, bryo-1 に代わる大量供給可能な新規 PKC リガンドの探索が強く望まれている。また, 上記の PKC リガンドの多くは, 発がん促進活性に関連した各種生物活性を指標として同定されてきたが, 発がん促進活性を持たない bryo-1 様の PKC リガンドの探索には, 従来法は適用できなかった。

2. 研究の目的

本研究代表者らは, 天然 PKC リガンドが結合する C1 ドメイン (図 1) を化学合成し, 亜鉛でフォールディングすることによって, 全長 PKC の代用品を開発した (K. Irie *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9159)。この PKC C1 ペプチドを用いるアッセイ系は, 発がん促進活性に依らない迅速な PKC リガンドの探索法になりうる。本研究では, この高感度スクリーニング法を用いて, bryo-1 の代替となる新規 PKC リガンドを海洋生物資源から探索することを目的とした。これまでに, 藍藻およびフサコケムシ以外の海洋生物から PKC リガンドが単離された例がないことから, 過去に多くの生理活性物質が単離されている海綿に着目してスクリーニングを行った。

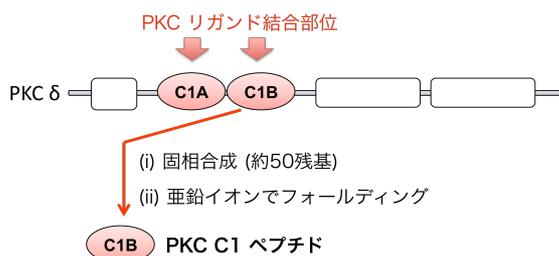


図 1. PKC C1 ペプチドの調製. PKC C1 ペプチドは全長 PKC に匹敵する PKC リガンド結合能を示す。

3. 研究の方法

- (1) PKC δ C1B ペプチドを用いたスクリーニング
がん細胞増殖抑制に関わっている PKC δ

イソザイムである PKC δ の C1B ドメインペプチドに対する結合能を指標としたスクリーニング法の有効性を検討するため, フサコケムシ *Bugula neritina* (図 2) の抽出物から bryostatin 類縁体の単離を試みた。PKC δ -C1B ペプチドは, およそ 50 残基からなる PKC δ の C1B ドメインを Fmoc 固相法により合成し, 適切な pH 条件下亜鉛イオンでフォールディングさせることで得られる。この PKC δ -C1B ペプチドは, 全長 PKC δ に匹敵する PKC リガンド結合能を示す。PKC δ -C1B ペプチドに対する結合能は, 放射性同位元素で標識された [3 H]phorbol 12,13-dibutyrate ([3 H]PDBu) の特異的結合の阻害度から評価され, 試料中の PKC リガンドの検出を高感度で行うことができる。本法は, 従来, PKC 活性化剤や抗がん剤の探索に使用されてきた各種細胞系でのアッセイ法と比較して, 短時間で簡便に行うことができ, アゴニストのみならず PKC C1 ドメインに結合するアンタゴニストも検出できる優れた方法である。

この PKC δ -C1B ペプチドに対する結合能を指標として, 2010 年夏, 福岡県今津で採集された *B. neritina* (図 2, 湿重量 6.1 kg) の EtOAc 抽出物を各種クロマトグラフィーにより分画・精製した。



図 2. フサコケムシの写真

(2) Bryostatin 類の活性評価

得られた bryostatin 類の各種生物活性として, PKC δ -C1B への結合能と PKC δ の活性化, Epstein-Barr virus 早期抗原 (EBV-EA) 誘導能, 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) による EBV-EA 誘導の抑制能を測定した。

PKC δ -C1B を用いた結合試験では, [3 H]PDBu に対する結合阻害試験により得られた 50%阻害濃度 IC₅₀ から結合定数 K_i を算出した。PKC δ 活性化試験には, 蛍光標識ペプチドを用いたアッセイキット (PepTag, Promega) を使用した。

EBV はヒトパピローマウイルスの一種であり, バーキットリンパ腫の原因となるがんウイルスである。TPA に代表される発がん促

進物質は EBV の早期抗原を顕著に誘導することから、発がん促進能の簡便な *in vitro* 評価法として用いられている。また、TPA とサンプル化合物を同時に処理することで、その化合物の抗発がん促進活性の評価を行うことも可能である。試験には EBV ゲノムを保持したヒト B リンパ腫細胞株である Raji 細胞を用い、間接免疫蛍光法により EA を発現した細胞の割合を計測した (Y. Ito *et al.*, *Cancer Lett.* **1981**, *13*, 29)。本アッセイは、金沢大学大学院医学研究科・徳田春邦准教授の協力により行った。

(3) 海綿のスクリーニング

日本近海（八丈島や石垣島などの周辺海域）で採集された海綿 374 サンプルのエタノール抽出物に対して、PKC δ -C1B ペプチドに対する結合能を指標として、PKC リガンドのスクリーニングを行った。海綿抽出物は東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物学専攻水圏天然物化学研究室・松永茂樹教授からご供与いただいた。被検試料 100 μ g/ml での PKC δ -C1B に対する [3 H]PDBu の特異的結合の阻害率 (%) が 70%以上のサンプルを、結合活性ありと判断した。

(4) 黄色 *Theonella swinhoei* 中の PKC リガンドの探索

上記スクリーニングの結果、*Theonella swinhoei* の多くに顕著な PKC 結合活性が認められた。これまで海綿 *Theonella swinhoei* からは、抗腫瘍活性を示す swinholide A、細胞毒性を示す onnamide A 及び auranoside A、セリンプロテアーゼ阻害活性を示す cyclotheonamide A などのユニークな構造をもつ数多くの生理活性物質が単離されている。しかしながら、*T. swinhoei* から PKC リガンドが単離された例はこれまでになく、新規 PKC リガンドである可能性が期待された。そこで、2005 年に沖縄慶良間諸島で採集された黄色 *T. swinhoei* (図 3) のエタノール抽出物について、PKC δ -C1B に対する結合能を指標として、各種クロマトグラフィーによる精製を行った。



図 3. 海綿 *Theonella swinhoei*. 2005 年に沖縄県慶良間諸島で採集されたサンプル。

4. 研究成果

(1) PKC δ -C1B ペプチドを用いた PKC リガンドスクリーニング系の確立

まず PKC δ -C1B ペプチドに対する結合能を指標とするスクリーニング系が機能するかどうかを確認する目的で、*B. neritina* (図 2, 湿重量 6.1 kg) の EtOAc 抽出物を各種クロマトグラフィーにより分画・精製した結果、顕著な PKC δ -C1B 結合能を示す化合物 6 種を単離することができた。NMR 及び MS スペクトルデータを文献値と比較した結果、これらの化合物は bryo-4, 5, 8, 10, 14, 19 (図 4) と同定した。これより、本法を用いることによって高選択的かつ高感度に PKC リガンドの探索および同定が可能であることが確認された。

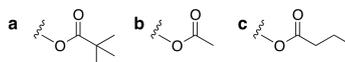
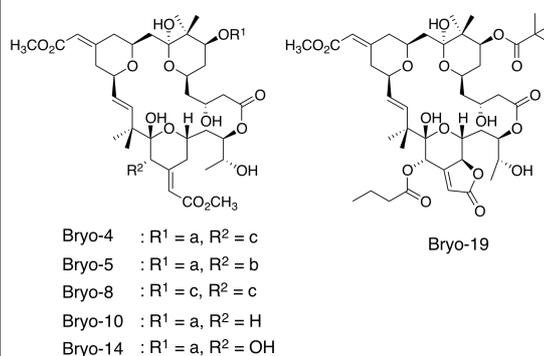


図 4. 日本産フサコケムシ *B. neritina* から単離した bryostatin 類の構造。

(2) Bryostatin 類の 20 位における構造活性相関

Bryo-4, 5, 10, 14 は、右上の A 環に pivaroyl 基 (図 4 の R¹ 基) を共通して有するが、左下の 20 位の置換基 (図 4 の R² 基) に違いがある。Wender らの研究によって (P. A. Wender and K. W. Hinkle, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6725), 20 位エステル側鎖の炭素数と PKC 結合能にある程度の相関があることが明らかにされているが、その他の生物活性に対する 20 位側鎖構造の影響は不明であった。そこで、十分な量を単離することができた bryo-4, 10, 14 について PKC δ に対する結合能ならびに活性化能、EBV-EA 誘導能、発がん促進物質である TPA による EBV-EA 誘導の抑制能をそれぞれ評価し、比較検討した。

Bryo-4, 10, 14 の PKC δ に対する結合定数 K_i は、それぞれ 0.16, 0.24, 1.2 nM であった。また、bryo-4 および 10 は、ポジティブコントロールである TPA と同等の PKC δ 活性化能を 10^{-8} M で示したのに対して、bryo-14 は

ずかに低い活性化能を示した。これらの結果は、bryostatin 類の 20 位の疎水性が PKC δ 結合能ならびに活性化能に重要であること、しかしながらエステル側鎖は必ずしも必要でないことを示唆している。

これまでに見いだされた天然 PKC リガンドの多くが発がん促進活性を示すのに対して、bryo-1 は TPA による発がん促進活性を抑制する。そこで、bryo-4, 10, 14 の抗発がん促進活性を EBV-EA 誘導試験によって評価した。Bryo-4, 10, 14 は bryo-1 と同様に EA をほとんど誘導せず、さらに TPA $10^{-7.5}$ M による EA の誘導 (約 30%) を顕著に抑制した。これらの結果は、bryo-4, 10, 14 が bryo-1 と同様に発がん促進活性をほとんど示さないこと、また 20 位の側鎖構造は EBV-EA 誘導抑制活性に影響を与えないことを示唆している。

これらの知見は、今後抗発がん促進活性を有する PKC リガンドを開発するうえで有用と考えられる。

(3) 海綿由来の新規 PKC リガンドのスクリーニング

日本近海 (八丈島や石垣島などの周辺海域) で、松永茂樹教授らが採集した海綿抽出物 374 サンプルのうち、22 サンプルにおいて顕著な PKC δ -C1B 結合活性が認められた。興味深いことに、これら 22 サンプルのうち 9 サンプルは、*Theonella* 属海綿であった。そこで *Theonella swinhoei* に含まれる PKC リガンドの精製を試みた。

(4) 黄色 *Theonella swinhoei* 中の PKC リガンドの探索

凍結保存した *T. swinhoei* 個体 (1.55 kg) を粉碎・抽出し、EtOAc 抽出物 (4.84 g) を得た。この EtOAc 抽出物を中間シリカゲルカラムクロマトグラフィー、逆相ならびに順相 HPLC で分画し、PKC δ -C1B に対して顕著な結合活性の認められたフラクションについて精製を進めたところ、ごく微量ではあるが 3 種類の活性画分が得られた。これらを松永茂樹教授の研究室で高田健太郎博士のご協力を得て、それぞれ LC-MS 分析したところ、いずれも m/z 745~773 と 1580~1634 に 2 つのピークが観測された。保持時間ならびに MS スペクトルを詳細に解析した結果、この *Theonella* 個体には少なくとも 3 種類の PKC リガンドが含まれ、これらの分子量は 758, 905 もしくは 910, 1600 付近のいずれかである可能性が示唆された。

これら 3 つの中で最も試料量が多かった画分の ^1H NMR を測定したところ、活性物質には *tert*-ブチル基やメトキシ基が含まれていることが判明した。これらの構造情報ならびに推定分子量などから、活性物質の一つは

bryostatin 類縁体である可能性が示唆された。しかしながら、UV スペクトル及び分子量に一致する bryostatin 類縁体の報告はなく、新規活性物質かも知れない。今後、*T. swinhoei* 大量精製を行い、構造決定に繋げて行きたい。

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) *Corresponding author

[雑誌論文] (計 1 件)

S. Ueno, R. C. Yanagita, K. Murakami, A. Murakami, H. Tokuda, N. Suzuki, T. Fujiwara, and *K. Irie: Identification and biological activities of bryostatins from Japanese bryozoan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2012**, *76*, 1041–1043, doi: 10.1271/bbb.120026 (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

植野紗代, 柳田 亮, 村上一馬, 村上 明, 徳田春邦, 鈴木信孝, 藤原健史, 入江一浩: 日本産フサコケムシに含まれるプリオスタチン類の同定と活性評価, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 平成 24 年 3 月 23 日, 京都.

[図書]

なし

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.orgchem.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 一浩 (IRIE KAZUHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 00168535

(2) 研究分担者

柳田 亮 (YANAGITA RYO)

香川大学・農学部・助教

研究者番号: 10598121

(3) 連携研究者

なし