

深海生物シロウリガイ *Calymene baccata* の化学成分の探索

釜野 徳明^{*1} 平出 初江^{*1} 山下 顕宏^{*1}
渡辺 利裕^{*1} 山下 文乃^{*1} 橋本 惇^{*2}

日本沿岸に生息する海洋生物の生理活性物質探索の一環として、深海生物シロウリガイ *Calymene baccata* の化学成分の探索を行った。その結果、限られた材料を使った検討にもかかわらず、数種の細胞毒性を有するフラクションを得、さらに、化学成分の検討から、糖1種 (ethyl α -D-glucopyranoside)、核酸1種 (inosine) およびアミノ酸5種 (α -alanine, β -alanine, taurine, glycine, phenylalanine) を単離・同定した。また、同時にヘイトウシンカイバリガイ *Bathymodiolus platifrons* とサツマハオリムシ *Lamellibrachia satsuma* についても、抽出物と分配物の生物活性スクリーニングを行った。

キーワード：深海生物 *Calymene baccata* *Lamellibrachia* sp. 細胞毒性スクリーニング

Search for the chemical substances of deep-sea organisms *Calymene baccata*.

Yoshiaki KAMANO^{*3} Hatsue HIRAIDE^{*3}
Akihiro YAMASHITA^{*3} Toshihiro WATANABE^{*3}
Ayano YAMASHITA^{*3} Jun HASHIMOTO^{*4}

For a series of search for bioactive substance of the Japanese coastal marine organisms, we investigated the chemical substances of deep-sea animal *Calymene baccata*. Although the amounts of this animal were limited, we found some interesting active fractions. Also, as the chemical components, from *Calymene baccata*, a monosaccharide (ethyl α -D-glucopyranoside), a nucleic acid (inosine), and five amino acids (α -alanine, β -alanine, taurine, glycine, and phenylalanine) were isolated. Additionally, we reported about the biological screening on cytotoxicity for the deep-sea animals, *Bathymodiolus platifrons* and *Lamellibrachia satsuma*.

Key words : Deep-sea animal *Calymene baccata* *Lamellibrachia* sp. Cytotoxic screening

* 1 神奈川県立理工学部

* 2 海洋科学技術センター

* 3 Faculty of Science, Kanagawa University

* 4 Japan Marine Science and Technology Center

1. 目的

海洋生物は海という特殊な環境下に、多様な環境に順応しながら生息している関係から、その進化の過程で陸上の生物と異なる代謝系を発展させてきたと推定される。そのため、海洋生物は、多彩な化学構造と多様な生理活性を有する代謝物や生体防御物質を産生していると考えられている。事実、珍しい新規な化合物が数多く発見されている。

シロウリガイは軟体動物門に属し、本研究で用いているシロウリガイという標準和名を持つものは *Calyptogena soyoae* で、相模湾を模式産地としている。深海底の水深750m～1200mに生息し、貝の大きさは約14cm位である。また、硫黄酸化細菌を内部共生させており、鰓と外套膜に硫黄の粒子が確認されている。

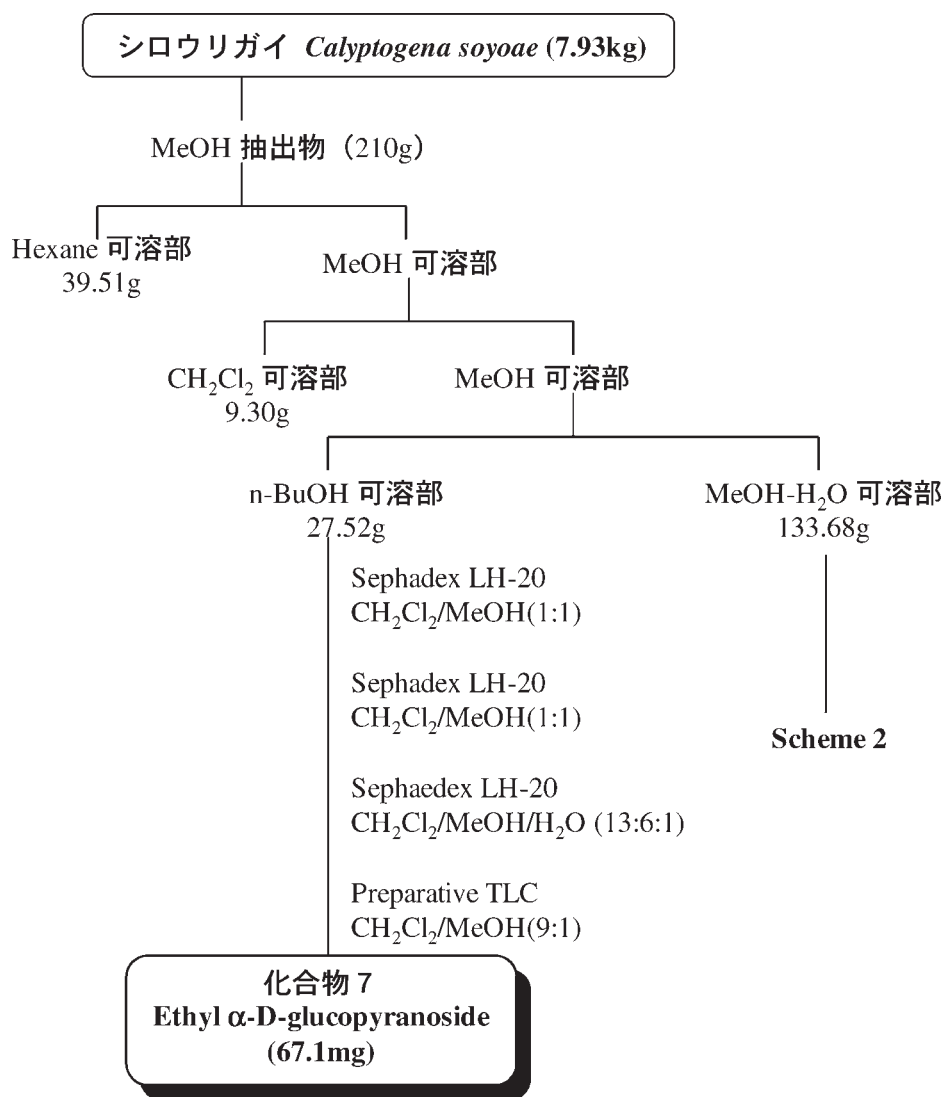
シロウリガイ *Calyptogena soyoae* の化学成分については、これまで報告が全くなく未知の分野である。先駆けと

して著者は相模湾初島沖で採集されたシロウリガイ *C. soyoae* の化学成分の探索を行った。また、ヘイトウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus platifrons* とハオリムシ2種 (*Lamellibrachia* sp. および *Lamellibrachia satsuma*) の抽出物および分配物について生物活性を検討したので併せて報告する。

2. 実験

2.1 材料

1993年から1997年にかけてドルフィン3Kにより相模湾初島沖の水深1000～1200mの海底で採集したシロウリガイ 7.93 kg を用いた。さらに、ハオリムシの一種 *Lamellibrachia* sp. [1993年相模湾初島沖の水深約1200mの海底で採集 (0.19kg)], ヘイトウシンカイヒバリガイ *Bathymodiolus platifrons* [1998年相模湾初島沖の水深約1200mの海底で採集(0.57Kg)]およびサツマハオリムシ



Scheme 1

Lamellibrachia satsuma [1993 年鹿児島県駿河湾の水深約 110m の海底で採集 (0.13Kg)]を用いた。

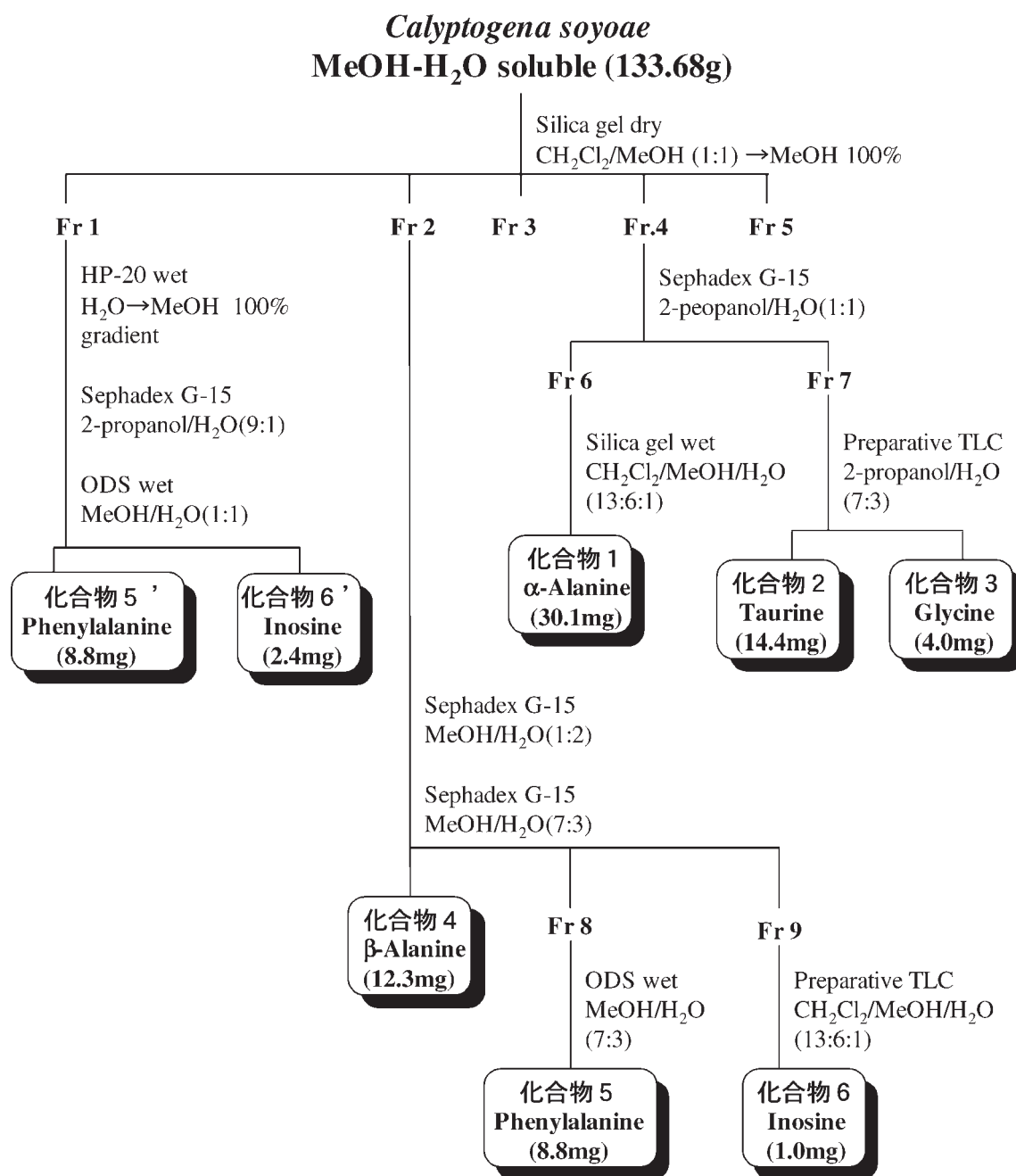
2.2 抽出・分配

冷凍保存されたシロウリガイを、室温中 MeOH で抽出した。得られた抽出液を、減圧下、40 度で濃縮乾固し、抽出物 (210g) を得た。抽出物を Scheme 1 に従い、含水 MeOH 中で、Hexane, CH₂Cl₂, n-BuOH で順次分配しそれぞれの可溶部を得、残りを MeOH-H₂O 可溶部とした。他の深海生物にもこれと同様の操作を行った。

2.3 化合物 1-7 の単離

シロウリガイの MeOH 可溶部 (133.68g) を Scheme 2 に従い、シリカゲルドライカラムクロマト (CH₂Cl₂-MeOH=1:1 → MeOH100% gradient) 分画した。TLC のニンヒドリン試薬の呈色を手掛かりに、各種カラムクロマトグラフィー (Silica gel, Sephadex G-15) および分取 TLC で精製し化合物 1-6 を単離した。

シロウリガイの n-BuOH 可溶部 (27.52g) を CH₂Cl₂-MeOH 系の溶媒を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex LH-20) を繰り返し行い、分取 TLC (CH₂Cl₂-MeOH=9:1) により化合物 7 を単離した。



Scheme 2

2.4 構造決定

1D (^1H , ^{13}C , DEPT) NMR および 2D (^1H - ^1H COSY, ^{13}C - ^1H COSY, HMBC, HMQC) NMR測定は, Pyridine- d_5 または D_2O に試料を溶解し, JEOL EX-400MHz spectrometer および Bruker DRX-500 spectrometer を使用した。Pyridine- d_5 は TMS を, D_2O では DSS [3-(Trimethylsilyl) propionic-2,2,3,3- d_4 acid, sodium salt] を内部標準とした。

2.5 生物活性試験

(1) ウニ受精卵卵割阻害作用

各サンプルを, MeOH に溶解 (10mg/mL) し, これを原液として倍々希釈して, 6 種の濃度系列を作った。活性の指標には vinblastine を用い, MeOH のみを control として, 同様な系列を作った。6 穴プレートに 1mL の人工海水とサンプルをそれぞれ注入, バフンウニ (*Hemicentrotus pulcherrimus*) 受精卵懸濁液 (2×10^3 cells/mL) を 4mL 添加し, 約 17 ~ 20°C でインキュベートした。約 80 ~ 120 分後に, control が 100% 第 1 卵割した時点で, 各サンプル濃度における卵割阻害率を求め, IC_{50} 値を算出した。

(2) マウスリンパ球白血病細胞 P388 (P388/S) および耐性細胞 (P388/ADR, P388/VCR) に対する殺細胞活性

白血病細胞 P388 を 1×10^4 cells/mL に調製し, 96 穴プレートに 200mL/well 分注した。37°C, 5% CO_2 インキュベーションで 24 時間培養後, 段階希釈したサンプルを

5mL/well 添加し, さらに, 72 時間培養後, MTT 法にて生細胞を染色し, DMSO で可溶化し吸光度を測定し, 生存細胞数を測定した。各サンプルの細胞増殖抑制率から IC_{50} 値を算出した。またアドリマイシン耐性細胞 (P388/ADR) およびビンクリスチン耐性細胞 (P388/VCR) では, それぞれ adriamycin および vincristine を 0.1, 0.4mg/well 存在させ, 親細胞と同様に IC_{50} 値を算出した。

(3) ヒト口腔類表皮癌由来細胞 KB (KB/S) および耐性細胞 (KB/VJ300) に対する殺細胞活性

KB 細胞を 2×10^4 cells/mL に調製し, 96 穴プレートに 200mL/well 分注した。37°C, 5% CO_2 インキュベーションで 24 時間培養後, 段階希釈したサンプルを 5mL/well 添加し, 耐性細胞 KB/VJ300 では 0.25mg/mL vincristine を含有させ, さらに 72 時間培養後, 遠心分離を行い, PBS, MeOH, 0.2% crystal violet solution, 1% SDS を加え, O.D (540nm) を測定した。各サンプルの細胞増殖抑制率から IC_{50} 値を算出した。

(4) インターロイキン 6 (IL-6) 依存性 (dep.) MH-60 細胞および非依存性 (inde.) MH-60 細胞に対する活性

dep. MH-60 2.5×10^3 cells/well に, IL-6 0.4U/mL (10% FCS) を加え調製した細胞液に, サンプル 5mL/well を添加した。37°C, 5% CO_2 インキュベーションで 3 日間培養した後, MTT 法で個体数を計測し, 細胞増殖抑

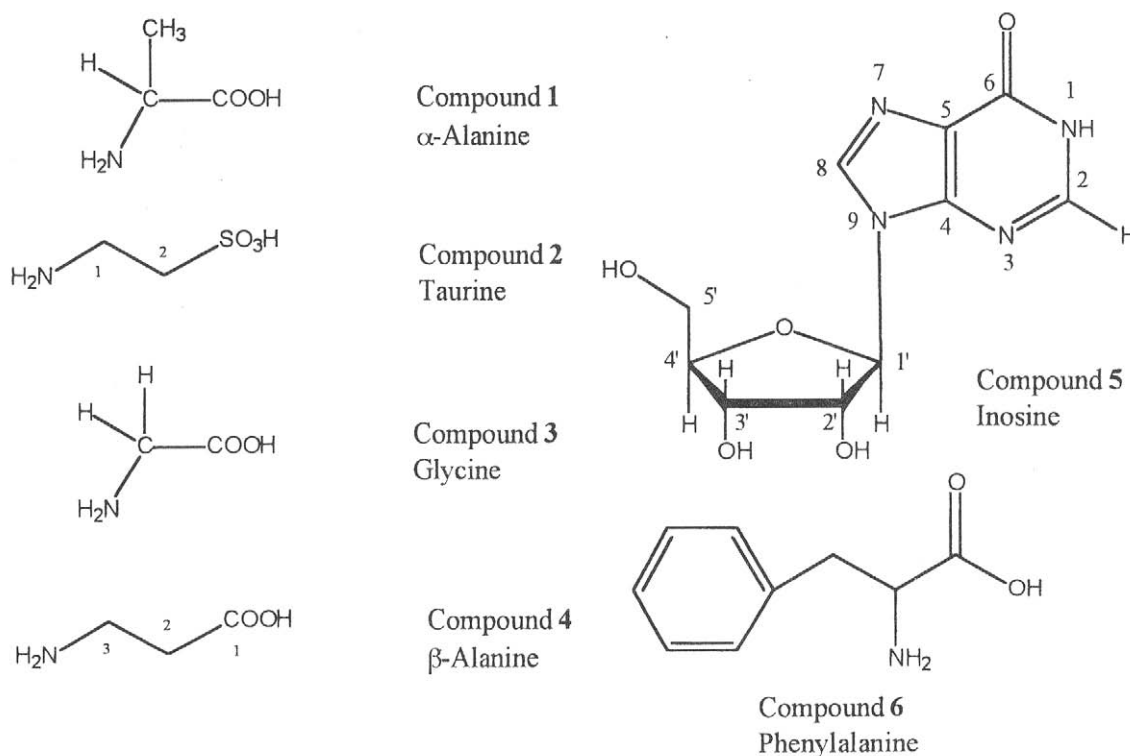


図 1 化合物 1-6 の構造)

Fig. 1 Structures of Compounds 1-6

制率からIC₅₀値を算出した。inde. MH-60活性に対しては、IL-6を加えず、dep. MH-60の場合と同様に処理した。

(5) ヒト組織球性リンパ腫U-937細胞に対する細胞毒性試験

96穴プレートにU-937細胞懸濁液(2×10⁴cells/mL)を100μLずつ分注し、37°C、5%CO₂インキュベーションで24時間培養後、段階希釈したサンプル溶液(DMSOまたはMeOHに溶解)2μLを添加した培養液をこの96穴プレートに100μLずつ添加し、48時間インキュベートした。次に、MTT法により細胞の生存率を求め、IC₅₀値を算出した。

3. 結果・考察

相模湾初島沖の水深1100mで採集した、深海生物シロウリガイ *Calymene soyoe* のMeOH抽出物の、極性成分であるMeOH-H₂O可溶部およびn-BuOH可溶部に着目し、分離を行った。

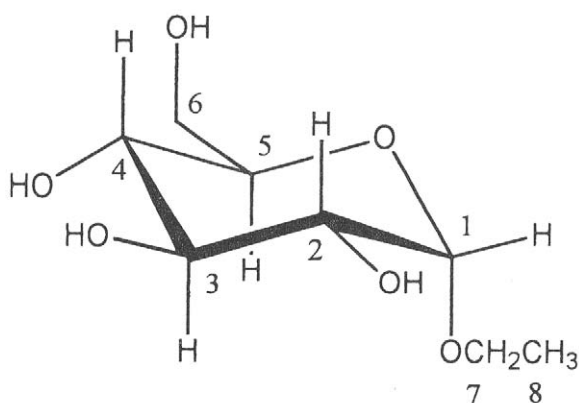


図2 化合物7 ethyl α-D-glucopyranosideの構造)
Fig. 2 Structure of Compound 7 ethyl α-D-glucopyranoside

3.1 α-Alanine (1), Taurine (2), Glycine (3), β-Alanine (4)および Phenylalanine(5)の同定

1-4は、TLC上でUV(254nm)に吸収を示さず、ニンヒドリン試薬でのみ検出された。1-5は、それぞれ、TLCのRf値および¹H NMR (D₂O)を標品と比較することにより、生体成分のα-Alanine, Taurine, Glycine, β-Alanineおよび Phenylalanineと同定した。1-6の構造をFigure 1に記す。

3.2 Inosine (6)の同定

各種分光学的データの結果を総合し構造を検討した。6は核酸構成成分であるInosine (m/z 268, C₁₀H₁₂N₄O₅)に相当していることが示唆され、TLCのRf値および¹H NMRを比較したところ標品と一致した。

3.3 Ethyl α-D-glucopyranoside (7) の構造決定

7 (67.1mg)は無色油状物として得られ、TLC上でUV(254nm)に吸収を示さず、アニスアルデヒド試薬でのみ検出された。各種分光学的データに基づいて構造を検討したところ、D-glucopyranosideの1位にethoxy基が結合していることが示唆され、H-1のケミカルシフト値δH 5.27 (J=3.71Hz)よりα位であることが判明した (Table 1)。これらの結果を総合し、7をα-D-glucopyranosideの誘導体であるEthyl α-D-glucopyranoside (m/z 208, C₈H₁₆O₆)と決定した(Figure 2)。

7は、既知化合物であるが今まで植物からのみ得られており、動物から得られたという報告はない。また、α-D-glucopyranosideより合成的に生成する報告もある。

3.4 生物活性

(1) 深海生物3種：シロウリガイ、ヘイトウシンカイヒバリガイおよびサツマハオリムシの抽出物および分配物について、ウニ受精卵卵割阻害活性およびヒト組織球性リンパ腫U-937に対する細胞毒性試験を行った。ウニ受精卵卵割阻害で毒性は認められなかった。またU-937細胞

表1 化合物7の重ピリジン溶液における¹Hおよび¹³C NMRデータ)
Table 1 ¹H and ¹³C NMR Data of Compound 7 in C₅D₅N

Position	δH	J (Hz)	δC	HMBC
1	5.27 (1H, d)	3.71	100.0	C-3, 5, 7
2	4.11 (1H, dd)	9.61, 3.72	73.8	C-1, 3, 4, 7
3	4.56 (1H, t)	9.14	75.4	C-1, 2, 4
4	4.17 (1H, t)	8.93	72.2	C-3, 5, 6
5	4.30 (1H, m)		74.1	C-1, 4, 6
6	4.35 (1H, dd)	11.48, 5.48	62.9	C-4, 5
	4.49 (1H, dd)	11.48, 2.34		
7	3.54 (1H, m)		63.3	C-1, 8
	3.94 (1H, m)			
8	1.14 (3H, t)	7.04	15.2	C-7

表2 深海生物の U-937 細胞に対する細胞毒性
Table 2 Cytotoxicity of Deep-Sea Animals against U-937 Cell

深海生物	IC ₅₀ (μg/mL)				
	MeOH extract	Hexane soluble	AcOEt soluble	n-BuOH soluble	MeOH-H ₂ O soluble
シロウリガイ	—	60.0	—	—	—
ヘイトウシンカイヒバリガイ	116.4	—	57.1	—	—
サツマハオリムシ	—	107.6	71.5	—	116.8

表3 深海生物の細胞毒性)
Table 3 Cytotoxicities of Deep-Sea Animals

Sample	IC ₅₀ (μg/mL)						
	P388			KB		MH-60	
	S ¹⁾	ADR ²⁾	VCR ³⁾	S	VJ300 ⁴⁾	IL-6 dep. ⁵⁾	IL-6 inde. ⁶⁾
シロウリガイ AcOEt soluble	—	—	—	—	—	—	—
	MeOH-H ₂ O soluble	98.3	109.4	10.1	—	—	—
	n-BuOH soluble	—	—	—	—	—	—
ハオリムシ	Hexane soluble	21.0	27.4	94.9	14.3	13.2	2.6
	AcOEt soluble	95.3	100.7	93.4	—	—	—
	MeOH-H ₂ O soluble	—	—	—	—	—	—

1)Parent cell 2)Resistant to vincristine 3)Resistant to adriamycin

胞に対して抽出物で細胞毒性は認められなかったが、分配することにより非活性が上昇した(Table 2)。すなわち、ヒバリガイの AcOEt 可溶部およびサツマハオリムシの AcOEt可溶部にそれぞれIC₅₀値57.1, 71.5 μg/mLという結果が得られた。この結果により、今後新たな有用物質が得られる可能性が考えられる。

(2) 深海生物シロウリガイ *Calypptogena soyoae* とハオリムシ *Lamellibrachia* sp. の抽出物および分配物についてのスクリーニングで興味ある細胞毒性を示した (Table 3)。すなわち、シロウリガイでは、MeOH-H₂O可溶部がP388のビンクリスチン耐性株(P388/VCR)に対して、IC₅₀ 値10.1μg/mLという強い活性を示した。ハオリムシでも、Hexane可溶部がP388の親株およびアドリアマイシン耐性株 (P388/ADR) に対して、それぞれIC₅₀ 値21.0, 27.4μg/mLという活性を示し、さらに他のヒト口腔類表皮癌由来細胞 KB と MH-60 細胞 (マウスリンパ節細胞とマウス形質細胞腫株をポリエチレングリコールにて細胞融合し、樹立された細胞株) に対しても強い細胞毒性を示した。

略語表

本論文中で使用する略語を以下にまとめた。

AcOEt : Ethyl acetate
ADM : Adriamycin
COSY : Correlation spectroscopy
DEPT : Distortionless enhanced by polarization transfer
EIMS : Electron impact mass spectroscopy
EtOH : Ethanol
FABMS : Fast atom bombardment mass spectroscopy
HMBC : ¹H detected multiple bond connectivity
HMQC : ¹H detected multiple quantum coherence
HPLC : High performance liquid chromatography
MeOH : Methanol
MTT : 3-(4, 5-Dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
n-BuOH : n-Buthanol
NMR : Nuclear magnetic resonance
ODS : Octadecyl silane
SDS : Sodium dodecyl sulfate
TLC : Thin-layer chromatography
VCR : Vincristine

(原稿受理：1999年12月24日)