

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18889

研究課題名(和文)ラン科セッコク属植物の包括的情報構築と潜在的薬用資源の探索

研究課題名(英文) Search for potential medicinal resources and construction of comprehensive information in Genus Dendrobium.

研究代表者

高宮 知子 (TAKAMIYA, Tomoko)

日本大学・薬学部・講師

研究者番号：50513917

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)：ラン科セッコク属植物は、1000種以上が分布しており、遺伝子塩基配列および形態学的特徴から、Asian cladeとAustralasian cladeに大別することができる。Asian cladeの一部の種は広い地域で伝承医薬に用いられてきた。一方、Australasian cladeには、創傷および皮膚疾患に用いられてきた種が知られているが、その二次代謝産物に関する研究は少ない。本研究では、セッコク属植物の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)プロファイルを作製し、化学的多様性解析を実施した。その結果、Australasian cladeの一部の種に特徴的なフェナントレン誘導体を同定した。

研究成果の概要(英文)：The genus Dendrobium, one of the largest genera in the Orchidaceae, includes 1100 species. Phylogenetic analyses based on morphological characteristics and DNA sequences indicated that the genus is divided into two major groups (Asian clade and Australasian clade). However, little is known about the chemical differences and similarities among the species in each clade. We selected 18 Dendrobium species and constructed HPLC profiles. Next, orthogonal partial least square discriminant analysis (OPLS-DA) was applied to the profile matrix to classify Dendrobium species into the Asian and Australasian clades in order to identify the peaks that significantly contribute to the class separation. In the results, two phenanthrenes, 4, 9-dimethoxyphenanthrene-2,5-diol and 1,5-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol, which contributed to the class separation, were isolated from the HPLC peaks. The existence of 1,5-dimethoxyphenanthrene-2, 7-diol was limited to the genetically related Australasian species.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ラン科セッコク属 Dendrobium 系統解析 代謝プロファイル 薬用資源

1. 研究開始当初の背景

ラン科植物は 850 属以上約 2 万種からなる非常に多様なグループであり、薬用資源として利用されている種が多く含まれている。その中でもセッコク属植物 (*Dendrobium*) は、1000 種以上がアジアからオセアニアにかけて分布している多種多様な属である。セッコク属は、遺伝子塩基配列の系統解析および形態学的特徴から、大きく 2 つのグループ (Asian clade, Australasian clade) に分けられている^(1,2)。

セッコク属植物は伝承医薬の基原として使用されており、その中でも、茎を用いた生薬「石斛 (せっこく)」は、中国では特に人気の高い滋陰薬である。Asian clade のおよそ 30 種が石斛の基原として用いられており、特に、*Dendrobium nobile*, *D. chrysotoxum*, *D. fimbriatum*, *D. catenatum* は中華人民共和国薬典に記載されている広く認知された薬用種である。これらの植物からは、抗炎症作用、抗腫瘍作用および抗酸化作用等を示すフェノール類ならびに配糖体が複数報告されている^(3,4)。

400 種以上のセッコク属植物が Asian clade に属するものの、薬用として認識されている種はごく一部であり、多くは薬用資源として未利用である。一方、Australasian clade に属する種の中には、火傷、創傷、白癬および皮膚炎の治療に用いられていた植物があるものの^(5,6)、これらの植物種および近縁種に対する成分研究はほとんど行われていない。そのような背景の中、我々の予備実験において、薬用植物として認識されていない植物種が、薬用資源として利用されてきた種よりも高いラジカル消去活性および一酸化窒素 (NO) 産生抑

制活性を示した。このことから、セッコク属植物の中には、薬用資源としての価値は未知数であるが、様々な生理活性物質を含む有用植物 (潜在的薬用植物) の存在が期待された。

しかしながら、多様かつ希少な種を含むセッコク属植物をすべて解析することは困難であることに加え、各国の生物多様性条約の締結に伴い、国外の生物資源へのアクセスは以前と比べると非常に厳しい。これから新しい生物資源を探索する一つ的手段として、国内に既存の生物資源を活用した多様性解析と、その結果を効果的に利用したスクリーニング法の確立が求められている。

2. 研究の目的

近年、セッコク属植物からは抗酸化、抗腫瘍、抗炎症作用などを示す化合物が報告されており、その二次代謝産物の多様性が注目されている。この多様性は、生合成に関わる酵素群、生育環境、植物器官の構造などの特性と関連している。したがって、薬用利用できる植物を探索するには、多角的な特性を評価することが有効である。本研究は、セッコク属植物からの潜在的薬用植物および生理活性物質の発見を目指して、遺伝子塩基配列の分子系統解析、形態学的分類、成分プロファイリングに基づく化学的多様性および系統解析、民族植物学情報およびエキスの生理活性評価を統合したスクリーニング法を構築することを目指した (図 1)。

3. 研究の方法

(I) 遺伝子塩基配列の系統解析および典型種の選抜

(1) セッコク属植物の ribosomal DNA

(rDNA) の internal transcribed spacer (ITS) 領域と maturaseK (matK) 遺伝子領域を用いた大規模な分子系統解析を行い、セッコク属が近縁種群のユニット (クレード) に分かれることを示した。

(2) 系統解析の結果から得られた遺伝的距離、さらに、形態学的特徴、伝承医薬における植物種の利用を考慮して、各クレードの典型種 (そのクレードの特徴を示した代表とする種) を選抜した。種数が多く、分岐回数の多いクレードからは複数の典型種を選抜した。

(II) HPLC プロファイルの作製

(1) 植物体から茎を採取し、凍結乾燥後、80%メタノールで抽出した。得られたエキスをフォトダイオードアレイ検出器を備えた逆相 HPLC で分析した。

(2) 各 HPLC ピークの保持時間 (tR) の許容誤差範囲を 0.6% と定め (内部標準物質: p-pentylbenzoic acid の tR 誤差範囲より算出)、異なる植物間で、この範囲内でピークの tR が一致し、かつ紫外吸収スペクトルも一致したものを同一化学成分とみなし、一致しないものは異なる化学成分とした。また、各化学成分の内部標準物質に対するピーク面積比を算出し、各ピークを定量した。表 1 が HPLC プロファイルの実体であり、多変量解析の解析対象の変数パラメーター行列となる。

表 1

HPLC検出ピークからの変数パラメーター行列の作成 (HPLCプロファイル)

	Chemical composition 1	Chemical composition 2	...	Chemical composition n
Plant 1	X_1^1	X_2^1	...	X_n^1
Plant 2	X_1^2	X_2^2	...	X_n^2
Plant 3	X_1^3	X_2^3	...	X_n^3
...
Plant m	X_1^m	X_2^m	...	X_n^m

内部標準物質を用いた定量

(III) HPLC プロファイルを用いた化学的多様性および系統解析

HPLC プロファイルを変数としたクラスター分析 (ソフトウェア: SIMCA) を行い、化学成分量に基づく植物間の類似度 (距離) を算出し、系統解析を行った。

HPLC プロファイルを種間で比較し、共通する化学成分、種特異的な化学成分を探索した。また、Asian clade と Australasian clade の分類の指標になる化学成分の探索も試みた。具体的には、HPLC プロファイルを変数として、直交部分最小二乗法による判別分析 (OPLS-DA) を行った。

(IV) 典型種のエキス成分の生理活性試験による評価

茎の 80%メタノール抽出エキスは、液-液抽出法を用いて、ヘキサン画分、酢酸エチル画分、水画分に分けた。得られた画分を実験試料に用いて、次の活性試験を行った。

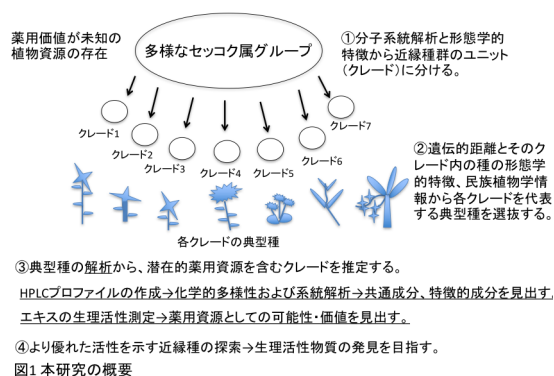
(1) 抗菌活性の測定: 各植物種から得られた各画分をそれぞれエタノールで調製し、ろ紙 (直径 6 mm) に添加した。微生物 (黄色ブドウ球菌、アクネ菌、白癬菌) を塗布した寒天培地にそのろ紙を静置して培養した。その後、発育阻止円を測定した。

(2) 一酸化窒素 (NO) 産生抑制活性の測定：各画分に関して、マクロファージ細胞株 Raw264.7 を用いて、Griess 法により NO 産生抑制活性を測定した。

(3) ラジカル消去活性の測定：各画分に関して、DPPH 法を用いて測定を行った。

(V) 潜在的薬用植物グループの解析

高い活性値を示した典型種が属するクレード (潜在的薬用植物グループ) については、典型種の近縁種を解析した。すなわち、クレード内の種の HPLC プロファイルの作製を行い、エキスの生理活性評価を行った。



4. 研究成果

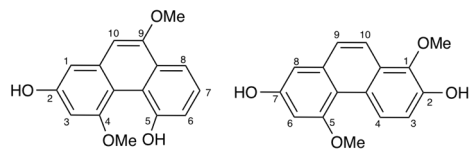
セッコク属植物の rDNA および matK 遺伝子のデータベースの構築と大規模な系統解析を実施し、系統関係を明らかにした。具体的には、Asian clade 210 種⁽⁷⁾および Australasian clade 150 種の系統解析と形態学的分類からセッコク属をクレードに分けた。遺伝的距離、形態学的特徴、民族植物学情報を考慮して、各クレードからそれぞれ典型種を選抜した。典型種の茎から 80%MeOH 抽出エキスを得て、HPLC 分析を行い、28 種の HPLC プロフ

ファイルを作製した。このうち 18 種に関しては、1 種につき 3 個体の HPLC 分析を行い、個体間の差異についても詳細に解析した。次に、HPLC プロファイルを変数としたクラスター分析を行い、化学成分量に基づく植物間の類似度 (距離) を算出して系統分類を行った。さらに、OPLS-DA による判別分析を実施し、Asian clade と Australasian clade のクラス分離に寄与する化学成分の探索を行ったところ、Australasian clade の一部の近縁種群に特徴的な 2 つのフェナントレン誘導体

(4,9-dimethoxyphenanthrene-2,5-diol and 1,5-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol) を同定した

(図 2)。さらに我々は、化合物データベース Reaxys (January, 2018) に収載されていたセッコク属植物由来の 57 のフェナントレン誘導体と、我々が単離した 2 化合物に関して、構造分類を実施した。酸素置換基の位置で比較したところ、1,5-

dimethoxyphenanthrene-2,7-diol の置換基パターンと同様のパターンを示した化合物は 1 化合物のみであった (雑誌発表 1)。



4,9-dimethoxyphenanthrene-2,5-diol 1,5-dimethoxyphenanthrene-2,7-diol
図 2 単離した化合物

典型種の茎の 80%メタノール抽出エキスを、さらに液-液抽出法にて画分に分け、抗菌活性、NO 産生抑制活性、ラジカル消去活性の測定を行った。黄色ブドウ球菌、アクネ菌、白癬菌に対する抗菌活性をペーパーディスク法により測定した結果、生育を抑制した

画分を見出した。これらの画分の HPLC プロファイルと比較したところ、生育抑制を示した複数画分に共通の成分ピークを見出した。抗菌活性を示した画分の中には、高い NO 産生抑制活性 (図 4) およびラジカル消去活性を示した画分があった。

上記の微生物に対して生育抑制効果を示した典型種の近縁種に関しても同様に抗菌活性を測定したところ、同程度以上の生育抑制を示した種を見出し、潜在的薬用資源が含まれると期待されるクレードを特定した。今後は、このクレードに含まれる未解析の種を調べるとともに、高い活性を示した植物種に共通に含まれる化学成分の同定を進める。

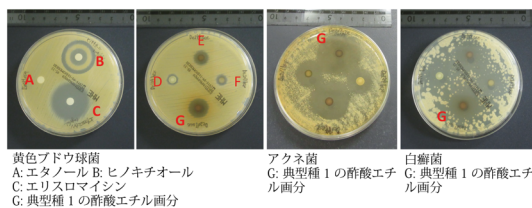
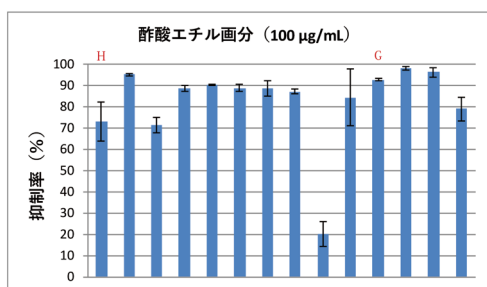


図 3 ペーパーディスク法による抗菌活性試験



H: 塩酸アミノグアナジン (終濃度 100 µM) G: 典型種 1 の酢酸エチル画分
図 4 NO 産生抑制測定

引用文献

- (1) Yukawa T. *et al.*, *Lindleyana*, **8**, 211–221 (1993).
- (2) Clements M. A., *Telopea*, **10**, 247–298 (2003).
- (3) Ng T. B. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1795– 803 (2012).

- (4) Kovács A. *et al.*, *Phytochemistry*, **69**, 1084–1110 (2008).
- (5) Wood H. P. “The *Dendrobium*,” A.R.G. Gantner Verlag Ruggell, Liechtenstein, 2006.
- (6) Lawler L. Traditional uses. *Dendrobium and its relatives*. (Lavarack PS, Stocker LG, Harris W eds.). Kangaroo Press, East Roseville. pp 43–45 (2000).
- (7) Takamiya T. *et al.*, *AoB PLANTS*, **6**: plu045; doi:10.1093/aobpla/plu045 (2014).

5 主な発表論文等

雑誌論文 (計 1 件)

- (1) Takamiya T., Kitamura S., Suzuki S., Shioda N., Matsuo Y., Murase K., Kaiho Y., Tsurumaki Y., Fujiwara Y., Sone M., Machida T., Matsumoto R., Miyamoto A., Hirose D., Furukawa M., Makino M., Matsuzaki K., Kitanaka S., Yukawa T., Iijima H., Identification of two phenanthrene derivatives from Australasian allied species in genus *Dendrobium*. *Chem. Pharm. Bull.*, **66** (6), 642-650, 2018. (査読有)

学会発表 (計 5 件)

- (1) ラン科セッコク属植物の二次代謝産物の化学的多様性解析 (1) . 草薙 真弓, 金子 実樹, 古川 めぐみ, 北中 進, 遊川 知久, 飯島 洋, 高宮 知子, 日本薬学会第 138 年会, 27PA-am184, 金沢, 2018 年 3 月 28 日.
- (2) ラン科セッコク属植物エキスの白癬菌への影響. 宮本智弘, 横山史歩, 金子実樹, 草薙真弓, 北中進, 遊川知久, 飯島洋, 高宮知子, 日本生薬学会第 64 回年会, 2P-04, 船橋市, 2017 年 9 月 10 日.
- (3) ラン科セッコク属植物エキスの微生物に対する影響の評価. 菊地泰平, 清水玲子, 吉野圭一, 宮本智弘, 横山史歩, 蔣文君,

北中進, 鈴木和浩, 遊川知久, 飯島洋, 高宮知子, 日本植物園協会第 51 回大会, 長野県白馬五竜, 2016 年 6 月 17.

- (4) ラン科セッコク属植物エキスの抗炎症活性評価. 高宮知子, 清水玲子, 菊地秦平, 吉野圭一, 町田智美, 曾根麻友美, 藤原有紀子, 松本亮平, 蔣文君, 北中進, 遊川知久, 飯島洋, 日本薬学会第 136 年会, 28AB-pm114, 横浜, 2016 年 3 月 28 日.
- (5) ラン科セッコク属の多様性解析に基づく薬用資源の探索. 曾根麻友美, 藤原有紀子, 町田智美, 松本亮平, 菊地秦平, 清水玲子, 吉野圭一, 北中進, 遊川知久, 飯島洋, 高宮知子, 日本植物園協会 50 周年記念大会, P22, 京都, 2015 年 6 月 26 日.

[その他]

ホームページ等

http://biofunctionalorgchem.pha.nihon-u.ac.jp/sheng_ti_ji_neng_hua_xue.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高宮 知子 (TAKAMIYA, Tomoko)

日本大学・薬学部・講師

研究者番号: 50513917