

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510293

研究課題名(和文) 薬用植物由来新規生細胞蛍光イメージリング剤の探索と創製

研究課題名(英文) Search for new fluorescent natural products from medicinal plants and their properties in living cells

研究代表者

大崎 愛弓(OHSAKI, Ayumi)

日本大学・文理学部・准教授

研究者番号：50161360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、主として南米産薬用植物の蛍光成分のスクリーニングを行い、Quassia amara の新規蛍光成分Amarastelline Aを単離し、構造を明らかとした。本化合物の種々の溶媒中での蛍光特性およびHeLa生細胞の蛍光イメージリングについて検討を行った。さらにAmarastelline Aの全合成研究を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed screening studies of fluorescent compounds derived from tropical medicinal plants. A strongly fluorescent compound, amarastelline A, consisting of a canthin unit and a carboline unit, was isolated from Quassia amara. Its fluorescent properties in various solvents and its ability to stain the cell cytoplasm of living HeLa cells were investigated. Furthermore, the total synthesis of amarastelline A and its derivatives were studied.

研究分野：天然物化学

キーワード：天然蛍光物質

1. 研究開始当初の背景

天然蛍光物質はオワンクラゲの GFP が有名であり、医学・生物学研究において広く用いられている。一方、種々の合成蛍光色素も多く用いられている。蛍光色素は、生体プローブとしての利用や、細胞内の微細構造の標識化のための研究に広く用いられているが、生体への適用については化合物の安定性や生体への安全性から制約も多く存在する。天然低分子を標的とした蛍光剤の研究は、ウンベフェロンが広く知られているが、蛍光発色が弱いことが難点の一つである。現在多くの蛍光色素が開発されているが、その殆どが合成物であり、基盤とする構造上の骨格は多くはない。

2. 研究の目的

天然低分子は人の叡智を超えた構造を持ち、新たな薬剤の開発を考えるうえでの基盤であり、作用メカニズムも新しい情報を与えることが多い。本研究は、新たな構造と作用機序を持つ薬用植物由来新規生細胞蛍光イメージリング剤の探索と創製を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 独自に構築した薬用植物エキスをライブラリーの中から蛍光を放つエキスを選択し、エキスを種々の分離用担体を用いることにより、天然蛍光物質の単離を行う。得られた複数の天然蛍光物質に対し、高分解能 NMR, MASS スペクトルを行い、3次元構造を含めて構造を明らかにする。
- 2) 新規蛍光天然化合物アマラステリン A (1) および得られた蛍光天然化合物の蛍光特性について、詳細に検討する。また、化合物 1 を細胞に導入し、蛍光挙動を検討するとともに、蛍光物質の細胞内部で光る理由について調べる。化合物 1 を用いて、種々の細胞に対する挙動について検討する。
- 3) 化合物 1 の全合成および類縁体の合成研究を行う。
- 4) 独自に構築した薬用植物エキスをライブラリー中の蛍光物質についても探索を継続する。

4. 研究成果

- 1) 新規化合物の構造と生細胞への導入
1,000 種を超える植物エキスを微量とり、メタノールに溶かし、蛍光ボックスの中で光る溶液をピックアップし、最終的に数種のエキスを選定した。その中で最も強い蛍光を放つニガキ科の *Quassia amara* (健胃剤) の蛍光成分の探索を行った。その結果、一つの極めて強い蛍光を持つ物質の単離に成功した。(図 1) その蛍光物質の構造は、カンチンアルカロイド部 (ユニット A) とカルボリンアルカロイド部 (ユニット B) がメチレンを介して結合した二つのユニットから構成されるアルカロイドであり、ダンベル型の新規化合物 1 を見出すことに成功した。化合物 1 を

細胞に導入したところ、細胞を強く光らせることが明らかとなった。1 は、GFP 様の緑色の強力な蛍光を放っており、細胞に対する毒性は見られなかった。(P388; IC₅₀>20 μM)

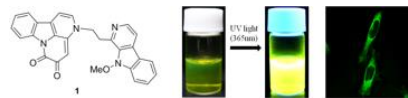


図 1

化合物 1 の蛍光は、DMSO 中において励起波長 450 nm にて 520 nm での強い蛍光を示した。種々の溶媒における蛍光スペクトルについて調べた。合成化合物 2 と新規蛍光物質 1 との UV および蛍光スペクトルでの比較では、殆ど同じ挙動を示したことから、蛍光部位はカンチン部であることが判明した。(図 2)

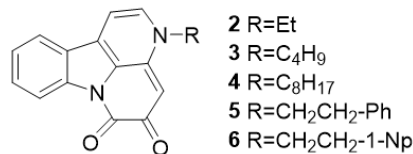


図 2

HeLa 細胞を用いて細胞導入実験を行った結果、細胞質内に蛍光導入されていることが共焦点レーザー顕微鏡において判明し、細胞核内は光っていないことを確認した。核染色剤であるヘキストとの共染色により、明確にすみ分けができていることを確認した。(図 1) しかしながら、細胞質のどの部位を染色しているのかは現在のところ明らかには出来ていない。化合物 1 の生細胞への導入率は FACS を用いて検討を行った結果 97%以上の極めて高い蛍光導入率を持つことが明らかとなった。合成化合物である 2 が、1 に比して、細胞内での蛍光輝度が弱いことから、細胞質への接着にはカルボリン部が必要であると考え、カンチン誘導体 3-6 を Fisher の方法に従い合成を行った。(図 2)

2) アマラステリン A(1) 誘導体の合成と蛍光特性および生細胞への導入

生細胞への導入に際し、カルボリン部 (ユニット B) が細胞導入について不可欠であるのかどうかを検証するために、化合物 3-6 の類縁体を用いて HeLa 生細胞への導入を試みた。その結果、輝度の差異は認められるが、全てについて細胞導入が行われていることを確認した。さらに、共焦点レーザー顕微鏡下においては、PC12 細胞を用いて実験を試みた。誘導体 5, 6 については細胞質への導入が行われていることを確認した。これらの結果より、カルボリン部位は、他の置換基であっても良いが、脂肪鎖よりも芳香族性の化合物である方がより良い結果を与えることが分かった。これらについてはさらに詳細な検討を行う予定である。

3) アマラステリン A (1)の全合成 (スキーム 1)

カンチンユニットと *N*-メトキシカルボリンユニットを最終段階でカップリングさせるアマラステリン A の収束型合成を検討した。新規カンチン合成法の開発を検討した結果、穏和でアトムエコノミーな条件を見出すことができ、これまでにない効率的なカンチン合成法を確立できた。この反応をアマラステリン骨格の構築に応用した結果、高収率でアマラステリン骨格の合成に成功した。

カンチン合成法の開発

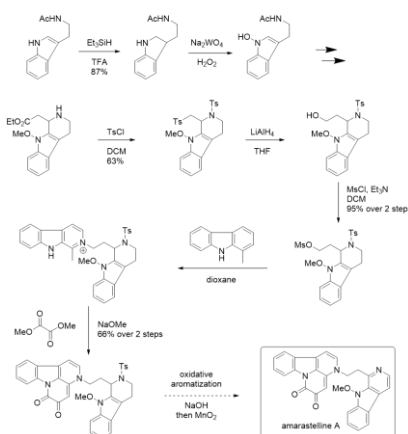
Fischer らが以前におこなったカンチン形成反応は、無溶媒中 180°C以上の高温条件を必要とし、アマラステリンAのような化合物の合成には適用することはできなかった。そこで今回詳細にカンチン合成法について検討した結果、穏和かつ原子効率の高い新規カンチン合成法を見出すことに成功した。本手法は、天然物ハルマンとカルボリンユニットを求核置換反応により連結後、シウ酸ジメチルとナトリウムメトキシドを添加するワンポット反応であり、種々のカンチン誘導體合成に適用可能である。

アマラステリン骨格の合成

新規カンチン合成法をアマラステリン A の合成に適用した。10 段階で調製した *N*-メトキシテトラヒドロカルボリンユニットをハルマンと連結後、カンチン合成反応を行った結果、66%の収率でアマラステリン骨格の合成に成功した。

今後の方策

新規カンチン合成法の確立によりアマラステリン骨格を構築できたので、最後にテトラヒドロピリジン部の酸化芳香族化反応をおこない天然物アマラステリン A の全合成を完了させることが第一課題である。さらにアマラステリン A の構造と蛍光との関係を明らかにすべく、開発したカンチン合成法を用いて種々のカンチン誘導體を合成し、蛍光特性を評価しさらに強力な新規蛍光化合物の創製を行う計画である。



スキーム 1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 32 件) 全て査読有

1. 大崎愛弓, 宝谷尚徳, 小沢正晃, 岸田晶夫, 小宮山寛機, 久保伊佐夫, 南米産薬用植物 *Licaria puchury-major* 種子のアルカロイド成分と薬剤耐性がん細胞に対する殺細胞活性, *日本大学文理学部自然科学研究所研究紀要*, **2015**, *50*, 295-298.
2. Harada, K.; Kubo, M.; Horiuchi, H.; Ishii, A.; Esumi, T.; Hioki, H.; Fukuyama, Y. Systematic Asymmetric Synthesis of All Diastereomers of (-)-Talaumidin and Their Neurotrophic Activity. *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 7076-7088. DOI: 10.1021/acs.joc.5b00945
3. Kubo, M.; Nishikawa, Y.; Harada, K.; Oda, M.; Huang, J-M.; Domon, H.; Terao, Y.; Fukuyama, Y. Tetranorsesquiterpenoids and Santalane-type Sesquiterpenoids from *Illicium lanceolatum* and their Antimicrobial Activity against the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *J. Nat. Prod.*, **2015**, *78*, 1466-1469. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00237
4. Harada, K.; Imai, A.; Uto, K.; Carter, R. G.; Kubo, M.; Hioki, H.; Fukuyama, Y. Formal Synthesis of Neurotrophic Jiadifenin Using Mizoroki-Heck and Tsuji-Trost Reactions. *Tetrahedron*, **2015**, *71*, 2199-2209. DOI:10.1016/j.tet.2015.02.090
5. Kubo, M.; Gima, M.; Baba, K.; Nakai, M.; Harada, K.; Suenaga, M.; Matsunaga, Y.; Kato, E.; Hosoda, S.; Fukuyama, Y. Novel Neurotrophic Phenylbutenoids from Indonesian Ginger Bangle, *Zingiber purpureum*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 1586-1591. DOI:10.1016/j.bmcl.2015.02.005
6. Omura, K.; Ohsaki, A.; Zhou, B.; Kishida, M.; Mitsuma, T.; Kobayashi, A.; Hagey, L. R.; Hofmann, A. F.; Iida, T. Improved Chemical Synthesis, X-ray Crystallographic Analysis, and NMR Characterization of (22*R*)-(22*S*)-Hydroxy Epimers of Bile Adics. *Lipid*, **2014**, *49*, 1169-1180. DOI: 10.1007/s11745-014-3955-y
7. Saito, Y.; Sasaki, Y.; Ohsaki, A.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Structures of Six New Compounds from *Ligularia brassicoides*. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 9726-9730. DOI:10.1016/j.tet.2014.10.003
8. Shimada, M.; Ozawa, M.; Iwamoto, K.; Fukuyama, Y.; Kishida, A.; Ohsaki, A. A Lanostane Triterpenoid and Three Cholestane Sterols from *Tilia kiusiana*. *Chem Pharm Bull*, **2014**, *62*, 937-941. DOI:org/10.1248/cpb.c14-00200
9. Saito, Y.; Sasaki, Y.; Komiyama, T.; Ohsaki, A.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Structure and Cytotoxic Evaluation of Five 12-Oxygenated Eremophilanes from *Ligularia lingiana*. *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 5878-5883. DOI:10.1016/j.tet.2014.06.030
10. Satoh, R.; Saito, T.; Ogata, H.; Ohsaki, A.

- Iida, T.; Asahina, K.; Mitamura, K.; Ikegawa, S.; Hofmann A. F.; Hagey, L. R. *N*-methyltaurine *N*-acyl Amidated Bile Acids and Deoxycholic Acid in the Bile of Angelfish (Pomacanthidae): a Novel Bile Acid Profile in Perciform Fish. *Steroids*, **2014**, *80*, 15-23. DOI:10.1016/j.steroids.2013.11.014
11. Harada, K.; Arioka, C.; Miyakita, A.; Kubo, M.; Fukuyama, Y. Efficient Synthesis of Neurotrophic Honokiol Using Syzuku-Miyaura Reactions. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 6001-6003. DOI:10.1016/j.tetlet.2014.09.040
12. Kubo, M.; Liu, Y.; Ishida, M.; Harada, K.; Fukuyama, Y. A New Spiroindene Pigment from the Medicinal Fungus *Phellinus ribis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **2014**, *62*, 122-124. DOI:10.1248/cpb.c13-00722
13. Saito, Y.; Taniguchi, M.; Komiyama, T.; Ohsaki, A.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M. Four New Compounds from *Ligularia virgaurea*; Isolation of Eremophylane and Noreremophylane Sesquiterpenoids and the Absolute Configuration of 2 α -Hydroxyeremophyl-11-en-9-one by the CD Spectrum and DFT Calculation. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 8505-8510. DOI:10.1016/j.tet.2013.06.104
14. Etoh, T.; Kim, Y.P.; Ohsaki, A.; Komiyama, K.; Hayashi, M. Inhibitory Effect of Erythraline on Toll-like Receptor Signaling Pathway in Raw264.7 Cells. *Biol Pharm Bull*, **2013**, *36*, 1363-1369. DOI:10.1248/bpb.b12-00910
15. Harada, K.; Makino, K.; Shima, N.; Okuyama, H.; Esumi, T.; Kubo, M.; Hioki, H.; Asakawa, Y.; Fukuyama, Y. Total Synthesis of Riccardin C and (\pm)-Cavicularin via Pd-catalyzed Ar-Ar Cross Couplings. *Tetrahedron*, **2013**, *69*, 6959-6968. DOI:10.1016/j.tet.2013.06.064
16. Makino, K.; Harada, K.; Kubo, M.; Hioki, H.; Fukuyama, Y. Total Synthesis of Bisbibenzyl Dibenzofuran Asprelin A via Intramolecular Oxidative Coupling. *Nat. Prod. Comm.*, **2013**, *8*, 915-918.
17. Kubo, M.; Ishii, R.; Ishino, Y.; Harada, K.; Matsui, N.; Akakgi, M.; Kato, E.; Hosoda, S.; Fukuyama, Y. Evaluation of Constituents of *Piper retrofractum* Fruits on Neurotrophic Activity. *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, 769-773. DOI:10.1021/np300911b
18. Ohsaki, A.; Ozawa, M.; Komiyama, T.; Kishida, A.; Isobe, T. The Cytotoxic Activity of Diterpenoids from *Isodon* Species, *Nat Prod Commun*, **2012**, *7*, 977-978.
19. Taniguchi, K.; Takizawa, S.; Hirano, T.; Murata, S.; Kagechika, H.; Kishida, A.; Ohsaki, A. Amarastelline A: New Fluorescent Alkaloid from *Quassia amara* and its Properties in living Cells. *ChemPlusChem*, **2012**, *77*, 427-431. DOI:10.1002/cplu.201200016
20. Nagano, H.; Hanai, R.; Yamada, H.; Matsushima, M.; Miura, Y.; Hoya, T.; Ozawa, M.; Fujiwara, M.; Kodama, H.; Torihata, A.; Onuki, H.; Nezu, Y.; Kawai, S.; Yamazaki, M.; Hirata, H.; Saito, Y.; Tori, M.; Ohsaki, A.; Gong, X.; Kuroda, C. Chemical and genetic study of *Ligularia duciformis* and Related Species in Sichian and Yunnan Provinces of China. *Chemistry and Biodiversity*, **2012**, *4*, 789-805. DOI:10.1002/cbdv.201100240
21. Saito, Y.; Takashima, Y.; Okamoto, Y.; Komiyama, T.; Ohsaki, A.; Gong, X.; Tori, M. Two New Norursane-type Triterpenoids from Collected in China. *Chem Lett.*, **2012**, *41*, 372-373. DOI:10.1246/cl.2012.372
22. Liu, Y.; Kubo, M.; Fukuyama, Y. Nerve Growth Factor-Potentiating Benzofuran Derivatives from the Medicinal Fungus *Phellinus ribis*. *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 2152-2157. DOI: 10.1021/np300566y
23. Liu, Y.; Kubo, M.; Fukuyama, Y. Spirocyclic Nortriterpenoids with NGF-potentiating Activity from the Fruits of *Leonurus heterophyllus*. *J. Nat. Prod.*, **2012**, *75*, 1353-1358. DOI: 10.1021/np300287f
24. Matsui, N.; Kido, Y.; Okada, H.; Kubo, M.; Nakai, M.; Fukuishi, N.; Fukuyama, Y.; Akagi, M. Neurotrophic Phenylbutenoid Dimers Isolated from *Zingiber purpureum* Enhance Adult Hippocampal Neurogenesis in Olfactory Bulbectomized Mice. *Neuroscience Lett.*, **2012**, *513*, 72-77. DOI :10.1016/j.neulet.2012.02.010
25. Kubo, M.; Kobayashi, K.; Huang, J-M.; Harada, K.; Fukuyama, Y. The First Examples of Seco-prezizaane Norsesquiterpenoids from *Illicium jadifengpi*. *Tetrahedron Lett.*, **2012**, *53*, 1231-1235. DOI:10.1016/j.tetlet.2011.12.107

他 7 件。

〔学会発表〕 (計 30 件)

1. 児玉佳之, 久保美和, 福山愛保, 廣田洋, 大崎愛弓, *Securinega suffruticosa* の成分, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日-29 日, パシフィコ横浜 (横浜)。
2. 草間-江口國子, 益子崇, 廣瀬大, 大崎愛弓, 牧野三津子, 松崎桂一, 飯島洋, 池上文雄, 北中進, 運動神経細胞死メカニズム研究を基礎とした ALS 治療効果のある薬物シーズの開発, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日-29 日, パシフィコ横浜 (横浜)。
3. 川邊浩史, 小宮山哲平, 齋藤義紀, 岡本育子, 通元夫, 黒田智明, 影近弘之, Gong Xun, 廣田洋, 大崎愛弓, 中国産 *Salvia grandifolia* および *Salvia* sp. の成分研究, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日-29 日, パシフィコ横浜 (横浜)。
4. 原恵美, 廣田洋, 大崎愛弓, *Portulaca pilosa* の成分, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26 日-29 日, パシフィコ横

浜 (横浜)。

5. 横尾英知, 平野智也, 大崎愛弓, 影近弘之, 蛍光性天然物およびその部分構造を基にした蛍光センサーの開発, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26日-29日, パシフィコ横浜 (横浜)。

6. 山根裕貴, 原田研一, 久保美和, 大崎愛弓, 福山愛保, 蛍光性アルカロイドアマラステリンAの合成研究, 日本薬学会第136年会, 2016年3月26日-29日, パシフィコ横浜 (横浜)。

7. 横尾英知, 平野智也, 大崎愛弓, 影近弘之, 蛍光性天然物ニガキノン誘導体の合成と蛍光特性の解析, 第45回複素環化学討論会, 2015年11月19日-21日, 早稲田大学 (東京)。

8. 横尾英知, 平野智也, 大崎愛弓, 影近弘之, 蛍光性天然物ニガキノンを基にした蛍光センサーの開発研究, 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月10日-12日, 熊本大学 (熊本)。

9. 笠原拓, 遠藤裕太, 原田研一, 久保美和, 平野智也, 江藤忠洋, 影近弘之, 福山愛保, 大崎愛弓, *Bowdichia virgilioides* 種子由来の新規フラノカッサン型ジテルペン成分, 第57回天然有機化合物討論会, 2015年9月9日-11日, 神奈川県民ホール (横浜)。

10. Kawabe H, Komiyama T, Saito Y, Tori M, Kuroda C, Gong X, Ohsaki A, New abietane diterpenoids from *Salvia grandifolia*, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, Tokushima, Japan, August 30-September 2. 徳島文理大学 (徳島)

11. Kodama Y, Shimada M, Kubo M, Fukuyama Y, Ohsaki A, Search for bioactive constituents from subtropical medicinal plants, *Securinega suffruticosa* var. *amamiensis*, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, Tokushima, Japan, August 30-September 2. 徳島文理大学 (徳島)

12. Hinata N, Hirano T, Kagechica H, Ohsaki A, Fluorescent compounds from *Quassia amara*, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, Tokushima, Japan, August 30-September 2. 徳島文理大学 (徳島)

13. Kasahara T, Natsume S, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y, Endo Y, Ohsaki A, Furanocassane diterpenoids from *Bowdichia virgilioides*, Inaugural Symposium of the Phytochemical Society of Asia 2015, Tokushima, Japan, August 30-September 2. 徳島文理大学 (徳島)

14. 笠原拓, 遠藤祐太, 夏目志帆理, 秋末剛吉, 原田研一, 久保美和, 福山愛保, 平野智也, 影近弘之, 大崎愛弓, ブラジル産薬用植物 *Bowdichia virgilioides* の種子に含まれる新規成分, 日本化学会, 第95春季年会, 2015年3月26日-29日, 日本大学 (船橋)。

15. 日向尚輝, 平野智也, 影近弘之, 大崎愛弓, *Quassia amara* 由来の蛍光成分, 日本化

学会, 第95春季年会, 2015年3月26日-29日, 日本大学 (船橋)。

16. Ohsaki A, Endo Y, Kasahara T, Harada K, Kubo M, Fukuyama Y. Furanocassane diterpenoids from *Bowdichia virgilioides*, American Society of Pharmacognosy, 2014

Annual Meeting, Oxford, MS, USA, August 2-6. ハンプトンホテル (米国, オックスフォード)

17. 塚田悠, 影近弘之, 斉藤紗野, 大崎愛弓, 斉藤義紀, 岡本育子, 通元夫, 黒田智明, Gong Xun, 中国四川省産 *Salvia przewalskii* および *Euphorbia griffithii* の成分研究, 日本薬学会第134年回, 2014年3月27日-3月30日, 熊本大学 (熊本)。

18. 大崎愛弓, 遠藤裕太, 秋末剛吉, 原田研一, 久保美和, 福山愛保, *Bowdichia virgilioides* に含まれる化学成分, 第57回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2013年10月5日-7日, 埼玉大学 (埼玉)。

19. 大城佳奈子, 日向尚輝, 土川裕輝, 黒木悠李菜, 平野智也, 影近弘之, 大崎愛弓, ニガキ科 *Quassia amara* に含まれる新規蛍光成分の探索, 第56回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月4日, 昭和薬科大学 (東京)。

20. 大崎愛弓, 小宮山哲平, 小沢正晃, Samir K SADHU, Ahmede FIROJ, 糸田幸恵, 袴塚高志, 合田幸広, 影近弘之, 石橋正己, シャタバリの成分と同定に関する検討, 日本薬学会第133回年会, 2013年3月27日-30日, パシフィコ横浜 (横浜)。

(他10件)

[その他]

ホームページ等

<http://ohsakilabo.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大崎 愛弓 (OHSAKI, Ayumi)

日本大学・文理学部・准教授

研究者番号: 50161360

(2) 研究分担者

福山 愛保 (FUKUYAMA, Yoshiyasu)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号: 70208990