

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252037

研究課題名(和文)メタボリックシンドロームから心血管疾患に至る経路を阻害する海洋天然物の探索

研究課題名(英文) Search for marine natural products that inhibit the pathway from metabolic syndrome to cardiovascular diseases

研究代表者

松永 茂樹 (Matsunaga, Shigeki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：60183951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常に分化した脂肪細胞は、メタボリックシンドロームを防ぐ効果を示すタンパク質を分泌するため、前駆脂肪細胞を正常脂肪細胞に分化させる化合物には成人病を防ぐ働きが期待される。カイメン等の海洋生物からそのような働きを示す化合物を探索した結果、カイメン *Xestospongia testudinaria* から多数の活性物質を発見し、その構造決定を行った。別種カイメンから、分化誘導活性物質としてペプチドの theonellamide の1種や芳香族アルカロイドを発見した。

研究成果の概要(英文)：When appropriately differentiated, adipocytes secrete proteins that can prevent metabolic syndromes. Therefore, compounds that promote the differentiation of preadipocytes to adipocytes are expected to improve the status of geriatric diseases. After searching for compounds with such activities, we found many active compounds from the marine sponge *Xestospongia testudinaria* and determined their structures. From other sponges we isolated a theonellamide related compound and an aromatic alkaloid as the active principles.

研究分野：海洋天然物化学

キーワード：脂肪細胞 分化誘導 海洋生物 カイメン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは、先進国における長寿命化と生活の利便化が裏目に出た社会現象と捉えることができる。すなわち、高脂肪食の摂取と運動不足の結果、内臓脂肪の蓄積、インスリン抵抗性、高血圧、高血糖、脂質異常症などが誘導され、その結果として発症する糖尿病や動脈硬化を主因として心筋梗塞や脳梗塞などの重篤な心血管疾患リスクが増大する現象である。なお、これら2種の梗塞による死亡率は日本人の死亡原因の2位と3位を占め(1位はがん)、その発症率は動脈硬化の進行に伴い増大する。

(2) 海洋生物由来の天然物は、有用物質の探索源として、長く注目を集めてきた。海洋天然物には、植物や土壌微生物とは異なる化学構造上の特徴を有する化合物が多数あり、その中には顕著な生物活性を示すものが少なからず存在する。すなわち、膨大な数を擁する海洋天然物ライブラリーは、植物および土壌微生物由来の天然物ライブラリーとは、化学構造と発現する生物活性の点で大きく異なる「集合」を形成する、という事実がある。以上の背景から、海洋生物を探索源として用いて、未だ発見されたことのないような化学構造をもち、メタボリックシンドロームに起因する疾患に対して有効な生理活性化合物を創製する、との着想に至った。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、限られた資源と時間を最大限に有効利用して、現代社会にとって解決が迫られるメタボリックシンドロームの二次予防に使用しうる化合物を発見することに挑む。探索源は研究代表者の研究室に所蔵されるおよそ2000種の海洋生物で、研究期間中に拡充の予定である。対象とする生物活性は、メタボリックシンドロームから動脈硬化・心血管障害に至る段階を対象とし、それぞれの段階の進行に関わる生化学過程に対する阻害活性を指標として、活性物質を探索する。

(2) 一般に、天然有機化合物は多数の同族体から構成されることが多いので、化学構造が少しずつ異なる多数の活性物質が同時に取得できる(天然物ライブラリー)。一方、天然物からの化学誘導により多数の誘導体を調製し、「化学ライブラリー」を作成し、両ライブラリーの生物活性を検定することにより構造活性相関を導出する。この結果を基に、より単純な構造で優れた物性および生物活性を示す化合物をデザインし、化学合成あるいは天然物からの誘導反応によりその化合物を調製し活性を評価することを通して、メタボリックシンドロームの2次予防に寄与しうる化合物を創製する。

## 3. 研究の方法

(1) 前駆脂肪細胞から小型脂肪細胞への分化誘導: 内臓肥満では、脂肪細胞が肥大化しアディポネクチンの分泌が低下する。アディポネクチンは炎症やインスリン抵抗性などの症状を改善する作用がある。そこで、前駆脂肪細胞から、アディポネクチン分泌能のある脂肪細胞への正常な分化を誘導する化合物を探索した。

(2) 炎症状態に陥った血管内皮に接着した単球が血管内膜に遊走し、マクロファージに分化後、大量のコレステロールと脂肪酸からなる中性脂肪滴を蓄えることが泡沫化の特徴である。そこで、マクロファージにおける脂肪滴の蓄積を阻害する化合物を探索した。

## 4. 研究成果

(1) 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化誘導試験

白色脂肪細胞の前駆細胞であるマウス由来前駆脂肪細胞 ST13 株の脂肪細胞への分化誘導を指標として、スクリーニングを行った。脂肪細胞への分化の度合いは、ST-13細胞を Oil Red O で染色し、細胞内に蓄積した脂肪滴を顕微鏡下で観察することによりおこなった。海洋生物抽出物存在下の培養において脂肪滴の蓄積を誘導する試料を選抜した。

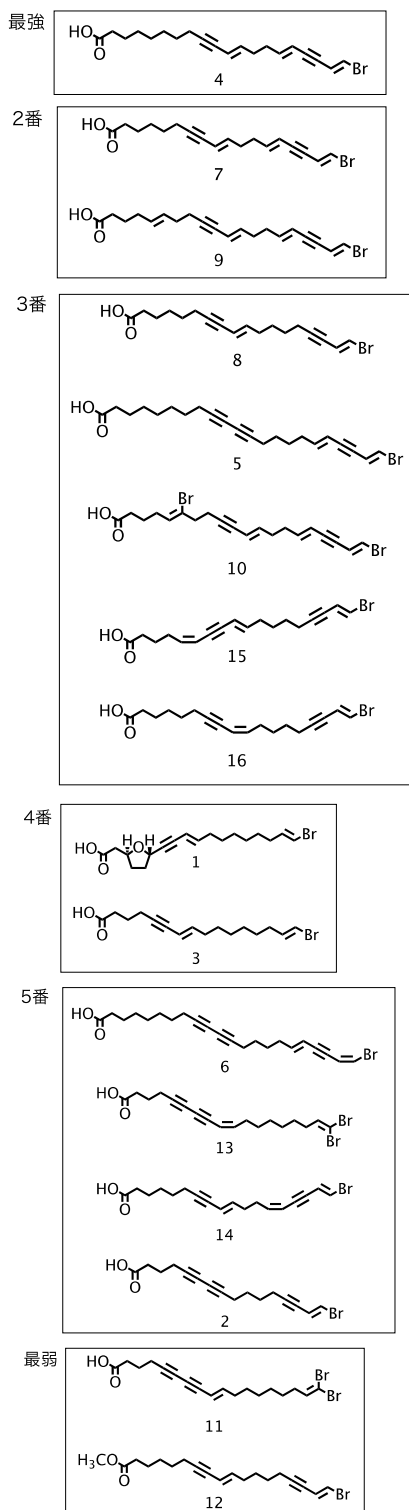
(2) カイメン *Xestospongia testudinaria* 由来の脂肪細胞分化誘導物質

スクリーニングにおいて顕著な活性を示した鹿児島県硫黄島産の標記カイメンの抽出物を、分化誘導活性を指標として分画した。すなわち、カイメンをメタノールおよびエタノールで順次抽出し、抽出液を合一して濃縮後、水とクロロホルムで二層分配を行った。クロロホルム画分を90%メタノールとヘキサンによる二層分配に付し、90%メタノール画分は水を添加して60%メタノール溶液とした後にクロロホルムで抽出した。最後に得られたクロロホルム画分が最も強い活性を示したため、これをセファデックス LH-20 を用いるカラムクロマトグラフィーにより分画した。ここで得られた活性画分を合一後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに逆相液体クロマトグラフィーで精製を行い、化合物1-16を得た。このうち化合物1-5は新規化合物、化合物6-16は既知化合物であった。

Testufuran A と命名した化合物1はテトラヒドロフラン環、1つの3重結合、2つの2重結合、カルボキシル基および1つの臭素原子をふくむ鎖状化合物であった。官能基の位置は二次元 NMR データの解析から導いた。テトラヒドロフラン環の相対配置は ROESY データから導き、テトラヒドロフラン環の絶対配置は、CD スペクトルの解析から決定した。すな

わち、コットン効果の符合が、3重結合で置換されたオキシメチン炭素の絶対配置を反映するとの報告があるため、その規則を適用した。

化合物 2-5 はいずれも分子末端が臭素化されたビニル基をもつ高度不飽和脂肪酸で、鎖中の不飽和結合の位置は、いずれの場合も、二次元 NMR データの解析により導いた。今回発見した活性物質を分化誘導活性の強い順に以下に示す。構造と活性の関係に一定の傾向があることが示された。

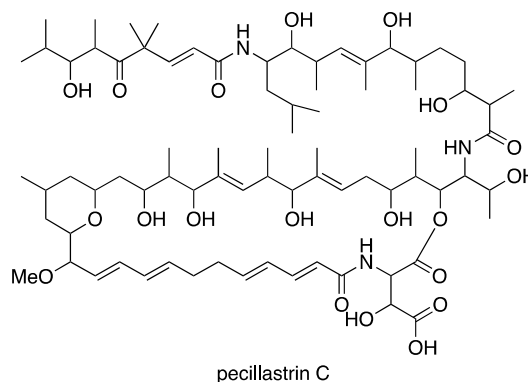


(3) サンゴ曽根産未同定種カイメン (S08-1311) 由来の前駆脂肪細胞に対する細胞毒性物質

スクリーニングにおいて ST-13 細胞に対して顕著な細胞毒性を示すカイメンが見いだされたため、活性成分を単離しスペクトルデータを解析したところ、ESI マスにおいて  $m/z$  1472 に分子イオンピークを与えた。各種二次元 NMR スペクトルを測定し、部分構造を決定した。

部分構造検索を行ったところ、今回得られた化合物は、深海産カイメンから見いだされた V-ATPase 阻害物質として知られる poecillastrin C と共通の部分構造が多数見いだされた。しかし、 $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおいて、poecillastrin C とは顕著に異なる化学シフトを与える水素があるため、両者には微妙な構造上の差があることが予想された。の誘導体であることが判明した。

単離できた化合物量が少なかったため、良好な HMBC スペクトルを得ることができず、全体の構造は未決定であるが、サンゴ曽根で再度カイメンの採取を行えば活性物質の量を増やし、新規 poecillastrin の全化学構造を決定することが期待される。



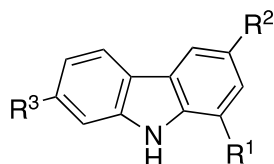
(4) 権曽根産未同定種カイメン (S-08-618) 由来の分化誘導物質

顕著な分化誘導活性を示した標記カイメンの抽出物を溶媒分画、ODS フラッシュクロマトグラフィーおよび ODS-HPLC を用いて精製し、活性成分を 2 つ (618A および 618B) 単離した。

化合物 618A は ESI マスにおいて  $m/z$  1358、709、679、649 にイオンを与えた。NMR スペクトルでは、1 置換ベンゼン環、多数のオキシメチンおよび多数のアルキル基由来のシグナルが観測された。良好な HMBC スペクトルを得るには不十分な量の化合物しか得ることができなかったため、全体の化学構造は未決定である。上述の化合物同様、単離量を増やすことにより、構造解析を進めたい。

化合物 618B は ESI マスにおいて 1:2:1 の

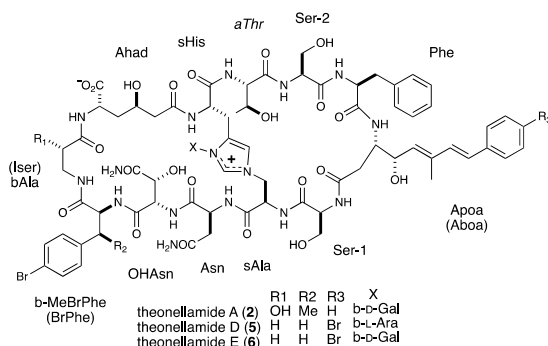
強度の分子イオンピークを与えたことから、分子内に臭素原子を3つ含むことが判明した。1H NMR スペクトルにおいて、1,2,4-3置換ベンゼン環、1,2,3,5-4置換ベンゼン環、および4つの水素と結合していないsp<sup>2</sup>炭素(δC 121.3, 122.4, 138.7, 141.3)が認められたことから、1位、3位と7位が置換されたカルバゾール環の存在が示された。分子全体の構造は現在検討中である。



化合物618Bの部分構造

(5) 大島新曾根産未同定種カイメン (S13-007) 由来の分化誘導物質

スクリーニングにおいて活性を示した標記カイメンの抽出物を上記(4)項の場合と同様に精製し、活性成分を得た。機器分析データから、この化合物はカイメン由来の抗カビ物質である theonellamide の類縁化合物(theonellamide X と仮称)であるものと予想された。Theonellamide X が顕著な活性を示したため、既知の theonellamide D および theonellamide E の分化誘導活性を調べた。



すでに報じられているように、既知の theonellamide 類は細胞内に液胞を形成したが、投与量を減らすと、脂肪滴の蓄積が認められた。十分量の theonellamide X が得られなかったため、全体構造は未決定である。今後化合物量を増やし構造決定を行う予定である。これまで、theonellamide 類が脂肪細胞の分化を誘導するとの報告はないため、その作用機序の解明は興味深い問題である。

(6) マクロファージにおける脂肪滴蓄積阻害物質の探索

マウスマクロファージ様細胞(RAW264)における脂肪滴蓄積阻害活性物質の探索を行った。本実験系を用いて脂肪滴蓄積スクリーニングを行った例が見あたらなかったため、再現性よく活性を調べることが困難であった。

リポソームの組成に工夫を加えることにより再現性を上げることができた。スクリーニングの結果、大島新曾根産未同定種カイメンに活性が認められたため、活性物質の精製を進めている。

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1件)

Akiyama, T.; Takada, K.; Oikawa, T.; Matsuura, N.; Ise, Y.; Okada, S.; Matsunaga, S.: Stimulators of adipogenesis from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron*, 2013, 69, 6560-6564. (査読有り)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 茂樹 (MATSUNAGA, Shigeki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号: 60183951

(2) 研究分担者

及川 勉 (OIKAWA, Tsutomu)  
神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・教授  
研究者番号: 40120141

(3) 連携研究者

池田 恵 (IKEDA, Megumi)

神奈川県立保健福祉大学・保健福祉学部・  
助手  
研究者番号：90535402

(4)研究協力者  
( )