

生物活性天然機能性有機分子の探索

千葉大学大学院薬学研究院

石橋正己

1. はじめに

当研究室では、天然物および天然物基盤合成化合物を活用して、種々の生命現象や疾患に関連する細胞シグナルに作用するスクリーニング研究を行っている¹⁾。スクリーニングの標的としては、種々の疾患に繋がるものが指摘されており、一方で幹細胞の自己複製能や多分化能の獲得に必須とされる細胞シグナルであるウイント (Wnt)、ヘッジホッグ (Hh)、ノッチ (Notch) の他、エピジェネティック転写制御に関わるポリコーム構成分子、およびがん細胞選択的にアポトーシスを誘導するデスリガンド・トレイル (TRAIL) などを取りあげている。活性天然物の探索の他、合成化合物ライブラリー構築、細胞アッセイ、細胞応答解析、活性作用発現機構に関する解析など、一連の包括的研究 (ケミカルバイオロジー) の展開を目指している。天然物の探索を行うには研究材料の調査・収集を行うことが必要であり、国内各地で収集した変形菌²⁾、千葉県を中心とした国内の土壌や海水・海泥から採取した放線菌³⁾、タイやバングラデシュ産の薬用植物⁴⁾など種々の天然資源を用いている。ここではこれらの細胞シグナルに作用する天然物のスクリーニングを中心に最近の研究の概要を紹介する。

2. TRAIL 耐性克服作用をもつ変形菌成分 fuligocandin B

TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) は、デスリガンドと呼ばれるサイトカインの一種であり、デスレセプター経路を介して、がん選択的にアポトーシス (細胞死) を誘導する。このため、TRAIL/デスレセプター経路 (図1) は新

たながん治療薬創製のための有望な標的として注目されている。このがん選択的なアポトーシス誘導効果は、多くのがん細胞ではデスレセプターを発現しているのに対して、正常細胞では TRAIL 誘導性アポトーシスに対して抑制的に作用する (おとり) のレセプター

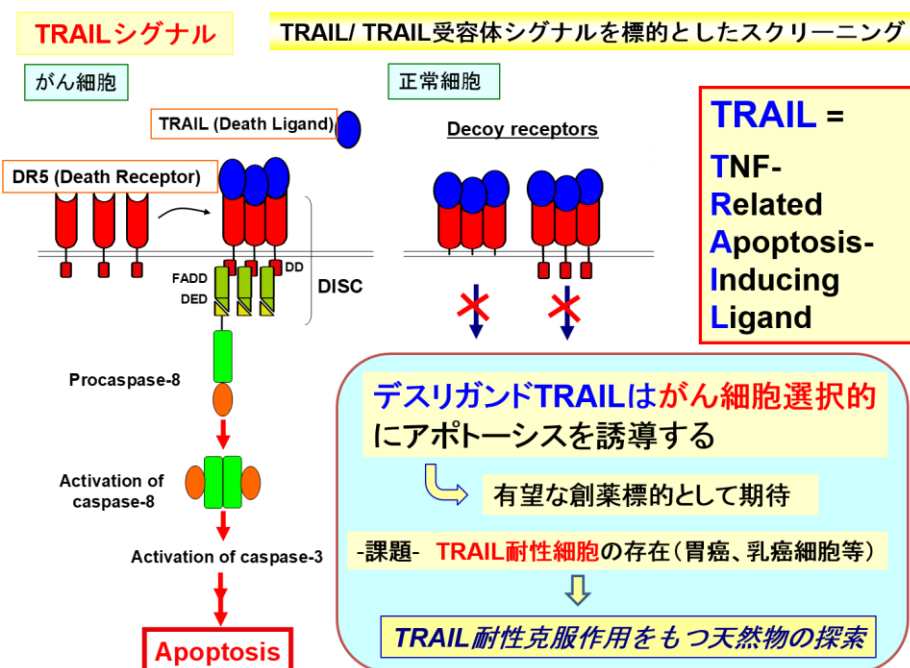


図1. TRAIL/デスレセプター経路

ー (デコイレセプター) が多く発現していることに基づくと考えられている。しかしながら、その一方で、最近、肺がん、大腸がん、胃がんなどの一部は TRAIL への耐性を有していることが明らかとなり、TRAIL の有効性の低下が問題となっている。そこで本研究では、TRAIL 耐性がん細胞株を用いて、TRAIL 感受性を増強させ、その耐性を克服する天然物の探索を行った⁵⁾。TRAIL 耐性克服作用は、TRAIL 耐性胃がん細胞 (AGS 細胞) を用いて、TRAIL と各試料の単独ならびに併用処理を行い、各処理群における細胞生存率を比較し、併用時に顕著な細胞生存率の低下が認められる試料を陽性と判定した。本試験法により当研究室保有の天然物コレクションの中から、変形菌シロススホコリより単離したシクロアントラニルプロリン型天然物 fuligocandin B⁶⁾ が顕著な活性を示すことが判明した。

変形菌は系統分類学的には最も下等な真核生物の一つとして位置づけられ、その生活環 (図 2) のなかで、胞子、アメーバ体、変形体、子実体など様々な形態をとるユニークな生物である。日本では南方熊楠が研究対象としたことで知られている。変形菌を対象とした天然物の探索に関しては 1980 ~ 90 年代に Steglich, 浅川らによる報告があったがその後あまり進展していなかった。当研究室ではこの変形菌を対象とする天然物の探索を行った。

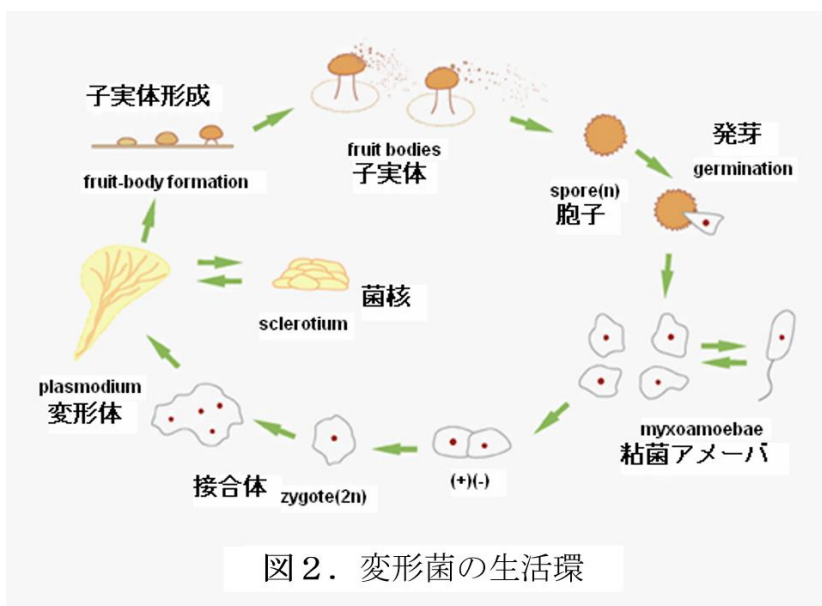
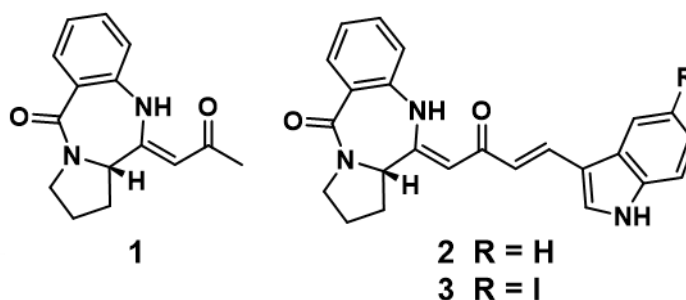


図 2. 変形菌の生活環

2004 年に変形菌シロススホコリ (*Fuligo candida*) 野外子実体 (図 3) より単離した fuligocandin A (1) と B (2) は、アントラニル酸とプロリンが縮合した母骨格を有し、2 はさらに交差共役型不飽和ケトンを通じてインドール骨格が結合した構造をもつ。2010 年に当研究室において 2 の全合成を行い、未決定であった不斉炭素の立体化学を S 配置と決定した⁷⁾。一方、fuligocandin B (2) は TRAIL に耐性を有するがん細胞に対し、TRAIL に対して感受性を上げアポトーシスへ導く作用を示した⁸⁾。さらに、化合物 2 に関する構造活性相関研究を通じて調製した 5'-iodofuligocandin B (3) は一連の誘導体の中で最も強力な活性を示すことを見出した。化合物 3 と TRAIL



図 3. *Fuligo candida* (シロススホコリ) の野外採取子実体



を併用すると 10 μ M において TRAIL 耐性胃がん細胞 (AGS 細胞) の生存率を 44% 低下させた. 次に化合物 **3** の標的タンパク質を決定するため **3** のフォトアフィニティビオチンプローブを合成しプルダウン実験を行った. その結果, 化合物 **3** の標的タンパク質が AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities) ATPase の一つである Valosin-containing protein (VCP/p97) であることが判明した. VCP はタンパク質の恒常性維持などにおいて様々な重要な役割を果たすことが知られているが, とくにユビキチン化されたタンパク質をプロテアソームに運び分解を促進するというはたらきをもつ. AGS 細胞を 5'-iodofuligocandin B (**3**) で処理すると, ユビキチン化されたタンパク質が蓄積したことから, **3** は VCP に結合してその作用を阻害することが示唆された. AGS 細胞に化合物 **3** を処理したところ小胞体ストレスマーカーである転写因子 CHOP とデスレセプター DR5 の発現が濃度依存的に上昇した. 化合物 **3** は VCP を阻害して小胞体ストレスを導き, CHOP の発現を上昇させて DR5 を増加させることによって TRAIL に対する感受性を上げる, すなわち, TRAIL 耐性克服作用を示すことが示唆された. VCP をノックダウンすると AGS 細胞の TRAIL 感受性が上昇した. このことから VCP はがん細胞における TRAIL 感受性と関連することが明らかになった⁹⁾.

3. 変形菌の成分と培養変形体の色

変形菌からの天然物探索を行うために変形菌の培養を試みた. すなわち, 野外採取した変形菌の子実体に含まれる胞子を寒天平板培地上で発芽させる実験を行った. 全国各地で採取した 222 株の変形菌について発芽実験を行った結果, 80 株 (37%) で発芽, 45 株 (21%) で変形体の形成, 9 株 (4%) で実験室での子実体の形成に成功した. 図 4 にはゴマシオカタホコリの野外子実体, 培養変形体, 培養子実体の写真を示した.

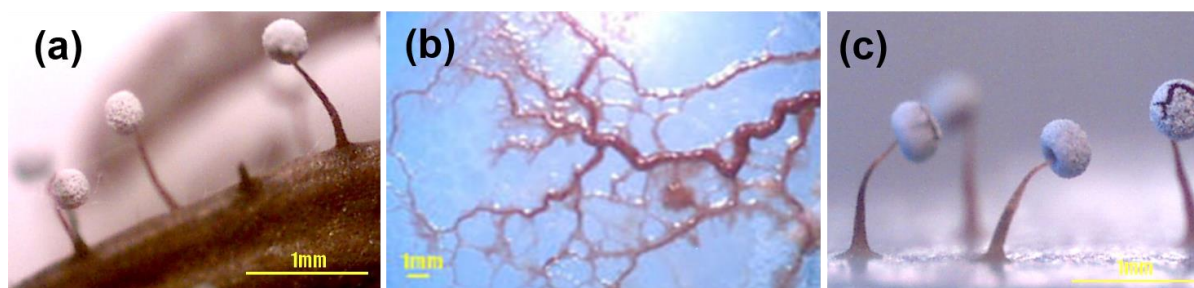


図 4. 変形菌ゴマシオカタホコリ (*Didymium iridis*)
(a) 野外子実体, (b) 培養変形体, (c) 培養子実体

このゴマシオカタホコリの培養変形体からは, 以前に海綿成分として知られていた makaluvamine I というピロールイミノキノン型構造をもつ色素成分を単離した. この他にも, 変形菌の培養変形体から新規ペプチドラクトン melleumin A, ポリエン型黄色色素 physaridin A 等を単離した. 一方, 種々の野外採取した変形菌子実体からもビスインドール化合物, トリテルペンアルデヒドラクトン, ナフトキノン型色素を始めとして一連の新規生物活性天然物を単離した (図 5).

変形菌の培養実験を行っているとき, 次のような現象が観察された. クネリカタホコリ (*Didymium flexosum*) という変形菌の培養変形体の色は通常は白色だが, シャーレ内にカビが混在していると紫色となった. しかし植え継ぎを繰り返してカビをシャーレから除去すると, 次第に変形体の色は元の白色へと戻った (図 6)²⁾. こ

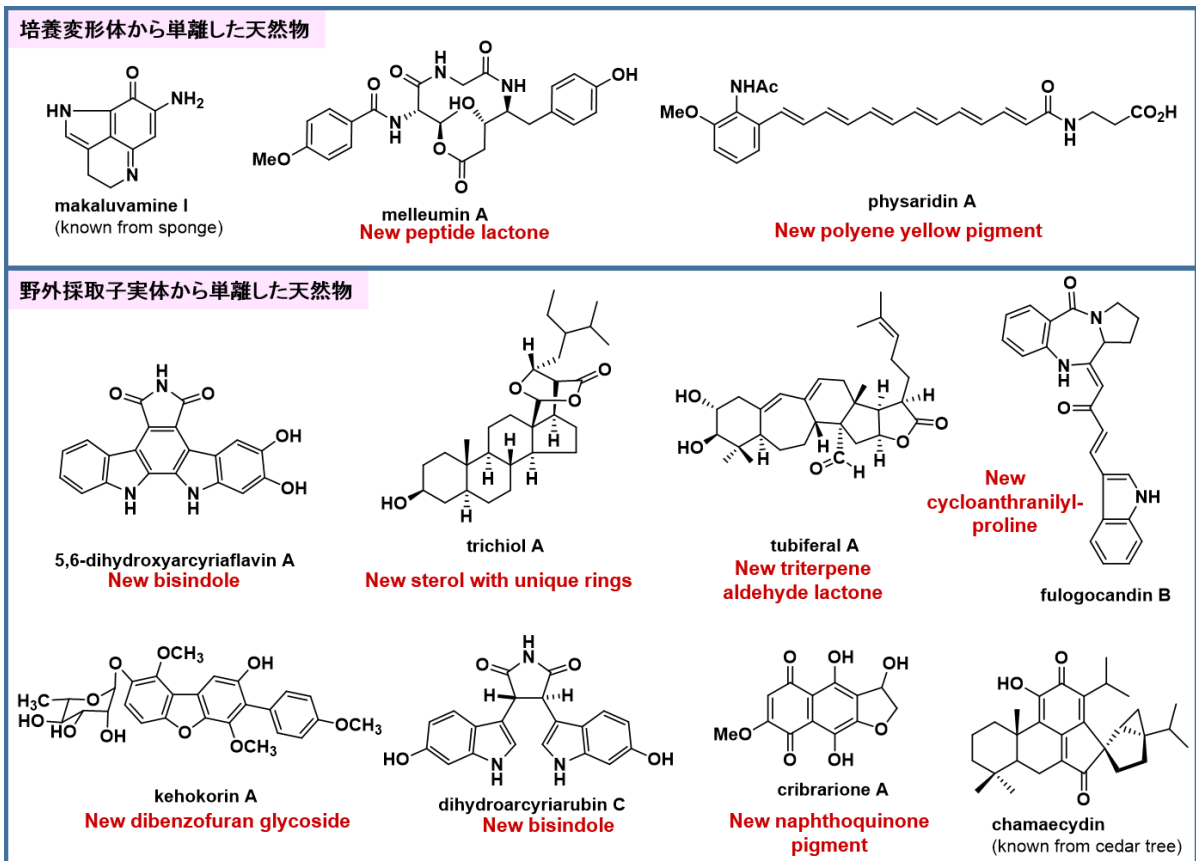


図 5. 変形菌由来の天然物

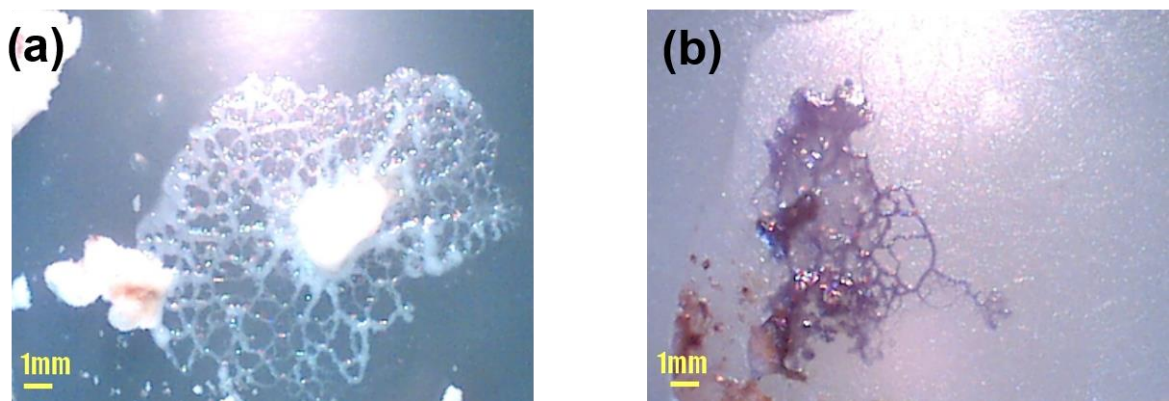


図 6. 変形菌クネリカタホコリ (*Didymium flexosum*)
(a) 培養変形体 (白), (b) 培養変形体 (紫)

の現象から、本変形菌の変形体はカビから身を守るため、あるいはカビを退治するために、紫色の色素物質 (=天然物) を生産していることが予想される。さらに本菌の場合、実験担当者の観察によると、紫色のときの方が白色のときより変形体の成長が速いという印象があったとのことだった。カビに負けないためには速く成長する必要があり、理に適っている。このクネリカタホコリの紫色物質を解明するには、カビを多すぎず少なすぎず、程よく混在させて培養することが必要となる。残念ながらまだその解明には至っていないが、本現象は、変形菌が環境からの刺激によって、通常では産生しない天然物を産生する可能性があることを示唆している。

4. 動物細胞との共培養による放線菌 *Nocardia* 属からの天然物探索

環境からの刺激によって通常では産生されない天然物が産生されることを期待して、放線菌 *Nocardia* 属を対象として次のような研究を行った。

放線菌は *Streptomyces* 属を始めとして、多様な構造と生物活性をもつ二次代謝産物を産生することが知られており、抗菌作用や抗がん作用をもつ抗生物質の多くは放線菌由来である。しかし放線菌のもつ生合成遺伝子の大部分は通常活性化されず二次代謝産物を産生せずに眠っていると言われる。

放線菌の一種である *Nocardia* 属はグラム陽性細菌であり、その多くが病原性を持ち、ヒトでは肺や皮膚、脳などに日和見感染を引き起こす。本属は感染により生体細胞と相互作用を持つと考えられる。これまでも放線菌の通常眠っている生合成遺伝子を活性化するための様々な方法が研究されてきた。当研究室では、病原性 *Nocardia* 属放線菌を対象として、動物細胞との共培養という新しい方法で二次代謝産物を産生させることを試みた。

Nocardia 属は人体に感染した際、マクロファージによる補食を受ける。そこで共培養に用いる動物細胞は、初期の感染状態を模倣する目的でマウスマクロファージ様細胞 (J774.1) 株を使用することとした。千葉大学真菌医学研究センターが保有する *Nocardia* 属放線菌の中から、生合成遺伝子解析および小スケール予備実験によって選別された *Nocardia tenerifensis* IFM 10554^T 株 (仮称 NT3) について、設定した条件 (菌数: 動物細胞数=10:1, mCD 培地, 175 cm² 細胞培養フラスコ, 28 °C, 14 日間) で静置培養し、培養液を得た。HPLC 分析の結果、本菌の共培養時には、本菌のみあるいは動物細胞 J774.1 のみの単培養では産生されないピークが複数存在することが明らかとなった (図7)。

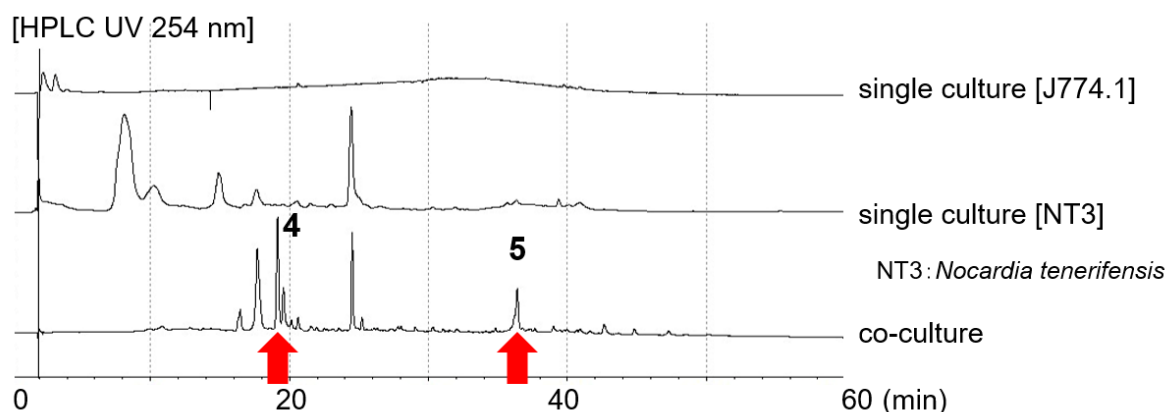
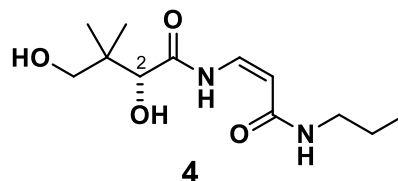


図7. *Nocardia tenerifensis* IFM 10554^T 株の培養エキスの HPLC 分析

そこで、本菌の共培養液 7.3 L を、溶媒分配および各種クロマトグラフィーによって精製し、共培養特有のピークに相当する2種の化合物 **4** および **5** を単離した。

化合物 **4** は、高分解能 ESIMS により分子式 C₁₂H₂₂N₂O₄ ともつと推定し、¹H, ¹³C および各種 2D NMR スペクトルの結果、2つのアミド結合および Z 型の二重結合をもち、α, β-不飽和アミドを有する新規パントテン酸誘導体であることが明らかとなった。また、化合物 **4** を D-パントテン酸カルシウムから 7 工程で全合成し、天然物と比旋光度および CD スペクトルを比較することにより、**4**



の2位の絶対立体配置をR配置と決定した¹¹⁾。一方、化合物**5**については、LC-MSより分子量1115であることが分かり、¹H、¹³Cおよび各種2D NMRにより9個のアミノ酸から構成される新規ペプチド化合物と推定し、現在、詳細な構造解析を行っている。

謝辞 本研究は日本学術振興会科研費（17H03992, 26305001）および千葉大学戦略的重点強化プログラム「ファイトケミカル植物分子科学」の支援により行った。

参考文献

1. (a) 石橋正己, 荒井緑, "細胞シグナルに作用する生物活性植物成分のスクリーニング研究", 日本ポリフェノール学会雑誌 **2018**, 7, in press. (b) 石橋正己, "がんの進展に関わる細胞シグナルを標的とした天然物の探索", FFI ジャーナル **2016**, 221, 94-99. (c) Fuentes, R. G.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. "Natural compounds with Wnt signal modulating activity" *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 1622-1628.
2. (a) Ishibashi, M.; Arai, M. A. "Bioactive natural products from myxomycetes having effects on signaling pathways" *Heterocycles* **2012**, 85, 1299-1332. (b) 石橋正己, "新しい創薬資源としての変形菌に関する研究", 薬学雑誌 **2007**, 127, 1369-1381.
3. (a) Abdelfattah, M. S.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. "Bioactive secondary metabolites with unique aromatic and heterocyclic structures obtained from terrestrial actinomycetes species" *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 668-675. (b) Ishibashi, M. "Bioactive heterocyclic natural products from actinomycetes having effects on cancer-related signaling pathways" *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Kobayashi, J. (Eds.); Springer; Wien, **2014**, 99, 147-198.
4. (a) 石橋正己, "がん関連シグナル経路を標的とした植物由来天然物の探索", 化学と生物 **2014**, 52, 541-548. (b) Ahmed, F.; Sadhu, S. K.; Ishibashi, M. "Search for bioactive natural products from medicinal plants of Bangladesh" *J. Nat. Med.* **2010**, 64, 393-401
5. (a) Ahmed, F.; Ishibashi, M. "Bio-active natural products with TRAIL-resistance overcoming activity" *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 119-127. (b) Ishibashi, M.; Ohtsuki, T. "Studies on search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling leading to tumor cell apoptosis" *Med. Res. Rev.* **2008**, 28, 688-714.
6. Nakatani, S.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. "Cycloanthranilylproline-derived constituents from a myxomycete *Fuligo candida*" *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52, 368-370.
7. Arai, M. A.; Seto, J.; Ahmed, F.; Uchiyama, K.; Ishibashi, M. "Practical total synthesis of fuligocandins A and B" *Synlett* **2010**, 2498-2502.
8. Hasegawa, H.; Yamada, Y.; Komiyama, K.; Hayashi, M.; Ishibashi, M.; Sunazuka, T.; Izuhara, T.; Sugahara, K.; Tsuruda, K.; Masuda, M.; Takasu, N.; Tsukasaki, K.; Tomonaga, M.; Kamihira, S. "A novel natural compound, a cycloanthranilylproline-derivative (Fuligocandin B), sensitizes leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis through 15d-PGJ₂ production" *Blood* **2007**, 110, 1664-1674.
9. Arai, M. A.; Taguchi, S.; Komatsuzaki, K.; Uchiyama, K.; Masuda, A.; Sampei, M.; Satoh, M.; Kado, S.; Ishibashi, M. "VCP is a target of 5'-I Fuligocandin B and enhances TRAIL-resistance in cancer cells" *ChemistryOpen* **2016**, 5, 574-579.
10. Hara, Y.; Arai, M. A.; Sakai, K.; Ishikawa, N.; Gonoi, T.; Yaguchi, T.; Ishibashi, M. "Dehydropropylpantothenamide isolated by a co-culture of *Nocardia tenerifensis* IFM 10554^T in the presence of animal cells" *J. Nat. Med.* **2018**, 72, 280-289.