慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	小胞体ストレス誘導剤クラハインの活性発現メカニズムの解明
Sub Title	Elucidation of the mode of action of kurahyne, an ER-stress inducer
Author	岩崎, 有紘(Iwasaki, Arihiro)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	海洋天然物クラハインは, 破骨細胞分化阻害活性と小胞体膜上のカルシウムイオンポンプ(SERCA)阻害活性を有する鎖状リポペプチドである。本化合物の示す生物活性の作用機序解明を目的として研究を行った。 結果として, 以下のことが明らかとなった。①クラハインによる破骨細胞分化阻害活性に, プロヒビチン-1および-2が関与している可能性が示唆された。②クラハインのSERCA結合部位として, 全アミノ酸配列(およそ1000残基)中, 特定の14残基のいずれかが関与する可能性が示唆された。③クラハイン類似海洋天然物2種を発見し, それらの構造を解明し, 全合成を達成した。また, 構造活性相関に関する知見を得た。 Kurahyne is a marine natural product that exhibits osteoclast differentiation-inhibitory activity and sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA)-inhibitory activity. In this study, I have investigated the detailed mechanisms of these activities. As a result, we have found the following things ; (1) Prohibitin-1 and -2 can play an important role in the osteoclast differentiation-inhibitory activity of kurahyne ; (2) Specific fourteen amino-acid residues in SERCA are identified as a possible kurahyne-binding site ; (3) Two kurahyne-related marine natural products were isolated, and the structure determination and the total synthesis of them were achieved. Furthermore, some knowledge regarding a structure-activity relationship was obtained.
Notes	研究種目 : 研究活動スタート支援 研究期間 : 2015 ~ 2016 課題番号 : 15H06584 研究分野 : 天然物化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15H06584seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２５　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　研究活動スタート支援
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｈ０６５８４

研究課題名（和文）小胞体ストレス誘導剤クラハインの活性発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mode of action of kurahyne, an ER-stress inducer

研究代表者
岩崎　有紘（Iwasaki, Arihiro）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教

研究者番号：００７５４８９７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,100,000円

研究成果の概要（和文）：　海洋天然物クラハインは、破骨細胞分化阻害活性と小胞体膜上のカルシウムイオンポンプ（SERCA）阻害活性を有する鎖状リポペプチドである。本化合物の示す生物活性の作用機序解明を目的として研究を行った。
　結果として、以下のことが明らかとなった。
①クラハインによる破骨細胞分化阻害活性に、プロヒビチン-1および-2が関与している可能性が示唆された。②クラハインのSERCA結合部位として、全アミノ酸配列（およそ1000残基）中、特定の14残基のいずれかが関与する可能性が示唆された。③クラハイン類似海洋天然物２種を発見し、それらの構造を解明し、全合成を達成した。また、構造活性相関に関する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：Kurahyne is a marine natural product that exhibits osteoclast differentiation-inhibitory activity and sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase (SERCA)-inhibitory activity. In this study, I have investigated the detailed mechanisms of these activities.
As a result, we have found the following things;
(1) Prohibitin-1 and -2 can play an important role in the osteoclast differentiation-inhibitory activity of kurahyne; (2) Specific fourteen amino-acid residues in SERCA are identified as a possible kurahyne-binding site; (3) Two kurahyne-related marine natural products were isolated, and the structure determination and the total synthesis of them were achieved. Furthermore, some knowledge regarding a structure-activity relationship was obtained.

研究分野：　天然物化学

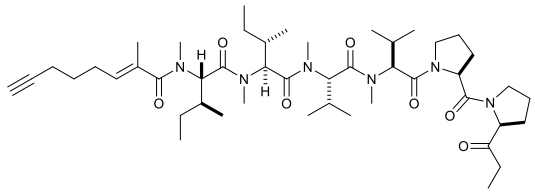
キーワード：　クラハイン　海洋天然物化学　SERCA　プロヒビチン　破骨細胞

１．研究開始当初の背景

新しい生物活性物質の発見と、それをプローブとした未知の生命現象の解明は、医学や生物学といった学問分野を劇的に発展させてきた [*J. Nat. Prod.* **75**, 311. (2012)]。このような背景の下、有用な物質の発見と、その作用機序解明を目的として、申請者は海洋生物由来の新規生物活性物質の探索研究を行ってきた。2014 年に申請者が見出した新規化合物であるクラハインは、リングビア属の海洋シアノバクテリアが生産する鎖状リポペプチドである。本化合物は、両端にアセチレンとケトンをそれぞれ有する特徴的な構造を持つ。予備的な生物活性評価を行い、一部のヒトがん細胞に細胞増殖阻害活性を示すことと、アポトーシス誘導活性を示すことを明らかにした [*RSC Adv.* **4**, 12840. (2014)]。

さらに種々のケミカルバイオロジー的手法を用いて解析を行ったところ、本化合物が小胞体膜上に存在するカルシウムイオンポンプ（SERCA）の働きを阻害することでアポトーシスを誘導することを見出した。カルシウムイオンは生体内における重要なセカンドメッセンジャーとして知られており、その制御を担う SERCA は創薬標的（たとえば抗がん剤）として注目されている。

以上の活性に加え、本化合物が、マウス由来マクロファージの破骨細胞への分化を阻害することを見出した。



クラハイン構造式

２．研究の目的

クラハインの構造は、既知の SERCA 阻害剤および破骨細胞分化阻害剤と全く異なる。それゆえこれらの阻害活性の詳細なメカニズム解析は、新規骨格の薬剤や生化学試薬の開発に結び付くことが期待される。本研究の目的は、以下の２点である。

(1) クラハインによる破骨細胞分化阻害メカニズムの解明
(2)クラハインと SERCA との結合様式の解明

３．研究の方法

(1) クラハインによる破骨細胞分化阻害メカニズムの解明

開始当初は、破骨細胞の分化阻害メカニズムに SERCA が関与していると予想し、SERCA 周辺のカルシウムシグナリングに関連するシグナル伝達経路の解析を中心に研究を進める予定であった。しかしその後、SERCA が関与しない可能性が示唆されたため、研究手法を大きく転換した。具体的には、ビオチンプローブを用いたアフィニティー精製により標的候補分子を探索し、ペプチドマスフィンガープリンティング法により、その同定を行った。さらに標的候補タンパクの抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、結合分子の確認を行った。これらの情報をもとに、作用機序の予測を行った。

(2) クラハインと SERCA との結合様式の解明

当初の計画では、蛍光プローブと共焦点レーザー顕微鏡を用いた局在部位の解析や、共結晶Ｘ線構造解析を利用して、結合様式を解明する予定であったが、”４．研究成果”で述べる予想外の実験事実が得られたことから、異なる手法を採用した。具体的な手法としては、哺乳類由来の培養細胞を用意し、これらに対するクラハインの SERCA 阻害活性を評価した。それぞれの細胞に対して、阻害活性の有無と SERCA の一次配列とを比較し、クラハインの SERCA 結合部を予測した。

さらに、まったく別のアプローチとして、自然界よりクラハイン類似分子の探索を行い、その構造を決定した。これらの分子の生物活性の評価により、構造活性相関に関する手がかりを得た。

４．研究成果

(1) クラハインによる破骨細胞分化阻害活性の細胞内標的候補分子の同定

先行研究より、クラハインがヒト由来細胞の SERCA を阻害することが分かっていたため、当初はクラハインによる破骨細胞分化阻害活性の細胞内標的分子は SERCA であると予想していた。しかしマウス由来マクロファージ細胞株（RAW246.7）を用いた細胞質内カルシウムイオン濃度の変動解析とアフィニティー精製より、クラハインはマウスの SERCA を阻害しない可能性が示唆された。そこで新たな標的候補分子を発見するべく、RAW246.7 細胞のライセートに対するアフィニティー精製を行い、クラハインの細胞内結合分子の探索を行った。その結果、分子量 27 kDa および 31 kDa 付近に結合候補タンパク質を発見した。ペプチドマスフィンガープリンティング法による解析の結果、これらのタンパク質がプロヒビチン-1 および -2 であると同定した。この実験結果は、プロヒビチン抗体を用いたウェスタンブロッティングによっても裏付けられた。プロヒビチン-1 および -2 は CRaf との複合体を形成することで MAPK 経路を活性化することが知られている。MAPK 経路の下流には c-Fos があり、このものが破骨細胞の分化に

必須の NFATc1 の活性化に関与している。以上の結果から、クラハインによる破骨細胞分化阻害活性は、当初予想された SERCA の阻害活性によるものでなく、プロヒビチン -1 および -2 の阻害によって下流の c-Fos が不活化されたために誘導されるという新たなメカニズムが示唆された。この仮説の検証を行うべく、現在 CRISPR-Cas9 を用いたプロヒビチンノックアウト細胞株の作成を行っている。今後は、プロヒビチンノックアウト細胞株の示すクラハイン感受性の変化や分化誘導能の変化を評価することを通じて、プロヒビチンと破骨細胞分化阻害活性の関連性の検証を行う。

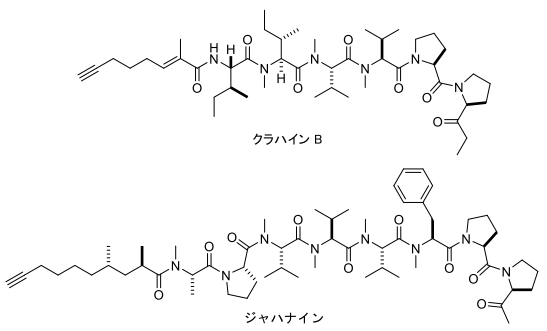
本研究を通じて、クラハインは従来の標的分子である SERCA に加え、第２、第３の標的分子としてプロヒビチン-1 および -2 を持つことが示唆された。このことは、クラハインが複数の標的分子と相互作用する鍵束として働くことを示唆するものである。

(2) クラハインの SERCA 結合部位の絞り込み

研究開始当初は、クラハインは生物種によらず SERCA を阻害するものと考えていた。しかし (2) で述べた通り、クラハインはヒトの SERCA は阻害する一方で、マウスの SERCA は阻害しないことが示唆された。SERCA はアミノ酸およそ 1000 残基からなる膜タンパクであり、ヒトとマウス間での相違部は 14 残基しか存在しない。すなわち、これら 14 残基の変異部のどこかにクラハインの結合に重要な部位が存在することが示唆された。

(3) クラハイン関連化合物の発見

沖縄県で採集した海洋シアノバクテリアより、クラハイン関連化合物として、クラハイン B とジャハナインを単離した。さらに、これらの構造を決定し、全合成を達成した。両化合物は、両端にアセチレンとケトンを併せ持つ天然物であり、クラハインとの構造の類似性が高い。



新規に発見したクラハイン関連物質

これらの化合物の生物活性として、両化合物がヒトがん細胞の増殖を阻害すること、およびジャハナインが HeLa 細胞に対してアポトーシスを誘導することを明らかにした。さらに細胞質内カルシウムイオン濃度の変動解析結果より、ジャハナインが HeLa 細胞の SERCA を阻害しないことを明らかにした。これらの結果より、クラハインによる SERCA 阻害活性には、分子両端の構造だけでなく、中央部のアミノ酸配列も重要であることが示唆された。

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３件）

① Shinichiro Okamoto, Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Kiyotake Suenaga: Isolation and Structure of Kurahyne B and Total Synthesis of the Kurahynes. *Journal of Natural Products*, **78**, 2719-2725 (2015).（査読有）
DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00662

② Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shun Katsuyama, Maho Morita, Yukiko Sasazawa, Shingo Dan, Siro Simizu, Takao Yamori, Kiyotake Suenaga: Identification of a Molecular Target of Kurahyne, an Apoptosis-inducing Lipopeptide from Marine Cyanobacterial Assemblages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **25**, 5295-5298 (2015).（査読有）
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.09.044

③ Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Hidetoshi Ogawa, Kim Anh Nguyen, Kiyotake Suenaga: Jahanyne, an Apoptosis-Inducing Lipopeptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp. *Organic Letters*, **17**, 652-655 (2015).（査読有）
DOI: 10.1021/ol5036722

〔学会発表〕（計 7 件）

① 岡本慎一朗、岩崎有紘、末永聖武、末端アルキン含有リポペプチド jahanyne の合成研究、日本化学会第 97 春季年会、2017 年 3 月 17 日、慶應義塾大学日吉キャンパス（神奈川県・横浜市）

② 岩崎有紘、海洋シアノバクテリア由来、新規ペプチド性化合物の構造と生物活性、高磁場・高感度 NMR 利活用促進のための天然物関連シンポジウム 2016、2016 年 7 月 19 日、理化学研究所横浜キャンパス（神奈川県・横浜市）、招待講演

③ 岩崎有紘、沖縄県産海洋シアノバクテリア由来ペプチド性化合物の構造と生物活性、第 30 回海洋生物活性談話会、2016 年 5 月 14 日、鳥取大学（鳥取県・鳥取市）

④ Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Siro Simizu, Kiyotake

Suenaga: Discovery, total synthesis and mode of action of kurahyne, a novel ER stress-inducer from a marine cyanobacterium. The 8th Takeda Science Foundation Symposium on Pharma Sciences, 2016 年 1 月 21 日, 武田薬品工業研修所 (大阪府・吹田市)

⑤ Arihiro Iwasaki, Osamu Ohno, Shinpei Sumimoto, Siro Simizu, Kiyotake Suenaga: Kurahyne, a novel ER stress-inducer isolated from marine cyanobacterial assemblages of *Lyngbya* sp. 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM 2015), 2015 年 12 月 18 日, Honolulu (アメリカ合衆国)

⑥ 岩崎有紘、大野修、澄本慎平、岡本慎一朗、末永聖武、海洋藍藻由来新規小胞体ストレス誘導剤クラハインの構造、合成および作用機序解明、2015 年 10 月 15 日、船堀タワー（東京都・江戸川区）

⑦ 岩崎有紘、大野修、澄本慎平、岡本慎一朗、森田真布、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クラハインの構造、合成および作用機序解明、2015 年 9 月 9 日、神奈川県民ホール（神奈川県・横浜市）

〔その他〕

①慶應義塾大学化学科末永研究室
http://user.keio.ac.jp/~suenaga/sand/

②第 57 回天然有機化合物討論会奨励賞受賞者
http://www.tennenyuuki.ne.jp/openwindow/jusyo_old.html

６．研究組織

(1)研究代表者

岩崎　有紘（IWASAKI, Arihiro）
慶應義塾大学・理工学部（矢上）・助教
研究者番号：00754897