

沖縄産アオヒトデの神経突起伸長活性ステロイド配糖体

小鹿 一
名古屋大学大学院生命農学研究科

Neuritogenic steroid glycosides from the Okinawan blue starfish *Linckia laevigata*

M. Ojika

1. はじめに

高齢化社会の到来とともにアルツハイマー病などの神経変性疾患は増加の一途をたどり、治療薬の市場は拡大し続けている。現在、処方されている治療薬は病気の進行を遅らせる対症療法剤であり、根本的な治療の観点から満足できるものではない。しかし、「ニューロンの損傷」を修復できれば、より優れた治療につながる。たとえば神経成長因子（NGF）や幹細胞由来神経細胞の利用はその例であるが、これらの脳内への到達は極めて困難である。こうした背景から、実用的な「神経栄養因子の代替品」の探索が盛んに行われてきた。我々は、ニューロンモデルとしてラット由来の株化細胞PC12（図1）を用いて沖縄などで採集した海洋生物試料（約40種）のNGF様突起伸長作用をスクリーニングした結果、アオヒトデ *Linckia laevigata* の水溶性抽出物に高い神経突起伸長活性を見出した。そこで阿嘉島臨海研究所の協力のもと、アオヒトデを採集し（図2）、有効

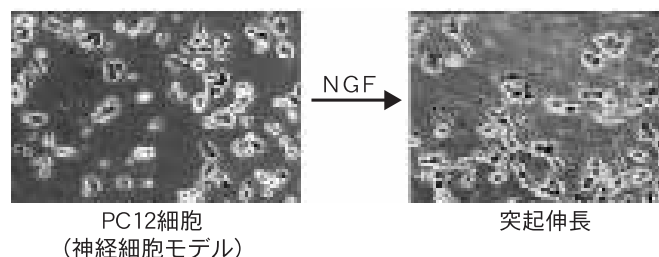


図1. 神経成長因子（NGF）による細胞分化



図2. 阿嘉島で採集したアオヒトデ

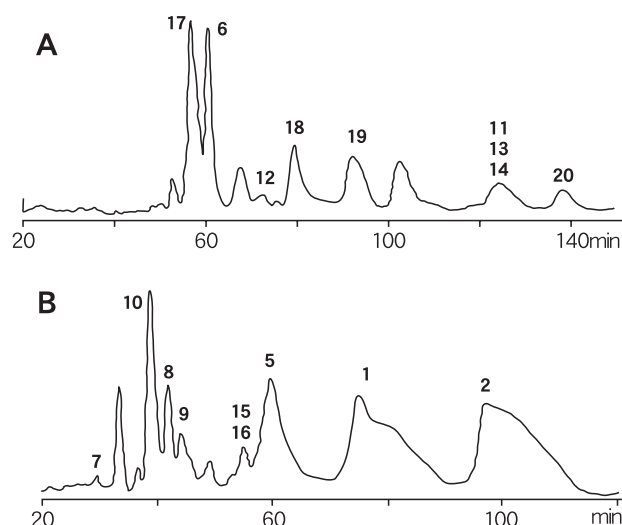
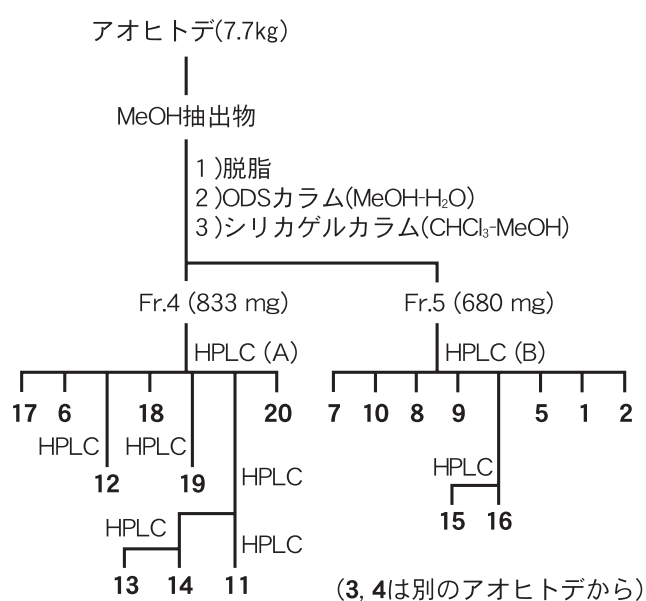


図3. ステロイド配糖体の精製（右のA, Bは最初のHPLCのチャート）

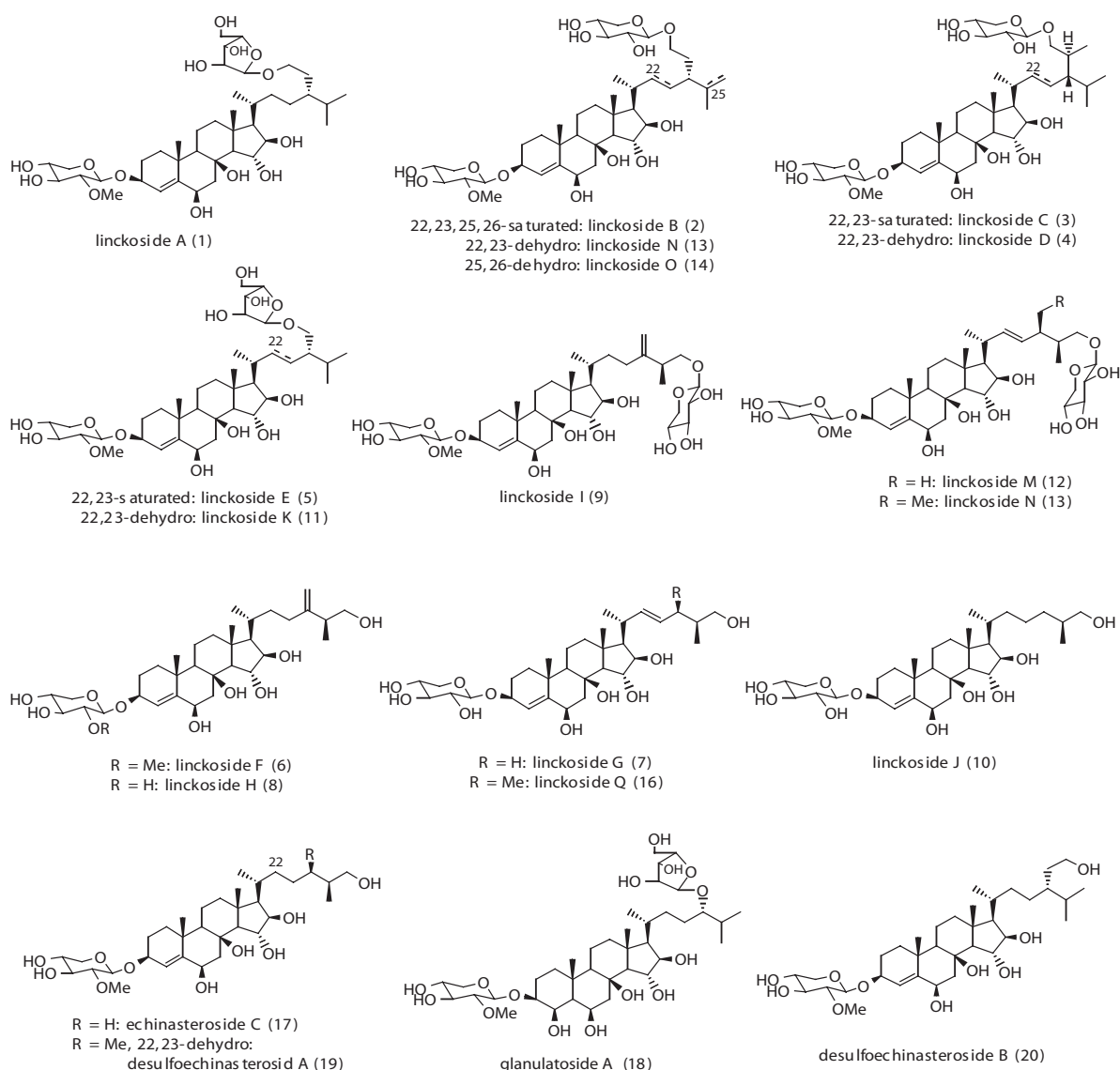


図4. アオヒトデから得られたステロイド配糖体群

成分の精製を開始した。以下、精製の過程、得られた化合物群の多様で新規な構造、それらの神経突起伸長作用について紹介する。

2. 分離

図3に成分の精製スキームを示した (Qi et al. 2002, Qi et al. 2004, Han et al. 2006a, b)。シリカゲルカラム後の活性画分Fr.4, Fr.5は無数の似た性質のステロイド配糖体から成っており、精製は困難を極めたが、最終的に20種の物質を単離することができた。このうち実に8割に相当する16種が新規であったので、

これらを学名にちなんで「linckoside」と命名した。精製しきれなかった成分も含めるとアオヒトデは100種以上の類縁物質を含むと思われる。ヒトデやナマコのような棘皮動物はサポニンの宝庫といわれるが、従来のサポニンと異なり毒性が低く、後述するように構造上も興味深い特徴を有していた。文献調査によると、アオヒトデからは1980年代中ごろに6種 (うち5種は当時既知) のステロイド配糖体の単離が報告されているのみであり、今回の研究で初めてアオヒトデステロイド配糖体の新規性、多様性が明らかになった。

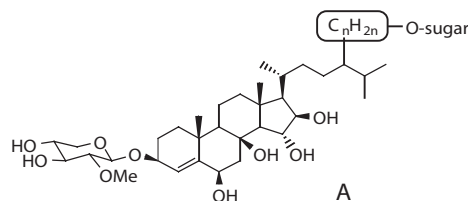


図5. Linckoside類の特徴的構造の1つ

3. 構造

得られた linckoside 類の構造は、NMR（核磁気共鳴装置）を中心とした機器分析と誘導反応により明らかにした（Qi et al. 2002, Qi et al. 2004, Han et al. 2006a, b）。既知物質を含め構造の一覧を図4に示した。これらは大まかに二糖タイプと単糖タイプに分類でき、前者は分子の両側に糖がひとつずつ結合する。また、糖は全て五炭糖である。最も特徴的な構造は、linckoside A（**1**）などのような「側鎖枝分れ炭素とステロイド核3位に糖」を持つ一般式A（図5）で、我々の linckoside 類の発見以前には1例しか報告されていなかった。さらに興味深いことに、構造Aを持つ化合物がより高い神経突起伸長作用を有していた（後述）。

4. 神経突起伸長活性

こうして得られたアオヒトデステロイド配糖体の神経突起伸長作用を、PC12細胞を用いて調べた（Qi et al. 2002, Qi et al. 2004, Han et al. 2006a, b）。24穴マイクロプレートに20000/wellの細胞を播き、DMSOに溶かしたサンプルを加えて約6日間にわたり細胞を毎日観察した。神経突起伸長活性は、細胞径より長い突起を伸長した細胞が何%の割合を占めるかで表した。Linckoside A-E（**1-5**, 12.5–25 μ M）の活性の経時変化を図6のグラフに示した。サンプルが無い場合（control）は10%以下の突起伸長しか見られないが、linckoside類を投与すると徐々に突起伸長が見られ、6日間で60%を超えるものも見られた。この活性はNGF（10 ng/ml）と同等であるが、NGFの場合は急速な突起伸長が見られた。興味深いことに、側鎖上の五炭糖がキシロースである**2-4**の方がアラビノースである**1, 5**より約2倍高い突起伸長活性を

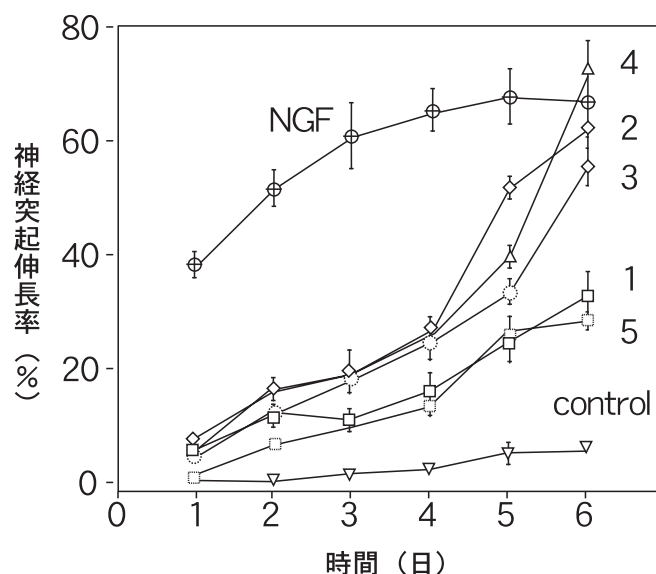


図6. Linckoside A-E（**1-5**）の突起伸長活性

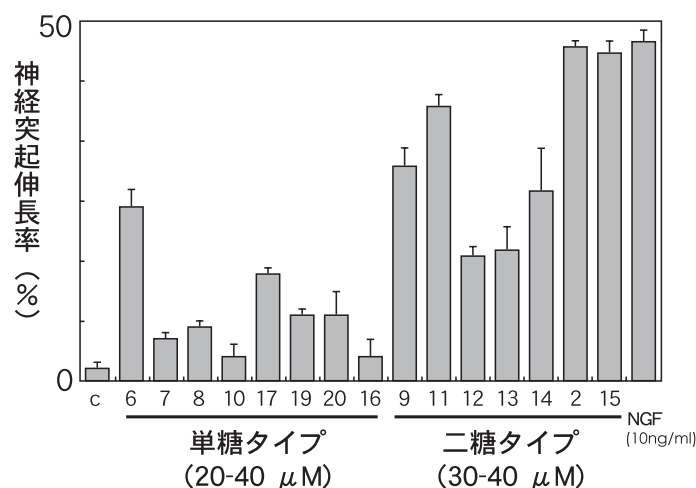


図7. Linckoside類によるPC12細胞の突起伸長

示した。その他の linckoside 類や既知の類縁体についても活性を調べた結果、構造と活性の間に興味深い関連を見出した。すなわち、これらステロイド配糖体を二糖タイプと単糖タイプに分類すると、前者の方が高い神経突起伸張活性を示した（図7）。また、全ての化合物がステロイド核の3位に xylose または 2'-O-methylxylose を有しているが、後者の方が約2倍高い活性を示した。図8に、PC12細胞に対する linckoside K（**11**）の神経突起伸長作用の顕微鏡写真を示した。

以上の結果を総合すると、一般式A（図5）のように、側鎖の分岐炭素とステロイド核3位に五炭糖が1つずつ結合し3位のキシロースは2-O-メチル化

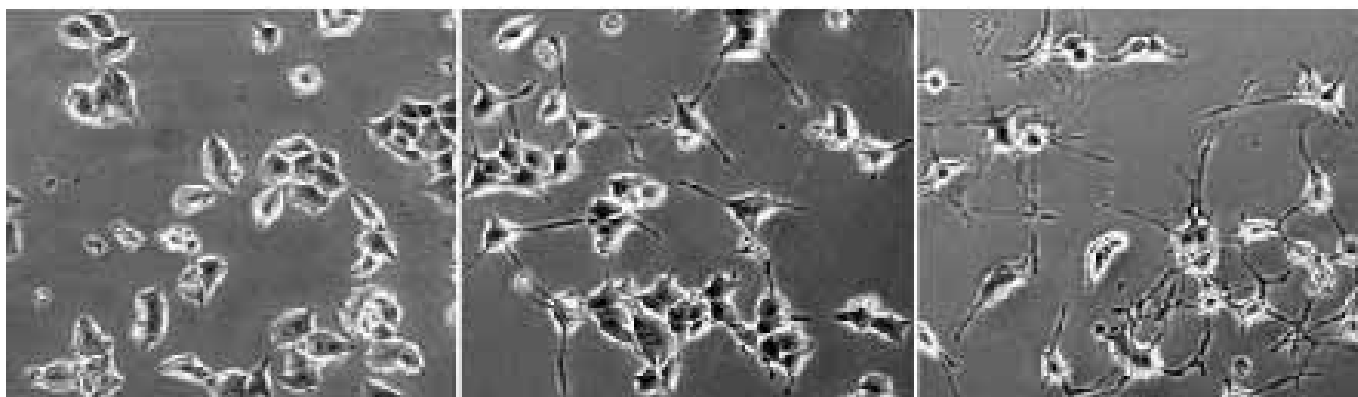


図8. PC12細胞（左）、linckoside K (**11**, 40 mM) により誘導された神経突起（中）およびNGF (10 ng/ml) による神経突起（右）

されている化合物の活性が高いことがわかる。さらに側鎖五炭糖がキシロースの場合、活性がより高くなる。このような構造活性相関を利用すると、細胞試験をすることなくその化合物の神経突起伸長活性が予想できるので、まだアオヒトデに無数に含まれる成分や他の棘皮動物の成分を精製することで活性の高い化合物を効率よく見出すことができるであろう。実際に我々は、沖縄で大量に駆除されているオニヒトデから同等の活性を示すステロイド配糖体を多数発見している。

5. NGF 増強効果

以上のようにアオヒトデステロイド配糖体は、その化学構造の微妙な差が神経突起伸長活性に顕著に影響することがわかったが、ごく微量のNGFを共存させると興味深い現象が見られる。すなわち、1.5 ng/ml という極めて低濃度のNGFはPC12細胞にほとんど突起伸長を誘導しない（突起伸長率<10%）が、ステロイド配糖体を投与するとほぼ全ての化合物がNGFの突起伸長活性を顕著に増強することがわかった。もっとも顕著な効果はgranuloside A (**18**)に見られた。この化合物はすでに別のヒトデから単離されていた物質だが、今回はじめてこのような生理作用が見つかった (Qi et al. 2006)。**18**自体は少なくとも40 μ Mまで突起伸張活性を示さないが、1.5 ng/mlのNGFに添加すると、10%未満だったNGFの突起伸張活性は濃度依存的に上昇し、40 μ Mでは40 ng/mlの

NGFと同等の95%に達した (図9 A)。さらに、**18**とNGFの相乗効果を確認するために、各濃度を同時に変化させたところ、NGFが1 ng/ml、**18**が40 μ Mの時に最も高い相乗効果が見られた (図9B)。この時の活性はNGF単独の約40 ng/mlに相当することから、**18**はNGFの活性を40倍に増強（つまり1/40のNGF濃度で同等の活性）したことになる。

Granuloside A (**18**)のNGF増強効果はどのような機構で発現するのであろうか。NGFはその受容体TrkAに結合した後、主に細胞内のMAPキナーゼカスケードを活性化して突起伸張を誘導する。特に持続的活性化（リン酸化）が重要と言われている。そこで、MAPキナーゼ「ERK」に注目してウエスタンブロット法で活性化を追跡した (Qi et al. 2006)。突起伸張をほとんど起こさない低濃度（1.5 ng/ml）のNGFは一過性（1時間）のERKの活性化しか起こさないが、**18**を添加すると活性化は4時間持続することがわかった (図10)。**18**自体はERKを活性化しないこと、TrkAの活性化促進には影響しないことから、ERKに対するアロステリック効果かもしれない。

6. おわりに

アオヒトデステロイド配糖体は構造新規性・多様性が高く、研究期間内に20種の類縁体の発見と構造解析を達成し、今後も増加する可能性が高い。これらの物質は、精製・構造解析に要する労力に勝る多くの有用な構造活性相関情報を提供してくれる、

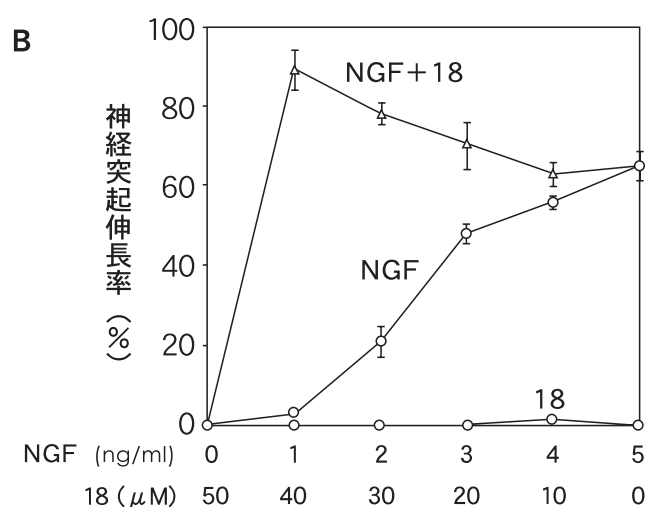
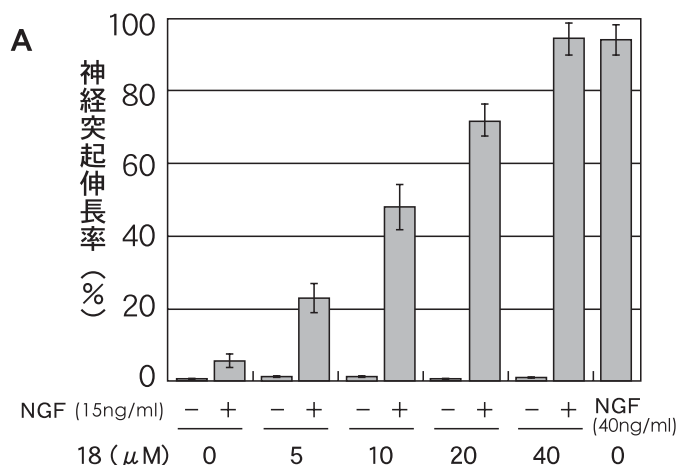


図9. Granulatoside A (**18**) によるNGF増強効果
A: 濃度依存的なNGF増強効果、B: 相乗効果

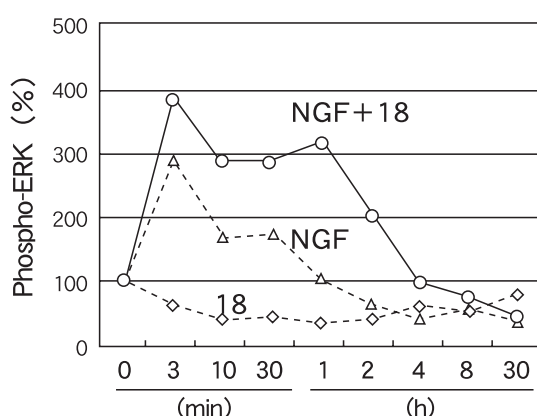


図10. Granulatoside A (**18**) によるNGF増強効果におけるMAPキナーゼの活性化
NGF: 1.5 ng/ml; **18**: 40 mM; NGF+**18**: NGF 1.5 ng/ml+ **18** 20 mM

いわば天然のコンビナトリアルライブラリーである。これらの化合物はサポニンの仲間であるにもかかわらず細胞毒性が低いという応用に有利な特徴も有している。今後、動物実験により記憶学習改善効果やニューロン修復効果が見出されれば、神経疾患治療薬のシーズとして期待できるものの、アオヒトデの生息数は限られており、今後このアオヒトデを材料に研究を進めることは容易ではない。前述したように、最近、沖縄で駆除されたオニヒトデの成分を調べた結果、類縁化合物が多数見つかった。今後、さんご礁を荒らすオニヒトデの有効利用ができれば正に一石二鳥であろう。

●謝辞

本研究で用いたアオヒトデの採集にあたり、多大なご協力いただいた阿嘉島臨海研究所の岩尾研二研究員はじめ所員の皆様に感謝いたします。また、共同研究者の名古屋大学大学院生命農学研究科の坂神洋次教授、戚建華博士、韓春光博士、笹山裕美修士、内田浩二助教授、柴田貴広助手、中原寛子修士に感謝します。本研究は日本学術振興会および文部科学省の科学研究費補助金の援助を受けて行ったものです。

●引用文献

- Han, C., J. Qi and M. Ojika 2006a. Structure-activity relationships of novel neuritogenic steroid glycosides from the Okinawan starfish *Linckia laevigata*. Bioorg. Med. Chem., 14: 4458-4465.
- Han, C., J. Qi and M. Ojika 2006b. Linckosides M-Q: Neuritogenic Steroid Bisglycosides from the Okinawan starfish *Linckia laevigata*. J. Nat. Med., 61: 138-145.
- Qi, J., M. Ojika and Y. Sakagami 2002. Linckosides A and B, two new neuritogenic steroid glycosides from the Okinawan starfish *Linckia laevigata*. Bioorg. Med. Chem., 10: 1961-1966.
- Qi, J., M. Ojika and Y. Sakagami 2004. Linckosides C-E, three new neuritogenic steroid glycosides from the Okinawan starfish *Linckia laevigata*. Bioorg. Med. Chem., 12: 4259-4265.
- Qi, J., C. Han, Y. Sasayama, H. Nakahara, T. Shibata, K. Uchida and M. Ojika 2006. Granulatoside A, a starfish steroid glycoside, enhances the PC12 cell neuritogenesis induced by nerve growth factor through an activation of MAP kinase. Chem. Med. Chem., 1: 1351-1354.