

Title	赤潮原因藻に対する薬用植物由来の殺藻活性物質に関する研究
Author(s)	大野, 友道
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49192
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	おおのともみち 大野友道
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第21619号
学位授与年月日	平成19年11月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	赤潮原因藻に対する薬用植物由来の殺藻活性物質に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 村上 啓寿 (副査) 教授 宇野 公之 教授 小林 資正 教授 平田 收正

論文内容の要旨

渦鞭毛藻の一種 *Heterocapsa circularisquama* は、1988年に初めて発生が確認された貝類にのみ強い毒性を示す新しい赤潮原因藻であり、アコヤガイ、カキ、アサリなどの養殖産業に非常に深刻な被害をもたらす現在最も問題となっている赤潮原因藻の1種である。しかし、このように有害な赤潮に対する有効な対策は確立されていないことから、著者は、薬用植物由来の本藻に対する強い殺藻活性を有する化合物の探索に着手した。

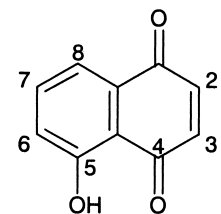
H. circularisquama は特徴的な動きで活発に泳動するため、その生死を顕微鏡下で直接観察して被検サンプルの殺藻活性を評価した。また、ヒメダカを用いた魚毒活性試験を実施し、殺藻活性の選択性を評価した。

約300種の南米産薬用植物についてスクリーニングを行い、活性の認められた *Juglans regia* から $0.2 \mu\text{M}$ (MIC) の殺藻活性を示す juglone (1) を見出し、1が魚毒活性に対して約50倍の選択性を示すことを明らかにした。さらに、1の誘導体の活性を比較し、1の活性発現には分子内のキノン環2重結合とフェノール性水酸基の両部分構造が重要であることを明らかにした。

一方、1は、ペプチド鎖中のプロリンの cis/trans 異性化酵素の1種である Pin1 の阻害物質であり、Pin1 は細胞周期の制御など重要な役割を担い、ある種のがん細胞株の生存に必須であることが報告されている。そこで、1の殺藻活性が Pin1 阻害に起因していると推測し、*H. circularisquama* 由来 Pin1 の1次構造の解析に着手した。

遺伝的に *H. circularisquama* に比較的近い原虫 *Toxoplasma gondii* および *H. circularisquama* と同様に光合成を行う植物3種の Pin1 コード領域の塩基配列に基づいて数種のプライマーを設計し *H. circularisquama* から抽出した mRNA をテンプレートとして RT-PCR による Pin1 コード領域の増幅を種々の条件で検討したが、特異的な DNA 断片の増幅は認められなかった。

次に、Pin1 コード領域に変異を持つ温度感受性変異酵母を用いた *H. circularisquama* の Pin1 コード領域のクローニングを計画した。本酵母は、37°C では Pin1 が機能せず増殖できないが、他生物由来の Pin1 を導入することで 37°C でも増殖出来るように形質転換されることが報告されていることから、この性質を利用して *H. circularisquama* の Pin1 コード領域を cDNA ライブラリーから探索することとした。*H. circularisquama* の mRNA から調製した二本鎖 cDNA 群をシャトルベクターに組み込んで大腸菌内で増殖させ cDNA ライブラリーを構築し、これを変異酵母へと導入して

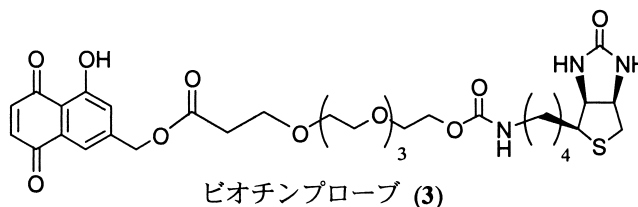


Juglone (1)

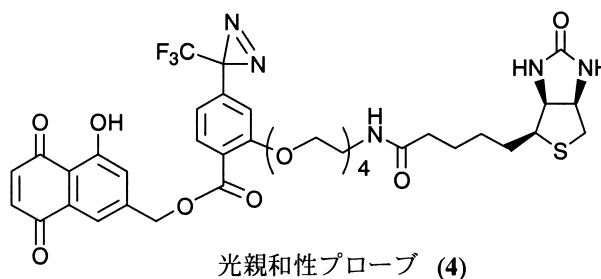
37°Cで培養した。しかしながら、種々の検討を行ったが、*H. circularisquama* の Pin1 コード領域が導入され温度耐性へと形質転換されたコロニーは見出されなかった。

ここまで juglone (1) の標的タンパクとした Pin1 のクローニングを試みたが目的は達成できなかった。そこで、次に、1 の化学構造を基に設計したプローブ分子を用いた *H. circularisquama* に対する 1 の標的タンパクの探索に着手した。

Juglone (1) の化学構造からキノン環部分が標的タンパク中のアミノ酸残基と共有結合を形成することが推定されたため、プローブ分子にはタンパクとの複合体形成後の精製や検出に利用するビオチンを導入し、1 とビオチンの間には水溶性を確保させる目的でポリエチレングリコールのリンカーで結合させることとした。リンカー結合位置は、1 の 7 位にヒドロキシメチル基導入したアナログ 2 が 1 と同等の活性を示したことから、2 の 1 級水酸基にリンカーを結合したビオチンプローブ 3 を設計・合成した。*H. circularisquama* の培養液に 3 を添加して培養後に細胞を破碎して標的タンパクを検出したところ、特異的なタンパクのバンドが観測されたのがその強度は非常に弱かった。



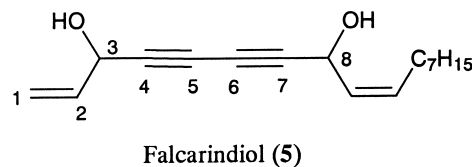
そこで、プローブ分子にジアジリン環構造を導入して、光照射によって標的タンパクのアミノ酸残基と不可逆的な共有結合を形成させることを計画し、光親和性プローブ 4 を設計した。3 の場合と同様に、培養液に 4 を添加して培養後、紫外線を照射したのち細胞を破碎する方法で標的タンパクを検出したところ、3 の場合とほぼ同じ大きさの 90 kDa 付近にバンドが検出された。



さらに、4 の添加前に競合剤として 1 を添加した場合、検出されたバンドの強度が低下したことから 4 が juglone と競合的に標的タンパクと結合していることが示唆された。

また、著者は、約 300 種の和漢薬用植物に対してもスクリーニングを行い、生薬“キョウカツ”より 2 μM (MIC) の殺藻活性を示す falcarindiol (5) を見出した。5 は文献既知の化合物であったが、3 位および 8 位水酸基の絶対立体配置に関しては、その立体配置と施光度の値の報告に統一性が無く、全合成も 3*R*、8*S* 体の一例のみであった。そこで、キョウカツより見出した 5 の絶対立体配置を施光度の比較によって決定する目的で、全立体異性体の合成を行った。合成ルートは、最終ステップにおいて 5、6 位間を塩化銅

(I) を用いた Cadiot-Chodkiewicz 反応によるカップリングにより縮合することとし、3 位および 8 位のキラルな 2 級水酸基は、対応するケトンから oxazaborolidine による不斉還元によって構築した。また、*Z* 配置 2 重結合は、Lindlar 触媒を用いた接触還元を行い合成した。



得られた 4 種の立体異性体と天然物の施光度を比較した結果、3*R*、8*S* 体と良い一致を示したことより今回単離した falcarindiol (5) の立体位置を 3*R*、8*S* であると決定した。また、天然物 (3*R*、8*S* 体) と比較して 3*S* 配置を持つ 2 種の異性体 3*S*、8*S* 体および 3*S*、8*R* 体が、より強い殺藻活性を有するとともに、天然物では認められなかった藻類に対する選択毒性を 3*R*、8*S* 体では 2 倍、3*R*、8*S* 体では 4 倍示すことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

申請者は、貝類の養殖産業に非常に深刻な被害をもたらす赤潮原因藻である *Heterocapsa circularisquama* に対して強い殺藻活性を有する化合物の探索を薬用植物抽出エキスから行い、見出した活性化合物について種々検討を行った。

まず、簡便な殺藻活性判定法と魚毒活性試験の方法を確立し、強力かつ選択的な殺藻活性を示した南米産薬用植物 *Juglans regia* 抽出エキスより活性成分として juglone (**1**) を見出した。**1** は、生命維持に重要な Pin1 阻害物質と報告されていたことから、**1** の標的が Pin1 であると推測し、*H. circularisquama* 由来 Pin1 のクローニングを試みた。藻より抽出した mRNA をテンプレートとした PCR 法および Pin1 コード領域に変異を持つ温度感受性変異酵母を利用した方法を用いて検討を行ったが、目的は達成できなかった。

次に、**1** の化学構造を基に設計した 2 種のプローブ分子を合成し、*H. circularisquama* に対する **1** の標的タンパクの探索を行い、**1** が約 90 kDa のタンパクと相互作用していることを明らかにした。

また、和漢薬用植物からは生薬“キョウカツ”より殺藻物質として falcarindiol (**5**) を見出し、**5** の全立体異性体の合成を行うことで絶対立体配置を決定した。さらに、**5** の立体異性体がより強い活性を示すことを明らかにした。

本研究成果は、薬用植物から前例のほとんどない殺藻活性成分を明らかにしただけでなく、今後、本化合物をシーズとした様々な研究成果が得られることが期待される。したがって、本論文は薬学博士を授与するに相応しい内容であると結論した。