

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870217

研究課題名(和文) 効率的な生薬成分抽出法の開発とヒアルロン酸分解酵素阻害剤の探索

研究課題名(英文) Development of extraction techniques for natural products and discovery of hyaluronan-degrading enzyme inhibitors from natural products

研究代表者

友原 啓介 (TOMOHARA, KEISUKE)

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：40711677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：多成分から成る生薬抽出エキスそのものを基質とした合成反応を開発し、複数の新規天然物様化合物の挙動創製に成功した。多成分系を基質とした分子変換でありながら、反応系は複雑化せず生成物の同定は容易であった。

また、DMSO摂動条件下のin vitro酵素活性評価系において、酵素阻害剤の濃度反応曲線の挙動を解析することにより、酵素活性部位に対して非特異的な酵素阻害剤を見極めるための新規手法を開発した。併せて、生薬成分中より新規ヒアルロニダーゼ阻害剤を同定した。

研究成果の概要(英文)：We have achieved direct chemical derivatization of natural plant extracts, where electrophilic ketones in the extracts could be selectively converted into the corresponding hydantoins (imidazolidine-2,4-dione) under the Bucherer-Bergs reaction conditions. The derivatization proceeded with enough chemoselectivity, minimizing the complication of the reaction system, and thus realizing the facile identification of unnatural hydantoins from the derivatized extracts.

We have also developed new methodology to highlight promiscuous non-specific binding inhibitors of enzymes by interpreting the behavior of concentration-response curves under in vitro DMSO-perturbing assay conditions. Furthermore, we have discovered novel inhibitors of hyaluronan-degrading enzyme from natural plant extracts.

研究分野：創薬化学

キーワード：生薬 多成分の分子変換 アミノ酸誘導体 ヒダントイン ヒアルロニダーゼ 化学的摂動効果 ジメチルスルホキシド 非特異的分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然有機化合物は、合成化学的には容易に入手し難い構造的多様性・複雑性を有しており、古くから創薬化学研究の起点として中心的な役割を果たしてきた。天然物化学研究は新規天然有機化合物の同定を、合成化学研究は意図した天然物あるいはその誘導体の合成をそれぞれ可能とするが、より多様な天然有機化合物へのアクセスを可能とするための新規方法論の開発が求められている。

(2) 創薬を指向した酵素阻害剤探索の初期薬理活性スクリーニングにおいては、酵素に対する非特異的な分子間相互作用様式を排除し、酵素活性部位特異性の高い阻害剤を提示することが重要である。これまでに報告のある非特異的な分子間相互作用の例として、タンパク質に対する非特異的な結合形成や、評価系に対する干渉作用、アグリゲーション形成によるタンパク質に対する非特異的な吸着などがあり、およびは経験則により、は界面活性剤添加条件下における阻害活性の低下によりそれぞれ見極めることができる。また、古典的な速度論解析や、熱力学的あるいは物理化学的手法によっても分子間相互作用様式を評価できるが、これらの手法では説明できない事例も多く存在することから、新規評価手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、生薬成分の新規抽出法と天然物様化合物の新規合成法の開発を指向して、酸・塩基反応に立脚した生薬のアンモニア液浸法や混合抽出法を開発することとした。

本研究ではまた、生薬成分中から新規ヒアルロン酸分解酵素(ヒアルロニダーゼ)阻害剤を探索することとした。ヒアルロニダーゼ阻害剤探索に当たっては、酵素活性特異性を考慮した *in vitro* 阻害活性評価試験を実施し、強力かつ酵素活性部位特異性の高い新規阻害剤を創出することを目的とした。

3. 研究の方法

新規生薬成分抽出法の実現においては、富山大学附属病院薬剤部で取扱いのある各種生薬を対象として、アンモニア液浸法や混合抽出法により各種抽出エキスを調製し、その成分組成について定性・定量分析を行った。併せて、抽出エキスそのものを基質とした合成反応を実施し、化学的に誘導化された生薬抽出エキスを調製し、その中から新規天然物様化合物を単離・構造決定した。

新規ヒアルロニダーゼ阻害剤の探索においては、初めに富山大学附属病院薬剤部で取扱いのある各種生薬の熱水抽出エキスを調製し、ヒアルロニダーゼ阻害活性スクリーニングを実施した。次に、強い阻害活性を示した生薬抽出エキスについて、ヒアルロニダーゼ阻害活性を指標として阻害活性本体を探

索した。併せて、酵素活性部位特異性の高い阻害剤を見極めるための新規手法を開発すべく、DMSO 撷動条件下の *in vitro* 評価系において、酵素阻害剤の濃度反応曲線の挙動解析を行った。

4. 研究成果

(1) 効率的な生薬成分抽出法の実現

効率的な生薬成分抽出法の実現を目指して、当初の研究計画に則り生薬のアンモニア液浸法及び混合抽出法を検討した。その結果、成分プロファイルの異なる生薬抽出エキスを調製することは出来たものの系はさらに複雑化したため、エキス中から新規成分を同定することは困難と思われた。

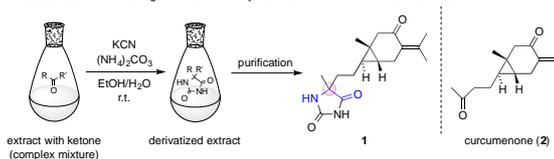
(2) 多成分からなる生薬抽出エキスそのものを基質とした分子変換法の実現

そこで、多成分から成る生薬抽出エキスそのものを基質とした合成反応を行い化学的に誘導化された生薬抽出エキスを調製し、その中から新規天然物様化合物を単離・構造決定することとした。ところが、多成分系に有機合成試薬を添加すると、予測不可能な副反応や構成成分の分解等により系は一層複雑化する。実際に、数少ない先行研究例においても、反応系の更なる複雑化により生成物の単離・構造決定は困難を極めていた。そこで、本研究では系の複雑化を回避した生薬抽出エキスの直接的分子変換を実現することとした。

多成分系を基質としながらも系の複雑化を回避した分子変換を実現するためには、標的化合物に対して化学選択的な反応系を構築する必要がある。加えて、反応成績体を天然由来成分と明確に区別して単離できることが重要である。これらの点を勘案し、本研究では単純ケトンにヒダントインへと変換する Bucherer-Bergs 反応を適用することとした。ヒダントインは生薬成分として報告のない構造単位でありかつ出発のケトンに比べて高極性であるため、混合物中からでも容易に同定できると考えた。

初めに、4-phenyl-2-butanone をモデル基質として反応条件を最適化した。一般的な Bucherer-Bergs 反応は加熱条件で行われるが、副反応等による系の複雑化を回避するために室温で行ったところ、反応時間は長くなるものの高収率で生成物を与えることが分かった。また抽出エキスを基質とする場合、エキス中に存在する単純ケトン類の正確な濃度は不明であるため、大過剰の反応剤存在下でも収率を損なうことなく反応が進行することを確認した。次に、最適化した

Scheme 1. Bucherer-Bergs reaction of ethyl acetate extract of *Curcuma zedoaria*



Bucherer-Bergs 反応条件下, 様々なカルボニル化合物を用いてモデル実験を行ったところ, IR スペクトルにおいて 1710 cm^{-1} 以上の領域にカルボニル基 (C=O) の伸縮振動に由来する吸収を与える単純ケトン類が Bucherer-Bergs 反応に好適の基質であることが分かった. そこで, 全 110 種類の生薬抽出エキスについて IR スペクトル解析を行った. その結果, 生薬「莪朮 (*Curcuma zadoaria*)」を最適基質として選抜した. 次に, 最適化した Bucherer-Bergs 反応条件下分子変換を試みたところ, curucumenon (2) に由来する新規天然物様化合物 1 を得ることができた (Scheme 1). このとき, 四置換不斉炭素が新たに構築され, ジアステレオマー比はおおよそ 1:1 であった. 反応は, 生成物を同定するのに十分な程化学選択的に進行した. またヒダントインに特長的な IR 及び $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおけるシグナルを手掛かりとすることで, 生成物は混合物中から容易に同定できた. 一方で, 「莪朮」の酢酸エチル抽出エキスそのものからは, 既知化合物である curzerenone, dehydrocurdione, curcumenol, curcumenone, zedoarondiol を同定した.

以上のように本研究では, 多成分系を基質とした合成反応でありながら反応系の更なる複雑化を回避し, 混合物中の標的分子のみを化学選択的に分子変換することに成功した. それにより, 天然資源から最も短工程の実験操作で純粋な合成化学においても構築が難しい四置換不斉炭素を有する新規天然物様化合物を合成することが可能となった. 現在までに, 生薬「牡丹皮 (*Paeonia suffruticosa*)」及び「生姜 (*Zingiber officinale*)」の酢酸エチル抽出エキスを用いて同様の分子変換を行い, 四置換不斉炭素を有する複数の新規天然物様アミノ酸誘導体を一挙に合成することにも成功している.

(3) DMSO 摂動効果を利用する分子間相互作用解析法の開発

創薬を指向した酵素阻害剤探索の初期薬理活性スクリーニングにおいては, 酵素に対する非特異的な分子間相互作用様式を排除し, 酵素活性部位特異性の高い阻害剤を提示することが重要である. 本研究では, DMSO (ジメチルスルホキシド) 摂動条件下の *in vitro* 評価系において, ヒアルロニダーゼ阻害剤の濃度反応曲線の挙動を解析することにより, 酵素活性部位に非特異的な阻害剤を見極めるための新規手法を開発した.

In vitro 酵素活性評価系に DMSO を添加すると, DMSO 用量依存的に酵素活性は低下する. これは, 酵素活性部位の 3 次元立体構造変化により基質分解能を失った non-productive な酵素の産生によるものと考えられる. このような系において, 酵素活性部位に特異的な阻害剤は, DMSO 摂動条件下であっても productive な酵素にのみ作用し基質と競合するため阻害活性に変化が見られ

ない. それに対して, 酵素活性部位に非特異的な阻害剤は, 酵素活性部位の構造変化に対して感受性が低く, 系中で共存する productive/non-productive 両酵素に阻害作用を示すため, 結果として productive な酵素における基質との競合率が低下し, 阻害活性が低下すると予想した. 以上の作業仮説について, 構造的に多様な文献既知ヒアルロニダーゼ阻害剤を用いて検証を行った. 検証に用いた全ての阻害剤について, 濃度依存的な阻害剤用を示すことを予め確認している.

初めに, 界面活性剤 (Triton X-100) 添加条件下において阻害活性評価を行い, アグリゲーション形成による非特異的な阻害作用を示す阻害剤を抽出し除外した. 次に最適化した DMSO 摂動条件下, 阻害剤の濃度反応曲線の挙動を観察した. 結果の一例を以下に示す. 弱いながらもヒアルロニダーゼの基質として作用することが知られている高分子阻害剤「コンドロイチン硫酸 C」については, 評価系中の DMSO 容積比を 1~11% まで変化させても濃度反応曲線の挙動には変化が見られず, 活性部位特異的な阻害剤であることが示唆された (Figure 1A). それに対して, 低分子阻害剤である「グリチルリチン」については, 評価系中の DMSO 用量の増加に従って濃度反応曲線が右にシフトし, 阻害活性の低下が見られ, 活性部位非特異的な阻害剤であることが示唆された (Figure 1B). 以上の結果は, 研究当初の作業仮説に一致するものである. 以上のように, 本研究では, 通常の *in vitro* 酵素活性評価系に DMSO を添加したときの酵素阻害剤の濃度反応曲線の挙動を解析することにより, 酵素活性部位特異性を簡便に

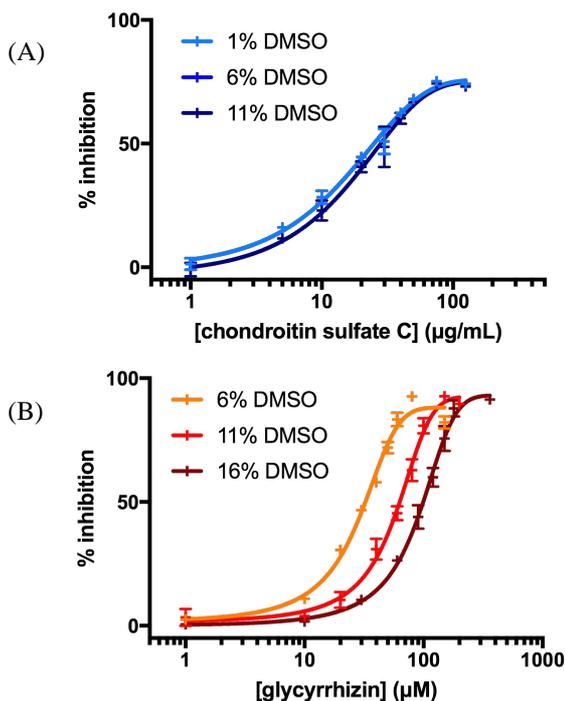


Figure 1. Concentration-response curves of chondroitin sulfate C (A) and glycyrrhizin (B) under the DMSO-perturbing assay conditions.

評価する新規手法を開発することができた。本研究は、タンパク質の構造解析や機能解析などに利用される DMSO 撓動効果を *in vitro* 酵素活性評価系に適用した初めての研究例である。DMSO は生化学実験等に汎用される溶媒であるため、本手法は *in vitro* 細胞系や *in vivo* 評価系への応用も可能と予想している。本研究結果（下記雑誌論文 No.3）は、2016 年 10 月 27 日付の *Atlas of Science* 誌にて紹介された。

(4) ヒアルロニダーゼ阻害剤の探索

次に、生薬成分からの新規ヒアルロニダーゼ阻害剤の同定を目指して、富山大学附属病院薬剤部で取扱いのある生薬全 98 種類（試用品を含む）の熱水抽出エキスを調製し、ヒアルロニダーゼ阻害活性スクリーニングを実施した。ここでは、ヒアルロニダーゼの基質であるヒアルロン酸が水溶性であることを勘案し、生薬熱水抽出エキスを評価対象とした。ところで、生薬成分中にはフラボノイド等の多数のポリフェノール類が存在し、それらは関連性のない複数の酵素を非特異的に阻害することが知られている (Soichet, B. K. *et al. ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 978.)。そこで、生薬熱水抽出エキス中のポリフェノール含量を定量し、阻害活性との関係性を考察した。その結果、抽出エキス中のポリフェノール含量とヒアルロニダーゼ阻害活性は概ね正の相関 ($r = 0.52$) を示すことが分かり、抽出エキス中に存在するポリフェノール類による相加的な阻害作用の可能性が示唆された。

次に、高活性を示した生薬抽出エキスのう

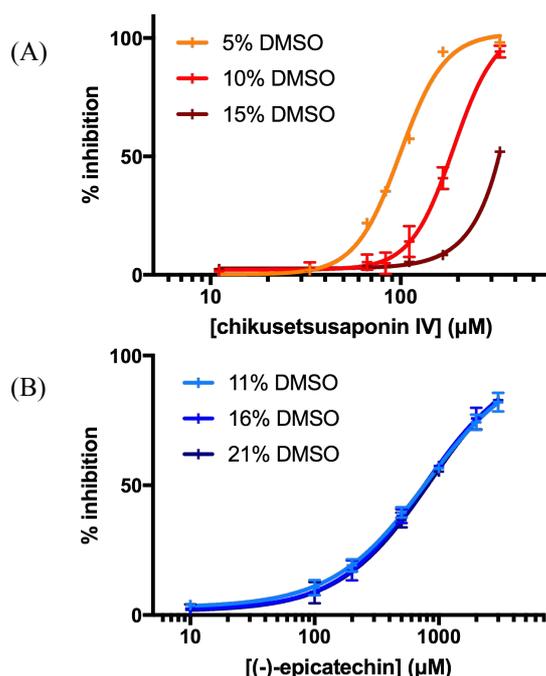


Figure 2. Concentration-response curves of chikusetsusaponin IV (A) and (-)-epicatechin (B) under the DMSO-perturbing assay conditions.

ち、ポリフェノール含量の低い群と高い群から「竹節人參 (*Panax japonicus*)」と「李根皮 (*Prunus salicina*)」をそれぞれ選定し、ヒアルロニダーゼ阻害活性を指標として阻害活性本体を探索した。その結果、ポリフェノール含量の低い群の「竹節人參」からは、強力な新規阻害剤として chikusetsusaponin IV ($IC_{50} = 24 \mu M$) 及び chikusetsusaponin V ($IC_{50} = 34 \mu M$) をそれぞれ同定することができた。一方、ポリフェノール含量の高い群の「李根皮」については、探索の過程で阻害活性が分散し、結果として中程度の阻害活性を有する (-)-catechin ($IC_{50} = 1.10 \times 10^3 \mu M$) 及び (-)-epicatechin ($IC_{50} = 804 \mu M$) を単離するに留まった。後者においては、抽出エキス中のポリフェノール類が相加的に阻害作用を示していたことが示唆された。

次に、上記 (2) で開発した DMSO 撓動条件下における分子間相互作用解析法を利用して、新規阻害剤の分子間相互作用様式を考察した。その結果、chikusetsusaponin IV は、界面活性剤 (Triton X-100) 存在下において阻害活性が低下したことから、アグリゲーション形成による非特異的阻害作用が示唆された。また、DMSO 撓動条件下においても DMSO 用量依存的に阻害活性が低下したことから、活性部位に非特異的な阻害剤であることが示唆された (Figure 2A)。一方で、(-)-epicatechin は、Triton X-100 存在下及び DMSO 撓動条件下のいずれにおいても阻害活性に変化がみられなかったため、活性部位特異的阻害剤あるいはアロステリック阻害剤のいずれかであることが示唆された (Figure 2B)。

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 4 件)

(1) Keisuke Tomohara, Tomohiro Ito, Saika Onikata, Atsushi Kato, Isao Adachi. Discovery of hyaluronidase inhibitors from natural products and their mechanistic characterization under DMSO-perturbed assay conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 1620-1623. 査読有り
DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.083.

(2) Keisuke Tomohara. Another aspect in use of DMSO in medicinal chemistry. *ATLAS of Science*, **2016**, Oct 27. 査読無し
<https://atlasofscience.org/another-aspect-in-use-of-dms0-in-medicinal-chemistry/>

(3) Keisuke Tomohara, Tomohiro Ito, Saika Onikata, Kota Furusawa, Atsushi Kato, Isao Adachi. Interpreting the behavior of concentration-response curves of hyaluronidase inhibitors under DMSO-perturbed assay conditions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*,

3153-3157. 査読有り
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.082.

(4) Keisuke Tomohara, Tomohiro Ito, Naoto Hasegawa, Atsushi Kato, Isao Adachi. Direct chemical derivatization of natural plant extract: straightforward synthesis of natural plant-like hydantoin. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 924-927. 査読有り
DOI: 10.1021/ja406653n.

〔学会発表〕(計 11 件)

(1) 古沢晃太, 友原啓介, 長谷川直人, 加藤敦, 足立伊佐雄. 極性変換を鍵とする多成分系の分子変換. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 27 日, 仙台国際センター他 (宮城県仙台市).

(2) 友原啓介, 加藤敦, 足立伊佐雄. DMSO 摂動条件下での酵素阻害剤の分子間相互作用様式の解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 26 日, 仙台国際センター他 (宮城県仙台市).

(3) 友原啓介, 伊藤智裕, 鬼形彩花, 加藤敦, 足立伊佐雄. DMSO 摂動条件下におけるヒアルロニダーゼ阻害剤の活性部位特異性の評価. 日本生薬学会第 63 回年会, 2016 年 9 月 25 日, 富山国際会議場 (富山県富山市).

(4) 古沢晃太, 友原啓介, 長谷川直人, 伊藤智裕, 加藤敦, 足立伊佐雄. 多成分からなる生薬抽出エキスの化学的直接誘導化による非天然型アミノ酸等価体の一挙創製. 日本生薬学会第 63 回年会, 2016 年 9 月 25 日, 富山国際会議場 (富山県富山市).

(5) 友原啓介. 生薬抽出エキスの化学的直接誘導化. 平成 28 年度北信越有機合成化学若手の会, 2016 年 4 月 3 日, 石川県四高記念文化交流館 (石川県金沢市).

(6) Keisuke Tomohara, Atsushi Kato, Isao Adachi. Synthesis of α,α -disubstituted hydantoins through chemoselective derivatization of natural product extracts. The international Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015, 18 December 2015, Honolulu (United States).

(7) 友原啓介. 化学的摂動法を利用した複雑系生薬研究への挑戦. 平成 27 年度富山大学若手研究者等の学术交流・発表会, 2015 年 9 月 8 日, 富山大学 (富山県富山市).

(8) 友原啓介, 伊藤智裕, 長谷川直人, 加藤敦, 足立伊佐雄. 生薬抽出エキスの一挙誘導化による α -アミノ酸誘導体の創製研究. フォーラム富山「創薬」第 41 回研究会, 2015 年 5 月 28 日, オークスカナルパークホテル富山 (富山県富山市).

(9) 友原啓介. 化学的摂動効果を利用した複雑系漢方研究への挑戦. 2015 年度北信越有機合成化学若手の会, 2015 年 4 月 4 日, 山田交流促進センター (富山県富山市).

(10) 友原啓介, 伊藤智裕, 加藤敦, 足立伊佐雄. ヒアルロン酸分解酵素活性評価系における DMSO 添加効果. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸学院大学他 (兵庫県神戸市).

(11) 伊藤智裕, 友原啓介, 鬼形彩花, 加藤敦, 足立伊佐雄. 活性部位特異的なヒアルロニダーゼ阻害剤の探索. 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸学院大学他 (兵庫県神戸市).

〔図書〕
該当無し

〔産業財産権〕
該当無し

〔その他〕
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友原 啓介 (TOMOYAMA, Keisuke)
富山大学・附属病院・助教
研究者番号: 40711677

(2) 研究分担者
該当無し

(3) 連携研究者
該当無し

(4) 研究協力者
該当無し