

124	植物D	植物D	植物D	leaves
125	植物D	植物D	植物D	branch

平成 19 年度厚生労働科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

分担研究課題；Matico (*Piper angustifolium*) の抗リーシュマニア活性物質の分離研究

分担研究者 黒柳 正典 県立広島大学生命環境学部 教授

協力研究者 淵野 裕之 医薬基盤研究所薬用植物資源センター 主任研究官

関田 節子 徳島文理大学香川薬学部 教授

代田 修 徳島文理大学香川薬学部 准教授

森 加奈美 徳島文理大学香川薬学部 助手

研究要旨 スクリーニングの結果、抗リーシュマニア活性が認められたペルー産の薬用植物 Matico から成分の分離精製を行い、20種類の化合物を分離した。核磁気共鳴 (NMR) を中心とする各種スペクトルデータの詳細な解析を行い、その構造を決定した。その結果、10種類の化合物が新規化合物と推定された。新規化合物は、*p*-hydroxybenzoic acid にプレニールが結合した誘導体であった。分離化合物の活性測定で、主成分である comp. 11 に最も強い活性が認められた。

A 研究目的

リーシュマニア症はアフリカ、南アメリカ、中東、アジア等の途上国を中心に感染が分布する深刻な疾病であり、世界中で1200万人の患者がいると言われている。用いられている治療薬は効果が低く副作用があり、しかも高価なため、本疾病が広まっている途上国の貧しい人々が十分な治療を受けることが困難である。そこで、途上国の人々が利用可能な安価で有効な抗リーシュマニア治療薬開発の必要性が問われている。このような背景のもと、リーシュマニア治療薬のリード化合物供給を目的として、リーシュマニア感染地域で採取された植物素材から抗リーシュマニア活性物質の探索研究を行う事を目的として研究が始まった。そこで、リーシュマニア症流行地域で採集した植物から抗リーシュマニア活性物質の分離構造決定を行った。活性を示したペルー産の薬用植物 Matico (*Piper angustifolium*) から成分分離を行い、得られた化合物については、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、質量分析 (MS) 等の分光学的手法を用いて構造解析を行い、分離化合物について抗リーシュマニア活性の測定を行った。

B 研究方法

1 抽出と分離；

抗リーシュマニア活性物質の抽出分離は、図1に示すように行った。ペルーから入手した薬用植物 Matico を粉末とし、メタノール (MeOH) を用いて還流抽出し、得られたメタノールエキスは、酢酸エチル (AcOEt)、ブタノール (*n*-BuOH) による分配操作により AcOEt 相、*n*-BuOH 相、水相の3つのフラクションに分けた。このうち AcOEt 相および *n*-BuOH 相に活性が認められた。薄層クロマトグラフィー (TLC) による検討の結果、AcOEt 相に多数の成分の存在が示唆されたため、AcOEt 相の分離から始めた。AcOEt 相はクロロホルム (CHCl₃)-MeOH 系溶媒を用い、順次極性を上げることにより、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、TLC の結果に従いまとめて、8つのフラクション (Fr. 1-Fr. 8) を得た。これらフラクションのうち、Fr. 2, 3, 4, 5 について、逆相系 (ODS 及び C-8) カラムを用い、溶媒系としてアセトニトリル (CH₃CN)-水 (H₂O) 系を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および分取 TLC (PLC) を丹念に繰り返すことにより成分の分離を行った。*n*-BuOH 相についても同様の分離を行った。

2、分離化合物の構造決定；

得られた化合物については質量分析 (ESI-MS、HR-ESI-MS) による分子式の決定を行った。核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) スペクトル, 2次元-NMR (NMR (H-H COSY, HMQC, HMBC) スペクトル, 旋光度、紫外吸収 (UV) スペクトル、赤外 (IR) スペクトルの測定を行い、それらのデータを丹念に解析することにより構造を決定した。

3、得られた化合物の抗リーシュマニア活性の測定；

得られた化合物のうち、量的に十分な化合物については、リーシュマニア原虫 *Leishmania major* に対して抗リーシュマニア活性を測定した。

C. 研究結果

1、抽出と分離；

ペルー産薬用植物 Matico の AcOEt 相をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、さらに HPLC, PLC を丹念に繰り返すことにより、シリカゲルカラムクロマトフラクションの Fr. 2 から comp. 1 (45 mg), 3 (35 mg), 8 (70 mg), 9 (18 mg), 11 (6.7 g), 12 (96 mg), 16 (7 mg) を得た。Fr. 3 についても同様に分離を行い comp. 5 (7 mg), 17 (10 mg) を得た。Fr. 4 を同様に分離を行い comp. 1 (13 mg), 2 (28 mg), 4 (13 mg), 8 (100 mg), 13 (126 mg), 14 (12 mg), 15 (12 mg) を得た。Fr. 5 を同様に分離を行い、comp. 2 (9 mg), 3 (46 mg), 6 (15 mg), 7 (38 mg), 8 (47 mg), 9 (14 mg), 10 (8 mg) を得た。*n*-BuOH 相についても、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、HPLC, PLC を丹念に繰り返すことにより、comp. 18 (12 mg), 19 (21 mg), 20 (17 mg) を得た。抽出分離の流れを図 1 に示す。

2、分離化合物の構造決定；

上記分離化合物のうち comp. 1 - comp. 10 は新規化合物と考えられる。これらの化合物の構造決定について以下に記述する。

Comp. 1 は淡黄色の無晶計の粉末として

得られ、HR-ESI-MS (negative mode); m/z 289.1392 $[\text{M-H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{O}_4$, 289.1440) から分子式は $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_4$ と決定された。 $^1\text{H-NMR}$ において、3つのオレフィンメチル基 [δ_{H} 1.73 (3H, s), 1.75 (3H, s), 1.82 (3H, s)], エキソメチレン [δ_{H} 4.89 (1H, s), 5.00 (1H, s)], *m*-カップリングした2つのメチレン [δ_{H} 7.68 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.79 (1H, d, $J = 1.7$ Hz)], 等価なメチレンプロトン [δ_{H} 3.37 (2H, d, $J = 7.0$ Hz)], 非等価なメチレンプロトン [δ_{H} 2.85 (1H, dd, $J = 14.6, 1.7$ Hz), 2.98 (1H, dd, $J = 14.9, 8.7$ Hz)], 3置換オレフィン [δ_{H} 7.79 (1H, br t, $J = 7.0$ Hz)], 酸素が置換したメチン [δ_{H} 4.41 (1H, br d, $J = 8.0$ Hz)] の存在が明らかになった。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおいて、17本のシグナルが観測され、カルボキシカルボニール (δ_{C} 172.0), 8つの sp^2 炭素 (δ_{C} 111.4, 120.5, 125.1, 129.7, 131.0, 131.7, 133.3, 146.2), 酸素が結合した sp^3 炭素 (δ_{C} 78.1) などの存在が明らかとなった。以上の結果、*p*-hydroxybenzoic acid に2つのイソペンテニールタイプの側鎖が結合した構造と考えられる。各官能基および置換基の位置関係は図 2 に示すように HMBC により決定した。H-1' から C-2, C-4, C-2' への相関、H-2' から C-3, C-4', C-5' への相関、H-1'' から C-4, C-6, C-3'' への相関、H-2'' から C-5, C-4'', C-5'' への相関等が観測された。以上の結果 comp. 1 の構造を 4-hydroxy-3-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)-5-isopentenylbenzoic acid と決定した。UV, IR スペクトルもこの構造を支持している。2'-位の絶対配置については検討していない。

Comp. 2 は HR-ESI-MS (positive mode); m/z 327.1510 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$, 327.1572) から分子式は $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$ と決定された。 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC の結果、comp. 2 は comp. 1 の Me-ether 誘導体である 4-methoxy-3-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)-5-isopentenylbenzoic acid であることが明らかになった。

Comp. 3 は HR-ESI-MS (negative mode); m/z 303.1577 $[\text{M-H}]^-$ (calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_4$, 303.1596) から分子式は $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_4$ と決定された。 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC から comp.

3 は comp. 2 の水酸基と 2 重結合が移動した構造 4-methoxy-3-(3-hydroxy-3-methyl-1-butenyl)-isopentenylbenzoic acid と決定した。

Comp. 4 は HR-ESI-MS (positive mode); m/z 341.1734 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{19}H_{26}O_4Na$, 341.1729) から分子式は $C_{19}H_{26}O_4$ と決定された。 1H -NMR、 ^{13}C -NMR、HMBC の詳細な検討の結果、comp. 4 は comp. 3 のアルコール性水酸基がさらにメチル化された構造、4-methoxy-3-(3-methoxy-3-methyl-1-butenyl)-5-isopentenylbenzoic acid と決定した。

Comp. 5 は HR-ESI-MS (positive mode); m/z 345.1643 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{18}H_{26}O_5Na$, 345.1678) から分子式は $C_{18}H_{26}O_5$ と決定された。 1H -NMR、 ^{13}C -NMR において、2 級水酸基および 3 級水酸基の存在が明らかになり、HMBC を詳細に検討することにより、その構造を 3-(2,3-dihydroxy-3-methyl-butyl)-4-methoxy-5-isopentenylbenzoic acid と決定した。

Comp. 6 は HR-ESI-MS (positive mode); m/z 359.1786 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{19}H_{28}O_5Na$, 359.1786) から分子式は $C_{19}H_{28}O_5$ と決定された。 1H -NMR、 ^{13}C -NMR において、2 級水酸基および 3 級水酸基の存在が明らかになり、HMBC を詳細に検討することにより、その構造を 3-(2-hydroxy-3-methoxy-3-methylbutyl)-4-methoxy-5-isopentenylbenzoic acid と決定した。

Comp. 7~10 についても同様に各種スペクトルを丹念に解析することにより、comp. 7 は 3,5-bis-(3-hydroxy-1-butenyl)-4-methoxybenzoic acid と、comp. 8 は 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-7-isopentenyl-2,3-dihydrobenzofurane-5-carboxylic acid と、comp. 9 は 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-3-hydroxy-8-isopentenyl-2H-1-benzopyran-6-carboxylic acid と、comp. 10 は 2,2-dimethyl-8-(2-hydroxy-3-methyl-3-butenyl)-2H-1-benzopyran-6-carboxylic acid と決定した。

得られた化合物のうち新規化合物は図 2 に、既知化合物は図 3 に記載した。

3、得られた化合物の抗リーシュマニア活性の測定；

Leishmania major に対して一部の化合物について抗リーシュマニア活性を測定した。その結果、表 1 に示すように、既知物質であ

り主成分である comp. 11 とフラボンの C-グルコサイド comp. 19 に比較的強い活性が認められた。

D 考察

Matico から 20 種類の化合物を分離し構造を決定した。このうち 10 種類の化合物は新規化合物であり、すべて、*p*-hydroxybenzoic acid にプレニール基の結合した構造を有していた。これら化合物は強い活性を示さなかったが、主成分である comp. 11 とフラボン-C-グルコサイド comp. 19 に比較的強い活性が認められた。

E 結論

Matico から得られた主成分に中程度の活性が得られたことは、抗リーシュマニア活性物質開発のリード化合物を提供できたものと考えられる。なお、新規と考えられる 10 種類の化合物を分離構造決定し学術的に大きな成果が得られた。

F 健康危機情報

無し

G 研究発表

1、論文発表

無し

2、学会発表

鈴木亜希子、黒柳正典、湊野裕之、代田修、森加奈未、関田節子；ペルー産薬用植物 Matico の抗リーシュマニア活性物質に関する研究、日本生薬学会第 54 回年会、名古屋、2007 年 9 月。

H 知的所有権の取得情報

無し

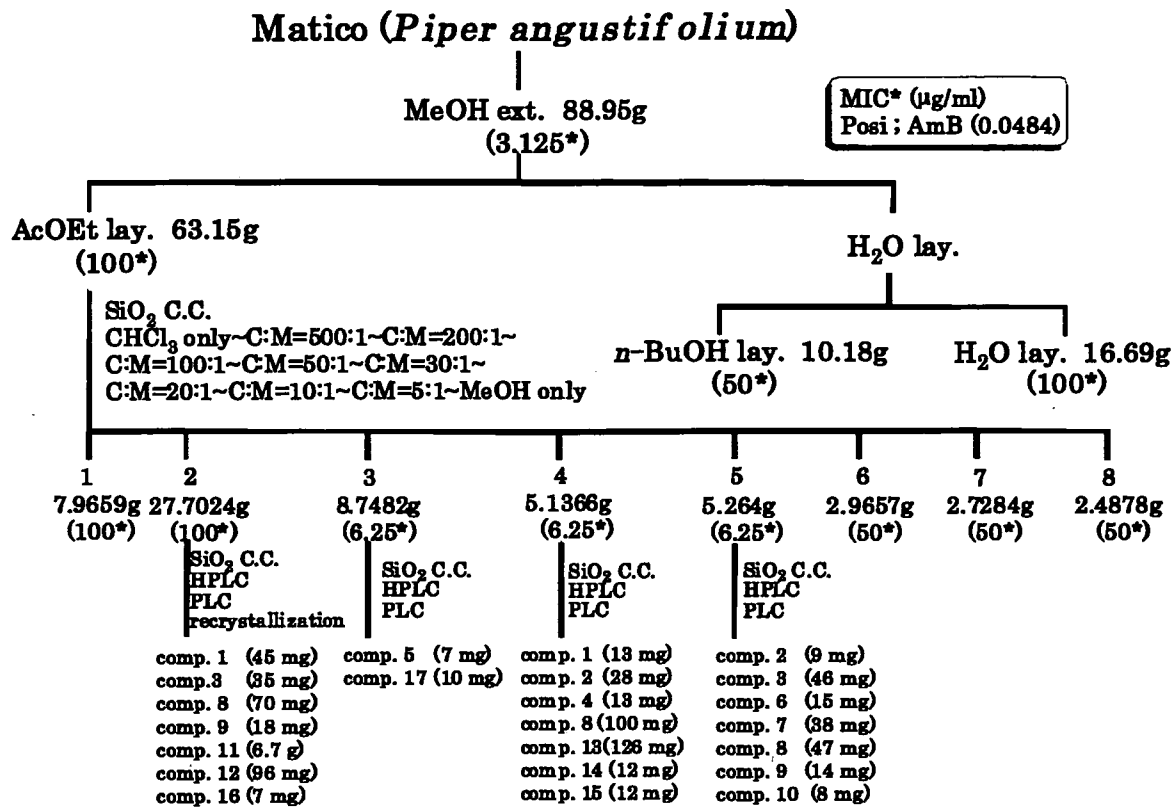


図1 Matico の抽出と成分の分離。

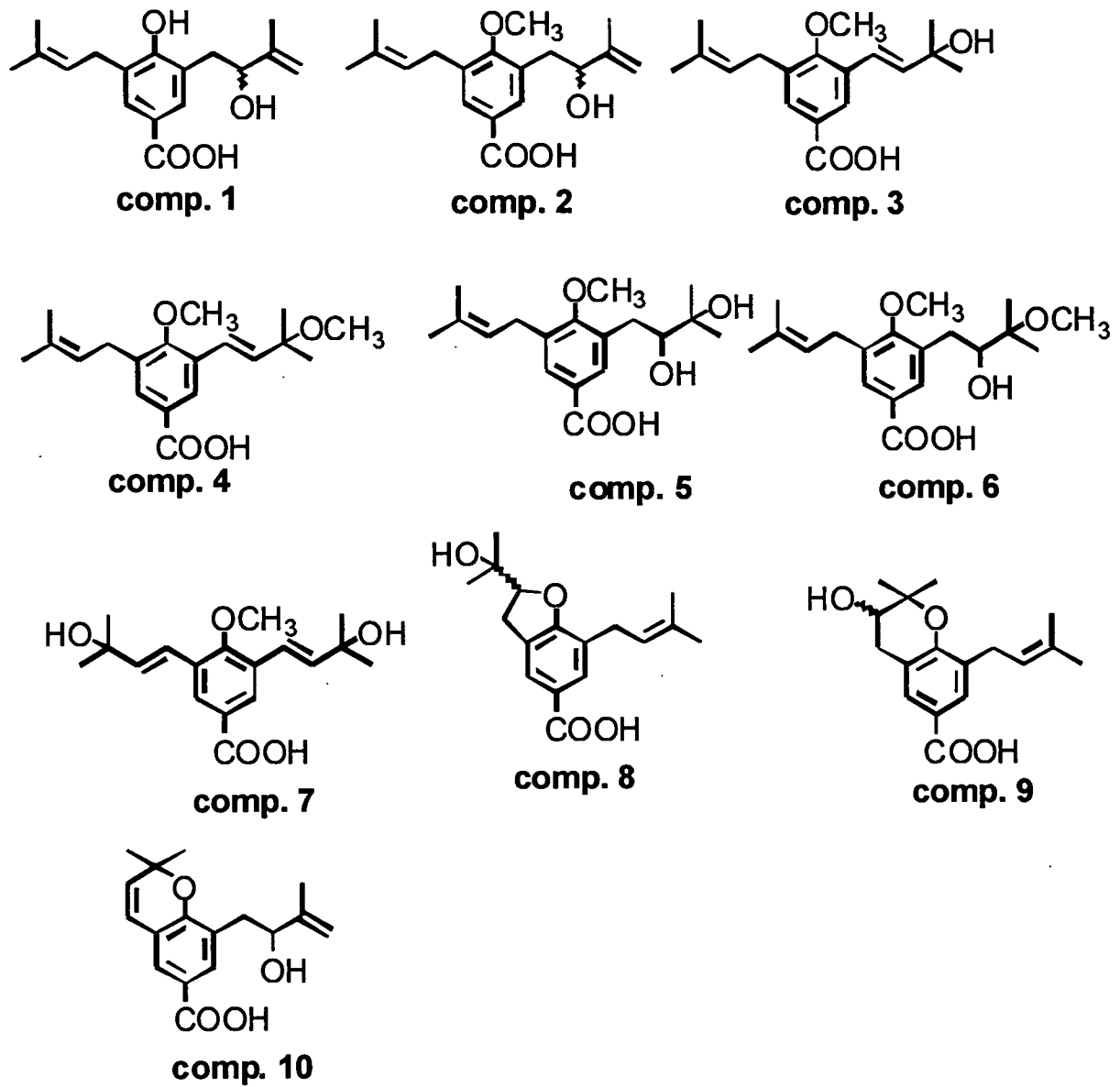


図2 Matico から分離した新規化合物 (comp. 1 ~ comp. 10)

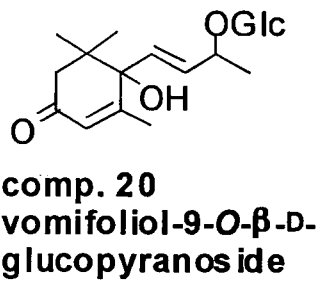
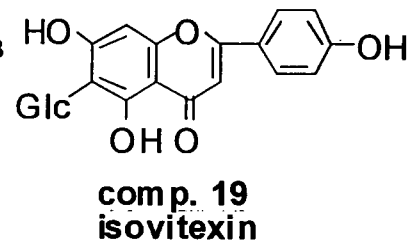
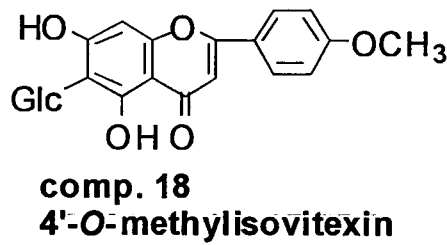
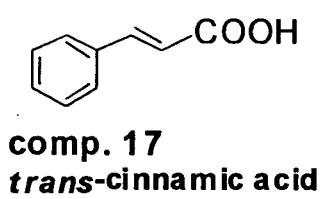
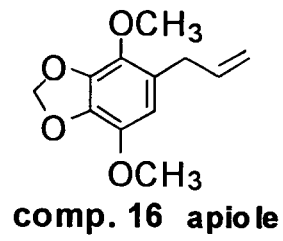
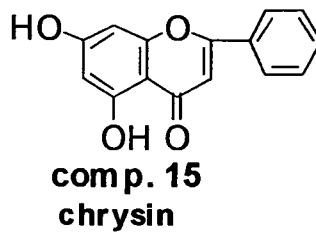
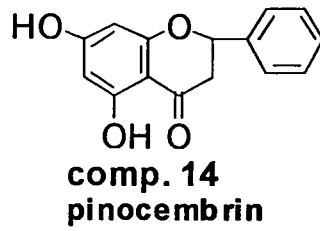
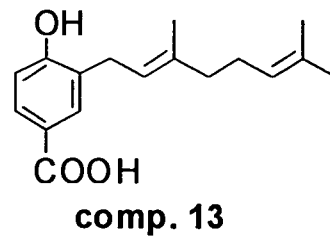
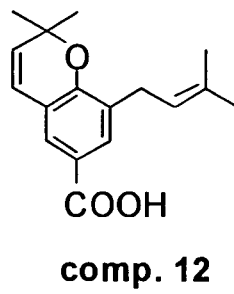
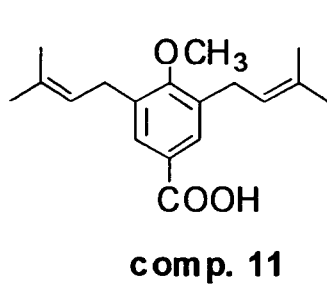


図3 Matico から分離した既知化合物 (comp. 11 ~ comp. 20)

平成 19 年度厚生労働科学研究補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

天然植物資源を元にした新規医薬リード化合物の開発に関する研究

細川敬三 兵庫大学 教授

日本全国から植物を広く収集するため、独立行政法人医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部・筑波研究部・種子島研究部の協力を得て、各研究部で系統保存している植物種および周辺に自生する植物を収集して抽出エキスを調製し、各種活性（グルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシン活性）をスクリーニングするため *in vitro* でのアッセイを実施した。その結果、アミラーゼ阻害活性では 10 植物種、スクラーゼ阻害活性では 10 植物種、マルターゼ阻害活性では 12 植物種、リパーゼ阻害活性では 13 植物種、抗酸化活性では 14 植物種、抗発癌プロモーター活性では 14 植物種、チロシナーゼ阻害活性では 14 植物種、ダイオキシン毒性阻害活性では 8 植物種であった。

A. 研究目的

（独）医薬基盤研究所薬用植物資源センターの薬用植物を用いて各種活性のグルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシン活性）をスクリーニングするため *in vitro* でのアッセイを実施した。

B. 研究方法

1) 植物材料

独立行政法人医薬基盤研究所の各研究部の協力を得て収集した植物サンプルは以下の通りで、全サンプル数 1288 点である。

・北海道研究部関係：48 科 109 種 206 サンプル

・筑波研究部関係：74 科 225 種 525 サンプル

・種子島研究部関係：112 科 327 種 557 サンプル

2) スクリーニング方法

・ α -グルコシダーゼ（スクラーゼとマルターゼ）の阻害活性

酵素として市販のラット小腸 α -グルコシダーゼを、基質としてスクロースまたはマルトースを用い、遊離するグルコース量の減少によって阻害活性を算出した。基質にスクロースを使用した場合はスクラーゼ活性、マルトースを使用した場合はマルターゼ活性である。

・ α -アミラーゼ阻害活性

酵素として市販のブタ膵臓 α -アミラーゼを、基質に青色色素結合デンプン溶液を用い、遊離色素の減少割合によって阻害活性を算出した。

・リパーゼ阻害活性

酵素として市販のブタ膵臓リパーゼを、基質にオレイン酸 4-メチルウンベリフェリルをトリス塩酸緩衝液中に超音波処理によって分散させた溶液を使用して、遊離蛍光色素の減少量によって阻害活性を算出した。

・抗酸化活性（DPPHラジカル捕捉活性）

安定ラジカルである DPPH と反応させ、フリーラジカルの減少割合を測定してラジカル捕捉活性とした。評価値は α -トコフェロール当量に換算して算出した。

・抗発癌プロモーター活性

試験物質が、発癌プロモーターであるオカダ酸のプロテインフォスファターゼ 2A の活性阻害の程度を測定し、抗発癌プロモーター活性として評価した。

・チロシナーゼ阻害活性

酵素源として市販のマッシュルーム由来チロシナーゼを使用し、基質に L-ドーパを用いて生成する褐色成分の生成量を測定し、阻害活性を算出した。

・ダイオキシン毒性阻害活性

ラット肝細胞画分に 0.1 nM 2,3,7,8-四塩化ジベンゾ-パラ-ジオキシンを添加し、活性化したアリアル炭化水素受容体の量を SW-E L I S A により測定し、その抑制率を算出した。

C. 研究結果

上記のスクリーニングの結果、その活性が非常に高かった植物種と部位は以下に示した通りである。

・アミラーゼ阻害活性

アメリカニガキ (葉) ・シマヤマヒハツ (茎) ・セイロンオリーブ (葉) ・タマリンド (葉) ・ベンガルボダイジュ (葉) ・オオバマホガニー (葉・葉柄) ・カンコノキ (葉) ・キミノバンジロウ (葉) ・ベーラムノキ (葉) ・モミジバフウ (葉)

・スクラーゼ阻害活性

スズメナスビ (果実) ・エゴノキ (葉) ・トベラ (葉) ・サツマイモ (茎) ・ハイドバ (葉・茎) ・マルバアキグミ (果実) ・ミツバアケビ (実) ・カリン (葉・茎) ・エゾミソハギ (葉) ・ケカラスウリ (茎)

・マルターゼ阻害活性

スズメナスビ (果実) ・トベラ (葉) ・サツマイモ (茎) ・ヤエヤマアオキ (果実) ・シマグワ (葉・枝) ・モミジバフウ (葉) ・ザクロ (果皮・種子) ・コデマリ (花) ・ミツバアケビ (実) ・ツツジ (花) ・ボタン (花) ・エゾミソハギ (葉)

・リパーゼ阻害活性

ヤマブドウ (蔓・根) ・トチノキ (果肉) ・オオイタドリ (種子) ・エビガライチゴ (果実) ・キタコブシ (枝) ・クリ (葉・実) ・ (葉・樹皮) ・ガマ (穂) ・ウラジロタデ (根) ・ハマナス (果実) ・クサソテツ (地上部) ・イチイ (枝) ・オシダ (葉)

・抗酸化活性 (DPPHラジカル捕捉活性)

エゾミソハギ (地上部・根) ・ハマナス (枝) ・カシワ (樹皮) ・オオイタドリ (種子) ・ニガキ (葉) ・ドクゼリ (葉) ・シャクヤク (葉) ・ボタン (葉) ・ザクロ (果皮) ・アメリカニガキ (葉) ・チョウジ (葉・茎) ・アブラギリ (葉) ・スダジイ (葉) ・ヤマモモ (葉) ・

・抗発癌プロモーター活性

オオヨモギ (地下茎・地上部) ・ノギリソウ (全草) ・オオウバユリ (葉) ・キタコブシ (葉) ・ホオズキ (果実) ・エゾエンゴサク (地上部) ・ハマナス (果実) ・カンゾウ (葉) ・セリバオウレン (葉) ・コブシ (果実)

・チロシナーゼ阻害活性

オオウバユリ (球根) ・アカザ (葉) ・オオイタドリ (種子) ・ボケ (種子) ・セイヨウバクチノキ (葉・茎) ・カリン (種子) ・カラミザクラ (種子) ・イカリソウ (葉) ・カラダイオウ (根部) ・カンコノキ (葉) ・シロナンテン (葉) ・モミジバフウ (葉) ・キミノバンジロウ (葉) ・シマカナメモチ (茎) ・

・ダイオキシシン毒性阻害活性

ハマナス (枝) ・ダイコンソウ (地上部) ・イチイ (果実) ・ハコベ (全草) ・イタヤカエデ (種子) ・ケカラスウリ (果皮・果実・葉) ・カラコギカエデ (種子) ・アカメガシワ (葉)

D. D 考察

予定に沿って食・薬用植物類の収集と6種類の活性のスクリーニングを実施し、高活性を示す植物種をピックアップすることができた。今後は、以下に示すように研究を進めるよていである。

E 結論

(独) 医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター北海道研究部・筑波研究部・種子島研究部の協力を得て、各研究部で系統保存している植物種および周辺に自生する植物を収集して抽出エキスを調製し、グルコシダーゼ類の阻害活性、リパーゼ阻害活性、抗酸化活性、抗発がん活性、チロシナーゼ阻害活性、抗ダイオキシシン活性をスクリーニングした。

F 健康危機情報

無し

G 研究発表

- 1, 論文発表
無し
- 2, 学会発表
無し

H 知的所有権の取得情報

無し

III. 研究成果の刊行に関する一覧
準備中