

ポストゲノム型標的蛋白質の機能解明を目指した低分子リガンドの探索

●石橋正己 ◆佐藤昌昭

千葉大学大学院薬学研究院

＜研究の目的と進め方＞

ポストゲノム時代の創薬研究においても、標的タンパク質に結合する低分子リード化合物の探索は重要である。本研究では、標的分子に結合する「低分子化合物の探索および最適化」に重点をおく。さらにその低分子リード化合物の探索をとくに「天然物」を素材としてスクリーニングを行い、従来にはない未知基本骨格構造をもつリガンド分子を創出することを目的とする。

＜研究開始時の研究計画＞

1) 天然物探索材料の入手：低分子リガンド探索のための研究材料として、海洋微細藻類、カビ・キノコ・粘菌などの菌類、ならびに熱帯薬用植物等、広範な生物種を対象として、系統的な調査採取を行い、抽出エキスを調製する。

2) 生物活性スクリーニング：得られた天然資源抽出物エキスをライブラリーに対して、1)で選定した数種の標的分子に対する作用に関するスクリーニングを行い、良好な活性を示した生物材料種を選別する。スクリーニング標的としては、①細胞周期進行に関わる作用、②細胞外マトリックス分解酵素阻害作用、③癌治療薬開発につながることを期待されていながらも未知の部分の多いシグナル伝達経路、④エビジェネティックな遺伝子発現制御に関わるクロマチン構造修飾等を選別して行う。

3) 生物活性物質の分離・精製：2)で選別された生物素材抽出物について各種分離用担体を用いたカラムクロマトグラフィーを行い、活性成分を単離する。

4) 活性物質の化学構造の決定：3)で分離された活性物質に対して、各種スペクトル的手法ならびに分解反応と光学活性化合物の合成などの化学的手法を組合せて、化学構造を解明する。

5) 化学誘導による有用物質の調製ならびに標的分子解析：4)で構造決定した天然物をモデルとして、構造活性相関の検討を行い、天然物よりさらに有効な活性を示す化合物を調製する。

＜研究期間の成果＞

1) 天然物ライブラリーの構築のために、変形菌(真性粘菌)、タイ産の熱帯薬用植物、紅藻、褐藻、緑藻を中心とした海藻、房総産後鰓類、及び関東地方産放線菌の採取、予備培養を行い、約300種のコレクションを作製した(リスト1-3)。

2) 上記ライブラリーに対するスクリーニングを行い、下記のような成果を得た。

① 細胞周期阻害作用物質：キク科 *Blumea glomerata* より細胞周期阻害成分としてジテルペンを単離した(リスト4)。またリュウゼツラン科 *Agave fourcroydes* およびヤシ科 *Calamus insignis* から細胞周期阻害作用をもつ数種の新規ステロイドサポニン単離した(リスト5)。

② 細胞外マトリックス分解酵素阻害物質：ヒルガオ科 *Ipomoea pes-caprae* より、コラゲナーゼ抑制成分と

して、数種のキナ酸エステル誘導体を単離し、エステル基の数と種類による構造活性相関に関する知見を得た(リスト6)。

③ シグナル伝達分子を標的としたスクリーニング：APC/ β -カテニンシグナル伝達系を標的としたスクリーニング系のために、大腸癌細胞株SW480にルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した安定発現細胞の樹立を行った。本細胞系を用いた当研究室保有の天然物ライブラリーに対するスクリーニングが可能となった。

④ ヒストンデアセチラーゼ阻害物質：エビジェネティックな遺伝子発現制御に関わる標的として、ヒストンデアセチラーゼ阻害作用に関するスクリーニングを行った。131種の植物に対してスクリーニングを行った結果、有効な活性を示す植物種として4種の植物を選別した。その中の一種であるマメ科植物 *Xylia kerrii* に関して活性成分の精製を行った。その結果、酢酸エチル可溶部の活性画分より *myricetin rhamnoside* を単離した。

＜国内外での成果の位置づけ＞

当研究室独自の天然物ライブラリーに関して、財団法人研究所・製薬会社等から、スクリーニング対象として取り上げられ、共同研究を開始した。コラゲナーゼ抑制成分に関しては、食品会社、香粧品会社からの問合せを受けた。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

APC/ β -カテニンシグナル伝達系を標的としたレポータープラスミドを導入した安定発現細胞の樹立が予想以上に困難であった。プラスミド導入する細胞株の選択に時間を費やした。

＜今後の課題＞

APC/ β -カテニンシグナル伝達系を標的としたルシフェラーゼレポーターアッセイ系を用いたスクリーニングを、当研究室独自のライブラリーに対して、積極的に進めていきたい。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

- 1) 石橋正己, 変形菌の生物活性天然物, バイオサイエンスとインダストリー, 63, 467-470 (2005).
- 2) 「ツビフェラルAおよびツビフェラルB」特願2004-244657, 発明者：石橋正己・鎌田和明, 出願人：千葉大学, 特許公開2005-314276.
- 3) 「メレウミンAおよびメレウミンB」特願2004-133212, 発明者：石橋正己, 出願人：千葉大学, 特許公開2005-306838.
- 4) Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Yamaguchi, N., and Ishibashi, M., Isolation of Austroinulin Possessing Cell Cycle Inhibition Activity from *Blumea glomerata* and Revision of Its Absolute Configuration,

Planta Medica, 70, 1170-1173 (2004).

- 5) Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Kawahara, N., Goda, Y., Yamaguchi, N., and Ishibashi, M., New Chlorogenin Hexasaccharide Isolated from *Agave fourcroydes* with Cytotoxic and Cell Cycle Inhibitory Activities, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 3841-3845 (2004).
- 6) Teramachi, F.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M., Collagenase inhibitory quinic acid esters from *Ipomoea pes-caprae*, *J. Nat. Prod.* 68, 794-796 (2005).