

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名

アツール ウパダヤ

題 目

沖縄産植物ギンネム、ゲットウ及びパイナップルの生理活性物質. (Biological activities of three Okinawan plants alpinia, leucaena, and pineapple).

植物生理活性化合物の有益な効果について、さまざまな病態疾患に関連した調査が行われてきている。本研究は、特定の生理活性を持つ化合物の分離と同定並びにスクリーニング法の開発などで構成されている。3種類の沖縄産植物、ゲットウ、ギンネム及びパイナップルの有効成分を用い、インフルエンザ予防のための合理的なターゲットとしていくつかの生理活性を評価するためにノイラミニダーゼ阻害に特に重点を置いた。

パイナップルの茎廃棄物から数種類のフェノール酸が同定され、抗菌、15-リポキシゲナーゼ、糖化最終産物の抑制、ノイラミニダーゼ阻害活性などを含むさまざまな生理活性に寄与することが確認された。ゲットウの根茎からは 5,6-Dehydrokawain (DK)、Dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK)、8 (17) 12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene) などが単離され、HIV-1 インテグラーゼとノイラミニダーゼに阻害活性を示すことが分かった。DDK は、 $IC_{50}$  がそれぞれインテグラーゼに対して  $3.6 \mu\text{M}$ 、ノイラミニダーゼに対しては  $24.6 \mu\text{M}$  と、最も活性の高い化合物であることを見出した。DDK のノイラミニダーゼに対する反応機構では遅発性並びに時間依存性に働く  $2.8 \mu\text{M}$  の  $K_i$  値を持つ可逆的阻害剤であることが分かった。また、2種類のゲットウの精油成分のノイラミニダーゼ阻害活性について調査した結果、テルペン化合物を多く含むタイリングゲットウがシマゲットウよりさまざまな阻害活性で高い値を示した。ギンネム葉から分離された非タンパク性アミノ酸ミモシンは、ノイラミニダーゼを阻害し、それぞれ  $K_m$  値が  $39.1 \text{ min}^{-1}$  と  $IC_{50}$  値は  $19.8 \mu\text{M}$  という阻害活性を示した。さらに、ミモシンの小分子ペプチド合成による強力なノイラミニダーゼ阻害剤が探索された。ミモシン-FFY (Phe-Phe-Tyr) は、50% ノイラミニダーゼ阻害濃度が  $1.8 \mu\text{M}$  の高い値を示した。このことは新規で強力なノイラミニダーゼ阻害剤開発に向けたペプチド合成を促すことになると思われる。

最後に、ゲットウ葉はフェノール酸化防止剤としても認識されてきていることから、フェノール含量の豊富なゲットウ葉分画 (ALP) を用いた寿命延長の効果を調べるための動物モデルとして線虫 (*C. elegance*) を用いて調査した。ALP 分画により、DAF 16 の下流にあるエフェクター分子であり、線虫の寿命を予測するストレス感受性レポーターである、SOD 3 と HSP 16.2 遺伝子の発現が上昇することに伴い線虫の寿命が大幅に増加することが明らかとなった。本研究により、沖縄産植物が広い範囲の生理活性を示し、このことはこれらの活性を持つポリフェノール、カワイン及びアミノ酸などの化合物を多く含むためであることが明らかになった。さらにこの研究に基づいて、これらの沖縄の植物は一連の治療目的のために機能性食品を加工するために利用することができると言える。しかしながら、さらなる生体内での研究がこれらの植物をさまざまな業界で商業的に実用化するためには必要であると考えられる。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Atul Upadhyay
題 目	Biological activities of three Okinawan plants alpinia, leucaena, and pineapple. (沖縄産植物ギンネム、ゲットウ及びパイナップルの生理活性物質)

The beneficial effects of bioactive compounds from plants have been investigated in relation to a variety of pathological diseases. This study is composed of investigations, screening as well as isolation and identification of compounds with specific bioactivities. Three indigenous Okinawan plants, *Alpinia zerumbet* (alpinia), *Leucaena leucocephala* (leucaena), and *Ananus comosus* (pineapple) were studied to assess several bioactivities, with particular emphasis on neuraminidase inhibitions, a rational target for influenza prevention.

Several phenolic acids were identified in the pineapple stem waste that attributed to different bioactivities including, antimicrobial, 15-lipoxygenase, advanced glycation end product formations, and neuraminidase inhibitions. 5,6-Dehydrokawain (DK), dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK), 8(17),12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene) were isolated from the rhizomes of alpinia and were investigated for HIV-1 integrase and neuraminidase inhibitions. DDK was found to be the most active compound with  $IC_{50}$  of 3.6  $\mu$ M and 24.6  $\mu$ M against integrase and neuraminidase, respectively. The kinetic mechanism showed DDK to be a slow, time-dependent, reversible inhibitor of neuraminidase with a  $K_i$  value of 2.8  $\mu$ M. Besides, essential oils of two varieties of alpinia leaves were investigated for the neuraminidase inhibitions. The results showed that *tairin* variety with large number of terpenoidal compounds exhibited better inhibitory properties.

A non-proteinogenic amino acid, mimosine, was isolated from leucaena leaves and it inhibited neuraminidase with  $K_m$  and  $IC_{50}$  values of 39.1  $\text{min}^{-1}$  and 9.8  $\mu$ M, respectively. Furthermore, a small library of mimosine tetrapeptides was synthesized in search for more potent neuraminidase inhibitor. Mimosine-FFY (Phe-Phe-Tyr) was identified as the best synthesized tetrapeptide, and it exhibited 50% neuraminidase inhibition at low micromolar range of 1.8  $\mu$ M. This would encourage the researchers to synthesize peptides to develop novel and potent neuraminidase inhibitors.

Finally, since the alpinia leaves had been identified as a rich source of phenolic antioxidants, longevity extending effects of phenolic rich fractions of alpinia leaves (ALP) were investigated *in vivo* using *C. elegans* as animal models. It was found that, ALP could significantly increase the lifespan of the worms by up-regulating SOD-3 and HSP-16.2 genes, both of which are the downstream effectors of DAF-16 and can serve as stress-sensitive reporters to predict the longevity in *C. elegans*.

Therefore, this study showed that the investigated Okinawan plants exhibited a wide range of bioactivities. Compounds responsible for those activities were identified which included polyphenols, kawains and amino acids. On the basis of this study, it could be said that these Okinawan plants could be utilized in preparing functional foods for a series of therapeutic purposes. However, further *in vivo* studies are necessary in order to use these plants commercially in various industries.

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏 名	ATUL UPADHYAY
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学 准教授 玉城 一
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 琉球大学 教授 田幸 正邦
審査協力者	
題 目	Biological activities of three Okinawan plants alpinia, Leucaena, and pineapple. (沖縄産植物ゲットウ、ギンネム及びパイナップルの生理活性)
<p>健康食品や医薬の原料として植物生理活性化合物を有効利用するために、さまざまな病態疾患に関連した調査が行われてきている。本研究では、3種類の沖縄産植物、ゲットウ、ギンネム及びパイナップルについて特定の生理活性を持つ化合物の分離、同定並びにスクリーニングを行っている。これらの植物に含まれる有効成分を用い、インフルエンザ予防のための合理的なターゲットとしてノイラミニダーゼ阻害に特に重点を置いている。</p> <p>学位申請者はまず、パイナップルの茎廃棄物から数種類のフェノール酸を同定し、これらが抗菌活性、糖化最終産物の抑制、15-リポキシゲナーゼ、ノイラミニダーゼ阻害活性などを含むさまざまな生理活性に寄与することを確認した。ゲットウの根茎からは5,6-Dehydrokawain (DK)、Dihydro-5,6-dehydrokawain (DDK)、8(17)12-labdadiene-15,16-dial (labdadiene)などを単離し、これらがHIV-1インテグラーゼとノイラミニダーゼに阻害活性を示すことを明らかにした。DDKは、<math>IC_{50}</math>がそれぞれインテグラーゼに対して<math>3.6\mu M</math>、ノイラミニダーゼに対して<math>24.6\mu M</math>と、最も活性の高い化合物であることを見出している。</p>	

DDKのノイラミニダーゼに対する反応機構については遅発性かつ時間依存性に働くことや2.8  $\mu\text{M}$ の $K_i$ 値を持つ可逆的阻害剤であることが分かった。また、ゲットウ精油成分のノイラミニダーゼ阻害活性について調査した結果、テルペン化合物を多く含むことが知られるタイリングゲットウの方がシマゲットウよりさまざまな阻害活性において高い値を示した。ギンネム葉から分離されたミモシンもまた、ノイラミニダーゼを強く阻害し、 $K_m$ 値が $39.1\text{min}^{-1}$ 、 $\text{IC}_{50}$ 値は $19.8\mu\text{M}$ という阻害活性を示した。さらに、ミモシンを含む合成ペプチドがノイラミニダーゼ阻害活性を示す可能性の探索を行ったところ、ミモシン-FFY (Phe-Phe-Tyr) がノイラミニダーゼに対して $\text{IC}_{50}$ 値が $1.8\mu\text{M}$ という高い阻害活性を示した。このことは今後ともペプチド合成により新規で強力なノイラミニダーゼ阻害剤の開発が行える可能性を示唆していると思われる。

続いて、ゲットウ葉は酸化防止剤としても良く知られていることから、フェノール含量の豊富なゲットウ葉分画 (ALP) が持つ寿命延長効果を調べるために動物モデルとして線虫を用いて調査した。ALP分画により、DAF16の下流にあるエフェクター分子であり、線虫の寿命を予測するストレス感受性レポーターでもある、SOD3とHSP16.2遺伝子の発現が上昇することが観察され、それに伴い線虫の寿命が大幅に増加することが明らかとなった。本研究により、沖縄産植物が広い範囲の生理活性を持つことを示し、また、このことはこれらの活性を持つポリフェノール、カワイン及びアミノ酸などの化合物が沖縄産植物に多く含まれることによることが明らかになった。したがって、本研究に基づき、これらの沖縄植物は上記の病気及び治療にも用いられるよう機能性食品等に加工することも可能であると考えられる。

以上のように、本論文は、沖縄産植物であるゲットウ、ギンネム、パイナップルより生理活性の高い有効成分の分離、同定、スクリーニング法を確立し、分離された生理活性物質がHIVインテグラーゼやインフルエンザウイルスの持つノイラミニダーゼに対して有意な阻害活性を持つことを示した。また、ギンネムの持つミモシンを含む小分子ペプチドの合成も行い、高い値でノイラミニダーゼを阻害することも示した。さらに、モデル動物である線虫を用いて、ゲットウ葉分画が寿命を延ばす効果があることを遺伝子発現レベルでも明らかにした。したがって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値あるものと判定された。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	ATUL UPADHYAY
審査委員	主査 琉球大学 教授 多和田 真吉
	副査 琉球大学 准教授 玉城 一
	副査 鹿児島大学 教授 菅沼 俊彦
	副査 佐賀大学 教授 神田 康三
	副査 琉球大学 教授 田幸 正邦
審査協力者	
実施年月日	平成24年 1月 6日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input checked="" type="checkbox"/> 答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成24年1月6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並びに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者  
氏名

ATUL UPADHYAY

主な質問とそれに対する回答は以下のとおりである。

[質問 1] 寿命延長試験で比較対象としてレスベラトロール 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を選んだのは何か理由があったのですか？

[回答 1] レスベラトロールは、線虫や他の動物の寿命を延ばす化合物として広く研究されています。濃度 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においては、線虫の寿命が大幅に増加することが報告されています。したがって、我々の研究でも、この濃度を選択して実験しました。

[質問 2] パイナップル抽出物 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の濃度では線虫の寿命にどのような影響を与えられますか？

[回答 2] これは非常に興味深い質問ですが、この実験はまだ行っていません。私は、将来これを確認するための実験を行うつもりでいます。

[質問 3] ミモシンテトラペプチドは、透過性が低いかも知れないのに、なぜあなたはこの合成が重要だと思ったのですか？

[回答 3] 韓国の研究者の論文によりますと、コウジ酸のトリペプチドは、大幅にチロシナーゼを阻害すると報告されています。また、ミモシンもチロシナーゼ阻害剤であるため、私は、ミモシンテトラペプチドの生物活性を調査したいと考えました。ミモシンは強力なノイラミニダーゼ阻害活性を示すことが分かりましたので、ミモシンを原料として合成したテトラペプチドのノイラミニダーゼ阻害を調べることにしました。

[質問 4] ゲットウからインテグラーゼとノイラミニダーゼの酵素阻害活性を調べることにした理由とは何でしたか？

[回答 4] ヒスピジンという化合物が、インテグラーゼ阻害剤として米国企業のメルク社によ

って同定されています。ヒスピジンの化学構造は、DDK (ジヒドロ-5,6-デヒドロカワイン K) から DK (5,6-デヒドロカワイン) などと非常によく似ています。したがって、私は、DK と DDK はインテグラーゼを阻害することができるかと推測しました。ノイラミニダーゼ阻害活性でゲットウを選んだ理由は、ゲットウの葉は沖縄で長い間、伝統的な食品に使用されていることです。ムーチーと呼ばれるこの食べ物は、寒い季節の間に消費され、そしてそれが風邪を引くことから私たちを防ぐと考えられています。そこで私は、抗ノイラミニダーゼ活性を調査するためにゲットウの葉を選びました。

[質問 5] ゲットウから単離された化合物による阻害活性の作用機構とはどのようなものですか？

[回答 5] 阻害活性の作用機構についてはまだ研究しておりません。私は今後ともこの実験を続けて行くための非常に強い熱望を持っています。

[質問 6] ゲットウのどのような化合物が、線虫の寿命を延長するための原因となっているのですか？

[回答 6] 我々はまだゲットウ分画中に存在する化合物を調査している段階です。しかし、私は非常に高いフェノール含量を発見し、フラボノイドはゲットウの葉に存在することが報告されているので、活性化合物はフラボノイドの一種でなければならないことを前提としています。