

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 24 年度博士課程進学

氏名 人羅 勇氣

指導教員 松永 茂樹

論文題目 **New bioactive sponge metabolites discovered through cell-based assays**  
(培養細胞系アッセイによってカイメンから見いだした新規生物活性物質に関する研究)

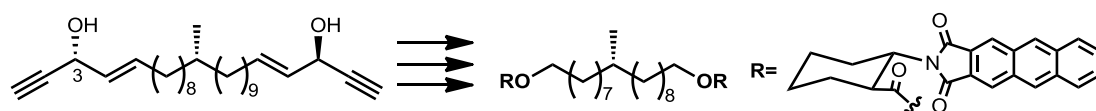
カイメン、ホヤ、サンゴをはじめとした海洋無脊椎動物は、独特な化学構造を有した多様な生物活性物質（海洋天然物）を含有していることが知られている。近年、海洋天然物をリードとしたがん化学治療薬が複数上市され、20 種以上の海洋天然物およびその誘導体が臨床試験に進んでいる。このように、海洋天然物は創薬資源、あるいは研究ツールとしての有用性が実証されてきた。本研究では、以下に示す二種類の培養がん細胞を用いた活性評価系を用いて、カイメンを探索源とし、抗がん活性に結びつくことが期待される生物活性を示す化合物の探索の単離、構造決定をおこなった。

1. ヒト子宮頸がん細胞（HeLa 細胞）に対する細胞毒性試験
2. 細胞周期可視化蛍光プローブ（Fucci2）が導入された Fucci2-HeLa 細胞のタイムラプスイメージングを用いた生物試験

これらの培養細胞系アッセイを用いて見出された新規生物活性物質に関する研究概要を以下に示す。



Miyakosyne A の 14 位不斉炭素は、修飾可能な末端構造から遠方に位置しており、不斉点を挟んだ左右の脂肪鎖長の差は一炭素分のみである。このような遠隔位に存在する不斉炭素のキラリティー認識は非常に困難である。そこで、遠隔位キラル認識試薬による化学誘導体化および  $^1\text{H}$  NMR スペクトル解析によって 14 位不斉炭素の絶対配置を決定することとした。まず、化学分解反応によって miyakosyne A より 9 位に分岐メチルを有する炭素鎖 18 のジオールを調製した。続いて、その両鏡像異性体をそれぞれ化学合成により調製した。天然物由来および合成由来のジオールに対して、遠隔位不斉認識試薬である赤坂・大類試薬を用いてエステル化した。合成標品および天然物由来の誘導体の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルを比較し、miyakosyne A の 14 位不斉炭素の絶対配置を *R* と決定した<sup>3</sup>。



Scheme 1. Chemical conversion and derivatization of miyakosyne A

深海性の未同定種カイメンより、細胞毒性成分として poecillastrin C (**13**) および新規 poecillastrin 類縁体 (**14**) を単離した。各種 NMR スペクトルデータの解析によって poecillastrin 類の平面構造を決定した。新規 poecillastrin 類縁体 (**14**) は、分子内にペンタエン構造を有しており、光に対して不安定であった。また、poecillastrin C (**13**) に関して、NOESY スペクトルおよび結合定数の解析により、一部の相対配置を推定した。

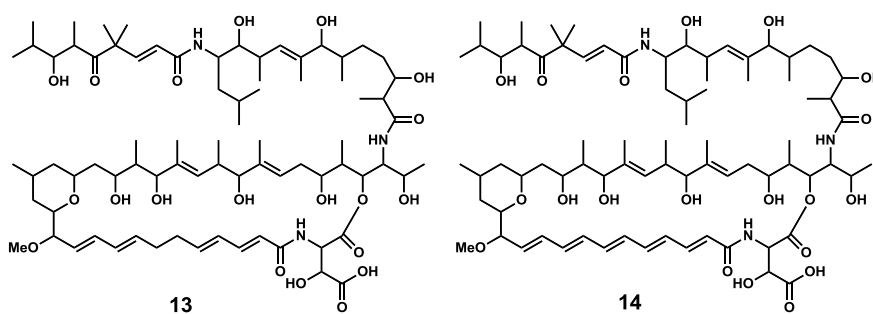


Figure 3. Chemical structures of poecillastrin C (**13**), and novel analogue (**14**)

## 2. Fucci2-HeLa 細胞を用いた細胞周期停止を誘導する化合物の探索

多くのがん化学治療薬は、DNA や細胞周期に関連するタンパク質を標的としており、がん細胞の細胞周期の停止および細胞死を引き起こす。そのため、細胞周期を停止する海洋天然物は、創薬のシードとして有望であると考えられる。そこで、細胞周期を可視化する蛍光プローブが導入された Fucci2-HeLa 細胞を海洋天然物の活性評価に応用した。まず、Fucci2-HeLa 細胞に対する 29 種の海洋天然物の生物活性を評価した。その結果、onnamide B が S/G2 期で細胞周期の停止を誘導した。さらに、複数の海洋天然物について、特徴的な生物活性が観察されたことから、Fucci2-HeLa 細胞を用いた活性評価系の有用性が支持された。そこで、約 1000 種類のカイメン抽出エキスイブラリーをスクリーニングし、S/G2 期での細胞周期の停止を誘導するサンプルを 20 種選別した。顕著な活性を示したサンプルを抽出し、新規化合物を含む複数の活性成分を単離した。

Fucci2-HeLa 細胞に対して、S/G2 期で細胞周期を停止させる化合物として二種類の新規 metachromin 類縁体(15, 16)を既知の metachromin 類と共に単離した。化合物 15 の不斉炭素の絶対配置に関しては、キラルカラムを用いた HPLC 分析によってラセミ体であると決定した。また、複数の metachromin 類縁体、および共通のベンゾキノン骨格を有する 5-*epi*-isospongiaquinone について、Fucci2-HeLa 細胞の細胞周期に与える影響を解析したところ、化合物 15 や 17 をはじめとした化合物が S/G2 期での細胞周期の停止誘導活性を示した。これにより、2-hydroxy-5-methoxy-1,4-benzoquinone 構造が細胞周期の停止に関与することが示唆された。

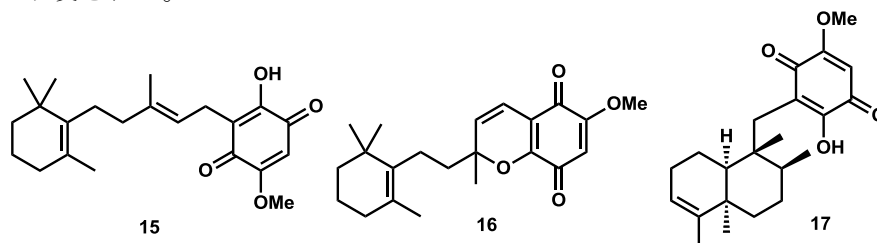


Figure 4. Chemical structures of novel metachromin analogues (15,16), and 5-*epi*-isospongiaquinone (17).

本研究では、二種類の培養細胞を用いた活性評価系を用いて活性物質の探索をおこない、(一)-duryne 類、miyakosyne 類、poecillastrin 新規類縁体、および metachromin 新規類縁体を単離、構造決定した。本研究結果は、培養細胞を用いた活性評価が、多様な生物活性を有する新規化合物を見出すために有効な実験系であることを示した。

1. Y. Hitora, K. Takada, and S. Matsunaga *Tetrahedron*, **67**, 4530, (2011).
2. Y. Hitora, K. Takada, S. Okada, and S. Matsunaga, *J. Nat. Prod.* **74** 1262 (2011).
3. Y. Hitora, K. Takada, and S. Matsunaga *Tetrahedron*, **52**, 11070 (2013).