

18. 新規小胞体ストレス誘導マクロリドの機能と応用

大野 修

Key words : biselyngbyaside, biselyngbyolide, kurahyne, jahanyne, 小胞体ストレス

*慶應義塾大学 理工学部 化学科
天然物化学研究室

緒 言

海洋生物由来の生物活性物質には特異な構造に基づく有用な機能を持つものが多い。例えば、ホヤより単離された ecteinascidin 743 は卵巣がんの治療薬として、クロイソカイメンより単離された halichondrin B を基に開発された eribulin mesylate は乳がんの治療薬としてそれぞれ有効活用されている。このように海洋生物は医薬品としての応用が期待される化合物を供給する。一方、それらには機能が未知である化合物も多く、その解析は応用面における重要な課題となる。著者の所属するグループでは海洋生物資源等から有用性が期待される新規化合物の獲得に取り組み、応用に繋がる研究を進めてきた。最近、著者らは鹿児島県および沖縄県で採集した海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. から、新規マクロリド化合物 biselyngbyolide A, B と biselyngbyaside B, C, D を単離し、構造を決定した¹⁻³⁾。これらは当研究室で単離された biselyngbyaside⁴⁾ の類縁化合物として初めて発見された。続いて、biselyngbyaside 類が小胞体ストレス誘導剤としての特性を有することを見出した。本研究では、沖縄県他で採集した海洋シアノバクテリアより新たな biselyngbyaside 類縁体を探索し、より強力な小胞体ストレス誘導活性を有する類縁体の獲得を目指すとともに、それらの活性を比較することで活性発現に重要な構造の解明を試みた。また、同様に海洋シアノバクテリアより biselyngbyaside 類以外の小胞体ストレス誘導剤の探索も目指した。

方法、結果および考察

1. 新規 biselyngbyaside 類縁体の単離と機能解析⁵⁾

沖縄県石垣島で採集したシアノバクテリア *Lyngbya* sp. をメタノールで抽出し、HeLa 細胞に対する増殖阻害活性を指標に新規化合物 biselyngbyolide C と biselyngbyaside E, F を単離した(図 1)。3種の化合物は MS スペクトルおよび各種 NMR スペクトル解析により平面構造を解明し、それらが biselyngbyaside の新規類縁体であることを明らかにした。各類縁体の相対立体配置は NOESY スペクトルと結合定数の解析およびこれまでに単離した化合物のデータとの比較により決定した。絶対立体配置については、biselyngbyaside との CD スペクトルの比較により決定した。

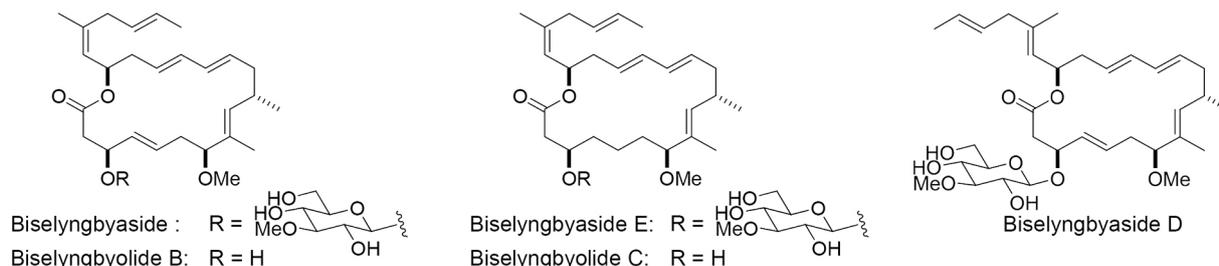


図 1. biselyngbyaside 類の構造.

*現所属：工学院大学 先進工学部 生命化学科 医薬化学研究室

次に、単離した biselyngbyaside 類の生物活性の評価を試みた。HeLa 細胞、HL60 細胞に対する増殖阻害活性を MTT 法を用いて測定したところ、いずれの化合物も阻害活性を示したが活性の強弱から以下の傾向が明らかとなった。分子内に糖を有さない類縁体は、それぞれ対応する配糖体に比べて 2～6 倍強力な活性を示した。一方、側鎖部の 3 置換オレフィンの幾何配置が *E* 体である biselyngbyaside F は *Z* 体の biselyngbyaside に比べて約 10 倍活性が低下することが判明した。また、マクロラクトン部 C4-C5 位の構造の違いは活性に大きな影響を与えないことが明らかとなった (表 1)。以上の結果から、biselyngbyaside 類の活性発現に重要な構造についての情報を得ることができた。

表 1. biselyngbyaside 類による HeLa 細胞および HL60 細胞に対する増殖阻害活性

化合物	IC ₅₀ 値 (μM)	
	HeLa	HL60
Biselyngbyaside	0.30	0.057
Biselyngbyolide B	0.049	0.030
Biselyngbyolide C	0.046	0.024
Biselyngbyaside E	0.19	0.071
Biselyngbyaside F	3.1	0.66

続いて、単離した類縁体の中で最も強力な細胞増殖阻害活性を示した biselyngbyolide C について生物活性発現機構の解析を試みた。まず、トリパンプルー細胞外排出試験により本化合物がカスパーゼ依存的な細胞死を引き起こしていることが分かった。また、DNA ラダー解析を行ったところ biselyngbyolide C は HeLa 細胞に対し濃度依存的にアポトーシスに特徴的な DNA の断片化を引き起こすことが確認された。さらに、RT-PCR を用いた解析により biselyngbyolide C はアポトーシスを誘導した濃度において小胞体ストレスマーカーである BiP および CHOP の mRNA の発現を誘導することが明らかになった (図 2)。これらの結果より、biselyngbyolide C の小胞体ストレス誘導剤としての活性を見出した。

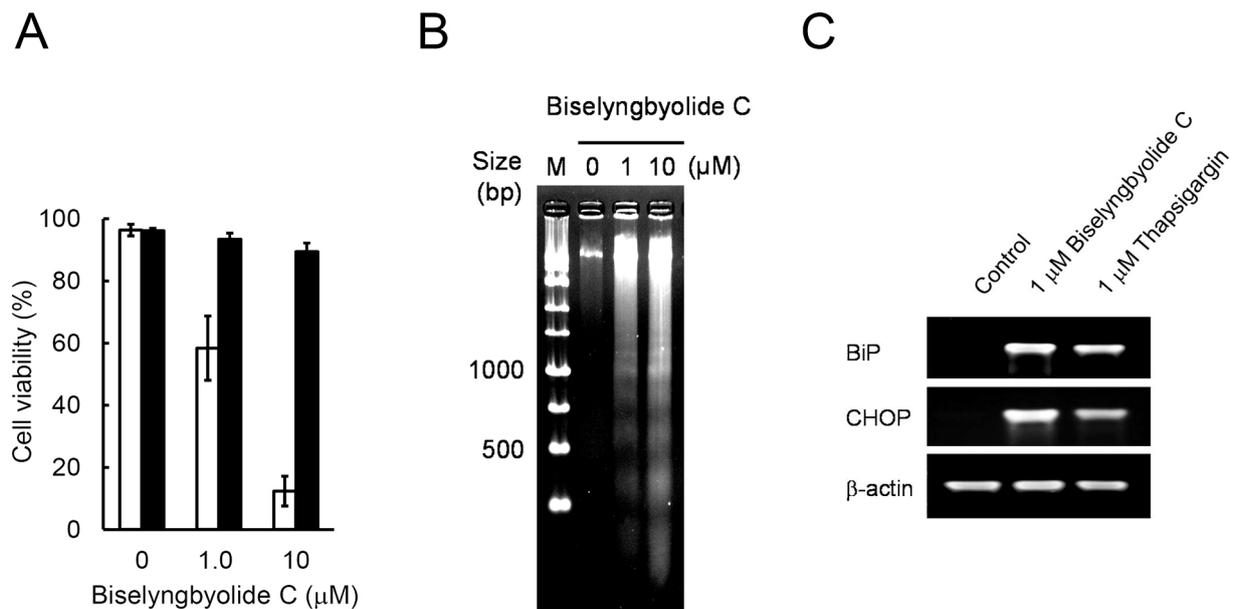


図2. biselyngbyolide C のアポトーシス誘導活性と小胞体ストレス誘導活性。

A) HeLa 細胞に対する biselyngbyolide C によるカスパーゼ依存的な細胞死誘導活性. 50 μM Z-VAD-FMK の非存在下 (白棒) もしくは存在下 (黒棒) において HeLa 細胞に biselyngbyolide C を 48 時間処理した後, 細胞生存率をトリパンプルー細胞外排出試験により測定した (n = 4). B) HeLa 細胞に対する biselyngbyolide C によるアポトーシスに特徴的な DNA 断片化の誘導. HeLa 細胞に biselyngbyolide C を 48 時間処理した後, ゲノム DNA を抽出しアガロースゲルにて電気泳動し, 断片化 DNA を検出した (M: 1 kbp DNA ラダーマーカー). C) HeLa 細胞における biselyngbyolide C による小胞体ストレスマーカーの発現の誘導. HeLa 細胞に 1 μM biselyngbyolide C もしくは 1 μM thapsigargin を 6 時間処理した後, 細胞内における BiP, CHOP, β-actin の mRNA の発現量を RT-PCR 法により検出した.

2. 海洋シアノバクテリア由来 kurahyne による小胞体ストレス誘導活性

著者の所属するグループで海洋シアノバクテリア *Lyngbya* sp. が形成するバイオマットより単離された新規ペプチド化合物 kurahyne (図 3)⁶⁾ について生物活性の詳細な解析を試みた. kurahyne は HeLa 細胞に対してアポトーシス誘導活性を示すが, 同濃度域において小胞体貯蔵 Ca²⁺の流出を引き起こすことを見出した. また, 小胞体ストレスマーカー BiP および CHOP の mRNA の発現を誘導することが確認された. さらに, kurahyne の分子内に蛍光基を導入したプローブを合成し, 本プローブの細胞内局在部位を蛍光顕微鏡により解析したところ小胞体への局在を示す結果を得た. 同様に kurahyne の分子内にビオチニル基を導入したプローブを合成し, 本プローブを用いて HeLa 細胞中の結合タンパク質をアフィニティー精製し, 電気泳動による解析を試みた. 解析の結果, 小胞体膜上カルシウム ATPase である SERCA が kurahyne の標的分子であることを強く示す結果が得られた. 続いて, ウサギ背筋より単離した筋小胞体膜上 SERCA の ATPase 活性に対する kurahyne の阻害活性を評価したところ, 濃度依存的な阻害活性を示すことを明らかにした. これらの結果より, kurahyne の小胞体ストレス誘導剤としての活性を見出した.

一方, 海洋シアノバクテリア由来の新規化合物の探索により, 沖縄県備瀬崎で採集したシアノバクテリア *Lyngbya* sp. から kurahyne と共通する特徴的な部分構造である末端アルキンを含む脂肪酸部を有する新規鎖状ペプチド化合物 jahanyne を単離し, 構造を決定した (図 3)⁷⁾. jahanyne についても kurahyne と同様に HeLa 細胞に対するアポトーシス誘導活性を示すことを見出した.

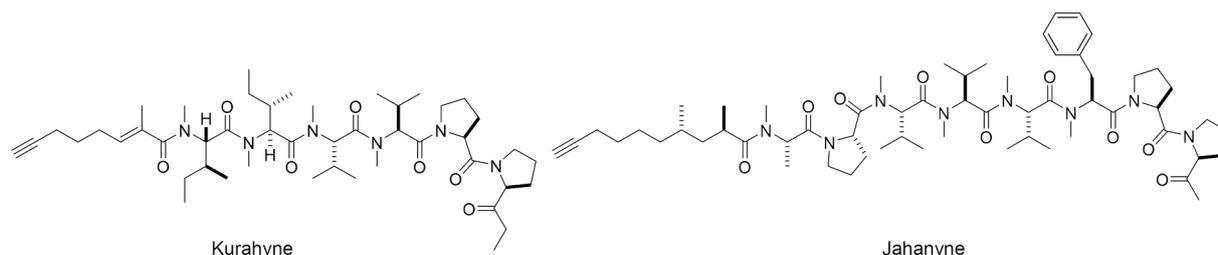


図3. kurahyne および jahanyne の構造.

以上のように、本研究を通じて海洋シアノバクテリアより単離した biselyngbyaside 類, kurahyne について新たな小胞体ストレス誘導剤としての特性を明らかにした。

共同研究者

本研究の共同研究者は、慶應義塾大学理工学部化学科の末永聖武教授および岩崎有紘助教、森田真布氏、渡邊絢音氏である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Morita, M., Ohno, O. & Suenaga, K. : Biselyngbyolide A, a novel cytotoxic macrolide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Chem. Lett.*, **41** : 165-167, 2012.
- 2) Morita, M., Ohno, O., Teruya, T., Yamori, T., Inuzuka, T. & Suenaga, K. : Isolation and structures of biselyngbyasides B, C, and D from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp., and the biological activities of biselyngbyasides. *Tetrahedron*, **68** : 5984-5990, 2012.
- 3) Ohno, O., Watanabe, A., Morita, M. & Suenaga, K. : Biselyngbyolide B, a novel ER stress-inducer isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Chem. Lett.*, **43** : 287-289, 2014.
- 4) Teruya, T., Sasaki, H., Kitamura, K., Nakayama, T. & Suenaga, K. : Biselyngbyaside, a macrolide glycoside from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Org. Lett.*, **11** : 2421-2424, 2009.
- 5) Watanabe, A., Ohno, O., Morita, M., Inuzuka, T. & Suenaga, K. : Structures and biological activities of novel biselyngbyaside analogs isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **88** : 1256-1264, 2015.
- 6) Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Suda, S. & Suenaga, K. : Kurahyne, an acetylene-containing lipopeptide from a marine cyanobacterial assemblage of *Lyngbya* sp. *RSC Adv.*, **4** : 12840-12843, 2014.
- 7) Iwasaki, A., Ohno, O., Sumimoto, S., Ogawa, H., Nguyen, K. A. & Suenaga, K. : Jahanyne, an apoptosis-inducing lipopeptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Org. Lett.*, **17** : 652-655, 2015.