薩南諸島産海洋無脊椎動物からの COVID-19 治療薬シーズの創出

濵田　季之

鹿児島大学大学院理工学研究科理学専攻
〒890-0065　鹿児島市郡元 1-21-24
TEL：099-285-8114

要旨

薩南諸島を含む鹿児島以南の海洋無脊椎動物の中から新型コロナウイルス感染症新規治療薬シーズ化合物の探索研究を行っている。SARS-CoV-2 メインプロテアーゼ阻害活性を指標にして、数種の薩南諸島産海綿動物の中から生物活性物質が得られているが、投稿論文準備中であるため公表は控える。本報告では、沖縄産ジャノメアメフラシから単離・構造決定した C_{15} アセトゲニン類やセスキテルペン類に関する研究について示す。３３種の化合物を単離・構造決定し、そのうち１２種類が新規化合物であった。また、数種がメインプロテアーゼ阻害活性を示した。今後、新たな作用機序を有する新型コロナウイルス感染症治療薬の開発が期待できる。

1. 緒言

2019 年 12 月に発生した新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染症 (COVID-19)[1]は約３年間パンデミックを引き起こし、2023 年 7 月末の時点で約 7.69 億人の感染が確認され、そのうち約 695 万人が死亡している [2]。効果的なワクチンの開発や集団免疫の獲得などが考慮され、2023 年 5 月に、WHO により宣言された「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態宣言」は解除されたが、この疾患は完全に根絶したわけではなく、新たな変異株の出現などによって新たなパンデミックが起こりうる依然として危険な感染症である。更なる有効で特異的な SARS-CoV-2 抗ウイルス薬の開発は急務となっている。

新規抗コロナウイルス薬の開発に最も広く用いられている試みは、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼとメインプロテアーゼ（M^{pro} または 3-chymotrypsin like protease; 3CLpro）を標的とするものである [3,4]。M^{pro} は SARS-CoV-2 の RNA から翻訳されたポリペプチドを切断する酵素であり、ウイルス複製に必須である [5]。M^{pro} はヒトのプロテアーゼには見られないグルタミン特異的な切断活性を示し [6,7]、重症急性呼吸器症候群（SARS）や中東呼吸器症候群などのコロナウイルス間で高度に保存されており [8]、創薬のターゲットに適している [9]。また、M^{pro} 特異的阻害剤はオフターゲット活性が無視できるほど小さく、副作用が少ないことが予想される [10,11]。これらの特徴から、M^{pro} は COVID-19 を治療するための魅力的で確実な標的となる。最近では、メインプロテアーゼ阻害薬としてニルマトレルビル (Nirmatrelvir)[12]とエンシトレルビル (Ensitrelvir)[13]の 2 剤が開発されたが、前者は代謝改善剤のリトナビルとの併用が必要であり、後者は副作用がある点で改善の余地がある。

本研究室では、蛍光物質 Edans とそのクエンチャーDabcyl をそれぞれC末端とN末端に付けた基質ペプチドを用いた SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害活性におけるアッセイ系を適用し、沖縄産ジャノメアメフラシや鹿児島県佐多岬産海綿から強力な M^{pro} 阻害活性物質を単離・構造決定した [14-18]。本報告書では、沖縄県泡瀬海岸で採取したアメフラシ [15-18]からの二次代謝産物に関する研究を示す。

2. 方法

2.1 Materials and General Procedures

沖縄県泡瀬西海岸のタイドプールにて、ジャノメアメフラシ 41 個体を採集した。採集物は、消化器系とそれ以外に分離し、化合物の分離に使うまでの間、それぞれを-20℃以下で冷凍保存した。カラムクロマトグラフィーは、シリカゲル 60 (Merck、70-230 μm) を用いて実施した。TLC には Silica gel 60F プレート (Merck、厚さ 0.25mm)、PTLC には Silica gel 60F プレート (Merck、厚さ 2.0 mm) を使用した。HPLC は、Shodex UV-41 検出器を備えた Waters 501 HPLC ポンプと Cosmosil 5C_{18}-MS-II (内径 1.0×25 cm) のカラムを用い、実施した。NMR スペクトルは Bruker Avance 600 および Avance III 600 クライオプローブスペクトロメーターを用いて 300 K で取得した。NOESY 実験での混合時間は 800 ms であった。高速原子衝撃波 (FAB) 質量スペクトルは、日本電子 JMS-700 MStation システムを用いて得た。

2.2 *In vitro* M^{pro} Assays

SARS CoV-2 M^{pro} 阻害活性におけるアッセイ系は、既報 [19]に示した以下のアッセイ系を構築した。酵素の基質は、蛍光物質 Edans とそのクエンチャーDabcyl をそれぞれC末端とN末端に付けたペプチド (ペプチド研究所、日本) を用いており、プロテアーゼが基質を切断するとクエンチャーが外れて蛍光が生じる。96 穴ブラックプレート (Thermo Scientific Cat#237105, USA) に終濃度 20 nM の SARS-CoV-2 M^{pro} (シグマ-アルドリッチ、USA) および各濃度の植物由来抽出液を加え、終濃度 10 μM の基質を含む緩衝液 (20 mM HEPES pH 6.5、120 mM NaCl、0.4 mM EDTA、4 mM DTT) を加え、反応温度 30 ℃のもと、マルチプレートリーダー (TECAN Infinite200, USA) にて、励起波長 340 nm での蛍光（485 nm）の FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）を観測した。ポジティブコントロールにはエンシトレルビルを使用した。溶媒で用いた DMSO をネガティブコントロールとし、その蛍光強度を 100%としてそれぞれの抽出液の蛍光阻害率を求めた。

3. 結果

3.1 二次代謝産物の抽出および単離

ジャノメアメフラシ *A. dactylomela* の中腸腺 (940 g, wet wt.) をメタノール (以下 MeOH と略す) と 50% MeOH/ジクロロメタン (以下 CH_2Cl_2 と略す) でそれぞれ抽出・ろ過をして、得られた抽出液を合わせて減圧濃縮にかけることで抽出物を得た。この抽出物を CH_2Cl_2 と水

(以下 H_2O と略す) で二層分配を行い、続けて、CH_2Cl_2 層をノルマル-ヘキサン (以下 *n*-hexane と略す) と 90% MeOH/H_2O で二層分配した。H_2O 層はノルマル-ブタノール (以下 *n*-BuOH と略す) と H_2O で二層分配した。

90% MeOH/H_2O 層の一部 (29.4 g 中 9.25 g) をバキュームカラムクロマトグラフィーで分離し、18 個の画分を得た。得られたフラクションのうち強い細胞傷害活性が見られた **fr.2**、**fr.3**、**fr.6**、**fr.7**、**fr.8**、および **fr.10** について、さらに分離・精製した。

fr.2 と **fr.3** を混ぜ合せたもの (410 mg) を分取薄層クロマトグラフィー (Preparative Thin-Layer Chromatography、以下 PTLC と略す) で 11 個のフラクションに分離し、得られた **fr.2-6** (27.3 mg)、を逆相高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography、以下 HPLC と略す) で分離し、化合物 **19** (2.2 mg)を単離した。**fr.6** と **fr.7** を混合したもの (1.70 g) をオープンカラムクロマトグラフィーで分離し、得られた **fr.6-25** (42.0 mg)、**fr.6-27** (380 mg)、**fr.6-29** (304 mg)、**fr.6-31** (52.5 mg)、および **fr.6-33** (24.0 mg) を更に分離することにした。**fr.6-25** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **7** (7.5 mg) を得た。**fr.6-27** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **3** (1.4 mg) および化合物 **4** (0.5 mg) を得た。**fr.6-29** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **13** (2.7 mg) を得た。**fr.6-31** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **5** (1.8 mg)、化合物 **6** (1.5 mg)、および化合物 **12** (1.1 mg) を得た。**fr.6-33** を逆相 HPLC で分離し、化合物 **17** (7.3 mg) および化合物 **30** (2.6 mg) を得た。**fr.8** (303 mg)を PTLC で分離し、得られた **fr.8-7** (163 mg) を逆相 HPLC で分離することで、化合物 **16** (4.9 mg)、化合物 **26** (2.9 mg)、および化合物 **33** (2.2 mg)を得た。**fr.10** (4.02 g)をオープンカラムクロマトグラフィーで分離し、得られた **fr.10-5** (59.2 mg) を逆相 HPLC で分離することで、化合物 **14** (1.7 mg)、化合物 **15** (3.6 mg)、および化合物 **29** (24 mg) を得た。

以上のように、沖縄県泡瀬産のジャノメアメフラシから１６種の化合物を単離した。それぞれの化合物について、核磁気共鳴分光法 (NMR) を用いて、構造解析を行ったところ、１６種のうち７種が新規化合物であった。スペクトルデータや詳細な構造決定については、現在投稿中の論文、および投稿準備中の論文の中に示す。**Fig. 1** と **Fig. 2** に、過去に当研究室により本アメフラシから単離・構造決定した二次代謝産物[17,18]を含めた単離化合物の化学構造と M^{pro} 阻害活性試験の結果を示す。

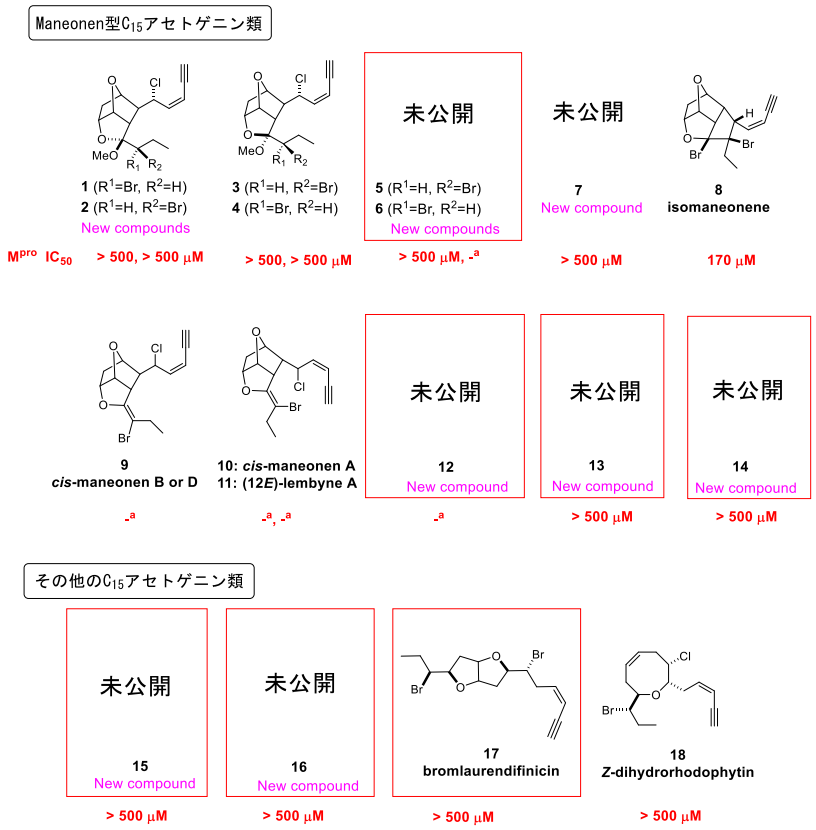


Figure.1 沖縄産ジャノメアメフラシより単離・構造決定した 18 種の C_{15} アセトゲニン類
（今回構造決定した 8 種（赤枠）を含む）

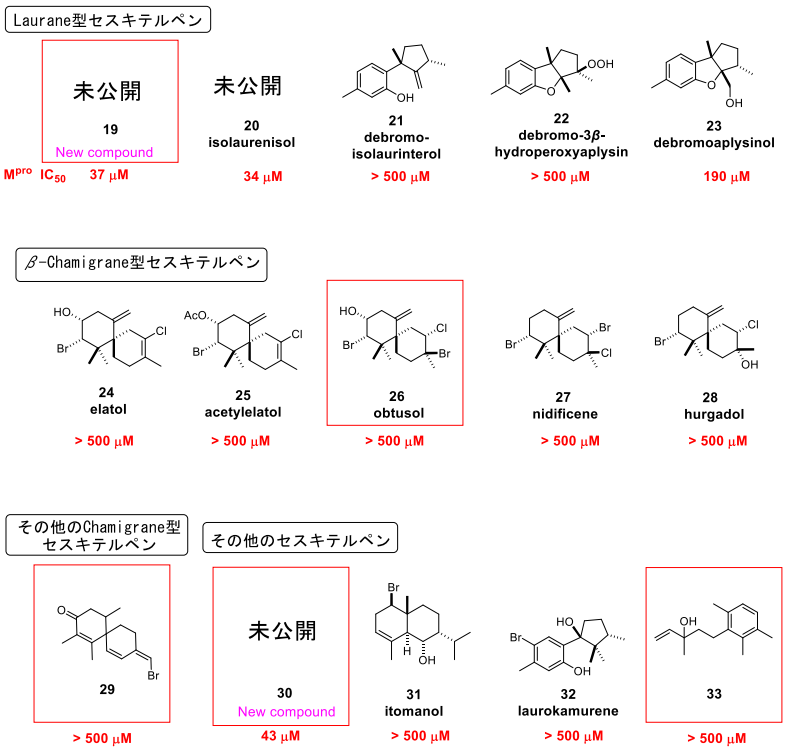


Figure.2 沖縄産ジャノメアメフラシより単離・構造決定した 15 種のセスキテルペン類
（今回構造決定した５種（赤枠）を含む）

3.2　構造活性相関

SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害活性について、C_{15} アセトゲニン類の中では、化合物 **8** が弱い M^{pro} 阻害活性を示したのみで、ほとんどの化合物では活性を示さなかった。

一方、セスキテルペン類の中では、laurane 型セスキテルペンに強い阻害活性が見られた。化合物 **19** や **20** のようなハロゲン（臭素）が含まれている化合物は 30 μM 程度のやや強い阻害活性を示したが、ブロモ基のない化合物 **21** には活性がないことから置換基としてブロモ基が重要であることがわかった。新規化合物 **19** に加え、新規化合物 **30** にもやや強い M^{pro} 阻害活性を示すことから、今後、構造の最適化も検討していきたい。

3.3　今後の研究課題

この沖縄産アメフラシから単離されてはいるが構造解析を行えていない化合物が十数個あり、それらの平面構造と立体について解析を行う必要がある。また、ジャノメアメフラシからは、まだ有望な化合物が単離できると見込んでいるため、更なる分離・精製が必要である。新規化合物と強い活性を示した既知化合物について、絶対配置の決定が必要である。エックス線結晶回析法、有機合成および ECD などを用いて、絶対配置を決定する。

4. 謝辞

本研究の一部は、「物質・デバイス領域共同研究拠点」の基盤共同研究（No. 20251386）ならびに科研費補助金(No.22K05836)によるものである。

5. 引用文献

1) L. Wang et al., *Int. J. Autimicrob. Agents*, **2020**, 56 (3), 106137.
2) https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019.
3) A. Zumla A et al., *Nat. Rev. Drug Discovery,* **2016**, *15*, 327−347.
4) C. Gil et al., *J. Med. Chem.,* **2020**, *63*, 12359−12386.
5) P. A. Rota et al., *Science,* **2003**, *300*, 1394−1399.
6) D. H. Goetz et al., *Biochemistry,* **2007**, *46*, 8744−8752.
7) L. Zhang et al., *J. Med. Chem.,* **2020**, *63*, 4562−4578.
8) T. Pillaiyar et al., *J. Med. Chem.,* **2016**, *59*, 6595-6628.
9) S. Ullrich et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2020**, *30*, 127377.
10) H. M. Mengist et al., *Front. Chem.,* **2021**, *9*, 622898.
11) Y. Liu et al., *Eur. J. Med. Chem.,* **2020**, *206*, 112711.
12) K. Vandyck et al., *Virology*, **2021**, *49*, 36–40.
13) Y. Unoh et al., *J. Med. Chem.*, **2022**, *65*, 6499-6512.
14) 小瀬日奈子, 上野大輔, 須藤正幸, 谷文都, 鬼束聡明, 岡村浩昭, 濵田季之, 鹿児島県佐多岬近海産 *Agelas* 属海綿由来の生物活性物質の探索, 第 62 回化学関連支部合同九州大会, 2025 年 7 月.

15) 小瀬日奈子, 中村龍之介, 谷文都, 鬼束聡明, 岡村浩昭, 濵田季之, ジャノメアメフラシ (*Aplysia dactylomela*) 由来の生物活性物質の探索および構造活性相関研究, 日本生薬学会第 71 回年会, 2025 年 9 月.
16) T. Hamada, H. Koze, R. Nakamura, K. Matsuyama, F. Tani, N. Arima, T. Iwagawa, M. Sudoh, S. Onitsuka, H. Okamura, Chemical structures and biological activities of secondary metabolites isolated from the Okinawan seahare *Aplysia argus*. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2025; Pacifichem 2025, 2025 年 12 月.
17) K. Matsuyama, T. Inoue, T. Muroga, N. Arima, M. Doe, F. Tani, Y. Ookawa, Y. Okamoto, S. Onitsuka, H. Okamura, T. Iwagawa,T. Hamada. New halogenated C15 acetogenins from Okinawan sea hare *Aplysia dactylomela*, *Tetrahedron*, **2022**, 132889.
18) Ryunosuke Nakamura, Koushi Matsuyama, Naomichi Arima, Fumito Tani, Satoaki Onitsuka, Hiroaki Okamura, Tetsuo Iwagawa, Masayuki Sudoh, Toshiyuki Hamada. Isolation, characterization, and biological activities of halogenated sesquiterpenes and C15acetogenins from the Okinawan sea hare, *Aplysia argus*, *Tetrahedron*, **2025**, *178*, 134588.
19) Hinako Koze, Masayuki Sudoh, Satoaki Onitsuka, Hiroaki Okamura, Takeshi Ishikawa, Fumito Tani, Yukako Miyata-Yabuki, Mikako Shirouzu, Masanori Baba, Mika Okamoto and Toshiyuki Hamada. Sulfoquinovosyl diacylglycerol, a Component of Holy Basil *Ocimum tenuiflorum*, inhibits the Activity of the SARS-CoV-2 Main Protease and Viral Replication *in vitro*, *Journal of Natural Medicines*, **2025**, *79*, 122–133, https://rdcu.be/d1s4s.

Chemical structures and biological activities of secondary metabolites isolated from the Okinawan sea hare *Aplysia argus*

Toshiyuki HAMADA

Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University
1-21-35, Korimoto, Kagoshima, Japan
Tel/Fax +81-99-285-8114; E-mail: thamada@sci.kagoshima-u.ac.jp

The sea hare of the genus *Aplysia* (Family Aplysiidae) is known to prey on red algae of the genus *Laurencia*, which produces a diverse range of halogenated secondary metabolites as a chemical defense; these metabolites tend to bioaccumulate in the sea hare. Several of these metabolites include terpenes, C_{15} acetogenin, macrolides, sterols, and alkaloids, have been reported to exhibit potent cytotoxic and antimicrobial/antifungal activities, suggesting their potential for development into pharmaceutical products. This presentation describes the isolation and structural characterization of 33 metabolites including 12 newcompounds from the crude methanol extract of *Aplysia argus* collected near the Awase coast, Okinawa, Japan. Additionally, enzyme inhibitory activities against SARS-CoV-2 M^{pro} of these compounds were evaluated. The preliminary structure-activity relationship studies are discussed.