

ひょうご神戸産学学官アライアンス
新技術説明会

DNA合成酵素を阻害する新規物質 による抗がん・抗炎症活性

神戸学院大学
大学院/食品薬品総合科学研究科
准教授 水品 善之

新技術の概要

・研究背景

日本は四方を海に囲まれた南北に長い島国であるから、他国と比較して圧倒的に海洋資源が豊富である。

しかし、野生の海洋生物(海藻・珊瑚・苔)に寄生している海洋微生物(カビ・細菌)の研究はほとんど行われていない。

・研究目的

海洋微生物の醗酵産物から生理活性物質や新規物質を見出す。
海洋微生物由来の医薬品(抗がん剤・抗炎症剤など)を開発することが最終目標である。

・研究方法

1. 日本各地から野生の海洋生物を無菌的に採集
2. 野生海藻・珊瑚に寄生する海洋微生物の分離、菌株同定
3. 生理活性(DNA合成酵素阻害活性)試験と菌株スクリーニング
4. 生理活性物質の単離・精製と構造決定
5. 医薬品開発へ向けた動物実験



各地の沿岸から
無菌的に採集



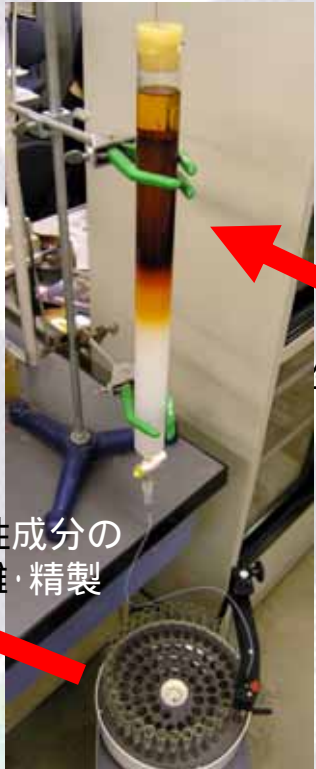
海洋微生物
(カビ・細菌)
の分離・純化・株化



海洋微生物の菌株
(ライブラリー化)

微生物代謝産物
(培養液・
菌体抽出物)

生理活性
試験



活性成分の
単離・精製



構造決定

機器分析
(NMR, MSなど)



新規な
医薬品の開発



新技術の基となる研究成果・技術

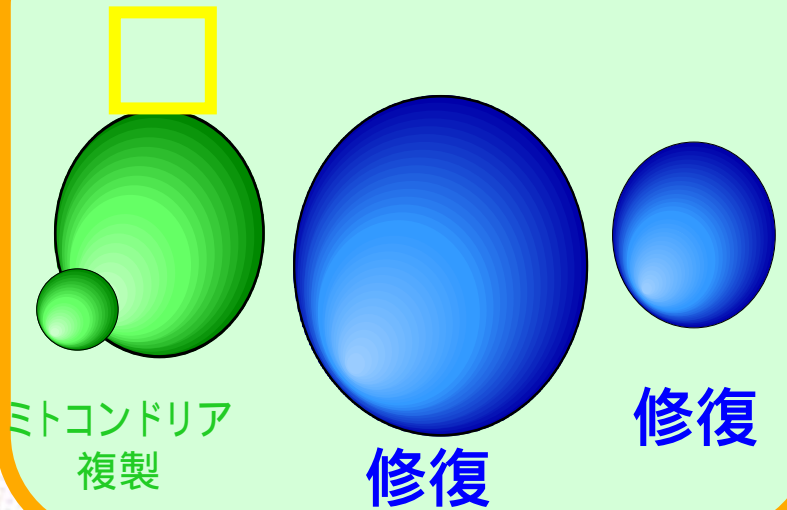
DNAポリメラーゼ (pol) の分子種選択的な阻害
活性測定方法の確立

野生の海洋生物から海洋微生物の単離と株化

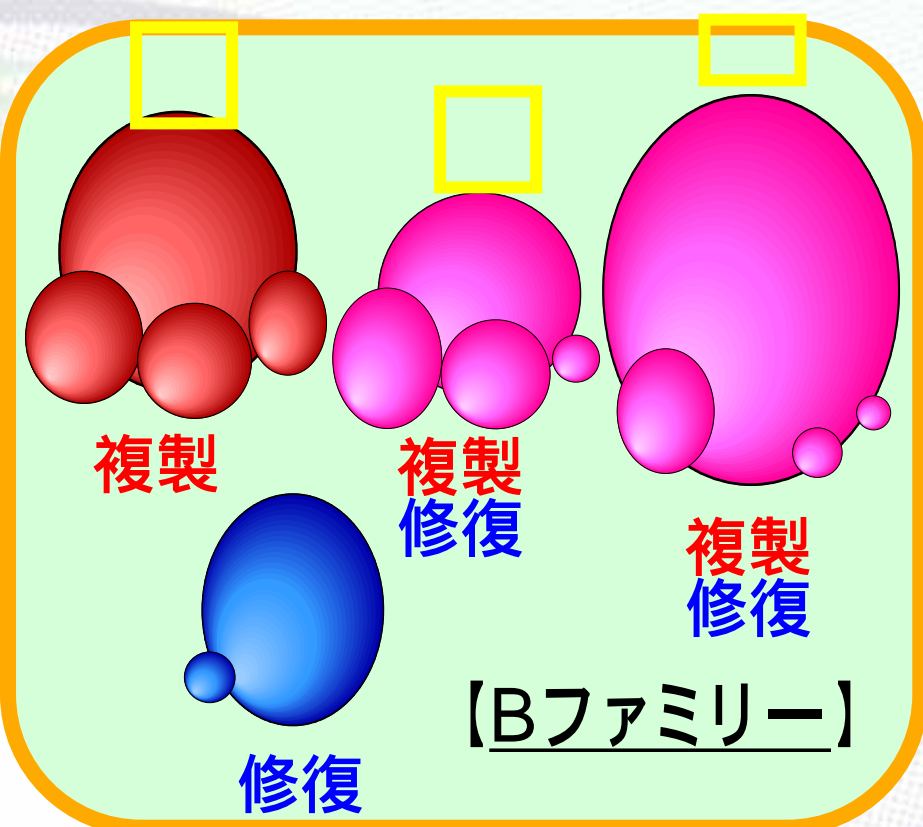
千葉県稲毛海浜公園で採集した海藻に寄生する
カビ (*Trichoderma viride*) から単離・精製した
pol阻害新規物質

海洋微生物から単離・精製したpol阻害活性を
を有する新規物質 ~

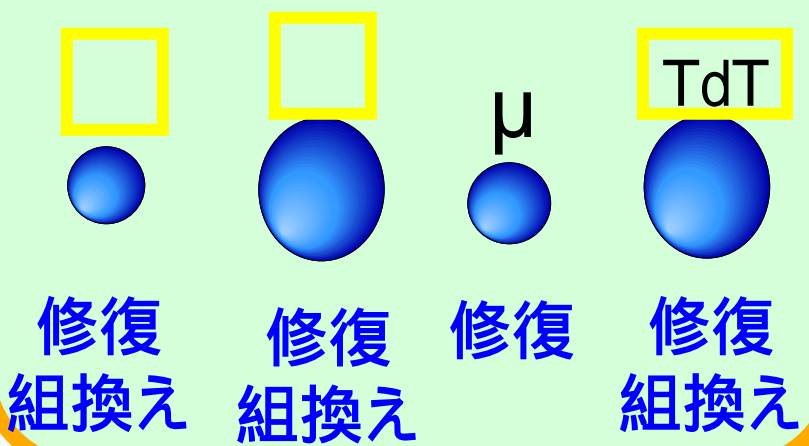
【Aファミリー】



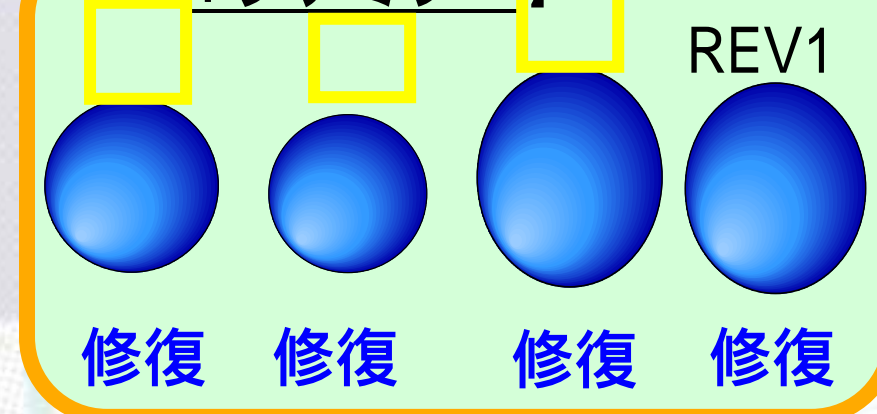
【Bファミリー】



【Xファミリー】



【Yファミリー】



黄色囲みの10種類のpol分子種を所有している

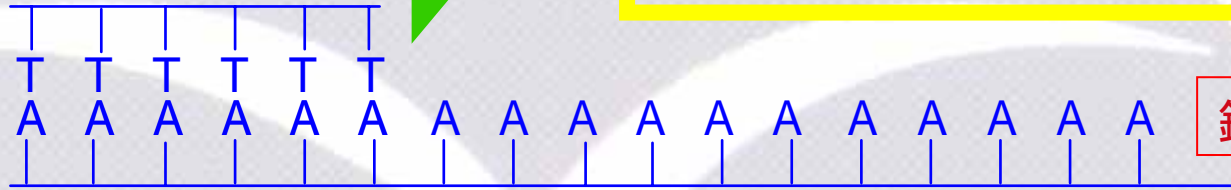
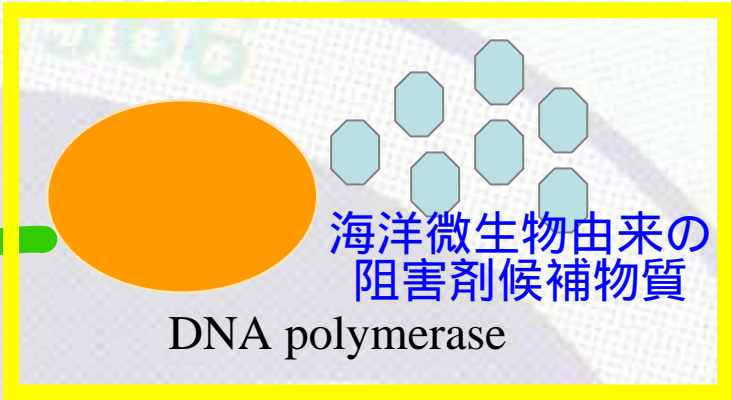
真核生物のDNA合成酵素 (DNAポリメラーゼ) の分子種

1. DNAへの結合

デオキシリボ
ヌクレオチド三リン酸
(dNTP)

$^3\text{H-dTTP}$

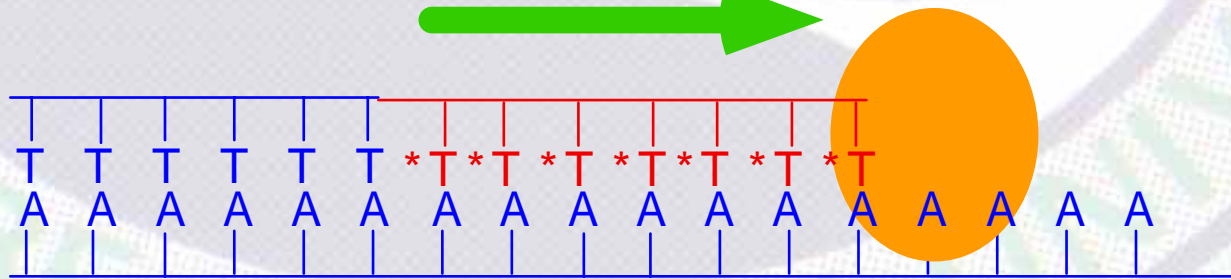
プレ・インキュベーション



poly(dA) / oligo(dT)₁₈

2. DNAの伸長

長所
・短時間(3時間)で測定可能
・多検体を同時に測定可能



DNAポリメラーゼ (DNA合成酵素) 活性測定方法
【特許 第3821867号、発明者: 水品他】

DNAポリメラーゼ (pol) 分子種に対する選択的 阻害剤の新規な健康機能性 **【新しい概念の提唱】**

全てのpol分子種を阻害する物質 (従来のpol阻害剤)

抗がん活性あり **抗がん剤** [例: シタラビン(シトシンアラビノシド)]
ただし、強い細胞毒性 **副作用あり**

pol分子種を選択的阻害物質

(例) DNA複製型pol , 阻害物質 **副作用がない抗がん作用**
DNA修復・組み換え型pol **抗炎症作用**

副作用がない

← 正常細胞には影響しない
(pol発現量・pol活性が微量であるため)

← 他のpol分子種が活性を補填するため

猛毒・阻害剤(Toxin, Inhibitor)ではなく、生体機能調節物質(Suppressor)

すべての操作は無菌的に行う

日本各地の海岸で海藻・珊瑚・苔を採集(無菌的に)

60%酢酸で無菌処理

CMA + ローズベンガル培地 or ポテト・デキストロース(PDA)培地
シャーレにて静置培養
(25℃、1~2週間)

各種微生物(カビ・細菌)の単離

PDA培地シャーレにて静置培養(菌株の純化)
(25℃、数日間)

菌株の純化の繰り返し

純化された菌株の保存
(50株以上)

必要に応じて
菌株の同定を依頼

野生の海洋生物に付着する微生物の単離方法

すべての操作は無菌的に行う

海藻・珊瑚・苔に付着する微生物(カビ・細菌)

↓
ポテト・デキストロース (PD) 培地で液体培養
(100mL、25℃、3週間、静置)

↓ろ過
菌体を回収

↓ろ過
CHCl₃ : MeOH (1 : 1 v/v) で抽出

↓ろ過
抽出液を乾固

↓
抽出物 (50株以上)

↓
生理活性(pol阻害活性)測定

野生の海洋生物に付着する微生物からpol阻害活性菌株の探索

pol阻害物質生産カビ (*Trichoderma viride*)

↓
ポテト・デキストロース (PD) 培地で大量培養
(6L、28、26日間、静置)

↓
菌体を回収

↓
CH₂Cl₂で抽出

↓
抽出液を乾固 (932 mg)

↓
シリカゲルカラムクロマトグラフィー (1回目)
(CHCl₃ : MeOH = 100 : 1)

↓
シリカゲルカラムクロマトグラフィー (2回目)
(CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1 ~ 20 : 1)

↓
シリカゲルカラムクロマトグラフィー (3回目)
(Toluene : EtOAc = 8 : 1 ~ 4 : 1)

↓
Compound 1
(4.1 mg) 無色粉末

↓
Compound 2
(10.5 mg) 無色粉末

海洋微生物 (*Trichoderma viride*) から pol阻害物質の単離・精製

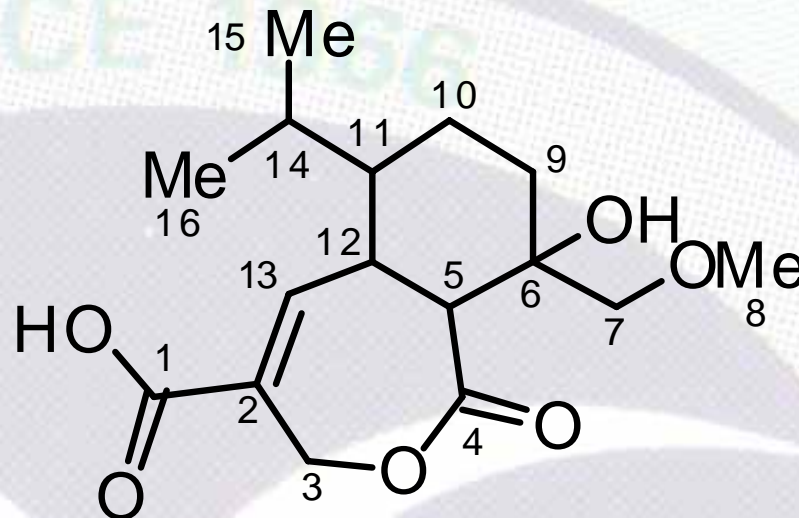


Compound 1

Trichoderonic acid A

(新規物質)

(5a*R**, 6*S**, 9*R**, 9a*R**)-9-hydroxy-6-isopropyl-9-(methoxymethyl)-1-oxo-1,3,5a,6,7,8,9,9a-octahydro-2-benzoxepine-4-carboxylic acid

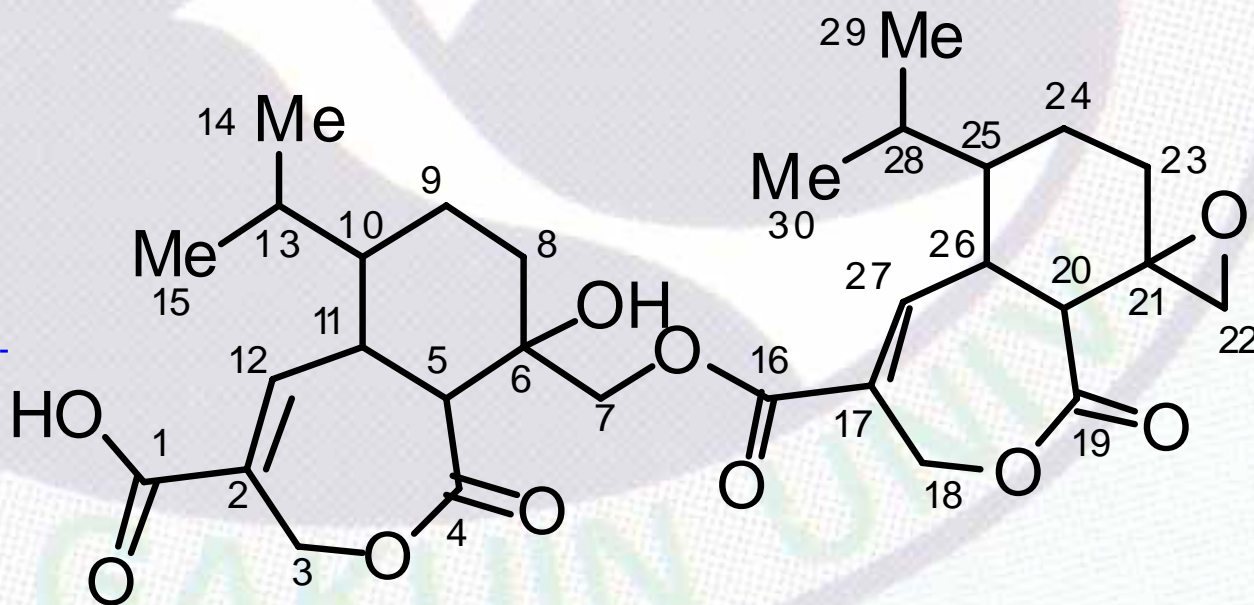


Compound 2

Trichoderonic acid B

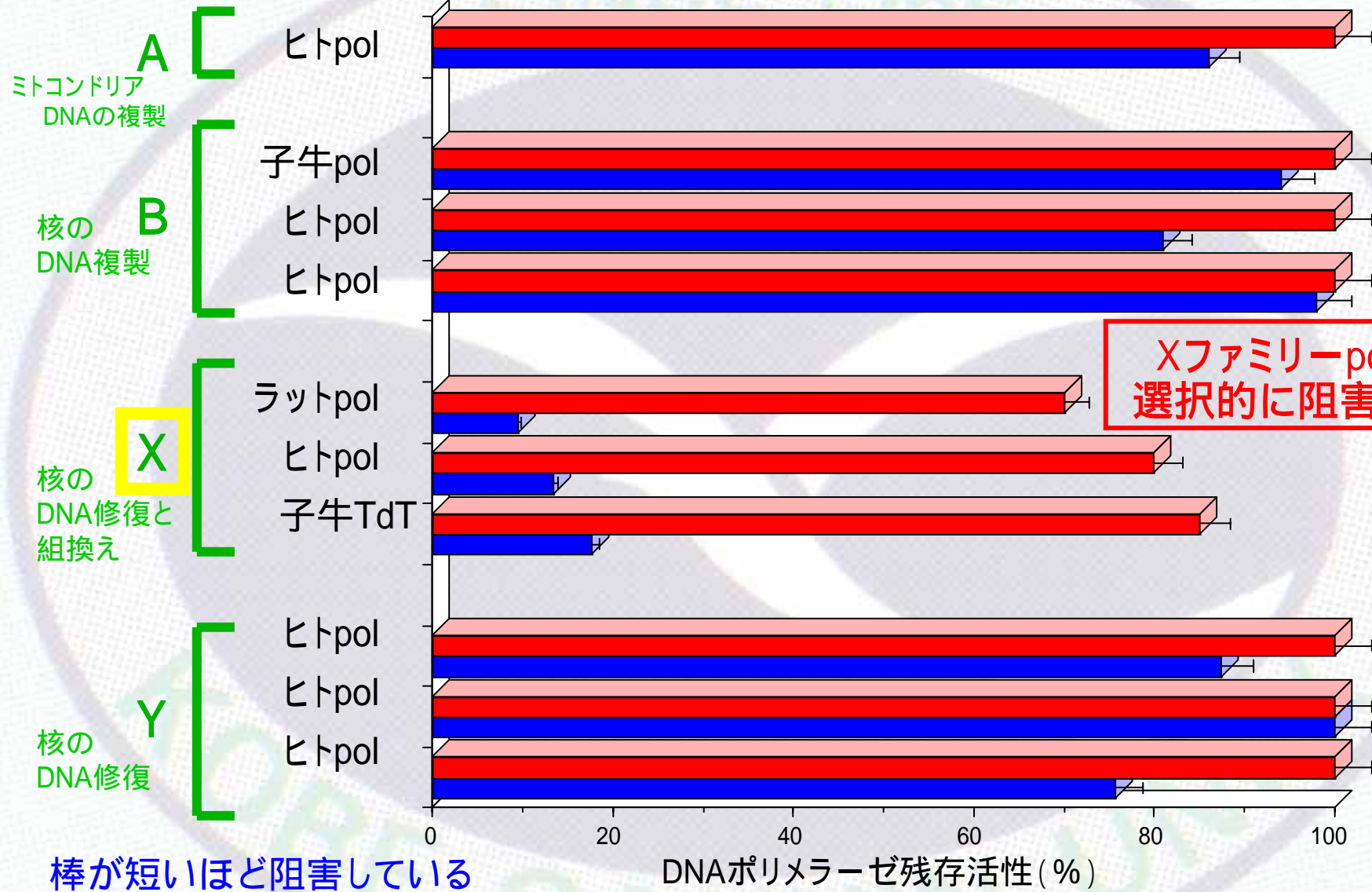
(新規物質)

9-hydroxy-6-isopropyl-9-(((6-isopropyl-1-oxo-1,5a,6,7,8,9a-hexahydro-3*H*-spiro[2-benzoxepine-9,2'-oxiran]-4-yl)carbonyl)oxy)methyl)-1-oxo-1,3,5a,6,7,8,9,9a-octahydro-2-benzoxepine-4-carboxylic acid

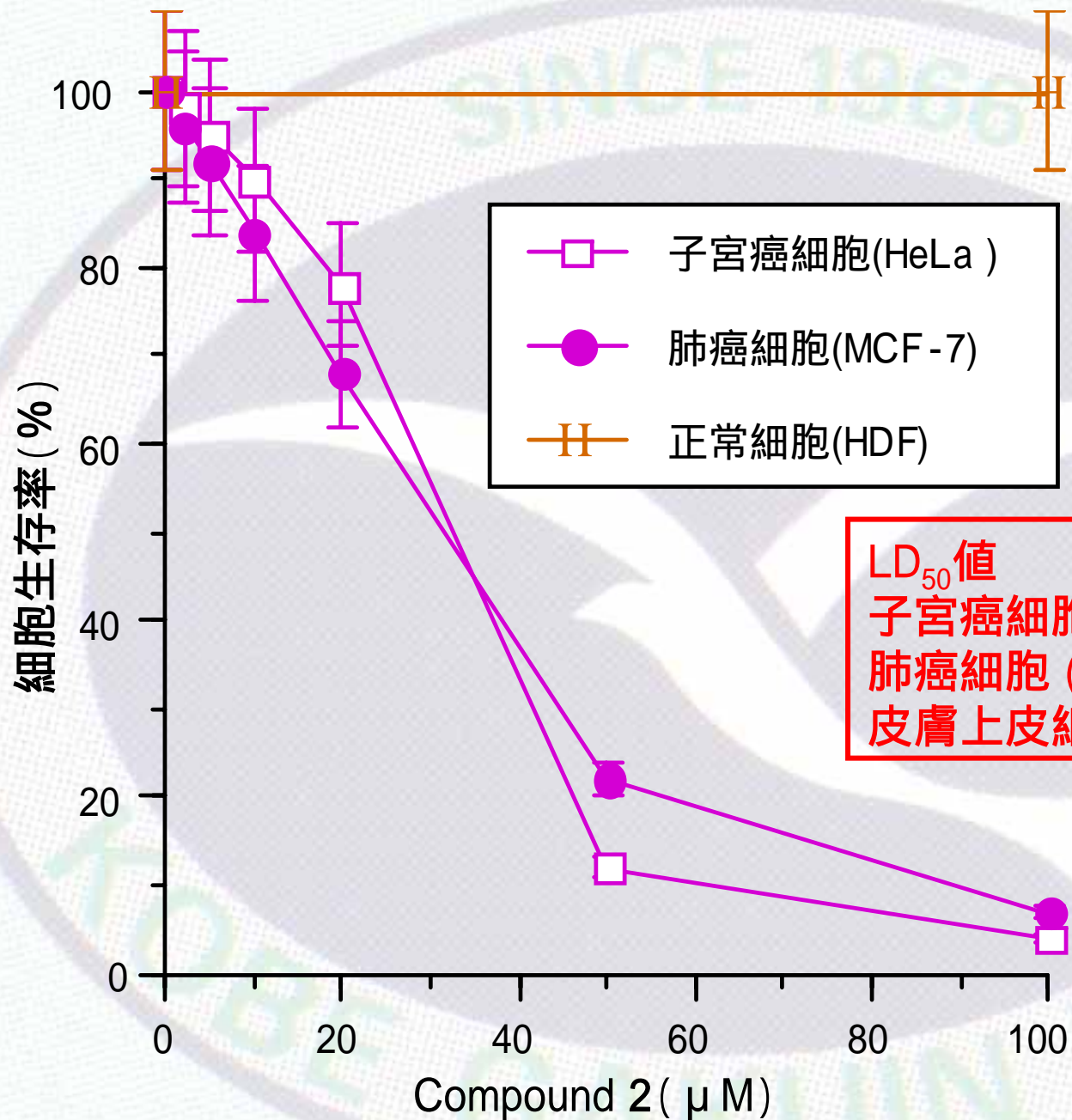


海洋微生物 (*Trichoderma viride*) 由来pol阻害物質の化学構造

polファミリー



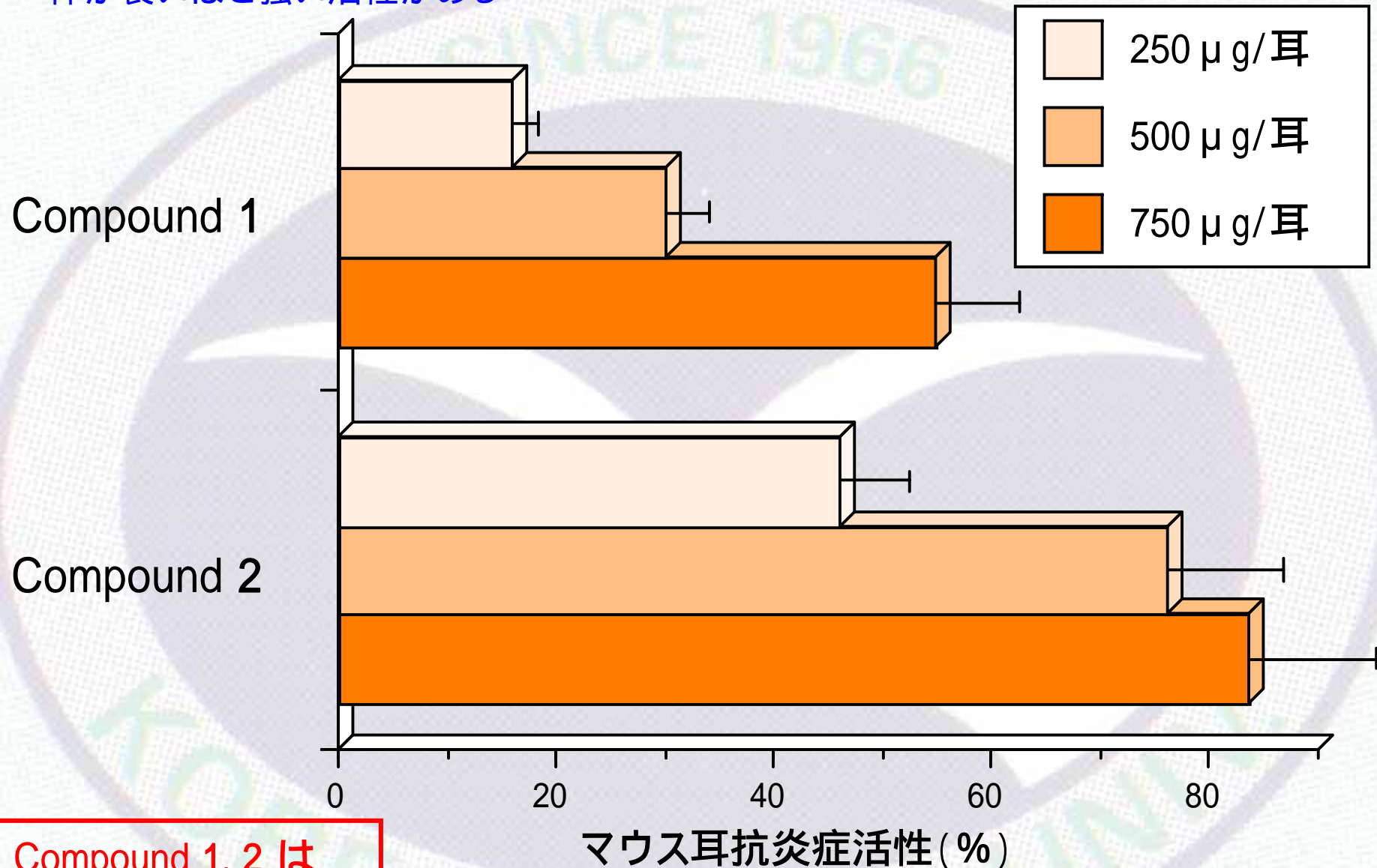
Compound 1, 2 (各100 μ M) における 哺乳類DNAポリメラーゼ (pol) 阻害活性



LD₅₀ 値
子宮癌細胞 (HeLa) 33.0 μM
肺癌細胞 (MCF-7) 31.6 μM
皮膚上皮細胞 (HDF) >100 μM

Compound 2 のヒト由来がん細胞増殖阻害曲線 (MTT法による)

棒が長いほど強い活性がある

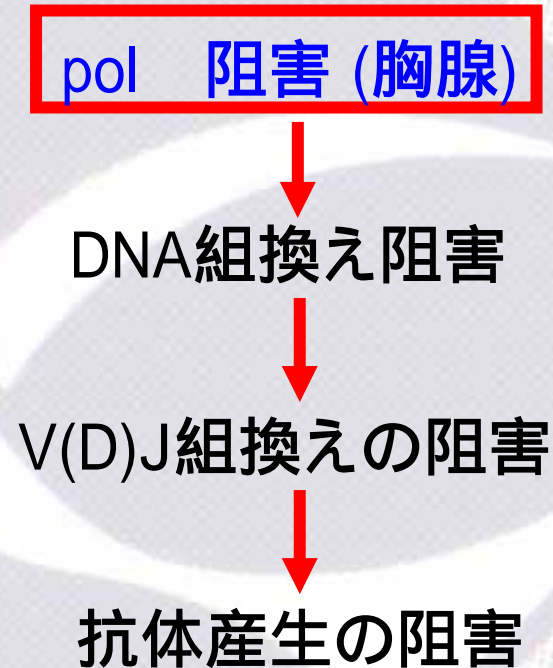
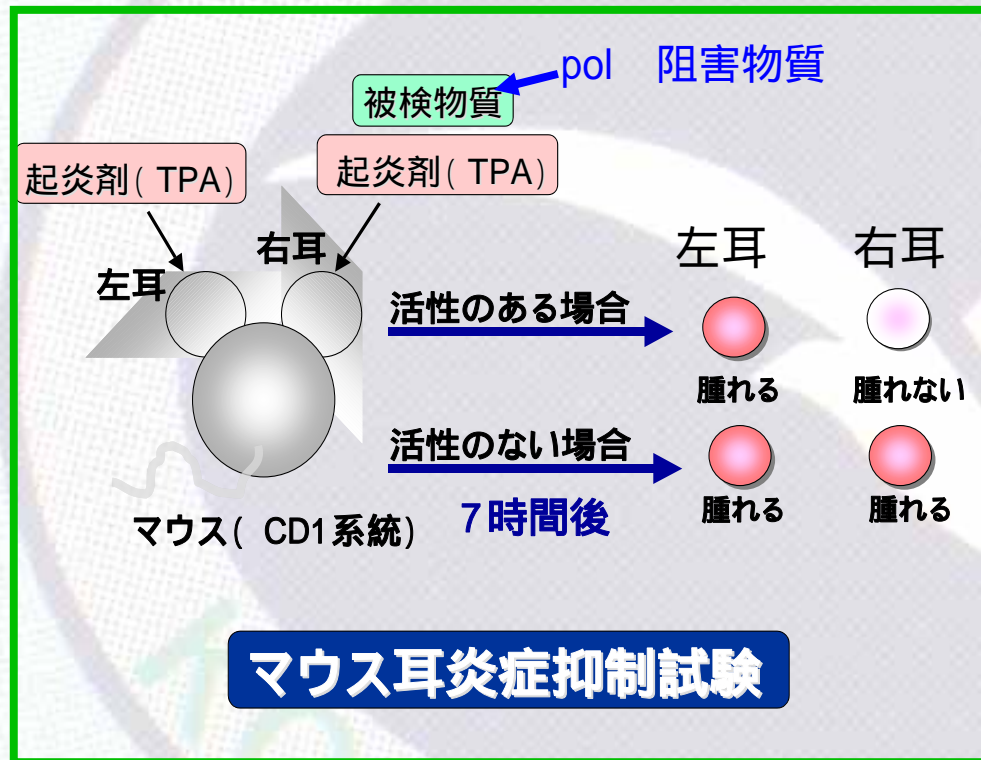


Compound 1, 2 は
抗炎症活性がある

Compound 1, 2 のマウス耳に対する抗炎症活性

pol 阻害活性と抗炎症活性の関係

状況証拠: この2つの活性には正の相関がある



IgG

免疫抑制活性

IgE

抗炎症活性

神戸大学・医学部・
消化器内科と共同研究中
(神戸大学・客員准教授として)



まとめ

- (1) 千葉県稲毛海浜公園に棲息する海藻に寄生するカビを単離した
*Trichoderma viride*と同定
- (2) 本株を大量培養して、菌体の脂溶性抽出物からpol阻害物質
Compound 1とCompound 2を精製した
新規物質: Trichoderonic acid A、Trichoderonic acid Bと命名
- (3) Compound 1, 2は哺乳類のXファミリーのpolを選択的に阻害した
阻害活性の強さ: Compound 2 > Compound 1
Compound 2のIC₅₀値: 30.8 ~ 44.1 μM
- (4) Compound 2はヒトがん細胞の増殖を抑制した
Compound 2のLD₅₀値: 子宮癌33.0 μM、肺癌31.6 μM
- (5) Compound 1, 2はマウス耳の抗炎症活性を示した
活性の強さ: Compound 2 > Compound 1
Compound 2の抗炎症活性: 500 μg/耳で76.2%

特許

登録番号: 特許第4500951号 (出願番号: 特願2009-184255)

登録日: 平成22年4月30日 (出願日: 平成21年8月7日)

発明の名称: DNA合成酵素阻害剤

特許権者: 学校法人 神戸学院

発明者: 水品 善之、菅原 二三男、竹内 倫文、吉田 弘美

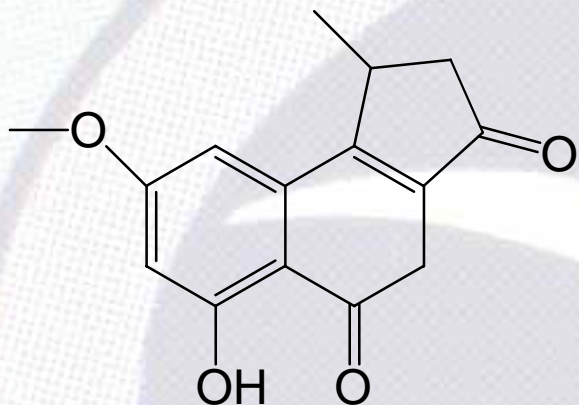
論文発表

Novel terpenoids, trichoderonic acids A and B isolated from *Trichoderma virens*, are selective inhibitors of family X DNA polymerases

Yasuhiro Yamaguchi, Yoshiyuki Mizushina *et al.*

***Bioscience Biotechnology, and Biochemistry* (2010) 74, 793-801.**

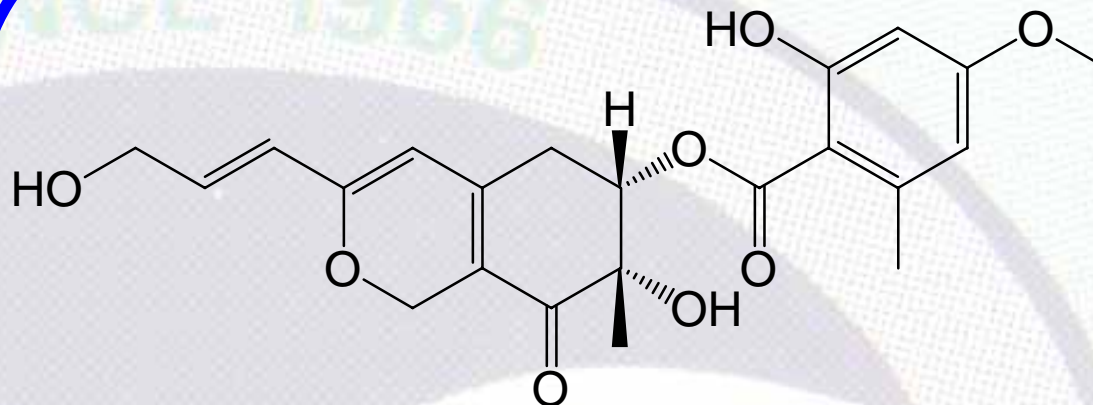
新規物質



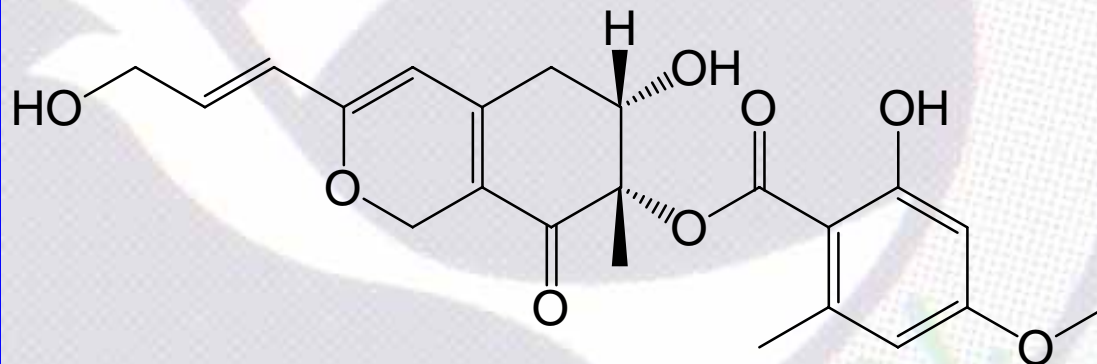
1-Deoxyrubralactone

東京都・八丈島の海藻
に寄生する
カビ(HJ33moB)株
の菌体由来

新規物質



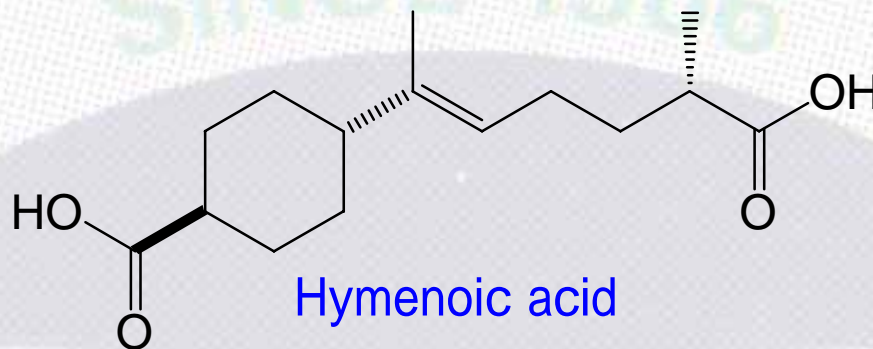
新規物質



Kasantosin A()とKasantosin B()

東京都・葛西臨海公園の海藻に寄生する
*Talaromyces*属のカビの菌体由来

新規物質



Hymenoic acid

東京都・八丈島の珊瑚に寄生する
*Hymenochaetaceae*属のカビの菌体由来

新規物質
～
の構造

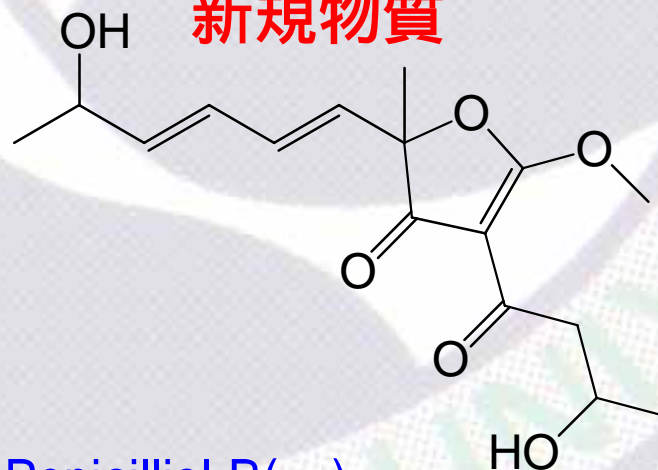
新規物質



Penicilliol A()とPenicilliol B()

宮崎県・日南港の苔に寄生する
Penicillium daleae K.M. Zaleskyの真菌の菌体由来

新規物質



HO

海洋微生物から見出した新規物質 ~ の 哺乳類由来DNA合成酵素 (pol) に対する50%阻害濃度

ファミリー	DNA 合成酵素 (pol)	海洋生物由来の新規物質 IC ₅₀ 値 (μM)					
A	ヒト pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	仔牛 pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200
B	ヒト pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200
	ヒト pol	>200	>200	>200	>200	>200	>200
X	ラット pol	11.9	27.3	60.1	>200	>200	>200
	ヒト pol	16.5	35.0	72.9	91.7	>200	>200
	仔牛 TdT	19.8	>200	>200	>200	>200	>200
Y	ヒト pol	66.0	>200	>200	>200	19.8	32.5
	マウス pol	67.1	>200	>200	>200	31.2	47.4
	ヒト pol	59.8	>200	>200	>200	47.9	47.9

pol阻害活性の選択性



X pol pol pol Y Y
Y pol pol

学術論文発表

新規物質

Mitsuki Naganuma, Yoshiyuki Mizushina *et al.*

1-Deoxyrubralactone, a novel specific inhibitor of families X and Y of eukaryotic DNA polymerases from a fungal strain derived from sea algae
Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008) 16, 2939-2944.

新規物質

Takuma Kimura, Yoshiyuki Mizushina *et al.*

Novel azaphilones, kasanosins A and B, which are specific inhibitors of eukaryotic DNA polymerases β and λ from *Talaromyces* sp.
Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008) 16, 4594-4599.

新規物質

Masayuki Nishida, Yoshiyuki Mizushina *et al.*

Hymenoic acid, a novel specific inhibitor of human DNA polymerase λ from a fungus of *Hymenochaetaceae* sp.

Bioorganic & Medicinal Chemistry (2008) 16, 5115-5122.

新規物質

Takuma Kimura, Yoshiyuki Mizushina *et al.*

Penicilliols A and B, novel inhibitors specific to mammalian Y-family DNA polymerases

Bioorganic & Medicinal Chemistry (2009) 17, 1811-1816.



従来技術とその問題点

有効な抗がん剤・抗炎症剤が少ない

pol分子種選択的阻害活性に基づく医薬品開発

新技術の特徴・従来技術との比較

野生の海洋生物 (海藻・珊瑚・苔など)



培養技術が不完全

大量安定供給が不可能

寄生

↓
類似の代謝産物(?)

海洋微生物 (カビ・細菌など)

培養技術が確立

大量安定供給が可能



海洋微生物は、野生の海洋生物の代替になる可能性



想定される用途

- Trichoderonic acid Bの抗がん剤開発
 - Trichoderonic acid AとBの抗炎症剤開発
 - 海洋微生物を探索源とする医薬品開発
-

実用化に向けた課題

- Trichoderonic acid AとBの化学合成法を開発中である。
- Trichoderonic acid AとBの安全性試験を実施する必要がある。
- Trichoderonic acid AとBの医薬品開発へ向けた臨床試験が必要である。



神戸学院大学 想定される業界

- ・ 利用者・対象
医薬品メーカー
- ・ 市場規模
未定

企業への期待

- ・ Trichoderonic acid AとBの抗がん剤・抗炎症剤開発
- ・ 海洋微生物のライブラリー化とそれを探索源とする
医薬品開発

お問い合わせ先

神戸学院大学 国際交流・研究支援センター
研究支援グループ

TEL 078-974-4297

FAX 078-974-2243

e-mail kenkyu@j.kobegakuin.ac.jp