

氏名	おやま まなみ 小山 愛美
授与学位	博士 (生物資源科学)
学位授与年月日	平成31年3月20日
学位授与の根拠法規	学位規則第4条第1項
研究科専攻	秋田県立大学大学院生物資源科学研究科 博士後期課程 生物資源科学専攻
学位論文題目	ヒト白血病細胞 HL-60 増殖抑制物質の探索、構造決定 と生合成の研究
指導教員	水野 幸一
論文審査委員	主査 水野 幸一 副査 田母神 繁、常盤野 哲生 特別 吉澤 結子

## 論文内容要旨

### 緒言

我が国では、高齢化が進んで生活習慣病の比率が高まり、また、がんが死亡原因の1位となっていることから、生活習慣病やがんを予防して健康寿命を延ばすことが医学的にも社会的にも重要となっている。これらの予防には、食事・食生活、身体活動・運動、飲酒・喫煙への配慮が基本だが、それに加えて機能性食材の利用に関心が高まっている。本研究では、がん抑制の一次スクリーニングとして用いられるヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 への増殖抑制を指標に有効な食材や生薬材料を探索し、民間伝承的に健康増進に用いられるヤマノイモ科トコロの塊茎や健康茶として利用可能性のあるヤナギ科カワヤナギの枝の活性成分を同定した。また、抗がん・抗酸化効果が知られているリンゴ・ポリフェノールについて生合成の誘導と代謝過程の解明を試みた。

### 1. ヤマノイモ科 *Dioscorea tokoro* の HL-60 増殖抑制活性物質の研究

*Dioscorea tokoro* (和名：オニドコロまたはトコロ) は、日本に広く分布する多年草で、その塊茎は苦味のため一般には食用とされないが、東北地方の一部では健康増進に良いとして食用にされてきた。HL-60 への活性を指標に塊茎の増殖抑制物質を探索した。

**[方法]** *D. tokoro* の塊茎 (図1) を CH<sub>3</sub>CN にて抽出し、得られた抽出物を各種クロマトグラフィーにて分画した。HL-60 細胞は常法により培養し、単離した化合物は各種機器分析を用いて構造を解析した。

**[結果および考察]** *D. tokoro* 塊茎の CH<sub>3</sub>CN 抽出物より活性物質 1 種を単離し (図2)、質量分析および NMR データの解析結果を文献と比較し、Protodioscin と同定

した (図 3)。単離収率は 1.54 mg/g fresh weight、IC<sub>50</sub> 値は 5.1 μM だった。Protodioscin は既知化合物だが、*D. tokoro* からの単離は初めての知見である。なお、この試料からは質量分析により Dioscin も検出された。*D. tokoro* の生理活性については、岩手県以外の地域からの試料では、中国、国内の京都府や福岡県の例があるが、化合物や生理活性が異なっており、このことが健康寄与効果や食習慣の地域差に影響していると考えている。

## 2. ヤナギ科 *Salix gilgiana* の HL-60 増殖抑制活性物質の研究

*Salix gilgiana* (和名: カワヤナギ) は、北海道南部から本州、ウスリー、朝鮮半島、中国東北部に分布する木本で、生薬・川柳は枝を原料としており、鎮痛薬などに利用されてきた。本研究において HL-60 に対する増殖抑制活性を見出したことから、有効成分の単離と構造決定を目指した。

**[方法]** *Salix gilgiana* の枝 (図 4) の乾燥品を MeOH にて抽出し、得られた抽出物を各種クロマトグラフィーにて分画した。なお、HL-60 増殖抑制活性試験および単離化合物の構造決定は、1. と同様の方法で行った。

**[結果および考察]** *S. gilgiana* の MeOH 抽出物より活性物質 3 種を単離し (図 5, 6)、質量分析および NMR データを文献値と比較し、7-ketositosterol、7β-hydroxysitosterol、7α-hydroxysitosterol と同定した (図 7)。なお、単離収率はそれぞれ、20、4.8、3.4 μg / g dry weight で、IC<sub>50</sub> 値は 45.6、31.3、8.4 μM だった。7α-hydroxysitosterol は β-体との 2:1 混合物として得られたため、収率および IC<sub>50</sub> 値は混合物での実測値から換算した。これらの酸化型シトステロールのヤナギ科での単離は初めての知見である。ヤナギ科植物は挿し木での増殖が容易で、木本植物の中では初期成長が早いという特徴から、緑化に用いられることが多い。本研究によりヒトの健康維持・増進に役立つ生理活性成分が見出されたので、ヤナギを利用した有用物質生産に繋がるかもしれない。

## 3. リンゴ培養植物に含まれる Phloretin 類の生合成に関する研究

リンゴは、従来から食物繊維やビタミン類を豊富に含み健康に良い食材とされてきたが、近年では抗酸化活性やがん細胞増殖抑制等を示すポリフェノールが注目されている。健康に寄与するポリフェノールを多く含むリンゴ品種の創出を目指し、ポリフェノール生合成に理解を深めるため、化合物レベルでの代謝実験に着手した。二次代謝産物の生成を誘導するエリシター処理を検討し、重水素標識体を用いた追跡実験を行って生合成過程について考察を加えた。

**[方法]** 今回調製した培養植物では二次代謝産物量が少なかったため、生合成を促進するため 2,6-dichloroisonicotinic acid (INA) によるエリシター処理を行った。新生化合物の単離は各種クロマトグラフィーにて行い、構造決定には質量分析および NMR を用いた。重水素標識体 [<sup>2</sup>H<sub>m</sub>]Phlorizin および [<sup>2</sup>H<sub>n</sub>]Phloretin (m, n は <sup>2</sup>H の標識数) を合成して培養植物への投与実験を行い、回収化合物をそれぞれ [<sup>2</sup>H<sub>x</sub>]Phloretin、[<sup>2</sup>H<sub>y</sub>]Phlorizin (x, y は <sup>2</sup>H の標識数) とし、投与化合物の移動や代謝動向を回収化合物の HPLC 定量分析と質量分析により解析して求めた。

**[結果および考察]** 培養植物には配糖体の Phlorizin が内在していた (図 10, 11) が、0.6 mM INA でエリシター処理を行った (図 8) ところ Phloretin (図 9 - 11) が新生

していた。そこで、新生する時期と量を知るため、INA 処理時の Phloretin と Phlorizin 量を 7 日間にわたって定量した (図 11)。INA の溶解に使用した DMSO のみで処理したものと比較した結果、DMSO 処理では、培地中に Phloretin および Phlorizin が検出されなかったが、INA 処理では培養 1 日目から Phloretin が新生し Phlorizin も増加していた (図 11, 12)。重水素標識体の取り込み実験では、 $[^2\text{H}_m]$  Phlorizin を投与した植物体では、回収化合物中の  $[^1\text{H}]$  Phlorizin を 100% とすると、 $[^2\text{H}_y]$  Phlorizin が占める割合は、DMSO 処理で 26% だったが INA 処理では 18% であり、また、 $[^2\text{H}_m]$  Phlorizin に由来すると考えられる  $[^2\text{H}_x]$  Phloretin が 40% 検出された (図 13)。次に  $[^2\text{H}_n]$  Phloretin の投与実験を行った。植物体において、 $[^2\text{H}_n]$  Phloretin を投与した DMSO 処理では Phloretin は検出されなかったが、INA 処理では新生した Phloretin の 26% が重水素化体であった。また  $[^1\text{H}]$  Phlorizin を 100% とすると、 $[^2\text{H}_y]$  Phlorizin の占める割合は、DMSO 処理では 17%、INA 処理では 6% であった (図 14)。

これらの実験結果から、まず、INA 処理の定量実験で培地中に両化合物を検出したことから、INA 処理によって生成した化合物が培地中に溶出したことが示唆された (図 16)。次に重水素標識体の実験で、培地に加えた重水素標識体やその代謝物が植物体中で検出されたことから、Phlorizin も Phloretin も培養植物表面を透過したことが示唆された。また、重水素化 Phlorizin 共存下の INA 処理で新生した Phloretin が重水素化体を含んでいたことから、Phlorizin は Phloretin の前駆体の一つであること、重水素化 Phloretin 共存下の DMSO 処理で重水素化 Phloretin が検出されないのに Phlorizin が標識されていたことから、Phloretin は植物体に取り込まれた後、DMSO 処理 (健常状態) ではほぼ全量が Phlorizin に変換 (非常に速い反応) されること、が示唆された。また、INA 処理では健常状態より標識 Phlorizin 量が相対的に少なかったことから、Phloretin から Phlorizin への変換は DMSO 処理の時よりも遅いか、あるいは Phlorizin の加水分解も起きていた (図 16) ことが考えられた。

ポリフェノール生合成経路から考察すると、Phloretin と Phlorizin は、4-Coumaroyl CoA からいくつかの過程を経て生成することが考えられる (図 15)。本研究では、健常状態と誘導条件下での Phloretin と Phlorizin の相互変換の一部を明らかにできた。文献より Phloretin と Phlorizin の各種生理活性を比較したとき、特に抗菌活性は配糖体 Phlorizin よりも Phloretin の方が高い (表 1)。このことから植物防御上の意義として植物表面の一種のストレスによって抗菌性の高い Phloretin が新生され体外に放出されていることが、防御機構として有効に働いていると考えられた。

Phloretin は HL-60 のアポトーシスを誘導するとの報告があり、ヒトの健康に寄与する可能性がある。本研究で用いた手法や得られた知見を基盤として、他の生理活性リンゴ・ポリフェノールの生合成についても詳細を明らかにし、機能性成分を多く含む品種の作出などに役立てたいと考えている。

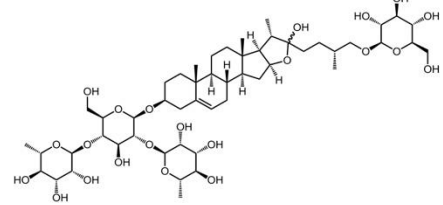
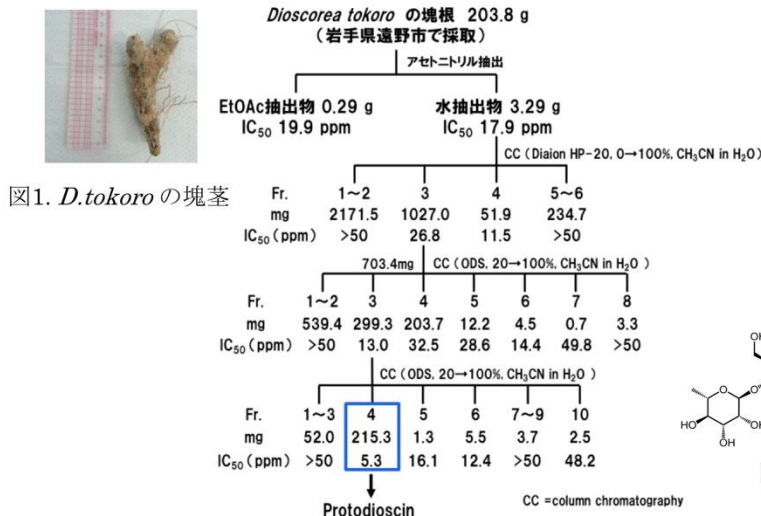


図3. Protodioscin の構造

図2. *D. tokoro* 抽出物の分画と Protodioscin の単離



図4. *S. gilgiana* の枝

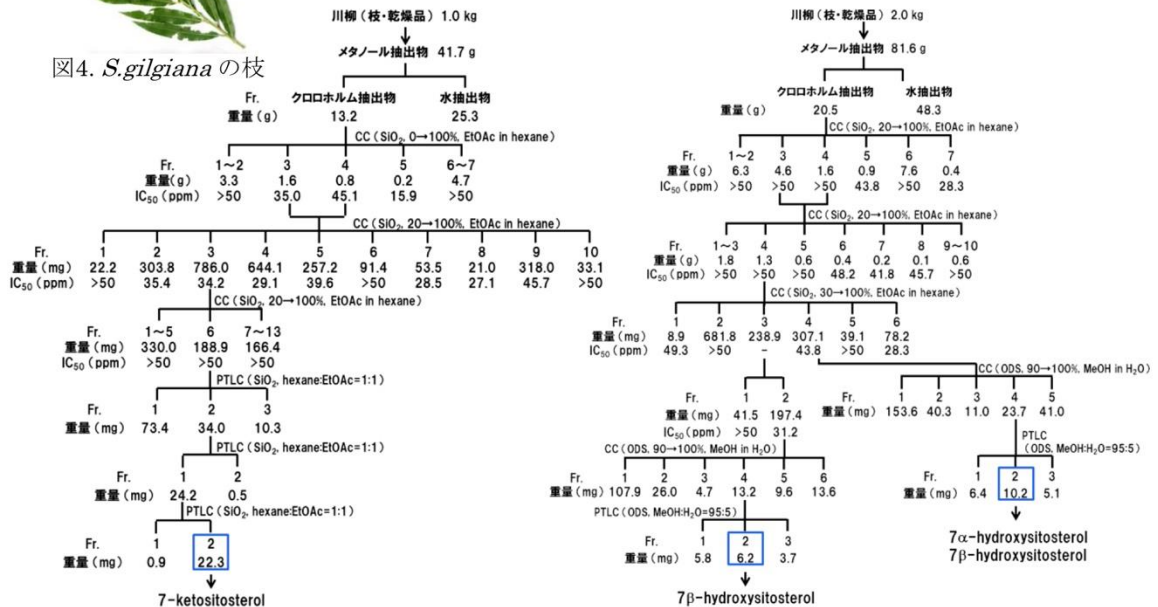


図5. *S. gilgiana* 抽出物の分画と 7-ketositosterol の単離

図6. *S. gilgiana* 抽出物の分画と 7β-hydroxysitosterol の単離、7α-hydroxysitosterol:7β-hydroxysitosterol=2:1 混合物の精製

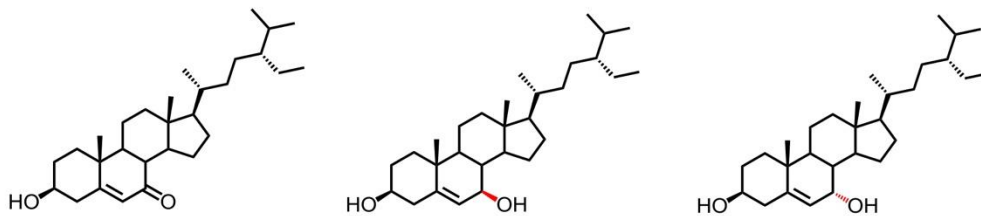


図7. 7-ketositosterol, 7β-hydroxysitosterol, 7α-hydroxysitosterol の構造

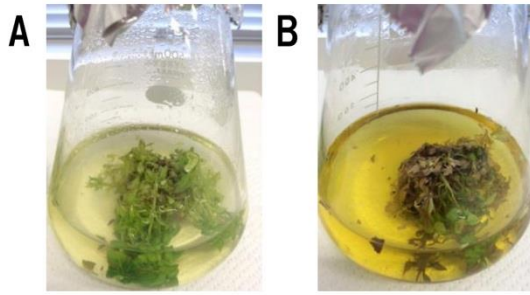


図8. リンゴ培養植物培養7日目の比較  
(A: 0.1%DMSO 処理 B: 0.6 mM INA 処理)

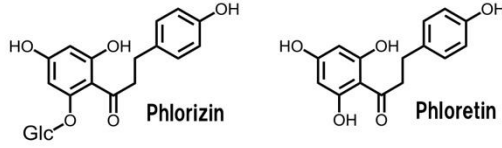


図10. Phlorizin と Phloretin の構造

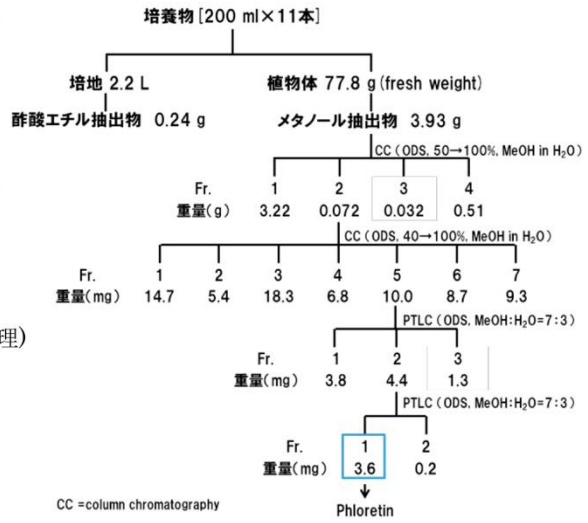


図9. リンゴ培養植物抽出物の分画と Phloretin の単離

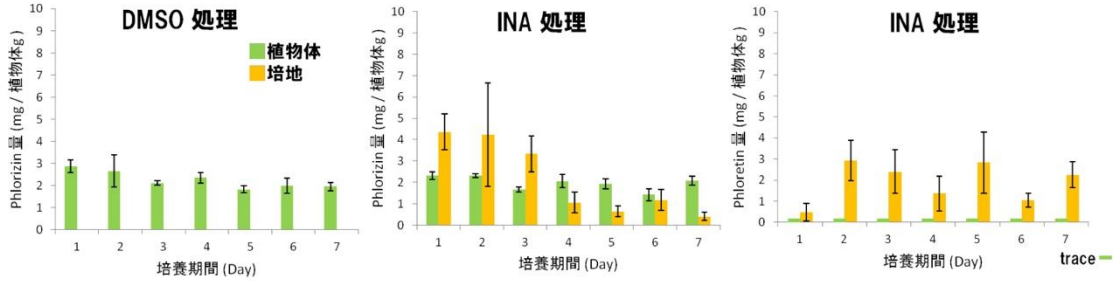


図11. リンゴ培養植物の植物体と培地の Phlorizin と Phloretin 量の経日変化 (化合物量mg / 植物体g)

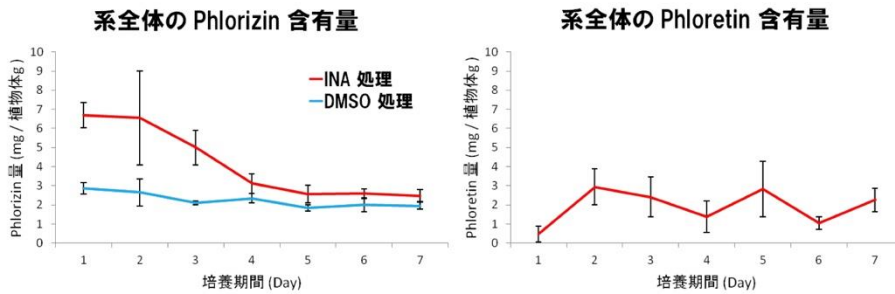


図12. リンゴ培養植物の Phlorizin と Phloretin の経日変化 (フラスコ内全体 / 植物g)

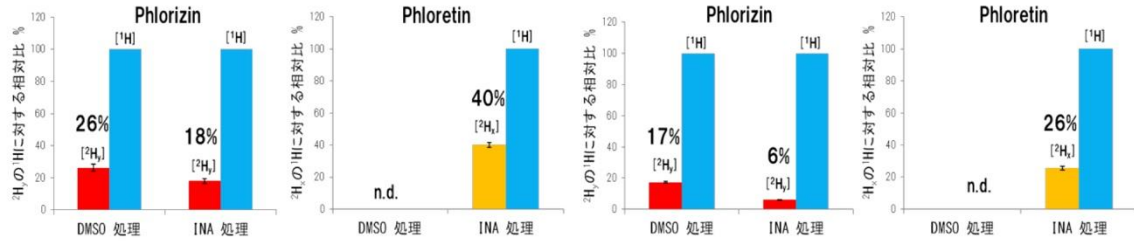


図13. 重水素標識体 $[^2\text{H}_m]$ Phlorizin 投与時の植物体の Phlorizin 量および Phloretin 量

図14. 重水素標識体 $[^2\text{H}_n]$ Phloretin 投与時の植物体の Phlorizin 量および Phloretin 量

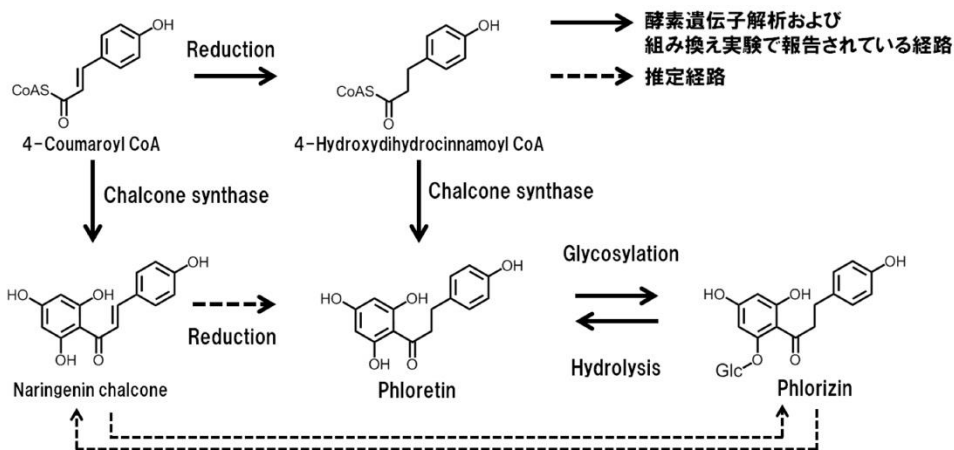


図15. Phlorizin と Phloretin の代謝経路の考察

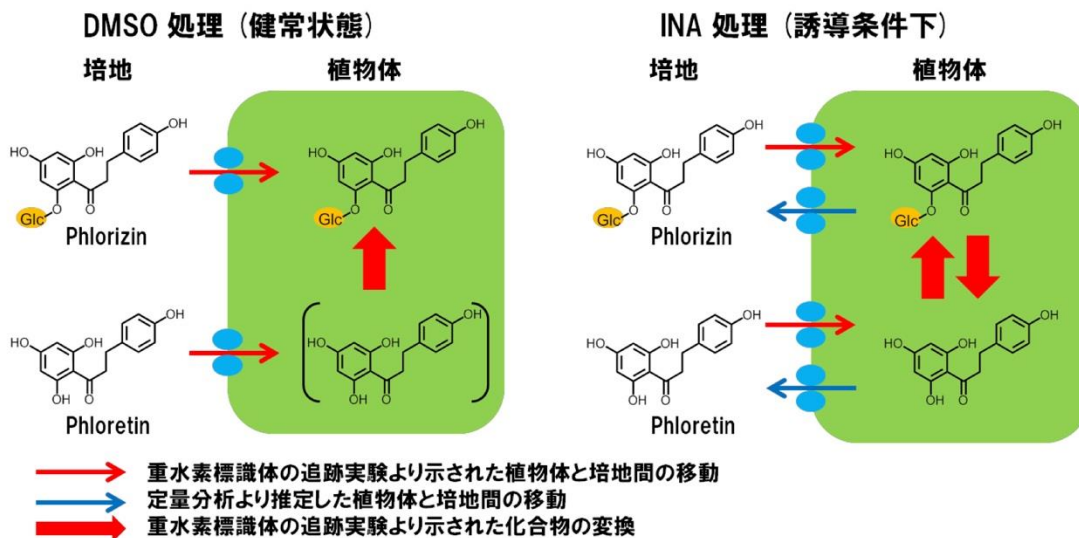


図16. DMSO 処理 (健常状態) と INA 処理 (INA 処理) における Phlorizin と Phloretin の代謝経路の考察

表1. Phlorizin と Phloretin の生理活性の例

活性	Phloretin	Phlorizin
抗炎症 (NO, PGEs, IL-6, TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2)	高い発現抑制	活性無し (TNF- $\alpha$ のみ弱い抑制)
抗菌 (グラム陽性、陰性14種)	高い活性	活性無し
抗酸化 (DPPH ラジカル除去能)	IC <sub>50</sub> = 179.47 mg/mL	IC <sub>50</sub> = 866.80 mg/mL
増殖抑制活性 (HL-60, A549, Bel7402, HepG2, HT-29)	高い活性	活性無し (HepG2 のみ弱い活性)

## 論文審査結果要旨

平成30年12月20日10時より本論文の公開予備審査会を実施し、発表と質疑応答を行った。また審査委員のみによる非公開の審査会も実施し、論文内容に関する討議を行った。その結果、内容の一部再構成を要するものの、論文提出要件である大学院後期課程における取得単位数および論文等の発表に関してもその要件を満たしていることから、博士学位論文として審査を受ける資格があるものと認定した。

予備審査会を経て平成31年2月18日10時より秋田県立大学にて博士学位論文の公開審査会を実施した。審査会では学位論文の内容に基づき、健康寿命を延ばすことに寄与する機能性食材や生薬材料の探索をめざして前骨髄性白血病細胞 HL-60 への増殖抑制を指標に、植物由来の天然有機化合物について示された。第1章では民間伝承で健康増進に有用とされる *Dioscorea tokoro* (和名: オニドコロ) 塊茎より活性成分を単離し、サポニン的一种 protodioscin と同定した。第2章では健康茶として利用の可能性がある *Salix gilgiana* (和名: カワヤナギ) の活性成分を単離し、酸化型シトステロールの 7-ketositosterol、7 $\alpha$ -および 7 $\beta$ -hydroxysitosterol と同定した。第3章では、リンゴ由来ポリフェノールの活性成分 phloretin の生合成過程に関する新しい知見を得た。リンゴ果実は食物繊維やビタミン類を豊富に含み健康に良いとされてきたが、近年では抗酸化活性やがん細胞増殖抑制等を示す生理活性ポリフェノールが注目されている。健康に寄与するポリフェノールを多く含むリンゴ品種の創出を目指し、その生合成への理解を深めるため、化合物レベルでの代謝実験を行った。リンゴ培養植物に対し2,6-ジクロロイソニコチン酸を用いたエリシター処理により phloretin 新規生合成を誘導する条件を見出した。つぎに重水素標識した phloretin と phloridin を合成し、培地に添加して代謝物動態を質量分析にて追跡した。その結果、健全な培養植物では phloretin が配糖体化を受け phloridin として蓄積されるが、エリシター処理下では phloretin の配糖体化とともに phloridin の加水分解も起こることを見出した。本研究により、リンゴ培養植物実験系はその二次代謝研究に有用であることが示され、本実験条件下での phloretin と phloridin の相互変換および両化合物の植物防御上の役割についても示唆を与えた。同日審査委員のみによる審査会も実施し、引き続き研究が必要な課題も残されているものの、データの有用性は高く、発表と質疑応答の状況も鑑み、本論文は秋田県立大学の博士の学位授与に十分値すると認定した。

以下、論文発表を示す。

- Oyama M., Tokiwano T., Kawaii S., Yoshida Y., Mizuno K., Oh K. and Yoshizawa Y. (2017) Protodioscin, isolated from the rhizome of *Dioscorea tokoro* collected in northern Japan is the major antiproliferative compound to HL-60 leukemic cells. *Curr. Bioact. Compd.* 13(2), pp.170-174
- Oyama M., Tokiwano T., Ota H., Mizuno K., Oh K., Kawaii S. and Yoshizawa Y. (2019)  $\beta$ -Sitosterol oxides from the dried stem of *Salix gilgiana* inhibit the proliferation of HL-60 leukemic cells. *Curr. Bioact. Compd.* DOI: 10.2174/1573407214666181026110106