

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460131

研究課題名(和文) 表面プラズモン共鳴を用いた植物資源からの抗生活習慣病薬のシーズ探索法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a SPR system to screen for plant-based seed compounds for drugs against lifestyle diseases

研究代表者

黒田 明平 (KURODA, Minpei)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：80266890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：センサーチップに糖尿病合併症に関与する酵素aldose reductase (AR)を固定後、従来の評価法により確認したAR阻害活性を示す植物エキスおよび化合物との相互作用について、表面プラズモン共鳴を用いて評価したが、相互作用を示すセンサーグラムは得られなかった。一方、従来法により4種の植物エキスにAR阻害活性を見出し、これら植物より新規化合物4種を含む計49種の化合物を単離した。単離した化合物のうち、ジカフェオイルキナ酸類は強いAR阻害活性を示し、キナ酸のカルボン酸がメチルエステル体になることで活性が減弱することや、カフェオイル基の結合位置や数が活性に影響を及ぼすことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Using a SPR system, we analyzed the interaction between aldose reductase (AR), which plays a role in diabetic complications, placed on the chip and a plant extract with AR inhibitory activity as determined by a conventional method. The resulting sensorgram showed no interaction. Then, we prepared four different plant extracts with AR inhibitory activity and isolated 49 compounds, including four new compounds, from the extracts. Among the compounds, dicaffeoylquinic acid (DCQA) derivatives exhibited strong inhibitory activity toward AR, and the activity decreased when the carboxylic acid of the DCQA was converted to a methyl ester. Our findings also revealed that the activity of the DCQA was affected by the binding site and number of caffeoyl groups.

研究分野：天然物化学

キーワード：表面プラズモン共鳴 抗生活習慣病薬 スクリーニング aldose reductase

1. 研究開始当初の背景

(1) 酵素阻害活性試験や PPAR- γ リガンド活性試験については、1) 実験ごとに動物組織からの酵素の調製や基質の調製が必要となる、2) HMG-CoA レダクターゼ阻害活性には通常ラジオイムノアッセイ法が用いられるため、実験施設も制限される、3) キメラアッセイ法に伴う操作の煩雑さ (pM-PPAR- γ と UASg-luc の CV-1 細胞への導入)、4) セルベースアッセイによる長い判定期間、5) 細胞を使用しない簡便なリガンド活性測定キットは高価であり、繰り返し測定できない、という欠点が挙げられる。

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いた酵素阻害活性評価および PPAR- γ リガンド活性の報告はこれまでに数例あるが、植物抽出エキスからの抗生活習慣病薬の新規シーズのスクリーニングに用いられた例はなく、酵素阻害活性についても報告はわずかである。

2. 研究の目的

(1) 表面プラズモン共鳴装置を用いた植物抽出エキスからの抗生活習慣病の探索法の確立: 本研究は、表面プラズモン共鳴 (SPR) バイオセンサーを用いた簡便、迅速、確実な天然物、特に植物資源からの抗生活習慣病活性物質のスクリーニング法を確立することを目的とする。SPR バイオセンサーでは標識を使わずにリアルタイムに生体分子の相互作用をモニタリングが可能である。酵素あるいは PPAR- γ リガンド結合ドメインをセンサーチップの金薄膜上に固定することでリガンドとし、アナライト (相互作用を確認したい物質) をセンサーチップの表面に流す。リガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化することで、リガ

ンドとアナライトの相互作用を得られたセンサーグラムから評価する。SPR を用いた評価系の利点として、1) 細胞へのプラスミドの導入が不要である、2) 細胞培養の必要が無く、短時間で評価できる、3) センサーチップに固定したリガンドは繰り返し利用可能である、4) 試料量が減量できる、が挙げられる。

(2) 従来の評価法による酵素阻害活性を示す植物抽出エキスおよび活性化合物の探索:

SPR 法を用いた抗生活習慣病薬のシード化合物のスクリーニング法の妥当性を評価するため、aldose reductase (AR) を用いた従来の阻害評価法 (マイクロプレートを使用し、吸光度を測定) を用い、AR 阻害活性を有する植物エキスおよび化合物を確保する。(公財)ヒューマンサイエンス振興財団による国内基盤技術調査報告書 (平成 27 年度) において、薬剤貢献度および治療満足度のいずれにおいても 60% に満たない疾患の中に糖尿病合併症 (糖尿病性神経障害, 糖尿病性腎症, 糖尿病性網膜症) が含まれる。AR は糖尿病合併症に関連する酵素であるため、今回、同酵素を選択した。

3. 研究の方法

(1) AR のセンサーチップへの固定化および活性化合物との相互作用測定: AR のアミノカップリング法によるセンサーチップ C1 (GE ヘルスケアジャパン社製) への固定化を検討した。例) HBS-EP バッファーを用い、センサーチップ表面のカルボキシル基の賦活化を目的に、アミノカップリングキットより調製した EDC と NHS の混合溶液を流速 10 μ L/min で 10 分間注入した。超純水 30 μ L に AR (0.1 unit) を溶解し、さらに 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) 100 μ L を加え、センサーチップに流速 10 μ L/min で 5 分間注入し、AR 表面のアミノ基とセンサーチップ

表面にある賦活化したカルボキシル基とを結合させた。ARと阻害活性化合物との相互作用は以下の通りに行った。HBS-EP バッファーにDMSOを加えてランニングバッファーとして用いた。植物エキス、粗画分および単離された化合物はDMSOとランニングバッファーで希釈し、サンプル溶液とした [植物エキスおよび画分：10 - 200 μM 、単離された：5 - 50 μM]。サンプル溶液を添加時間100秒，流速 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ で注入し、得られるセンサーグラムで相互作用を検討した。

(2) 植物抽出エキス、粗画分、および単離された化合物に対する従来の手法によるAR阻害活性評価：ヒト組み換え体ARをリン酸緩衝液で0.02 unit/mLの酵素溶液とし、AR阻害活性試験時には5倍希釈して用いた。植物のMeOH抽出エキス、多孔質合成樹脂Diaion HP-20を充填したカラムにより得られた粗画分、単離化合物をdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解させ、水で10倍希釈し、サンプル溶液とした。リン酸緩衝液、酵素溶液、サンプル溶液を混和した反応液にDL-glyceraldehydeを加えて25で15分間反応させた。反応開始直後と反応終了後の吸光度(340 nm)を測定し、その吸光度の差から植物抽出物のARに対する阻害率(%)と IC_{50} 値を算出した。植物エキスおよび粗画分は20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で阻害率が50%以上の場合に、化合物は20 μM の濃度で阻害率が50%以上の場合に IC_{50} 値を算出した。なお、陽性対照として用いたEpalrestatの IC_{50} 値は0.39 - 1.1 μM であった。

4. 研究成果

38種の植物のMeOH抽出エキスについて、従来の方法(マイクロプレート使用、吸光度測定)によるAR阻害活性を評価した結果、キク科 *Tussilago farfara* 葉 (IC_{50} : 3.34

$\mu\text{g}/\text{mL}$)、キク科 *Achillea millefolium* 地上部 (6.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、バラ科 *Agrimonia eupatoria* 地上部 (8.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、カバノキ科 *Betula alba* 樹皮 (13.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) に強い阻害活性が認められた。よって、これら抽出エキスからの阻害活性物質の単離を実施した。

・*T. farfara* 葉の化学成分とAR阻害活性：
T. farfara 葉 (1.0 kg) のMeOH抽出エキス (105 g) をDiaion HP-20カラムクロマトグラフィーに付し、20%MeOH、EtOH、EtOAcで順次極性を下げながら溶出させた。このうちEtOH溶出画分 (25 g) について各種クロマトグラフィー(CC)を用いて分離・精製し、新規化合物1種(1)を含む計16種の化合物(1-16)を単離した (Fig. 1)。

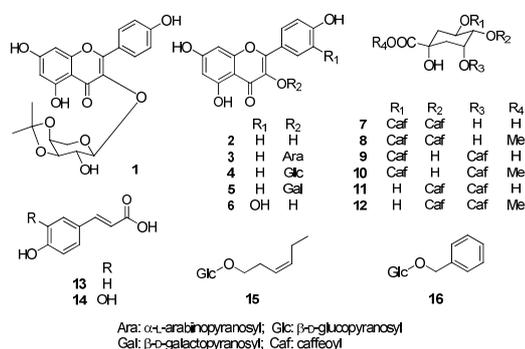


Fig. 1

ジカフェオイルキナ酸誘導体である7 (IC_{50} : 0.58 μM)、8 (3.84 μM)、9 (1.25 μM)、10 (5.38 μM)、11 (2.67 μM)、12 (4.85 μM)は強いAR阻害活性を示した。ジカフェオイルキナ酸類の阻害活性を比較することで、キナ酸のカルボン酸がメチルエステル体になることで阻害活性が減弱することが確認された。また、キナ酸部がカルボン酸、メチルエステル体のいずれの場合においても、カフェオイル基が3位と4位に結合した化合物が最も強い阻害活性を示した。キナ酸に1個のカフェオイル基が結合した chlorogenic acid は、ジカフェオイルキナ酸類より弱い阻害活性 (IC_{50} : 7.50 μM)を示したこ

とから、カフェオイル基の数が活性に影響することが示唆された。

・ *Achillea millefolium* 地上部の化学成分 : *A. millefolium* 地上部 (2.0 kg) の MeOH 抽出エキス (190 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィーに付し、20%MeOH、EtOH、EtOAc で順次極性を下げながら溶出させた。このうち、強い AR 阻害活性 (IC_{50} : 6.0 μ g/mL) を示した EtOH 溶出画分 (110 g) について各種クロマトグラフィーを用いて分離・精製し、新規化合物 **24** を含む計 15 種の化合物 (**6, 8 - 10, 17 - 27**) を単離した (Fig. 2)。

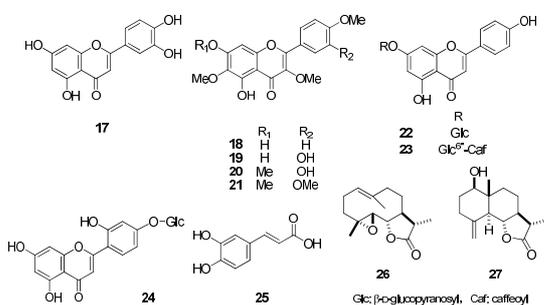


Fig. 2

ジカフェオイルキナ酸類である化合物 **8** (IC_{50} 3.41 μ M) および **10** (5.28 μ M) は強い AR 阻害活性を示した。

・ *Agrimonia eupatoria* 全草の化学成分 : *A. eupatoria* 全草 (2.0 kg) の MeOH 抽出エキス (238 g) を Diaion HP-20 CC に付し、20%MeOH、EtOH、EtOAc と順次極性を下げながら溶出させた。このうち、強い AR 阻害活性 (IC_{50} : 4.41 μ g/mL) を認めた EtOH 溶出画分 (46 g) について各種 CC を用いて分離・精製し、新規化合物 **35** を含む計 9 種の化合物 (**4, 28—35**) を単離した (Fig. 3)。フラボノール類である化合物 **4** (IC_{50} 18.5 μ M), **30** (21.3 μ M), **31** (15.2 μ M), **32** (18.5 μ M), **33** (15.6 μ M), フェニルプロパノイド類である **35** (16.7 μ M) に弱い AR 阻害活性が認められた。

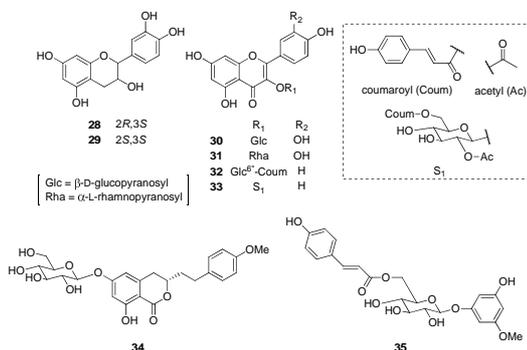


Fig. 3

・ *B. alba* 樹皮 (2.0 kg) から得られた MeOH 抽出エキス (230 g) を Diaion HP-20 CC に付し、20% MeOH、EtOH、EtOAc で順次極性を下げながら溶出した。このうち、EtOH 画分が強い AR 阻害活性を示した (12.1 μ g/mL) ため、EtOH 画分について各種 CC を用いて分離・精製を行った。その結果、新規化合物 **36** を含む計 14 種の化合物 (**36 - 49**) を単離した (Fig. 4)。

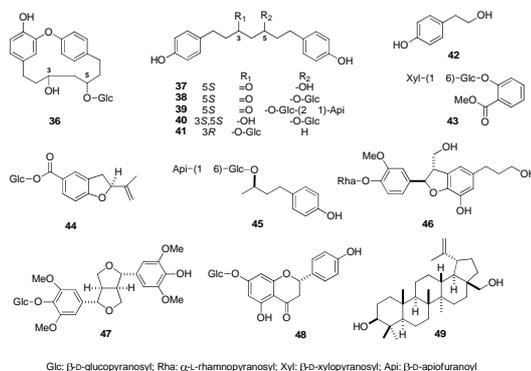


Fig. 4

トリテルペノイドである化合物 **49** (betulin, IC_{50} : 34.0 μ M) のみが弱い AR 阻害活性を示した。

AR 阻害活性を示した 4 種の植物の MeOH 抽出エキスとセンサーチップに固定した AR との相互作用はセンサーグラムからは確認できなかった。また、活性化化合物であるジカフェオイルキナ酸誘導体である **7, 9, 11** についても、相互作用を示す濃度依存的なセンサーグラムは得られなかった。前述と同様の方法で PPAR- γ リガンドタンパクおよび xanthine oxidase (XO) (牛乳由

来)をセンサーチップへの固定化を試みた。得られたセンサーチップと従来の方法で既に得ている PPAR- γ リガンド活性エキスおよび活性化化合物(生薬・カンゾウ EtOH エキス抽出およびイソフラバン glabridin)および XO 阻害活性エキスおよび活性化化合物(*Verbascum thapsus* 葉 EtOH 抽出エキスおよびフラボノリグナン hydrnocarpin)においても相互作用を示すセンサーグラムは得られていない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Minpei Kuroda, Takumi Ohshima, Chihiro Kan, Yoshihiro Mimaki, Chemical Constituents of the Leaves of *Tussilago farfara* and Their Aldose Reductase Inhibitory Activity, *Nat. Prod. Commun.*, 査読有, **11**, 2016, 1661 - 1664.

Minpei Kuroda, Katsura Iwabuchi, Saori Usui, Nanami Akiyama, Yoshihiro Mimaki, Chemical Compounds from the Leaves of *Verbascum thapsus* and Their Xanthine Oxidase Inhibitory Activity, *Jpn. J. Pharmacog.*, 査読有, **71**, 2017, 49 - 50.

[学会発表](計5件)

黒田明平 他3名、キク科 *Achillea millefolium* 地上部の化学成分と aldose reductase 阻害活性に関する研究、日本生薬学会 第61回年会、平成26年9月13日、福岡

黒田明平 他3名、キク科 *Tussilago farfara* 葉およびバラ科 *Agrimonia eupatoria* 全草の化学成分と aldose reductase 阻害活性、日本生薬学会 第62回年会、平成27年9月11日、岐阜

黒田明平 他2名、天然由来の α -glucosidase 阻害活性物質の探索に関する研究、第59回日本生薬学会 関東支部大会、平成27年9月12日、千葉

黒田明平 他5名、マメ科 *Trifolium pratense* 種子および *T. repens* 種子の化学成分と生物活性、第59回日本生薬学会 関東支部大会、平成27年9月12日、千葉

黒田明平 他2名、カバノキ科 *Betula alba* 樹皮の化学成分と aldose reductase 阻害活性、日本生薬学会 第63回年会、平成28年9月24日、富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 明平 (KURODA, Minpei)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 80266890