

令和元年6月12日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08295

研究課題名(和文) 海洋渦鞭毛藻からの細胞増殖制御物質の探索と開発

研究課題名(英文) Research for cell-growth regulators from marine dinoflagellates

研究代表者

津田 正史 (Tsuda, Masashi)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・教授

研究者番号：10261322

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)：本研究では、アンフィジニウム属渦鞭毛藻に含まれる細胞増殖制御物質の探索の一環として研究を進めることで、西表島産のアンフィジニウム属海洋渦鞭毛藻KCA09053株より、2種の新規細胞増殖阻害物質イリオモテオリド-10aと12aを、同じくKCA09052株より新規細胞増殖阻害物質イリオモテオリド-9aと11aを単離し、それらの化学構造を明らかにしてきた。西表島産のアンフィジニウム属海洋渦鞭毛藻HYA024株より新規25員環マクロリド・イリオモテオリド-8aならびにアンフィリオン-1についてスペクトルデータの解析に基づいてそれらの構造を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

得られた化合物はいずれも特異な化学構造を有する新規化合物であり、合成化学研究のターゲットとして注目される。これらの化合物の生物活性をより詳細に検討することで、新しい細胞増殖制御につながるメカニズムの解析につながるものと期待され、がんを始めとする様々な疾患の予防・治療につながるリード分子になると期待され、学術的・社会的に有用な成果である。

研究成果の概要(英文)：During our continuing searches for new cell-growth regulators from extracts of marine dinoflagellates Amphidinium species, we have isolated several new compounds with cytotoxic activity. Iriomoteolides-9a and 11a, new 15- and 19-membered macrolides, respectively, have been isolated from the marine dinoflagellate Amphidinium species (strain KCA09052), and their structures were assigned on the basis of detailed NMR analyses. Iriomoteolides-9a and 11a exhibited cytotoxic activity against human cervix adenocarcinoma HeLa cells. Two new macrolides, iriomoteolides-10a and -12a, have been isolated from a marine dinoflagellate Amphidinium sp. (KCA09053 strain), and their structures were elucidated on the basis of a detailed 2D NMR analysis. Iriomoteolide-10a exhibited cytotoxic activity against human cervix adenocarcinoma HeLa and murine hepatocellular carcinoma MH134 cells.

研究分野：天然物化学

キーワード：二次代謝産物

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

海洋産微細藻類を対象とした二次代謝産物の探索は、海産毒を中心に数多くの研究がなされてきた。本研究で取り上げるアンフィジニウム属 (*Amphidinium* sp.) 渦鞭毛藻からはこれまでに、内外の研究者によって多くの二次代謝産物の単離・構造解析に関する研究が行われている。研究代表者らは、アンフィジニウム属渦鞭毛藻の遺伝子解析により抗腫瘍性マクロリド類の産生株を効率的に発見できることがわかった。さらに、抽出物のメタボローム解析と殺細胞活性試験を組み合わせることで、新規マクロリド産生株やマクロリド大量生産株を選別する方法論を構築した。さらに、海洋深層水を用いた千リットルスケールでの攪拌式バッチ培養と高速集藻装置から成る高効率大規模培養施設を整備した。大量培養藻体を用いた生物活性物質の探索を行うことで、本渦鞭毛藻に特徴的な細胞増殖阻害活性 (殺細胞活性) を示す新規ポリケチド化合物 [Iriomoteolide-13a や Amphirionin-2 を発見するとともに、これらとは正反対の性質を持つ細胞増殖活性化物質 Amphirionin-4 など発見してきた。

2. 研究の目的

アンフィジニウム属渦鞭毛藻からは現在までに、50 種を超えるマクロリド化合物、20 種あまりの長鎖ポリヒドロキシ化合物が単離されていたが、新規化合物産生株探索法や集約的な培養法を取り入れることで、新たに二次代謝産物群の発見に繋がった。さらに継続的に展開することで新たな医薬品のリードや生命現象に有用な試薬となり得る細胞増殖制御物質が得られる可能性が高い。本研究では、(1) 強力な殺細胞活性や抗腫瘍性を持つポリケチド化合物や、幹細胞等の正常細胞の増殖を促進するポリケチド化合物といった、細胞増殖を制御する新規代謝産物を探索し構造解析を行う。(2) 得られた新規化合物や顕著な細胞増殖活性を示す Amphirionin-4 に関して、詳細な活性評価を行うとともに、薬理学的手法やケミカルバイオロジー手法により活性発現の標的分子と作用機序を解明する。(3) これらポリケチド化合物は、既存のポリケチド生合成経路では説明できないユニークな炭素骨格を有することから、安定同位体取込実験やポリケチド生合成酵素遺伝子の網羅的解析による生合成研究を検討する。以上の研究により、既存の抗がん剤とは化学構造が異なる新しいタイプの抗がん剤リードや再生医療に活用可能な幹細胞等の増殖促進物質の開発を目指すとともに、これまでほとんど未解明な渦鞭毛藻ポリケチド生合成機構の解析といった渦鞭毛藻代謝産物に関する総合的なケミカルバイオロジー研究を実施する。

3. 研究の方法

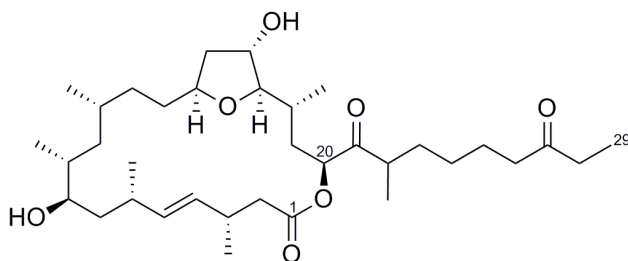
(1) 新規ポリケチド化合物の探索: 四国太平洋岸や瀬戸内海、沖縄県を含む九州沿岸域を中心に新規活性物質産生株を見出す。得られたアンフィジニウム渦鞭毛藻株の抽出物について培養腫瘍細胞を用いた細胞増殖阻害あるいは促進活性の評価に基づいて新規化合物の探索を行なった。得られた新規化合物についてスペクトルデータの詳細な解析に基づいて解析を行なった。

(2) 細胞増殖制御活性の評価: 上記結果により得られた新規増殖阻害物質については、様々な種類の腫瘍細胞 (白血病細胞、臓器での固形がん細胞) について増殖阻害活性を検討する。

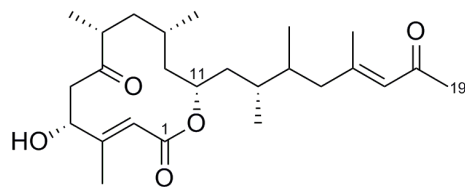
(3) ポリケチド化合物の生合成研究: 疎水性直鎖ポリケチドやマクロリド類を産生するアンフィジニウム属渦鞭毛藻株を用いて、¹³C 標識酢酸ナトリウムを海水培地に添加したブレカサー取り込み実験を行った。

4. 研究成果

西表島産のアンフィジニウム属海洋渦鞭毛藻 KCA09053 株より、2 種の新規細胞増殖阻害物質イリオモテオリド-10a と 12a を単離した。イリオモテオリド-10a は、分子内にテトラヒドロフラン環 1 個、2 個のケトン基、2 個の水酸基、6 個の炭素分岐を持つ新規 21 員環マクロリドであった。詳細なデータ解析により一部の相対立体配置を帰属した。一方、イリオモテオリド-12a は、既知化合物アンフィジノリド Q に構造が類似する新規 12 員環マクロリドであった。環上に存在する不斉炭素の相対立体配置は、アンフィジノリド Q と同一であると推定した。イリオモテオリド-10a には、HeLa 細胞に対する細胞毒性が認められた。



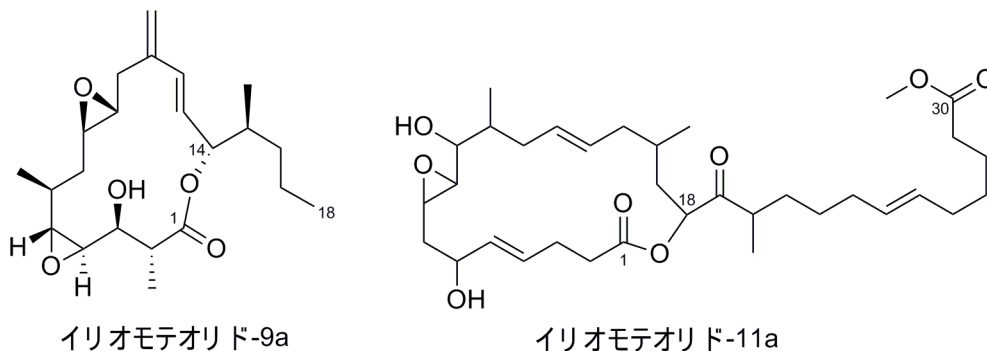
イリオモテオリド-10a



イリオモテオリド-12a

西表島産のアンフィジニウム属海洋渦鞭毛藻 KCA09052 株を PES 含有海水で培養するこ

とにより新規細胞増殖阻害物質イリオモテオリド-9aを単離した。イリオモテオリド-9aは、分子内にエポキシ環2個、水酸基、4個の炭素分岐を持つ新規15員環マクロリドであった。詳細なデータ解析により9個の不斉炭素の相対立体配置を帰属した。一方、イリオモテオリド-12aは、同じKCA09052株をTKF培地を用いて培養したところ、その藻体抽出物からはイリオモテオリド-11aが得られた。イリオモテオリド-11aは、分子内にエポキシ環1個、2個の水酸基、3個の炭素分岐と側鎖末端にエステルカルボニル基を持つ新規19員環マクロリドであった。イリオモテオリド-9aと11aはいずれも、HeLa細胞に対する細胞毒性が認められた。これらの分子はSPR実験によってアクチン分子に結合性を示すことからアクチン阻害剤として細胞毒性を示す可能性が高い。



西表島産のアンフィジニウム属海洋渦鞭毛藻HYA024株より2種の新規細胞毒性化合物イリオモテオリド-8aとアンフィリオニン-1が得られた。スペクトルデータの詳細な解析によりイリオモテオリド-8aは、3個のテトラヒドロフラン環、1個のエポキシ環、ケトン基、4個の水酸基、5個の炭素分岐を持つ新規25員環マクロリドであった。一方、スペクトルデータの詳細な解析によりアンフィリオニン-1は、炭素鎖24個からなる直鎖状カルボン酸化合物であり、分子内に4個の炭素分岐と4個の水酸基を有する化合物であると帰属した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6件)

1. Sakamoto, K.; Hakamata, A.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Tsuda, M.; Fuwa, H. Total Synthesis, Stereochemical Revision, and Biological Assessment of Iriomoteolide-2a. *Chem. Euro. J.* **2019**, 10.1002/chem.201900813.
2. Sakamoto, K.; Hakamata, A.; Tsuda, M.; Fuwa, H. Total Synthesis and Stereochemical Revision of Iriomoteolide-2a. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 3801-3805 査読有
3. Kumagai, K.; Tsuda M.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Masuda, A.; Tsuda, M. Iriomoteolides-9a and 11a: two new odd-numbered macrolides from the marine dinoflagellate *Amphidinium* species. *J. Nat. Med.* **2017**, 71, 506-512. 査読有
4. Uchimasu, H.; Matsumura, K.; Tsuda, M.; Kumagai, K.; Akakabe, M.; Fujita, M. J.; Sakai, R. Mellpaladines and dopargimine, novel neuroactive guanidine alkaloids from a Palauan Didemnidae tunicate. *Tetrahedron* **2016**, 72, 7185-7193. 査読有
5. Kanto, M.; Sato, S.; Tsuda, M.; Sasaki, M. Stereodivergent Synthesis and Configurational Assignment of the C1-C15 Segment of Amphirionin-5. *J. Org. Chem.* **2016**, 81, 9105-9121. 査読有
6. Akakabe, M.; Kumagai, K.; Tsuda M.; Konishi, Y.; Tominaga A.; Kaneno D.; Fukushi, E.; Kawabata, J.; Masuda, A.; Tsuda, M. Iriomoteolides-10a and 12a, Cytotoxic Macrolides from Marine Dinoflagellate *Amphidinium* Species. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 1019-1023. 査読有

〔学会発表〕(計 9件)

1. Tsuda M., Kumagai K., Tsuda M., Structures and cytotoxic activities of new macrolides from the marine dinoflagellates *Amphidinium* species, 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Royal Olympic Hotel, Athens, Greece (2018/11/25-29)
2. 坂本溪太, 袴田旺弘, 岩崎有紘, 末永聖武, 津田正史, 不破春彦, イリオモテオリド-2aの全合成と構造改訂, 第60回天然有機化合物討論会, 久留米 (2018/9/26-28)
3. 森本博俊, 端口佳宏, 魚住嘉伸, 中川光司, 津田正史, 海洋性渦鞭毛藻の増殖に関する海洋深層水成分の検討(第二報), 第21回海洋深層水利用学会全国大会「海洋深層水2017北海道大会, 羅臼, (2017/10/12-13)
4. Tsuda M., Unique metabolites regulating cell-proliferation from marine

dinoflagellates *Amphidinium* species, International Symposium Fisheries Science for Future Generations, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo (2017/9/22-24) 招待

5. Tsuda M., Bioactive secondary metabolites from marine dinoflagellates *Amphidinium* species, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology The Sixth Symposium, Pacific Hotel Okinawa, Naha (2017/4/23-26) 招待

6. Dana Ulanova, 津田正史, NMR analysis of actinobacterial culture extracts after addition of primary metabolism inhibitor, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都 (2017/3/17-20)

7. 野田大貴, 木谷茂, 富岡寿也, Dana Ulanova, 津田正史, 荒井雅吉, 仁平卓也, 高知県沖海綿に生息する放線菌の多様性と生理活性物質生産能, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都 (2017/3/17-20)

8. 端口佳宏, 魚住嘉伸, 中川光司, 津田正史, 海洋性渦鞭毛藻の増殖に關与する海洋深層水成分の検討, 第 20 回海洋深層水利用学会全国大会, 滑川 (2016/11/11-12)

9. Akakabe, M., Kumagai, K., Tsuda M., Tsuda M., Simultaneous observation of two nuclei in hyperpolarized probes, The XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems Kyoto (2016/8/21-26)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。