

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05335

研究課題名(和文)細胞分化を制御する発生段階選択的細胞機能調節物質の探索と構造解析

研究課題名(英文) Structure elucidation of developmental-stage selective cell function regulators that control cellular differentiation

研究代表者

太田 伸二(Ohta, Shinji)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・教授

研究者番号：60185270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：有用な細胞機能調節物質の開発を目的として、イトマキヒトデ胚の発生を特定の段階で選択的に停止させる活性を指標にして、海洋生物などから生理活性物質の探索を行った。その結果、エジプト紅海で採取された軟体サンゴからは新規な大環状ジテルペノイド類を、またハムシ科甲虫の代謝産物からは新規硫酸化プリン配糖体類を、さらに日本固有種の植物カンアオイの根からは新規なオキサジノン環を有するフェナントレン誘導体類を単離し、それらの構造をNMRおよびMSスペクトルデータならびにX線結晶解析に基づいて決定した。これら新規化合物のうちの数種は、がん細胞の増殖を抑制したほかアポトーシスを誘導することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋生物、昆虫および植物などから得られた新規な骨格構造を有する天然有機化合物は極めて選択的な生理活性を示すことから、モデル生物でもあるイトマキヒトデの胚発生過程における細胞分化などの重要なイベントのメカニズムを明らかにするための有用なツールとなる新規細胞機能調節物質の開発につながるという学術的な意義を有しているとともに、これまでに知られていない作用機構を持った抗がん剤や抗ウイルス剤など有用な医薬品開発のためのリード化合物となりうることも期待される。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of developing useful cell function regulators, we searched for bioactive natural products that selectively arrest the progression of embryonic development of starfish at the late blastula stage. Bioassay-guided fractionation of the crude extracts resulted in the isolation of new macrocyclic diterpenoids, new sulfated purine glycosides, and new phenanthrene derivatives with an oxadinone ring from soft corals collected in the Red Sea, metabolites of seed-eating bruchid beetles, and roots of *Asarum* sp. Their structures were elucidated based on NMR and MS spectral data as well as X-ray crystallography. Several of these compounds have been found to inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis.

研究分野：生物分子科学

キーワード：生物活性物質 軟体サンゴ 昆虫 植物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地中海、紅海、フィリピンならびに日本近海で採取した海洋生物の粗抽出物について、棘皮動物卵を用いた成熟阻害、受精阻害および胚発生阻害活性試験を行って、特異的な阻害活性を有する新規生理活性物質の探索と構造解析を進めてきた。これまでに大環状ラクトン化合物イグジグオリドを始めとして、含臭素アミド化合物クラスリンアミド A-C、テトラミン酸配糖体アンコリノシド A、スチレン硫酸エステル化合物ジャスピシン類、ポリアセチレン硫酸エステル化合物カリスポンジン A および B、ノルセスタテルペンアクリル酸ロパロイン酸 A-C といった新規生理活性物質を単離・構造決定してきた。海洋生物から得られたこれらの新規化合物は極めて選択的な生理活性を示すものが多く、有用な細胞機能調節物質の開発につながることを期待されている。

### 2. 研究の目的

新規細胞機能調節物質を開発するため、本研究では、海綿動物などの海洋生物や植物および昆虫の代謝産物等について、棘皮動物に対する胚発生阻害活性試験を行い、ヒトデ胚の発生初期の細胞分裂には影響を与えず、胞胚期および初期原腸胚の発生段階でのみ胚発生を停止させる活性を指標にして生理活性物質を多量に単離し、絶対配置も含めて構造決定を行う。さらに、得られた生理活性物質について、様々な酵素や細胞に対する生理活性を調べてその生理機能の詳細を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

海洋生物や植物および昆虫の代謝産物等の抽出物について、次の活性試験を実施し、棘皮動物の胚発生を選択的に阻害する化合物の探索を行った。

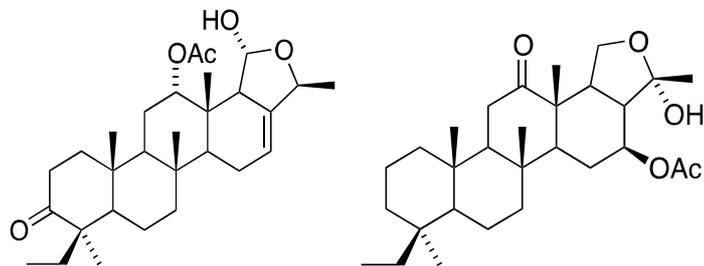
胚発生阻害活性試験：様々な濃度に調製した抽出物や画分の MeOH 溶液 1  $\mu$ L を 90% 海水 100  $\mu$ L に加えたのち、1-メチルアデニンで処理して成熟させたイトマキヒトデの受精卵を加えて、8 時間後、12 時間後、24 時間後に顕微鏡下で形態を観察することによって、初期の胚発生には影響を与えず胞胚期および初期原腸胚の段階以降で発生を特異的に阻害する活性を示すものを選び出した。

この活性試験によって選び出された抽出物および画分について、その活性を指標として活性化合物の分画・精製を行った。多量の抽出物を溶媒分画後、吸着クロマト(HP20)、ゲルろ過(LH20)、HPLC (ODS) 等により分画精製し、活性物質を単離した。

単離された化合物について、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルならびに高分解能質量分析、単結晶 X 線解析等に基づいて絶対配置も含めて構造を決定した。新規生理活性物質ならびにそれらから調製した各種誘導体について、受精阻害や胚発生に対する詳細な阻害様式を調べるとともに、様々な癌細胞の細胞増殖に及ぼす影響を評価した。さらに、誘導体や関連化合物の構造活性相関についても調べて、新規生理活性物質の生理機能の詳細の究明を図った。

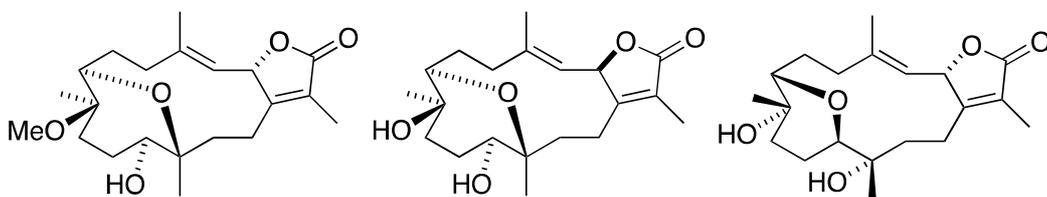
### 4. 研究成果

地中海、紅海、フィリピンならびに日本近海で採取した海洋生物の MeOH 抽出物についてイトマキヒトデの受精卵を用いた胚発生阻害試験を実施した。海水で段階的に希釈した海洋生物の MeOH 抽出物中にイトマキヒトデ受精卵を約 20 個加えて、初期発生等に対する影響を顕微鏡下で観察し、ヒトデの胚発生に対して卵割等には影響を与えず胚発生の後期の段階である胞胚期および初期原腸胚の発生段階でのみ胚発生を選択的に停止させる活性が認められた粗抽出物について、順次ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールおよび水の各可溶性画分に溶媒分画した。活性を示した溶媒可溶性画分を、シリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分画・精製することにより活性物質を単離し、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルならびに高分解能質量分析等によって活性物質の構造を決定した。まず、フィリピン産未同定海綿の MeOH 抽出物からは、活性物質として 3-ケト-20,22-ジメチル-20—デオキソスカラリンが得られた。本活性物質は、3~100 ppm の広い濃度範囲に渡ってイトマキヒトデ受精卵の胚発生を初期原腸胚の段階で停止させることが明らかになった。一方、同じ海綿から単離された同じ環骨格を有するスカラディシン B は全く活性を示さないことがわかった。



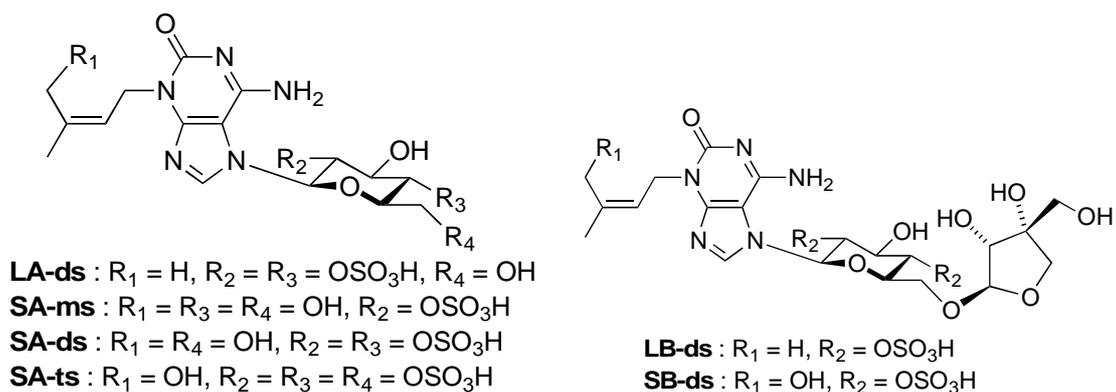
3-ケト-20,22-ジメチル-20—デオキソスカラリン (左) およびスカラディシン B (右) の化学構造

また、エジプトの紅海産ザルコフィトン属軟体サンゴのジクロロメタン-メタノール可溶性画分からは、ザルコエレンベルギライド D-F と名付けた 3 種の新規センブラン型ジテルペノイド類を活性物質として単離した。これらの化学構造を NMR および MS 等のスペクトルデータに基づいて決定するとともに、ECD スペクトルと TDDFT 計算に基づいて絶対配置を決定した。ザルコエレンベルギライド D-F は、肺癌細胞 A549 に対して IC<sub>25</sub> 値がそれぞれ 23、27 および 25 μM の細胞増殖阻害活性を示すことが明らかになった。また、ヒト肝臓癌細胞 HepG2 に対して、ザルコエレンベルギライド E および F は、それぞれ IC<sub>25</sub> 値 22 および 31 μM で細胞増殖阻害活性を示したが、ザルコエレンベルギライド D は活性を示さないこともわかった。

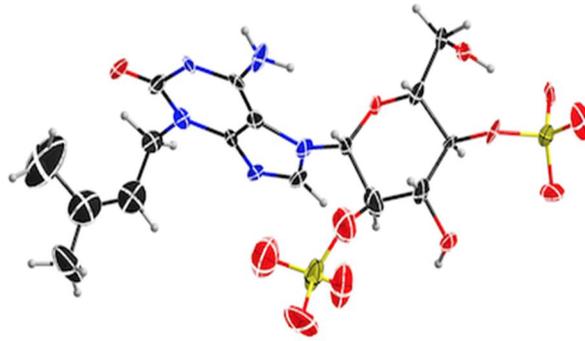


新規ザルコエレンベルギライド D (左)、E (中)、および F (右) の構造

また、昆虫の代謝産物から活性物質の探索を行った。ハムシ科の甲虫サイカチマメゾウムシはマメ科植物サイカチの種子に寄主植物選択的に寄生して成長することが知られている。サイカチマメゾウムシ幼虫は蛹化する前に自身のまわりに排泄物や分泌物を利用して蛹室を形成し、成虫になると再び種皮を穿孔して脱出する。この蛹室の粗抽出物が棘皮動物受精卵の発生を段階選択的に阻害することがわかったため、活性を指標として活性成分の分画を行った結果、水溶性画分から 6 種の新規化合物を単離し、LA-ds、LB-ds、SA-ms、SA-ds、SA-ts および SB-ds と命名した。単離した活性物質は、NMR および MS 等のスペクトルならびに X 線結晶解析等に基づいていずれも新規イソグアニン配糖体の硫酸エステル化合物であると決定した。



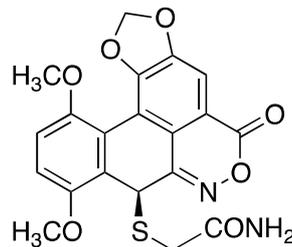
新規硫酸化イソグアニン配糖体類の化学構造



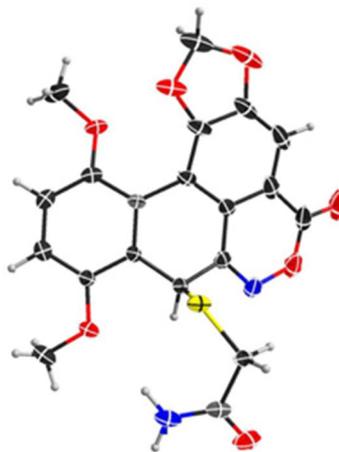
新規硫酸化イソグアニン配糖体の結晶構造

これらの新規硫酸化イソグアニン配糖体類のうち、主成分として得られた SA-ds、SA-ts および LB-ds は、ヒトデ胚の発生をそれぞれ 55、75 および 133  $\mu\text{M}$  以上の濃度で胞胚形成の段階で胚発生を阻害することがわかった。ヒトデの原腸胚形成後にこれらの化合物を添加しても胚発生に影響を与えなかったことから、胞胚形成期に段階特異的な阻害を引き起こしていることが確認された。

またさらに、植物抽出物から活性物質の探索を行った。日本固有種の植物であるウマノスズクサ科カンアオイの根の酢酸エチル可溶性画分に、ヒトデ胚の胞胚形成を非常に強く阻害する活性が認められた。この酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって繰り返し分画精製を行った結果、活性成分を得た。NMR および MS 等のスペクトルに基づいて構造を推定したのち、最終的に単結晶 X 線解析によってその構造をオキサジノン環およびフェナントレン骨格を有する新規アリストロキア酸誘導体であると確定するとともに、硫黄原子の異常分散に基づいて絶対配置を決定し、アサロイドオキサジン A と命名した。



アサロイドオキサジン A の化学構造



アサロイドオキサジン A の結晶構造

アサロイドオキサジン A は、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に対して  $\text{IC}_{50}$  値 2.7  $\mu\text{M}$  の神経毒性を示すことがわかった。さらに、アサロイドオキサジン A で処理した細胞には細胞核クロマチンの凝縮および核の断片化が観測されたとともに、カスパーゼ 3/7 の活性が顕著に増大したことから、アサロイドオキサジン A は神経芽細胞に対する強力なアポトーシス誘導物質であることも明らかになった。

本研究課題において、ヒトデ等の棘皮動物の胚発生を発生段階得意的に阻害する活性を指標

にして細胞機能調節物質を探索した結果、フィリピン産海綿から2種の活性セスタテルペノイドを同定したほか、エジプト紅海産の軟体サンゴからは3種の新規大環状ジテルペノイド類を活性物質として単離・構造決定した。これらのうちの数種は、癌細胞に対して細胞増殖抑制活性を示した。また、ハムシ科の甲虫の代謝産物からは、活性物質として硫酸化されたプリン配糖体6種を単離・構造決定した。さらに日本固有種の植物カンアオイの根からは、活性物質として新規なオキサジノン環を有するフェナントレン誘導体を単離・構造決定した。選択的生理活性を示す新規な骨格を有する天然有機化合物の発見は、細胞機能に対して特異的な作用をもつ可能性が期待される。本研究課題によって得られた新規生理活性天然有機化合物に関して、さらに細胞ならびに酵素に対する阻害アッセイを行うことにより、詳細な生理機能を明らかにするとともに、より活性が高く選択性に優れた細胞機能調節物質の開発を図ることが今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohta Shinji, Yuasa Yasunori, Aoki Nobuwa, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Norbisabolane and bisabolane sesquiterpenoids from the seeds of <i>Angelica keiskei</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 94 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2019.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hegazy Mohamed-Elamir F., Mohamed Tarik A., Elshamy Abdelsamed I., Hamed Ahmed R., Ibrahim Mahmoud A. A., Ohta Shinji, Umeyama Akemi, Pare Paul W., Efferth Thomas	4. 巻 9
2. 論文標題 Sarcoehrenbergilides D-F: cytotoxic cembrene diterpenoids from the soft coral <i>Sarcophyton ehrenbergi</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 27183 ~ 27189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ra04158c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uyama Yuri, Ohta Emi, Harauchi Yui, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Kawachi Hiroyuki, Imamura-Jinda Aya, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 35
2. 論文標題 Rare sulfated purine alkaloid glycosides from <i>Bruchidius dorsalis</i> pupal case	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytochemistry Letters	6. 最初と最後の頁 10 ~ 14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytol.2019.10.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ohta Shinji, Yuasa Yasunori, Aoki Nobuwa, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M.	4. 巻 27
2. 論文標題 NMR and ESIMS data for bisabolane-type sesquiterpenoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 104780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.104780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Uyama Yuri, Ohta Emi, Harauchi Yui, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Kawachi Hiroyuki, Imamura-Jinda Aya, Uy Mylene M., Ohta Shinji	4. 巻 28
2. 論文標題 Nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry data for sulfated isoguanine glycosides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 105032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2019.105032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Harauchi Yui, Muranaka Kyo, Ohta Emi, Kawachi Hiroyuki, Imamura-Jinda Aya, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Ohta Shinji	4. 巻 15
2. 論文標題 Sulfated Purine Alkaloid Glycosides from the Pupal Case Built by the Bruchid Beetle <i>Bruchidius dorsalis</i> Inside the Seed of <i>Gleditsia japonica</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry & Biodiversity	6. 最初と最後の頁 e1800154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbdv.201800154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Misato, Nakamura Fumiya, Taguchi Emi, Nakata Maho, Wada Fumi, Takihi Momoka, Inoue Tomoyo, Ohta Shinji, Kawachi Hiroyuki	4. 巻 446
2. 論文標題 4',6-Dimethoxyisoflavone-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside (wistin) is a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR $\alpha$ ) agonist in mouse hepatocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 35 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-018-3270-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hegazy Mohamed-Elamir F., Hamed Ahmed R., El-Halawany Ali M., Hussien Taha A., Abdelfatah Sara, Ohta Shinji, Pare Paul W., Abdel-Sattar Essam, Efferth Thomas	4. 巻 130
2. 論文標題 Cytotoxicity of abietane diterpenoids from <i>Salvia multicaulis</i> towards multidrug-resistant cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fitoterapia	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fitote.2018.08.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Akihara Yui, Kamikawa Sayuri, Harauchi Yui, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Ohta Shinji	4. 巻 156
2. 論文標題 Hydroxylated furanoditerpenoids from pupal cases produced by the bruchid beetle <i>Sulcobruchus sauteri</i> inside the seeds of <i>Caesalpinia decapetala</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 151 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.phytochem.2018.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akihara Yui, Kamikawa Sayuri, Harauchi Yui, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Ohta Shinji	4. 巻 21
2. 論文標題 HPLC profiles and spectroscopic data of cassane-type furanoditerpenoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1088
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2018.10.068	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mohamed Tarik A., Elshamy Abdelsamed I., Ibrahim Mahmoud A. A., Zellagui Ammar, Moustafa Mahmoud F., Abdelrahman Alaa H. M., Ohta Shinji, Pare Paul W., Hegazy Mohamed-Elamir F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Carotane sesquiterpenes from <i>Ferula vesceritensis</i> : in silico analysis as SARS-CoV-2 binding inhibitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 34541 ~ 34548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ra06901a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohta Shinji, Oshimo Shiori, Ohta Emi, Nehira Tatsuo, Omura Hisashi, Uy Mylene M., Ishihara Yasuhiro	4. 巻 83
2. 論文標題 Asaroidoxazines from the Roots of <i>Asarum asaroides</i> Induce Apoptosis in Human Neuroblastoma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 3050 ~ 3057
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.0c00574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Felmer S. Latayada, Mylene M. Uy, Emi Ohta, Shinji Ohta
2. 発表標題 Four new oligorhamnosylferulate esters isolated from leaves of Ficus nota
3. 学会等名 1st International Conference in Science and Mathematics (ICSM 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田 愛実、太田 恵美、根平 達夫、大村 尚、太田 伸二
2. 発表標題 ジャノヒゲ種子に含まれる新規長鎖アナカルジン酸誘導体類の構造と生理活性
3. 学会等名 第63回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇山優理、原内 優衣、太田 恵美、根平 達夫、大村 尚、河内浩行、今村(陣田)綾、太田 伸二
2. 発表標題 マメゾウムシ蛹室由来の新規硫酸化プリンアルカロイド類の構造と生理活性
3. 学会等名 第63回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chona Gelani, Mylene Uy, Shinji Ohta, Emi Ohta
2. 発表標題 Anticancer property of 3-keto-20,22-dimethyl-20-deoxoscalarin isolated from Philippine marine sponge
3. 学会等名 The 99th CSJ Annual Meeting
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋原由依、紙川 小百合、原内 優衣、太田 恵美、根平 達夫、大村 尚、太田 伸二
2. 発表標題 ジャケツイバラ種子内に寄生するザウテルマメゾウムシの代謝成分
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原内 優衣、太田 恵美、村中 恭、河内浩行、今村(陣田)綾、根平 達夫、大村 尚、太田 伸二
2. 発表標題 サイカチマメゾウムシにより位置選択的に硫酸化されたプレニル化プリンアルカロイド配糖体類
3. 学会等名 第62回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
エジプト	National Research Centre			
フィリピン	MSU-Iligan Institute of Technology			