

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成12年度博士課程 進学
氏名 岡田裕実春
指導教官 伏谷伸宏 教授

Studies on Antimicrobial Substances from Marine Sponges

(海綿からの抗菌物質に関する研究)

海洋生物からの有用二次代謝産物の探索は1970年始めから活発に行われ、1万を超える新規化合物が得られている。特に、海綿や原索動物などの無脊椎動物からは、抗菌、抗カビ、抗腫瘍など医薬として有用な活性を持つ化合物が多く発見されている。一方、薬剤耐性菌の出現や真菌症の急増などから、新しい抗生物質の開発が急がれている。

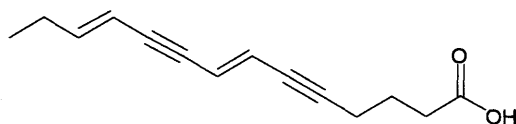
このような背景のもと、本研究では海洋無脊椎動物を対象として、従来の抗菌・抗カビ試験に加え、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の特定の遺伝子に損傷がある変異株を用いるスクリーニングを行うとともに、有望な活性を示した3種類の海綿から活性物質の単離と構造解析を試みたところ、4つの新規化合物を得ることができた。その概要は以下の通りである。

1. 海産無脊椎動物の抗真菌活性スクリーニング

1997年から2002年にかけて日本沿岸で採集した海綿動物631検体、腔腸動物142検体、外肛動物18検体、脊索動物85検体から脂溶性および水溶性画分を調製し、それぞれについて *S. cerevisiae* に対する活性を変異株10種を用いてペーパーディスク法にて評価した。活性を示した検体の割合は脂溶性および水溶性画分でそれぞれ海綿動物が29.8%および18.4%、腔腸動物が12.8%および7.0%、外肛動物が16.7%および11.1%、原索動物が20.2%および15.3%で、海綿動物がもっとも有望な探索源であることを示した。

2. 愛媛県佐田半島産 *Oceanapia* sp. から得られたアセチレンカルボン酸

抗真菌活性スクリーニングにおいて、cdc 遺伝子変異株に対して比較的強い活性が脂溶性画分に認められた釜木湾産海綿 *Oceanapia* sp. に含まれる活性成分を探索した。凍結試料 (120 g) のメタノール抽出物を二層分配、ODS-HPLC およびシリカゲルクロマトグラフィーで順次精製し、活性物質 **1** を 12 mg 得た。この物質の分子式は、マスペクトルおよび NMR データから $C_{14}H_{16}O_2$ と決定された。COSY および HOHAHA スペクトルから 3 つの部分構造を推定し、さらに ^{13}C NMR と HMBC データより、各部分構造間にアセチレンが配置された構造が導かれた。そして、カルボキシル基を末端に配置して海洋生物由来の天然物として報告のない ene-yne-ene-yne 構造を含む構造を決定した。化合物 **1** は酵母の 3 種類の変異株に対して 50 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で成長を阻害したが、*Penicillium chrysogenum* および *Mortierella ramanniana* に対しては 100 $\mu\text{g}/\text{disk}$ でも活性を示さなかった。また、50 $\mu\text{g}/\text{disk}$ でグラム陽性菌 (*Bacillus subtilis*, *Staphyrococcus aureus*) およびグラム陰性菌 (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) に対しても活性を示した。



1

3. 鹿児島県上甌島産 *Theonella* sp. からの抗菌性ペプチドの単離と構造決定

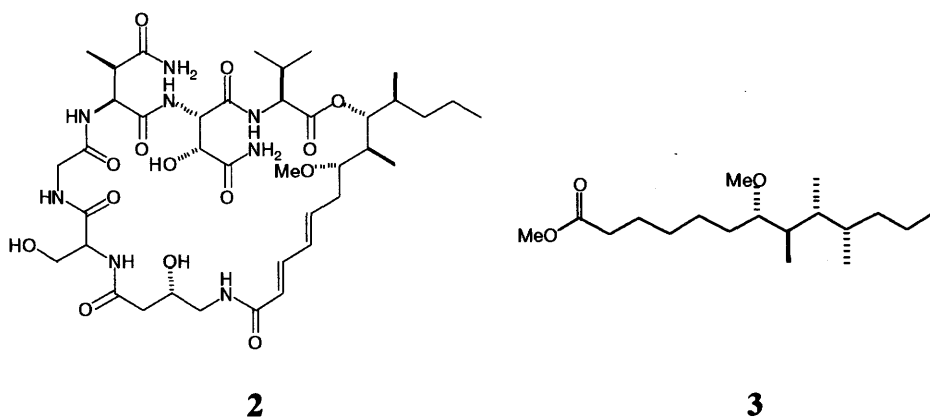
S. cerevisiae の変異株を用いたスクリーニングにおいて顕著な活性を示した上甌島産海綿 *Theonella* sp. より活性物質の単離と同定を試みた。凍結試料 (100 g) をメタノールおよびプロパノールで順次抽出後、抽出物を二層分配、シリカゲルおよび ODS クロマトグラフィーならびに ODS-HPLC によって精製した。活性本体は既知化合物の theonellamide 類であったが、同時に nagahamide **A(2)** と命名した抗菌物質を 2.3 mg 単離した。この化学構造を FABMS および各種二次元 NMR を含むスペクトルデータならびに化学分解実験から決定した。

DMSO- d_6 中の ^1H NMR から、Gly, Ser および Val が各 1 残基存在することが容易にわかった。これらに加え、 β 位がメチル基および水酸基で置換された Asn が各 1 残基認められた。一方、トリプレットとして観測されるアミドプロトンを起点として COSY スペクトルを解析した結果、4-amino-3-hydroxybutyric acid (AHBA) 残基が存在することが判明した。残された発色団 (λ_{max} 260 nm) を含むユニットは、アミド水素を含まず、COSY および HOHAHA スペクトルを解析したところ $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ 不飽和アミドが各 2 個のメチル基と酸素で置換された C_8 ユニットに結合した 8, 10-dimethyl-9-hydroxy-7-methoxytrideca-2,4-dienoic acid (DHMDA) 残基の存在が明らかとなった。

上記ユニットが 6 個のアミドと一つのエステルで結合すると FABMS から得られた分子式を満たした。各ユニットの配列は HMBC および NOESY データから導き、**2** の平面構造が得られた。

構成アミノ酸のうち β -Me Asn ならびに β -OH Asn の相対立体化学は、アミノ酸分析からいずれも *erythro* 型であることが明らかになった。またすべての構成アミノ酸の絶対立体化学は酸加水分解物を Marfey 分析に付すことによりすべて L 型と決定した。次に、DHMDA 残基の立体化学は、以下のように決定した。まず、DHMDA 残基と同一の平面構造のアグリコンを持つバクテリア由来の抗真菌化合物で立体化学が既知の YM47522 と NMR データの比較を行った。4 つの連続した不斉炭素上のメチン水素の ^1H NMR における結合定数値がよい一致を示したため、両者の相対配置が同一であることが予想された。このことを化学的に証明するために、YM47522 を水素添加、酸加水分解、およびメチルエーテル化して化合物 **3** を得た。一方、nagahamide A を接触還元後加水分解に付し、DHMDA 由来の残基を調製した。両者の ^1H NMR データを比べたところ、よい一致を示したため、DHMDA 残基の相対配置を $7S^*8S^*9R^*10S^*$ と決定した。

Nagahamide A は野生型と変異型の酵母ならびに *M. ramanniana* に対して 50 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示さなかったが、グラム陰性菌の *E. coli* およびグラム陽性菌の *S. aureus* に対して抗菌性を示した。



4. 八丈島産 *Erylus sp.* からの新規ステロイド配糖体の単離と構造決定

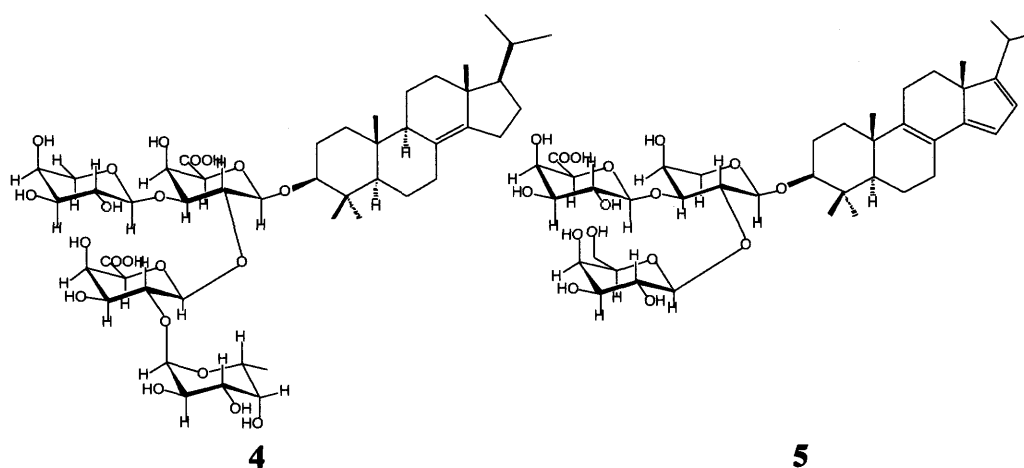
S. cerevisiae の *cdc* 遺伝子変異株に対する活性が、水溶性画分認められた八丈島産 *Erylus sp.* から活性成分を探索した。凍結試料 (100 g) を含水プロパノールで抽出後、抽出物を二層分配、ODS クロマトグラフィーならびに HPLC によって精製し、sokodoside A (**4**) および B (**5**) と命名した活性成分を、それぞれ 19.3 mg と 43.5 mg 単離した。これらの化学構造を各種二次元 NMR を含むスペクトルデータならびに化学分解反応を用いて決定した。

Sokodoside A は ^1H NMR データからステロイド配糖体であることが推測された。アグリコン部分は COSY およびに HOAHAHA データから得られた部分構造を HMBC データを用いてつな

げることにより、新規ノルステロイドであることが明らかとなった。4環性の炭素骨格の相対配置は NOESY スペクトルを解析することにより **4** に示すように決定した。一方、各種二次元 NMR データから、糖部の構造を解析したところ各一残基の5単糖および6-ヘキソースならびに2残基のヘキスロン酸の存在が示された。さらに、NOE 相関と *J* 値からアラビノース (Ara)、フコース (Fuc) およびガラクトツロン酸 (GalU) と同定するとともに、相互の結合様式を明らかにした。一方、各構成糖の絶対立体化学は sokodoside A の加溶媒分解物を誘導体化後キラル GC 分析に付し、L-Ara、L-Fuc および D-GalU と決定した。

Sokodoside B は ^1H NMR スペクトルから **4** と同様にステロイド配糖体であることが示唆されたが、 ^{13}C NMR においてオレフィン領域に新たに4本のシグナルが認められた。各種二次元 NMR データを解析した結果、アグリコン部は D 環がサイクロペンタジエンに酸化された構造を持つことが明らかになった。この相対配置は **4** の場合と同様に決定した。糖部の解析も **4** と同様にを行い、それぞれ一分子の L-Ara、D-GalU および D-Gal が **5** のようにつながることが判明した。

化合物 **4** と **5** はいずれも酵母 *S. cerevisiae* の変異株に対して 50 $\mu\text{g}/\text{disk}$ で活性を示した。



以上、本研究では、日本近海で採集された海綿を中心とする海産無脊椎動物について *S. cerevisiae* の変異株を含むバクテリアとカビに対する抗菌活性を調べたところ、多くの海綿に活性を認めるとともに、活性のあった有望な3種の海綿からアセチレンカルボン酸、珍しい DHMDA 残基を含む7残基の抗菌性デプシペプチド、および前例のない炭素骨格を持つ2つのステロイド配糖体を単離することができた。