

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6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658065

研究課題名（和文）海洋生物由来の抗マラリア性化合物の探索

研究課題名（英文）Search for anti-malaria agents from marine organisms

研究代表者

松永 茂樹 (MATSUNAGA SHIGEKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60183951

研究成果の概要（和文）：マラリア原虫に対する選択毒を海洋生物から発見するための研究を行った。生物活性は、非メバロン酸経路が働いている細菌の生育を阻害し、メバロン酸経路が働いている細菌には作用しないことを指標とした。わが国沿岸各地で採取した海産無脊椎動物を探索源とし、スクリーニングにより活性検体を選抜し、活性成分の単離・構造決定を試みた。鹿児島産未同定カイメンおよび種子島産ソフトコーラルから活性成分を単離したが、それぞれの菌株に対する感受性の差は大きくなかった。

研究成果の概要（英文）：We searched for compounds selectively toxic against malaria parasites from marine organisms. The bioassay was examined to see differential antimicrobial activity against bacteria dependent on mavalonate pathway and non-mevalonate pathway. We screened the 736 extracts of marine invertebrates collected along the coast of Japan. Active compounds from hit organisms were isolated and their structures were elucidated. We characterized several compounds from an unidentified marine sponge from Kagoshima and a soft coral from Tanegashima. The selectivities of the isolated compounds were not noteworthy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：天然物化学、海洋生物、テルペン生合成、抗菌活性、遺伝子操作、枯草菌

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、ハマダラカが媒介するマラリア原虫に起因する熱帯・亜熱帯性の感染症で、年間の罹患者数は4-5億人、死亡者数は100-300万人と見積もられている。マラリアの治療および予防にはキニーネやクロロキ

ンなどの薬物が使用されているが、原虫における薬剤耐性が深刻な問題となっている。

テルペノイドは複数のイソプレン単位から構成される化合物の総称で、原核生物から真核生物にいたる全ての生物に含まれ、生命の維持にとって必須の生体成分である。イソ

プレンの生合成は、メバロン酸を経由することが定説となっていたが、近年になって、植物の葉緑体およびある種のバクテリアでは、五炭糖のデオキシキシロースリン酸 (DXP) を経由する全く別の経路 (非メバロン酸経路) が見いだされた²。興味深いことに、マラリア原虫で、テルペノイドはアピコプラストという小器官内で非メバロン酸経路により作られる。したがって、非メバロン酸経路を選択的に阻害する薬物は、この経路を用いているマラリア原虫 (およびその他の病原性原虫や微生物) を死滅させるが、非メバロン酸経路を使わない哺乳類には無害である。

2. 研究の目的

申請者の研究室で冷凍保存している海産無脊椎動物試料の抽出物ライブラリーから、テルペノイドの生合成経路のみが異なる組換え微生物とその野生株を用いるバイオアッセイ系により、非メバロン酸経路選択的阻害剤のスクリーニングを行う。そこでの活性検体から有効成分を精製し構造決定を行う。さらに、得られた物質が、非メバロン酸経路のどの段階の酵素反応を阻害するのか、インビトロでの酵素反応により調べる。加えて、良好な活性を示す活性物質については、マラリア原虫に対する増殖阻害活性を調べる。

このようにして、わが国沿岸に生息する海産無脊椎動物から、抗マラリア薬のリード化合物を探索し、得られた非メバロン酸経路阻害剤の化学構造の決定を行う。並行して、活性物質の非メバロン酸経路中の作用点の解明を試み、海産無脊椎動物の抗マラリア薬探索のための生物資源としての可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 生物活性スクリーニング

①組換え枯草菌を用いた生物活性試験 メバロン酸経路と非メバロン酸経路に対する阻害活性をを選択的に検出するために、組換え微生物を用いる。菌が本来保有するテルペノイド生合成遺伝子を不活性化した枯草菌に対して、非メバロン酸経路遺伝子群を導入した組換え枯草菌とメバロン酸経路を用いて生育する野生株を、連携研究者の葛山が作成し保有している。これらの菌株のいずれかに対して、選択的増殖阻害作用を示す化合物は、増殖しなかった方の菌株に導入されているテルペノイド生合成経路を選択的に阻害するものと考えられる。スクリーニングはペーパーディスク法により行う (下図)。元来もっている非メバロン酸経路のみを利用して生育する菌株の増殖を阻害し、かつ、遺伝子操作によりメバロン酸経路が導入された菌株の増殖に影響を与えない試料を活性検

体とする。なお、試料中に、非メバロン酸経路阻害物質とそれ以外に作用点を持つ抗菌物質が共存する場合は、両菌株とも増殖が阻害されるため、非メバロン酸経路阻害活性を検出できなくなる。そこで、両菌株の増殖を同時に阻害する試料は、あらかじめ含有成分を分離して活性を調べる。すなわち、試料を薄層クロマトグラフィーで展開後、寒天平板法によりバイオオートグラフィー試験を行うこととする。

②試料 わが国沿岸各地で採取した約 1000 種類の海産無脊椎動物の抽出物から調製した、水溶性画分と脂溶性画分を用いる。

(2) 活性成分の単離

スクリーニングにて見いだされた活性検体の抽出物を、溶媒分画、逆相、ゲル濾過、順相およびイオン交換などのクロマトグラフィーに付して活性物質を精製する。最終的に、HPLC を用いて活性成分を分離する。なお、すべての分離工程において、生物活性を指標として分画を行う。

(3) 活性物質の構造決定

単離された活性物質の化学構造は、以下に示した手順により決定する。

①分光法による構造解析 化合物の構造解析は、まず、マススペクトルや NMR スペクトルを用いておこなう。分子量および分子式は高分解能マススペクトルにより決定する。ついで、平面構造は二次元 NMR の COSY、HOHAHA、HMQC および HMBC スペクトルの解析により明らかにする。一方、相対配置は、NOE データの解析により決定する。

②化学的手法による構造解析 化合物の構造が複雑で分光分析だけでは不十分な場合は、加水分解や二重結合の酸化的切断などの化学反応を用いてフラグメントを得る。それぞれのフラグメントについて構造決定を行い、帰納的に全体の化学構造を決定する。

③絶対配置の決定 活性物質中にアミノ酸や糖などの既知化合物と比較可能なユニットが含まれる場合、化学分解により該当する部分を遊離させ、キラルカラムを用いるガスクロマトグラフィーや HPLC、あるいは旋光度や CD スペクトルの標品との比較を行い絶対配置を決定する。また、化合物中に二級水酸基やアミノ基が存在する場合は ¹H NMR の新モシャー法を適用して、水酸基が結合した炭素の絶対配置を決定する。

4. 研究成果

(1) 生物活性スクリーニング

①生物活性試験 メバロン酸経路と非メバ

ロン酸経路に対する阻害活性をを選択的に検出するために、組換え微生物を用いた。菌が本来保有するテルペノイド生合成遺伝子を不活性化させた枯草菌に対して、非メバロン酸経路遺伝子群を導入した組換え枯草菌とメバロン酸経路を用いて生育する野生株を用意した。これらの菌株のいずれかに対して、選択的増殖阻害作用を示す化合物は、増殖しなかった方の菌株が保有するテルペノイド生合成経路を選択的に阻害するものと考えられる。スクリーニングはペーパーディスク法により行った。元来もっている非メバロン酸経路のみを利用して生育する菌株の増殖を阻害し、かつ、遺伝子操作によりメバロン酸経路が導入された菌株の増殖に影響を与えない試料を活性検体とした。

②試料 わが国沿岸各地で採取した736の海産無脊椎動物(カイメン516、コケムシ3, 刺胞動物144, 原索動物68)の抽出物から調製した、水溶性画分と脂溶性画分を用いた。

(2) 鹿児島産カイメンからの活性成分の単離

スクリーニングにて見いだされた鹿児島産未同定カイメン(コード番号S02-008)を、メタノールで抽出、抽出物を水とクロロホルムで二層分配に付した。水層をブタノールで抽出し、有機層を合一後、逆相クロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィーおよび逆相HPLCに順次付して、4つの活性物質を精製した。核磁気共鳴、質量分析などの機器分析に付し、構造解析を進めた。いずれの化合物も、2つのジヒドロピペリジン環がアルキル鎖で結合した大環状構造を取っていて、それぞれの構造の違いは、アルキル鎖の長さと同数の二重結合の位置と数であった。

(3) 種子島産ソフトコーラル由来の活性物質

枯草菌の生育阻害が認められた未同定ソフトコーラルに含まれる活性物質の単離・構造決定を試みた。メタノールおよびエタノール抽出物を水とクロロホルムで二層分配に付した。クロロホルム層を液々分配に付しクロロホルム画分を得た。これを、セファデックスLH-20クロマトグラフィーおよびCPC(遠心液分配クロマトグラフィー)で精製し、活性物質を得た。この化合物の構造解析を質量分析および核磁気共鳴により行ったところ、(12S,5Z,8Z,10E,14Z)-12-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acidと同定された。この化合物のメチルエステルがすでにソフトコーラルから得られているが、遊離型での単離は初めての例である。

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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 茂樹 (MATSUNAGA SHIGEKI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：60183951

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

葛山 智久 (KUZUYAMA TOMOHISA)
東京大学・生物生産工学センター・准教授
研究者番号：30280952

乙黒 一彦 (OTOGURO KAZUHIKO)

北里大学・基礎研究所・センター長
研究者番号：80118794