

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05269

研究課題名(和文) モーリシャスサンゴ礁海水中に存在する天然ホルモン活性物質の同定

研究課題名(英文) Identification of hormonal active compounds found in coral reef seawater in Mauritius

研究代表者

徳元 俊伸 (Tokumoto, Toshinobu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：30273163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、モーリシャスのサンゴ礁で検出された天然ホルモン活性物質の単離・構造決定を目的とした。サンゴ礁の海水中の物質を濃縮し、HPLCによる精製を進め、活性画分の質量分析を行った。活性物質は夏にのみ検出され、その量は約10-100 ng/1000Lと推定され、主に海藻とサンゴから分泌されていることが明らかになった。分子質量約447と621 Daの物質が活性物質の有力候補であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is isolation and determination of chemical structure of hormonal active compounds found in coral seawater. For that, we concentrated hormonal compounds in the seawaters from shallow coral reef on the cartridge. To isolate and characterize the compounds, HPLC and molecular mass analysis were conducted. The active compounds were detected in only summer time. Amount of active compounds in coral seawater was estimated as 10-100 ng/1000L. Molecular masses of active compounds determined as 447 and 621 Da by molecular mass analysis.

研究分野：生殖生物学

キーワード：天然資源 ホルモン活性物質 ステロイド膜受容体

## 1. 研究開始当初の背景

新規ステロイド膜受容体, mPR は長年、同定が待たれていた卵成熟誘起ホルモンの受容体として 2003 年に発表された (Zhu et al. PNAS 2003)。本分子の発見は卵成熟誘起ホルモンの受容体として動物生理学の分野で脚光を浴びただけではなく、ステロイドホルモンの引き起こす急性反応であるノンゲノミック反応を仲介する新規受容体として内分泌学分野でも大きな反響を呼んでいる。mPR 分子の発表以降、ノンゲノミック反応に関する研究が世界的に進められ、エストロゲンの膜受容体候補としてオープン受容体である GPR30 が候補分子として報告された。

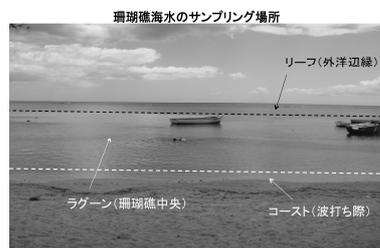
申請者らは、ジエチルスチルベストロール (DES) の卵成熟誘導作用を発見し (Tokumoto et al. PNAS 2004)、その標的候補である新規ステロイド膜受容体 (mPR) を同定し (Tokumoto et al. Gen Comp Endo 2006)、DES が mPR に作用して卵成熟を誘起することを明らかにした (Tokumoto et al. Endocrinology 2007)。その後、個体レベルでの DES の作用を解明するためゼブラフィッシュ生体を用いた生体アッセイ法を確立した (特許 4501002、4528973 号、Tokumoto et al. PLOS ONE 2011)。さらに最近、mPR 安定発現細胞株へ改変ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、細胞内 cAMP 濃度変化の検出を可能とする細胞株を樹立し、mPR が抑制性 G タンパク質を介して作用していることを示す決定的なデータを得ている (Nakashima et al. Steroids 2015)。

mPR に関する上記の基礎研究を続ける状況の中、申請者らは 2010 年採択の“JST 戦略的環境リーダー育成拠点形成”の研究で、モーリシャス、タイ王国などの汚染された河川や海水中に含まれるステロイド膜受容体反応性物質の探索を行った。予想に反してこれまでの調査では汚染水中には反応性物質は検出されなかったのに対し、ほぼ汚染が無い清純なモーリシャスのサンゴ礁海水中に天然ホルモン活性物質を見出した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究は、モーリシャスのサンゴ礁で検出された天然ホルモン活性物質の単離・構造決定を

目的とした。我々の調査地であるモーリシャスのアルビオン (地名) には約 500m 沖まで水深 1m 未満の遠浅のサンゴ礁が続く特異な環境がある (右上写真)。この環境では



サンゴ礁の海水は長期間に渡って滞留し、サンゴ礁由来の物質が濃縮されていると考えられる。

現在、海洋バイオテクノロジーは急速に進展し、海洋生物による有用物質の生産等が試みられている。特に海産無脊椎動物であるサンゴは、多種多様な骨格を有するテルペン系化合物を生産することが知られており、特にセンブリンジテルペン類はアレルギー性疾患治療薬としての利用が考えられている。また、共同研究者の小谷は、サンゴからの新規抗菌物質の単離・精製に成功しており (Kodani et al. Res. Nat. Prod. 2013)、細菌感染症治療薬としての利用が期待されている。しかしながら、これまでのサンゴ由来生理活性物質研究はサンゴの組織からの単離であり、環境中への分泌物質に関しては、ほとんど調査がなされていない。この発見を推し進め、天然ホルモン物質の単離・構造決定に成功すれば、ブレイクスルーとなると考えられる。本ホルモン物質は低分子性物質であることが予想されているため、化学構造が決定されれば、有望なリード化合物としてさまざまな誘導体の化学合成により、医薬品への実用化を図ることができる。また、環境化学分野の観点から見ても、海水中からの天然ホルモン物質の単離・構造決定はほとんど例がなく、サンゴ礁における天然ホルモン物質の役割という新しい命題を打ち立てる大きな契機となりうる。

## 3. 研究の方法

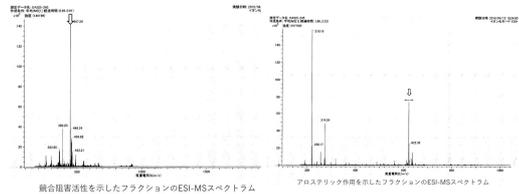
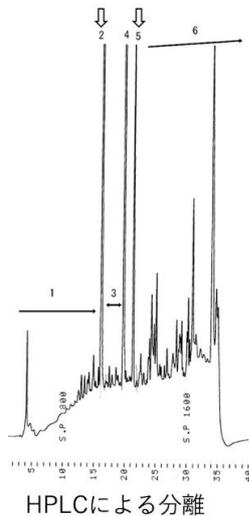
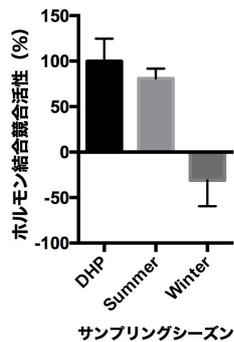
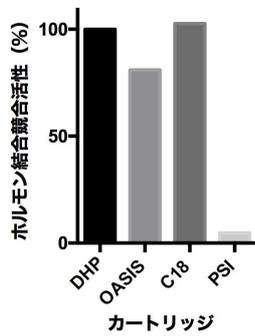
以前の研究で明らかとなった天然ホルモン物質をより多く含むサンゴ礁中心部、ラグーンの海水を採取し、固層抽出カラムを用いて濃縮した。この濃縮物を溶出後、ステロイド膜受容体への反応性をステロイド膜結合実験により測定した。活性の見られた試料について HPLC による精製を進め、画分について活性を検証した後、活性画分の質量分析 (ESI-MS) により画分中の活性物質の分子質量を測定した。

## 4. 研究成果

まず、天然ホルモン活性物質の濃縮に適した固層抽出カラムの選定と活性物質の季節変動を調べるためモーリシャスの冬季にあたる 7 月から 8 月にかけて、夏季となる 3 月にサンプリングを実施した。また、物質の同定に向けサンプリングの多量化を図った。多量化については濃縮用のカートリッジのサイズ変更はせず、送液ポンプの台数を増やすことで対応した。それにより目標であった海水 1000L からの物質の濃縮を達成できた。サンプルを日本に持ち帰った後、活性物質を溶出し、溶出画分の活性を確認した。

その結果、活性物質の濃縮には OASIS HBL という疎水性、親水性の物質の両方を吸着

できる固層抽出カラムと一般的に用いられる C18 カラムが適していることが分かった(右上図)。この内、OASIS が海水処理能力において C18 に比べ 2 倍程度優れていたため多量の濃縮には OASIS を用いることとした。また、活性物質は夏季には存在し、冬季には存在しないことが明らかになった(右中央図)。HPLC 画分にも活性が検出され、やや疎水性の高い物質であることが分かった(右下図、2 と 5 番のピークに活性が検出された)。また、冬季と夏季では海水中の溶存物質の種類が大きく異なることが明らかになった。しかしながら、1000 L の海水中に含まれていた活性物質の量は約 10-100 ng と推定され、完全な構造決定を行うためには、さらに 100-1000 倍の海水が必要となってくるという試算となった。そこでホルモン活性物質を分泌する生物種の特特定を目指すこととなった。サンプリングポイントのサンゴ礁で優勢となっている生物種 12 種類について一昼夜飼育し、その間、海水成分をカートリッジに濃縮し、分泌されている物質を回収した。一方、その他の生物を含む 17 種については生体試料の抽出液を調製し、体内に活性物質が含まれるかどうか調べた。その結果、バイオマスの多い海藻とサンゴからアロステリック効果のある化学物質が分泌されていることが明らかになった。そこで海藻からの直接的な活性物質の抽出を試みた。海藻約 1 kg を採取し、70%メタノールにより抽出液を調製した。これを濃縮し、日本に持ち帰った。凍結乾燥後、エタノールにて溶解したサンプルについて活性を確認した。その後、HPLC にて分画を行い、活性測定を行った結果、海藻にはアロステリック効果のある化学物質と競合阻害効果を示す物質の両方が含まれることが明らかになった。各画分の ESI-MS 分析の結果をこれまでの解析結果と比較したところ、



それぞれ分子質量、約 447 と 621 Da の物質が活性物質の有力候補であることが明らかとなった(上図)。

活性物質を分泌する海藻の個体内にも活性物質が含まれることが確認できた。正攻法による抽出液からの精製の道も開けた。しかしながら構造解析に必要な多量のサンプリングのためには、不純物の極めて少ない海水分泌物の濃縮品がより精製に適している可能性が高いため、今後は生物の長期間飼育による継続的なサンプリングと直接的な精製の二通りのアプローチで実施する予定である。これらの取り組みにより構造決定に着手したい。

3年間の成果により、共著論文の発表と合同ワークショップ開催に至り、モーリシャス大学との関係も深まった。今後、大学施設を利用した長期飼育場所の提供についても確約が得られたことは大きな前進であった。

#### 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 10 件)

1. W. Klangnurak, T. Fukuyo, MD, Rezanujjaman, M. Seki, S. Sugano, Y. Suzuki, T. Tokumoto (2018) Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an *in vivo* assay in zebrafish. **PLOS ONE** 13 (5), 1-19. 査読有 doi.org/10.1371/journal.pone.0196544
2. T. Miyazaki, M. Fukui, E. Inagaki, K. Miki, S. Takabayashi, H. Katoh, Y. Ohira, M. Noguchi, T. Tokumoto (2018) Identification of two additional genomic loci responsible for experimentally induced testicular teratoma 2 and 3 (*ett2* and *ett3*). **Zoological Science** 35(2), 172-178. 査読有 doi.org/10.2108/zs170176
3. T. Tokumoto, S. Kodani, T. Miyazaki, Y. Suzuki, B. Casareto, T. Bahorun, R. Bhagooli (2017) Detecting membrane progesterin receptor (mPR)-interacting compounds from coral seawater in Mauritius. **WIOMA (Western Indian Ocean Journal of Marine Science)**. Special Issue 1/2017, 77-84. 査読有 https://www.ajol.info/index.php/wiojms/article/view/148800

4. W. Klangnurak, T. Tokumoto (2017) Fine selection of up-regulated genes during ovulation by *in vivo* induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. **Zoological Letters** 3,2. 1-10. 査読有 doi.org/10.1186/s40851-017-0065-8
  5. J. Wang, W. Klangnurak, A. A. Naser, T. Tokumoto (2017) Generation of transparent goldfish. **AAACL Bioflux**, 10(3), 615-621. 査読有 日本経済新聞、中日新聞に掲載 <https://www.bioflux.com.ro/docs/2017.615-621>
  6. S. R. Roy, J. Wang, Md. R. Rana, M. Nakashima, T. Tokumoto (2017) Characterization of membrane progesterin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ) of the medaka and role in the induction of oocyte maturation. **Biomedical Research**, 38(1), 79-87. 査読有 doi.org/10.2220/biomedres.38.79
  7. Mst. A. Akhter, R. Kumagai, S.R. Roy, S. Ii, M. Tokumoto, Md. B. Hossain, J. Wang, W. Klangnurak, T. Miyazaki, T. Tokumoto (2016) Generation of Transparent Zebrafish with Fluorescent Ovaries: a Living Visible Model for Reproductive Biology. **Zebrafish** 13(3), 155-160. 査読有 表紙に採用 doi.org/10.2220/biomedres.38.79
  8. T. Tokumoto, Md. B. Hossain, J. Wang (2016) Establishment of procedures for studying mPR-interacting agents and physiological roles of mPR. **Steroids** 111 79-83. 査読有 doi: 10.1016/j.steroids.2016.02.015
  9. Md. B. Hossain, T. Oshima, S. Hirose, J. Wang, T. Tokumoto (2015) Expression and purification of human membrane progesterin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ). **PLOS ONE** 10 (9), 1-16. 査読有 静岡新聞に掲載 doi: 10.1371/journal.pone.0138739
  10. M. Nakashima, M. Suzuki, M. Saida, Y. Kamei, Md. B. Hossain, T. Tokumoto (2015) Cell-based assay of nongenomic actions of progestins revealed inhibitory G protein coupling to membrane progesterin receptor  $\alpha$  (mPR $\alpha$ ). **Steroids** 100 21-26. 査読有 doi:10.1016/j.steroids.2015.04.002
- [学会発表](計 12 件)
1. 「Coral reefs stay on new frontiers of natural compounds」Toshinobu Tokumoto, Workshop 「State and conservation of our coral reefs」
  2. 「ゼブラフィッシュの *starmaker* (*stm*) 遺伝子のゲノム編集による機能解析」ワンラダクラングヌラク、福與健人、エムディレザヌツジャマン、徳元俊伸, 日本動物学会第 88 回大会
  3. 「ゼブラフィッシュ生体内卵成熟・排卵誘導法による排卵誘導候補遺伝子の特異的選択」ワンラダクラングヌラク、福與健人、エムディレザヌツジャマン、今村聖実、堀内映実、菅野純夫、鈴木穰、徳元俊伸, 日本動物学会第 88 回大会
  4. 「キンギョ脳におけるプロゲステロン膜受容体 (mPR) の局在」王 軍、原口省吾、徳元俊伸, 第 4 2 回日本比較内分泌学会大会
  5. 「キンギョ脳におけるプロゲステロン膜受容体 (mPR) の発現とステロイドとの結合親和性」王 軍、原口省吾、徳元俊伸, 第 4 1 回日本比較内分泌学会大会
  6. 「Establishment of membrane progesterin receptor (mPR) mutant Medaka strains to analyse central roles of mPRs」J. Wang, S.R. Roy, I. Hara, K.Naruse, Y. Kamei, Y. Taniguchi, T. Tokumoto, The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan
  7. 「An application of *in vivo* assay to identify ovulation-inducing genes in zebrafish」Klangnurak W, Tosaka M, Imamura K, Horiuchi T, Sugano S, Suzuki Y, Tokumoto T., The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan
  8. 「Identification of ovulation-inducing genes selected by the method for *in vivo* induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish」Klangnurak W, Tosaka M, Imamura K, Horiuchi T, Sugano S, Suzuki Y, Tokumoto T., The Japanese Medaka and Zebrafish Meeting (JMZM)
  9. 「Approaches for detailed analysis of membrane progesterin receptor (mPR) protein and for physiological roles of mPR」Toshinobu Tokumoto, 8th International Symposium of Fish Endocrinology
  10. 「ステロイド膜受容体の構造と機能の解明に向けて」徳元俊伸, 第 13 回「GPCR 研究会」講演会
  11. 「Membrane progesterin receptor (mPR)

**a possible target for new drugs」**  
Toshinobu Tokumoto, MD Babul Hossain,  
Jun Wang, Takehiro Miyazaki, **9th**  
**SFRR-Africa**

12. 「 **ESTABLISHMENT OF**  
**PROCEDURES FOR mPR**  
**INTERACTING AGENTS AND STUDY**  
**ON PHYSIOLOGICAL ROLES OF**  
**mPR」** Toshinobu Tokumoto, 9<sup>th</sup> Rapid  
Responses to Steroid Hormones

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

徳元 俊伸 (TOKUMOTO, Toshinobu)  
静岡大学・理学部・教授  
研究者番号：30273163

##### (2) 研究分担者

小谷 真也 (KODANI, Shinya)  
静岡大学・農学部・准教授  
研究者番号：20510621

鈴木 款 (SUZUKI, Yoshimi)  
静岡大学・創造科学技術大学院・特任教授  
研究者番号：30252159

CASARETO Beatriz (CASARETO, Beatriz)  
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授  
研究者番号：60402244

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号：

(4) 研究協力者  
Theeshan Bahorun (Theeshan, Bahorun)  
モーリシャス大学・CBBR 研究所・教授

Ranjeet Bagooli (Ranjeet, Bagooli)  
モーリシャス大学・海洋生物学部・准教授