みどりいし，(8)：1-3，(1997)

阿嘉島近海の海綿から採取された新規生理活性物質アカテルピン

梅澤　一夫
慶応義塾大学理工学部

Akaterpin, a nobel bioactive triterpene from a marine sponge *Callyspongia* sp. collected in Akajima Island

K. Umezawa

１.はじめに

AMSL に初めて滞在したのは平成７年８月である。数年前から東京水産大学の大森教授に素晴らしい臨海研究所があると伺っていた。滞在にあたって自分の研究に結びつく何をしようかと考えた。私は土壌の放線菌から細胞のシグナル伝達を修飾する低分子化合物を探索している。細胞のシグナル伝達を自由に調節すれば、がんその他の疾患をコントロールできるはずである。そこで阿嘉島周辺の海底の土を採取して、放線菌を分離し、培養上清を調製して、生理活性物質のスクリーニングを行うことにした。

微生物化学研究所の岡見博士は永年にわたって海底の微生物を採取され、培養して生理活性物質のスクリーニングを行っている。海底の土を少量つかみとる器具（岡見式）も開発されている。これは海底につくとスプリングが働いて土をトラップするようにできている。そこでこれをお借りして、阿嘉島の海で使ってみたけれど、下はサンゴ礁のため固くて何もとれない。すぐにあきらめてしまった。

その後、AMSL にもどって雑談の間に、保坂理事長から、海綿を使ってみるように勧められた。海綿からは国内外でたくさんの有機化合物が単離され、報告されているが、特異的な生物活性を指標にしたスクリーニングに用いるのは珍しい。新しさがあるし、意外にヒットするかもしれない、構造も新規が多いかもしれない、そこで海綿抽出物をスクリーニングの対象にすることにした。

２.二次代謝産物

生物が産生し、生命維持に必要な化合物は一次代謝産物（あまり使わない言葉であるが）である。解糖系やクエン酸回路の物質がこれに入る。一方、産生する生物にとってあってもなくてもよい低分子化合物は二次代謝産物と呼ばれる。植物に含まれるアルカロイドやテルペンが代表的である。最初に発見された抗生物質ペニシリンはカビが生産し、結核に使われるストレプトマイシンは土壌放線菌が生産する、いずれも微生物二次代謝産物である。私達は最近、緑濃菌からホスファチジルイノシトールを加水分解するホスホリパーゼＣ γを阻害する新規物質フォリペプチンを単離した（Tetrahedron Lett. 36, 7479-7480, 1995）。キノコからは新しい βグルコシターゼ阻害剤サイクロフェリトールを単離したことがある（J. Antibiot. 49, 49-53, 1990）。このように、カビ、放線菌、細菌、キノコなど微生物はたくさんの二次代謝産物をつくり、その構造は多彩で、生理活性物質の宝庫となっている。海綿がつくる二次代謝産物は、おそらく寄生する微生物によるものと考えられている。

ホイタッカーは地球上の生物を５グループに分けた。それを受けてマルグリスとシュヴァルツは五つの王国（Five Kingdoms）という本を書いた（日経サイエンス社, 1987）。五つの王国とはそれぞれ、動物界、植物界、菌界、原生生物界、原核生物界である（図１）。それまでは大きく動物と植物に分け、菌や原核生物は植物に入れられていた。ホイタッカーは動物性、植物性プランクトンで構成される原生生物界を独立させた。海綿は動物界の下等なところに入る。

海綿のつくる産物は微生物によるとすると、二次代謝産物をつくるのは５界の中の植物、菌、原核生物に含まれる生物ということになる。原生生物が二

次代謝産物をつくっているかどうか明らかでないが、進化の位置から、植物性のものはつくる生物があるのではないか。こうしてみると、以前の分け方で、“植物”の中で広く生産されているのは興味深い。

３.細胞内シグナル伝達と阻害物質

今やシグナル伝達大はやりで、猫も杓子もシグナル伝達研究に没頭している。signal transduction は電気工学でよく使われる言葉であるが、細胞外からのホルモンや増殖因子による情報が細胞膜のレセプターを介し、細胞内でいくつかの分子を経て、細胞質や核へと伝えられていくのに使われている。

典型的なシグナル伝達因子として G 蛋白、サイクリック AMP、プロテインキナーゼ、SH2 や SH3 部位を含むシグナル蛋白、イノシトールリン脂質代謝回転の酵素などがある。それに加えて、最近、スフィンゴミエリナーゼ下流のシグナル伝達が注目されている。アポトーシスを誘導する TNF- α は初期にスフィンゴミエリナーゼを活性化し、セラミドを生成させる。セラミドはアポトーシス誘導作用がある。セラミドが更にセラミダーゼにより加水分解されるとスフィンゴシンが生成される。スフィンゴシンからもつくられると考えられるリン酸化スフィンゴシンは

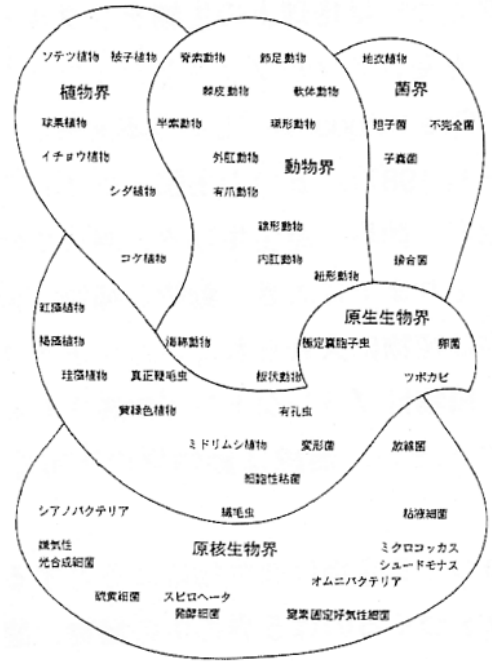

図 1. ホイタッカーの提唱した生物の 5 界

増殖活性化作用があると報告されている。イノシトールリン脂質代謝は膜成分のホスファチジルイノシトールから始まり、増殖等の調節に重要なよく知られた経路であるが、スフィンゴミエリンから始まる経路も増殖や細胞死の調節に重要であろう。

私達は今まで、新しい機構で働く抗がん剤の開発を目的として、がん遺伝子産物の活性を阻害する物質を天然から探索してきた。がん遺伝子産物の活性は殆どが、プロテインキナーゼや G 蛋白などのシグナル伝達因子としての活性である。更に、ホスホリパーゼ C、ホスファチジルイノシトール　４キナーゼやホスファチジルイノシトール合成酵素の阻害物質も放線菌から単離した。そして３年前から スフィンゴミエリナーゼ阻害物質のスクリーニングを始めた。

４.スフィンゴミエリナーゼ阻害物質の探索

スフィンゴミエリナーゼのアッセイ系として、ウシ脳の膜画分とサンプルを pH7.4 の緩衝液中で、37℃で５分間インキュベートした後、基質として蛍光標識されたスフィンゴミエリンを加え、更に 37℃で 30 分間インキュベートした。これにクロロホルム：メタノール＝２/１を加え、基質と生成物である蛍光セラミドを抽出した。乾固させた後、クロロホルムにて再溶解し、TLC にスポットし、クロロホルム：メタノール：12mM $MgCl_2$ =100/40/6 にて展開し、UV 照射にて基質と生成物のスポットを検出した。このアッセイ系を用いて放線菌、細菌サンプルについて阻害物質を検索した。その結果、1000 以上のサンプルから脂肪酸以外、何も得られなかった。

そこで阿嘉島近海で採取した数十の海綿の抽出物を調べたところ、そのうちのひとつに阻害活性がみられ、活性物質を単離、精製した。

５.アカテルピンの単離と構造決定

海綿からの一次抽出は、放線菌の菌体からの抽出法と同じ様にして、等量のアセトンを加えて行った。活性のあったサンプルの海綿（27.9g）はアセトンで抽出し、アセトンを減圧で除去した後、30ml のブタノールを加えて抽出し、ブタノール抽出物をシリカ

ゲルカラムにかけて、クロロホルム：メタノール（10:0～10:5）で溶出した。活性画分を集めて分取HPLCで精製し、35～50%アセトニトリルにより溶出して、12.0mgの純粋な阻害物質が得られた。

各種スペクトルにより構造決定したところ、図２に示すような二つのデカリン骨格を有するテルペン化合物であることがわかった。この物質は新規物質であったのでアカテルピンと命名した。構造決定は以下のように行った。マススペクトル、^{1}H及び^{13}CNMRの結果から分子量722、分子式が$C_{36}H_{52}O_8S_2Na_2$と決定された。^{1}H、^{13}CNMR及びHMBC、HMQC、COSYスペクトルにより平面構造を決定した。立体構造についてはNOESY及びNEO差スペクトルを用いて決定した。4位のメチルプロトン（0.86）と5位のメチルプロトンがcisの位置関係にあり、６位のプロトンの逆側についていることが示され、さらに、4’-CH_3（1.15）と6’-H（1.68）あるいは11’-H（2.40）間のNOEが観察されたことから、4’-CH_3と11’-Hは６’-Hと同じ側にあることがわかった。一方、1’の立体位置はNOESYを用いても決定できなかった。

アカテルピンは新しい骨格の天然物である。比較的近い構造のものに、やはり海洋性海綿由来のトキシユソール（Tetrahedron 49, 4275-4282, 1993）があるが、２つのデカリンの結合様式が全く異なる。生産する海綿の同定はお茶の水女子大学の渡辺洋子先生にお願いして*Callyspongia* sp.と決めていただいた。

６.アカテルピンの生物活性

アカテルピンのウシ脳由来中性スフィンゴミエリナーゼ阻害活性はIC_{50}値が約30 μg/mlであった。酸性スフィンゴミエリナーゼは100μg/mlで阻害しなかった。その他、シグナル伝達に関与するいくつかの酵素に対する阻害活性を調べたところ、ホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ CγをIC_{50}値0.5 μg/mlで阻害した。ホスファチデートホスファターゼ、チロシンホスファターゼ、プロテインキナーゼ C、チロシンキナーゼに対する阻害のIC_{50}値はそれぞれ、10、30、100、4.5μg/mlであった。

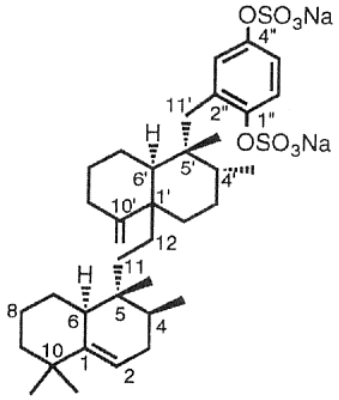

図 2. アカテルピン
(各デカリンユニットの相対配置を示す)

そこで、アカテルピンは、むしろホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼＣ γの特異的阻害剤といえる。

７.おわりに

1940年代にペニシリンが青カビから単離されて以来、土壌微生物からたくさんの抗生物質が単離され、使われている。1960年代からはプロテアーゼ阻害剤など抗菌活性を持たない酵素阻害物質が 探索されるようになり、現在も、日本の雑誌 Journal of Antibioticsにはいくつもの微生物由来、新規酵素阻害物質が紹介されている。私達はシグナル伝達阻害剤の探索源としてやはり土壌微生物を用いている。最近は既知化合物にあたることが多くなったので、熱帯植物の抽出物も取り入れた。海綿サンプルは生理活性物質の探索源として取り入れて、未だ日が浅いが、新規物質アカテルピンを単離することができた。それより前に、既知物質ヘテロネミンをやはり阿嘉島の海綿から Fps を発現するがん細胞の形態を正常化する物質として取り出した。海綿からのスクリーニングは採取に限界があって、生物活性のあるものを自由に追加することが難しい。それに海綿の生産する化合物は複雑で容易に合成できないことが多い。さらに海綿から新規物質を単離し、構造決定する優れた天然物有機化学の専門家が多い中で、新規物質を発見するのは容易ではない。それにもかかわらず新しい探索の指針を持って海綿からの生理活性物質を探すのはとても興味深い。