



Title	Haliclona属海綿由来の神経分化誘導物質 Lembehynes 類に関する研究
Author(s)	松井, 耕平
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44145
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 まつ い こう へい
松 井 耕 平

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 7 7 6 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

薬学研究科応用医療薬科学専攻

学 位 論 文 名 *Haliclona* 属海綿由来の神経分化誘導物質 lembeyne 類に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 小林 資正

(副査)

教 授 北 泰行 教 授 山元 弘 教 授 土井 健史

論 文 内 容 の 要 旨

サンゴ、海綿、ホヤなど、海底には多種類の生物が生息し、それらの底生海洋生物は、特異な生合成経路を持つことにより、多様性、複雑性に富んだ代謝産物を生産している。既に海洋生物からは 1 万を越える新規化合物が単離されているが、それらの多くはサンプル量が限られていることなどから、ほとんど活性評価がなされていない。これまで、海洋生物由来の生物活性成分の探索は、主に新しい抗癌剤を開発する目的で癌細胞に対する細胞毒性活性を中心に進められてきたが、今後は新たな活性評価系を用いて再探索を行い、多様な成分の活性評価を行う必要があると考えられる。

これまでの研究により、生体内における神経細胞の分化、生存維持に際して神経成長因子 (NGF) をはじめとするタンパク質性の分化誘導因子が重要な役割を果たすことが明らかにされている。また、神経分化の制御機構の異常により生じた神経芽腫のような癌細胞は、分化誘導因子の作用により正常様の成熟神経細胞へと脱癌化できることが知られている。そのため、神経細胞の脱落を伴うアルツハイマー病のような神経疾患や、小児期によくみられる神経芽腫のような癌疾患の治療薬として、分化誘導物質の可能性が期待されている。生体内に存在するタンパク質性の分化誘導因子については作用機序がよく研究され、治療薬の有望な候補ではあるが、目的の作用部位への移行性や安定性等に問題があることから、同様の作用を有する低分子化合物の発見が望まれており、既に低分子分化誘導物質であるレチノイドは抗癌剤としての臨床試験が行われている。また、神経分化の機構にはまだ未解明の部分が多く、新たに発見した低分子分化誘導物質は、神経分化の機構を解明するためのツールとして利用できると考えられる。

以上のような背景から、著者は、海洋生物由来の生理活性物質探索の一環として、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 やマウス神経芽細胞腫 Neuro 2A のような癌細胞を正常な神経様細胞へと分化させる低分子活性物質を探索するアッセイ系を構築した。そして、このアッセイ系を用いて種々の海洋生物の抽出エキスをスクリーニングした結果、インドネシア、レンベ島で採集した *Haliclona* 属海綿の抽出エキスを顕著な分化誘導活性を見出した。各種クロマトグラフィーによりこのエキスを精製した結果、活性成分として新規長鎖ポリケチド化合物 lembeyne A (1)、B (2)、C (3) を単離し、各種機器分析、化学分解、改良 Mosher 法により、その全化学構造を決定した。Lembeyne 類は、低濃度で PC12 及び Neuro 2A 細胞に対して顕著な神経突起伸張作用を示し、細胞内アセチルコリンエステラーゼ活性の上昇作用も有することから、形態的にも機能的にも神経分化を誘導していることが判明した。また、lembeyne 類が神経分化誘導作用を発現するための必須構造を明らかにするために、末端の 1-yn-3-ol 構造や脂肪鎖構造を変換

したアナログを設計、合成し、それらの活性を評価した。その結果、末端 1-yn-3-ol 構造は活性発現に必須であり、3 位水酸基の立体化学、脂肪鎖の長さも重要であることが明らかとなった。

Lembehyne 類は、PC12 及び Neuro 2A 細胞に対する既存の分化誘導物質と比較して強い活性を示し、化学構造が大きく異なっていることから、新規な作用機序で分化を誘導することが推測され、その作用機序を解明することに興味をもたれた。そこでまず、細胞分化と密接な関係のある細胞周期における影響を検討したところ、lembehyne A (1) は Neuro 2A 細胞に対し、G1 チェックポイント制御因子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク p21 の発現上昇を誘導し、細胞周期を G1 期で停止させることが明らかとなった。そして細胞周期停止作用は Neuro 2A 細胞に特異的であった。また、構造活性相関研究の結果をもとに、光親和性基を導入し ^{125}I で標識したプローブ分子を設計、合成し、そのプローブ分子を Neuro 2A 細胞に投与して細胞レベルで光親和性標識を行ったところ、分子量約 3 万のタンパク質を選択的にラベル化することに成功した。このタンパク質のラベル化は、1 あるいは活性アナログの投与により拮抗阻害されるが、不活性アナログの投与によっては拮抗阻害されず、またラット繊維芽細胞 3Y1 やヒト白血病細胞 K562 においてはみられないため、このタンパク質が lembehyne 類の標的タンパクであり、Neuro 2A 細胞の神経分化に関与する重要な因子である可能性が考えられた。

現在のところ、分子量約 3 万の lembehyne 標的タンパクがどのような性質のタンパクであるかという情報は得られていないが、今後、精製法を確立し、その本体を明らかにすることにより、神経分化のメカニズムに重要な知見を得るとともに、新たな神経芽腫の分化誘導療法剤のリード化合物の創生につながると期待される。

論文審査の結果の要旨

神経細胞の分化、生存維持には神経成長因子 (NGF) をはじめとする分化誘導物質が、アルツハイマー病のような神経疾患や神経芽腫のような癌疾患の治療薬として期待されている。しかしながら、タンパク質性の分化誘導因子は目的的作用部位への移行性や安定性等で治療薬として問題があることから、低分子量の分化誘導物質の発見が望まれている。また、神経分化の機構にはまだ未解明の部分が多く、神経分化の機構を解明するためのツールとして役立つと期待されている。

一方、サンゴ、海綿、ホヤなどの底生海洋生物からは、1 万を越える多様性、複雑性に富んだ新規化合物が見出されているが、ほとんど活性評価がなされていないことから新規活性物質の宝庫として注目されている。

著者は、ラット副腎髄質褐色細胞腫 PC12 やマウス神経芽細胞腫 Neuro 2A のような癌細胞を正常な神経様細胞へと分化させる低分子活性物質を探索するアッセイ系を構築した。そして、このアッセイ系を用いて探索し、インドネシア、レンベ島で採取した *Haliclona* 属海綿から新規長鎖ポリケチド化合物 lembehyne A、B、C を単離し、各種機器分析、化学分解により、それらの全化学構造を決定した。Lembehyne 類は、低濃度で PC12 及び Neuro 2A 細胞に対して顕著な神経突起伸展作用を示し、細胞内アセチルコリンエステラーゼ活性の上昇作用も有することから、形態的にも機能的にも神経分化を誘導していることを明らかにした。また、種々の lembehyne アナログを設計、合成し、神経分化誘導作用と構造の相関を解析した結果、末端 1-yn-3-ol 構造は活性発現に必須であり、3 位水酸基の立体化学、脂肪鎖の長さも重要であることを明らかにした。

また、lembehyne A は Neuro 2A 細胞特異的にサイクリン依存性キナーゼ阻害タンパク p21 の発現上昇を誘導し、細胞周期を G1 期で停止させることを明らかにした。さらに、構造活性相関研究の結果をもとに、光親和性基を導入し ^{125}I で標識したプローブ分子を設計、合成し、そのプローブ分子を用いて Neuro 2A 細胞に対して分子量約 3 万の標的タンパク質を選択的にラベル化することに成功している。この標的タンパク質は、Neuro 2A 細胞の神経分化に関与する重要な因子である可能性が考えられ、神経分化のメカニズムを解析するツールとして、また新たな神経芽腫の分化誘導療法剤のリード化合物として期待される。

以上の成果は、博士 (薬学) の学位論文として十分価値のあるものと認められる。