

機関番号：37107

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19310042

研究課題名（和文）海綿由来の抗菌活性物質の探索および感染症治療薬リード化合物の創製

研究課題名（英文） Research of antibacterial chemicals in marine sponge and development of lead compounds for therapy in infectious diseases

研究代表者

原口 浩一（HARAGUCHI KOICHI）

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00258500

研究成果の概要（和文）：

パラオ産海綿(*Lamellodysidea* sp.)から抗菌活性を有するフェノール性臭素化合物を探索した。APCI-LC/MS/MS および ECNI-GC/MS により種々の臭素化ジフェニルエーテル骨格を有する抗菌成分を単離し、その化学構造を明らかにした。抽出分画および化学合成した成分の抗菌スペクトルならびに 9 種の細菌に対する最小発育阻止濃度(MIC)を求めた結果、tetrabromocatechol, 2,2'-dihydroxy-BB80 および 2'-hydroxy-6-methoxy-BDE68 がいずれも腸球菌、黄色ブドウ球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌などに対し低濃度で増殖抑制作用を示した。これらは抗菌薬のリード化合物として期待される。

研究成果の概要（英文）：

We developed the APCI-LC/MS/MS and ECNI-GC/MS methods for screening of antibacterial brominated products in marine sponges (e.g. *Lamellodysidea* sp.) from Palau, Micronesia. Broad antibacterial spectra of phenolic products such as tetrabromocatechol, 2,2'-dihydroxy-BB80 and 2'-hydroxy-6-methoxy-BDE68 were observed and these products showed growth inhibitory effects against *E. Faecalis*, *E. Faecius*, *S. aureus*, MRSA and *S. pyogenes*. These components are expected for lead compounds of antibacterial agents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
20年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
21年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：海綿、臭素化合物、抗菌活性、リード化合物、創薬

1. 研究開始当初の背景

環境中には、天然物由来の薬理活性を有する成分が数多く存在し、それらを利用し

た創薬研究がさかんに行われている。そのうち、海綿動物や海藻から抗菌活性を有するフェノール性ハロゲン化合物は医薬品素材開発の基盤となっている。最近の調査

では、海綿動物から抽出された成分のなかには、脂溶性の高いハロゲン化合物があり、それらは海洋微生物から産出され、食物連鎖を通じて高等生物へ生物濃縮されるものも報告されている。

我々は、ビフェニル骨格(PBB)やジフェニルエーテル骨格(PBDE)を有する臭素系フェノール化合物が天然に存在すること、これらは海綿などに共生する微生物による二次代謝産物であることに着目し、それらの化合物群の抗菌性物質を単離し、創薬研究の手がかりになると考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究は、生体残留性臭素化合物群およびパラオ産海綿動物から単離される臭素含有成分の抗菌活性試験を通じて、抗菌活性成分の同定および強力な抗菌作用を有するリード化合物を探索し、構造活性相関に基づくリード化合物の最適化を行うことで抗菌薬への応用するための基盤を形成する。そのため、抗菌性臭素化合物について、(1) 環境動態を調べる(2) ヒト試料(母乳および血液)中の分布状態を把握する。(3) 海綿から単離抽出成分の抗菌試験、特にパラオ産海綿を素材として抽出画分の抗菌スクリーニングを行い、抗菌成分の化学構造決定を行う。(4) 天然化合物群の抗菌活性(グラム陽性菌、グラム陰性菌および嫌気性菌)を測定し、抗菌スペクトルの作成および抗菌活性のランダムスクリーニングを行う。(5) 海綿の単離成分中から抗菌薬候補を選定し、構造活性相関データよりリード化合物を選定し、ドラッグデザインによる最適化を行い、抗菌薬および感染症治療薬開発の基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 海洋生物に残留する天然臭素化合物の定性、定量

2007年沖縄石垣島で駆除されたイタチザメ(n=42)、ツマジロ(n=8)、メジロザメ(n=1)およびオオメジロザメ(n=1)の肝臓(合計n=52)について、残留性の高い6-MeO-BDE47、2'-MeO-BDE68、2,2'-diMeO-BB80、およびそのフェノール体、Br₄Cl₂-DBP、Cl₇-MBPなどの天然残留成分をGC/MS(SIM mode)で定量した。前処理としては、抽出脂肪に内標準を加えた

後、GPCにより脂肪を除去した。天然臭素成分を含むPCB分画をシリカゲルカラムで精製し、GC/MS(EI)で分析した。さらに簡便な分析法として、ECNI-SIM(m/z 79)を用いるスクリーニング法を開発した。

(2) ヒト由来試料および海産物中 PBDE 関連物質の定性、定量。

母乳は日本人(65検体)は2004年に4地域から提供されたうち、京都大学ヒト試料バンクに保管されているものを用いた。

日本人血清(pooled 20 sample)は30-70歳の女性から供与されたプール血清を用いた。

日本国内海産物食品では、本マグロ(脂肪含量10%以上)魚介類の可食部10-20g中の脂肪分をヘキサン・アセトン混合液で抽出した。抽出脂肪量10-100mgに一定量の内標準を添加し、GPC(Bio Beads S-X3)で脱脂し、さらにシリカゲルカラムで精製した。天然脂溶性残留成分をGC/EI-MSおよびGC/ECNI-MSイオン検出で定性、定量した。

(3) パラオ産海綿の抗菌成分分析

Lamellodysidea sp.をMeOHに浸した抽出液に1M-KOHを加えて、ヘキサンで分配抽出した。GC/MS(EIモード)でマススペクトルを測定した。一方、KOH/MeOH溶液に1M-HClを加えて酸性とし、n-hexane:diethylether(9:1)で分配抽出した。この液にジアゾメタン(エーテル溶液)数滴を加え、よく振りまぜ、30分後にマススペクトルを測定した。

OH-PBDEについてはMeO-PBDEと分離後GC/MS-ECNI法で定性、定量できた。dihydroxy-PBDE(diOH-PBDE)およびhydroxy-methoxy-PBDE(OH-MeO-PBDE)についてはAPCI-LC/MS/MSによる分析のMRMによる最適化—微量分析法を確立した。

パラオ産海綿約40種のECNI法によるスクリーニングによって抗菌成分含量の多い*Lamellodysidea* sp., *Callyspongia* sp. および*Haliclona* sp.について成分分析を行った。

(4) 海綿中の生産菌の探索

海綿を無菌下小片とし、marine agar培地に播種して25°C・48時間培養し、コロニーを得た。得られたコロニーについて、常法により、細胞溶解液を調製してDNAを抽出し、PCR法により目的とする配列を増幅・精製した。得られたDNAについてダイレクトシーケンシングを行った。結果について、DNAデータバンクよりホモロジー検索と系統分類を行った。

(5) 抗菌スペクトルおよび抗菌活性試験

bromocatechol, 2,2'-dihydroxy-3,3',5,5'-tetrabromobiphenyl (2,2'-diMeO-BB80), 2',6-dihydroxy-2,3',4,5'-tetrabromobiphenyl (2',6-diOH-BDE68)およびそれらのMeO体(合計16種)を化学合成し、これらをDMSOに溶解し、液体培地希釈法により、大腸菌 (*Escherichia coli*)、サルモネラ属菌 (*Salmonella enteritidis*)、腸球菌 (*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)、化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 及び緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の増殖抑制効果を調べた。抗菌スペクトルは、Mac Farland 法に準じて測定し、希釈した菌液にフェノール性臭素化合物を加え、37°Cで18~24時間培養後、660 nmにおける吸光度を測定することにより、最小発育阻止濃度 (MIC)で評価した。

4. 研究成果

(1) 海洋生物中の抗菌性臭素化合物の定性・定量

サメ肝臓の酸性分画に、抗菌性OH-PBDE およびdiOH-PBBがイタチザメの場合、0.8 ng/g lipid、オオメジロザメの場合、6.2~8.4 ng/g lipid 含まれていた。

サメ肝臓の中性分画には6-MeO-BDE47がBDE47より2-15倍高濃度で残留し、サメ体長および体重と有意に相関した ($p < 0.05$)。2,2'-diMeO-BB80が最大2300 ng/g lipidで検出された。6-MeO-BDE47はBDE-47との相関性が高かったが、2'-MeO-BDE68 および2,2'-diMeO-BB80との相関性は低く、起源の異なる食物連鎖機構が示唆された。ツマジロ肝臓では2'-MeO-BDE68が高濃度を示した。

座礁カズハゴンドウ (房総半島) およびシャチ (知床半島) の組織には、MeO-PBDEがPBDEより高濃度で残留していた。

(2) ヒト由来試料中のOH-PBDEおよびMeO-PBDE

日本人母乳中のPBDE関連物質の定性、定量分析を行った。日本人母乳60試料すべてから、PBDEsと同レベルのMeO-PBDEが2種、diMeO-PBBが1種、Br₄Cl₂-diMe-bipyrroleおよびCl₇-methyl-bipyrroleがPBDEと同濃度で検出された。

日本人血清中には、OH-PBDEおよびMeO-PBDEが検出され、主成分は6-OH-

BDE47, 2'-OH-BDE68および2,2'-diOH-B80であった。海産物(海藻)にOH-PBDEおよびMeO-PBDEが検出されているため、ヒトの血液に残留するOH-PBDEおよびMeO-PBDEは、食事(海藻類)に由来すると考えられる。

(3) APCI-LC/MS/MSによるOH-PBDEおよびMeO-PBDEの同時分析法

① 環境中のOH-PBDEおよびMeO-PBDEを分画することなく一斉に高感度で定量するためのAPCI-MRM-LC/MS/MSを開発した。OH-PBDEは[M-H]⁻→Br-をMeO-PBDEは[M-Br+O]⁻→Br-を用いて、MRMの最適化を図り、GC/MSと同様の感度で測定することが可能となった。

② 海綿中に存在するdiOH-PBDEsおよびOH-MeO-PBDEsを分別定量するためのMRM最適化条件を設定した。APCIイオン化LC/MS/MSにより、パラオ産の*Lamellodysidea* sp. はdiOH-pentaBDEおよびdiOH-hexaBDEが主成分であるが、*Callyspongia* sp.はOH-MeO-hexaBDEの組成からなることがわかった。さらにこの種にはOH-tetrabromo-dibenzo-p-dioxinが存在した。

(4) 海綿抽出物中のプロモフェノール類

パラオ産海綿 (*Callyspongia* sp.) からプロモフェノールの他に、カテコール、グアヤコールおよびベラトロールの臭素化体を検出し、臭素化カテコールではtroclocosanと類似の抗菌活性が認められた。フィリピン産紅藻 (*Halimena durvillaei*) から、臭素化ヒドロキノンおよびそのmethoxy体が検出された。臭素化ヒドロキノンより臭素カテコールの方がより強い抗菌作用を示したが、methoxy体はいずれも抗菌作用を示さなかった。

海綿のHPLCで得たdihydroxy-PBDEsを含む分画はtriclocosanと同様の抗菌スペクトルを示した。

海綿(*Haliclona* sp.)のneutral fractionには、2'-MeO-BDE68, 6-MeO-BDE47 および2,2'-diMeO-BB80が合計約50 ppm含まれていた。さらにMeO-triBDEが4種(合計で10ppm)が含まれていた。phenol fractionには、diOH-PBDEs数種が6 ppm程度で存在した。この組成はパラオから日本近海の魚介類で検出される成分組成と一致し、海産物中のPBDE関連物質は海綿由来であると推察された。海綿(*Lamellodysidea* sp.)では2',6-diMeO-BDE68のほか、dihydroxy-PBDEsおよびhydroxy-methoxy-PBDEs体が主成分であり、海綿の乾重量あたり4-6%を占めた。このほ

か、brominated veratrole 関連物質が 0.2-1%の含量で検出された。

(5) OH-PBDE生産菌の探索

パラオ産海綿12種を用いて、海綿に生存する細菌のスクリーニングを行った。Marine agar培地で培養して得た26個のコロニーからDNA抽出、PCR法により目的とする配列を増幅した。精製したDNAのダイレクトシーケンシングから16S rRNA解析による細菌を分類し、bromoperoxidaseをコードする配列を調べた結果、*gamma proteobacterium*などが系統分類された。本研究からOH-PBDEなど臭素系ハロゲン化合物の産生菌の手がかりを得るにはさらなる海綿のスクリーニングが必要である。

(6) 各種化合物の細菌増殖抑制効果

パラオ産海綿(*Lamellodysidea* sp)からフェノール性臭素化合物を単離し、2,2'-diOH-BB80 および 2'-OH-6-MeO-BDE68 など 16 異性体を合成し、9種の細菌の増殖抑制効果を調べた。

Tetrabromocatechol は、腸球菌 (*E. faecalis*, *E. faecium*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対し増殖阻害作用を示した。

2,2'-diOH-BB80 は、腸球菌 (*E. faecalis*, *E. faecium*)、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 及び化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) に対して、増殖阻害作用を示した。

2'-OH-6-MeO-BDE68は、腸球菌よりも黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、化膿レンサ球菌 (*S. pyogenes*) に対して、低濃度で増殖阻害作用を示した。

臭素化guaiacolおよび臭素化veratrole については菌の増殖阻害作用は弱かった。

この結果、以下の臭素化フェノール類が抗菌薬のリード化合物として有用性が高いことが示唆された。



(7) 総括

海綿(*Lamellodysidea* sp.)の有機溶媒抽出物の酸性分画には0.1-0.3%のOH-PBDEsを含有し、それらはいずれも MRSA などのグラム陽

性菌に抑制効果を示すことが分かった。このため、海綿の抗菌成分のスクリーニングを行い、*Callyspongia* sp.や *Haliclona* sp.に新規抗菌成分候補が数多く存在することを明らかにした。これらは海綿だけでなく海藻などの海産物にも検出され、ヒト血液中の OH-PBDEの起源と考えられ、天然抗菌剤としての応用が期待される。それらの構造のうち、tetrabromocatechol, 2,2'-diOH-BB80 および 2'-OH-6-MeO-BDE68 は *S. aureus* などのグラム陽性球菌などに増殖抑制効果を示すことから、これらをリード化合物として化学修飾することで抗菌薬開発につながることを期待される。

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9件)

(1) Kato Y, Okada S, Atobe K, Endo T, Matsubara F, Oguma T, and Haraguchi K. Simultaneous determination by APCI-LC/MS/MS of hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers found in marine biota. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 5942-5948. 査読有

(2) Kato Y, Haraguchi K, Kubota M, Seto S, Ikushiro S, Sakaki T, Koga N, Yamada S, and Degawa M. 4-Hydroxy-2,2',3,4',5,5',6-heptachlorobiphenyl-mediated decrease in serum thyroxine level in mice occurs through increase in accumulation of thyroxine in the liver. *Drug Metab. Dispos.* 2009, 37, 2095-2102. 査読有

(3) Haraguchi K, Hisamichi Y, Kotaki Y, Kato Y, and Endo T. Halogenated bipyrroles and methoxylated tetrabromodiphenyl ethers in tiger shark (*Galeocerdo cuvier*) from the southern coast of Japan. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 2288-2294. 査読有

(4) Haraguchi K, Kato Y, Atobe K, Okada S, Endo T, Matsubara F, and Oguma T. Negative APCI-LC/MS/MS method for determination of natural persistent halogenated products in marine biota. *Analytical Chemistry*, 2008, 80, 9748-9755. 査読有

(5) Koga N, Matsuo M, Ohta C, Haraguchi K, Matsuoka M, Kato Y, Ishii T, Yano M, and Ohta H. Comparative study on nobiletin metabolism with liver microsomes from rats, guinea pigs and

hamsters and rat cytochrome P450. Biol. Pharm. Bull. 2007, 30, 2317-2323. 査読有

(6) Haraguchi K, Hisamichi Y, Nishimura E, and Endo T. Natural persistent organohalogens in breast milk from Japan. *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 1705-1708. 査読有

(7) Hisamichi Y, Endo T, Nishimura E, and Haraguchi K. Natural and anthropogenic POPs in bluefin tuna from Japanese market. *Organohalogen Compounds*, 2007, 69, 1709-1712. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

(1) 岡田将平、加藤善久、跡部一孝、松原大、遠藤哲也、尾熊隆嘉、原口浩一、APCI-LC/MS/MSによる天然のポリ臭化ジフェニルエーテル関連化合物の探索：海綿抽出物から創薬への応用をめざして、第 48 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2009 年 11 月、徳島

(2) 松原大、加藤善久、尾熊隆嘉、小瀧裕一、遠藤哲也、太田千穂、古賀信幸、原口浩一、海綿由来フェノール性臭素化合物の細菌増殖抑制効果：抗菌薬の開発をめざして、フォーラム 2009：衛生薬学・環境トキシコロジー、2009 年 11 月、沖縄

(3) 松原大、大坪仁子、平川裕子、立石大樹、吉浜麻生、剣持直哉、加藤善久、遠藤哲也、原口浩一、海綿に生息する細菌の 16S rRNA 遺伝子解析による系統分類、日本薬学会第 128 年会、2009 年 3 月、京都

(4) 加藤善久、岡田将平、跡部一孝、松原大、遠藤哲也、尾熊隆嘉、原口浩一、APCI-LC/MS/MSによる天然ハロゲン化合物の定量：海洋哺乳動物における蓄積特性、環境ホルモン学会第 11 回研究発表会、2008 年 12 月、東京

(5) 久道洋輔、遠藤哲也、加藤善久、太田千穂、古賀信幸、原口浩一、GC/MS-EI/SIMによる天然ハロゲン化合物の定量：サメにおける蓄積特性、フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー、2008 年 10 月、熊本

(6) 原口浩一、西村恵理、久道洋輔、遠藤哲也、太田千穂、古賀信幸、加藤善久、母乳中に残留する天然有機ハロゲン化合物の環

境起源調査、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.daiichi-cps.ac.jp/kenkyu>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原口 浩一 (HARAGUCHI KOICHI)

第一薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00258500

(2) 研究分担者

加藤 善久 (KATO YOSHIHISA)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：90161132

松原 大 (MATSUBARA FUTOSHI)

第一薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60368975

尾熊 隆嘉 (OGUMA TAKATOSHI)

徳島文理大学・香川薬学部・教授

研究者番号：20446074

(H20 → H21 連携研究者)

西村 恵理 (NISHIMURA ERI)

第一薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：80412550

(H20 → H21 連携研究者)