

鹿児島産海藻抽出物を用いた新規物質の一挙構築と生物活性評価

熊谷百慶

鹿児島大学水産学部食品生命科学分野
〒890-0056 鹿児島市下荒田 4-50-20
TEL:099-286-4221

要旨

本研究では、海藻の抽出物に化学修飾を加えることで新たな構造を有する生物活性物質を一挙に得る手法を開発することを目的とした。鹿児島県で採集した褐藻ウラボシヤハズ (*Dictyopteris polypodioides*) 抽出エキス中に複数のテルペノイドの存在が示唆された。化学反応条件を検討するために単離化合物を用いて条件検討を行い、複数の化学修飾物質を得た。それらの抗炎症活性および破骨細胞分化抑制活性を調べたところ、天然物のアセチル化体である化合物 **9** に顕著な活性が認められた。そこで、ウラボシヤハズの抽出エキスをアセチル化反応に付して HPLC で分析したところ、新たに複数の化合物の生成が確認された。また、紅藻ミツデソゾ (*Laurencia okamurae*) の抽出エキスには複数の含臭素テルペノイドが含まれていた。そこで抽出エキスに対してカリウムフェニルトリフルオロボラートを用いて鈴木-宮浦クロスカップリングによる化学修飾を試み、HPLC で分析したところ新たに複数の化合物の生成が示唆された。

1. 緒言

人類は自然界に存在する生物資源から生理活性を有する有機化合物を探索し、様々な疾病の治療に利用してきた。様々な生物から新規構造を有する化合物を発見することは、新薬等の開発に向けて重要である。しかし近年、新規構造を有する天然物の発見は困難となっており、新たな構造を持つ化合物探索手法開発が望まれる。組み合わせ論に基づき、設計された一連の化学物質の構造を網羅的に合成する方法論であるコンビナトリアルケミストリーが盛んに利用されているが、天然物に比べて構造の複雑性や多様性が低くなる等の問題がある。一方、天然物の抽出エキスを利用して多様性を有する化合物群を合成する手法が試みられている¹⁻⁴⁾。申請者はこれまでに鹿児島県沿岸で採集した未利用海藻の成分調査を行い、海洋生物特有の構造を有するテルペノイド類を高含有する海藻種を多数見出した。そこで本研究では、多様な化学構造を有するテルペノイドを高含有する海藻エキスに着目し、そのエキスを化学修飾を加えることにより、天然物

の多様性を持った新規化合物群を一挙に得るための手法を開発することを目的とした。そのために種々の単離化合物に対して化学修飾を行い、反応条件を検討した。得られた化合物について培養細胞を用いた抗骨粗しょう症活性や抗炎症活性を検証した。さらに、見出した反応条件を用いて抽出エキスに対して反応を行い、新たな生成物が認められるか検証した。

2. 実験方法

2.1 試薬・海藻サンプル

本研究で用いたウラボシヤハズ (*Dictyopteris polypodioides*) およびミツデソゾ (*Laurencia okamurae*) は鹿児島県内で採集したものをを用いた。

2.2 海藻由来化合物の単離と誘導体合成

ウラボシヤハズの乾燥藻体 37.8 g を MeOH (2.0 L) で浸漬抽出した (×2 回)。回収した抽出液を濃縮し、MeOH 抽出物を得た。MeOH 抽出物 (6.1 g) を EtOAc と H₂O で分配し、EtOAc 可溶画分 (2.91 g) を得た。EtOAc 可溶画分を逆相オープンカラムクロマトグラフィーに付し、Fr. 1~Fr. 5 を得た。Fr. 4 (1.70 g) のうち、505 mg を 85 % MeOH に溶解後、逆相 HPLC (Detection: 210 nm, Solvent: 85 % MeOH, Flow rate: 3 mL/min, Column: wakosil-II 5C18 RS 10×250 mm) により化合物 **1** (12.5 mg), **2** (173.2 mg), **3** (111.5 mg), **4** (6.2 mg), **5** (35.2 mg), **6** (8.8 mg), **7** (12.6 mg) を単離した (Fig. 1)。得られた化合物の構造は、¹H および ¹³C-NMR、質量分析、比旋光度の測定値等を文献値^{5,7,9,11)}と比較することにより行った。さらに、化合物 **2** を用いて Scheme 1 に示した誘導体化を行い、化合物 **8~10** を得た。

ミツデソゾの藻体 129.6 g を MeOH (0.7 L) で浸漬抽出した (×3 回)。回収した抽出液を濃縮し、MeOH 抽出物を得た。MeOH 抽出物 (5.5 g) を EtOAc と H₂O で分配し、EtOAc 可溶画分 (0.8 g) を得た。EtOAc 可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、L. Fr. 1~L. Fr. 5 を得た。L. Fr. 1 (300 mg) のうち、222 mg を 85 % MeOH に溶解後、逆相 HPLC により化合物 **11** を 12.5 mg, **12** を 173.2 mg, **13** を 111.5 mg, **14** を 6.2 mg および **15** を 35.2 mg 単離した。¹H-NMR スペクトルより、得られた化合物の構造を推定した (Fig. 4)。さらに、MeOH 抽出物とフェニルトリフルオロボラートカリウム塩を用いた鈴木-宮浦クロスカップリング反応を行い、得られたエキスを HPLC で分析した。

2.3 単離化合物の NO 産生抑制試験と細胞毒性試験

NO 産生抑制試験は以前に報告した方法で行った⁶⁾。RAW264 細胞を培地で希釈し、細胞懸濁液を 96 穴プレートへ播種した。各サンプルをそれぞれの濃度に調製し、各 well へ添加したのちに LPS もしくは培地を添加して 37°C の CO₂ インキュベーターで 24 時

間培養した。産生した NO 測定には Griess 法を用いた。インキュベーション後、96 穴プレートにサンプル添加細胞の上清を取り、Griess 試薬と混合し、室温に 20 分間静置して、540 nm の吸光度測定を行った。標準溶液には NaNO₂ 溶液の希釈系列を用いて検量線を作成し、LPS 添加のコントロールを 100 %とした際の各サンプルの NO 産生率を算出した。陽性対照にはケルセチンを用いた。細胞毒性試験は NO 産生抑制試験と同様の条件で LPS を添加する代わりに培地を添加し、24 時間培養後に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いて評価した。

2.4 単離化合物の破骨細胞分化抑制活性評価

破骨細胞分化抑制試験は以前に報告した方法で行った⁸⁾。RAW264 細胞を培地で調製し、96 穴プレートに播種した。培養プレートを 37°C、5 % CO₂存在下にて 24 時間培養後、各ウェルに RANKL 及び各サンプルを終濃度 0.5-4 μM となるように添加し、3 日間培養した。陽性対照にはこれまでに破骨細胞形成抑制作用が報告されている Ipriflavone を用いた。培養後に破骨細胞の酵素マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ陽性の多核化した破骨細胞を染色して観察した。

3. 結果と考察

3.1 褐藻抽出エキスの化学修飾条件の設定に向けた条件検討および生物活性評価

鹿児島県に生息する様々な褐藻の抽出エキスを調製し抗炎症活性試験を行ったところ、褐藻ウラボシヤハズに顕著な活性を見出した。そこでまず本海藻に着目し、活性物質の単離を試みた。RAW264 細胞を用いた NO 産生抑制試験を指標に MeOH 抽出物の分画を行った結果、セスキテルペンハイドロキノン類 **1**~**7** を単離同定した (Fig. 1)。

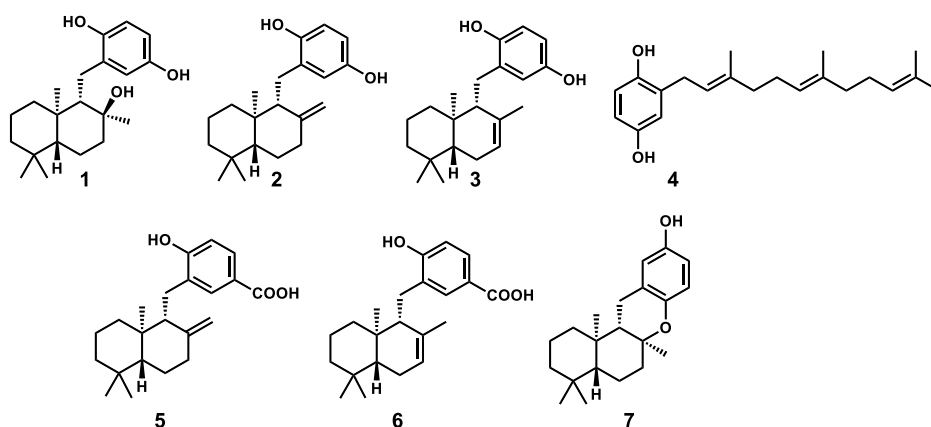
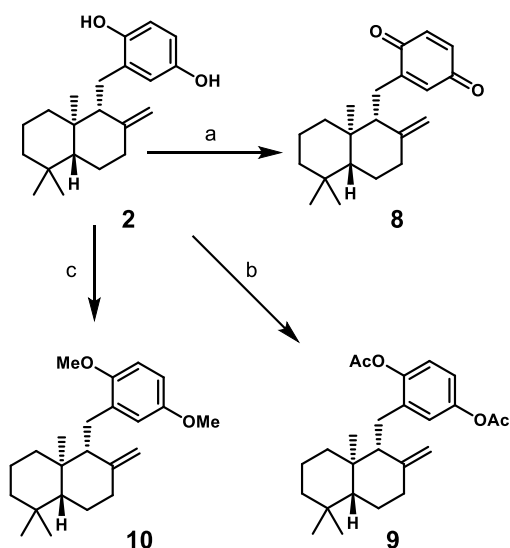


Fig. 1 Chemical structures of isolated compounds from *Dictyopteris polypodioides*.

本研究の最終目標は、海藻抽出エキスを様々な試薬との化学反応に供することにより新規生物活性化合物を一挙に構築することである。そのために、まずは単離化合物を用いて種々の化学反応の反応条件を確認することおよび予想生成物の生物活性を確認す

ることが必要と考えられた。そこで、収量の多かった化合物 **2** について種々誘導体化を試み、化合物 **8**~**10** を収率 35%~85% で得た (Scheme1)。得られたすべての化合物について抗炎症活性を調べた結果を Fig. 2 に示した。ハイドロキノン構造を有する化合物 **1**~**3** およびキノン **8** とアセチル化体 **9** に顕著な活性が認められた。化合物 **4** は細胞毒性も強かったため、化合物 **4** の NO 産生抑制効果は細胞毒性によるものと考えられた。化合物 **2** および **3** のドリマン骨格部分の構造は化合物 **5** および **6** と同じであることより、これらの化合物についてハイドロキノン構造が活性発現に重要と考えられた。ハイドロキノンの抗炎症活性については、nuclear factor kappa B (NF- κ B) 経路の阻害や activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の活性化¹⁰ がその活性発現に関与することが報告されている。本研究で得られた化合物も同様の経路で活性を示すことが予想されるが、さらなる検証が必要である。



Scheme 1 Semi-synthesis of compounds **8**, **9**, and **10** from zonarol (**2**). (a) Ag₂O, acetone, rt, 85%; (b) Ac₂O, DMAP, pyridine, rt, 83%; (c) MeI, K₂CO₃, acetone, 60°C, 35%.

次に、得られた化合物の抗骨粗しょう症活性を明らかにするため、RAW264 細胞を用いた RANKL による破骨細胞分化モデルを使用して活性評価を行った。RAW264 細胞に

RANKL を作用させると多核化した TRAP 陽性の破骨細胞 (Fig.3 黒矢印) に分化する。特に高い破骨細胞分化抑制活性を示した化合物の結果を Fig. 3 に示した。骨粗しょう症薬である Ipriflavone は TRAP 陽性多核化細胞の形成を抑制した。ハイドロキノン構造を有する化合物 **1**~**3** およびそのアセチル化体 **9** に強い活性が認められた。なお、ここに詳細に結果を示さないが、ハイドロキノン構造を持たない **9** が強い活性を示した理由として、**9** を細胞に添加すると脱アセチル化酵素の作用により **2** へと変換されることを示唆する結果が得られている (図は示さない)。以上より、化合物 **9** は細胞内で **2** へと変換されたのちに活性を示すものと考えられた。

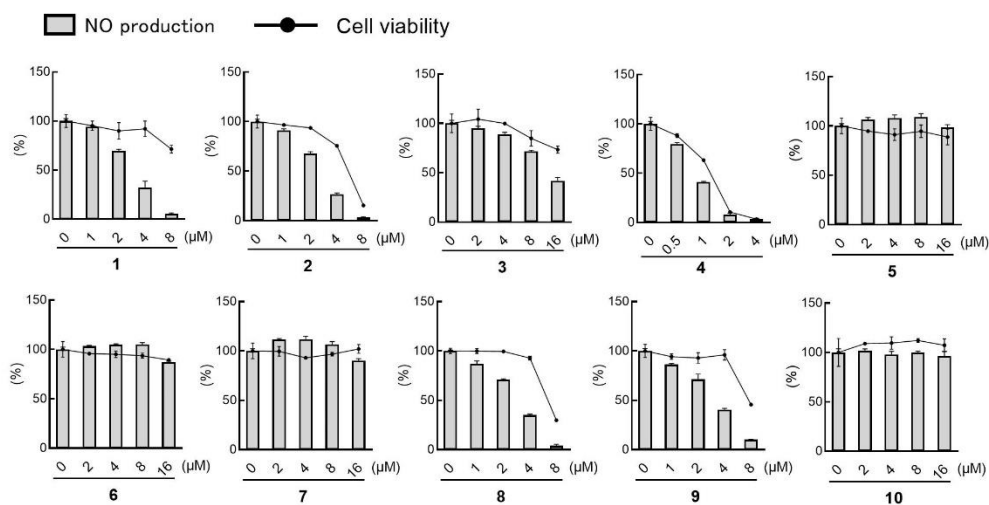


Fig. 2 NO production inhibitory activity and cell viability of isolated compounds and semi-synthesized compounds in RAW264 cells. Data are shown as the mean $\pm$ SD ($n = 3$).

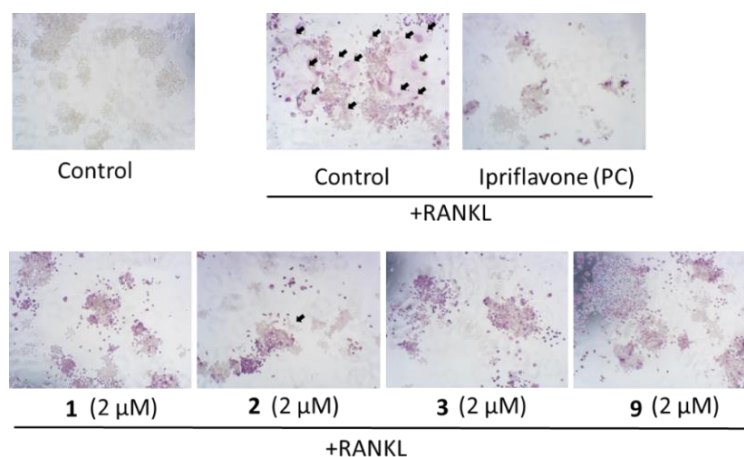


Fig. 3 Effects of compounds **1**~**3**, **9**, and ipriflavone on RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264 cells. RAW264 cells were cultured with the test compounds in the presence of RANKL (10 μ g/mL) for 72 h. For microscopic analysis, cells were fixed and stained by TRACP and ALP double-stain Kit. Arrows show TRAP-positive multinucleated cells. Each picture is representative of at least three independent cultures. Ipriflavone was used as positive control (PC).

3.2 褐藻抽出エキスの化学修飾

3.1 において褐藻ウラボシヤハズから得られた化合物 **2** のアセチル化体 (**9**) が顕著な抗炎症作用および破骨細胞分化抑制作用を示すことが明らかとなった。また、**2** のアセチル化反応は良好な収率で進行した。そこで、ウラボシヤハズから得られた MeOH 抽出エキスを無水酢酸を DMAP 存在下ピリジン溶液中で作用させ、抽出物中の様々な成

分を一挙にアセチル化できるか調べた。ウラボシヤハズから得られた MeOH 抽出物の反応前および反応後の HPLC クロマトグラムを Fig. 4 に示す。反応前に認められた化合物 **1**~**7** のピークは反応後に顕著に減少し、代わりに新たな生成物のピークが複数認められた。以上の結果より、種子島産の褐藻ウラボシヤハズの MeOH 抽出物を用いることにより、簡便な化学反応でセスキテルペン類の類縁化合物を一挙に得ることができる可能性が示唆された。

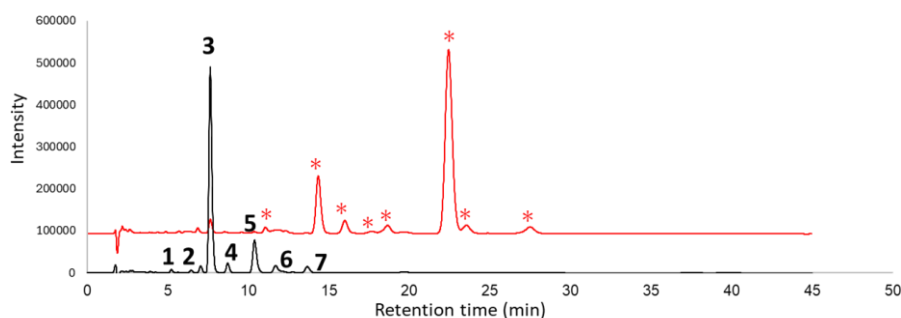


Fig.4 HPLC chromatogram of MeOH extract of *D. polypodioides*. Black line: before chemical reaction, red line: after chemical reaction. *Newly generated peaks.

3.3 紅藻抽出エキスの化学修飾

鹿児島産の紅藻ミツデソゾの MeOH 抽出物に含まれる成分を単離して構造決定した結果、Fig. 5 に示す **11**~**15** が主な含有物質として認められた。**13**~**15** は含臭素化合物であることに着目し、これらの含臭素化合物を含む抽出エキスとフェニルトリフルオロボラートカリウム塩を鈴木-宮浦クロスカップリング反応に供することにより、ビフェニル骨格を有する新たな化合物が得られると考え、反応を行った。反応後抽出物を HPLC で分析した結果 (Fig. 6)、新たなピークの生成が複数認められたことより、エキス中の複数の成分から新規化合物が生成したと予想された。

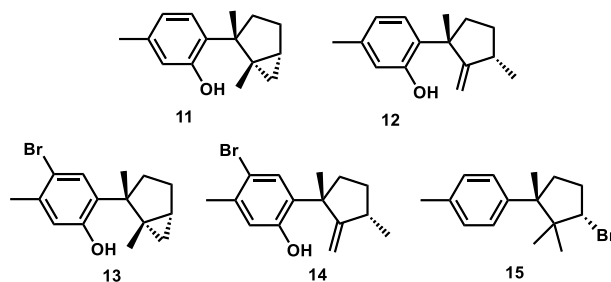


Fig. 5 Chemical structures of isolated compounds from *Laurencia okamurae*.

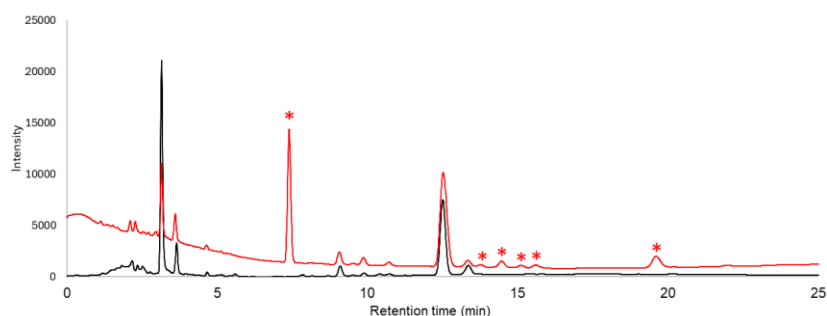


Fig.6 HPLC chromatogram of MeOH extract of *L. okamurae*. Black line: before chemical reaction, red line: after chemical reaction. *Newly generated peaks.

4. 成果発表

本研究成果の一部を以下のとおり発表した。

Kumagai, M, Matsuda, A, Shiiba, N, Tsuruta T, Endo, H, Nishikawa, K, Morimoto, Y. Structure-activity relationship of anti-inflammatory meroterpenoids isolated from *Dictyopteris polypodioides* in RAW264 cells, *Biosci. Biotech. Biochem.* **2024**, *accepted*.

5. 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂きました公益財団法人サンケイ科学振興財団に心より感謝申し上げます。また、鹿児島大学水産学部 松田明奈氏と椎葉望実氏には本研究の推進にご協力いただきました。本研究で用いたミツデソゾは鹿児島大学大学院連合農学研究科 教授 寺田竜太博士にご供与いただきました。鹿児島大学水産学部 准教授 遠藤光博士にはウラボシヤハズの種同定を行っていただきました。深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Lopez SN, Ramallo IA, Sierra MG, Zacchino SA, Furlan RLE. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 441–444 (2007).
- 2) Kawamura T, Matsubara K, Otaka H, Tashiro E, Shindo K, Yanagita RC, Irie K, Imoto M. Generation of “Unnatural Natural Product” library and identification of a small molecule inhibitor of XIAP. *Bioorganic Med. Chem.*, **19**, 4377–4385 (2011).
- 3) Méndez L, Salazar MO, Ramallo IA, Furlan RLE. Brominated extracts as source of

- bioactive compounds. *ACS Comb. Sci.*, **13**, 200–204 (2011).
- 4) Beato A, Haudecoeur R, Boucherle B, Peuchmaur M. Expanding Chemical Frontiers : Approaches for Generating Diverse and Bioactive Natural Product-Like Compounds Libraries from Extracts. **2024**, e202304166, (2024).
 - 5) Kumagai M, Nishikawa K, Matsuura H, Umezawa T, Matsuda F, Okino T. Antioxidants from the brown alga dictyopteris undulata. *Molecules*, **23**, 1–8 (2018).
 - 6) Kumagai M, Watanabe A, Yoshida I, Mishima T, Nakamura M, Nishikawa K, Morimoto Y. Evaluation of aculeatin and toddaculin isolated from Toddalia asiatica as anti-inflammatory agents in LPS-stimulated RAW264 macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 132–137 (2018).
 - 7) Laube T, Beil W, Seifert K. Total synthesis of two 12-nordrimanes and the pharmacological active sesquiterpene hydroquinone yahazunol. *Tetrahedron*, **61**, 1141–1148 (2005).
 - 8) Kumagai M, Nishikawa K, Mishima T, Yoshida I, Ide M, Watanabe A, Fujita K, Morimoto Y. Fluorinated Kavalactone Inhibited RANKL-Induced Osteoclast Differentiation of RAW264 Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **43**, 898–903 (2020).
 - 9) Laube T, Schröder J, Stehle R, Seifert K. Total synthesis of yahazunol, zonarone and isozonarone. *Tetrahedron*, **58**, 4299–4309 (2002).
 - 10) Funakoshi-Tago M, Matsutaka M, Hokimoto S, Kobata K, Tago K, Tamura H. Coffee ingredients, hydroquinone, pyrocatechol, and 4-ethylcatechol exhibit anti-inflammatory activity through inhibiting NF- κ B and activating Nrf2. *J. Funct. Foods*, **90**, 104980 (2022).
 - 11) Fenical W, Sims JJ, Squatrito D, Wing RM, Radlick P. Zoiarol and Isozonarol, Fungitoxic Hydroquinones from the Brown Seaweed Dictyopteris sonarioides. *J. Org. Chem.*, **38**, 2383–2386 (1973).

Construction of chemically modified compounds using seaweed extracts from Kagoshima and evaluation of their biological activities

Momochika Kumagai

Faculty of Fisheries

4-50-20 Shimoarata, Kagoshima, Kagoshima, Japan, 890-0056

TEL: +81 099-286-4221

The aim of this study was to obtain new bioactive compounds from chemically engineered seaweed extracts. The presence of multiple terpenoids was suggested in the extract of the brown alga *Dictyopteris polypodioides* collected in Kagoshima Prefecture. In order to set the chemical reaction conditions, we conducted semi-synthesis using isolated compounds and obtained several analogs. Their anti-inflammatory and osteoclast differentiation inhibitory activities were examined, and the acetylated analog of the natural product, compound **9**, showed remarkable activity. Therefore, we subjected to acetylation reaction of the extracts and analyzed by HPLC. The results indicated that there were several newly generated compounds. In addition, the extract of the red alga *Laurencia okamurai* contained several brominated terpenoids. We attempted chemical modification of this extract by Suzuki-Miyaura cross-coupling reaction and analyzed it by HPLC. The results indicated there were several newly generated compounds.

These results suggested that seaweeds extracts are good source for chemically engineered natural product extract.