

研究区分	教員特別研究推進 地域振興
------	---------------

研究テーマ	静岡産植物を由来とする大腸発がん抑制物質の開発				
研究組織	代表者	所属・職名	薬学部・特任教授	氏名	長田 裕之
	研究分担者	所属・職名	薬学部・教授	氏名	渡辺 賢二
		所属・職名	薬学部・講師	氏名	佐藤 道大
		所属・職名	薬学部・助教	氏名	岸本 真治
	発表者	所属・職名	薬学部・講師	氏名	佐藤 道大

講演題目	植物エキスライブラリーからのコリバクチン生合成阻害剤の探索
------	-------------------------------

研究の目的、成果及び今後の展望	<p>コリバクチン生合成阻害剤を見出すため、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所が提供する食品構成成分を含んでいる植物エキスライブラリー（10,080種類）を対象に大規模なスクリーニングを行った。</p> <p>&lt;方法&gt;</p> <p>1) 1次スクリーニング（Clbプローブアッセイ） 植物エキスライブラリーに対して、Clbプローブアッセイを用いて1次スクリーニングを行った。用いた蛍光プローブは、ClbPによって加水分解され、蛍光的に検出可能な部分である7-アミノ-4-メチルクマリンを放出するように設計されている。したがって、ClbPを産生するコリバクチン産生菌株培養液にプローブを添加すると、強い蛍光シグナルを検出できる。一方、ClbPを阻害すると、蛍光シグナルが弱くなる。このメカニズムに基づいて、コリバクチン産生阻害物質のスクリーニングを行った。</p> <p>コリバクチン産生菌#50 または#50c1bP 遺伝子ノックアウト株の培養液に植物エキスを添加し、終濃度 0.1mM となるように Clb プローブ溶液を加えた。プレート表面にシールを貼り、37°C、24 時間の静置培養後、励起波長 350 nm、測定波長 460 nm で蛍光測定した。コリバクチン産生菌と c1bP ノックアウト株の蛍光値の差をネガティブコントロールとして加えた DMSO と比較し、蛍光強度の増加率を算出した。</p> <p>2) 2次スクリーニング（<i>N</i>-myr-D-Asn の定量） 1次スクリーニングで陽性と判断した化合物に対して、産生する <i>N</i>-myr-D-Asn の定量により2次スクリーニングを行った。コリバクチンは非常に不安定な物質で速やかに分解されてしまう。このためその産生途中で産生される <i>N</i>-myr-D-Asn を定量することで、コリバクチン産生活性を推定した。</p> <p>2次スクリーニングでは、#50培養液98 μLに植物エキス2 μLを添加した。プレート表面にシールを貼り、37 °C、24 時間の静置培養を行った。その後、1.5 mLエッペンドルフチューブに1 N HCl 356 μL、500 ng/mL <i>d27</i>-myr-asn 4 μLを添加し、さらに氷上で冷やしながら培養液40 μLを加えた。EtOAc 400 μLを加え、遠心後、上清250 μLを新たな1.5 mLエッペンドルフチューブに採取し、減圧下、濃縮乾固した。DMF 50 μLを加え、ボルテックス、遠心後、上清45 μLをLC-MS解析した。ネガティブコントロールとして加えたDMSOと比較し、<i>N</i>-myr-D-Asn産生を抑制している植物エキスを選抜した。</p> <p>&lt;結果&gt;</p> <p>1次スクリーニングではコリバクチン産生阻害活性が強い場合、蛍光が抑制され、コリバクチン産生阻害活性が無い場合、蛍光が増加する。よって蛍光強度を判定の基準とした。また、一部の植物エキスには何らかの蛍光物質があらかじめ含まれており、培養開始直後の蛍光強度が2,000を超えるサンプルは誤差が大きすぎることから、1次スクリーニングでは未判定とした。その結果、10,080種の植物エキスから582種の植物エキスにおいて蛍光抑制を見出した。さらに2次スクリーニングを行った結果、73の植物エキスをコリバクチン産生阻害を確認した。今後これらの作用の解明、目的化合物の特定を行い、最終的には大腸発がんの予防剤開発につながることを期待される。</p>
-----------------	---