

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 18 日現在

機関番号：34412  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23780123  
 研究課題名(和文) 人の健康を守るプロアントシアニジンの真の機能を明らかにする化学生物学研究  
 研究課題名(英文) Chemical biological study of proanthocyanidins to elucidate the functionalities for human health  
 研究代表者 齊藤 安貴子 (SAITO AKIKO)  
 大阪電気通信大学・工学部・准教授  
 研究者番号：40415162

研究成果の概要(和文)：様々な強い生物活性を持つプロアントシアニジン(PA)のプロープ化、及び、その化学生物学研究を行った。我々が見出した位置特異的脱保護法を足掛かりとして、蛍光プロープ化、フルオラスタグ化等のプロープ化を進め、フルオラスタグを用いたとき、リコンビナントの DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  との小分子化合物—タンパク質間の物理的結合を確認することが出来た。さらに、お茶カテキンである EGCG よりもはるかに強いガン細胞(HeLa S3)に対する細胞増殖抑制活性を持つ化合物(3,3"-ジガレート 2 量体)を見出すことが出来た。PA の安定化に関する研究においては、抗酸化活性試験(TBA method, DPPH method)においては、糖鎖の影響は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Proanthocyanidins (PAs), which have various strong biological activities, were modified with fluorescent molecules, fluorous tags, etc. by using our regioselective deprotection method for chemical biological studies of PAs. Using fluorous tags, the interaction between PAs and recombinant DNA polymerase  $\alpha$  was detected with SDS page. Furthermore, we identified that 3,3"-digallate dimers showed extremely high activity against decrease in cell proliferation (HeLa S3). However, the effect of oligosaccharides for stabilization of PAs was not detected with antioxidant activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質・化学生物学

## 1. 研究開始当初の背景

「医食同源」というように昔から親しんでいる食品は健康に良いとされる。しかし、何故健康によいのか、そして本当に安全なのか、化学的に証明されているものは少ない。食品に含まれる活性物質は長期に摂取して効果を発揮し、大量に摂取しても排泄または迅速に分解されると言われている。これは、動物が長い年月をかけて進化し取得した機構で

あろう。しかし今、これらが何故活性を発現するのかを化学的に証明・理解し、利用する必要に迫られている。なぜなら、高価な医薬品が家庭の経済、国家の経済を圧迫し、人が健康に生きていく事すら難しい世の中になりつつあるからである。また糖尿病などの生活習慣病のように、半永久的に服薬を余儀なくされる病気が増え、その副作用が問題となってきた。申請者は、これからは「病気の予防薬」が必要であり、それには昔ながらの食

品や漢方薬由来の化合物が「副作用も少なく」有効な解決手段になると考えている。

一方、現在用いられている薬（医療に用いられる薬剤）は、短期間で効果を発揮するものが多い。なぜなら、病気が悪化しないために速効性が必要とされるからであり、また、これまでの生物学を元にした評価方法では長期間の活性試験系の構築が困難なためである。では、食品や漢方由来の、ゆるやかに効果を示す化合物の評価をどのようにするのか。これを解決するのが化学を軸足にした「化学生物学」の技術である。これまで申請者は、様々な植物に含まれる多様な機能を持つ化合物、プロアントシアニジン（以後 PA と略す）に注目し研究を行ってきた。この化合物群はポリフェノール類であり、多くのグループが *in vitro* の機能解明研究を行っている。しかし、純粋な化合物の入手が困難であるため、アッセイは混合物で行われ正確な活性を反映しない事が多い。そこで申請者は博士号取得後、自ら合成方法を開発・大量合成した純粋な PA で正確な生物活性試験を測定することに独創性を打ち出してきた。しかしながらこれまでの自らの研究、つまり、単独の蛋白質に対する機能解析研究や独立した活性試験では、各化合物の蛋白質に対する活性は強いが、それが生体内で本当に作用するのか、副作用はないのか等の疑問の解決には程遠く、化合物本来の機能を探るには不十分だと考えるに至った。そこで、化合物をプローブ化して研究する技術や、小分子化合物と生体物質の物理的相互作用を観察する技術（化合物アレイ・SPR イメージング法・アフィニティービーズ法）について技術を得、研究を進めてきた。そして 22 年 4 月より大阪電気通信大学で「化学生物学研究室」を立ち上げ、PI として、PA の人の健康に対する機能の解明を目指して、自ら合成した PA を用いた化学生物学研究や PA のプローブ化研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、背景で先に述べたように、申請者がこれまで行ってきた PA 研究と化学生物学研究の流れを一本にし、ヒトの培養細胞等を用いて様々な蛋白質が存在する条件下で化合物の機能を解析できる「化学生物学」の手法を用い、PA が作用する蛋白質を解析することで PA の機能を明らかにすることを目的とした。この方法であれば、定法では長期間かかる食品の化合物の機能を短期間で評価できる上、これまで PA が影響する蛋白質として知られている分子に対し、様々な異なる蛋白質の存在下でも直接影響を及ぼすかどうか検出する事も可能だと考えた。PA は赤ワインポリフェノール、リンゴポリ

フェノール、カカオポリフェノール等とも呼ばれ、主に果物類、野菜類、穀物類、さらには、漢方やお茶にも多く含まれている。PA は、ある構造単位 (flavan-3-ol 類: 代表的な化合物としてはカテキン、エピガロカテキンガレート EGCG) が縮合しオリゴマー構造をとった化合物群の総称であり、通常は様々な長さ・構造単位・修飾の有無などが異なった化合物の混合物として得られ単離が非常に困難である。抗酸化活性以外にも抗腫瘍活性をはじめとする様々な生物活性が見出されているが、ほとんどの研究が混合物で行われているため、その活性発現機構は未だ解明されていない。申請者はこれまでの研究において、効率的かつ立体選択的な合成法の開発に成功し、それを用いて修飾化合物を含む様々な化合物の合成を完了し、生物活性試験を行っている。しかし前述のように、単純な活性試験では化合物本来の機能解明は困難である事がわかってきた。例えば、様々な酵素に対する *in vitro* の強い生物活性は生体内でどのように影響しあうのか、それとも、独立しているのか。他の蛋白質が大量に存在する時、PA はどのような挙動をとるのだろうか。一般に言われているように、非特異的に蛋白質に結合するのだろうか。これらの疑問を包括的に研究可能な手法が「化学生物学」の手法である。これを行うために必要な大量の純粋な化合物は、自らがこれまで開発した合成方法で供給する事が可能である。さらに最近、化学生物学分野では化合物を合成化学的なアプローチでプローブ化し、生命現象を可視化して追跡した素晴らしい論文が数多く発表されている。本研究目的においては、申請者の得意分野である有機合成の手法を最大限に活用し、現象の可視化技術を用いた化学生物学研究を行った①。また、この実験を行うにあたり、問題となるのは PA の安定性である。強い抗酸化活性を持つ事は、活性酸素等と容易に反応する事を示している。そこで、本研究では、独自の PA 安定化技術の開発も同時に進め、PA が安定に存在する条件化で化学生物学的研究を進め、PA の真の機能を解明する新たな実験系の構築も行った②。

## 3. 研究の方法

(1) PA を蛍光、ビオチン、光親和型官能基などでプローブ化し、生体内でどのように作用しているのか、可視化できる道具 (バイオプローブ) の開発を試みた。それにより、細胞のどの部分に局在するのかを顕微鏡で確認する事が可能であると考えた。

さらに、アフィニティービーズ法を試みた。これは、ビーズなどの固相に PA 化合物を有機化学的に導入してヒトの培養細胞の破碎液に加え、ビーズ上の PA に直接結合してく

る蛋白質を SDS page で解析する手法である。これまでに、構造が一部異なるだけで、ある蛋白質の活性の強弱に大きく影響する事が確認されており、この活性の変化が蛋白質の結合の強弱によるのかを判断できると考えた。また、一般に PA は様々なタンパク質とランダムに相互作用すると言われているが、申請者はこれまでの生物活性試験ではそれと矛盾する結果を得ており、PA の微細な構造の違いと蛋白質の相互作用の相関を明らかにできると考え本研究を進めた。

(2) 本研究を進めるにあたり問題になるのは、PA の安定性であった。化学的に不安定であるという事は、生物体内に取り込まれたときには大部分が体内で分解してしまう事を意味する。すなわち化学生物学実験において、PA が本来の機能を保ったまま生体分子と相互作用できるようにするためには、PA の安定化技術を開発する必要がある。ポリフェノール化合物の安定化に関してはすでに様々な研究がなされており、ヒドロキシ基を持つ化合物との混合やグリコシド化などの方法が知られている(太陽化学(株)特開 2001-309763 等)。申請者はこれらの背景から PA はヒドロキシ基を持つ化合物により包接されて安定化すると考えている。また、茶ポリフェノール化合物の代表として知られる EGCG (エピガロカテキンガレート) は、キシログルカンのような多糖と相互作用しゲル化する。ただし、化合物が包接によって安定化したかどうかは議論されておらず、EGCG のような単純なカテキン類以外の、複雑なカテキン類オリゴマーである PA に関する研究はない。そこで、化学生物学研究と同時進行する形で、多糖を用いた PA 安定化の研究を行った。

#### 4. 研究成果

以下、PA のプローブ化研究を(1)、PA の安定化に関する検討を(2)、そのほか(3)として、それぞれについて述べる。

(1) PA の活性に関与しない部分へのリンカーの導入方法の確立と、プローブ化に成功した(図1)。

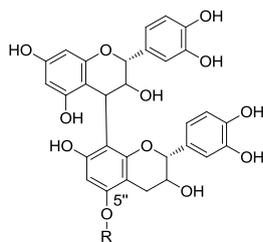


図1. PA プローブの構造

まず、リンカーを導入する 5'位の位置選択

的脱保護の反応条件の最適化を行った。この位置は、ポリフェノールのフェノール基のうちで、生物活性にほとんど影響がないとされている位置であり、リンカー導入に最適であると考えた。実際に、プローブ化した化合物を抗酸化活性や細胞毒性試験に供したところ、活性への影響は見られなかった。

リンカーRの導入方法として様々な検討を行ったところ、イソシアネート法、あるいはエステル法がもっとも有効であることを確認した。Rには、FITC等の蛍光分子、ビオチン、フルオラスタグの主に3種類を導入した。この時、ネガティブ・コントロールとして、生物活性が低い単量体もプローブ化している。蛍光分子を導入したPA、及び、単量体を細胞に加えたが、現時点では差は見られていない。現在、さらに検討を重ねている。フルオラスタグを導入したPAおよび単量体を、アフィニティービーズ化した。フルオラスタグは、フッ素化された脂肪鎖のことで、フルオラスタグ同士の強い相互作用によって、コンビナトリアル合成やマイクロアレイに使用されているタグである。これによって作成したPAアフィニティービーズを用いて、PAが阻害活性を持つリコンビナントのDNAポリメラーゼ $\alpha$ に対する結合実験を行った。実際には、DNAポリメラーゼ $\alpha$ の溶液に、それぞれのアフィニティービーズを加えてインキュベートし、ビーズを洗浄後SDS pageで結合を確認した。その結果、DNAポリメラーゼ $\alpha$ に活性を持たない単量体のアフィニティービーズに対してはタンパク質の結合は見られなかったが、PAに関しては、DNAポリメラーゼの結合が検出できた。活性のあるPAと、活性のない単量体で物理的な結合に差がある事が確認できた。これにより、目的の一つである活性と物理的結合の相関の証明については達成できたと考えている。現在詳細を確認しており、論文投稿の準備を進めている。

さらに、光親和型アフィニティービーズの作成も行った。光親和型の官能基としては、365 nmで活性化するジアジリンを用いた。この方法は、理化学研究所長田抗生物質研究室で開発された手法であり、小分子化合物の固相への固定化を、非位置特異的に行うものである。この手法を用いたところ、現在も検討を進めているが、本研究期間中の2年間では、活性のあるPAと活性のない単量体との間で、DNAポリメラーゼに対する物理的結合の差は見られなかった。同じ化合物を用いても、手法によって見えるもの、見えないものがある。これがどのような理由によるものか、今後検討を進めていきたい。

(2) PAの安定性向上に関して、PAとキシログルカン等の糖鎖(オリゴ糖)を用いて、検

討を行った。主に食品添加物として用いられている糖鎖を PA の溶液に添加し、加熱や化学的処理による PA の分解を阻止できるかを確認した。安定性を評価する手法として、TBA 法による抗酸化活性や DPPH ラジカル消去活性を指標にして行った。今回用いた PA は、主にカテキンやエピカテキンをオリゴマー化した PA、及び、ポジティブコントロールとして EGCG である。その結果、オリゴ糖を添加しても、抗酸化活性や DPPH ラジカル消去活性には変化がない事が確認できた。加熱や化学的処理により、PA や EGCG は赤色等に変化し、明らかに構造が変化していることが確認できたが、酸化に対する活性はあまり変化していなかった。これは、PA 等が変化して赤色のアントシアニン系化合物へ変換されるが、この構造変換が抗酸化活性には影響が少ないためだと考えている。しかし、糖鎖を加えた時の PA の色の変化については、多少の差がある事が確認できたため、糖鎖による PA の安定性は確保できたと予想している。今後、色の変化を測定することで、糖鎖の効果さをさらに詳細に解析する予定である。

(3) 活性の強い PA の構造を明らかとするため、ヒトがん細胞を用いた細胞毒性試験や、抗菌活性試験を進めた。その結果、細胞毒性試験、抗菌活性試験の両方において、コントロールとして用いた EGCG よりも非常に強い生物活性を持つ PA が確認できた。細胞毒性試験については、3、3'位にガロイル基が結合したジガレート体が、非常に強い活性を示した。さらに、この活性は、細胞内のシグナル伝達に関わるタンパク質に対して影響を及ぼしている事を、シグナル伝達分子の抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法で確認した。この現象は、EGCG やガロイル基がない PA、一分子導入した PA では見られない事から、PA のある構造に特異的な現象であると結論づけられた。

これらの結果により、PA は、その詳細な構造により、活性が異なる事が証明できたと考えている。ゆえに、日々摂取するこれらの化合物について、純粋な化合物を用いたそれぞれの詳細な機能確認は、非常重要的な研究分野だと強く示唆されたと考えている。

#### 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 1 件)

1. 岡本泰輔、他、齊藤安貴子、大阪電気通信大学研究論集(自然科学編)、46、44-48 (2011) 査読有

「TBDMS 基で保護した求核体を用いたプロシアニジン-B3 アナログの立体選択的合

成研究」

ほか、本研究に関し、現在投稿準備中のものの 2 報

[学会発表] (計 17 件)

<学会発表、シンポジウム、国際学会>

1. ○石原 沙也加、他、齊藤安貴子、「Procyanidin-B1-3,3"-di-O-gallate は EGCG と異なる作用で HeLa S3 細胞の増殖を阻害する？」日本農芸化学会、口頭発表、全国大会、2013 年 3 月 27 日 (仙台)

2. ○土井 翔馬、他、齊藤安貴子、「アセチル化求電子体を用いたプロアントシアニジンの合成研究」日本農芸化学会、口頭発表、全国大会、2013 年 3 月 27 日 (仙台)

3. ○岡本 泰輔、他、齊藤安貴子、「プロシアニジン・オリゴマーのプロープ化研究」日本農芸化学会、口頭発表、全国大会、2013 年 3 月 27 日 (仙台)

4. ○岡本 修平、他、齊藤安貴子、「プロシアニジン・オリゴマーの構造-活性相関研究」日本農芸化学会、口頭発表、全国大会、2013 年 3 月 26 日 (仙台)

5. Sayaka Ishihara, et al. , Akiko Saito, 「Stereoselective synthesis of proanthocyanidins, and their SAR study」IKCOC-12, (2012 年 11 月 14 日、Kyoto)

6. ○岡本泰輔、他、齊藤安貴子、「プロアントシアニジンの立体選択的合成と構造-活性相関研究」、カテキン学会 (2012 年 11 月 11 日、静岡、ポスター発表予定)

7. ○岡本泰輔、他、齊藤安貴子、第 54 回 天然有機化合物討論会、講演要旨集 p315 (2012 年 9 月 18 日、東京)

8. ○岡本泰輔、他、齊藤安貴子、「D 環 5 位を選択的に修飾した procyanidin-B1~B4 の立体選択的合成とその抗酸化活性」、日本農芸化学会関西支部(2012 年 7 月 14 日、大阪、口頭発表)

9. ○土井翔馬、他、齊藤安貴子、「アセチル基によって脂溶性を高めたプロアントシアニジンの合成」、新規素材探索研究会 (2012 年 6 月 6 日、横浜)

10. ○岡本修平、岡本泰輔、他、齊藤安貴子、「アセチル化親電子ユニットを用いた効率

的プロアントシアニジン合成法の開発」、日本農芸化学会関西支部会、(2012年5月26日、京都)

11. ○土井翔馬、他、齊藤安貴子、「プロアントシアニジンのプローブ化研究」、日本農芸化学会全国大会(京都)(2012年3月23日、京都)

12. ○植西譲二、他、齊藤安貴子、「プロアントシアニジン立体選択的合成における保護基の再検討」、日本農芸化学会全国大会(京都)、(2012年3月23日、京都)

13. ○石原沙也加、他、齊藤安貴子、「3-Benzyl-7-hydroxy-4-methylcoumarinのアナログ合成研究」日本農芸化学会全国大会、(2012年3月23日、京都)

14. ○岡本泰輔、他、齊藤安貴子、「TBDMSを保護基として用いたプロシアニジ-B3アナログの立体選択的合成と位置選択的脱保護」、日本農芸化学会全国大会、(2012年3月23日、京都)

15. ○岡本泰輔、他、齊藤安貴子、「プロアントシアニジン・オリゴマーの立体選択性～保護基の再検討とプローブ合成～」複素環化学討論会、(2011年10月21日、熊本、ポスター発表)

16. 岡本泰輔、他、○齊藤安貴子、「化学生物学研究を目指したプロアントシアニジン立体選択的合成研究の再検討」日本農芸化学会関西支部会、(2011年5月28日、京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤安貴子 (SAITO AKIKO)

大阪電気通信大学・工学部・准教授

研究者番号・40415162