

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860081

研究課題名(和文) アルツハイマー病治療薬創製を志向したヒガンバナアルカロイド生合成基盤の確立

研究課題名(英文) Establishment of Amaryllidaceae alkaloid biosynthesis technology that was oriented to Alzheimer's drug discovery

研究代表者

浅野 孝 (ASANO, TAKASHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：10552888

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アルツハイマー病は原因不明の疾病で完治が不可能であるため、症状の進行を遅らせるための薬の開発が数多く行われており、複数のアルカロイドの有効性が報告されている。本研究では、アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有するGalanthamineを含むヒガンバナ科植物に注目し、効果的なアルツハイマー病治療薬を創り出す基盤として、ヒガンバナアルカロイドの安定かつ効率の良い生産を無菌的に培養可能な植物にて確立することができた。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease is a condition of unknown etiology; and since complete recovery is impossible, a number of medications aimed at slowing the progression of symptoms are under development, and the effectiveness of a number of alkaloids has been reported. This study was focused on a plant of the family Amaryllidaceae which contained galanthamine, a substance with an inhibitory effect on acetylcholinesterase; and the findings have allowed for establishing a stable and efficient production of Amaryllidaceae alkaloids in aseptically cultured plants, as a basis for the creation of effective therapeutic agents against Alzheimer's disease.

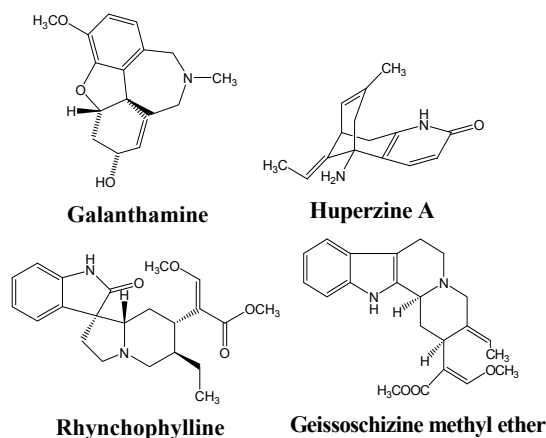
研究分野：天然医薬資源学

キーワード：ヒガンバナアルカロイド 生合成 組織培養 LCMS-IT-TOF

1. 研究開始当初の背景

日本における高齢化問題は深刻なものとなっており、それに付随して問題となっている疾患として『認知症』があげられる。その中でも『アルツハイマー型認知症』の割合が近年増加しており、患者数は世界で2,000万人以上と言われている。アルツハイマー病の原因は未だ不明であり、完治も不可能であるため、いかに症状の進行を遅らせるかが重要である。しかし、症状の進行を劇的に抑えられる特効薬は未だ存在せず、様々なアプローチでのアルツハイマー病治療薬開発が急務な課題であると言える。

アルツハイマー病の治療としては、脳内のアセチルコリンレベルの低下を防ぐことを目的として、「アセチルコリンエステラーゼ阻害薬」の塩酸ドネペジル（商品名：アリセプト）やガラントミン臭化水素酸塩（商品名：レミニール）などが日本国内で保険適応を受けて使用されている。このアルツハイマー病治療薬として重要な役割を果たしている『Galanthamine』は、天然植物由来アルカロイド成分であり、ヒガンバナ科植物に広く含有することが報告されている。また、『Galanthamine』とは構造的に異なるリコポジウムアルカロイドに分類される『Huperzine A』も同様の作用を有することが報告されている。さらに、認知症に対する漢方方剤の有効性について、『釣藤散』及び『抑肝散』が症状を抑えることが報告されており、これら漢方処方に共通する生薬である『釣藤鈎』に対する関心が高まっている。釣藤鈎には、『Rhynchophylline』や『Isorhynchophylline』などのオキシインドール型アルカロイドと、『Geissoschizine methylether』、『Hirsutine』などのインドール型アルカロイドが含有されており、これら成分もまたアルツハイマー病治療薬の候補となり得る。

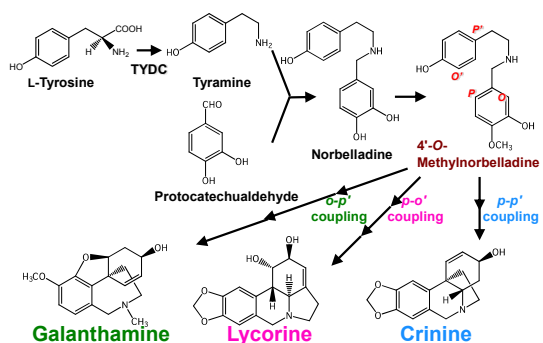


これらの観点から、アルツハイマー病に効果を示すアルカロイドの効率的な物質生産系の構築と生合成工学による自由自在な化合物改変によってもたらされる非天然型アルカロイドの創製の融合はアルツハイマー

病治療薬開発の新たな手法であると共に、貴重な天然医薬資源の持続可能な利用を可能にする方法であると言える。

2. 研究の目的

アセチルコリンエステラーゼ阻害作用を有する Galanthamine は、アルツハイマー病治療薬として広く世界中で用いられている。ヒガンバナアルカロイドは 4'-O-Methylnorbelladine を共通の生合成中間体とし、その後、カップリング様式の違いにより、Galanthamine、Lycorine、Crinine の3タイプに分岐していくと考えられているが、どのような代謝制御機構に基づいて生合成されているかはほとんど解明されていない。



そこで本研究では、以下の点を明らかにすることを目的とする。

- (1) ヒガンバナアルカロイドの効率的生産に向けて、ヒガンバナ科植物の培養系の構築を行う。
- (2) ヒガンバナ科無菌植物体及びカルスにおけるヒガンバナアルカロイド生合成仮想中間体の一斉分析系の確立を行う。
- (3) ヒガンバナ科無菌植物体及びカルスにおける発現遺伝子の網羅的な解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ヒガンバナアルカロイドの効率的生産に向けた培養系の構築

種々のヒガンバナ科植物を材料として、植物ホルモンの種類及び濃度を検討することにより、再生植物体及びカルスの誘導を行う。

(2) ヒガンバナ科無菌植物体及びカルスにおけるヒガンバナアルカロイド生合成仮想中間体の一斉分析系の確立

ヒガンバナ科植物には多様なアルカロイドが含まれていることが知られているが、植物間の成分パターンの違いに関する系統的解析はほとんどなされていない。そこで、ヒガンバナ科無菌植物体及びカルスの部位別アルカロイド含有量を LCMS-IT-TOF を用いて測定することにより、植物種間でのアル

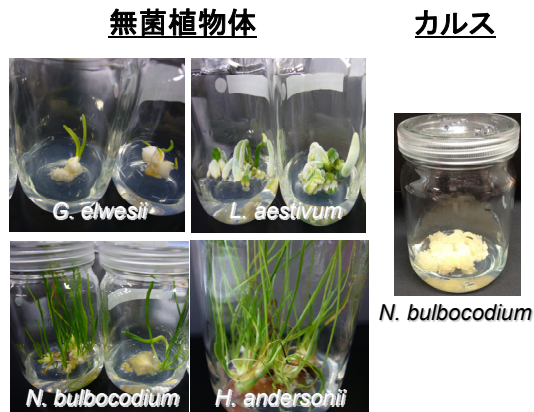
カロイドの含有パターンの違いと特定部位への局在性を明らかにする。

(3) 次世代シーケンサーを用いたヒガンバナアルカロイド生合成関連候補遺伝子の解析

ヒガンバナアルカロイド生合成は『4'-O-Methylnorbelladine』を共通中間体とし、その後、カップリング様式の違いにより、『Galanthamine』、『Lycorine』、『Crinine』の3タイプに分岐していくと考えられているが、生合成遺伝子についてはほとんど明らかにされていない。そこで、ヒガンバナアルカロイド生合成関連候補遺伝子の選抜を最終目的として、ヒガンバナ科無菌植物体及びカルスについて、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子の網羅的解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒガンバナ科植物の球根りん片を殺菌後、植物ホルモンを添加した培地にて 20℃、暗所下で培養した結果、*Galanthus elwesii* と *Leucojum aestivum* の 2 種において小球の再生が確認された。さらに、得られた小球を、植物ホルモンを添加した生長培地に移植し、20℃、16 時間明期、8 時間暗期で培養したところ、植物体の生長が確認された。また、*Narcissus bulbocodium*、*Habranthus andersonii* の 2 種においては、球根を殺菌後、植物ホルモンを添加した生長培地で培養することにより、無菌植物体の確立に成功した。さらに、*N. bulbocodium* の小球からはカルスの誘導が確認された。



(2) *N. bulbocodium* のカルス及び 4 種のヒガンバナ科無菌植物体 (*G. elwesii*, *H. andersonii*, *N. bulbocodium*, *L. aestivum*) の地上部、小球、根を凍結乾燥させた後、メタノール抽出し、アダマンチル基を充填剤表面に導入した逆相カラムを用いて LCMS-IT-TOF 分析を行った。検出された質量イオンピークについて、ヒガンバナアルカロイドの精密質量に基づいてスクリーニングを行った結果、Galanthamine は *L. aestivum*, *N. bulbocodium* の地上部と小球、*G. elwesii* の根に多く蓄積していることが示

された。また、Lycorine はいずれの植物においても多く蓄積していることが示されたが、*N. bulbocodium* では他の 3 種と比べて Lycorine の蓄積量が少ない一方で、Lycorine と骨格が僅かに異なる Narcissidine と推測されるピークのイオン強度が非常に大きいことが明らかになった。*N. bulbocodium* のカルスでは、ヒガンバナアルカロイド生合成仮想中間体 (図 1) と推測されるピークは検出されなかった。

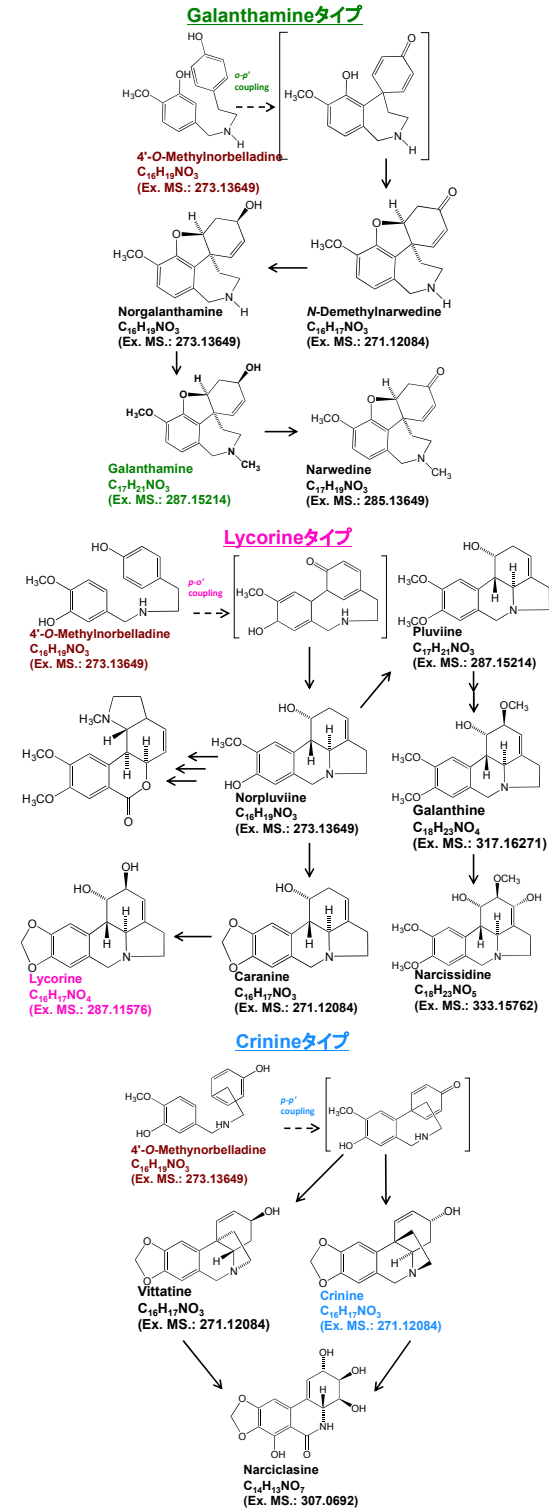


図 1 ヒガンバナアルカロイド仮想生合成経路

(3) *N. bulbocodium* のカルス及び 4 種のヒガンバナ科無菌植物体 (*G. elwesii*, *H. andersonii*, *N. bulbocodium*, *L. aestivum*) の地上部、根を材料として、次世代シーケンサーを用いた発現遺伝子の網羅的解析を行った。その結果、無菌植物体の発現遺伝子の中にヒガンバナアルカロイド生合成に関与する可能性のある遺伝子が複数存在した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 小野寺蓮、浅野孝、小暮紀行、高山廣光、藤井勲
ヒガンバナアルカロイド生合成仮想中間体の一斉分析系の開発
日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 27 日
デザイン・クリエイティブセンター神戸 (兵庫県神戸市)
2. 浅野孝、小暮紀行、高山廣光、藤井勲
ヒガンバナ科植物の組織培養と代謝物解析
第 32 回日本植物細胞分子生物学会、2014 年 8 月 21 日～2014 年 8 月 22 日
アイーナ いわて県民情報交流センター (岩手県盛岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅野 孝 (ASANO, TAKASHI)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：1 0 5 5 2 8 8 8