

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660163

研究課題名(和文) 海綿メタボロミクスを基盤とした希少海綿動物および微量天然物の有効利用

研究課題名(英文) Sponge-metabolomics for the discovery of new bioactive natural products

## 研究代表者

高田 健太郎 (Takada, Kentaro)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90455353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：海洋天然物は多様な化学構造を持ち、また、興味深い生物活性を示すことから、医薬品の探索資源として利用されている。その中でも海綿動物は体内に数多くの共生微生物を持つことから、化合物の多様性に富む。本研究では、海綿動物の抽出物に対するメタボロミクスにより、各海綿動物の化合物プロファイルを明らかにし、未利用資源からの有用物質の探索研究に有効活用することを目的とした。その結果、約1500種の海綿動物の化合物プロファイルの構築とクラスター解析に成功し、さらに解析データを基に2種の海綿動物より生物活性物質の単離と構造決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：Marine sponges are an important source of structurally diverse and biologically active natural products, several of which have inspired the development of therapeutic agents. In this project, 1500 extracts of marine sponges collected in Japanese shallow-sea or deep-sea were analyzed by LC-MS followed by cluster analyses to reveal their chemical profiles. Based on the chemical profiles, we isolated three cytotoxic peptides and three cytotoxic glycolipids from two different marine sponges. Their structures were determined by a combination of chemical methods and spectroscopic data analyses.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：海洋天然物 メタボロミクス 生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

海洋天然物が医薬品の候補として徐々に臨床開発されるようになり、現在、海洋生物由来の7つの化合物が上市され、13が臨床試験中である。2010年には、クロイソカイメンから単離されたハリコンドリンBの化学構造を参考にして、抗がん剤が開発された。これまでに報告された海洋天然物は3万を超え、現在でも世界各国で活発に探索研究がおこなわれている。我々の研究室では、深海性の海綿動物を主な探索源として有用物質の探索を試みているが、深海性の海綿は色彩や形状による特徴に乏しく、また、採集中の意図しない破碎により原型を留めていないことが多いことから、その選別は困難である。このような理由から、我々は2012年夏より海綿メタボロミクス研究を開始した。その結果、主要な海洋天然物や、申請者の研究室で過去に単離された活性物質は、特定の実験の主要成分である場合が多く、我々は限定された生物資源しか利用していないことが明らかになってきた。

2. 研究の目的

研究室が保有する海綿動物の粗抽出物ライブラリ、および、これまでに採集してこなかった希少な海綿動物の抽出物に対して、メタボローム解析をおこない、ケミカルプロファイル进行分析すると共に、データベースを構築する。これらの情報から総合的に判断し、未利用である化合物、もしくは、これまでに研究対象とされていなかった試料をHPLCによる予備分画法を用いて、生物活性を示す有用物質の探索を効率的におこなうことを目的とした。

3. 研究の方法

1) LCMS分析とデータ解析

研究室が保有する約1500種類の海綿動物の粗抽出物を適切な前処理の後、LCMS分析をおこなった。LCMSデータよりイオンを抽出し、研究グループで開発した独自のクラスター解析ソフトにて分析をおこなった。

2) 予備分画と生物活性スクリーニング

得られた解析データから、目的に応じた試料を選別し、HPLCを用いて96ウェルプレートに予備分画をおこなった。その後、様々な生物活性試験にてスクリーニングをおこなった。

3) 活性化合物の単離および構造決定

スクリーニングで有望な活性を示したサンプルから、溶媒分画および各種クロマトグラフィーにより、活性化合物の単離をおこなった。また、得られた活性化

合物の化学構造は核磁気共鳴装置(NMR)および質量分析装置(MS)をはじめとした各種分析機器のデータ解析により決定した。また、化合物の立体化学は化学分解および各種分析機器のデータ解析により決定した。

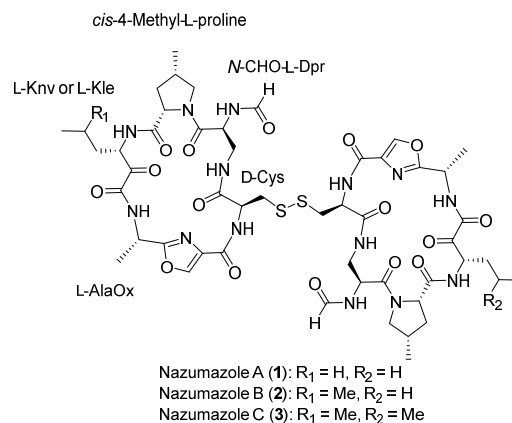
4. 研究成果

1) LCMS分析とデータ解析

約1500種類の海綿の粗抽出物をLCMSで分析したところ、採集した年および場所に関わらず、同じ種の実験動物は似たような化合物プロファイルを持つことがわかった。また、我々が想像していた以上の海洋天然物が存在しており、医薬品の探索資源として、今後も有望であることが明らかとなった。現在、カイメンの種と共生微生物の組成、および化合物プロファイルに関して統合的に解析している。

2) 新規細胞毒性ペプチド nazumazole 類の単離と構造解析

上記メタボロミクスのデータ解析から、前例がない幅広いイオンピークを与える成分を検出した。そこで、抽出物を溶媒分画、ODSカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、およびHPLCに順次付し、新規ペプチド nazumazoles A-C (1-3)の混合物を得た。この混合物はP388マウス白血病細胞に対して毒性を示したので、その構造決定を行った。



HRESIMSにより、1-3の分子式をそれぞれC<sub>50</sub>H<sub>68</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>、C<sub>51</sub>H<sub>70</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>、およびC<sub>52</sub>H<sub>72</sub>N<sub>14</sub>O<sub>16</sub>S<sub>2</sub>と決定し、nazumazoles A-Cは分子式がCH<sub>2</sub>ひとつずつ異なる同族体であった。<sup>1</sup>H NMRおよび<sup>13</sup>C NMRを測定したところ、アミド水素およびアミドカルボニル炭素のシグナルが観測されたことから、1-3はペプチド性の化合物であることがわかった。各種二次元NMRの解析により、構成アミノ酸およびその配列を決定した。このペプチドの構成アミノ

酸は $\alpha$ -ケト- $\beta$ -アミノ酸のケトノルバリン (Knv) およびケトロイシン (Kle)、4位がメチル化されたプロリン (MePro)、2位のアミンがホルミル化されたジアミノプロピオン酸 (Dpr)、システイン、アラニンとオキサゾールが結合した構造 (AlaOX) であった。また、1-3 は2種のペントペプチド鎖

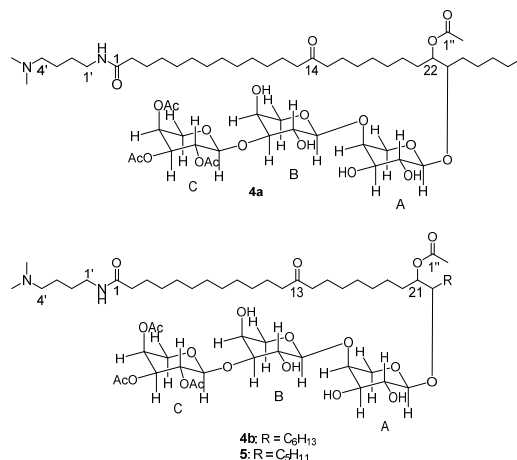
A) -Knv-MePro-Dpr-Cys-AlaOX-と  
B) -Kle-MePro-Dpr-Cys-AlaOX-の二量体であり、分子式の違いはこれらペプチド鎖の組み合わせに由来していた。

1-3 の構造は環内でジスルフィド結合を形成する環状デカペプチド、もしくはジスルフィド結合を介して二量化する環状ペントペプチド二量体のいずれかであることが示唆された。そこで、1-3 を  $\text{NaBH}_4$  および DTT で還元した後4-ピニルピリジンでアルキル化し、得られたアルキル化体の構造を解析した。その結果、1-3 のおよそ半分の分子量を示すアルキル化体を2種得た。この結果により、1-3 は環状ペプチドがジスルフィド結合を介して二量化するという特徴的な構造を有していることがわかった。

### 3) 新規細胞毒性糖脂質の単離と構造解析

さらに、メタボロミクスのデータ解析から、深海性の海綿動物でこれまでに研究対象としていなかった試料を選別し、96穴マイクロプレートに予備分画した。その結果、分子量が1100付近の化合物群が細胞毒性を示したため、化合物の単離および構造決定をおこなうこととした。カイメンを抽出後、細胞毒性とLC-MSでの分析を指標に、溶媒分画、各種クロマトグラフィーにて分画し、最終的に逆相HPLCにて活性物質を精製した。その結果、活性物質として分離が困難な化合物 **4a**, **4b**, および **5** を単離した。各種機器分析の結果、**4a** および **4b** はC28の脂肪酸とテトラメチレンジアミンが縮合したアグリコンと3分子のアラビノースからなる糖脂質であることが明らかとなった。脂肪鎖中に存在するケトンと2つの水酸基の位置はFAB-MS/MSにより推定し、その後、化学合成によって調製したアグリコンのMS/MSデータと比較することで確認した。また、アラビノースの絶対配置は化学誘導化後、標品とのLCMSでの比較をおこなったところ、全てL型であることが明らかとなった。化合物**5**は**4a**の脂肪鎖が1炭素短い同族体であり、絶対配置を含む他の化学構造は化合物**4b**と同じであった。化合物**4a**, **4b**, および**5**はそれぞれ10および30  $\mu\text{g/mL}$ で細胞毒性を示した。

本研究では、海綿動物の粗抽出物を対



象としてメタボロミクスを実施することで、海綿動物に含まれる化合物プロファイルの基盤を構築することができた。この結果、これまでに研究に用いられてきた試料と未利用の試料を明確に区別することが可能となり、また、微量成分を他試料から検出することも容易になった。

今後は、この化合物プロファイルを探索研究に有効活用するとともに、海綿の種と化合物の関係について明らかにしていく。

### 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6件)全て査読有

1. Fukuhara K, Takada K\*, Okada S, Matsunaga S\*  
Nazumazoles A-C, Cyclic Pentapeptides Dimerized through a Disulfide Bond from the Marine Sponge *Theonella swinhoei* *Org. Lett.* 2015, in press
2. Takada K\*, Okada S, Matsunaga S\*  
Structural reappraisal of corticatic acids, biologically active linear polyacetylenes, from a marine sponge of the genus *Petrosia* *Fish. Sci.* 2014, 80, 1057-1064
3. Sun Y, Takada K, Nogi Y, Okada S, Matsunaga S.  
Lower Homologues of Ahpatinin, Aspartic Protease Inhibitors, from a Marine *Streptomyces* sp. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 1749-1752
4. Ciavatta M.L., Nuzzo G., Takada K., Mathieu V., Kiss R., Villani G, Gavagnin M.  
Sequestered fulvinol-related polyacetylenes in *Peltodoris atromaculata*. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 1678-1684

5. Wilson M. C., Mori T., Ruckert C., Uria A. R., Helf M. J., Takada K., Gernert C., Steffens U., Heycke N., Schmitt S., Rinke C., Helfrich E. J. N., Brachmann A. O., Gurgui C., Wakimoto T., Kracht M., Crusemann M., Hentschel U., Abe I., Matsunaga S., Kalinowski J., Takeyama H., Piel J.

An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 2014, 506, 58-62

6. Hitora Y, Takada K, Matsunaga S  
On the Assignment of the Absolute Configuration at the Isolated Methyl Branch in Miyakosyne A, Cytotoxic Linear Acetylene, from the Deep-Sea Marine Sponge *Petrosia* sp. *Tetrahedron* 2013, 69, 11070-11073.

〔学会発表〕(計2件)

1. 福原和哉、高田健太郎、岡田茂、松永茂樹

カイメン *Theonella swinhoei* 由来の新規細胞毒性ペプチド nazumazoles A-F の単離と構造決定

平成 27 年度日本水産学会春季大会、平成 27 年 3 月 30 日、東京海洋大学

2. Victoria Peddie、高田健太郎、岡田茂、松永茂樹

カイメン *Stelletta* sp. 由来の新規細胞毒性物質の単離と構造決定

平成 27 年度日本水産学会春季大会、平成 27 年 3 月 30 日、東京海洋大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://anpc.fs.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高田 健太郎 (TAKADA KENTARO)

東京大学大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90455353

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

奥田 修二郎 (OKUDA SHUJIRO)

新潟大学大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：00512310

伊勢 優史 (ISE YUJI)

名古屋大学大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：20535108