

学位論文題名

Studies on linear peptides from the freshwater cyanobacteria of genus *Anabaena*

(淡水産ラン藻*Anabaena*属の直鎖ペプチドに関する研究)

学位論文内容の要旨

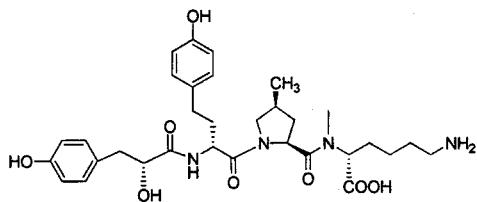
Cyanobacteria grow vigorously during algal blooms, release toxins and cause problems in eutrophication of lakes, reservoirs and rivers. These cyanobacteria supply a large number of peptides. Some of these peptides are linear and have protease inhibitory activities. Cyanobacterial extracts in the laboratory were explored, and several extracts exhibited promising protease inhibitory activities. The *Anabaena* species and its thrombin, cathepsin B and dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), and trypsin inhibitory activities were focused as the subject of the study.

The main objective of this study is to isolate and elucidate linear peptides with protease inhibitory activities from the cyanobacteria of genus *Anabaena*. The *Anabaena* are found in algal blooms, together with other cyanobacteria, and caused eutrophication of freshwater environments. The *Anabaena*, which are considered as wastes during algal blooms were utilized for research and medical purposes by exploring its protease inhibitory activities.

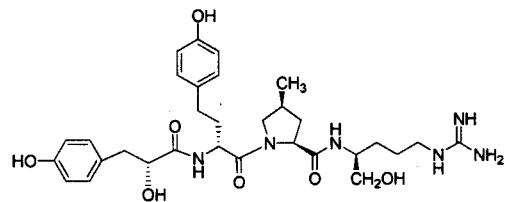
Two strains of *Anabaena*, *A. compacta* (NIES-835) and *A. heterospora* (NIES-1697) were found to be active from screening in the laboratory for thrombin and DPP IV inhibitory assays, respectively. These two species of *Anabaena* were worked out and pursued for isolation and structure elucidation of protease inhibitors. Also, previous screening done by Shirato in the laboratory for over 20 extracts of cyanobacteria for thrombin inhibitory assay showed extracts from *A. compacta* (NIES-835) gave positive result in thrombin assay and was pursued for isolation.

Cultures optimization of the active compounds from *A. compacta* was done for 36 days. The yield, thrombin inhibitory assay, and concentration of active compounds with *m/z* 613 were monitored every 3 days by LC-MS. The maximum yield with *m/z* 613-containing compounds with consistent % inhibition is at its best to harvest on 27-30 days.

Bioassay-guided investigation of the *A. compacta* extracts afforded linear peptides spumigin J and the known thrombin inhibitory spumigin A. The relative configuration of spumigin J was analyzed by advanced Marfey's methodology. Spumigin J inhibited thrombin with EC_{50} of 4.9 μM . The isolated spumigins J and A inhibit cathepsin B with EC_{50} 0.7 and 0.2 μM , respectively. Spumigins J and A were subjected to thrombin docking study using MM-GBSA methodology. The MM-GBSA predicted spumigin with 2S-4-methylproline as the better thrombin inhibitor.



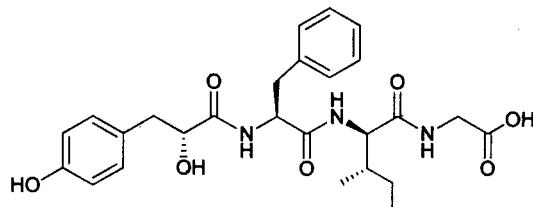
Spumigin J



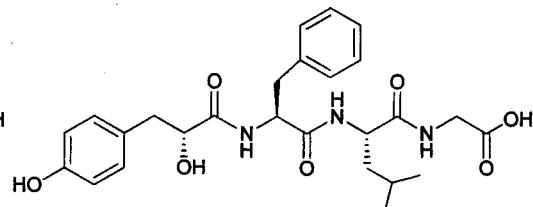
Spumigin A

This study also deals with the screening of cyanobacterial extracts for Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) inhibitory activity. The cyanobacterial extracts present in the laboratory were screened for the potential DPP IV inhibitory activity. The enzyme- substrate optimization was performed using varying amounts of DPP IV enzyme and substrate. The 149 fractions were extracted, which included 6 methanol extracts of *Anabaena* species. In the DPP IV inhibitory assay, using porcine kidney and Gly-Pro-MCA, the genera of *Oscillatoria*, *Phormidium* and *Microcystis* exhibited DPP IV inhibition. *O. agardhii* gave 95% DPP IV inhibition at high dose of 100 μ g/mL. The *A. heterospora* (NIES 1697) and *A. pseudocompacta* (NIES 1939) gave promising activity of 75% and 70%, respectively, at a lower dose of 10 μ g/mL. These two species of *Anabaena* are strong candidates for exploring novel protease inhibitors for further study. Both species are understudied and no known activities reported from literature.

Heterosporins A and B are linear peptides from the freshwater *A. heterospora* (NIES 1697). The structures of heterosporins were elucidated by interpretation of 1D and 2D-NMR. The linear sequence of heterosporins was deduced by FTMS/MS techniques. The overall stereostructures of the isolated compounds were analyzed by advanced Marfey's analysis, and HPLC-FTMS. Heterosporin, a new class of linear peptides isolated from *A. heterospora*, is composed of 4-hydroxyphenyllactic acid (*R*-Hpla), phenylalanine (L-Phe), D-*allo*-isoleucine or leucine (D-*allo*-Ile or L-Leu), and glycine (Gly). Heterosporins A and B have trypsin inhibitory activity at 4.87 μ M and 0.08 μ M, respectively.



Heterosporin A



Heterosporin B

学位論文審査の要旨

主査	准教授	沖野龍文
副査	教授	坂入信夫
副査	教授	中村貴義
副査	教授	松田冬彦
副査	助教	梅澤大樹

学位論文題名

Studies on linear peptides from the freshwater cyanobacteria of genus *Anabaena*

(淡水産ラン藻*Anabaena*属の直鎖ペプチドに関する研究)

シアノバクテリアは、富栄養化した湖沼・ダムなどで異常発生し、種によっては有毒物質を生産したり、異臭を発生したりするので、公衆衛生上あるいは景観上の問題となる。また、有毒物質以外にも、プロテアーゼ阻害物質などのペプチドを生産することで知られる。プロテアーゼ阻害物質がシアノバクテリアを分解する細菌に対して機能を有していることが示唆されており、生態における役割も興味深い。また、プロテアーゼ阻害物質は医薬品への応用も期待されるので、有害とされる生物の有効利用という観点からも興味深い。

申請者は、糖尿病の治療薬として有望視されているジペプチジルペプチダーゼ4阻害活性を指標に、多数のシアノバクテリア、大型海藻、海洋無脊椎動物の抽出物に対してスクリーニングを実施したところ、*Anabaena*属の数種シアノバクテリアに顕著な阻害活性を発見した。また、既に知られている*Anabaena*属のシアノバクテリアのトロンビン阻害活性も、その活性本体が明らかになっていないことに着目した。*Anabaena*属のシアノバクテリアは、アノトキシンなどの有毒物質を生産することで古くから知られているし、最近ではシデロフォアを生産することが報告されている。わずかであるが、プロテアーゼ阻害物質の報告もある。これらから判断すると、2次代謝産物が豊富であることが期待されるものの比較的研究が進んでいない属である。このことから、*Anabaena*属シアノバクテリアのプロテアーゼ阻害物質を探索することとした。

トロンビン阻害活性を示した*Anabaena compacta* (NIES 835)からは、活性物質として2種の化合物が得られた。しかしながら、2種とも相互変換するコンフォマーの存在のために複雑なNMRシグナルを示し、かつ単離後に再度分析すると複数のピークが現れることで異性化が行っていることが示唆されるなど、構造解析が困難であることが予想された。より活性の高い化合物は既知のspumigin Aであると判明したが、文献にはNMRのデータがなかつたり、立体が決定されていない部分があるなどの問題が残っていた。そこで、新規spumigin Jと共に立体配置も含めて決定した。特に、4-MePro残基については、可能な4種の異性体を合成して、立体配置を決定した。この種の化合物で完全にNMRを帰属したのは初めての

ことである。さらに、ドッキングスタディを行い、4-MeProの可能な異性体のうち2S体であることが活性に重要であることを明らかにした。

次に、ジペプチジルペプチダーゼ4阻害活性を示した*A. heterospora* (NIES-1697)から活性物質の単離を試みた。また、2種類の化合物を単離することに成功したが、残念ながらジペプチジルペプチダーゼ4阻害活性を示さなかった。その代わり、顕著なトリプシン阻害活性を示した。これらの構造決定も、spumigin類と同様に異性化が起きたために、困難を極めた。しかしながら、申請者の丹念な異性化反応の経時的追跡とNMRデータの解析により、Hpla、Phe、GlyとIleあるいはLeuをもつ直鎖のペプチドであることが判明した。立体化学をMarfey法およびキラルHPLCにより決定し、IleおよびLeu残基の部分で異性化が起きていることを明らかにした。

以上のように、申請者は、異性化により困難となった構造決定を見事にやり遂げ、spumigin類については酵素との結合様式も明らかにした。また、発表でも、異性化により複雑となっている状況をわかりやすく説明することができた。

これらの結果は、シアノバクテリアの化学的多様性をさらに明らかにしたものであり、酵素との相互作用も明らかにすることで、生物活性ペプチドの応用の実現にも重要な知見を与えたものである。

審査委員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院博士課程における研鑽や修得単位などもあわせ、申請者が博士（環境科学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。