

熱帯雨林産植物 *Laetia corymbulosa* と *Hernandia nymphaeifolia* からの新規生理活性物質の探索

著者	スマイルジャン エメット
著者別表示	Simayijiang Aimaiti
雑誌名	博士論文本文Full
学位授与番号	13301甲第4889号
学位名	博士(創薬科学)
学位授与年月日	2019-03-22
URL	http://hdl.handle.net/2297/00058905

doi: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.joc.7b02951>

熱帯雨林産植物 *Laetia corymbulosa* と *Hernandia nymphaeifolia*

からの新規生理活性物質の探索

SIMAYIJIANG AIMAITI

2019年1月11日

博 士 論 文

熱帯雨林産植物 *Laetia corymbulosa* と *Hernandia nymphaeifolia*

からの新規生理活性物質の探索

金沢大学大学院医薬保健総合研究科

創薬科学専攻

分子生薬学研究室

学 籍 番 号 : 1629012005

氏 名 : SIMAYIJIANG AIMAITI

主任指導教員名 : 後藤 (中川) 享子

略語表

本論文中において、以下の略語を用いた。

Api:	apiose
Ac:	acetyl
<i>n</i> -BuOH:	normal butanol
brs:	broad singlet
brd:	broad doublet
CDCl ₃ :	deuterated chloroform
CD ₃ OD:	deuterated methanol
CHCl ₃ :	chloroform
CH ₂ Cl ₂ :	dichloromethane
COSY:	correlation spectroscopy
d:	doublet
dd:	double doublet
ddd:	double double doublet
DMAP:	<i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMSO:	dimethyl sulfoxide
dt:	double triplet
EIMS:	electron ionization mass spectrometry
EtOAc:	ethyl acetate
ECD:	electron circular dichroism
HRFABMS:	high resolution fast atom bombardment mass spectrometry
Fr.:	fraction
Glc:	glucose
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMBC:	heteronuclear multiple bond coherence
HMQC:	heteronuclear multiple quantum correlation
HPLC:	high performance liquid chromatography
Hz:	hertz
<i>J</i> :	coupling constant
m:	multiplet
MDR:	multiple drug resistance
MPLC:	medium pressure liquid chromatography
NGF:	nerve growth factor
NMR:	nuclear magnetic resonance
NOESY:	nuclear Overhauser effect spectroscopy
ODS:	octadecyl silyl
OMe:	methoxy

pTLC:	preparative thin layer chromatography
RPMI-1640	roswell park memorial institute medium 1640
t:	triplet
td:	triple doublet
TRAIL:	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
TLC:	thin layer chromatography
s:	singlet
sep:	septet
1D NMR:	1 dimensions nuclear magnetic resonance
2D NMR:	2 dimensions nuclear magnetic resonance
δ :	NMR chemical shift (ppm)

熱帯雨林産植物 *Laetia corymbulosa* と *Hernandia nymphaeifolia* からの新規生理活性物質の探索

目次

序論	1
本論	4
第一章 <i>Laetia corymbulosa</i> からの新規生理活性物質の探索	4
第一節 <i>Laetia corymbulosa</i> について	4
第二節 <i>Laetia corymbulosa</i> の化学成分の単離・精製 ²²⁾	7
第三節 <i>Laetia corymbulosa</i> の化学成分の構造解析	8
第四節 ヒトがん細胞増殖抑制評価	20
第五節 小括	23
第六節 実験の部	24
第二章 <i>Hernandia nymphaeifolia</i> からの新規生理活性物質の探索	29
第一節 <i>Hernandia nymphaeifolia</i> について	29
第二節 <i>Hernandia nymphaeifolia</i> の化学成分の単離・精製	30
第三節 <i>Hernandia nymphaeifolia</i> の化学成分の構造解析	31
第四節 ヒトがん細胞増殖抑制評価	42
第五節 小括	43
第六節 実験の部	44
総括	49
謝辞	49
引用文献	51
NMR スペクトルデータ	55
第一章 <i>Laetia corymbulosa</i> から得られた新規化合物	55
第二章 <i>Hernandia nymphaeifolia</i> から得られた新規化合物	89

序論

植物を含むあらゆる生物は、それぞれ特有な酵素の働きにより多様な化合物を生合成しており、それらは一次代謝産物、二次代謝産物と大きく 2 つに分類される。一次代謝産物は細胞成長や発生、生殖などに直接関わる必須化合物の総称であり、アミノ酸、糖、糖アルコール、核酸や有機酸類などが挙げられる。二次代謝産物は天然物とも呼ばれ、自然界における生存戦略に必要な数々の生物機能を持っているが、生命現象に直接関与はしていない化合物の総称である。これらは他種に対して様々な生物活性を有することが多く、例えば細菌感染防御など他の生物から身を守る手段として重要な役割を果たしているものなどがある。人類は、植物・微生物等が生合成するこれら二次代謝産物を、医薬品を始め農薬、香料、染料、研究用試薬など様々な分野で活用してきた。また、このような生理活性天然物は、生命現象の解明にも重要な役割を果たしてきた。例えば、フグ毒として知られるアルカロイド、テトロドトキシンの発見は電位依存性ナトリウムチャネルの作用機構の解明に、またストレプトマイセス属から発見されたマクロライド、タクロリムス (FK506) は免疫機能の解明に寄与した。

医薬品開発においても、二次代謝産物は多大なる貢献をしてきた。古くから、様々な天然資源が伝統医薬として使われてきたが、その活性本体は主としてそれが生合成する二次代謝産物である。特に植物は、人類初の医薬品とも言われている。1897 年にヤナギの樹皮から単離したサリシンを元にアスピリンが誕生して以来、西洋医学では活性本体である天然物を単離し、必要であれば人工的な化学修飾を施して、医薬品としてきた。さらに、抗酸化活性を持つフラボノイド類など、人類の健康に役立つ有用成分も数多く発見されてきた。

植物からの天然物探索は 1900 年代後半には全盛期を迎え、日本を含む世界中で多くの研究者が新規生理活性物質の発見に精力を注いだ。地球上には 400,000 以上の高等植物が存在すると言われており¹⁾、驚くべきことに、天然物探索が

始まってから 200 年以上経つ現在でも、精査されたのは全体の 15%にも満たない。私達は、植物からの天然物の探索には未知の可能性が潜んでおり、有用な新規生理活性物質の発見ができると考えている。

一方、未だ新種が続々と発見される熱帯雨林地方は生物多様性に満ちており、医薬品シード化合物の宝庫ともいえる。熱帯雨林の占める割合は全地表の僅か 6-7%程度にもかかわらず、地球上の全生物種の半分以上が生息すると言われている。高温多湿の気候は多彩な生物種を生み出し、現在でも未発見種が数多く存在する一方で、自然破壊、気候変動によりその多くが絶滅の危機に曝されている。従って、新規生理活性天然物の発見に繋がる可能性がある熱帯林産植物の詳細な植物化学調査は、早急に行うべきだと考えられる。

本探索研究では、米国立がん研究所 (NCI) が所有する熱帯雨林産植物エキス 2 種を対象とした。生理活性評価の基準として、がん細胞に対する増殖抑制活性を選んだ。増殖抑制効果を示さない低毒性化合物は、抗がん以外の様々な生理活性評価に付すことができる。また、顕著ながん細胞増殖抑制効果を示すものは、抗がん剤シード候補となりうる。天然物からの抗がん剤探索は、ニチニチソウから単離したビンカアルカロイドが有望視された 1950 年代後半から本格化した。NCI は 1960 年後半から 1990 年代にかけ、温帯地域を中心として精力的に 8 万種の植物を各部位ごとに採取し、それらの抽出液に対して 60 種類の様々な臓器由来のヒトがん細胞を使いスクリーニング (NCI60 パネルスクリーニング) を行った。その結果、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度で有望ながん細胞増殖抑制効果が示したものは約 3 千種あり、そのうちの約 70%が熱帯雨林産の植物であったとしている。その後、パクリタキセルやカンプトテシンを含む様々な抗がん活性を示す多くの新規化合物が発見され、それらは現在でも中心的な抗がん剤として臨床で使用されている²⁾。

私達は NCI Natural Product Branch 前室長 Dr. David J. Newman と現室長である Dr. Barry R. O'Keefe の協力下、がん細胞増殖抑制効果が認められた熱帯雨林産

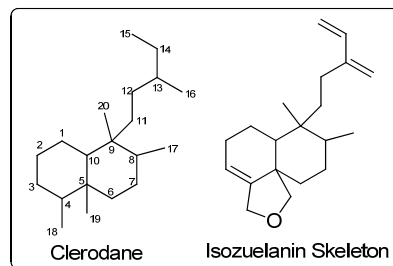
植物の抽出液 2 種 *Laetia corymbulosa* と *Hernandia nymphaeifolia* の詳細な含有天然物の単離・精製・構造決定ならびに生理活性評価を行うことを目的として研究を着手した。

本論

第一章 *Laetia corymbulosa* からの新規生理活性物質の探索

第一節 *Laetia corymbulosa* について

以前はヤナギ科に属していたイイギリ科は、二次代謝産物としてイソズエラニン骨格を有するクレロダンジテルペンを生合成する代表的な植物である³⁾。特に *Zuelania* と *Casearia* 属はイソズエラニン骨格を多く含む植物として知られている。例えば、*Z. guidonia* からは *esculentin A*、*zuelaguidins A-D* ならびに *F*⁴⁾、*C. nigrescens* から *caseanigrescens D*⁵⁾、*C. arguta* から *argutins A-H*⁶⁾、*C. membranacea* から *caseamembrins A-U*⁷⁻¹¹⁾、*C. balansae* から *caseabalansins A-G*¹²⁾ と *balanspenes A-H*¹³⁾、および *C. grewiifolia* から *caseagrewiifolins A* と *B*¹⁴⁾ が単離されている。これらの化合物は、シス型で縮環したデカリンの4位と5位に二置換テトラヒドロフランを有する三環系で、8位と9位にはメチル基がトランスで存在し、9位に3-メチレンペント-4-エン-1-イル側鎖を有するという特徴を持つ。これらの化合物群には8つの立体中心があるが、多くは NOESY などの 2D NMR スペクトルによる相対立体構造の決定のみで、絶対立体構造は決定された報告例は少ない^{6,9,13,14)}。また、これらのイソズエラニン骨格を持つクレロダンジテルペンは顕著な細胞毒性を示すことが知られている^{4,5,7-9,11,12,14)}。その他、NGF増強性¹³⁾、網膜Ca²⁺-ATPase阻害性¹⁵⁾、および TRAIL増感性⁶⁾などの生理活性が報告されている。



今回の研究対象である *Laetia* 属植物は、主にペルー、ブラジル、コロンビアなどの南米の熱帯地域に分布しており、これまでに35種が知られている¹⁶⁾。植物化学的な精査報告は僅かであり¹⁷⁻²¹⁾、特に *L. corymbulosa* については2000年 Beutler らの報告²⁰⁾ と2017年に当研究室の鈴木が報告²¹⁾ した2例のみである。前者の報告では *corymbulosins A-C* (**1-3**)、後者の報告では *corymbulosins D-H* (**4-8**) の単離・

構造決定が成されている (Figure 1)。

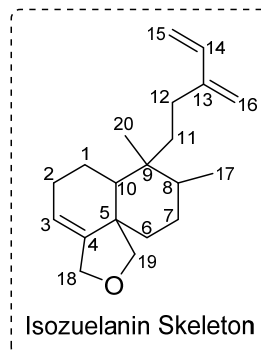
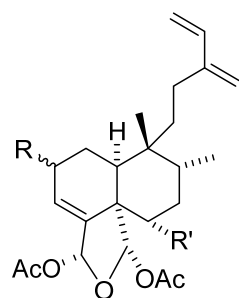
鈴木が使用した植物エキスは NCI より譲り受けたものである。本エキスは、*L. corymbulosa* の樹皮の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物(N005829)であり、NCI60 パネルスクリーニングにより抗がん活性があることが示唆された。さらにインハウスで行った 5 種のヒトがん細胞を用いた増殖抑制試験では、トリプルネガティブ乳がん細胞 MDA-MB-231 と鼻咽頭がん細胞 KB に対して特異的に強い活性を示した (Table 1)。

Table 1. Antiproliferative activity of MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) extract of *L. corymbulosa* (N005829)

	Cell line ^a (IC ₅₀ µg/ml)				
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	KB	KB-VIN
N005829	3.97	0.72	2.47	0.81	3.18
PXL ^b (nM)	6.53	8.36	12.13	7.07	2213.14

^aKB (epidermoid carcinoma of the nasopharynx), KB-VIN (P-gp-overexpressing MDR subline of KB), A549 (lung carcinoma), MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MCF-7 (ER-positive & HER2-negative breast cancer). ^bPaclitaxel

Corymbulosins D–H (**4–8**)の単離報告後、さらに鈴木は corymbulosins I (**9**) ならびに K–N (**10–13**) を単離・構造決定している (Figure 1)。本プロジェクトを引き続き、まだ未解析のフラクションを精製し、本植物のより詳細な化学成分を精査することとした。



	R	R'		R	R'
Corymbulosin A (1)		HO...	Corymbulosin H (8)	O=	
Corymbulosin B (2)	HO...		Corymbulosin I (9)		HO...
Corymbulosin C (3)	HO		Corymbulosin K (10)		MeO...
Corymbulosin D (4)	HO...		Corymbulosin L (11)		MeO...
Corymbulosin E (5)	HO...		Corymbulosin M (12)		MeO...
Corymbulosin F (6)	HO		Corymbulosin N (13)		MeO...
Corymbulosin G (7)	HO				

Figure 1. Structures of isolated diterpenes 1–13 from *L. corymbulosa*.

第二節 *Laetia corymbulosa* の化学成分の単離・精製²²⁾

前任者の鈴木により、*L. corymbulosa* の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物 (12.8 g) は水と酢酸エチルで液液分配され、水抽出物 (2.2 g) と酢酸エチル抽出物 (7.4 g) を得た。酢酸エチル抽出物は *n*-ヘキサン-酢酸エチルを溶出溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離し、5つのフラクション F1-5 を得た。鈴木は主に F1 と F5 のフラクションから単離・精製を繰り返し、corymbulosins A (1)²⁰⁾、D-H (4-8)²¹⁾、I (9)、ならびに K-N (10-13) を得ている (青色)。筆者は後を引き継ぐ形で、残りの F2-F4 について順相および逆相カラムクロマトグラフィーなどの各種クロマトグラフィーによる単離・精製を行い、11 種の新規を含む (赤色)、16 種の化合物を得た (Figure 2)。

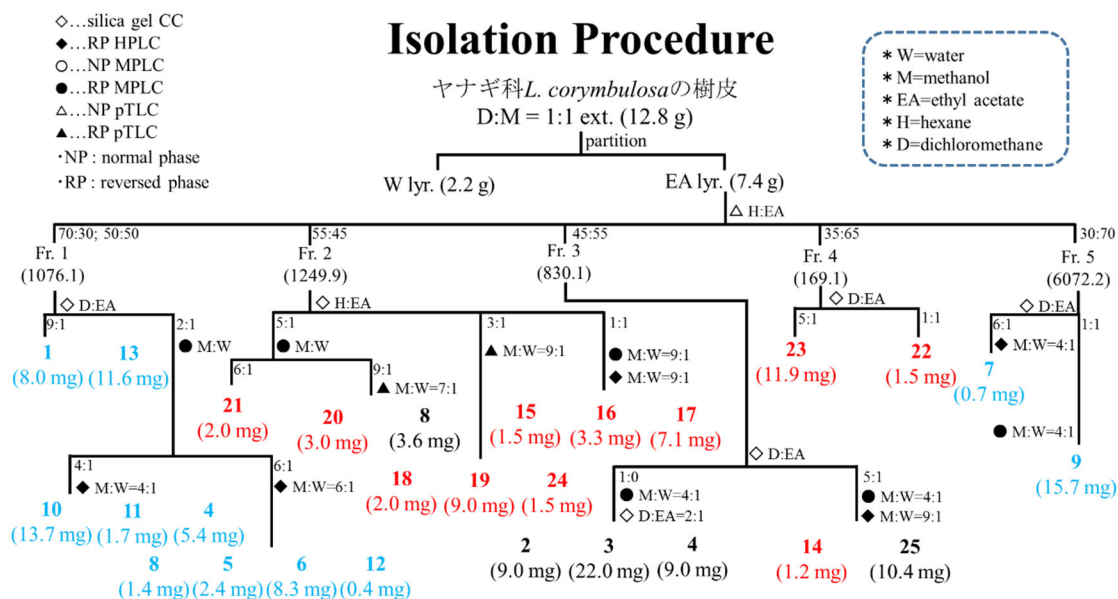
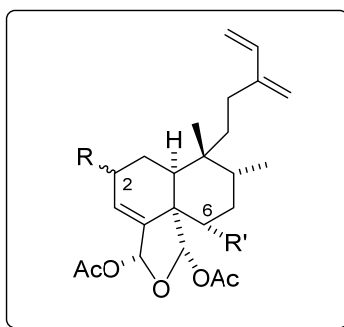


Figure 2. Isolation procedure of all compounds from *L. corymbulosa*.

第三節 *Laetia corymbulosa* の化学成分の構造解析

各種 NMR、MS などの解析により、得られた化合物は 11 種の新規イソズエラニン骨格を有するジテルペン、corymbulosins J (14)、O-S (15-19)、X (20)、および T-W (21-24) と既知化合物 corymbulosins B (2)²⁰、C (3)²⁰、D (4)²¹、H (8)²¹、および caseamembrin E (25)⁷ であると同定した (Figure 3)。全ての新規化合物の絶対立体構造は旋光度、ECD スペクトル、および改良モッシャーを用いて決定した (Figures 1, 3)。



	R	R'		R	R'
Corymbulosin J (14)		HO...	Corymbulosin X (20)		H
Corymbulosin O (15)		MeO...	Corymbulosin T (21)		H
Corymbulosin P (16)			Corymbulosin U (22)	HO...	H
Corymbulosin Q (17)			Corymbulosin V (23)	HO...	
Corymbulosin R (18)		H	Corymbulosin W (24)	O=	
Corymbulosin S (19)		H	Caseamembrin E (25)		HO...

Figure 3. Structures of isolated diterpenes (14-25) from *L. corymbulosa*.

新規化合物の構造解析

化合物 **14** は無色固体として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 527.2624 [$M + Na$]⁺、分子式 $C_{28}H_{40}O_8$ を示した。¹H NMR スペクトルデータ (Table 2A) から 2 つのメチル基 [δ_H 0.94 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-17), 0.95 (3H, s, H-20)]、2 つのビニルプロトン [δ_H 5.89 (1H, m, H-3), 6.43 (1H, dd, $J = 17.6, 10.5$ Hz, H-14)]、4 つのメチリデンプロトン [δ_H 5.22 (1H, d, $J = 17.6$ Hz, H-15a), 5.03 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, H-15b), 5.06 (1H, s, H-16a), 4.91 (1H, s, H-16b)]、18 位と 19 位に繋がった 2 つのアセトキシメチル [δ_H 2.07 (3H, s), 1.90 (3H, s)]、2 つのアセタール-アシルオキシメチンプロトン [δ_H 6.71 (1H, t, $J = 1.4$ Hz, H-18), 6.42 (1H, s, H-19)] とメチンプロトン [δ_H 2.35 (1H, dd, $J = 13.3, 2.3$ Hz, H-10)] のシグナルが観測され、同植物から単離された corymbulosins A–H と主な骨格が同じであることが示唆された^{20,21})。¹H および ¹³C NMR スペクトル (Tables 2A, 3) による更なる精査で、オキシメチン [δ_H 4.00 (1H, m)/ δ_C 74.3, C-6]、脂肪族部分 [δ_H 2.56 (1H, sep, $J = 7.3$ Hz), 1.19 (6H, d, $J = 7.3$ Hz)/ δ_C 34.1, 18.9, 18.7, C-2', 3'] とカルボニル炭素 (δ_C 177.1, C-1') のシグナルが見られたこと、また HMBC と COSY の相関 (Figure 4) の結果、6 位にヒドロキシ基と 2 位にイソブタノイルオキシ基が付加していることが推察された。H-1/H-6、H-2/H-10、H-6/H-8、H-7/H-19、H-10/H-12 および H-11/H-19 の NOESY 相関 (Figure 5) が見られたことから相対立体構造を決定した。ECD スペクトルデータ (Figure 6) は鈴木が絶対立体構造を決定した化合物 **3**²¹) と一致していることから絶対立体構造を決定し、化合物 **14** は (2*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-6-hydroxy-2-isobutanoyloxycyclo-3,13(16),14-triene であり、corymbulosin J と命名した。

化合物 **15** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 555.2921 [$M + Na$]⁺、分子式 $C_{30}H_{44}O_8$ が観測された。¹H と ¹³C NMR のスペクトルデータ (Tables 2A, 3) は **25** と類似しているが、メトキシ基 [δ_H 3.34 (3H, s)/ δ_C 57.5)] 由

来のシグナルが1つ多いことが観察された。HMBCとCOSY相関 (Figure 4) から、6位にメトキシが結合していることが明らかになった。相対立体構造はNOESY相関 (Figure 5) から決定し、絶対立体構造はECDスペクトルデータ (Figure 6) が化合物 **14** と同じコットン効果を示していることから決定した。故に、化合物 **15** は (2*S*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-6-methoxy-2-(2'-methyl-butanoyloxy)-cleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin O)であると決定した。

化合物 **16** は、無色油状物として得られ、HRFABMSスペクトルで m/z 625.3340 [M + Na]⁺、分子式 C₃₄H₅₀O₉ を示した。¹Hと¹³C NMRのスペクトルデータ (Tables 2A, 3) が **4** と類似しており、同様の骨格を有する化合物であると考えられたが、**16** では新たに [δ_H 2.14 (3H, s)/ δ_C 21.5, 170.7] にアセチル基由来のシグナルが観察された。HMBCとCOSY相関 (Figure 4) からアセチル基は2位に結合していると決定した。相対立体構造はNOESYスペクトルデータ (Figure 5) の解析によって同定し、絶対立体構造はECDスペクトルデータ (Figure 6) を **4** と一致していることから決定し化合物 **16** は (2*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-2,18,19-tri-*O*-acetyl-18,19-epoxy-6-octanoyloxy-cleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin P)であると決定した。

化合物 **17** は無色油状物として得られ、HRFABMSスペクトルで m/z 653.3651 [M + Na]⁺、分子式 C₃₆H₅₄O₉ が観測された。HRFABMSおよび¹³C NMRスペクトルの解析から、**16** と類似した構造であるが、新たに2つのメチレン基の存在が示唆された。HMBCとCOSY相関 (Figure 4) から、6位には**16**のようなオクタノイルオキシではなく、デカノイルオキシが結合していることが明らかになった。絶対立体構造はこれまでと同様、NOESY相関 (Figure 5)、旋光度、およびECDスペクトル (Figure 6) を **16** と比較することにより同定した。以上のことから、化合物 **17** は (2*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-2,18,19-tri-*O*-acetyl-18,19-epoxy-6-decanoyloxy-cleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin Q)であると決定した。

化合物 **18** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 497.2511 $[M+Na]^+$ 、分子式 $C_{27}H_{38}O_7$ を示した。 1H と ^{13}C NMR スペクトル (Tables 2A, 3) において、caseamembrin S¹¹⁾ と類似したスペクトルを示した。しかし、caseamembrin S の 6 位水酸基のシグナルが見られず、代わりにメチレン基 (δ_H 1.50 m, 1.90 m/ δ_C 29.4) と考えられるシグナルが観測された。6 位がメチレンであることは、H-19 と C-6 の HMBC 相関、ならびに H-6 と H-7 の COSY 相関からも確認された (Figure 4)。相対立体構造を NOESY スペクトル (Figure 5) の解析で同定後、絶対立体構造は ECD スペクトルデータ (Figure 6)、さらに後に説明する改良モッシャー法により絶対立体構造を明らかにした **22** の ECD スペクトルと比較して決定した。従って、化合物 **18** は (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-propionyloxycleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin R) であると決定した。

化合物 **19** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 511.2681 $[M+Na]^+$ 、分子式 $C_{28}H_{40}O_7$ が観測された。 1H および ^{13}C NMR スペクトルデータ (Tables 2B, 3) は **18** と類似しているが、新たに 1 つのメチル基シグナルが観測された。HMBC と COSY 相関 (Figure 4) から 2 位に結合しているのは **18** のプロピオニルオキシではなく、イソブタノイルオキシであることが示唆された。これまで同様に、相対立体構造は NOESY スペクトル (Figure 5) から、絶対立体構造は ECD スペクトルデータ (Figure 6) が **18** と一致していることから決定し化合物 **19** は (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-tri-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-isobutanoyloxycleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin S) であると同定した。

化合物 **20** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 525.2808 $[M+Na]^+$ 、分子式 $C_{29}H_{42}O_7$ を示した。 1H と ^{13}C NMR のスペクトル (Tables 2B, 3) は、既知化合物である *rel*-18(*S*),19(*R*)-diacetoxy-18,19-epoxy-6(*R*)-hydroxy-2(*S*)-(3-hydroxy-octanoyloxy)-5(*R*),8(*S*),9(*S*),10(*R*)-cleroda-3,13(16),14-triene²³⁾ と完全に一致した。しかし旋光度を比べたところ、上記既知化合物は $[\alpha]^{25}_D -6.0$ (c 0.14,

CHCl₃) であるのに対し、**20** は $[\alpha]_D^{25} +4.8$ (*c* 0.15, CHCl₃) であることから、**20** は既知化合物のエナンチオマーであることが推察された。ECD スペクトルデータ (Figure 6) において、コットン効果が **18** ならびに **19** と非常に良く一致していることから、絶対立体構造が明らかとなった。従って、化合物 **20** は (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-(2'-methylbutanoyloxy)-cleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin X) であると決定した。

化合物 **21** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで *m/z* 539.2960 [M + Na]⁺、分子式 C₃₀H₄₄O₇ が観察された。¹H と ¹³C NMR のスペクトル (Tables 2B, 3) において、**18** と類似したスペクトルを示すことからその類縁体であると考えられた。MS および ¹³C NMR で 3 つ分のメチレン基が多いことが観察された。さらに、HMBC と COSY 相関 (Figure 4) から 2 位にヘキサノイルオキシ基が結合していることを決定した。相対立体配置は NOESY 相関 (Figure 5) から、絶対立体構造は旋光度、ECD スペクトルデータ (Figure 6) を **18** のデータと比較して決定し、化合物 **21** は (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-hexanoyloxy-cleroda-3,13(16),14-triene (corymbulosin T) であると決定した。

化合物 **22** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで *m/z* 441.2218 [M + Na]⁺、分子式 C₂₄H₃₄O₆ を示した。¹H と ¹³C NMR スペクトル (Tables 2B, 3) が化合物 **18** と類似しているが、プロピオニル基のシグナルが観測されなかったこと、2 位から 1 位と 3 位の COSY 相関 (Figure 4) が観測されたこと、さらに 2 位の化学シフトが高磁場側の値をとっていたことから、2 位にヒドロキシル基が結合していると考えられた。NOESY 相関 (Figure 5) から相対立体構造を決定し、絶対立体構造は改良モッシャー法によって決定した。すなわち、2 位の水酸基を α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル) フェニルアセチル (MTPA) クロリドによってエステル化し、得られた MTPA エステルの正および負の $\Delta\delta_H$ (*S-R*) 値から、2 位の立体が *R* であると決定した (Figure 7)。以上のことから、化合物 **22**

は (2*R*,5*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-hydroxycyclo-
3,13(16),14-triene (corymbulosin U)であるとした。

化合物 **23** は、無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 555.2925 [M + Na]⁺、分子式 C₃₀H₄₄O₈ が観測された。¹H と ¹³C NMR スペクトルデータ (Tables 2B, 3) が **4** と類似しているが、2D NMR (Figures 4, 5) と MS スペクトルデータを比較した結果、6 位に結合している側鎖が **4** より 2 つ分のメチレン基が少ないことが観察された。相対立体構造は NOESY スペクトル (Figure 5) から解析し、絶対立体構造は ECD スペクトルデータ (Figure 6) を **4** と一致したことから確定し、化合物 **23** は (2*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-18,19-epoxy-2-hydroxy-6-hexanoyloxycyclo-3,13(16),14-triene (corymbulosin V)であると決定した。

化合物 **24** は無色油状物として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 581.3075 [M + Na]⁺、分子式 C₃₂H₄₆O₈ が観測され、**8** より 28 小さい分子量を示した。¹H、¹³C NMR、HMBC および COSY スペクトルデータ (Tables 2B, 3, Figure 4) を **8** と比較した結果、2 つ分のメチレン基が少ないことから、**24** の 6 位にはオクタノイルオキシ基が結合していると考えられた。相対立体構造は NOESY スペクトル (Figure 5) から解析し、絶対立体構造は ECD スペクトルデータ (Figure 6) が **8** と同じコットン効果を示したことから決定した。以上のことから、化合物 **24** は (5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*)-18,19-di-*O*-acetyl-6-octanoyloxy-18,19-epoxycyclo-3,13(16),14-trien-2-one (corymbulosin W) であると決定した。

化合物 **25** (caseamembrin E)⁷⁾ が既知化合物であるが、相対立体構造を決定のみでした。そこで、化合物 **25** の CD スペクトルデータを化合物 **14** と比較した結果、絶対立体配置は 2*R*,5*S*,6*S*,8*R*,9*R*,10*S*,18*R*,19*S*であることが決定した(Figure 6)。

Table 2A. ¹H NMR spectroscopic data of compounds **14–18**

	14^b (CDCl ₃)	15^b (CDCl ₃)	16^b (CDCl ₃)	17^a (CDCl ₃)	18^b (CDCl ₃)
position	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)
1	2.15 m 1.71 m	2.15 m 1.68 m	1.92 m 1.87 m	1.93 m 1.88 m	1.89 m
2	5.59 m	5.59 m	5.46 m	5.46 m	5.41 m
3	5.89 m	5.81 brd (3.2)	5.94 brd (3.4)	5.94 brd (3.1)	5.87 brd (4.1)
6	4.00 m	3.51 dd (12.0, 3.8)	4.95 dd (11.3, 4.6)	4.95 dd (11.0, 4.4)	1.90 m 1.50 m
7	1.68 m 1.77 m	1.49 m 1.89 m	1.61 m 1.68 m	1.60 m 1.70 m	1.42 m 1.72 m
8	1.80 m	1.76 m	1.86 m	1.87 m	1.62 m
10	2.35 dd (13.3, 2.3)	2.35 m	2.25 m	2.29 m	2.13 dd (13.4, 3.4)
11	1.60 m 1.18 m	1.47 m 1.26 m	1.50 m 1.25 m	1.51 m 1.23 m	1.50 m 1.28 m
12	2.07 m	2.08 m	2.11 m	2.11 m	2.09 m
14	6.43 dd (17.6, 10.5)	6.42 dd (17.5, 11.0)	6.44 dd (17.5, 10.6)	6.44 dd (17.5, 10.6)	6.43 dd (17.4, 10.5)
15	5.22 d (17.6) 5.03 d (10.5)	5.20 d (17.5) 5.03 d (11.0)	5.23 d (17.5) 5.04 d (10.6)	5.22 d (17.5) 5.05 d (10.6)	5.21 d (17.4) 5.03 d (10.5)
16	5.06 s 4.91 s	5.02 s 4.93 s	5.05 s 4.93 s	5.07 s 4.95 s	5.05 s 4.92 s
17	0.94 d (6.9)	0.91 d (7.2)	0.92 d (6.9)	0.92 d (6.9)	0.88 d (6.9)
18	6.71 t (1.4)	6.62 t (1.9)	6.51 t (1.8)	6.51 t (1.4)	6.69 t (1.4)
19	6.42 s	6.39 s	6.55 s	6.55 s	6.32 s
20	0.95 s	0.93 s	0.96 s	0.96 s	0.94 s
2'	2.56 sep (7.3)	2.38 m	2.29 ddd (15.7, 7.8, 2.7)	2.31 ddd (15.1, 7.7, 2.7)	2.40 dd (15.1, 7.6)
3'	1.19 d (7.3) ^c 1.19 d (7.3) ^c	1.44 m 1.69 m	1.60 m	1.58 m	1.19 t (7.6)
4'		0.94 t (7.6)	1.28 m ^d	1.25 m ^e	
5'		1.17 d (6.9)	1.28 m ^d	1.25 m ^e	
6'			1.28 m ^d	1.25 m ^e	
7'			1.28 m ^d	1.25 m ^e	
8'			0.88 t (6.9)	1.25 m ^e	
9'				1.25 m ^e	
10'				0.86 t (6.9)	
18-OAc	2.07 s	2.06 s	2.08 s	2.08 s	2.07 s
19-OAc	1.90 s	1.87 s	1.93 s	1.93 s	1.90 s
2-OAc			2.14 s	2.14 s	
6-OMe		3.34 s			

Table 2B. ¹H NMR spectroscopic data of compounds **19–24**

	19^b (CDCl ₃)	20^b (CDCl ₃)	21^b (CDCl ₃)	22^b (CDCl ₃)	23^b (CDCl ₃)	24^b (CDCl ₃)
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1	1.93 m	1.93 m	1.97 dd (15.1, 4.4) 1.89 m	1.91 m 1.60 m	1.99 dd (13.4, 4.8) 1.65 m	2.53 dd (17.4, 6.8) 2.57 dd (17.4, 12.8)
2	5.37 m	5.37 d (2.3)	5.40 m	4.37 m	4.44 m	
3	5.87 dd (4.6, 1.4)	5.88 d (4.1)	5.85 brd (4.1)	5.92 brd (3.7)	6.00 brd (3.4)	6.14 brd (1.4)
6	1.71 m 1.50 m	1.71 m 1.52 m	1.72 m 1.46 m	1.71 m 1.45 m	4.97 dd (11.7, 4.8)	5.12 dd (11.9, 4.1)
7	1.42 m 1.52 m	1.45 m 1.37 m	1.40 m 1.50 m	1.37 m 1.52 m	1.68 m	1.72 m 1.81 dt (13.7, 4.1)
8	1.62 m	1.62 m	1.62 m	1.62 m	1.87 m	2.00 m
10	2.20 t (8.2)	2.22 dd (10.5, 5.5)	2.13 dd (13.4, 3.4)	2.13 dd (11.9, 5.0)	2.32 dd (13.4, 3.8)	2.86 dd (12.8, 6.4)
11	1.50 m 1.28 m	1.46 m 1.23 m	1.49 m 1.25 m	1.51 m 1.30 m	1.50 m 1.26 m	1.51 m 1.27 m
12	2.11 m	2.10 m	2.06 m	2.07 m	2.09 t (8.6)	2.07 m
14	6.43 dd (17.4, 10.5)	6.43 dd (17.8, 11.0)	6.43 dd (17.5, 11.0)	6.42 dd (17.5, 10.8)	6.42 dd (17.5, 10.8)	6.43 dd (17.6, 10.9)
15	5.20 d (17.4) 5.02 d (10.5)	5.17 d (17.8) 5.02 d (11.0)	5.18 d (17.5) 5.03 d (11.0)	5.22 d (17.5) 5.02 d (10.8)	5.22 d (17.5) 5.02 d (10.8)	5.21 d (17.6) 5.05 d (10.9)
16	5.04 s 4.94 s	5.04 s, 4.94 s	5.05 s 4.92 s	5.04 s 4.93 s	5.04 s 4.94 s	5.07 s 4.93 s
17	0.88 d (6.9)	0.88 d (6.9)	0.89 d (6.8)	0.89 d (6.9)	0.91 d (6.9)	0.96 d (6.9)
18	6.68 t (1.4)	6.68 t (1.7)	6.67 t (1.2)	6.68 t (1.7)	6.51 t (1.4)	6.65 d (1.4)
19	6.30 s	6.30 s	6.30 s	6.31 s	6.54 s	6.62 s
20	0.93 s	0.93 s	0.92 s	0.98 s	0.99 s	0.95 s
2'	2.62 sep (7.3)	2.45 dd (13.7, 6.8)	2.36 t (7.3)		2.29 sep (3.1)	2.31 ddd (10.5, 7.8, 2.8)
3'	1.20 d (7.3) ^f 1.20 d (7.3) ^f	1.63 m	1.65 m		1.60 m	1.59 m
4'		0.97 t (7.8)	1.34 m ^g		1.28 m ^h	1.27 m ⁱ
5'		1.18 d (6.9)	1.34 m ^g		1.28 m ^h	1.27 m ⁱ
6'			0.91 t (7.4)		0.87 t (7.2)	1.27 m ⁱ
7'						1.27 m ⁱ
8'						0.88 t (6.9)
18-OAc	2.08 s	2.07s	2.08 s	2.08 s	2.07 s	2.07 s
19-OAc	1.90 s	1.89 s	1.90 s	1.90 s	1.90 s	1.91 s

^a 600 MHz, ^b 400MHz. ^{c-i}Overlapping signals

Table 3. ^{13}C NMR spectroscopic data in CDCl_3 of compounds **14–24**

		14^b	15^b	16^b	17^a	18^b	19^b	20^b	21^b	22^b	23^b	24^b
position		δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1		26.3	26.5	26.9	27.0	26.1	26.2	26.2	26.3	29.6	29.5	35.5
2		70.4	70.5	66.1	66.2	66.3	66.3	66.3	66.3	64.2	63.8	198.0
3		124.4	123.8	123.0	123.1	120.4	120.4	120.4	120.4	123.8	126.4	125.6
4		144.3	145.2	144.3	144.3	147.1	147.2	147.2	147.1	145.4	142.6	163.0
5		53.6	53.0	52.0	52.1	49.2	49.3	49.3	49.2	49.3	52.2	53.4
6		74.3	83.0	73.6	73.6	29.4	29.2	29.3	29.4	28.9	73.7	73.8
7		37.50	31.3	33.0	33.1	27.2	27.2	27.2	27.2	27.2	33.0	33.0
8		37.54	36.9	37.1	37.2	37.2	37.3	37.3	37.16	37.18	36.7	36.2
9		38.1	41.1	37.3	37.4	37.1	37.1	41.2	37.09	37.20	37.3	37.8
10		41.0	38.2	36.5	36.5	34.3	34.2	34.2	34.4	33.4	36.2	41.9
11		27.6	27.4	28.0	28.1	28.2	28.1	28.0	28.2	28.2	27.9	27.3
12		23.7	23.7	23.8	23.9	23.6	23.6	23.6	23.6	23.6	23.8	23.7
13		145.0	145.0	145.1	145.1	145.4	145.3	145.2	145.3	145.4	145.2	144.7
14		140.2	140.3	140.4	140.4	140.4	140.4	140.5	140.4	140.3	140.3	140.1
15		112.6	112.5	112.5	112.5	112.3	112.1	112.1	112.2	112.5	112.6	112.8
16		115.4	115.5	115.5	115.5	115.4	115.4	115.4	115.4	115.3	115.4	115.5
17		15.7	15.9	15.6	15.6	15.7	15.7	15.7	15.7	15.8	15.6	15.5
18		95.0	95.6	95.2	95.2	94.5	94.4	94.4	94.5	94.6	95.3	94.4
19		97.4	97.9	98.3	98.2	99.7	99.5	99.5	99.7	99.8	98.3	98.1
20		25.4	25.6	25.5	25.5	26.3	26.1	26.1	26.0	26.1	25.5	24.7
1'		177.1	176.5	173.2	173.2	174.0	176.4	175.9	173.4		173.3	173.0
2'		34.1	41.1	34.7	34.8	28.0	34.1	41.1	34.6		34.7	34.6
3'		18.9	26.8	24.8	24.7	9.3	19.2	26.8	24.8		24.4	24.6
4'		18.9	11.7	29.1	29.4		18.7	11.7	31.2		31.3	29.1
5'			16.6	28.9	29.23			16.6	22.3		22.3	28.8
6'				31.6	29.19				13.9		13.9	22.6
7'				22.6	29.12							31.6
8'				14.1	31.9							14.1
					22.8							
					14.1							
18-OAc	C=O	171.0	170.2	170.09	170.08	170.3	170.3	170.2	170.3	170.3	170.1	169.54
	Me	21.2	21.4	21.3	21.4	21.4	21.2	21.2	21.3	21.3	21.3	21.5
19-OAc	C=O	169.9	169.9	170.08	170.07	170.1	170.0	170.0	170.1	170.1	170.0	169.47
	Me	21.5	21.7	21.7	21.7	21.3	21.3	21.3	21.4	21.5	21.7	21.0
2-OAc	C=O			170.5	170.5							
	Me			21.5	21.5							
6-OMe			57.5									

^a 150 MHz, ^b 100MHz.

HMBC/COSY
(400 MHz)

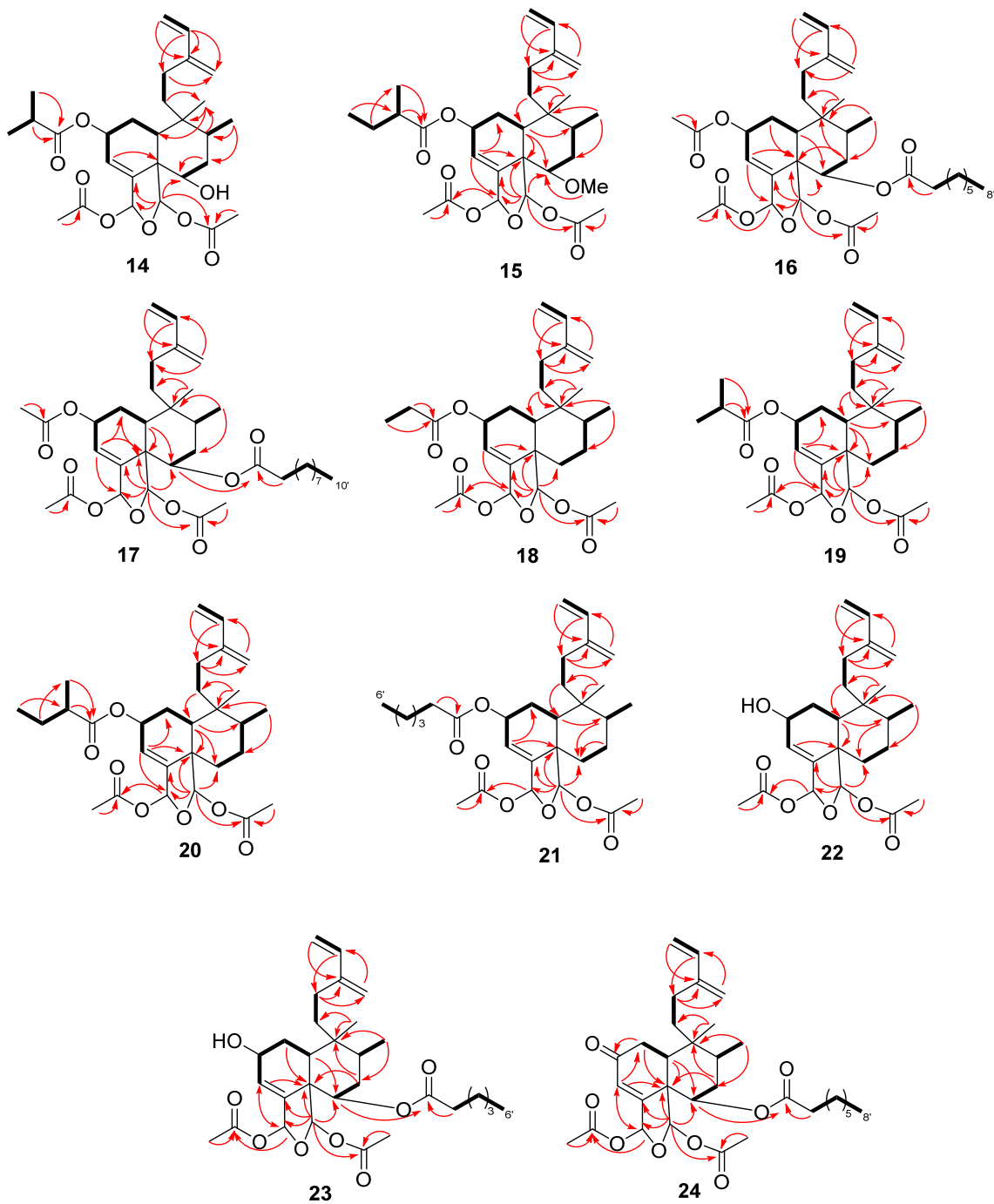


Figure 4. Selected HMBC correlations (arrows in red), COSY connectivities (bold lines) for 14–24.

NOESY
(400 MHz)

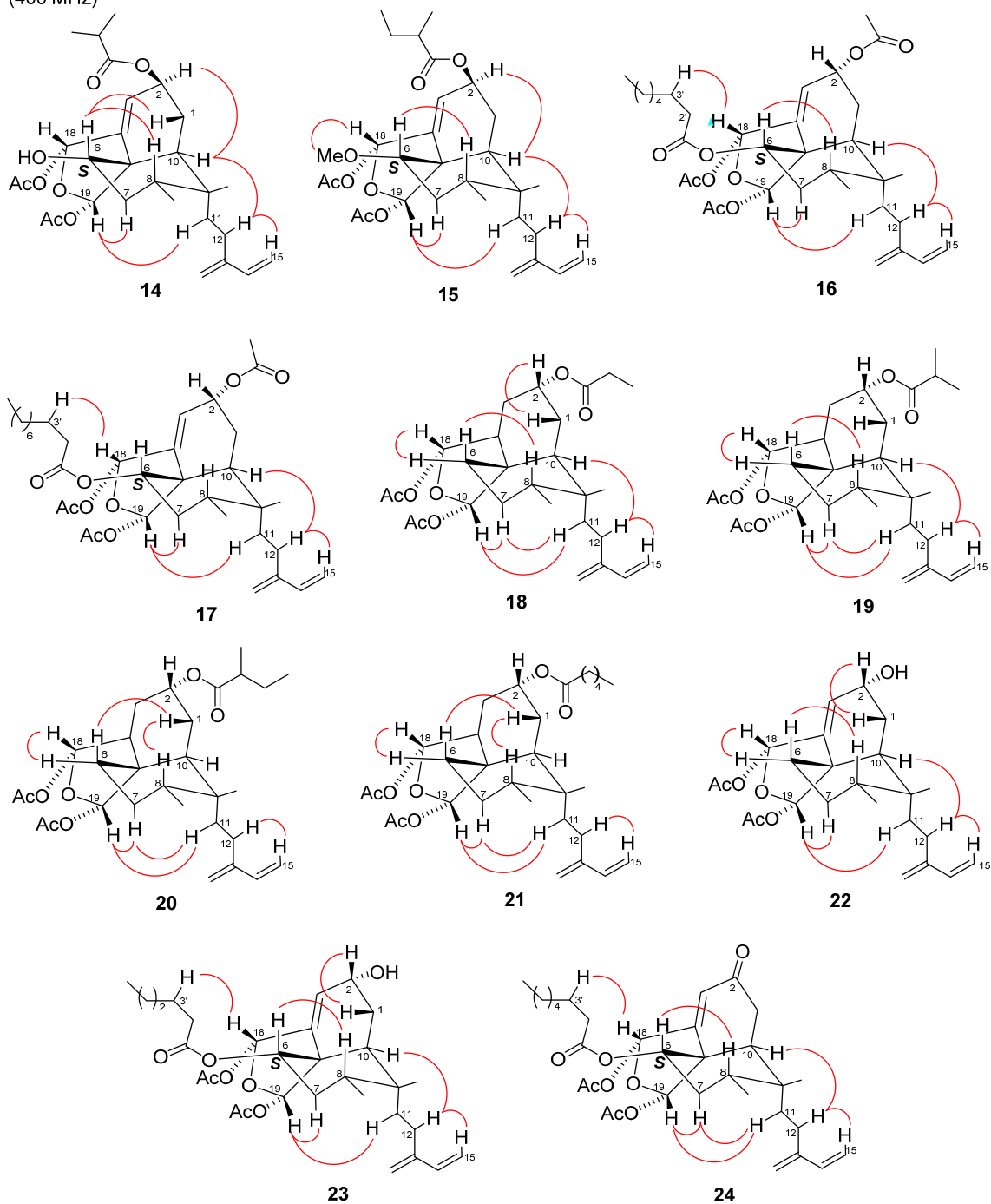


Figure 5. Key NOESY correlations for 14–24.

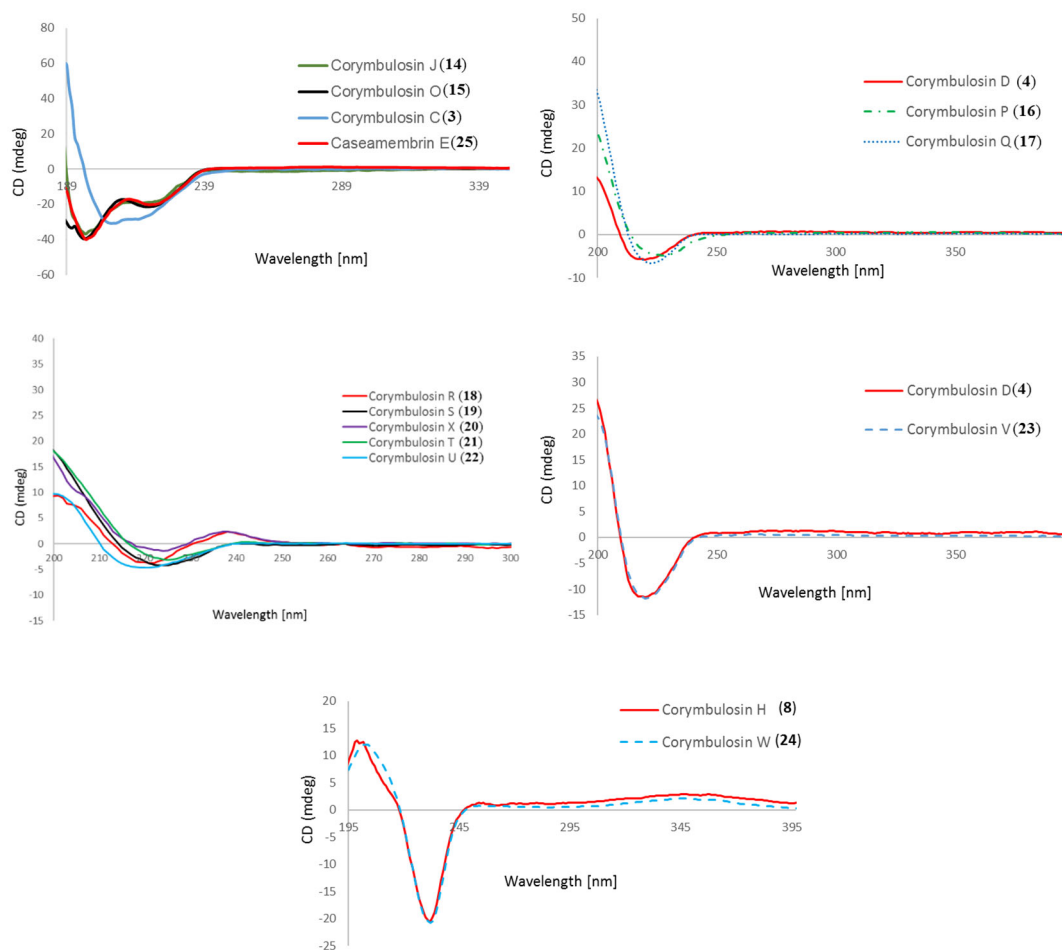


Figure 6. Experimental ECD spectra of isolated clerodane diterpenes in acetonitrile.

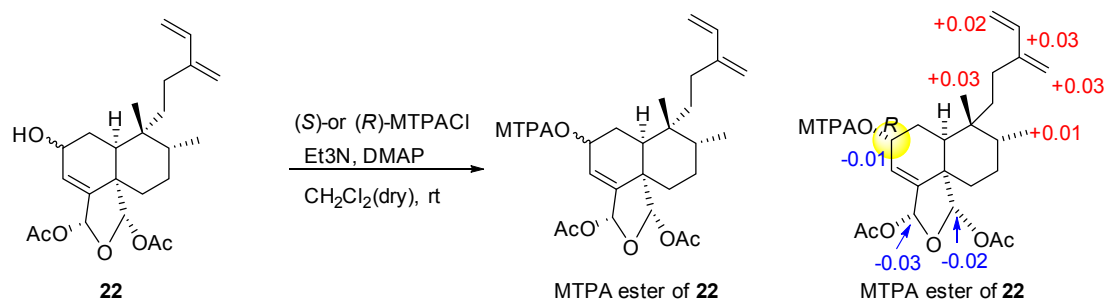


Figure 7. Preparation of Mosher ester and $\Delta\delta_{\text{H}}$ (*S*-*R*) values (ppm) calculated from 2-*O*-MTPA esters of **22**.

第四節 ヒトがん細胞増殖抑制評価

L. corymbulosa の樹皮の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物から単離した化合物について、各種ヒトがん細胞 [肺がん (A549)、トリプルネガティブ乳がん (MDA-MB-231)、HER2 ネガティブ乳がん (MCF-7)、鼻咽頭がん (KB)、ビンクリスチン耐性鼻咽頭がん細胞 (KB-VIN)] に対する増殖抑制作用を調べた。ポジティブコントロールとして paclitaxel を使用し、IC₅₀ 値 (50% 増殖阻害濃度) を算出することにより、これらがん細胞に対する増殖抑制作用を評価した (Table 4)。

Table 4. Antiproliferative activity of the isolated diterpenes from *L. corymbulosa*

compounds	cell lines ^a (IC ₅₀ μM)				
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	KB	KB-VIN
1	0.45	0.43	0.44	0.42	0.45
2	4.74	5.22	4.94	5.02	4.88
3	5.32	5.40	5.42	4.47	4.81
4	4.69	5.13	4.94	4.97	4.94
5	4.55	4.84	4.79	4.84	4.89
6	4.82	5.05	5.24	4.92	4.76
8	29.9	28.9	8.39	5.91	9.83
9	0.66	0.48	0.68	0.56	0.98
10	0.47	0.49	0.68	0.56	0.98
11	4.60	4.95	4.94	5.19	4.92
13	5.04	4.90	5.82	5.23	5.19
15	4.75	3.31	4.65	4.25	4.76
16	5.98	4.93	6.39	5.16	5.03
17	40.2	20.5	31.7	19.8	39.2
19	>40	22.9	26.2	25.1	26.6
21	2.29	0.49	0.69	0.56	0.61
23	4.76	4.73	5.19	4.74	4.88
25	0.53	0.40	0.55	0.43	0.51
PXL ^b (nM)	6.53	8.36	12.13	7.07	2213.3

^aKB (epidermoid carcinoma of the nasopharynx), KB-VIN (P-gp-overexpressing MDR subline of KB), A549 (lung carcinoma), MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MCF-7 (ER-positive & HER2-negative breast cancer). ^bPaclitaxel

その結果、2位にエステル基、6位に水酸基またはメトキシを有する化合物 **1**、**9**、**10**、**25** が、多剤耐性 (MDR) がん細胞 KB-VIN を含む全てのヒトがん細胞に対して、IC₅₀値 0.5 μM 前後の顕著な増殖抑制効果を示した。その他の化合物では、**8**、**17**、および **19** 以外がIC₅₀値 7 μM以下の活性を示すことが明らかになった。構造と活性の相関を評価すると、2位に (2'Z,4'Z)-2',4'-デカジエノエート、6位に水酸基が結合している**1**は、2位に水酸基、6位に (2'Z,4'Z)-2',4'-デカジエノエートが結合している**5**と**6**より10倍ほどの強い活性を示すことがわかった。6位にデカノイルオキシを有する**2**、**3**、および**8**では、2位で水酸基の立体がR体である**2**とS体である**3**は活性が同等だが、2位がケトンの**8**よりA549 細胞とMDA-MB-231 細胞に対して5倍以上の強い活性を示した。同様に6位が (2'Z,4'Z)-2',4'-デカジエノエートであり、2位水酸基の立体が違う**5**と**6**はほぼ同じ活性を示した。また、2位がイソペンタイルオキシ、6位がメトキシ基を結合している**13**と**15**でも、2位立体の違いによらずほぼ同じ活性を示した。以上のことから、2位置換基の立体は活性に影響しないことが示唆された。2位が水酸基で6位に結合しているエステルの大きさ違う**2**、**4**、および**23**では同様な活性を示したことから、6位エステルの大きさも活性には影響がないと考えられた。しかし、2位がアセチル基の場合は、6位デカノイル**16**より6位オクタノイル**17**の方が5-8倍ほどの強い活性を示し、エステルの大きさが活性に影響を与えていた。2位にイソブタノイルオキシを有する**9**、**10**、および**19**では、6位が水酸基である**9**と6位がメトキシ基である**10**が同様な活性を示したが、6位が無置換基である**19**より40-80倍ほど活性が強いことが明らかになった。従って、6位の酸素官能基が、活性に重要な役割を果たしていることが考えられた。2位にイソペンタイルオキシの場合、6位に水酸基が結合している**25**は、6位にメトキシ基が結合している**15**より10倍程度の強い活性を示した。6位無置換基である**19**と**21**との比較では、2位にイソブタイルオキシ基が結合している**19**より2位にヘキサイルオキシ基が結合している**21**が40倍ほどの強い活性を示し、6位無置換基では2位のエステルにより活性が左右される

ことが明らかとなった。

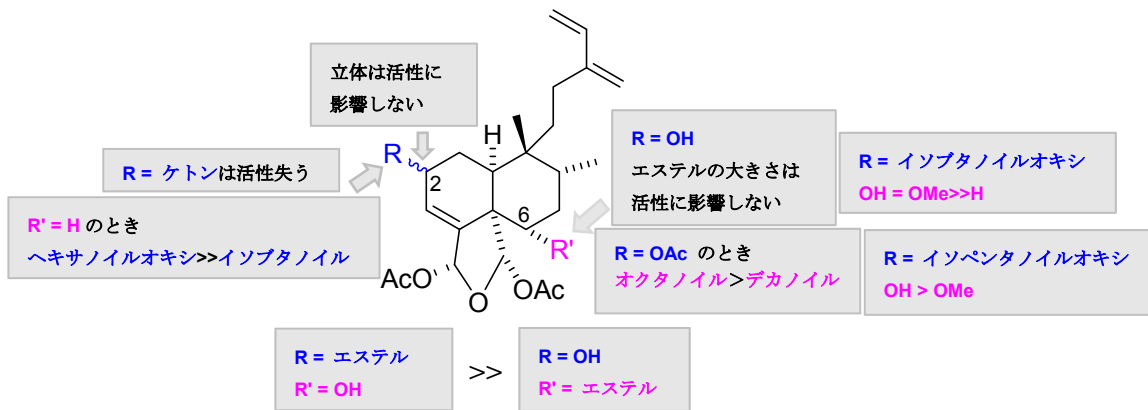


Figure 8. Structure-activity relationship studies of clerodane diterpenes.

以上の構造活性相関をまとめると以下のようなになる (Figure 8)。

- 1) 2位にエステル基、6位に水酸基の組み合わせは、2位に水酸基、6位にエステル基の組み合わせより活性が10倍ほど強い。
- 2) 2位の立体は活性に影響しないが、ケトンでは活性を失う。
- 3) 活性には6位に酸素官能基が必要である。
- 4) 2位が水酸基のとき、6位に結合しているエステル基の大きさは活性に影響しないが、2位がエステルの場合は6位置換基に影響される。

第五節 小括

- (1) ペルー産植物 *L. corymbulosa* 樹皮の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) の抽出物から HPLC などの各種カラムクロマトグラフィーを用いて、16 種の化合物を単離・精製した。
- (2) 単離した化合物を NMR、MS などの各種機器分析で解析した結果、全てイソズエラニン骨格を有するクレロダンジテルペンであり、そのうち 11 種が新規化合物 corymbulosins J (14)、O-S (15-19)、X (20)、および T-W (21-24) であると決定した。全ての新規化合物は、比旋光度、ECD スペクトル、又は改良モッシャー法により絶対立体構造を決定した。
- (3) *L. corymbulosa* の抽出物から得られた化合物のがん細胞増殖抑制作用を調べた結果、2 位にエステル基、6 位に水酸基またはメトキシを有する化合物 1、9、10、25 が、MDR を含む全てのヒトがん細胞に対して、IC₅₀ 値 0.5 μM 前後の顕著な増殖抑制効果を示した。
- (4) Corymbulosin 類のがん細胞増殖抑制評価から、2 位、6 位の置換基効果に関する構造活性相関を明らかにした。

第六節 実験の部

General Experimental Procedures. Optical rotations were measured on a JASCO P-2200 digital polarimeter. CD spectra were recorded on JASCO J-820 spectrometer. Infrared spectra (IR) were obtained with a Thermo Fisher Scientific NICOLET iS5 FT-TR spectrometer from samples in CH₂Cl₂. NMR spectra were measured on JEOL JMN-ECA600 and JMN-ECS400 spectrometers with tetramethylsilane as an internal standard, and chemical shifts are stated as δ values. HRMS data were recorded on a JMS-700 Mstation (FAB) mass spectrometer. Analytical and preparative TLC were carried out on precoated silica gel 60F₂₅₄ and RP-18F₂₅₄ plates (0.25 or 0.50 mm thickness; Merck). MPLC was performed on Combiflash Rf (Teledyne Isco) with silica gel and C18 cartridges (Biotage, Uppsala Sweden). Preparative HPLC was operated on a GL Science recycling system using an InertSustain C18 column (5 μ M, 20 \times 250 mm).

Plant Material. The crude MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) extract (N005829) of bark of *L. corymbulosa* collected in Peru was provided by NCI/NIH (Fredrick, MD, U.S). A voucher specimen (voucher # QT65T0390) was deposited at the Smithsonian Institution (Washington, D.C.) and voucher extracts were deposited at the NCI (Frederick, MD) and Kanazawa University (Kanazawa, Japan). The crude organic extract of (N005829) was evaluated for cytotoxicity by NCI with an in vitro 60-cell tumor screening panel as reported previously.

Extraction and Isolation. The crude extract N005829 (12.8 g) was partitioned between H₂O and EtOAc to obtain H₂O-soluble (2.2 g) and EtOAc-soluble portions (7.4 g). The latter portion was subjected to silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 120 g) with a gradient system [*n*-hexane/EtOAc 90:10 (600 mL) \rightarrow 80:20 (40 mL) \rightarrow 75:25 (120 mL) \rightarrow 65:35 (80 mL) \rightarrow 60:40 (120 mL) \rightarrow 55:45 (80 mL) \rightarrow

45:55 (240 mL) → 30:70 (520 mL) → 10:90 (440 mL) → EtOAc/MeOH 90:10 (120 mL) → MeOH (1400 mL)] to yield 11 fractions, F1–F5.

F2 (1249.9 mg) was further fractionated by silica gel column chromatography (CC) eluted with *n*-hexane/EtOAc (5:1 to 0:1) to afford 12 subfractions 2a-l. Subfraction 2g (384.9 mg) was purified by MPLC on ODS-25 (YMC-DispoPack AT 12 g) with H₂O/MeOH (1:6), followed by repeated recycling preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:7) to yield compounds **8** (3.6 mg), **20** (3.0 mg), and **21** (2.0 mg). Subfraction 2h (279.1 mg) was purified by repeated recycling preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:9) to provide compounds **18** (2.0 mg), **19** (9.0 mg), and **24** (1.5 mg). Subfraction 2i (98.0 mg) was purified by repeated recycling preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:9) to afford compounds **15** (1.5 mg) and **17** (7.1 mg). Subfraction 2j (183.2 mg) was purified by repeated recycling preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:9), followed by preparative TLC using *n*-hexane/EtOAc (4:1) to yield compound **16** (3.3 mg).

F3 (830.1 mg) was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (1:0 to 0:1) followed by MeOH to obtain six subfractions, 3a–f. Subfraction 3b (336.1 mg) was purified by MPLC on ODS-25 (YMC-DispoPack AT 12 g) with H₂O/MeOH (1:4), followed by silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (1:0 to 4:1) to afford **2** (9.0 mg), **4** (9.0 mg), and **13** (22.0 mg). Subfraction 3c (107.0 mg) was purified by MPLC on ODS-25 (YMC-DispoPack AT 12 g) with H₂O/MeOH (1:4), followed by recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:4) to afford compounds **14** (1.2 mg) and **25** (10.4 mg).

F4 was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (1:0 to 0:1) followed by MeOH to give 14 subfractions, 4a–n. Compounds **22** (1.5 mg) and **23** (11.9 mg) were obtained by repeated recycling preparative HPLC of subfraction 4f (169.1 mg) with H₂O/MeOH (1:5).

General procedure for esterification with (S/R)-MTPA-Cl. To a solution of **22** (0.7 mg, 1.7 μmol) in anhydrous CH₂Cl₂ (0.25 mL) were added Et₃N (1.6 μL, 7.5 μmol), DMAP

(1.0 mg, 6.6 μmol), and (*S*)-MTPACl (2.7 μL , 12 μmol). The mixture was stirred at rt for 0.5 h, followed by direct purification using preparative TLC with CH_2Cl_2 to afford the (*R*)-MTPA ester (0.3 mg, 28%). The corresponding (*S*)-MTPA ester (0.4 mg, 40%) was obtained by the same procedure using (*R*)-MTPACl.

(*R*)-MTPA ester of **22**. 40% yield. ^1H NMR (CHCl_3 , 600 MHz) δ_{H} 7.56-7.44 (5H, m, aromatic protons), 6.72 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-18), 6.36 (dd, $J = 17.2, 10.6$ Hz, H-14), 6.30 (1H, s, H-19), 6.02 (1H, brd, $J = 4.5$ Hz, H-3), 5.64 (1H, m, H-2), 5.09 (1H, d, $J = 17.2$ Hz, H-15), 4.99 (1H, s, H-16), 4.97 (1H, d, $J = 10.6$ Hz, H-15), 4.88 (1H, s, H-16), 2.33 (1H, dd, $J = 14.0, 2.6$ Hz, H-10), 2.05 (3H, s, 18-OAc), 2.00 (2H, m, H-12), 1.75, (1H, m, H-6), 1.73 (3H, s, 19-OAc), 1.46 (1H, m, H-6), 0.91 (3H, s, H-20), 0.88 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-17).

(*S*)-MTPA ester of **22**. 28% yield. ^1H NMR (CHCl_3 , 600 MHz) δ_{H} 7.51-7.37 (5H, m, aromatic protons), 6.69 (1H, t, $J = 1.7$ Hz, H-18), 6.39 (dd, $J = 17.5, 10.8$ Hz, H-14), 6.28 (1H, s, H-19), 6.02 (1H, brd, $J = 3.7$ Hz, H-3), 5.61 (1H, m, H-2), 5.08 (1H, d, $J = 17.5$ Hz, H-15), 5.01 (1H, s, H-16), 4.98 (1H, d, $J = 10.8$ Hz, H-15), 4.90 (1H, s, H-16), 2.31 (1H, d, $J = 12.0$ Hz, H-10), 2.04 (3H, s, 18-OAc), 2.02 (2H, m, H-12), 1.78 (3H, s, 19-OAc), 1.74 (1H, m, H-6), 1.47 (1H, m, H-6), 0.94 (3H, s, H-20), 0.89 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-17).

Corymbulosin J (14). Colorless amorphous solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -88.0$ (c 0.01, MeOH); IR ν_{max} (CH_2Cl_2) cm^{-1} 3463, 2957, 2923, 2853, 1730, 1595, 1458, 1376; ^1H and ^{13}C NMR, Tables 2A, 3; HRFABMS m/z 527.2624 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_8\text{Na}$, 527.2621).

Corymbulosin O (15). Colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -64.0$ (c 0.07, MeOH); IR ν_{max} (CH_2Cl_2) cm^{-1} 2955, 2926, 2881, 1756, 1730, 1373, 1226; ^1H and ^{13}C NMR, Tables 2A, 3; HRFABMS m/z 555.2921 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{O}_8\text{Na}$, 555.2934).

Corymbulosin P (16). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +0.9$ (*c* 0.20, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2964, 2928, 2860, 1751, 1733, 1373, 1224; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2A, 3; HRFABMS *m/z* 625.3340 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₄H₅₀O₉Na, 625.3353).

Corymbulosin Q (17). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +19.6$ (*c* 0.15, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2955, 2926, 2854, 1738 1373, 1220; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2A, 3; HRFABMS *m/z* 653.3651 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₆H₅₄O₉Na, 653.3666).

Corymbulosin R (18). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -27.1$ (*c* 0.08, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2958, 2926, 2855, 1755, 1734, 1374, 1226; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2A, 3; HRFABMS *m/z* 497.2511 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₇H₃₈O₇Na, 497.2515)

Corymbulosin S (19). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -10.0$ (*c* 0.45, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2967, 2941, 2870, 1749, 1730, 1373, 1226; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 511.2681 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₈H₄₀O₇Na, 511.2672).

Corymbulosin X (20). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +4.8$ (*c* 0.15, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2964, 2935, 2877, 1753, 1728, 1373, 1226; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 525.2808 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₉H₄₂O₇Na, 525.2828).

Corymbulosin T (21). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} +0.7$ (*c* 0.35, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2961, 2935, 2870, 1757, 1733, 1374, 1224; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 539.2960 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₀H₄₄O₇Na, 539.2985)

Corymbulosin U (22). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -28.7$ (*c* 0.07, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 3473, 2955, 2933, 1750, 1374;1227; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 441.2218 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₄H₃₄O₆Na, 441.2253)

Corymbulosin V (23). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -18.8$ (*c* 0.28, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2961, 2930, 1735, 1374, 1225; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 555.2925 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₀H₄₄O₈Na, 555.2934)

Corymbulosin W (24). Colorless oil; $[\alpha]_D^{25} -62.4$ (*c* 0.08, CHCl₃); IR ν_{\max} (CH₂Cl₂) cm⁻¹ 2961, 2927, 2855, 1761, 1374, 1220; ¹H and ¹³C NMR, Tables 2B, 3; HRFABMS *m/z* 581.3075 [M + Na]⁺ (calcd for C₃₂H₄₆O₈Na, 581.3090)

Assay for Antiproliferative Activity: All stock cell lines were grown in T-75 flasks at 37 °C with 5% CO₂ in air. Freshly trypsinized cell suspensions were seeded in 96-well microtiter plates at densities of 4000–12 000 cells per well (based on the doubling time of the cell line) with compounds. The highest concentration of DMSO in the cultures (0.1% v/v) was without effect on cell growth under the culture conditions used. After 72 h in culture with test compounds, attached cells were fixed with 50% trichloroacetic acid and then stained with 0.04% sulforhodamine B. After solubilizing the protein-bound dye with 10 mM Tris base, absorbance at 515 nm was measured using a microplate reader (ELx800, BioTek) with Gen5 software (BioTek). The mean IC₅₀ is the concentration of agent that reduced cell growth by 50% compared with vehicle (DMSO) control under the experimental conditions used and is the average from at least three independent experiments with duplicate samples. Cells were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 2 mM Lglutamine and 25 mM HEPES (HyClone), supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone), 100 µg/mL streptomycin, 100 IU/mL penicillin, and 0.25 µg/mL amphotericin B (Cellgro). MDR stock cells (KB-VIN) were maintained in the presence of 100 nM VIN.

第二章 *Hernandia nymphaeifolia* からの新規生理活性物質の探索

第一節 *Hernandia nymphaeifolia* について

ハスノハギリ科は現在 5 属 (*Hernandia*、*Illigera*、*Valvanthera*、*Gyrocarpus*、および *Sparattanthelium*) 約 60 種が知られている²⁴⁾。その内 *Hernandia* 属は主に亜熱帯と熱帯地域に分布している²⁵⁾。本属からは、現在臨床で使用されている抗がん剤エトポシドのリード化合物となったポドフィロトキシンを含む各種リグナン類^{26,27)}、およびアポフィンを含むベンジルイソキノリン類²⁸⁻³⁰⁾などの多くの二次代謝産物が単離され、それらは細胞毒性^{31,32)}、抗マラリア^{32,33)}、抗菌²⁶⁾などの生物活性を示すことが報告されている。

H. nymphaeifolia (C.Presl) Kubitzki (別名: *H. peltata* Meisn.) は海岸近くに生える代表的な樹木で、高さは約 12–20 m になる。西サモアで癩、咳、下痢、腹痛、痙攣、および眼病などを治療するために使われている伝統的な生薬である³⁴⁾。*H. nymphaeifolia* の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物 (N053499) は、NCI60 パネルスクリーニングにおいて非常に強い細胞増殖抑制活性が示されており、5 種のヒトがん細胞を用いたインハウスでの試験でも IC₅₀ が 0.01 μg/ml 以下の強力な細胞増殖抑制効果が見られた (Table 5)。*Hernandia* 属に関する植物化学的精査は多く報告されているが、*nymphaeifolia* 種に関する報告例は 6 例のみだった^{26,27,32,35-37)}。この 6 例では植物の部位は実ではなかったため、今回の研究では、本植物の実からの単離・精製を行うことになった。さらに、これまで本属から得られたことがなかったブタノリド類とリグナン配糖体類を単離した。

Table 5. Antiproliferative activity of MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) extract of *H. nymphaeifolia* (N053499)

	Cell line ^a (IC ₅₀ μg/ml)				
	A549	MD-MB-231	MCF-7	KB	KB-VIN
N053499	<<0.01	<0.01	<0.01	<<0.01	<<0.01
PXL ^b (nM)	6.53	8.36	12.13	7.07	2213.14

^aKB (epidermoid carcinoma of the nasopharynx), KB-VIN (P-gp-overexpressing MDR subline of KB), A549 (lung carcinoma), MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MCF-7 (ER-positive & HER2-negative breast cancer). ^bPaclitaxel

第二節 *Hernandia nymphaeifolia* の化学成分の単離・精製

H. nymphaeifolia の実の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物 (25.0 g) は、水と *n*-ヘキサン、酢酸エチル、*n*-ブタノールでそれぞれ液液分配して *n*-ヘキサン抽出物 (17.3 g)、酢酸エチル抽出物 (4.0 g)、*n*-ブタノール抽出物 (1.7 g)、および水抽出物 (1.0 g) を調製した。*n*-ヘキサン抽出物、酢酸エチル抽出物、*n*-ブタノール抽出物をそれぞれ順相および逆相を担体とした各種クロマトグラフィーを駆使して単離・精製を行ったところ、9種の新規を含む (赤色)、20種の化合物を単離した (Figure 9)。

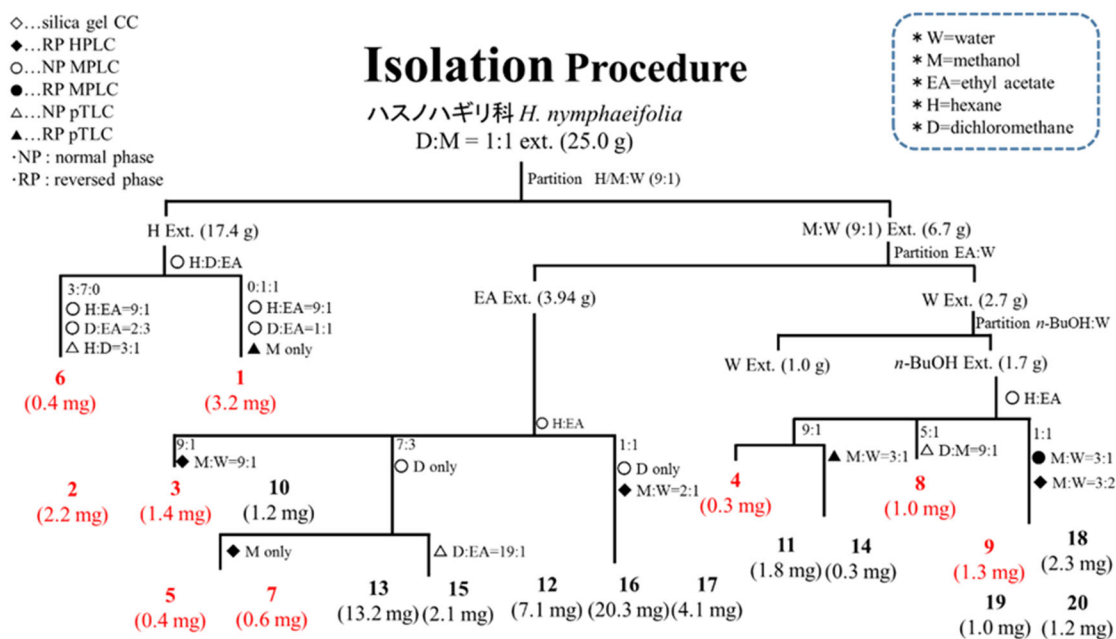


Figure 9. Isolation method of compounds 1–20 from *H. nymphaeifolia*.

第三節 *Hernandia nymphaeifolia* の化学成分の構造解析

得られた化合物全てについて、NMR、MS などの各種スペクトルデータを解析した結果、それらは新規ブタノリド類 hernanolides A-G (**1-7**)、新規リグナン配糖体 (**8-9**)、ならびに既知化合物である tambouranolide (**10**)³⁸、deoxypodophyllotoxin (**11**)³⁹、podorhizol (**12**)⁴⁰、bursehernin (**13**)⁴¹、(2*S*,3*S*)-(+)-5'-methoxyyatein (**14**)⁴²、epiashantin (**15**)⁴³、epieudesmin (**16**)⁴⁴、(1*S*,3*aR*,4*R*,6*aR*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)tetrahydro-1*H*,3*H*-furo[3,4-*c*]furan (**17**)⁴³、(7*R*,8*S*)-dehydrodiconiferyl alcohol-4-*O*- β -D-glucoside (**18**)⁴⁵、erythro-1-(4-*O*- β -glucopyranosyl-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyl-4-[1-(*E*)-propene-3-ol]-phenoxy]l-propane-1,3-diol (**19**)⁴⁶、osmanthuside H (**20**)⁴⁷ であると決定した (Figure 10)。

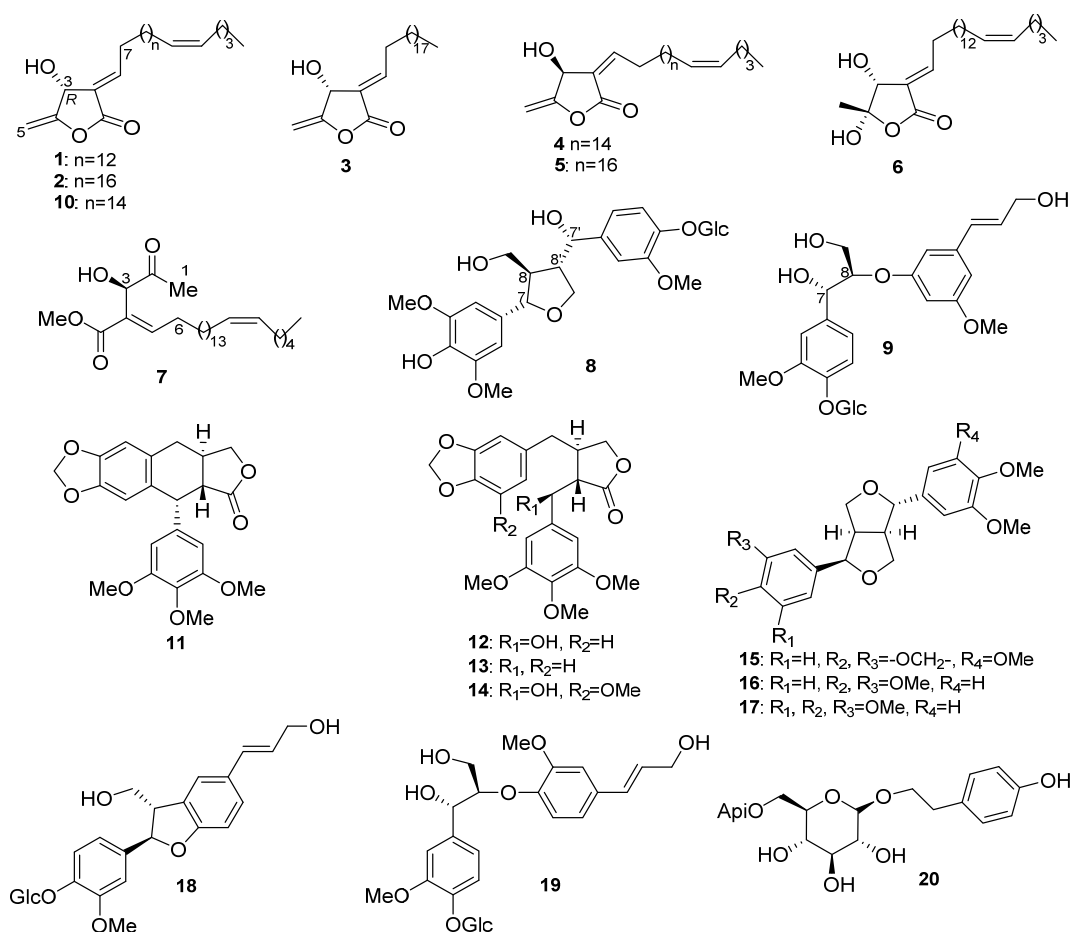


Figure 10. Structures of isolated compounds 1–20 from *H. nymphaeifolia*.

新規化合物の構造解析

化合物 **1** は黄色固体として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 390.3137 [M]⁺、分子式 C₂₅H₄₂O₃ を示した。¹H と ¹³C NMR スペクトルデータ (Tables 6, 7) からオキシメチン [δ_{H} 5.26 (1H, brs)/ δ_{C} 66.5, C-3]、ビニリデン基 [δ_{H} 4.96 (1H, dd, J = 2.8, 1.4 Hz), 4.72 (1H, dd, J = 2.8, 1.4 Hz)/ δ_{C} 91.4, 157.6, C-4, 5]、ビニル基 [δ_{H} 7.09 (1H, td, J = 7.8, 2.2 Hz)/ δ_{C} 127.3, 150.3, C-2, 6]、およびカルボニル炭素 (δ_{C} 166.5, C-1) の存在がそれぞれ1つずつ確認され、 β -hydroxy- γ -methylene- α,β -unsaturated- γ -lactone 骨格を有することが推察された。二重結合 [$\Delta^{2(6)}$] の立体配置に対しては、既知ブタノリド **10** と同じく H-6 (δ_{H} 7.09)と H-7 (δ_{H} 2.48) であること、3位と7位の NOESY 相関 (Figure 12) があることから *E* 配置であると同定した。残り 19個のカーボンシグナルは、6位側鎖上に1つの二重結合といくつかのメチレン基が存在することを示唆していた。6位側鎖上の二重結合の立体配置は、¹³C NMR においてアリル位 (δ_{C} 27.0, 27.2) とオレフィン (δ_{C} 129.8, 129.9) のカーボンシグナルが **10** と一致していることから *Z* 配置であると決定した。さらに HMBC と COSY 相関 (Figure 11) から二重結合の位置は Δ^{20} であると同定した。NMR と HREIMS のスペクトルデータを **10** と比べた結果、脂肪族部分で2つ分のメチレン基が少ないことから、6位側鎖は $n=12$ (Figure 10)であることが決定された。立体構造は旋光度が **10** とほぼ一致していることから推定し、従って、化合物 **1** は (2*E*,3*R*)-3-hydroxy-4-methylidene-2-[(15*Z*)-15-icosenylidene]-butanolide であり、hernanolide A と命名した。

化合物 **2** は黄色固体として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 446.3743 [M]⁺、分子式 C₂₉H₅₁O₃ が観測された。MS および NMR スペクトルデータ (Tables 6, 7, Figures 11, 12) から、**1** より脂肪族側鎖で4つメチレン基が多いことが判明した。化合物 **1** と旋光度がほぼ一致していることから3位の立体配置は *R* 体であると推定した。従って、化合物 **2** は (2*E*,3*R*)-3-hydroxy-4-methylidene-2-[(19*Z*)-19-tetracosenylidene]butanolide (hernanolide B)であると推定した。

化合物 **3** は無色油状物として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 392.3302 $[M]^+$ 、分子式 $C_{25}H_{44}O_3$ を示した。 1H と ^{13}C NMR スペクトルデータ (Tables 6, 7) は既知化合物 miaolinolide⁴⁸⁾ と類似しているが、6 位の化学シフトの違い、すなわち **3** では δ_H 7.10 (1H, td, $J = 7.8, 2.2$ Hz) であるに対し、miaolinolide では δ_H 6.70 (1H, td, $J = 8.0, 2.0$ Hz) であること、H-3 と H-7 の NOESY 相関 (Figure 12) が見られたことから、6 位の二重結合は *E* 配置であるとした。3 位の立体配置については miaolinolide の旋光度との比較によって、*R* 体であると同定した。従って、化合物 **3** は (2*E*,3*S*)-3-hydroxy-4-methylidene-2-icosylidenebutanolide (hernanolide C) であると推定した。

化合物 **4** は黄色固体として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 441.3357 $[M + Na]^+$ 、分子式 $C_{27}H_{46}O_3$ が観測された。 1H ならびに ^{13}C NMR スペクトルデータ (tables 6, 7) は **10** と類似しているが、3 位と 6 位の NOESY 相関 (Figure 12) からラクトンに直結している二重結合 [Δ^2 (6)] は *Z* 配置であることが示唆された。3 位の立体配置は、**4** の旋光度 [α]^{25D} -29.7 (c 0.02, $CHCl_3$) と **10** の旋光度 [α]^{25D} +18.0 (c 0.03, $CHCl_3$) の違いから、*S* 体であると考え、化合物 **4** は (2*Z*,3*S*)-3-hydroxy-4-methylidene-2-[(17*Z*)-17-docosenylidene]butanolide (hernanolide D) であると推定した。

化合物 **5** は黄色固体として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 446.3743 $[M]^+$ 、分子式 $C_{29}H_{51}O_3$ が観測され、**4** より分子量が 28 多いことが示された。また、NMR スペクトルデータ (Tables 6, 7, Figures 11, 12) から、**4** より脂肪族側鎖のメチレン基が 2 つ多いことが明らかになった。立体構造は **4** と旋光度がほぼ一致していることから 3*S* と推定した。従って、化合物 **5** は (2*Z*,3*S*)-3-hydroxy-4-methylidene-2-[(15*Z*)-15-icosenylidene]butanolide (hernanolide E) であると推定した。

化合物 **6** は無色油状物として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 408.3227 $[M]^+$ 、分子式 $C_{25}H_{44}O_4$ が観測された。 1H と ^{13}C NMR スペクトル (tables 6, 7) において、**1** と類似したスペクトルを示したが、ビニリデン基由来のシグナルが観測さ

れず、代わりにメチル基 [δ_{H} 1.62 (3H, s)/ δ_{C} 26.8] とヘミアセタール炭素 (δ_{C} 100.1) 由来のシグナルが観察された。HMBC 相関 (Figure 11) からメチル基とヘミアセタール炭素は 4 位に結合していることが認められた。 Δ^2 (6) の立体に関しては、NOESY スペクトルデータ (Figure 12) で H-7 と H-3 の相関が見られたことから *E* 体と推定した。3 位の立体配置は 6 の旋光度 [α] $^{25}_{\text{D}}$ +116.0 (*c* 0.015, CHCl₃) と類似既知化合物 litseakolide G⁴⁹) の旋光度 [α] $^{25}_{\text{D}}$ +77.4 (*c* 0.09, CHCl₃) を比較し、符号が同じく正になっていることから *R* 体であると推定した⁴⁹⁻⁵¹)。さらには H-3 と H-5 の NOESY 相関から 4 位は *S* 体であると推定した。従って、化合物 6 は (2*E*,3*R*,4*S*)-3,4-dihydroxy-5-methyl-2-[(15*Z*)-15-icosenylidene]butanolide (hernanolide F) であると推定した。

Table 6. ¹H NMR spectroscopic data of compounds **1–6**

position	1^a (CDCl ₃)	2^b (CDCl ₃)	3^b (CDCl ₃)	4^b (CDCl ₃)	5^b (CDCl ₃)	6^a (CDCl ₃)
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)
1						
2						
3	5.26 brs	5.26 brs	5.26 brd (5.6)	5.11 m	5.10 brd (7.3)	4.82 brs
5a	4.72 dd (2.8, 1.4)	4.72 dd (2.8, 1.4)	4.72 dd (2.8, 1.4)	4.67 dd (2.8, 1.4)	4.66 dd (2.8, 1.4)	1.62 s
5b	4.96 dd (2.8, 1.4)	4.96 dd (2.8, 1.4)	4.96 dd (2.8, 1.4)	4.89 dd (2.8, 1.4)	4.89 dd (2.8, 1.4)	
6	7.09 td (7.8, 2.2)	7.09 td (7.8, 2.2)	7.10 td (7.8, 2.2)	6.69 td (7.8, 2.2)	6.67 td (7.8, 2.2)	7.04 td (7.8, 2.2)
7	2.48 m	2.48 m	2.48 m, 2.43 m	2.78 m	2.76 m	2.38 m
8	1.52 m	1.52 m	1.53 m	1.46 m	1.45 m	1.52 m
9-18	1.26 m ^c	1.26 m ^e	1.25 m ^g	1.25 m ^h	1.25 m ^j	1.25 m ^m
19	2.00 m	1.26 m ^e	1.25 m ^g	1.25 m ^h	1.25 m ^j	2.01 m ⁿ
20	5.36 m ^d	1.26 m ^e	1.25 m ^g	1.25 m ^h	1.25 m ^j	5.34 t (4.8) ^o
21	5.36 m ^d	1.26 m ^e	1.25 m ^g	2.02 m	1.25 m ^j	5.34 t (4.8) ^o
22	2.02 m	1.26 m ^e	1.25 m ^g	5.35 m ⁱ	1.25 m ^j	2.01 m ⁿ
23	1.26 m ^c	2.00 m	1.25 m ^g	5.35 m ⁱ	2.01 m ^k	1.25 m ^m
24	1.32 m	5.36 m ^f	1.25 m ^g	2.02	5.33 m ^l	1.31
25	0.89 t (6.9)	5.36 m ^f	0.89 brt (7.3)	1.25 m ^h	5.33 m ^l	0.89 t (6.0)
26		2.02 m		1.33 m	2.01 m ^k	
27		1.26 m ^e		0.88 t (6.9)	1.25 m ^j	
28		1.32 m			1.32 m	
29		0.89 t (7.3)			0.87 t (6.9)	
2-OH		2.26 m				

^a600 MHz, ^b400MHz, ^{c-o}Overlapping signals.

Table 7. ^{13}C NMR spectroscopic data in CDCl_3 of compounds **1–6**

position	1^a	2^b	3^b	4^b	5^b	6^a
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	166.5	166.5	166.3	163.1		166.4
2	127.3	127.3	127.2	127.4	127.3	125.2
3	66.5	66.5	66.6	68.9	68.9	70.9
4	157.6	157.6	157.5	160.1	160.2	100.1
5	91.4	91.4	91.5	90.3	90.4	26.8
6	150.3	150.3	150.3	151.4	151.4	151.9
7	29.8	29.8	29.8	29.8	29.8	30.1
8	28.4	28.4	28.4-29.6 ^d	28.4	28.4	29.5-29.9 ^g
9-18	29.4-30.0	29.4-30.0 ^c	28.4-29.6 ^d	29.4-30.0 ^e	29.4-30.0 ^f	29.5-29.9 ^g
19	27.0	29.4-30.0 ^c	28.4-29.6 ^d	29.4-30.0 ^e	29.4-30.0 ^f	27.0
20	129.8	29.4-30.0 ^c	28.4-29.6 ^d	29.4-30.0 ^e	29.4-30.0 ^f	129.8
21	129.9	29.4-30.0 ^c	28.4-29.6 ^d	27.0	29.4-30.0 ^f	129.9
22	27.2	29.4-30.0 ^c	28.4-29.6 ^d	129.8	29.4-30.0 ^f	27.7
23	32.0	27.0	32.0	129.9	27.0	32.1
24	22.4	129.8	22.8	27.2	129.8	22.5
25	14.0	129.9	14.1	32.0	129.9	14.1
26		27.2		22.3	27.2	
27		32.0		14.0	32.0	
28		22.4			22.4	
29		14.0			14.0	

^a150 MHz, ^b100MHz, ^{c-g}Overlapping signals.

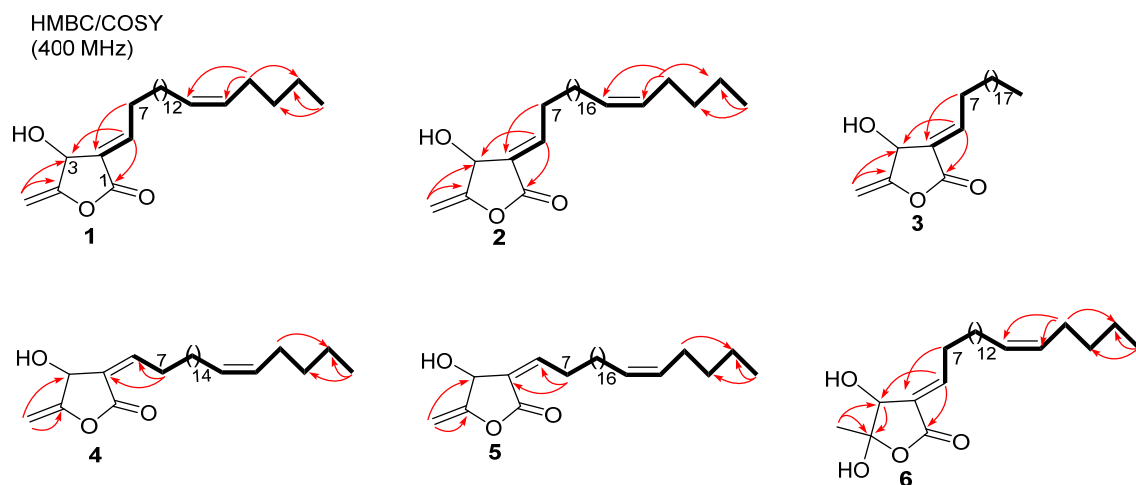


Figure 11. Selected HMBC correlations (arrows in red), COSY connectivities (bold lines) for compounds 1–6.

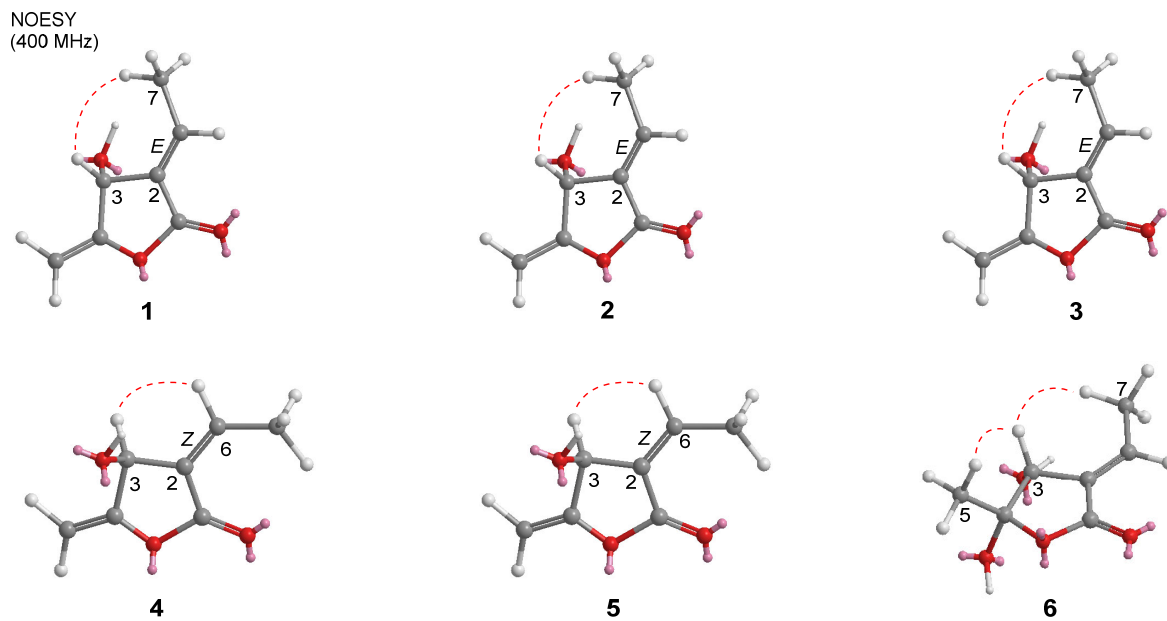


Figure 12. Key NOESY (red dashed lines) correlations for compounds 1–6.

化合物 **7** は無色油状物として得られ、HREIMS スペクトルで m/z 450.3702 $[M]^+$ 、分子式 $C_{28}H_{50}O_4$ を示した。NMR スペクトルデータ (Table 8, Figures 13, 14) と EIMS のフラグメントピーク (Figure 15) を比較した結果、既知化合物 illigerone A^{52} と一致していることが明らかになった。しかし、ECD スペクトル (Figure 16) が illigerone A と違うコットン効果を示し、さらに旋光度符号も違うことから、**7** は illigerone A のエナンチオマーであると同定した。従って、化合物 **7** は (3*R*,4*E*,20*Z*)-3-hydroxy-4-(2-methoxy-2-oxo)hexacos-4,20-dien-2-one (hernanolide G) であると決定した。

Table 8. 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data of **7**.

position	7 ($CDCl_3$)	
	δ_C^a	δ_H (J in Hz) ^b
1	24.8	2.15 s
2	206.3	
3	73.4	4.89 d (4.2)
4	129.8	
5	149.0	7.07 t
6	28.7	2.34 td (14.8, 8.0)
7	29.3	1.50 m
8	29.4-30.0 ^c	1.25 m ^d
9-18	29.4-30.0 ^c	1.25 m ^d
19	27.2	2.00 m ^e
20	129.8	5.34 t (4.8) ^f
21	129.9	5.34 t (4.8) ^f
22	27.2	2.00 m ^e
23	29.8	1.25 m ^d
24	31.9	1.25 m ^d
25	22.7	1.31 m
26	14.1	0.89 t (6.0)
3-OH		4.00 brs
4-OAc	C=O	166.5
	OCH ₃	52.0

^a100 Hz, ^b400 Hz, ^{c-f}Overlapping signals.

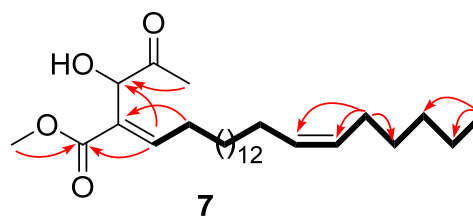


Figure 13. HMBC and COSY correlations of **7**.

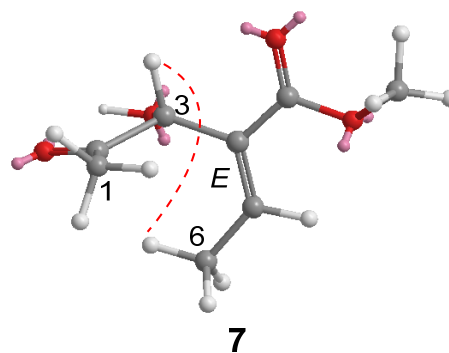


Figure 14. NOESY correlations of **7**.

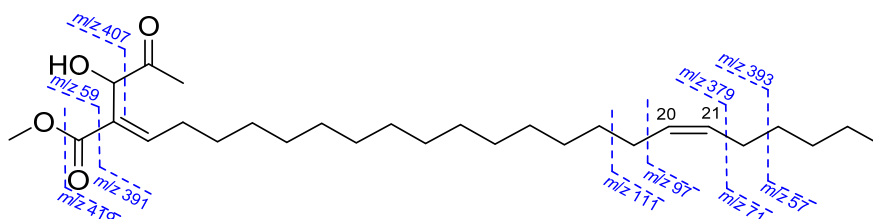


Figure 15. EIMS fragmentation of **7**.

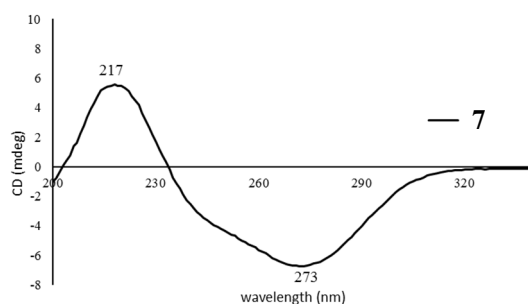


Figure 16. Experimental ECD spectra of compound 7.

化合物 **8** は黄色固体として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 591.2097 [$M + Na$]⁺、分子式 $C_{25}H_{44}O_4$ が観測された。¹H ならびに ¹³C NMR スペクトルデータ (Table 9) は既知化合物 (7*S*,8*R*,7'*R*,8'*S*)-4,9,7'-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-7,9'-epoxylignan-4'-*O*- β -D-glucopyranoside⁵³) と類似しているが、**8** では芳香族 3 位にメトキシ基が結合していると推定された。このことは、2 位のプロトンと 3 位に結合しているメトキシのプロトンの NOESY 相関 (Figure 19) があることから証明された。一方、H-7/H-9、H-8/H-7'、および H-8'/H-9 の ROESY 相関 (Figure 19) から H-7/H-8 と H-8/H-8' はトランス型であることが明らかになった。ECD スペクトル (Figure 20) では、前述の類似既知化合物と同じく 230–280 nm でポジティブコットン効果を示したことから、*rel*-7*S*,8*R*,8'*S* であると推定し、7'位の立体に対しては今検討中である。従って、化合物 **8** は (7*S*,8*R*,8'*S*)-4,9,7'-trihydroxy-3,5,3'-trimethoxy-7,9'-epoxylignan-4'-*O*- β -D-glucopyranoside であると決定した。

化合物 **9** は黄色固体として得られ、HRFABMS スペクトルで m/z 561.1916 [$M + Na$]⁺、分子式 $C_{26}H_{34}O_{12}$ を示した。¹H と ¹³C NMR スペクトルデータ (Table 9) は既知化合物 8-*O*-3'-neolignan **21** (Figure 17)⁵⁴) と類似したスペクトルを示しているが、新たに β -グルコース (Glc) のシグナルが観察された。Glc-1 位のプロトンと 5 位のプロトンに NOESY 相関 (Figure 19) が観察されたことから、 β -Glc は 4 位に結合していることが明らかになった。7 位と 8 位の相対立体配置は DMSO 重溶媒で測定した ¹H NMR スペクトル (Figure 145) で、既知化合物と同じカップリング定数 ($J = 4.8$ Hz) を示していることから、エリスロ型であると決定した。絶対立体構造は **9** の ECD スペクトル (Figure 20) と既知化合物 **21**⁵⁴) が同じく

210–250 nm でネガティブコットン効果を示していることから *7S*, *8R* であると同一定した。従って、化合物 **9** は (*7S,8R,7'E*)-7,9,9'-trihydroxy-3,5'-dimethoxy-8-3'-oxyneolign-7'-ene-4-*O*- β -D-glucopyranoside であると決定した。

Table 9. ^1H and ^{13}C NMR Spectroscopic Data of **8** and **9**

position	8 (CD ₃ OD)		9 (CD ₃ OD)	
	δ_{C}^a	δ_{H} (<i>J</i> in Hz) ^b	δ_{C}^a	δ_{H} (<i>J</i> in Hz) ^b
1	134.1		131.5	
2	104.6 ^c	6.52 s ^e	112.3	7.09 brs
3	149.3 ^d		147.4	
4	135.9		150.5	
5	149.3 ^d		120.6	7.06 d (8.2)
6	104.6 ^c	6.52 s ^e	121.1	6.96 dd (2.2, 8.2)
7	85.1	4.63 d (7.3)	74.9	4.85 overlap
8	53.7	1.89 m	85.9	4.36 m
9	62.3	3.87 m, 3.63 m	62.2	3.82 m, 3.47 m
1'	139.5		137.8	
2'	112.2	6.92 d (1.8)	118.7 ^h	6.86 brs ⁱ
3'	150.7		149.2	
4'	147.5		118.7 ^h	6.86 brs ⁱ
5'	117.5	7.11 d (8.2)	151.2	
6'	120.9	6.82 dd (8.2, 1.8)	111.3	6.97 d (2.2)
7'	74.8	4.52 d (8.2)	132.9	6.52 d (15.4)
8'	50.7	2.53 m	111.3	6.27 dd (5.7, 15.4)
9'	71.4	4.26 dd (9.0, 4.6), 3.92 m	63.8	4.19 d (5.7)
3-OMe	56.9	3.84 s ^f	56.7	3.81 s
5-OMe	56.8	3.84 s ^f	56.5	3.79 s
3'-OMe	56.7	3.83 s		
Glc-1	102.7	4.84 m	103.1	4.81 d (6.9)
Glc-2	74.9	3.4-3.8 m ^g	73.9	3.4-3.8 m ⁱ
Glc-3	78.2	3.4-3.8 m ^g	77.9	3.4-3.8 m ^j
Glc-4	76.2	3.4-3.8 m ^g	71.4	3.4-3.8 mh ⁱ
Glc-5	77.9	3.4-3.8 m ^g	78.2	3.4-3.8 m ^j
Glc-6	62.5	3.4-3.8 m ^g	62.5	3.4-3.8 m ^j

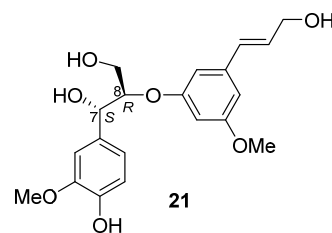


Figure 17. Structure of **21**.

^a100 Hz, ^b400 Hz, ^{c-j}Overlapping signals.

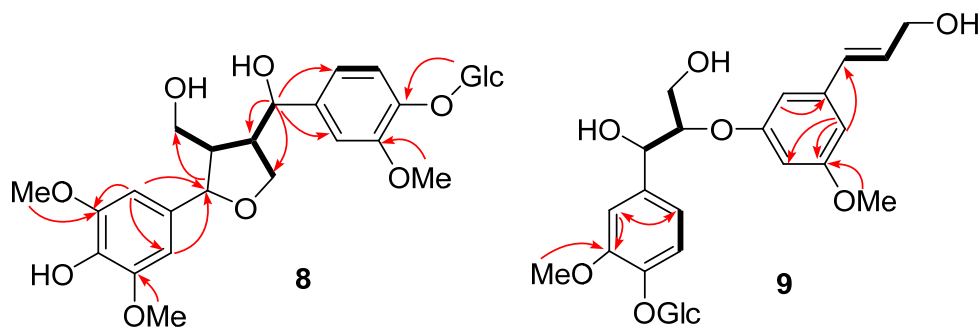


Figure 18. HMBC and COSY correlations of **8** and **9**.

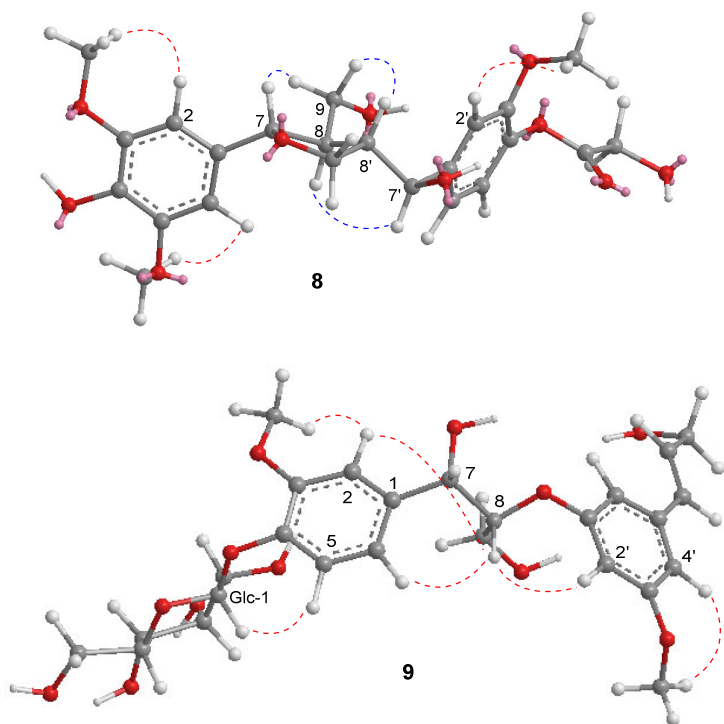


Figure 19. Key NOESY (red lines) and Key ROESY correlations (blue lines) for **8** and **9**.

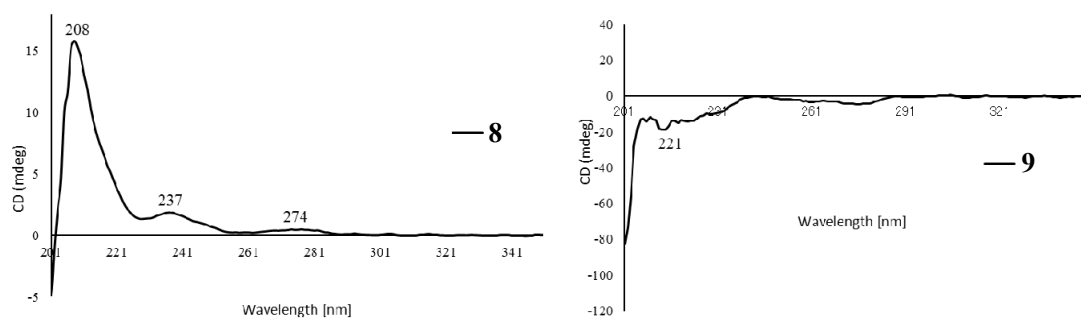


Figure 20. Experimental ECD spectra of **8** and **9**.

第四節 ヒトがん細胞増殖抑制評価

H. nymphaeifolia の実の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物から単離した化合物について、第1章第四節と同様にヒトがん細胞に対する増殖抑制作用を評価した (Table 10)。

Table 10. Antiproliferative activity of the isolated compounds from *H. nymphaeifolia*

compounds	cell lines ^a (IC ₅₀ μM)				
	A549	MDA-MB-231	MCF-7	KB	KB-VIN
1	>40	22.5	>40	25.7	31.7
2	21.9	24.6	24.6	22.6	21.4
8	35.1	35.3	35.7	32.7	21.7
10	12.5	10.8	8.81	18.6	8.79
13	32.8	37.7	33.5	>40	8.66
14	23.2	32.9	32.8	23.2	19.9
15	8.08	20.81	6.84	20.25	5.37
16	5.68	8.19	8.06	12.6	5.34
17	37.8	>40	38.0	>40	8.18
18	>40	>40	>40	>40	>40
PXL ^b (nM)	6.53	8.36	12.1	7.07	2213.3

^aKB (epidermoid carcinoma of the nasopharynx), KB-VIN (P-gp-overexpressing MDR subline of KB), A549 (lung carcinoma), MDA-MB-231 (triple-negative breast cancer), MCF-7 (ER-positive & HER2-negative breast cancer). ^bPaclitaxel

ブタノリド **1**、**2** ならびにリグナン **8**、**14**、**18** は IC₅₀>20 μM と顕著な細胞増殖抑制効果を示さなかったが、リグナン **15** と **16** は A549、MCF-7、ならび MDR 細胞 (KB-VIN) に対して IC₅₀<10 μM の増殖抑制活性を示した。既知リグナン類 **13** と **17** が選択的に MDR (KB-VIN) 細胞に対して IC₅₀<10 μM の活性を示すことがわかった。

第五節 小括

- (1) インドネシア産植物 *H. nymphaeifolia* の実の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物から各種クロマトグラフィーを用いて、7 種の新規ブタノリド類、hernanolides A-G (1-7)、および 2 種の新規リグナングルコース類、8 と 9 含む 20 種の化合物を単離し、絶対立体配置を含めてその構造を決定した。
- (2) *H. nymphaeifolia* の抽出物から得られた化合物のがん細胞増殖抑制作用を調べた結果、新規化合物には増殖抑制効果が見られなかったが、既知リグナン類 15 と 16 はヒトがん細胞の種類に対して IC₅₀<10 μM の増殖抑制活性を示した。既知リグナン類 13 と 17 が選択的に MDR (KB-VIN) 細胞に対して IC₅₀<10 μM の活性を示すことがわかった。

第六節 実験の部

General Experimental Procedures. Infrared spectra (IR) were obtained with a Thermo Fisher Scientific NICOLET iS5 FT-TR spectrometer from samples in CHCl₃ and MeOH. NMR spectra were measured on JEOL JMN-ECA600 and JMN-ECS400 spectrometers with tetramethylsilane as an internal standard, and chemical shifts are stated as δ values. HRMS data were recorded on a JMS-700 Mstation (FAB or EI) mass spectrometer. Analytical and preparative TLC were carried out on precoated silica gel 60F₂₅₄ and RP-18F₂₅₄ plates (0.25 or 0.50 mm thickness; Merck). MPLC was performed on Combiflash Rf (Teledyne Isco) with silica gel and C18 cartridges (Biotage, Uppsala Sweden). Preparative HPLC was operated on a GL Science recycling system (PU714 pump and UV702 UV-Vis detector) using an InertSustain C18 column (5 μ M, 20 \times 250 mm).

Plant Material. The crude MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) extract (N053499) from fruit of *H. nymphaeifolia* (originally as *H. peltata*) collected in Java (Indonesia) was provided by NCI/NIH. A voucher specimen was deposited at the Smithsonian Institution (Washington, D.C.) and voucher extracts were deposited at the NCI (Frederick, MD) and Kanazawa University (Kanazawa, Japan).

Extraction and Isolation. The crude extract N053499 (25.0 g) was dissolved into MeOH/H₂O (9:1) then partitioned with *n*-hexane, EtOAc, and *n*-BuOH, yielding *n*-hexane fraction (17.4 g), EtOAc fraction (3.94 g), *n*-BuOH fraction (1.72 g), and H₂O (0.997 g) fraction. The EtOAc-soluble fraction was subjected to silica gel column chromatography (CC) with a gradient system [*n*-hexane/EtOAc 100:0 (500 mL) \rightarrow 90:10 (500 mL) \rightarrow 70:30 (1000 mL) \rightarrow 50:50 (1000 mL) \rightarrow 30:70 (1000 mL) \rightarrow 10:90 (1000 mL) \rightarrow 0:100 (500 mL) \rightarrow EtOAc/MeOH 50:50 (500 mL) \rightarrow MeOH (1000 mL)] to yield 9 fractions, F1–F9. F3 (123 mg) was subjected to silica gel MPLC (RediSep Rf

GOLD High Performance 4 g) eluted with *n*-hexane/EtOAc (9:1 to 0:1) to afford 5 subfractions 3a-e. Subfraction 3b (21.6 mg) was purified by repeated recycling reversed-phase preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:19), to provide compounds **2** (2.2 mg), **3** (1.4 mg), and **10** (1.2 mg). F4 (77.9 mg) was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂ followed by MeOH to yield eight subfractions 4a-h. Subfraction 4d (1.0 mg) was further separated by preparative normal-phase TLC with CH₂Cl₂ to afford compound **5** (0.4 mg). Subfraction 4f (4.6 mg) was purified by repeated recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:2) to afford compound **7** (0.6 mg), Subfraction 4h (54.0 mg) was purified by preparative normal-phase TLC with CH₂Cl₂/EtOAc (19:1) to afford compounds **13** (13.2 mg) and **15** (2.1 mg). F6 was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (19:1 to 0:1) followed by MeOH to obtain six subfractions, 6a-f. Subfraction 6b (37.5 mg) was purified by repeated recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:2) to afford compounds **12** (7.1 mg) and **16** (20.3 mg). Subfraction 6c (15.9 mg) was purified by repeated recycling preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:2), to provide compound **17** (4.1 mg). The *n*-hexane fraction (12.0 g) was subjected to silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 120 g) with a gradient system [*n*-hexane/CH₂Cl₂ 1:1 (600 mL) → 2:3 (1400 mL) → 3:7 (1200 mL) → 4:1 (1400 mL) → CH₂Cl₂ (1200 mL) → CH₂Cl₂/EtOAc 1:1 (1000 mL) → EtOAc (1000 mL) → MeOH (1400 mL)] to yield fifteen fractions, F1-F15. F6 (695 mg) was silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 24 g) with *n*-hexane/EtOAc (9:1 to 0:1) followed by MeOH to yield ten subfractions 6a-j. Subfraction 6e (197 mg) was silica gel CC eluted with *n*-hexane/EtOAc (2:3 to 0:1) followed by MeOH to yield eleven subfractions 6e1-11. Subfraction 6e5 (4.9 mg) was purified by preparative normal-phase TLC with *n*-hexane/CH₂Cl₂ (3:1) to afford compound **6** (0.4 mg). F11 (1.12 g) was silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 24 g) with *n*-hexane/EtOAc (9:1 to 0:1) followed by MeOH to yield seven subfractions 11a-g. Subfraction 11f (535 mg) was purified by

MPLC on ODS-25 (YMC-DispoPack AT 12 g) with H₂O/MeOH (1:3), followed by recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:2) to afford compounds **13** (0.4 mg) and **14** (0.2 mg). F13 (1.35 g) was silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 24 g) with *n*-hexane/CH₂Cl₂/EtOAc (1:1:0 to 0:0:1) followed by MeOH to yield ten subfractions 13a–j. Subfraction 13e (48.2 mg) was purified by ODS preparative TLC developing three times using MeOH to afford compounds **1** (3.2 mg), **2** (1.1 mg), and **10** (1.0 mg). The *n*-BuOH-soluble fraction (1.72 g) was subjected to silica gel MPLC (RediSep Rf GOLD High Performance 120 g) with a gradient system [CHCl₃/MeOH 1:0 (1000 mL) → 10:1 (1400 mL) → 5:1 (1200 mL) → 1:1 (1800 mL) → MeOH (1400 mL)] to yield 9 fractions, F1–F9. F1 (147 mg) was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (1:0 to 0:1) followed by MeOH to obtain fourteen subfractions, 1a–n. Compound **4** (0.3 mg) was determined from subfraction 1e. Subfraction 1g (3.3 mg) was purified by preparative normal-phase TLC with CH₂Cl₂/EtOAc (95:5) to afford compound **10** (1.3 mg). Subfraction 1k was purified by recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (1:3) to afford compounds **11** (1.8 mg), **14** (0.3 mg), and **17** (0.4 mg). F2 (44.3 mg) was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/EtOAc (9:0 to 0:1) followed by MeOH to obtain nine subfractions, 2a–i. Subfraction 2b (1.1 mg) was purified by ODS preparative TLC developing three times using H₂O/MeOH (1:8) to yield compound **13** (0.6 mg). F3 (33.8 mg) was purified by preparative normal-phase TLC with CHCl₃/MeOH (9:1) to afford compound **8** (1.0 mg). F5 (149 mg) was subjected to silica gel CC eluted with CH₂Cl₂/MeOH (10:1 to 1:1) followed by MeOH to obtain seven subfractions, 5a–g. Subfraction 5d (75.6 mg) was purified by MPLC on ODS-25 (YMC-DispoPack AT 12 g) with H₂O/MeOH (1:3), followed by recycle preparative HPLC with H₂O/MeOH (2:3) to afford compounds **9** (1.3 mg), **18** (2.3 mg), **19** (1.0 mg), and **20** (1.2 mg).

Hernanolide A (1). Yellow amorphous solid; $[\alpha]^{25}_D +27.3$ (*c* 0.075, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2923, 2853, 2017, 1733, 1457, 1278, 1219; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HREIMS *m/z* 390.3137 [M]⁺ (calcd for C₂₅H₄₂O₃, 390.3134).

Hernanolide B (2). Yellow amorphous solid; $[\alpha]^{25}_D +26.1$ (*c* 0.12, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2923, 2852, 1731, 1464, 1265, 1074; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HREIMS *m/z* 446.3743 [M]⁺ (calcd for C₂₉H₅₁O₃, 446.3760).

Hernanolide C (3). Colorless oil; $[\alpha]^{25}_D +26.0$ (*c* 0.07, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2916, 2849, 2016, 1750, 1678, 1470, 1278, 1184; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HREIMS *m/z* 392.3302 [M]⁺ (calcd for C₂₅H₄₄O₃, 392.3290).

Hernanolide D (4). Yellow amorphous solid; $[\alpha]^{25}_D -29.7$ (*c* 0.02, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2923, 2852, 1783, 1733, 1465, 1373, 1287; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HRFABMS *m/z* 441.3357 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₇H₄₆O₃Na, 441.3345).

Hernanolide E (5). Yellow amorphous solid; $[\alpha]^{25}_D -21.1$ (*c* 0.015, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2922, 2852, 2017, 1770, 1731, 1557, 1458, 1375, 1287; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HREIMS *m/z* 446.3743 [M]⁺ (calcd for C₂₉H₅₀O₃, 446.3760).

Hernanolide F (6). Colorless oil; $[\alpha]^{25}_D +116.0$ (*c* 0.015, CHCl₃); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2923, 2852, 1733, 1558, 1540, 1456, 1287; ¹H and ¹³C NMR, Tables 6, 7; HREIMS *m/z* 408.3227 [M]⁺ (calcd for C₂₅H₄₄O₄, 408.3240).

Hernanolide G (7). Colorless oil; $[\alpha]^{25}_D -78.5$ (*c* 0.03, acetonitrile); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 2922, 2852, 2016, 1717, 1669, 1558, 1456, 1436; ¹H and ¹³C NMR, Table 8; HREIMS *m/z* 450.3702 [M]⁺ (calcd for C₂₈H₅₀O₄, 450.3709).

(7*S*,8*R*,7'*S*,8'*S*)-4,9,7'-trihydroxy-3,5,3'-trimethoxy-7,9'-epoxylignan-4'-*O*- β -*D*-glucopyranoside (**8**). yellow solid; $[\alpha]^{25}_D +5.6$ (*c* 0.055, MeOH); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 3330, 2945, 2833, 1645, 1514, 1450, 1112; ¹H and ¹³C NMR, Table 9; HRFABMS *m/z* 591.2097 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₇H₃₆O₁₃Na, 591.2054).

(7S,8R,7'E)-7,9,9'-trihydroxy-3,5'-dimethoxy-8-3'-oxyneolign-7'-ene-4-O-β-D-glucopyranoside (9). yellow solid; $[\alpha]^{25}_D -71.8$ (*c* 0.065, MeOH); IR ν_{\max} (CHCl₃) cm⁻¹ 3386, 3293, 1657, 1511, 1265; ¹H and ¹³C NMR, Table 9; HRFABMS *m/z* 561.1916 [M + Na]⁺ (calcd for C₂₆H₃₄O₁₂Na, 561.1948).

Assay for Antiproliferative Activity: Antiproliferative activity of the compounds was determined by the sulforhodamine B (SRB) assay as described Chapter I.

総括

生物多様性に富む熱帯雨林産植物には、未知なる医薬品候補化合物が数多く存在している可能性がある。しかし、植物化学的に精査された種は、全植物のわずか 15%程度だと言われている。本研究では、NCI が所有する熱帯雨林産植物 *L. corymbulosa* と *H. nymphaeifolia* の MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) 抽出物の植物化学的な精査を行った。各種クロマトグラフィーを駆使し、*L. corymbulosa* から 11 種の新規を含む 16 種のイソズエラニン骨格のクレロダンジテルペン類を、また *H. nymphaeifolia* からは 7 種の新規ブタノリド類および 2 種の新規リグナン配糖体を含む 20 種の天然物を単離した。得られた新規化合物全てについて、各種スペクトル解析により平面構造並びに相対立体構造を明らかにした。さらに、旋光度、ECD スペクトル、および改良モッシャー法を用いてそれらの絶対立体構造を決定した。

- (3) 単離した化合物については、5 種のヒトがん細胞に対する増殖抑制作用を評価した。その結果、イソズエラニン骨格を有するクレロダンジテルペン類の構造活性相関が明らかとなり、2 位、6 位置換基のパターンが活性に影響を及ぼすことが示唆された。更に新規に単離されたブタノリド類およびリグナン配糖体には顕著な活性が見られなかったが、2 種のリグナンが選択的に MDR (KB-VIN) 細胞に対して IC₅₀<10 μM の活性を示すことがわかった。

謝辞

本研究ならびに研究室の生活において終わりまで、多大なご支援、ご指導を賜りました金沢大学医薬保健研究域 薬学系 分子生薬研究室 准教授 後藤（中川）享子先生に深謝いたします。また、本研究において、ご助力、ご助言頂いただきました本分野の助教授 斎藤 洋平先生に厚く御礼申し上げます。

細胞毒性試験を行って頂きましたノースカロライナ大学 後藤 益生 先生に感謝いたします。

博士論文の審査を担当していただき、また、激励のご言葉を賜りました本分野の准教授 佐々木 陽平先生ならびに、本学 学際科学実験センター 准教授 内山 正彦先生、本学 精密分子構築学研究室 准教授 稲垣冬彦先生、本学 機能性分子合成学研究室 准教授 吉村智之先生に感謝いたします。

また、研究や生活にあたり様々な協力下さった分子生薬学研究室の皆様から感謝いたします。

最後に、日頃から温かくご支援して下さいました両親及び妻に感謝いたします。

引用文献

- (1) Lughadha, E. N.; Govaerts, R.; Belyaeva, I.; Black, N.; Lindon, H.; Allkin, R.; Magill, R. E. and Nicolson, N. *Phytotaxa*, **2016**, 272, 82–88.
- (2) Cragg, G. M.; Newman, D. J. *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 100, 72–79.
- (3) Li, R.; Morris-Natschke, S.; Lee, K. H. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 1166–1226.
- (4) Calderón, C.; Ford, C. D.; Castro, V.; Merfort, I.; Murillo, R. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 455–463.
- (5) Williams, R. B.; Norris, A.; Miller, J. S.; Birkinshaw, C.; Ratovoson, F.; Andriantsiferana, R.; Rasamison, V. E.; Kingston, D. G. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 206–209.
- (6) Whitson, E. L.; Thomas, C. L.; Henrich, C. J.; Sayers, T. J.; McMahon, J. B.; McKee, T. C. *J. Nat. Prod.* **2010**, 73, 2013–2018.
- (7) Shen, Y. C.; Wang, C. H.; Cheng, Y. B.; Wang, L. T.; Guh, J. H.; Chien, C. T.; Khalil, A. T. *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 316–321.
- (8) Shen, Y. C.; Lee, C. L.; Khalil, A. T.; Cheng, Y. B.; Chien, C. T.; Kuo, Y. H. *Helv. Chim. Acta.* **2005**, 88, 68–77.
- (9) Shen, Y. C.; Cheng, Y. B.; Ahmed, A. F.; Lee, C. L.; Chen, S. Y.; Chien, C. T.; Kuo, Y. H.; Tzeng, G. L. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1665–1668.
- (10) Shen, Y. C.; Cheng, Y. B.; Chen, Y. H.; Khalil, A. T.; Ko, C. L. *J. Chin. Chem. Soc.* **2005**, 52, 1263–1268.
- (11) Chen, C. Y.; Cheng, Y. B.; Chen, S. Y.; Chien, C. T.; Kuo, Y. H.; Guh, J. H.; Khalil, A. T.; Shen, Y. C. *Chem. Biodiversity.* **2008**, 5, 162–167.
- (12) Wang, B.; Wang, X. L.; Wang, S. Q.; Shen, T.; Liu, Y. Q.; Yuan, H.; Lou, H. X.; Wang, X. N. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1573–1579.
- (13) Xu, J.; Zhang, Q.; Wang, M.; Ren, Q.; Sun, Y.; Jin, D. Q.; Xie, C.; Chen, H.; Ohizumi, Y.; Guo, Y. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 2182–2189.

- (14) Nguyen, H. T.; Truong, N. B.; Doan, H. T.; Litaudon, M.; Retailleau, P.; Do, T. T.; Nguyen, H. V.; Chau, M. V.; Pham, C. V. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2726–2730.
- (15) Ford, C. D.; Calderón, C.; Sehgal, P.; Fedosova, N. U.; Murillo, R.; Olesen, C.; Nissen, P.; Møller, J. V.; Merfort, I. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1262–1270.
- (16) Tropicos. <http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Laetia&commonname=>, searched on 11/19/2018.
- (17) Henry, G. E.; Adams, L. S.; Rosales, J. C.; Jacobs, H.; Heber, D.; Seeram, N. P. *Cancer Lett.* **2006**, *244*, 190–194.
- (18) Jullian, V.; Bonduelle, C.; Valentin, A.; Acebey, L.; Duigou, A. G.; Prévost, M. F.; Sauvain, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5065–5070.
- (19) Gibbons, S.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 635–638.
- (20) Beutler, J. A.; McCall, K. L.; Herbert, K.; Johnson, T.; Shoemaker, R. H.; Boyd, M. R. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 233–236.
- (21) Suzuki, A.; Saito, Y.; Fukuyoshi, S.; Goto, M.; Miyake, K.; Newman, D. J.; O’Keefe, B. O.; Lee, K. H. and Nakagawa-Goto, K. *J. Nat. Prod.* **2017**, *80*, 1065–1072.
- (22) Aimaiti, S.; Suzuki, A.; Saito, Y.; Fukuyoshi, S.; Goto, M.; Miyake, K.; Newman, D. J.; O’Keefe, B. R.; Lee, K. H. and Nakagawa-Goto, K. *J. Org. Chem.* **2018**, *83*, 951–963.
- (23) Gibbons, S.; Gray, A. I.; Waterman, P. G. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 565–570.
- (24) Pereira, C. A. B.; Oliveira, F. M.; Conserva, L. M.; Lemos R. P. L.; Andrade, E. H. *A. Biochemical Systematics and Ecology* **2007**, *35*, 637–639.
- (25) Lakshmi, V.; Pandey, K.; Mishra, S. K.; Srivastava, S.; Mishra, M. and Agarwa, S. K. *Rec. Nat. Prod.* **2009**, *3*, 1–22.
- (26) Pettit, G. R.; Meng, Y. H.; Gearing, R. P.; Herald, D. L.; Pettit, R. K.; Doubek, D. L.; Chapuis, J. C. and Tackett, L. P. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 214–220.

- (27) Udino, L.; Abaul, J.; Bourgeois, P.; Corrichon, L.; Duran, H.; Zedde, C. *Planta Med.* **1999**, *65*, 279–281.
- (28) Wei, C.Y.; Wang, S. W.; Ye, J. W.; Hwang, T. L.; Cheng, M. J.; Sung, P. J.; Chang, T. H. and Chen, J. J. *Molecules* **2018**, *23*, 2286–2298.
- (29) Lavault, M.; Cabalion, P.; Bruneton, J. *Planta Med.* **1982**, *46*, 119–121.
- (30) Chen, J. J.; Tsai, I. L. and Chen, I. S. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 156–158.
- (31) Chen, J. J.; Ishikawa, T.; Duh, C. Y.; Tsai, I. L.; Chen, I. S. *Planta Med.* **1996**, *62*, 528–533.
- (32) Angerhofer, C. K.; Guinaudeau, H.; Wongpanich, V.; Pezzuto, J. M. and Cordell, G. *A. J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 59–66.
- (33) Rasoanaivo, R.; Urverg, R.; Rafatro, H.; Ramanitrahasimbola, D.; Palazzino, G.; Galeffi, C. and Nicoletti, M. *Planta Med.* **1998**, *64*, 58–62.
- (34) Dittmar, A. *J. Ethnopharmacol.* **1991**, *33*, 243–251.
- (35) Bruneton, J.; Shamma, M.; Minard, R. D.; Freyer, A. J. and Guinaudeau, H. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 3957–3960.
- (36) Chen, I. S.; Chen, J. J.; Duh, C. Y. and Tsai, I. L. *phytochemistry* **1997**, *45*, 991–996.
- (37) Chen, I. J.; Chang, Y. L.; Teng, C. M.; Chen I. S. *Planta Med.* **2000**, *66*, 251–256.
- (38) Yoder, B. J.; Cao, S.; Norris, A.; Miller, J. S.; Ratovoson, F.; Andriantsiferana R.; Rasamison, V. E. and Kingston, D. G. I. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 37–41.
- (39) Muto, N.; Tomokuni, T.; Haramoto, M.; Tatemoto, H.; Nakanishi, T.; Inatomi, Y.; Murata, H. and Inada, A. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72*, 477–484.
- (40) Trazzi, G.; André, M. F. and Coelho, F. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2327–2339.
- (41) Okunishi, T.; Umezawa, T.; Shimada, M. *J. Wood Sci.* **2000**, *46*, 234–242.
- (42) Li, N.; Wu, J. L.; Sakai, J. I. and Ando, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1421–1426.
- (43) Ahmed, A. A.; Mahmoud, A. A.; Ali, E. T.; Tzakou, O.; Couladis, M.; Mabry, T. J.;

- Ga'ti, T.; To'th, G. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 851–856.
- (44) Iida, T.; Nakano, M. and Ito, K. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 673–675.
- (45) Asikin, Y.; Takahashi, M.; Mizu, M.; Takara, K.; Okua, H. and Wada, K. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 1209–1215.
- (46) Calis, I.; Kirmizibekmez, H.; Beutler, J. A.; Donmez, A. A.; Yalc, F. N.; Kilic, I. E.; Ozlap, M.; Ruedi, P.; Tasdemir, D. *Turk. J. Chem.* **2005**, *29*, 71–81.
- (47) Sugiyama, M. and Kikuchi, M. *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1553–1555.
- (48) Tsenga, M.; Su, Y.S.; Cheng, M. J.; Liu, T. W.; Chen, I. S.; Wu, M. D.; Chang, H. S. and Yuan, G. F. *Chem. Biodivers.* **2013**, *10*, 303–312.
- (49) Cheng, H. I.; Lin, W.Y.; Duh, C. Y.; Lee, K. H.; Tsai, I. L. and Chen, I. S. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1502–1505.
- (50) Juan, C.; Martinez, V.; Yoshida, M. and Gottlieb, O. R. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 459–464.
- (51) Takeda, K. I.; Sakurawi, K. and Ishi, H. *Tetrahedron* **1972**, *28*, 3757–3766.
- (52) Li, X. J.; Dong, J. W.; Cai, L.; Wang, J. P.; Yu, N. X.; Ding, Z. T. *Phytochem. Lett.* **2017**, *19*, 181–186.
- (53) Yang, Y. N.; Huang, X. Y.; Feng, Z. M.; Jiang, J. S. and Zhang, P. C. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 9095–9102.
- (54) Greca, M. D.; Molinaro, A.; Monaco, P. and Previtera, L. *Phytochemistry* **1994**, *35*, 777–779.