

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21404010

研究課題名（和文） アジア・太平洋海域における有用海洋生物資源調査

研究課題名（英文） Research for useful marine organisms in Asia and Pacific regions

研究代表者

中尾 洋一（NAKAO YOICHI）

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号：60282696

研究成果の概要（和文）：

ミクロネシア、ヴェトナム、およびインドネシアの3か国で海洋生物の採集を行い、合計515検体のサンプル採集が達成できた。これらのサンプルをもとに、可能な範囲で混合抽出物、共生微生物、遺伝子を取り出し、それぞれのライブラリーとして保存した。現在、本ライブラリーをもとに有用生物活性および活性本体のデータベース化を行っている。また、調査活動を通じて現地の研究機関との強固な共同研究体制も築くことができた。

研究成果の概要（英文）：

In this project, a total 515 marine organisms were collected from 3 countries and preserved as the extract-, microbe-, and genome-libraries. Currently, evaluation for bioactivities of these extracts are being carried out. At the same time, tight collaborative relationship among the researchers of these countries and our group was founded, through this project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：海洋生物資源

1. 研究開始当初の背景

腔腸、海綿、原索動物などの海洋無脊椎動物は、ユニークな構造や生物活性を有する化合物の宝庫であることが知られ、製薬企業に巨大な売上をもたらすブロックバスターの探索源として熱い注目を集めている。

これらの海洋天然化合物の多くは海洋無脊椎動物に共生している微生物によって生合成されていると考えられているが、これらの共生微生物は単独で取り出して培養する

ことが非常に難しい。この結果、海洋天然化合物は製薬企業で探索源としている培養可能な微生物とは異なる微生物群から得られる化合物ということになり、新規医薬品素材の探索源として非常に魅力的なものになっている。

このため、世界中で海洋生物から有用化合物を作り出す共生微生物を単離したり、化合物を作り出す生合成遺伝子そのものを取りだして遺伝子組み換え技術によって人工的

に化合物を作らせようという試みがなされている。

研究代表者（中尾）と研究連携者（酒井）はこれまで国内およびマイクロネシア・インドネシアなどの太平洋島嶼国産の海洋無脊椎動物を中心に医薬品素材の探索研究を行い、百を超える新規化合物を発見してきた。これらの中には臨床試験を経て薬として認可直前のもや前臨床段階で有望な薬理効果を示すものだけでなく、ユニークな薬理効果を示し、生命科学研究にとってなくてはならないツールとなっているものも含まれている。

一方、研究分担者（堀）は、国内で海藻類の採集を行い、海藻に含まれ抗がん・抗ウイルスなどの作用が知られる有用物質レクチンに関する研究を行っている。また、ベトナム科学技術アカデミー（VAST）との共同研究で、ベトナム産の紅藻類キリンサイをはじめ各種藻類のレクチン含有量に関する調査研究を行っており、その有望性を確認している。

以上のように、天然化合物の探索源として貴重な海洋生物資源であるが、近年以下に述べるような事情からその保存を意識せざるを得ない状況になった。

すなわち、サンゴの白化現象とそれに引き続いて起こるサンゴ礁の死滅が地球温暖化の影響であるとして、大きな問題になっている。サンゴには褐虫藻（かっちゅうそう）という単細胞の藻類が共生しており、この褐虫藻が 30 度を超えるような高水温などのストレスを受けることでサンゴの体内から逃げ出してしまった状態がサンゴの白化現象である。サンゴ自体は共生藻類が光合成によって作り出した栄養素を受け取って生息しているため、この共生関係が崩れてしまうと生きてゆけなくなり、やがて死んでしまう。

サンゴ以外の海綿や群体ホヤなどの多くの海洋無脊椎動物にも微生物が共生しているため、環境変化の影響がこれらの生物の共生微生物相にも深刻な影響を与えている可能性は大いに考えられる。しかし、サンゴと違って海中で人目につかないこれらの生物は、たとえ環境変化により深刻なダメージを受けていたとしても気づかれることはほとんどない。つまり、貴重な海洋生物資源が人知れず着実に地球の温暖化によって絶滅の危機にさらされている可能性が高いといえる。

そこで、海洋生物資源を採集し、そこに含まれる化合物・微生物・遺伝子のライブラリーを作れば、海洋生物資源の医薬品探索源としての重要な部分を保存することになり、将来的にますます利用価値が高まると考えられる海洋天然化合物をはじめとする海洋生化学資源の持続的利用が可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では太平洋島嶼国であるマイクロネシアと大陸沿岸国であるベトナムを調査対象国として選び、3年間の研究期間を通じて研究実施国内各地で採集調査研究を行うこととした。採集した海洋生物サンプルの一部を切り取り3つに分け、それぞれから化合物（混合抽出物）、共生微生物、遺伝子を取り出してそれぞれのライブラリーとして保存し、各種アッセイ系によって、有望な生物活性も同時にデータベース化することとした。

本研究で作成する3本立てのライブラリーによって、天然化合物の持続的利用を可能にする生物資源を確保し、海洋天然物化学の発展に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、アジア・太平洋海域に生息する海洋生物資源を化合物・共生微生物・遺伝子の各ライブラリーとして保存するための採集活動を行うこととした。採集する海域の多様性、治安、交通（機材やサンプル輸送）、現地での受け入れ先および採集許可の可否を選択基準として、まず、マイクロネシア（太平洋地域）およびベトナム（アジア）の2国で調査研究を行うこととした。また、平成22年度以降は調査対象国の追加も検討することとした。

マイクロネシアでの採集においては研究代表者が窓口になり採集調査を行うこととした。現地での潜水作業は研究代表者（中尾）、研究連携者（酒井他）、および学生が複数のプロダイバーの安全監視下、もっとも安全なシステムと考えられているフォーメーションダイビングによって採集作業を行うこととした。研究代表者は採集したサンプルから化合物、微生物、および遺伝子保存用のサンプルを切り取り、これを保存することとした。

ベトナムにおける採集においては研究分担者（堀）の共同研究先である VAST のニャチャン支所の協力下、マイクロネシアの場合と同様の体制で調査を行うこととした。

海綿の同定は極めて専門的な研究分野であり、世界中でも 10 名程度しか専門家がないため、本研究で採集する海綿のサンプルについては海外共同研究者（van Soest）に同定依頼することとした。

また、本研究の成否はいかに多くの種類のサンプルを安全に採集できるかにかかっている。このため、1国ではなく島嶼国と大陸沿岸国という海洋環境が異なる2つの国を対象として調査を行うこととした。慣れない海外での潜水作業を含む調査であるため、事故を未然に防ぐことを目的に、調査チームはお互いに意思疎通に問題がないメンバーで構成するだけでなく、現地で協力してもらう

ダイビングサービスについても、現地のガイドとの意思疎通を重視した。

4. 研究成果

平成 21 年度は、(アジア海域) 8 月 24-30 日の間、ニャチャンに滞在し、周辺の海域 6 か所(水深 5-15m)で海洋生物サンプルの採集を行い、74 検体のサンプルについて採集調査をおこなった。また、9 月 6-13 日の間はミクロネシア・トラック環礁および君島環礁(太平洋州)海域水深 0-40m において、海綿・腔腸などの海洋無脊椎動物 142 検体のサンプルについて採集調査を行った。ヴェトナムにおいては広島大学生物圏研究科堀寛治教授と VAST (Vietnamise Academy of Science and Technologies) との共同研究によって調査を行い、また、ミクロネシアでは北海道大学水産学部酒井隆一教授およびミクロネシアカレッジとの共同研究により調査を行った。調査対象とした海洋生物は、陸上でサンプル番号を付けた状態でスチル撮影して記録に残し、水中での生態写真があるものは直ちに陸上で付けたサンプル番号をもとに整理した。さらに、調査場所および調査風景についても、水中スチル写真および水中ビデオ撮影を行って記録に残した。

平成 22 年度は、太平洋海域であるミクロネシア・ヤップ島周辺の水深 0-30m の海域において、8 月 24 日から 29 日の期間に採集調査を行い、海綿・腔腸などの海洋無脊椎動物を中心に 113 検体の海洋生物サンプルを採集することができた。研究チームは研究連携者である北海道大学水産学部酒井隆一教授のグループと合同で結成し、日本水中科学協会に所属するプロダイバーに潜水作業の安全確保を依頼した。また、海外の共同研究先であるオランダ・ライデン大学から海綿の生物学を専門とする研究者を招へいしてチームに加え、海洋生物のフィールドにおける生態調査を担当させた。

実際の作業としては、調査対象とした海洋生物について、陸上でサンプル番号を付けた状態でスチル撮影して記録に残し、水中での生態写真があるものは陸上で付けたサンプル番号をもとに整理した。さらに、調査場所および調査風景についても、水中スチル写真および水中ビデオ撮影を行って記録に残した。

調査採集した海洋生物サンプルについては、帰国後研究室でアルコールにて抽出・濃縮後、水とクロロホルムで二層分配して、それぞれの層を濃縮して、それぞれを水溶性および脂溶性画分とした。得られた各画分をスクリーニングサンプルとし、これらに対して細胞毒性・酵素阻害・細胞分化制御・抗原

虫等の生理作用を調べる各種生物活性試験を開始し、採集サンプルに含まれる有用成分の分析を行っている。

平成 23 年度はスラウェジ島マナド、サムラトランギ大学 Remy Mangindaan 教授との共同研究を開始したため、3 国目のインドネシアでの採集が可能となった。

インドネシアではマナド周辺の水深 0-30 m の海域で採集を行い、合計 186 検体のサンプルを採集した。研究チームは研究連携者である広島大学生物圏研究科堀寛治教授のグループと合同で結成し、日本水中科学協会に所属するプロダイバーに潜水作業の安全確保を依頼した。また、海外の共同研究先であるオランダ・ライデン大学から海綿の生物学を専門とする研究者を招へいしてチームに加え、海洋生物のフィールドにおける生態調査を担当させた。

調査対象とした海洋生物について、陸上でサンプル番号を付けた状態でスチル撮影して記録に残し、水中での生態写真があるものは陸上で付けたサンプル番号をもとに整理した。さらに、調査場所および調査風景についても、水中スチル写真および水中ビデオ撮影を行って記録に残した。

インドネシアからは抽出物としてしか海洋生物サンプルを持ちだせないため、帰国前にサムラトランギ大学内の研究室にて、採集サンプルの一部をアルコールにて抽出したものを持ち帰り、残りのサンプルは現地にて凍結保存した。持ち帰った抽出物は帰国後研究室で水とクロロホルムで二層分配して、それぞれを水溶性および脂溶性スクリーニングサンプルとした。これらに対して細胞毒性・酵素阻害・細胞分化制御・抗原虫等の生理作用を調べる各種生物活性試験を開始し、採集サンプルに含まれる有用成分の分析を行っている。

当初の予定ではミクロネシアとヴェトナムの 2 国が採集対象国であったが、期間内に 3 国目のインドネシアでの採集が可能となり、その結果 3 年間で合計 515 検体のサンプル採集が達成できた。また、調査活動を通じて現地の研究機関との強固な共同研究体制も築くことができた。

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 7 件) すべて査読あり

1. Takada, Y.; Umehara, M.; Katsumata, R.; Nakao, Y.; Kimura, J. The total synthesis and structure-activity relationships of a highly cytotoxic depsipeptide

- kulokekahilide-2 and its analogs *Tetrahedron*, 68, 659-669, (2012).
- Murayama, S.; Imae, Y.; Takada, K.; Kikuchi, J.; Nakao, Y.; van Soest, R. W. M.; Okada, S.; Matsunaga, S. Shishicrellastatins, inhibitors of cathepsin B, from the marine sponge *Crella (Yvesia) spinulata* *Bioorg. Med. Chem.* 19, 6594-6598, (2011).
 - Shengule, S.R.; Loa-Kum-Cheung, W. L.; Parish, C. R.; Blairvacq, M.; Meijer, L.; Nakao, Y.; Karuso, P. A One-pot Synthesis and Biological Activity of Ageladine A and Analogues *J. Med. Chem.* 54, 2492-2503, (2011).
 - Takaku, M.; Kainuma, T.; Ishida, T.; Ishigami, S.; Suzuki, H.; Tashiro, S.; van Soest, R. W. M.; Nakao, Y.; Kurumizaka, H. Halenaquinone, a Chemical Compound That Specifically Inhibits the Secondary DNA Binding of RAD51 *Genes to Cells* 16, 427-436, (2011).
 - Ueoka, R.; Nakao, Y.; Kawatsu, S.; Yaegashi, J.; Matsumoto, Y.; Matsunaga, S.; Furihata, K.; van Soest, R. W. M.; Fusetani, N. Gracilioethers A-C, Anti-malarial Metabolites from the Marine Sponge *Agelas gracilis* *J. Org. Chem.* 74, 4204-4207, (2009).
 - Umehara, M.; Takada, Y.; Nakao, Y.; Kimura, J. Intramolecular Ester Exchange of Potent Cytotoxic Kulokekahilide-2 *Tetrahedron Lett.* 50, 840-843, (2009).
 - Yamashita, T.; Nakao, Y.; Matsunaga, S.; Oikawa, T.; Imahara, Y.; Fusetani, N. A New Antiangiogenic C₂₄ Oxylipin from the Soft Coral *Sinularia numerosa* *Bioorg. Med. Chem.* 17, 2181-2184, (2009).
 - 中尾洋一 『医薬品素材としての海洋天然化合物』 富士山麓産学官金連携フォーラム2010 沼津 2010年3月.
 - 中尾洋一 『天然化合物を利用したケミカルエピゲノミクス研究の可能性について』 大阪大学蛋白質研究所セミナー「疾患の基盤としてのエピジェネティクス」 大阪 2009年6月.

国内学会発表

- 喜納惟斗, 中尾洋一, 木村宏, 林陽子, 『海洋生物由来のヒストン修飾制御剤の探索研究』, 日本化学会第92春季年会、横浜、2012年3月.
 - 町田光史, 中尾洋一, 『鹿児島県産海洋生物混獲物からの細胞毒性物質の単離と構造決定』, 日本化学会第90春季年会、大阪、2010年3月.
 - 田中順子, 杉山結香, 石上進太郎, 吉野哲哉, 中尾洋一, 三輪佳宏, 『ケミカルスクリーニングに向けたハイスループットEGFシグナル検出プローブの開発』, 第34回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、横浜、2011年12月.
 - 須賀則之, 吉河理与, 中尾洋一, 梅原崇史, 横山茂之, 『クロマチン構造をになうヌクレオソーム間相互作用のトランス制御因子』, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月.
 - 石田恭子, 海沼嵩, 高久誉大, 鈴木秀和, 田代聡, 石上進太郎, 中尾洋一, 胡桃坂仁志, 『新規RAD51組換え活性制御化合物の同定とその作用機序』, 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月.
 - Hirohama, M.; Ito, A.; Fukuda, I.; Igarashi, Y.; Saitoh, H.; Nakao, Y.; Yoshida, M. "Identification of spectomycin B as the first SUMO E2 inhibitor" 第33回日本分子生物学会年会第83回日本生化学会大会合同大会、神戸、2010年12月.
 - 勝俣良祐, 中尾洋一, 『海綿由来の細胞毒性物質の探索研究』, 日本化学会第90春季年会、大阪、2010年3月.
 - 前島寛, 渡部裕喜, 中尾洋一, 『海洋生物由来の細胞毒性物質に関する研究』, 日本化学会第90春季年会、大阪、2010年3月.
- 〔学会発表〕 (計 13 件)
- 海外招待講演
- Nakao, Y.; Ishigami, S.; Goto, Y.; Kawazu, S.; Matsumoto, Y. "Anti-Protozoan Agents from Marine Invertebrates" 2010 環太平洋国際化学会議 (PACIFICHEM2010)
- 国内招待講演
- 中尾洋一 『DNA損傷機構に影響する化合物の探索』 構造エピゲノム研究会第4回ワークショップ「DNA損傷とエピゲノム」 横浜 2011年7月.

9. 石上進太郎、中尾洋一、『海洋生物由来の抗リーシュマニア活性化化合物に関する研究』、日本化学会第90春季年会、大阪、2010年3月。

〔図書〕(計4件)

1. Nakao, Y.; Fusetani, N. Enzyme Inhibitors from Maine Invertebrates, In *Marine Natural Products Handbook*, Springer, Vol. 2, pp. 1145-1229, (2012).
2. 酵素阻害剤『マリンバイオテクノロジーの新展開』、児玉公一郎・中尾洋一、伏谷伸宏監修、シーエムシー出版、pp.74-92、東京、(2011).
3. 「海洋天然有機化合物が拓くケミカルバイオロジー」、児玉公一郎・中尾洋一、日経BPムック、早稲田大学産学連携レビュー'11、pp.18-20、東京、(2011).
4. Nakao, Y.; Fusetani, N. Marine Invertebrates: Sponges. In *Comprehensive Natural Products ; Chemistry II Chemistry and Biology*; Mander, L.; Lui, H.-W., Eds. Elsevier: Oxford, Vol. 2, pp. 327-362, (2010).

〔産業財産権〕

○出願状況(計5件)

名称: Biologically active compounds derived from marine organisms

発明者: 中尾洋一、町田光史、切替照雄

権利者: 学校法人早稲田大学

種類: 米国仮出願

番号: US 61/592,165

出願年月日: 平成24年1月30日

国内外の別: 国外

名称: Novel Cyclic Depsipeptide and Use Thereof

発明者: 山下潤、中尾洋一、勝俣良祐

権利者: 国立大学法人京都大学、学校法人早稲田大学

種類: PCT 出願

番号: PCT/US 61/334,961

出願取得年月日: 平成23年5月13日

国内外の別: 国外

名称: 腔腸動物由来抗原虫化合物

発明者: 中尾洋一、石上進太郎、後藤康之、河津信一郎、井上昇

権利者: 学校法人早稲田大学、国立大学法人帯広畜産大学

種類: PCT 出願

番号: PCT/JP2011/055715

出願年月日: 平成23年3月10日

国内外の別: 国外

名称: 新規環状デプシペプチドおよびその用途

発明者: 山下潤、中尾洋一、勝俣良祐

権利者: 国立大学法人京都大学、学校法人早稲田大学

種類: 米国仮出願

番号: US 61/334,961

出願年月日: 平成22年5月17日

国内外の別: 国外

名称: 腔腸動物由来抗原虫化合物

発明者: 中尾洋一、石上進太郎、後藤康之、河津信一郎、井上昇

権利者: 学校法人早稲田大学、国立大学法人帯広畜産大学

種類: 国内出願

番号: 特願 2010-055150

出願年月日: 平成22年3月11日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 洋一 (NAKAO YOICHI)

早稲田大学・理工学術院・准教授

研究者番号: 60282696

(2) 研究分担者

研究者番号:

(3) 連携研究者

堀 寛治 (HORI KANJI)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号: 50116662

酒井 隆一 (SAKAI RYUICHI)

北海道大学・水産科学研究科・教授

研究者番号: 20265721

伏谷 伸宏 (FUSEYANI NOBUHIRO)

北海道大学・水産科学研究科・教授

研究者番号: 70012010

松岡 俊二 (MATSUOKA SHUNJI)

早稲田大学・アジア太平洋研究科・教授

研究者番号: 00211566

福沢世傑 (FUKUZAWA SEKETSU)

東京大学・理学系研究科・助教

研究者番号: 40321806

脇本 敏幸 (WAKIMOTO TOSHIYUKI)

東京大学・薬学研究科・講師

研究者番号：70363900

藤田 雅紀 (FUJITA MASAKI)
北海道大学・水産科学研究科・助教
研究者番号：30505251

高田 健太郎 (TAKADA KENTAROU)
東京大学・農学生命科学研究科・助教
研究者番号：90455353