



令和3年8月27日

報道機関 各位

熊本大学

## 天然物から細胞周期阻害物質の探索に成功

～蛍光イメージングを用いた評価系の構築と新規細胞周期阻害物質の発見～

### (ポイント)

- HeLa/Fucci2細胞を用いて蛍光イメージングによる細胞周期阻害活性のハイスループット評価系を構築することに成功した。
- 上記評価系により、当研究室独自の天然物エキスライブラリーのサンプルをスクリーニングし、海綿 *Datylospongia metachromia* のエキスが細胞周期をS期からM期にかけて停止させることを見出した。
- その海綿エキスから、細胞周期阻害物質として、新規ベンゾキノネ *neisosmospongine* を単離することに成功した。
- 本評価系を探索研究に適用することで、天然物から新たな細胞周期阻害物質を発見することが可能であると考えられる。

### (概要説明)

天然物からは、医薬品の原料となりうる化合物あるいは特定の物質の検出を可能とする化学物質となるような、ユニークな化学構造と強い生物活性を示す低分子化合物が数多く発見されてきました。また、現在臨床で使用されている抗がん剤の半数以上が天然物由来であり、天然物が新規抗がん剤開発のシーズとして強く期待されるものであるといえます。

がん細胞などの細胞は、分裂を繰り返すことによって増殖します。一つの細胞が二つに分裂する過程を細胞周期と呼び、細胞周期は、G1期、S期、G2期、M期の4つの期間に分けられます。

本研究では、細胞周期阻害物質をハイスループット<sup>\*1</sup>で評価するため、細胞周期可視化マーカーであるHeLa/Fucci2細胞の蛍光イメージングを応用し、細胞周期阻害活性を定量的に解析することができる評価系を構築しました。そして、当研究室で保有している天然物エキスをスクリーニングし、細胞周期をS期からM期にかけて停止させる新規天然物を発見し、そこから細胞周期阻害物質を単離することに成功しました。

本研究は、熊本大学大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター天然薬物学分野の人羅勇氣助教、瀬治山藍大学院生、本田公洋大学院生、塚本佐知子教授、琉球大学熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設の伊勢優史研究員、Sam Ratulangi大学（インドネシア）のFitje Losung補佐員および Remy E. P. Mangindaan教授により行われ、研究成果は *Bioorganic &*

*Medicinal Chemistry*に令和3年2月1日に掲載されました。また、本研究は文部科学省科学研究費助成事業の支援を受けて実施したものです。

## (説明)

### [背景]

Fucciは、細胞周期の特定の時期に核内に蓄積する2種類のタンパク質に赤色と緑色の蛍光タンパク質を融合して発現させることで、細胞周期を蛍光観察により可視化することができるインジケータです。第二世代であるFucci2が導入されたHeLa/Fucci2細胞は、G1期に赤色蛍光を、そしてS/G2/M期には緑色蛍光を示すので、細胞を固定させる必要がなく、生細胞の状態でも蛍光イメージングにより個々の細胞の細胞周期を解析することが可能です。そこで私たちは、HeLa/Fucci2細胞を用いて蛍光イメージングによる細胞周期阻害物質のハイスループット評価系を構築し、細胞周期阻害作用を示す天然物を探索しました。

### [研究の内容]

96穴プレートに天然物エキスを添加したHeLa/Fucci2細胞を2日間培養した後、イメージングプレートリーダー<sup>\*2</sup>を用いて蛍光画像を取得し、赤色蛍光ならびに緑色蛍光を示す細胞数を計測しました。そして、赤色蛍光を示す細胞数に対する緑色蛍光を示す細胞数の割合をG/R値として、細胞周期を定量的に解析しました。コントロール（無処理）細胞におけるG/R値0.64に対し、0.4以下の場合をG1期での停止、1.2以上の場合をS期からM期における停止と設定し、海洋無脊椎動物や微生物のエキス5687サンプルの活性を評価しました（図1）。

### [成果]

上記の評価系により、当研究室で保有している独自の天然物エキスライブラリーをスクリーニングした結果、海綿*Datylospongia metachromia*のエキスが細胞周期をS期からM期にかけて停止させました。そこで、エキスから細胞周期阻害作用を示す化合物を精製し、新規ベンゾキノンneoisosmenospongineとその類縁体を単離することに成功しました。化合物の構造は、核磁気共鳴<sup>\*3</sup>スペクトルなどのスペクトル解析により決定しました。

### [展開]

本研究において、HeLa/Fucci2細胞の蛍光イメージングを用いた細胞周期阻害活性の評価系を構築し、イメージングプレートリーダーを用いることにより、ハイスループットで細胞周期阻害作用を評価することに成功しました。そして、天然物エキスライブラリーをスクリーニングし、細胞周期を阻害する天然物の網羅探索を行った結果、細胞周期をS期からM期にかけて停止させる新規ベンゾキノン類を見出すことに成功しました。今後も本評価系を用いて細胞周期阻害物質を探索することにより、多様な構造を有する天然物の中から、新たな細胞周期阻害物質が得られると考えています。また、これまでに知られていない標的に作用するような化合物も見出すことができるのではないかと期待しています。

[用語解説]

- ※1 ハイスループット：迅速に効率よく処理すること。
- ※2 イメージングプレートリーダー：細胞の顕微鏡画像を解析する装置。
- ※3 核磁気共鳴：原子核のスピン状態に関係した現象で、有機化合物に含まれる水素や炭素原子の状態に関する情報を得ることができる。

(論文情報)

論文名：Fluorescent image-based high-content screening of extracts of natural resources for cell cycle inhibitors and identification of a new sesquiterpene quinone from the sponge, *Dactylospongia metachromia*.

著者：Yuki Hitora,<sup>a,1</sup> Ai Sejiyama,<sup>a,1</sup> Koyo Honda,<sup>a</sup> Yuji Ise,<sup>b</sup> Fitje Losung,<sup>c</sup> Remy E. P. Mangindaan,<sup>c</sup> Sachiko Tsukamoto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University, Japan; <sup>b</sup> Sesoko Station, Tropical Biosphere Research Center, University of the Ryukyus, Japan; <sup>c</sup> Faculty of Fisheries and Marine Science, Sam Ratulangi University, Indonesia. <sup>1</sup> contributed equally

掲載誌：*Bioorganic & Medicinal Chemistry*

URL：<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115968>

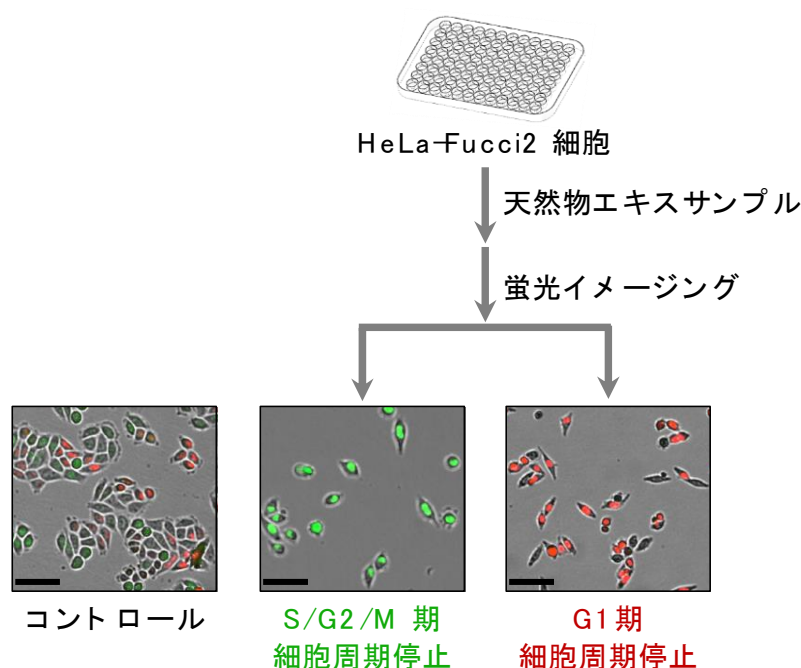


図1 蛍光イメージングを用いた評価系

96 穴プレートに HeLa/Fucci2 細胞を入れて、天然物エキスを添加し培養した。2 日後に、蛍光イメージングにより解析し、細胞が緑色蛍光を示している場合に S/G2/M 期で細胞周期が停止していると判定し、赤色蛍光を示している場合に G1 期で細胞周期が停止していると判定した。

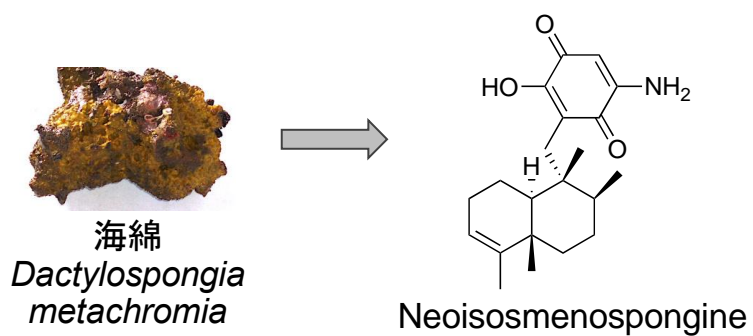


図2 海綿 *Dactylospongia metachromia* と、そのエキスから細胞周期阻害物質として得られた新規ベンゾキノン neoisosmenospongine

【お問い合わせ先】

熊本大学大学院生命科学研究部附属グローバル天然物科学研究センター

天然薬物学分野

担当：助教 人羅 勇氣

096-371-4382

hitora@kumamoto-u.ac.jp

教授 塚本 佐知子

096-371-4380

sachiko@kumamoto-u.ac.jp