

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2017

課題番号：26305002

研究課題名(和文) インドネシア底生海洋生物の調査と新規医薬シーズ資源の開拓

研究課題名(英文) Investigation of benthic marine organisms in Indonesia and development of new medical resources

研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)

大阪大学・薬学研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：80311231

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：新しい医薬資源を開発するため、スマトラ島北部のアチェならびにサバン島、スマトラ島西部のメンタワイ、ジャワ島北部サウザンアイランド諸島のプラムカ島を拠点として、周辺サンゴ礁域から底生海洋生物265サンプルを採集した。また、資源の保全と持続的利用のため、採集した底生海洋生物の総ゲノムの保存、224種の共棲微生物の分離を行った。そして、生物試料を標本として保存するとともに、水中写真に基づいて、生息状況、生育環境、形態的特徴の情報をまとめリスト化した。さらに生物試料および共棲微生物の培養物から抽出エキスを調製し、生物活性試験の結果と産生成分の情報についても合わせてリスト化した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop the new medicinal resources, 265 samples of benthic marine organisms were collected from the coral reefs surrounding Aceh and Sabang Island in northern part of Sumatra Island, Mentawai in the western part of Sumatra Island, and Plumaka Island of Thousand Islands (northern part of Java Island). For the purpose of conservation and sustainable use of resources, we conserved the total genome of collected benthic marine organisms, and isolated 224 kinds of microorganisms from benthic marine organisms. In addition to preserving benthic marine organisms as specimens, information of inhabitation, environments, and morphological features of benthic marine organisms were summarized and listed based on the pictures of marine organisms under the water. Moreover, the extracts were prepared from marine organisms and cultured microbes, and then information of biological activities and bioactive constituents were also listed.

研究分野：天然物化学 ケミカルバイオロジー

キーワード：海洋生物 海綿 海洋微生物 インドネシア 医薬シーズ 活性天然物

### 1. 研究開始当初の背景

海綿やホヤなどの底生海洋生物からは、新奇な化学構造を有し強力な生物活性を示す化合物が数多く見出されており、新しい医薬創製のための探索源として注目されている。一方、インドネシアのサンゴ礁域には豊富に生物種が生息しているが、その調査研究は遅れており、自然破壊も年々進行している現状があった。

### 2. 研究の目的

本研究では、豊富に底生海洋生物資源を保有しながら、その調査研究が遅れ、自然破壊も進みつつあるインドネシアサンゴ礁の底生海洋生物について、生息状況、環境に関する情報収集、医薬シーズ資源開拓のための生物試料採集と抽出エキストラライブラリーの構築を行う。また、資源の保全と持続的利用のため、採取した底生海洋生物の総ゲノムの保存、共棲微生物の分離とその培養抽出エキストラライブラリーを構築する。さらに、医薬シーズの創出を効率良く推進することを目的として、Phenotypic Screening 試験を多角的に実施し、得られた活性評価結果と化学分析した産生成分等の情報をあわせて整理する。

### 3. 研究の方法

(1) 日本(大阪大学、琉球大学、兵庫医療大学)とインドネシア(ランブン大学、ディポネゴロ大学)の天然物化学者を中心とする共同研究チームを形成し、スキューバダイビングによる底生海洋生物の調査・採集を行い、調査地域での生物種の生息状況に関する情報を収集する。採集した底生海洋生物は、その生物標本を保存するだけでなく、水中写真をもとにして、生息環境、形状・色等の形態的特徴を整理する。また、採集した各底生海洋生物の抽出エキスを調製し、これをライブラリー化する。

(2) 採取した各底生海洋生物から種々の培地を用いて海洋微生物を単一分離・保存して、さらに分離した微生物の培養物の抽出エキストラライブラリーを構築する。

(3) 採取した底生海洋生物から、常法に従い総ゲノムの抽出を行い、これをライブラリー化して保管する。

(4) 平成 26 年度は、スマトラ島北部のアチェならびにサバン島を、平成 27 年度は、スマトラ島西部のメンタワイ地区を、平成 28 年度は、ジャワ島北部に位置するサウザンアイランド諸島のプラムカ島を拠点として、周辺サンゴ礁域の調査を行った。

(5) Phenotypic Screening 試験は、以下の 4 つの評価系を用いて実施する。

低酸素環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

腫瘍内の低酸素環境に適応したがん細胞は、がんの病態悪化に大きく寄与している。本評価系では、ヒト前立腺がん細胞 DU145 を 1% の低酸素条件で培養することにより、低酸素環境に適応させ、通常培養条件と比較して、低酸素培養条件選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

グルコース飢餓環境適応がん細胞選択的な増殖阻害物質の探索

と同様、がんの病態悪化に寄与している栄養飢餓環境適応がん細胞に対して選択的に増殖阻害活性を示すサンプルをスクリーニングする。すなわち、炭素源であるグルコースを除去した培地での培養を栄養飢餓環境のモデルとして、ヒト膵臓がん細胞 PANC-1 を栄養飢餓環境に適応させた後、被験サンプルの増殖阻害活性を測定した。また、通常培養条件と比較して、グルコース飢餓環境選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC 選択的な増殖阻害物質の探索

本評価系では、がん血管新生阻害物質の創出を効率良く実施することを目的として、血管新生の全ての過程に関与している血管内皮細胞に着目し、がん細胞(ヒト咽頭上皮がん細胞 KB3-1)の増殖には影響を与えず、HUVEC 選択的に増殖阻害活性を示すサンプルを探索した。

がん細胞の上皮間葉転換を阻害する化合物の探索

がん転移の初期過程では、運動性の高い間葉系細胞に表現型が変化する上皮間葉転換が起きる。本評価系では、PANC-1 細胞をサイトカイン TGF- $\beta$  で刺激することにより上皮間葉転換を惹起し、顕鏡下での細胞の形態変化を指標に、これを阻害するサンプルを探索した。

### 4. 研究成果

平成 26 年度は、スマトラ島北部のアチェならびにサバン島を調査地域として、周辺沿岸 8 箇所を調査を行い、合計 70 サンプルの底生海洋生物の試料を得た。また、これら海綿サンプルから共棲微生物の分離を行い、64 種類の真菌の分離に成功した。平成 27 年度はスマトラ島西部のメンタワイ地区を調査地域として、周辺サンゴ礁域 10 箇所から合計 85 サンプルの生物試料を採集した。また、採取した底生海洋生物サンプルから 76 種類の真菌を分離した。そして、平成 28 年度については、サウザンアイランド諸島のプラムカ島を拠点として、10 箇所のサンゴ礁域から、合計 110 サンプルの試料を採集した。また海綿サンプルから 84 種類の真菌を分離した。

採取した底生海洋生物は、70% エタノールでの固定を行い、標本として保管した。さら

に、すべての生物標本には、年度ごとに番号を付与し、水中写真と共に、生息環境、形状・色等の形態的特徴を整理したリストの作成を行った。また、採取した各底生海洋生物の抽出エキスを調製し、これを抽出エキスライブラリーとして保存した。

分離に成功した真菌についても同様に、年度ごとに番号を付与し、分離源の情報と共にリスト化した。また、これら菌株をグリセロールストックとして保管すると共に、数種類の培地で培養・抽出したエキスをライブラリー化した。

さらに近年、高分子量の二次代謝産物合成遺伝子を発現し活性物質を産生させる遺伝子技術の開発が精力的に行われており、近い将来、底生海洋生物から得られる二次代謝産物合成遺伝子を基に、生物活性物質の安定供給が可能になると予想される。このような背景から、QAIAGEN社のキットを利用して、本研究で採取した各底生海洋生物から総ゲノムを抽出し、クオリティーチェック後、それを保存した。

現在、継続して生物活性スクリーニングを進めており、いくつかの活性が見られたサンプルから、活性試験の結果を指標にした活性物質の分画・精製と化学構造の解析を進めている。また、すでに得られている活性評価結果、産生成分の情報、底生海洋生物に関する情報、ならびに分離した微生物に関する情報を統合してデータベース化を進めている。

## 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 13 件)

N. Kotoku, R. Ishida, H. Matsumoto, M. Arai, K. Toda, A. Setiawan, O. Muraoka, M. Kobayashi, Biakamides A–D, unique polyketides from a marine sponge, act as selective growth inhibitors of tumor cells adapted to nutrient starvation. *J. Org. Chem.* (2017) 82, 1705-1718. DOI:10.1021/acs.joc.6b02948 査読有

M. Arai, D. Shin, K. Kamiya, R. Ishida, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, Marine spongy polybrominated diphenyl ethers, selective growth inhibitors against the cancer cells adapted to glucose starvation, inhibits mitochondrial complex II. *J. Nat. Med.* (2017) 71, 44-49. DOI: 10.1007/s11418-016-1025-x 査読有

M. Arai, K. Kamiya, D. Shin, H. Matsumoto, T. Hisa, A. Setiawan, N. Kotoku, M. Kobayashi, N-Methylpiperidine A, a new 3-alkylpyridine alkaloid as an inhibitor of the cancer cells adapted to nutrient starvation, from an Indonesian marine sponge of *Xestospongia* sp. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 766-771. DOI: 10.1248/cpb.c16-00118 査読有

M. Arai, T. Kawachi, N. Kotoku, C. Nakata, H. Kamada, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, H. Endo, M. Inoue, H. Sato, M. Kobayashi, Furospinosulin-1, marine spongy furanosesterterpene, suppresses the growth of hypoxia-adapted cancer cells by binding to transcriptional regulators p54<sup>nrB</sup> and LEDGF/p75. *ChemBioChem* (2016) 17, 181-189. DOI: 10.1002/cbic.201500519 査読有

M. Arai, Exploring New Drug Targets through the Identification of Target Molecules of Bioactive Natural Products. *Yakugaku Zasshi* (2016) 136, 669-676. DOI: 10.1248/yakushi.15-00281 査読有

N. Kotoku, M. Arai, M. Kobayashi, Search for anti-angiogenic substances from natural sources. *Chem. Pharm. Bull.* (2016) 64, 128-134. DOI: 10.1248/cpb.c15-00744 査読有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, M. Arai, M. Kobayashi, Structure-activity relationship and in vivo anti-tumor evaluations of dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Mar Drugs* (2015) 13, 7419-7432. DOI: 10.3390/md13127074 査読有

Y. Sumii, N. Kotoku, A. Fukuda, T. Kawachi, Y. Sumii, M. Arai, M. Kobayashi, Enantioselective synthesis of dictyoceratin-A (smenospondiol) and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge. *Bioorg. Med. Chem.* (2015) 23, 966-975. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.021 査読有

M. Arai, T. Kawachi, H. Sato, A. Setiawan, M. Kobayashi, Marine spongy sesquiterpene phenols, dictyoceratin-C and smenospondiol, display hypoxia-selective growth inhibition against cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2014) 24, 3155-3157. DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.04.116 査読有

[学会発表](計 18 件)

石田良典, 新規海洋天然物 biakamide 類の栄養飢餓環境選択的がん細胞増殖阻害活性とその作用メカニズム, 第21回日本がん分子治療学会学術集会, 2017年

荒井雅吉, 海洋天然物の魅力と創薬研究への応用, 第40回新適塾「未来創薬への誘い」, 2017年

伊藤みなみ, 海洋由来 Trichoderma 属真菌からの抗潜在性結核物質の探索, 日本生薬学会第64年会, 2016年

小林資正, 医薬シーズの開拓を目指した海洋生物資源からの活性天然物の探索, 日本薬学会第63年会, 2016年

Masayoshi Arai, Exploring novel drug target for cancer chemotherapy by the study of furospinosulin-4, a hypoxia selective growth inhibitor against cancer cells, The 6th Queenstown Molecular Biology Meeting in Shanghai, 2016年

荒井雅吉, 海綿由来環状デプシペプチド

arenastatin A の新規結合タンパク質の同定,  
第 57 回天然有機化合物討論会, 2015 年

河内崇志, 海洋天然物 furospinosulin-1  
を利用する新規がん細胞低酸素適応因子の  
創出, 第 18 回日本がん分子治療学会学術集  
会, 2014 年

Masayoshi Arai, Phenotypic Screening and  
Chemical Biology for Exploring New Medicinal  
Seeds and Drug Targets, 第 8 回日中韓生薬学  
合同シンポジウム, 2014 年

古徳直之, グルコース飢餓環境選択的がん  
細胞増殖阻害作用を有する新規ポリケチ  
ド類の化学構造と生物活性, 第 56 回天然有  
機化合物討論会, 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

荒井雅吉, 小林資正. 化学同人, アルカ  
ロイドの科学, 2017 年, 534 頁 (81-97 頁)

〔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  
[http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b  
012/](http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)  
大阪大学大学院・薬学研究科・特任教授(常  
勤)  
研究者番号 : 80311231

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号 :

### (3) 連携研究者

小林 資正 (KOBAYASHI, Motomasa)  
大阪大学大学院・薬学研究科・招へい教授

研究者番号 : 40116033

田中 淳一 (TANAKA, Junichi)  
琉球大学・理学部・教授  
研究者番号 : 20163529

青木 俊二 (AOKI, Shunji)  
兵庫医療大学・薬学部・教授  
研究者番号 : 60252699

### (4) 研究協力者

( )