

Title	Studies on Trypanocidal Principles from Central African Medicinal Plants
Author(s)	Benetode, Konziase
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49672
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	ベネトデ コンジアアセ BENETODE KONZIASE
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 22876 号
学位授与年月日	平成21年3月24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	Studies on Trypanocidal Principles from Central African Medicinal Plants (中央アフリカ薬用植物由来抗トリパノソーマ活性成分に関する研究)
論文審査委員	(主査) 教授 村上 啓寿 (副査) 教授 小林 資正 教授 藤岡 弘道 教授 小比賀 聡

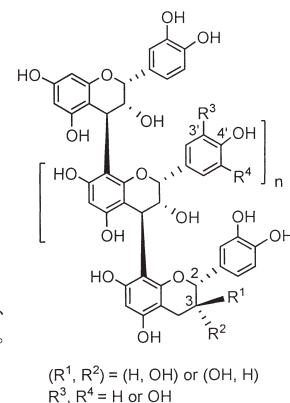
論文内容の要旨

アフリカ睡眠病は、ツェツェバエが媒介するトリパノソーマ原虫によって引き起こされる寄生虫感染症であり、毎年推定35~50万人が感染すると報告されている。また、感染が進行すると、原虫は中枢神経にまで侵入することで睡眠サイクルの異常や昏睡などの致死的な症状を引き起こし、年間約4万人以上の死亡者が出ているとされている。しかしながら、本寄生虫感染症に対する薬剤開発は著しく立ち遅れている状況にあり、今なお非常に毒性が強く副作用の多い毒素化合物がその治療に使用されているのが現状である。一方、中央アフリカでは現在においても様々な疾病の治療に伝承的な薬用植物を用いている地域も多く存在している。そこで、申請者は、アフリカ睡眠病の治療や予防に用いられている中央アフリカ由来薬用植物より抗トリパノソーマ活性物質の探索に着手した。

トリパノソーマ原虫は培養液中で活発に運動していることが顕微鏡下で観察できることから、活性評価法として、トリパノソーマ原虫の培養液に被検サンプルを添加して培養し、経時的にその運動を観察することで生存原虫数を計数し、コントロールの生存数との比較によって致死率を計算した。中央アフリカより入手した薬用植物について、上記の活性評価法にしたがってスクリーニングを行い、強力な抗トリパノソーマ活性を示した *Cola accuminata* および *Artemisia annua* を見出した。

まず、活性を示した *C. accuminata* の70%エタノール抽出エキスについて蒸留水に溶解し、ジクロロメタン、酢酸エチル、n-ブタノールで順次分配したところ、n-ブタノール移行部に活性が認められたことから、活性試験の結果に基づいてダイヤイオンHP-20に続くODSカラムクロマトグラフィーによって分画を進めた。続いて、活性を示したフラクションについて Sephadex LH-20を担体としたゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離を行い、最終的に11種の活

性フラクションを得た。各活性フラクションについて¹H-および¹³C-NMRを測定したところ、いずれのフラクションもプロアントシアニンであることが判明した。さらに、最も強力な活性を示した2フラクションについてより詳細な構造解析を行った。まず、MALDI-TOF MSスペクトルを測定することで重合度を決定するとともに、観測されたピークパターンからB環上に水酸基を2個有するユニットが主構成単位として推察された。次に、酸性条件下フロログルシノールを用いた分解反応による反応成績体の化学構造から、底部ユニットの立体異性体(2,3-*cis* or 2,3-*trans*)の比率およびB環部の置換様式(3',4'-*diOH* or 4'-*OH*)が判明した。続いて、他の活性フラクションの化学構造についても考察を行った。まず、¹³C-NMRの詳細な解析により各ユニット間の結合パターン(4-6位あるいは4-8位)の比率について推察した。また、MALDI-TOF-MSスペクトルより重合度および構成ユニットのB環部置換様式の比率についても推察した。

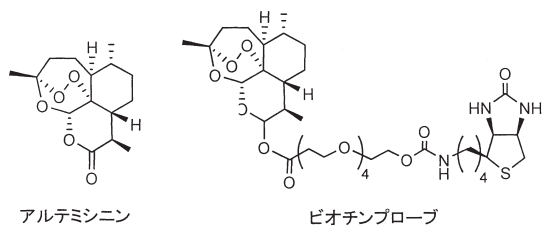


プロアントシアニン

一方、*C. accuminata*と同様にスクリーニングにて抗トリパノソーマ活性が見出された *A. annua* のエタノール抽出エキスについては蒸留水-酢酸エチル、n-ブタノールで順次分配したところ、酢酸エチル移行部に強力な活性が認められた。続いて、活性試験の結果をもとにシリカゲルおよびODSカラムクロマトグラフィーによって分画を進め、最終的に順相HPLCによって精製することで活性本体を単離した。本化合物は、¹H-および¹³C-NMR、COSY、HMQC、HMBC、IR、FAB-MS、旋光度の各種スペクトルデータを文献値と比較することでアルテミシニンと同定した。次に、抗トリパノソーマ活性アルテミシニンの標的タンパク探索を目的として、アルテミシニンの化学構造に基づいたプローブ分子の設計を行った。プローブ分子には、標的タンパクの分離精製および検出に有用であるビオチンを組み込むこととし、アルテミシニンとビオチンは、水溶性の向上を目的としてポリエチレングリコール鎖で結合させた。また、アルテミシニンは、分子内にパーオキシライド構造を有することから原虫内でラジカルを発生し標的タンパクと直接結合することが予測されたが、その結合が不安定である可能性も考慮して光親和性基であるジアジリン環ユニットを組み込むことで、光照射によりジアジリン環が標的タンパクに結合するプローブも合成した。さらに、ジアジリン環とアルテミシニン間にリンカーを挿入したプローブも2種合成した。

これら4種のプローブは、いずれもアルテミシニンと比較すると減弱するものの抗トリパノソーマ活性を示した。また、プローブの培地中およびトリパノソーマ原虫細胞破碎液中での安定性を検討したところ、いずれのプローブも37°Cで3時間インキュベート後に約60% (培地中)、約80% (細胞破碎液中) 残存していることが明らかとなり、標的タンパク探索実験には大きな支障がないと判断した。さらに、プローブの原虫内への取り込み実験を行ったところ、いずれも30分で設定濃度の81~96%に到達していることが明らかとなり、こちらも問題がないと判断した。そこで、これらプローブによってラベル化される原虫由来タンパクの探索を行った。方法としては、トリパノソーマ原虫培養液にプローブを添加してインキュベート後に細胞を破碎し、ビオチンと親和性の高いストレプトアビジンによって精製したのちSDS-PAGEによって分離後、メンブレンへと転写してHRP-labeledストレプトアビジンで検出した。その結果、光親和性基を有する3種のプローブについては特異的に結合するタンパクのバンドは検出されなかったが、ビオチンプローブについては33 kDa, 40 kDa, 60 kDa付近にプローブと特異的に結合したタンパクが見出された。さらに、これらのバンドはアルテミシニンを競合剤として添加することで消失することから、この3タンパクがアルテミシニンの標的タンパクである可能性が示唆された。3タンパクのうち最も強い強度の60 kDa付近のバンドは、ゲルから切

り出して回収し、再度電気泳動することでほぼ単一として得られた。



アルテミシニン

ビオチンプローブ

論文審査の結果の要旨

申請者は、アフリカ睡眠病の治療や予防に用いられている中央アフリカ由来薬用植物より抗トリパノソーマ活性物質の探索に着手し、以下の研究成果を得た。

*Cola accuminata*の抽出エキスを各種溶媒による分配、ダイヤイオンHP-20、ODSカラムクロマトグラフィー、Sephadex LH-20を担体としたゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる分離を行い、最終的に11種の活性フラクションを得た。各活性フラクションについて¹H-および¹³C-NMRを測定したところ、いずれのフラクションもプロアントシアニジンであることが判明した。これら各フラクションは、MALDI-TOF MSスペクトルを測定することで重合度を決定するとともに、B環上の置換様式を明らかにした。

一方、*Artemisia annua*の抽出エキスについては、溶媒分配後、シリカゲルおよびODSカラムクロマトグラフィー、順相HPLCによって精製することで活性本体を単離した。本化合物は、¹H-および¹³C-NMR、COSY、HMQC、HMBC、IR、FAB-MS、旋光度の各種スペクトルデータを文献値と比較することでアルテミシニンであると決定した。

次に、抗トリパノソーマ活性アルテミシニンの標的タンパク探索を目的として、ビオチンとポリエチレングリコール鎖を組み込んだ4種のプローブを合成した。続いて、4種のプローブをトリパノソーマ原虫培養液に添加してインキュベート後に細胞を破碎し、ビオチンと親和性の高いストレプトアビジンによって精製したのちSDS-PAGEによって分離後、メンブレンへと転写してHRP-labeledストレプトアビジンで検出した。その結果、1種のプローブに結合するタンパクが33 kDa, 40 kDa, 60 kDa付近に認められた。

本研究では、中央アフリカ由来薬用植物より抗トリパノソーマ活性成分の解明とともに、活性成分を鋳型としたビオチン標識プローブ分子によりタンパクのラベル化に成功しており、これらの研究成果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。