

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20577

研究課題名（和文）深海性生物混合物を探索源とした新規海洋天然化合物の探索と化合物ライブラリー化

研究課題名（英文）A new approach to search for the marine natural compounds from the mixtures of deep sea organisms

研究代表者

中村 文彬 (Fumiaki, Nakamura)

早稲田大学・理工学術院・助手

研究者番号：10907083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：地上と異なる環境に適応した深海性の生物からはユニークな構造や活性を有する二次代謝産物が同定されているが、その報告例は未だ限られている。その原因のひとつに、深海生物サンプルの確保が困難であることが挙げられる。深海生物は主にドレッジで採集されるため、採集過程において破砕・小断片化されてしまうことから、大量の分類不能サンプルが未利用資源として生じる。本研究では、貴重な深海生物から大量に生じる分類不可能な小断片混合物サンプルを有効利用することを目的として、混合サンプルをまとめて抽出したのから生物活性天然物化合物の探索研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで未利用資源とされてきた貴重な深海性生物の断片を有効利用することで深海性の海洋生物由来の天然化合物を明らかにできた。近年、天然から十分量の新規生物活性化合物を発見することが難しくなっていることから、医薬品開発研究においても合成化合物の比重が増大しつつある。しかしながら、現在でも合成物を凌駕した多様な化学骨格を有する天然化合物は依然として重要な医薬品の探索ソースと考えられるため、医薬品候補となる新たな化合物探索を可能とした本研究の意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Bathophilous organisms have evaluated their metabolism and adapted to the extreme environment different from those of terrestrial. As the result, secondary metabolites from such organisms one of quite unique structures and bioactivities. Many of these organisms are collected by dredging and, as the results, become crushed and fragmented small pieces making it difficult to obtain enough amount of the classified samples. In this study, we focused on the unclassified small fragment mixtures of the deep sea organisms as the source of drug leads, and explored the various natural products from the extract of the mixture.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然物化学 天然化合物 深海生物 ドレッジ採集

1. 研究開始当初の背景

天然化合物の探索研究では、長年の精力的な研究の結果、生物資源から新規骨格を含む生物活性分子を発見することが困難になってきている。そのような状況の中で新規の構造/生物活性化合物を発見するためには、未開拓な生物資源から探索する、もしくは、従来にない新しい生物活性を指標とする、2つの戦略が有効と考えられる。

本研究では、深海生物の分類不能サンプル(戦略)に着目した。海洋生物は医薬品の探索源として注目されており、中でも地上とは異なる環境に適応した深海生物にはユニークな構造や活性を有する二次代謝産物が含まれていることが期待される。しかしながら、これまで報告された海洋天然化合物のうち、深海生物由来化合物は全体の約 2%と報告例が少ない。1 そのひとつの原因として、深海生物は底引き網漁のような手法である“ドレッジ”によって採集されるが、その採集過程において深海生物は破碎・小断片化されてしまうため、サンプル量の確保が難しいことが考えられる。通常、天然化合物の探索研究には起源となる生物種の同定が必須なため、破碎を免れた分類可能な生物サンプルにのみ着目され、破碎された大量の分類不能サンプルは未利用資源とされてきたが、分類不能な深海生物断片からも様々な生物活性を示す化合物の探索源として期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、貴重な深海生物から大量に生じる分類不能サンプルを新たな未利用生物資源として有効利用することで、新規の深海性海洋天然化合物を単離・同定することを目指した。また、多種多様な化学構造や生物活性を有するユニークな深海性生物由来天然化合物は貴重な研究リソースになりうると考えて、深海性海洋天然化合物をライブラリー化する。

3. 研究の方法

混合物サンプルからの探索研究では、まず①「採集過程で生じた分類不能な混合物サンプルから天然化合物の探索および同定」を行う。次に、①で同定された天然化合物はドレッジ採集で得られた分類可能なサンプルにも含まれていると仮定して、②「分類された深海性生物サンプルに含まれる二次代謝産物を感度高く分析できる LC/MS 分析を用いて網羅的に調べる」ことで、生物に含まれる天然化合物の特徴から、化合物の起源生物を同定する(図 1)。このように従来とは異なるアプローチで研究を行うことで未利用生物資源である貴重な深海生物の分類不能サンプルを様々な生理活性化合物の探索源として有効利用できると考えた。

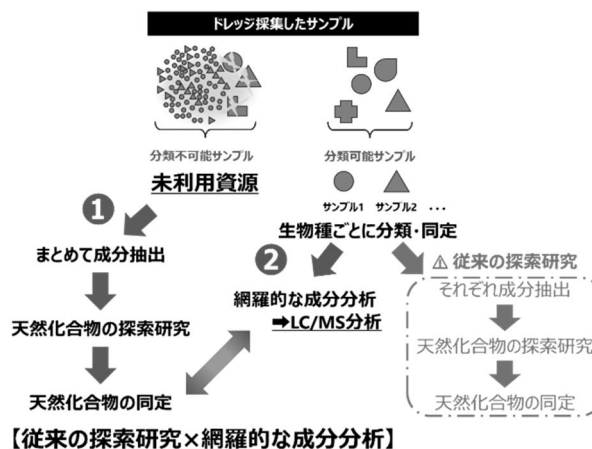


図 1. 研究アプローチ.

4. 研究成果

(1) 深海性生物混合物からの天然化合物探索

鹿児島県屋久新曽根(水深 166 ~ 167 m)でドレッジ採集を行い、分類可能であった深海生物サンプル 99 種と同時に、採集過程において破碎・小断片化されてしまった分類不能な深海生物小断片混合物 24.625 kg (wet wt.) が得られた。そこで、この深海生物小断片混合物から海洋天然化合物の探索を試みた。深海生物小断片混合物をメタノールで抽出後、溶媒分画および各種クロマトグラフィーによって計 23 画分のスクリーニングサンプルを調製した。これらスクリーニングサンプルは細胞毒性や抗原虫活性など様々な生物活性を有していたことから、これまで未利用生物資源とされてきた深海生物の分類不能サンプルが生物活性化合物の興味深い探索源となりうることが示唆された。本研究では、まずヒト子宮頸がん由来細胞である HeLa 細胞に対する毒性活性を指標として、さらなる分画および精製操作によって得られた新規化合物を含む 12 種類の化合物 2-13 を単離した(表 1)。得られた各化合物は MS および各種 NMR を測定し、スペクトルを解析することで構造を決定した。

表 1. 各化合物の細胞毒性

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
IC ₅₀ (ng/mL)	HeLa	<0.13	1.4	1.4	7.2	36	-	1.8 × 10 ²	8.9 × 10 ²	2.0 × 10 ³	4.5 × 10 ³	0.64	8.9 × 10 ²
	P388	8.9 × 10 ²	36	80	1.8 × 10 ²	1.8 × 10 ²	-	8.9 × 10 ²	8.9 × 10 ²	8.9 × 10 ²	4.5 × 10 ³	4.0 × 10 ²	4.5 × 10 ³

(2) 天然化合物の起源生物の同定

深海生物の分類不能サンプルから単離した天然化合物を含む生物種の同定するため、同じドレッジ採集で得られた分類可能な深海生物サンプル 99 種から調製した抽出液を用いて、LC/MS 分析を用いた網羅的なメタボローム解析を行った。具体的には、分類した深海生物サンプルそれぞれをメタノールで抽出し、逆相カラムによる 2 ステップの前処理後、LC/MS 分析に付し、**positive mode** および **negative mode** の測定を行った。その結果、各深海性生物サンプルの二次代謝産物プロファイルを得て、深海性生物の二次代謝産物データベースを構築した。

その後、各化合物の特徴的なイオンピークを指標として、天然化合物を含む生物種を探索して、それぞれの天然化合物を含む生物種が明らかにした (図 2)。中でも **ceratamine B (11)** を含む生物種 **S170159** はサンプル量が **90 g** のみであったことから、**S170159** からの探索研究では化合物 **11** を発見するのは困難であったことが推測され、大量の深海生物小断片混合物を探索源とすることで同定できた化合物であると考えている。

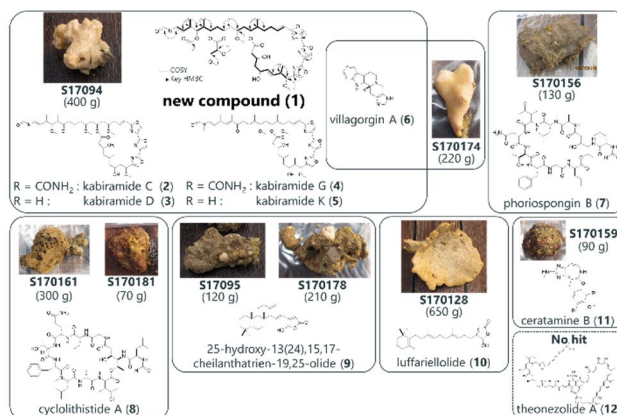


図 2. 天然化合物を含む生物種の同定。

(3) 深海性海洋天然化合物のライブラリー化と今後の展望

深海性生物を対象とした探索研究は国内外で報告が多くあるものの、海洋生物混獲物からの化合物同定報告はほとんどない。そのため、「混合物からの探索研究」と「LC/MS 分析を用いた網羅的な成分分析」を組み合わせることにより、これまで未利用資源とされてきた深海の分類不能な生物断片混合物を有効利用することで深海性海洋生物由来の天然化合物を明らかできた意義は大きいと考えている。深海性生物混合物を探索源とした新規海洋天然化合物探索研究のための基盤を整えたことで深海生物の分類不能サンプルから同定した天然化合物の起源生物を迅速に、かつ、効率的に同定することが可能となった。

本アプローチは生物種が混ざり合ったサンプルから探索研究を行うため、様々な生物種由来の生理活性成分を一度に、そして、効率的に得ることができる。そのため、新規化合物の探索研究だけでなく、貴重な深海性海洋天然化合物を研究リソースとして、ライブラリー化することができた。有機合成によって作成される系統だった化合物ライブラリーとは異なり、多種多様な化学骨格を有するユニークな化合物ライブラリーとなっていることから、現在も継続的に探索研究を進めており、本ライブラリーを用いた生物活性スクリーニングによって医薬品候補となる化合物を得たいと考えている。

<引用文献>

- Skropeta, D. *Nat. Prod. Rep.* 2008, 25, 1131-1166.**
Machida, K.; Abe, T.; Arai, D.; Okamoto, M.; Shimizu, I.; Voogd, N. J.; Fusetani, N.; Nakao, Y. *Org. Lett.* 2014, 16, 1539-1541.
Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Hashimoto, K.; Kosei, K.; Noma, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 847-849.
Matsunaga, S.; Fusetani, N.; Hashimoto, K.; Kosei, K.; Noma, M.; Noguchi, H.; Sankawa, U. *J. Org. Chem.* 1989, 54, 1360-1363.
Petchprayoon, C.; Asato, Y.; Higa, T.; Garcia-Fernandez, L. F.; Pedpradab, S.; Marriott, G.; Suwanborirux, K.; Tanaka, J. *Heterocycles* 2006, 69, 447-456.
Espada, A.; Jimenez, C.; Debitus, C.; Riguera, R. et al. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 7773-7776.
Capon, R. J.; Ford, J.; Lacey, E.; Gill, J. H.; Heiland, K.; Friedel, T. *J. Nat. Prod.* 2002, 65, 358-363.
Tajima, H.; Wakimoto, T.; Takada, K.; Ise, Y.; Abe, I. *J. Nat. Prod.* 2014, 77, 154-158.
Clark, D. P.; Carroll, J.; Naylor, S.; Crews, P. *J. Org. Chem.* 1998, 63, 8757-8764.
Buchanan, M. S.; Edser, A.; King, G.; Whitmore, J.; Quinn, R. J. *J. Nat. Prod.* 2001, 64, 300-303.
Albizati, K. F.; Holman, T.; Faulkner, D. J.; Glaser, K. B.; Jacobs, R. S. *Experientia* 1987, 43, 949-950.
Manzo, E.; Van Soest, R.; Maitainaho, L.; Roberge, M.; Andersen, R. *J. Org. Lett.* 2003, 24, 4591-4594.
Kobayashi, J.; Kondo, K.; Ishibashi, M.; Walchli, M. R.; Nakamura, T. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 6661-6665.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Fumiaki Nakamura, Yoichi Nakao
2. 発表標題 Search for the Marine Natural Compounds from the Mixtures of Deep-Sea Invertebrates
3. 学会等名 The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------