

フトモモ科植物中の PARP 阻害活性物質

市場俊雄、鎌田靖弘、前泊智恵

加藤愛美*1、屋嘉部響*1、宮城郁子*1、田中康春*1

工業技術センターが所有する生物資源素材ライブラリを用いて PARP (ポリ ADP リボースポリメラーゼ) 阻害活性スクリーニングを行ったところ、レンブの葉抽出物が *in vitro* 活性試験において強い阻害活性を示した。PARP 阻害活性を指標に活性成分を分離したところ、2 種類のタンニン vescalagin (化合物 6) と castalagin (化合物 7) を得ることができた。これらのタンニンは加水分解型タンニン類で、フトモモ科をはじめとする比較的広範囲の植物に含まれることが知られている。今回、これらの 2 成分の PARP 阻害活性について明らかにした。

1 はじめに

工業技術センターでは、沖縄県内の生物資源の産業的利用を促進するため、平成 10 年から生物を収集し抽出を行い、これまでに 2,500 種に上る抽出エキスを作成し生物資源素材ライブラリとして保存してきている。このライブラリは県内外の研究機関や大学などで機能評価が行われ、その結果に基づきこれまで幾つかの健康食品や化粧品原料などが開発、製品化されてきている。今回我々は、琉球大学医学部と共同でこのライブラリエキスについて PARP (ポリ ADP リボースポリメラーゼ、Poly(ADP-Ribose) Polymerase) 阻害活性スクリーニングを行った。

PARP は、DNA のニック及び切断端へ特異的に結合することで活性化され、NAD⁺を基質として様々な核タンパク質に ADP-リボース残基を付加重合する翻訳後修飾反応を触媒する酵素である。主な標的はヒストン、DNA トポイソメラーゼ、および PARP 自身であるため、PARP は DNA 損傷後の修復、細胞周期、がん化や細胞死との関係が注目されている¹⁾。PARP は、クロマチン DNA 代謝に関わる酵素であり、複数のアイソフォームが存在することも知られており、その中の一つ、PARP1 は子宮頸がんの治療の標的として注目されており、それに対する阻害薬は、BRCA1/2(BReast CAncer susceptibility gene 1/2) 変異陽性乳がんおよび卵巣がんに対する抗がん剤として有望であるとされている¹⁾。

生物資源素材ライブラリエキスの PARP 阻害スクリーニングの結果、東南アジア原産の植物であるレンブ (*Syzygium samarangense* Merr. & Perry) が、*in vitro* および培養細胞を用いた阻害活性試験において、PARP を阻害することを見出した。レンブは、オオフトモモやジャワフトモモとしても知られる果樹で、マライ半島、アンダマン諸島原産のフトモモ科の常緑樹である²⁾。こ

の樹木は、東南アジアなど温暖な気候の地域で広くみられ、5 月から 7 月にかけて結実し、その実は食されている。

これまでに、このレンブの葉の 50% エタノール抽出エキスに関して工業技術センターで機能評価を行ったところ、DPPH ラジカル消去活性 (抗酸化活性) に加えて、リパーゼ、マルターゼ、チロシナーゼなどの酵素阻害活性を示すことが分かっており、DPPH ラジカル消去活性物質として 5 種の既知ポリフェノール (化合物 1-5) を単離、同定している。

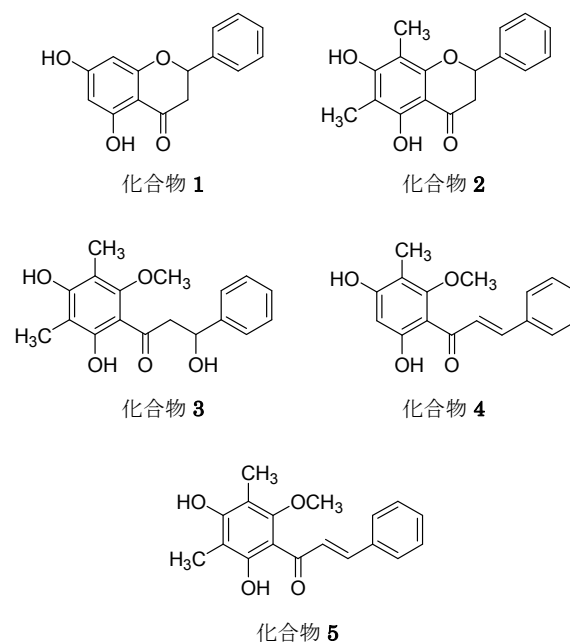


図 1 50%エタノール抽出エキスから単離した化合物1~5

本研究では、琉球大学医学部と共同で、PARP 阻害活性を示したエキスの中で最も強い活性を示したレンブ葉エキス中の PARP 阻害物質の分離同定を行い、その薬理化学的評価を行ったので報告する。

*1 琉球大学医学部保健学科

2 実験方法

2-1 実験材料

レンブ (*Syzygium samarangense* Merr. & Perry 別名：オオフトモモ) の葉は 2014 年に沖縄市の民家で採集し、60°Cで乾燥後、粉碎、篩過 (IKA MF10、3000rpm、カッターミル、φ1.0mm 篩) したものを使用した。

溶媒としてアセトン (ナカライテスク、特級)、アセトニトリル (Sigma-Aldrich、HPLC 用)、メタノール (ナカライテスク、HPLC 用)、*n*-ブタノール (ナカライテスク、特級)、*n*-プロパノール (ナカライテスク、特級)、酢酸エチル (ナカライテスク、特級)、ギ酸 (フィッシャーサイエンス、HPLC 用) を用いた。水は実験室で製造した超純水を使用した。NMR 測定には重水 (関東化学) を用いた。ろ過には東洋濾紙 GA-100 を用いた。

抽出は高速溶媒抽出装置 (サーモサイエンティフィック、DIONEX ASE-350) により行った。粗分離には ODS (YMC、YMC-Pack ODS-AQ 120-S50) を充てんしたガラスカラム (φ50mm×L100mm) を、ゲルろ過では東ソーの TOYOPEARL HW40F を充てんしたガラスカラム (φ30mm×L300mm) を、向流クロマトグラフには三鬼エンジニアリングの CPC-LLB-M を用いた。

核磁気共鳴測定は、ブルカーの AV400N を用いて行った。旋光度は日本分光の P-1020 により測定した。質量分析はウォーターズの LC-MS 分析装置 (Aquity H-class、SQD) により行った。

2-2 化合物 6 (vescalagin) の単離

試料 70g を 700mL のアセトン/水 7:3 で抽出 (1 日静置) したのち、遠心分離 (3000rpm、30 分) により固液分離した。固体はさらに 2 回、700mL のアセトン/水 7:3 で抽出 (1 日静置) したのち、遠心分離 (3000rpm、30 分) による固液分離を行った。3 回の抽出操作により合わせて約 2000mL の抽出液を得た。この抽出液を減圧下でアセトンを除去し、さらに濃縮を行い約 500mL の水溶性抽出液を得た。これをフィルター濾過後、酢酸エチル 500mL を加えて分液し、その下相 (水相) を減圧下で酢酸エチルを除去し、さらに濃縮を行い約 250mL の抽出液を得た。

この抽出液を ODS カラムで粗分離 (0.1%ギ酸→0.1%ギ酸/アセトニトリル 80:20、流速 27mL/分) を行った。得られた化合物 6 を含む画分 (463mg) をゲルろ過により分離 (水/アセトニトリル 75:25、流速 6mL/分) し、粗化合物 6 (236mg) を得た。この粗化合物 6 は最終的にゲルろ過により精製 (水/アセトニトリル 75:25、流速 2.5mL/分) し、205mg の化合物 6 を薄褐色のアモルファスとして得た (図 2)。

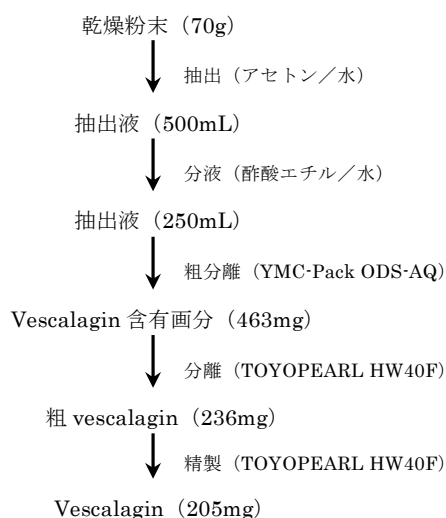


図 2 化合物 6 (vescalagin) の分離スキーム

¹H-NMR (400MHz, D₂O) : δ4.08 (d 1H 12.6Hz)、4.51 (d 1H 7.6Hz)、4.81 (dd 1H 1.6, 13.0Hz)、4.84 (d 1H 2.0Hz)、4.99 (d 1H 7.2Hz)、5.21 (brs 1H)、5.49 (d 1H 7.6Hz)、6.59 (s 1H)、6.71 (s 1H)、6.75 (s 1H)

¹³C-NMR (100MHz, D₂O) : 表 1

ESI-MS (ESI positive モード、CV 20V) : m/z957 (M+Na)、935 (M+H)、917 (M-H₂O+H)、633 (M-HHDP+H)、615 (M-HHDP-H₂O+H)

[α]_D -94.5° (c = 6.09, H₂O)

2-3 化合物 7 (castalagin) の単離

抽出は高速溶媒抽出装置により、抽出試料 90g (試料/セライト 45:45) を 100mL セル 3 本に 30g ずつ充填し、水を溶媒に、85°C、静置時間 5 分×2 回、フラッシュ容量 60%、パージ時間 300 秒で行った。

得られた水抽出液 (250mL) は、室温に戻したのち ODS で粗分離 (溶媒系: 0.1%ギ酸→0.1%ギ酸/アセトニトリル 80:20、流速 27mL/分) を行った。得られた化合物 7 を含む画分 (426mg) をゲルろ過により分離 (水/アセトニトリル 75:25、流速 6mL/分) し、粗化合物 7 (153mg) を得た。この粗化合物 7 は最終的に向流クロマトグラフィーにより精製 (1100rpm、水/*n*-ブタノール/*n*-プロパノール 100:45:55、上層移動相、流速 2.5mL/分) し、106mg の化合物 7 を薄褐色のアモルファスとして得た。

¹H-NMR (400MHz, D₂O) : δ4.10 (d 1H 12.9Hz)、4.87 (d 1H 11.0Hz)、5.62 (d 1H 4.5Hz)、4.99 (d 1H 7.1Hz)、5.05 (d 1H 7.1Hz)、5.46、

5.07 (d 1H 5.3Hz)、6.68 (s 1H)、6.74 (s 1H)、6.88 (s 1H)

¹³C-NMR (100MHz、D₂O) : 表2

ESI-MS (ESI positive モード、CV 20V) : m/z957 (M+Na)、935 (M+H)、917 (M-H₂O+H)、633 (M-HHDP+H)、615 (M-HHDP-H₂O+H)

[α]_D -96.4° (c = 5.58、H₂O)

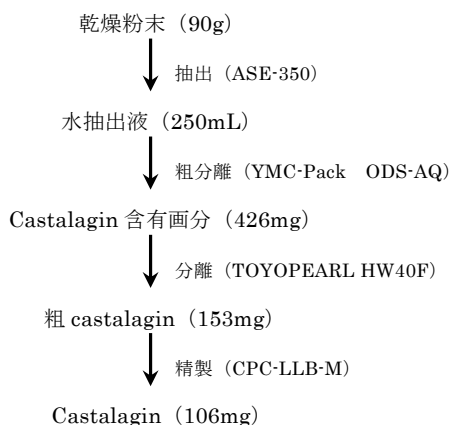


図3 化合物7 (castalagin) の分離スキーム

3 結果

3-1 化合物6の同定

化合物6は、薄褐色のアモルファスとして得られた。マスマスペクトルから分子量は934と考えられた。¹³C-NMRにエステル炭素が5個、ベンゼン環に由来すると思われる炭素が30個存在することから、化合物6は没食子酸部分を5個有する加水分解型タンニン類である可能性が高い。¹³C-NMRより炭素数は41個であり、分子量934であることから、グルコース部分1個分の炭素6個を加えて、この物質の分子式をC₄₁H₂₆O₂₆と推定した。これらの特徴を持つフトモモ科由来の加水分解型タンニンを検索したところ、既知化合物であるvescalaginまたはcastalaginであると推定された^{3)、4)}(図4)。

Vescalaginとcastalaginはバラ科、フトモモ科などの植物に広く分布するタンニンで²⁾、レンブがフトモモ科であることからレンブからのこれらの単離には妥当性がある。そこでNMRデータを文献値と比較したところ(表1)vescalaginのデータと非常によく一致すること、および比旋光度の符号が一致することから、化合物6を絶対配置を含めvescalaginと同定した(図4)⁴⁾。

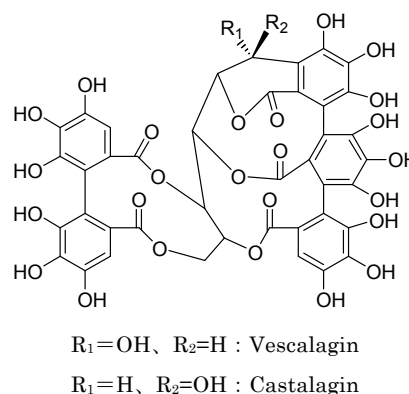


図4 Vescalaginとcastalaginの構造

表1 化合物6とvescalagin⁴⁾の¹³C-NMRデータの比較

¹³ C-NMR (δ)					
# C	Vescalagin	6	# C	Vescalagin	6
C6	65.3	65.2	C4' II	134.4	134.5
C1	65.6	63.9	C4' V	135.3	135.1
C3	66.1	67.8	C4' III	136.2	135.9
C4	68.8	68.9	C4' IV	136.5	136.3
C5	70.9	70.5	C4' I	138.0	137.5
C2	73.7	77.0		143.3	143.7
C2' V	107.3	106.9		-	143.8
C2' IV	108.5	108.0		-	143.8
C2' III	109.4	108.7		-	143.9
C6' II	112.1	113.2	C3' I-V, ~C5'	-	143.9
C6' I	113.4	112.2	I-V	-	144.1
C6' III	113.5	113.8		-	144.6
C6' V	113.7	113.9		-	144.7
C6' IV	114.9	115.0		-	144.9
C2' II	115.4	115.1		145.7	147.3
C2' I	117.0	116.5	C7' I	166.1	165.5
C1' I	120.8	123.4	C7' II	166.1	166.0
C1' III	123.5	123.5	C7' IV	167.2	166.8
C1' IV	123.9	124.1	C7' III	167.5	167.2
C1' V	125.4	125.6	C7' V	170.0	169.8
C1' II	126.3	126.5			

3-2 化合物7の同定

化合物7は、薄褐色のアモルファスとして得られた。マスマスペクトル、¹³C-NMR、¹H-NMRの特徴が化合物6と類似していることから、vescalagin同様にフトモモ科植物に広く分布するvescalaginの異性体であるcastalaginであると推定し³⁾、¹³C-NMRデータを文献値と比較したところ一致することから(表2)化合物7を

castalagin と同定した (図4) ⁴⁾。

表2 化合物7と castalagin⁴⁾の ¹³C-NMR データの比較

¹³ C-NMR (δ)					
# C	Castalagin		# C	Castalagin	
C6	65.3	65.3	C4' II	134.4	134.4
C1	65.6	65.6	C4' V	135.3	135.3
C3	66.1	66.1	C4' III	136.2	136.2
C4	68.8	68.7	C4' IV	136.5	136.4
C5	70.9	70.9	C4' I	138.0	138.1
C2	73.7	73.7		143.3	143.3
C2' V	107.3	107.2		-	143.6
C2' IV	108.5	108.4		-	143.66
C2' III	109.4	109.3		-	143.74
C6' II	112.1	112.1	C3' I-V, ~C5'	-	143.8
C6' I	113.4	113.4	I-V	-	143.8
C6' III	113.5	113.6		-	144.8
C6' V	113.7	113.7		-	144.9
C6' IV	114.9	114.9		-	145.0
C2' II	115.4	115.4		145.7	145.7
C2' I	117.0	117.1	C7' I	166.1	166.1
C1' I	120.8	120.9	C7' II	166.1	166.1
C1' III	123.5	123.5	C7' IV	167.2	167.2
C1' IV	123.9	124.0	C7' III	167.5	167.5
C1' V	125.4	125.4	C7' V	170.0	170.0
C1' II	126.3	126.3			

3-3 PARP 阻害活性

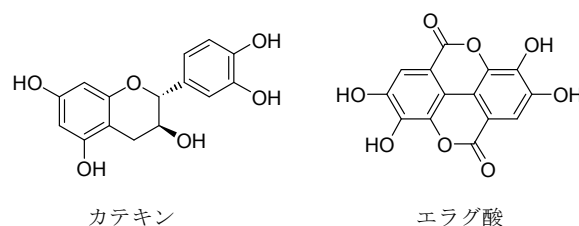
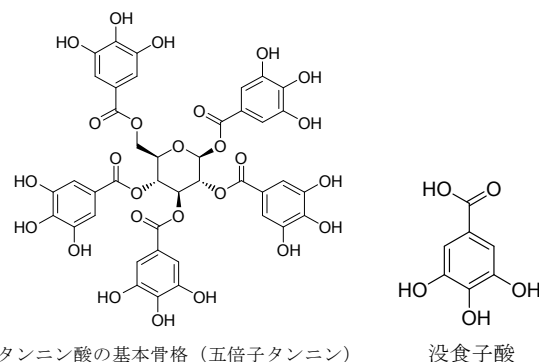
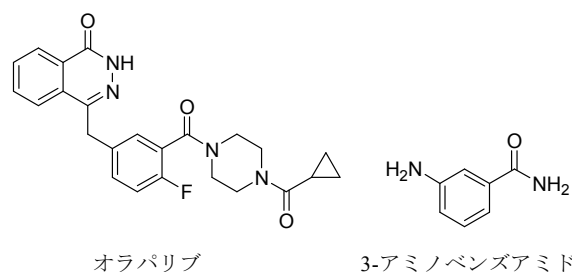
単離した vescalagin (化合物6)、castalagin (化合物7)、関連したポリフェノール類、およびコントロール化合物であるオラパリブと 3-アミノベンズアミドの PARP 阻害活性を測定したところ、その阻害率はそれぞれ表3のとおりであった。

タンニン酸 (和光純薬) およびカテキン (東京化成) の PARP 阻害活性が弱いことから、vescalagin および castalagin の PARP 阻害活性は、ポリフェノール類に普遍的である可能性は低いと考えられる。また、レンプ抽出物は PARG⁵⁾に対して阻害活性を示さないことから、vescalagin および castalagin の PARP 阻害活性は多くのポリフェノールに見られるような、非選択的な阻害ではなく、構造的にある程度の選択性を持つものであることが期待できる。一方 vescalagin および castalagin の構成部位であるエラグ酸 (和光純薬) や没食子酸 (和光純薬) は阻害活性を示さないことから、vescalagin およ

び castalagin は、その阻害機構にも興味を持たれる。

表3 単離した化合物と試薬類の PARP 阻害活性

化合物	活性
vescalagin (化合物6)	50%阻害 @2.3μM
castalagin (化合物7)	51%阻害 @2μM
オラパリブ (医薬品)	100%阻害 @1μM
3-アミノベンズアミド	17%阻害 @2μM
タンニン酸	6%阻害 @2μg/mL
カテキン	7%阻害 @2μg/mL
没食子酸	Not active @2μM
エラグ酸	Not active @2μM



Vescalagin および castalagin は、多くの加水分解型タンニン同様、水溶液中で徐々に加水分解される傾向がある。今後、加水分解物を初めとして、vescalagin および castalagin から誘導される化合物について活性試験を行い、その阻害機構などについても明らかにしたい。

なお本報告は、「沖縄の自生植物から分離された PARP 阻害物質の構造解析およびその薬理効果に関する研究」として琉球大学医学部と行った共同研究の結果の一部で

あり、沖縄県企画部が行う研究評価システムにおける「フトモモ科植物中のタンパク質合成阻害物質の研究」(2013 技 011) として実施しているものである。

参考文献

- 1) The development of PARP inhibitors in ovarian cancer from bench to bedside, Yvette Drew, *British Journal of Cancer*, **2015**, 113, S3-S9
- 2) 小島 裕著、熱帯の果実－性状・栽培・利用法とエピソード－、新星図書出版、1989年、pp138-139
- 3) 奥田拓男編、薬用天然物化学 第2版、廣川書店、第三章 芳香族化合物、pp77-87
- 4) Antioxidative Constituents in Camu-camu Fruit Juice Residue, Tai Kaneshima, Takao Myoda, Kazuki Toeda, Takane Fujimori and Makoto Nishizawa, *Food Sci. Technol. Res.*, **2013**, 19, 223-228
- 5) PARG (ポリ ADP リボシル化分解酵素) は、PARP により DNA 断片に形成された ADP リボースポリマーの分解を行う酵素。

編 集 沖縄県工業技術センター

発 行 沖縄県工業技術センター

〒904-2234 沖縄県うるま市字州崎 12 番 2

T E L (098)929-0111

F A X (098)929-0115

U R L <https://www.pref.okinawa.lg.jp/site/shoko/kogyo/>

著作物の一部および全部を転載・翻訳される場合は、当センターに

ご連絡ください。