

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310160

研究課題名(和文) 海洋シアノバクテリア由来の生体機能分子

研究課題名(英文) Bioactive substances from marine cyanobacteria

## 研究代表者

末永 聖武 (Suenaga, Kiyotake)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号：60273215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,400,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県および鹿児島県奄美地方で採集した海洋シアノバクテリアから、ビスセリングピオライドAおよびB、クラハインなど多くの新規生物活性物質を発見した。さらに、それらが腫瘍細胞に小胞体ストレスに基づくアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導することを明らかにした。さらに、ビスセリングピアサイド類と標的的生体分子である小胞体カルシウムポンプSERCAとの複合体の結晶構造解析を行い、既存の阻害剤とは異なるユニークな結合様式を明らかにした。また、ビスセリングピオライドAおよびBの化学合成を達成した。

研究成果の概要(英文)：We could find a lot of novel bioactive substances such as biselyngbyolides A and B and kurahayne from marine cyanobacteria collected at Okinawa and Amami Islands in Kagoshima Prefecture. These compounds induced apoptosis based on their ER stress. Crystallization and structure determination of sacro-endoplasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) complexed with biselyngbyaside and biselyngbyolide B were achieved. Biselyngbyasides bind to SERCA with unique binding mode. We achieved chemical synthesis of biselyngbyolides A and B.

研究分野：天然物化学

キーワード：海洋シアノバクテリア ビセリングピアサイド リポペプチド 構造決定 全合成 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

日本の死因第一位は癌であり、優れた抗がん剤が求められており、そのリード化合物を天然物に求める研究が盛んに行われている。特に、成育環境や生態系が陸上生物とは異なる海洋生物からは数多くの細胞毒性物質・抗腫瘍性物質が単離されている。そのような研究の中から、カイメンから発見されたハリコンドリンBに基づきエリブリンが開発され、2011年に認可された。海洋生物由来の物質の多くは微量成分であり、試料供給が困難なために研究の推進が不可能な場合が多い。エリブリンは、その点を有機合成化学の力で克服した。近年、クロスカップリングやオレフィンメタセシスなど有機合成化学の発展により、複雑な生体機能分子の効率的な合成が可能になった。また、生物活性物質の作用機構、標的分子を解明するケミカルバイオロジーの手法が発展してきた。リードとなる物質から、有機合成化学とケミカルバイオロジーによって医薬へ繋がる研究が可能となりつつある。したがって、上記のような研究の展開が可能で優れた生体機能分子を発見することが何よりも重要である。

海洋シアノバクテリアは光合成を行う細菌の一種で、ラン藻とも呼ばれる。これまで海洋生物からは、特異な化学構造と医薬品として有望な活性を持つ物質が多数発見されているが、その多くはシアノバクテリアによって生産されていると推定される。海洋シアノバクテリア由来の生体機能分子は、米国の Fenical, Gerwick, Luesch らによって活発に研究されており、ユニークな物質が続々と報告されている。申請者もここ数年、海洋シアノバクテリアの生体機能分子についての研究を進め、ピセプロモアミド、ピセリングピアサイド類を発見した。ピセプロモアミドは腫瘍細胞の増殖を nM オーダーの低濃度で抑制し、細胞増殖に重要なシグナル制御キナーゼ (ERK) のリン酸化を強力かつ選択的に阻害した。さらに、細胞骨格タンパク質のアクチンの重合を促進し、アクチン線維を安定化することが分かった。また、ピセリングピアサイドは破骨細胞の分化を 30 nM 程度の低濃度で抑制し、骨粗しょう症治療薬のリード化合物として期待される。以上の研究から、海洋シアノバクテリアは医薬のリードとなり得る新分子の探索源として極めて有望であり、さらに探索を進めることの重要性が示された。

## 2. 研究の目的

細胞内シグナル伝達を選択的に阻害する優れた生体機能分子をできるだけ多く発見し、その化学構造を決定する。これが本研究の第一の目的である。潮間帯は、豊富な生物多様性を有し、塩濃度や温度が変化しやすい環境である。環境の変化・ストレスに対するシアノバクテリアの応答はよく研究されて

おり、さまざまな遺伝子の発現量が変動することが知られている。したがって、環境変化に依りて多様な物質の産生が期待される。優れた新分子の発見には生物種の選択が重要である。申請者は前項で述べたように海洋シアノバクテリア由来の生物活性物質について研究を続けており、独自の生態学的情報を蓄積してきた。この情報に基づき、採集地や生物種を厳選し、ユニークな生体機能分子を発見できる可能性を高める。

つぎに、発見した物質について細胞内シグナル伝達に着目した生物活性評価や標的分子探索を行い、作用機構を明らかにする。ピセプロモアミドとレプトリングピオリド類にはアクチンに作用し、ERK リン酸化を阻害するという共通点がある。アポトーシスに関連する酵素やシグナル伝達系への作用を詳細に解析し、アクチンに対する作用が ERK リン酸化や細胞死 (アポトーシス) にどのように繋がっていくのかを明らかにする。アクチンに脱重合作用を有するマクロライド (アブリロニン A やミカロライド B) についても同様の解析を行い、アクチンに対する作用が ERK リン酸化や細胞死 (アポトーシス) と普遍的に関係しているかどうかを明らかにする。ピセリングピアサイドは、各種ヒト癌細胞に対する感受性パターンが、細胞の小胞体からのカルシウム放出を誘導する薬剤と類似していることが分かった。そこで、ピセリングピアサイドが細胞内カルシウム濃度に及ぼす影響を調べる。

さらに、生体機能分子を生産する海洋シアノバクテリアのゲノムを抽出し、最近導入された次世代シーケンサーにより網羅的配列解析を試み、遺伝学的特徴を明らかにする。得られた配列データからバイオインフォマティクス的手法により生合成遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

沖縄県や鹿児島県奄美地方の海岸で、干潮時に潮間帯の海洋シアノバクテリアを採集した後、有機溶媒による抽出で得た抽出エキスに対して生物活性試験を行った。時期によって発生する種が異なるので、時期を変えながら何度も採集を行った。また、同種であっても採集時期や採集場所により、成分が異なることもあるため、採集を繰り返し行い、多種多様なシアノバクテリアを入手した。生物活性試験としては腫瘍培養細胞に対する増殖阻害活性を主に用いた。顕著な活性を示したサンプルから単離・構造解析を行った。化学構造は NMR を中心とする機器分析により決定する。機器分析だけで立体構造の決定が困難な場合には、合成化学的手法を用いて解決した。海洋シアノバクテリアの同定は、顕微鏡による形態観察と 18S rDNA 配列解析により行った。

ビスリンギンピアサイドについては、カルシウムイオン感受性蛍光色素 Fura-2 を細胞に取り込ませた後、刺激後の蛍光強度変化を測定し、細胞内カルシウム濃度の変化を調べた。また、小胞体ストレスを誘導しているのかどうか明らかにするため、小胞体ストレスマーカータンパク質の mRNA 発現について RT-PCR 法により解析した。さらに、小胞体膜上のカルシウムポンプ SERCA の阻害活性を評価し、SERCA との複合体の共結晶化・構造解析を行った。

ビスプロモアミドについては構造活性相関の知見に基づき、活性に充用ではないケトンカルボニル基を利用してビオチン標識体を合成し、アビジン-ビオチン結合を利用してアフィニティークロマト担体を調製し、アフィニティ精製を行った。

レプトリングピオリド類については、結晶化を狙って種々の誘導体を調製した。また、細胞骨格タンパク質アクチンとの複合体の共結晶化・構造解析を検討した。また、アクチン脱重合マクロリド、アプリロニン A の側鎖部人工類縁体のアポトーシス誘導活性を評価した。

#### 4. 研究成果

沖縄県および鹿児島県で採集した海洋シアノバクテリアから、新規鎖状ペプチド maedamide, kurahyne, jahanayne、新規環状デプシペプチド kurahamide、および 8 種の新規 biselyngbyaside 類縁体を単離し、その化学構造構造を明らかにした。Kurahyne は腫瘍細胞に対してアポトーシスを誘導し、細胞内カルシウム濃度を上昇させる活性を示した。また、全合成を達成し、その化学構造を確定した。Maedamide および kurahamide は顕著なプロテアーゼ阻害活性を示した。Maedamide の全合成も達成したが、スペクトルデータが天然品のものとは一致せず、現在立体化学について検討中である。また、三重県志摩半島で採集した海藻の一種より mebamamide 類を単離し、その構造を明らかにした。Mebamamide B は、HL60 細胞のマクロファージ様細胞への分化を誘導した。

Biselyngbyaside (BLS) 類は細胞内カルシウムイオン濃度を顕著に上昇させる作用を示した。また、小胞体ストレスマーカータンパク質の発現を誘導させる活性も示した。ヒトがん細胞パネル実験の結果、BLS 類のプロファイルは小胞体カルシウムポンプ SERCA 阻害剤であるタプシガルジン (TG) やシクロピアゾン酸 (CPA) と類似していることが判明し、標的分子が SERCA であると予想された。そこで、共役酵素アッセイで BLS 類の SERCA 阻害活性を評価したところ、数十 nM 程度の低濃度で SERCA を阻害することが分かった。そこで、SERCA との共結晶化を検討した結果、BLS とそのアグリコンである

biselyngbyolide B (BLLB) について SERCA との共結晶化が得られ、結晶構造を決定することが出来た。その結果、BLS および BLLB は、SERCA に対して TG とは全く異なるサイトで結合していることが分かった。CPA とは一部結合位置が重なっていたが、BLS および BLLB はより細胞質側に結合しており、脂溶性相互作用により SERCA に強く結合していることが分かった実際、BLS および BLLB の SERCA 阻害活性は CPA に比べて約 100 倍強かった。

ビスプロモアミドについては、ビオチン標識体を用いてアフィニティ精製を行った。標的候補となるタンパク質を見いだしたが、実験結果の再現性に問題があり、現在さらなる検討を行っている。レプトリングピオリドについては、種々の誘導体およびアクチンとの複合体に関して結晶化を検討しているが、今のところ構造解析が可能な結晶は得られていない。

アプリロニン A の側鎖部人工類縁体は、やや活性が弱いものの腫瘍細胞に対してアポトーシス誘導活性を示した。また、HL60 細胞に対する細胞増殖阻害活性はアクチン脱重合活性と良い相関を示すことが明らかとなった。

#### 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 13 件)

1. Keiji Yuki, Mariko Ikeda, Shosuke Yoshida, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Kaoru Yamada, Daisuke Uemura, and Kenji Miyamoto: Isolation of monovalerianester A, an inhibitor of fat accumulation, from *Valeriana fauriei*. *Natural Product Communications*, in press. (査読有)
2. Maho Morita, Haruo Ogawa, Osamu Ohno, Takao Yamori, Kiyotake Suenaga, and Chikashi Toyoshima: Biselyngbyasides, Cytotoxic Marine Macrolides, are Novel and Potent Inhibitors of the Ca<sup>2+</sup> Pumps with a Unique Mode of Binding. *FEBS Letters*, in press. (査読有) (doi:10.1016/j.febslet.2015.04.056)
3. Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Teruhiko Matsubara, Satoshi Shimada, Toshinori Sato and Kiyotake Suenaga: Mebamamides A and B, Cyclic Lipopeptides Isolated from the Green Alga *Derbesia marina*. *Journal of Natural Products*, **78** (4), 901-908 (2015). (査読有) (DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00168)
4. Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Hidetoshi Ogawa, Kim Anh Nguyen, and Kiyotake Suenaga: Jahanyne, an apoptosis-inducing lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Organic Letters*, **17** (3), 652-655 (2015). (査読有) (DOI:

10.1021/ol5036722)

5. Toshiyasu Inuzuka, Keita Yamamoto, Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga, Yoshinori Kawazoe, and Daisuke Uemura:

An inhibitor of the adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells, yoshinone A, and its analogs, isolated from the marine cyanobacterium *Leptolyngbya* sp. *Tetrahedron Letters*, **55** (49), 6711-6714 (2014). (査読有) (DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.10.032)

6. Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, and Kiyotake Suenaga: Maedamide, a novel chymotrypsin inhibitor from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *Tetrahedron Letters*, **55** (30), 4126-4128 (2014). (査読有) (DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.05.099)

7. Yurika Tanabe, Eisuke Sato, Naoya Nakajima, Akifumi Ohkubo, Osamu Ohno, and Kiyotake Suenaga: Total Synthesis of Biselyngbyolide A. *Organic Letters*, **16** (11), 2858-2861 (2014). (査読有) (DOI: 10.1021/ol500996n)

8. Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, and Kiyotake Suenaga: Kurahyne, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *RSC Advances*, **4** (25), 12840-12843 (2014). (査読有) (DOI: 10.1039/c4ra00132j)

9. Arihiro Iwasaki, Shinpei Sumimoto, Osamu Ohno, Shoichiro Suda, and Kiyotake Suenaga: Kurahamide, a Cyclic Depsipeptide Analog of Dolastatin 13 from a Marine Cyanobacterial Assemblage of *Lyngbya* sp. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **87** (5), 609-613 (2014). (査読有) (doi:10.1246/bcsj.20140008)

10. Osamu Ohno, Ayane Watanabe, Maho Morita, and Kiyotake Suenaga: Biselyngbyolide B, a Novel ER Stress-inducer Isolated from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Chemistry Letters*, **43** (3), 287-289 (2014). (査読有) (doi:10.1246/cl.130960)

11. Kenjiro Suzuki, Ryuichi Mizuno, Kiyotake Suenaga, Toshiaki Teruya, Nobuyuki Tanaka, Takeo Kosaka, and Mototsugu Oya: Bisebromoamide, an extract from *Lyngbya* species, induces apoptosis through ERK and mTOR inhibitions in renal cancer cells. *Cancer Medicine*, **2** (1), 32-39 (2013). (査読有) (doi: 10.1002/cam4.53)

12. Osamu Ohno, Maho Morita, Kazuhiro Kitamura, Toshiaki Teruya, Kozo Yoneda, Masaki Kita, Hideo Kigoshi, and Kiyotake Suenaga: Apoptosis-inducing activity of the actin-depolymerizing agent aplyronine A and its side-chain derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23** (5), 1467-1471 (2013). (査読有) (DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.12.052)

13. Maho Morita, Osamu Ohno, Toshiaki Teruya, Takao Yamori, Toshiyasu Inuzuka, and Kiyotake Suenaga: Isolation and structures of biselyngbyasides B, C, and D from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp., and the biological activities of biselyngbyasides. *Tetrahedron*, **68** (30), 5984-5990 (2012). (査読有) (doi:10.1016/j.tet.2012.05.038)

[学会発表](計42件)

1. 森田真布・小川治夫・杖田淳子・大野 修・矢守隆夫・豊島 近・末永聖武: X-線結晶構造解析が明かすピセリングピアサイド類のCa<sup>2+</sup>ポンプ阻害機構、日本化学会第95春季年会、日本大学薬学部(船橋市)、1J2-32、2015年3月26日

2. 岩崎有紘・大野 修・澄本慎平・末永聖武: 海洋微細藻類由来新規リポペプチドの構造および生物活性、日本化学会第95春季年会、日本大学薬学部(船橋市)、4J1-17、2015年3月29日

3. Kiyotake Suenaga: Biological Activities of Biselyngbyasides, Macrolides from Marine Cyanobacteria International Mini Symposium on Chemical Biology of Natural Products: Target ID and Regulation of Bioactivity、慶應義塾大学理工学部(横浜市)、2015年3月24日

4. 森田真布、大野 修、渡邊絢音、杖田淳子、小川治夫、矢守隆夫、豊島 近、末永聖武: 海洋シアノバクテリア由来のマクロリド biselyngbyaside 類の単離と生物活性、第56回天然有機化合物討論会、高知県民文化ホール(高知市)、2014年10月17日

5. 大野 修、岩崎有紘、旦 慎吾、矢守隆夫、末永聖武: 海洋シアノバクテリア由来新規小胞体ストレス誘導剤 kurahyne の単離と機能解析、第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、仙台市情報・産業プラザ(仙台市)、2014年6月26日

6. 岩崎有紘、大野 修、旦 慎吾、矢守隆夫、末永聖武: 海洋シアノバクテリア由来新規小胞体ストレス誘導剤 kurahyne の単離と機能解析、日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会、大阪大学会館(豊中市)、0-04、2014年6月11日

7. 佐藤英祐、田辺由利香、中島修弥、大久保哲史、末永聖武: Biselyngbyolide 類の合成研究、第105回有機合成シンポジウム、東京工業大学デジタル多目的ホール(東京都目黒区)、1-4、2014年6月10日

8. 岩崎有紘・大野 修・澄本慎平・須田彰一郎・末永聖武: 海洋シアノバクテリアが形成するバイオマツト由来の新規生物活性物質の単離と構造、日本化学会第94春季年会、名古屋大学東山キャンパス(名古屋市)、3H6-28、2014年3月29日

9. Kiyotake Suenaga: Biological Activity and Total Synthesis of Biselyngbyasides, Cytotoxic Macrolides Isolated from Marine Cyanobacteria The 2nd Mini-Symposium Between Keio University and National Tsing Hua University, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, 2014年3月12日.

10. 田辺由利香、佐藤英祐、中島修弥、大久保哲史、末永聖武: Biselyngbyolide 類の合成研究、第55回天然有機化合物討論会、同志社大学寒梅館(京都市) 2013年9月18日.

11. 末永聖武、森田真布、渡邊絢音、大野修、照屋俊明: 海洋産マクロリド biselyngbyaside 類の構造と生物活性、第15回マリンバイオテクノロジー学会大会、沖縄県市町村自治会館(那覇市) 2013年6月2日

12. 森田真布・大野修・照屋俊明・佐々木宏明・末永聖武: 海洋産マクロリド Biselyngbyaside 類の構造と生物活性、日本化学会第93春季年会、立命館大学びわこ・くさつキャンパス(草津市) 4C6-13、2013年3月25日

13. Maho Morita, Osamu Ohno, Hiroaki Sasaki, Kazuhiro Kitamura, Toshiaki Teruya, and Kiyotake Suenaga: Structure and Biological Activity of Biselyngbyasides, Novel Macrolides Isolated from Marine Cyanobacteria, The 1st Mini-Symposium Between Keio University and National Tsing Hua University, National Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan, 2013年2月23日.

14. 鈴木一司、秋山聡志、鳥居原英輔、深澤英悟、大野修、照屋俊明、末永聖武: アクチン脱重合活性物質 Reidispongiolide A の合成研究、第54回天然有機化合物討論会、東京農業大学世田谷キャンパス(東京都世田谷区) 2012年9月18日

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:

出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

末永聖武 (Suenaga, Kiyotake)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 60273215

##### (2) 研究分担者

照屋俊明 (Teruya, Toshiaki)  
琉球大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 90375428

##### (3) 連携研究者

大野修 (Ohno, Osamu)  
慶應義塾大学・理工学部・助教  
研究者番号: 20436992

宮本憲二 (Miyamoto, Kenji)  
慶應義塾大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 60360111

平田邦生 (Hirata, Kunio)  
理化学研究所・放射光科学総合研究センター・技師  
研究者番号: 20373524