

海洋産マクロリド biselyngbyaside 類の構造と作用機序

平成 27 年度

森田 真布

主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	森田 真布
主 論 文 題 目： 海洋産マクロリド biselyngbyaside 類の構造と作用機序				
(内容の要旨) 現在に至るまで自然界に有用化合物を求める研究が精力的に行われており、生命科学や創薬といった周辺分野の進展に寄与してきた。特に、カイメンやホヤといった海洋生物からは数々の生物活性物質が発見されてきたが、その多くはシアノバクテリアや渦鞭毛藻といった共生微生物によって生産されると考えられている。なかでも海洋シアノバクテリアは培養が難しいとされ、私は自然界から採取した海洋シアノバクテリアを用いて、新しい生物活性物質の探索研究を進めてきた。 第一章では、biselyngbyaside 類の単離と構造決定について述べる。Biselyngbyaside 類は、鹿児島県徳之島で採取した海洋シアノバクテリア <i>Lyngbya</i> sp. の抽出物より単離された。これらはいずれも 18 員環のマクロリドであり、2009 年に当研究室で単離された biselyngbyaside の類縁体であった。その平面構造および相対立体配置は、高分解能マススペクトルと核磁気共鳴スペクトルの解析により推定した。さらに円偏光二色性スペクトルを測定し、既知化合物である biselyngbyaside と比較することで、biselyngbyaside 類の絶対立体配置を決定した。 第二章では、biselyngbyaside 類の生物活性評価について述べる。本研究において biselyngbyaside の類縁化合物が単離されたことにより、構造活性相関の知見を得ることができた。マクロラクトン環内の共役 1,3-ジエンとその周辺構造が活性に重要であること、そして糖を持たないアグリコン誘導体は配糖体に比べ約 100 倍活性が強いという知見を得た。さらに、ヒトがん細胞パネルスクリーニングを糸口として、biselyngbyaside 類の作用機序の解明に取り組んだ。種々の活性評価の結果から、biselyngbyaside 類は腫瘍細胞に対して小胞体ストレスを誘導し、アポトーシスを引き起こすことが分かった。ヒトがん細胞パネルスクローニングの結果と生物活性評価の結果により、biselyngbyaside 類は（筋）小胞体膜上カルシウムポンプを阻害することが示唆された。ウサギの筋小胞体を用いた活性試験を行なったところ、biselyngbyaside 類が（筋）小胞体膜上カルシウムポンプ SERCA1a および 2a を強力に阻害することが明らかになった。 第三章では、biselyngbyaside 類の標的分子であるカルシウムポンプ SERCA1a に対する結合様式について述べる。biselyngbyaside 類との結合様式を解明するため、東京大学分子細胞生物学研究所との共同研究を行い、共結晶の作製と X 線結晶構造解析を試みた。SERCA1a は分子量 110kDa の膜タンパク質であり、カルシウムイオンを細胞質から小胞体内腔へと能動輸送する。Biselyngbyaside とそのアグリコン biselyngbyolide B は、SERCA1a の膜貫通ヘリックス M1-M4 および細胞質ドメインである P ドメインに囲まれた領域に結合することが結晶構造から明らかになった。二種の biselyngbyaside 類はいずれも膜貫通ドメインと細胞質ドメインの境界領域に結合しており、これまでに報告されているカルシウムポンプ阻害剤とは異なる様式で結合していることが分かった。本研究で得られた知見は今後、カルシウム依存性シグナル制御機構の解明や研究試薬、医薬リードの開発における合理的分子設計の重要な基盤になるものと考えられる。				

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

School School of Fundamental Science and Technology	Student Identification Number	SURNAME, First name MORITA, Maho
Title Structures and Molecular Mechanism of Marine Macrolides Biselyngbyasides		
Abstract <p>Marine organisms are rich source of biologically active compounds that are useful for therapeutic agents and research tools. Their scarcity, complex structures, and diverse bioactivities make it challenging to elucidate the molecular mechanisms of natural products. Recent studies indicate microbes like cyanobacteria and dinoflagellate living in a symbiotic relationship with marine organisms, such as sponge and ascidian, produce a number of bioactive molecules. We have particularly focused on marine cyanobacteria as a source of novel bioactive molecules.</p> <p>First chapter describes isolation and structure determination of biselyngbyasides. Biselyngbyasides were isolated from the marine cyanobacterium <i>Lyngbya</i> sp. collected in Tokunoshima Island at Kagoshima prefecture. The best studied is biselyngbyaside, which was originally isolated from Okinawan cyanobacterium in 2009. Gross structures of its analogues, biselyngbyolide A and biselyngbyasides B, C, and D were determined based on NMR spectral analyses and mass spectrometry. The absolute stereochemistries of BLSs were established based on comparing their CD data with that of biselyngbyaside whose absolute stereostructure was previously determined.</p> <p>Second chapter describes biological activities of biselyngbyasides. Growth-inhibitory activities of biselyngbyasides against HeLa cells, human cervical cancer cells, are evaluated and the result provides new insights into structure-activity relationships of biselyngbyasides. MTT assay indicated that a glycoside showed much weaker growth inhibition than its aglycon with lack of sugar moiety. Furthermore, the conjugated diene part in biselyngbyasides was revealed to be essential for growth-inhibitory activity against HeLa cells. Previously, biselyngbyasides were submitted to JFCR39 anticancer drug screening system. Based on its profile of bioactivity, biselyngbyasides were suggested to be inhibitors of SERCA1a and 2a, ATP-powered Ca^{2+}-pumps in sarco/endoplasmic reticulum membrane. <i>In vitro</i> assay of ATPase activity showed BLSs strongly inhibited SERCA1a at low concentration.</p> <p>Third chapter describes binding modes of biselyngbyasides to SERCA1a. Structures of SERCA1a with bound BLSs were investigated by X-ray crystallographic analyses. It is noteworthy that BLSs bind in novel manner to the boundary domain between transmembrane and cytoplasm of SERCA1a. The crystal structures of the complexes of SERCA1a and biselyngbyasides with and without a sugar moiety and activity measurements of several analogs allow us to identify important components that confer high potency to biselyngbyasides as Ca^{2+} inhibitors. The crystal structures form a solid basis for designing Ca^{2+}-pump probes and pharmaceutical leads for SERCA-related diseases.</p>		