

論文内容の要旨

氏名	丸本真輔		
学位の種類	博士(工学)		
学位記番号	工第186号		
学位授与の日付	平成23年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Study on Biological Activity and Biotransformation of Naturally Occurring Coumarins (天然クマリン類の生理活性と生物変換に関する研究)		
論文審査委員(主査)	教授	宮澤	三雄
(副主査)	教授	藤原	尚
(副主査)	准教授	石船	学

本研究は、天然クマリン類のβ-セクレターゼ (BACE1) 阻害活性およびがん発生抑制を有する認知機能改善に関する検討を中心に、以下の三章からなる研究を行った。第一章では46種の天然クマリン類のBACE1阻害活性とその構造活性相関について検討している。第二章では46種の天然クマリン類の抗遺伝毒性評価と抗遺伝毒性機構について行っている。第三章において天然クマリン類を微生物 *Glomera cingulata* を用いた微生物変換による有用物質の産出、変換反応の特異性および変換生成物のBACE1阻害活性と抗遺伝毒性について検討した。

第一章 天然クマリン類の探索とβ-セクレターゼ (BACE1) 阻害活性

本章では、46種の天然クマリン類(11種の単純クマリン 6-16, 28種のフラノクマリン 1-5, 17-39, 7種のピラノクマリン類 40-46)のBACE1阻害活性について検討した。その結果、4種のフラノクマリン betgamottin (21), 8-geranyloxypsoralen (26), 5-geranyloxy-8-methoxy-psoralen (33), および 8-geranyloxy-5-methoxypsoralen (35) が特に強いBACE1阻害活性値を示し (Fig. 1), IC<sub>50</sub>値はそれぞれ 32.2, 9.9, 20.4 および 11.1 μMと決定した。また、これらの化合物の阻害形式を Dixon plot法を用いて検討をした。結果、化合物 26, 33 および 35 において非競争阻害、一方、化合物 21 では競争阻害であると説明している。構造活性相関については、各クマリン骨格においてゲラニルオキシ基 (OCH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) および プレニルオキシ基 (OCH<sub>2</sub>CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) の置換基が最も BACE1 阻害活性に寄与していることを明らかにした。

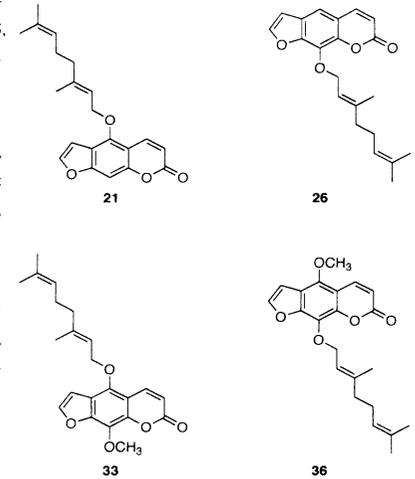


Fig. 1. Chemical structures of compounds 21, 26, 33, and 36.

第二章 天然クマリン類の抗遺伝毒性評価

本章では、天然クマリン類の抗遺伝毒性について評価した。フラノクマリン 1-5 の *umu* テストにおける SOS 誘導抑制活性性を評価し、化合物 1-5 は変異原物質 (AF-2, MNNG) に対しては抑制効果を示さなかった。しかし、ラット肝臓の酸化酵素群である cytochrome P450 (CYP) を含む S9mix (rat S9mix) によって代謝活性化された変異原性を示す前変異原物質 (PBTA-4, MeIQ) に対して特に化合物 1-4 が強い抑制効果を示した。

示した。過去に PBTA-4 は CYP1A1 の分子種が、MeIQ については CYP1A2 の分子種が代謝活性化に関与していることが報告されていることから、ラットおよびヒトの CYP1A1 と CYP1A2 (パキュロウイルス発現系) を用いた代謝活性化に対する SOS 誘導抑制についても検討した結果、化合物 1-4 はそれぞれに対して強い抑制効果を示した。また、化合物 1-5 の P450 分子種 (CYP1A1, CYP1A2) に対する阻害活性値を検討するため 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 試験を行った。化合物 1-5 は強い阻害活性を示し、その IC<sub>50</sub> 値は 0.23 ~ 20.64 μM の濃度範囲であった。これらのことから化合物 1-5 の前変異原物質 (PBTA-4, MeIQ) に対する抑制効果は P450 酵素による代謝活性化を阻害することに起因することが明らかになった。

ヒト CYP1A2 (大腸菌発現系) を代謝活性化に用いた MeIQ に対するクマリン化合物 1-46 の SOS 誘導抑制効果ならび構造活性相関を検討した。化合物 26, 34, および 35 は特に強い抑制効果を示し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 0.057, 0.082 および 0.091 μM と強い抑制効果を示した。また、化合物 6, 17, 40 の IC<sub>50</sub> 値を比較することによりフランおよびピラン環 (特にフラン環) が抑制効果に寄与していることが示唆される。さらに、フラノクマリン類においては 8 位にゲラニルオキシもしくはプレニルオキシ基の付加が SOS 誘導抑制効果に大きく関与していることが解った。

ヒト CYP1A2 (大腸菌発現系) に対する化合物 1-46 の阻害活性値を検討するため EROD 試験を行った結果、SOS 誘導抑制効果を示したクマリン類は EROD 試験においても強い阻害活性値を示し、MeIQ に対するクマリン類の SOS 誘導抑制効果発現には、CYP1A2 の阻害が深く関与していることが明らかになった。

### 第三章 天然クマリン類の微生物変換

本章では、天然クマリン類からさらなる有用物質の産出を目的とし、生体触媒として植物寄生菌 *Glomeralla cingulata* を用いた微生物変換について検討した。

BACE1 阻害活性と SOS 誘導抑制効果の両者に対して活性を示した isoimperatorin (1) および imperatorin (2) の *G. cingulata* による微生物変換を行った。その結果、1 および 2 はそれぞれ単一の化合物へと変換された。変換物の構造は各種スペクトルデータを解析することにより、化合物 1 の変換物は α,β-不飽和ラクトン環の還元が進行した 6,7-furano-5-prenyloxy hydrocoumaric acid (1-1) と決定した。一方、化合物 3 の変換物はエーテルの開裂が進行した xanthotoxol (22) であると決定した。

次に、bergapten (19), xanthotoxin (23) の *G. cingulata* による変換について検討した。化合物 19 および 23 の変換では 1 と同様に α,β-不飽和ラクトン環の還元が進行した 19-1 と 23-1 をそれぞれ得た。さらに 23 の変換でのみ脱メチル化が進行した 22 とえた。脱アルキル化が基質特異的に反応することが示された。

続いて、5 位および 8 位にメトキシ基を有する isopimpinellin (31) を基質として用いた変換について検討を行った。化合物 31 の変換において単一の変換物を確認し、その構造を α,β-不飽和ラクトン環の還元が進行した 31-1 と決定した。今回の変換においては 8 位の脱メチル化反応は進行しなかったことより、8 位の脱アルキル化には 5 位のアルコキシ基の存在が関与していることが解った。

さらに、フランおよびピラン環の微生物変換に対する影響を検討するために、coumarin (6), psoralen (17) および xanthyletin (40) の *G. cingulata* による変換について行った。3 種の基質においていずれも α,β-不飽和ラクトン環の還元が進行した 6-1, 17-1 および 40-1 を生成することが解った。さらに、基質 17 および 40 ではそれぞれの変換生成物 17-1, 40-1 のカルボキシル基がアルコールへと還元が進行した変換物 17-2, 40-2 も生成することが明らかとなった。この種の変換においてフランおよびピラン環の存在はカルボキシルからアルコールへの還元を促進し、一方、5 位および 8 位のアルコキシ基の存在はこの還元を阻害することも解った。

得られた変換生成物 (Fig. 2) の BACE1 阻害活性およびヒト CYP1A2 (大腸菌発現系) を用いた前変異原物質 MeIQ に対する SOS 誘導抑制活性について検討した。BACE1 阻害活性において α,β-不飽和ラクトン環の還元が進行して得られた変換物および基質の阻害活性値においては大きな差はみられなかったが、カルボキシル基をメチルエステル体に誘導した変換物メチル化体においては基質と比較して強い阻害活性を有することを見出した。また、SOS 誘導抑制活性については基質と比較して変換物の抑制効果が著しく減少してしまっただが、変換物メチル化体では基質とほぼ同等の抑制効果がみられるものもあった。このことは、生体触媒を用いた有用物質・有用リード化合物生産の可能性を示唆するものであるといえる。

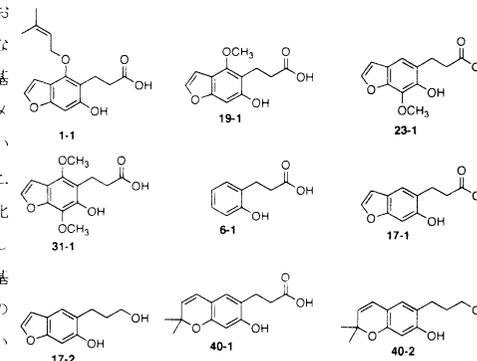


Fig. 2. Metabolites form biontransformation of coumarins by *G. cingulata*

以上、本論文において、46 種の天然クマリン化合物を用いた β-セクレターゼ (BACE1) 阻害活性と抗遺伝毒性 (SOS 誘導抑制活性) を評価し、その構造活性相関を明らかにした。これらの化合物は様々な置換基が活性の要因になっており、その作用機序も各物質によってそれぞれ特異的であるといえる。このような BACE1 阻害活性物質や抗遺伝毒性活性物質を身近な植物からみだすことは、多様な機構によって引き起こされる認知症に対して、有効な化学的予防・改善の一戦略になると考えられる。また、微生物変換では、基質特異的および位置選択的に変換が進行するとともに、変換生成物がより強い生理活性を示すことより、生体触媒における新規有用物質生産の可能性を明らかにした。

本論文の結果は、天然クマリン類の用途開発において、認知症およびがん予防の分野に新たな指針を示すとともに、生体触媒を用いた物質変換法において工業的に大いに発展が期待される。

論文審査結果の要旨

本論文では、天然クマリン類の生理活性 (β-セクレターゼ (BACE1) 阻害活性およびがん発生抑制) と生物変換について検討し、以下の三章からなる研究を行っている。第一章では 46 種の天然クマリン類の BACE1 阻害活性とその構造活性相関について、第二章では 46 種の天然クマリン類の抗遺伝毒性評価と抗遺伝毒性機構について、第三章において天然クマリン類を微生物 *Glomerella cingulata* を用いた微生物変換による有用物質の産出、変換反応の特異性および変換生成物の BACE1 阻害活性と抗遺伝毒性について検討し、その成果について述べている。

第一章では、46 種の天然クマリン類 (11 種の単純クマリン 6 - 16, 28 種のフラノクマリン 1 - 5, 17 - 39, 7 種のピラノクマリン類 40 - 46) の BACE1 阻害活性について検討し、その結果、4 種のフラノクマリン betgamotin (21), 8-geranyloxy-psoralen (26), 5-geranyloxy- 8-methoxy-psoralen (33), および 8-geranyloxy-5-methoxy- psoralen (35) が特に強い BACE1 阻害活性値を示すことを明らかにしている (Fig. 1)。また、これらの化合物の阻害形式を Dixon plot 法を用いて検討をし、化合物 26, 33 および 35 において非競争阻害、一方、化合物 21 では競争阻害であると解明している。構造活性相関については、各クマリン骨格においてゲラニルオキシ ( $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) およびプレニルオキシ基 ( $\text{OCH}_2\text{CH}=\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ) の置換基が最も BACE1 阻害活性に寄与していることを明らかにしている。

第二章では、天然クマリン類の抗遺伝毒性について論述している。フラノクマリン 1 - 5 の *umu* テストにおける SOS 誘導抑制活性を評価し、化合物 1 - 5 は変異原物質 (AF-2, MNNG) に対しては抑制効果を示さず、ラット肝臓の酸化酵素群である cytochrome P450 (CYP) を含む S9mix (rat S9mix) によって代謝活性化され変異原性を示す前変異原物質 (PBTA-4, MeIQ) に対して特に化合物 1 - 4 が強い抑制効果を示したことから PBTA-4 および MeIQ に対する抗遺伝毒性について詳細に検討している。その結果、化合物 1 - 4 はそれぞれに対して強い抑制効果を示し、また、化合物 1 - 5 の P450 分子種 (CYP1A1, CYP1A2) に対する阻害活性値を 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 試験で評価した結果、化合物 1 - 5 は強い阻害活性を示したことから化合物 1 - 5 の前変異原物質

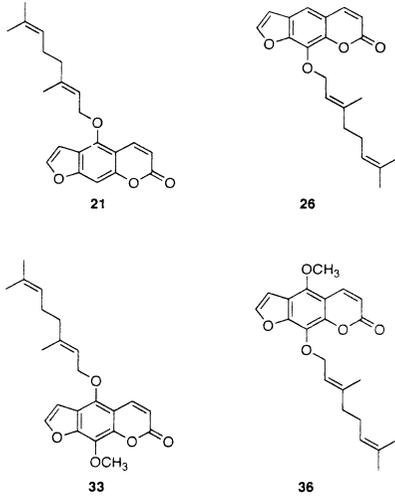


Fig. 1. Chemical structures of compounds 21, 26, 33, and 36.

(PBTA-4, MeIQ) に対する抑制効果は P450 酵素による代謝活性化を阻害することに起因することを明らかにしている。また、ヒト CYP1A2 (大腸菌発現系) を代謝活性化に用いた MeIQ に対するクマリン化合物 1 - 46 の SOS 誘導抑制効果ならび構造活性相関を検討し、化合物 26, 34, および 35 は特に強い抑制効果を示し、さらに化合物 6, 17, 40 の活性値を比較することによりフランおよびピラン環 (特にフラン環) が抑制効果に寄与していることを明らかにするとともに、フラノクマリン類においては 8 位にゲラニルオキシもしくはプレニルオキシ基の付加が SOS 誘導抑制効果に大きく関与していることを明らかにしている。

第三章では、天然クマリン類からさらなる有用物質の産出を目的とし、生体触媒として植物寄生菌 *Glomerella cingulata* を用いた微生物変換について検討している。8 種の基質 isoimperatorin (1), imperatorin (2), coumarin (6), psoralen (17), bergapten (19), xanthotoxin (23) および xanthyletin (40) について生体触媒として *G. cingulata* を用いた生物変換について検討し、6 種の新規誘導体の産出に成功している。また、*G. cingulata* のクマリン類の代謝傾向についても明らかにしている。さらに、得られた変換生成物の BACE1 阻害活性およびヒト CYP1A2 (大腸菌発現系) を用いた前変異原物質 MeIQ に対する SOS 誘導抑制活性について検討し、評価することで生体触媒を用いた有用物質・有用リード化合物生産の可能性を示唆する結果も論述している。

これらの研究内容は学術誌 *Phytother. Res., Bioorg. Med. Chem., J. Agric. Food Chem.* および *Tetrahedron* で公表されており、学位論文として高く評価される。

以上、本論文で述べられた知見は、多数の独創性と優れた結果を含み、学術的にも工業的にも価値があり、博士 (工学) 論文として値するものと認めた。