

令和元年9月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04546

研究課題名(和文)細胞表面の「生命装置」に作用する海洋天然物の探索

研究課題名(英文) Search for marine natural products that act on "cellular machinery" on cell surface

研究代表者

酒井 隆一 (Sakai, Ryuichi)

北海道大学・水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜表面に埋め込まれたイオンチャンネルや受容体、脂質、糖鎖等は細胞間の情報交換を担う窓口であり、多細胞生物の恒常性を維持する「生命装置」といえる。本研究では海洋生物の水溶性抽出物より、シナプス受容体であるセロトニン受容体、オピオイド受容体、グルタミン酸受容体等に作用する新規化合物を見出した。これに加え水溶性にもかかわらず細胞膜を透過して細胞内に侵入するペプチド毒、タンパク質毒そして低分子化合物を見出し、海洋生物の水溶性抽出物が優れた神経活性物質の探索源であるのみならず、細胞のバリアである生体膜を攻略する分子を含んでいることを示した。これらの分子は、薬物送達システムの開発に資する可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた神経活性物質は、脳神経伝達の調整に重要な役割を持つセロトニン受容体やオピオイド受容体に作用する新規の化合物である。この知見は、受容体に作用するに必要な化学構造の情報を提供し、未知の神経機能の解明、さらには神経疾患治療薬の開発につながる。また、本研究で得られたタンパク質毒素は細胞表面から細胞内に侵入し、核まで到達する。このような機能をつまく生かすことで、薬物や遺伝子を核内に届ける技術の開発につながる。本研究の成果は海洋生物資源の高度利用をさらに推進する基盤を築くものである。

研究成果の概要(英文)：Ion channels, receptors, sugar chains, etc. embedded in the cell membrane surface serve as the window for information exchange between cells, and can be regarded as "cellular machinery" that maintains homeostasis of multicellular organisms. In this study, we found novel compounds that act on synaptic receptors such as serotonin receptor, opioid receptor and glutamate receptor from water-soluble extracts of marine organisms. In addition to this, we also found peptide toxins, protein toxins and low molecular weight compounds that penetrate the cell membrane to enter cells despite being water soluble molecule. These results demonstrated that water soluble extract of marine organisms is an excellent source for not only neuroactive substances but also molecules that attack biological membranes act as cell barriers. These molecules are likely to have structural units that contribute to the development of drug delivery systems.

研究分野：水産化学

キーワード：海綿 ホヤ 神経受容体 毒素 タンパク質 ペプチド アルカロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、フグ毒テトロドトキシンが鎮痛剤として臨床開発されるなど、海洋天然物から全く新しいコンセプトの中枢神経疾患治療薬を開発する動きが活発化し、海洋天然物の特異な構造に眠る価値が再認識されている。代表者は、グルタミン酸受容体に作用する海洋天然物の研究を先駆けているが、その研究過程で見出した種々の化合物がより広い作用標的と特異な作用機構を示すことがわかり、この分野を展開・発展させることで神経の未知機能を指し示す化合物が発見できると確信した。

2. 研究の目的

細胞膜表面に埋め込まれたイオンチャンネルや受容体、脂質、糖鎖等は細胞間の情報交換を担う窓口であり、多細胞生物の恒常性を維持する「生命装置」といえる。本研究は、うつ病や神経損傷の病態に関連する指標を探索研究に加えることで、海洋天然物・合成類縁体の多様な化合物プールから複雑な神経機能の解明、さらには神経疾患治療薬の開発につながる物質を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

海洋生物の水溶性抽出物を、マウスを用いた行動実験、細胞に対する作用、溶血性、ブラインシュリンプに対する毒性、抗カビ性を組み合わせたパネルで評価した。また、神経保護作用に関しては培養神経細胞にアミロイドペプチドで損傷を加え、化合物による修復を指標とした。活性を示した試料は活性もしくは分光学的な特徴を指標に精製し活性本体を追った。

4. 研究成果

(1) パラオ産のホヤからより得られた新規グアニジンアルカロイド
パラオ共和国で採集したジデムニ (Didemnidae) 科のホヤの水抽出物はマウスの自発行動を抑制する作用を示したので、活性成分の分離を行ったところ、新規のグアニジンアルカロイドであるメルパラジン(1-1e) およびドーパルジミン(2)を単離した。これらの化合物は、脳神経伝達を調節するセロトニン受容体やオピオイド受容体に作用したことから、マウスで観察された行動抑制は神経受容体にこれらの化合物が作用したためと推測された(図1)。

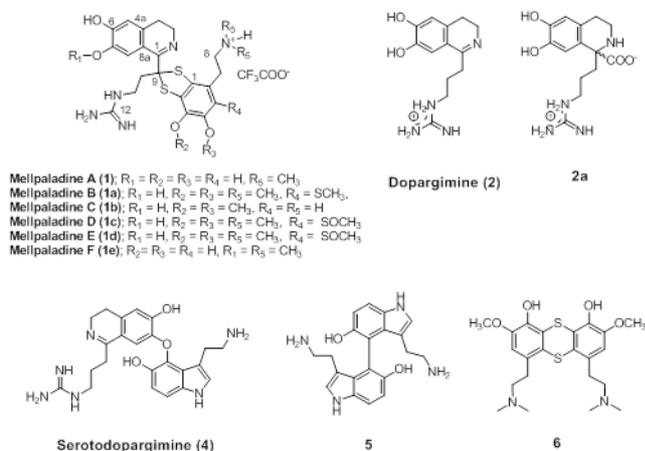


図1. パラオ産ジデムニ科ホヤより得られた新規グアニジンアルカロイドおよび芳香族化合物

リソクリバディン類(6)はホヤ特有の含硫黄ドーパミンでその生合成に関して知見がほとんどなかったが、今回初めて生合成仮説を提案するきっかけとなる観察結果を得た。その他にも新規化合物セロトドーパルジミン(4)やセロトニンダイマー(5)等の芳香族化合物が得られ、本種が特異な芳香族化合物の生合成機構を持つことが示唆された。

(2) 新規トリスグアニジンアルカロイド KB343

パラオ産スナギンチャク、*Epizoanthus illoricatus* から新規トリスグアニジンアルカロイド KB343 を単離した。KB343 はこれまでにない骨格構造を持ち、分子内に3つのグアニジンを内包している特異な分子構造を持つ。KB343 は細胞毒性と抗カビ作用を示すとともにマウスに脳室内投与すると遅効性の致死活性を示した。活性発現機構の解明が課題である。

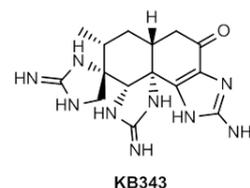
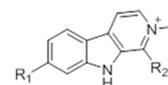


図2. パラオ産スナギンチャク、*Epizoanthus illoricatus* から得られた新規トリスグアニジンアルカロイドKB343

(3) 函館産のホヤ *Cnemidocarpa irene* の芳香族代謝物

本試料からは新規カルボリンおよびプリン化合物をはじめとした新規活性物質を見出した(図3)。これらの化合物は、アルツハイマー病治療薬のガランタミンに匹敵するアセチルコリンエステラーゼ阻害活性を示した。また、ホヤの血液の主成分としてカルボリン化合物が含まれていた。これらに加えて11種の新規化合物を単離し、その一つにはグルタミン酸受容体に対する親和性を確認した。



Irenecarboline A $R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{H}$
Irenecarboline B $R_1 = \text{Br}$, $R_2 = \text{CH}_3$
N-methyl- β -carbolin $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$

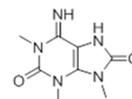


図3. 函館産のホヤ *Cnemidocarpa irene* より得られたアセチルコリンエステラーゼ阻害物質

(4) 海綿に含まれる神経修復物質

パラオ産の海綿 *Siphonodictyon* より神経修復物質 DDCA を見出し、構造決定及び合成を行った。しかし、DDCA の活性の最大発現には同時に含まれていたアミノ酸誘導体 SMET が必要であることが分かった。これらの活性発現機構を調べるのは今後の課題である。

(5) アークユレインの研究

西表産海綿 *Axinyssa aculeata* より得られたポリアミンペプチド、アークユレイン (ACU、図4) の作用機構を詳細に調べ、ACU-A が細胞膜にリン脂質選択的に結合することが示唆された。ACU の活性機序を解明するためにペプチド部 (AcuPep) の小規模での大腸菌を用いた発現実験を行い、得られたペプチドの溶血性を調べたところ、活性は見られず、ポリアミンが活性に必須である可能性が示唆された。一方、ポリアミンを含む N-末端残基 pACU-B については全合成を試み、完全保護体の pACU-B 合成に成功した。興味深いことに、pACU-B 合成の副産物として得られた誘導体 A をマウスに脳室内投与したところ、興奮性の痙攣誘発活性を誘発した。しかしポリアミンのついた B や pAcu-B 自身にはこのような活性は無いので作用機構を解明するのが課題である。さらに、天然の ACU 類縁体の探索も行い新規の ACU-D を単離・構造決定した。ACU-A は 10kDa の蛍光ナノ粒子を細胞内へ送達する活性を示すことを今回初めて見出した。この結果から ACU をはじめとした海洋生物のポリカチオン化合物がドラッグデリバリーの素子となる可能性が示唆された。

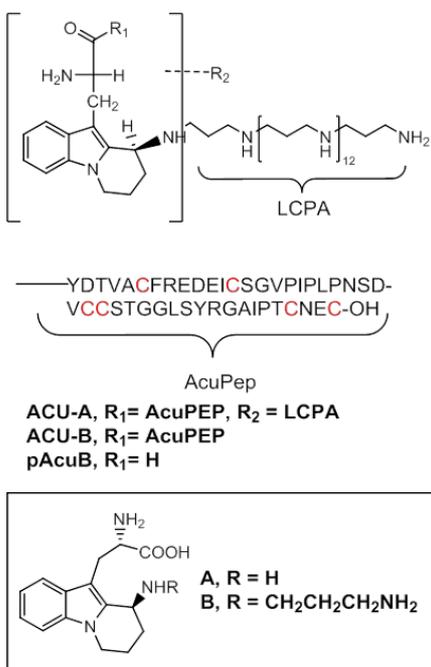


図4. ACU-A, B および合成誘導体 A, B の構造

(6) 海綿毒素 SOR の研究

西表産海綿 *Spongosorites sp.* より毒素タンパク質ソリテシジン (SOR) を得た。SOR 分子量約 110 kDa のタンパク質で、培養がん細胞やマウスに対して最強の海洋毒とされるパリトキシンよりも低濃度で毒性を示すことを明らかにした。SOR はゆっくりと細胞内に侵入し 16 時間ほどかけて核内に移行する様子を捉えることに成功した。SOR は 947 残基からなる一本鎖のペプチドで DNaseI のモチーフを N-末端側に持つが、C-末端側のドメインは酵素を核内に運ぶ送達子として機能している可能性が強く示唆された。部位別のペプチド発現実験を行い核送達機能の機序を解明することが次の課題である。

(7) トロンボエチン様作用を持つ新規タンパク質 ThC の研究

ミクロネシア産海綿 *Corticium sp.* より見出した新規タンパク質トロンボコルシチン (ThC) は造血サイトカイン受容体の一種であり、血球前駆細胞を血小板へと分化させるトロンボポエチン受容体を活性化した。ThC は外因性のサイトカイン様活性を示す初めてのタンパ

ク質であり、未解明な点の多いサイトカイン受容体の活性化機構を解明する有用なツールとなる物質である。現在 ThC の活性発現機序について鋭意に研究を進めており、トロンボポエチン受容体の新規活性化メカニズムに関する知見が得られている。今後は ThC が既存の医薬とどのような相互作用を示すかを詳細に検討するとともに、モデル細胞を用いて人の血小板産生にどのような作用を示すかを検討することで、医薬や研究試薬としての利用を推進したい。

(8) まとめ

本研究では、海洋生物の水溶性抽出物には多様な低分子生理活性物質が含まれ、それらの多くが、構造的にユニークなだけでなく細胞表面の受容体や生体膜に作用することを立証した。一方で、タンパク質を含む高分子化合物においても、細胞に侵入、核に到達することや、サイトカイン受容体に作用するなど予期しなかった活性を示す化合物が見出された。これは今後、低分子化合物に加え中・高分子生理活性物質の探索を推進することで、これまでに例のない活性をもった化合物が見出されることを強く示唆する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Watari H, Nakajima H, Atsumi W, Nakamura, T., Nanya, T., Ise, Y., Sakai, R. A novel sponge-derived protein thrombocortin is a new agonist for thrombopoietin receptor. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* 2019, 82-88. 査読有 DOI 10.1016/j.cbpc.2019.04.003

Sakai R., Tanano K, Ono T, Kitano M, *et al.* Soritesidine, a Novel Proteinous Toxin from the Okinawan Marine Sponge *Spongisorites* sp. *Mar. Drugs* 2019,17:216. 査読有 DOI 10.3390/md17040216

Tsukamoto S, Itagaki H, Morokuma K, Miyako, K., Ishikawa, Y., Sakai, R., Oikawa, M. An efficient enantiospecific synthesis of neuroactive glutamate analogues. *Heterocycles* 2019. in press 査読有 DOI 0.3987/COM-19-S(F)2

酒井隆一, 松永智子. 海綿の長鎖ポリアミン. *ポリアミン* 2018,5:5-13. 査読無 <http://pa.umin.jp/PolyamineVol5No1Apr2018.pdf>

Shiozaki H, Miyahara M, Otsuka K, , *et al.* 11 人中 10 番 Studies on Aculeines: Synthetic Strategy to the Fully Protected Protoaculeine B, the N-Terminal Amino Acid of Aculeine B. *Org. Lett.* 2018. 3403-3407 査読有 10.1021/acs.orglett.8b01331

Matsumura K, Taniguchi T, Reimer JD, Noguchi S, Fujita MJ, Sakai R. KB343, a Cyclic Tris-guanidine Alkaloid from Palauan Zoantharian *Epizoanthus illoricatus*. *Org. Lett.* 2018,20:3039-3043. 査読有 DOI 10.1021/acs.orglett.8b01069

Hlokoane O, Itagaki H, Chiba M, Noda T, Takasaki Y, Miyako K, *et al.* 9 人中 7 番 Prins reaction Using Trioxane for Trisubstitute cis-Fused Hexahydro-2H-furo[3,2-b]pyran Derivative. *Heterocycles* 2018,96:453-460. 査読有 DOI 10.3987/COM-17-13776

Tadokoro Y, Nishikawa T, Ichimori T, Matsunaga S, Fujita MJ, Sakai R. N-Methyl- β -carbolinium Salts and an N-Methylated 8-Oxoisoguanine as Acetylcholinesterase Inhibitors from a Solitary Ascidian, *Cnemidocarpa irene*. *ACS Omega* 2017,2:1074-1080. 査読有 DOI 10.1021/acsomega.7b00127.

Motohashi S, Jimbo M, Naito T, Suzuki T, Sakai R., Kamiya H. Isolation, amino acid sequences, and plausible functions of the galacturonic acid-binding egg lectin of the sea hare *Aplysia kurodai*. *Mar. Drugs* 2017,15:161. 査読有 DOI 10.3390/md15060161

Oda Y, Zhang Q, Matsunaga S, Fujita MJ, Sakai R. Two New Mycosporine-like Amino Acids LC-343 and Mycosporine-ethanolamine from the Micronesian Marine Sponge *Lendenfeldia*

chondrodes. *Chem. Lett.* 2017,**46**:1272-1274. 査読有 DOI 10.1246/cl.170490

Kita A, Jimbo M, Sakai R, Morimoto Y, *et al.* Crystal structure of octocoral lectin SLL-2 complexed with Forssman antigen tetrasaccharide. *Glycobiol.* 2017,**27**:696-700. 査読有 DOI 10.1093/glycob/cwx043

Chiba M, Ishikawa Y, Sakai R, Oikawa M. Three-Component, Diastereoselective Prins–Ritter Reaction for cis-Fused 4-Amidotetrahydropyrans toward a Precursor for Possible Neuronal Receptor Ligands. *ACS Comb. Sci.* 2016,**18**:399-404. 査読有 DOI 10.1021/acscombsci.6b00046

Uchimasu H, Matsumura K, Tsuda M, *et al.* 7人中7番 Mellpaladines and dopargimine, novel neuroactive guanidine alkaloids from a Palauan Didemnidae tunicate. *Tetrahedron* 2016,**72**:7185-7193. 査読有 DOI 10.1016/j.tet.2016.09.051

Fukushima K, Ishikawa Y, Sakai R, Oikawa M. A monocyclic neodysiherbaine analog: Synthesis and evaluation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016,**26**:5164-5167. 査読有 DOI 10.1016/j.bmcl.2016.09.074.

〔学会発表〕(計16件)

辺浩美、中島寛弥、渥海航、酒井隆一、海綿由来蛋白質 ThC によるトロンボポエチン受容体の活性化機構、平成 31 年度日本水産学会春季大会、2019 年 3 月 28 日 東京海洋大学 (東京都、港区)

酒井隆一、細胞表面の「生命装置」に作用する水溶性海洋天然物の探索(低分子編)、天然薬物の開発と応用シンポジウム 2018 年 10 月 6 日、熊本大学

松村賢、谷口透、J. Reimer, 野口峻太郎、藤田雅紀、酒井隆一 パラオ産 *Epizoanthus illoricatus* より得られた新規トリスグアニジンアルカロイドの構造と生理活性、第 60 回天然有機化合物討論会、2018 年 9 月 26 日、久留米シティプラザ

K. Matsumura, M. J Fujita, J. Reimer, R. Sakai Novel guanidine alkaloids from an aqueous extract of Palauan *Epizoanthus* sp, International Symposium: Fisheries Science for Future Generations, 2017 年 9 月 23 日、東京海洋大学 (東京都、港区)

K. Miyako, Y. Tadokoro, T. Ichimori, M. J Fujita, R. Sakai Bioactive alkaloids from a solitary ascidian *Cnemidocarpa irene*, International Symposium: Fisheries Science for Future Generations, 2017 年 9 月 23 日、東京海洋大学 (東京都、港区)

H. Watari, H. Nakajima, W. Atsumi, T. Nakamura, T. Nanya, M. J Fujita, R. Sakai A novel sponge-derived protein Thrombocortin with thrombopoietin-like activity International Symposium: Fisheries Science for Future Generations、2017 年 9 月 23 日、東京海洋大学 (東京都、港区)

宮古圭、田所洋平、市森大地、藤田雅紀、酒井隆一 単体ボヤ *Cnemidocarpa irene* に含まれる生理活性アルカロイドの探索、第 59 回天然有機化合物討論会 2017 年 9 月 20 日、札幌市民ホール

R. Sakai, Bioactive metabolites from water-soluble marine extracts. American Society of Pharmacognosy Meeting, 2017 年 7 月 29 日 Portland, USA

宮古圭、保野洋子、品田哲郎、藤田雅紀、酒井隆一、単体ボヤ *Cnemidocarpa irene* より得られた芳香族化合物の構造と機能平成 30 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 28 日 東京海洋大学 (東京都、港区)

飯田祐介、中野宏治、上田拓也、北野雅也、藤田雅紀、酒井隆一 西表産 *Spongosorites* 属海綿由来の新規タンパク質毒素の作用機構 平成 30 年度日本水産学会春季大会

2017年3月28日、東京海洋大学（東京都、港区）

松村賢、内舩肇、藤田雅紀、酒井隆一、津田正史、熊谷慶子、赤壁麻衣、パラオ産 *Didemnidae* 科ホヤに含まれる新規神経活性物質グアニジンアルカロイドとその関連化合物に関する研究、日本水産学会春季大会 2017年3月26日、東京海洋大学（東京都、港区）

R. Sakai, Soritesidine: A potent protein toxin from the marine sponge *Spongisorites sp.*, US-JAPAN symposium on marine natural products 2016年11月14日、ハワイ大学癌研究所 米国 ホノルル市

酒井隆一、中野宏治、上田拓也、北野雅也、小野 巧、棚野豪太、神保 充、藤田雅紀、西表島産 *Spongisorites* 属海綿に含まれるタンパク質毒素の分離、平成28年度日本水産学会年会 2016年3月28日

田所洋平、酒井隆一、西川輝明、藤田雅紀北海道産単体ボヤ *Cnemidcarpa irene* に含まれる生理活性物質に関する研究 2016年3月28日 東京海洋大学（東京都、港区）

内升 肇、松村 賢、津田 正史、熊谷 慶子、赤壁 舞依、藤田雅紀、酒井隆一 パラオ産 *Didemnidae* 科ホヤ由来新規神経活性化合物群 Mellpaladine 類に関する研究第57回天然有機化合物討論会、2015年9月7日 神奈川県民ホール（神奈川県、横浜市）

酒井隆一 海綿毒素ソリテシジンの研究第62回トキシシンポジウム 2015年7月8日、エクシード合歓、賢島（三重県、志摩市）

〔図書〕(計1件)

酒井隆一(上村大輔 編)

天然物の化学II(科学のとびら 64): 自然からの贈り物、東京化学同人、2018年、pp141-147

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.fish.hokudai.ac.jp/faculty-member/sakai-ryuichi/?key=en>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東田 千尋

ローマ字氏名：Tohda Chihiro

所属研究機関名：富山大学

部局名：和漢医薬学総合研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 10272931

研究分担者氏名：及川 雅人

ローマ字氏名：Oikawa Masato

所属研究機関名：横浜市立大学

部局名：生命ナノシステム科学研究科(八景キャンパス)

職名：教授

研究者番号(8桁): 70273571

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。