

## 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24年6月13日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21510235

研究課題名（和文） 棘皮動物胚の発生及び孵化を阻害する新規天然物質

研究課題名（英文） New natural compounds that inhibit development and hatching of echinoderm embryos.

研究代表者

太田 伸二 (OHTA SHINJI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：60185270

研究成果の概要（和文）：抗がん剤候補および有用細胞機能調節物質等の開発を目的に、棘皮動物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、海洋生物等から生理活性物質の探索を行った。その結果、鹿児島県近海で採取された海綿 *Petrosia solida* および *Theonella swinhoei* から新規生理活性物質を単離し、新規なポリアセチレン類であることを NMR および MS 等のスペクトルデータに基づいて決定した。Petroacetylene および bromotheoynic acid と命名したこれら新規ポリアセチレン類は、イトマキヒトデの胚発生を胞胚形成の段階で選択的に停止させることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：New linear polyacetylene compounds designated petroacetylene and bromotheoynic acid have been isolated from the marine sponge *Petrosia solida* Hoshino 1981 and *Theonella swinhoei*, respectively, collected off the coast of Kagoshima Prefecture, Japan. The structures were elucidated on the basis of spectroscopic data and chemical means. We have evaluated the effects of the new polyacetylenes on development and hatching of echinoderm embryos.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：天然物有機化学、生物活性物質、海綿、ポリアセチレン、胚発生

## 1. 研究開始当初の背景

これまで、我々の研究グループで、日本近海で採集した数百種の海綿のメタノール抽出物について、棘皮動物卵の成熟阻害、受精阻害、卵割阻害、胚発生段階特異的阻害および孵化阻害を指標にして新規生理活性物質の探索とそれら

の機能解析を進めてきており、すでにスチレン硫酸エステルであるジャスピシレン類、ポリアセチレン硫酸エステルであるカリスボンジン類、含臭素アミドであるクラスリンアミド類、テトラミン酸配糖体アンコリノシド類、アクリル酸構造を有するノルセスタテルペンであるロ

パロイン酸類などの新規生理活性物質を単離・構造決定してきていた。とくに、受精時の卵-精子細胞融合阻害と孵化阻害を示すジャスピシンについては、癌細胞の転移に関係するマトリックス・メタロエンドプロテアーゼ (MMP) を阻害するなど注目されたが、エノールサルフェート構造ゆえに化学合成が難しく、また天然物からの供給もままならないため、新たな選択的胚発生阻害物質の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

上記研究背景で記述したように、新たな胚発生阻害物質の開発を目指して、まず、棘皮動物卵を用い、その成熟・受精・胚の初期発生等には影響を与えず、孵化や胞胚形成、原腸胚形成を阻害する生理活性物質を数百種の実験動物からスクリーニングする。活性のあった実験動物から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。また、単離した生理活性物質に関して、受精阻害や胚発生に対する詳細な阻害様式を調べ、その生理機能の詳細を究明する。

## 3. 研究の方法

実験動物等の抽出物について、次のスクリーニングを行い、棘皮動物の胚発生を選択的に阻害する化合物を探索する。

[胚発生阻害スクリーニング] 各種濃度に調製した検体のメタノール溶液 1  $\mu$ L を人工海水 100  $\mu$ L に加えたのち、イトマキヒトデ受精卵 (冬季はバフンウニを用いてアッセイする) を入れて飼育する。8 時間後、12 時間後、24 時間後に顕微鏡下観察を行い、初期発生には影響を与えず (非特異的細胞毒性を示すサンプルを除外するため)、胞胚期以降で発生を段階特異的に阻害する活性ならびに孵化を阻害する活性を有する検体を選び出す。

上記で選ばれた検体について、活性物質の単離・構造決定を行う。多量の実験動物等の抽出物を溶媒分画後、イトマキヒトデの原腸胚形成阻害活性を指標として、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・構造決定する。

単離・構造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。またさらに、構造活性相関に関する知見を得るなどして、新規生

理活性物質の生理機能の詳細を明らかにする。

## 4. 研究成果

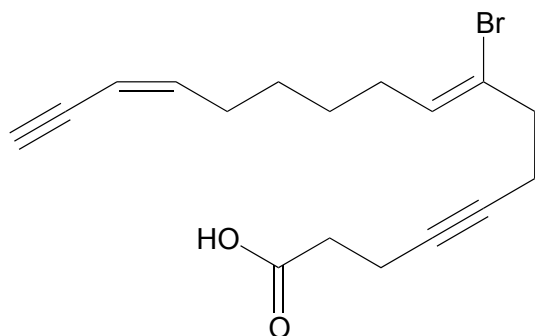
イトマキヒトデの胚発生に対する選択的阻害を指標として、植物および海綿動物由来の生理活性物質の探索を行なった。アシタバ種子の酢酸エチル可溶性成分は、16 ppm 以上の濃度でイトマキヒトデの胞胚形成を阻害することがわかった。阻害活性を指標にしてシリカゲルカラムクロマトで分画することにより、活性成分として 1 種のポリアセチレン化合物および 2 種のクマリン化合物を単離した。これら活性物質は、NMR および MS スペクトルデータ等に基づき、既知物質である falcarindiol、ammidin および jsolemanidin と同定した。

鹿児島県屋久島産の未同定海綿の抽出液は、イトマキヒトデの原腸胚形成を阻害することが示された。この海綿のメタノール抽出物から、2 種のビスボラン型セスキテルペノイド類とともに 1 種の新規物質を単離した。この新規物質は、(+)-および (-)-ESIMS で  $m/z$  319  $[M+H]^+$  および 317  $[M-H]^-$  にそれぞれ擬分子イオンピークを示したことから、分子量 318 の化合物とわかった。さらに、(-)HRESI-TOFMS の結果から、分子式を  $C_{20}H_{30}O_3$  と決定した。さらに、IR、UV、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルデータに基づいて、その構造を新規ジテルペノイドと決定した。この新規ジテルペノイドは、1.6 ppm 以上の濃度でイトマキヒトデの原腸胚形成を選択的に阻害することを明らかにした。

また、鹿児島県硫黄島産の未同定海綿のメタノール抽出物がイトマキヒトデ胚の孵化を阻害することを見出し、阻害活性を指標にして分画した結果、4 種のピリジンアルカロイド類を単離した。これらは、各種スペクトルデータの解析に基づき、分子量 274、300、304、および 314 のいずれも 3-ピリジル基を有するアルカロイドであることがわかった。

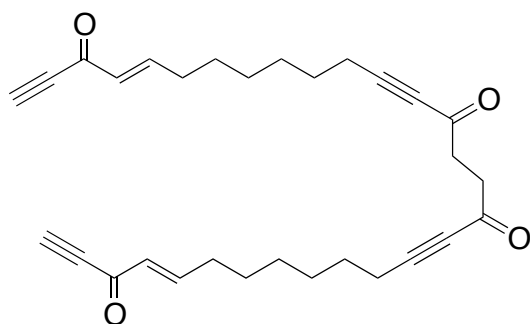
さらに、鹿児島県種子島近海で採取された海綿 *Theonella swinhoei* のメタノール抽出物にイトマキヒトデの胚発生を阻害する活性が見出された。このメタノール抽出物を酢酸エチル-水で分配した後、酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトで分画することにより、既知ステロイドである theonellasterol とともに新規ポリアセチレン化合物を単離し、bromotheoynic acid と命名した。この新規ポリアセチレン

bromotheoynic acid は、ESIMS で  $m/z$  335 および 337  $[M-H]^-$  に擬分子イオンピークを示したことから、1 個の臭素原子を含む分子量 336 の化合物とわかった。さらに、(-)HRESI-TOFMS の結果から、分子式を  $C_{17}H_{21}BrO_2$  と決定した。さらに、IR、UV、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルデータに基づいて、その構造を決定した。この新規ポリアセチレンは、100 ppm 以上の濃度でイトマキヒトデ胚の胞胚形成を阻害することが明らかとなった。



新規物質 bromotheoynic acid の構造

またさらに、鹿児島県奄美大島近海で採取された海綿 *Petrosia solida* のメタノール抽出物には、イトマキヒトデの胚発生を胞胚形成の直前で阻害する活性が見出された。このメタノール抽出物を酢酸エチル-水で分配した後、酢酸エチル可溶性画分をシリカゲルカラムクロマトで分画することにより、活性成分として新規ポリアセチレンを単離し petroacetylene と命名した。この petroacetylene は、MALDI-TOFMS で  $m/z$  481  $[M+Na]^+$  に擬分子イオンピークを示した。また、(+)-HRMALDI-TOFMS の結果から、分子式を  $C_{30}H_{34}O_4$  と決定した。さらに、IR、UV、1 次元および 2 次元 NMR スペクトルデータに基づいて、その構造が対称中心を有するポリアセチレンケトンであると決定した。



新規物質 petroacetylene の構造

Petroacetylene は、 $3.1 \mu\text{g/mL}$  以上の濃度でイトマキヒトデの胞胚形成を選択的に阻害した。新規ポリアセチレン petroacetylene を  $\text{CeCl}_3$  共存下で  $\text{NaBH}_4$  と反応させて、4 個のケトンが還元されたテトラオール誘導体に導いた。このテトラオール誘導体は、元の天然物よりも低濃度でヒトデ胚の発生を胞胚形成の段階で停止させることを明らかにした。

本研究課題において、bromotheoynic acid および petroacetylene 等の新規生理活性物質を単離・構造決定した。これらのうち、bromotheoynic acid は奇数炭素鎖をもつ極めて稀な臭素化ポリアセチレン化合物であった。これらは、棘皮動物の胚発生を胞胚形成の段階で選択的に停止させる活性を示した。選択性の高い生理活性を有する化合物は、何らかの細胞機能に対して特異的な作用を及ぼす可能性を秘めていることから、今後、さまざまな細胞アッセイならびに酵素アッセイを行うことによってそれらの詳細な生理機能を明らかにするとともに、さらに活性の高い選択的阻害剤の開発を目指すことが課題である。

## 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 10 件)

- ① N. Aoki, K. Yamamoto, T. Ogawa, E. Ohta, T. Ikeuchi, K. Kamemura, S. Ikegami and S. Ohta. Bromotheoynic acid, a brominated acetylenic acid from the marine sponge *Theonella swinhoei*, *Nat. Prod. Res.*, in press. (査読有)
- ② Y. Kamei, T. Tamura, R. Yoshida, S. Ohta, E. Fukusaki, Y. Mukai. GABA metabolism pathway genes, UGA1 and GAD1, regulate replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **407**, 185-190 (2011). (査読有)
- ③ M. F. Hegazy, A. E. H. Mohamed, N. Aoki, T. Ikeuchi, E. Ohta, and S. Ohta. Bioactive jatrophone diterpenes from *Euphorbia guyoniana*. *Phytochemistry*, **71**, 249-253 (2010). (査読有)
- ④ M. Takagi, J. Ueda, T. Kunoh, M. Sekigawa, S. Wada, Y. Mukai, S. Ohta, T. Mizukami, R. Sasaki, and K. Shin-ya. JBIR-14, a highly oxygenated ergostane, from *Isaria* sp. NBRC 104353. *J. Antibiot.*,

63, 139-141 (2010). (査読有)

- ⑤ M. Sekigawa, T. Kunoh, S. Wada, Y. Mukai, K. Ohshima, S. Ohta, N. Goshima, R. Sasaki and T. Mizukami. Comprehensive Screening of Human Genes with Inhibitory Effects on Yeast Growth and Validation of a Yeast Cell-Based System for Screening Chemicals. *J. Biomol. Screen.*, **15**, 368-378 (2010). (査読有)
- ⑥ T. Kajimoto, N. Aoki, E. Ohta, Y. Kawai, and S. Ohta. Saikachinoside A, a novel 3-prenylated isoguanine glucoside from seeds of *Gleditsia japonica*. *Tetrahedron Lett.*, **51**, 2099-2101 (2010). (査読有)
- ⑦ N. Aoki and S. Ohta. Ashitabaol A, a new antioxidative sesquiterpenoid from seeds of *Angelica keiskei*. *Tetrahedron Lett.*, **51**, 3449-3450 (2010). (査読有)
- ⑧ T. Kunoh, T. Noda, K. Koseki, M. Sekigawa, M. Takagi, K. Shinya, N. Goshima, S. Iemura, T. Natsume, S. Wada, Y. Mukai, S. Ohta, R. Sasaki, and T. Mizukami. A Novel Human Dynactin-Associated Protein, dynAP, Promotes Activation of Akt, and Ergosterol-Related Compounds Induce dynAP-Dependent Apoptosis of Human Cancer Cells. *Mol. Cancer Therap.*, **9**, 2934-2942 (2010). (査読有)
- ⑨ T. Kajimoto, N. Aoki, E. Ohta, and S. Ohta. Locustoside A-A new purine alkaloid glucoside from seeds of *Gleditsia japonica*. *Phytochemistry Lett.*, **3**, 198-200 (2010). (査読有)
- ⑩ M. A. El-Sayed, A. E. H. Mohamed, M. K. Hassan, M. F. Hegazy, S. J. Hossain, M. G. Sheded, and S. Ohta. Cytotoxicity of 3-O-( $\beta$ -D-Glucopyranosyl)etioline, a Steroidal Alkaloid from *Solanum diphyllum* L. *Z. Naturforsch. C*, **64c**, 644-649 (2009). (査読有)

[学会発表] (計7件)

- ① 梶本将史、太田伸二、*N*-プレニル化プリンアルカロイド類縁体の合成と生理活性、第55回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2011年11月20日、筑波。

- ② 廣瀬弥生、太田恵美、梶本将史、太田伸二、サイカチマメゾウムシ (*Bruchidius dorsalis*) 幼虫から得られた新規デヒドロフェニルアラニン含有リピドの構造と生理活性、第53回天然有機化合物討論会、2011年9月27日、大阪。
- ③ 青木信和、白井正明、太田伸二、アシタバ種子に含まれる新規生理活性セスキテルペノイド類、日本化学会第90春季年会、2010年3月28日、東大阪。
- ④ 梶本将史、青木信和、太田恵美、太田伸二、サイカチ (*Gleditsia japonica*) 種子由来の新規プリンアルカロイドの構造と活性、日本化学会第91春季年会、2011年3月26日、横浜。
- ⑤ 太田伸二、発芽種子の生理活性成分、第53回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、2009年11月8日、奈良。
- ⑥ 青木信和、白井正明、太田伸二、アシタバ種子由来の新規生理活性物質、第40回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2009年11月7日、岐阜。
- ⑦ 鬼塚明也、太田恵美、村上祐美、向由起夫、池上晋、太田伸二、バクテリア由来の新規生理活性物質の構造とヒト胚発生過程に対する影響、第40回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2009年11月7日、岐阜。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

太田 伸二 (OHTA SHINJI)  
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授  
研究者番号：60185270

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者