

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22日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651091

研究課題名（和文） 共生現象鍵物質の化学的研究

研究課題名（英文） Bioorganic Studies on the Key Natural Products Focused on Marine Symbiosis

研究代表者

北 将樹 (KITA MASAKI)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30335012

研究成果の概要（和文）：宿主動物と共生藻の間で働く物質や、外敵からの防御物質など、海洋生物由来の鍵物質の化学的解明を目指した。共生藻由来のシンビオジノライドについては、新規分解反応を駆使して平面構造を決定し、N型Caチャンネル特異的なアゴニストであることを解明した。また刺胞動物ウミトサカの抽出物に強力な炎症惹起活性を見だし、活性物質としてトリプタミンを同定した。さらに極微量の水溶性低分子活性成分の単離にも成功した。

研究成果の概要（英文）：We investigated the bioactive key natural products that serve the symbiotic relationship between host animals and symbionts or act as defense substances from predators in marine ecosystem. We determined the planar and partial relative structures of symbiodinolide, a metabolite from a symbiotic dinoflagellate, by using unique degradation reactions. We also established that this compound was a potent N-type Ca channel agonist. We discovered that the extract of an Alcyonarian coral shows potent inflammatory activity, and successfully isolated tryptamine and a water-soluble small molecule as active substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	0	1,600,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	180,000	3,280,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：共生現象・天然物化学・単離と構造・生物活性

1. 研究開始当初の背景

共生現象はサンゴ-褐虫藻など様々な生物間でみられ、その成立や維持には内因性物質が関わるとされるが、物質レベルでは未解明である。共生藻の生態に影響する宿主由来の

因子（ホストファクター、HF）や、共生関係の成立や維持、崩壊に関わる共生藻由来の因子（ゲストファクター、GF）が解明できれば、物質レベルや遺伝子発現レベルで共生現象を評価することが可能になる。また社会的関心も高いサンゴ白化現象の改善や、宿主動物

の色彩や形態の制御など、貴重な海洋資源の維持や向上につながる重要な知見が得られると期待される。

本研究では、海洋生物由来の、宿主動物と共生微細藻類との間で働く生理活性物質や、外敵や異種動物に対する防御物質として機能するユニークな炎症惹起物質の解明を目指した。

2. 研究の目的

(1) シンビオジノライドは、海洋無脊椎動物ヒラムシに共生する渦鞭毛藻 *Symbiodinium* 属より単離された、分子量 2,850 の巨大な長鎖ポリオール化合物である。本研究では、新規分解反応を駆使して本化合物の全構造の決定を目指した。また様々な生物活性試験・薬理活性試験で評価することで、本化合物の潜在的な機能を解明し、さらに宿主動物（ヒラムシ）と共生微生物（渦鞭毛藻）との共生関係に、どのように影響するか調べた。

(2) 海洋性無脊椎動物（刺胞動物）の一種であるウミトサカ *Dendronephthya* sp. は、その体液が目や皮膚に付着すると腫れることから、地元の漁師たちの間で“目つぶし”と呼ばれている。この炎症惹起成分はウミトサカにとって防御物質として機能すると予想されるが、その活性成分の構造や機能は判っていない。また活性物質の真の生産者も不明であることから、共生や食物連鎖などを介した特異な代謝移動も予想される。本研究では、この炎症惹起物質の化学的解明を目指した。

3. 研究の方法

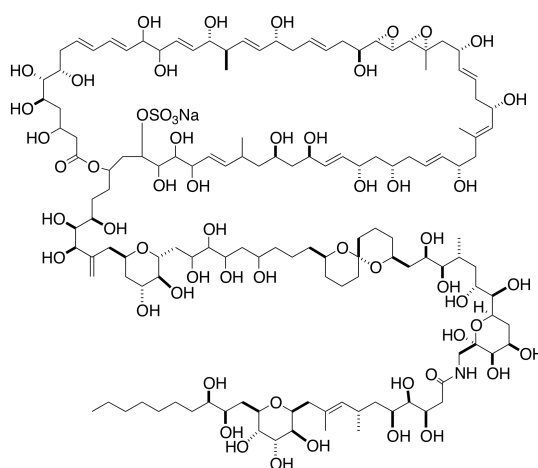
(1) 宿主動物ヒラムシから単離した渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. を大量培養して得たシンビオジノライドについて、新たに開発した第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を用いた加エチレン分解反応を行い、得られたフラグメントの構造解析を行った。また単離した化合物を用いて、受容体拮抗活性など数々の生物活性試験を実施した。

(2) 三重県沿岸でウミトサカ（湿重量 18 kg）を採取し、メタノールで抽出、ろ過、濃縮してメタノール抽出物を得た。この抽出物をマウスの後脚裏側へ皮下投与したところ、顕著な炎症惹起作用を見いだした。この活性を指標に、抽出物を液-液分配および各種クロマ

トグラフィーで分離し、活性成分の精製を行った。

4. 研究成果

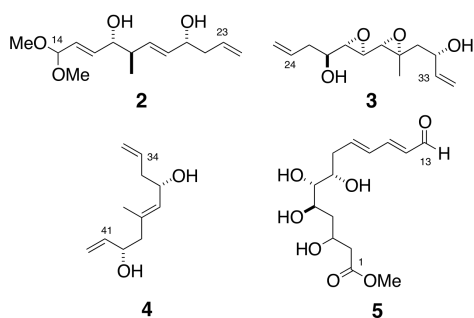
(1) シンビオジノライドの構造解析：HR-ESI-MS 分析から、シンビオジノライドの分子式を $C_{137}H_{232}NNaO_{57}S$ と決定した。また各種 NMR スペクトルの詳細な解析により、本化合物が 62 員環マクロラクトン構造、連続ビスエポキシド構造、6,6-スピロアセタール構造、およびヘミアセタール構造を持つことが明らかになった。また硫酸エステル基については、NMR 化学シフト値 (δ_H 4.69, δ_C 76.3) および重水素シフト実験より、C59 位に結合していると決定した (Fig. 1)。



symbiodinolide (1)

(Fig. 1)

さらに、シンビオジノライド (1) の平面構造を決定するため、分解反応を種々検討した。メタノール-ジクロロメタン混合溶媒中、第二世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を用いることでシンビオジノライド (1) の加エチレン分解が進行することを見だし、マクロリド部分の C14-C23, C24-C33, および C34-C41 フラグメント 2-4 を得た (Fig. 2)。さらに 1 を塩基性条件加メタノール分解を行い、マクロラクトン部を開環してから加エチレン分解を行うことで、bis-アリルジオール部が酸化的に開裂して生じた C1-C13 フラグメント 5 を得ることに成功した。



(Fig. 2)

結合定数およびNOEの詳細な解析により、シンビオジノライド(1)のC26-C32位、C44-C51位、およびC64-C66位の相対立体化学を決定した。さらに、類縁化合物であるゾーサンテラトキシン類とのスペクトルデータの比較により、1のC69-C73位、C83-C103位、およびC1'-C25'位の絶対立体化学を決定した。これまでに、約3/4の立体構造の決定を達成しており、現在、DMSO-*d*₆中のNMRスペクトルデータも含めてさらなる構造解析を進めている。

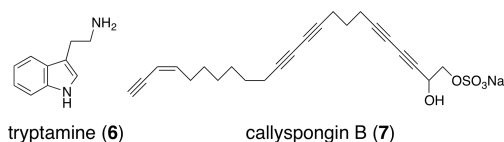
(2) シンビオジノライドの生物活性：シンビオジノライドは極低濃度(7 nM)で電位依存型N型カルシウムチャネルの開閉活性を示した。また薬理学実験により、本化合物はモルモット回腸標本に対して顕著な収縮を引き起こし(EC₅₀ = 270 nM)、さらにN型カルシウムチャネル特異的なアゴニストであることを解明した。一方、類縁化合物であるゾーサンテラトキシン類は、ウサギ大動脈に対する血管収縮作用および血小板の凝集作用を示すが、この筋収縮作用はカルシウム拮抗薬により阻害されることから、細胞膜のカルシウムイオン透過性を増加することが原因とされている。したがって、Caチャネル開口作用はマクロリド構造を持つ両化合物の共通の活性であると考えられる。

また、シンビオジノライド(1)を宿主動物ヒラムシに直接投与したところ、2.5 μMで表層の細胞が破裂し、体内の共生藻が遊離するという興味深い現象を見いだした。一方、宿主動物から遊離した渦鞭毛藻には形態異常などはみられなかったことから、本化合物が宿主動物による消化を防ぐ共生藻にとっての防御物質として機能していることが示唆された。

シンビオジノライドの発見は、イオンチャネルの構造・機能研究や、海洋生態学の発展に寄与すると期待される。

(3) ウミトサカ由来の炎症惹起物質：ウミトサカのメタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配したところ、酢酸エチル相と水相の両方に炎症惹起活性が見られた。酢酸エチル相をさらにヘキサン、ジクロロメタン、60%メタノールで液-液分配した結果、60%メタノール相に顕著な活性がみられた。

60%メタノール相を沈殿法、ゲルろ過、シリカゲルおよび逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分離した結果、活性物質としてトリプタミン(6)(1.2 mg)をTFA塩として単離した(Fig. 3)。単離した6は、60 μg/kgで顕著な炎症惹起活性を示した。また市販品の6とHPLC保持時間、NMRスペクトル、および生物活性は、いずれも完全に一致した。なお、上述のジクロロメタン相からは、ヒト子宮頸がん細胞HeLa S3細胞に対する細胞増殖阻害活性を示す、既知のポリアセチレン化合物callyspongin B(7)も単離したが、この化合物には炎症惹起活性は見られなかった。



(Fig. 3)

続いて、ウミトサカのメタノール抽出物を酢酸エチルと水で分配して得られた水溶性画分について、1-ブタノール抽出、ODSカラムクロマトグラフィー、沈殿法、ゲルろ過、シリカゲル、逆相HPLCで順次分離を進めた。その結果、得られた量は約0.1 mgと極微量ながら、強力な炎症惹起作用(5 μg/kg)を示す活性物質の単離に成功した。ESI-MS分析より分子量は229であり、本化合物が低分子の含窒素物質であることが判った。

本研究では培養生物ではなく、海洋にて採集した無脊椎動物から直接抽出分離した試料を用いて活性物質の分離精製を進めており、多量の試料の確保が困難であった。限られた試料から、活性画分の単離に成功したものの、600 MHz NMRではシグミ製マイクロチューブを用いてもほとんど何もシグナルが観測されず、構造情報は得られなかった。そこでクライオプローブ装備の900 MHz NMR(理研・横浜研究所)を活用して解析を進めた結果、複数のエチル基やヘテロ環構造の存在を明らかにすることができた。現在、二次元NMR解析を駆使して、活性物質の構造解明を目指している。

今回検討したウミトサカ由来の炎症惹起物質は、分離精製を進めるほど、有機溶媒へ

の不溶化や、凍結融解による失活、および HPLC 分析の再現性がみられなくなるなど、その不安定性や挙動の変化が問題点として明らかとなった。今後の研究を進める上で重要な知見と言える。

今後、炎症惹起物質の構造決定が達成できたら、まず化学合成してその生物活性を確認する。次いで光親和性プローブなど誘導体を合成し、構造活性相関と標的受容体の解明を目指す。既存の標的分子であれば、その標的受容体を阻害する物質を共存させて、炎症惹起作用が阻害されるかどうか調べる。さらに、マクロファージ由来の培養細胞を用いる炎症性サイトカインの遊離作用や NO 産生作用など、種々の炎症関連の生物活性評価を網羅的に行うことで、発見した新物質の機能と作用メカニズムについて理解を目指したい。

天然由来の炎症惹起物質として、紅藻由来の硫酸多糖カラゲニンが有名である。カラゲニンはプロスタグランジン遊離亢進作用を示し、ラット足蹠浮腫試験で起炎物質として用いられる。この試験を利用して、アスピリンやインドメタシンに続く新規抗炎症剤の探索や、抗炎症剤の作用機序解明研究などが行われている。またヒスタミンやセロトニンなども内因性の炎症性メディエーターであり、その受容体拮抗剤は医薬として重要である。このように、新奇な炎症惹起作用物質を発見できれば、薬理学、生理学研究の研究ツールとして、基礎研究の発展に広く貢献できると期待される。

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 10 件)

- ① M. Kita, Y. Hirayama, M. Sugiyama, and H. Kigoshi : Development of highly cytotoxic and actin-depolymerizing biotin derivatives of aplyronine A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 9871–9874 (2011). 査読有
DOI: 10.1002/anie.201103802
- ② M. Kita, O. Ohno, C. Han, and D. Uemura : Bioactive secondary metabolites from symbiotic marine dinoflagellates: symbiodinolide and durinskiols. *Chem. Rec.* **10**, 57–69 (2010). 査読有
DOI: 10.1002/tcr.200900007
- ③ M. Kita and D. Uemura : Marine huge molecules: the longest carbon chains in natural products. *Chem. Rec.* **10**, 48–52 (2010). 査読有
DOI: 10.1002/tcr.200900030
- ④ D. Uemura, M. Kita, H. Arimoto, and M. Kitamura : Recent aspects of chemical ecology–natural toxins, coral communities, and symbiotic relationships–. *Pure Appl. Chem.* **81**, 1093–1111 (2009). 査読有
DOI: 10.1351/PAC-CON-08-08-12
- ⑤ M. Kita, D. StC. Black, O. Ohno, K. Yamada, H. Kigoshi, and D. Uemura : Duck-billed platypus venom peptides induce Ca²⁺ influx in neuroblastoma cells. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 18038–18039 (2009). 査読有
DOI: 10.1021/ja908148z
- ⑥ C. Han, Y. Yamano, M. Kita, H. Takamura, and D. Uemura : Determination of absolute configuration of C14–C23 fragment in symbiodinolide. *Tetrahedron Lett.* **50**, 5280–5282 (2009). 査読有
DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.07.014

[学会発表] (計 55 件)

- ① 北将樹 : 有毒哺乳動物および海洋無脊椎動物由来の生物活性鍵物質に関する化学的研究, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス
- ② 河村篤・GISE, BARO・北将樹・木越英夫 : 海洋生物由来の抗腫瘍性および抗炎症活性物質に関する研究, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス
- ③ M. Kita : Bioorganic Studies on the Key Natural Products from Venomous Mammals and Marine Invertebrates, 1st Prof. G. W. K. Cavill Lecturship, 2011 年 11 月 1 日, ニューサウスウェールズ大学 (豪州シドニー)
- ④ 富田佳祐, 永野義仁, 北将樹, 木越英夫 : ウミトサカ由来の炎症惹起物質, 日本化学会第 4 回関東支部大会, 2010 年 8 月 30 日, 筑波大学つくばキャンパス
- ⑤ 北将樹 : 進化と共生に着目した生物現象鍵物質の化学的研究, 筑波大学 TIMS 第 12 回機能性分子シンポジウム, 2010 年 6 月 25 日, 筑波大学つくばキャンパス
- ⑥ M. Kita : Bioactive Secondary Metabolites from Symbiotic Marine Dinoflagellates. The Chemical Society of Japan (CSJ) Asian International Symposium, 2010 年 3 月 27 日, 近畿大学本部キャンパス
- ⑦ 富田佳祐, 永野義仁, 北将樹, 木越英夫 : ウミトサカ由来の炎症惹起物質, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 27 日, 近

畿大学本部キャンパス

[図書] (計2件)

- ① M. Kita, T. Inuzuka, N. Maru, and D. Uemura : *Marine Pharmacognosy: Trends and Applicatons* (CRC Press, Taylor Francis, New York), in press (2012).
- ② M. Kita, M. Kitamura, and D. Uemura : *Comprehensive Natural Products Chemistry*, 2nd edition. Vol. 4, (Elsevier, Amsterdam), pp. 263–281 (2010).

[その他]

ホームページ等

http://www.chem.tsukuba.ac.jp/kigoshi/j/top_j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北 将樹 (KITA MASAKI)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30335012