

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05336

研究課題名（和文）愛媛県に生息する海洋生物を対象とした生物活性物質の探索研究

研究課題名（英文）Searching for bioactive compounds from marine organisms at Ehime prefecture

研究代表者

倉本 誠（Kuramoto, Makoto）

愛媛大学・学術支援センター・准教授

研究者番号：50291505

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体中には様々な物質が存在し、生命現象に深くかかわっている。海綿動物は多様な共生微生物を含有することで、二次代謝産物（化学物質）の探索対象として研究されてきた生物である。本研究では水深100m付近に生息する生体を採集し、新しい構造を有する天然有機化合物の発見を目的に研究を展開した。その結果、がん細胞に対して毒性を示す新規な物質、環状構造をしたペプチド類などを複数発見し、構造と機能を明らかとする研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、海洋生物に含まれる二次代謝産物の探索研究を実施した。その成果として、がん細胞に対する増殖抑制を示す物質や新規な構造を有する物質を複数発見してその構造を明らかとした。新規な構造を有する物質は化学的な知見のみならず、生命現象解明や合成目標などとなることから広範の研究者との共同研究へ展開が可能となる。

また、研究対象となった生体試料は、通常採集されながら廃棄される未利用海産資源である。大量の生体採集は環境への負荷付加が大きく社会的な問題となるが、廃棄される生体の有効利用法への展開が期待できる。

研究成果の概要（英文）： Various substances exist in living organisms. Such molecules are known to be deeply involved in biological phenomena. In particular, sponges contain diverse symbiotic microorganisms. Therefore, sponges have been studied as targets for the exploration of biologically active secondary metabolites. In this study, sponges and mollusks were collected from depths of around 100 m, with the aim of discovering bioactive substances contained in them. As a result, we discovered several novel substances, cyclic peptides, etc., which show toxicity against cancer cells. The structures of these compounds were clarified by a combination of mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. Further bioactivity of these compounds is highly interesting.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：生物活性物質 二次代謝産物 構造解析

1. 研究開始当初の背景

自然界の動植物からは、その生態に由来する特徴ある骨格や生理活性を示す分子が報告されてきた。そのような生体機能分子を対象とした探索研究は古くから行われており、数多くの研究成果が報告されてきた。新しい分子は、生命現象解明のためのツール、有機合成標的分子として多くの研究者の興味を引きつけてきた。近年では新しい成分の報告は減少しているが、高感度装置を利用すること、対象を精査することで微量成分の発見が期待できると考えられた。

探索研究における究極の目的は、生体の有する未解明の有機分子発見であり、生命現象の鍵となる物質を明かすことにある。未知の分子の発見と他の研究者への情報提供により関連する学問分野との共同研究へ展開すること期待された。

2. 研究の目的

海洋生物を起源とする生理活性物質の探索研究は国内外で行われているが、内包する二次代謝産物は生息する環境に大きな影響を受けると推測される。研究代表者は、20年間にわたり愛媛県沿岸、特に佐田岬を中心に生物調査を行ってきた。本研究課題では宇和海、伊予灘に生息する海洋生物に内包される化学物質を調査することを目的とした。さらに、廃棄されている海洋生物群が未利用の資源であり、二次代謝産物の探索起源として利用できることを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

探索研究においては研究対象となる試料の選択が大きな問題となる。一般に海洋生物の試料採集は潮間帯や潜水可能域での採集が主になっている。愛媛県では東予地方は護岸工事により自然海岸がほとんどなく、潮間帯での採集は困難である。一方、中予・南予地方は、入り組んだ海岸線を形成しており自然海岸も多く残っているが、漁業権の制約により沿岸および洋上での採集は困難である。しかしながら、申請者は25年にわたり佐田岬漁業協同組合等との連携を行ってきたことから、漁業者の協力により、水深100m前後からの採集を実施することが可能となった。このようにして得られた生物試料を用いて探索研究を実施した。

物質の探索研究としては、生物活性試験法を用いた新規物質の獲得を試みたが、活性の弱い新規化合物については発見が困難となる。そのため、本研究では分離途中の抽出物に対して積極的な機器分析を実施し、得られたスペクトルにおけるシグナルを指標として分離を試みることで特徴ある新規な構造を有する物質の探索研究を実施した。

4. 研究成果

○試料採集について

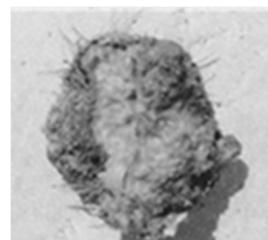
佐田岬周辺では刺し網漁を中心にエビや魚の採集が行われていた。この漁において、特に大潮の時期に海底から剝離した海綿動物や軟体サンゴ類が同時に採集される。このような生物種は、漁業者にとっては市場での販売経路がないため、すべて廃棄されてきた。この海域は海流が早く、洋上で廃棄された海綿動物類が再度着床することは困難である。

現在では、生物保護の観点から生体の大量採集は倫理的に問題となり実施は難しい。しかしながら、本研究では廃棄される試料を対象とすることで、この問題を解決することができた。本課題では、約一か月程度の漁期において継続的な回収を行うことで、1試料あたり5-30kgの生物を集めて冷凍保存し、これを用いて探索研究を行った。2020、2021年度は感染症の拡大により、新規試料の採集を実施することが出来なかったが、前年度までに採集を行い、冷凍保存した試料を用いて研究の継続を行うことができた。

(*Ircinica* sp. 含有成分の変化)

Ircinia sp. は佐田岬周辺で、採集される海綿動物の中でも量的な入手が可能な生物種であった。この海綿動物からは、予備試験においてこれまでに下の図に示すように、フラノテルペン、やチオエステル化合物を得ることが出来る生物種であった。

2018年度に採集することの出来た試料をメチルアルコール中で破砕し、溶出液を作成した。この溶出液は、予備試験で作成した2010年に採集し保管していた試料と異なり、弱い細胞毒性しか示さなかった。そこで、活性を指標とせず分離を行ったが、各画分のNMRスペクトルからは予備試験で認められた物質のシグナルが認められなかった。この原因としては、佐田岬の南側と北側という採集地の違いによることが大きいと考えられる。また、近年の水温の変化率の大きさも漁業者からは指摘されており、その原因についてはさらなる調査を実施してゆきたい。



Ircinia sp.

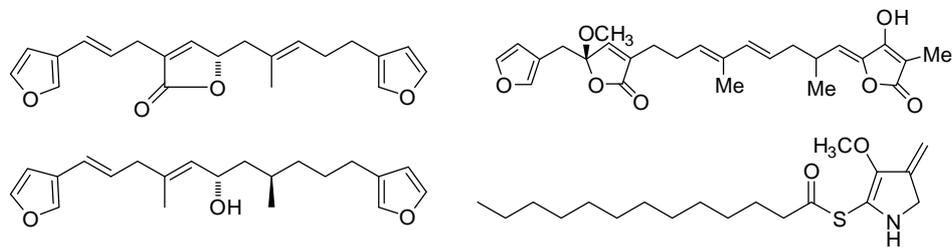


Figure 1. *Ircinia* sp. から単離された化合物 1-3

(ポリアセチレン化合物を含む海綿動物)

右に示す未同定の海綿動物のアルコール抽出液が、HeLa細胞に対して弱いながら活性を示した。この活性を指標として分配操作、カラムクロマトグラフ操作を繰り返して、活性を示す化合物を3種単離した。いずれも核磁気共鳴スペクトルにおいては、長鎖アルカンと複数の4級炭素を有することが確認された。ここで、IRスペクトルを確認したところ、 2200 cm^{-1} 付近に吸収帯を有していたことから、三重結合を複数有することが確認された。最終的に、下図に示す、ポリアセチレン化合物であることが確認出来た。これ以外にも多くのアセチレン化合物を含むことが確認出来ている。

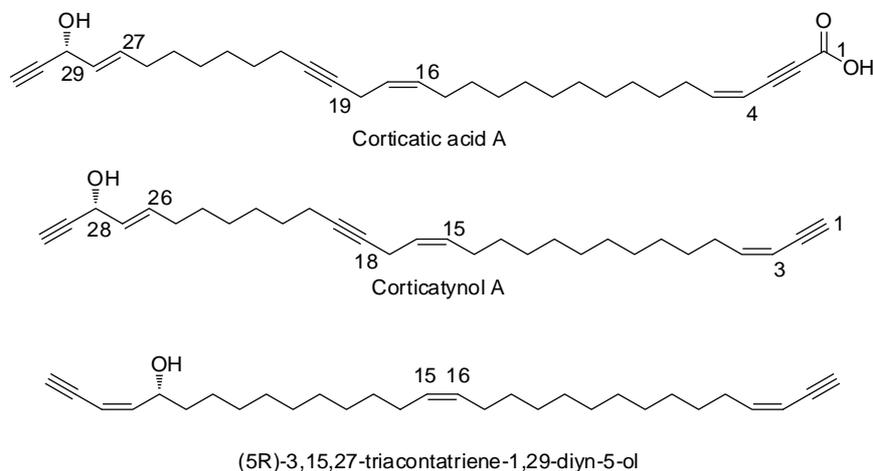


Figure2. 未同定海綿から単離したポリアセチレン化合物 4-6

また、同海域で採集した *Axinella* sp. からは、プロモピロールアルカロイドを有することを報告しているが、この海綿動物の抽出液についてIRスペクトルにおける特性吸収帯を指標として分離をすすめることで、下に示すアセチレン化合物を単離している。

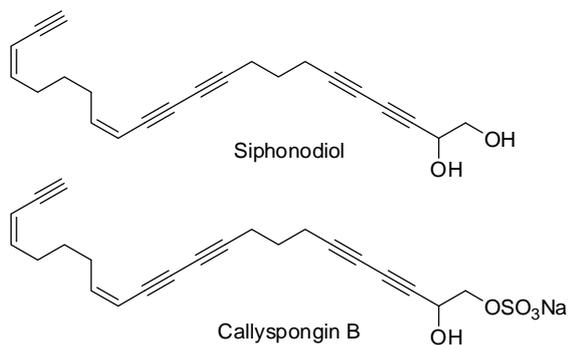


Figure 3. *Axinella* sp. に含まれるポリアセチレン化合物 7,8

(Calyculine および Discokiolide 類を含有する海綿動物)

Discodermia sp. と推定される非常に堅い海綿動物が 27 kg 採集された。この海綿動物のメチルアルコール抽出物は、HeLa 細胞に対して非常に強力な細胞毒性を示した。活性を指標として分離をすすめたところ、 IC_{50} 9 pg/mL を示す画分が得られた。スペクトル解析の結果、400 mg 以上の calyculine A を中心として、既知の Calyculin 類を単離することが出来た。Calyculin は、構造的に特徴的なポリエン構造、スピロアセタール構造を有している。活性にとらわれず、核磁気共鳴スペクトルにおいて観察されるこれら一連のシグナルに注目し、分離をすすめることで、新規な構造を有する新規カリキュリンを単離することができた。 ^{13}C NMR の化学シフト値は、骨格情報を反映することが知られている。そこで、Calyculin A と新規化合物の化学シフト値を比較したところ、南半球については同一の立体化学であることが示唆されている。更なる立体化学の解明をすすめてゆきたい。

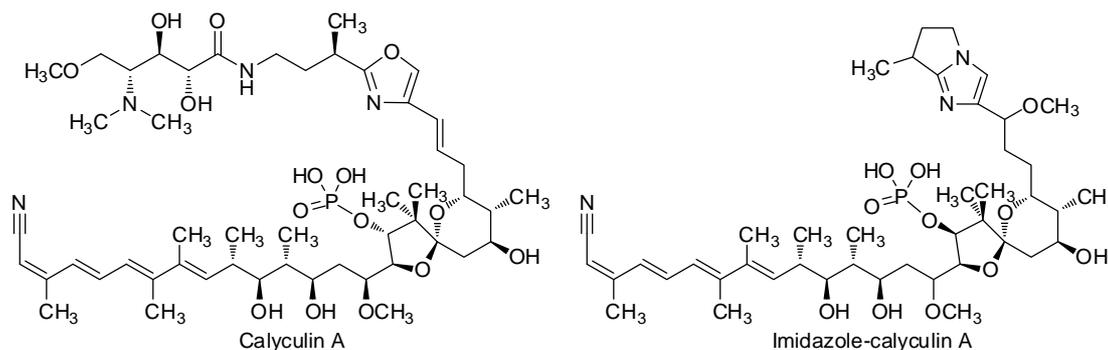


Figure 4. 未同定海面より単離された Calyculin⁹ および新規 Calyculin 類縁体

さらに、高極性画分について微量成分の探索を進めた結果、Discokiolide 類を単離することが出来た。本物質は、分離が困難であり、混合物あるいはメチルエステル体へと誘導体化した状態でのみ単離報告されていた。今回、HPLCにおいてカラムおよび溶媒条件を検討することで、Discokiolide A と B をそれぞれ分離することに成功している。さらに X 線結晶構造解析により絶対立体化学の解析を実施している。現在、得られた単結晶の誘導体化を試みており、既報の誘導体との詳細な比較を実施している。

Figure 5. Discokiolide A, B¹⁰

(含塩素環状デブシペプチドを含む海綿動物)

赤色の未同定海綿のメチルアルコール抽出液は、HeLa 細胞に対して強い活性を示さなかったことから、機器分析のスペクトル解析を中心に特徴ある構造を有する分子の発見を目的に分離を行った。まず赤色成分について分離を行ったところ、低極性画分にはオーラントサイド E が含まれていることが示唆された。

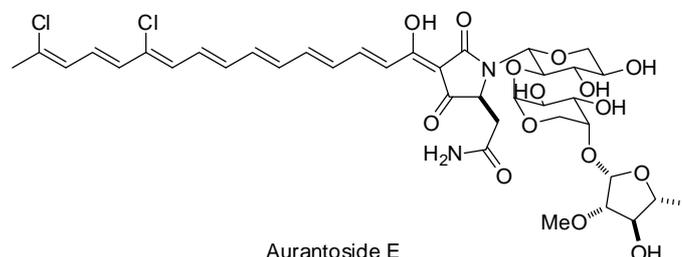


Figure 6 未同定海綿動物に含まれる赤色色素成分¹¹⁾

一方、高極性画分に注目すると、塩素原子を含む 3 種の新規環状デブシペプチドが得られた。アミノ酸の絶対立体化学は改良 Marfey 法により確認出来た。また、チアゾール環周辺の立体化学も付いては、誘導体化による検討を進めている。ここで、これら化合物の水溶性が高いことが

ら、水層に注目して分離を進めたところ、4種類以上の含塩素ペプチド化合物の存在が確認出来た。先の化合物群の類縁体と考えられるが、現在構造の解析を進めている。

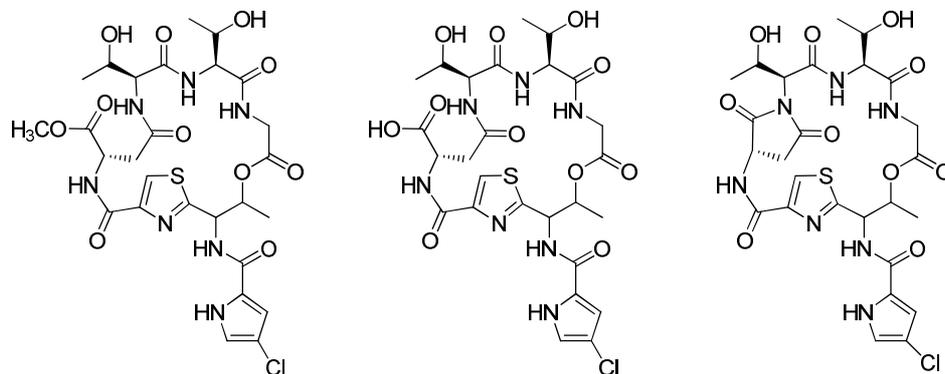


Figure7. 未同定海綿動物から単離した新規環状デブシペプチド

本課題を通じて、佐田岬周囲海域において、未利用で廃棄されている多量の高綿動物が継続的に入手できることが確認出来た。この高綿動物は水深 100m 付近に生息している種類であり、本手法による採集が有効であることを示している。特に、これらの海洋生物から得られる二次代謝産物は構造的に多様で有り、生物資源として非常に興味深いことを示した。また、多量に入手できた試料を用いることで、微量成分の探索を実施することが出来たことは本課題の成果であると考えている。

参考文献

- 1) Yanaka, J.; Higa, T. *Tetrahedron*, **1988**, 44, 2805-2810.
- 2) Cimino, G.; De Stefano, S.; Minale, L.; Fattorusso, E. *Tetrahedron*, **1971**, 27, 4673-4679.
- 3) Kuramoro, M.; Fujita, T.; Ono, N. *ChemLett.* **2002**, 31, 464-465.
- 4) Li, H-Y.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1464-1467.
- 5) Takada, K.; Okada, S.; Matsunaga, S. *Fish. Sci.* **2014**, 80, 1057-1064.
- 6) Ochi, M.; Arika, S.; Tatsukawa, A.; Kotsuki, H.; Fukuyama, Y.; Shibata, K. *Chem. Lett.* **1994**, 23, 89-92.
- 7) Uno, M.; Ohta, S.; Ohta, E.; Ikegami S. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 1149-1148.
- 8) Tada, H.; Yasuda, F. *Chem. Lett.* **1984**, 13, 779-780.
- 9) Kato, Y.; Fusetani, N.; Matsunaga, S.; Hashimoto, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2780-2781.
- 10) Tada, H.; Tozoy, T.; Terui, Y.; Hayashi, F. *Chem. Lett.* **1992**, 21, 431-434.
- 11) Sata, N.U.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R.W. *J. Nat. Prod.* **1999**, 62, 969-971.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 善成・石倉 彩・大道 直樹・倉本 誠・森 重樹・宇野 英満
2. 発表標題 媛県産海綿動物由来の環状デプシペプチド類
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大道 直樹, 倉本 誠, 森 重樹, 宇野 英満
2. 発表標題 愛媛県産海綿動物由来の天然有機化合物の探索研究
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 善, 倉本 誠, 森 重樹, 宇野 英満
2. 発表標題 愛媛県産海綿動物由来の生物活性物質
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 善成・佐藤 誠造・倉本 誠・森 重樹・宇野 英満
2. 発表標題 愛媛県産海綿動物由来の生物活性物質
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会 愛媛大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大道直 樹・倉本誠・森重樹・宇野英満
2. 発表標題 愛媛県産海綿動物由来の微量生物活性物質の探索
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会 愛媛大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲斐 響・井上 善成・石倉 彩・倉本 誠・森 重樹・宇野 英満
2. 発表標題 愛媛県産海綿動物由来のデブシペプチドの構造解析
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------