

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670045

研究課題名(和文) NMR信号増幅法による海洋マクロリドの活性発現機構と立体化学の解明

研究課題名(英文) investigation using NMR for molecular targets and stereochemistry of marine macrolides

研究代表者

津田 正史 (TSUDA, Masashi)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：10261322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：海洋性アンフィジニウム属渦鞭毛藻からはこれまでに、培養腫瘍細胞に対して強力な殺細胞活性をもつマクロリド化合物が得られている。本研究ではイリオモテオリド-1aについて殺細胞活性の発現機構の解析を行い、チューブリン分子へ作用することがわかった。一方、新たに得られた細胞増殖促進作用を示すアンフィリオニン-4と細胞毒性をもつ新規23員環マクロリド・イリオモテオリド-2aについて立体化学を含めた化学構造を解析した。

研究成果の概要(英文)：Marine dinoflagellates of the genus Amphidinium have been recognized as a valuable source of unique macrolides possessing exhibiting potently cytotoxic activity. In this study, the investigation for molecular targets of the cytotoxic macrolide, iriomoteolide-1a, resulted in affinity for tubulin. Furthermore, we isolated two new compounds, amphirionin-4 with potent cell proliferation-promoting activity and iriomoteolide-2a, a 23-membered macrolide with cytotoxic activity, and their structures with absolute stereochemistries were elucidated.

研究分野：薬学

キーワード：マクロリド 殺細胞活性 細胞増殖促進活性 渦鞭毛藻

1. 研究開始当初の背景

海洋産微細藻類を対象とした二次代謝産物の探索は、海産毒を中心に数多くの研究がなされてきた。本研究で取り上げるアンフィジニウム属渦鞭毛藻からはこれまでに、内外の研究者によって多くの二次代謝産物の単離・構造解析に関する研究が行われている。アンフィジニウム属渦鞭毛藻を生物材料として、小林ら(北海道大)や Shimizu ら(米国ロードアイランド大)が単離した抗腫瘍性マクロリド、安元ら(東北大)や、橘ら(東京大)、村田ら(大阪大)、Guo ら(中国上海生物科学研)、上村(名古屋大)による長鎖ポリケチド化合物といった、特異な化学構造と興味深い生物活性を有する二次代謝産物が数多く単離されてきた。研究代表者らはこれまでに、海洋産扁形動物・無腸類ヒラムシの体内に共生するアンフィジニウム属渦鞭毛藻より、培養腫瘍細胞に対して顕著な細胞毒性を示す一連のマクロリド化合物・アンフィジノリド類を、また、ユニークな長鎖ポリケチド化合物コロブシノール類、ルテオファノール類、アンフェゾノール類を単離し、絶対立体配置を含むそれらの化学構造を明らかにしてきた。

研究代表者らは、アンフィジニウム属渦鞭毛藻の遺伝子解析により抗腫瘍性マクロリドを産生する株を効率的に収集し、さらに、抽出物のメタボローム解析と殺細胞活性試験により、新規マクロリド産生株やマクロリド大量生産株を選別する手法を構築した。このようにして得られた西表島産のアンフィジニウム属渦鞭毛藻の殺細胞活性物質の探索研究によって、強い殺細胞活性を示す 20 員環マクロリド化合物・イリオモテオリド-1a を発見し、化学構造の解析を行ってきた。しかし、Gohosh らの全合成研究によって提案構造に誤りがあると指摘された。また、強い殺細胞活性を引き起こす作用機序の解明もなされていない。さらにこれら渦鞭毛藻には、殺細胞活性物質を始め様々な生物活性物質の存在が示唆された。

2. 研究の目的

(1) イリオモテオリド-1a は、海洋産のアンフィジニウム属渦鞭毛藻より単離した 20 員環マクロリド化合物であり、強い殺細胞活性を示す。本研究では NMR 信号増幅法を駆使して、イリオモテオリド-1a の強い殺細胞活性の作用発現の分子メカニズムを調べることが目的とする。

(2) アンフィジニウム属渦鞭毛藻に含まれる殺細胞活性を始め様々な生物活性をもつ新規化合物を単離し、それらの化学構造並びに生物活性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の保有するアンフィジニウム属渦鞭毛藻 HYA024 株ならびに KCA09053 株のトルエン抽出物よりイリオモテオリド-1a

の分離を試みた。100L 培養で得られた藻体を抽出した後、各種カラムクロマトグラフィー分離を行ない、高速液体クロマトグラフィーによりイリオモテオリド-1a を単離した。表面プラズモン共鳴を用いたタンパク質との結合実験や細胞周期阻害実験等によりイリオモテオリド-1a の殺細胞活性発現の作用機序を検討した。さらに得られた結果からイリオモテオリド-1a はチューブリン分子に作用することが予想されたことから、イリオモテオリド-1a を超偏極してチューブリンへの偏極転移実験を行った。

(2) アンフィジニウム属渦鞭毛藻 KCA09051 株、HYA024 株、KCA09053 株の抽出物について、ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞に対する殺細胞活性を指標として、各種カラムクロマトグラフィーならびに高速液体クロマトグラフィーによる分離を行い、新規化合物の探索を行った。得られた化合物について、2 次元 NMR データを含むスペクトルデータの詳細な解析や化学的方法に基づいて、それらの化学構造を明らかにした。生物活性を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 100L 培養で得られた藻体を抽出した後、抽出物あるいは各種カラムクロマトグラフィー分離を行ない、イリオモテオリド-1a および新規化合物としてイリオモテオリド-2a、アンフィリオニン-4a を単離精製した。イリオモテオリド-1a は、チューブリンやアクチンを用いた表面プラズモン共鳴での結合実験で、チューブリンとの結合能を有することが示されたことから、チューブリンの重合阻害活性試験を行ったところ、ピンラスチンと同様に阻害活性を示した。さらに細胞周期阻害活性試験において、G2/M 期に集積し細胞分裂阻害を示すことから、イリオモテオリド-1a の強い殺細胞活性は、チューブリンの重合阻害によるものと予想された。

(2) 沖縄県・西表島において採取・分離したアンフィジニウム属渦鞭毛藻 KCA09051 株の培養は、補強栄養剤を含む室戸海洋深層水中で実験室にて大量培養をした。まずアクリル製大型シャーレの滅菌を行い、2 L の海洋深層水を入れて、さらに補強栄養剤を終濃度 1% で添加した。この培地に、当該株の培養液を加え、25 °C で 16 時間明期、8 時間暗期の照射サイクルにて 2 週間静置培養をした。培養液を 20 L へとスケールアップして攪拌培養を行い、2 週間ごとに 200 L、1,000 L へとスケールアップした。培養液を限外ろ過膜によるクロスフローろ過で濃縮後、遠心分離にて収穫し、得られた藻体を凍結乾燥することで、1,600 L の培養液より乾燥藻体を得た。

得られた乾燥藻体をトルエン/メタノールの混合溶媒で抽出した。この抽出物をトルエンと 1M 食塩水で分配し、トルエン可溶画分をシリカゲルのカラムクロマトグラフィーに付した。クロロホルム/メタノール系で溶出

したフラクションについて、アセトニトリルにて C₁₈ カラムを行い、更に、アミノシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行った。ヘキサン/酢酸エチル(1:1)にて溶出したフラクションを逆相系高速液体クロマトグラフィーで精製し、新規化合物としてアンフィリオニン-4 を単離した。

アンフィリオニン-4 は、無色の光学活性油状物質として得られ、高分解能 ESIMS スペクトルから、分子式が C₂₆H₄₀O₃ であることが明らかとなった。¹H NMR スペクトルから、メチル基 3 個、オキシメチンプロトン 2 個の存在およびエキソメチレン 2 個の存在が示唆された。¹³C NMR と HMQC スペクトルからは sp² 四級炭素 4 個、sp² メチン炭素 5 個、sp² メチレン炭素 3 個、sp³ オキシメチン炭素 4 個、sp³ メチレン炭素 7 個、メチル炭素 3 個からなる 26 個の炭素シグナルを観測することができた。分子式並びに ¹³C NMR データから 1 個の環構造を有することがわかった。2 次元 NMR および MS スペクトルの詳細な解析から、アンフィリオニン-4 は THF 環、2 つのエキソメチレンそして 2 つの水酸基を有する新規直鎖状ポリケチド化合物であった。¹H-¹H COSY および TOCSY スペクトルでは、太線で示す H₃-1 から H₂-6、H-8 から H₂-10 および H-16 から H₂-22 への繋がりが明らかとなった。HMBC スペクトルからは、H₂-23/C-7、H₂-6/C-7、H-8/C-7 の相関および H₂-25/C-13、H-12/C-13、H₂-14/C-13 の相関により、C-7 および C-13 にエキソメチレン基が結合していることが示された。そして、H₂-10/C-11、H-12/C-11、H-12/C-13、H₂-14/C-13、H₂-14/C-15、H-16/C-15 の相関より、C-11-C-12 間、C-15-C-16 間には 3 置換二重結合が存在することが示唆された。H₂-14/H-16 および H-17/H₃-26 に NOESY 相関が見られることから E 体であると考えた。NOESY スペクトルにおいて、H-2/H-5 に相関が観察され、C-2 から C-5 で THF 環を形成していることが示唆された。THF 環の H-2、H-4、H-5 の相対立体配置は、NOESY スペクトルの解析から全て配置であることがわかった。アンフィリオニン-4 の C-2、C-4、C-5、C-8 における絶対立体配置を帰属するため、4 位と 8 位の 2 個の水酸基に MTPA エステル化を行い、得られた誘導体の各ケミカルシフト値を比較する改良 Mosher 法を適用することとした。アンフィリオニン-4a を CH₂Cl₂ 溶液にて DMAP、Et₃N および (R)-(-)-あるいは (S)-(+)-MTPACl で処理し、それぞれ 4,8-Bis-(S)-MTPA エステルおよび (R)-MTPA エステルを得た。各々 ¹H NMR データを帰属し、Bis-(S)-MTPA エステル体の化学シフト値と (R)-MTPA エステル体の化学シフト値から差を求め、H-4 (+0.11 ppm) 及び H-8 (+0.11 ppm) が正の値より S 配置であると帰属した。それにより、C-2 及び C-5 の絶対立体配置を、それぞれ R, S であると帰属した(図 1)。

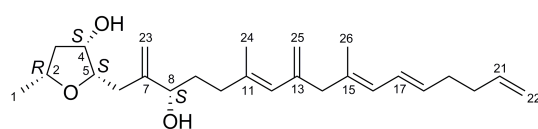


図1 アンフィリオニン-4の構造

アンフィリオニン-4 の ¹³C 標識酢酸取り込み実験により得られた 1-¹³C および 2-¹³C 酢酸標識体の ¹³C NMR スペクトルから C-2、C-4、C-7、C-9、C-11、C-13、C-15、C-17、C-19、C-21 は酢酸の 1 位によってラベル化されたのに対して、C-1、C-3、C-5、C-6、C-8、C-10、C-12、C-14、C-16、C-18、C-20、C-22、C-23、C-24、C-25、C-26 は酢酸の 2 位によってラベル化されることがわかった。INADEQUATE スペクトルより C-1-C-2 と C-3-C-4、C-6-C-7、C-8-C-9、C-10-C-11、C-12-C-13、C-14-C-15、C-16-C-17、C-18-C-19、C-20-C-21 のインタクトな酢酸ユニットが 10 個存在することが示され、C-5 と C-22 およびエキソメチレンや分枝メチルは、酢酸の 1 位が脱離した孤立した 2 位メチル基由来であった。これらの酢酸取り込みパターンは、渦鞭毛藻の代謝産物に特徴的な非連続型のポリケチドであることがわかった(図 2)。

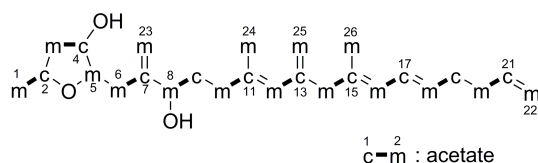


図2 アンフィリオニン-4の酢酸取込パターン

アンフィリオニン-4 の培養細胞に対する作用を検討したところ、マウス骨髄間葉系細胞 ST-2 の増殖に強い促進活性を示し、0.1 ng/mL において 950% 細胞増殖を加速させる活性を見出した。これに対して、マウス骨芽細胞 MC3T3-E1 やマウス線維芽細胞 NIH3T3 の増殖に何ら影響を与えなかった(図 3)。アンフィジニウム属渦鞭毛藻からはこれまでに細胞増殖阻害活性を示す化合物が種々単離されてきたが、細胞増殖促進活性を示す化合物はほとんど例がない。

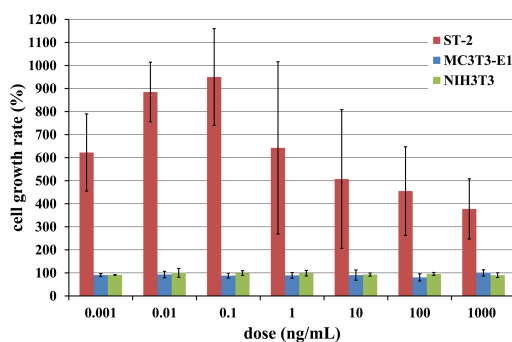


図3 アンフィリオニン-4の細胞増殖促進活性

沖縄県・西表島において採取・分離したアンフィジニウム属渦鞭毛藻 KCA09053 株について各種カラムクロマトグラフィーや高速

液体クロマトグラフィーによる分離を行うことで、強力な殺細胞活性を示す新規マクロリド化合物イソカリベノリド- を単離した。一方、アンフィジニウム属渦鞭毛藻 HYA024 株からは、強力な殺細胞活性を示す新規 23 員環マクロリド・イリオモテオリド-2a を単離した。イリオモテオリド-2a は、無色の光学活性油状物質として得られ、高分解能 ESIMS スペクトルから、分子式が $C_{33}H_{54}O_7$ であることが明らかとなった。 ^{13}C NMR スペクトルからは、エステルカルボニル、 sp^2 四級炭素 2 個、 sp^2 メチン炭素 3 個、 sp^2 メチレン炭素 1 個、オキシメチン炭素 8 個を含む sp^3 オキシメチン炭素 11 個、 sp^3 メチレン炭素 10 個、メチル炭素 5 個からなる 33 個の炭素シグナルを観測された。分子式並びに ^{13}C NMR データから 3 個の環構造を有することがわかった。2 次元 NMR および MS スペクトルの詳細な解析から、2 個の THF 環、5 個の C_1 分岐、3 個の水酸基をもつ 23 員環マクロリドであると帰属した。分子内に 11 個存在する不斉炭素の立体化学は、J-Based Configuration 解析と改良 Mosher 法によって、絶対立体配置を含めて帰属した(図 4)。イリオモテオリド-2a は、ヒトリンパ腫細胞に対して強い殺細胞活性を示した。

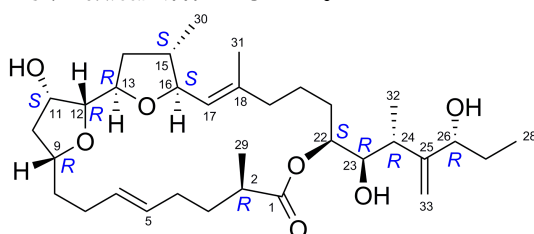


図 4 イリオモテオリド-2aの構造

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kumagai, K.; Tsuda, M.; Masuda, A.; Fukushi, E.; Kawabata, J., Iriomotelide-2a, a Cytotoxic 23-Membered Macrolide from Marine Benthic Dinoflagellate *Amphidinium* Species., *Heterocycles*, 査読有, Vol. 91, No. 2, 2015, 265-274.

Minamida, M.; Kumagai, K.; Ulanova, D.; Akakabe, M.; Konishi, Y.; Tominaga A.; Tanaka, H.; Tsuda M.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Masuda, A.; Tsuda, M., Amphirionin-4 with Potent Proliferation-Promoting Activity on Bone Marrow Stromal Cells from a Marine Dinoflagellate *Amphidinium* Species., *Organic Letters*, 査読有, Vol. 16, No. 17, 2014, 4858-4861.
dx.doi.org/10.1021/ol5023504

6 . 研究組織

(1)研究代表者

津田 正史 (TSUDA, Masashi)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授
研究者番号：10261322

(2)研究分担者

小椋 賢治 (OGURA, Kenji)

石川県立大学・生物資源環境学部・教授
研究者番号：50270682

ウラノバ ダナ (ULANOVA Dana)

高知大学・教育研究部総合科学系・助教
研究者番号：70610129