

平成 20 年 9 月 16 日現在

研究種目：若手研究 B  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19710192  
 研究課題名（和文） 生物由来活性物質とその安定化に寄与する介在高分子に関する研究  
 研究課題名（英文） Studies on natural active compounds surrounded by polymers contributing the stabilization of the active compounds  
 研究代表者  
 犀川 陽子（SAIKAWA YOKO）  
 慶應義塾大学・理工学部・講師  
 研究者番号：20348824

研究成果の概要：ミドリイガイの殻皮層を塩酸抽出したのちイオン交換、分子ふるい、逆相クロマトグラフィーなどを用いて精製を行い、主成分である青色色素が光、酸素に安定で親水性の色素ペプチドであることを明らかにした。また、アカクラゲ由来の刺激物質の探索を敏感マウスのくしゃみを用いた評価法にて行った。抽出物のヘキサン画分をシリカゲルや逆相クロマトグラフィーにて精製し、有意な活性を持つ脂肪酸を分離した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：天然物化学、ミドリイガイ、青色色素、色素ペプチド、アカクラゲ、刺激物質、脂肪酸、リノレン酸

## 1. 研究開始当初の背景

これまで自然現象に関わる色素に注目して研究を行っており、緑青色キノコであるロクショウグサレキンの青色色素ザイリンデンの誘導体が光によって自己酸化還元を起こすことおよびカバの汗に含まれる不安定

な色素がカバの皮膚を保護していることなどを突き止めた。これらの研究を通して、不安定な色素が生体内では安定に存在することに注目し、不安定な活性物質の安定化に寄与する高分子の機能に注目して研究を行うことにした。

## 2. 研究の目的

(1) ミドリイガイの殻皮層に含まれる色素と介在タンパク質の構造と機能の解明

鮮やかな緑色の殻皮層を持つミドリイガイの主成分である青色色素に注目し、単離、構造決定を行う。単離した色素の安定性を調べ、その色素が膜構成成分である硬タンパク質とどのように相互作用しているのかを探る。



(2) アカクラゲ由来の刺激物質の探索

アカクラゲは海岸に打ち上げられて乾燥した粉をヒトが吸うとくしゃみがとまらないと言われている。これは刺胞毒による刺激だと言われているが、クラゲの刺胞毒として不安定なタンパク質が報告されており、乾燥状態になるまで安定に存在しているとは考えづらい。そこで、「不安定な刺胞毒が介在する生体高分子によって安定化されている可能性」、「刺胞毒ではない全く別の刺激物質がくしゃみを引き起こしている可能性」の2つを考えて刺激物質の探索を行う。



3. 研究の方法

(1) ミドリイガイの殻皮層に含まれる色素と介在タンパク質の構造と機能の解明

色素の抽出

ミドリイガイの殻皮層は主に硬タンパク質の膜であり、色素はこの膜に強固に取り込まれていて色素のみを溶出させることはできなかった。そこで、膜自体を溶解させるためにアセトン、ヘキサン、クロロホルム、メタノールを始めとする有機溶媒、酢酸、塩酸、アンモニア水、ピリジンなどの酸性、塩基性溶媒、タンパク質の可溶化試薬の添加などを

行ったが、全く反応しなかった。最終的に、塩酸中加熱するという、硬タンパク質が酸加水分解される条件にて、ようやく緑色の粗抽出液を得ることができた。

色素の粗精製

粗抽出液は色素の他に分子量様々のタンパク質の膜断片を含み、粘性の高い懸濁液であった。この液へ HP-20 粒子を加えて緑色の画分を吸着させ、ろ過して粒子を洗い、酢酸メタノール 水の混合溶媒にて色素を効率的に溶出させることができた。

色素の分離

粗精製を行った緑色溶液を分子ふるい (LH-20; リン酸バッファー) に通し、黄色、青緑色、緑茶色の画分に分離した。この操作にて、ミドリイガイはこれらの色素が混ざることによって緑色を呈していたことが明らかになった。幼貝に多くみられる青色色素が膜の形成時に生成する色素で、次第に分解して緑茶色を呈すると考え、青色色素のさらなる精製を行った。イオン交換 (DEAE-Sephadex; リン酸バッファー) にて青色色素を吸着させたのち、塩化ナトリウム濃度を変えて溶出させ、混在する緑茶色を除き、最後に逆相クロマトグラフィー (ODS; メタノール 水) にて繰り返し精製することで、青色色素を数種類分離した。

色素の性質

青色色素は、612 nm 付近に最大吸収波長を示すことからテトラピロール系色素と思われる。しかし、藻類に見られる色素タンパク質フィコシアニンのクロモペプチドや卵殻に見られるビリベルジンなどのテトラピロール系色素が有機溶媒に可溶で、光や酸素に不安定なのに対して、ミドリイガイの色素は極めて親水性であり、光や酸素に対して安定であった。また、エステル化、アセチル化などの化学誘導によっても低極性の誘導体

は得られなかった。

#### 各種スペクトルによる解析

得られた色素類および殻皮層の分解ペプチド混合物の NMR 測定を行ったところ、いずれもよく似たスペクトルを示し、この色素はチロシン、フェニルアラニンなどが含まれる色素ペプチドであることがわかった。マススペクトルからは、色素は分子量 1700 程度であることがわかり、分解ペプチドも 1700 ~ 2000 程度の断片であった。また、色素の発色団の構造情報を得るために、ESR を測定したところ、塩基性溶液中では赤色に変化し、ESR シグナルが観測された。これにより、青色発色団自体は常磁性金属錯体ではないことがわかった。塩基性条件下で、色の変化に伴って ESR が観測されたことは興味深く、今後の構造決定の手掛かりになると考えている。

## (2) アカクラゲ由来の刺激物質の探索

### 刺激物質の活性試験方法

アカクラゲの傘、触手それぞれをホモジナイズし、マウスの鼻腔に抽出液を塗布してくしゃみの数を数えた。しかし、結果にばらつきが見られたため、定期的にアルブミンを投与した敏感マウスを作成し、鼻腔に塗布してマウスのくしゃみの回数を数えて評価することで信頼性のあるデータが得られた。

### 刺激物質の粗精製

アカクラゲの傘、触手、クラゲの保存液(海水)のうち、触手と海水に強い活性が見られたが、海水の活性は主に塩によることがわかったため、脱塩操作として活性炭を用いて有機物質を吸着させたのち、メタノールで溶出させた画分のみを集めたところ、やはり活性が見られた。さらに、分配操作を行ったところ、触手も海水もヘキサンに分配される画分に活性が見られた。

### ヘキサン画分の精製

ヘキサン層を濃縮したのち、シリカゲル(ヘキサン 酢酸エチル)にて繰り返し精製を行うと、吸着の強い画分に有意な活性が見られ、リノレン酸類似の脂肪酸の混合物であることがわかった。さらに ODP(アセトニトリル 水)、ODS(メタノール 水)などを用いて HPLC による分離の検討を行ったが、分離困難であった。そこで、脂肪鎖のわずかな違いも認識すると期待される大類試薬を 6 行程にて化学合成し、活性物質とのエステルに誘導した。これを再度 ODS HPLC にて精製すると主に 3 種類の脂肪酸エステルに分離することができた。

### 脂肪酸の解析

分離した脂肪酸エステル類 NMR スペクトルはよく似ており、幾何異性や位置異性のわずかな構造の違いと考えられる。リノレン酸自体には活性はなく、HPLC の保持時間が異なることから活性画分には含まれていないことを確認した。

## 4. 研究成果

### (1) ミドリイガイの殻皮層に含まれる色素と介在タンパク質の構造と機能の解明

#### 研究の主な成果

ミドリイガイの殻皮層に含まれる青色色素が光や酸素に対して安定な色素ペプチドであることが明らかとなった。類例として、藻類に含まれる青色色素、フィコシアニンがあり、テトラピロール系色素であるフィコシアノピリンがタンパク質に結合している(下図)。しかし、このような骨格を持つ色素群は光に対して不安定なことが多い。

ミドリイガイの青色色素は比較的安定な色素であり、膜タンパクからの分離を行ってもその安定性には変化が見られなかったことから、介在高分子の寄与ではなく発色団自体が安定な新規骨格を持つ可能性、色素ペプチドのペプチド部分が安定化に寄与している可能性がある。

国内外における位置づけとインパクト

色素タンパク、色素ペプチドは、**テトラピロール系色素の例** 発色団をとりまくペプチド鎖の構造情報が優先し、特に回転異性によってそれらが NMR スペクトル上非常に広幅化するため、発色団の情報が得られにくい。また、ペプチド鎖と切り離す際に発色団が分解することが多く、ペプチド鎖を合成的に発色団に結合させてスペクトルを比較するような方法もとられている。ミドリイガイの青色色素のスペクトルも広幅化しており、構成アミノ酸以外の発色団の構造情報は得られていない。しかし、本研究では NMR のみに頼らず、UV 吸収、ESR スペクトルの測定、化学誘導実験などを通して、ペプチド鎖を残したままの構造解析の可能性を示唆した。

#### 今後の展望

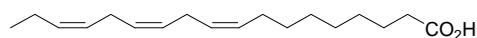
色素ペプチドそのものの構造解析と共に、発色団のみの性質を調べ、ペプチド部分が発色団の性質、特に安定性に寄与しているかを評価する。ペプチド鎖に関わらず、新規骨格を持った安定な発色団であった場合には、その化学的性質と共にミドリイガイ生体内での機能を探る。

## (2) アカクラゲ由来の刺激物質の探索

### 研究の主な成果

アカクラゲ抽出物のヘキササン画分から、マ

ウスに対してくしゃみを引き起こす刺激物質を探索し、リノレン酸類似の脂肪酸類を得た(下図)。



リノレン酸

リノレン酸自体には活性がなく、構造が微妙に異なる脂肪酸が刺激物質であると考えられる。

#### 国内外における位置づけとインパクト

クラゲの刺胞毒については精力的な研究が行われており、国内のグループは不安定な溶血性タンパク質を単離、構造決定している。しかし、アカクラゲ以外にもくしゃみを引き起こすと言われるクラゲがいるにも関わらず、それらの刺激物質は刺胞毒によるものとして扱われ、研究報告は見当たらない。本研究は現象(くしゃみ)をそのまま評価系として探索する方法で刺胞毒ではない成分を捕えることができた。In vivo で現象を単純化した評価系では見落としがちな「体内の総合的な仕組みの結果としての活性」を忠実に再現した点で、インパクトのある研究となったと考えている。

#### 今後の展望

化学誘導体(大類試薬とのエステル)として分離したそれぞれの脂肪酸を解析して正確な分子構造を決定すると共に、活性物質がアカクラゲの体内で目的を持って作られたものなのか、或いは海岸で乾燥する際に新たに無毒の脂肪酸から生成するものなのか、をフィールドワークによる調査を踏まえて明らかにする。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

(1) 田中教介、藤森友紀子、犀川陽子、中田雅也

Diastereoselective synthesis of useful building blocks by crotylation of  $\beta$ -branched  $\alpha$ -methylaldehydes with potassium crotyltrifluoroborates

The Journal of Organic Chemistry (査読有)  
73 巻、2008 年、6292-6298.

(2) 橋本貴美子、犀川陽子、中田雅也

Studies on the red sweat of the *Hippopotamus amphibious*  
Pure and Applied Chemistry (査読有)  
79 巻、2007 年、501-511.

(3) 森智紀、宮城まりえ、鈴木顕吾柴崎光人、犀川陽子、中田雅也

Synthetic studies on chlorofusin: synthesis of the cyclic peptide portion  
Heterocycles (査読有)  
72巻、2007年、275-291.

[学会発表](計2件)

(1) 渡辺香菜、西川知之、吉田優子、  
亀田俊輔、岩田佑介、井出光昭、犀川陽子、  
中田雅也

ラクトナマイシンのCDEF環の合成研究  
日本化学会第88春季年会(2008年3月30日)  
立教大学

(2) 藤森友紀子、田中教介、犀川陽子、中田雅也  
クロチルトリフルオロボレートを用いた高立体選択的な3連続不斉中心構築法の開発  
日本化学会第88春季年会(2008年3月30日)  
立教大学

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

犀川 陽子 (SAIKAWA YOKO)  
慶應義塾大学・理工学部・講師  
研究者番号：20348824

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし