

# Wnt シグナルに作用する生物活性天然物の探索

千葉大学大学院 医学薬学府 先端医学薬学専攻

活性構造化学研究室

大石 健介

(2015 年修了)

目次

序論	3
第1章 研究背景・目的	
第1節 Wnt シグナル伝達経路	6
第2節 ゼブラフィッシュを用いた解析	11
第2章 スクリーニング法	
第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の測定	17
第2節 細胞生存率の測定	21
第3章 植物エキストラライブラリーのスクリーニング	
第1節 TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇または低下を指標としたスクリーニング	22
第4章 <i>Zanthoxylum rhetsa</i> からの Wnt シグナル活性化成分の探索	
第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標とした分画	29
第2節 単離した化合物の構造解析及び同定	34
第3節 単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価	36
第4節 小括	37
第5章 <i>Ricinus communis</i> からの Wnt シグナル活性化成分の探索	
第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標とした分画	39
第2節 単離した化合物の構造解析及び同定	48
第3節 単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価	52
第4節 化合物 <b>3</b> の Wnt シグナルに対する活性化作用の解析	53
第5節 化合物 <b>3</b> のゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルに対する活性化作用の解析	56
第6節 小括	61

## 序論

---

第 6 章	<i>Eurycoma longifolia</i> からの Wnt シグナル阻害成分の探索	
第 1 節	TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の低下を指標とした分画	64
第 2 節	単離した化合物の構造解析及び同定	73
第 3 節	単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価	76
第 4 節	単離した化合物のがん細胞に対する細胞毒性の評価	77
第 5 節	化合物 <b>7</b> の Wnt シグナルに対する阻害作用の解析	79
第 6 節	化合物 <b>7</b> のゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルに対する 阻害作用の解析	84
第 7 節	小括	98
第 7 章	<i>Tabernaemontana divaricata</i> からの Wnt シグナル阻害成分の探索	
第 1 節	TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の低下を指標とした分画	102
第 2 節	単離した化合物の構造解析及び同定	113
第 3 節	単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価	117
第 4 節	単離した化合物のがん細胞に対する細胞毒性の評価	118
総括		122
実験の部		123
謝辞		151
主論文目録		153
学位論文審査		154

## 序 論

現在の有用な医薬品は植物や菌類、海洋生物から、多く発見されてきた。1929年のアオカビからのペニシリンの発見により、細菌からの医薬資源の探索が開始された。1970年代には、海洋からの探索も始まり、現在に至るまでさかんに行われている。下図には1981年から2010年までに世界中で承認された抗悪性腫瘍薬の由来を示す (Figure 1)。この図が示すように、約半分の医薬品が天然物由来である<sup>[1]</sup>。したがって、天然資源は現在までの創薬において重要な役割を果たしてきたことが証明されている。

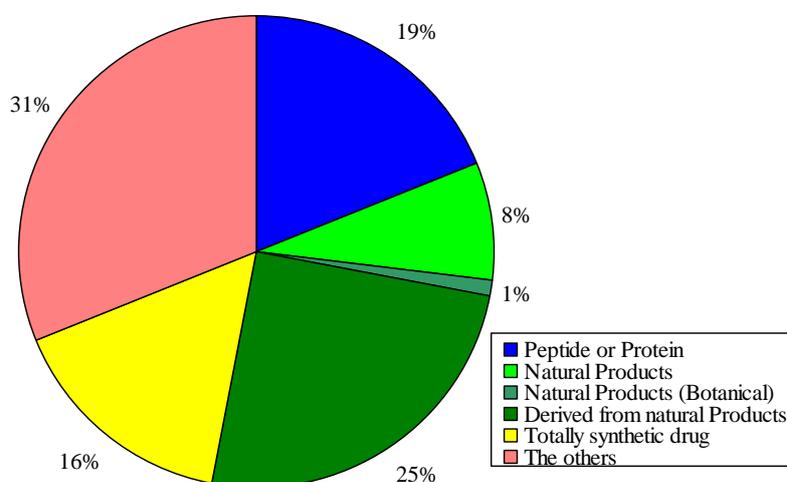


Figure 1. All anticancer drugs 1981-2010

しかしながら、現在の創薬は SBDD(structure based drug design)のようなタンパク質の立体構造情報に基づく薬剤の設計、*in silico* スクリーニング及びコンビナトリアルケミストリーを利用した化合物ライブラリーの作成などが主流であり、天然物のランダムスクリーニングによる探索は衰退しつつあり、次第に行われなくなっている。

このような現状においても、強力な生物活性を持った化合物の探索は母骨格無しでは、非常に困難である。この要因としては、合成化合物ライブラリーでは、天然物のような多彩な母骨格を持った化合物が少なく、多様性に欠けるという問題点があるためであると考えられている。このような事実が存在するため、製薬企業では再び、天然資源ライブラリーに注目が集まりつつある<sup>[2]</sup>。このような現状から、依然として天然資源は創薬において重要な役割を果たすことが期待される。

## 序論

近年においても天然物由来の医薬品は上市されており、アルツハイマー病に適応を持つガランタミン（レミニール<sup>®</sup>）はヒガンバナ科植物から得られたアルカロイドである。また、腎細胞癌に適応を持つエベロリムス（アフィニトール<sup>®</sup>）、乳癌に適応を持つエリブリン（ハラヴェン<sup>®</sup>）などが医薬品として利用されている<sup>[3]</sup>。これらはそれぞれ、海綿 (*Halicondria okadai*)及び放線菌(*Streptomyces hygroscopicus*)から得られた天然物の誘導体である (Figure 1-2)。

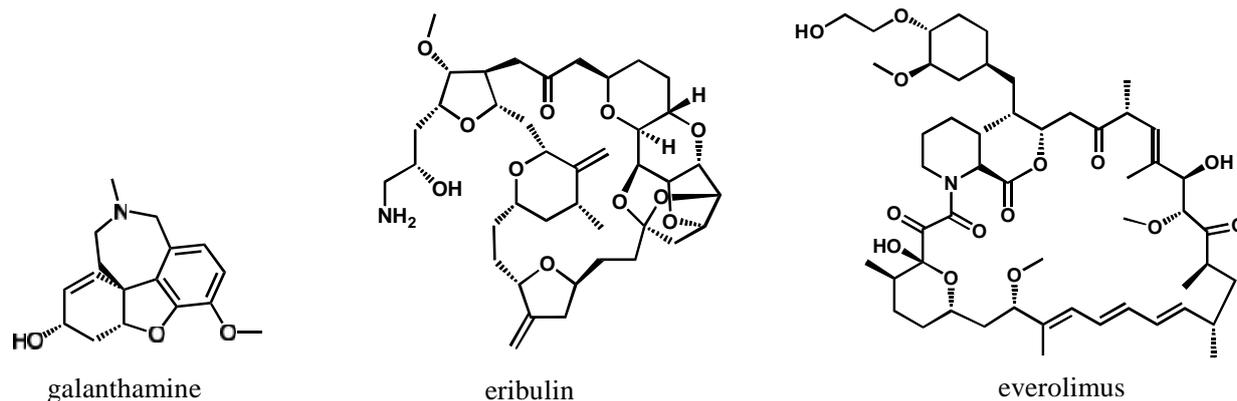


Figure 2. FDA approval drugs from natural resource

近年では、がん細胞に特異的に細胞毒性に効果を示す、分子標的薬が利用されている。分子標的薬の例として、Figure 2 で示した Everolimus は細胞内シグナル伝達分子である mTOR (mamalian target of rapamycin) を標的とし、抗腫瘍活性を發揮する<sup>[4]</sup>。分子標的薬の特徴として疾患の原因である標的に選択的に作用示す点や、副作用を軽減させることで、治療効果を高めることできる点が挙げられる。また、がんだけではなく治療満足度の低い疾患である。糖尿病などの代謝系疾患やアルツハイマー病や統合失調症などの神経疾患等における分子標的薬の開発も行われている。また、近年は新規医薬品の創出が困難になっており、その一因として創薬の研究開発費の高騰が挙げられる。ゆえに、製薬企業では既存医薬品の適応症の拡大を狙い、育薬研究がさかんに行われている、したがって、新規化合物だけではなく既存の低分子化合物の新たな生物活性及び標的分子の同定等の研究も今後の創薬研究において重要になると考えられる。

本論文ではがんだけではなく、糖尿病や神経疾患等への作用も期待した化合物の発見を目指し、植物抽出物からの活性化合物の探索及び作用機序解析を行った。

[参考文献]

- [1] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J Nat Prod* **2012**, 75, 311-335.
- [2] 20<sup>th</sup> Symposium on the Development and Application of Naturally Occurring Drug Materials Abstracts.
- [3] G. M. Cragg, D. J. Newman, *Biochim Biophys Acta* **2013**, 1830, 3670-3695.
- [4] R. Yuan, A. Kay, W. J. Berg, D. Lebwohl, *J Hematol Oncol* **2009**, 2, 45.

### 第1章 研究背景・目的

#### 第1節 Wnt シグナル伝達経路

Wnt シグナル伝達経路は細胞内におけるシグナル伝達経路の一つであり線虫, ショウジョウバエ, ゼブラフィッシュ, マウス及びヒトなど, 無脊椎動物から脊椎動物などの様々な生物において保存されている。また, 細胞内において, 細胞増殖, 細胞分化, 胚発生及び形態形成などの役割を担っており, 成人組織におけるホメオスタシスの維持にも不可欠である<sup>[1]</sup>。Wnt は分子量約 4 万の分泌性のタンパク質であり, 現在までに 19 種類報告されている<sup>[2]</sup>。Wnt たんぱく質はそれぞれ役割が異なっており, Wnt1 は中枢神経の発達<sup>[3]</sup>, Wnt3a は脂肪新生<sup>[4]</sup>などに関与している。Wnt シグナル伝達経路には 2 種類存在し, 主経路である Wnt/ $\beta$ -catenin 経路, 副経路である PCP (planar cell polarity: PCP)経路, Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路及び Wnt/PKA 経路が知られている。Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は $\beta$ -catenin/T-cell factor (TCF) を介して Wnt 標的遺伝子の発現を制御する<sup>[1]</sup>。PCP 経路は, 細胞極性を制御し<sup>[5]</sup>, Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路は細胞接着及び細胞運動に関与しており<sup>[6]</sup>, さらに, Wnt/PKA 経路は筋新生の制御に関与していることが報告されている<sup>[7]</sup>。本研究では特に Wnt/ $\beta$ -catenin 経路について述べる。

Wnt シグナル伝達経路において最も研究されているのが Wnt/ $\beta$ -catenin 経路である。この経路の概略図を以下に示した(Figure 1-1)。Wnt たんぱくが結合していない状態では細胞質における転写活性化因子である $\beta$ -catenin はプロテインキナーゼである casein kinase 1 (CK1) や GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), 足場たんぱく質である APC (Adenomatous polyposis coli) や Axin などと複合体を形成している<sup>[8]</sup>。 $\beta$ -catenin はまず, CK1 により N 末端に存在する Serine 45 部位のリン酸化を受け, 続いて GSK-3 $\beta$  により, Threonine 41, Serine 33, Serine 37 部位に順次リン酸化を受ける。さらに, E3 ユビキチンリガーゼである  $\beta$ -transducin repeat containing protein ( $\beta$ -TrCP) により, Serine 33, Serine 37 部位が認識され,  $\beta$ -catenin をポリユビキチン化する。最後にポリユビキチン化された $\beta$ -catenin はプロテアソームにより分解される<sup>[9]</sup>。

一方で, Wnt たんぱくが Frizzled (Fzd) 受容体及び共受容体である LRP5/6 に結合すると, LRP5/6 はリン酸化される。この際に, 複合体中の Axin と LRP5/6 は結合すると同時に複合体より  $\beta$ -TrCP は解離する。続いて,  $\beta$ -catenin は CK1 や GSK3 $\beta$  によりリン酸化を受け

るが、 $\beta$ -TrCP が複合体より解離しているため $\beta$ -catenin のユビキチン化及び分解は抑制される。その結果、細胞質内に $\beta$ -catenin に蓄積する。この  $\beta$ -catenin が核内に移行し、転写因子である TCF/LEF (T - Cell Factor/Lymphoid-Enhancer Factor) と複合体を形成して、下流の標的遺伝子である *c-Myc*, *cyclin D1*, *PPAR $\alpha$* , *COX2*, *MMP-7* などの転写を亢進する<sup>[8]</sup>。

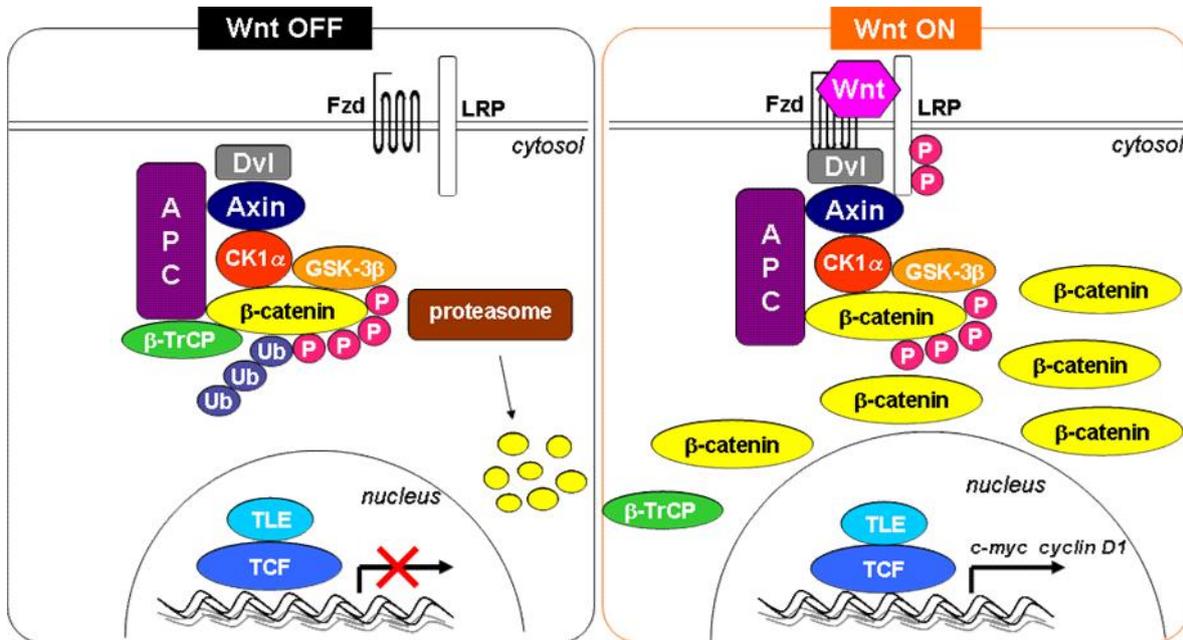


Figure 1-1. Wnt/ $\beta$ -catenin pathway

Wnt シグナルは細胞内において様々な生理応答を行う。したがって、本経路に異常が生じると、がんや糖尿病、神経疾患、骨粗鬆症などの疾患を引き起こす<sup>[10]</sup>。例えば、大腸がんや肝がん等において、Wnt シグナルの異常が報告されており、大腸がんでは APC や  $\beta$ -catenin に変異が<sup>[11]</sup>、肝がんでは Axin1 に変異を有する<sup>[12]</sup>。また大腸がんの 80%以上は APC に変異を有することが知られている<sup>[11]</sup>。生活習慣病の一つである糖尿病は高血糖による動脈硬化、網膜症及び腎不全を併発する疾患であり、生活習慣が発症に起因している。しかし、遺伝的要因も報告されており、2 型糖尿病患者における膵島の TCF7L2(TCF4)の mRNA の発現レベルの上昇及びインスリン分泌の低下が認められる<sup>[13]</sup>。Wnt は中枢神経の発生に関与しており、高次脳機能に Wnt シグナルが関与する可能性は示唆されている。神経疾患ではアルツハイマー病や統合失調症の発症において関連性が報告されており、統合失調症を発症した患者の前頭皮質において、GSK3 $\beta$ の発現レベルの低下や GSK3 $\beta$ のリン酸化の発現レベルの上昇が認められる<sup>[14]</sup>。Wnt シグナルは骨形成に重要であり、

## 第1章 研究背景・目的

Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を制御している。骨粗鬆症を伴う偽神経膠腫症候群では LRP5 に変異を有するため、Wnt シグナルの異常低下を生じる<sup>[15]</sup>。このように Wnt/ $\beta$ -catenin 経路における様々な遺伝子及びたんぱく質の変異によって多くの疾患が引き起こされることが考えられる。したがって、Wnt シグナルを制御する低分子化合物が創薬において注目が集まっている。本シグナルを制御する化合物として下記のような化合物が報告されている。上段は Wnt シグナルの阻害剤であり (Figure 1-2), 下段は Wnt シグナルの活性化剤である (Figure 1-3)。現在、Wnt シグナルを標的とした医薬品研究が行われているものの、臨床開発には至っていない。salinomycin は放線菌より単離された化合物であり、がん幹細胞を標的とした医薬品研究が行われている。作用機序としては、LRP6 のリン酸化を抑制し、LRP6 の分解を促進することで Wnt シグナルを阻害する<sup>[16]</sup>。pyrvinium は FDA により駆虫薬として承認されている医薬品であり、CK1 を活性化することで  $\beta$ -catenin の分解を促進する<sup>[17]</sup>。ICG-001 は合成化合物であり、 $\beta$ -catenin と CBP (CREB-binding protein) の結合を阻害することで、標的遺伝子の発現を阻害する<sup>[18]</sup>。一方で、6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO)<sup>[19]</sup> 及び SB-216763<sup>[20]</sup> は GSK-3 $\beta$  を阻害することで、Wnt シグナルを活性化する。さらに、SKL2001 は Axin と  $\beta$ -catenin の結合を阻害することで、 $\beta$ -catenin を安定化させる<sup>[21]</sup>。

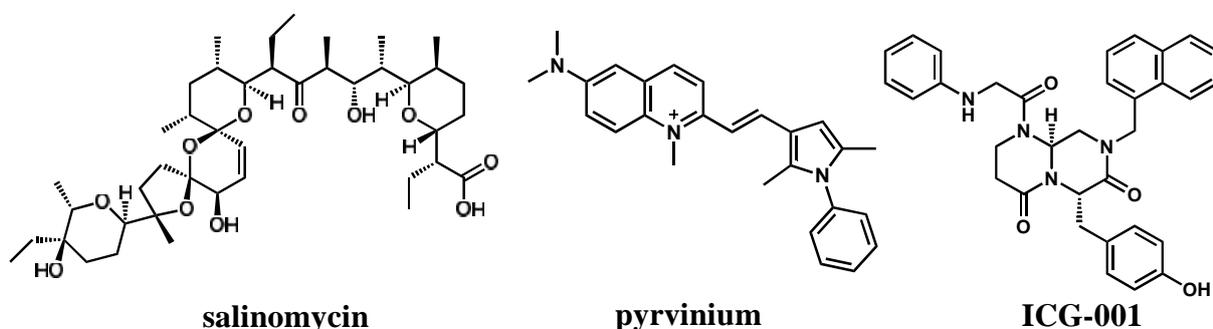


Figure 1-2. small molecule inhibitors of Wnt signaling

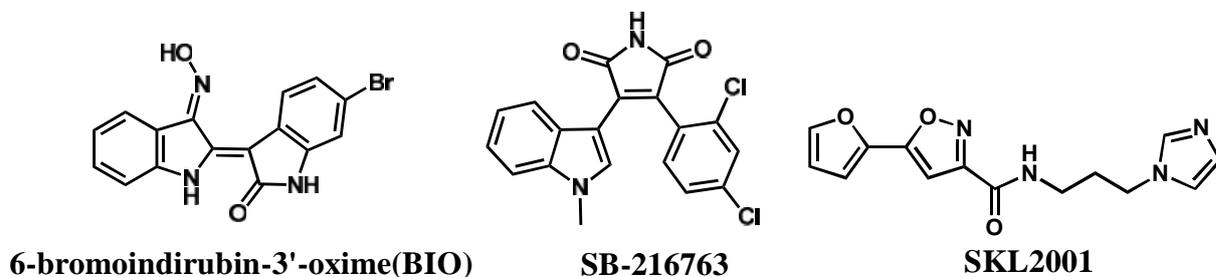


Figure 1-3. small molecule activators of Wnt signaling

## 第1章 研究背景・目的

当研究室ではこれまでの研究において、下記に示す化合物が Wnt シグナルを阻害する化合物として見出した(Figure1-4). 上段はすべて植物由来天然物, 下段は植物由来天然物及び当研究室で合成した変形菌由来の類縁体である. いずれも TCF/  $\beta$ -catenin 転写阻害作用をもつことが報告されている.

calotropin はガガイモ科植物 *Calotropis gigantea* より単離されたカルデノライドであり, CK1 の mRNA の発現レベルを上昇させることで,  $\beta$ -catenin の分解を促進する<sup>[22]</sup>. xylogranin B はセンダン科植物 *Xylocarpus granatum* より単離されたりモノイドであり,  $\beta$ -catenin の核内移行を阻害する<sup>[23]</sup>. scopadulciol はオオバコ科植物 *Scoparia dulcis* より単離されたジテルペノイドであり, p53 のたんぱく質の発現量を増加させることで $\beta$ -catenin を減少させる<sup>[24]</sup>. isoeletherin はアヤメ科植物である *Eleutherine palmifolia* より単離されたナフトピランであり核内の $\beta$ -catenin を減少させる<sup>[25]</sup>. *cis*-dihydroarcyriarubin は活性は弱いものの TCF/  $\beta$ -catenin 転写阻害作用を示す<sup>[26]</sup>.

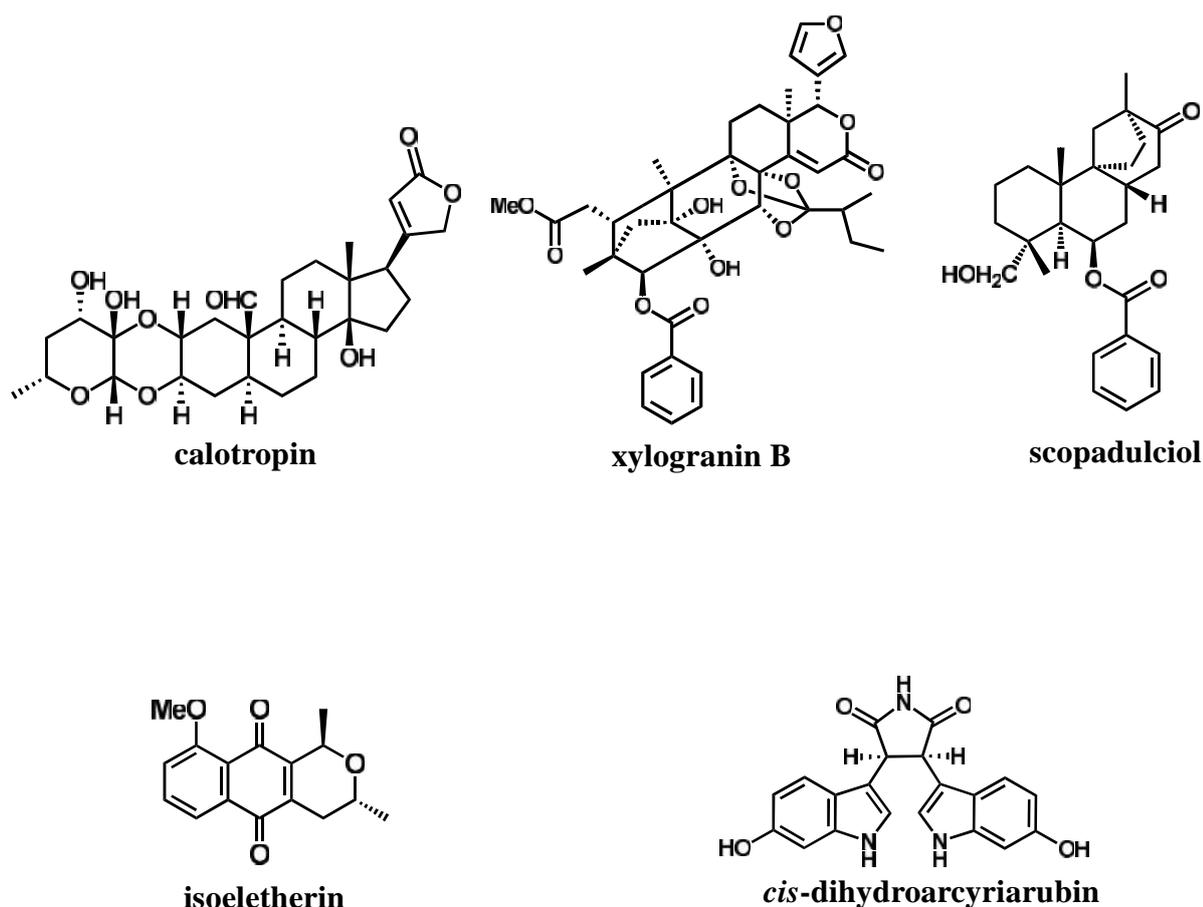


Figure 1-4. small molecule inhibitors of Wnt signaling by our laboratory

## 第1章 研究背景・目的

---

本研究では、TCF/  $\beta$ -catenin の転写を活性化あるいは阻害する化合物の探索を目的に、当研究室保有の熱帯植物由来の天然物資源ライブラリーを対象とした Wnt シグナルの活性の上昇または低下を指標としたスクリーニングにより活性成分の探索を行った。

### 第2節 ゼブラフィッシュを用いた解析

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) はコイ科に属するインド原産の熱帯魚であり、成体の体表に縞模様を持つことから名づけられている。ゼブラフィッシュの体長は成体では5cm、幼体では1cm程度であり、ラットやマウスと比較すると小さく、扱いが容易である (Figure 1-5 A, B)。また、一度の産卵で100~200個の卵を産むため、多くのサンプル数を得ることができる。さらに、胚が透明であるため臓器の発生過程をリアルタイムで観察することができ、主要臓器は受精後72時間で完成する。このような利点を持つため、疾患の研究や分子生物学のツールとして利用されている<sup>[27]</sup>。

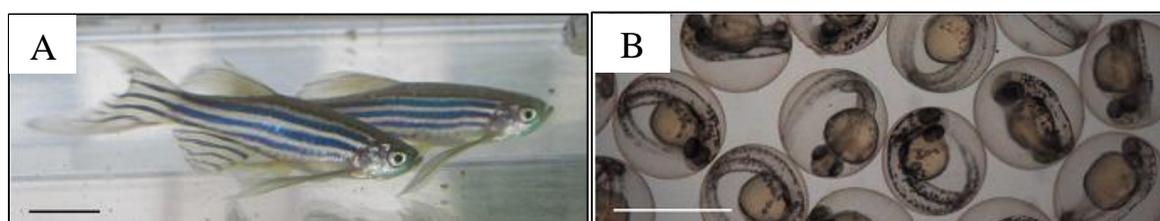


Figure 1-5. (A) zebrafish adults (B) zebrafish embryos at 48 hpf (hpf: hours post fertilization)

ゼブラフィッシュを用いた遺伝学研究は遺伝子をランダムに変異を導入し、目的の変異体を探索する手法 (フォワードジェネティクス) により行われてきた。この手法により、異常を起している遺伝子を突き止め、その遺伝子の機能を解析する。フォワードジェネティクスによる研究はこれまでにショウジョウバエや線虫を用いて広く行われてきたが、無脊椎動物の研究は脊椎動物であるヒトへの研究に結びつかないことが多かった。そのため、脊椎動物であるゼブラフィッシュが注目され、1990年代にゼブラフィッシュを用いた変異体の大規模スクリーニングが行われた<sup>[28]</sup>。このスクリーニングにより、器官形成過程に様々な特徴的な異常を示す変異体が多数見出された。

この手法を用いてこれまでに、血管のリモデリングを調節する遺伝子である *seryl-tRNA synthetase*<sup>[29]</sup> や T リンパ球に発生に関与する遺伝子である *Foxn1* などが同定されている<sup>[30]</sup>。また、この手法は疾患モデルの作成にも利用されており、*APC* に変異を有す大腸がんモデル<sup>[31]</sup> やウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素に変異を有すポルフィリン症モデル等が作成され<sup>[32]</sup>、疾患解析に用いられている。したがって、ゼブラフィッシュはフォワードジェネティクスによる標的遺伝子及びたんぱく質の解析に有用であると考えられる。

このような背景により、近年ではゼブラフィッシュは医薬品やケミカルツール等の候補

## 第1章 研究背景・目的

になり得る低分子化合物のフェノタイプスクリーニングや作用機序解析に用いられている。例えば、CI-1040はゼブラフィッシュの初期発生において細胞運動を阻害することが見出されたが、マウスにおいて抗腫瘍活性を示す<sup>[33]</sup>。また、サリドマイドはヒト胎児に対し催奇形性をもたらすが、催奇形性をもたらすメカニズムは不明であった。しかし、サリドマイドはたんぱく質の分解に関与するCRBNに結合することで、催奇形作用をもたらすことが判明した<sup>[34]</sup>。

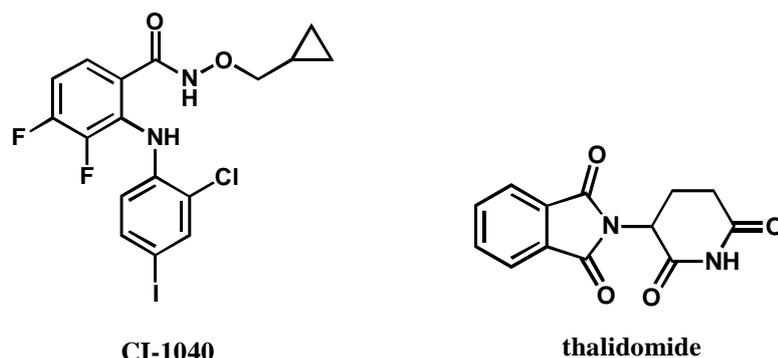


Figure 1-6. Structures of CI-1040 and thalidomide

Wnt シグナルにおいては HLY78<sup>[35]</sup>のような Wnt シグナル活性化剤や Windrphen<sup>[36]</sup>のような Wnt シグナル阻害剤が見出されている (Figure 1-7)。HLY78は Wnt8 の mRNA をインジェクションし、Wnt シグナルを活性化させたゼブラフィッシュにおいて、眼の形成不全を引き起こす。また、Windrphen を処理すると眼の形成不全を引き起こす Axin の変異体において、眼の形成不全が誘導されず、正常に近い眼を形成させる。すなわち、眼の形成不全を回復させる。なお、ゼブラフィッシュにおいて眼の形成不全は Wnt シグナルの活性化を指し、眼の形成不全の回復は Wnt シグナルの阻害を指す。したがって、HLY78は Wnt シグナルを活性化する化合物であり、windrphen は Wnt シグナルを阻害する化合物ということになる。

このようにフェノタイプの変化を解析することで、化合物の *in vivo* における作用を明らかにすることができる。

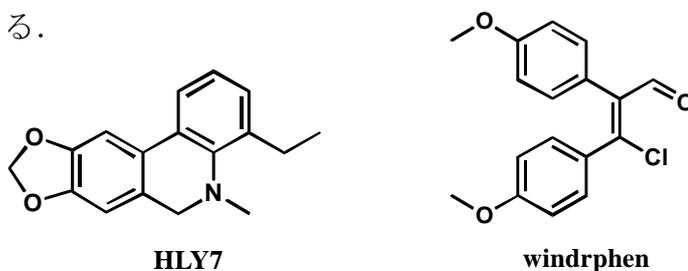


Figure 1-7. Reported a Wnt signal activator, HLY78 and a Wnt signal inhibitor, windrphen in the zebrafish embryos

## 第1章 研究背景・目的

---

ゼブラフィッシュを用いて低分子化合物の作用を解析することで、新たな器官形成の制御メカニズムが報告されている。ゼブラフィッシュのトランスジェニックラインを用いて、FGF シグナルを制御する化合物の探索を行ったところ、BCI はフォスファターゼである *Dusp6* を阻害することで、FGF シグナルを活性化することが判明した。さらに、BCI を処理し、心臓形成について調べたところ *Dusp6* が心臓形成を制御していることが判明した (Figure 1-8) <sup>[37]</sup>。



Figure 1-8. Structures of (E)-2-benzylidene-3-(cyclohexylamino)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (BCI)

このようにゼブラフィッシュを用いてその化合物の作用を調べることができるだけではなく、新たな生命現象の発見につながる可能性が考えられる。そこで、本研究では、*in vitro* で Wnt シグナルに対する作用が認められた化合物を対象にゼブラフィッシュを *in vivo* における低分子化合物の作用機序解析に用いた。

[参考文献]

- [1] H. Clevers, R. Nusse, *Cell* **2012**, *149*, 1192-1205.
- [2] R. Nusse, H. Varmus, *Embo j* **2012**, *31*, 2670-2684.
- [3] M. E. Dickinson, R. Krumlauf, A. P. McMahon, *Development* **1994**, *120*, 1453-1471.
- [4] H. X. Li, X. Luo, R. X. Liu, Y. J. Yang, G. S. Yang, *Mol Cell Endocrinol* **2008**, *291*, 116-124.
- [5] M. Katoh, *Oncol Rep* **2005**, *14*, 1583-1588.
- [6] A. De, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **2011**, *43*, 745-756.
- [7] A. E. Chen, D. D. Ginty, C. M. Fan, *Nature* **2005**, *433*, 317-322.
- [8] E. Sadot, M. Conacci-Sorrell, J. Zhurinsky, D. Shnizer, Z. Lando, D. Zharhary, Z. Kam, A. Ben-Ze'ev, B. Geiger, *J Cell Sci* **2002**, *115*, 2771-2780.
- [9] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, X. He, *Cell* **2002**, *108*, 837-847.
- [10] R. T. Moon, A. D. Kohn, G. V. De Ferrari, A. Kaykas, *Nat Rev Genet* **2004**, *5*, 691-701.
- [11] A. Klaus, W. Birchmeier, *Nat Rev Cancer* **2008**, *8*, 387-398.
- [12] S. Satoh, Y. Daigo, Y. Furukawa, T. Kato, N. Miwa, T. Nishiwaki, T. Kawasoe, H. Ishiguro, M. Fujita, T. Tokino, Y. Sasaki, S. Imaoka, M. Murata, T. Shimano, Y. Yamaoka, Y. Nakamura, *Nat Genet* **2000**, *24*, 245-250.
- [13] V. Lyssenko, R. Lupi, P. Marchetti, S. Del Guerra, M. Orho-Melander, P. Almgren, M. Sjogren, C. Ling, K. F. Eriksson, A. L. Lethagen, R. Mancarella, G. Berglund, T. Tuomi, P. Nilsson, S. Del Prato, L. Groop, *J Clin Invest* **2007**, *117*, 2155-2163.
- [14] N. Kozlovsky, R. H. Belmaker, G. Agam, *Eur Neuropsychopharmacol* **2002**, *12*, 13-25.
- [15] A. Mani, J. Radhakrishnan, H. Wang, M. A. Mani, C. Nelson-Williams, K. S. Carew, S. Mane, H. Najmabadi, D. Wu, R. P. Lifton, *Science* **2007**, *315*, 1278-1282.
- [16] D. Lu, M. Y. Choi, J. Yu, J. E. Castro, T. J. Kipps, D. A. Carson, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 13253-13257.
- [17] C. A. Thorne, A. J. Hanson, J. Schneider, E. Tahinci, D. Orton, C. S. Cselenyi, K. K. Jernigan, K. C. Meyers, B. I. Hang, A. G. Waterson, K. Kim, B. Melancon, V. P. Ghidu, G. A. Sulikowski, B. LaFleur, A. Salic, L. A. Lee, D. M. Miller, E. Lee, *Nat. Chem. Biol.*

- 2010, 6, 829-836.
- [18] W. R. Henderson, Jr., E. Y. Chi, X. Ye, C. Nguyen, Y. T. Tien, B. Zhou, Z. Borok, D. A. Knight, M. Kahn, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 14309-14314.
- [19] L. Meijer, A. L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, *Chem Biol* **2003**, *10*, 1255-1266.
- [20] M. P. Coghlan, A. A. Culbert, D. A. Cross, S. L. Corcoran, J. W. Yates, N. J. Pearce, O. L. Rausch, G. J. Murphy, P. S. Carter, L. Roxbee Cox, D. Mills, M. J. Brown, D. Haigh, R. W. Ward, D. G. Smith, K. J. Murray, A. D. Reith, J. C. Holder, *Chem Biol* **2000**, *7*, 793-803.
- [21] J. Gwak, S. G. Hwang, H. S. Park, S. R. Choi, S. H. Park, H. Kim, N. C. Ha, S. J. Bae, J. K. Han, D. E. Kim, J. W. Cho, S. Oh, *Cell Res* **2012**, *22*, 237-247.
- [22] H. Y. Park, K. Toume, M. A. Arai, S. K. Sadhu, F. Ahmed, M. Ishibashi, *Chembiochem* **2014**, *15*, 872-878.
- [23] K. Toume, K. Kamiya, M. A. Arai, N. Mori, S. K. Sadhu, F. Ahmed, M. Ishibashi, *Org Lett* **2013**, *15*, 6106-6109.
- [24] Fuentes, R. G. *doctoral thesis* **2014**.
- [25] X. Li, T. Ohtsuki, T. Koyano, T. Kowithayakorn, M. Ishibashi, *Chemistry – An Asian Journal* **2009**, *4*, 540-547.
- [26] K. Kaniwa, M. A. Arai, X. Li, M. Ishibashi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4254-4257.
- [27] S. Basu, C. Sachidanandan, *Chem Rev* **2013**, *113*, 7952-7980.
- [28] R. O. Karlstrom, T. Trowe, S. Klostermann, H. Baier, M. Brand, A. D. Crawford, B. Grunewald, P. Haffter, H. Hoffmann, S. U. Meyer, B. K. Muller, S. Richter, F. J. van Eeden, C. Nusslein-Volhard, F. Bonhoeffer, *Development* **1996**, *123*, 427-438.
- [29] H. Fukui, R. Hanaoka, A. Kawahara, *Circ Res* **2009**, *104*, 1253-1259.
- [30] T. Boehm, C. C. Bleul, M. Schorpp, *Immunol Rev* **2003**, *195*, 15-27.
- [31] A. P. Haramis, A. Hurlstone, Y. van der Velden, H. Begthel, M. van den Born, G. J. Offerhaus, H. C. Clevers, *EMBO Rep* **2006**, *7*, 444-449.
- [32] H. Wang, Q. Long, S. D. Marty, S. Sassa, S. Lin, *Nat Genet* **1998**, *20*, 239-243.
- [33] J. S. Sebolt-Leopold, *Clin Cancer Res* **2008**, *14*, 3651-3656.

- [34] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, *Science* **2010**, 327, 1345-1350.
- [35] S. Wang, J. Yin, D. Chen, F. Nie, X. Song, C. Fei, H. Miao, C. Jing, W. Ma, L. Wang, S. Xie, C. Li, R. Zeng, W. Pan, X. Hao, L. Li, *Nat. Chem. Biol* **2013**, 9, 579-585.
- [36] J. Hao, A. Ao, L. Zhou, C. K. Murphy, A. Y. Frist, J. J. Keel, C. A. Thorne, K. Kim, E. Lee, C. C. Hong, *Cell Rep* **2013**, 4, 898-904.
- [37] M. Maillet, N. H. Purcell, M. A. Sargent, A. J. York, O. F. Bueno, J. D. Molkenin, *The Journal of Biological Chemistry* **2008**, 283, 31246-31255.

第2章 スクリーニング法

第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価法

本研究において Wnt シグナルに作用する化合物を発見を目的に植物エキストラライブラリーのスクリーニングを行うことにした。スクリーニングには Wnt シグナルの活性化状態を定量的に測定することができるルシフェラーゼアッセイを用いた。本実験で用いるレポータープラスミドである pSuperTOPflash は TCF 結合領域 (binding site) の下流に Luciferase coding gene を含み、これを細胞に導入すると、核内の TCF/ $\beta$ -catenin 複合体が TCF 結合領域に結合し、luciferase たんぱくを発現する (Figure 2-1)。

したがって、この luciferase 活性を測定することにより、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化状態 (TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性) を検出することができる。本実験における TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の評価は、pSuperTOPflash を、ヒト胎児腎細胞株 (293 細胞) へ安定的に導入した細胞株 (STF/293) を用いた。なお、本細胞株は、ジョーンズホプキンス大学の Jeremy Nathans 博士より御恵与いただいた。

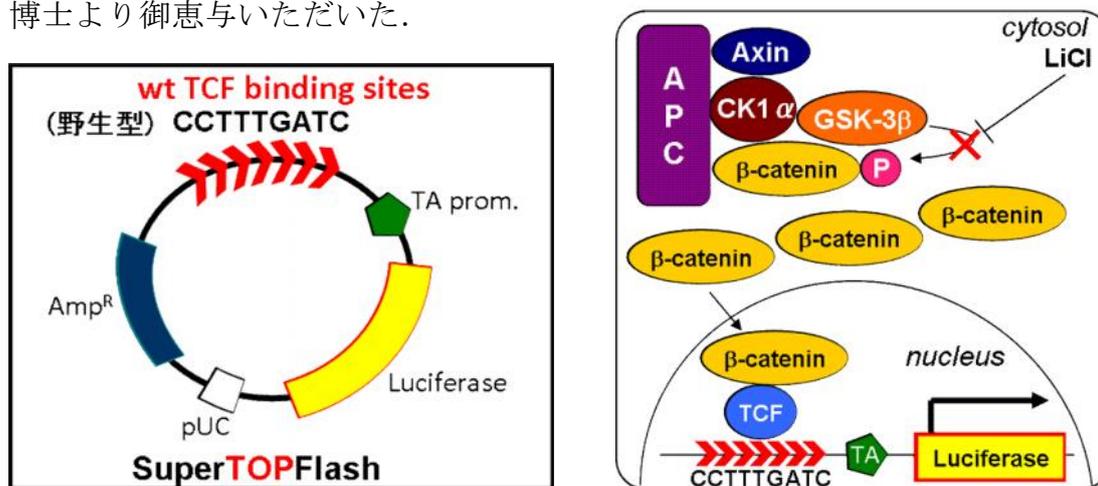


Figure 2-1. pSuperTOPflash vector and cell-based assay system

この細胞株を用いて、コントロール群と比較して試料処理群に TOP flash のルシフェラーゼ活性 (TOP 活性) の上昇あるいは低下が認められた場合、この試料は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化あるいは阻害していると考えられる。また、試料による細胞毒性により、TOP 活性が低下することも考えられるので、同時に FMCA 法 (本章の 2 節にて述べる) により細胞生存率も測定した。したがって、高い TOP 活性及び高い細胞生存率を示す試料を Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化する試料、低い TOP 活性及び高い細胞生存率を示す

## 第2章 スクリーニング法

試料を Wnt/  $\beta$ -catenin シグナルを阻害する試料と判断した。(Figure 2-2).

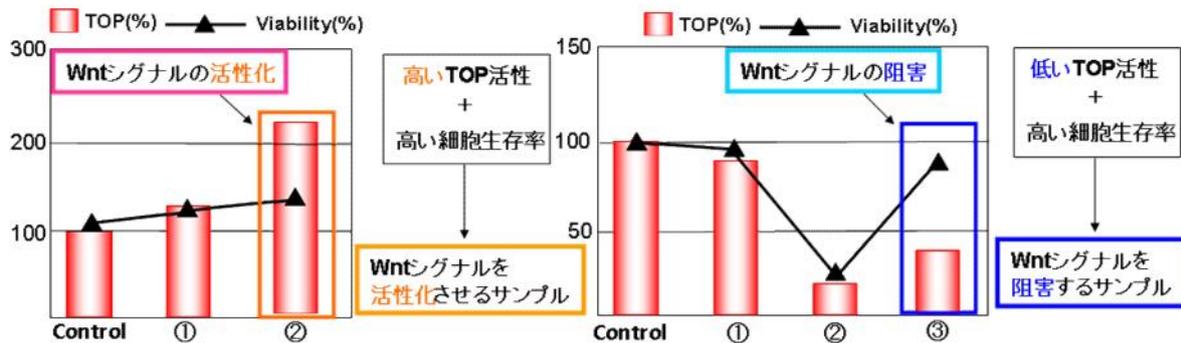


Figure 2-2. Judgment of active sample in TOP assay system

TOP 活性を上昇あるいは低下させるメカニズムとして、試料の TCF/  $\beta$ -catenin 転写活性に対する作用の他に、試料による細胞毒性による細胞生存率の低下やルシフェラーゼたんぱく質の非特異的な発現に対する作用や、ルシフェラーゼたんぱく質自体への作用などが挙げられる。したがって、このような偽陽性を示す試料を除くため、TOP 活性を上昇あるいは低下させた試料について、その試料が TCF/  $\beta$ -catenin 転写活性化作用または転写阻害作用を有するかを確認するために、TCF 結合領域 (binding site) に変異を持つレポータープラスミドである pSuperFOPflash (Figure 2-3) を用いた。

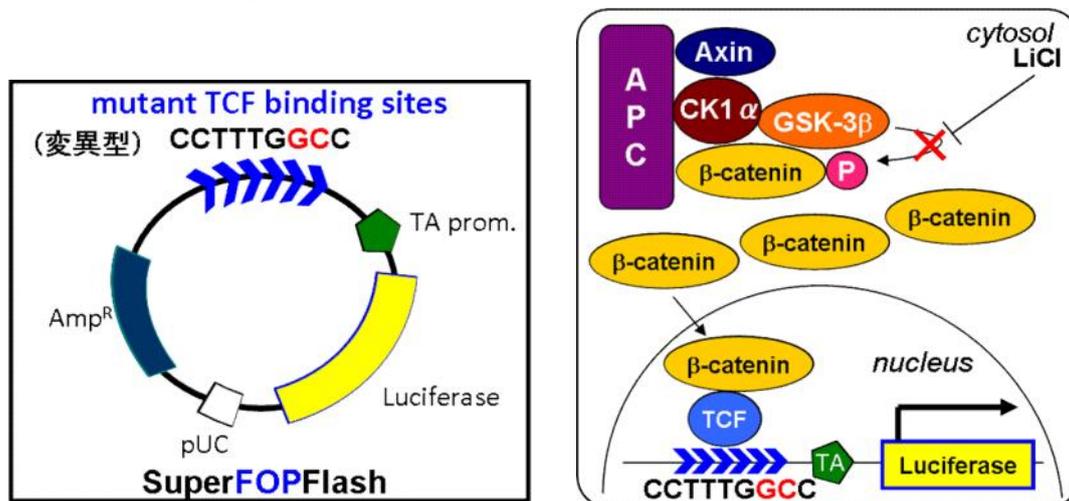


Figure 2-3. pSuperFOPflash vector and cell-based assay system

このプラスミドを 293 細胞あるいは 293T 細胞に一過性に導入し、FOP flash のルシフェラーゼ活性 (FOP 活性) を測定した。試料が偽陽性であった場合、その試料はルシフェラーゼたんぱく質の発現やルシフェラーゼたんぱく質自体へにも作用していると考えられるため、TOP 活性とともに FOP 活性も上昇あるいは低下させると考えられる。試料が陽性

## 第2章 スクリーニング法

である場合、FOP 活性を変化させずに、TOP 活性のみを上昇あるいは低下させると考えられる (Figure 2-4). したがって、FOP 活性を測定することにより、TOP 活性評価における偽陽性を除くことができる。

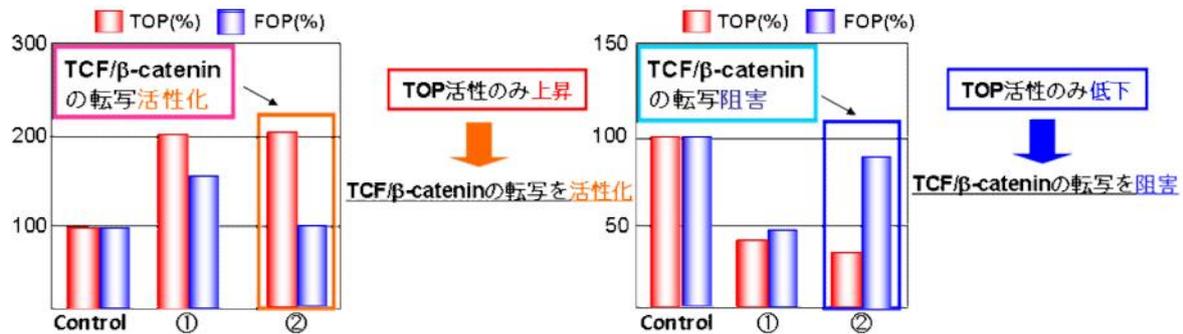


Figure 2-4. Judgment of active sample in FOP assay system

FOP 活性の評価はホタルルシフェラーゼ発現量 (firefly luciferase) をウミシイタケルシフェラーゼ発現量 (Renilla luciferase) で補正し、相対的なルシフェラーゼ活性を算出することで評価した (Figure 2-5). なお、トランスフェクション効率の内部標準である pRL-CMV ベクターは Renilla luciferase レポーター遺伝子を含み、Renilla luciferase たんぱくを発現する. このベクターを FOPflash とコトランスフェクションすることで、FOP 活性の評価した. 実験の詳細は実験の部にて記載した. また、firefly luciferase は分子量 61 kDa のたんぱく質で、基質の Beetle Luciferin を触媒酸化することで化学発光が得ることができる. また、Renilla luciferase は分子量 36 kDa のたんぱく質で、こちらは基質の Coelenterazine を触媒酸化し発光する (Figure 2-6).

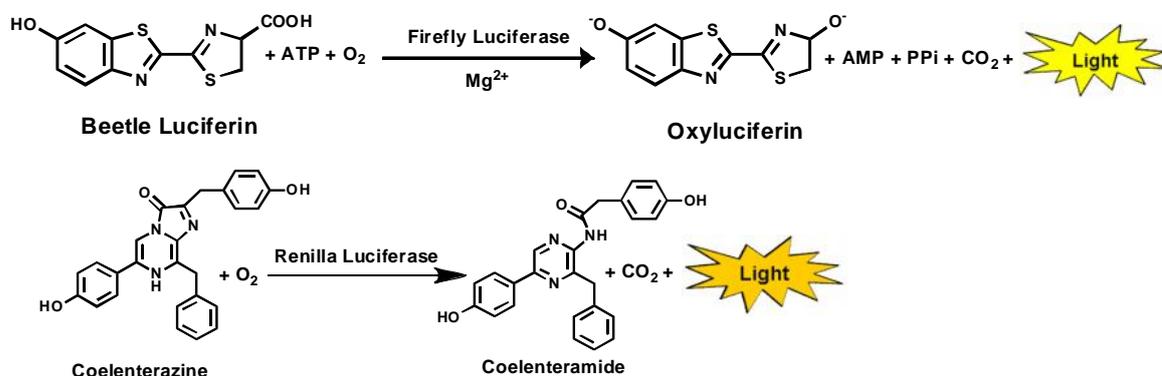


Figure 2-6. The firefly luciferase and renilla luciferase reaction

$$\text{Normalized Lumi. (sample)} = \text{Ave.} \left[ \frac{\text{Firefly lumi. (sample)}}{\text{Renilla lumi. (sample)}} \right]$$

$$\text{Normalized Lumi. (control)} = \text{Ave.} \left[ \frac{\text{Firefly lumi. (control)}}{\text{Renilla lumi. (control)}} \right]$$

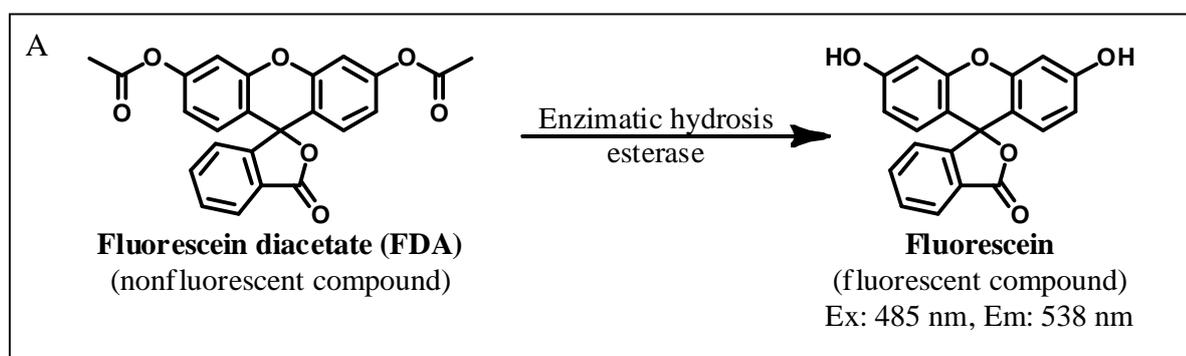
$$\text{Relative Luciferase Activity (FOP activity)} = \frac{\text{Normalized Lumi. (sample)}}{\text{Normalized Lumi. (control)}} \times 100$$

Lumi. = Luminoscence  
 Control = Transfected, sample untreated cells  
 sample = Transfected, sample treated cells

Figure 2-7. Relative luciferase activity

第2節 細胞生存率の評価法

TOP 活性が減少する原因の一つとして、化合物により誘導される細胞毒性が挙げられる。そこで、同時に細胞生存率を測定することで、細胞死による TOP 活性の減少したサンプルを除外することができる。本研究では、細胞生存率の測定に FMCA 法 (fluorometric microculture cytotoxicity assay) を用いた。FDA (fluorescein diacetate) は細胞内に取り込まれると、細胞内のエステラーゼにより加水分解されて Fluorescein に変換される。よって、生存細胞が fluorescein によって蛍光染色されるため、生存細胞数は Fluorescein の蛍光強度に比例すると考えられる。したがって、細胞生存率を以下に示す計算式から算出した (Figure 2-7)。



B

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Sample の蛍光強度}}{\text{Control の蛍光強度}} \times 100$$

Figure 2-7. (A) conversion from FDA to fluorescein (B) calculation formula of cell viability

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

#### 第1節 TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇及または低下を指標としたスクリーニング

第2章で述べたアッセイ法を用いて、当研究室のバングラデシュ産及びタイ産植物のエキスライブラリーのスクリーニングを行った。なお、李 暁帆氏<sup>[1]</sup>及び神谷健太郎氏<sup>[2]</sup>が過去にスクリーニングを行った結果において TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇または低下を示した植物エキス及び2009年～2014年に当研究室で作成された植物エキスを対象に行った。その結果、全37種のバングラデシュ産植物において11種の植物で TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇が、7種の植物で TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の低下が認められた(Table 3-1)。また、全46種のタイ産植物において20種の植物で TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇が、11種の植物で TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の低下が認められた(Table 3-2)。

[バングラデシュ産植物]

KKB No.	TCF/ $\beta$ -catenin転写活性化を示した植物	KKB No.	TCF/ $\beta$ -catenin転写阻害活性を示した植物
33	<i>Cerbera manghas</i>	239	<i>Andrographis paniculata</i>
45	<i>Kandelia candela</i>	250	<i>Ficus hispida</i>
223	<i>Kalanchoe pinnata</i>	251	<i>Ficus hispida</i>
224	<i>Kalanchoe pinnata</i>	255	<i>Xanthium strumarium</i>
227	<i>Rauwolfia serpentina</i>	263	<i>Solanum surattense</i>
229	<i>Zanthoxylum rhetsa</i>	270	<i>Tabernaemontana divaricata</i>
252	<i>Ricinus communis</i>	299	<i>Ecbolium linneanum</i>
254	<i>Xanthium strumarium</i>		
257	<i>Leea macrophylla</i>		
260	<i>Aphelandra dolichantha</i>		
262	<i>Solanum surattense</i>		

Table 3-1. left list: List of 11 Bangladesh plants which showed relatively strong TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity in STF/293 reporter cells. right list: List of 7 Bangladesh plants which showed relatively strong TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity in STF/293 reporter cells.

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

[タイ産植物]

KKP No.	TCF/β-catenin転写活性化を示した植物	KKP No.	TCF/β-catenin転写阻害活性を示した植物
12	<i>Claoxylon polot</i>	281	<i>Erythrina variegata</i>
13	<i>Costus speciosus</i>	302	<i>Rhoeo discolor</i>
18	<i>Alstonia scholaris</i>	310	<i>Clausena lansium</i>
24	<i>Hura crepitans</i>	312	<i>Murraya paniculata</i>
35	<i>Aganosma marginata</i>	315	<i>Eurycoma longifolia</i>
36	<i>Ichnocarpus frutescens</i>	316	<i>Canarium album</i>
62	<i>Glochidion daltonii</i>	299	<i>Ecboium linneanum</i>
78	<i>Kopsia fruticosa</i>	318	<i>Alpinia oxymitra</i>
91	<i>Bidens pilosa</i>	319	<i>Amomum villosum</i>
163	<i>Coccinia indica</i>	320	<i>Aglaiia odorata</i>
268	<i>Dalbergia latifolia</i>	321	<i>Decaschistia eximia</i>
288	<i>Artocarpus integra</i>		
290	<i>Ficus fistulosa</i>		
304	<i>Merremia umbellata</i>		
306	<i>Vitis vinifera</i>		
307	<i>Acronychia laurifolia</i>		
311	<i>Clausena harmandiana</i>		
313	<i>Toddalia aculeata</i>		
322	<i>Musa sapientum</i>		
323	<i>Zalacca edulis</i>		

Table 3-2. left list: List of 20 Thailand plants which showed relatively strong TCF/β-catenin transcription enhance activity in STF/293 reporter cells. right list: List of 11 Thailand plants which showed relatively strong TCF/β-catenin transcription inhibitory activity in STF/293 reporter cells.

著者は TCF/β-catenin 転写活性の上昇または低下が認められた植物の中で TCF/β-catenin 転写活性の上昇を示した植物である KKB 229 *Zanthoxylum rhetsa* 及び KKB 252 *Ricinus communis* (トウダイグサ科), TCF/β-catenin 転写活性の低下を示した KKP 315 *Eurycoma longifolia* (ニガキ科) 及び KKB 270 *Tabernaemontana divaricata* (キョウチクトウ科)から活性成分の探索を行うことにした。

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

オレンジ枠: Wnt シグナルを活性化する成分の探索を行った植物

青枠: Wnt シグナルを阻害する成分の探索を行った植物

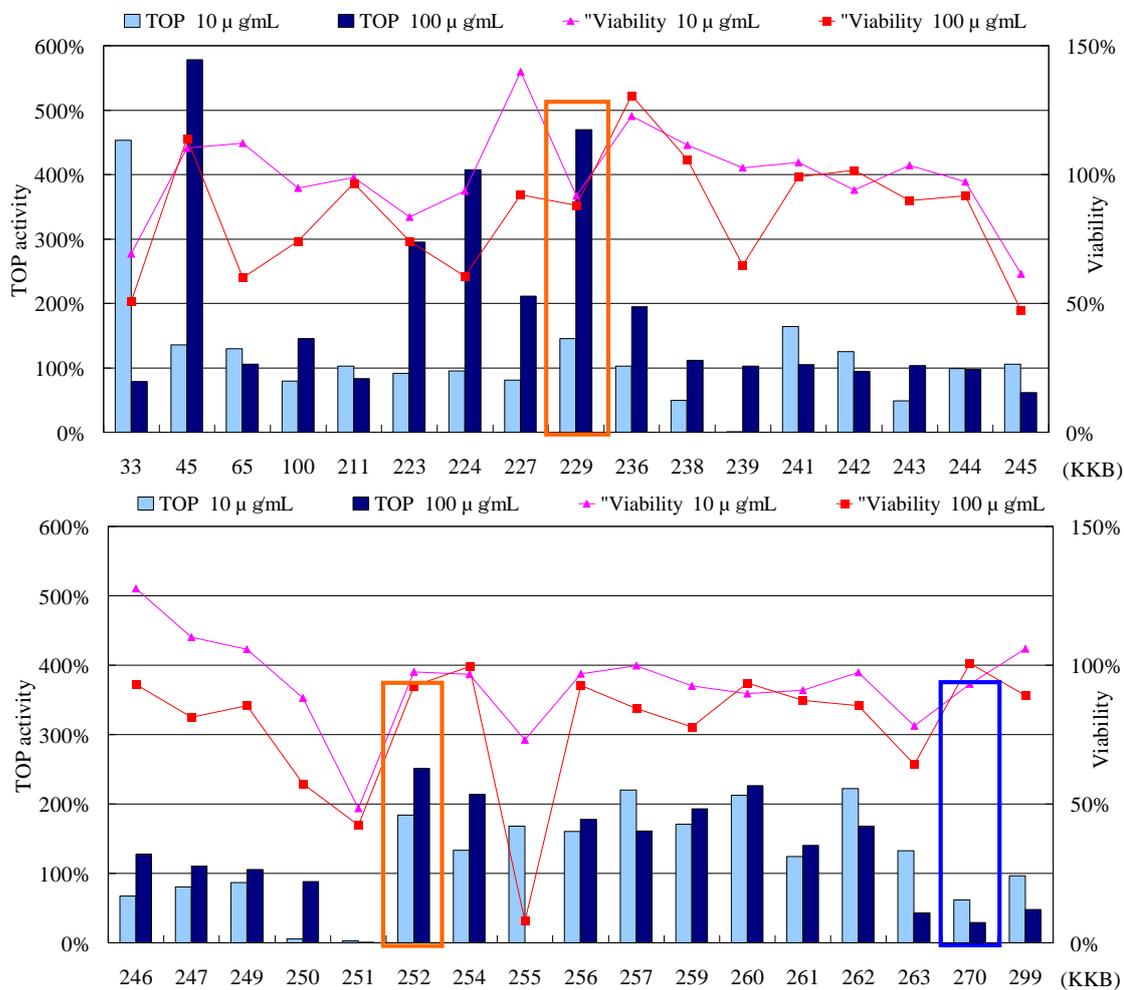


Figure 3-1. TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity of Bangladesh plants extract in STF/293

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

赤粋: Wnt シグナルを活性化する  
成分の探索を行った植物

青粋: Wnt シグナルを阻害する  
成分の探索を行った植物

KKB No.	Scientific name	TOP 10 µg/mL	TOP 100 µg/mL	Viab.10 µg/mL	Viab. 100 µg/mL	plant part used
33	<i>Cerbera manghas</i>	453%	78%	69%	51%	leaves
45	<i>Kandelia candela</i>	136%	579%	110%	114%	leaves
65	<i>Cynometra ramiflora</i>	130%	105%	112%	60%	leaves
100	<i>Mimusops elengi</i> Linn.	79%	146%	95%	74%	leaves
211	<i>Smilax zeylanica</i>	103%	83%	99%	97%	leaves
223	<i>Kalanchoe pinnata</i>	91%	295%	84%	74%	stems
224	<i>Kalanchoe pinnata</i>	95%	407%	94%	60%	leaves
227	<i>Rauwolfia serpentina</i>	81%	211%	140%	92%	stems
229	<i>Zanthoxylum rhetsa</i>	146%	469%	92%	88%	leaves
236	<i>Ficus racemosus</i>	103%	194%	123%	131%	fruits
238	<i>Asparagus racemosus</i>	50%	111%	111%	106%	roots
239	<i>Andrographis paniculata</i>	1%	103%	103%	65%	whole plants
241	<i>Bombax ceiba</i>	164%	105%	105%	99%	roots
242	<i>Glycosmis pentaphylla</i>	125%	94%	94%	102%	leaves
243	<i>Glycosmis pentaphylla</i>	49%	104%	104%	90%	roots
244	<i>Brassica juncea</i>	99%	97%	97%	92%	leaves
245	<i>Geodorum densiflorum</i>	105%	62%	62%	47%	tubers
246	<i>Glycosmis pentaphylla</i>	67%	128%	128%	93%	stems
247	<i>Leucas aspera</i>	80%	110%	110%	81%	fruits
249	<i>Achyramthes aspera</i>	87%	106%	106%	85%	roots
250	<i>Ficus hispida</i>	5%	88%	88%	57%	stems
251	<i>Ficus hispida</i>	3%	1%	48%	42%	leaves
252	<i>Ricinus communis</i>	184%	251%	98%	92%	stems
254	<i>Xanthium strumarium</i>	133%	214%	97%	99%	stems
255	<i>Xanthium strumarium</i>	168%	0%	73%	8%	leaves
256	<i>Leea macrophylla</i>	161%	178%	97%	93%	stems
257	<i>Leea macrophylla</i>	220%	161%	100%	84%	leaves
259	<i>Madhuca longifolia</i>	171%	193%	92%	78%	leaves
260	<i>Aphelandra dolichantha</i>	212%	227%	90%	94%	leaves
261	<i>Aphelandra dolichantha</i>	124%	141%	91%	87%	stems
262	<i>Solanum surattense</i>	222%	168%	97%	85%	fruits
263	<i>Solanum surattense</i>	133%	43%	78%	64%	leaves
270	<i>Tabernaemontana divaricata</i>	62%	29%	93%	101%	aerial parts
299	<i>Ecbolium linneanum</i>	97%	48%	106%	89%	aerial parts

Table 3-3. Screening of Bangladesh plant extracts library using STF/293

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

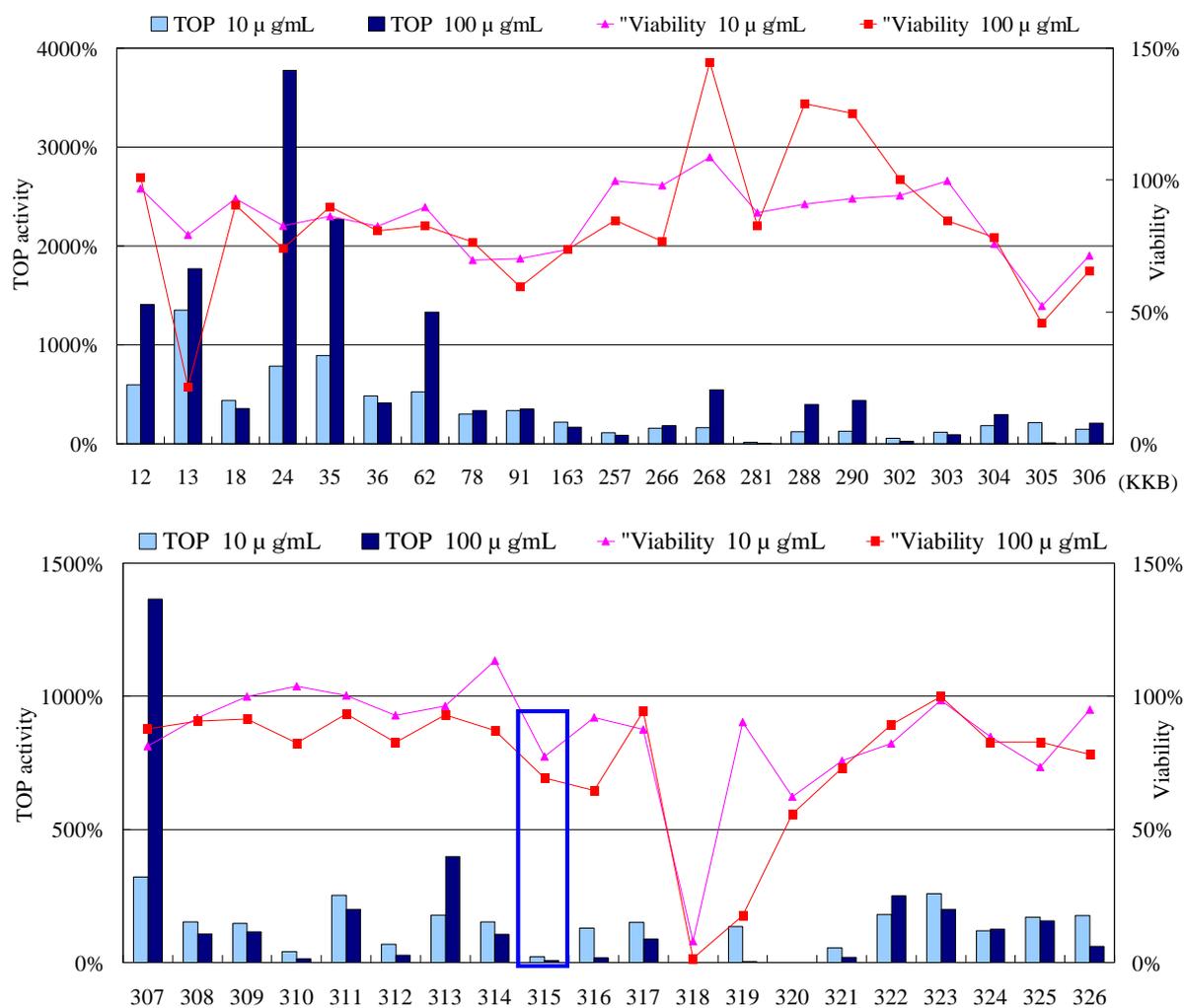


Figure 3-2. TCF/β-catenin transcriptional activity of Thailand plants extract in STF/293

### 第3章 植物エキスライブラリーのスクリーニング

KKP No.	Scientific name	TOP 10 µg/mL	TOP 100 µg/mL	Viab.10 µg/mL	Viab. 100 µg/mL	plant part used
12	<i>Claoxylon polot</i>	594%	1409%	97%	101%	barks
13	<i>Costus speciosus</i>	1351%	1772%	79%	22%	rhizomes
18	<i>Alstonia scholaris</i>	438%	359%	93%	91%	leaves
24	<i>Hura crepitans</i>	785%	3776%	83%	74%	leaves
35	<i>Aganosma marginata</i>	892%	2273%	86%	90%	leaves/branches
36	<i>Ichnocarpus frutescens</i>	483%	411%	83%	81%	leaves
62	<i>Glochidion daltonii</i>	525%	1333%	90%	83%	leaves
78	<i>Kopsia fruticosa</i>	303%	338%	70%	77%	leaves
91	<i>Bidens pilosa</i>	334%	350%	70%	59%	aerial parts
163	<i>Coccinia indica</i>	222%	168%	74%	74%	fruits
257	<i>Saccarum officinarum</i>	110%	88%	100%	85%	trunks
266	<i>Euphorbia neriifolia</i>	156%	186%	98%	77%	leaves
268	<i>Dalbergia latifolia</i>	162%	544%	109%	145%	branches
281	<i>Erythrina variegata</i>	17%	7%	88%	83%	leaves
288	<i>Artocarpus integra</i>	124%	396%	91%	129%	leaves
290	<i>Ficus fistulosa</i>	128%	441%	93%	125%	leaves
302	<i>Rhoeo discolor</i>	55%	25%	94%	100%	whole plants
303	<i>Murdannia loriformis</i>	117%	92%	100%	85%	whole plants
304	<i>Merremia umbellata</i>	186%	298%	76%	78%	leaves
305	<i>Santalum album</i>	212%	12%	52%	46%	woods
306	<i>Vitis vinifera</i>	146%	211%	71%	66%	leaves
307	<i>Acronychia laurifolia</i>	321%	1364%	81%	88%	leaves
308	<i>Aegle marmelos</i>	153%	109%	92%	91%	leaves
309	<i>Citrus maxima</i>	147%	115%	100%	91%	peels
310	<i>Clausena lansium</i>	40%	14%	104%	82%	leaves
311	<i>Clausena harmandiana</i>	252%	199%	100%	93%	leaves
312	<i>Murraya paniculata</i>	70%	28%	93%	83%	leaves
313	<i>Toddalia aculeata</i>	178%	398%	96%	93%	leaves
314	<i>Picrasma javanica</i>	152%	107%	113%	87%	leaves
315	<i>Eurycoma longifolia</i>	21%	8%	77%	69%	roots
316	<i>Canarium album</i>	128%	18%	92%	65%	leaves
317	<i>Canarium album</i>	152%	87%	87%	94%	fruits
318	<i>Alpinia oxymitra</i>	0%	0%	8%	2%	rhizomes
319	<i>Amomum villosum</i>	135%	3%	90%	18%	rhizomes
320	<i>Aglaiia odorata</i>	1%	1%	62%	56%	leaves
321	<i>Decaschistia eximia</i>	55%	19%	76%	73%	aerial parts
322	<i>Musa sapientum</i>	181%	251%	82%	89%	flowers
323	<i>Zalacca edulis</i>	258%	200%	99%	100%	peels
324	<i>Helianthus tuberosus</i>	119%	125%	85%	83%	tubers
325	<i>Sapindus rarak</i>	170%	158%	74%	83%	leaves
326	<i>Nephelium hypoleucum</i>	177%	61%	95%	78%	bark

Table 3-4. Screening of Thai plant extracts library using STF/293 cells

[参考文献]

[1] X. Li, *doctoral thesis* **2009**.

[2] K. Kamiya, *master thesis* **2012**.

## 第4章 *Zanthoxylum rhetsa* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

本章では第3章で植物エキストラブラリーのスクリーニングで Wnt シグナルの活性化を示した *Zanthoxylum rhetsa* から活性成分の探索を行った。TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標に分画及び化合物の単離を行った。また、得られた化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価を行った。



Figure 4-1. *Zanthoxylum rhetsa*

*Zanthoxylum rhetsa* はミカン科 (*Rutaceae*) サンショウ属に属する落葉低木である。原産地は中国や朝鮮半島とされているが、世界中に分布している。また、用途として香辛料や盆栽等の鑑賞用として利用されている。薬理活性としては、抗糖尿病作用や鎮痙作用、抗利尿作用などが報告されている<sup>[1]</sup>。

*Zanthoxylum rhetsa* からはトリテルペノイドである Xanthoxylone A<sup>[2]</sup>やリグナンである sesamin<sup>[3]</sup>等の単離が報告されている。

第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標とした分画

本植物の葉部の MeOH エキスについて溶媒分配を行い酢酸エチル可溶部 (1.0 g), ブタノール可溶部(3.0 g), 水溶部(1.4 g)を得た, これらの可溶部の転写活性を測定したところ酢酸エチル可溶部に転写活性の上昇が認められた(Figure 4-2). そこで酢酸エチル可溶部を HP-20 カラムクロマトグラフィーを行い, Fr. 1 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr.1 A に認められた(Figure 4-3).

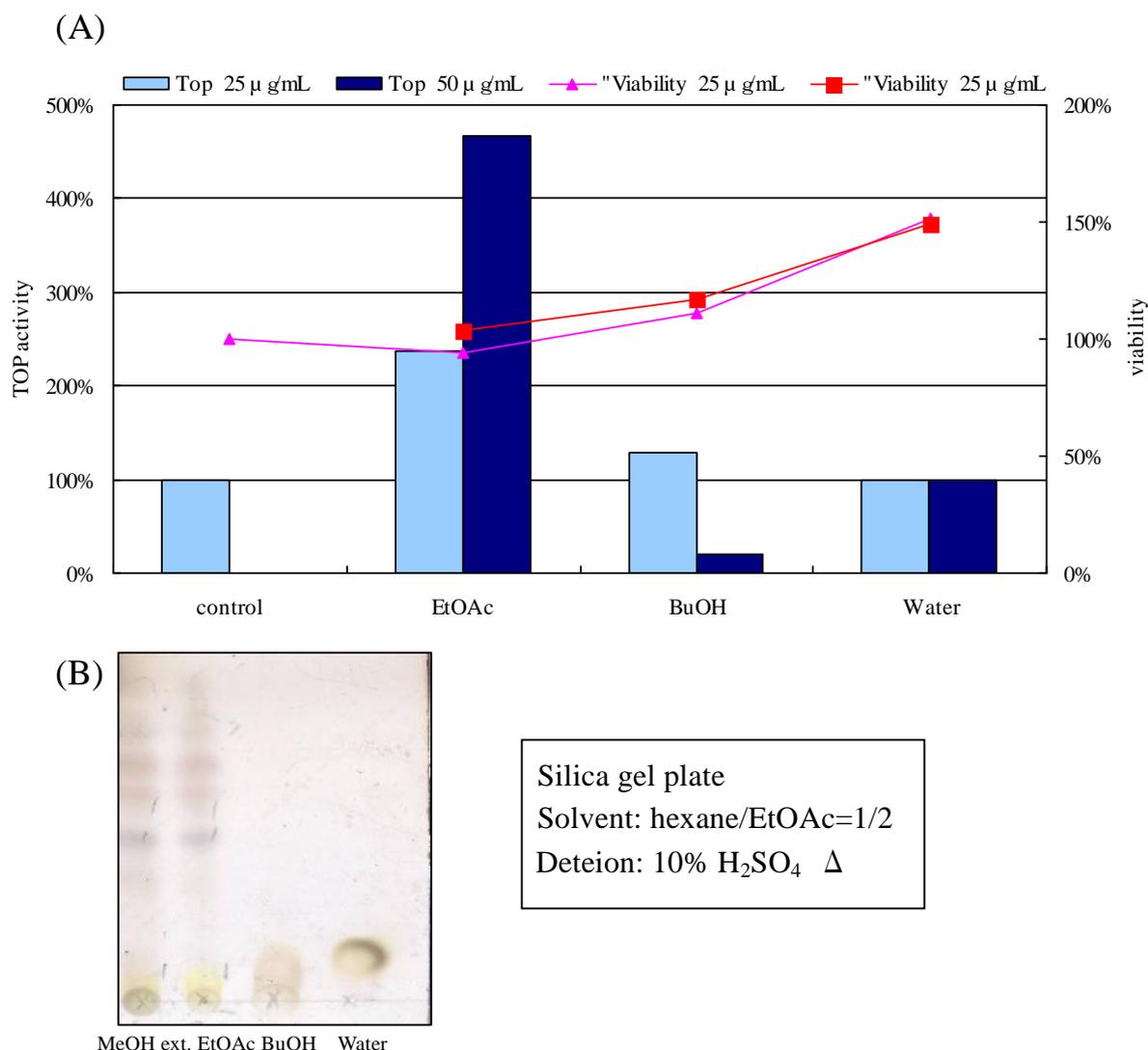


Figure 4-2. (A) TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of each layer

(B) TLC analysis. Silica gel plate, Solvent: hexane /EtOAc = 1/2, Detection: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Δ

## 第4章 *Zanthoxylum rhetsa* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

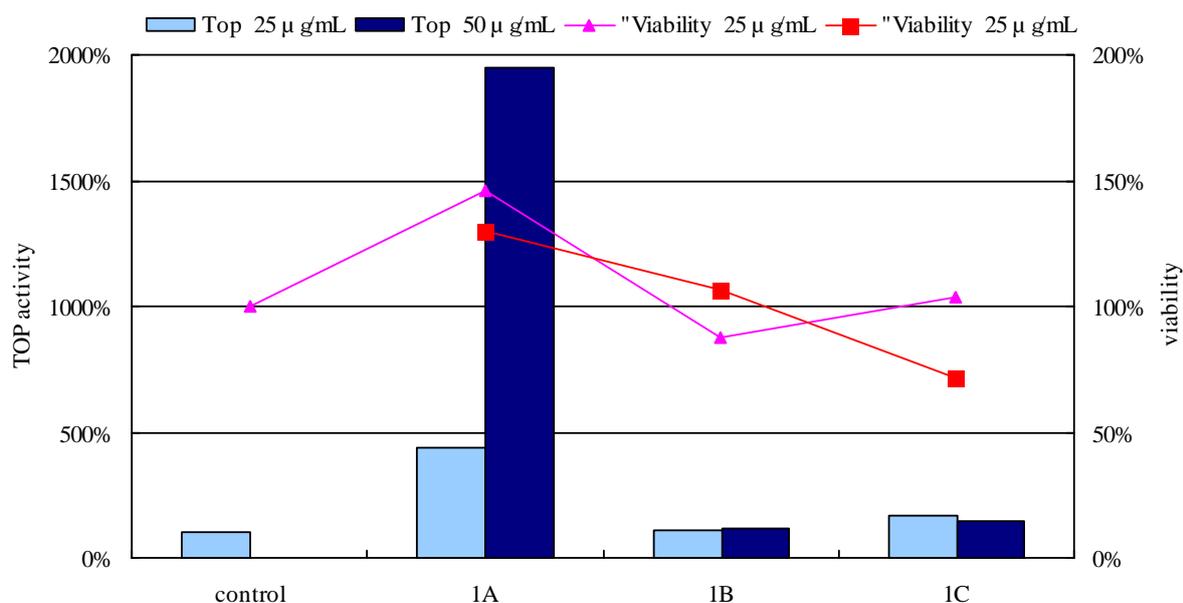


Figure 4-3. Fractions TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.1A-1C

活性の認められた Fr. 1A の分画をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い, Fr. 2 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 2C, Fr. 2D 及び Fr. 2I に認められた(Figure 4-4). そこで, 活性有し, かつ TLC 上でスポットが明確であった. Fr. 2I の分画をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 3 シリーズを得た. また, Fr. 3B 及び Fr. 3C よりそれぞれ化合物 **2** 及び化合物 **1** を得た(Figure 4-5). 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 3C に認められた(Figure 4-6).

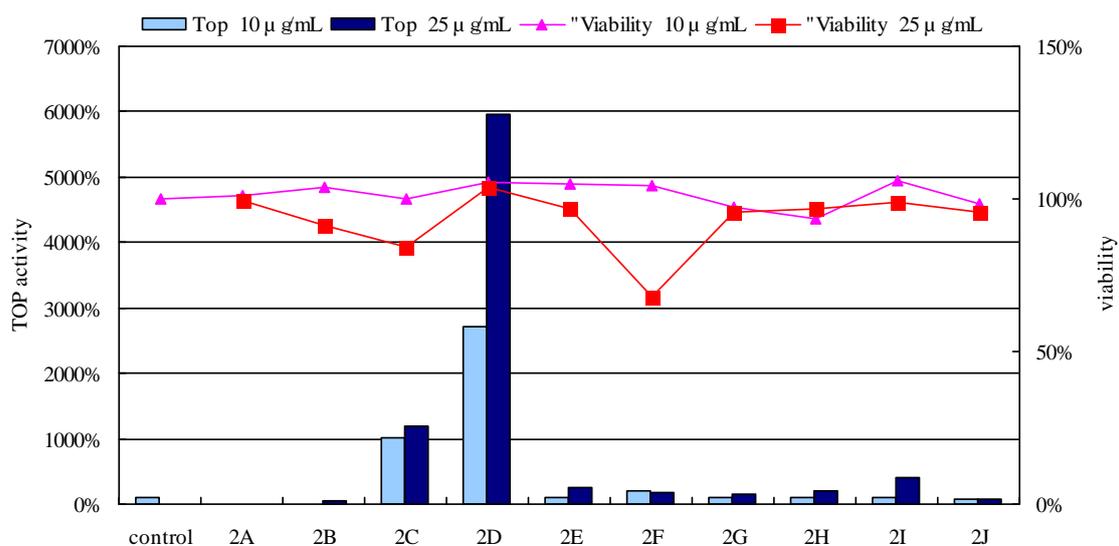
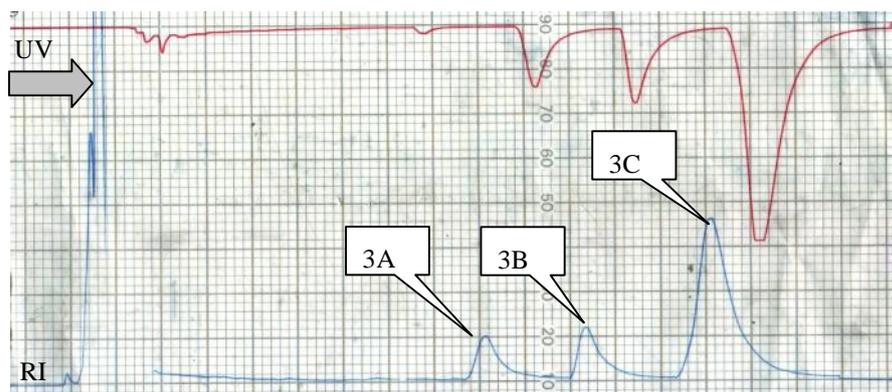


Figure 4-4. Fractions TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.2A-2J



Column: Develoilsil ODS-HG-5 (φ 10×250 mm)  
 Solvent: 45% MeOH    Flow: 2 mL/min  
 Chart speed: 30cm/h    UV: 254nm  
 UV range: 0.8    RI range: 16  
 Inject: 10 μl (50mg/mL)

Figure 4-5. HPLC chromatogram of Fr. 3A -3E

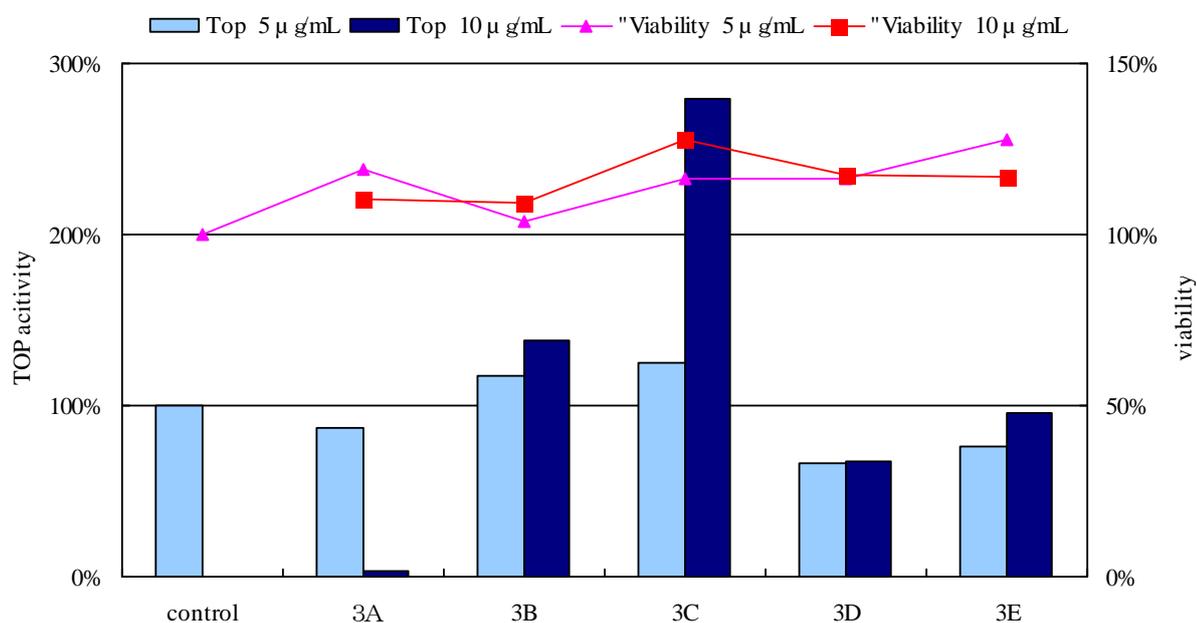


Figure 4-6. TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.3A-3E

次に、活性を有していた Fr.2C 及び Fr.2D の分画を行ったが、含有量が少量のためか化合物の単離には到らなかった。

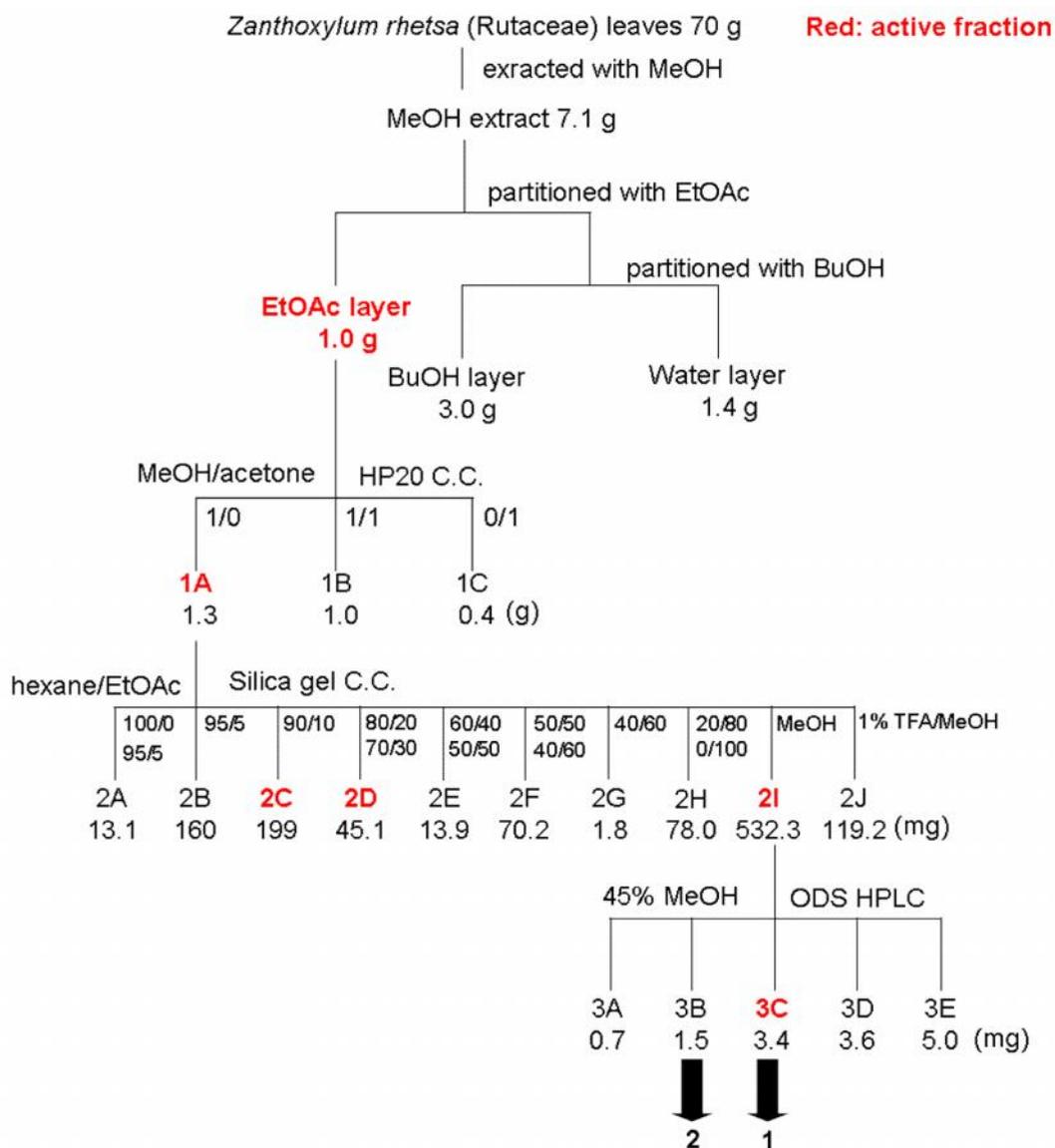


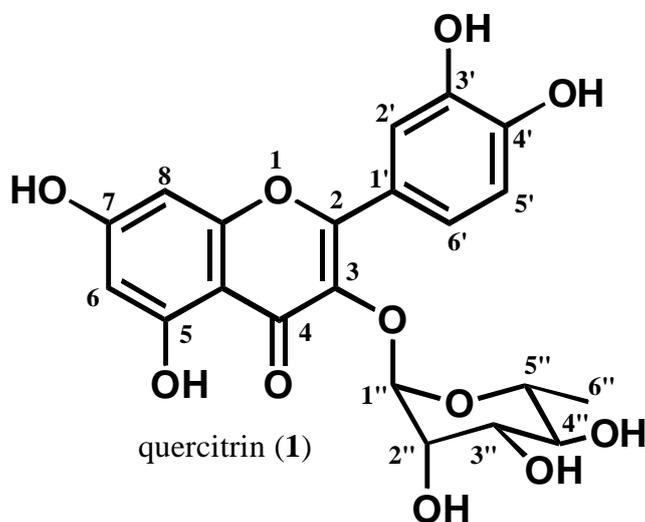
Figure 4-7. Isolation chart of *Zanthoxylum rhetsa*

第2節 単離した化合物の構造解析及び同定

*Zanthoxylum rhetsa* から単離した化合物 **1** 及び化合物 **2** の構造解析を行った。化合物 **1** は黄色の非結晶固体として得られ、ESIMS スペクトル( $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>) 及び <sup>1</sup>HNMR の文献値<sup>[4]</sup>との比較により、quercitrin (**1**)と同定した(Table 4-1)。

	Fr. 3C in CD <sub>3</sub> OD	quercitrin in CD <sub>3</sub> OD <sup>[4]</sup>
position	H (J in Hz)	H (J in Hz)
1		
2		
3		
4		
5		
6	6.18 d (1.9)	6.19 d (1.9)
7		
8	6.35 d (2.0)	6.36 d (1.9)
9		
10		
1'		
2'	7.33 d (2.1)	7.33 d (2.0)
3'		
4'		
5'	6.90 d (8.3)	6.90 d (8.3)
6'	7.30 dd (8.3, 2.0)	7.30 dd (8.3, 2.0)
1''	5.33 d (1.5)	5.34 d (1.5)
2''	4.21 dd (3.2, 1.7)	4.21 dd (3.2, 1.7)
3''	3.74 dd (9.3, 3.3)	3.74 dd (9.3, 3.3)
4''	3.37 t (9.6)	3.37 t (9.6)
5''	3.40 dq (9.6, 6.0)	3.40 dq (9.6, 6.0)
6''	0.93 d (6.0)	0.93 d (6.0)

Table 4-1. NMR spectroscopic data for quercitrin (**1**)



[<sup>17,6</sup>] -74.4 (MeOH; *c*0.5)

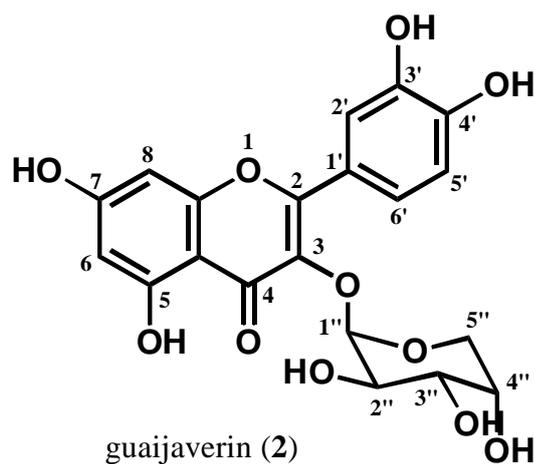
[<sup>25</sup>] -147.0 (MeOH; *c*0.5) <sup>[5]</sup>

第4章 *Zanthoxylum rhetsa* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

化合物 **2** は黄色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  433  $[M-H]^-$ ) 及び  $^1H$ NMR の文献値<sup>[6]</sup>との比較により, guaijaverin (**2**)と同一した(Table 4-2).

	Fr. 3B in CD <sub>3</sub> OD	Guaijaverin in CD <sub>3</sub> OD <sup>[6]</sup>
position	H (J in Hz)	H (J in Hz)
1		
2		
3		
4		
5		
6	6.19 d (2.0)	6.19 d (2.0)
7		
8	6.38 d (2.0)	6.38 d (2.0)
9		
10		
1'		
2'	7.74 d (2.1)	7.75 d (2.0)
3'		
4'		
5'	6.86 d (8.1)	6.86 d (8.0)
6'	7.57 dd (8.1, 2.0)	7.57 dd (8.0, 2.0)
1''	5.15 d (6.8)	5.15 d (7.0)
2''	3.89 dd (8.5, 6.8)	3.90 dd (8.5, 7.0)
3''	3.63 dd (8.5, 3.1)	3.64 dd (8.5, 3.0)
4''	3.80 t (3.4)	3.80 t (3.5)
5''	3.44 dd (13.2, 3.1)	3.44 dd (13.0, 3.0)
	3.82 dd (13.0, 3.8)	3.82 dd (13.0, 4.0)

Table 4-2. NMR spectroscopic data for guaijaverin (**2**)



[ $\alpha$ ]<sup>21.6</sup> -14.6 (MeOH; c1.0)

[ $\alpha$ ]<sup>25</sup> -53.6 (MeOH; c1.0) <sup>[7]</sup>

第3節 単離した化合物の TCF/s-catenin の転写活性の評価

*Zanthoxylum rhetsa* より単離した化合物 **1** について TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性を評価したところ、化合物 **1** は TOP 活性の上昇が認められた。一方で、化合物 **1** は FOP 活性に変化は認められなかった。したがって、化合物 **1** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性化作用を持つことが示唆された(Figure 4-8).

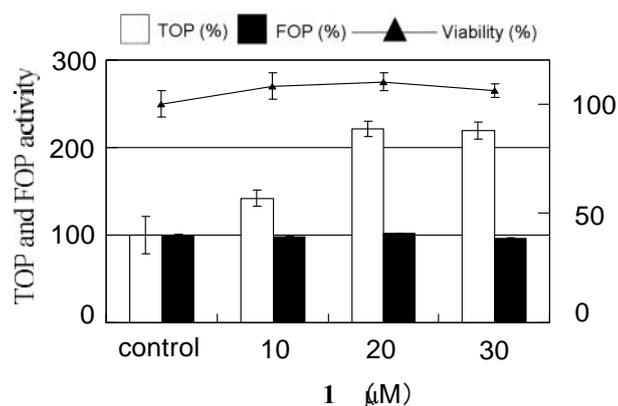


Figure 4-8. **1** enhanced TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity. Luciferase activity for TOP and FOP activities were evaluated in STF/293 cells and 293 cells, respectively. Viability was evaluated using STF/293 cells.

#### 第4節 小括

ミカン科植物 *Zanthoxylum rhetsa* から Wnt シグナルの転写活性の上昇を指標に天然物の探索を行い、2種のフラボノイド配糖体を単離した。

化合物 **1** の TOP 活性及び FOP 活性を評価したところ、化合物 **1** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写を活性化させることが示唆された。

[参考文献]

- [1] A. K. Yadav, V. Tangpu, *J Parasit Dis* **2009**, *33*, 42-47.
- [2] A. Chatterjee, A. Mukherjee, A. B. Kundu, *Phytochemistry* **1974**, *13*, 623-625.
- [3] M. Ahsan, M. R. Haque, M. B. Hossain, S. N. Islam, A. I. Gray, C. M. Hasan, *Phytochemistry* **2014**, *103*, 8-12.
- [4] B. B. Cota, E. P. Siqueira, D. M. de Oliveira, T. M. A. Alves, M. E. G. Sobral, A. Rabello, C. L. Zani, *Rev. Bras. Farmacogn.* **2012**, *22*, 1253-1258.
- [5] P. V. Kiem, C. V. Minh, N. T. Dat, X. F. Cai, J. J. Lee, Y. H. Kim, *Arch Pharm Res* **2003**, *26*, 1014-1017.
- [6] S. Kadota, Y. Takamori, K. N. Nyein, T. Kikuchi, K. Tanaka, H. Ekimoto, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1990**, *38*, 2687-2697.
- [7] M. K. Sakar, D. Sohretoglu, M. Ozalp, M. Ekizoglu, S. Piacente, C. Pizza, *Turk. J. Chem.* **2005**, *29*, 555-559.

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

本章では第3章で植物エキストラライブラリーのスクリーニングで Wnt シグナルの活性化を示した *Ricinus communis* から活性成分の探索を行った。TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標に分画及び化合物の単離を行った。また、得られた化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価及び Wnt シグナルに対する作用解析を行った。



Figure 5-1. *Ricinus communis*

*Ricinus communis* はトウダイグサ科 (*Euphorbiaceae*) トウゴマ属に属する多年草である。原産地は東アフリカとされているが、世界中で栽培されている。また、種子からはひまし油が得られ、燃料や香料などに利用されてきた。薬理活性としては、抗炎症作用や肝保護作用、抗真菌作用、利尿作用、緩下作用などが報告されている<sup>[1]</sup>。

*Ricinus communis* からはトリテルペノイドサポニン<sup>[2]</sup>やピリドンアルカロイドである ricinine<sup>[3]</sup>等の単離が報告されている。

第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の上昇を指標とした分画

本植物の茎部の MeOH エキスについて溶媒分配を行い酢酸エチル可溶部 (1.0 g), ブタノール可溶部(1.5 g), 水溶部(6.5 g)を得た, これらの可溶部の転写活性を測定したところ酢酸エチル可溶部に転写活性の上昇が認められた(Figure 5-2). そこで酢酸エチル可溶部をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い, Fr. 1 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr.1B, 1C, 1D に認められた (Figure 5-3).

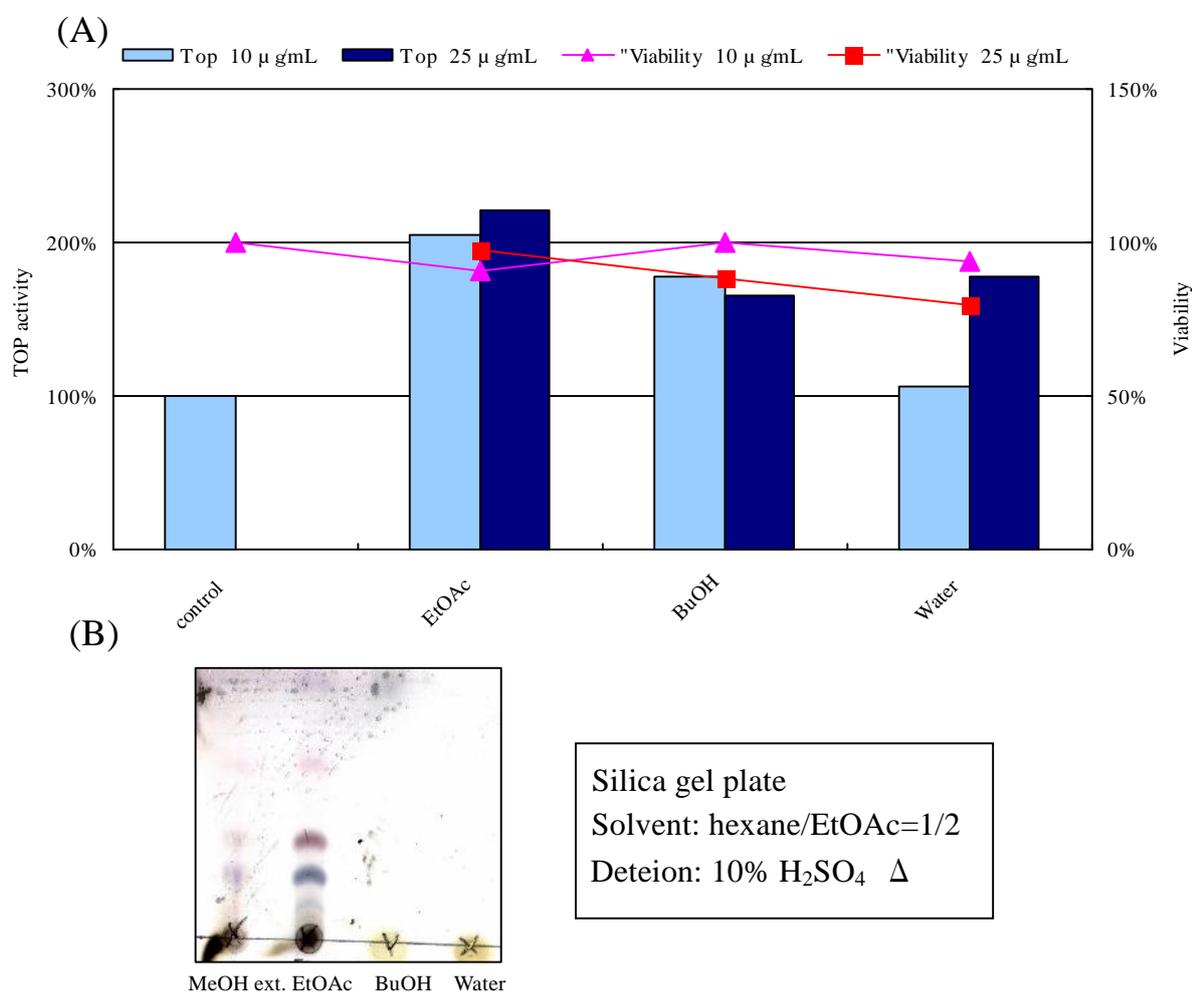


Figure 5-2. (A) TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of each layer

(B) TLC analysis. Silica gel plate, Solvent: hexane /EtOAc = 1/2, Detection: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  $\Delta$

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

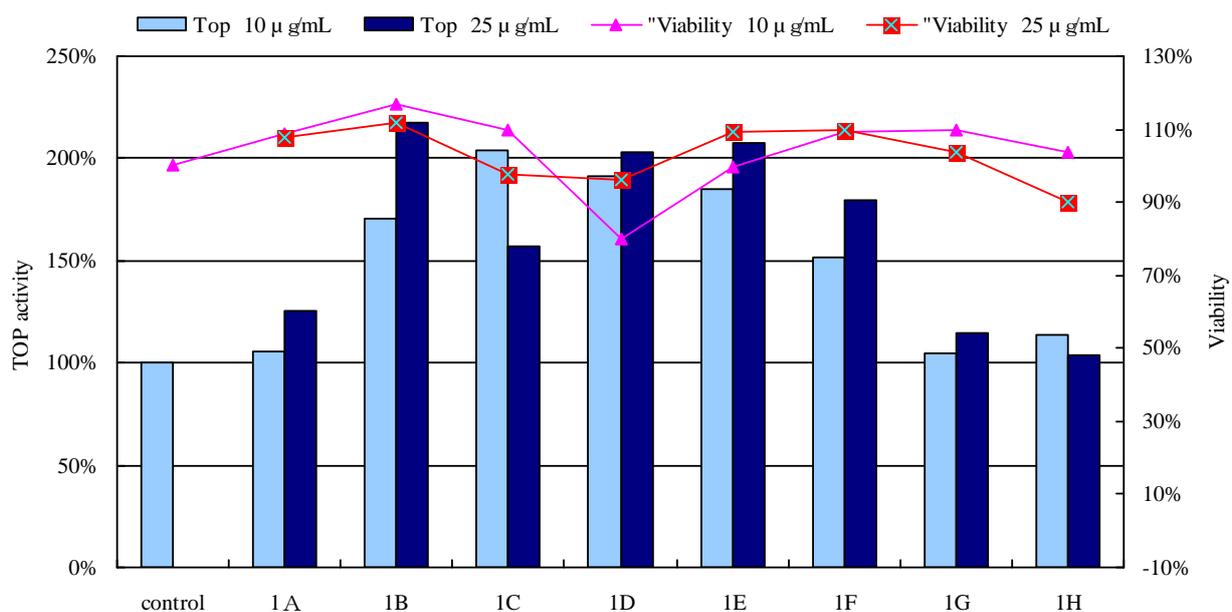


Figure 5-3. Fractions TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.1A-1H

活性の認められた Fr. 1D の分画をメタノール/水系溶媒を用いて ODS カラムクロマトグラフィーを用いて分画を行った. その結果 Fr. 2 シリーズを得た. また Fr. 2B より, 化合物 **3** を得た. Fr. 2 シリーズの活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 2B に認められた(Figure 5-4). 次に, 活性を有していた Fr.1B をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い, Fr. 3 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 3C に認められた(Figure 5-5).

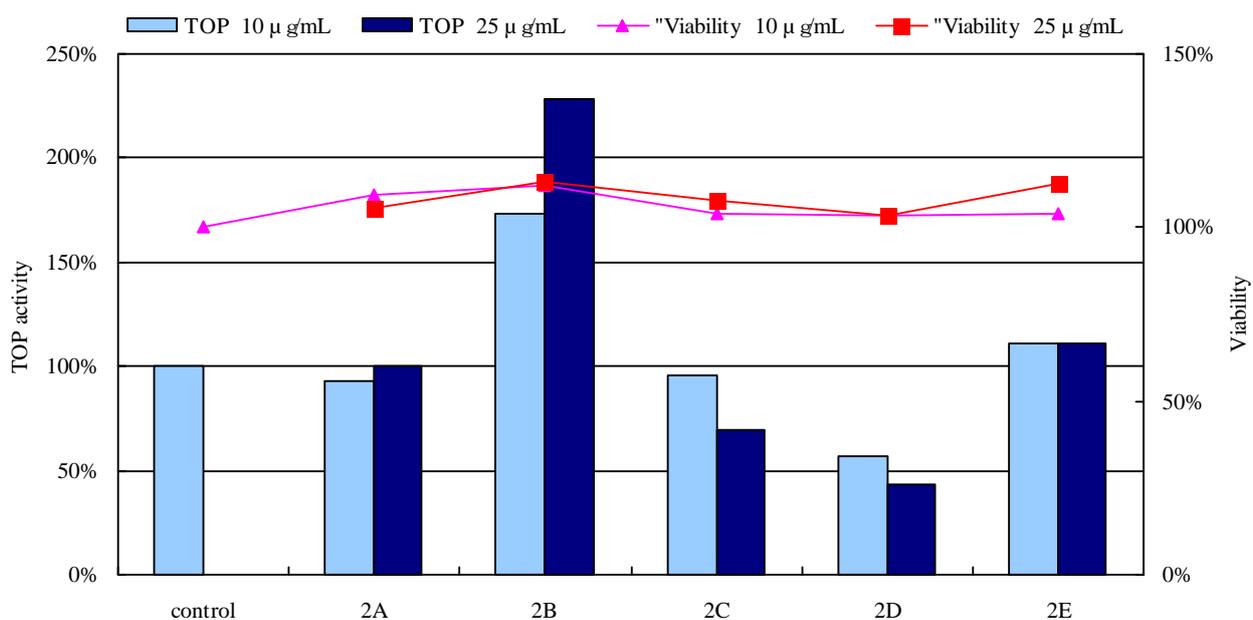


Figure 5-4. Fractions TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.2A-2E

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

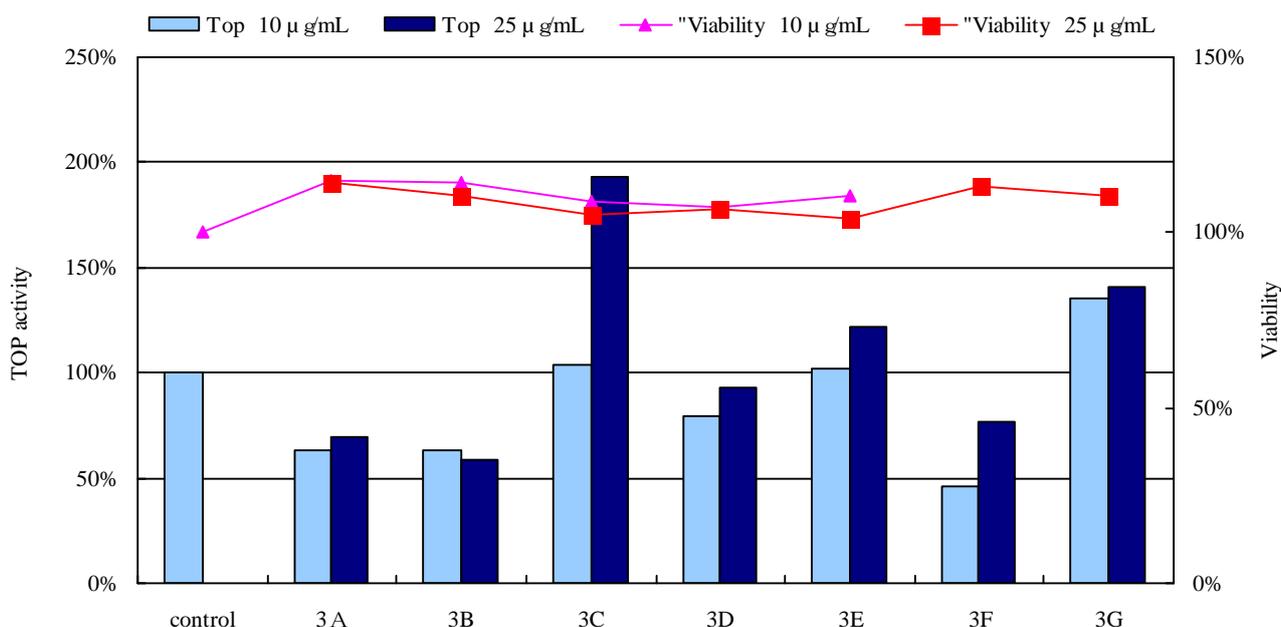


Figure 5-5. Fractions TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.3A-3G

そこで、活性の認められた Fr. 3C をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 4 シリーズを得た。また、Fr. 4J より化合物 **4** を得た(Figure 5-6)。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 4J と 4O に認められた(Figure 5-7)。Fr. 4O は少量であったためか、NMR スペクトルを得ることはできなかった。

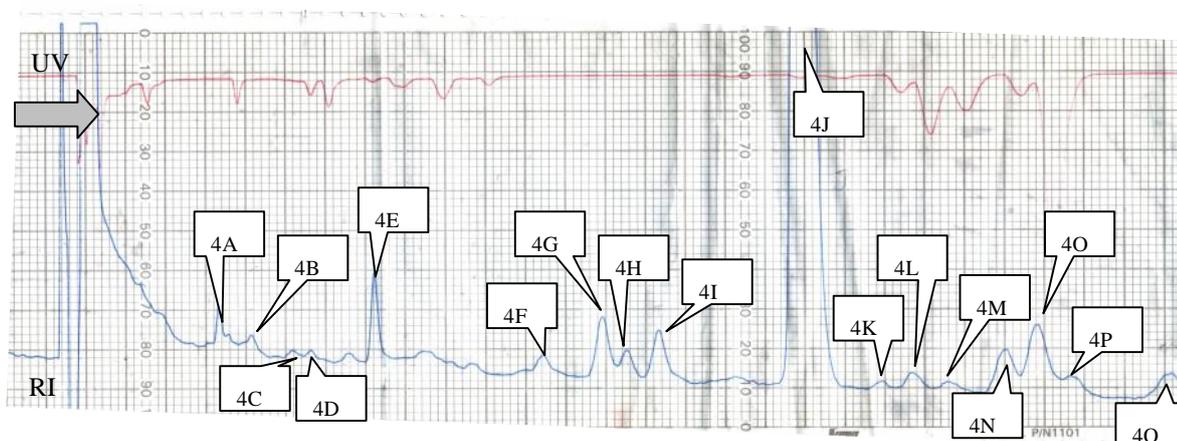


Figure 5-6 HPLC chromatogram of Fr.4A -4O

Column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II  
 (φ 10×250 mm)  
 Solvent: 98% MeOH Flow: 2.5mL/min  
 Chart speed: 30cm/h UV range: 0.8  
 RI range: 16 Inject: 25 µl (50mg/mL)

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

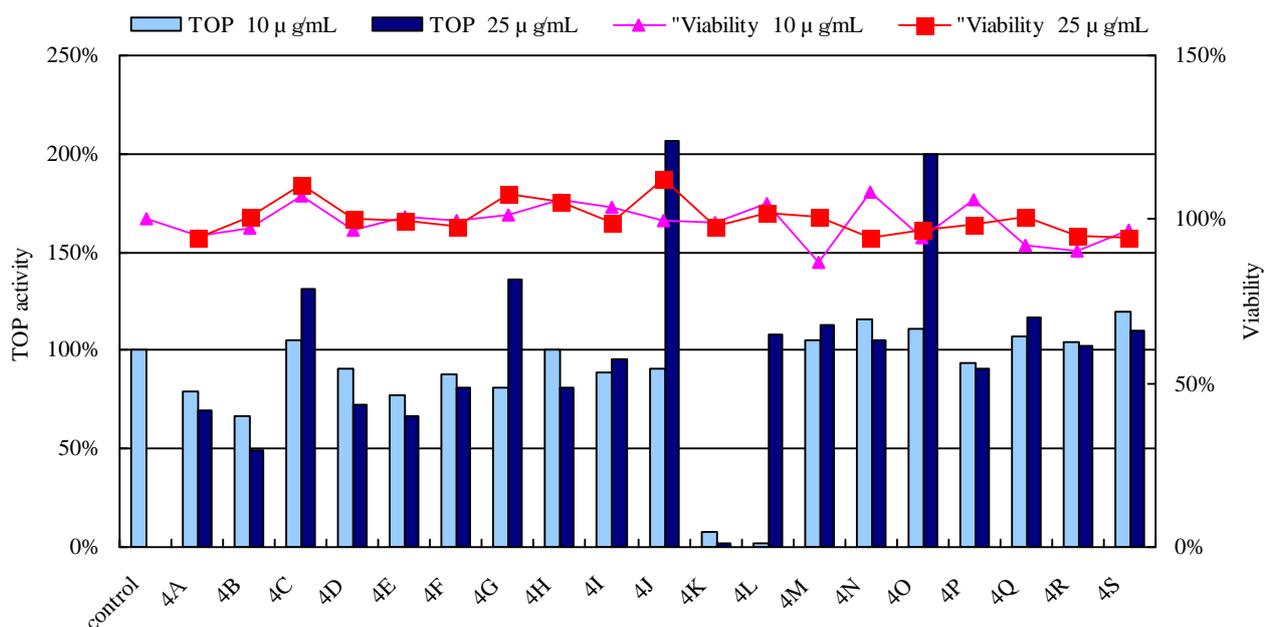


Figure 5-7. TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.4A-4S

次に、活性を有していた Fr.1C をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い、5 シリーズを得た、得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 5D に認められた(Figure 5-8)。そこで、活性の認められた 3C をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い 6 シリーズ及び Fr. 6B より化合物 **5** を得た(Figure 5-9)。そこで得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 6B に認められた(Figure 5-10)。

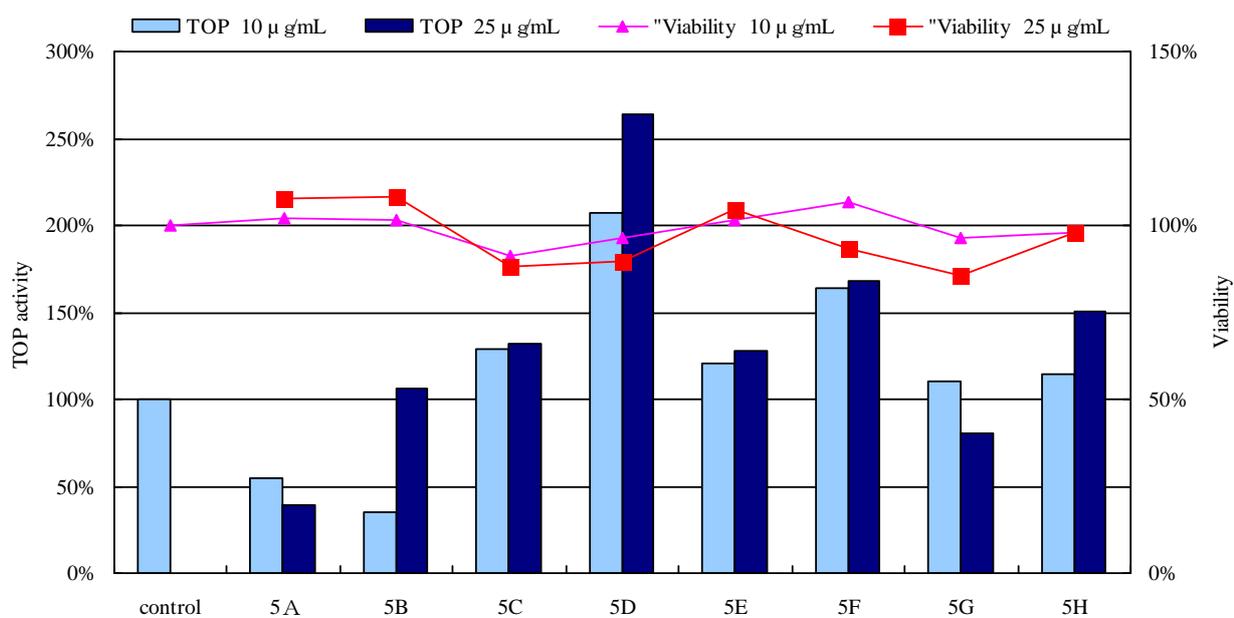


Figure 5-8. TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.5A-5H

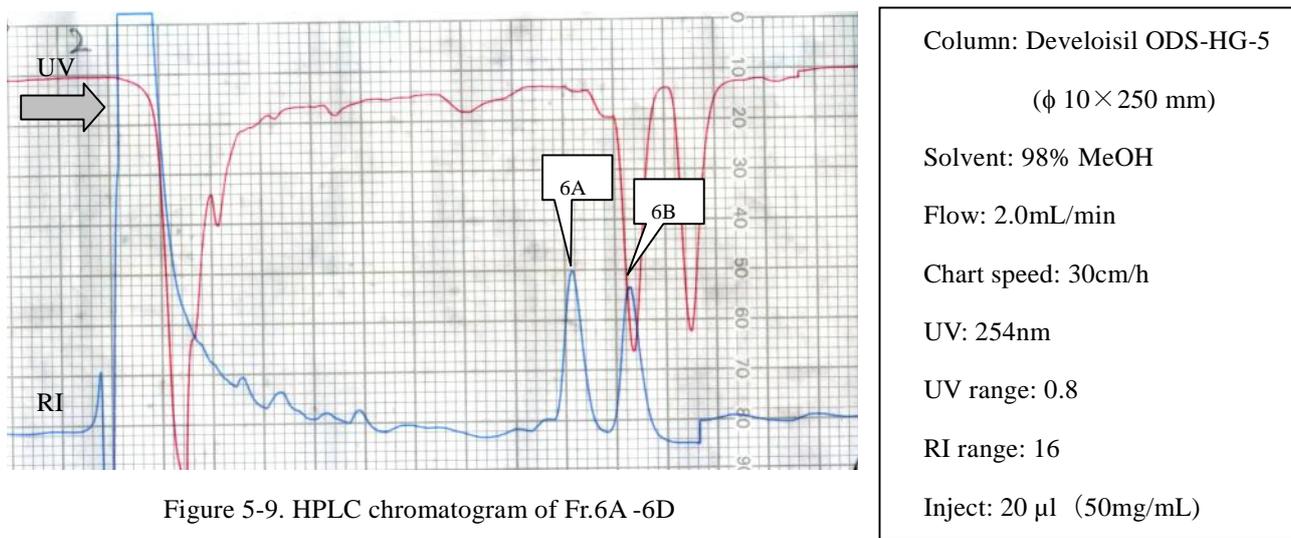


Figure 5-9. HPLC chromatogram of Fr.6A -6D

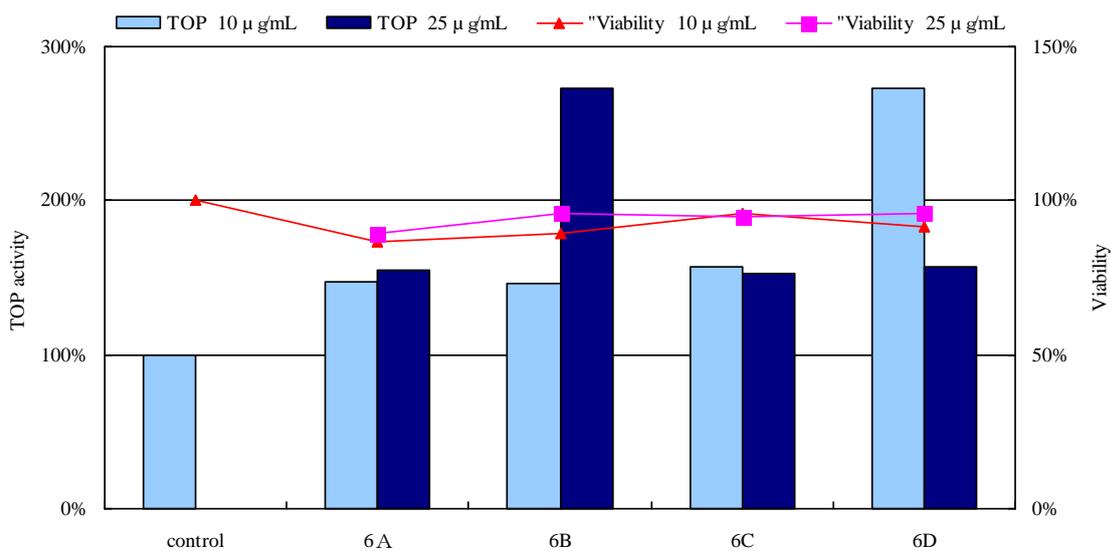


Figure 5-10. TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.6A-6H

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

最後に、活性を有していた Fr.1D をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い、7 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 7C に認められた(Figure 5-11)。そこで、活性の認められた 7C をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により、分画を行い 8 シリーズ及び Fr. 8E より化合物 **6** を得た(Figure 5-12)。そこで得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 8E に認められた(Figure 5-13)。

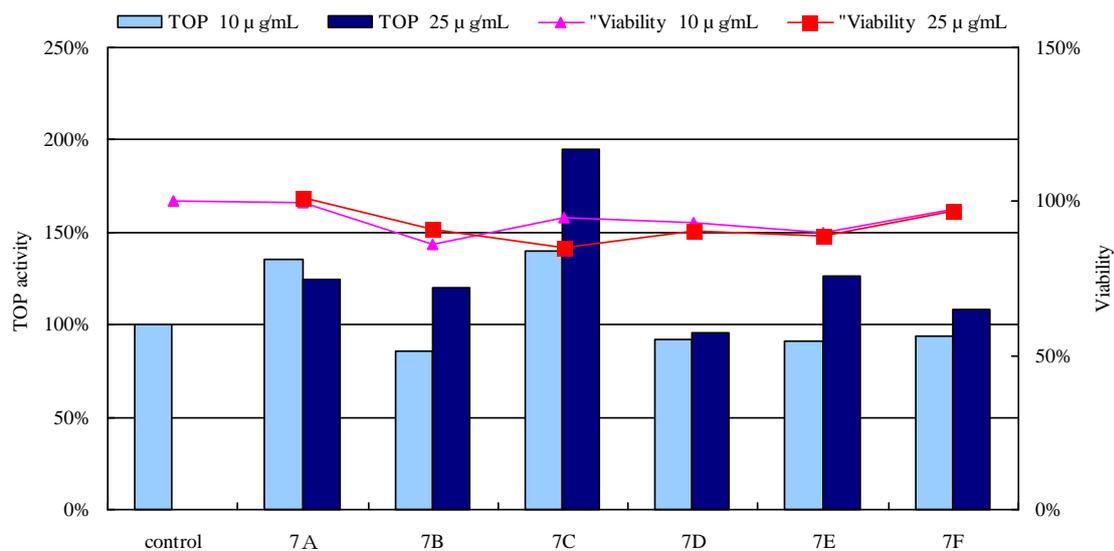


Figure 5-11. TCF/ $\beta$ -catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.7A-7F

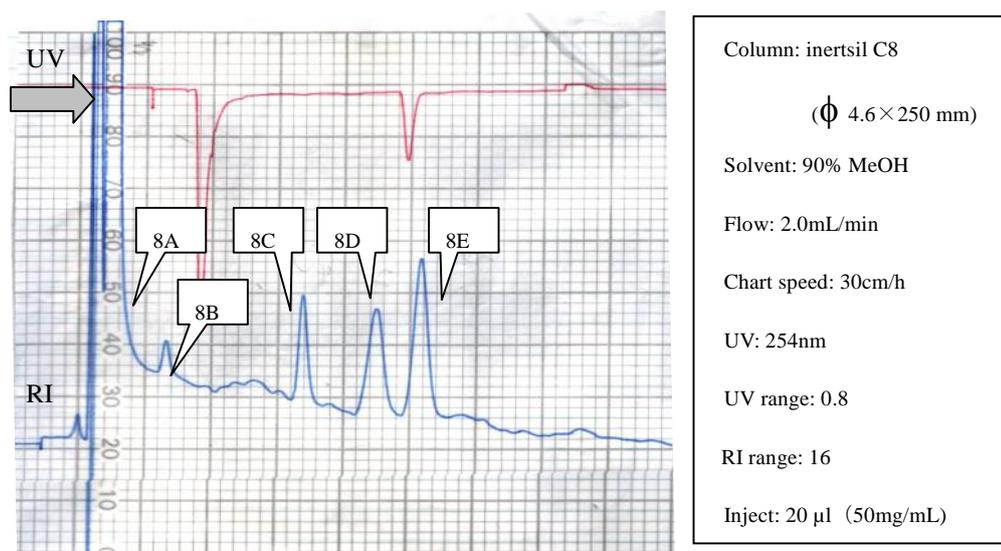


Figure 5-12. HPLC chromatogram of Fr.8A -8G

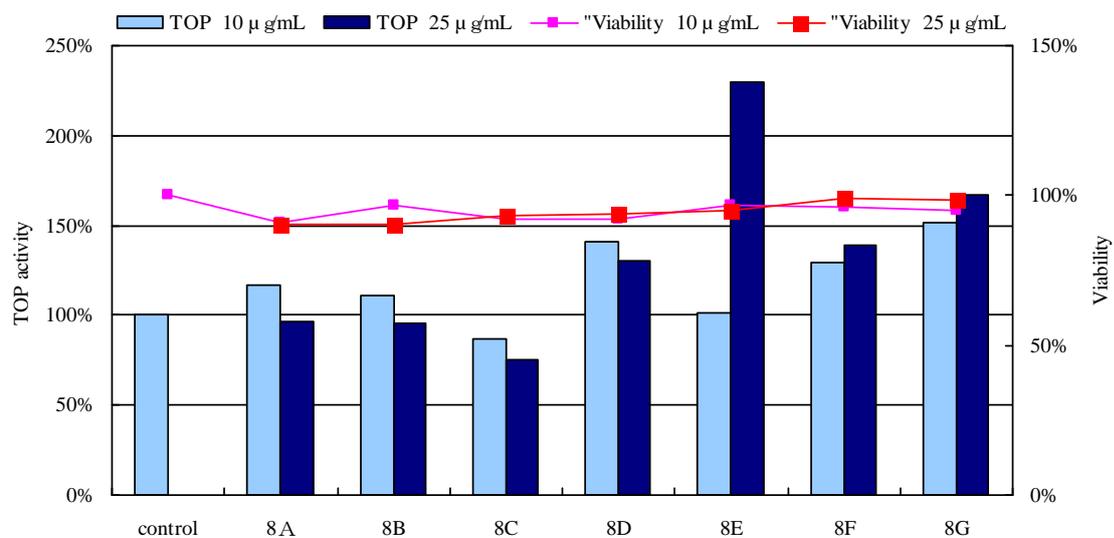


Figure 5-13. TCF/β-catenin transcription enhance activity and cell viability of Fr.8A-8G

第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

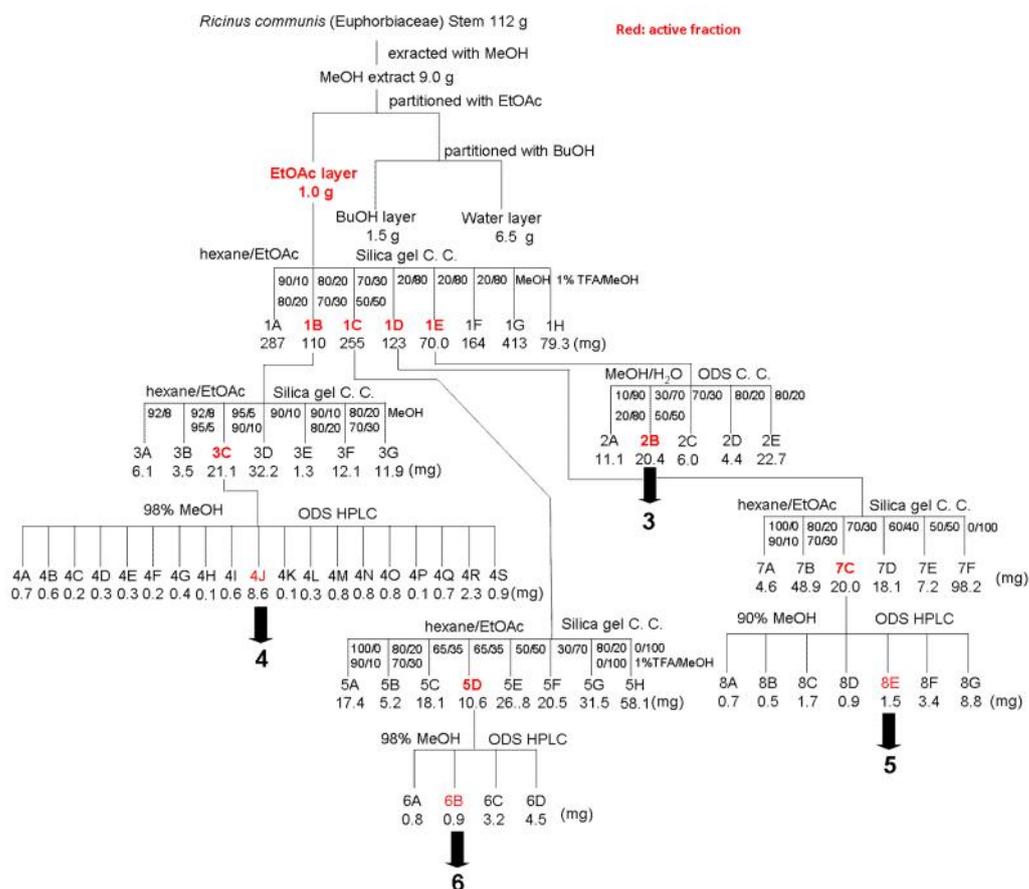


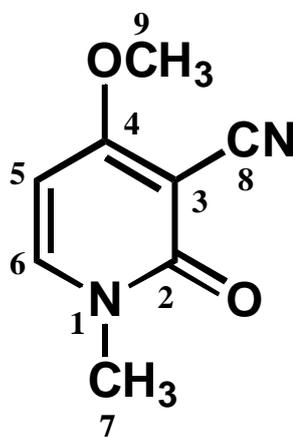
Figure 5-14. Isolation chart of *Ricinus communis*

## 第2節 単離した化合物の構造解析及び同定

*Ricinus communis* から単離した化合物 **3-6** の構造解析を行った。化合物 **3** は白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  187  $[M+Na]^+$ , 351  $[2M+Na]^+$ , 515  $[3M+Na]^+$ ) 及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_8H_8N_2O_2$  と決定した。 $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[4]</sup>との比較により, ricinine (**3**)と同定した(Table 5-1).

	Fr. 2B in $CDCl_3$	Fr. 2B in $CDCl_3$	ricinine in $CDCl_3$ <sup>[4]</sup>	ricinine in $CDCl_3$ <sup>[4]</sup>
position	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1				
2	172.3		172.4	
3	113.7		113.7	
4	161.3		161.3	
5	93.6	6.05 d (7.7)	93.6	6.06 d (7.6)
6	143.6	7.51 d (7.7)	143.6	7.53 d (7.6)
7	37.5	3.52 s	37.5	3.52 s
8	88.6		88.5	
9	57.1	3.97 s	57.1	3.97 s

Table 5-1. NMR spectroscopic data for ricinine (**3**)



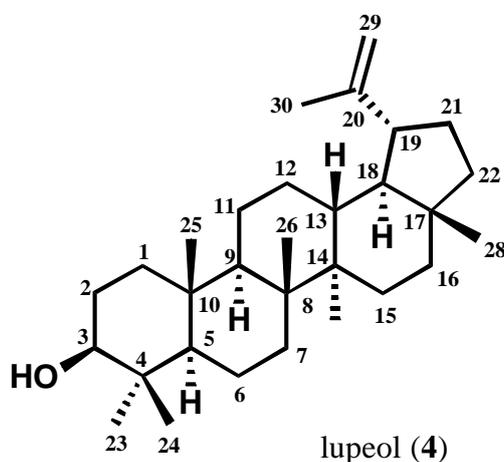
ricinine (**3**)

第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

化合物 **4** は白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  449  $[M+Na]^+$ , 875 $[2M+Na]^+$ ) 及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{30}H_{50}O$  と決定した.  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[5]</sup>との比較により, lupeol (**4**)と同定した(Table 5-2).

	Fr. 4J in $CDCl_3$	Fr. 4J in $CDCl_3$	lupeol in $CDCl_3$ <sup>[5]</sup>	lupeol in $CDCl_3$ <sup>[5]</sup>
position	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1	38.7		38.7	
2	27.4		27.5	
3	79.0	3.16 dd (11.0, 5.4)	79.0	3.16 dd (10.8, 5.5)
4	38.9		38.9	
5	55.3		55.3	
6	18.3		18.3	
7	34.3		34.3	
8	40.8		40.9	
9	50.4		50.5	
10	37.2		37.2	
11	20.9		21.0	
12	25.1		25.2	
13	38.1		38.1	
14	42.8		42.9	
15	27.4		27.5	
16	35.6		35.6	
17	43.0		43.0	
18	48.0		48.0	
19	48.3	2.35 dt (11.0, 5.6)	48.3	2.35 dt (10.9, 5.5)
20	150.9		150.9	
21	29.8	1.81-1.95 m	29.9	1.82-1.96 m
22	40.0		40.0	
23	28.0	0.94s	28.0	0.94 s
24	15.3	0.73 s	15.3	0.73 s
25	16.1	0.80 s	16.1	0.80 s
26	16.0	1.00 s	16.0	1.00 s
27	14.5	0.92 s	14.6	0.92 s
28	18.0	0.76 s	18.0	0.76 s
29	19.3	4.66 s 4.54 s	19.3	4.65brs 4.55 brs
30	109.3	1.65 s	109.3	1.65 s

Table 5-2. NMR spectroscopic data for lupeol (**4**)



$[ ]^{25.0} + 25.7$  (MeOH;  $c0.7$ )

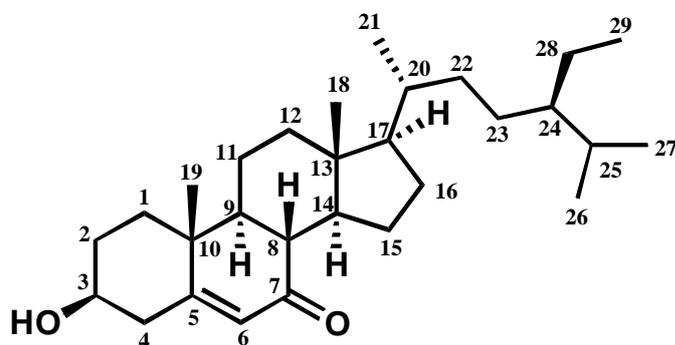
$[ ]^{24.5} + 27.3$  (MeOH;  $c0.7$ )

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

化合物 **5** は白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  429  $[M+H]^+$ )及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{29}H_{48}O_2$  と決定した.  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[7]</sup>との比較により 7-Oxo- -sitosterol (**5**)と同定した(Table 5-3).

	Fr. 6B in $CDCl_3$	Fr. 6B in $CDCl_3$	7-oxo- -sitosterol in $CDCl_3$ <sup>m</sup>	7-oxo- -sitosterol in $CDCl_3$ <sup>m</sup>
position	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1	36.4		36.4	
2	31.2		31.2	
3	70.5	3.65-3.70 m	70.5	3.68 tt (11.0, 5.0)
4	41.8	2.51 ddd (13.0, 5.0, 2.0 4 ) 2.37-2.42 m (4 )	41.8	2.51 ddd (13.0, 5.0, 1.8 4 ) 2.4 ddt (13.0, 11.0, 1.8 4 )
5	165.1		165.2	
6	126.1	5.69 d (1.7)	126.1	5.69 d (1.8)
7	202.3		202.4	
8	45.8	2.24 dd (11, 1,7)	45.8	2.24 t (11)
9	49.9		49.9	
10	38.3		38.3	
11	21.2		21.2	
12	38.7	2.03 dt (12.7, 3.6)	38.7	2.04 dt (12.7, 4.0)
13	43.1		43.1	
14	49.9		49.9	
15	26.3		26.3	
16	28.5		28.5	
17	54.7		54.7	
18	12.0	0.67 s	12.0	0.64 s
19	17.3	1.20 s	17.3	1.20 s
20	36.1		36.1	
21	18.9	0.93 d (6.6)	18.9	0.93 d (6.8)
22	33.9		33.9	
23	26.1		26.1	
24	45.4		45.8	
25	29.1		29.1	
26	19.0	0.81 d (6.8)	19.0	0.81d (6.8)
27	19.8	0.85 d (7.0)	19.8	0.86 d (6.8)
28	23.0		23.0	
29	12.0	0.82 t (6.8)	12.0	0.82 t (6.8)

Table 5-3. NMR spectroscopic data for 7-Oxo- -sitosterol (**5**)



7-Oxo- -sitosterol (**5**)

$[ \ ]^{24.8} -37.7$  ( $CHCl_3$ ;  $c1$ )

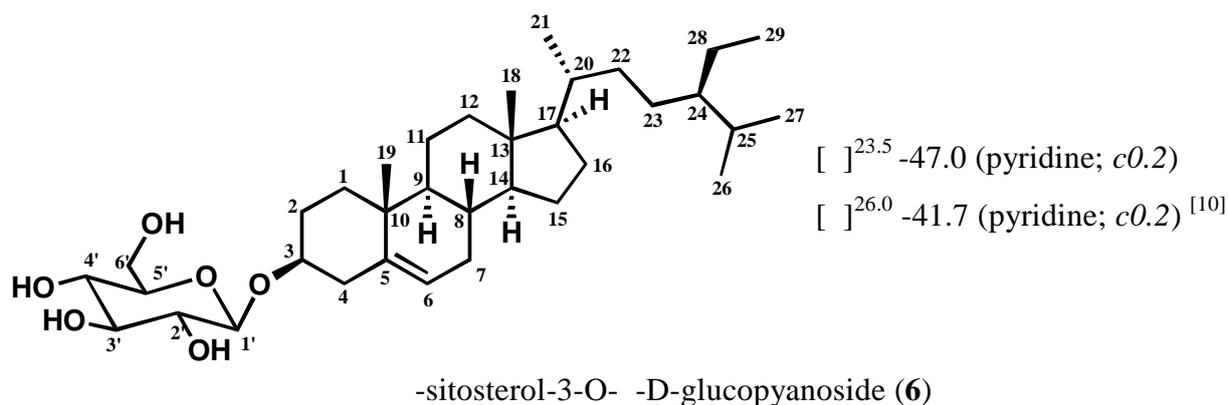
$[ \ ]^{20.0} -98.0$  ( $CHCl_3$ ;  $c1$ )<sup>[8]</sup>

## 第 5 章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

化合物 **6** は白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  575 [M-H]<sup>-</sup>)及び <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR より分子式を C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub> と決定した. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR の文献値<sup>[9,10]</sup>との比較により -sitosterol-3-O- -D-glucopyanoside (**6**)と同定した(Table 5-4).

position	8E in DMSO-d <sub>6</sub>	8E in pyridine-d <sub>5</sub>	-sitosterol-3-O- -D-glucopyanoside in DMSO-d <sub>6</sub> <sup>[9,10]</sup>	-sitosterol-3-O- -D-glucopyanoside in pyridine-d <sub>5</sub> <sup>[9,10]</sup>
	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1	36.8		36.8	
2	29.3		29.2	
3	76.8		76.9	
4	39.3		39.3	
5	140.4		140.4	
6	121.2	5.34 m	121.2	5.35 t (2.5)
7	31.4		31.4	
8	31.3		31.3	
9	49.6		49.6	
10	36.2		36.2	
11	20.6		20.6	
12	38.3		38.3	
13	41.9		41.8	
14	56.2		56.1	
15	23.9		23.8	
16	27.8		27.8	
17	55.4		55.4	
18	11.6	0.65 s	11.6	0.66 s
19	19.1	0.93 s	19.1	0.94 s
20	35.5		35.5	
21	18.6	0.98 d (6.5)	18.6	0.98 d (6.5)
22	33.3		33.3	
23	25.4		25.4	
24	45.1		45.1	
25	28.6		28.6	
26	19.7	0.82 d (7.0)	19.7	0.84 d (7.0)
27	18.9	0.86 d (7.0)	18.9	0.86 d (7.0)
28	22.6		22.6	
29	11.8	0.88 t (7.5)	11.8	0.88 t (7.5)
1'	100.8	5.05 d (7.7)	100.7	5.04 d (7.7)
2'	73.4	4.06 t (7.8)	73.4	4.04 dd (7.7, 7.5)
3'	76.9		76.9	
4'	70.0		70.0	
5'	76.8		76.7	
6'	61.0		61.0	

Table 5-4. NMR spectroscopic data for -sitosterol-3-O- -D-glucopyanoside (**6**)



第3節 単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価

*Ricinus communis* より単離した化合物 3-6 について TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性を評価したところ、化合物 3-6 は TOP 活性の上昇が認められた。一方で、化合物 3 及び化合物 5 は FOP 活性に変化は認められなかった。したがって、化合物 3 及び化合物 5 は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性化作用を持つことが示唆された(Figure 5-15)。

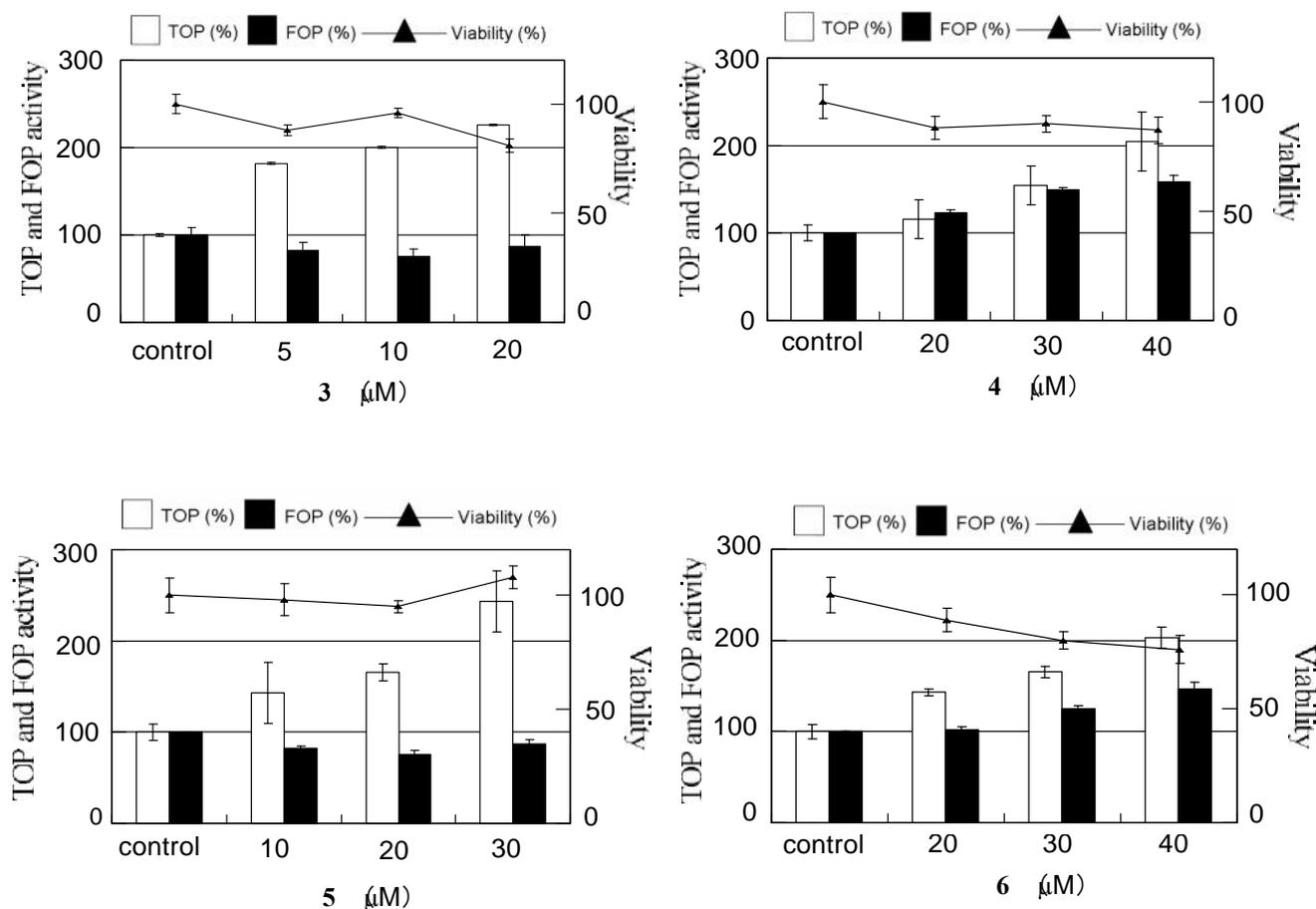


Figure 5-15. 3 and 5 enhanced TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity. Luciferase activity for TOP and FOP activities were evaluated in STF/293 cells and 293 cells, respectively. Viability was evaluated using STF/293 cells.

第4節 化合物 3 の Wnt シグナルに対する活性化作用の解析

化合物 3 は中枢神経刺激作用が報告されているが<sup>[11]</sup>, 他の生物活性や細胞内シグナルに対する作用は報告されていない. そこで, TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性化作用を示した化合物 3 について Wnt シグナルに対する作用を詳細に解析した. Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は転写活性化因子である  $\beta$ -catenin により調節される. そこで, 化合物 3 についての  $\beta$ -catenin に対する作用をウエスタンブロット法を用いて解析した. また, ポジティブコントロールとして,  $\beta$ -catenin を増加させることが報告されている 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)を用いた<sup>[12]</sup>. その結果, 化合物 3 は細胞全体や細胞質, 核内において  $\beta$ -catenin を増加させた (Figure 5-16).

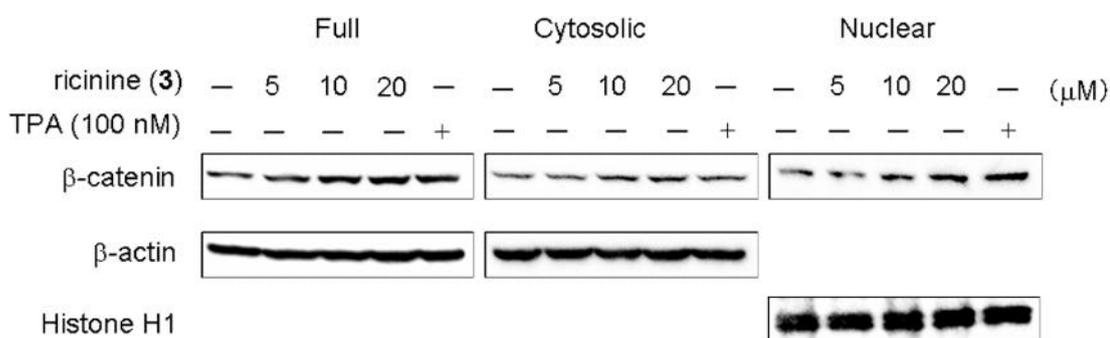
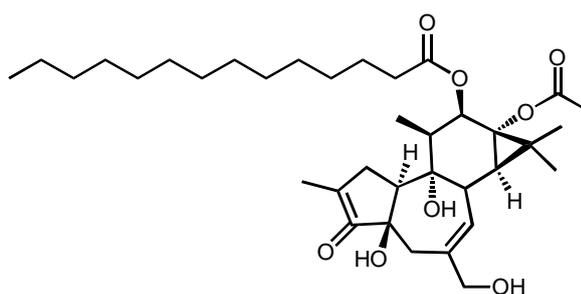


Figure 5-16. ricinine (3) increased  $\beta$ -catenin expression in STF/293 cells.



12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

$\beta$ -catenin は casein kinase 1 (CK1) により Serine 45(S45)のリン酸化を受け、さらに、glycogen synthase kinase 3 (GSK3) により Threonine 41, Serine 37, Serine 33(T41/S37/S33)のリン酸化を受けることで、ユビキチン-プロテアソーム系にて分解されることが知られている<sup>[13]</sup>. そこで、化合物 **3** の CK1 や GSK3 による  $\beta$ -catenin のリン酸化や CK1 や GSK3 に対する作用を調べた.

その結果、化合物 **3** は  $\beta$ -catenin を増加させ、リン酸化  $\beta$ -catenin である p-  $\beta$ -catenin を減少させた. 一方で、CK1 及び GSK3 の発現量に変化は認められなかった. これらの結果から化合物 **3** は CK1 の活性を阻害することが考えられた(Figure 5-17).

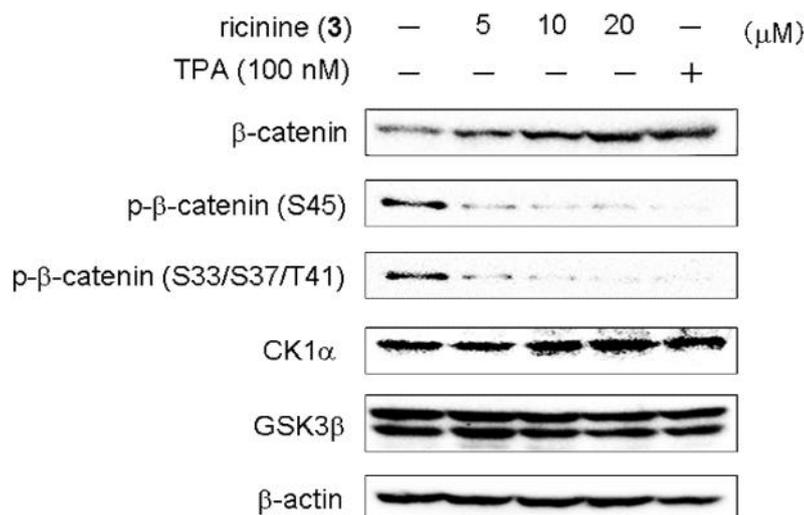


Figure 5-17. Effects of ricinine (**3**) on the expression of  $\beta$ -catenin, p- $\beta$ -catenin, CK1 and GSK3 in the STF/293 cells treated with **3**.

Figure 5-17 の結果より化合物 **3** が CK1 の活性を阻害することが考えられた。そこで、CK1 を活性化することで、Wnt シグナルを阻害することが知られている pyrvinium<sup>[14]</sup> と化合物 **3** を併用処理することで、化合物 **3** の CK1 に対する作用を調べた。pyrvinium は  $\beta$ -catenin を減少させ、p- $\beta$ -catenin を増加させた。一方で、化合物 **3** と pyrvinium を併用処理により  $\beta$ -catenin を減少させず、p- $\beta$ -catenin を減少させた。すなわち、pyrvinium 単独処理した際の  $\beta$ -catenin の減少が化合物 **3** により回復したと考えられる。これらの結果から化合物 **3** は CK1 の活性を阻害することが示唆された(Figure 5-18)。

化合物 **3** が CK1 の活性を阻害するメカニズムとして、CK1 の活性を直接阻害するメカニズムと間接的に阻害するメカニズムが考えられる。直接的に阻害するメカニズムは CK1 が働くために必要な ATP と拮抗するようなメカニズムが考えられ、CKI-7<sup>[15]</sup> のような化合物が報告されている。間接的に阻害するメカニズムとして、CK1 の上流因子の阻害が考えられる。CK1 の活性を調節する因子として、DEAD-box RNA helicase の一つである DDX3 が報告されている<sup>[16]</sup>。DDX3 を siRNA を用いてノックダウンすると CK1 の活性が低下する。すなわち、DDX3 は CK1 の活性を制御していると考えられる。DDX3 の活性化と  $\beta$ -catenin の分解との関連性は不明であるが、今後はキナーゼアッセイにより CK1 の活性化状態や DDX3 の活性や発現量を検討する必要があると考えられる。

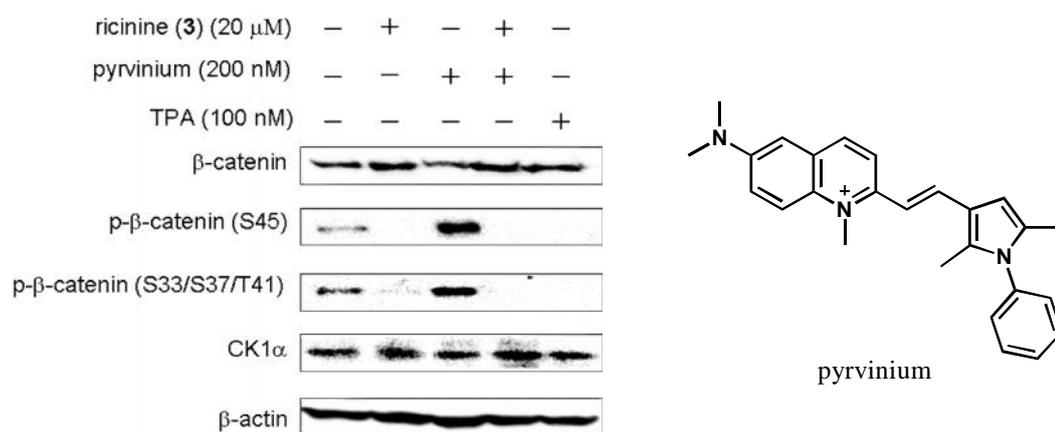


Figure 5-18. Effects of ricinine (**3**) and pyrvinium on CK1 activity in the STF/293 cells.

第5節 化合物3のゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルに対する活性化作用の解析

化合物3が *in vitro* において CK1 を介して Wnt シグナルを活性化していたことから、*in vivo* における化合物3の作用をゼブラフィッシュを用いて解析を行った。まず、化合物3によるフェノタイプの変化を調べた。ゼブラフィッシュにおいて認められるフェノタイプの変化は化合物を処理した時間により異なることがある。例えば、Figure 5-19 に示すように、図 B では LiCl (0.3 M) を受精後 1.75 時間後に処理すると頭部は正常だが、後部において、正常な尾や脊索になる予定の組織ではねじれが認められる。また、図 C では受精後 4 時間後に LiCl を処理すると目が正常に形成されない<sup>[17]</sup>。

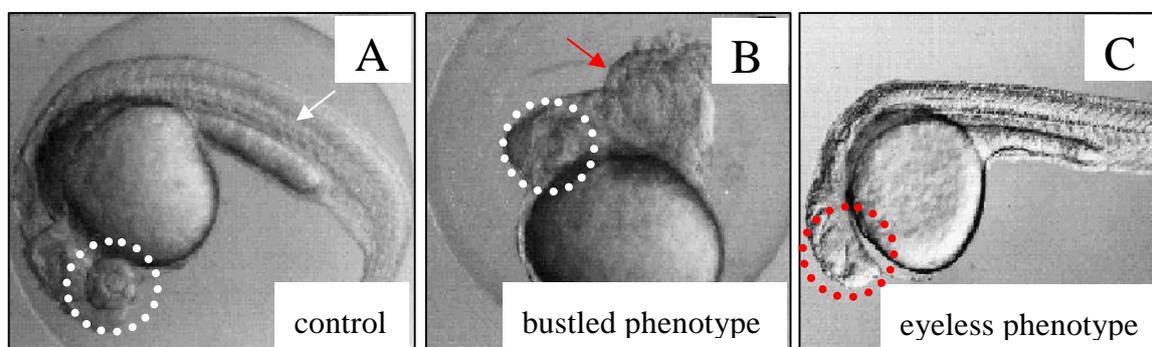


Figure 5-19. Effects of LiCl (0.3 M) on zebrafish embryos in 26-28 hours post fertilization (hpf). (A), White arrow incated normal notochord. White dashed circle indicated normal eyes. (B) Red arrow incated twisted notochord. (C) Red dashed circle indicated eyeless.

そこで、受精 0.3, 1.75, 4 時間後にそれぞれ化合物3 (20  $\mu$ M)を 処理し、24 時間後に形態観察を行った。それぞれの時間において化合物3を処理したゼブラフィッシュ胚の形態観察を行ったが、コントロール群と比較して顕著な差は認められなかった(Figure 5-21~5-23)。なお実験は各群 n=10 で行った。

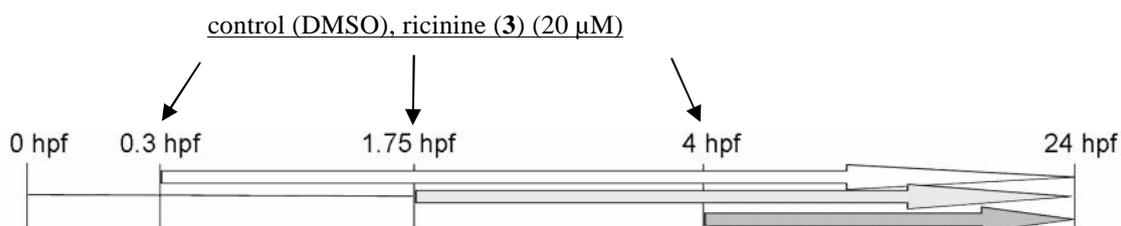


Figure 5-20. Schedule of phenotype assay in the zebrafish embryos.

0.3 hpf-24 hpf

control (DMSO)



ricinine (3) (20  $\mu$ M)



Figure 5-21. Effects of ricinine (3) on zebrafish embryos in 24 hpf.

1.75 hpf-24 hpf

control (DMSO)



ricinine (3) (20  $\mu$ M)

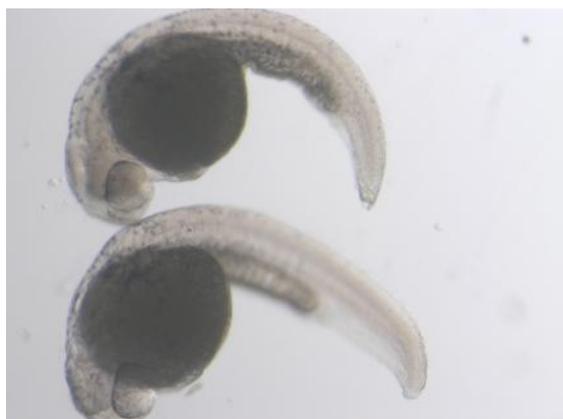


Figure 5-22. Effects of ricinine (3) on zebrafish embryos in 24 hpf.

4 hpf-24 hpf

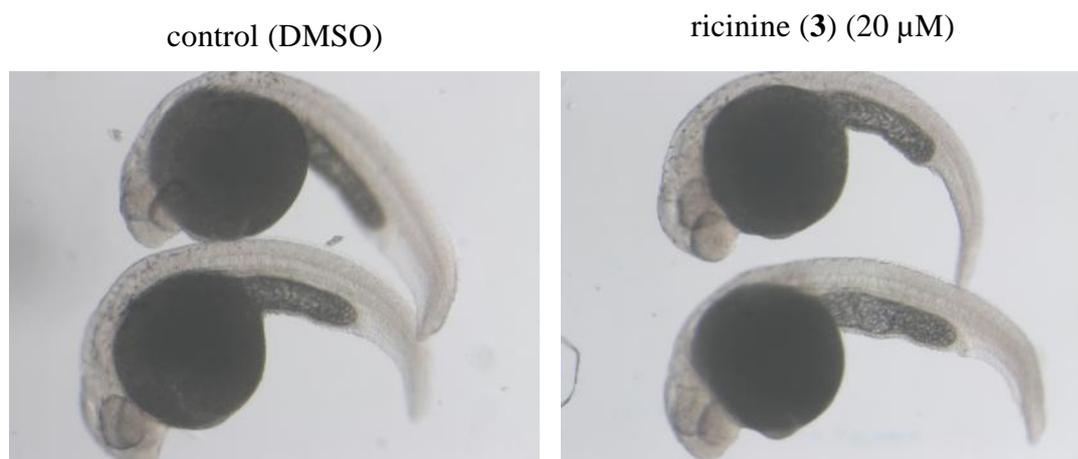


Figure 5-23. Effects of ricinine (**3**) on zebrafish embryos in 24 hpf.

化合物 **3** を処理したゼブラフィッシュ胚において、顕著なフェノタイプの変化は認められなかった。しかしながら、*in vitro* におけるレポーターアッセイにて TOP 活性の上昇が認められている。そこで、ゼブラフィッシュにおいて TOP 活性が上昇するかどうか調べた。そこで、TCF/LEF 結合部位を持ち、GFP レポータープラスミドである TOPdGFP を安定的に導入した Wnt レポーターラインを用いた。このラインは Wnt/ $\beta$ -catenin 経路が活性化すると、頭部の中脳視蓋に緑色の蛍光が認められる。例えば、Figure 5-24 のように、リガンドである Wnt1 をノックダウンすると TOPdGFP 活性の低下が認められる<sup>[18]</sup>。すなわち、リガンドによる刺激がなくなったため、Wnt シグナルの低下が起きていると考えられる。

そこで、受精後、4 時間後に化合物を処理し、24 時間後に蛍光を観察した。その結果、コントロールと比較して、化合物処理群において顕著な差は認められなかった (Figure 5-25)。なお実験は各群 n=5 で行った。

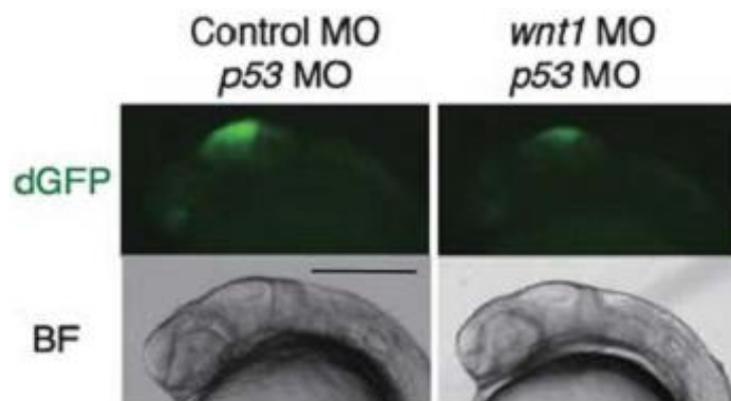


Figure 5-24. TOPdGFP activity was reduced in presence of Wnt1 MO (morpholino) in zebrafish embryos.

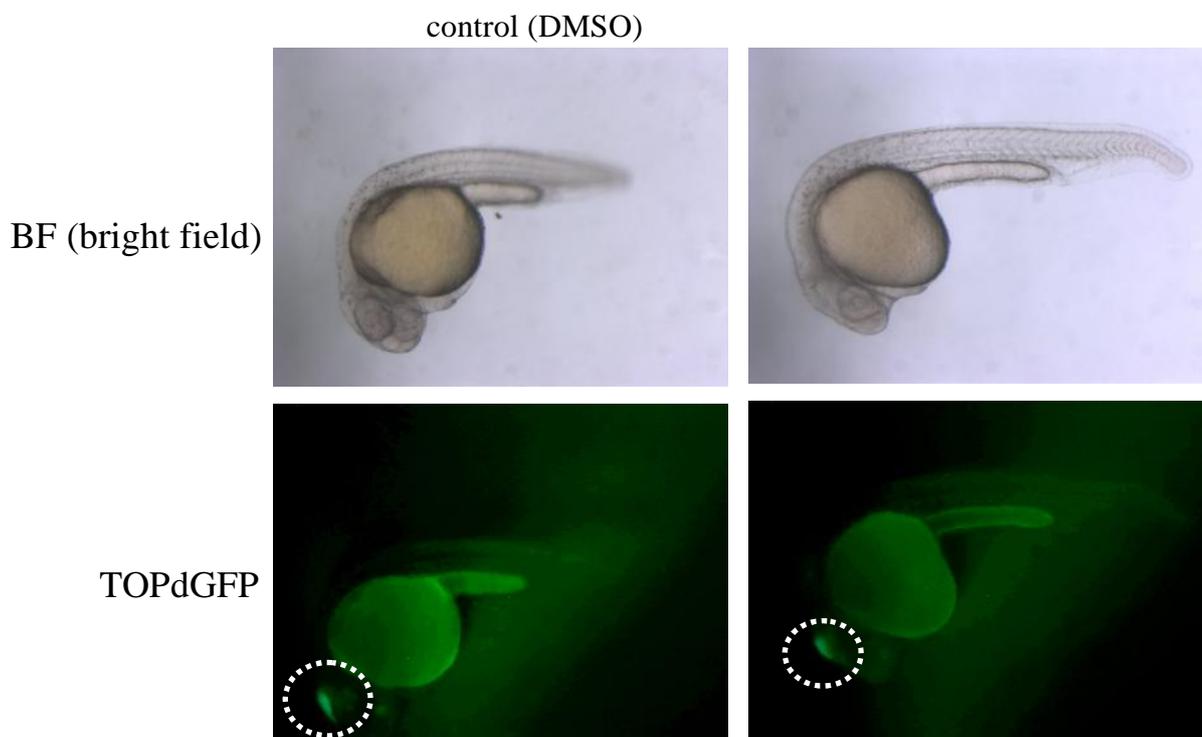


Figure 5-25. Effects of ricinine (3) on TOPdGFP activity in 24 hpf TOPdGFP transgenic zebrafish embryos.

## 第5章 *Ricinus communis* からの Wnt シグナル活性化成分の探索

化合物 **3** はレポーターラインに対して作用が認められなかったが、内在性の転写活性化因子である  $\beta$ -catenin に変化が認められるかどうか調べた。受精後 1.75 時間後に、化合物 **1** を処理し、24 時間後にライセートを回収した。その後、 $\beta$ -catenin の発現量をウエスタンブロット法にて解析した。その結果、化合物 **1** は  $\beta$ -catenin の発現量を増加させた。また、ポジティブコントロールとして用いた、6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO) <sup>[19]</sup> も同様に  $\beta$ -catenin の発現量を増加させた(Figure 5-26)。

Wnt シグナルを活性化させると、様々なフェノタイプの変化が認められることが報告されており、BIO による胚に対する処理<sup>[20]</sup>や *Axin*<sup>[21]</sup>及び *TCF3*<sup>[22]</sup>の変異体は前脳の欠損や眼の形成不全が認められる。また、 $\beta$ -catenin の過剰発現は体軸が二つ発生させるなどが報告されている<sup>[23]</sup>。化合物 **3** に顕著なフェノタイプの変化が認められなかったのにもかかわらず、 $\beta$ -catenin の発現量の増加が認められた。一方で、BIO を処理により  $\beta$ -catenin の発現量を増加させ、かつ眼の形成不全も認められた。 $\beta$ -catenin の発現とフェノタイプの発現の関係性は不明であるが、目の形成不全が誘導されるためには BIO は誘導しているが、化合物 **3** は誘導していない転写因子が存在することが考えられる。

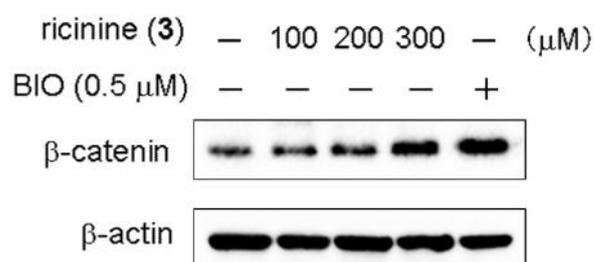
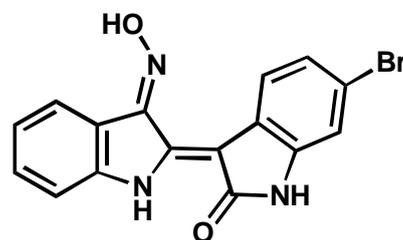


Figure 5-26. Effect of ricinine (**3**) on the expression of  $\beta$ -catenin in 24 hpf zebrafish embryos.



6-bromoindirubin-3'-oxime (BIO)

## 第6節 小括

トウダイグサ科植物 *Ricinus communis* から Wnt シグナルの転写活性の上昇を指標に天然物の探索を行い, 1 種の pyridone 型アルカロイド(**3**), 1 種のトリテルペン(**4**), 及び 2 種ステロイド(**5, 6**)を単離した.

化合物 **3-6** の TOP 活性及び FOP 活性を評価したところ, 化合物 **3** 及び **6** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写を活性化させることが示唆された.

ウェスタンブロット法を用いて, 化合物 **3** の Wnt シグナルに対する作用を評価したところ, 化合物 **3** は  $\beta$ -catenin を増加させ, リン酸化  $\beta$ -catenin である p- $\beta$ -catenin を減少させた. 一方で, CK1 及び GSK3 の発現量に変化は認められなかった. または化合物 **3** と pyrvinium を併用処理すると  $\beta$ -catenin の減少は認められなかった. また, 化合物 **3** はゼブラフィッシュにおいて  $\beta$ -catenin を増加させた.

以上の結果より, 化合物 **3** は CK1 の活性を阻害することで,  $\beta$ -catenin のリン酸化及び分解を抑制し, その結果, Wnt シグナルを活性化させていることが示唆された.

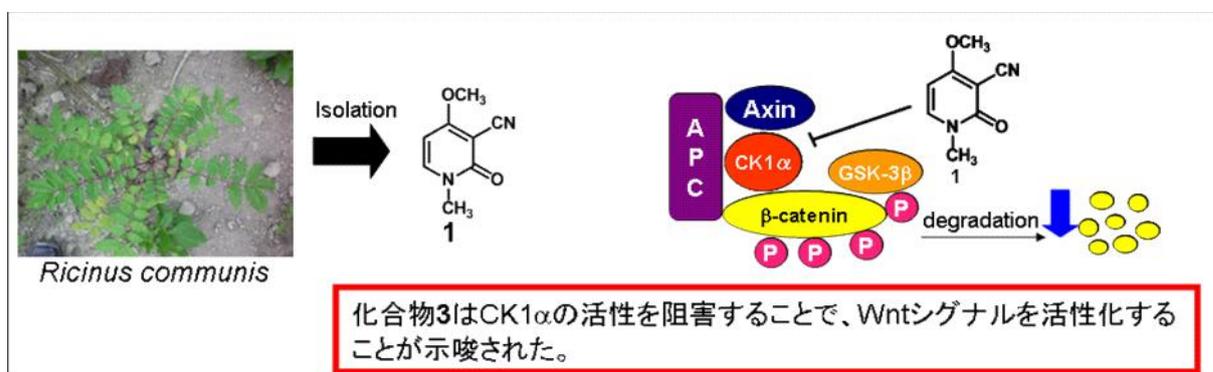


Figure 5-27. Summary of this chapter: isolation from *Ricinus communis* and evaluating activation of Wnt signaling

[参考文献]

- [1] R. Ilavarasan, M. Mallika, S. Venkataraman, *Toxicol Mech Methods* **2011**, *21*, 246-250.
- [2] C. Acharya, N. A. Khan, *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 54-57.
- [3] A. C. Leite, E. C. Cabral, D. A. P. dos Santos, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, M. F. d. G. F. da Silva, *Quim. Nova* **2005**, *28*, 983-985.
- [4] V. Bullangpoti, N. Khumrungsee, W. Pluempanupat, Y. Kainoh, U. Saguanpong, *J. Pestic. Sci. (Tokyo, Jpn.)* **2011**, *36*, 260-263.
- [5] M. Sholichin, K. Yamasaki, R. Kasai, O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 1006-1008.
- [6] J. Fotie, D. S. Bohle, M. L. Leimanis, E. Georges, G. Rukunga, A. E. Nkengfack, *J Nat Prod* **2006**, *69*, 62-67.
- [7] G. R. Pettit, A. Numata, G. M. Cragg, D. L. Herald, T. Takada, C. Iwamoto, R. Riesen, J. M. Schmidt, D. L. Doubek, A. Goswami, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 72-78.
- [8] X. Zhang, P. Geoffroy, M. Miesch, D. Julien-David, F. Raul, D. Aoudé-Werner, E. Marchioni, *Steroids* **2005**, *70*, 886-895.
- [9] S. Faizi, M. Ali, R. Saleem, Irfanullah, S. Bibi, *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, *39*, 399-405.
- [10] A. El-Fishawy, R. Zayed, S. Afifi, *J. Nat. Prod. (Gorakhpur, India)* **2011**, *4*, 184-195.
- [11] A. C. Ferraz, M. E. Angelucci, M. L. Da Costa, I. R. Batista, B. H. De Oliveira, C. Da Cunha, *Pharmacol Biochem Behav* **1999**, *63*, 367-375.
- [12] R. H. Chen, W. V. Ding, F. McCormick, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 17894-17899
- [13] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G. H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, X. He, *Cell* **2002**, *108*, 837-847.
- [14] C. A. Thorne, A. J. Hanson, J. Schneider, E. Tahinci, D. Orton, C. S. Cselenyi, K. K. Jernigan, K. C. Meyers, B. I. Hang, A. G. Waterson, K. Kim, B. Melancon, V. P. Ghidu, G. A. Sulikowski, B. LaFleur, A. Salic, L. A. Lee, D. M. Miller, E. Lee, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 829-836.
- [15] T. Chijiwa, M. Hagiwara, H. Hidaka, *J Biol Chem* **1989**, *264*, 4924-4927.
- [16] C. M. Cruciat, C. Dolde, R. E. de Groot, B. Ohkawara, C. Reinhard, H. C. Korswagen, C.

- Niehrs, *Science* **2013**, 339, 1436-1441.
- [17] S. E. Stachel, D. J. Grunwald, P. Z. Myers, *Development* **1993**, 117, 1261-1274.
- [18] S. Ota, S. Ishitani, N. Shimizu, K. Matsumoto, M. Itoh, T. Ishitani, *Embo j* **2012**, 31, 1904-1915.
- [19] L. Meijer, A. L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl, P. Greengard, *Chem Biol* **2003**, 10, 1255-1266.
- [20] N. Nishiya, Y. Oku, Y. Kumagai, Y. Sato, E. Yamaguchi, A. Sasaki, M. Shoji, Y. Ohnishi, H. Okamoto, Y. Uehara, *Chem Biol* **2014**, 21, 530-540.
- [21] J. Hao, A. Ao, L. Zhou, C. K. Murphy, A. Y. Frist, J. J. Keel, C. A. Thorne, K. Kim, E. Lee, C. C. Hong, *Cell Rep* **2013**, 4, 898-904.
- [22] C. H. Kim, T. Oda, M. Itoh, D. Jiang, K. B. Artinger, S. C. Chandrasekharappa, W. Driever, A. B. Chitnis, *Nature* **2000**, 407, 913-916.
- [23] G. M. Kelly, D. F. Erezyilmaz, R. T. Moon, *Mech Dev* **1995**, 53, 261-273.

## 第 6 章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

本章では第 3 章で植物エキストラライブラリーのスクリーニングで Wnt シグナルの阻害を示した *Eurycoma longifolia* から活性成分の探索を行った。TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の低下を指標に分画及び化合物の単離を行った。また、得られた化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価及び Wnt シグナルに対する作用解析を行った。



Figure 6-1. *Eurycoma longifolia*

*Eurycoma longifolia* はニガキ科 (*Simaroubaceae*) ユリコマ属に属する灌木である。原産地はインドネシアやマレーシアである。東南アジアでは、Tongkat Ali(トンカットアリ)と呼ばれ、強壮や解熱などを目的として民間薬として用いられている。薬理活性としては、抗腫瘍活性や抗マラリア活性などが報告されている<sup>[1]</sup>。

*Eurycoma longifolia* からは Quassinoid 類である longilactone<sup>[2]</sup>や -carboline 型アルカロイドである canthin-6-one<sup>[3]</sup>等の単離が報告されている。

第1節 TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の低下を指標とした分画

本植物の茎部の MeOH エキスについて溶媒分配を行いヘキサン可溶部 (780 mg) 酢酸エチル可溶部 (467 mg), ブタノール可溶部 (683 mg), 水溶部 (2.4 g) を得た. これらの可溶部の転写活性を測定したところ, ヘキサン可溶部, 酢酸エチル可溶部に活性が認められた(Figure 6-2). そこでヘキサン可溶部をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い, Fr. 1 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr.1C 及び Fr.1D に認められた(Figure 6-3).

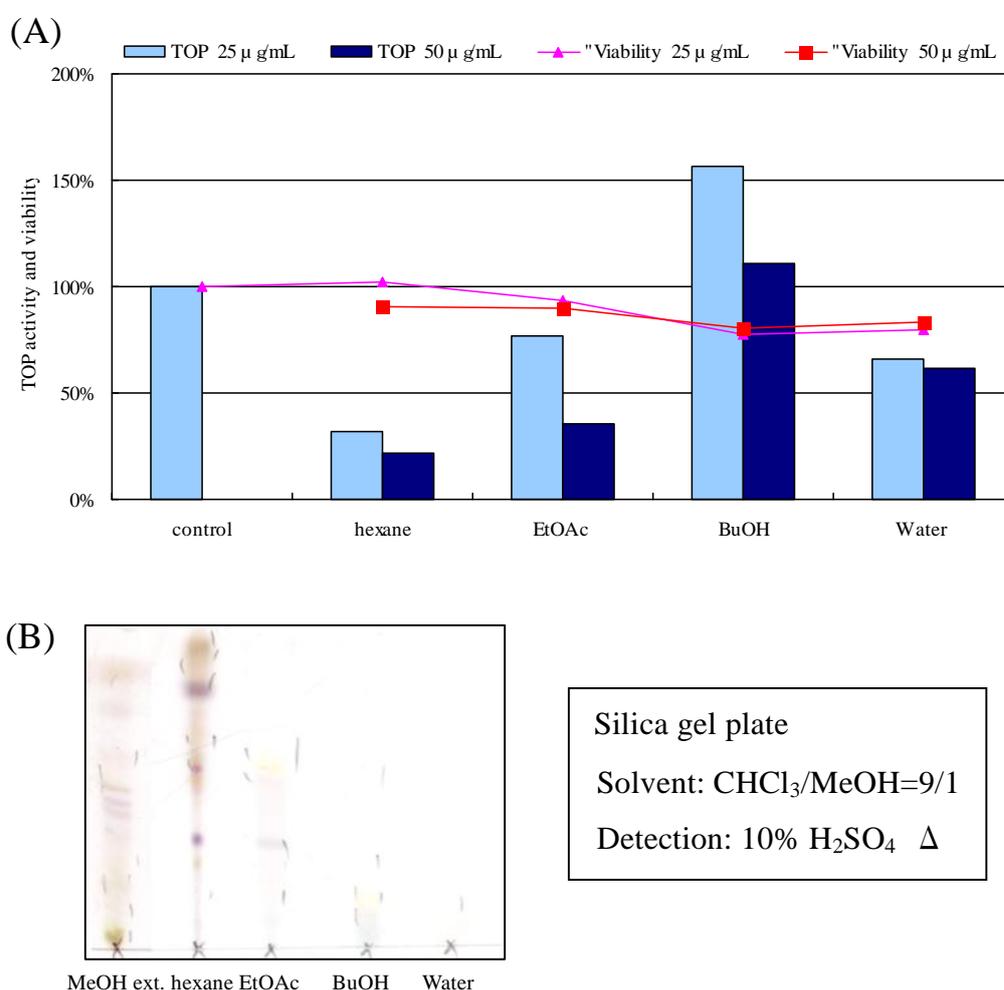


Figure 6-2. (A) TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of each layer

(B) TLC analysis. Silica gel plate, Solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1, Detection: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Δ.

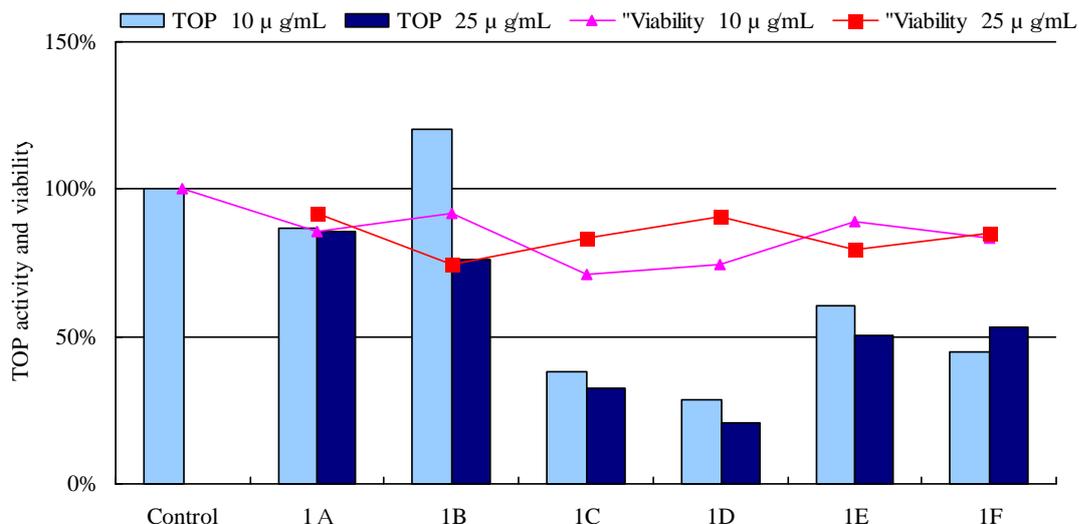


Figure 6-3. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.1A-1F

活性の認められた Fr. 1D の分画をメタノール/水系溶媒を用いて ODS カラムクロマトグラフィーを用いて分画を行った, その結果 Fr. 2 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 2C に認められた(Figure 6-4). そこで, 活性の認められた Fr. 2C をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い 3 シリーズを得た. また, Fr. 3A より化合物 7 を得た(Figure 6-5). Fr. 3 シリーズの活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 3A に認められた(Figure 6-6).

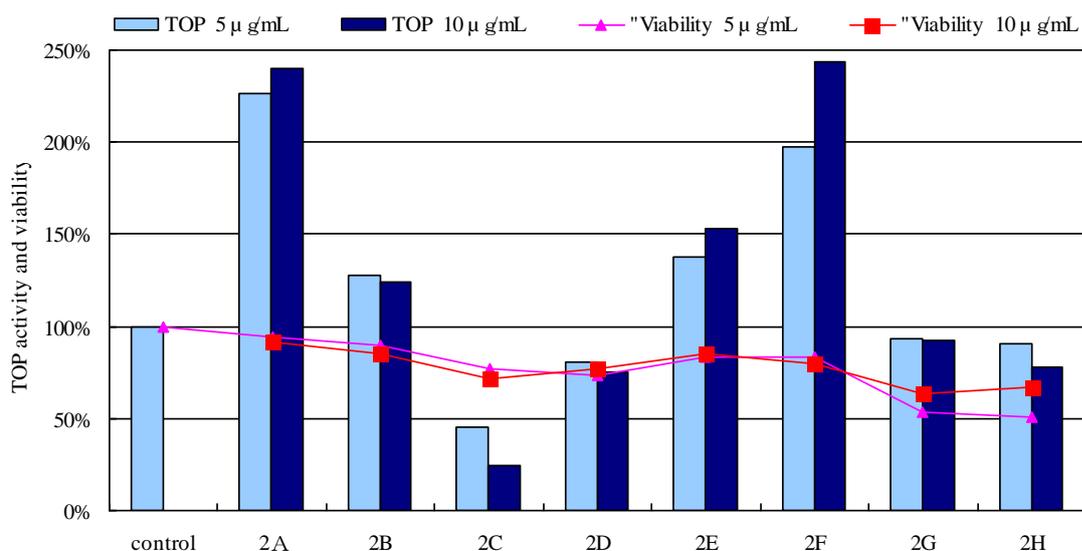


Figure 6-4. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.2A-2H

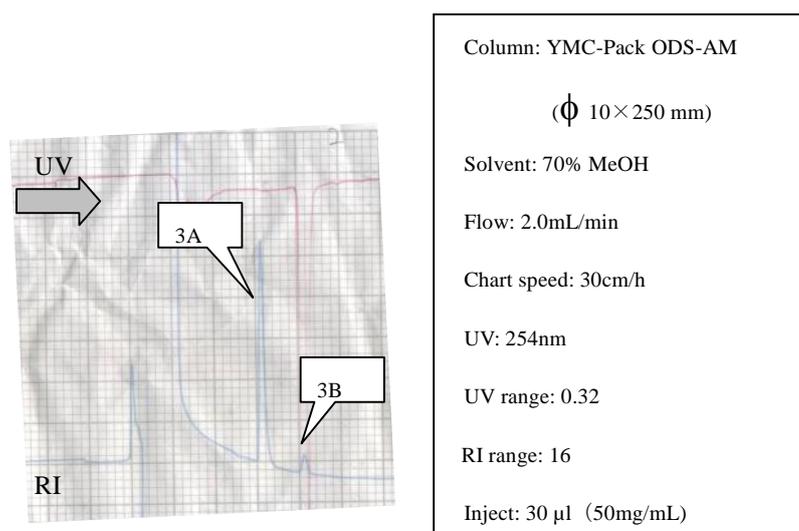


Figure 6-5 HPLC chromatogram of Fr.3A – 3D

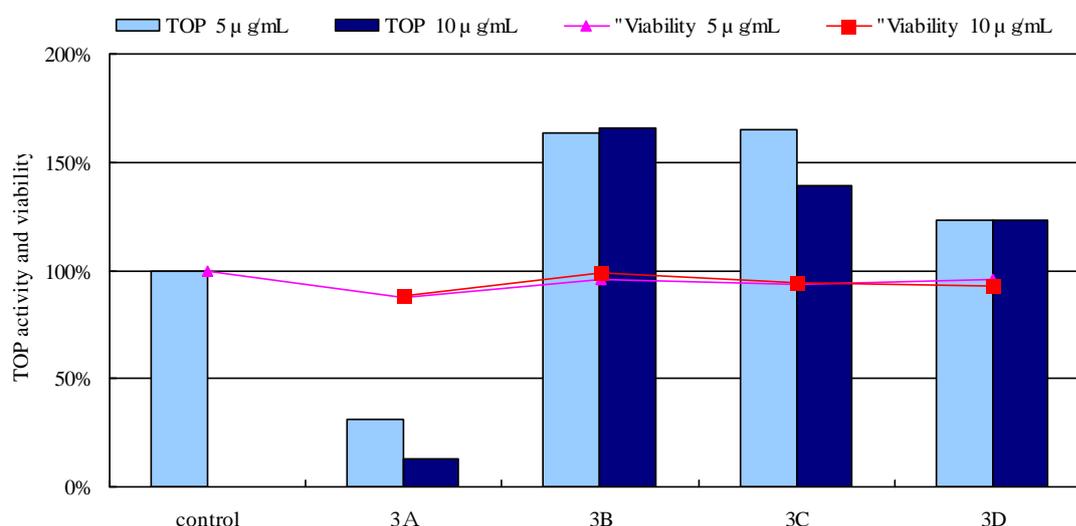


Figure 6-6. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.3A-3D

次に、活性を有していた Fr.1C をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い、Fr. 4 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 4F に認められた(Figure 6-7)。そこで、活性の認められた Fr. 4F をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 5 シリーズを得た。また、Fr. 5B より化合物 **8** を得た(Figure 6-8)。Fr. 5 シリーズの活性評価を行ったところ、活性は Fr. 5B に認められた(Figure 6-9)。

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

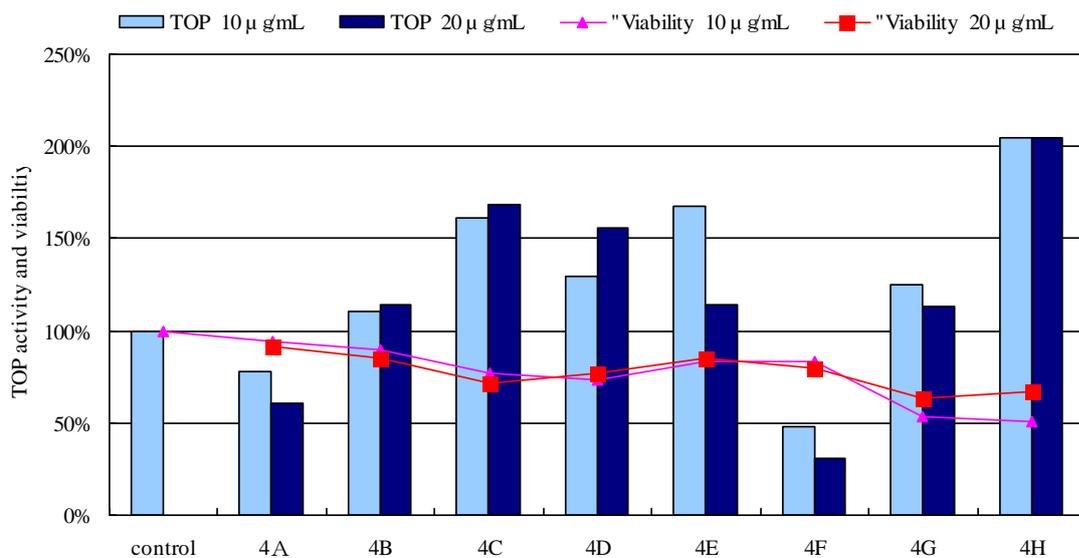


Figure 6-7. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.4A-4H

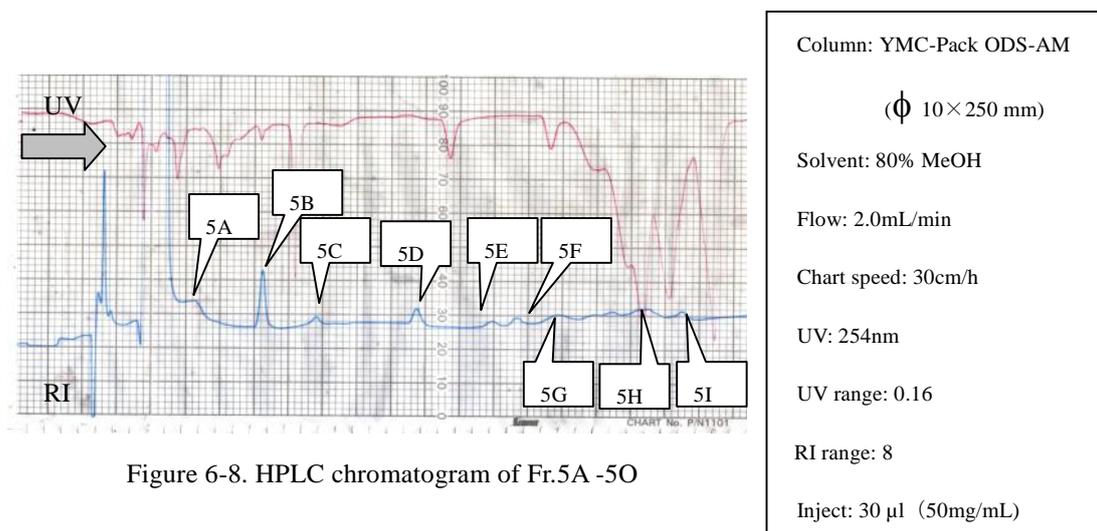


Figure 6-8. HPLC chromatogram of Fr.5A-5O

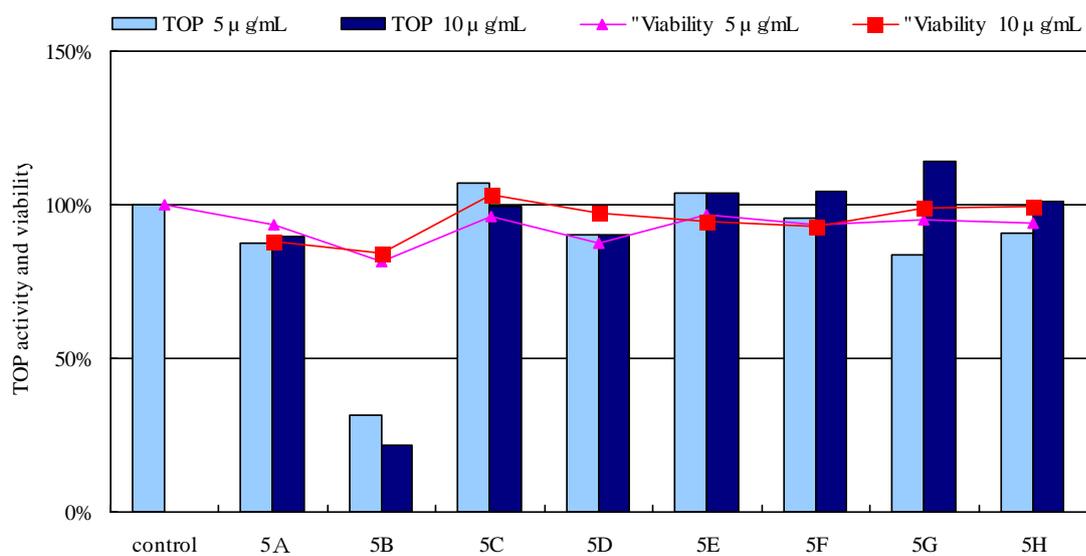


Figure 6-9. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.5A-5H

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

次に、活性を有していた酢酸エチル可溶部を水/メタノール系溶媒を用いて ODS カラムクロマトグラフィーを行い、Fr. 6 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 6C および 6F に認められた(Figure 6-10)。そこで、活性の認められた Fr. 6F をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 7 シリーズを得た。また、Fr. 7A より化合物 7 を得た(Figure 6-11)。Fr. 7 シリーズの活性評価を行ったところ、活性は Fr. 7A に認められた(Figure 6-12)。

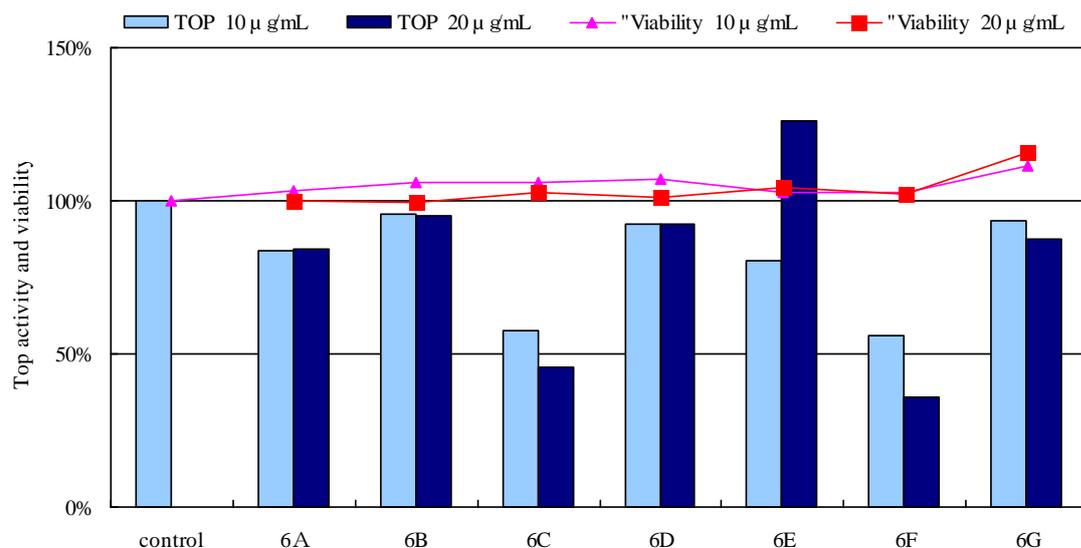


Figure 6-10. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.6A-6G

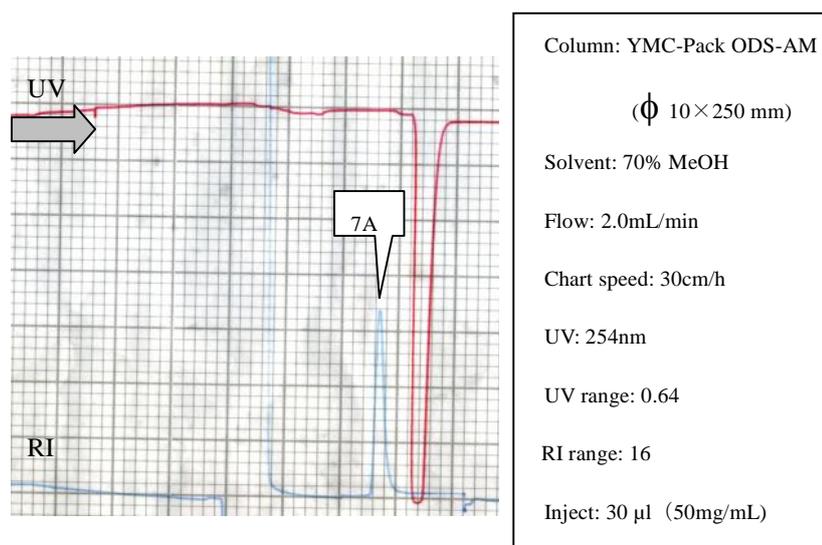


Figure 6-11. HPLC chromatogram of Fr.7A-7C

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

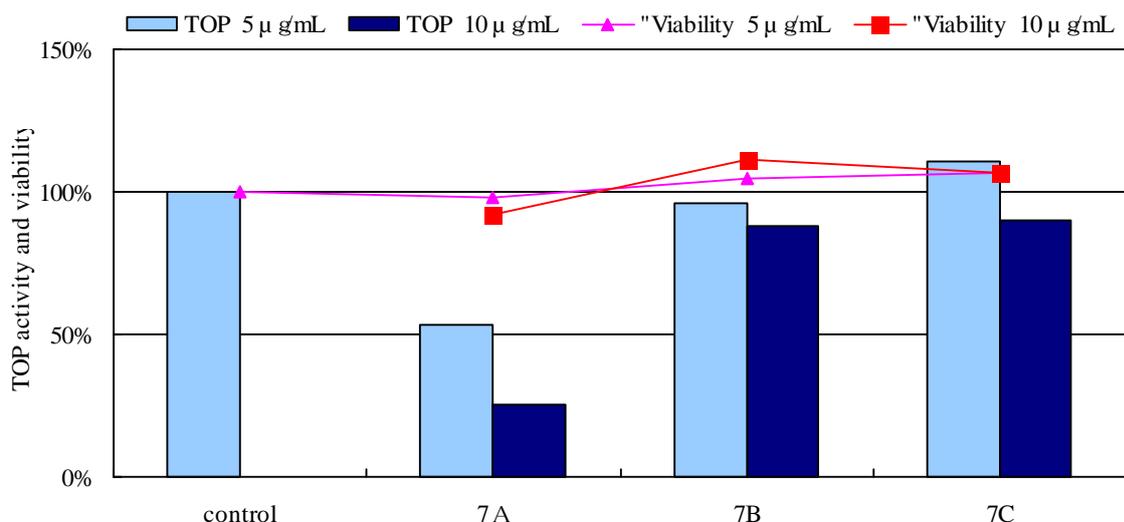


Figure 6-12. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.7A-7C

最後に、活性を有していた Fr. 6C をヘキササン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い、Fr. 8 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 8E に認められた(Figure 6-13)。そこで、活性の認められた Fr. 8E をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 9 シリーズを得た。また、Fr. 9C より化合物 **9** を得た(Figure 6-14)。Fr. 7 シリーズの活性評価を行ったところ、活性は Fr. 9C に認められた(Figure 6-15)。

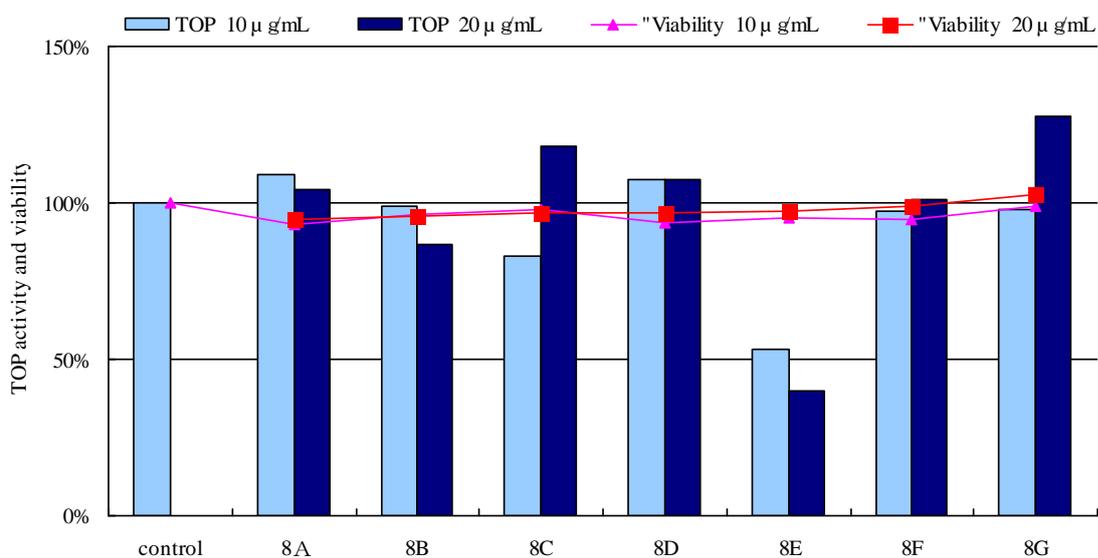


Figure 6-13. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.8A-8G

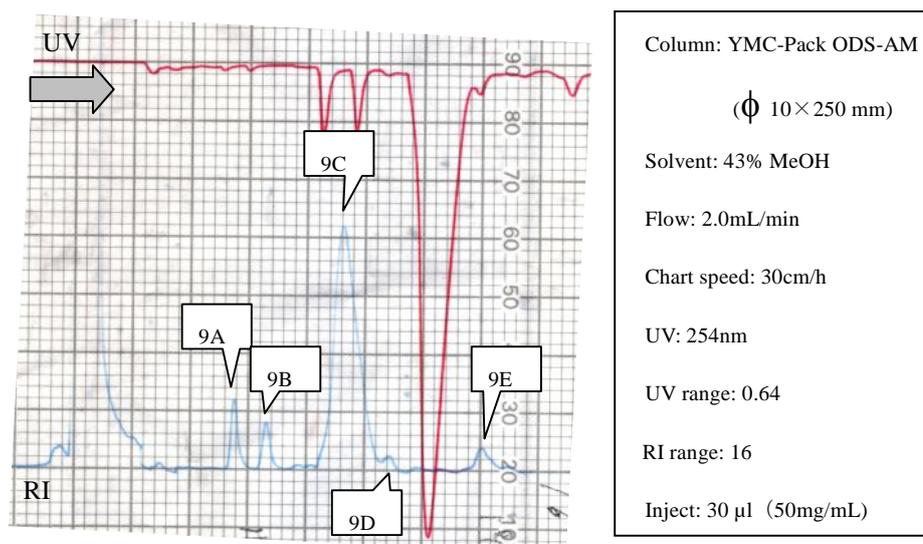


Figure 6-14. HPLC chromatogram of Fr.9A-9E

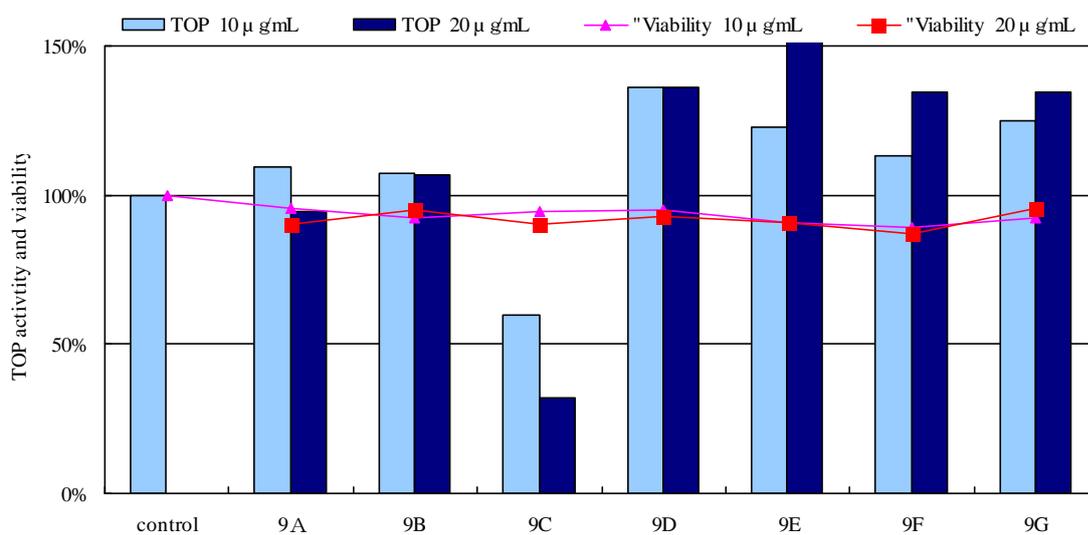


Figure 6-15. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.9A-9G

## 第 6 章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

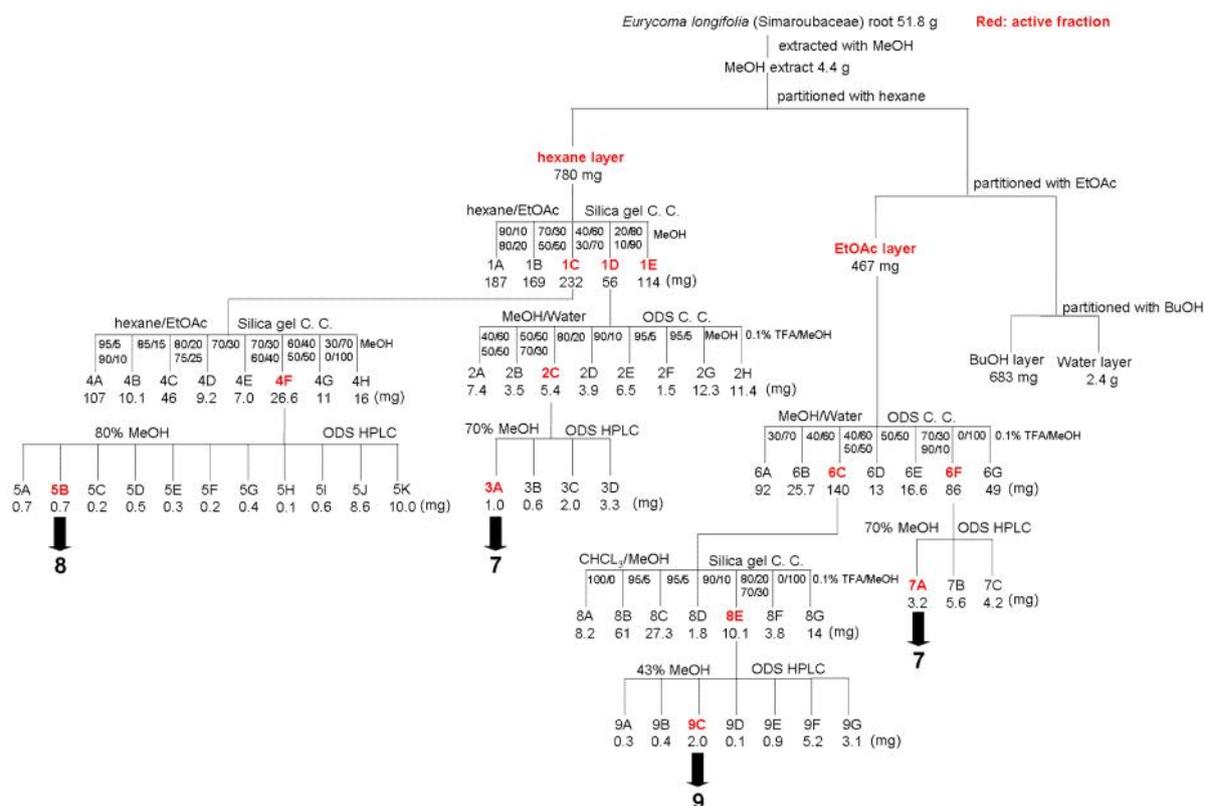


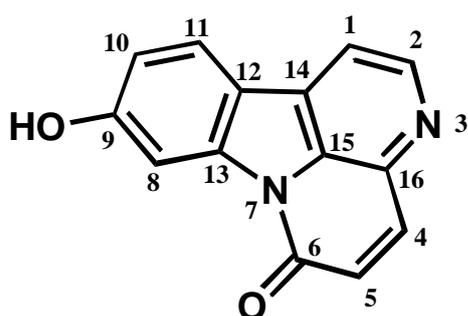
Figure 6-16. Isolation chart of *Eurycoma longifolia*

第2節 単離した化合物の構造解析と同定

*Eurycoma longifolia* から単離した化合物 **7-9** の構造解析を行った。化合物 **7** は黄色の非結晶固体として得られ、ESIMS スペクトル( $m/z$  235 [M-H]<sup>-</sup>) 及び <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR より分子式を C<sub>14</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と決定した。<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR の文献値<sup>[4]</sup>との比較により, 9-hydroxycanthin-6-one (**7**) と同定した(Table 6-1).

	Fr. 3A in DMSO-d6	Fr. 3A in DMSO-d6	9-hydroxycanthin-6-one in DMSO-d6 <sup>(a)</sup>	9-hydroxycanthin-6-one in DMSO-d6 <sup>(a)</sup>
position	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1	114.3	8.16 d (5.0)	114.3	8.15 d (5.0)
2	146.0	8.75 d (5.0)	145.9	8.75 d (5.0)
4	140.0	8.09 d (10)	140.0	8.08 d (10)
5	128.3	6.93 d (10)	128.3	6.93 d (10)
6	159.0		158.9	
8	104.5	8.13 d (2.5)	104.5	8.12 d (2.0)
9	159.8		159.7	
10	116.7	7.27 dd (9, 2.5)	116.5	7.27 dd (8, 2.0)
11	124.6	8.23 d (9)	124.4	8.23 d (8)
12	118.3		118.2	
13	140.0		139.9	
14	129.5		129.3	
15	132.0		131.8	
16	135.4		135.3	
1'	101.0	5.02 d (8.0)	101.0	5.02 d (8.0)
2'	73.3		73.2	
3'	77.3		77.2	
4'	69.5		69.5	
5'	76.5		76.5	
6'	60.5		60.5	

Table 6-1. NMR spectroscopic data for 9-hydroxycanthin-6-one (**7**)

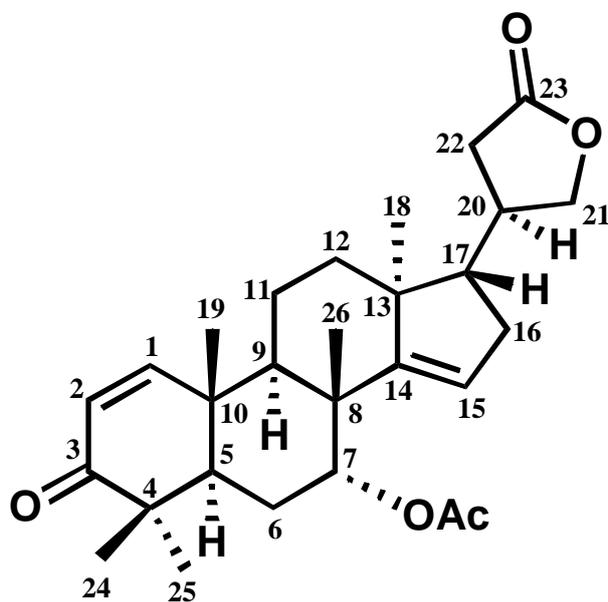


9-hydroxycanthin-6-one (**7**)

## 第 6 章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **8** は白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  477  $[M+Na]^+$ )  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{28}H_{38}O_5$  と決定した,  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[5]</sup>との比較により, 20, 21, 22, 23-tetrahydro-23-oxoazadirone (**8**)と同定した(Table 6-2).

	Fr. 5B in $CDCl_3$	Fr. 5B in $CDCl_3$	20, 21, 22, 23-tetrahydro-23-oxoazadirone in $CDCl_3$ <sup>[5]</sup>	20, 21, 22, 23-tetrahydro-23-oxoazadirone in $CDCl_3$ <sup>[5]</sup>
position	$\delta C$ (J in Hz)	$\delta H$ (J in Hz)	$\delta C$ (J in Hz)	$\delta H$ (J in Hz)
1	157.8	7.14 d (11)	157.8	7.14 d (12)
2	125.6	5.86 d (11)	125.6	5.86 d (12)
3	204.5		204.5	
4	44.1		44.1	
5	46.6		46.6	
6	23.7		23.7	
7	74.4	5.24 m	74.4	5.24 m
8	42.7		42.7	
9	38.2		38.3	
10	39.8		39.9	
11	16.4		16.4	
12	33.8		33.8	
13	46.2		46.2	
14	158.8		158.7	
15	118.9	5.30 m	118.9	5.30 m
16	34.8		34.8	
17	58.2		58.2	
18	19.9	1.02 s	19.9	1.02 s
19	19.0	1.18 s	19.0	1.18 s
20	37.5	2.73 m	37.5	2.73 m
21	72.4	3.93 t (9.2), 4.47 t (9.2)	72.4	3.93 t (9.0), 4.47 t (9.0)
22	34.0	2.52 dd (17, 8)	34.0	2.52 dd (16, 8)
23	177.0		177.0	
24	27.0	1.08 s	27.0	1.08 s
25	21.1	1.09 s	21.1	1.08 s
26	27.4	1.10 s	27.4	1.10 s
$OCOCH_3$	21.3	1.95 s	21.3	1.95 s
$OCOCH_3$	170		170	



20, 21, 22, 23-tetrahydro-23-oxoazadirone (**8**)

[  $\delta$  ]<sup>26.6</sup>-29.7 ( $CHCl_3$ ;  $c$  0.02)

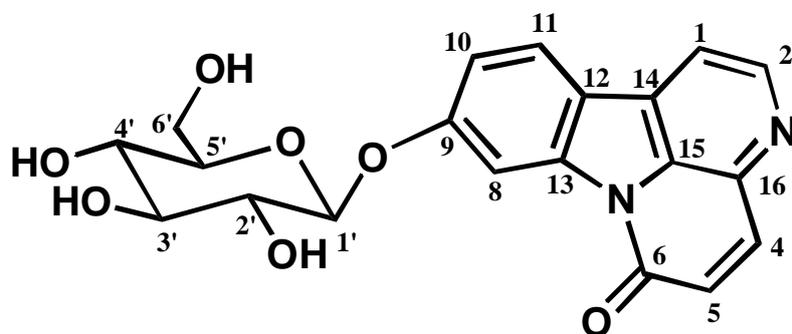
[  $\delta$  ] -15.0 ( $CHCl_3$ ;  $c$  0.02) <sup>[5]</sup>

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **9** は黄色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  399  $[M+H]^+$ )及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{20}H_{18}N_2O_7$  と決定した.  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[6]</sup>との比較により, canthin-6-one-O- $\beta$ -glucopyranoside (**9**)と同定した(Table 6-3). なお, dl 体の決定は行っていない.

position	Fr. 9C in DMSO-d6	Fr. 9C in DMSO-d6	canthin-6-one-O- $\beta$ -glucopyranoside in DMSO-d6 <sup>[6]</sup>	canthin-6-one-O- $\beta$ -glucopyranoside in DMSO-d6 <sup>[6]</sup>
	C (J in Hz)	H (J in Hz)	C (J in Hz)	H (J in Hz)
1	114.3	8.16 d (5.0)	114.3	8.15 d (5.0)
2	146.0	8.75 d (5.0)	145.9	8.75 d (5.0)
4	140.0	8.09 d (9.6)	139.9	8.08 d (9.8)
5	128.3	6.93 d (9.6)	128.2	6.93 d (9.8)
6	159.0		158.9	
8	104.5	8.13 d (1.8)	104.5	8.12 d (2.0)
9	159.8		159.7	
10	116.7	7.27 dd (8.7, 1.8)	116.5	7.27 dd (8.6, 2.0)
11	124.6	8.25 d (8.7)	124.4	8.23 d (8.6)
12	118.3		118.2	
13	140.0		139.9	
14	129.5		129.3	
15	132.0		131.8	
16	135.4		135.3	
1'	101.0	5.00 d (7.8)	101.0	5.02 d (8.0)
2'	73.3		73.2	
3'	77.3		77.2	
4'	69.5		69.5	
5'	76.5		76.5	
6'	60.5		60.5	

Table 6-3. NMR spectroscopic data for canthin-6-one 9-O- $\beta$ -glucopyranoside (**9**)



$$[\alpha]^{19.4} + 8.3 \text{ (DMSO; } c0.5)$$

canthin-6-one-O- $\beta$ -glucopyranoside (**9**)

第3節 単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価

*Eurycoma longifolia* から単離した化合物 **7-9** について TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性を評価したところ、化合物 **7-9** は TOP 活性の低下が認められ、FOP 活性に変化は認められなかった。したがって、化合物 **7-9** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性を阻害させることが示唆された (Figure 6-17)。

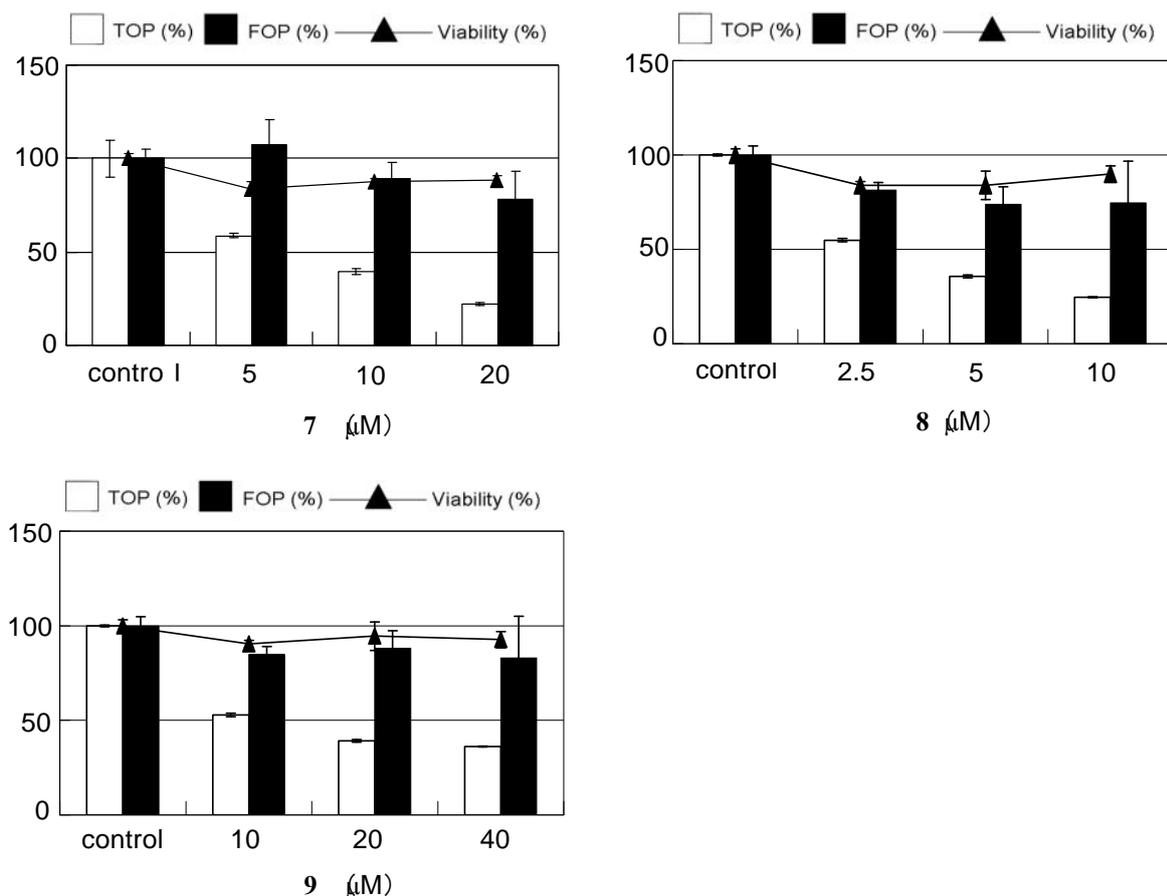


Figure 6-17. **7-9** inhibited TCF/  $\beta$ -catenin transcriptional activity. Luciferase activity for TOP and FOP activities were evaluated in STF/293 cells and 293T cells, respectively. Viability was evaluated using STF/293

Compound	TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity IC <sub>50</sub> (μM)
<b>7</b>	<b>6.8</b>
<b>8</b>	<b>3.0</b>
<b>9</b>	<b>11.6</b>

Table 6-4. IC<sub>50</sub> values of for the TCF/  $\beta$ -catenin transcriptional activity activities of **7-9**

### 第4節 単離した化合物のがん細胞に対する細胞毒性の評価

*Eurycoma longifolia* から単離した化合物 **7-9** について大腸がん細胞に対する細胞毒性を評価した。細胞毒性の評価には大腸がん細胞である SW480, DLD1, HCT116 及び RKO 細胞を用いた。SW480 及び DLD1 細胞は APC に変異を有し<sup>[7]</sup>, HCT116 細胞はβ-catenin に変異を有することが知られている<sup>[8]</sup>。したがって、これらの大腸がん細胞を Wnt 依存性の大腸がん細胞とした。また、大腸がん細胞に対する細胞毒性の選択性を調べるために、Wnt シグナルの働きに依存せずに細胞増殖をする RKO 細胞を用いた<sup>[9]</sup>。また、この細胞を Wnt 非依存性の大腸がん細胞とした。さらに、正常細胞である HEK293 及び HE293T 細胞に対する細胞毒性も同時に評価した。

化合物 **7** 及び **8** は正常細胞由来の細胞や Wnt 非依存性の大腸癌細胞と比較して Wnt 依存性の大腸癌細胞に対して強い毒性を示した。また、化合物 **7** と **8** は SW480 により強い毒性を示した(Table 6-5)。

第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

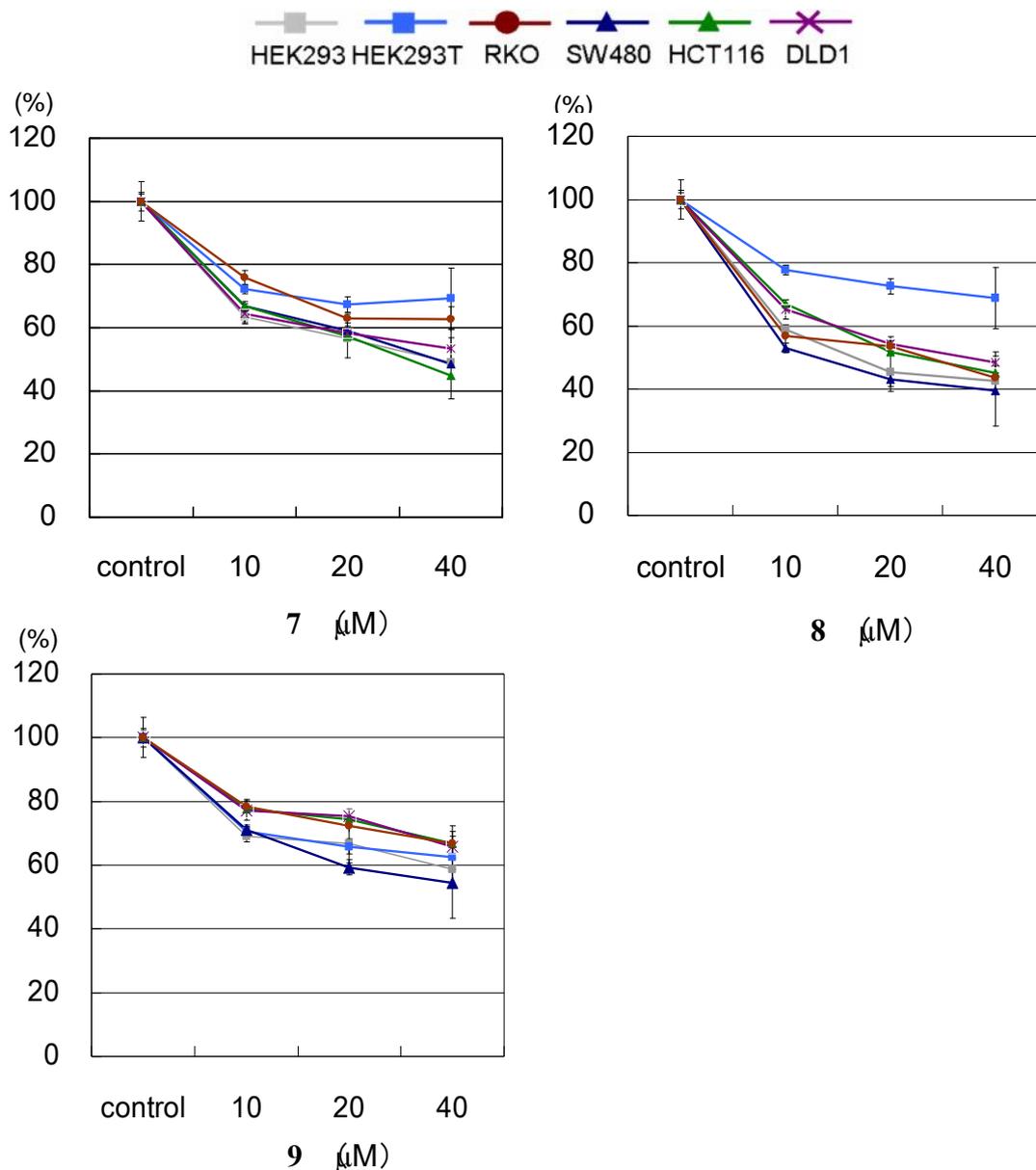


Figure 6-18. Cytotoxicities of 7-9 against non-cancer cells (HEK293, HEK293T) and cancer cells (SW480, SW480, HCT116, RKO)

Compound	(IC <sub>50</sub> μM)					
	non-cancer cells (human embryonic kidney cells)		colon cancer cells (human)			
	HEK293	HEK293T	Wnt-independent		Wnt-dependent	
		RKO	SW480	HCT116	DLD1	
7	36.7	>40	>40	17.4	30.0	>40
8	31.2	>40	26.4	11.2	24.4	31.7
9	36.7	>40	>40	>40	>40	>40

Table 6-5. IC<sub>50</sub> values of for the cytotoxicities of 7-9

第5節 化合物7の Wnt シグナルに対する阻害作用の解析

第1項 ウェスタンブロットによる化合物5の Wnt シグナルに対する阻害作用の評価

化合物7はヒト肺がん細胞に対する細胞毒性や抗マラリア活性が報告されているが<sup>[10]</sup>, 他の生物活性や細胞内シグナルに対する作用は報告されていない. そこで, TCF/ $\beta$ -catenin 転写阻害活性を示した化合物7について Wnt シグナルに対する作用を詳細に解析した, Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の転写活性化因子である $\beta$ -catenin により調節されていることが報告されている. そこで, 化合物7についての $\beta$ -catenin に対する作用をウェスタンブロット法を用いて解析した. その結果, 化合物7は細胞全体や細胞質, 核内において $\beta$ -catenin を減少させた(Figure 6-19).

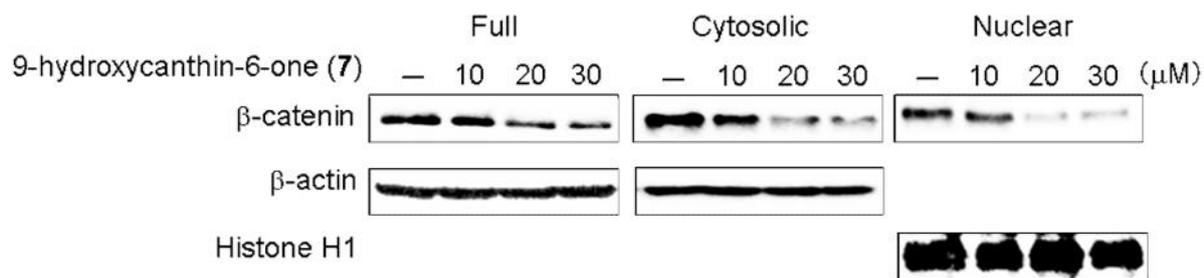


Figure 6-19. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) decreased  $\beta$ -catenin in SW480 cells.

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

$\beta$ -catenin は -catenin は casein kinase 1 (CK1) により ser45 の(S45)リン酸化を受け、さらに、glycogen synthase kinase 3 (GSK3) により ser33, ser37, Thr41(T41/S37/S33)のリン酸化を受けることで、ユビキチン-プロテアソーム系にて分解されることが知られている<sup>[11]</sup>。そこで、化合物 7 の CK1 や GSK3 による -catenin のリン酸化や CK1 や GSK3 に対する作用を調べた。

化合物 7 は -catenin を減少させ、GSK3 によりリン酸化された、-catenin である p- $\beta$ -catenin1(T41/S37/S33)を増加させた。一方で、CK1 によりリン酸化された -catenin である p- $\beta$ -catenin(S45)を変化させなかった。また、CK1 及び GSK3 の発現も変化させなかった。これらの結果から化合物 7 は GSK3 を活性化させていると考えられた(Figure 6-20)。

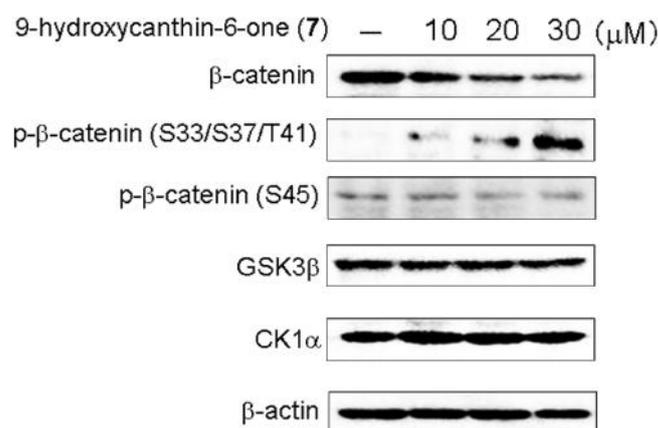


Figure 6-20. Effects of 9-hydroxycanthin-6-one (7) on the expression of -catenin, p- $\beta$ -catenin, GSK3 and CK1 in SW480 cells.

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **7** は GSK3 を活性化させることで、Wnt シグナルを阻害していると考えられた。そこで、GSK3 を siRNA を用いてノックダウンした後、化合物 **7** を作用させることで、Wnt シグナルに対する作用を調べた。

Control siRNA 処理群では、化合物 **7** は  $\beta$ -catenin を減少させ、p- $\beta$ -catenin(T41/S37/S33) を増加させた。さらに、リン酸化 GSK3 である p-GSK3 (ser9(S9)) を減少させた。GSK3 はリン酸化されたものは不活性化状態であるため、 $\beta$ -catenin を分解することができない<sup>[12]</sup> (Figure 5-22)。しかしながら、化合物 **7** により p-GSK3 (S9) を減少させ、かつ GSK3 の発現量を変化させていないため、活性型の GSK3 (非リン酸化 GSK3) が増加していると考えられる。一方で、Control siRNA 処理群では、化合物 **7** は  $\beta$ -catenin を減少させなかった。これらの結果から、化合物 **7** は GSK3 の活性化を介して、 $\beta$ -catenin のリン酸化及び分解を促進し、その結果、Wnt シグナルを阻害していることが示唆された(Figure 6-21)。

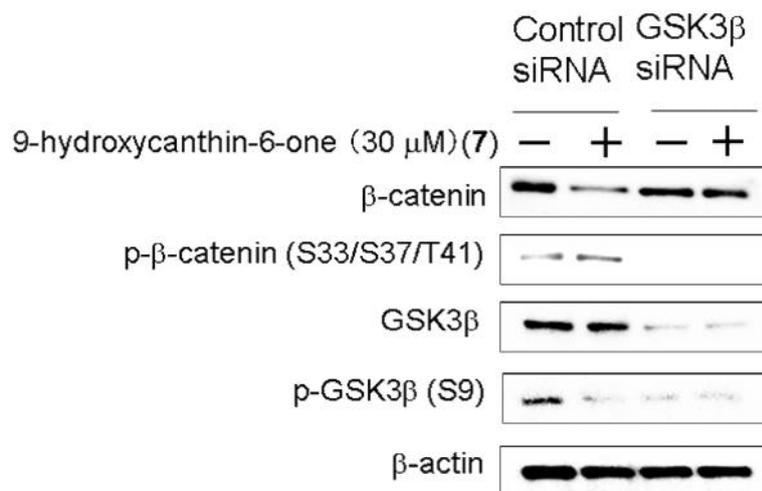


Figure 6-21. SW480 cells were transfected with control siRNA or GSK3 $\beta$  siRNA for 24 h, and then incubated with 9-hydroxycanthin-6-one (**5**)

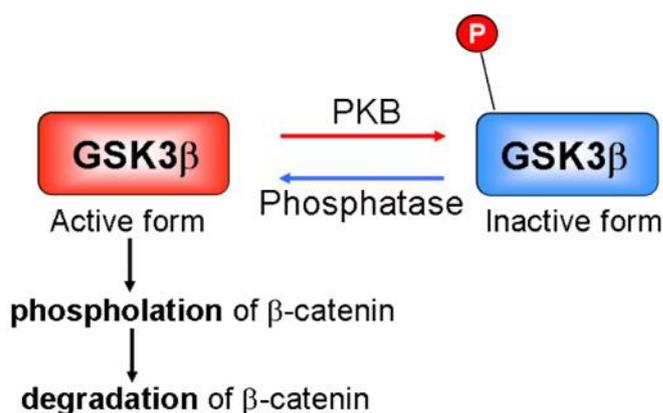


Figure 6-22. Activity of GSK3β is regulated by PKB and phosphatase. Non-phospholated GSK3 (active form) induces phospholation and degradation of β-catenin.

現在の知見によると β-catenin の分解は CK1 による ser45 のリン酸化および GSK3 による ser33, ser37, Thr41 のリン酸化が必要であると考えられている<sup>[11]</sup>。しかし、化合物 7 は ser45 のリン酸化を増加させず、ser33, ser37, Thr41 のリン酸化を増加させて β-catenin の分解を促進させている。また、β-catenin の分解の際にユビキチン化に必要なリン酸化部位は、ser33, ser37 であることが報告されている<sup>[13]</sup>。したがって、CK1 に依存しない機構の存在が考えられる。この結果から、β-catenin の分解機構として、CK1 のリン酸化に依存せずに GSK3 を介した機構の存在が考えられた。

そこで、CK1 を siRNA を用いてノックダウンした後、化合物 7 を作用させ、解析を行った。Control siRNA 処理群では、化合物 7 は β-catenin を減少させ、p-β-catenin(T41/S37/S33)を増加させた。一方で、CK1 によりリン酸化された β-catenin である p-β-catenin(S45)を変化させなかった。また、CK1 及び GSK3 の発現も変化させなかった。CK1 siRNA 処理群では、Control siRNA 処理群と同様に、化合物 7 は β-catenin を減少させ、(T41/S37/S33)を増加させた。また、p-GSK3 (S9)に変化は認められなかった。これは CK1 が GSK3 の活性の制御には関与していないことが考えられる。

以上の結果から、化合物 7 は CK1 非依存的に GSK3 の活性化を介して、Wnt シグナルを阻害していることが示唆された(Figure 6-23)。このような作用を持つ化合物は現在のところ報告されていない、また、CK1 非依存的に β-catenin を分解する機構についても報告されておらず、今後は CK1 をノックダウンあるいはノックアウトした状態において GSK3 の過剰発現あるいは活性化状態にさせ、β-catenin を分解が誘導されるのかどうか

調べる必要があると考えられる。

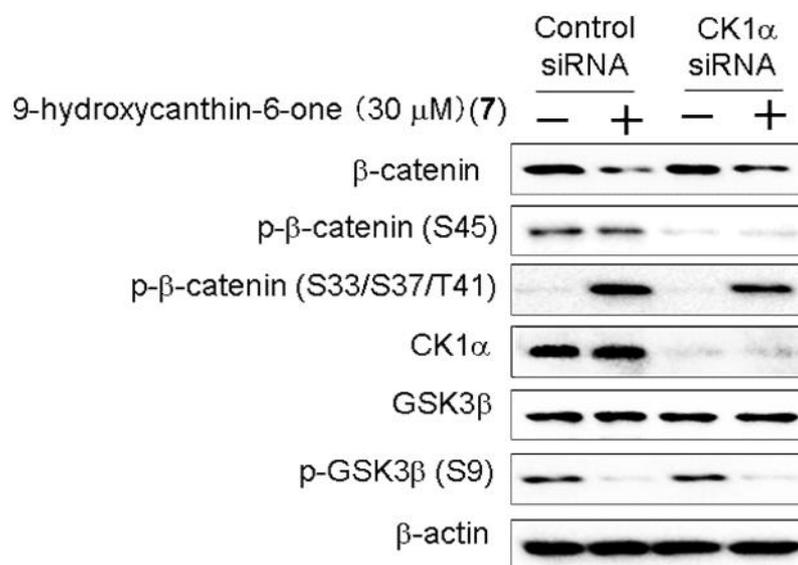


Figure 6-23. SW480 cells were transfected with control siRNA or CK1 siRNA for 24 h, and then incubated with 9-hydroxycanthin-6-one (7)

### 第6節 化合物7のゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルに対する阻害作用の解析

#### 第1項 化合物7のゼブラフィッシュに対するフェノタイプの評価

化合物7が *in vitro* において、Wnt シグナルに対して阻害作用を示したことから、ゼブラフィッシュを用いて、*in vivo* における Wnt シグナルに対する作用を調べた。まず、化合物7がゼブラフィッシュに対してどのようなフェノタイプ（表現型）を誘導させるのか調べた。このフェノタイプを解析することで、化合物7が作用している Wnt シグナルに関連した遺伝子を調べることにした。

ゼブラフィッシュにおいて、Wnt シグナルに関連した様々なフェノタイプの変化が報告されており、例えば、中脳後脳境界（MHB: mid-hindbrain boundary）は中脳及び後脳の発生を制御している組織である。例えば、野生型の個体では中脳後脳境界(黄色点線部分)が認められるが<sup>[14]</sup>、Wnt1 及び Wnt10b が欠損した個体に対してさらに、Wnt3a をノックダウンすると、中脳後脳境界の形成不全が認められることが報告されている<sup>[15]</sup>(Figure 6-24)。

また、ゼブラフィッシュにおける色素細胞の分化は *microphthalmia-associated transcription factor (mitf)* により制御されており、この遺伝子をモルフォリノ（たんぱく質の翻訳を阻害することでたんぱく質の発現を阻害するオリゴヌクレオチド）によりノックダウンすると色素細胞の分化が抑制されることが報告されている<sup>[16]</sup>(Figure 6-25)。

さらに、ゼブラフィッシュの尾部の正常な発達は体軸の形成との関連性あり。すなわち、尾部の発達に異常が認められると、体軸が正常に形成されていない可能性が高いと考えられる。また、体軸の形成には Wnt シグナルとの関連性が報告されており、Wnt5b の欠損体では尾部の屈曲（*pipetail* と呼ばれている）が認められることが報告されている<sup>[17]</sup>(Figure 6-26)。

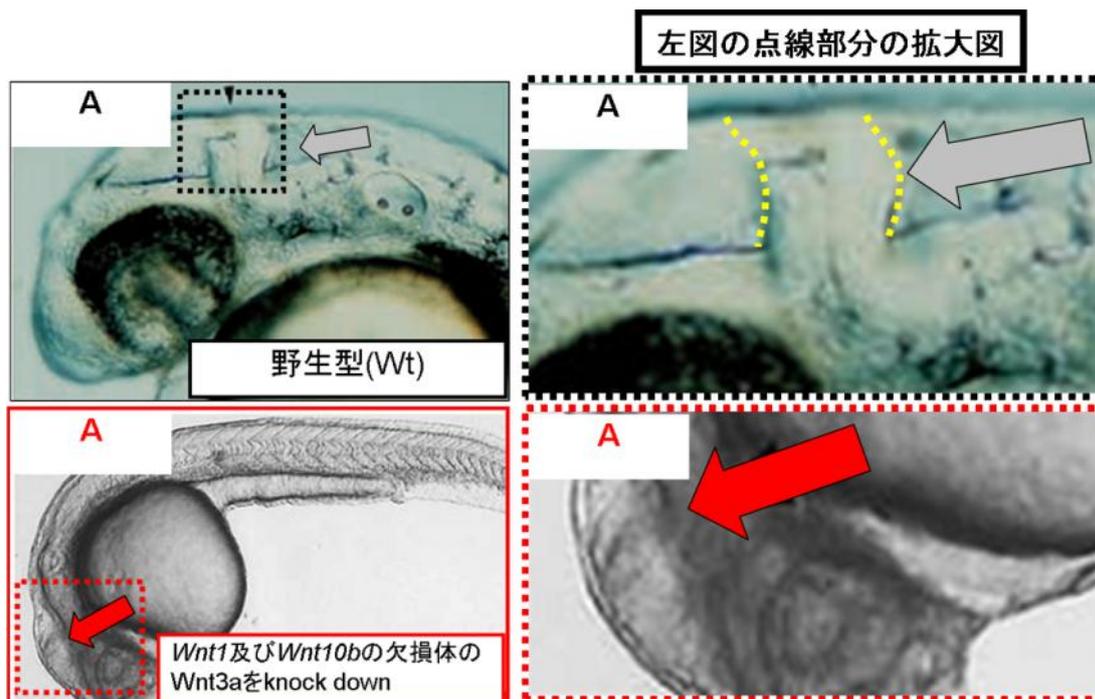


Figure 6-24. Loss of MHB in zebrafish embryos lacking *Wnt1*, *Wnt10b*, and *Wnt3a* <sup>[15]</sup>

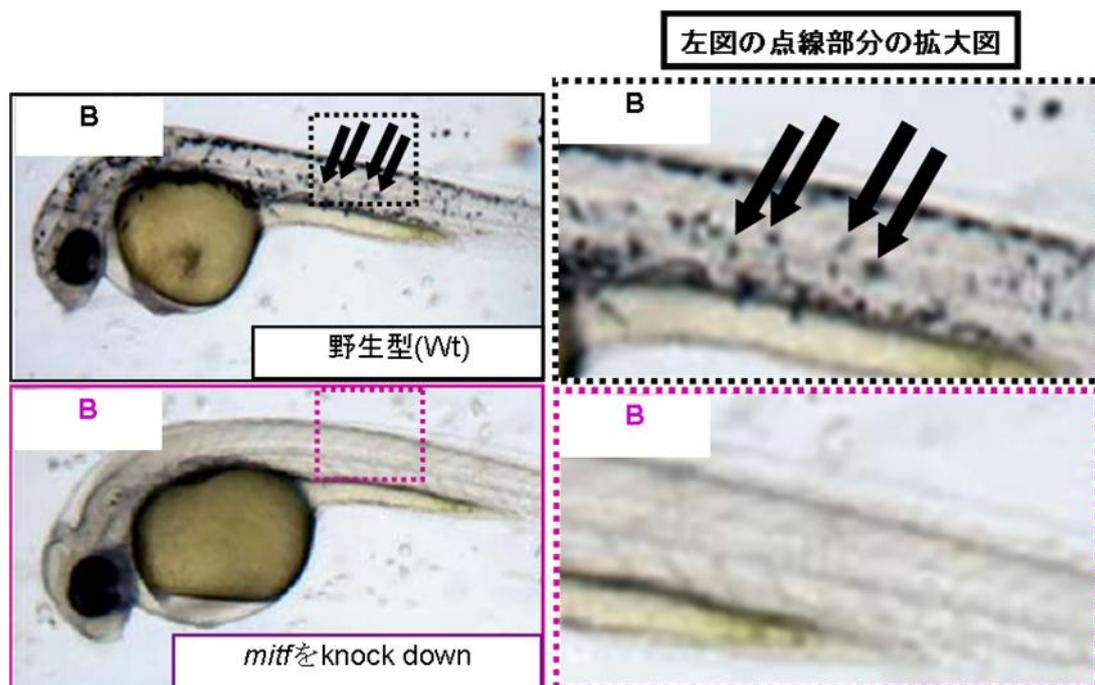


Figure 6-25. *Mitf* morpholino induced block on pigment-cells development in zebrafish embryos <sup>[16]</sup>.

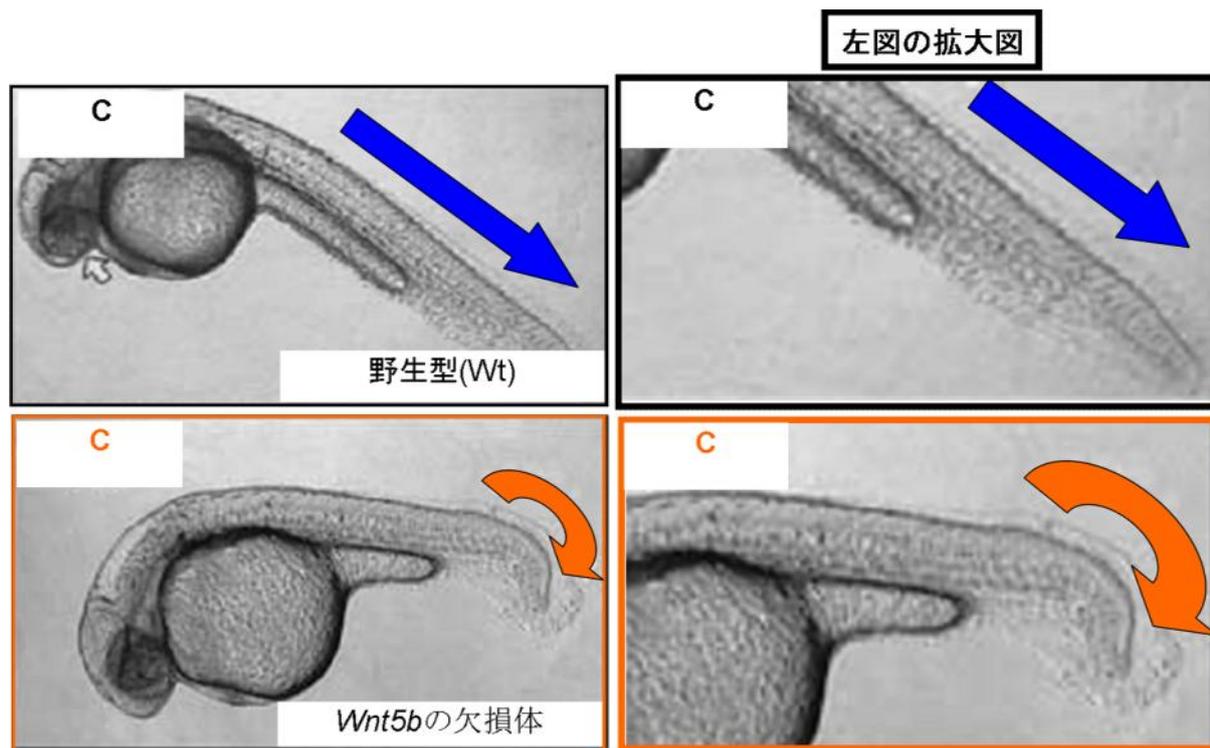


Figure 6-26. *Wnt5b* knocked-down embryos exhibited curled tail<sup>[16]</sup>.

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

Figure 6-24, 25, 26 のようなフェノタイプの変化が認められるどうか調べるため、化合物 **7** を受精 4 時間後に処理し、30 時間後に形態観察をおこなった。その結果、化合物 **7** により MHB の形成不全が認められた (Figure 6-27)。また、色素細胞が顕著に減少した (Figure 6-28)。さらに、尾部の屈曲が認められた (Figure 6-29)。なお実験は n=10 行いこれらのフェノタイプの変化は n=6 に認められた。これらのフェノタイプの変化は前述した Wnt シグナルに関連したフェノタイプの変化 (Figure 5. 24-26) と酷似していた、これらの結果から、化合物 **7** は Wnt シグナルに影響を与えていると考えられた。

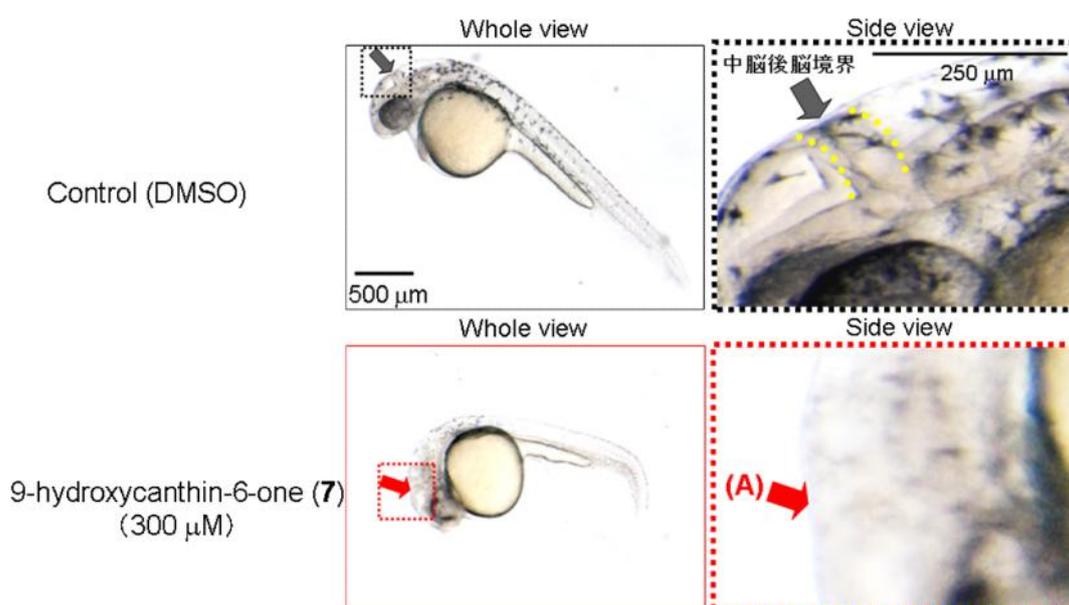


Figure 6-27. 9-Hydroxycanthin-6-one (**7**) exhibited malformations in 30 hours post fertilization (hpf) zebrafish embryos .

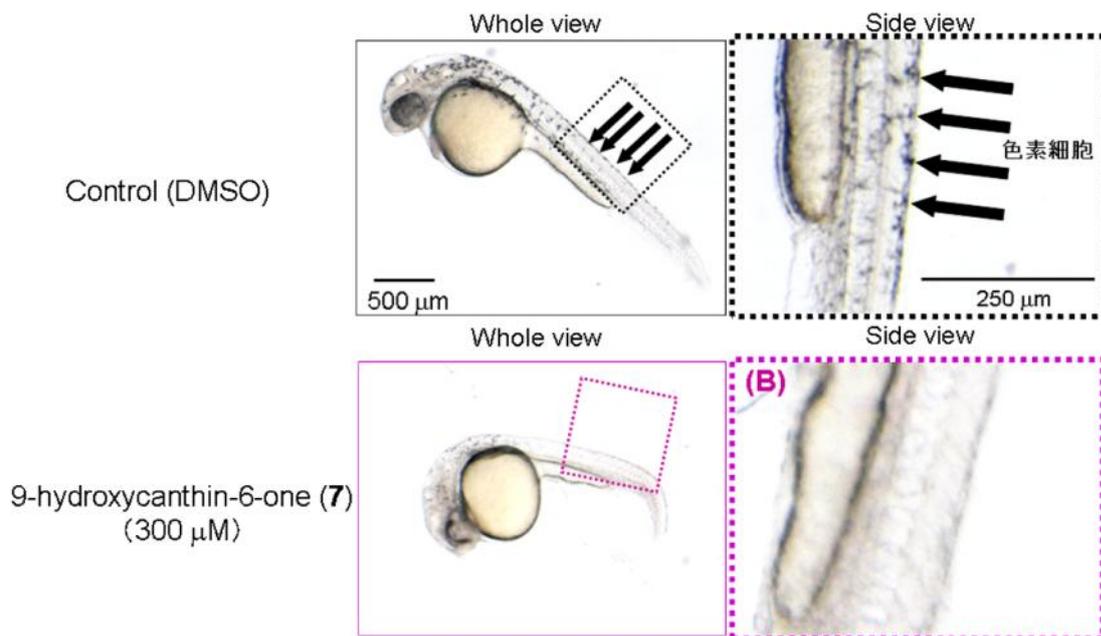


Figure 6-28. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) decreased pigment cells in 30 hpf zebrafish embryos .

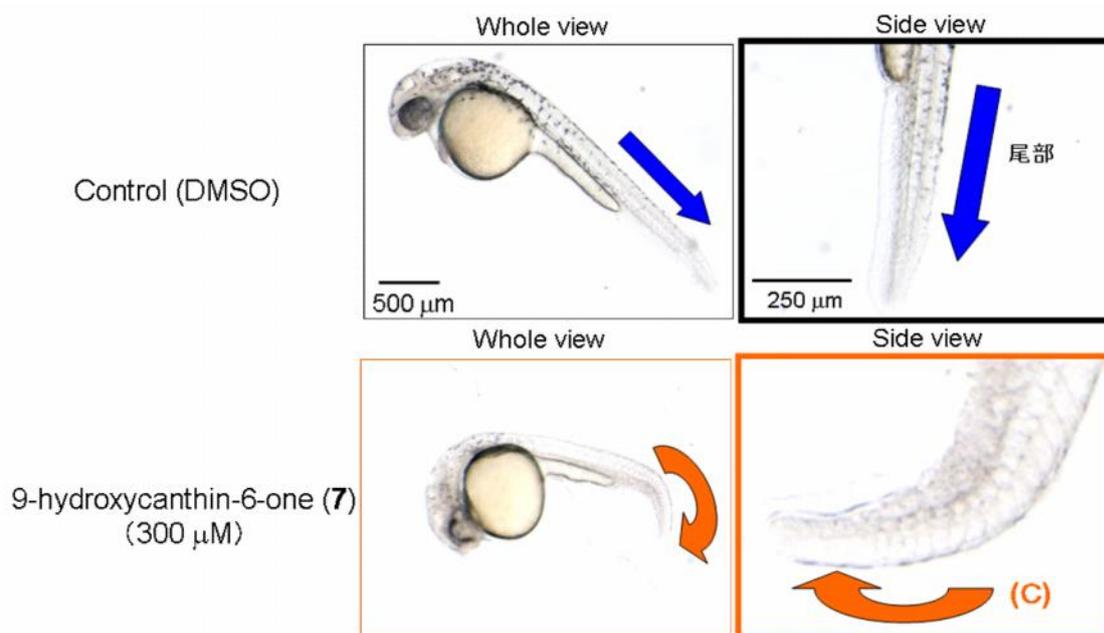


Figure 6-29. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) exhibited curled tail in 30 hpf zebrafish embryos.

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

MHB の形成不全が認められた結果から、化合物 **7** は MHB の形成に影響を与えていると考えられた。MHB の形成には Wnt1 及び Fgf8 が関与しており、MHB の形成不全を起こしている個体では MHB において Fgf8 の発現の減少が認められることが報告されている<sup>[18]</sup>。

そこで、Wnt1 及び Fgf8 の発現を *in situ* hybridization により調べた。なお、*in situ* hybridization については実験の部に記載した。また、化合物 **7** を受精 4 時間後から受精 27 時間後まで処理し、顕微鏡にて観察を行った。

Wnt1 の発現を検出した群では、化合物 **7** によりコントロール群の MHB (黒色矢印及び灰色の点線) と化合物処理群 (赤色矢印及び赤色の点線) を比較したところ、Wnt1 の発現に変化は認められなかった。一方で、コントロール群の rhombomere (この組織より後脳が形成される) は 7 つに分節しているが (灰色矢印)、化合物 **7** により背部において Wnt1 の発現範囲が拡大し、分節構造の形成不全が認められた (ピンク矢印)。また、Fgf8 の発現を検出した群では、化合物 **7** によりコントロール群の MHB (黒色矢印及び灰色の点線) と比較して、化合物処理群 (赤色矢印及び赤色の点線) を比較したところ、Fgf8 の発現範囲の拡大が認められた (Figure 6-30)。

これらの結果と Figure 6-27 で認められた化合物 **7** による MHB の形成不全との相関性は不明であるが、化合物 **7** は rhombomere の形成及び Wnt1 の発現に影響を与えている。また、rhombomere の形成には Wnt1 が関与していることが報告されている<sup>[19]</sup>。したがって、化合物 **7** が Wnt シグナルに作用している可能性が考えられた。

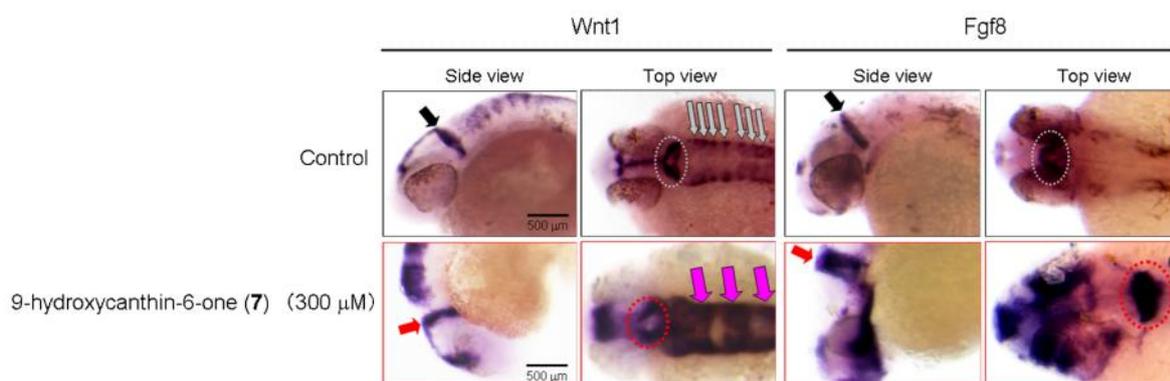


Figure 6-30. 9-Hydroxycanthin-6-one (**7**) expanded expression of Wnt1 and Fgf8 on MHB and in 27 hpf zebrafish embryos. Black and red arrows indicated MHB in the ventral side. Grey and red dashed circles indicated MHB in the dorsal side. Grey and pink arrows indicated rhombomere in the dorsal side.

### 第 2 項 化合物 7 の Wnt レポーターゼブラフィッシュに対する評価

化合物 7 により、フェノタイプの変化や MHB 及び rhombomere における Wnt1 の発現の変化が認められたことから、化合物 7 が Wnt シグナルに作用していることが考えられた。そこで、化合物 7 がゼブラフィッシュにおいて Wnt シグナルを阻害しているかどうか調べた。Wnt シグナルの阻害作用を評価するにあたり、Wnt レポーターラインを用いた。Wnt レポーターラインについては第 5 章第 5 節において述べた。

また Wnt レポーターラインを用いて、TOPdGFP 活性を評価するに当たり、化合物 5 による細胞毒性による、蛍光の減弱を防ぐため、*p53* モルフォリノ (MO: morpholino) <sup>[20]</sup>を用いた。モルフォリノはアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、標的たんぱく質の翻訳を防ぐことで、たんぱく質の発現を阻害する。すなわち、*p53*MO をゼブラフィッシュに導入することにより、細胞死 (アポトーシス) を防ぐことができるため、細胞毒性による蛍光の減弱の可能性を除くことができる。そこで、受精 0.75 時間後 (1 cell stage または 2 cell stage) にコントロール MO または *p53*MO を導入し、受精 4 時間後に化合物 7 を処理する。さらに、受精 24 時間後に蛍光顕微鏡にて TOPdGFP の観察を行った。さらに、TUNNEL 法を用いて、細胞死を検出し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。また、化合物 7 の処理時間を受精 10 時間後から受精 24 時間後までに変更した実験も同時に行った。

受精 4 時間後から受精 24 時間後まで処理したコントロール MO 処理群では、化合物 7 により TOPdGFP 活性の減少が認められ、細胞死 (赤いシグナル) の顕著な増加が認められた。一方で、*p53*MO 処理群では、TOPdGFP 活性の減少が認められたが、細胞死の増加は認められなかった。なお実験は n=10 で行い TOPdGFP 活性の減少は n=10 に認められた。(Figure 6-31)。

受精 4 時間後から受精 10 時間後まで処理したコントロール MO 処理群及び *p53*MO 処理群では化合物 7 により TOPdGFP 活性の減少が認められたが、細胞死の増加は認められなかった。なお実験は n=10 で行い TOPdGFP 活性の減少は n=10 に認められた。(Figure 6-32)。

以上の結果から化合物 7 はどちらの処理時間においても Wnt レポーターラインにおいて Wnt シグナルを阻害することが示唆された。

4 hpf-24 hpf

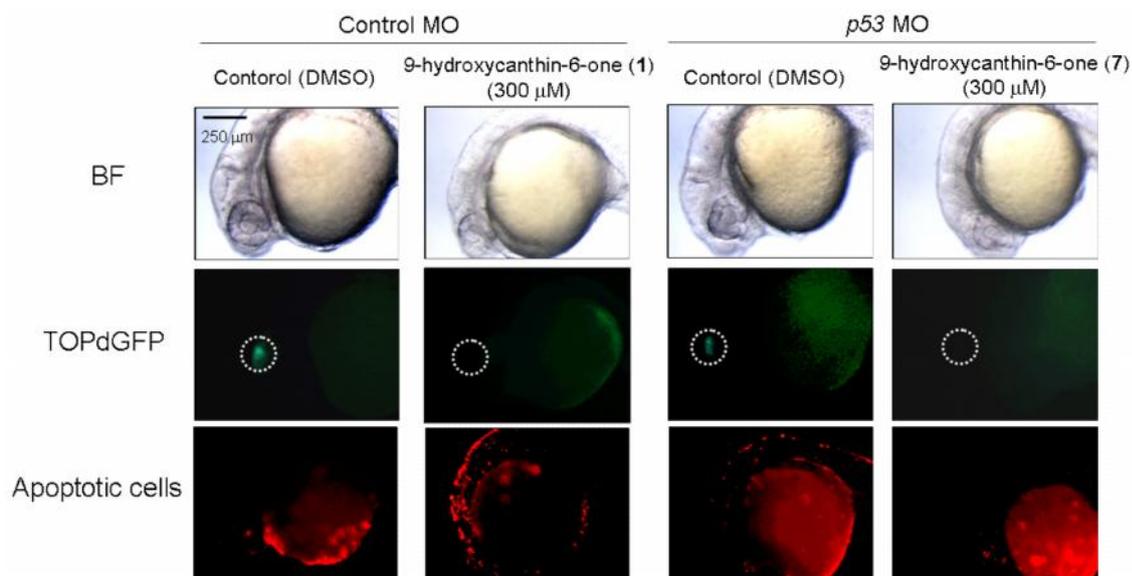


Figure 6-31. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) reduced TOPdGFP activity in 24 hpf TOPdGFP transgenic zebrafish embryos, which were co-injected with control MO or *p53* MO. White dashed circles in the middle panels indicated TOPdGFP visualized in the zebrafish midbrain

10 hpf-24 hpf

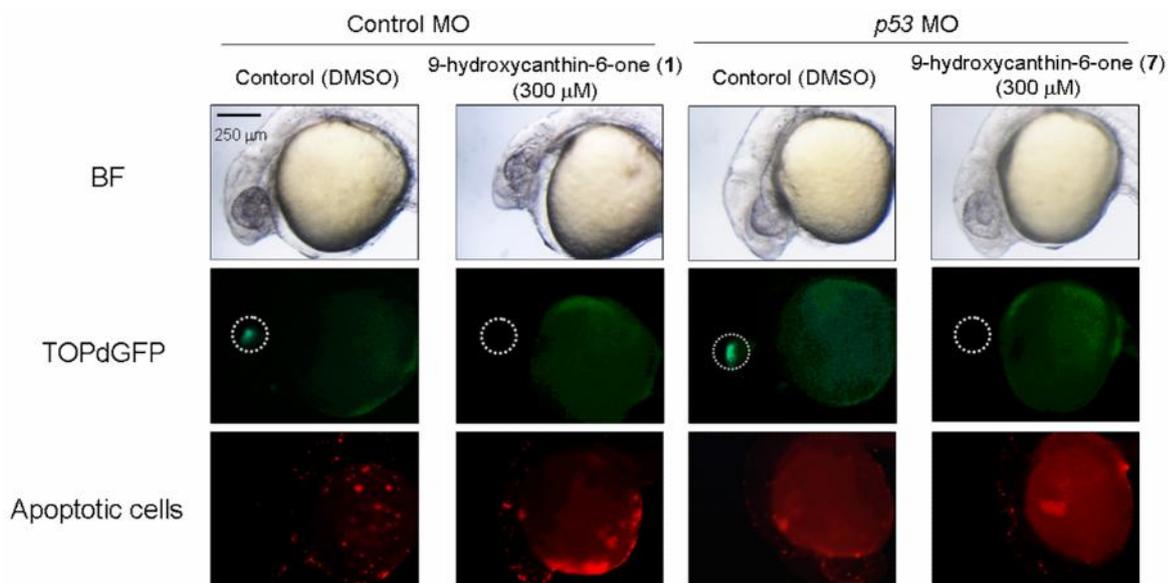


Figure 6-32. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) reduced TOPdGFP activity in 24 hpf TOPdGFP transgenic zebrafish embryos, which were co-injected with control MO or *p53* MO. White dashed circles in the middle panels indicated TOPdGFP visualized in the zebrafish midbrain

### 第3項 化合物7のゼブラフィッシュにおける Wnt シグナルの標的遺伝子の評価

化合物7が Wnt レポーターラインにおいて、Wnt シグナルを阻害したことから、化合物7が内在性の Wnt シグナルの標的遺伝子の発現を阻害しているかどうか調べた。ゼブラフィッシュにおいて、Wnt シグナルの標的遺伝子として *zic2a*<sup>[21]</sup>や *mitf*<sup>[22]</sup>が知られており、*zic2a* は中脳の発達に関与しており、中脳視蓋などに発現している。また、*mitf* は神経堤細胞から色素細胞への分化誘導を制御しており、神経堤細胞などに発現している。また、MHB の形成に関与している遺伝子である *pax2a* についても調べた。*pax2a* は Wnt シグナルの標的遺伝子であるかどうかは不明であるが、APC に変異を導入したゼブラフィッシュ胚において発現上昇が報告されている<sup>[23]</sup>。そこで、化合物7の処理により MHB における発現に変化が認められるかどうか調べた。

受精4時間後から受精24時間後まで化合物7を処理したところ、コントロール MO 処理群及び *p53MO* 処理群において、化合物7の処理により、*zic2a* の発現の減少が認められた (Figure 6-33)。なお、コントロール MO 処理群において、実験は n=11 で行い減少が認められたのは n=6 であり、*p53MO* 処理群において、実験は n=13 で行い減少が認められたのは n=7 であった。これらの結果は Wnt レポーターラインにおいて、Wnt シグナルの低下が認められた結果と相関がある結果であると考えられた。

また、コントロール MO 処理群及び *p53MO* 処理群において、化合物7の処理により背部側及び腹部側における神経堤細胞において、*mitf* の発現の減少が認められた (Figure 6-34)。なお、コントロール MO 処理群において、実験は n=14 で行い減少が認められたのは n=7 であり、*p53MO* 処理群において、実験は n=15 で行い減少が認められたのは n=9 であった。しかし、MHB において *pax2a* の発現に顕著な変化は認められなかった。したがって、化合物7の処理による MHB の形成不全は *pax2a* によらないものであると考えられる (Figure 6-35)。なお、コントロール MO 処理群及び *p53MO* 処理群において、実験は n=3 で行った。

以上の結果から化合物7はゼブラフィッシュにおいて Wnt シグナルの標的遺伝子の発現を阻害していることが示唆された。

化合物7の処理により尾部の屈曲が認められている (Figure 6-29)。この結果から原因遺伝子を特定することはできないが、体軸の形成を担っている遺伝子に関与していることが考えられる。

## 第 6 章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

現在のところ Wnt シグナルの標的遺伝子であり、かつ体軸形成に関与している遺伝子として *bozozok* という遺伝子が知られている<sup>[21]</sup>。この遺伝子に変異を有する個体は尾が短くなり脊索が消失する。しかしながら、化合物 **7** の処理により、脊索が消失は認められなかった。また、*bozozok* は受精後 3 時間後付近の発現を調査した報告は多数存在するが、受精後 24 時間後や 30 時間後等の発現を調査した報告は見られなかった。したがって、このフェノタイプの変化に関連した遺伝子の評価は検討中である。

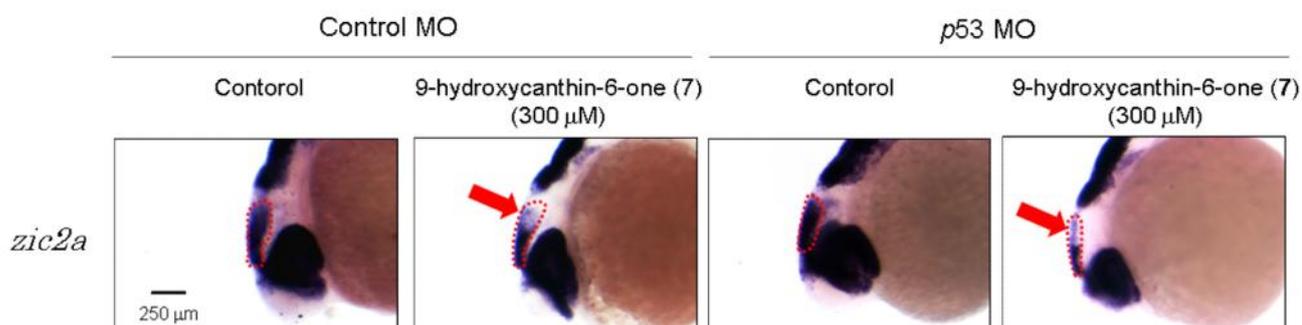


Figure 6-33. 9-Hydroxycanthin-6-one (**7**) reduced expression of *zic2a* in 24 hpf zebrafish embryos, which were co-injected with control MO or *p53* MO. Panels show whole mount *in situ* hybridization for *zic2a*. Red dashed lines indicate midbrain tectum. Red arrows indicate regions of reduction.

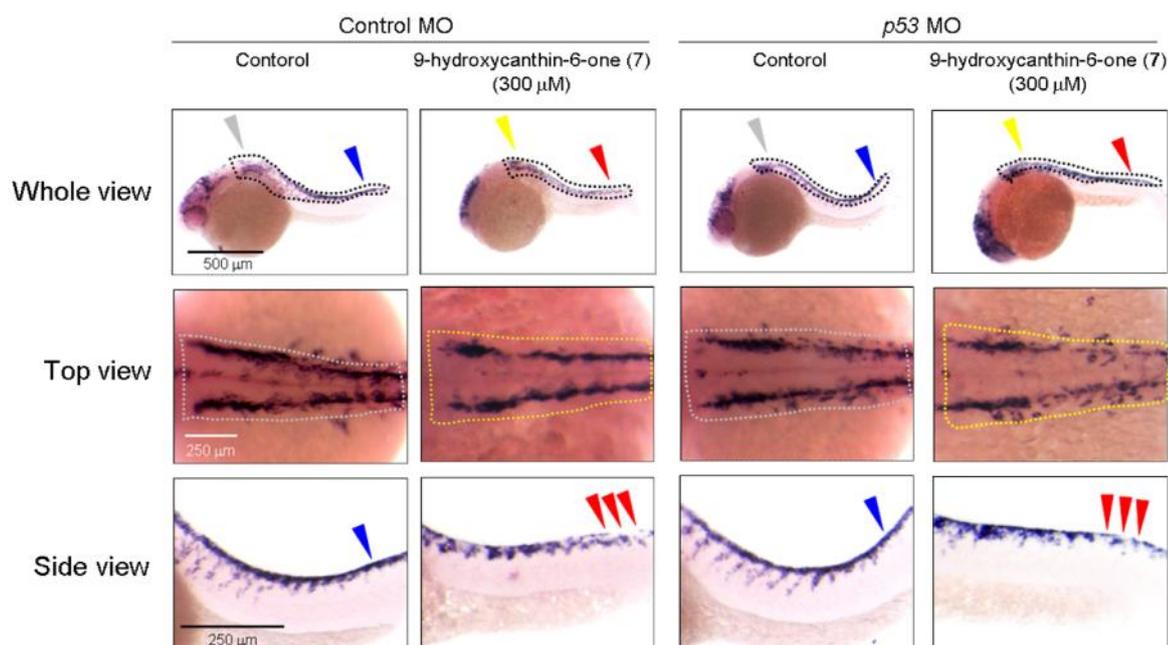


Figure 6-34. 9-Hydroxycanthin-6-one (**7**) reduced expression of *mitf* in 24 hpf zebrafish embryos which were co-injected with control MO or *p53* MO. Panels shows whole mount *in situ* hybridization for *mitf*. Black dashed lines in the top panels indicate neural-crest cells (NCCs). Gray and yellow dashed lines in the middle panels indicate NCCs in the dorsal side. Blue and red arrowheads in the bottom panels indicate NCCs in the ventral side. Yellow broken lines in middle panels and red arrows in bottom panels indicate regions of reduction.

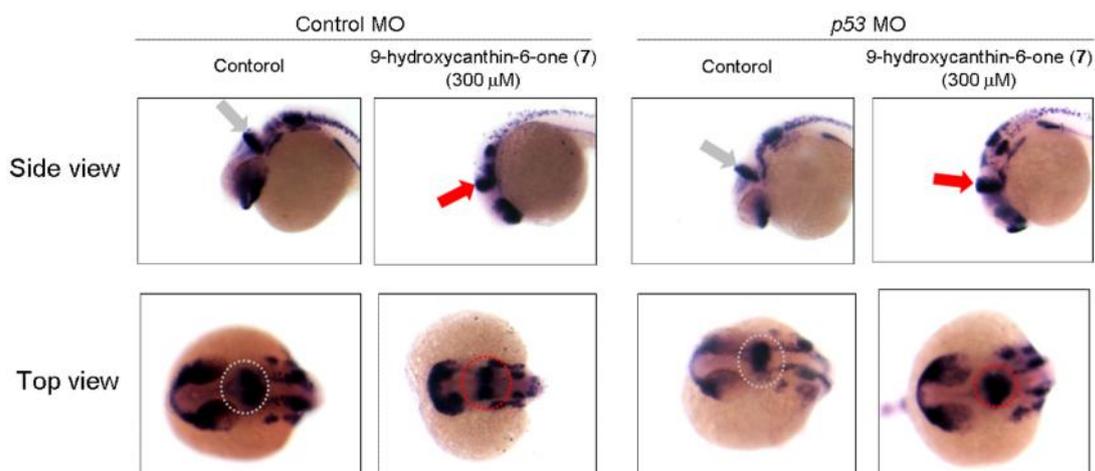


Figure 6-35. 9-Hydroxycanthin-6-one (**7**) remained unchanged expression of *pax2a* in 24 hpf zebrafish embryos, which were co-injected with control MO or *p53* MO. Panels show whole mount *in situ* hybridization for *pax2a*.

## 第6章 *Eurycoma longifolia* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

神経堤細胞から色素細胞への分化は以下の図のようなプロセスにより誘導される (Figure 6-36)。まず、神経板が陥没し神経溝が形成されると同時に、神経堤が形成される。さらに発生が進行すると、神経溝の両側が伸展し、筒状に閉塞され、神経管が形成される。この際、同時に神経堤細胞の遊走が開始される。遊走した細胞は色素細胞の他に、感覚神経や自律神経細胞等に分化する。前述したように、*mitf* は Wnt シグナルの標的遺伝子であり、*mitf* は神経堤細胞から色素細胞への分化誘導を制御している。また、化合物 7 により色素細胞の減少が認められ (Figure 6-28)、さらに、*mitf* の減少も認められた (Figure 6-34)。

これらの結果より、化合物 7 は *mitf* の発現を減少させることで、色素細胞への分化を抑制することが示唆された。

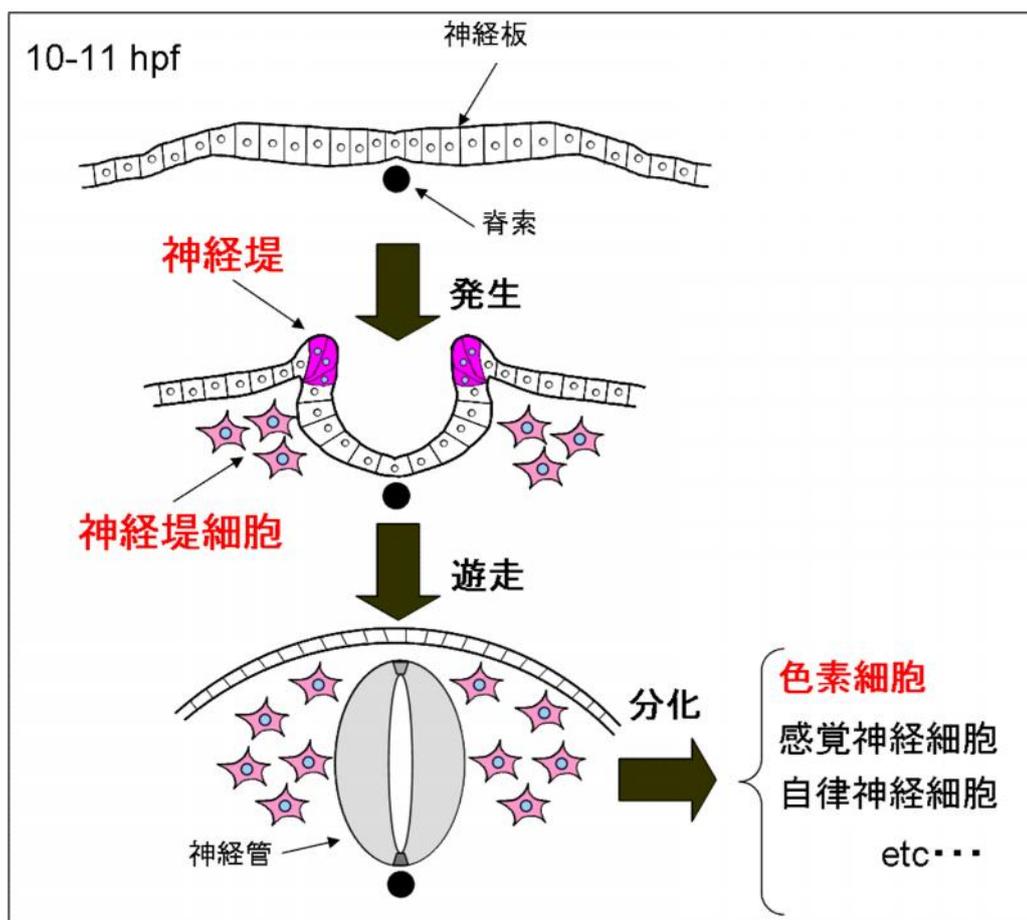


Figure 6-36. Model of differentiation of neural crest cells to pigment cells

### 第 4 項 化合物 5 のゼブラフィッシュにおける GSK3 に対する作用の評価

化合物 7 は Figure 6-21 において *in vitro* の作用を検討し、その結果、化合物 7 は GSK3 の活性化を介して、Wnt シグナルを阻害していることが示唆された。そこで、*in vivo* における作用を検討するために、ゼブラフィッシュを用いて検討を行った。

ゼブラフィッシュにおいて、Wnt シグナルを活性化させると認められるフェノタイプの変化の一つとして、眼の形成不全あるいは前脳の欠損等が知られており、例えば、*Axin* の変異体<sup>[22]</sup>や *TCF3* の変異体<sup>[23]</sup>や *Wnt8a* を過剰発現させた個体に認められる<sup>[24]</sup>。また、GSK3 阻害剤である BIO (6-bromindirubin-3'-oxime)を、ゼブラフィッシュに処理すると眼の形成不全を誘導させることが知られている。さらに、BIO と、Wnt シグナル阻害する化合物である ICG-001 を併用処理すると眼の形成不全が起こらず、目の形成の回復が観察される<sup>[25]</sup>。そこで、化合物 7 及び BIO を併用処理することで、眼の形成不全が回復するかどうか調べた。

その結果、BIO 単独処理では、眼の形成不全を誘導した、一方で、化合物 7 及び BIO 併用処理により眼の形成不全が認められなかった。すなわち眼の形成不全が回復した。なお、実験は n=13 で行い、比較的、大きく眼の形成不全を回復させたサンプルを *rescued eyes* とし、このフェノタイプが認められたサンプル数は n=7 であった。また、眼の形成不全の回復がマイルドであったサンプルを *slightly rescued eyes* とし、このフェノタイプが認められたサンプル数は n=6 であった (Figure 6-37)。これらの結果から、ゼブラフィッシュにおいて化合物 7 は GSK3 を介して Wnt シグナルを阻害していることが示唆された。また、これらの結果と *in vitro* において GSK3 の活性化を介して、Wnt シグナルを阻害していること Figure 6-21 で認められた結果を考慮すると化合物 7 は *in vitro* 及び *in vivo* において化合物 7 は GSK3 の活性化を介して Wnt シグナルを阻害していることが示唆された。

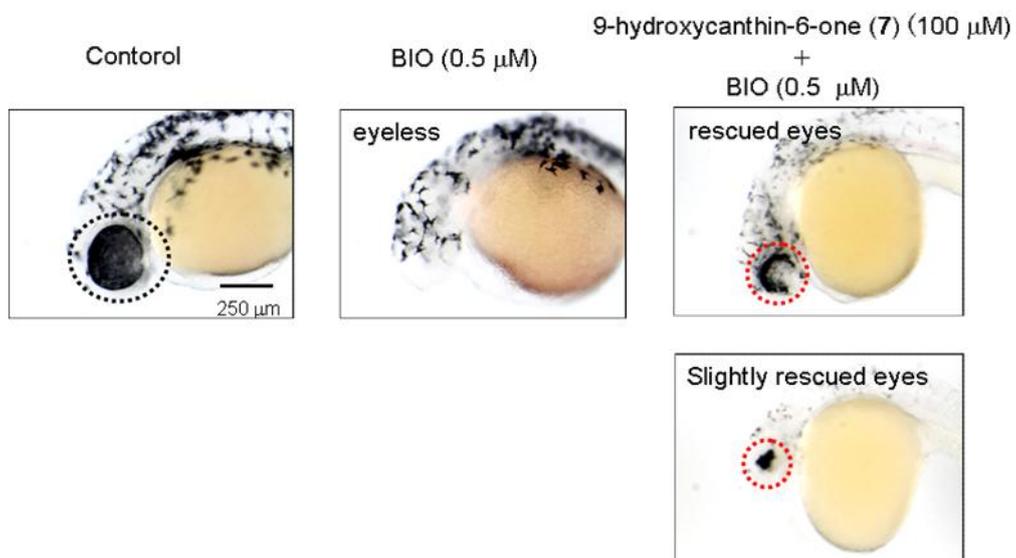


Figure 6-37. 9-Hydroxycanthin-6-one (7) rescued the eyeless phenotype in 30 hpf zebrafish embryos. Red dashed lines show rescued eyes in the right panels.

### 第6節 小括

ニガキ科植物 *Eurycoma longifolia* から Wnt シグナルの活性の低下を指標に天然物の探索を行い、-carboline 型アルカロイドである 9-hydroxycanthin-6-one (**7**)及びその配糖体(**8**), トリテルペン(**9**)を単離した.

化合物 **7-9** の TOP 活性及び FOP 活性を評価したところ, 化合物 **5-7** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性を阻害することが示唆された.

化合物 **7-9** を用いて, Wnt 依存性の大腸癌細胞, Wnt 非依存性の大腸癌細胞及び正常由来細胞に対する細胞毒性を評価したところ, 化合物 **7** 及び **8** は Wnt 依存性の大腸癌細胞である SW480 に対して特に強い毒性を示した.

化合物 **7** のゼブラフィッシュ胚に対する作用を評価したところ, 中脳後脳境界の形成不全, 色素細胞の減少及び尾部の屈曲が認められた.

化合物 **7** の Wnt レポーターゼブラフィッシュに対する作用を評価したところ, Wnt シグナルを低下させ, さらに, *in situ* hybridization にて, Wnt シグナルの標的遺伝子である *zic2a* 及び *mitf* の発現を評価したところ, 化合物 **7** は *zic2a* 及び *mitf* の発現を減少させた. これらの結果から, 化合物 **7** はゼブラフィッシュにおいて Wnt シグナルを阻害することが示唆された.

ウェスタンブロット法を用いて, 化合物 **7** の Wnt シグナルに対する作用を評価したところ,  $\beta$ -catenin を減少させ, p- $\beta$ -catenin(T41/S37/S33)を増加させた. 一方で, p- $\beta$ -catenin(S45)に変化は認められなかった. また, GSK3 及び CK1 の発現量に変化は認められなかった. GSK3 を siRNA を用いて GSK3 をノックダウンした後に, 化合物 **7** の Wnt シグナルに対する作用を評価したところ, GSK3 の siRNA 処理群において  $\beta$ -catenin の減少は認められなかった. またゼブラフィッシュに化合物 **7** 及び GSK3 阻害剤である BIO を併用処理したところ, BIO により誘導される眼の形成不全の回復が認められた. これらの結果から *in vitro* 及び *in vivo* において化合物 **7** は GSK3 の活性化を介して Wnt シグナルを阻害することが示唆された. さらに, CK1 を siRNA を用いて CK1 をノックダウンした後に, 化合物 **7** の Wnt シグナルに対する作用を評価したところ, Wnt シグナルに対する作用を評価したところ, CK1 の siRNA 処理群において  $\beta$ -catenin の減少が認められた. 以上の結果から化合物 **7** は CK1 非依存的に GSK3 の活性化を介して Wnt シグナルを阻害することが示唆された.

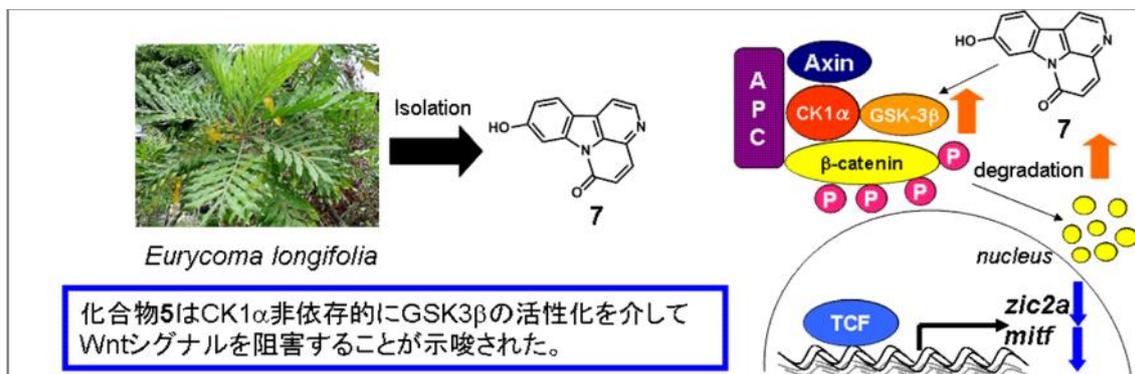


Figure 6-38. Summary of this chapter: isolation from *Eurycoma longifolia* and evaluating inhibition of Wnt signaling.

[参考文献]

- [1] P.-C. Kuo, L.-S. Shi, A. G. Damu, C.-R. Su, C.-H. Huang, C.-H. Ke, J.-B. Wu, A.-J. Lin, K. F. Bastow, K.-H. Lee, T.-S. Wu, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1324-1327.
- [2] S. Jiwajinda, V. Santisopasri, A. Murakami, N. Hirai, H. Ohigashi, *Phytochemistry* **2001**, *58*, 959-962.
- [3] K. Mitsunaga, K. Koike, T. Tanaka, Y. Ohkawa, Y. Kobayashi, T. Sawaguchi, T. Ohmoto, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 799-802.
- [4] L. B. Kardono, C. K. Angerhofer, S. Tsauri, K. Padmawinata, J. M. Pezzuto, A. D. Kinghorn, *J Nat Prod* **1991**, *54*, 1360-1367.
- [5] J. de Paula, I. J. C. Vieira, M. F. d. G. F. da Silva, E. R. Fo, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, A. L. Pinheiro, E. F. Vilela, *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1449-1454.
- [6] T. Kanchanapoom, R. Kasai, P. Chumsri, Y. Hiraga, K. Yamasaki, *Phytochemistry* **2001**, *56*, 383-386.
- [7] J. Yang, W. Zhang, P. M. Evans, X. Chen, X. He, C. Liu, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 17751-17757.
- [8] M. Ilyas, I. P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli, W. F. Bodmer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10330-10334.
- [9] J. Waaler, O. Machon, L. Tumova, H. Dinh, V. Korinek, R. Wilson Steven, E. Paulsen Jan, M. Pedersen Nina, J. Eide Tor, O. Machonova, D. Gradl, A. Voronkov, P. von Kries Jens, S. Krauss, *Cancer Res* **2012**, *72*, 2822-2832.
- [10] P. C. Kuo, A. G. Damu, K. H. Lee, T. S. Wu, *Bioorg Med Chem* **2004**, *12*, 537-544.
- [11] C. Liu, Y. Li, M. Semenov, C. Han, G.-H. Baeg, Y. Tan, Z. Zhang, X. Lin, X. He, *Cell* **2002**, *108*, 837-847.
- [12] R. S. Jope, *Trends Pharmacol Sci* **2003**, *24*, 441-443.
- [13] S. Amit, A. Hatzubai, Y. Birman, J. S. Andersen, E. Ben-Shushan, M. Mann, Y. Ben-Neriah, I. Alkalay, *Genes Dev* **2002**, *16*, 1066-1076.
- [14] A. F. Schier, S. C. Neuhauss, M. Harvey, J. Malicki, L. Solnica-Krezel, D. Y. Stainier, F.

- Zwartkruis, S. Abdelilah, D. L. Stemple, Z. Rangini, H. Yang, W. Driever, *Development* **1996**, *123*, 165-178.
- [15] G. R. Buckles, C. J. Thorpe, M. C. Ramel, A. C. Lekven, *Mech Dev* **2004**, *121*, 437-447.
- [16] E. M. Mellgren, S. L. Johnson, *Dev Genes Evol* **2004**, *214*, 493-502.
- [17] T. A. Westfall, R. Brimeyer, J. Twedt, J. Gladon, A. Olberding, M. Furutani-Seiki, D. C. Slusarski, *The Journal of Cell Biology* **2003**, *162*, 889-898.
- [18] A. C. Lekven, G. R. Buckles, N. Kostakis, R. T. Moon, *Dev Biol* **2003**, *254*, 172-187.
- [19] B. B. Riley, M. Y. Chiang, E. M. Storch, R. Heck, G. R. Buckles, A. C. Lekven, *Dev Dyn* **2004**, *231*, 278-291.
- [20] U. Langheinrich, E. Hennen, G. Stott, G. Vacun, *Current Biology* **2002**, *12*, 2023-2028.
- [21] M. K. Nyholm, S. F. Wu, R. I. Dorsky, Y. Grinblat, *Development* **2007**, *134*, 735-746.
- [22] T. Ishitani, K. Matsumoto, A. B. Chitnis, M. Itoh, *Nat Cell Biol* **2005**, *7*, 1106-1112.
- [23] J. T. Paridaen, C. Danesin, A. T. Elas, S. van de Water, C. Houart, D. Zivkovic, *Dev Biol* **2009**, *331*, 101-112.
- [21] K. Fekany, Y. Yamanaka, T. Leung, H. I. Sirotkin, J. Topczewski, M. A. Gates, M. Hibi, A. Renucci, D. Stemple, A. Radbill, A. F. Schier, W. Driever, T. Hirano, W. S. Talbot, L. Solnica-Krezel, *Development* **1999**, *126*, 1427-1438.
- [22] J. Hao, A. Ao, L. Zhou, C. K. Murphy, A. Y. Frist, J. J. Keel, C. A. Thorne, K. Kim, E. Lee, C. C. Hong, *Cell Rep* **2013**, *4*, 898-904.
- [23] C. H. Kim, T. Oda, M. Itoh, D. Jiang, K. B. Artinger, S. C. Chandrasekharappa, W. Driever, A. B. Chitnis, *Nature* **2000**, *407*, 913-916.
- [24] L. S. Kategaya, B. Changkakoty, T. Biechele, W. H. Conrad, A. Kaykas, R. Dasgupta, R. T. Moon, *PLoS One* **2009**, *4*, e6129.
- [25] N. Nishiya, Y. Oku, Y. Kumagai, Y. Sato, E. Yamaguchi, A. Sasaki, M. Shoji, Y. Ohnishi, H. Okamoto, Y. Uehara, *Chem Biol* **2014**, *21*, 530-540.

## 第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

本章では第3章で植物エキストラブラリーのスクリーニングで Wnt シグナルの阻害を示した *Tabernaemontana divaricata* から活性成分の探索を行った。TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の低下を指標に分画及び化合物の単離を行った。また、得られた化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価を行った。



Figure 7-1. *Tabernaemontana divaricata*

*Tabernaemontana divaricata* はキョウチクトウ科 (Apocyanaceae) サンユウカ属に属する常緑性の低木である。サンユウカ属は *Tabernaemontana elegans* や *Tabernaemontana macrocalyx* など、約 100 種類が存在している。原産地はインドであり、外観はクチナシによく似ている。香りが良いため、装飾樹として植栽される。薬理活性としては、抗炎症活性<sup>[1]</sup>や抗腫瘍活性<sup>[2]</sup>などが報告されている。

*Tabernaemontana divaricata* からは aspidosperma 型アルカロイドである Tabersonine<sup>[3]</sup>や iboga 型アルカロイドである voaganigne<sup>[4]</sup>等の単離が報告されている。

第1節 TCF/s-catenin の転写活性の低下を指標とした分画

本植物の地上部の MeOH エキスについて HP-20 カラムクロマトグラフィーを行い, Fr. 1 シリーズを得た. 得られた画分の活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 1A に認められた (Figure 7-2). そこで, Fr.1A について, 溶媒分配を行いヘキサン可溶部 (3.9 g) 酢酸エチル可溶部 (1.5 g), ブタノール可溶部(1.0 g), 水溶部(1.1 g)を得た. これらの可溶部の転写活性を測定したところ, ヘキサン可溶部, 酢酸エチル可溶部に活性が認められた (Figure 7-3).

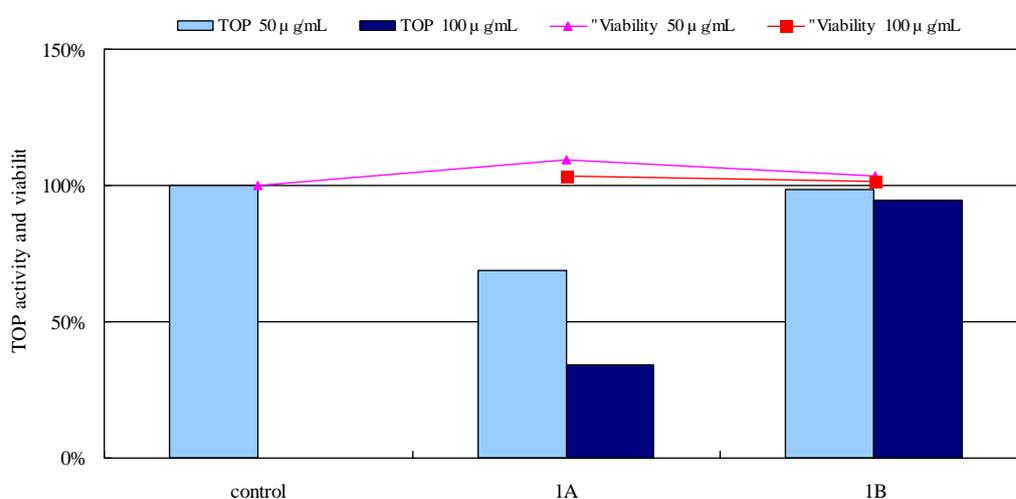


Figure 7-2. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr. 1A and 1B

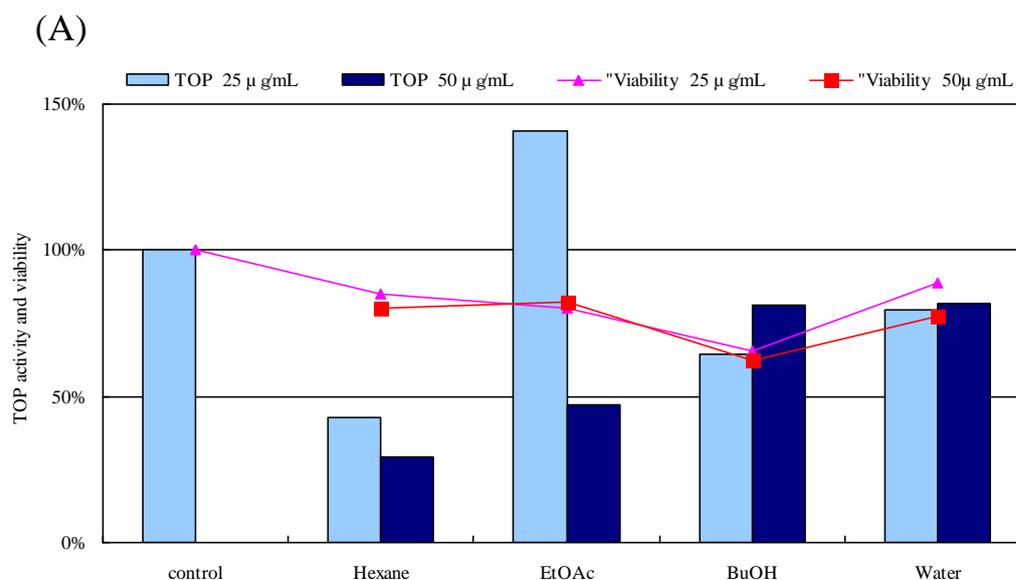


Figure 7-3. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of each layer

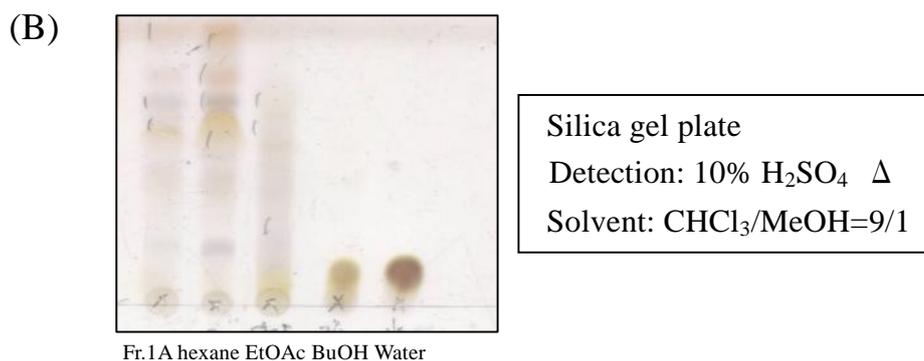


Figure 7-4. (A) TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of each layer

(B) TLC analysis. Silica gel plate, Solvent: CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 9/1, Detection: 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Δ.

活性の認められた酢酸エチル可溶部をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い Fr. 2 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 2B 及び Fr. 2D に認められた(Figure 7-5)。そこで、活性の認められた Fr. 2B をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて 3 シリーズを得た、Fr. 3 シリーズの活性評価を行ったところ、活性は Fr. 3C-3G に認められた(Figure 7-6)。

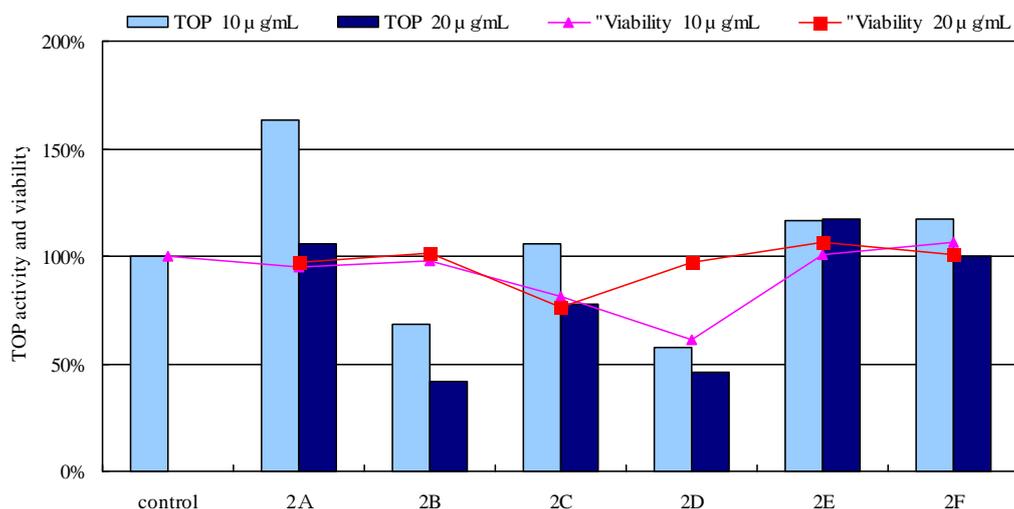


Figure 7-5. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.2A-2F

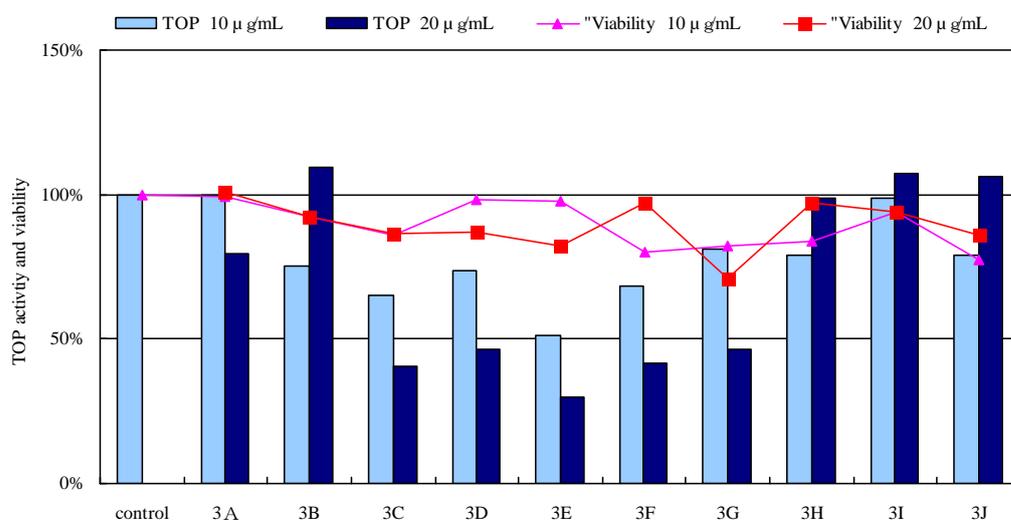


Figure 7-6. TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr. 3A-3J

もっとも活性が強かった Fr.3E をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 4 シリーズを得た。また, Fr. 4A 及び Fr. 4B より, それぞれ化合物 **10** 及び化合物 **11** を得た(Figure 7-7). Fr. 4 シリーズの活性評価を行ったところ, 活性は Fr. 4A 及び Fr. 4B に認められた(Figure 7-8).

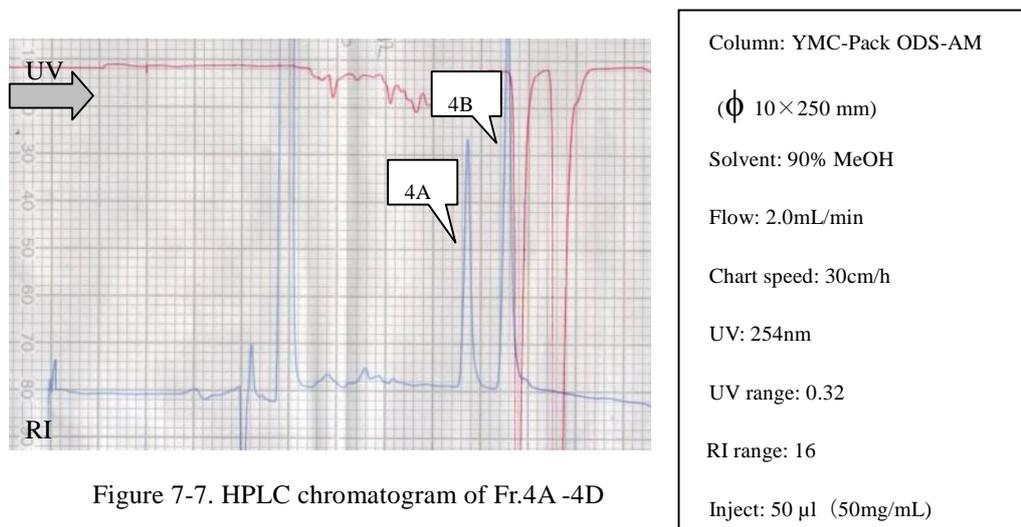


Figure 7-7. HPLC chromatogram of Fr.4A -4D

## 第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

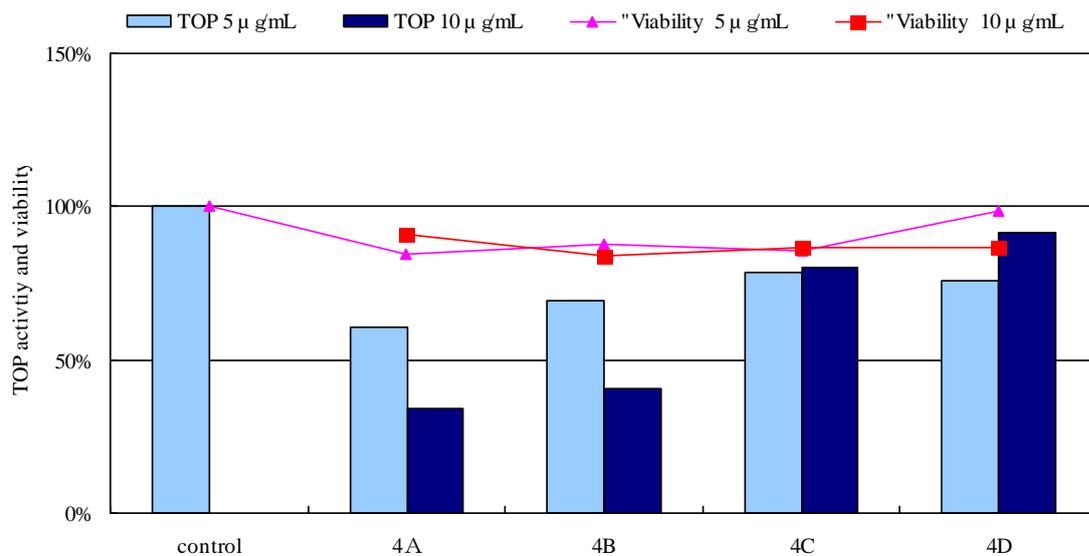


Figure 7-8. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.4A-4D

次に、活性を有していた Fr. 3C をメタノール/水系溶媒を用いて ODS カラムクロマトグラフィーを行い、Fr. 5 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 5D に認められた(Figure 7-9)。さらに、活性の認められた Fr. 5D をヘキサン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルクロマトグラフィーを行い分画を行い Fr. 6 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 6B に認められた(Figure 7-10)。

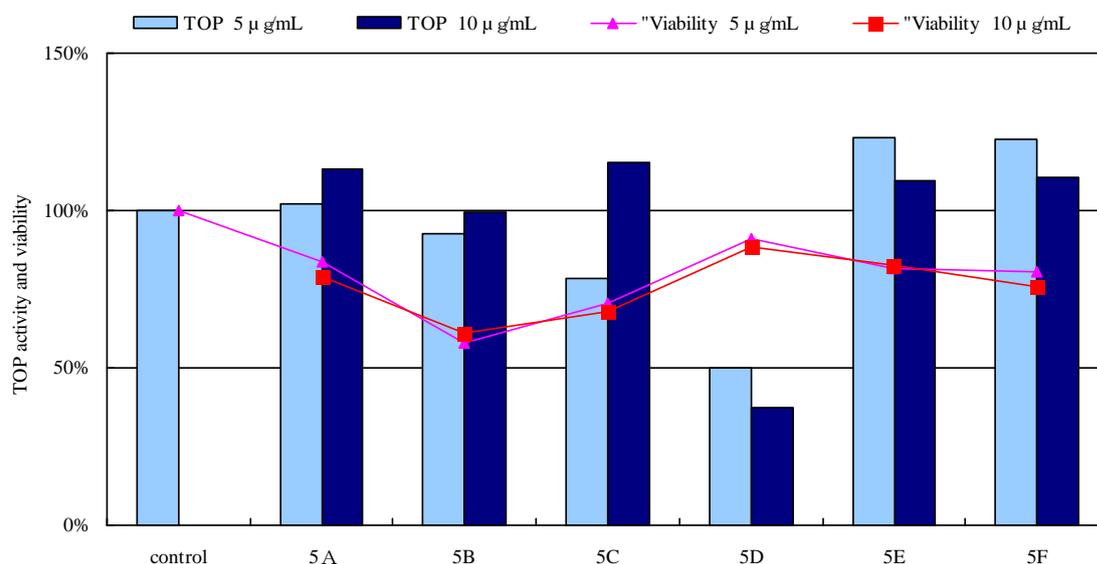


Figure 7-9. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.5A-5F

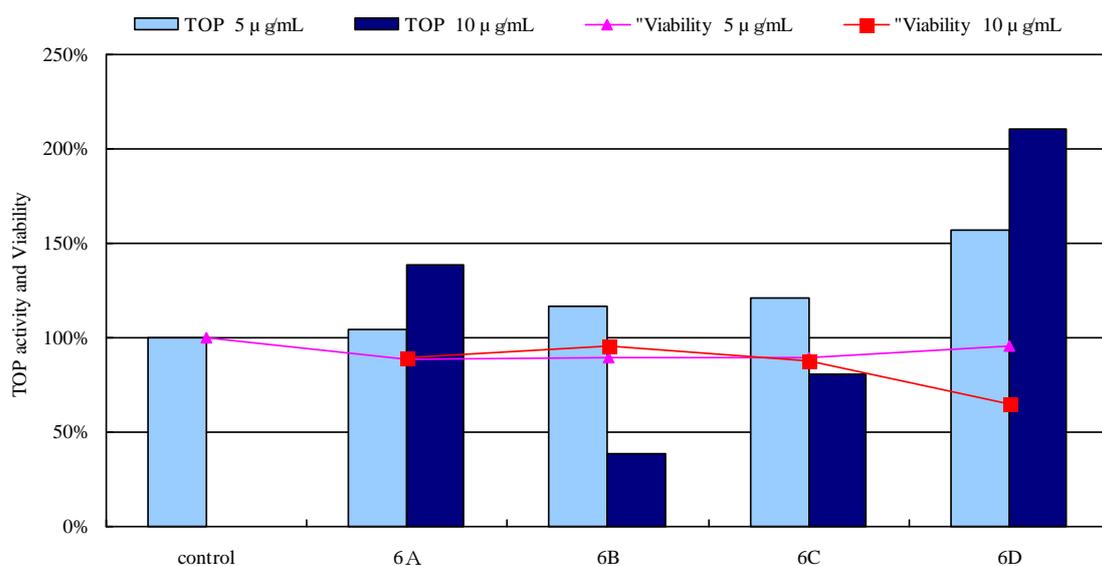


Figure 7-10. TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.6A-6D

そこで、活性を有していた Fr. 6B をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 7 シリーズを得た。また、Fr. 7G より化合物 **12** を得た(Figure 7-11)。Fr. 7 シリーズの活性評価を行ったところ、活性は Fr. 7G に認められた(Figure 7-12)。

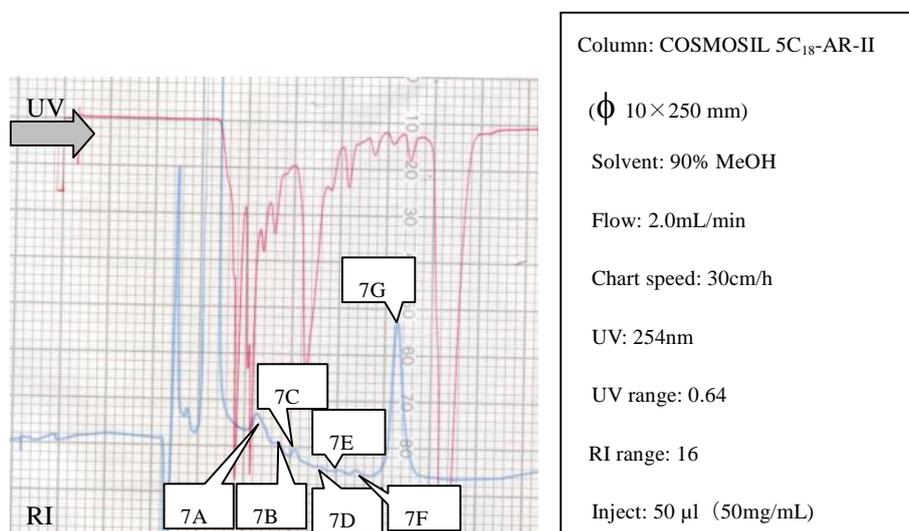


Figure 7-11. HPLC chromatogram of Fr.7A -7J

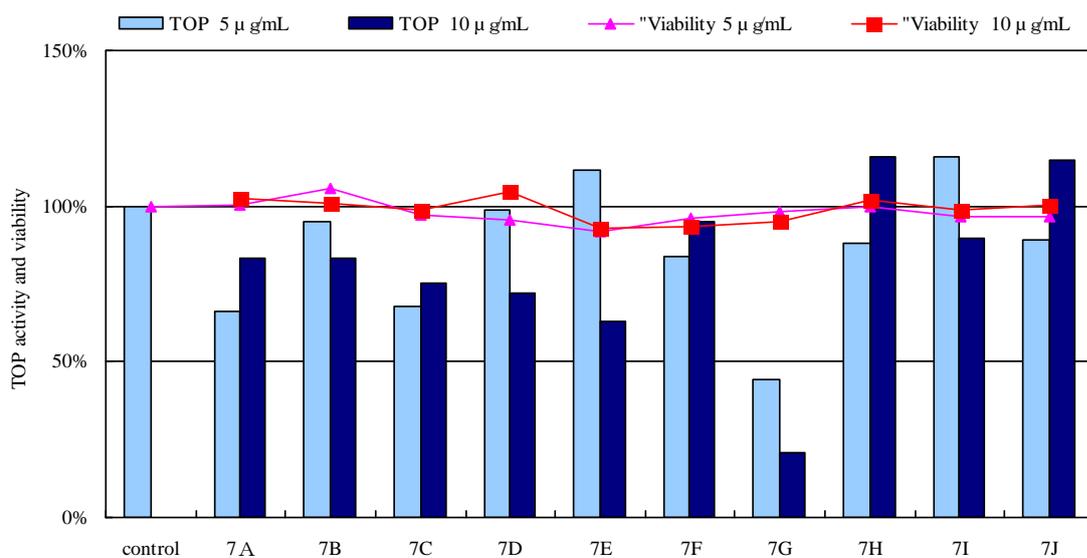


Figure 7-12. TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.7A-7J

次に、活性を有していた Fr. 3D をヘキササン/酢酸エチル系溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い Fr. 8 シリーズを得た。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 8C-8G に認められた(Figure 7-13)。そこで、活性の認められた Fr. 8F をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 9 シリーズを得た。また、Fr. 9C より化合物 **13** を得た(Figure 7-14)。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 9C に認められた(Figure 7-15)。

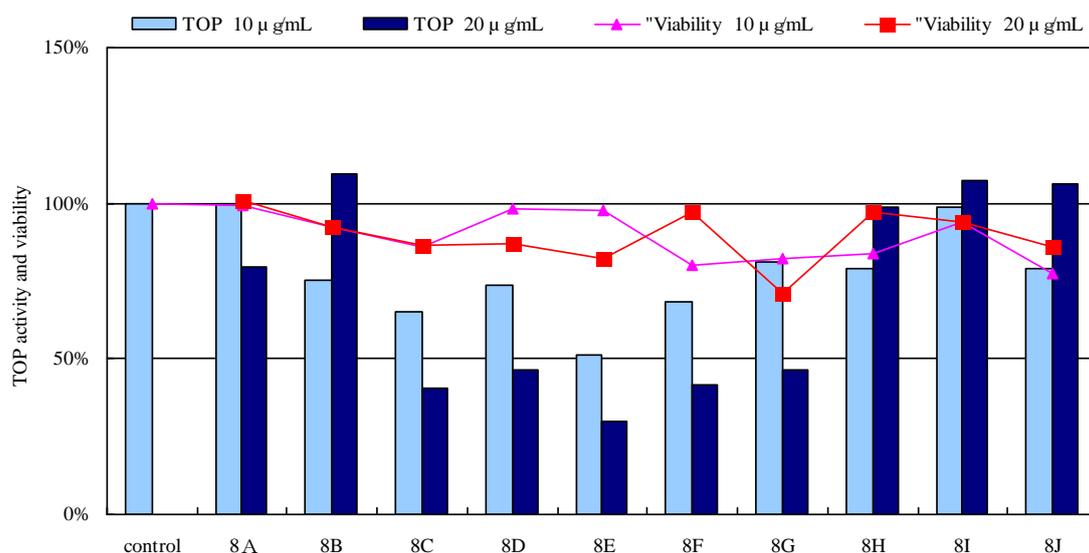


Figure 7-13. TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.8A-8J

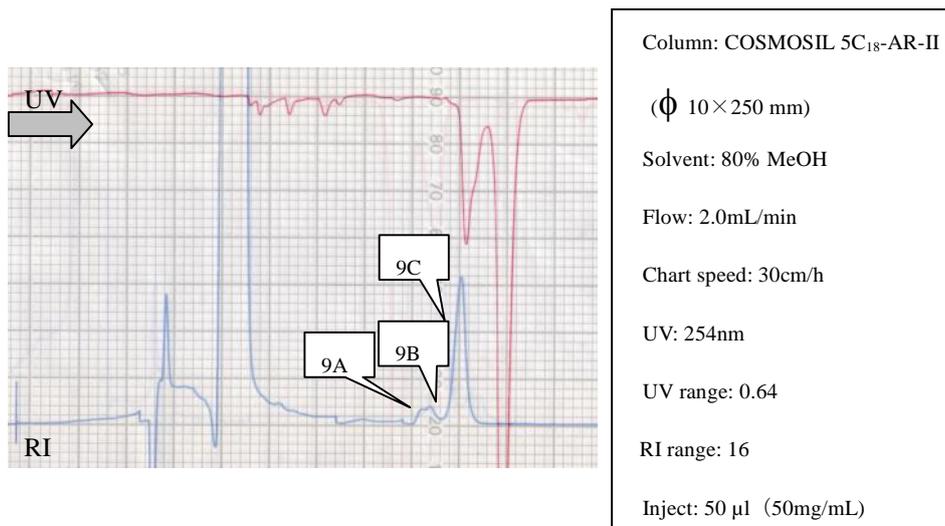


Figure 7-14. HPLC chromatogram of Fr.9A-9E

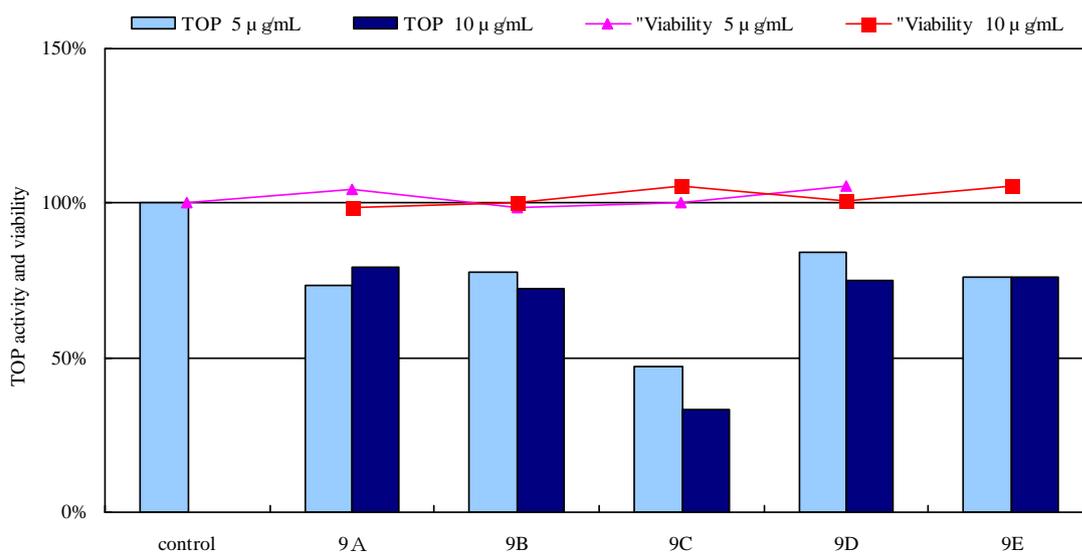


Figure 7-15. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.9A-9E

## 第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

次に、活性を有していた Fr. 8F をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 10 シリーズを得た。また、Fr. 10C 及び Fr. 10D より、それぞれ化合物 **10** 及び化合物 **12** を得た(Figure 7-16)。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 10C 及び Fr. 10D に認められた(Figure 7-17)。

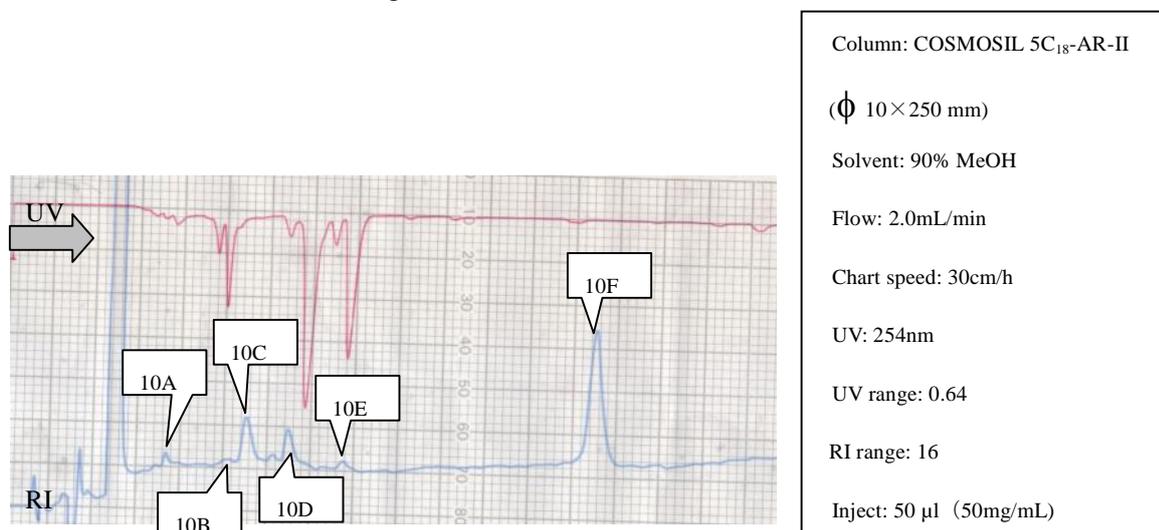


Figure 7-16. HPLC chromatogram of Fr.10A -10H

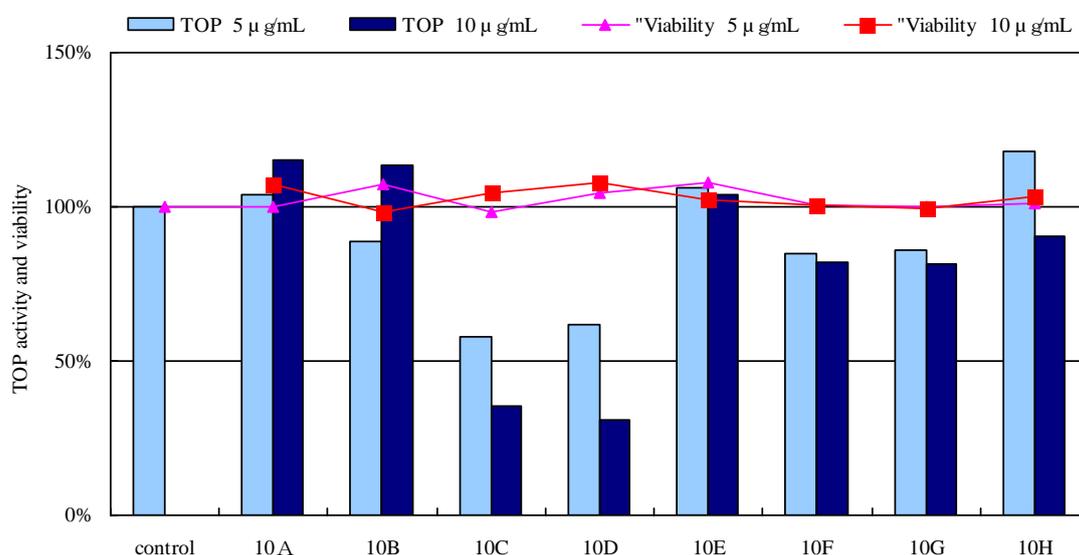


Figure 7-17. TCF/β-catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.10A-10H

## 第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

次に、活性を有していた Fr. 8D をメタノール/水系溶媒を用いて逆相 HPLC により分画を行い Fr. 11 シリーズを得た。また、Fr. 11A より化合物 **12** を得た(Figure 7-18)。得られた画分の活性評価を行ったところ、活性は Fr. 11A に認められた(Figure 7-19)。

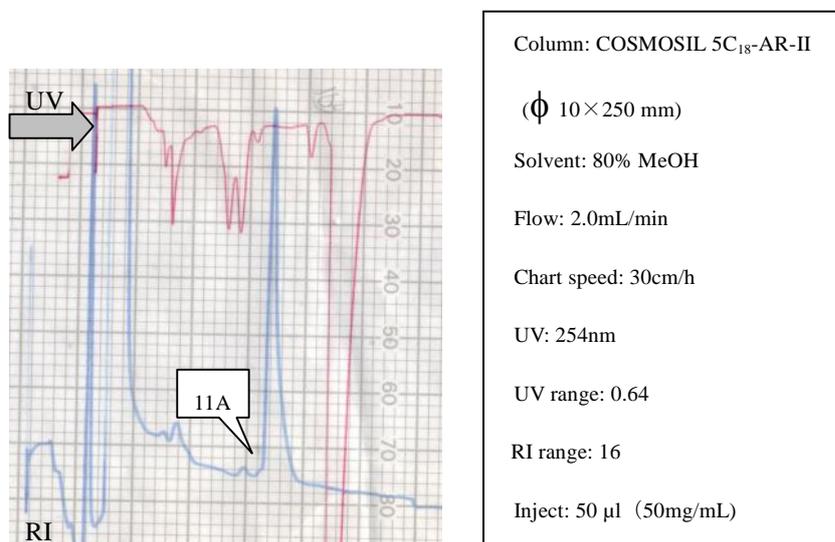


Figure 7-18. HPLC chromatogram of Fr.11A -11C

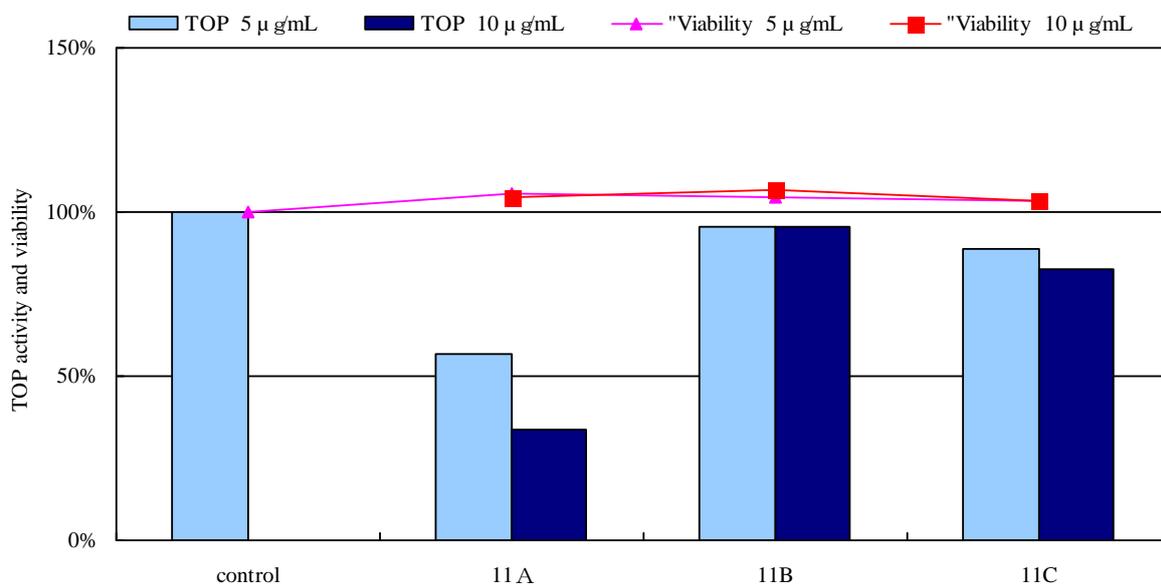


Figure 7-19. TCF/ $\beta$ -catenin transcription inhibitory activity and cell viability of Fr.11A-11C

第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

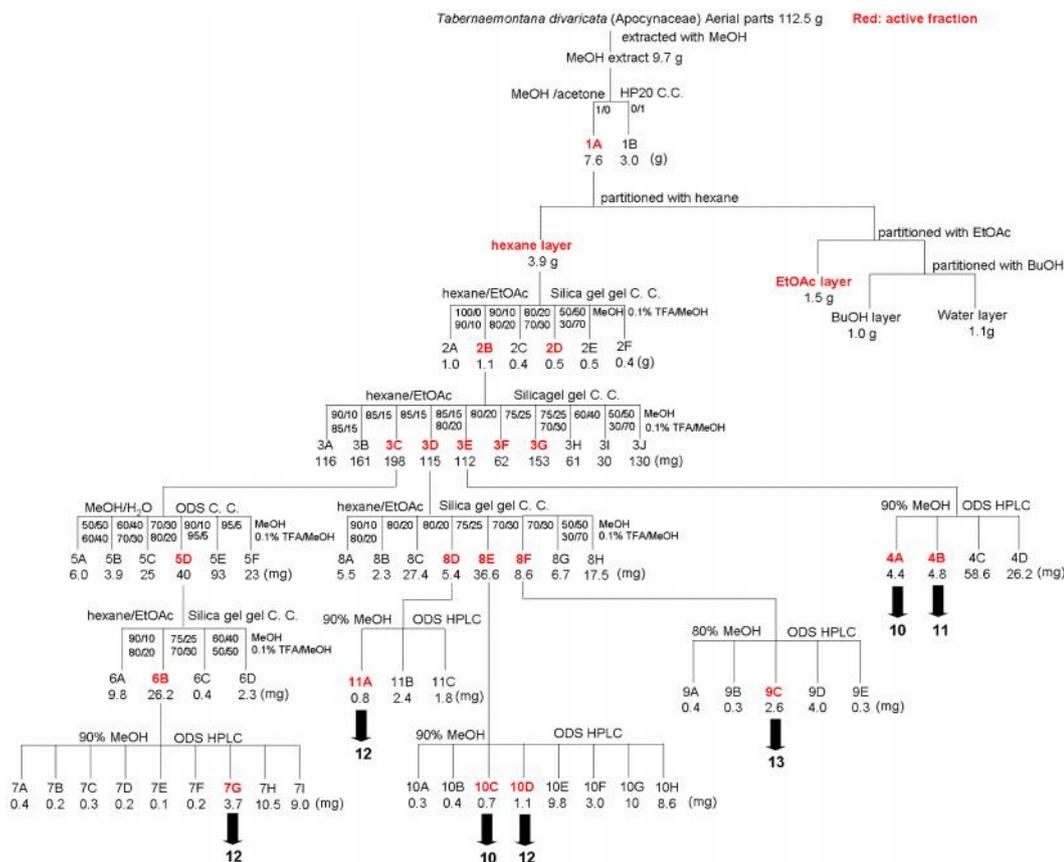


Figure 7-20. Isolation chart of *Tabernaemontana divaricata*

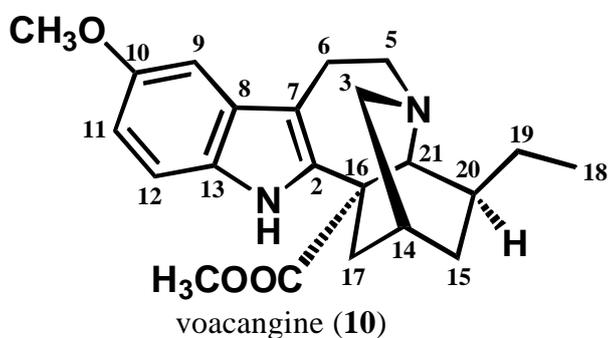
第2節 単離した化合物の構造解析と同定

*Tabernaemontana divaricata* から単離した化合物 **10-13** の構造解析を行った。

化合物 **10** は黄白色の非結晶固体として得られ、ESIMS スペクトル( $m/z$  369  $[M+H]^+$ ) 及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{22}H_{28}N_2O_3$  と決定した。 $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[5, 6]</sup>との比較により, voacangine (**10**)と同定した(Table 7-1).

position	Fr. 4A in in CDC $\delta C$ (J in Hz)	Fr. 4A in in CDC $\delta H$ (J in Hz)	voacangine in CDC $\delta C$ <sup>[5, 6]</sup> (J in Hz)	voacangine in CDC $\delta H$ <sup>[5, 6]</sup> (J in Hz)
1				
2	137.4		137.3	
3	51.9		51.7	
4				
5	53.1		53.1	
6	22.0		22.2	
7	110.0		110.0	
8	128.9		129.1	
9	100.6	6.91d (2.5)	100.7	6.91d (2.6)
10	153.7		154.0	
11	111.7	6.78 dd (8.6, 2.5)	111.9	6.80 dd (8.6, 2.6)
12	111.3	7.13 d (8.7)	111.1	7.13 d (8.6)
13	130.8		130.6	
14	27.3		27.3	
15	32.0		32.0	
16	55.1		55.0	
17	36.3		36.5	
18	11.6	0.87 t (7.2)	11.7	0.90 t (7)
19	26.7		26.7	
20	39.0		39.1	
21	57.4		57.6	
O CO CH <sub>3</sub>	175.7		175.6	
O CO CH <sub>3</sub>	52.5	3.71 s	52.7	3.73 s
ArO CH <sub>3</sub>	55.9	3.83 s	55.7	3.85 s

Table 7-1. NMR spectroscopic data for voacangine (**10**)



$[\alpha]^{21}_{D} -41$  (CHCl<sub>3</sub>; *c*1.02)

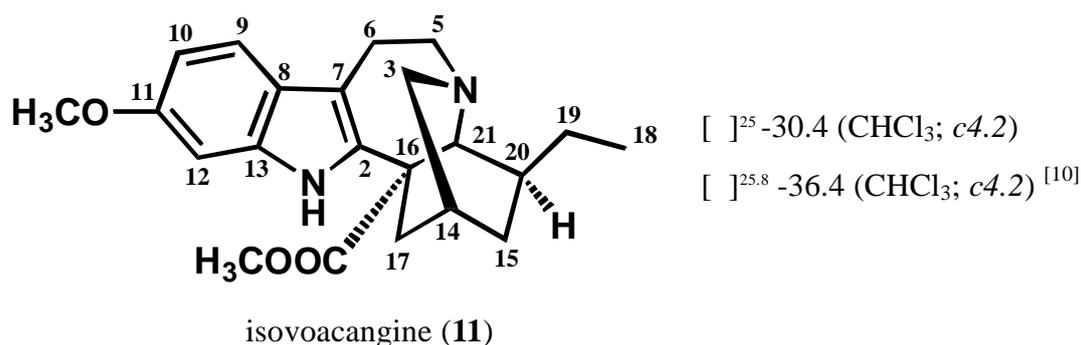
$[\alpha]^{24.9}_{D} -8.9$  (CHCl<sub>3</sub>; *c*1.02) <sup>[7]</sup>

第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **11** は黄白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  369  $[M+H]^+$ )  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{22}H_{28}N_2O_3$  と決定した,  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[8,9]</sup>との比較により, isovoacangine (**11**)と同定した(Table 6-2).

position	Fr. 4B in CDCl <sub>3</sub> $\delta C$ (J in Hz)	Fr. 4B in CDCl <sub>3</sub> $\delta H$ (J in Hz)	isovoacangine in CDCl <sub>3</sub> <sup>[8,9]</sup> $\delta C$ (J in Hz)	isovoacangine in CDCl <sub>3</sub> <sup>[8,9]</sup> $\delta H$ (J in Hz)
1				
2	136.4		136.3	
3	51.5		51.4	
4				
5	53.3		53.1	
6	22.2		22.2	
7	110.0		110.0	
8	123.2		123.2	
9, 10	119, 108.9	6.8 dd (2, 8.7)	119, 108.9	6.78 m
11	156.4		156.5	
12	94.5	7.38 d (8.7)	94.3	7.35 d (9)
13	135.5		135.3	
14	27.4		27.4	
15	32.1		32.1	
16	55.1		55.1	
17	36.3		36.4	
18	11.8		11.7	
19	26.7		26.7	
20	39.2		39.2	
21	57.6		57.6	
OCOCH <sub>3</sub>	176.0		175.9	
OCOCH <sub>3</sub>	52.6	3.76 s	52.5	3.72 s
ArOCH <sub>3</sub>	55.8	3.9 s	55.7	3.85 s

Table 7-2. NMR spectroscopic data for isovoacangine (**11**)

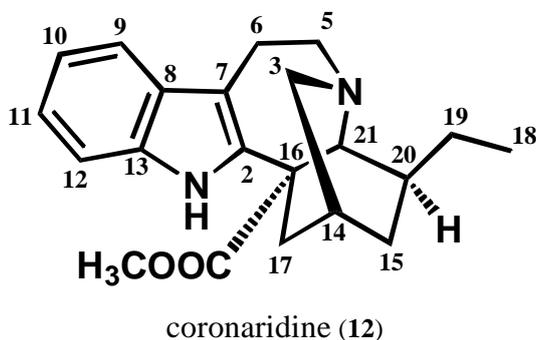


第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **12** は黄白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  339  $[M+H]^+$ )及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{21}H_{26}N_2O_2$  と決定した.  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[8]</sup>との比較により, coronaridine (**12**)と同定した(Table 7-3).

position	Fr. 7G in CDC $\delta C$ (J in Hz)	Fr. 7G in CDC $\delta H$ (J in Hz)	coronaridine in CDC $\delta C$ (J in Hz)	coronaridine in CDC $\delta H$ (J in Hz)
1				
2	136.7		136.7	
3	51.5	2.8 d (8.6), 2.9 m	51.5	2.8 d (8.7), 2.9 dd (8.9, 8.7)
4				
5	53.1	3.00 m, 3.15 m	53.1	3.01 m, 3.15 m
6	22.0	3.21 m, 3.38 m	22.0	3.21 m, 3.39 m
7	110.3		110.4	
8	128.8		128.9	
9	118.4	7.47 d (7.7)	118.5	7.47 dd (1.2, 7.5)
10	119.2	7.07 dd (1.3 6.5, 7.7)	119.3	7.08 ddd (1.2, 6.3, 7.5)
11	122.0	7.13 dd (1.3 6.5, 7.7)	122.0	7.14 ddd (1.2, 6.3, 7.5)
12	110.3	7.23 d (7.7)	110.4	7.24 dd (1.2, 7.5)
13	135.4		135.5	
14	27.3	1.88 m	27.3	1.88 m
15	32.0	1.12 m, 1.73 m	31.9	1.13 m, 1.74 m
16	55.1		55.0	
17	36.5	1.91m, 2.57 m	36.4	1.91m, 2.57ddd (2.4, 5.7, 14.1)
18	11.6	0.9 t (7.3)	11.5	0.9 t (7.5)
19	26.7	1.44 m, 1.56 m	26.6	1.45 m, 1.55 m
20	39.1	1.32 m	39.1	1.33 m
21	57.5	3.56 bs	57.4	3.56 bs
OCOCH <sub>3</sub>	52.6	3.70 s	52.5	3.71 s
OCOCH <sub>3</sub>	175.7		175.9	

Table 7-3. NMR spectroscopic data for coronaridine (**12**)



$[\alpha]^{24.1}_{D} -32.2$  ( $CHCl_3$ ;  $c0.5$ )

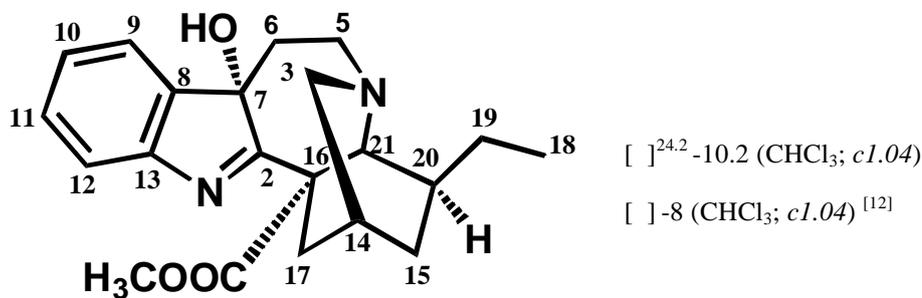
$[\alpha]^{21}_{D} -20$  ( $CHCl_3$ ;  $c0.5$ )<sup>[11]</sup>

第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

化合物 **13** は黄白色の非結晶固体として得られ, ESIMS スペクトル( $m/z$  355  $[M+H]^+$ )及び  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR より分子式を  $C_{21}H_{26}N_2O_3$  と決定した.  $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR の文献値<sup>[6]</sup>との比較により, coronaridine hydroxyindolenine (**13**)と同定した(Table 7-4).

position	Fr. 9C in CDCl <sub>3</sub> δC (J in Hz)	Fr. 9C in CDCl <sub>3</sub> δH (J in Hz)	Coronaridine hydroxyindolenine in CDCl <sub>3</sub> δC (J in Hz)	Coronaridine hydroxyindolenine in CDCl <sub>3</sub> δH (J in Hz)
1				
2	189.3		189.3	
3	48.7	2.72 m	48.7	2.70 m
4				
5	49.1	2.96 ddd (14.8, 4.2), 3.51 m	49.0	2.95 ddd (15, 4, 2), 3.5 m
6	33.8	1.88 m, 1.99 m	33.8	1.86 m, 1.97 m
7	88.3		88.3	
8	142.6		142.6	
9, 11, 12	126.8, 129.2, 121.4	7.36 d (7.2), 7.30-7.20 m	126.7, 129.1, 121.4	7.38-7.17 m
10	120.8	7.45 d (7.2)	120.8	7.44 d (7.0)
13	151.3		151.3	
14	27.0	1.92 m	27.0	1.90 m
15	32.0	1.10 m, 1.77 m	32.0	1.10 m, 1.78 m
16	58.7		58.7	
17	34.7	2.48 ddd (14, 4.2, 2.8), 2.72 m	34.8	2.48 ddd (14, 4, 3), 2.70 m
18	11.5	0.87 t (7.4)	11.5	0.86 t (7.5)
19	26.5	1.44 m	26.5	1.42 m
20	37.5	1.38 m	37.5	1.36 m
21	58.4	3.8 s	58.3	3.79 s
OCOCH <sub>3</sub>	53.2	3.70 s	53.1	3.68 s
OCOCH <sub>3</sub>	173.7		173.6	

Table 7-4. NMR spectroscopic data for coronaridine hydroxyindolenine (**11**)



coronaridine hydroxyindolenine (**13**)

第3節 単離した化合物の TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性の評価

*Tabernaemontana divaricata* から単離した化合物 **10-13** について TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性を評価したところ、化合物 **10-13** は TOP 活性の低下が認められ、FOP 活性に変化は認められなかった。したがって、化合物 **10-13** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性を阻害させることが示唆された(Figure 7-21)。

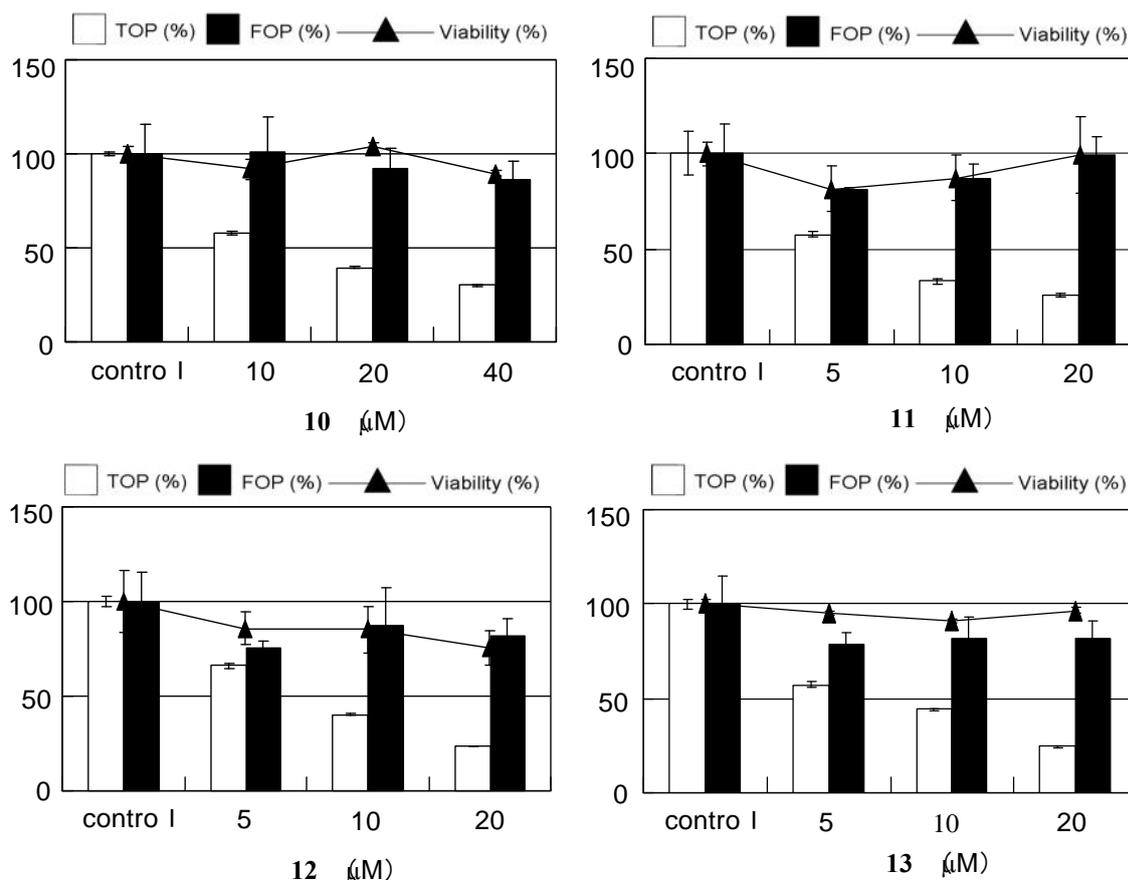


Figure 7-21. **10-13** inhibited TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity. Luciferase activity for TOP and FOP activities were evaluated in STF/293 cells and 293T cells, respectively. Viability was evaluated using STF/293 cells.

Compound	TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
10	11.5
11	6.0
12	5.8
13	7.3

Table 7-5. IC<sub>50</sub> values of for the TCF/ $\beta$ -catenin transcriptional activity activities of **10-13**

#### 第4節 単離した化合物のがん細胞に対する細胞毒性の評価

*Tabernaemontana divaricata* から単離した化合物 **10-13** について大腸がん細胞に対する細胞毒性を評価した。細胞毒性の評価には大腸がん細胞である SW480, DLD1, HCT116 及び RKO 細胞を用いた。なお、これら大腸がん細胞については第6章第4節にて述べた。

化合物 **10** 及び化合物 **13** は正常細胞由来の細胞や Wnt 非依存性の大腸癌細胞と比較して Wnt 依存性の大腸癌細胞を減少させたものの、40  $\mu$ M までの濃度で細胞毒性は認められなかった。一方で、化合物 **12** 及び化合物 **13** は正常細胞由来の細胞や Wnt 非依存性の大腸癌細胞と比較して Wnt 依存性の大腸癌細胞に毒性を示した。また、化合物 **12** と **13** は SW480 により強い毒性を示した(Table 7-6)。

第7章 *Tabernaemontana divaricata* からの Wnt シグナル阻害成分の探索

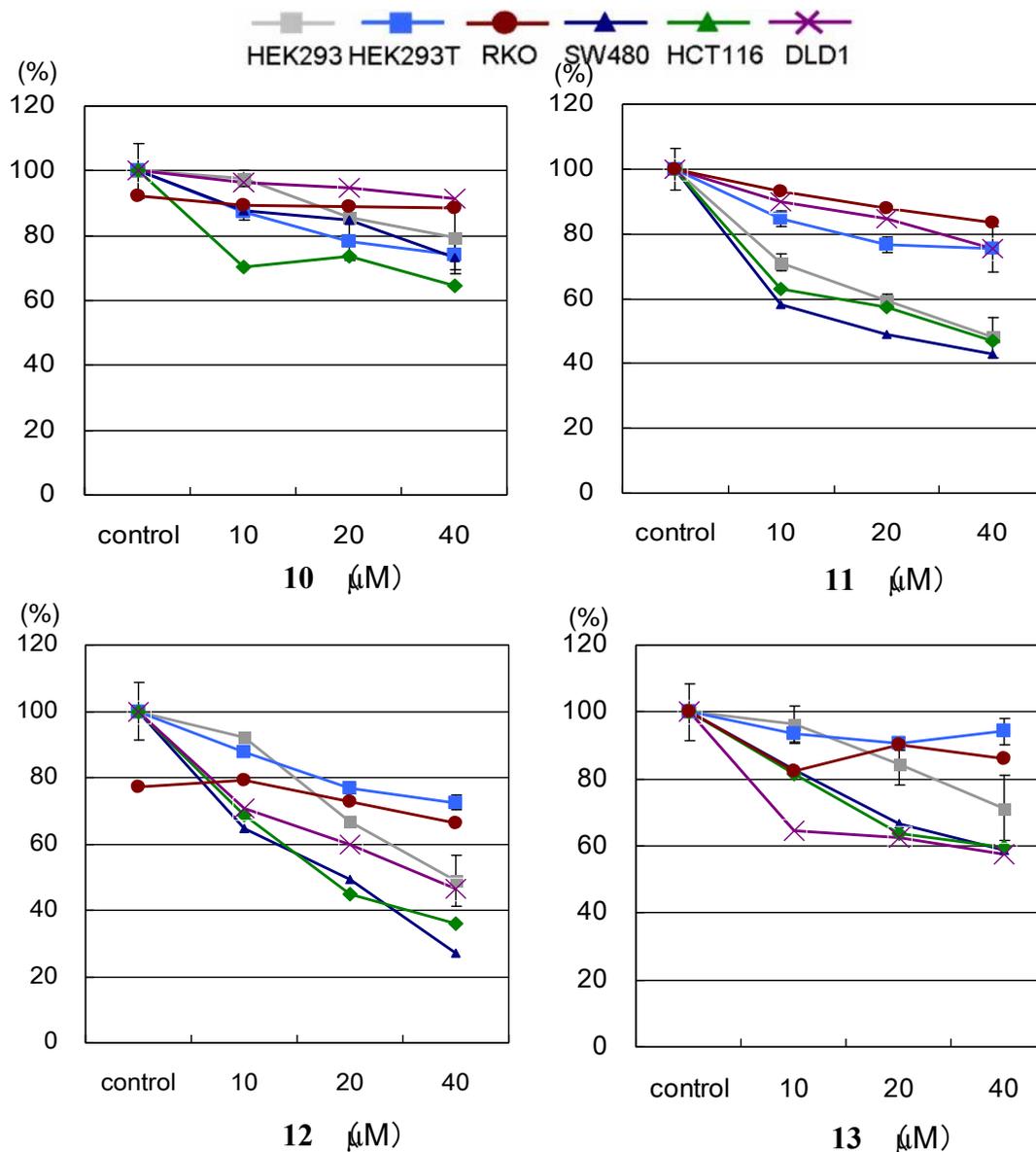


Figure 7-22. Cytotoxicity of **10-13** against non-cancer cells (HEK293, HEK293T) and cancer cells (SW480, SW480, HCT116, RKO)

Compound	IC <sub>50</sub> (μM)					
	non-cancer cells (human embryonic kidney cells)		colon cancer cells (human)			
	HEK293	HEK293T	Wnt-independent RKO	Wnt-dependent SW480 HCT116 DLD1		
<b>10</b>	>40	>40	>40	>40	>40	>40
<b>11</b>	35.6	>40	>40	11.2	24.4	>40
<b>12</b>	31.7	>40	>40	10.4	11.6	24.4
<b>13</b>	>40	>40	>40	>40	>40	>40

Table 7-6. IC<sub>50</sub> values of for the cytotoxicities of **10-13**

## 第6節 小括

キョウチクトウ科植物 *Tabernaemontana divaricata* から Wnt シグナルの活性の低下を指標に天然物の探索を行い, iboga 型アルカロイドである voacangine(**10**), isovoacangine (**11**), coronaridine(**12**)及び coronaridine hydroxyindolenine(**13**)を単離した.

化合物 **10-13** の TOP 活性及び FOP 活性を評価したところ, 化合物 **10-13** は TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性を阻害することが示唆された.

化合物 **10-13** を用いて, Wnt 依存性の大腸癌細胞, Wnt 非依存性の大腸癌細胞及び正常由来細胞に対する細胞毒性を評価したところ, 化合物 **11** 及び **12** は Wnt 依存性の大腸癌細胞である SW480 により強い細胞毒性を示した.

[参考文献]

- [1] S. Jain, P. Sharma, S. Ghule, A. Jain, N. Jain, *Chin J Nat Med* **2013**, *11*, 472-476.
- [2] M.-F. Bao, J.-M. Yan, G.-G. Cheng, X.-Y. Li, Y.-P. Liu, Y. Li, X.-H. Cai, X.-D. Luo, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1406-1412.
- [3] D. Dagnino, J. Schripsema, R. Verpoorte, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 671-676.
- [4] L. S. R. Arambewela, T. Ranatunge, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1740-1741.
- [5] M. Damak, C. Poupat, A. Ahond, *Tetrahedron Letters* **1976**, *17*, 3531-3534.
- [6] P. S. Pereira, S. d. C. Franca, P. V. Anderson de Oliveira, C. M. d. S. Breves, S. I. V. Pereira, S. V. Sampaio, A. Nomizo, D. A. Dias, *Quim. Nova* **2008**, *31*, 20-24.
- [7] R. Torrenegra, J. A. P. Pedrozo, H. Achenbach, P. Bauereiß, *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1843-1848.
- [8] M. A. Zocoler, A. J. B. de Oliveira, M. H. Sarragiotto, V. L. Grzesiuk, G. J. Vidotti, *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 1372-1377.
- [9] J. P. Kutney, A. Horinaka, R. S. Ward, B. R. Worth, *Can. J. Chem.* **1980**, *58*, 1829-1838.
- [10] A. E. Gower, B. d. S. Pereira, A. J. Marsaioli, *Phytochemistry* **1986**, *25*, 2908-2910.
- [11] H. Achenbach, R. Waibel, M. Zwanzger, *Phytochemistry* **1994**, *37*, 1737-1743.
- [12] D. Dagnino, J. Schripsema, R. Verpoorte, *Phytochemistry* **1994**, *35*, 671-676.

総 括

著者は、がんや糖尿病、神経疾患などの種々の疾患に関与しているシグナル経路の一つである Wnt シグナルに着目し、このシグナルの最下流に位置する TCF/ $\beta$ -catenin の転写を活性化あるいは阻害する化合物の発見を目的に、当研究室保有の熱帯植物由来の天然物資源ライブラリーを対象とした TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇あるいは低下を指標としたスクリーニングを行い、Wnt シグナル活性化作用を見出したミカン科植物 *Zanthoxylum rhetsa* 及びトウダイグサ科植物 *Ricinus communis*、Wnt シグナル阻害作用を見出したニガキ科植物 *Eurycoma longifolia* 及びキョウチクトウ科植物 *Tabernaemontana divaricata* からの活性成分の探索を行い、以下の知見を得た。

1. *Zanthoxylum rhetsa* について TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇を指標とした活性化合物の探索を行い、化合物 2 種を得た。化合物 1 は TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性化作用を示した。
2. *Ricinus communis* について TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の上昇を指標とした活性化合物の探索を行い、化合物 4 種を得た。化合物 1 及び 3 は TCF/ $\beta$ -catenin の転写活性化作用を示した。化合物 3 は CK1 を阻害することで Wnt シグナルを活性化することが示唆された。化合物 3 はゼブラフィッシュにおいて $\beta$ -catenin を増加させた。
3. *Eurycoma longifolia* について TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の低下を指標とした活性化合物の探索を行い、化合物 3 種を得た。化合物 7-9 TCF/ $\beta$ -catenin の転写阻害活性を示した。化合物 7 はゼブラフィッシュにおいて GSK3 $\beta$  を介して Wnt シグナルの標的遺伝子である *zic2a* 及び *mitf* を減少させた。化合物 7 は CK1 非依存的に GSK3 $\beta$  を活性化することで Wnt シグナルを阻害することが示唆された。
4. *Tabernaemontana divaricata* について TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性の低下を指標とした活性化合物の探索を行い、化合物 4 種を得た。化合物 10-13 TCF/ $\beta$ -catenin の転写阻害活性を示した。

実験の部

**1. 使用機器 及び 試薬**

各種機器分析データを得るため、次の装置および試薬を用いて測定した。

1-1. 化合物の単離，構造決定（第 4, 5, 6, 7 章）

核磁気共鳴測定装置（NMR）

JMN ECP 600 spectrometer	JEOL
JMN ECP 400 spectrometer	JEOL
JMN ECP 600 spectrometer	JEOL
JMN ECS 400 spectrometer	JEOL

核磁気共鳴（NMR）用溶媒について内部標準として以下の残留溶媒周波数を用いた。  
CDCl<sub>3</sub>（<sub>H</sub>: 7.24 (1), <sub>C</sub>: 77.0 (3) ）， CD<sub>3</sub>OD（<sub>H</sub>: 4.78 (1), 3.30 (5), <sub>C</sub>: 49.0 (7) ），  
DMSO-d<sub>6</sub>（<sub>H</sub>: 2.49 (5), <sub>C</sub>: 39.5 (7) ）， pyridine-d<sub>5</sub>（<sub>H</sub>: 8.71 (br), 7.55 (br), 7.19 (br) ,  
<sub>C</sub>: 149.9 (3), 135.5 (3), 123.5 (3) ）。重水素化溶媒は Acros 社製，または CIL（Cambridge  
Isotope Laboratories）社製を用いた。測定溶媒を基準として，化学シフトは 値 (ppm) で  
示した。化学シフト値は 値で表し， の単位は ppm である。スピン結合定数は *J* 値 (Hz)  
で表し，開裂様式は s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, quin : quintet, sep : septet,  
m : multiplet, br : broad, o : overlapped とそれぞれ略した。

TLC 発色試薬

濃硫酸： 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（噴霧後加熱）

リンモリブデン酸： 12 モリブド(IV)りん酸 n 水和物/メタノール（Wako）  
= 25 g / 250 mL（噴霧後加熱）

アニスアルデヒド： *p*-アニスアルデヒド 9.1 mL/conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.3 mL/AcOH 3.7  
mL/EtOH 370 mL（噴霧後加熱）

## 実験の部

---

質量分析計 (MS)

ESIMS : JMS-T100LP

JEOL

旋光計 ([ $\alpha$ ]<sub>D</sub>)

DIP-1020 Digital Polarimeter

JASCO

HPLC 装置

カラム : COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II ( $\phi$  10 × 250 mm)

Nacalai tesque Inc.

Develosil ODS HG-5 ( $\phi$  10 × 250 mm)

野村化学

Inersil C<sub>8</sub>-3 ( $\phi$  4.6 × 250 mm)

GL Science Inc.

YMC-Pack ODS-AM ( $\phi$  10 × 250 mm)

YMC Co., Ltd.

装置は以下の組み合わせでいずれかを用いた.

System 1. (JASCO A)

ポンプ : PU-980 Intelligent HPLC Pump

JASCO

検出器 : UV-970 Intelligent UV / VIS Detector

JASCO

RI-1530 Intelligent RI Detector JASCO

System 2. (JASCO B)

ポンプ : PU-2080 plus Intelligent HPLC Pump

JASCO

検出器 : UV-2075 plus Intelligent UV / VIS Detector

JASCO

RI-2031 plus Intelligent RI Detector

JASCO

System 3. (Shimadzu)

システムコントローラー : SCL-10A VP

SHIMADZU

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 : SPD-M10A VP

SHIMADZU

送液ユニット : LC-10AD *vp* SHIMADZU

低圧クラジェントユニット : FCV-10AL *vp*

SHIMADZU

オンラインテガッサ : DGU-12A

SHIMADZU

LC ワークステーション : CLASS-VP < ver.5.032 >

SHIMADZU

オープンカラムクロマトグラフィー担体

## 実験の部

---

Chromatrex PSQ 100B	富士シリシア化学
Chromatrex ODS	富士シリシア化学
Silica gel 60N (spherical, neutral)	関東化学
Dianon HP-20	三菱化成

薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート

Kieselgel 60 F <sub>254</sub>	Merck
RP 18 F <sub>254</sub>	Merck

TLC を展開後, UV ランプにより 254 nm, 360 nm の波長でスポットを検出した.

冷却遠心機

20PR-52	HITACHI
---------	---------

凍結乾燥機

FDU-830	EYELA
---------	-------

有機溶媒

メタノール, アセトン, クロロホルム, 酢酸エチル, ヘキサン, *n*-ブタノール (関東化学) は, 試薬一級品を素蒸留して用いた. また 2-プロパノール (Wako), エタノール (Wako) は, 試薬特級品, ジメチルスルホキシドは, 分子生物学用 (Wako) または試薬特級品 (関東化学) を用いた.

## 2. 細胞, たんぱく, 及び遺伝子関連実験 (第 4, 5, 6, 7 章)

使用機器

Vortex : vortex GENIE-2	Scientific Industries
ピペットマン : P-1000, P-200, P-20, P-2	GILSON
オートクレーブ : HA-300M , HA-300MIV	HIRAYAMA
乾燥滅菌機 : DA60 HIRAYAMA	
CO <sub>2</sub> インキュベーター	SANYO

## 実験の部

---

インキュベーター	HIRAYAMA MFG. CORP.
クリーンベンチ： MCV-B131S, MCV-710ATS	SANYO
UV radiator	コスモバイオ
遠心機： M200-IVD	SAKUMA
M150	SAKUMA
プチ R まる 8 エイト	WAKEN
UV-VIS spectrometer： UV mini 1240	SHIMADZU
振動培養機： personal-10	TAITEC
Thermo minder SM-05R	TAITEC
超音波破碎・洗浄機： UT205S	SHARP
マイクロタイタープレート： F96 WHITE	NUNC.
マイクロタイタープレート： F96 BLACK	NUNC.
マイクロタイタープレート： 24 well culture 3526	CORNING
蛍光測定： Fluoroskan Ascent	Thermo
化学発光測定： Luminoskan Ascent	Thermo
倒立型培養顕微鏡： CK40	OLYMPUS
CKX41	OLYMPUS

### 培養細胞株

STF/293 細胞（ヒト胎児腎細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

          ジョーンホップキンス大学 Dr. Jeremy Nathans より御恵与いただいた

293T 細胞（ヒト胎児腎細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

293 細胞（ヒト胎児腎細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

C3H10T1/2 細胞（マウス線維芽細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

SW480 細胞（ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

HCT116 細胞（ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

DLD1 細胞（ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C）

STF/293 細胞, 293T 細胞, 293 細胞, SW480 細胞, HCT116 細胞, DLD1 細胞及び RKO 細胞は 10%FBS 含有 DMEM (Wako) を培養に用いた. Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest) は, 補体を失活させるため, 56 °C, 30 分間の加熱処理を行い, 非動化を行ったものを使

## 実験の部

---

用した。細胞の剥離には, Trypsin EDTA (0.25 % Trypsin-EDTA, Gibco) を用いた。細胞計測には Trypan blue 溶液 (0.4% (w/v) trypan blue, Nacalai tesque Inc.) を用い, 顕微鏡下で行った。

PBS (-) は以下の組成のものを用いた。

KCl (Wako)	0.2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Nacalai tesque Inc.)	0.2 g/L
NaCl (Wako)	8.0 g/L
<u>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako)</u>	<u>1.11 g/L</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 1000 mL (autoclaved 121 °C, 20 min.)

### Wnt 関連実験

使用したプラスミド

pSuperTOPflash	ワシントン大学 Dr. Randall Moon より御恵与いただいた。
pSuperFOPflash	ワシントン大学 Dr. Randall Moon より御恵与いただいた。
pRL-CMV	Promega

トランスフェクション関連試薬

Lipofectamine 2000	Invitrogen
Opti-MEM	Promega

ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5X	Promega
Luciferase 1000 Assay System	Promega
( Luciferase Assay Substrate )	
( Luciferase Assay Buffer )	
( Passive Lysis Buffer 5X )	Promega
( Dual-Glo Luciferase Assay System )	Promega
( Dual-Glo Luciferase Substrate )	

## 実験の部

---

Dual-Glo Luciferase Buffer

Dual-Glo Stop & Glo Substrate

Dual-Glo Stop & Glo Buffer

ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット

東洋ビーネット

5倍濃 細胞溶解剤  
ピッカジーン発光試薬 II 緩衝液  
ピッカジーン発光基質  
シーパンジー発光試薬緩衝液  
シーパンジー発光基質溶液

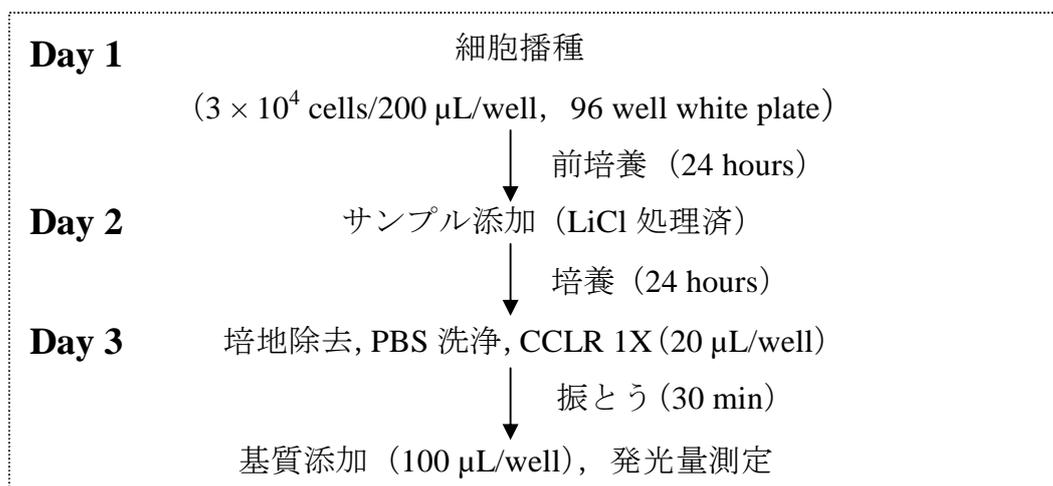
LiCl 溶液 (5 M) : LiCl (Wako) 2.1 g を滅菌水に溶解して 10 mL の 5 M LiCl 溶液とした後, 10 個の 1.5 mL エッペンチューブに分注し, 冷蔵保存した.

Quercetin 溶液 (27.7 mM) : Quercetin Dyhydrate (Wako) 23.4 mg を DMSO 500  $\mu$ L に溶解して 138.5 mM Quercetin 溶液とした後, 1.5 mL エッペンチューブに分注し, 冷凍保存した. 次に, この 100  $\mu$ L を DMSO 400  $\mu$ L に溶解して 27.7 mM Quercetin 溶液とした後, 1.5 mL エッペンチューブに分注し冷蔵保存した.

Fluorescein diacetate (FDA)溶液 : FDA (Wako) 5 mg を DMSO 500  $\mu$ L に溶解して FDA 10 mg/mL DMSO 溶液とした. 使用時に, この 7  $\mu$ L を PBS 20 mL に添加して FDA 溶液とした.

Wnt 関連実験 (第 4, 5, 6, 7 章)

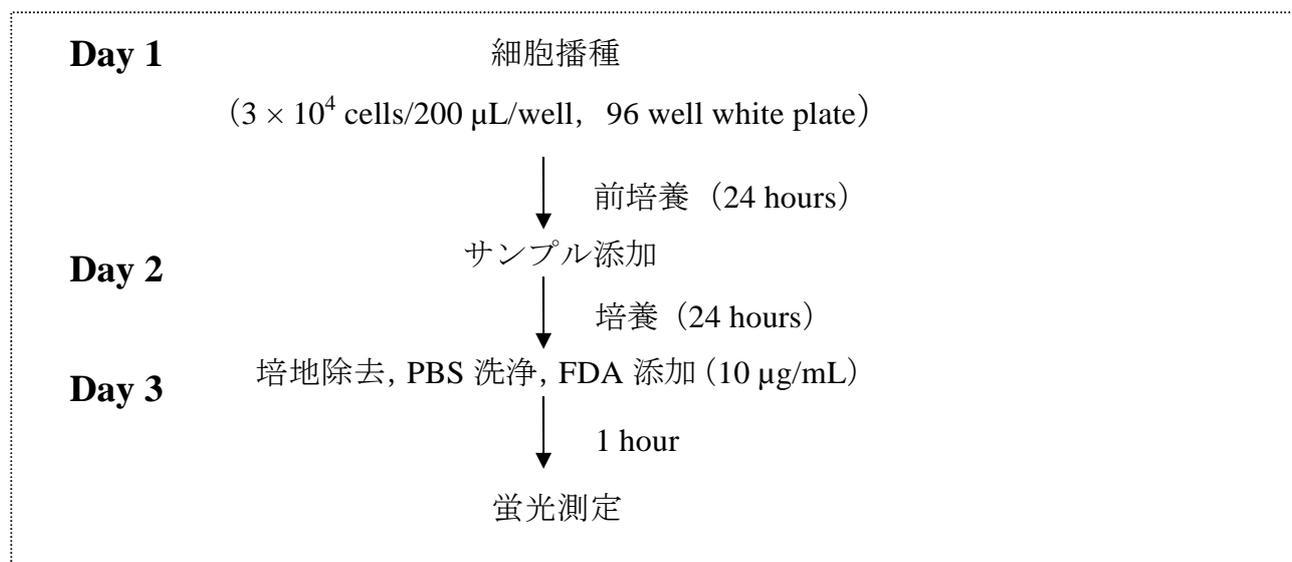
Wnt シグナル阻害活性測定 – TOPflash (Luciferase assay)



96 穴平底白マイクロプレートに STF/293 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L/well) を播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した. 24 時間後培地を取り除き, 測定試料及び LiCl 15 mM を含有する DMEM 培地 200  $\mu$ L を各 well に添加し, 24 時間培養した. その後培地を取り除き, PBS で細胞を 1 回洗浄後, 細胞溶解剤である Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 1X 溶液を各 well に 20  $\mu$ L ずつ添加した. 30 分間振とうした後, Luciferase Assay Buffer に溶解した Luciferase Assay Substrate を各 well に 100  $\mu$ L ずつ, Luminoscan Ascent (Thermo) に付属するオートインジェクターを用いて添加し, 発光量を測定した.

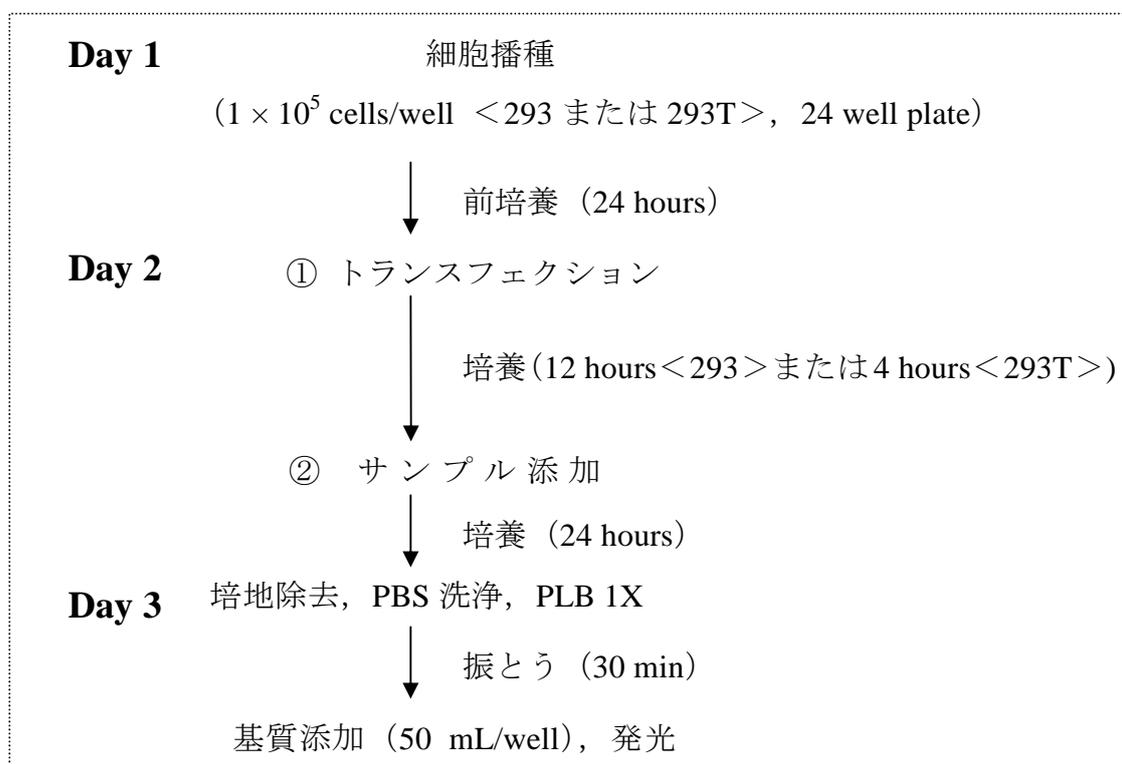
## 実験の部

### 細胞生存試験 (FMCA assay) <sup>[1]</sup>



96 穴平底黒マイクロプレートに SW480 細胞, HCT116 細胞, DLD1 細胞, RKO 細胞, 293T 細胞, 293 細胞 ( $6 \times 10^3$  cells/200  $\mu$ L/well) または STF/293 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L/well) を播種し, CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した. 24 時間後培地を取り除き, 適当な試料濃度に調製した試料含有 DMEM (293 細胞は EMEM) 培地を 200  $\mu$ L 各 well に添加し, 24 時間培養した. その後培地を取り除き, PBS で細胞を 1 回洗淨後, FDA 溶液を各 well に 200  $\mu$ L ずつ添加した. 1 時間後, Fluorescein の蛍光測定を行った.

Wnt シグナル特異的阻害活性測定－FOPflash (Dual luciferase assay)



24 穴平底透明マイクロプレートに 293 あるいは 293T 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/500  $\mu$ L/well) を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した。24 時間後、遺伝子導入操作を行った。すなわち、pSuperFOPflash (最終濃度: 1  $\mu$ g/ $\mu$ L) 及び pRL-CMV (最終濃度: 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ L) を含有する Opti-MEM 培地 (A 溶液) と Lipofectamine 2000 (2  $\mu$ L) を含む Opti-MEM 培地 (B 溶液) を当量混ぜ、各 well に 100  $\mu$ L ずつ滴下した。適当な時間培養後、適当な試料濃度に調製した試料含有 LiCl 15 mM で処理した DMEM 培地 500  $\mu$ L を各 well に加え、24 時間培養した。その後培地を取り除き、PBS で細胞を 1 回洗浄後、Passive lysis buffer (PLB) 1X 溶液、または 1 倍濃 細胞溶解剤を各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加した。30 分間振とうした後、細胞溶解液 50  $\mu$ L を取り (白粘着状固形物を取らない)、96 穴平底白マイクロプレートに移し、Dual-Glo luciferase Buffer に溶解した Dual-Glo luciferase Substrate、またはピッカジーン発光試薬 II 緩衝液に溶解したピッカジーン発光基質を各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加し、FOPflash に由来する化学発光 (Firefly luminescence) を測定した。その後、Dual-Glo Stop & Glo Buffer に溶解した Dual-Glo Stop & Glo Substrate、またはシーパンジー発光試薬緩衝液に溶解したシーパンジー発光基質溶液を各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加し、内部標準である pRL-CMV に由来する化学発光 (Renilla luminescence) を測定した。

## たんぱく実験（第 5, 6 章）

### ウェスタンブロット

#### 細胞溶解液（ライセート）の調製

10 cm ディッシュに  $1 \times 10^6$  cells/10 mL/dish の STF/293 あるいは SW480 を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した。24 時間後、培地を取り除き、適当な試料濃度に調製した試料含有 DMEM 培地を 10 mL 各ディッシュに添加し、24 時間培養した。化合物を処理後、培地を取り除き、PBS で洗浄後、Trypsin EDTA により細胞を剥離し、細胞を 50 mL チューブに回収した。遠心分離（1,000 rpm, 3 min., 4 °C）を行い、上清を取り除き、1 mL の PBS に懸濁させた後、2 本の 1.5 mL エッペンチューブに分けた。これらについて細胞全体ライセート、細胞質ライセート及び核ライセートの調整に進んだ。

#### ・細胞全体ライセートの調整

1.5 mL エッペンチューブについて遠心分離（5,000 rpm, 5 min., 4 °C）を行った。上清を取り除いた後、1 mL の PBS で懸濁させ、再度遠心分離（5,000 rpm, 5 min., 4 °C）を行った。上清を除いた後、100 µL の lysis buffer を加え、氷上で 30 分インキュベートした。その後、遠心分離（13,000 rpm, 30 min., 4 °C）を行い、上清を細胞全体ライセートとした。

#### ・細胞質及び核ライセートの調整

NE-PER<sup>®</sup> Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents（Thermo）に同梱されている CER I, CER II 及び NER を用いた。

1.5 mL エッペンチューブについて遠心分離（3,000 rpm, 5 min., 4 °C）を行った。上清を取り除いた後、1 mL の PBS で懸濁させ、再度遠心分離（3,000 rpm, 5 min., 4 °C）を行った。上清を除いた後、氷上で 10 分以上氷上に放置し、ペレットを乾燥させた。このペレットに 200 µL のプロテアーゼ阻害剤含有 CER I を加え、15 秒間ボルテックスを行い、ペレットを懸濁させた後、氷上で 10 分間インキュベートした。その後、11 µL の CER II を加え、5 秒間ボルテックスを行い、氷上で 1 分間インキュベートした後、再度 5 秒間ボルテックスを行った。その後、遠心分離（13,000 rpm, 10 min., 4 °C）を行い、上清を細胞質ライセートとした。

## 実験の部

---

ペレットに 100  $\mu$ L のプロテアーゼ阻害剤含有 NER を加え、15 秒間ボルテックスを行った。その後、「氷上で 10 分間インキュベート、15 秒間ボルテックス」という操作を 4 回繰り返した。その後、遠心分離 (13,000 rpm, 10 min., 4 °C) を行い、上清を核ライセートとした。

### SDS-PAGE

得られたライセートは、10% polyacrylamide gel を用いて分離した。ライセートに 5 × Sample buffer/2-メルカプトエタノール混合液 (4/1) を加え、加熱 (100 °C, 3 min.) した。ウェルにサンプルを注入し、電気泳動を行った (200 V, 20~30 mA)。サンプルを入れないウェルには代わりとして lysis buffer を用いたものを泳動した。分子量マーカーには Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (BIO-RAD) を使用した。泳動はブロモフェノールブルー色素がゲルの下端から 5 mm 程度まできたところで終了した。

### メンブレンへの転写

SDS-PAGE の後、ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへの転写は semi-dry 法により行った。バッファーを染み込ませたろ紙 (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD) でゲルとメンブレンを挟み込み、30 分間通電した。

### 一次抗体及び二次抗体処理

PVDF への転写後、3%スキムミルク (skim milk ; Difco Laboratories or 森永乳業) または、3%BSA(リン酸化たんぱく質検出時)を含む TBST で 1 時間、室温にてブロッキングを行い、blots を TBST で洗浄 (5 min., 3 times) し、一次抗体処理に移った。

3%スキムミルクまたは、3%BSA を含む TBST でそれぞれに希釈した一次抗体を室温にて 1 時間反応後、blots を TBST で洗浄 (5 min., 3 times) し、二次抗体処理に移った。3%スキムミルクまたは、3%BSA を含む TBST でそれぞれに希釈した二次抗体を室温にて 1 時間反応後、blots を TBST で洗浄 (5 min., 3 times) し、immunocomplex の検出に移った。

検出は、ECL Advance Western detection system (GE Healthcare/Amersham Biosciences) または Immobilon Western (Millopore) を用いた。内部標準のコントロールとして、-actin または、Histone H1 を用いた。

一次抗体として (anti- -catenin, 1:2000, #610153, BD Biosciences; anti-p- -catenin

## 実験の部

---

(S33/S37/T41), 1:1000, #9561, Cell Signaling; anti-p- $\beta$ -catenin (S45), 1:1000, #9564, Cell Signaling; anti-GSK3 $\beta$ , 1:1000, #sc-71186, Cell Signaling; anti-p-GSK3 $\beta$  (S9), 1:1000, #sc-9336, Santa Cruz Biotechnology; anti-CK1 $\delta$ , 1:1000, #sc-6447, Santa Cruz Biotechnology;  $\beta$ -actin, 1:4000, #A2228, Sigma; histone H1 (AE-4), sc-8030, #1:1000, Santa Cruz Biotechnology)を用いた。また、二次抗体として anti-mouse IgG (1:4000, #NA931VS, GE Healthcare), anti-rabbit IgG (1:4000, #111-035-144, Jackson ImmunoResearch), or anti-goat IgG (1:4000, #A5420, Sigma)を用いた。

### 一次抗体及び二次抗体の除去

blots を Stripping buffer に浸し、室温にて 1 時間ゆっくりと振とうした。その後、TBST で洗浄 (5 min., 3 times) し、ブロッキングに移った。

#### Stripping buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	3.13 mL (62.5 mM)
10% SDS	10 mL (2% (v/w))
<u>2-mercaptoethanol</u>	<u>349 <math>\mu</math>L (100 mM)</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 50 mL

### GSK3 あるいは CK1 の siRNA を用いた実験

24 穴平底透明マイクロプレートに  $1 \times 10^5$  (または  $5 \times 10^4$ ) cells/500  $\mu$ L/well の SW480 を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した。24 時間後、培地を取り除き、control siRNA (10 pmol; #sc-37007)、または GSK3 $\beta$  (または CK1 $\delta$ ) siRNA (10 pmol; #sc-35527 または #sc-29912) を含有する Opti-MEM 培地 (A 溶液) と Lipofectamine 2000 (2  $\mu$ L; Invitrogen, USA) を含む Opti-MEM 培地 (B 溶液) を当量混ぜ、各 well に 100  $\mu$ L ずつ滴下した。3 時間 (または 6 時間) 培養後、適当な試料濃度に調製した試料含有 DMEM 培地 500  $\mu$ L を各 well に加え、24 時間培養した。その後培地を取り除き、PBS で細胞を 1 回洗浄後、細胞溶解液の調製の項で述べた方法でライセートを作製した。

## ゼブラフィッシュの関連実験 (第 5, 6 章)

以下の実験は生化学研究室にて行った。

### ゼブラフィッシュのメンテナンス

本研究では野生型である AB ライン及びトランスジェニックラインである TOPdGFP ラインを用いた。♂及び♀を掛け合わせることによって得られたゼブラフィッシュ胚をメチレンブルー含有の E3 培地(5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.33 mM MgSO<sub>4</sub>)を用いて、28.5°Cのインキュベーターにて飼育した。採集した胚は 10 cm ディッシュに移し、無受精卵の除去を行った。各アッセイは 24 または 48 平底透明マイクロプレート上にて行った。なお発生ステージは受精後時間及び形態にて判断した。

### フェノタイプアッセイ及びレポーターアッセイ

#### 化合物 5 によるフェノタイプアッセイ

受精後 4 時間後のゼブラフィッシュ胚に DMSO (1%) または化合物 5 (300 μM) を処理し、受精後 30 時間後に顕微鏡にて形態観察を行った。

#### 化合物 5 及び BIO を用いたレスキューアッセイ

受精後 4 時間後のゼブラフィッシュ胚に DMSO (1%) または化合物 5 (300 μM) を単独処理あるいは化合物 5 及び BIO (0.5 μM) を併用処理し、受精後 30 時間後に顕微鏡にて形態観察を行った。

#### レポーターアッセイ及び TUNNEL アッセイ

受精後 0.75 時間後の TOPdGFP ゼブラフィッシュ胚に (1 cell または 2 cell ステージ) に control MO または p53 MO を導入し、受精後 4 時間後に化合物 5 (300 μM) を処理した。

## 実験の部

---

さらに、受精後 24 時間後に蛍光顕微鏡にて中脳視蓋の蛍光(緑色)を観察した。その後、*in situ* Cell Death Detection Kit (Roche applied Science)を用いて細胞死を検出し、蛍光顕微鏡にて細胞死 (赤色) の観察を行った。

### ウエスタンブロット

細胞溶解液 (ライセート) の調製

受精後 1.75 時間後のゼブラフィッシュ胚に化合物 **1** を処理し、受精後 24 時間後に 10% trichloroacetic acid を用いて 30 min 氷上で胚を固定し、yolk を除去した。胚をホモジナイズした後、遠心分離 (13,000 rpm, 5 min., 4 °C) を行い lysis buffer (9 M Urea, 2% TritonX-100, 5% 2-ME, 10% LiDS, and 1 M Tris)を加え、超音波処理を行った。さらに、遠心分離 (13,000 rpm, 5 min., 4 °C) を行い、上清をライセートとした。

### *in situ* hybridization

**Day 1** 受精後 4 時間後のゼブラフィッシュ胚に DMSO (1%) または化合物 **5** (300 μM) を処理した。

**Day 2** 受精後 24 時間後にコリオン (卵膜) を除去し、4% paraformaldehyde (PFA)/PBS(137mM NaCl、2.7mM KCl、10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)中にて固定した(4°C, O/N)

**Day 3** 胚を 1 × PBSTw(137 mM NaCl、2.7 mM KCl、10.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.76 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1% Tween 20), 25% MeOH/PBSTw, 50% MeOH/PBSTw, 75% MeOH/PBSTw, 100% MeOH の順に置換し保存した (-20°C, 20 min) 。その後、hybridization buffer (400 μl) を加え prehybridization (65°C, 1hr)を行い、RNA probe (*zic2a*<sup>[2]</sup>, *mitf*<sup>[3]</sup>, 100 × hybridization buffer, 100 μl)に置換し hybridization(65°C, O/N)した。

**Day 4** 50% formamide/2 × SSCTw (65°C, 30 min) ×2、2xSSCTw (15 min)、0.2xSSCTw (30

min)の順に洗浄した。その後、1×MABDT(10% MAB, 1% DMSO, 0.1% Tween20)で洗浄し(RT, 15 min), Blocking buffer (10% MAB, 1% DMSO, 0.1% Tween20、10% FBS)により Blocking (RT, 1 hr) を行った。AP-conjugated anti digoxigenin antibody (5000 × Blocking buffer, 500 µl)と反応させた(4°C, O/N)。

**Day 5** 1×MABDT(10% MAB, 1% DMSO, 0.1% Tween20)で洗浄した(RT, 15 min) ×8. NTMT buffer (0.1M NaCl, 0.05M MgCl<sub>2</sub>, 0.1M Tris-HCl, 0.1% Tween20)で洗浄した(RT, 5 min) ×2. 発色液 (NBT, 22.5 µl /BCIP, 35 µl, (Roche applied Science ))により遮光しながら発色させた。発色が完了した後、1 × PBSTw で数回洗浄し、4%PFA/PBS に置換し4°Cで保存した。

## 植物エキスの分画及び化合物の構造決定 (第 4, 5, 6, 7 章)

### **KKB 229 *Zanthoxylum rhetsa* からの活性化合物の単離**

#### 植物エキスの抽出

*Zanthoxylum rhetsa* の葉部 (70 g) をメタノールにて抽出を行い、メタノール抽出エキス (7.1 g)を得た。

#### 植物エキスの溶媒分配

本メタノール抽出エキス (7.1 g) を、酢酸エチル、ブタノールで順次溶媒分配を行い、酢酸エチル層 (1.0 g), ブタノール層 (3.0 g), 水層 (1.4 g) を得た。

#### 酢酸エチル層の分画

酢酸エチル層(1.0 g)を HP20 カラムクロマトグラフィー(φ 40 × 300 mm)により分画し、メタノール/アセトン = 1/0 溶出画分として Fr.1A (1.3 g) を、1/1 溶出画分として Fr.1B (1.0 g) を、0/1 溶出画分として Fr.1C (0.4 g) を得た。

#### Fr. 1A の分画

Fr. 1A (1.3 g) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー(φ 30 × 300 mm)により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0~95/5 溶出画分として Fr. 2A (13.1 mg) を、95/5 溶出

## 実験の部

---

画分として Fr. 2B (160 mg), 90/10 溶出画分として Fr. 2C (199 mg) を, 80/20~70/30 溶出画分として Fr. 2D (45.1 mg) を, 60/40~50/50 溶出画分として Fr. 2E (13.9 mg) を, 50/50~40/60 溶出画分として Fr. 2F (70.2 mg) を, 40/60 溶出画分として Fr. 2G (1.8 mg) を, 20/80~0/100 溶出画分として Fr. 2H (78 mg) を, メタノール溶出画分として Fr. 2I (532.3 mg) を, 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 2J (119.2 mg) を得た.

### Fr. 2I の分画

Fr. 2I (532.3 mg) を ODS HPLC (カラム : Develoislil ODS-HG-5,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 45/55, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 3A (0.7 mg,  $t_R$  14-16 min.), Fr. 3B (1.5 mg,  $t_R$  18-20 min.), Fr. 3C (3.4 mg,  $t_R$  21-24 min.), Fr. 3D (3.6 mg, others), Fr. 3E (5.0 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 3B 及び Fr. 3C をそれぞれ化合物 **2** 及び化合物 **1** とした.

## **KKB 252 *Ricinus communis* からの活性化化合物の単離**

### 植物エキスの抽出

*Ricinus communis* の茎部 (112 g) をメタノールにて抽出を行い, メタノール抽出エキス (8.9 g) を得た.

### 植物エキスの溶媒分配

本メタノール抽出エキス (8.9 g) を, 酢酸エチル, ブタノールで順次溶媒分配を行い, 酢酸エチル層 (1.0 g), ブタノール層 (1.5 g), 水層 (6.5 g) を得た.

### 酢酸エチル層の分画

酢酸エチル層 (1.0 g) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー ( $\phi$  25 × 250 mm) により分画し, ヘキサン/酢酸エチル = 90/10~80/20 溶出画分として Fr. 1A (287 mg), 80/20~70/30 溶出画分として Fr. 1B (110 mg), 70/30~50/50 溶出画分として Fr. 1C (255 mg) を, 20/80 溶出画分として Fr. 1D (123 mg), Fr. 1E (70 mg) 及び Fr. 1F (41.1 mg) を, 100% メタノール溶出画分として Fr. 1G (85.2 mg) を, 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 1H (79.3 mg) を得た.

#### Fr. 1E の分画

Fr. 1E (70 mg) を ODS カラムクロマトグラフィー ( $\phi$  20×300 mm) により分画し、メタノール/水 = 100/0~90/10 溶出画分として Fr. 2A (11.1 mg) を、30/70~50/50 溶出画分として Fr. 2B (20.4 mg), 70/30 溶出画分 Fr. 2C (6.0 mg) を、80/20 溶出画分として Fr. 2D (4.4 mg) を、80/20 溶出画分として Fr. 2E (22.7 mg) を得た。また、Fr. 2E を化合物 **3** とした。

#### Fr. 1B の分画

Fr. 1B (110 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  20×300 mm)により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 92/8 溶出画分として Fr. 3A (6.1 mg) を、92/8~95/5 溶出画分として Fr. 3B (3.5 mg) を、95/5~90/10 溶出画分として Fr. 3C (21.1 mg) を、90/10 溶出画分として Fr. 3D (32.2 mg) を、90/10~80/20 溶出画分として Fr. 3E (1.3 mg) を、80/20~70/30 溶出画分として Fr. 3F (12.1 mg) を、メタノール溶出画分として Fr. 3G (11.9 mg) を得た。

#### Fr. 3C の分画

Fr. 3C (21.1 mg) を ODS HPLC (カラム : COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II,  $\phi$  10×250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 98/2, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い、Fr. 4A (0.7 mg,  $t_R$  10-12 min.), Fr. 4B (0.6 mg,  $t_R$  12-14 min.), Fr. 4C (0.2 mg,  $t_R$  14-16 min.), Fr. 4D (0.3 mg,  $t_R$  14-16 min), Fr. 4E (0.3 mg,  $t_R$  18-20 min) Fr. 4F (0.2 mg,  $t_R$  26-28 min.), Fr. 4G (0.4 mg,  $t_R$  28-30 min.), Fr. 4H (0.1 mg,  $t_R$  30-32 min.), Fr. 4I (0.6 mg,  $t_R$  32-34 min), Fr. 4J (8.6 mg,  $t_R$  38-42 min) Fr. 4K (0.1 mg,  $t_R$  44 min.), Fr. 4L (0.3 mg,  $t_R$  44-46 min), Fr. 4M (0.8 mg,  $t_R$  47 min) Fr. 4N (0.8 mg,  $t_R$  50 min), Fr. 4O (0.8mg,  $t_R$  51-52 min.), Fr. 4P (0.1 mg,  $t_R$  53 min.), Fr. 4Q (0.7 mg,  $t_R$  58 min.), Fr. 4R (2.3 mg, others), Fr. 4S (0.9 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た。また、Fr. 4J を化合物 **4** とした。

#### Fr. 1C の分画

Fr. 1C (255 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  25×250 mm)により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0~90/10 溶出画分として Fr. 5A (17.4 mg) を、

## 実験の部

---

80/20~70/30 溶出画分として Fr. 5B (5.2 mg), 65/35 溶出画分として Fr. 5C (18.1 mg), Fr. 5D (10.6 mg) 及び Fr. 5E (26.8 mg) を, 30/70 溶出画分として Fr. 5F (20.5 mg) を, 80/20~0/100 溶出画分として Fr. 5G (31.5 mg) を 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 5H (58.1 mg) を得た.

### Fr. 5D の分画

Fr. 5D (10.6 mg) を ODS HPLC (カラム : Develoasil ODS-HG-5,  $\phi$  10  $\times$  250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 98/2, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 6A (0.8 mg,  $t_R$  22-23 min.), Fr. 6B (0.9 mg,  $t_R$  24-26 min.), Fr. 6C (3.2 mg, others), Fr. 6D (4.5 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 6B を化合物 **5** とした.

### Fr. 1C の分画

Fr. 1D (123 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  30  $\times$  300 mm)により分画し, ヘキサン/酢酸エチル = 100/0~90/10 溶出画分として Fr. 7A (4.6 mg) を, 80/20~70/30 溶出画分として Fr. 7B (48.9 mg), 70/30 溶出画分 Fr. 7C (20 mg) を, 60/40 溶出画分として Fr. 7D (18.1 mg) を, 50/50 溶出画分として Fr. 7E (7.2 mg) を, 0/100 溶出画分として Fr. 7F (98.2 mg) を得た.

### Fr. 7C の分画

Fr. 7C (20.0 mg) を ODS HPLC (カラム : inertsil C8,  $\phi$  4.6  $\times$  250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 8A (0.7 mg,  $t_R$  3 min.), Fr. 8B (0.5 mg,  $t_R$  4-5 min.), Fr. 8C (1.7 mg,  $t_R$  8-10min.), Fr. 8D (0.9 mg,  $t_R$  10-12min), Fr. 8E (1.5 mg,  $t_R$  12-13min), Fr. 8F (3.4 mg, others), Fr. 8G (8.8 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 8E を化合物 **6** とした.

## KKP 315 *Eurycoma longifolia* からの活性化合物の単離

### 植物エキスの抽出

*Eurycoma longifolia* の根部 (51.8 g) をメタノールにて抽出を行い、メタノール抽出エキス(4.4 g)を得た.

### 植物エキスの溶媒分配

本メタノール抽出エキス (4.4 g) を、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで順次溶媒分配を行い、ヘキサン層 (780 mg), 酢酸エチル層 (467 mg), ブタノール層 (683 mg), 水層 (2.4 g) を得た.

### ヘキサン層の分画

ヘキサン層 (780 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  25 × 300 mm) により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 90/10~80/20 溶出画分として Fr. 1A (187 mg), 70/30~50/50 溶出画分として Fr. 1B (169 mg), 40/60~30/70 溶出画分として Fr. 1C (232 mg) を, 20/80~10/90 溶出画分として Fr. 1D (56 mg), メタノール溶出画分として Fr. 1E (70 mg)) を得た.

### Fr. 1D の分画

Fr. 1D (56 mg) を ODS カラムクロマトグラフィー ( $\phi$  25 × 300 mm) により分画し、メタノール/水 = 40/60~50/50 溶出画分として Fr. 2A (7.4 mg) を, 50/50~70/30 溶出画分として Fr. 2B (3.5 mg), 80/20 溶出画分として Fr. 2C (5.4 mg) を, 90/10 溶出画分として Fr. 2D (3.9 mg) を, 95/5 溶出画分として Fr. 2E (6.5 mg) を, 80/20 溶出画分 Fr. 2F (1.5 mg) を, 90/10 溶出画分として Fr. 2G (12.3 mg) を, 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 2H (11.4 mg) を得た.

### Fr. 2C の分画

Fr. 2C (5.4 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 70/30, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 3A (1.0 mg,  $t_R$  12-13 min.), Fr. 3B (0.6 mg,  $t_R$  14-15 min.), Fr. 3C (2.0 mg, others), Fr. 3D

## 実験の部

---

(3.3 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 3A を化合物 **7** とした.

### Fr. 1C の分画

Fr. 1C (232 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  20 × 300 mm)により分画し, ヘキサン/酢酸エチル = 95/5~90/10 溶出画分として Fr. 4A (107 mg) を, 85/15 溶出画分として Fr. 4B (10.1 mg), 80/20~75/25 として溶出画分 Fr. 4C (46 mg) を, 70/30 溶出画分として Fr. 4D (9.2 mg) を, 70/30~60/40 溶出画分として Fr. 4E (7.0 mg) を, 60/40~50/50 溶出画分として Fr. 4F (26.6 mg) を, 70/30~0/100 溶出画分として Fr. 4G (11 mg) を, メタノール溶出画分として Fr. 4H (16 mg) を得た.

### Fr. 4F の分画

Fr. 4F (26.6 mg) を ODS HPLC (カラム: YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液: メタノール/水 = 80/20, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 5A (0.7 mg,  $t_R$  10-11 min.), Fr. 5B (0.8 mg,  $t_R$  14-15 min.), Fr. 5C (0.2 mg,  $t_R$  17-18 min.), Fr. 5D (0.5 mg,  $t_R$  23-24 min.), Fr. 5E (0.3 mg,  $t_R$  28 min.) Fr. 5F (0.2 mg,  $t_R$  29-30 min.), Fr. 5G (0.4 mg,  $t_R$  31-32 min.), Fr. 5H (0.1 mg,  $t_R$  36-38 min.), Fr. 5I (0.6 mg,  $t_R$  39 min.), Fr. 5J (8.6 mg, others) Fr. 5K (10 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 5B を化合物 **8** とした.

### 酢酸エチル層の分画

酢酸エチル層 (467 mg) を Silica gel PSQ100 ODS カラムクロマトグラフィー( $\phi$  25 × 300 mm)により分画し, メタノール/水 = 30/70 溶出画分として Fr. 6A (287 mg), 40/60 溶出画分として Fr. 6B (110 mg), 40/60~50/50 溶出画分として Fr. 6C (255 mg) を, 50/50 溶出画分として Fr. 6D (123 mg), 70/30~90/10 溶出画分として Fr. 6E (70 mg) を, 0/100 溶出画分 Fr. 6F (41.1 mg) を, 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 6G (85.2 mg) を得た.

### Fr. 6F の分画

Fr. 6F (41.1 mg) を ODS HPLC (カラム: YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液: メタノール/水 = 70/30, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 7A (7.4 mg,  $t_R$  13 min.), Fr. 7B (12.6 mg, others), Fr. 7C (43.2 mg, メタノール/水 =

100/0) を得た. また, Fr. 7A を化合物 **9** とした.

#### Fr. 6C の分画

Fr. 6C (255 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi 2 \times 200\text{cm}$ )により分画し, クロロホルム/メタノール = 100/0 溶出画分として Fr. 8A (8.2 mg) を, 95/5 溶出画分として Fr. 8B (61 mg) 及び Fr. 8C (27.3 mg) を, 90/10 溶出画分として Fr. 8D (1.8 mg) を, 80/20~70/30 溶出画分として Fr. 8E (10.1 mg) を, 50/50 溶出画分として Fr. 8F (3.8 mg) を, 0/100 溶出画分として Fr. 8G (14 mg) を得た.

#### Fr. 8E の分画

Fr. 8E (10.1 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi 10 \times 250\text{ mm}$ , 溶離液 : メタノール/水 = 43/57, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 9A (0.3 mg,  $t_R$  7-8 min.), Fr. 9B (0.4 mg,  $t_R$  8-9 min.), Fr. 9C (2.0 mg,  $t_R$  10-12min.), Fr. 9D (0.1 mg,  $t_R$  12-13 min.), Fr. 9E (0.9 mg,  $t_R$  16 min.) Fr. 9F (5.2 mg, others), Fr. 9G (3.1 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 9C を化合物 **10** とした.

## KKB 270 *Tabernaemontana divaricata* からの活性化合物の単離

### 植物エキスの抽出

*Tabernaemontana divaricata* の地上部 (112.5 g) をメタノールにて抽出を行い、メタノール抽出エキス(9.7 g)を得た.

### 植物エキスの分画

メタノール抽出エキス(9.7 g)を HP20 カラムクロマトグラフィー(φ 70 × 300 mm)により分画し、メタノール溶出画分として Fr. 1A (7.6 g) を、アセトン溶出画分として Fr. 1B (3.0 g) を得た.

### Fr.1A の溶媒分配

本メタノール抽出エキスを、ヘキサン、酢酸エチル、ブタノールで順次溶媒分配を行い、ヘキサン層 (3.9 g)、酢酸エチル層 (1.5 g)、ブタノール層 (1.0 g)、水層 (1.1 g) を得た.

### ヘキサン層の分画

ヘキサン層 (3.9 g) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー(φ 45 × 300 mm)により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 100/0~90/10 溶出画分として Fr. 2A (1.0 g)、90/10~80/20 溶出画分として Fr. 2B (1.1 g) を、80/20~70/30 溶出画分として Fr. 2C (400 mg) を、50/50~30/70 溶出画分として Fr. 2D (0.5 g) を、メタノール溶出画分として Fr. 2E (0.5 g)、1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 2F (0.4 g) を得た.

### Fr. 2B の分画

Fr. 2B (1.1 g) を ODS カラムクロマトグラフィー (φ 4 × 250 mm) により分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 90/10~85/15 溶出画分として Fr. 3A (116 mg) を、85/15 溶出画分として Fr. 3B (161 mg) 及び Fr. 3C (198 mg) を、85/15~80/20 溶出画分として Fr. 3D (115 mg) を、80/20 溶出画分として Fr. 3E (112 mg) を、75/25 溶出画分として Fr. 3F (62 mg) を、75/25~70/30 溶出画分として Fr. 3G (12.3 mg) を、60/40 溶出画分として Fr. 3H (12.3 mg) を、50/50~30/70 溶出画分として Fr. 3I (130 mg) を、メタノール溶出画分及び 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 3J (11.4 mg) を得た.

Fr. 3E の分画

Fr. 3E (112 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10  $\times$  250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 4A (4.4 mg,  $t_R$  17-18 min.), Fr. 4B (4.8 mg,  $t_R$  19-20 min.), Fr. 4C (58.6 mg, others), Fr. 4D (26.2 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 4A 及び Fr. 4B を化合物 **10** 及び化合物 **11** とした.

Fr. 3C の分画

Fr. 1C (198 mg) を ODS カラムクロマトグラフィー( $\phi$  10  $\times$  250 mm)により分画し, メタノール/水 = 50/50~60/40 溶出画分として Fr. 5A (6.0 mg) を, 60/40~70/30 溶出画分として Fr. 5B (3.9 mg), 70/30~80/20 溶出画分として Fr. 5C (25 mg) を, 90/10~95/5 溶出画分として Fr. 5D (40 mg) を, 95/5 溶出画分として Fr. 5E (93 mg) を, メタノール溶出画分及び 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 5F (23 mg) を得た.

Fr. 5D の分画

Fr. 5D (40 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  10  $\times$  250cm)により分画し, クロロホルム/メタノール = 90/10~80/20 溶出画分として Fr. 6A (9.8 mg) を, 75/25~70/30 溶出画分として Fr. 6B (26.2 mg), 60/40~50/50 溶出画分として Fr. 6C (0.4 mg) を, メタノール溶出画分及び 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr. 6D (2.3 mg) を得た.

Fr. 6B の分画

Fr. 6B (26.2 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10  $\times$  250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 7A (0.4 mg,  $t_R$  10-12 min.), Fr. 7B (0.2 mg,  $t_R$  12-13 min.), Fr. 7C (0.3 mg,  $t_R$  14-15 min.), Fr. 7D (0.2 mg,  $t_R$  15-16 min.), Fr. 7E (0.1 mg,  $t_R$  16 min.) Fr. 7F (0.2 mg,  $t_R$  17 min.), Fr. 7G (3.7 mg,  $t_R$  18-20 min.), Fr. 7H (10.5 mg, others.), Fr. 7I (9.0 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 7G を化合物 **12** とした.

Fr. 3D の分画

Fr. 3D (115 mg) を Silica gel PSQ100 カラムクロマトグラフィー( $\phi$  10  $\times$  250 mm) により

## 実験の部

---

分画し、ヘキサン/酢酸エチル = 90/10~80/20 溶出画分として Fr. 8A (5.5 mg) を、80/20 溶出画分として Fr. 8B (2.3 mg) 及び Fr. 8C (27.4 g) を、75/25 溶出画分として Fr. 8D (5.4 mg) を、70/30 溶出画分として Fr. 8E (36.6 mg) 及び Fr. 8F (8.6 mg) を 50/50~30/70 溶出画分として Fr. 8G (6.7 mg) を、メタノール溶出画分及び 1%TFA/メタノール溶出画分として Fr.8H (17.5 mg) を得た。

### Fr. 8F の分画

Fr. 8F (8.6 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 9A (0.4 mg,  $t_R$  16-17 min.), Fr. 9B (0.3 mg,  $t_R$  16-17 min.), Fr. 9C (2.6 mg,  $t_R$  17-19 min.), Fr. 9D (4.0 mg, others), Fr. 9E (0.3 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 9C を化合物 **13** とした.

### Fr. 8E の分画

Fr. 8E (5.4mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 10A (0.3 mg,  $t_R$  7-8 min.), Fr. 10B (0.4 mg,  $t_R$  10-11 min.), Fr. 10C (0.7 mg,  $t_R$  11-12 min.), Fr. 10D (1.1 mg,  $t_R$  12-14 min.), Fr. 10E (9.8 mg,  $t_R$  15-16 min.) Fr. 10F (3.0 mg,  $t_R$  26-28 min.), Fr. 10G (10 mg, others), Fr. 10H (8.6 mg, メタノール/水 = 100/0) を得た. また, Fr. 10C 及び Fr. 10D をそれぞれ化合物 **10** 及び化合物 **12** とした.

### Fr. 8D の分画

Fr. 8D (8.6 mg) を ODS HPLC (カラム : YMC-Pack ODS-AM,  $\phi$  10 × 250 mm, 溶離液 : メタノール/水 = 90/10, 流速 2 mL/min., 検出波長 254 nm + RI) により精製を行い, Fr. 11A (0.8 mg,  $t_R$  10-11 min.), Fr. 11B (2.4 mg,  $t_R$  14-15 min.), Fr. 11C (1.8 mg,  $t_R$  17-18 min.), を得た. また, Fr. 11C を化合物 **12** とした.

単離した化合物の物理化学的性状

quercitrin (1)



黄色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  447 [M-H]<sup>-</sup>

[ ]<sup>17.6</sup> -74.4 (MeOH;  $c0.5$ ), [ ]<sup>25</sup> -147.0 (MeOH;  $c0.5$ )<sup>[4]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータは本論 Table 4-1 を参照のこと.

guaijaverin (2)



黄色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  433 [M-H]<sup>-</sup>

[ ]<sup>21.6</sup> -14.6 (MeOH;  $c1.0$ ), [ ]<sup>25</sup> -53.6 (MeOH;  $c1.0$ )<sup>[5]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータは本論 Table 4-2 を参照のこと.

ricinine (3)

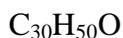


白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  187 [M+Na]<sup>+</sup>, 351[2M+Na]<sup>+</sup>, 515[3M+Na]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータは本論 Table 5-1 を参照のこと.

lupeol (4)



白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  449 [M+Na]<sup>+</sup>, 875[2M+Na]<sup>+</sup>

[ ]<sup>25.0</sup> +25.7 (MeOH;  $c0.7$ ), [ ]<sup>24.5</sup> +27.3 (MeOH;  $c0.7$ )<sup>[6]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータは本論 Table 5-2 を参照のこと.

7-Oxo- $\beta$ -sitosterol (5)



白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  429  $[M+H]^+$

$[ ]^{24.8}$  -37.7 ( $CHCl_3$ ;  $c1$ ),  $[ ]^{20.0}$  -98.0 ( $CHCl_3$ ;  $c1$ )<sup>[7]</sup>

$^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータは本論 Table 5-3 を参照のこと.

-sitosterol-3-O- -D-glucopyranoside (**6**)

$C_8H_8N_2O_2$

白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  575  $[M-H]^-$

$[ ]^{23.5}$  -47.0 (pyridine;  $c0.2$ ),  $[ ]^{26.0}$  -41.7 (pyridine;  $c0.2$ )<sup>[8]</sup>

$^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータは本論 Table 5-4 を参照のこと.

9-hydroxycanthin-6-one (**7**)

$C_{14}H_8N_2O_2$

黄色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  575  $[M-H]^-$

$^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータは本論 Table 6-1 を参照のこと

20, 21, 22, 23-tetrahydro-23-oxoazadirone (**8**)

$C_8H_8N_2O_2$

白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$   $m/z$  477  $[M+Na]^+$

$[ ]^{26.6}$  -29.7 ( $CHCl_3$ ,  $c0.02$ ),  $[ ]$  -15.0 ( $CHCl_3$ ;  $c0.02$ )<sup>[9]</sup>

$^1H$ -NMR,  $^{13}C$ -NMR スペクトルデータは本論 Table 6-2 を参照のこと

canthin-6-one-O- $\beta$ -glucopyranoside (**9**)

$C_8H_8N_2O_2$

黄色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  575  $[M-H]^-$

$[ ]^{19.4}$  +8.3 (DMSO;  $c0.5$ )

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは本論 Table 6-3 を参照のこと

voacangine (**10**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

黄白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  369  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\ ]^{21} -41$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c1.02$ ),  $[\ ]^{24.9} -8.9$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c1.02$ )<sup>[10]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは本論 Table 7-1 を参照のこと

isovoacangine (**11**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

黄白色非結晶固体

ESIMS  $m/z$  369  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\ ]^{25} -30.4$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c4.2$ ),  $[\ ]^{25.8} -36.4$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c4.2$ )<sup>[11]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは本論 Table 7-2 を参照のこと

coronaridine (**12**)

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_3$

黄白色非結晶固体

$m/z$  339  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\ ]^{24.1} -32.2$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c0.5$ ),  $[\ ]^{21} -20$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c0.5$ )<sup>[12]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは本論 Table 7-3 を参照のこと

coronaridine hydroxyindolenine (**13**)

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$

黄白色非結晶固体

$m/z$  355  $[\text{M}+\text{H}]^+$

$[\ ]^{24.2} -10.2$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c1.04$ ),  $[\ ] -8$  ( $\text{CHCl}_3$ ;  $c1.04$ )<sup>[13]</sup>

$^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルデータは本論 Table 7-4 を参照のこと

[参考文献]

- [1] E. Lindhagen, P. Nygren, R. Larsson, *Nat. Protoc.* **2008**, 3, 1364-1369.
- [2] Y. Grinblat, H. Sive, *Dev Dyn* **2001**, 222, 688-693.
- [3] R. I. Dorsky, D. W. Raible, R. T. Moon, *Genes Dev* **2000**, 14, 158-162.
- [4] P. V. Kiem, C. V. Minh, N. T. Dat, X. F. Cai, J. J. Lee, Y. H. Kim, *Arch Pharm Res* **2003**, 26, 1014-1017.
- [5] M. K. Sakar, D. Sohretoglu, M. Ozalp, M. Ekizoglu, S. Piacente, C. Pizza, *Turk. J. Chem.* **2005**, 29, 555-559.
- [6] J. Fotie, D. S. Bohle, M. L. Leimanis, E. Georges, G. Rukunga, A. E. Nkengfack, *J Nat Prod* **2006**, 69, 62-67.
- [7] X. Zhang, P. Geoffroy, M. Miesch, D. Julien-David, F. Raul, D. Aoudé-Werner, E. Marchioni, *Steroids* **2005**, 70, 886-895.
- [8] S. Faizi, M. Ali, R. Saleem, Irfanullah, S. Bibi, *Magnetic Resonance in Chemistry* **2001**, 39, 399-405.
- [9] J. de Paula, I. J. C. Vieira, M. F. d. G. F. da Silva, E. R. Fo, J. B. Fernandes, P. C. Vieira, A. L. Pinheiro, E. F. Vilela, *Phytochemistry* **1997**, 44, 1449-1454.
- [10] R. Torrenegra, J. A. P. Pedrozo, H. Achenbach, P. Bauerei, *Phytochemistry* **1988**, 27, 1843-1848.
- [11] A. E. Gower, B. d. S. Pereira, A. J. Marsaioli, *Phytochemistry* **1986**, 25, 2908-2910.
- [12] H. Achenbach, R. Waibel, M. Zwanzger, *Phytochemistry* **1994**, 37, 1737-1743.
- [13] D. Dagnino, J. Schripsema, R. Verpoorte, *Phytochemistry* **1994**, 35, 671-676.

## 謝 辞

---

### 謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜り、また、論文執筆等にも直接指導を賜りました、千葉大学薬学部 活性構造化学研究室 石橋正己教授に厚く感謝すると共に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験をはじめとする研究室での様々な場面で有益な御助言を賜りました、千葉大学薬学部 活性構造化学研究室 荒井緑准教授に心から感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接の指導者として実験や論文執筆をはじめとする多くの有意義な御討論と御鞭撻を賜りました千葉大学薬学部 活性構造化学研究室 當銘一文助教(現、富山大学 和漢医薬総合研究所 資源開発研究部門・生薬資源科学分野 當銘一文准教授)に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究に関する多くの有意義な御討論と御鞭撻を賜り、非常に有益な御指導、御助言を賜りました千葉大学薬学部 活性構造化学研究室 石川直樹助教に心から御礼申し上げます。

熱帯植物の入手に御協力頂きましたテムコ株式会社 小谷野喬博士、コンケン大学農学部 Thaworn Kowithayakorn 博士に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験や論文執筆等に有意義な御討論と御鞭撻を賜り、非常に有益な御指導、御助言を賜りました千葉大学薬学部 生化学研究室 伊藤素行教授に心から御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、直接の実験の指導や有意義な御討論を賜り、非常に有益な御指導、御助言を賜りました千葉大学薬学部 生化学研究室 溝口貴正助教に心から御礼申し上げます。

## 謝 辞

---

在学中，御指導・御討論を頂き，御世話になりました活性構造化学研究室及び生化学研究室の皆様へ感謝いたします。

最後に，9年間に渡る学生生活を支えて下さいました私の家族へ深く感謝致します。

主論文目録

本学位論文の内容は、下記の発表論文による。

1. K. Ohishi, K. Toume, M. A. Arai, S. K. Sadhu, F. Ahmed, T. Mizoguchi, M. Itoh, M. Ishibashi,  
*Bioorg. Med. Chem.* 2014, 22, 4597-4601.

## 謝 辞

---

### 学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 高山 廣光

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 山口 直人

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 齊藤 和季

審査をして頂き、貴重な御助言を賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。