

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：19850020

研究課題名（和文） 伝承薬物の有効利用を目指した化学と生物の融合領域研究

研究課題名（英文） Chemical and biological study for effective application of traditional medicinal resources

研究代表者

金子 雅文（KANEKO MASAFUMI）

高崎健康福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：50433636

研究成果の概要：ブラジル原産の伝承薬 *T. avellanedae* の細胞を培養することにより抗がん活性をもつ 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione (NQ801) を効率的に生産する方法の開発を行った。この化合物あるいは *T. avellanedae* の抽出物を用い、様々な腫瘍細胞に対する毒性試験、がん初期抗原発現抑制試験、マウスを用いた抗腫瘍活性試験を行った。その結果、本植物の医薬素材としての応用の可能性が広がった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,350,000	0	1,350,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	405,000	3,105,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード： *Tabebuia avellanedae*、Taheebo、補完代替医療、がん化学予防、NFD、カルス、後発がん促進

1. 研究開始当初の背景

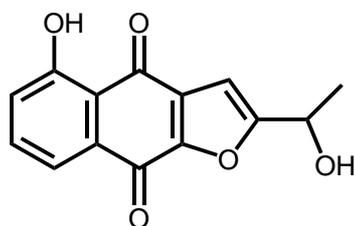
天然物化学といえば、伝承的に病気の治療に用いられていた動植物や海洋生物、微生物起源の有用な活性成分の探索とその構造解明が主要な研究テーマであった。また、これらの成分を人工的に作るため合成化学が始まり、医薬品、農薬、その他の化学工業の発展が遂げられてきた。今日の天然物化学は、天然資源からの新しい医薬素材、機能性素材のターゲット探しの点で重要な役割を担っているが、これまでの研究で膨大な数の化合

物の構造が明らかにされ、新規な骨格を有する化合物を発見するのは、極めて困難になってきている。このような背景の中、かつての単離、構造決定などの化学構造研究から脱却して、生命現象に関わる物質の機能解明や、物質生産に関する化学的機構の解明など、化学の視点から生物の現象を捉えようとする研究が活発になってきた。また、入手困難で貴重な天然資源を有効利用するための試みも重要である。そこで申請者は、南米で伝統的に用いられている伝統薬物の有効成分の

化学的証明とその生合成を明らかにすると共に、遺伝子工学的手法を用いた生合成遺伝子解明、遺伝子組換えによるコンビナトリアル生合成の実現を目標とした本研究を企画した。

2. 研究の目的

Tabebuia avellanedae は、ブラジルから南アメリカにかけた南アメリカに自生する樹木で、古代インカでは Tahebo と呼ばれ、その樹皮は、抗がん、抗炎症、抗ウイルス、鎮痛、利尿、解毒作用があるとされている。*T. avellanedae* の成分研究において、抗発がんプロモーション活性を示す NQ801 (図1) をはじめとするフラノナフトキノン類を含有していることが知られており、*T. avellanedae* のカルスや培養細胞懸濁液からは、高い収率でこのフラノナフトキノン類が得られることが明らかにされている。



5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-
naphtho[2,3-b]furan-4,9-dione
(NQ801)

図1. NQ801 の化学構造

NQ801 はその構造から、ポリケチド (ポリケチド) 合成酵素 (PKS) によるポリケチド合成を経由し、その後の分子内アルドール反応、および Claisen 反応による環化と芳香族化によって達成されていると考えられる。しかしながら、ポリケチド合成の反応開始に用いられるスターターユニットの種類や炭素鎖伸長の順序については不明である。これまでに多環式芳香族化合物を合成するポリケチド合成経路に関しては、植物や *Penicillium* 属由来のアントラキノン合成経路や、*Streptomyces* 属由来テトラヒドロキシナフタレン合成経路、*Streptomyces* 属のテトラサイクリン類の合成経路が知られているが、植物におけるナフトキノン類の合成経路は明らかとなっていない。また、NQ801 が構造中に持つフラン環の合成がどのような反応機構で達成されているか非常に興味を持たれる。本研究で *T. avellanedae* のフラノナフトキノン類の生合成経路を明らかにすると共に、その酵素遺伝子をクローニング、大腸菌や酵母

等の異種生物で発現させることにより工業的応用の可能性を探ることも目的としている。クローニングされた生合成遺伝子に変異導入や組換え、他の修飾酵素遺伝子と組み合わせることにより、効率的な物質生産や、天然には存在しない“非天然型”天然物の創製を可能とするコンビナトリアル生合成へと展開することも可能となる。さらに、このような系で生産された化合物の薬理効果を評価し、医薬のリード化合物としての応用も検討する。

3. 研究の方法

T. avellanedae の成分研究に関して、樹皮のメタノール抽出物を各種クロマトグラフィー、HPLC 等を用いて精査し、フラノナフトキノンの関連化合物を合成中間体も含め単離、構造決定する。同時に種子を植物ホルモンを添加した Murashige-Skoog 培地で培養することにより、カルスを形成。さらに液体培地で振とう培養することにより懸濁培養細胞を作成し、フラノナフトキノンを経率的に得るための条件を検討する。培養細胞系で効率よく安定にフラノナフトキノンを提供できれば誘導体化や詳細な構造解明の材料としての利用が容易となるはずである。また、¹³C でラベルした酢酸ナトリウムを培地中に添加することにより、ラベル化フラノナフトキノンを得ることができ、ラベル化の位置を解析することにより、その生合成解明に非常に重要な手がかりとなることが期待される。すなわち、[1-¹³C]-酢酸あるいは [2-¹³C]-酢酸を取り込ませ、¹³C-NMR スペクトルやマスマスペクトルを解析することにより、酢酸ユニットがどのような順序で縮合しているかが明らかとなり、[1,2-¹³C]-酢酸を取り込ませるダブルラベル化を行うことにより酢酸ユニットが切れずにそのまま取り込まれているか、あるいは伸張したポリケチド鎖がいったん開裂してフラノナフトキノン骨格が形成されているかを推察することができる。このような情報を元に、閉環の様式や、その後の酸素官能基の導入、還元機構を予想する手がかりを得る。

培養細胞代謝産物を LC-MS で分析し、NQ801 含量が増加する細胞培養法の開発を試みた。一方で、*T. avellanedae* の培養細胞より mRNA を抽出、逆転写後、既知のポリケチド合成酵素 (PKS) 遺伝子の配列の保存領域を基に設計したプライマーでフラノナフトキノン合成に関与する PKS 遺伝子の一部を取得する。3', 5'-RACE 法により全長の配列を明らかにすると共に、サザンプロットによ

り PKS 遺伝子周辺領域の遺伝子配列、遺伝子クラスターを明らかにする。明らかとなった遺伝子を PCR によって増幅、制限酵素サイトを付加し、pET システムなどの大腸菌の発現ベクターあるいは酵母用の発現ベクターに組み込む。酵素タンパクを宿主で発現させ、酵素を精製後、得られたフラノナフトキノ合成酵素の *in vitro* の活性を確認する。ところで、コンビナトリアル生合成の実現を一つの目標としている本研究にとって、PKS の基質に対する特異性は非常に重要なファクターである。数多くの反応基質を取り込む能力を PKS に付与することができれば、添加する基質の種類によって最終的な生成物の構造を作り分けることが出来るはずである。そのための基礎データ取得のため、スターター基質となる脂肪族あるいは芳香族の CoA エステルを反応系中に添加し、得られた PKS の基質に対する寛容性と速度パラメーターを明らかにする。フラノナフトキノ合成酵素の構造については、X 線結晶構造解析あるいはホモロジーモデリング等の手法を用いて解明し、反応に關与するアミノ酸残基を特定する。反応の基質結合部位の構造が明らかとなれば、自ずと反応に關与できる基質の構造が規定されるわけである。明らかとなった活性部位や基質結合部位、および反応場の空間を形成するアミノ酸に変異を導入することにより、フラノナフトキノ合成酵素の基質特異性、ポリケチド鎖伸長の回数の変更を行うことで、望みの基質を反応させた有用な物質の生産が可能となると期待できる。

本研究で *T. avellaneda* のフラノナフトキノ類の生合成経路を明らかにすると共に、その酵素遺伝子をクローニング、大腸菌や酵母等の異種生物で発現させることにより工業的応用の可能性を探ることも目的としている。クローニングされた生合成遺伝子に変異導入や組換え、他の修飾酵素遺伝子と組み合わせることにより、効率的な物質生産や、天然には存在しない“非天然型”天然物の創製を可能とするコンビナトリアル生合成へと展開することも可能となる。さらに、このような系で生産された化合物の薬理効果を評価し、医薬のリード化合物としての応用も検討する。生物活性評価に関しては、天然由来あるいは合成した化合物を用い、各種がん細胞に対する毒性試験、がん初期抗原発現抑制試験、マウスを用いた抗腫瘍活性試験を行った(図2)。さらにこれらの医薬資源のヒトカルシノーマに対する小規模な臨床試験もおこなった。

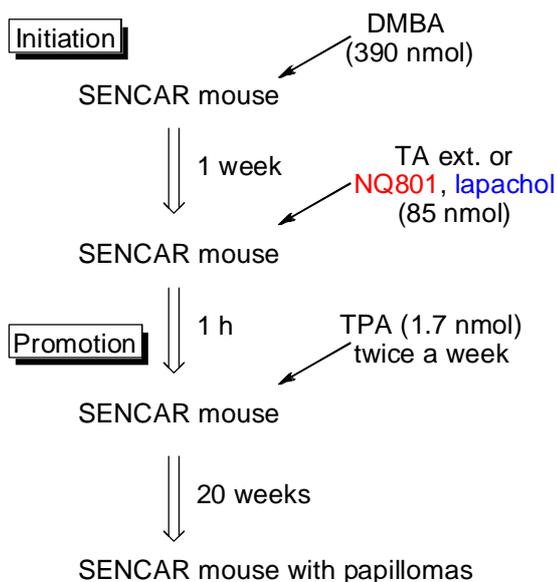


図2. マウスを用いた抗腫瘍活性試験

4. 研究成果

ブラジル原産の伝承薬 *T. avellaneda* より誘導したカルスを様々な条件下で培養することにより NQ801 を効率的に生産する方法の開発を行った。*T. avellaneda* の葉より抽出した mRNA をもとに RT-PCR を行い cDNA ライブラリーを作成した。このライブラリーを鋳型として、既知の型 PKS の保存領域の配列をもとにして設計したプライマーを用い PCR 法で数種の型ポリケチド合成酵素の部分配列を取得、その解析を行った。*T. avellaneda* の詳細な生物活性の評価のために、エタノール抽出物を各種クロマトグラフィーにかけて得られた分画について、LCMS-IT-TOF により分析を行い、NQ801 の類縁化合物を多く含むフラクションを明らかにした。このフラクションを分取 HPLC により精製し、各種スペクトル解析により NQ801 類縁化合物群の構造の解明を試みた。生物活性評価に関しては、天然由来あるいは合成した化合物を用い、各種がん細胞に対する毒性試験、がん初期抗原発現抑制試験、マウスを用いた抗腫瘍活性試験を行った。さらにこれらの医薬資源のヒトカルシノーマに対する前臨床試験もおこなった。

その結果、*T. avellaneda* 抽出物と NQ801 が乳がん細胞 MCF-7 に対して、濃度依存的に増殖抑制効果を示すことを見出した。細胞毒性に関しては、抽出物では微弱な活性であったが、そこに含有する主たる活性成分である NQ801 については強い活性がみられた。また、小規模な臨床試験においても *T. avellaneda* 抽出物がヒトカルシノーマに対して治療効果を示すことが明らかとなった。*T.*

avellanedae 由来成分の効率的生産法の開発と、その生物活性の解明により、本植物の医薬素材としての応用が期待される。

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 1件)

Stereoselective Synthesis and Cytotoxicity of a cancer Chemopreventive Naphthoquinone from *Tabebuia avellanedae*; Mitsuaki Yamashita, Masafumi Kaneko, Akira Iida, Harukuni Tokuda, and Katsumi Nishimura; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6417-6420 査読有り

[学会発表](計 3件)

金子雅文ほか4名、ブラジル原産 *Tabebuia avellanedae* 由来成分の抗腫瘍活性、日本薬学会第129年会、2009年3月26日、国立京都国際会館

金子雅文ほか3名、南米産伝統薬物 *Tabebuia avellanedae* エキスの抗腫瘍効果、日本生薬学会第55回年会、2008年9月19日、長崎大学

金子雅文ほか 3 名、ブラジル原産 *Tabebuia avellanedae* 由来成分の構造と生物活性、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月 26 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 雅文 (KANeko MASAFUMI)
高崎健康福祉大学・薬学部・准教授
研究者番号：50433636

(2)研究分担者

(3)連携研究者