

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03072

研究課題名（和文）ケミカルバイオロジー的アプローチによる付着阻害活性発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of expression of antifouling activity using a chemical biology approach

研究代表者

北野 克和 (KITANO, Yoshikazu)

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：10302910

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、付着忌避活性を有するイソニトリル化合物の活性発現メカニズムを解明することを目的とした。具体的には、イソニトリル化合物が付着阻害活性発現時にどのような遺伝子変化が起きているのか、また光反応性プローブを合成し標的タンパク質の構造を解析した。その結果、新たな知見は得られたものの明確な結論は得られなかった。ただし、今後本研究成果と同様の方法により他の化合物の活性発現メカニズム解明に応用できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新たな付着防汚剤としての利用が期待されているイソニトリル化合物に関する付着阻害活性発現メカニズムの解明を目的としたものである。海洋生物の付着に関してはあまり取り上げられていないが、低炭素化社会が求められている現在において極めて重要な研究分野である。本研究で得られた成果は、今後引き続き検討されることによって、イソニトリル化合物の有用性を明らかにするとともに、環境調和型の付着防汚剤として利用され社会的意義が高いものとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of expression of the antifouling activity of isonitrile compounds was tried to elucidate in this study. The target protein was analyzed using photoaffinity probes with synthesized isocyanide groups. Additionally, transcriptome analysis of barnacle cyprids was performed in the bioassay with an antifouling active isocyanide. Novel findings were discovered, although the conclusion was unclear. However, these novel findings may be applied to similar analyses for the elucidation of mechanisms of other compounds in the future.

研究分野：生物有機化学

キーワード：付着生物 イソニトリル フジツボ 海洋付着生物 ケミカルバイオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) フジツボなどの海洋付着生物は、船底、漁網(養殖網・定置網)および発電所の冷却システム等に付着し日本国内だけでも年間1,000億円以上もの多大な被害を与えている。特に船底への付着は、船舶の燃費低下により排出二酸化炭素ガスを増加させることから、地球温暖化対策が求められている現在において極めて深刻な被害となる。また、漁網への付着は、漁獲量を大幅に低減させ、水産業界に大きな被害を与えている。

(2) これら付着生物の防除には、従来、有機スズ化合物、亜酸化銅、および農薬系化合物(バイオサイド)を含む防汚塗料が主に使われてきた。しかしながら、有機スズ系防汚塗料は、環境汚染が明らかになり国際海事機関により2008年から世界的に使用が禁止され、また、亜酸化銅やバイオサイドを含む防汚塗料についても、蓄積によるサンゴの生育不良や稚仔魚への強い毒性など環境への悪影響が問題視されはじめ、各国で規制も始まりつつある。これは、既存の防汚剤が付着生物を殺生する毒性によって付着を防止しているためである。そのため、新たなコンセプトに基づく“環境にやさしい”付着防汚剤の開発が強く望まれている。“環境にやさしい”付着防汚剤の開発は、低炭素化社会、および低環境負荷が求められている現在において極めて重要な研究開発である。

(3) そのような背景から、これまでに研究代表者らは、ウミウシなどより単離される付着阻害物質の多くがイソシアノ基を有することに着目して、フジツボの付着期幼生(キプリス幼生)への付着阻害活性を指標とした、構造活性相関の考察を行ってきた。その結果、イソシアノ基が付着阻害活性発現に重要であることを明らかにするとともに、キプリス幼生を殺生することなく、付着のみを阻害する様々なイソニトリル化合物(付着忌避物質)( $LC_{50}$ (半数致死濃度) $> 100 \mu\text{g/mL}$ 、 $EC_{50}$ (半数付着阻害濃度) $< 0.1 \mu\text{g/mL}$ )の創製に成功した。創製したイソニトリル化合物は、過去に防汚剤として使用されていた硫酸銅( $LC_{50} = 3.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $EC_{50} = 0.3 \mu\text{g/mL}$ )よりも高い付着阻害活性を示すことから、“環境にやさしい”付着防汚剤として非常に有望な化合物である。

(4) しかしながら、なぜイソニトリル化合物がキプリス幼生を殺生することなく付着阻害活性を発現するのかについては明確な結論が得られていなかった。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、イソニトリル化合物の付着阻害活性発現メカニズムを解明することである。具体的には、付着阻害活性発現時にイソニトリル化合物が作用する標的タンパク質について、光反応性プローブによりピックアップし、キプリス幼生のトランスクリプトーム解析による遺伝子発現の情報を融合することによって明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 光反応性プローブについては、市販の化合物を出発物質とし、活性発現部位としてイソシアノ基、光反応性部位としてアジド基を有する化合物の合成法を検討した。また、プローブの検出については、アジドと反応性の高いシクロオクチン環、および蛍光を発するダンシル基を有する化合物の合成法を検討した。

(2) 合成したプローブについては、タテジマフジツボキプリス幼生を用いた付着試験を行った。具体的には、各濃度24個体の付着率等を観察し、試験は3回繰り返した。

(3) プローブと相互作用するタンパク質を探索するために、合成したプローブは付着阻害活性を示す( $30 \text{ mg/mL}$ )の濃度下でタテジマフジツボキプリス幼生を投入し、24時間インキュベートさせることで、プローブと作用すると考えられるタンパク質を結合させた。24時間後に254 nmのUVを5分間照射し、プローブのアジド部分とタンパク質との結合反応を促した。その後、キプリス幼生を回収し、 $-80^\circ\text{C}$ で冷凍保存後に、Minute Total Protein Extraction Kit (Invent Biotechnologies, Inc.)にて総タンパク質を抽出し、ブラッドフォード法で定量した。定量後に、タンパク質溶液中に0.5 mMの蛍光検出試薬を投入し合成プローブと反応させた。反応後のタンパク質溶液については、常法に従い、SDS電気泳動およびネイティブページ電気泳動を行い、電気泳動後に蛍光標識プローブの位置をUVイルミネーターで確認した。

(4) ノープリウス幼生から飼育した変態後2日令のタテジマフジツボキプリス幼生(変態後 $6^\circ\text{C}$ で2日間維持)を用い、6ウェルマルチウェルプレートに各150個体をろ過滅菌海水10 mL中に収容した。収容後、0.3 mg/mLの濃度となるように調整したイソニトリル化合物のメタノール溶液0.1 mLを添加し、全暗条件 $25^\circ\text{C}$ で24時間インキュベートした。処理後、付着していな

いキブリス幼生を回収し、滅菌ろ過海水で洗浄後に、バイオマッシャーに収容した。収容後速やかに Nucleospin RNA Buffer RA1 350 mL で固定し、RNA 抽出まで-80°Cで凍結保存した。無処理区については、25°Cの通常条件下では付着変態してしまうため、処理区と同条件で6ウェルマルチウェルプレートに収容後に、6°Cで24時間インキュベートしたものを用い、処理区と同様に固定し、-80°Cで保存した。処理区は3連、無処理区は2連で行った。試験終了時に処理区においては、一部付着・変態した個体が存在し、回収したキブリスは、100個体、107個体、114個体であった。無処理区については付着が観察されず、全て150個体を回収した。RNAの抽出はNucleospin RNA kitのマニュアルに従い行い、抽出後に、Agilent 2100 バイオアナライザによる抽出RNAの濃度確認を行い、TruSeq stranded mRNA Library preparation kitを用いたRNA-seqを行い、発現RNAライブラリーを得た。

(5) ノープリウス幼生から飼育した変態後のアカフジツボキブリス幼生を回収後、付着を防ぐため塩分22の海水に収容した。収容後1日令のキブリス幼生用い、6ウェルマルチウェルプレートに各50個体をろ過滅菌海水10 mL(塩分33)中に収容した。収容後、0.3 mg/mLの濃度となるように調整したイソニトリル化合物のメタノール溶液0.1 mLをウェルに添加し、全暗条件25°Cで24時間インキュベートした。24時間後、付着していないキブリス幼生を取り出し、滅菌ろ過海水で洗浄後に、バイオマッシャーに回収した。回収後速やかに Nucleospin RNA Buffer RA1 350 mL で固定し、RNA 抽出まで-80°Cで凍結保存した。無処理区については、25°Cの通常条件下で、海水を塩分33とし、処理区と同条件で6ウェルマルチウェルプレートに収容後に、24時間インキュベートした。24時間後、処理区と同様に固定し、-80°Cで保存した。実験は処理区、無処理区共に4連で行った。試験終了時に処理区においては、一部付着・変態した個体が存在し、回収したキブリスは、47個体、46個体、50個体、50個体であった。無処理区については付着が観察されず、全て150個体を回収した。RNAの抽出はNucleospin RNA kitのマニュアルに従い行い、抽出後に、Agilent 2100 バイオアナライザによる抽出RNAの濃度確認を行い、TruSeq stranded mRNA Library preparation kitを用いたRNA-seqを行い、発現RNAライブラリーを得た。

#### 4. 研究成果

(1) 光反応性プローブの合成法については、3-ヨード安息香酸エチルを出発物質として光反応性アジド部分を合成するとともに、ホウ素を含むイソニトリル化合物を別途合成し、鈴木-宮浦カップリングにより連結して目的とするプローブを合成した。なお、プローブ化合物については、連結部分の長さ、形状が違うものと複数合成した。また、検出試薬については、市販のアミノ基を有するシクロオクチン化合物に対してダンシル基を導入し、合成した。

(2) 合成したプローブについてタテジマフジツボキブリス幼生に対する付着阻害活性を測定したところ、半数付着阻害濃度(EC<sub>50</sub>)は1.31~4.52 µg/mLと、モデルとしたイソニトリル化合物と比較すると活性が弱くなっていたものの、十分な付着阻害活性を有していた。そのため、イソニトリル化合物が付着阻害活性を発現する際に標的タンパク質に作用するのであれば、架橋させるに十分な活性を保持したままプローブを作成できたと判断された。

(3) 電気泳動の結果、蛍光検出試薬が確認される箇所は電気泳動最下流側に集中しており、標的タンパク質と思われるバンドは検出されなかった。

(4) フジツボのRNA-seq dataについては、OmicsBoxを用いて、Trimmomaticによるtrimを行ったのち、タテジマフジツボゲノムデータに対してSTARによるmapping(BAM filesの作成)、およびcount tableの作成した後、差別的な解析(DE analysis)を行った。その結果、統計的にみて有意にイソニトリル処理で増加した遺伝子(up-regulated genes)を6、減少した遺伝子(down-regulated genes)を25見いだした。ただし、annotationレベルで、イソニトリルと関連することが示唆されているP450関連遺伝子、付着・変態との関連が予測されるホルモンであるMF(or JH)とecdysteroid関連遺伝子(受容体、結合タンパク質)およびイソニトリルが脂溶性であるため、広く脂質と関連がannotateされている遺伝子と推定可能な候補遺伝子を見出すことはできなかった。uncharacterized proteinは9あり、annotationのついた遺伝子群における特別な傾向は見られなかった。ただ、pollenなどフジツボでは存在しないannotationもあり、非モデル生物であるフジツボのannotationに問題がある可能性もあり、引き続き、個々の配列レベルでより詳細な解析を行っている。

(5) 本研究で得られた知見を基に、今後は、光反応性プローブの構造等を微調整することによって標的タンパク質が特定され、付着阻害活性発現メカニズムが解明されることが期待される。

## 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 0件 / うちオープンアクセス 2件）

|   |                 |
|---|-----------------|
| 1. 著者名<br>Tanikawa Aina, Fujihara Takaya, Nakajima Natsumi, Maeda Yuka, Nogata Yasuyuki, Yoshimura Erina, Okada Yohei, Chiba Kazuhiro, Kitano Yoshikazu     | 4. 巻<br>20      |
| 2. 論文標題<br>Anti Barnacle Activities of Isothiocyanates Derived from Citronellol and Their Structure-Activity Relationships                                  | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>Chemistry & Biodiversity  | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/cbdv.202200953  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |
| 1. 著者名<br>Morizumi Haruka, Okamoto Kazuhiro, Akahane Shinnosuke, Takemae Hitoshi, Oba Mami, Okada Yohei, Kitano Yoshikazu, Mizutani Tetsuya, Chiba Kazuhiro | 4. 巻<br>26      |
| 2. 論文標題<br>Stereoselective Production of Imino ribitol and Azanucleosides through Electrochemical C-H Functionalization                                     | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Organic Chemistry   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/ejoc.202201046  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |
| 1. 著者名<br>Okamoto Kazuhiro, Shida Naoki, Morizumi Haruka, Kitano Yoshikazu, Chiba Kazuhiro  | 4. 巻<br>61      |
| 2. 論文標題<br>Oxidation Potential Gap ( $E_{ox}$ ): The Hidden Parameter in Redox Chemistry  | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Angewandte Chemie International Edition   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/anie.202206064  | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |
| 1. 著者名<br>Kitade Shiori, Endo Noriyuki, Nogata Yasuyuki, Matsumura Kiyotaka, Yasumoto Ko, Iguchi Akira, Yorisue Takefumi                                    | 4. 巻<br>9       |
| 2. 論文標題<br>Faint chemical traces of conspecifics delay settlement of barnacle larvae  | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Marine Science   | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3389/fmars.2022.983389   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Nagahara Shingo, Okada Yohei, Kitano Yoshikazu, Chiba Kazuhiro | 4. 巻<br>12                  |
| 2. 論文標題<br>Biphasic electrochemical peptide synthesis                    | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>Chemical Science   | 6. 最初と最後の頁<br>12911 ~ 12917 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1039/d1sc03023j                           | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Okamoto Kazuhiro, Nagahara Shingo, Imada Yasushi, Narita Risako, Kitano Yoshikazu, Chiba Kazuhiro | 4. 巻<br>86                  |
| 2. 論文標題<br>Hydrosilane-Mediated Electrochemical Reduction of Amides   | 5. 発行年<br>2021年             |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Organic Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>15992 ~ 16000 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.joc.1c00931   | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>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<br>-                   |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Okamoto Kazuhiro, Tsutsui Mizuki, Morizumi Haruka, Kitano Yoshikazu, Chiba Kazuhiro  | 4. 巻<br>2021              |
| 2. 論文標題<br>Electrochemical Synthesis of Imino C Nucleosides by "Reactivity Switching" Methodology for in situ Generated Glycoside Donors | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Organic Chemistry  | 6. 最初と最後の頁<br>2479 ~ 2484 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/ejoc.202100106   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Yamagami Sayuri, Okada Yohei, Kitano Yoshikazu, Chiba Kazuhiro | 4. 巻<br>2021              |
| 2. 論文標題<br>Peptide Head to Tail Cyclization: A "Molecular Claw" Approach | 5. 発行年<br>2021年           |
| 3. 雑誌名<br>European Journal of Organic Chemistry                          | 6. 最初と最後の頁<br>3133 ~ 3138 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1002/ejoc.202100185                       | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Casalme Loida O., Katayama Keisuke, Hayakawa Yoshiki, Nakamura Kensuke, Yamauchi Arisa, Nogata Yasuyuki, Yoshimura Erina, Matsuda Fuyuhiko, Umezawa Taiki | 4. 巻<br>20              |
| 2. 論文標題<br>Effective Synthesis and Antifouling Activity of Dolastatin 16 Derivatives  | 5. 発行年<br>2022年         |
| 3. 雑誌名<br>Marine Drugs  | 6. 最初と最後の頁<br>124 ~ 124 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/md20020124  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Fathoni Imam, Petitbois Julie G., Alarif Walied M., Abdel-Lateff Ahmed, Al-Lihaibi Sultan S., Yoshimura Erina, Nogata Yasuyuki, Vairappan Charles S., Sholikhah Eti Nurwening, Okino Tatsufumi | 4. 巻<br>25                |
| 2. 論文標題<br>Bioactivities of Lyngbyabellins from Cyanobacteria of Moorea and Okeania Genera   | 5. 発行年<br>2020年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecules  | 6. 最初と最後の頁<br>3986 ~ 3986 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.3390/molecules25173986  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>北野 克和                        |
| 2. 発表標題<br>環境調和型付着防汚剤の開発                |
| 3. 学会等名<br>令和4年度日本水産学会秋季大会シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野方靖行                        |
| 2. 発表標題<br>フジツボやイガイ類等の付着生物から考える海の変化    |
| 3. 学会等名<br>令和4年度水産環境保全委員会シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2022年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野方 靖行                         |
| 2. 発表標題<br>発電所における付着生物対策の現状              |
| 3. 学会等名<br>海を拓く現場計測研究会 令和3年度第1回研究会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡邊 純平、室崎 喬之、野方 靖行、下村 政嗣、平井 悠司       |
| 2. 発表標題<br>ドットバターニング SAM基板上におけるフジツボキブリス幼生の付着調査 |
| 3. 学会等名<br>2022年度日本付着生物学会研究集会                  |
| 4. 発表年<br>2022年                                |

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>北野 克和                   |
| 2. 発表標題<br>海洋付着生物に対する環境調和型付着防汚剤の開発 |
| 3. 学会等名<br>日本農薬学会第46回大会（招待講演）      |
| 4. 発表年<br>2021年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤原 隆也、中嶋 菜摘、野方 靖行、吉村 えり奈、千葉 一裕、北野 克和               |
| 2. 発表標題<br>-シトロネロール誘導体イソチオシアネート化合物の合成とフジツボキブリス幼生に対する付着阻害活性の評価 |
| 3. 学会等名<br>第21回マリンバイオテクノロジー学会大会                               |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>北野 克和                                 |
| 2. 発表標題<br>新規防汚化合物の開発                            |
| 3. 学会等名<br>2020年度オンラインシンポジウム「海洋利用と生物付着の制御」(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2020年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>野方 靖行                                 |
| 2. 発表標題<br>汚損生物としての付着生物に関する最新情報と問題提起             |
| 3. 学会等名<br>2020年度オンラインシンポジウム「海洋利用と生物付着の制御」(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2020年                                  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三上 恵、渡邊 純平、室崎 喬之、野方 靖行、下村 政嗣、平井 悠司 |
| 2. 発表標題<br>着生防止基板を同時評価可能な新規フジツボ着生実験系の検討       |
| 3. 学会等名<br>2021年度日本付着生物学会研究集会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                              | 備考 |
|-----------|--|--|----|
| 研究<br>分担者 | 野方 靖行<br><br>(NOGATA Yasuyuki)<br><br>(10371535) | 一般財団法人電力中央研究所・環境科学研究所・上席研究員<br><br><br><br>(82641) |    |



6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考            |
|-------|--|---|---------------|
| 研究分担者 | 岡野 桂樹<br><br>(OKANO Keiju)<br><br>(40147070) | 秋田県立大学・生物資源科学部・研究員<br><br><br><br>(21401) | 削除：2022年1月14日 |

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 |
|---------|---------|
|         |         |