

受理年月日	受理番号

## 帯広畜産大学原虫病研究センター共同研究報告書

令和元年 5月20日

採択番号	30-共同-15		
研究部門	感染免疫研究部門	原虫病研究センター 内共同研究担当教員	菅沼啓輔
研究課題名	抗トリパノソーマ活性を持つ海洋生物由来リード化合物の探索と作用機序解明		
研究代表者	(ふりがな) 氏名	所属部局等・職名	
	なかお よういち 中尾 洋一	早稲田大学理工学術院・教授 研究統括	
研究分担者	いとう しゅん 伊藤 駿	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2年 活性化合物の精製・構造決定	
	たきぐち ありさ 滝口 ありさ	早稲田大学大学院先進理工学研究科・修士 2年 活性化合物の精製・構造決定	
	すがぬま けいすけ 菅沼 啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター・ 抗トリパノソーマ活性試験	
研究期間	平成30年 4月 1日 ~ 平成31年 3月31日		
目的・趣旨	<p>トリパノソーマ症は病状が進行すると死に至り得る深刻な感染症だが、既存薬は副作用が強いため新たな治療薬の開発が望まれている。申請者は独自に採取・収集してきた海洋生物抽出物ライブラリーを所有しており、抗リーシュマニア活性を持つ新規化合物クリスタキセニン (Ishigami et al., <i>J. Org. Chem.</i>, 2012) など様々な新規天然化合物を単離、構造決定してきた。有望な天然化合物については将来的な創薬を目指し、合成研究も進めている (Fumiyama et al, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i>, 2016 など)。</p> <p>先行研究において、貴センター菅沼啓輔特任助教が開発した試験管内トリパノソーマ培養系を用いてスクリーニングを実施した結果、強力な抗トリパノソーマ活性を示す抽出物サンプルを複数見出した。このうち山口県青海島産カイメンから活性を指標に精製を進めた結果、5<math>\alpha</math>,8<math>\alpha</math>-Epidioxyergosta-6,24(28)-dien-3<math>\beta</math>-ol (IC<sub>50</sub>=41ng/mL) を同定している。</p> <p>そこで本研究では、新たなトリパノソーマ治療薬のリード化合物を得ることを目的とし、これまでに得たヒットサンプルから活性本体の更なる探索を行い、リード化合物候補を充実させる。さらに、リード化合物の標的タンパク質の同定を行って作用機序を解明し、新たな治療薬開発のための知見を集積させる。</p>		

受理年月日	受理番号

<p>研究経過の概要</p>	<p>本研究では、<i>in vitro</i> アッセイにおける抗トリパノソーマ活性を指標にした活性化化合物の単離・同定を継続して行った。加えて、研究代表者が保有する海洋生物抽出物ライブラリーに対して、大規模なスクリーニングを実施した。</p> <p>スクリーニングで抗トリパノソーマ活性が認められた海洋生物をメタノールで抽出した後、溶媒分画、カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製を行った。得られた画分は 96 ウェルプレートで培養した <i>Trypanosoma congolense</i> に添加し、生細胞測定試薬を用いて抗トリパノソーマ活性を算出した。最終的に単離された活性化化合物について、MS スペクトル、H-NMR、C-NMR、ならびに各種二次元 NMR スペクトル (COSY、NOESY、TOCSY、HMBC、HMQC など) を測定し、スペクトルデータを解析することで構造を同定した。</p>
<p>研究成果の概要</p>	<p>貴センター菅沼啓輔特任助教との共同研究により、研究代表者が保有する海洋生物抽出ライブラリー 5622 サンプル (脂溶性画分及び水溶性画分各 2811 サンプル) に対して抗トリパノソーマ原虫活性スクリーニングを行った。同時にトリパノソーマ原虫に対する選択的活性を評価するために、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞株およびマウス白血病細胞株 P388 に対する細胞毒性試験も行った。</p> <p>この結果、脂溶性画分 (サンプル濃度 0.25<math>\mu</math>g/ml) 90 サンプル、水溶性画分 (サンプル濃度 1.5625<math>\mu</math>g/ml) 35 サンプルに顕著な抗トリパノソーマ活性が認められ、このうち脂溶性画分 5 サンプルと水溶性画分 4 サンプルに高選択的な抗原虫活性を見出した。</p> <p>この結果を受けて現在活性本体の単離・同定を行っている。このうち屋久島新曾根産未同定海綿抽出物を ODS フラッシュカラムクロマトグラフィー及びシリカゲルオープンカラムクロマトグラフィーにより分画後、逆相 HPLC によって精製を行ったところ、新規化合物を含む 7 つの化合物の単離・同定に成功した。これらの化合物のうち 2 つの化合物において抗トリパノソーマ活性が認められ、その IC<sub>50</sub> 値は 1.17 および 1.61<math>\mu</math>g/mL であった。</p>
<p>研究成果の発表</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物の探索、 日本ケミカルバイオロジー学会第 13 回年会、2018.06.13</li> <li>2. 伊藤駿、万場昌子、菅沼啓輔、中尾洋一、 抗トリパノソーマ活性を有する海洋天然化合物、 第 13 回化学生態学研究会、2018.06.22</li> </ol>