

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670044

研究課題名(和文) エピジェネティックな化学修飾酵素阻害剤を用いた植物由来有用物質の創出

研究課題名(英文) Search for plant-origin natural products by epigenetics-modifying chemicals

研究代表者

大島 吉輝 (OSHIMA, Yoshiteru)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00111302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新たな有用二次代謝物が植物培養細胞において生産されるならば、それは天然物化合物ライブラリーの格段な充実につながる。本研究では、エピジェネティックな遺伝子発現変化を誘発するHDAC酵素阻害剤などの化学物質により、植物培養細胞での新たな二次代謝物生産を試みた。その結果、代謝阻害剤とHDAC阻害剤の両剤を併用して植物細胞培養を行うと、二次代謝物生産能が低下した古いカルスにおいても、その能力が回復することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Novel secondary metabolites produced by plant cell culture lead to expansion of diversity of the compound library consisted by natural products. This research tried to produce useful secondary metabolites of plant cell cultures using the chemicals such as HDAC inhibitors which induce epigenetic change of gene-expression in the cells. As a result, concurrent addition of metabolic inhibitor and HDAC inhibitor in cell cultures was effective to recover the ability of secondary metabolite production of the plant cells.

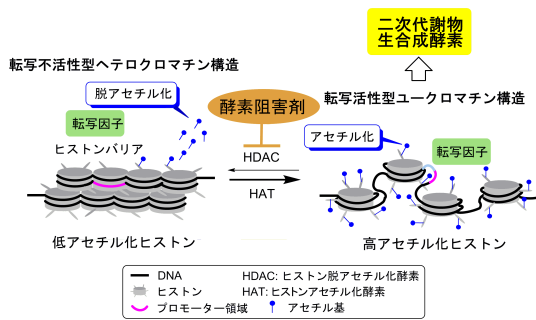
研究分野：医歯薬

キーワード：植物 二次代謝物 エピジェネティクス 酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

最近、ヒストンや DNA のアセチル化やメチル化などのエピジェネティック（後天的）な化学修飾が二次代謝物の生産に大きな影響を及ぼすことが明らかになってきた。例えば、ヒストンに数多くのアセチル基が存在すると転写活性型クロマチン構造をとり遺伝子発現が上昇し、二次代謝物が生産される（図1）。われわれは、選択性や阻害メカニズムの異なる様々なヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤やDNAメチル化酵素阻害剤について、十数種の糸状菌（カビ）を対象として、その二次代謝物の組成変化と生産量を指標に検討を行ってきた。その結果、糸状菌に共通して有効な阻害剤とその添加条件を見出し、小スケールでのスクリーニングから大量培養による二次代謝物取得までの一連の実験をルーティン化した方法を確立することができた。さらに、本法により、新規骨格をもつ化合物を含む、数多くの新規天然物の取得に成功し、酵素阻害剤を用いる新規天然物生産の有用性を示した（“糸状菌二次代謝のエピジェネティクス制御と天然物探索” 浅井禎吾, 大島吉輝, *化学と生物*, 51, 13 (2013); *ファルマシア*, 50, 112 (2014); 日経産業新聞紹介記事 (2012.10.18)）。

エピジェネティックな化学修飾に働く酵素の阻害剤を用いる方法は、真核生物に共通する遺伝子発現制御システムを利用するものである。したがって、これまで全く試みられていなかった高等植物培養細胞に対しても本法が適用可能にあると考えられる。すなわち、本法により高等植物から、多種多様な新規有用天然物が発見されることが強く期待される。

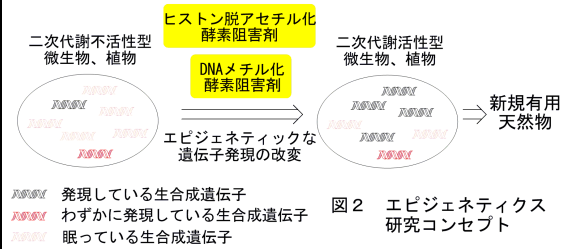


2. 研究の目的

様々なHDAC阻害剤やDNAメチル化酵素阻害剤を用いて、高等植物の培養細胞のクロマチン構造を変化させ、未利用生合成遺伝子（休眠遺伝子）を発現させ、創薬において有用な新規天然物を創出する（図2）。それにより、創薬に有用な天然物ライブラリーのケミカルスペースの拡充を図る。

3. 研究の方法

植物カルスにおける酵素阻害剤を用いた化学的手法の開発



(1) 各種阻害剤の最適条件の設定

われわれが予備実験で得た知見をもとに、エピジェネティックな化学修飾酵素阻害剤のカルスへの使用方法およびカルスの培養条件を検討し、二次代謝物の組成変化を指標に最適条件を設定する。二次代謝物の変化は逆相 HPLC と TLC によって追跡する。高等植物においては、微生物に比較して、二次代謝物生成に対する複雑な制御が行われており、生合成経路が確定していない有用な化合物も多い。阻害剤の濃度や種類だけでなく、カルスの培養条件（培養日数、振とう速度等）や増殖のフェーズに合わせた阻害剤の添加時期、あるいは、ジャスモン酸などのエリシターとの組み合わせなど、阻害剤が効果的に作用する環境を設定する。また、カルスの形態や増殖状態によっても、効果が異なる可能性があるため、本研究に適したカルスを選定する。植物種により最適条件が異なる可能性があるため、それぞれ条件を最適化する。

(2) 植物カルスにおけるテルペノイド生産の回復

植物が作り出す二次代謝物の中で、テルペノイドは創薬において最も重要なものの一つである。テルペノイドは複雑な構造故に合成的供給が難しく、生合成解析もあまり進んでおらず、肝臓の治療薬であるグリチルリチンは現在でもカンゾウより精製したものを使用している。このような有用物質をカルス等の植物培養細胞を用いて生産しようという多くの試みがされてきたが、培養細胞へと誘導するとほとんどの場合その生産がストップしてしまう。本研究ではカンゾウや薬用人参のカルスを用いて、様々な酵素阻害剤を用いた条件を検討し、テルペノイド生産を回復させる。その際、スケールアップを考慮し、液体培養について検討を進める。植物カルスでは誘導前の組織と比較して DNA メチル化レベルが高いことが知られており、それにより遺伝子発現不活性なクロマチン構造を形成し二次代謝物生産に関する一連の遺伝子発現が抑制されているのであれば、本法は有効である可能性が高い。25年度は、保有するおたね人参カルスにて、まず検討を行う。ジンセノサイド類での遺伝子発現制御の知見は、グリチルリチンへも応用可能である。

(3) 植物カルス創生による適用範囲の拡大

適用範囲の拡大のため、本学部が保有している薬用植物の中から、利用範囲の広い生薬

のカルス誘導を行う。既に医薬品成分の生成が知られている、*Glycyrrhiza* 属、*Galanthus* 属、種々の薬効を示す *Rehmannia* 属、*Scutellaria* 属などを選択する。

収穫期の植物体の根または球根部を流水で洗浄後、数 cm 以下にカットし、エタノールと次亜塩素酸ナトリウムで殺菌する。滅菌水で洗浄後、形成層を含む組織をコルクボーラーで打ち抜き、厚さ 1-2mm の組織片を作製する。オーキシンなどの植物ホルモンを含む寒天培地に、組織片を接種し、25℃、暗所で培養する。1-2 カ月後に発生したカルスを新鮮培地に移植し、その後継代培養にて、カルスを増殖させる。

4. 研究成果

(1) 各種阻害剤の最適条件の設定

おたね人参 (*Panax ginseng*) カルスに、HDAC 阻害剤 (Zn²⁺型HDAC 阻害剤: suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), suberoyl hydroxamic acid (SBHA)) 500 μM を添加して液体培養し、カルスの増殖および代謝物への影響を調べた。阻害剤添加により、増殖は抑制され、特に SAHA で増殖は停止し、カルスも褐色に変化した。代謝物プロファイルは SAHA で変化した (図3)。細胞株による反応のばらつきを調べるため、産地やカルス化期間の異なる4株を繰り返し培養し、有意な増殖抑制作用を確認した。また固形培地にて、他の薬用人参3種6株 (*P. quinquefolius*, *P. notoginseng*, *Eleutherococcus senticosus*) を含む 18 株でも同様な作用を確認した。その結果、カルスの増殖状態と代謝物変化の相関がみられる SAHA を阻害剤に選択した。また、代謝物の量を確保するため、二次代謝物を生成しやすい培養後期に添加し、同様の作用を確認した。

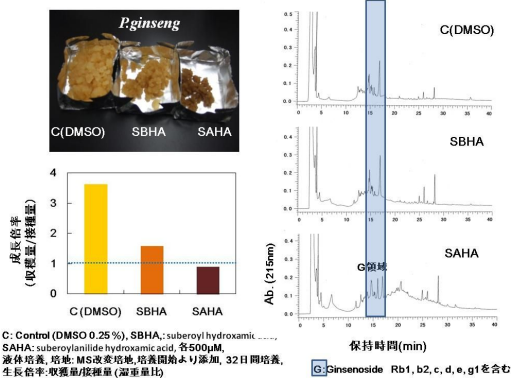


図3 HDAC阻害剤添加によるカルスの増殖状態と成分変化

(2) 植物カルスにおけるテルペノイド生産の回復

おたね人参カルス(カルス期間 15 年)のジンセノサイド(G)類生成に対する HDAC 阻害剤 SAHA の作用を調べた。比較として、二次代謝活性化に関与するジャスモン酸メチル (MJ) を用いた。増殖抑制の強さは両者同程度だが、

カルスの色に違いが見られた。また成分では、MJ が G 領域で増加傾向がみられるのに対し、SAHA は G 領域で低下、それ以外で LC のピーク数に増加傾向が見られた (図 4)。両者を添加した場合、全体的にピークが減少した。

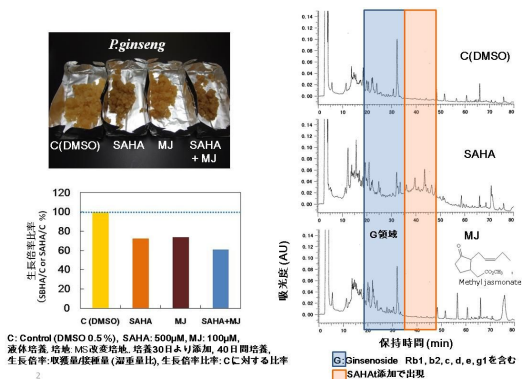


図4 ホルモン(MJ)と阻害剤(SAHA)の作用比較

次に、SAHA 及び MJ 添加 24h 後の、G 生合成系酵素の mRNA 発現量を比較した。その結果、MJ で発現量の増加が見られるのに対し、SAHA では、変化なしまたは低下した (図 5)。水酸化酵素 P450 や糖転移酵素においても、同様な結果を示し、生合成遺伝子発現レベルと G 類生成の間に相関がみられた。

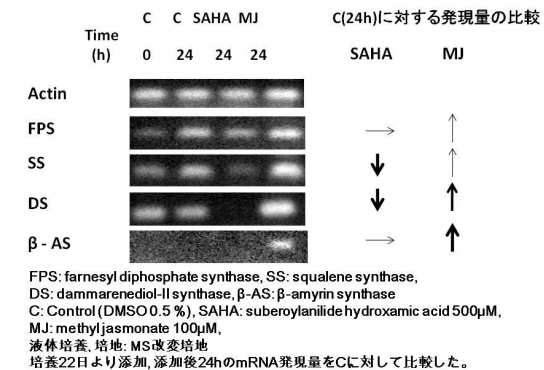
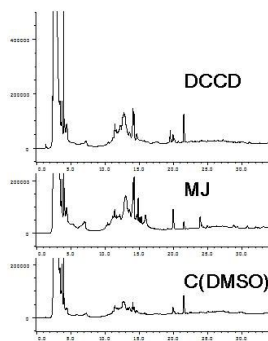


図5 G 骨格形成に関与する生合成酵素の遺伝子発現

植物は複雑な制御系を有するため、阻害剤の添加だけでは、二次代謝物生成遺伝子の発現促進が難しいことも示唆された。

そこで、植物細胞に、エピジェネティックな遺伝子発現制御を誘発する、物理的および化学的刺激を与えることで、二次代謝物の変化を調べた。また、HDAC 阻害剤との相乗作用の可能性も調べた。刺激として、細胞膜に変化を与え、シグナル伝達系を活性化するための外的刺激 (pH, 温度, 金属, 膜 ATPase 阻害, 超音波, 一酸化窒素) と、細胞内の代謝系酵素阻害 (ステロール生合成阻害) を行った。その結果、外的刺激では、膜 ATPase 阻害剤 *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) が、HPLC において、MJ と類似した代謝物プロファイルを示したが、刺激の強さは MJ に及ばなかった (図 6)。添加濃度増加により、G 類の生成はみられなくなった。



C: Control (DMSO 0.5%),
DCCD: *N,N'*-dicyclohexycarbodiimide 100μM,
MJ: methyl jasmonate 100μM,
液体培養, 培地: MS改変培地, 培養3週目に添加

図6 G類生成に対する膜ATPase阻害剤添加の影響

また、ステロール合成阻害剤ミコナゾールでは、MJで生成されるG類を含む幅広いピークの出現がみられ、膜ATPase阻害とは、異なる代謝物プロファイルを示した(図7)。現在、代謝物の同定を行っている。さらに、SAHAやMJと組み合わせることで、G類生成増加の可能性もみられた(図8)。

以上のように、外的刺激、代謝阻害、ホルモンやHDAC阻害を種々組み合わせることで、二次代謝物生産能が低下した古いカルスにおいても、その能力を回復させることが可能とわかった。

しかしながら、刺激を与える細胞の状態、生成代謝物も変化することから、さらに詳細な制御方法の検討を進めている。

(3) 植物カルス創生による適用範囲の拡大
適用拡大に備え、5種の薬用植物の根または葉を用いて、カルス化を行った(図9)。

5. 主な発表論文等
なし

〔その他〕

ホームページ等

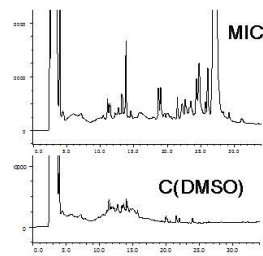
<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~shigen/lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

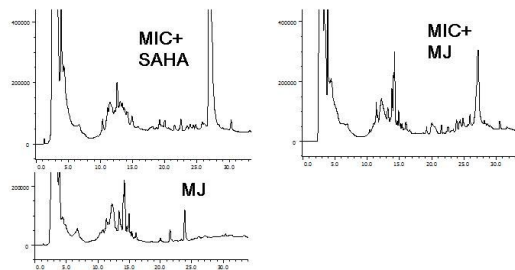
大島 吉輝 (OSHIMA Yoshiteru)
東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 00111302



C: Control (DMSO 0.5%),
MIC: miconazole nitrate 500μM,
液体培養, 培地: MS改変培地, 培養3週目に添加

図7 ステロール合成阻害剤添加の影響



MIC: miconazole nitrate 200μM,
SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid 200μM,
MJ: methyl jasmonate 40μM,
液体培養, 培地: MS改変培地, 培養3週目に添加

図8 MICとSAHAまたはMJとの組み合わせの影響



図9 誘導カルス