

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710193

研究課題名(和文) 複合的な作用による抗腫瘍活性物質の探索

研究課題名(英文) Isolation and structure of novel antitumor compounds using a novel bioassay

研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA TOSHIAKI)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：90375428

研究成果の概要：沖縄県で採集したリングピア属のシアノバクテリアの抽出物について腫瘍細胞増殖阻害活性を指標として生理活性物質の探索を行った結果、HeLa S<sub>3</sub> 腫瘍細胞に対して強い細胞増殖阻害活性を示す新規マクロライド配糖体、ピセリングピアサイド (IC<sub>50</sub>=0.10 µg/mL) を単離し、各種スペクトル解析により平面構造を決定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	210,000	3,410,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：シアノバクテリア、ピセリングピアサイド

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日本の死因第一位は癌であり、優れた抗癌剤の出現が求められている。海洋生物は新しい生理活性物質の宝庫として考えられており、抗癌剤を海洋天然物に求める研究も活発に行なわれている。最近海洋生物由来の抗癌剤候補などがいくつか現れ、有用物質素材として注目されている。しかし、これらの物質はいずれも微量成分であり、絶対立体化学も含めた構造が決定されている物質は少なく、また化学合成された例も少ない。そのため学術的にも、医薬品としての応用面からも有意義な物質であっても、さらに生物有機化学的研究を推進することはできず、またこれらの物質の活性発現機構に関する研究はほとんど進んでいない。このような背景か

ら海洋生物由来の抗癌剤、およびそのリード化合物の探索、活性発現機構の解明が重要だと考えた。

我々は抽出材料として海洋産シアノバクテリアに注目し、抗癌剤およびそのリード化合物の探索を行っている。これまでにカイメンやホヤからは多くの抗腫瘍活性を有する化合物が単離されているが、シアノバクテリア由来であると推定されているものも多い。またシアノバクテリアには約 1500 の機能未知遺伝子があり、塩濃度や水温の変化により遺伝子発現が変化するため、シアノバクテリアに含まれる生理活性物質は環境により異なる可能性がある。これまでに同じ地点で同種のシアノバクテリアを定期的に採集し、含まれる有機物質を調べたところ、季節により

含まれる物質や含有量が異なることを確認した。以上の理由からシアノバクテリアは、これまでに報告されていない機能性有機低分子の探索に適した素材だと考えられる。しかしシアノバクテリアは他のカイメン、ホヤ、軟体動物、サンゴ類に比べて量的供給が難しく、純粋培養の確立が他の微生物と比較して困難である。そのためシアノバクテリアに含まれる生理活性物質に関する報告例は他の海洋生物に比べて圧倒的に少ない。我々は量的供給可能なシアノバクテリアを得るため、三重県や沖縄県の干潟、浅瀬の海岸を調査した。その結果これまでに数キログラム単位で採集可能なシアノバクテリアを十数種類得ることができた。

## 2. 研究の目的

これまでに採集したシアノバクテリアの粗抽出物について腫瘍細胞(HeLa S<sub>3</sub>)の増殖阻害活性を調べたところ、7種類の粗抽出物に顕著な腫瘍細胞増殖阻害活性を確認した。その中でも沖縄県で採集したリングピア属のシアノバクテリアの粗抽出物が強い腫瘍細胞増殖阻害活性を示すことが明らかとなった。そこでこのシアノバクテリアに含まれる活性物質の単離、構造決定を行うこととした。

## 3. 研究の方法

シアノバクテリア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し、得られた水層をさらに *n*-ブタノールで分配する。得られた画分は HeLa S<sub>3</sub> 腫瘍細胞を用いた腫瘍細胞増殖阻害活性試験を指標として、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により分離、精製を行う。単離し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により化学構造を決定する。

## 4. 研究成果

### (1) ピセリングピアサイド1の単離

沖縄県で採集したリングピア属のシアノバクテリア 1.0 kg を 3 L のメタノールで抽出した。抽出液をろ過、濃縮し、得られた粗抽出物を酢酸エチルと水で分配した。得られた水層を *n*-ブタノールで抽出し、酢酸エチル層を 90%メタノールとヘキサンで分配した。これら4つのフラクションについて HeLa S<sub>3</sub> 腫瘍細胞を用いて細胞増殖阻害活性を評価したところ 90%メタノール層に活性が濃縮されていることが明らかになった。90%メタノール層について、活性試験を指標として ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィーによる分離・精製を進めた結果、腫瘍細胞増殖阻害活性物質としてピセリングピアサイド1を単離した(図1)。この化合物は HeLa S<sub>3</sub> 腫瘍細胞に対して細胞増殖阻害活性(IC<sub>50</sub>=0.1 μg/ml)を

示した。

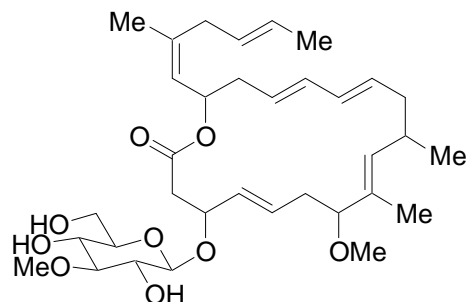


図1 ピセリングピアサイド1

### (2) ピセリングピアサイド1の構造決定

新規マクロライド配糖体1は無色油状物として得られ、分子式はESI マススペクトル ( $m/z$  627.3487, calcd for C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup> 627.3509) より C<sub>34</sub>H<sub>52</sub>O<sub>9</sub> であることが判明した。また Dragendorff 試薬および ninhydrin 試薬に対して呈色しなかった。ピセリングピアサイド1の構造については主として NMR スペクトルの解析をもとに行った。まず <sup>1</sup>H NMR について考察する。1.02 ppm にメチン炭素に結合すると考えられるメチル基が観測された。1.55 ppm, 1.64 ppm, 1.67 ppm にオレフィンに結合するメチル基と考えられる二重線のシグナルが一つ、一重線のシグナルが二つ観測された。また 3.15 ppm, 3.62 ppm にメトキシ基と考えられる一重線のシグナルが二つ観測された。1.90 ppm から 2.90 ppm にかけてメチンまたはメチレンと考えられるシグナルが観測された。また 3.05 ppm から 4.50 ppm にかけて酸素原子を持つ炭素原子に結合するメチンまたはメチレンプロトンが観測された。さらに 5.10 ppm から 6.02 ppm 付近にオレフィンまたは共役オレフィンと考えられるプロトンが観測された。次に <sup>13</sup>C NMR について考察する。172.1 ppm にエステルに対応するシグナルが観測され、100.9 ppm にアセタール炭素由来のシグナルが観測された。さらに 124.9 ppm から 140.1 ppm にかけて二重結合に対応すると考えられるシグナルが12本観測された。さらに 10.8 ppm から 89.0 ppm にかけて 21本のシグナルが観測された。これらの結果に加えて COSY スペクトルを詳細に解析した結果、4つの部分構造 C2-C7, C9-C18, C20-C23, C1'-C6' (図2) が明らかとなった。さらに HMBC スペクトルにおいて H2/C1, H25/C7, H25/C8, H25/C9, H27/C18, H27/C19, H27/C20, H1'/C3 の相関が観測されたことから、これら4つの部分構造のつながりが明らかとなった。さらに H17/C1 の相関が観測されたことから、C17位はエステル結合を介して C1位と連結していることが明らかとなった。以上の結果から新規マクロライド配糖体1の平面構造を決定した(図2)。

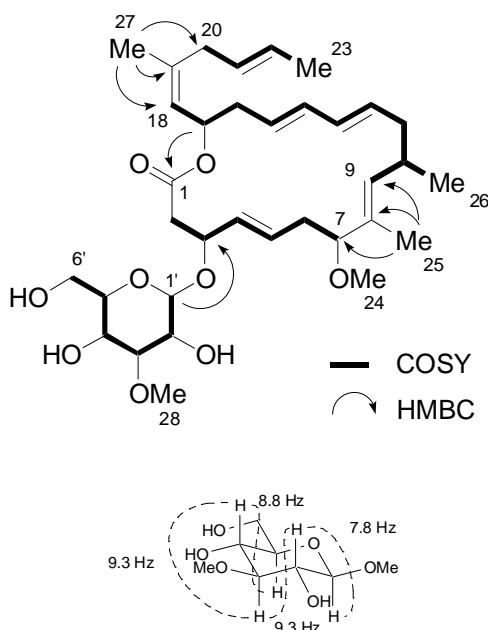


図2 ビセリングピアサイド1の構造決定

オレフィン部分の立体配置は、オレフィンに隣接するメチレンあるいはメチル基(6位, 11位, 16位, 20位, 23位, 25位, 27位)の炭素の化学シフト値に基づいて決定した<sup>1)</sup>。すなわち, C25位のメチル基の化学シフト値が10.2 ppmと通常のメチル基よりも高磁場に観測されたことから8*E*であると決定した。一方, C27位のメチル基は23.6 ppmと通常のメチル基よりも低磁場に現れていることから18*Z*であると決定した。その他のオレフィンに関しては, C6, C11, 16, 20位のメチレン炭素の化学シフト値がそれぞれ, 36.8, 41.5, 39.6, 36.6 ppmと通常のメチレン炭素より低磁場に観測されていることから, それぞれ4*E*, 8*E*, 12*E*, 14*E*, 18*Z*, 21*E*であると決定した。また糖部分に関しては H2'・H6'の結合定数がそれぞれ  $^3J_{H_2', H_6'} = 9.3$  Hz,  $^3J_{H_3', H_4'} = 9.3$  Hz,  $^3J_{H_4', H_5'} = 8.8$  Hz であることから, グルコースの誘導体であることが明らかとなった(図2)。また H1'・H2'の結合定数が  $^3J_{H_1', H_2'} = 7.8$  Hz であることから, アノマー炭素(C1'位)はβ配置であることが明らかとなった。

今後は各種分解反応により分解反応, 誘導反応を行い絶対立体配置の決定を目指す。

#### 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5件)

1. Synthetic Studies of Mangostin Derivatives with an Inhibitory Activity on PDGF-Induced Human Aortic Smooth Cells Proliferation  
Nishihama, Y.; Ogamino, T.; Shi, W. L.; Cha, Byung-Yoon.; Yonezawa, T.; Teruya, T.; Nagai, K.; Suenaga, K.; Woo, Je-Tae.; Nishiyama, S. *Heterocycles*, **2009**, 77, 759-765.  
査読有
2. Allelopathy and the allelopathic activity of a phenylpropanol from cucumber plants  
Thi, H. L.; Teruya, T.; Suenaga, K.; Chin, D. V.; Kato-Noguchi, H. *Plant Growth Regul.* **2008**, 56, 1-5.  
査読有
3. Hexamollamide, a hexapeptide from an Okinawan ascidian *Didemnum molle*.  
Teruya, T.; Sasaki, H.; Suenaga, K. *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 5297-5299.  
査読有
4. An unusual iodinated 5'-deoxyxylofuranosyl nucleoside from an Okinawan ascidian, *Diplosoma* sp.  
Margiastuti, P.; Ogi, T.; Teruya, T.; Taira, J.; Suenaga, K.; Ueda, K. *Chem. Lett.* **2008**, 37, 448-449.  
査読有
5. 20-N-Methylpurpuramine E, New Bromotyrosine-derived Metabolite from Okinawan Marine Sponge *Pseudoceratina purpurea*  
Teruya, T.; Iwasaki, A.; Suenaga, K. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2008**, 81, 1026-1027.  
査読有

[学会発表](計8件)

1. タイトル 抗菌性デプシペプチド Miuraenamides A の合成研究  
発表者 徳住啓太, 鳥居原英輔, 照屋俊明, 末永聖武  
掲載誌 化学と工業 Vol.62-3. p.403, 2009.  
学会名 日本化学会第89春季年会, 29, Mar. 2009(千葉)
2. タイトル 海洋産細胞毒性環状デプシペプチド Palau'amides の合成研究  
発表者 杉山 弘和, 照屋俊明, 末永聖武  
掲載誌 化学と工業 Vol.62-3. p.403, 2009.  
学会名 日本化学会第89春季年会, 29, Mar. 2009(千葉)

- 3 タイトル アクチン脱重合活性物質レイジスポンジオリドAの合成研究  
 発表者 秋山聡志, 鳥居原英輔, 照屋俊明, 末永聖武  
 掲載誌 化学と工業 Vol.62-3 . p.397, 2009.  
 学会名 日本化学会第 89 春季年会, 28, Mar. 2009 (千葉)
- 4 タイトル 沖縄産シアノバクテリア由来の新規マクロライド配糖体の単離と構造  
 発表者 佐々木宏明, 照屋俊明, 末永聖武  
 掲載誌 化学と工業 Vol.62-3 . p.402, 2009.  
 学会名 日本化学会第 89 春季年会, 28, Mar. 2009 (千葉)
- 5 タイトル 沖縄産シアノバクテリア由来の新規マクロライド配糖体の絶対立体構造  
 発表者 佐々木宏明, 北村和大, 照屋俊明, 末永聖武  
 掲載誌 化学と工業 Vol.62-3 . p.402, 2009.  
 学会名 日本化学会第 89 春季年会, 28, Mar. 2009 (千葉)
- 6 タイトル 沖縄県産ホヤ由来の新規リゲナン骨格を有する生物活性物質の合成研究  
 発表者 大久保哲史, 岩崎有紘, 照屋俊明, 末永聖武  
 掲載誌 化学と工業 Vol.62-3 . p.403, 2009.  
 学会名 日本化学会第 89 春季年会, 28, Mar. 2009 (千葉)
- 7 タイトル 天然物を模倣した C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 化合物の合成研究  
 発表者 渡辺浩太郎, 石川裕一, 照屋俊明, 末永聖武, 禹濟泰, 西山繁  
 掲載誌 化学と工業 Vol.62-3 . p.398, 2009.  
 学会名 日本化学会第 89 春季年会, 28, Mar. 2009 (千葉)
- 8 タイトル 未同定沖縄産シアノバクテリアから単離した新規マクロライド配糖体の構造と生物活性  
 発表者 佐々木宏明, 照屋俊明, 末永聖武  
 掲載誌 第 50 回天然有機化合物討論会講演要旨集 . p.355-360, 2008.  
 学会名 第 50 回天然有機化合物討論会, 30, Sep. 2008 (福岡)

〔図書〕(計 2 件)

- 1 著者 末永聖武, 照屋俊明  
 タイトル サンゴの生態化学  
 掲載誌 天然物化学 - 海洋生物編 - (2008), pp. 45-51.
- 2 著者 照屋俊明, 禹濟泰  
 タイトル 骨吸収抑制剤の探索  
 掲載誌 新規素材探索 - 医薬品リード化合物・食素材を求めて - (2008), pp. 185-192.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

照屋 俊明 (TERUYA TOSHIAKI)  
 慶應義塾大学・理工学部・助教  
 研究者番号: 90375428

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし