

原 著

青森県で採集した水圏由来糸状菌からの
protein tyrosine phosphatase 1B 阻害剤の探索

千田 一慶, 齊藤 亮, 山崎 寛之,* 菅野 秀一, 石川 正明, 浪越 通夫

Quest of protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from aquatic fungi collected in Aomori

Kazunori CHIDA, Ryo SAITO, Hiroyuki YAMAZAKI,* Syu-ichi KANNO,
Masaaki ISHIKAWA, and Michio NAMIKOSHI

(Received November 20, 2014)

In the course of our studies on the bioactive metabolites of aquatic fungi, we have tested the inhibitory activity on the culture broths of 21 fungal strains isolated from marine and freshwater (lake) environments against protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B, an important target enzyme for the treatment of type II diabetes and obesity. The ethyl acetate extracts from the culture broths of five fungal strains inhibited the PTP1B activity. Bioassay-guided isolation from the extract of a marine-derived *Trichoderma* sp. strain TPU1239 yielded two known *a*-pyrone derivatives, 6-[(*E*)-hept-1-enyl]-*a*-pyrone (**1**) and 6-*n*-pentyl-*a*-pyrone (**2**) as PTP1B inhibitors. The structures of **1** and **2** were identified on the basis of their spectroscopic data. Compound **1** showed an inhibitory activity against PTP1B with an IC_{50} value of 32.4 μ M. This is the first time to report the PTP1B inhibitory activity for compounds **1** and **2**. Moreover, compound **1** did not inhibit the cell proliferation of the human hepatoma Huh-7 cells. A hepatocyte is one of the locations of PTP1B, and Huh-7 cells are used for the study on the mechanism of action for PTP1B inhibitors.

Key words — PTP1B inhibitor; marine-derived fungus; *Trichoderma* sp.; *a*-pyrone derivative

1. 序 論

Protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B は、インスリンやレプチンによる細胞内のシグナル伝達を負に制御している。よって、本酵素の阻害剤はインスリン抵抗性 2 型糖尿病や肥満症に対する治療薬の有望なリードになると考えられている。¹⁾ これまでに 300 種類を超える天然物由来 PTP1B 阻害剤が報告されているが、阻害活性の強さや他酵素との選択性において満足できる化合物が見いだされていないことから、臨床応用されている薬剤はまだない。²⁾ そこで、我々は新しいタイプの PTP1B 阻害物質を求め、国内外の水圏環境から採集した生物資源（微生物や無脊椎動物など）を中心に探索研究を行っている。³⁾

今回、青森県むつ市内の海と湖沼から分離した 21 株の糸状菌培養液を用いてスクリーニングを行った結果、芦崎湾より分離した海洋糸状菌 *Trichoderma* sp. TPU1239 株の培養抽出物に PTP1B 阻害活性を見いだした。生物活性試験を指標にして分離を行ったところ、PTP1B 阻害活性を有する 6-[(*E*)-hept-1-enyl]-*a*-pyrone (**1**) と 6-*n*-pentyl-*a*-pyrone (**2**) を単離、同定した (Fig. 1)。本稿では、化合物 **1** および **2** の培養、精製、構造および生物活性について報告する。

2. 結果と考察

2-1. 糸状菌の分離とスクリーニングアッセイ
本研究で使用した糸状菌 21 株は、2012 年にむつ



Fig. 1. Structures of compounds **1** and **2** produced by *Trichoderma* sp. TPU1239.

市内の5カ所で採取した海水と淡水から分離した。分離した糸状菌はスクロースを主成分とした生産培地による小スケール (50 mL) の培養を行い, アセトン処理と酢酸エチル抽出をして得たエキスをスクリーニングサンプルとしてPTP1B阻害活性を評価した。その結果, 21株中5株の培養抽出サンプル (TPU1222, TPU1234, TPU1236, TPU1237 および TPU1239 株) にPTP1B阻害活性を見いだした。

2-2. *Trichoderma* sp. TPU1239 株の培養と化学成分の単離

スクリーニングアッセイにおいてPTP1B阻害活性を示した糸状菌5株の中から, 阻害活性を示す化合物の単離のため, はじめにTPU1239株の検討を行った。PDA培地上に生育した菌糸や孢子囊, 孢子の形態的特徴より, 本菌株を *Trichoderma* 属と同定した。

PTP1B阻害活性物質の生産の最適な培養条件を検討するため, 実験の部に記載した4種類の条件で培養を行った。条件Aから条件Dにより得られた培養液の酢酸エチル抽出物についてPTP1B阻害活性を評価した結果, 真水培地 (条件AとB)の方が海水培地 (条件CとD)より強い活性を示した (Fig. 2)。また, 静置培養 (条件AとC)より振とう培養 (条件BとD)において強い活性が認められた。特に, 条件B (真水培地を用いた振とう培養)による培養で得られた酢酸エチル抽出物は, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で81%のPTP1B阻害活性を示した (Fig. 2)。そこで, 条件Bを用いて培養を行い, 阻害活性物質の単離を進めた。

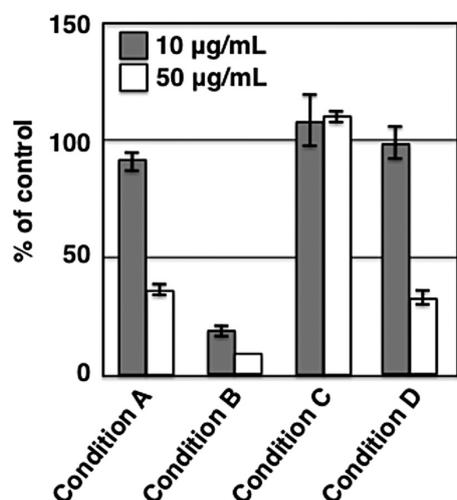


Fig. 2. PTP1B inhibitory activity of EtOAc extracts from culture broths of strain TPU1239 obtained by four culture conditions.

実験の部に記載した通り, TPU1239株の種培養液を植菌した生産培地 (2.4 L) を25°Cで1週間振とう培養し, アセトン処理と酢酸エチル抽出して754.6 mgの赤褐色油状抽出物を得た。PTP1B阻害活性を指標にしてODSカラムおよびHPLCによる分離を行い, この抽出物から2.24 mgの化合物1と0.21 mgの化合物2を単離した。

2-3. 化合物1と2の構造

化合物1のEI-MSにおいて, 分子イオンピークが $m/z = 192$ $[\text{M}]^+$ に観測された。 ^{13}C -NMRスペクトルには12本のシグナルが検出され, ケミカルシフト値よりエステル由来のカルボニル基の存在が示された。また, ^1H -NMRスペクトルでは16個分のプロトンシグナルが観測されたことから, 化合物1の分子式を $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$ と決定した。 ^1H -NMRおよび ^1H - ^1H COSYスペクトルより, メチル [δ 0.91 t (3H, $J = 7.3$ Hz)], 4つのメチレン [δ 1.34 m (2H), 1.34 m (2H), 1.49 m (2H), 2.25 q (2H, $J = 7.3$ Hz)] および2つの sp^2 -メチン [δ 6.12 m (1H), 6.65 dt (1H, $J = 7.3, 15.6$ Hz)] のつながりが検出され, 炭素7個の不飽和脂肪鎖の存在が確認された。その二重結合は, カップリングコンスタントの値 (15.6 Hz) より, *E*体と決定した。さらに, 3つの sp^2 -メチンシグナル [δ 6.16 m (1H), 6.20 m (1H), 7.48 dd (1H, $J = 6.8, 9.2$ Hz)] の存在と, それらのシグナルから観測されたHMBC相関より, α -ピロン環の存在および不飽和脂肪鎖とのつながりを確認した。以上の解析から, 化合物1の構造を6-[(*E*)-hept-1-enyl]- α -pyrone (Fig. 1)と決定した。この構造をScifinder scholarで検索した結果, 2007年にZhangらによって海洋糸状菌 *Botrytis* sp.の培養液から単離されたチロシナーゼ阻害物質⁴⁾と同じであることがわかった。

化合物2は化合物1と同様のUVスペクトルを与えたことから, 類縁の α -ピロン化合物であると考えられた。化合物2のEI-MSでは, 化合物1より26 μ 小さい分子イオンピークが $m/z = 166$ $[\text{M}]^+$ に検出されたので, 化合物2の分子式を $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$ と推定した。文献検索を行った結果, 化合物2は1972年にCollinsらにより糸状菌 *Trichoderma* sp.の培養液より単離された6-*n*-pentyl- α -pyrone⁵⁾と同定した。

2-4. 生物活性

精製した化合物1と化合物2のPTP1B阻害活性³⁾を検討した。化合物1は IC_{50} 値 32.4 μM でPTP1B

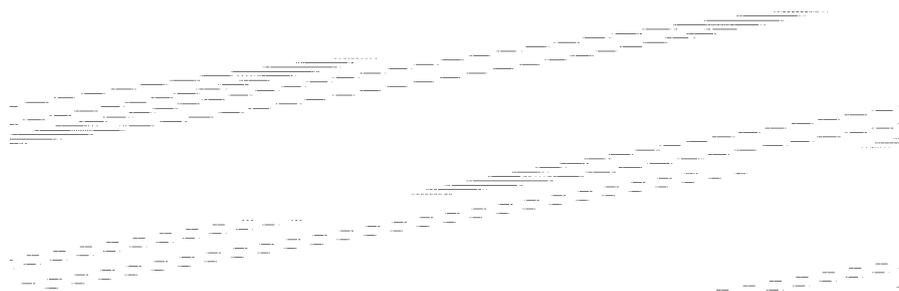


Fig. 3. Structures of PTP1B inhibitors possessing an α -pyrone ring.

の活性を阻害した。同じ実験で、ポジティブコントロールとして用いた oleanolic acid の IC_{50} 値は $1.17 \mu\text{M}$ であった。化合物 **2** も化合物 **1** と同等の PTP1B 阻害活性を示したが、得られた化合物量が少なかったため、 IC_{50} 値を算出することができなかった。化合物 **1** および化合物 **2** が PTP1B 阻害活性を有することを見いだしたのは、本研究が初めてである。

また、化合物 **1** の細胞毒性^{6,7)} を評価した結果、Jurkat 細胞に対しては $50 \mu\text{M}$ でも細胞分裂に影響を与えなかった。さらに、PTP1B の主な存在場所である肝細胞に対する毒性を検出する目的で、化合物 **1** のヒト肝臓がん Huh-7 細胞に対する影響を評価した。その結果、化合物 **1** は $50 \mu\text{M}$ においても Huh-7 細胞に毒性を示さなかった。Huh-7 細胞は PTP1B 阻害剤の活性発現機構の解明に利用されている細胞であるので、この細胞に毒性を示さないことは、化合物 **1** の活性発現機構の解明に有利である。

α -ピロン環を有する PTP1B 阻害物質としてはこれまでに、Helaly らや Hohmann らによって gombapyrone 類 ($100 \mu\text{M}$ で 22–39% 阻害)⁸⁾ と albidopyrone ($IC_{50} = 494.2 \mu\text{M}$)⁹⁾ が報告されている (Fig. 3) が、阻害活性はいずれも非常に弱い。これらの化合物には側鎖にベンゼン環や多数の二重結合があり、化合物 **1** と化合物 **2** の構造と比較すると、側鎖と活性の強さの相関に興味をもたれる。そこで今後、脂肪鎖の炭素数が異なる α -ピロン誘導体を調製して PTP1B 活性を比較することにより、構造–活性相関について検討していく予定である。

3. 実験の部

3-1. 使用機器

EI-MS の測定は JMS-MS 700 (JEOL) で行った。

各種 NMR の測定は JNM-AL-400 (JEOL) を使用し、溶媒には CD_3OD (ACROS) を用いた。HPLC は CCPM-II SD-8022 (東ソー) および L-6200 (日立) を使用した。UV の測定には U-3310 (日立) を用いた。

3-2. 試薬

ヒト組み替え PTP1B は Enzo より購入した。p-ニトロフェニルリン酸化二ナトリウム (pNPP) は Sigam-Ardrich より購入した。Potato dextrose agar (PDA) および酵母エキスは BD より、エビオス錠はアサヒフードアンドヘルスケア株式会社より購入した。本実験で用いた有機溶媒およびその他の化学試薬は和光純薬から購入した。

3-3. 培地

分離用プレートは PDA に 0.05% ローゼベンガルと 0.01% カナマイシンを添加した後、丸形のプラスチックシャーレに分注して作成した。保存用斜面培地には LCA 培地 (0.10% glucose, 0.080% KH_2PO_4 , 0.020% K_2HPO_4 , 0.020% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.020% KCl, 0.20% NaNO_3 , 0.020% 酵母エキス, 1.5% agar, pH 6.0) を用いた。糸状菌の培養のための種培地 (2.0% glucose, 0.50% polypeptone, 0.20% 酵母エキス, 0.10% KH_2PO_4 , 0.050% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% agar, pH 6.0) および生産培地 (3.0% glucose, 3.0% soluble starch, 1.0% malt extract, 0.3% エビオス錠, 0.10% KH_2PO_4 , 0.050% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.10% agar, pH 6.0) は真水または天然海水で調製し、オートクレーブで滅菌した。

3-4. 菌株

青森県むつ市内の 4 カ所 (関根浜の砂浜, 関根浜の防波堤, 大平の岸壁, 芦崎湾) で海水を採取した。また、同市内の早掛沼で淡水を得た。採集した水試料を分離用プレートに塗布し、 25°C で 1 週間培養した後に出現したコロニーを釣菌して斜

面培地に保存した. 5カ所の水試料から21株の糸状菌を分離した. 本研究に用いた糸状菌 TPU1239 株は芦崎湾で採取した海水から分離した株で, 分離プレート上に形成された菌糸と胞子の形態観察より *Trichoderma* 属と同定した.

3-5. 培養

保存用 LCA スラントで2週間 (25°C, 暗所) 培養した後, 室温で保存した菌株を使用した. 種培養および生産培養には, 以下の4つの条件 (A-D) を用いた.

(条件 A) 真水で調製した種培地 50 mL を 100 mL 容三角フラスコに入れ, 保存用 LCA スラントから一白金耳を植菌し, 25°C で3日間振とう (150 rpm) して種培養を行った. その種培養液 2 mL を真水で調製した生産培地 200 mL を入れた 500 mL 容三角フラスコに植菌し, 25°C で14日間, 静置条件で培養した.

(条件 B) 条件 A と同様の種培養と生産培地への植菌を行い, 25°C で7日間, 振とう培養を行った.

(条件 C) 天然海水で調製した種培地と生産培地を用い, 条件 A と同様の培養を行った.

(条件 D) 天然海水で調製した種培地と生産培地を用い, 条件 B と同様の培養を行った.

スクリーニングアッセイに用いた21株の糸状菌の培養液は, 条件 A により調製した. 化学成分研究用に選択した糸状菌 TPU1239 株は, すべての培養条件 A-D による検討を行い, 最も強い活性を示した培養条件 B を化合物生産用に使用した.

3-6. TPU1239 株の培養と化合物 1 と 2 の単離

真水で調製した種培養液を 500 mL 容三角フラスコ 12 本 (2.4 L) に植菌し, 7日間振とう培養した後, 2.4 L のアセトンを加えて30分間の超音波処理をした. これを濾過し, 濾液のアセトンを留去後, 得られた水溶液を 2.4 L ずつの酢酸エチルで3回抽出した. 酢酸エチル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧濃縮して粗抽出物 754.6 mg を得た. この粗抽出物を少量の30%メタノール-水に溶解して ODS カラム (38 g) に吸着させ, メタノール-水 (30, 50, 70, 100%メタノール, 各 120 mL) で段階的に溶出した. 化合物 1 と 2 は 100%メタノールで溶出され, この画分を濃縮乾固して 139.5 mg の褐色油状物質を得た. これをメタノールに 50 mg/mL の濃度で溶解し, 分取 HPLC (カラム,

PEGASIL ODS 10×250 mm; 移動相, 70%メタノール水溶液; 流速, 2.0 mL/min; 検出, UV at 220 nm) を用いて褐色油状の化合物 1 (2.24 mg) と 2 (0.21 mg) を単離した. 化合物 1 と 2 はこの分取 HPLC でそれぞれ 23 分と 14 分に溶出した.

6-[(*E*)-Hept-1-enyl]-*a*-pyrone (1) ¹H-NMR (400 MHz, in CD₃OD) δ : 0.91 (3H, t, $J=7.3$ Hz), 1.34 (2H, m), 1.34 (2H, m), 1.49 (2H, m), 2.25 (2H, q, $J=7.3$ Hz), 6.12 (1H, m), 6.16 (1H, m), 6.20 (1H, m), 6.65 (1H, dt, $J=7.3, 15.6$ Hz), 7.48 (1H, dd, $J=6.8, 9.2$ Hz). ¹³C-NMR (100 MHz, in CD₃OD) δ : 14.3, 23.5, 29.5, 32.7, 33.7, 104.9, 114.2, 123.0, 140.5, 146.6, 161.1, 164.3. UV λ_{\max} (CH₃OH) nm (ϵ): 201 (17150), 227 (12100), 328 (3350). EI-MS m/z : 192 [M]⁺.

6-*n*-Pentyl-*a*-pyrone (2) UV λ_{\max} (CH₃OH) nm (ϵ): 201 (11000), 226 (7040), 300 (5300). EI-MS m/z : 166 [M]⁺.

3-7. PTP1B 阻害活性試験³⁾

クエン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に溶解した PTP1B を 96 穴プレート (Corning 社) に 100 μ L ずつ分注し, 各濃度に調製した試験化合物のメタノール溶液を 2 μ L ずつ加えて 37°C で 10 分間静置した. 次に, クエン酸塩緩衝液 (pH 6.0) に溶解した pNPP を 100 μ L ずつ添加し, 37°C で 30 分間静置した後, 10 M NaOH を 10 μ L ずつ加えた. pNPP の脱リン酸化による発色の吸光度を 405 nm の波長で測定し, 酵素活性とした.

3-8. 細胞毒性試験 (MTT アッセイ)⁶⁾

1×10^5 cells/mL に調製した Jurkat 細胞を 100 μ L ずつ分注した 96 穴プレートに, 試験化合物 (最終濃度 0.05–50 μ M) を 1 μ L ずつ添加し, 37°C で 48 時間培養した. 次いで, 5.5 mg/mL の MTT 試薬 (Thiazolyl blue tetrazolium bromide を 5.5 mg/mL に PBS で調製溶解後, 0.22 mm のフィルター (Corning 社) で濾過滅菌) を 10 μ L ずつ添加して 37°C で 4 時間培養した後, 細胞溶解液 (40% *N,N*-dimethylfolamide, 20% sodium dodecyl sulfate, 2% CH₃COOH, 0.03% HCl の組成のもの) を精製水で溶解して調製) を 90 μ L ずつ加えて 1 時間振とうした. 細胞生存率は, 550 nm の吸光度を MTP-500 (Corona 社) を用いて測定した値より算出した.

3-9. 細胞毒性試験 (WST-1 アッセイ)⁷⁾

Huh-7 細胞 (1×10^4 cells/well) を 96 穴プレートに分注し, 37°C で一晩培養した後, 試験化合物 (最終濃度 50 μ M) を添加した. そのプレートを

37°Cで48時間インキュベートした後、WST-1溶液(0.5 mMのWST-1試薬と0.02 mMの1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate)を各ウェルに添加し、37°Cで1時間培養した。各ウェルの吸光度(438 nm)をSH-1200 Microplate Reader (Corona社)で測定し、細胞生存率を算出した。

謝辞 本研究の一部は、科学研究費補助金、若手研究(B)(No. 25870660)および財団法人日本化学研究会の支援を受けて行われた。質量分析を行っていただいた本学中央機器センターの佐藤真一氏、松木智之氏、本研究の一部を補助していただいた本研究室配属生の成田麗加氏、今野翔太氏、高橋亮介氏に感謝致します。

REFERENCES

- 1) (a) Barr, A. J., *Future Med. Chem.*, **2**, 1563–1576 (2010). (b) Zhang, S., Zhang, Z. Y., *Drug Discov. Today*, **12**, 373–381 (2007). (c) Lee, S., Wang, Q., *Med. Res. Rev.*, **27**, 553–573 (2007).
- 2) Jiang, C. S., Liang, L. F., Guo, Y. W., *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 1217–1245 (2012).
- 3) (a) Yamazaki, H., Sumilat, D. A., Kanno, S., Ukai, K., Rotinsulu, H., Wewengkang, D. S., Ishikawa, M., Mangindaan, R. E., Namikoshi, M., *J. Nat. Med.*, **67**, 730–735 (2013). (b) Yamazaki, H., Nakazawa, T., Sumilat, D. A., Takahashi, O., Ukai, K., Takahashi, S., Namikoshi, M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2151–2154 (2013).
- 4) Zhang, D., Li, X., Kang, J. S., Choi, H. D., Son, B. W., *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 887–888 (2007).
- 5) Collins, R. P., Halim, A. F., *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 437–438 (1972).
- 6) Mosmann, T., *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55–63 (1983).
- 7) Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S., *Biotechnol. Annu. Rev.*, **11**, 127–152 (2005).
- 8) Helaly, S., Schneider, K., Nachtigall, J., Vikineswary, S., Tan, G. Y., Zinecker, H., Imhoff, J. F., Süssmuth, R. D., Fiedler, H. P., *J. Antibiot.*, **62**, 445–452 (2009).
- 9) Hohmann, C., Schneider, K., Bruntner, C., Brown, R., Jones, A. L., Goodfellow, M., Krämer, M., Imhoff, J. F., Nicholson, G., Fiedler, H. P., Süssmuth, R. D., *J. Antibiot.*, **62**, 75–79 (2009).