

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻

平成 10 年度博士課程 進学

氏 名 藤 薫

指導教官名 伏谷 伸宏

論文題目 Studies on Telomerase Inhibitors from Marine Invertebrates (海洋無脊椎動物からのテロメラーゼ阻害物質に関する研究)

ヒト細胞において、その DNA 末端は、TTAGGG の繰り返し配列からなる DNA で構成されている。このような DNA 末端構造はテロメアと呼ばれ、その長さが染色体の安定性の維持や細胞寿命の規定において重要な役割を果たす。すなわち、テロメアがある程度短くなると、細胞はもはや分裂しない細胞老化という状態に陥り、最終的に細胞死に至る。

テロメラーゼは、テロメア配列に対する鋳型 RNA をもつ逆転写酵素である。この酵素は、DNA 末端にテロメア配列を付加し、テロメア長を維持する働きをする。ほとんどの正常細胞においてテロメラーゼの発現が抑制されており、その寿命が有限であるのに対し、がん化した体細胞あるいは不死化した体細胞ではテロメラーゼが発現し、テロメア長を一定に保つのでこれらの細胞は無限に細胞分裂することができる。従って、これらの細胞にテロメラーゼ阻害剤を作用させると、その細胞分裂回数は有限となり、結果的に細胞死に誘導することができると推察される。さらにテロメラーゼがほとんどの正常細胞で発現していない一方、ほとんどのがん細胞に発現していることから、テロメラーゼ阻害剤は選択的抗がん剤となることに期待される。

現在、さまざまなテロメラーゼ阻害剤が発見されているが、陸上微生物由来の阻害剤の報告例はあるものの、天然物由来の阻害剤はまだ少ない。そこで、本研究では、日本産海洋無脊椎動物を対象にテロメラーゼ阻害活性を調べるとともに、有望な活性を示した 2 種の実験動物から活性物質の単離と構造決定を試みた。その概要は以下の通りである。

1. スクリーニング

太平洋沿岸で採取された海洋無脊椎動物 897 検体を有機溶媒で抽出し、その抽出物を溶媒分画により、クロロホルム可溶画分、ブタノール可溶画分、水可溶画分に分けた。脂溶性画分は 50 $\mu\text{g/mL}$ で、水溶性画分は 200 $\mu\text{g/mL}$ でテロメラーゼ阻害活性試験を行った。その結果、海綿抽出液の脂溶性画分の 0.65 %および水溶性画分の 1.8 %が活性を示した一方、ホヤ類抽出液の脂溶性画分の 1.8 %は活性を示したものの、水溶性画分は活性を示さなかった。また、ソフトコーラルとコケムシ類の抽出液は、いずれの画分も活性を示さなかった。活性の発現頻度と強度から海綿が最も有望なテロメラーゼ阻害物質探索源であることが判明した。次に、選択的な阻害活性を示した海洋無脊椎動物のうち、2 種類の実験動物、*Axinella infundibula* と *Dyctyodendrilla verongiformis* からテロメラーゼ阻害物質の単離と構造解析を試みた。

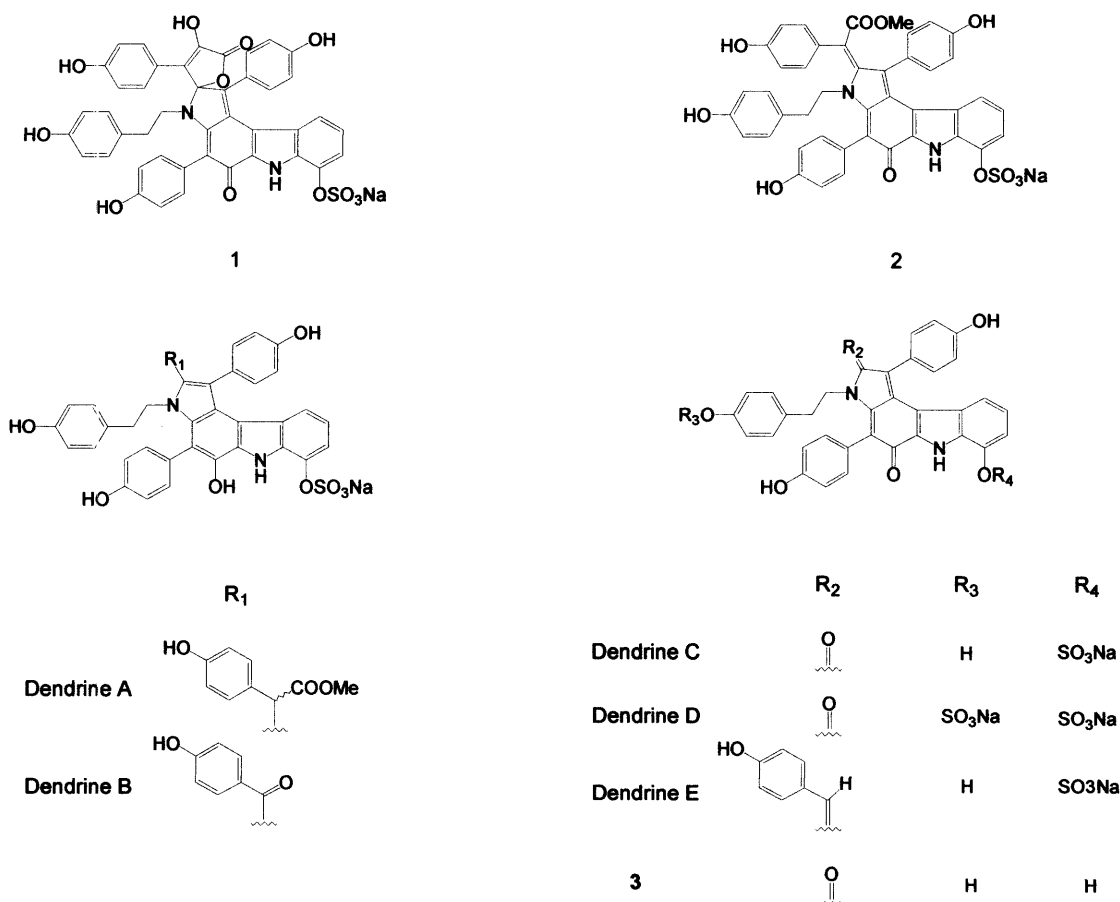
2. 長崎県長島産海綿 *Dyctyodendrilla verongiformis* からの dendrine A-E の単離と構造決定

長崎県天草諸島の長島で採取した海綿 *Dyctyodendrilla verongiformis* (湿重量 80 g) をメタノールで抽出後、ク

ロロホルムと水とで二層分配し、水層をさらにブタノールで抽出した。ブタノール層を、活性を指標に ODS フラッシュクロマトグラフィーおよびゲルろ過で分画後、逆相 HPLC で精製して dendrine A (12.8 mg), B (0.9 mg), C (4.6 mg), D (1.1 mg), E (2.7 mg)、および、既知化合物の化合物 1 (26.3 mg) と化合物 2 (1.1 mg) とをそれぞれ単離した。

Dendrine A の分子式を質量分析データと NMR データとから $C_{43}H_{33}N_2O_{11}SNa$ と決定した。IR スペクトルは水酸基、アミノ基、およびエステル結合の存在を示唆した。また、328 nm に強い UV 吸収を示したことから、dendrine A は長く伸びた共役系を有することが示唆された。これらのデータに加え、二次元 NMR データを詳細に解析した結果、その構造を下に示す構造を推定した。さらに、dendrine A の空気酸化により化合物 2 が生成することから、これらの化合物が同一の炭素骨格を有することが判明した。なお、不斉中心が 1 つあるにもかかわらず、dendrine A は CD 不活性だったので、逆相 chiral HPLC で分析したところ、面積比が 1:1 の 2 つのピークを与え、しかもそれぞれのピークが互いに逆の Cotton 効果を示したことから、dendrine A はラセミ体であることが判明した。Dendrine B, C, D, および E の構造は dendrine A と同様に、質量分析および各種分光学的手法を用いて推定した。さらに、dendrine B, C, D, E ならびに化合物 2 を酸加水分解すると、いずれも共通の反応生成物 3 を与えたことから、これらの化合物が共通の炭素骨格を有することが明らかとなった。

Dendrine A-E と化合物 1 および 2 は、いずれも 50 $\mu\text{g/mL}$ でテロメラーゼ活性を 100 % 阻害した。



3. 式根島産海綿 *Axinella infundibula* からの axinelloside A の単離と構造決定

伊豆諸島の式根島で採取した海綿 *Axinella infundibula* (湿重量 3.9 kg) をメタノール、エタノール、およびアセトンで順次抽出した。抽出物を合一し、水とエーテルで分配した。エーテル層をさらに、90 %メタノールとヘキサンとで分配した。活性が認められたヘキサン層を ODS フラッシュクロマトグラフィー、次いでシリカ

ゲルクロマトグラフィーで分画後、逆相 HPLC で精製して、axinelloside A を 27.3 mg 得た。

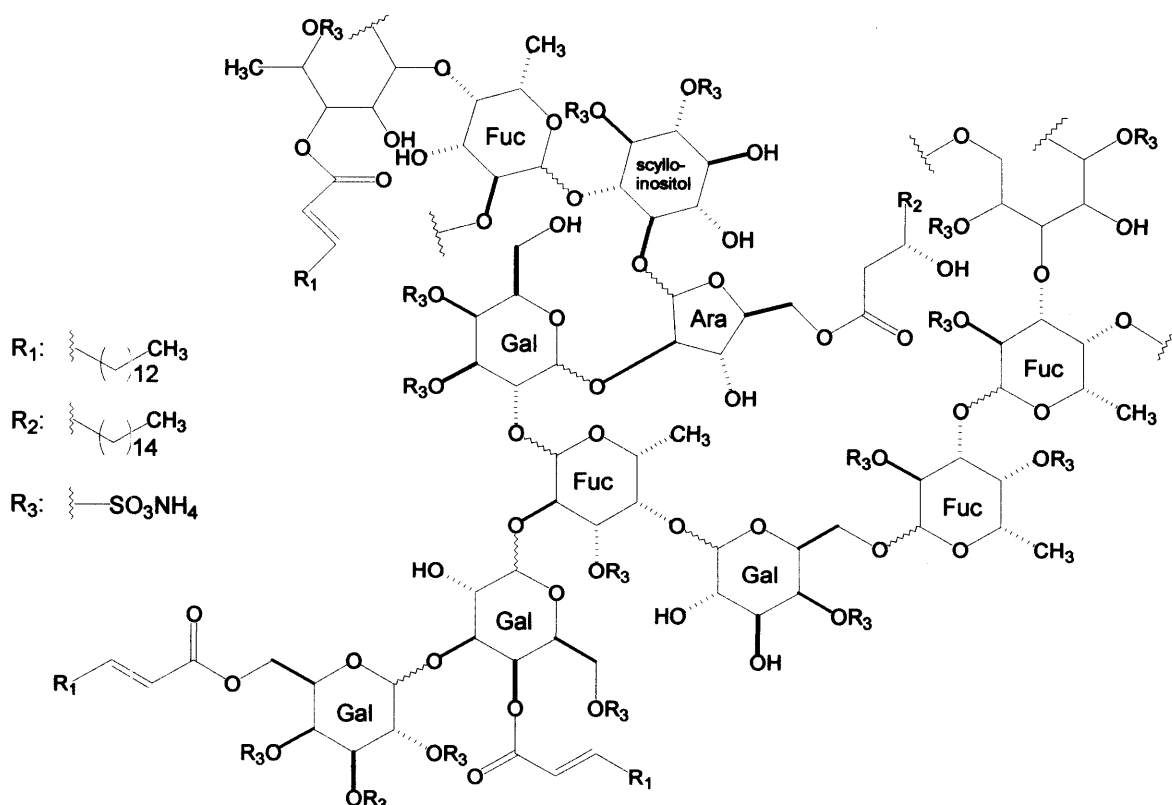
まず、ESI-MS データと NMR データとから、axinelloside A は分子量約 4100 の糖脂質であることが示唆された。そこで、NMR 分析および糖の alditol acetate 分析を行ったところ、axinelloside A には arabinose、fucose、galactose、および scyllo-inositol が 1:4:4:1 の割合で含まれることがわかった。また、arabinose、fucose、および galactose の絶対立体化学は、それぞれ D、L および D であった。

一方、NMR 分析の結果、axinelloside A には α,β -不飽和カルボン酸と β -ヒドロキシカルボン酸とが、3:1 の割合で存在することがわかった。そこで、axinelloside A のアルカリ加水分解物から α,β -不飽和カルボン酸を単離し、FABMS および NMR で分析した結果、このカルボン酸は、2-hexadecenoic acid であることがわかった。一方、axinelloside A の酸加水分解物をヘキサンと水とで二層分配した後、ヘキサン層のカルボン酸を TMS-diazomethane で処理し、メチルエステル体とした後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、 β -ヒドロキシカルボン酸メチルエステルを得た。これを FABMS と NMR とで分析した結果、methyl 3-hydroxyoctadecanoate であることが明らかとなった。さらに、 β 位の絶対立体化学は改良 Mosher 法から *R* と決定した。

NMR データから galactose、fucose、arabinose、scyllo-inositol、 α,β -不飽和カルボン酸および β -ヒドロキシカルボン酸の存在比は、4:4:1:1:3:1 であると判明した。HMBC データと NOESY データとを解析した結果、下に示すような部分構造を推定するに至った。なお、糖および β -ヒドロキシカルボン酸中の水酸基の数は重水素化シフト実験の結果より推定した。

Axinelloside A の ESI-TOFMS (陰イオンモード) スペクトルの分子イオン領域には 80 違いのピークが多数観測された。この性状は、axinelloside A に多数の硫酸基が存在することを示唆した。 ^{31}P NMR スペクトルにおいてシグナルが観測されなかったことからリン酸エステルは含まれていないと結論できたが、酸加水分解物の陰イオン交換 HPLC 分析においては、硫酸イオンが検出された。その結果は、硫酸基が概ね 22 個存在することを示唆しており、現在、正確な数の算出法を検討中である。

テロメラーゼ阻害活性試験において、axinelloside A は、2 $\mu\text{g/mL}$ でテロメラーゼ活性を 100 % 阻害した。



テロメラーゼ阻害活性を指標に海洋無脊椎動物の抽出物のスクリーニングをした結果、海綿がもっとも有望な探索源であることを見出すとともに、有望な活性を示した 2 種類の海綿 *Dyctyodendrilla verongiformis* および *Axinella infundibula* から、合計 6 種の新規テロメラーゼ阻害物質を単離し、各種分光学的手法および化学的手法を用いてその化学構造を推定した。*D. verongiformis* から単離された一連のアルカロイドは、共通の骨格 **3** を有するが、側鎖に多様性がみられる。生合成的には 3 つのチロシンと 1 つのトリプトファンとの縮合により **3** が生成し、ついで側鎖が形成される経路が考えられる。一方で、3,4-ジヒドロフェニルアラニンを原料として生合成されたと考えられる類縁天然有機化合物が *Didemnum* 属のホヤなどから発見されており、双方の生合成的関連について興味をもたれる。*A. infundibula* から単離された糖脂質は、分子量の非常に大きい化合物で、このような糖脂質は海洋天然物として初めての例である。NMR シグナルがブロードなために、炭素間の結合情報を提供する HMBC スペクトルを得ることが困難であること、多くの硫酸基をもつためにマスペクトルでイオンピークを観測し難いこと、といった構造解析に不利な条件が重なっているために、構造決定は困難を極めた。本化合物には、細菌から単離された lipid A や多数の硫酸基で修飾されているヘパリン分子との類似が見られ、生体内でのその役割に興味をもたれる。