

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350965

研究課題名(和文) 段階特異的な胚発生阻害活性を有する新規細胞機能調節物質

研究課題名(英文) Cellular function regulating substances that inhibit echinoderm embryogenesis

研究代表者

太田 伸二(OHTA, Shinji)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：60185270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：棘皮動物胚の発生を特定の段階で選択的に停止させる活性を指標にして、海洋生物等から有用細胞機能調節物質の探索を行った。その結果、鹿児島県近海で採取した海綿およびエジプト紅海産の軟体サンゴや軟体動物等から新規生理活性物質を単離し、NMRおよびMS等のスペクトルデータならびにX線結晶解析に基づいてそれらの化学構造を決定した。これらのうち、海綿由来のポリアセチレン、アメフラシ由来のハロゲン化合物および軟体サンゴ由来の大環状ジテルペンは白血病細胞等に対して細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Search for marine natural products capable of arresting the embryonic development of starfish at the specific stage led to discovery of new specific inhibitors of cellular functions, such as polyacetylene compounds, halogenated sesquiterpenes, macrocyclic diterpenoids which have been isolated from marine sponges, Egyptian sea hare, and Red Sea coral, respectively. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic analyses and the absolute configuration was confirmed by X-ray analysis. We have evaluated the effects of the new compounds on echinoderm embryogenesis and human cancer cell lines. Several compounds exhibited cytotoxic activity in vitro against several human cancer cells.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：生理活性物質 海綿 軟体サンゴ 棘皮動物 胚発生

1. 研究開始当初の背景

日本近海で採取した数百種の海綿のメタノール抽出物について、棘皮動物卵の成熟阻害、受精阻害、卵割阻害、胚発生段階特異的阻害および孵化阻害を指標にして新規生理活性物質の探索とそれらの機能解析を進めてきており、これまでに次期抗癌剤として注目されるマクロライド化合物であるイグジグオリド、スチレン硫酸エステル化合物であるジャスピシン類、ポリアセチレン硫酸エステル化合物であるカリスポンジン類、含臭素アミド化合物であるクラスリンアミド類、テトラミン酸配糖体であるアンコリノシド類、ノルセスタテルペンアクリル酸であるロパロイン酸類などの新規生理活性物質を単離・構造決定してきた。これらはいずれも天然から微量しか得られないものの極めて選択的な生理活性を示すものが多いことから、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ている。

2. 研究の目的

上記研究背景で記述したように、新たな細胞機能調節物質の開発を目指して、本研究では、海綿動物等から、棘皮動物の胚発生を段階選択的に阻害する物質をスクリーニングし、特に、胚発生後期に対する選択的阻害活性に着目して生理活性物質を多量に単離し、絶対配置も含めて構造決定を行う。また、単離した生理活性物質に関して、受精阻害や胚発生に対する詳細な阻害様式を調べ、その生理機能の詳細を究明することを目的とした。

3. 研究の方法

海綿等の抽出物について、次のスクリーニングを実施し、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。
胚発生阻害スクリーニング：各種濃度に調製した検体のメタノール溶液 1 μL を人工海水 100 μL に加えたのち、イトマキヒトデ受精卵（冬季はパフンウニを用いてアッセイを実施した）を入れて飼育した。8 時間後、12 時間後、24 時間後に顕微鏡下観察を行い、初期発生には影響を与えず（非特異的細胞毒性を示すサンプルを除外するため）、胞胚期以降で発生を段階特異的に阻害する活性ならびに孵化を阻害する活性を有する検体を選び出した。

こうして選択された検体について、活性を指標として活性物質の単離・構造決定を行った。多量の海綿等の抽出物を溶媒分画後、イトマキヒトデの原腸胚形成阻害活性を指標として、吸着クロマト(HP20)、ゲ

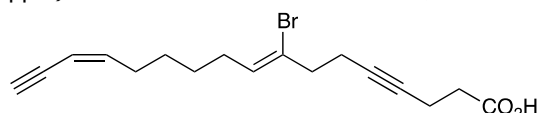
ル過(LH20)、HPLC (ODS) 等により分画精製し、活性物質を単離した。

高分解能 MS および 1D/2D NMR スペクトルならびに X 線結晶解析等に基づいて絶対配置も含めて構造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た。また、各種癌細胞の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。またさらに、構造活性相関に関する知見を得るなどして、新規生理活性物質の生理機能の詳細を究明した。

4. 研究成果

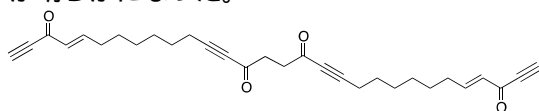
棘皮動物イトマキヒトデの受精卵を用いた胚発生阻害スクリーニングを、海綿等の海洋生物のメタノール抽出物について実施した。海水で段階的に希釈した鹿児島県産海綿等のメタノール抽出物中にイトマキヒトデ受精卵を約 20 個加えて、初期発生等に対する影響を顕微鏡下で観察し、ヒトデの胚発生を特定の発生段階で選択的に阻害する活性が認められた粗抽出物について、順次ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールおよび水の各可溶性画分に溶媒分画した。これらのうち活性が認められた溶媒可溶性画分を、各種カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分画・精製することにより活性物質を単離し、NMR、MS 等によって活性物質の構造を特定した。まず、胞胚形成を阻害した海綿抽出物からは、活性物質としてデメチルファリオリドが得られた（最小有効濃度 3 ppm）。また、別種の海綿抽出物からは、4 種の活性物質が得られた。最も活性な 4,5-ジブプロモ-1*H*-ピロール-2-カルボキサミドは、最小有効濃度 0.08 ppm でヒトデ胚の発生を初期原腸胚の段階で選択的に停止させた。さらに別種の海綿抽出物からは、アラニン、臭素化 *N*-メチルトリプトファンおよび β -チロシンを構成成分とするデブシペプチドと推定された活性物質が得られ、10 ppm 以上の濃度でヒトデの胚発生を初期原腸胚の段階で選択的に停止させることがわかった。また、鹿児島県種子島近海で採取した *Theonella* 属海綿のメタノール抽出物がイトマキヒトデの胚発生を阻害することがわかった。この粗メタノール抽出物を酢酸エチル 水で分配した後、酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトで分画することにより、新規ポリアセチレン化合物を単離した。この新規ポリアセチレン化合物は、ESIMS で m/z 335 および 337 にほぼ同強度の $[M-H]^-$ イオンピークを示したことから、分子量 336 の含臭素化合物であることがわかった。さらに、高分解能 ESI-TOFMS の結果から、その分子式を $C_{17}H_{21}BrO_2$ と決定した。さらに、IR、UV、

1D および 2D NMR スペクトルデータに基づいて、その構造を決定した。この新規ポリアセチレン化合物を 100 ppm の濃度でイトマキヒトデ胚に添加すると、32 細胞期までは正常に胚発生が進行するが、その後の胞胚形成を阻害することが明らかとなった。また、本化合物は、ヒト白血病細胞 U937 および HL60、肺ガン細胞 A549 および H1299 に対して細胞増殖阻害活性 ($IC_{50} = 24\text{--}72$ ppm) を示すことが明らかになった。



新規ハロゲン化ポリアセチレンの化学構造

またさらに、鹿児島県奄美大島近海で採取された *Petrosia* 属海綿のメタノール抽出物がイトマキヒトデの胚発生を胞胚形成の直前で阻害することが見出された。この粗メタノール抽出物を酢酸エチル 水で分配した後、酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトで分画することにより、活性成分として新規ポリアセチレン化合物を単離した。このポリアセチレン化合物は、MALDI-TOFMS で m/z 481 に $[M+Na]^+$ イオンピークを示し、高分解能 MALDI-TOFMS 分析の結果から、その分子式を $C_{30}H_{34}O_4$ と決定した。さらに、IR、UV、1D および 2D NMR スペクトルデータに基づき、その化学構造は、対称中心を有するポリアセチレンであると決定した。この化合物は、 $3\ \mu\text{g/mL}$ 以上の濃度でイトマキヒトデの胞胚形成を選択的に阻害することがわかった。本化合物を $CeCl_3$ 共存下で $NaBH_4$ と反応させることにより、全てのカルボニル基が還元されてテトラヒドロキシ体が得られた。このテトラヒドロキシ体は、元のカルボニル化合物よりも低濃度でヒトデ胚の発生を胞胚形成の段階で停止させることを明らかにした。また、この新規ポリアセチレン化合物は、ヒト白血病 U937 細胞に対して細胞増殖阻害活性を示すことが明らかになった。

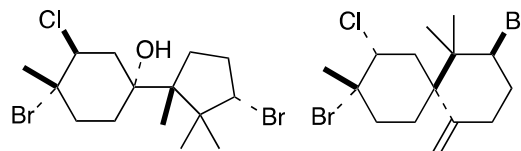


新規ポリアセチレン化合物の化学構造

フィリピン産の *Callyspongia* 属海綿抽出物からは、活性物質として長鎖脂肪酸が得られ、ピコリニルエステル誘導体にして MS 測定し、フラグメントイオン解析を行って不飽和結合の位置を決定した。また、別種のフィリピン産海綿抽出物からは、3 種の活性物質が得られ、いずれも高度不飽和側鎖を有するトリテルペノイド類と同定された。

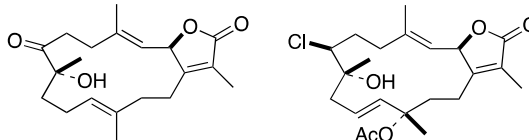
また、エジプト紅海で採集されたアメフ

ラシの消化管のアセトン抽出物からは、新規生理活性物質として 2 種のハロゲン化セスキテルペン類が得られた。これらは、前立腺癌細胞、肺癌細胞、乳腺癌細胞、肝細胞癌細胞、結腸癌細胞に対して $10\ \mu\text{g/mL}$ 以下の濃度で細胞増殖阻害活性を示すことがわかった。



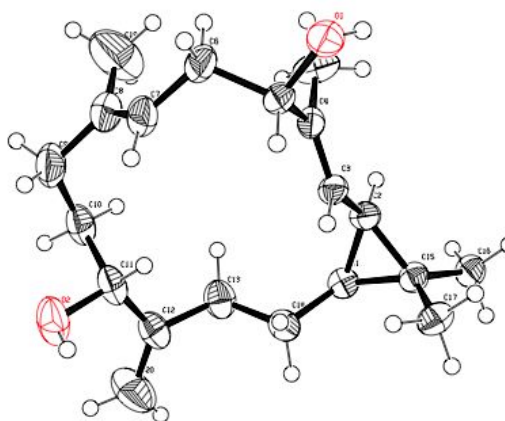
新規ハロゲン化セスキテルペン類の化学構造

さらにエジプト紅海産の *Sarcophyton* 属軟体サンゴの酢酸エチル抽出物からは、2 種の新規生理活性ジテルペン類が得られ、肝細胞癌細胞および乳腺癌細胞に対して弱い細胞増殖阻害活性を示すことを明らかにした。これらの化学構造を以下に示す。



新規ジテルペン化合物類の化学構造

また、エジプト紅海産 *Sinularia* 属軟体サンゴのジクロロメタン-メタノール可溶性画分をシリカゲルクロマトグラフィーで分画後逆相 HPLC により活性物質を精製した結果、3 種の 14 員環を有する新規カスバン型ジテルペン類が得られた。高分解能 MS および 2D NMR データ等に基づいて平面構造を決定し、エネルギー計算と NOE 相関からこれら大環状化合物の相対配置を推定した。さらに、*Sinularcasbane M* について単結晶 X 線構造解析を行って絶対配置も含めてその化学構造を確定した。以下に、結晶構造を示す。



新規大環状ジテルペノイドの結晶構造

本研究課題において、棘皮動物の胚発生阻害活性を指標にして細胞機能調節物質の探索を行った結果、日本近海産の海綿から

は極めて稀な新規臭素化ポリアセチレン化合物および新規ポリアセチレンケトン化合物を、エジプト紅海産の軟体動物からは新規ハロゲン化セスキテルペン類を、エジプト紅海産の軟体サンゴからは新規大環状ジテルペノイド類を単離・構造決定した。これらのうちの数種は、癌細胞に対して細胞増殖抑制活性を示した。高選択的な生理活性を有する化合物は、何らかの細胞機能に対して特異的な作用を及ぼす可能性が期待されることから、今後、さまざまな細胞アッセイならびに酵素アッセイを行うことによってそれらの詳細な生理機能を明らかにするとともに、より活性が高く選択性にも優れた細胞機能調節物質の開発を目指すことが課題である。

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 12 件)

F. S. Latayada, M. M. Uy, Y. Akihara, E. Ohta, S. Ohta. Two new C11-terpenes with an octahydrobenzofuran skeleton isolated from the leaves of *Ficus nota*, *Phytochemistry Lett.*, **19**, 237-240 (2017). (査読有)

DOI:10.1016/j.phytol.2017.01.018

M. Sanada, R. Hayashi, Y. Imai, F. Nakamura, T. Inoue, S. Ohta, H. Kawachi. 4',6-Dimethoxyisoflavone-7-O- β -D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) agonist that stimulates adipocyte differentiation. *Animal Sci. J.*, **87**, 1347-1351 (2016). (査読有)

DOI:10.1111/asj.12552

M. F. Hegazy, T. A. Mohamed, A. I. Elshamy, M. A. Alhammady, S. Ohta, P. W. Pare. Casbane diterpenes from Red Sea coral *Sinularia polydactyla*. *Molecules*, **21**, 308-315 (2016). (査読有)

DOI:10.3390/molecules21030308

S. Kamikawa, E. Ohta, T. Nehira, H. Ômura, and S. Ohta. Structure Revision of Caesalpinista A and Caesalpinista B and Isolation of a New furanoditerpenoid from the cotyledons of *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*. *Helv. Chim. Acta*, **99**, 133-137 (2016). (査読有)

DOI: 10.1002/hlca.201500171

S. Kamikawa, S. Oshimo, E. Ohta, T. Nehira, H. Ômura, and S. Ohta. Cassane diterpenoids from the roots of *Caesalpinia decapetala* var. *japonica* and structure revision of caesaljapin. *Phytochemistry*, **121**, 50-57 (2016). (査読有)

DOI:10.1016/j.phytochem.2015.10.001

S. Kamikawa, E. Ohta, S. Ohta. Caesaljaponins A and B: New

Cassane-type Furanoditerpenoids from the Seeds of *Caesalpinia decapetala* var. *japonica*. *Helv. Chim. Acta*, **98**, 336-342 (2015). (査読有)

DOI:10.1002/hlca.201400170

A. Elkhateeb, A. A. El-Beih, A. M. G. Eldeen, M. A. Alhammady, S. Ohta, P. W. Paré, M. F. Hegazy. New terpenes from the Egyptian soft coral *Sarcophyton ehrenbergi*. *Marine Drugs*, **12**, 1977-1986 (2014). (査読有)

DOI:10.3390/md12041977

M. F. Hegazy, A. Y. Moustfa, A. E. H. Mohamed, M. A. Alhammady, S. E. I. Elbehairi, S. Ohta, P. W. Pare. New Cytotoxic Halogenated Sesquiterpenes from the Egyptian Sea Hare, *Aplysia oculifera*. *Tetrahedron Lett.*, **12**, 1977-1986 (2014). (査読有)

DOI:10.1016/j.tetlet.2014.01.096

S. Ohta, T. Ogawa, E. Ohta, T. Ikeuchi, K. Kamemura, S. Ikegami. Petroacetylene, a new polyacetylene from the marine sponge *Petrosia solida* that inhibits blastulation of starfish embryos. *Nat. Prod. Res.*, **27**, 1842-1847 (2013). (査読有)

DOI:10.1080/14786419.2012.763128

A. H. Mohamed, H. H. Mahmoud, F. F. Abdellatif, Y. S. Mohamed, A. A. Ahmed, S. Ohta. New guaianolide-type sesquiterpene lactones from *Inula verbascifolia*. *Z. Naturforsch.*, **68c**, 175-180 (2013). (査読有)

<http://znaturforsch.com/ac/v68c/68c0175.pdf>

Y. Hirose, E. Ohta, Y. Kawai, S. Ohta. Dorsamin-A's, Glycerolipids Carrying a Dehydrophenylalanine Ester Moiety from the Seed-eating Larvae of the Bruchid Beetle, *Bruchidius dorsalis*. *J. Nat. Prod.*, **76** (4), 554-558 (2013). (査読有)

DOI: 10.1021/np300713c

N. Aoki, K. Yamamoto, T. Ogawa, E. Ohta, T. Ikeuchi, K. Kamemura, S. Ikegami and S. Ohta. Bromotheoynic acid, a brominated acetylenic acid from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Nat. Prod. Res.*, **27**, 117-122 (2013). (査読有)

DOI:10.1080/14786419.2012.660636

[学会発表](計 2 件)

F. Nakamura, M. Sanada, R. Hayashi, Y. Imai, T. Inoue, S. Ohta, H. Kawachi, Wistin is a PPAR γ agonist that stimulates adipocyte differentiation, 17th AAAP Animal Science Congress, 2016年8月23日、福岡.

Y. Imai, Y. Yamada, M. Sanada, F. Nakamura, T. Hayashi, S. Ohta, H. Kawachi, Fractionation and identification of

5-nonadecylresorcinol as an agonist of PPAR γ in soy sauce oil、17th AAAP Animal Science Congress、2016年8月23日、福岡。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

太田 伸二 (OHTA Shinji)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：6 0 1 8 5 2 7 0