

## 第 31 回 (2003 年度) 研究奨励金受領者研究報告

### 機能性ポリフェノール由来尿中バイオマーカーの探索研究

岡山大学大学院自然科学研究科  
(現 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科) 伊東秀之

天然から多様な化学構造を有するポリフェノールの存在が解明されるに伴い、それらの持つ機能性も各種実験系において数多く見だされてきている。しかし、実際に機能性ポリフェノールが生体内でどのような運命を辿り、その機能性を発揮しているかは未解明である。本研究では生体内挙動の観点から、ポリフェノールの有する各種機能性発現に関与する活性本体探求の基盤創製を目的とし、ポリフェノールが生体内に摂取された後、尿中に排泄されるポリフェノール由来のバイオマーカーを探索する。

クランベリーは古くから欧米で尿路感染症の予防、治療を目的に民間療法として用いられ、プロアントシアニジン、フラボノイド、アントシアンなど多種多様なポリフェノールが豊富に含まれている。筆者らはクランベリーに含まれている多様なポリフェノール成分に注目し、クランベリージュース飲用のヒト尿中ポリフェノール代謝物を探索し、その尿中代謝物の中から尿路感染症の予防、治療に有効なバイオマーカーの探索を行う。

ボランティア 10 人に対してクランベリー UR100 (キッコーマン) 200 mL 飲用後 24 時間までの尿を採取し (岡山大学薬学部倫理委員会承認)、採取した尿は酵素による脱抱合化、Bond Elut C<sub>18</sub> による固相抽出、フィルター後、分析用サンプルとした。クランベリー中に含まれる低分子フェノール、フラボノイド、プロシアニジン、アントシアン、および予測される代謝物を含め計 59 種のポリフェノールを分析の対象とし、ジュース中および尿サンプルについて HPLC-ESI-MS-MS 法による定量を行った。定量方法については以前筆者が確立した方法<sup>1,2)</sup>を応用して、化合物のタイプ別に低分子フェノール類、フェニルプロパノイド類、フラボノイド類はそれぞれ ESI negative mode で、カテキン類およびそのメチル化体とプロアントシアニジン類は ESI positive mode で定量を行った。

紙面の都合上詳細なデータは割愛させていただくが、主な尿中ポリフェノールの排泄に関する結果を表に示す。Vanillic acid は最も高い尿中排泄率を示したが、このことはクランベリーに多量含まれているプロアントシアニジンポリマーの代謝物としても尿中に排泄されている可能性が

表 ヒトにおけるクランベリージュース飲用の主なポリフェノールの尿中排泄 (n=10)

| Compound                           | Urinary excretion<br>( $\mu$ M/24 hr)<br>(min-max) | Excretion<br>recovery<br>(%) |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------|
| Vanillic acid                      | 84.0 (2.3-703.6)                                   | 89.3                         |
| Isovanillic acid                   | 10.0 (0.71-42.6)                                   | — <sup>a)</sup>              |
| Protocatechuic acid                | 15.7 (0.26-74.9)                                   | 6.0                          |
| <i>m</i> -Coumaric acid            | 9.7 (0.63-42.2)                                    | —                            |
| <i>p</i> -Coumaric acid            | 17.4 (2.37-70.0)                                   | 8.1                          |
| <i>m</i> -Hydroxyphenylacetic acid | 9.3 (0-85.6)                                       | —                            |
| Chlorogenic acid                   | 0.14 (0.01-0.42)                                   | 0.72                         |
| Isorhamnetin                       | 1.0 (0.17-4.9)                                     | 0.69                         |
| Quercetin                          | 0.58 (0.11-2.8)                                    | 0.80                         |
| Quercitrin                         | 0.06 (0-0.15)                                      | 0.21                         |
| Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside   | 0.08 (0.01-0.40)                                   | 0.11                         |
| Quercetin 3- <i>O</i> -arabinoside | 0.02 (0-0.16)                                      | 0.04                         |
| Myricetin 3- <i>O</i> -galactoside | 0.02 (0-0.05)                                      | 0.03                         |

<sup>a)</sup> ジュース中では未検出

示唆された<sup>3)</sup>。また Isovanillic acid, *m*-Coumaric acid, および *m*-Hydroxyphenylacetic acid はジュース中には検出されず、尿中に初めて検出されたもので、これらもクランベリーのポリフェノール成分の代謝物として尿中排泄されていることが考えられた。また各種フラボノイド配糖体も排泄率は低いものの尿中に排泄されることが認められ、さらに Catechin および Epicatechin については、それらの代謝物である 3'-および 4'-*O*-メチル化体も尿中に排泄されていることを確認した<sup>4)</sup>。一方、クランベリーに豊富に含まれているプロアントシアニジン、特に A-type Proanthocyanidin は尿路上皮細胞への大腸菌の付着阻害作用が知られており<sup>5)</sup>、クランベリーが有する尿路感染症の予防又は治療効果の活性本体とされているが、A-type Proanthocyanidin が未変化のまま吸収後、尿中に排泄され尿路でその効果を発揮しているかは疑問である。そこでヒト尿中における Procyanidin A-2 の排泄について HPLC-ESI-MS-MS により検索を行った結果、いずれの尿サンプル中にも確認できなかったが、その代謝物と考えられるモノメチル化体に相当するピークを検出することができ、Procyanidin A-2 は生体内でメチル化され尿中に排泄されることを示唆するデータを得た (図)。

以上の結果からジュース中には見られない幾つかのポリフェノールが尿中に排泄されていることが明らかとなり、クランベリーの尿路感染症の治療、予防に関しては、ジュース中の成分もさることながら生体内代謝物もその効果に

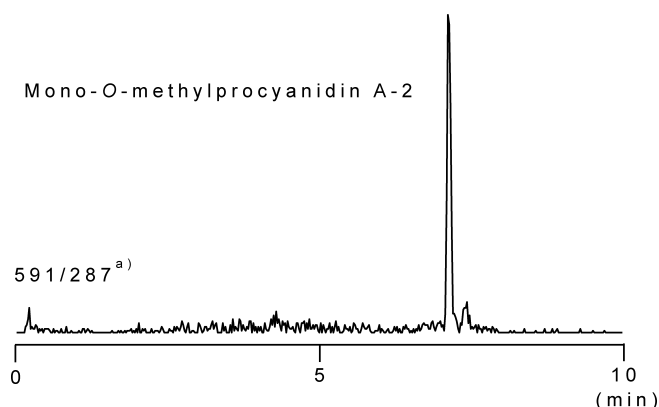


図 クランベリージュース飲用後のヒト尿中 Procyanidin A-2 モノメチル化体の HPLC-ESI-MS-MS 分析におけるシングルイオンクロマトグラム (MRM mode with positive ionization)  
a) ( $m/z$  parent ion)/( $m/z$  product ion)

## 線虫の休眠誘導フェロモンの単離・構造解析

鳥取大学農学部 河野 強

線虫 *Caenorhabditis elegans* は、生育密度の上昇・餌の枯渇などの生育環境の悪化に应答して耐性幼虫を形成し、休眠する。この耐性幼虫形成は TGF- $\beta$  および insulin シグナルによって制御される。加えて、insulin シグナルは線虫の成虫寿命を制御することが知られている。線虫は休眠誘導フェロモン（正確には休眠誘導物質）を合成・分泌し、生育密度を知るための化学信号に用いる。高濃度のフェロモンは TGF- $\beta$  の合成・分泌を阻害し、線虫を休眠させる。このフェロモンの存在は 20 年ほど前から知られていたが、その構造は不明のままであった。

著者らは、休眠誘導フェロモンの正体を明らかにすべく精製を進めていたが、2005 年 2 月に韓国の研究グループにより休眠誘導フェロモン (daumone と呼ばれる) の構造が報告された。一方、著者らは、本研究の過程で①休眠誘導活性を有する物質が複数存在すること、②休眠誘導フェロモン粗抽出物が成虫寿命を延長させる活性を有することを見出した。ここでは、フェロモン粗抽出物が insulin シグナルを介して成虫寿命を延長させることについて報告する。

### 休眠誘導フェロモン粗抽出物の調製と寿命延長活性

野生株 N2 の液体培養を行い、線虫および餌である大腸菌を除去した後、活性炭クロマトグラフィー（メタノール溶出）を行い、1/100 容量まで濃縮し、フェロモン粗抽出物とした。また、フェロモン生合性不全株 *daf-22* について

寄与している可能性が示唆された。今後、尿中で確認されたポリフェノールについて尿路感染症の予防を目的とした生理活性を検討していく予定である。

最後に、本研究を遂行するにあたり、研究奨励金を賜りました財団法人農芸化学研究奨励会に深謝申し上げます。

- 1) H. Ito, M.P. Gonthier, C. Manach, C. Morand, L. Mennen, C. Remesy, and A. Scalbert, *BioFactors*, **22**, 241–243 (2004).
- 2) H. Ito, M.P. Gonthier, C. Manach, C. Morand, L. Mennen, C. Remesy, and A. Scalbert, *Br. J. Nutr.*, **94**, in press (2005).
- 3) L. Y. Rios, M. P. Gonthier, C. Remesy, I. Mila, C. Lapi-erre, S. A. Lazarus, G. Williamson, and A. Scalbert, *Am. J. Clin. Nutr.*, **77**, 912–918 (2003).
- 4) 大西令子, 伊東秀之, 笠島直樹, 金田 幸, 狩山玲子, 公文裕巳, 吉田隆志, 日本農芸化学会 2005 年度大会 (札幌).
- 5) L. Y. Foo, Y. Lu, A. B. Howell, and N. Vorsa, *J. Nat. Prod.*, **63**, 1225–1228 (2000).

も同様の処理を行い、対照区とした。生育培地 (NGM: nematode growth medium) にそれぞれの粗抽出物を 10% 容量添加し、休眠率（耐性幼虫形成率）を測定したところ、野生株由来の粗抽出物では約 90% の休眠率を示したのに対し、フェロモン生合性不全株由来の粗抽出物では殆ど耐性幼虫を形成しなかった。

寿命測定では子孫の存在が測定を煩雑にするため、生育培地に 5-fluoro-2'-deoxyuridine を添加して胚発生を阻害した。上記 NGM に野生株由来の粗抽出物を 5% あるいは 10% 容量添加し、4 齢幼虫を 25°C で培養して寿命を測定した。その結果、平均延命はそれぞれ約 17 日、20 日であった。また、粗抽出物を加えない場合の平均寿命は約 13 日であった。このことから、野生株由来の粗抽出物は濃度依存的に成虫寿命を延長させることが明らかとなった。一

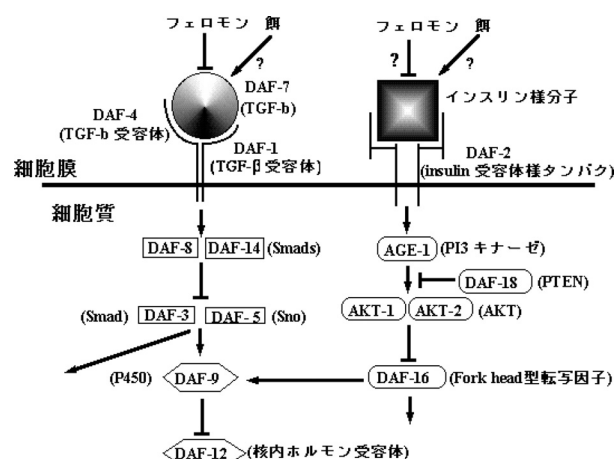


図 線虫の休眠・寿命を制御する情報伝達経路

方、フェロモン生合成不全株由来の粗抽出物についても同様に寿命測定を行ったところ、寿命延長効果が殆ど認められなかった。以上のことから、フェロモンを含む野生株由来の粗抽出物には延命効果を有する物質が含まれると結論づけた。

#### フェロモン粗抽出物の延命効果は insulin シグナルを経由するのか？

*daf-16* 遺伝子はフォークヘッド型転写因子をコードしており、その変異は insulin シグナルの減少（例えば、受容体 DAF-2 ならびにそれに続く PI 3-kinase の変異）による延命効果を完全に抑制する。そこで、フェロモン粗抽出物の延命効果が insulin 経路に依存するかどうかを確定す

るために、変異株 *daf-16* に対する寿命測定を行った。その結果、変異株では粗抽出物の延命効果が完全に消失した。このことから、粗抽出物の延命効果は insulin 経路を介すると考えた。

今後、粗抽出物が insulin 様分子の合成・分泌を阻害するのかどうかを明らかにすると共に、休眠誘導活性・延命活性を有する物質の同定を進めて行きたい。

最後に、本研究に対してご援助いただきました（財）農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

1) 河野 強ら：2005 年度日本農芸化学会大会発表

#### 新規抗生物質リポシドマイシンの 3-メチルグルタル酸残基を特異的に分解する酵素活性に関する研究

岩手大学農学部農業生命科学科 木村賢一

放線菌が産生する抗生物質であるリポシドマイシンは、非常に精巧なオンリーワンの有機化学構造を有しており、しかも、作用点が未だ医薬品に唯一なっていない、細菌のペプチドグリカン合成のトランスロケース I (EC2.7.8.13, Phospho-MurNAc-pentapeptide translocase) を nM オーダーで強力に阻害する。これまでの研究で、リポシドマイシン A において、硫酸基と 3-メチルグルタル酸残基が外れた化合物（タイプ (IV)）が、恐らくは膜透過性の改善の結果として、抗酸菌に対しより高い抗菌活性を示している（図 1）<sup>1)</sup>。そこで、タイプ (IV) の活性をさらに精査するため、生産量が多い硫酸基のみが無いタイプ (III) の化合物であるリポシドマイシン C-(III)、あるいは M-(III)<sup>2)</sup> をリガンドとして用い、分子内の 3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す活性成分を各種動物血清に求めた。そして、その活性が認められた動物血清からリポシドマイシン特異的結合タンパク質を精製し、得られたタンパク質（酵素）の性質を明らかにすることを目的として研究を進めた（図 2）。

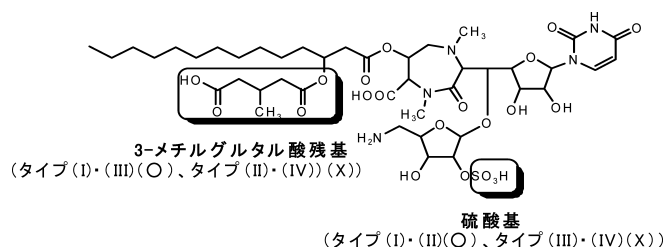


図 1 リポシドマイシンの構造

#### (1) 分子内の 3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す条件の検討

①有機化学反応：リポシドマイシン M-(III) を用いて、0.1 M 濃度の pH 3～pH 10 の各種緩衝液中、37℃、24 時間の反応におけるタイプ (III) からタイプ (IV) への変換を HPLC により調べたところ、pH 8 から変換が始まり、pH 10 では約 61% の変換が認められた。一方、pH 7 以下では全く変化は認められなかった。次に最も変換効率が高かった pH 10（ホウ酸-塩化カリウム-水酸化ナトリウム）の緩衝液を用いて、その濃度の違いによる変換効率を調べたところ、0.2 M 以上でタイプ (III) からタイプ (IV) への 100% の変換が認められた。以上により、脂肪側鎖を intact のままで、3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す有機化学的条件が明らかとなった<sup>3)</sup>。今回の結果より、培養条件の改変によって 3-メチルグルタル酸残基が外れたリポシドマイシンのタイプ (II) と (IV) が生じたのは、その生産量の低さからも鑑みて、培地の pH 変化によるアーティファクトの可能性が高いと推定された。

②生化学反応：有機化学的に分子内の 3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す条件が明らかとなったので、次に特異的酵素活性の検索を行った。9 種の市販動物血清（ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリ、ラット、モルモット）を用いてリポシドマイシンと反応を行い、生成物を HPLC で分析することでタイプ (III) からタイプ (IV) への変換活性を測定した。条件は、40 mM リン酸緩衝液 (pH 8) 中 500 μg の各種動物血清を用い、37℃、24 時間の反応を行った。その結果、ウサギとラット血清中に 40% を超える高い変換活性が認められた。そこで、今後の結合タンパク質の実験には、ウサギかラットの血清を用いる事とした<sup>3)</sup>。

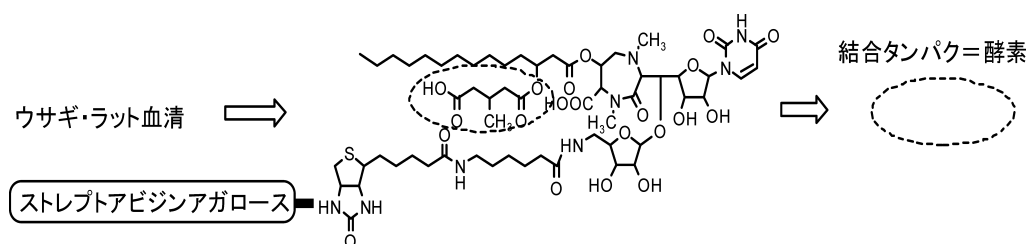


図2 リポシドマイシンアフィニティーカラムによる3-メチルグルタル酸残基を外す酵素の取得

## (2) 分子内の3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す酵素の検討

### ① ビオチン化リポシドマイシンの作製

分子内の3-メチルグルタル酸残基のみを特異的に外す酵素を取得するための方法の一つとして、リポシドマイシン C-(III) のアフィニティーカラムを作製して検討することとした。リポシドマイシンは、分子内にアミノ基を有することから、Biotinamido hexanoic acid N-hydroxy-succinimide ester と 4-Dimethylaminopyridine を用いて反応を行ったところ、元のリポシドマイシンよりも HPLC で保持時間の早い1本のピークが認められた。そこで、そのピークを分取して高分解能質量分析 (ESI(+)) を行ったところ、分子量 (計算値: 1269.61759, 測定値: 1269.61789), 分子式 ( $C_{58}H_{93}N_8O_{21}S$ ) が得られ、目的のビオチン化体が作製できたと判断した。今後活性を確認した上で、本ビオチン化リポシドマイシン C-(III) をストレプト

アビジンアガロースに結合させ、ウサギ、ラットの血清を作用させることで結合タンパクの分析を行う予定である。

微生物培養液や食材などの植物抽出液から天然の低分子有機化合物 (バイオプローブ) を見出し、それを用いて、病気に対する分子レベルのメカニズムなど生命の複雑な現象を解析するケミカルバイオロジーは、現在非常に興味深い学問であり、そのような一連の研究により、今後有用な医薬品や特定保健用食品の開発へと結びつけたい。

最後に、本研究に対しご援助頂きました (財) 農芸化学研究奨励会に深く感謝致します。

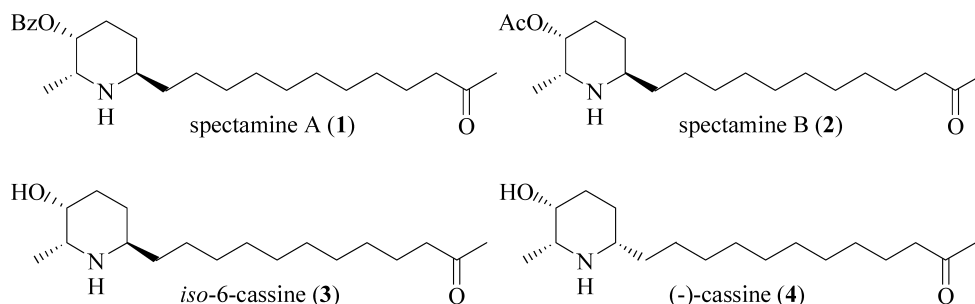
- 1) K. Kimura and T. D. H. Bugg: *Nat. Prod. Rep.* (Review), **20**, 252-273 (2003).
- 2) S. Kagami, Y. Esumi, M. Nakakoshi, M. Yoshihama and K. Kimura: *J. Antibiot.*, **56**, 552-556 (2003).
- 3) 木村賢一, 板倉芳江, 佐々木徳子, 山田達夫, 平 秀晴, 各務 忍, 高橋英俊, 江角保明, 越野広雪: 2003 年度日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 272.

## 2,6-2 置換ピペリジナルカロイドを指標とした活性酸素抑制化合物の創製

信州大学大学院農学研究科 真壁秀文

スーパーオキシド ( $O_2^{\cdot-}$ ) は、活性酸素の一種でマクロファージなどの細胞によって生産され、殺菌作用や情報伝達など生体防御に必要な物質だが種々の刺激により過剰に生産されると炎症や老化、さらに癌化の原因につながると考えられている。この様な観点から、信州大学農学

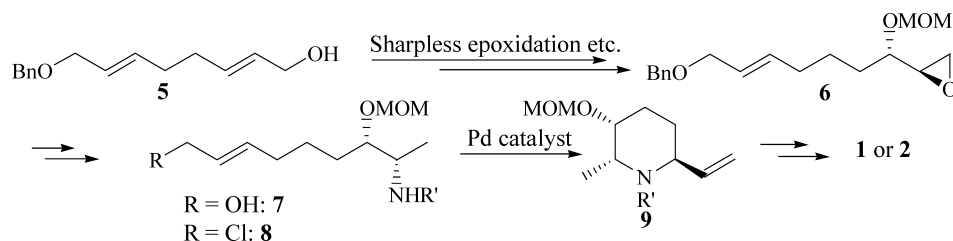
部応用生命科学科生理活性化学研究室では  $O_2^{\cdot-}$  の産生を抑制する化合物の探索が行われてきた。最近、当研究室ではアフリカ産マメ科植物 *Cassia spectabilis* より  $O_2^{\cdot-}$  の産生を抑制する 2,6-2 置換ピペリジナルカロイドの spectamine A (1), spectamine B (2), iso-6-cassine (3) を単離した。これらの化合物のうちベンゾイル基を持つ spectamine A (1) は  $25 \mu\text{mol}$  でマクロファージにより生産された  $O_2^{\cdot-}$  を 46.7% 抑制した。2,6-2 置換ピペリジナルカロイドは様々な生理活性が報告されているが、活性酸素を抑制する効果は本研究がはじめてである。本研究では活性酸



素抑制のメカニズム解明のための分子プローブの創製を目的に 2,6-2 置換ピペリジナルカロイド類の効率的な成法を確立することを目的とした。

• Spectamine A (**1**) の合成研究

アリルアルコール **5** を出発物質として、Sharpless 不斉エポキシ化反応等を経てエポキシド **6** に導いた。さらにジフェニルリン酸アジドを用いた光延法によるアジド化は  $\text{NaN}_3$  を用いた場合よりもはるかに高収率でアジドを与え **7** に導くことができた。



Scheme 1

本合成の鍵反応は  $\pi$  アリルパラジウム錯体を経た立体選択的な環化反応である。2,6-*cis* 体のピペリジン環の合成は既にアリルアルコール **7** から  $\text{PdCl}_2$  を触媒に用いることで完全なジアステレオ選択性で反応が進むことを見出し、(-)-cassine の合成に応用した (Fig. 1)。

今回は合成が困難とされる 2,6-*trans* 体を生成させる条件を検討した (Fig. 2)。

その結果、アリルクロリド **8** を用い触媒量の  $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$

を用いた場合に約 5 : 2 の比で望む 2,6-*trans* 体が得られた。Pd の代わりに Ni や Pt を触媒に用いた場合は予想に反して生成物が得られなかった。

またアリルアルコールをピバロイル基で保護した **7** の誘導体を用いて立体障害を利用して 2,6-*trans* 体の合成を試みたが 6 位のメチル基の立体障害のために反応が進行しなかった (Fig. 3)。

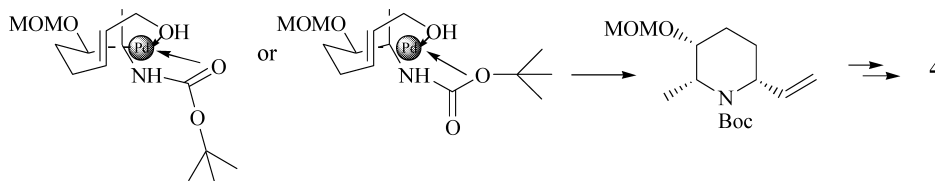


Fig. 1

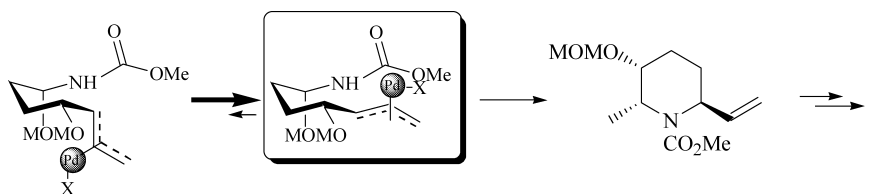


Fig. 2

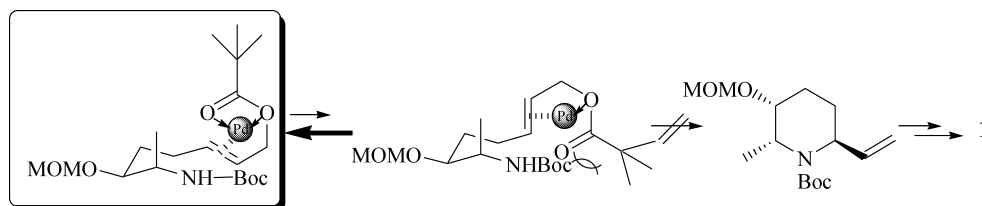
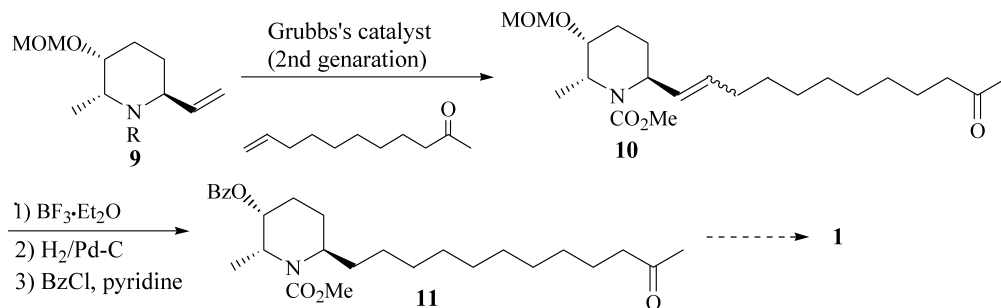


Fig. 3

以上の知見から Fig. 2 のような反応で Pd に dppp など  
の二座配位子を用いることで反応が改善される可能性があ

ることが示唆される。続いて **9** を用い Scheme 2 に示す方法  
で spectamine A (**1**) の保護体を得た。現在最終工程を  
検討している。



spectamine A (**1**) のような 2,6-2 置換ピペリジナル  
カロイド類が活性酸素産生を抑制することは極めて興味深  
く今後構造活性相関が明らかにされると活性酸素による生  
体障害の予防につながる可能性がある。また活性酸素発生  
のメカニズム解明の分子プローブになる可能性があり、生

化学的にも興味深い発見につながる可能性を含んでいる。

最後に、本研究に対してご援助いただきました(財)農芸  
化学研究奨励会に深く感謝申し上げます。

## ヒト致死性オゴノリ毒ポリカバノシド類に関する研究

東北大学大学院農学研究科 山下まり

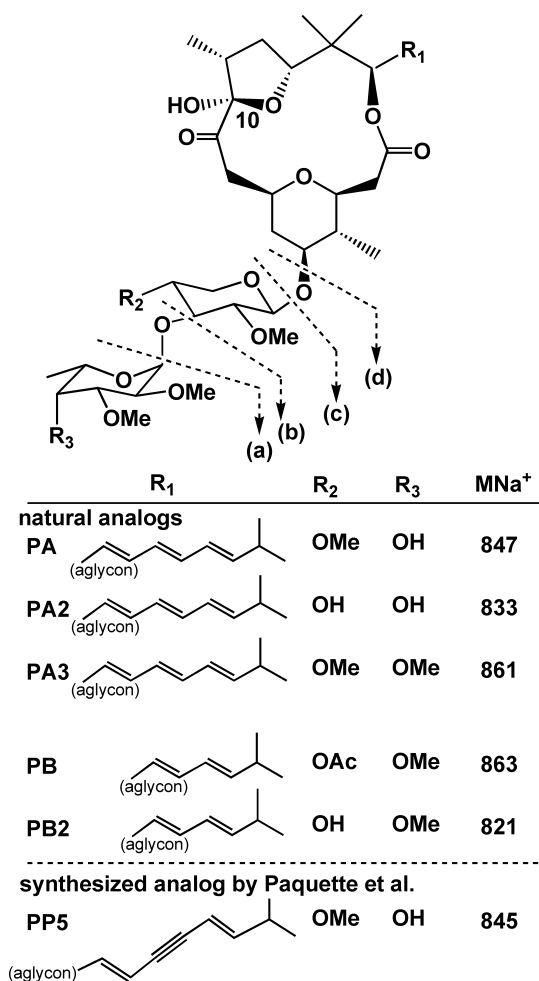
### 1. ポリカバノシド類の LC/MS による分析法の確立と同定

ポリカバノシド A (polycavernoside A, PA) は、1991 年  
にグアムで発生した *Gracilaria edulis* による食中毒原因  
物質として、我々が単離、構造決定した配糖体マクロリド  
である (Fig. 1)<sup>1)</sup>。このグアムの事件では 13 人が発症して  
3 名が死亡した。オゴノリによる食中毒の特徴は、食用と  
して常用している海藻が突然毒化することと、死亡率が高  
いことである。日本でもこれまで、少なくとも 4 件のオゴ  
ノリ中毒が報告されていて、3 名の死者が報告された。フ  
ィリピン北西部の La Union 州で採集された 2 種の食用の  
紅藻、カタオゴノリ *G. edulis* 及びトゲノリ一種である  
*Acanthophora specifera* により、2002 年-2003 年に計 3  
回の食中毒が発生し、計 36 人が発症し、8 名が死亡した。  
PA が原因物質として疑われたため、次のように分析法を  
確立して同定した<sup>2)</sup>。Fig. 1 に示す様に、ポリカバノシド類  
には多くの類縁体が存在する<sup>3)</sup>。有毒海藻から得たマウス  
に対して毒性を示す画分を、LC-多波長 UV 検出 (LC-  
DAD) (Mightysil RP-18, 0.2×15 cm, MeCN-H<sub>2</sub>O 4:1, v/  
v, 26°C, 0.2 ml/min) に供したところ、ポリカバノシド類

に特徴的な共役トリエン (*E, E, E*) の吸収 ( $\lambda_{\max}$  259, 269,  
280 nm) を示すピークが、標品 PA と同じ保持時間に示さ  
れた。さらに、上記と同じ LC 条件下で、TSQ700 を用い  
た LC/ESI-MS (MNa<sup>+</sup> を検出する SIM モード) に供し  
て、ポリカバノシド類及びアプリシアトキシン類の標品と  
マスキロマトグラムを比較した結果、PA と保持時間が一  
致するピークが示された。さらに、ポリカバノシド類の  
MNa<sup>+</sup> を親イオンとした MS/MS の解裂は、糖と糖の間、  
及び糖とアグリコンの間で起こるので (Fig. 1 (a)-(d))、こ  
れを LC/MS/MS SRM モードに応用して PA を完全に同  
定した。LC-DAD 及び LC/MS (SIM) の結果から PA の海  
藻における含量は、約 80 nmol/kg 湿海藻と推定した。

### 2. ポリカバノシド類の起源生物の追求<sup>4)</sup>

2002 年 12 月 2 日のフィリピンでの食中毒発生時から  
3 日後に採集された *G. edulis* (40 g) を 0.1 L の水で 5 回  
洗い、その洗液を遠心分離 (3000 rpm 15 min) して得ら  
れた沈殿を、海藻付着物とした。付着物及び洗った海藻を  
それぞれ、acetone 及び MeOH で順次抽出した。濃縮後、  
CHCl<sub>3</sub>-40% MeOH で分配し、CHCl<sub>3</sub> 相をマウス (10 g,  
ddY, 雄, i.p.) に投与した。24 時間以内に 1 匹のマウスを  
死亡させる毒量を 1 MU とすると、付着物からは 3 MU、  
洗った海藻からは 2 MU の毒性が検出された。付着物の  
CHCl<sub>3</sub> 画分を、Silica gel (Wakogel C-100, 1 ml, CHCl<sub>3</sub>-  
MeOH, 9:1 で溶出) および Silica gel ODS Q3 (富士ゲ



**Fig. 1** The structures of polycavernoside congeners and their ESI-MS/MS fragmentation patterns (a-d)

ル, 1 ml, 100% MeOH 溶出) で粗精製し, 前章と同様の方法で LC-DAD 及び LC/MS (SIM), LC/MS/MS (MEM) に供して, PA を同定した. 次に, 付着生物を顕微鏡観察したところ, 2 種類の藍藻が優先種であった. 以上の結果から, 藍藻による生産が疑われた.

### 3. ポリカバノシド類の培養細胞に対する生理作用<sup>4)</sup>

Paquette 教授から供与された PA の合成類縁体 PP5 (Fig. 1) は, PA の共役トリエン側鎖が共役エンインエン (*E, E*) に置換された化合物であり, マウスに対する毒性が PA の約半分 (LD<sub>99</sub>, ddY, mice, i.p. 0.4-0.8 mg/kg) である<sup>5)</sup>. この PP5 を用いて, 培養細胞に対する作用を調べた. DMSO 溶液 (最終濃度 0.5%) として PP5 をヒト慢性骨髄性白血病細胞 (K562) および, マウス神経芽腫細胞 (Neuro-2a) に添加すると, 両細胞とも 12  $\mu$ M で形態変化を示し, 24-48 時間で完全に死滅した. 死滅する直前に DAPI 染色すると, クロマチンの凝集が観察された. また, Neuro-2a にこの類縁体を 12  $\mu$ M 添加後, 5 時間後に caspase-3/7 活性を測定すると, 上昇が示された. また, 断片化された DNA を染色する TUNEL 法で, PP5 添加後 24 時間で核が赤褐色に染色された細胞が多く観察された. さらに, 添加後 22 時間後に細胞から DNA を抽出して, 電気泳動すると, 断片化された DNA がラダーとして観察された. 以上より, PP5 は Neuro-2a に 12  $\mu$ M でアポトーシスを誘導することが示された.

最後に, 本研究に対してご援助いただきました(財)農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします.

- 1) Mari Yotsu-Yamashita, Robert L. Haddock, and Takeshi Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 1147-1148.
- 2) Mari Yotsu-Yamashita, Takeshi Yasumoto, Shunichi Yamada, Fe Farida A. Bajarias, Mirriam A. Formelosza, Marc Lawrence Romero, and Yasuo Fukuyo, *Chem. Res. Toxicol.*, **2004**, 17, 1265-1271.
- 3) Mari Yotsu-Yamashita, Tetsuya Seki, Valerile J. Paul, Hideo Naoki, and Takeshi Yasumoto, *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 5563-5566.
- 4) 山下まり, 阿部一美, 田谷有妃, 安元 健, 関 哲也, 山田俊一, Fe F. A. Bajaria, Mirriam A. Formelosza, 福代康夫, 第 46 回天然有機化合物討論会講演要旨集 p. 671-676 (2004).
- 5) Louis Barriault, Serge L. Boulet, Kenshu Fujiwara, Akio Murai, Leo A. Paquette and Mari Yotsu-Yamashita, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9, 2069-2072.