

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01803

研究課題名(和文) 沖縄産海洋生物由来の骨代謝調節分子の探索と作用機序の解明

研究課題名(英文) Isolation and biological activity of marine natural compounds with bone-resorbing and bone forming properties

研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA, Toshiaki)

琉球大学・教育学部・教授

研究者番号：90375428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：沖縄県浦添市の海岸で採集した海洋ラン藻 *Okeania* sp. から ypaoamide B, C を単離し、それぞれの化学構造式を明らかにした。得られた化合物のうち、ypaoamide C は破骨細胞分化を抑制する傾向があることが示唆された。また紅藻 *Laurencia nidifica* から単離した既知化合物である aplysin には、骨芽細胞の初期の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性の上昇が認められたが、石灰化は促進しないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Two new pyrrolinone-containing lipopeptides, ypaoamides B and C, were isolated from an *Okeania* sp. marine cyanobacterium collected in Okinawa. Their structures were determined by spectroscopic analysis and Marfey's analysis of acid hydrolysates. Ypaoamides C inhibited receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis in mouse monocytic RAW264 cells. Aplysin is a known compound derived from Red Alga *Laurencia nidifica* collected in Okinawa. Aplysin enhanced the Alkaline Phosphatase (ALP) activity, an early osteoblast marker.

研究分野：天然有機化合物

キーワード：破骨細胞 骨芽細胞 アルカリホスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

骨では骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収による骨リモデリングが絶えず繰り返されており、この骨形成と骨吸収のバランスにより骨の恒常性や血液中カルシウム濃度が維持されている。しかし、この骨吸収と骨形成のバランスが崩れると様々な骨疾患を引き起こす。例えば骨粗鬆症は骨密度の低下により骨折のリスクが増大する骨疾患であるが、その患者数は1300万人を超えると推定されている。平成28年に厚生労働省が行った国民生活基礎調査結果では、要介護度別にみた介護が必要となった主な原因として関節疾患が1位、骨折・転倒が3位である。骨疾患は、直ちに命に影響するものではないが、高齢者の生活の質を低下させるだけでなく、周囲の人々の支援や介護を必要とすることから、骨疾患の予防・治療対策は重要である。骨粗鬆症の治療薬としてはビスフォスフォネート剤や選択的エストロゲン受容体作動薬などが開発されており、一定の成果を上げている。しかしビスフォスフォネート剤は胃腸障害や顎骨壊死などの副作用が報告されており、選択的エストロゲン受容体作動薬は更年期症状の悪化や深部静脈血栓症などが起こることが報告されている。最近、骨形成促進剤である副甲状腺ホルモン製剤が開発されたが、ペプチド製剤であることから経口投与が難しく、皮下投与するため患者への負担が大きい。これらの状況から、望ましくは経口投与可能な低分子化合物で、新たな作用機序に基づいて骨吸収を抑制する、あるいは骨形成を促進する骨代謝改善剤の開発が求められている。このような背景から、当研究室では海洋生物から骨代謝を調整する低分子化合物の探索を行っており、破骨細胞の分化を阻害する化合物を単離した。また海洋生物抽出物をスクリーニングしたところ、沖縄県の沿岸域で採集した海洋ラン藻抽出物や紅藻抽出物が骨芽細胞の初期骨分化マーカー酵素であるアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させることを見出した。

2. 研究の目的

海洋ラン藻から破骨細胞の分化を阻害する化合物を得たが、微量でありその化学構造は明らかになっていない。そこで、この破骨細胞の分化を阻害する化合物を含むラン藻を採集し、各種クロマトグラフィーを用いて分離、精製する。また得られた化合物に関しては二次元 NMR スペクトル、質量分析などの機器分析や分解、誘導反応によりその化学構造を解析する。さらに沖縄県の沿岸域で採集した海洋ラン藻抽出物や紅藻抽出物が ALP 活性を上昇させたことから、この化合物を単離・構造解析し、得られた化合物が石灰化を促進するか検討する。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の分化を阻害する化合物の分離、構造解析

破骨細胞の分化を阻害する化合物を含むラン藻 *Okeania* sp. を恩納村、本部町、浦添付近の海岸で採集する。採集したラン藻をメタノールで抽出し、得られた抽出物を酢酸エチルと水で分配する。目的の化合物は酢酸エチル層に濃縮されることが明らかになっているので、酢酸エチル層を各種クロマトグラフィーおよび、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離精製を進める。得られた化合物に関しては二次元 NMR スペクトル、質量分析などの機器分析や、分解・誘導反応により化学構造を明らかにする。

(2) 骨芽細胞の分化を誘導する化合物の単離、構造解析

沖縄県本部町で採集した海洋ラン藻抽出物や、うるま市で採集した紅藻抽出物が ALP 活性を上昇させることから、MT3T3-E1 細胞を用いて骨芽細胞の分化を誘導する化合物を探索する。MT3T3-E1 細胞を2日間培養後、各抽出物存在下で6-7日間培養する。氷冷メタノールにて細胞を固定して乾燥後、ALP 基質溶液を用いて ALP 活性を測定する。さらに染色基質溶液を用いて ALP 染色を行う。ALP 活性を上昇させた分離画分については、さらに精製を進め化合物を単離する。

(3) 骨芽細胞を用いた単離化合物の石灰化評価

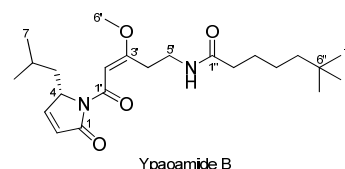
単離した骨芽細胞の分化を誘導する化合物が石灰化を促進するのか検討する。MT3T3-E1 細胞を2日間培養後、アスコルビン酸、β-glycerophosphate および単離した化合物で10-14日間培養して70% エタノールにて細胞を固定した後、石灰化して沈着したカルシウムをアリザリンレッドで染色し、単離した化合物が石灰化を促進するか評価する。

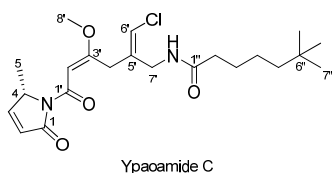
4. 研究成果

(1) 破骨細胞の分化を阻害する化合物の分離、構造解析

採集した海洋ラン藻をメタノールで抽出した。得られたメタノール抽出物を吸引した後、ろ液を減圧濃縮し、メタノール粗抽出物を得た。得られたメタノール粗抽出物を水と酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層は、さらに90%メタノール水溶液とヘキサンで分配した。

90%メタノール層を ODS カラムクロマトグラフィーにより分離し、高速液体クロマトグラフィーを用いて精製を進めた結果、ypaoamide B, C を単離した。次に単離した ypaoamide B, C の構造解析を行った。





Ypaoamide B の分子量は高分解能質量スペクトルから $C_{23}H_{38}N_2O_4$ であると決定した。次に ypaoamide B の COSY スペクトル及び HOHAHA スペクトルの詳細な解析により、図 1 に太線で示した 3 組 (C-2'' ~ C-5'', C-4' ~ C-5', C-2 ~ C-8) の炭素原子のつながりが明らかとなった。さらに図 1 に示した HMBC スペクトルを詳細に解析する事で、substructure A, B に示す構造を明らかにした。また NOESY スペクトルにおいて、H-2'/H-6' の相関が観測されたことから、C-2' の二重結合は 2'E であると決定した。また HMBC スペクトルから substructure A と B のつながりは明らかとならなかったが、不飽和度と分子式、C-1' 炭素のケミカルシフトの値から、substructure A と B はアミド結合により C-1' を介して結合していると決定した。このようにして ypaoamide B の平面構造を決定した。

Ypaoamide C の分子量は高分解能質量スペクトルから $C_{22}H_{33}ClN_2O_4$ であると決定した。次に ypaoamide C の COSY スペクトル及び HOHAHA スペクトルの詳細な解析により、図 1 に太線で示した 2 組 (C-2'' ~ C-5'', C-2 ~ C-5) の炭素原子のつながりが明らかとなった。さらに図 1 に示した HMBC スペクトルを詳細に解析する事で、substructure A, B に示す構造を明らかにした。また NOESY スペクトルにおいて、H-2'/H-8' と H-4'/H-6' の相関が観測されたことから、C-2' と C-5' の二重結合はそれぞれ 2'E, 5'Z であると決定した。また HMBC スペクトルから substructure A と B のつながりは明らかとならなかったが、不飽和度と分子式、C-1' 炭素のケミカルシフトの値から、substructure A と B はアミド結合により C-1' を介して結合していると決定した。このようにして ypaoamide B の平面構造を決定した。

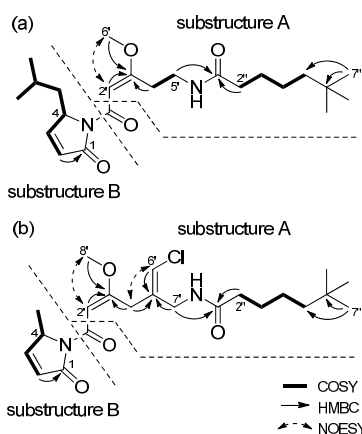


図 1. Gross structures of ypaoamides B (1) and C (2). (a) Key 2D NMR correlations for 1. (b) Key 2D NMR correlations for 2.

次に ypaoamide B, C の C-4 位の絶対立体配置を決定するため、ypaoamide B, C をオゾン分解後、酸化処理し加水分解した。得られたアミノ酸に Marfey 法を用いて不斉補助基を導入した。得られた誘導体を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、Marfey 不斉補助基が結合した L-ロイシン-L-アラニン誘導体を検出した。以上の結果から ypaoamide B, C の絶対立体配置を決定した。

(2) 骨芽細胞の分化を誘導する化合物の単離、構造解析

沖縄県本部町で採集した海洋ラン藻抽出物と、うるま市で採集した紅藻抽出物を各種クロマトグラフィーで分離し、骨芽細胞の分化を誘導する化合物を探索した。その結果、うるま市で採集した紅藻ミナミソゾ *Laurencia nidifica* から単離した既知化合物である aplysin 処理細胞で ALP 活性の上昇が認められた。また本部町で採取した海洋ラン藻抽出物分離画分処理細胞でも同様に ALP 活性の上昇が認められたが、含まれる化合物については現在構造解析を行っている。

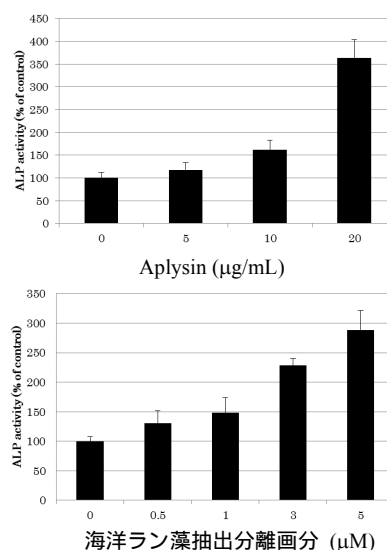


図 2. 骨芽細胞における低分子化合物分化促進作用

(3) 骨芽細胞を用いた単離化合物の石灰化評価

ALP 活性の上昇が認められた単離化合物が石灰化を促進するか検討した。石灰化の判定には、カルシウム塩を染色する Alizarin Red S 溶液を用いた。その結果、分化促進実験と同様に海洋ラン藻分離画分を処理した群は Alizarin Red S 染色の増加が認められたが (図 3)、aplysin は Alizarin Red S 染色の増加が認められなかった。

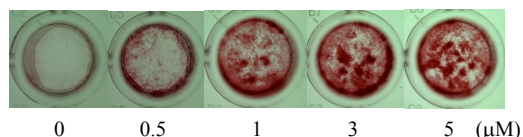


図 3. 海洋ラン藻分離画分の Alizarin Red S 染色の写真

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)

1. Sueyoshi, K.; Yamano, A.; Ozaki, K.; Sumimoto, S.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Teruya, T. Three New Malyngamides from the Marine Cyanobacterium *Moorea producens*. *Mar. drugs* **2017**, 15, 367. 査読有
2. Iwasaki, A.; Tadenuma, T.; Sumimoto, S.; Ohshiro, T.; Ozaki, K.; Kobayashi, K.; Teruya, T.; Tomoda, H.; Suenaga, K. Biseokeaniamides A, B, and C, Sterol *O*-Acyltransferase Inhibitors from an *Okeania* sp. Marine Cyanobacterium. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 1161. 査読有
3. Sueyoshi, K.; Kudo, T.; Yamano, A.; Sumimoto, S.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Teruya, T. Odobromoamide, a Terminal Alkynyl Bromide-Containing Cyclodepsipeptide from the Marine Cyanobacterium *Okeania* sp. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **2017**, 90, 436. 査読有
4. Sumimoto, S.; Iwasaki, A.; Ohno, O.; Sueyoshi, K.; Teruya, T.; Suenaga, K. Kanamienamide, an Enamide with an Enol Ether from the Marine Cyanobacterium *Moorea bouillonii*. *Org. Lett.* **2016**, 18, 4884. 査読有
5. Sueyoshi, K.; Kaneda, M.; Sumimoto, S.; Oishi, S.; Fujii, N.; Suenaga, K.; Teruya, T. Odoamide, a cytotoxic cyclodepsipeptide from the marine cyanobacterium *Okeania* sp. *Tetrahedron* **2016**, 72, 5472. 査読有
6. Kim, H-J.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Woo, J-T.; Cha, B-Y. Nobiletin, a Polymethoxy Flavonoid, Reduced Endothelin-1 Plus SCF-Induced Pigmentation in Human Melanocytes. *Photochem. Photobiol.* **2015**, 91, 379. 査読有

〔学会発表〕(計14件)

1. 小林正幸、澄本慎平、四宮誠一、照屋俊明、岩崎有 紘、末永聖武：海洋産リポペプチド Minnamide A の合成研究と立体化学の決定、日本化学会 第98春季年会、2018.3.23、日本大学(千葉県、船橋市)
2. 保科静香、岩崎有 紘、工藤隆文、照屋俊明、末永聖武：海洋リポペプチド Jahanyne 類の構造活性相関とバイオチンプローブの合成、日本化学会 第98春季年会、2018.3.23、日本大学(千葉県、船橋市)
3. 尾崎香織、山野亜紀、末吉康佑、澄本慎平、岩崎有 紘、末永聖武、照屋俊明：沖縄県産海洋生物における糖取り込み物質の探索、日本化学会 第98春季年会、2018.3.21、日本大学(千葉県、船橋市)
4. 工藤隆文、尾崎香織、山野亜紀、末吉康

- 佑、澄本慎平、岩崎有 紘、末永聖武、照屋俊明：沖縄県備瀬産海洋シアノバクテリア由来の新規類縁体 JahanyneB, C の構造と生物活性、日本化学会 第97春季年会、2017.3.17、慶應義塾大学(神奈川県、横浜市)
5. 尾崎香織、山野亜紀、石井貴広、照屋俊明：沖縄県産海洋生物における骨代謝調節物質の探索、日本化学会 第97春季年会、2017.3.17、慶應義塾大学(神奈川県、横浜市)
 6. 山野亜紀、尾崎香織、山田美希、末吉康佑、澄本慎平、岩崎有 紘、末永聖武、照屋俊明：沖縄県産海洋生物由来筋管細胞糖取り込み活性物質の探索、日本化学会 第97春季年会、2017.3.17、慶應義塾大学(神奈川県、横浜市)
 7. 澄本慎平、四宮誠一、岩崎有 紘、犬塚俊康、照屋俊明、末永聖武：海洋シアノバクテリア由来新規リポペプチド Minnamide 類の単離と構造決定、日本化学会 第97春季年会、2017.3.17、慶應義塾大学(神奈川県、横浜市)
 8. 岩崎有 紘、蓼沼隆人、大城太一、尾崎香織、澄本慎平、照屋俊明、供田 洋、末永聖武：沖縄県産海洋シアノバクテリア由来チアゾール含有ペプチドの単離と構造、日本化学会 第97春季年会、2017.3.16、慶應義塾大学(神奈川県、横浜市)
 9. Toshiaki Teruya: Search for muscle glucose uptake and bone metabolism regulatory properties in Okinawan marine organism compounds, US-Japan Symposium: 21st Century Innovations in Natural Products, November 17, 2016、(ホノルル、アメリカ合衆国)
 10. Takafumi Kudo, Kosuke Sueyoshi, Kozo Fukumoto, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, Toshiaki Teruya: Isolation and structure of a novel and potent cytotoxic peptides from the marine cyanobacterium *Symploca* sp., 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 18, 2015、(ホノルル、アメリカ合衆国)
 11. Miki Yamada, Kosuke Sueyoshi, Takayuki Yonezawa, Byung-Yoon Cha, Je-Tae Woo, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, Toshiaki Teruya: Structures and bioactivities of okeaniamide and chlorokeaniamide from marine cyanobacterium *Okeania* sp., 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December 18, 2015、(ホノルル、アメリカ合衆国)
 12. Kosuke Sueyoshi, Masato Kaneda, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Shinpei Sumimoto, Shoichiro Suda, Toshiaki Teruya: Odoamide, a novel cyclodepsipeptide from marine cyanobacterium *Symploca* sp., 2015

International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Poster, December 18, 2015、
(ホノルル、アメリカ合衆国)

- 13 . Toshiaki Teruya: Novel Bioactive Substances from Okinawan Marine Cyanobacteria, Latest local/ international marine resources research and technology trend seminar, December 15, 2015、(濟州、韓国)
- 14 . 照屋俊明: 日本潰瘍学会・OIST 合同シンポジウム 2 「創薬と育薬—新たな可能性を求めて」, 2015 年 6 月 20 日、沖縄科学技術大学院大学 (沖縄県、国頭郡恩納村)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称: ネボジン高含有ギンギシ抽出物の製造方法及びネボジン高含有ギンギシ抽出物
発明者: 照屋俊明、山野亜紀、末吉康佑、山田美紀、禹濟泰、照屋勇人、佐々木梢
権利者: 沖縄リサーチセンター、琉球大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-71165
出願年月日: 2016 年 3 月 31 日
国内外の別: 国内

名称: トリテルペノイド高含有種子抽出物の製造方法及びトリテルペノイド高含有種子抽出物
発明者: 禹濟泰、照屋俊明、山野亜紀
権利者: 沖縄リサーチセンター、琉球大学
種類: 特許
番号: 特願 2018-044352
出願年月日: 2018 年 3 月 12 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 柑橘類のノビレチン及びタンゲレチン高含量画分の製造方法及びその方法で得られたノビレチン及びタンゲレチン高含量画分
発明者: 照屋俊明、照屋勇人、杉山幸来、禹濟泰
権利者: 沖縄リサーチセンター、琉球大学
種類: 特許
番号: 特許第 5735184 号
取得年月日: 2015 年 4 月 24 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA, Toshiaki)

琉球大学・教育学部・教授

研究者番号: 90375428

(2) 連携研究者

禹 濟泰 (Woo, Je-Tae)

中部大学・応用生物学部・応用生物科学科

研究者番号: 20272693