

論文の内容の要旨

水 圏 生 物 科 学 専 攻
平成17年度博士課程 入学 (進学)
氏 名 村山 周平
指導教員名 松永 茂樹

論文題目 Studies on inhibitors of enzymes involved in tumor metastasis
from marine invertebrates
(海洋無脊椎動物からのがん転移関連酵素阻害物質に関する研究)

海洋無脊椎動物からは陸上生物には見られない新しい骨格や、興味深い生理活性を持つ低分子化合物が多数発見されており、海洋無脊椎動物は医薬品のリード化合物の探索源として高いポテンシャルを有している。一方、腫瘍の悪性化には腫瘍細胞の転移や、腫瘍細胞へ栄養を運ぶための血管新生などさまざまな機構が関わることが知られている。それらの過程においては腫瘍の原発部位周辺に存在し、物理的な障害となっている細胞外基質を破壊することが必要である。細胞外基質の破壊には MMP2 などさまざまな酵素が関わることが知られているが、特にカテプシン B は直接細胞外基質を分解するだけでなく、他の分解に関係する酵素の活性化にも関わるなど重要な役割を果たしている。そのためカテプシン B の阻害物質は有用な抗がん剤のリード化合物となりうると期待される。

そこで本研究では、新しい抗がん剤リード化合物の探索を目的として、がん転移に関連する酵素としてカテプシン B を選択しその酵素阻害活性をスクリーニングした。このスクリーニングで浮かび上がった4種の海綿から活性物質の単離、構造決定を行ったので、概要を以下に述べる。

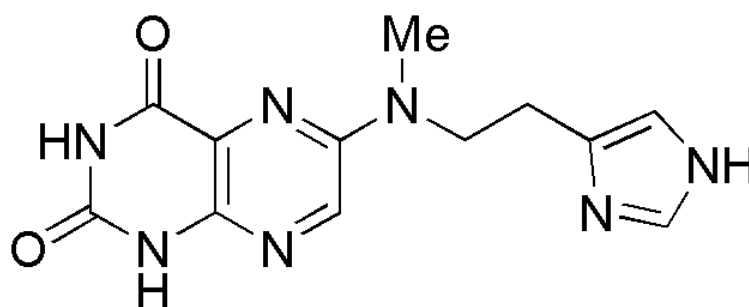
1. スクリーニング

日本沿岸で採取した 303 検体の無脊椎動物の粗抽出液（脂溶性画分、水溶性画分）について、カテプシン B に対する阻害活性のスクリーニングを行った。海綿動物と原索動物に活性を示すサンプルが高頻度で認められた。

2. *Asteropus simplex* からの新規プテリン誘導体 *asteropterin* の単離と構造決定

スクリーニングにおいて強い活性を示した東京都根島産海綿 *Asteropus simplex* から活性成分の単離を試みた。海綿を各種溶媒で抽出し液液分配、ODS フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過で分画した後に、逆相の HPLC で精製し、新規化合物 *asteropterin* (**1**)を得た。

Asteropterin の構造は各種スペクトル解析によって決定した。まず、高分解能 ESIMS により分子式は $C_{12}H_{13}N_7O_2$ であることがわかった。 1H 、 ^{13}C NMR に加え COSY、HMBC、HSQC などの通常の二次元 NMR データの解析によって部分構造として N-メチルヒスタミンとピロミジン-2,4-ジオンが得られたが、部分構造間の結合様式を決定することができなかった。そこで、 ^{15}N -HMBC を測定することで窒素とその近傍にある水素との関係を調べた結果、*asteropterin* は N-メチルヒスタミンとルマジンが結合する化合物であることがわかった。*Asteropterin* はカテプシン B に対して IC_{50} 値 $1.4 \mu g/mL$ で活性を示した。構造活性相関を調べるために *asteropterin* の部分構造であるルマジン、ヒスタミン、ルマジンの類縁体であるキサントプテリン、イソキサントプテリンさらにルマジンとヒスタミンの混合物についても活性試験を行ったが $50 \mu g/mL$ の濃度において阻害活性を示すものはなかった。したがって、ルマジンとヒスタミンが連結した構造が活性発現に必要であることがわかった。



asteropterin (**1**)

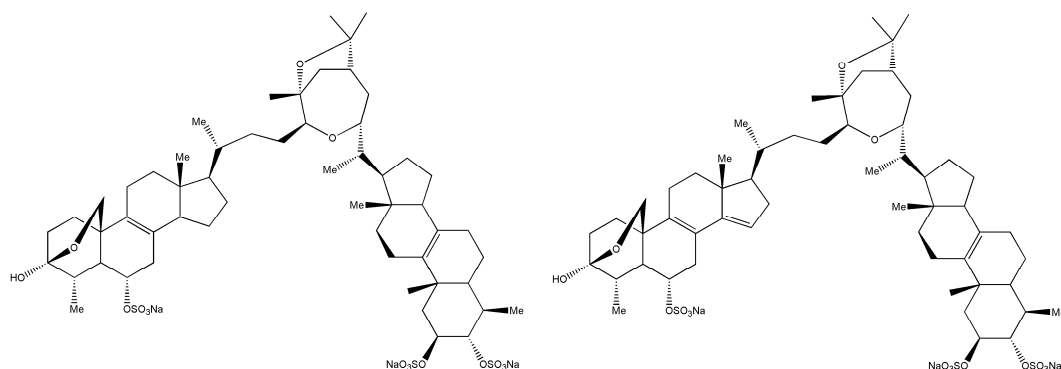
3. *Crella (Yvesia) spinulata* からの新規ステロール二量体 *shishicrellastatin* 類の単離と構造決定

スクリーニングにおいて活性を示した鹿児島県獅子島産海綿 *Crella (Yvesia)*

spinulata から活性成分の単離を試みた。海綿をメタノールで抽出し液液分配、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。活性成分は無機塩を添加しない条件の逆相 HPLC ではよい分離を示さなかったが、過塩素酸ナトリウムを含む溶媒系で分析したところ、塩濃度の上昇に伴って、分離能が向上するという結果が得られた。そこで 1.5 M と高濃度の過塩素酸ナトリウムを添加して HPLC を行い、活性成分として shishicrellastatin A (2) および B (3) と名づけた 2 つの新規ステロール二量体を得た。

Shishicrellastatin 類の構造決定はスペクトル解析によって行った。まず、分子式は高分解能 ESIMS から $C_{56}H_{83}Na_3O_{16}S_3$ と決定した。各種二次元 NMR スペクトルデータから平面構造を決定したところ、この化合物はバヌアツ産の同属海綿より単離された crellastatin 類と類似の骨格を持つ化合物であることがわかった。しかし crellastatin 類に特徴的な 3 α -hydroxy-3,19-ether 構造の数、硫酸エステルの数など、ステロールの修飾様式が異なる新規化合物であった。相対配置は ROESY データより導いた。Shishicrellastatin B は高分解能 ESIMS から shishicrellastatin A より水素原子が 2 個少ないため、脱水素により二重結合が 1 つ増えた化合物と予想した。各種 NMR スペクトルを解析した結果、shishicrellastatin A の 15 位、16 位の間新たに二重結合が導入されていることがわかった。Shishicrellastatin A、および B はカテプシン B に対してそれぞれ IC₅₀ 値 7.0 μ g/mL、7.8 μ g/mL を示した。

海洋生物由来のステロールの二量体としては、ritterazine 類や cephalostatin 類など A 環同士で結合される化合物が発見されており、合成の研究も進んでいる。しかしステロールの側鎖同士で結合した化合物は crellastatin 類しか見つかっていない。Crellastatin 類はステロールの 4 位にそれぞれ 2 つのメチル基が結合しているが、shishicrellastatin 類ではそれぞれ 1 つのメチル基しか結合していない。また、shishicrellastatin 類の 2 つのステロールモノマー間で 4 位メチル基の配向が逆転していることも興味深い。



Shishicrellastatin A (2)

shishicrellastatin B (3)

4. 未同定種海綿からの重金属含有活性成分の単離

スクリーニングにおいて強い活性を示した鹿児島県獅子島産未同定種海綿から活性成分の単離を試みた。海綿をメタノールで抽出し液液分配、ODS フラッシュクロマトグラフィー、ゲルろ過で分画し、さらに活性画分を逆相 HPLC によって精製した。

得られた画分の ^1H NMR スペクトルはブロードなシグナルを与え、 ^{13}C NMR スペクトルではシグナルが検出されなかった。さらに、HPLC での挙動などから、活性成分が無機物であることが疑われたため、元素分析を依頼した。元素分析の結果、炭素は全体の 26%程度含まれていることが判明したが、窒素、炭素、水素の量が全体の 50%程度と少なく、金属イオンが含まれているものと推察された。そこで、金属イオンの定性分析を依頼したところ、マグネシウム、ナトリウム、ニッケルを高濃度で含んでいることがわかった。現在、化合物の構造を決定するために、結晶化を試みている。

5. 未同定種海綿からの cathepsin B 阻害物質の単離

スクリーニングにおいて強い活性を示した、鹿児島県大島新曾根産未同定種海綿から活性成分の単離を試みた。海綿をメタノールで抽出し液液分配、ODS フラッシュクロマトグラフィー、シリカゲルクロマトグラフィーで分画した。HPLC で分析し、活性の分布の広がり方などから硫酸エステル存在を予想した。そこで、shishicrellastatin 類を単離した際に有効であった高濃度の過塩素酸ナトリウムを添加した溶媒系を用いる HPLC で、1つの化合物を精製した。

化合物の構造は各種スペクトル解析を用いて検討している。この化合物の ^1H NMR スペクトルでは、過去に当研究室において α グリコシダーゼ阻害剤として海綿から見出された schulzeine 類に特有の 2本の 6 ppm 付近のシグナルが得られたため、類似の構造を持つ化合物であると推測された。しかし、200 ppm 付近にケトン基由来のシグナルが見られるなど、既知の schulzein 類とは異なっていた。現在、全構造の解析および類縁化合物の探索を行っている。