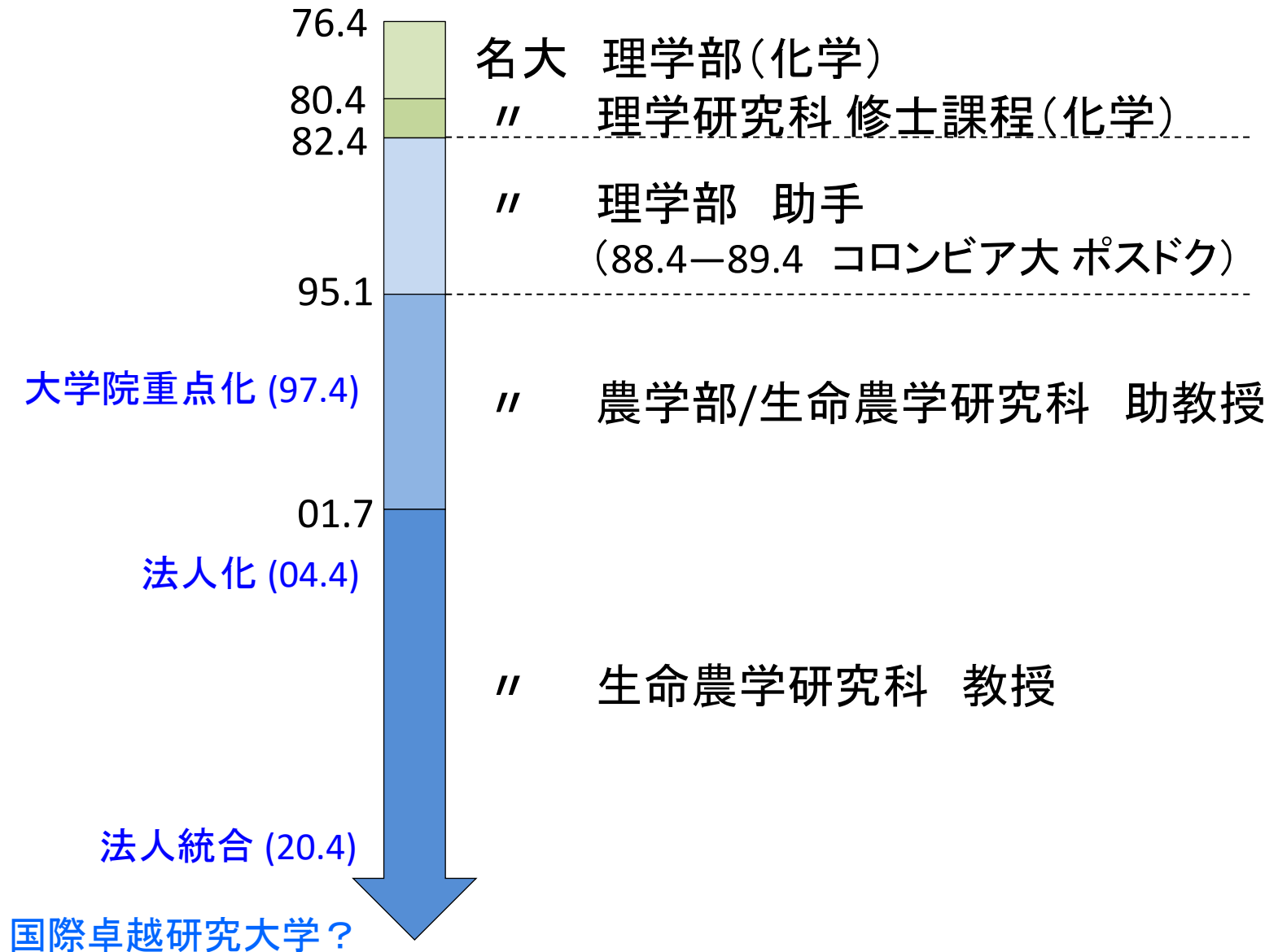


生命農学研究科 定年退職記念講演会
2023年2月17日

私の天然物探索40年

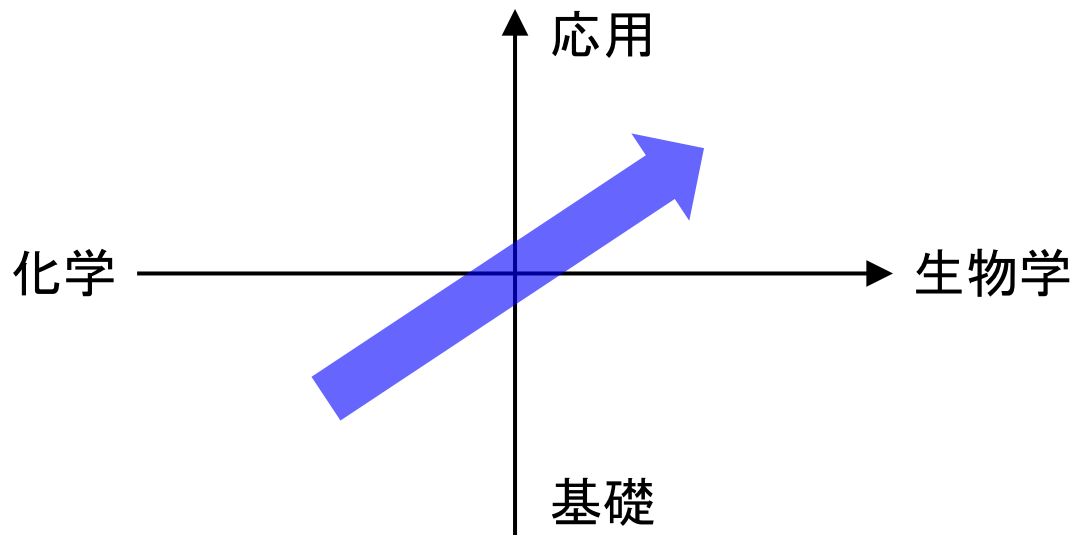
生物活性分子研究室
小鹿 一

経歴

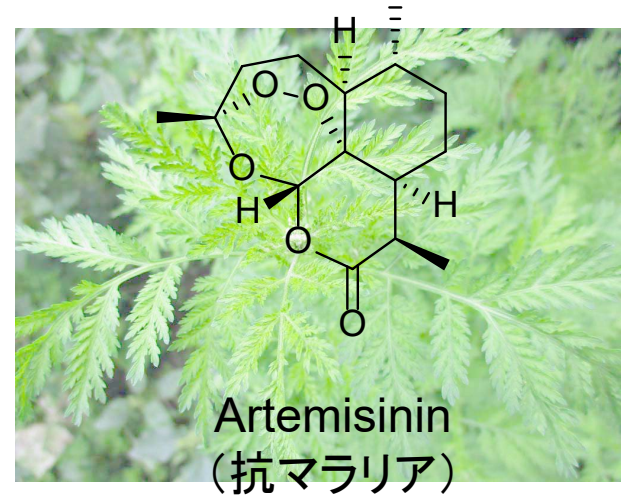
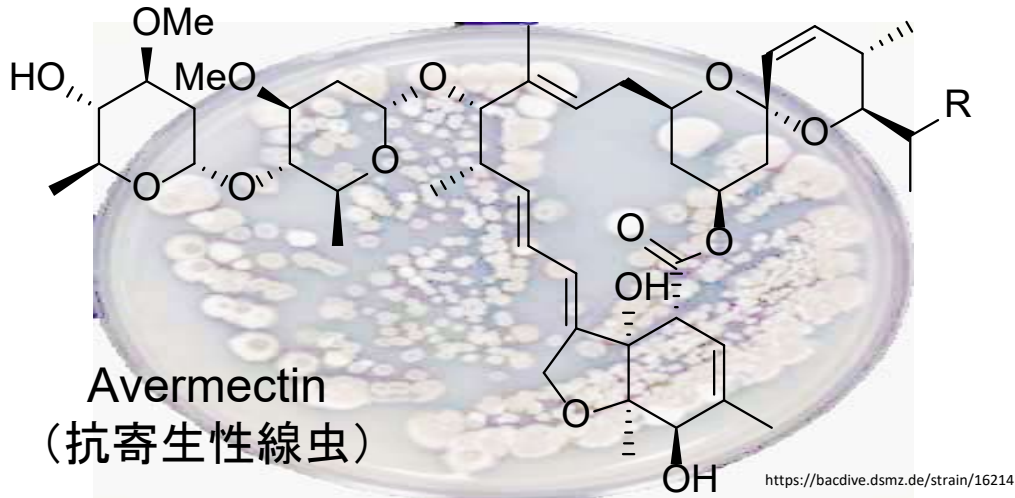


天然物 Natural Products

- 生物が作る有機化合物
- 狭義の二次代謝産物
- 生物活性を示すことも
- 応用への展開(医薬・農薬など)
- 14件のノーベル賞
1910年(テルペンおよび....)～2015年(抗寄生線虫抗生物質)

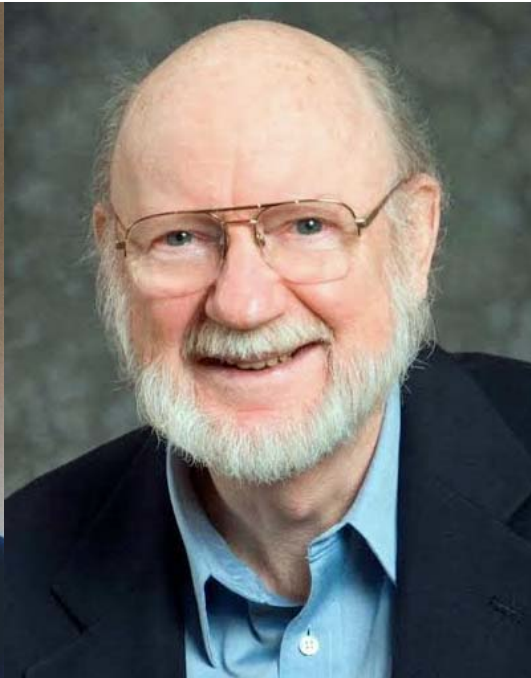


2015年ノーベル生理学・医学賞 「寄生虫感染症に対する新規治療物質に関する発見」



<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00359993>

Satoshi Omura



<https://www.ria.ie/william-cecil-campbell>

William C. Campbell



Wikipedia

Tu Youyou

第1話 植物の天然物

～ワラビの発がん物質～
(理学部 1984-1995年)



ワラビによる家畜被害

急性ワラビ中毒、
慢性血尿症



[https://www.eahp.eu/sites/default/files/files/03_02a_Biopharmaceuticals_for_immunological_intervention_jiskoot_\(NXP\).pdf](https://www.eahp.eu/sites/default/files/files/03_02a_Biopharmaceuticals_for_immunological_intervention_jiskoot_(NXP).pdf)

進行性網膜変性



<http://www.gov.pe.ca/photos/original/4HSheepLG.pdf>

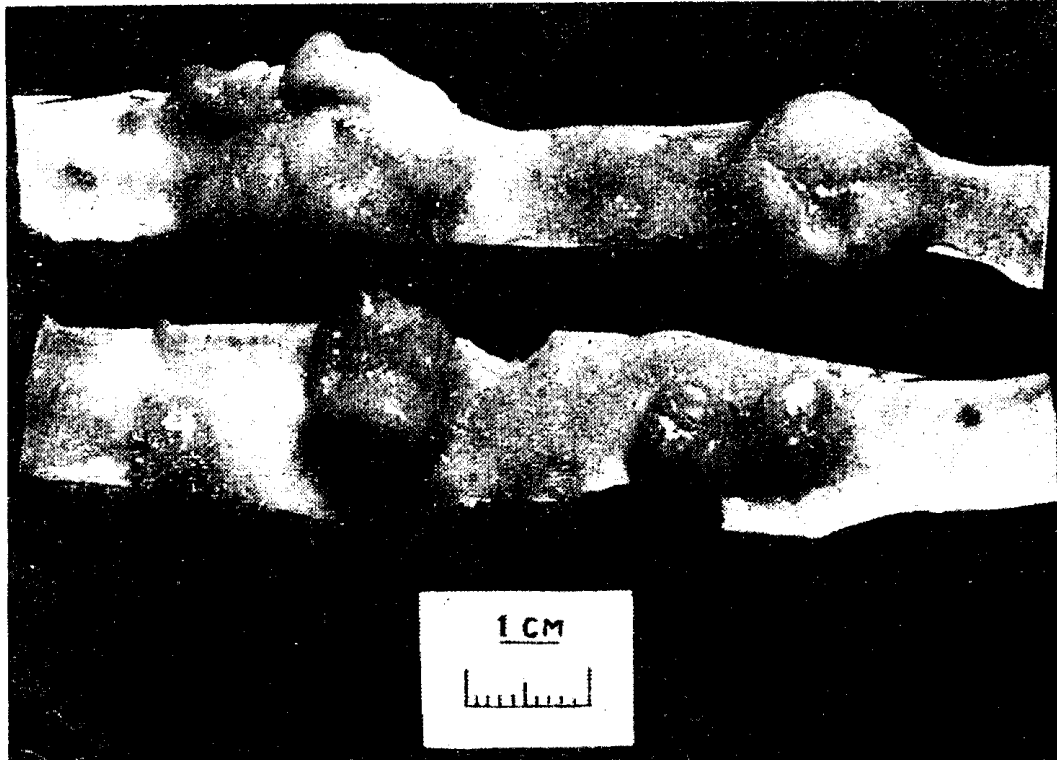
腰ふら病
(VB₁欠乏症)



<http://www.njpetsitting.com/gallery/0030.jpg>

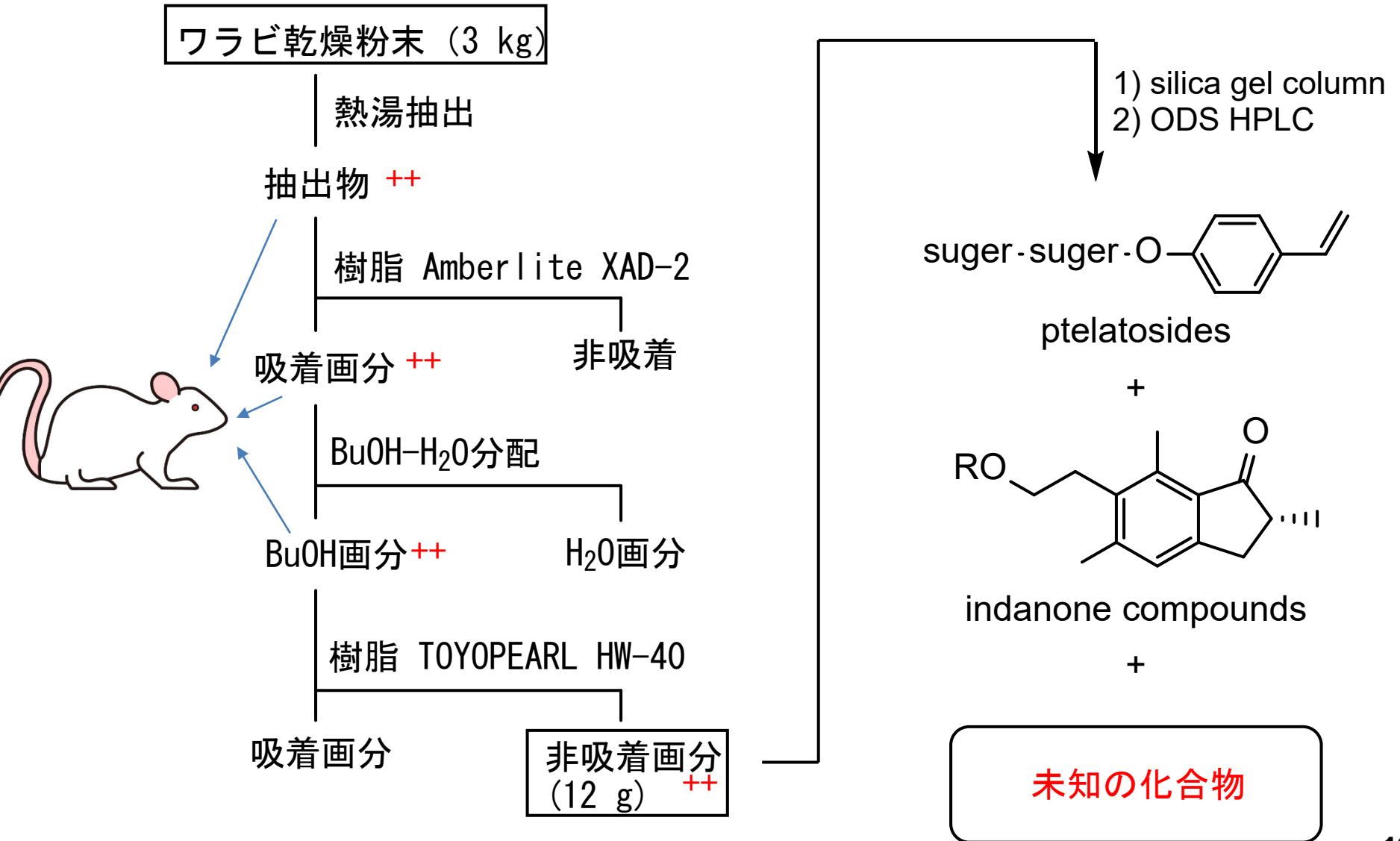
"Carcinogenic Activity of Bracken"

I. A. Evans and J. Mason, *Nature* (1965)

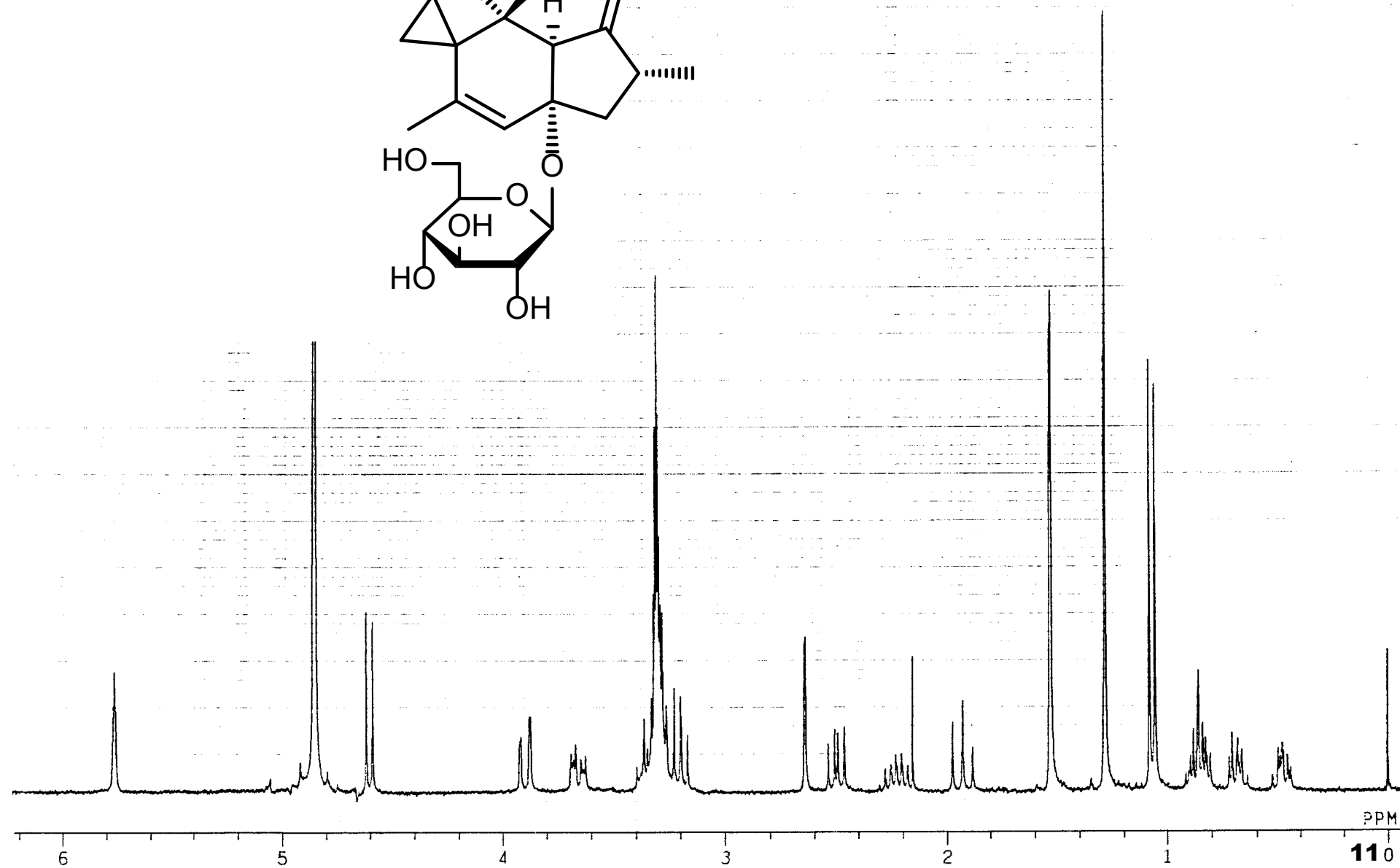
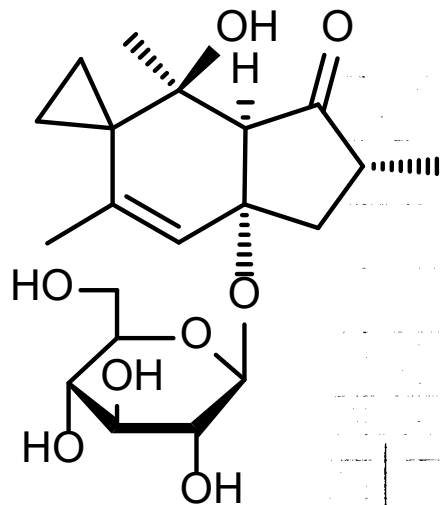


ラット発癌部位： 回腸、盲腸、膀胱
原因究明は困難： 変異原性テスト陰性

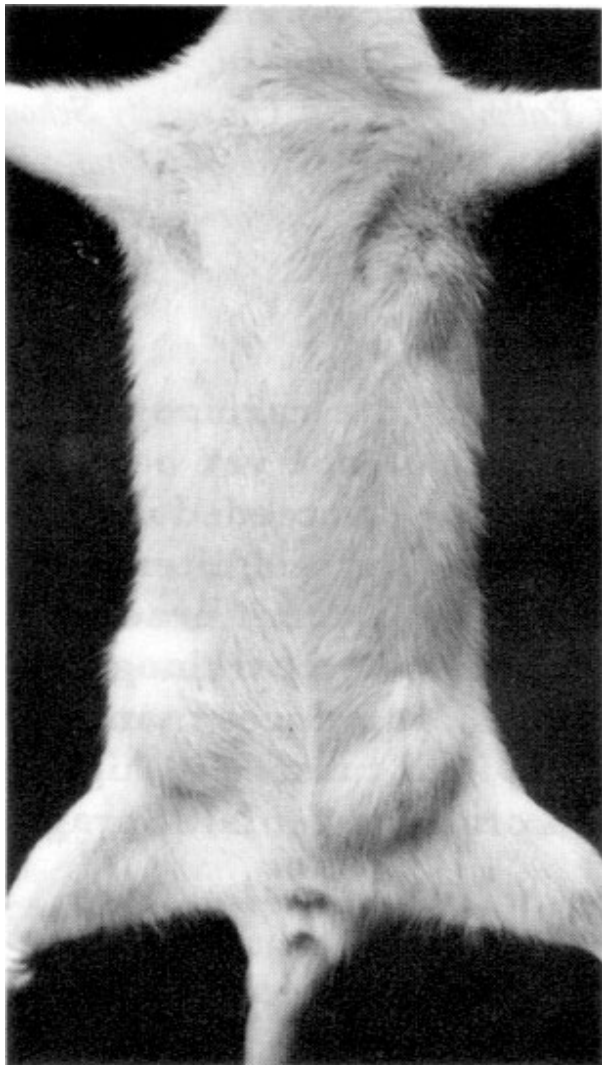
ワラビの抽出と分画



Ptaquiloside



Ptaquilosideの発がん性



600 mg/rat (210 days)

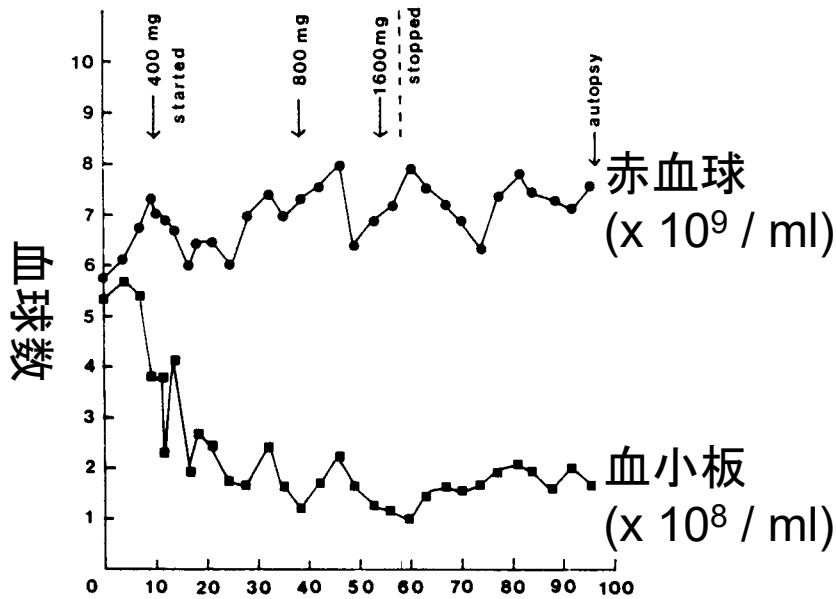


牛の急性ワラビ中毒の証明

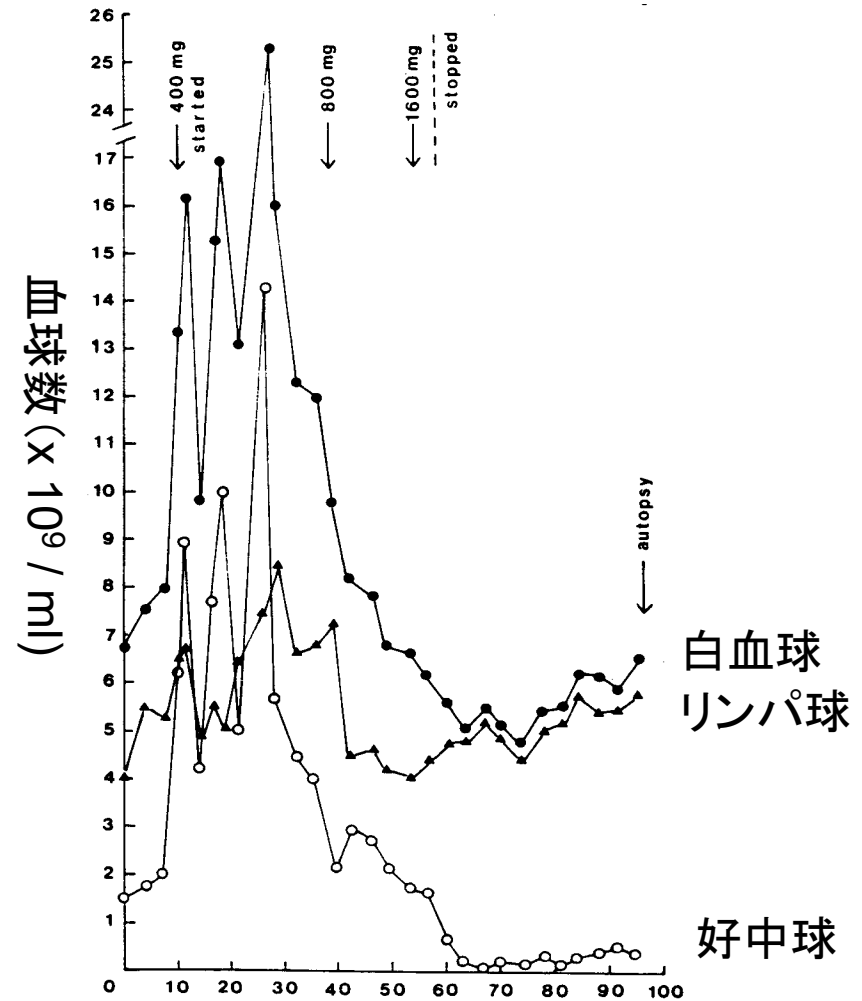
投与量:

27.2 g/137 kg 仔牛 (57 days)

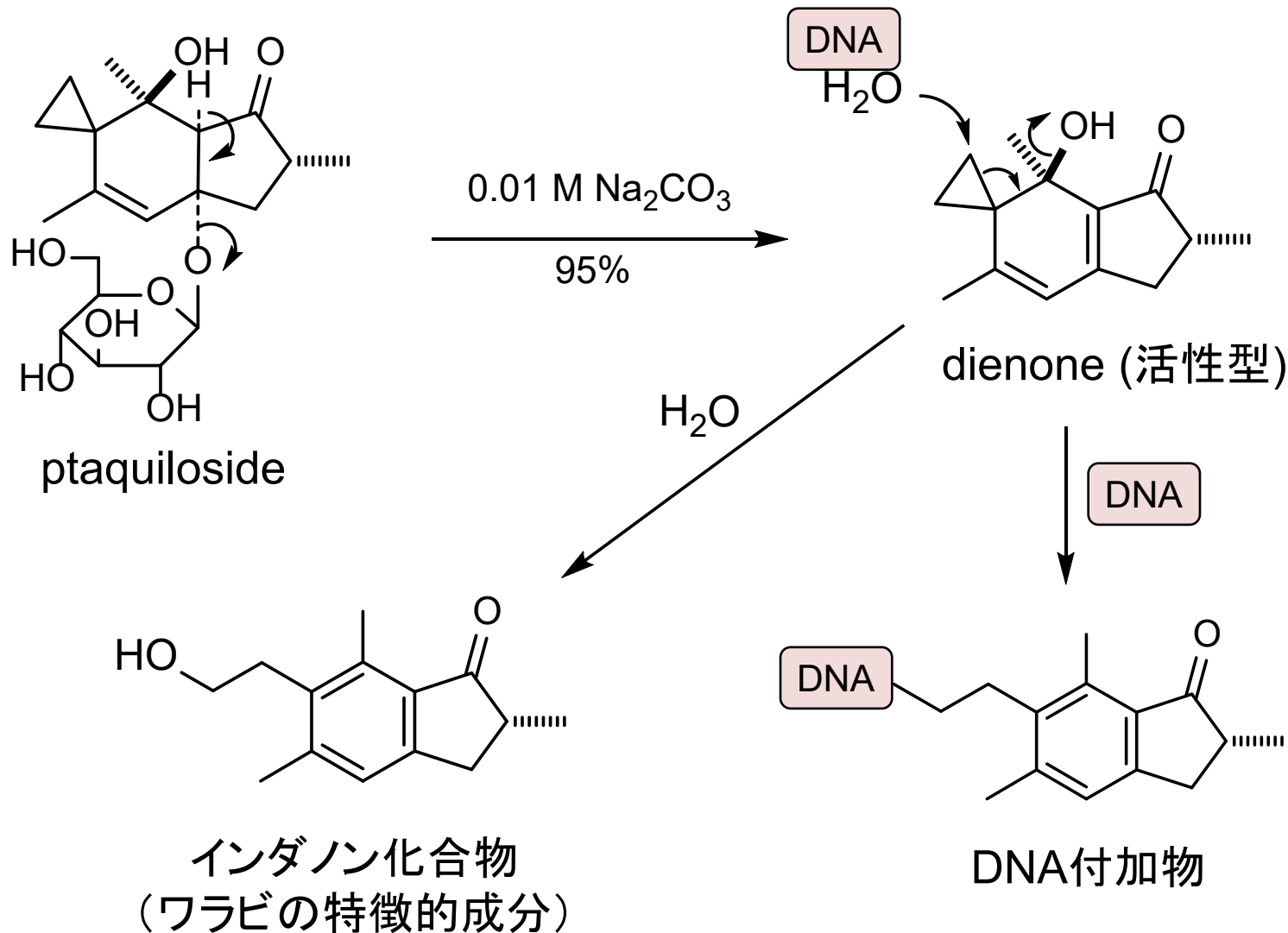
赤血球・血小板



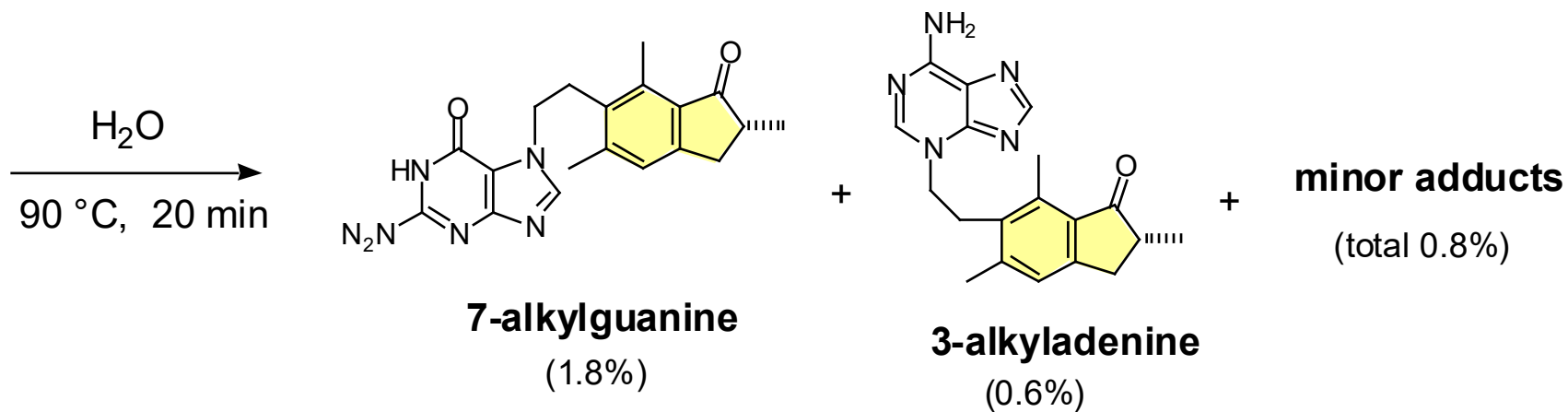
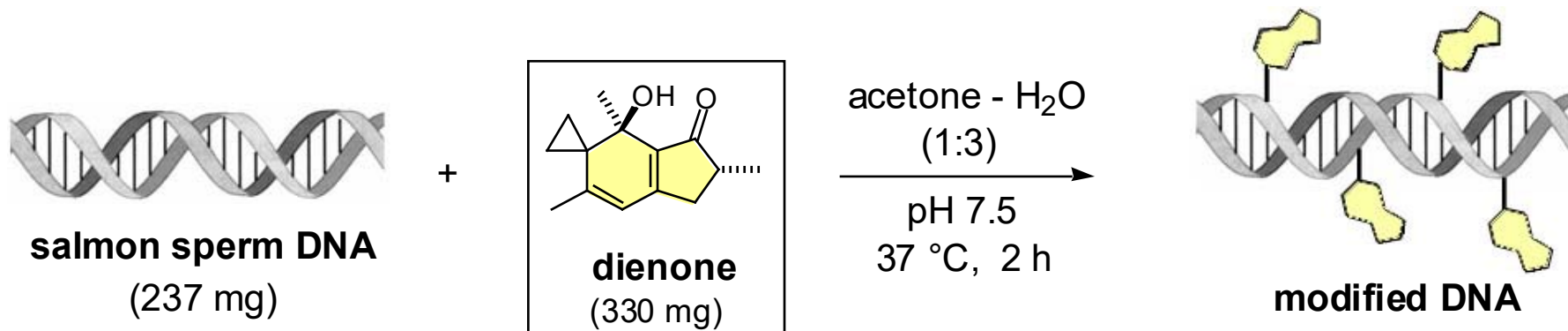
白血球



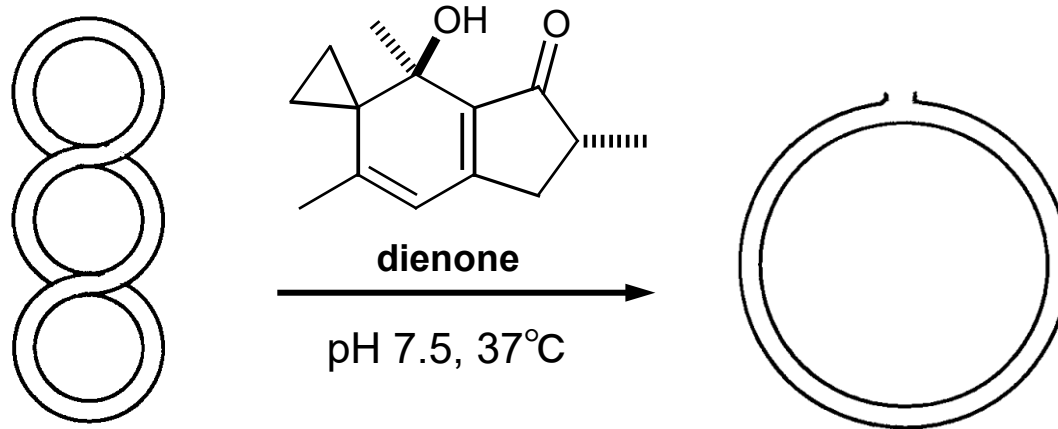
Ptaquilosideの発がん機構



核酸のアルキル化(1)

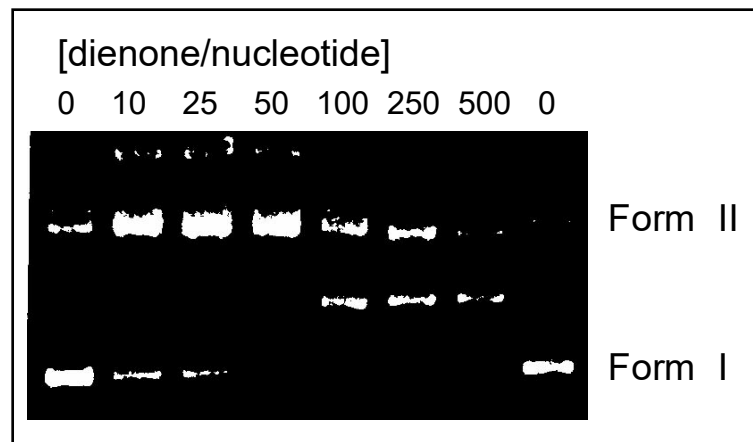


核酸のアルキル化(2)



Plasmid DNA
(Form I)

Form II



その後：～健康・環境へのリスク研究～

- 牛乳、肉

摂取量の $8.6 \pm 1.2\%$ が牛乳に移行(含量10 mg/0.5 L)

(*Nature*, **1996**, 382, 587)

- 人の癌

ワラビ摂取と食道癌・胃癌に相関関係

(*IARC Sci. Public.* **2002**, 156, 379–380)

- 環 境

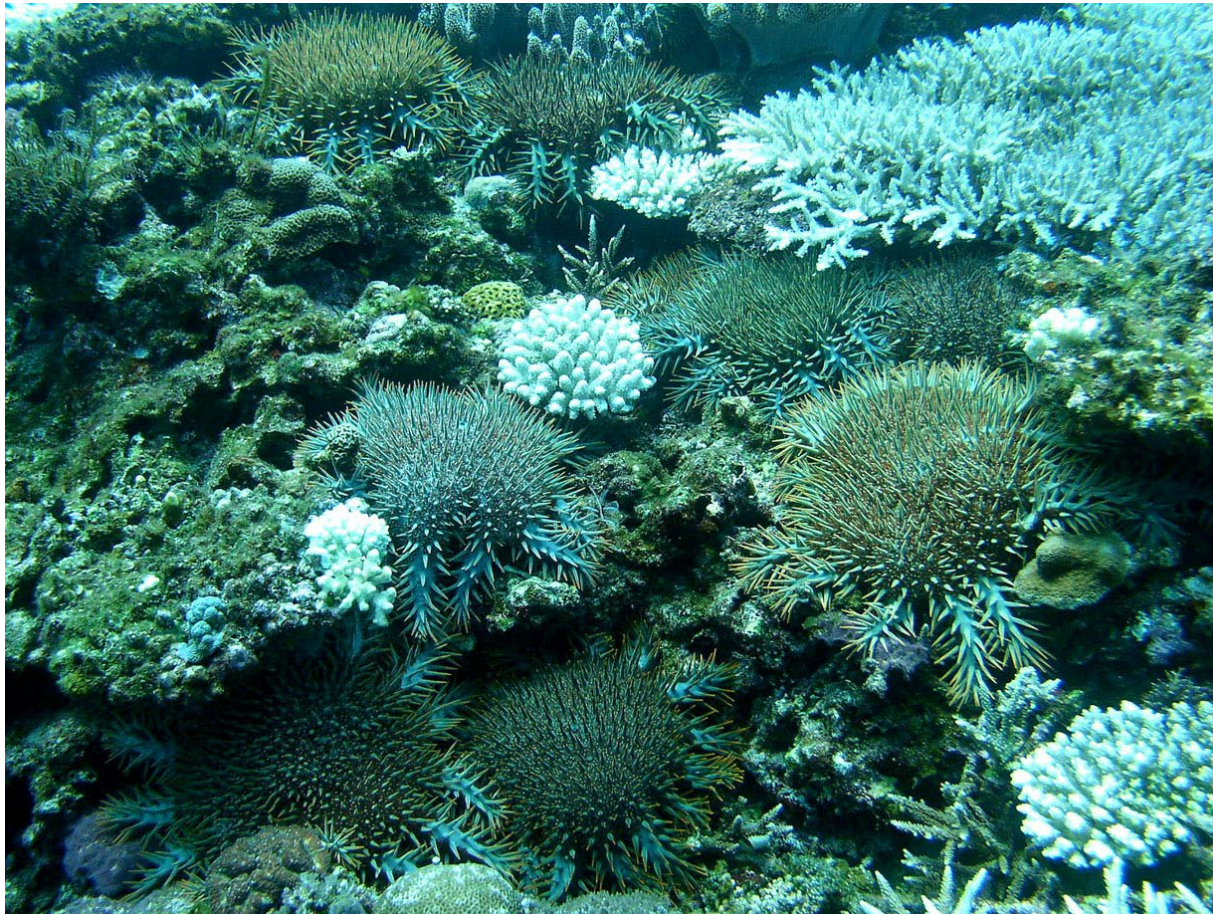
ワラビ生育地の土壌、地下水に検出

(*Chemosphere*, **2003**, 51, 117–127;

J. Agric. Food Chem. **2008**, 56, 9848–9854)

第2話 海洋天然物

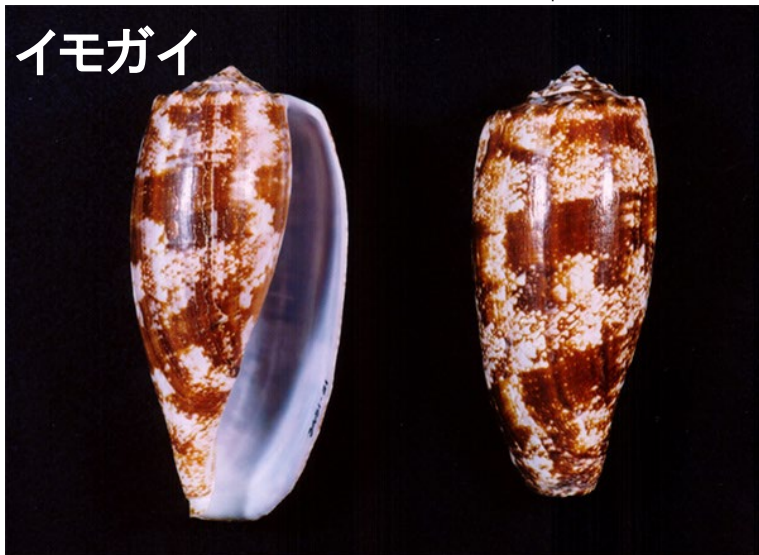
～ヒトデ由来の記憶改善ステロイド配糖体～
(農学部 1995年～)



薬になった海洋天然物

<https://chulachula.info/333.html>

イモガイ



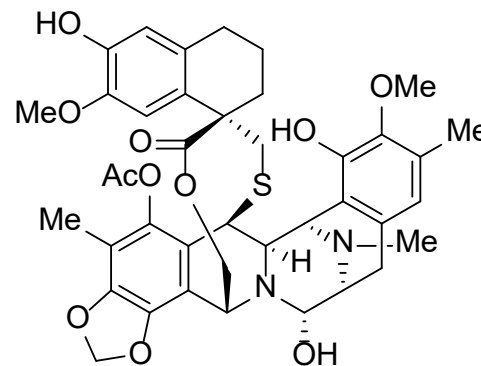
https://www.wipo.int/wipo_magazine/en/2009/01/article_0008.html

ホヤ



ω -conotoxin VIIA
(Ziconitide/Prialt®)

認可: 2004年 (USA)
適用: 疼痛緩和
(脊髄損傷後慢性痛)



ecteinacidin-743 (Yondelis®)

認可: 2007年 (EU)
適用: がん (軟部組織肉腫)

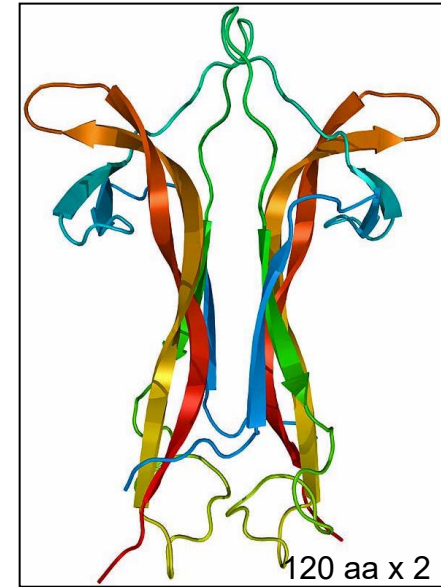
神経成長因子の様な天然物を探す

神経成長因子(NGF)

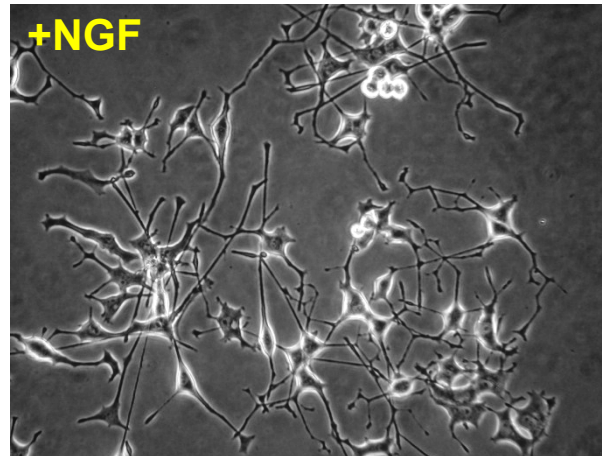
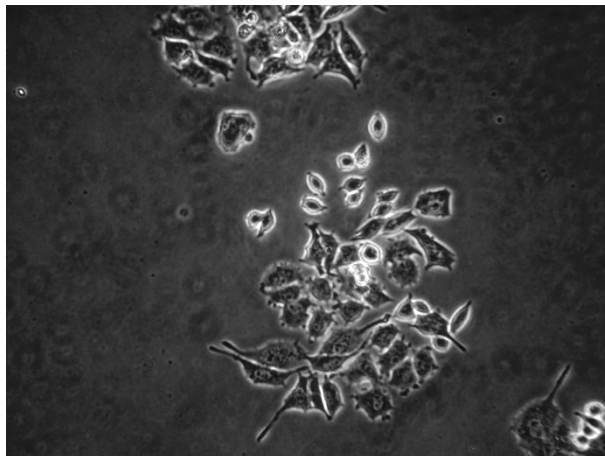
- 神経の成長、分化、維持
- アルツハイマー病の治療効果
(脳内への直接注入など)



NGF代替物質の探索



PC12 cells(神経細胞ではないがNGFに応答)



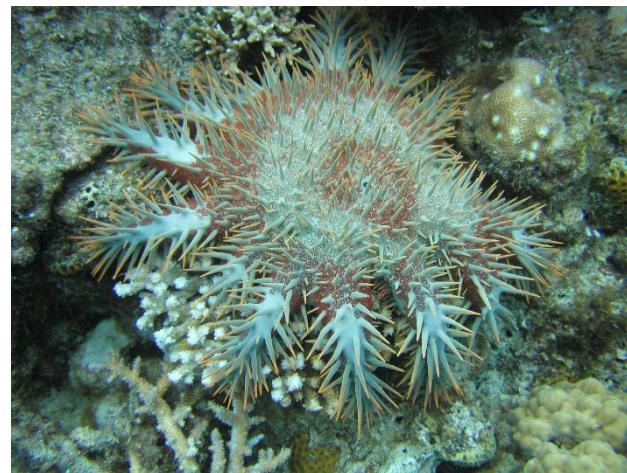
分離・精製

オニヒトデ *Acanthaster planci*

- MeOH extraction
- ODS column

突起伸長活性 (4.76 g)

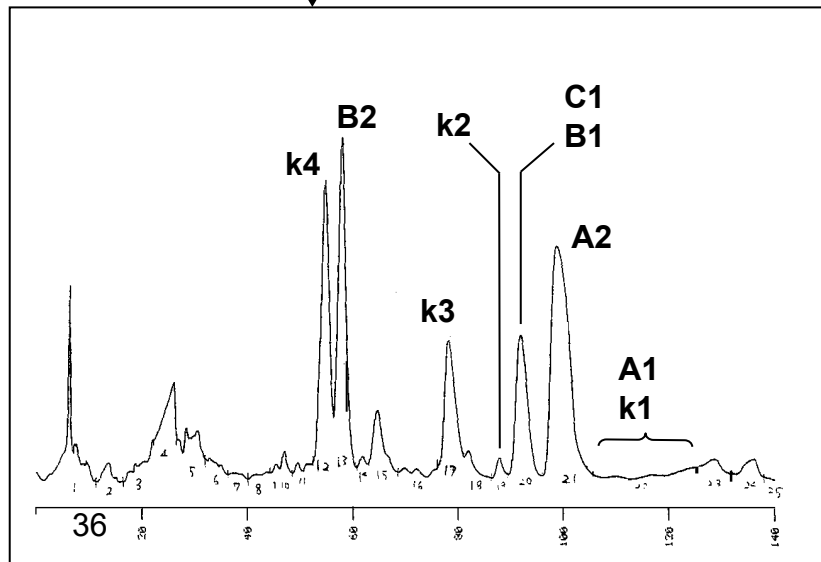
- Silica gel column



阿嘉島臨海研究所(沖縄)提供

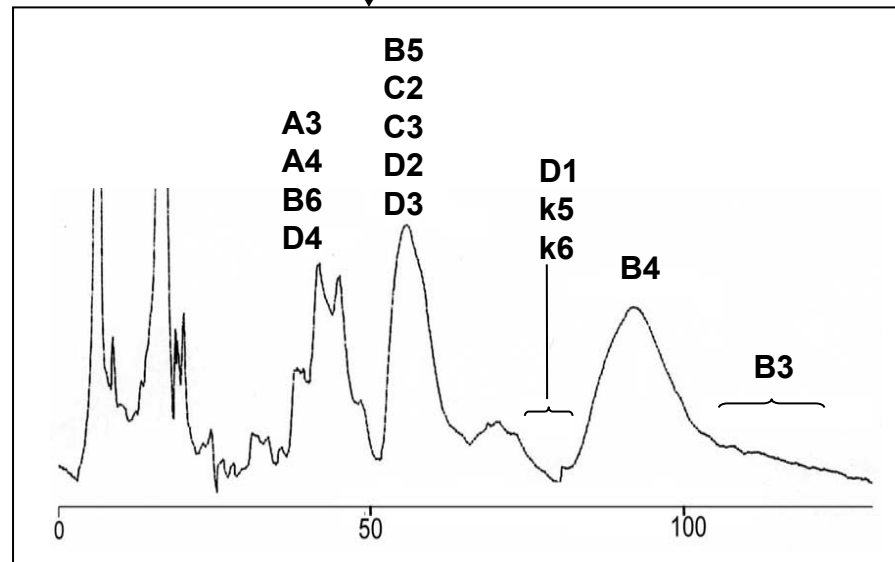
活性区 A (277 mg)

HPLC

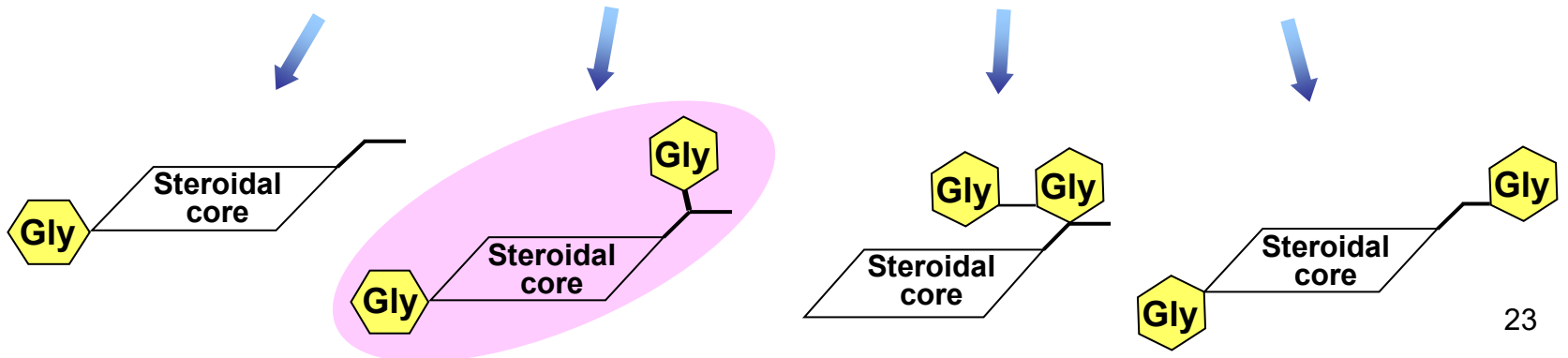
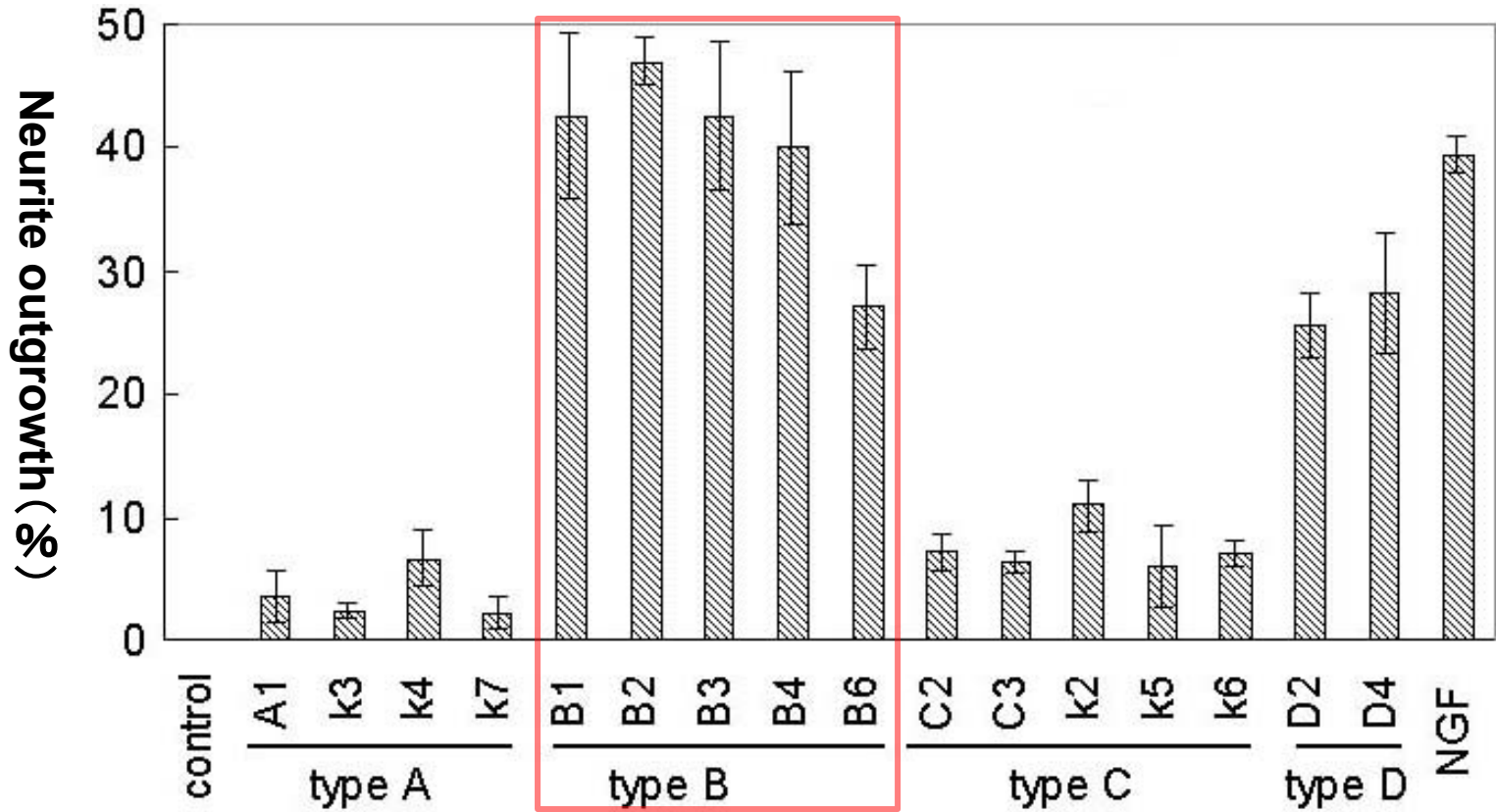


活性区 C (930 mg)

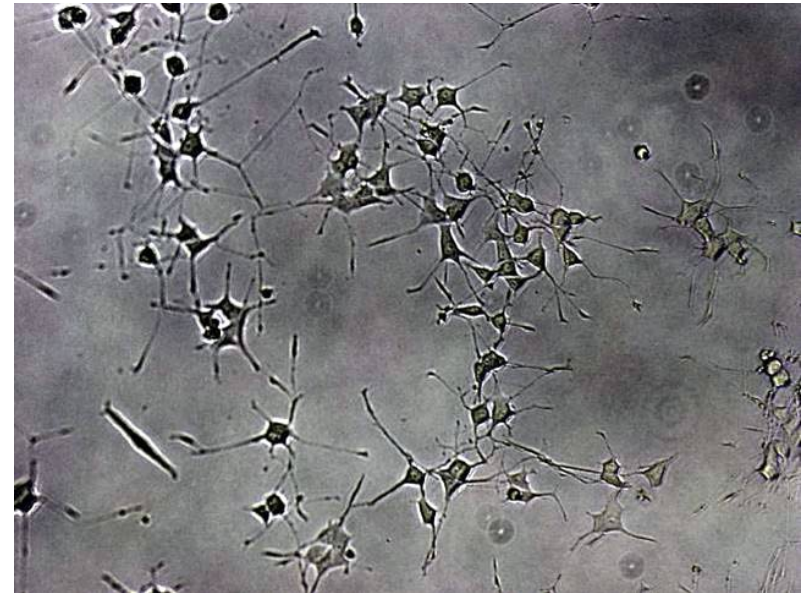
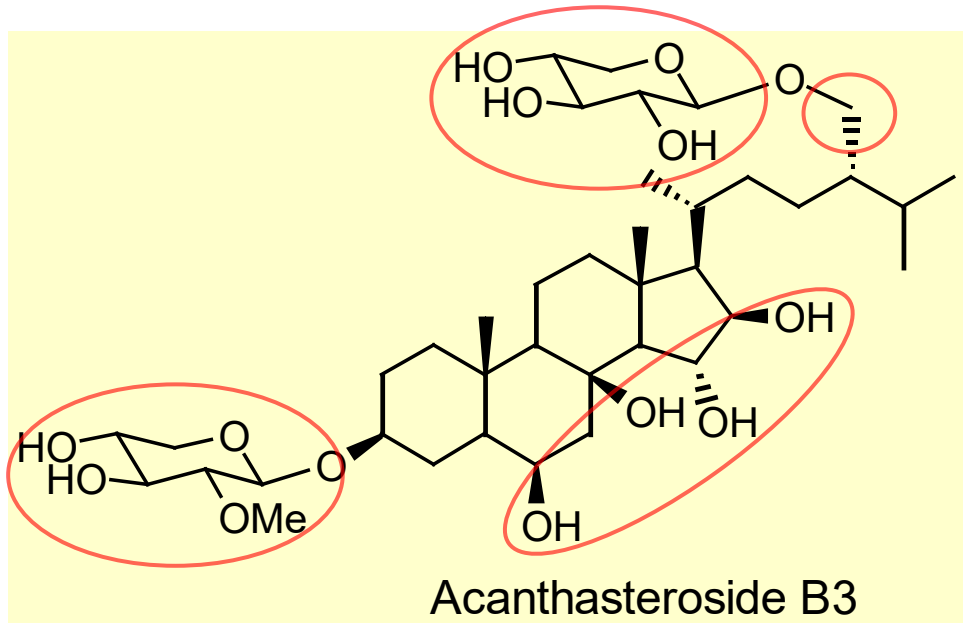
HPLC



SAR (構造活性相関)



Acanthasteroside B3



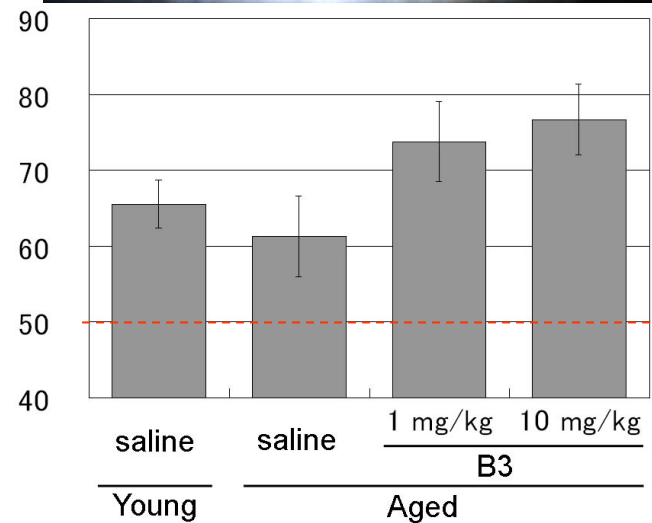
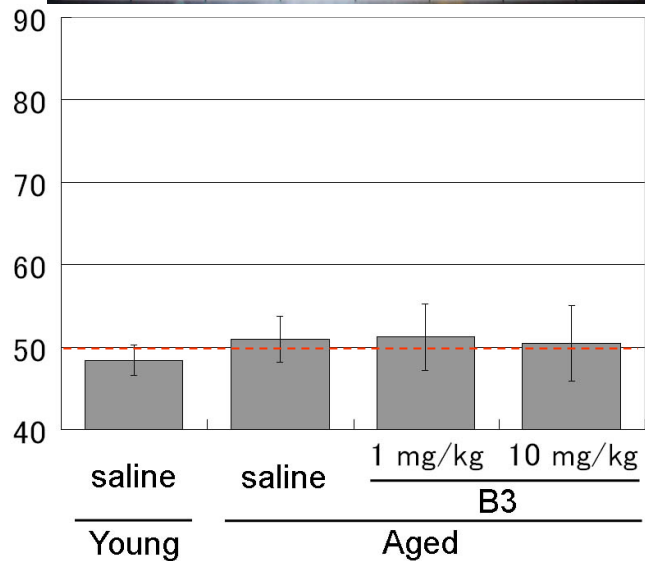
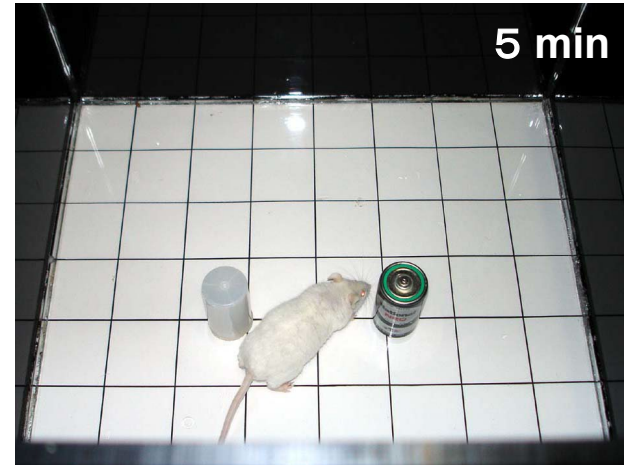
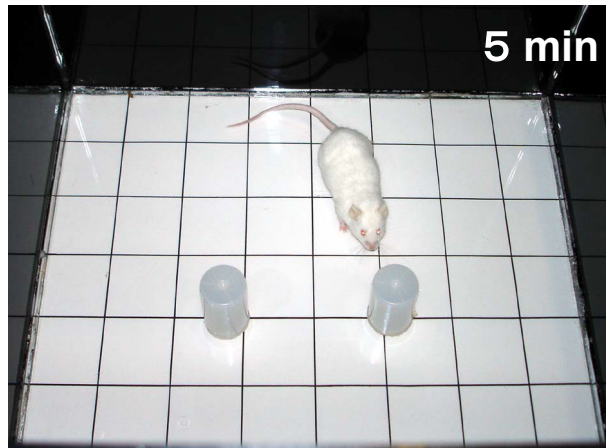
PC12 cells (B3: 40 μ M)



動物の中樞神経系でも同様に働くのか？

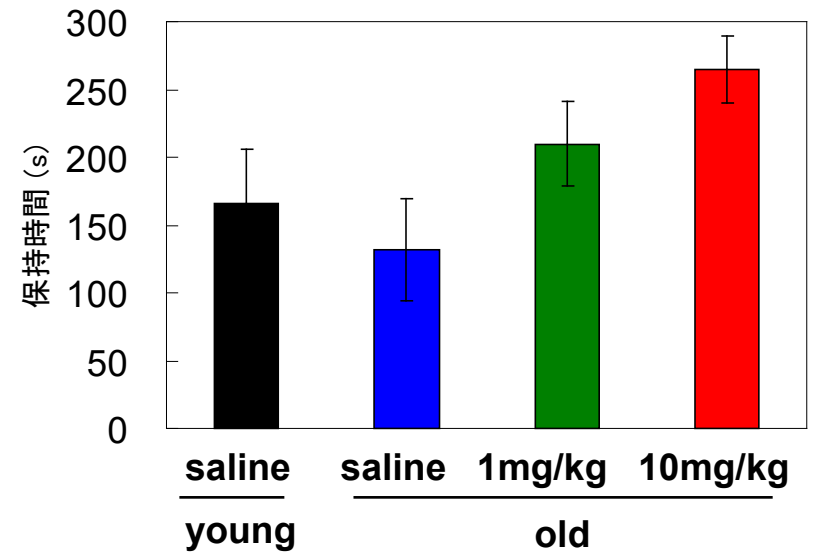
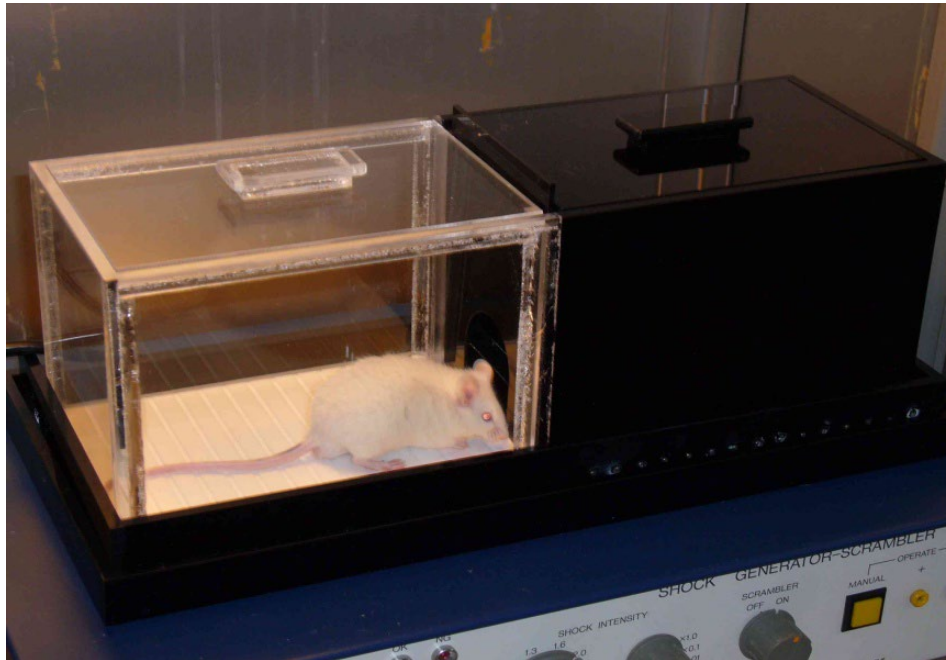
老化マウスに対する認知性向上(2)

新規物体認知テスト (短期記憶)



老化マウスに対する認知性向上(3)

受動的回避テスト(長期記憶)



生命つなぐ 新薬の宝庫

地球異変

サンゴからの警告

⑤

沖繩のサンゴ礁で駆除されたオニヒトデをバラバラに砕き、メタノールに浸す。その茶色いスーブをフィルターで濾過し、精製を繰り返す。

名古屋大学の小鹿一教授（天然物化学）の実験室では、オニヒトデから新薬の候補を抽出する作業が進められている。この抽出物を使った実験で、老化したマウスの記憶力改善に一定の効果

サンゴを調査する富野小学校の児童たち。干潮の時間にあわせ、学校近くのサンゴの健康状態をチェックしている。沖繩県石垣市で、恒成利幸撮影

がみられた。研究グループは、アルツハイマー病の治療薬開発につながるのでは、と期待する。海洋生物を使った医薬

品開発は、50年代にサンゴ礁域のカイメンから見つかった特異な化合物がきっかけだった。その後、抗がん剤や抗ウイルス剤が生まれた。04年にはサンゴ礁にすむイモガイ類から開発された鎮痛剤が、米国で承認された。小鹿さんも複数の特許を出願している。

新薬の開発には時間と金がかかる。製薬会社には手を引くところも出ている。だが、北海道大学の伏谷伸宏客員教授（海洋天然物化学）は「有用

物質の資源としてサンゴ礁の魅力が減ったわけではない」という。

サンゴ礁の面積は、世界の海の約0・2%にすぎない。だが、海産魚種の4分の1がそこに生息するといわれる。新薬の宝庫としての価値はごく一部だが、サンゴの役割を私たちに伝えてくれるいい例だ。

沖繩県石垣市の富野小学校では、3～6年の児童7人が、近くの海岸で育つサンゴに名前を付け、「マイサンゴ」とし

て観察を続けている。

中原康成教諭(51)は「サンゴがなくなると、いろんな生物がいなくなると人間にも影響が出るんだ」と説明する。

今年2日、観察していた子どもたちが「私のサンゴが白くなっている」と次々に声を上げた。干潮時の礁内の水温は37度。白化が始まっていた。

周辺の浅瀬では珍しいことではないが、高水温が続けば死滅することもある。子どもたちはサンゴの回復を祈りながら観察を続けている。

編集委員・石井徹
山本智之

おわり



朝日新聞2007年7月6日(夕刊)

NHK名古屋「金とく」(2010年4月2日)



第3話 微生物の天然物

3-1. 粘液細菌の抗生物質

3-2. 疫病菌の交配ホルモン

(農学部 1995～)

抗生物質の生産者

Basidiomycetes (1.5)

Algae (0.3)

粘液細菌 Myxobacteria (1.7)

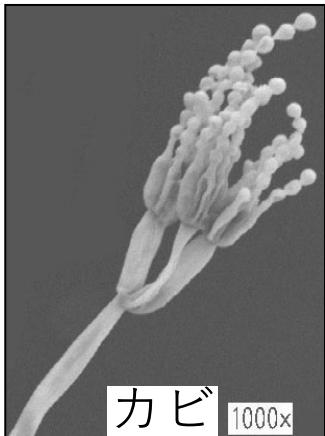
Yeast (0.0)

Others (1.5)

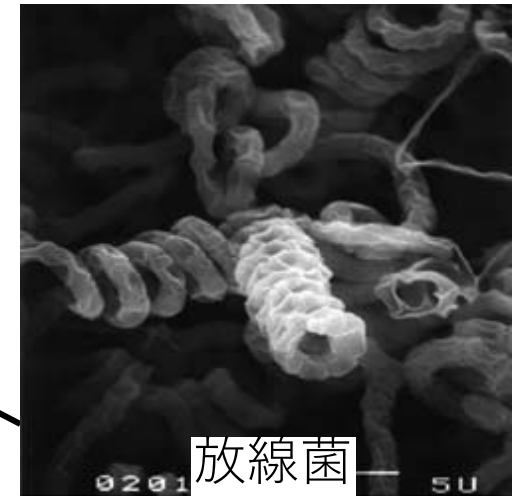
Bacteria (7.9)



Fungi (21.1)



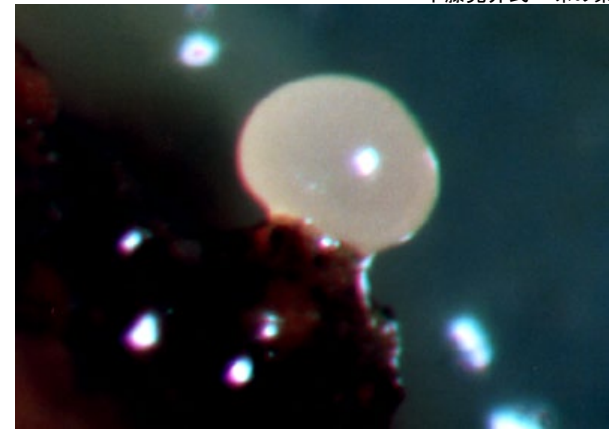
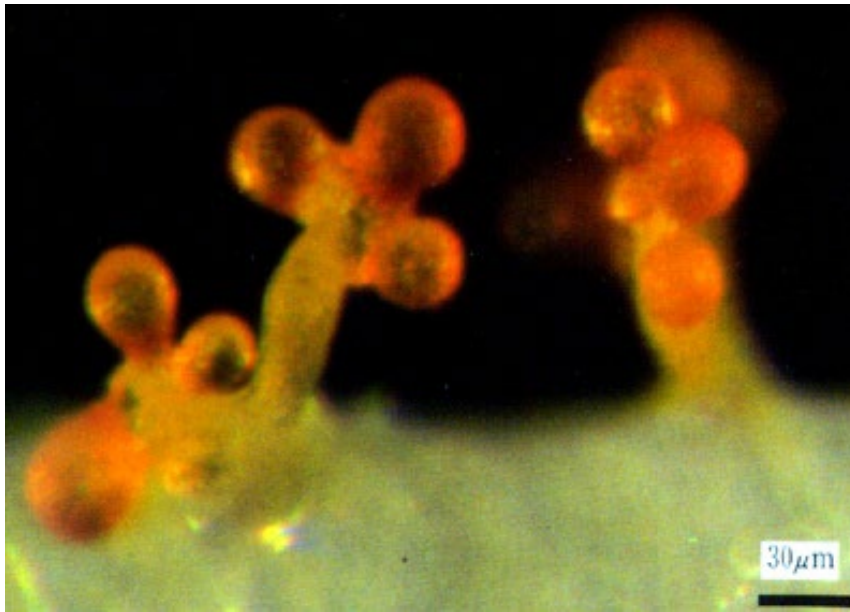
Actinomycetes (60.0)



財団法人日本抗生物質学術協議会データベースより (1948-1999年発見)

粘液細菌の多様な子実体

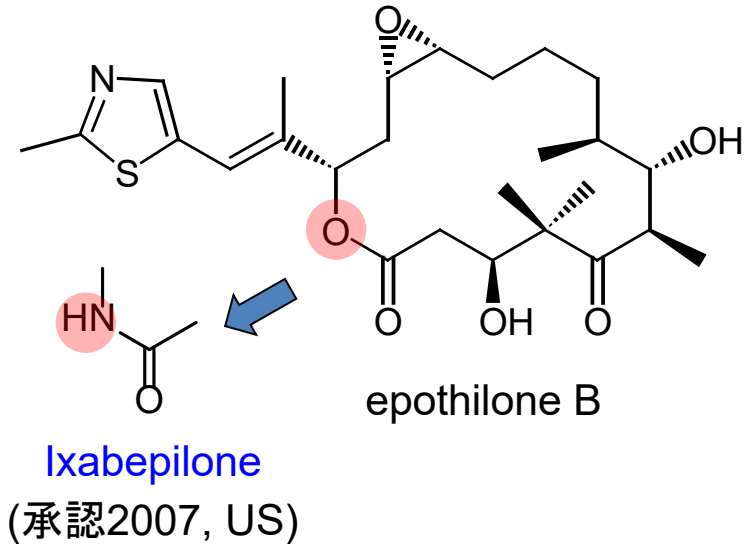
不藤亮介氏=味の素株式会社(当時)提供



Epothiloneとpaclitaxel

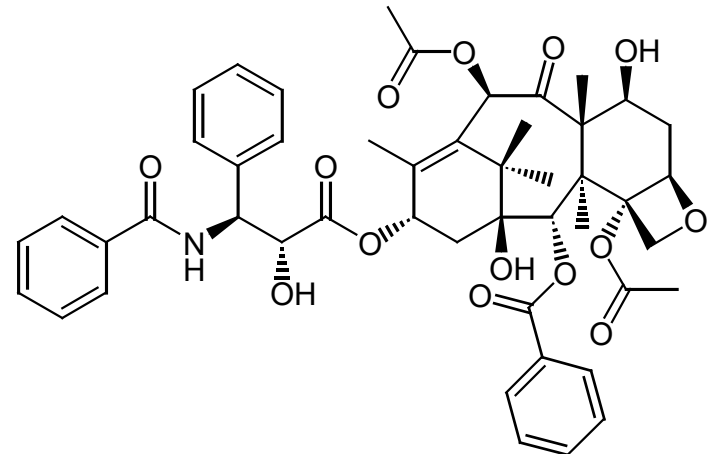
抗がん剤 Epothilone類

- *Sorangium cellulosum* (1993)
- 細胞分裂の阻害
(チューブリン安定化)
- 高い水溶性
- 培養による量産



抗がん剤 Paclitaxel

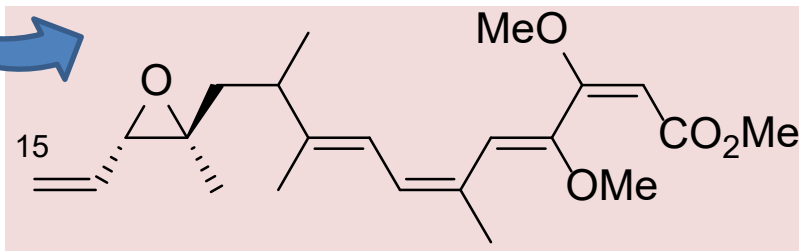
- 同じ機構
- 低い水溶性
- 成長の遅いイチイから抽出
- 薬剤耐性がん細胞の出現



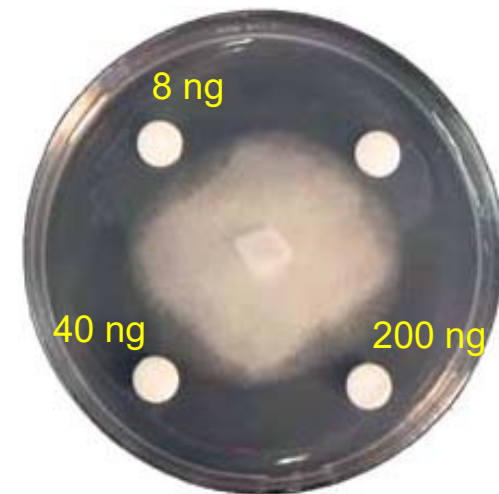
粘液細菌 *Haliangium ochraceum* SMP-2



- 最初の海洋性粘液細菌
(至適NaCl: 2–3%)
 - 遅い生育速度 (2–4 weeks)
 - 抗生物質の低い生産性
- ⇒「難培養性」



Haliangicin^{2,3}



Antifungal activity
(疫病菌)

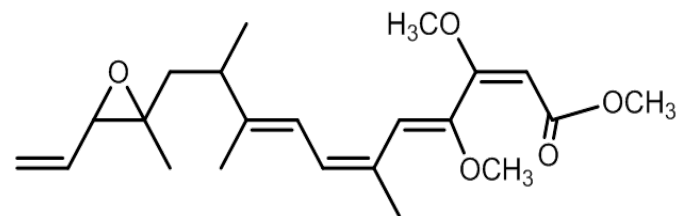
- 1) T. Iizuka, et al. FEMS Microbiol. Lett. 169, 317 (1998).
- 2) R. Fudou, et al. J. Antibiot. 54, 149, 153 (2001).
- 3) B. A. Kundim, et al. J. Antibiot. 56, 630 (2003).

生合成遺伝子を利用して抗生物質を量産



古典的培養技術

14日間で1 mg/L



haliangicin

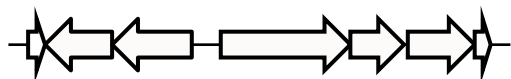
Haliangium ochraceum
(難培養性)

- ゲノムライブラリーの構築
- 遺伝子のクローニング

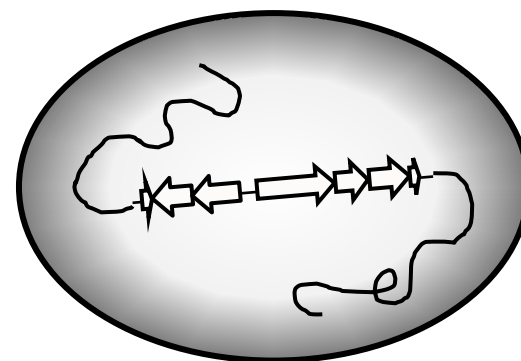
異種発現

(高効率生産?)

形質転換



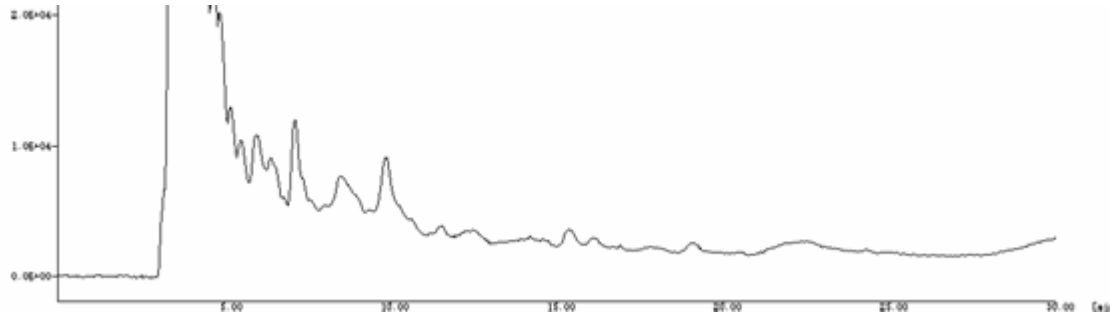
生合成遺伝子
クラスター (*hli*)



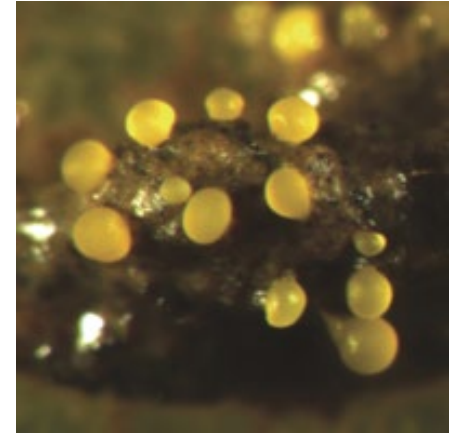
培養しやすい宿主細菌

異種発現によるhaliangicinの生産

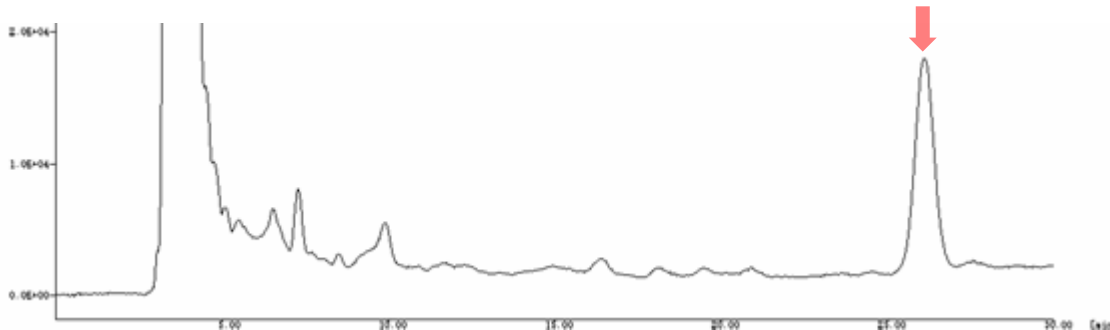
宿主細菌 *M. xanthus* (WT)



Trends in Microbiology, 29 (6), 562-563, 2021

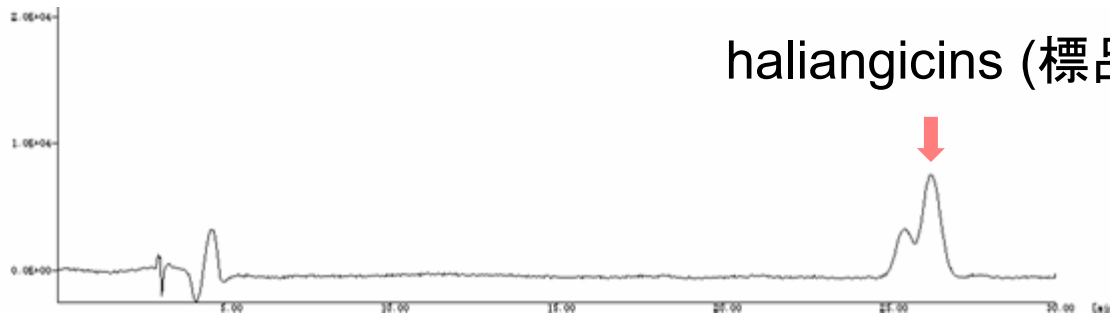


生合成遺伝子を導入した宿主細菌 *M. xanthus::hli*

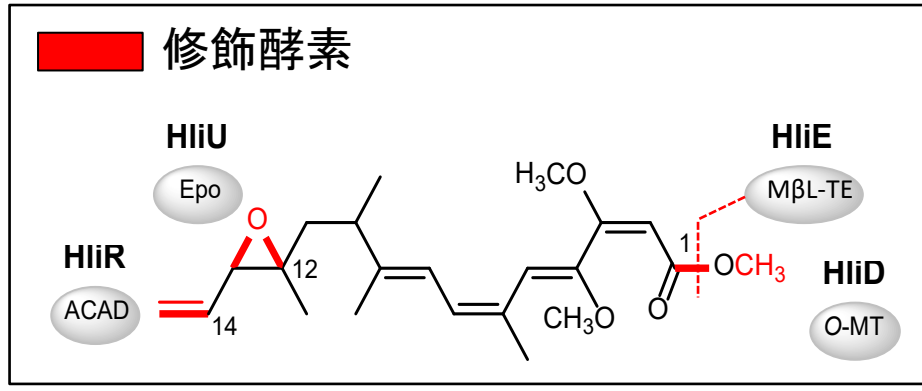
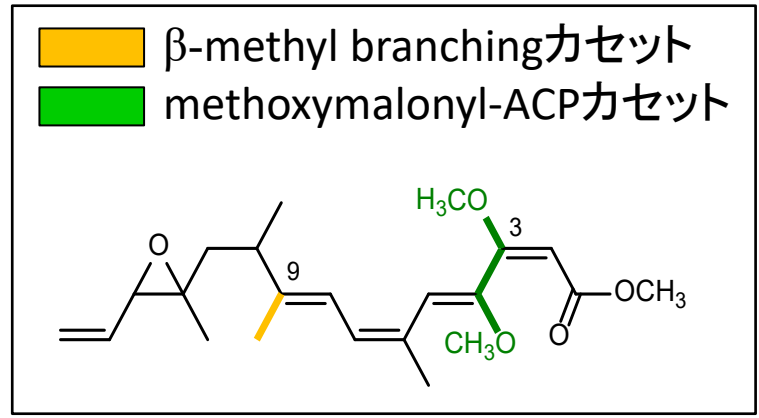
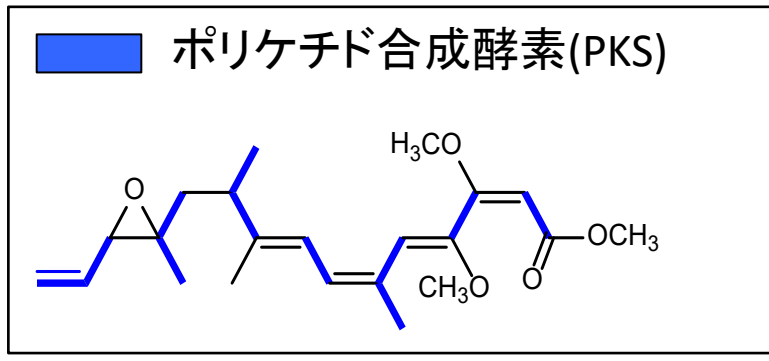
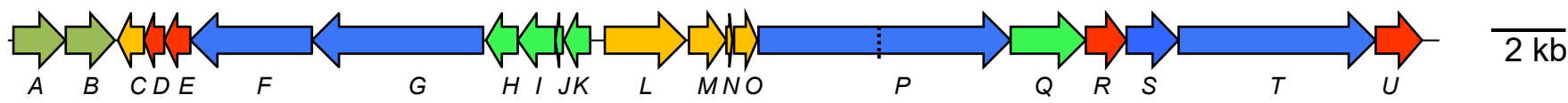


宿主細菌:
Myxococcus xanthus
(陸生粘液細菌)

haliangicins (標品)

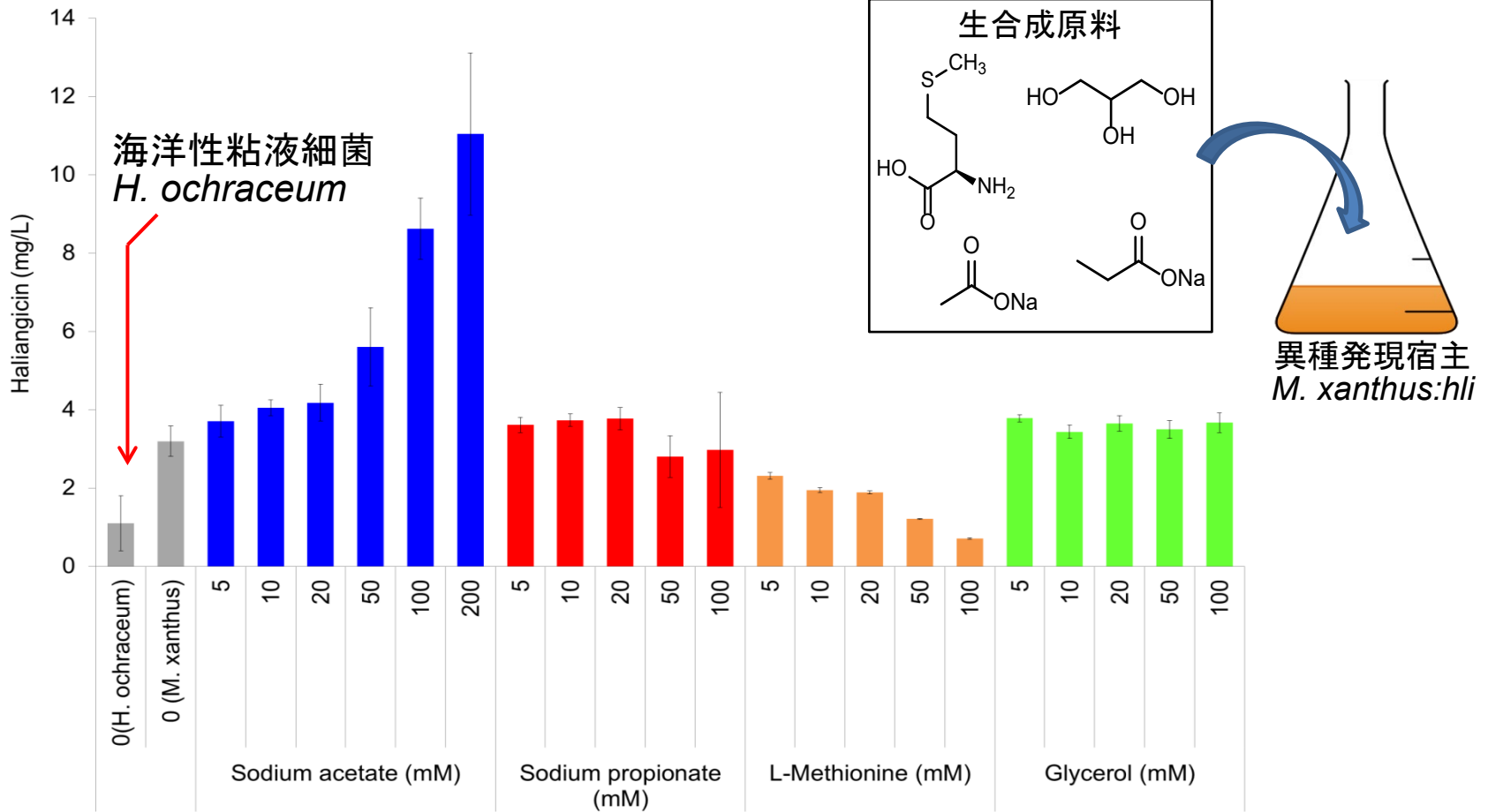


Haliangicin 生合成遺伝子クラスター *hli*



O-MT: O-methyltransferase,
MβL-TE: metallo β-lactamase
type thioesterase,
ACAD: acyl-CoA dehydrogenase,
Epo: epoxidase

Haliangicin生産性の最適化

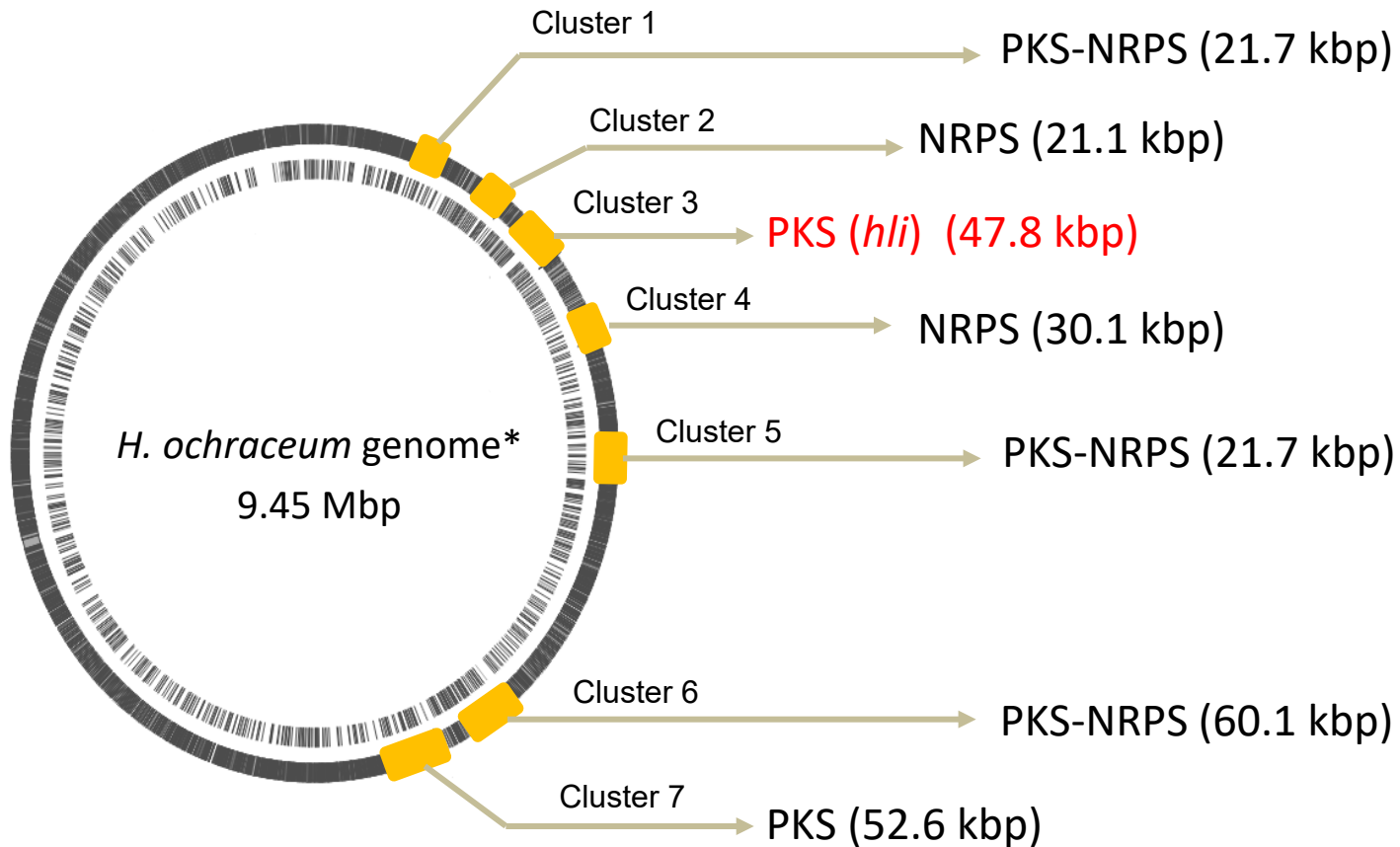


Haliangium ochraceum
(original producer)
14-days, 1 mg/L



Myxococcus xanthus
(heterologous producer)
5-days, 11 mg/L

*H. ochraceum*ゲノム上の天然物生合成マシナリー



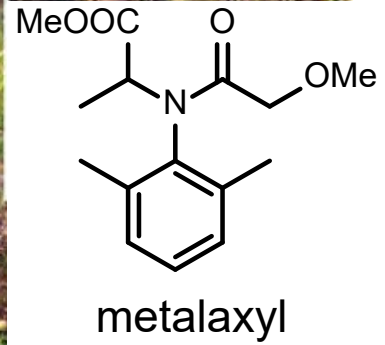
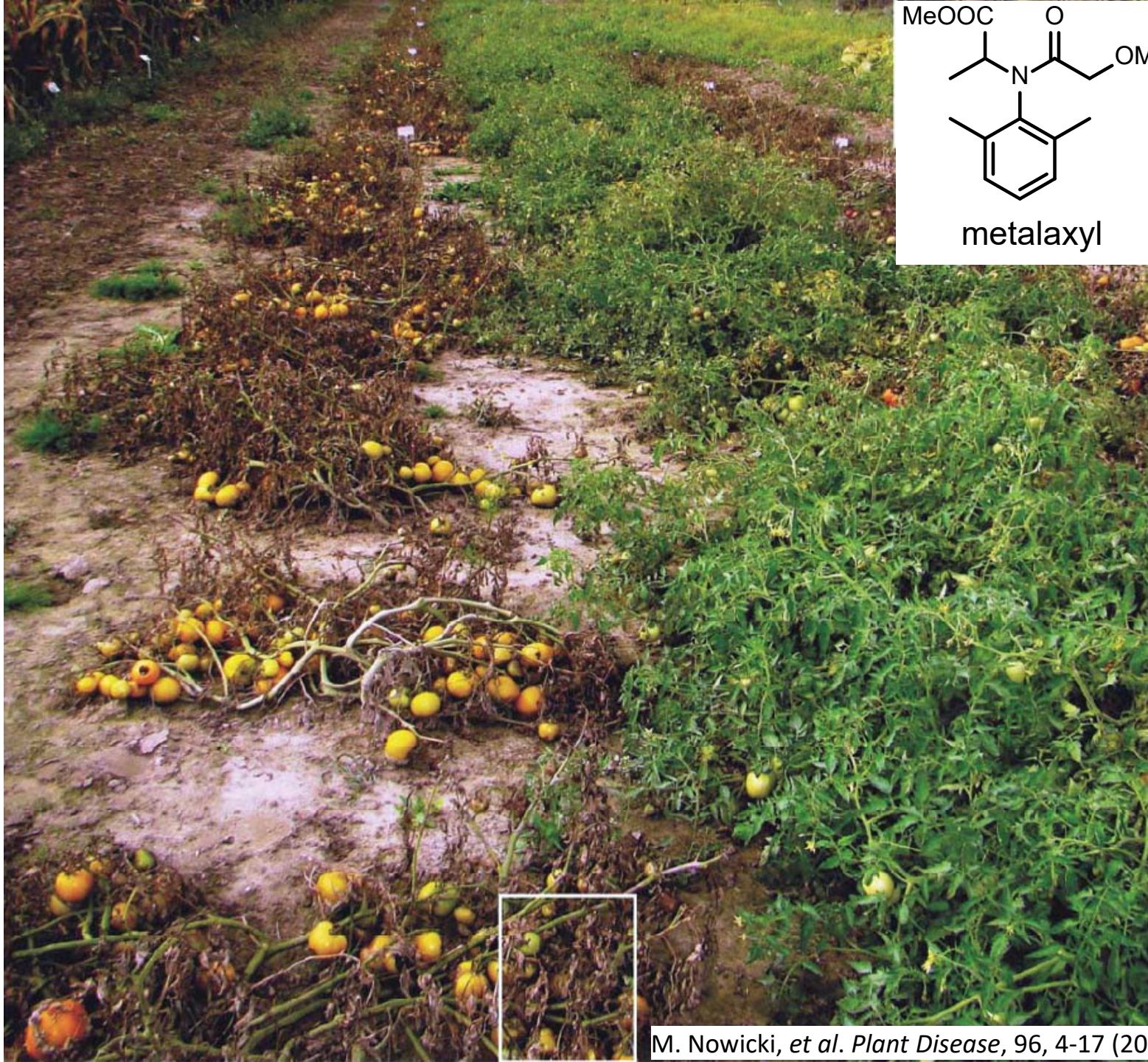
これらの遺伝子クラスターを覚醒させるには？

第3話 微生物の天然物

3-1. 粘液細菌の抗生物質

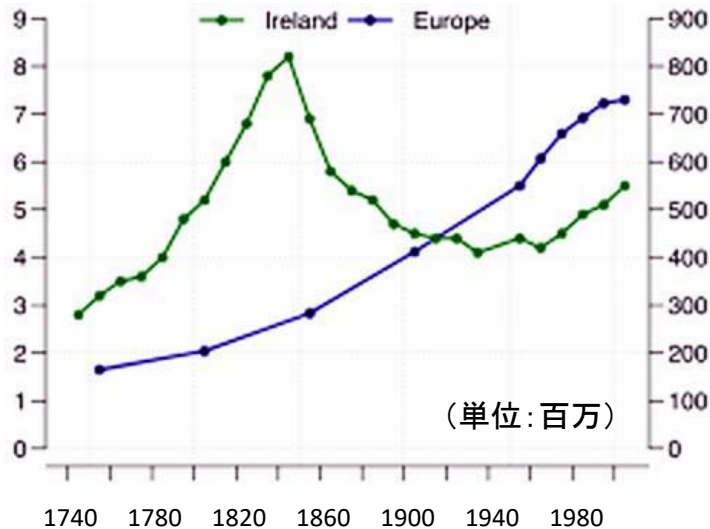
3-2. 疫病菌の交配ホルモン

(農学部 1995～)



“The Great Famine” (Potato Famine)

アイルランドとヨーロッパの人口

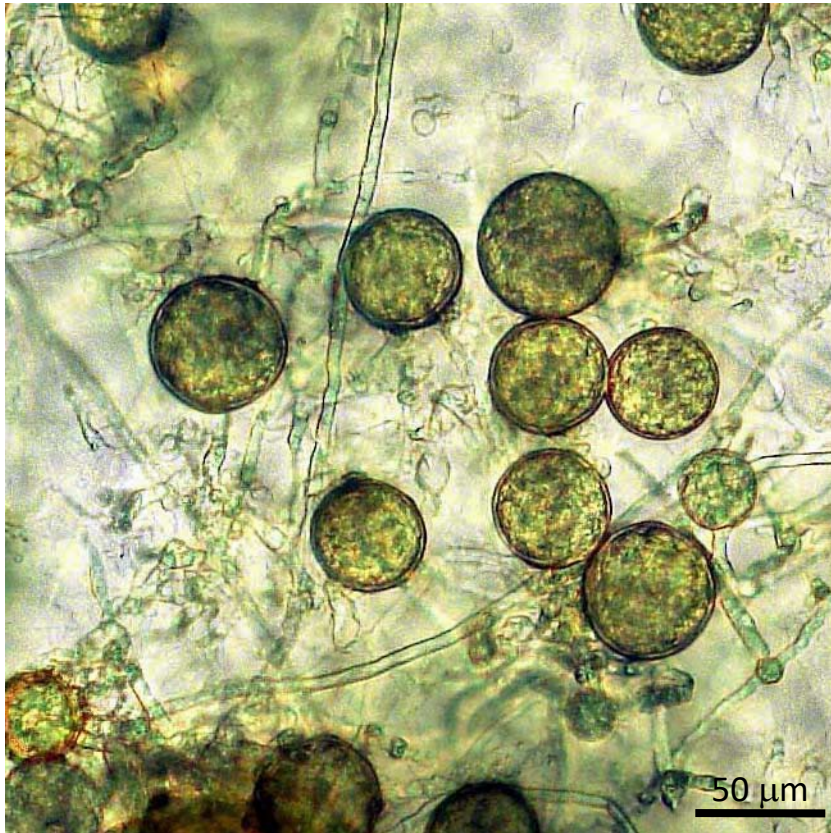


©Ania Mendrek
<https://www.flickr.com/photos/27758558@N00/3162679537>

飢饉記念碑 (Dublin, Ireland)

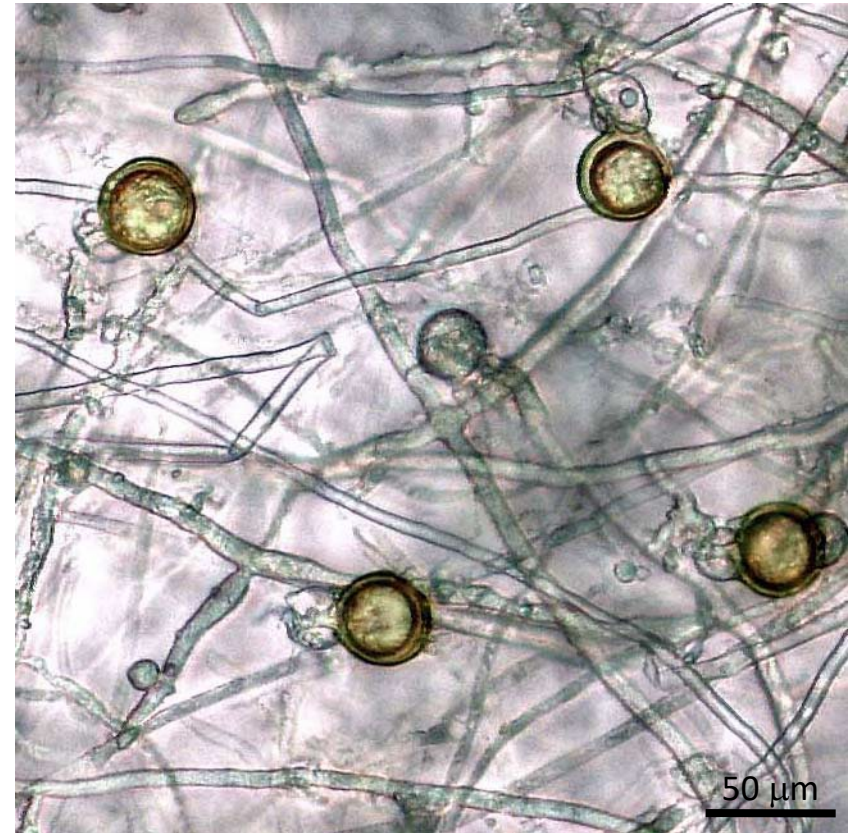
疫病菌 *Phytophthora* の繁殖戦略

無性生殖



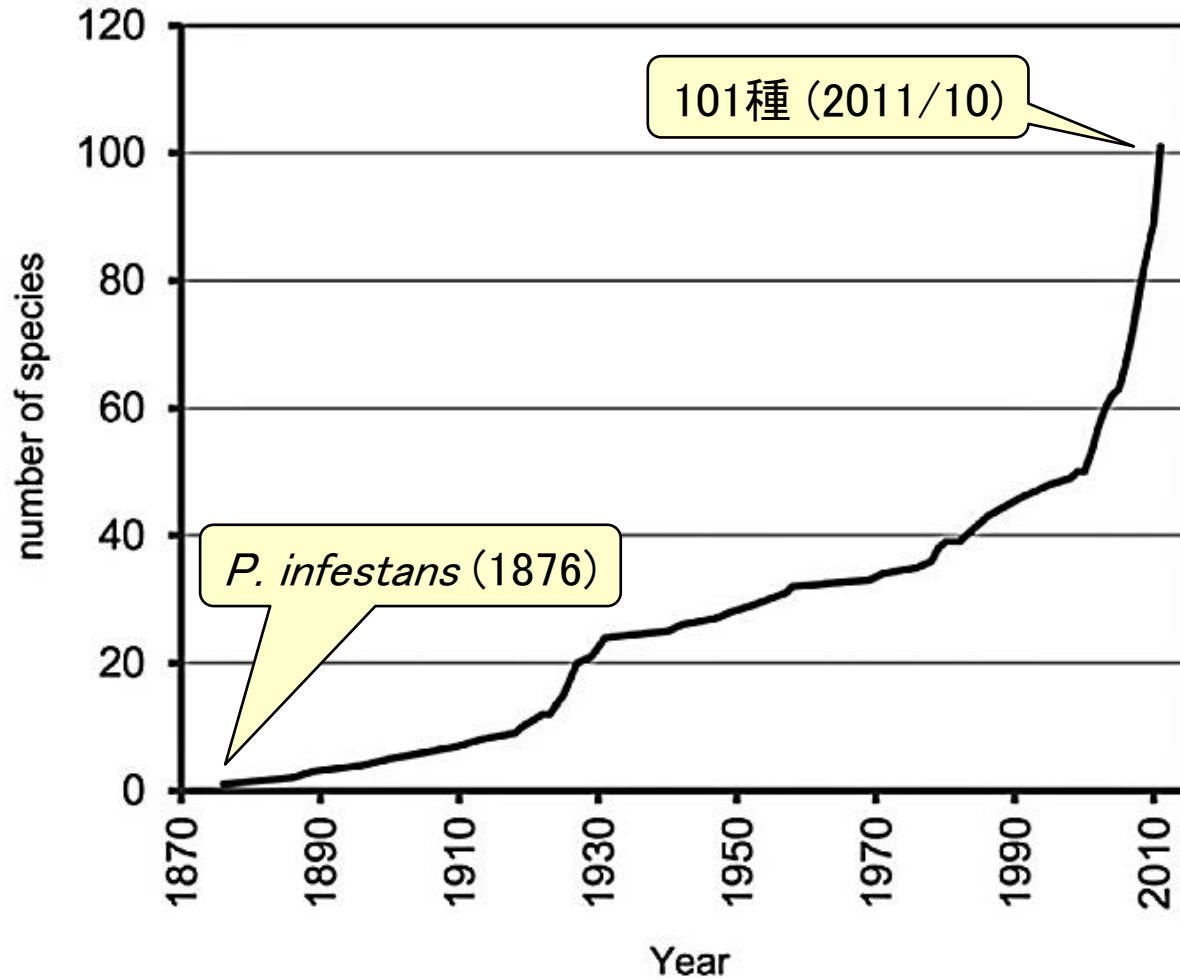
遊走子嚢

有性生殖



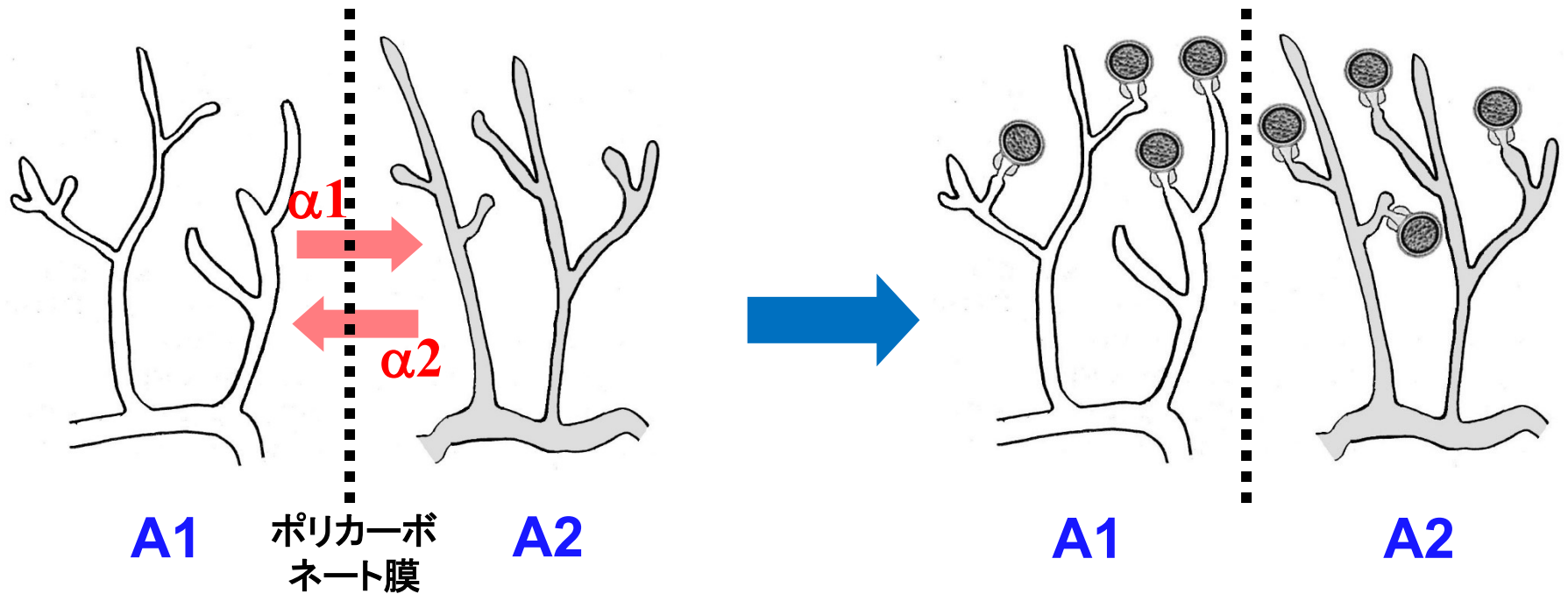
卵胞子

種の急速な多様化



L.P.N.M. Kroon, *et al. Phytopathology*, 102, 348-364 (2012).

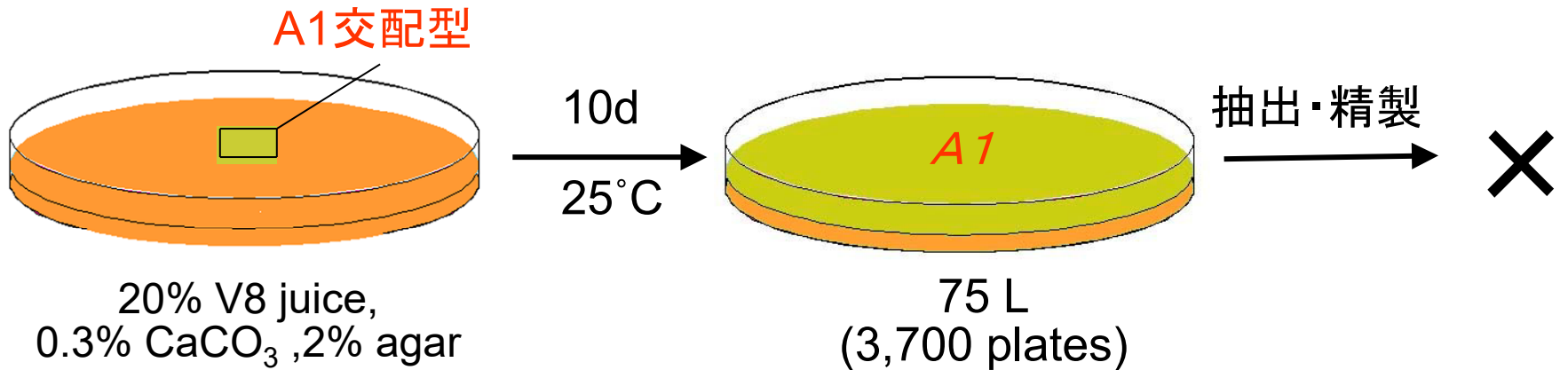
有性生殖誘導因子の発見



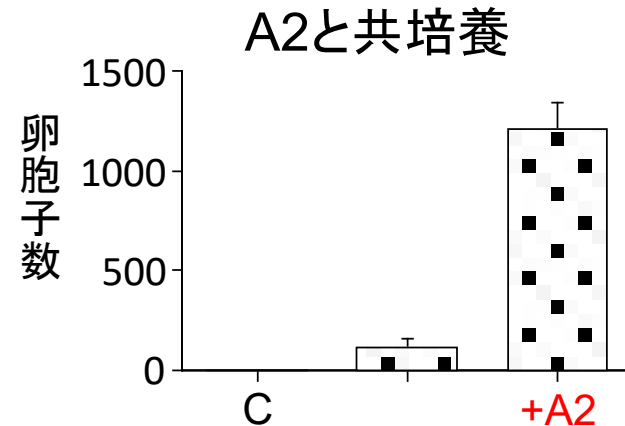
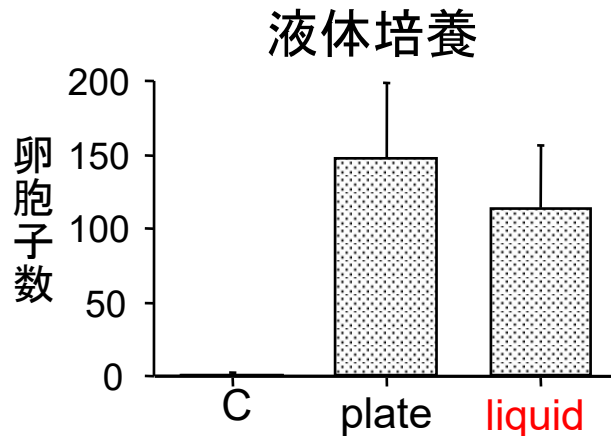
$\alpha 1, \alpha 2$ → 「交配ホルモン」

交配ホルモン $\alpha 1$ の探索

【1994～2003年】



【2003年～】







交配ホルモン $\alpha 1$ の精製

P. nicotianae A1 (400 L)

ろ過
ろ液のEtOAc抽出

EtOAc画分 (8.7 g)

シリカゲルカラム

0.35 g

ODSカラム

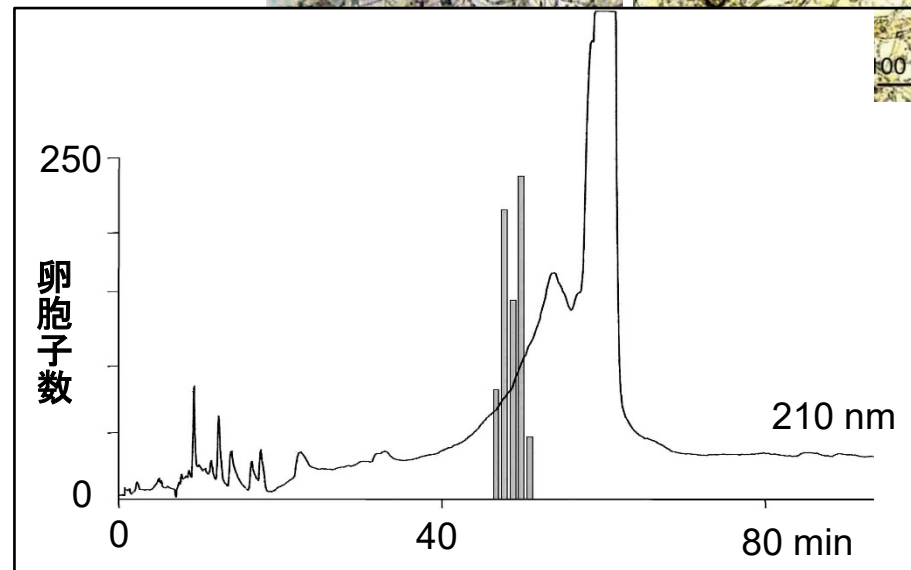
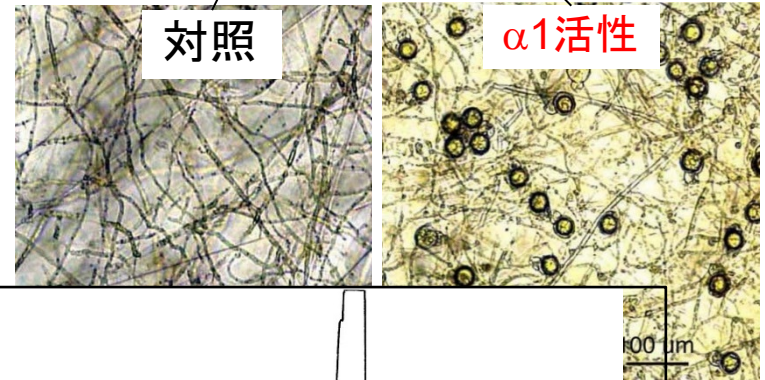
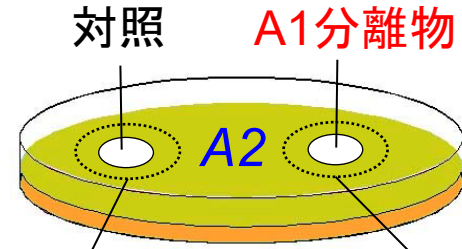
6 mg

HPLC-1

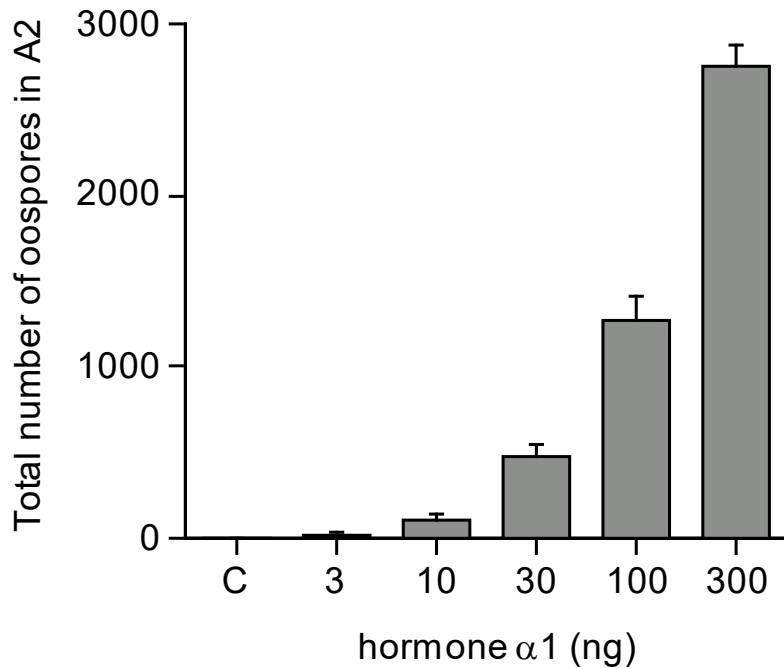
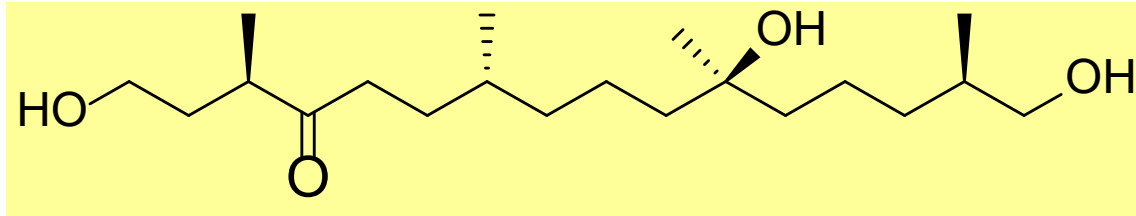
0.8 mg

HPLC-2

$\alpha 1$ (0.2 mg)



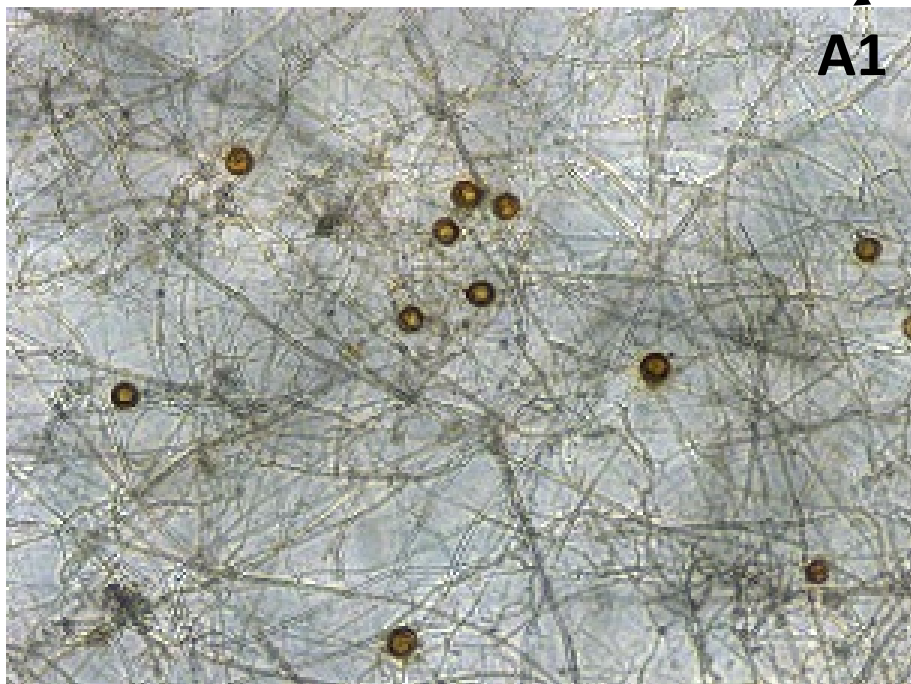
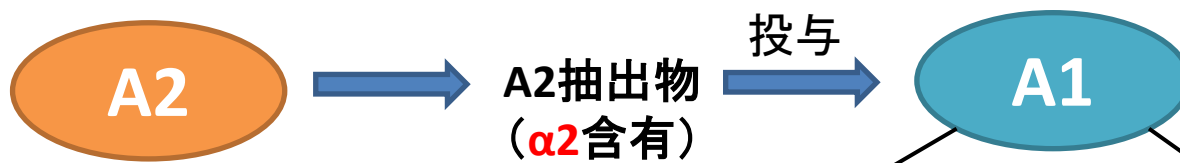
α の構造とホルモン活性



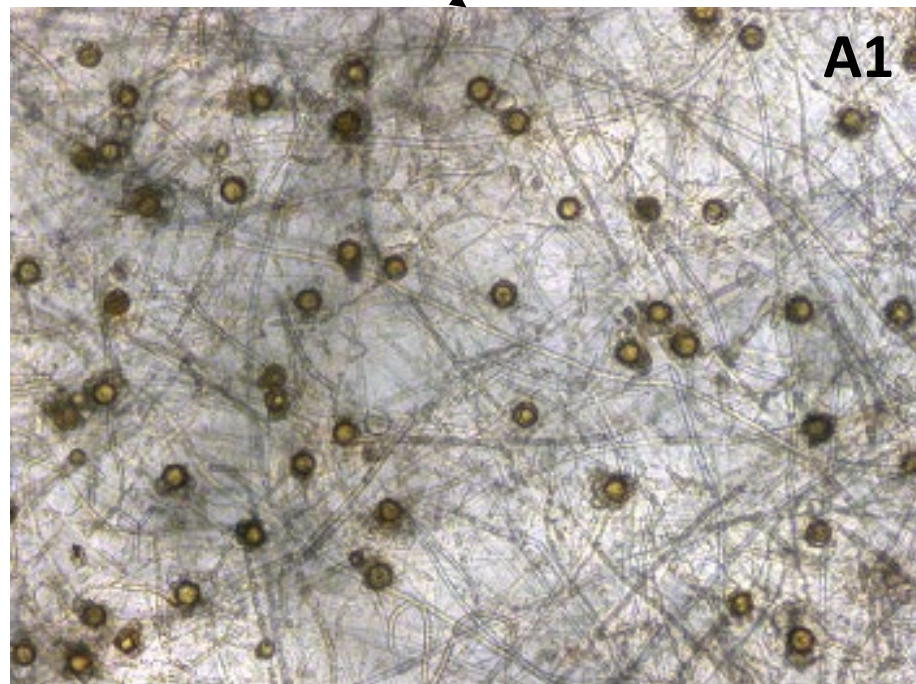
α 1で処理されたA2交配型

J. Qi, et al. *Science*, **309**, 1828 (2005).

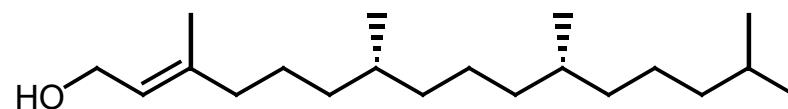
A2交配型による $\alpha 2$ の生産



- phytol



A2 + phytol (1 ppm)



α 2の抽出精製

P. nicotianae (A2)+ phytol
液体培養物(83 L)

- 1. filtration
- 2. ODS column

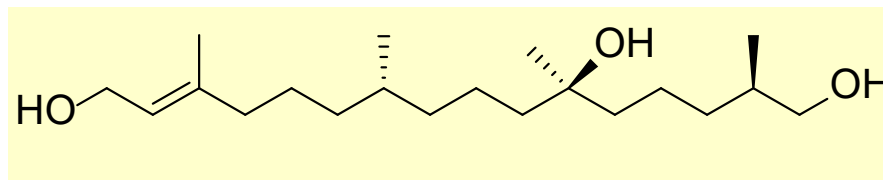
85% MeOH fr. (368 mg)

HPLC-1

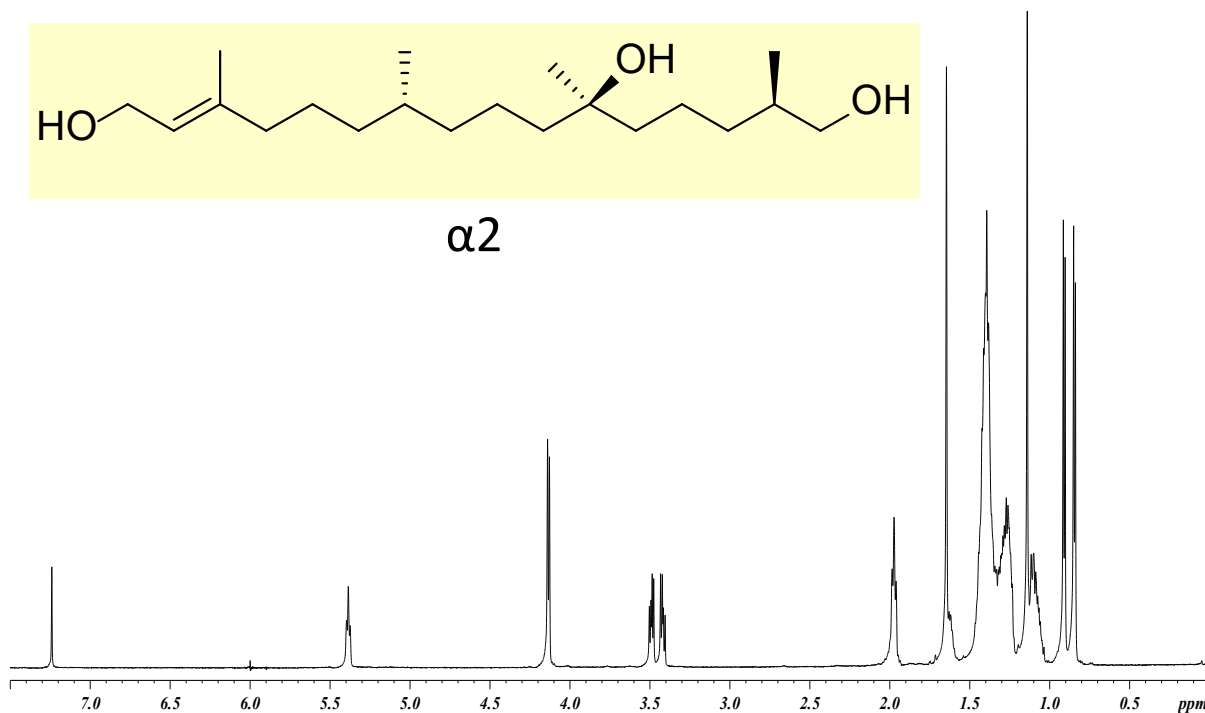
活性画分 (3.8 mg)

HPLC-2

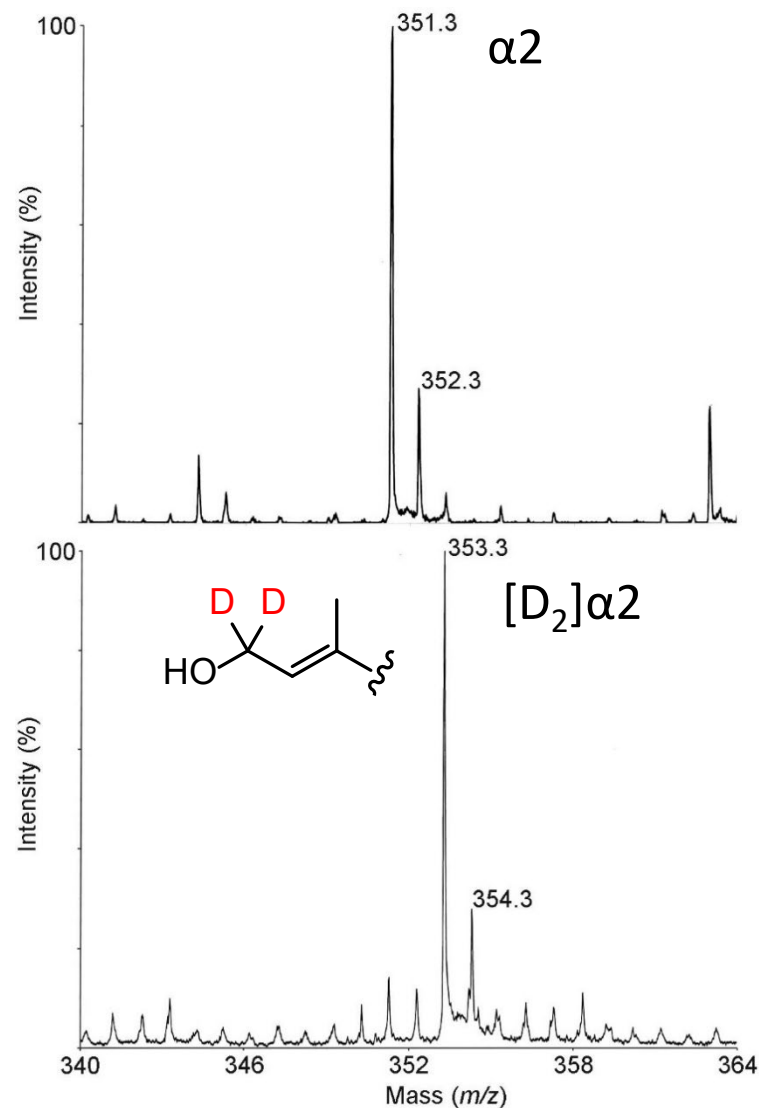
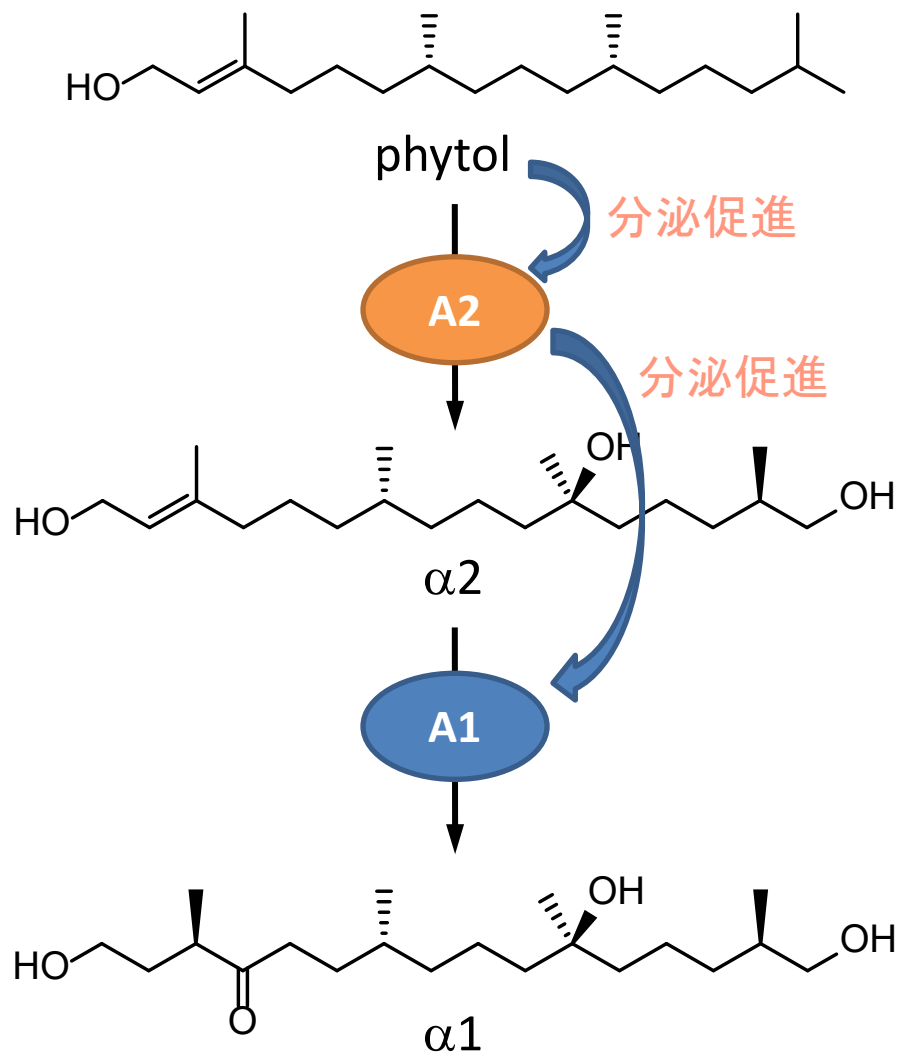
α 2 (0.9 mg)



α 2

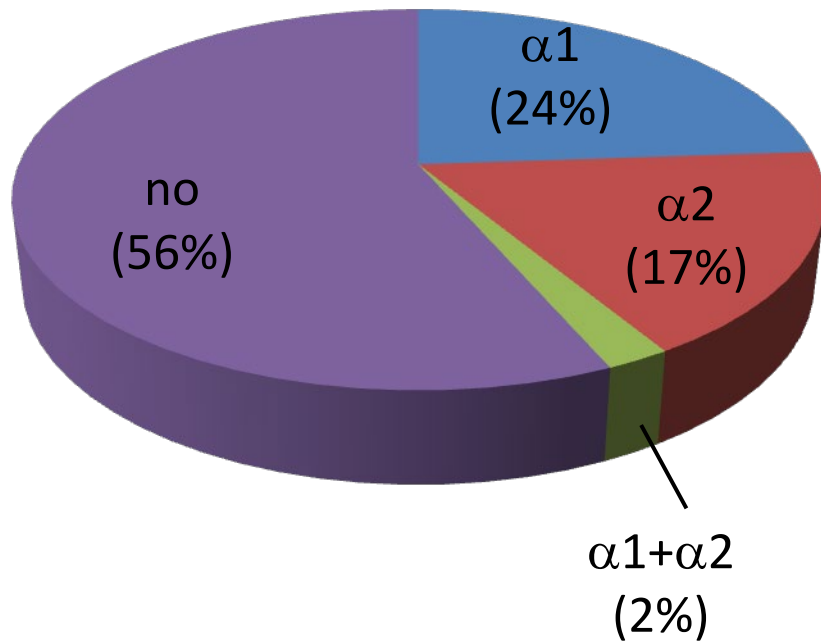


交配ホルモンの生合成

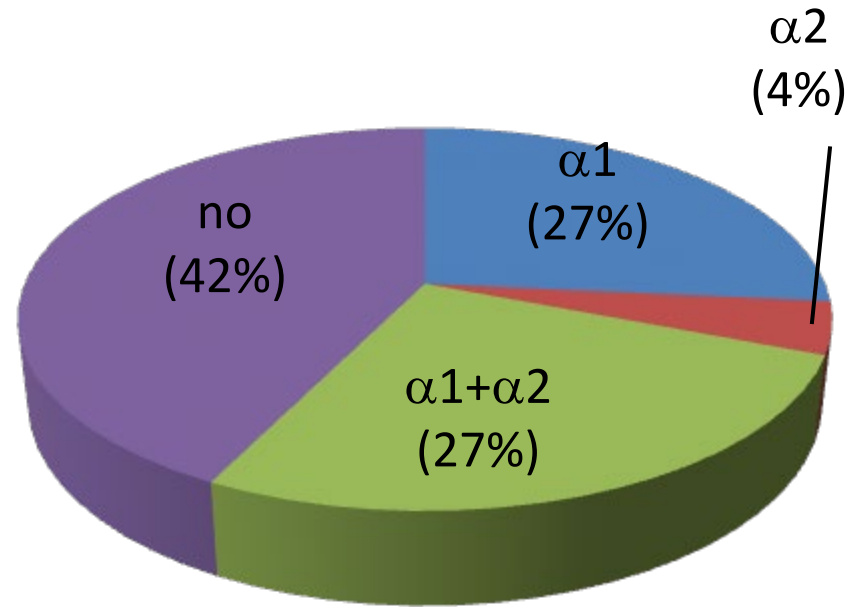


α ホルモンの普遍性

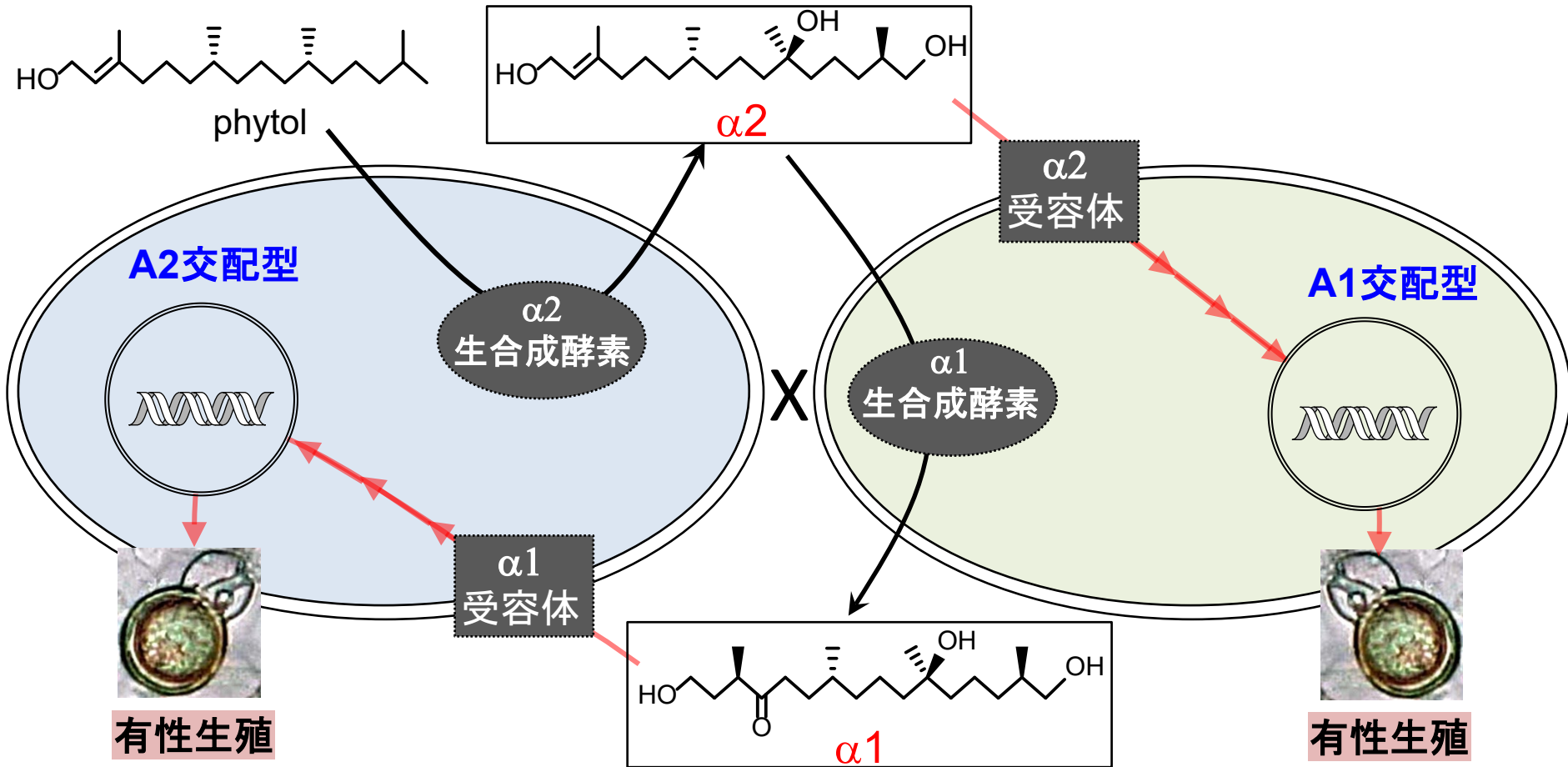
感受性



生産性

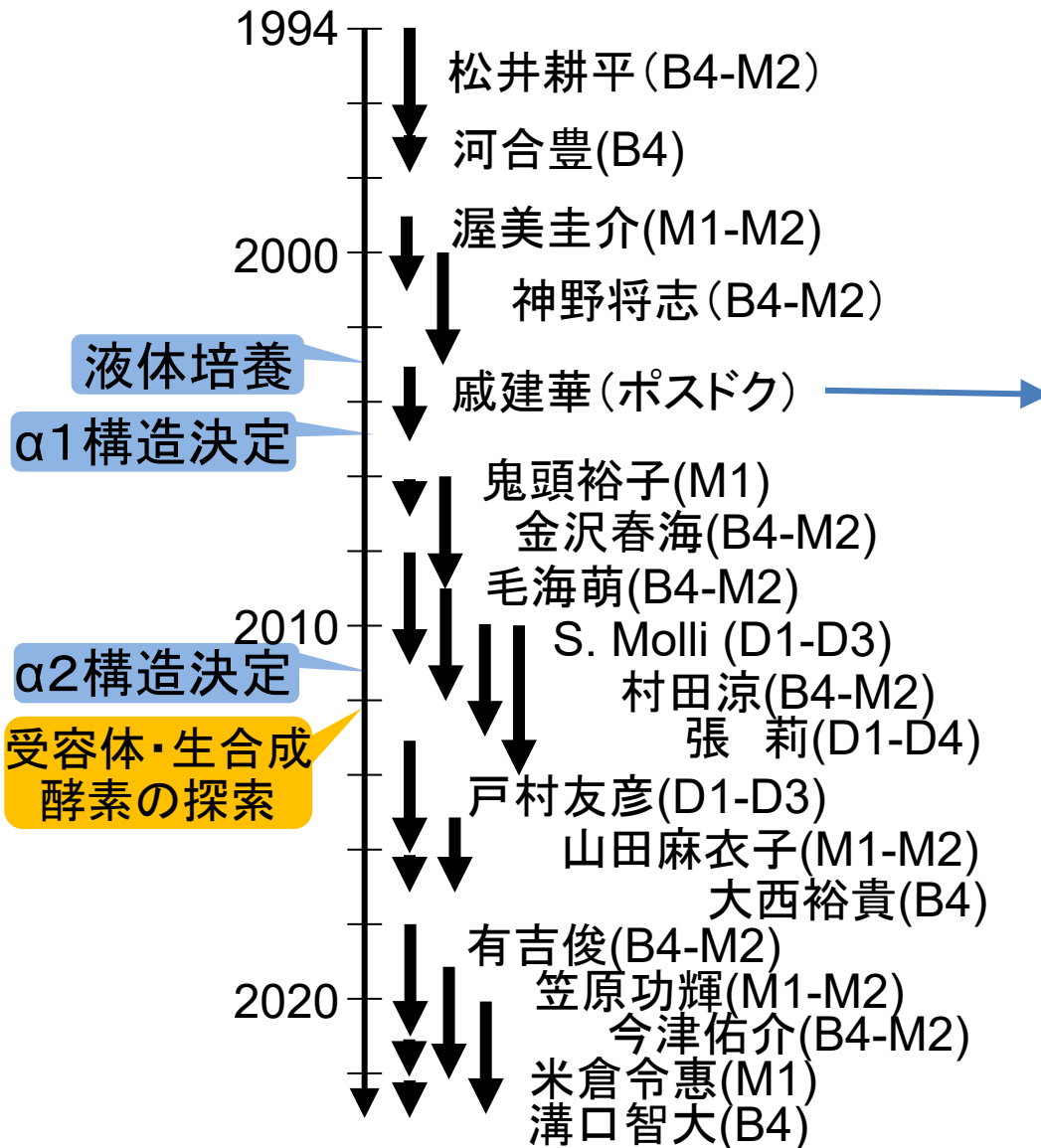


疫病菌の有性生殖システム



—→ シグナル伝達経路 —→ 生合成経路

疫病菌交配ホルモン関係者



戚 建華
(浙江大学薬学院教授)

科研費基盤研究(A)
2010-2013
2014-2017
2018-2022

謝 辞

恩 師

山田静之 先生(理学部時代)

坂神洋次 先生(農学部時代)

農学部・生命農学研究科の指導学生

計 90名

(博士課程 20名)

(留学生 16名)

共同研究

5研究室(本研究科)、8他大学(国内)、5海外研究者、9民間企業

研究費

日本学術振興会、文部科学省、大幸財団ほか