

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成 11 年度博士課程 進学
氏 名 奥 直也
指導教官名 伏谷 伸宏

論文題目 Studies on metabolites that induce morphological changes in 3Y1 rat fibroblasts from marine invertebrates
(海洋無脊椎動物由来の 3Y1 ラット繊維芽細胞に形態変化を誘導する物質に関する研究)

増殖、分化、運動、老化、細胞死など、細胞の諸機能にはタンパク質を始めとする様々な生体分子が関わっている。こうした現象を解明するため、今日では様々な手法が開発されているが、なかでも特定の分子の機能を阻害または亢進する低分子プローブを用いた方法はもっとも汎用されている。たとえば、okadaic acid や calyculin A は、タンパク質脱リン酸化酵素の特異的阻害剤として細胞内シグナル伝達や発がん機構の解明などに貢献をしている。そこで本研究では、細胞内の生理的变化が形態の変化に反映されることを利用して、これを指標としたアッセイ系を構築し、海洋無脊椎動物より新たなツールとなりうる物質の探索を試みた。その概要は以下の通りである。

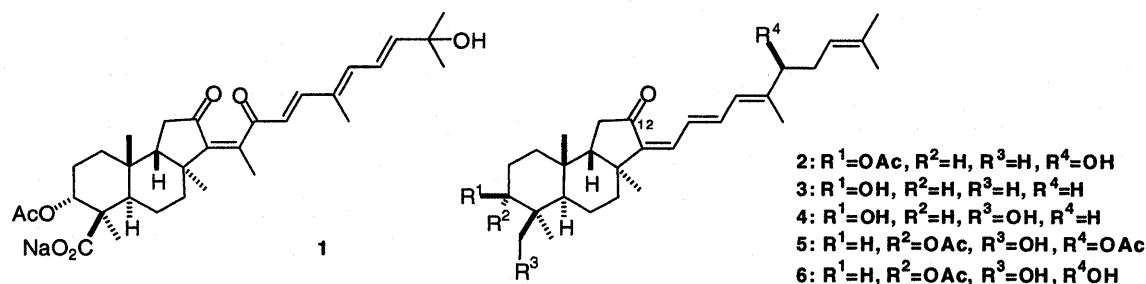
1. アッセイ系の構築およびスクリーニング

3Y1 ラット胎児由来繊維芽細胞は、よく伸展して形態が観察し易く、かつ継代も簡単で性質が正常細胞に近いので、これを用いた。作用機序が分かっている 26 種の化合物がどのような形態変化を引き起こすのかを観察したところ、11 種の化合物が特徴的な形態変化を引き起こした。したがって、誘導された細胞形態をもとに、薬剤の作用点を推定できる可能性が示唆された。次に、1997 年から 2000 年にかけて、タイ Sichang 島、マリアナ諸島、トカラ列島、大隅諸島、甌島列島、鹿児島県川辺郡坊津町、宮崎県日南大島、天草諸島、高知県沖の島、伊豆諸島、静岡県熱海市において採集された海綿(293 検体)、腔腸動物(89 検体)、コケムシ(6 検体)、ホヤ(49 検体)の計 437 検体から調製した脂溶性および水溶性画分についてスクリーニングを行った。その結果、何らかの形態変化を引き起こしたものは、海綿では 45%と最も多く、続いてホヤ(39%)、腔腸動物(35%)、コケムシ(33%)の順に活性発現頻度が高かった。従って、探索源として海綿が最も有望であることが明らかになった。また、アクチン脱重合、チューブ

リン重合阻害あるいはチューブリン安定化作用など、細胞骨格系への影響がもっとも多く見られ、全検体の 10%を占めた。なお、海域や動物門ごとに検出頻度の高い形態変化のタイプが異なることも明らかとなった。次に、スクリーニングで浮かび上がった有望検体から活性物質の単離と構造決定を試みた。

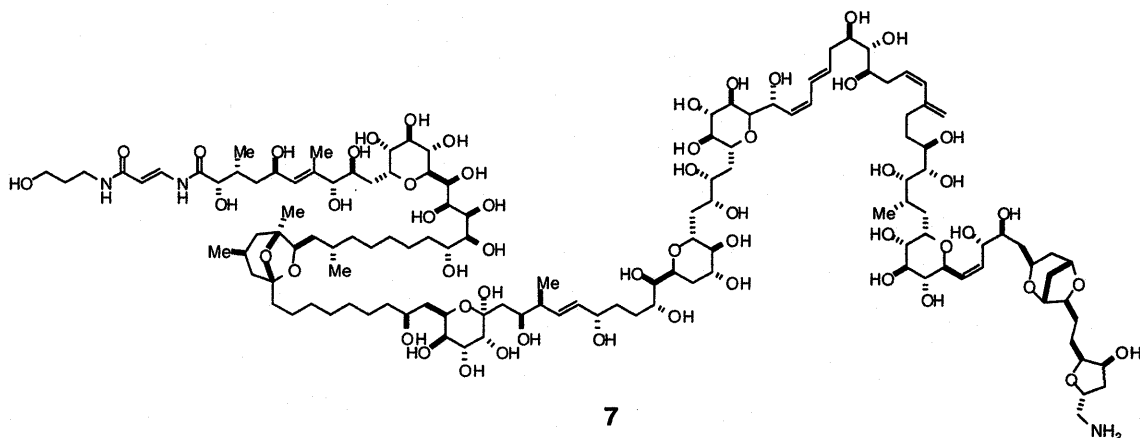
2. 馬毛島産海綿 *Stelletta globostellata* からの紡錘形の細胞形態を誘導する物質の単離と構造決定

鹿児島県馬毛島産海綿 *Stelletta globostellata* の脂溶性画分は、3Y1 細胞の伸展を抑制し、紡錘形の細胞形態を誘導した。この海綿から単離された細胞毒性イソマラバリカントリテルペン globostellatic acid A (1)はそのような作用を示さなかったため、形態変化誘導物質の検索を行った。試料をエタノールで抽出後、溶媒分画、ODS クロマトグラフィー、ゲル濾過、HPLC により 5 種の活性物質を得た。これらのうち、2 種は既知物質のイソマラバリカントリテルペン stelliferin A (2) および D (3) であり、残りの 3 種はいずれも 29 位に水酸基が導入された新規 stelliferin 類縁体、29-hydroxystelliferin D (4)、3-*epi*-29 hydroxystelliferin E (5)、および 3-*epi*-29-hydroxystelliferin E (6)と判明した。それぞれの化合物の縮合環の相対立体構造は、カップリング定数および NOESY スペクトルの解析から求めた。化合物 4 および 5 の絶対立体配置は、12 位のケトン還元して水酸基とし、これに改良 Mosher 法を適用して決定した。化合物 6 はこれの完全アセチル体が 5 の完全アセチル体と ¹H NMR スペクトルおよび旋光度が一致したことから、絶対立体構造を導いた。化合物 2-6 は、0.2 μM の濃度で 24 時間以内に上記の形態変化を誘導した。また、活性の発現に 12 位のケトンが重要であることが明らかとなった。stelliferin 類の細胞毒性は IC₅₀ 18-60 nM であった。



3. トカラ列島産スナギンチャク *Palythoa aff. margaritae* からの細胞の破裂死を引き起こす物質の単離と構造決定

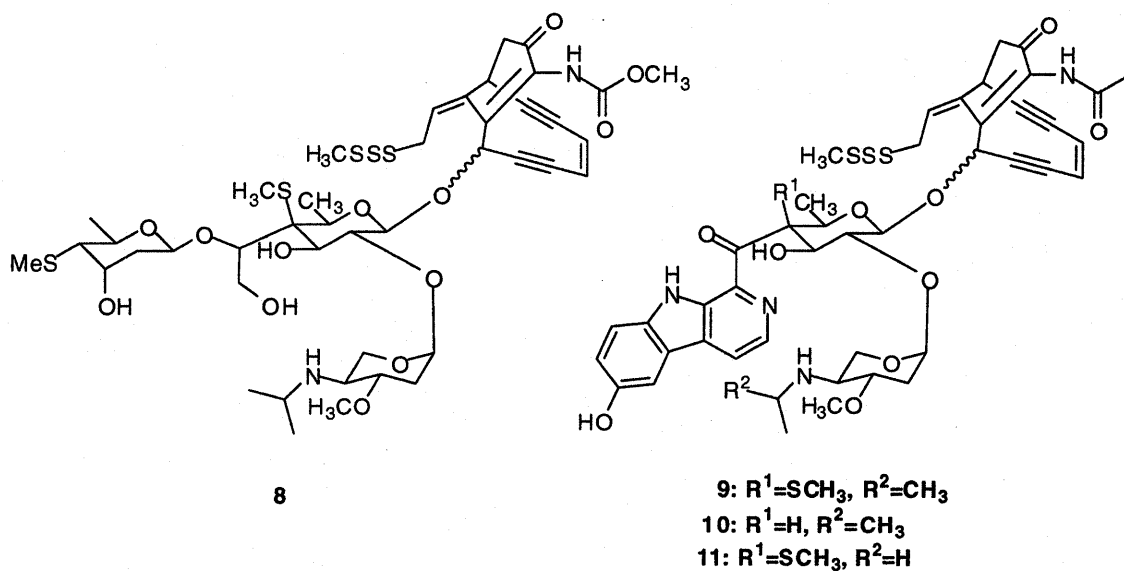
鹿児島県中之島で採集されたスナギンチャクの一つ *Palythoa aff. margaritae* の水溶性画分は、ごく微量で 3Y1 細胞を短時間で破裂させた。バクテリアやカビに対しては生育阻害活性を示さなかったことから、動物細胞に特異的に作用することが示唆された。そこでスナギンチャク(3.2 kg)をエタノールで抽出後、溶媒分画、CPC などで分画し、最終的に TMS-HPLC で精製して活性物質 0.3 mg を得た。この化合物の ¹H NMR、FABMS スペクトル、および HPLC の挙動は palytoxin (7)と一致した。Palytoxin (7)は 5 nM で 45 分以内に上記の活性を示し、3Y1 細胞に対する細胞毒性は IC₅₀ 0.72 pM であった。



4. 天草諸島産ミナミスボヤ *Didemnum proliferum* からの核膜を消失させる物質の単離と構造決定

鹿児島県獅子島で採集されたミナミスボヤ *Didemnum proliferum* の抽出液は、3Y1 細胞の核膜を消失させる特異な活性を示した。このような活性は、これまでに観察したことがなく、また非常に強い細胞毒性を示したことから活性の本体に興味を持たれた。冷凍試料をエタノールで抽出後、溶媒分画、CPC、ODS HPLC で順次精製して4つの活性成分を得た。そのうち一つは namenamicin (8) と同定されたが、残りの3つは新規物質であった。そこで二次元 NMR を中心とする機器分析で構造を解析したところ、いずれも β -carboline を有する新規エンジイングリコシドであることが明らかとなり、shishijimicin A-C (9-11) と命名した。これらの物質の相対立体構造は NOESY スペクトルおよびカップリング定数から決定した。絶対立体構造は未決定であるが、calicheamicinone ユニットについては CD スペクトルから calicheamicin γ_1^1 と同じ絶対配置を持つことが示唆された。

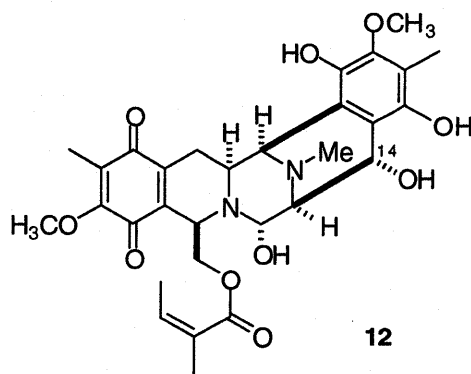
Shishijimicin B (10) は 40 nM の濃度で 24 時間以内に半数近くの細胞に上記の形態変化を誘導した。また、3Y1、HeLa、および P388 細胞に対する細胞毒性は IC_{50} 0.47-6.3 pM であった。



5. 口永良部島産未同定海綿からの RNA/タンパク質合成阻害時の形態変化を誘導する物質の単離と構造決定

鹿児島県口之永良部島で採集された未同定海綿の抽出物は、細胞毒性を発現する際、核小体の縮小、および隣り合う細胞同士の境界を不明瞭にする作用を示した。このような変化は、RNA あるいはタンパク質合成阻害剤で見られるものの、カビに対し生育阻害活性を示さなかったことから、バクテリアおよび動物細胞に選択的に作用する物質の存在が示唆された。エタノール抽出物を溶媒分画後、ゲル濾過、逆相 HPLC で順次精製して一つの活性成分を得た。この物質はアルカリに対し不安定で、かつ非常に酸化され易かった。しかし、各種 NMR スペクトルの解析から、本物質はヒドロキノンとキノンを有する二量体型のイソキノリンアルカロイドであることが判明したので、renieramycin J (12) と命名した。なお、本物質の相対立体構造はカップリング定数および NOESY スペクトルから決定した。さらに、絶対立体配置は、ビスキノンとした後、14 位の水酸基に改良 Mosher 法を適用して決定した。

Renieramycin J (12) は 86 nM の濃度で 12 時間以内に上記の形態変化を引き起こした。また、3Y1、HeLa、および P388 細胞に対する細胞毒性は、それぞれ IC_{50} 5.2, 12.3, および 0.52 nM であった。



以上、本研究では、細胞の形態変化を指標としたアッセイ系を用いて、437 検体の海洋無脊椎動物をスクリーニングし、特異化合物探索源として多くの種類を発掘するとともに、有望な活性を示した 2 種の海綿、および腔腸動物とホヤそれぞれ 1 種から合計 11 種の化合物を単離、同定した。そのうち 7 種が新規化合物であった。なお、本アッセイの有効性も示すことが出来た。