

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20611006

研究課題名（和文） 共生微細藻類の生産する長鎖ポリオール化合物の共生現象における役割の解明

研究課題名（英文） Roles of long chain polyol compounds in symbiotic functions of microalgae

研究代表者

大野 修 (OHNO OSAMU)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号：20436992

研究成果の概要（和文）：海洋生物の共生藻由来の長鎖ポリオール化合物の自然界における役割・機能・存在意義はほとんど解明されていない。本研究では新たな長鎖ポリオール化合物の探索を基盤とした研究を実施し、それらの生物活性の測定と生体内局在の解析を通じ、生物学的機能と共生現象における役割の解明を目的とした研究を行った。その結果、シンビオスピロール類を始めとして複数の新たな長鎖ポリオール化合物を単離、構造決定し、それらが有する特有の生物活性を見出した。さらに、シンビオスピロール類の構造活性相関についての知見を得て作製したポリクローナル抗体を活用して、生産渦鞭毛藻における局在解析を試みた。

研究成果の概要（英文）：While long chain polyol compounds have been reported to show various biological activities, their biological functions and roles in symbioses have not been thoroughly investigated. In this project, we aimed to obtain novel long chain polyol compounds from symbiotic microalgae and to understand their structures and functions in symbiotic relationships. As a result, we succeeded to find several novel long chain polyol compounds, such as symbiospirols, and their unique characteristics were identified. We prepared polyclonal anti-bodies against symbiospirol A and tried to detect its localization in the producer organisms by microscopic analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物有機化学、生物活性天然物、ポリオール

1. 研究開始当初の背景

海洋生物由来の二次代謝産物には特異な

構造や活性を持つものが多く知られている。
その真の生産者は多くの場合、共生もしくは

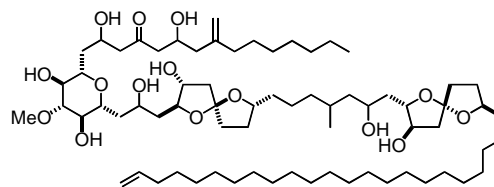
食物連鎖の関係にある微細藻類であり、培養した藻体から様々な化合物が単離されてきた。共生藻類が生産する化合物の中でも特に長鎖ポリオール化合物は構造・機能の両面から興味深い化合物群であると言える。しかし、その生合成や代謝経路、共生系における存在意義はほとんど解明されていない。海洋生物における共生現象の化学的解明は貴重な海洋資源の維持や保全に直結するため重要であり、本分野の研究の進展が望まれてきた。

2. 研究の目的

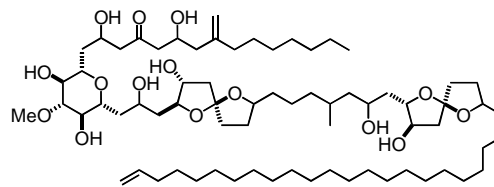
海洋生物の共生藻由来の長鎖ポリオール化合物の自然界における役割・機能・存在意義はほとんど解明されていない。本研究では新たな長鎖ポリオール化合物の探索を基盤とした研究を実施し、これまでに得られている長鎖ポリオール化合物も含め、それらの生物活性の測定と生体内局在の解析を通じ、生物学的機能と共生現象における役割の解明を目的とした研究を試みた。

3. 研究の方法

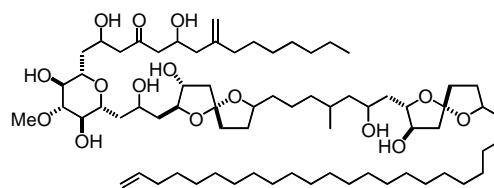
海洋生物の共生藻由来の長鎖ポリオール化合物の共生現象における役割を解析することを目的とし、以下の流れで、共生藻抽出液より単離した長鎖ポリオール化合物の機能について解析を試みた。まず、採集した海洋生物から共生藻を分離し、マススペクトルや NMR、生物活性試験を併用して新規長鎖ポリオール化合物の探索を試みた。続いて、得られた化合物の構造解析と生物活性の評価に取り組み、生物活性発現に必要な構造を調べ活性発現のメカニズムを解析した。さらに、長鎖ポリオール化合物の細胞・組織内の局在の解析を行い、生産藻体内における分布の解析を試みた。これらの実験により新たな長鎖ポリオール化合物の、宿主生物-共生藻間共生現象における役割についての知見を得ることを試みた。



シンビオスピロールA



シンビオスピロールB



シンビオスピロールC

4. 研究成果

主に共生系で生息する藻類が生産する新規二次代謝産物を探索し、その共生系での役割・機能の解明を目指した研究に着手した。

沖縄県産のヒラムシより分離した渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp.より分子量 1,207 の新規長鎖ポリオール化合物シンビオスピロール A、B、C を単離し構造を決定した。シンビオスピロール A について種々の生物活性試験を行い、本化合物がプロテインキナーゼ C (PKC) に対する阻害活性を有することを見出した。同様にシンビオスピロール B、C についても PKC 阻害活性の評価を行い、シンビオスピロール A 及び C が同等の活性を有する一方、シンビオスピロール B は他の類縁体よりも活性が弱いことを見出した。この結果からシンビオスピロール類による PKC 阻害活性に必要な構造と部位を明らかにすることができ、更なる作用機構の解明に役立つ知見を得ることができた。

一方、シンビオスピロール A の生産生物内での局在及び結合分子の解明に向けて有効なプローブになりうる、シンビオスピロール A の末端にカルボキシル基を導入した誘導体

を合成した。また、シンビオスピロール A のポリクローナル抗体を、ウサギを免疫動物として作製し、その抗体価を ELISA 法により確認した。さらに、作製したシンビオスピロール A ポリクローナル抗体を用い蛍光顕微鏡による渦鞭毛藻内での局在解析を行うための条件検討を行い、局在解析に蛍光抗体法を用いることが有効であることを見出した。さらに、本ポリクローナル抗体を用いたシンビオスピロール結合分子の解析の条件検討も試みた。以上のように生産生物内での長鎖ポリオール化合物の生合成部位、機能部位を明らかにするための新たな手法の確立につながる知見を得た。

また、同一の渦鞭毛藻 *Symbiodinium* sp. よりこれまでに得た長鎖ポリオール化合物シンビオジノライドを、分解反応に供することで得られた化合物について溶血活性の評価を行い、シンビオジノライドが示す活性との比較を行い、活性発現に必要な部分構造の推定を行った。また、モルモット回腸を用いた評価を行い、シンビオジノライドが N 型カルシウムチャンネルを標的分子としてチャンネル開口活性を示すことを解明した。本成果により誘導体の機能評価を行う上での新たな評価指標を得ることができた。

また、他にも共生藻類からの新規ポリオール化合物の探索を試み、タコクラゲ共生渦鞭毛藻 *Amphidinium* sp. より単離したポリオール化合物シンビオポリオールの構造を決定し、本化合物が血管内皮細胞における細胞接着分子 VCAM-1 の発現阻害活性と、血球と血管内皮細胞の接着阻害活性を示すことを見出した。また、沖縄県産のアカボシツバメガイの共生渦鞭毛藻 *Durinskia* sp. より新たに長鎖ポリオール化合物デュリンスキオール B を単離しその構造を決定した。また、カイメンに共生する未同定種渦鞭毛藻よりヒドラジド構造を有する新規低分子化合物ディノヒドラジド類を単離した。本化合物は分子量が小

さく長鎖ポリオール化合物の断片を構成する化合物である可能性が示唆されたため、長鎖ポリオール分子の生合成経路及び機能の解明に役立つことが期待される。また、沖縄県糸満市で採集した藍藻 *Leptolyngbya* sp. より新規 22 員環マクロリド配糖体を、微量含まれる 3 種の類縁体とともに単離しその構造を明らかにした。生物活性の解析により本化合物がアクチン脱重合活性及び腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導活性を有することを見出した。本解析結果を踏まえ、アクチン脱重合物質であるアプリロニン A 及びミカロライド B についても同様の評価を試み、腫瘍細胞へのアポトーシス誘導活性を有することを見出し、アクチンとアポトーシスを繋ぐシグナル伝達経路の存在を示唆する知見を得た。

また、新たな生物活性の評価系として抗酸化作用に関連するメラニン生成阻害活性の測定系を構築し、植物サンプルから活性物質の抽出を試みることで本評価系の有用性を確認した。本評価系を共生藻抽出物のサンプルにも応用し生物活性の測定に役立てた。

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 10 件)

- ① Maru, N., Ohno, O., Uemura, D., Lyngbyacyclamides A and B, novel cytotoxic peptides from marine cyanobacteria *Lyngbya* sp. *Tetrahedron Letters*, 51, 6384–6387, 2010 (査読有り)
- ② Hanif, N., Ohno, O., Kitamura, M., Yamada, K., Uemura, D., Symbiopolyol, a VCAM-1 Inhibitor from a Symbiotic Dinoflagellate of the Jellyfish *Mastigias papua*, *Journal of Natural Products*, 73, 1318–1322, 2010 (査読有り)
- ③ Ohno, O., Watabe, T., Nakamura, K.,

- Kawagoshi, M., Uotsu, N., Chiba, T., Yamada, M., Yamaguchi, K., Yamada, K., Miyamoto, K., and Uemura, D., Inhibitory Effects of Bakuchiol, Bavachin and Isobavachalcone Isolated from *Piper longum* on Melanin Production in B16 Mouse Melanoma Cells, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74, 1504-1506, 2010 (査読有り)
- ④ Maru, N., Koyama, T., Ohno, O., Yamada, K., and Uemura, D.: Sunabedine, a Novel Toxic Bromotyrosine-derivative Alkaloid from Okinawan Sponge, Order *Verongida*, *Heterocycles*, 82, 371-375, 2010 (査読有り)
- ⑤ Maru, N., Ohno, O., Yamada, K. and Uemura, D.: Dinohydrazides A and B, Novel Hydrazides from a Symbiotic Marine Dinoflagellate, *Chemistry Letters*, 39, 596-597, 2010 (査読有り)
- ⑥ Kita, M., Ohno, O., Han, C., and Uemura, D.: Bioactive Secondary Metabolites from Symbiotic Marine Dinoflagellates: Symbiodinolide and Durinskiols, *The Chemical Record*, 10, 57-69. 2010 (査読有り)
- ⑦ Maru, N., Ohno, O., Koyama, T., Yamada, K. and Uemura, D.: Papillamide, a Novel Fatty Acid Amide from the Red Alga *Laurencia papillosa*, *Chemistry Letters*, 39, 366-367. 2010 (査読有り)
- ⑧ Kita, M., Black, D. StC., Ohno, O., Yamada, K., Kigoshi, H. and Uemura, D.: Duck-billed Platypus Venom Peptides Induce Ca^{2+} Influx in Neuroblastoma Cells. *Journal of American Chemical Society*, 131, 18038-18039. 2009 (査読有り)
- ⑨ Tsunematsu, Y., Ohno, O., Konishi, K., Yamada, K., Suganuma, M. and Uemura, D.: Symbiospirols: Novel Long Carbon-chain Compounds Isolated from Symbiotic Marine Dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Organic Letters*, 11, 2153-2156. 2009 (査読有り)
- ⑩ Ohno, O., Ye, M., Koyama, T., Yazawa, K., Mura, E., Matsumoto, H., Ichino, T., Yamada, K., Nakamura, K., Ohno, T., Yamaguchi, K., Ishida, J., Fukamizu, A. and Uemura, D.: Inhibitory Effects of Benzyl Benzoate and Its Derivatives on Angiotensin II-Induced Hypertension, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 7843-7852. 2008. (査読有り)
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 丸範人、大野修、山田薫、上村大輔、沖縄産海綿からのブロモチロシン誘導体の単離、日本化学会第 91 春季年会、横浜、2011. 3. 29.
- ② 森田真布、照屋俊明、大野修、末永聖武、海洋シアノバクテリア由来の新規マクロリド配糖体の構造および生物活性、日本化学会第 91 春季年会、横浜、2011. 3. 27.
- ③ Ohno, O., Watabe, T., Nakamura, K., Kawagoshi, M., Uotsu, N., Chiba, T., Yamada, M., Yamaguchi, K., Yamada, K., Uemura, D.: Inhibitory effects of prenylated phenolic compounds isolated from *Piper longum* on melanin biosynthesis in B16 cells, Pacificchem 2010 conference, Hawaii, USA, 2010. 12. 19.
- ④ Maru, N., Ohno, O., Yamada, K., Uemura, D.: Studies on cytotoxic compounds from marine cyanobacteria, Pacificchem 2010 conference, Hawaii, USA, 2010. 12.

- 19.
- ⑤ Hanif, N., Ohno, O., Kitamura, M., Yamada, K., Uemura, D.: *ent*-Lingshuiol B: A new VCAM-1 inhibitor from a symbiotic dinoflagellate of the jellyfish, *Mastigias papua*, Pacificchem 2010 conference, Hawaii, USA, 2010. 12. 19.
- ⑥ 森田真布、照屋俊明、大野修、末永聖武、海洋シアノバクテリア由来の新規マクロリド配糖体の単離と構造、日本化学会第4回関東支部大会、つくば、2010. 8. 31.
- ⑦ 大野修、渡部多恵子、中村和彦、川越大、魚津伸夫、奥田千晶、山田昌良、山口宏二、上村大輔、ヒハツに含まれるメラニン生成阻害物質、日本ケミカルバイオロジー学会第5回年会、横浜、2010. 5. 19.
- ⑧ Ohno, O., Nakamura, K., Watabe, T., Persson, A., Yamada, K., Fujiwara, C., Koyama, T., Yazawa, K., Ohno, T., Yamaguchi, K., Uemura, D.: Inhibitory Effects of Benzyl Benzoate Derivatives against the Activity of Angiotensin II. The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy (ASP), Hawaii, USA, 2009. 6. 28.
- ⑨ 大野修、恒松雄太、小西香織、山田薫、菅沼雅美、上村大輔、渦鞭毛藻由来新規巨大炭素鎖化合物 symbiosipirool 類による PKC 阻害活性、平成 21 年度新規素材探索研究会、横浜、2009. 6.5.
- ⑩ 大野修：微生物・植物を用いた新規素材探索研究、第4回名古屋大学技術研究会特別講演、名古屋、2009. 3. 5.
- ⑪ 韓春光、Novriyandi Hanif、恒松雄太、大野修、山野喜、北村誠、山田薫、

北将樹、菅沼雅美、上村大輔、海洋渦鞭毛藻由来の生物活性ポリオール類の単離および新分解反応を用いた構造決定法、第50回天然物有機化合物討論会、福岡、2008. 9. 30.

- ⑫ 大野修、阿部孝宏、村絵美、植村匡詞、中村和彦、上村大輔：新生理活性物質の探索研究、「生態系ダイナミズムに着目した物質探索法」シンポジウム、淡路、2008. 6. 27.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

- ① 名称：メラニン産生抑制剤及び美白剤、発明者：川越大、山田昌良、千場智尋、中村和彦、大野修、渡部多恵子、上村大輔、権利者：株式会社ファンケル、学校法人慶應義塾、種類：特許権、番号：特願 2010-254171、出願年月日：2010年11月12日、国内外の別：国内
- ② 名称：メラニン産生抑制剤及び美白剤、発明者：川越大、山田昌良、千場智尋、大野修、渡部多恵子、上村大輔、権利者：株式会社ファンケル、学校法人慶應義塾、種類：特許権、番号：特願 2010-053585、出願年月日：2010年3月10日、国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 修 (OHNO OSAMU)
慶應義塾大学・理工学部・助教
研究者番号：20436992

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし