

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04645

研究課題名(和文) 医薬資源としての持続的利用のためのインドネシア海洋生物調査

研究課題名(英文) Investigation of marine organisms in Indonesia intended for sustainable use as medicinal resources

研究代表者

荒井 雅吉 (Arai, Masayoshi)

大阪大学・薬学研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：80311231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシア海洋薬用資源の持続的利用と開拓を目的に、ジャワ島西部パナイタン島周辺、バリ島西部バニュエダンおよびスラウェシ島北部ゴロンタロ地区のサンゴ礁域において、底生海洋生物158サンプルを採集した。また、資源の保全と持続的な利用のため、採集した底生海洋生物の総ゲノムの保存、175種の内生微生物の分離を行った。そして生物試料を標本として保存するとともに、水中写真をもとにして、生息状況、生息環境、形態的特徴の情報をまとめ、リスト化した。さらに、生物試料および内生微生物の培養物から抽出物エキスを調製して、成分分析および生物活性試験の結果を紐付けしてデータベース化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋薬用資源の調査研究が遅れ、環境破壊も進んでいるインドネシアにおいて、海洋薬用資源の現状把握とともに、資源の保全と持続的な利用を勘案した開拓を実施した例はこれまでにない。また各種試料の保存を行うだけでなく、一連の情報の体系化も行っていることから、これらの学術的価値は高く、今後、特に創薬研究領域に大きく貢献できると思われる。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of sustainable use and development of Indonesian marine medicinal resources, totally 158 samples of benthic marine organisms were collected in the coral reefs of Panaitan Island in western Java, Banyuwedang in western Bali and Gorontalo area in northern Sulawesi. In order to use the resources sustainably, we preserved the whole genome of the collected marine organisms and separated totally 175 species of endophytic microorganisms. Then, the biological samples were saved as specimens, and information of habitat, environments, morphological characteristics was listed based on the pictures of marine organisms under the water. In addition, the extracts library was constructed from marine organisms and cultured microorganisms, and then information of biological activities and bioactive constituents were also listed.

研究分野：天然物化学, ケミカルバイオロジー

キーワード：海洋薬用資源 インドネシア 医薬シーズ 底生海洋生物 海洋微生物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

海綿やホヤなどの底生海洋生物からは、多彩な化学構造と生物活性を有する化合物が数多く発見されており、新しい医薬シーズ創製のための探索資源として注目されている。一方、インドネシアのサンゴ礁域には、豊富に底生海洋生物が生息しているが、その調査研究は遅れており、自然破壊も年々進行している現状があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、豊富に海洋薬用資源を保有しながら、その調査研究が遅れ、自然破壊も進みつつあるインドネシアサンゴ礁の底生海洋生物について、生息状況、環境に関する情報収集、医薬シーズ資源開拓のための生物試料採集と抽出エキスをライブラリーの構築を行う。また、資源の保全と持続的利用のため、採取した底生海洋生物の総ゲノムの保存、内生微生物の分離とその培養抽出エキスをライブラリーを構築する。さらに、医薬シーズの創出を効率良く推進することを目的として、表現型スクリーニング法による生物活性試験を多角的に実施し、得られた活性評価結果と化学分析した産生成分等の情報をあわせて整理する。

### 3. 研究の方法

(1) 日本 (大阪大学、琉球大学、兵庫医療大学) とインドネシア (ランブン大学、ディポネゴロ大学) の天然物化学者を中心とする共同研究チームを形成し、スキューバダイビングによる底生海洋生物の調査・採集を行い、調査地域での生物種の生息状況に関する情報を収集する。採集した底生海洋生物は、その生物標本を保存するだけでなく、水中写真をもとにして、生息環境、形状・色等の形態的特徴を整理する。また、採集した各底生海洋生物の抽出エキスを調製し、これをライブラリー化する。

(2) 採取した各底生海洋生物から種々の培地を用いて内生微生物を単一分離・保存して、さらに分離した微生物の培養物の抽出エキスをライブラリーを構築する。

(3) 採取した底生海洋生物から、常法に従い総ゲノムの抽出を行い、これをライブラリー化して保管する。

(4) 2017年度はジャワ島西部パナイタン島周辺、2018年度はバリ島西部パニュエダン、2019年度はスラウェシ島北部ゴロンタロ地区を拠点として、周辺サンゴ礁域の調査を行った (図1)。



図1 調査地域図

(5) 表現型スクリーニング法による生物活性試験は、以下の6つの評価系を用いて実施した。

#### ① 低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

腫瘍内の低酸素環境に適応したがん細胞は、がんの病態悪化に大きく寄与している。本評価系では、ヒト前立腺がん細胞 DU145 を 1% の低酸素条件で培養することにより、低酸素環境に適応させ、通常培養条件と比較して、低酸素培養条件選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

#### ② グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

①と同様、がんの病態悪化に寄与している栄養飢餓環境適応がん細胞に対して選択的に増殖阻害活性を示すサンプルをスクリーニングする。すなわち、炭素源であるグルコースを除去した培地での培養を栄養飢餓環境のモデルとして、ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 を栄養飢餓環境に適応させた後、被験サンプルの増殖阻害活性を測定した。また、通常培養条件と比較して、グルコース飢餓環境選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

### ③正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC 選択的な増殖阻害物質の探索

本評価系では、がん血管新生阻害物質の創出を効率良く実施することを目的として、血管新生の全ての過程に関与している血管内皮細胞に着目し、がん細胞（ヒト咽頭上皮がん細胞 KB3-1）の増殖には影響を与えず、HUVEC 選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

### ④がん細胞の上皮間葉転換を阻害する化合物の探索

がん転移の初期過程では、運動性の高い間葉系細胞に表現型が変化する上皮間葉転換が起きる。本評価系では、PANC-1 細胞をサイトカイン TGF- $\beta$ で刺激することにより上皮間葉転換を惹起し、顕鏡下での細胞の形態変化を指標に、これを阻害するサンプルを探索した。

### ⑤アメーバ赤痢の増殖を阻害する化合物の探索

アメーバ赤痢は、発展途上国での小児下痢症の主因であり、効果的な治療法や感染制御法の確立が必要とされている。本評価系では、生体内を模倣した、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と腸内細菌との共棲培養環境で、抗赤痢アメーバ活性の測定を行い、腸内細菌には影響を与えず、赤痢アメーバの増殖を選択的に阻害するサンプルを探索した。

### ⑥潜在性結核菌に有効な化合物の探索

結核症に対する化学療法長期化の主因である、潜在化した結核菌にも有効な抗菌物質の創出を目的として、検定菌 (*Mycobacterium smegmatis* および *M. bovis* BCG) を低酸素環境で培養することで潜在状態を誘導し、潜在状態の検定菌に対しても抗菌活性を示すサンプルを探索した。

## 4. 研究成果

2017年度のジャワ島西部パナイタン島周辺での調査では、周辺沿岸10箇所を調査し、合計50サンプルの生物試料を採集した。また、採集した底生海洋生物サンプルから、65種類の内生微生物を分離した。2018年度は、バリ島西部バニュエダン地区において、8箇所のサンゴ礁域から70サンプルの生物試料を採集した。また60種の内生微生物の分離に成功した。さらに2019年度は、スラウェシ島北部ゴロンタロ地区を拠点として、6箇所のサンゴ礁域から、合計38サンプルの試料を採集した。また海綿サンプルから50種類の内生微生物を分離した。

採取した底生海洋生物は、70%エタノールでの固定を行い、標本として保管した。さらに、すべての生物標本には、年度ごとに番号を付与し、水中写真と共に、生息環境、形状・色等の形態的特徴を整理したリストの作成を行った。また、採取した各底生海洋生物の抽出エキスを調製し、これを抽出エキスライブラリーとして保存した。

分離に成功した内生微生物についても同様に、年度ごとに番号を付与し、分離源の情報と共にリスト化した。また、これら菌株をグリセロールストックとして保管すると共に、数種類の培地で培養・抽出したエキスをライブラリー化した。

さらにライブラリー化した抽出エキスおよび培養抽出物について、LC-MSによる成分分析、研究の方法(5)で示した6つの生物活性試験を実施し、これらの結果を生物試料と内生微生物との情報と合わせて紐付けを行い、データベース化した。また、生物活性試験の結果、「②グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質」の評価方法で、3つの底生海洋生物抽出物、5つの内生微生物（真菌）培養抽出物が選択され、「⑤赤痢アメーバの増殖を阻害する化合物の探索」の評価方法では、1つの底生海洋生物抽出物、2つの内生微生物（真菌および放線菌）培養抽出物、「⑥潜在性結核菌に有効な化合物の探索」の評価系では、5つの底生海洋生物抽出物が選択された。また、各評価系で選択されたサンプル間に重複するものはなかった。現在、各評価系で選択されたサンプルからの活性成分の分離を進めている。

一方、近年、高分子量の二次代謝産物合成遺伝子を発現し活性物質を産生させる遺伝子技術の開発が精力的に行われており、近い将来、底生海洋生物から得られる二次代謝産物合成遺伝子を基に、生物活性物質の安定供給が可能になると予想されることから、QIAGEN社のキットを利用して、本研究で採取した各底生海洋生物から総ゲノムを抽出し、クオリティーチェック後、それを保存した。

一連の調査研究の結果については、調査地域の担当役所への報告を行い、最終年度には、インドネシア科学院の海洋研究所において、各調査地域での底生海洋生物の生息・生育状況を中心に研究成果の報告と情報の共有を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jomori Takahiro, Setiawan Andi, Sasaoka Miho, Arai Masayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Cytotoxicity of New Diterpene Alkaloids, Ceylonamides G-1, Isolated From Indonesian Marine Sponge of <i>Spongia</i> sp.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Natural Product Communications	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1934578X19857294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Jomori Takahiro, Hara Yasumasa, Sasaoka Miho, Harada Kazuo, Setiawan Andi, Hirata Kazumasa, Kimishima Atsushi, Arai Masayoshi	4. 巻 74
2. 論文標題 <i>Mycobacterium smegmatis</i> alters the production of secondary metabolites by marine-derived <i>Aspergillus niger</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01345-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tang Rui, Kimishima Atsushi, Ishida Ryosuke, Setiawan Andi, Arai Masayoshi	4. 巻 74
2. 論文標題 Selective cytotoxicity of epidithiodiketopiperazine DC1149B, produced by marine-derived <i>Trichoderma lixii</i> on the cancer cells adapted to glucose starvation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 153 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-019-01357-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tang Rui, Kimishima Atsushi, Setiawan Andi, Arai Masayoshi	4. 巻 74
2. 論文標題 Secalonic acid D as a selective cytotoxic substance on the cancer cells adapted to nutrient starvation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 495 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-020-01390-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sumii Yuji, Kotoku Naoyuki, Han Chisu, Kamiya Kentaro, Setiawan Andi, Vilch?ze Catherine, Jacobs William R., Arai Masayoshi	4. 巻 61
2. 論文標題 3-(Phenethylamino)demethyl(oxy)amptamine as an anti-dormant mycobacterial substance: Isolation, evaluation and total synthesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151924 ~ 151924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.151924">https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2020.151924</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ishida Ryosuke, Matsumoto Hirokazu, Ichii Sayaka, Kobayashi Motomasa, Arai Masayoshi, Kotoku Naoyuki	4. 巻 67
2. 論文標題 Structure-Activity Relationship of Biakamide, Selective Growth Inhibitors under Nutrient-Starved Condition from Marine Sponge	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 210 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Shohei, Kitani Shigeru, Namba Takushi, Arai Masayoshi, Ikeda Haruo, Nihira Takuya	4. 巻 71
2. 論文標題 Engineered production of kitasetalic acid, a new tetrahydro- -carboline with the ability to suppress glucose-regulated protein synthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 854 ~ 861
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-018-0074-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 K. Kamiya, M. Arai, A. Setiawan, M. Kobayashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-dormant mycobacterial activity of viomellein and xanthomegnin, naphthoquinone dimers produced by marine-derived <i>Aspergillus</i> sp.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Prod. Commun.	6. 最初と最後の頁 579-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kotoku Naoyuki, Ishida Ryosuke, Matsumoto Hirokazu, Arai Masayoshi, Toda Kazunari, Setiawan Andi, Muraoka Osamu, Kobayashi Motomasa	4. 巻 82
2. 論文標題 Biakamides A-D, Unique Polyketides from a Marine Sponge, Act as Selective Growth Inhibitors of Tumor Cells Adapted to Nutrient Starvation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1705 ~ 1718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.6b02948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Arai Masayoshi, Shin Dayoung, Kamiya Kentaro, Ishida Ryosuke, Setiawan Andi, Kotoku Naoyuki, Kobayashi Motomasa	4. 巻 71
2. 論文標題 Marine spongean polybrominated diphenyl ethers, selective growth inhibitors against the cancer cells adapted to glucose starvation, inhibits mitochondrial complex II	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 44 ~ 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-016-1025-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 木下遼祐, 君嶋敦, 荒井雅吉
2. 発表標題 潜在性結核菌に有効な海綿由来抗菌物質の探索
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 Masayoshi Arai
2. 発表標題 Bioactive Compounds from Marine Resources and their Mode of Action
3. 学会等名 The 3rd Joint Symposium of Osaka University with Higher Educational Institutions of Brunei Darussalam (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年 ~ 2020年

1. 発表者名 荒井雅吉
2. 発表標題 表現型スクリーニングによる天然物探索と標的分子解析
3. 学会等名 第42回白金シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 荒井雅吉
2. 発表標題 表現型スクリーニングによるMONOTORI (ものとり) と標的分子解析
3. 学会等名 第22回天然薬物の開発と応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Masayoshi Arai
2. 発表標題 Search for new medicinal seeds and drug targets from natural resources
3. 学会等名 The 2nd Joint Symposium of Osaka University with Higher Educational Institutions of Brunei Darussalam (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 城森啓宏、原康雅、笹岡美歩、Andi Setiawan、荒井雅吉
2. 発表標題 微生物共培養法を利用した活性天然物の探索
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 荒井雅吉
2. 発表標題 海洋天然物の魅力と創薬研究への応用
3. 学会等名 第40回新適塾（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 荒井雅吉
2. 発表標題 海洋天然物を活用するケミカルバイオロジー研究
3. 学会等名 第216回Kitasato Microbial Chemistryセミナー（招待講演）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Masayoshi Arai
2. 発表標題 Exploring new medicinal seeds and drug targets from marine resources
3. 学会等名 Joint Symposium of Osaka University with Higher Educational Institutions of Brunei Darussalam（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 石田良典、唐 睿、木村出海、小林資正、荒井雅吉
2. 発表標題 海洋由来微生物が産生する栄養飢餓環境適応がん細胞増殖阻害物質の探索
3. 学会等名 第67回日本近畿支部総会・大会
4. 発表年 2017年～2018年

## 〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yuichi Kobayashi (Ed), Masayoshi Arai	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer-Nature	5. 総ページ数 355
3. 書名 Cutting-Edge Organic Synthesis and Chemical Biology of Bioactive Molecules	

1. 著者名 高山廣光編, 荒井雅吉, 小林資正	4. 発行年 2017年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 546
3. 書名 アルカロイドの科学	

## 〔産業財産権〕

## 〔その他〕

大阪大学大学院 薬学研究科 天然物創薬学分野 ホームページ <a href="http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/">http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/</a>
--

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	アンディ セティアワン (Andi Setiawan)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	アグス トリアント (Agus Triant)		
連携研究者	田中 淳一 (Tanaka Junichi) (20163529)	琉球大学・理学部・教授  (18001)	
連携研究者	青木 俊二 (Aoki Shunji) (60252699)	兵庫医療大学・薬学部・教授  (34533)	