

## 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

藤田雅紀

伏谷伸宏 教授

### Studies on Protease Inhibitors from Marine Invertebrates (海洋無脊椎動物からのプロテアーゼ阻害物質に関する研究)

浸潤・転移はがんの主要な特徴であり、その過程において細胞間基質 (ECM) および血管基底膜の分解が必須である。多くのがん細胞で matrix metalloproteinase 2 (MMP2)、cathepsin B、および plasminogen activator などの ECM 分解プロテアーゼの増加が認められている。特に、MMP2 は ECM の主要成分である IV 型 collagene を分解するため、がんの浸潤・転移において重要な働きをしていると考えられる。また MMP2 の活性化因子として単離された膜型メタロプロテアーゼ MT1-MMP も多くの転移性がん細胞で発現亢進が確認されている。これらプロテアーゼに対する阻害剤は有効な抗転移剤となることが期待され、現在その研究が活発に行われている。

このような背景の下、海綿を主体とする海洋無脊椎動物を対象に cathepsin B、MMP2 および MT1-MMP の阻害活性を調べるとともに、有望な活性が認められた 4 種の実験動物から活性物質の単離・構造決定を試みたところ、9 つの活性物質を得ることができた。その概要は以下の通りである。

#### 1. スクリーニング

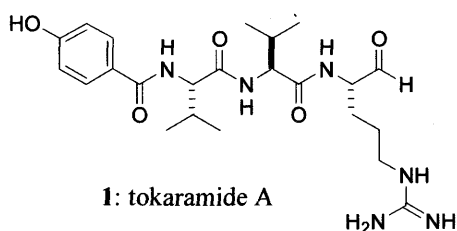
日本沿岸各地で採集した海洋無脊椎動物 1304 検体 (海綿動物 1038 検体, 腔腸動物 163 検体, 軟体動物 6 検体, 外腔動物 20 検体, 脊索動物 77 検体) から常法に従って調製した脂溶性画分および水溶性画分について、上記 3 酵素に対する阻害活性を調べた。その結果、各酵素に対して脂溶性画分では約 8%、また水溶性画分では約 6% に顕著な活性が認められた。分類別に見ると、cathepsin B に対しては海綿 151、腔腸 2、脊索 23 検体が活性を示し、MT1-MMP と MMP2 に対しては、それぞれ海綿 170 および 166、腔腸ともに 8、外腔 0 およ

び 1、脊索 6 および 11 検体が活性を示した。活性検体のうち特に選択性に優れ、活性の強かった海綿 4 種について、活性本体の解明を試みた。

## 2. Cathepsin B 阻害物質 tokaramide A の単離と構造決定

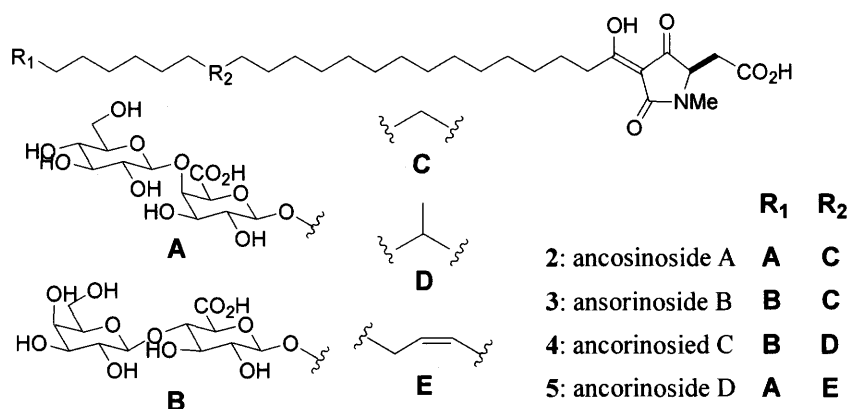
水溶性画分に顕著な cathepsin B 阻害活性が認められたトカラ列島中之島産海綿 *Theonella aff. mirabilis* の凍結試料 3.1 kg を、MeOH、CHCl<sub>3</sub> で抽出後、活性を指標に溶媒分画、ODS フラッシュクロマトグラフィー、および逆相 HPLC で分画した。最終的に 250 mM NaClO<sub>4</sub> を添加した溶媒を用いる逆相 HPLC により精製して tokaramide A (**1**) 1.2 mg を得た。

<sup>1</sup>H NMR データより、tokaramide A は N-末端がブロックされたトリペプチドであると推測された。また、詳細な 2D NMR の解析から *p*-hydroxybenzoate、2 残基の valine および argininal (Argal) 残基の存在が確認され、その配列は HMBC の相関から **1** のように決定した。各残基の絶対立体化学は NaClO<sub>2</sub> 酸化により Argal を Arg へ変換後、酸加水分解し Marfey 法により **1** のように決定した。本化合物は cathepsin B を IC<sub>50</sub> 値 29 ng/mL で阻害した。



## 3. MT1-MMP 阻害物質 ancorinoside B-D の単離と構造決定

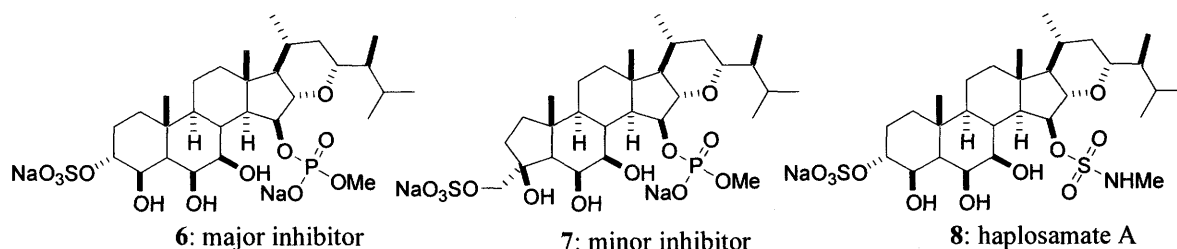
MT1-MMP に対して特異的な阻害活性を示した鹿児島県請島産海綿 *Penares sollasi* Thiele の凍結試料 400g の抽出物を、溶媒分画および ODS フラッシュクロマトグラフィーで分画した。最も強い活性を示した 100%MeOH 溶出画分を濃縮中に沈殿が生じた。この沈殿に強い活性が認められたので、これをさらに逆相 HPLC にて精製し、3 つの新規物質を含む 4 つの MT1-MMP 阻害物質 ancorinoside A-D (**2-5**) を単離した。



主要な化合物 **3** は各種機器分析の結果、ガラクトース、グルクロン酸、アルキル長鎖およびテトラミン酸を有することが明らかとなった。さらに 2D NMR の解析から、アルキル鎖の一端に 2 糖が、もう一方にテトラミン酸が結合した構造が導かれた。糖部分の立体化学は、酸加水分解物のキラル GC 分析からいずれも D 体と決定した。一方、テトラミン酸部分の立体化学は、 $\text{RuCl}_3/\text{NaIO}_4$  酸化後、加水分解により *N*-MeAsp へと導き Marfey 法により 5*R* と決定した。化合物 **4** および **5** も同様に、アルキル鎖と糖部分が異なる類縁体と決定した。Acorinoside A-D (**2-5**) は MT1-MMP を  $\text{IC}_{50}$  値 180-500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で阻害した。なお、**4** は P388 細胞に対して  $\text{IC}_{50}$  値 90  $\text{ng}/\text{mL}$  の細胞毒性を示した。

#### 4. *Cribrochalina* 属海綿由来 MT1-MMP 阻害物質の単離と構造決定、および haplosamate A の構造訂正

脂溶性画分に MT1-MMP 阻害活性が認められた、高知県二並島産海綿 *Chribrochalina* sp. の凍結試料 390g の抽出物を、溶媒分画、ゲルろ過、逆相液体クロマトグラフィーで順次精製したところ、2 つの阻害物質 **6** と **7** を単離できた。



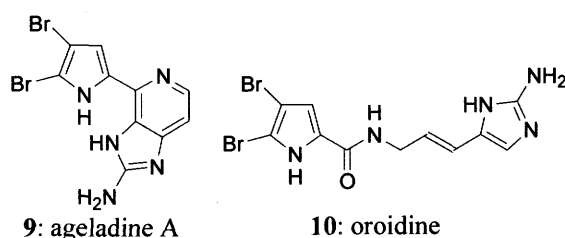
化合物 **6** の FABMS および NMR データは、HIV-1 integrase 阻害剤として報告された haplosamate A (**8**) と完全に一致したが、報告されたデータにいくつかの疑問点を認めたので、構造解析を行った。Haplosamate A に含まれる methylsulfamate 基の特徴的な  $\delta_{\text{H}}$  3.61 (d,  $J = 10.4$  Hz, 3H) のシグナルは、methylphosphate のシグナルと推測されたので、 $^{31}\text{P}$  NMR を測定したところ、1 つのリン原子の存在が確認されたとともに、 $^{31}\text{P}$  HMBC 測定から  $\delta_{\text{H}}$  3.61 のプロトンシグナルと相関が認められた。すなわち、化合物 **8** は **6** の構造へ訂正された。また、化合物 **7** は 2D NMR の解析から A-nor ステロールと決定した。なお、化合物 **6** および **7** は MT1-MMP を  $\text{IC}_{50}$  値 150-180  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で阻害した。

#### 5. MMP2 阻害剤 ageladine A の単離と構造決定

鹿児島県口永良部島産海綿 *Agelas nakamurai* Hoshino の有機層に顕著な MMP2 阻害活性が認められたので、活性本体の解明を試みた。海綿 400 g の抽出液を、溶媒分画、ODS フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過で順次分画したところ、青色蛍光を示す画分に活性

が認められた。最終的に逆相 HPLC で精製して ageladine A (9) を活性本体として単離した。

Ageladine A (9) は FABMS および 1D NMR データより、dibromopyrrole 誘導体であると判明した。しかし、HR-FABMS から推定した分子式は、炭素数および酸素原子の有無などの点でこれまでに報告されている oroidine 誘導体とは異なり、新規骨格の存在が推測された。本化合物は 3 つの  $^1\text{H}$  NMR シグナルを与えるだけで、構造決定は困難であった。そこで、9 についてメチル化反応を行ったところ、メチル基が 3-5 個導入されたメチル誘導体を与えた。これらメチル誘導体の各種 2D NMR の解析から化合物 9 は、oroidine (10) が環化した特異な構造を有するアルカロイドであると決定できた。



Ageladine (10) は MMP2 に対して  $\text{IC}_{50}$  値  $2.0 \mu\text{g/mL}$  で阻害活性を示した。多くの MMP 阻害物質は亜鉛結合部位を有するので、本化合物の亜鉛配位活性を  $\text{ZnCl}_2$  を用いて試験したが、活性は認められなかった。また阻害様式を調べたところ、非競合阻害であることが示唆された。

以上本研究では、がん転移阻害剤もしくはそのリード化合物開発を目的として、海洋無脊椎動物 1304 検体から調製した水溶性および脂溶性抽出物について、cathepsin B、MT1-MMP、MMP2 に対する阻害活性を調べた。その結果、多くの検体に活性が認められ、これらのうち有望な活性を示した 4 種の海綿から合計 9 種の活性物質を単離した。そのうち 8 種は新規化合物であった。得られた化合物の中には強い活性を示すものもあり、海綿はこれら酵素阻害剤の有望な探索源と思われる。