

機関番号：34512

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590046

研究課題名(和文) 生物活性物質のハイスループット活性予測法の開発と応用

研究課題名(英文) Development and application of the high-throughput prediction method of activity for the bioactive substances

研究代表者

小山 淳子 (KOYAMA JUNKO)

神戸薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：60102109

研究成果の概要(和文): キノン、フラボノイド、リグナン、アルカロイド等の抗発がんプロモーター活性、抗菌活性、抗炎症活性ならびに抗アレルギー活性を測定し、それらの活性とサイクリックボルタンメトリーによって得た酸化還元電位との間により相関を認めた。この相関の一般性を明らかにすることは、簡単な物理的測定により、*in vitro*での活性実験をすることなく、化合物の生物活性の有無の予測を可能にすると考えられる。結果として、酸化還元電位はよいパラメーターであることが示唆された。

研究成果の概要(英文): The biochemical activities (anti-promoter of tumor, anti-bacterial, anti-inflammatory, and anti-allergic activities) of quinones, flavonoids, lignans, and alkaloids were determined. Good correlation was found between the activities and the oxidation-reduction potentials by a cyclic voltammetry. It was thought that elucidating the generality of these correlations enabled a prediction of the bioactivity of compound by the physical measurement without *in vitro* assay. As for the result, the oxidation-reduction potential was suggested that it was a good parameter.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：分析化学、生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、国民全体の衛生状態の向上や栄養状態の改善などを背景に、日本人の平均寿命が急速に伸び、がんをはじめとする加齢性疾患が深刻な医療社会問題となってきた。

1981年以来、がんは我が国の死亡原因の第1位を占め、がんの死亡率はさらに増え続けると予測されている。これまで日本においては早期発見、早期治療ががんの予防対策であったが、もう少し積極的な化学予防の研究が、

我が国でもようやく本格的に始まった。毒性のない化合物を長期に服用することにより、臨床的にがんの発症を遅延し、抑制し、予防しようというものである。特に安全性の面から食品、民間薬などが精力的に研究されている。がん予防物質の探索においては、1次スクリーニングの1つとしてRaji細胞を用いた12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) の活性化抑制効果を指標とした抗発がんプロモーター活性試験が行われている。

(2) 日本国民の約3人に1人がアレルギーなどの炎症疾患をもつといわれ、特に花粉症患者はその半数を占めることから、抗花粉症薬の開発は焦眉の急務となっている。抗アレルギー・抗炎症活性物質の探索では、ヒト好塩基球細胞を用いたケミカルメディエーター遊離抑制試験や、慢性炎症に重要な因子である一酸化窒素 (NO) を標的とした免疫担当細胞の機能抑制試験などが行われている。しかし、上記のがん予防や抗アレルギー・抗炎症において、これらの活性測定試験では細胞培養の設備と技術を必要とするため、より簡便、迅速で汎用性に優れた方法が求められている。

(3) これまでに我々は、いくつかのアントラキノン類、ナフトキノン類、アザキノン類について EBV-EA 活性化抑制試験を用いた抗発癌プロモーション効果の評価や、抗菌活性試験を行ってきた。また、それと同時に電子的諸性質を CAChe MOPAC プログラムの PM3 法を用いて計算し、EBV-EA 活性化抑制効果や抗菌活性との間に良い相関性があることを見出した。さらにサイクリックボルタンメトリー法を用いてキノン部に基づく酸化還元電位を測定し、EBV-EA 活性化抑制効果や抗菌活性と還元電位との間に良好な相関があることを見出した。また、アレルギー・炎症は活性酸素と関連が深いといわれていることより、酸化還元電位と相関性があるに違いないと考えられる。

2. 研究の目的

(1) キノン類は細胞内で呼吸鎖における電子伝達系物質の1つであり、重要な生理活性物質であるユビキノ、メナキノ、プラストキノ、ビタミン K1 などがある。このようにキノン類は酸化還元反応と密接な関係があることから、酸化還元電位を測定する研究や、生体内での電子伝達系における酸化還元電位とキノン類関連の研究は多い。しかし、キノン類の薬理活性と酸化還元電位との相関研究は少なく、化合物を系統的に検討しているも

のは殆どない。当該研究は酸化還元電位と EBV-EA 活性化抑制活性効果 (抗発がんプロモーター抑制活性)、ならびに NO やケミカルメディエーター産生抑制活性 (抗アレルギー・抗炎症活性) との間における相関性を見出すことを一つの目的とする。

(2) さらにサンプル数を増やすことでその規則性の一般性を明らかにし、*in vitro* での活性実験を行うことなく、簡単な物理的測定により、種々の化合物のがん予防効果や抗アレルギー、抗炎症活性効果などの生物活性の有無の予測を可能にするための解析パラメーターの開発と評価を目的とする。

将来的には、電子伝達系が関与すると考えられる全ての生理学的活性の予測に応用できると考える。

3. 研究の方法

(1) *Tabebuia impetiginosa* から単離されたフラノナフトキノン類は強い細胞増殖阻害活性を有し、がん細胞に特異的に働く作用があることがわかった。そこでまず、チオナフトキノン類やアザキノン類などのヘテロキノン誘導体の合成を行うことを計画した。また、植物からのキノン類の単離を行い、サンプル数を多く確保する。

(2) 植物からのフラボノイド類、リグナン類、アルカロイド類の単離を行い、サンプル数を多く確保する。

(3) 得られた化合物について、EBV-EA 活性化抑制効果、抗炎症活性、抗アレルギー活性等の生物学的活性試験を行う。

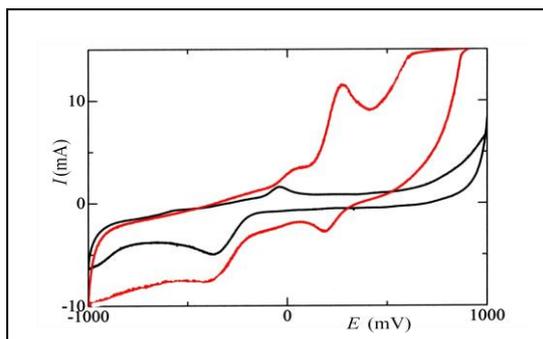
(4) サイクリックボルタンメトリー法を用いて、酸化還元電位を測定する。上記の活性値と酸化還元電位との相関性を求める。

(5) さらに、電子的諸性質を CAChe MOPAC プログラムを用いて計算し、酸化還元電位以外のパラメーターを考慮することにより信頼性の高い活性予測の一般則になりうるように検討する。

4. 研究成果

(1) イソキノリンアルカロイドであるプロトベルベリン類について酸化還元電位の測定を行うと同時に電子的諸性質を CAChe MOPAC プログラムを用いて計算した。さらに EBV-EA 活性化抑制効果、38 Human Cancer Cell への細胞毒性、抗菌活性に対して、酸化還元電位、物理的諸性質との相関関係をそれぞれ検討した。その結果、3種の活性はともにプロトベルベリン類の第1還元電位との間に相関を認め、パラメーターとして電子的諸性質の steric エネルギー、LUMO、HOMO エネルギーなどを重回帰分析に加えることによりさらに良い相関が得られた。このことより、キノン類だけでなくプロトベルベリン類に

においても還元電位が生物活性効果の有無を予測するためのパラメーターとして有用であることが示唆された。



プロトベルリン類のサイクリックボルタモグラム

(2) ヒト由来慢性骨髄性白血病細胞株 KU812 細胞から放出されるケミカルメディエーターのうち、臨床マーカーとなりうるヒスタミン、プロスタグランジン(PG)_{D2}を選び、それらの放出抑制率を指標とした新しい抗アレルギー評価法を確立した。

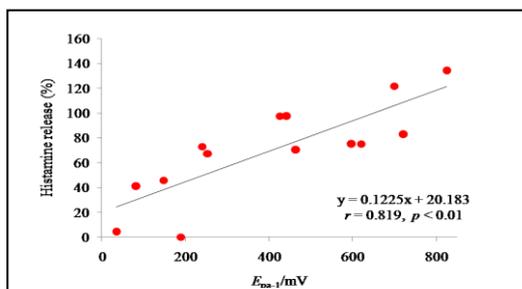
①まず、LC-ESI-MS/MSによる活性アミン類を測定し、特にその中のヒスタミンについて測定法を確立した。

②アラキドン酸カスケードに属する化合物のうち、KU812 からのケミカルメディエーター放出実験において、指標として十分な量を有する化合物はヒスタミン、PGD₂であることを確認した。

③LC-MS/MSにおいて、ヒスタミンは positive ion mode、PGD₂は negative ion mode で分析するが、単独で分析すると所要時間が長くなるため、異なるイオンモードの化合物の同時分析法を検討した。その結果、時間の短縮、操作の簡便化に成功した。

④確立した新しい分析法を用いて、フラボノイド類、リグナン類および抗アレルギー活性を持つと考えられる植物エキスの抗アレルギー活性試験を行った。

⑤フラボノイド類、リグナン類の酸化還元電位を測定し、その第1酸化電位と抗アレルギー活性との間の相関を検討したところ、相関が認められた。



Histamine 放出抑制効果とフラボノイド類の第1酸化電位との相関

(3) イオウ、チツソ、酸素原子をもつヘテロキノンを合成し、38 Human Cancer Cell への細胞毒性を測定した。その活性値と還元電位との相関を検討した結果、良い相関が得られた。さらに、LUMO エネルギーや log P を重回帰分析に加えることによりさらに良い相関が認められた。

(4) 強い EBV-EA 活性化抑制効果を有するアントラキノンのエモジンについて更に強い活性を持つ化合物をみつけるため、Raji 細胞内における活性代謝物を LC-APCI-MS/MS を用いて検索し、エモジンより強い活性を持つ酸化体が代謝産物の中に存在することがわかった。これらの化合物を合成し、EBV-EA 活性化抑制効果を測定すると同時にその酸化還元電位を測定し、両者の値に相関性があることを確認した。

(5) リグナン類、キノン類の NO 産生抑制活性試験を行った。

さらにサンプル数を増やす必要があるが、以上のことより、ポリフェノール類やイソキノリン類の活性を予測するためのパラメーターとして、酸化還元電位が有用であることが示唆されたと考える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① [Junko Koyama, Izumi Morita, Takao Yamori](#), Correlation between Cytotoxic Activities and Reduction Potentials of Heterocyclic Quinones, *Molecules*, 査読あり, 15, 2010, 6559-6569.
- ② [Yumi Nishiyama, Kinuko Iwasa, Suguru Okada, Sousuke Takeuchi, Masataka Moriyasu, Miyoko Kamiguchi, Junko Koyama, Atsuko Takeuchi, Harukuni Tokuda, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya, Kazuyoshi, Takeda, Yi-Nan Liu, Pei-Chi Wu, Kenneth F. Bastow, Toshiyuki Akiyama, Kuo-Hsiung Lee](#), Geranyl Derivatives of Isoquinoline Alkaloids Show Increased Biological Activities, *HETEROCYCLES*, 査読あり, 81, 2010, 1193-1229.
- ③ [Kinuko Iwasa, Wenhua Cui, Teturo Takahashi, Yumi Nishiyama, Miyoko Kamiguchi, Junko Koyama, Atsuko Takeuchi, Masataka Moriyasu, and Kazuyoshi Takeda](#), Biotransformation of Phenolic Tetrahydroprotoberberines in Plant Cell Cultures Followed by LC-NMR, LC-MS, and LC-CD, *J. Nat. Prod.*, 査読あり, 73, 2010, 115-122.

- ④ J. Koyama, A. Takeuchi, I. Morita, Y. Nishino, M. Shimizu, M. Inoue, N. Kobayashi, Characterization of emodin metabolites in Raji cells by LC-APCI-MS/MS, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読あり, 17, 2009, 7493-7499.
- ⑤ J. Koyama, A. Takeuchi, C. Tode, M. Shimizu, I. Morita, M. Nobukawa, M. Nobukawa, N. Kobayashi, Development of an LC-ESI-MS/MS method for the determination of histamine: Application to the quantitative measurement of histamine degranulation by KU812 cells. *J. Chromatogr. B*, 査読あり, 877, 2009, 207-212.
- ⑥ J. Koyama, Y. Nishino, I. Morita, N. Kobayashi, T. Osakai, H. Tokuda, Correlation between reduction potentials and inhibitions of Epstein-Barr virus activation by anthraquinone derivatives, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読あり, 18, 2008, 4106-4109.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 清水香衣, 森田いずみ, 竹内敦子, 小林典裕, 小山淳子, 信川真智子, 信川京子, LC-ESI-MS/MS による PGD₂・ヒスタミン測定を用いたリグナン類の抗アレルギー活性の評価, 第 60 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2010 年 10 月 30 日, 枚方.
- ② 小山淳子, 森田いずみ, 竹内敦子, 小林典裕, Separation of *O*-methyl- ω -hydroxyemodins by LC-MS/MS using a β -cyclodextrin-bonded column, 15th International Cyclodextrin Symposium, 2010 年 5 月 10 日, ウィーン.
- ③ 森田いずみ, 小山淳子, 小林典裕, *Casearia sylvestris* の成分研究, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山.
- ④ 多賀詩織, 小山淳子, 森田いずみ, 竹内敦子, 小林典裕, LC-ESI-MS/MS による PGD₂・ヒスタミン放出抑制率測定を基盤とする抗アレルギー活性フラボノイドの探索, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山.
- ⑤ 清水香衣, 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, LC-ESI-MS/MS による *Taxus yunnanensis* 中の抗アレルギー活性成分研究, 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山.
- ⑥ 清水真希, 小山淳子, 森田いずみ, 竹内敦子, 小林典裕, LC-APCI-MS を用いたエモジン 2 量体の Raji 細胞内代謝物の検

29 日, 岡山.

- ⑦ 森田いずみ, 小山淳子, 小林典裕, LC-MS を用いたケミカルメディエーター類の分析と抗アレルギー活性評価への応用, 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009 年 11 月 25 日, 東京
- ⑧ 多賀詩織, 小山淳子, 森田いずみ, 竹内敦子, 清水真希, 小林典裕, LC-ESI-MS/MS を用いた KU812 細胞由来プロスタグランジン D₂ ならびにヒスタミンの分析, 第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2009 年 10 月 24 日, 東大阪市.
- ⑨ 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, 岩佐衣子, 守安正恭, プロトベルベリン型アルカロイドの生物活性と還元電位との相関性について, 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 27 日, 京都.
- ⑩ 森田いずみ, 小山淳子, 清水真希, 小林典裕, 信川真智子, 信川真貴子, LC-APCI-MS/MS による *Taxus yunnanensis* 中の成分研究, 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 27 日, 京都.
- ⑪ 清水真希, 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕, LC-APCI-MS/MS を用いたエモジンの Raji 細胞内代謝物の同定, 日本薬学会第 129 年会 2009 年 3 月 26 日, 京都.
- ⑫ 小山淳子, 森田いずみ, 小林典裕, 徳田春邦, プロトベルベリン類による Epstein-Barr virus 活性抑制と還元電位との相関性について, 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 29 日, 名古屋.
- ⑬ 清水真希, 小山淳子, 竹内敦子, 森田いずみ, 小林典裕, LC/ESI-MS による KU812 細胞由来ヒスタミンならびに生体アミン類の分析, 第 58 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2008 年 10 月 25 日, 神戸.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 淳子 (KOYAMA JUNKO)
神戸薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 60102109

(2) 研究分担者

小林 典裕 (KOBAYASHI NORIHIRO)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 90205477
森田いずみ (MORITA IZUMI)
神戸薬科大学・薬学部・助手
研究者番号: 20299085