

平成21年 4月 6日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18406002
 研究課題名（和文） 北太平洋熱帯サンゴ礁海域に棲息する無脊椎動物の生理・生態と
 化学成分の調査研究
 研究課題名（英文） Investigation of physiology, ecology, and constituents in the
 invertebrates, which inhabit in the coral reef of the North Pacific
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：塚本 佐知子 (TSUKAMOTO, Sachiko)
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：70324093

研究成果の概要：本研究課題は、熱帯サンゴ礁に棲息する海洋生物の生理・生態と化学成分について調査することが目的である。これまでの研究により、海綿から、細胞増殖阻害活性を示す新規化合物、がん抑制遺伝子産物 p53 の作用を増強することが期待される化合物、および、プロテアソームの作用を阻害する化合物などを発見することができた。今後、さらに生物活性物質の探索を続ける予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2007年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：複合新領域・生物分子科学

キーワード：調査研究、海洋無脊椎動物、熱帯サンゴ礁、生理、生態、化学成分

1. 研究開始当初の背景

海洋無脊椎動物からは、陸上の植物からは発見されないような、特異な化学構造を示す化合物や強い生物活性を有する化合物が、これまでに多く報告されてきた。それは、海洋無脊椎動物の生態や棲息する環境が陸上とは大きく異なることに起因すると考えられている。たとえば、海洋無脊椎動物の多くは、岩盤に付着して棲息しているため天敵から逃れることができないので、他の生物が忌避するような化学物質を周りの海水中に分泌して身を守っていると考えられている。一方、海水中には空気中の数十億倍もの病原微生物が存在しているといわれている。そこで、海洋無脊椎動物は抗生物質のような化合物を体内に保有して、身を守っていると考えられている（生体防御）。ところで、ホヤの体内にはある種のプロクロロンまたはバクテ

リアが共生しており、ホストとゲストとの関係は1：1であることが知られている。一方、海綿の体内には複数種類のプロクロロンや藍藻が共生していることが多いが、それらの生物は、通常、海綿の体内で棲み分けしている。そして、ホヤの場合のように、ホストとゲストが1：1の共生関係にある場合には、何らかの鍵化合物がその関係を制御していると考えられる。一方で、海綿の例のように、複数種類の微生物が棲み分けしている際にも、何らかの鍵化合物がその現象を制御していると考えられる。すなわち、海洋無脊椎動物およびそれら生物の体内に棲息している微生物は、個体の生存や種の存続のために、フェロモンのような化学物質を巧みに用いていると考えられている。したがって、海洋無脊椎動物および海洋微生物に含まれる化学成分を研究することは、医薬品開発に貢献

するだけでなく、化学物質によって制御されている生態系の理解につながると期待される。

2. 研究の目的

これまでに多くの医薬品のリード化合物が天然から得られているが、放線菌を初めとする菌類の培養液や生薬などの植物に加え、近年、海洋生物から得られた化合物をリード化合物とするものが次々と臨床試験に入っており、他にも多くの海洋生物由来の化合物が前臨床試験中である。中でも、カリブ海原産のホヤから単離された ET-743 (Ecteinascidin) は、アメリカにおいて抗がん剤としての臨床試験が行われ、申請時において、Phase II の段階で実用化が期待されていた（現時点では認可されている）。また、熱帯から亜熱帯のサンゴ礁海域に棲息するイモガイは、口中から発射する毒矢を用いて魚貝類を麻痺させ補食する。その毒は多くのペプチドの混合物で、イオンチャネルの機能を選択的に制御することが明らかとなった。そして、モルヒネの 1000 倍という強力な鎮痛作用を示す一方で、モルヒネの弱点である習慣性を示さないという長所を備えた、非常に優れた鎮痛剤として、既に商品化されている。このように海洋生物からは特異な生物活性を有する化合物が多く発見されている。しかし、海洋生物からの化合物の探索研究の歴史は浅く、1960 年代後半にカリブ海産腔腸動物ヤギから大量のプロスタグランジンが発見されたのが初めての海洋由来の生物活性物質であり、伝承薬用植物に比較して、生物活性が調べられているものは意外なほど少ない。そこで、本研究課題では、生物種の豊富な北太平洋サンゴ礁における海洋生物をターゲットとして含有成分の生物活性を広く調査し、医薬品のシーズ探索の端緒とすることを目的としている。

本学術調査では、当初、北太平洋サンゴ礁海域の中でも、これまで採集の実績のある、インドネシアのスラウエシ島の北部に位置するメナド、パラオ、ヤップ、ポンペイにおいて、海綿・ホヤなどの無脊椎動物、および、海洋微生物の調査・採集を行なうことを計画した。また、雨期（11～3 月）と乾期（4～10 月）、あるいは、生殖時期とそれ以外の時期においては生物の生理が異なるので、調査時期によって、生物に含まれる特異的な化学成分に変化が生じると考えられる。そこで、1 年に数回、同じ場所で採集を行うことにより、特定の生物の生理・生態に関する知見が明らかになると考えた。初めの計画では、2006 年度に、メナド、パラオ、ヤップ、ポンペイの海域を調査し、それぞれの海域で採集した生物の抽出液を用いたスクリーニングを行い、

その結果を参考にして、2007～2008 年度には、有望な生物活性を示す生物や生理・生態的に興味深い生物に焦点をしばって調査を行う予定であった。しかし、メナド周辺海域の地形が極めて多彩であるとともに、棲息する生物の種類も多様性に富んでいたことから、その後も引き続き、メナド周辺海域での調査研究を続けた。

3. 研究の方法

(1) メナド周辺海域における調査研究

本研究代表者は、東北薬科大学の浪越教授と鶴飼博士、および、東京大学分子細胞生物学研究所の小林博士とチームを組み、サムラトランギ大学のマンギンダーン教授（インドネシア・メナド市）の協力を得て、ダイビングによる調査研究を行った。生態学的に興味深いと思われる無脊椎動物を中心にして採集を行った。また、生物や水中に沈んでいる葉などから、微生物の単離を行った。調査は、以下の期間において行った。2006. 8. 31～9. 9、2006. 12. 15～12. 24、2007. 8. 31～9. 11、2007. 12. 16～12. 25、2008. 9. 14～23。

(2) 無脊椎動物および微生物からのスクリーニング用サンプルの調製

採集した無脊椎動物は、直ちにエタノール漬けにした。そして、マンギンダーン教授の研究室において、大学院生・学生の協力を得て抽出液とし、本研究代表者に輸送した。単離した微生物は、東北薬科大学において培養し、スクリーニング用サンプルを調製した。

(3) 各種生物活性についてのスクリーニング、活性物質の精製・構造決定

金沢大学において、生物活性試験のスクリーニング、活性物質の精製・構造決定を行った。本研究では生物活性の評価として、①細胞増殖阻害、②フローサイトメトリーを用いた細胞周期阻害活性、③ユビキチン依存的タンパク質分解系に対する阻害活性を調べた。

①細胞増殖阻害：細胞増殖阻害試験は、従来から、天然物化学の研究室で行われてきた簡便なアッセイ法であるが、細胞周期阻害活性を調べるためのサンプルを絞込むため、まず、細胞増殖阻害試験を行なう必要がある。一方、細胞増殖阻害試験を行なうことにより、細胞周期への影響が全くなくても生命活動を阻害するような活性物質を見つけることができるので、生物活性を広くスクリーニングすることが可能となる。

②フローサイトメトリーを用いた細胞周期阻害活性：生物学の基本的な概念としての細胞周期は、近年、分子レベルでの解明が急速に行われており、それにともない、がん化、分化や老化などの生命現象の機構解明も急速に進んでいる。新しい細胞周期制御物質の発見は、細胞周期に関する研究分野における

ブレークスルーをもたらすとともに、がん治療薬など医薬品の創製につながる。

③ユビキチン依存的タンパク質分解系に対する阻害活性試験：生体内で分解される運命にあるタンパク質は、ユビキチン化された後でプロテアソームにより選択的に分解される。その過程は『ユビキチン依存的タンパク質分解系』とよばれており、多段階から形成される複雑なシステムとなっている。プロテアソームは生命活動に必須な酵素であり細胞において普遍的に機能しているものであることから、従来はプロテアソームを標的とする制がん剤は考えられなかった。しかし、2003年、合成プロテアソーム阻害物質 PS-341 が多発性骨髄腫の治療薬としてアメリカで認可され、プロテアソーム阻害物質が制がん剤として有効であることが示され注目されている。しかし、天然物からのプロテアソーム阻害物質の網羅的な探索はほとんど行われていないので、広く天然物をターゲットとした精力的な探索が待たれているのが現状である。本研究代表者は、複雑で未解明な部分の多いユビキチン依存的タンパク質分解系を標的とする鍵化合物を開発することは、創薬に加えて、サイエンス全般に対する貢献につながると考え、PS-341 が認可される以前から、ユビキチン依存的タンパク質分解系を標的とする天然資源由来の化合物の単離と作用機序に関する研究を行ってきた。そして、自らアッセイ系を立ち上げ、ユビキチン依存的タンパク質分解系の中でも、特に、プロテアソーム、ユビキチン活性化酵素、ユビキチン結合酵素、および、ユビキチンリガーゼに対する阻害活性を指標にして阻害物質を探索してきた。対象とする酵素のうち、標的タンパク質がユビキチン化される際に最後の過程で働くユビキチンリガーゼは、膨大な数の標的タンパク質に対応して分子多様性に極めて富んでいる。そして、特定のユビキチンリガーゼの機能を阻害することにより、特定の標的タンパク質の分解が抑制され、それによって副作用の少ない薬剤の開発が可能であると考えられている。

4. 研究成果

採集した生物サンプルの量が多いため、2008年度に採集した生物は、まだ EtOH 漬けの状態であり、スクリーニング用サンプルの調製は完了していない。したがって、スクリーニングも途中までしか行っていない。今後、引き続き生物活性のスクリーニングを行い、生物活性物質の精製を行う。これまでに得られた成果は、以下の通りである。

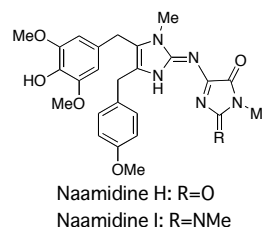
(1) 海綿 *Leucetta chagosensis* から得た新規細胞増殖阻害物質 Naamidines H, I

2006年9月にマナド沖のマンテハゲ島周辺

で採集した海綿 *Leucetta chagosensis* から、HeLa 細胞に対する成長阻害活性を指標にして精製を行い、2つの新規イミダゾールアルカロイドを単離し、naamidines H, I と命名した。それぞれの化合物の IC₅₀ 値は 5.6、15 μg/mL であった (雑誌論文 3、学会発表 6)。2つの化合物の構造の違いは、ウレアとグアニジンの違いである。同様な構造の違いは、dibromophakelstatin と dibromophakelin にも認められているが、細胞増殖阻害活性は、ウレアになっている dibromophakelstatin の方が、強いという同様の結果が報告されている (Plubrukarn, A. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **60**, 712, 1997)。したがって、類似した構造を有する化合物においては、グアニジンよりもウレアになっている方が強い活性を示す傾向がある可能性が考えられる。また、今回、得られた化合物は、スラウエシ島北部で採集した海綿から得られたものであるが、南部で採集した海綿からは、右側の環が存在しない化合物 naamidines E, G が得られている (Gross, H. *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **65**, 1190, 2002; Hassan, *et al.*, *J. Nat. Prod.*, **67**, 817, 2004)。南部に棲息する海綿には、右側の環を合成する酵素が存在していない可能性が考えられ、生合成酵素の違いが示唆される。



Leucetta chagosensis



(2) 海綿 *Leucetta* aff. *microrhaphis* から得た Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害物質 leucettamol A

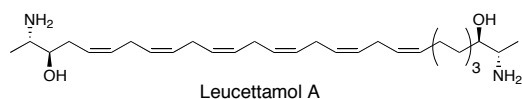
ユビキチン依存的タンパク質分解系において、E2 酵素の一つである Ubc13 は、Uev1A とヘテロ複合体を形成することにより、p53 の単量体化と核外輸送を誘起し、また一方、Ubc13 のノックダウンにより p53 の転写活性化が誘導される (Laine *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 8901, 2006)。したがって、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する物質は、p53 の転写活性化を誘導でき、抗がん剤の候補になると考えられる。そこで、大腸菌で発現・精製した Ubc13 と Uev1A を用いて ELISA 法により複合体の形成を阻害する化合物のスクリーニングを行った。その

結果、2006年9月にマナド沖のマナドツアデウ島周辺で採集した海綿 *Leucetta aff. microrhaphis* の抽出物に、Ubc13-Uev1A 複合体の形成を阻害する活性が認められたので、化合物の精製を行った。そして、以前、抗菌物質として単離された (Kong *et al.*, *J. Org. Chem.*, **58**, 970, 1993) leucettamol A を得ることができた。Leucettamol A の Ubc13-Uev1A 複合体形成阻害作用は、 IC_{50} 値が 50 $\mu\text{g/mL}$ であったが、アセチル化すると阻害活性が消失したので、leucettamol A に含まれるアミノ基と水酸基は、Ubc13-Uev1A 複合体形成の阻害に必要であると考えられる。また、leucettamol A を還元すると IC_{50} 値は 4 $\mu\text{g/mL}$ と強くなった。Ubc13 は、MMS2 ともヘテロ複合体を形成するが、leucettamol A は、Ubc13-MMS2 複合体形成を阻害しなかったので、Uev1A に結合している可能性が考えられる (雑誌論文 2、学会発表 3、4)。

Leucettamol A は、単離された当初は、ラセミ体であると報告されていたが、最近、deconvoluted exciton coupled CD 法により、絶対立体配置が 2*R*, 3*S*, 28*S*, 29*R* であることが明らかとなった (雑誌論文 1)。



Leucetta aff. microrhaphis

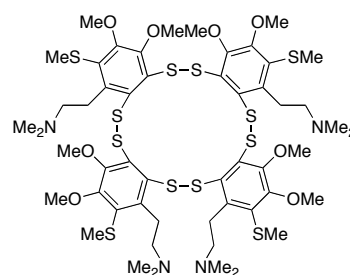


(3) 群体ボヤ *Lissoclinum cf. badium* から単離した新規 lissoclibadin 類

この群体ボヤからは、これまでに含イオウアルカロイド lissoclibadins 1-7 が得られているが、2006年9月に北スラウエシ島で採集したサンプルから、lissoclibadins 8-14 が得られた。一連の化合物は、ドーパミンに複数のイオウが結合したユニークな構造を有している。特に、lissoclibadin 8 のような 4 量体構造の含イオウ芳香族アルカロイドは、初めて見つかったものであり非常にユニークな構造であるといえる (学会発表 5)。



Lissoclinum cf. badium



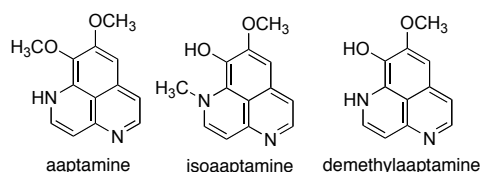
Lissoclibadin 8

(4) 海綿 *Aptos suberitoides* から得られたプロテアソーム阻害物質

2006年12月にマンテハゲ島で採集した海綿 *Aptos suberitoides* の抽出液にプロテアソームのキモトリプシン様活性を阻害する活性と HeLa 細胞に対する成長阻害活性が認められた。EtOH 抽出液の BuOH 可溶画分を精製したところ、aaptamine, isoaaptamine, demethylaaptamine が得られた。精製した化合物を用いて、各生物活性を調べたところ、細胞増殖阻害活性の IC_{50} 値は、順に 12.0, 2.5, 0.76 $\mu\text{g/mL}$ であった。プロテアソームに対する阻害活性は、isoaaptamine と demethylaaptamine は、3 種類の作用 (キモトリプシン様、トリプシン様、カスパーゼ様) の全てに対して aaptamine よりも強い阻害活性を示した (学会発表 2)。



Aptos suberitoides



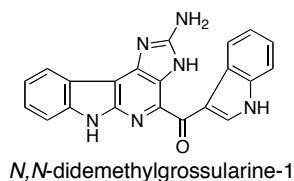
(5) ニシキボヤ *Polycarpa aurata* 由来アルカロイド *N,N*-didesmethylgrossularine-1 (DDMG-1) のヒト炎症性サイトカイン産生阻害効果

既に、DDMG-1 が、LPS 刺激したマウスマクロファージ系細胞株からの TNF- α の産生を抑制することを明らかにしたが、さらに、異なる刺激下においてヒト単球系細胞株から産生される炎症性サイトカイン量への影響を検討した。その結果、LPS 刺激によって最も産生量の高い IL-8 と、産生量の低い IL-6, IL-1 β のいずれに対しても、DDMG-1 は 1-10 μM の範囲で濃度依存的に阻害効果を示した。また、THP-1 細胞からの IL-8 産生量は、PMA の単独刺激では微量であるが、rhizoxin が共存すると増大する。この系においても、

DDMG-1 は IL-8 の産生を阻害した。特に、10 μ M での産生阻害効果は顕著であった (学会発表 1)。



Polycarpa aurata



N,N-didemethylgrossularine-1

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 3 件)

- (1) D. S. Dailisay, S. Tsukamoto, and T. F. Molinski. Absolute Configuration of the α , ω -Bifunctionalized Sphingolipid Leucettamol A from *Leucetta* sp. by Deconvoluted Exciton Coupled CD. *J. Nat. Prod.* **72** (3), 353-359 (2009). 査読有
- (2) S. Tsukamoto, T. Takeuchi, H. Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, R. W. M. van Soest, K. Ukai, H. Kobayashi, M. Namikoshi, T. Ohta, and H. Yokosawa: Leucettamol A: A New Inhibitor of Ubc13-Uev1A Interaction Isolated from a Marine Sponge, *Leucetta* aff. *microrhaphis*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18** (24), 6319-6320 (2008). 査読有
- (3) S. Tsukamoto, T. Kawabata, H. Kato, T. Ohta, H. Rotinsulu, R. E. P. Mangindaan, R. W. M. van Soest, K. Ukai, H. Kobayashi, and M. Namikoshi: Naamidines H and I: Cytotoxic Imidazole Alkaloids from the Indonesian Marine Sponge, *Leucetta chagosensis*, *J. Nat. Prod.* **70** (10), 1658-1660 (2007). 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 浪越通夫; ニシキボヤホヤ由来アルカロイド *N,N*-didesmethylgrossularine-1 のヒト炎症性サイトカイン産生阻害効果; 日本薬学会第 129 回年会、京都、2009. 3. 26.
- (2) 塚本佐知子; 海綿 *Aaptos aaptos* から得られたプロテアソーム阻害物質; 日本薬学会第 129 回年会、京都、2009. 3. 26.
- (3) 塚本佐知子; ユビキチン-プロテアソームシステムを阻害する leucettamol A とその誘導体の活性について; 第 12 回がん分子標的治療研究会総会、東京、2008. 6.

26-27.

- (4) 塚本佐知子; インドネシア産海綿 *Leucetta microrhaphis* から得られたプロテアソーム阻害物質; 日本薬学会第 128 回年会、横浜、2008. 3. 26.
- (5) 王偉芳; 群体ボヤ *Lissoclinum* cf. *badium* から単離した新規 Lissoclibadin 類; 第 49 回天然有機化合物討論会、札幌、2007. 9. 19-21.
- (6) 塚本佐知子; インドネシア産海綿から得られた新規イミダゾールアルカロイドの構造; 日本薬学会第 127 回年会、富山、2007. 3. 28-30.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚本 佐知子 (TSUKAMOTO SACHIKO)
千葉大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 70324093

(2) 研究分担者

浪越 通夫 (2006-2007 年度) (NAMIKOSHI MICHIO)

東北薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30189196

(3) 連携研究者

浪越 通夫 (2008 年度) (NAMIKOSHI MICHIO)
東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 30189196
鵜飼 和代 (UKAI KAZUYO)

東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 60433512

小林 久芳 (KOBAYASHI HISAYOSHI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 80225531

(4) 研究協力者

Remy E. P. Mangindaan
インドネシア・サムラトランギ大学・教授