

論文内容の要旨

Biological Function of Norzoanthamine and Elucidation of the Producing Organisms

ノルゾアンタミンの生物機能と生産生物の解明

源治 尚久

生物活性を有する海洋動物由来天然物の多くがその保有動物の生体防御に何らかの形で関与しているとされ、同時にこれらの多くがその保有動物ではなく微生物によって産生されていると考えられている。よってこれら海洋動物と海洋天然物産生微生物の間にはこうした天然物を介した共生関係が存在すると推察できる。しかし多くの場合にこれらは推察の域を出ず、単離・構造決定された海洋天然物の数と比較して、それらの生態系での機能、海洋動物内の産生生物、生合成機構などが実験的な裏付けを伴い解明された例は稀である。

奄美大島産スナギンチャク *Zoanthus* sp. (Fig. 1) から単離された海産アルカロイド、ノルゾアンタミン (**1**) もこれを保有する動物における意義が不明確な海洋天然物の一つである。これまでに**1**の生物活性としてインターロイキン6産生阻害や閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨重量・骨強度減少抑制が報告されている。しかしながら骨を持たない刺胞動物であるスナギンチャクにこれらの活性が有用であるとは考えにくい。よって**1**にはスナギンチャク内において別の生物機能があると筆者は考えた。スナギンチャクは**1**をその湿重量に対して0.19% (= 約 4 mmol/kg) と、コレステロールに匹敵する量を含有している。また近年発見された多くの海洋天然物と異なり**1**には毒性が認められないため、通常想定されるような摂食阻害などの生体防御には関与していないと考えられる。さらにその構造から界面活性剤や色素として機能することは考え難い。これらの背景から**1**のスナギンチャク *Zoanthus* sp. における生物機能の解明に取り組んだ。

天然物の生物機能とはその天然物保有生物にとっての役割を指し、その化合物としての性質と適切な生体内分布によって初めて発揮される。つまり**1**に関してこれらの解明が生物機能解明への必要条件となる。

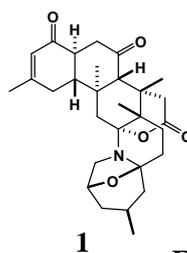


Fig. 1. スナギンチャク *Zoanthus* sp.

1. スナギンチャク *Zoanthus* sp.内におけるノルゾアントミンの分布

一般に海洋天然物の保有生物内分布が調べられた例は少ない。これは天然物を抽出した時点で位置情報が失われることに起因する。これまでに報告されている海洋天然物の保有動物内分布の調査例の多くは保有動物を組織毎に切り分け、各組織抽出液中の対象天然物含有量を定量する方法や組織片の抗体染色などである。しかし2-3 mm の個体が群体として造礁サンゴ上に張り付いて生息しているスナギンチャク *Zoanthus* sp. の解剖による組織片取得は特殊技術を要する。また抗体染色を行う場合、塩基性化合物**1**の中性水溶液への拡散、抗体作製の手間や低分子化合物認識の特異性の低さが問題になる。そこで凍結乾燥したスナギンチャクを用い、 α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸をレーザー光吸収媒体であるマトリックスに用いた MALDI MS により**1**が容易に検出できることを利用し、その切片から直接**1**の分子イオンピークを半定量的に観測した。その結果**1**またはゾアントミンの分子イオンピークを切片上から直接観測することができた (Fig. 2A-C)。また垂直方向に切断したスナギンチャク切片を同様に測定し、その写真と重ね合わせたところ表皮周辺組織に**1**の分子イオンピークが多く観測された (Fig. 3A-E)。一般に分子イオンピーク強度はイオン化効率に影響され、本実験の場合是不均一系である生物切片上ではレーザー照射位置によりそれが変化すると考えられるため、分子イオンピーク強度と存在量には厳密な相関があるわけではない。そこで各切片中の**1**含有量を別途抽出液のHPLCクロマトグラム上でのUV吸収強度で定量したところ、表皮周辺組織の割合が多い切片により多くの**1**が含まれていた (Fig. 3F)。これらの結果より**1**はスナギンチャク内で表皮周辺組織に局在していることが示された。また目的天然物のイオン化効率に左右される可能性はあるものの、切片の MALDI MS 測定による天然物の同時多成分 *in situ* 分析が可能であることが示された。

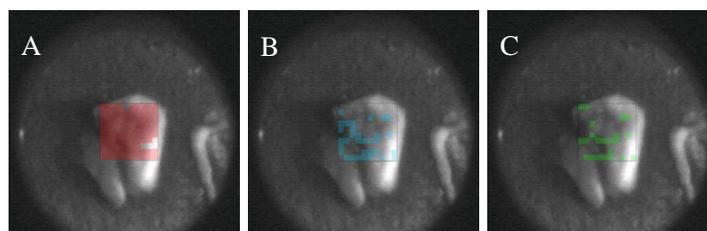


Fig. 2. スナギンチャク *Zoanthus* sp.切片上での分子イオンピーク観測箇所 (A)分子イオンピーク (B)**1**の分子イオンピーク(C) ゾアントミンの分子イオンピーク

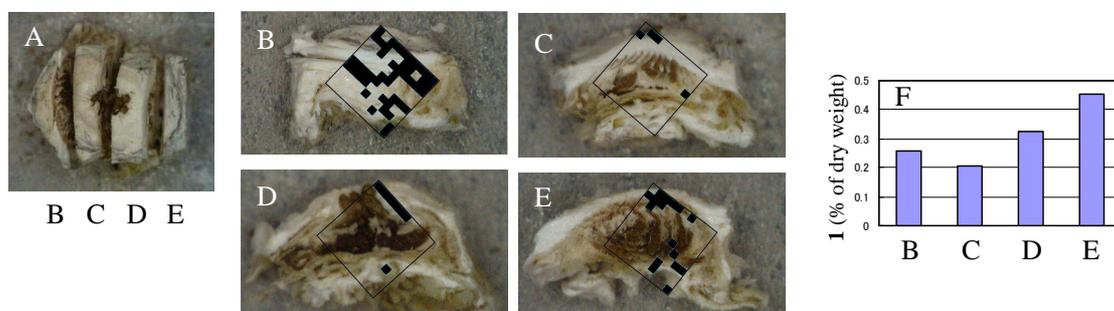


Fig. 3. スナギンチャク *Zoanthus* sp.切片上でのノルゾアントミンの分子イオンピークの分布と切片抽出液中におけるノルゾアントミンの相対量 (レーザー照射範囲を一辺 1 mm の正方形で囲み、分子イオンピークが観測された箇所を黒色表示した)

2. ノルゾアンタミンの性質

1はスナギンチャク内で4 mM 以上の高濃度で存在し中性水溶液に対する溶解性はこれ程高くないことから、同様に生体内の高濃度で存在する成分である脂質二重膜やタンパク質などと親和性があると考えた。これらを確認するために生体膜モデルとしてDPPCリポソーム、およびタンパク質として生体内に大量に存在する水溶性タンパク質の代表例の一つであるアルブミンと**1**の親和性を飽和移動差¹H-NMRの手法を用いてそれぞれから**1**への飽和移動を観測したところ、リポソームからの飽和移動は観測されず、アルブミンからは観測された (Fig. 4)。さらに**1**は性質の異なる数種類のペプチド全てのUV (Fig. 5) またはCD吸収を変化させること、単純なペプチド鎖であるGly-Gly-Gly-OHの¹H-NMRスペクトルを変化させることから、その性質としてペプチド鎖と親和性があることが示された。

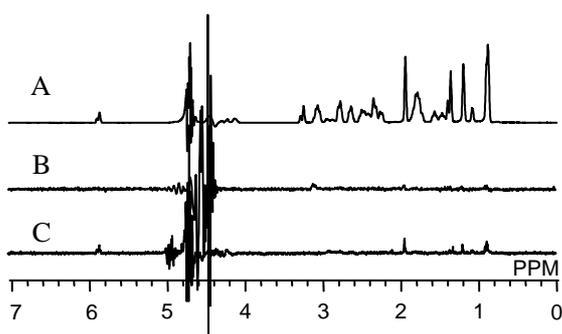


Fig. 4. (A) **1** の¹H-NMR スペクトル (B) DPPC リポソーム添加時の**1**の飽和移動差 NMR スペクトル (C) アルブミン添加時の**1**の飽和移動差 NMR スペクトル

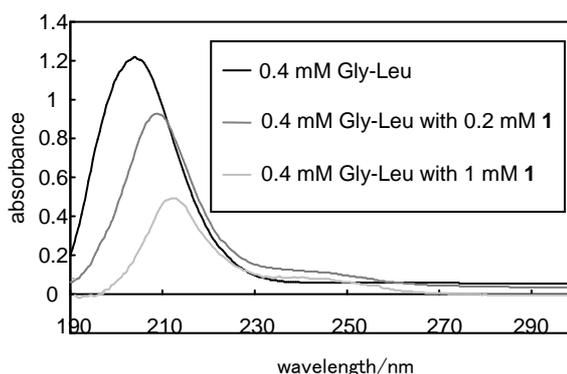


Fig. 5. **1** 存在下での Gly-Leu-OH の UV スペクトル

3. ノルゾアンタミンのスナギンチャクでの生物機能

表皮周辺組織に局在していることとペプチド鎖と親和性があるという化合物としての性質より、**1**はスナギンチャク内で表皮周辺組織構成タンパク質に吸着していると考えられる。よってそのスナギンチャク内での役割として外的刺激からの保護組織である表皮の機能を強化していると考えた。そこで体組織構成主要タンパク質であるコラーゲンに**1**存在下で紫外線照射したところ、その分解が抑制された (Fig. 6A)。この効果は同様の吸光団を持つメシチルオキシド (**2**) を添加しても観測されなかった (Fig. 6B) ことから紫外線吸収または消光によるものではない。生体内分布と合わせて考察すると、スナギンチャク内では表皮周辺組織構成タンパク質の分解を抑制することで体内外要因からスナギンチャクを保護する機能があると推察できる。

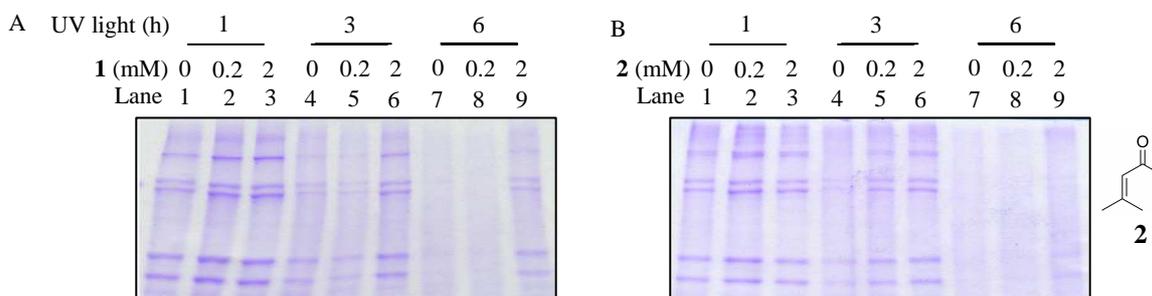


Fig. 6. 紫外線照射後の SDS-PAGE 図 (A) **1** 添加緩衝液 (B) **2** 添加緩衝液

4. スナギンチャク *Zoanthus* sp. からのゾアントアミン類産生菌の単離

底棲無脊椎動物由来生理活性天然物の生産は多くの場合共生微生物に由来すると推察されておりポリケチド由来と推定される**1**でも同様に考えられているが、これまでに直接的に証明された例は少なく、海洋天然物全体で数例報告されているのみである。**1**の生物内分布・生物機能を示すことができたことから、さらにスナギンチャクと**1**の関係を体系的に理解することを目的にスナギンチャク共生微生物を探索した。スナギンチャク表面を70%エタノールで殺菌した後に体表を切開し緩衝液に浸漬した。この緩衝液を一定量寒天培地に塗布し30°Cにて培養したところ、*Aspergillus fumigatus*と同定されたカビが非常に高い頻度で観測された。形成されたコロニー数から概算するとスナギンチャク湿重量1 gあたり少なくとも 29,000 cells含有している。この数字はこのカビがスナギンチャクと共生関係にあることを強く示唆している。これを単離、液体培地で培養後、菌体抽出液をLC-MSにて分析したところ、**1**と同じ保持時間に同じ分子量に相当する分子イオンピークが観測され (Fig. 7)、これを前駆イオンとして ESI MS/MS 分析したところ解裂様式を含めて**1**と一致した (Fig. 8)。またこのカビの他に4種類の微生物コロニーが単離できたが、これらに関しては再現性がなく、その培養抽出物中に**1**と同じ分子イオンピークを与える化合物を確認することはできなかった。また[1-¹³C] 標識酢酸ナトリウム添加培地で培養したカビの抽出液中に含まれる**1**のMSスペクトルでは、その同位体分子イオンピーク である m/z 482 + 1と482 + 2 の強度の割合がそれぞれ35%から42%、7%から15%へ増加した。[1-¹³C] 標識酢酸が**1**に取り込まれたことは、これが確かに培養により生産されていることを示す。この結果より**1**がスナギンチャクの共生菌によって産生されていることを直接的に示すことができた。

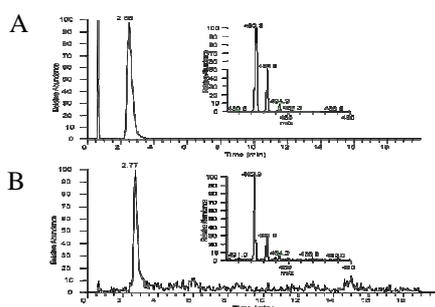


Fig. 7. LC-MS クロマトグラム (A) **1** (B) 菌抽出液

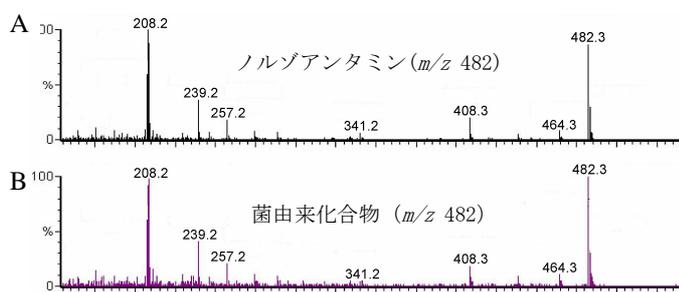


Fig. 8. MS/MS スペクトル (A) **1** (B) 菌抽出液

結論

海洋天然物として初めてMALDI MSを用いたその保有動物内分布図作成が可能であることを示した。その結果**1**はスナギンチャク内で表皮周辺組織に局在していることを示した。また**1**はペプチド鎖に親和性を有することをCD、NMRなどにより明らかにした。さらに**1**共存下ではペプチド鎖が化学的に安定化することを示し、保有動物内分布と合わせ、**1**の生物機能はスナギンチャクの表皮周辺組織構成タンパク質の安定化、およびそれを分解する体内外要因からの保護と考察した。またスナギンチャク共生菌を単離しこれによる**1**の生産を、培養抽出液の各種MS測定と[1-¹³C] 標識酢酸ナトリウム取り込み実験により確認した。この結果は保有動物と産生微生物の海洋天然物を經由した関係を直接的に示すことができた数少ない例の一つである。スナギンチャクと菌の間に、スナギンチャクは菌に住処を供給し菌はスナギンチャクにとって有用である**1**を提供する、という海洋天然物を介した共生関係成立の可能性を実験的に示すことができたと考えている。