

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05289

研究課題名(和文)クロマチン修飾を制御する新規細胞機能調節物質の探索と構造解析

研究課題名(英文) Search and structural elucidation of cell function regulators that control chromatin modification

研究代表者

太田 伸二 (Ohta, Shinji)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：60185270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：イトマキヒトデ胚の発生では、胞胚期において特異的なヒストン2量体が形成されることが発見されている。このようなクロマチン修飾は細胞分化と深く関係しているものと考えられることから、ヒトデの胞胚ならびに原腸胚形成を選択的に阻害する細胞機能調節物質の開発が必要とされている。そこで、ヒトデ胚発生を特定の段階で停止させる活性を指標にして、生理活性物質の探索を行った結果、軟体サンゴから新規ジテルペノイドおよびセスキテルペノイド類を、海綿から含臭素化合物類を、オリーブ害虫から蛍光化合物類を、さらにカンアオイの根からフェナントレン類を単離し、スペクトルデータ及びX線結晶解析に基づいて構造決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで知られていない骨格構造を有する天然有機化合物を海洋生物や昆虫および植物などから新たに探し出すという今回の研究成果は、モデル生物としても知られる棘皮動物の胚発生過程における細胞分化などの重要な発生学的イベントで生起している現象のメカニズムを解明するのに必要なツールとなりうる新規な細胞機能調節物質の開発につながるという学術的な意義を有している。さらに社会的にも、これまで知られていない作用機構を持った抗がん剤や抗ウイルス剤など有用な医薬リード化合物の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Modified histone heterodimers have been shown to be produced in *A. pectinifera* embryos at mid-blastula stage but not in earlier stages. The process from mid-blastula stage to early gastrula stage in embryogenesis is closely related to the initiation of cell differentiation. For the purpose of developing useful cell function regulators, we searched for bioactive natural products that selectively inhibit the progression of starfish embryonic development at the mid-blastula stage. Bioassay-guided fractionation of the crude extracts resulted in the isolation of new diterpenoids and sesquiterpenoids from soft corals collected in the Red Sea, new bromine-containing compounds from a Philippine marine sponge, new fluorescent compounds from an olive weevil, and new phenanthrene derivatives from roots of *Asarum* sp. Their structures were elucidated based on spectroscopic data and X-ray crystallography. Some of the isolated compounds were found to inhibit cancer cell proliferation.

研究分野：生物分子科学

キーワード：生物活性物質 海洋生物 昆虫 植物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

棘皮動物の胚発生初期段階で、胞胚ならびに原腸胚が形成される過程は細胞分化が開始される重要な時期である。イトマキヒトデ胚においては、受精後7～8時間の初期胞胚期で細胞分裂の頻度が急激に低下するとともに細胞分裂の同調性が低下する。さらに受精後12～15時間の中期胞胚期に、28 kDaの核蛋白質 p28 が初めて出現する。この核蛋白質 p28 は、ヒストン H2B の9番目のグルタミン残基の  $\gamma$ -カルボキサミド基とヒストン H4 の5番目のリジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基との間でアシル転移によって生じた架橋を有するヒストン 2 量体であり、全生物界で初めて見出されたものである。このヒストンの架橋 2 量体によって遺伝子発現が制御され、胚細胞の分化が進行するのではないかと考えられる。このようなクロマチン制御に関わる極めて重要な胚発生過程である胞胚形成期ならびに原腸胚形成期に対して選択的に作用を及ぼす細胞機能調節剤の開発が必要とされている。イトマキヒトデの胚に対して、胞胚形成ならびに原腸胚形成の段階で発生を停止させる生理活性物質として、これまでに大環状ラクトン化合物マイクロモノスポライド A-C、イグジグオリドおよびノルセスタテルペンアクリル酸ロパロイン酸 A-C といった新規生理活性物質が単離・構造決定されてきている。微生物や海洋生物等から得られたこれらの新規化合物は極めて選択的な生理活性を示すことから、本研究は有用な細胞機能調節物質の開発につながることを期待される。

### 2. 研究の目的

本研究では、有用な細胞機能調節物質を開発するため、海綿動物などの海洋生物や植物および昆虫の代謝産物等について、棘皮動物に対する胚発生阻害活性試験を行い、ヒトデ胚の発生初期の細胞分裂には影響を与えず、クロマチン制御に関係する胞胚期および初期原腸胚の発生段階でのみ胚発生を停止させる活性を指標にして生理活性物質を多量に単離し、絶対配置も含めてそれらの構造を決定するとともに、様々な酵素や細胞に対する生理活性を調べることによって、得られた化合物が有する生理活性の詳細を究明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

エジプト、フィリピンならびに日本で採取した海洋生物や植物および昆虫の代謝産物等の抽出物について、イトマキヒトデ胚発生阻害活性試験を実施し、棘皮動物の胚発生を選択的に阻害する化合物の探索を行った。具体的には、様々な濃度に調製した抽出物や画分のメタノール溶液 1  $\mu$ L を 90%海水 100  $\mu$ L に加えたのち、1-メチルアデニンで処理して成熟させたイトマキヒトデの受精卵を加え、8 時間後、12 時間後、24 時間後に顕微鏡下で形態を観察することによって、初期の胚発生には影響を与えず胞胚期および初期原腸胚の段階以降で発生を特異的に阻害する活性を示すものを選び出した。

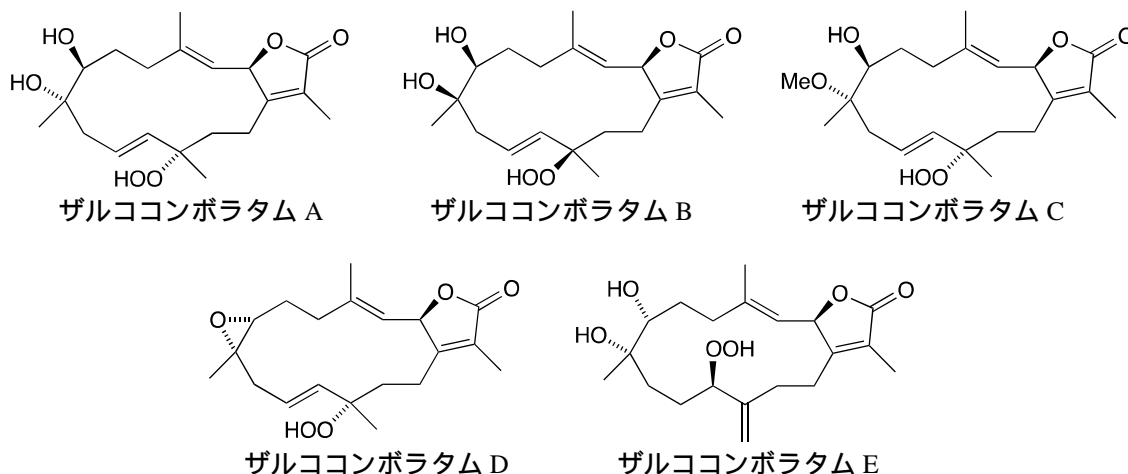
この活性試験によって選び出された抽出物および画分について、その活性を指標として活性化合物の分画・精製を行った。多量の抽出物を溶媒分画後、吸着クロマト(HP20)、ゲルろ過(LH20)、HPLC (ODS) 等により分画精製し、活性物質を単離した。

単離された化合物について、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルならびに高分解能質量分析、単結晶 X 線解析等に基づいて絶対配置も含めて構造を決定した。新規生理活性物質ならびにそれらから調製した各種誘導体について、受精阻害や胚発生に対する詳細な阻害様式を調べるとともに、様々な癌細胞の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。さらに、誘導体や関連化合物の構造活性相関についても調べて、新規生理活性物質の生理機能の詳細の究明を図った。

### 4. 研究成果

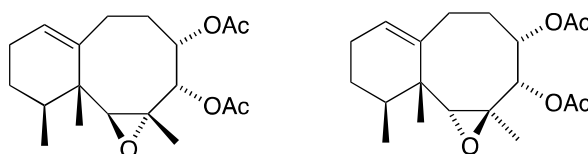
エジプト、フィリピンならびに日本で採取した海洋生物や昆虫及び植物を有機溶媒で抽出して得られた粗画分についてイトマキヒトデの受精卵を用いた胚発生阻害試験を実施した。試料のメタノール抽出物を海水で段階的に希釈したのちイトマキヒトデ受精卵を約 20 個加えて、初期発生等に対する影響を顕微鏡下で観察し、ヒトデの胚発生に対して卵割等には影響を与えず胚発生後期の段階である胞胚期でのみ胚発生を選択的に停止させる活性が認められた粗抽出物について、有機溶媒を用いて順次分画した。活性を示した溶媒可溶性画分を、シリカゲルおよび逆相 (ODS) カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分画・精製することにより活性物質を単離し、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルならびに高分解能質量分析等に基づいてそれらの化学構造を決定した。まず、エジプトの紅海産ザルコフィトン属軟体サンゴの酢酸エチル可溶性画分からは、ザルココンボラタム A-E と名付けた 5 種の新規センブラン型ジテルペノイド類を活性物質として単離した。NMR および MS 等のスペクトルデータに基づいてこれらの平面構造を推定した。さらに、 $^1\text{H}$  NMR のカップリング定数ならびに NOE 相関等に基づいて、それらの立体配置を決定した。ザルココンボラタム A-E について肺癌細胞株 A549 およびヒト口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 に対する作用を調べた結果、ザルココンボラタム D は、これら癌細胞株に対してそれぞれ  $\text{IC}_{50}$  値が 49.70 および 53.17  $\mu\text{M}$  の細胞増殖阻害活性を示すことが明らかになった。これに

対して、ザルココンボラタム A-C および E は顕著な阻害活性を示さなかった。



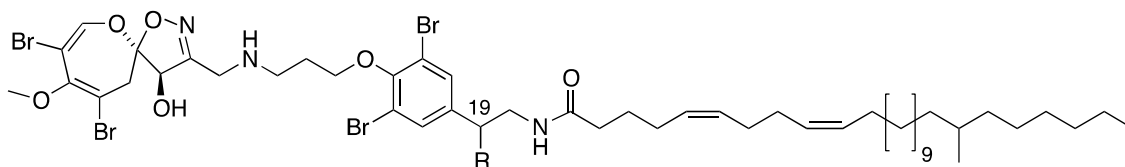
新規化合物ザルココンボラタム A-E の化学構造

一方、エジプトの紅海産パラレムナリア属軟体サンゴの酢酸エチル可溶性画分からは、パラレムノリン A および B と名付けた 2 種の新規セスキテルペノイド類を活性物質として単離した。これらの化学構造を NMR および MS 等のスペクトルデータに基づいて決定した。それらの立体化学は NOE 相関の解析によって決定した。パラレムノリン A および B は、黄色ブドウ球菌に対して最小阻害濃度がともに 1.5  $\mu\text{mol}$  の抗菌活性を示すことが明らかになった。

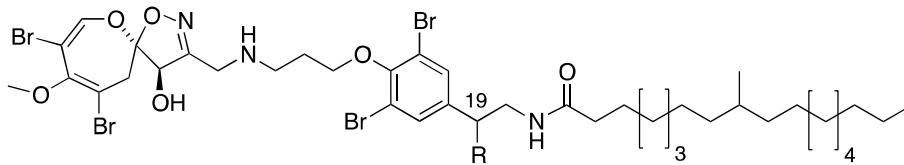


新規化合物パラレムノリン A (左) および B (右) の化学構造

また、フィリピン産イルシニア属海綿のジクロロメタン可溶性画分からは、イルシニアプリシン A-D と名付けた 4 種の新規含臭素化合物類を活性物質として単離し、これらの化学構造を NMR および MS 等のスペクトルデータに基づいて決定した。これらはいずれも側鎖に枝分かれメチル基を持つプサマプリシン関連物質であった。これらのうち、イルシニアプリシン A および B は、側鎖が炭素数 29 の長鎖不飽和脂肪酸となったユニークな構造を有していた。側鎖の枝分かれメチル基の位置は、加水分解後メチル化を行って得られた脂肪酸メチルエステル誘導体類の GCMS 分析により決定した。さらに、報告されている既知のプサマプリシン化合物類との比旋光度および CD スペクトルの比較によって、イルシニアプリシン A-D の絶対配置を決定した。単離された化合物についてヒト大腸癌細胞株 HCT-116 に対する作用を調べたが、細胞増殖阻害活性は示さなかった。

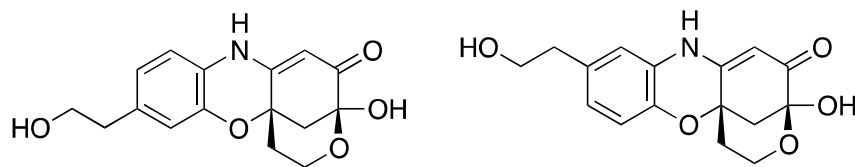


新規化合物イルシニアプリシン A (R=H) および B (R=OH) の化学構造

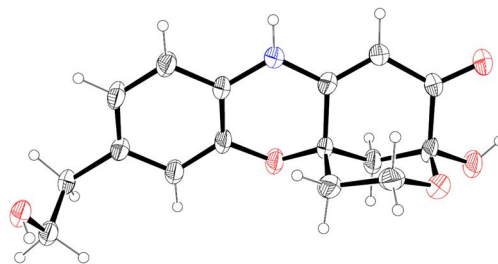


新規化合物イルシニアプリシン C (R=H) および D (R=OH) の化学構造

さらに、昆虫の代謝産物から活性物質の探索を行った。オリーブアナアキゾウムシは、日本でのオリーブ栽培に多大な被害をもたらす重要害虫として知られている。オリーブアナアキゾウムシ成虫のクロロホルム抽出物をシリカゲルカラムクロマトおよび ODS カラムクロマトで繰り返し分画・精製を行って 2 種の蛍光化合物類を単離し、ピメフォラジン A および B と命名した。単離した化合物は、NMR および MS 等のスペクトルならびに X 線結晶解析等に基づいて構造決定した。ピメフォラジン A および B は、旋光度や X 線結晶解析の結果などからラセミ体であることがわかったため、キラル HPLC 分取によって光学分割し、ECD 計算によってそれぞれの絶対配置を決定した。さらに、ピメフォラジン A および B についてヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に対する作用を調べた結果、神経変性疾患の進行に關与する  $H_2O_2$  の酸化ストレスによる傷害から神経細胞を保護する活性を有していることが明らかになった。

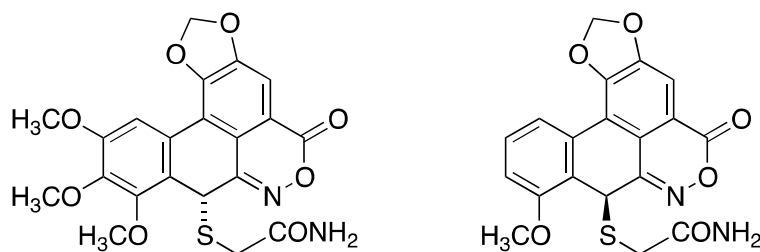


新規化合物ピメフォラジン A (左) および B (右) の化学構造

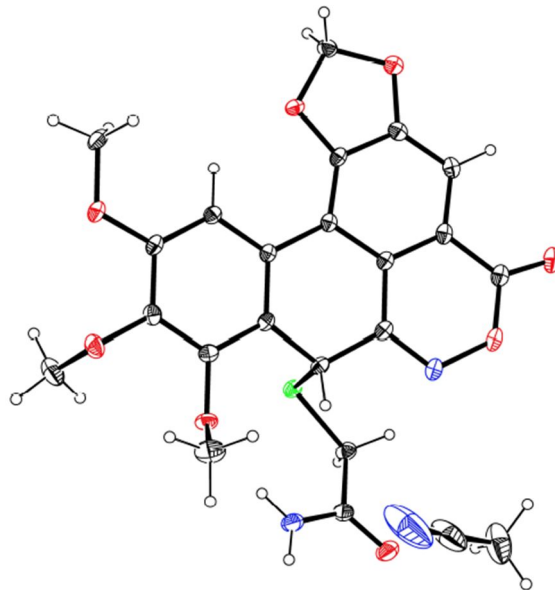


ピメフォラジン A の結晶構造

また、植物抽出物から活性物質の探索を行った。日本固有種の植物であるウマノスズクサ科カンアオイの根の酢酸エチル可溶性画分に、ヒト胚の胞胚形成を強く阻害する活性が認められた。この酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって繰り返し分画精製を行った結果、活性成分を得た。NMR および MS 等のスペクトルに基づいて構造を推定するとともに単結晶 X 線解析によってその構造をオキサジノン環およびフェナントレン骨格を有する新規アリストロキア酸誘導体であると確定した。また、CD スペクトルの計算結果に基づいて絶対配置を決定し、アサロイドオキサジン C および D と命名した。アサロイドオキサジン C および D は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対して  $IC_{50}$  値 7.4 および 22.6  $\mu M$  の神経毒性を示すことを明らかにした。



アサロイドオキサジン C (左) および D (右) の化学構造



アサロイドオキサジン C の結晶構造

本研究課題で、棘皮動物の胚発生においてクロマチン制御に関する胞胚期および初期原腸胚の発生段階でのみ胚発生を停止させる活性を指標にして細胞機能調節物質を探索した結果、エジプト紅海産の2種の軟体サンゴから5種の新規センブラン型ジテルペノイド類ならびに2種の新規セスキテルペノイド類を活性物質として単離・構造決定した。これらのうちの数種は、癌細胞に対する細胞増殖抑制活性ならびに抗菌活性を示した。フィリピン産の海綿からは、2種の新規ブサマプリシン関連化合物類を単離・構造決定した。また、甲虫の一種であるオリーブ害虫の代謝産物からは、2種の新規蛍光化合物を単離・構造決定した。さらに日本固有種の植物であるカンアオイの根からは、活性物質としてオキサジノン環を有する2種のフェナントレン誘導体類を単離・構造決定した。このような細胞分化に関係する段階で胚発生を選択的に停止させる生理活性を示す新規な骨格を有する天然有機化合物の発見は、特異的な作用を示す細胞機能調節物質の開発へと発展する可能性が期待される。本研究課題によって見出された新規生理活性天然有機化合物について、さらに各種細胞ならびに酵素を用いて詳細な活性試験を行うことによってそれらの生理機能を詳しく調べるとともに、より選択性に優れた高活性な細胞機能調節化合物の開発につなげて行くことが今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Gelani Chona D., Mazo Roeve Ann Mae C., Lavilla Charlie A., Uy Mylene M., Tabugo Sharon Rose M., Ohta Emi, Ohta Shinji	4. 巻 19
2. 論文標題 Antibacterial, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic Studies of the Amines Isolated from the Philippine Marine Sponge <i>Desmacella</i> sp	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Bioactive Compounds	6. 最初と最後の頁 52 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1573407218666220509152514	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Fujikawa Aya, Ishihara Yasuhiro, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 85
2. 論文標題 Isolation of Fluorescent Benzoxazines with Neuroprotective Activity from the Olive Weevil <i>Pimelocerus perforatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2740 ~ 2745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.2c00670	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Higashi Reina, Ohta Emi, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 19
2. 論文標題 Triterpenoid Saponins from the Fruits of <i>Symplocos lucida</i> as Glucuronidase Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry & Biodiversity	6. 最初と最後の頁 e202200774
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbdv.202200774	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Higashi Reina, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 51
2. 論文標題 Acylated secoiridoid glucosides isolated from the fruit extract of <i>Symplocos lucida</i> inhibit glucuronidase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2022.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Ohta Shinji, Takeda Manami, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ishihara Yasuhiro	4. 巻 191
2. 論文標題 Janohigenins: Long-chain anacardic acid derivatives with neuroprotective activity from <i>Ophiopogon japonicus</i> seeds	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 112904 ~ 112904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2021.112904	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Mohamed Tarik A., Elshamy Abdelsamed I., Abdel-Tawab Asmaa M., AbdelMohsen Mona M., Ohta Shinji, Pare Paul W., Hegazy Mohamed-Elamir F.	4. 巻 19
2. 論文標題 Oxygenated Cembrene Diterpenes from <i>Sarcophyton convolutum</i> : Cytotoxic <i>Sarcoconvolutum</i> A-E	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 519 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/md19090519	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

1. 著者名 Elshamy Abdelsamed I., Mohamed Tarik A., Elkady Eman M., Saleh Ibrahim A., El-Beih Ahmed A., Alhammady Montaser A., Ohta Shinji, Umeyama Akemi, Pare Paul W., Hegazy Mohamed-Elamir F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Paralemnolins X and Y, New Antimicrobial Sesquiterpenoids from the Soft Coral <i>Paralemnalia thyrsoide</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antibiotics	6. 最初と最後の頁 1158 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antibiotics10101158	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 太田伸二
2. 発表標題 甲虫類が作り出す生理活性物質
3. 学会等名 第24回 天然薬物の開発と応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 太田伸二
2. 発表標題 植物と昆虫が作り出す生理活性物質
3. 学会等名 第66回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東玲奈・太田恵美・根平達夫・大村尚・太田伸二
2. 発表標題 -グルクロニダーゼ阻害活性を有するクロキ果肉由来の新規セコイリドイド配糖体
3. 学会等名 第66回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤川 亜也・石原康宏・太田恵美・根平達夫・大村尚・太田伸二
2. 発表標題 オリーブの重要害虫由来の新規アルカロイド類の構造および神経細胞保護活性
3. 学会等名 第66回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田愛実・加藤亜記・太田伸二・大村尚
2. 発表標題 アミジグサ科褐藻類に含まれる刺激性成分
3. 学会等名 第66回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 太田伸二・竹田愛実・太田恵美・根平達夫・大村尚・石原康宏
2. 発表標題 ジャノヒゲ種子由来の新規長鎖アナカルジン酸誘導体ジャノヒゲニン類の神経細胞保護活性
3. 学会等名 第65回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
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			
フィリピン	ミンダナオ州立大学			
エジプト	国立研究所			