

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05291

研究課題名(和文) 海洋シアノバクテリア由来の生活習慣病治療薬リード化合物の探索と作用機序の解析

研究課題名(英文) Isolation, structure elucidation and biological activity of compounds from marine cyanobacteria for lifestyle-related diseases

研究代表者

照屋 俊明 (Toshiaki, Teruya)

琉球大学・教育学部・教授

研究者番号：90375428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：糸満市大度海岸で採集した海洋ラン藻 *Okeania* sp. から odookeanyne A, B と okeaniamide A, B を単離し、それらの化学構造式を明らかにした。次に得られた化合物について、3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて評価した結果、odookeanyne A, B と okeaniamide A, B は脂肪細胞分化を促進することが明らかとなった。また、成熟脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物として、デブロモアプリアトキシンを得た。デブロモアプリアトキシンは、成熟脂肪細胞の脂肪分解を促進するとともに、脂肪細胞の分化を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

沖縄産海洋シアノバクテリアから 3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化促進作用を有する化合物を探索した例や、成熟脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物を探索した例はほとんどない。3T3-L1 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進する化合物、成熟脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物を沖縄産海洋シアノバクテリアから発見する事は、新たな生活習慣病予防、治療薬のリード化合物の発見につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Odookeanyne A, B and okeaniamide A, B were isolated from the marine cyanobacterium *Okeania* sp. collected from the coast of Itoman City and their structures were elucidated by spectroscopic techniques. These compounds dose-dependently promoted the differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes in the presence of insulin. In addition, a search for compounds that promote lipolytic activity yielded debromoaplysiatoxin. It was suggested that debromoaplysiatoxin promotes lipolysis in hypertrophic adipocytes and inhibits differentiation of mouse 3T3-L1 preadipocytes.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：Odookeanyne Okeaniamide デブロモアプリアトキシン 3T3-L1前駆脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肥満者は、日本人の死亡原因の 6 割を占める糖尿病や高血圧などの生活習慣病を発症する確率が高いことが報告されており、その対応は我が国にとって重要な課題である。また、生活習慣病を発症した肥満者は COVID-19 感染後に重症化しやすく、予後も悪いと報告されていることから [Zheng et al. *Metabolism*, 2020, 108, 154244.]、感染症に感染しても軽症で回復するために肥満の予防は重要である。

肥満は、主に脂肪細胞の肥大化によって生じると考えられている。肥満患者の脂肪組織では、大型脂肪細胞の形成により、TNF や MCP-1 などのアディポサイトカインが大量に生産、分泌され、骨格筋でのインスリンシグナル伝達を障害し、インスリン抵抗性を発症させることが報告されている [Folli et al. *Acta Diabetol.*, 2014, 51, 123.]。このように、内臓脂肪の過剰蓄積、大型脂肪細胞の形成はインスリン抵抗性や糖尿病などの生活習慣病の発症に深く関与している。インスリン抵抗性とは、血中に十分にインスリンが存在するにも関わらず、その作用が低下している状態であり、現在インスリン抵抗性を改善する薬剤として、ピオグリタゾンなどのチアゾリジン系薬剤が広く用いられている。経口投与が可能なチアゾリジン系薬剤は強力な peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) のアゴニストであり、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導を転写レベルで促進する。前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化を促進することにより、血中グルコースを効率よく取り込むことが可能な脂肪細胞が増殖し、血糖値が低下すると考えられていることから、前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導を効率よく促進できる化合物は、インスリン抵抗性の予防または改善作用による抗糖尿病効果が期待できる。また、大型脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物は肥満改善効果が期待でき、生活習慣病の発症リスクを低くすることが期待できる。当研究室では海洋生物、特に海洋シアノバクテリアに含まれる生物活性物質の探索を行っている。そこで、脂肪蓄積を評価する細胞系として広く知られているマウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞を用いて、脂肪細胞への分化誘導を促進する化合物や大型脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物を沖縄産海洋シアノバクテリアから探索することとした。

2. 研究の目的

琉球列島沿岸で採集した未同定シアノバクテリアの抽出物が、3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化促進、又は成熟脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進することを明らかにしている。そこで、各種クロマトグラフィーを用いて化合物を分離、精製する。得られた化合物については 3T3-L1 細胞を用いて脂肪細胞への分化を促進する効果があるか確認する。また PPAR γ の遺伝子発現及び PPAR γ の標的遺伝子である adiponectin の遺伝子発現を確認する。

3. 研究の方法

(1) 化合物の単離・構造決定

脂肪細胞への分化を促進する化合物や成熟脂肪細胞に蓄積したトリグリセリドの分解を促進する化合物については、それら化合物を生産する海洋シアノバクテリアを採集し、アルコールを用いて成分を抽出する。次に各種クロマトグラフィーを用いて目的とする化合物を抽出物から精製する。得られた化合物については、核磁気共鳴スペクトルやマススペクトルを解析し、それぞれの化学構造式を明らかにする。化合物の構造解析が困難な場合は、誘導反応や分解反応を行い、化学構造式を明らかにする。

(2) 薬理活性評価

3T3-L1 前駆脂肪細胞の分化誘導評価試験

3T3-L1 前駆脂肪細胞を培養する。次に細胞は試験サンプルとインスリン存在下および非存在下で培養し、脂肪蓄積促進作用を Oil red O 染色によって評価する。細胞は顕微鏡下で撮影後、イソプロパノールで脂肪滴中の Oil red O を抽出し、吸光度を測定する。

3T3-L1 成熟脂肪細胞の脂肪分解促進評価試験

3T3-L1 前駆脂肪細胞を培養する。次に分化促進培地で培養し、その後分化維持培地で培養することで、成熟脂肪細胞へと分化させる。分化させた成熟脂肪細胞は、試験サンプルを添加した高グルコース培地で培養し、培養培地中のグリセロール濃度を測定する。さらに細胞溶解液中のトリグリセリド濃度を測定する。

Real-time RT-PCR 解析による脂肪細胞分化関連遺伝子発現レベルの評価

3T3-L1 前駆脂肪細胞を培養する。次に細胞は試験サンプルとインスリン存在下および非存在下で培養する。所定の期間培養後、細胞から Total RNA を抽出し、RNA から cDNA を合成後、Real-time PCR 法により、PPAR γ 、adiponectin の mRNA の発現量を確認する。

Real-time RT-PCR 解析による脂肪合成及び分解関連遺伝子発現レベルの評価

3T3-L1 前駆脂肪細胞を培養する。次に分化促進培地で培養し、その後分化維持培地で培養することで、成熟脂肪細胞へと分化する。分化させた成熟脂肪細胞は、試験サンプルを添加した高グルコース培地で培養する。所定の期間培養後、細胞から Total RNA を抽出し、RNA から cDNA を合成後、Real-time PCR 法により、adipocyte protein 2 (aP2) の mRNA の発現量を確認する。

4. 研究成果

(1) 海洋シアノバクテリア *Okeania* 属から単離した odookeanyne A, B の単離、構造、生物活性

沖縄県糸満市付近の海岸で採集した *Okeania* 属の海洋シアノバクテリアをメタノールで抽出した。得られた抽出物を濃縮後、水と酢酸エチルで分配し、さらに酢酸エチル層を 90%メタノールとヘキサンで分配した。得られた 90%メタノール層を ODS カラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いて精製した結果、odookeanyne A (1), B (2)を得た(図 1)。

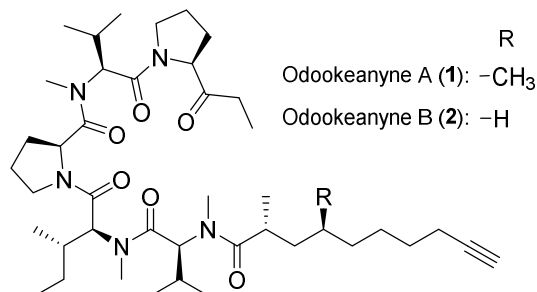


図1 Odookeanyne A, B の構造式

続いて 1 の構造解析を行った。高分解能質量スペクトルから 1 の分子式を $C_{43}H_{73}N_5O_6$ と決定した。続いて COSY スペクトル、HMBC スペクトル、HSQC スペクトルを解析し、1 の平面構造を決定した。次に構成アミノ酸と 2-(1-oxo-propyl)-pyrrolidine の絶対立体配置を決定するために 1 を加水分解した。得られた 2 つの *N*-メチルバリン、プロリン、*N*-メチルイソロイシンは改良 Marfey 法によりすべて *L* 体と決定した。また 2-(1-oxo-propyl)-pyrrolidine 部位はケトン基の位がエピ化する可能性があったので、1 のケトン基を $NaBH_4$ で還元した後、加水分解し、改良 Marfey 法により得られた化合物の絶対立体配置を *S* 体であると決定した。脂肪酸部位については、アルキン部位を還元した後、加水分解することで脂肪酸部位を得た。2,4-dimethyl 構造を有するアルキル鎖の相対立体配置は、2 つのメチル基に挟まれたメチレン水素の化学シフト値の差によって推定できることから、2 つのメチル基の相対立体配置は *anti* であると推定した [Schmidt et al. *Chem. Eur. J.*, 2012, 18, 7017.]. カルボキシル基の位のメチル基の絶対立体配置は PGME 法により *S* 配置と決定した。また 1 から得られた PGME 誘導体はすでに報告されており、今回得られた PGME 誘導体と、報告されている PGME 誘導体の 1H NMR の化学シフト値が良い一致を示したことから [Iwasaki et al. *Org. Lett.*, 2015, 17, 625.], 脂肪酸部位の絶対立体配置を決定した。2 については、1 と同様の手法で化学構造を決定した。

次に 3T3-L1 前駆脂肪細胞を用いて、1, 2 の生物活性を評価した結果、1, 2 はどちらも濃度依存的に脂肪細胞への分化を促進することが明らかになった。

(2) 海洋シアノバクテリア *Okeania* 属から単離した okeaniamide A, B の単離、構造、生物活性

沖縄県糸満市で採集した *Okeania* 属の海洋シアノバクテリアをメタノールで抽出し、抽出液をろ過、濃縮した。得られたメタノール抽出物を水と酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層を 90%メタノールとヘキサンで分配した。次に 90%メタノール層を各種クロマトグラフィーで精製した結果、okeaniamide A (3), B (4)を得た(図 2)。続いて 3 の構造解析を行った。高分解能質量スペクトルから 3 の分子式を $C_{31}H_{54}N_2O_5$ と決定した。さらに COSY スペクトル、HMBC スペクトル、HSQC スペクトルなどの二次元 NMR スペクトルを詳細に

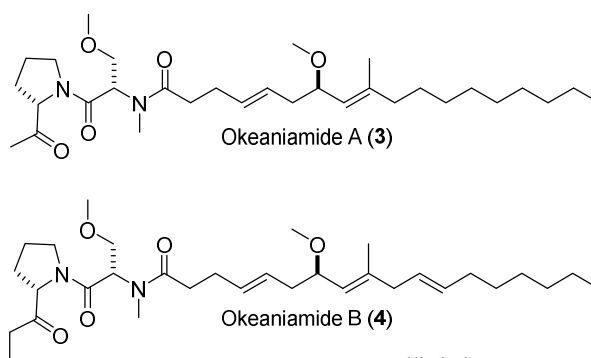


図2 Okeaniamide A, B の構造式

解析し、3 の平面構造を決定した。脂肪酸部位の二重結合については NOESY スペクトルを解析し、どちらも *E* 体と決定した。次に構成アミノ酸の *N,O*-ジメチルセリンと 2-(1-oxo-ethyl)-pyrrolidine の絶対立体配置を決定するために 3 を加水分解した。加水分解により得られた *N,O*-ジメチルセリンは改良 Marfey 法により *L* 体と決定した。また $NaBH_4$ で 3 のケトン部位を還元し、加水分解により 2-(1-hydroxy-ethyl)-pyrrolidine を得た。得られた 2-(1-hydroxy-ethyl)-pyrrolidine は改良 Marfey 法により絶対立体配置を *S* 体と決定した。以上の結果から 2-(1-oxo-ethyl)-pyrrolidine 部位の絶対立体配置は *S* 体であると決定した。次に脂肪酸部位の立体

化学について検討した。1 をオゾン分解後、フェナシルプロミドと反応させ 2-methoxysuccinic acid のフェナシルプロミド誘導体を得た。得られた 2-methoxysuccinic acid のフェナシルプロミド誘導体と市販の 2-hydroxysuccinic acid から別途調整したフェナシルプロミド誘導体のスペクトルデータを比較することで、脂肪酸部位のメトキシ基の絶対立体配置を *R* 配置と決定した。

得られた okeaniamide A (3), B (4) はどちらも濃度依存的に脂肪細胞への分化を促進することが明らかになった。

(3) 脂肪分解作用を有する化合物の探索

1. デプロモアプリトキシンの単離と脂肪分解促進作用

3T3-L1 細胞を用いる評価系を用いて脂肪分解促進作用をもつ化合物を探索した結果、沖縄県八重瀬町で採集した未同定海洋シアノバクテリアの粗抽出物が脂肪分解促進作用を有することが明らかになった。そこで、得られた粗抽出物を酢酸エチルと水で分配し、さらに酢酸エチル層を 90%メタノールとヘキサンで分配した。つづいて各種クロマトグラフィーを用いて 90%メタノール層に含まれる化合物を精製した結果、脂肪分解促進作用を有する化合物として、デプロモアプリシアトキシンを得た。次に得られたデプロモアプリシアトキシンの脂肪分解促進作用を評価した。3T3-L1 細胞を成熟脂肪細胞へ分化させ、デプロモアプリシアトキシスが成熟脂肪細胞に蓄積した中性脂肪を遊離脂肪酸とグリセロールへ分解するか確認した。その結果デプロモアプリシアトキシンは細胞生存率に影響を及ぼさない濃度 (0.05 ~ 1 μ M) で濃度依存的に脂肪分解促進作用を示した。

2. 脂肪分解関連遺伝子に対するデプロモアプリシアトキシンの影響

デプロモアプリシアトキシスが脂肪分解促進作用を示したことから、作用機序の解明を目的として、脂肪分解に関係する転写因子やアディポカインなどの遺伝子の発現量を調べた。本研究では脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとされている転写因子 PPAR、主に脂肪細胞から分泌されるアディポネクチン、脂肪分解が活発になると活性化される aP2 の遺伝子を測定した。その結果、デプロモアプリシアトキシンは脂肪細胞の分化に必須の転写因子である PPAR の発現を抑制しことから、3T3-L1 前駆脂肪細胞が成熟脂肪細胞へ分化するのを阻害している可能性が示唆された。さらに、アディポネクチンと aP2 の発現を促進することが明らかとなった。アディポネクチンは肝臓や骨格筋に存在する受容体に結合し、各臓器の脂肪の燃焼を促進することで、インスリン抵抗性を改善することが明らかとなっている。さらに、脂肪分解が活発になると活性化される aP2 の発現を促進していることが明らかとなった。以上の結果から、デプロモアプリシアトキシンは成熟脂肪細胞への分化抑制作用と、成熟脂肪細胞に蓄積した中性脂肪の分解作用の双方の作用により脂肪分解を促進していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Aki Yamano, Yuka Asato, Noriyuki Natsume, Arihiro Iwasaki, Kiyotake Suenaga, Toshiaki Teruya	4. 巻 85
2. 論文標題 Odookeanynes A and B, Acetylene-Containing Lipopeptides from an Okeania sp. Marine Cyanobacterium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 169-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.1c00915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaori Ozaki, Yuka Asato, Noriyuki Natsume, Shunya Tojo, Shimpei Sumimoto, Arihiro Iwasaki, Kiyotake Suenaga, Toshiaki Teruya	4. 巻 86
2. 論文標題 Differentiation-Promoting Effects of Okeaniamides A and B from an Okeania sp. Marine Cyanobacterium on Preadipocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1564-1570
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.3c00256	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八木澤 和正、照屋 俊明
2. 発表標題 沖縄県産海洋シアノバクテリア由来の新規環状ペプチド類の単離と構造決定
3. 学会等名 沖日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東條 隼也、尾崎 香織、夏目 矩之、座安 隆太、照屋 俊明
2. 発表標題 沖縄県糸満市産海洋シアノバクテリアにおける糖代謝促進化合物の探索
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 比嘉 星依夢、八木澤 和正、夏目 矩之、照屋 俊明
2. 発表標題 沖縄県浦添市西洲産海洋シアノバクテリアに含まれる尿酸産生抑制物質の探索
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 秋元 海月、照屋 俊明、吉田 将人、木越 英夫
2. 発表標題 海洋シアノバクテリア由来天然物Lagunamide C の合成による構造訂正
3. 学会等名 日本化学会第104春季年会(2024)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関