

学 位 論 文 要 旨

氏 名 坂尾 こそ枝

題 目 化学修飾によるケルセチンの構造活性の解明
(Clarification of Structure-Activity Relationship of Quercetin by Chemical Modification)

ケルセチンはフラボノール型のフラボノイドであり、果物や野菜などの植物由来の食物に多く存在し、抗癌活性をはじめ多様な生物活性を有することが報告されている。フラボノイドは天然ポリフェノール誘導体であり、これまでは様々な構造を有するフラボノイドを比較することでその構造と活性の関係が検討されてきた。少なくとも、フラボノイドのヒドロキシル基はフラボノイドの生物活性機能を示す上で重要な役割を担っていることが考えられているが、構造改変によるフラボノイド機能の直接的な解明については報告例が少ない。本論文ではフラボノイドの代表例であるケルセチンを用いて構造改変の手法により、ケルセチンのヒドロキシル基の役割および構造活性の相関を直接的に証明し、ケルセチンより強い活性のフラボノイドの合成も試みた。

まずケルセチンのヒドロキシル基のベンジル化、アセチル化、メチル化および金属錯体の合成を行い、4種類のケルセチン誘導体を得た。これらの化合物の活性はヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60) における細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導能の評価により行った。その結果、ケルセチンのヒドロキシル基が細胞内スーパーオキシドの生成に寄与し、HL-60 細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導に起因することが直接的に証明された。ベンジル化した 3, 7, 3', 4'-*O*-tetrabenzylquercetin (4Bn-Q) は、ヒドロキシル基をマスクしたことによりこれらの作用を喪失させた。次に、ケルセチンのアセチル誘導体、3, 7, 3', 4'-*O*-tetraacetylquercetin (4Ac-Q) はケルセチンより強い細胞増殖抑制能およびアポトーシス誘導能を示し、さらに ROS を産生しない新しいタイプの癌細胞アポトーシス誘導剤であることが示された。一方、メチル誘導体 3, 7, 3', 4'-*O*-tetramethylquercetin (4Me-Q) はこれらの活性を失っていることが分かった。最後にケルセチン亜鉛錯体(Zn-Q)はケルセチンより高いフリーラジカル消去能を示し、三種類の癌細胞に対する強い細胞増殖抑制能を有することが分かった。

このように、ケルセチンの構造改変によりヒドロキシル基の役割および構造活性の相関を直接的に示した。特に、ケルセチンのアセチル化は HL-60 のアポトーシス誘導において高い効果を証明した。また、ケルセチンの亜鉛錯体もケルセチンより強い癌細胞増殖抑制効果を示した。これらの結果よりフラボノイドの化学的改変は効果の高い、新たな化学抗癌剤の設計や合成の助けになるであろうと考えられる。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Kozue Sakao
題 目	Clarification of Structure-Activity Relationship of Quercetin by Chemical Modification (化学修飾によるケルセチンの構造活性の解明)
<p>Quercetin is a flavonol-type flavonoid ubiquitously present in plant-derived foods, fruit and vegetables, and has been reported to have various biological effects including anticancer activity. Flavonoids are a group of natural polyphenolic derivatives. Accumulated data have suggested that the hydroxyl groups of flavonoids are important for their bioactive function. However, the structure-activity relationship is still unclear. To directly demonstrate the structure-activity relationship and to obtain stronger bioactive derivatives of flavonoids, quercetin was chosen to modify by chemical modifications in the present study. Four kinds of quercetin derivatives were synthesized by benzylation, acetylation, methylation and metal complexation. The ability of these synthesized compounds to cause cell proliferation inhibition and apoptosis was then investigated in human leukemia (HL-60) cells.</p> <p>Firstly, the results revealed that quercetin caused cell proliferation inhibition and apoptosis; 3, 7, 3', 4'-<i>O</i>-tetrabenzylquercetin (4Bn-Q) by substituting the hydroxyl groups with benzyl groups lost this ability. Moreover, treatment with 4Bn-Q reduced intracellular level of quercetin-induced superoxide. These data directly demonstrated that the hydroxyl groups of quercetin contributed to intracellular superoxide generation, consequently causing proliferation inhibition and apoptosis induction in HL-60 cells. Secondly, acetyl and methyl derivatives of quercetin, 3, 7, 3', 4'-<i>O</i>-tetraacetylquercetin (4Ac-Q) and 3, 7, 3', 4'-<i>O</i>-tetramethylquercetin (4Me-Q) revealed that 4Ac-Q significantly inhibited cell proliferation by caspase-mediated apoptosis while 4Me-Q lost this ability. Interestingly, 4Ac-Q revealed stronger apoptotic activity than parent quercetin via a ROS-independent pathway. Thirdly, the zinc(II)-quercetin complex (Zn-Q) increased both free radical scavenging activity and the sensitivity to inhibit the proliferation of three cell lines, comparing with quercetin.</p> <p>In summary, the role of hydroxyl groups and structure-activity relationship of quercetin was directly clarified by chemical modification. In particular, acetylation of quercetin (4Ac-Q) might be a valuable strategy to increase the sensitivity of human leukemia HL-60 cells toward apoptosis, and complexation of quercetin (Zn-Q) could be implicated in antitumor drug design. These findings suggest that chemical modification of flavonoids is one of useful strategy for designing and developing new potential cancer chemopreventive agents.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	坂尾 こそ枝
審査委員	主査 鹿児島大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島大学 教授 藤井 信
	副査 琉球大学 教授 安田 正昭
	副査 鹿児島大学 准教授 橋本 文雄
	副査 琉球大学 教授 和田 浩二
審査協力者	
題目	Clarification of Structure-Activity Relationship of Quercetin by Chemical Modification (化学修飾によるケルセチンの構造活性の解明)
<p>ケルセチンはフラボノール型のフラボノイドであり、果物や野菜などの植物由来の食物に多く存在し、抗癌活性をはじめ多様な生物活性を有することが報告されている。フラボノイドは天然ポリフェノール誘導体であり、これまでは様々な構造を有するフラボノイドを比較することでその構造と活性の関係が検討されてきた。少なくとも、フラボノイドのヒドロキシル基はフラボノイドの生物活性機能を示す上で重要な役割を担っていることが考えられているが、構造改変によるフラボノイド機能の直接的な解明については報告例が少ない。本論文ではフラボノイドの代表例であるケルセチンを用いてフラボノイド構造改変の手法により、ケルセチンのヒドロキシル基の役割および構造活性の相関を直接的に証明するとともに、ケルセチンより強い活性のフラボノイドの合成も成功した。</p>	

まず、ケルセチンのヒドロキシル基のベンジル化、アセチル化、メチル化および金属錯体の合成を行い、4種類のケルセチン誘導体を得た。これらの化合物の活性はヒト骨髄性白血病細胞 (HL-60) における細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導能の評価により行った。その結果、ケルセチンのヒドロキシル基が細胞内スーパーオキシドの生成に寄与し、HL-60 細胞の増殖抑制およびアポトーシス誘導に起因することを直接的に証明した。ベンジル化した 3, 7, 3', 4'-*O*-tetrabenzylquercetin (4Bn-Q) は、ヒドロキシル基をマスクしたことにより、これらの作用を喪失させた。次に、ケルセチンのアセチル誘導体、3, 7, 3', 4'-*O*-tetraacetylquercetin (4Ac-Q) はケルセチンより強い細胞増殖抑制能およびアポトーシス誘導能を示し、さらに活性酸素種 (ROS) を産生しない新しいタイプの癌細胞アポトーシス誘導剤であることを示した。一方、メチル誘導体 3, 7, 3', 4'-*O*-tetramethylquercetin (4Me-Q) はこれらの活性を失っていることが分かった。最後にケルセチン亜鉛錯体 (Zn-Q) はケルセチンより高いフリーラジカル消去能を示し、三種類の癌細胞に対する強い細胞増殖抑制能を有することが分かった。このように、ケルセチンの構造改変によりヒドロキシル基の役割および構造活性の相関を直接的に示した。特に、ケルセチンのアセチル化は HL-60 のアポトーシス誘導において強い効果を有することを明らかにした。また、ケルセチンの亜鉛錯体もケルセチンより強い癌細胞増殖抑制効果を示した。以上の研究は、フラボノイドの化学的改変により効果の高い、新たな化学抗癌剤の設計や合成に新たな知見を提供するものである。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値のあるものと判定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	坂尾 こそ枝
審査委員	主査 鹿児島 大学 准教授 侯 徳興
	副査 鹿児島 大学 教授 藤井 信
	副査 琉球 大学 教授 安田 正昭
	副査 鹿児島 大学 准教授 橋本 文雄
	副査 琉球 大学 教授 和田 浩二
審査協力者	
実施年月日	平成21年7月23日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="radio"/> 口答・筆答	
<p>主査および副査は、平成21年7月23日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士(農学)の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏 名	坂尾 こず枝
<p>[質問 1]ケルセチンの修飾化合物の中でも Zn-Q の生物活性が最も強い理由、もしくはそのメカニズムは分かっているのか？</p> <p>[回答 1]考えられることの一つとして、亜鉛を挟み込むことでケルセチンが平面構造をとるようになり、動きに制限が加わることでタンパク等との結合の仕方に変化が起きた可能性がある。他の研究者によると Zn-Q は DNA に対する結合能力が高いとの報告もあることから錯体化により Zn-Q とタンパクまたは DNA との相互作用に変化が起きることは確かと思われる。</p> <p>[質問 2]亜鉛毒を引き起こす可能性はないのか？</p> <p>[回答 2]摂取量、濃度にもよると思われるが亜鉛毒の可能性が全くないとは言い切れないと考えている。例えば体内に取り込んだ場合、代謝されずに体外に排出されるなら問題はないだろうが、代謝、分解によって大量に蓄積されるような状態が起きれば、金属中毒を引き起こす可能性は高くなると思う。</p> <p>[質問 3]多くの金属の中でなぜ亜鉛を用いて錯体を作ろうと考えたのか？</p> <p>[回答 3]錯体の合成を行う際、ご指摘頂いたように私も金属中毒のことを念頭に入れていたため、金属中毒が起きにくいとされている金属を用いることを考えた。最も安全なものとしてカルシウムを考えたが、錯体化合物の形成が困難であるため、生体内必須微量金属で毒性がかなり低い亜鉛を用いることにした。</p> <p>[質問 4]ケルセチンのアポトーシス誘導能は B 環のヒドロキシル基に寄与するところが大きいですが、B 環のヒドロキシル基がケルセチンより一つ少ないケンフェロールのアポトーシス誘導能はどうなるか？</p> <p>[回答 4]過去の報告によると、ケンフェロールはアポトーシス誘導能を有するがケルセンと比べその誘導能は低いとされている。また、ケルセチンよりも B 環のヒドロキシル基が一つ多いミリセチンと呼ばれるフラボノールは、逆にケルセチンより高いアポトーシス誘導能を示すという報告もなされている。</p> <p>[質問 5]他のフラボノイドもアポトーシスを誘導するのか？</p> <p>[回答 5]極端にヒドロキシル基の数が少ないフラボノイドでない限り、たいていのフラボノイドはアポトーシスを誘導すると思われる。ただし、その強度はヒドロキシル基の数と構造によって差が生じると思われる。</p> <p>[質問 6]EGCG は B 環に 3 つのヒドロキシル基を持っているが、多くのものに対して高い効果を示すのは何故か？</p> <p>[回答 6]EGCG の場合、没食子酸基またはガレート基と呼ばれる、ヒドロキシル基を 3 個有す</p>	

る官能基をC環の3位に有しているのが最大の理由だと思われる。また、フラボノール類とは異なりカテキン類はC環の4位にケトン基を有しておらず、さらに2,3位に二重結合がないことよりフラボノール類よりは自由にコンフォメーションを変化させることが出来るなどといった点から、タンパクとの結合やスペースマッチング性も豊かになる可能性があると思われる。

[質問 7] EGCG ではスーパーオキシドの産生が抑制の方向に見られるが、そのスーパーオキシドは EGCG によるアポトーシス誘導能と関連性がないのか？

[回答 7] スーパーオキシドは活性酸素種の一つである。EGCG はスーパーオキシドを産生せず、むしろ抑制するという現象は今回の実験において初めて明らかになったものである。近年の報告では、EGCG が別の活性酸素種であるヒドロキシルラジカルを産生しアポトーシスを誘導すると報告されており、本研究もその産生が確認された。よって EGCG によるがん細胞のアポトーシス誘導はスーパーオキシドよりヒドロキシルラジカル活性酸素種を産生することによって生じているものと考えられる。

[質問 8] Zn-Q はケルセチンの B 環が修飾されずに残っている状態であり、HL60 細胞の実験では Quercetin と Zn-Q のアポトーシス誘導機構は同じスーパーオキシド産生に寄与するものだ、という報告に対し、HCT116 と LoVo 細胞ではケルセチンは効果がなく Zn-Q は効果がある、というような異なる機構を示している。これについての見解は？スーパーオキシド産生は関係していないのか？

[回答 8] スーパーオキシド産生が関与するなら Zn-Q はケルセチンが 2 個結合した構造なので 2 倍の効果を示すと考えられるが、MTT assay の結果では Zn-Q はケルセチンの 2 倍以上の効果を示している。そのことから考えると HCT や LoVo 細胞ではスーパーオキシド産生の影響よりも、先ほどの報告例で述べた Zn-Q の DNA との直接的な結合がアポトーシス誘導に関与しているのではないかとと思われる。

[質問 9] Zn-Q と DNA との結合はどこでおきているのか。シスプラチンは、シス体のみが DNA と結合できるが、Zn-Q も構造に依存する可能性が考えられるのか？

[回答 9] 私自身はまだ結合部位の特定などといった実験を行っていないのではっきりしたことは言えないが、他の研究者の方によると Zn-Q の一部が DNA のリン酸基と結合しているかもしれないと言う報告がある。しかし実際は亜鉛が DNA と結合するのか、DNA ラセンの間に挟まって転写の妨げをしているのか、ケルセチン構造のうち、亜鉛と結合していない部分が DNA の一部と結合しているかは明確ではない。今後、他の金属を用いた錯体で比較実験を行うことにより明らかになればと考えている。

[質問 10] 亜鉛のみを用いた実験は行ったのか。

[回答 10] 増殖抑制効果の実験、MTT assay だけではあるが行っている。その結果から述べると亜鉛のみでは増殖抑制能は示さなかった。よって、今回の実験では亜鉛が効果を示したの

ではなく、ケルセチンと錯体化したことで効果が生まれたのだと思われる。

[質問 11] 4Bn-Q は溶媒を選ばないと溶解しないと思われるが、細胞実験の際 4Bn-Q は溶解した状態で使えているのか？ 実験結果に差し支えはないのか？

[回答 11] 形態変化の細胞の映像からも分かる通り 4Bn-Q は培養液中で完全に溶解することがなく一部は析出する。それだと溶解していないから効果が出ていないように見えるが、今回発表していない他の実験のウェスタンブロッティング測定において、4Bn-Q が培養液中で析出していてもタンパクが動くという結果が得られていた。そこで本実験においても溶媒中での一部析出による大きな影響はないと考え 4Bn-Q をサンプルとして用いた。ただし、完全に溶解する条件で実験した場合と本実験とでは、強度などが異なる結果が得られる可能性はあると考えている。

[質問 12] Zn-Q の構造決定における NMR スペクトルデータでは目的物以外の化合物が含まれているように見えるが、どうなのか？ ケルセチンは他の部位でも亜鉛と錯体化できるのではないか？

[回答 12] ご指摘通り、亜鉛はケルセチンの他の部位と錯体を形成することが可能である。今回も NMR の結果より目的の部位以外と錯体化を起こした化合物が混在している可能性が考えられたため、¹H-NMR の他に炭素—水素間の相関を見る HMQC、HMBC を測定し、亜鉛がどの部位と結合しているかの同定を行った。さらに質量分析も行った。これらの結果より目的化合物が 9 割以上であることが分かったのでサンプルとして用いた。

[質問 13] アセチル基が効果を示しているように感じられるが、アセチル基修飾がなされた化合物なら、例えば糖にアセチル修飾した場合など効果が高まるのか？

[回答 13] アセチル化することで糖の効果が高まるのかは分からないが、例えばアセチルした EGCG の報告はある。それによると、アセチル化した EGCG が本来のものとは異なる代謝経路を通ることで高い効果を示すと報告されており、今回の実験とはメカニズムは違うが、アセチル化することで効果が上がる例がある。そのことから考えると糖をアセチル化することで異なる効果を示すようになるかもしれないと思われる。