

天然物からの細胞分化に関わるシグナル阻害剤の探索

2016 年

米山 達朗

目次

| | |
|---|-----|
| 序論 | 2 |
| 本論 | |
| 第一章 Hedgehog 伝達経路阻害剤の探索 | |
| 一節 アッセイ系について | 10 |
| 二節 <i>Themeda arguens</i> からの分画及び構造決定 | 12 |
| 三節 単離化合物の構造解析及び同定 | 19 |
| 四節 活性評価 | 20 |
| 五節 <i>Withania somnifera</i> からの分画及び構造決定 | 23 |
| 六節 単離化合物の構造解析及び同定 | 28 |
| 七節 活性評価 | 29 |
| 八節 GLI1 転写阻害活性化合物の EMSA を用いた作用機序の検討 | 34 |
| 九節 小括 | 42 |
| 第二節 Notch 伝達経路阻害剤の探索 | |
| 一節 アッセイ系について | 43 |
| 二節 バングラデシュ植物エキスライブラリーのスクリーニング | 45 |
| 三節 <i>Calotropis gigantea</i> からの分画及び構造決定 | 48 |
| 四節 単離化合物の構造解析及び同定 | 55 |
| 五節 活性評価 | 56 |
| 六節 神経幹細胞分化アッセイの条件検討について | 61 |
| 七節 単離化合物の神経幹細胞分化に与える影響の評価 | 68 |
| 八節 小括 | 70 |
| 総括 | 71 |
| 実験の部 | 73 |
| 参考文献 | 112 |
| 謝辞 | 116 |
| 主要論文目録 | 117 |
| 学位審査 | 118 |

序論

天然物からの創薬

現在利用されている医薬品は天然物，天然物の誘導体もしくは天然物を模倣して合成された薬剤が多くを占めている^[2]。天然物化学の歴史は長く，1805年の薬剤師 F. W. A. Sertürner のアヘンからの morphine の単離や，1985年の長井長義による麻黄からの *l*-ephedrine の単離，1928年の A. Fleming による *Penicillium* 属の青カビからの penicillin，さらに現在医薬品として用いられる化合物にカフェイン，ベルベリン，アトロピン等が挙げられる (Figure 1)。

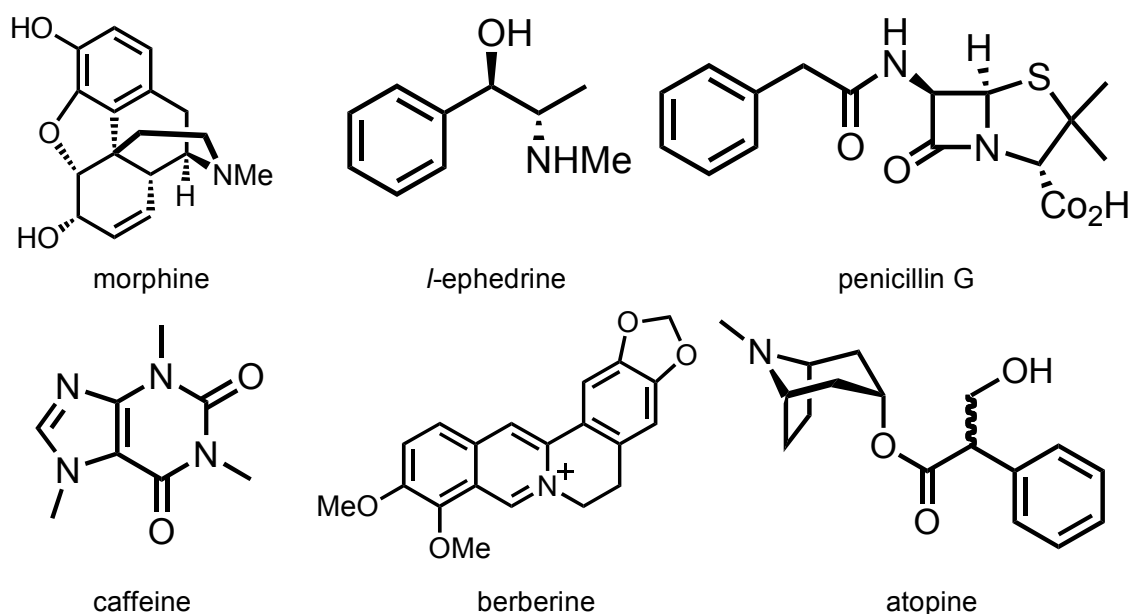


Figure 1 Chemical structures of medical drugs discovered from natural products.

このように様々な生物活性を示す化合物の発見が医療のみならず人類の歴史に多くの影響を与えている。また，現在までに人類が利用可能であった天然物素材は地球上に存在するうちの 10%程度にも満たないと言われる事からさらに多くの発見が期待される。現代ではさらに，それら天然由来化合物の構造解析のみならず，活性及び作用機序の解明を標的とした研究が新たな天然物化学を発展させている。著者は，天然物からの創薬シーズの発見に興味を持ち，天然物からの未知の活性を有す創薬シーズの探索及び阻害剤の作用機序解明は新たな医薬品の開発に貢献すると考え，本研究を行った。

癌治療薬開発の現状

日本における死亡率は 2013 年の人口動態統計によれば 1 位は悪性新生物 (癌) であり、続いて心臓病, 肺炎, 脳卒中が上位を占めている (Figure 2)^[2]. 現在癌治療薬の研究開発が精力的に行なわれる一方, 癌による死亡率は統計の開始された 1947 年以降一貫して増加を続けている.

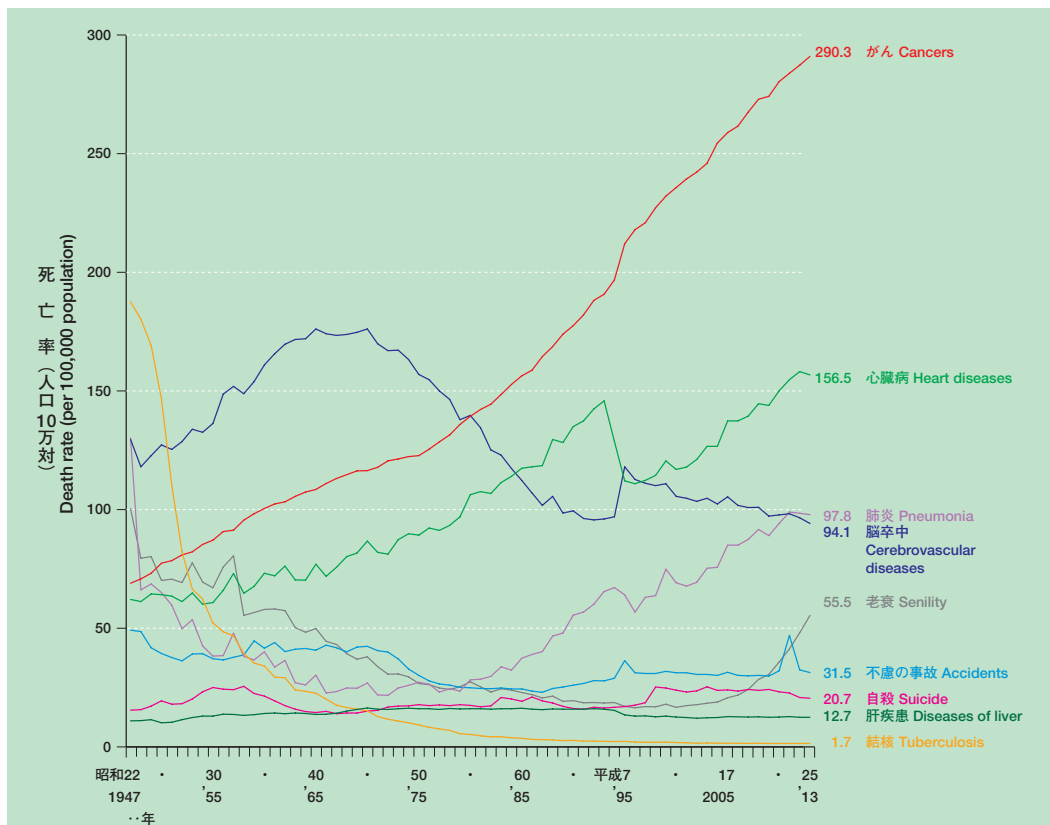


Figure 1 Trends in death rates for leading cause of death, 1947-2013.

近年では癌細胞内で特異的な変化の見られる分子の存在が明らかとなり, 現在では CD20 や上皮成長因子受容体 (EGFR) 等のチロシンキナーゼ等の分子が報告されている. また, Notch シグナル, Wnt シグナル, Hedgehog シグナル, TGF β シグナル等のシグナル伝達経路の癌の発生・拡大への関与が報告されており, これらの分子及びシグナル伝達経路を標的とした分子標的薬の開発が行なわれている. これまでに, 1997 年米国にて B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療薬として承認されたリツキシマブを初めとして 60 種を超える薬剤が承認を受けている. これらの薬剤は癌細胞に特異的に発現する分子に作用する性質から, これまでの治療薬に比べ副作用を抑えられるなどの利点が挙げられ, 癌治療に貢献している.

Hedgehog シグナル伝達経路について

2013 年の日本における癌の性別毎の内訳としては男性では肺，胃，大腸，肝臓，膵臓，次いで前立腺という順であり，女性では大腸，肺，胃，膵臓，乳房となっている^[2]。上位を占める胃癌及び肝臓癌が近年減少傾向を見せる一方，肺癌，膵臓癌及び前立腺癌等は増加を続けている事から，新たな治療法や抗癌剤の開発が期待されている。特に膵臓癌では早期発見が困難であり，さらに再発率の高い事から難治性の癌としてあげられている。この膵臓癌や前立腺癌等で hedgehog シグナルの異常亢進が報告されている。

Hedgehog シグナル伝達経路は胚発生において分化・形態形成に重要な働きをする伝達経路である。hh 遺伝子は 1980 年にショウジョウバエの胚の体節異常を起こす変異体の原因遺伝子として発見された^[3]。この伝達経路の名は変異ホモ体の腹側上皮を覆う歯状突起が「ハリネズミ (hedgehog)」に似ていたため名付けられた。Hh ファミリータンパク質は，ショウジョウバエでは 1 種類，哺乳類では 3 種類，Sonic hedgehog (SHH), Desert hedgehog (DHH), Indian hedgehog (IHH) の存在が明らかとなっている。この中でも SHH は脊椎動物において最も広く分布し，研究が盛んに行なわれている。

膜結合型前駆体として合成された Pre-Hh は N 末側シグナルペプチドの脱離により Hh-N (Signaling domain) 及び Hh-C (Intein-like domain) に分裂し，その際 Hh-N は hedgehog acyl transferase (Hhat) による N 末端のパルミトイル化及び C 末端のコレステロールエステル化を受け成熟し分泌される^[4]。この Hhat は membrane-bound O-acyltransferase (MBOAT) ファミリーのタンパク質の一つであり，Hhat ノックアウトマウス及びパルミトイル化能欠損 Shh 組換えマウスは Shh ノックアウトマウスと類似の発達障害をみせる事から，その重要性が示唆されている^[5]。

Hh リガンド非存在下では Hh リガンドの受容体である 12 回膜貫通型タンパク質 PTCH は一次繊毛 (primary cilium) に局在し，7 回膜貫通型タンパク質 SMO の一次繊毛への移動を阻害する (Figure 3)。一方 Glioma-associated oncogene homolog (GLI) と Su(Fu) から成る複合体は PKA や CK1 等キナーゼによるリン酸化を受け，その後プロテアソームにより一部が分解され不活性型 GLI となり核内へ移行し，標的遺伝子の転写を阻害する。しかし，Hh タンパク質 PTCH に結合すると PTCH は一次繊毛から移動し，SMO への抑制が解除され，SMO は一次繊毛へ移動し Su(Fu) を阻害する事でキナーゼによる GLI のリン酸化を阻害する。これにより活性型の GLI が核内へ移行し *gli1*, *ptch*, *Bcl2*, *cycline D*, *cycline E*, *N-Myc* 等の細胞生存に関わる標的遺伝子の転写が始まる。

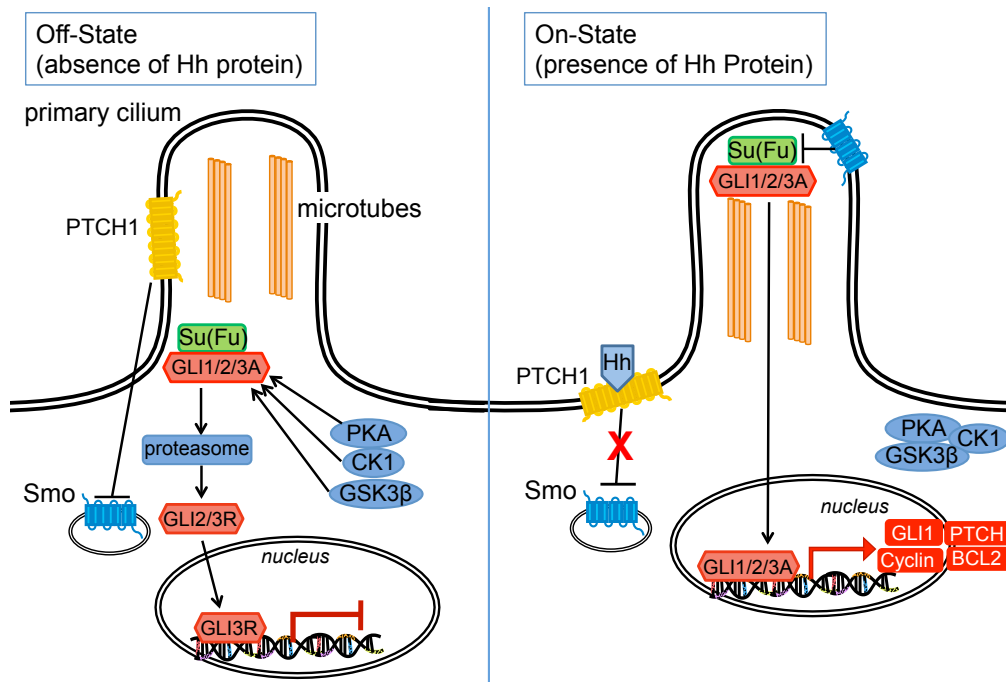


Figure 3 Hedgehog signaling pathway.

また、成体組織においてHedgehogシグナルはその維持及び修復に重要な働きを担っている。例えば脳では損傷に伴いアストロサイトからSHHが分泌される事が報告されている^[6]。また、髪^[7]、皮膚^[8]又は骨^[9]等の組織においても修復や維持への関与が報告されている。

このように胚での分化や成体組織での重要な働き的一方で、hedgehogシグナルのリガンド依存的・非依存的な異常亢進が癌の発生・拡大に寄与する事も知られている。リガンド非依存的な癌化としてはPTCHの機能不全、SMOやSu(Fu)の変異などが挙げられ、基底細胞癌^[10]、髄芽種^[11]などの発生に関わっている。また、伝達経路のコンポーネントへの変異は伴わないが、癌細胞自身や間質細胞により発現したりリガンド依存的な癌化が前立腺癌^[12]、肺癌、大腸癌及び膵臓癌^[13]等で報告されている。この為、Hedgehogシグナル伝達経路を阻害する事は癌の治療のターゲットとして注目され、臨床試験も行なわれている^[14]。

これまでに報告されているHedgehogシグナルの阻害剤として、SMO阻害剤としてはユリ科植物 *Veratrum californicum* より単離された Cyclopamine^[15, 16]、合成化合物では CUR61414^[17]、SANTs^[18]、さらに hedgehog 阻害剤として初めてFDAに承認された基底細胞癌治療薬の vismodegib^[19]等がある。さらに、Hhat阻害剤である RU-SKI 43^[20]、SHHNに相互作用し阻害作用を示す Robotnikinin^[21]、GLI1阻害剤である GANT61^[22]、AAA⁺ATPase阻害剤の HPIs^[23]などが報告されている (Figure 4)。

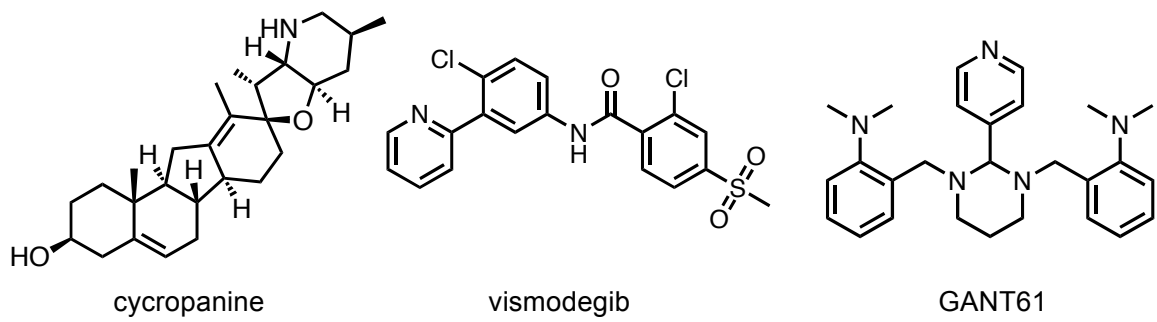


Figure 4 Reported Hh inhibitors

当研究室ではこれまでに構築したレポーターアッセイ系を用いて天然物より阻害剤探索を行い, physalin B^[24], physalin F^[24], colubrinic acid^[25], caldenolides^[26], taepenin D^[27], flavonoid glycoside^[28], vitetrifolin D^[29] 及び physalin H^[30],等を報告している (Figure 5). GLIの転写阻害作用を有する化合物は, 新規抗がん剤の有用なリード化合物になりえると考え, 天然物より探索することとした.

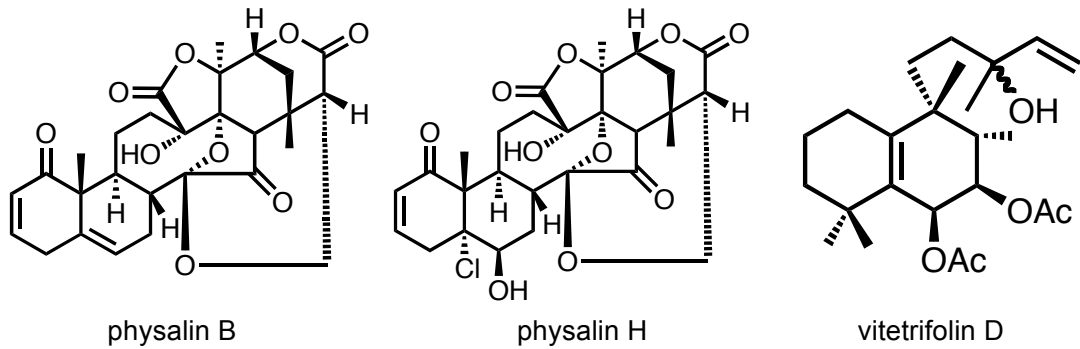


Figure 5 Reported GLI1 transcriptional inhibitors.

Notch シグナル伝達経路について

Notchシグナルは高度に保存された、細胞間情報伝達を介して幹細胞等の様々な細胞の運命決定に関わる伝達経路である (Figure 7). Notchシグナル伝達経路は隣接する細胞表面上に存在するリガンドJagged及びDeltaがNotchタンパク質と相互作用する事で始まる. これを引き金にNotchタンパク質に対するADAM/TACEメタロプロテアーゼによるS2, γ -secretaseによるS3/S4切断によりintracellular domain of Notch (NICD) が核内に移行する. 次いで核内においてNICDがRBP-J κ 及びMAMLと三量体を形成し, 標的遺伝子の転写が始まる. 標的遺伝子としてはHES1, HES5, HES7, Hey1, Hey2及びHeyL等のHESのサブファミリーが報告されている^[32]. また, 癌細胞においてはc-myc, cyclinD1, NF κ B2等が報告されている^[33-35]このうちHES1はbasic helix-loop-helix型転写因子のうち抑制型に分類され, 核内において二量体を形成し, Mash1, Ngn2などの神経幹細胞の分化を促進する働きを持つ活性型bHLH型転写因子の転写を抑制する^[36].

Signal sending cell

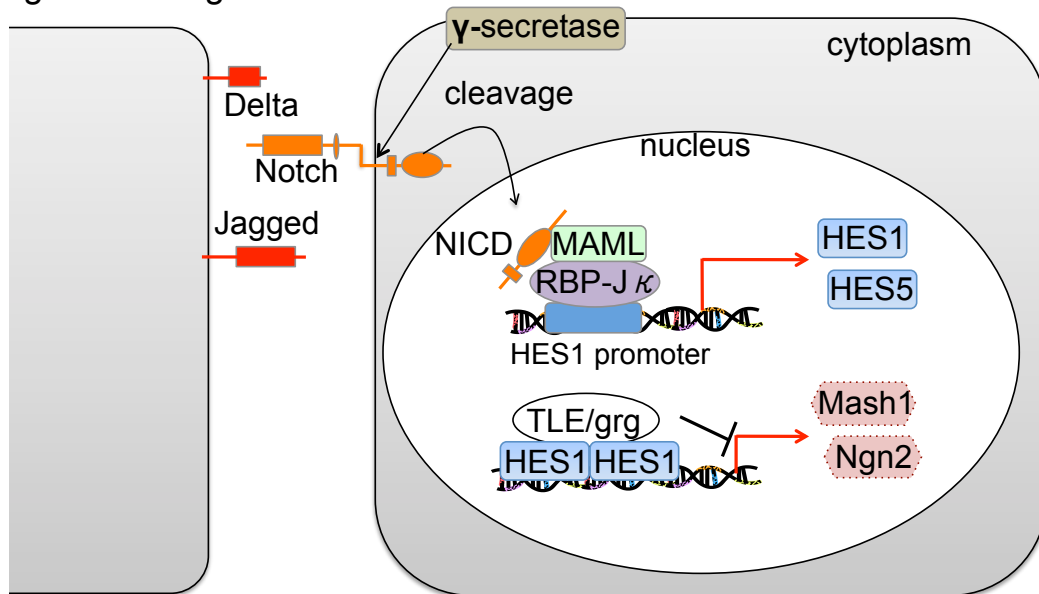


Figure 7 Notch signaling.

次に Notch シグナル及び標的遺伝子である HES の神経幹細胞分化に対する影響について説明する (Figure 8)^[37]. HES1 は抑制型 bHLH 型転写因子の一つで, HES5 等とともに神経幹細胞の自己増殖を促進し, 各種神経細胞への分化を抑制する働きを持つ. また, Notch シグナルはニューロン前駆細胞においては前駆細胞からニューロンへの分化を阻害する働きを持つ. そのため, この抑制的に働く HES1, 5 を制御する Notch シグナルを阻害することで神経幹細胞の分化を促進することは, アルツハイマー病等の神経変性疾患の治療に貢献する可能性がある.

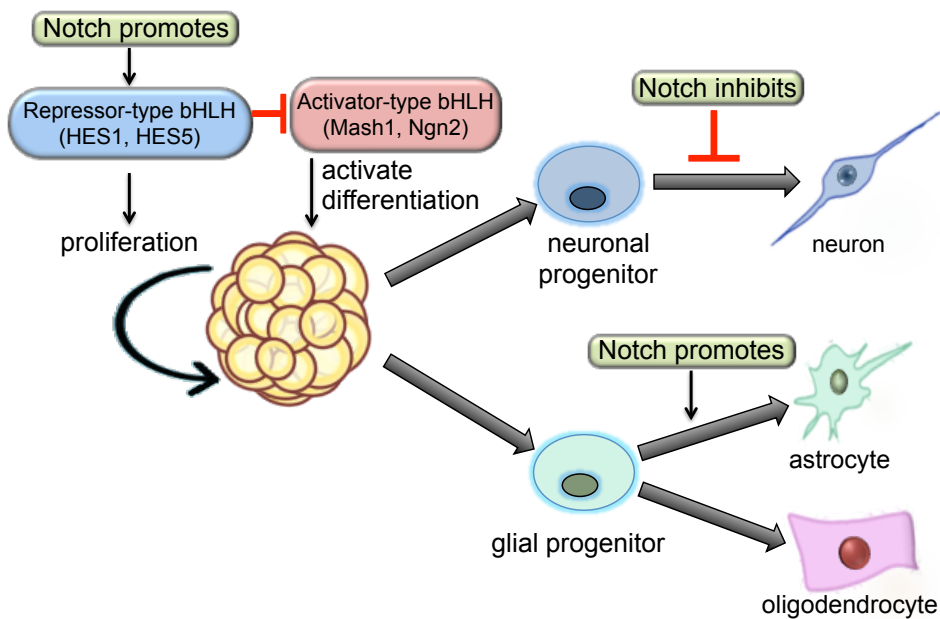


Figure 8 Effect of Notch signaling on differentiation of neural stem cells

これまでに Notch シグナルの阻害剤としては DAPT (*N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-*L*-alanyl]-*S*-phenylglycine *t*-butyl ester)^[38], LY411,575^[39]や MK0752 (*cis*-4-[(4-Chlorophenyl)sulfonyl]-4-(2,5-difluorophenyl)cyclohexanepropanoic acid)^[40, 41]等の γ -secretase 阻害剤 (GSI) や、天然物では curcumin^[42]や genistain^[43]等が報告されている (Figure 9). しかし、Notch シグナル阻害剤の報告は少なく、その研究の多くが Notch シグナルの関連する白血病等の癌を標的とした物であり、神経幹細胞分化を標的とした物はわずかである。このため本研究では Notch シグナルを阻害する事で神経幹細胞のニューロン等神経細胞への分化を促進する化合物の発見を目的とし実験を行なった。

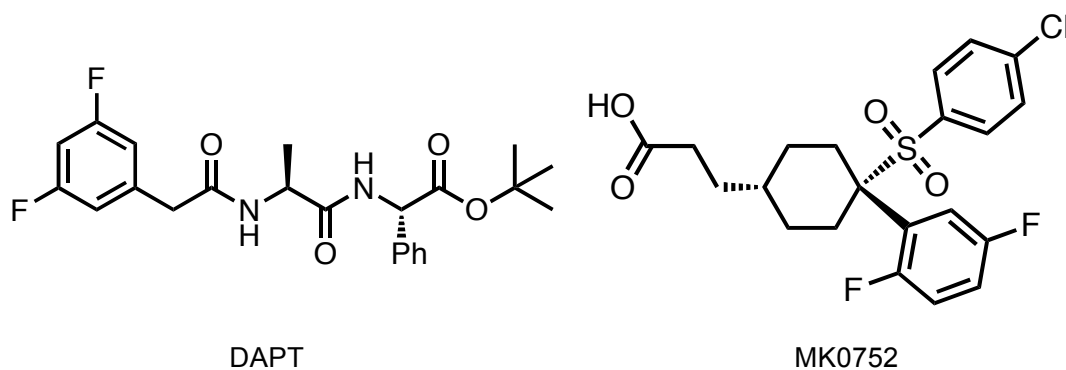


Figure 9 Reported Notch inhibitors.

第一節 アッセイ系

Hedgehog シグナル伝達経路の下流に位置する転写因子である GLI1 による転写活性の阻害作用を有す化合物の探索を目的に、当研究室において T-REx システム (Invitrogen™) を用いて構築したルシフェラーゼアッセイ系を用いて活性評価を行なった。T-REx システムは *E. coli* Tn10 由来の tetracycline (Tc) 耐性オペロンを用いた発現調節機構である。目的遺伝子を挿入した Tet オペレーター-DNA 配列を含む pcDNA 4/TO 及び Tet repressor (TetR) をコードする pcDNA 6/TR を形質転換し、Tc の添加により目的遺伝子の発現を制御する事が可能である。

本研究で用いるアッセイ系作製では、Dr. Rune Toftgård 氏 (Karolinska Institutent, Sweden) より譲与頂いた 12GLI-RE-TKO (12xGLI1 結合領域-TK prom. を含む) の 12xGLI1 結合領域-TK prom. (449 bp) を pGL4.20 [luc2/Puro] のマルチクローニングサイトに挿入し、pGL4-GLI BS を作製した。また、Dr. Fritz Aberger 氏 (University of Salzburg) より譲与いただいた pcDNA3.1-GLI1, pcDNA 6/TR を安定発現しているヒト表皮角化細胞 HaCaT cells^[44]に、作製した pGL4-GLI BS を形質転換し、1 µg/mL puromycin 及び zeocin を用いた薬剤選択により安定発現株を得た。

Tc 非添加時には tetR ホモダイマーが pcDNA3.1-GLI1 上の Tet オペレーター配列 (TetO₂) に結合し、GLI1 の転写を抑制する。Tc を添加すると、Tc は TetR ホモダイマーに結合し、その立体構造を変化させ、TetO₂ から解離させることで目的遺伝子 GLI1 の転写が開始される。発現した GLI1 が pGL4-GLI BS 上の GLI1 結合領域に結合する事でその下流にコードされた luciferase が転写される。細胞溶解後に luciferase の基質、luciferin を添加する事で生じる化学発光を測定する事で GLI1 による転写活性を定量する (Figure 1.1.1).

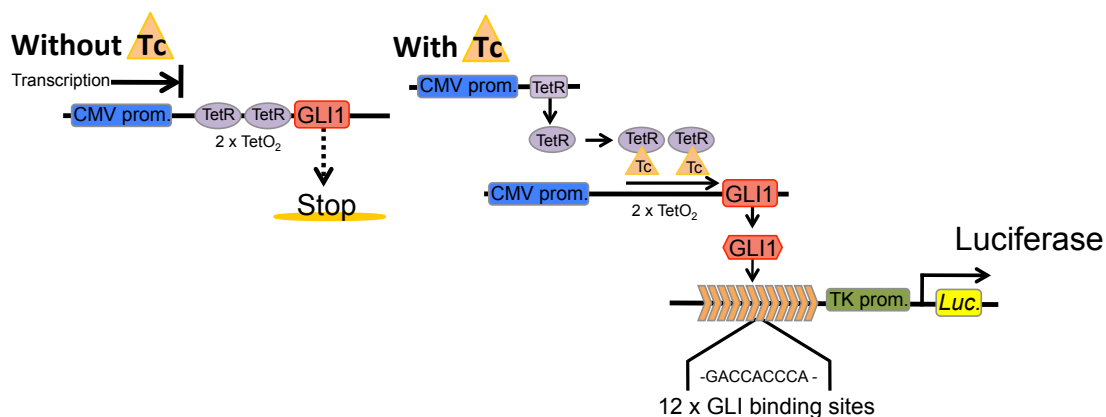


Figure 1.1.1 Constructed cell-based assay system. Tc: tetracycline, CMV prom.: CMV promoter, TetR; tetracycline repressor, TetO₂; tetracycline operator 2, TK prom.: TK promoter.

また、luciferase 活性がサンプルの細胞毒性により低下する場合もある為、細胞生存率を fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) を用いて同時に測定した。コントロールの luciferase 活性及び細胞生存率を 100 % とし、高い細胞生存率、低い luciferase 活性を示したサンプルを陽性と判断した (Figure 1.1.2).

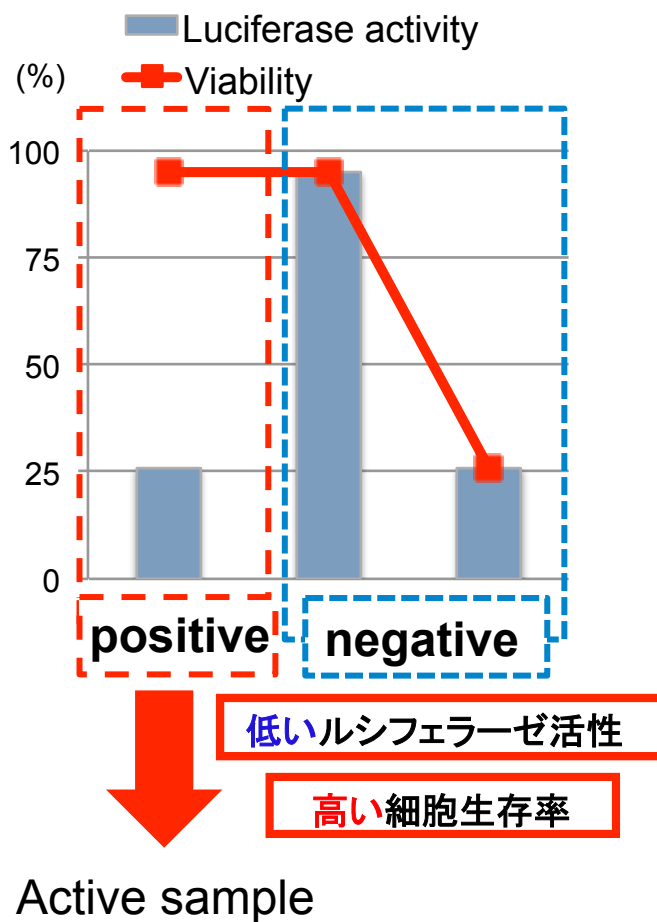


Figure 1.1.2 GLI1 transcriptional activity and cell viability.

第二節 *Themeda arguens* の GLI1 転写阻害活性を指標とした分画

過去の植物エキブラリーのスクリーニングにおいて GLI1 転写阻害活性を示したタイ産 *Themeda arguens* について活性成分の探索、活性評価及び作用機序の解明のためウエスタンブロットを用いて単離化合物のタンパク質発現量に対する影響を評価した。

Themeda arguens

本植物はカホン科 (Paceae) に属し、東南アジア・オーストラリア等に分布している。抗リウマチ作用や強壯効果を目的に用いられていたが、成分探索の報告はこれまでにないため、分画を行なう事とした。

T. arguens の全草は 5 lot に分かれて保存されていた。Lot 毎に MeOH を用いて抽出を行った (Table 1.2.1)。それぞれの Lot より得た MeOH ext. について活性評価を行った (Figure 1.2.1)。

Table 1.2.1 Extraction of *T. arguens*.

| Lot | 植物重量 | 抽出時溶媒量, 回数 | MeOH エキス量 |
|-------|---------|-------------|-----------|
| 7-232 | 108.0 g | 1L x 2 回 | 7.1 g |
| 7-282 | 70.3 g | 1.5 L x 2 回 | 6.0 g |
| 7-291 | 101.9 g | 1.5 L x 2 回 | 6.9 g |
| 7-313 | 90.8 g | 1L x 2 回 | 9.0 g |
| 7-335 | 183.9 g | 1L x 2 回 | 15.4 g |

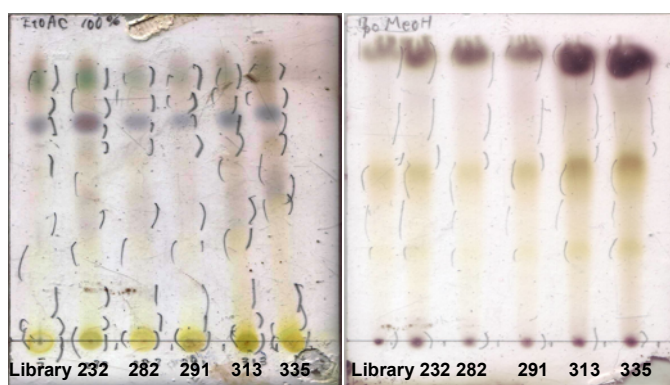
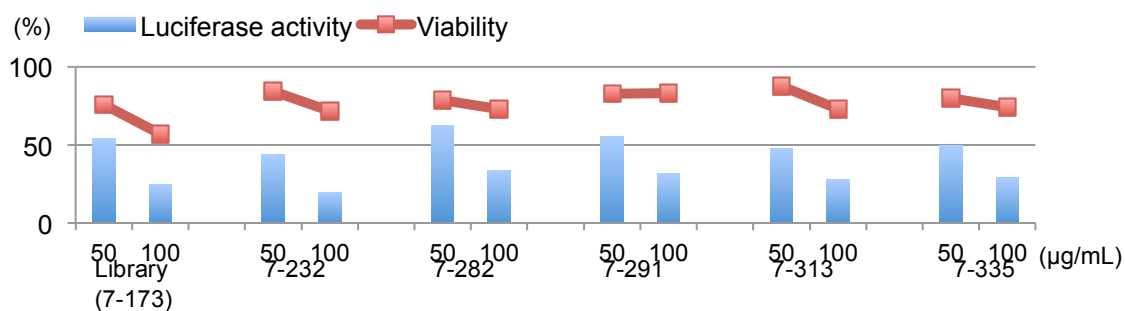


Figure 1.2.1 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, EtOAc, H₂SO₄, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 7:3, 10% H₂SO₄, Δ

各 Lot MeOH 抽出物は TLC において同様のスポットを示し, Library 品と同程度の活性を示した. 本研究では 7-335 より得られた MeOH 抽出物 (15.4 g) を用いて分画を行なった.

KKP259 (7-335) より得た MeOH 抽出物 (15.4 g) についてクロロフィル・糖の除去を目的に H₂O, MeOH, acetone を用いて Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ø10x230 mm) により分画を行い, Fr.1A-1F を得た. 活性は 1D, 1E に認められた (Figure 1.2.2).

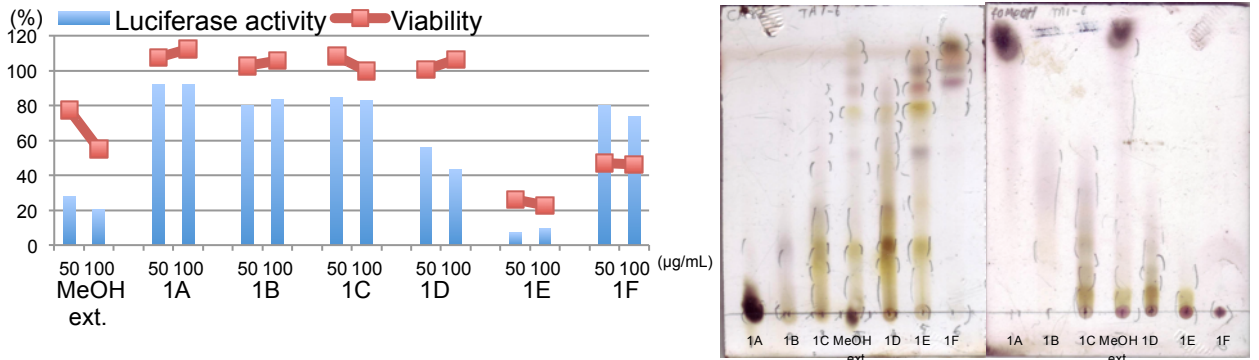


Figure 1.2.2 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 8:2, H₂SO₄, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 4:6, 10% H₂SO₄, Δ

Fr.1D (2.2 g) を CHCl₃: MeOH 系を, 用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ø60 x 240 mm) により分画し, Fr.2A-2N を得た. 活性は 2D, 2E に認められた (Figure 1.2.3).

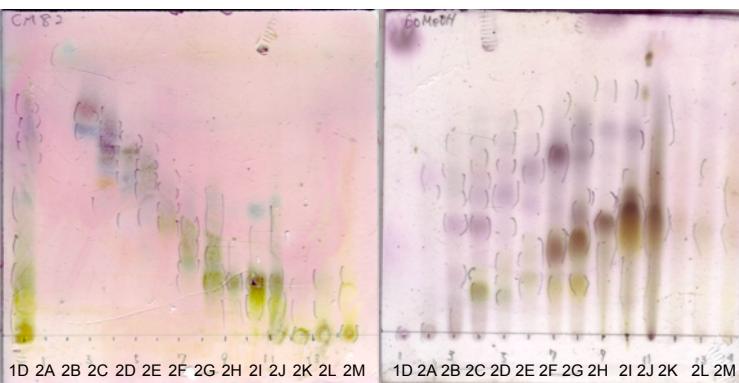
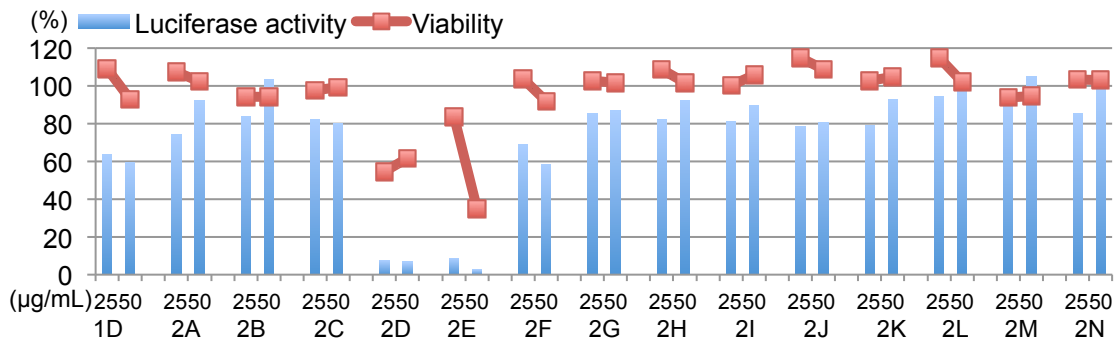


Figure 1.2.3 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 8:2, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.2D (34.2 mg) を H₂O:MeOH (4:6-0:1) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (φ12x210 mm) により分画し, Fr.3A-3H を得た. 活性は Fr.3C-3H に認められた (Figure 1.2.4).

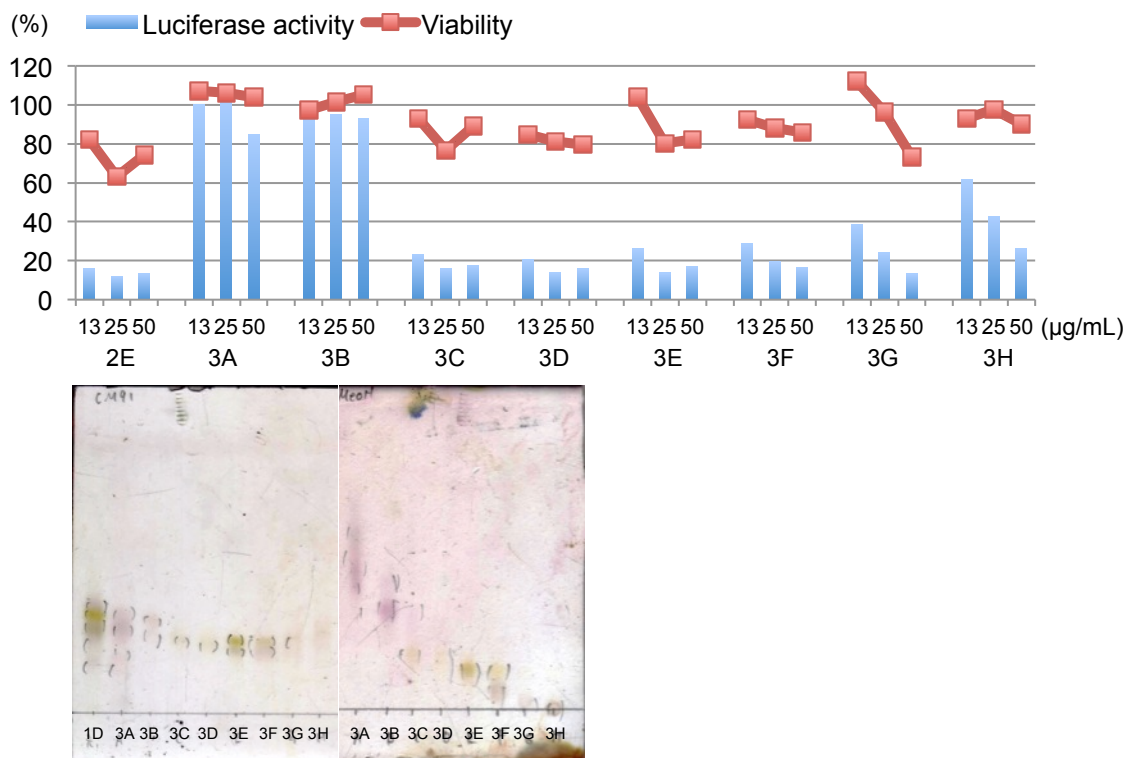


Figure 1.2.4 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.3E (11.2 mg) を ODS HPLC (Develosil ODS-MG-5, φ10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **1** (Fr.4C, 4.8 mg, t_R 45 min) および **2** (Fr.4D, 2.3 mg, t_R 49 min) を得た (Figure 1.2.5).

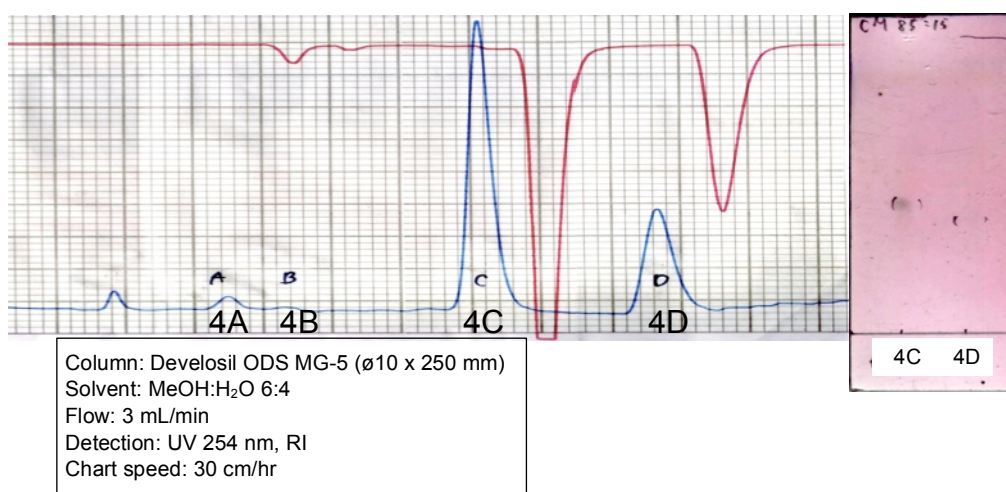


Figure 1.2.5 HPLC chromatogram of Fr.3E and TLC analysis. Silica gel, CHCl₃:MeOH 85:15, anisaldehyde, Δ

Fr.2E (44.0 mg) を H₂O:MeOH (9:1-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø12x220 mm) により分画し Fr.5A-5I を得た。活性は 5F 及び 5G に認められた (Figure 1.2.6).

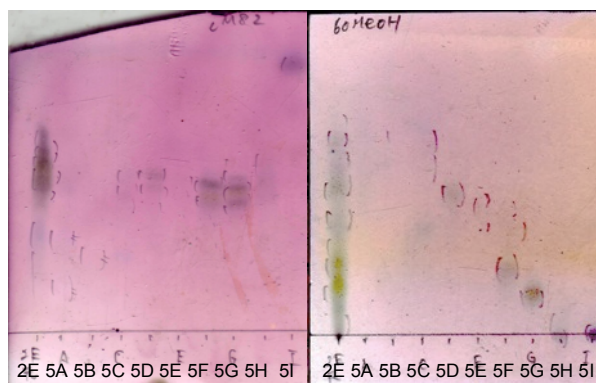
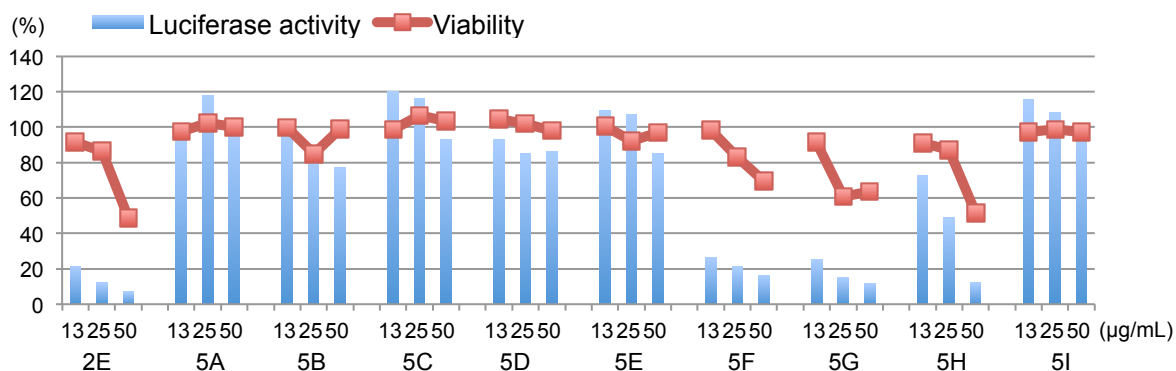


Figure 1.2.6 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 8:2, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.4G (8.7 mg) を ODS HPLC (Develosil ODS-MG-5, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (53:47), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **2** (Fr.6B, 2.4 mg, t_R 64 min) および **3** (Fr.6C, 1.3 mg, t_R 69 min) を得た (Figure 1.2.7).

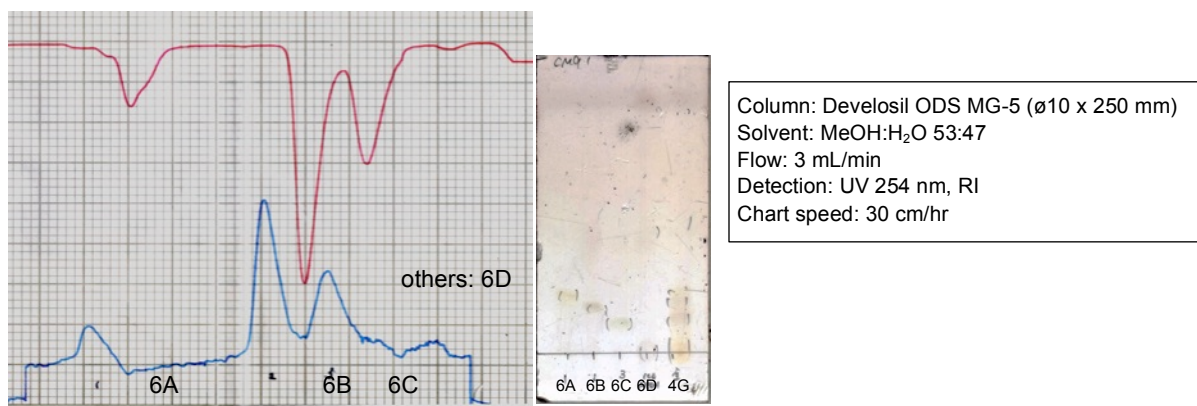


Figure 1.2.7 HPLC chromatogram of Fr.3E and TLC analysis. Silica gel, CHCl₃:MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ

Fr.1E (2.5 g) を CHCl_3 :MeOH 系混合溶媒を用いたシリカゲルクロマトグラフィー (PSQ 100B, $\phi 25 \times 240$ mm) により分画し, Fr.7A-7M を得た. 活性は 7C-7G に認められた (Figure 1.2.8).

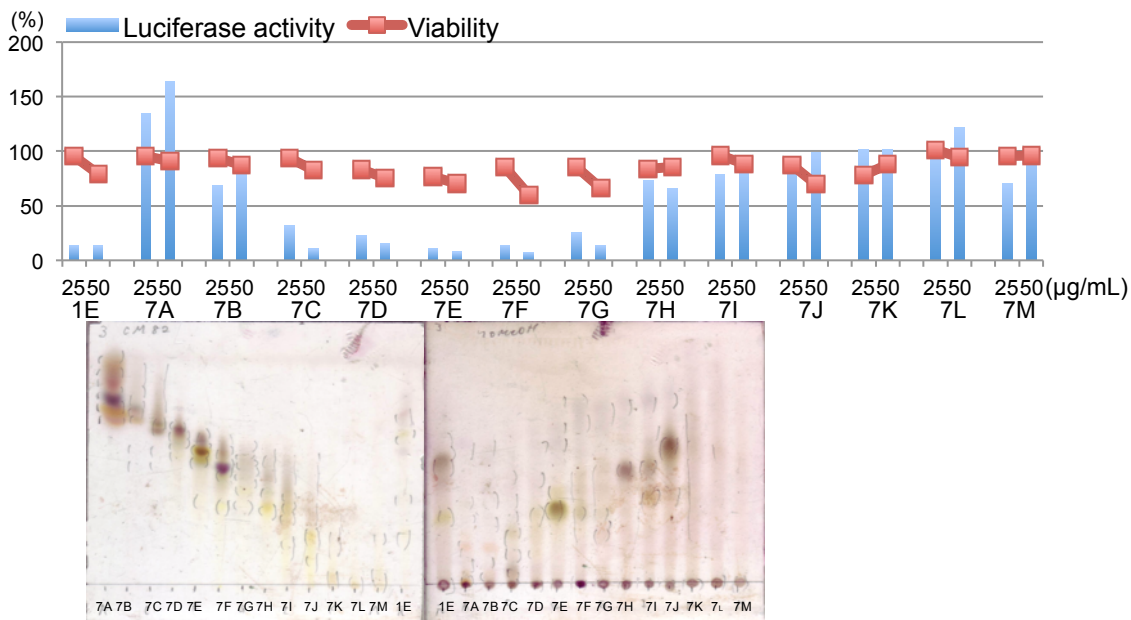


Figure 1.2.8 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis.
Left: Silica gel, CHCl_3 :MeOH 8:2, 10% H_2SO_4 , Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 7:3, 10% H_2SO_4 , Δ

Fr.7C (159.9 mg) を H_2O :MeOH (1:1-0:1, 0:1+0.1 % TFA) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (18x300 mm) により分画し, Fr.8A-8M を得た. 活性は 8D-8H に認められた (Figure 1.2.9).

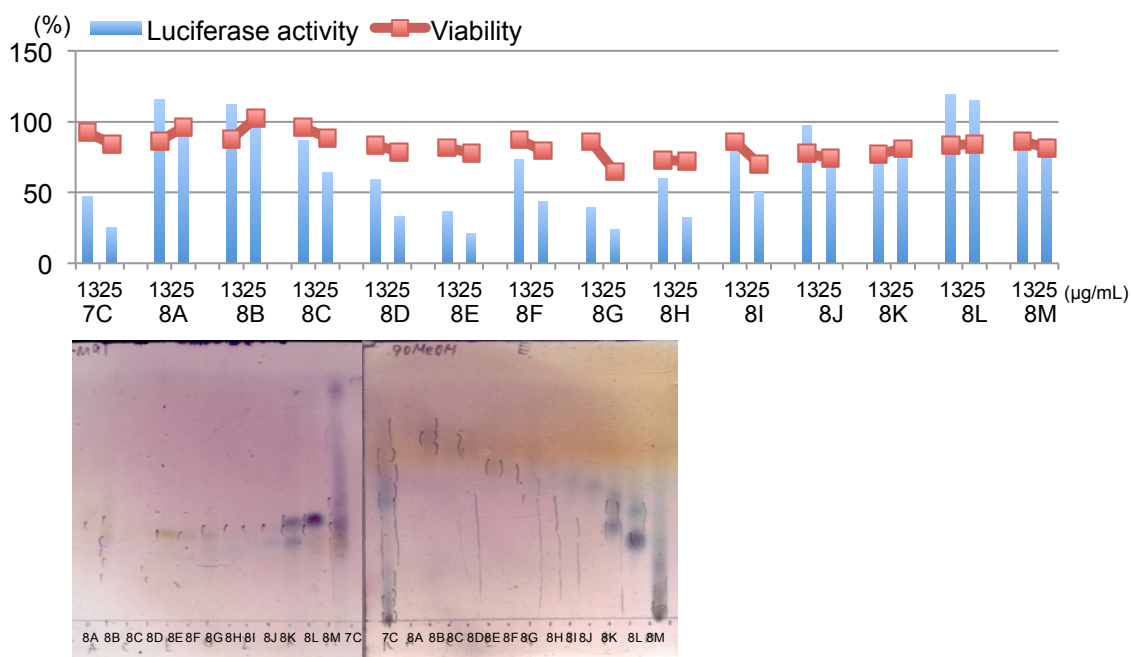


Figure 1.2.9 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis.
Left: Silica gel, CHCl_3 :MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 9:1, anisaldehyde, Δ

Fr.8E (10.6 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, $\phi 10 \times 250$ mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min), にて分取し, Fr.9A-9D を得た (Figure 1.2.10).

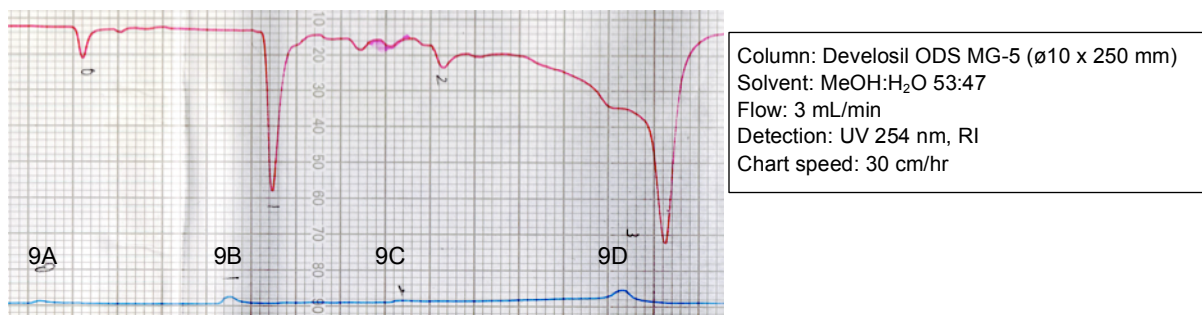


Figure 1.2.10 HPLC chromatogram of Fr.8E.

Fr.9D の NMR を測定し, 構造解析を行うとその ¹H-NMR の解析より **4** である事が明らかとなったが不純物が確認されたためさらに MeOH を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー ($\phi 12 \times 340$ mm, eluent MeOH) にて精製され, **4** (Fr.10C, 1.1 mg) を与えた.

Fr.7E (266.0 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1)を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー ($\phi 24 \times 230$ mm) により分画し, Fr.11A-11I を得た. 活性は 11E-11H に認められた (Figure 1.2.11).

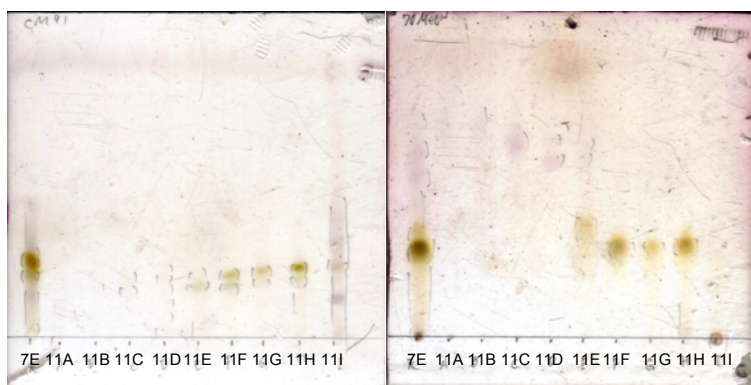
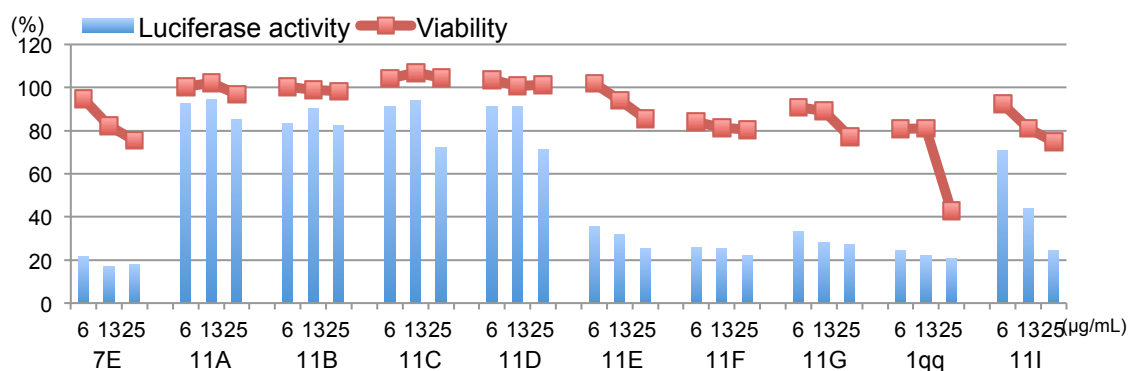


Figure 1.2.11 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH:H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ

Fr.11F (45.3 mg) を CHCl_3 :MeOH (1:1) を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 15x430 mm) により Fr.12A-12D に分画した (Figure 1.2.12). 活性評価は行わず Fr.12B 及び 12C の精製を行なった.

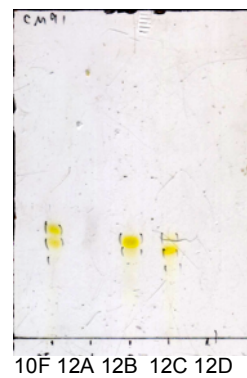


Figure 1.2.12 TLC analysis. Silica gel, CHCl_3 :MeOH 9:1, 10% H_2SO_4 , Δ

Fr.12B (23.7 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (54:46), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, Fr.13A-13F を得た. さらに Fr.13D (18.8 mg, t_R 32 min) を ODS HPLC (Cosmosil 5CN-MS, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (45:55), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて精製し, **1** (Fr. 14B, 16.3 mg, t_R 12 min) を得た (Figure 1.2.13).

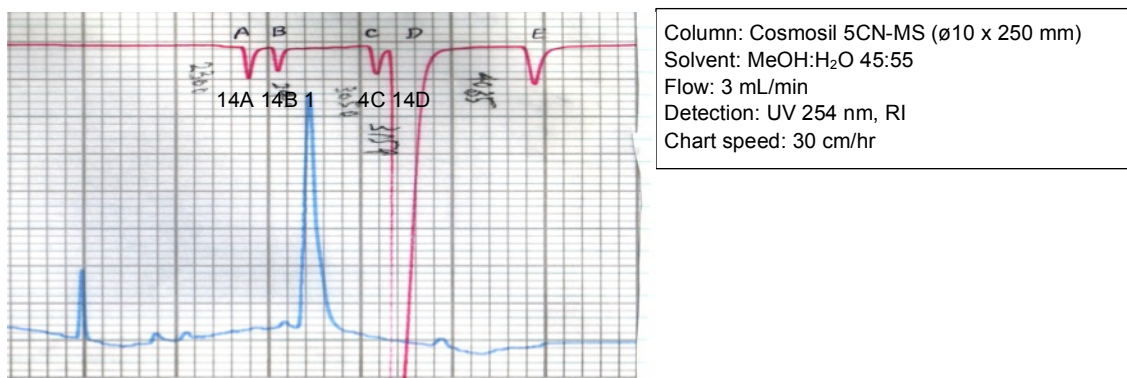


Figure 1.2.13 HPLC chromatogram of Fr.13D.

Fr.12C (20.2 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10 x 250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **2** (Fr.15D, 12.7 mg, t_R 66 min) を得た (Figure 1.2.14).

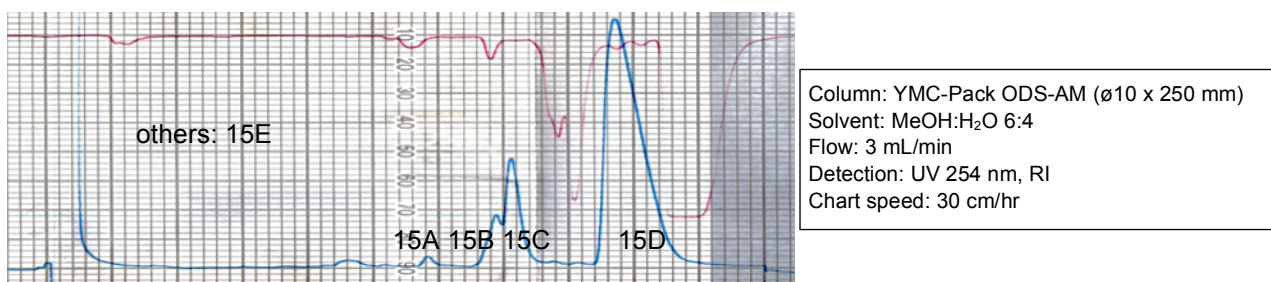


Figure 1.2.14 HPLC chromatogram of Fr.12C.

第三節 単離化合物の構造解析及び同定

化合物 **1** は，非結晶黄色固体として得られ，ESIMS において m/z 415 $[M+H]^+$ 及び 437 $[M+Na]^+$ ，比旋光度 $[\alpha]_D^{25} +13$ (c 0.5, MeOH) を示した．1D 及び 2D-NMR の解析を行い，文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **1** を aciculatin と同定した^[45]．

化合物 **2** は，非結晶黄色固体として得られ，ESIMS において m/z 415 $[M+H]^+$ ，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +101$ (c 1.0, MeOH) を示した．1D 及び 2D-NMR の解析を行い，文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **2** を 7-de-O-methylaciculatin と同定した^[46]．

化合物 **3** は，非結晶黄色固体として得られ，ESIMS において m/z 401 $[M+H]^+$ ，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +70$ (c 0.2, MeOH) を示した．1D 及び 2D-NMR の解析を行ない，文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **3** を 8-C- β -D-boivinopyranosylapigenin と同定した^[47]．

化合物 **4** は，非結晶黄色固体として得られ，ESIMS において m/z 413 $[M+H]^+$ ，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +79$ (c 0.27, MeOH) を示した．1D 及び 2D-NMR の解析を行ない，文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **4** を aciculatinone と同定した^[48]．

第四節 活性評価

(1) 単離化合物の GLI1 転写阻害活性の評価

T. arguens より単離された化合物 **1-4** の GLI1 転写活性阻害活性を評価した。以下に結果と IC₅₀ 値を示す (Figure 1.4.1).

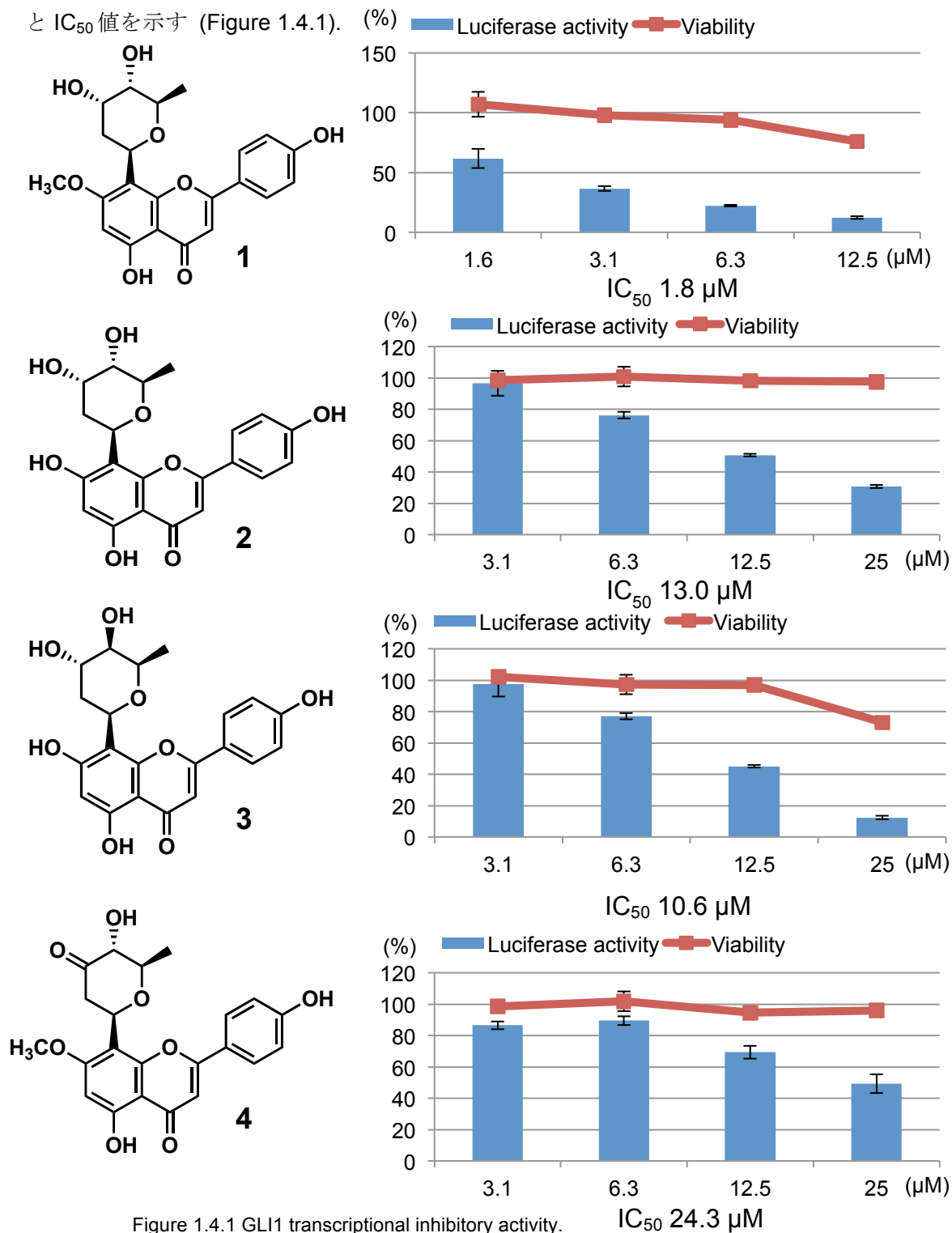


Figure 1.4.1 GLI1 transcriptional inhibitory activity.

(2) 単離化合物の癌細胞に対する影響

Hedgehog シグナル伝達経路の異常亢進が報告されているヒト膵臓癌細胞 PANC-1 cells, 前立腺癌細胞 DU-145 cells 及び乳癌細胞 MCF-7 cells に対する化合物の影響を評価した。その結果を以下に示す (Figure 1.4.2 and Table 1.4.1).

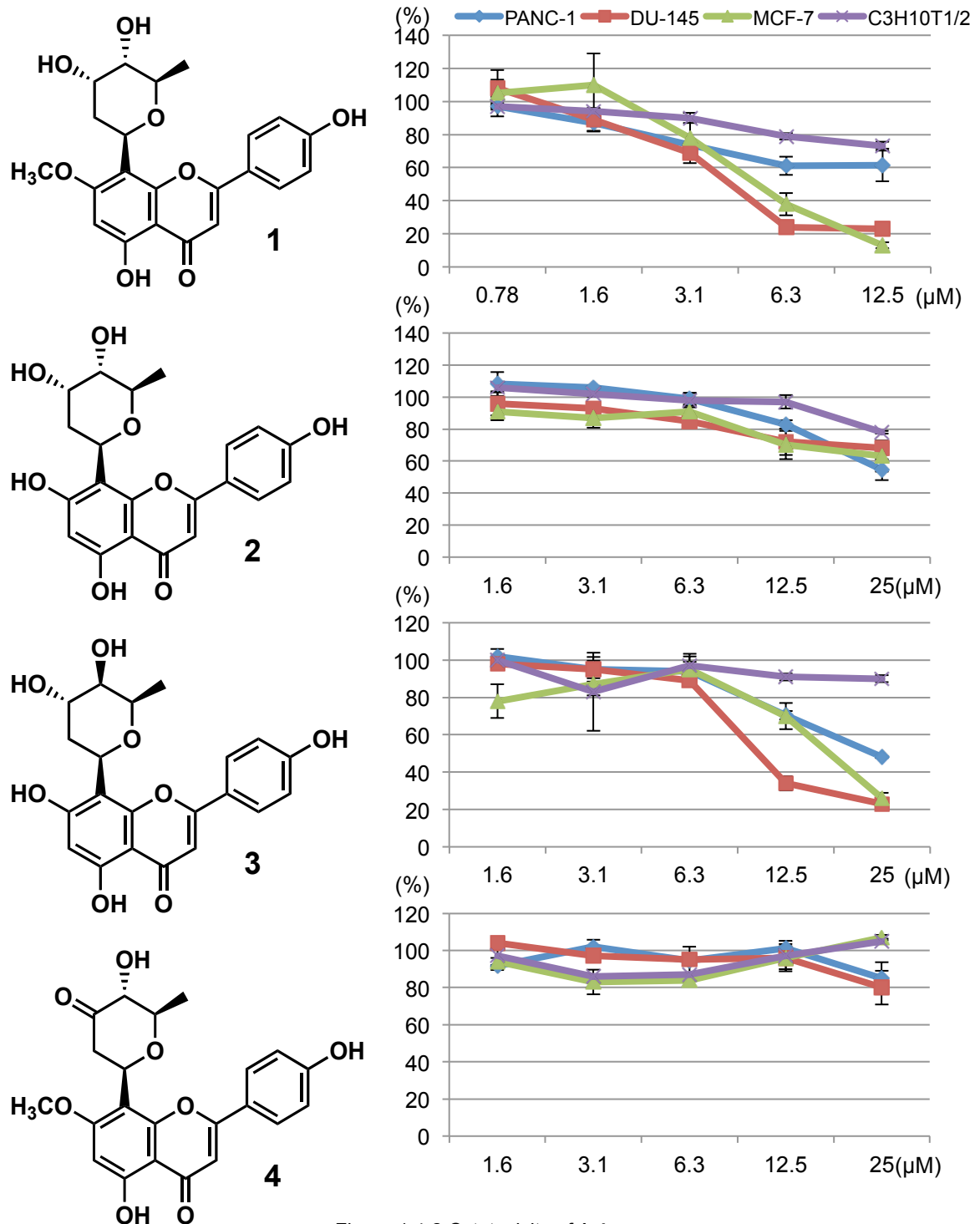


Figure 1.4.2 Cytotoxicity of 1-4.

Table 1.4.1 GLI1 transcriptional inhibitory activity and cytotoxicity of 1-4.

| compound | GLI1 transcriptional inhibition (IC ₅₀ μM) | Cytotoxicity (IC ₅₀ μM) | | | |
|----------|---|------------------------------------|--------|-------|-----------|
| | | PANC-1 | DU-145 | MCF-7 | C3H10T1/2 |
| 1 | 1.8 | >12.5 | 5.4 | 5.4 | >12.5 |
| 2 | 13.0 | >25 | >25 | >25 | >25 |
| 3 | 10.6 | 23.8 | 16.5 | 7.8 | >25 |
| 4 | 24.3 | >25 | >25 | >25 | >25 |

活性評価の結果を Table 1.4.1 に示した. **1** 及び **3** は Hedgehog シグナル伝達経路の亢進している事が知られる前立腺癌細胞 DU-145 及び乳癌細胞 MCF-7 に対し細胞毒性を示した. 一方で Hedgehog シグナルを有す正常細胞であるマウス胚由来繊維芽細胞 C3H10T1/2 に対しては毒性を示さなかった. この事から Hedgehog シグナルの異常亢進により増殖が促進されている癌細胞に対し選択的に毒性を示したと考えられる.

(3) **1** のタンパク質発現に対する影響

1 についてウエスタンブロットを用いてタンパク質の発現に対する影響を評価すると, アッセイ細胞である GLI1 を過剰発現している HaCaT cells では外因性の GLI1 の発現に影響を与えずに Hedgehog シグナル伝達経路の標的遺伝子である抗アポトーシスタンパク質 BCL2 を減少させた (Figure 1.4.3). また, 前立腺癌細胞 DU-145 に対する影響を評価すると, **1** は濃度依存的に Hedgehog シグナル伝達経路の標的遺伝子である Hedgehog タンパク質受容体 PTCH1 及び BCL2 を減少させた. これらの結果から **1** は Hedgehog シグナルを阻害する事が確認された.

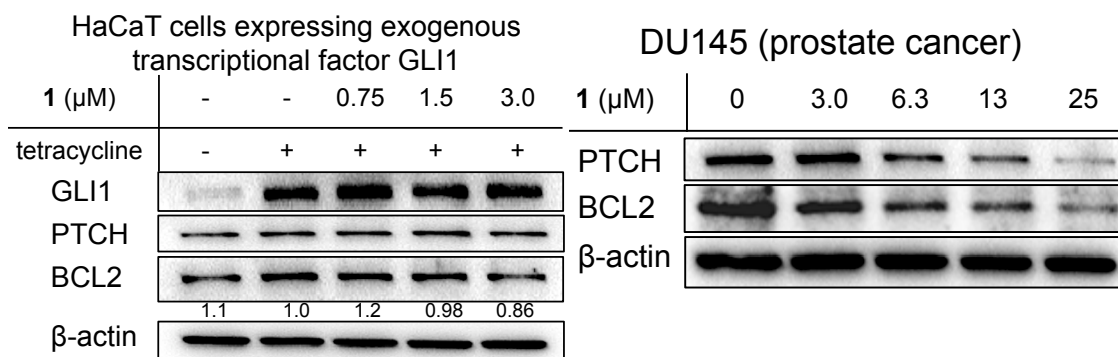


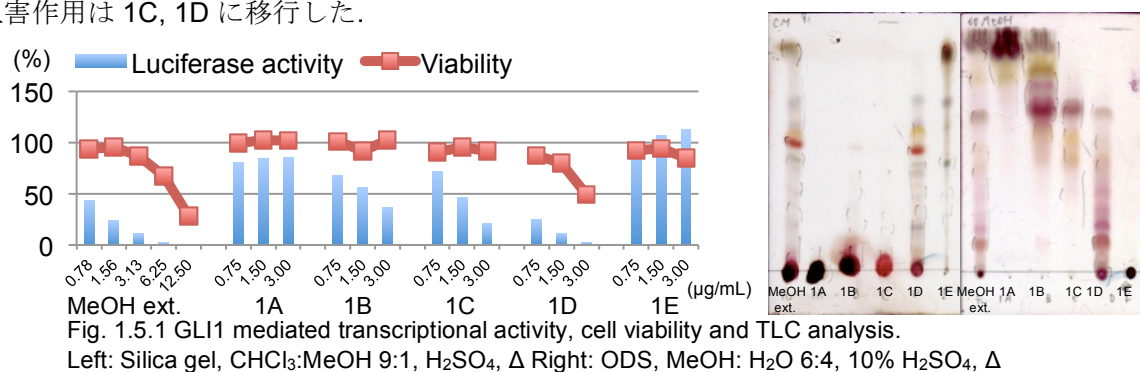
Figure 1.4.3 Western blot of assay cell and DU-145 after treatment of 1.

第五節 *Withania somnifera* からの分画

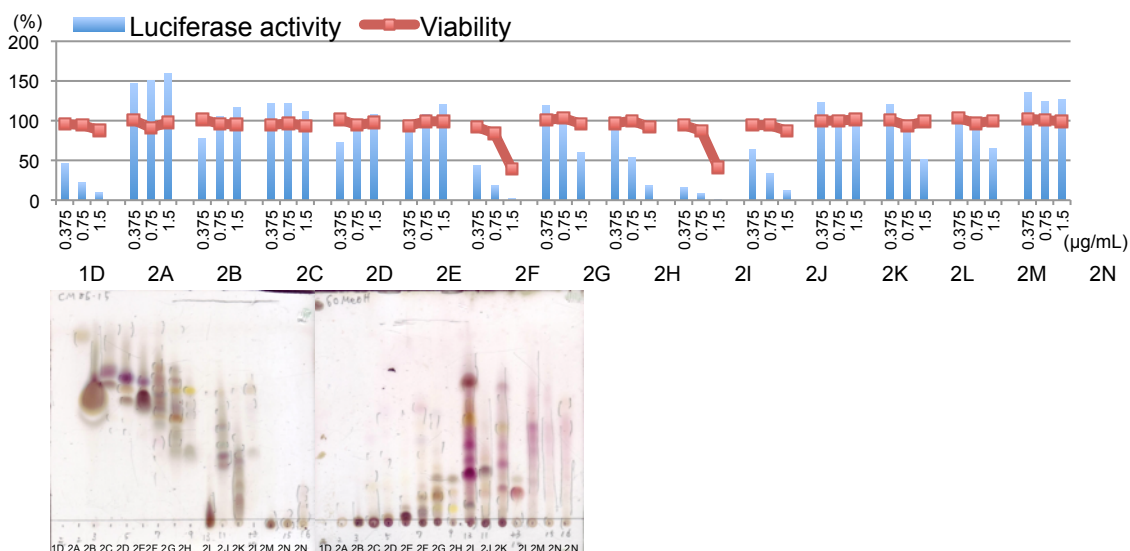
Withania somnifera

本植物はナス科 (*Solanaceae*) に属し、インド、アフリカ南部、地中海等に分布している。抗癌活性、抗炎症活性等が報告されている^[47]。アシュワガンダという名で知られ、インド大陸の伝統的医学であるアーユルヴェーダにおいて滋養強壮や記憶力の改善に用いられている。

Withania somnifera の葉部 (101.5 g) を MeOH (1L x 3 回) で抽出し、得た MeOH 抽出物 (22.8 g) を H₂O:MeOH:acetone (1:1:0, 0:1:0, 0:1:1, 0:0:1) を用いた Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ø50x200 mm) にて分画し、Fr.1A-1E を得た (Figure 1.5.1)。GLI1 転写阻害作用は 1C, 1D に移行した。



Fr.1D (6.6 g) を CHCl₃: MeOH 系を、用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ø45x430 mm) により分画し、Fr.2A-2N を得た。活性は 2F, 2H, 2I 及び 2J に認められた (Figure 1.5.2)。



Fr.2I (1252.0 mg) は TLC 分析よりほぼ単一化合物である事が分かり、分画後の溶液に結晶を認めたため再結晶による精製が可能であると考えられた。そのため、Fr.2I のうち 6.25 mg を用い、EtOAc:CHCl₃ を用いて再結晶により精製する事で **1** (5.8 mg) を得た (Figure 1.5.3).



Figure 1.5.3 TLC analysis of **1**.
ODS, MeOH: H₂O 8:2, anisaldehyde, Δ

Fr.2F (201.0 mg) は H₂O:MeOH (6:4-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø12x192 mm) により Fr.3A-3K に分画された。活性は 3F 及び 3I に認められた (Figure 1.5.4).

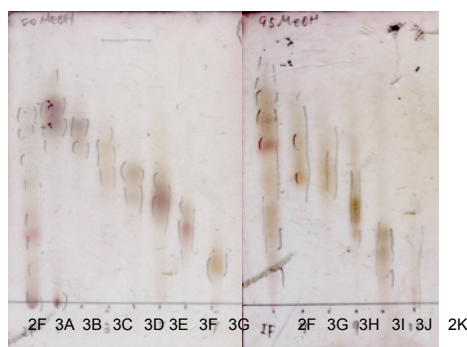
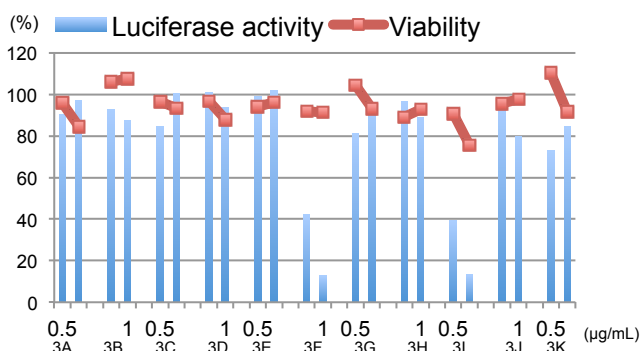


Figure 1.5.4 GLI1 mediated transcriptional activity and cell viability and 4 TLC analysis.
Left: ODS, MeOH:H₂O 8:2, H₂SO₄, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 95:5, 10% H₂SO₄, Δ

Fr.3F (48.4 mg) を hexane:EtOAc:CHCl₃:MeOH (6:4:0:0-0:0:0:1) を用いたカラムクロマトグラフィー (ø12x360 mm) により分画し、Fr.4A-4K を得た (Figure 1.5.5). Fr.4D (25.3 mg) は結晶 X 線回折による構造解析の結果、**6** であると同定された。活性は Fr.4D 認められた。

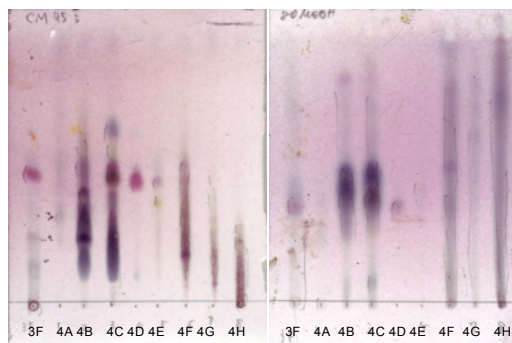
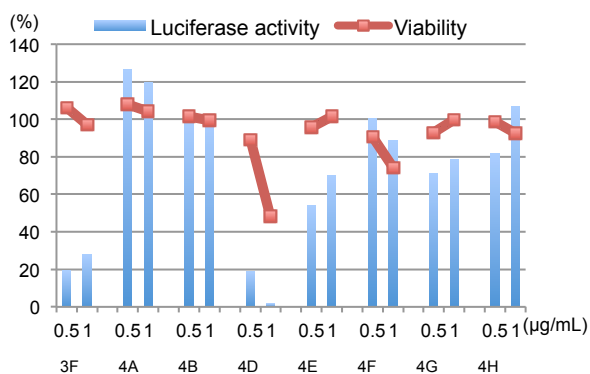


Figure 1.5.5 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis.
Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH:H₂O 95:5, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 8:2, anisaldehyde, Δ

Fr.2H (66.2 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø15x276 mm) により分画し, Fr.5A-5J を得た (Figure 1.5.6). そのうち, Fr.5H (7.8 mg) より **3** を得た. Fr.5F は silica gel TLC の結果スポットが Fr.5E と共通していたため活性評価を行わなかった. Fr.5D は NMR を測定したが構造決定に至らなかった.

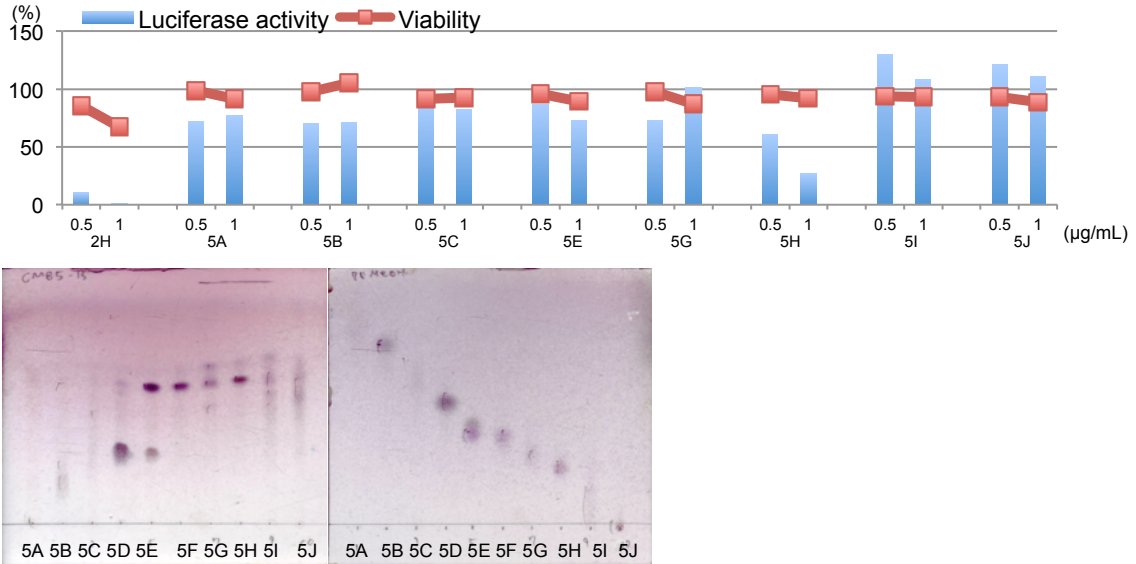


Figure 1.5.6 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH:H₂O 85:15, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 9:1, anisaldehyde, Δ

Fr.2J (573.4 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø29x285 mm) により分画し Fr.6A-6J を得た (Figure 1.5.7). 活性は 6E にのみ認められた.

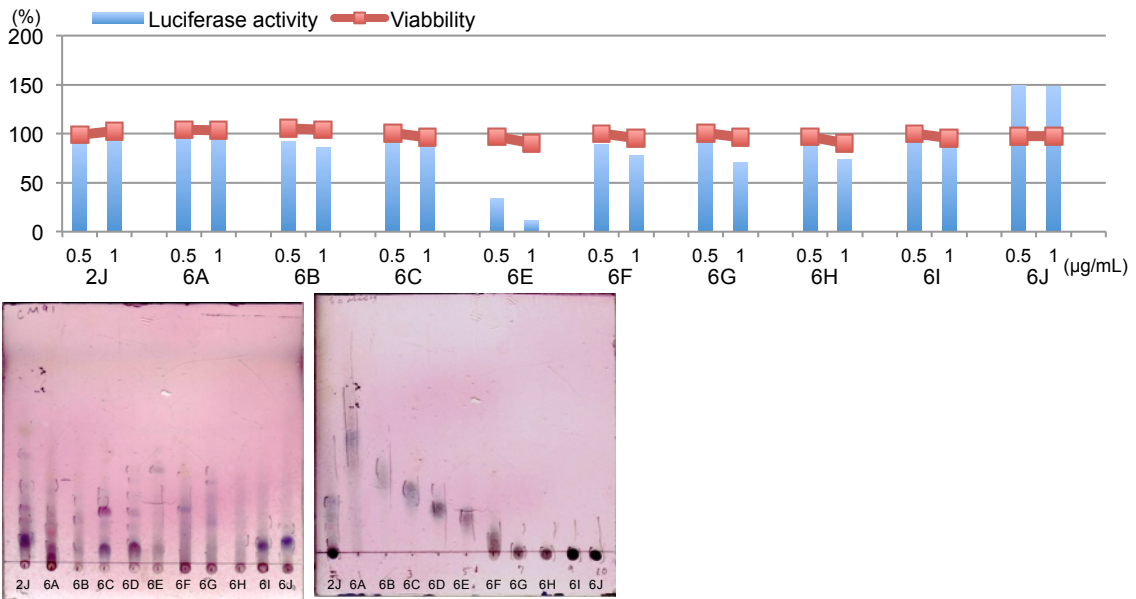


Figure 1.5.7 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH:H₂O 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.6E (64.5 mg) を CHCl_3 :MeOH (1:0-0:1) を用いたグラジエント系でのシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 17 \times 370$ mm) により分画し, Fr.7A-7 得た (Figure 1.5.8). 活性は Fr.7F に認められた. Fr.7E (2.0 mg) は構造解析の結果, **8** と同定された. また, Fr.7G (3.0 mg) は **5** であった.

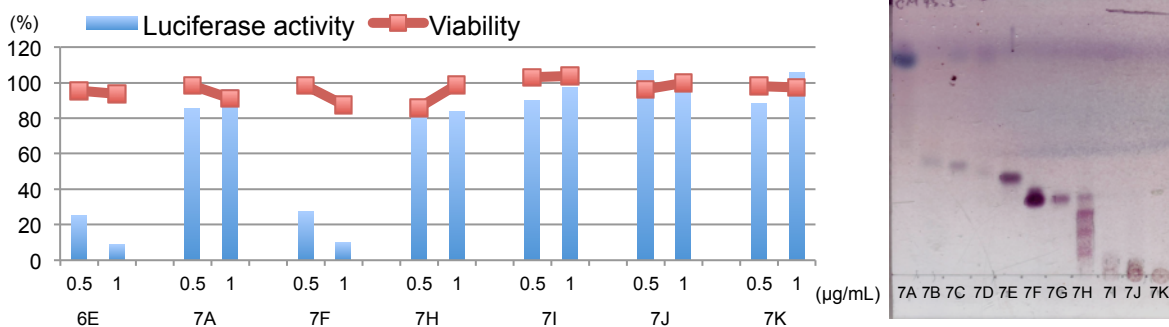


Figure 1.5.8 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability and TLC analysis.

Silica gel, CHCl_3 :MeOH:H₂O 95:5, anisaldehyde, Δ

Fr.7F (27.8 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, $\phi 10 \times 250$ mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し **5** (Fr.8B, 20.89 mg, t_R 19 min) 及び **9** (Fr.8C, 2.4 mg, t_R 22 min) を得た (Figure 1.5.9).

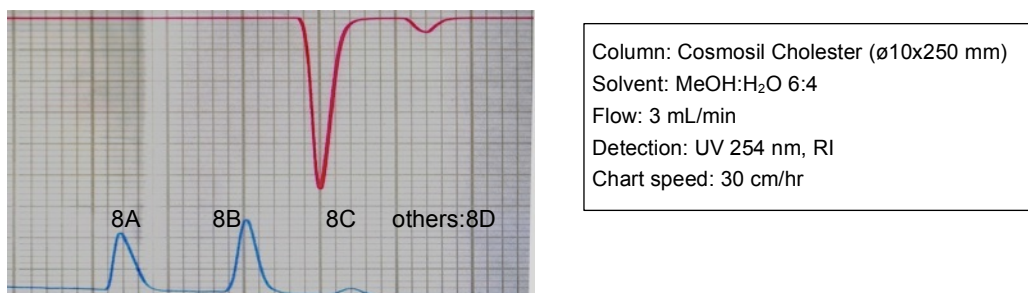


Figure 1.5.9 HPLC chromatogram of Fr. 8F.

Fr.1C (0.9 g) を CHCl_3 :MeOH (9:1-0:1) を用いたグラジエント系でのシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica N60, $\phi 17 \times 370$ mm) により分画し, Fr.9A-9H を得た (Figure 1.5.10). 活性は 9E 及び 9F に認められた.

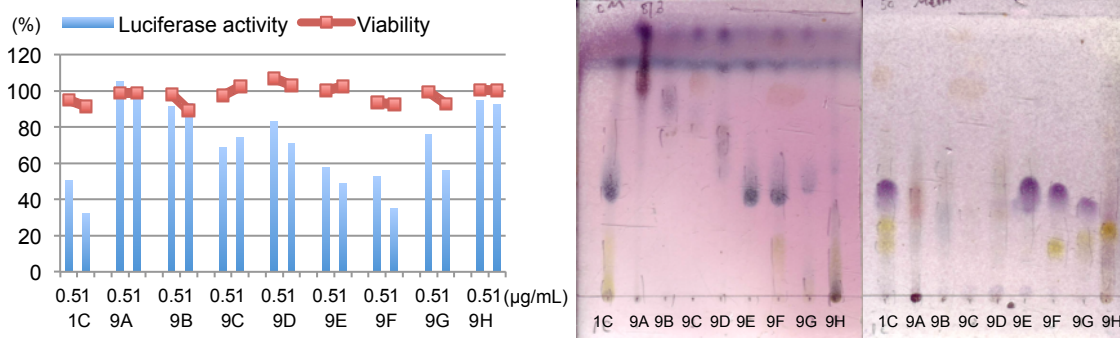


Figure 1.5.10 GLI1 mediated transcriptional activity, cell viability TLC analysis.

Left: Silica gel, CHCl_3 :MeOH:H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 1:1, anisaldehyde, Δ

Fr.9F (21.7 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー(φ17 x 270 mm)により分画し Fr.10A-10D を得た (Figure 1.5.11). 活性は 10A 及び 10C に認められた. Fr.10C は NMR 解析の結果 **5** と同定された.

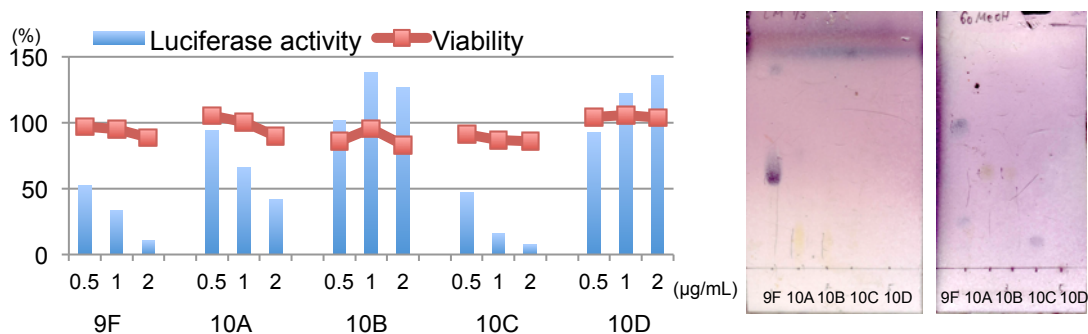


Figure 1.5.11 GLI1 mediated transcriptional activity and cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH:H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.10A (16.87 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, φ10 x 250 mm.; eluent MeOH:H₂O (35:65), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min)にて精製し, **10** (Fr. 11A, 4.4 mg, t_R 14 min)を得た (Figure 1.5.12).

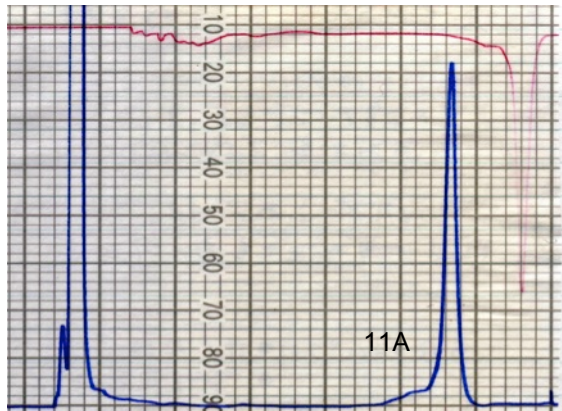


Figure 1.5.12 HPLC chromatogram of Fr. 10A.

第六節 単離化合物の構造解析及び同定

化合物 **5** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 469 [M-H]⁻及び 493 [M+Na]⁺, 比旋光度 $[\alpha]_D^{21}$ +114 (c 0.56, CHCl₃) を示した. 1D 及び 2D-NMR の解析を行ない, 文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **5** を withaferin A と同定した^[48].

化合物 **6** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において 453 [M-H]⁻, m/z 455 [M+H]⁺ 及び 477 [M+Na]⁺, 比旋光度 $[\alpha]_D^{16}$ +268 (c 0.5, CHCl₃) を示した. 1D 及び 2D-NMR の解析及び X 線構造解析の結果, 化合物 **6** を 27-deoxywithaferin A と同定した^[49].

化合物 **7** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 477 [M+Na]⁺, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ +68 (c 0.17, CHCl₃) を示した. 1D 及び 2D-NMR 解析を行ない, 文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **7** を 5,6-deoxywithaferin A と同定した^[50].

化合物 **8** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 471 [M-H]⁻及び 473 [M+H]⁺, 比旋光度 $[\alpha]_D^{24}$ +12 (c 0.91, CHCl₃) を示した. 1D 及び 2D-NMR 解析を行ない, 文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **8** を 2,3-dihydroxywithaferin A と同定した^[51].

化合物 **9** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 504 [M+H]⁺及び 526 [M+Na]⁺, 比旋光度 $[\alpha]_D^{25}$ +0.8 (c 1.0, dioxane) を示した. 1D 及び 2D-NMR 解析を行ない, 文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **9** を 2,3-dihydro-3 β -methoxywithaferin A と同定した^[48].

化合物 **10** は、結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 567 [M-H]⁻, 比旋光度 $[\alpha]_D^{26}$ +22 (c 0.21, MeOH) を示した. 1D 及び 2D-NMR 解析を行ない, 文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **10** を 2,3-dihydro-3 β -O-sulfate withaferin A と同定した^[48].

第七節 活性評価

(1) 単離化合物の GLI1 転写阻害活性の評価

W. somnifera より単離された化合物 **5-10** の GLI1 転写活性阻害活性を評価した。以下に結果と IC₅₀ 値を示す (Figure 1.7.1 and Figure 1.7.2).

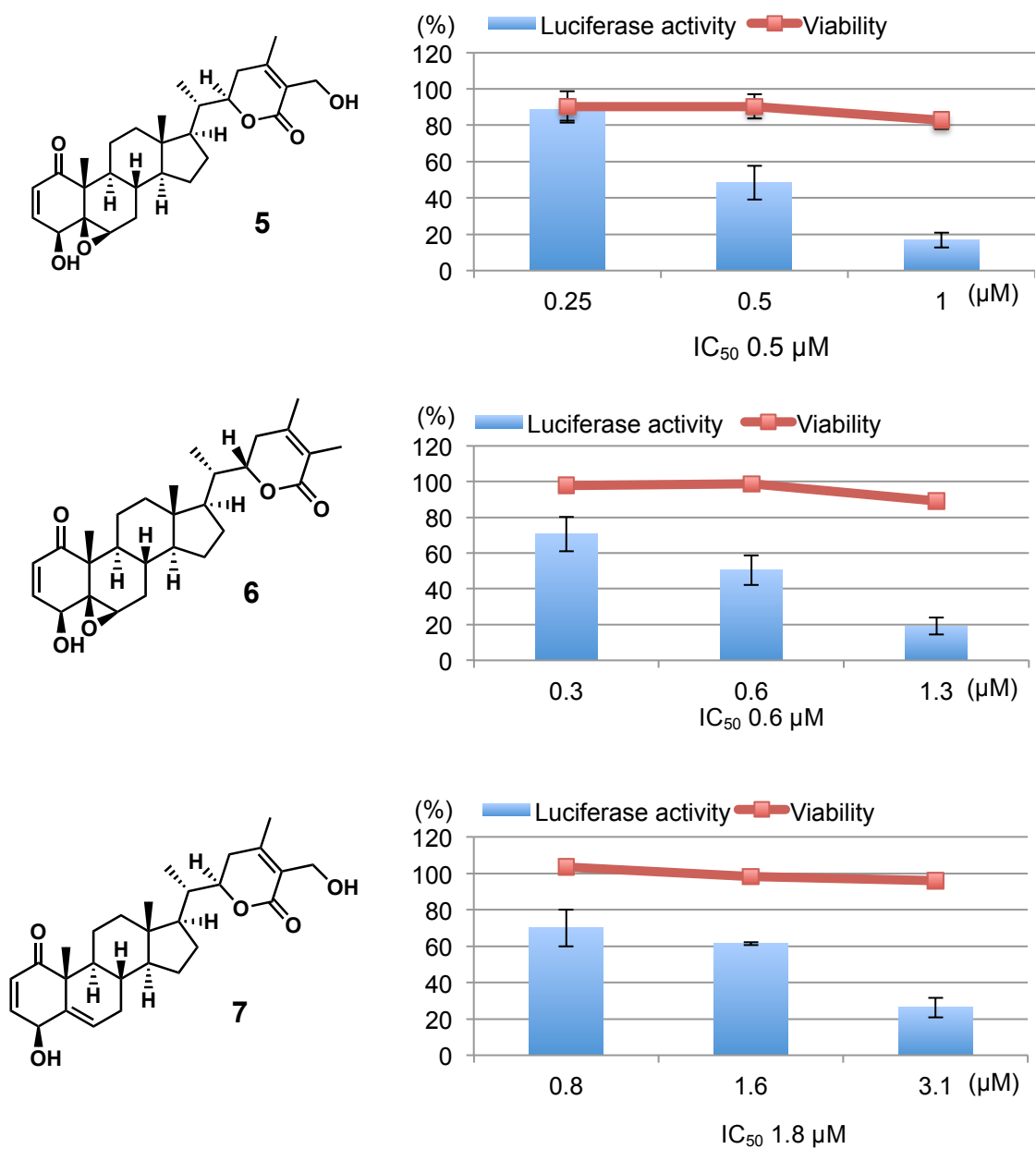


Figure 1.7.1 GLI1 transcriptional inhibitory activity of **5-7**.

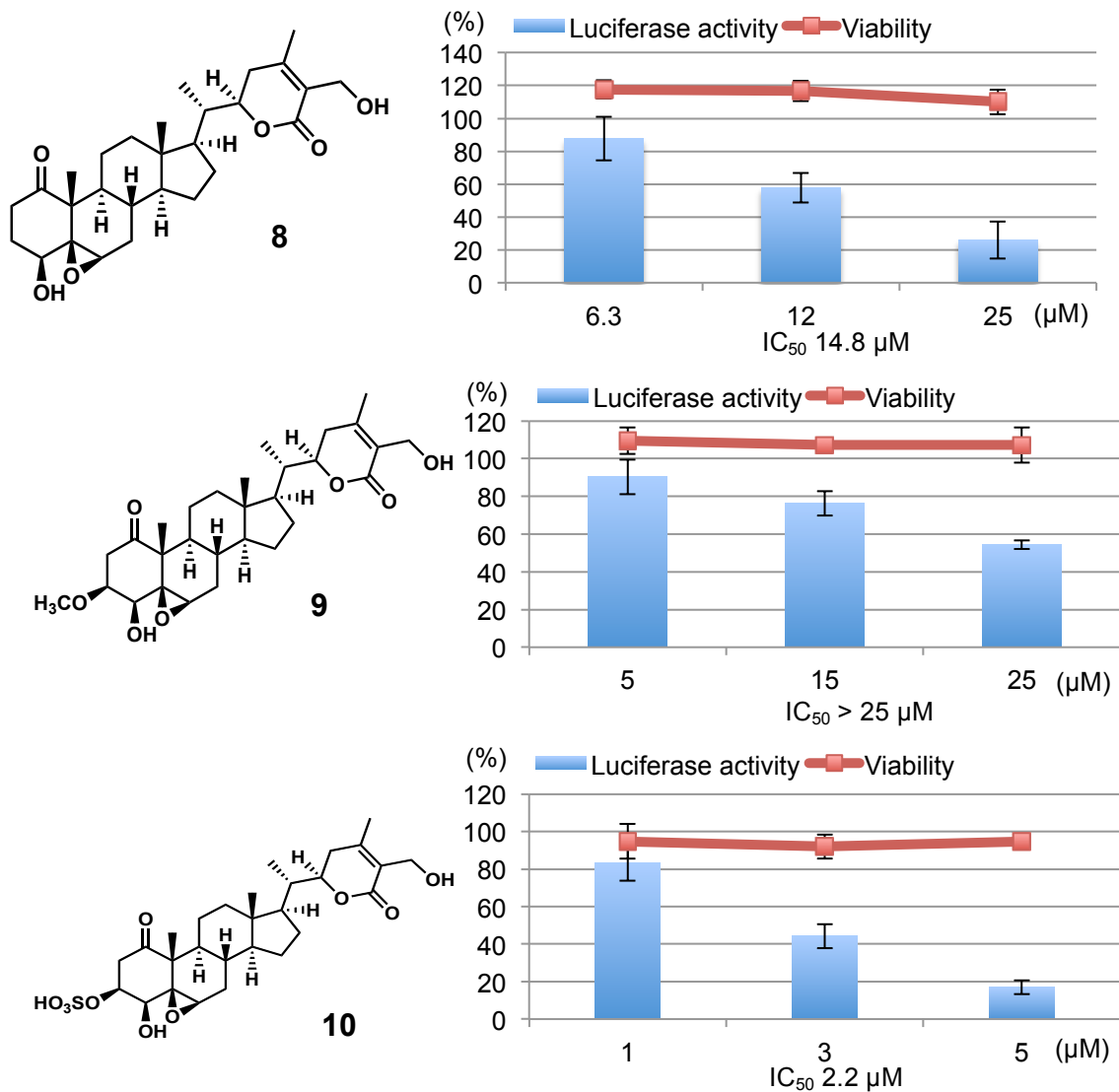


Figure 1.7.2 GLI1 transcriptional inhibitory activity of 8-10.

(2) 単離化合物の癌細胞に対する影響

Hedgehog シグナル伝達経路の異常亢進が報告されている癌細胞 PANC-1 cells, DU-145 cells 及び MCF-7 cells に対する化合物の影響を評価した (Figure 1.7.3, Figure 1.7.4 and Table 1.7.1).

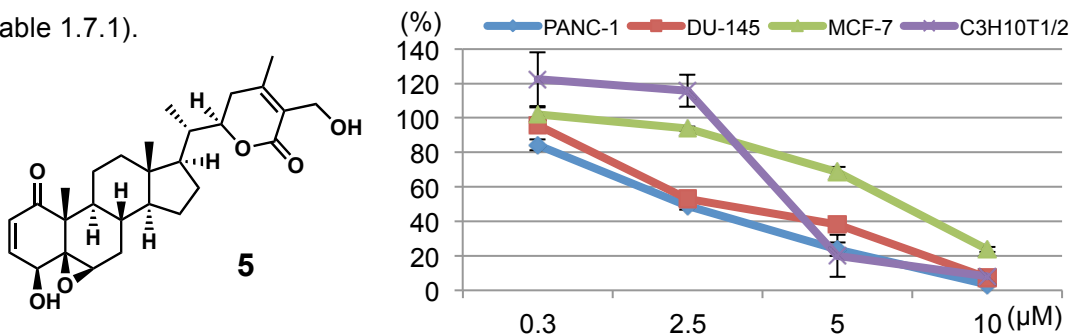


Figure 1.7.3 Cytotoxicity of 5.

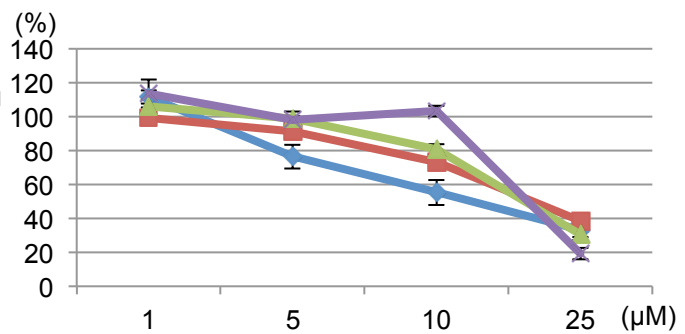
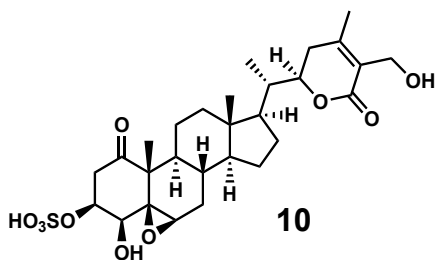
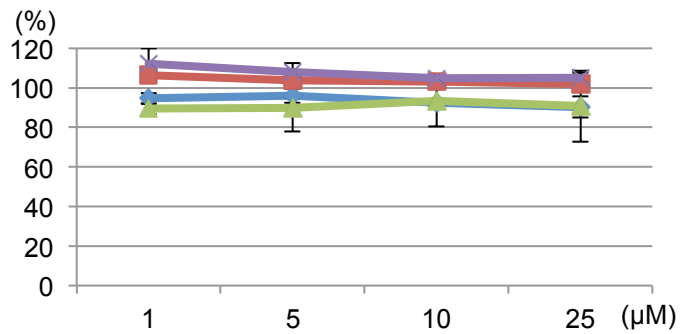
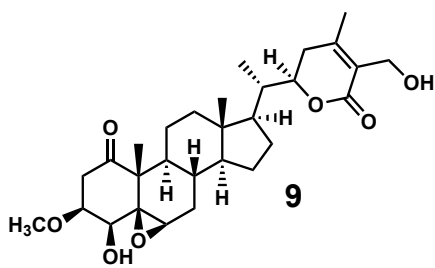
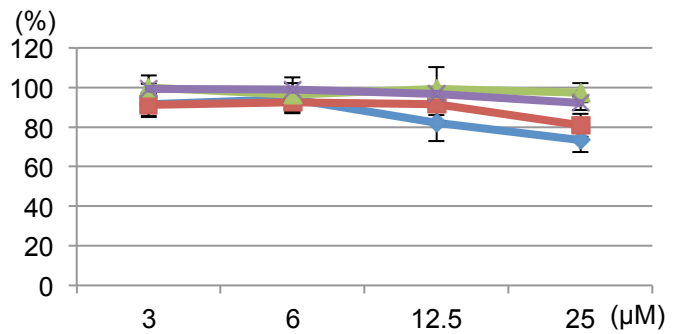
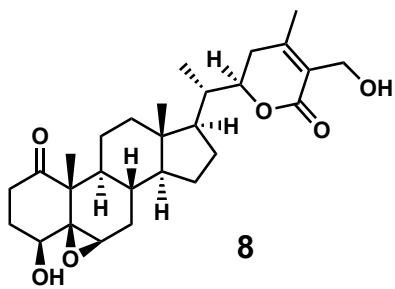
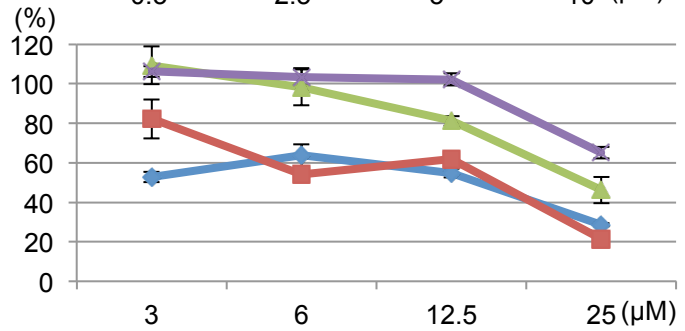
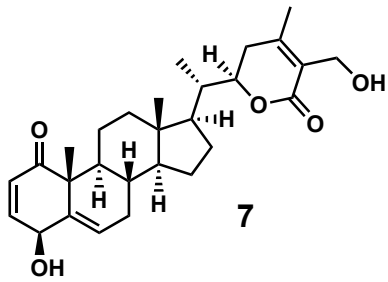
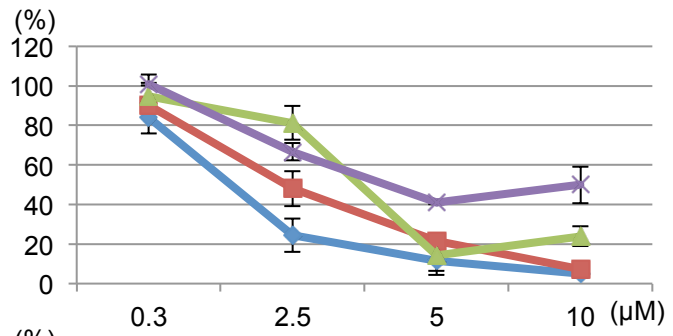
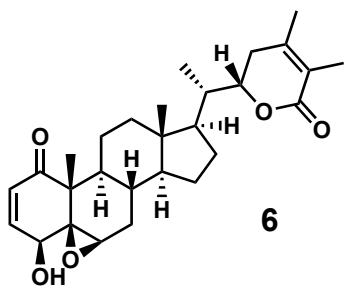


Figure 1.7.4 Cytotoxicity of 6-10.

Table 1.7.1 GLI1 transcriptional inhibitory activity and cytotoxicity of **5-10**.

| compound | GLI1 transcriptional inhibition(IC ₅₀ μM) | Cytotoxicity (IC ₅₀ μM) | | | |
|-----------|--|------------------------------------|--------|-------|-----------|
| | | PANC-1 | DU-145 | MCF-7 | C3H10T1/2 |
| 5 | 0.5 | 1.6 | 2.5 | 6.3 | 4.9 |
| 6 | 0.6 | 1.1 | 1.8 | 2.8 | 4.1 |
| 7 | 1.8 | 11.9 | 10.6 | 22.6 | >25 |
| 8 | 14.8 | >25 | >25 | >25 | >25 |
| 9 | >25 | >25 | >25 | >25 | >25 |
| 10 | 2.2 | 14.8 | 21.7 | 17.9 | 21.0 |

活性評価の結果を Table に示した. **5, 6, 7** 及び **10** は Hedgehog シグナル伝達経路の亢進する癌細胞に対し細胞毒性を示したが, 同時に C3H10T1/2 に対しても毒性を示した. 一方, **8** 及び **9** は 25 μM 以下においては毒性を示さなかった.

(3) **5, 6** 及び **7** のタンパク質発現に対する影響

化合物 **5, 6** 及び **7** についてウェスタンブロットを用いてタンパク質の発現量に対する影響を評価すると **5, 6** 及び **7** は過剰発現させた GLI1 の発現量に影響を与えず, Hedgehog シグナルの標的遺伝子 PTCH 及び BCL2 を減少させた (Figure 1.7.5 and Figure 1.7.6). また, PANC-1 においても PTCH 及び BCL2 を減少させた. これらの結果から **5, 6** 及び **7** が Hedgehog シグナルを阻害する事が確認された.

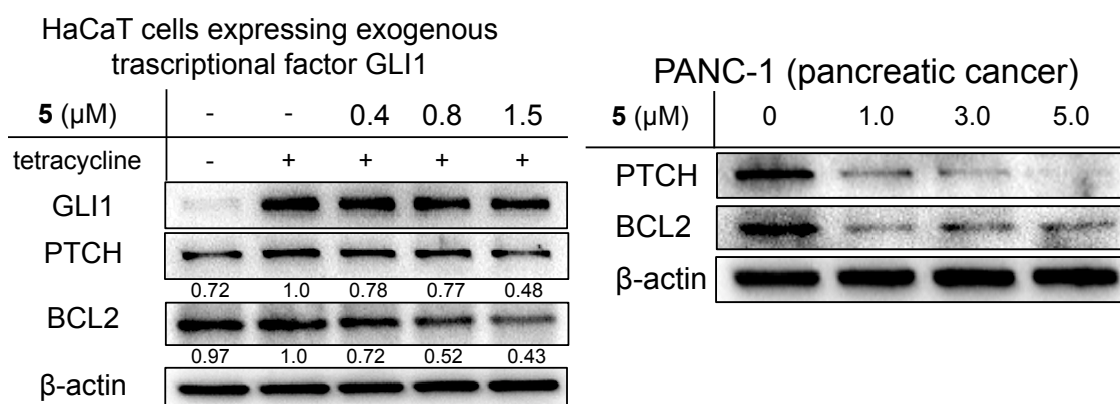


Figure 1.7.5 Western blot of assay cells and PANC-1 after treatment of **5**.

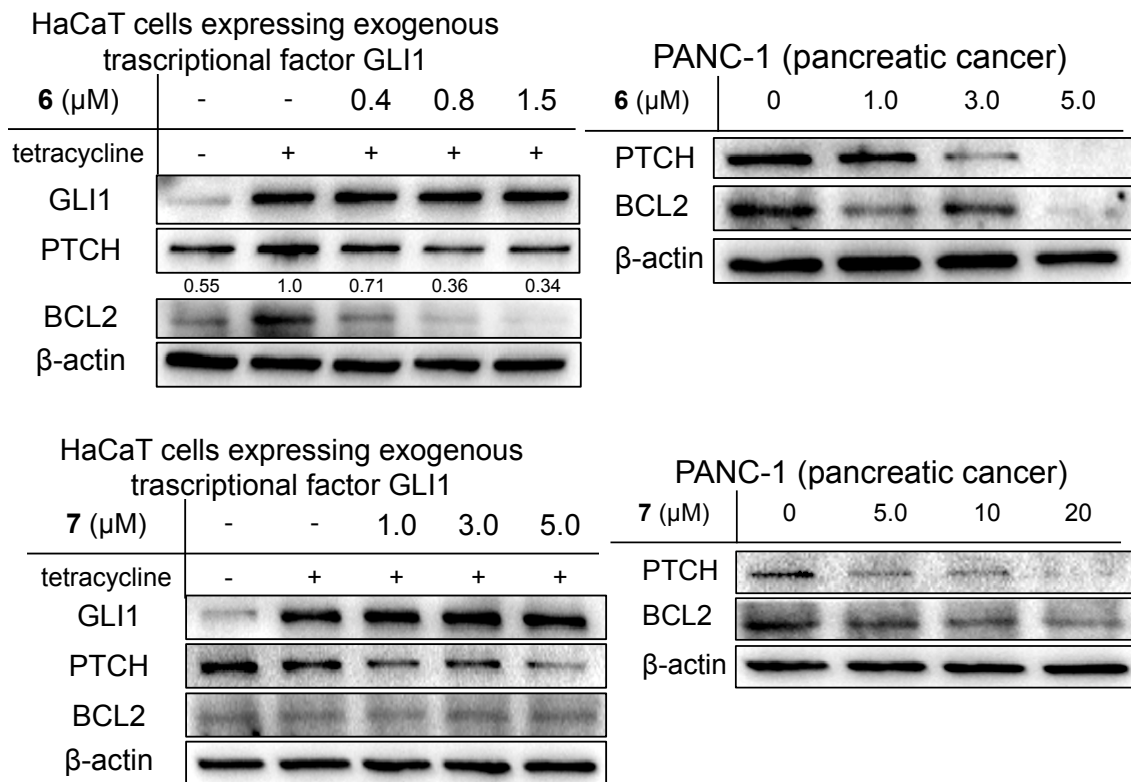


Figure 1.7.6 Western blot of assay cells and PANC-1 after treatment of **6** and **7**.

第八節 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) について

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) は DNA とタンパク質の結合を評価するアッセイ系である。標識化 DNA とタンパク質を混合後 Native page にて電気泳動後、標識化した DNA を検出する。標識化 DNA とタンパク質が複合体を形成した場合、Free の DNA よりも遅く流れるため、その移動度の違いから複合体形成を確認する事が出来る (Figure 1.8.1). 本研究においては大腸菌より発現・精製した GST-GLI1 タンパク質 (171 (Arg)-515 (Arg)) と 5'末端をビオチン標識した GLI1 結合配列を含む DNA 断片 (23 bases, forward; 5' - biotin-AGCTACCTGGGTGGTCTCTTCGA - 3' (下線部;GLI1 結合配列^[52]), reverse; 5' - biotin - TCGAAGAGACCAGGTAGCT - 3') を用いて試験を行い、任意の化合物を標識化 DNA と GST-GLI1 タンパク質を混合する際に加え、化合物が複合体形成を阻害する場合には複合体のバンドが減少する事が期待される事から GLI1 転写阻害活性を有す化合物の GLI1-DNA 複合体形成阻害作用の検討に用いていた。

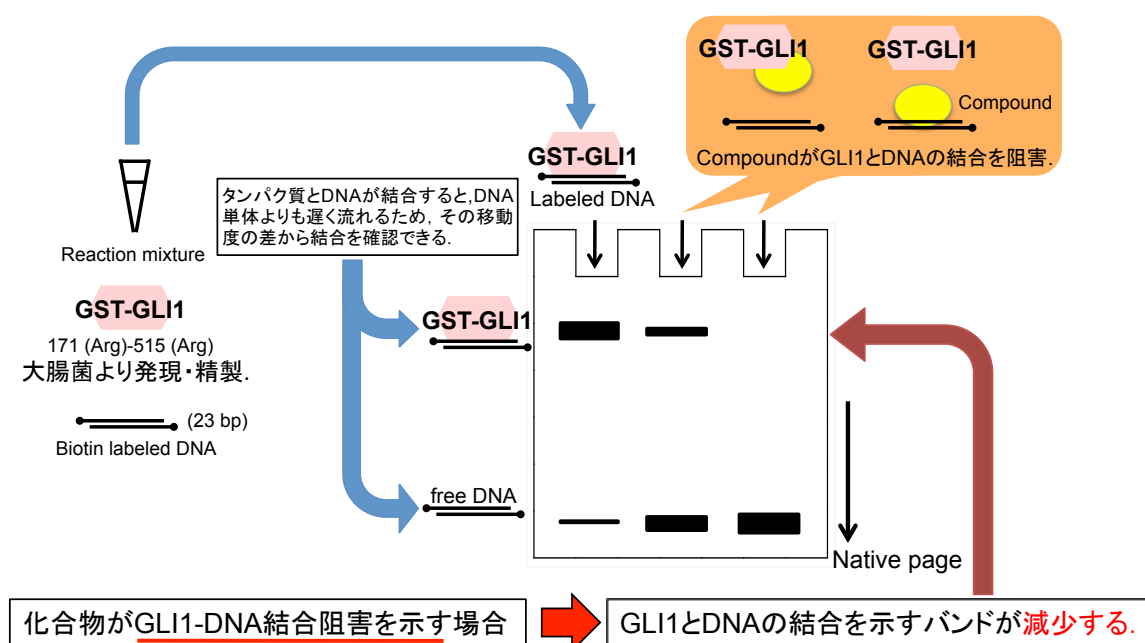


Figure 1.8.1 EMSA

これまで大腸菌より GST-GLI1 タンパクを精製する際、これまでの精製方法では精製時にタンパク質に混入した DNA を取除けていないため、純度の高い GST-GLI1 タンパク質を用いる事が出来ないという問題点があった。これまでのプロトコルに従い GLI1 タンパクを作製 (条件 i) すると以下のようなスペクトルを示した (Figure 1.8.2).

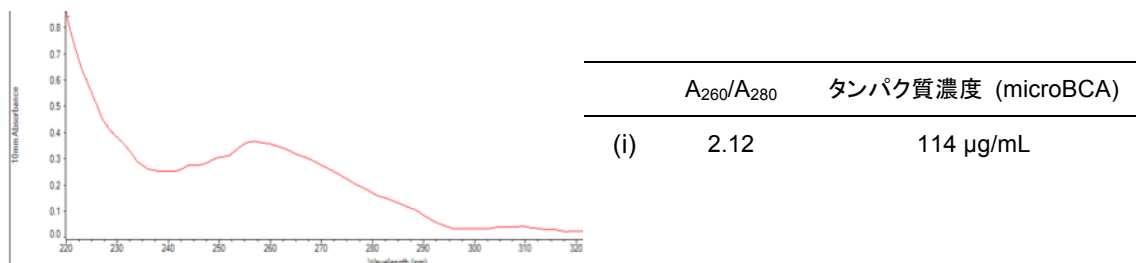


Figure 1.8.2 UV spectrum and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (i).

このように nanodrop2000 にて A_{260}/A_{280} を測定すると 1.5~2.1 となり、260 nm にピークが存在する、すなわち DNA が多くタンパク質に混入したままである事が分かった。この DNA の混入を防ぐため精製方法を変更し、より高純度の GST-GLI1 タンパク質の精製を目的とし、検討を行った。

初めに、NaCl を加える事で菌体残さの目的タンパク質への巻き込みを防ぐことで、DNA 量を減少させようと試みた。ビーズの洗浄に用いる PBS に、NaCl 濃度が 500 mM となるよう NaCl を加え洗浄に用いた (条件 ii).

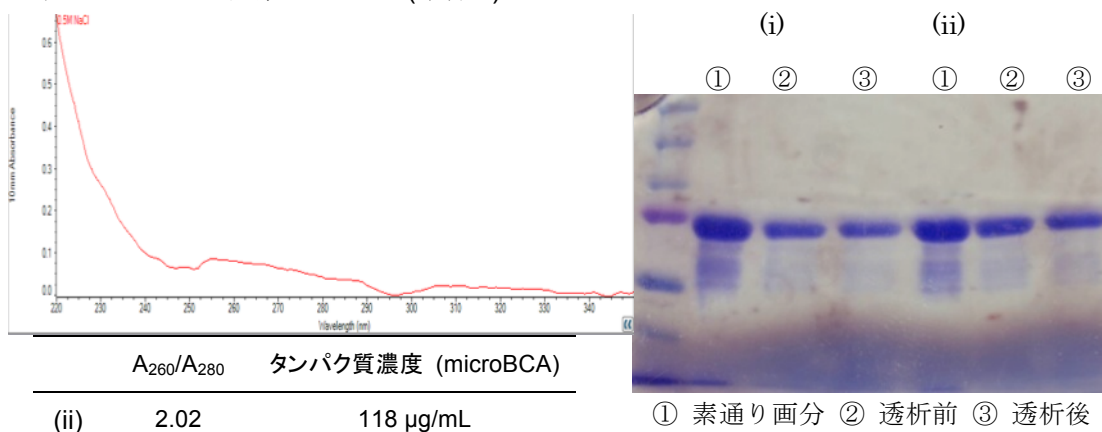
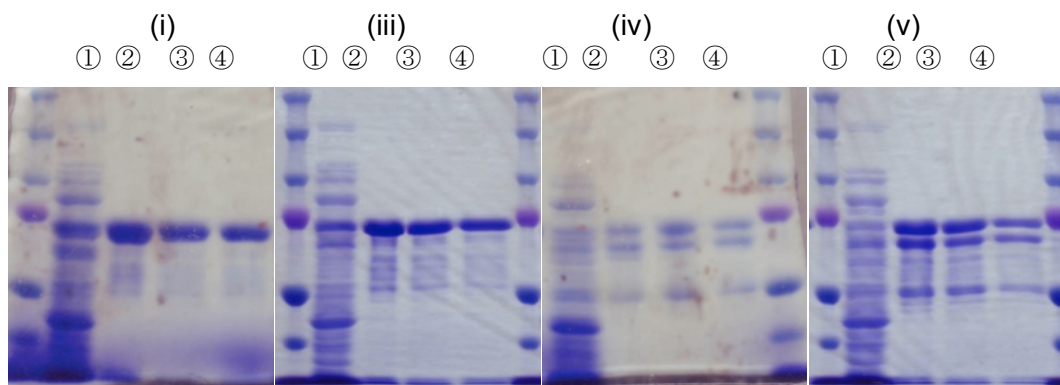
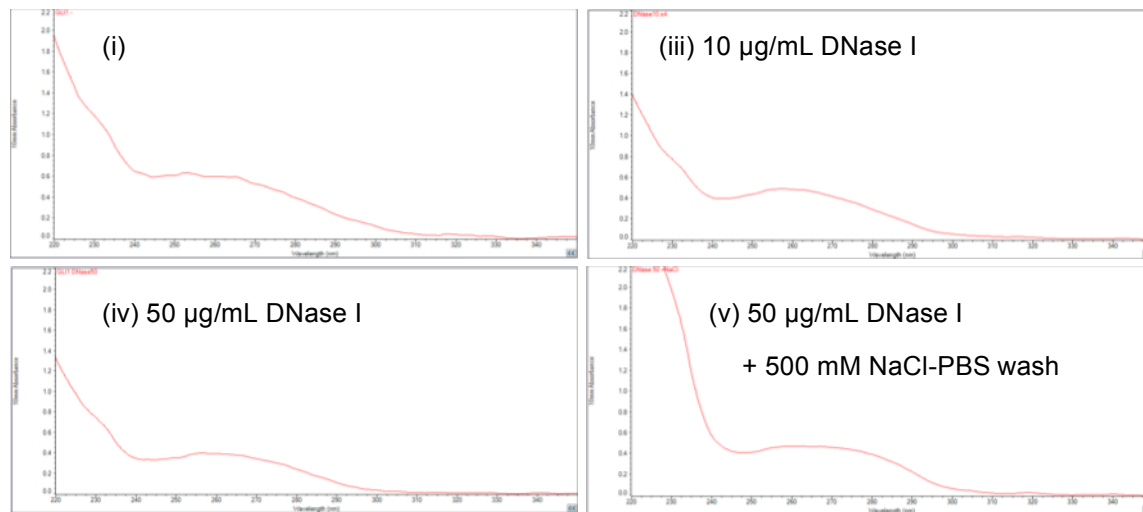


Figure 1.8.3 UV spectrum and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (ii).

その結果、ビーズ洗浄に 500 mM PBS を用いると A_{260}/A_{280} 値に変化は見られなかったが 260 nm のピークが減少する事が分かった (Figure 1.8.3). またタンパク質濃度には影響は無かった。この結果から NaCl を加えた PBS をビーズ洗浄に用いる事で DNA の混入を減少させることが出来た。しかし、極大ピークが 280 nm に確認されることはなかった。

次に、菌体ライセートを回収する際、PBSにDNase Iを加える事で核酸の混入を抑える事を試みた。このため、(iii) 10 µg/mL DNase I, (iv) 50 µg/mL DNase I 及び先述の検討で良好であったビーズ洗浄条件を組み合わせた (v) 50 µg/mL DNase I で菌体を回収し、ビーズ洗浄に 500 mM PBS, を用いる条件を検討した。



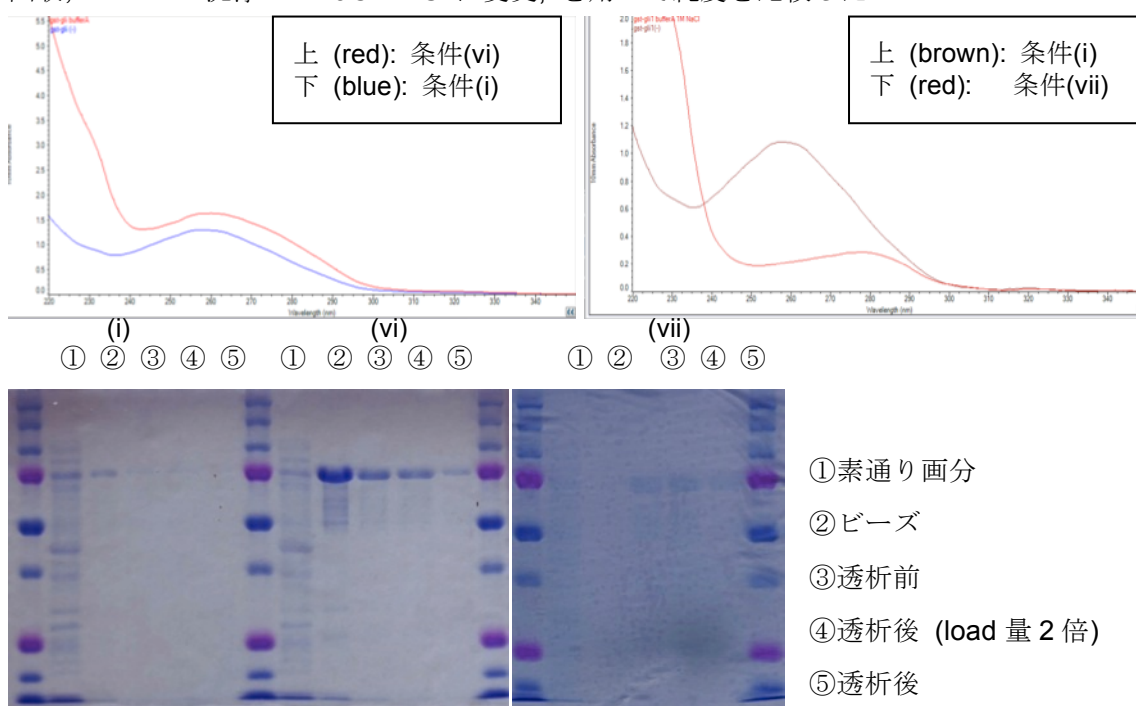
| | A_{260}/A_{280} | タンパク質濃度 (microBCA) | |
|-------|-------------------|--------------------|---------|
| (i) | 1.53 | 118 µg/mL | ① 素通り画分 |
| (iii) | 1.63 | 245 µg/mL | ② ビーズ |
| (iv) | 1.67 | 213 µg/mL | ③ 透析前 |
| (v) | 1.21 | 250 µg/mL | ④ 透析後 |

Figure 1.8.4 UV spectrum and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (iii), (iv) and (v).

Nanodrop2000 による UV スペクトルの測定の結果、DNase I 処理により 260 nm のピーク高は低下したが A_{260}/A_{280} には改善は見られなかった (Figure 1.8.4). この結果から A_{260}/A_{280} の改善には DNase I 処理よりも洗浄に NaCl を加えた PBS を用いる方が有効だと分かった。また、電気泳動によりタンパク質純度を確認すると、10 及び 50 µg/mL DNase I 処理を行なうと、目的タンパク質のバンドよりも小さなタンパク質のバンドが見られた。

DNase I 処理によりタンパク質が切断されてしまった可能性が示唆されたことから DNase 処理は不適と判断した。

Buffer A はセリンプロテアーゼ阻害剤 APMSF や DTT を含み、これらがタンパク質を加水分解等の有害な反応から守ることで純度の高いタンパク質を精製できる可能性がある。そのため、buffer A を用い精製条件を検討した。次の条件、(i) PBS で菌体を回収、ビーズを PBS で洗浄、(vi) buffer A で菌体を回収、ビーズを PBS で洗浄及び (vii) buffer A で菌体回収、ビーズの洗浄 1M NaCl PBS に変更、を用いて純度を比較した。



| | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | タンパク質濃度 (microBCA) |
|-------|------------------------------------|--------------------|
| (i) | 2.01 | 86 µg/mL |
| (vi) | 1.56 | 471 µg/mL |
| (vii) | 0.76 | 469 µg/mL |

Figure 1.8.5 UV spectrum, CBB staining and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (vi) and (vii).

菌体回収を buffer A に回収に変更した (vi) では UV スペクトルに大きな変化は無いが、さらにビーズの洗浄を 1M NaCl PBS に変更した条件 (vii) では UV スペクトルのピークが 260 nm から 280 nm に近づいた (Figure 1.8.5)。このことからこの条件では DNA の混入が少ない目的タンパク質を得る事が出来たと考え、EMSA をおこなった。また、菌体の回収に用いる buffer を PBS から buffer A に変更すると透析後のタンパクの収率が 5 倍に増加した。これ buffer A により目的タンパク質が加水分解等の有害な反応を逃れた為と考えられる。

EMSA によるタンパク質の DNA への結合能の確認

作製した GST-GLI1 タンパク質と target DNA との複合体形成を確認するため EMSA を行った。その結果、全ての条件で精製したバンドにおいて DNA・GST-GLI1 タンパク質の複合体のバンドが確認された (Figure 1.8.6)。しかし条件 (vi) 及び (vii) のタンパク質では複合体のバンドの上に条件 (i) では現れないもう 1 本のバンドが確認された。また、(i) と比べ (vi) 及び (vii) では Free DNA のバンドの減少が確認された。バンドが 2 本現れたことから buffer A を用いて回収した条件で精製されたタンパク質は凝集してしまったタンパク質と正常なタンパク質の混合物等のためその性質が均一でない可能性が示唆された。

この為、菌体回収に buffer A を用いるのは不適と考え、これまでの検討で最適と考えられる精製条件 (ii: ビーズの洗浄に 0.5 M NaCl PBS を用いる。) が有用であると考えられる。また、どの精製条件においても well の底 (画像最上部) にバンドができてしまった。タンパク質の添加量が少ない場合には出現しない場合もあり、タンパク質添加量を減らせば低減させられると考えられる。

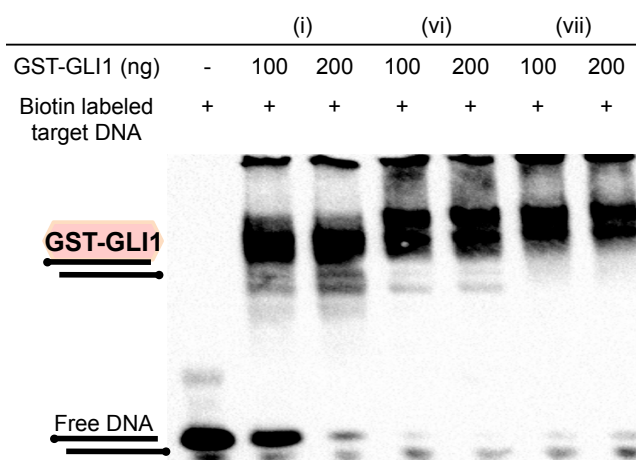


Figure 1.8.6 EMSA performed with GST-GLI1 protein produced at condition (vi) and (vii).

これまでの検討で最適と考えられた条件 (ii) よりも PBS の NaCl 濃度を高く設定した条件 (viii ; 菌体回収は PBS で行い、ビーズの洗浄を 1 M NaCl PBS で行なう。) に変更して検討を行った。

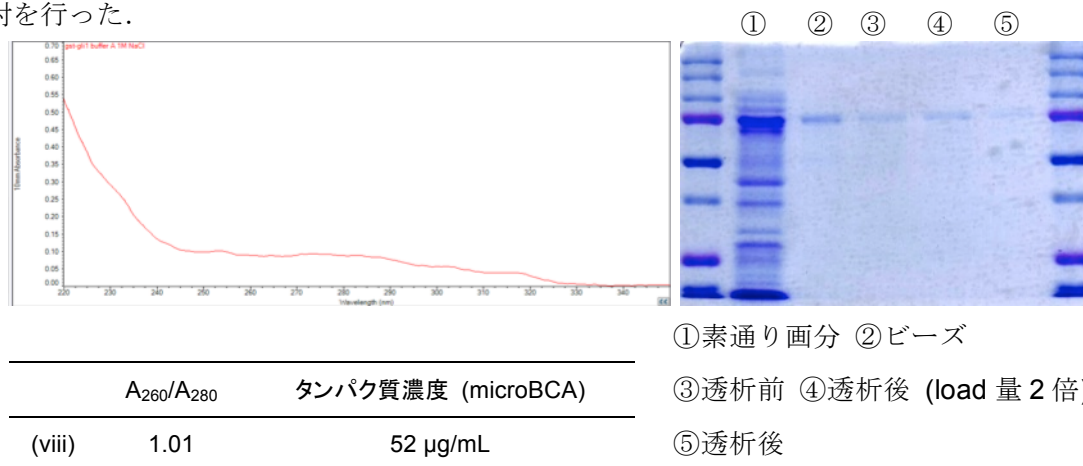


Figure 1.8.7 UV spectrum, CBB staining and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (viii).

条件 (viii) では条件 (vii) のように 260 nm にピークは無く, 260-280 nm がフラットなスペクトルを与えた (Figure 1.8.7). しかし, A_{260}/A_{280} の値は 1.01 と良好であり, 条件 (i) のように 260 nm にピークが見られなかった事から比較的 DNA 混入量の少ない目的タンパク質が得られたと考えられる. 280 nm においてピークが高くなるのは濃度が低いためと考えられる. 限外ろ過等を用いて濃縮することでタンパク質濃度が上昇すれば改善すると考えられる.

条件 (viii) のタンパクを EMSA で DNA との複合体形成能を試験した. 対象には条件 (i ; 菌体回収及ビーズ洗浄を PBS で行なう.) 及び条件 (vii ; 菌体回収を buffer A, ビーズ洗浄を 1M NaCl PBS) を用いた. 条件 (viii) で精製したタンパクでは条件 (i) と同じ移動度に 1本のバンドが確認でき, タンパク質濃度上昇とともに Free DNA のバンドが減少した (Figure 1.8.8). また, A_{280}/A_{260} の値も改善された事から条件 (iv) が現在までの最善の条件であると考えられる. また, 今回の精製条件を用いて作製した GST-GLI1 タンパク質では 200 ng (3.16 pmol) 用いた際, 複合体バンドが明瞭に確認された事から以降の実験では GST-GLI1 タンパク質を 200 ng/well 用いる事とした.

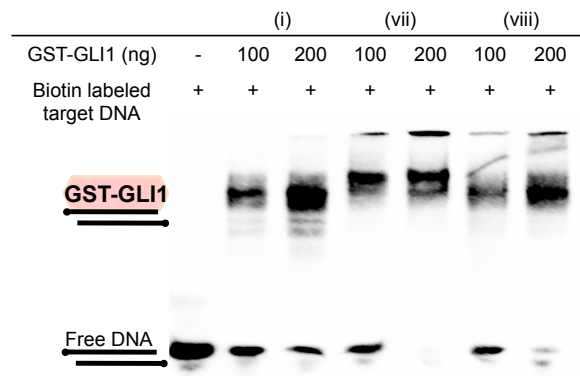


Figure 1.8.8 EMSA performed with GST-GLI1 protein produced at condition (vii) and (viii).

競合試験

条件 (viii) のタンパクを用い競合試験を行なうため, GST タンパク質を作製した. GST タンパク質を競合試験に用いる事で目的タンパク質である GST-GLI1 の GST 部でなく GLI1 部に DNA が結合する事を確認する.

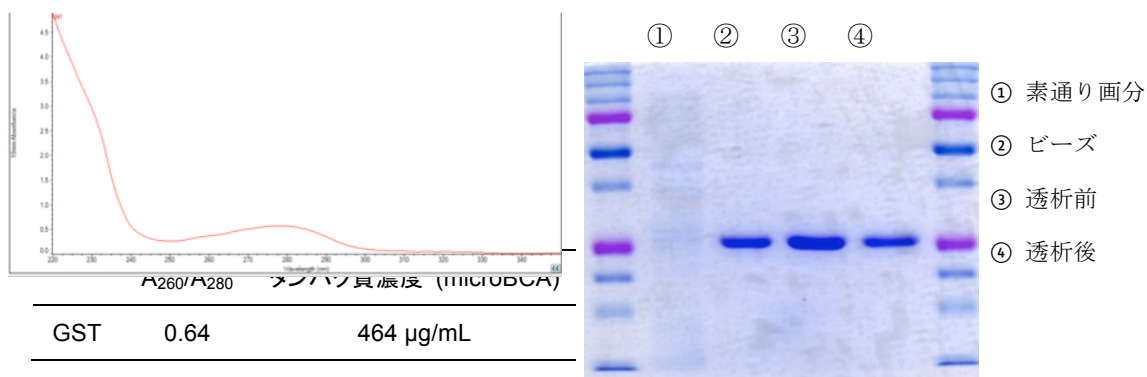


Figure 1.8.9 UV spectrum, CBB staining and concentration of GST-GLI1 protein produced at condition (viii).

GST タンパク質は GST-GLI1 タンパク質よりも高濃度で得られ, UV スペクトルでは 260 nm にピークが観察され, A_{260}/A_{280} も良好であった (Figure 1.8.9).

EMSA でのタンパク質量は GST-GLI1 タンパク質は 200 ng/well, GST タンパク質は 120 ng/well で行なった. また, サンプル添加時に溶媒として用いる DMSO の複合体形成に与える影響を 10 % (反応液 20 μ L 中 2 μ L) 及び 20 % (4 μ L) にて検証した. 結果を以下に示す (Figure 1.8.10).

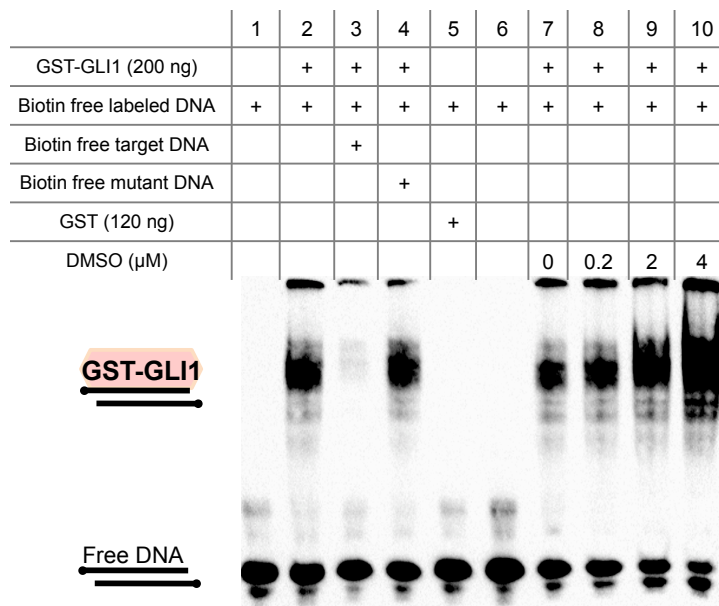


Figure 1.8.10 Competition assay.

GST-GLI1 と標識 DNA では複合体が形成された (2). 標識 DNA と GST-GLI1 の複合体バンドが標識されていない DNA を標識 DNA の 200 倍量加える事で減少した (3). 一方, GLI1 結合配列に変異が入った mutant DNA を 200 倍量加えた場合では複合体バンドが変化しなかった (4). さらに, GST タンパク質を添加した場合には複合体バンドは認められなかった (5). この結果から作製した GST-GLI1 タンパクの GLI1 部位が結合領域を含む DNA 断片と特異的に結合する事を確認した. また, 反応溶液中の DMSO 濃度を 0 %, 1 % (0.2 μ L), 10 % (2 μ L), 20 % (4 μ L) と増加させると, 複合体バンドとその周囲のバンドが増加し, Free DNA バンドが減少した(Figure 右側 6-10). DMSO の影響を排除してアッセイを行なうには終濃度 1 % (0.2 μ L) 以下にする必要がある.

EMSA での単離化合物の GLI1-DNA 複合体形成阻害作用の検討.

これまでに決定した条件で単離化合物の GLI1-DNA 複合体形成阻害作用を行なった. *T. arguens* より単離された化合物のうち, 最も強い阻害活性を示した **1** (IC_{50} 1.8 μ M) と, 比較的弱い活性を示した **2** (13.0 μ M) について試験した (Figure 1.8.11). その結果 **1** は 200 μ M において GLI1-DNA の複合体を示すバンドの減弱がみられた. この結果から **1** の GLI1 転写阻害の機序として GLI1-DNA の複合体形成阻害が含まれる事が示唆された. また, **2** においては複合体を示すバンドに変化が見られなかった事から転写阻害活性には 7 位メトキシ基の存在が重要である事が示唆された.

また同様の方法により, *W. somnifera* より単離された強い GLI1 転写阻害活性を示した **5** (IC_{50} 0.5 μ M) と, 比較的弱い阻害活性を示した化合物 **8** (IC_{50} 14.8 μ M) について試験すると, **5** は濃度依存的に GLI1-DNA の複合体形成を阻害した事から **5** の GLI1 転写阻害の機序として GLI1-DNA の複合体形成阻害が含まれる事が示唆された. また, **8** においては複合体を示すバンドに顕著な変化が見られなかった事から **5** の GLI1 転写阻害活性には $\alpha\beta$ -不飽和カルボニルの存在が重要である事が示唆された.

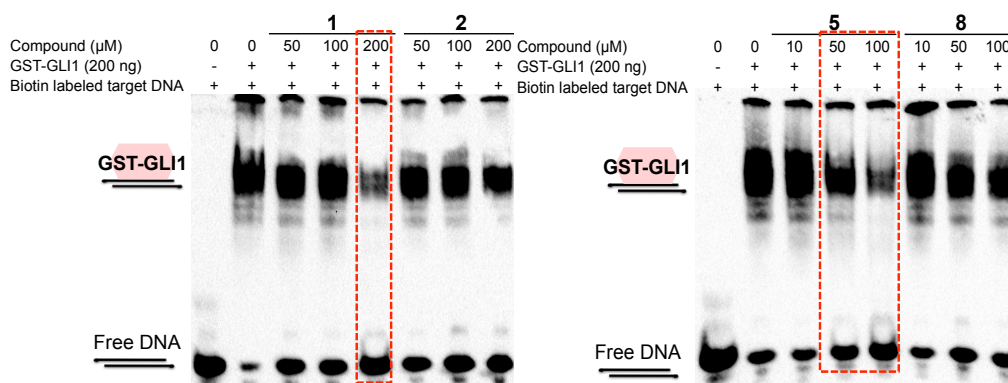


Figure 1. 8.11 EMSA with GLI1 transcriptional inhibitors.

小括 Hedgehog シグナル伝達経路阻害剤探索

GLI1 転写阻害活性を指標に 2 種の植物の MeOH 抽出物 (*Themeda arguens*, *Withania somnifera*) より分画を行ない、10 種の化合物を単離した。10 種の化合物は GLI1 転写阻害活性を示し、そのうち 6 種の化合物 (**1, 3, 5, 6, 7, 10**) は Hedgehog シグナル伝達経路の亢進する癌細胞に対して毒性を示した。**1** 及び **3** は正常細胞 C3H10T1/2 cells に対して毒性を示さなかったが、一方で **5, 6, 7** 及び **10** は C3H10T1/2 cells に対し毒性を示した。withanolide 類は細胞毒性、抗血管新生、NF- κ B 阻害作用等の様々な生物活性が報告されており、Hedgehog シグナル以外への作用により正常細胞に対しても細胞毒性を示したと考えられる。4 種の化合物 (**1, 5, 6, 7**) はアッセイ細胞及び癌細胞において hedgehog シグナルの標的遺伝子である Hedgehog リガンド受容体 PTCH 及び抗アポトーシスタンパク質 BCL2 を減少させた。また、EMSA において **1** 及び **5** は GLI 結合部位を含む DNA 断片と GLI タンパク質の複合体形成を阻害した。比較的活性の弱い化合物 (**2, 8**) では複合体のバンドに顕著な変化が観察されなかった。この結果から **1** 及び **5** の GLI1 転写阻害活性の一部に GLI1-DNA の複合体形成阻害作用が示唆された。

第二章 Notch 伝達経路阻害剤の探索

第一節 アッセイ系について

Notchシグナル伝達経路の阻害活性を有す化合物の探索を目的に当研究室においてT-Rexシステムを用いて構築されたルシフェラーゼアッセイ系を用いて活性評価を行なった。このアッセイ細胞は、東京医科歯科大学再生医療研究センター 岡本 隆一教授よりご供与いただいた、大腸癌細胞由来LS714T cellsを用いて作製されたLS174T cells/TET-ON-NICDを元に作製された。この細胞はFLAG-NICD1 (N-kozak-Flag-mouseNotch1:1704-2531) を目的遺伝子として挿入したpcDNA4.0-FLAG-NICD1及びpcDNATM6/TRを形質転換して作製された。

本研究ではこのLS174T/TET-ON-NICDに、TP-1-luc (981-6, RIKEN) より Sal I/Xho I処理により得た404 bp (12x RBP-Jk結合配列- β -globin promoter) をpGL4.20にXho I処理を用いて挿入したベクターを形質転換し、 puromycin (final conc. 1 μ g/mL) を用いて薬剤選択が行なわれ作製された安定発現株を活性評価に用いた。Doxycyclineの添加によりTetRが解離しNICDよりも配列が40 a.a.多い、N-kozak-Flag-mouseNotch:11704-2531 (Notch Δ E) が発現する。これが細胞由来の γ -secretaseにより切断されNICDが産生される。このNICDが核内にてMAML及びRBP-Jkと三量体を形成しその下流にコードされたluciferaseが転写される。細胞溶解後にluciferaseの基質、 luciferinを添加する事で生じる化学発光を測定する事でNotchシグナルによる転写活性を定量する (Figure 2.1.1)。Notch阻害剤としての報告はGSIが殆どであるが、 γ -secretaseは様々なタンパク質の切断に関わっておりその阻害により消化管障害などの深刻な副作用が生じる可能性がある^[53]。しかし本アッセイ系では γ -secretase阻害作用以外の作用機序の化合物も検出が可能であるため新規作用機序のNotchシグナル阻害剤の発見が期待される。

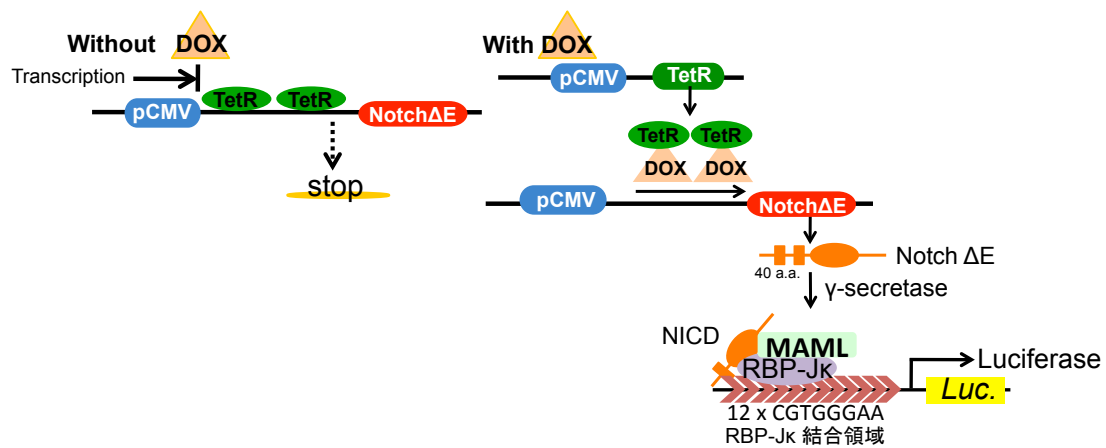


Figure 2.1.1 Constructed cell-based assay system. Dox: doxycycline, CMV prom.; CMV promoter, TetR; tetracycline repressor, TetO₂; tetracycline operator 2, MAML; mastermind-like protein

また、luciferase 活性がサンプルの細胞毒性により低下する場合もある為、FMCA を用いて細胞生存率を同時に測定した。コントロールの luciferase 活性及び細胞生存率を 100 % とし、高い細胞生存率、低い luciferase 活性を示したサンプルを陽性と判断した。

第二節 バングラデシュ産植物エキブラリーのスクリーニング

研究室保有のバングラデシュ産植物エキブラリーKKB1-343 に対し Notch シグナル阻害活性を指標にスクリーニングを行なった。以下にその結果を示す (Figure 2.2.1, Figure 2.2.2).

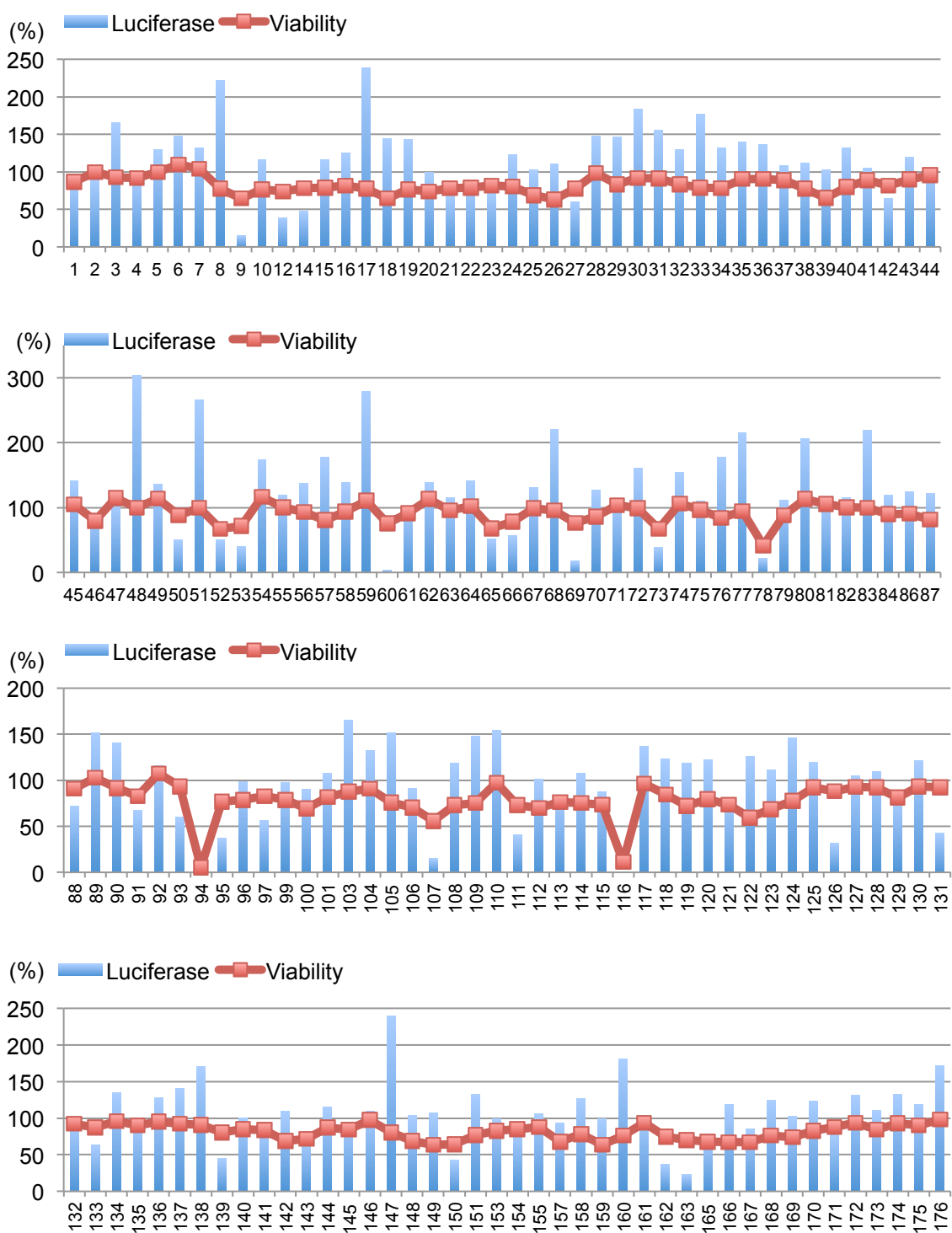


Figure 2.2.1 Screening of KKB plant extract library.

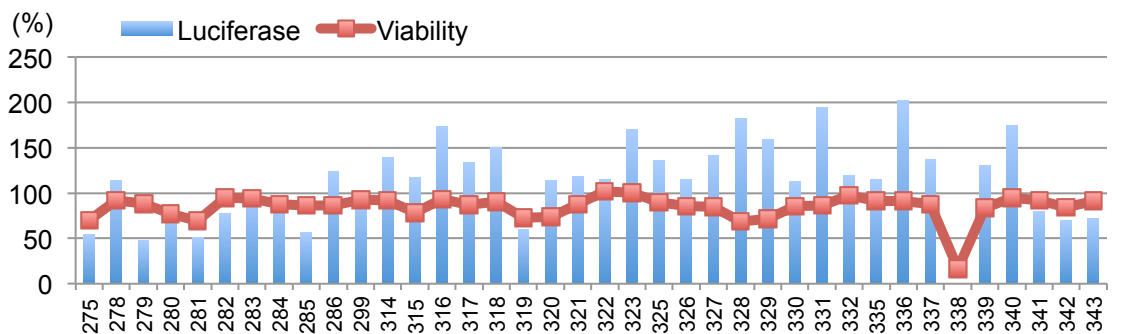
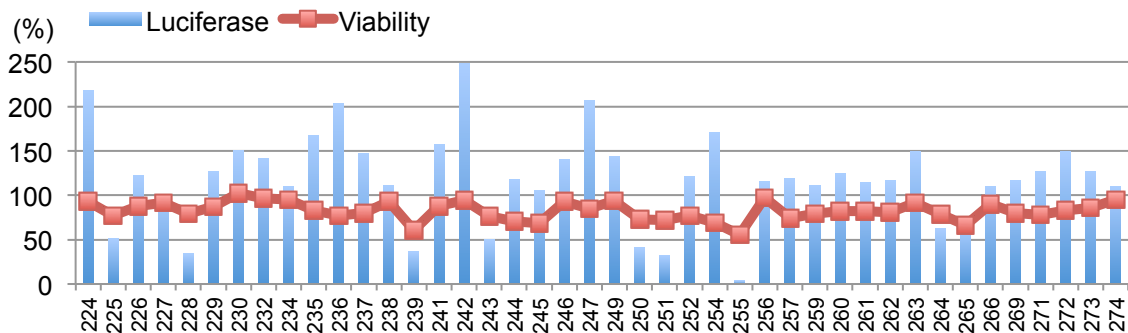
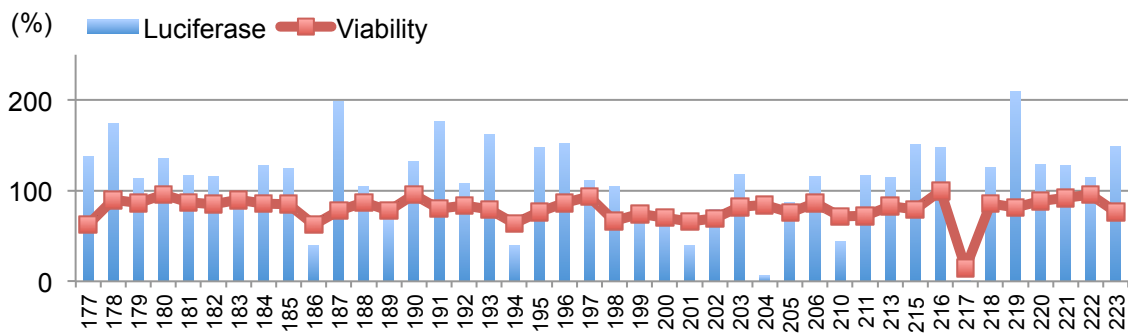


Figure 2.2.2 Screening of KKB plant extract library.

Viability と Luciferase 活性との差 $\geq 30\%$ を基準に選出を行なうと、22 種のエキス、19 種の植物に Notch シグナル阻害活性を認められた。活性が認められたのは以下の植物である。

KKB9 *Sida acuta*

KKB12 *Derris indica*

KKB14 *Physaris minima*

KKB50 *Urginea indca*

KKB53 *Pongamia pinnata* Merr. / *Derris indica* (Fruit)

KKB60 *Ricinus communis* L. (Benna)

KKB69 *Calotropis giguntea*

KKB93 *Ammannia baccifera* Linn
KKB95 *Aphanamixis polystachya*
KKB107 *Vallisneria spiralis* (stem)
KKB111 *Phyllanthus emblica*
KKB126 *Sida acuta*
KKB131 *Elephantopus scaber* L.
KKB139 *Microcos paniculata*
KKB162 *Calotropis procera* (leaves)
KKB163 *Calotropis procera* (stem)
KKB204 *Solanum nigrum*
KKB228 *Rauwolfia serpentina* (root)
KKB250 *Ficus hispida* (stem)
KKB251 *Ficus hispida* (leaves)
KKB255 *Xanthium strumarium*
KKB279 *Semecarpus anacardium*

第三節 *C. gigantea* からの活性成分探索

Calotropis gigantean

本植物はガガイモ科 (*Asclepiadaceae*) に属し、インド、アジア及びアフリカ等に分布する。crown flower や milk weed の名で知られている。インド等では伝統的に様々な治療に用いられ、皮膚疾患、刺傷、癌等の様々な治療効果が知られている^[54]。

C. gigantea は以前当研究室にて朴氏により Wnt シグナル阻害活性を指標に分画が行なわれた。その際 6 種の化合物 **11-16** を単離報告している (Figure 2.2.1)^[55]。

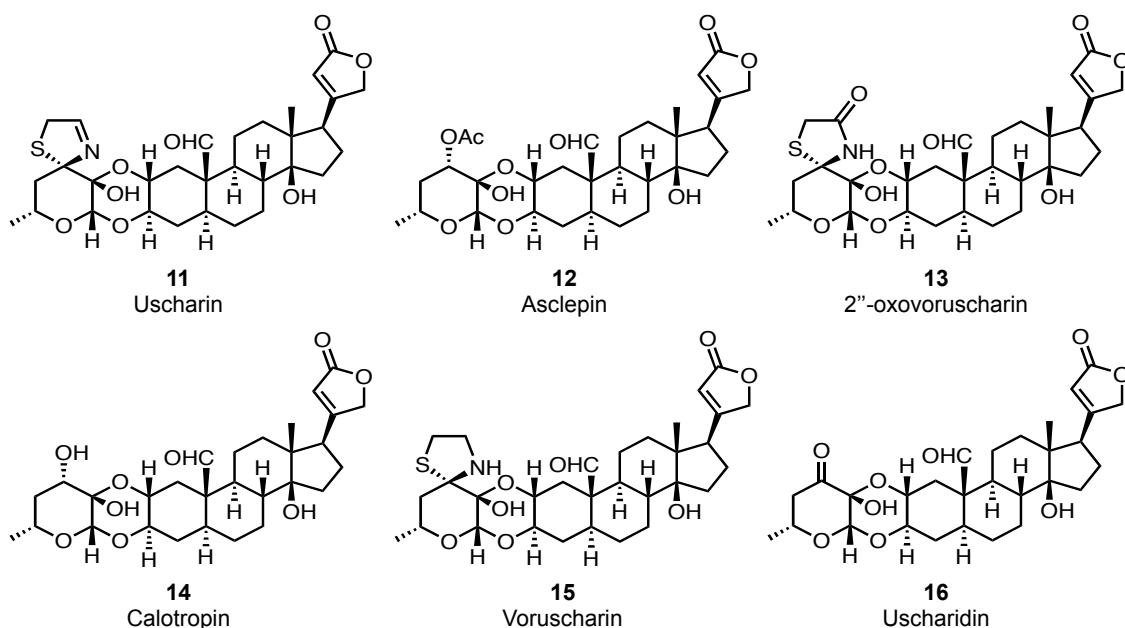


Figure 2.2.1 Structure of isolated compounds for *C. gigantea*.

本実験ではその分画済みのエキスをを用いた。保存されていた分画済みのフラクションについて活性評価を行うと 25 及び 50 $\mu\text{g/mL}$ において hexane 層及び 90% MeOH 層以外のフラクションが Notch シグナル阻害活性を示した。Fr.8C は他のフラクションよりも弱い活性を示した。

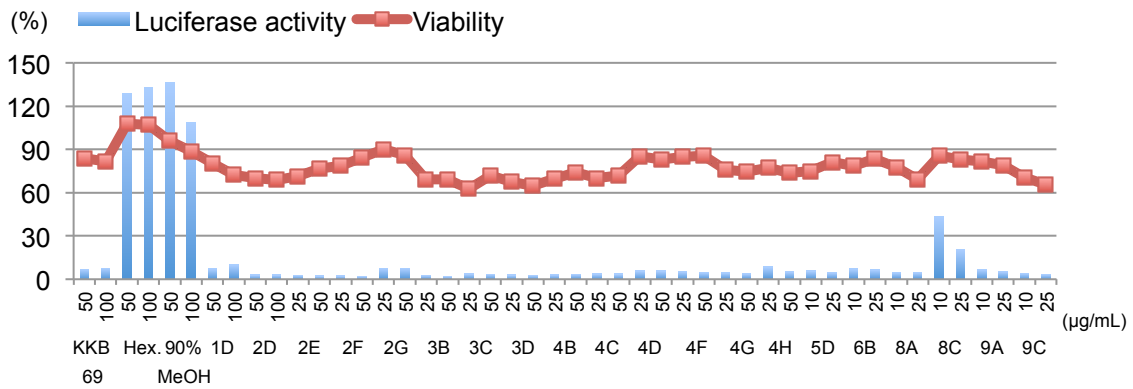


Figure 2.2.2 Notch signaling activity and cell viability.

これら活性認められたフラクションのうち **Crude** エキスに近い未分画な、かつ量が多いフラクションについて再度低濃度で評価すると、1D, 2D に低濃度で強い阻害活性が認められたため分画する事とした (Figure 2.2.3). 4B は TLC 分析より **14** と思われるスポットがメイン化合物として確認されたため分画を行なわなかった。

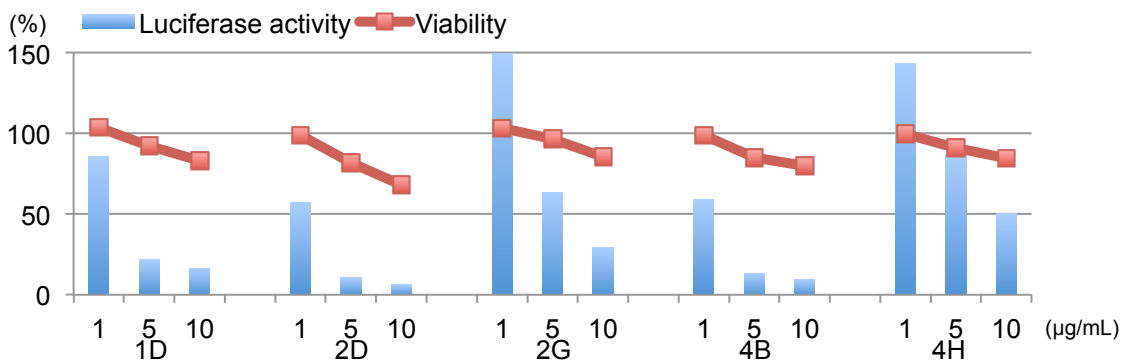


Figure 2.2.3 Notch signaling activity and cell viability.

Fr.1D (5 g) を MeOH:H₂O 系を用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ø32x260 mm) により分画し, Fr.14A-14G を得た. Notch シグナル阻害活性は 14A-14E に認められた (Figure 2.2.4). 中でも Fr.14C に特に強い阻害活性が認められた。

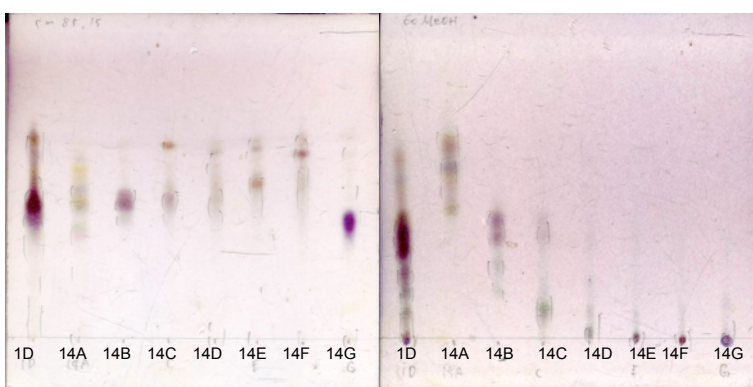
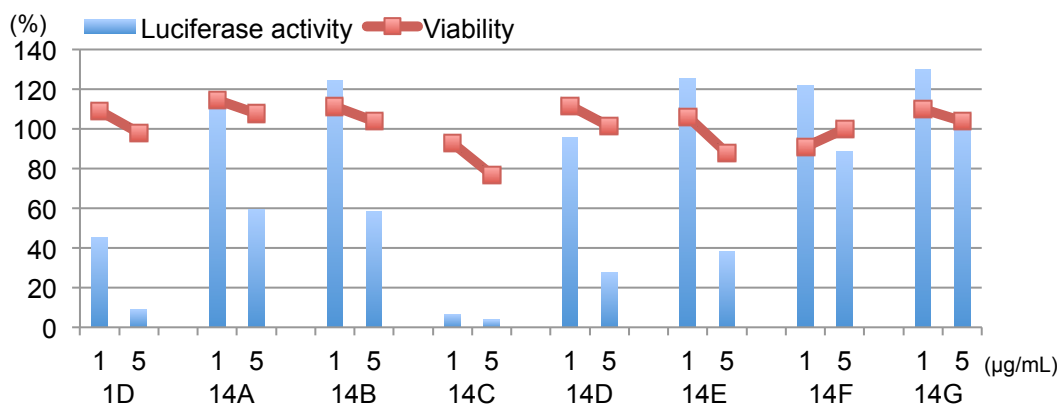


Fig. 2.2.4 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis.
 Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 85:15, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.14C (395 mg) を CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルクロマトグラフィー(PSQ 100B, ø29x230 mm) により Fr.15A-15G に分画し, **11** (15C, 85 mg) を得た. Fr.15A-15G の阻害活性を比較すると Fr.1D の阻害活性は **11** によるものと考えられる (Figure 2.2.5).

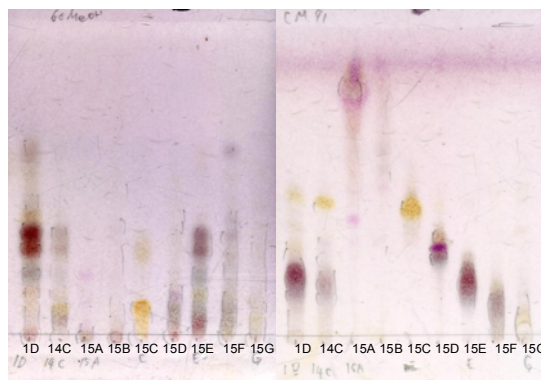
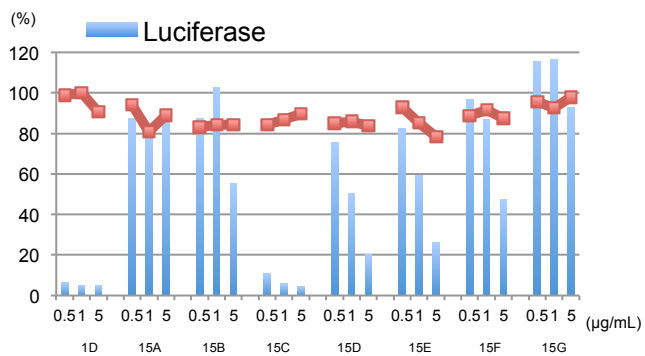


Figure 2.2.5 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis.
 Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.4B (84 mg) を CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルクロマトグラフィー(PSQ 100B, ø27x205 mm) により分画し Fr.16A-16I を得, **14** (Fr.16D, 36 mg) を得た. また, 活性評価を行うと弱い活性が 16F に認められた (Figure 2.2.6).

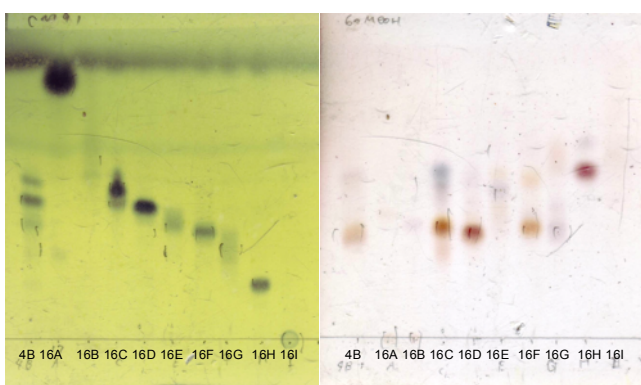
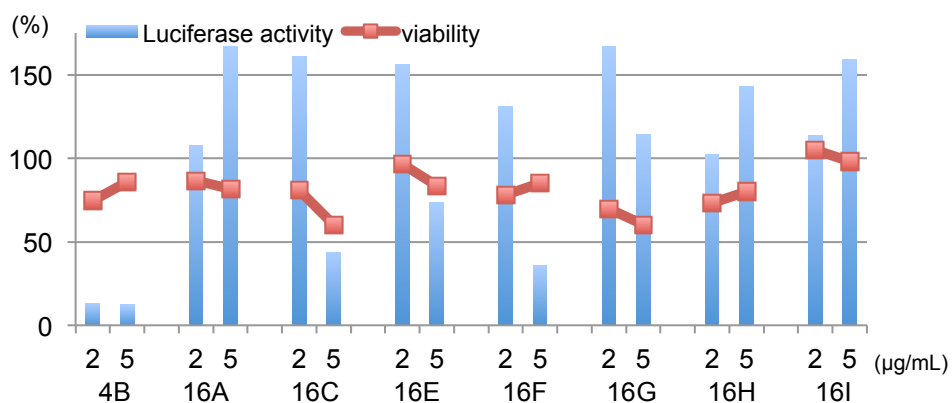


Fig. 2.2.6 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis.
 Left: Silica gel, CHCl_3 :MeOH 9:1, phosphomolybdic acid Right: ODS, MeOH: H_2O 6:4, anisaldehyde, Δ

Fr.3E (11.2 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, $\phi 10 \times 250$ mm,; eluent MeOH: H_2O (48:52), wavelength 220 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **12** (Fr.18A, 9.7 mg, t_R 12 min) および **17** (Fr.16B, 6.5 mg, t_R 16 min) を得た (Figure 2.2.7).

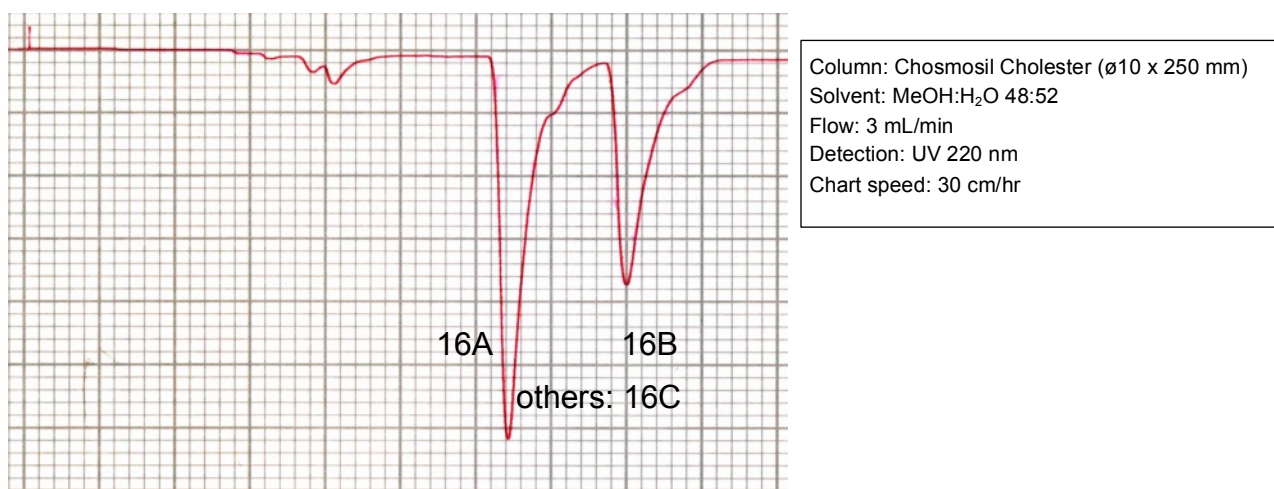


Figure 2.2.7 HPLC chromatogram of Fr.3E.

Fr.17F (10 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (45:55), wavelength 220 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **18** (Fr.19E, 0.4 mg, t_R 72 min) を得た (Figure 2.2.8).

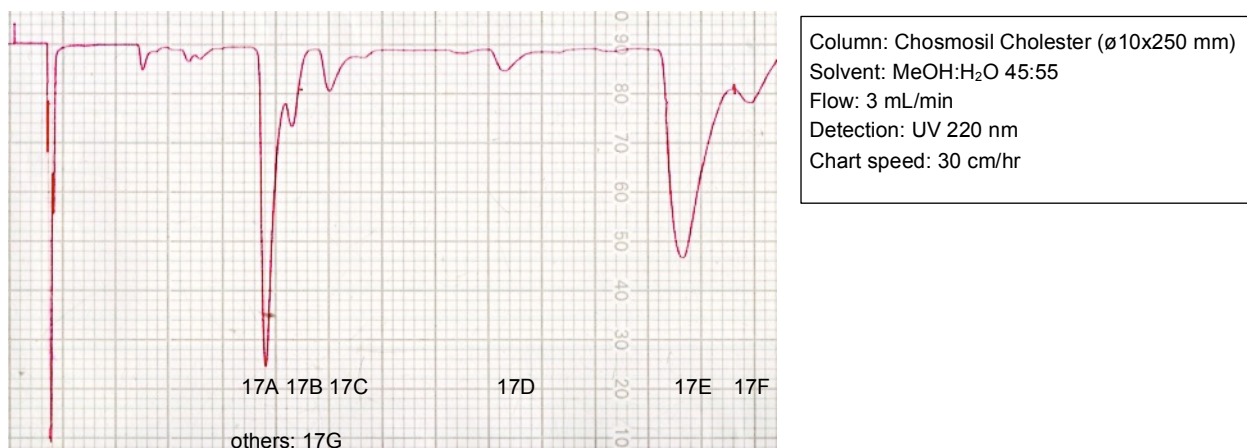


Figure 2.2.8 HPLC chromatogram of Fr.17F.

Fr.2D (180 mg) は H₂O:MeOH (3:7-0:1) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 27x245 mm) で分画し, Fr.20A-20I を得た. 活性は Fr.20D-20F に認められた (Figure 2.2.9).

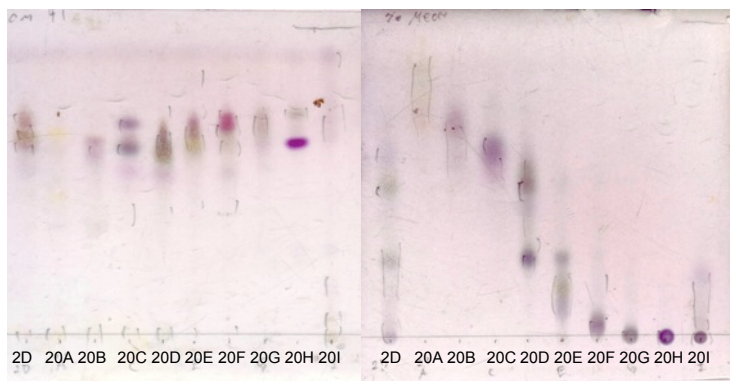
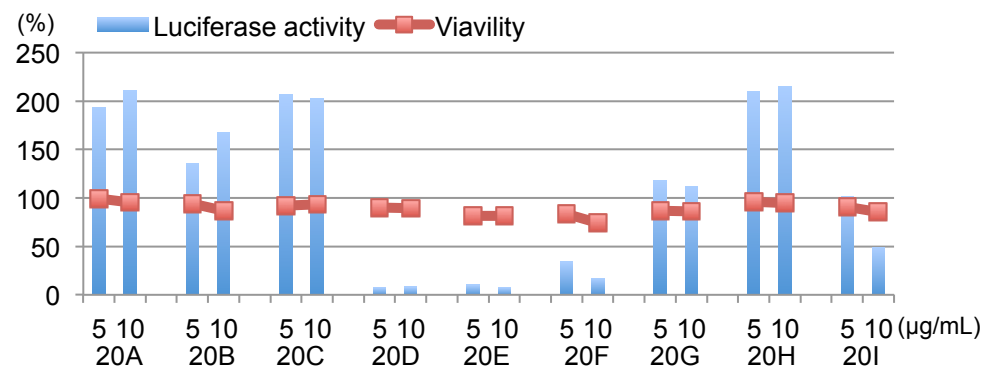


Figure 2.2.9 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 9:1, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ

Fr.20D (112.1 mg) を H₂O:MeOH (4:6-3:7) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ø23x245 mm) で分画し, Fr.21A-21F を得た. 活性は Fr.21B-21E に認められた (Figure 2.2.10).

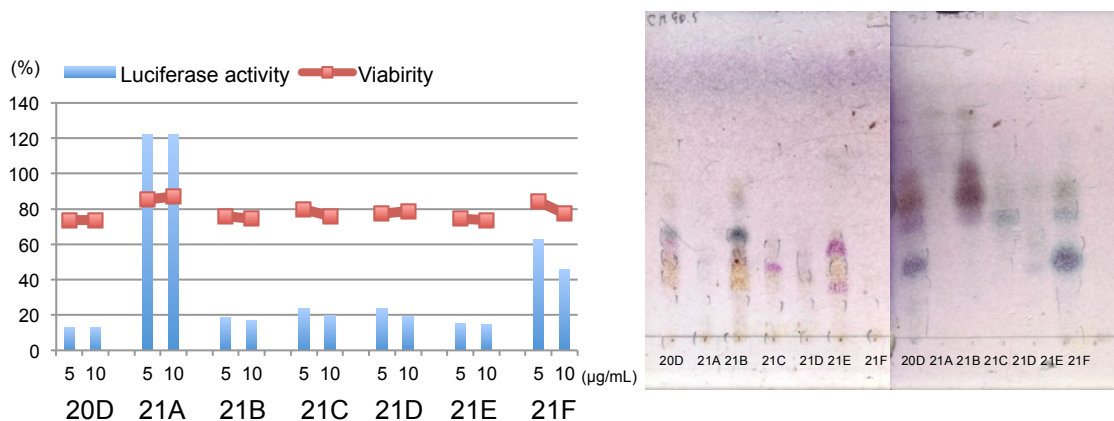
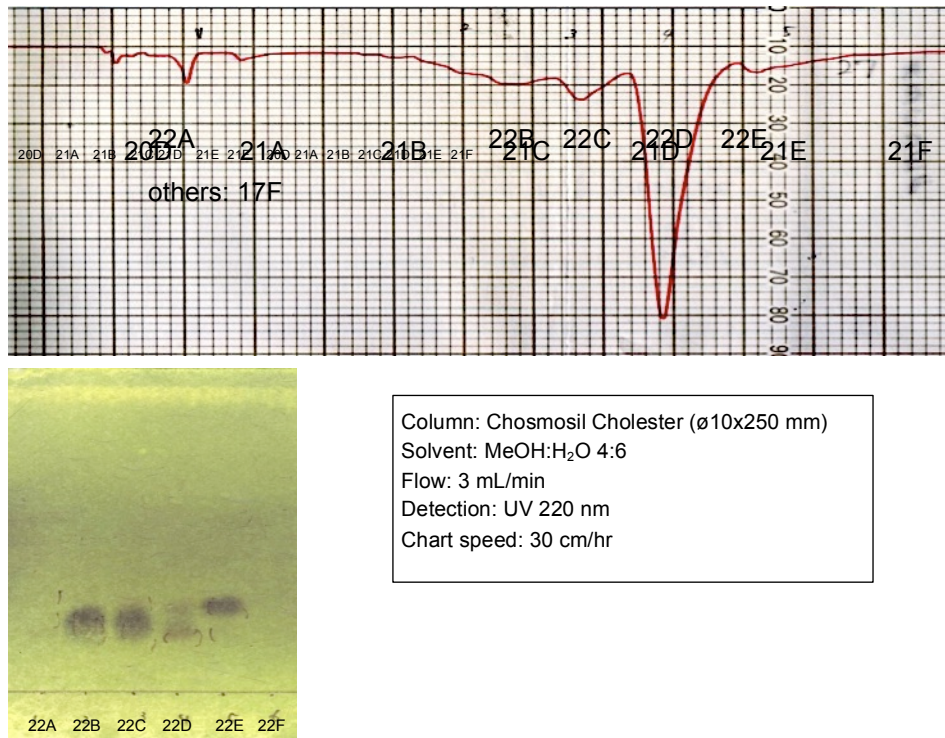


Figure 2.2.10 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis.
Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 95:5, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ

Fr.21B (49.2 mg) を ODS HPLC (Cosmosil 5CN-MS, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (4:6), wavelength 210 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **16** (Fr.22B, 17.5 mg, *t_R* 12 min) 及び **17** (Fr.22E, 3.5 mg, *t_R* 19 min)を得た (Figure 2.2.11).



Column: Chosmosil Cholester (ø10x250 mm)
Solvent: MeOH:H₂O 4:6
Flow: 3 mL/min
Detection: UV 220 nm
Chart speed: 30 cm/hr

Figure 2.2.11 HPLC chromatogram of Fr.21B and TLC analysis. ODS, MeOH: H₂O 6:4, phosphomolybdic acid, Δ

Fr.20E (21.1 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (65:35), wavelength 210 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **16** (Fr.23F, 1.6 mg, t_R 19 min) を得た (Figure 2.2.12).

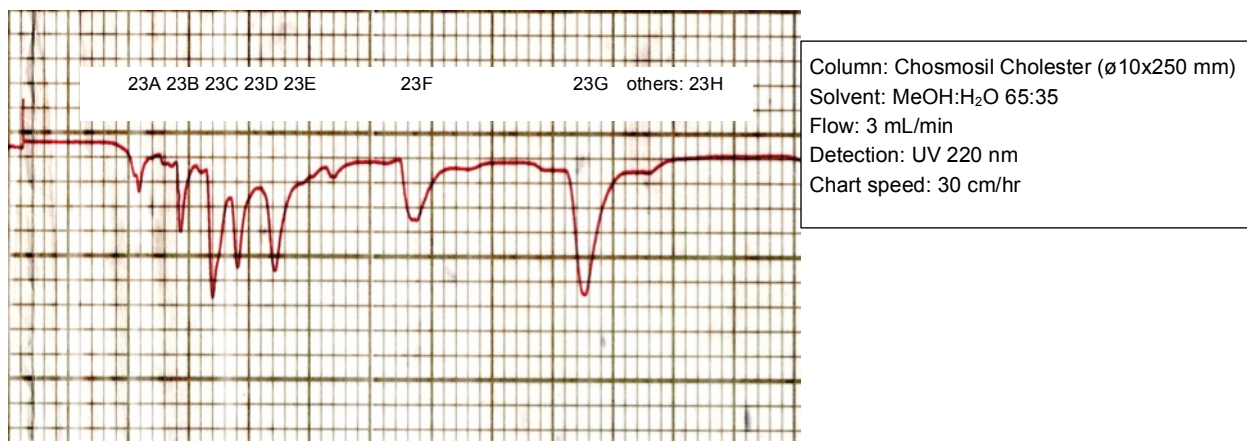


Figure 2.2.12 HPLC chromatogram of Fr.20E.

Fr.20F (10.3 mg) を CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルカラムカラムクロマトグラフィー (ϕ 12 x 180 mm) により分画し, **15** (Fr.24D; 2.6 mg, Fr24E; 1.9 mg) 及び **17** (Fr.24F, 1.1 mg) を得た (Figure 2.2.13).

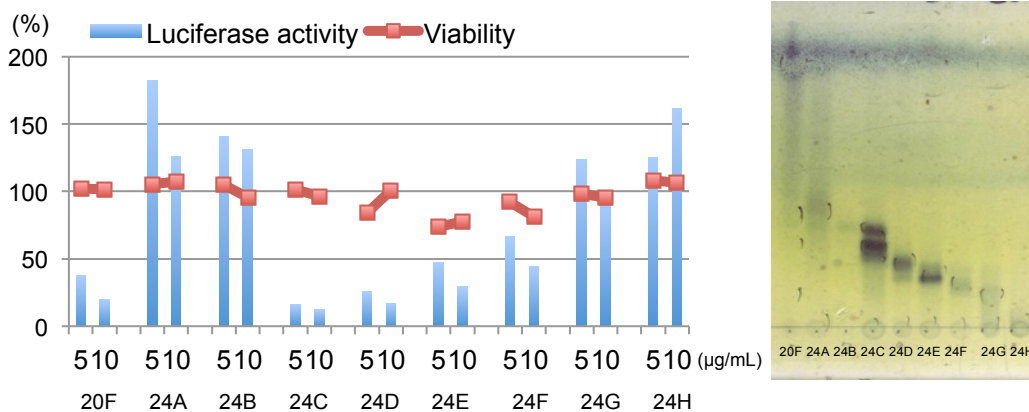


Figure 2.2.13 Notch signaling activity, cell viability and TLC analysis. Left: Silica gel, CHCl₃:MeOH 95:5, anisaldehyde, Δ Right: ODS, MeOH: H₂O 7:3, anisaldehyde, Δ

第四節 単離化合物の構造解析及び同定

化合物 **11** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 610 $[M+Na]^+$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +10$ (c 1.0, $CHCl_3$) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **11** を uscharin と同定した^[56]。

化合物 **12** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 573 $[M-H]^-$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{27} +12$ (c 1.0, $CHCl_3$) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **12** を asclepin と同定した^[57]。

化合物 **14** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 531 $[M-H]^-$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +61$ (c 1.0, MeOH) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **14** を calotropin と同定した^[56]。

化合物 **15** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 610 $[M+Na]^+$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{27} +71$ (c 0.3, EtOH) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **15** を vorscharin と同定した^[58]。

化合物 **16** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 553 $[M+Na]^+$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{26} +20$ (c 0.6, EtOH) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **16** を uscharidin と同定した^[56]。

化合物 **17** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 585 $[M+Na]^+$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{27} -3$ (c 1.0, CH_2Cl_2) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **17** を calactinic acid methyl ester と同定した^[59]。

化合物 **18** は、非結晶白色固体として得られ、ESIMS において m/z 604 $[M+H]^+$ 、比旋光度 $[\alpha]_D^{27} -16$ (c 0.4, MeOH) を示した。1D 及び 2D-NMR 解析を行ない、文献値とのスペクトルデータの比較により化合物 **18** を 16- β -hydroxyuscharin と同定した^[60]。

第五節 活性評価

化合物 **11-18** の Notch シグナル阻害活性

C. gigantea より単離された化合物 **11-18** の Notch シグナル阻害活性を評価した。以下に結果と IC_{50} 値を示す (Figures 2.4.1, 2.4.2 and 2.4.3).

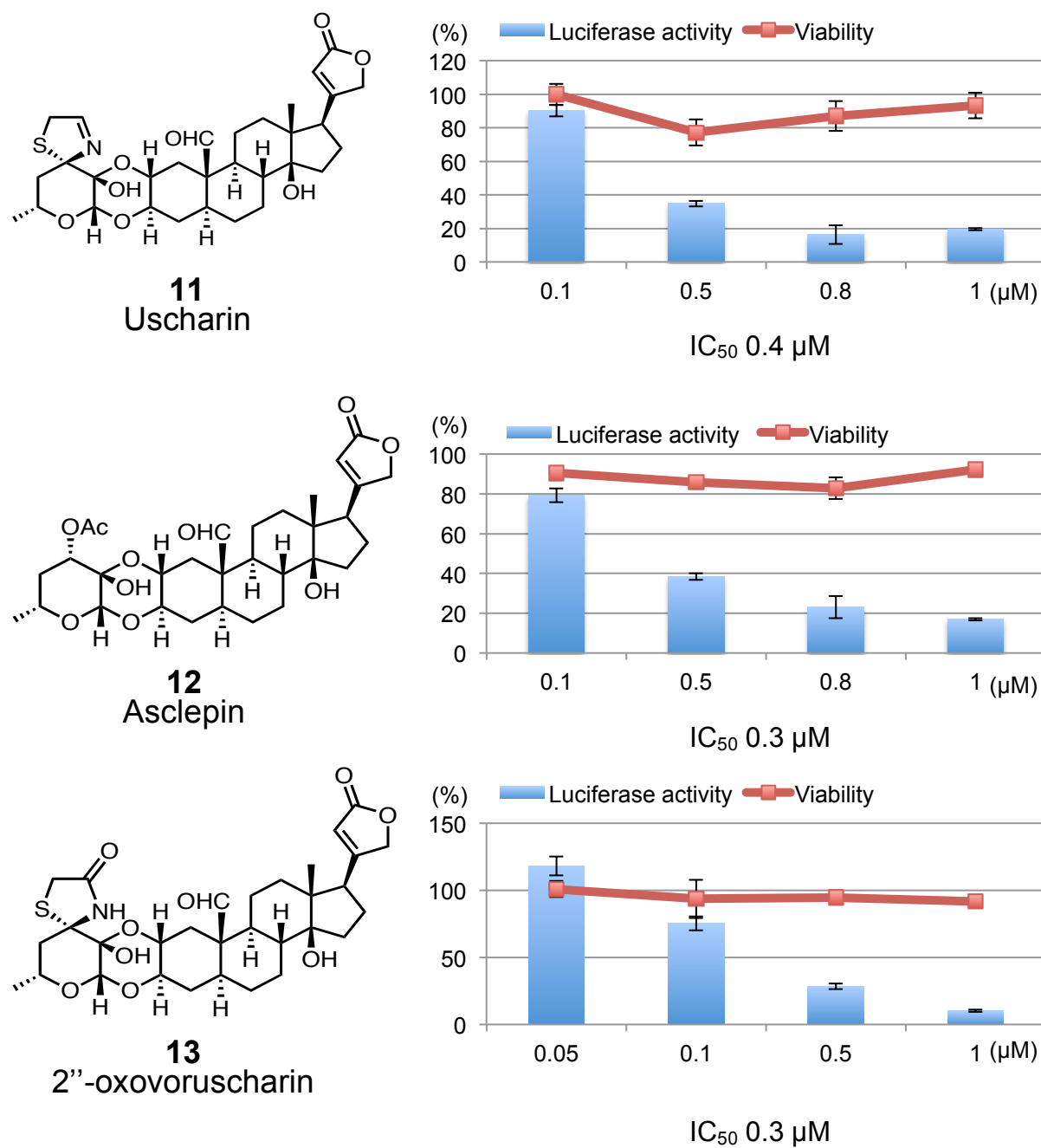


Figure 2.4.1 Structures and Notch signaling activities of **11-13**.

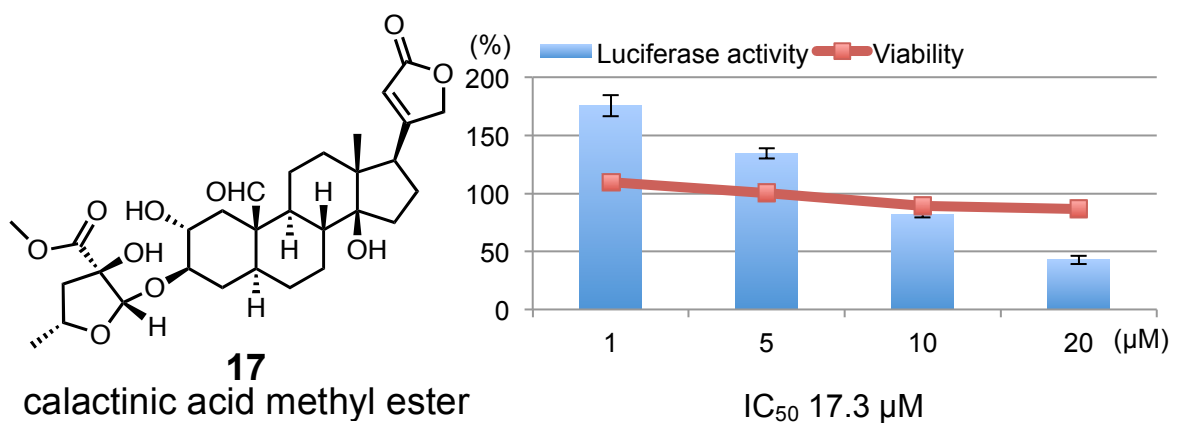
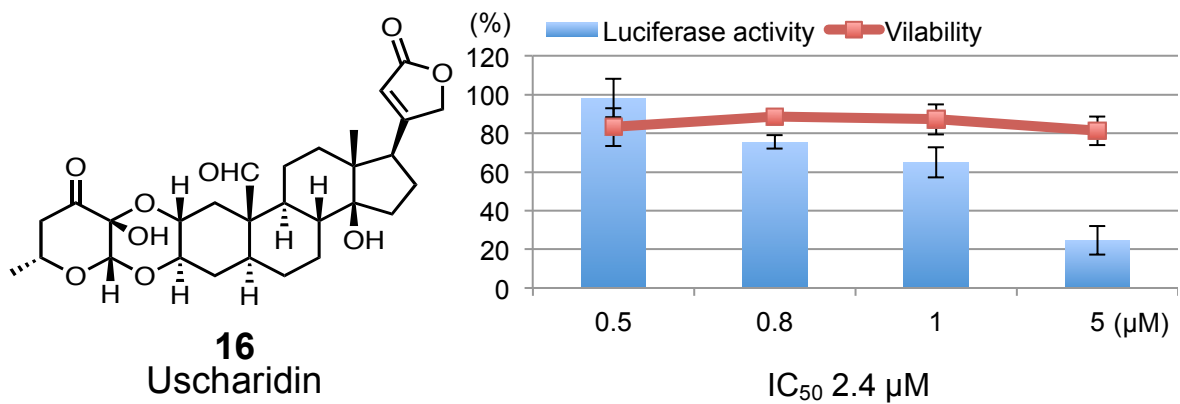
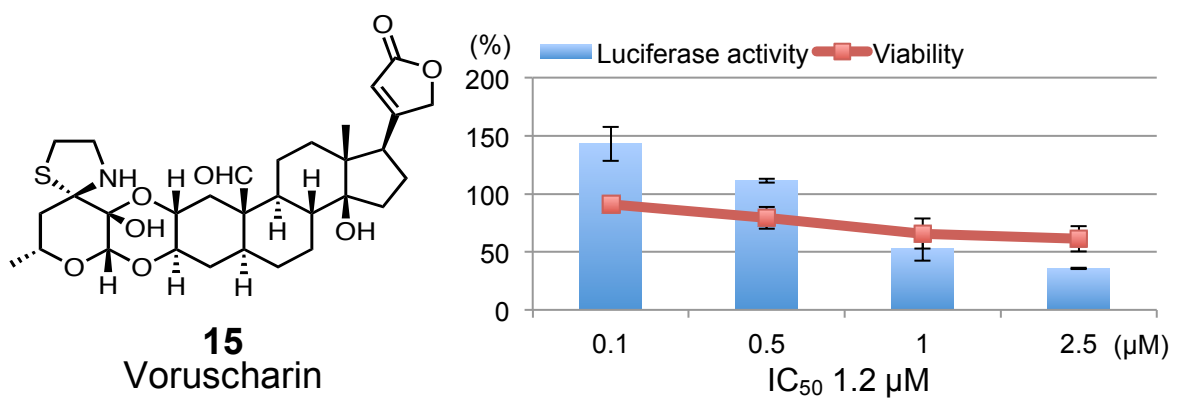
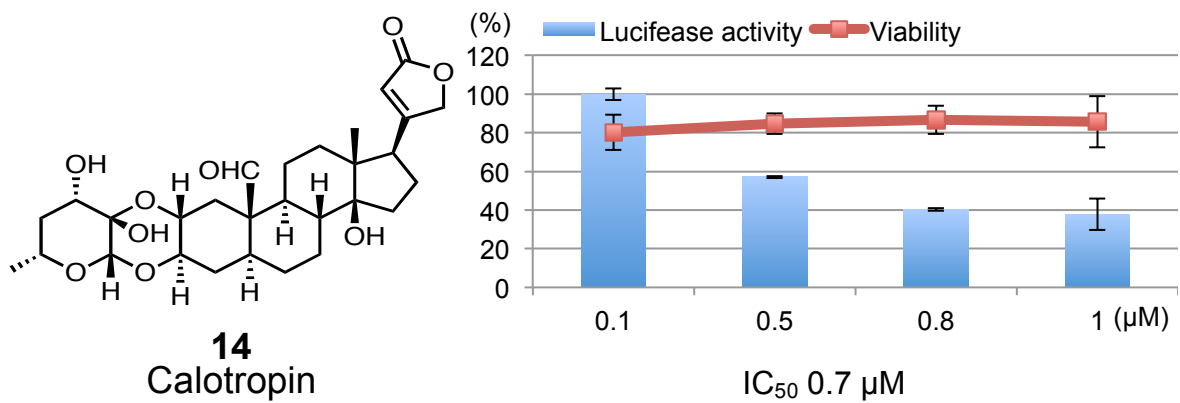


Figure 2.4.2 Structures and Notch signaling activities of 14-17.

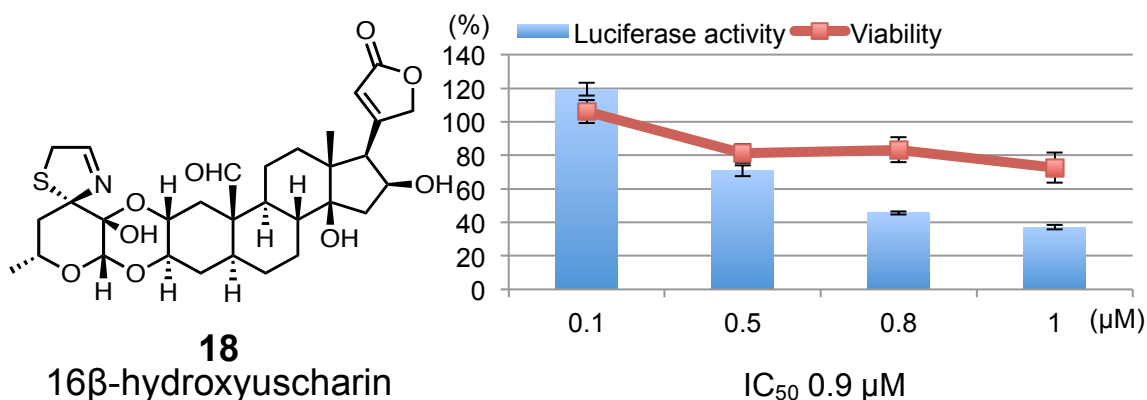


Figure 2.4.3 Structures and Notch signaling activities of **18**.

11 のウエスタンブロットを用いた作用機序の検討

11 について作用機序を解明する為、ウエスタンブロットを用いてアッセイ細胞のタンパク質の発現に対する化合物の影響を評価した。初めに NICD, Notch Δ E, Notch シグナルの標的遺伝子 HES1 及び HES5 に対する影響を評価した (Figure 2.4.4).

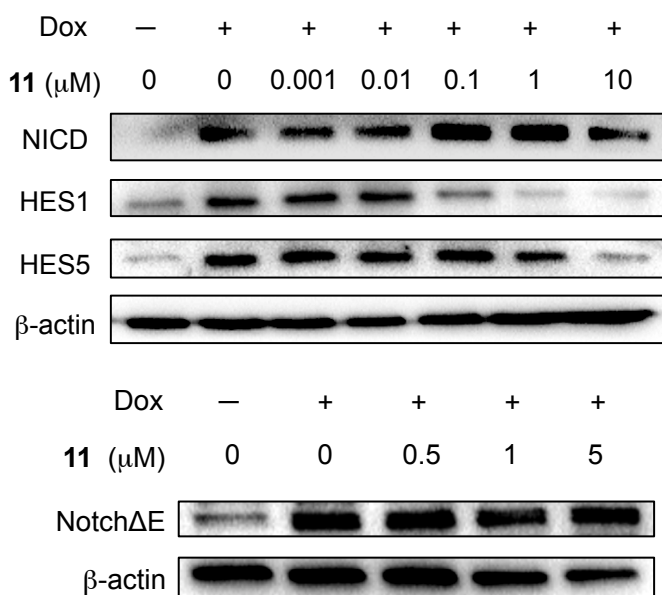


Figure 2.4.4 Western blot of NICD, HES1 and HES5 in assay cells after treatment of **11**.

その結果 **11** は Notch シグナルの標的遺伝子である HES1 および HES5 を減少させた。また 0.1-1 μM において NICD を増加させ、その後減少させたが、10 μM においては 0 μM よりも減少させることはなかった。また、Notch Δ E の N 末端に存在する Flag tag を抗 Flag 抗体を用いて Notch Δ E を検出した。その結果 **11** は Notch Δ E に影響を与えなかった。

ライセートを Cytoplasm 及び Nucleus に分け試験すると NICD は核内に多く存在し, **11** は NICD の核内移行を阻害していない事が分かった. これらウエスタンブロットの結果と **11** の IC₅₀ 値(0.4 μM)とを比較すると **11** は NICD に影響を与え Notch シグナルを阻害したのではない事が示唆された (Figure 2.4.5).

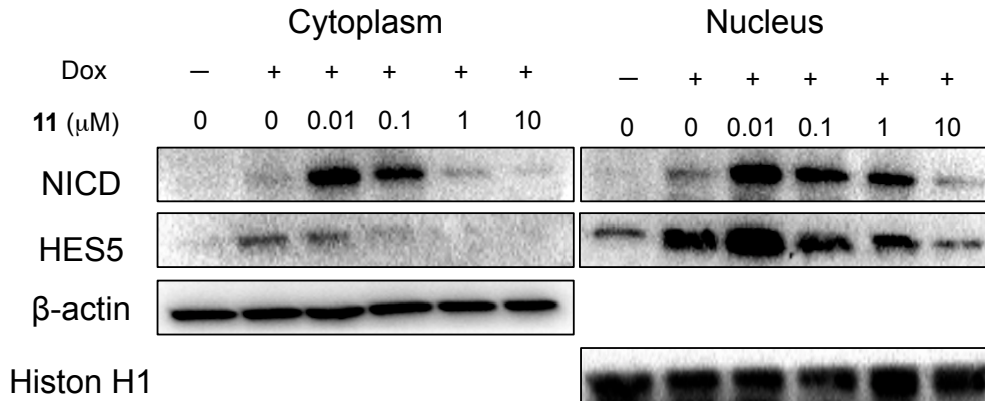


Figure 2.4.5 Western blot of NICD and HES5 in assay cells after treatment of **11**.

また, ウエスタンブロットを用いてその他のタンパク質量について調べると **11** は 1 μM で RBP-Jκ を減少させる事が分かった. この事から RBP-Jκ の分解に関わる Proteasome 及び Lysosome 系^[61]に対する化合物の影響を評価した (Figure 2.4.6).

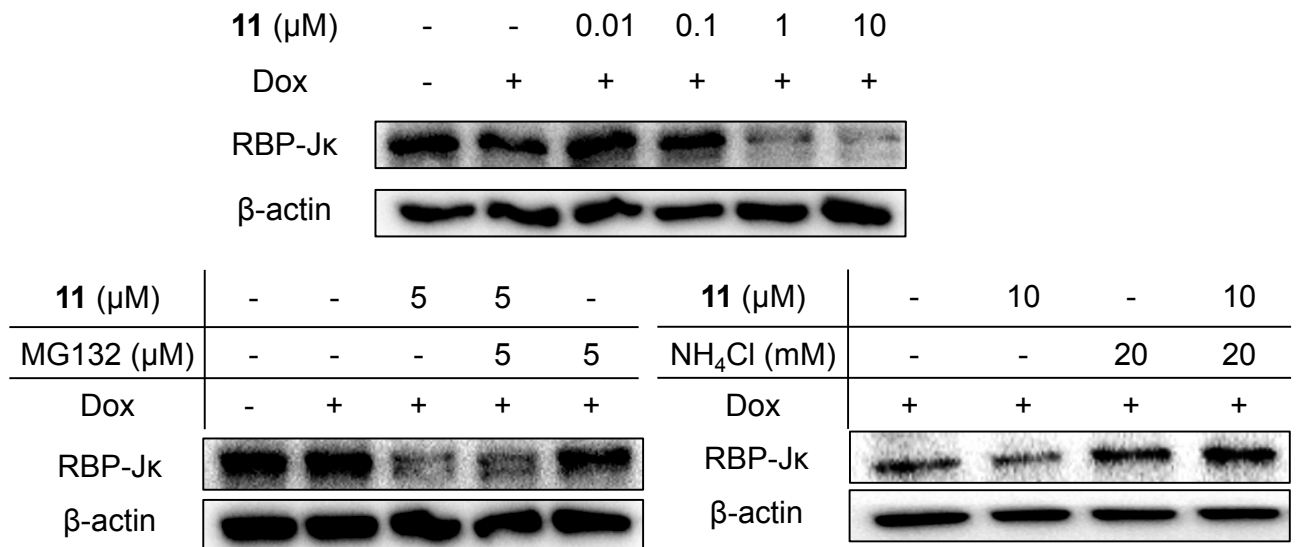


Figure 2.2.6 Western blot of assay cells after co-treatment of **11** and MG132 or NH₄Cl

Proteasome 阻害剤である MG132^[62]との併用実験を行なうと **11** 5 μM と MG132 5 μM を併用すると RBP-Jk のタンパク質量が一部回復した。また, Lysosome 阻害剤 NH_4Cl ^[63]との併用では **11** 10 μM と NH_4Cl 20 μM を併用するとタンパク質量の回復が観察された。これらの結果から **11** は RBP-Jk の分解を促進する事で Notch シグナルを阻害する事が示唆された。

また, γ -secretase の構成タンパク質の発現量を調べると **11** は 1 μM において Presenilin 1 を, 10 μM において Nicastrin, Presenilin 2, PEN2 を減少させた (Figure 2.2.7)。これらの結果から **11** は RBP-Jk 及び γ -secretase を減少させることで Notch シグナルを阻害する事が分かった。

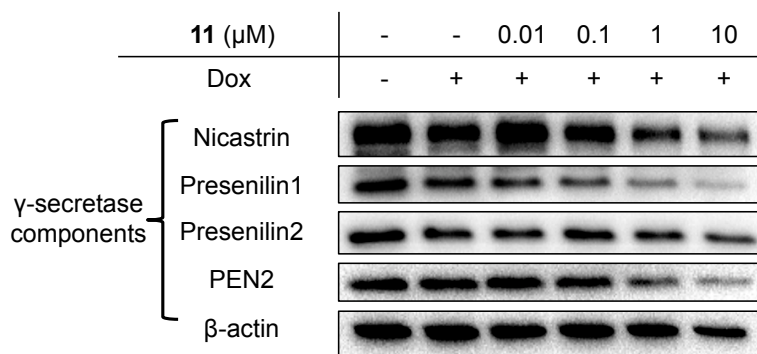


Figure 2.2.7 Western blot of assay cells after treatment of **11**.

第六節 MEB5 cells の神経幹細胞分化アッセイの条件設定

これまでの当研究室で用いていた神経幹細胞分化試験のマウス由来神経幹細胞 MEB5 cells の細胞播種条件 (2×10^4 cells/well, 24 well plate) では細胞同士が接触しておらず、細胞間での相互作用が起こらない為に Notch シグナルが動いていないことが予想された、Notch シグナルの阻害作用を試験する為の適切な条件の設定が必要であった。また、これまでに本細胞を用いた Notch シグナル関連の報告が無い為、本細胞が Notch シグナルに応答性を有しているかを調べる必要があった。その為本研究では、形質転換を用いた実験により MEB5 cells が Notch シグナルに対する応答性を有しているかを試験した。また、細胞播種数を増やすことで細胞同士を密着させ、Notch シグナルが動く条件を探す事とした。

初めに、形質転換実験に MEB5 cells が使用可能であるか試験する為、GFP タンパク質を発現する pEGFP-N1 を MEB5 cells に一過性導入し、MEB5 cells の形質転換効率を試験した。Poly-L-lysine, Fibronectin/Laminin でコーティングした 24 well plate に MEB5 cells を 2×10^4 cells/well 播種し、12 hr 後に分化用培地に交換すると同時にプラスミドを添加、その 24 hr 後に細胞プレパラートを作製し、蛍光の観察及び画像の取得を行なった。画像取得後は GFP 陽性細胞数/全細胞数を算出し、形質転換効率を算出した。pEGFP-N1 は千葉大学 生化学研究室 伊藤 素行教授より譲与頂いた物を ECOSTM Competent *E. coli* JM109 を用いて増量し、実験に使用した。

形質転換は各 well あたり以下の条件で行なった。(n=2 well, 4 pictures/well)

1. Lipofectamine 2000 1 μ L, pEGFP 500ng
2. Lipofectamine 2000 1.5 μ L, pEGFP 500ng
3. Lipofectamine 2000 2 μ L, pEGFP 500ng
4. Lipofectamine 2000 2.5 μ L, pEGFP 500ng
5. TransIT[®]-2020 Transfection Reagent 1.5 μ L, pEGFP 500ng
6. TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System 1.5 μ L, pEGFP 500ng

例として Lipofectamine 2000 2.5 μ L/well 添加時の取得画像を示す (Figure 2.5.1).

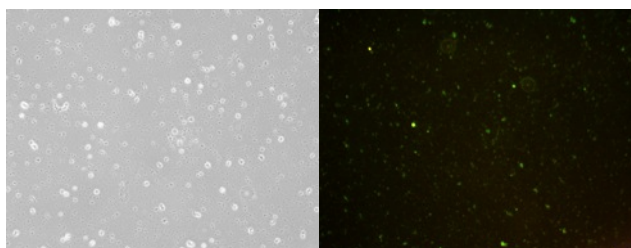


Figure 2.5.1 Transfection of MEB5 cells with pEGFP-N1. Left: bright field, Right: fluorescence

Table 2.5.1 Transfection ratios of MEB5 cells.

| | ① | ② | ③ | ④ | ⑤ | ⑥ |
|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|
| GFP ⁺ cell/total cell (%) | 17.2 | 12.5 | 22.0 | 36.6 | 16.1 | 18.1 |

その結果, Lipofectamine 2000 2.5 μ L/well 用いたとき, 最大の導入効率を得た (Table 2.5.1). その他のトランスフェクション試薬においても導入効率の改善は得られなかった. また, どの試薬においても細胞が凝集したような形の細胞が多く見られた. 試薬の細胞毒性が影響している可能性がある. この結果より, 以下の形質転換実験の形質転換試薬の添加条件として Lipofectamin 2000, 2.5 μ L/well を用いた.

次に, 目的のプラスミドである TP-1-luc, すなわち RBP-Jk binding site - luciferase 及び mNotch1-RAMIC すなわち pEF-BOSneo-mNotch1 RAMIC での MEB5 cells の形質転換を行い, Notch シグナルへの反応性の確認を行なった. 内部標準として pRL-CMV を同時に形質転換し, Dual-Glo[®] Luciferase assay system を用いて検出を行った. 以下の条件で形質転換を行った.

Poly-L-lysine, Fibronectin/Laminin でコーティングした 24 well plate に MEB5 cells を 2×10^4 cells/well 播種し, 12 hr 後に分化用培地に交換すると同時にプラスミドを添加, その 24hr 後に Firefly 及び Renilla Luciferase を順次検出した. プラスミドは以下の様に割振り形質転換を行なった.

- ① プラスミドなし
- ② pRL-CMV 25ng
- ③ TP-1-luc 400ng + pRL-CMV 25ng
- ④ TP-1-luc 400ng + RAMIC 20ng + pRL-CMV 25ng
- ⑤ TP-1-luc 400ng + RAMIC 100ng + pRL-CMV 25ng

ブランクとして条件②の Firefly 及び Renilla それぞれの Luciferase activity を用い計算した結果以下の結果を得た (Figure 2.5.2). その結果 MEB5 cells は mNotch1-RAMIC の形質転換量に比例して Luciferase activity が上昇したことから Notch シグナルに対して応答性を有す事が分かった.

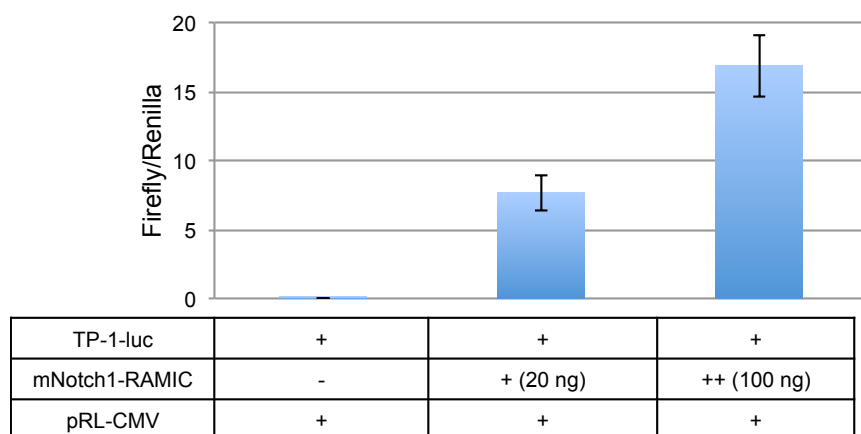


Figure 2.5.2 Relative luciferase activity of transfected MEB5 cells

次に細胞播種数の検討を行った。細胞播種数を検討する際、文献^[64]の試験条件を参考にするとともに、以下のことを指標とした。

1. Notch シグナル活性化の指標として、western blot を用いて NICD が検出可能である。
2. Notch 阻害剤 DAPT で NICD の減少等の阻害作用が確認できる。
3. 免疫染色で神経細胞のカウントが可能である。

文献での細胞播種数を参考に、以下の 6 条件の細胞播種数で Poly-L-lysine, Fibronectin/Laminin でコーティングした 24 well plate に播種し、12 hr 後に血清の除去と共に分化用培地に変更し 4 日間培養した後に免疫染色を行った。

- ① 2×10^4 cells/well (現在の細胞数)
- ② 1×10^5 cells/well (5x 現在の細胞数)
- ③ 2×10^5 cells/well (10x 現在の細胞数)
- ④ 4×10^5 cells/well (20x 現在の細胞数)
- ⑤ 2×10^6 cells/well (100x 現在の細胞数)
- ⑥ 2×10^4 cells/well (現在の播種数) で播種し、増殖培地で維持し、コンフルエントさせる。

以下に免疫染色の結果を示す (Figure 2.5.3).

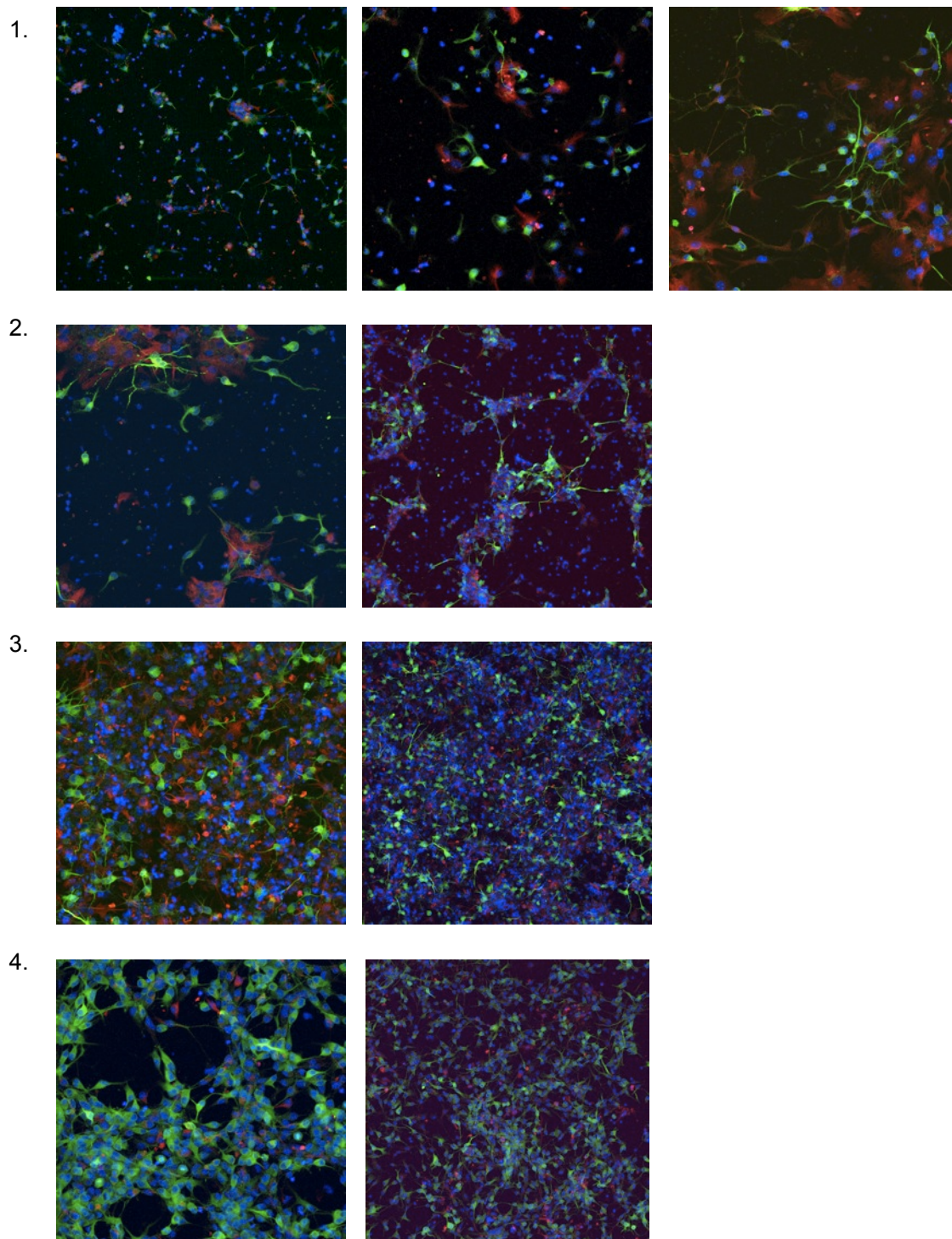


Figure 2.5.3 Immunostaining of MEB5 cells. Cell numbers (magnifications of objective)
 1. Left: ① 2×10^4 cells/well (x10), Center: ① 2×10^4 cells/well, (x20), Right: ② 1×10^5 cells/well (x20) 2.
 Left: ③ 2×10^5 cells/well (x20), Right: ④ 4×10^5 cells/well (x10) 3. Left: ⑤ 2×10^6 cells/well (x20), Right:
 ⑤ 2×10^6 cells/well (x10) 4. Left: ⑥ 2×10^4 cells/well (x20) Right: ⑥ 2×10^4 cells/well (x10)

参考文献^[65]の画像に近い細胞数が得られたのは④ 4×10^5 cells/well (20x) または⑤ 2×10^6 cells/well (100x) であった。他の条件では細胞の脱落によりこれまでの条件①と大きな変化は見られなかった。 2×10^4 cells/well で播種した後、コンフルエントさせる条件⑥では細胞数は良好であったが Tuj-1 (neuron marker), GFAP (astrocyte marker) で染色される細胞が増えてしまった。MEB5 cells は増殖用培地で単層培養を継続すると GFAP 陽性細胞が増加すると報告されているが^[66], 今回は Tuj-1 陽性細胞が比較的増えているようであった。Nestin 等の幹細胞マーカーでの染色により細胞の多分化能の確認を行ったのではないため正確ではないが、未分化な状態を維持できない可能性が示唆されたため、播種後にコンフルエントさせる条件は検討を中止した。

ここで、以前の条件 (2×10^5 cells/6 cm dish) で MEB5 cells で Notch1 及び NICD の検出が可能か試験した。



その結果 NICD は検出が出来なかったが、Notch1 ほどの時点でも検出が可能であった (Figure 2.5.4). この結果から、Notch シグナルが動く条件を設定すれば Notch1 が γ -secretase により切断を受け NICD が産生され、検出が可能になると考えられる。

次に、6 cm dish にて 4×10^6 cells/dish (20x) および 2×10^7 cells/dish (100x) で細胞を培養し、ウェスタンブロットにて NICD が検出可能であるか試験した。

4×10^6 cells/dish (20x)

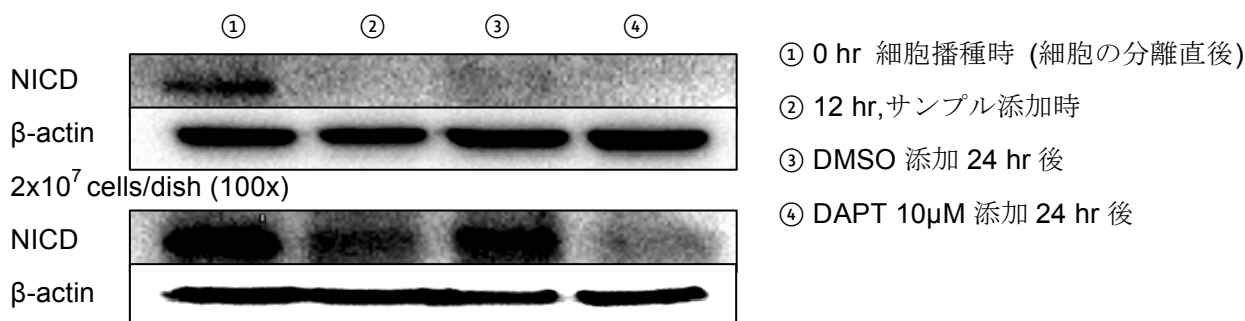


Figure 2.5.5 Western blot of MEB5 cells (4×10^6 cells/dish and 2×10^7 /dish). ①: after 0 hr ②: after 12 hr, ③, ④: 24 hr after addition of DMSO or 10 μ M of DAPT.

4×10^6 cells/dish においては、①の細胞播種時には NICD が検出可能であるがそれ以降の時点では検出ができなかった (Figure 2.5.5). この結果からスフィアの状態では Notch シグナルが動いているため、Notch 阻害作用が確認できる可能性がある。それ以降の時点で検出できなかった原因及びその解決策としては以下の事が挙げられる。

1. Notch シグナルが動いていないため NICD が産生されない。そのため細胞密度を上げることで産生させられる可能性がある。
2. NICD が産生される条件ではあるがタンパク質量が少ないため検出できない。この場合はウエスタンブロットが検出方法として用いることが出来ないため RT-PCR 等で検出をすることが可能であると考えられる。

2×10^7 cells/dish の結果、播種時、播種 12 hr 後及び DMSO 添加 12 hr 後においても NICD の検出が可能であった (Figure 2.5.5). この事からこの細胞播種数においては細胞間相互作用により Notch シグナルが活性化され、NICD が産生される事が示唆された。また、 $10 \mu\text{M}$ DAPT 添加 12 hr 後においては DAPT による NICD 量の減少が観察された。この結果から、この条件においては Notch 阻害剤による阻害作用が観察可能であると考えられる。

2×10^7 cells/dish において NICD を検出可能であったが、これは産生される NICD のタンパク質量が少なかった為、検出が出来なかったが、細胞数の増加に伴い、検出可能となった可能性が考えられる。この為、NICD が検出可能であった条件の半分の細胞数、 1×10^7 cells/dish (50x) でもウエスタンブロットを行った。

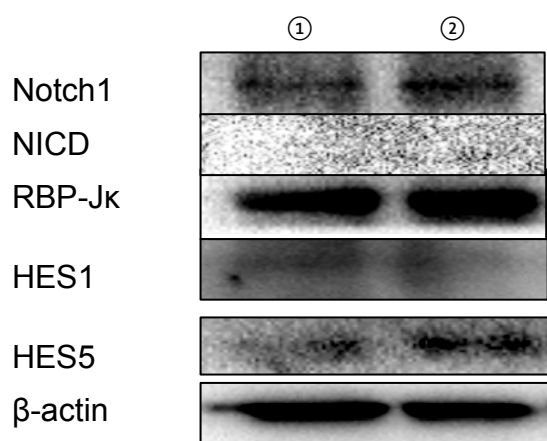


Figure 2.5.6 Western blot of MEB5 cell (1×10^7 cells/dish). ①: after 12 hr ②: 24 hr after of addition of DMSO.

その結果, 1×10^7 cells/dish (50x) においては NICD が検出できなかった. 2×10^7 cells/dish (100x) でのウェスタンブロットで検出された NICD のバンドは鮮明で, タンパク質量が半分減少しても検出が可能と考えられる事から, この細胞数以下では単に NICD タンパク質の量が少ない為に NICD が検出できないのではなく, 産生されていない, すなわち Notch シグナルが動いていないために NICD の検出が出来なかったと考えられる.

以上の結果から Notch シグナルが活性化する細胞播種数としてはこれまで当研究室で神経分化アッセイに用いていた細胞数の 100 倍, 1×10^7 cells/6 cm dish, 2×10^6 cells/well (24 well plate) の細胞数が必要である事が分かった. この条件では, DAPT (γ -secretase 阻害剤) による NICD の減少が確認できる可能性がある.

これまでに得た結果より, 細胞播種数を増加させることで NICD が検出可能であった事からその条件を用いて TP-1-luc による形質転換を再度同様の手法を用いて行い, 2×10^6 cells/well (24 well plate) で播種した際の Notch シグナルの活性化を確認した.

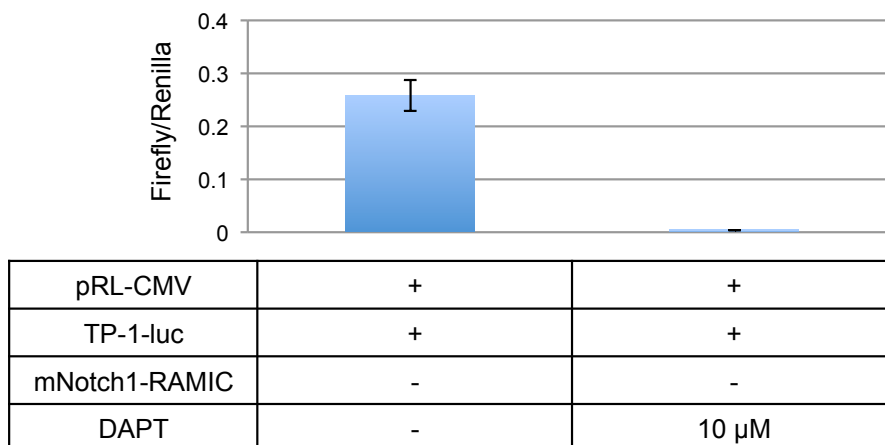


Figure 2.5.7 Relative luciferase activity of transfected MEB5 cells (2×10^6 cells/well).

その結果, 2×10^6 cells/well において MEB5 cells は mNotch1-RAMIC の形質転換なしに Luciferase 活性が上昇した (Figure 2.5.7). また, DAPT (10 μ M) の添加によりその Luciferase 活性が減少する事が分かった. この事から MEB5 cell は 2×10^6 cells/well においては Notch シグナルが動いている事, そして Notch 阻害剤による阻害作用が観察できる事が分かった. しかし, この細胞数を得る為には大量の細胞培養が必要である. また, 免疫染色後の観察においても, アストロサイトの細胞数の定量が困難であるなど不利な点があるため改善の余地がある. 以上の結果より細胞播種数を 2×10^7 cells/6 cm dish, 2×10^6 cells/well (24 well plate) と決定し, 単離化合物の活性評価を行った.

第七節 単離化合物の神経幹細胞分化に与える影響の評価

C. gigantea より得られた Notch シグナル阻害剤のうち **11** についてマウス由来神経幹細胞 MEB5 の分化に対する影響を評価した。これまでに設定したアッセイ条件を用いて評価を行った。Positive control として 10 μ M DAPT を用いた。以下に免疫染色により取得した画像を示す (Figure 2.6.1)。

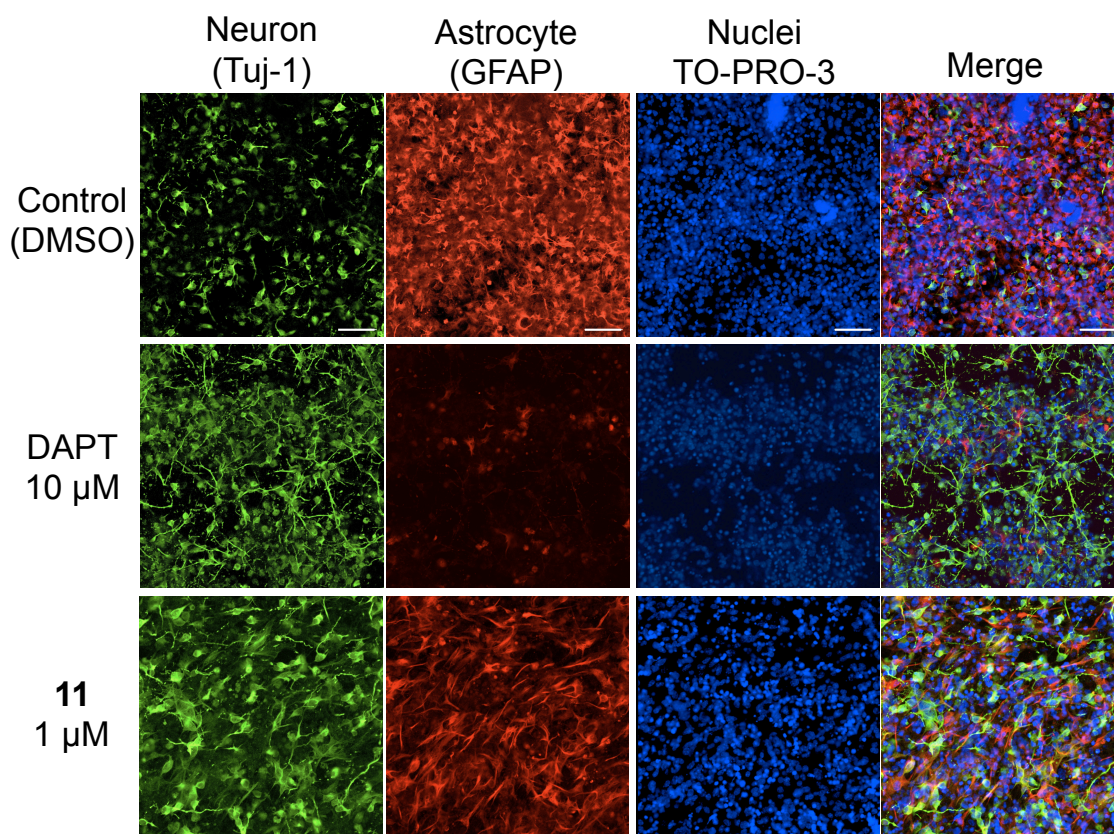


Figure 2.6.1 Immunostaining of MEB5 cells after treatment of DMSO, 10 μ M of DAPT and 1 μ M of **11**.

免疫染色の結果, DAPT 及び **11** の添加により Control 群と比べ, neuron が増加し, astrocyte が減少する事が分かった。さらに neuron について顕微鏡画像より細胞数を計測した (Figure 2.6.2)。その結果 DAPT 及び **11** はコントロールに比べ MEB5 cells を neuron にそれぞれ 59%, 70% 多く分化させることが分かった (Figure 2.6.2)。また, neuron の神経突起について調べると DAPT 及び **11** はコントロールに比べそれぞれ 6.3 μ m (43%), 5.3 μ m (26%) 長く伸展させることが分かった。

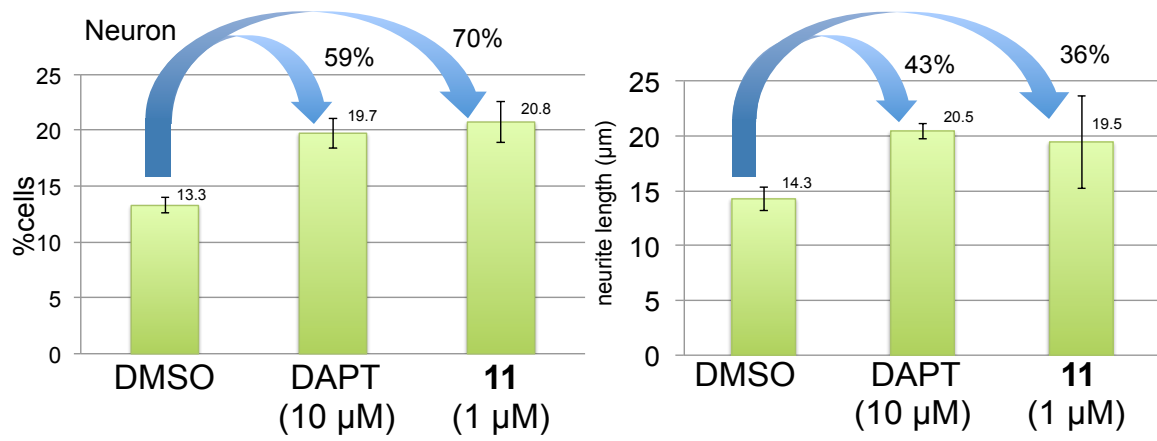


Figure 2.6.2 %cells of neurons and neurite length of MEB5 cells after treatment of DMSO and 10 μM of DAPT and 1 μM of 11.

小括 Notch シグナル伝達経路阻害剤探索

Notch シグナル阻害作用を指標に当研究室保有のバングラデシュ産植物エキスイブラリー KKB1-343 に対しスクリーニングを行ない、22 種のエキス、19 種の植物に Notch シグナル阻害活性を見いだした。本研究では KKB69 *Calotropis gigantea* を選出し、実験を行った。*C. gigantea* より単離された 8 種の化合物に Notch シグナル阻害活性を見いだした。**11** について作用機序解析を行なうとアッセイ細胞において標的遺伝子である HES1 及び HES5, RBP-J κ , γ -secretase の構成タンパク質を減少させることが分かった。Notch シグナルの標的遺伝子の発現を減少させたことから、**11** が Notch シグナルを阻害している事が確認された。また、RBP-J κ の分解に関わる proteasome 及び lysosome 系への影響を調べると、各経路の阻害剤との併用によりタンパク質量が回復したことから **11** は RBP-J κ の減少を促進させる事が示唆された。このように **11** は RBP-J κ 及び γ -secretase を減少させ Notch シグナルを阻害する事が示唆された。また、マウス由来神経幹細胞 MEB5 cells を用い、Notch シグナルの活性化した条件での神経分化アッセイの条件を設定し活性評価を行った。その結果、**11** がコントロールと比べ neuron への分化を 70 %、神経突起の伸展を 5.3 μ m 促進する事が分かった。**11** はポジティブコントロールとして用いた DAPT (10 μ M) よりも低濃度において同程度の神経分化促進作用を示す事が分かった。

総括

本研究では新たな医薬品シードの発見を目指し、癌の発生及び拡大に関わる Hedgehog シグナル伝達経路阻害剤及び神経幹細胞の分化に関わる Notch シグナル伝達経路の阻害剤の探索を天然物より行なった。各阻害剤の植物エキストラライブラリーのスクリーニングを当研究室で構築されたレポーターアッセイ系を用いて行なった。Hedgehog シグナル阻害剤の開発では SMO の阻害作用が、Notch シグナル阻害剤は γ -secretase 阻害作用がそれぞれ主要なターゲットとされているが、本研究ではその他の作用機序を有す阻害剤を得た。

第一章では GLI1 転写阻害活性を指標にタイ産カホン科植物の *Themeda arguens* の全草 MeOH 抽出物より分画を行ない GLI1 転写阻害剤として aciculatin (1), 8-C- β -D-digitoxopyranosylapigenin (2), 8-C- β -D-boivinopyranosylapigenin (3) および aciculatinone (4) を単離した。1-4 の構造を比較すると GLI1 転写阻害活性には 7 位メトキシ基及び糖部 3' 位水酸基が活性に重要である事が示唆された。1 及び 3 は Hedgehog シグナルの異常亢進が報告されている前立腺癌 DU-145 cells 及び乳癌細胞 MCF-7 cells に対し細胞毒性を示した。一方で正常細胞 C3H10T1/2 に対して毒性を示さなかった。この事から GLI1 転写阻害活性と癌細胞に対する細胞毒性に相関が見られた。また、1 は DU-145 cells において hedgehog シグナルの標的遺伝子である Hedgehog リガンド受容体 PTCH 及び抗アポトーシスタンパク質 BCL2 を減少させた。

また、バングラデシュ産ナス科植物の *Withania somnifera* の葉部 MeOH 抽出物より分画を行ない、withaferin A (5), 27-deoxywithaferin A (6), 5,6-deoxywithaferin A (7), 2,3-dihydroxywithaferin A (8), 2,3-dihydro-3 β -methoxywithaferin A (9), 2,3-dihydro-3 β -O-sulfate withaferin A (10) を単離した。5-10 の構造を比較すると、GLI1 転写阻害活性には 2-3 位を含む α β 不飽和カルボニル及び 5-6 位エポキシ基が重要である事が示唆された。5, 6, 7 及び 10 は Hedgehog シグナルの亢進した癌細胞に対して毒性を示したが、同時に正常細胞に対しても毒性を示した。一方、8 及び 9 は 25 μ M 以下では細胞毒性を示さなかった。また、5, 6 及び 7 はアッセイ細胞及び膵臓癌細胞 PANC-1 cells において PTCH 及び BCL2 を減少させた。

GLI1 タンパク質と DNA との複合体形成阻害作用を検討する EMSA に使用する GST-GLI1 タンパク質の精製条件を検討し、以前の条件よりも UV スペクトルにおいて A_{260}/A_{280} に改善が見られたことから DNA の混入の少ない条件での精製が可能になった。その GST-GLI1 タンパク質を用いた EMSA を行い、1 及び 5 が DNA-GLI1 の複合体バンドを減少させた事から、1 及び 5 が DNA と GLI1 タンパク質の複合体形成を直接阻害する事が分かった。

Notch シグナル阻害活性を指標にバングラデシュ産植物エキスイブラリーのスクリーニングを行い 22 種のエキスに阻害活性を見いだした。KKB69 *Calotropis gigantea* を選出し実験を行ない、8 種の単離化合物、Uscharin (11), asclepin (12), 2''-oxovoruscharin (13), calotropin (14), Voruscharin (15), Uscharidin (16), calactinic acid methyl ester (17), 16- β -hydroxyuscharin (18) に Notch シグナル阻害活性を見いだした。11 についてタンパク質発現量に対する影響を評価するとアッセイ細胞において Notch シグナルの標的遺伝子 HES1 及び HES5, RBP-J κ 及び γ -secretase を減少させた。RBP-J κ の分解に関わる proteasome 及び lysosome 系への影響を調べるため、各経路の阻害剤との併用によりタンパク質量が回復したことから 11 は RBP-J κ の減少を促進させる事が示唆された。このように 11 は RBP-J κ 分解促進及び γ -secretase を減少させる事で Notch シグナルを阻害する事が示唆された。

また、マウス由来神経幹細胞 MEB5 cells を用い、Notch シグナルの活性化した条件での神経分化アッセイの条件として、これまで神経幹細胞分化アッセイに用いていた細胞数の 100 倍 (2×10^6 cells/well, 24 well plate もしくは 2×10^7 cells/6 cm dish) においては Notch シグナルが活性化している事が分かったため、これをアッセイ条件として設定し、活性評価を行った。その結果、11 がコントロールと比べ neuron への分化を 70 %、神経突起の伸展を 5.3 μ m 促進する事が分かった。11 はポジティブコントロールとして用いた DAPT (10 μ M) よりも低濃度において同程度の神経分化促進作用を示す事が分かった。更なる作用機序の解明により単離化合物の生物活性への理解を深めたい。

本研究で明らかとなった GLI1 転写阻害剤及び Notch シグナル阻害剤が、新たな薬剤の開発に貢献する事を願う。

実験の部

使用機器・試薬

化合物の単離・構造決定においては各種機器分析には以下の装置及び試薬を用いた。

カラムクロマトグラフィー: PSQ 100B, 富士シリシア化学
Silica Gel N60 (spherical, neutral), 関東化学
Chromatorex ODS; 富士シリシア化学
Diaion HP-20, 三菱化学
Sephadex LH-20, GE Healthcare

TLC plate: Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck
RP-18 F₂₅₄S, Merck

有機溶媒: :メタノール 関東化学 (試薬一級), 大伸化学
エタノール 関東化学
アセトン 関東化学 (試薬一級), 大伸化学
アセトニトリル (試薬一級), 関東化学
クロロホルム (試薬一級), 関東化学
ヘキサン (試薬一級), 関東化学
酢酸エチル (試薬一級), 関東化学, 大伸化学

高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) には分析用として島津製作所製の, システムコントローラー (SCL-10AVP), ダイオードアレイ検出器 (SPD-M20A), オンラインデガッサー (DGU-12A), オートサンプラー (SIL-20A), カラムオーブン (CTO-10ASVP) 及び送液ユニット (LC-20AD) を用い, Waters 製の, コントローラー (600 controller), ダイオードアレイ検出器 (2996, Photodiode Array Detector), 送液ユニット (600 Pump) 及びデガッサー (In-Line Dwgasser AF) を用いた。また, 分取には日本分光製の, 送液ユニット (PU-2080Plus 又は PU-980), RI 検出器 (RI-2031Plus 又は RI-1530), UV/VIS 検出器 (UV-2075Plus 又は UV-1575) を用いた。

カラムには Develosil ODS-MG-5 ($\phi 10 \times 250$ mm, 野村化学), YMC-Pack Pro C18 ($\phi 10 \times 250$ mm, YMC), YMC-Pack ODS-AM ($\phi 10 \times 250$ mm, YMC), COSMOSIL 5C₁₈-AR-II ($\phi 10 \times 250$ mm, Nacalai tesque), COSMOSIL Cholester ($\phi 10 \times 250$ mm, Nacalai tesque), COSMOSIL Cholester ($\phi 20 \times 250$ mm, Nacalai tesque), COSMOSIL 5CN-MS ($\phi 10 \times 250$ mm, Nacalai tesque), COSMOSIL π NAP ($\phi 10 \times 250$ mm, Nacalai tesque) を用いた.

呈色試薬:

10 % 硫酸

H₂O 476 mL

硫酸 (Wako) 17 mL

アニスアルデヒド硫酸

EtOH (Kanto Chemical) 478 mL

濃硫酸 (Wako) 18 mL

酢酸 (Wako) 5 mL

p-アニスアルデヒド (Kanto Chemical) 13 mL

リンモリブデン酸エタノール

リンモリブデン酸 25 g

EtOH 500 mL

核磁気共鳴 (NMR: nuclear magnetic resonance) は ECZ600 spectrometer (JEOL, ¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz), ECP600 spectrometer (JEOL, ¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz), ECA600 spectrometer (JEOL, ¹H: 600 MHz, ¹³C: 150 MHz) 及び ECP400 spectrometer (JEOL, ¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz) を用いて測定した. NMR の化学シフト (chemical shift) δ は ppm で表し, 結合定数 (coupling constant) J は Hz で示した.

測定溶媒:

Chloroform-*d*₁ (関東化学): ¹H: 7.26 ppm, ¹³C: 77.0 ppm

MeOH-*d*₄ (関東化学): ¹H: 4.78, 3.30 ppm, ¹³C: 49.0 ppm

acetone-*d*₆ (関東化学): ¹H: 2.04 ppm, ¹³C: 206.5, 29.8 ppm

DMSO-*d*₆ (関東化学): ¹H: 2.49 ppm, ¹³C: 39.7 ppm

pyridine-*d*₅ (Acros Organic): ¹H: 8.71, 7.55, 7.19 ppm, ¹³C: 149.2, 135.5, 123.5 ppm

旋光度計は P-1020 digital polarimeter (JASCO) を用いた.

ESIMS 及び HRESIMS は AccuTOF LC-plus mass spectrometer (JEOL) を用いた. また, LC-MS には島津製作所の物を用い, 送液ユニット (LC-20AT), インラインデガッサー (DGU-20A₃), オートサンプラー (SIL-20A), PDA 検出器 (SPD-M20A), バルブユニット (FCV-20AH₂), 質量分析装置 (LCMS-2020), N₂ ジェネレーター (N₂ Supplier Model 24F), LC ワークステーション (Labsolution LCMS) を用いた.

細胞培養

各細胞の培養条件を以下に示す.

Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest, Sigma) は, 補体を失活させるため, 56 °C, 30 分間の加熱処理を行い, 非動化を行ったものを使用した.

Assay cells (HaCaT-GLI1-luc cell)

DMEM (high glucose, Wako)

5 % FBS

Penicillin (200 unit/mL) / Streptomycin (200 mg/mL) (Gibco)

アッセイ時の GLI1 の発現誘導には tetracycline (Invitrogen) を用いた.

PANC-1 cells (RIKEN BRC)

DU-145 cells (Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University)

RPMI-1640 (Wako)

10% FBS

C3H10T1/2 cells (RIKEN BRC)

MCF-7 cells (RIKEN BRC)

DMEM (high glucose)

10% FBS

Assay cells (LS174T cells/Tet-on-NICD, pGL4.20-TP-1)

DMEM (high glucose)

10% FBS

Penicillin (200 unit/mL) / Streptomycin (200 mg/mL) (Gibco)

細胞剥離には, Trypsin EDTA (0.25 % Trypsin-EDTA, Gibco) を用いた. 細胞計測には Trypan blue 溶液 (0.4 % (w/v) trypan blue, Nacalai tesque) を用い, 顕微鏡下で行った.

PBS (-) は, 以下の組成を用いた

| | |
|---|-----------|
| KCl (Wako) | 0.2 g |
| KH ₂ PO ₄ (Wako) | 0.2 g |
| NaCl (Wako) | 8.0 g |
| Na ₂ HPO ₄ (Nacalai tesque) | 1.11 g |
| dH ₂ O | up to 1 L |

上記組成の物をオートクレーブした後用いた.

細胞培養は, CO₂インキュベーター (MCO-17A1C, SANYO) にて 37 °C, 5 % CO₂にて行った. また, 細胞培養の操作は, クリーンベンチ (Bio Clean Bench MCV-B131S, SANYO) 内でおこなった. 細胞培養に用いた plate の震盪には Microplate mixer MPX-96 (Iwaki), マイクロプレートリーダーは蛍光測定には Fluoroskan Ascent™ (Thermo) を, 化学発光測定は Luminoskan Ascent™ (Thermo) を用いた.

Themeda arguens の GLI1 転写阻害活性を指標とした分画

試料である *Themeda arguens* は、2008 年 Thailand にて小谷野喬氏により採取されたものを用いた。

Themeda arguens の全草 (183.9 g) を MeOH (1L x 2 回) で抽出し、得た MeOH 抽出物 (15.4 g) を Diaion HP-20 カラム (ϕ 10x230 mm) に伏し、H₂O:MeOH:acetone 1:1:0, 0:1:0,0:1:1, 0:0:1 で溶出させ、Fr.1A-1F を得た。GLI1 転写阻害作用は 1D, 1E に移行した。Fr.1D (2.2 g) を CHCl₃:MeOH 系を、用いたシリカゲルカラムカラムクロマトグラフィー (ϕ 60x240 mm) により分画し、Fr.2A-2N を得た。活性は 2D, 2E に認められた。Fr.2D (34.2 mg) を H₂O:MeOH (4:6-0:1) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 12x210 mm) で分画し、Fr.3A-3H を得た。活性は Fr.3C-3H に認められた。Fr.3E (11.2 mg) を ODS HPLC (Develosil ODS-MG-5, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し、**1** (Fr.4C, 4.8 mg, t_R 45 min) および **2** (Fr.4D, 2.3 mg, t_R 49 min) を得た。Fr.2E (44.0 mg) を H₂O:MeOH (9:1-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 12x220 mm) により Fr.5A-5I を得た。活性は 5F 及び 5G に認められた。Fr.5G (8.7 mg) を ODS HPLC (Develosil ODS-MG-5, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (53:47), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し、**2** (6B, 2.4 mg, t_R 64 min) および **3** (6C, 1.3 mg, t_R 69 min) を得た。Fr.1E (2.5 g) を CHCl₃:MeOH 系混合溶媒を用いたシリカゲルクロマトグラフィー (PSQ 100B, ϕ 25x240 mm) により Fr.7A-7M を得た。活性は 7C-7G に認められた。Fr.7C (159.9 mg) を H₂O:MeOH (1:1-0:1, 0:1+0.1% TFA) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (18x300 mm) により分画し、Fr.8A-8M を得た。活性は 8D-8H に認められた。Fr.8E (10.6 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min), にて分取し、Fr.9A-9D を得た。Fr.9D の NMR を測定、構造解析を行うと **4** である事が明らかとなったが不純物が確認されたためさらに MeOH を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 12x340 mm, eluent MeOH) にて精製し、**4** (Fr.10 C, 1.1 mg) を得た。Fr.7E (266.0 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1)を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 24x230 mm) により分画し、Fr.11A-11I を得た。活性は 11E-11H に認められた。Fr.11F (45.3 mg) を CHCl₃:MeOH (1:1) を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 15x430 mm) により分画し、Fr.12A-12D を得た。Fr.12B (23.7 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (54:46), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し、Fr.13A-13F を得た。

Fr.13D (18.8 mg, t_R 32 min) を ODS HPLC (Cosmosil 5CN-MS, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (45:55), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて精製し, **1** (16.3 mg, t_R 12 min) を得た. Fr.12C (20.2 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow rate 3.0 mL/min) にて分取し, **2** (12.7 mg, t_R 66 min) を得た.

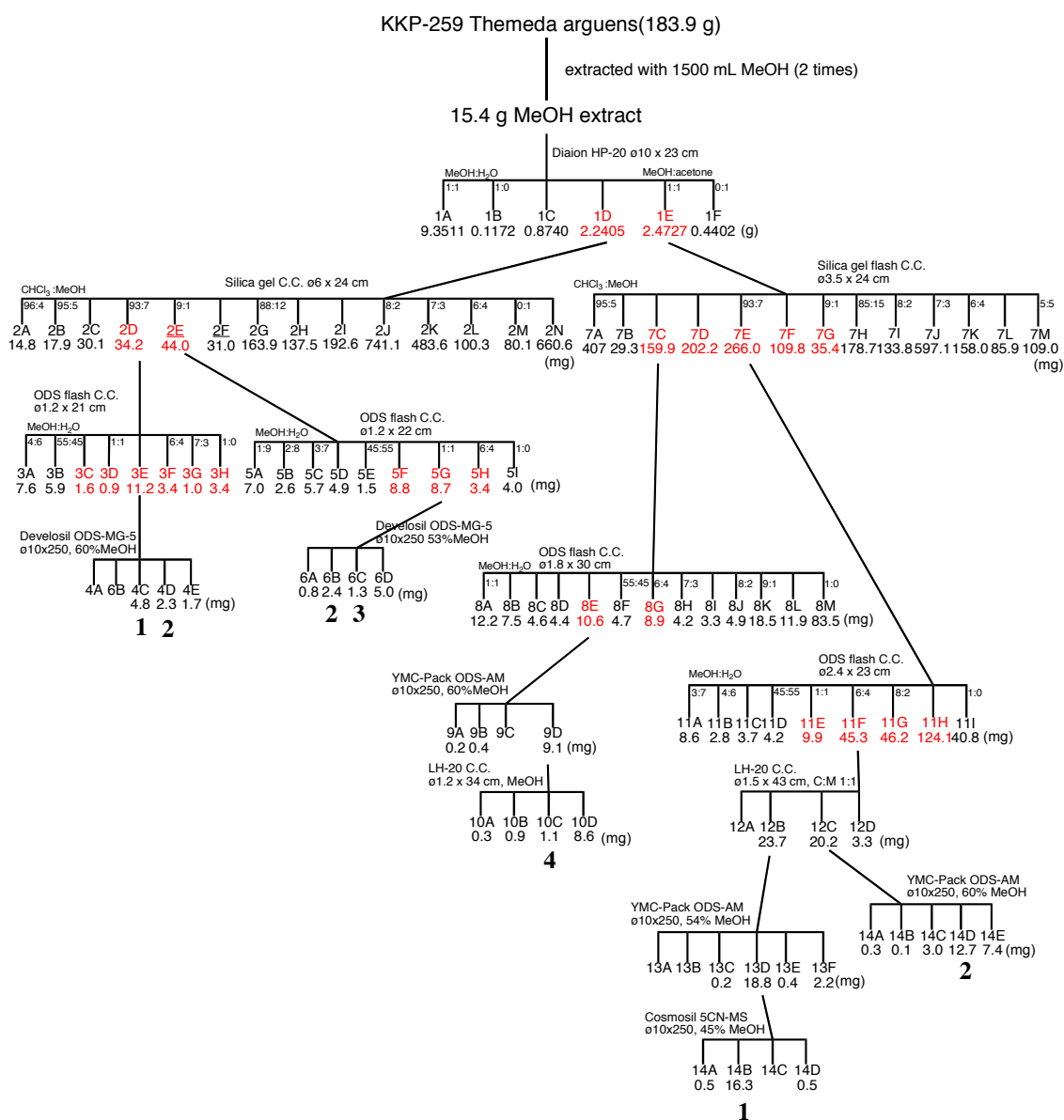


Figure I . Separation of MeOH extract of *T. argens*. Red: active fractions

aciculatin (**1**) yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{25} +13$ (c 0.5, MeOH), ^1H and ^{13}C NMR data, Table, ESIMS m/z 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 437 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

8-C- β -D-digitoxopyranosylapigenin (**2**) yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{24} +101$ (c 1.0, MeOH), ^1H and ^{13}C NMR data, Table, ESIMS m/z 415 $[\text{M}+\text{H}]^+$

8-C- β -D-boivinopyranosylapigenin (**3**) yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{24} +70$ (c 0.2, MeOH), ^1H and ^{13}C NMR data, Table, ESIMS m/z 401 $[\text{M}+\text{H}]^+$

aciculatinone (**4**) yellow amorphous solid; $[\alpha]_D^{24} +79$ (c 0.27, MeOH), ^1H data, Table, ESIMS m/z 413 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Table I. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **1** and **2**.

| | 1 in CDCl_3 : $\text{CD}_3\text{OD} = 1:1$ | | 2 in acetone- d_6 | |
|--------|--|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) |
| 2 | 164.9 | | 164.7 | |
| 3 | 102.1 | 6.59 (s, 1H) | 103.6 | 6.67 (s, 1H) |
| 4 | | | 183.2 | |
| 5 | 160.9 | | 162.1 | |
| 6 | 93.6 | 6.44 (s, 1H) | 100.3 | 6.17 (s, 1H) |
| 7 | 162.5 | | 163.2 | |
| 8 | 106.9 | | 105.4 | |
| 9 | 102.2 | | 154.3 | |
| 10 | 155.3 | | 105.2 | |
| 1' | 121.8 | | 123.0 | |
| 2', 6' | 128.4 | 7.97 (d, 2H, 8.8) | 129.5 | 8.07 (d, 2H 8.8) |
| 3', 5' | 115.4 | 6.96 (d, 2H, 8.8) | 116.9 | 7.01 (d, 2H, 8.8) |
| 4' | 128.3 | | 162.1 | |
| -OMe | 65.3 | 3.93 (s, 3H) | | |
| 1" | 35.8 | 5.64 (d, 1H, 11.5) | 70.3 | 5.76 (dd, 1H 11.4, 1.8) |
| 2"ax" | 35.8 | 2.60 (dd, 1H, 14, 11.5) | 38.9 | 2.14 (d, 1H, 14, 11.4) |
| 2"eq" | 67.3 | 1.86 (d, 1H, 14) | | 2.20 (dd, 1H, J 14, 1.8) |
| 3" | 73.1 | 4.16 (d, 1H, 2.2) | 68.0 | 4.17 (d, 1H, 2.0) |
| 4" | 72.4 | 3.49 (dd, 1H, 9.2, 2.2) | 73.6 | 3.48 (dd, 1H, 9.2, 2.0) |
| 5" | 17.7 | 3.96 (dd, 1H, 9.2, 6.2) | 74.7 | 4.00 (dq, 1H, 6.4, 9.2) |
| 6" | 55.5 | 1.39 (d, 3H, 6.2) | 18.7 | 1.38 (d, 3H, 6.4) |
| 5-OH | | | | 12.95 (s, 1H) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

Table II. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **3** and **4**.

| | 3 in acetone- d_6 | | 4 in acetone- d_6 |
|-------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{H} (J, Hz) |
| 2 | 164.7 | | |
| 3 | 103.8 | 6.65 (s, 1H) | 6.70 (s, 1H) |
| 4 | 183.2 | | |
| 5 | 162 | | |
| 6 | 100.5 | 6.17 (s, 1H) | 6.49 (s, 1H) |
| 7 | 163.7 | | |
| 8 | 106.4 | | |
| 9 | 153.8 | | |
| 10 | 105 | | |
| 1' | 123.2 | | |
| 2',6' | 129.4 | 8.01 (d, 2H, 8.8) | 8.08 (d, 2H, 8.8) |
| 3',5' | 116.9 | 6.99 (d, 2H, 8.8) | 7.06 (d, 2H, 8.8) |
| 4' | 162.1 | | |
| -OMe | | | 3.97 (s, 3H) |
| 1" | 70.3 | 5.76 (dd, 12, 2.4) | 5.40 (dd, 1H, 12.0, 2.8) |
| 2"ax" | 33.9 | 1.85 (d, 1H, 13.2) | 2.51 (dd, 1H, 13.6, 2.8) |
| 2"eq" | | 2.34 (dd, 1H, 13.2, 12) | 3.55 (dd, 1H, 12.0, 1.6) |
| 3" | 68.2 | 4.11 (d, 1H, 2.4) | |
| 4" | 70.4 | 3.52 (d, 1H, 2.4) | 4.09 (d, 1H, 10.0) |
| 5" | 72.9 | 4.28 (q, 1H, 6.4) | 3.60 (m, 1H) |
| 6" | 17.3 | 1.30 (d, 3H, 6.4) | 1.48 (d, 1H, 6.4) |
| 5-OH | | 12.95 (s, 1H) | 13.44 (s, 1H) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

Withania somnifera の GLI1 転写阻害活性を指標とした分画

試料である *W. somnifera* は, 2010 年 Bangladesh にて採取されたものを用いた.

Withania somnifera の葉部 (101.5 g) を MeOH (1L x3 回) で抽出し, 得た MeOH 抽出物 (22.8 g) を H₂O:MeOH:acetone (1:1:0, 0:1:0, 0:1:1, 0:0:1) を用いた Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ø50x200 mm) にて分画し, Fr.1A-1E を得た. GLI1 転写阻害作用は 1C, 1D に移行した. Fr.2I (1252.0 mg) から 6.25 mg を用い, EtOAc:CHCl₃ を用いて再結晶により精製する事で **5** (5.8 mg) を得た. Fr.2F (201.0 mg) を H₂O:MeOH (6:4-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø12x192 mm) により Fr.3A-3K に分画した. 活性は 3F 及び 3I に認められた. Fr.3F (48.4 mg) を hexane:EtOAc:CHCl₃:MeOH (6:4:0:0-0:0:0:1) を用いたカラムクロマトグラフィー (ø12x360 mm) により精製し, **6** (Fr.6D, 25.3 mg) を得た. Fr.2H (66.2 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø15x276 mm) により精製し, **8** (Fr.7H, 7.8 mg) を得た. Fr.2J (573.4 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø29x285 mm) により分画し, Fr.5A-5J を得た. 活性は 5E に認められた. Fr.5E (64.5 mg) を CHCl₃:MeOH (1:0-0:1) を用いたグラジエント系でのシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ø17x370 mm) により精製し, **8** (Fr.8E, 2.0 mg) を得た. Fr.8F (27.8 mg) は ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (6:4), wavelength 254 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **5** (Fr.11B, 20.89 mg, *t_R* 19 min) 及び **9** (Fr.11C, 2.4 mg, *t_R* 22 min) を得た. Fr.1C (0.9 g) は CHCl₃:MeOH (9:1-0:1) を用いたグラジエント系でのシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica N60, ø17x370 mm) により分画し, Fr.9A-9H を得た. 活性は 9E 及び 9F に認められた. Fr.9F (21.66 mg) を H₂O:MeOH (7:3-0:1) を用いたグラジエント系での ODS カラムクロマトグラフィー (ø17x270 mm) により分画し Fr.10A-10D を得た. 活性は 10A 及び 10C に認められた. Fr.10A (16.87 mg) は ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (35:65), wavelength 254 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **10** (Fr.13A, 4.4 mg, *t_R* 14 min) を得た.

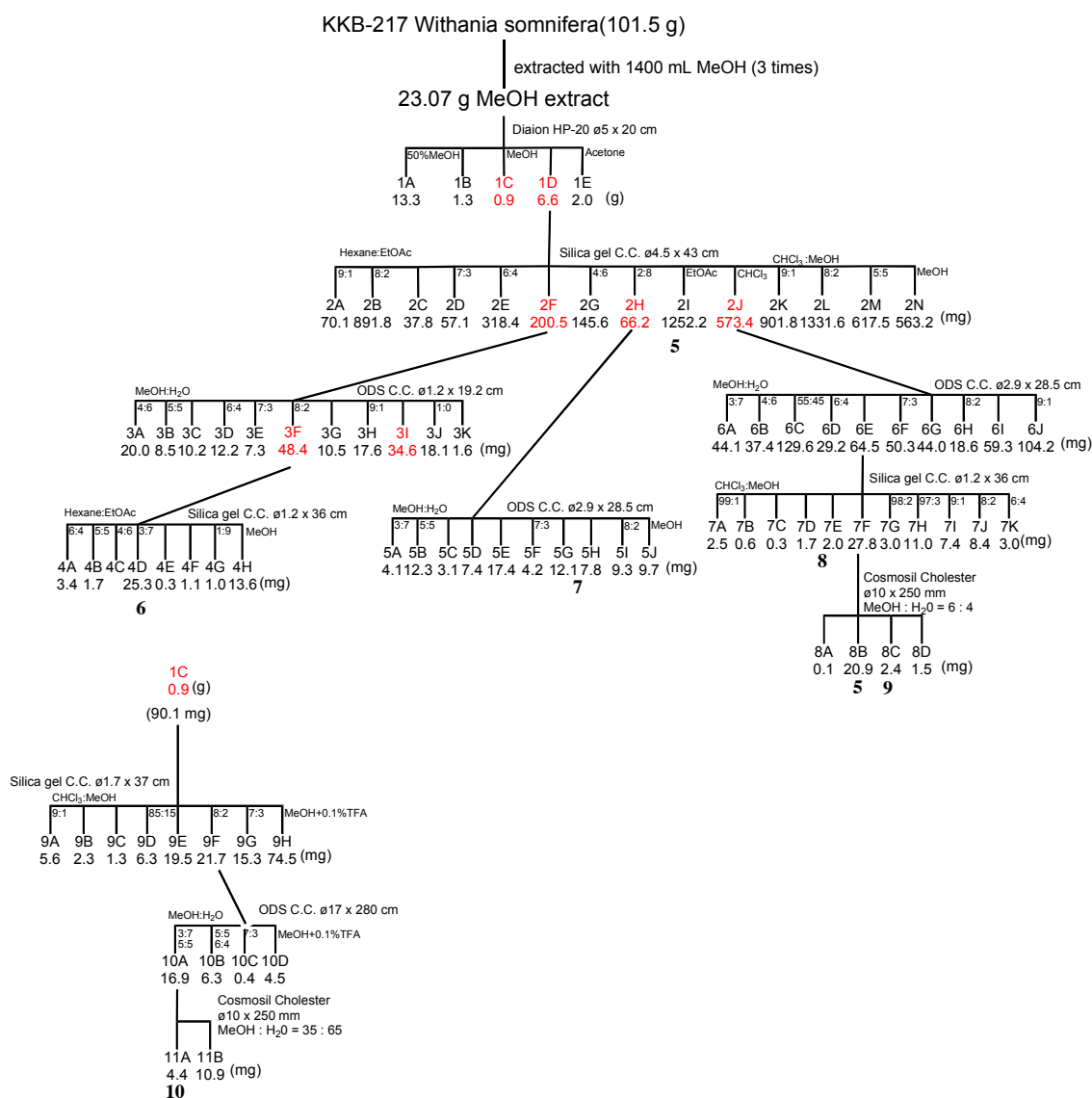


Figure II. Separation of MeOH extract of *W. somnifera*. Red: active fractions.

withaferin A (**5**) white crystal; $[\alpha]_D^{21} +114$ (c 0.56, CHCl₃), ¹H and ¹³C NMR data, Table; ESIMS *m/z* 469 [M-H]⁻

27-deoxywithaferin A (**6**) white crystal; $[\alpha]_D^{16} +268$ (c 0.5, CHCl₃), ¹H data, Table; ESIMS 453 [M-H]⁻, *m/z* 455 [M+H]⁺ and 477 [M+Na]⁺

5,6-deoxywithaferin A (**7**) white crystal; $[\alpha]_D^{25} +68$ (c 0.17, CHCl₃), ¹H and ¹³C NMR data, Table; ESIMS *m/z* 477 [M+Na]⁺

2,3-dihydroxywithaferin A (**8**) white crystal; $[\alpha]_D^{24} +12$ (c 0.91, CHCl₃), ¹H data, Table; $[\alpha]_D^{25} +68$ (c 0.17, CHCl₃), ESIMS *m/z* 471 [M-H]⁻ and 473 [M+H]⁺

2,3-dihydro-3β-methoxywithaferin A (**9**) white crystal; $[\alpha]_D^{25} +0.8$ (c 1.0, dioxane), ¹H and ¹³C NMR data, Table; ESIMS *m/z* 504 [M+H]⁺ and 526 [M+Na]⁺,

2,3-dihydro-3β-O-sulfate withaferin A (**10**) white crystal; $[\alpha]_D^{26} +22$ (c 0.21, MeOH), ¹H and ¹³C NMR data, Table; ESIMS *m/z* 567 [M-H]⁻

Table III. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **5** and **6**.

| | 5 in CDCl_3 | | 6 in CDCl_3 |
|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{H} (J, Hz) |
| 1 | 202.3 | | |
| 2 | 132.3 | 6.18 (d, 1H, 10) | 6.19 (d, 1H, 9.6) |
| 3 | 142.0 | 6.91 (dd, 1H, 10, 6) | 6.91 (dd, 1H, 9.6, 6) |
| 4 | 69.9 | 3.73 (d, 1H, 5.6) | 3.75 (d, 1H, 6) |
| 5 | 63.8 | | |
| 6 | 62.5 | 3.21 (s, 1H) | 3.21 (s, 1H) |
| 7 | 29.8 | 2.12 (dd, 1H, 16, 3.2) | |
| | | 1.30 (m) | |
| 8 | 31.1 | 1.39 (m) | |
| 9 | 44.1 | 1.14 (m) | |
| 10 | 47.7 | | |
| 11 | 22.1 | 1.27 (m) | |
| | | 1.18 (m) | |
| 12 | 27.3 | 1.88 (m) | |
| | | 1.08 (m) | |
| 13 | 42.6 | | |
| 14 | 56.1 | 0.95 (m) | |
| 15 | 24.3 | 1.64 (m) | |
| | | 1.13 (m) | |
| 16 | 39.3 | 1.66 (m) | |
| | | 1.35 (m) | |
| 17 | 51.9 | 1.07 (m) | |
| 18 | 11.6 | 0.68 (s, 3H) | 0.68 (s, 3H) |
| 19 | 17.4 | 1.39 (s, 3H) | 1.39 (s, 3H) |
| 20 | 38.8 | 1.97 (m) | |
| 21 | 13.3 | 0.97 (d, 3H, 6.8) | 0.97 (d, 3H, 6.6) |
| 22 | 78.7 | 4.39 (dt, 1H, 17.2, 3.5) | 4.33 (dt, 1H, 12.6, 1.8) |
| 23 | 29.8 | 2.47 (dd, 1H, 17.2, 13.6) | |
| | | 1.94 (m) | |
| 24 | 152.8 | | |
| 25 | 125.7 | | |
| 26 | 167.0 | | |
| 27 | 57.4 | 4.36 (m) | 1.85 (s, 3H) |
| | | 4.31 (d, 1H, 12.8) | |
| 28 | 20.0 | 2.01 (s, 3H) | 1.91 (s, 3H) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

Table IV. ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of **7** and **8**.

| | 7 in CDCl ₃ | | 8 in CDCl ₃ |
|----|-------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| | δ_C | δ_H (J, Hz) | δ_H (J, Hz) |
| 1 | 203.5 | | |
| 2 | 131.0 | 5.95 (d, 1H, 9.9) | |
| 3 | 142.7 | 6.77 (dd, 1H, 9.9, 4.2) | |
| 4 | 69.4 | 4.63 (d, 1H, 4.2) | 3.50 (m) |
| 5 | 129.1 | | |
| 6 | 125.7 | 5.93 (d, 1H, 5.4) | 3.27 (s, 1H) |
| 18 | 11.8 | 0.74 (s, 3H) | 0.69 (s, 3H) |
| 19 | 22.9 | 1.45 (s, 3H) | 1.17 (s, 3H) |
| 20 | | | |
| 21 | 13.3 | 1.03 (d, 3H, 6) | 0.99 (d, 3H, 6.9) |
| 22 | 78.8 | | |
| 24 | 153.1 | | |
| 25 | 125.5 | | |
| 26 | 167.2 | | |
| 27 | 57.5 | 4.44 (dt, 1H, 13.2, 3.6) | 4.33 (d, 1H, 12) 4.38 (d, 1H, 12) |
| 28 | 20.0 | 2.05 (s, 3H) | 2.03 (s, 3H) |

Data were recorded at 150 MHz (¹³C-NMR) and 600 MHz (¹H-NMR).

Table V. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **9** and **10**.

| | 9 in CDCl_3 | | 10 in CDCl_3 | |
|-------|-----------------------------|--|------------------------------|---|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) |
| 1 | 210.0 | | 209.3 | |
| 2 | 39.4 | 3.00 (dd, 1H, 15.1, 6.2) 2.59 (dd, 1H, 15.1, 4.1) | 41.6 | 3.60 (1H, dd, 17.8, 10.0) 3.28 (1H, dd, 17.8, 6.4) |
| 3 | 77.4 | 3.69 (ddd, 1H, 6.2, 4.1, 2.1) | 72.5 | 5.59 (1H, ddd, 10.0, 6.4, 2.0) |
| 4 | 75.2 | 3.46 (d, 1H, 2.8) | 76.4 | 4.51 (1H, d, 2.0) |
| 5 | 64.9 | | 64.7 | |
| 6 | 60.6 | 3.19 (s, 1H) | 56.8 | 3.59 (1H, s) |
| 7 | 31.1 | 2.14 (ddd, 1H, 14.8, 3.4, 2.1) | 31.4 | |
| 8 | 29.3 | | 30.0 | |
| 9 | 42.7 | | 42.7 | |
| 10 | 50.4 | | 49.4 | |
| 11 | 21.7 | | 21.2 | |
| 12 | 39.1 | | 41.1 | |
| 13 | 42.7 | | 42.7 | |
| 14 | 56.0 | | 56.0 | |
| 15 | 24.2 | | 24.4 | |
| 16 | 27.3 | | 27.3 | |
| 17 | 51.9 | | 52.0 | |
| 18 | 11.6 | | 11.5 | 0.49 (3H, s) |
| 19 | 15.9 | | 15.4 | 1.67 (3H, s) |
| 20 | 38.8 | | 39.1 | |
| 21 | 13.3 | 0.96 (d, 3H, 6.2) | 13.5 | 0.95 (3H, d, 7.0) |
| 22 | 78.7 | 4.39 (dt, 1H, 13.8, 3.4) | 78.4 | 4.37 (1H, dt, 13.4, 3.1) |
| 23 | 29.8 | 2.48 (s, 1H, 16.8, 13.8) 1.89 (dd, 1H, 16.8, 3.4) | 29.9 | 2.33 (1H, dd, 17.6, 13.4) |
| 24 | 152.7 | | 154.1 | |
| 25 | 125.7 | | 127.9 | |
| 26 | 167.0 | | 166.4 | |
| 27 | 57.5 | 4.36 (d, 1H, 12.4) 4.31 (d, 1H, 12.4) | 56.2 | 4.84 (1H, d, 11.8) 4.73 (1H, d, 11.8) |
| 28 | 20.0 | 2.01 (s, 3H) | 20.1 | 2.06 (3H, s) |
| 3-OMe | 57.5 | 3.32 (s, 3H) | | |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

6のX線結晶構造解析

All measurements were made on a Rigaku R-AXIS RAPID diffractometer using filtered Cu-K α radiation.

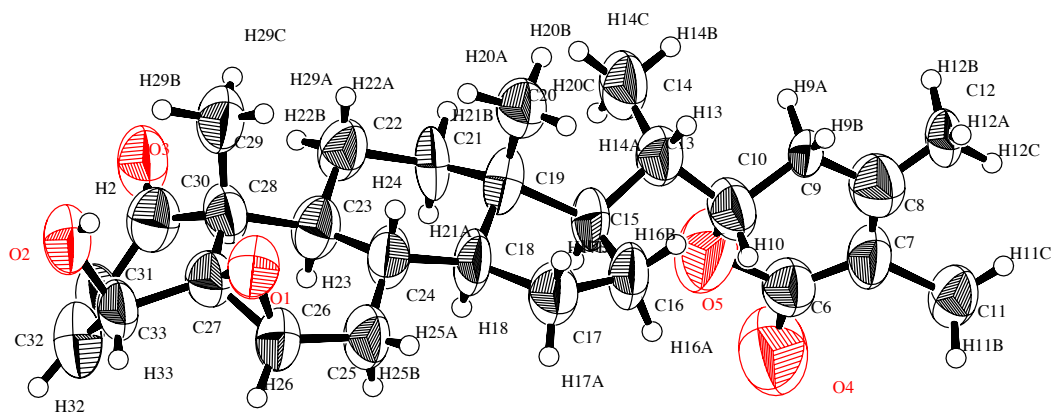


Figure III ORTEP view of **7**. Single crystals of C₂₈H₃₈O₆ **2** were recrystallized from MeOH and H₂O (1:1).

Crystal structure determination of complex **7**

Crystal data. C₂₈H₃₈O₆, $M = 470.60$, orthorhombic, $a = 7.6555(4)$, $b = 10.0365(6)$, $c = 33.828(2)$ Å, $V = 2599.2(3)$ Å³, $T = 95.15$ K, space group $P212121$ (no.19), $Z = 4$, 27884 reflections measured, 4685 unique ($R_{int} = 0.2157$) which were used in all calculations. The final $R1$ was 0.2004.

C. gigantea の Notch シグナル阻害活性を指標とした分画

C. gigantea は以前当研究室にて朴氏により Wnt シグナル阻害活性を指標に分画が行なわれた。本実験ではその分画済みのエキスをを用いた。

Fr.1D (5 g) を MeOH:H₂O 系を用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ø32x260 mm) により分画し, Fr.14A-14G を得た。活性は 14A, 14C-E に認められた。Fr.14C (395 mg) を CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルクロマトグラフィー (PSQ 100B, ø29 x 230 mm) により分画し, **11** (85 mg) を得た。Fr.4B (84 mg) は CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルクロマトグラフィー (PSQ 100B, ø27 x 205 mm) により分画し, Fr.16A-16I を得, 14 (Fr. 16D, 36 mg) を得た。活性は 16C 及び 16F に認められた。Fr.3E (11.2 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (48:52), wavelength 220 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **12** (Fr.18A, 9.7 mg, t_R 12 min) および **17** (Fr.16B, 6.5 mg, t_R 16 min) を得た。Fr.17F (10 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (45:55), wavelength 220 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **18** (Fr.19E, 0.4 mg, t_R 72 min) を得た。Fr.2D (180 mg) は H₂O:MeOH (3:7-0:1) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ø27x245 mm) で分画し, Fr.20A-20I を得た。活性は Fr.20D-20F に認められた。Fr.20D (112.1 mg) を H₂O:MeOH (4:6-3:7) のグラジエントを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (ø23x245 mm) で分画し, Fr.21A-21F を得た。活性は Fr.21B-21E に認められた。Fr.21B (49.2 mg) を ODS HPLC (Cosmosil 5CN-MS, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (4:6), wavelength 210 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **16** (Fr.22B, 17.5 mg, t_R 12 min) 及び **17** (Fr.22E, 3.5 mg, t_R 19 min) を得た。Fr.20E (21.1 mg) を ODS HPLC (Cosmosil Cholester, ø10x250 mm,; eluent MeOH:H₂O (65:35), wavelength 210 nm, flow late 3.0 mL/min) にて分取し, **16** (Fr.23F, 1.6 mg, t_R 19 min) を得た。Fr.20F (10.3 mg) を CHCl₃:MeOH 系を用いたシリカゲルカラムカラムクロマトグラフィー (ø12x180 mm) により分画し, **15** (Fr.24D; 2.6 mg, Fr.24E; 1.9 mg) 及び **17** (Fr.24F, 1.1 mg) を得た。

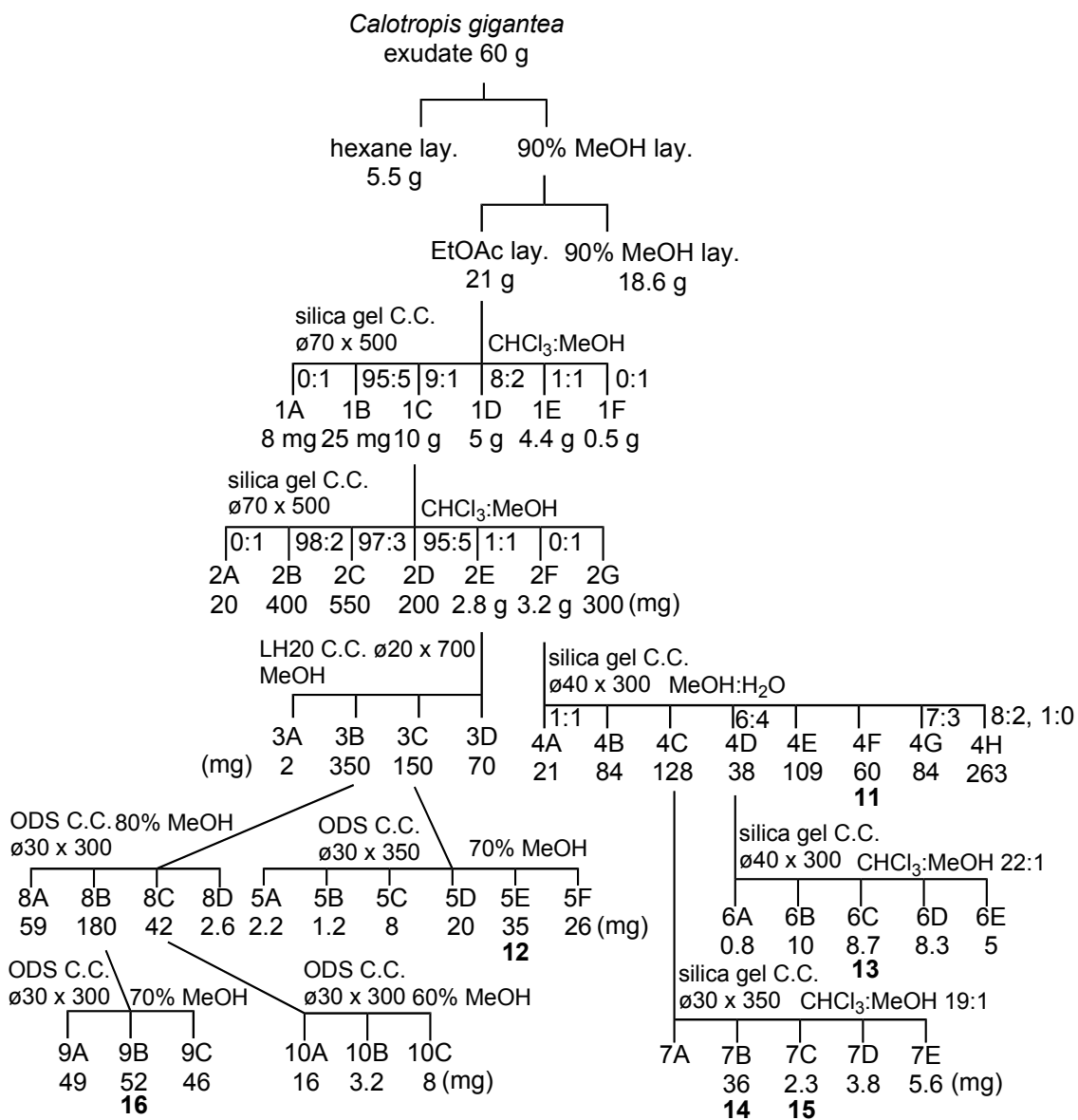


Figure IV. Previous separation of MeOH extract of *C. gigantea*.

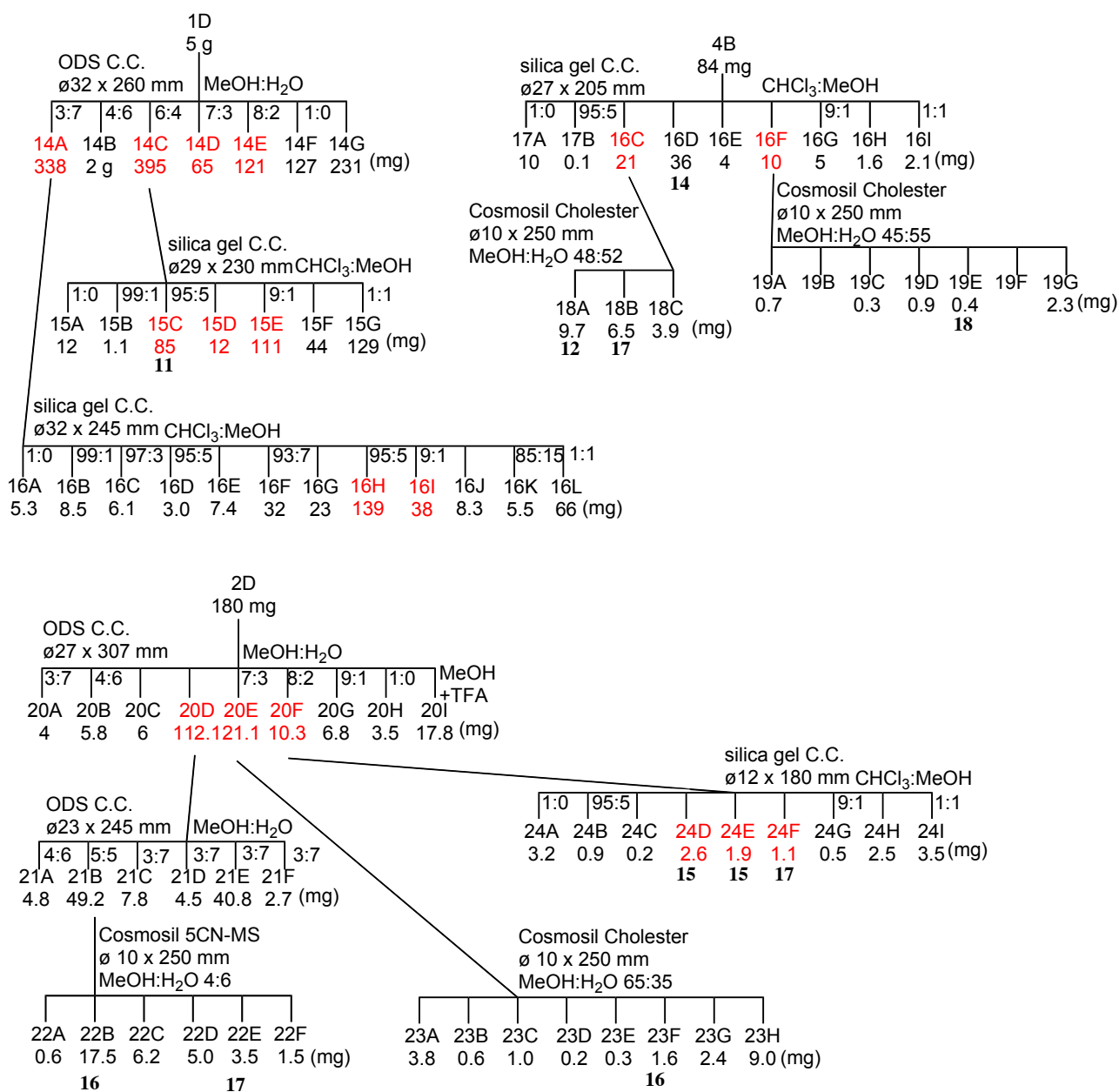


Figure V Separation of MeOH extract of *C. gigantea*. Red: active fractions

uscharin (**11**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{24} +10$ (c 1.0, CHCl₃), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 610 [M+Na]⁺

asclepin (**12**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{27} +12$ (c 1.0, CHCl₃), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 573 [M-H]⁻

calotropin (**14**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{24} +61$ (c 1.0, MeOH), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 531 [M-H]⁻

Voruscharin (**15**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{27} +71$ (c 0.3, EtOH), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 610 [M+Na]⁺

Uscharidin (**16**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{26} +20$ (c 0.6, EtOH), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 553 [M+Na]⁺

calactinic acid methyl ester (**17**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{27} -3$ (c 1.0, CH₂Cl₂), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 585 [M+Na]⁺

16-β-hydroxyuscharin (**18**) white amorphous solid; $[\alpha]_D^{27} -16$ (c 0.4, MeOH), ¹H and ¹³C NMR data, Table, ESIMS *m/z* 604 [M+H]⁺

Table VI. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **11** and **12**.

| | 11 in CDCl_3 | | 12 in $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD} = 5:1$ |
|----------------------|------------------------------|--|---|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{H} (J, Hz) |
| 1 | 36.2 | 2.46 (dd, 12.5, 4.1) | 2.46 (dd, 12.5, 3.7) 1.1 (t, 11.7) |
| 2 | 68.3 | 4.05 (dt, 1H, 10.7, 4.1) | 3.94 (dt, 11, 4.4) |
| 3 | 71.5 | 4.24 (dq, 1H, 4.8, 1.4) | |
| 4 | 32.4 | | |
| 5 | 43.5 | | |
| 6 | 27.6 | 1.84 (m) 1.22 (m) | |
| 7 | 27.4 | 2.45 (dd, 12.4, 4.1) | |
| 8 | 42.5 | | |
| 9 | 48.7 | | 1.37 (m, 11.7) |
| 10 | 52.6 | | |
| 11 | 21 | | |
| 12 | 39.4 | | |
| 13 | 49.4 | | |
| 14 | 85 | | |
| 15 | 33.2 | | |
| 16 | 26.8 | | |
| 17 | 50.6 | 2.73 (dd, 1H, 9.6, 5.4) | 2.63 (brd) |
| 18 | 15.7 | 0.79 (s) | 0.83 (3H, s) |
| 19 | 207.2 | 9.97 (s) | 10.0 (s) |
| 20 | 174.5 | | |
| 21 | 73.5 | 4.92 (d, 1H, 18) 4.77 (dd, 1H, 18, 1.4) 5.84 (s, 1H) | 5.0 (d, 18.3) 4.78 (d, 19.8) 5.84 (s) |
| 22 | 118 | | |
| 23 | 174.3 | | |
| 1' | 95 | | 4.55 (s) |
| 2' | 99.6 | 5.03 (s, 1H) | |
| 3' | 91.6 | | 4.73 (dd, 12.5, 5.1) |
| 4' | 47.4 | 2.20 (dd, 1H, 11) 1.98 (dd, 1H, 12, 3.4) | |
| 5' | 69.8 | | 3.89 (dt, 11, 4.4) |
| 6' | 21.9 | 1.20 (d, 3H, 6.2) | 1.28 (d, 6.6) |
| CH=N | 160.2 | 7.49 (s) | |
| CH ₂ S | 42.8 | 3.85 (d, 1H, 8.9) | |
| 3'-COCH ₃ | | | 2.14 (3H, s) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

Table VII. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **14**, **15** and **16**.

| | 14 in CDCl_3 | | 15 in CDCl_3 | 16 in CDCl_3 |
|----|------------------------------|--|--------------------------------|--|
| | δ_{C} | δ_{H} (J, Hz) | δ_{H} (J, Hz) | δ_{H} (J, Hz) |
| 1 | 36 | 2.41 (dd, 12.5, 4.3) 1.06 (t, 12.2) | 2.45(dd, 12.5, 4.3) | 2.43 (1H, dd, 12.4, 4.4) 1.09 (t, 1H, 12.4) |
| 2 | 68.1 | | 3.95(m) | 3.94 (ddd, 1H, 12.4, 10.7, 4.4) |
| 3 | 71.9 | 3.95 (dd, 10.5, 4.3) | 4.08(ddd, 11, 5.1, 3.9) | 4.09 (dt, 1H, 10.7, 4.4) |
| 4 | 32.2 | | | 1.98 (m), 1.68 (m) |
| 5 | 43.4 | | | 1.56 (m) |
| 6 | 27.6 | | | 1.98 (m) |
| | | | | 1.68 (m) |
| 7 | 27.4 | | | 1.86 (m), 1.25 (m) |
| 8 | 42.4 | | | |
| 9 | 48.6 | | | 1.32 (m) |
| 10 | 52.8 | | | |
| 11 | 21.1 | | | 1.68 (m), 1.25 (m) |
| 12 | 39.3 | | | 1.52 (m), 1.32 (m) |
| 13 | 49.5 | | | |
| 14 | 84.9 | | | |
| 15 | 33.2 | | | 1.79 (m) |
| | | | | 1.46 (m) |
| 16 | 26.8 | | | 2.15 (t, 9.3) |
| | | | | 2.18 (m) |
| 17 | 50.6 | 2.72 (dd, 9.2, 5.6) | 2.75(dd, 9.3, 4.8) | 2.75 (dd, 1H, 9.3, 5.5) |
| 18 | 15.7 | 0.78 (s) | 0.81(s) | 0.81 (s, 1H) |
| 19 | 207.5 | 9.9 (s) | 10.0(s) | 10 (s, 1H) |
| 20 | 174.8 | | | |
| 21 | 73.6 | 4.93 (d, 18) 4.77 (d, 18) | 4.93(d, 18.0) 4.78(d, 18.0) | 4.94 (d, 1H, 18.2) 4.78 (d, 1H, 18.2) |
| 22 | 117.8 | 5.84 (s) | 5.87(br s) | 5.86 (s, 1H) |
| 23 | 174.7 | | | |
| 1' | 95.6 | 4.53 (s) | 4.63(s) | 4.66 (s, 1H) |
| 2' | 91.2 | | | 4.43 (brs 1H) |
| 3' | 73.1 | 3.61 (dd, 11.7, 5.1) | | |
| 4' | 38.7 | | 1.98(m) 1.85(m) | 2.77 (d, 1H, 14.1) 2.46(1H, 14.1) |
| 5' | 69.2 | 3.88 (m) | 4.1(m) | 3.74 (m) |
| 6' | 21.9 | 1.22 (s) | 1.24(d, 6.4) | 1.41 (d, 3H, 6.2) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

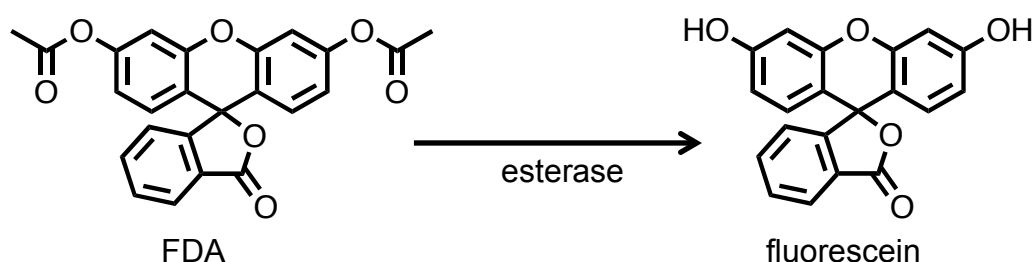
Table VIII. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts of **17** and **18**.

| | 17 in CDCl_3 :pyridine- d_5 | 18 in CDCl_3 :pyridine- d_5 |
|-----------------------|---|---|
| | δ_{H} (J, Hz) | |
| 1 | 2.50 (dd, 12.8, 4.5) 0.82 (t, 12.8) | 1.18(t, 11) |
| 2 | 3.30 (ddd, 14.1, 10.5, 5.1) | 4.47(dd, 10, 4.1) |
| 3 | 3.13 (ddd, 14.1, 10.5, 5.1) | 4.42 (td, 10.2, 4.1) |
| 4 | | |
| 8 | | 1.54(q, 12.4) |
| 16 | | 1.77(t, 12.4) |
| 17 | 2.62 (dd, 8.8, 5.2) | 5.02(m) |
| 18 | 0.69 (s) | 3.03(d, 3.4) |
| 19 | 9.78 (s) | 0.91(s) |
| 21 | 4.88 (d, 17.3) | 9.87(s) |
| 22 | 4.65 (d, 17.3) | 5.04(d, 18.6) |
| 1' | 5.72 (s) | 5.17(d, 18.6) |
| 3'-CO ₂ Me | 4.86 (s) | 6.24(s) |
| 4' | 3.57 (s) | 5.59(s) |
| 5' | 2.20 (dd, 13, 5.14) | 1.86(d, 12.4) |
| 6' | 2.04 (dd, 13, 5.14) | 2.01(t, 12.4) |
| CH=N | | 4.57(dd, 12.4, 6.2) |
| CH ₂ S | 1.24 (d, 5.8) | 1.38(d, 6.2) |
| | | 7.60(s) |
| | | 3.84(d, 16.5) |
| | | 3.91(d, 16.5) |

Data were recorded at 150 MHz (^{13}C -NMR) and 600 MHz (^1H -NMR).

GLI1 転写阻害活性試験

アッセイ細胞 (HaCaT cells GLI1-Luc) を 96 well ホワイトプレートに 2×10^4 cells/well 播種し, 12 hr 後に tetracycline を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ となるように加える. さらに 12 hr 後, 培地を除去し, サンプルを各目的濃度に希釈した培地を加える. 12 hr 後, 培地を除去し, Glo Lysis Buffer, 1X (Promega) を $30 \mu\text{L/well}$ 加え, シェイカーで攪拌した後 (20 min), $30 \mu\text{L/well}$ Luciferin (Promega) を加え, 化学発光を Luminoskan™ Ascent Microplate Luminometer (Thermo SCIENTIFIC) で測定した. また, fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA) を用いて cell viability を同時に測定した^[67]. FMCA では FDA (fluorescein diacetate, Wako) が生細胞に取込まれた後, 各種 esterase の働きにより加水分解され蛍光性 fluorescein (Ex: 485 nm, Em: 538 nm) になる. このため生細胞が FDA により蛍光染色される事から細胞生存率の試験法として用いられる.



アッセイ細胞を 96 well ブラックプレートに 2×10^4 cells/well 播種し, 12 hr 後に tetracycline を終濃度 $1 \mu\text{g/mL}$ となるように加える. さらに 12 hr 後, 培地を除去し, サンプルを各濃度に希釈した培地を加える. 12 hr 後, 培地を除去し, FDA $10 \mu\text{g/mL}$ (PBS) を $200 \mu\text{L/well}$ 加え, 1 hr インキュベートした後, 蛍光を Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer (Thermo SCIENTIFIC) で測定する. 以下の式を用いて GLI1 転写活性及び Cell viability を算出した.

$$\text{GLI1 転写活性 (\%)} = \frac{\text{サンプルの発光強度}}{\text{コントロールの発光強度}} \times 100$$

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{サンプルの蛍光強度}}{\text{コントロールの蛍光強度}} \times 100$$

細胞毒性試験

各癌細胞 (PANC-1 cells, DU-145 cells, MCF-7 cells) 及び正常細胞 (C3H10T1/2 cells) を 96 well ブラックプレートに 2×10^4 cells/well ずつ播種し、24 hr 後、サンプルを各濃度に希釈した培地を加える。12 hr 後、培地を除去し、FDA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (PBS) を 200 $\mu\text{L}/\text{well}$ 加え、1 hr インキュベートした後、蛍光を Fluoroskan Ascent™ Microplate Fluorometer で測定した。Cell viability を上記の式で算出した。

タンパク質発現・精製

タンパク質精製時の超音波破碎機には ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201 (TOMY) を用いた。UV によるタンパク質及び DNA 濃度測定は Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) を用いて測定した。アガロースゲル電気泳動後の DNA の検出は Ethidium bromide 溶液 (Nacalai tesque) で 10 分間染色を行った後、ChemiDoc (Bio Rad) を用いて検出した。

培地及び試薬は以下の組成で作製した。

LB 液体培地

LB broth 2.0 g

dH₂O up to 100 mL

混和後、オートクレーブにて滅菌処理を行った (121 °C, 20 min).

Wash buffer

PBS 10 mL

20% triton-X-100 500 μL

Glutathione solution

Glutathione (Reduced form, Wako) 1.55 g (final conc. 50 mM)

1M Tris-HCl (pH 8.8) 5 mL (final conc. 50 mM)

dH₂O up to 100 mL

dH₂O 80 mL に溶解後、NaOH 水溶液を加え、pH 8.8 に調製し、メスアップした。フィルター滅菌した後、15 mL 遠沈管に分注し、-30 °C で保存した。

Staining solution

Solution A

| | |
|--|-------|
| CuSO ₄ · 5H ₂ O (Wako) | 1 g |
| 酢酸 | 20 mL |
| dH ₂ O | 80 mL |

Solution B

| | |
|----------------------------------|-------|
| CCoomassie brilliant blue (Wako) | 0.3 g |
| MeOH | 90 mL |
| dH ₂ O | 10 mL |

使用時に A:B 1:1 で混合し、使用した。

タンパク質発現

5 mL LB 培地に 100 mg/mL ampicillin を 5 μ L 添加し (final conc. 100 μ g/mL), 大腸菌グリセロールストックから植菌し, 培養する (前培養, 37 °C, 160 rpm, over night). 前培養液を 250 mL LB 液体培地 (100 μ g/mL ampicillin) に混和し, 培養する (37 °C, 160 rpm, 1.5 hr). 0.1 M IPTG を 250 μ L 添加し培養する (タンパク質発現誘導, 25 °C, 160 rpm, 3 hr). 培養液を遠心分離し (4 °C, 6,000 rpm, 5 min), 上清を捨て, ペレットに 10 mL 氷冷 PBS を加え再懸濁し, 50 mL 遠沈管に回収する. 遠沈管を氷水中で冷やしながらか超音波処理により菌体を破碎する ((sonication 80 counts, icing 15 sec) x 4). 20 % Triton-X-100 を 500 μ L 加え, 回転混和した後 (4 °C, 30 min), 遠心分離する (4 °C, 5,000 rpm, 30 min). 上清を 15 mL 遠沈管に回収する.

タンパク質精製

600 μ L Glutathione Sepharose 4B (75 % スラリー) を 1.5 mL エッペンチューブに取り, Wash buffer を 600 μ L 加え混和し遠心分離した後 (4 °C, 2,000 rpm, 1 min), 上清を捨てる. これを 4 回繰り返した後, Wash buffer を 600 μ L 加え, Glutathione Sepharose 4B (50 % スラリー) を得る. タンパク質液上清を回収した 15 mL 遠沈管に Glutathione Sepharose 4B (50% スラリー) を 500 μ L 加え, 回転混和する (4 °C, 1 hr). その後, 遠心分離し (4 °C, 2,000 rpm, 5 min), 上清を取除き Glutathione Sepharose beads を 1.5 mL エッペンチューブに回収する. PBS を 500 μ L 加え, 遠心分離した後 (4 °C, 2,000 rpm, 1 min), 上清を取除

く. この洗浄操作を 5 回行う. その後, 50 mM Glutathione solution を 300 μ L 加え, 回転混和し (4 °C, 10 min), 遠心分離後 (4 °C, 2,000 rpm, 1 min), 上清を新しい 1.5 mL エッペンチューブに回収する. この溶出操作を 6 回繰り返す. PBS を 1L 作製し, 4 °C に冷却する. 透析膜を PBS に浸けておく (10 min). 500 mL ビーカーに 4 °C の PBS を 500 mL 加え, 5 mL シリンジで上清を透析膜カセットに注入し, 浮きを装着し, スターラーで PBS を攪拌しながら透析する (4 °C, 3 hr). PBS を交換しさらに透析する (4 °C, over night). 透析膜カセットからタンパク質液を回収し, タンパク質濃度を Nano drop 2000 で測定後, -80 °C で保存する. 精製後純度の確認には SDS-PAGE を行なったのち, Staining solution を用いて CBB 染色を行なった.

Western blot

各試薬は以下の組成で作製した.

Lysis buffer

| | |
|---|-------------------|
| 1 M Tris-HCl | 2 mL (20 mM) |
| NaCl | 878 mg (150 mM) |
| Triton X-100 | 0.5 mL (0.5 w/v%) |
| sodium deoxycholate (Sigma Aldrich) | 500 mg (0.5 w/v%) |
| EDTA | 292.2 mg (10 mM) |
| sodium orthovanadate (V) (Na_3VO_4 , Wako) | 18.4 mg (1 mM) |
| sodium fluoride (NaF, Wako) | 0.42 mg (0.1 mM) |
| dH ₂ O | up to 100 mL |

使用時に protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque) を終濃度 1 %となるよう加えた.

5x SDS sample buffer

| | |
|------------------------------------|-------------|
| 1 M Tris-HCl (pH 6.8) | 7.85 mL |
| SDS | 2.5 g |
| Sucrose (Nacalai tesque) | 6.25 g |
| Bromo phenol blue (Kanto chemical) | 6.25 mg |
| dH ₂ O | up to 25 mL |

10 x Running buffer

| | |
|--------------------------|-----------|
| Tris | 30 g |
| SDS | 10 g |
| Glycine (Kanto chemical) | 144 g |
| dH ₂ O | up to 1 L |

10 % SDS

| | |
|-------------------|-------|
| SDS (Wako) | 4 g |
| dH ₂ O | 40 mL |

30 % Acrylamide

| | |
|---|--------------|
| Acrylamide (Wako) | 29.2 g |
| <i>N, N'</i> -methylene-bis-acrylamide (Wako) | 0.8 g |
| dH ₂ O | up to 100 mL |

10 % APS

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Ammonium persulfate (MP Biomedical) | 100 mg |
| dH ₂ O | 1 mL |

Transfer buffer

| | |
|-------------------|---------------|
| Tris | 15 g (250 mM) |
| Glycine (Wako) | 72 g (1.92 M) |
| 10 % SDS | 10 mL (0.1 %) |
| dH ₂ O | up to 500 mL |

TBST (Tris-buffered saline Tween 20)

| | |
|-------------------|---------------------------|
| Tris | 3.6 g |
| NaCl | 17.4 g |
| HCl | adjust pH to 7.4 (2.4 mL) |
| Tween 20 | 3.0 g |
| dH ₂ O | up to 3.0 L |

SDS PAGE gel は以下の様に作製した。

| SDS PAGE gel acrylamide conc. | Running gel | | Stacking gel |
|----------------------------------|-------------|------------|--------------|
| | 10 % | 1.25 % | 5% |
| dH ₂ O | 4.65 mL | 3.3 mL | 2.8 mL |
| 30% Acrylamide | 4.95 mL | 6.3 mL | 0.66 mL |
| 1 M Tris-HCl (pH 8.8) | 5.1 mL | 5.1 mL | |
| 1 M Tris-HCl (pH 6.8) | | | 0.5 mL |
| 10% SDS | 0.15 mL | 0.15 mL | 0.04 mL |
| 10% APS | 0.15 mL | 0.15 mL | 0.04 mL |
| TEMED (Wako) | 10 μ L | 10 μ L | 4 μ L |

ゲル作製及び電気泳動にはミニプロティアン Tetra セルを用いた。ガラスプレートに Running gel 溶液を加え、EtOH または飽水 BuOH を重層した。ゲルが固まった後、dH₂O で洗浄し、ろ紙で水分を拭き取った後、Stacking gel を加え、コームをさし、固まった物を使用した。

全細胞ライセートの作製

アッセイ細胞及び癌細胞を各播種数 (HaCaT-GLI1-Luc cells: 1×10^6 cells/6 cm dish, PANC-1 cells, DU-145 cells, MCF-7 cells: 1×10^6 cells/6 cm dish) で播種し、HaCaT-GLI1-Luc cells では 12 hr 後に tetracycline を終濃度 1 μ g/mL で添加する。さらに 24 hr 後、HaCaT-GLI1-Luc cells の場合は 12 hr 後に各種目的濃度となるように培地で希釈したサンプルを添加する。サンプル添加 12 hr 後に 1 ml (6 cm dish では 500 μ L) の PBS で 2 回洗浄した後、さらに PBS を 500 μ L 加え、細胞をセルスクレーパーで剥離し、1.5 mL エッペンチューブに回収した。細胞を遠心分離し (4 $^{\circ}$ C, 1,000 rpm, 10 min), 上清を捨て、新たに 500 μ L PBS を加え、再度遠心分離し (4 $^{\circ}$ C, 1,000 rpm, 10 min), 細胞を洗浄する。上清を除き、Lysis buffer (1 % PI カクテル含有) を 100 μ L 加え、氷上で 30 min インキュベートする。その後遠心分離し (4 $^{\circ}$ C, 13,000 rpm, 30 min), 上清をタンパク質溶液 (whole lysate) として新たな 1.5 mL エッペンチューブに回収した。

核・細胞質ライセートの作製

核・細胞質のライセートは NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific) を用いて作製した。10 cm dish を用いて全細胞ライセート作製時と同様に細胞にサンプルを作用させた後、PBS 1 mL で 2 回洗浄した後、トリプシン/EDTA を 1 mL

加え静置し、細胞を剥離する (37°C, 3-5 min). 培地を 4 mL 加え細胞を 15 mL 遠沈管に回収した後、遠心分離する (4°C, 3,000 rpm, 3 min). 上清を取除き, PBS を 1 mL 加え懸濁し, 半量 (500 μ L) を全細胞ライセート作製用に使用した. 細胞液 500 μ L を 1.5 mL エッペンチューブに移し, 遠心分離した (4 °C, 5,000 rpm, 5 min). 上清を取除き, 再度 PBS を 500 μ L 加え遠心分離した (4 °C, 5,000 rpm, 5 min). 上清を取除き, 氷上でペレットを乾燥させる (10 min). 氷冷 CER I (1 % PI カクテル含有) を 100 μ L 加え, ボルテックスし (15 sec), 氷上に静置する (10 min). 氷冷 CER II を 11 μ L 加え, ボルテックス (5 sec) した後, 氷上に静置する (1 min). ボルテックス (5 sec) した後, 遠心分離する (4 °C, 13,000 rpm, 10 min). 上清を細胞質ライセートとして 1.5 mL エッペンチューブに回収する.

ペレットに氷冷 NER (1 % PI カクテル含有) を 50 μ L 加え, ボルテックスする (15 sec). その後, 氷上に静置し (10 min), ボルテックス (15 sec) を 4 回繰り返す. その後, 遠心分離し (4 °C, 13,000 rpm, 10 min), 上清を核ライセートとして回収する.

lysate に 5 × SDS Buffer:2-メルカプトエタノール混合液 (4:1) を加え, CHILL HEAT CHT-101HT (Iwaki) を用いて加熱 (100 °C, 3 min) した. サンプルと同時にタンパク質分子量マーカー (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad) もゲルにアプライし, ゲル厚が 1.0 mm の場合は stacking gel を電圧 150V, 電流 20 mA で, running gel を電圧 200V, 電流 30 mA で分離した. 泳動はブロモフェノールブルー色素がゲルの下端から 5 mm 程度まできたところで終了した. 転写にはミニプロティアン Tetra セル もしくは Trans-Blot® Turbo™ を用いた.

一次抗体, 二次抗体処理及び検出

PVDF への転写後, 5 % skim milk (森永乳業) を含む TBST (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, and 0.1 % Tween 20) を用いて blocking を行い (r.t, 1 hr), blots を TBST で洗淨 (5 min, 3 times) した. 一次抗体処理は 5 % skim milk を含む TBST でそれぞれの目的濃度に希釈した一次抗体液にメンブレンを浸け反応させた (r.t., 1 hr or 4 °C, over night). メンブレンを TBST で洗淨した (5 min, 3 times). 二次抗体処理は 5 % skim milk を含む TBST でそれぞれに希釈した二次抗体を反応後 (r.t., 1 hr), メンブレンを TBST で洗淨した (5 min, 3 times). 検出には, ECL Advance Western detection system (GE Healthcare), Chemi-Lumi One Ultra (Nacalai tesque) 又は Immobilon Western (Millipore) を用いた. 内部標準として β -actin を用いた.

一次抗体として、GLI1 (C-18) (1 : 200), PTCH (1 : 200, Abcam), および BCL2 (1 : 2000, Sigma Aldrich), β -actin (1 : 4000, Sigma Aldrich), Cleaved Notch1 (Val1744) (1:1000, Cell Signaling Technologies), Notch1 (C-20) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology), HES1 (1:1000, Santa cruz), HES5 (1:700, Cell Signaling Technologies), RBP-Jk (1:2000, Santa cruz), Flag (1:1000, Sigma) 及び γ -Secretase Antibody Sampler Kit (全て 1:2000, Cell Signaling Technologies) を用いた.

二次抗体として、anti-goat IgG (1 : 10000) (Sigma), anti-rabbit IgG (1 : 4000, Jackson ImmunoResearch), anti-mouse IgG (1:4000) (GE Healthcare) 及び anti-rat (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) を用いた.

EMSA について

EMSA の実験は LightShift Chemiluminescent EMSA kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて実験を行った。オリゴヌクレオチドは、それぞれの ssDNA (計 6 種) をグライナージャパン社に合成を委託し、アニーリングして実験に用いた。以下に配列を示す。

5'-biotin target DNA (23 bases)

forward: 5' - biotin - AGCTACCTGGGTGGTCTCTTCGA - 3'

reverse: 5' - biotin - TCGAAGAGACCACCCAGGTAGCT - 3'

Biotin free target DNA (23 bases)

forward: 5' - AGCTACCTGGGTGGTCTCTTCGA - 3'

reverse: 5' - TCGAAGAGACCACCCAGGTAGCT - 3'

Biotin free mutant DNA (23 bases)

forward: 5' - AGCTACCTCCCACTTCTCTTCGA - 3'

reverse: 5' - TCGAAGAGAAGTGGGAGGTAGCT - 3'

Buffer 及びゲルを以下の様に作製した。

| | |
|--|-----------|
| 5 x TBE buffer (室温保存): Tris (Invitrogen™) | 54.51 g |
| boric acid (Wako) | 27.82 g |
| EDTA · 2Na (Wako) | 3.72 g |
| dH ₂ O | up to 1 L |
| 6 % Native polyacrylamide gel: 30 % acrylamide | 3.6 mL |
| dH ₂ O | 12.6 mL |
| 5 x TBE | 1.8 mL |
| 10 % APS (Wako) | 300 μL |
| TEMED (Wako) | 15 μL |

| | (μ L) | Final conc. | |
|--|-----------------------|-------------|-----------------------|
| 10 x binding buffer | 2 | 1 x | |
| 50 % glycerol | 1.6 | 4 % | |
| 100 mM MgCl ₂ | 1 | 5 mM | |
| 50 fmol/ μ L biotin labeled DNA | 0.4 | 4 pmol | |
| 5 pmol/ μ L biotin free target DNA | 0.8 | 4 pmol | for competition assay |
| 5 pmol/ μ L biotin free mutant DNA | 0.8 | 20 fmol | for competition assay |
| GST-GLI1 (200 μ g/mL) | Depends on experiment | | |
| Compound in DMSO | Depends on experiment | | |
| dH ₂ O | Up to 20 μ L | | |

ゲル作製及び電気泳動にはミニプロテイン Tetra セル (Bio-Rad) を用いた。上記の組成で 6 % Native page 用ポリアクリルアミドゲルを作製した。固まったゲルを泳動槽にセットし、0.5x TBE buffer を満たし、110 V 定電圧で 40-50 min プレランを行う。氷上で融解させた試薬を表の組成で 1.5 mL チューブで混合する。DNA は最後に加える。スピンドウンした後 (1 sec) , 氷上に静置する (20 min). 5 μ L 5x Loading buffer (kit) を各サンプルに加え、20 μ L ずつウェルにアプライし、120 V, 400 mA (定電圧) で電気泳動する。0.5x TBE buffer に 10 min 以上浸した Biodyne B 0.45 μ m (Pall Corporation) に Trans-Blot[®] Turbo[™] (Bio Rad) を用いて転写した。転写したメンブレンをラップでくるみ、転写面を下にしてトランスルミノメーター (コスモ・バイオ) を用いて 312 nm UV を 15 分間照射し DNA をメンブレンに固定化した。37-50 °C に加温し、溶解させた Blocking buffer (kit) 20 mL にメンブレンを浸し、シェイカーで揺らしながらインキュベートする (15 min). buffer を捨て、Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugated (kit) を 20 μ L 加えた新しい Blocking buffer 10 mL に入れ替え揺らしながらさらにインキュベートする (15 min). 4 x Wash buffer (kit) を dH₂O で希釈し 1 x Wash buffer を 100 mL 調製し、1x Wash buffer 20 mL で洗浄し、1x wash buffer 20 mL で洗浄し (5 min), 新しい 1x Wash buffer に替え、洗浄する。これを 4 回繰り返す (total 20 min). 洗浄後のメンブレンの buffer を良く切ってから Substrate Equilibration buffer (kit) 30 mL に浸け、揺らしながらインキュベーションする (5 min). 500 μ L Luminol/Enhancer Solution (kit) ・ 500 μ L Stable Peroxidase solution (kit) を 1:1 で混合し、メンブレンに添加し、ChemiDoc[™] XRS+ (Bio Rad) にて検出した。

Notch シグナル阻害活性試験

アッセイ細胞 (LS174T cells /Tet-on-NICD, pGL4.20-TP-1) を 96 well ホワイトプレートに 2×10^4 cells/well 播種し, 12 hr 後に doxycycline を終濃度 100 ng/mL 加える. さらに 12 hr 後, 培地を除去し, サンプルを各目的濃度に希釈した培地を加える. 12 hr 後, 培地を除去し, Glo Lysis Buffer 1X を 30 μ L/well 加え, シェイカーで攪拌した後 (20 min), 30 μ L/well Luciferin を加え, 化学発光を LuminoskanTM Ascent Microplate Luminometer (Thermo SCIENTIFIC) で測定した. また, cell viability を FMCA にて同時に測定した. アッセイ細胞を 96 well ブラックプレートに 2×10^4 cells/well 播種し, 12 hr 後に doxycycline を終濃度 100 ng/mL 加える. さらに 12 hr 後, 培地を除去し, サンプルを各濃度に希釈した培地を加える. 12 hr 後, 培地を除去し, FDA 10 μ g/mL (PBS) を 200 μ L/well 加え, 1 hr インキュベートした後, 蛍光を Fluoroskan AscentTM Microplate Fluorometer (Thermo SCIENTIFIC) で測定する. 以下の式を用いて Notch シグナル活性及び Cell viability を算出した.

$$\text{Notchシグナル活性 (\%)} = \frac{\text{サンプルの発光強度}}{\text{コントロールの発光強度}} \times 100$$

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{サンプルの蛍光強度}}{\text{コントロールの蛍光強度}} \times 100$$

プラスミドの増量

購入したプラスミド pGL-4.20[*luc2*/Puro] (Promega, Wisconsin, USA), pEF-BOSneo-mNotch1 RAMIC (Riken bio resource center, Japan), 頂いたプラスミド pEGFP-N1 (Clontech, USA) 及び TP-1 について ECOSTM Competent *E. coli* JM109 (ニッポンジーン, Japan) を用いて増量した.

大腸菌用の培地は以下のように調整した.

選択用寒天培地 (ampicillin, kanamycin plate)

LB broth (Sigma-Aldrich) 4 g
寒天, 粉末 (Wako) 3 g
dH₂O 200 mL

上記の物をオートクレーブし (121 °C, 20 min), ampicillin (終濃度 50 µg/mL) もしくは kanamycin (終濃度 25 µg/mL) を加え温時 10 cm dish に 20 mL ずつ分注し固化させた.

液体培地

LB broth (Sigma-Aldrich) 4 g
dH₂O 200 mL

上記の物をオートクレーブし (121 °C, 20 min), ampicillin (終濃度 50 µg/mL) もしくは kanamycin (終濃度 25 µg/mL) を加えた.

プラスミド精製には QIAGEN-tip 500 (QIAGEN, Japan) を使用し, Buffer は以下の様に調整した.

Buffer P1: 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 10 mM EDTA
 10 µg/mL RNaseA (ナカライテスク, Japan)

Buffer P2: 200 mM NaOH
 1 % SDS

Buffer P3: 3.0 M potassium acetate (pH 5.5)

Buffer QBT: 750 mM NaCl

50 mM MOPS (pH 7.0)

15 v/v% isopropanol

0.15 v/v% Triton X-100

Buffer QC: 1.0 M NaCl

50 mM MOPS (pH 7.0)

15 v/v% isopropanol

Buffer QF: 1.25 M NaCl

50mM Tris-HCl (pH 8,5)

15 v/v% isopropanol

Buffer QN: 1.6 M NaCl

50mM Tris-HCl (pH 7.0)

15 v/v% isopropanol

ECOS™ Competent *E. coli* JM109 (ニッポン・ジーン, Japan) を氷上で融解し, 直ちにプラスミド溶液を加え, 直ちにボルテックスで 1 秒間攪拌し, 氷上で 5 分間インキュベートした. インキュベート後直ちにインキュベートし (42 °C, 45 sec), 直ちにボルテックスで攪拌した (1 sec). 選択用寒天培地 2 枚に移し, 均一に塗布し培養した (37 °C 12 hr). 寒天培地上のコロニーを選出し, 3 mL の液体培地に播種し前培養した後 (37 °C, 160 rpm, 6 hr), 培地全量を新たな液体培地 200 mL に加え本培養を行なった (37 °C, 160 rpm, 12-16 hr). 本培養液を遠心分離した後 (4 °C, 6,000 g, 15 min), 上清を捨て, 菌体ペレットを得る. 菌体ペレットを Buffer P1 10 mL で再建濁する. Buffer P2 10 mL を加え, 転倒混和し静置する (5 min, r.t.). 30 mL の氷冷 Buffer P3 を 10 mL 加え転倒混和し, インキュベートする (20 min, 氷上). 転倒混和後, 遠心分離した後 (4 °C, 4,000 rpm, 30 min), キムワイプで濾過した後再度 4 °C, 4,000 rpm, 15 min 遠心分離し, 上清を DNA 溶液として得る (60 µL を泳動用サンプル①として保存する.). Buffer QBT (10 µg/mL RNase を含む.) 10 mL で QIAGEN tip (Quiagen, Japan) を洗浄する (60 µL 濾過液をサンプル②として保存する.). プラスミド DNA を含む上清をカラムに添加する. buffer QC 30 mL を二回流す. Buffer QF 15 mL でプラスミド DNA を溶出させる (サンプル③). 50 mL チューブに DNA 溶液を移し,

2-propanol を 10.5 mL 加え，転倒混和後遠心分離する (4 °C, 4,000 rpm, 30 min).ペレットに 70 % EtOH を 5mL 加え，遠心分離し (r.t., 4,000 rpm, 15 min), 上清を捨て，5-10 min 風乾し，任意の buffer (dH₂O, pH 8.0 TE buffer 等) に再懸濁し-20 °C で保存する．電気泳動後のサンプルをアガロースゲル電気泳動し純度を確認する．目的のプラスミド DNA が得られたかを確認するため，制限酵素によりプラスミドを切断後に泳動し，DNA 鎖の長さを算出する．

形質転換実験

MEB5 cell を PLL, Fibronectin/Laminin コーティングした 24 well plate に 2×10^4 cells/well 播種しインキュベートした後 (37 °C, 5 % CO₂, 12 hr) に無血清培地で置換し EGF 等を除いた後，分化用培地に置換するとともに目的遺伝子を一過性導入した．45 μL/well の Opti-MeM (Gibco) と 2.5 μL/well の Lipofectamine 2000 (Invitrogen™) を混合する．また，50 μL/well の Opti-MeM と目的のプラスミドを混合し，Opti-MeM と Lipofectamine 2000 の混合物と 1:1 で混合し，細胞に添加し，インキュベートする (37 °C, 5 % CO₂).

その後 luciferase 活性を測定する場合は，Dual-Glo™ Luciferase Assay System (Promega) を用いて luciferase 活性を測定した．培地を取除き 5xPassive lysis buffer (Promega) を dH₂O で希釈し調製した 1x Passive lysis buffer を 60 μL/well 加え，震盪する (r.t., 30 min). 細胞溶解液を 96 well white plate に各サンプル 50 μL ずつ移し，融解した Dual-Glo® Reagent 50 μL/well を加え，firefly luciferase 活性を測定した．その後，Dual-Glo® Stop & Glo® Reagent を 50 μL 加え，renilla luciferase 活性を測定した．

神経幹細胞 MEB5 cells の分化アッセイについて

プレートのコーティング

24 well plate の各 well に 13 mm Micro Cover Glass (Matsunami Glass Ind. Ltd) を 1 枚ずつ入れた後、1 M NaOH をプレートに加え (24 well plate; 500 μ L, 6 cm dish; 5 mL), 静置する (r.t., 暗所, 1~2 hr). NaOH を吸引除去し、1 M HCl をに加え (24 well plate; 500 μ L, 6 cm dish; 5 mL), 静地する (r.t., 暗所, 1~2 hr). HCl を吸引除去した後、500 μ L 滅菌精製水で 3 回洗浄し、プレートを風乾させる。乾燥させたプレートに Poly-L-lysine hydrobromide (PLL, Wako) をに加え (24 well plate; 500 μ L, 6 cm dish; 3-5 mL), 培養する (4°C, 8-12 hr). PLL を回収し、500 μ L 滅菌精製水で 3 回洗浄し、風乾させる。乾燥したプレートに 20 μ g/mL Fibronectin (Invitrogen™) / 10 μ g/mL Laminin (invitrogen™) PBS 溶液を加え (24 well plate; 500 μ L, 6 cm dish; 3-5 mL), 静置した (4°C, 8-12 hr).

細胞播種~サンプル添加

増殖用培地及び分化用培地は以下の様に調製した。

| | |
|---|------------|
| Proliferation medium: NeuroCult™ Basal Medium (Stemcell Technologies) | 18 mL |
| NeuroCult™ Proliferation supplement (Mouse) (Stemcell Technologies) | 2 mL |
| 10 μ g/mL EGF (VERITAS, Stemcell Technologies) | 40 μ L |
| Differentiation medium: NeuroCult™ Basal Medium | 18 mL |
| NeuroCult™ Differentiation Supplement (Mouse) (Stemcell Technologies) | 2 mL |

直径 100 μ m 程度に増殖させた MEB5 cells のニューロスフィアを 50 mL 遠沈管に回収し、遠心分離する (20 °C, 5,000 rpm, 5 min). 上清を取り除き NeuroCult™ Chemical dissociation kit (Mouse) (Stemcell Technologies) の solution A を 500 μ L 加え、450 μ L に設定したピペッターで泡をたてないように 30 回ピペッティングする。solution B を 125 μ L 加え、30 回ピペッティングする (0 min). 3 min, 7 min において 30 回ピペッティングをする。8 min において solution C 40 μ L を加え、ピペッティングし、proliferation medium を 350 μ L 加え、細胞数を計測する。Fiblonectin/Laminine 溶液を回収し、プレートが乾燥する前に細胞を播種する (24 well plate; 2×10^4 cells/well, 6 cm dish, 2×10^5 cells/dish). 12 hr 後、血清不含培地を 500 μ L 加え、洗浄し EGF 等を除去した後、サンプルを目的濃度に希釈し

た分化用培地を 500 μ L 加え培養する (37°C, 5 % CO₂, 4-7days).

免疫染色

免疫染色に用いる buffer 及び抗体液等は以下の用に調製した (24 well plate 1 枚分) .

1 % BSA: BSA (Merck) 1.2 g + PBS 120 mL

10 % BSA: 1.6 g + PBS 16 mL

Blocking Buffer: 10 % BSA 5 mL + 20 % Triton X-100 (Wako) 7.5 μ L

Buffer A: 1 % BSA 11 μ L + 20 % Triton X-100 5.5 μ L

Primary antibody solution: 10 % BSA 5 mL

0.5 mg/mL Anti- β -Tubulin, Neuronal Class III, Mouse-Mono (Tuj-1) (R&D systemsTM)
10 μ L (1:500)

Rabbit anti-GFAP Polyclonal Antibody (VERITAS) 12.5 μ L (1:400)

Secondary antibody solution: 10 % BSA 5 mL

Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Life technologies) 12.5 μ L (1:400)

Alexa Fluor® 555 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Life technologies) 25 μ L (1:200)

RNase solution Buffer A 5 mL

10 mg/mL RNase 100 μ L (final conc. 200 μ g/mL)

To-PRO-3 (InvitrogenTM) solution Buffer A 5 mL

10 mM TO-PRO-3 (InvitrogenTM) 15 μ L

4-7 日間培養後、培地を除き 4% ホルムアルデヒドを 500 μ L 加え、細胞を固定する (r.t., 20 min). ホルムアルデヒドを除き、1% BSA 500 μ L で 3 回洗浄した。blocking buffer を 200 μ L 加え静置した (r.t., 45 min). Blocking buffer を除き、Primary antibody solution を 200 μ L 加え、静置した (4°C, over night). 1% BSA 500 μ L で 3 回洗浄し、secondary antibody solution を 200 μ L 加え静置した (r.t., 暗所, 1hr). 1 % BSA 500 μ L で 3 回洗浄し、RNase solution を 200 μ L 加え静置した (37 °C, 1hr). PBS 500 μ L で 3 回洗浄し、To-PRO-3 solution を 200 μ L 加え静地した (r.t., 暗所, 10 min). PBS 500 μ L で 3 回洗浄し、PBS を 200 μ L 加えた後、Micro Cover glass をプレパラート (Micro Slide Glass Fine Frost, Matsunami Glass Ind. Ltd.) 上に移し Prolong gold with DAPI (InvitrogenTM) を 1 滴添加し、24x24 mm Micro Cover Glass (Matsunami Glass Ind. Ltd.) を載せた。蛍光画像の取得には LSM700 (ZEISS) を用いた。

Notch シグナル活性化条件下での神経幹細胞 MEB5 cells 分化アッセイ

上記と同様の方法でプレートをコーティングし，neurocult dissociation kit を用いて細胞をディソシエーションし，細胞を播種する (24 well plate; 2×10^6 cells/well, 6 cm dish, 2×10^7 cells/well). 12 hr 後，500 μ L 血清不含培地を加え，洗浄した後，サンプルを目的濃度に希釈した分化用培地を 500 μ L 加え培養する (37°C, 5% CO₂, 4 days). 免疫染色は前述と同様の方法で行なう.

参考文献

- [1] Internet Material (人口動態統計)
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/81-1a2.pdf>
- [2] Newman, D. J., Cragg, D. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 461-477
- [3] Fietz, M. J., Concordet, J. P., Barbosa, R., Johnson, R.; Krauss, S.; McMahon, A. P., Tabin, C., Ingham, P. W. *Dev. Suppl.* **1994**, *120*, 43-51.
- [4] Mann, R.K., Beachy, P. A. *Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 891–923.
- [5] Chen, M. H., Li, Y. J., Kawakami, T., Xu, S. M., Chuang, P. T. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 641–659.
- [6] Amankulor, N. M., Hambardzumyan, D., Pyonteck, S. M., Becher, O. J., Joyce, J. A., Holland, E. C. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 10299-10308.
- [7] Sato, N., Leopold, P. L., Crystal, R. G. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 855-864.
- [8] Solanas, G., Benitah, S. A. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 737-748.
- [9] Ohba, S., Kawaguchi, H., Kugimiya, F., Ogasawara, T., Kawamura, N., Saito, T., Ikeda, T., Fujii, K., Miyajima, T., Kuramochi, A., Miyashita, T., Oda, H., Nakamura, K., Takato, T., Chung U.I. *Dev. Cell.*, **2008** *14*, 689-699.)
- [10] Soufir, N., Gerard, B., Portela, M., Brice, A., Liboutet, M., Saiag, P., Descamps, V., Kerob, D., Wolkenstein, P., Gorin, I., Lebbe, C., Dupin, N., Crickx, B., Basset-Seguín N., Grandchamp, *Br. J. Cancer*, 2006, *95*, 548–553.
- [11] Stecca, B.; Ruiz i Altaba, A. *J. Neurobiol.* **2005**, *64*, 476-490.
- [12] Fan, L., Pepicelli, C. V., Dibble, C. C., Catbagan, W., Zarycki, J. L., Laciak, R., Gipp, J., Shaw, A., Lamm, M. L. G., Munoz, A., Lipinski, R., Thrasher, J. B., Bushman, W. *Endocrinology* **2004**, *145*, 3961–3970.
- [13] Yauch, R. L., Gould, S. E., Scales, S. J., Tang, T., Tian, H., Ahn, C. P., Marshall, D., Fu, L., Januario, T., Kallop, D., Nannini-Pepe, M., Kotkow, K., Marsters, J. C., Rubin, L. L., de Sauvage, F. J. *Nature*, **2008**, *455*, 406–410.
- [14] Li, Y., Maitah, M. Y., Ahmad, A., Kong, D., Bao, B., Sarkar, F. H. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 49.
- [15] Chen, J. K., Taipale, J., Cooper, M. K., Beachy, P. A. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2743.
- [16] Incardona, J. P., Gaffield, W., Kapur, R. P., Roelink, H. *Development* **1998**, *125*, 3553.
- [17] Williams, J. A., Guicherit, O. M., Zaharian, B. I., Xu, Y., Chai, L., Wichterle, H., Kon, C., Gatchalian, C., Porter, J. A., Rubin, L. L., Wang, F. Y. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**,

100, 4616.

[18] Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., Beachy, P. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14071.

[19] Atwood, S. X., Chang, A. L. S., Oro, A. E. *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 193.

[20] Petrova, E., Rios-Esteves, J., Ouerfelli, O., Glickman, J. F., Resh, M. D. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 247.

[21] Stanton, B. Z., Peng, L. F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Duffner, J. L., Taveras, K. M., Hyman, J. M., Lee, S. W., Koehler, A. N., Chen, J. K., Fox, J. L., Mandinova, A. Schreiber, S. L. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 154.

[22] Lauth, M., Bergström, Å., Shimokawa, T., Toftgård, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, *104*, 8455.

[23] Firestone, A. J., Weinger, J. S., Maldonado, M., Barlan, K., Langston, L. D., O'Donnell, M., Gelfand, V. I., Kapoor, T. M., Chen, J. K. *Nature* **2012**, *484*, 125.

[24] Hosoya, T., Arai, M. A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M. *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 1082.

[25] Arai, M. A., Tateno, C., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9420.

[26] Rifai, Y., Arai, M. A., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M. *J. Nat. Prod.*, **2010**, *73*, 995.

[27] Arai, M. A., Tateno, C., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Kawabe, S., Ishibashi, M. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1133.

[28] Rifai, Y., Arai, M. A., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *21*, 718.

[29] Arai, M. A., Fujimatsu, T., Uchida, K., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ishibashi, M. *Mol. BioSyst.* **2013**, *9*, 1012.

[30] Arai, M. A., Uchida, K., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ishibashi, M. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 134.

[31] a: Internet material: 医療産業政策研究所 アンメット・メディカル・ニーズに対する医薬品の開発・承認状況

http://www.jpma.or.jp/about/issue/gratis/newsletter/archive_until2014/pdf/2010_140_11.pdf

[32] Internet material: ヒューマンサイエンス振興財団 国内基盤技術調査報告書 「60 疾患の医療ニーズ調査と新たな医療ニーズ」

http://www.jhsf.or.jp/paper/report/report_201401.pdf

- [32] Iso, T., Kedes, L., Hamamori, Y. *J. Cell. Physiol.* **2003** *194*, 237 – 255.
- [33] Weng, A.P., Millholland, J. M., Yashiro, O. Y., Arcangeli, M. L., Lau, A., Wai, C., Del Bianco, C., Rodriguez, C.G., Sai, H., Tobias, J., Li, Y., Wolfe, M. S., Shachaf, C., Felsher, D., Blacklow, S.C., Pear, W. S., Aster, J.C. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 2096–2109.
- [34] Ronchini, C., Capobianco, A. *J. Mol. Cell. Biol.* 2001, *21*, 5925–5934.
- [35] Oswald, F., Liptay, S., Adler, G., Schmid, R. M. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 2077–2088.
- [36] Imayoshi, I., Kageyama, R. *Neuron* **2014**, *82*, 9-23.
- [37] Louvi, A., Artavanis-Tsakonas, S., *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 93-102.
- [38] Morohashi, Y., Kan, T., Tominari, Y., Fuwa, H., Okamura, Y., Watanabe, N., Sato, C., Natsugari, H., Fukuyama, T., Iwatsubo, T., Tomita, T. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 14670-14676.
- [39] Wong, G.T., Manfra, D., Poulet F. M., Zhang, Q., Josien, H., Bara, T., Engstrom, L., Pinzon-Ortiz, M., Fine, J. S., Lee, H. J., Zhang, L., Higgins, G. A., Parker, E. M. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 12876-12882.
- [40] Krop, I., Demuth, T., Guthrie, T., Wen, P. Y., Mason, W. P., Chinnaiyan, P., Butowski, N., Groves, M. D., Kesari, S., Freedman, S. J., Blackman, S., Watters, J., Loboda, A., Podtelezchnikov, A., Lunceford, J., Chen, C., Giannotti, M., Hing, J., Beckman, R., and LoRusso, P. *J. Clin. Oncol.* 2012, *30*, 2307-2313.
- [41] Harrison, H., Farnie, G., Howell, S. J., Rock, R. E., Stylianou, S., Brennan, K. R., Bundred, N. J., Clarke, R. B. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 709-718.
- [42] Wang, Z., Zhang, Y., Banerjee, S., Li, Y., Sarkar, F. H. *Cancer* **2006**, *106*, 2503-2513.
- [43] Wang, Z., Zhang, Y., Banerjee, S., Li, Y., Sarkar, F. H. *Int. J. Cancer* **2006**, *118*, 1930-1936.
- [44] Regl, G., Neill, G. W., T., Eichberger, T., Kasper¹, M., Ikram, M. S., Koller, J., Hintner, H., Quinn, A. G., Frischauf, A. -M., Aberger, F. *Oncogene* **2002**, *21*, 5529-5539.
- [45] Carte, B. K., Carr, S.; DeBrosse, C., Hemling, M. E., MacKenzie, L., Offen, P., Berry, D. E. *Tetrahedron* **1991**, *47*, 1815-1822.
- [46]] Shen, C. C., Cheng, J. J., Lay, H. L., Wu, S. Y., Ni, C. L., Teng, C. M., Chen, C. C. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 198-201.
- [47] Mishra, L. C., Singh, B. B., Dagenais, S. *Altern. Med. Rev.* **2000**, *5*, 334.
- [48] Zhang, H., Samadi, A. K., Gallagher, R. J., Araya, J. J., Tong, X., Day, V. W., Cohen, M. D., Kindscher, K., Gollapudi, R., Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2532-2544.
- [49] Kirson, I., Glotter, E., Abraham, A., Lavie, D. *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2209-2219.

- [50] Nittala, S. S., Lavie, L. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2735-2739.
- [51]] Kupchan, S. M., Anderson, W. K.; Bollonger, P., Doskotch, R. W., Smith, R. M., Renauld, J. S., Schnoes, H. K., Burlingame, A. L., Smith, D. H. *J. Org. Chem.* **1969**, *34*, 3858-3866.
- [52] Pavletich, N. P., Pabo, C. O. *Science* **1993**, *261*, 1701-1707.
- [53] Searfoss, G. H., Jordan, W. H., Calligaro, D. O., Galbreath, E. J., Schirtzinger, L. M., Berridge, B. R., Gao, H., Higgins, M. A., May, P. C., Ryan, T. P. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46107-46116.
- [54] Kadiyala, M., Ponnusankar, S., Elango, K. J. *Ethnopharmacol.* **2013**, *150*, 32-50.
- [55] Park, H.-Y., Toume, K., Arai, M. A., Sadhu, S. K., Ahmed, F., Ishibashi, M. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 872-878
- [56] Cheung, H. T. A., Chiu, F. C. K., Watson, T. R., Wells, R. J. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1983**, 2827-35.
- [57] Singh, B., Rastogi, R. P., *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 752-62.
- [58] Brushweiler, F., Stockel, K., Reichstein, T., *Helv. Chim. Acta.* **1969**, *52*, 2276-303.
- [59] Roy, M. C., Chang, F. R., Huang, H. C., Chiang, M. Y.-N., Wu, Y. C. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1494-1499.
- [60] Warashina, T., Noro, T. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 217-226.
- [61] Kim, S.-M., Kim, M.-Y., Ann, E.-J., Mo, J.-S., Yoon, J.-H., Park, H.-S. *J. cell Sci.* **2011**, *125*, 1296-1308.
- [62] Rock, K. L., Gramm, C., Rothstein, L., Clark, K., Stein, R., Dick, L., Hwang, D., Goldberg, A. L. *Cell* **1994**, *78*, 761-771.
- [63] Dean, R. T., Jessup, W., Roberts, C. R. *Biochem. J* **1984**, *217*, 27- 40.
- [64] Šestan, N., Artavanis-Tsakonas, S., Rakic, P. *Science* **1999**, *286*, 741-746.
- [65] Borghese, L., Dolezalova, D., Opitz, T., Haupt, S., Leinhaas, A., Steinfarz, B., Koch, P., Edenhofer, F., Hampl, A., Brüstle, O. *Stem cell* **2010**, *28*, 955-964.
- [66] Saito, K., Fukuda, N., Matsumoto, T., Iribe, Y., Tsunemi, A., Kazama, T., Noro, Y. C., Hayashi, N. *Brain Res.* **2010**, *1358*, 20-29.
- [67] Larsson, R., Fridborg, H., Kristensen, J., Sundström, C. Nygren, P. *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 969.

謝辞

本研究に際し、御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 石橋 正己教授に厚く御礼申し上げます。

貴重な御助言、御指導を賜りました千葉大学千葉大学大学院薬学研究院 荒井 緑准教授、富山大学和漢医薬学総合研究所 當銘 一文准教授に心より感謝申し上げます。

同期の博士課程入学者として、そして助教として御指導、有意義な御意見を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 石川 直樹助教に感謝申し上げます。

熱帯植物の採取提供をして頂きましたテムコ株式会社 小谷野 喬博士、コンケン大学農学部 Thaworn Kowithayakorn 教授、クルナ大学 Samir K Sadhu 教授、ダッカ大学 Firoj Ahmed 教授に心より感謝申し上げます。

日々の研究生活において様々な場面で援助、協力して下さった活性構造化学研究室の皆様感謝申し上げます。

進学に際し、またその後の研究においても貴重なご意見を賜りました昭和大学 高松 智准教授そして日本大学 矢作 忠弘助教に心より感謝申し上げます。

これまでの長い学生生活において惜しみないサポートをして下さった家族に心より感謝致します。

主要論文目録

本学位論文の内容は、下記の発表論文による。

1. Hedgehog inhibitors from *Withania somnifera*

Yoneyama, T.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M.

Bioorg. Med. Chem. Lett. **2015**, *25*, 3541-3544.

学位論文審査

本学位論文の審査は、千葉大学薬学研究院で指名された下記の審査委員により行なわれた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）薬学博士 高山 廣光

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）薬学博士 斉藤 和季

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院）薬学博士 伊藤 素行

審査をして頂き、種々の貴重なご助言賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。