

## 共同研究報告

研究プロジェクトタイトル F. 「海洋生物の医薬資源開発—医薬を指向した海洋生物の有用物質の探索」

代表者 釜野徳明

メンバー (学内) 釜野徳明、速水 格、日野晶也、小笠原 強、関 邦博、  
服部明彦、小竹文乃、南達信代、戸澤満智子  
(学外) 西川輝昭(名古屋大学人間情報研究科)、竹内一郎(東京  
大学海洋研究所)、橋本 惇(海洋科学技術センター)、  
姚 新生(瀋陽薬科大学、中国)、易 楊華(Yi Yanghua)  
(上海第二軍医大、中国)、小宮山寛機(北里研究所)、  
川村将弘(慈恵医大)、張 恵平(理化学研究所)

### 研究の概要

海洋生物はその種 100 万といわれ、地上における今もなお未知な世界である。本年度も、この海洋生物から、医薬資源となりうる有用な生理活性物質を発見し、構造を明らかにし、生物活性を検討することを目的として研究を行った。

本年採集した生物は、23 種であり、今までに 249 件を採集している。採集生物のリストを Table に示した。バイオアッセイを目印に、今まで、海草、アカフジツボ、クダウミヒドラ、スポンジ、エボヤ、ユーレイボヤ、イソギンチャク、群体ボヤ、オオワレカラ、コケムシ類等につき有用成分の探索を行った。特に、付着生物コケムシ(Bryzoa)類の各種の成分に注目し、各地で採集したフサコケムシ *Bugula neritina*、ホソフサコケムシ *Tricellaria occidentalis* およびアメリカのフロリダ産コケムシ *Amathia convoluta* の活性成分を検討し、有益な知見を得た。また、中国との共同研究が進み、中国側で大量(全 1000Kg)のフサコケムシが採集でき、その成分の分離を行っている。特に海南島産フサコケムシから新規ブリオスタチン 19 を単離し構造を決定した。<sup>1)</sup>さらに、昨年度から淡水産のコケムシの一種であるオオマリコケムシをつくば市の沼で採集し、活性成分の探索を開始しており、本年も同じ場所で採集している。淡水産コケムシについての成分研究は、まったく未知であり本研究室が最初である。今までに幾つかの成分を単離している。以上の結果は、成分の成果の項に要約した。

一方、かねてより海洋科学技術センターと共同研究を行っていた深海生物の成分探索に進展がみられ、相模湾深海生物のシロウリガイとハオリムシにも抗癌活性物質が存在することを発見し、目下他の様々な成分とあわせその活性成分の検索を進めている。途中の経過は、第 14 回しんかいシンポジウム(11月、コクヨホール、品川、海洋科学技術センター主催)にて報告した。<sup>2)</sup>

また、第 11 回天然薬物の開発と応用シンポジウム(8月、八王子、東京薬科大学、日本薬学会主催)にて招待講演を行い、本プロジェクトの最近の成果を

報告している。<sup>3)</sup>その他の発表、論文などリストした。

### 採集生物リスト

1997年（平成9年）に採集した生物のリストを示す。

識別KM-番号	種和名	学名ないし和名	採集地（月）	湿重量(Kg)
227	フサコケムシ	<i>Bugula neritina</i>	B(2)	10.000
228	フサコケムシ	<i>Bugula neritina</i>	C(3)	115.852
229	オオマリコケムシ	<i>Pectinatella magnifica</i>	D(?)	
230	フサコケムシ	<i>Bugula neritina</i>	E(5)	300.000
231	フサコケムシ	<i>Bugula neritina</i>	F(5)	300.000
232	フサコケムシ	<i>Bugula neritina</i>	G(5)	300.000
233	ゴカイの一種		A(8)	0.282
234	ネンエキボヤ	<i>Diplosoma mitsukurii</i>	A(8)	0.360
235	イソギンチャク	<i>an anthozoan</i>	A(8)	6.230
236	ジデムナム	<i>Botrylloides sp.</i>	A(8)	11.440
237	マンジュウボヤ	<i>Aplidium pliciferum</i>	A(8)	3.490
238	チゴケムシ	<i>Watersipora subovoidea</i>	A(8)	0.435
239	シロガヤ	<i>Aglaophenia whiteleggei</i>	A(8)	0.355
240	ウスイタボヤ	<i>Botryllus schlasserii</i>	A(8)	0.113
241	ユウレイボヤ	<i>Ciona sayignyi</i>	A(8)	1.190
242	スポンジ		A(8)	2.930
243	エラコ	<i>Pseudopotamilla</i>	A(8)	0.090
244	ミズジジデムニ	<i>Trididemnum savignii</i>	A(8)	0.090
245	スジキレボヤ	<i>Ascidia sydneiensis</i>	A(8)	25.440
246	シライトゴカイ		A(8)	0.050
247	エボヤ	<i>Styela clava</i>	A(8)	13.520
248	アミコケムシ		A(8)	0.020
249	ホヤの一種		A(8)	0.030
250	ゴカクキンコ	<i>Pentacra australis</i>	A(8)	0.021
251	モルグラ	<i>Eugyra glutinans</i>	A(8)	0.060
252	未知 A		A(8)	0.100
253	ホソフサコケムシ	<i>Tricellaria</i>	A(8)	2.840
254	シロウリガイ	<i>Calypptogena soyoeae</i>	H(12)	4.280

A:岩手県大槌町、B:中国海南島、C:真鶴、D:つくば市（沼）

E:中国 Daya湾(1)、F:中国 Daya湾(2)、G:中国 Sanya湾、H:神奈川県相模湾

本年度大槌湾で採集した生物は 21 種である。ホソフサコケムシは採集したがフサコケムシはみられなかった。一方、ジデムナム、スジキレボヤは例年多く、特に本年度は、イソギンチャクとマンジュウボヤの量が多かった。

3 月に真鶴でフサコケムシの付着している網を発見、2 日間に及んで 116Kg を採集した。日本沿岸で最も多い量であった。一方、中国側での採集では、海南島のほか、Daya 湾および Sanya 湾で大量(900Kg)のフサコケムシを採集している。いずれもエキスは抗腫瘍活性を示し(研究成果の項参照)当面抗癌剤ブリオスタチンの単離を急いでいる。

## 研究成果の概要

(1) イソギンチャクについて成分検索に入り、極性成分の分離を試みている。オオマリコケムシ(淡水産)についても成分検索に入り、幾つかのヌクレオチドを分離している。

ホソフサコケムシからは、環状ケトンを単離している。*Amathia convoluta* および黄色海綿 *Lissodendoryx isodictyalis* からも類似の環状化合物が得られており、生物の機能に関係した成分と推定している。構造の解明とその役割に興味を持たれる。

(2) フサコケムシについては、沖縄産、真鶴産共にメタノールエキスを作成、分配して、ヘキササン可溶部(MH)、酢酸エチル可溶部(MEt)、ブタノール可溶部(MBt)、メタノール-水可溶部(M/H<sub>2</sub>O)を得、ウニ受精卵卵割阻害作用を検討した。その結果を表1に示す。いずれもMEt部分が活性を示したが、沖縄産のMH部分に強い活性が見られその成分に興味を持たれる。

一方、中国で採集したフサコケムシ3種のEtOHエキスを作成し、ウニ受精卵卵割阻害作用(Sea urchin)のほか、KB、PC-3、HeLa-S<sub>3</sub>、P388などの培養癌細胞とそれらの耐性細胞に対するテストを行った。その結果を表2に示す。何れも良い活性を示し、特に、Daya Bay-2のものは、P388/ADM耐性株に、またSanyaのものは、HeLa-S<sub>3</sub>に対してエキスであるにもかかわらず10<sup>-1</sup>オーダの強い活性が見られた。

表1. フサコケムシ *Bugula neritina*

採集場所	採集重量	採集時期	ウニ受精卵々割阻害作用			
			IC <sub>50</sub> (μg/ml)			
			MH	Met	MBt	M/H <sub>2</sub> O
沖縄産	9Kg	1996/9	3.7	14.7	—	—
真鶴産	136Kg	1997/4	—	47.6	—	—

表2. Cytotoxicity of The Chinese *Bugula neritina* EtOH Extract. (IC<sub>50</sub>;μg/ml)

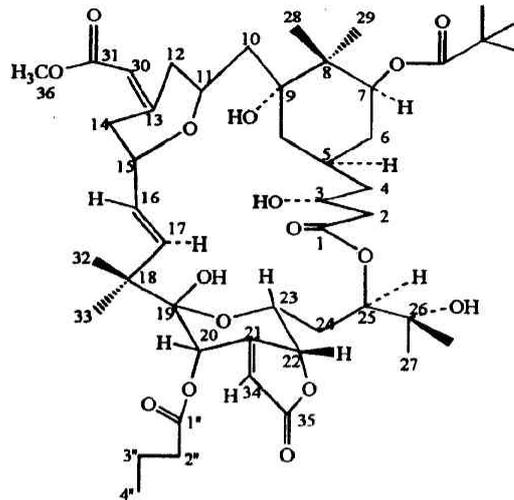
sample	Cells						
	KB(S)	PC-3(S)	PC-3/CDP-5	HeLa-S <sub>3</sub>	P388(S)	P388/ADM	Sea urchin
Daya Bay-1	19.5	29.5	—	5.23	11.03	48.64	4.84
Daya Bay-2	50.6	1.76	2.61	1.56	42.1	5.2×10 <sup>-1</sup>	14.95
Sanya	49.8	—	—	1.4×10 <sup>-1</sup>	35.4	10.93	53.11

S:Parent cell, CDP-5:Resistance sells by etoposide, ADM:Resistance cells by Adriamycin

Sea urchin:Inhibition of cell division of fertilized sea urchin eggs

Daya bay:Guangdong Province (1800Kg, May '97)

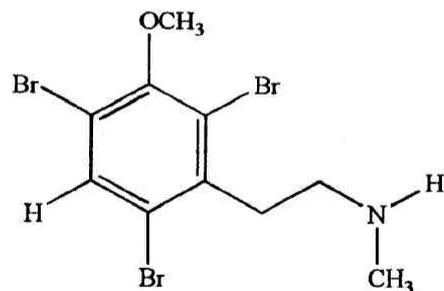
(3) 中国産フサコケムシのうち、海南島では採集したものについて成分の検索に入り、活性成分として新しいブリオスタチン類(ブリオスタチン 19 と命名)を単離し構造を決定した。



Bryostatine 19

IC<sub>50</sub>:  $2.8 \times 10^{-3}$  μg/ml  
for P388 cell

(4) 一方、米国フロリダ産コケムシ *Amathia convoluta* の新規生物活性アルカロイドの検索も進行中であり、BuOH 可溶部から一種の新しい β-phenylethylamine 体を単離し構造決定中である。さらに convolutamine A を再単離したので、その acetate を合成した。convolutamine F を含め、これらの化合物の生物活性を検討している。さらに、昨年単離・構造決定した Lutamide C の抗癌活性がユニークであり、耐性細胞に強い活性を示したことから、この化合物の各種癌細胞および種々の生物活性を検討する目的で全合成を開始した。現在の所 convolutamine F の全合成に成功し日本化学会第 74 春季年会 (1998) で口頭発表を行った。<sup>4)</sup>



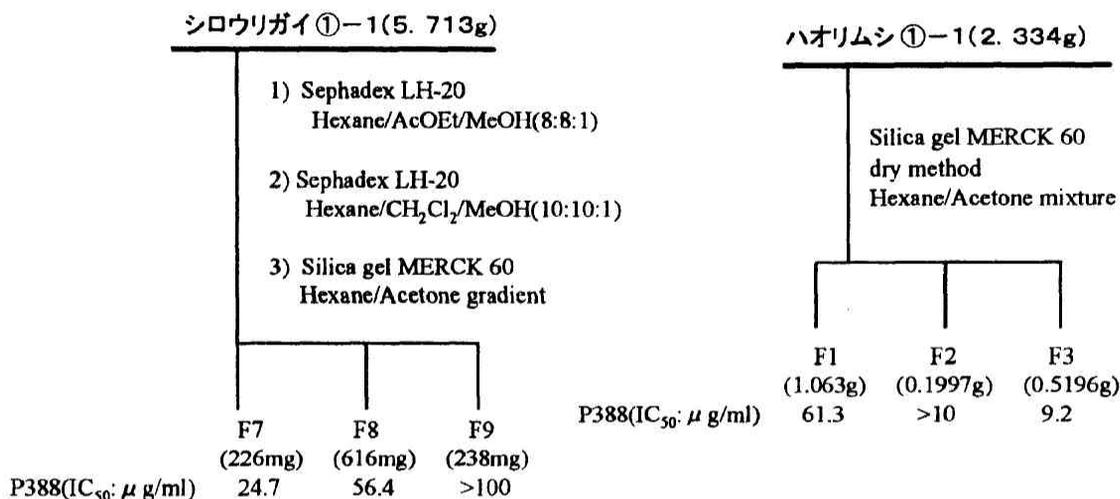
Convolutamine F

また、The 9<sup>th</sup> Naito conference では *Amathia convoluta* から得られたアルカロイドの総合発表を行った。<sup>5)</sup>

(5) 相模湾で採集した深海生物シロウリガイ *Calyptogena Soyoae* とハオリムシの一種(チューブワーム) *Lamellibrachia sp.* の生物活性を検討する機会を得た。

シロウリガイとハオリムシをそれぞれメタノールで抽出、抽出物をさらに含水メタノール中でヘキサン、酢酸エチルおよびブタノールで順次抽出し、各分配物を得た。これらの抽出物・分配物について、ウニ受精卵々割作用を検討したがいずれも活性は見られなかった。しかし、マウスリンパ球白血病細胞 P388 を用いて培養癌細胞に対するテストをした所、シロウリガイの酢酸エチル分画物(①-3)に有意な活性が見られた。さらに、ヘキサン可溶部(①-1)を Sephadex

LH-20 で 2 回、ついでシリカゲルでクロマト分画した所、F7 と F8 に有意な活性が見られた。同じようにハオリムシのヘキササン可溶部 (①-1) をシリカゲルでクロマト分画した F1 と F3 とも活性が見られた。そこで、これらの活性フラクションについて種々の展開剤と検出試薬を用いた薄層クロマトグラフィーを行い、成分の検索を行った所、各フラクションについて興味あるスポットを検出した。現在、これらのスポットの精製と生物活性テストを実試中である。<sup>2)</sup>



(6) Bryostatin 10 の steroidgenesis に関する論文を完成した。<sup>6)</sup>

### 論文他

- 1) Houwen Lin, Yanghua Yi, Xin-Sheng Yao, Yoshiaki Kamano, "Preliminary studies on the Antineoplastic Constituents of the Marine Bryozoan *Bugula neritina*", The 9<sup>th</sup> Naito Conference on *Chemical and Biological Basis for the Diversity of Marine Life*, Abstracts p.84(No. PSA-26), Shonan Village Center, Kanagawa, Oct. 1997.
- 2) 釜野徳明、平出初江、山下顕宏、小竹文乃、橋本 惇、“相模湾産シロウリガイ *Calyptogena soyoae* およびハオリムシ *Lamellibrachia sp.* の生物活性成分の探索”、第 14 回しんかいシンポジウム(海洋科学技術センター主催)、予稿集 p.96(No.P15)、コクヨホール、品川、11 月、1997.
- 3) 釜野徳明、“海洋産抗がん物質の最近の新展開”(シンポジウム II: 抗発がんおよび抗がん性天然薬物の開発、招待講演)、講演要旨集、p.33-38、東京薬科大学(八王子)、8 月、1997.
- 4) 佐藤信裕、羽島宏史、釜野徳明、“フロリダ産海洋コケムシ *Amathia convoluta* より得た新規 β-phenylethylamine 誘導体の合成的アプローチ”、講演予稿集 II、p.1112(No.4E601)、京都、3 月、1998.
- 5) Hui-ping Zhang, Yoshiaki Kamano, George R. Pettit, "Novel Bioactive Alkaloids from the Floridian Marine Bryozoa *Amathia convoluta*", The 9<sup>th</sup> Naito Conference on *Chemical and Biological*

*Basis for the Diversity of Marine Life*, Abstracts, p.83(PSA-25), Shonan Village Center, Kanagawa, Oct. 1997.

- 6) Yoshiaki Kamano, Motoyuki Yoshida, Hui-ping Zhang, George R. Pettit, Naoko Kosuge, Masahiro Kawamura, "Effect of Antineoplastic Macrolide Bryostatin 10 on steroidogenesis in the Primary Culture Bovine Adrenocortical Cells", *Jikei Medical Journal*, 45(4), 1998(in press).

共同研究者の論文リスト

西川 輝昭

- 7) Hirose, E., Lambert, G., Kusakabe, T. & Nishikawa, T. 1997. Tunicuticular protrusions in ascidians (Chordata, Tunicata): A perspective of their character-state distribution. *Zoological Science*, 14:683-689.
- 8) Hishikawa, T., Shirai, H., Chen, Y., Dai, C., Nohara, M. & Soong, K. 1997. First find of *Epigonichthys maldivensis* (Cooper) and rediscovery of *E. lucayanus* (Andrews) from Nanwan Bay, Southern Taiwan (Cephalochordata). *Benthos Research*, 52: 103-109.
- 9) Nishikawa, T. & Nishida, M. 1997. Problems in lancelet systematics. In "Advances in Comparative Endocrinology" (Proc. 13<sup>th</sup> Internat. Congr. Comp. Endocrinol.), Kawashima, S. & Kikuyama, S. eds. pp. 241-246.

日野 晶也

- 10) Sahiko Takemura, Kana Okano, Hazime Mizoguchi & AKIYA HINO (1997) Calcium Ionophore-Induced situs inversus and double imaginal disks in sea urchin embryos. *Zoological Science*. in press.
- 11) Akiko Fujiwara, Yasuyuki Kamata, Manabu Kawaomoto, AKIYA Hino, Hazime Mizoguchi & Ikuo Yasumasu (1997) Do artificial  $Ca^{2+}$  signals induced by A23187 cancel cell differentiation in gut of sea urchin embryos. *Zoological Science*. in press
- 12) Shinobu Kawai, Yoshitake Azumi, Kouichi H. Kato & AKIYA HINO (1997): "Isolation, purification and analysis of nucleic acids from a sperm tail fraction in *Asterina pectinifera*." Cambridge University Press, Zygote. in press

(文責: 釜野徳明)