

3-19.南西諸島産海洋生物および薬用植物に含まれる生物活性二次代謝産物の探索研究

濱田 季之

Study on secondary metabolites from marine organisms and plants in Nansei Islands

HAMADA Toshiyuki

鹿児島大学大学院理工学研究科

Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University

はじめに

当研究室では、生物多様性に富む奄美群島を中心として南西諸島に生息する海洋生物や植物に含まれる二次代謝産物を探索し、その中から医薬品などの有用物質を見つけ出し、その化学構造や生物学的な性質を解明することを目的に研究を行っている。これまで、世界最大規模の魚毒食中毒シガテラ (cigatera) に対する解毒活性や九州南部に患者や死者の多い成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia: ATL) のがん細胞株 (S1T) に対する細胞毒性活性を指標として生物活性物質を探索してきたが、2022 年度から新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19) の新規治療薬開発を目指して SARS-CoV-2 メインプロテアーゼ (M^{pro}) の阻害活性物質の探索研究も開始した。その研究例として、本報告では沖縄県泡瀬海岸で採取したジャノメアメフラシ (*Aplysia dactylomela*) に含まれていた 21 種の二次代謝産物 (6 種の新規化合物含む) の単離・構造決定ならびに生物活性について示す。

沖縄産ジャノメアメフラシ由来の二次代謝産物に関する研究¹⁾

ジャノメアメフラシは、温帯から熱帯にかけての浅い海域に分布する大型のアメフラシである。体長は約 20 cm 程度で体色は茶色やクリーム色であり、背面全体に蛇の目状の斑点を持つ。また、刺激を与えると紫色の液体を出し外敵から身を守っている。*Laurencia* 属紅藻を主食としており、紅藻に由来するテルペノイド、 C_{15} アセトゲニン、ステロール、アルカロイドなどの様々なハロゲン化代謝物を体内に蓄えていることが分かっている^{2,3)}。また、これらのハロゲン化代謝物は、強力な細胞傷害性、抗細菌性、抗真菌性、神経毒性を示すことが報告されている⁴⁾。紅藻はアメフラシの体内の消化管で消化され、それに含まれる様々な化合物は、中腸線に蓄えられる⁵⁾。一部の紅藻由来の化合物は、中腸線から皮膚やインク線に輸送されるが、大部分の化合物は中腸線に蓄えられたままであるので、ジャノメアメフラシから化合物を抽出するときは、中腸線を用いるのが一般的であり、本研究でも中腸線を用いて研究を行なった。未発表データを含むため、新規化合物の単離・構造決定や生物活性試験の詳細は非公開とする。

材料と方法

沖縄県泡瀬西海岸のタイドプールにて、ジャノメアメフラシ 41 個体を採集した。採集物は、消化器系とそれ以外に分離し、化合物の探索研究に使うまでの間、それぞれを -20°C 以下で冷凍保存した。

ALT 細胞株 S1T は、10%ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン、および 2 mM L-グルタミン酸を添加した RPMI-1640 で培養・継代し、既報に記載した手順^{6,7)}に従って細胞傷害アッセイに使用した。

SARS CoV-2 M^{pro} 阻害活性におけるアッセイ系も、既報⁸⁾を参考に以下のアッセイ系を構築した。酵素の基質は、蛍光物質 Edans とそのクエンチャー Dabcyl をそれぞれ C 末端と N 末端に付けたペプチド (ペプチド研究所, 日本) を用いた。96 穴ブラックプレート (Thermo Scientific, Cat#237105, USA) に終濃度 20 nM の SARS-CoV-2 M^{pro} (シグマ-アルドリッチ, USA) および各濃度の抽出物および化合物を加え、終濃度 10 mM の基質を含む緩衝液 (20 mM

HEPES pH 6.5, 120 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 4 mM DTT) を加え、反応温度 30 °Cのもと、マルチプレートリーダー (TECAN Infinite200, USA) にて、励起波長 340 nm での蛍光 (485 nm) の FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) を観測した。ポジティブコントロールにはエンシトレルビルを使用した。溶媒で用いた DMSO をネガティブコントロールとし、その蛍光強度を 100% としてそれぞれの抽出液の蛍光阻害率を求めた。

結果と考察

ジャノメアメフラシ *A. dactylomela* の中腸腺 (940 g, wet wt.) を MeOH と 50% MeOH/CH₂Cl₂ でそれぞれ抽出・ろ過をして、得られた抽出液を減圧濃縮にかけることで抽出物を得た。この抽出物を CH₂Cl₂ と H₂O で二層分配を行い、続けて、CH₂Cl₂ 層を *n*-hexane と 90% MeOH/H₂O で二層分配した。H₂O 層は *n*-BuOH と H₂O で二層分配した。90% MeOH/H₂O 層の一部 (29.4 g 中 9.25 g) をバキュームカラムクロマトグラフィー、PTLC、ODS-HPLC 等で分離し、31 種の化合物を単離した。そして、そのうち 21 種の化合物について構造解析を行った。非公開情報を含む 4 つの化合物 (3~5、および 10) を除き、残りの 17 種の化合物について、Fig. 1 に化学構造を示す。生物活性については、掲載済み論文 (1) および現在投稿予定の学術誌を参照のこと。

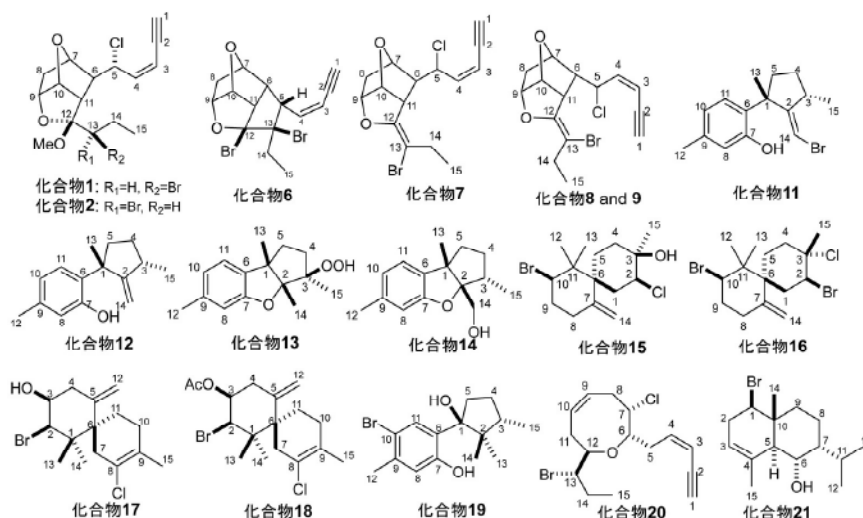


Figure 1 ジャノメアメフラシから単離した 17 種の化合物の化学構造

引用文献

- (1) K. Matsuyama et al. (2022) New halogenated C15 acetogenins from Okinawa sea hare *Aplysia dactylomela*. Tetrahedron, 120: 132889.
- (2) D.W. Ginsburg et al. (2001) Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites. Mar. Ecol. Prog. Ser., 215, 261–274.
- (3) A. Ianora et al., (2006) New trends in marine chemical ecology. Estuaries Coasts, 29, 531–551.
- (4) C. Avila, (1995) Natural products of opisthobranch molluscs: a biological review. Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev., 33, 487–559.
- (5) 神尾道也 (2012) 総説 アメフラシ類の化学防御機構：捕食者と同種個体の化学感覚に働く複数の化学物質，比較生理生化学, 29, 11–17.
- (6) T. Hamada et al. (2012) The bioassay-guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL), from the Jamaican plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of Hyptiside. Molecules, 17, 9931–9938.
- (7) Y. White et al. (2011) Novel cytotoxic isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* jacq induces apoptosis and overcomes multidrug resistance. Anticancer Res., 31, 4251–4257.
- (8) H. S. Lo et al. (2021) Simeprevir Potently Suppresses SARS-CoV-2 Replication and Synergizes with Remdesivir. ACS Cent. Sci., 7, 792–802.