

## 論文内容の要旨

水圏生物科学専攻  
平成 27 年度博士課程進学

氏名 福原 和哉  
指導教員 松永 茂樹

論文題目 Studies on bioactive peptides from the marine sponge *Theonella swinhoei*  
(カイメン *Theonella swinhoei* 由来の生物活性ペプチドに関する研究)

カイメンは、地球上でもっとも原始的な多細胞生物のひとつとして知られる水生無脊椎動物である。カイメンの中には、強い生物活性を示す複雑な構造をした二次代謝産物を含むものが存在し、それら活性物質は捕食者や競合生物、さらに有害な微生物に対する化学防御物質として機能すると考えられている。そのため、これら生物活性物質は新たな創薬シードとして期待されており、有用化合物の探索研究が盛んにおこなわれてきた。カイメンに含まれる生物活性物質は、体内に多数認められる共生微生物によって生産されていると考えられているが、その詳細は未だ不明な部分が多い。

*Theonella swinhoei* は、カイメンの中でも特に多様な生物活性物質を含むことが知られている種である。そのため、このカイメンの共生微生物に関する研究が活発におこなわれており、近年、難培養性の共生微生物 *Candidatus Entotheonella factor* が、*T. swinhoei* から発見されたほとんどすべての生物活性物質を生産することが明らかとなった。本研究では、このように化合物の供給源として有用なカイメン *T. swinhoei* から、新たな生物活性物質を探索した。その結果、(I) 細胞毒性ペプチド二量体の nazumazoles A–C (1–3)、および単量体の類縁体である nazumazoles D–F (4–6)、さらに (II) 一部カイメン個体にのみ含まれる細胞毒性ペプチド theonellamide H (7) を発見した。以下にその概要を述べる。

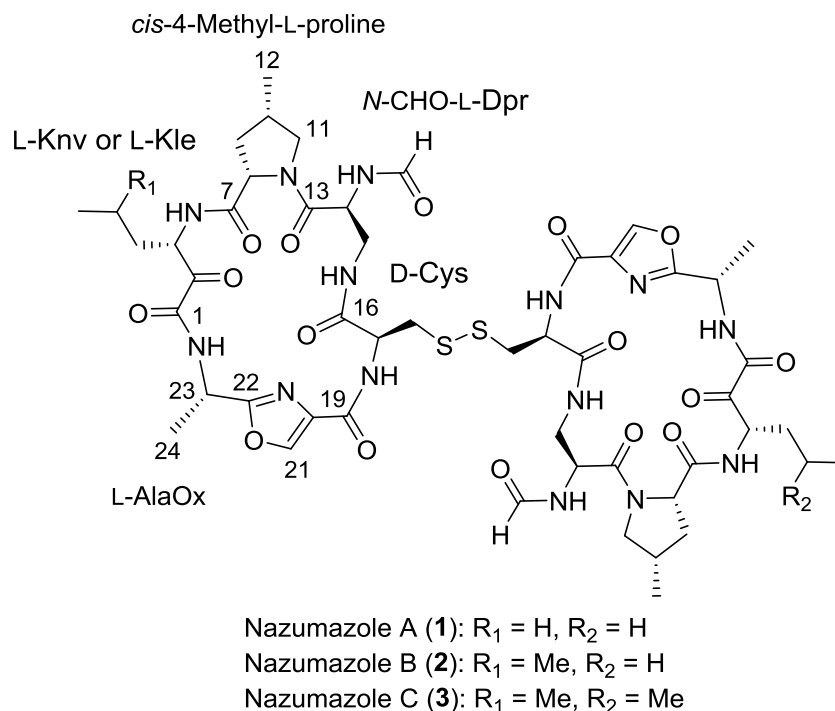
## I. 新規細胞毒性ペプチド二量体 nazumazoles A–C および単量体の類縁体 nazumazoles D–F

八丈島産カイメン *T. swinhoei* をメタノールで抽出し、抽出物を LC-MS で分析したところ、ODS カラムから幅広いピークとして溶出し、分子量およそ 1200 を示す成分を発見した。そこで、カイメン抽出物から当該ピークを nazumazoles A–C (**1–3**) の混合物として単離した。生物活性を検討したところ、この混合物は P388 マウス白血病細胞に対して毒性を示したため、それら成分の構造決定をおこなった<sup>1</sup>。

HRESIMS により、各化合物の分子式を決定し、**1–3** は分子式がそれぞれ CH<sub>2</sub> ひとつずつ異なる同族体であることがわかった。各種 NMR データを解析したところ、**1–3** は分子量が 14 異なる 2 種のペプタペプチドの二量体であり、分子式の違いはこれらペプチドの組み合わせに由来していた。

以上の解析から、**1–3** の構造は環内でジスルフィド結合を形成する環状デカペプチド、もしくはジスルフィド結合を介して二量化する環状ペプタペプチド二量体のいずれかであることが示唆された。そこで、**1–3** のジスルフィド結合を還元アルキル化したところ、**1–3** のおよそ半分の分子量を示すアルキル化体を 2 種得たため、**1–3** は環状ペプチドがジスルフィド結合を介して二量化していることが明らかとなった。

最後に、各アミノ酸残基の絶対配置を Marfey 法により決定し、**1–3** の構造を以下に示すように決定した。**1–3** の混合物は P388 マウス白血病に対して毒性を示し (IC<sub>50</sub> 値: 0.83 μM)、ジスルフィド結合を切断した誘導体は毒性を示さなかった (IC<sub>50</sub> 値 > 50 μM)。

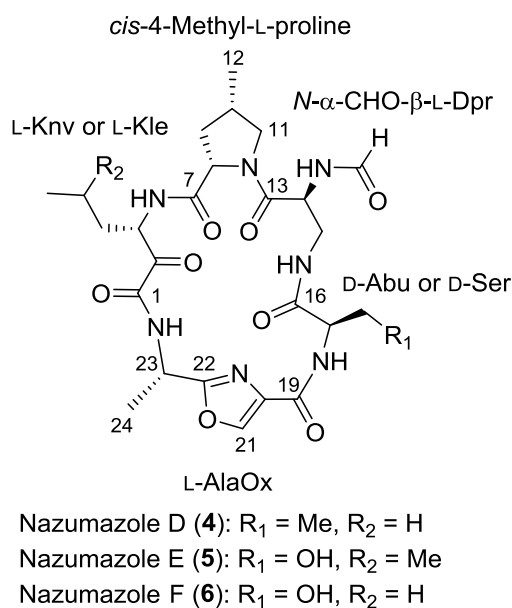


1) Fukuhara, K; Takada, K; Okada, S; Matsunaga, S. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2646–2648.

**1-3** はジスルフィド結合を介して二量化していることから、カイメン内には単量体も含まれていることが推測された。また、**1-3** はジスルフィド結合を切断すると活性を失うことから、単量体も毒性を持たないことが予想された。そこで、その存在と生物活性に興味を持たれたため、**1-3** の単量体を探索することとした。

*T. swinhoei* の抽出物を解析したところ、幅広い時間にわたり溶出し、**1-3** のおよそ半分の分子量を示す成分、nazumazoles D-F (**4-6**) を発見した。そして、抽出物より各成分を単離し、構造決定および生物活性の検討をおこなった<sup>2</sup>。

HRESIMS により各成分の分子式を決定し、各種 NMR データによって平面構造を解析した結果、**4-6** は **1-3** を構成する単量体の類縁体であり、**1-3** 中の Cys 残基が  $\alpha$ -アミノ酪酸 (Abu) 残基もしくは Ser 残基に置換していた。アミノ酸の絶対配置を Marfey 法により決定したところ、ペプチド中の位置ごとにアミノ酸残基の絶対配置は保存されていた。



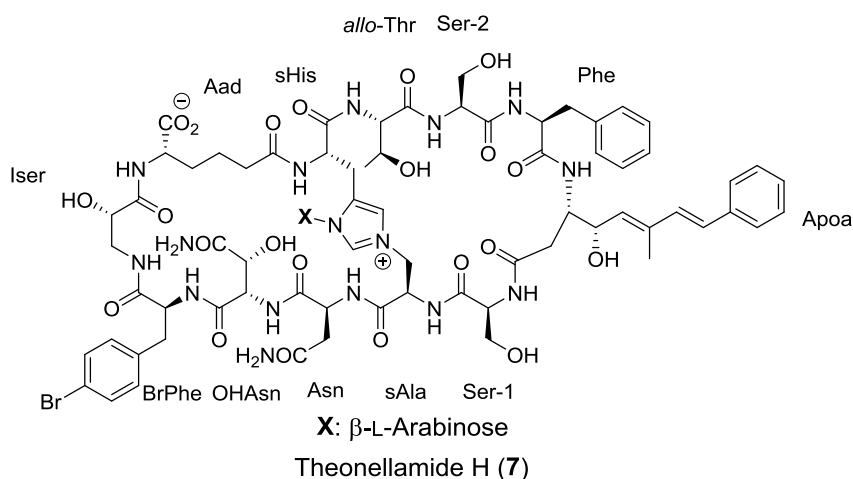
細胞毒性を調べたところ、**4-6** はいずれも P388 細胞に対して活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> 値 > 50  $\mu$ M)。そこで、他の生物活性についても検討することとした。Cyclotheonamide A は、塩基性側鎖を持つ  $\alpha$ -ケト- $\beta$ -アミノ酸を含み、塩基性のアミノ酸を認識するセリンプロテアーゼのトリプシンやトロンビンの活性を阻害することで知られている。一方で、**4-6** には疎水性側鎖を持つ  $\alpha$ -ケト- $\beta$ -アミノ酸である  $\alpha$ -ケトノルバリン (Knv) や  $\alpha$ -ケトロイシン (Kle) が含まれるため、疎水性のアミノ酸を認識するセリンプロテアーゼであるキモトリプシンを阻害すると推測した。実際に酵素活性試験をおこなったところ、**4-6** はキモトリプシンの活性を阻害した (IC<sub>50</sub> 値: **4**, 2  $\mu$ M; **5**, 3  $\mu$ M; **6**, 10  $\mu$ M)。

## II. 分布に個体差にある細胞毒性ペプチド theonellamide H (7) の単離と構造決定

同じ海域に生息する同種の海洋生物の化学的プロファイルはほぼ同一であることが予想される。しかし、ホヤやカイメンでは、共生微生物が二次代謝産物の生産に深く関与しているため、それらに個体差があると、二次代謝産物の組成にも個体差が生じることが予想され、実際にそのような報告例も存在する。そこで、カイメン内の微生物資源をより有効活用するため、本研究では LC-MS を用いて *T. swinhoei* の化合物組成を個体ごとに分析し、特定の個体にのみ含まれる新規物質を探索することとした。

八丈島産 *T. swinhoei* 15 個体を個体ごとにメタノールで抽出し、得られた抽出物をそれぞれ LC-MS で分析したところ、一部の化合物は分布に個体差が見られた。それらの中で、限られた個体にだけ認められた  $m/z$  1703 および 1705 にイオンピークを与える化合物に着目した。この化合物は、7 個体にだけ含まれていたため、含量の高いカイメン個体から単離し、構造決定および生物活性の検討をおこなった。

HRESIMS により分子式を決定し、各種 NMR 解析により構造解析をおこなったところ、本化合物は theonellamide 類縁体であったため、theonellamide H (7) と命名した。さらに詳細に解析した結果、本化合物は既知化合物の theonegramide からメチル基がひとつ欠失した構造であった。ついで、構成アミノ酸およびアラビノースの絶対配置を決定したところ、本化合物中のイソセリン残基およびアラビノース残基は、theonegramide で報告されているものの鏡像体であることを明らかにした。本化合物は HeLa 細胞に対して  $IC_{50}$  値  $1.9 \mu M$  で毒性を示した。



以上のように、カイメン *T. swinhoei* より新規活性ペプチド nazumazole 類 (1-6)、および分布に個体差のある theonellamide H (7) を発見し、構造を決定した。本成果は、過去の探索研究でおこなわれてきた生物活性や UV 吸収を基準とした分画法では発見の難しい化合物の存在を実証し、カイメンの創薬資源としての利用の可能性を拓げるものである。