

令和元年6月21日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15472

研究課題名(和文)オートファジーを制御する二量体インドールアルカロイドの探索および作用機序の解明

研究課題名(英文) Discovery and mechanism of action of dimeric indole alkaloids with autophagy-regulating activity

研究代表者

ヌグロホ アルファリウス・エコ (Nugroho, Alfarius Eko)

星薬科大学・薬学部・特任助教

研究者番号：40770029

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)：インドネシア産 *Voacanga grandifolia* および *Tabernaemontana macrocarpa*、マレーシア産 *Leuconotis griffithii*、*Leuconotis eugenifolius* を素材に、8種の新規を含む、計16種のモノテルペンインドールアルカロイドの分離に成功した。単離した化合物については、A549細胞(ヒト非小細胞肺癌)に対して細胞増殖阻害活性を評価した結果、*Leuconotis griffithii* および *Voacanga grandifolia* から単離した6種の化合物が活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、アポトーシス耐性を持つがん細胞が知られており、新たな抗がん剤としてオートファジーを制御する物質の利用が注目されている。本研究により、新たなリード化合物が見出されることが期待される。また、作用機構の解明により新規標的分子の解明も考えられる。

研究成果の概要(英文)：Eight new and 8 known monoterpene indole alkaloids were isolated from *voacanga grandifolia*, *Leuconotis griffithii*, *Leuconotis eugenifolius* and *Tabernaemontana macrocarpa* collected in Indonesia and Malaysia. The isolated compounds were tested for growth inhibitory activity against A549 (human lung adenocarcinoma), and 6 compounds isolated from *Leuconotis griffithii* and *Voacanga grandifolia* showed cell growth inhibitory activity.

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 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内の遺伝的にコードされた分子機構が発動する細胞死は、「制御された細胞死」と呼ばれている。制御された細胞死には、アポトーシス、制御されたネクローシス、オートファジー細胞死、等がある。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、アポトーシス耐性を持つがん細胞が知られており、新たな抗がん剤としてオートファジーを制御する物質の利用が注目されている。

(2) 申請者は、これまで、植物資源を用いた新規医薬リード化合物の探索研究を行い、数多くの活性を有する新規天然分子を発見してきた(研究業績を参照)。近年、申請者は、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 Bisleucocurine A および Bisleuconothine A (以下、Bis-A) などの二量体モノテルペンインドールアルカロイドを発見している。これら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抑制活性や抗マラリア原虫活性を示した。特に Bis-A については、最近、各種がん細胞に対して、オートファジーを誘導することにより、細胞増殖阻害活性を示すことを見出した。しかしながら、Bis-A のターゲット分子はまだ判明されておらず、詳細な作用機構の検討が必要である。そこで、申請者は、Bis-A のオートファジー誘導の分子機構を解析し、Bis-A のターゲット分子の同定を目指す。さらに、オートファジーを制御する二量体モノテルペンインドールアルカロイドの報告は非常に少ない。Bis-A のような二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。また、Bis-A の他、さらなるオートファジーを制御する二量体モノテルペンインドールアルカロイドの探索、開発が期待される。そこで本研究は、二量体モノテルペンインドールアルカロイドを含有するキョウチクトウ科植物に注目し、申請者が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、新しいオートファジーを制御する二量体アルカロイドを探索し、開発することを目指す。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、キョウチクトウ科 *Leuconotis* 属および *Voacanga* 属植物に注目して、オートファジーを制御する二量体モノテルペンインドールアルカロイドの発見および Bisleuconothine A のオートファジー誘導の分子機構の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) マレーシアおよびインドネシアに自生する *Leuconotis* 属、*Voacanga* 属植物を採取あるいは入手する。採集した材料を用いて、抽出物を調製する。抽出物について、酸および塩基を用いた液々分配を行い、アルカロイド画分を得る。

(2) アルカロイド画分を、各種カラムクロマトグラフィーを用いて分離・精製を行い、化合物を単離する。

(3) 得られた化合物については、NMR, MS 等を中心とした分光学的手法により解析を行う。また医薬品開発において、絶対立体配置を決定することは不可欠であるため、本研究では、得られた化合物については X 線構造解析、円偏光二色性(ECD)法、密度汎関数理論法等を用いて、絶対立体配置を決定する。

(4) 構造が確定した成分について、細胞増殖阻害活性評価を行う。また、細胞増殖阻害活性が認められた化合物について、オートファジーが促進されるか否かを確認する。

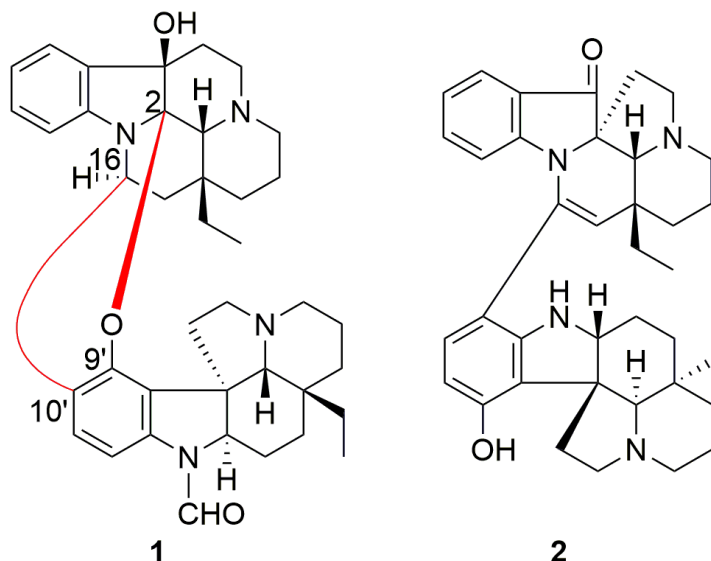
4. 研究成果

(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 1-2 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) および DFT 計算によって明らかにした。1 は、eburnane 骨格の 16 位と aspidosperma 骨格の 10 位、eburnane 骨格の 2 位と aspidosperma 骨格の 9 位が結合した新規骨格アルカロイドと推定した。2 は、spiroeburnane 骨格の 16 位と aspidosperma 骨格の 12 位が結合した新規アルカロイドと推定した。1 - 2 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、1 - 2 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。

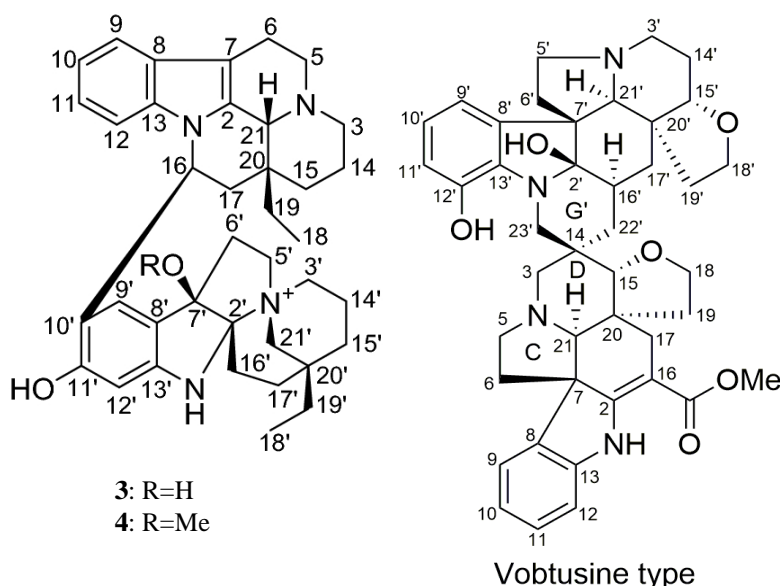
(2) マレーシア産キョウチクトウ科 *Leuconotis eugenifolius* の樹皮を素材として成分研究を行った結果、新規ビスモノテルペンインドールアルカロイド 3 - 4 と共に melaxillarinine の単離に成功した。それらの立体構造は各種二次元 NMR (^1H - ^1H COSY、HSQC、HMBC、NOESY) および DFT 計算によって明らかにした。また、TDDFT 計算を用いた CD スペクトルの比較により絶対立体配置まで推定した。3 - 4 は、eburnane 骨格の 16 位と quebrachamine 骨格の 10 位が結合した新規骨格アルカロイドと推定した。

(3) インドネシア産キョウチクトウ科 *Voacanga grandifolia* の葉部からは、2 種の新規を含む、計 4 種の vobtusine 類ビスモノテルペンインドールアルカロイド (5 - 8) を単離し、それらの構造を各種二次元 NMR により明らかにした。

(4) インドネシア産キョウチクトウ科 *Tabernaemontana macrocarpa* の樹皮からは、2 種の新規を含む、計 7 種のモノテルペンインドールアルカロイドの単離に成功し、それらの構造を各種二次元 NMR により明らかにした。



(5) 単離した化合物については、A549細胞(ヒト非小細胞肺癌)に対して、細胞増殖阻害活性を評価した。*Voacanga grandifolia* から単離した4種のビスインドールアルカロイド、*Leuconotis griffithii* から単離した2種のビスインドールアルカロイド(1, 2, 5-8)は細胞増殖阻害活性を示した。また、*Leuconotis griffithii* から単離した化合物1-2添加後、A549細胞のLC3-IIタンパクの発現量が上昇することをWBで判明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tang, Y.; Nugroho, A. E.; Hirasawa, Y.; Tougan, T.; Horii, T.; Hadi, A. H. A.; Morita, H., Leucophyllinines A and B, bisindole alkaloids from *Leuconotis eugenifolia*. *J. Nat. Med.* 審査有, 2019. 印刷中

DOI: 10.1007/s11418-019-01297-5

Nugroho, A. E.; Zhang, W.; Hirasawa, Y.; Tang, Y.; Wong, C. P.; Kaneda, T.; Hadi, A. H. A.; Morita, H., Bisleuconothines B-D, Modified Eburnane-Aspidosperma Bisindole Alkaloids from *Leuconotis griffithii*. *J. Nat. Prod.* 審査有, 2018, 81, 2600-2604.

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.8b00749

〔学会発表〕(計2件)

唐怡鳴, 張雯佳, Alfarius Eko Nugroho, Chin Piow Wong, 平澤祐介, 金田利夫, 森田博史(星薬大)「キョウチクトウ科 *Leuconotis eugenifolia* 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65回年会、2018年9月16～17日(広島)

唐怡鳴, 張佳, Alfarius Eko Nugroho, Chin Piow Wong, 平澤祐介, 金田利夫, A. Hamid A. Hadi, 森田博史(星薬大、マラヤ大・理)「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 64 回年会、2017 年 9 月 9
～ 10 日（千葉）

〔その他〕

ホームページ等

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

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。