

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380114

研究課題名(和文)興奮と抑制の中樞神経伝達を制御する海洋天然物の探索

研究課題名(英文) Neuroactive marine metabolites that modulate synaptic functions

研究代表者

酒井 隆一 (Ryuichi, Sakai)

北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円、(間接経費) 3,630,000円

研究成果の概要(和文)：海洋生物毒・生理活性物質は神経伝達やその調整を司る受容体やチャンネルの宝庫である。本研究では海綿やホヤなどの無脊椎動物より新規の神経毒ペプチドであるアーキュレイン、グルタミン酸受容体の糖鎖を認識して機能を変調する海綿ガレクチンCchG、新規NMDA型グルタミン酸受容体のアゴニストであるHDDA、神経疾患薬のターゲットであるG-タンパク質共役型受容体(GPCR)に作用する新規のアルカロイドを見出し、それらの構造決定を行うとともに生理活性について詳細に検討した。

研究成果の概要(英文)：Marine natural products are a rich source of neuroactive compounds that selectively acts to ion channels and receptors that function or modulate synaptic neurotransmission. Here, we have isolated biologically active metabolites that modulate neuronal functions, including new polyamine-modified peptide toxin aculeines, a sponge galectin CchGs that modulate actions of AMPA/KA-type glutamate receptors, a new alkaloids from sponges that target neuronal receptors selectively. We determined chemical structures, target receptors, and modes of activity of those molecules.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：海洋天然物 中枢神経 生理活性物質 グルタミン酸受容体 GPCR レクチン プリン

1. 研究開始当初の背景

中枢神経は興奮性と抑制性神経伝達の巧妙なバランスを保つことでその恒常性を維持しているが、それを司るのはシナプス表面に存在する各種受容体、イオンチャンネル等の機能分子である。これらの機能分子の理解を深めるため、さらには中枢神経疾患薬の探索のためには、シナプスの調節機構を制御する化合物の存在が不可欠である。そこで本研究では、神経活性物質の潜在的な宝庫である海洋天然物[発表論文 3]を探索、新規の神経活性物質を発見し、その構造と機能を解明する目的で研究を行った。研究当初、2種の西表産海綿の抽出物にそれぞれグルタミン酸受容体の脱感作を強力に抑制する作用、およびポリアミンにより修飾されたペプチド毒が存在すること、またいくつかのパラオ産の海洋生物の抽出物がマウスに対し神経毒様の症状を示すことを見出していたが、活性成分の構造と作用について詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では期間内に1で述べた活性抽出物に含まれる活性本体を単離し、その構造、生理活性の詳細な検討を行うことを主目的として研究を行った。また、天然物の構造をモチーフに合成された新規神経活性物質の活性評価も併せて行った。

3. 研究の方法

新規神経活性物質の単離：ゼブラフィッシュ、マウス、神経細胞を組み合わせた検定法で活性を示した試料を、生物検定を指標に各種クロマトグラフィーで分離し、活性本体を単離した。単離した化合物の構造は、低分子化合物であれば機器分析と化学変換を併用することで、またタンパク質であればアミノ酸及び遺伝子の配列解析により決定した。タンパク質等の立体構造解析には

X-線構造解析を用いた。

生理活性の評価：神経活性に関しては化合物をマウスの脳室内に投与し、行動を観察することで検討するとともに、活性を示した試料については、その標的受容体を発現受容体に対する結合試験及び電気生理的な手法を用いて探索した。また電気生理実験により詳細な機能評価を行った。

4. 研究成果

レクチンの構造研究：

海綿 *Cynachyrella* から活性本体として単離したレクチン(CchG)は動物ガレクチンと相同性を持つ分子量約 16 kD のポリペプチドであった[発表論文 4]。X-線構造解析の結果 CchG はこれまでにないドーナツ型の4量体構造のガレクチンであることが判明した(図1)[発表論文 6]。



図1 C c h Gの立体構造

レクチンの生理活性：CchG は発現 AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体の脱感作を阻害する活性を持つ(図2)[発表論文 4]。単量体として構造的に類似するマアナゴ、ヒトガレクチン 1とその活性を比較すると4量体として最も安定な構造を持つ CchG が最も強い活性を持つことが分かった。この結果はレクチンにより受容体糖鎖が架橋される際に安定した構造を取り得る可能性が高いことを示唆している。この

点は X-線構造解析で得られた結果からも推測できる。すなわち CchG の糖結合部位間の間隔はグルタミン酸受容体の糖鎖結合部位間の間隔である 54 にほぼ一致している[発表論文 6]。この結果から予測できるようにガレクチンの作用は発現受容体において糖鎖のプロセッシングに依存的であることが分かった。これらの結果から、AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体は糖鎖プロセッシングの度合いに応じてガレクチンにより様々な変調を受け、中枢の生理または病理的な状態に影響を及ぼしている可能性を提唱した[発表論文 2]。

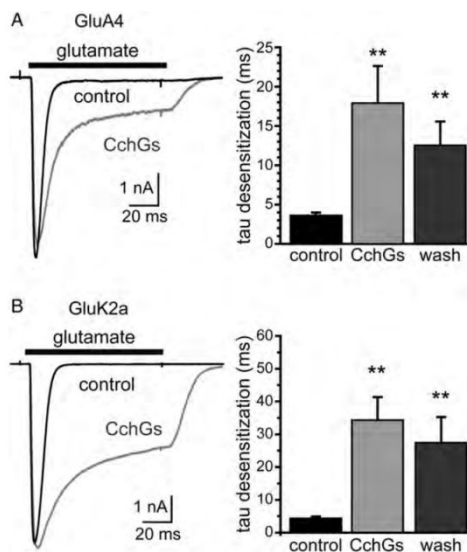


図 2 . C c h G により発現 AMPA (GluA4) および KA (GluK2a) 型グルタミン酸受容体の脱感作が阻害された

アーキュレインの構造：アーキュレイン (ACU) は西表産海綿 *Axynissa aculeata* 由来の 44 残基の生理活性ペプチドで、N-末端が長鎖ポリアミン (LCPA) で修飾されたこれまでにない新規構造を持つ(図 3)[発表論文 8]。本研究では、アーキュレイン類アミノ酸配列を決定するとともに、N-末端側のアミノ酸残基プロトアーキュレイン (pACU-B) の構造を、合成モデル化合物と比較検討することで決定した。この結果から、これまで例を見ない構造を持

つ分子量 6570、5702 である ACU-A 及び B の作業構造を提出した(図 3)。

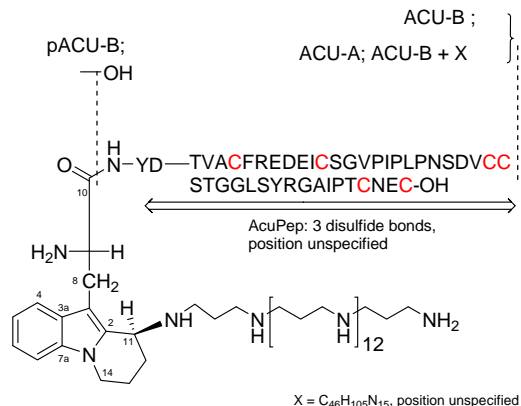
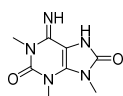


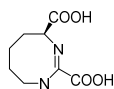
図 3 . プロトアーキュレイン B の構造とアーキュレイン類の作業構造

アーキュレインの生理活性：ACU は当初マウスの脳室内投与で痙攣誘発作用を持つ化合物として単離されたが、今回の研究で、ACU は強い溶血作用を示すこと、さらに神経細胞膜を破壊することで、細胞内にカルシウムイオン流入を惹起することを示した。この結果は ACU の毒性が、中枢で神経細胞の膜を破壊することに起因することが分かった。そこで、ACU の細胞膜破壊機構を探るため、ACU-A の溶血作用を阻害する物質を探索した。ACU は LCPA を持っているため、それに結合する陰イオン性の物質を中心に検討したところ、リン酸等の多価無機陰イオン、陰イオン性のリン脂質、ヘパラン硫酸、レクチン等によって強く阻害されることを見出した。一方、1 価無機イオンや中性リン脂質による阻害は見られなかった。また、ヘパラン硫酸に特異的に結合するアミン化合物であるアドヘサミンはヘパラン硫酸の阻害作用と拮抗しなかった。これらの結果から、ACU が細胞表面の何らかの陰イオン性物質を認識し、結合することが溶血活性に必要なことが示唆された。

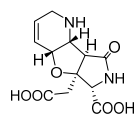
新規神経活性物質の単離と作用の解明：海洋生物には神経シナプスの受容体やイオンチャンネルに作用する化合物が広く含まれていると考えられるが、それらを探索することは容易ではない。そこで、海洋生物抽出物をマウスの脳室内に投与し、行動変化を観察する手法、ゼブラフィッシュ幼魚の試料投与による行動変化を、ビデオトラッキング装置を用いて観察する手法、さらには培養神経細胞を用いた電気生理学実験を併用することでスクリーニングした。その結果神経活性を示した抽出物の分離・精製を行い、パラオ産海綿 *Cribrochalina olemda*、*Halichondria viridis* より G-タンパク質共役型受容体に結合するカフェインと類似した構造を持つ新規プリン誘導体 1 を見出し、それらが抑制性神経伝達機構を抑えることで興奮性の神経伝達を亢進する作用を持つことを見出した[発表論文 9]。またパラオ産海綿より (Z)-3,4,5,6,7,8-hexahydro-1,3-diazocine-2,4-dicarboxylic acid (HDDA、2) を単離し、それが NMDA 受容体のアゴニストであることを見出した。その他パラオ産ホヤ及び海綿より新規のあるカロイドを見出しその構造を決定した。



1,7-dimethyl-8-oxoisoguanine (1)



HDDA (2)



IKM 159 (3)

さらに、ミクロネシア産海綿より見出された興奮性アミノ酸ネオダイシハーベイン及びその誘導体のグルタミン酸受容体に対する結合を受容体のリガンド結合ドメインとの共結晶の X-線構造解析から解明し、カインニン酸型受容体においてリガンド結合部位のアゴニスト結合に伴うコンフォメーションの変化がイオンチャンネルの開閉にどの

ように影響するかという問題解決に資する知見を提供した[発表論文 7]。また、ダイシハーベインの構造をモデルとして合成された新規物質 IKM159 (3) がマウスに対して弛緩作用を示すことを見出し、その分子レベルでの作用機構の解明を行った。その結果 IKM159 は AMPA 型グルタミン酸受容体に結合し、その活性化を抑制するアンタゴニストであることを見出した[発表論文 5]。

その他、合成カインニン酸の新規蛍光誘導体がマウスに対し興奮性の活性を示すことを見出した[発表論文 1]。

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 9 件)

1) Sasaki, S.; Suzuki, H.; Ouchi, H.; Asakawa, T.; Inai, M.; Sakai, R.; Shimamoto, K.; Hamashima, Y.; Kan, T., Practical synthesis of kainoids: a new chemical probe precursor and a fluorescent probe. *Org Lett* **2014**, *16*, 564-7. (査読あり, DOI: 10.1021/o1403434e)

2) Copits, B. A.; Vernon, C. G.; Sakai, R.; Swanson, G. T., Modulation of ionotropic glutamate receptor function by vertebrate galectins. *J. Physiol.* **2014**, *592*, 2079-96 (査読あり, DOI: 10.1113/jphysiol.2013.269597)

3) Sakai, R.; Swanson, G. T., Recent progress in neuroactive marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 273-309. (査読あり, DOI: 10.1039/c3np70083f)

4) Ueda, T.; Nakamura, Y.; Smith, C. M.; Copits, B. A.; Inoue, A.; Ojima, T.; Matsunaga, S.; Swanson, G. T.; Sakai, R., Isolation of novel prototype galectins

from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. *Glycobiology* **2013**, *23*, 412-25. (査読あり, DOI: 10.1093/glycob/cws165)

5) Juknaite, L.; Sugamata, Y.; Tokiwa, K.; Ishikawa, Y.; Takamizawa, S.; Eng, A.; Sakai, R.; Pickering, D. S.; Frydenvang, K.; Swanson, G. T.; Kastrup, J. S.; Oikawa, M., Studies on an (S)-2-amino-3-(3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolyl)propionic acid (AMPA) receptor antagonist IKM-159: asymmetric synthesis, neuroactivity, and structural characterization. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2283-93. (査読あり, DOI: 10.1021/jm 301590z)

6) Freymann, D. M.; Nakamura, Y.; Focia, P. J.; Sakai, R.; Swanson, G. T., Structure of a tetrameric galectin from *Cinachyrella* sp. (ball sponge). *Acta Crystallogr. D, Biol. Cryst.* **2012**, *68*, 1163-74. (査読あり, DOI: 10.1107/s0907444912022834)

7) Unno, M.; Shinohara, M.; Takayama, K.; Tanaka, H.; Teruya, K.; Doh-Ura, K.; Sakai, R.; Sasaki, M.; Ikeda-Saito, M., Binding and Selectivity of the Marine Toxin Neodysiherbaine A and Its Synthetic Analogues to GluK1 and GluK2 Kainate Receptors. *J. Mol. Biol.* **2011**. (査読あり, DOI: S0022-2836(11)00955-7 [pii])

8) Matsunaga, S.; Jimbo, M.; Gill, M. B.; Wyhe, L. L.; Murata, M.; Nonomura, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R., Isolation, amino acid sequence and biological

activities of novel long-chain polyamine-associated peptide toxins from the sponge *Axinyssa aculeata*. *Chembiochem* **2011**, *12*, 2191-200. (査読あり, DOI: 10.1002/cbic.201100329)

9) Sakurada, T.; Gill, M. B.; Frausto, S.; Copits, B.; Noguchi, K.; Shimamoto, K.; Swanson, G. T.; Sakai, R., Novel N-methylated 8-oxoisoguanines from Pacific sponges with diverse neuroactivities. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 6089-99. (査読あり, DOI: 10.1021/jm 100490m)

[学会発表](計 15 件)

1) パラオ産海綿 *Axinyssa* sp. より得られたグルタミン酸受容体作動薬に関する研究 内舩肇, Eng A., Ekins M., Hooper J., Swanson G.T., 酒井隆一 日本水産学会大会, 2014年3月28日北海道大学函館キャンパス、函館

2) Aculeine A の溶血活性 岸伶美, 酒井隆一 日本水産学会大会, 2014年3月28日北海道大学函館キャンパス、函館

3) Sakai R., Kishi R., Matsunaga S. Aculeines: Novel peptide toxins modified with long chain polyamine from the Okinawan marine sponge. MaNaPro 2013, 2013年9月16日 Hesperia La Toja Hotel, La Toja Island, Spain

4) Uchimasu H., Eng A., Swanson GT, Sakai R. Neuroactive small molecules from water soluble extracts of Palauan sponges and tunicates. MaNaPro 2013, 2013年9月16日 Hesperia La Toja Hotel, La Toja Island, Spain

5) 海綿 *Cinachyrella* sp. から得られた iGluR 制御活性を示す新規ガレクチンの研究 上田拓弥, Freymann DM, Focia PJ, 中村友香, Smith C, 井上昌, 尾島孝男, 松永智子, Swanson GT, 酒井隆一 日本水産学会大会, 2013年3月26日 東京海洋大学 東京

6) 海綿 *Axinyssa aculeata* 由来の長鎖ポリアミン化合物 Protoaculeine B の構造解析 松永智子, 酒井隆一 日本水産学会大会, 2013年3月26日 東京海洋大学 東京

7) Sakai R. *Novel neuroactive compounds from aqueous extracts of marine sponges.* American Chemical Society Meeting, Philadelphia, PA 2012年8月19日 (招待講演)

8) 海綿由来興奮性アミノ酸ダイシハーベイン 酒井隆一 日本薬学会年会 2012年3月29日 北海道大学、札幌 (招待講演)

9) Sakai R. *Biologically active ribosomal peptides from sponges.* Gordon Research Conference on Marine Natural Products, Ventura CA. 2012年2月27日 (招待講演)

10) Sakai R. US-Japan Seminar for Marine Natural Products, Okinawa, 2011年11月 (招待講演)

11) 沖縄県産海綿 *Cinachyrella* sp. より得られたガレクチン IRI35 の配列解析 上田拓弥, 井上昌, 中村友香, 松永智子, 尾島孝男, Swanson GT., 酒井隆一 日本水産学会大会 2011年9月28日 長崎大学、長崎市

12) Aculeine およびその類縁体の構造解析 松永智子, 酒井隆一, Gill M.B., Lash Van Wyhe L.L., Swanson GT. 天然有機化合物討論会 2011年9月27日 大阪国際交流センター 大阪

13) パラオ産海綿より得られた新規プリン化合物の構造と神経調節活性 櫻田剛史, Gill M.B., Frausto S., Copits B., 野口恵一, 島本啓子, Swanson GT., 酒井隆一 日本水産学会大会 2011年3月27日 東京海洋大学 東京

14) Aculeine 類およびその類縁体の構造解析 松永智子, 酒井隆一 日本水産学会大会、2011年3月27日 東京海洋大学、東京

15) パラオ産 Haplosclerida 海綿より得られた新規プリンの構造と神経調節活性 櫻田剛史, Gill M. B., Frausto S., Copits B., 野口恵一, 島本啓子, Swanson G.T., 酒井隆一 天然有機化合物討論会、2010年9月30日 静岡コンベンションアーツセンター、静岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 隆一 (Sakai Ryuichi)
北海道大学・大学院水産科学研究院・教授

研究者番号：20265721