

南米産植物由来の NF- κ B 阻害物質
に関する構造化学的研究

2014

岡山理科大学大学院
理学研究科
材質理学専攻

光井 太一

目次

略語一覧

緒言 1

第1部 南米産薬用植物の成分研究

第1章 南米産キク科植物 *Senecio culcitioides* Sch. Bip. の成分研究

序論 4

第1節 実験材料及び方法

第1項 研究試料 5

第2項 新規 eremophilane 型セスキテルペノイド *culcitiolide* 類の単離・精製 5

第2節 結果と考察

第1項 *culcitiolide* 類の構造解析 7

第2項 考察 20

第3項 結論 23

第3節 実験の部 26

参考文献 32

スペクトルデータ 34

第2章 南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の成分研究

序論 51

第1節 実験材料及び方法

第1項 研究試料 52

第2項 新規 cassane 型セスキテルペノイド *echinalide* 類の単離・精製 53

第2節 結果と考察

第1項 *echinalide* 類の構造解析 54

第2項 考察 75

第3項 結論 76

第3節 実験の部 79

参考文献 85

スペクトルデータ 87

第2部 NF- κ B 阻害活性評価

序論 115

第1章 実験材料及び方法

第 1 節	細胞の保存及び培養	118
第 2 節	形質転換株の作成	118
第 3 節	NF- κ B 阻害活性評価	118
第 2 章 結果と考察		
第 1 節	<i>S. culcitioides</i> 由来 culcitiolide 類の NF- κ B 阻害活性	119
第 2 節	<i>C. echinata</i> 由来 echinalide 類の NF- κ B 阻害活性	121
第 3 節	考察	122
第 4 節	結論	122
第 3 章	実験の部	123
	参考文献	125
総括		126
業績		128
謝辞		131

略語一覽

NMR; nuclear magnetic resonance

TLC; thin-layer chromatography

ODS; octa decyl silyl

R_f ; ration of flow

Fr.; fraction

UV; ultraviolet

IR; infrared spectroscopy

(HR-) FAB-MS; (high resolution-) fast atom bombardment mass spectrometry

(HR-) EI-MS; (high resolution-) electron impact mass spectrometry

DEPT; distorsionless enhancement by polarization transfer

HMQC; hetero-nuclear multiple quantum coherence

HSQC; hetero-nuclear single quantum coherence

^1H - ^1H COSY; proton-proton correlation spectroscopy

HMBC; hetero-nuclear multiple-bond connectivity

NOESY; nuclear overhauser enhancement and exchange spectroscopy

CD; circular dichroism

HPLC; high performance liquid chromatography

PAs; pyrrolizidine alkaloids

MTPA; methoxy trifluoromethyl phenyl acetic acid

Me; methyl

Et; ethyl

Ac; acetyl

TEA; triethylamine

*m*CPBA; *m*-chloroperbenzoic acid

DMAP; *N,N*-dimethyl-4-aminopyridine

NF- κ B; nuclear factor - κ B

I κ B; inhibitory of κ B

IKK; I κ B kinase

IL; interleukin

TNF- α ; tumor necrosis factor- α

DNA; deoxyribonucleic acid

SEAP; secreted alkaline phosphatase

Luc; luciferase

PBS; phosphate-buffered saline

緒言

生物はその生命や種を維持するために様々な化合物を生み出しており、これら天然物由来の化合物の中には我々にとっても有用なものが多くある。特に植物においては、自ら移動手段を持たないため、自己防衛や情報伝達などの目的で、他の生物に比べ、はるかに多くの二次代謝物を生産しており、人間はこれら多くの化合物の恩恵を受けてきた。セイヨウイチイの樹皮から発見されたパクリタキセルやニチニチソウから単離されたビンブラスチンなどは抗がん剤として利用されており、ケシの実から採取されるモルヒネは現在でも強力な鎮痛剤として使われている。また、強心配糖体であるジギトキシンはジギタリスの葉から発見された (図 1)。これら天然が生み出す化合物の最大の魅力は、その豊かな多様性である。近年、有機合成化学が目覚ましく発展を遂げ、化合物の構造を自在に操れるようになりつつある。さらに、コンピューター支援により化合物を設計することも可能になった現在においても、天然の生み出す化合物の重要性は非常に高く、その化学構造の多様性は未だに魅力を失っていない。

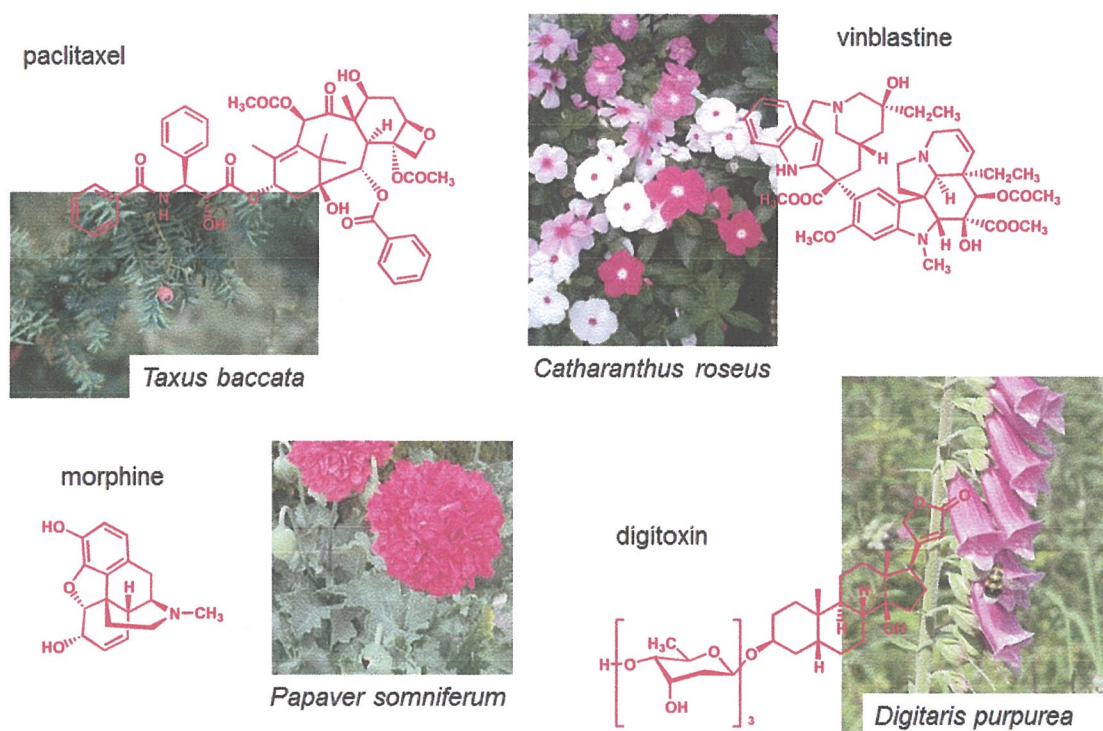


図 1 天然有機化合物の化学構造の多様性

天然物由来の生理活性物質探索は、各種機器分析技術の飛躍的な進歩に伴い、急速な発展を遂げており、「天然由来の有用化合物は、ほぼ採り尽くされた。」という考え方も一部で広まっている。そのため、天然由来の化合物探索は、さらなる多様性を獲得するための研究が主流となりつつある¹⁻⁴。しかし、発展途上国では、いまだ成分未解明の植物が数多く存在していることから、今後も有用化合物を天然より探索することは、極めて重要であると考えている。現在、世界に存在する植物の数は、種の定義や分類方法によって様々な説があるが、英国 Kew 王立植物園及び米国 Missouri 植物園がまとめた 2013 年版のデータベース (Version 1.1.) によると、約 35 万種存在しているとされている⁵。その中でも南米地域に生息する植物は非常に多様性に富んでいる。その

主な理由の一つとして、南米地域の多様な気候が挙げられる。南米アマゾン川流域は熱帯雨林気候が分布しており、多様な気候と赤道直下の太陽の光、アマゾン川を中心とした豊富な水資源などが豊かな土壌を産み、雨季の増水は肥沃な土を運び、さらなる豊かな土壌を形成する。一方、南米アンデス山脈では赤道直下とはいえ、標高 3000 m 付近では亜熱帯気候、4500 m 付近の地域は寒冷気候、さらに標高の高い地域はツンドラ気候の地域が分布しており、氷雪の山地である。このように多様な気候帯が南米に生息する種の多様性を産んでいると考えられる。

これまでの研究では、南米産植物を中心に世界中の薬用植物の抽出液に対して、様々な薬理活性スクリーニングを行ってきており、過去にはネパールの高山帯に自生しているカヤツリグサ科 *Kobresia Nepalensis* (Cyperaceae) 由来の新規スチルペノイドオリゴマー類に強力な II 型トポイソメラーゼ阻害活性を見出している⁶⁻⁸。さらに、南米産マメ科植物 *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) 由来の新規カルコンオリゴマー類については、それらが有する強力な II 型トポイソメラーゼ阻害活性に加えヒト白血病細胞株 HL-60 に対するアポトーシス誘導活性についても報告した^{9,10}。以上のような背景から、私は、南米地域に生息する希少植物に焦点を絞り、それらが生み出す化合物の化学構造を分光学的手法により解析し、それらの物理化学的性質を明らかにしていくこととともに、化合物が有する生理活性及びその化学構造との相関関係を明らかにする目的で本研究に着手した。その一環として、当研究室で行っている様々な薬理活性スクリーニングのうち、炎症反応に関与する核内転写因子 NF- κ B に着目し、その阻害剤を天然物由来の化合物から探索することを計画した。

本論文は2部構成とし、第1部 第1章では、ペルーで採取された *Senecio culcitioides* Sch. Bip. の成分研究及びブラジルで採取された *Caesalpinia echinata* Lam. の成分研究について報告する。第1章で報告する、*S. culcitioides* は、当研究室の薬理活性スクリーニングにおいて、NF- κ B に対する阻害活性を有することが明らかとなったが、その成分に関する報告はこれまでになかった。したがって本植物からは、新規生理活性物質の発見が期待され、その成分研究に着手した。その結果、今回新たに7種の新規 eremophilane 型セスキテルペノイドを発見し、culcitiolide E-K と命名した。それらの化学構造について、各種スペクトルデータを詳細に検討することで決定した。

第1部 第2章では、*C. echinata* の成分研究について報告する。本植物も核内転写因子 NF- κ B に対する阻害活性スクリーニングにおいて、その阻害活性が認められたが、本植物の化学成分に関する詳細な報告例は筆者が調べる限り3例しかないことから、より詳細な成分検索に着手した。本植物からは、echinalides と命名した8種の新規 cassane 型ジテルペノイドが見いだされ、それらの絶対立体配置を含めた化学構造について詳細に検討した。

第2部では、これら二つの植物より単離された新規化合物について、NF- κ B に対する阻害活性を評価した結果を報告する。さらに、それらの構造と活性の相関関係についても併せて報告する。

参考文献

1. Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T., *Nature chemistry*, **2010**, *2* (10), 858-64.
2. Brakhage, A. A.; Schroeckh, V., *Fungal Genet Biol* **2011**, *48* (1), 15-22.
3. Kawamura, T.; Matsubara, K.; Otaka, H.; Tashiro, E.; Shindo, K.; Yanagita, R. C.; Irie, K.; Imoto, M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19* (14), 4377-85.
4. López, S. N.; Ramallo, I. A., *PNAS*, **2007**, *104* (2), 441-444.
5. The Plant List (2013). <http://www.theplantlist.org/>.
6. Yamada, M.; Hayashi, K.-I.; Hayashi, H.; Ikeda, S.; Hoshino, T.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Iinuma, M.;

- Nozaki, H., *Phytochemistry*, **2006**, *67* (3), 307-13.
7. Yamada, M.; Hayashi, K.-I.; Hayashi, H.; Tsuji, R.; Kakumoto, K.; Ikeda, S.; Hoshino, T.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Ito, T.; Iinuma, M.; Nozaki, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, *54* (3), 354-8.
 8. Yamada, M.; Hayashi, K.-i.; Ikeda, S.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Ito, T.; Iinuma, M.; Nozaki, H., *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29* (7), 1504-7.
 9. Nozaki, H.; Hayashi, K.-i.; Kido, M.; Kakumoto, K.; Ikeda, S.; Matsuura, N.; Tani, H.; Takaoka, D.; Iinuma, M.; Akao, Y., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48* (47), 8290-8292.
 10. Ohira, S.; Takaya, K.; Mitsui, T.; Kido, M.; Kakumoto, K.; Hayashi, K.-i.; Kuboki, A.; Tani, H.; Ikeda, S.; Iinuma, M.; Akao, Y.; Nozaki, H., *Tetrahedron Lett.*, **2013**, *54* (37), 5052-5055.

第1部 南米産薬用植物の成分研究

第1章 南米産キク科植物 *Senecio culcitioides* Sch. Bip.の成分研究

序論

Senecio 属の植物は、世界各地に分布しており、現在 1500 種以上が知られている¹。それらの化学成分についても研究が進んでおり、ピロリジジナルカロイド (pyrrolizidine alkaloid; PAs) や eremophilane 型セスキテルペノイドなどが報告されている^{1,2}。ピロリジジナルカロイドは、主にキク科 (Asteraceae)、マメ科 (Fabaceae)、ムラサキ科 (Boraginaceae) などの植物から単離報告がある化合物群であり³、一般に様々な肝毒性や発がん性が知られている^{4,5}。これらを多く含む植物は毒性植物として知られているものも多い。*Senecio* 属の植物においては、*Senecio brasiliensis* や *Senecio miser* に含まれている (*N*-oxide) intergerrimine に、抗潰瘍活性⁶や摂食阻害作用⁷が報告されている。一方、eremophilane 型セスキテルペノイドは、同じキク科の *Ligularia* 属、*Montanoa* 属、*Petasites* 属の植物から多数の報告例がある化合物群である。その生理活性については、抗菌活性⁸や抗結核作用⁹なども知られている (図 1-1)。

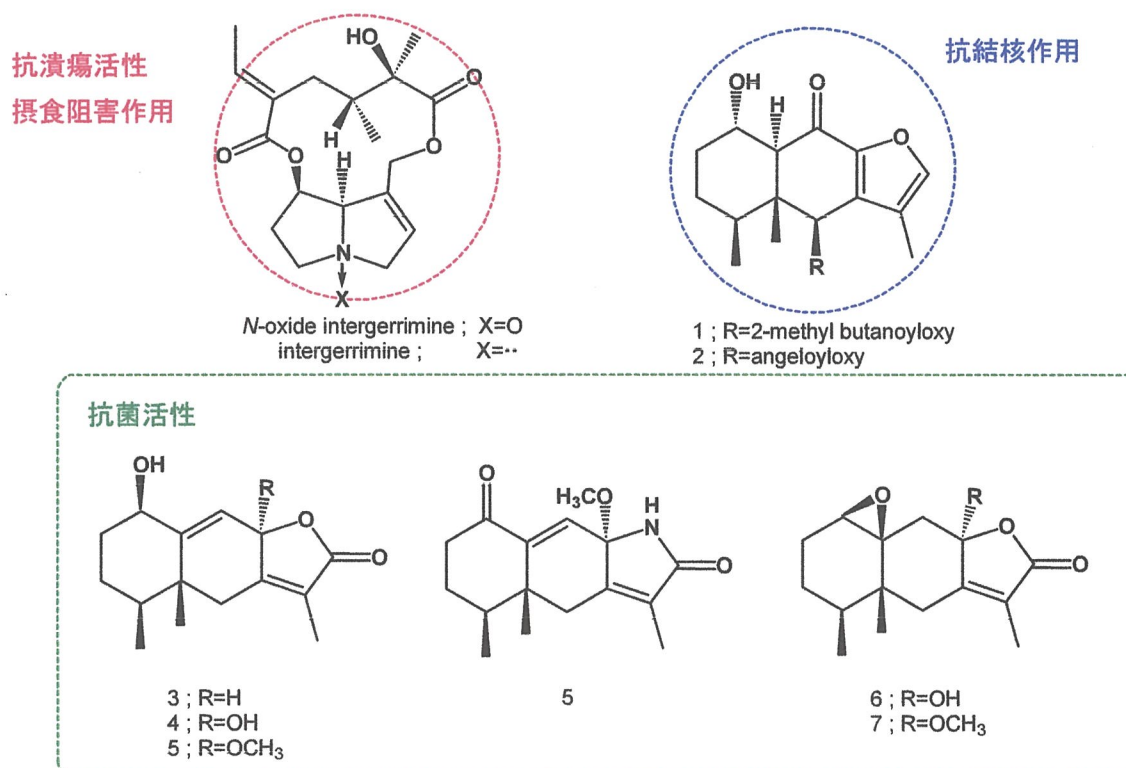


図 1-1 *Senecio* 属の生理活性成分

今回、南米産薬用植物の抽出物に対し、様々な薬理活性スクリーニングを行った結果、炎症反応に関与する核内転写因子 NF- κ B (nuclear factor - κ B) に対する阻害活性試験において、本南米産キク科植物 *Senecio culcitioides* Sch. Bip. の幹部メタノール抽出物に、顕著な阻害活性が認められたため、本植物の成分検索を開始した。本植物からは、過去に我々の先行研究によって、4 種の新規 eremophilane 型セスキテルペノイド *culcitiolide A - D* が単離・構造決定され、2012 年に Nozaki らによって報告された¹⁰。さらに、これらの化合物のうち、*culcitiolide C* に非常に強い NF- κ B 阻害

活性があることを見出している。以上のような背景から、さらなる NF- κ B に対する阻害物質の発見が期待されたため、本植物のより詳細な成分検索に着手した。

第1節 実験材料及び方法

第1項 研究試料

Senecio culcitioides Sch. Bip. (図 1-2) は、キク科 [Asteraceae (Compositae)] サワギク属 (*Senecio*) に属し、南米アンデス地方標高 4500 - 5100 m の地に分布している。現地では Huamanripa の名で呼ばれており、全長約 15 - 30 cm の植物で、夏から秋にかけて黄色い花を咲かせる。本植物は、喘息や気管支炎の治療に利用されているが¹¹、これまでにその成分に関する報告は 2012 年に Nozaki らが発表したもののみである¹⁰。



図 1-2 *Senecio culcitioides* Sch. Bip.¹²

第2項 新規 eremophilane 型セスキテルペノイド culcitiolide 類の単離・精製

S. culcitioides の幹部メタノール抽出物 (74 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 7.0 cm \times 100.0 cm, gradient mixture of chloroform - methanol) にて精製し、溶出画分を大きく 6 つのフラクション (Fr.1 - Fr.6) に取り分け、減圧濃縮を行った。得られた Fr.2 (22.4 g) を同様にシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 5.0cm \times 60.0 cm, gradient mixture of *n*-hexane - EtOAc) によって精製し、7 つのフラクション (Fr.1 - Fr.7) に取り分け、減圧濃縮を行った。さらに、カラムクロマトグラフィーによる精製を繰り返した結果、Fr.2-3 より culcitiolide F, G (13.4 mg) の混合物及び culcitiolide H, I (10.8 mg) の混合物が得られた。また、Fr.2-4 より、culcitiolide E (10.8 mg) を単離し、Fr.3-3 からは、culcitiolide K (3.5 mg) を単離した。一方、Fr.5 をさらに精製することで、culcitiolide J (3.56 g) を得た (図 1-3)。

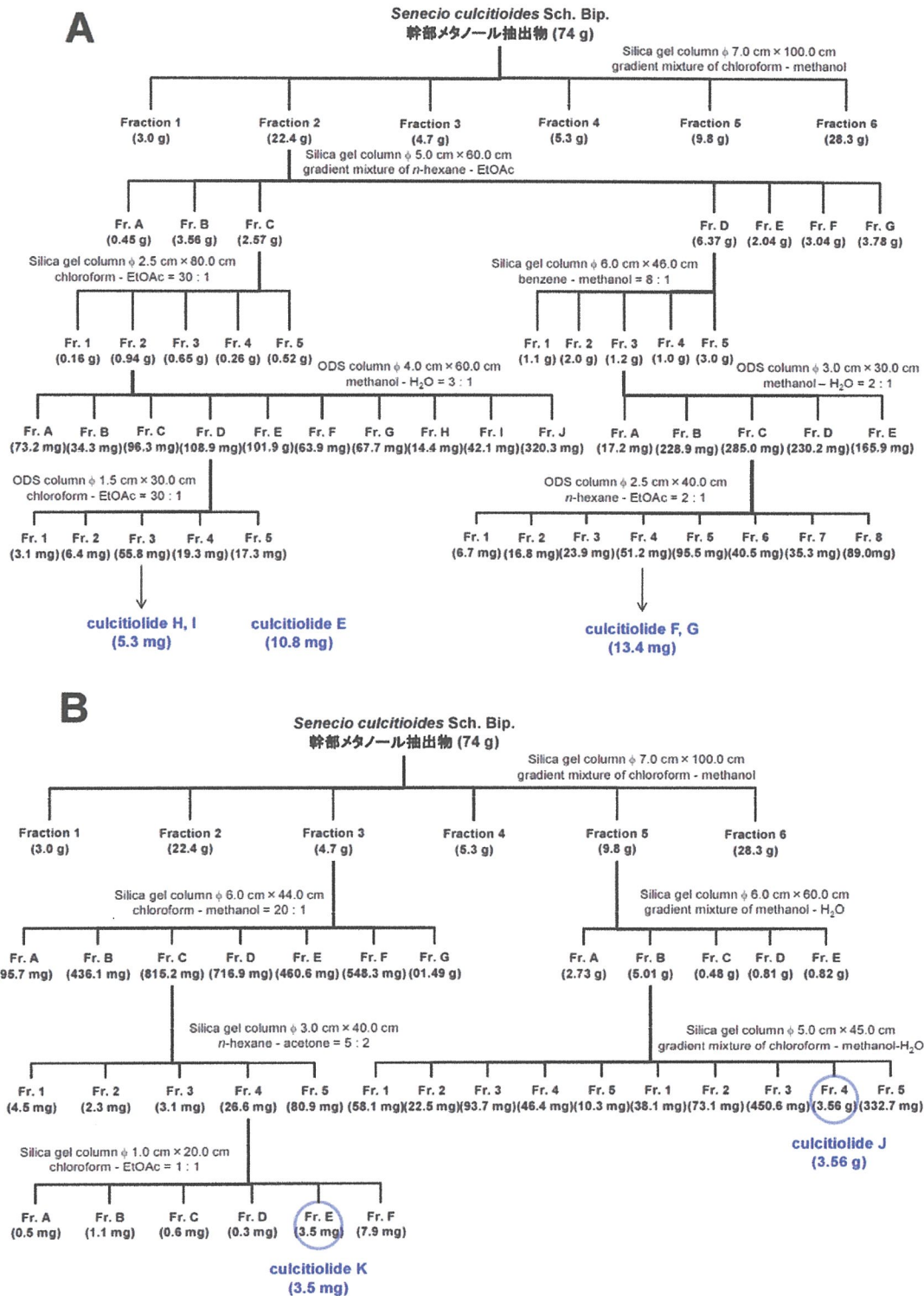


図 1-3 *Senecio culcitioides* Sch. Bip. のメタノール抽出物の各種クロマトグラフィーによる分画図
(A) culcitiolide E - I の単離・精製, (B) culcitiolide J, K の単離

第2節 結果と考察

第1項 *culcitiolide* 類の構造解析

当研究室では、過去に本植物のメタノール抽出物から単離された4種の新規 *eremophilane* 型セスキテルペノイド類 *culcitiolide* A - D の構造を決定している¹⁰。今回、さらに7種の新規 *eremophilane* 型セスキテルペノイド [*culcitiolides* E (1) - K (7)] の単離・精製を行い、その化学構造について、物理化学的性質を測定し、さらに NMR を中心とした各種機器分析手法でその構造を解析した。以下にその詳細を記す。

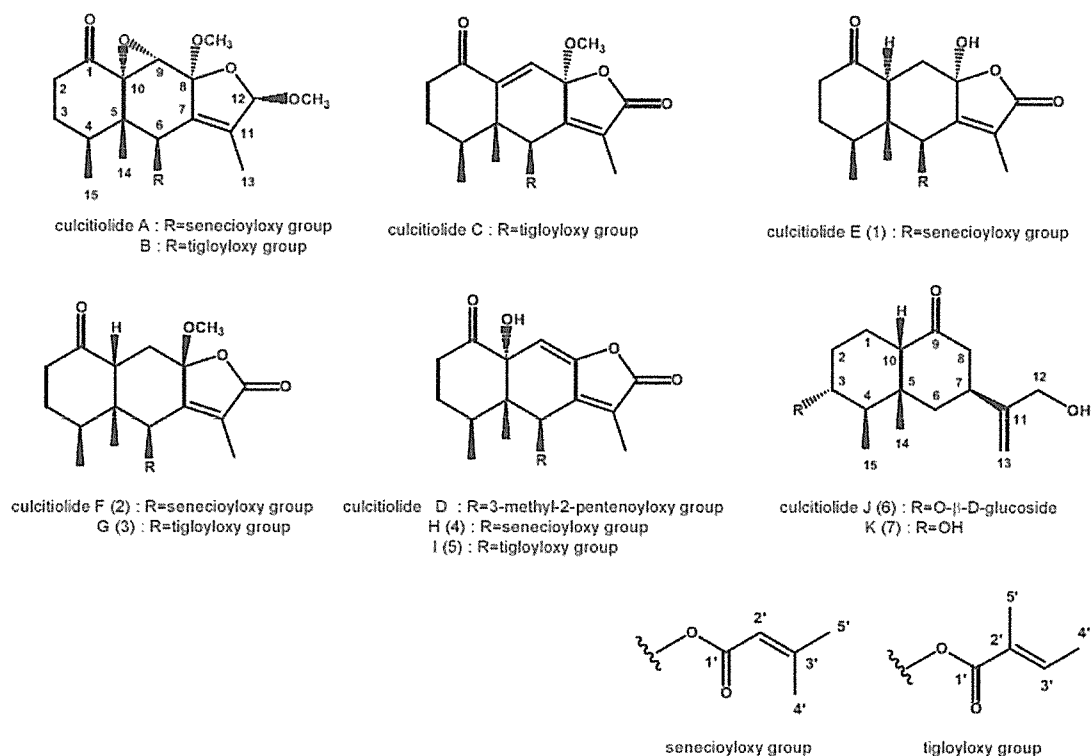


図 1-4 *Senecio culcitioides* Sch. Bip. より単離された成分

culcitiolide E (1)

culcitiolide E (1) は、淡黄色オイルとして単離された。chloroform, acetone には易溶で、methanol には難溶である。TLC において展開溶媒として、benzene - EtOAc = 3:1 を用いた場合、 R_f 値は 0.38 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては淡赤色のスポットとして確認された。FABMS スペクトルにおいて、 m/z 363 $[M+H]^+$, 385 $[M+Na]^+$ に擬似分子イオンピークが確認されたことから分子量を 362 と推定した。さらに、HR-FAB-MS スペクトルにおいて、 m/z 385.1625 $[M+Na]^+$ (Calcd. for $C_{20}H_{27}O_6$; 385.1627, Δ -0.2 mmu) に Na 付加型分子イオンピークが観測されたことから、分子式を $C_{20}H_{26}O_6$ と決定した。IR スペクトルからはカルボニル基 (1713cm^{-1}) 及び α , β -不飽和 γ -ラクトン環 (1761cm^{-1}) の存在が示唆された。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル [図 1-5 (A)] では、1 本の三級メチル基 [δ_{H} 0.81 (3H, s)], 3 本のビニルメチル基 [δ_{H} 1.84 (3H, d,

$J=1.2$ Hz), 1.87 (3H, d, $J=2.0$ Hz), 2.26 (3H, d, $J=1.2$ Hz)], 1 本の二級メチル基 [δ_{H} 1.01 (3H, d, $J=6.8$ Hz)], 1 本の低磁場シフトしたオキシメチンシグナル [δ_{H} 6.29 (1H, d, $J=2.0$ Hz)], 1 本のオレフィンプロトンシグナル [δ_{H} 5.95 (1H, br s)] が観測された. ^{13}C -NMR [図 1-5 (B)] 及び DEPT スペクトルからは, 1 本のオキシカーボンシグナル [δ_{C} 77.0 (d)], 1 本のアセタールカーボンシグナル [δ_{C} 104.0 (s)], 4 本のオレフィンカーボンシグナル [δ_{C} 115.5 (d), 124.4 (s), 156.4 (s), 160.4 (s)], 1 本のカルボニルエステルシグナル [δ_{C} 165.6 (s)] 及び 1 本のケトカルボニル基のシグナル [δ_{C} 208.6 (s)] を含む合計 20 本のシグナルが確認された. これらのスペクトルは *culcitiolide* A-D¹⁰ と類似しており, 本化合物は *eremophilane* 型セスキテルペノイドであることが示唆された. そこで, 本化合物の化学構造をより詳細に解析するため各種二次元 NMR スペクトルによる解析を行った.

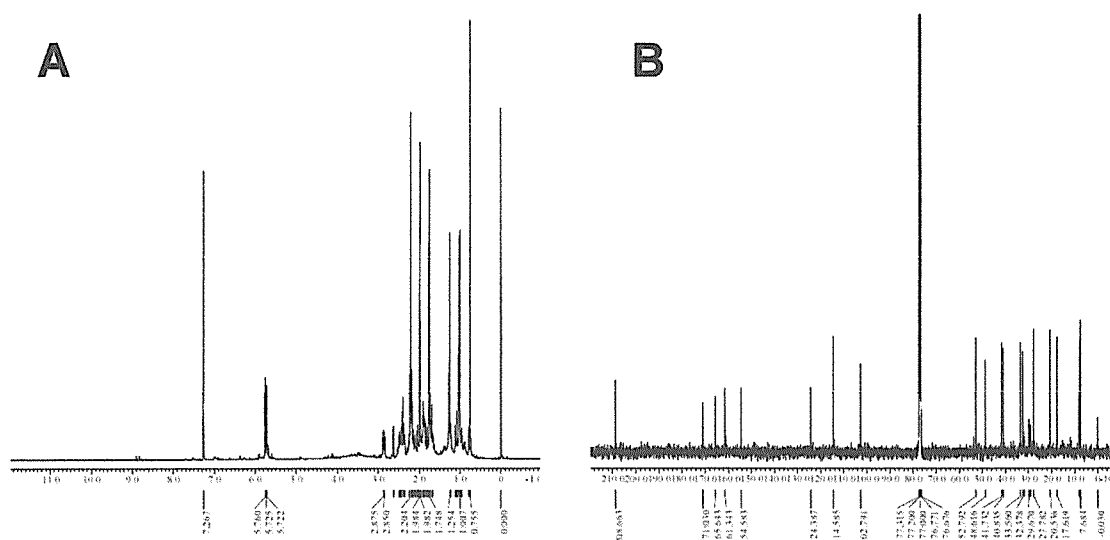


図 1-5 *culcitiolide* E (1) の 1D-NMR スペクトル (in CDCl_3) (A) ^1H -NMR (400 MHz), (B) ^{13}C -NMR (100 MHz)

まず, 直接結合する水素と炭素を検出する HMQC スペクトルの測定を行い, DEPT 135° パルスの結果と合わせて検討を行うことで, それぞれの水素と炭素の結合が明らかとなった (図 1-6). なお, DEPT スペクトルからは, 観測される炭素の級数が判定できる.

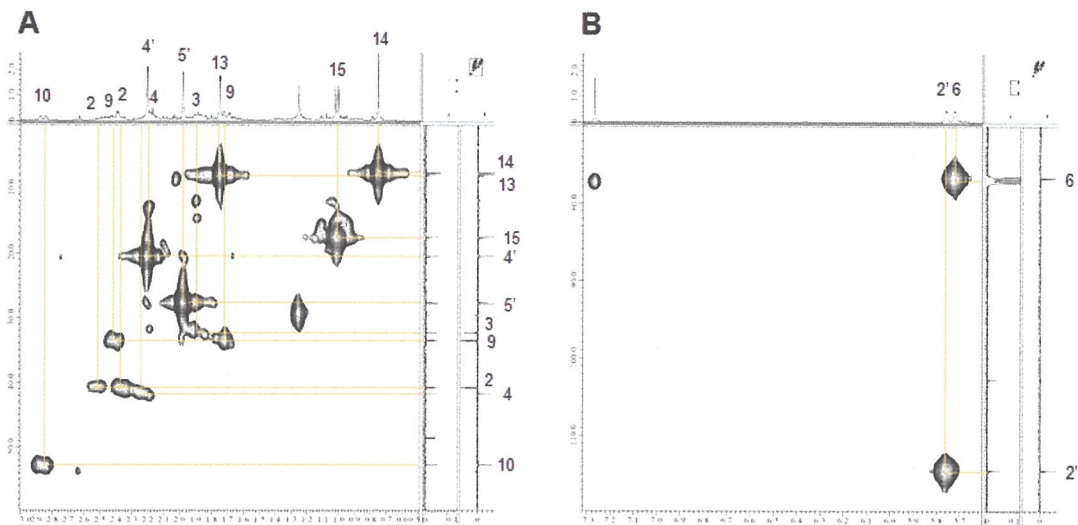
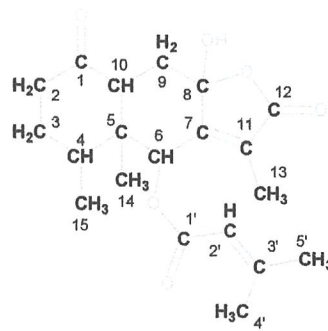


図 1-6 culcitolide E (1) の HMOC スペクトル

次に、互いにスピン結合している水素同士を検出する ^1H - ^1H COSY では、2 位から 15 位までの繋がりが明らかとなった。また、H-9/H-10 との相関も確認できた (図 1-7)。なお、H-6/H-13, H-2'/H-4', 5' の相関は、遠隔カップリングに由来するものである。

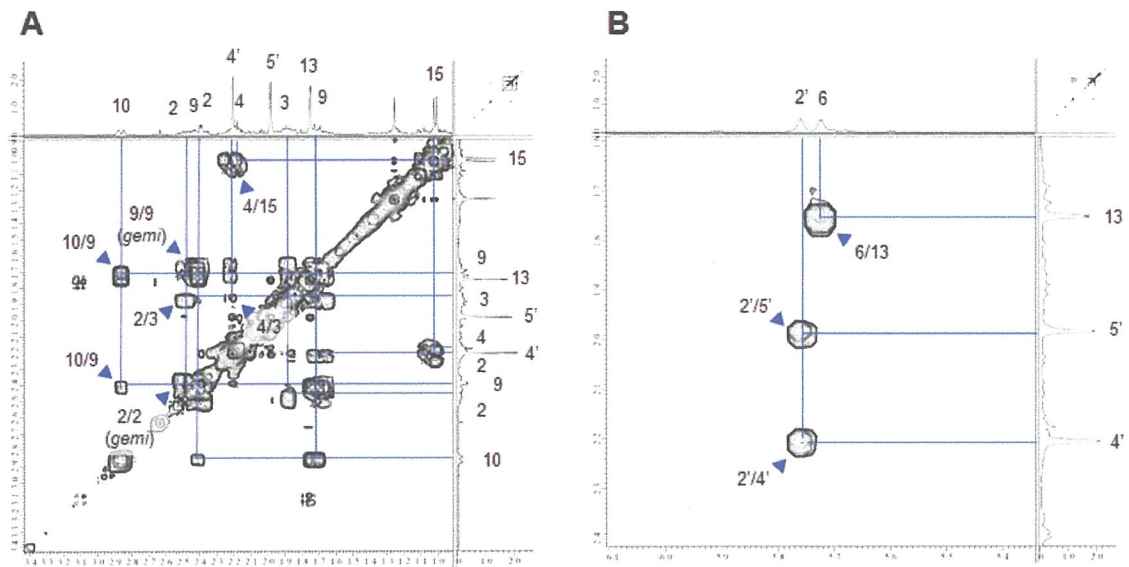
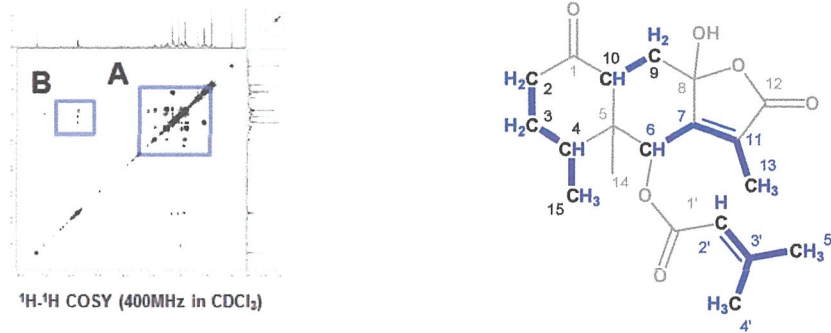


図 1-7 culcitiolide E (1) の $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY スペクトル
 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY correlations (blue lines)

最後に、ロングレンジスピ結合している水素と炭素を検出する HMBC スペクトルの測定を行った (図 1-8). その結果, H-15 (二級メチル基) からは C-3, 4, 5 へ, H-14 (三級メチル基) からは C-4, 5, 6, 10 へ相関が認められた. さらに, H-9 から C-1, 5, 7, 8 へ, H-2 から C-3, 4, 10 への相関も確認された. これらに加えて, $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY の結果も踏まえると, 本化合物は eremophilane 骨格を有していることが明らかになった.

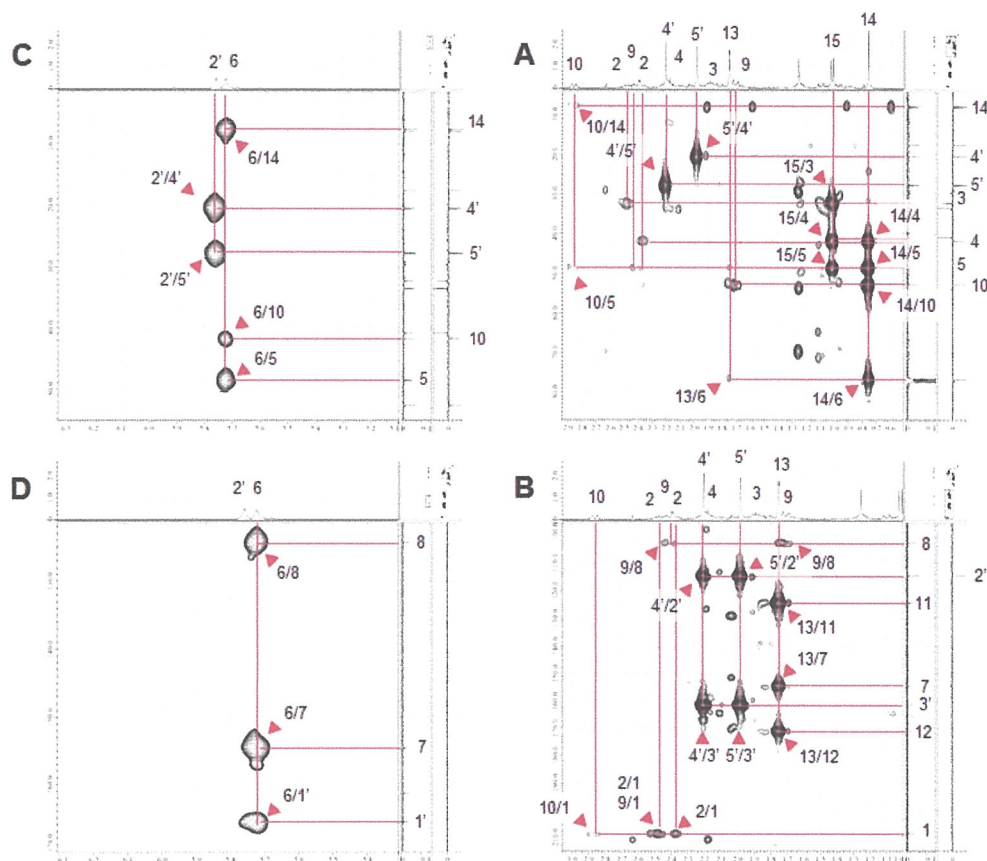
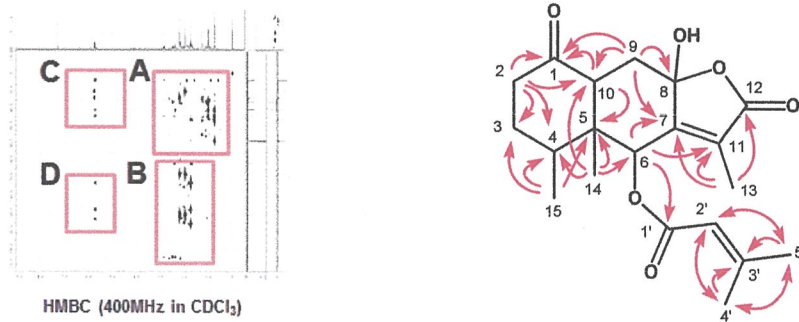


図 1-8 calcitriolide E (1) の HMBC スペクトル
HMBC correlations (red arrows)

さらに詳細な HMBC スペクトルの解析の結果, H-13 からは C-7, 11, 12 へ, H-9 から C-8 へ相関が確認されたことから, 6 位と 9 位に結合した α , β -不飽和 γ -ラクトン環の存在が明らかとなった。最後に, H-2' から C-4', 5' 位に ^1H - ^1H COSY 及び HMBC 相関が認められ, C-1' へは H-6 及び H-2' のプロトンから相関が確認されたことから, 本化合物の平面構造を 6 位に senecioidyl 基を有する図 1-9 のような eremophilane 型セスキテルペノイドであることが明らかとなった。

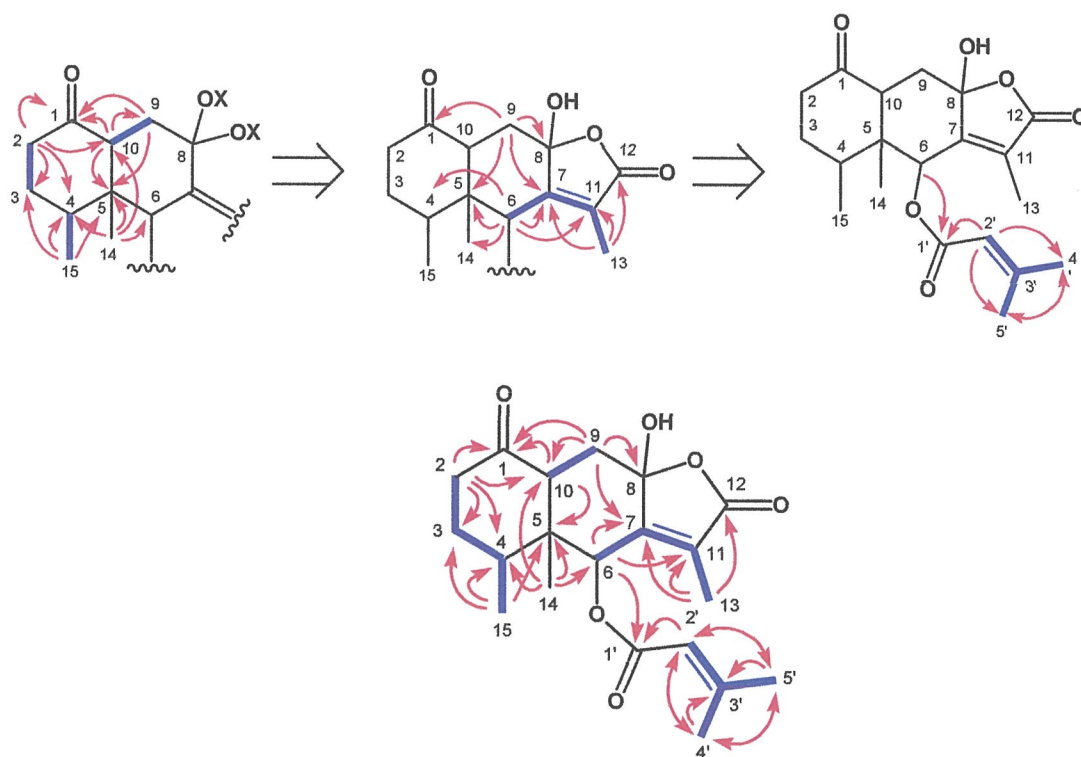


図 1-9 culcitolide E (1) の平面構造解析, ^1H - ^1H COSY (blue lines)及び HMBC (red arrows)

本化合物の相対立体配置については, NOESY スペクトルによる検討を行った. NOESY スペクトルでは, 空間的に近接した核を検出できることから, 分子の立体化学が決定できる. まず, H-14 からは, H-3 $_{\beta}$ 及び H-9 $_{\beta}$ へ相関が確認されたことから, 14 位メチル基は β -axial に配向であることが明らかとなった. また, H-10 からは, 4, 6, 9 $_{\alpha}$ へ相関が確認されており, 本化合物のデカリン環は *trans* であると決定した. さらに, H-6 は, H-4, 10, 15 と相関が確認されたことから 6 位オキシメチンプロトンが α -axial に配向しており, senecioid 基は β -equatorial に配向であることが明らかとなった(図 1-10). しかしながら, 8 位の立体化学については, NOESY スペクトルによる検討からは決定が困難であった. なお, NOESY スペクトルについては, シグナル同士の重なり合いが少ない重ピリジン($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) を測定溶媒として用いた. それぞれの水素と炭素は, 先ほどと同様に ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBC のスペクトルデータから帰属した.

そこで, Naya らの論文^{13, 14} を参考に, 本化合物 8 位の相対立体配置の決定を試みた. Naya らは, H-13 及び H-6 (本化合物においては, 6 位オキシメチンプロトン) との間に観測される homoallylic coupling ($^5J_{\text{HH}}$) に着目している. すなわち, 8 位の立体化学に依存して, デカリン環の配座が変化することを利用し, H-6 と H-13 の二面角が約 90° を示す場合には, デカリン環部分は非ステロイド型が最も安定な配座となり, これらのプロトンが互いにカップリングすることを実験的に証明している. 一方, H-6 と H-13 の二面角が約 20° である場合, デカリン環部分はステロイド型の配座をとり, これらのカップリングは無視できる (観測されない) ことを示してある (図 1-11).

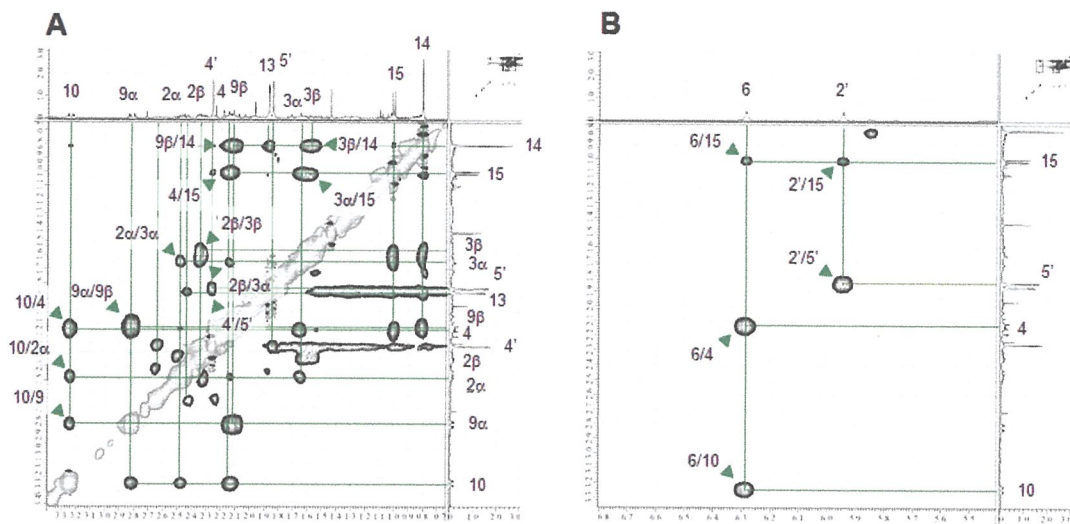
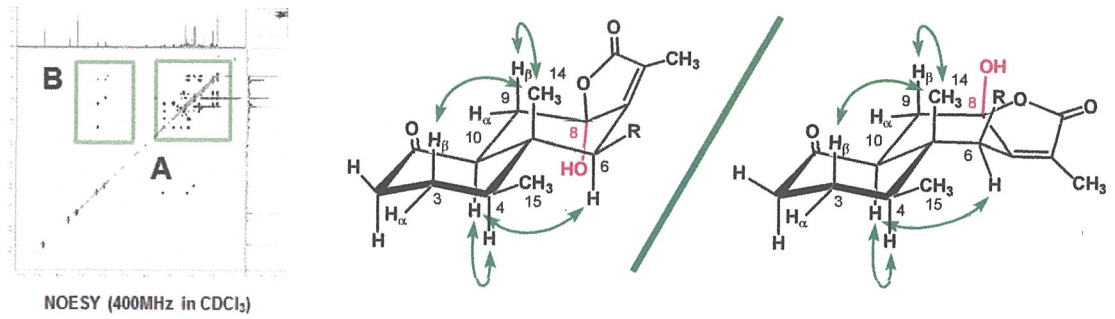


図 1-10 culcitolid E (1) の NOESY スペクトル key NOESY correlations (green arrow)

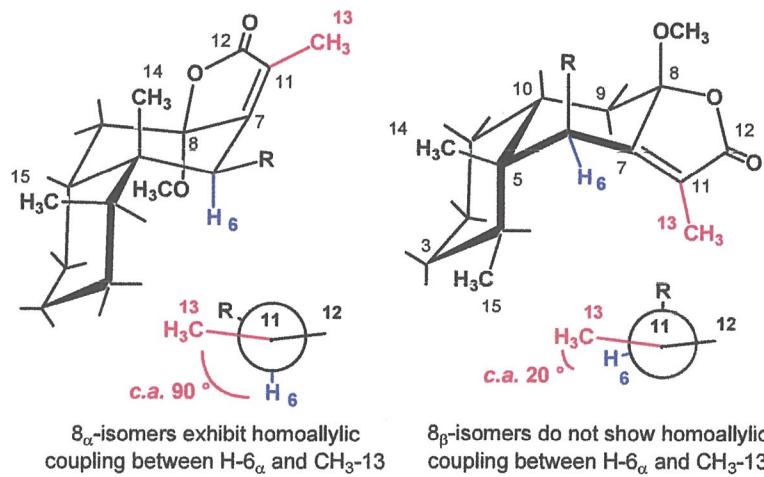


図 1-11 eremophilane 型セスキテルペンラクトンで観測される homoallylic coupling

このことを踏まえて、本化合物の NMR スペクトルデータを確認すると、ビニルメチル基 (H-13) とオキシメチンプロトン (H-6) は互いに 2.0 Hz でカップリングしており、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいても相関が確認された。よって、H-13 と H-6 は、約 90° の角度を示す相対的な位置関係をとっていることが考えられ、この配座関係を満たすためには 8 位ヒドロキシ基は α 配向でなければならないことが明らかになった (図 1-12)。また、NOESY スペクトルにおいても、これら H-6 と H-13 の間には、相関が確認されておらず、(間接的ではあるが) 空間的に遠いことが推測される。以上の結果から本化合物の相対立体配置を図 1-12 に示すように決定した。

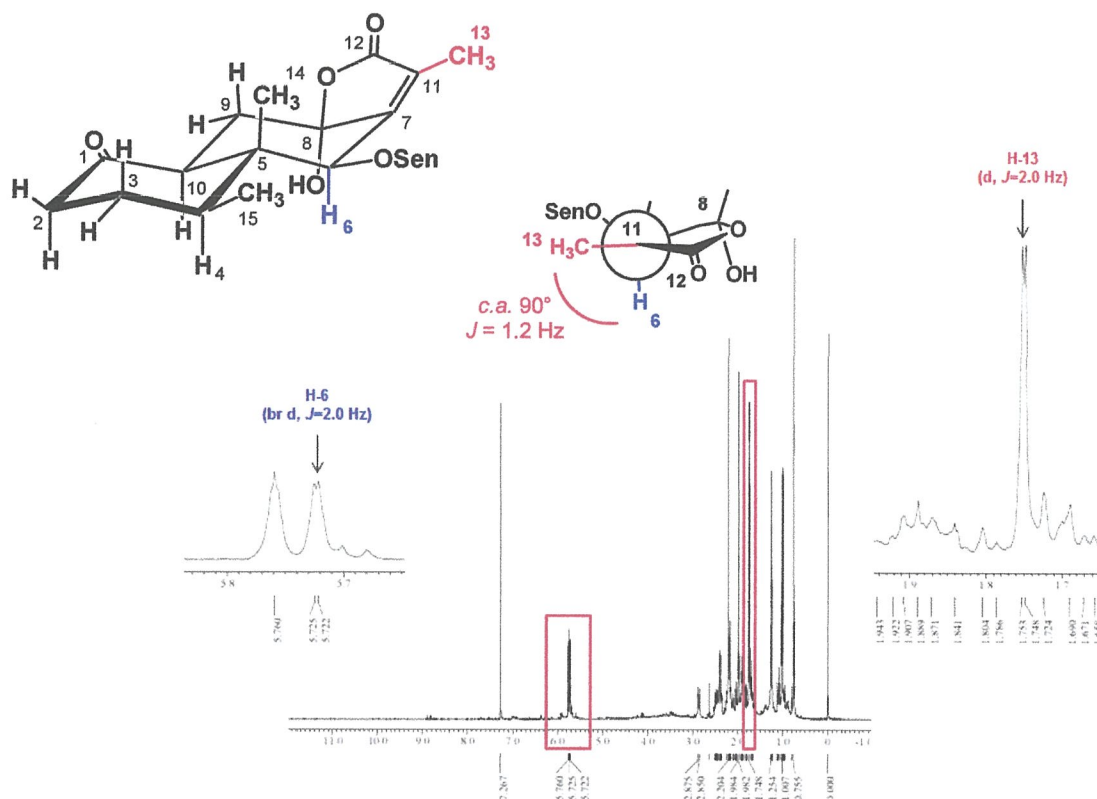


図 1-12 culcitiolide E (1) における homoallylic coupling

さらに、Naya らは、 α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有する eremophilane 型セスキテルペノイドでは CD スペクトルにおいて、 α , β -不飽和 γ -ラクトン環由来の π - π^* 遷移による Cotton 効果が 240 - 260 nm 付近に観測され、その符号は γ 位のキラリティーに依存することも同時に報告している¹⁴。この考えに基づき、これまで数多くの eremophilane 型セスキテルペノイドの絶対立体配置が決定されてきた^{15,16,17}。そこで、本化合物の CD スペクトルを測定した結果 (図 1-13)、245 nm に大きく負の Cotton 効果 ($[\theta]_{245} = -10607^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$) が観測されたことから、8 位の絶対立体化学は R であることが示された。以上の結果から、本化合物の化学構造を絶対立体配置も含めて図 1-4 に示すように決定した。なお、286 nm に観測されている正の Cotton 効果は、 α , β -不飽和 γ -ラクトン環由来の n - π^* 遷移に起因する吸収である。

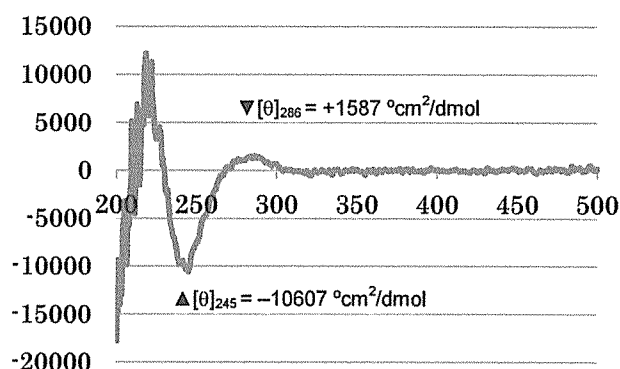


図 1-13 culcitiolide E (1)の CD スペクトル

culcitiolide F (2), G (3)

culcitiolide F (2), G (3)は白色粉末の異性体混合物として得られた。本化合物の NMR スペクトルは, eremophilane 型セスキテルペノイドに特徴的なシグナルを示したことに加え, 部分的にシグナルが対となって観測された。また, HR-FAB-MS では単一の擬似分子イオンピークのみが観測され, その分子式を $C_{21}H_{28}O_6$ (m/z 377.1942 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{21}H_{28}O_6$; 377.1964, $\Delta -2.2$ mmu) と決定した。これらのことから, 本化合物は異性体混合物であることが推測されたが, 各種クロマトグラフィーにおいて分離が困難であったため, 混合物のまま解析を進めた。 1H - 1H COSY スペクトルにおいて, H-2 / H-3, H-9 / H-10 に相関が確認されたことに加えて, HMBC スペクトルでは, H-15 から, C-3, 4, 5 位へ, H-14 からは, C-4, 5, 6 位へ相関が見られた。さらに, C-1 (ケトカルボニル) へは, H-2, 3, 9, 10 から相関が確認されたことから, culcitiolide E と同様に, 1 位にケトン基を有する eremophilane 骨格の存在が確認できた。H-13 (ビニルメチル基) から C-7, 11, 12 へ, H-16 (メトキシ基) からは C-8 (アセタール炭素) へ相関が確認されたことから, γ 位にメトキシ基を有する α, β -不飽和 γ -ラクトン環の存在が確認できた。また, 1 組の低磁場シフトしたオキシプロトンシグナルは, それぞれ senecioyl 基及び tigloyl 基の C-1' (エステルカルボニル炭素) へ相関が確認されたことから, 本化合物は [図 1-14 (A)] のような eremophilane 型セスキテルペノイドであり, 6 位に置換基として senecioyl 基または tigloyl 基を有する構造異性体であることが明らかになった。なお, senecioyl 基と tigloyl 基のオレフィンプロトンシグナルの面積比から, culcitiolide F (2) と G (3) は, ほぼ 1:1 の物質質量比で混合していることも判明した。また, NOESY スペクトルによる解析から [図 1-14 (B)], H-10 / H-14 に NOE 相関が確認されており, *cis* のデカリン環を有しており, ステロイド型の配座をとっていることが明らかとなった¹⁸。しかし, culcitiolide E (1) と同様に 8 位の立体化学に関しては NOESY スペクトルからは決定が困難であった。

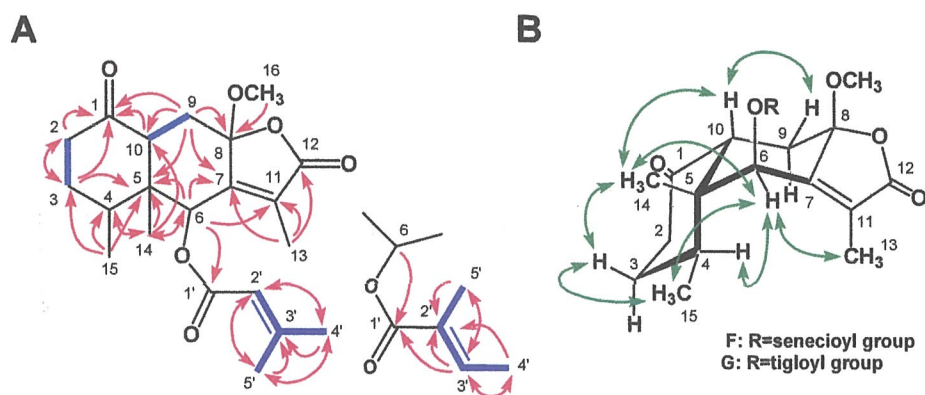


図 1-14 culcitolid F (2), G (3)の各種二次元 NMR 相関図
 (A) ^1H - ^1H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows) (B) NOESY (green arrows)

そこで、H-13 (ビニルメチル基) 及び H-6 (オキシプロトン) のカップリングについて観察したところ、これらのプロトンは互いにカップリングしておらず (^1H - ^1H COSY 相関も観測されていない), NOESY スペクトルにおいても H-13 / H-6 に相関が確認されたことから、これらの二面角は eclipsed 配座に近い位置関係であると推測でき、8 位のメトキシ基は β 配置であることが明らかになった [図 1-14(B)]. 以上の結果から culcitolid F (2), G (3) の化学構造を相対立体配置も含めて、図 1-4 に示すように決定した。

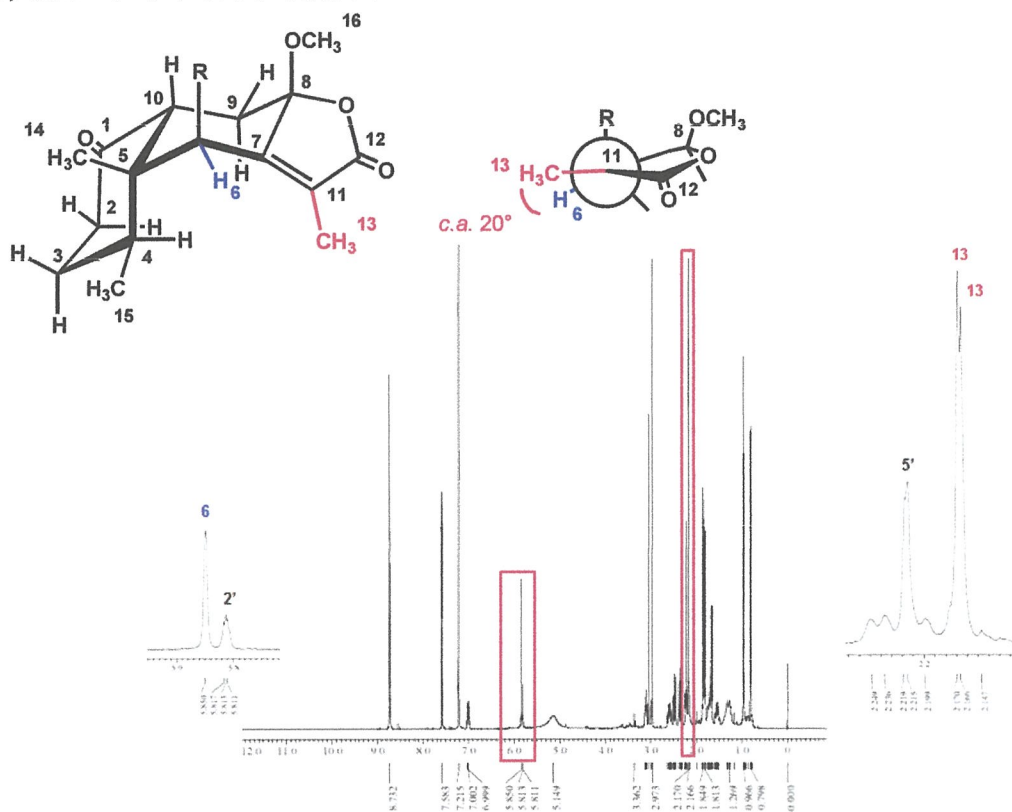


図 1-15 culcitolid F (2), G (3) の 6 位メチンプロトンと 13 位メチルプロトンにおける homoallylic coupling

culcitiolide H (4), I (5)

culcitiolide H (4), I (5) は、各種クロマトグラフィーにおいて、分離困難な黄色オイルの混合物として得られ、HR-FAB-MS (m/z 361.1665 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{20}H_{25}O_6$; 361.1651, $\Delta +1.4$ mmu) スペクトルにおいて分子式を $C_{20}H_{24}O_6$ と決定した. IR スペクトルでは、ラクトン環及びカルボニル基の特徴的な吸収 ($1773, 1718, 1646\text{ cm}^{-1}$) が観測された. 本化合物の NMR スペクトルは culcitiolide D と非常に類似しており、新たに senecioidyl 基及び tigloyl 基に特徴的なオレフィンプロトンシグナルが 1:1 の面積比で確認された. このことから、本化合物は culcitiolide D と同様の骨格を有する eremophilane 型セスキテルペノイドであり、置換基として senecioidyl 基と tigloyl 基を有する構造異性体混合物であると推測できた [図 1-16 (A)]. 相対立体配置については、NOESY スペクトルを解析することで決定したが、10 位の立体化学に関しては決定することができなかった [図 1-16 (B)].

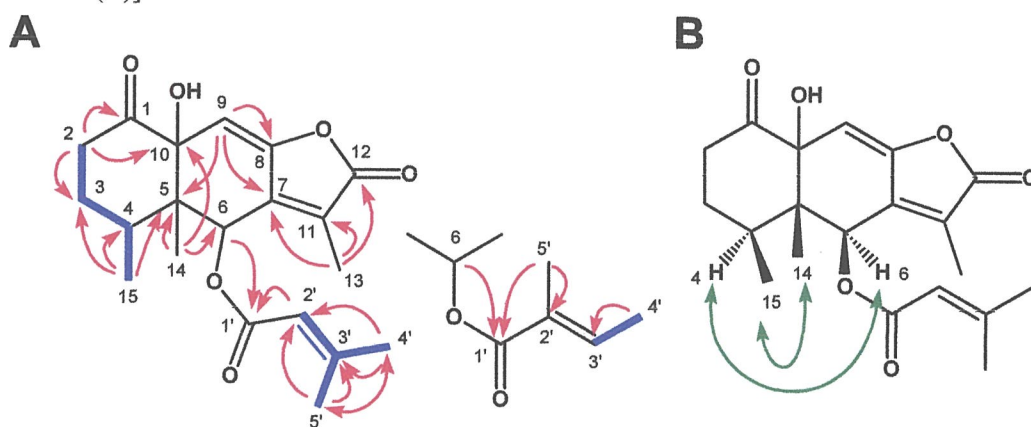


図 1-16 culcitiolide H (4), I (5) の平面構造

(A) $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

そこで、本化合物の 10 位の立体化学に関しては Zhao らの論文を参考に推定した¹⁹. Zhao らは、*Senecio tsoongianus* 由来の eremophilane 型セスキテルペノイド tsoongianolide A の化学構造を X 線結晶構造解析により決定したうえで、tsoongianolide B の 10 位ヒドロキシ基の立体化学は、tsoongianolide A とのケミカルシフト値の比較から決定している. すなわち、10 位ヒドロキシ基が α 配置の場合、デカリン環は chair-chair 型の配座となり、10 位ヒドロキシ基の近傍に位置する 4 位メチンプロトンが低磁場シフトする. 一方、10 位ヒドロキシ基が β 配向の場合、デカリン環はステロイド型の配置をとることが予想されるが、この場合 10 位ヒドロキシ基と同じ向きにある 14 位メチル基がヒドロキシ基由来の遮蔽を受け、低磁場シフトが観測される (図 1-17).

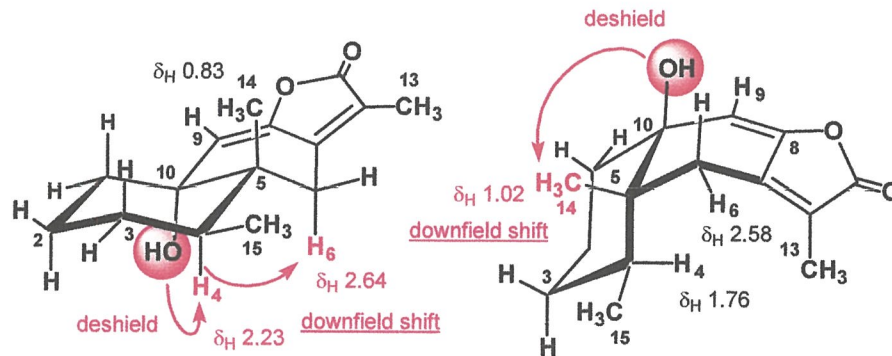
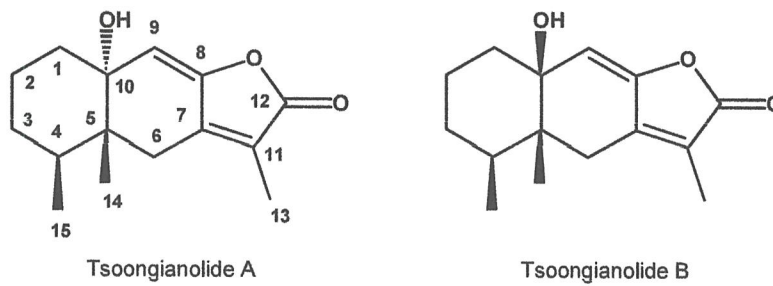


図 1-17 tsoongianolide A 及び B

本化合物においては、14位メチル基のケミカルシフト値は、*culcitiolide* E-G と比較しても大きな差が見られない。しかし、4位メチンプロトン及び6位オキシメチンプロトンに関しては、*culcitiolide* E-G と比べて大きく低磁場シフトしていることがわかる (第3節 実験の部 $^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフト表)。この低磁場シフトは、本化合物10位ヒドロキシ基由来の遮蔽により説明できる。*culcitiolide* H (4), I (5)の10位ヒドロキシ基は α 配向であると決定できた。以上の結果から、本化合物の化学構造を図 1-4 に示すように決定した。

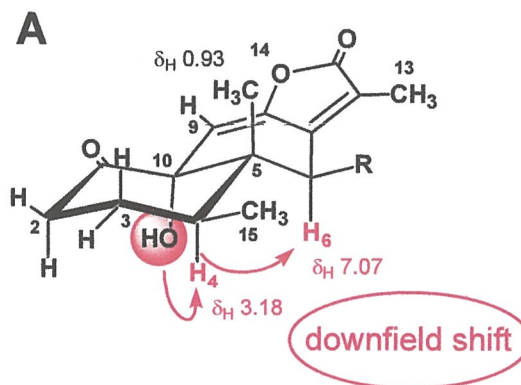


図 1-18 *culcitiolide* H (4), I (5) の10位立体化学の検討

culcitiolide J (6)

culcitiolide J (6) は、薄黄色粉末として 3.5 g 単離され、抽出物の約 5 % (w/w) にあたることから、本植物抽出物中の主成分であると考えられた。HR-FAB-MS (m/z 437.2154 $[M+Na]^+$, Calcd. for $C_{21}H_{34}O_8Na$; 437.2152, $\Delta +0.2$ mmu) スペクトルから、その分子式を $C_{21}H_{34}O_8$ と決定した。IR スペクトルでは、ヒドロキシ基 (3404 cm^{-1}) 及びケトカルボニル基 (1697 cm^{-1}) の吸収が観測された。本化合物の化学構造は、各種二次元 NMR スペクトルより eremophilane 型セスキテルペノイドの配糖体であることが明らかとなった (図 1-19)。なお、糖については、アノメリックプロトン ($H-1'$) のカップリング定数 ($J=7.6\text{ Hz}$) より、 β -アノマーであると推測できた。さらに、本化合物を加水分解し、得られた水層を HPLC 分析することで、結合している糖は D-glucose であることが明らかとなった。

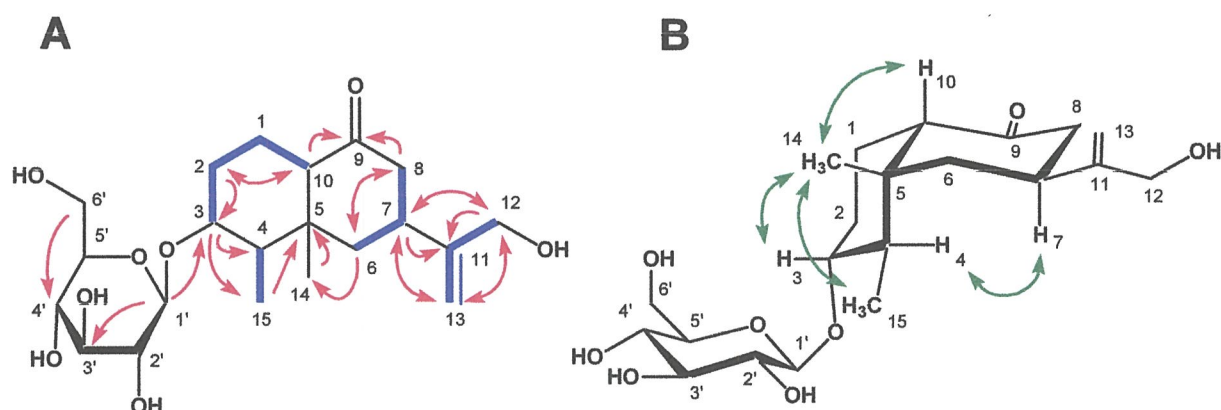


図 1-19 culcitiolide J (6) の各種二次元 NMR スペクトル相関図

(A) $^1H-^1H$ COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) dNOE (green arrows)

本化合物の絶対立体配置については、改良 Mosher 法を適応し、決定を試みた。まず、culcitiolide J (6) を β -glucosidase によって酵素加水分解を行うことで、そのアグリコンを得た。さらに得られたアグリコンに S 及び R の MTPACl を反応させることで、 R 及び S の MTPA エステル体へ誘導した (図 1-20)。得られた二つの化合物から、改良 Mosher 法に基づき、3 位の絶対立体配置は R であることが明らかになった [図 1-21 (B)]。なお、測定溶媒は重ベンゼンを用いた²⁰。

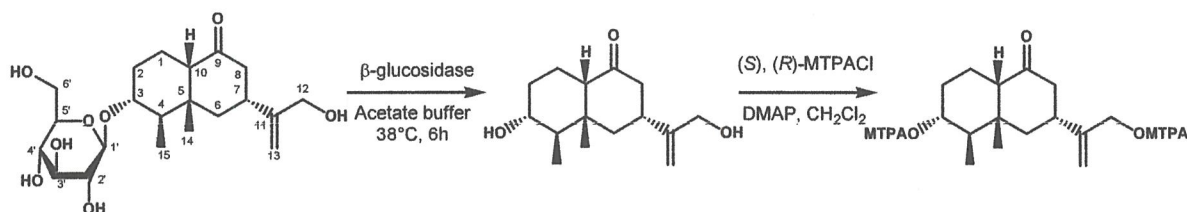


図 1-20 culcitiolide J (6) の MTPA エステル体合成

culcitiolide J (6) を糖加水分解して得られたアグリコンは、本抽出液からも単離されており、culcitiolide K (7) と命名した。

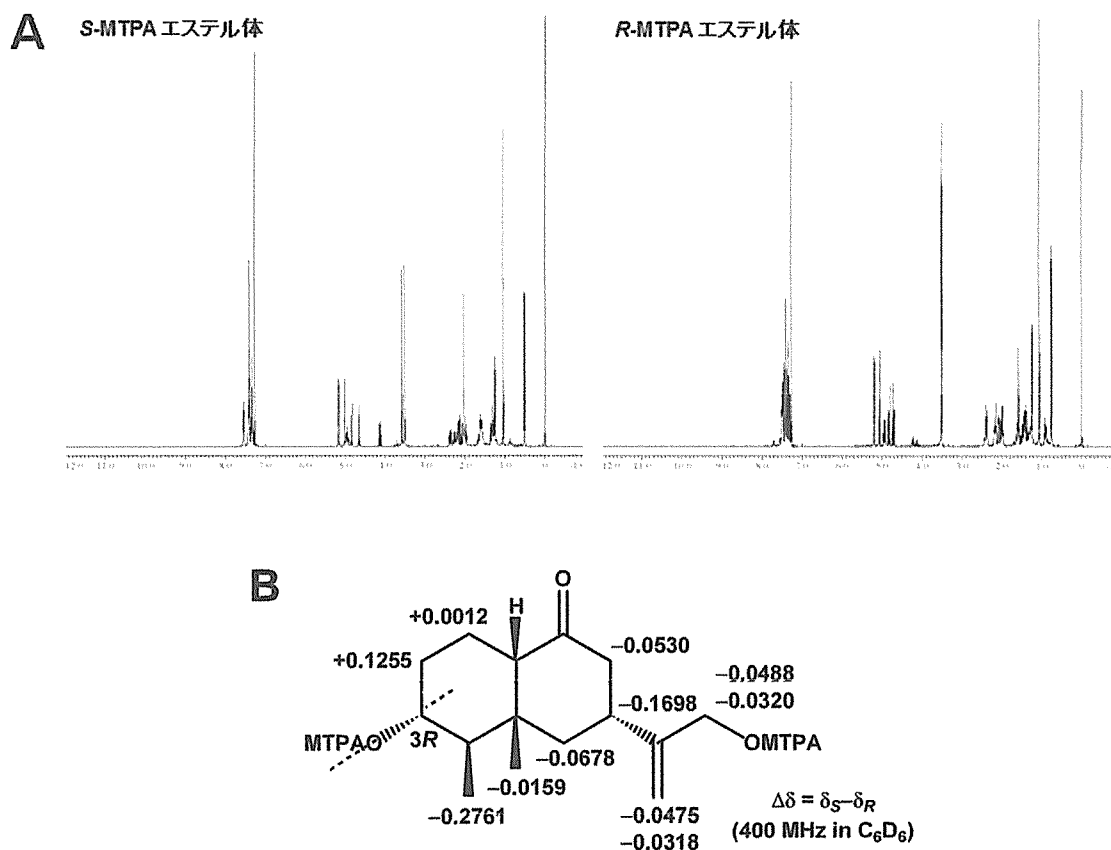


図 1-21 culcitiolide J (6) の改良 Mosher 法

(A) culcitiolide J (MTPA エステル体) の ¹H-NMR スペクトル, (B) MTPA エステル体 culcitiolide J の $\Delta\delta$ 値

第 2 項 考察

今回得られた化合物の絶対立体配置については、culcitiolide E (1) と culcitiolide J (6), K (7) について決定した。一方、culcitiolide F (2) / G (3) 及び H (4) / I (5) については、混合物であることから決定は困難であったが、culcitiolide E (1), J (6), K (7) と同一植物から単離されていることを考慮すると、その絶対立体配置も同様であると考えられる。なお、culcitiolide J (6), K (7) の絶対立体配置について、CD スペクトルによる確認を行ったところ、295 nm に負の Cotton 効果が観測された [図 1-22 (A)]。これを 9 位カルボニルケトンにおける octant 則 (back octant) に適応したところ、改良 Mosher 法によって示されたそれと矛盾することが明らかとなった。このことに関しては、最近、Saito らによって同様の報告がなされている²¹。すなわち、*Ligularia virgaurea* より単離された 2 α -hydroxyeremophil-11-en-9-one の CD スペクトルは予想に反して負の Cotton 効果を示し、octant 則 (back octant) に照らし合わせると、*ent*-eremophilane であることになる (図 1-23)。しかし、

Ligularia 属の植物から *ent*-eremophilane は見つかっておらず, back octant の適応できない例として報告している. Saito らは, 最終的に DFT 計算の結果と 2α -hydroxyeremophil-11-en-9-one の CD スペクトルの実測データが良好な一致を示したことから, *ent* 体ではないことを証明している. また, この原因としては, 2位のヒドロキシ基が front octant に倒れ込んでおり, back octant が適応できないと考察している. 一方, 非常に類似した構造を有する *culcitiolide* J (6) 及び K (7) には, MM2 分子力場計算より, front octant に倒れ込む置換基が存在しないことが確認できているにもかかわらず [図 1-22 (B)], octant 則とは逆の Cotton 効果を示した. このことから, 置換基の位置や配座に関係なく, 化合物の骨格自体が Cotton 効果に寄与している可能性が示唆され, 今後さらなる検討が必要である.

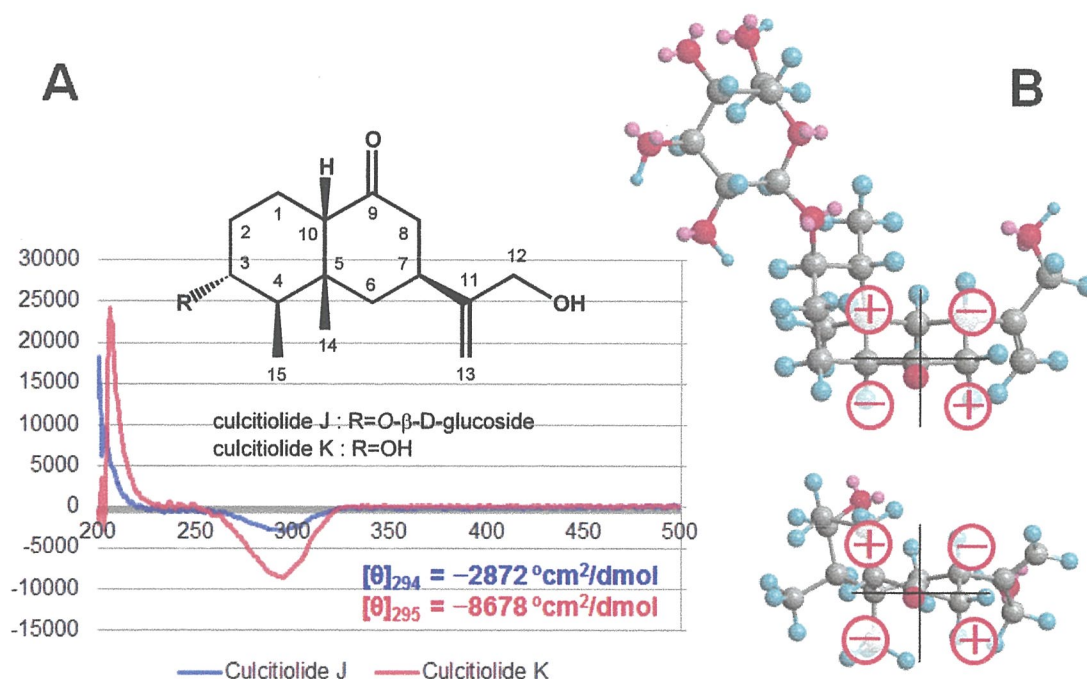


図 1-22 (A) *culcitiolide* J (6) 及び K (7) の CD スペクトル, (B) 分子力場計算 (MM2) による最安定コンフォメーションと octant 則 (back octant) の適応

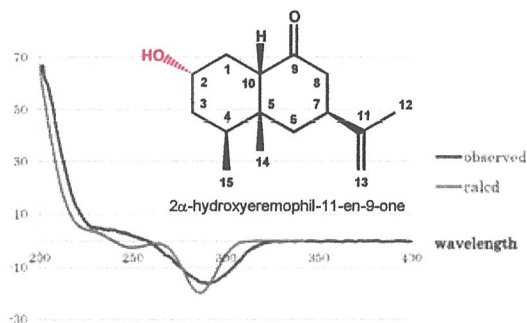


Fig. 8. The observed (blue line) and calculated (red line) CD curves of compound 9

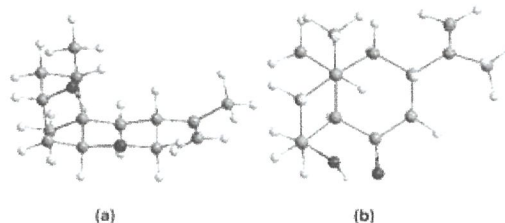


Fig. 7. Conformation of compound 9 (a) View from the carbonyl group, (b) top view

図 1-23 Saito らの報告した eremophilane 型セスキテルペノイドの CD スペクトル²¹

また、本植物の成分研究では、culcitiolide E (1) や H (4), I (5) のように *trans*-decalin 環を有するものと、culcitiolide F (2), G (3) 及び J (6), K (7) のように *cis*-decalin 環を有するものの 2 種類が得られており、生合成の観点から興味深い。eremophilane 型のセスキテルペノイドは、一般には、*cis*-decalin 型の天然物と言われており²²、*cis*-decalin 骨格を有する。しかし、culcitiolide E (1) や H (4), I (5) のように *trans*-decalin 環を有する化合物も少なくない。これらの化合物は、eremophilane 骨格が構築された後に、デカリン環の立体反転を伴い生成したことが予想される。実際、今回単離された culcitiolide 類は、1 位もしくは 9 位にカルボニル基が存在するという構造的特徴を有していることから (図 1-24)、10 位メチンプロトンは、脱離しやすく立体反転を起こしやすいと推測される。また、筆者が調べた限りでは、*trans*-eremophilane 型セスキテルペノイドは、1 位もしくは 9 位にカルボニル基を有している場合が多いということもこれらの考察を裏付けるものであると云える²³⁻²⁵。

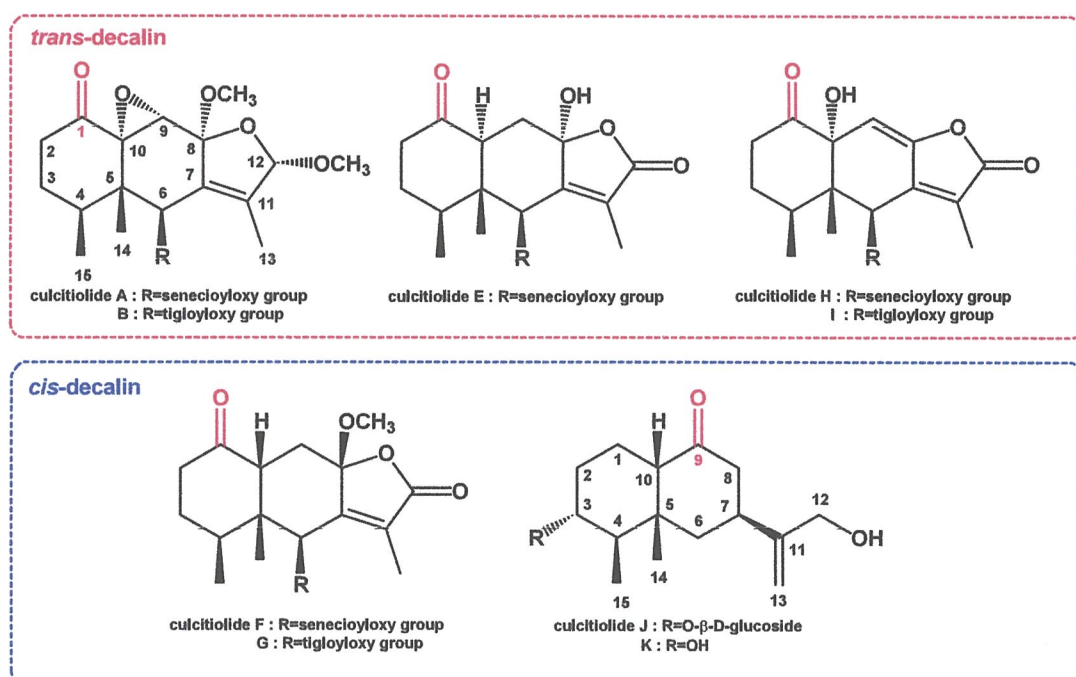


図 1-24 culcitiolide 類の decalin 環の縮環様式

本研究において、*S. culcitioides* 抽出物からは、現時点においてはピロリジジンアルカロイドが単離されていない。また、本植物抽出液に対して、TLC 上で dragendorff 試薬による検出を試みたが、アルカロイド特有のスポットは確認できなかったことから、本植物はピロリジジンアルカロイドを含んでいない、もしくは含有量が非常に微量であると考えている²⁶。したがって、現在のところ *S. culcitioides* 由来の PAs による毒性は非常に少ないものと考えている。

第3項 結論

Senecio culcitioides Sch. Bip. の幹部メタノール抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィーなどによる精製操作を経て、すでに単離・構造決定されている culcitolide A - D に加えて、今回新たに新規 eremophilane 型セスキテルペノイド culcitolide E (1) - K (7) を単離・構造決定することに成功した。さらに、culcitolide E (1) に関しては、CD スペクトルから、その絶対立体配置を決定することができた。一方、culcitolide F (2), G (3) 及び H (4), I (5) に関しては、各種クロマトグラフィーにおいて分離困難であったため、混合物として構造解析を進め、それぞれの相対立体配置を含めた化学構造を決定した。また、culcitolide J (6) については、新規化合物であるにもかかわらず抽出物のおよそ 5% (w/w) にあたる約 3.5 g が単離されており、本植物抽出物中の主成分であると考えられた。さらに、そのアグリコンである culcitolide K (7) も新規化合物である点は非常に興味深い。これら culcitolide J (6) 及びそのアグリコンである culcitolide K (7) については、改良 Mosher 法を適応することで、その絶対立体配置を決定した。

キク科植物は世界中に分布しており、その研究に関する論文も膨大な数であるが、本植物 *S. culcitioides* に関する論文は筆者が調べる限りこれまで 1 報しかなく、その成分に関しては不明であった。今回の研究では、成分未解明であった *S. culcitioides* からの 7 つの新規 eremophilane 型セスキテルペノイドを単離し、その化学構造を明らかにすることができた。

最後に、今回単離された culcitolide E (1) - K (7) の NMR スペクトルデータを表 1-1 及び 1-2 にまとめて示す。

¹H-NMR ケミカルシフト表

表 1-1 culcitolide E (1) - K (7) の ¹H-NMR (400 MHz in C₅D₅N)

position	E (1)	F (2)	G (3)	H (4)	I (5)	J (6) ^a	K (7) ^b
1						2.14 (m)	2.16 (m)
						1.54 (m)	1.56 (m)
2	2.34 (m)	2.23 (m)	2.23 (m)	3.45 (m)	3.21 (m)	1.96 (m)	1.86 (m)
	2.46 (m)	2.59 (m)	2.59 (m)	2.32 (m)	2.28 (m)	1.47 (m)	1.53 (m)
3	1.55 (m)	1.54 (m)	1.54 (m)	1.68 (m)	1.80 (m)	3.71 (td, 10.2, 5.0)	3.48 (d, 5.2)
	1.66 (m)	1.72 (m)	1.72 (m)	1.61 (m)	1.62 (m)		
4	2.15 (m)	1.85 (m)	1.85 (m)	3.18 (m)	3.18 (m)	1.51 (m)	1.27 (m)
5							
6	6.29 (br d, 2.0)	5.85 (s)	5.85 (s)	7.07 (d, 2.0)	7.07 (d, 2.0)	2.10 (m)	2.12 (m)
7						2.61 (m)	2.62 (br t, 13.0)
						2.37 (m)	2.49 (dt, 13.6, 2.4)
8						2.40 (m)	2.25 (t, 13.6)
9	2.12 (m)	2.35 (td, 13.2, 4.4)	2.35 (td, 13.2, 4.4)	6.69 (s)	6.67 (s)		
	2.82 (dd, 14.0, 3.6)	2.48 (dd, 13.2, 4.4)	2.48 (dd, 13.2, 4.4)				
10	3.24 (dd, 13.0, 3.6)	3.11 (dt, 13.2, 4.4)	3.11 (dt, 13.2, 4.4)			2.26 (br s)	2.14 (m)
11							
12						4.06 (s)	4.12 (s)
13	1.87 (d, 2.0)	2.17 (s)	2.17 (s)	1.79 (d, 2.0)	1.86 (2.0)	5.11 (s)	4.92 (s)
						4.95 (s)	5.12 (s)
14	0.81 (s)	0.97 (s)	0.95 (s)	0.93 (s)	0.93 (s)	1.09 (s)	1.06 (s)
15	1.01 (d, 6.8)	0.81 (d, 7.2)	0.81 (d, 7.2)	1.00 (d, 6.8)	0.94 (d, 6.8)	0.97 (d, 6.8)	0.96 (d, 6.6)
-OMe		3.04 (s)	2.97 (s)				
1'							
2'	5.95 (br s)	5.81 (s)		5.97 (s)			
3'			7.01 (qd, 6.8, 1.2)		7.15 (q, 7.2)		
4'	1.84 (d, 1.2)	1.81 (s)	1.67 (d, 6.8, 1.2)	2.29 (s)	1.75 (d, 7.2)		
5'	2.26 (d, 1.2)	2.22 (s)	1.85 (s)	1.85 (s)	1.95 (s)		
6'							
(suger)							
1'						4.32 (d, 7.6)	
2'						3.11 (dd, 9.2, 7.6)	
3'						3.26 (m) ^c	
4'						3.31 (m) ^c	
5'						3.34 (m) ^c	
6'						3.67 (dd, 11.6, 5.2)	
						3.86 (dd, 12.0, 2.0)	

a) Measured in CD₃OD, b) Measured in CDCl₃, c) Signals may be interchangeable within same column.

¹³C-NMR ケミカルシフト表

表 1-2 culcitolide E (1) - K (7) の ¹³C-NMR (100 MHz in C₅D₅N)

position	E	F	G	H	I	J*	K
1	208.6	210.5	210.4	209.1	209.1	19.6	18.8
2	41.0	36.7	36.7	36.5	36.5	28.7	31.8
3	32.5	30.7	30.8	31.7	31.6	78.5	71.7
4	41.7	28.3	28.3	33.5	33.5	40.7	41.6
5	48.8	45.6	45.4	51.5	51.4	43.0	41.8
6	77.0	70.6	69.7	72.4	71.4	43.6	42.3
7	156.4	149.8	149.8	145.8	145.6	35.6	34.0
8	104.0	105.5	105.4	150.6	150.6	47.4	46.5
9	34.9	37.3	37.5	106.3	106.3	213.6	211.5
10	53.3	53.0	52.9	78.6	78.6	56.2	55.3
11	124.4	131.7	131.8	125.0	124.9	153.1	151.1
12	171.8	170.5	170.4	170.4	170.4	65.1	64.8
13	8.2	9.2	9.2	8.7	8.7	109.6	109.5
14	7.9	15.3	15.3	9.6	9.6	23.2	22.6
15	17.7	15.5	15.3	17.3	17.3	10.6	9.9
-OMe		50.4	50.4				
1'	165.6	165.8	166.9	166.5	167.4		
2'	115.5	115.3	128.3	115.5	128.4		
3'	160.4	159.8	139.2	160.9	140.3		
4'	27.3	27.2	12.0	27.4	14.6		
5'	20.4	20.3	14.4	20.5	12.1		
6'							
suger							
1'						101.3	
2'						75.1	
3'						77.8 ^a	
4'						71.7	
5'						78.1 ^a	
6'						62.9	

a) Measured in CD₃OD, b) Measured in CDCl₃, c) Signals may be interchangeable within same column.

第3節 実験の部

測定機器

核磁気共鳴 (NMR) スペクトル

各種 NMR スペクトルは、JEOL JNM-ECS400 を用いて、400 MHz ($^1\text{H-NMR}$), 100 MHz ($^{13}\text{C-NMR}$) で測定した。また、各種二次元 NMR 測定も同様に、JEOL JNM-ECS400 で測定を行った。測定溶媒は、重水素化溶媒 (chloroform- d_3 , benzene- d_6 , acetone- d_6 , methanol- d_4 及び $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) を用いた。なお、HMBC では、特に記載がない限り、 $J=8.0\text{ Hz}$ ($\Delta=62.5\text{ msec}$) で測定を行った。

赤外吸収 (IR) スペクトル

PERKIN-ELMER MODEL 1720 FT-IR, 日本分光 FT/IR-410 及び Herschel FT/IR-400 を用いて測定を行った。測定は、ICL 社製の PTFE IR CARD (ポリエチレンテレフタレート製) をキャストフィルムとして使用し、サンプルを塗布して測定した。

紫外分光 (UV) スペクトル

日立 U-3210 自動分光光度計を用いて測定を行った。セルは石英セルを、溶媒として methanol 及び ethanol を使用した。

質量分析 (MS) スペクトル

日本電子 (JEOL) JMS-700 MStation 高性能二重収束質量分析計を用いて測定した。EI 法では、加速電圧 7.0 kV, イオン化電流 300 μA , イオン化エネルギー 70 eV の条件で測定を行った。また、FAB 法では、positive モード, 加速電圧 7.0 kV, FAB エネルギー 6 keV, エミッション電流 5 mA で行い、マトリックスは glycerol, *m*-nitro benzylalcohol, thioglycerol を使用した。

比旋光度

堀場 SEPT-200 及び SEPA-500 を用いて測定した。セルは石英セル ($l=5\text{cm}$) を、溶媒として chloroform 及び methanol を使用した。

円二色性 (CD) スペクトル

日本分光 J-820 を用いて測定した。
セルは石英セルを、溶媒として methanol 及び ethanol を使用した。

一般操作

成分の単離は各種カラムクロマトグラフィーで行い、以下の充填剤を用いた。

順相カラムクロマトグラフィー用充填剤

MERCK Silica gel 60 (0.063-0.200 mm) for column chromatography (70-230 mesh)

MERCK Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) for column chromatography (230-400 mesh)

MERCK Silica gel 60 (0.015-0.040 mm) for column chromatography

逆相カラムクロマトグラフィー用充填剤

FUJI SIYLSIA CHEMICAL LTD. ODS (100-200 mesh)

順相中圧カラムクロマトグラフィーポンプ

KUSANO KP-6H (草野科学) に, KUSANO Pre-packed Column Silica Gel を装着し, 使用した.

逆相中圧カラムクロマトグラフィーポンプ

KUSANO KP-6H (草野科学) に, KUSANO Pre-packed Column ODS (C18-20)を装着し, 使用した.

また, 化合物の分取及び分離・精製の確認には以下の薄層クロマトグラフィー (TLC) プレートを用いた.

順相 ; MERCK TLC Silica gel 60 F₂₅₄ 25 Aluminium sheet 20×20 cm

逆相 ; MERCK TLC plate Art. 1.15685, RP-18 F254S, 5×10, 0.25 mm 厚

TLC 展開後のスポットの検出は、以下の操作により行った。

非破壊的検出法 ; 紫外 (UV) 吸収を UV ランプ (254 / 365 nm) により確認した。

破壊的検出法 ; バニリン-硫酸呈色試薬を展開済みの TLC 版に塗布する。その後、ヒートガンで加熱することでスポットを検出した。バニリン-硫酸呈色試薬は、バニリン (15 g) を methanol (250 mL) に溶解させ、濃硫酸 (2.5 mL) をゆっくり滴下することにより調製する。

溶媒の減圧濃縮にはロータリーエバポレーター (岩城硝子) を用い、溶媒回収ユニット (東京理科器械) を連結して使用した。

実験項

成分の抽出・粗精製

研究サンプルは、2005年6月ペルー国アンデス地方にて採取され、サンパウロ植物研究会の橋本 梧郎 博士によって *Senecio culcitioides* Sch. Bip. と同定された (No. OUS-1105)。採取した *S. culcitioides* 幹部 (940 g) を遮光条件下、常温で約 5 L の methanol に 3 週間浸漬し、成分の抽出を行った。得られた抽出液をブフナー漏斗で吸引濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮することで、粗抽出物 74 g を得た。ガラスカラムにクロロホルムで懸濁させた MERCK Silica gel 60 for column chromatography (70-230 mesh) Lot No. TA1367885 を、約 100 cm 充填した。粗抽出物をシリカゲルに吸着させ、シリカゲルを充填したカラムにて精製を行った。chloroform - methanol = 100 : 1 (3L), 50 : 1 (3L), 20 : 1 (3L), 10 : 1 (3L), 5 : 1 (3L), 2 : 1 (3L), 1 : 1 (3L), methanol (3L) の順に溶出液を流し、溶出画分を大きく 6 つのフラクション (Fr.1 - Fr.6) に取り分け、減圧濃縮を行った。

culcitiolide 類の単離・精製

先のカラムクロマトグラフィー操作によって得られた 6 つのフラクションについて、順相及び

逆相 TLC プレートで展開溶媒を検討した. Fr. 1 に関して, 順相 TLC (*n*-hexane - EtOAc = 20 : 1) において, R_f 値 0.3 付近に紫色のスポットが確認できた. また, 低極性部位及び高極性部位にも赤紫色のスポットが複数確認できた. そこで, これらの成分の単離を試みた.

Fr.2 (22.4 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 5.0 cm \times 60.0 cm, *n*-hexane - EtOAc) にて精製を行い, 7つのフラクションに分画した (Fr.2A - Fr.2G). Fr.2C (2.57 g) を展開溶媒 chloroform - EtOAc = 30 : 1 (ϕ 2.5 cm \times 80.0 cm) でシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い, 5つのフラクションに取り分けた (Fr. 2C1 - Fr. 2C5). さらに, Fr. 2C2 (0.94 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 4.0 cm \times 60.0 cm, methanol - H₂O = 3 : 1) にて, 精製を行い, 10のフラクションに分画した (Fr. 2C2A - Fr. 2C2J). Fr. 2324 (108.9 mg) は, 展開溶媒を *n*-hexane - EtOAc = 3 : 1 とし, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.5 cm \times 30.0 cm) により精製を行った結果, 4つのフラクションに分画した (Fr. 2C2D1 - Fr. 2C2D4). さらに, Fr.2C2D3 (55.8 mg) を TLC 分取 (chloroform - EtOAc = 15 : 1) により精製した結果, culcitiolide F (2), G (3) (13.4 mg) の混合物を得た. これらは各種クロマトグラフィーにおいてこれ以上精製が困難であった. Fr.234 (0.26 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 2.0 cm \times 25.0 cm, *n*-hexane - acetone = 3 : 1) によって精製を行い, 4つのフラクションに取り分けた (Fr.2C4A - Fr.2C4D). さらに, Fr.2342 (6.4 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 20.0 cm, *n*-hexane - acetone = 2 : 1) による精製を行い, culcitiolide H (4), I (5) (5.3 mg) の混合物を得た. Fr.2D (6.37 g) に関して, シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 6.0 cm \times 46.0 cm, benzene - methanol = 8 : 1) により精製を行い, 5つのフラクションに分画した (F2D1 - F2D5). F243 (1.2 g) を逆相 ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 3.0 cm \times 30.0 cm, methanol - H₂O = 2 : 1) にて精製を行い, 5つのフラクションに取り分けた (Fr.2D3A - Fr.2D3E). Fr.2433 (285.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 2.5 cm \times 40.0 cm, *n*-hexane - EtOAc = 2 : 1) により精製し, 8つのフラクション (F2D3C1 - F2D3C8) に分画した. さらに, F2D3C4B (51.2 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 2.0 cm \times 30.0 cm, benzene - EtOAc = 3 : 1) による精製を行った結果, culcitiolide E (10.8 mg) を単離した. Fr.5 (9.8 g) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 6.0 cm \times 60.0 cm, gradient mixture of methanol - H₂O) にて精製を行い, 5つのフラクションに取り分けた (Fr.5A - Fr.5E). さらに, Fr.5B (5.01 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 5.0 cm \times 45.0 cm, gradient mixture of chloroform - methanol - H₂O) にて精製することで, culcitiolide J (3.56 g) を単離した.

culcitiolide E

淡黄色オイルとして単離された. chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり, methanol にはやや溶けづらい. TLC において, 展開溶媒 benzene-EtOAc = 3 : 1 を用いた場合, R_f 値は 0.38 であった. UV (短波長) 吸収を示し, バニリン-硫酸呈色試薬に対しては, 加熱することで, 赤色のスポットとして確認された.

pale yellow oil. HR-FAB-MS m/z 385.1625 [M+Na]⁺, Calcd. for C₂₀H₂₇O₆; 385.1627, Δ -0.2 mmu (matrix; glycerol), $[\alpha]_D^{20} = -46^\circ$ ($c=0.43$, CHCl₃), IR ν_{max} (neat) 1761, 1713 cm⁻¹, UV λ_{max} (EtOH) nm (log ϵ) 218 (4.22). CD (EtOH) $[\theta]_{245} = -10607^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$, $[\theta]_{245} = +1587^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$.

culcitiolide F, G

culcitiolide G, H は、各種クロマトグラフィーにおいて、分離不可能な白色粉末の異性体混合物として得られた。TLCにおいて、展開溶媒に benzene-EtOAc = 8 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.40 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、赤色のスポットとして確認された。

white powder. HR-FAB-MS m/z 377.1942 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{21}H_{29}O_6$; 377.1964, Δ -2.2 mmu, $[\alpha]_D = +2^\circ$ ($c=0.87$, $CHCl_3$), IR ν_{max} (neat) 1767, 1710, 1648 cm^{-1} , UV λ_{max} (log ϵ) nm 218 (4.28)

culcitiolide H, I

culcitiolide H, I は、各種クロマトグラフィーにおいて分離不可能な黄色オイルとして得られた。TLCにおいて、展開溶媒に benzene-EtOAc = 7 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.38 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、赤色のスポットとして確認された。

yellow oil. HR-FAB-MS m/z 361.1665 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{20}H_{25}O_6$; 361.1651, Δ +1.4 mmu, $[\alpha]_D = -85^\circ$ ($c=0.27$, $CHCl_3$), IR ν_{max} (neat) 3420, 1775, 1716, 1664 cm^{-1} , UV λ_{max} (log ϵ) nm 220 (4.16)

culcitiolide J

culcitiolide J は、淡黄色粉末として得られた。TLCにおいて、展開溶媒に chloroform - methanol - H_2O = 10 : 1 : 0.1 を用いた場合、 R_f 値は 0.16 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、褐色のスポットとして確認された。

pale yellow oil, m.p. 99-101 $^\circ C$, HR-FAB-MS m/z 437.2154 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{21}H_{34}O_8Na$; 437.2152, Δ +0.2 mmu (matrix; thio glycerol), $[\alpha]_D = -29^\circ$ ($c=0.41$, in MeOH), IR ν_{max} (neat) 3404, 2945, 1697 cm^{-1} , CD (EtOH) $[\theta]_{294} = -2872^\circ cm^2/dmol$.

culcitiolide K

culcitiolide K は、淡黄色オイルとして得られた。TLCにおいて、展開溶媒に chloroform - methanol - H_2O = 10 : 1 : 0.1 を用いた場合、 R_f 値は 0.16 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、褐色のスポットとして確認された。

pale yellow oil, HR-FAB-MS m/z 275.1617 $[M+Na]^+$, Calcd. for $C_{15}H_{24}O_3Na$; 275.1623, Δ -0.6 mmu, $[\alpha]_D = +13^\circ$ ($c=0.50$, $CHCl_3$), IR ν_{max} 3358, 2941, 1699 cm^{-1} , CD (EtOH) $[\theta]_{295} = -8678^\circ cm^2/dmol$.

culcitiolide J のアセチル化

culcitiolide J (70.8 mg; 0.171 mmol) を pyridine 4 mL に溶かし、過剰量の Ac_2O (6 mL) を加え、室温で一晩攪拌した。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、溶媒を減圧除去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 12.0 cm, benzene - EtOAc = 10 : 1) により精製し、目的のペンタアセテート体、化合物 Ja (18.5 mg, 収率 43 %) を白色粉末状の化合物として得

た。化合物 Ja の各種測定データを以下に示す。

化合物 Ja; white powder. m.p: 169-172°C. $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$ ($c=0.38$, CHCl_3). IR (KBr) ν_{\max} 2947, 1755 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz in CDCl_3) δ_{H} : 0.89 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 1.05 (3H, s), 1.38 (1H, m), 1.44 (1H, m), 1.49 (1H, m), 1.53 (1H, m), 1.83 (1H, m), 2.00 (3H, s), 2.03 (3H, s), 2.04 (3H, s), 2.07 (3H, s), 2.10 (3H, s), 2.14 (overlapped), 2.20 (overlapped), 2.23 (1H, br s), 2.51 (1H, br d, $J=14.2$ Hz), 2.61 (1H, br t, $J=12.7$ Hz), 3.64 (1H, m), 3.48 (1H, m), 4.14 (1H, dd, $J=11.7, 2.4$ Hz), 4.23 (1H, dd, $J=12.2, 4.9$ Hz), 4.50 (1H, d, $J=7.8$ Hz), 4.56 (2H, s), 4.92 (1H, m), 5.02 (1H, br s), 5.07 (1H, m), 5.15 (1H, br s), 5.19 (1H, m). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz in CDCl_3) δ_{C} : 10.0, 18.6, 20.6, 20.7, 20.7, 20.7, 20.9, 22.7, 22.7, 27.7, 34.4, 39.4, 41.7, 42.1, 46.2, 55.0, 62.1, 65.9, 68.8, 71.4, 71.4, 72.9, 79.1, 98.6, 112.9, 146.1, 169.4, 169.5, 170.3, 170.5, 170.6, 210.0. HR-FAB-MS: m/z 625.2833 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Calcd. for $\text{C}_{31}\text{H}_{45}\text{O}_{13}$; 625.2861, Δ -2.8 mmu.

culcitiolide J の加水分解

culcitiolide J (75.6 mg, 0.183 mmol) を 10 mM Acetate buffer (pH 5.0) 1.0 mL に溶かし、 β -glucosidase (アーモンド由来) を 15.5 mg 加え、38 - 40 °C で 6 時間反応させた。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、 H_2O と EtOAc で分液し、得られた有機層を減圧濃縮し、黄色オイルの culcitiolide J アグリコン (化合物 J') を 39.5 mg, 収率 86 % で得た。

Aglycon of culcitiolide J (Compound J'); yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +13^\circ$ ($c=0.50$, CHCl_3). IR (KBr) ν_{\max} 3358, 2941, 1699 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz in CDCl_3) δ_{H} : 0.96 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 1.06 (3H, s), 1.27 (1H, m), 1.43 (1H, t, $J=13.6$ Hz), 1.53 (1H, m), 1.56 (1H, m), 1.86 (1H, m), 2.12 (1H, m), 2.14 (1H, m), 2.25 (1H, t, $J=13.6$ Hz), 2.49 (1H, br dt, $J=13.6, 2.4$ Hz), 2.62 (1H, br t, $J=13.0$ Hz), 3.48 (1H, td, $J=10.0, 4.4$ Hz), 4.12 (2H, s), 4.92 (1H, s), 5.12 (1H, s). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz in CDCl_3) δ_{C} : 9.9, 18.8, 22.6, 31.8, 34.0, 41.6, 41.8, 42.3, 46.5, 55.3, 64.8, 71.8, 109.5, 151.1, 211.5. CD (MeOH): $[\theta]_{295} = -8678^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$. HR-FAB-MS: m/z 275.1617 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$; 275.1623, Δ -0.6 mmu.

culcitiolide J の糖の同定

culcitiolide J の加水分解で、得られた水層を HPLC にて分析し (35 °C, $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O} = 3 : 1$, Flow rate 1.0 mL/min, column pressure 60 kg/cm², 検出器 RI), 標品と比較した結果, glucose であると同定した。

culcitiolide J アグリコンのアセチル化

culcitiolide J' (29.0 mg, 0.115 mmol) を pyridine 1.0 mL に溶かし、過剰量の Ac_2O (3 drops) を加え、室温で一晩攪拌した。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、溶媒を減圧除去した後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.0 \text{ cm} \times 12.0 \text{ cm}$, benzene - EtOAc = 10 : 1) により精製し、目的のジアセテート体を 18.5 mg, 収率 43 % 白色粉末状の化合物として得た。化合物 J'a の各種測定データを以下に示す。

Acetate of culcitiolide J aglycon (compound J'a); light yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = -16^\circ$ ($c=0.43$, CHCl_3). IR (KBr) ν_{\max} 2962, 1736 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz in CDCl_3) δ_{H} : 0.83 (3H, d, $J=6.3$ Hz), 1.12 (3H, s), 1.45

(1H, m), 1.52 (1H, m), 1.53 (1H, m), 1.56 (1H, m), 1.87 (1H, br d, $J=10.7$ Hz), 2.03 (3H, s), 2.10 (3H, s), 2.15 (overlapped), 2.17 (overlapped), 2.27 (1H, br t, $J=13.5$ Hz), 2.53 (1H, m), 2.57 (1H, m), 4.58 (2H, dd, $J=17.9, 13.0$ Hz), 4.78 (1H, m), 5.04 (1H, br s), 5.17 (1H, br s). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz in CDCl_3) δ_{C} : 9.9, 18.5, 20.9, 21.2, 22.6, 27.8, 34.6, 38.4, 41.7, 42.0, 46.2, 54.9, 65.9, 74.6, 112.9, 145.9, 170.5, 170.7, 210.0. HR-FAB-MS: m/z 359.1858 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Na}$; 359.1835, $\Delta+2.3$ mmu.

culcitiolide J アグリコンの (S)-MTPAエステル化

culcitiolide J' (5.9 mg, 0.023 mmol) を CH_2Cl_2 1.0 mL に溶かし, DMAP (8.8 mg, 0.072 mmol) 及び (R)-(-)-MTPACl (12 μL , 0.064 mmol) を加え, 室温で40分間攪拌させた. 反応進行をTLC (n -hexane - EtOAc = 2 : 1) にて追跡し, 反応終了後, 溶媒を減圧除去した後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -hexane - EtOAc = 2 : 1, ϕ 1.0 cm \times 22.0 cm) により精製し, (S)-MTPAエステル誘導体 4.1 mg (yield 26%) を無色オイルとして得た. (S)-MTPAエステル誘導体の各種測定データを以下に示す.

culcitiolide J- S_{MTPA} ; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -51^\circ$ ($c=0.28$, MeOH). IR (KBr) ν_{max} 2921, 2849, 1746, 1705, 1451 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz in C_6D_6) δ_{H} : 0.34 (3H, d, $J=6.4$ Hz), 0.56 (3H, s), 0.72 (1H, t, $J=14.1$ Hz), 1.50 (1H, br d, $J=14.1$ Hz), 1.60 (1H, t, $J=12.8$ Hz), 1.67 (1H, br q, $J=12.5$ Hz), 1.81 (1H, qd, $J=12.1, 4.7$ Hz), 1.96 (1H, m), 2.13 (2H, br d, $J=13.1$ Hz), 3.35 (3H, s), 3.45 (3H, s), 4.23 (1H, d, $J=13.1$ Hz), 4.44 (1H, d, $J=13.2$ Hz), 4.54 (1H, s), 4.88 (1H, s), 4.97 (1H, td, $J=11.3, 4.9$ Hz), 7.03 - 7.10 (6H, m, aromatic protons), 7.56 (2H, d, $J=6.7$ Hz), 7.73 (2H, d, $J=7.9$ Hz). HR-FAB-MS: m/z 707.2396 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{F}_6\text{O}_7\text{Na}$; 707.2419, $\Delta+1.3$ mmu.

culcitiolide J アグリコンの (R)-MTPAエステル化

culcitiolide J' (5.3 mg, 0.021 mmol) を CH_2Cl_2 1.0 mL に溶かし, DMAP (7.3 mg, 0.060 mmol) 及び (S)-(+)-MTPACl (12 μL , 0.064 mmol) を加え, 室温で1時間攪拌させた. 反応進行をTLC (n -hexane - EtOAc = 2 : 1) にて追跡し, 反応終了後, 溶媒を減圧除去した後, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 22.0 cm, n -hexane - EtOAc = 2 : 1) により精製し, (R)-MTPAエステル誘導体 8.8 mg (yield 61%) を無色オイルとして得た. (R)-MTPAエステル誘導体の各種測定データを以下に示す.

culcitiolide J- R_{MTPA} ; colorless oil. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +15^\circ$ ($c=0.33$, MeOH). IR (KBr) ν_{max} 2920, 2848, 1738, 1705, 1451 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz in C_6D_6) δ_{H} : 0.57 (3H, s), 0.62 (3H, d, $J=6.7$ Hz), 0.79 (1H, t, $J=13.6$ Hz), 1.17 (1H, m), 1.32 (1H, m), 1.36 (1H, m), 1.53 (1H, m), 1.59 (1H, m), 1.69 (1H, m), 1.84 (1H, br t, $J=13.0$ Hz), 2.03 (1H, m), 2.13 (1H, br d, $J=13.7$ Hz), 3.37 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.28 (1H, d, $J=13.1$ Hz), 4.47 (1H, d, $J=12.8$ Hz), 4.59 (1H, s), 4.91 (1H, s), 4.94 (1H, td, $J=11.2, 4.6$ Hz), 6.99 - 7.04 (2H, m, aromatic protons), 7.07 - 7.11 (4H, m, aromatic protons), 7.61 (2H, d, $J=8.0$ Hz), 7.70 (2H, d, $J=8.0$ Hz). HR-FAB-MS: m/z 707.2427 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, Calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{F}_6\text{O}_7\text{Na}$; 707.2419, $\Delta+0.8$ mmu.

参考論文 (第 1 章)

1. Yang, Y.; Zhao, L.; Wang, Y. F.; Chang, M. L.; Huo, C. H.; Gu, Y. C.; Shi, Q. W.; Kiyota, H., *Chem. Biodivers.*, **2011**, 8 (1), 13-72.
2. Hashimoto, G.; Nishimoto, S., *Illustrated cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants*, Aboc-sha & Co., Ltd. **2002**, 324-325.
3. Roeder, E.; Wiedenfeld, H., *Pharmazie* **2011**, 66 (9), 637-47.
4. Fu, P. P.; Xia, Q.; Lin, G.; Chou, M. W., *Drug metabolism reviews*, **2004**, 36 (1), 1-55.
5. Cheeke, P. R., *J. Anim. Sci.*, **1988**, 66 (9), 2343-50.
6. Toma, W.; Trigo, J. R.; de Paula, A. C.; Brito, A. R., *J. Ethnopharmacol.*, **2004**, 95 (2-3), 345-51.
7. Reina, M.; Gonzalez-Coloma, A.; Gutierrez, C.; Cabrera, R.; Rodriguez, M. L.; Fajardo, V.; Villarroel, L., *J. Nat. Prod.*, **2001**, 64 (1), 6-11.
8. Loizzo, M. R.; Statti, G. A.; Tundis, R.; Conforti, F.; Bonesi, M.; Autelitano, G.; Houghton, P. J.; Miljkovic-Brake, A.; Menichini, F., *Phytother. Res.*, **2004**, 18 (9), 777-9.
9. Gu, J. Q.; Wang, Y. H.; Franzblau, S. G.; Montenegro, G.; Timmermann, B. N., *J. Nat. Prod.*, **2004**, 67 (9), 1483-1487.
10. Nozaki, H.; Hayashi, K.; Kawai, M.; Mitsui, T.; Kido, M.; Tani, H.; Takaoka, D.; Uno, H.; Ohira, S.; Kuboki, A.; Matsuura, N., *Nat. Prod. Commun.*, **2012**, 7 (4), 427-430.
11. Hammond, G. B.; Fernandez, I. D.; Villegas, L. F.; Vaisberg, A. J., *J. Ethnopharmacol.*, **1998**, 61 (1), 17-30.
12. *Senecio culcitioides* Sch. Bip.の画像は以下のページから引用した。
Neotropical Herbarium Specimens; <http://fm1.fieldmuseum.org/vrrc/index.php?PHPSESSID=b85...>
Neotropical Live Plant Photos; http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/color_images.asp
13. Naya, K.; Nogi, N.; Makiyama, Y.; Takashina, H.; Imagawa, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1977**, 50 (11), 3002-3006.
14. Naya, K.; Shimizu, M.; Nishio, H.; Takeda, M.; Oka, S.; Hirota, K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1991**, 64 (4), 1071-1080.
15. Bodensieck, A.; Fabian, W. M.; Kunert, O.; Belaj, F.; Jahangir, S.; Schuhly, W.; Bauer, R., *Chirality*, **2010**, 22 (3), 308-19.
16. Sumioka, H.; Harinantenaina, L.; Matsunami, K.; Otsuka, H.; Kawahata, M.; Yamaguchi, K., *Phytochemistry*, **2011**, 72 (17), 2165-71.
17. Liu, Q.; Ahn, J. H.; Kim, S. B.; Lee, C.; Hwang, B. Y.; Lee, M. K., *Phytochemistry*, **2013**, 87, 112-8.
18. Tori, M.; Kawahara, M.; Sono, M., *Phytochemistry*, **1998**, 47 (3), 401-409.
19. Zhao, Y.; Wang, P.; Hao, X. J.; Parsons, S.; Rankin, D. W. H.; Shi, H.; Yu, H.; Sevenet, T.; Gueritte, F., *Chin. Chem. Lett.*, **2002**, 13 (8), 754-757.
20. Kusumi, T.; Ooi, T.; Ohkubo, Y.; Yabuuchi, T., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2006**, 79 (7), 965-980.
21. Saito, Y.; Taniguchi, M.; Komiyama, T.; Ohsaki, A.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M., *Tetrahedron*, **2013**, 69 (39), 8505-8510.

22. 千葉 一裕.; 多田 全宏., *化学と生物*, **1979**, 17 (1), 31-34.
23. Torres, P.; Ayala, J.; Grande, C.; Macías, M. J.; Grande, M., *Phytochemistry*, **1998**, 47 (1), 57-61.
24. Delgado, B. R. a. G., *HETEROCYCLES*, **1990**, 1405-1408.
25. Perez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Guzman, S. L.; Villasenor, J. L.; Romo de Vivar, A., *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69 (10), 1471-5.
26. メタノール抽出物 (*Senecio racemosus*) から PAs を単離している例.
Ahmed, W.; Khan, A. Q.; Malik, A.; Ergun, F.; Sener, B., *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55 (12), 1764-1767

スペクトル集

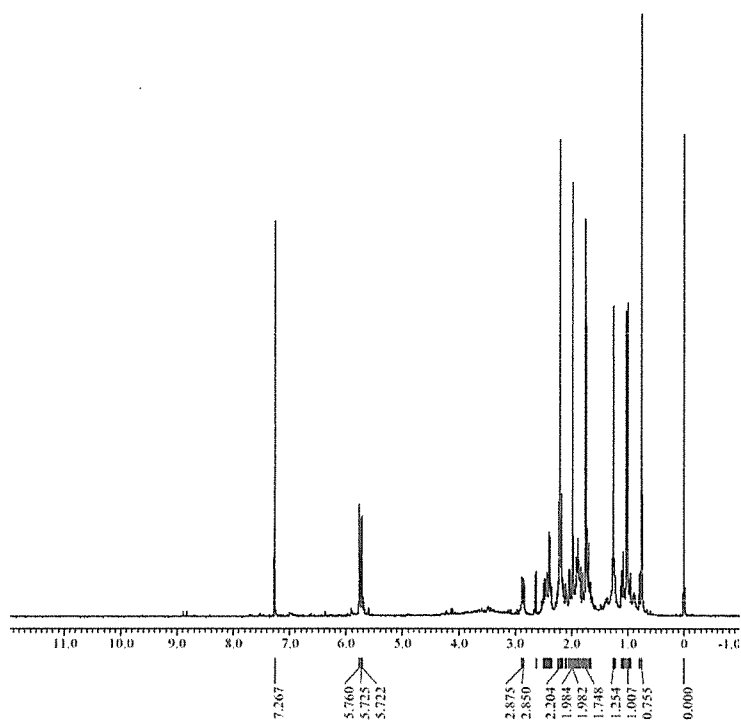


図 S1-1 culcitolide E (1) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

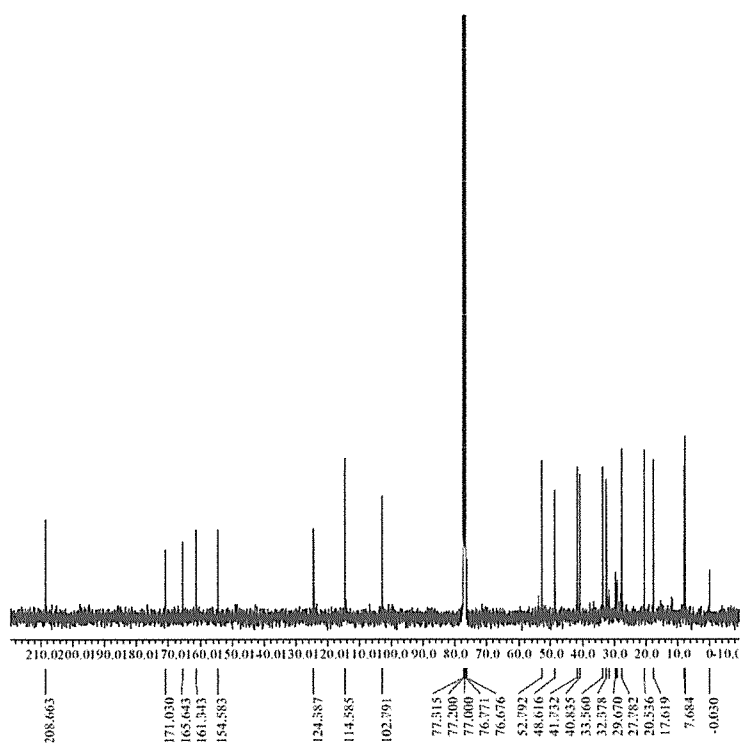


図 S1-2 culcitolide E (1) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

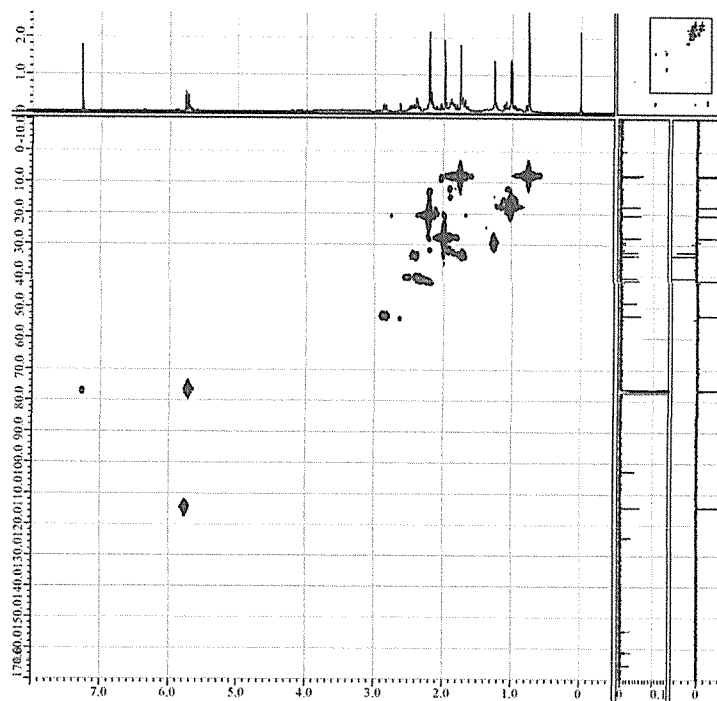


図 S1-3 culcitiolide E (1) の HMQC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

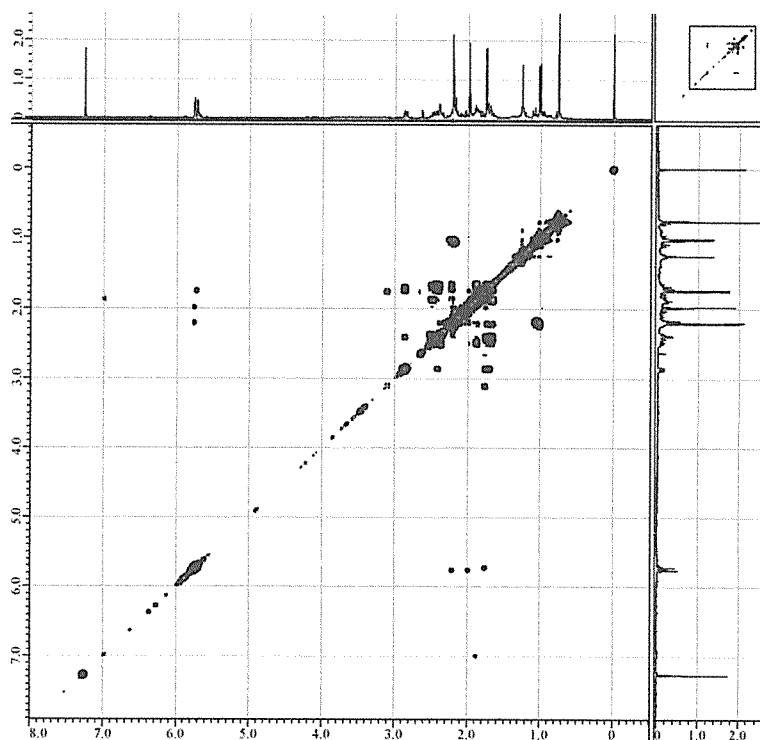
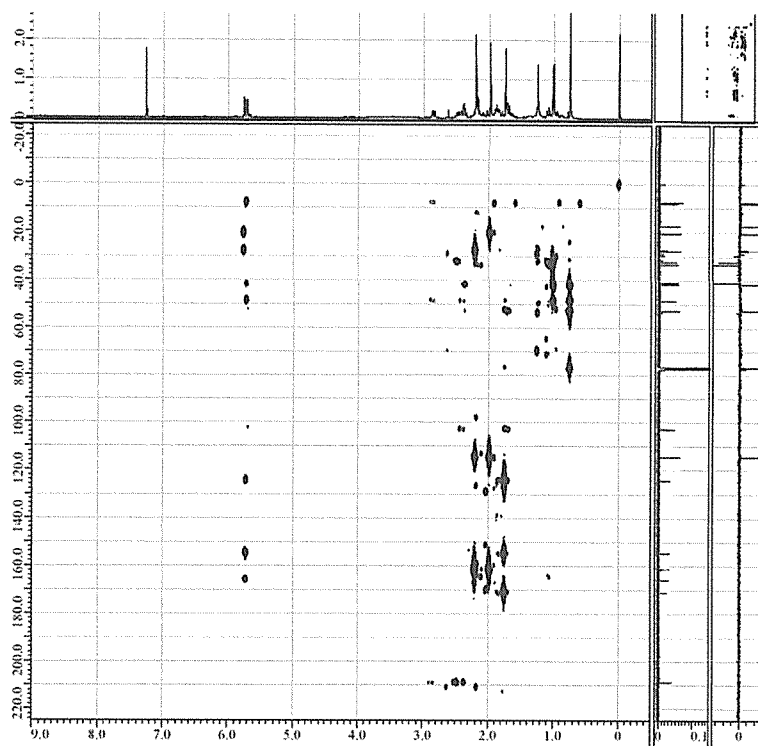
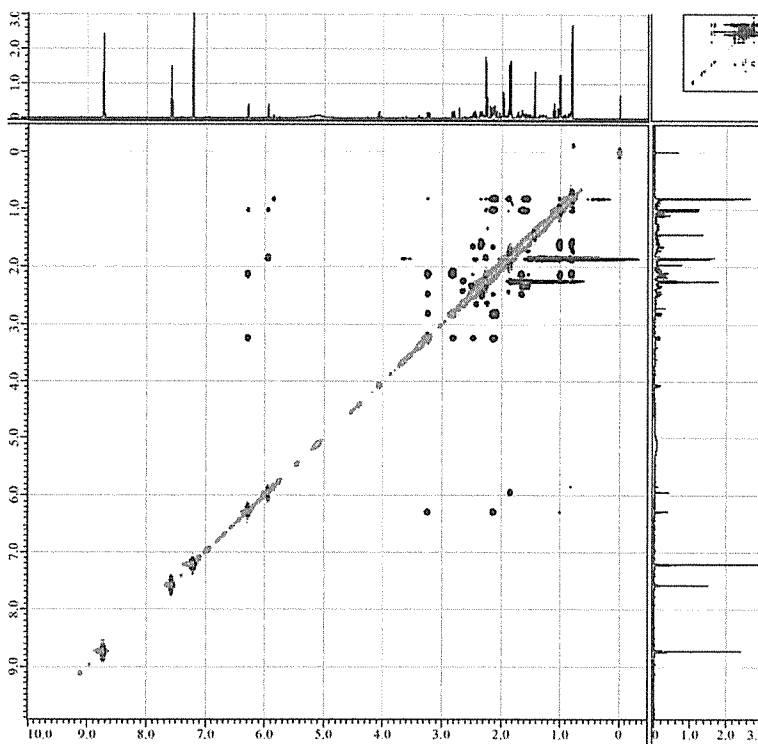


図 S1-4 culcitiolide E (1) の ^1H - ^1H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl_3)



☒ S1-5 culcitolide E (1) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)



☒ S1-6 culcitolide E (1) の NOESY スペクトル (400 MHz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

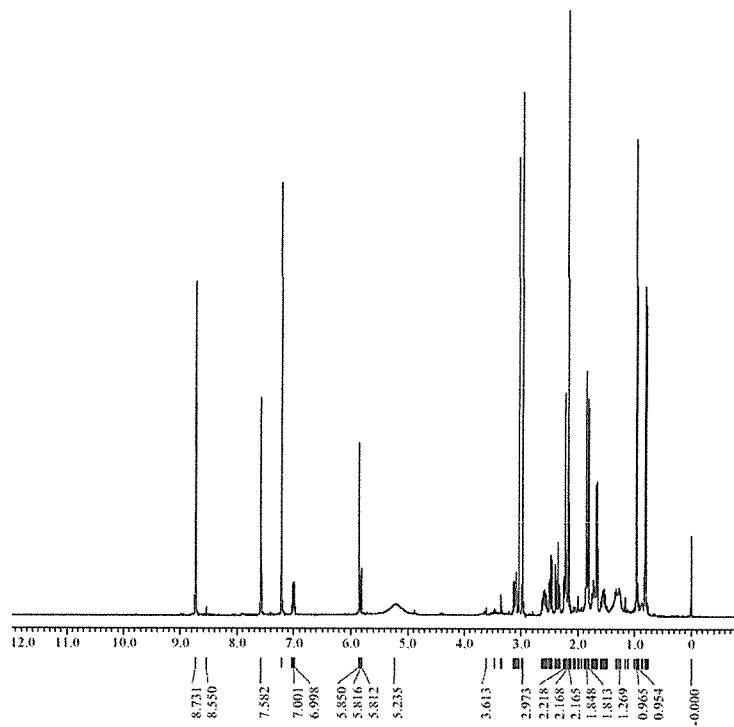


図 S2-1 culcitolide F (2), G (3) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

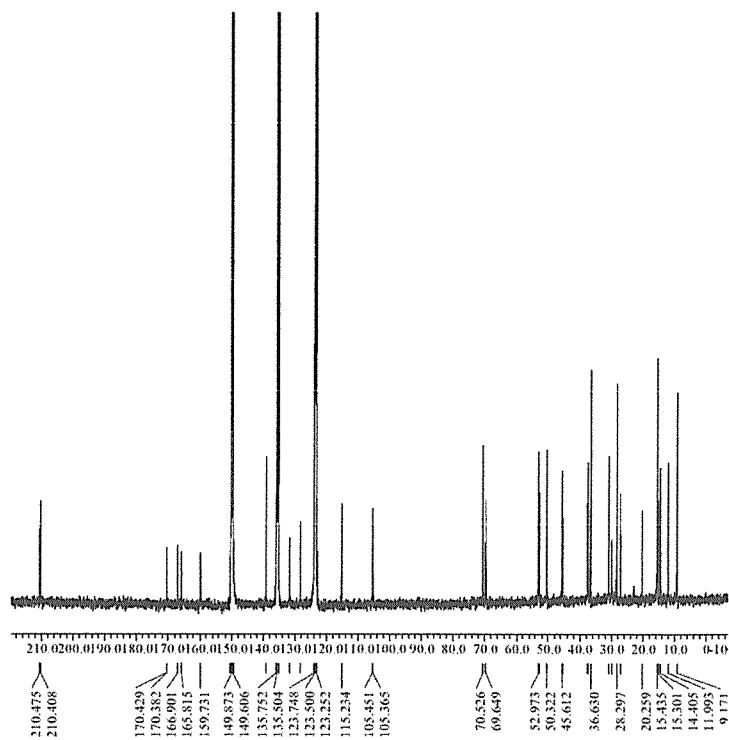


図 S2-2 culcitolide F (2), G (3) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

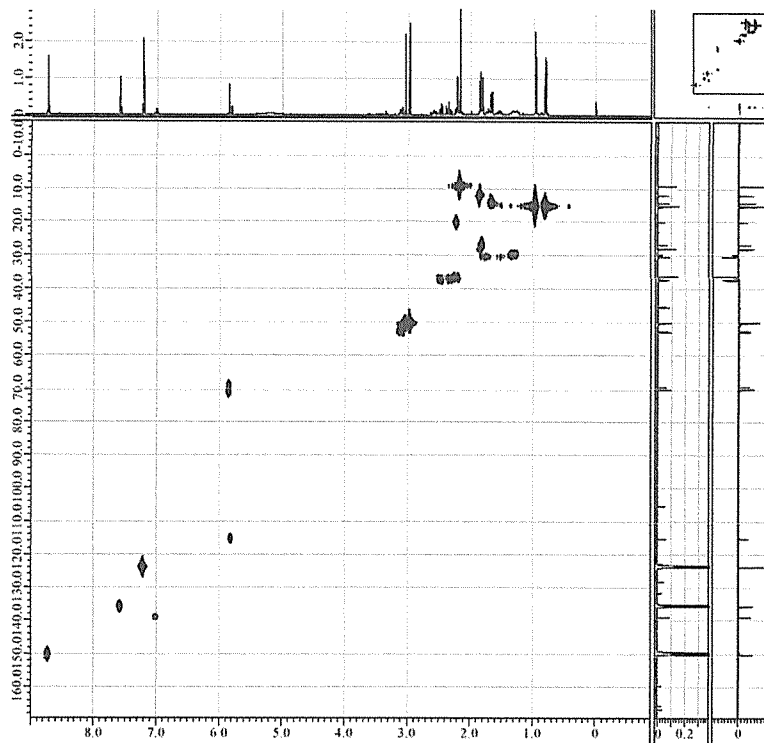


図 S2-3 culcitiolide F (2), G (3) の HMQC スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

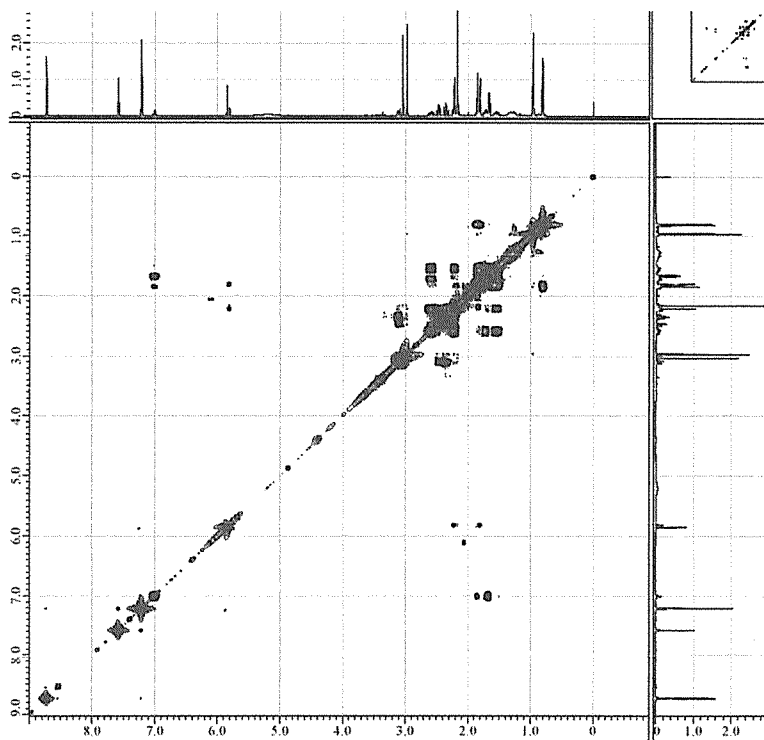


図 S2-4 culcitiolide F (2), G (3) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

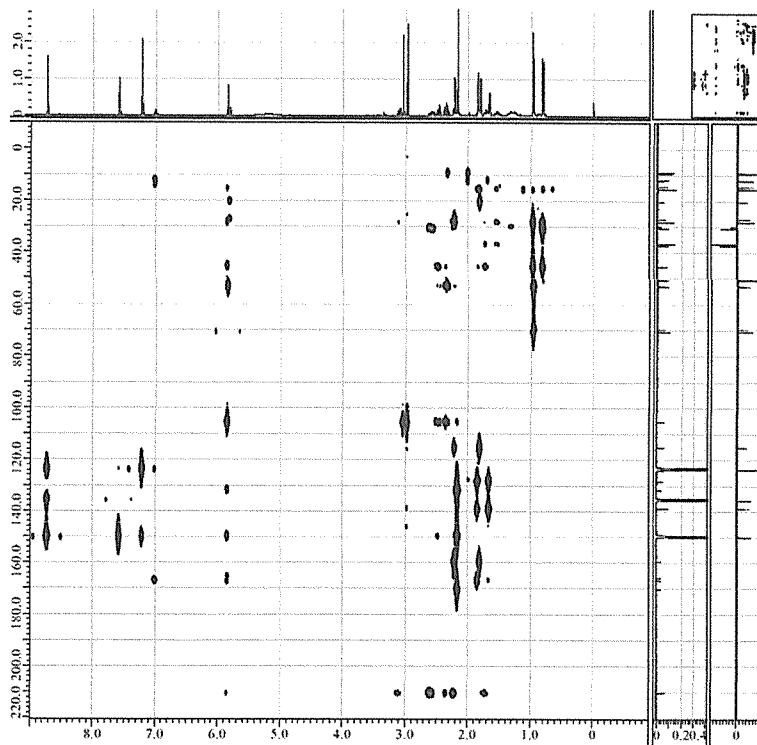


図 S2-5 culcitolide F (2), G (3) の HMBC スペクトル (400 MHz in C_5D_5N)

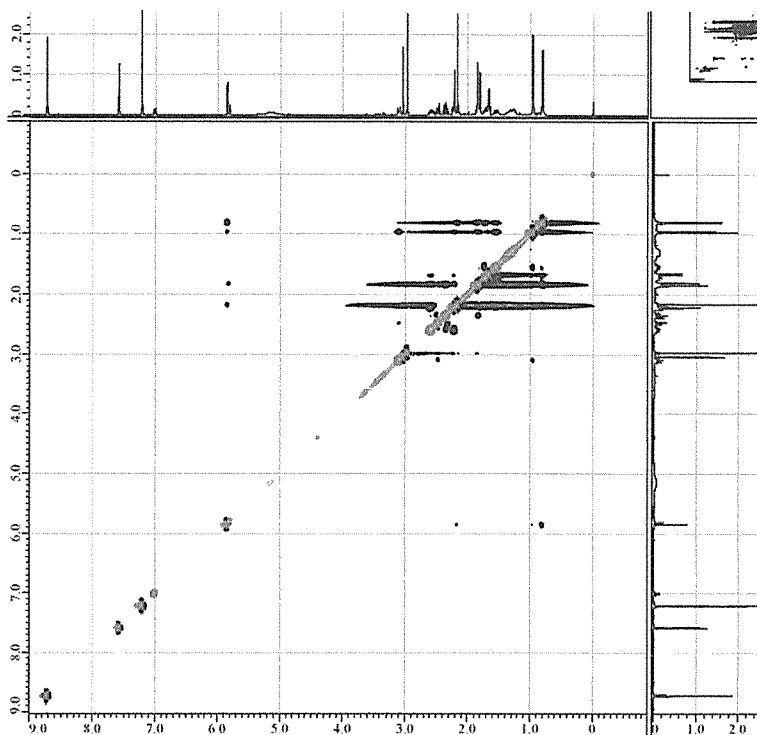
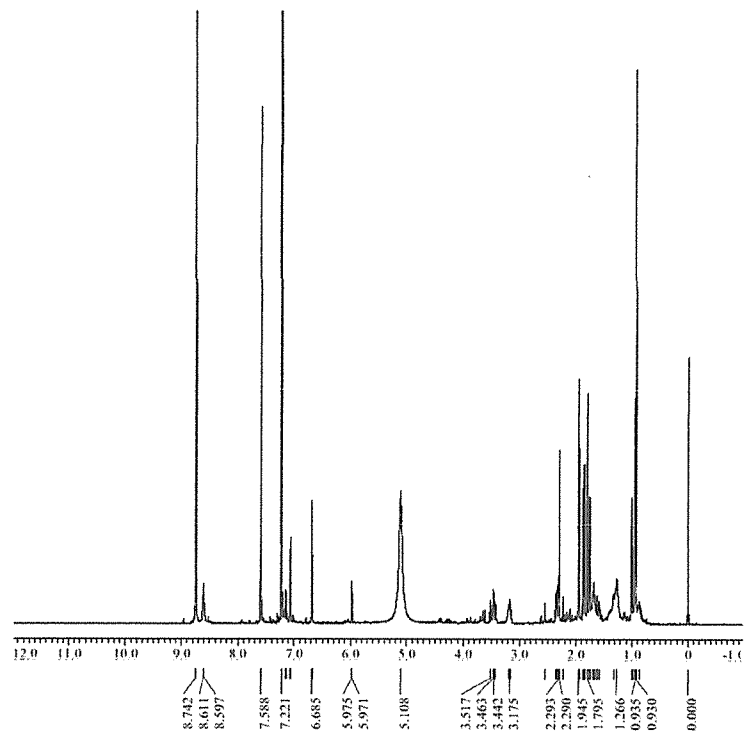
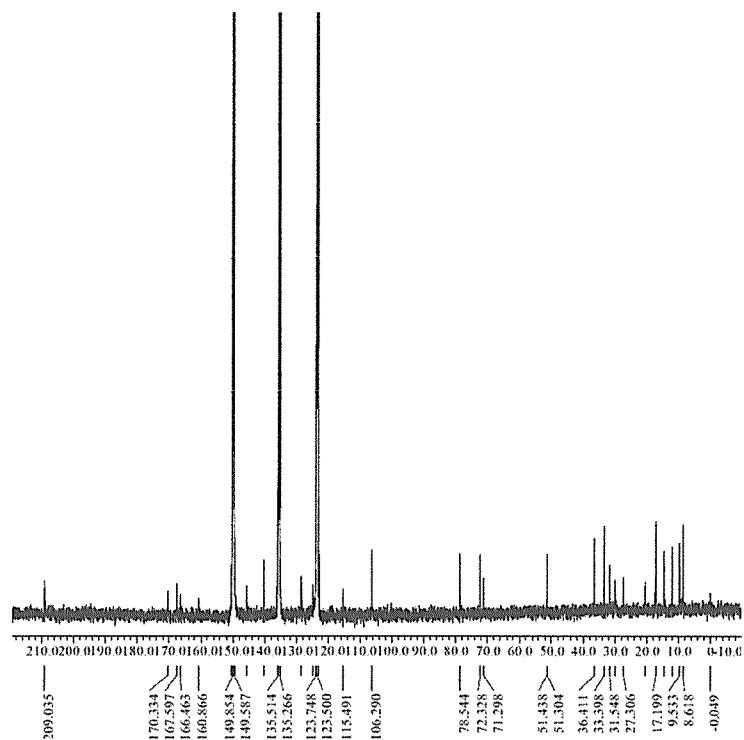


図 S2-6 culcitolide F (2), G (3) の NOESY スペクトル (400 MHz in C_5D_5N)



☒ S3-1 culcitolide H (4), I (5) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)



☒ S3-2 culcitolide H (4), I (5) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

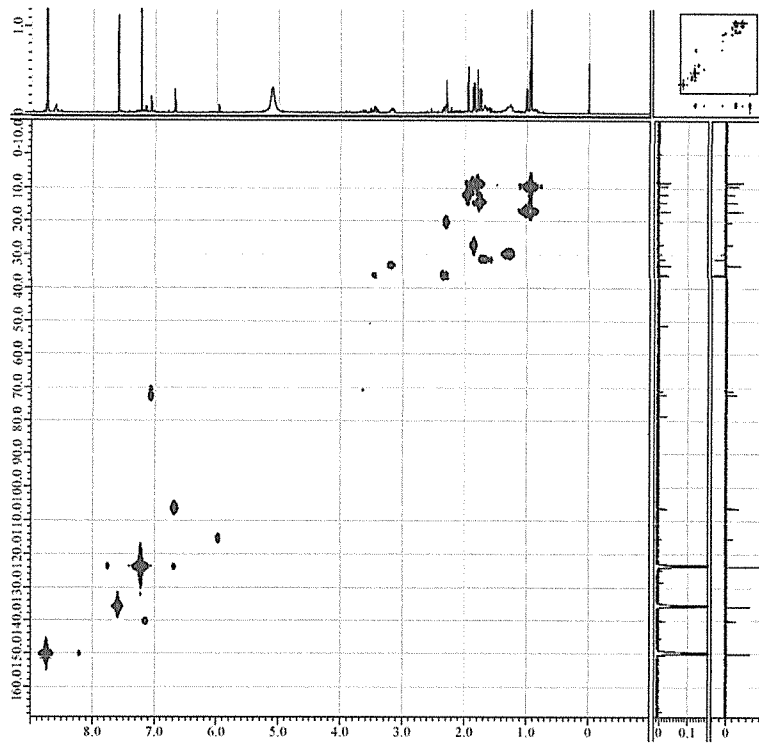


図 S3-3 culcitolid H (4), I (5) の HMQC スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

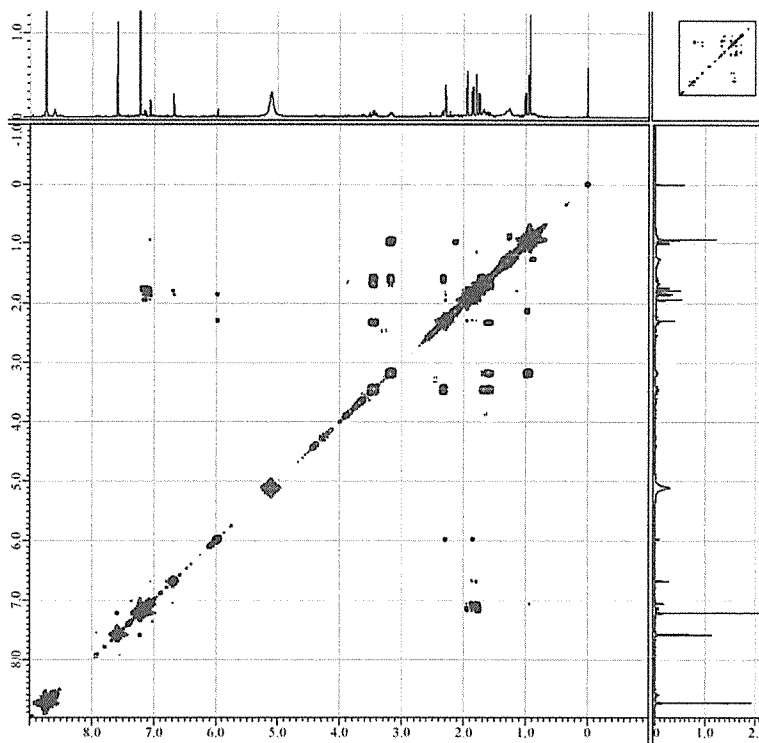


図 S3-4 culcitolid H (4), I (5) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

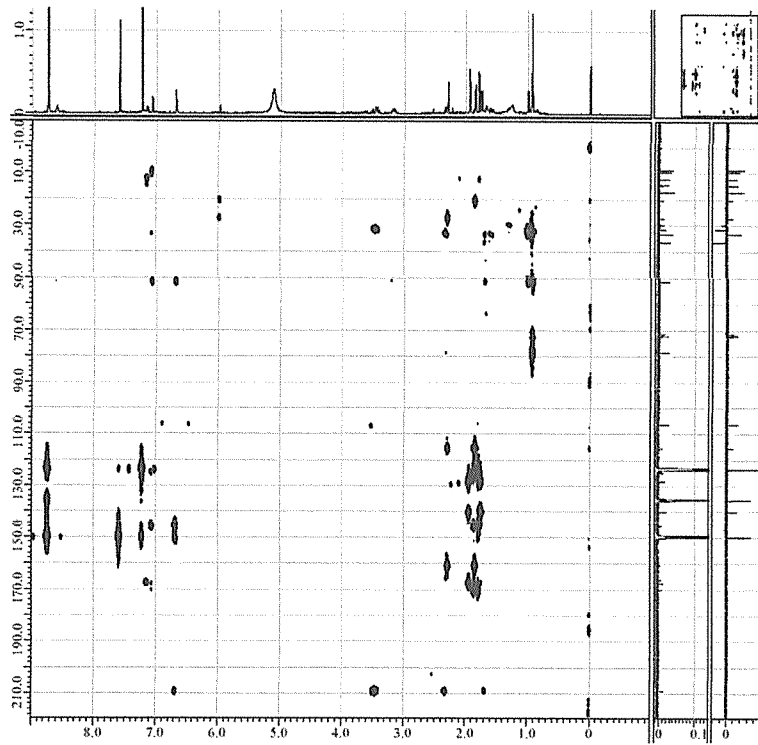


図 S3-5 culcitolide H (4), I (5) の HMBC スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

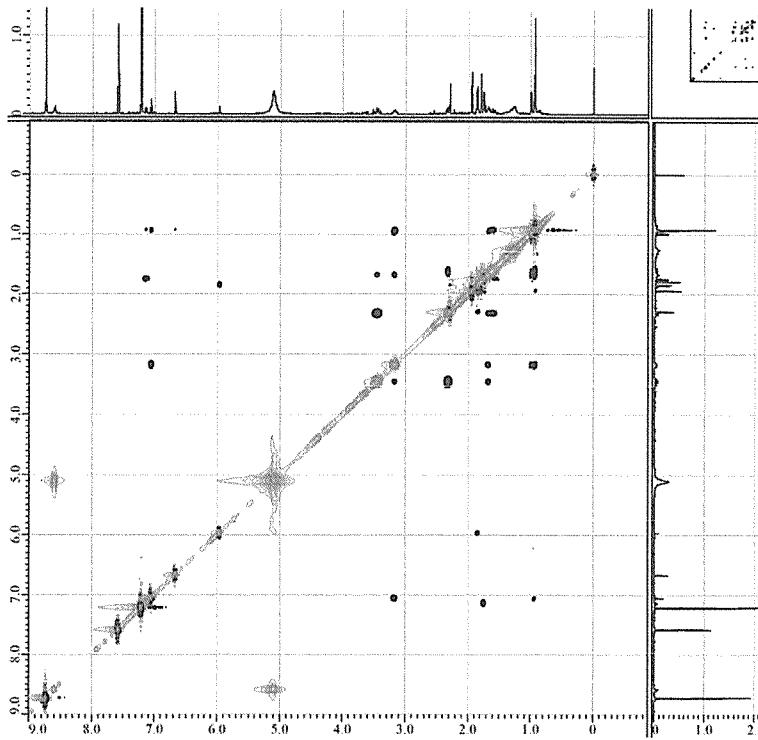


図 S3-6 culcitolide H (4), I (5) の NOESY スペクトル (400 MHz in C₅D₅N)

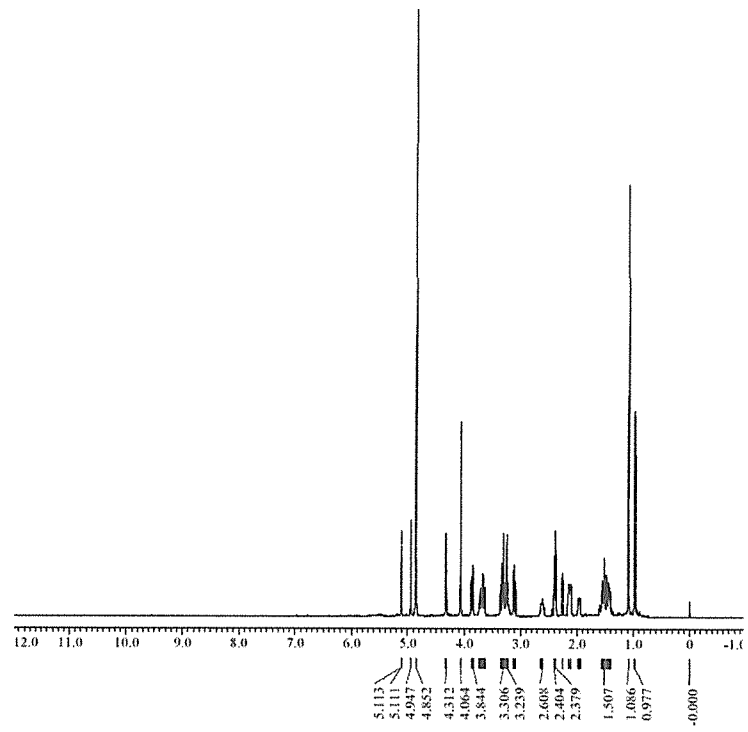


図 S4-1 calcitriolide J (6) の ¹H-NMR スペクトル (400 MHz in CD₃OD)

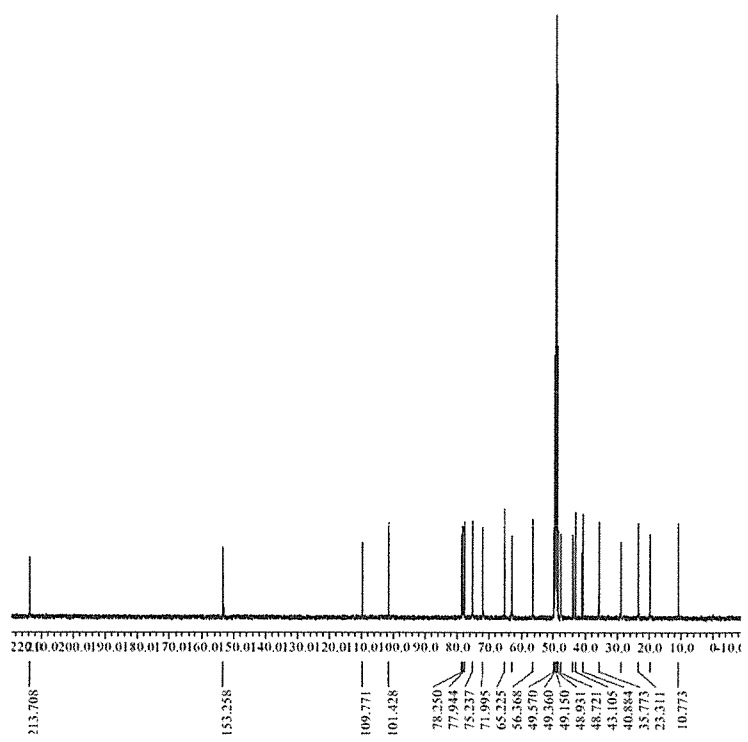


図 S4-2 calcitriolide J (6) の ¹³C-NMR スペクトル (100 MHz in CD₃OD)

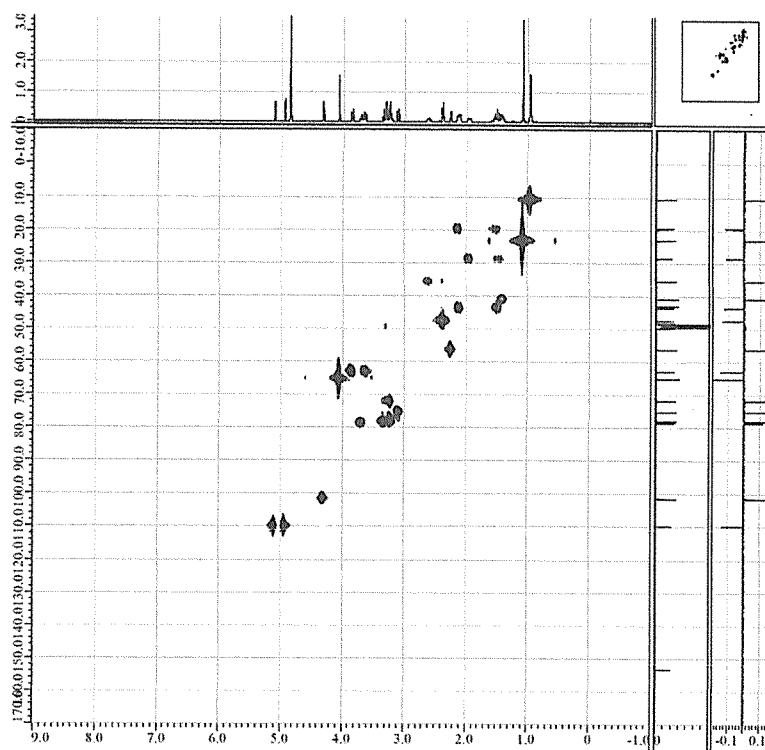


図 S4-3 culcitolide J (6) の HMQC スペクトル (400 MHz in CD₃OD)

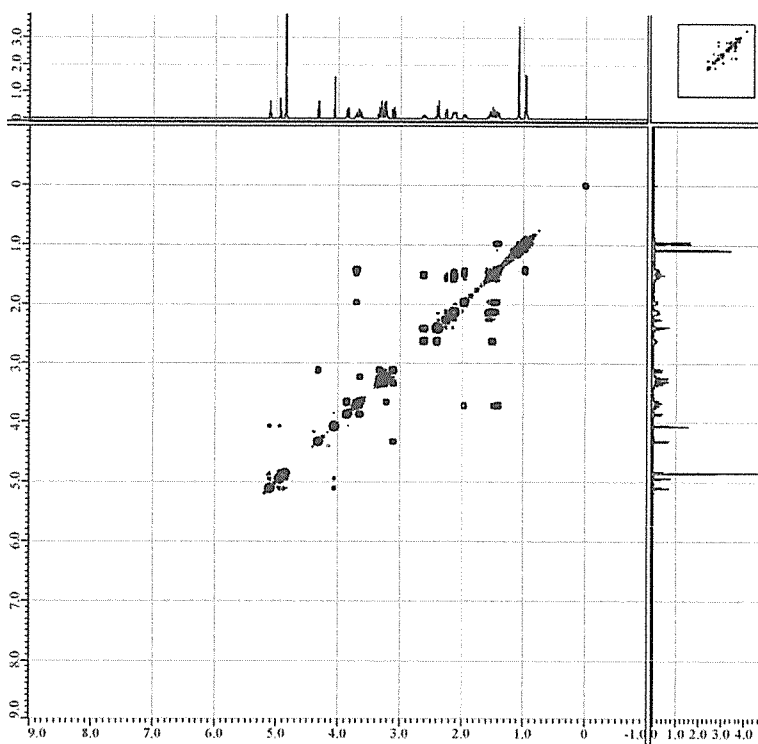
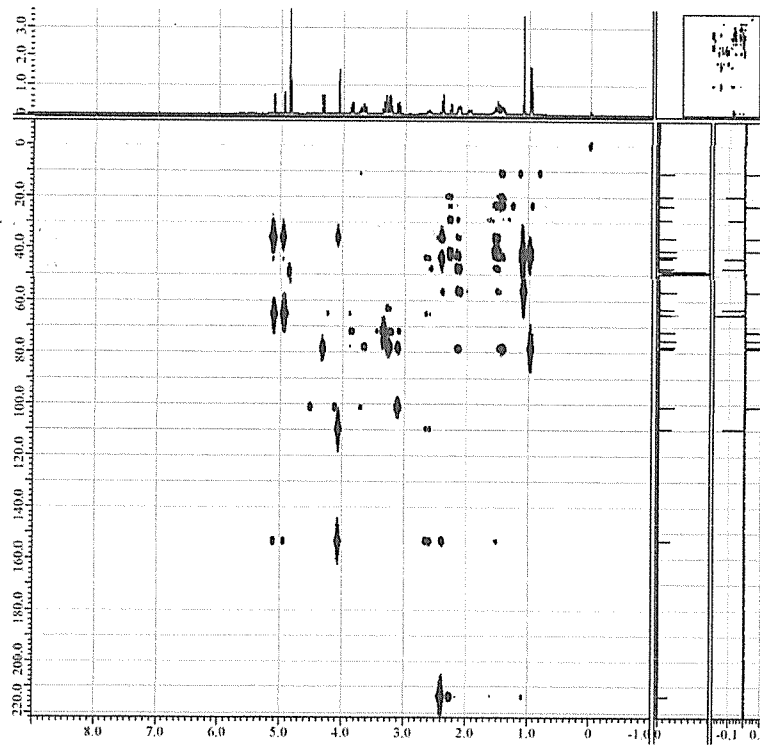
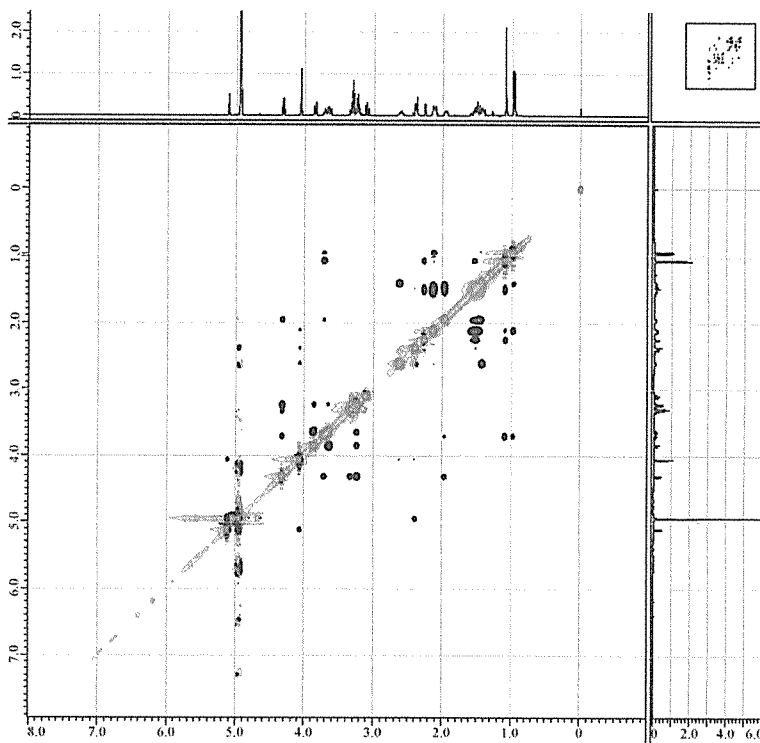


図 S4-4 culcitolide J (6) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CD₃OD)



☒ S4-5 culcitolid J (6) の HMBC スペクトル (400 MHz in CD₃OD)



☒ S4-5 culcitolid J (6) の NOESY スペクトル (400 MHz in CD₃OD)

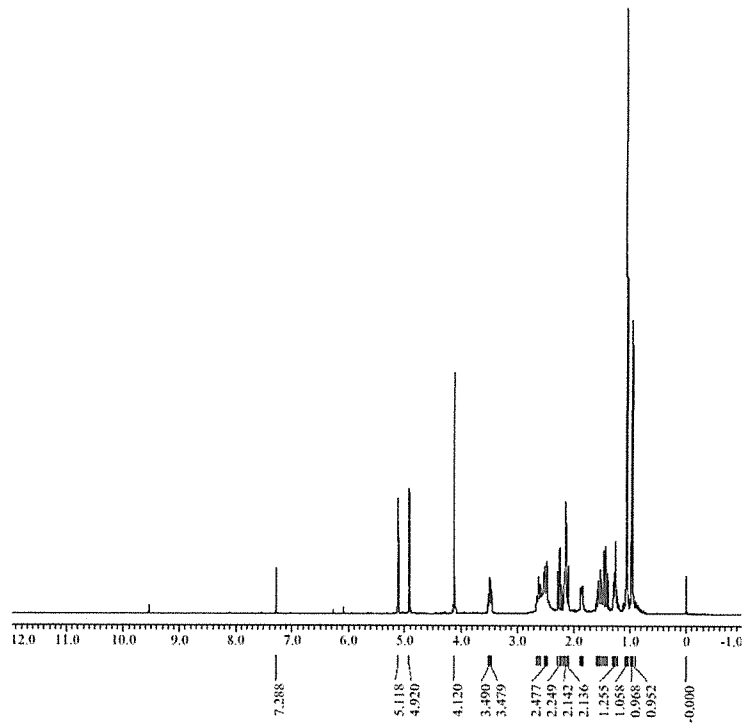


図 S5-1 culcitolide K (7) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CD_3OD)

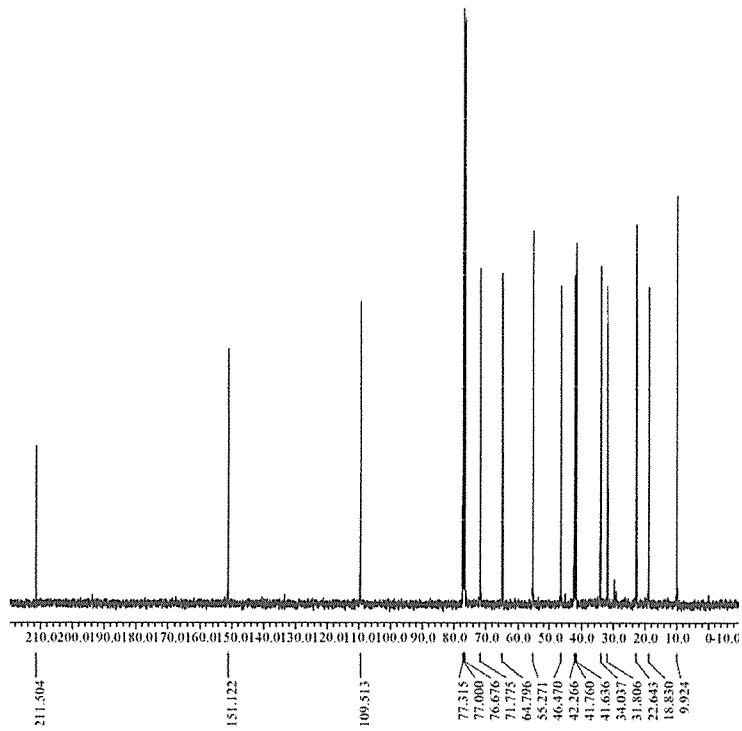


図 S5-2 culcitolide K (7) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CD_3OD)

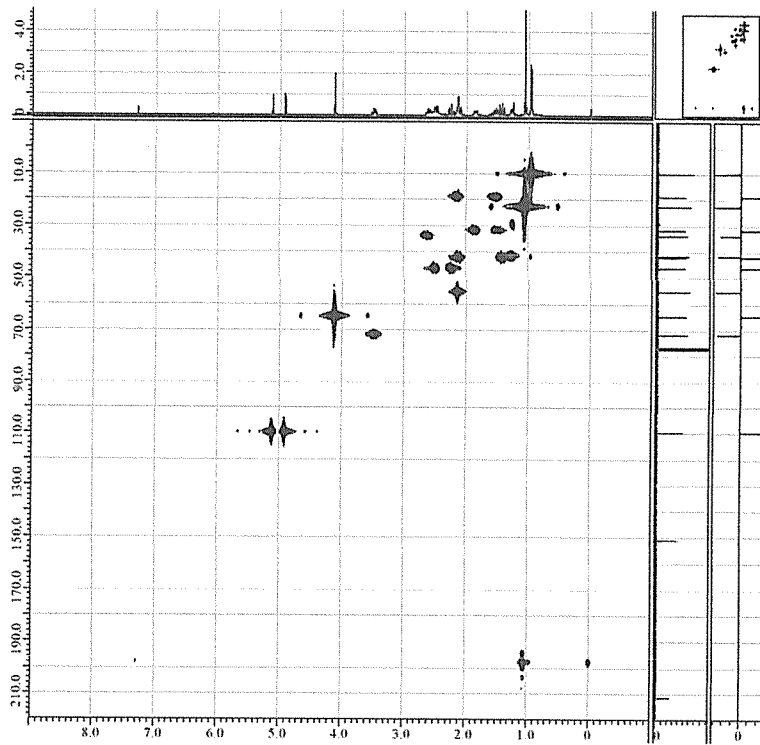


図 S5-3 culcitilide K (7) の HMQC スペクトル (400 MHz in CD₃OD)

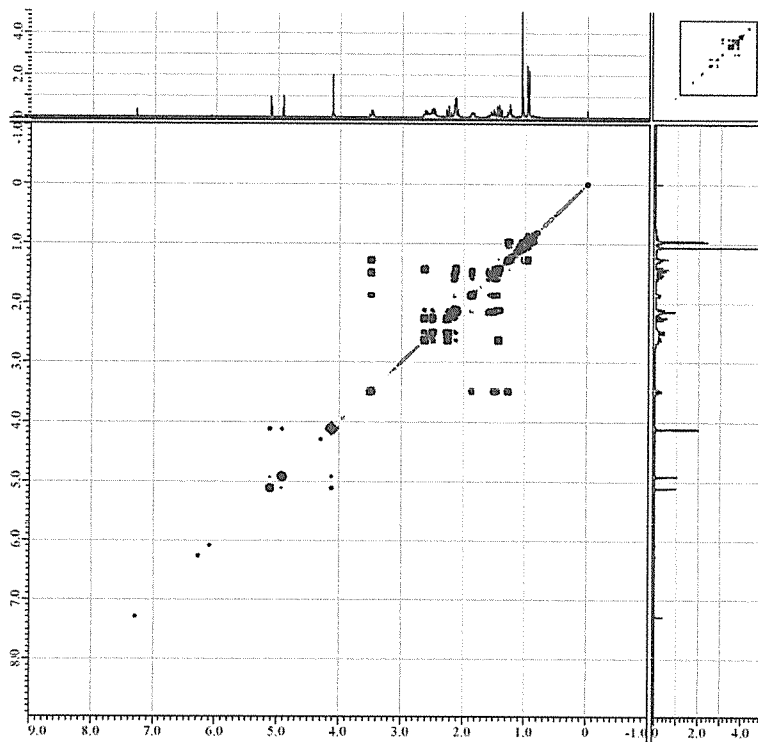
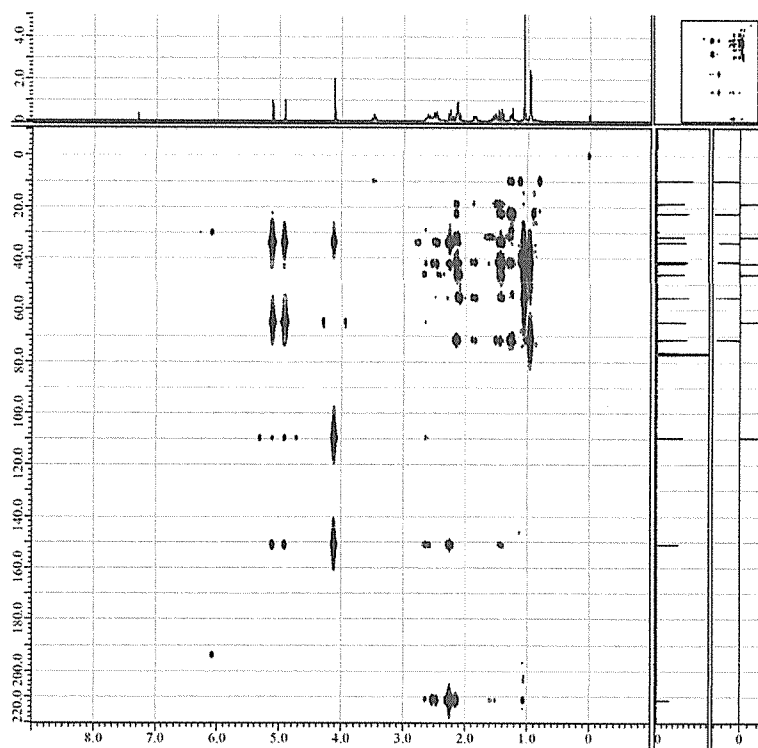


図 S5-4 culcitilide K (7) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CD₃OD)



☒ S5-5 culcitolide K (7) の HMBC スペクトル (400 MHz in CD₃OD)

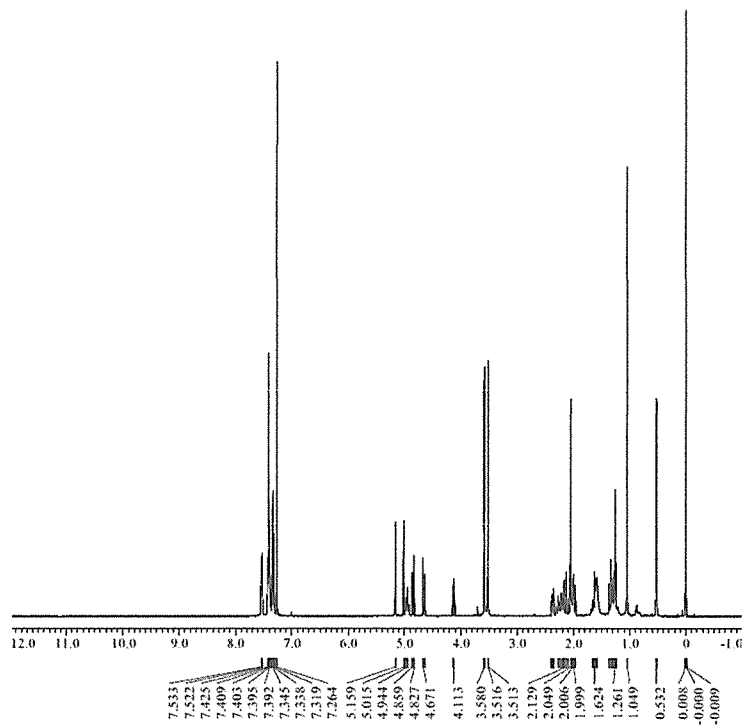


図 S6-1 3, 12-(S)-MTPA エステル体 culcitolide K (7) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

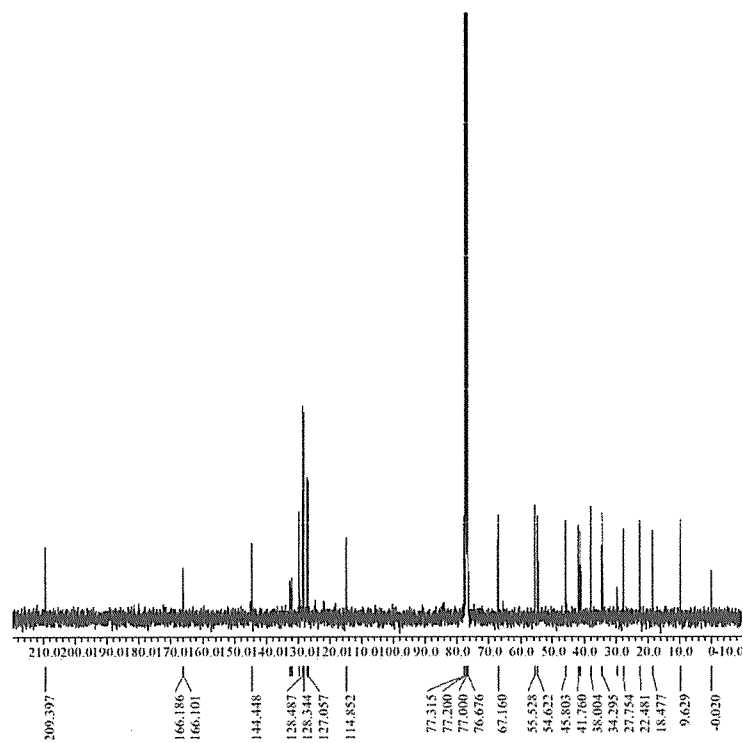


図 S6-2 3, 12-(S)-MTPA エステル体 culcitolide K (7) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

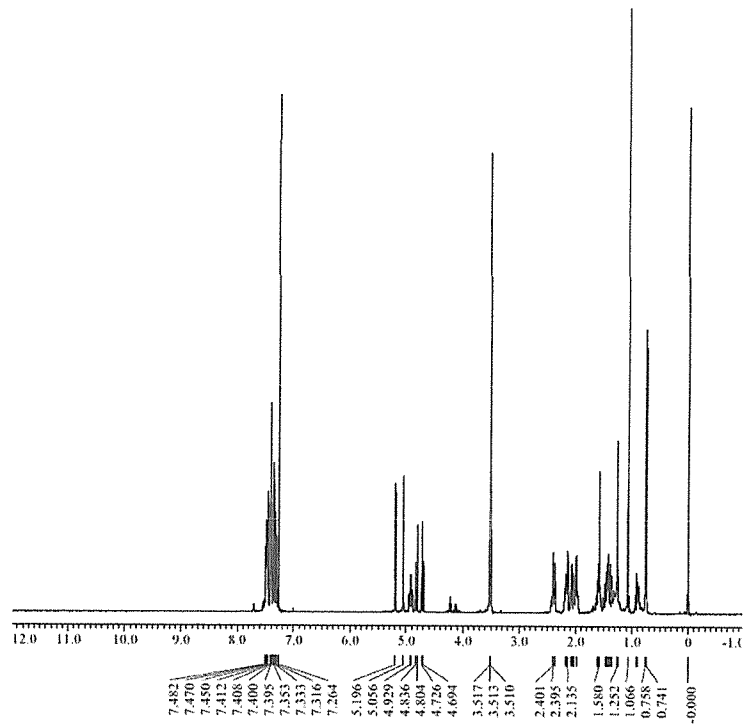


図 S7-1 3, 12-(*R*)-MTPA エステル体 culcitiolide K (7) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

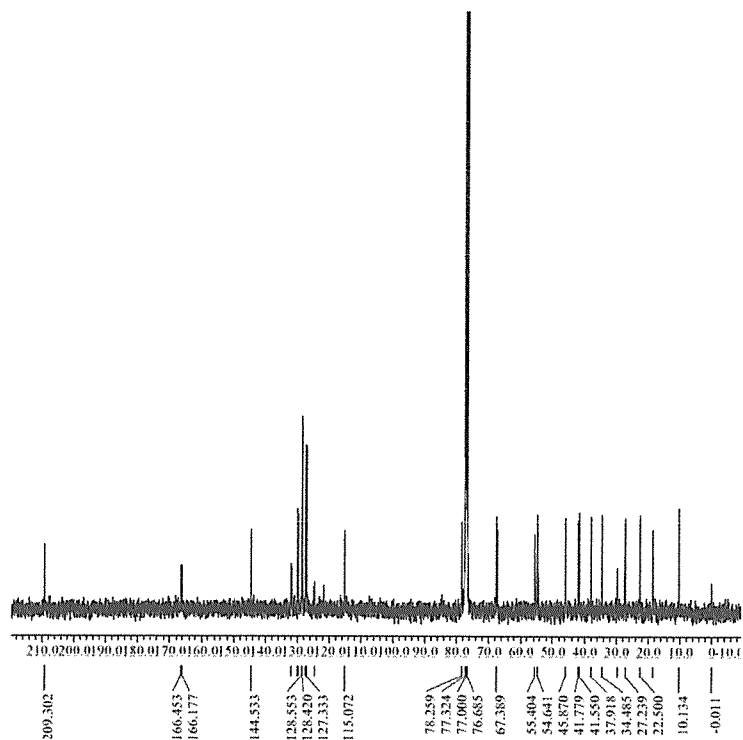


図 S7-2 3, 12-(*R*)-MTPA エステル体 culcitiolide K (7) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

第1部 第2章 南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の成分研究

序論

Caesalpinia 属の植物は、世界中に分布し、500以上の種が存在しており¹、その化学成分は、これまでに cassane 型ジテルペノイドをはじめフラボノイド²やステロール類³などの報告がある。特に、*Caesalpinia* 属において限定的に見いだされる cassane 型ジテルペノイドに関する論文は、ここ20年で100例近く発表されており、その生理活性は多岐に及ぶ。*Erythrophleum guineense* に含まれる cassane 型ジテルペノイド cassaine は、1975年 Tobin らによって非常に強い強心作用を示すことが見出された⁴。その作用機構は、1998年に Munari らによって、既知の強心配糖体 digitoxin と類似していることも証明され⁵、非ステロイド型の強心薬として注目されている。一方、2006年 Kalauni S. K.らの報告によると *Caesalpinia crista* より発見された norcaesalpinin E や 2-acetoxy-3-deacetoxycaesaldekarin e などの cassane 型ジテルペノイドは、既知の抗マラリア剤であるクロロキンを凌ぐ強力な抗マラリア作用を示すことが明らかにされた⁶。

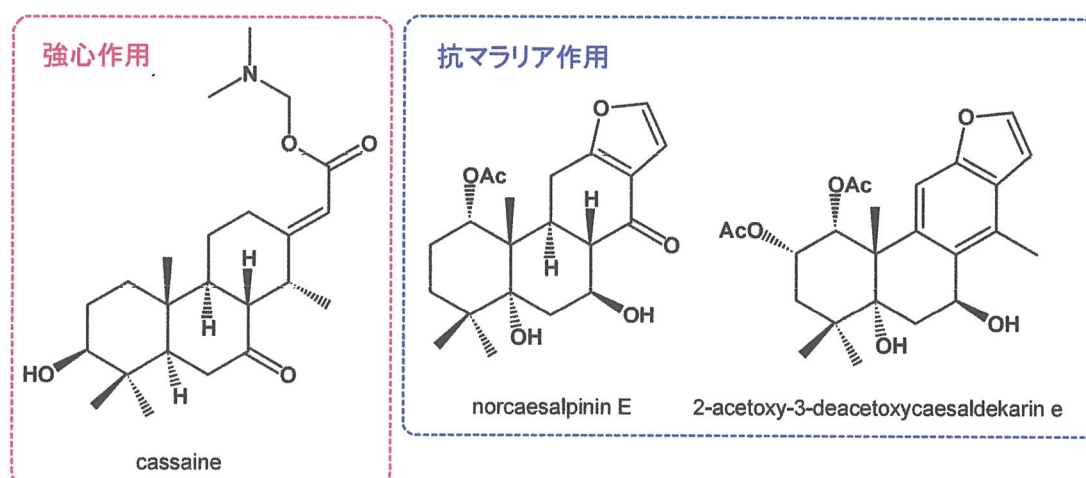


図 2-1 生理活性を示す cassane 型ジテルペノイド

その他にも cassane 型ジテルペノイドが有する生理活性については、がん細胞に対する増殖抑制効果^{7,8}や抗菌活性^{9,10}、抗酸化作用¹⁰及び抗結核作用¹¹などの報告もあり、近年注目を浴びている¹²。

今回、南米産植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の幹部アセトン抽出物に対して、NF- κ B 阻害活性を評価した結果、その阻害活性が認められたことから本植物の成分検索に着手した。なお、本植物抽出物は、2014年に Gomes らによってラットの角膜における炎症を軽減する効果が報告されたが¹³、それまで抗炎症作用に関する報告はなかった。

第1節 実験材料及び方法

第1項 研究試料



図 2-3 *Caesalpinia echinata* Lam.¹⁴

Caesalpinia echinata Lam. は、マメ科 [Leguminosae (Fabaceae)] ジャケツイバラ属 (*Caesalpinia*) に属し、ブラジルの大西洋岸森林に分布する樹高 20 - 30 m の高木である。*Caesalpinia* 属の植物は世界中に広く分布しているが、本植物に関してはブラジルにのみ生息するとされている¹。その幹にはとげが生えており、9 - 12 月にかけて黄色い花を咲かせる。現地では Pau Brasil や Pernambuco などと呼ばれており、材の色が燃える火の色に似ていることからブラジルの国名の由来になった植物である^{15, 16}。心材からは、紅色色素 brazilin や brazilein などのキノ

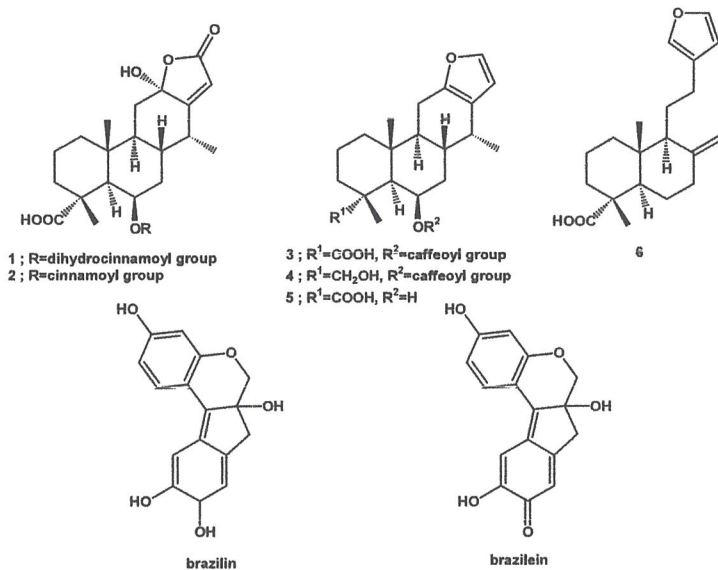


図 2-4 本植物より報告されている化合物

ン誘導体が得られ、以前は染料として用いられていた¹⁷⁻¹⁹。また、材が固いため現在でもバイオリン、ビオラ、チェロなどの弦楽器の弓として利用されている^{20, 21}。効能としては、収斂性があり強壯薬として用いられているほか、抗菌作用など報告もされている¹⁵。しかし、本植物に関する論文のほとんどは、詳細な化学成分について触れておらず、本植物の成分に関する詳細な報告は筆者が知る限り 3 例しかない^{16, 21, 22}。

第2項 新規 cassane 型ジテルペノイド echinalide 類の単離・精製

Caesalpinia echinata Lam. 幹部アセトン抽出物 (60 g) をカラムクロマトグラフィー (φ7.0 cm × 100.0 cm, gradient mixture of chloroform - methanol) による精製を行い, 8 つのフラクション (Fr.1 - Fr.8) に分画した. これら 8 つのフラクションを様々な展開溶媒を用いて薄層クロマトグラフィーを行った. そのうち Fr.1 について, さらなる分離を進めた. 精製過程を以下の図 2-5 に示す.

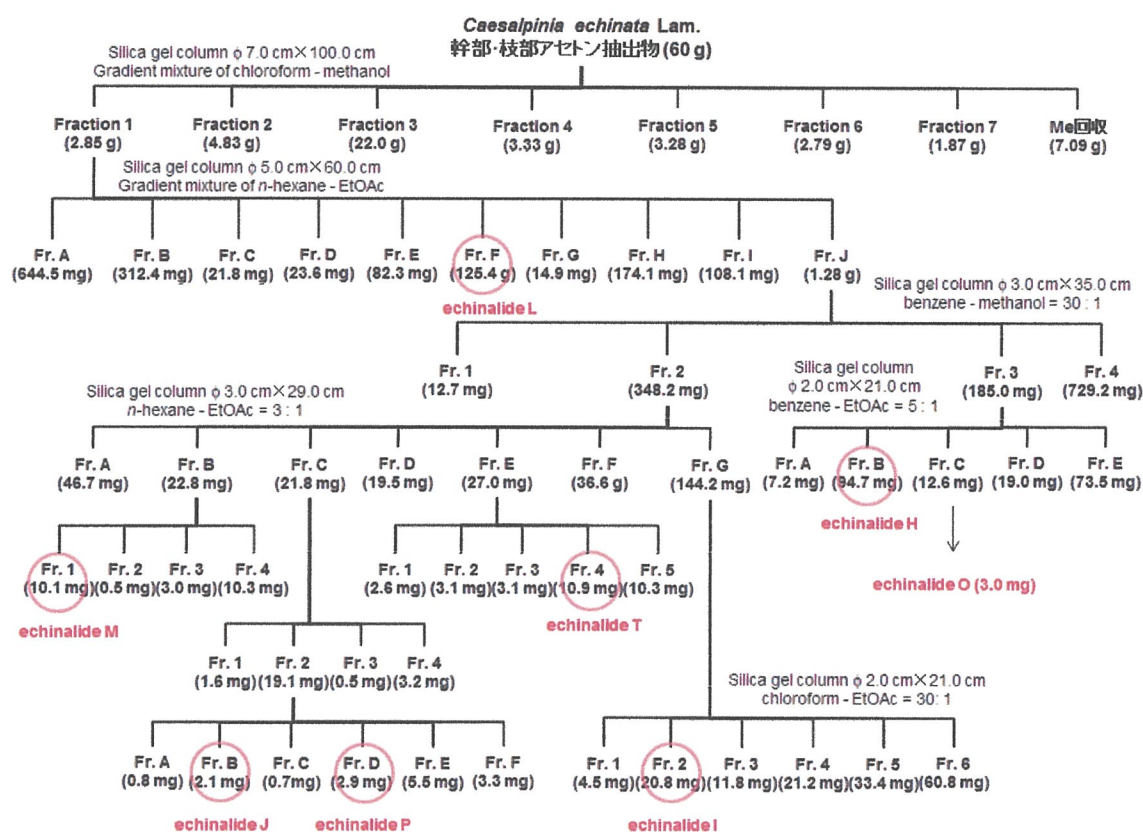


図 2-5 *Caesalpinia echinata* Lam. のアセトン抽出物の各種クロマトグラフィーによる分画図

第2節 結果と考察

第1項 echinalide 類の構造解析

本植物の幹部アセトン抽出物を各種クロマトグラフィーによって精製を行い、図2-6に示す21種の新規 cassane 型ジテルペノイドのうち、今回赤字で示した8種類の新規 cassane 型ジテルペノイドを単離した。その化学構造については、物理化学的性質を測定し、さらに NMR を中心とした各種機器分析手法でその構造を解析した。以下にその詳細を記す。なお、echinalide A - G については、2014年に報告済みである²³。

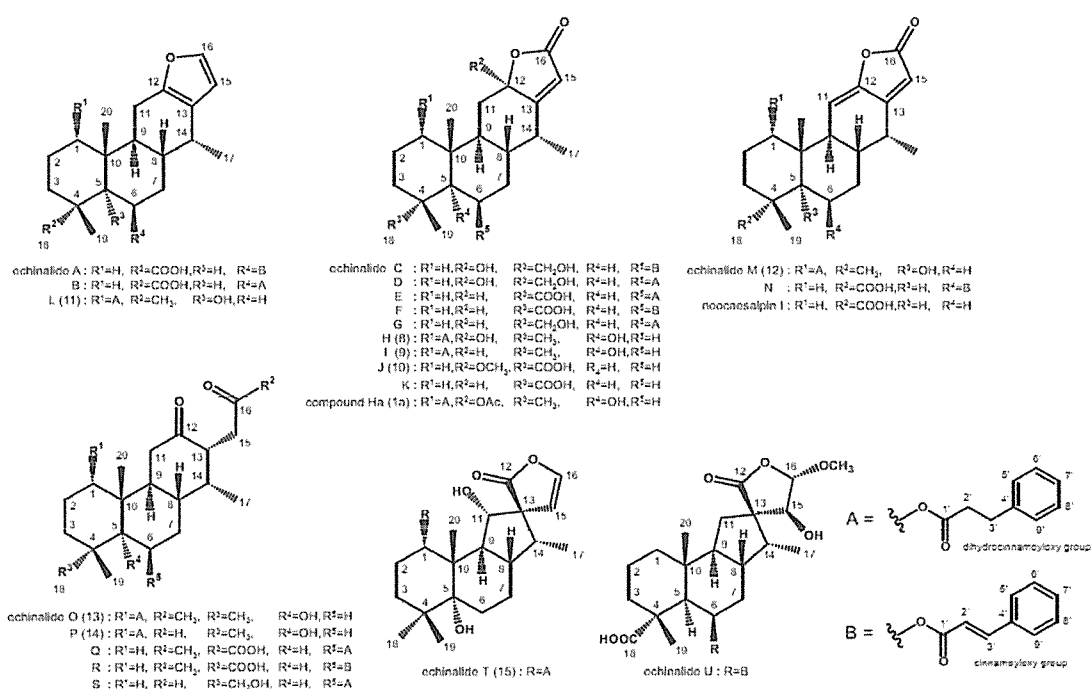


図2-6 *Caesalpinia echinata* Lam. より単離された成分

echinalide H (8)

echinalide H (8) は、淡黄色オイルとして単離された。本化合物は chloroform に易溶であり、methanol には難溶であった。TLC において、展開溶媒に benzene - EtOAc = 5 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.26 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで紫色のスポットとして確認され、しばらくすると緑色 - 茶褐色に変化した。本化合物は、HR-FAB-MS スペクトルにおいて、 m/z 483.2737 (Calcd. for C₂₉H₃₉O₆; 483.2746, $\Delta = 0.9$ mmu) に擬似分子イオンピークが観測されたことから、その分子式を C₂₉H₃₈O₆ と推定した。IR スペクトルからは、ヒドロキシ基 (3372 cm⁻¹) 及び α , β -不飽和 γ -ラクトン環 (1732, 1652 cm⁻¹) に特徴的なシグナルが観測された。¹H-NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃) において、3本の三級メチル基 [δ_H 0.98 (s), 0.98 (s), 1.03 (s)], 1本の二級メチル基 [δ_H 1.22 (d, $J=7.6$ Hz)], 1本の低磁場シフト

したオキシメチンシグナル [δ_{H} 4.89 (br s)], 1本のオレフィンプロトンシグナル [δ_{H} 5.66 (s)]及び5H分の芳香族由来のシグナル [δ_{H} 7.19-7.31 (overlapped)] が観測された。 ^{13}C -NMR 及び DEPT スペクトルからは, 2本のオキシカーボンシグナル [δ_{C} 75.6 (d), 77.2 (s)], 1本のアセタールカーボンシグナル [δ_{C} 105.8 (s)] に加えて, フェニル基由来のシグナル [δ_{C} 126.4 (d), 128.2 (d), 128.6 (d), 140.0 (s)], 1組のオレフィンカーボンシグナル [δ_{C} 113.1 (d), 173.3 (s)] 及び2つのエステルカルボニル由来のシグナル [δ_{C} 171.1 (s), 171.6 (s)] が観測された (図 2-7). そこで, 本化合物の平面構造を明らかにするため, 各種二次元 NMR スペクトルによる解析を行った (図 2-8).

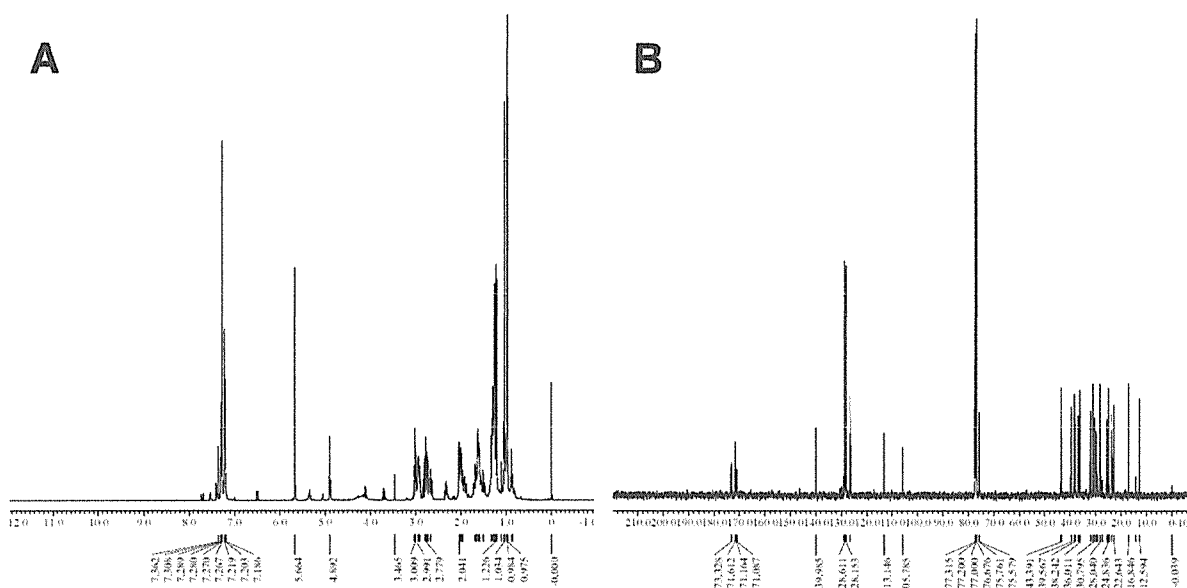


図 2-7 echinalide H (8) の 1D-NMR スペクトル (in CDCl_3)
(A) ^1H -NMR スペクトル (400 MHz), (B) ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz)

まず, ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて 2', 3'位間及び 5'-9'位間に相関が確認された. さらに HMBC スペクトルによる解析から, Unit 1 に示すようなジヒドロ桂皮酸エステルの存在が明らかになった. 次に, HMBC スペクトルにおいて, H-18, 19 (三級メチル基) から C-3, 4, 5 にそれぞれ相関が確認され, H-20 (三級メチル基) からは C-1, 5, 9 及び 10 に相関が確認された. ^1H - ^1H COSY スペクトルからは 1 位から 3 位及び 7 位から 9 位まで相関が確認されたことから, Unit 2 の存在が明らかになった. また, α , β -不飽和 γ -ラクトン環を含む Unit 3 についても ^1H - ^1H COSY 及び HMBC スペクトルにおいて図 2-8 に示すような相関が確認されたことから明らかになった.

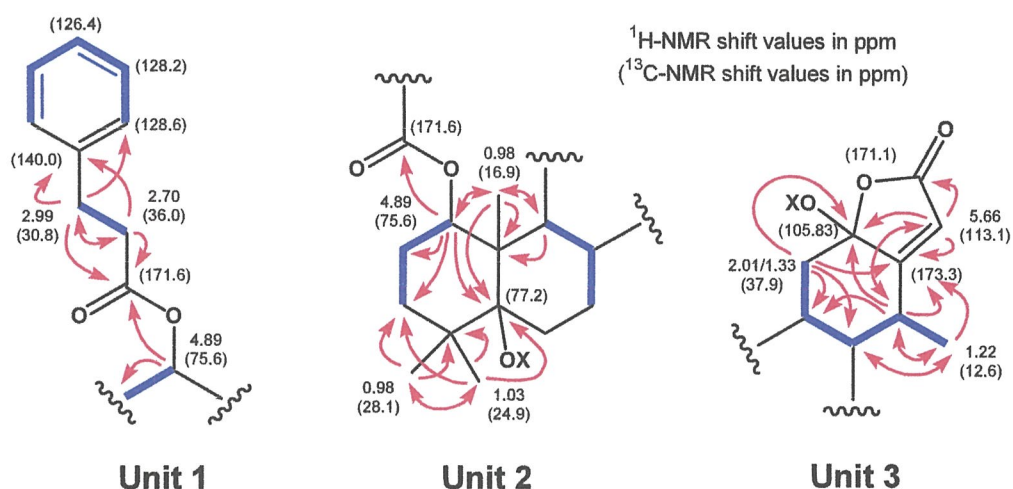


図 2-8 echinalide H (8) の部分構造解析
 (blue lines; ¹H-¹H COSY correlations, red arrows; HMBC correlations)

さらに、詳細な各種二次元 NMR スペクトルの解析により、これら部分構造の繋がりが明らかとなり、本化合物の平面構造を図 2-9 (A) に示すような 1 位にジヒドロ桂皮酸エステルを有する新規 cassane 型ジテルペンラクトンであると決定した。

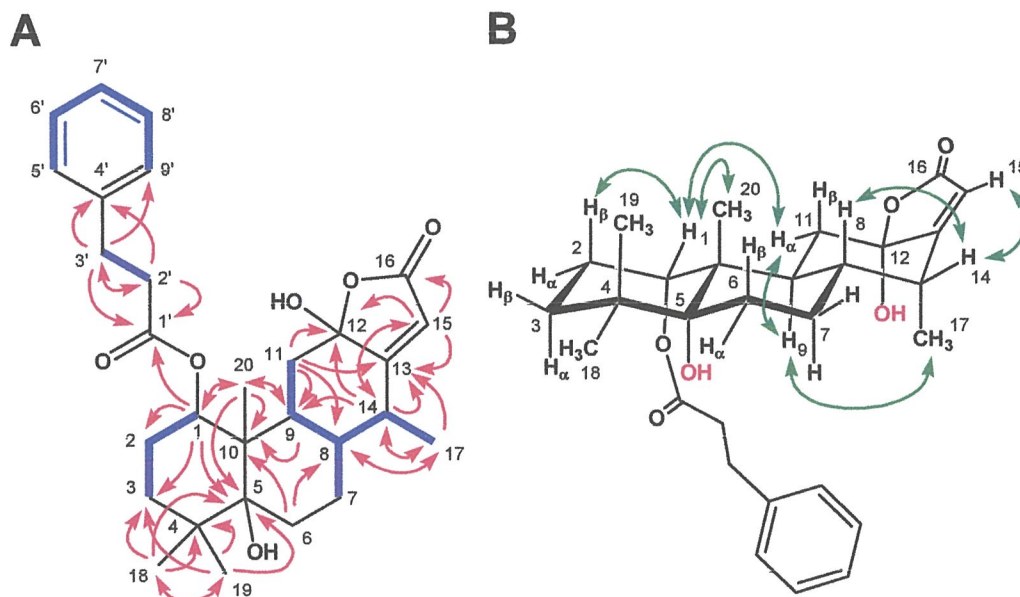


図 2-9 echinalide H (8) の各種二次元 NMR スペクトル解析
 (A) ¹H-¹H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

本化合物の相対立体配置を明らかにするため、NOESY スペクトルによる解析を行い、図 2-9 (B) に示すように相対立体配置を決定したが、5 位及び 12 位の立体化学については、決定が困難であった。そのため、5 位及び 12 位の三級ヒドロキシ基に対して常法に従いアセチル化を試みた結果、12 位のヒドロキシ基のみがアセチル化された無色板状結晶のモノアセテート体 化合物 Ha

(2.3 mg, 収率 71 %) を得た (図 2-10).

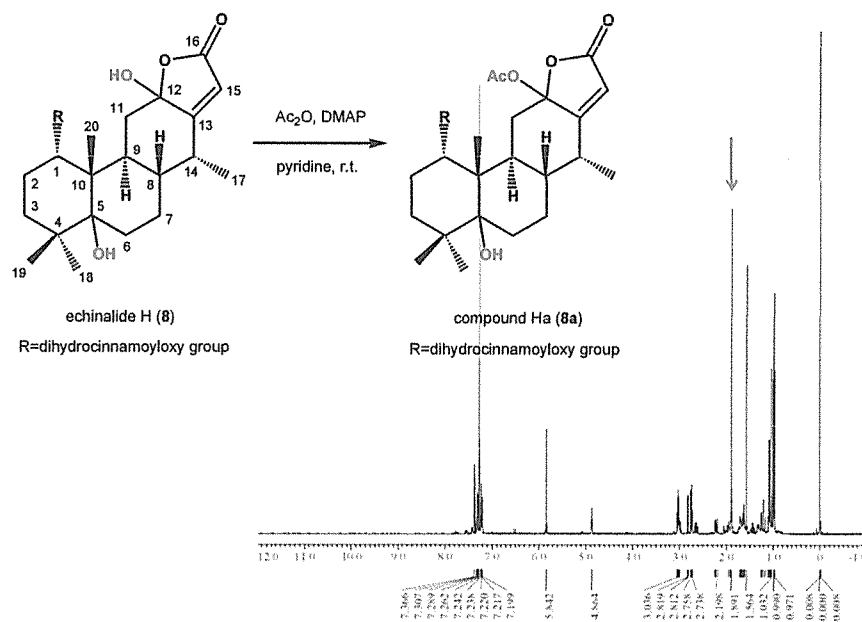


図 2-10 echinalide H (8) のアセチル化とその NMR スペクトル

化合物 Ha (8a) は, chloroform, pyridine には易溶であるが, methanol には難溶であった. 化合物 Ha (8a) の NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃) は, 各種二次元 NMR によりすべての炭素及び水素について帰属することができたことに加え, 5 位ヒドロキシ基由来のプロトンシグナルも明確に観測されていた. 以上のことを踏まえて, 化合物 Ha (8a) の相対立体配置を NOESY スペクトルにより解析した結果, H-12 (アセチル基) は H-17 (メチル基) と相関が確認されたことから, 12 位アセチル基は α -axial に配向することが確認できた. また, 5 位ヒドロキシ基は 3 α 及び 9 位との相関が確認できたことから, 本化合物の 1-14 位までの縮環様式は, *trans* / *anti* / *trans* であることが明らかになった. よって, 化合物 Ha (8a) の化学構造を決定するとともに, echinalide H (8) の相対立体配置も決定した [図 2-11 (A)]. さらに, 化合物 Ha (8a) より得られた単結晶に対して, X線結晶構造解析を行った結果, 相対立体配置を含め, NMR による解析の結果と相違ないことが確認できた [図 2-11 (B), CCDC Deposit No. 934527].

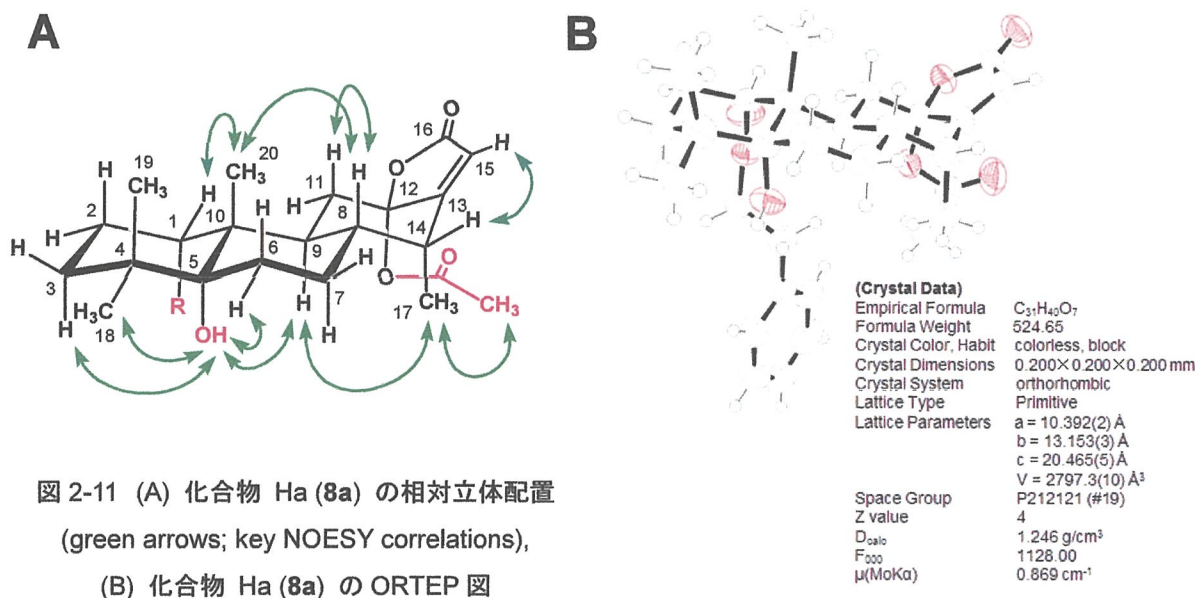


図 2-11 (A) 化合物 Ha (8a) の相対立体配置
(green arrows; key NOESY correlations),
(B) 化合物 Ha (8a) の ORTEP 図

化合物 Ha (8a) の X 線結晶構造解析の結果より化合物 Ha (8a) 及び echinalide H (8) は、5 位ヒドロキシ基と 1 位アシル基の酸素原子が水素結合することが明らかとなった。このことは、過去に R. W. Jiang らによって cassane 型ジテルペノイドである caesalmin 類の X 線結晶構造解析で同様の報告もされており、Jiang らはこの水素結合によって cassane 骨格が非常に安定に保たれていると報告している²⁴。

化合物 Ha (8a) の絶対立体配置については、CD スペクトルから検討した。前述のとおり eremophilane 型セスキテルペノイドにおいては、 α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有する場合、その γ 位のキラリティーが CD スペクトルにおいて、 π - π^* 遷移に起因する Cotton 効果の符号に影響を与えることが一般的に知られているが (第 1 章 p.14), 近年では cassane 型ジテルペノイドにおいても同様の方法で絶対立体配置が決定された例が多数報告されていることから、本化合物の CD スペクトルを測定した^{8, 7, 25}。その結果、echinalide H (8) は、244 nm 付近に強い負の Cotton 効果を示したことから本化合物の 12 位立体化学は R であることが明らかとなった。なお、1 位に結合したジヒドロ桂皮酸エステルがスペクトルへ与える影響を検討する目的で本化合物の加水分解を行い、化合物 H' (8') を得た。この化合物の CD スペクトルを測定した結果、echinalide H のスペクトルと良好な一致を示し、この波長領域でのアシル基の寄与は無視できることが明らかとなった (図 2-12)。

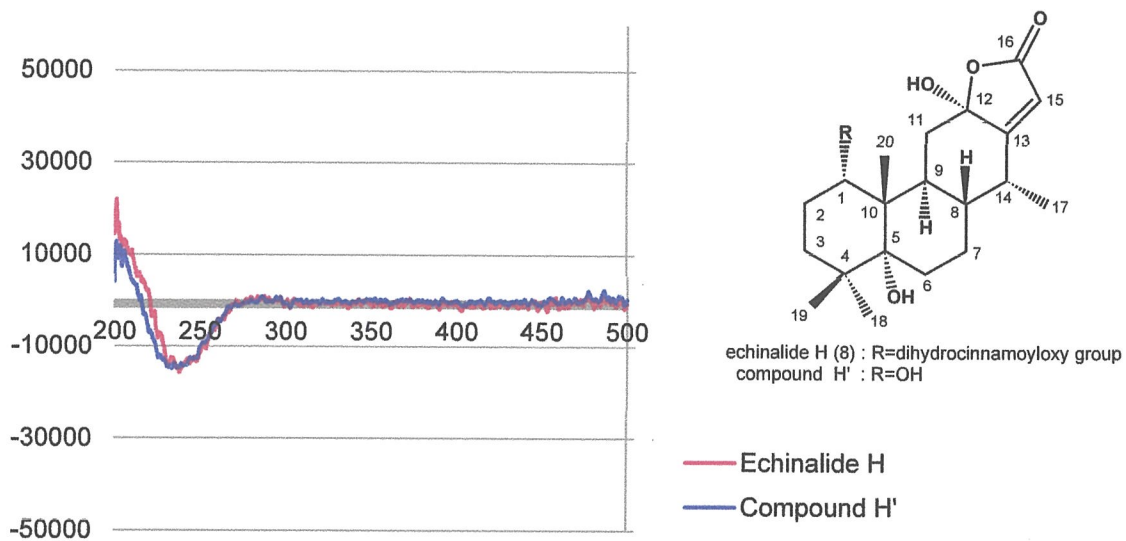


図 2-12 echinalide H (8) と化合物 H' (8') の CD スペクトル (in EtOH)

また、12 位アセチル化体である化合物 Ha の CD スペクトルも同様に 240nm 付近に負の Cotton 効果が観測された (H: $[\theta]_{244} = -13825 \text{ } ^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$, Ha: $[\theta]_{247} = -24300 \text{ } ^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$) (図 2-13).

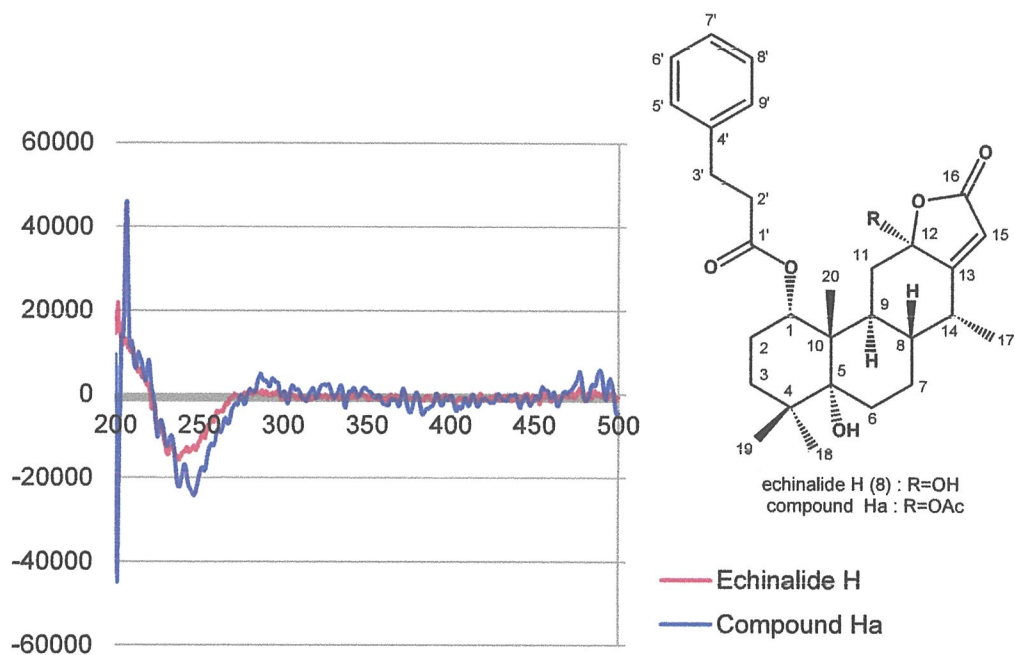


図 2-13 echinalide H (8) と化合物 Ha (8a) の CD スペクトル (in EtOH)

最後に、echinalide H の各種二次元 NMR スペクトルを以下に示す。

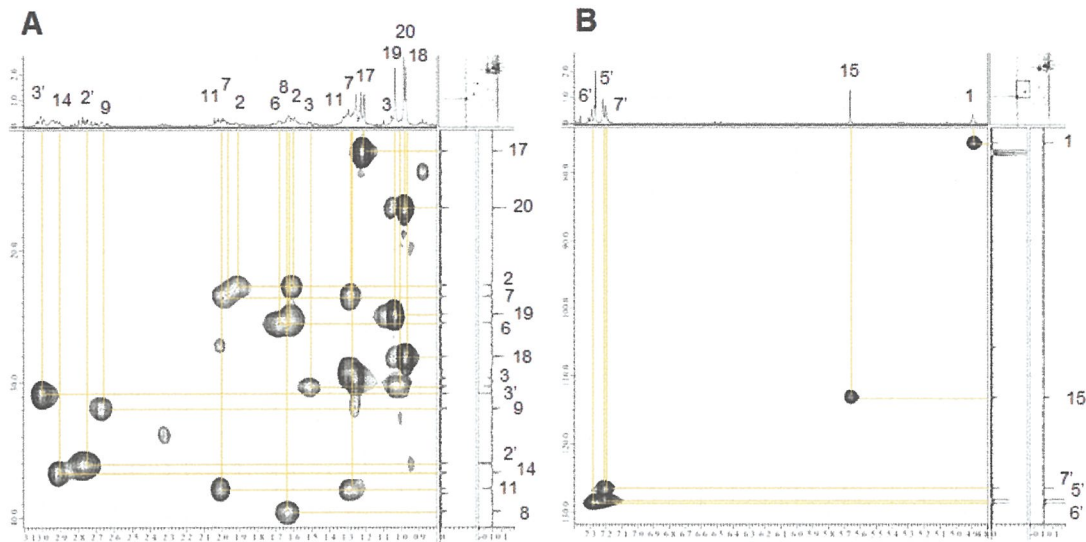
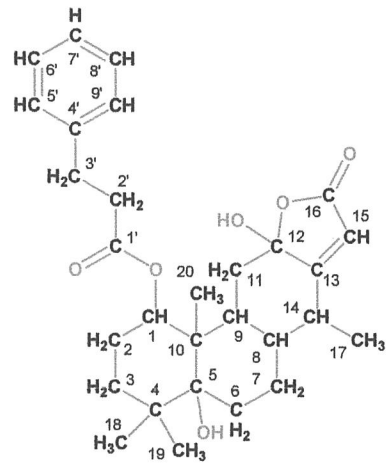
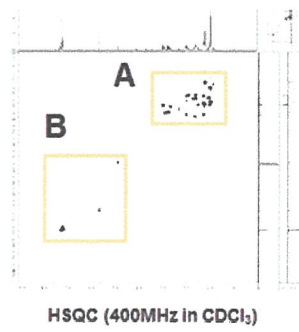


図 2-14 echinalide H (8) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

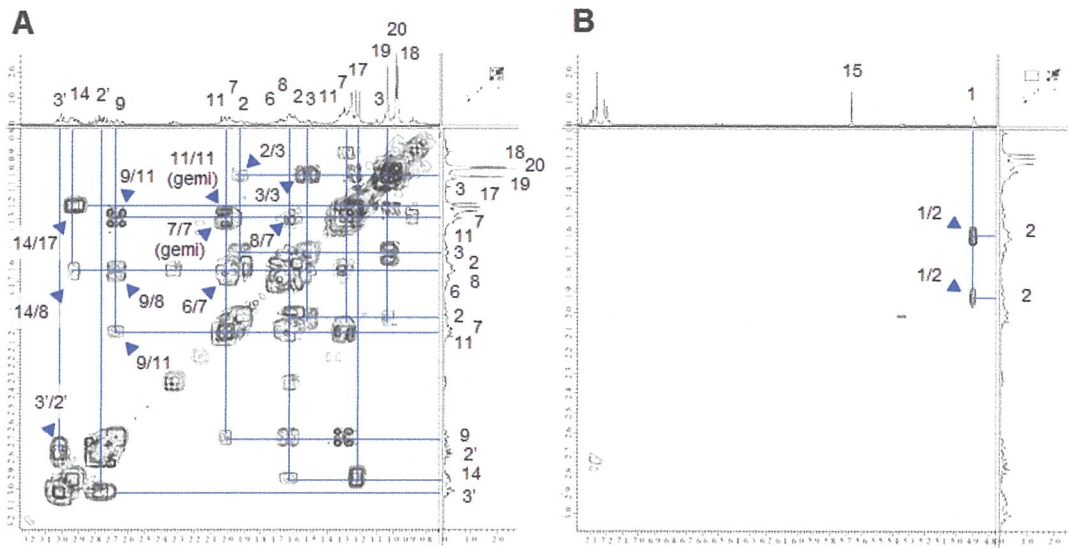
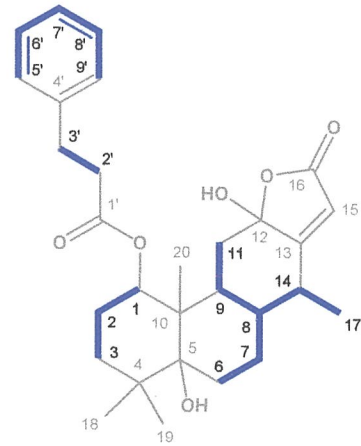
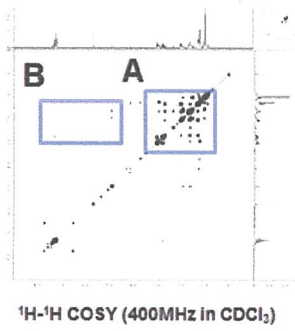


図 2-15 echinalide H (8) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)
¹H-¹H COSY correlations (blue lines)

echinalide I (9)

echinalide I (9) の各種スペクトルデータは, echinalide H と非常に類似しており, NMR スペクトル(400MHz in CDCl₃) を比較すると, 12位アセタール炭素が消失し, 新たに ABX 型にカップリングしたオキシメチンシグナル[δ_{H} 4.77 (1H, dd, $J=11.2, 6.4$ Hz / δ_{C} 79.2 (d)] が観測されていた. よって, 本化合物の平面構造は 12 位にオキシメチンプロトンを有することが推測できた. これは, HR-FAB-MS スペクトルの結果 (m/z 467.2788 [M+H]⁺, Calcd. for C₂₉H₃₉O₅; 467.2797, $\Delta -0.9$ mmu) とも矛盾しない. さらに, 各種二次元 NMR スペクトルによる解析からもこのことは支持された [図 2-10 (A)]. 本化合物の相対立体配置に関しては, NOESY スペクトルを解析することにより決定した [図 2-10 (B)]. すなわち, H-12 / H-17 に明確なクロスピークが確認されており, その他の相関に関しても echinalide H と同様であったことから, 本化合物の相対立体配置を図 2-10 (B) に示すように決定した. また, 絶対立体配置に関しても echinalide H と同様に CD スペクトルから決定した ($[\theta]_{286}^{\circ} = +3018$ °cm²/dmol, $[\theta]_{235}^{\circ} = -12660$ °cm²/dmol).

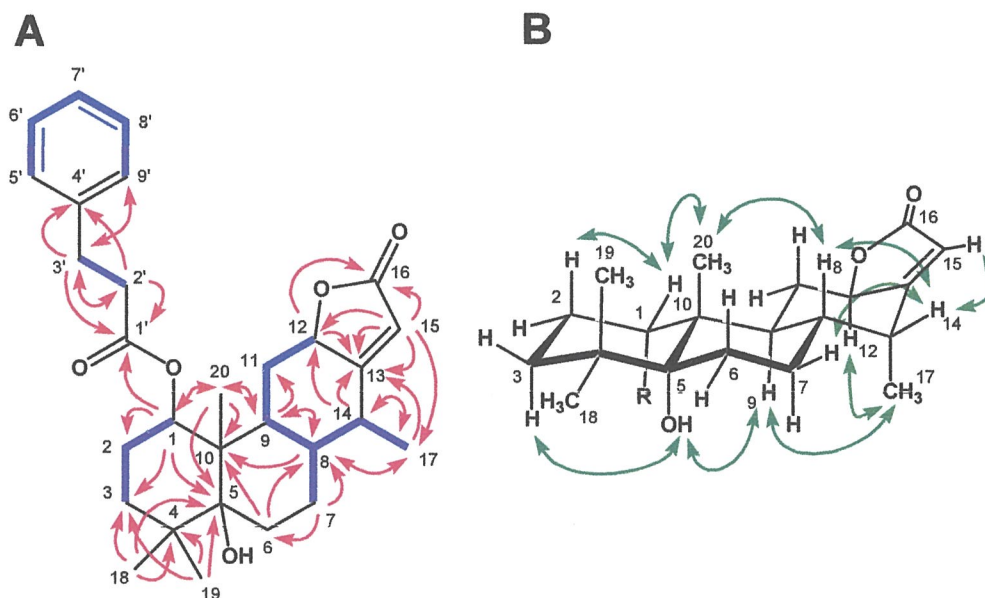


図 2-10 echinalide I (9) の各種二次元 NMR 相関図

(A) ¹H-¹H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

echinalide J (10)

echinalide J (10) の NMR スペクトルも echinalide H と非常に類似しており, ジヒドロ桂皮酸エステルを有する cassane 型ジテルペンラクトンであることが推測できた. 本化合物の NMR スペクトルは, echinalide H と比較すると新たにメトキシ基 [δ_{H} 3.10 (3H, s) / δ_{C} 50.8 (q)] の存在が確認されており, このことは, HR-FAB-MS より算出された分子式 C₃₀H₄₀O₆ を踏まえると本化合物は, echinalide H の 12 位ヒドロキシ基がメトキシ基に置き換わった構造であることが推定できる. さらに, このメトキシ基 (H-21) は HMBC スペクトルにおいて, C-12 (アセタール炭素) への相関が確認でき, NOESY スペクトルでは, 17 位メチル基との間に明確な相関が確認できたことから本化合物の化学構造を相対立体配置も含めて, 図 2-11 に示すように決定した. なお, 本化合物の

絶対立体配置は, echinalide H 及び I と同様に CD スペクトルから決定した ($[\theta]_{295} = +3305 \text{ }^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$, $[\theta]_{233} = -35968 \text{ }^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$).

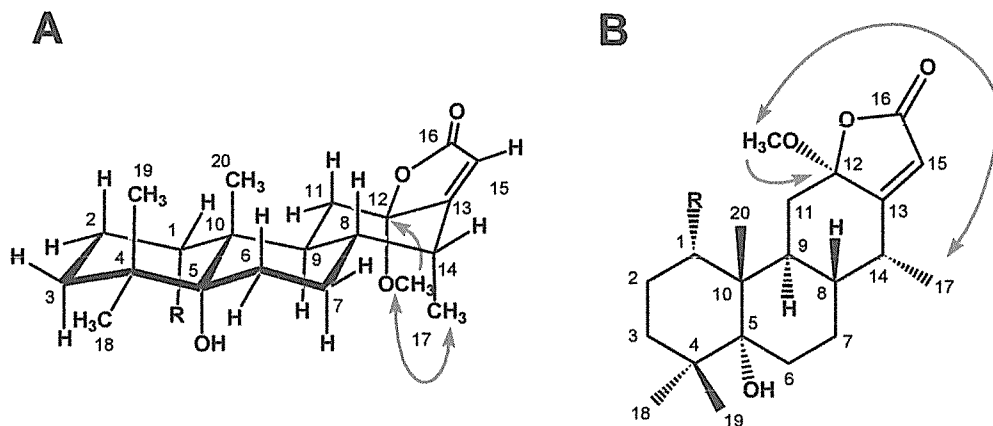


図 2-11 echinalide J (10) の平面構造及び相対立体配置の解析
key HMBC correlation (red arrows), key NOESY correlation (green arrows)

echinalide L (11)

echinalide L (11) は, 分子式 $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{O}_4$ (HR-FAB-MS m/z 451.2869, Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4$; 451.2848, $\Delta +2.1 \text{ mmu}$) の淡黄色オイルとして単離された. 本化合物は, TLC 上で Ehrlich 呈色試薬を噴霧することで, フラン誘導体に特徴的な赤紫色の呈色を示した²⁶. 本化合物の NMR スペクトルは, echinalide H (8), I (9), J (10) と同様にジヒドロ桂皮酸エステルを有する cassane 型ジテルペノイドに特徴的なシグナルを示しており, echinalide H との相違点は, α , β -不飽和 γ -ラクトン環由来のシグナルが消失している代わりに, 新たにフラン環由来のシグナルが観測されたことである. そこで, 各種二次元 NMR スペクトルによる詳細な解析を行った結果, 本化合物はフラン環を有する新規 cassane 型ジテルペノイドであると決定した. また, NOESY スペクトルによる解析からこれまでの cassane 型ジテルペノイドと同様の相対立体配置を有することも明らかになった (図 2-12).

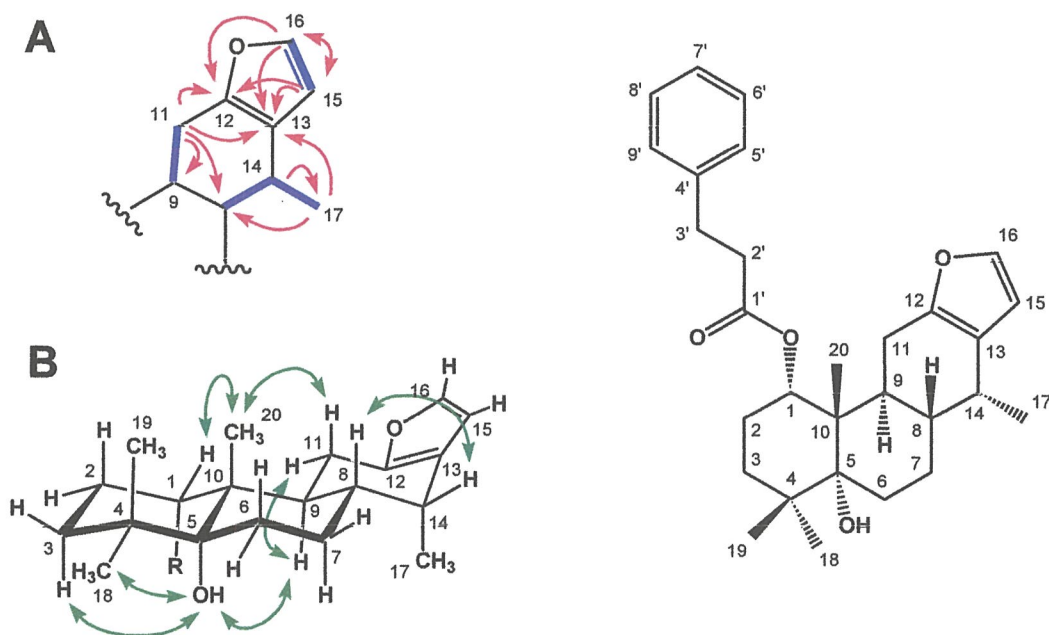
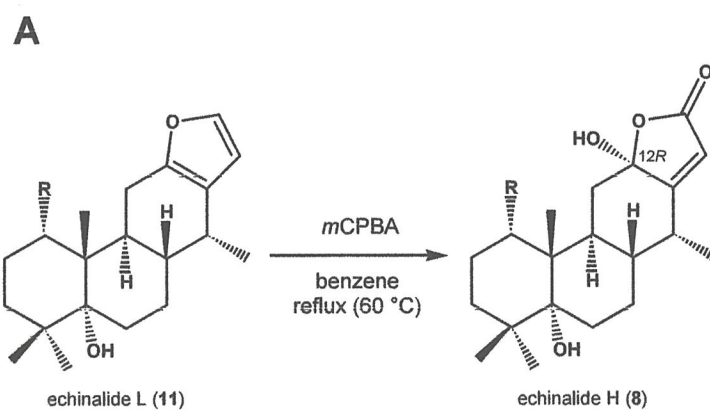


図 2-12 echinalide L (11) の各種二次元 NMR 相関図

(A) ^1H - ^1H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

さらに、本化合物は *m*-クロロ過安息香酸 (*m*CPBA) で処理し、フラン環をラクトン環に変換することで、絶対立体配置が決定している echinalide H (8) へ誘導することができた [図 2-13 (A)]²⁵. 本反応で得られた主生成物は、12 位立体化学に関して、立体選択的に反応が進行しており [図 2-13 (B)], 比旋光度を含めて全てのスペクトルデータが echinalide H (8) と良好な一致を示したことから、本化合物の絶対立体配置は、echinalide H (8) と同様であることが明らかになった. 反応の選択性については、より安定な *chair-chair-chair* の配座を維持するため、図 2-13 (B) 下段に示したようにエポキシ化が進行したためであると推測している.



B

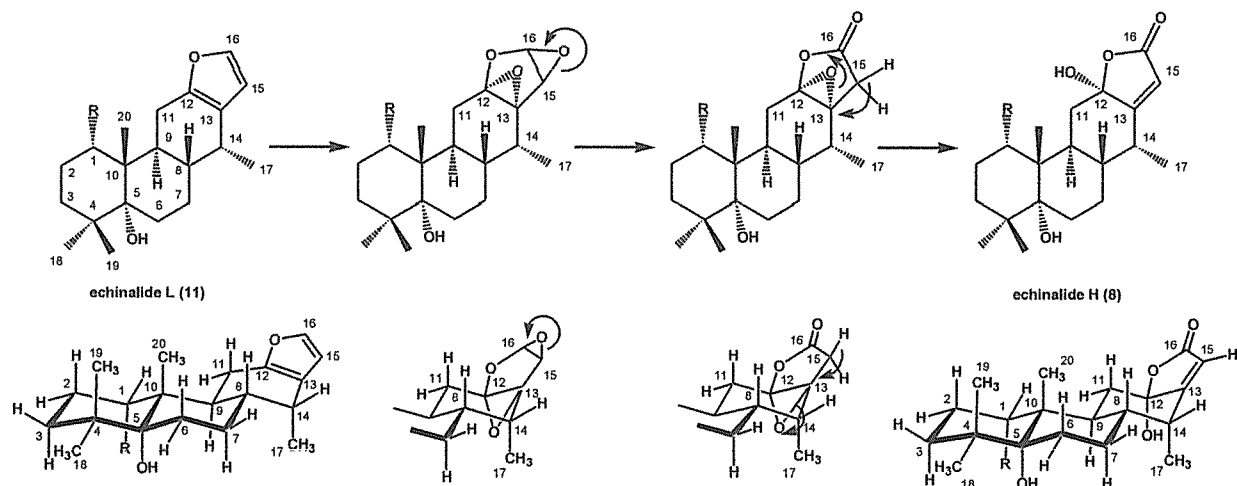


図 2-13 echinalide L (11) フラン環の酸化反応

(A) *m*CPBA によるフラン環のラクトン化反応, (B) 本反応における立体選択性

本化合物は溶液の状態为数日間室温に放置していると自動酸化を受け、構造が変化してしまう。よって、保管の際は遮光瓶に入れた後、窒素を充填して密封し、冷凍保管しなければならない (図 2-14)²⁷。

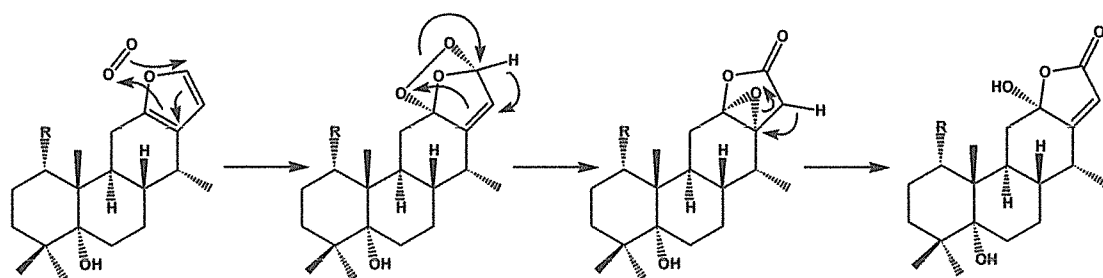


図 2-14 echinalide L (11) の自動酸化

echinalide M (12)

echinalide M (12)は、黄色オイルとして単離された。各種スペクトルデータが echinalide H (8)と類似しており、本化合物の分子式に関してはHR-FAB-MSによる解析からC₂₉H₃₆O₅ (*m/z* 465.2634, Calcd. for C₂₉H₃₇O₅; 465.2641, Δ = -0.7 mmu)であることから、echinalide H (8) の脱水体であることが示唆された。IR スペクトルからはヒドロキシ基 (3327 cm⁻¹) 及び α, β-不飽和 γ-ラクトン環 (1751 cm⁻¹) 由来の吸収が観測されており、UV スペクトルにおいて、280 nm に極大吸収が観測されていることを考慮すると、共役した二重結合を有するα, β-不飽和 γ-ラクトン環の存在が推測できる。本化合物のNMR スペクトルを echinalide H (8) と比較すると、echinalide H のアセタール

由来のシグナルが消失している代わりに、新たに三置換オレフィンの存在が明らかになった [δ_{H} 5.49 (br s) / δ_{C} 110.7 (d), 150.8 (s)]. 以上の結果から本化合物の平面構造を図 2-15 (A) に示すように推測し、各種二次元 NMR スペクトルによる解析から全ての水素と炭素について帰属することができた。さらに、相対立体配置については、NOESY スペクトルによる解析を行い、図 2-15 (B) に示すように決定した。

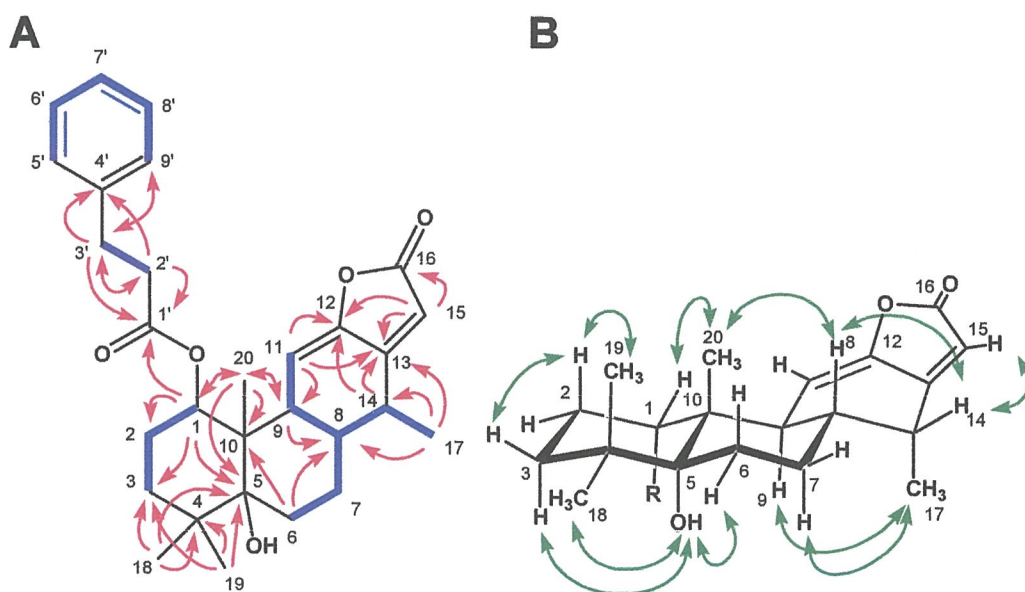


図 2-15 echinalide M (12) の各種二次元 NMR 相関図

(A) ^1H - ^1H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

また、本化合物の絶対立体配置を確認する目的で、echinalide H (8) を TEA 存在下、MsCl で処理し、本化合物への誘導を試みた (図 2-16)。その結果、echinalide H の 12 位ヒドロキシ基の脱水が進行し、得られた化合物は、比旋光度及びその他の各種スペクトルデータが本化合物と完全に一致した為、本化合物の化学構造を絶対立体配置も含めて決定した。

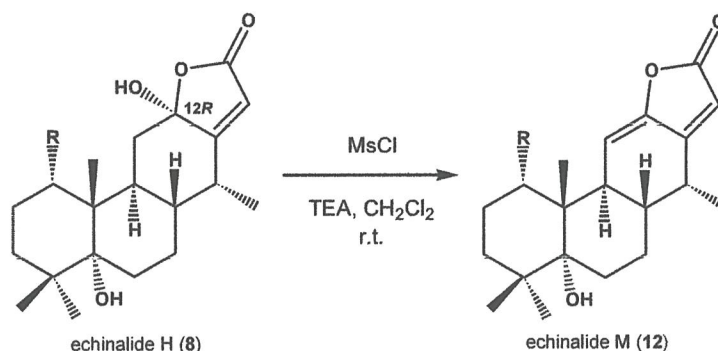


図 2-16 echinalide H (8) の脱水反応

echinalide O (13)

echinalide O (13) は、無色オイルとして単離された。HR-FAB-MS スペクトルから分子式 $C_{30}H_{42}O_6$ (m/z 499.3029 $[M+H]^+$, Calcd. for $C_{30}H_{43}O_6$; 499.3059, $\Delta -3.0$ mmu) と決定した。NMR スペクトルから、ジヒドロ桂皮酸の存在が推測されたことに加え、3本の三級メチル基、1本の二級メチル基が確認されており、これらのシグナルはジヒドロ桂皮酸エステルを有するケサン型ジテルペノイドに特徴的であった。しかし、これまでの echinalide 類に比べ、 1H -NMR スペクトルにおいて、二級メチル基が高磁場シフトして観測されており、新たにメトキシ基のシグナルも観測されていた。さらに、 ^{13}C -NMR スペクトルでは、ケトカルボニル由来のシグナルも観測されており、echinalide H の NMR スペクトルと比較すると、11-17位までのケミカルシフトが大きく異なっていた。そこで、本化合物の構造をより詳細に解析するために、各種二次元 NMR スペクトルによる解析を行った。その結果、1-10位のデカリン環とその1位に結合したジヒドロ桂皮酸、4位の gem-ジメチル基 (18位, 19位) 及び10位の三級メチル基 (20位) の存在は、echinalide H と同様であることが確認できた。一方、 1H - 1H COSY スペクトルから、ケトカルボニル基を隔てる 11-17位までのつながりが明らかとなり、HMBC スペクトルでは、H-17 (二級メチル基) から C-8, 13, 14 へ相関が確認され、H-11, 15 からは、C-12 (ケトカルボニル炭素) へ相関が見られた。さらに、C-16 (カルボニルエステル炭素) には H-15, 21 (メトキシ基) から相関が見られていることから、本化合物は echinalide H のラクトン環が開環した図 2-17 (A) のような平面構造をもつことが明らかとなった。本化合物の相対立体配置については、NOESY スペクトルから検討した [図 2-17 (B)]。H-13 / H-11 $_{\beta}$, 8 と相関が確認され、H-17 (二級メチル基) / H-15 との相関が確認できた。以上のことから、13位メチンプロトンは β -アキシャルに配向していることが明らかとなった。さらに詳細な NOESY スペクトルの解析から、その他の不斉点における立体化学に関しては、echinalide H (8) と同様であることが明らかとなった。

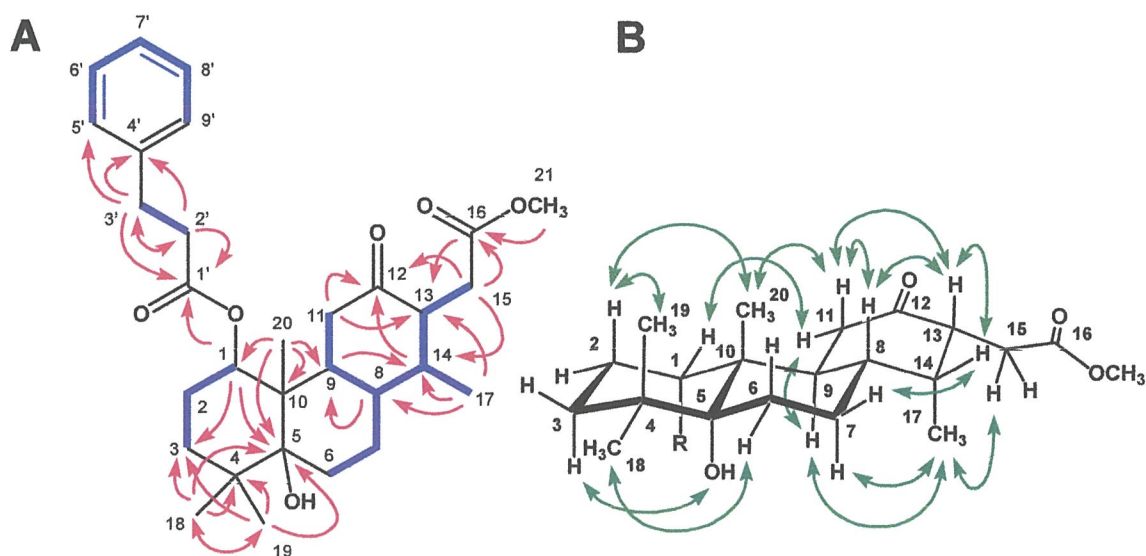


図 2-17 echinalide O (13) の各種二次元 NMR 相関図

(A) 1H - 1H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

echinalide P (14)

echinalide P (14) は、無色オイルとして単離された。本化合物の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、echinalide O と非常に類似しており、echinalide O (13) との相違点はメトキシ基のシグナルが消失していることである。また、HR-FAB-MS スペクトルにおいても、その分子式を $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_6$ (m/z 485.2923 $[\text{M}+\text{H}]^+$, Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{O}_6$; 485.2903, $\Delta +2.0$ mmu) であると決定することができた。したがって、本化合物は、echinalide O (13) の 16 位メチルエステルがカルボン酸に置き換わった構造であることが推測された。そこで、各種二次元 NMR スペクトルによる詳細な解析の結果、本化合物の化学構造を相対立体配置も含めて図 2-18 に示すように決定できた。

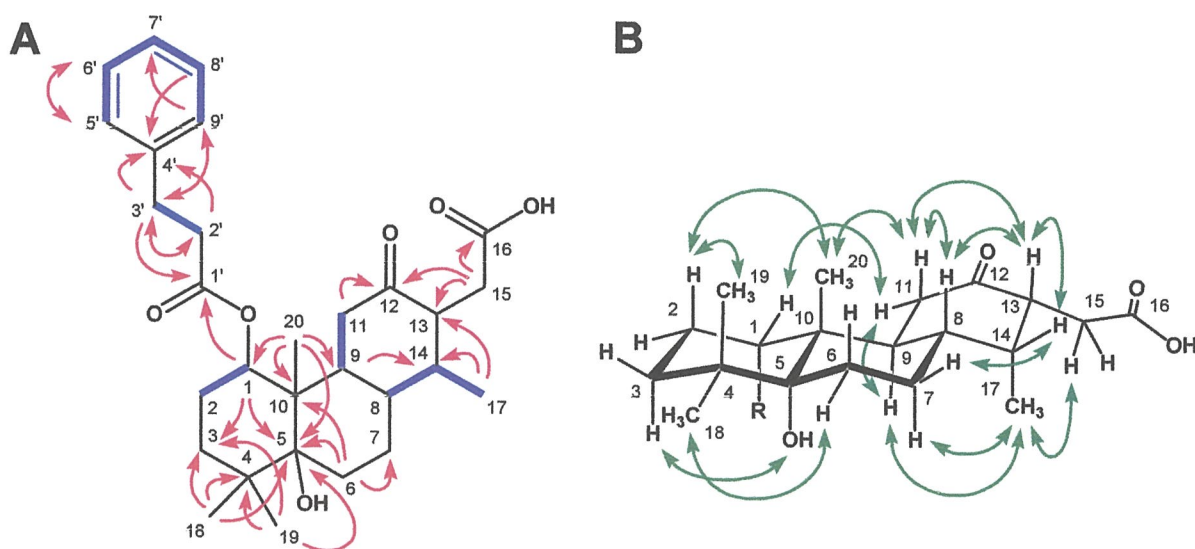


図 2-18 echinalide P (14) の各種二次元 NMR 相関図

(A) $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows), (B) NOESY (green arrows)

本化合物は、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (in CDCl_3 , 100 MHz) において、12 位 及び 16 位のシグナルが観測されていないことに加えて、15 位のシグナルはブロード化し、シグナル強度が著しく低下していた。測定溶媒を $\text{methanol-}d_4$ に変更した場合、12 位ケトカルボニル炭素 (δ_{H} 214.0) が明確に確認され、 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ で測定した場合は、12 位ケトカルボニル炭素が消失し、アセタールカーボン由来と思われるシグナル (δ_{H} 102.5) が、新たに観測されていた [図 2-19 (A)]. このことから本化合物は、溶液中で互変異性体と平衡状態にあることが推測された [図 2-19 (B)].

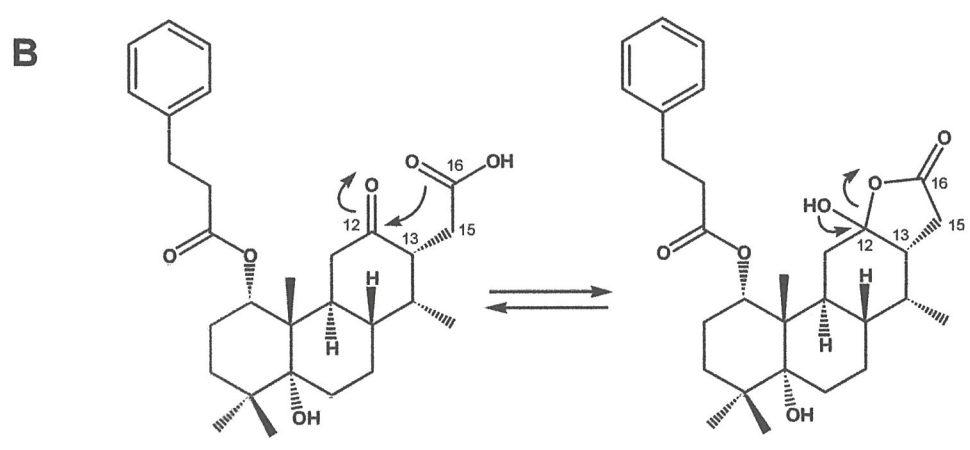
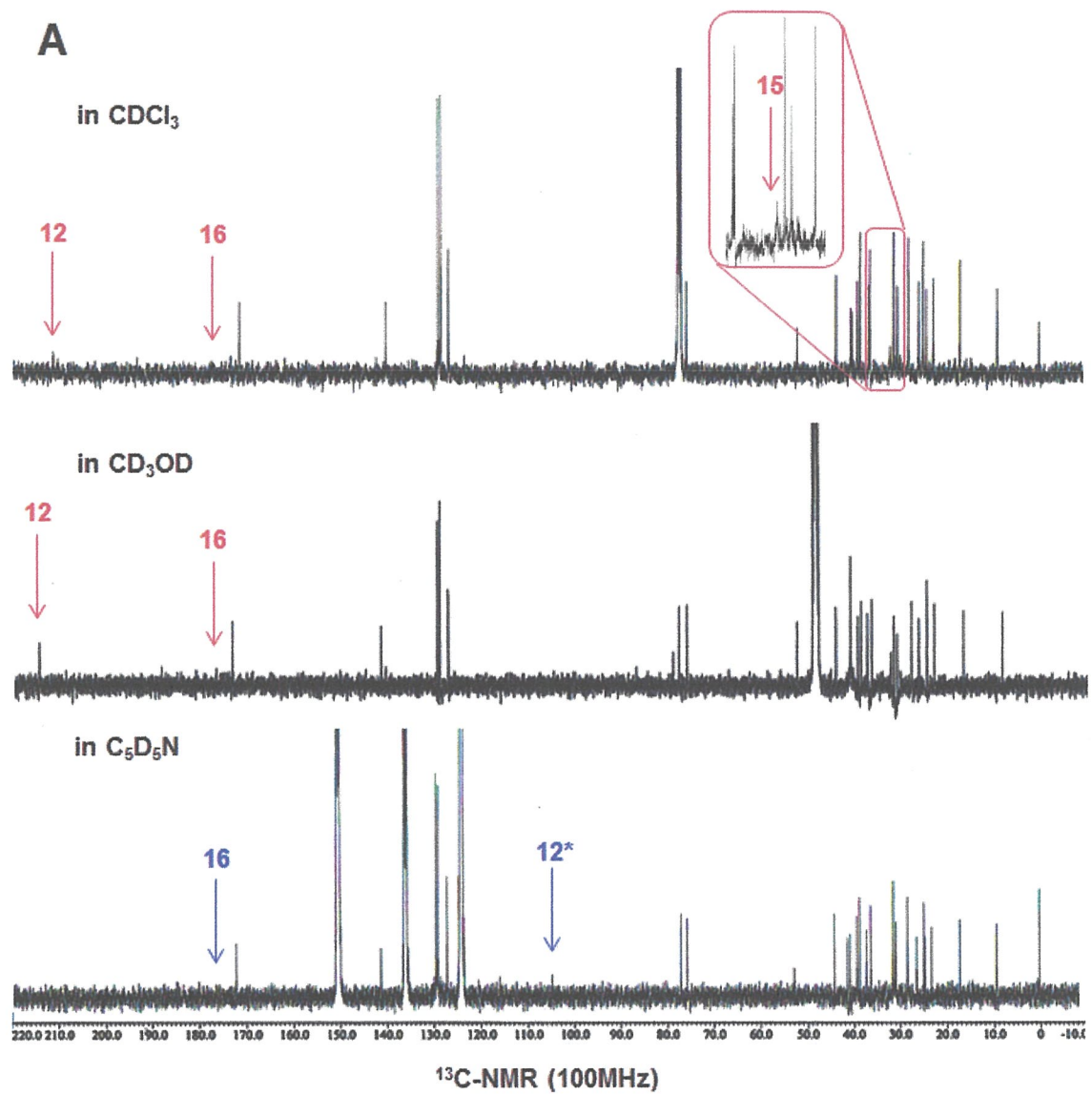


図 2-19 (A) echinalide P (14) の ¹³C-NMR スペクトル, (B) echinalide P の互変異性化

この考察に基づき、絶対立体配置が決定している echinalide H (8) の13位, 15位間の二重結合を還元することで、得られる化合物は、速やかに互変異性を起こし本化合物へ誘導できると考えた (図 2-20). 実際, echinalide H (8) を接触還元させることで得られた二つの化合物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.0 \text{ cm} \times 14.0 \text{ cm}$, chloroform - methanol = 20 : 1) によって分離し、得られた化合物 Hb は, echinalide P (14) と比旋光度を含め各種スペクトルデータが完全に一致した. さらに, 化合物 Hb をメチル化することで得られる化合物 Hd は, 全てのスペクトルデータが echinalide O (9) と良好な一致を示したことから, echinalide P (14) 及び O (13) の絶対立体配置を図 2-6 に示すように決定できた.

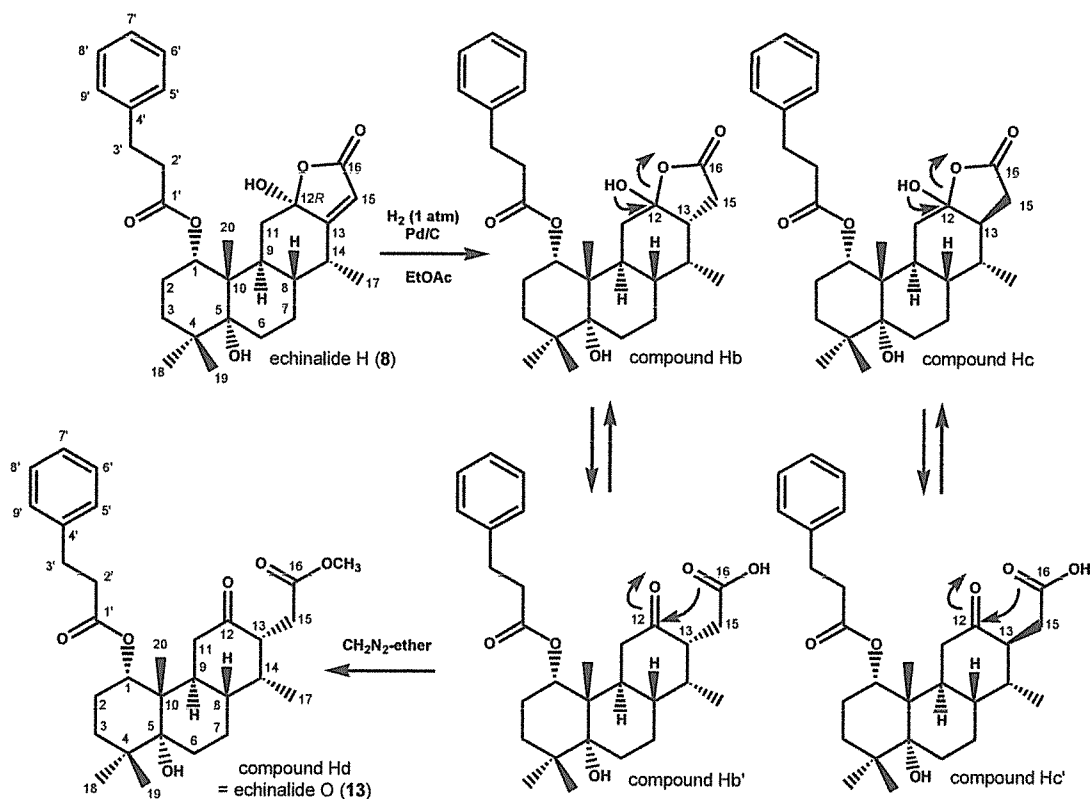


図 2-20 echinalide H (8) の誘導体化反応

echinalide T (15)

echinalide T (15) は無色 - 淡黄色固形物として単離された. TLC において, 展開溶媒に benzene - acetone = 15:1 を用いた場合, R_f 値は 0.24 であった. UV (短波長) 吸収を示し, バニリン-硫酸呈色試薬に対しては, 加熱することで, 紫色のスポットとして確認された. 本化合物の分子式は HR-FAB-MS スペクトルから $C_{29}H_{38}O_6$ (m/z 483.2765 $[M+H]^+$, Calcd. For $C_{29}H_{39}O_6$; 483.2746, $\Delta +1.8\text{mmu}$) であると決定し, 不飽和度は 11 と算出した. ¹H-NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃) においては, cassane 型ジテルペノイドに特徴的な 1 本の二級メチル基 [δ_H 0.97 (3H, d, $J=6.0\text{Hz}$)], 3 本三級メチル基 [δ_H 0.98 (3H, s), 1.04 (3H, s), 1.15 (3H, s)], エステルの付け根に特徴的な大きく低磁場シフトしたオキシメチンシグナル [δ_H 4.81 (1H, br s)], ジヒドロ桂皮酸由来のシグナル [δ_H

7.21 - 7.31 (overlapped)] の他, 互いにカップリングした 1 組のオレフィンプロトンシグナル[δ_{H} 5.52 (1H, d, $J=3.6$ Hz), 6.77 (1H, d, $J=4.0$ Hz)] 及び ABX 型にカップリングしたオキシメチンプロトン[δ_{H} 4.08 (1H, dd, $J=8.8, 4.4$ Hz)] が観測されていた. さらに, D_2O を極微量加えた $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3) では, δ_{H} 1.83 (1H, d, $J=4.8$ Hz; 11-OH), 3.14 (1H, d, $J=2.8$ Hz; 5-OH) に観測されていたピークが消失したことから, これらはヒドロキシ基由来のピークであることが明らかとなった. また, これらのピークの消失に伴い, δ_{H} 4.08 のオキシメチンプロトンの分裂パターンが変化しことから, このオキシメチンプロトンは, 二級ヒドロキシ基の付け根に結合していることも明らかとなった (図 2-21).

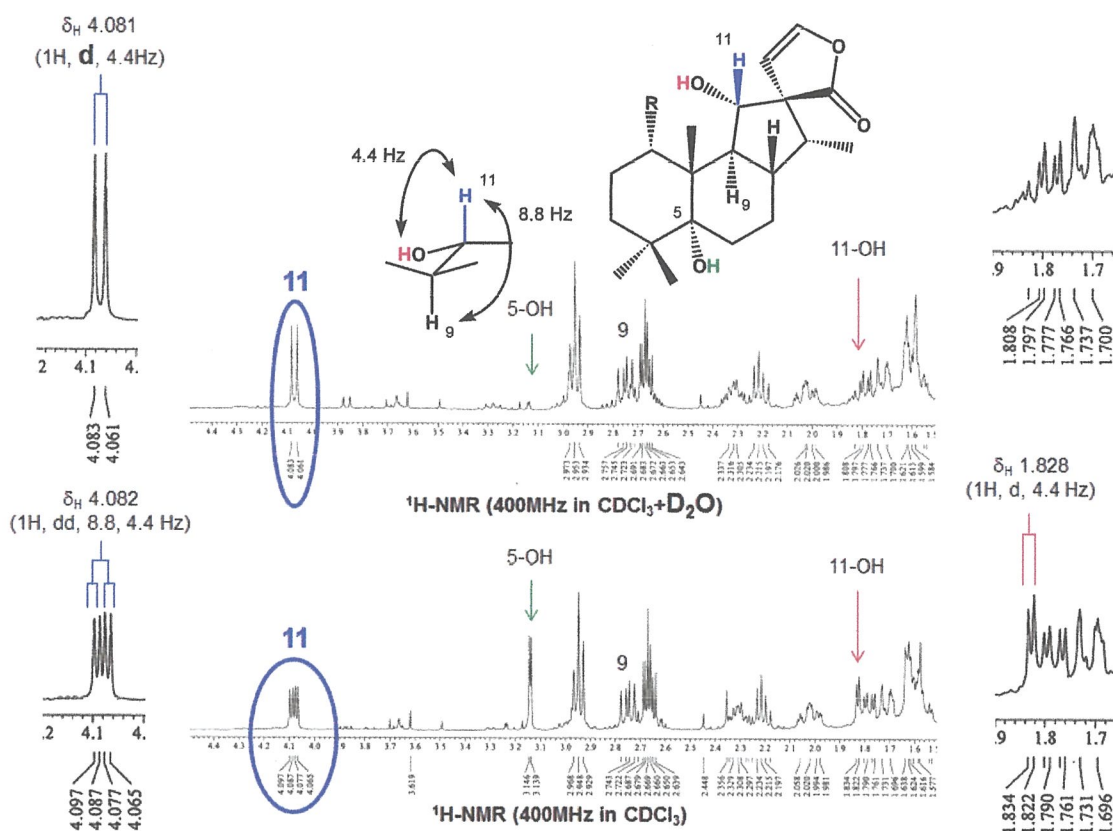


図 2-21 echinalide T (15)におけるヒドロキシ基の確認

$^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル(100 MHz in CDCl_3) においては, cassane 型ジテルペノイドに特徴的なシグナル及びジヒドロ桂皮酸に帰属できるシグナル [δ_{C} 30.8 (d), 36.1 (d), 126.3 (d), 128.2 (2C, d), 128.5 (2C, d), 140.3 (s), 171.6 (s)] を含む計 27 本のシグナルが確認されていた. これまでの化合物との大きな相違点は, δ_{C} 60.5 (s) に四級炭素が確認された点である. 本化合物は, 1 組のオレフィン, ラクトン環及びジヒドロ桂皮酸エステルを有しており, 不飽和度が 11 であることを考慮すると 4 環性であることが明らかになる. さらに, 本化合物の構造を詳細に解析するために, 各種二次元 NMR スペクトルによる解析を行った. まず $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$ スペクトルからは, 1 位から 3 位及び 6 位から 9 位に相関が観測されており, これらの繋がりが明らかとなった. また, HMBC スペクトルにおいて, H-20 (三級メチル基) から C-1, 5, 9, 10 へ, H-18, 19 (三級メチル基) からは C-3,

4, 5 へ相関が観測されており, H-1 (オキシメチンプロトン) からは C- 3, 5, 1' (カルボニルエステル炭素) へ相関が確認された. 以上のことから 1 位にジヒドロ桂皮酸を有するデカリン環部分の構造が明らかとなった. さらに, ^1H - ^1H COSY スペクトルでは, 9 位と 11 位及び 8 位-14 位-17 位の繋がりが明らかとなり, H-17 (二級メチル基) からは, C-8, 13, 14 へ相関が確認された. H-14 からは, C-9, 12, 13, 11 へ相関が確認されたことから, 5 員環の存在が明らかとなった. さらに詳細な解析から, 互いにカップリングした H-15 及び H-16 位 (オレフィンプロトン)からは, C-12, 13 へ相関が確認された. 以上の結果を考慮すると, 本化合物は δ_{C} 60.5 (s) をスピロセンターとする γ -スピロラクトン環を有することが推測でき, 本化合物の平面構造を図 2-22 に示すように決定した.

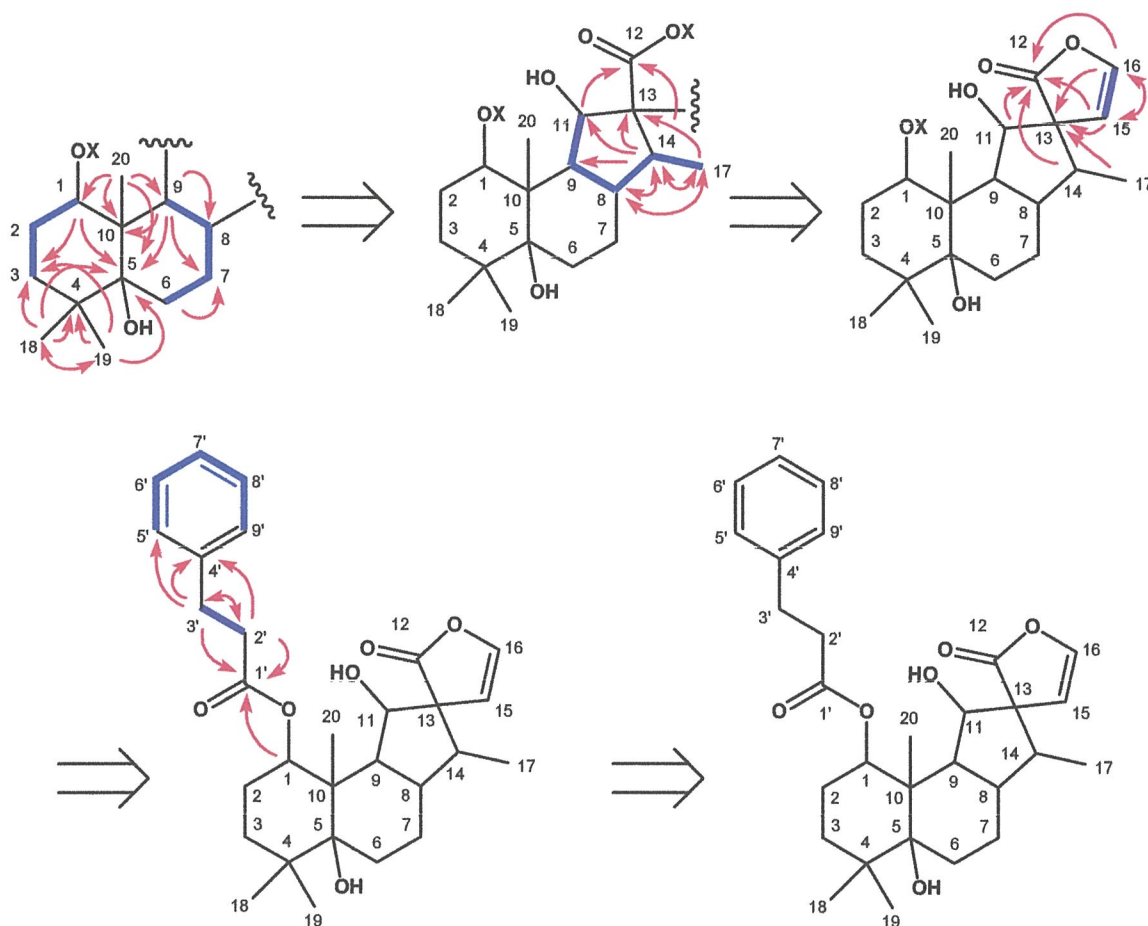


図 2-22 echinalide T (15) の平面構造解析 ^1H - ^1H COSY (blue lines) 及び HMBC (red arrows)

また、本化合物は極細い針状の結晶を形成したので、X線結晶構造解析を行った(図2-23, CCDC deposit No. 1017120)。その結果、本化合物の化学構造を相対立体配置も含めて図2-6に示すように決定できた。絶対立体配置については、X線結晶構造解析からは、決定できなかったが、echinalide Hと同一植物から発見されたことを考慮すると、本化合物もechinalide H(8)と同様の絶対立体配置を有するものと推測している。

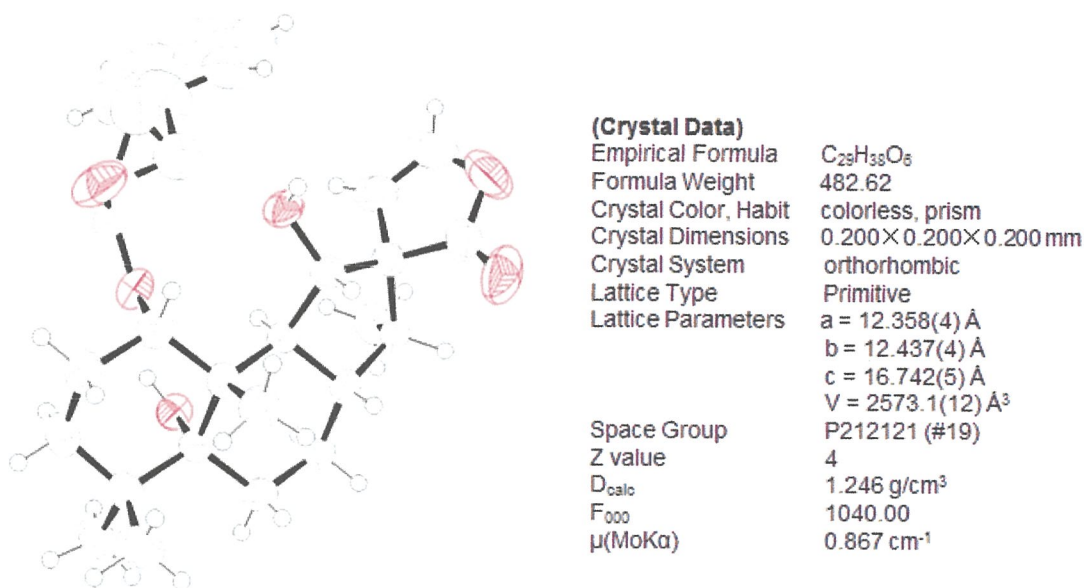


図 2-23 echinalide T (15) の ORTEP 図

X線結晶構造解析の結果では、ジヒドロ桂皮酸部分に disorder が観測されており、これはジヒドロ桂皮酸エステルの3'-9'位が2通りの立体配座の重なりとして解析されたことに起因するものである。

eremophilane 型セスキテルペノイドやラブダン型ジテルペノイドなどのフラン環、ラクトン環を形成しやすい骨格を有するテルペノイド類からγ-スピロラクトン環が生じる例は珍しくないが、cassane 型ジテルペノイド類由来のスピロ化合物の報告は、これまで spirocaesalmin^{8,28}, caesalminaxin C 及び D²⁹ の3例のみであった。一方、本研究に関する先行研究では、2012年度に、cassane 型ジテルペノイドから生成したと予想される γ-スピロラクトン環を有する新たな化合物が石原によって単離・構造決定されているが³⁰、天然よりβ,γ-不飽和 γ-ラクトン環を有する cassane 型ジテルペノイドが単離された例は初めてである。²⁵

第2項 考察

これら echinalide 類は、そのユニークで多様な構造から、生合成の観点から興味を持たれた。そこで、これらの生合成経路について以下のように考察した (図 2-24)。

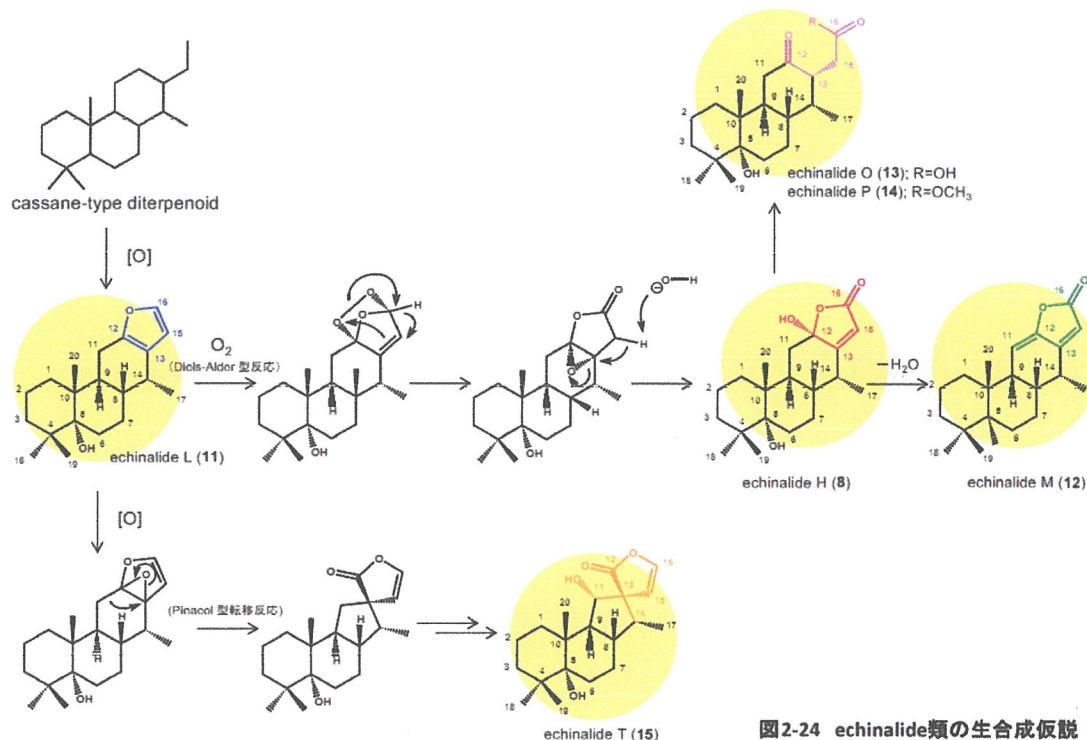


図2-24 echinalide類の生合成仮説

cassane 型ジテルペノイドが酸化を受け、まずフラン環が形成され、echinalide L (11) が生成する。このフラン環が Diels-Alder 型の酸化を受け、オゾニド中間体が生成され、図に示した矢印のように電子移動が起き、ラクトン環が形成され、echinalide H (8) が生じたと推測できる³¹。また、このラクトン環が開環することで、echinalide O (13) や P (14) が生成されたと考えられる。一方、echinalide H (8) の12位ヒドロキシ基が脱水することにより、echinalide M (12) が生じたと予想できる。さらにスピロ化合物である echinalide T (15) に関しては、echinalide L (11) から図のように酸化された後、pinacol 型の転位を経て、 γ -スピロラクトン環を形成したと推測している²⁵。なお、echinalide L (11) の酸化については、echinalide L (11) の構造解析でも触れたように空気中でも容易に反応が進行する。このことから、echinalide H (8) の生合成は非酵素的に進行している可能性も考えられる。一方、これまでも *Caesalpinia* 属の植物に関する成分研究において、ラクトン環を有する cassane 型ジテルペノイドの単離報告も数多くある。したがって、echinalide H (8) を始めとするラクトン環は、抽出・精製の過程で生じた「アーティファクト」である可能性も否定できないが、この酸化反応は植物体内でもすでに進行している可能性が高いと考えている。

第3項 結論

今回, *Caesalpinia echinata* Lam. の幹部アセトン抽出物より図に示すように 8 種の新規ケサン型ジテルペノイドの単離・構造決定に成功した. また, echinalide H (8), I (9), J (10) に関しては, CD スペクトルによる検討より, その絶対立体配置も含めて決定できた. また, echinalide L (11), M (15), O (13), P (14) に関しては, 化学変換によって echinalide H (8) と関連付けることで, その絶対立体配置を決定した (図 2-25).

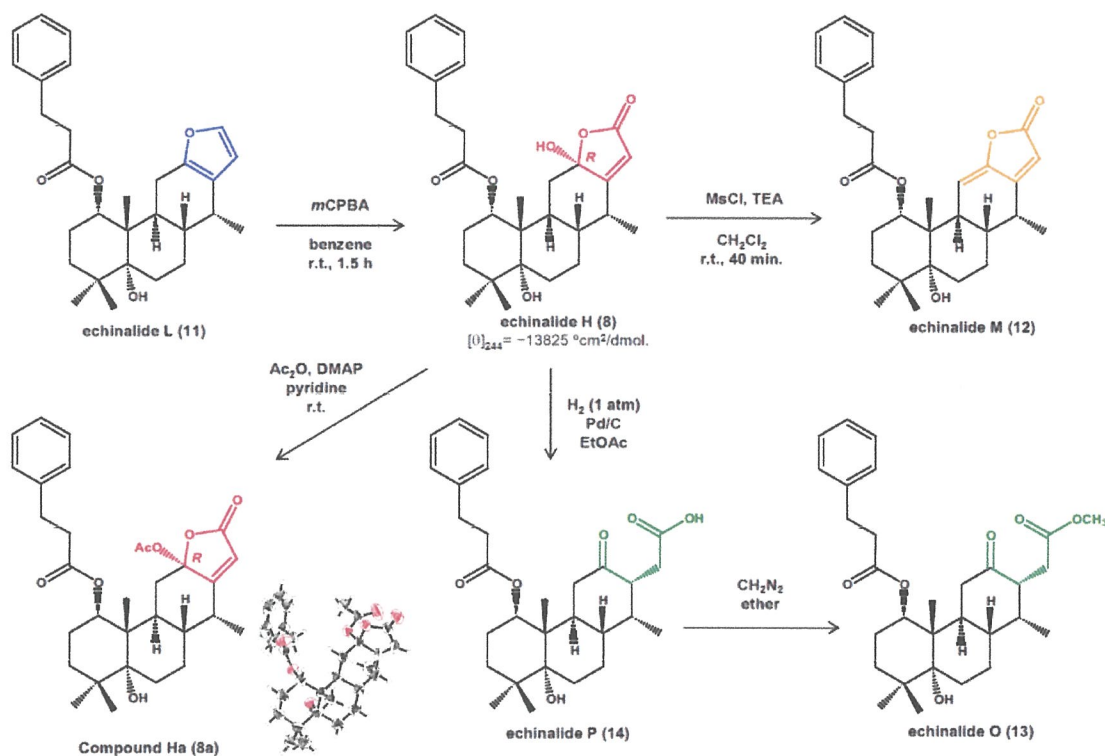


図 2-25 echinalide 類の誘導体化反応

これらのうち echinalide T に関しては, cassane 型ジテルペノイドから生じたと考えられる γ -スピロラクトン環を有しており, 非常に珍しい. 今回, 単離された cassane 型ジテルペノイドに関しては, 非常に限定的な植物種にのみ分布しており, マメ科 (Fabaceae), 特に *Caesalpinia* 属の植物から成分報告が多い¹². なお, *Caesalpinia* 属及び *Pterodon* 属の植物には, vouacapane 骨格と呼ばれるフラン環を有する cassane 型ジテルペノイド類が多く含まれていることが報告されており, 特に 5 位の酸化されたものは *Caesalpinia* 属の植物に含まれることが知られている²⁴.

最後に, 今回単離された echinalide 類のスペクトルデータを表 2-1 及び 2-2 にまとめて示す.

¹H-NMR ケミカルシフト表表 2-1 echinalide H (8) - T (15) の ¹H-NMR (400 MHz in CDCl₃)

	H (8)	I (9)	J (10)	L (11)	M (12)	O (13)	P (14)	T (15)
1	α 4.89 (br s)	4.90 (br s)	4.90 (br s)	4.85 (br s)	5.09 (br s)	4.68 (br s)	4.67 (br s)	4.81 (br s)
	β 1.60 (m)	1.67 (m)	1.67 (m)	1.62 (m)	1.65 (m)	1.63 (m)	1.61 (m)	1.63 (m)
2	β 1.92 (m)	1.91 (td, 12.8, 5.2)	1.92 (t like, 14.0)	1.90 (m)	2.03 (m)	1.90 (m)	1.89 (dd, 13.2, 4.4)	2.02 (m)
	α 1.00 (m)	1.07 (m)	1.06 (m)	1.03 (m)	1.06 (m)	0.98 (m)	1.01 (m)	1.02 (m)
3	β 1.51 (br t, 14.0)	1.56 (m)	1.58 (m)	1.54 (m)	1.59 (m)	1.47 (td, 14.8, 4.0)	1.46 (t-like, 14.0)	1.58 (m)
4								
5								
5-OH	2.94 (m)	2.87 (1H, d, 2.4)	2.93 (d, 2.8)	2.95 (m)	2.90 (d, 2.8)	2.82 (br s)		3.14 (d, 2.8)
6	α 1.68 (m)	1.65 (m)	1.62 (m)	1.67 (m)	1.72 (m)	1.62 (m)	1.69 (m)	1.60 (m)
	β		1.71 (m)					1.71 (m)
7	α 1.97 (m)	1.94 (m)	2.00 (td, 12.8, 4.8)	1.95 (m)	1.94 (m)	1.87 (m)	1.86 (m)	1.77 (m)
	β 1.27 (m)	1.29 (m)	1.28 (m)	1.37 (m)	1.29 (br d, 8.8)	1.38 (m)	1.38 (br d, 10.0)	1.45 (m)
8	1.63 (m)	1.60 (m)	1.63 (m)	1.80 (m)	1.88 (m)	2.12 (m)	2.01 (m)	2.31 (m)
9	2.67 (m)	2.28 (1H, td, 12.4, 2.4)	2.67 (m)	2.56 (m)	3.06 (br d, 8.8)	2.65 (m)	2.71 (m)	2.75 (dd, 13.2, 8.8)
10								
11	α 2.01 (br d, 9.6)	1.98 (m)	2.06 (dd, 13.6, 3.6)	2.10 (dd, 16.4, 6.8)	5.49 (br s)	1.92 (m)	1.93 (m)	4.08
	β 1.29 (m)	0.89 (br q, 12.0)	1.26 (m)	2.32 (m)		2.16 (m)	2.13 (m)	(dd, 8.8, 4.4)
11-OH								1.79 (d, 4.4)
12		4.38 (dd, 11.6, 6.4)						
13						3.05 (br m)	3.00 (br m)	
14	2.92 (m)	2.90 (m)	2.94 (m)	2.60 (m)	2.83 (m)	2.07 (m)	2.10 (m)	2.22 (m)
15	5.66 (s)	5.61 (br s)	5.81 (s)	6.19 (d, 2.0)	5.74 (br s)	2.13 (m)	2.16 (m)	5.52 (d, 3.6)
16				7.23 (d, 2.0)		2.81 (m)	2.83 (br m)	6.77 (d, 4.0)
17	1.22 (d, 7.6)	1.04 (d, 6.8)	1.17 (d, 7.2)	1.02 (d, 6.8)	1.06 (d, 8.8)	0.71 (d, 6.8)	0.70 (d, 6.8)	0.97 (d, 6.0)
18	0.98 (s)	1.04 (s)	0.99 (s)	0.99 (s)	1.00 (s)	0.96 (s)	0.96 (s)	0.98 (s)
19	1.03 (s)	0.98 (s)	1.04 (s)	1.06 (s)	0.98 (s)	1.05 (s)	1.05 (s)	1.04 (s)
20	0.98 (s)	0.98 (s)	0.99 (s)	1.06 (s)	1.03 (s)	1.13 (s)	1.12 (s)	1.15 (s)
21			3.10 (s)			3.66 (s)		
1'								
2'	2.78 (m)	2.74 (m)	2.73 (m)	2.69 (m)	2.69 (m)	2.69 (m)	2.66 (m)	2.67 (m)
3'	3.01 (m)	3.00 (m)	3.02 (t, 8.4)	2.97 (m)	2.96 (m)	2.96 (t, 8.0)	2.96 (t, 7.6)	2.95 (t, 8.0)
4'								
5' (9')	7.22 (m)	7.22 (br d, 7.2)	7.23 (m)	7.17 (m)	7.17 (d, 7.2)	7.21 (m)	7.20 (m)	7.21 (m)
6' (8')	7.30 (m)	7.31 (t, 7.2)	7.31 (m)	7.21 (m)	7.26 (t, 7.2)	7.30 (m)	7.29 (m)	7.31 (m)
7'	7.20 (m)	7.20 (t, 7.2)	7.22 (m)	7.11 (m)	7.14 (t, 7.2)	7.20 (m)	7.22 (m)	7.22 (m)

¹³C-NMR ケミカルシフト表

表 2-2 echinalide H (8) - T (15) の ¹³C-NMR (400 MHz in CDCl₃)

	H (8)	I (9)	J (10)	L (11)	M (12)	O (13)	P (14)	T (15)
1	75.6	75.5	75.3	76.1	74.1	75.5	75.5	76.7
2	22.7	22.7	22.7	22.5	22.7	22.5	22.5	22.8
3	30.3	30.3	30.4	30.6	30.3	30.3	30.3	30.6
4	38.3	38.3	38.3	38.4	38.4	38.3	38.3	38.3
5	77.2	77.2	77.2	77.2	77.2	77.2	77.2	78.0
6	25.5	25.7	25.5	25.7	25.8	25.7	25.7	26.3
7	23.5	23.5	23.4	24.1	23.7	24.1	24.1	22.1
8	39.6	38.9	39.9	34.5	37.6	40.0	38.8	36.8
9	31.9	31.8	31.7	32.3	36.1	36.3	36.3	48.0
10	43.4	43.9	43.4	43.6	43.6	43.5	43.5	43.2
11	37.9	33.6	37.5	21.9	110.7	40.3	40.2	77.3
12	105.8	78.8	108.0	148.7	150.8	210.6	210.9	182.9
13	173.3	176.7	171.3	122.8	161.4	51.9	51.8	60.5
14	36.7	36.4	37.0	31.4	33.5	38.9	40.0	43.8
15	113.1	110.5	115.7	109.6	110.1	31.6	31.8	110.5
16	171.2	173.5	170.0	140.4	170.1	173.2	177.5 ^a	141.7
17	12.6	14.0	11.7	17.4	14.5	8.9	8.9	13.1
18	28.1	24.9	28.1	28.1	24.1	27.9	27.9	28.1
19	24.9	28.0	24.8	25.1	27.4	24.7	24.8	24.4
20	16.9	16.9	16.8	17.4	19.3	16.9	16.9	18.0
21			50.8			51.7		
1'	171.6	170.7	171.0	171.1	170.9	171.0	171.1	171.6
2'	36.0	36.0	36.1	36.1	36.1	36.2	36.1	36.1
3'	30.8	30.8	30.9	30.9	30.9	31.1	31.0	30.8
4'	140.0	139.7	140.2	139.6	139.6	139.8	139.8	140.3
5' (9')	128.2	128.1	128.1	128.0	128.1	128.1	128.1	128.2
6' (8')	128.6	128.8	128.7	128.6	128.6	128.7	128.6	128.5
7'	126.4	126.6	126.4	126.4	126.5	126.5	126.5	126.3

a) Based on HMBC.

第3節 実験の部

測定機器

本研究に使用した各種測定機器は、第1章に示したものと同様である。また、echinalide Hのアセチル化体 (化合物 Ha) 及び echinalide T (15) の X線結晶構造解析に使用した機器は以下の通りである。

X線結晶構造解析

リガク 分解能可変X線集光ミラー&CCD X線構造解析装置 VariMax with Saturnを用いて測定した。データ処理ソフトにはCrystal Clearを、構造解析ソフトはCrustal Structureをそれぞれ使用した。

一般操作

成分の単離に使用した充填剤等は、第1章で示したものと同様である。また、フラン誘導体の検出に使用した。Ehrlich 呈色試薬については、*p*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) (0.15 g) を ethanol (9 mL) に溶かし、HCl conc (6 mL) を加えることで調製した。噴霧器を使用しTLC板に吹き付けることで、スポットを検出できる (ヒートガンなどで加熱はしない)。

実験項

成分の抽出・粗精製

研究サンプルは、2005年5月ブラジル国アマゾン地方にて、採取され、サンパウロ植物研究会の橋本 梧郎 博士に判定していただき、*Caesalpinia echinata* Lam. と同定された (No. OUS-1106)。本植物の幹部 (3.8 kg) を1 cm 四方に破碎した後、acetone に約2ヶ月浸漬し遮光条件下で成分の抽出を行った。抽出液をブフナーロートで吸引濾過し、ロータリーエバポレーターを用いて減圧濃縮した。さらに同様の作業を2回繰り返す、合計6ヶ月間の抽出作業で、粗抽出物60 gを得た。ガラスカラムに chloroform で懸濁させた MERCK Silica gel 60 for column chromatography (70-230 mesh) Lot No. TA1367885を約100cm充填し、粗抽出物をシリカゲルに吸着させ、シリカゲルを充填したカラムで精製を行った。chloroform - methanol = 100 : 1 (3L), 50 : 1 (3L), 20 : 1 (3L), 10 : 1 (3L), 5 : 1 (3L), 2 : 1 (3L), 1 : 1 (3L), methanol (3L) の順に溶出液を流し、溶出画分を大きく8つのフラクション (Fr.1 - Fr.8) に取り分け、減圧濃縮を行った。

echinalide 類の単離・精製

先のカラムクロマトグラフィー操作によって得られたフラクションについて、順相及び逆相 TLC プレートでモニタリングを行った。Fr.1 に関して、順相 TLC (*n*-hexane - EtOAc = 20 : 1)において、 R_f 値 0.3 付近に紫色のスポットが確認できた。また、低極性部位及び高極性部位にも赤-紫色のスポットが複数確認できた。そこで、これらの成分の単離を試みた。

Fr.1 (2.86 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 5.0 cm×60.0 cm, gradient mixture of *n*-hexane - EtOAc) により精製を行い、10のフラクションに分画した (Fr.1A- Fr.1J)。Fr.1E (125.4

mg) から, echinalide L (**11**) (125.4 mg) を得た. Fr.1J (1.28 g) は, シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 3.0\text{ cm} \times 35.0\text{ cm}$, benzene - methanol = 30 : 1) により精製し, 4つのフラクションに取り分けた (Fr.1J1 - Fr.1J4). さらに, Fr.1J3 (185.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 2.0\text{ cm} \times 21.0\text{ cm}$, benzene - EtOAc = 5 : 1) にて精製することで, echinalide H (**8**) (94.7 mg) を得た. Fr.1J2 (348.2 mg) は, シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 3.0\text{ cm} \times 29.0\text{ cm}$, *n*-hexane - EtOAc = 3 : 1) によって精製し, 7つのフラクションに分画した (Fr.1J2A - Fr.1J2G). さらに, Fr.1J2G (144.2 mg) を chloroform - EtOAc = 30 : 1 でシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 2.0\text{ cm} \times 21.0\text{ cm}$) で精製することで, echinalide I (**9**) (19.9 mg) を得た. また, Fr.1J2B (22.8 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.5\text{ cm} \times 21.0\text{ cm}$, benzene - EtOAc = 15 : 1) にて精製することで, echinalide M (**12**) (10.1 mg) を単離した. Fr.1J2C (21.8 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.5\text{ cm} \times 21.0\text{ cm}$, benzene - methanol = 80 : 1) にて精製することで, echinalide J (**10**) (2.1 mg) 及び echinalide P (**14**) (2.9 mg) を得た. Fr.1J2E (27.0 mg) を, シリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.5\text{ cm} \times 21.0\text{ cm}$, benzene - acetone = 30 : 1) にて精製することで, echinalide T (10.9 mg) を得た.

echinalide H

echinalide H は, 淡黄色オイルとして単離された. chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり, methanol にはやや溶けづらい. TLC において, 展開溶媒 benzene - EtOAc = 5 : 1 を用いた場合, R_f 値は 0.22 であった. UV (短波長) 吸収を示し, バニリン-硫酸呈色試薬に対しては, 加熱することで紺色のスポットとして確認された.

pale yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +11^\circ$ ($c=0.61$, CHCl_3). IR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 3586, 3372, 2925, 2864, 2250, 1732, 1652, 1454, 1385, 1296, 1257, 1200, 1175, 1145, 995, 913. UV λ_{max} (EtOH) nm (log ϵ): 203(4.08), 276(3.17). $^1\text{H-NMR}$: Table 1. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. CD (EtOH): $[\theta]_{244} = -13825^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$. HR-FABMS: m/z 483.2737 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_6$; 483.2746).

echinalide I

echinalide I は, 黄色オイルとして単離された. chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり, methanol にはやや溶けづらい. TLC において, 展開溶媒に benzene - acetone = 15 : 1 を用いた場合, R_f 値は 0.25 であった. UV (短波長) 吸収を示し, バニリン-硫酸呈色試薬に対しては, 加熱することで, 紫色のスポットとして確認される.

colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +28^\circ$ ($c=1.06$, CHCl_3). IR ν_{max} (neat) cm^{-1} : 3582, 3401, 2929, 2856, 1744, 1643, 1452, 1379, 1294, 1141, 1075, 1037, 984. UV λ_{max} (EtOH) nm (log ϵ): 210(4.22), 292(3.27). $^1\text{H-NMR}$: Table 1. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. CD (EtOH): $[\theta]_{235} = -11361^\circ \text{cm}^2/\text{dmol}$. HR-FAB-MS: m/z 467.2788 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_5$; 467.2797).

echinalide J

echinalide J は白色オイルとして単離された. chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり,

methanol にはやや溶けづらい。TLC において、展開溶媒に chloroform - EtOAc = 100 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.24 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、薄紫色のスポットとして確認される。

colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +15^\circ$ ($c=0.15$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 3379, 1760, 1630, 1443, 1353, 1202, 1145, 913. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 202(4.46), 272(3.61). $^1\text{H-NMR}$: Table 1. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. CD (EtOH): $[\theta]_{231} = -39340$ $^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$. HR-FAB-MS: m/z 497.2903 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_6$; 497.2903).

echinalide L

echinalide L は、淡黄色オイルとして単離された。chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり、methanol にはやや溶けづらい。TLC において、展開溶媒に *n*-hexane - EtOAc = 20 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.24 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、濃い紫色のスポットとして確認される。また、TLC 上に Ehrlich 呈色試薬を塗布した場合、淡赤色に発色する。

pale yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +30^\circ$ ($c=0.88$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 3585, 2920, 2861, 1732, 1716, 1455, 1373, 1199, 1176, 1144, 970, 914. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 203(4.02), 276(3.44). $^1\text{H-NMR}$: Table 1. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. HR-FAB-MS: m/z 451.2869 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_4$; 451.2848).

echinalide M

echinalide M は、黄色オイルとして単離された。chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり、methanol にはやや溶けづらい。TLC において、展開溶媒に benzene - EtOAc = 15 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.25 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、黄色のスポットとして確認される。

yellow oil. $[\alpha]_D^{20} = +93^\circ$ ($c=0.51$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 3579, 3327, 2925, 1776, 1751, 1607, 1451, 1389, 1203, 1143, 989. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 207(3.99), 280(4.06). $^1\text{H-NMR}$: Table 1. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. HR-FAB-MS: m/z 465.2634 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{O}_5$; 465.2641).

echinalide O

echinalide O は、無色オイルとして単離された。chloroform, acetone, methanol, pyridine など様々な有機溶媒に易溶である。TLC において、展開溶媒に chloroform を用いた場合、 R_f 値は 0.20 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、紫色のスポットとして確認される。

colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +36^\circ$ ($c=0.20$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 3223, 1733, 1710, 1450, 1356, 1195, 1140, 943. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 205(4.04), 273(3.47). $^1\text{H-NMR}$: Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. HR-FAB-MS: m/z 499.3029 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{O}_6$; 499.3059).

echinalide P

echinalide P は、黄色オイルとして単離された。chloroform, methanol, pyridine に易溶であり、TLC において、展開溶媒に chloroform - methanol = 20 : 1 を用いた場合、 R_f 値 0.33 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することでテーリングした紫色のスポットとして確認された。以下に echinalide P より得られた各種測定データをまとめて記す。

colorless oil. $[\alpha]_D^{20} = +6^\circ$ ($c=0.31$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 3566, 2925, 1704, 1202, 1174, 1145, 971. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 205(3.99), 275(3.43). $^1\text{H-NMR}$: Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. HR-FAB-MS: m/z 485.2923 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{O}_6$; 485.2903).

echinalide T

echinalide T は、無色針状結晶として単離された。chloroform, acetone, pyridine などには易溶であり、methanol にはやや溶けづらい。TLC において、展開溶媒に benzene - acetone = 15 : 1 を用いた場合、 R_f 値は 0.25 であった。UV (短波長) 吸収を示し、バニリン-硫酸呈色試薬に対しては、加熱することで、濃い紫色のスポットとして確認される。

colorless crystal. m.p. 179 - 183 $^\circ\text{C}$. $[\alpha]_D^{20} = +51^\circ$ ($c=0.52$, CHCl_3). IR ν_{\max} (neat) cm^{-1} : 2923, 2860, 1772, 1733, 1716, 1207, 1145. UV λ_{\max} (EtOH) nm (log ϵ): 205(4.04), 273(3.47). $^1\text{H-NMR}$: Table 2. $^{13}\text{C-NMR}$: Table 3. HR-FAB-MS: m/z 483.2765 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{O}_6$; 483.2746).

echinalide H のアセチル化

echinalide H (3.0 mg; 0.006 mmol) を pyridine 1.0 ml に溶かし、DMAP (1.1 mg; 1.5 eq) と大過剰の無水酢酸 (3 drops) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、1N HCl を加えて、溶液を酸性にし、EtOAc で抽出後、 Na_2SO_4 で脱水した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($\phi 1.0 \text{ cm} \times 12.0 \text{ cm}$, benzene - EtOAc = 10 : 1) により精製し、目的のモノアセテート体 (化合物 Ha) を 2.3 mg, 収率 70.6 % 無色板状結晶の化合物として得た。化合物 Ha の各種測定データを以下に示す。

化合物 Ha; colorless crystal. m.p. 219 - 218 $^\circ$, $[\alpha]_D^{20} = +32^\circ$ ($c=0.08$, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, CHCl_3): δ_{H} 0.97 (3H, s; H-18), 0.99 (3H, s; H-20), 1.00 (1H, m; H-3 $_{\beta}$), 1.03 (3H, s; H-19), 1.08 (3H, d, 7.2; H-17), 1.21 (1H, t, 13.2; H-11 $_{\beta}$), 1.32 (1H, br d, 12.8; H-7 $_{\beta}$), 1.44 (1H, td, 14.4, 4.0; H-3 $_{\alpha}$), 1.63 (1H, m; H-2), 1.64 (1H, m; H-6), 1.68 (1H, m, H-8), 1.70 (1H, m, H-6), 1.89 (3H, s; 12-OAc), 1.91 (1H, m; H-2), 1.95 (1H, m, H-7 $_{\alpha}$), 2.21 (1H, dd, 13.2, 3.2; H-11 $_{\alpha}$), 2.64 (1H, td, 12.4, 2.8; H-9), 2.74 (2H, t, 8.0; H-2'), 2.82 (1H, d, 2.8; 5-OH), 3.00 (1H, m; H-14), 3.04 (2H, t, 8.0; H-3'), 4.86 (1H, br s; H-1), 5.84 (1H, s; H-15), 7.22 (2H, m; H-5', 9'), 7.24 (1H, m; H-7'), 7.30 (1H, m; H-6', 8'). $^{13}\text{C-NMR}$ (100MHz, CHCl_3): δ_{C} 11.5 (C-17), 16.9 (C-20), 21.7 ($\text{CH}_3(\text{OAc})$), 22.6 (C-2), 23.5 (C-7), 24.8 (C-19), 25.5 (C-6), 28.0 (C-18), 30.2 (C-3), 30.9 (C-3'), 31.4 (C-9), 35.9 (C-2'), 36.5 (C-14), 37.8 (C-11), 38.3 (C-4), 39.6 (C-8), 43.4 (C-10), 75.3 (C-1), 77.2 (C-5), 105.0 (C-12), 115.3 (C-15), 126.7 (C-7'), 128.1 (C-5', 9'), 128.8 (C-6', 8'), 139.6 (C-4'), 168.3 ($\text{CO}(\text{OAc})$), 169.6 (C-16), 169.7 (C-13), 170.8 (C-1'). ; IR ν_{\max} (neat): 2975, 2921, 1770, 1635, 1455, 1363, 1164, 1130, 978, 910 cm^{-1} ; UV λ_{\max} (log ϵ) (in EtOH): 213nm (5.37), 274(3.91). ; CD (EtOH): $[\theta]_{247} = -24300 \text{ }^\circ\text{cm}^2/\text{dmol}$. ; HR-FAB-MS: m/z 525.2845 $[\text{M}+\text{H}]^+$

(Calcd. for $C_{31}H_{41}O_7$; 525.2852, Δ -0.7).

echinalide H の加水分解

echinalide H (10.0 mg, 0.021 mmol) に 2M KOH – methanol - $H_2O = 2 : 3 : 4$ の混合溶液を 0.5 mL 加え、10 mL 丸底フラスコで撹拌した。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、3M HCl を加えて、溶液を酸性にし、EtOAc で抽出後、 Na_2SO_4 で脱水した。溶媒を減圧除去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 14.0 cm, benzene - EtOAc = 1 : 1) にて精製し、無色オイル状の化合物 H' を 3.6 mg, 収率 50 % で得た。化合物 H' の各種測定データを以下に示す。

化合物 H'; colorless oil, UV λ_{max} (log ϵ) nm 213.8 (3.76). ; 1H -NMR (400MHz, $CHCl_3$): δ_H 0.93 (3H, s; H-20), 0.98 (3H, s; H-18), 1.06 (3H, s; H-19), 1.14 (1H, m; H-3 β), 1.25 (3H, d, $J=7.6$ Hz; H-17), 1.36 (1H, m; H-7), 1.39 (1H, m; H-11 β), 1.64 (2H, m; H-6), 1.67 (1H, m; H-8), 1.77 (1H, m; H-2 ω), 1.90 (1H, m; H-7), 1.96 (1H, m; H-3 ω), 1.99 (1H, m; H-2 β), 2.42 (1H, dd, $J=13.2, 2.4$ Hz; H-11 ω), 2.81 (1H, br t, $J=10.0$ Hz), 2.96 (1H, m; H-14), 3.16 (1H, br s; 5-OH), 3.81 (1H, br s; H-1), 5.67 (1H, m; H-15). ^{13}C -NMR (100MHz, $CHCl_3$): δ_C 12.9 (C-17), 16.7 (C-20), 23.7 (C-7), 25.1 (C-19), 25.3 (C-2), 26.2 (C-6), 28.0 (C-18), 30.2 (C-3), 31.8 (C-9), 36.7 (C-14), 37.7 (C-11), 38.5 (C-4), 39.6 (C-8), 43.3 (C-10), 72.7 (C-1), 79.0 (C-5), 105.6 (C-12), 113.3 (C-15), 170.8 (C-16), 172.6 (C-13). ; CD (EtOH) $[\theta]_{240} = -14407$ $^{\circ}cm^2/dmol$. ; FABMS m/z 351 $[M+H]^+$ (matrix ; glycerol), HR-FAB-MS m/z 351.2179 $[M+H]^+$, (Calcd. For $C_{20}H_{31}O_5$; 35102171, Δ +0.8 mmu (matrix; glycerol).

echinalide H の脱水反応

echinalide H (8.3 mg, 0.017 mmol) を 10 mL 丸底フラスコに入れ、 CH_2Cl_2 (400 μ L) に溶かし、0 $^{\circ}C$ で撹拌した。TEA (6 μ L; 2.5 eq), MsCl (3 μ L; 2.2eq) を加え、室温に戻し撹拌を続けた。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、反応液に飽和食塩水を加え、EtOAc で抽出した。得られた有機層を Na_2SO_4 で脱水し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 20.0 cm; benzene - EtOAc = 15 : 1) にて精製し、黄色オイル状の化合物を 2.9 mg, 収率 27 % で得た。

echinalide H の接触還元

echinalide H (20.0 mg, 0.041 mmol) を 10 mL 丸底フラスコに入れ、EtOAc (1 mL) に溶かし、Pd/C (20.2 mg) を加え、水素雰囲気下で撹拌した。反応進行を TLC (benzene - EtOAc = 2 : 1) にて追跡し、反応終了後、反応液をセライト濾過にかけ、母液を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 14.0 cm, chloroform - methanol = 20 : 1) で精製し、無色オイル状の化合物 echinalide P を 4.2 mg, 収率 21.1 % で得た。

echinalide L の加水分解

echinalide L (12.1 mg; 0.027 mmol) を 10 mL 丸底フラスコに量りとり、2M KOH – methanol - $H_2O = 2 : 3 : 4$ の混合溶液 0.5 mL を加え、室温で撹拌した。反応進行を TLC にて追跡し、反応終了後、3N HCl を加えて、溶液を酸性にし、EtOAc で抽出後、 Na_2SO_4 で脱水した。得られた反応液より、Ehrlich 呈色試薬にて赤く呈色したスポットをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.0 cm \times 17.0 cm, *n*-hexane - EtOAc = 8 : 1) により精製し、echinalide L' (1.6 mg, yield 18 %) で得た。本化合物の NMR スペクトルは、既知化合物である 1 β , 5 α -dihydroxyvoucapane⁹ のそれと一致した。

以下に、その各種測定データを示す。

yellow oil. HR-FAB-MS m/z 301.2151 $[M+H-H_2O]^+$, Δ 1.7 mmu (matrix; thio glycerol), IR ν_{\max} 1254, 1200, 1174, 1145 cm^{-1}

echinalide Lの酸化反応 (ラクトン化反応)

echinalide L (15.1 mg, 0.033 mmol) を10 mL丸底フラスコに入れ, benzene (700 μL) に溶かし, *m*-chloroperbenzoic acid (*m*CPBA) (16.6 mg, 3 eq) を加えて, 室温で1時間半攪拌した. 反応進行をTLCで追跡し, 反応終了後, 反応溶液に0.05 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液を加え反応を停止させ, NaHCO_3 溶液で溶液を中和し, EtOAcで抽出し, 有機層を飽和食塩水で洗浄した. 得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 1.5 cm \times 19.0 cm, benzene - EtOAc = 5 : 1) で精製し, 無色オイル状のラクトン化体Echinalide Hを2.1 mg, 収率12.1 %で得た. 得られた化合物の各種スペクトルデータは, echinalide Hと完全に一致した.

echinalide Pのメチル化

50 mL三角フラスコに, Et_2O に溶かしたechinalide P (6.0 mg, 0.012 mmol) を入れ, 溶液が黄色く呈色し退色しなくなるまで, CH_2N_2 -ether 溶液を加えた. 反応液を濃縮し, シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより(ϕ 1.0 cm \times 12.0 cm, chloroform) で精製し, 4.6 mg, 収率 75.0 % 無色オイルとしてechinalide Oを得た.

化合物 Ha の単結晶作成

化合物 Ha をマイクロチューブ内で chloroform (10 滴程度) に溶解させ過飽和状態を作り出した溶液に, methanol を1滴加えた. マイクロチューブは, 薬包紙を二重に重ねにし輪ゴムで固定した後, パラフィルムを巻きつけ蓋をした. このマイクロチューブを冷蔵庫で数日保管した結果, 良好な単結晶が析出した.

X-ray crystallography of compound Ha (1a)

$\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{O}_7$, $M=524.63$, orthorhombic, P212121, $a=10.392(2)$ Å, $b=13.153(3)$ Å, $c=20.465(5)$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=2797.3(10)$ Å³, $Z=4$, $D_{\text{calcd}}=1.246$ g/cm³, $\mu=0.869$ cm⁻¹, 21589 reflections measured, 6313 reflections independent ($R_{\text{int}}=0.0259$), $R=0.0488$, $wR2=0.1266$, goodness of fit=1.051, and $T=293\text{K}$. CCDC deposition No. 934527.

echinalide T の単結晶作成

echinalide T をマイクロチューブ内で chloroform (10 滴程度) に溶解させ過飽和状態を作り出した溶液に, methanol を1滴加えた. マイクロチューブは, 薬包紙を二重に重ねにし輪ゴムで固定した後, パラフィルムを巻きつけ蓋をした. このマイクロチューブを冷蔵庫で数日保管した結果, 極細い針状の結晶が析出した.

X-ray crystallography of echinalide T (13)

$\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{O}_6$, $M=482.62$, orthorhombic, P212121, $a=12.358(4)$ Å, $b=12.437(4)$ Å, $c=16.742(5)$ Å, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=2573.1(12)$ Å³, $Z=4$, $D_{\text{calcd}}=1.246$ g/cm³, $\mu=0.857$ cm⁻¹, 18570 reflections measured, 4978 reflections independent ($R_{\text{int}}=0.0714$), $R=0.0639$, $wR2=0.1570$, goodness of fit=1.057, and $T=293\text{K}$. CCDC deposition No. 1017120.

参考論文 (第 2 章)

1. Zanin, J. L. B.; de Carvalho, B. a.; Martineli, P. S.; dos Santos, M. H.; Lago, J. H. G.; Sartorelli, P.; Viegas, C.; Soares, M. G., *Molecules*, **2012**, *17* (7), 7887-902.
2. Nozaki, H.; Hayashi, K.-i.; Kido, M.; Kakumoto, K.; Ikeda, S.; Matsuura, N.; Tani, H.; Takaoka, D.; Iinuma, M.; Akao, Y., *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48* (47), 8290-8292.
3. Oh, S. R.; Kim, D. S.; Lee, I. S.; Jung, K. Y.; Lee, J. J.; Lee, H. K., *Planta Med.*, **1998**, *64* (5), 456-8.
4. Tobin, T.; Akera, T.; Brody, S. L.; Ku, D.; Brody, T. M., *Eur. J. Pharmacol.*, **1975**, *32* (02), 133-45.
5. De Munari, S.; Barassi, P.; Cerri, A.; Fedrizzi, G.; Gobbini, M.; Mabilia, M.; Melloni, P., *J. Med. Chem.*, **1998**, *41* (16), 3033-40.
6. Kalauni, S. K.; Awale, S.; Tezuka, Y.; Banskota, A. H.; Linn, T. Z.; Asih, P. B. S.; Syafruddin, D.; Kadota, S., *Biol. Pharm. Bull.*, **2006**, *29* (5), 1050-1052.
7. Ma, G.-X.; Yuan, J.-Q.; Cao, L.; Yang, J.-S.; Xu, X.-D., *Chem. Pharm. Bull.*, **2012**, *60* (6), 759-63.
8. Ma, G. X.; Xu, X. D.; Cao, L.; Yuan, J. Q.; Yang, J. S.; Ma, L. Y., *Planta Med.*, **2012**, *78* (12), 1363-9.
9. Ochieng, C. O.; Owuor, P. O.; Mang'uro, L. A.; Akala, H.; Ishola, I. O., *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 74-80.
10. Dickson, R. A.; Houghton, P. J.; Hylands, P. J., *Phytochemistry*, **2007**, *68* (10), 1436-41.
11. Encarnación-Dimayuga, R.; Agúndez-Espinoza, J.; García, A.; Delgado, G.; Molina-Salinas, G. M.; Said-Fernández, S., *Planta Med.*, **2006**, *72* (8), 757-61.
12. Maurya, R.; Ravi, M.; Singh, S.; Yadav, P. P., *Fitoterapia*, **2012**, *83* (2), 272-80.
13. da Silva Gomes, E. C.; Jimenez, G. C.; da Silva, L. C.; de Sa, F. B.; de Souza, K. P.; Paiva, G. S.; de Souza, I. A., *J. Cancer*, **2014**, *5* (2), 143-50.
14. *Caesalpinia echinata* Lam. の画像は以下のページから引用した。
Royal Botanic Gardens, Kew; <http://www.arkive.org/pau-brasil/caesalpinia-echinata/>
15. G., H.; S., N., In *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medical Plant*, Aboc-sha & Co., Ltd., **2002**, 645-646.
16. de Oliveira, L. F. C.; Edwards, H. G. M.; Velozo, E. S.; Nesbitt, M., *Vibrational Spectroscopy*, **2002**, *28* (2), 243-249.
17. Manhita, A.; Ferreira, T.; Candeias, A.; Dias, C. B., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *400* (5), 1501-14.
18. Ferreira, E. S.; Hulme, A. N.; McNab, H.; Quye, A., *Chem. Soc. Rev.*, **2004**, *33* (6), 329-36.
19. Gilbert, K.; Cooke, D., *Plant Growth Regulation*, **2001**, *34* (1), 57-69.
20. Matsunaga, M.; Sugiyama, M.; Minato, K.; Norimoto, M., *Holzforschung*, **1996**, *50*, 511.
21. Matsunaga, M.; Sakai, K.; Kamitakahara, H.; Minato, K.; Nakatsubo, F., *Journal of wood science*, **2000**, *46* (3), 253-257.
22. Cota, B. B.; de Oliveira, D. M.; de Siqueira, E. P.; Souza-Fagundes, E. M.; Pimenta, A. M. C.; Santos, D. M.; Rabello, A.; Zani, C. L., *Fitoterapia*, **2011**, *82* (7), 969-975.
23. Mitsui, T.; Ishihara, R.; Hayashi, K.-i.; Sunadome, M.; Matsuura, N.; Nozaki, H., *Chem. Pharm. Bull.*, **2014**, *62* (3), 267-73.
24. Jiang, R.-W.; Ma, S.-C.; He, Z.-D.; Huang, X.-S.; But, P. P.-H.; Wang, H.; Chan, S.-P.; Ooi, V. E.-C.;

- Xu, H.-X.; Mak, T. C. W., *Bioorg. Med. Chem.*, **2002**, *10* (7), 2161-2170.
25. Matsuno, Y.; Deguchi, J.; Hirasawa, Y.; Ohyama, K.; Toyoda, H.; Hirobe, C.; Ekasari, W.; Widyawaruyanti, A.; Zaini, N. C.; Morita, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18*, 3774-7.
26. Kuroda, C.; Ueshino, T.; Nagano, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2004**, *77* (9), 1737-1740.
27. Kinoshita, T.; Kaneko, M.; Noguchi, H.; Kitagawa, I., *HETEROCYCLES* **1996**, *43* (2), 409-409.
28. Jiang, R. W.; Ma, S. C.; But, P. P. H.; Mak, T. C. W., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **2001**, (22), 2920-2923.
29. Zheng, Y.; Zhang, S. W.; Cong, H. J.; Huang, Y. J.; Xuan, L. J., *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76* (12), 2210-8.
30. 石原 理紗, 岡山理科大学大学院 修士論文. 2013.
31. Saito, Y.; Ichihara, M.; Okamoto, Y.; Gong, X.; Kuroda, C.; Tori, M., *Tetrahedron Lett.*, **2011**, *52* (48), 6388-6391.

スペクトルデータ集

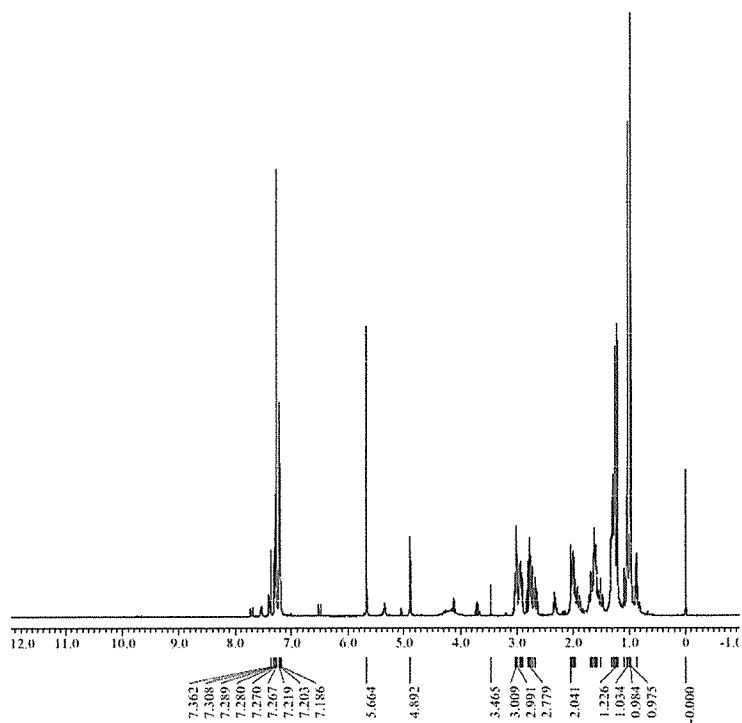


図 S8-1 echinalide H (8) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

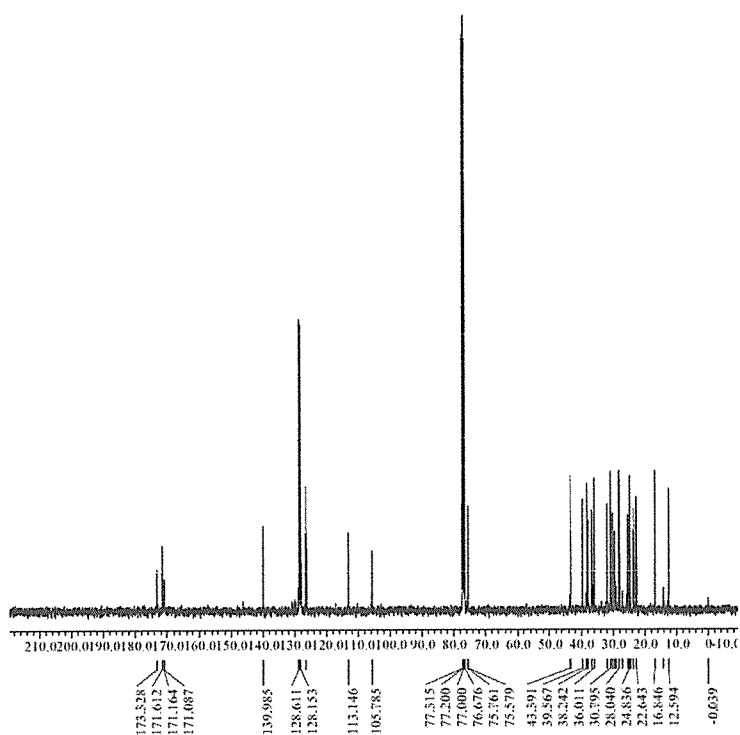


図 S8-2 echinalide H (8) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

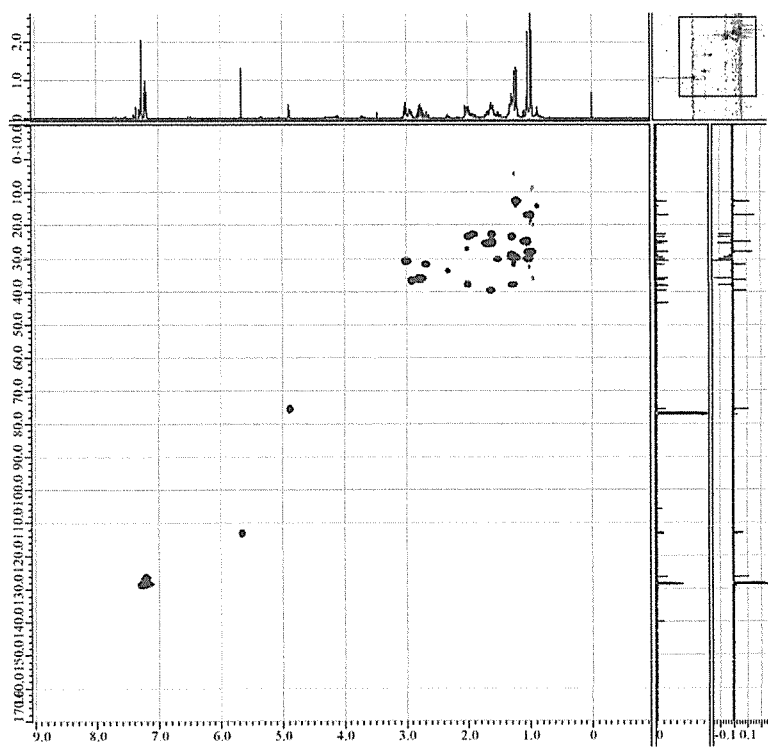


図 S8-3 echinalide H (8) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

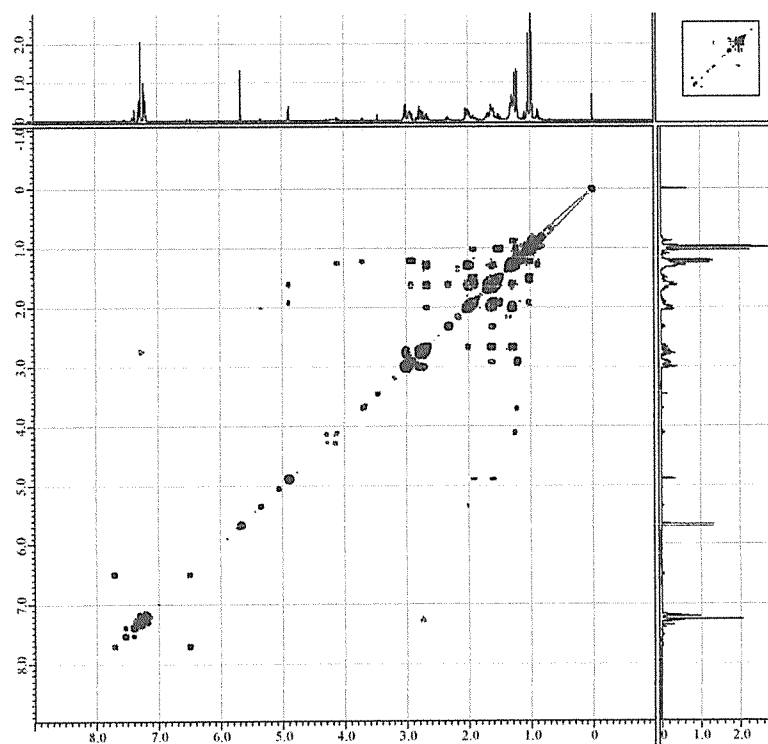
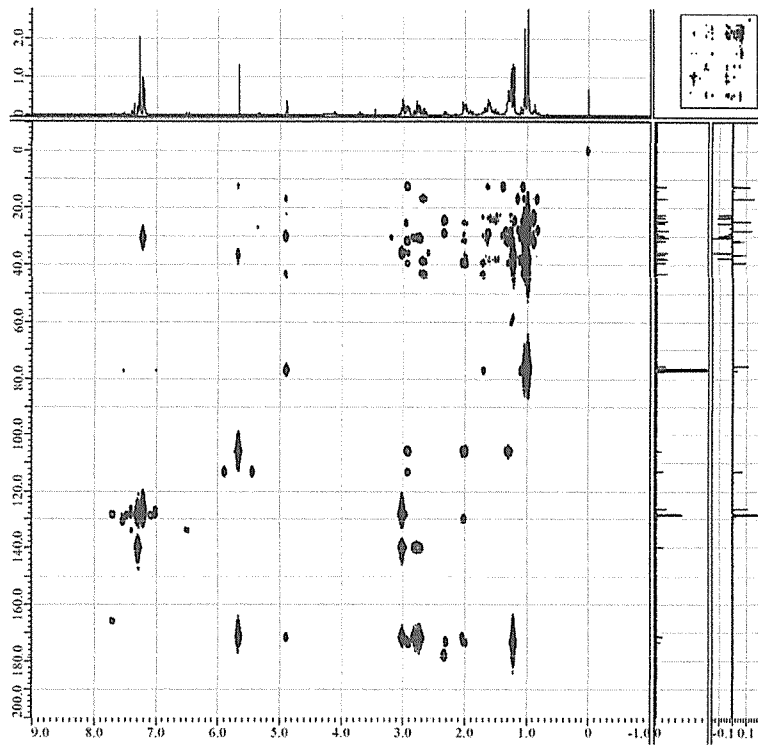
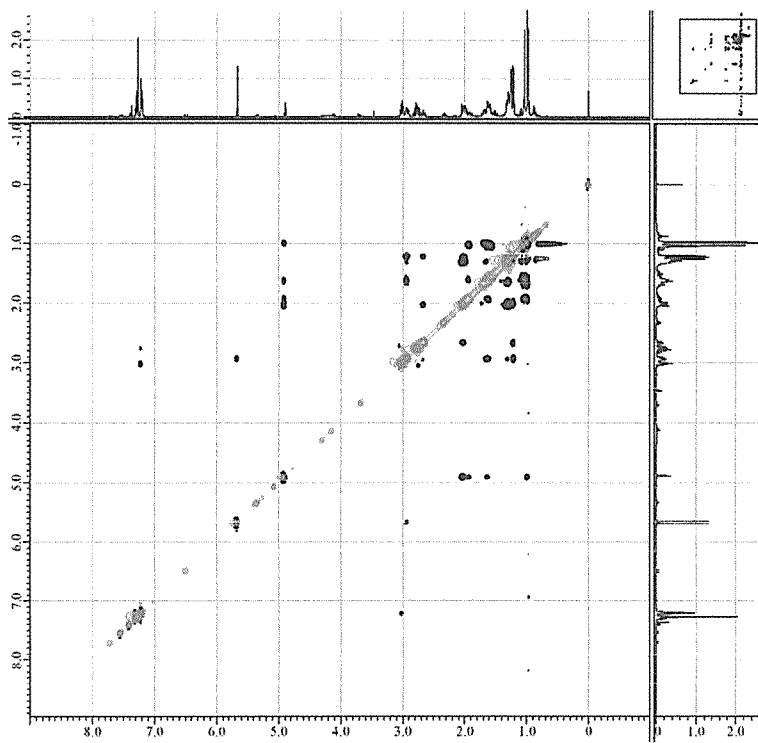


図 S8-4 echinalide H (8) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S8-5 echinalide H (8) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S8-6 echinalide H (8) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

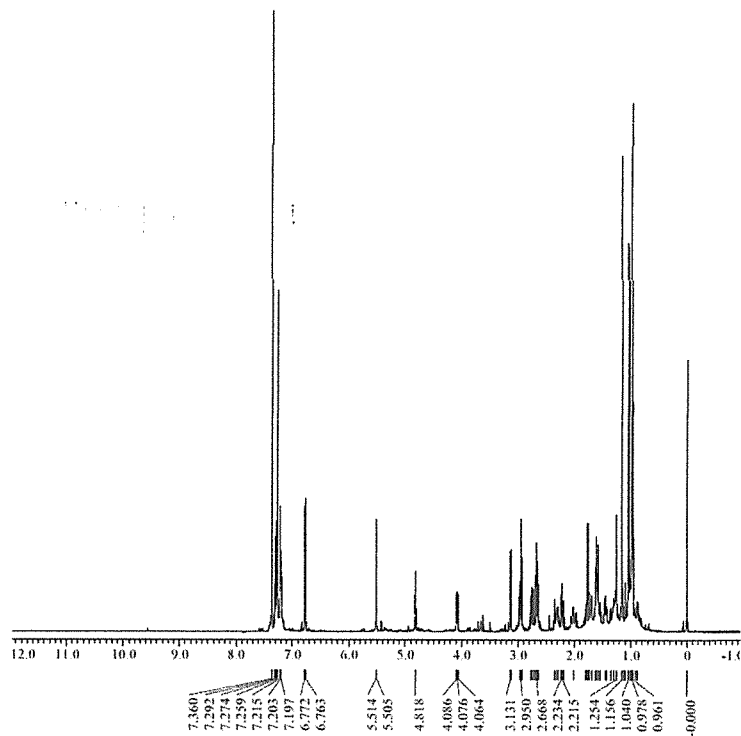


図 S8a-1 compound Ha (8a) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

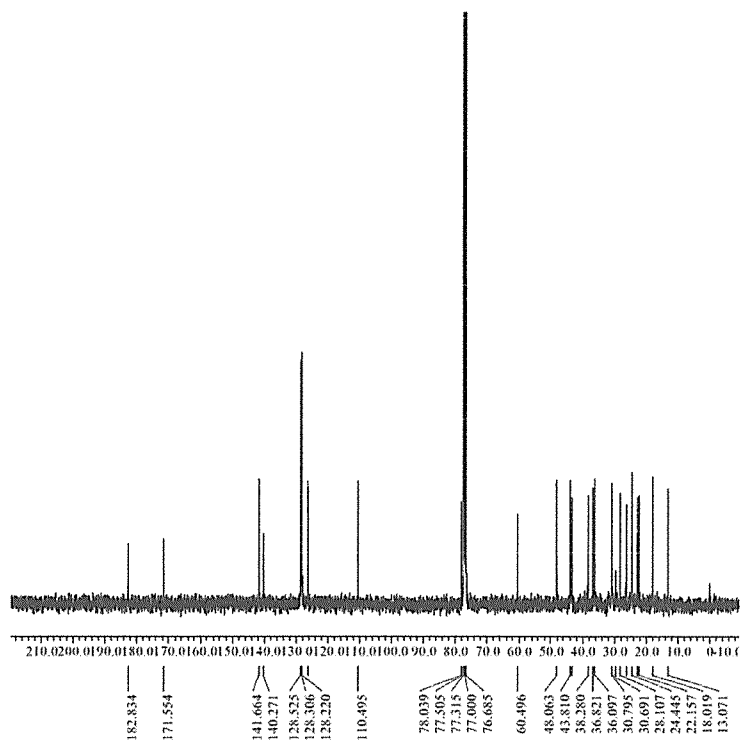


図 S8a-2 compound Ha (8a) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

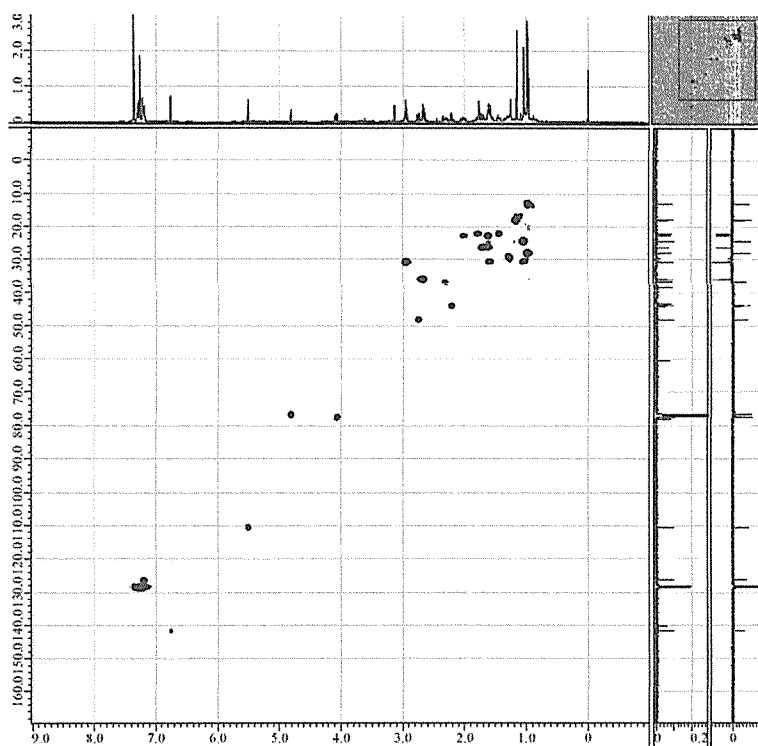


図 S8a-3 compound Ha (8a) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

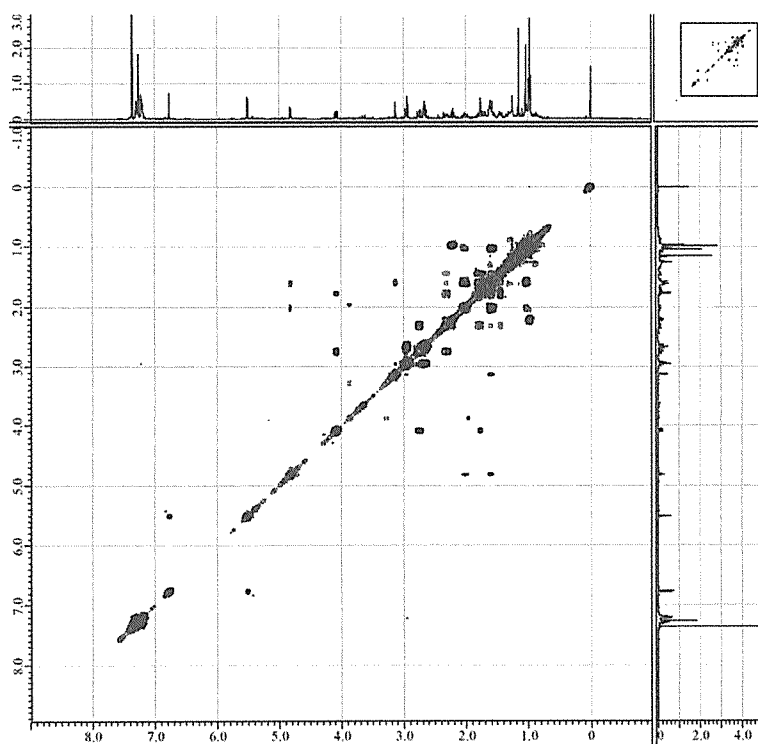


図 S8a-4 compound Ha (8a) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

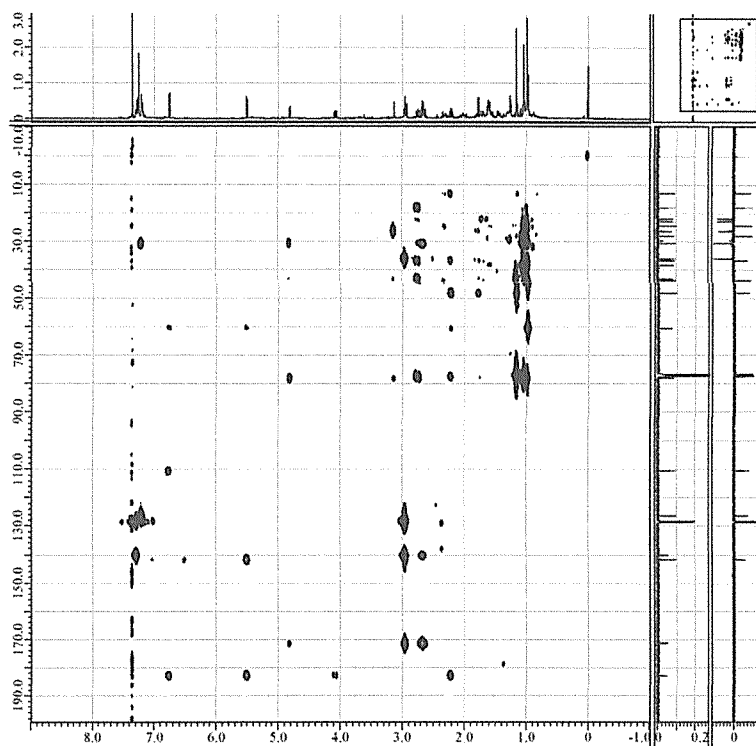


図 S8a-5 compound Ha (8a) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

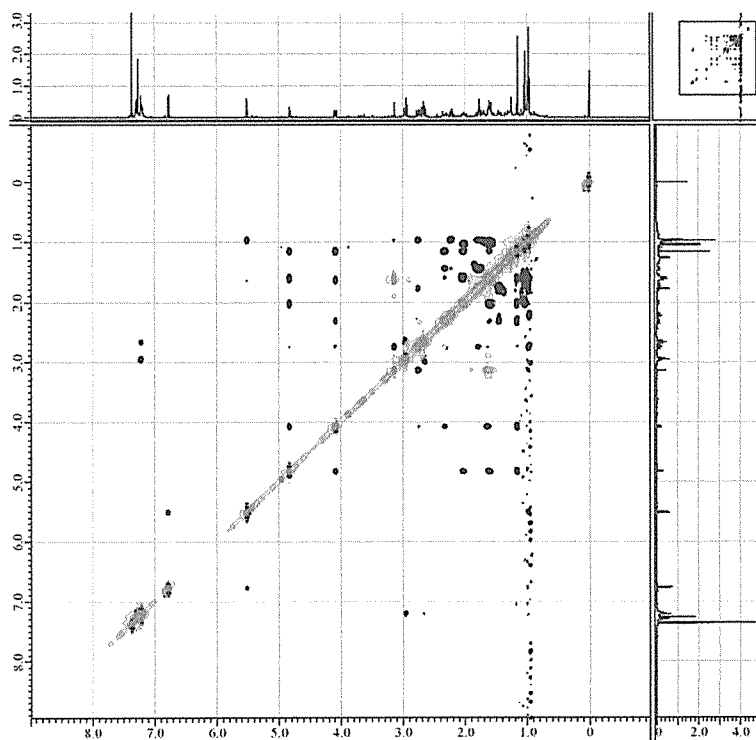
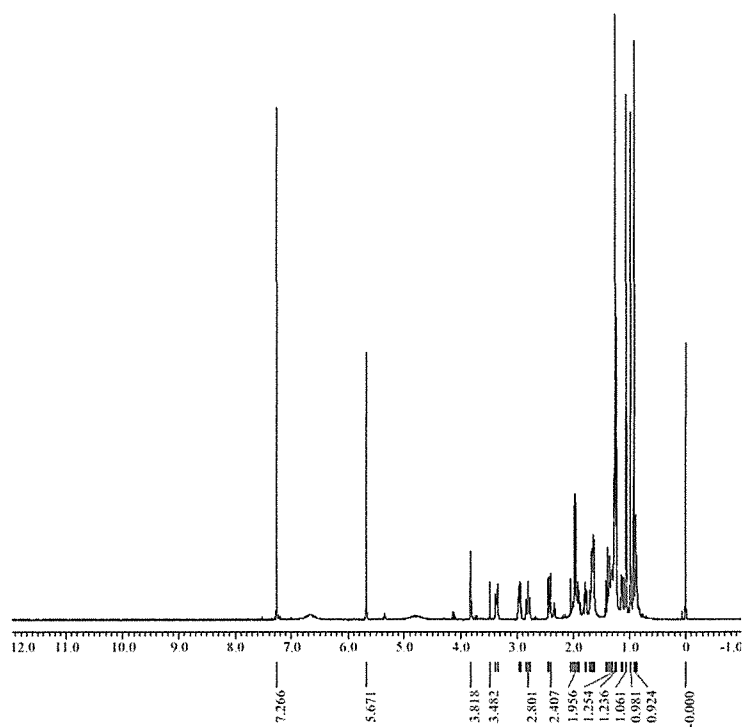
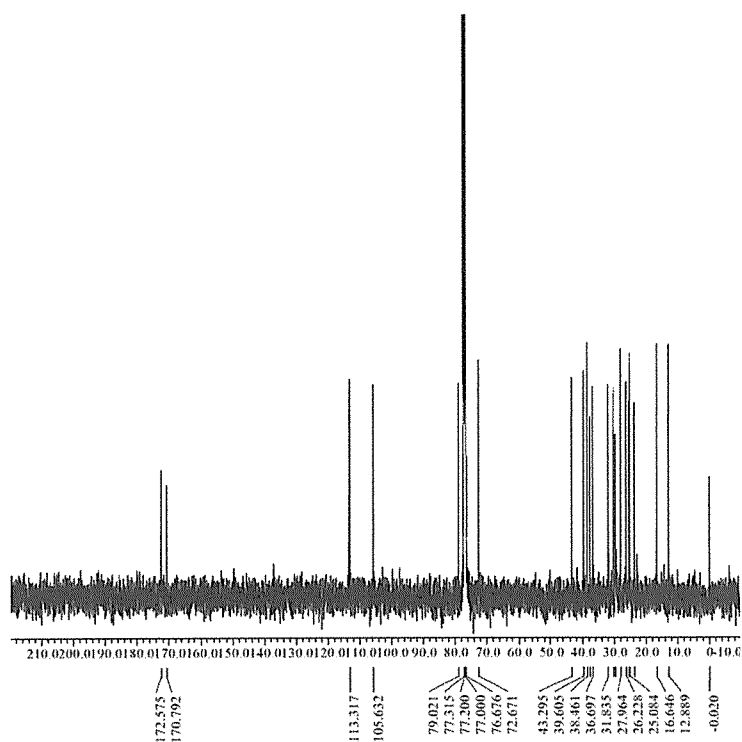


図 S8a-6 compound Ha (8a) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl_3)



☒ S8b-1 compound H' (8') の¹H-NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S8b-2 compound H' (8') の¹³C-NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

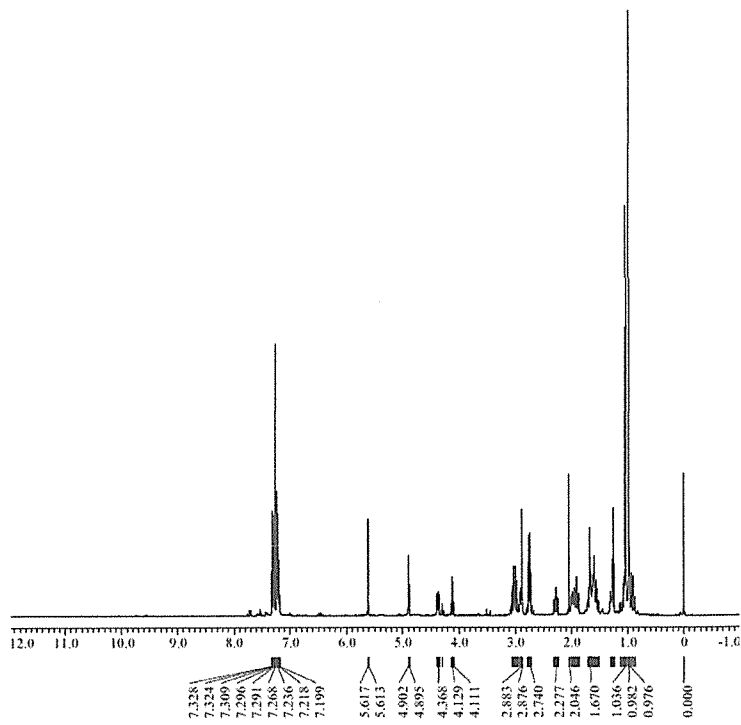


図 S9-1 echinalide I (9) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

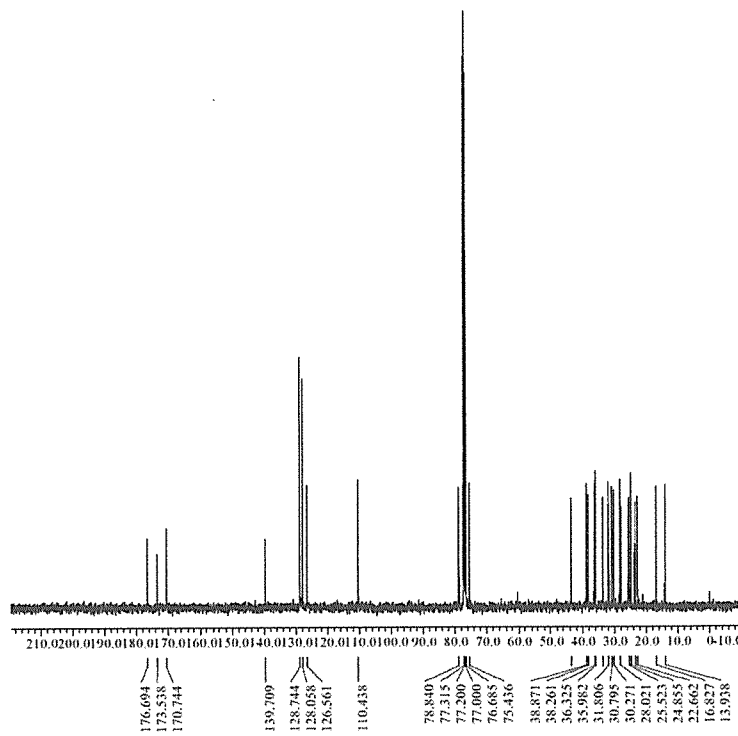


図 S9-2 echinalide I (9) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

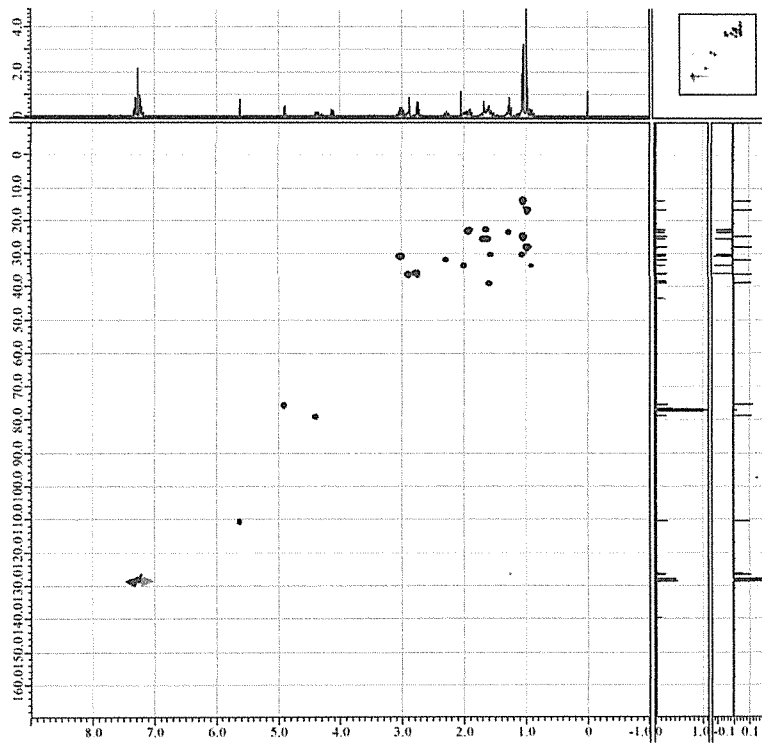


図 S9-3 echinalide I (9) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

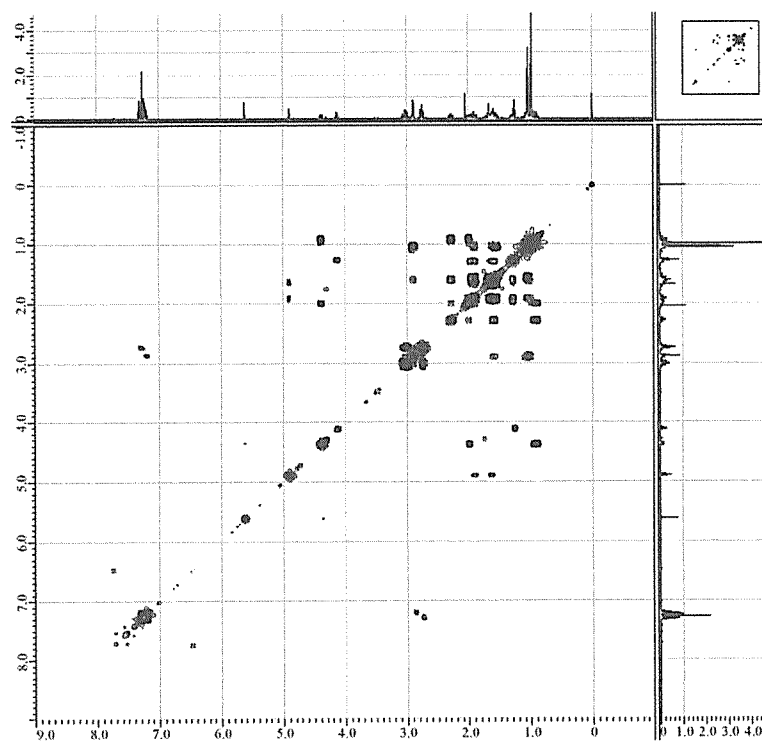
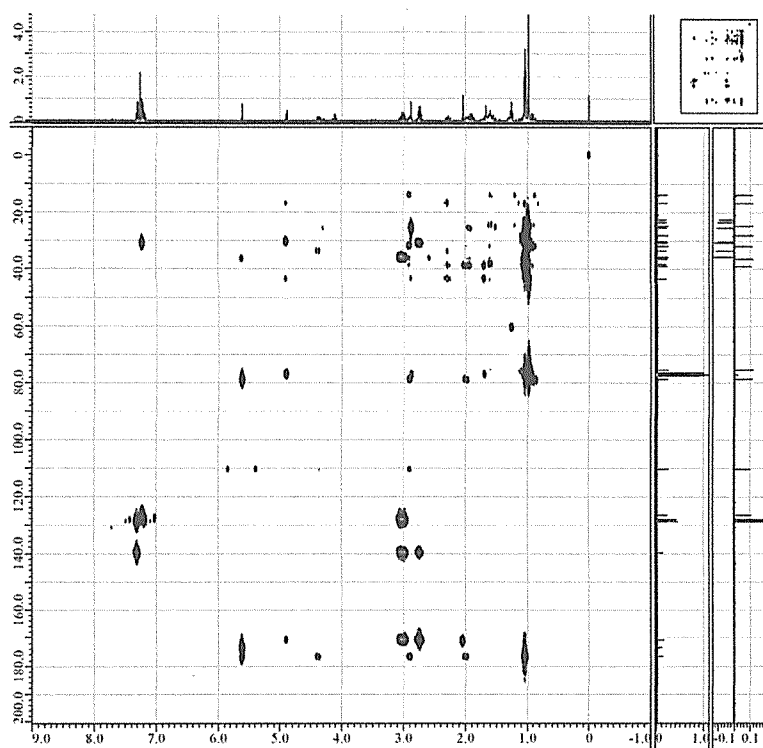
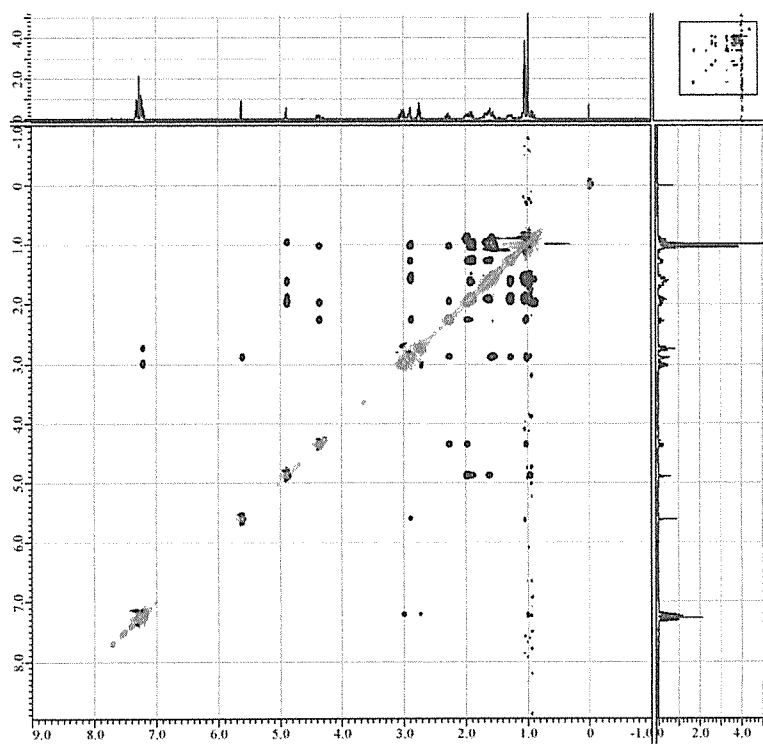


図 S9-4 echinalide I (9) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S9-5 echinalide I (9) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S9-6 echinalide I (9) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

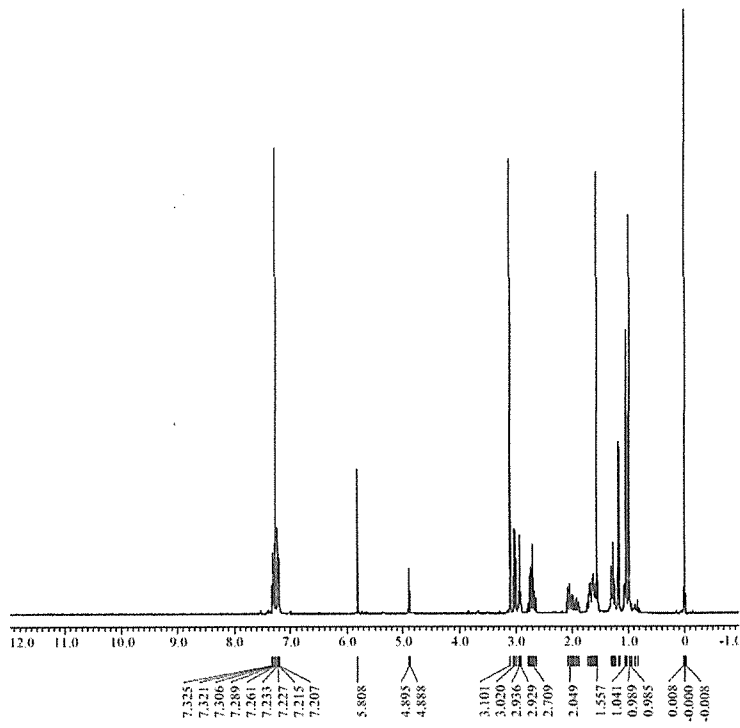


図 S10-1 echinalide J (10) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

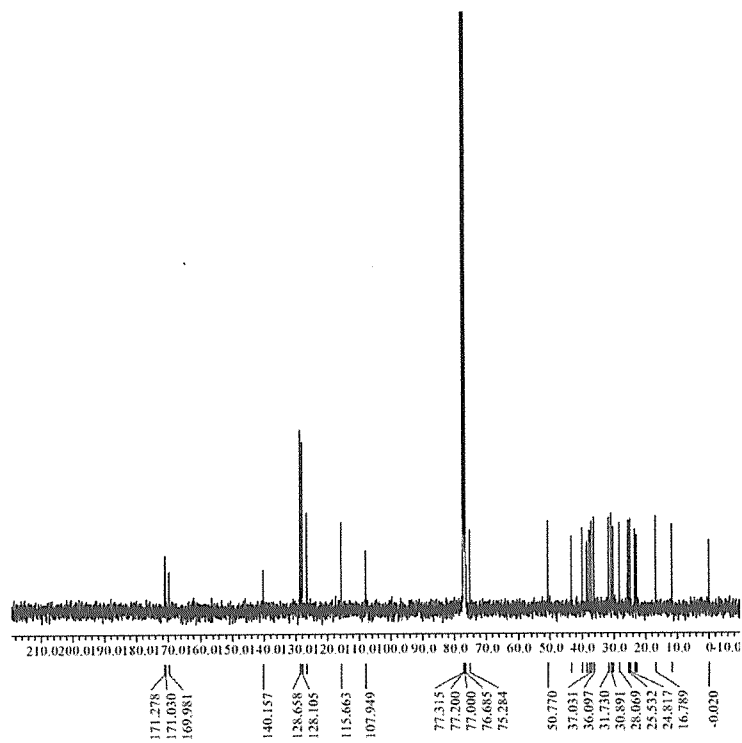


図 S10-2 echinalide J (10) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

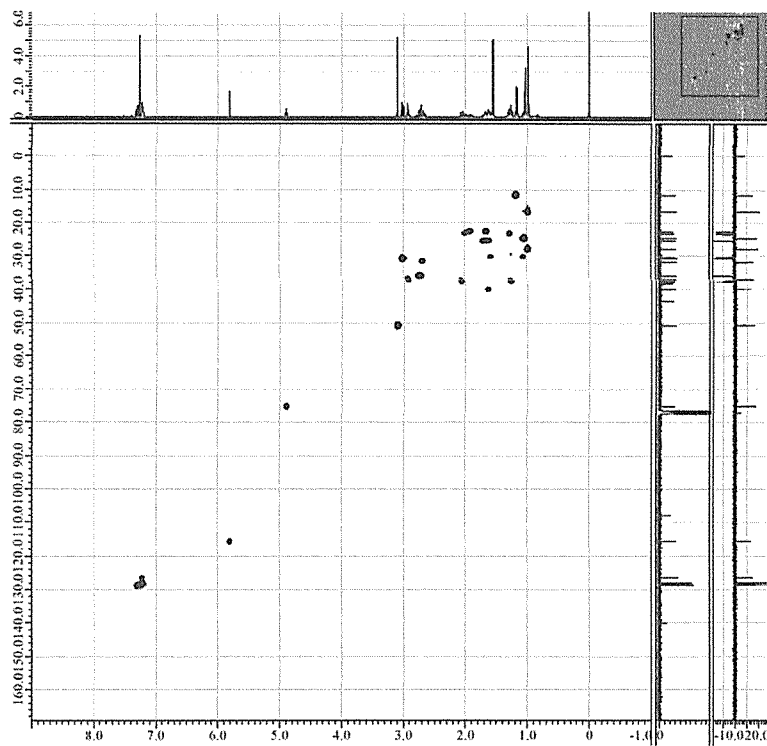


図 S10-3 echinalide J (10) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

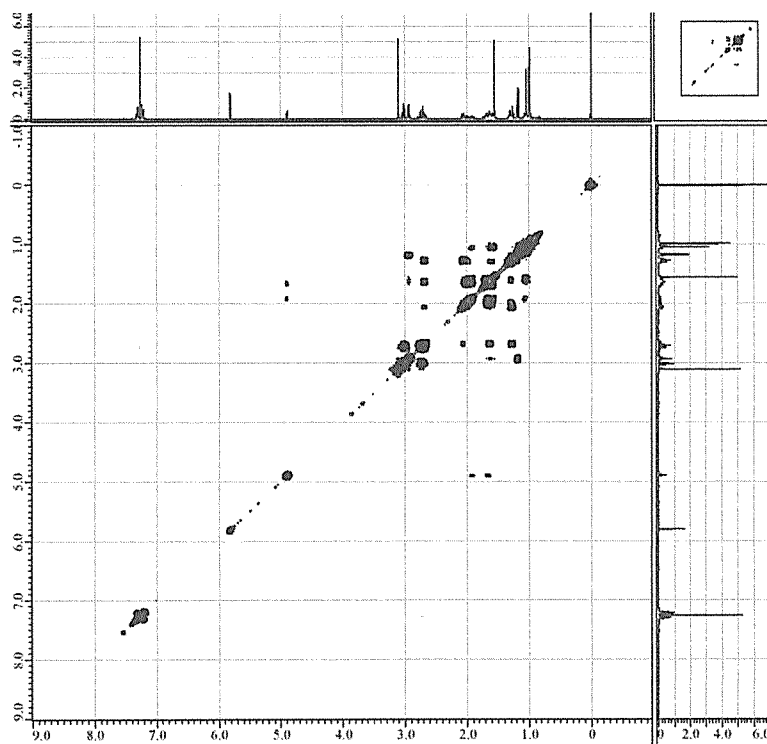
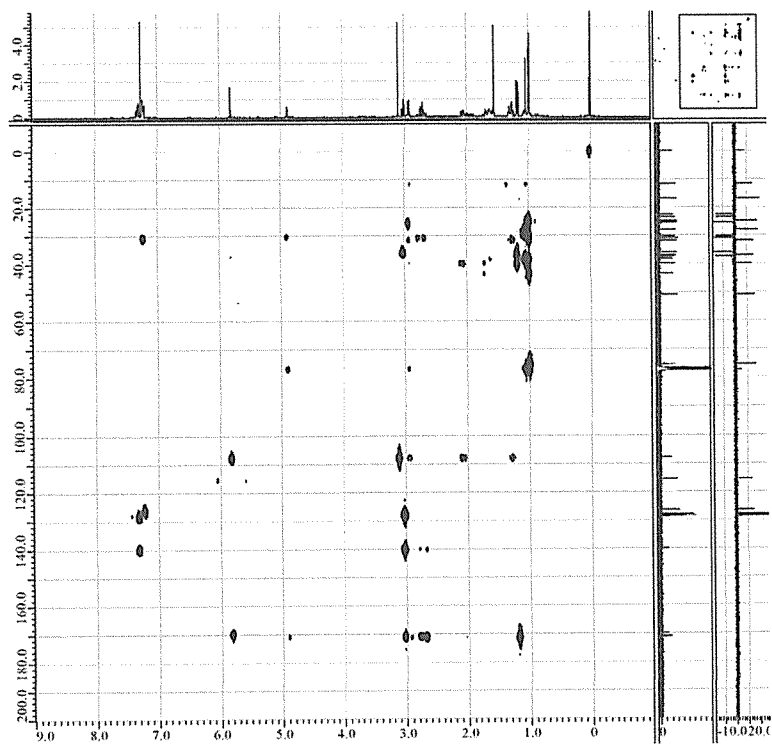
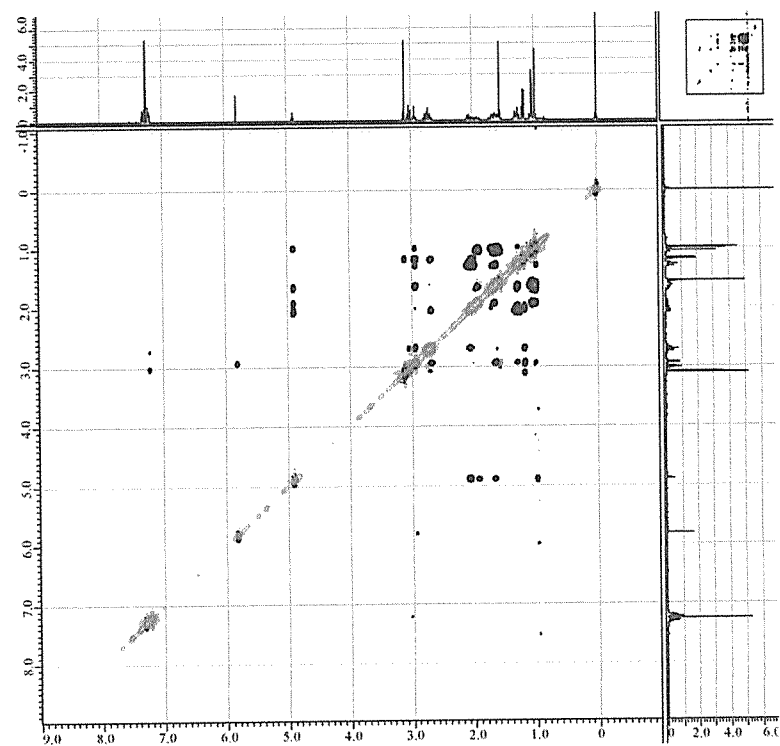


図 S10-4 echinalide J (10) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S10-5 echinalide J (10) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S10-6 echinalide J (10) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

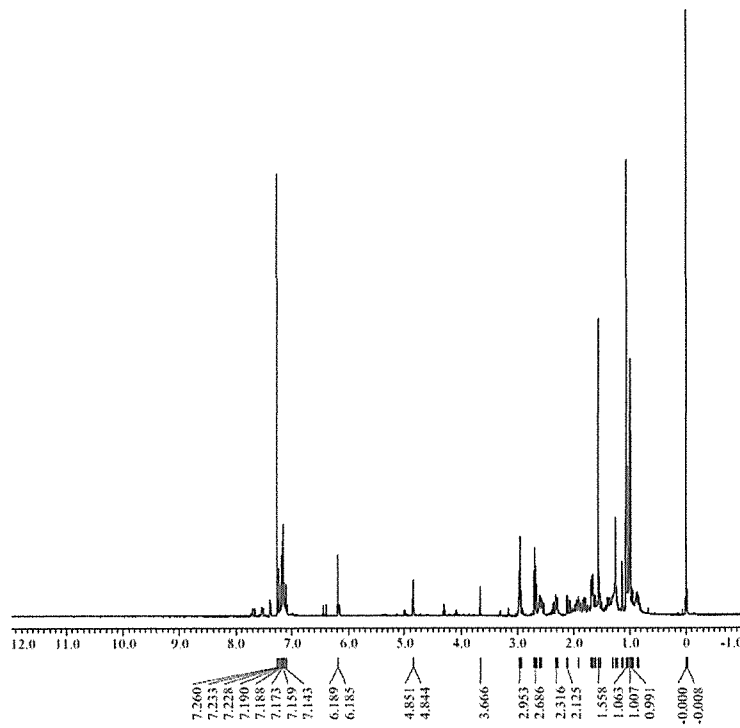


図 S11-1 echinalide L (11) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

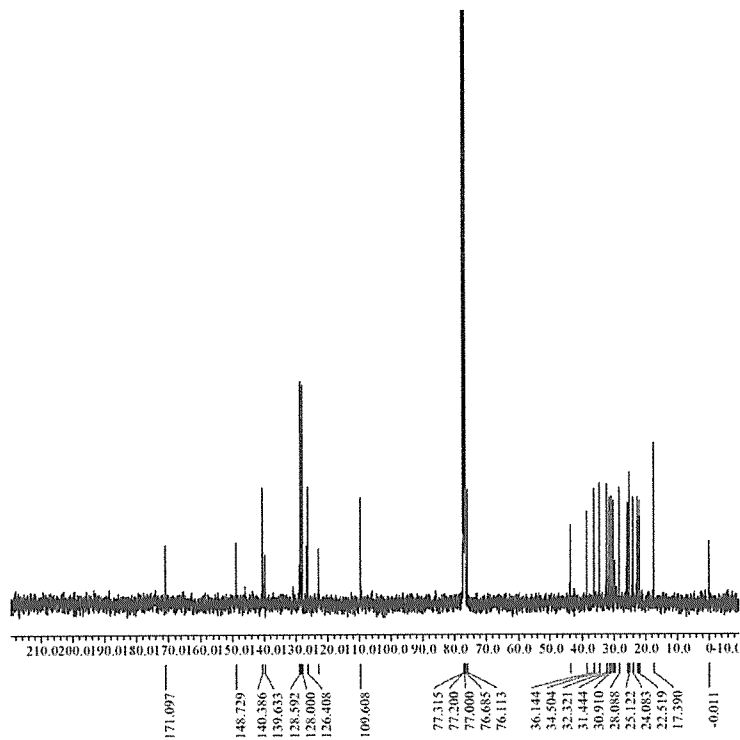


図 S11-2 Echinalide L (11) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

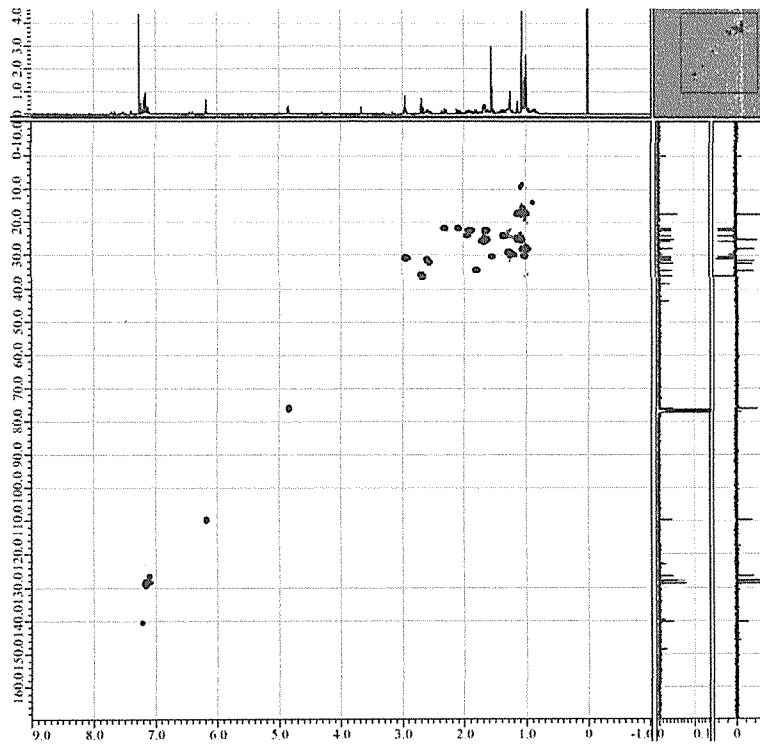


図 S11-3 echinalide L (11) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

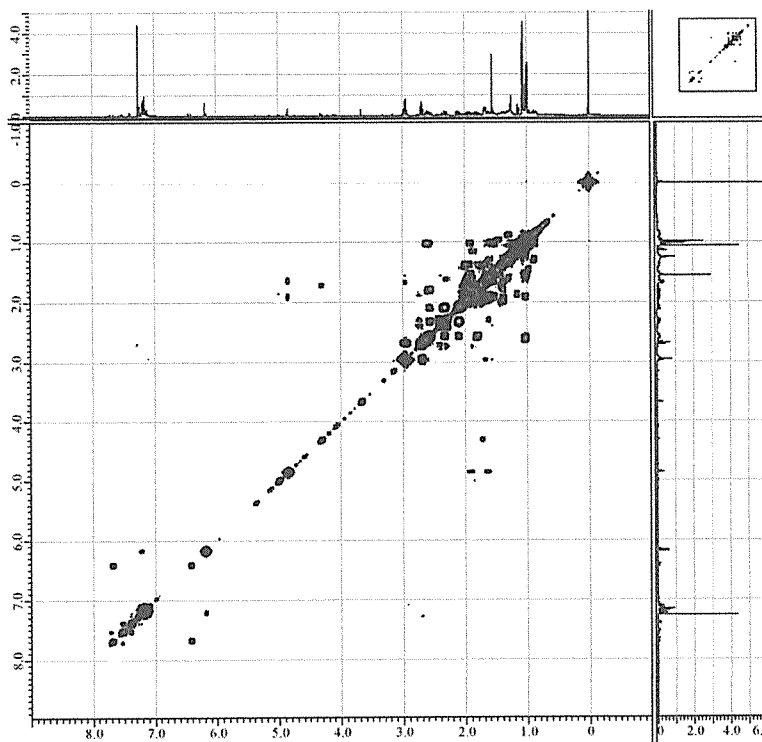
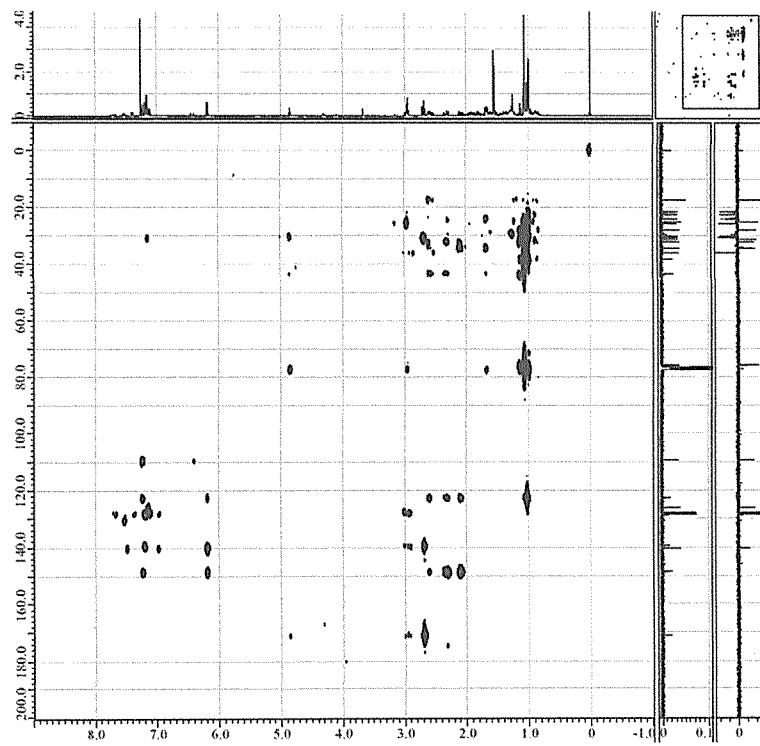
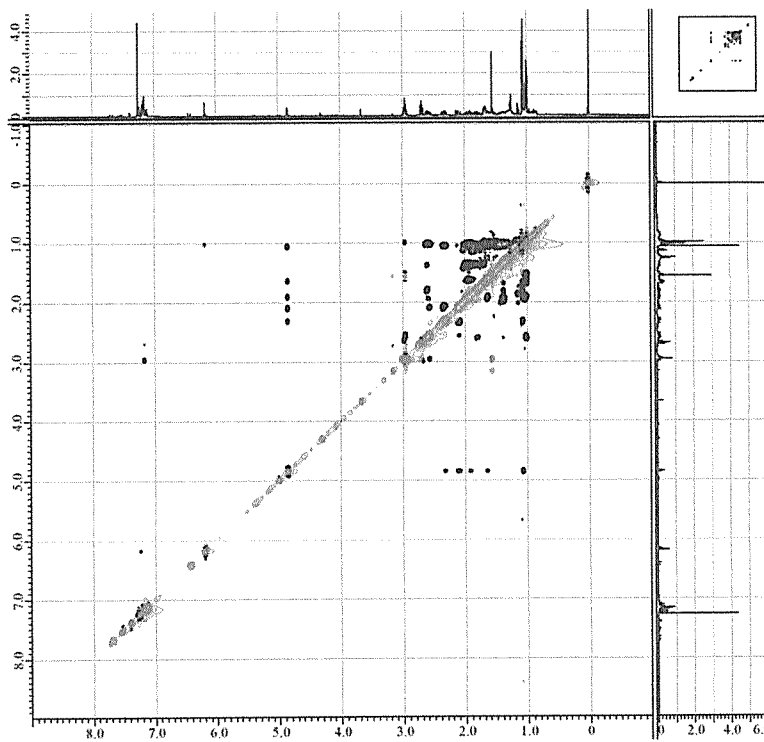


図 S11-4 echinalide L (11) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S11-5 echinalide L (11) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S11-6 echinalide L (11) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

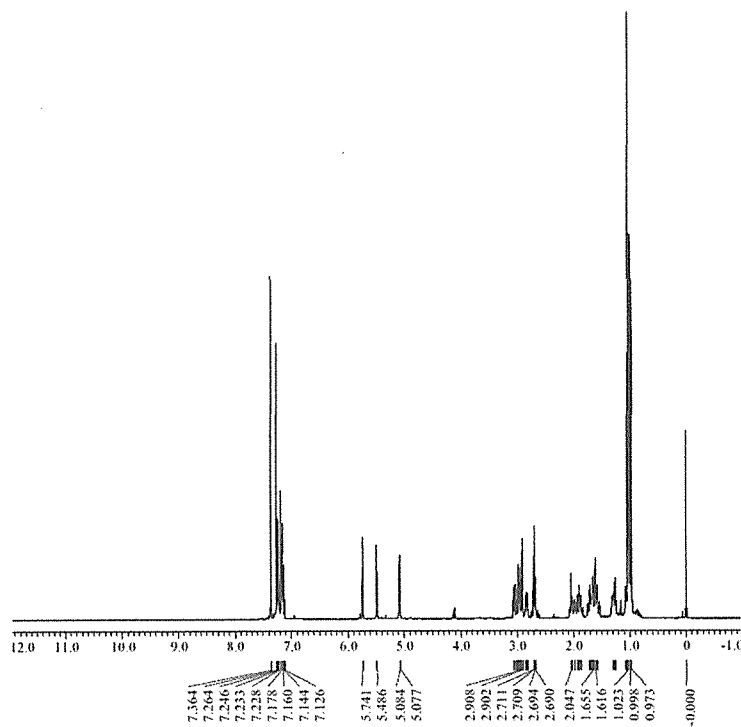


図 S12-1 echinalide M (12) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

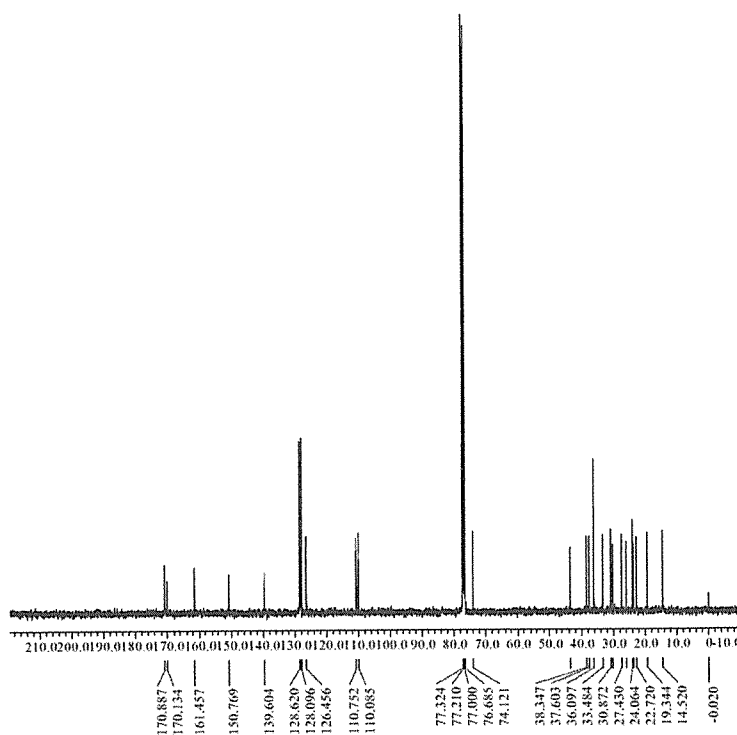


図 S12-2 echinalide M (12) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

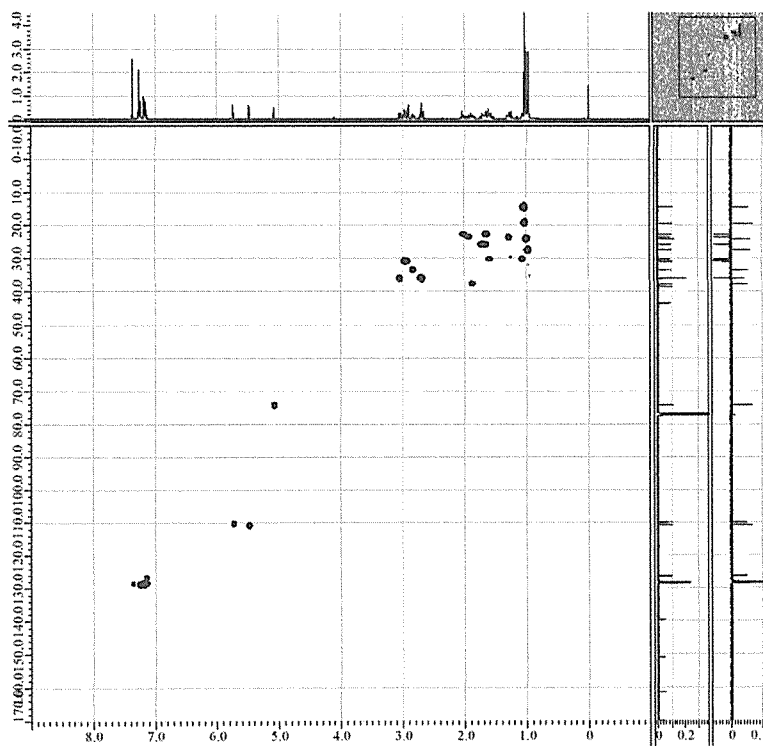


図 S12-3 echinalide M (12) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

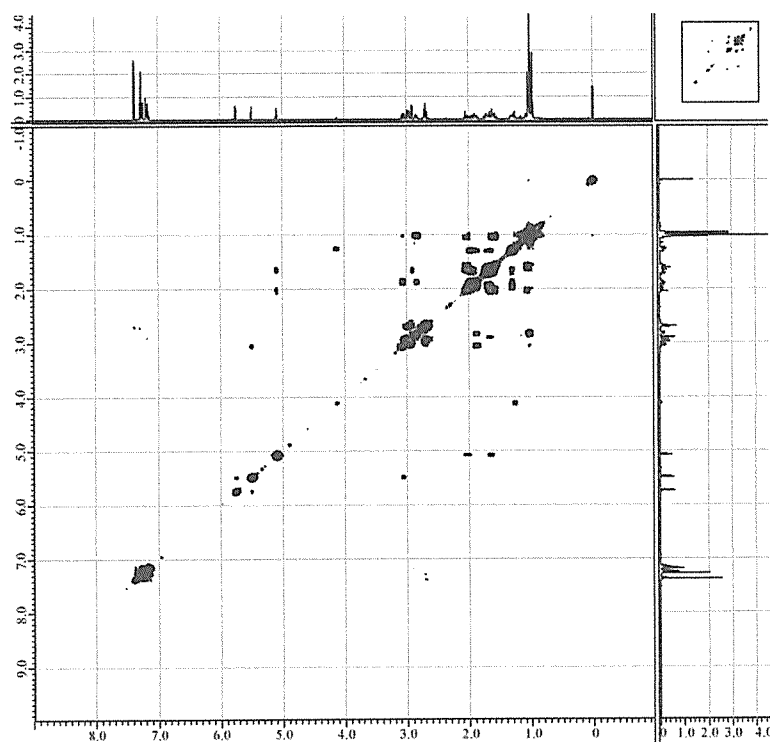


図 S12-4 echinalide M (12) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

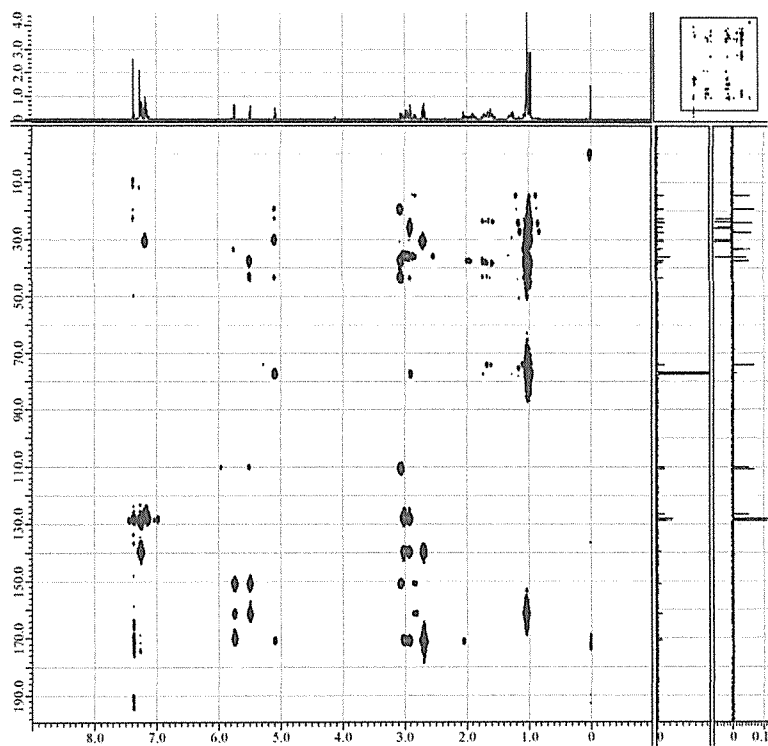


図 S12-5 echinalide M (12) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

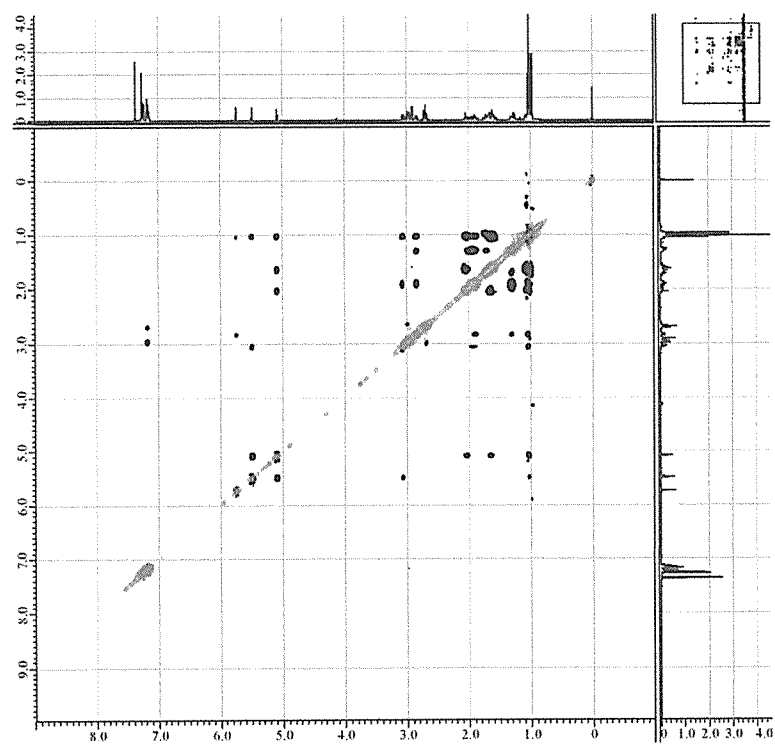
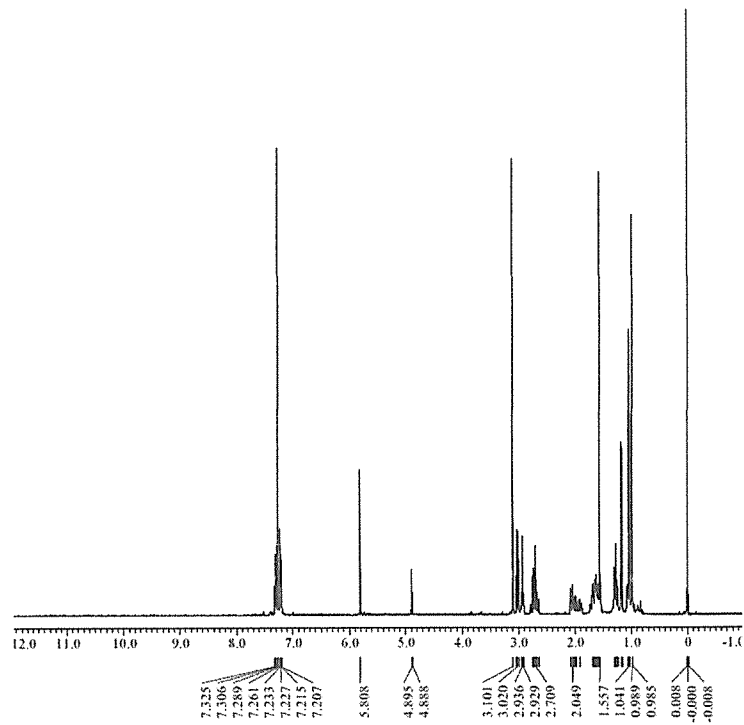
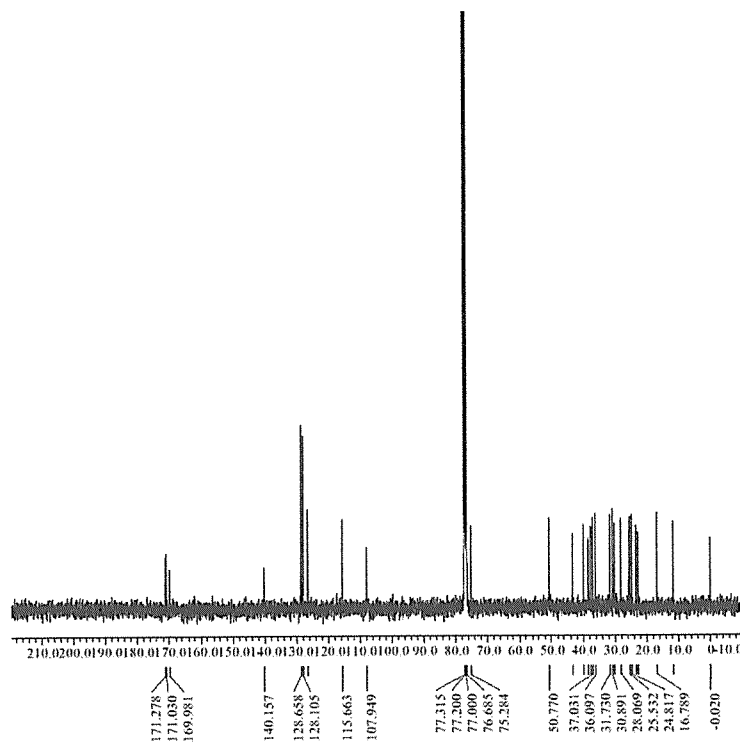


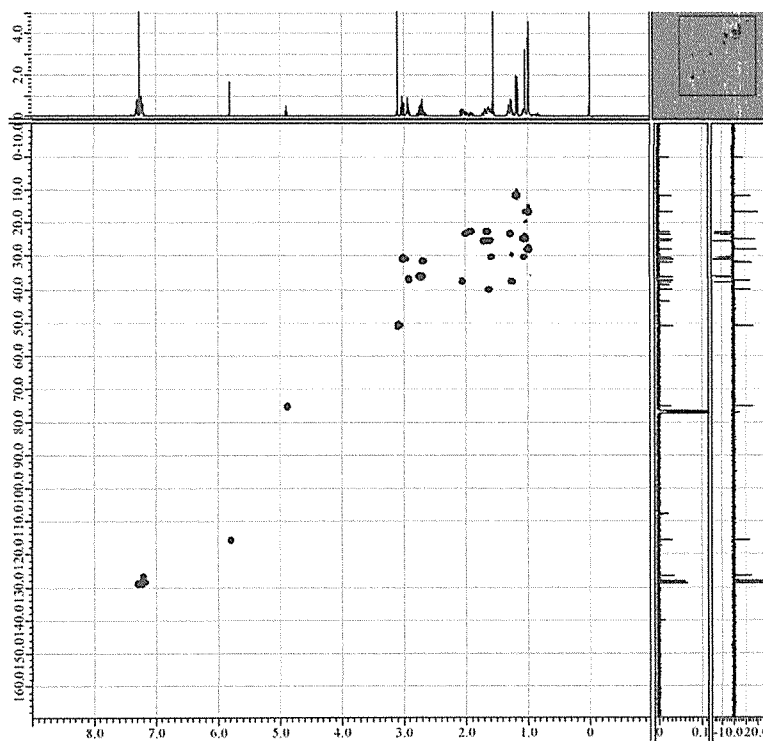
図 S12-6 echinalide M (12) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



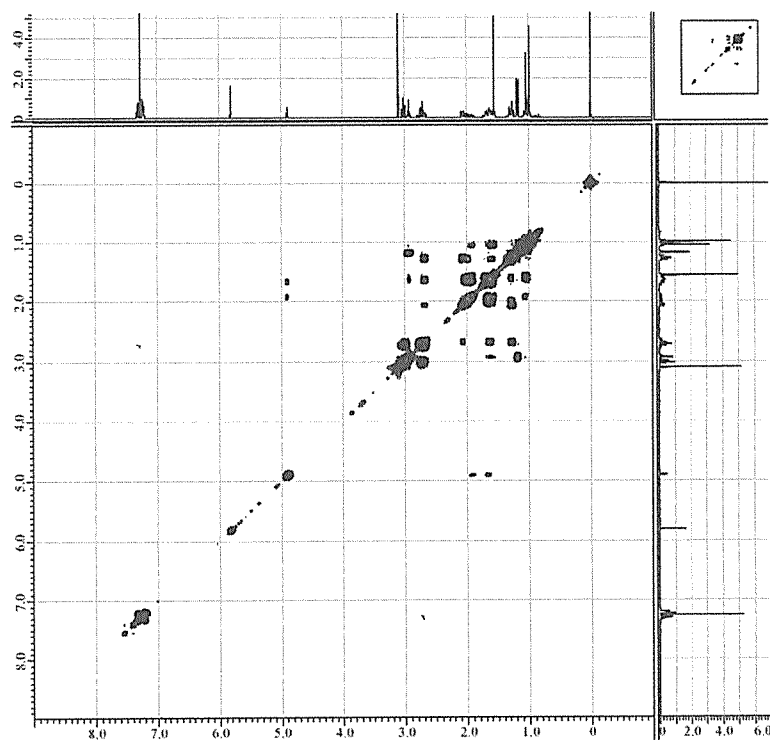
☒ S13-1 echinalide O (13) の¹H-NMR スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



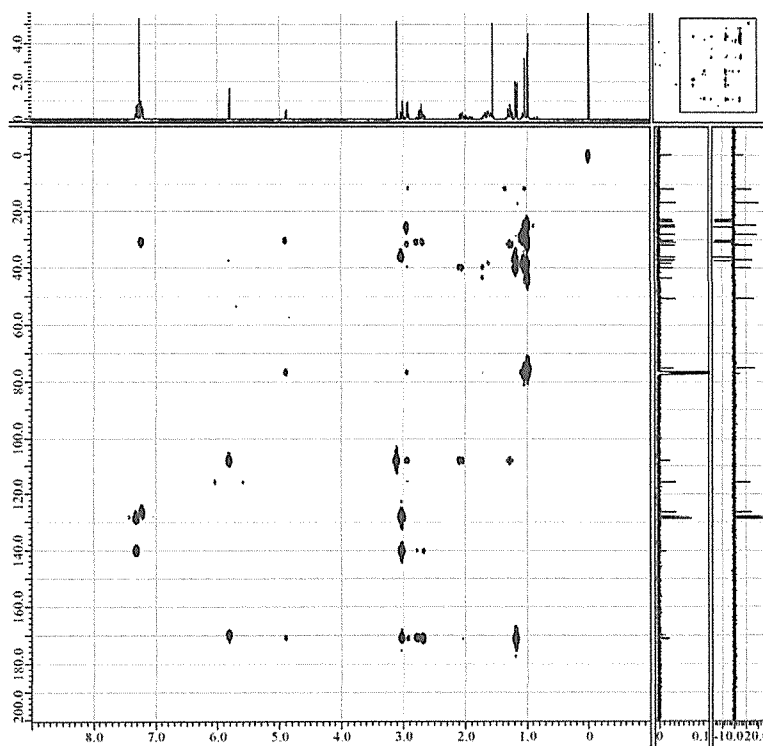
☒ S13-2 echinalide O (13) の¹³C-NMR スペクトル (100 MHz in CDCl₃)



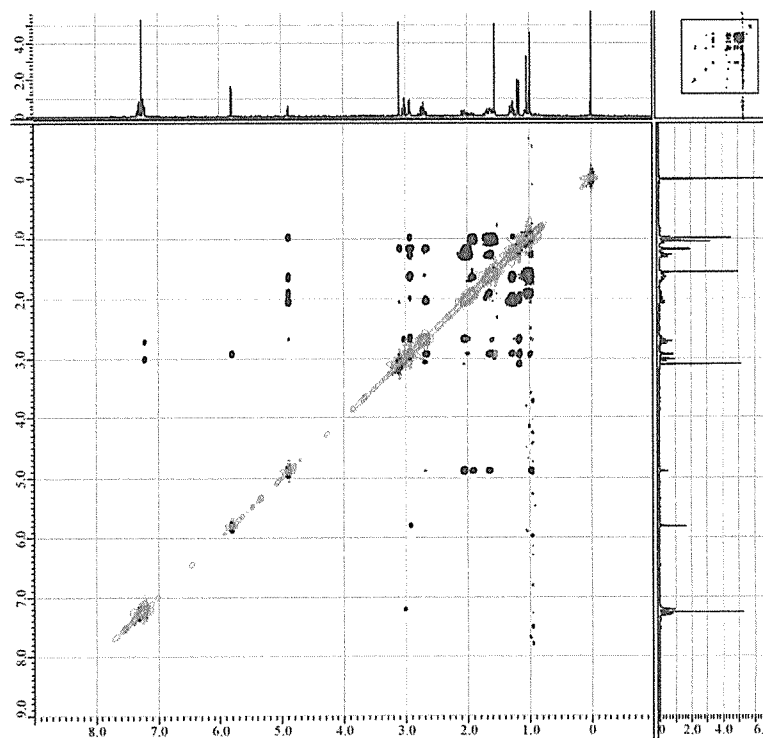
☒ S13-3 echinalide O (13) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S13-4 echinalide O (13) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S13-5 echinalide O (13) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S13-6 echinalide O (13) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

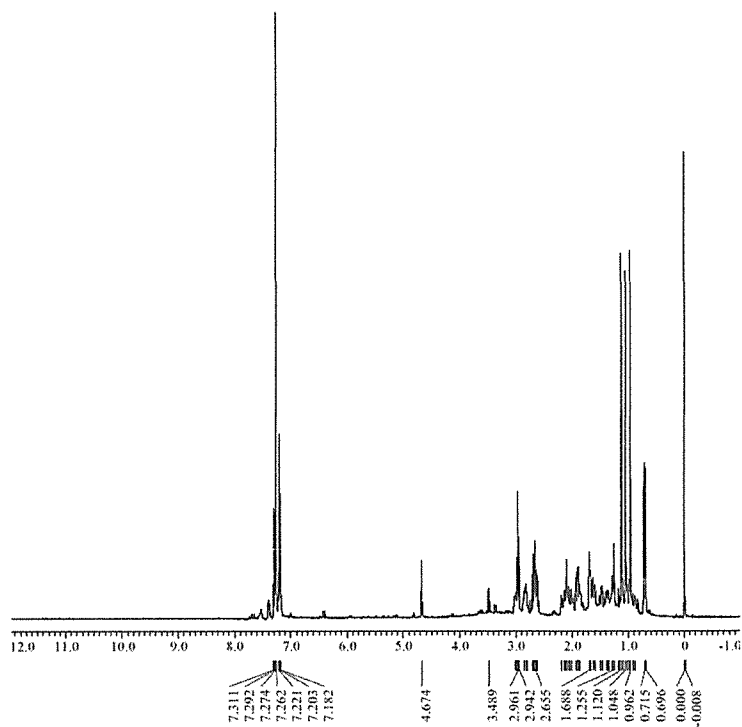


図 S14-1 echinalide P (14) の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

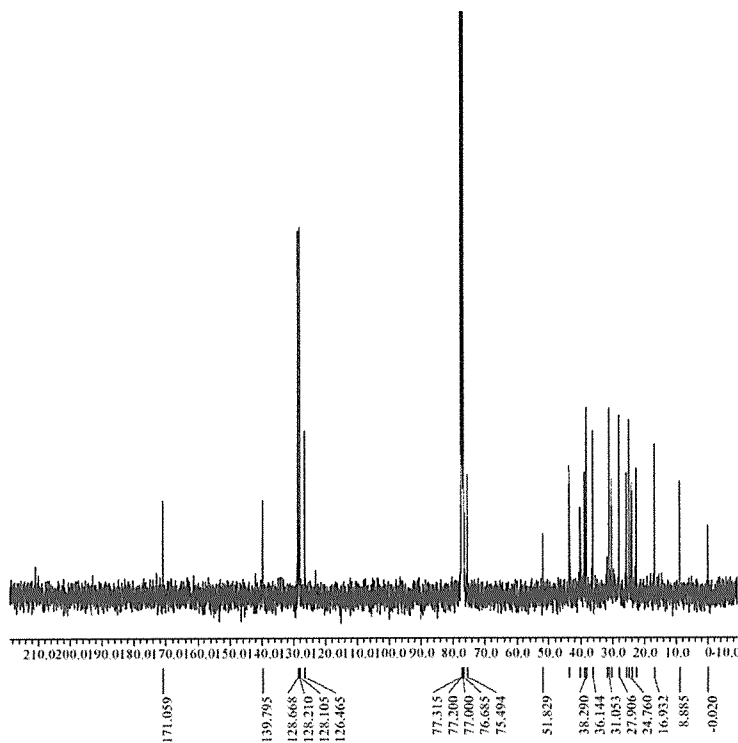


図 S14-2 echinalide P (14) の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz in CDCl_3)

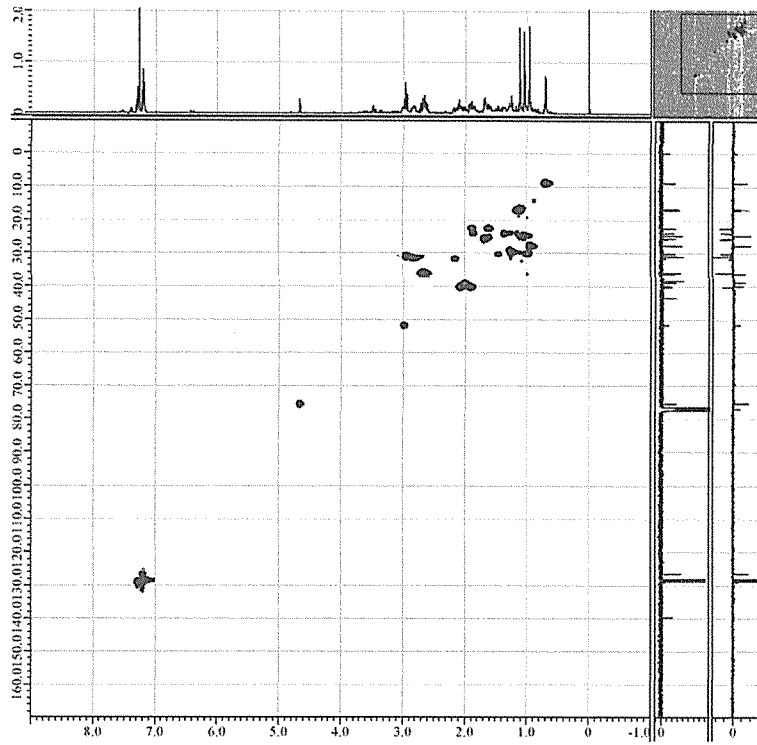


図 S14-3 echinalide P (14) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

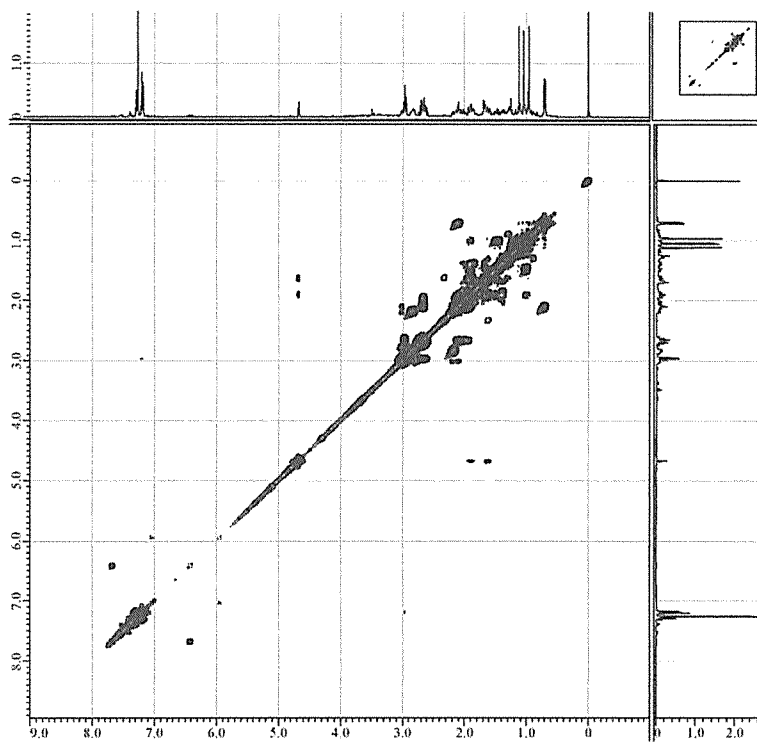


図 S14-4 echinalide P (14) の ^1H - ^1H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

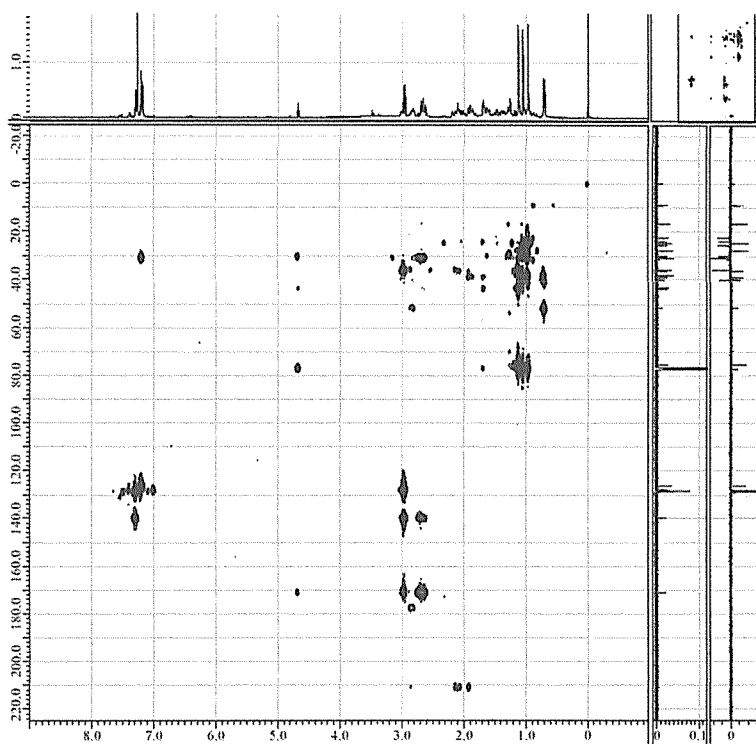


図 S14-5 echinalide P (14) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

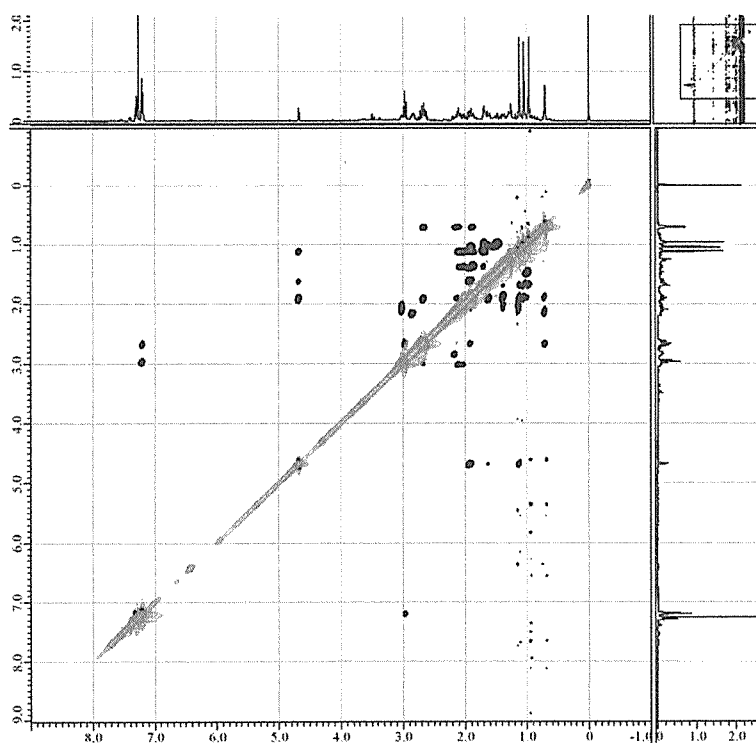


図 S14-6 echinalide P (14) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

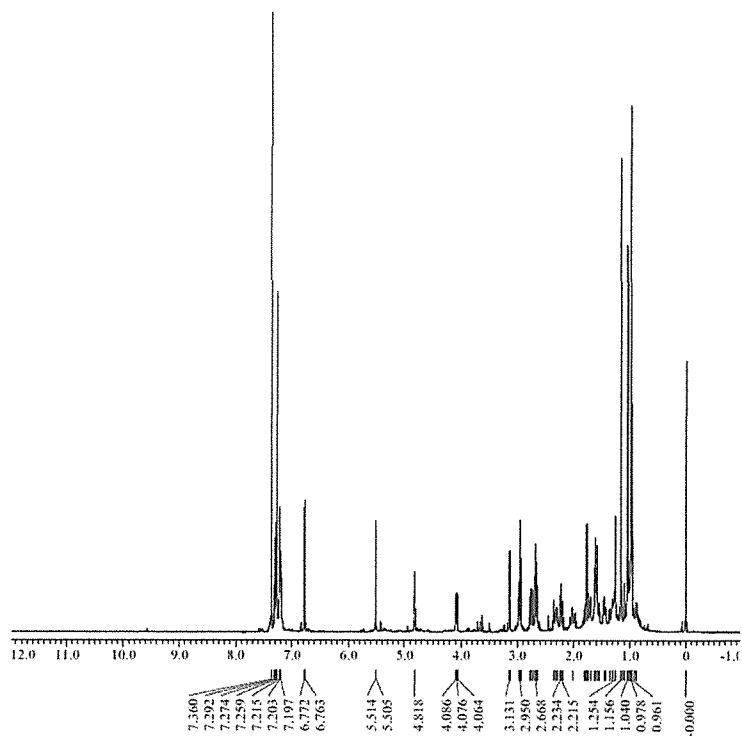


図 S15-1 echinalide T (15) の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

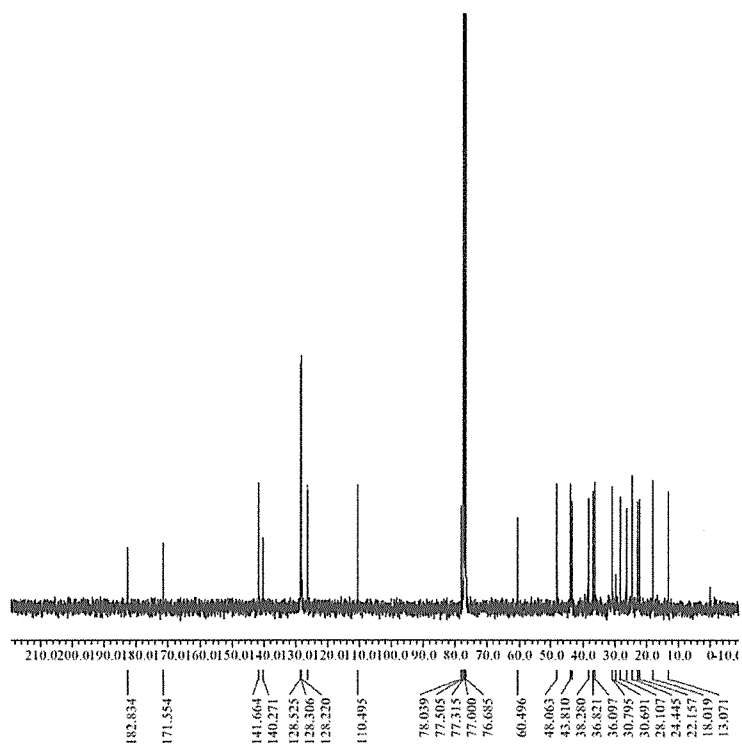
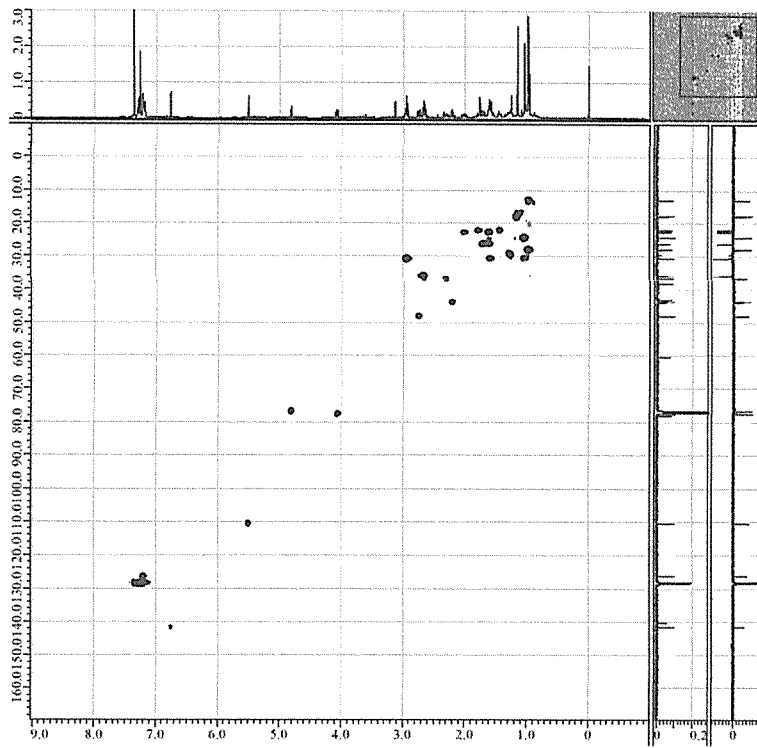
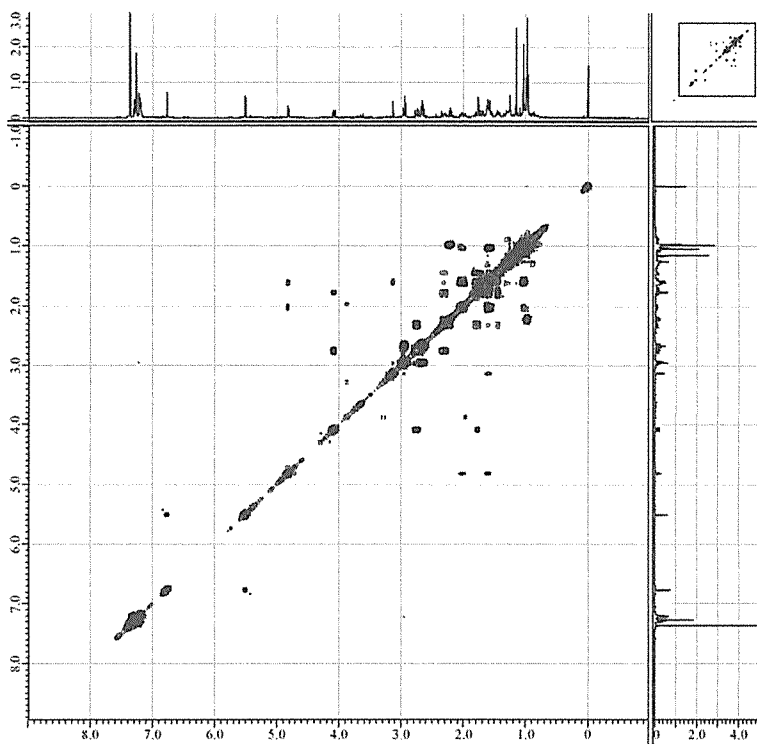


図 S15-2 echinalide T (15) の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (100 MHz in CDCl_3)



☒ S15-3 echinalide T (15) の HSQC スペクトル (400 MHz in CDCl₃)



☒ S15-4 echinalide T (15) の ¹H-¹H COSY スペクトル (400 MHz in CDCl₃)

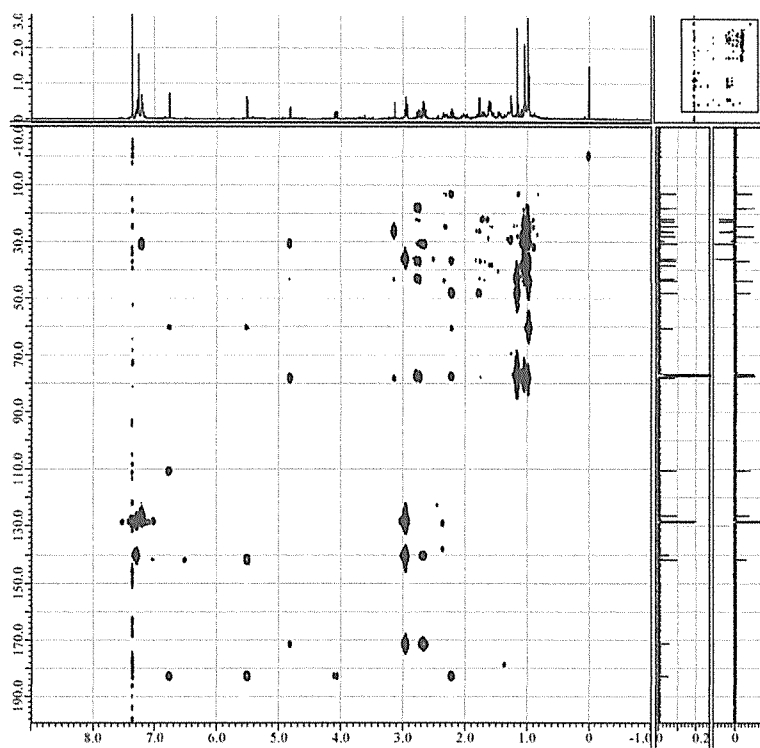


図 S15-5 echinalide T (15) の HMBC スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

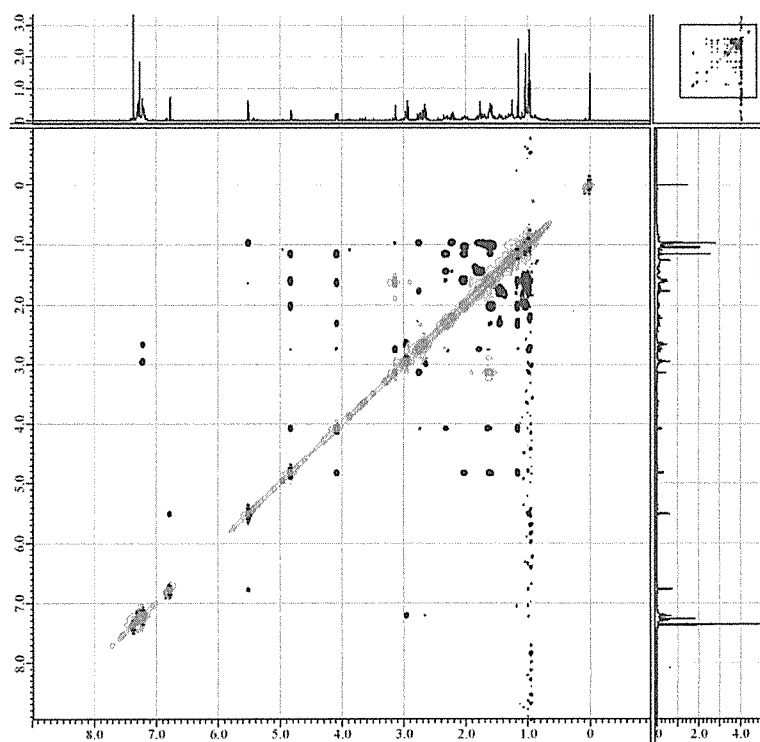


図 S15-6 echinalide T (15) の NOESY スペクトル (400 MHz in CDCl_3)

第2部 NF-κB 阻害活性評価

序論

NF-κB は、同じ Rel ファミリーからなる転写因子群の総称である。NF-κB を構成する Rel ファミリーは、現在5種類 [p50, p52, p65 (RelA), RelB, c-Rel] が知られており、これらの homo あるいは hetero-dimer として存在する^{1,2}。この NF-κB は、通常細胞質内で IκB と呼ばれる inhibitor と会合して、不活性型として存在している。細胞外からの広範な刺激により、IκB は IKK と呼ばれるリン酸化酵素によるリン酸化を受け、ユビキチン-プロテアソーム系により分解される。一方、遊離した NF-κB は速やかに核内に移行し、NF-κB 結合 cis element の下流にある種々の遺伝子発現を惹起する³。この活性化には *de novo* のタンパク質合成を介しておらず、細胞外からの刺激を速やかに核に伝達することができる。NF-κB は炎症性サイトカインなどの種々の疾患・炎症関連分子 (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α など) の発現を調節しており、これらの発現を一度に抑制する効果が得られることから、免疫疾患治療及び炎症治療の標的分子として注目されている²。

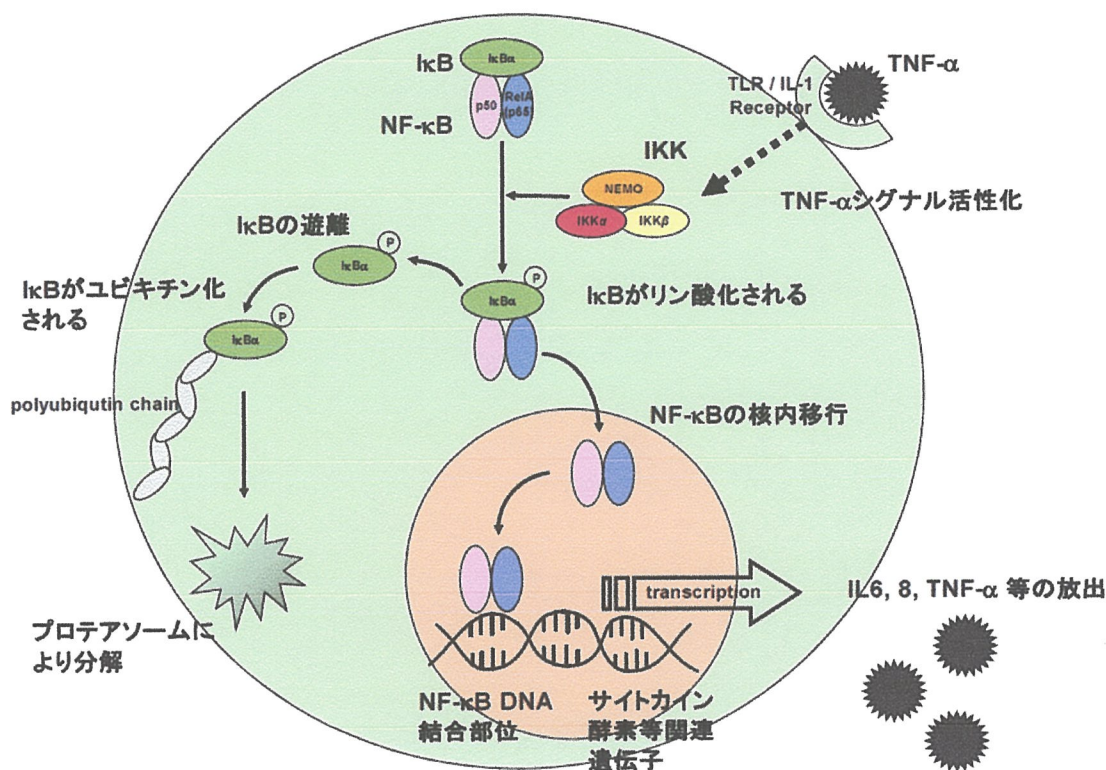


図 3-1 NF-κB について

また、NF-κB の活性化には、IκB の分解により誘導される活性化経路 (古典経路) の他に、NF-κB 自身 (p100) の限定分解により活性化される経路も存在する (非古典経路)⁴。この非古典経路では、刺激後新たなタンパク質の合成を必要とすること、活性化が日単位で長期間に及ぶことなどが古典経路と異なる点である。ただし、p100 や RelB など非古典経路に関与する NF-κB の

転写が古典経路の NF- κ B 活性化に大きく依存しているため、この非古典経路は、完全に独立して機能するわけではない⁵。

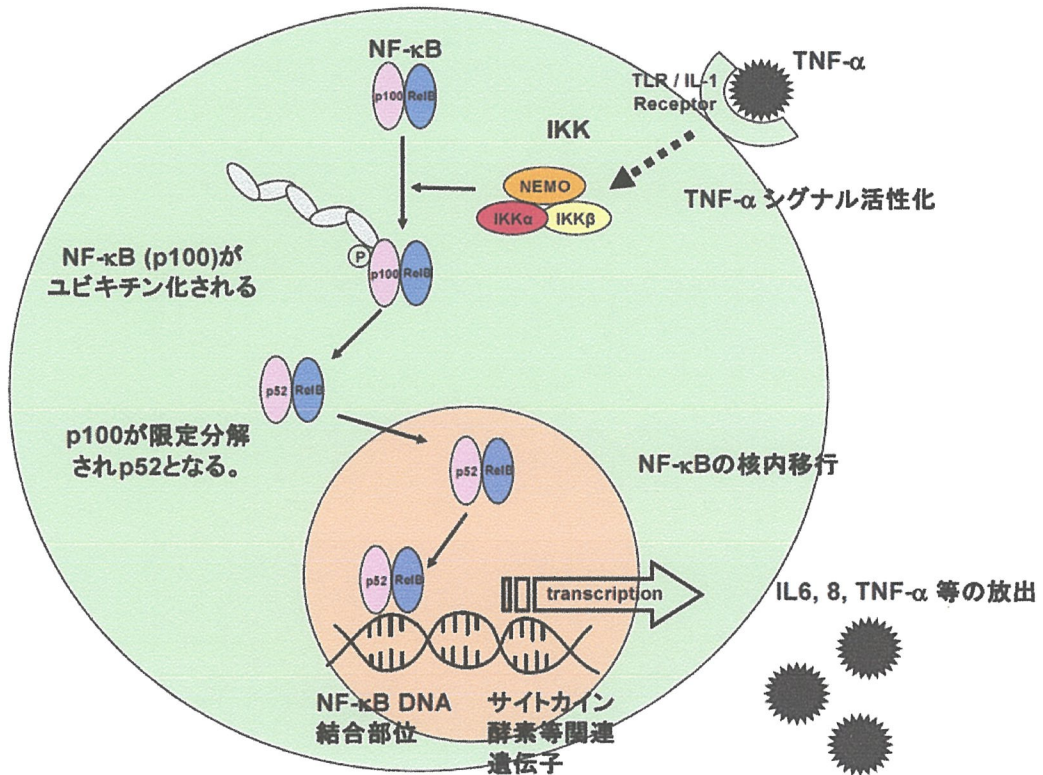


図 3-2 NF- κ B について (非古典経路)

NF- κ B の活性化には、サイトカイン刺激や種々のストレス、紫外線刺激などが挙げられる。また、DNA 損傷ストレスによっても活性化され、IR (ionizing radiation), CPT (camptothecin), VP16 (etoposide), Dox (doxorubicin), adriamycin など多くの抗がん剤は、NF- κ B を活性化することが示されている⁶。がん細胞においては、この NF- κ B の恒常的な活性化が見られ、炎症性サイトカインの生産を行うことで、がん周辺に多くの増殖因子や酸素を供給することができ、がんの悪性化を促進している⁷。また、Bcl-xL, cIAP, c-FLIP などのアポトーシス抑制タンパクを発現させていることも知られている⁸。さらに、MMP (Matrix Metallo Protease) を産生することで、転移・浸潤が促進されることから、抗がん剤や放射線への抵抗性を増加させていることが明らかになっている⁹。以上のようにがん細胞における NF- κ B 活性化が、がんの細胞死を妨げる様々な要因となっていることがわかっている。したがって、がん治療を効率的に行ううえで、抗がん剤などにより誘導される細胞死を亢進させるために NF- κ B 阻害剤を併用することは、有望な治療法として期待されている⁸。

既知の NF- κ B 阻害物質としては、*Tanacetum parthenium* から単離された parthenolide¹⁰ や *Arnica montana* 及び *Arnica chamissonis* より単離される helenalin¹¹ などが知られている (図 3-4)。これら

の化合物の共通点は、 α -メチレン γ -ラクトン環を有するセスキテルペノイドであることである。 α -メチレン γ -ラクトン環は、NF- κ B の構成因子である p65 に特異的な cystein 残基 (Cys³⁸) と Michael 付加型の結合を形成することが知られている¹²。

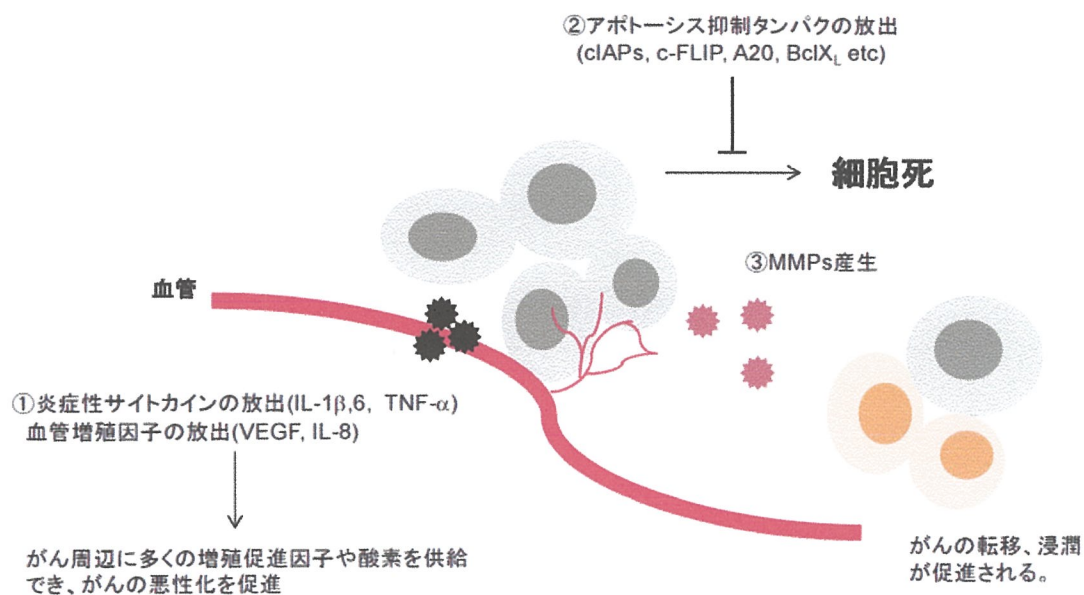


図 3-3 がん細胞における NF- κ B について

Cys³⁸ は、DNA に非常に近い位置に存在することが明らかになっており、この cystein 残基に阻害物質が結合することで、NF- κ B と DNA との結合が阻害された結果、NF- κ B 結合 *cis* エLEMENT の下流にある遺伝子の発現が阻害される。一方、epoxide のような官能基も NF- κ B の活性化を阻害することが知られている。2000 年に Umezawa らによって発見された DHMEQ は、低毒性な NF- κ B 阻害物質である。この DHMEQ は、抗生物質である epoxyquinomicin の骨格をもとにドラッグデザインされた¹³。その阻害機構は、Cys³⁸ の SH 基が epoxide を攻撃することで、NF- κ B と DNA との結合を阻害していることがわかっている。しかし、DHMEQ は体内に普遍的に存在するチオール基を有する化合物との反応性が高すぎることや難水溶性であることが問題となっている¹⁴。これらの NF- κ B / p65 における Cys³⁸ への特異的結合は、核内のみならず細胞質内でも起こっていることが知られており、I κ B の分解を抑え、NF- κ B の核内移行も阻害するという報告もある^{15, 16}。

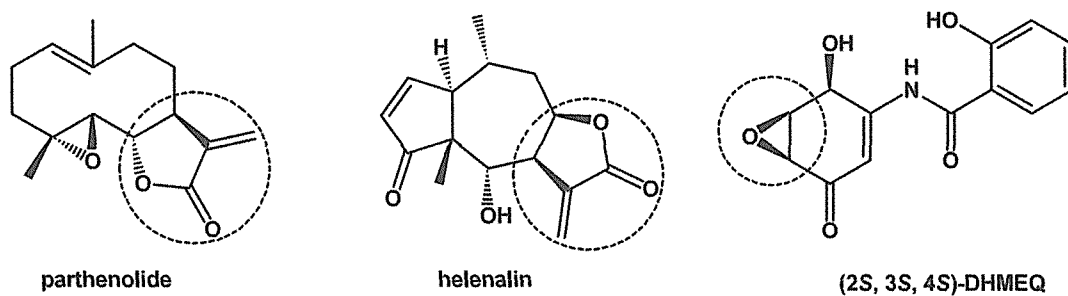


図 3-4 既知の NF-κB 阻害物質

このように NF-κB は、免疫応答や発がんなど様々な生命現象に深く関わる転写因子である。私は、この NF-κB に対する阻害物質を天然から探索することを目的とし本研究に着手した。今回、南米産植物 *S. culcitioides* 及び *C. echinata* の抽出物に、この NF-κB に対する阻害活性が認められたことから、両植物の成分検索を行い、得られた新規化合物それぞれに対して、NF-κB 阻害活性評価を行った。

第 1 章 実験材料及び方法

第 1 節 細胞の保存及び培養

セラムチューブ(Corning 社)中に凍結保存してある HeLa 細胞 (10 % DMSO) を解凍し、10 mL の MEM (Minimal Essential Medium) 培地を含む 15 mL コニカルチューブ(Corning 社) 移した。1000 rpm, 4 °C, 3 min 遠心分離後、上清を除去し、2 mL の培地で細胞を分散させ、13 mL の培地を入れた 100 mm 培養シャーレ (Corning 社) に移し、37 °C, 5 % CO₂ 存在下にて一晩培養した。Bacteria 等の混入がないことを確認し、必要に応じて培地交換・継代培養を行った。

第 2 節 形質転換株の作成

HeLa 細胞を 60 mm 培養シャーレに $2.0 - 8.0 \times 10^5$ の密度で播種した。24 時間後に、NF-κB 結合 *cis* エレメントの下流に分泌性アルカリホスファターゼ遺伝子 SEAP (Secreted Alkaline Phosphatase 遺伝子) を連結したプラスミド (pNF-κB-SEAP) と Luciferase (Luc) 遺伝子の組み込まれたプラスミド (pGL3) を HeLa 細胞に導入した (図 3-5)。

第 3 節 NF-κB 阻害活性評価

形質転換した HeLa 細胞を 96-well white plate (NUNC™ 社) に 125 μL/well 播種した。1 時間後に評価する化合物を入れ、さらに 30 分後、TNF-α を加え、37 °C, 5 % CO₂ 存在下にて培養した。このとき陽性対象には、強力な NF-κB 阻害剤である parthenolide を用いた。24 時間後、SEAP 活性測定及び Luc 活性測定をマイクロプレートリーダー (TECAN 社 infinite M1000) にて行った。この実験では、生成される SEAP の量が少ないほど加えた化合物が持つ NF-κB 阻害能が高いという

ことになる。また、各ウェルの細胞数の違いや化合物の細胞毒性による誤差を考慮するために、SEAP/Luc を算出することで補正を行った。なお、形質転換体のみでの測定値を blank とし、形質転換体に阻害剤を加えず、TNF- α で刺激したものを陰性対象とした。

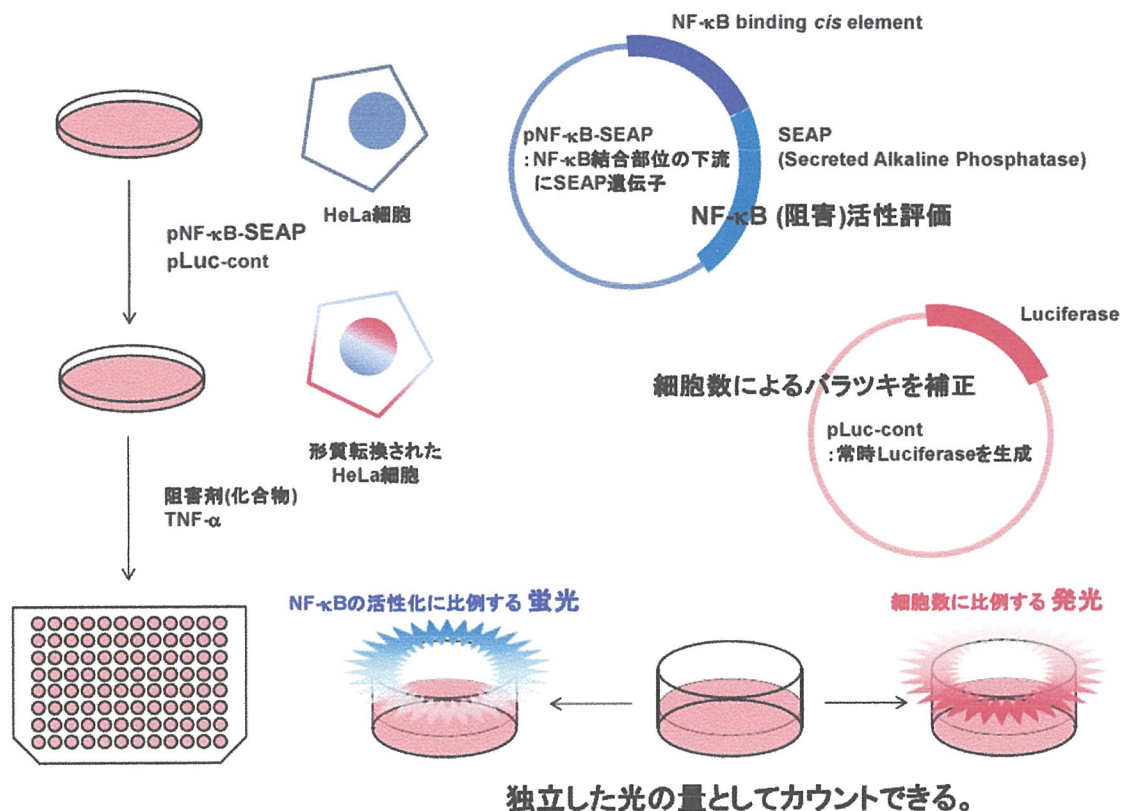


図 3-5 NF- κ B 阻害活性評価の概要

第 2 章 結果と考察

第 1 節 *S. culcitioides* 由来 *culcitiolide* 類の NF- κ B 阻害活性

今回単離された *culcitiolide* E - K に加えて、過去に当研究室で発見されていた *culcitiolide* A - D も合わせて合計 11 種の *eremophilane* 型セスキテルペノイドについて、NF- κ B 阻害活性を評価した。その結果、終濃度 20 μ M においては、*culcitiolide* C, D, E 及び H / I に強い阻害活性が観察された。一方、*culcitiolide* A / B, F / G, J 及び K に関しては、その阻害活性が 25 % 以下であった。20 μ M において強い阻害活性が見出された化合物を終濃度 5 μ M に希釈し、再度同様の阻害活性評価を行った。その結果、*culcitiolide* C に最も強い NF- κ B 阻害活性を見出すことができた。

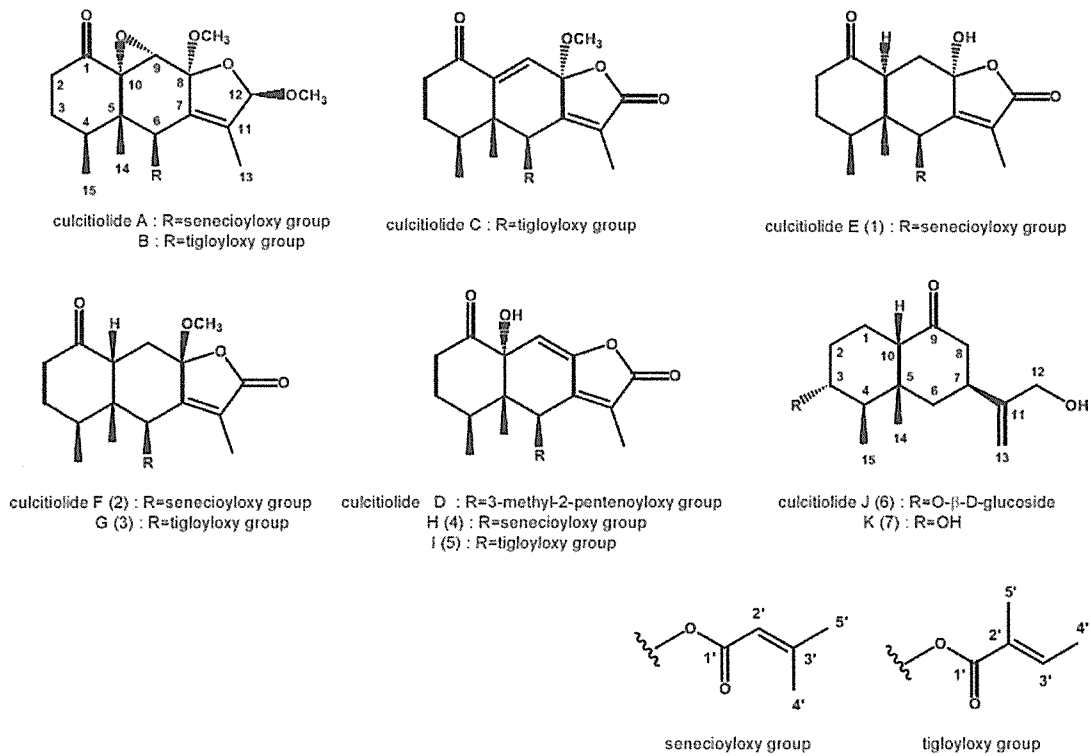


図 3-6 *S. culcitioides* 由来の新規化合物

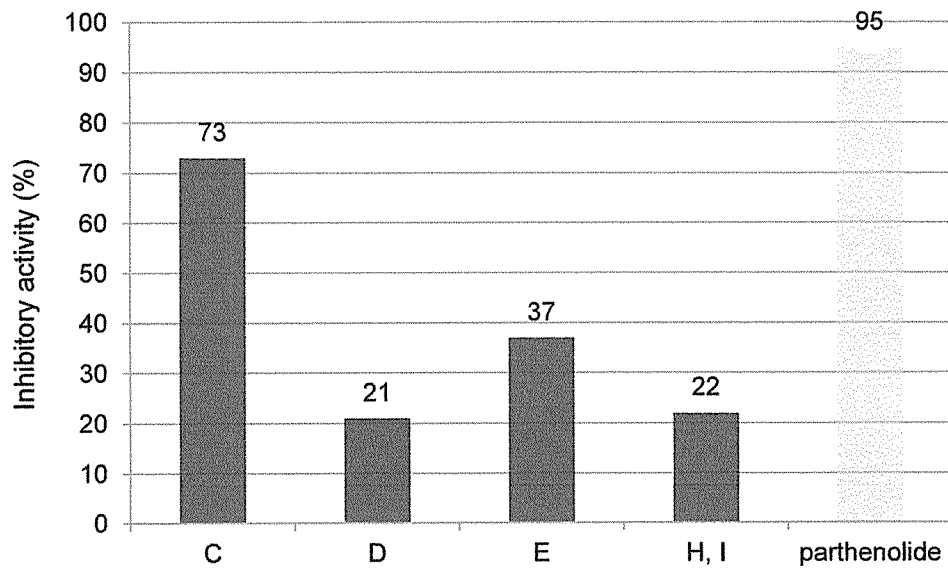


表 3-1 *S. culcitioides* 由来活性物質の NF-κB 阻害活性 (5 μM)

第2節 *C. echinata* 由来 echialide 類の NF-κB 阻害活性

echinalide については、過去に当研究室で発見されたものも含め合計 21 種類の化合物 (echinalide A - U) を評価した。echinalide も culcitiolide と同様にまず、終濃度 20 μM で評価し、50 % 以上の阻害活性を示した化合物 (echinalides C, D, E, F, G, H, L 及び M) を 5 μM に希釈し、再度検討した。その結果、echinalide C 及び D に 70 % を超える強い活性を見出すことができた。

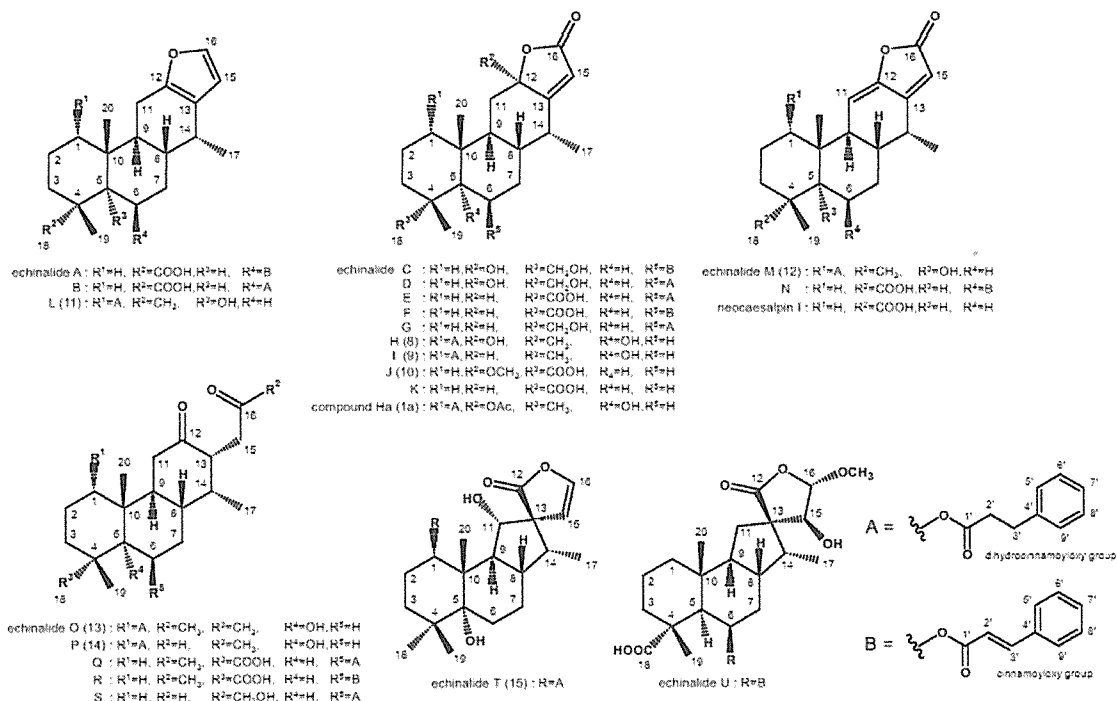


図 3-7 *C. echinata* 由来の新規化合物

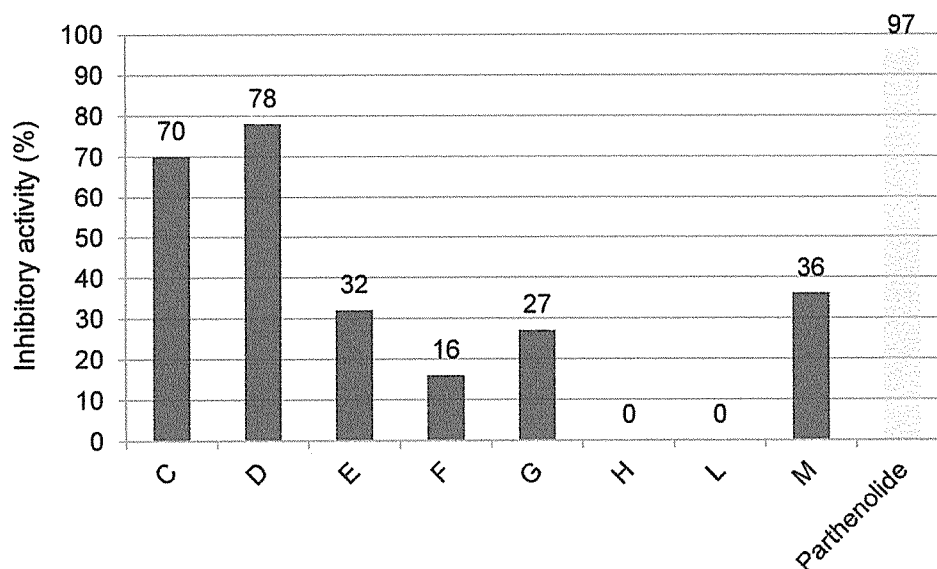


表 3-2 *C. echinata* 由来活性物質の NF-κB 阻害活性 (5 μM)

第3節 考察

既知の NF- κ B 阻害剤である parthenolide^{17, 18} や helenalin¹¹ に代表されるセスキテルペンラクトン (Sesquiterpene Lactone; SLs) は, NF- κ B の構成因子である p65 に特異的な cystein 残基 (Cys³⁸ 及び Cys¹²⁰) と Michael 付加型の結合を形成することで, NF- κ B と DNA の結合を阻害していることが知られている¹². 今回, 阻害活性を示した culcitiolide 類 (culcitiolides C, D, E, H / I) は, parthenolide と同様 SLs であり, 分子内に α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有していることから, NF- κ B に直接結合することで, DNA との結合を阻害しているのではないかと考えられる. しかし, culcitiolide H, I の混合物は, α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有しているにもかかわらず, 阻害活性が著しく低下しており, culcitiolide H, I が *cis*-decalin 骨格を有することに起因するのではないかと推測している. 一方, echinalide 類についても parthenolide や culcitiolide と同様に α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有している化合物に比較的強い阻害活性が観測される傾向がある (echinalides C - H, L, M). このことから, echinalide 類は, セスキテルペノイドではないものの parthenolide と同様の機構で, NF- κ B 阻害活性を示していることが推測される. また, echinalide I, J, K, N のように α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有しているにもかかわらずその阻害活性が著しく低下しているものもあり, これらジテルペノイド類の NF- κ B 阻害機構は, α , β -不飽和 γ -ラクトン環のみでは, 説明できないことも明らかとなった.

第4節 結論

NF- κ B 阻害活性を示した南米産植物 *S. culcitioides* 及び *C. echinata* の成分検索を行った結果, それぞれ 7 種及び 8 種の新規化合物を得た (第 1 部). これら新規化合物の NF- κ B 阻害活性について検討したところ *S. culcitioides* 由来の化合物では, culcitiolide C に, *C. echinata* 由来の化合物では, echinalides C 及び D に非常に強い阻害活性が認められた. これらの化合物は, 共通して α , β -不飽和 γ -ラクトン環を有していることから, この部分構造が活性に関与していることを示すことができた. また, これまで一般的に NF- κ B 阻害活性を示すのは, セスキテルペンラクトン (SLs) であることが知られていたが, セスキテルペノイド以外の化合物でも α , β -不飽和 γ -ラクトン環が NF- κ B 阻害を示すことも明らかにできた. 以上の知見から, これらの化合物が抗炎症作用を有するシード化合物になり得る可能性を提示できたと考えている (図 3-8).

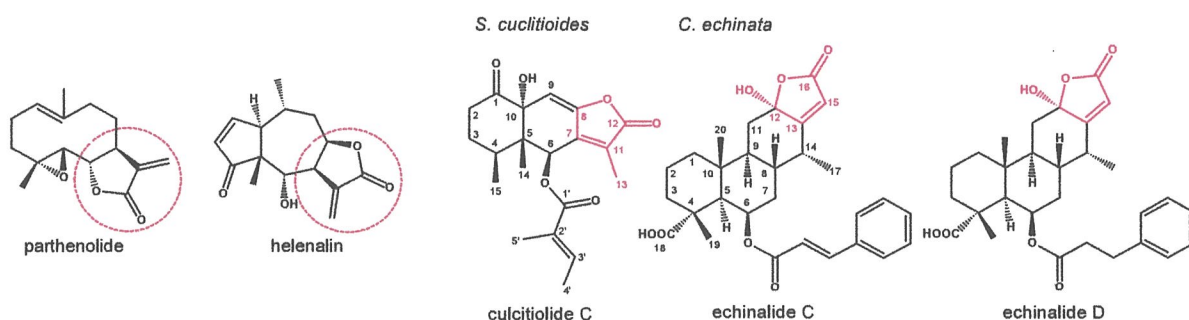


図 3-8 NF- κ B 阻害物質の構造活性相関

第3章 実験の部

使用した試薬は、特に記載のない限り特級試薬を用いた。

HeLa 細胞

HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞) は、ヒューマンサイエンス研究資源銀行より分譲されたものを用いた。

イーグル MEM 培地の作成

イーグル MEM 培地 (Minimal Essential Medium, ニッスイ[®]; 日本製薬株式会社) 4.7 g を 500 mL の超純水に溶かし、オートクレーブ (121 °C, 20 min) 滅菌した。室温に戻した後、10 % 牛胎児血清 [CS (Calf Serum): GIBCO Lot. 345452], ろ過滅菌した L-グルタミン 150 mg/10 mL, 10 % NaHCO₃ 9 mL (別途, 蒸気滅菌が必要), 非必須アミノ酸溶液 5 mL を加え, 調製した。CS は, 37 °C の水浴で溶解し, 56 °C で 30 分間熱処理することにより非動化した。非動化後, 100 mL ずつ分注し使用直前まで -2 °C 保存したものを使用した。作成した MEM 培地は, 4 °C の冷蔵庫で保管した。

トリプシン溶液調製

Trypsin (GIBCO 社) 0.5 g, EDTA·3Na 0.2 g を PBS (-) で 1.0 L にし, 4 °C で 16 時間攪拌した。完全に溶解したことを確認した後, ろ過滅菌を行った。

PBS (-) 溶液調製

NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g, KH₂PO₄ 0.2 g を超純水 1.0 L で溶解し, オートクレーブ (121 °C, 20 min) 滅菌した。

継代培養

100 mm 培養シャーレの培地を除去し, PBS (-) で 2 回洗浄し, トリプシン処理により細胞を 15 mL コニカルチューブに回収した。1000 rpm, 4 °C, 3 min 遠心分離後, 上清を除去し, 2 mL の培地を加え細胞を分散後, 13 mL の培地を入れた 100 mm 培養シャーレに希釈倍率を決めて播き, 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で培養した。細胞の増殖に応じて継代培養を行った。

形質転換

形質転換方法については, Effectene Transfection Reagent (QIAGEN 社) のプロトコールに従った。すなわち, エッペンドルフチューブに, プラスミド [pNF-κB-SEAP (2.7 μL), pLuc-count (4.2 μL)] を入れ, Buffer EC 150 μL を加えた。その後, Enhancer 16 μL 加え, ボルテックスにて約 1 秒間遠心させた。約 2 分間静置後に Effectene 25 μL を加え, 約 10 秒間ボルテックスにて遠心し, 約 5 分間静置させた。その後, 2 回程度ピペッティングを行い, 4 mL の MEM 培地を入れた 60 mm 培養シャーレにプラスミドを含む溶液を加え, 16 - 18 時間 37 °C, 5 % CO₂ 存在下で保管した。

NF- κ B 阻害活性評価

形質転換した HeLa 細胞を含む 60 mm 培養シャーレの培地を除去し、PBS (-) で 2 回洗浄後、トリプシン処理により細胞を回収した。1000 rpm, 4 °C, 3 min. の条件で遠心分離後、上清を除去し、2.5 mL の培地を加え、細胞を分散させた。6 mL の MEM 培地を入れてあるリザーバーに懸濁液を加え、96-well white plate (NUNC™ 社) に 125 μ L/well 播種した。なお、使用するプレートは、あらかじめ外枠の 36 穴 (1, 12 行及び A, H 列) に、125 μ L/well ずつ MEM 培地のみを入れたものを使用し、それより内側の 60 穴に細胞を播種した。1 時間後に評価する化合物を入れ、さらに 30 分後、500 μ g/mL の TNF- α を加え、37 °C, 5 % CO₂ 存在下にて培養した。24 時間後、SEAP 活性測定及び Luc における蛍光強度測定をマイクロプレートリーダーにて行った。

Luciferase 活性測定

被験試料添加から 24 時間後、96-well white plate から細胞培養液を 25 μ L/well 回収し、新たに用意した 96-well white plate に移した。残りの 100 μ L/well に Luciferase 活性測定用溶液を 100 μ L/well 添加し、マイクロプレートリーダーにて発光強度を測定した。なお、マイクロプレートリーダーにプレートを挿入後、15 - 20 程度放置してから測定を開始した。

Luciferase 活性測定用溶液の調製

60 mM Tricine - NaOH (pH 7.8), 16 mM (MgCO₃)₄ Mg (OH)₂ · 5H₂O (塩基性 MgCO₃), 0.4 mM EDTA, 10 % Surfact - Amps × 100 (Thermo), 0.5 mM D-luciferin potassium salt (ナカライテスク), 1.5 mM adenosine 5'-triphosphate (Sigma), 0.5 mM coenzyme A (Sigma), 0.1 mM β -mercaptoethanol を超純水で調製し、10 mL 程度ずつ分注して、使用直前まで -20 °C で保存した。

SEAP 活性測定

(被験試料添加から 24 時間後) 96-well white plate から回収した細胞培養液を 25 μ L/well に 1 × dilution buffer 25 μ L/well を添加し、セロハンテープで蓋をした後、約 30 分間、65 °C で放置した。96-well white plate を室温に戻し、assay buffer 90 μ L/well を添加し、穏やかに振盪させた。25 °C で 5 分間放置し、MUP (4-methyl umbelliferyl phosphate) solution 10 μ L/well を加え、暗所にて 60 分間反応させ、4-methylumbeliferone に基づく蛍光強度 (Ex = 360 nm, Em = 460 nm) の測定を行った。

1 × dilution buffer の調製

NaCl 4.38 g, Tris 2.42 g を 90 mL の超純水で溶解した。12N-HCl を加えて pH 7.2 に調整し、使用直前まで 4 °C で保管した (5 × dilution buffer)。使用する直前に 5 × dilution buffer を H₂O で希釈した。

assay buffer の調製

L-homoarginine 0.9 g, MgCl₂ 0.04 g を超純水 158 mL に溶解し、diethanolamine 42 mL を加えた。12N-HCl を加えて、pH 9.8 に調整し、使用直前まで 4 °C に保管した。

MUP solution の調製

5 × dilution buffer 2.7 mL/well, assay buffer 7 mL/well, 10 × MUP 0.3 mL/well を混ぜた。10 × MUP は、4-methylumbelliferyl phosphate (MUP) 2.56 mg を超純水で溶解し、使用直前まで 4 °C に保管した。

参考文献 (第 2 部)

1. Iguchi, Y. H.; Awakami, S. K.; Ashida, M. H., *Yakugaku Zasshi*, **2008**, *128* (2), 209-218.
2. 中野 裕康; 中島 章人, *実験医学*, **2007**, *25* (8), 1190-1194.
3. Ghosh, S.; May, M. J.; Kopp, E. B., *Annu. Rev. Immunol.*, **1998**, *16*, 225-260.
4. Siebenlist, U.; Brown, K.; Claudio, E., *Nat. Rev. Immunol.*, **2005**, *5* (6), 435-45.
5. 山岡 昇司, *実験医学*, **2007**, *25* (8), 1185-1189.
6. Huang, T. T.; Wuerzberger-Davis, S. M.; Seufzer, B. J.; Shumway, S. D.; Kurama, T.; Boothman, D. A.; Miyamoto, S., *J. Biol. Chem.*, **2000**, *275* (13), 9501-9.
7. Hoesel, B.; Schmid, J. A., *Mol. Cancer*, **2013**, *12*, 86.
8. Patel, N. M.; Nozaki, S.; Shortle, N. H.; Bhat-Nakshatri, P.; Newton, T. R.; Rice, S.; Gelfanov, V.; Boswell, S. H.; Goulet, R. J.; Sledge, G. W.; Nakshatri, H., *Oncogene* **2000**, *19* (36), 4159-4169.
9. Kesanakurti, D.; Chetty, C.; Bhoopathi, P.; Lakka, S. S.; Gorantla, B.; Tsung, A. J.; Rao, J. S., *PLoS One* **2011**, *6* (5), e19341.
10. Kwok, B. H.; Koh, B.; Ndubuisi, M. I.; Elofsson, M.; Crews, C. M., *Chem. Biol.*, **2001**, *8* (8), 759-66
11. Lyss, G.; Knorre, A.; Schmidt, T. J.; Pahl, H. L.; Merfort, I., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273* (50), 33508-16.
12. García-Piñeres, A. J.; Castro, V.; Mora, G.; Schmidt, T. J.; Strunck, E.; Pahl, H. L.; Merfort, I., *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276* (43), 39713-20.
13. 梅沢 一夫; 須貝 威, *化学と生物* **2011**, *49* (6), 406-414.
14. 中後 孝洋, 高山 敢, 折井 雅和, 安井 英子, 今村 保忠, 南雲 紳史, 第 57 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 要旨集, **2013**, 82-84.
15. Ariga, A.; Namekawa, J.; Matsumoto, N.; Inoue, J.; Umezawa, K., *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277* (27), 24625-30.
16. Hehner, S. P.; Heinrich, M.; Bork, P. M.; Vogt, M.; Ratter, F.; Lehmann, V.; Schulze-Osthoff, K.; Droge, W.; Schmitz, M. L., *J. Biol. Chem.*, **1998**, *273* (3), 1288-97.
17. Govindachari, T. R.; Joshi, B. S.; Kamat, V. N., *Tetrahedron* **1965**, *21* (6), 1509-1519.
18. Quick, A.; Rogers, D., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1976**, *4*, 465-465.

総括

天然物より生理活性を示す化合物を探索することは極めて重要であり、これらの化合物の構造多様性は、現在でもその魅力を失っていない。特に南米では、生物多様性が非常に進んでおり、未だに成分未解明の植物が多く生息しているとされていることから、当研究室では、南米産の薬用植物の成分探索を継続してきた。その中でも私は、様々な生命現象において重要な役割を果たす NF- κ B に着目し、その阻害活性を有する化合物を探索に着手し、以下の知見を得た。

1. 南米産キク科植物 *Senecio culcitioides* Sch. Bip. 由来の新規化合物

南米産キク科植物 *S. culcitioides* の幹部メタノール抽出物から 7 種の新規 eremophilane 型セスキテルペノイドを見出した。それらの化学構造については、2 次元 NMR スペクトルを含む各種スペクトルデータを詳細に解析することで決定し、それぞれを *culcitiolides* E - K と命名した。そのうち、*culcitiolide* J については本植物抽出物の約 5% に相当し、本植物の主成分であると考えられ、そのアグリコンである *culcitiolide* K も新規化合物であった。

2. 南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. 由来の新規化合物

南米産マメ科植物 *C. echinata* の幹部アセトン抽出物からは、新規 *cassane* 型ジテルペノイド 8 種を見出し、*echinalides* H, I, J, L, M, O, P 及び T と命名した。これらのうち *echinalide* T に関しては、*cassane* 型ジテルペノイドから派生した γ -スピロラク톤を有する化合物であり、構造化学的な観点から非常に興味深く、これらの生合成仮説についても検討した。

3. 新規化合物の NF- κ B 阻害活性

これらの化合物に対して、NF- κ B 阻害活性評価を行ったところ、*culcitiolide* C, *echinalide* C および D に特に強い NF- κ B 阻害活性を見出した。さらに、これらの活性物質は共通部分構造として、 α , β -不飽和 γ -ラク톤環を有していることも明らかにした。*parthenolide* に代表される既知の NF- κ B 阻害剤は、 α -メチレン γ -ラク톤環が活性に寄与するということが知られており、これらの化合物は、*parthenolide* 同様の作用機構で NF- κ B の活性化を阻害していると推測している。

以上の結果から、南米産薬用植物 *S. culcitioides* および *C. echinata* の薬用植物としての有用性を示すことができた。なお、*S. culcitioides* の抽出液より単離された化合物の合計は、約 3.5 g となり、これらが示す NF- κ B 阻害活性は、抽出液が示した阻害活性の約 21.4% に当たる。一方、*C. echinata* の抽出液より単離された化合物の合計は約 559 mg であり、これらの NF- κ B 阻害活性の合計は、抽出液全体の NF- κ B 阻害活性の 0.02% にしか満たない。したがって、本植物抽出液が示す NF- κ B 阻害活性を有する成分の更なる探索が期待される。

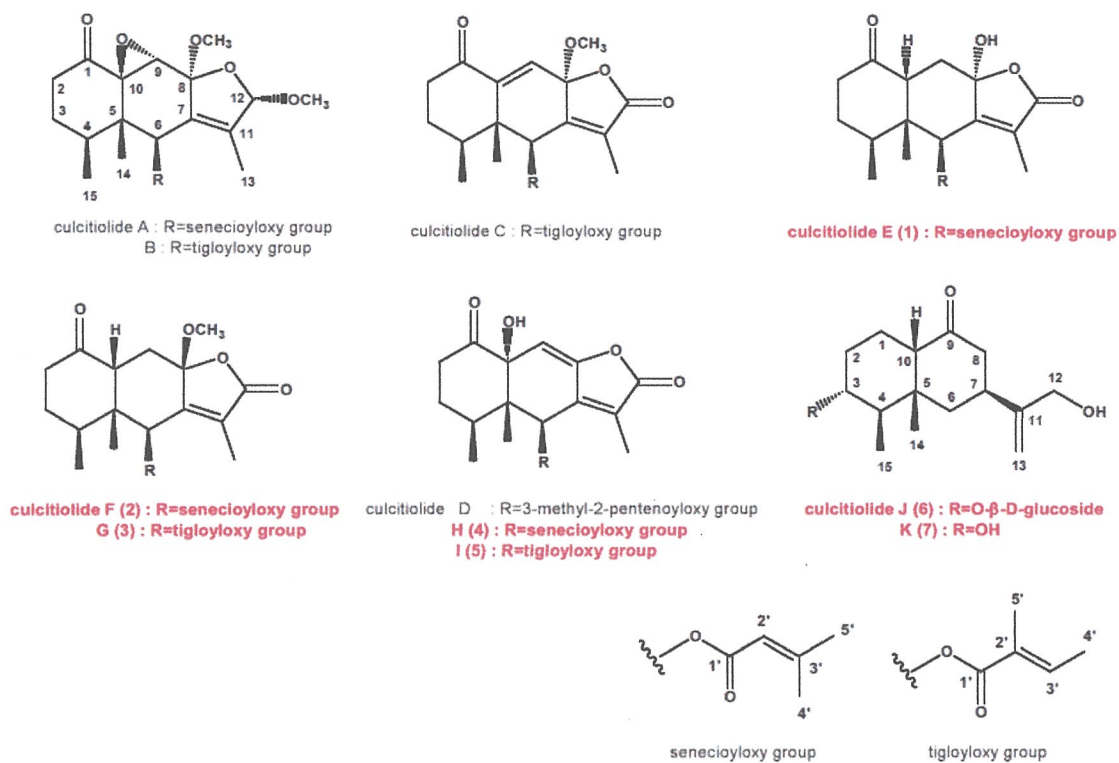


図 4-1 *S. calcitrioides* より単離された新規 eremophilane 型セスキテルペノイド

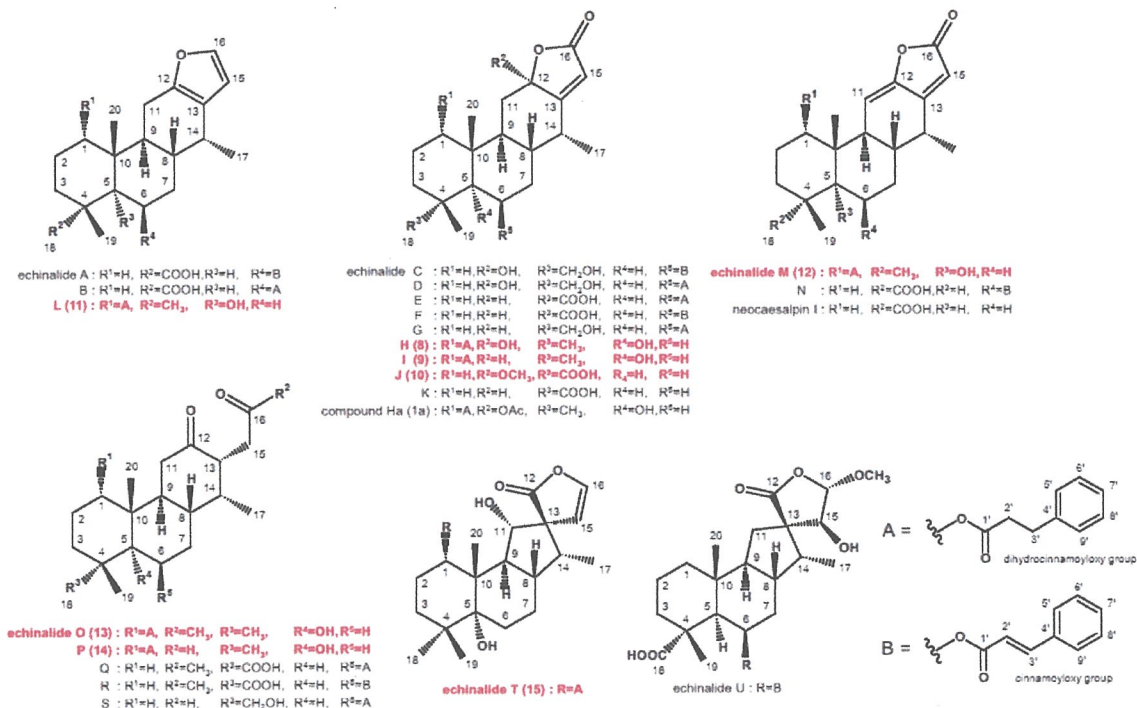


図 4-2 *C. echinata* より単離された新規 cassane 型ジテルペノイド

業績

学会発表 (本人発表分のみ)

- 1) 光井太一, 石原理紗, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の新規テルペノイドについて(その 2)
第 56 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (鹿児島) 2012 年 10 月
- 2) 光井太一, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の新規ケサン型ジテルペノイドについて
第 57 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (埼玉) 2013 年 10 月
- 3) 光井太一, 織田啓介, 千葉さおり, 天野政之, 松浦信康, 林謙一郎, 野崎浩
Baccharis genistelloides の新規テルペノイドについて
2013 年 日本化学会 中国四国支部大会 (広島) 2013 年 11 月
- 4) 光井太一, 城戸雅裕, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Pau ferro* 由来フラボノイド類の多様な生理活性について
2014 年 日本化学会 春季年会 (名古屋) 2014 年 03 月
- 5) 光井太一, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
Caesalpinia echinata の Cassane 型ジテルペノイドおよびその誘導体に関する研究
第 58 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (和歌山) 2014 年 09 月
- 6) 光井太一, 高谷恭平, 城戸雅裕, 角本和行, 林謙一郎, 窪木厚人, 大平進, 池田正五, 松浦信康, 谷弘幸, 飯沼宗和, 赤尾幸博, 野崎浩
Caesalpinia ferrea Mart. の新規ポリフェノール類の構造と活性
第 57 回 天然有機化合物討論会 (高知) 2014 年 10 月

国際学会

- 1) Taichi Mitsui, Ken-ichiro Hayashi, Nobuyasu Matsuura, Hiroshi Nozaki
Eremophilane-type sesquiterpenoids of South America plant *Senecio culcitioides* Sch. Bip. Exhibiting Nuclear factor κ B inhibition
International Conference on Biologically Active Substances Bioactive Okayama 2012 –Food and Health- (Okayama, Japan) September, 2012
- 2) Taichi Mitsui, Ken-ichiro Hayashi, Nobuyasu Matsuura, Shogo Ikeda, Shinji Kawano, Kuo-Hsiung Lee, Munekazu Iinuma, Yukihiko Akao, Hiroshi Nozaki
Bioactive diversity of resveratrol derivatives and relative compounds
Resveratrol 2014 3rd international conference of resveratrol and health (Hawaii) November to December, 2014

※その他の共同研究成果

- 1) 横川快明, 光井太一, 林謙一郎, 香川直也, 松浦信康, 窪木厚人, 大平進, 野崎浩
イソマツ科 *Plumbago zeylanica* の新規化合物の構造、合成および活性に関する研究
第 56 回香料テルペンおよび精油成分に関する討論会 (鹿児島) 2012 年 10 月
- 2) 石原理紗, 光井太一, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の新規テルペノイドについて (その 1)
第 56 回香料テルペンおよび精油成分に関する討論会 (鹿児島) 2012 年 10 月
- 3) 石原理紗, 光井太一, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の新規ジテルペノイドおよび生理活性
2013 年 日本化学会 春季大会 (滋賀) 2013 年 3 月
- 4) 宮地千尋, 光井太一, 横川快明, 林謙一郎, 大平進, 窪木厚人, 野崎浩
イソマツ科 *Plumbago zeylanica* のナフトキノン誘導体の合成
2014 年 日本化学会 中国四国支部大会 (山口) 2014 年 11 月
- 5) 石村悠, 光井太一, 豊原正絵, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
イソマツ科 *Plumbago zeylanica* の新規ナフトキノン誘導体の構造と活性
2014 年 日本化学会 中国四国支部大会 (山口) 2014 年 11 月
- 6) 織田啓介, 光井太一, 千葉さおり, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産キク科植物 *Baccharis genistelloides* の新規テルペノイド
2014 年 日本化学会 中国四国支部大会 (山口) 2014 年 11 月

受賞

- 1) 光井太一, 林謙一郎, 松浦信康, 野崎浩
南米産マメ科植物 *Caesalpinia echinata* Lam. の新規ケサン型ジテルペノイドについて
第 57 回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (埼玉) 2013 年 10 月
ベストプレゼンテーション賞受賞

学術論文 (査読有)

- 1) Hiroshi Nozaki, Ken-ichiro Hayashi, Mikiko Kawai, Taichi Mitsui, Masahiro Kido, Hiroyuki Tani, Daisuke Takaoka, Hidemitsu Uno, Susumu Ohira, Atsuto Kuboki and Nobuyasu Matsuura
Culcitolide A-D, Four New Eremophilane-Type Sesquiterpene Derivatives from *Senecio culcitioides*
Natural Product Communications, **2012**, 7(4), 427-430
- 2) Ken-ichiro Hayashi, Naoyuki Kusaka, Kazuki Ando, Taichi Mitsui, Takashi Aoyama, Hiroshi Nozaki
Design and synthesis of photolabile caged cytokinin
Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, **2012**, 22(17), 5663-5667
- 3) Taichi Mitsui, Ken-ichiro Hayashi, Mikiko Kawai, Masahiro Kido, Hiroyuki Tani, Daisuke Takaoka, Nobuyasu Matsuura and Hiroshi Nozaki
Culcitolide E-J, Six New Eremophilane-Type Sesquiterpene Derivatives from *Senecio culcitioides*
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, **2013**, 61(8), 816-822
- 4) Susumu Ohira, Kyouhei Takaya, Taichi Mitsui, Masahiro Kido, Kazuyuki Kakumoto, Ken-ichiro Hayashi, Atsuhito Kuboki, Hiroyuki Tani, Shougo Ikeda, Munekazu Iinuma, Yukihiro Akao and Hiroshi Nozaki
New chalcon dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart. act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II
Tetrahedron Letters, **2013**, 54, 5052-5055
- 5) Taichi Mitsui, Risa Ishihara, Ken-ichiro Hayashi, Mitsuhsa Sunadome, Nobuyasu Matsuura and Hiroshi Nozaki
New Cassane-type diterpenoids of *Caesalpinia echinata* (Leguminosa) exhibiting NF- κ B inhibitory activities
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, **2014**, 62(3), 267-273
- 6) Susumu Ohira, Yoshiaki Yokogawa, Shinji Tsuji, Taichi Mitsui, Tatsuhiko Fukukawa, Ken-ichiro Hayashi, Atsuhito Kuboki, Nobuyasu Matsuura, Munekazu Iinuma and Hiroshi Nozaki
New naphthoquinone and monoterpenoid from *Plumbago zeylanica*
Tetrahedron Letter, **2014**, 48(26), 6554-6556
- 7) Taichi Mitsui, Risa Ishihara, Ken-ichiro Hayashi, Nobuyasu Matsuura, Haruo Akashi and Hiroshi Nozaki
Cassane Type Diterpenoids from *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) and their NF- κ B signaling inhibition activities
Phytochemistry, under review

謝辞

本論文は、私が博士課程後期の 3 年間で研究した成果をまとめたものです。本研究を遂行し、まとめるにあたって、実に多くの方にお世話になりました。この場を借りて、謝辞を述べさせていただきます。

まず、主査を務めていただいた本学生物化学科 教授 野崎 浩 先生、副査を努めていただいた同教授 林 謙一郎 先生には、本研究を行うにあたり実験操作の基礎から学会発表、論文作成に至るまで終始御懇篤な指導と御鞭撻を賜りました。深甚なる感謝の意を表します。

岡山理科大学理学部教授 大平 進 先生、同教授 濱田 博喜 先生、同教授 星野 卓二 先生ならびに立教大学 教授 黒田 智明 先生におかれましては、副査を引き受けていただきました。心より感謝の意を表します。

愛媛大学教育学部 教授の高岡 大輔 先生をはじめ、同准教授 谷 弘幸 先生そして城戸 雅裕 さん、城戸(川井) 美貴子さんには *Senecio culcitioides* Sch. Bip. の成分研究に関して、様々なアドバイスを頂きました。深く感謝いたします。

本学臨床生命科学科 准教授 松浦 信康 先生には NF- κ B 阻害活性についての技術指導を賜り、ここに厚く御礼申し上げます。また、研究内容のみならず多くの的確なアドバイスを頂き、活発な議論にお付き合いくださいました。本研究を大きく推し進める原動力となりました。心より感謝の意を表します。

X 線結晶構造解析の際には、本学化学科 教授 赤司 治夫 先生ならびに錯体構造機能研究室の皆様に多大なご協力を賜りました。研究以外の場所での交流でも大変お世話になり、学生生活の良い思い出となりました。心から感謝申し上げます。

そして、同研究室 修士課程修了の石原 理紗さんには、*Caesalpinia echinata* Lam. の成分研究における先行研究に尽力していただきました。その他、この場で具体的に名前を挙げきれていない岡山理科大学 理学部 生物化学科 天然物活性構造化学研究室で私と時を同じく在籍された皆様様に終始温かい励ましとご支援を賜りました。特に研究の合間の何気ない会話を交わすことも、研究生活の楽しみの一つで、研究活動において非常に大きな活力となりました。誠にありがとうございました。皆様には、心身ともに支えていただき、私生活でも大変お世話になりました。

最後に、私が博士課程後期に進学することに対して理解と献身的な協力をいただき、大学院生活を精神的、経済的に支えていただいた両親、研究するにあたり助言、指導していただいたすべての皆様に深く感謝いたします。

2015 年 3 月

光井 太一