

Investigation on new bioactive peptides from marine invertebrates

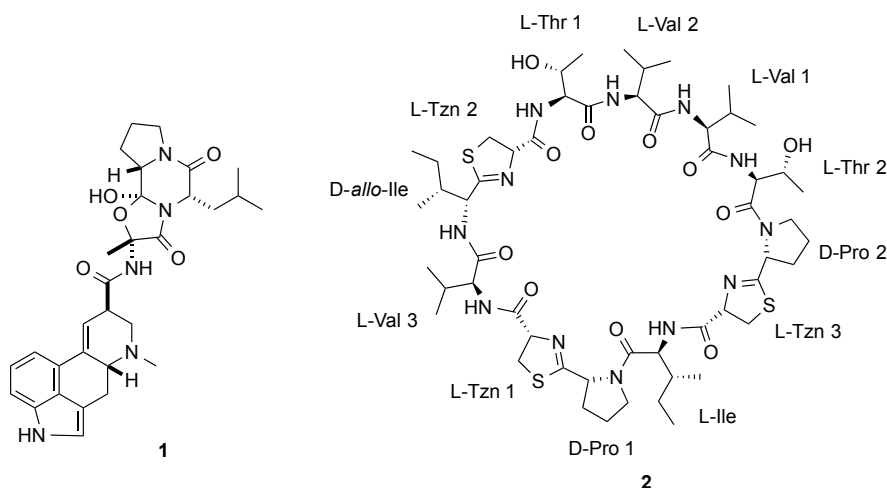
その他のタイトル	海洋無脊椎動物由来新規生物活性ペプチドに関する研究
学位授与年月日	2016-09-16
URL	http://doi.org/10.15083/00075317

審査の結果の要旨

氏名 タン カレン コー

海洋無脊椎動物の中でも、海綿動物や後鰓類に含まれる生物活性物質は、含有生物の化学防御物質としての機能が予想されており、それらの中には特異な生物活性を示す化合物が多い。実際に数多くの天然生物活性物質が見出されてきた海洋無脊椎動物は、医薬品リード化合物の探索源として重要な生物資源である。そこで本研究では、従来の探索研究事例の少ない海洋無脊椎動物を選択し、それらに含まれる新規生物活性物質の探索を試みた。また、海綿動物由来の生物活性ペプチドに関して、その生産者と生合成経路の詳細な解析を行った。

Pleurobranchus forskalii (ゼニガタフシエラガイ) は地中海、インド洋、太平洋域に広く分布するウミウシの仲間である。これまでにインドネシアやフィリピンの海域に生息する *P. forskalii* より、環状ペプチド *keenamide* 類やジテルペン類が単離、構造決定されている。しかし、日本国内の海域に生息する *P. forskalii* においては探索研究が皆無であったため、本研究では石垣島産の *P. forskalii* より生物活性物質の探索を試みた。*P. forskalii* をエタノールによって抽出し、抽出物をクロロホルムと水で分配した。得られたクロロホルム層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した結果、TLC 分析において特徴的な蛍光を発するスポットが認められた。このスポットを指標に ODS HPLC を用いて精製を行った結果、麦角アルカロイドの一種である *ergosinine* (**1**) を単離、同定した。絶対立体配置を含む構造確認は各種 NMR スペクトルと旋光度の比較によって行った。通常麦角アルカロイドは高等植物や真菌類から見出されるが、*ergopeptide* 類が海洋生物から単離、同定されたのは本研究成果が初めての事例である。

Fig. 1 *Pleurobranchus forskalii* 由来の生物活性物質

さらに *P. forskalii* のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで得たより高極性な画分より、ODS HPLC を用いて精製を行った結果、新規環状ペプチド *cycloforkamide* (**2**) を単離した。¹H NMR スペクトル

において、6.5~8.5 ppm に交換性のプロトンが複数観測されたことから、**2** はペプチドであることが示唆された。その分子量は 1174.57 であり、2 次元 NMR を含む各種 NMR スペクトルの解析から、12 個のアミノ酸を含む環状ドデカペプチドであることが明らかになった。そのアミノ酸組成は 2 つの Ile、3 つの Val、2 つの Thr、2 つの Pro、3 つの thiazoline を含む。これらアミノ酸残基の絶対配置を決定するために、**2** を酸加水分解に付し、構成アミノ酸を得た。この際、thiazoline は Cys に変換される。得られた構成アミノ酸を誘導体化後、キラルカラムを用いた GC-MS によって分析し、標品との比較によって絶対配置を決定した。その結果、1 つの Ile と 2 つの Pro を除くすべてのアミノ酸残基が L 体であることが明らかになった。D-体と判明したアミノ酸残基 D-allo-Ile と D-Pro はいずれも thiazoline 残基に連結しており、thiazoline 環のイミンの存在によって α 位のエピメリ化が生じたものと考えられる。**2** はマウス白血病細胞 P388 に対して、 $IC_{50} = 6 \mu M$ の細胞毒性を示した。

伊豆半島や紀伊半島に生息する海綿動物 *Discodermia kiiensis* には環状デプシペプチドである discodermin 類が主要な二次代謝産物として含まれていることが知られている。また、よりマイナーな成分として紀伊半島産 *D. kiiensis* より discokiolide 類が報告されている。しかし、他の *Discodermia* 属海綿よりも比較的探索事例の少ない海綿動物であることから、さらなる新規生物活性物質の探索を進めた。海綿 *D. kiiensis* をエタノールによって抽出後、エーテルと水で分配し、得られたエーテル層をさらに 90% メタノールとヘキサンで分配した。90% メタノール層を ODS カラムクロマトグラフィー、ODS HPLC によって順次精製し、新規リポペプチド lipodiscamied A-C (**3-5**) を単離した。各種二次元 NMR スペクトルの解析の結果、lipodiscamide 類は特環状ジラクトン骨格を有し、シトルリン、ウレイドアラニン、デヒドロノルバリンなどの異常アミノ酸を含む特異な構造を有する新規リポペプチドであった。絶対立体配置は、酸加水分解後、得られた構成アミノ酸をキラルカラム GC-MS の分析に供し、標品との比較によって決定した。また、市販品として入手不可能な加水分解断片に関しては、各立体異性体を合成し、それらとの保持時間の比較によって全ての絶対立体配置を決定した。

さらに上記の分画過程によって得られた水層を n-ブタノールによって抽出し、Sephadex LH-20 によるカラムクロマトグラフィーによって分画したその結果、lipodiscamide よりも分子量 80 大きい化合物を検出した。80 マスユニットは硫酸基 1 個分に相当する。Lipodiscamide の構造には水酸基は一つもないことから、硫酸化される部位として考えられる官能基は分子内に 2 つ存在するウレア残基のみであった。しかし、これまでに硫酸化ウレア構造を持つ天然物の報告例は皆無であったため、実際にそのような官能基が天然物として存在するかどうかは不明であった。そこで、各種 2 次元 NMR スペクトルの詳細な解析を行い、sulfolipodiscamide のシトルリン残基のケミカルシフトが lipodiscamide と大きく異なっていることが判明した。したがって硫酸基はシトルリンのウレア基に結合していることが分かった。マウス白血病細胞 P388 に対する細胞毒性試験の結果、新規化合物 sulfolipodiscamide の IC_{50} 値は lipodiscamide より約 2 倍程度低濃度であった。以上の結果より *D. kiiensis* には主要二次代謝産物である discodermin 類以外に、特異な構造を有する新規リポペプチド lipodiscamide 類が含まれていることが明らかになった。

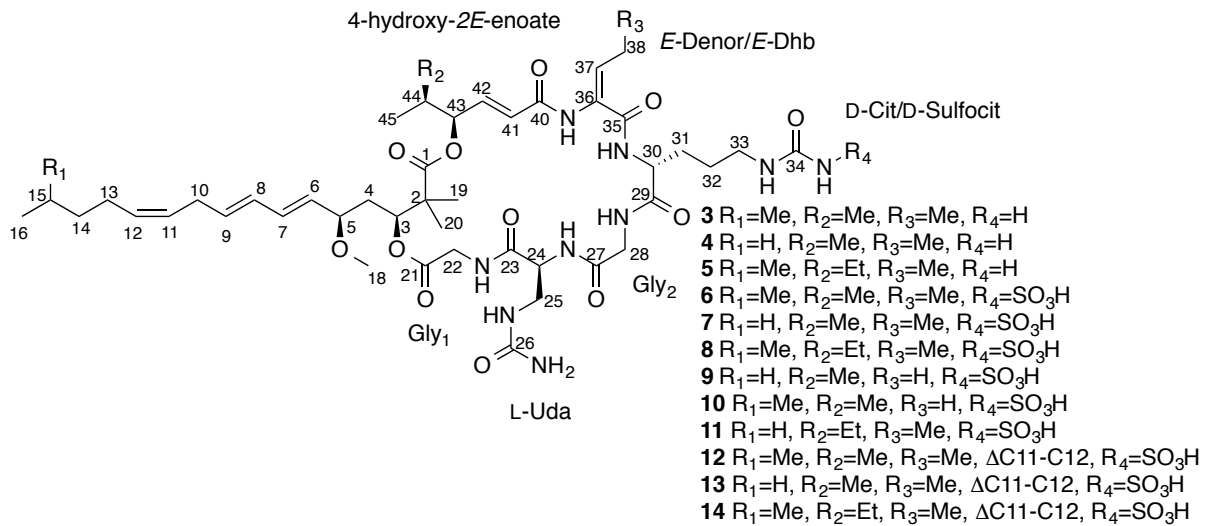


Fig. 2 *Discodermia kiiensis* 由来の生物活性物質

さらに、sulfolipodiscamide の硫酸基の生合成経路を明らかにすべく、lipodiscamide 生合成遺伝子クラスターにコードされている硫酸基転移酵素の機能解析を試みた。大腸菌を用いて該当する硫酸基転移酵素を異種発現し、様々な推定基質との酵素反応を行った。その結果、Fmoc-L-シトルリンを基質に用いた場合にのみ、硫酸化が進行することが明らかになった。

本研究成果は海洋無脊椎動物の天然医薬品資源としての重要であり、引き続き詳細な探索研究が必要であることを示している。特に sulfolipodiscamide は不安定な硫酸化ウレア残基を有する初めての天然物である。このような新規の官能基を有する新たな天然物を見出し、その全構造を明らかにし、その生合成過程を解明した業績は、博士（薬科学）の学位を授与するに値するものと認めた。