

平成21年5月20日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19810015
 研究課題名（和文） ミトコンドリア特異的な天然物由来抗酸化剤開発と活性発現機構解明
 研究課題名（英文） The Development of Natural Antioxidants with Specific Activities to the Mitochondrial Biomembranes and the Clarification of their Bioactive Mechanism
 研究代表者
 土江 松美 (DOE MATSUMI)
 大阪市立大学・大学運営本部・技術職員
 研究者番号：90433317

研究成果の概要：粗抽出液が強い抗酸化活性を示した植物 *Trichilia cuneata* を本研究のターゲットとし、強い抗酸化作用を示す新規化合物類をはじめとした、計 12 種類の化合物の単離同定に成功し、そのラインナップを達成することができた。

さらに、その過酸化の阻害機構について、過酸化の連鎖反応中の特定部位をブロックする反応条件にてのミトコンドリアに特異的な抗酸化活性として比較検討を進めた。

一方で、本化合物全合成過程での反応中間体から、活性発現に有効な構造活性相関の情報を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	402,000	1,742,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	402,000	3,042,000

研究分野：天然物有機化学

科研費の分科・細目：化学・生物分子科学

キーワード：抗酸化活性、ミトコンドリア、膜酸化、天然物、メキシコ産トリキリア属植物、フラノエレモフィラン、

1. 研究開始当初の背景

すべての生物は、生命維持に必要なエネルギーを太陽光・食物等から得て、自身の“エネルギー変換システム”においてATPという形に変換して貯蔵し、これを必要に応じて加水分解することで生命活動を営んでいる。ミトコンドリアは真核生物においてこの酸化リン酸化反応の担い手であり、ここでエネ

ルギー要求量の80%以上がまかなわれている。このためミトコンドリアは大量の酸素を代謝し、これに伴い常時産生される数%の活性酸素は、ミトコンドリア内外にある細胞内抗酸化物質により速やかに代謝される。が、種々の要因によりこれら抗酸化機構のバランスが崩れたとき、この活性酸素はミトコンドリア自身に種々の悪影響を与える。中でも特にミトコンドリア膜は容易に脂質過酸化

を受け、膜機能を消失し、内膜のマトリックス構造の破壊から、その構造の崩壊を引き起して行く。ミトコンドリア自身はこれを防ぐかのように融合・分裂・増殖と形態を変化させるダイナミックな機構を持ち、アポトーシス誘導や細胞分化とも関連することが分かっている (B. Westermann, *Biochim. Biophys. Acta*, **2003**, *1641*, 195-202)。

また膜の過酸化に伴い、特に内膜の外側に結合したシトクロム *c* が放出され、これがアポトーシスの引き金を引く事も分かっている (P. Li, D. Nijhawan, L. Budihardjo, *Cell*, **1997**, *91*, 479-489)。

即ち、ミトコンドリアの膜構造の変化は、ダイナミックな動態を示しながら、その細胞の運命を制御する機能を有しているのである。さらにその遺伝子 DNA は、ヒストンによって守られていないため酸化変異しやすく、その障害はミトコンドリア膜の破壊と共に各種の疾患を引き起こし、その生物自体の生命までを奪う脅威を持っている。また、リン脂質の酸化生成物自身もアポトーシスの誘導や動脈硬化の発症に関与することが報告されている。

それゆえ、生命の運命を担う司令塔とも言うべきミトコンドリアについて、その脂質過酸化に対する有効な抑制物質を見出すことは、アポトーシスの機能解明をはじめ、動脈硬化症等の各種成人病、特に、現在有効な治療法が確立していない機能代謝障害や難病、しいては老化の予防と治療に光明を見いだすことになる。

2. 研究の目的

現在実用化されている抗酸化剤においては、合成品である BHA や BHT はその発癌性から敬遠され、専ら、天然物由来抗酸化剤の探索が精力的になされ、トコフェロールやフラボノイドやカロテノイド等の有効な化合物が報告されている。しかしこれらの化合物は、生体膜全般に対し、特にミクロソームやリポソームに対して有効な傾向があり、ミトコンドリアに対して特異的に有効なものほとんどない。

さらに今後の抗酸化剤の実用化では、供給の容易さが重要視され、原料生物が微生物のように大量培養が可能であるか、若しくは、短工程合成で量産可能なシンプルな化合物が有力候補となる。

そのため本研究代表者は、ミトコンドリア特異的抗酸化剤の探索の潜在的医薬資源を植物に求めた。なぜなら、植物は本来クロロフィルでの光合成で生じる膜脂質の過酸化防止のため有効な抗酸化性物質を有する可能性が高いからである。

この観点から、かつて研究代表者と共同研

究を進めていた三井化学株式会社は、古代文明繁栄の地であり豊富な天然資源からの伝承秘薬の文化をもつメキシコに焦点をあて、現地で購入同定した数種のメキシコ産植物について、抗酸化活性を指標にスクリーニングを実施した。

その結果を受け、本研究代表者は、その粗抽出液が強い抗酸化活性を示した植物 *Trichilia cuneata* を本研究のターゲットとした。

3. 研究の方法

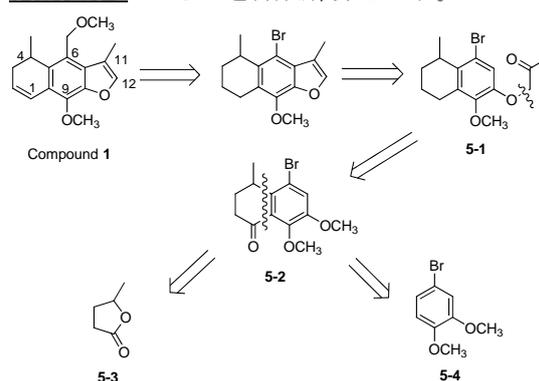
(1) 抽出、分離、精製

メキシコにて採集され、三井化学株式会社により現地で買付けられ、*Trichilia cuneata* として同定された樹皮及び葉の粉砕物 (900 g) を処理して、メタノール抽出物 (21.8 g) を得た。このメタノール抽出物をクロロホルムと水で分配し、得られた有機層について、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (クロロホルム / メタノール系)、次いで、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (ヘキサン / ジクロロメタン / メタノール系)、シリカゲルカラムクロマトグラフィ (ベンゼン / 酢酸エチル / メタノール系) と繰り返し、さらに各分画について、リサイクリング分取用 HPLC (LC-908 type; JAIGEL-H / クロロホルム、または ODS-SIL / メタノール / 水) を使用して、分子ふるいにより分離、精製することにより、化合物 **1** ~ **12** を単離した。

(2) 新規化合物 **1** の合成

単離した新規化合物 **1** についての合成研究を報告する。

Scheme 1 にその逆合成解析を示す。



Scheme 1 Retrosynthetic Analysis of Novel Compound **1**

ジヒドロ体の C 環へは、テトラヒドロ体から脱水素化反応を用いて誘導することとする。本化合物の合成アルキル化の可能な置換基として、C-6 位に臭素の入ったフラノエレモフィラン骨格を構築する必要がある。そ

ここでまず、B・C環骨格をもつテトラロン **5-2** を構築する事とした。テトラロン **5-2** からテトラヒドロ体へは適切な官能基変換を施しフラン環を構築することとし、テトラロン **5-2** へは、□-バレロラクトン **5-3** と 4-ブロモベラトロール **5-4** をカップリングし、分子内環化反応によりテトラロン **5-2** へと導くこととした。

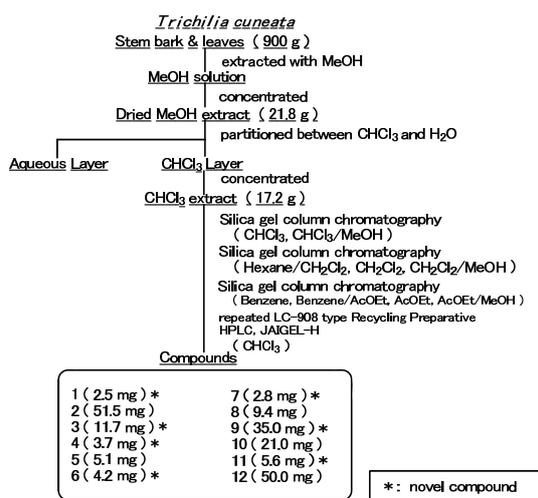
(3) 生理活性のアッセイ系

脂質過酸化の実験系としては、不飽和脂肪酸であるリノール酸の自動酸化を調べるのが一般的である。具体的には、60℃くらいで数日放置し、生じた過酸化脂質量を測定する。しかし、今回著者はより実際の生体内での活性に近い系を模索した結果、生体内での膜脂質に着目し、生体内で酸化反応の活発なミトコンドリア及びマイクロソームを調整し、実際の電子伝達にリンクしこれらの脂質の過酸化の抑制を調べる事とした。これらの器官での発達した電子伝達系では、呼吸によって吸収された酸素が電子受容体として用いられるため、酸素分圧も高く活性酸素が生理的に生成され、膜脂質は過酸化を受ける事になる。従って、その防止効果がある化合物は将来医薬品等へのリード化合物として利用できる可能性もあるからである。

4. 研究成果

(1) 化合物の単離同定結果

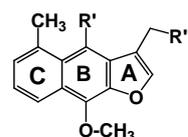
Scheme 2 に示した方法で処理することにより、化合物 1~12 を単離し、各々の化合物について、その構造を確定することができた。**(Figure 1)** このうち 8 個が新規化合物であった。



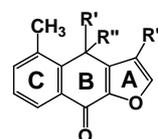
Scheme 2



	R'	R''
1	OCH ₃	CH ₃
3	X	CH ₂ OH
6	OH	X
7	X'	CH ₂ OH
9	OCH ₃	OH
	(X: OCO-CH=CH-CH ₃) H ₃ C	
	(X': OCO-CH=CH-CH ₃) CH ₃	



	R'	R''
2 (maturin acetate)	CHO	OAc
4	H	OH
10 (maturin)	CHO	OH
11	H	OAc



	R'	R''	R'''
5 (cacalonol)	CH ₃	OH	CH ₃
8 (maturone)	=O		CH ₂ OH
12 (maturinone)	=O		CH ₃

Fig. 1 Compounds 1~12 from *Trichilia cuneata*

(2) 化合物の抗酸化活性結果

今回著者はまず、ミトコンドリアでの実験系として NADH 依存の酵素的酸化の抑制作用をみることにした。ミトコンドリアの電子伝達系では電子が常に数%漏出しており、O₂⁻ が形成されているが、実験の正確性を上げるために電子伝達阻害剤である rotenone により電子を 100% 漏出させて脂質過酸化を起こさせた。即ち、複合体 I からの NADH 依存性の電子伝達が阻害される結果、複合体 I は還元状態となって酸素に直接電子を渡し、O₂⁻ を生成することになる。

このような反応系を利用して、ADP-Fe³⁺ 存在下で NADH を電子供与体としたミトコンドリア膜の過酸化に対し、各単離化合物による抑制作用を TBA 法を用いて測定した。一方マイクロソームについては、NADPH を電子供与体とした NADPH-シトクローム P-450 レダクターゼから漏出する電子によって還元されたキレート鉄と酸素の複合体が起こす脂質の過酸化に対する抑制作用を同様の TBA 法により調べた。結果を **Table 1** に示す。

(3) 化合物の活性部位についての抗酸化活性結果

さらに、著者が「3-(2) 新規化合物 1 の合成」の過程で得た合成中間体についても、前項と同様に抗酸化活性を測定した。その結

果について概論する。

Table 1 Antioxidative Activities of Compounds from *Trichilia cuneata*

Compounds	IC ₅₀ (μM)	
	Mitochondria	Microsomes
	NADH dependent	NADPH dependent
1	76.8	>100
2 (maturin acetate)	56.9	60.8
3	>100	>100
4	28.8	29.1
5 (cacalonol)	>100	>100
6	66.1	>100
7	>100	>100
8 (maturone)	58.1	41.0
9	>100	99.1
10 (maturin)	>100	>100
11	79.7	24.0
12 (maturinone)	71.7	74.4

まず合成中間体の抗酸化活性について明らかなのは、ナフトエレモフィラン系化合物の基本骨格である3員環(A, B, C環)の構造が活性発現には必須であろうということである。さらに、特にA環のフランのジヒドロ体に活性がなかったことから、フラン環の存在も必須であろうと推察された。

さらに、大変興味深いことは、天然物のC-4位とC-9位の置換基の位置が反転した、C-1位、C-6位の位置異性体においても、明確な抗酸化活性を示したことである。なぜなら著者は、これらの化合物が酵素的な酸化作用を抑制する点から考えて、酵素の阻害剤として基質と競合する形をとるにしろ、酵素と基質の複合体に関与するにしろ、また、酵素自身または基質や補酵素の構造のどこかに影響を与えて2次的に酵素活性を押さえているにしろ、天然物のC-4位、C-9位、C-11位という置換基の位置関係はかなり重要なポイントであろうと予想していたからである。逆に言うと、この位置関係が反転しても一定の活性を示したことにより、これらの化合物の作用は比較的ゆるい結合を介して空間的に余裕のある形で行われていることが推察される。

また、全体的に見て、天然物での置換基であるC-9位のメトキシ基、フラン環の水酸基及びアセチル基も必須の条件ではないらしく、C-6位が水酸基となっても、また、フラン環にメチルカルボニルエステルがついた化合物でも活性を示した事は興味深い。

今後は、今回のような *in vitro* の系から、*in vivo* の系での検討ならびに、さらに、天然物1に代表されるC環がジヒドロ体の化合物での特徴的な抗酸化活性発現について

も、今回と同様に、さらに位置異性体を調製し、検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

① Iwagawa Tetsuo, Hashimoto Kanta, Yokogawa Yukiko, Okamura Hiroaki, Nakatani Munehiro, Doe Matsumi, Morimoto Yoshiki, Takemura Kaoru; Cytotoxic Biscembranes from the Soft Coral *Sarcophyton glaucum*, *Journal of Natural Product*, 10.1021/np8003485(Web) **2009**, (査読有)

② Fujiwara Nagatoshi, Nakata Noburo, Naka Takeshi, Yano Ikuya, Doe Matsumi, Chatterjee Delphi, McNeil Michael, Brennan Patrick J., Kobayashi Kazuo, Makino Masahiko, Matsumoto Sohki, Ogura Hisashi, Maeda Shinji; Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*, *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3613-3621, **2009**, (査読有)

③ Iwagawa Tetsuo, Miyazaki Miho, Yokogawa Yukiko, Okamura Hiroaki, Nakatani Munehiro, Doe Matsumi, Morimoto Yoshiki, Takemura Kaoru; Aplysinopsin dimers from a stony coral. *Tubastraea aurea*, *Heterocycles*, 75(8), 2023-2028, **2008**, (査読有)

④ Kipassa Nsiama Tienabe, Iwagawa Tetsuo, Okamura Hiroaki, Doe Matsumi, Morimoto Yoshiki, Nakatani Munehiro; Limonoids from the stem bark of *Cedrela odorata*, *Phytochemistry(Elsevier)*, 69(8), 1782-1787, **2008**, (査読有)

⑤ Kipassa Nsiama Tienabe, Okamura Hiroaki, Doe Matsumi, Morimoto Yoshiki, Iwagawa Tetsuo, Nakatani Munehiro; Three mexicanolides from the root bark of *Entandrophragma angolense*, *Heterocycles*, 75(1), 157-164, **2008**, (査読有)

⑥ Mizuhara Naoko, Usuki Yoshinosuke, Ogita Masaki, Fujita Ken-Ichi, Kuroda Manabu, Doe Matsumi, Iio Hideo, Tanaka Toshio; Identification of phoslactomycin E as a metabolite inducing hyphal morphological abnormalities in *Aspergillus fumigatus* IFO 5840, *Journal of Antibiotics*, 60(12), 762-765, **2007**, (査読有)

⑦ Uruma Yoshiyuki, Sakamoto Kei, Takumi Kohei, **Doe Matsumi**, Usuki Yoshinosuke, Iio Hideo; Assignment of ^{13}C NMR spectrum for blepharism C based on biosynthetic studies, *Tetrahedron*, 63(25), 5548-5553, 2007, (査読有)

⑧ Fujiwara Nagatoshi, Nakata Noburo, Maeda Shinji, Naka Takeshi, **Doe Matsumi**, Yano Ikuya, Kobayashi Kazuo; Structural characterization of a specific glycolpeptidolipid containing a novel N-acetyl-deoxy sugar from *Mycobacterium intracellulare* serotype 7 and genetic analysis of its glycosylation pathway, *Journal of Bacteriology*, 189(3), 1099-1108, 2007, (査読有)

⑨ Isobe Takahiko, **Doe Matsumi**, Morimoto Yoshiki, Nagata Kumiko, Masuoka Noriyuki, Ohsaki Ayumi; Structural analysis and biosynthesis gene cluster of an antigenic glycopeptidolipid from *Mycobacterium intracellulare*, *Yakugaku Zasshi*, 127(2), 389-395, 2007, (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

① 瀬田梢、宮本顕範、田原由樹、梶間由幸、吉岡康一、**土江松美**、臼杵克之助、飯尾英夫；自己防御物質クリマコストールの構造活性相関；

日本化学会第 89 春季年会；2009. 3/27～3/30；千葉

② Mizuno Seiko, Naka Takeshi, Kobayashi Kimiko, **Doe Matsumi**, Maeda Shinji, Fujiwara Nagatoshi; Structural analysis of sphingoglycolipid from *Basidiomycota*；

BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年會・第 80 回日本生化学会 合同大会)；2007. 12/11～12/15；神奈川

③ 梶間由幸、阪本圭、内匠浩平、**土江松美**、臼杵克之助、飯尾英夫；自己防御物質ブレファリズミン-C の ^{13}C NMR の帰属；

2007 年日本化学会西日本大会；2007. 11/10～11/11；岡山

④ 梶間由幸、阪本圭、内匠浩平、**土江松美**、臼杵克之助、飯尾英夫；生合成研究を用いたブレファリズミン-C の ^{13}C NMR の帰属；

第 49 回天然有機化合物討論会；2007. 9/19～9/21；北海道

⑤ Mizuhara Naoko, Usuki Yoshinosuke, Ogita Masaki, Fujita Ken-Ichi, Kuroda Manabu, **Doe Matsumi**, Iio Hideo, Tanaka Toshio;

Structure and Biological Activities of Metabolites Produced by *Streptomyces sp.* Inducing Hyphal Morphological Abnormalities in *Filamentous Fungi*;

The 11th OCU International Conference；2007.8/3；Osaka

⑥ 水原尚子、臼杵克之助、小北真生、藤田憲一、黒田学、**土江松美**、飯尾英夫、田中俊雄；

放線菌が生産する糸状菌の菌糸における形態異常誘起物質の構造と生物活性；

日本ケミカルバイオロジー研究会第 2 回年会；2007. 5/9～5/10；京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土江 松美 (DOE MATSUMI)

大阪市立大学・大学運営本部・技術職員

研究者番号；90433317

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし