

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：32702

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2009年度～2012年度

課題番号：21221009

研究課題名（和文） 巨大炭素鎖を持つ特異な天然有機分子の化学

研究課題名（英文） Chemistry of Novel Naturally Occurring Super-carbon-chain Molecules

研究代表者

上村 大輔 (UEMURA Daisuke)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号：00022731

研究成果の概要（和文）：長い炭素鎖を持ち、繰り返し構造の無い海洋生物由来天然分子を巨大炭素鎖有機分子と呼ぶ。これらは、その特異な構造とともに強力な生物活性に特徴がある。本研究では、海洋生物に共生する微生物の大量培養やメタゲノム的手法といった新しい方法論を導入する事で、新規巨大炭素鎖有機分子の探索を試みた。また、新規化合物の発見のみに満足することなく、それらの生物学的存在意義、生合成限界、生物活性、特異な化学反応を視野に入れて研究を展開した。その結果、複数の重要化合物の単離と生物学的役割の解明に成功し、巨大炭素鎖有機分子の概念の確立に貢献した。

研究成果の概要（英文）：We refer to marine organism-derived long carbon chain molecules without repeating motifs as super-carbon-chain molecules. They have extraordinary chemical structures and exhibit strong biological activities. In this study, we endeavored to identify novel super-carbon-chain molecules by a new approach: the large-scale cultivation of symbiotic bacteria or a meta-genomic method. We also studied the biological significance, biological activities, biosynthesis, and unique chemical reactivities of these molecules. As a result, we successfully identified several important molecules and determined their biological activities. Our findings should help to establish the concept of super-carbon-chain molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	25,400,000	7,620,000	33,020,000
2010年度	29,500,000	8,850,000	38,350,000
2011年度	30,000,000	9,000,000	39,000,000
2012年度	32,000,000	9,600,000	41,600,000
年度			
総計	116,900,000	35,070,000	151,970,000

研究分野：複合領域

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：天然物有機化学、巨大炭素鎖有機分子、生物活性、海洋生物共生鞭毛藻、生物学的存在意義、生体内動態、メタゲノム

1. 研究開始当初の背景

代表者は自然界に存在する物質のうち、人知を凌ぐ化学構造と、切れ味鋭い生体機能を合わせ持つ物質について研究を進めて

きた。特に、海洋生物の二次代謝産物研究では世界的に注目される成果をあげてきた。例えば、腔腸動物イワスナギンチャクから取り出して構造決定したパリトキシンは、

分子量 2,680 と従来の常識を逸脱した巨大有機分子として歴史に残る。さらに日本の海綿動物として生物学的に重要なクロイソカイメンからハリコンドリン B (分子量 1,110) を抗腫瘍性物質として発見した。この物質もその新規構造と顕著な抗腫瘍活性から大きなインパクトを与え、抗がん剤として開発が進められた。これらの分子は、次の特徴を持つ有機分子である。

- ・ポリケチド由来と考えられる極めて長い一本の炭素鎖を骨格とする。
- ・分子量は数千を超え、一つの化学式で表される純粋な化学物質として最大級である。

こうした特徴を持つ化合物群は、生体成分であるタンパク質、多糖類や合成ポリマーのような一定構造ユニットの繰り返しを持たない点でペプチドや多糖類などとは一線を画した斬新な化合物であった。このような化合物は、天然物質、人工物質を問わず他に例がない。

2. 研究の目的

代表者らは、これら巨大な有機分子を「巨大炭素鎖有機分子」と定義し、未だ断片的にしか解明されていないこの未知の創造物について総合的な研究を行うことによりその性質を体系的に理解する必要があると考え、今後新しい分野「巨大炭素鎖を持つ特異な天然有機分子の化学」として研究を展開することを目的とした。5名の研究者からなる研究グループを組織し、以下に示した分担研究課題に沿って研究を進めた。

- 1) 巨大炭素鎖有機分子の創製 (上村大輔)
- 2) 巨大炭素鎖有機分子と生体膜との相互作用 (大野修)
- 3) 巨大炭素鎖有機分子の生物活性 (末永聖武)
- 4) 巨大炭素鎖有機分子の分子設計 (有本博一)
- 5) 巨大炭素鎖有機分子の生合成系遺伝子解析 (宮本憲二)

本研究ではいくつかの研究の中で特に、巨大炭素鎖有機分子の形状を中心として構造化学を主眼とし、タンパク質化学での手法が通用する世界であるのか、新たな手法の開発が必要となるのかについて研究を進め、固有の形態を有する鎖状分子としてポリオールを構築することも大きな目的の一つとした。

3. 研究の方法

これまで海洋性天然物の研究においては、藻類やカイメン等を直接有機溶媒で抽出して単離が行われていた。しかしながら、天然より得られる有機化合物は非常に微量なことが多い。巨大炭素鎖分子の構造決定や

更なる生理活性の検定には、化合物の量的な供給が不可欠であり、この点がネックとなっていた。

ところで最近の研究によれば、海洋由来天然物の多くはこのようなカイメンが真の生産者ではなく、そこに共生する鞭毛藻のような微生物が生産していることが示唆されている。従って、カイメン等に住み着いている微生物を大量培養することによって、量的供給が確保できるかもしれない。そこで本研究では、このような微生物の大量培養からの新規巨大炭素鎖分子の獲得を試みた。

しかしながら、地球上に生息する微生物のうち、人工的に培養できる種類には限りがあり、大半は難培養性であることも指摘されている。この問題の解決策として本研究では、メタゲノム法を取り入れた物質生産も試みた。巨大炭素鎖分子のような二次代謝産物は、微生物が持つ生合成酵素群の働きによって合成される。従って、これら生合成酵素群が利用できる環境を整えることによって、微生物自身を単離することなく物質生産が可能となる。メタゲノム法においては、環境中微生物由来の遺伝子 DNA を直接取得し、それを大腸菌などの適当な宿主に組み込むことで酵素の発現と物質生産を可能とさせることが出来る。

海洋性生物からの直接単離に加えて、上記の方法で単離した巨大炭素鎖化合物は、各種分析機器を駆使して構造決定を行なった。さらに、統合的な生理活性評価を行い、各々の化合物における潜在性を引き出すことにも注視した。研究目的の項に掲げた研究課題を分担する研究代表者と研究分担者が互いの緊密な連携を心掛け、研究を遂行した。

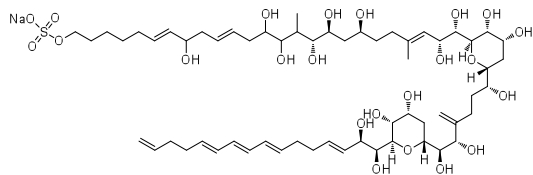
4. 研究成果

本研究は、巨大炭素鎖有機分子の構造と機能を統合的に理解することで天然物化学、ひいては生物分子科学のような学際的領域に新しい概念を提唱することを目指した。その結果、以下の成果を得た。

(1) 微生物の大量培養による新規化合物の探索：研究代表者らは本研究に先立ち、種々のカイメンやヒラムシから渦鞭毛藻等の微生物を単離し、およそ 200 株からなる渦鞭毛藻ライブラリーを構築した。本研究の遂行中にその規模を 410 株にまで拡充することができた。本ライブラリーを用いて新規巨大炭素鎖分子の探索を行い、生物学的にも有用と考えられる分子を得た。

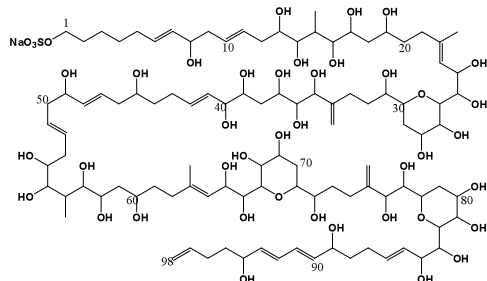
まず、タコクラゲ由来の渦鞭毛層から新規分子シンビオポリオール (分子量: 1,242) を単離し、詳細なスペクトル解析を元にそ

の化学構造を決定した。さらに、本化合物はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC において、細胞接着分子の一つである VCAM-1 の産生を抑制することを見出した。さらにこの活性は、HUVEC と Ramos リンパ球細胞との接着活性阻害によっても確認することが出来た。[J. Nat. Prod., 2010]



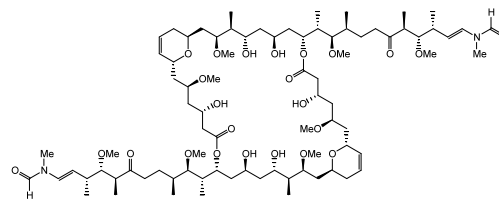
シンビオポリオール

また、紅藻に付着する渦鞭毛藻からは、アンジゲノール A と名付けた新規化合物（分子量：2,169）を発見した。アンジゲノールには、さらに B、C と名付けた類縁体が存在する。本化合物の構造決定には、研究代表者らが独自に開発した第二世代 Grubbs 触媒を利用する allyl vic-diol の選択的酸化分解反応 [Tetrahedron, 2011] を駆使して達成することが出来た。この化合物の生理活性としては、抗肥満薬リードとして期待できるという成果を得ている。[Tetrahedron Letters, 2011]



アンジゲノール A

巨大炭素鎖有機分子の構造決定においては、シグナル同志の重なりにより通常の分光学的手法では立体構造の確定を行うことは困難を極める。その解決策の一つは、上述したように選択的分解を行って対象化合物を断片化することであるが、この方法はあらゆる場合に適応できるわけではない。研究代表者らは普遍的な方法論を検討し、サンゴ幼生の変態、着生を誘導する新規マクロライド化合物、ルミナオリドの立体化学を推定することに成功した。このような分子の立体構造を考えるうえで、ROESY 法を使った NOE 解析と JBCA 法を利用した立体配座解析が極めて有効であることが明らかとなった。



ルミナオリド

さらに研究代表者らは、本渦鞭毛藻ライブラリーから推定分子量 8,245、6,026、5,148、5,088、3,911 の巨大炭素鎖分子の存在を確認している。このうち、推定分子量 5,148 の分子については構造解析に供することが出来る量を単離できたため、NMR 法を用いた構造解析を行ったが、一次元・二次元の NMR 解析からはシグナルの重なりが激しく、断片的な構造情報が得られるのみであった。しかしながら、この NMR 解析から本化合物には多数のオレフィン構造が存在することが明らかとなったので、第二世代 Grubbs 触媒を用いた開裂反応を行い、分解断片の構造解析を行うこととした。予想通り、開裂反応によって多数の分解断片が生じ、HPLC 分離を繰り返してその一つ (mw=398) の単離に成功した。一次元・二次元 NMR 解析、ESI-MS の情報、アセチル化合物の NMR スペクトル解析によって構造を明らかにした。他に 19 個の部分構造を明らかにしている。これ以外の分解断片の単離・構造解析を進めている。分子量 5,088 の分子については、イオン交換樹脂を用いて分離法の改良に成功しており、現在構造解析中である。さらに、シンビオジノライドの立体化学については、合成的手法で着実に構造決定を進めている。海洋天然物ハリクロリンと抗生物質ケンドマイシンの全合成にも成功し、合成研究の過程で新規の減炭反応を発見して、反応条件や機構の検討を行い最適な反応条件を見出した。

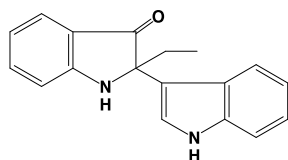
他に、リングピアシクラミド、ハリコニン類、ピセリングビオライド類、トムルリン等の新規生物活性化合物を単離・構造決定した。

(2) メタゲノム法を活用した物質生産：
この地上に生息している細菌のうち、およそ 99 % は人工的な培養が出来ないと考えられている。そのような細菌が生産している有用物質の取得法として、それらの遺伝子の直接的な利用が考えられる。二次代謝産物の生産には、生合成酵素群の働きが必要不可欠であり、生合成酵素群は細菌の遺伝子上にコードされている。従って、生合成酵素群をコードする遺伝子を取得できれば、

細菌を直接培養することなく物質生産を行わせることが出来ると考えられる。

研究代表者らはこの考え方を実践し、まずは構築が比較的容易なバクテリオファージをベースとしたフォスミドライブラリーの構築を試みた。対象とした細菌は、クロイツカイメン由来の難培養性バクテリアである。研究代表者らはクロイツカイメンから、オカダ酸やハリコンドリン類といった、化学分野のみならず生命科学や医療の分野にも大きな貢献をしている化合物の単離を行ってきた実績があるからである。クロイツカイメンからカイメン由来ゲノムが0.02%の高純度メタゲノムDNAを抽出し、およそ15万クローンからなるフォスミドライブラリーを構築した。本メタゲノムDNAを次世代DNAシーケンサーで解析した結果、 α プロテオバクテリアや放線菌、シアノバクテリア、根粒菌等、天然物を生産する事が知られている属が多数存在する事が明らかとなった。興味深いことに、その中でも特に根粒菌が高濃度で存在する事が明らかとなった。[Biosci. Biotechnol. Biochem, 2012]

引き続き、本フォスミドライブラリーを用いて新規物質の探索を試みた。スクリーニングの結果、二種類の色素生産株を単離した。AK2株からは黄色の色素を抽出した。各種スペクトル解析の結果、本色素は新規



ハリクロム A

ビスインドール体であることが明らかとなり、ハリクロム A と名付けた。[Chem. Lett., 2012]

また、AK1 株からは赤色、青色、黄色の色素を抽出した。各種スペクトル解析の結果、赤色の色素は既知化合物インディルビン、青色の色素は既知化合物インディゴ、そして黄色の色素はハリクロム A であった。

しかしながら現行の問題点としては、使用しているフォスミドベクターが原理的に、40kbp 程度の比較的短い断片しか挿入できない点にある。巨大炭素鎖分子の生合成には、多種多様な生合成酵素の関与が予測されることから、それらは長大な遺伝子クラスターを構成している可能性が高い。この問題の解決に向けて研究代表者らは、およそ 150kbp の遺伝子断片を挿入可能な細菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターを用いたライブラリ

一の構築に着手し、これに成功した。本ライブラリーの活用によって、新規巨大炭素鎖有機分子の異所的生合成が可能になると期待できる。

実際にスクリーニングを試みたところ、羊血寒天培地に対し溶血性を示すクローンを単離した。また、テトラサイクリンに対し薬剤耐性を示す株の単離にも成功した。さらに、本ライブラリーより各種酵素について機能ベーススクリーニングを行い、ラッカーゼとプロテアーゼ活性を見出した。フォスミドベクターに含まれる 40 kbp 程のインサート配列を次世代シーケンサーで解読、ラッカーゼ及びプロテアーゼ候補遺伝子を同定した。

本研究は未使用遺伝子資源の有効利用に全く新しい光を当てると同時に、未だ決着がつかない巨大炭素鎖有機分子の真の生産者の特定にも有効な手法であると考えられる。このライブラリーの有効活用は、新しい物質探索源として今後の天然物化学を先導するものである。

(3) 巨大炭素鎖有機分子概念の確立に向けて: 本研究期間中の 2011 年には、研究代表者が単離・構造決定を行った巨大炭素鎖有機分子の代表的な存在であるハリコンドリン B の合成誘導体であるエリブリンが、末期乳癌患者の治療薬として全世界的に認可、使用されるに至った。テレビ番組としても放送され、社会的にも大きなインパクトを与えた。

一方、生体膜と相互作用する巨大ポリオール (5,000 以上の分子量) の研究を進めたが、分子量の大きなもの程藻外へ放出され易いことを見つけ出し、これらの分子の存在意義を酸素の受容体と位置づけ酸化に対する防御機構の一環ではないかとの仮説をたてるに至った。十分に酸化されたポリオールは細胞表層に局在化し、遂には藻外に排泄されるのである。そこでポリクロナル抗体を作製し、存在の確認を試みたがクロフィルの蛍光のため、蛍光での検出が困難であることを確認した。今後電子顕微鏡等を用いた解析へと発展させていきたい。

さらに近年の海水温の上昇によって、猛毒を持つ熱帯魚類ソウシハギが本州沿岸でもごく最近確認されている (読売新聞 2012 年 10 月 23 日、朝日新聞 2012 年 11 月 10 日)。この毒性の本体は巨大炭素鎖分子の代表であるパリトキシンであり、研究代表者が構造と機能を解明した。この問題に関して研究代表者は読売テレビ番組内で啓蒙活動を行った (2012 年 11 月 19 日放送)。巨大炭素鎖分子の化学は学術的側面のみならず、このように人類の健康にも寄与することが出来る。

以上のように巨大炭素鎖有機分子に関する研究は順調に進展しており、目的とする新しい化学物質の世界、「巨大炭素鎖分子の化学」が創成されつつあると認識できるようになってきた。実際にこれらの内容をIUPACの天然物化学国際会議において基調講演として紹介することが出来た[ISCNP27, 2011]。

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 68 件)

- (1) Construction of a Metagenomic Library for the Marine Sponge *Halichondria okadai*, T. Abe, F. P. Sahin, K. Akiyama, T. Naito, M. Kishigami, K. Miyamoto, Y. Sakakibara, D. Uemura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 76, 633-639 (2012)
10.1271/bbb.110533 (査読有)
- (2) Isolation and Structure of a Novel Biindole Pigment Substituted with an Ethyl Group from a Metagenomic Library Derived from the Marine Sponge *Halichondria okadai*, T. Abe, A. Kukita, K. Akiyama, T. Naito, D. Uemura, *Chem. Lett.*, 41, 728-729 (2012)
10.1246/cl.2012.728 (査読有)
- (3) Recent Insights into Natural Venoms, D. Uemura, C-G. Han, N. Hanif, T. Inuzuka, N. Maru, H. Arimoto, *Pure Appl. Chem.*, 84, 1297-1315 (2012)
10.1351/PAC-CON-11-09-32 (査読有)
- (4) Halichonines A, B, and C, Novel Sesquiterpene Alkaloids from the Marine Sponge *Halichondria okadai* Kadota, O. Ohno, T. Chiba, S. Todoroki, H. Yoshimura, N. Maru, K. Maekawa, H. Imagawa, K. Yamada, A. Wakamiya, K. Suenaga, D. Uemura, *Chem. Commun.*, 47, 12453-12455 (2011)
10.1039/C1CC15557A (査読有)
- (5) Amdigenol A, a Long Carbon-backbone Polyol Compound Produced by the Marine Dinoflagellate *Amphidinium* sp., T. Inuzuka, H. Yamamoto, D. Uemura, *Tetrahedron Lett.*, 239-302 (2011)
10.1016/j.tetlet.2011.11.033 (査読有)
- (6) Grubbs carbene complex-catalyzed cleavage of allyl vic-diols to aldehydes with a co-oxidant: application to the selective cleavage of huge marine molecules, C-G. Han, Y. Yamamoto, F. Kakiuchi, K. Nakamura, D. Uemura, *Tetrahedron*, 9622-962 (2011)
10.1016/j.tet.2011.09.002 (査読有)
- (7) Halichlorine Reduces Monocytes Adhesion to Endothelium Through the

Suppression of Nuclear Factor- κ B Activation, Y. Tsubosaka, T. Murata, K. Yamada, D. Uemura, M. Hori, H. Ozaki, *J. Pharmacol. Sci.* 113, 208-213 (2010)
10.1254/jphs.10065FP (査読有)

(8) Symbiopolyol, a VCAM-1 Inhibitor from a Symbiotic Dinoflagellate of the Jellyfish *Mastigias papua*, N. Hanif, O. Ohno, M. Kitamura, K. Yamada, D. Uemura, *J. Nat. Prod.*, 73, 1318 - 1322 (2010)
10.1021/np100221k (査読有)

(9) Exploratory research on bioactive natural products with a focus on biological phenomena, D. Uemura, *Proc. Jpn. Acad., Ser. B.* 86, 190-201 (2010) (査読なし)

[学会発表] (計 116 件)

(1) 上村大輔, Lovely Natural Products in the Marine Chest, 3rd International Symposium on Creation of Functional Materials -Coordination Chemistry at the Front- (Strategic Initiative (A), University of Tsukuba), 2012年12月10日, 筑波

(2) 上村大輔, Recent Topics of Natural Venoms, 27th International Symposium on the Chemistry of Natural Products (ISCNP27), 2011年7月13日, ブリスベン (オーストラリア)

(3) 上村大輔, Marine huge molecules, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), 2010年12月17日, ハワイ, 米国

(4) 上村大輔, Recent Aspects of Chemical Ecology, 75th Meeting of the Israel Chemical Society, David Intercontinental Hotel, 2010年1月26日, テルアビブ (イスラエル)

(5) 上村大輔, Bioorganic Studies on Marine Natural Products: Diverse Chemical Structures and Bioactivities, Australian Academy of Science Workshop (日豪「生物多様性」ワークショップ), 2009年10月27日, キャンベラ (オーストラリア)

[図書] (計 8 件)

(1) Chapter 12, Bioactive Molecules from Symbiotic Marine Dinoflagellates, M. Kita, T. Inuzuka, N. Maru, D. Uemura in *Marine Pharmacognosy: Trends and Applications*, CRC Press, Ed. Kim, *in press* (2013)

(2) Chapter 10, Sea-Originated Cytotoxic Substances in *Advances in Food and Nutrition Research*, N. Maru, D. Uemura, in *Marine Medicinal Foods Implications and Applications: Animals and Microbes*, Vol.

65, pp. 171-184, Ed. Se-Kwon Kim, Elsevier, (2012) 総ページ 523

(3) Chapter 11, Secondary Metabolites with New Medicinal Functions from Marine Organisms in Advances in Food and Nutrition Research, O. Ohno, K. Suenaga, D. Uemura, in Marine Medicinal Foods Implications and Applications: Animals and Microbes, Vol. 65, pp. 185-193, Ed. Se-Kwon Kim, Elsevier, (2012) 総ページ523

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 6 件)

(1) 名称: リングピアシクラミドを有効成分とする試薬、及び医薬

発明者: 上村大輔、丸範人、大野修、五十鈴川和人、山田薫

権利者: 上村大輔

種類: 特許

番号: 特願 2012-180264

出願年月日: 2012 年 7 月 31 日

国内外の別: 国内

(2) 名称: マクロジオライド化合物及びその用途

発明者: 上村大輔、北村誠、P.J. Schupp、中野義勝、丸範人、渡部多恵子

権利者: 上村大輔

種類: 特許

番号: 特願 2012-82263

出願年月日: 2012 年 3 月 14 日

国内外の別: 国内

(3) 名称: ペプチド性化合物およびその用途

発明者: 末永聖武、照屋俊明、佐々木宏明

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: PCT/JP2010/062514、W02011/013612

出願年月日: 2010 年 7 月 26 日

国内外の別: 国外

(4) 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

番号: 特願 2010-254171

出願年月日: 2010 年 11 月 12 日

国内外の別: 国内

(5) 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

番号: 特願 2010-053585

出願年月日: 2010 年 3 月 10 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

(1) 名称: 環状ヘプタペプチド及びその用途
発明者: 上村大輔、下川賢一郎、岩瀬賢、山田薫

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許第 4441621 号

取得年月日: 2010 年 1 月 22 日

国内外の別: 国内 (欧州、米国出願手続中)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.chem.kanagawa-u.ac.jp/~uemura/>

<http://www.educ.cc.keio.ac.jp/~suenaga>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上村 大輔 (UEMURA Daisuke)

神奈川大学・理学部・教授

研究者番号: 00022731

(2) 研究分担者

大野 修 (OHNO Osamu)

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号: 20436992

末永 聖武 (SUENAGA Kiyotake)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 60273215

有本 博一 (ARIMOTO Hirokazu)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号: 60262789

宮本 憲二 (MIYAMOTO Kenji)

慶應義塾大学・理工学部・准教授

研究者番号: 60360111

(3) 連携研究者

該当なし