

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350973

研究課題名(和文) サンゴ礁生物からの新規抗ウイルス剤の探索

研究課題名(英文) Search for antiviral molecules from coral reef organisms

研究代表者

田中 淳一 (TANAKA, Junichi)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：20163529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄沿岸で採集したサンゴ礁生物からエキスライブラリー、ならびに少数の海洋天然物ライブラリーを作成し、それらを HCV NS3 helicase、HCV replicon、HBV core promoterなどの抗ウイルススクリーニングに提供した。ヒットしたエキスからは、アッセイと並行して活性成分を単離・構造決定をするとともに、同定した化合物の類縁体の探索、誘導体の作成、活性評価を行った。これらの内容を研究協力者とともに論文と学会で報告してきた。

研究成果の概要(英文)：We constructed a library of extracts from coral reef organisms and a small library of marine natural products. They were screened for antiviral assays: HCV NS3 helicase, HCV replicon, and HBV core promoter. Some of hit extracts were separated and isolated compounds were characterized mainly by spectroscopic methods. After identifying hit molecules, we searched similar molecules and prepared derivatives by chemical transformations. The isolated compounds and derivatives were subjected for assays to see structure-activity relationship. We reported some of the results as papers or presentations in scientific meetings, though some of the contents are still under investigation.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：HCV HBV NS3 helicase core promoter サンゴ礁生物 メロセスキテルペン

### 1. 研究開始当初の背景

B型およびC型肝炎は、各肝炎ウイルス(HBV, HCV)に感染することによって起こり、慢性肝炎を経て肝硬変、肝がんに至る疾病である。それぞれの患者数は国内で150万人、200万人、さらに世界全体では、3.5億人、1.7億人と推測されている。

本研究では、これらのウイルスの増殖に対して阻害効果を示す化合物をサンゴ礁の海洋生物を材料に活性評価を担当する研究協力者とともに探索しようと計画した。

### 2. 研究の目的

本研究では、沖縄沿岸で収集できるサンゴ礁生物から作成するエキスライブラリー等を材料に、B型およびC型肝炎ウイルスに対する新規抗ウイルス活性物質の探索と活性物質の同定をするとともに、海洋天然物化合物ライブラリーの活性評価を行い、抗ウイルス活性を示した化合物を基に構造活性相関等の知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は以下の1~6の段階から構成される。1) 沖縄のサンゴ礁生物材料の採集とエキスライブラリーの作成、および、これまでに研究代表者が収集した海洋天然物のライブラリーの作成、2) 山梨大学医学系と産総研のバイオメジャー研究グループを中心とするスクリーニング(HCV-NS3ヘリケースに対する酵素アッセイ、HCVレプリコンアッセイ、抗HBV core promoterアッセイ、HBVの増殖に対するRT-PCRによるアッセイ)への提供と活性評価、3) ヒットしたエキスからの抗ウイルス活性成分の単離と機器分析等による構造決定、4) 単離した化合物での抗ウイルス活性の評価と活性メカニズムの検討、5) 単離した化合物、あるいはヒットした化合物を基に各種誘導体の作成、および類似した化合物による構造活性相関の検討、6) さらに活性メカニズム等を解明するためのプローブ等の作成、を行うと申請した。

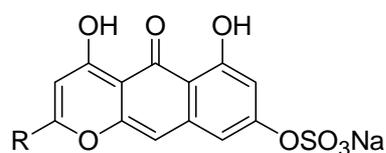
これらの段階のうち、1、3、5の段階は研究代表者のグループが主に行った。2、4の抗ウイルス活性スクリーニングは、病原ウイルス、酵素、遺伝子組み換え体の取り扱い、放射性同位体の使用等が含まれるため、研究協力者が中心となって進められた。6の段階については、残念ながら高い抗ウイルス活性を示すリード化合物が本研究では得られなかったことから、この研究期間内に行っていない。

### 4. 研究成果

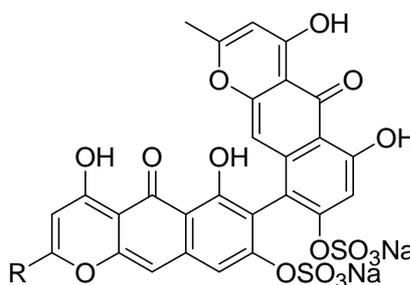
まず、主に海綿や海藻類などを中心とした沖縄産サンゴ礁生物を沖縄本島、ならびに離島の沿岸のサンゴ礁ならびにそれに続く海底で収集した。研究室に持ち帰った試料はアセトンにより抽出し、酢酸エチル可溶分画とメタノール可溶分画をとりわけ、エキスライ

ブラリー化した。さらに、これまでに本研究費とは異なる事業で作成し、研究室で保存しているエキスライブラリーも本研究のスクリーニングに活用した。

研究協力者によって収集された沖縄産棘皮動物のウミシダ類17種を含めたエキスライブラリーの一部をHCVの酵素NS3 RNAヘリケースに対してスクリーニングを行い、その結果を先にMarine Drugという雑誌に報告した。いくつものヒットが見られたが、沖縄本島で採集したウミシダの一種 *Alloeocomatella polycladia* 由来のエキスをアッセイと並行して分画したところ、cholesterol sulfate を同定し、標品を使用してすでにその活性を報告した。さらに、このエキスの別の活性分画から、極性の高い一連の新規芳香族サルフェート類(単量体1, 2と二量体3, 4)を単離した。



- 1 R = Me  
2 R = Pr



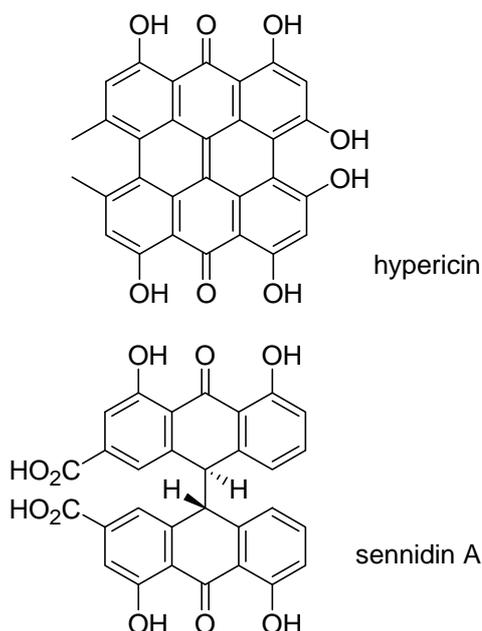
- 3 R = Me  
4 R = Pr

化合物1の化学構造については、天然物のNMR等による機器分析だけでは互変異性体の可能性を排除できなかったことから、計算、ならびにメチル化誘導体でのNOE測定によってその構造を上記のように決定した。化合物2については、1のメチル基の代わりに *n*-プロピル基があると容易に判明した。

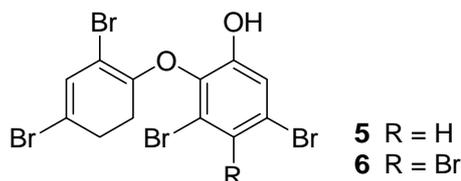
一方、化合物3はESIMSとNMRから、二量体構造をしていることが判明し、HMBCなどの解析から化合物1に相当する2分子が図に示す位置で結合していると推定した。両方の環の結合位置のオルト位の置換基と環の存在による立体障害から、この化合物には軸性不斉が生じると予想された。実際、化合物3は負の比旋光度を示した上、ECDスペクトルでは負のCotton効果を示したことから、*S*配置のみ、あるいは *S*配置が優占している混合物と推定された。化合物4はESIMSの結果と化合物3のNMRデータとの比較により、一方のメチル基が *n*-プロピル基になっていることが推定された。また、化合物3とほぼ同様の比旋光度とCotton効果を示したことから、同様の立体配置を取っていると推定された。

二量体化合物 3 と 4 ( $IC_{50}$  7, 5  $\mu$ M) は、HCV NS3 ヘリケースに対して単量体 1 と 2 ( $IC_{50}$  71, 95  $\mu$ M) よりも強い酵素阻害活性を示した。

これらの芳香族サルフェート類がヒントとなり、研究協力者が関連する芳香族アントラキノン類を入手して、酵素阻害活性を調べた。フェノールを含むアントラキノン単量体では活性が低かったものの、hypericin や sennidin A のような植物由来のフェノールを含むアントラキノン二量体化合物が比較的高い HCV NS3 ヘリケース阻害活性 ( $IC_{50}$  3, 0.8  $\mu$ M) を示し、ウミシダ由来の化合物と同様の傾向がみられた。また、サルフェートである必然性はないように推測される。



過去に国際共同研究の一環としてインドネシアのスラウェシ島周辺でサンゴ礁生物を収集した。保存してあったこのエキスイブラリーを HBV の core プロモーターに対する阻害アッセイに提供したところ、海綿の一種 *Dysidea granulosa* などのエキスに HBV に対する阻害活性がみられた。このエキスを分画して調べたところ、既知の PBDE (polybrominated diphenyl ether) 類の 3,5-dibromo-2-(2,4-dibromo-phenoxy)-phenol (5) と 3,4,5-tribromo-2-(2,4-dibromo-phenoxy)-phenol (6) が活性成分 ( $EC_{50}$  0.23, 0.80  $\mu$ M) として同定された。興味深いことに、これらの化合物は、HCV NS3 ヘリケースに対しても阻害活性を示すことを先に報告している。

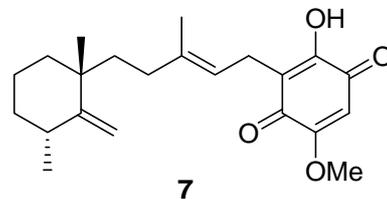


さらに、研究代表者が保管する小さな海洋天然物ライブラリーから提供した15個のテ

ルペン類を中心とする化合物の中で、西表島産の海綿の一種 *Dactylospongia metachromia* 由来のメロセスキテルペン metachromin A (7) がヒットした。この化合物は先に細胞毒性と血管弛緩作用が報告されているが、HBV に対する抗ウイルス活性を示した。

そこで、metachromin A の関連化合物 metachromin B, E を海綿のエキスから単離するとともに、比較的多く得られる metachromin A から誘導体を作成した。具体的には、キノン部分のフェノールの修飾、還元した化合物、また、二重結合部分を還元した誘導体を作成して構造を確認した後、研究協力者らに送付して活性を評価してもらった。その結果、metachromin A そのものの活性が最も高く、誘導体では活性が落ちるだけで、キノン部分や二重結合部分が活性の発現に重要と推測された。

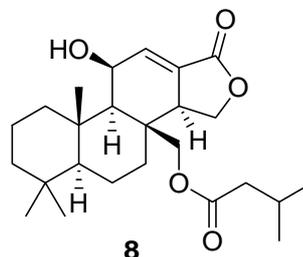
さらに、類似のキノン部分を有し、セスキテルペン部分が異なる化合物を研究室で保存していたことから、それらも活性評価に送付したが、興味を引くような抗 HBV 活性は見られなかった。



metachromin A については、研究協力者により抗ウイルス活性メカニズムについて検討がなされており、この報告書作成の段階では論文投稿中である。

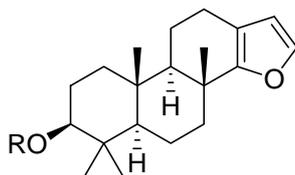
また、もう一つヒットした *Dysidea* 属の海綿由来のメロセスキテルペンについても天然物が HBV に対して阻害活性を示したので、含まれる官能基を利用していくつかの誘導体を作成しているが、これらはまだ活性評価の途中である。

この研究期間中、別の共同研究で海綿の一種 *Hyatella* aff. *intestinalis* 由来の spongian 型ジテルペン類がアデノウイルスに対して活性を示した。そこで、先に研究代表者らは、沖縄本島産の海綿の一種 *Dysidea* cf. *arenaria* から細胞毒性を示す spongian 類を報告していたことから、伊良部島産の同種 of 海綿も調べたところ、類似の新規 spongian 型ジテルペン 8 などを得た。残念ながら、これらのジテルペン類は細胞毒性を示したものの、有意な抗ウイルス活性は示さなかった。



その他に、本研究経費によって材料を収集し作成したサンゴ礁生物エキスイブラリーの中に、抗ウイルス活性スクリーニングではヒットしなかったものの、NMR から特異な二次代謝成

分が含まれているエキスが散見された。沖縄本島産の海綿の一種 *Luffariella* sp.よりは、既知の cacofuran A, B に加えて、微量成分として弱い細胞毒性を示す isospongian 骨格の新規天然物 **9**, **10** を見出し、その化学構造を報告した。



**9** R = H  
**10** R = Ac

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Faricha, A.; Ahmadi, P.; de Voogd, N. J.; Tanaka, J., Two isospongian diterpenes from the sponge *Luffariella* sp. *Nat. Prod. Commun.* 2017, Vol. 12, in press. 査読有

Hermawan, I.; Furuta, A.; Higashi, M.; Fujita, Y.; Akimitsu, N.; Yamashita A.; Moriishi, K.; Tsuneda, S.; Tani, H.; Nakakoshi, M.; Tsubuki, M.; Sekiguchi, Y.; Noda, N.; Tanaka, J., Four aromatic sulfates with an inhibitory effect against HCV NS3 helicase from the crinoid *Alloecomatella polycladia*. *Marine Drugs* 2017, Vol. 15, 117. 査読有  
doi:10.3390/md15040117

Shingaki, M.; Wauke, T.; Ahmadi, P.; Tanaka, J., Four cytotoxic spongian diterpenes from the sponge *Dysidea* cf. *arenaria*. *Chem. Pharm. Bull.* 2016, Vol. 64, 272-275. 査読有  
http://doi.org/10.1248/cpb.c15-00726

Furuta, A.; Tsubuki, M.; Endoh, M.; Miyamoto, T.; Tanaka, J.; Salam, K. A.; Akimitsu, N.; Tani, H.; Yamashita, A.; Moriishi, K.; Nakakoshi, M.; Sekiguchi, Y.; Tsuneda, S.; Noda, N., Identification of hydroxyanthraquinones as novel inhibitors against hepatitis C virus NS3 helicase. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, Vol. 16, 18439-18453. 査読有  
doi:10.3390/ijms160818439

Yamashita, A.; Fujimoto, Y.; Tamaki, M.; Setiawan, A.; Tanaka, T.; Okuyama-Dobashi, K.; Kasai, H.; Watashi, K.; Wakita, T.; Toyama, M.; Baba, M.; de Voogd, N. J.; Maekawa, S.; Enomoto, N.; Tanaka, J.; Moriishi, K., Identification of antiviral agents targeting hepatitis B virus

promoter from extracts of Indonesian marine organisms by a novel cell-based screening assay. *Marine Drugs* 2015, Vol. 13, 6759-6773. 査読有  
doi:10.3390/md13116759

〔学会発表〕(計 10 件)

Tanaka, J., Search for antiviral molecules from coral reef organisms and biodiversity aspects of secondary metabolites. The 6th symposium - Riken Max Planck Institute Joint Research Center, 2017 年 4 月 24 日、パシフィックホテル、沖縄県那覇市。

Hermawan, I.; Fujiwara, T.; Kanamoto, A.; Haruyama, T.; Kobayashi, N.; Tanaka, J., A new cyclic imine and portimine from an Okinawan dinoflagellate. International Symposium on Natural Products for the Future 2016. 2016 年 9 月 1~4 日、徳島文理大学、徳島県徳島市。

Ahmadi, P.; Higashi, M.; Tanaka, J., Two new sesterterpenes from the sponge *Luffariella variabilis*. International Symposium on Natural Products for the Future 2016. 2016 年 9 月 1~4 日、徳島文理大学、徳島県徳島市。

山下篤哉、田中智久、葛西宏威、渡士幸一、脇田隆字、外山正明、馬場昌範、前川伸哉、榎本信幸、玉城麻友美、田中淳一、森石恆司、カイメン由来化合物 metachromin A 及びその類縁化合物の抗 HBV 活性の検討、第 25 回抗ウイルス療法学会総会、2015 年 5 月 22~24 日、リーガロイヤルホテル、東京都新宿区。

Ahmadi, P.; Higashi, M.; Tanaka, J., New bioactive compounds from marine sponges. 「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム 沖縄の生物資源とネットワークを活用した医薬品探索研究(最終回)、2014 年 12 月 18 日、パシフィックホテル、沖縄県那覇市。

和宇慶剛、田中淳一、沖縄産サンゴ礁生物からの新規生理活性物質の探索、「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム 沖縄の生物資源とネットワークを活用した医薬品探索研究(最終回)、2014 年 12 月 18 日、パシフィックホテル、沖縄県那覇市。

平出裕美、田中淳一、春山貴弘、小林信之、海綿由来の抗 HIV 活性物質の探索、「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム 沖縄の生物資源とネットワークを活用した医薬品探索研究(最終回)、2014 年 12 月 18 日、パシフィックホテル、沖縄県

那覇市。

Hermawan, I.; Tanaka, J. Search for molecules against infectious diseases from Okinawan marine organisms. 「知的クラスター形成に向けた研究拠点構築事業」シンポジウム 沖縄の生物資源とネットワークを活用した医薬品探索研究(最終回) 2014年12月18日、パシフィックホテル、沖縄県那覇市。

田中淳一、サンゴ礁生物からの細胞毒性物質探索、アカデミアからの抗がん剤創薬に向けて 天然物の有効利用、2014年5月12日、万国津梁館、沖縄県名護市。

Roy, S. R., Salam, K. A., 古田篤史、野田尚宏、常田聡、関口勇地、山下篤哉、津吹政可、秋光信佳、田中淳一、PBDE: Structure-activity studies for the inhibition of hepatitis C virus NS3 helicase. アカデミアからの抗がん剤創薬に向けて 天然物の有効利用、2014年5月12日、万国津梁館、沖縄県名護市。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 淳一 (TANAKA, Junichi)  
琉球大学・理学部・教授  
研究者番号：20163529

### (2) 研究協力者

野田 尚弘 (NODA, Naohiro)  
産業技術総合研究所・主任研究員  
研究者番号：70415727

関口 勇地 (SEKIGUCHI, Yuji)  
産業技術総合研究所・主任研究員  
研究者番号：20313570

谷 英典 (TANI, Hidenori)  
産業技術総合研究所・研究員  
研究者番号：10635329

森石 恆司 (MORIISHI, Kohji)  
山梨大学大学院・総合研究部・教授  
研究者番号：90260273

山下 篤哉 (YAMASHITA, Atsuya)  
山梨大学大学院・総合研究部・助教  
研究者番号：00334871

常田 聡 (TSUNEDA, Satoshi)  
早稲田大学・理工学術院・教授  
研究者番号：30281645

秋光 信佳 (AKIMITSU, Nobuyoshi)  
東京大学・アイソトープ総合センター・

教授

研究者番号：40294962

津吹 政可 (TSUBUKI, Masayoshi)  
星薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：90163865

藤田 喜久 (FUJITA, Yoshihisa)  
沖縄県立芸術大学・准教授  
研究者番号：20771463

東 雅大 (HIGASHI, Masahiro)  
琉球大学・理学部・助教  
研究者番号：20611479