

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18890

研究課題名(和文)新規多量体インドールアルカロイドの探索と細胞死誘導機構の解析

研究課題名(英文)Studies on the polymeric alkaloids and analysis of the mechanism of cell death

研究代表者

平澤 祐介(Hirasawa, Yusuke)

星薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90434183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：キョウチクトウ科Leuconotis griffithiiを素材として新規医薬リードの探索研究を行った結果、2種の新規骨格アルカロイドを含む4種の新規ビスモノテルペンインドールアルカロイドcompound A～Dを単離した。得られた新規化合物について各種活性評価を行ったところ、compound A、B、DにA549細胞に対する細胞増殖阻害活性を見出し、その機構はオートファジーによる細胞死であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Four new bis-monoterpene indole alkaloids (compounds A-D) including two novel skeletons were isolated from Leuconotis griffithii. Compounds A, B, and D showed growth inhibitory activities against A549 cells by autophagy pathway.

研究分野：天然物化学

キーワード：インドールアルカロイド キョウチクトウ科 Apocynaceae

1. 研究開始当初の背景

(1) キョウチクトウ科の植物は、古くから種々の伝統的民間薬として用いられ、その薬効成分の多くは、モノテルペンインドールアルカロイドであると考えられてきた。例として、キョウチクトウ科植物ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) から単離された vincristine や vinblastine は抗悪性腫瘍活性を、また同科インドジャボク (*Rauwolfia serpentina*) より単離された reserpine は血圧降下作用を見出され、本科植物の創薬資源としての地位を確固たるものにしていく。

(2) 植物を対象として行われてきた天然機能性分子の探索研究において、新しい骨格を有する天然分子の発見は減少傾向にある。このような中で、申請者は、数多くの新規骨格を有する天然分子を未利用植物資源より発見してきた。近年、種々のキョウチクトウ科植物の研究にも着手し、*Hunteria zeylanica* より bisnicalaterine A-C を、*Leuconotis griffithii* より bisleuconothine A および bisleuconothine A を単離、構造決定している。これらの二量体モノテルペンインドールアルカロイドの多くは、それぞれを構成する単量体とはまったく異なる強い細胞増殖阻害活性や抗マラリア原虫活性を示した。特に bisleuconothine A については、アポトーシスを起こさない低濃度において、オートファジー細胞死による抗がん活性を示すことを見出した。このような多量体モノテルペンインドールアルカロイドの活性は非常に興味深く、詳細な構造活性相関の検討が望まれる。オートファジーは細胞内のタンパクを分解する細胞機構であり、神経変性、老化、免疫、発生などに関与することが知られている。従来、抗がん剤に期待される作用は、がん細胞にアポトーシス細胞死を誘導する効果であった。しかしながら、近年、オートファジーは多くのがん細胞においてその機構が抑制されており、発がん機構にも関与していることが明らかにされている。このような知見より、近年、新たな抗がん剤としてがん細胞にオートファジー細胞死を誘導する物質の利用が注目されている。

2. 研究の目的

本研究は、国内、熱帯域に自生するキョウチクトウ科 *Tabernaemontana* 属、*Leuconotis* 属、および *Alstonia* 属植物を素材として、申請者が既に有する学術的基礎データと天然物化学的な精密技術を基盤に、オートファジーやアポトーシスといった機能的細胞死を誘導する生物活性多量体アルカロイドを探索し、開発することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 国内、マレーシアおよびインドネシア

に自生する *Tabernaemontana* 属、*Leuconotis* 属、*Alstonia* 属植物を採取あるいは研究協力者を通して入手する。採集した材料にメタノール、酢酸を用いて、抽出物を調製する。抽出物について、2% 酒石酸と酢酸エチルによる液々分配を行い、次に水層に炭酸ナトリウムを加え塩基性としたのち、クロロホルムで抽出し、アルカロイド画分を得る。

(2) アルカロイド画分について、複数回の Sephadex LH-20 (ゲルろ過) カラムグラフィーを行い、高分子量画分を得る。このものについて、詳細な MS の分析による多量体アルカロイドの検索を行い、さらにシリカゲル、アミノシリカゲル、ODS を用いた各種カラムクロマトグラフィーおよび HPLC によって目的化合物の分離、精製をする。

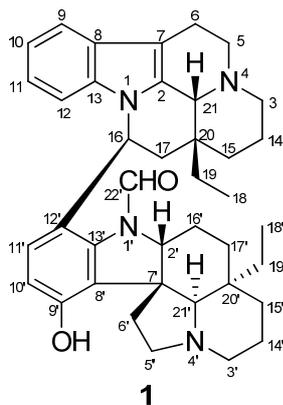
(3) 得られた多量体アルカロイドについては、NMR, MS 等を中心とした分光学的手法により構造解析を行う。また、結晶化に成功した場合には X 線結晶解析を行う。立体化学の解析において必要な場合には分解反応を行い、分解生成物の光学活性体を合成し、天然物と比較することにより絶対立体配置を決定する。

(4) 構造が確定した活性成分について、抗マラリア原虫活性、抗がん活性、チューブリン重合阻害活性、血管弛緩作用などの試験を検討し、詳細な活性評価を行う。

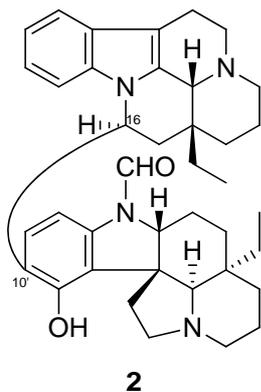
(5) 抗がん作用の評価については、各植物エキスあるいは精製途中のフラクションに対して MTT アッセイを適用し、スクリーニングを行う。アッセイの過程では、添加エキスによる細胞形態の変化について、顕微鏡下の観察を重要視する。一般的に細胞傷害性試験に用いられる HL-60 細胞等の浮遊細胞については、顕微鏡下の詳細な観察が困難であることから、付着性の細胞株 A549 (ヒト非小細胞肺癌) 等を評価に使用する。細胞の形態観察から、認められる細胞傷害性がアポトーシス、ネクロシス、オートファジー、増殖停止の何れに起因するかを判断し、必要に応じて詳細な解析を行う。たとえば、細胞死がアポトーシスに起因すると予想されるならば、カスパーゼ -3/7, -8, -9 の活性について蛍光プレートリーダーを用いて測定する。また、オートファジーが予想されれば LC-3II の発現をウェスタンブロッティング (WB) で評価する。ネクロシスの場合には乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定する。さらに、有望な化合物が単離された際には、上記に加え各種 Bcl-2 ファミリーのタンパク発現に対する WB、チューブリン重合阻害、あるいはフローサイトメーターを用いた細胞周期解析等を実施し、当該化合物の持つ特性を詳細に検討する。

4. 研究成果

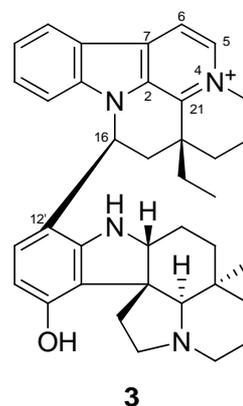
(1) マレーシア産キョウチクトウ科 *Leuconotis griffithii* の樹皮を素材として成分研究を行った結果、新規ビスモノテルペンインドールアルカロイド compound A~D (1~4) の単離に成功した。それらの立体構造は各種二次元NMR (^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC, NOESY) によって明らかにし、DFT 計算を用いた CD スペクトルの比較により絶対立体配置まで推定した。



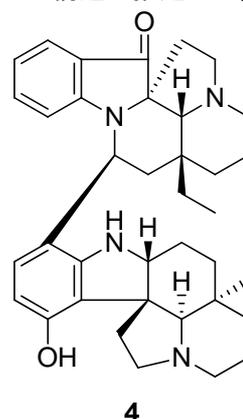
Compound A (1) は、eburnane 骨格の 16 位と aspidosperma 骨格の 12 位が結合し、さらに aspidosperma 骨格の 1 位にホルミル基が結合した構造と推定した。本化合物は N-CHO 結合によって 2 種類の回転異性体を生じ、構造解析が困難であるが、慎重な解析により両者とも明瞭な構造を明らかにした。bisleuconothine A をホルミル化することで compound A に誘導することで絶対立体配置を含めて明らかにした。



Compound B (2) は、eburnane 骨格の 16 位と aspidosperma 骨格の 10 位が結合し、さらに aspidosperma 骨格の 1 位にホルミル基が結合した新規骨格アルカロイドと推定した。本化合物も 1 と同様に N-CHO 結合によって 2 種類の回転異性体を生じるが、慎重な解析により両者とも明瞭な構造を明らかにした。



Compound C (3) は、bisleuconothine A の C 環が芳香化した構造と推定した。



Compound D (4) は、spiroeburnane 骨格の 16 位と aspidosperma 骨格の 12 位が結合した新規骨格アルカロイドと推定した。

Compound A~D について A549 細胞に対する細胞増殖阻害活性を評価したところ、Compound A、B、D が活性を示し、その機構はオートファジーによる細胞死であることを見出した。Compound A は bisleuconothine A の N-ホルミル体であるが、同等の活性を示したことから 2 つの化合物の表面上の変化は乏しいことが窺える。Compound C は他に比べて水溶性が高い構造をしており、そのことが活性を減弱していると考えた。また、compound D は B より活性が弱く、spiroeburnane 骨格の構造が活性値に影響を及ぼすと考えた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

南 若余、安田 玲奈、吉川 彰、平澤 祐介、Alfarius Eko Nugroho、森田 博史、キョウチクトウ科サンユウカに含まれるアルカロイドの成分研究、日本生薬学会第 63 回年会、2016 年 9 月 24 日~25 日、富山国際会議場(富山県富山市)

平澤 祐介、張 雯佳、Alfarius Eko Nugroho、Chin Piow Wong、金田 利夫、森田 博史、キ

ヨウチクトウ科 *Leuconotis griffithii* より単離した新規アルカロイドの構造、日本生薬学会第 63 回年会、2016 年 9 月 24 日~25 日、富山国際会議場（富山県富山市）

張 雯佳、Alfarius Eko Nugroho、Chin Piow Wong、平澤 祐介、金田 利夫、森田 博史、キョウチクトウ科 *Leuconotis griffithii* より単離した新規アルカロイドの構造と活性、日本生薬学会第 63 回年会、2016 年 9 月 24 日~25 日、富山国際会議場（富山県富山市）

張 雯佳、Alfarius Eko Nugroho、平澤 祐介、内山 奈穂子、袴塚 高志、金田 利夫、森田 博史、キョウチクトウ科 *Leuconotis griffithii* より単離した新規アルカロイドの構造、日本生薬学会第 62 回年会、2015 年 9 月 11 日~12 日、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/shouyaku/shouyaku.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

平澤 祐介（HIRASAWA, Yusuke）

星薬科大学・生薬学教室・講師

研究者番号：90434183