

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350966

研究課題名(和文)伊予灘を中心とした未利用海産資源由来の生物活性物質の探索

研究課題名(英文)Searching for bioactive compounds from marine organisms around Sada Cape

研究代表者

倉本 誠(kuramoto, Makoto)

愛媛大学・学術支援センター・准教授

研究者番号：50291505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：愛媛県佐田岬周辺で、廃棄されていた未利用の海産資源を対象として生物活性物質の探索研究を展開した。水深200mから採集した海綿動物のアルコール抽出液について分離を行った。新規の含臭素アルカロイドを複数分離し、その構造を明らかとした。また、これまでの生合成研究から予想されていた重要中間体を発見し、立体化学を含めた全構造の解析に成功した。これ以外にも、新規環状ペプチドの構造解析も終了している。これら新規化合物を含む海綿動物の共生微生物の分離を行い、30種以上の微生物を分離している。現在、培養を行いこれらの生産する化合物の探索研究を開始した。

研究成果の概要(英文)：In Ehime Prefecture, it is a thriving fishing industry, but not worth organisms have been discarded. In the course of our continuing search for biologically active substances from such marine organisms, we isolated bioactive compounds from marine sponges, which was collected at the Sada Cape.

An MS-guided purification of this extract revealed novel bromopyrrole alkaloids and peptide. The planar structures of these compounds were clarified on the basis of NMR spectroscopic and mass spectrometric data. The stereochemistry of those compounds were suggested by NOE and CD experiments. Such chemicals are considered symbiotic microorganisms have produced. Therefore, separation and identification of symbiotic-microorganisms from marine sponge have been done. Further cultivation of symbiotic microorganisms are under way in our laboratory.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：海洋生物 生理活性物質 共生微生物 構造解析

1. 研究開始当初の背景

愛媛県は海産物が重要な地場産業となっており、特に養殖業は全国でも有数の売上高をほこる。代表者は、愛媛県に生息する海洋生物を中心に研究を行ってきた。特に、アコヤガイの大量死問題(特定領域研究 H12-14) 養殖魚に関する感染症調査(基盤研究(C), H21-23)などを展開する中で、多くの商品価値の低い海産物が廃棄されていることが明らかとなった。海洋生物は、体内に多くの共生微生物を含有しており、分離・分析技術の発展により自然界から多くの特徴的な有用分子が発見されてきた。そのような新しい分子は、生命現象解明のためのツール、有機合成標的分子として多方面での研究へ展開されている。近年では、新しい分子の発見は容易ではないと言われているが、探索対象となる生物群と活性試験を組み合わせることで、未知の物質を明らかに出来ると考えた。

愛媛県は漁業権の関係で、沿岸および近海の試料採集が困難であるが、申請者はこれまでの共同研究から、漁業協同組合と共同で愛媛県沿岸、近海での試料採集が可能であった。これまでの研究から、宇和海で入手可能な養殖生物や水深 50-100m 付近に生息する生物を対象とすることで特色ある新物質の更なる発見と未利用資源の有効利用法の開発が期待できると考えた。

2. 研究の目的

上記の研究背景に述べたように、愛媛県は漁業・養殖業が盛んであるが、商業価値の低いため廃棄される生物種が多い。その未利用海洋生物を対象として、分光分析と複数の生物活性試験法を組み合わせることで、特徴ある構造と切れ味の鋭い活性を示す有用分子を探索することが本研究の目的である。

第2の目的としては特徴ある化合物の分離できた生物について、共生微生物の分離を実施し、真の生産者の探索につながる研究の展開があげられる。

3. 研究の方法

(試料の収集について)

研究対象となる生物試料の収集は、研究の根幹となる部分である。愛媛県は沿岸の漁業権の問題が大きく、自由な生物収集は困難であった。代表者は愛媛県佐田岬漁業協同組合との10年以上の協力により、水深50-100mに生息する海洋生物を入手することが出来る。これは定期的に入手可能であり、採集箇所も特定の漁場を中心に実施することから、同一種の採集が可能と考えられた。そこで、本研究ではこの佐田岬周辺に生息する海洋生物を第一の対象とした。また周辺では柑橘類も盛んに栽培されており同様に入手可能であり、研究の対象となると考えられた。(分離精製について)

まず、本研究では研究の対象となる分子を効率よく抽出するために、アルコールを用い

て試料を抽出した。さらに抽出液の分配操作、各種クロマトグラフィーを用いて分画を進めた。得られた抽出液は予備試験により、アルカロイド、テルペノイド、ペプチドなど複数の物質の存在が示唆されていた。これら物質について予備試験の段階でシリカゲルカラムを用いることで活性の低下や、スペクトル中でのシグナルの消失が認められていた。そこで、できる限り中性の条件を用いて分離を進めることとした。また、分離の迅速化のため、活性試験と平行して機器分析における特徴的なシグナルを指標とした分離を展開した。

構造の解析には、所属センターに設置されている核磁気共鳴装置や質量分析装置などの大型機器を用いて行うこととした。

(その他)

カンキツ試料は海洋生物採集時に、採集協力者から無料で入手できた。特に果皮については工場において飲料作成時に廃棄されるため、継続的な入手が可能であることから、研究対象として用いた。また、この抽出物は予備試験において魚病菌に対する弱い阻害活性を示したことから、検討を進めた。

4. 研究成果

本研究では愛媛県佐田岬漁業協同組合の協力を得て、水深50-100mから生物採集を行った。その結果、毎年5-8種の海綿・軟体珊瑚類を毎年各1kg 20kgを採取することが出来た。おのおのについてアルコール抽出液を作製し、その粗抽出液を作製し、NMR スペクトルを測定している。主として観測されるものは不飽和脂肪酸であるが、呈色剤や質量分析スペクトルを測定すると、含窒素化合物、臭素や塩素を含有する分子、分子量800を超える分子などを観測することが出来た。また、簡便な抗菌活性試験において阻止円の形成も確認できた。



図1 *Axinella cylindratus*

愛媛県佐田岬で採集したカイメン動物 *Axinella cylindratus* (13.7 kg) をメチルアルコール 40 L を用いて抽出した。得られたアルコール抽出液はフラッシュエバポレーターを用いて低温で濃縮し、メチルアルコール抽出物 3 L を得た。この濃縮液を酢酸エチルと水で分配し、酢酸エチル層をヘキサンとメチルアルコールで脱脂操作を行った。このメタノール層からは、多くのプロモピロールアルカロイドが得られることが、予備試験から

明らかとなっていた。この分離には複数回の逆層カラムクロマトグラフィー、分子ふるい、イオンクロマトグラフなどによって精製を行っていたが、試料の損失と分離にかかる時間が問題となった。

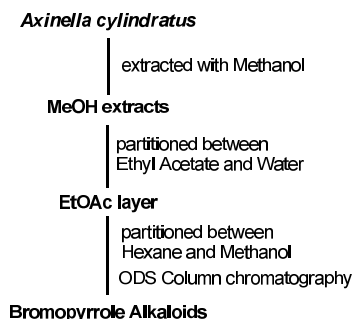


図2 分離スキーム 1

ここで、ジプロモピロール環を有する分子は270 nm に極大吸収を持つことから、この波長を用いて逆走条件での HPLC 分析を行った。まず ODS で分画した画分からドラージェンドルフ試薬に陽性を示す画分を集め試験に供したところ、図3に示すように複数のピークを確認できた。そこで、特徴的なピークを集め構造解析を行った結果、図4に示す物質を明らかにできた。さらに、その他のピークについても質量分析の結果から、含臭素化合物であるものがあり微量同族体の今後の発見が期待できる結果となった。

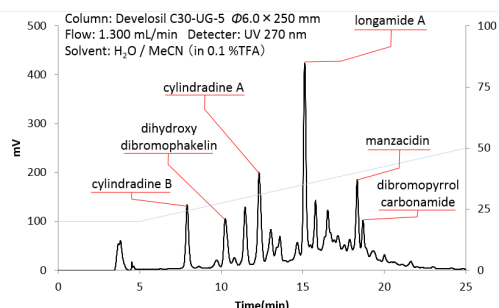


図3 HPLC による分離チャート

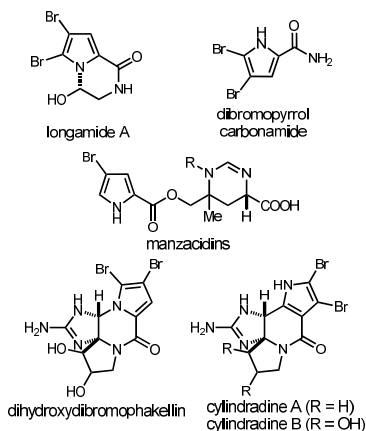


図4 分離された含臭素化合物の構造

さらに、この *A. cylindratius* 抽出液の酢酸エチル抽出後の水画分について、ブチルアルコールを用いて抽出を行った。質量分析において分子量900を超えるイオンピークが観測された。また、この分子イオンピークの同位体様式から複数のハロゲンを持つことが示唆された。先に述べたプロモピロールアルカロイド類は、生合成としてオロイジンを経由する。このとき、2量体の形成が知られていたことから、詳細な分離と構造解析を行った。(図5)

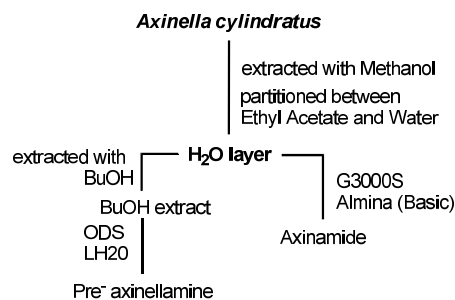


図5 分離スキーム 2

その結果、図6に示す新規な二量体構造であることが示された。この構造は、Axinellamine, Massadine と類似しており、生合成前駆体として予想されながら、未発見の化合物であった。さらに NOE 実験および CD スペクトルの測定結果から、隣接するピロール側鎖の絶対立体化学が明らかとなり、全構造の解析を達成した。また、本物質は HL-60 に対して穏やかな細胞毒性を示した。

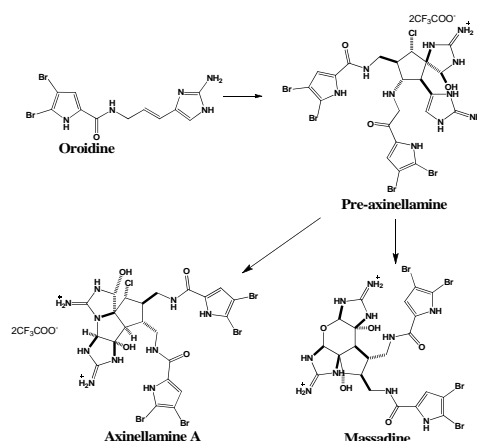


図6 Pre-axinellamine と生合成経路

上記の水層画分については、ポリスチレンゲル G3000S を通過させることで、新規環状ペプチド Axinamide を得ることが出来た(図5) 本化合物の分離においては、ODS, LH20 などの一般的な分離による精製が困難であった。目的外の成分が脂肪酸と推定されたことから、塩基性アルミナを用いた分離により、試料の損失を抑えた分離に成功した。環状のペプチド類は、ODS 条件において幅広の溶出ピークとして得られ分離の困難な物もあることが先の理由と考えられた。構成アミノ酸

については、加水分解物のアミノ酸分析により明かとなることが出来た。しかしながら、加水分解物の分離が困難であったことから、絶対立体化学の解析には、混合物のままL-FDLAと縮合してジアステレオマーへと導くことで決定した。その結果、すべての構成アミノ酸がL体であることが示されている。この物質については、複数の腫瘍細胞に対する生理活性試験を行ったが、顕著な活性は示さなかったことから更なる調査を進めている。

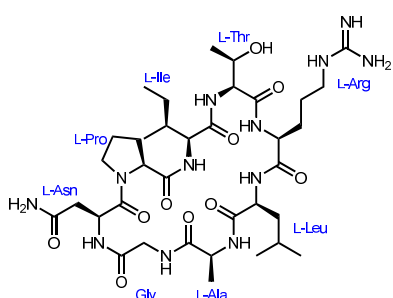


図7 Axinamideの構造

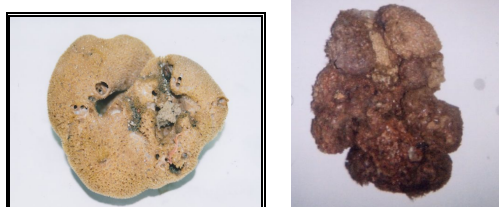


図8 未同定海綿(左)とIrcinia sp.(右)

図8に示す未同定海綿抽出物からは、図9に示すフラノテルペン類が確認された。興味深いことにIrcinia sp.(図8右)からも同一の化合物が得られている。これら2つの海綿動物は性状が大きく異なっている。このことから、これら化合物の真の生産者が共生の微生物であるということが、強く示唆された。

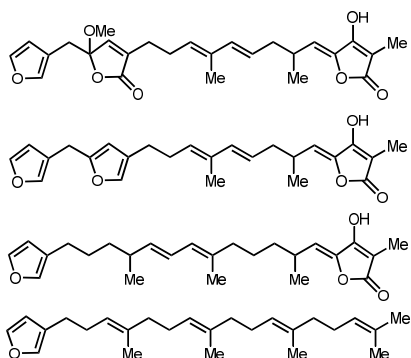


図9 未同定海綿から分離された化合物

さらに共生微生物に関する研究を展開した。京都府立大学石井孝昭教授のご協力により、*A. cylindratus*から34種の共生微生物を分離できた。現在、この微生物群について培養を開始している。生育条件の調整が難し

く、生産物の分析には至っていないが、今後継続して更なる研究を展開する。

カンキツの果皮の粗抽出液は、弱いながら抗菌活性を示した。しかしながら分離を継続するにつれ活性の低下が見られ、物質の同定には至っていない。この過程で、複数の蛍光物質を分離し、フラボノイド、クマリンなど複数の構造を決定した。いずれも既報の化合物ではあったが、品種ごとに蛍光波長が異なっていること、果皮の破損によって発現することから、応用面での発展が期待される結果であった。

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3件)

1. UV-Fluorescence Components Associated with and Detection of Surface Damage in Green Pepper (*Capsicum annum* L), D. Fatchurrahman, M. Kuramoto, N. Kondo, Y. Ogawa, T. Suzuki, WSCG 2015 – Full Papers Proceedings, 査読有, pp1-6 (2015). <http://wscg.zcu.cz/WSCG2015/CSRN-2501.pdf>
2. Identification of UV-Fluorescence Components for Detecting Peel Defects of Lemon and Yuzu using Machine Vision, Md. A. Momin, M. Kuramoto, N. Kondo, K. Ido, Y. Ogawa, T. Shigi, U. Ahamad, *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 査読有, 6, 165-171 (2013). doi:10.1016/S1881-8366(13)80004-3
3. Cytotoxins Associated with Akoya Oyster Disease Induce Sterol Metabolic Abnormality, Y. Uchimura, M. Kuramoto, *Aquaculture Science*, 査読有, 61, 182-187(2013) https://www.jstage.jst.go.jp/article/aquaculturesci/61/2/61_183/_pdf

[学会発表](計9件)

- 1) 坂本 求, 倉本 誠, 黒川嘉彦, 横尾義貴, 森 重樹, 宇野英満, 愛媛県産海綿動物由来の生物活性物質. 日本化学会第97春季年会(2016年3月, 京都府・京田辺市)
- 2) 倉本 誠, 坂本 求, 黒川嘉彦, 森 重樹, 宇野英満. Isolation and structure elucidation of bioactive compounds from Sada cape. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM2015) (2015年12月, Honolulu (USA))
- 3) 坂本 求, 倉本 誠, 森 重樹, 宇野英満. 海洋生物由来の含臭素化合物の構造解析. 2015ハロゲン利用ミニシンポジウム(第8

回臭素化学懇話会年会) (2015年11月, 島根県・松江市)

- 4) 倉本誠, A fluorescent Substance from Natural Samples -preparation and measurement-, SPRITS Workshop 2015 in The 6th SUSTAIN 2015 (2015年11月, Bali (Insonisia))
- 5) 坂本 求, 黒川嘉彦, 倉本 誠, 森 重樹, 宇野英満. 愛媛県産海綿動物由来の生物活性物質探索. 第82回日本分析化学会有機微量分析研究懇談会 (2015年5月, 愛媛県・松山市)
- 6) 坂本求, 黒川嘉彦, 倉本誠, 森繁樹, 宇野英満, 愛媛県産海綿動物由来の生物活性物質探索, 日本化学会第95春季年会, (2015年3月, 千葉県・船橋市)
- 7) 倉本 誠, 海洋生物由来の含ハロゲン物質, 第7回臭素化学懇話会年会 (2014年12月, 東京都・千代田区)
- 8) 黒川嘉彦, 倉本誠, 森繁樹, 宇野英満, 愛媛県産海綿動物由来の含窒素化合物の探索, 日本化学会第94回春季年会 (2014年3月, 愛知県・名古屋市)
- 9) 黒川嘉彦, 倉本誠, 森繁樹, 宇野英満, 海洋生物由来の含臭素化合物の構造解析, 第6回ハロゲン利用ミニシンポジウム (2013年11月, 愛媛県・松山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉本 誠 (KURAMOTO MAKOTO)

愛媛大学・学術支援センター・准教授

研究者番号: 50291505