

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550192

研究課題名(和文)天然物由来のシガテラ解毒物質の単離、構造決定および作用機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of organic compounds which detoxified ciguatera fish poisoning, isolated from some medical plants and marine organisms

研究代表者

濱田 季之 (Hamada, Toshiyuki)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40321799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：世界最大規模で発生している魚毒食中毒であるシガテラの予防ならびに治療を目的として、薬用植物、海洋無脊椎動物、海藻からのシガテラ解毒物質の探索を行った。マレーシア産海綿から有機化学的手法を用いて分離・精製を行い、5種類のプロモピロール類縁体を単離した。沖縄産キダチトウガラシ *Capsicum frutescens* L. から5種類のカプサイシン類縁体を単離した。6種類の合成物を加えた11種類のカプサイシン類縁体と一緒にシガテラ解毒活性試験を行い、構造活性相関を行った。さらに、紅藻由来のプロモインドール化合物について、構造活性相関研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Ciguatera fish poisoning (CFP) is usually a nonfatal illness such as fever and diarrhea, caused by ingestion of various fishes living in the tropics and subtropics. Here, we studied some organic compounds which detoxified CFP, isolated from some medical plants and marine organisms in Southern area. We also carried out the structure-activity relationship study of the related compounds about bromopyrroles, bromoindoles, and capsaicins.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：シガテラ解毒活性 化学構造 植物 海洋生物 構造活性相関 マレーシア 国際情報交換

1. 研究開始当初の背景

シガテラ (*Ciguatera*) 中毒とは、海藻に付着する底性渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* が生産する ciguatoxin (CTX; **図 1 上**) や maitotoxin (MTX) などの毒性ポリエーテル化合物を体内に蓄積した熱帯産魚類を摂取することで引き起こされる世界最大規模の食中毒である (文献 1~4)。死亡率は低いものの、下痢や吐き気、筋肉痛、激しいかゆみに襲われる。また、ドライアイス・センセーション (冷たいものを触れたり、食べたりすると激しく痛む) を発症することもある。世界中で年間 10 万人の中毒患者を出しながら、このシガテラ中毒の治療法は、症状の一時的緩和を目的とした伝承植物の使用のみであり、「化合物レベルでの治療薬」は存在していない。CTX は、Na チャンネルを過剰開放することにより、細胞のイオンバランスを壊し、細胞異常 (または細胞死) を引き起こす。Na チャンネル上の CTX 結合部位は、赤潮毒のプレベトキシン (BTX; **図 1 下**) と同じく、5 番目の膜貫通ドメインの 3 番目の helix に位置する (文献 3)。安元-Manger らは、マウス神経芽細胞 Neuro-2a を用いた実験系で、Na チャンネルの立体構造上で CTX や BTX 結合部位の近傍に結合する veratridine (Na チャンネル過剰開放作用物質) と ouabain (Na⁺/K⁺-ATPase 阻害剤) を共存させることで、希少で高価な CTX や BTX を極微量 (96 wells マイクロプレートの 1 well あたり、1~2 pg 量の CTX または 2~3 ng 量の BTX) 加えるだけで、細胞の Na チャンネルの過剰開放を促し、細胞死に導くことを報告した (文献 5)。さらに、2005 年に Garrec らは、上記の安元-Manger らの方法を用いて、31 種類のシガテラの伝承薬用植物の抽出液が CTX/BTX により誘発される Na チャンネル過剰開放を抑えることを報告した (文献

6)。この研究報告により、多くのシガテラ伝承薬用植物は、CTX/BTX で誘発される Na チャンネル過剰開放を抑える化学物質を含んでおり、その化学物質の働きによりシガテラを解毒することが初めて分かったのである。

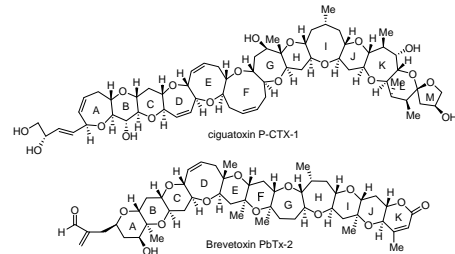


図 1. ciguatoxin (CTX) と brevetoxin (BTX) の化学構造

申請者は、平成 21 年度から 3 年間、科研費「基盤 C」の研究資金のもと、上記 (文献 6) の CTX/BTX による Na チャンネル過剰開放を抑制する南方系薬用植物のうち、特に鹿児島県以南に自生する植物を採集し、安元-Manger らの Neuro-2a を用いた実験系 (文献 5) を立ち上げて、**図 2** に示す抽出・二層分配法やカラムクロマトグラフィー法を用いて、シガテラ解毒物質を探索した。その結果、モンパノキ (*Argusia Argentea*) とハマゴウ (*Vitex rotundifolia* Linne fil.) の葉については、水溶性画分に活性が見られ、数種の糖やイリドイド配糖体を単離・構造決定した (文献 7)。キダチトウガラシ (*Capsicum frutescens* L.) からは脂溶性の脂肪酸エステルを含む画分に活性が見られた。その他にも、ゲンバイヒルガオの根、パパイヤの花、ザクロの実から活性成分を単離しつつある。この研究で得られた活性物質である糖質や脂肪酸関連の化合物は、効果 (作用機序) として浸透圧効果による細胞内の余分な水分排出を行い、一時的にはシガテラ中毒症状の緩和には有効であるが、イオンチャンネルおよびそれに結合したシガトキシンには直接は影響を与えておらず、シガテラ中毒の根本的な治

癒には使えないという結論に至った。

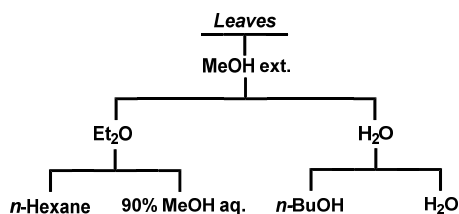


図 2. 薬用植物の有機溶媒抽出および二層分配

2. 研究の目的

上記のように、シガテラ中毒に間接的に関与し、緩和するものではなく、CTX やイオンチャンネルに直接作用し、シガテラ中毒を治癒できうる化合物を探索することを目的として、南方系薬用植物だけでなく、海洋無脊椎動物や海藻類を加えて、シガテラ解毒物質を探索することにした。海洋無脊椎動物や海藻類には、多種多様な化学構造を有する二次代謝産物が無数に含まれており、同じく海洋生物由来の tetrodotoxin (TTX) などのようにイオンチャンネルに直接作用する化合物が含まれている可能性はきわめて高い。

本研究では、申請者の研究室で平成 19 年 6 月以降、行っている「CTX/BTX による Na チャンネル開放の抑制活性」を指標にして、薬用植物、海洋無脊椎動物、海藻などの有機溶媒抽出物からの天然物化学的手法によるシガテラ毒解毒活性物質の単離および化学構造の決定を行うこととする。また、その治療薬の作用メカニズムを解明するために、解毒活性物質の構造活性相関研究を行い、副作用のないシガテラ毒治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 試料採集およびシガテラ毒解毒活性化合物の単離

海洋生物についてはその有機溶媒抽出液でシガテラ解毒活性の一次スクリーニングを行い、活性を示すと判定された海洋生物については、単一化合物レベルでの化学構

造解析が可能な量の海洋生物（大体、湿重量で 500g から 1 kg 程度）を鹿児島県以南の島嶼群およびボルネオ島（マレーシア・サバ州）からスキューバダイビング等で採集する。採集した薬用植物や海洋生物についてメタノール等で抽出後、活性試験を指標にして溶媒分画、フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過、および逆相 HPLC（高速液体クロマトグラフィー）により目的のシガテラ毒解毒物質を単離する。（マレーシア・サバ州での生物試料については、サバ大学熱帯生物保全研究所准教授 Charles S. Vairappan 博士のご協力のもと、現地にて採集および抽出・二層分配を行なった後、国内に持ち帰り、申請者の研究室にて単離・構造決定を行なう。）

(2) 活性試験

Manger や Garrec らが報告した方法（文献 5 と 6）を用いて、マウス繊維芽細胞 Neuro-2a を用いて、ベラトリジンとウアバイン共存下、CTX または BTX を加えることで起こる Na チャンネルを過剰開放を薬用植物の抽出物がどの程度の抑制するのかについて検討する。この活性試験法については、既に最適な試薬類の濃度や反応時間等は検討済みである。

(3) 解毒活性物質の化学構造の決定

得られたシガテラ毒解毒物質の構造は、主に NMR（核磁気共鳴）法を用いて決定する。また、質量分析（MS）法、赤外吸収分光（IR）法、紫外吸収分光（UV）法なども NMR 法と相補的に用いることで最終の立体化学を含めた化学構造を決定する。

(4) シガテラ毒解毒活性物質の構造活性相関

得られたシガテラ毒解毒活性物質の類縁体を単離や化学誘導反応などで調製し、1-2

の活性試験における活性値を比較検討することで、解毒活性物質中の重要な官能基や部分構造を明らかにする。

4. 研究成果

(1) マレーシア産海綿由来のシガテラ毒解毒活性化合物の単離

マレーシアボルネオ島近海で採取した種未同定海綿 (No. TH11-6-4) 2.64 kg を MeOH で抽出した。濃縮後、得られた MeOH 抽出物 (99 g) を AcOEt と H₂O で二層分配し、AcOEt 層を 90% MeOHaq. (3.3 g) と *n*-hexane (6.1 g) にて、H₂O 層をさらに *n*-BuOH (19 g) と H₂O (44 g) にてそれぞれ二層分配した。90% MeOHaq. 層について、ODS カラムクロマトグラフィー、pTLC、MPLC および ODS-HPLC による分離・精製を行い、3 種のペプチド化合物を単離した。また、*n*-BuOH 層から同様の方法で 5 種のプロモピロールを単離した。一次元 (1D) および二次元 (2D) 核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いて化学構造を決定した。さらに、シガテラ解毒活性試験を行ったところ、1 種類のプロモピロール化合物にシガテラ解毒活性が見られた。論文投稿準備中のため、化学構造等については省略する。

マレーシアボルネオ島近海で採取した海綿 *Luffariella variabilis* 2.64 kg を MeOH で抽出した。濃縮後、得られた MeOH 抽出物 (132 g) を AcOEt と H₂O で二層分配し、AcOEt 層 (28 g) を 90% MeOHaq. と *n*-hexane にて、H₂O 層をさらに *n*-BuOH と H₂O にてそれぞれ二層分配した。シガテラ解毒活性を示した 90% MeOHaq. 層 (15 g) について、ODS カラムクロマトグラフィー、pTLC、MPLC および ODS-HPLC による分離・精製を行い、compound A を 7.3 mg、compound B を 92 mg 単離した (図 3)。一次元 (1D) および二次元 (2D) 核磁気共鳴 (NMR) 分光法を用いた構造解析の結果、compound B は、既知化合

物の (4*E*,6*E*)-dehydromanoalide (文献 8) であると同定した。また、compound A は compound B の 25 位水酸基がメトキシ基になった化合物と同定した (図 3)。Compound A についての単離報告例はこれまでないことから、本化合物は新規化合物と考えている。また、これら 2 つの化合物は、残念ながらシガテラ解毒活性を示さなかった。

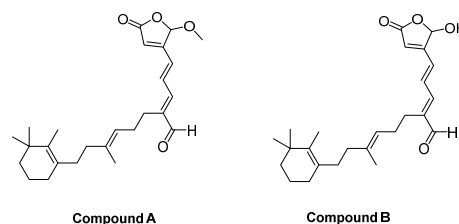


図 3. 化合物 A と B の化学構造

(2) 単離化合物に対する抗シガテラ解毒活性試験

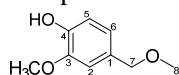
マレーシア産と日本近海産の紅藻から単離された 42 種の化合物、ならびにマレーシア産ソフトコーラルから単離された 70 種の化合物について、シガテラ毒解毒活性評価を行ったところ、3 種の紅藻由来プロモインドール化合物が特に強い活性を示した。奄美大島で採集したソゾノハナから更に 6 種のプロモインドールを単離し、合計 9 種の化合物のシガテラ解毒活性試験を行い、構造活性相関を調べた。投稿論文準備中のため、詳細は省略する。

(3) 薬用植物由来のシガテラ毒解毒活性化合物の単離

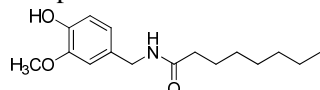
沖縄県産キダチトウガラシ *C. frutescens* L. 395 g を MeOH で抽出した。濃縮後、得られた MeOH 抽出物 (55 g) を AcOEt と H₂O で二層分配し、AcOEt 層を 90% MeOHaq. (2.8 g) と *n*-hexane (5.6 g) にて、H₂O 層をさらに *n*-BuOH (5.4 g) と H₂O (14 g) にてそれぞれ二層分配した。90% MeOHaq. 層について、ODS カラムクロマトグ

ラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、および ODS-HPLC による分離・精製を行い、5 種のカプサイシン類縁体を単離し、二次元 NMR 分光法を用いて化学構造を決定した。

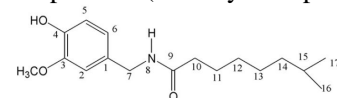
Compound C



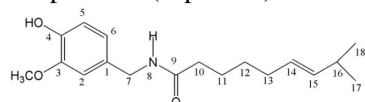
Compound D



Compound E (nordihydrocapsaicin)



Compound F (capsaicin)



Compound G (dihydrocapsaicin)

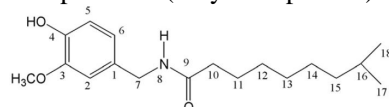


図 4 . 化合物 C と G の化学構造

それぞれについて、シガテラ解毒活性試験を行った。5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度では、細胞毒性が強くて解毒活性が判断できなかったが、0.5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で細胞毒性が弱くなった時に解毒活性を有している化合物が見られたため、さらに、6 種のカプサイシン類縁体を化学合成して、全 11 種による構造活性相関を行った。その結果、5 $\mu\text{g/mL}$ の濃度において、

直鎖脂肪酸の長い化合物が、弱い細胞毒性ならびにやや強いシガテラ解毒活性を示した。

芳香環部分に水酸基、メトキシ基を持たない化合物が、弱い細胞毒性ならびに弱いシガテラ解毒活性を示した。

今回得られた結果は、カプサイシンの直鎖脂肪酸部分の長さや芳香環部分の置換基の種類が細胞毒性に影響を与えることを示

しているが、同時に、強い細胞毒性のために検出できていなかったシガテラ解毒活性が、毒性の影響がなくなることで検出を可能にした。毒性が弱くシガテラ解毒活性がやや強い化合物を得ることが出来た。今後、作用機序の解明等を進めていく。

薬用植物については、キダチトウガラシ以外に、ザクロやベニスモモの実、ボタンボウフウの葉からの生物活性物質の探索を行っている。

<引用文献>

- Yasumoto, T.; Murata, M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1897-1909.
 Yasumoto, T.; Satake, M. *J. Toxicol-Toxin Rev.* **1996**, *15*, 91-107.
 Nicholson, G. M.; Lewis, R. J. *Marine Drugs* **2006**, *4*, 82-118.
 Murata, M.; Legrand, A. M.; Ishibashi, Y.; Yasumoto, T. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8929-8931.
 Manger, R. L. *et al.*, *J. AOAC. Int.* **1995**, *78*, 521-527.
 Garrec, R. B.-L. *et al.*, *Toxicol.* **2005**, *46*, 625-634.
 Hamada T. *et al.*, 第 52 回天然有機化合物討論会講演要旨集 **2010**, 715-720.
 B. C. M. Potts, R. J. Capon, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.*, **1992**, *57*, 2965-2967.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Toshiyuki Hamada, Daisuke Harada, Mitsunobu Hirata, Keisuke Yamashita, Kishneth Palaniveloo, Hiroaki Okamura, Tetsuo Iwagawa, Naomichi Arima, Toshiyuki Iriguchi, Nicole J. de Voogd and Charles S. Vairappan, Manoalide-related Sesterterpene from the Marine Sponge *Luffariella variabilis*, **Natural Product Communications**, 査読有, Vol.10, 2015, Accepted.

Ryuji Ohira, Toshiyuki Hamada, Satoaki Onitsuka, and Hiroaki Okamura, Base-catalyzed Asymmetric Diels-Alder Reaction of N-Nosyl-3-hydroxy-2-pyridone with a Chiral Acrylate, and Its Application to the Synthesis of Aminocarbasugars, **Global Science and Technology Forum JChem**, 査読有, Vol.2, 2015, Accepted.

有馬直道、Yohann White, 吉満 誠、濱

田 季之、薬剤耐性を克服する新規抗がん剤の有用性 トロピカルプラント Hyptis verticillata Jacq由来の新規リグナム系化合物 hyposide-, **化学工業**, 査読有, Vol.66, 2015, pp. 41-45.

Yuji Koyanagi, Toshiyuki Hamada, Tetsuo Iwagawa, and Hiroaki Okamura, Asymmetric Synthesis of Ampelomin A and ent-Epiampelomin A, **J. Oleo Science**, 査読有, Vol.64, 2015, pp. 449-454.

T. Hamada, Y. White, M. Nakashima, Y. Oiso, M. Fujita, H. Okamura, T. Iwagawa, N. Arima, The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaican plant Hyptis verticillata, and NMR characterization of hyptoside. **Molecules**, 査読有, Vol.17, 2012, pp. 9931-9938.

[学会発表](計 9 件)

キダチトウガラシ由来のシガテラ解毒物質の探索 仮屋崎 綾, 平田 美信, 鬼束 聡明, 岡村 浩昭, 濱田 季之 第95回日本化学会春季年会, 2015年3月28日, 日本大学理工学部(千葉県船橋市)

マレーシア産海綿Niphates caribica由来の二次代謝産物の研究 山下 慧介, 平田 美信, 原田 大輔, 鬼束 聡明, 岡村 浩昭, パイラッパン チャールス, 濱田 季之 第95回日本化学会春季年会, 2015年3月28日, 日本大学理工学部(千葉県船橋市)

核小体ストレス応答による腫瘍進展制御と革新的抗癌治療法の創生 川畑 拓斗, 河原 康一, 堀口 史人, 上條 陽平, 山本 雅達, 新里 能成, 南 謙太郎, Moinuddin F.M., 田辺 寛, 藤本 啓汰, 土屋 理佐子, 有馬 一成, 濱田 季之, 古川 龍彦 日本薬学会 第135回年会, 2015年3月26日, 兵庫医療大(兵庫県神戸市)

Spatio-temporal assessment of nucleolar stress response by a novel visualized reporter system and its application of anti tumor drugs discovery Takuto Kawahata, Kohichi Kawahara, Fumito Horikuchi, Kazuma Arima, Toshiyuki Hamada, Tatsuro Furukawa 細胞機能と分子活性の多次元蛍光生体イメージング, 2015

年1月26日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

マレーシア産海綿由来の生物活性ペプチドの探索 平田 美信, 原田 大輔, 岩川 哲夫, 岡村 浩昭, 濱田 季之, Vairappan Charles 日本化学会 第93回春季年会, 2013年3月24日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

シソ目植物由来の生物活性物質の探索 森川 梓生, 平田 美信, 鳥塚 真璃亜, 岩川 哲夫, 岡村 浩昭, 濱田 季之 日本化学会 第93回春季年会, 2013年3月22日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

アサ科植物キリエノキの二次代謝産物の構造と生物活性 杉田 梨恵, 田知行 紘太, 岩川 哲夫, 岡村 浩昭, 濱田 季之 日本化学会 第93回春季年会, 2013年3月22日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

鹿児島県近海産フレリトゲアメフラシ由来の二次代謝産物の研究 吉井 一史, 西 一駿, 平田 美信, 原田 大輔, 杉田 梨恵, 岩川 哲夫, 岡村 浩昭, 濱田 季之 日本化学会 第93回春季年会, 2013年3月22日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

マレーシア産海綿由来の二次代謝産物についての研究 原田 大輔, 平田 美信, 岩川 哲夫, 岡村 浩昭, 濱田 季之, Vairappan Charles 日本化学会 第93回春季年会, 2013年3月22日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀県草津市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.kagoshima-u.ac.jp/~thamada/hamada.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 季之 (HAMADA TOSHIYUKI)

鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 40321799