

*Santalum album* 等からの  
Wnt シグナルに作用する天然物の探索

千葉大学大学院 医学薬学府 先端医学薬学専攻

活性構造化学研究室

佐藤 知幸

(2020 年修了)

## 目次

序論	3
第1章 研究背景、目的	7
第2章 Wnt シグナル評価方法	13
第3章 バングラデシュ産植物のスクリーニング	18
第4章 <i>Clinogyne dichotoma</i> からの成分探索	20
第1節 <i>Clinogyne dichotoma</i> の分画	21
第2節 TOP 活性を指標とした分画	22
第3節 化合物の構造解析	27
第4節 単離化合物の活性評価	30
第5章 <i>Ricinus communis</i> 由来のヒマシ粕からの成分探索研究	32
第1節 <i>Ricinus communis</i> 由来のヒマシ粕の分画	33
第2節 TOP 活性を指標とした分画	34
第3節 化合物の構造解析	43
第4節 単離化合物の活性評価	44

第 6 章 <i>Canarium album</i> からの成分探索研究	46
第 1 節 <i>Canarium album</i> の分画	47
第 2 節 TOP 活性を指標とした分画	48
第 3 節 化合物の構造解析	62
第 4 節 単離化合物の活性評価	63
第 7 章 <i>Santalum album</i> からの成分探索研究	65
第 1 節 <i>Santalum album</i> の分画	66
第 2 節 <i>Santalum album</i> の分画の詳細	67
第 3 節 化合物の構造解析	82
第 4 節 単離化合物の活性評価	90
第 5 節 Wnt シグナル阻害活性化合物のがん細胞に対する毒性	92
第 6 節 化合物 <b>17</b> のウェスタンブロッティング	93
総括	95
実験の部	97
謝辞	166
主論文目録	167
学位論文審査	168

## 序論

現在の使用されている医薬品のほとんどが天然物そのものか天然物を基に合成されている。1981年から2014年の間で作られた医薬品では、天然物そのものと、植物性薬品、天然物の誘導体を合わせると約25%が天然物であり、天然物を模倣して合成された医薬品やファーマコフォアが天然物となっている医薬品まで含めると、約半数の医薬品が天然物に関連している (Table 1)<sup>[1]</sup>。医薬品の開発例の多さからもわかるように天然資源には数多くの有用な天然物が存在し、天然物探索研究は新薬創出の上で欠かせない重要な基盤となっている。

**Table 1 1981年から2014年に開発された医薬品の内訳<sup>[1]</sup>**

内訳	例数	割合
生体高分子	250	16%
天然物	67	4%
植物性薬品 (混合物)	9	1%
天然物誘導体	320	20%
合成品	420	27%
合成品 (天然物のファーマコフォア)	61	4%
ワクチン	101	6%
天然物を模倣した合成品(天然物のファーマコフォア)	162	10%
天然物を模倣した合成品	172	11%
	<b>全例数</b>	<b>1562</b>

天然物の中でも植物からは、古来から多くの生物活性が見出され、薬草として疾病を予防、治療する目的で使用されてきた。紀元前 3000 年以上前から、アヘンが少量で痛みを和らげることが知られていた。1817 年、ドイツの薬剤師フリードリヒ・ゼルチェルネルがアヘンの主成分として **morphine** を見出した。この発見から薬草の中の 1 つの化合物が生物活性を示していることが明らかになった。**morphine** の構造はこの発見から 150 年後に全合成により決定された(Figure 1)。また、ヤナギ類は昔から解熱、鎮痛などを目的として利用されてきた。ギリシャの医師ペタニウス・ディオスコリデスの「薬物誌」にもヤナギの樹皮などが解熱、鎮痛などに用いられたと記載されている。イギリスのエドワード・ストーンはセイヨウシロヤナギ (*Salix alba*) から悪寒、発熱などに有効である天然物を 6 年間かけて分離し、**salicin** として発表した(Figure 1)<sup>[2]</sup>。薬草の生物活性が見出され、その活性を示す天然物の発見には、長い年月がかけられてきた。しかし、現代は分析技術の発展に伴いこの長い時間は大幅に短縮され、多くの天然物が短い時間で見いだされるようになった。

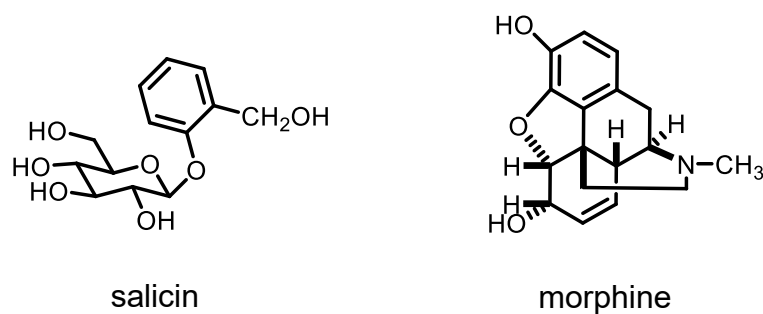


Figure 1 salicin と morphine の構造

見出されてきた天然物には生物活性を有するものも数多く存在し、医薬品や医薬品シーズとなってきた。例えば、ヌマミズキ科植物の喜樹 (カレンボク, *Camptotheca acuminata*) から camptothecin<sup>[3]</sup>、リンゴの樹皮から phlorizin<sup>[4]</sup>、ヒガンバナ科スノードロップ (*Galanthus nivalis*) から、アルツハイマー病治療薬として使用される galantamine<sup>[5]</sup>が見出されてきた (Figure 2)。

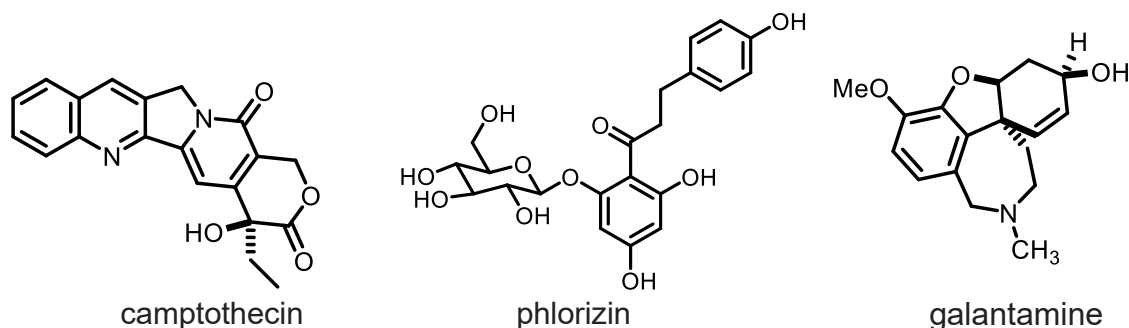


Figure 2 植物由来の生物活性を持つ天然物の例

Camptothecin はトポイソメラーゼ II 阻害薬の抗腫瘍薬イリノテカン<sup>[6]</sup>として、phlorizin はナトリウム-グルコース共輸送体 (SGLT II) に作用する血糖降下薬イプラグリフロジン<sup>[7]</sup>として、元の構造が変換され医薬品として使用されている。発見当初は有用と考えられていた生物活性とは別に有用性が見出され、薬として使用された例もあり、その 1 例が発見当初は解熱作用を有し、発熱と感染症に有効であると考えられていた phlorizin である<sup>[4]</sup>。

天然物探索研究を行う意義は、目的の生物活性を有する天然物を得ることに加え、得られた天然物に活性が無くとも時代の流れとともに新たな活性に価値を見出される可能性があるという点も存在すると考えられる。

そこで、本研究ではタイ産、バングラデシュ産植物等からがん、アルツハイマー病、糖尿病等の様々な疾患へ作用する可能性のある Wnt シグナルへ作用する天然物を得ることを目的とした。詳細は第 1 章の「研究背景、目的」にて述べる。

参考文献

- [1] Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
- [2] 大川 雅史, 大塚 功, 片川 和明, 川口 基一郎, 北中 進, 高松 智, 平井 康昭, 平野 裕之, 船山 信次, 安田 高明 *医療を指向する天然物医薬品化学 [第2版]*, 廣川書店 **2011**.
- [3] Wall, M. E.; Wani, M. C.; Cook, C. E.; Palmer, K. H.; Macphil, A. T.; Sim, G. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 3888-3890.
- [4] Ehrenkranz, J. R. L.; Lewis, N. G.; Kahn, C. R.; Roth, J. *Diabetes Metab. Res. Rev.* **2005**, *21*, 31-38.
- [5] Greenblatt, H. M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J. L. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321-326.
- [6] Oguri, T.; Takahashi, T.; Miyazaki, M.; Isobe, T.; Kohno, N.; Mackenzie, P. I.; Fujiwara, Y. *Anticancer Res.* **2004**, *24*, 2893-2896.
- [7] Imamura, M.; Nakanishi, K.; Suzuki, T.; Ikegai, K.; Shiraki, R.; Ogiyama, T.; Murakami T.; Kurosaki, E.; Noda, A.; Kobayashi, Y.; Yokota, M.; Koide, T.; Kosakai, K.; Ohkura Y.; Takeuchi M.; Tomiyama, H.; Ohta, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3263-3279.

## 第1章 研究背景、目的

Wnt シグナルは様々な動物種で高度に保存されている細胞の分化、増殖や初期発生などを担うシグナル伝達経路である<sup>[1]</sup>。Wnt シグナルの研究はがんウイルス遺伝子の研究の中で *int-1* と呼ばれる遺伝子<sup>[2]</sup>が発見されたことにより始まる。現在では *int-1* は *wnt-1* として知られる<sup>[3]</sup>。

Wnt タンパク質は分泌性の糖タンパク質であり、Wnt タンパク質は 19 種類が存在する<sup>[4]</sup>。このタンパク質がリガンドとして働く Wnt シグナルには Wnt/ $\beta$ -catenin 経路、PCP 経路、Ca<sup>2+</sup>経路、Wnt/PKA 経路と呼ばれる経路が存在しているが、本研究では Wnt/ $\beta$ -catenin 経路に着目した。

Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の概略図を Figure 1-1 に示す。細胞質では足場タンパク質の Axin はがん抑制遺伝子の産物の adenomatous polyposis coli (APC)、リン酸化酵素の casein kinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ )、glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )、 $\beta$ -catenin と結合し  $\beta$ -catenin を分解する複合体 (分解複合体) を形成している。

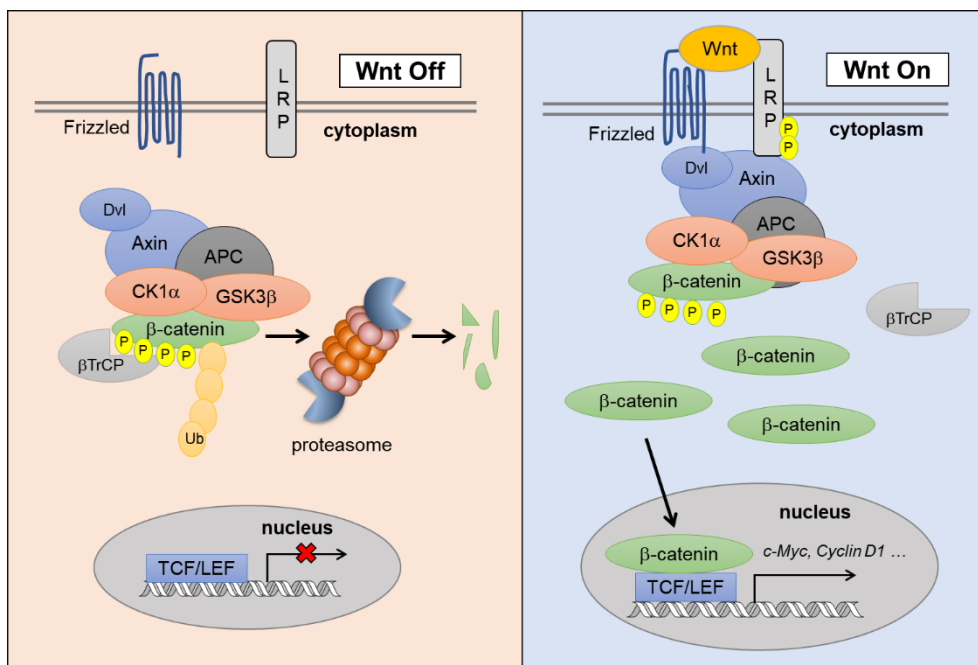


Figure 3-1 Wnt/ $\beta$ -catenin 経路

Wnt タンパク質が受容体である Frizzled (Fz) 及び **Low Density Lipoprotein receptor related protein (LRP)** に結合していない場合、分解複合体中で  $\beta$ -catenin は最初に CK1 $\alpha$  により Ser45 がリン酸化され、次いで GSK3 $\beta$  により Thr41、Ser37、Ser33 がリン酸化される。 $\beta$ -catenin のリン酸化を受けたモチーフは”degron”と呼

ばれ、 $\beta$ -catenin は”degron”を介してユビキチンリガーゼE3である $\beta$ TrCp と結合し、ユビキチン化を受けてプロテアソーム系で分解される<sup>[4]</sup>。

一方、受容体と Wnt タンパク質が結合すると、disheveled (Dvl) が二つのタンパク質、Fz 及び Axin と結合する。また、Axin は LRP の細胞質側の尾部と結合する。この際 LRP は GSK3 $\beta$ や CK1 $\alpha$ などによりリン酸化を受けて Axin の結合部位が形成される。このように受容体の細胞質側と結合した分解複合体中ではリン酸化 $\beta$ -catenin は安定に存在しユビキチン化が起こらなる。そのため、リン酸化 $\beta$ -catenin で分解複合体が飽和する。この後、新しく発現した $\beta$ -catenin が蓄積し、核内に移動した後、転写因子の T cell factor (TCF) や lymphoid-enhancer-factor (LEF) と結合して標的遺伝子の発現を促す<sup>[4]</sup>。

APC 内には、 $\beta$ -catenin 阻害領域 ( $\beta$ -catenin inhibitory domain: CID) と呼ばれる領域が存在しており、 $\beta$ -catenin の減少を促すには必要であると考えられている。実際に、CID は一般的な APC 切断が起こっているがん細胞中での切断された領域に位置している。CID はその周辺が GSK3 $\beta$ により、リン酸化されて APC のコンフォメーション変化が起こると考えられている。このコンフォメーションの変化は $\beta$ -catenin のユビキチン化を起こすために必要であると考えられている<sup>[4]</sup>。

Wnt シグナルの標的遺伝子には、*c-Myc*<sup>[5]</sup>や *cyclin D1*<sup>[6]</sup>、*PPAR $\delta$* <sup>[7]</sup>などが知られる。*c-Myc* や *cyclin D1* は細胞周期に関わるタンパク質として知られ<sup>[8]</sup>、*PPAR $\delta$* は脂肪酸代謝に関わるタンパク質として知られる<sup>[9]</sup>。Wnt シグナルは多くの疾患との関連が示唆されている。

例えば、APC の変異は家族性の大腸がんに関連し、タンパクの機能が失われると、 $\beta$ -catenin の分解が起こらず Wnt 経路が過剰に働いてしまう。他にも、Axin 2 の変異は結腸がんのリスクを高め、Axin 1 の変異は肝がんのリスクを高めることも知られる。また、少数の結腸ガンの症例で $\beta$ -catenin の Axin との結合部位として知られる、N 末端側の Ser/Thr 部が無くなっていることが知られ、似たような変異はメラノーマでも報告されている<sup>[4]</sup>。

前述したがんでの変異は Wnt シグナルが亢進する変異である。しかし、Wnt シグナルが低下することで、疾患につながる変異も知られる。例えば Wnt の受容体を構成する LRP5 の機能が失われる変異では、骨粗鬆症-偽神経膠腫や家族性滲出性硝子体網膜症、LRP6 の変異では骨粗鬆症や早期冠動脈疾患などが知られる。さらに Fz の変異により LRP5 の変異でも見られる、家族性滲出性硝子体網膜症が起こることが知られる。さらに Wnt タンパク質の Wnt3 や Wnt4 の変異でテトラ-アメリカやミューラー管の退行と男性化が起こることも知られる<sup>[10]</sup>。

このため、Wnt シグナルを標的とした低分子化合物の研究が進められており、これまでに Wnt シグナルに作用する低分子化合物も数多く研究されている (Figure 1-2)。

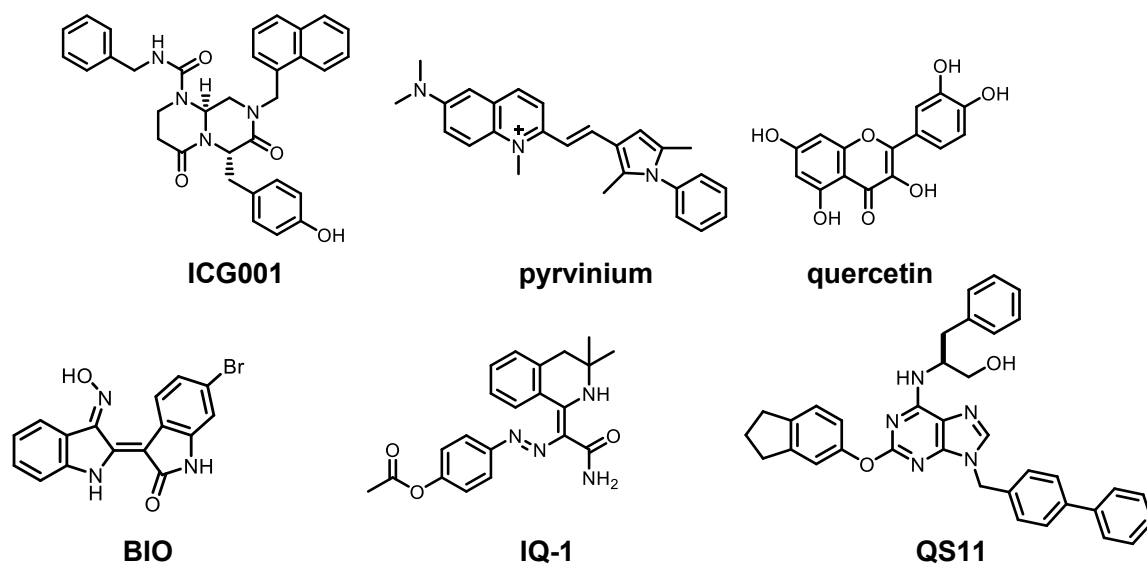


Figure 1-4 Wnt シグナルに作用する化合物 (上段: 阻害活性化合物、下段: 活性化化合物)

ICG-001 は CREB-binding protein というタンパク質と  $\beta$ -catenin の相互作用を阻害し、Wnt シグナルを阻害する合成化合物として知られる<sup>[11]</sup>。また、同じく合成化合物の pyrvinium は CK1 $\alpha$  を活性化することにより、Wnt シグナルを阻害することが報告されている<sup>[12]</sup>。さらに、quercetin は核内で Tcf と  $\beta$ -catenin の結合を阻害し、Wnt シグナルを阻害するとされる<sup>[13]</sup>。

また、活性化を行う化合物として、例えば、GSK3 $\beta$  の阻害剤である BIO<sup>[14]</sup> や PP2A と呼ばれるタンパク質を活性化する IQ-1<sup>[15]</sup>、GTPase activating protein of ADP ribosylation factor 1 (ARFGAP1) と呼ばれるタンパク質を阻害する QS11<sup>[16]</sup> などが知られる。

また、当研究室でもこれまでに多くの Wnt シグナルに作用する化合物を見出している (Figure 1-3)。Calotropin はガガイモ科植物 *Calotropis gigantea* から単離され CK1 $\alpha$ を増加させることにより Wnt シグナルを阻害する化合物として報告された<sup>[17]</sup>。Xylogranin B はセンダン科植物 *Xylocarpus granatum* から、核内での $\beta$ -catenin 量を減らし、Wnt シグナルを阻害する化合物として単離された<sup>[18]</sup>。Trichillin H はセンダン科植物 *Azadirachta excelsa* から得られ、 $\beta$ -catenin に変化を与えることなく下流の標的遺伝子である *c-myc* の発現量を減らしたことから $\beta$ -catenin より下流に作用する化合物であると報告された<sup>[19]</sup>。オオバコ科植物 *Scoparia dulcis* から scopadulciol が見出され、p53 による $\beta$ -catenin の分解誘導を促すと報告された<sup>[20]</sup>。ニガキ科植物 *Eurycoma longifolia* から 9-hydroxycanthin-6-one が単離され、CK1 $\alpha$ 非依存的に GSK3 $\beta$ が活性化されて、 $\beta$ -catenin の分解を促進する化合物であると考えられた<sup>[21]</sup>。さらに、Wnt シグナルを活性化する化合物としてトウダイグサ科の *Ricinus communis* より CK1 $\alpha$ の阻害を行う化合物として ricinin が得られた<sup>[22]</sup>。

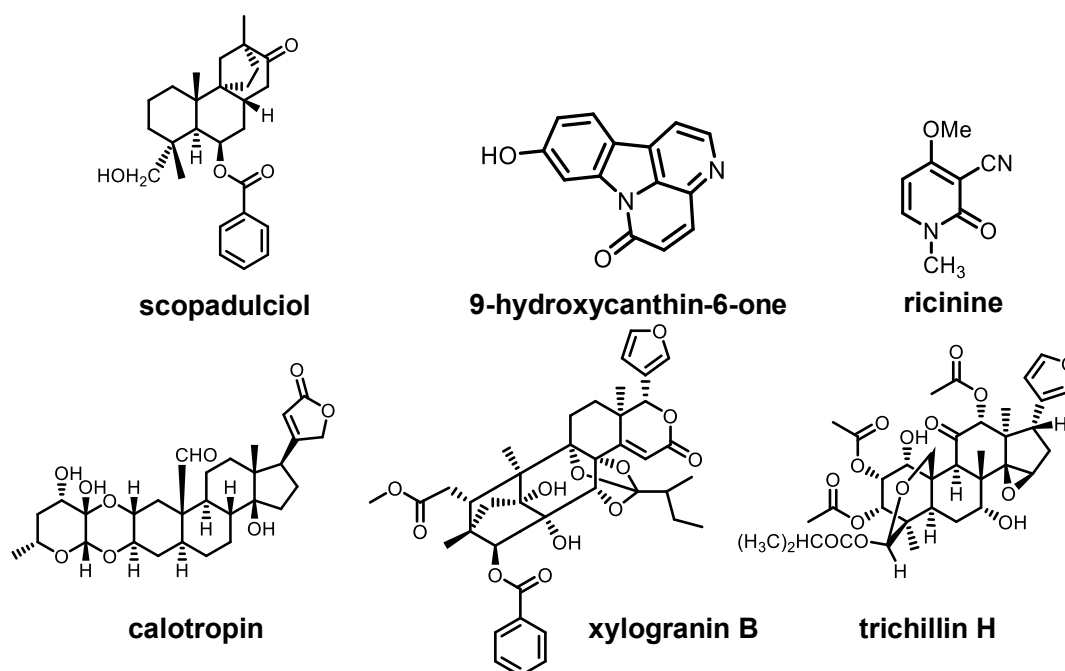


Figure 1-5 当研究室で得られた Wnt シグナルに作用する天然物

これまでに述べたように Wnt シグナルが過剰に働いている、あるいは過剰に抑制されている疾病が存在する。そのため、Wnt シグナルを活性化あるいは阻害する低分子化合物はそれらの疾病に対する治療薬の有用なシーズ化合物や疾病の病態解明に役立つツールにもなり得る。そのため、本研究では Wnt シグナルを活性化あるいは阻害する天然物、すなわち Wnt シグナルに作用する天然物の探索を行うことを目的とした。

## 参考文献

- [1] Loh, L.M.; Amerongen, R.; Nusse, R. *Dev. Cell* **2016**, *38*, 643-655.
- [2] Nusse, R.; Varmus, H. E. *Cell* **1982**, *31*, 99-109.
- [3] Nusse, R.; Brown, A.; Papkoff, J.; Sambler, P.; Shackelford, G.; McMahon, A.; Moon, R.; Varmus, H. *Cell*, **1991**, *64*, 231-232.
- [4] Nusse, R.; Clevers, H. *Cell* **2017**, *169*, 986-999.
- [5] He, T.-C.; Sparks, A. B.; Rago, C.; Hermeking, H.; Zawel, L.; Costa, L. T., Morin, P.J.; Vogelstein, B.; Kinzler, K. W. *Science* **1998**, *281*, 1509-1512.
- [6] Tetsu, O.; McCormick, F. *Nature* **1999**, *398*, 422-426.
- [7] He, T.-C.; Chan, T. A.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. *Cell* **1999**, *99*, 335-345.
- [8] Gracia-Gurierrez, L.; Delgado, M. D.; Leon J. *Genes* in press. DOI: 10.3390/genes10030244
- [9] Palomer, X.; Barroso, E.; Pizarro-Delgado, J.; Pena, L.; Botteri, G.; Zarei, M.; Afuilar, D.; Montori-Grau, M.; Vazquez-Carrera, M. *Int. J. Mol. Sci.* in press DOI: 10.3390/ijms19030913.
- [10] MacDonald, B. T.; Tamai, K.; He X. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 9-26.
- [11] Emami, K. H.; Nguyen, C.; Ma, C.; Kim, D. H.; Jeong, K. W.; Eguchi, M.; Moon, R. T.; Teo, J.-L.; Oh, S. W.; Kim, H. Y.; Moom, S. H.; Ha, J. R.; Kahn, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, *101*, 12682-12687.
- [12] Thorne C. A.; Hanson A. J.; Schneider, J.; Tahinci, E.; Orton, D.; Cselenyi, C. S.; Jernigan, K. K.; Meyers K. C.; Hang B. I. Waterson, A. G.; Kim, K.; Melancon, B.; Ghidu, V. P.; Sulikowski G. A.; LaFleur, B.; Salic, A.; Lee, L. A.; Miller III, D. M.; Lee, E. *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 829-836.
- [13] Park, C. H.; Chang J. Y.; Hahn E. R. Park, S.; Kim, H.-K.; Yang C. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 227-234.
- [14] Sato, N.; Meijer L.; Skaltsounis, L.; Greengard, P.; Brivanlou A. H. *Nat. Med.* **2004**, *10*, 55-63.
- [15] Miyabayashi, T.; Teo, J.-L.; Yamamoto, M.; McMilan, M., Nguyen, C.; Kahn, M. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 5668-5673.
- [16] Zhang, Q.; Major, M. B.; Takanashi, S.; Camp, N. D.; Nishiya, N.; Peters E. C.; Ginsberg, M. H.; Jian, X.; Randzso, P. A.; Schultz, P. G.; Moon R. T.; Ding, S. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 7444-7448.
- [17] Park, H. Y.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. *Chem. Bio. Chem.* **2004**, *15*, 872-878.
- [18] Toume, K.; Kamiya, K.; Arai, M. A.; Naomi, M.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 6106-6109.
- [19] Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 280-285.
- [20] Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 864-872.

[21] Ohishi, K.; Toume K.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. *J. Nat. Prod.* **2015**, 78, 1139-1146.

[22] Ohishi, K.; Toume K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4597-4601.

## 第2章 Wnt シグナル評価方法

本研究では、野生型の TCF 結合領域の下流にルシフェラーゼをコードしたプラスミド (SuperTOPflash) がヒト胎児腎細胞 (293 細胞) に安定導入された STF/293 細胞<sup>[1]</sup>を用いて、TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性 (TOP 活性) を評価した。なお、本細胞株は Johns Hopkins 大学の Jeremy Nathans 博士よりご供与頂いた。この細胞は $\beta$ -catenin/TCF 複合体が TCF 結合領域に結合すると、TCF 結合領域下流の luciferase タンパク質を発現する。ここに一定量の発光基質である luciferin を添加すると luciferase タンパク質の量に応じた発光が得られ、この発光強度を測定することで間接的に簡便に luciferase タンパク質の発現量の変化を知ることができる。luciferase タンパク質の発現量は Wnt シグナルの活性の状態 (TCF/ $\beta$ -catenin 転写活性) と同様に变化するため、luciferase と基質の反応から Wnt シグナルの活性の状態を測定できる (Figure 2-1)。

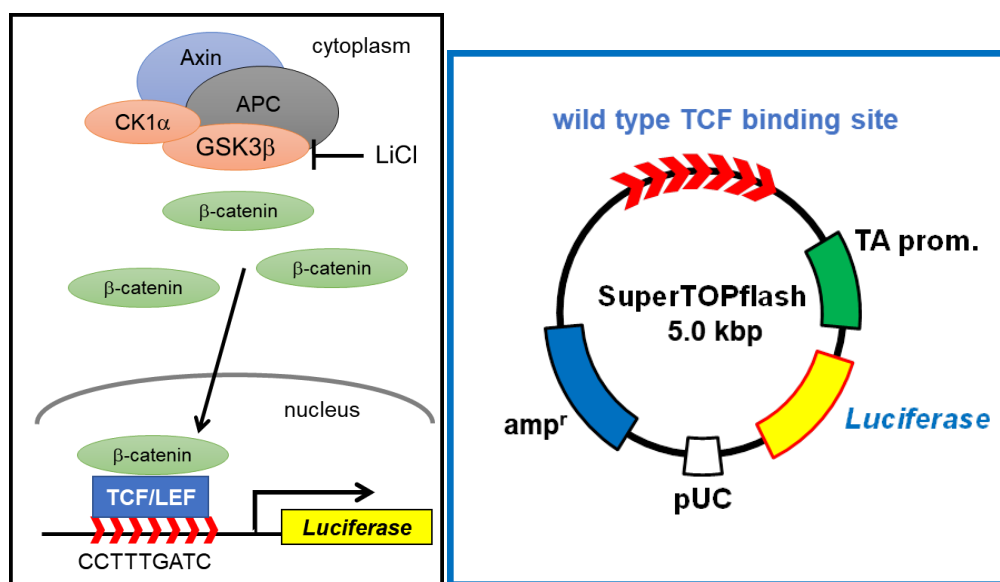


Figure 2-1 TOP assay の概略と SuperTOPflash

試料の TOP 活性に対する影響を評価する (TOP assay) 際には control を 100% として、試料が control に比べ、発光量がどの程度下がる、あるいは上がるかを評価した。細胞のみで得られるシグナル強度はとても小さいため、塩化リチウム (LiCl) 15 mM 存在下で評価を行った<sup>[1]</sup>。GSK3 $\beta$ は Mg<sup>2+</sup>を取り込んで働く酵素であり、Li<sup>+</sup>が Mg<sup>2+</sup>と置き換わり GSK3 $\beta$ 阻害する阻害剤として知られる<sup>[3]</sup>。なお、4 章以降の n=3 以上のデータには標準偏差を合わせて示した。

試料によっては細胞毒性により、TOP 活性が減少したように観察されることがあるため、Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA) 法で細胞生存率も同時に測定した。FMCA 法では fluorescein diacetate (FDA) を用いて、生細胞の相対的な量を蛍光強度で置き換えて測定を行う。生細胞に FDA が取り込まれると細胞内のエステラーゼにより、加水分解を受けて蛍光性の物質 Fluorescein が生じる(Figure 2-2)。Fluorececin の励起光 (485 nm) を照射し、得られる control の蛍光 (538 nm) の強度を 100%としたときの相対的な蛍光の強度を測定し、細胞生存率とした (Figure 2-3, Figure 2-4) 。なお、4 章以降の n=3 以上のデータには標準偏差を合わせて示した。

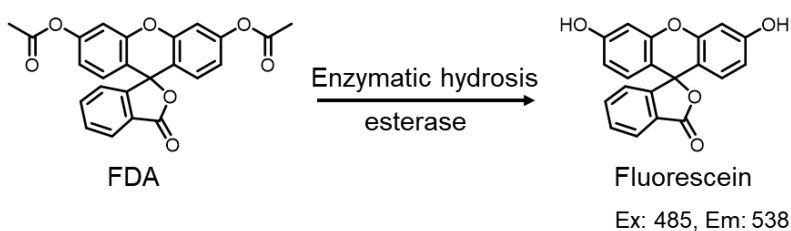


Figure 2-2 細胞内エステラーゼによる FDA の加水分解

$$\text{viability}(\%) = \frac{\text{sample fluorescent}}{\text{control fluorescent}} \times 100$$

Figure 2-3 viability の算出

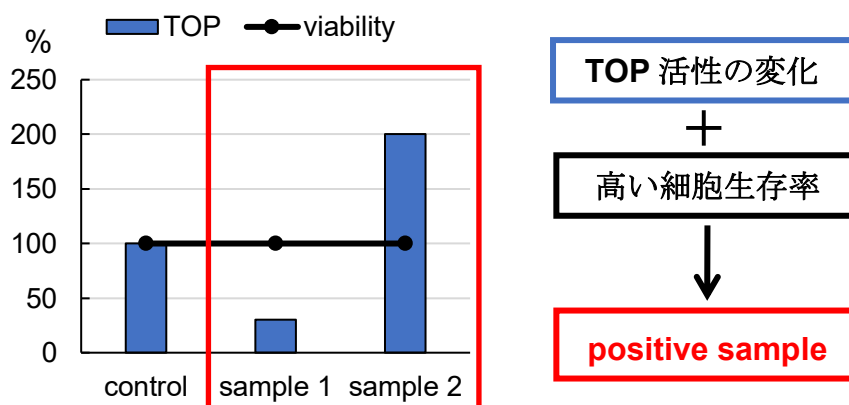


Figure 2-4 TOP assay の評価方法

本研究では、高い細胞生存率を維持しつつ、TOP 活性において Figure 2-2 の sample 1 のように TOP 活性を低下もしくは sample 2 のように TOP 活性を増加させるものを陽性の試料とした。

また、TOP 活性と細胞生存率では排除できないタンパク質の非特異的な分解や、非特異的な発現抑制などの偽陽性の可能性が存在するため、得られた化合物について FOP 活性を測定した。FOP 活性は変異している TCF 結合部位の下流に firefly luciferase をもつプラスミド (SuperFOPflash) を一過性に 293 細胞に導入し、アッセイを行う FOP assay により評価した (Figure 2-5)。FOP assay ではプラスミドの TCF 結合部位が変異しているため、luciferase 活性に変化を与えた場合 TCF/ $\beta$ -catenin 複合体と DNA の結合によらないものと判断できる。そのため化合物が偽陽性である可能性が示唆される。

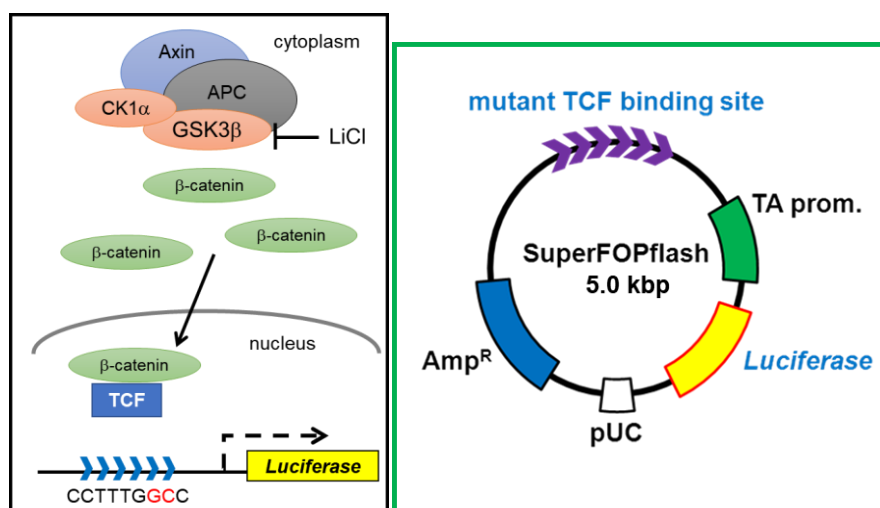


Figure 2-5 FOP assay の概略と SuperFOPflash

さらに、化合物の評価の際には 2 種のプラスミドを用いた。前述の superFOPflash とトランスフェクション効率の内部標準である pRL-CMV の 2 種である。pRL-CMV は renilla luciferase 遺伝子を含んでおり、renilla luciferase タンパク質を恒常的に発現する。firefly luciferase は分子量 61 kDa のタンパク質で beetle luciferin を触媒酸化し、renilla luciferase は分子量 36 kDa のタンパク質で基質の coelenterazine を触媒酸化する酵素である。それぞれの反応で生じる光を測定する (Figure 2-6)。

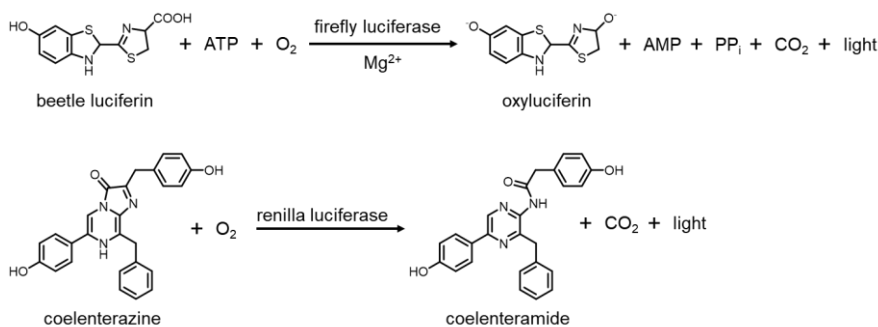


Figure 2-6 2 種の luciferase (firefly、renilla luciferase) による反応

FOP 活性の値は superFOPflash から発現する firefly luciferase の発光強度を pRL-CMV から発現する renilla luciferase で除してトランスフェクション効率を一定としたときの値 (normalized lumi.) で評価し control 群と sample 群の比 (relative luciferase activity) を百分率で表し FOP の値を計算し (Figure 2-7)、TOP の値と FOP の値に差があるサンプルを陽性とした (Figure 2-8)。なお、4 章以降のデータには標準偏差を合わせて示した。

$$\text{normalized lumi. (control)} = \text{Ave.} \left[ \frac{\text{firefly lumi. (control)}}{\text{renilla lumi. (control)}} \right]$$

$$\text{normalized lumi. (sample)} = \text{Ave.} \left[ \frac{\text{firefly lumi. (sample)}}{\text{renilla lumi. (sample)}} \right]$$

$$\text{relative luciferase activity} = \frac{\text{normalized lumi. (sample)}}{\text{normalized lumi. (control)}}$$

$$\text{FOP (\%)} = \text{relative luciferase activity} \times 100$$

lumi. = luminescence  
 control = transfected, sample untreated cells  
 sample = transfected, sample treated cells

Figure 2-7 FOP activity

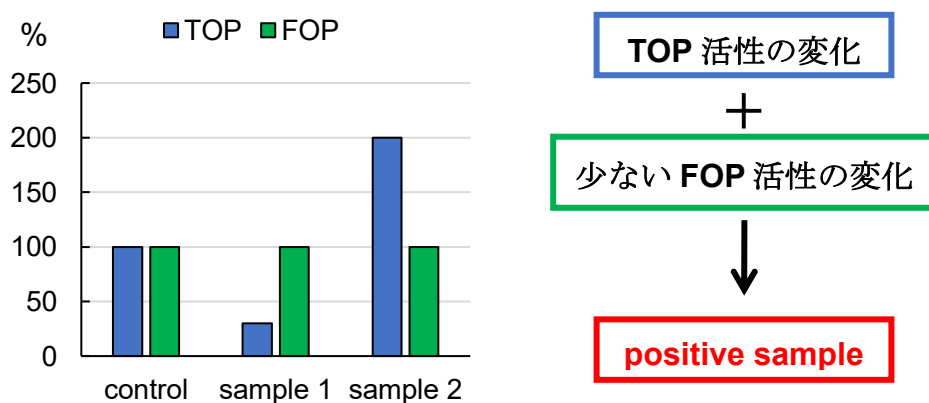


Figure 2-8 FOP assay の評価方法

参考文献

- [1] Korinek, V.; Barker, N.; Morin, P. J.; Wichen, D.; Weger, R.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Clevers, H. *Science* **1997**, *275*, 1784-1787.
- [2] Li, X.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 540-547.
- [3] Dudev, T.; Lim, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 9506-9515.

### 第3章 バングラデシュ産植物のスクリーニング

当研究室保有のバングラデシュ産植物のメタノール (MeOH) 抽出物エキスのライブラリーについて、2章で述べた TOP assay でスクリーニングを行った (Figure 3-1、3-2、Table 3-1)。

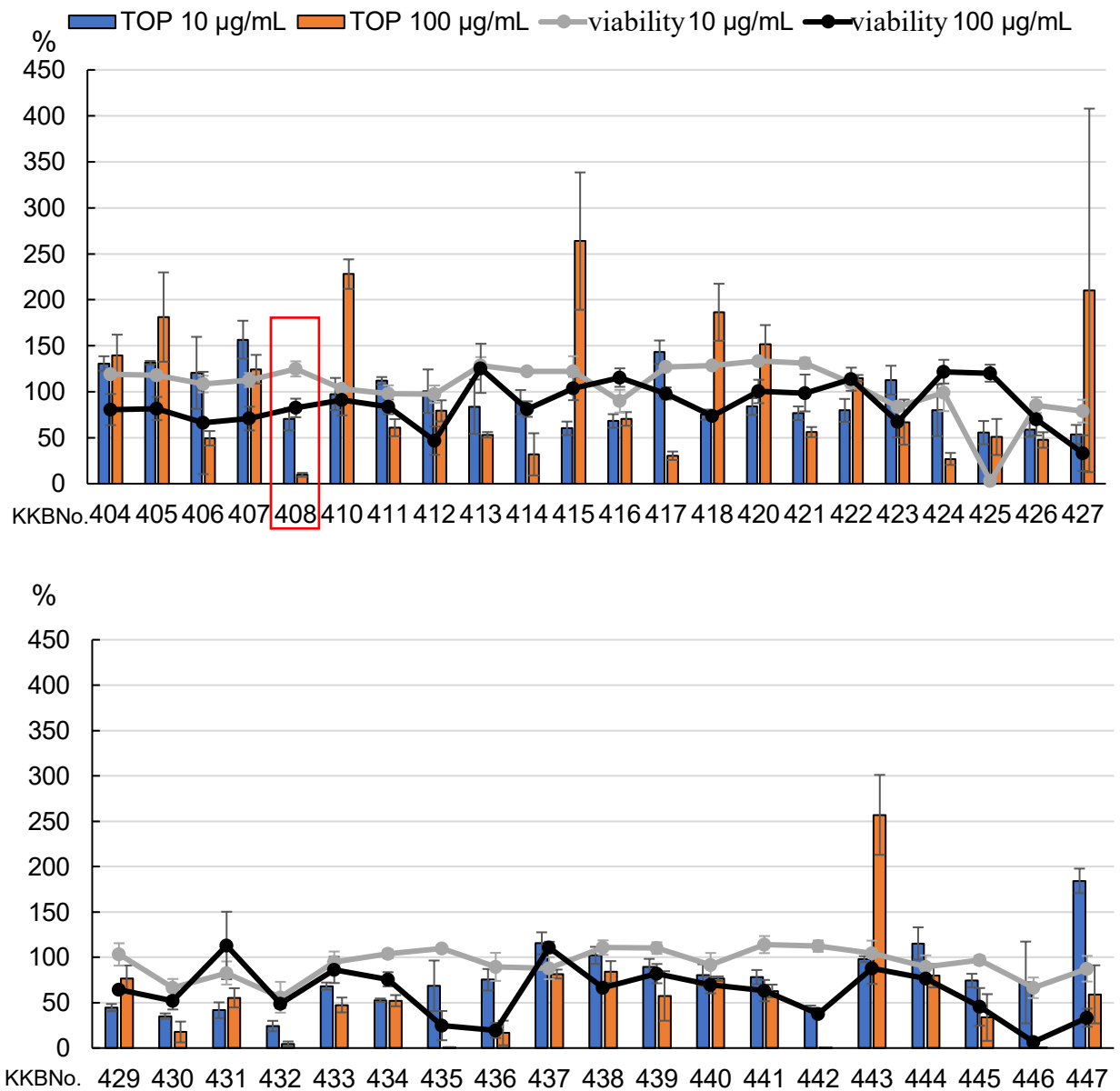


Figure 3-1 バングラデシュ産植物ライブラリーのスクリーニング結果

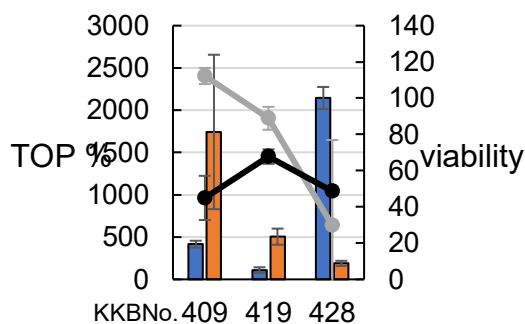


Figure 3-2 バングラデシュ産植物 MeOH 抽出物ライブラリーの内 TOP を顕著

Table 3-1 バングラデシュ産植物 MeOH 抽出物のスクリーニング結果

KKB	植物名	TOP				viability			
		TOP 10 $\mu\text{g/mL}$	SD	TOP 100 $\mu\text{g/mL}$	SD	viability 10 $\mu\text{g/mL}$	SD	viability 100 $\mu\text{g/mL}$	SD
404	<i>Ficus benamina</i>	131 %	8	140 %	23	119 %	4	81 %	17
405	<i>Barringtonia acutangula</i>	132 %	2	181 %	49	118 %	4	82 %	13
406	<i>Crataeva nurvala</i>	121 %	39	49 %	8	108 %	9	66 %	56
407	<i>Syzygium grandis</i>	157 %	21	124 %	16	113 %	8	71 %	13
408	<i>Clinnogyne Dichotoma</i>	70 %	12	10 %	2	125 %	8	82 %	10
409	<i>Calamus viminalis</i>	416 %	41	1743 %	913	112 %	4	45 %	12
410	<i>Melastoma malabathricum</i>	98 %	17	228 %	16	103 %	3	91 %	17
411	<i>Cleome hassleriana</i>	112 %	4	61 %	9	98 %	9	84 %	8
412	<i>Acanthus ilicifolius</i>	101 %	24	79 %	12	97 %	10	47 %	15
413	<i>Myriostachya wightiana</i>	84 %	30	53 %	3	128 %	9	125 %	27
414	<i>Phoenix paludosa</i>	89 %	13	32 %	23	122 %	0	81 %	8
415	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	60 %	7	264 %	75	122 %	17	104 %	13
416	<i>Phoenix paludosa</i>	68 %	7	70 %	7	90 %	12	115 %	10
417	<i>Cynometra ramiflora</i>	143 %	13	30 %	5	127 %	1	98 %	7
418	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	75 %	6	186 %	31	128 %	1	74 %	2
419	<i>Derris trifoliata</i>	110 %	33	505 %	95	89 %	6	68 %	4
420	<i>Avicenia officinalis</i>	84 %	9	152 %	21	133 %	3	100 %	13
421	<i>Heritiera fomes</i>	77 %	7	56 %	5	131 %	6	99 %	20
422	<i>Ficus racemosa</i>	80 %	12	115 %	3	109 %	5	114 %	13
423	<i>Calophyllum inophyllum</i>	113 %	16	67 %	25	84 %	4	67 %	17
424	<i>Rumex maritimus</i>	80 %	28	27 %	7	99 %	20	122 %	13
425	<i>Solanum nigrum</i>	56 %	13	51 %	20	3 %	1	120 %	9
426	<i>Ranunculus sceleratus</i>	59 %	8	48 %	8	86 %	9	70 %	17
427	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	54 %	10	210 %	198	79 %	12	33 %	19
428	<i>Croton bonplandianum</i>	2145 %	130	189 %	31	30 %	47	49 %	3
429	<i>Hyptis mutabilis</i>	45 %	4	77 %	14	103 %	12	64 %	4
430	<i>Spilanthes calva</i>	35 %	3	18 %	11	66 %	10	52 %	10
431	<i>Acalypha indica</i>	42 %	9	55 %	11	83 %	13	113 %	37
432	<i>Pouzolzia indica</i>	24 %	6	5 %	3	56 %	17	49 %	5
433	<i>Blumea lacera</i>	68 %	4	47 %	8	95 %	12	86 %	15
434	<i>Heliotropium indicum</i>	53 %	2	52 %	6	104 %	5	76 %	8
435	<i>Lagerstroemia reginae</i>	69 %	28	1 %	0	110 %	3	25 %	16
436	<i>Phyllanthis niruri</i>	75 %	12	17 %	14	89 %	15	19 %	8
437	<i>Nasturtium indicum</i>	115 %	12	82 %	5	88 %	12	111 %	6
438	<i>Phyla nodiflora</i>	102 %	9	84 %	12	111 %	8	67 %	2
439	<i>Sida acuta</i>	89 %	9	57 %	27	110 %	6	82 %	11
440	<i>Moringa oleifera</i>	80 %	12	76 %	2	92 %	13	70 %	9
441	<i>Albizia saman</i>	78 %	8	63 %	7	114 %	9	63 %	12
442	<i>Mangifera indica</i>	44 %	3	0 %	0	112 %	6	38 %	3
443	<i>Vernonia patula</i>	98 %	3	257 %	44	105 %	14	88 %	17
444	<i>Eupatorium odoratum</i>	115 %	18	80 %	13	89 %	13	77 %	2
445	<i>Polycarpon prostratum</i>	74 %	7	34 %	26	97 %	5	45 %	21
446	<i>Litsea glutinosa</i>	72 %	45	0 %	0	66 %	11	7 %	1
447	<i>Lagerstroemia reginae</i>	184 %	13	59 %	32	87 %	14	33 %	10

グラフの横軸にはバングラデシュ産植物の研究室の管理番号、縦軸は TOP 活性の値を示している。

この結果、100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において、高い viability を維持しつつ TOP 活性を低下させた KKB408 の *Clinogyne dichotoma* の分画を決定した。

## 第4章 *Clinogyne dichotoma* からの成分探索

本章では、第3章バングラデシュ産植物のスクリーニングにおいて、阻害活性 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の TOP 活性が 10%) を示した *Clinogyne dichotoma* の分画について記述する。

*Clinogyne dichotoma* は *Schumannianthus dichotomus* の別名として知られている<sup>[1]</sup>。*Clinogyne dichotoma* はクズウコン科 (Marantaceae) の植物で、東南から南アジアの湿地に生育しており、大きなものでは草丈が 5 m 程度で、茎は 2 cm 程度ある。葉は卵形から長楕円形で葉身の長さは 12 から 20 cm 程度である。本種はミャンマーやバングラデシュでは茎の繊維は莫菴の材料として利用される<sup>[2]</sup>。また、*Clinogyne dichotoma* からは syringic acid、methyl syringate が単離され植物の成長阻害活性を示す物質として報告されている (Figure 4-1)<sup>[3]</sup>。

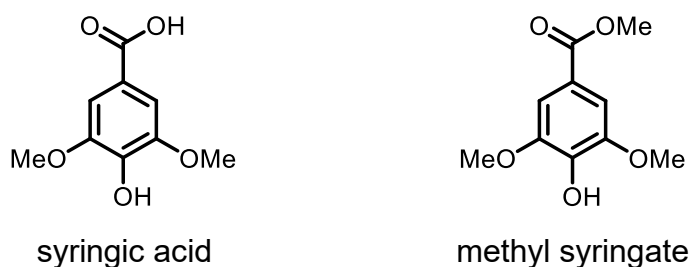


Figure 4-1 同植物からの単離報告がある化合物の構造

## 第1節 *Clinogyne dichotoma* の分画

*Clinogyne dichotoma* からは TOP 活性を指標に分画を行い、化合物 **1**、**2** を得た (Figure 4-1-1)。第2節で詳細を述べる。

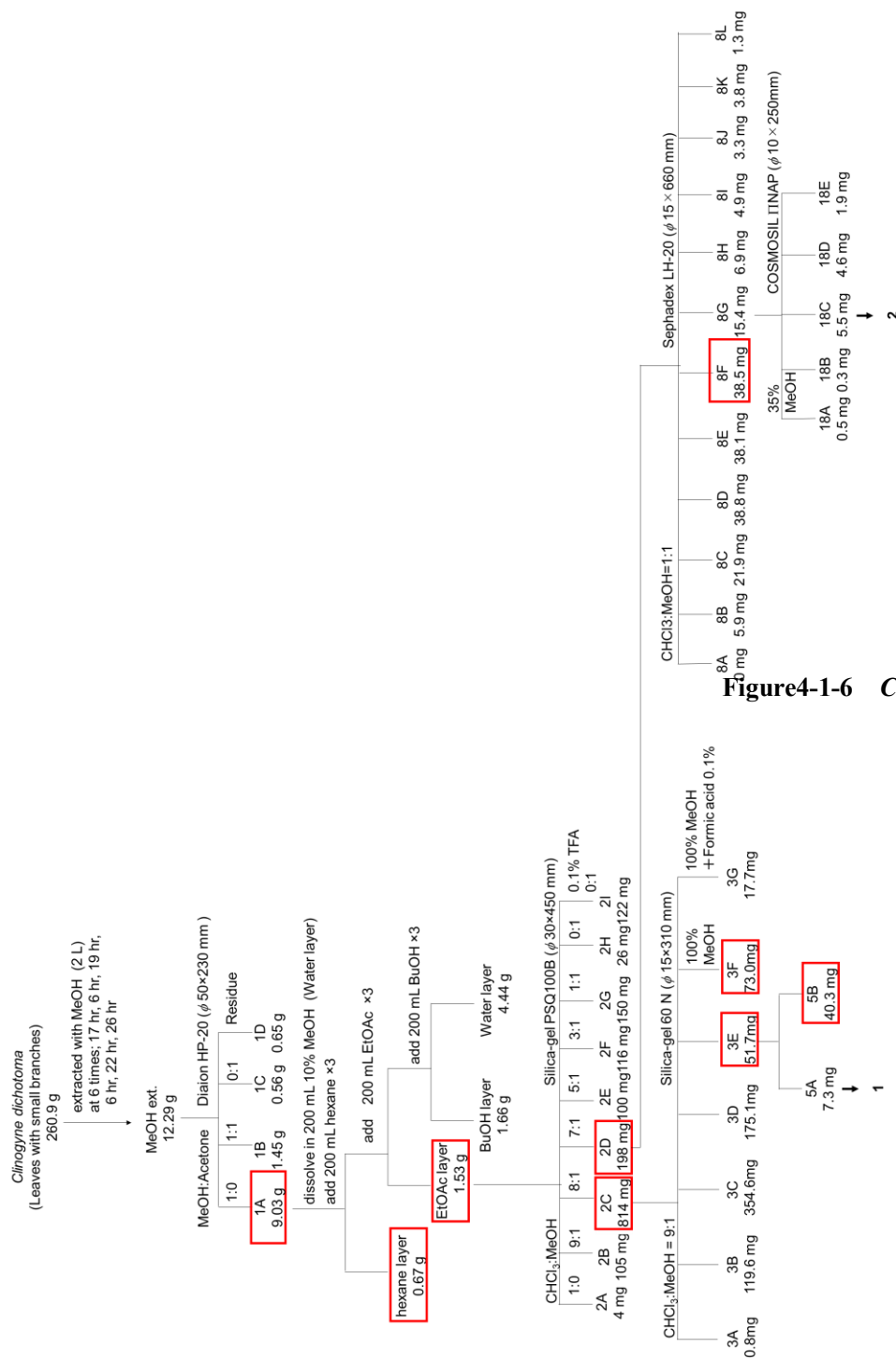


Figure 4-1-6 *Clinogyne dichotoma* の分画

## 第2節 TOP 活性を指標とした分画

本植物の葉及び小枝を MeOH で抽出し、得られた MeOH 抽出物を Diaion HP-20 ( $\phi 50 \times 230$  mm) にて分画し 1 series (1A-1D) を得て silica gel TLC で分析を行った (Figure 4-2-1)。得られた 1 series の阻害活性は 1A で観察された (Figure 4-2-2)。

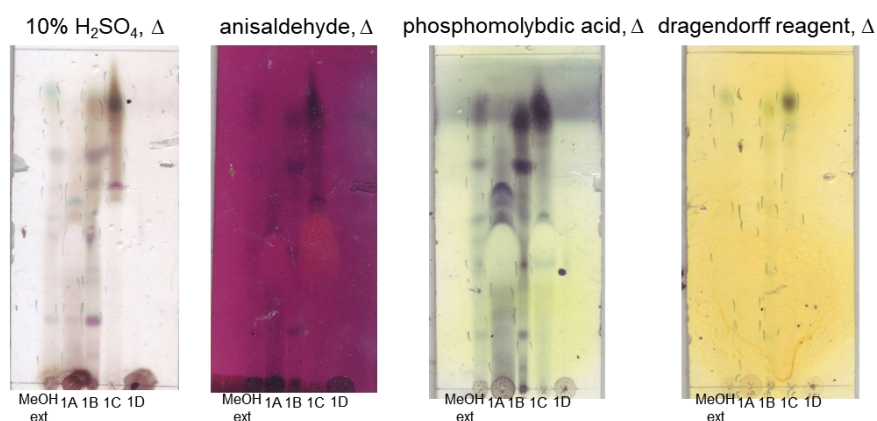


Figure 4-2-1 1 series の Silica gel TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH =9/1)

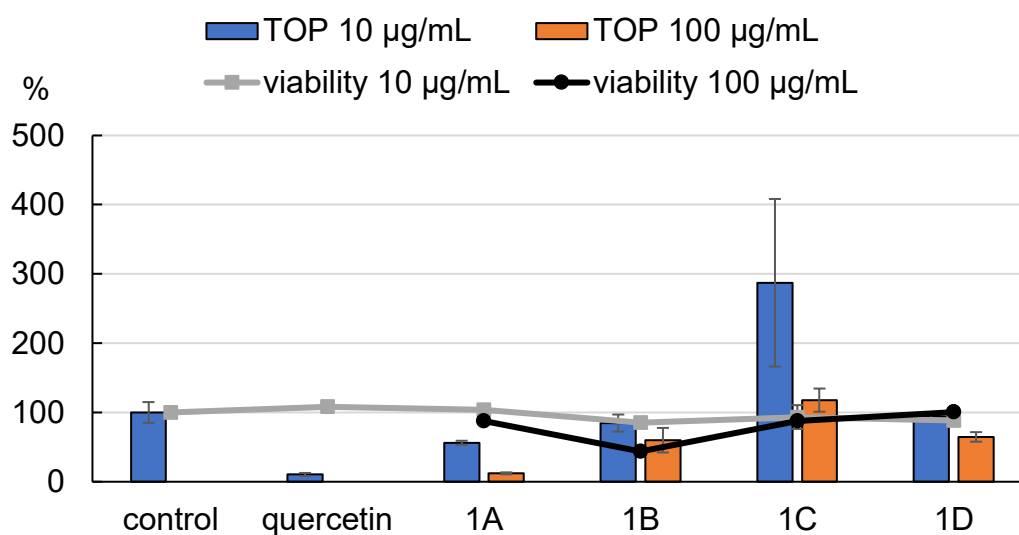


Figure 4-2-2 1 series の TOP 活性と細胞生存率

阻害活性が観察された 1A を 10%MeOH 中に溶解し、ヘキサン(hexane)、酢酸エチル (EtOAc)、*n*-ブタノール (BuOH) で液液分配して各層を得て silica gel TLC で分析した (Figure 4-2-3)。TOP assay の結果、hexane 層と EtOAc 層に TOP の阻害活性が観察された (Figure 4-2-4)。

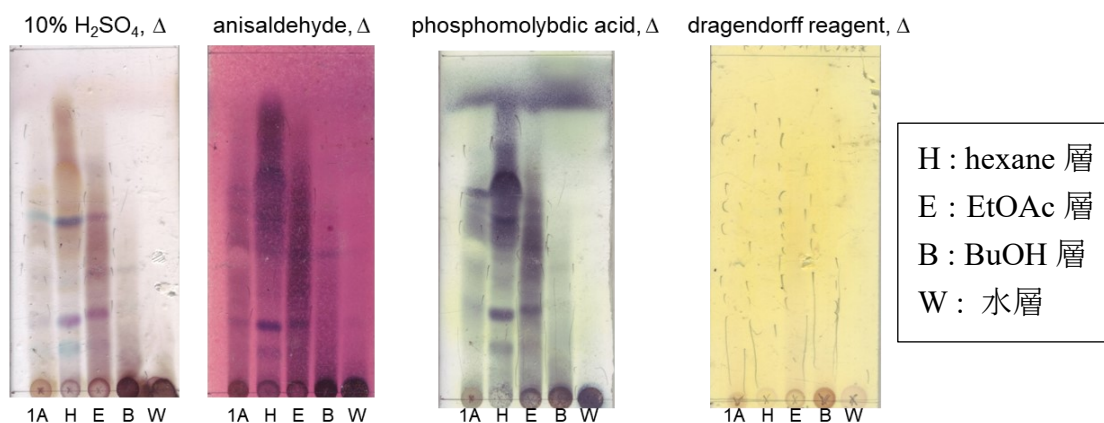


Figure 4-2-3 各層の Silica gel TLC ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/1$ )

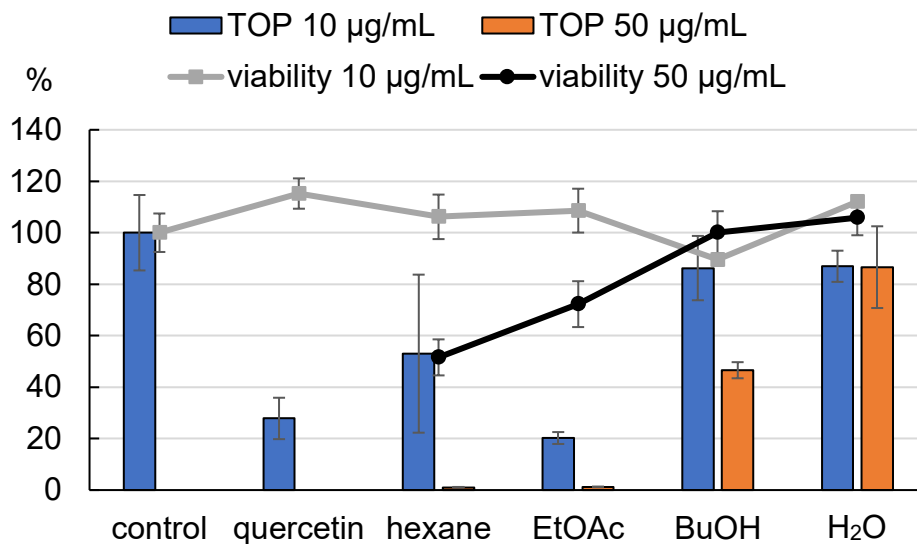


Figure 4-2-4 各層の TOP 活性と細胞生存率

阻害活性が観察された EtOAc 層を  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  混合溶媒を用いた silica gel カラム ( $\phi 30 \times 450 \text{ mm}$ ) で分画した。このカラムで 2 series (2A-2I) を得て、silica gel TLC で分析した (Figure 4-2-5)。TOP assay の結果 2C、2D に TOP の阻害活性が観察された (Figure 4-2-6)。

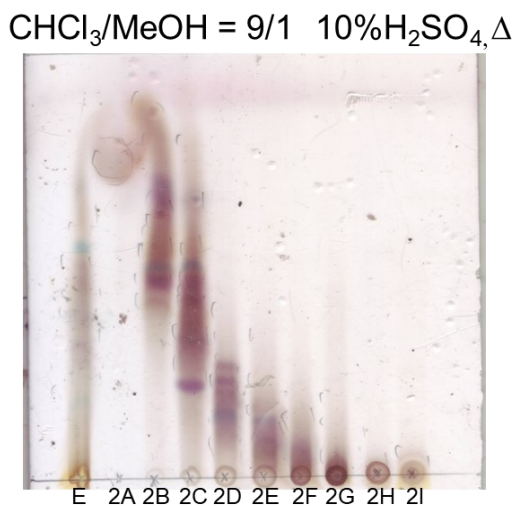


Figure 4-2-5 2 series の Silica gel TLC (E : EtOAc 層)

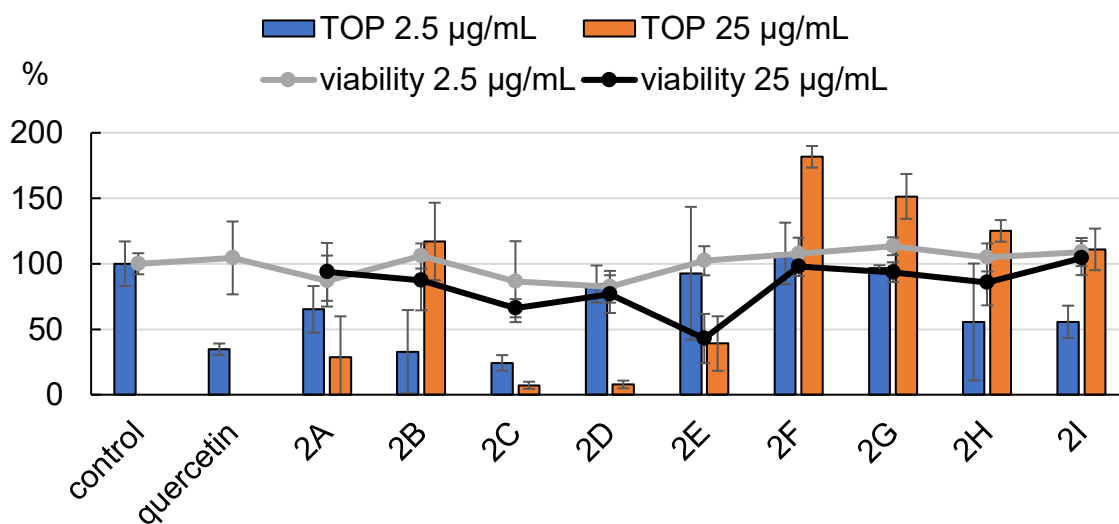


Figure 4-2-6 2 series の TOP 活性と細胞生存率

阻害活性が観察された 2C について、 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=9:1$  の混合溶媒を用いて、silica gel カラム ( $\phi 15 \times 310 \text{ mm}$ ) で分画し 3 series (3A-3G) を得た。得られた 3 series を TLC で分析 (Figure 4-2-7) した。また、TOP assay の結果、阻害活性は 3E、3F に観察された。3E には MeOH に不溶な白色固体が観察されたため、ろ取し不溶部と可溶部に分け、5A (不溶部)、5B (可溶部) を得た。5A (7.3 mg) を化合物 **1** として得た。

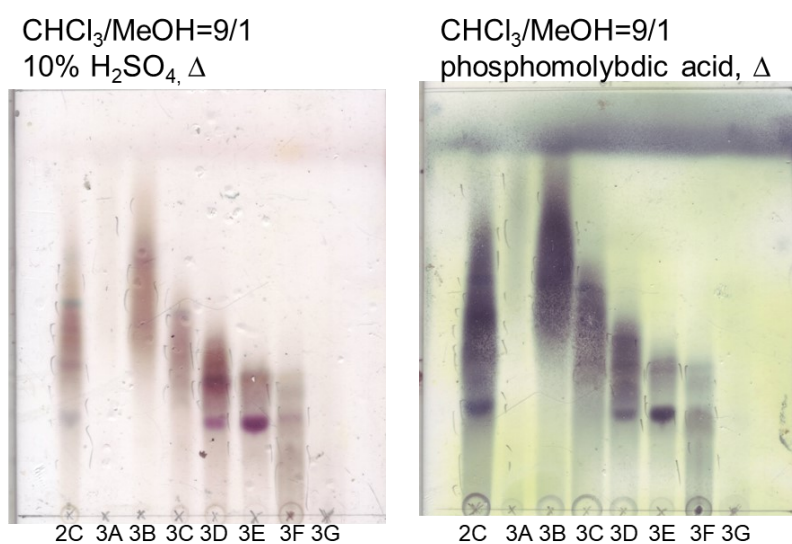


Figure 4-2-7 3 series の TLC

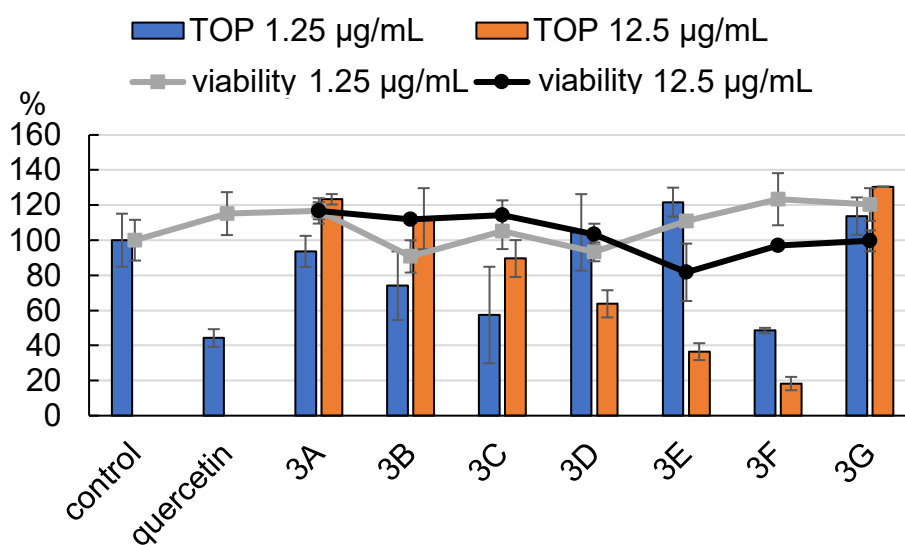


Figure 4-2-8 3 series の TOP 活性と細胞生存率

また、TOP の阻害活性が観察された 2D について Sephadex LH-20 ( $\phi$  15×660 mm, CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:1) で分画を行い 8 series (8A-8L) を得た。得られた 8 series を TLC で分析した (Figure 4-2-9)。また、TOP assay の結果、8F に阻害活性が観察された。

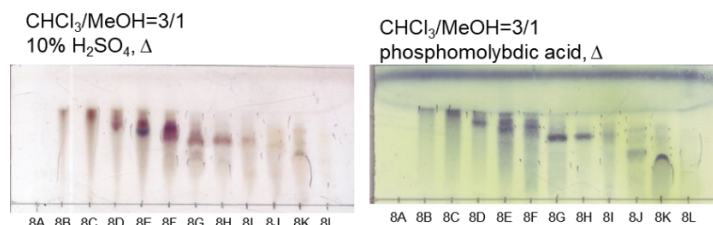


Figure 4-2-9 8 series の silica gel TLC

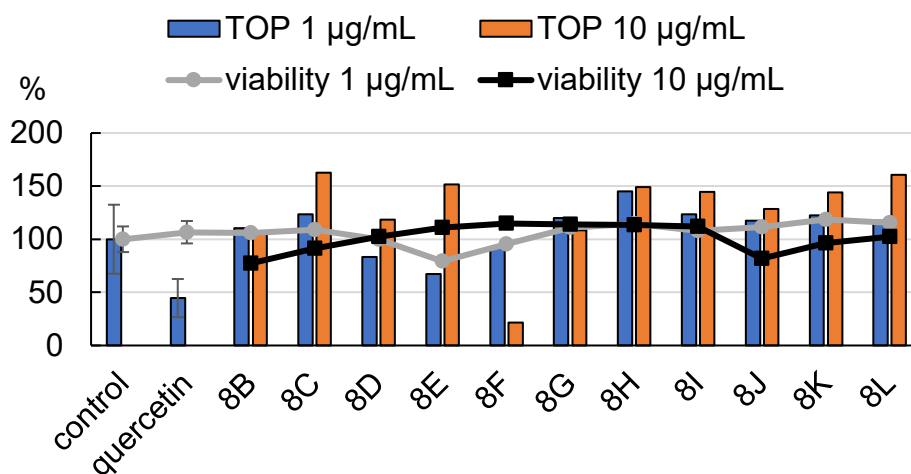
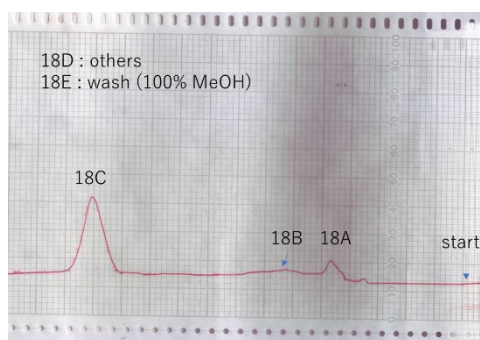


Figure 4-2-10 8 series の TOP 活性

8G を HPLC で分画し、18 series を得た。得られたフラクションの内、18C ( $t_R$ 13.2 min, 5.5 mg) を化合物 **2** とした (Figure 4-12)。



Column : COSMOSIL Π NAP  
( $\phi$  10×250 mm)  
Solvent : 35% MeOH  
Flow : 4.0 mL/min  
Chart speed : 1 cm/min  
UV (254 nm) range : 2.56  
Injection 25.7 mg/mL, 100  $\mu$ L

Figure 4-2-11 18 series を得た際の HPLC

### 第3節 化合物の構造解析

化合物 **1** は白色非結晶性固体として得られ、ESI-MS により  $m/z$  599  $[M+Na]^+$  が観察され、 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR を文献値<sup>[4]</sup>と比較し、分子量 576 の既知ステロイド配糖体の stigma-5-en-3-O- $\beta$ -glucoside と決定した (Figure4-3-1)。

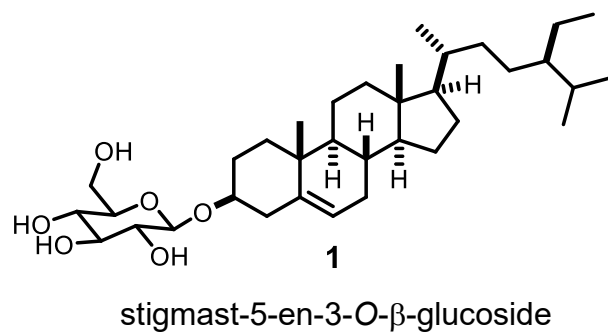


Figure 4-3-1 化合物 **1**

化合物 **2** は無色非晶質として得られ、高分解能 ESI-MS では  $m/z$  413.1192  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{20}H_{22}O_8Na$  413.1212) が観測されたことからその分子式が  $C_{20}H_{22}O_8$  であると判明した。

IR スペクトルからヒドロキシ基 ( $3410\text{ cm}^{-1}$ )、カルボニル基 ( $1615\text{ cm}^{-1}$ ) の存在が示唆された。

また、 $^1\text{H-NMR}$  から 6H 分のシングレットのシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  3.73) から対称面が存在する 2つのメトキシ基の存在が示唆され、 $^{13}\text{C-NMR}$  ではエステル結合を示唆するシグナル ( $\delta_{\text{C}}$  178.8) が観察された。さらに、 $^1\text{H-NMR}$  のオルトカップリングする 2つの 2H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  7.00, 6.64,  $J_{\text{H-2''}, 6''/\text{H-3''}, 5''} = 9.0$ ) 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  のシグナル ( $\delta_{\text{C}}$  127.4, 115.5) からパラ置換型のベンゼン環、 $^1\text{H-NMR}$  の 2H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.35) 及び  $^{13}\text{C-NMR}$  のシグナル ( $\delta_{\text{C}}$  104.1) から対称面を持っている 4 置換ベンゼンの存在が示唆された (Figure 4-3-2)。

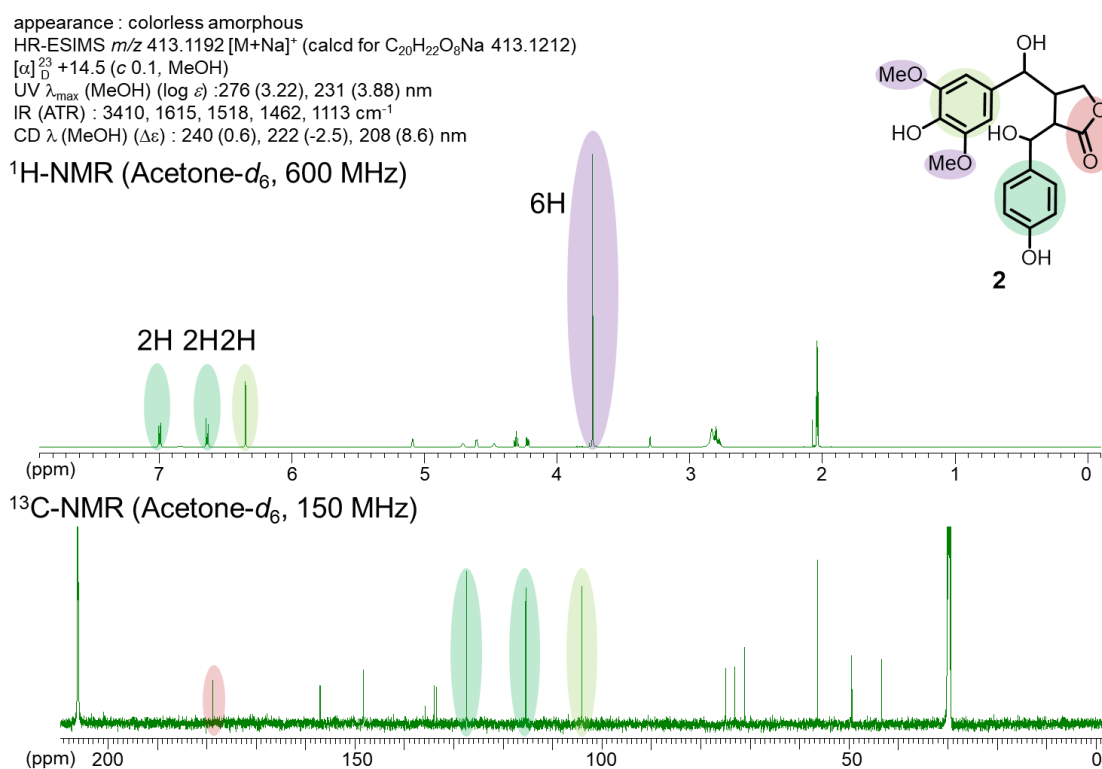


Figure 4-3-2 化合物 **2** の 1D-NMR

さらに 2D-NMR を測定し、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY により部分構造 [H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.81) / H-3 ( $\delta_{\text{H}}$  2.78) / H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.31, 4.22) / H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  4.61) / H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5.09)] が連結された。

HMBC のメトキシ基 ( $\delta_{\text{H}}$  3.73) から C-5' ( $\delta_{\text{C}}$  148.3) への相関から、対称面を持つメトキシ基は、1D-NMR での存在が示唆された 4 置換ベンゼン環上に置換していると判明した。また、4 置換ベンゼン上の H-6' ( $\delta_{\text{H}}$  6.35) からの C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  75.0) への相関とあわせて 4 置換ベンゼンと COSY により示唆された部分構造が連結された。パラ置換ベンゼン上の H-2'' ( $\delta_{\text{H}}$  7.00) からの C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  73.1) への相関から COSY により推測された部分構造とパラ置換型ベンゼンが連結された。さらに、H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  5.09) から C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  178.8) への相関によって平面構造が得られた (Figure 4-3-3)。

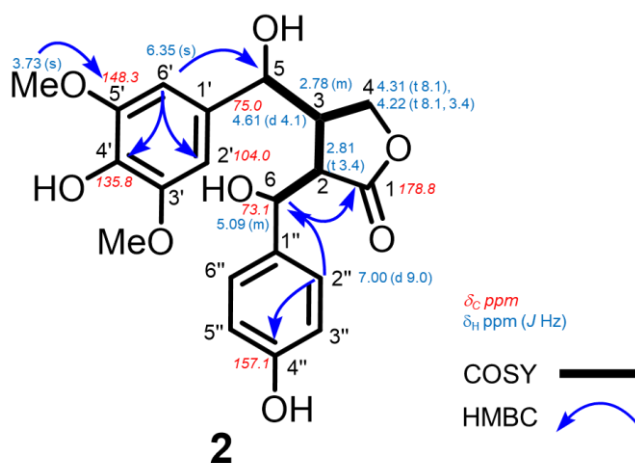


Figure 4-3-3 化合物 **2** の 2D-NMR

最終的に化合物 **2** のスペクトルデータは構造式に付したように帰属され、パラ置換ベンゼン及びピロガロール型のベンゼン環を持つ 1,4-diarylbutane 型のリグナンが側鎖で 5 員環ラク톤を形成した新規リグナンであった (Figure 4-3-4)。

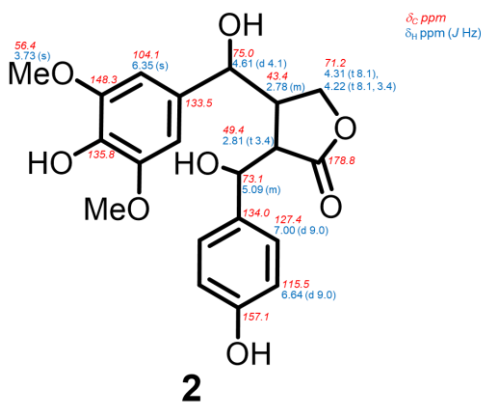


Figure 4-3-4 化合物 **2**

## 第4節 単離化合物の活性評価

単離化合物の TOP 活性を調べた。その結果 **1** は弱い活性化作用を示し、**2** は TOP 活性を示さなかった (Figure 4-4-1)。

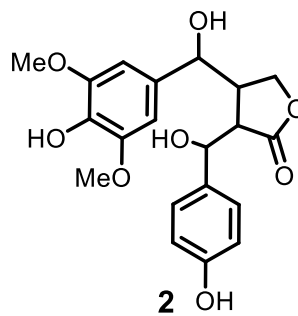
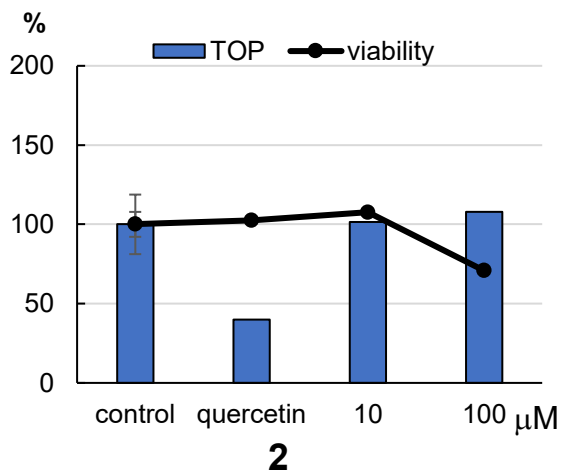
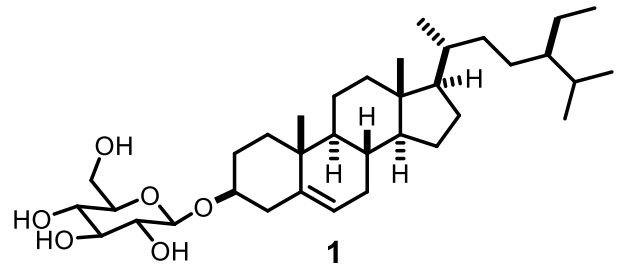
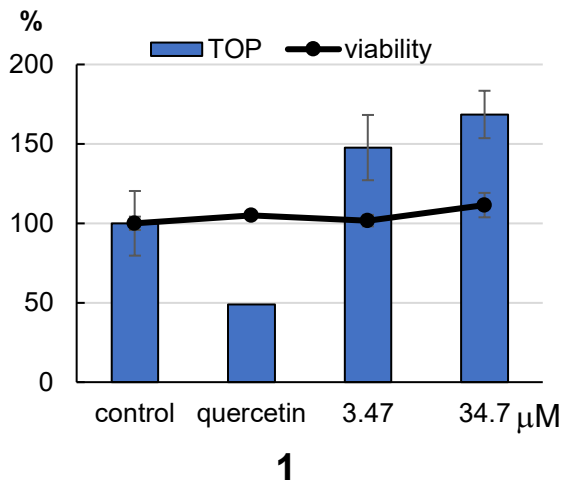


Figure 4-4-1 単離化合物の活性

参考文献

- [1] Chowdhure, D.; Konwar, B.K. *Curr. Sci.* **2006**, *91*, 648-651.
- [2] 藤川 和美 高知県立牧野植物園研究報告 やまとぐさ **2017**, *2*, 35-44.
- [3] Rob, M. M.; Hossen, K.; Iwasaki, A.; Suenaga, K.; Kato-Noguchi, H. *Plants*, **2020**, *9*, in press DOI: :10.3390/plants9010102
- [4] Faizi, S.; Ali, M.; Saleem,R.; Irfanullah; Bibi, S. *Magn. Reason. Chem.* **2001**, *39*, 399-405.

## 第5章 *Ricinus communis* 由来のヒマシ粕からの成分探索研究

以前当研究室で *Ricinus communis* (Figure 5-1) 茎部より、ricinine 等が単離された。ricinine はウェスタンブロッティング解析等により、CK1 $\alpha$ を阻害することで Wnt シグナルを活性化すると結論された (Figure 5-2)<sup>[1]</sup>。このことから、本研究では *Ricinus communis* からのさらなる Wnt シグナルに関連する天然物の探索を目的とし、本植物の分画を行った。

本植物の種子部を圧搾して得られる油はヒマシ油として知られ、峻下剤、軟膏基材、リニメント剤、化粧品等に用いられる。本研究では、種子部を圧搾してヒマシ油を除いた残渣であるヒマシ粕 (伊藤製油製) を用いて成分探索研究を行った。



Figure 5-7 *Ricinus communis* (東邦大学 習志野キャンパス)

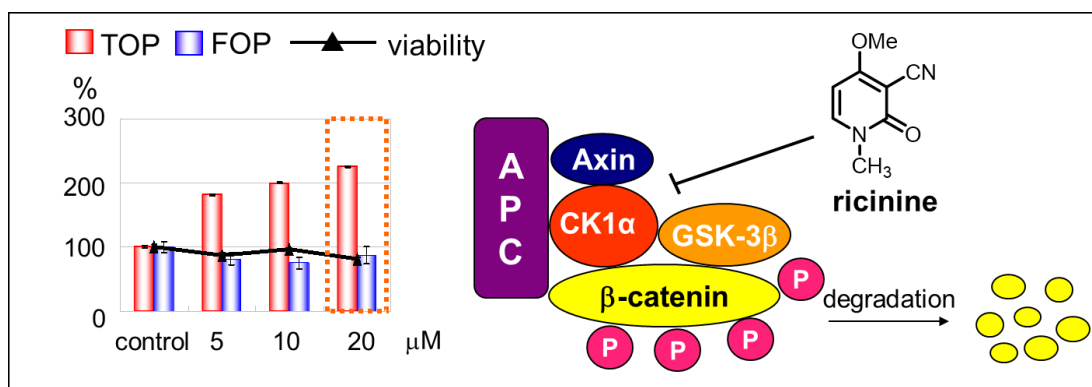


Figure 5-8 Ricinine の Wnt シグナル活性化と作用機序<sup>[1]</sup>



## 第2節 TOP 活性を指標とした分画

ヒマシ粕 (伊藤製油製) を MeOH にて抽出した。得られた MeOH 抽出物を 10%MeOH に溶解し、hexane、EtOAc、BuOH で液液分配した。得られた各層、MeOH 抽出物を silica gel TLC で分析した (Figure 5-2-1)。TOP assay の結果、EtOAc 層に阻害活性が観察された (Figure 5-2-2)。

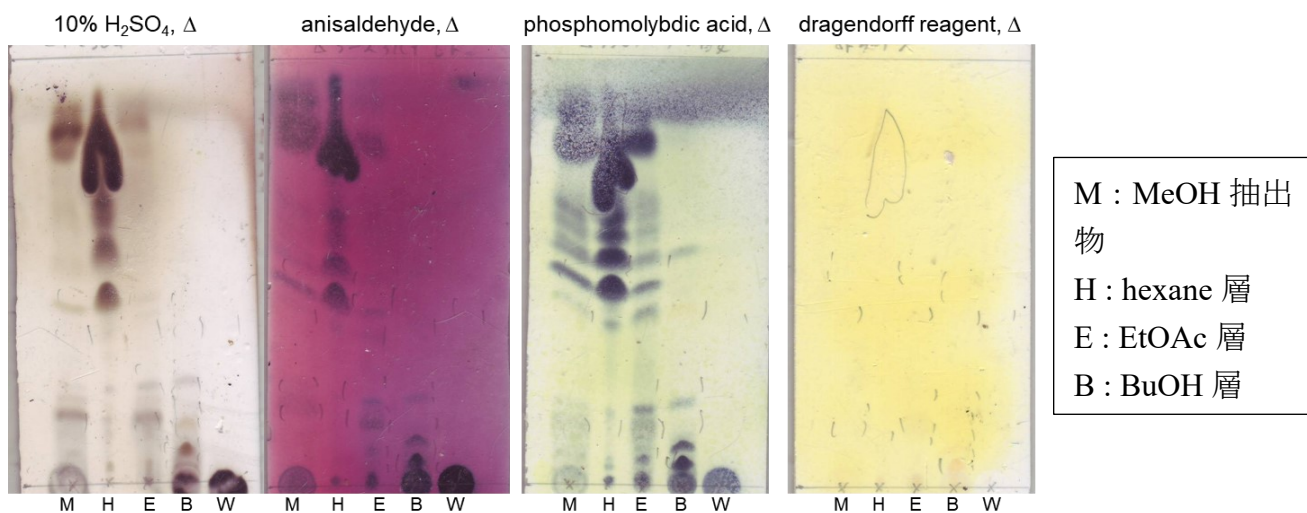


Figure 5-2-1 ヒマシ粕 MeOH 抽出物、液液分配後の各層の silica gel TLC (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=9/1)

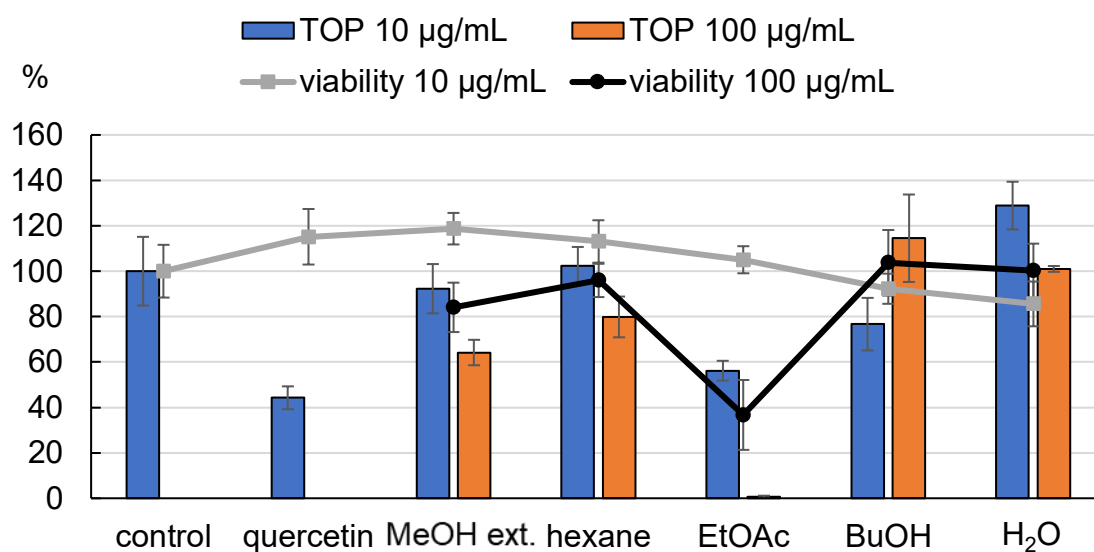


Figure 5-2-2 ヒマシ粕 MeOH 抽出物、液液分配後の各層の TOP 活性と細胞生存率

活性を有していた EtOAc 層について、silica gel カラム ( $\phi$  25×410 mm) を用い、hexane/EtOAc/MeOH 系の混合溶媒を使用して分画を行い、1 series (1A-1G) を得た (Figure 5-2-3)。TOP assay の結果、1C、1D に阻害活性が観察された (Figure 5-2-4)。

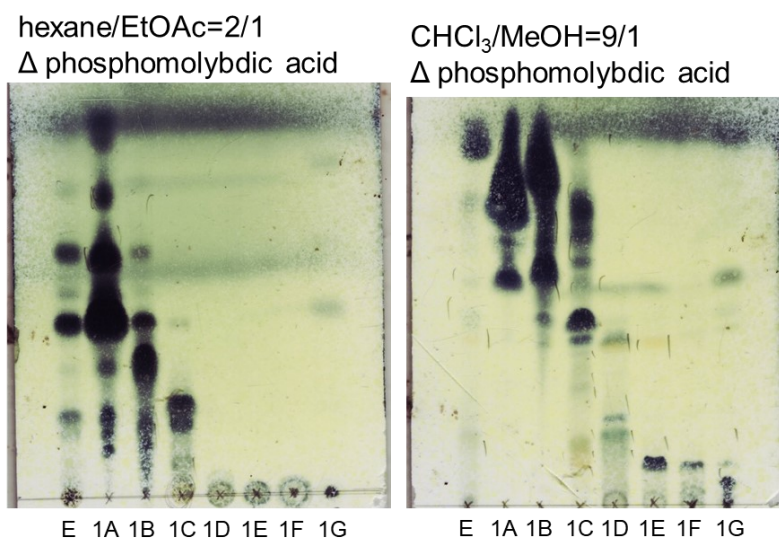


Figure 5-2-3 1 series の silica gel TLC (E : EtOAc 層)

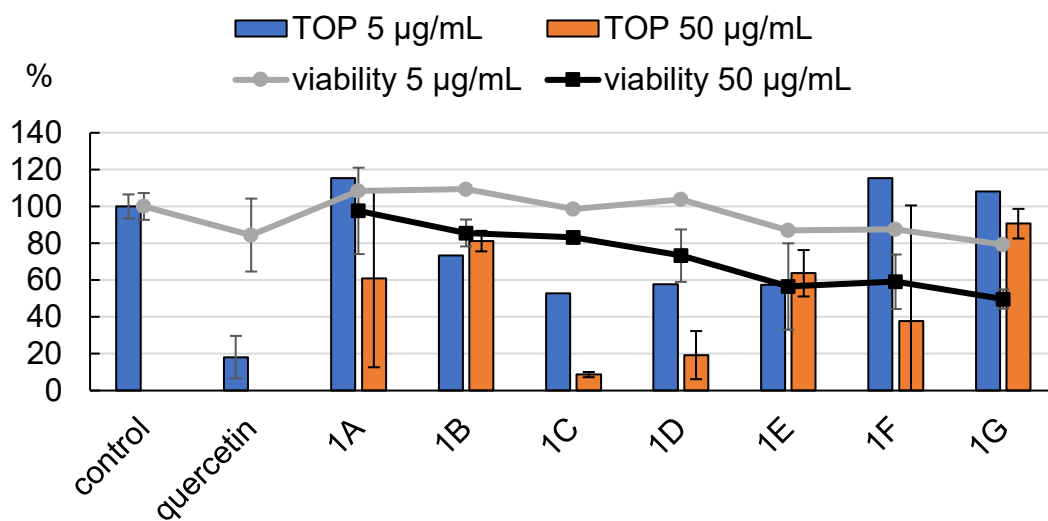


Figure 5-2-4 1 series の TOP 活性と細胞生存率

活性が観察された 1C について silica gel カラム (15×260 mm) を用い、CHCl<sub>3</sub>/acetone 系の溶媒で分画した後、MeOH 及び MeOH+0.1%TFA の溶媒を用いてカラムに残った成分を溶出させ、2 series (2A-2I) を得た (Figure 5-2-5)。また TOP assay の結果、阻害活性は 2E、2F に観察された (Figure 5-2-6)。

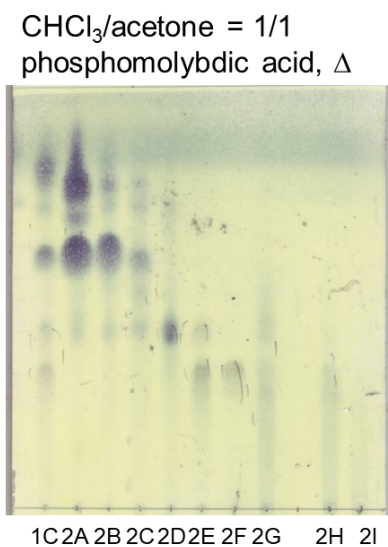


Figure 5-2-5 2 series の silica gel TLC

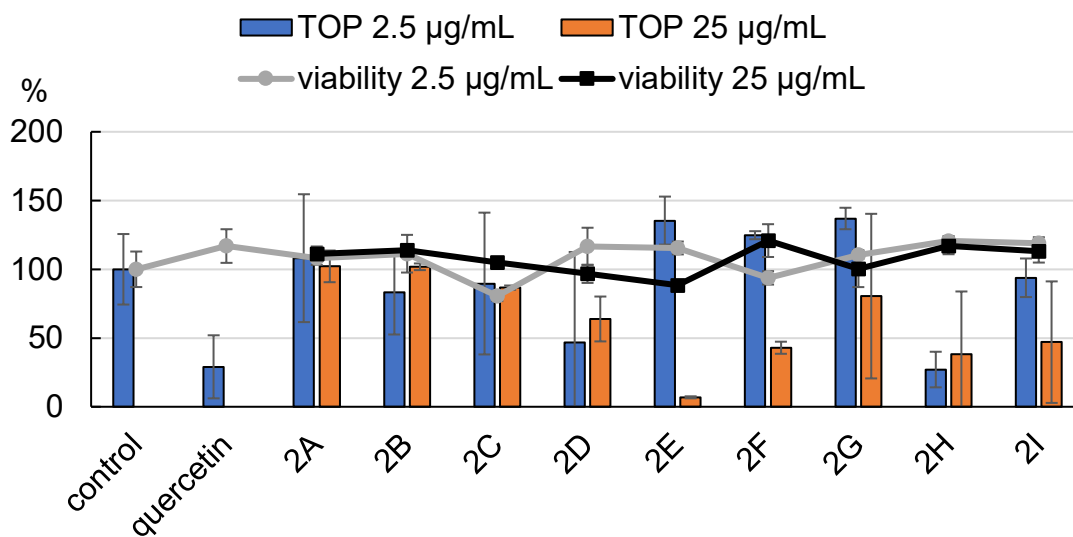


Figure 5-2-6 2series の TOP 活性と細胞生存率

TOP の阻害活性が観察された 2E について、H<sub>2</sub>O/MeOH 混合溶媒を用いて octadecyl silyl (ODS) カラムクロマトグラフィー (φ 13×140 mm) を行い、3 series (3A-3K) を得た (Figure 5-2-7)。また、TOP 阻害活性は 3A、3B、3H、3I に見られた (Figure 5-2-8)。さらに、3D (25.3 mg) を化合物 **6** として得た。

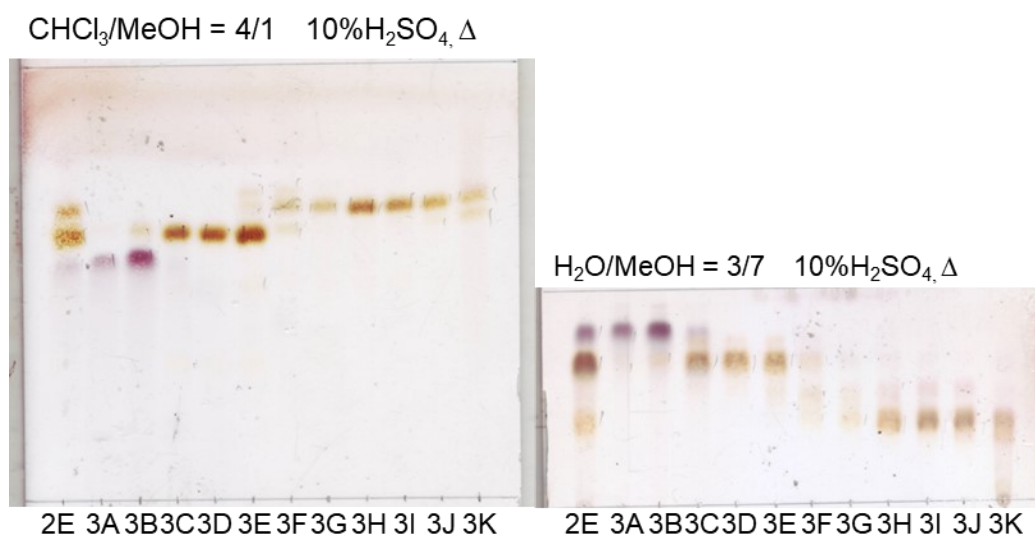


Figure 5-2-7 3 series の TLC (左 : silica gel TLC、右 : ODS TLC)

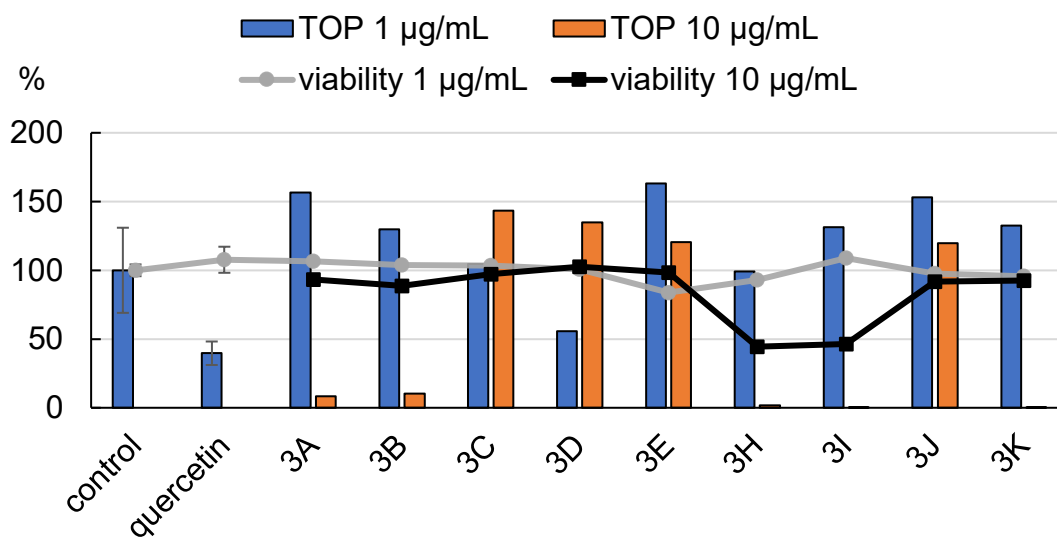


Figure 5-2-8 3 series の TOP 活性と細胞生存率

3I を HPLC (70% MeOH) で分画し、5 series (5A-5E) を得た (Figure 5-2-9) 。これらの内 5C ( $t_R$  11.8 min, 4.0 mg) を化合物 **7** とした。この後、5C の NMR 測定後、夾雑物が存在すると考え、精製を試みた。しかし、NMR に大きな変化は見られなかった。夾雑物と思われたシグナルは化合物 **7** が異性化したことにより観測されたと考えた。

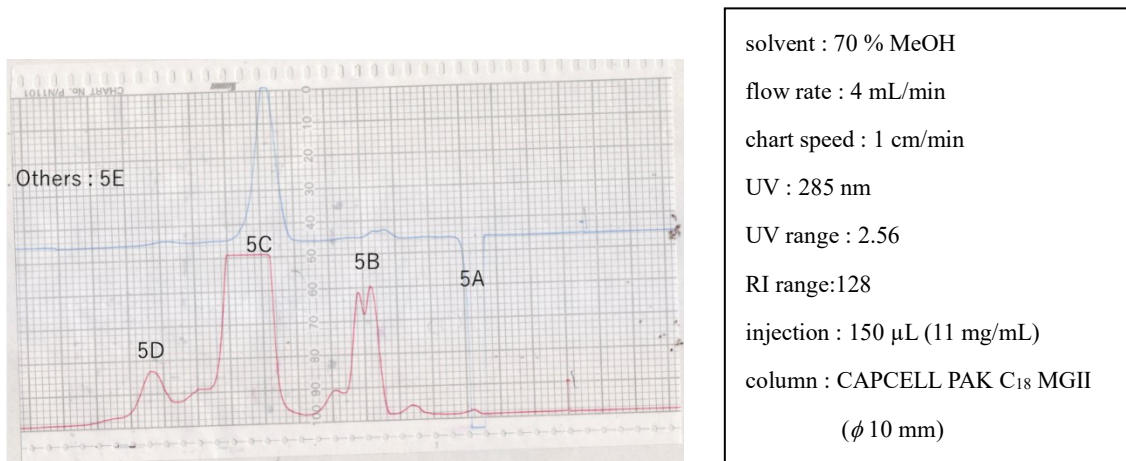


Figure 5-2-9 5 series 分取時の HPLC

また、活性が観察された 3A、3B を合わせ、HPLC (50%MeOH) を行い、7 series (7A-7F) を得た (Figure 5-2-10) 。これらの内、7C を ( $t_R$ , 5.8 min, 2.8 mg) を化合物 **3** とした。

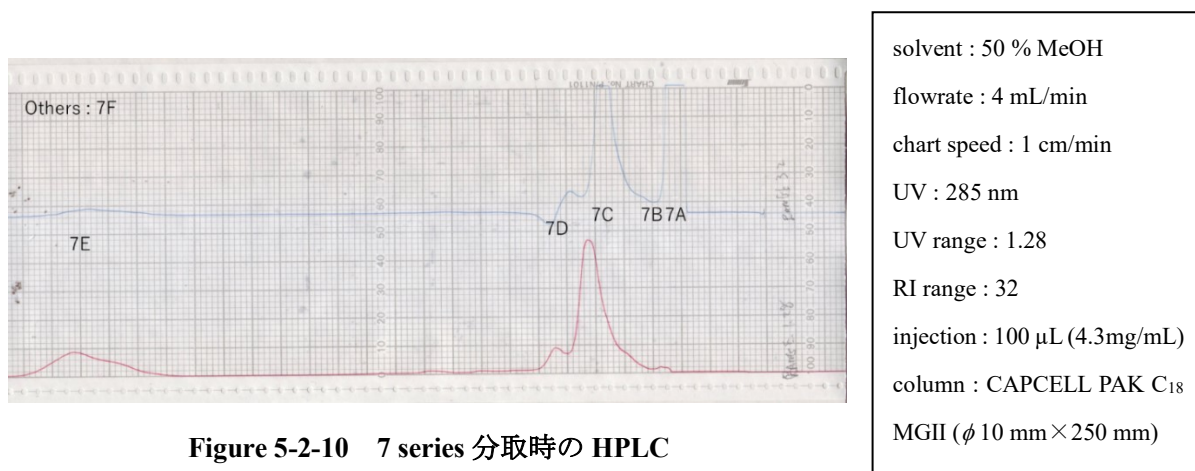


Figure 5-2-10 7 series 分取時の HPLC

さらに、TOP 阻害活性が観察されなかった 2D は、TLC (Figure 5-2-5) 上で 1 スポットに近いと考えた。そこで、Sephadex LH-20 ( $\phi$  12×460 mm) にて  $\text{CHCl}_3$ :MeOH=1:1 を溶媒として用いて分画し、10 series (10A-10F) を得た (Figure 5-2-11)。得られたフラクションの TOP assay を行った。その結果、10F に阻害活性が観察された (Figure 5-2-12)。また、10D (2.2 mg) を化合物 **4** とした。

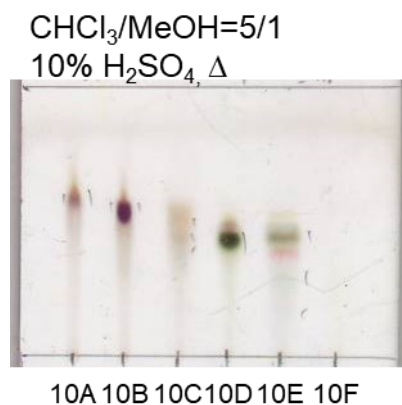


Figure 5-2-11 10 series の silica gel TLC

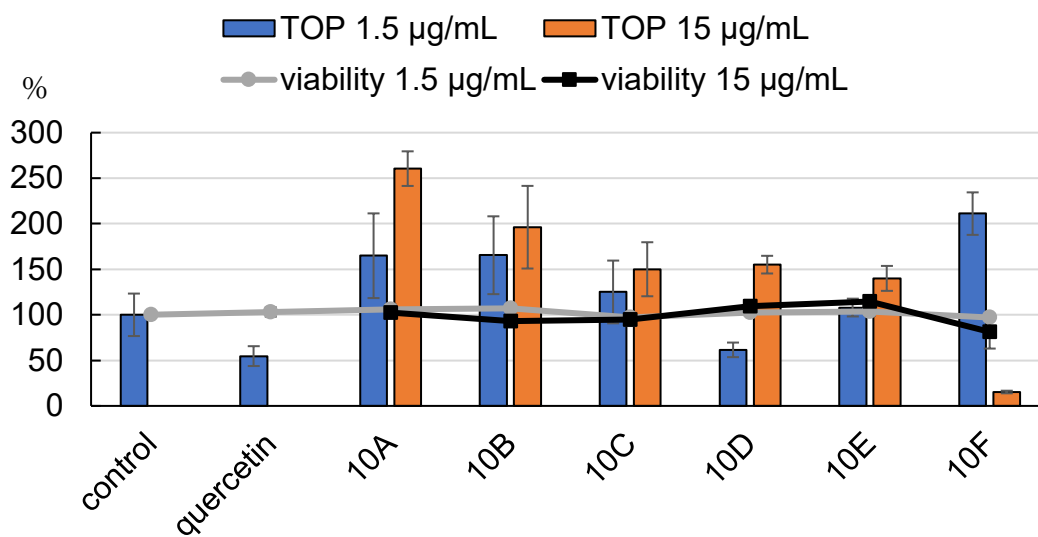


Figure 5-2-12 10 series の TOP 活性と細胞生存率

TOP 阻害活性を有していた 1D を  $\text{CHCl}_3/\text{acetone}$  混合溶媒を用いて、silica gel カラム ( $\phi 40 \times 180 \text{ mm}$ ) に付し、フラクション 4 series (4A-4J) を得た (Figure 5-2-13)。TOP 阻害活性が 4F、4G に観察された (Figure 5-2-14)。

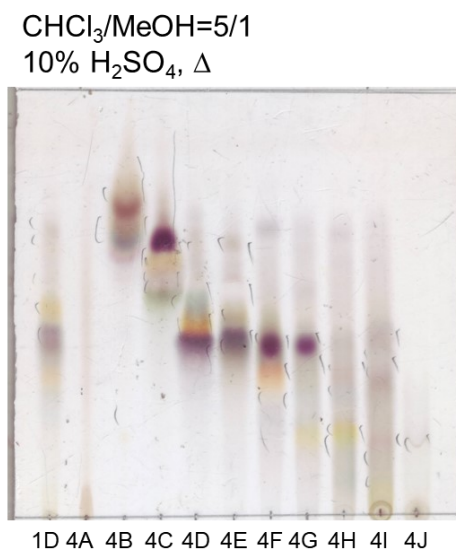


Figure 5-2-13 4 series の silica gel TLC

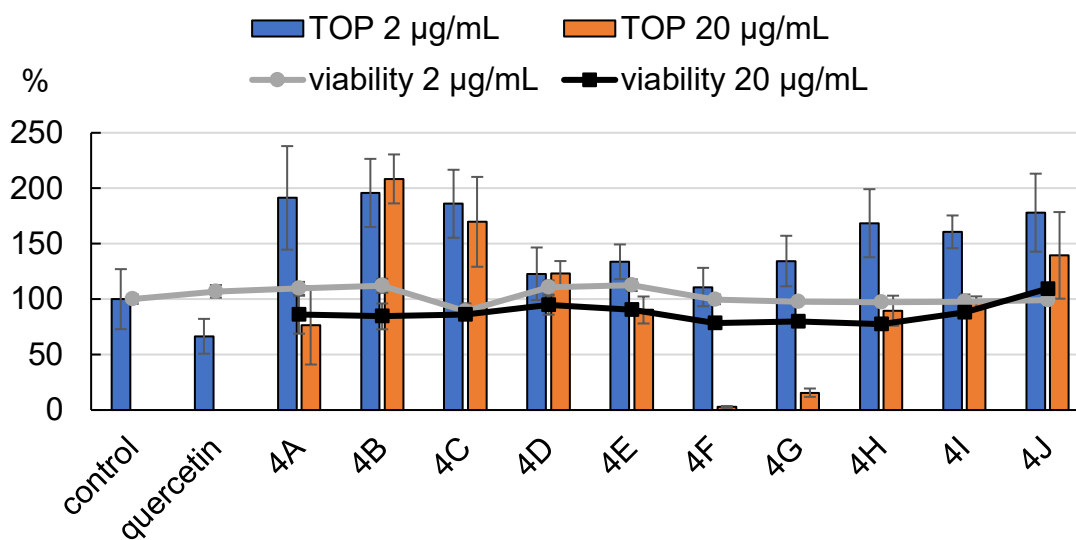


Figure 5-2-14 4 series の TOP 活性と細胞生存率

TOP 阻害活性が観察された 4G について、 $\text{CHCl}_3$ : MeOH= 1:1 を溶媒に用いて、Sephadex LH-20 ( $\phi 15 \times 410$  mm) で分画を行い、12 series (12A-12G) を得て、TLC で分析した(Figure 5-2-15)。得られた画分の TOP assay の結果、12D、12E に阻害活性が観察された (Figure 5-2-16)。なお、12A、12G については微量となったため、活性評価を行ってない。

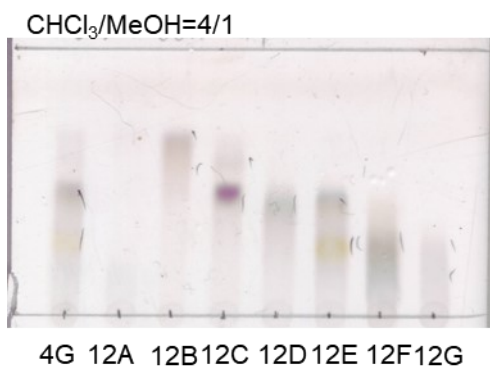


Figure 5-2- 15 12series の silica gel TLC

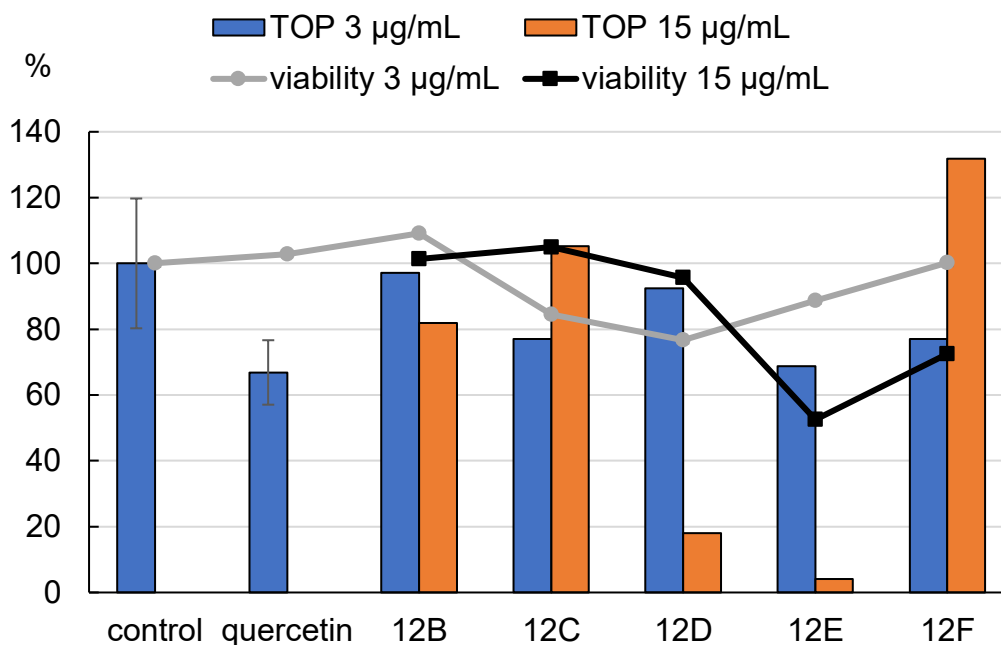


Figure 5-2-16 12series の TOP 活性と細胞生存率

TOP 阻害活性が観察された 12E について、HPLC (50% MeOH) を行い 14 series (14A-14F) を得た (Figure 5-2-17) 。14D ( $t_R$  17.7 min, 2.0 mg) を化合物 **5** として得た。

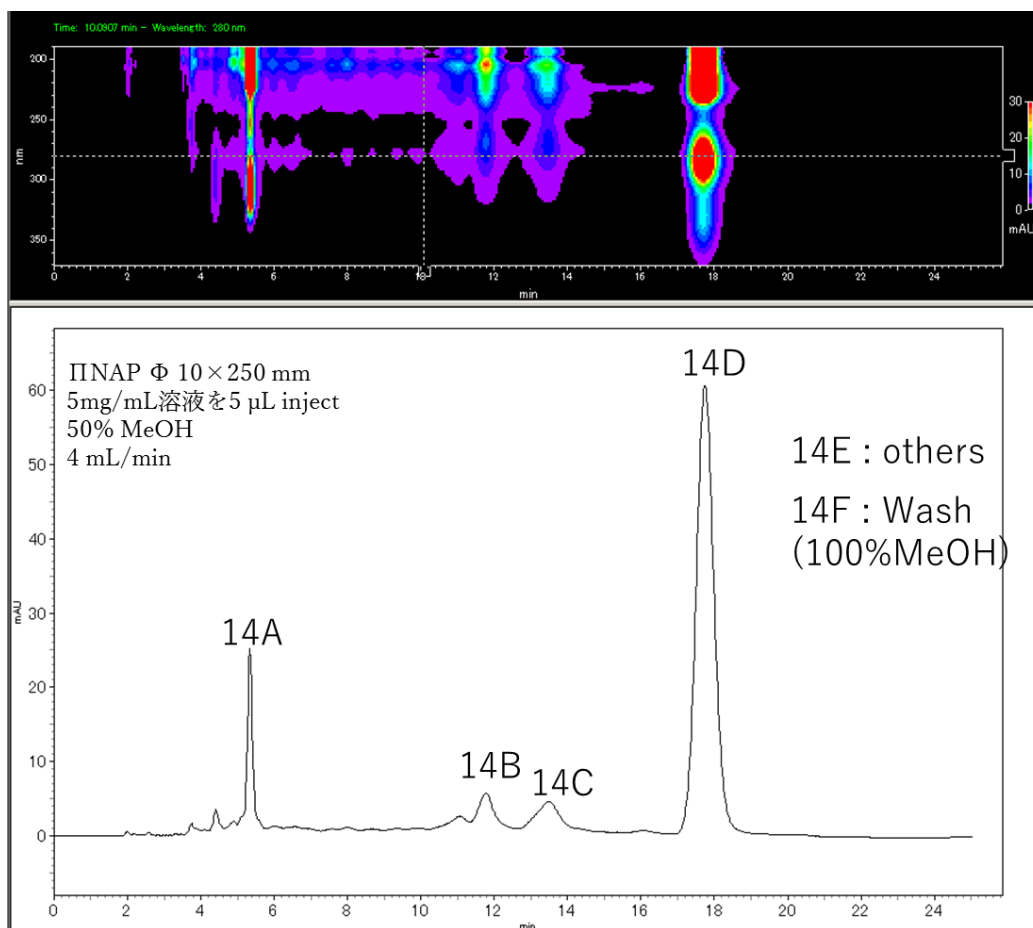


Figure 5-2-17 12E から 14 series 分取時の HPLC (UV : 280 nm)

また、12D について、H<sub>2</sub>O/MeOH 系の溶媒を使用して、逆相系の固相抽出カートリッジである Sep-pac<sup>®</sup> Vac 3cc (200 mg) C<sub>18</sub> Cartridges を用いて分画を行いフラクション 16 series を得た。16 series の内、16A (3.6 mg, H<sub>2</sub>O : MeOH = 9:1 溶出画分) を化合物 **6** とした。

### 第3節 化合物の構造解析

化合物 **3** は褐色固体として得られ、ESI-MS により  $m/z$  661  $[2M+H]^+$ 、659  $[2M-H]^-$  を観測したこと、NMR データの文献値<sup>[2]</sup>との比較により、**3** を 3',3''-bisdemethylpinoresinol であると決定した。

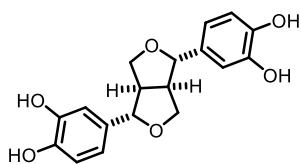
化合物 **4** は褐色非晶質として得られ、ESI-MS により、 $m/z$  329  $[M+H]^+$ 、327  $[M-H]^-$ 、655  $[2M-H]^-$  が観測され、分子量 328 の分子であると予測された。また、文献値<sup>[2]</sup>と NMR データを比較した結果、isoamericanin A であると決定した。

化合物 **5** は白色固体として得られ、ESI-MS により  $m/z$  435  $[M+H]^+$ 、433  $[M-H]^-$  が観測され、分子量 434 と考えられた。また、NMR データを文献値<sup>[3]</sup>と比較することにより、naringenin 7-*O*- $\beta$ -glucopyronoside であると決定した。

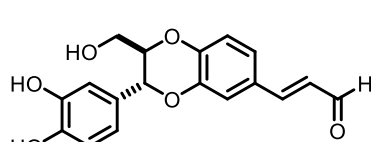
化合物 **6** は白色固体として得られ、ESI-MS により  $m/z$  581  $[M+H]^+$ 、579  $[M-H]^-$  が観測され分子量 580 であると考えられた。また、NMR データを文献値<sup>[4]</sup>と比較し **6** を naringenin 7-*O*- (3''-*p*-coumaroylglucoside) であると決定した。

化合物 **7** は白色固体として得られ、ESI-MS により  $m/z$  727  $[M+H]^+$ 、725  $[M-H]^-$  が観測され分子量 726 であると考えられた。また、NMR データを文献値<sup>[4]</sup>と比較し **7** を naringenin 7-*O*- (3'',6''-di-*p*-coumaroylglucoside) であると決定した。

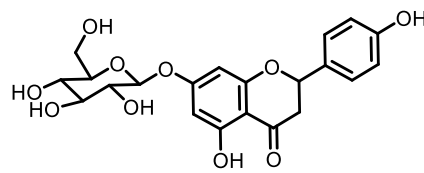
化合物 **8** は白色固体として得られた。ESI-MS により  $m/z$  151  $[M+H]^+$ 、149  $[M-H]^-$  が観測され分子量 150 であると考えられた。また、<sup>1</sup>H-NMR データを文献値<sup>[5]</sup>と比較し、<sup>13</sup>C-NMR で観察されたシグナルの数やケミカルシフトから **8** を *N*-demethylricinine であると決定した。



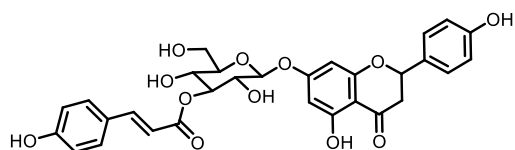
**3**  
3', 3''-bisdemethylpinoresinol



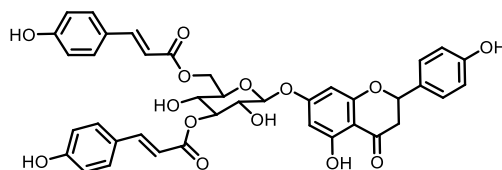
**4**  
isoamericanin A



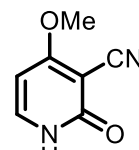
**5**  
naringenin 7-*O*- glucoside



**6**  
naringenin 7-*O*- (3''-*p*-coumaroylglucoside)



**7**  
naringenin 7-*O*- (3'',6''-di-*p*-coumaroylglucoside)



**8**  
*N*-demethylricinine

## 第4節 単離化合物の活性評価

単離した化合物について、TOP 活性を測定し、活性を示したサンプルについては、FOP 活性を測定した (Figure 5-4-1)。化合物 **3**、**7** は FOP 活性には大きな影響を与えず、TOP 活性では阻害活性が観察されことから、Wnt シグナル阻害活性を有する化合物であると示唆された。

化合物 **3**、**7** の TOP assay での IC<sub>50</sub> はそれぞれ 21.7、11.1 μM であった。

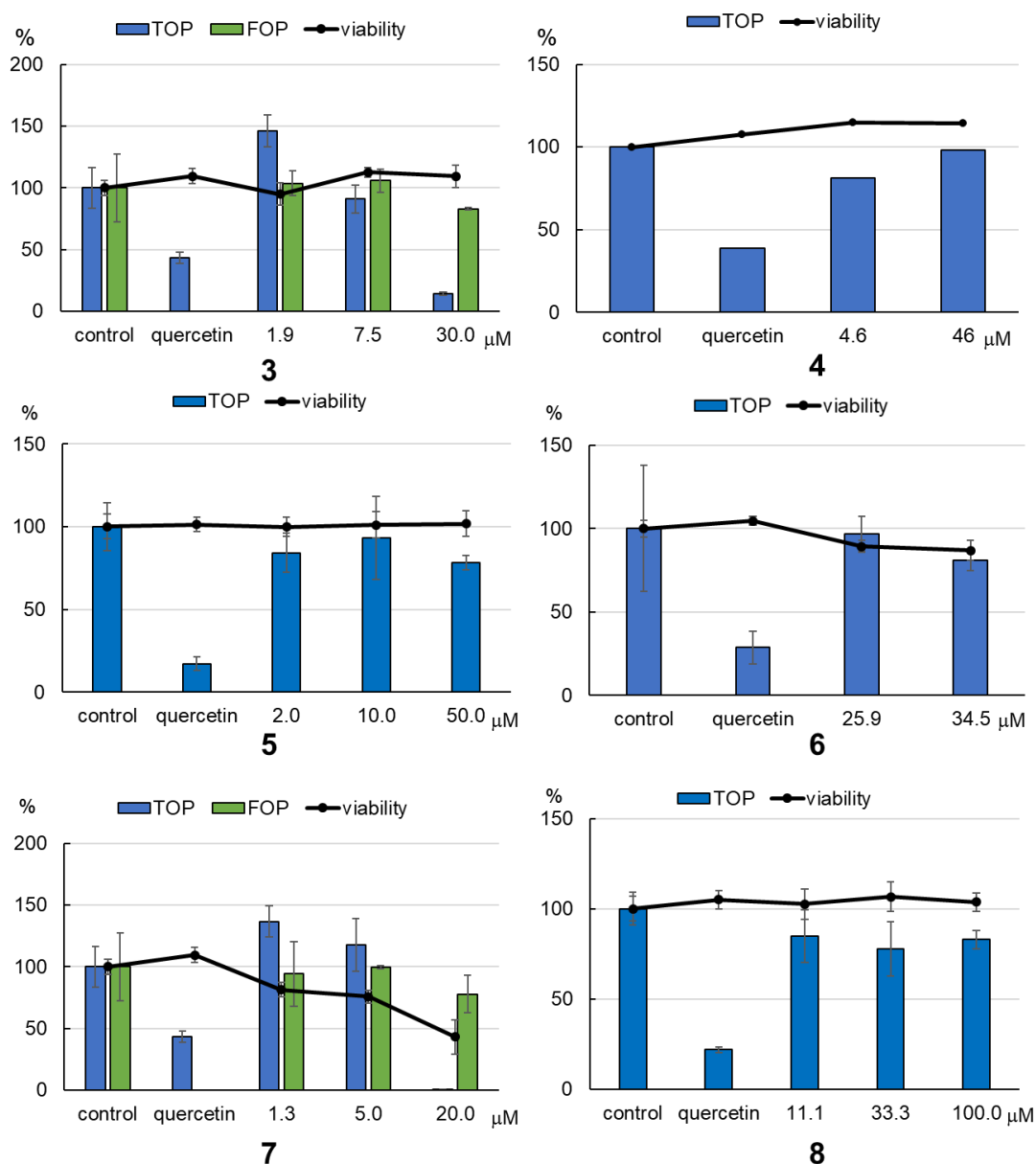


Figure 5-4-1 単離化合物の Wnt シグナル活性

参考文献

- [1] Ohishi, K.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Mizoguchi, T.; Itoh, M.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 4597–4601.
- [2] Waibel, R.; Benirschke, G.; Benirschke, M.; Achenbach, H. *Phytochemistry* **2003**, *62*, 805-811.
- [3] Rayyan, S.; Fossen, T.; Nateland S. H.; AndersenM. Ø. *Phytochem. Anal.* **2005**, *16*, 334-341.
- [4] Bahroun, A.; Ben, A. N.; Damak, M. *J. Soc. Chim. Tunisie.* **2002**, *4*, 1427-1431.
- [5] Mittelbach, M.; Kastner, G.; Junek, H. *Arch. Pharm.* **1985**, *318*, 481-486.

## 第6章 *Canarium album* からの成分探索研究

これまでの当研究室における Wnt シグナル阻害物質探索の一環として、前任者はタイ産植物エキスライブラリーのスクリーニングを行った<sup>[1]</sup>(Figure 6-1)。スクリーニングにて TOP 阻害活性を示していた KKP596 の *Canarium album* を本研究の分画対象として選び出した。

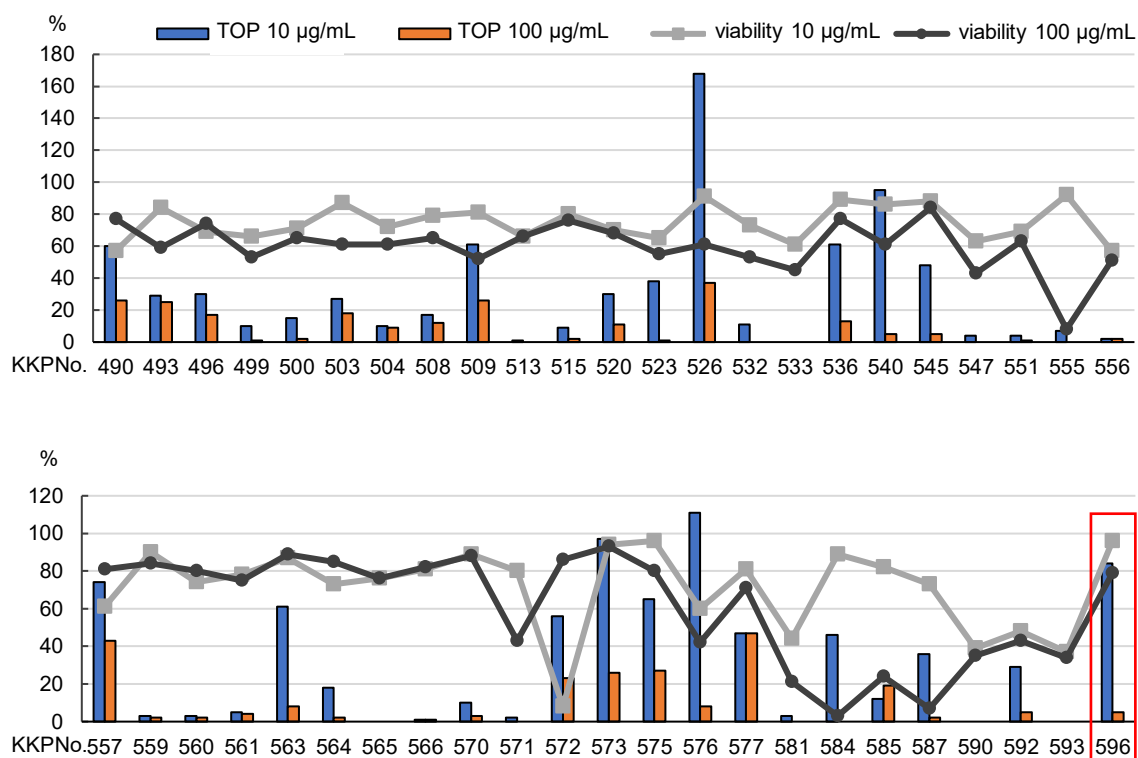


Figure 6-9 前任者によるタイ産植物エキスライブラリーのスクリーニング

*Canarium album* はカンラン科カンラン属のカンランという植物である。カンランの果実部はチャイニーズオリーブと呼ばれ、スープや飲料、お菓子を作るために加工されている。また伝統的な薬用植物として成熟した果実部を乾燥させ、のどの痛み、せき、多汗症、食中毒に用いられている<sup>[2]</sup>。

本研究では TOP 阻害活性を示したタイ産カンラン葉部を分画対象とした。

## 第1節 *Canarium album* の分画

*Canarium album* から TOP 活性を指標に分画を行い、化合物 **9-13** を得た (Figure 6-1-1)。第2節で詳細を述べる。

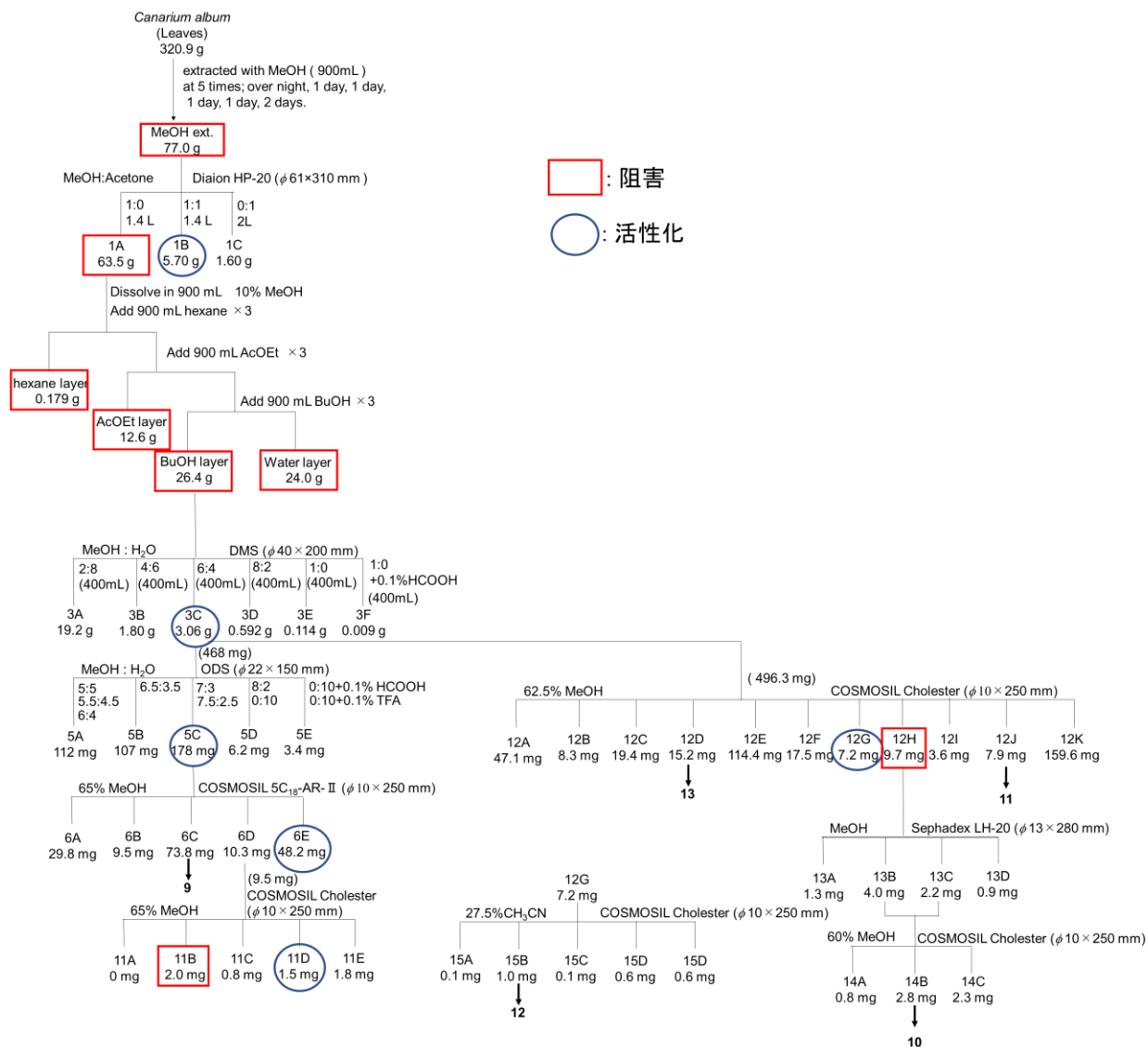


Figure 6-1-1 *Canarium album* の分画

## 第2節 TOP 活性を指標とした分画

*Canarium album* 葉部を MeOH 抽出し、得られた MeOH 抽出物を Diaion HP-20 ( $\phi 20 \times 310$  mm) を用いて MeOH/acetone 系の溶媒で分画し 1 series (1A-1B) を得た (Figure 6-2-1)。TOP 活性試験の結果、TOP 阻害活性は 1A に観察された (Figure 6-2-2)。

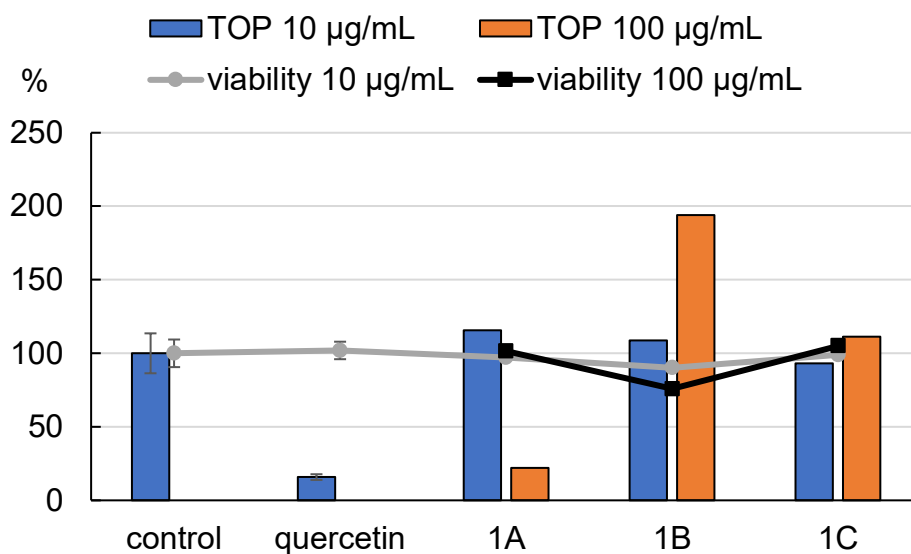


Figure 6-2-1 1 series の TOP 活性細胞生存率

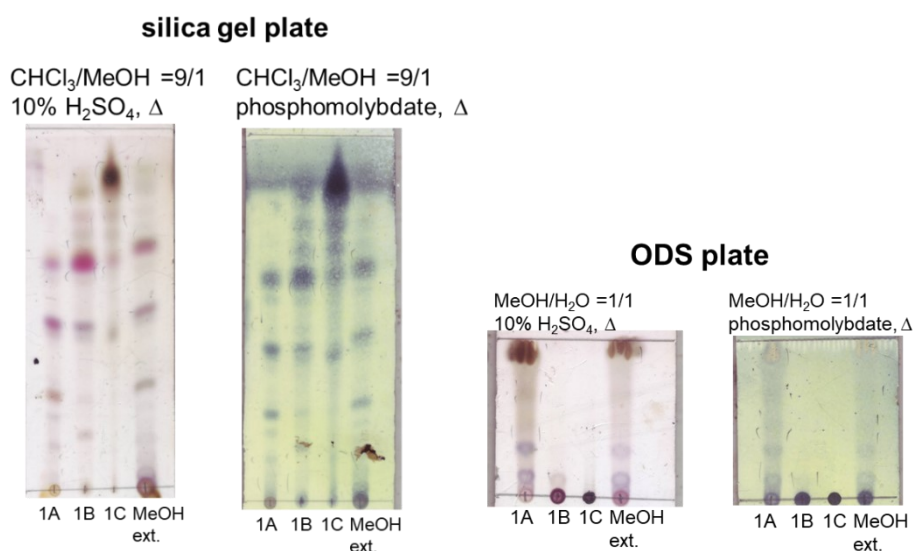


Figure 6-2-2 1 series の TLC (左 : silica gel TLC、右 : ODS TLC)

阻害活性の観察された 1A について 10%MeOH に溶解し、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH を用いて液液分配を行った (Figure 6-2-3)。TOP 活性試験の結果、阻害活性は hexane 層、BuOH 層、水層に移行した (Figure 6-2-4)。

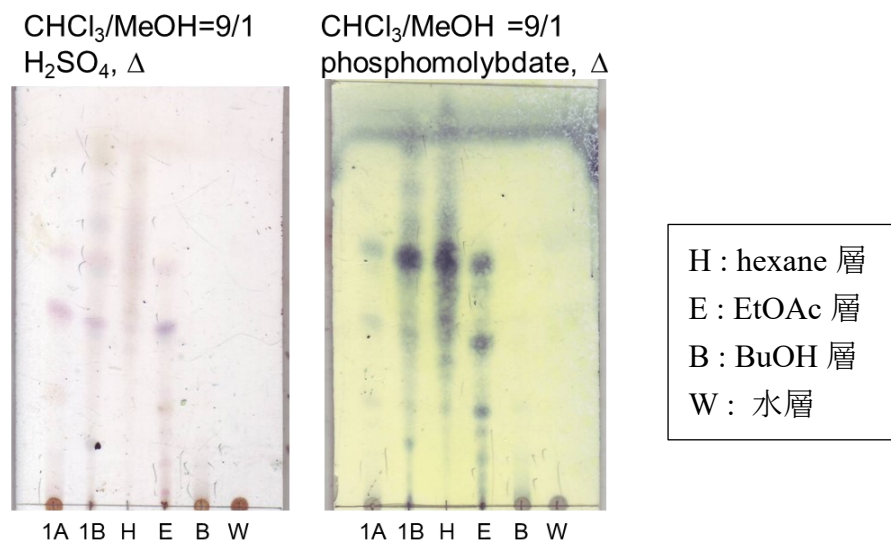


Figure 6-2-3 液液分配後の silica gel TLC

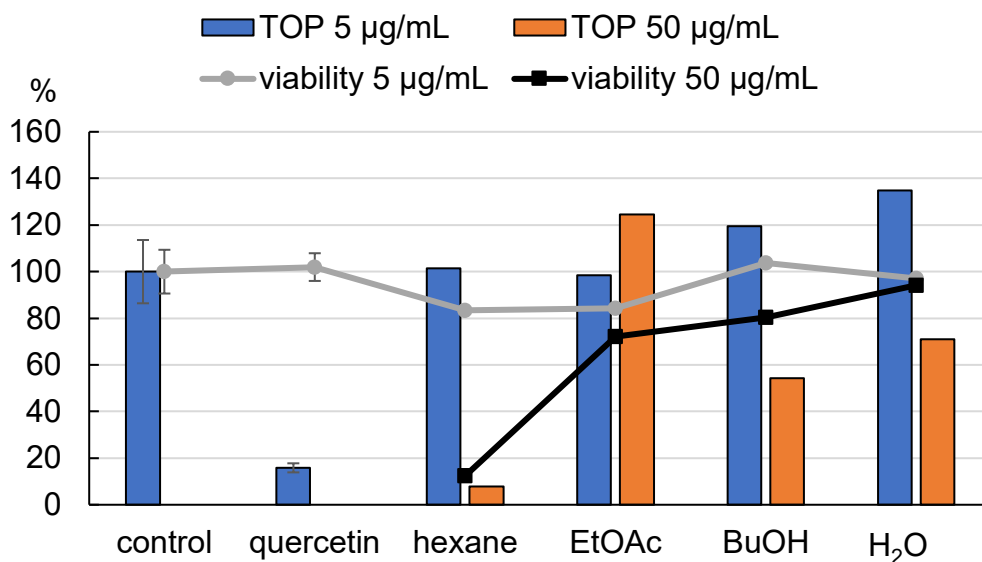


Figure 6-2-4 液液分配後の各層の TOP 活性と細胞生存率

阻害活性が観察され、重量も多い BuOH 層を DMS (FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.) カラム ( $\phi 40 \times 200$  mm) に付し MeOH/H<sub>2</sub>O 混合溶媒を用いて分画し、3 series を得た (Figure 6-2-5)。TOP 活性試験の結果 3C が顕著に活性化作用を示した (Figure 6-2-6)。

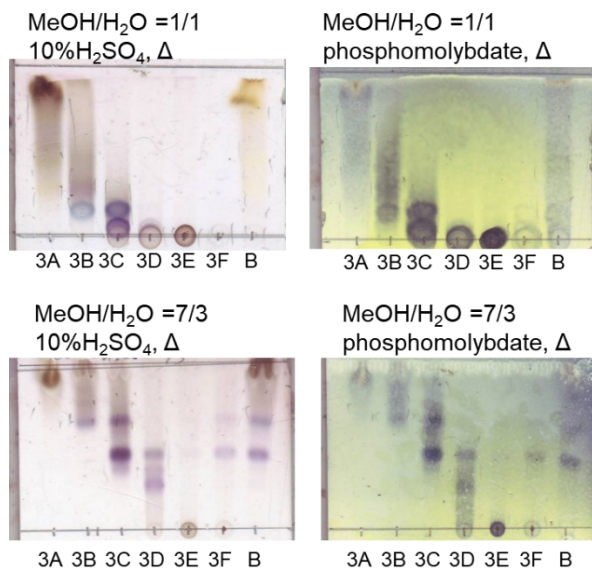


Figure 6-2-5 3 series の ODS TLC

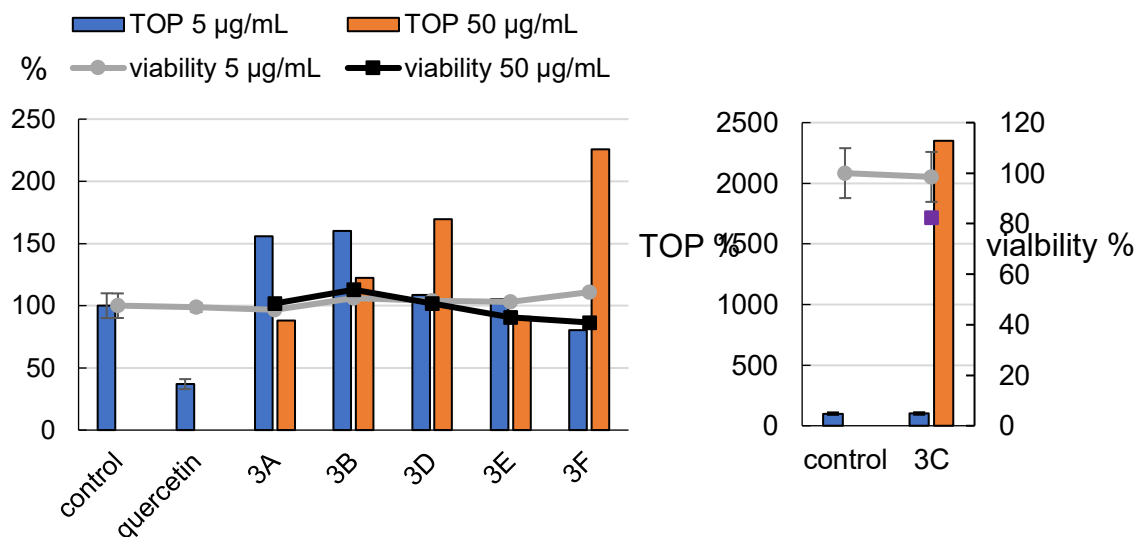


Figure 6-2-6 3 series の TOP 活性と細胞生存率

TOP 活性化作用を示した 3C の一部 (468 mg) を ODS カラム ( $\phi 22 \times 150$  mm) に負荷し MeOH/H<sub>2</sub>O 混合溶媒を用いて分画し、5 series を得た (Figure 6-2-7) 。 TOP 活性試験の結果、5C に活性化作用が観察された (Figure 6-2-8) 。

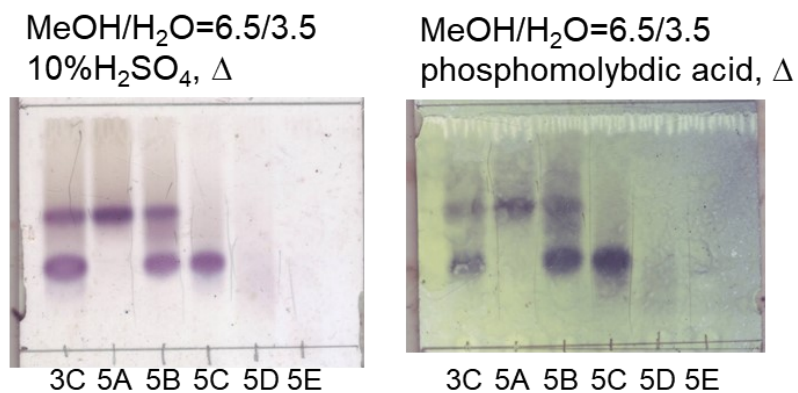


Figure 6-2-7 5 series の TLC

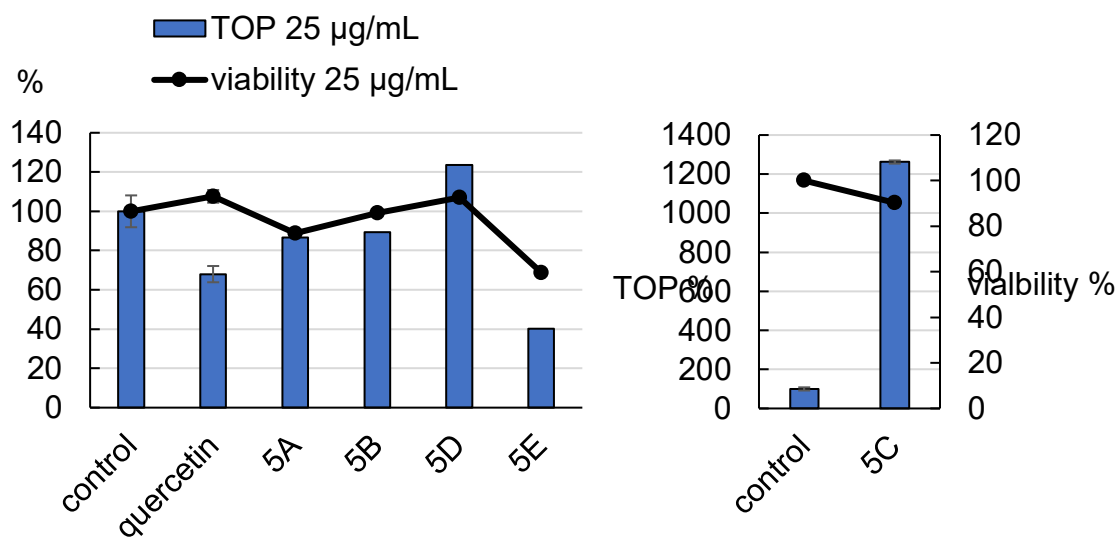


Figure 6-2-8 5 series の TOP 活性と細胞生存率

この後、TOP 活性化作用を示した 5C について HPLC (65% MeOH) で分画し、6C (73.8 mg,  $t_R$  8.2 min) を化合物 9 として単離した (Figure 6-2-9)。

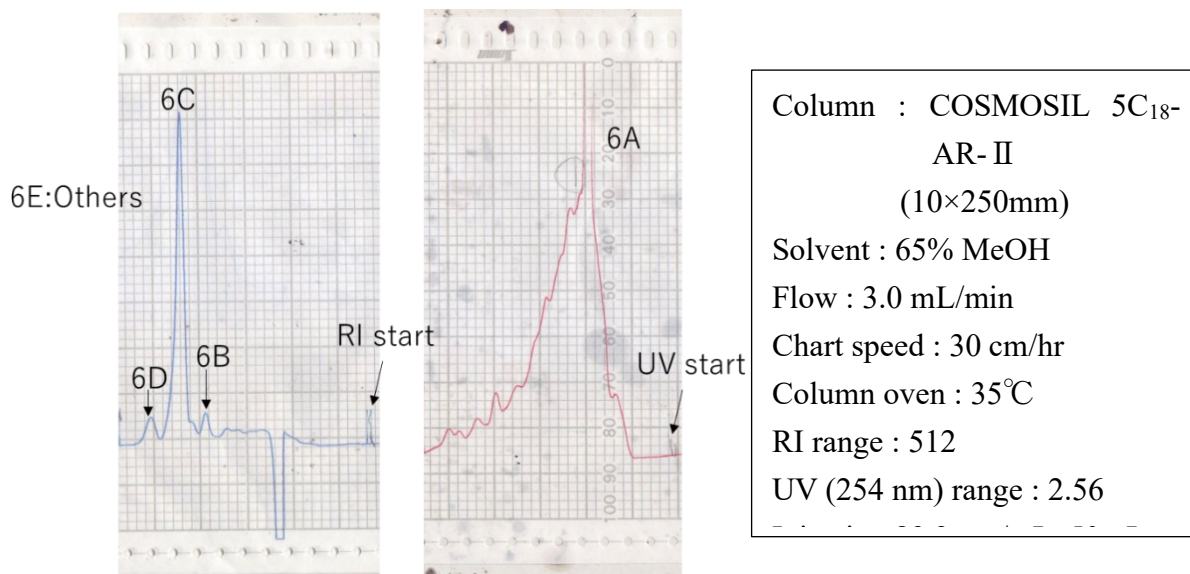


Figure 6-2-9 6 series の HPLC

ESI-MS から 6B、6C、6D の主要成分の分子量は 666、666、650 であると予想された。このため、それぞれのフラクションの主要成分の濃度を 40  $\mu$ M となるように調製し、TOP 活性試験を行った。その結果、活性化作用は 6E に観察された (Figure 6-2-10)。

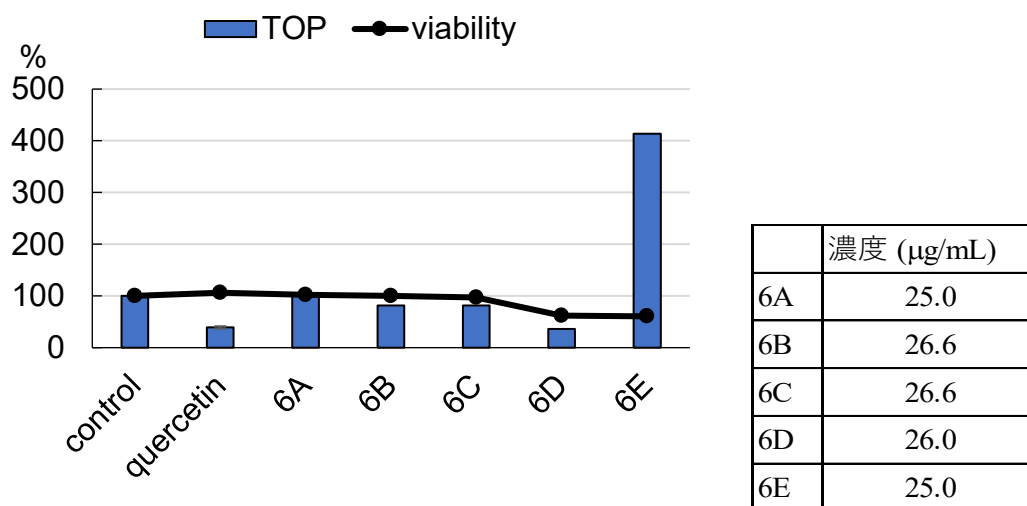


Figure 6-2-10 6 series の活性評価

6 series を分画した際に、分画を進めていく過程で活性化作用が弱まっていることに疑問を抱いた。そこで、5C より 6 series を分画する以前では以下の性質を示す 3 種 (A-C) の化合物が共存し、強い活性化作用を示していたと考えた。

- A: 標的タンパク質 A' に対して作用し、活性化作用を示す物質
- B: 標的タンパク質 B' に対して作用し、阻害作用を示す物質
- C: 標的タンパク質 B' に対して、結合し、阻害物質 B の作用を阻害する物質

仮説は次のようなものである。

仮説 : 5C ではこれらの物質が共存していたが、分画を進めると同一画分に存在する C の濃度が減少し、B の作用が強くなることで、A の作用が隠された。

ここで、仮説の検証を行うために、HPLC でピークとして観察され得られた画分同士を混合し、分画前の TOP 活性が再現されるかを検証した。混合比は RI 検出で得たピークの面積比から 6B:6C:6D=3:28:2 で混合すれば、分画前の 2 成分あるいは 3 成分の組成に近づくと考えた。TOP 活性評価の結果、6C と 6D を混合することで活性化する現象が観察された (Figure 6-2-11)。

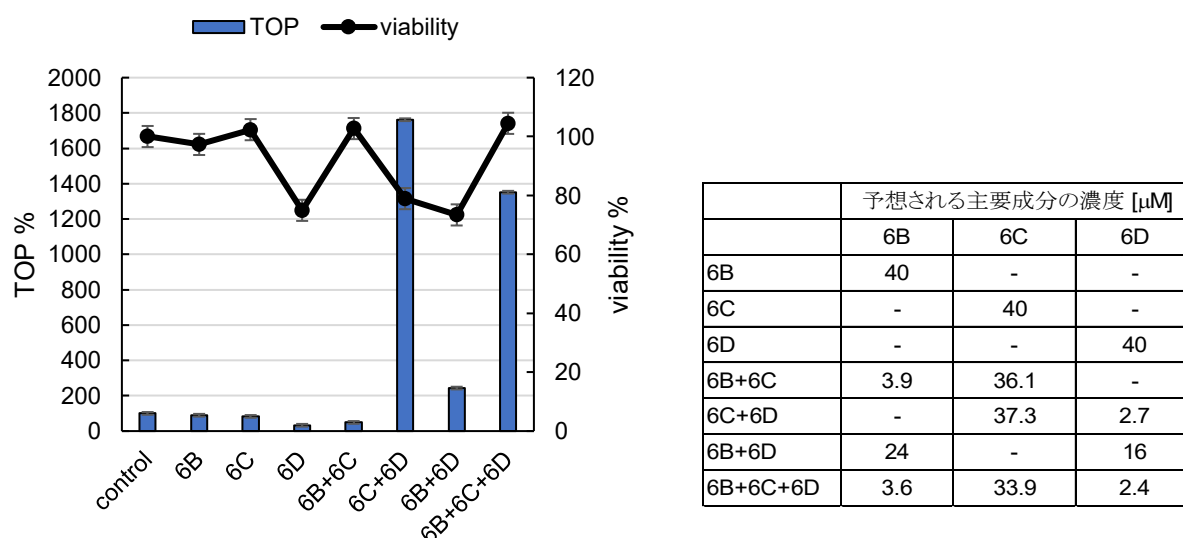


Figure 6-2-11 6series の混合を検討した TOP 活性と細胞生存率

この後、NMR から、6D は混合物であることが分かり、6D の分画を行った。

NMR から 6D が混合物であると判明したため、HPLC (65%/MeOH) で分画を行い、11 series を得た (Figure 6-2-12) 。11B、11C、11D に関しては、保持時間の短い背の高いピークを 11B、保持時間の長い背の低いピークを 11D とした。また、11B、11D が混在する領域を 11C として分取した。11B について、化合物 **10** を単一で得たと考えた。

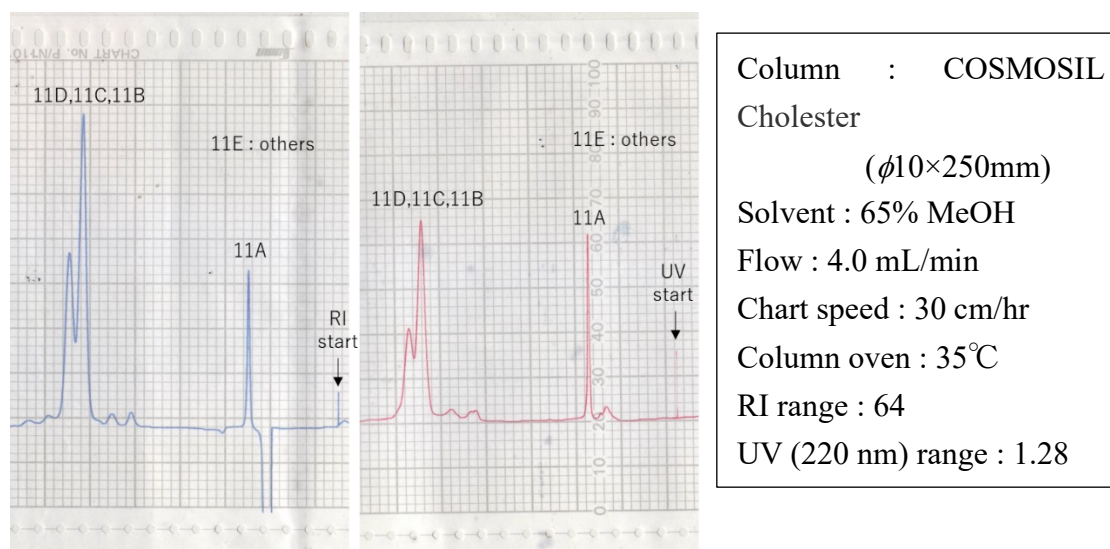


Figure 6-2-12 11 series 分取時の HPLC

また、Table 6-2-1 のように各画分を混合し、TOP 活性を測定した (Figure 6-2-13) 。その結果、11B のみでは阻害活性を示し、他の画分と混合すると活性化作用を示した。

Table 6-2-1 フラクシヨンの混合後の主要成分の濃度

	混合後濃度 [μM]		
	6C	11B	11D
6C	40	-	-
11B	-	40	-
11D	-	-	40
6C+11B	37.3	2.7	-
6C+11D	37.3	-	2.7
11B+11D	-	20.0	20.0
6C+11B+11D	35.0	2.5	2.5

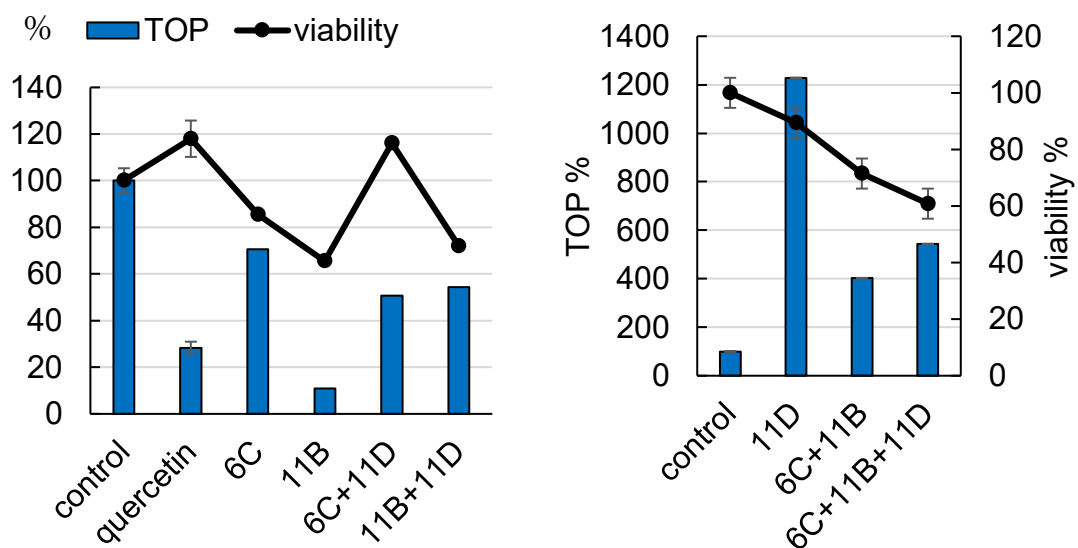


Figure 6-2-13 11 series の TOP 活性と細胞生存率

そこで次に 6C と 11B の両者の主要成分が 40  $\mu$ M となる溶液を調製し、画分同士の混合によってどのように活性化作用が変化するかを調べた。そこで混合比を変化させて TOP 活性を行った (Figure 6-2-14)。その結果、6C:11B=28:1、35:1 の間の比率で TOP 活性の値が最大値となり、14:1 では最大値の半分程度に活性化が観察されることが分かった。

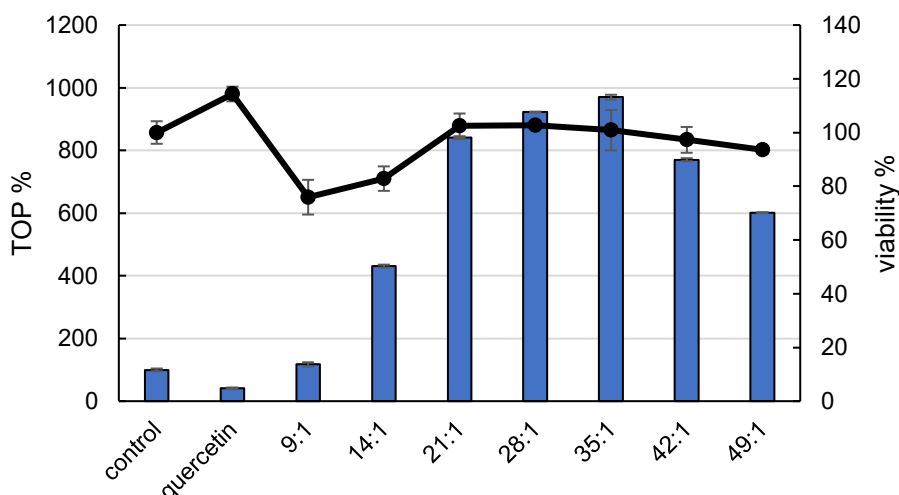


Figure 6-2-14 6C と 11B の混合比の別の TOP 活性と細胞生存率 (6C : 11B)

混合比の検討から活性化の最大値に近い 6C:11B=28:1 及びその半分程度の活性化が観察された 14:1 の混合比で混合した 2 種の溶液を用いて、293 細胞でウェスタンブロッティングを行った。前述の TOP 活性の結果から、14:1、28:1 で *c-Myc* タンパク質量は大幅 (約 4 倍、8 倍) に増大すると推測したが、混合溶液の結果では *c-Myc* タンパク質量は変化しなかった (Figure 6-2-15)。

この結果、ウェスタンブロッティングを行う際には LiCl を添加しない条件で行っているため、観察されていた活性化作用は LiCl の作用の増強 (LiCl 強化作用) によるものである可能性が考えられた。

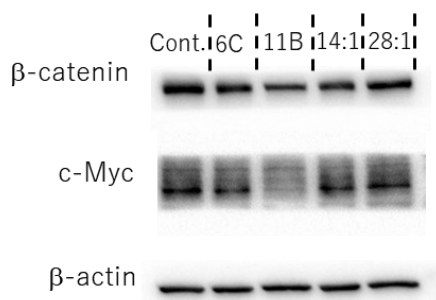


Figure 6-2-15 混合溶液のウェスタンブロッティング

活性化作用が LiCl 強化作用である可能性が考えられたため、TOP 活性を LiCl 以外の方法で Wnt シグナルを活性化して測定した。LiCl と作用点と同じ、GSK3 $\beta$  の阻害剤である BIO (5.6  $\mu$ M) を試験化合物と同時に添加し、TOP 活性を測定した。その結果、BIO を用いた TOP 活性試験では活性化作用は観察されず、フラクション中の成分が LiCl 強化作用を持っていると判明した (Figure 6-2-16)。

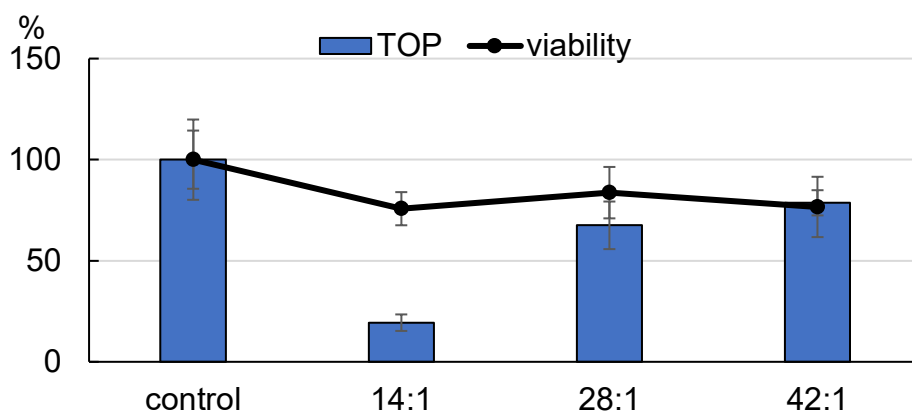


Figure 6-2-16 BIO を用いた TOP 活性評価の結果 (6C:11B)

11B を化合物 **10** が単一で存在しているフラクションであると考えたため、11B の TOP 阻害活性の面に着目し、濃度を変化させて LiCl 及び BIO 添加時の TOP 活性試験を行った。

その結果、LiCl 添加時は化合物の濃度が低下すると活性化作用が観察され、濃度が高くなると TOP 阻害作用が観察された。一方、BIO 添加時では、TOP 阻害活性が観察された。ここから、11B は低濃度で LiCl 強化作用を示すことが判明した (Figure 6-2-17)。

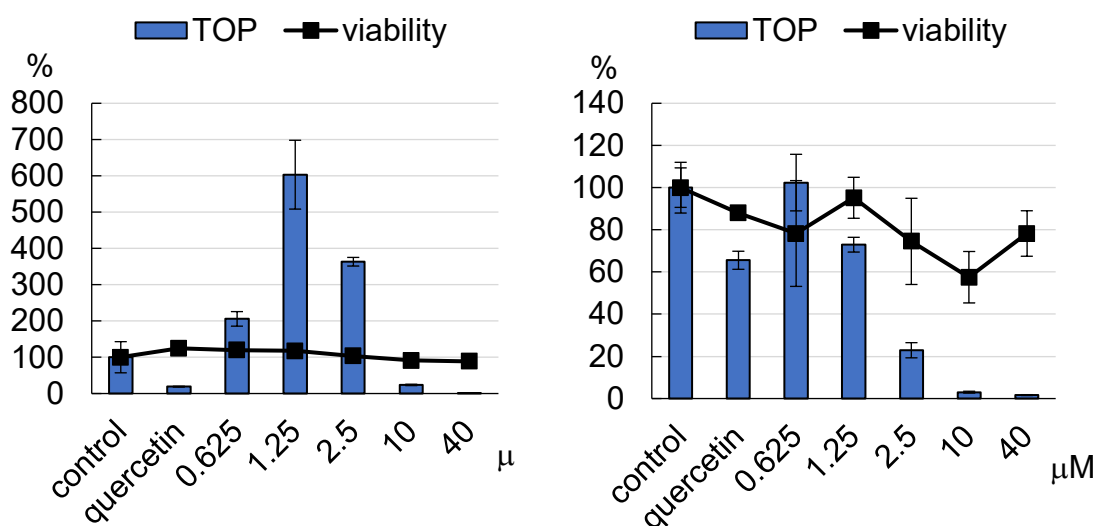


Figure 6-2-17 11B の TOP 活性評価 (左: LiCl 活性化、右 : BIO 活性化)

しかし、この後の分画において、Fr. 14B を化合物 **10** として単離したが、LiCl 強化作用及び TOP 阻害作用は観察されなかった。そのため、これらの作用が化合物 **10** によって引き起こされていることは否定された。

Fr. 11B の残量が少なくなったため、化合物の増量と新たな化合物の単離を目的に 3C の一部 (496.3 mg) を分画した。3C を HPLC (62.5%MeOH) で分画し、12 series を得た (Figure 6-2-18, 6-2-19)。12 series の活性評価の結果、12H が阻害活性を示し、12G、12K は活性化作用を示した (Figure 6-2-20)。12D ( $t_R$  10.2 min, 15.2 mg) を化合物 **13** として、12J ( $t_R$  15.5 min, 3.6 mg) を化合物 **11** として得た。

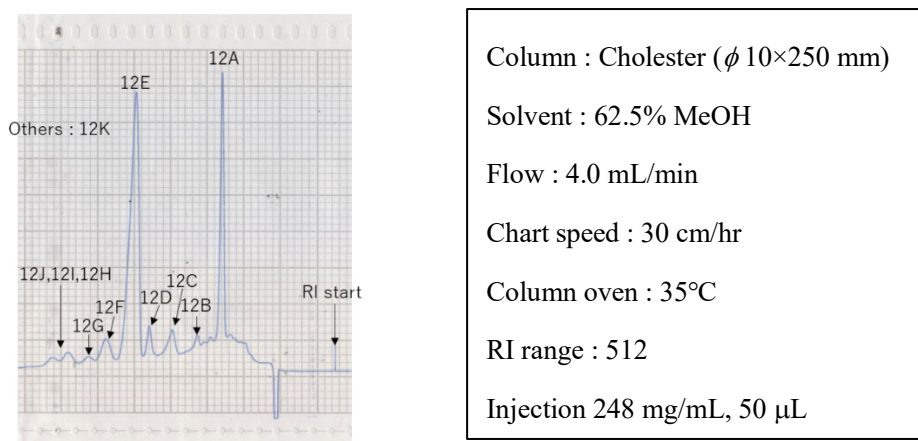


Figure 6-2-18 12 series 分取時の HPLC

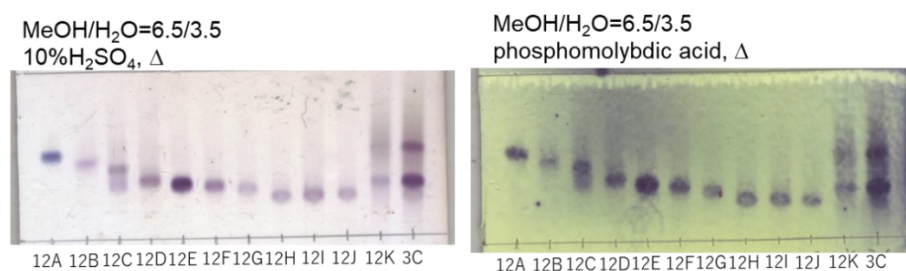


Figure 6-2-19 12 series の TLC

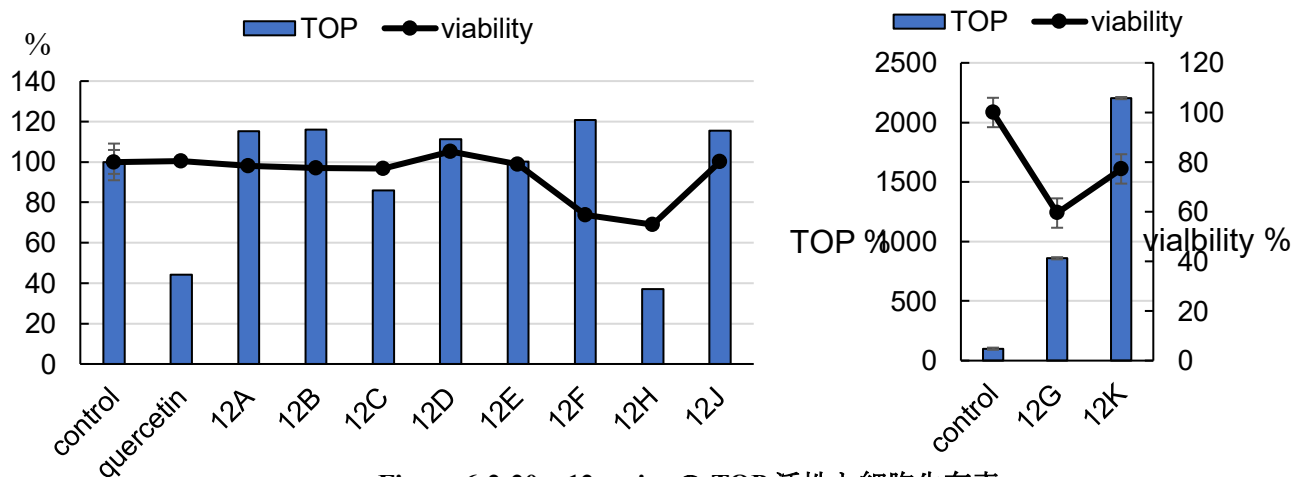


Figure 6-2-20 12 series の TOP 活性と細胞生存率

12H は、化合物 **10** を主に含むフラクションであったことから、このフラクションの分画を進めた。12H を Sephadex LH-20 を担体とし、MeOH を溶媒としたカラムクロマトグラフィー ( $\phi$  13×280 mm) で分画して 13 series を得た (Figure 6-2-21)。

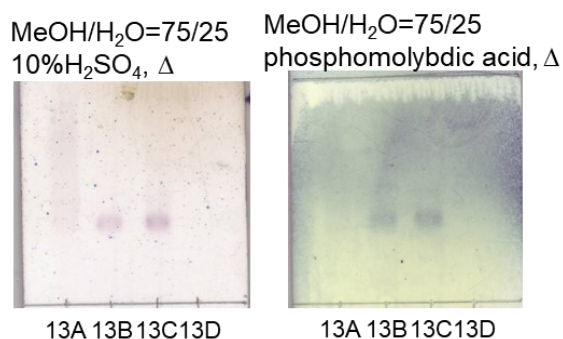


Figure 6-2-21 13 series の ODS TLC

さらに 13B と 13C を合わせて HPLC (60%MeOH) で精製し、14B ( $t_R$  27.9 min, 2.8 mg) を化合物 **10** として得た (Figure 6-2-22)。

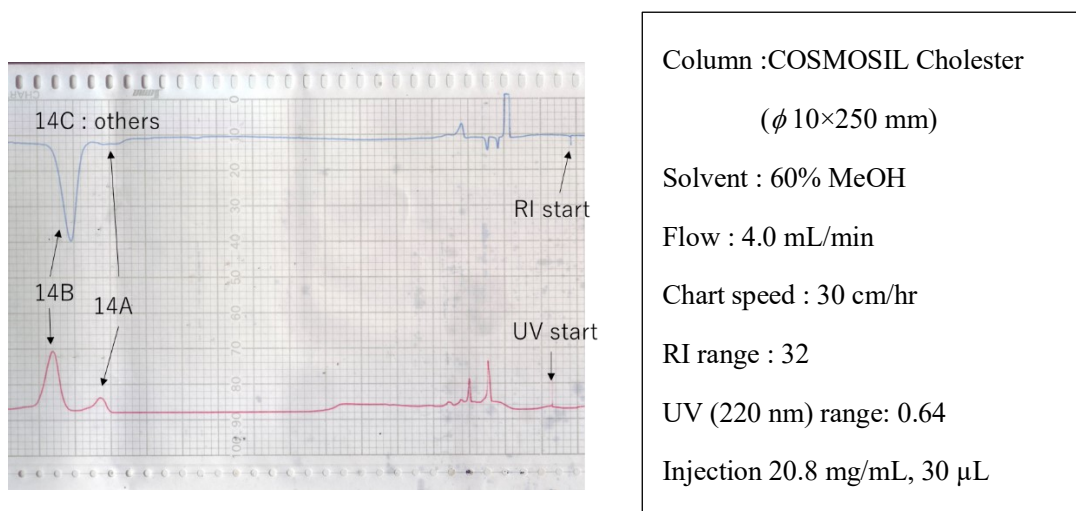


Figure 6-2-22 14 series 分取時の HPLC

また、活性化作用を示した 12G について、HPLC (27.5% CH<sub>3</sub>CN) で精製し、15 series を得た。これらの内、15B (*t*<sub>R</sub> 36.0 min, 1.0 mg) を化合物 **13** とした (Figure6-2-23)。

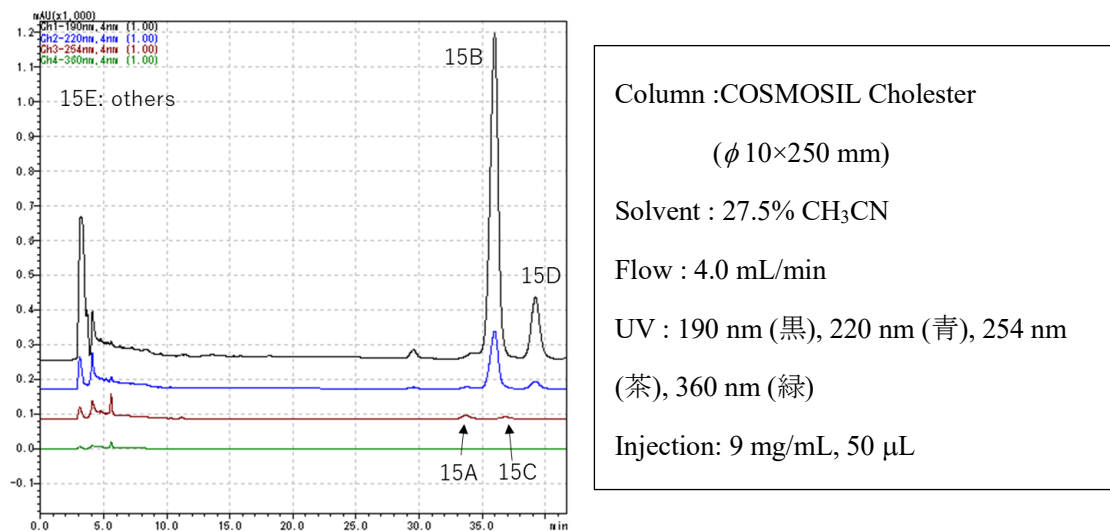


Figure 6-2-23 15 series 分取時の HPLC

### 第3節 化合物の構造解析

*Canarium album* 葉部から化合物 **9-13** を単離した (Figure 6-3-1)。

化合物 **9** は茶色非晶質として得られ、ESI MS で  $m/z$  689  $[M+Na]^+$ 、711  $[M+HCOO]^-$  が観測されたことから分子量 666 と予測され、NMR データを文献値<sup>[3, 4]</sup>と比較することで化合物 **9** をオレアナン型トリテルペン配糖体である chebloside II と決定した。

化合物 **10** は白色非晶質であり、ESI MS で  $m/z$  673  $[M+Na]^+$ 、695  $[M+HCOO]^-$  が観測され、分子量 650 の分子と想像された。NMR データを文献値<sup>[4, 5]</sup>と比較し、化合物 **10** をオレアナン型トリテルペン配糖体 arjunglucoside II と決定した。

化合物 **11** は茶色非晶質として得られ、ESI MS で  $m/z$  673  $[M+Na]^+$ 、695  $[M+HCOO]^-$  が測定されて、分子量 650 の分子であると示唆された。NMR データを文献値<sup>[4, 6]</sup>と比較し、化合物 **11** をウルサン型トリテルペン配糖体 quadranoside IV と決定した。

化合物 **12** は白色非晶質体で、ESI MS で  $m/z$  649  $[M+H]^+$ 、698  $[M+HCOO]^-$  が観測され、分子量 648 の分子と予想された。NMR データを文献値<sup>[7]</sup>と比較し、化合物 **12** をウルサン型トリテルペン配糖体 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxylurs-12,20(30)-dien-28-oic acid  $\beta$ -D-glucopyranoside と決定した。

化合物 **13** は茶色非晶質と観察され、ESI MS で  $m/z$  667  $[M+H]^+$ 、711  $[M+HCOO]^-$  が観測され、分子量 666 の分子であると考えられた。NMR データを文献値<sup>[6]</sup>と比較し、化合物 **13** はルパン型トリテルペン配糖体 quadranoside II であると判明した。

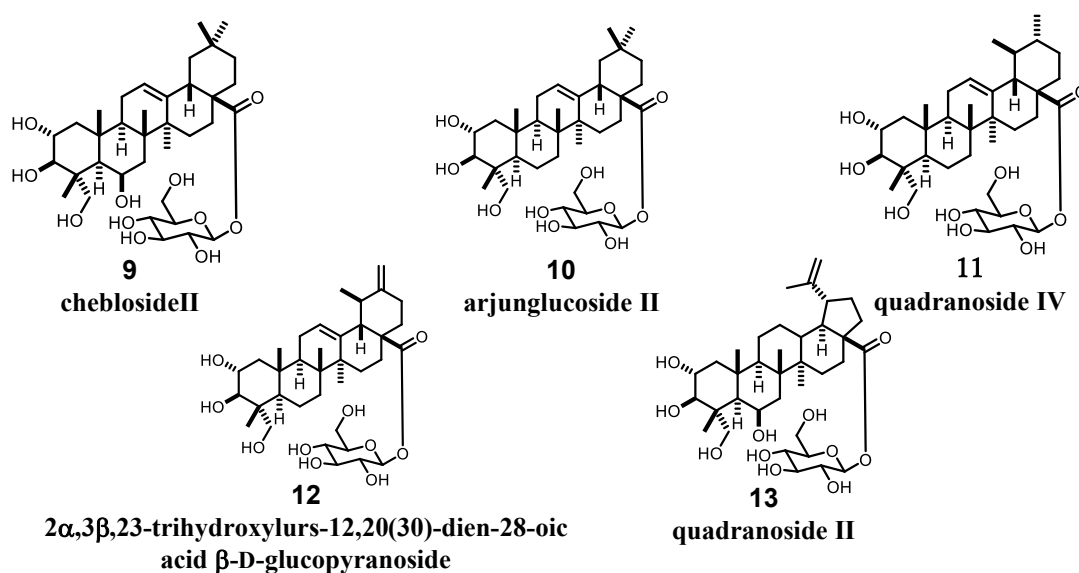


Figure 6-3-1 化合物 **9-13** の構造

## 第4節 単離化合物の活性評価

得られた化合物の TOP 活性を測定した。その結果化合物 **9-13** は TOP 活性を示さなかった (Figure 6-4-1)。

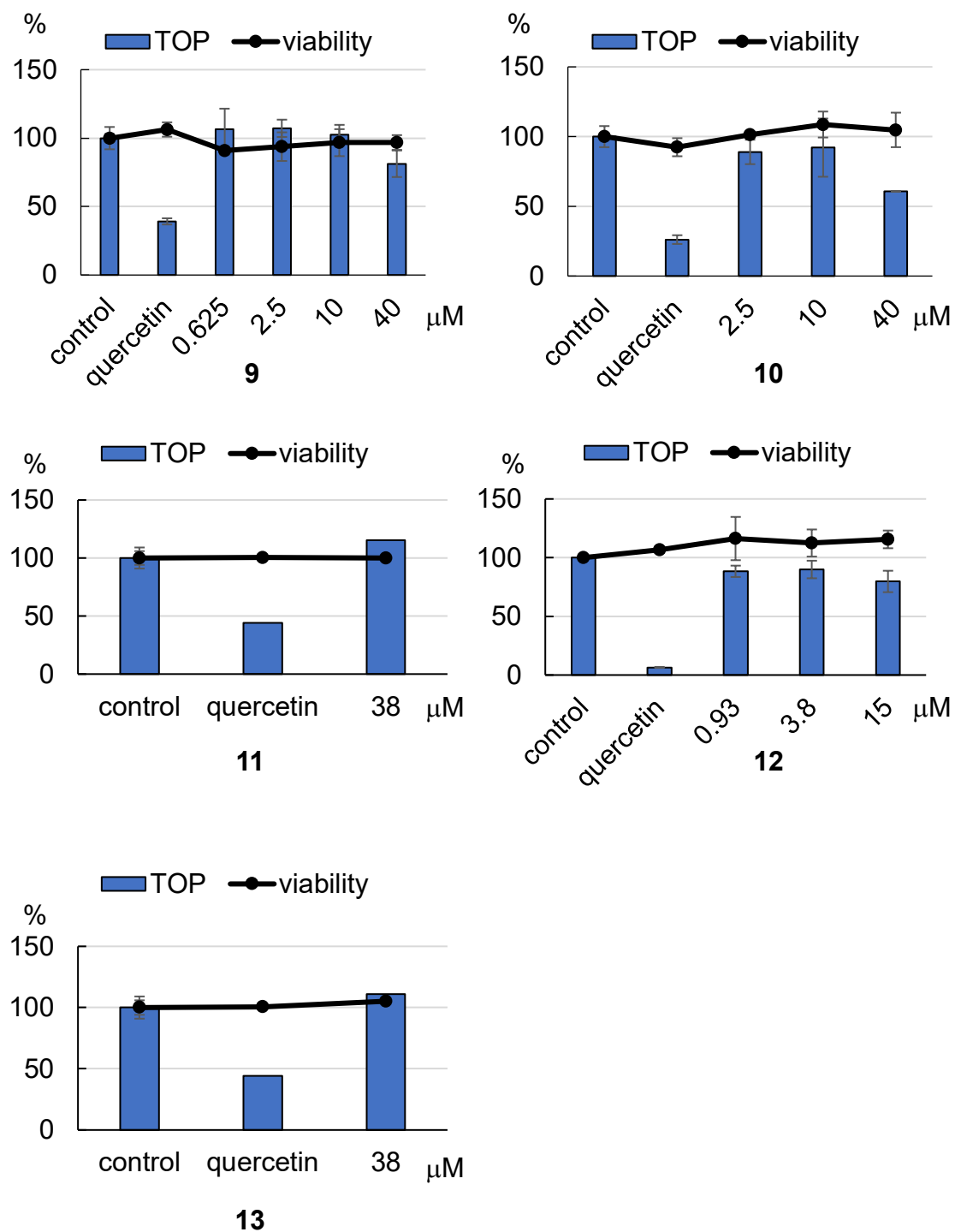


Figure 6-4-1 化合物の活性 9-13 の活性

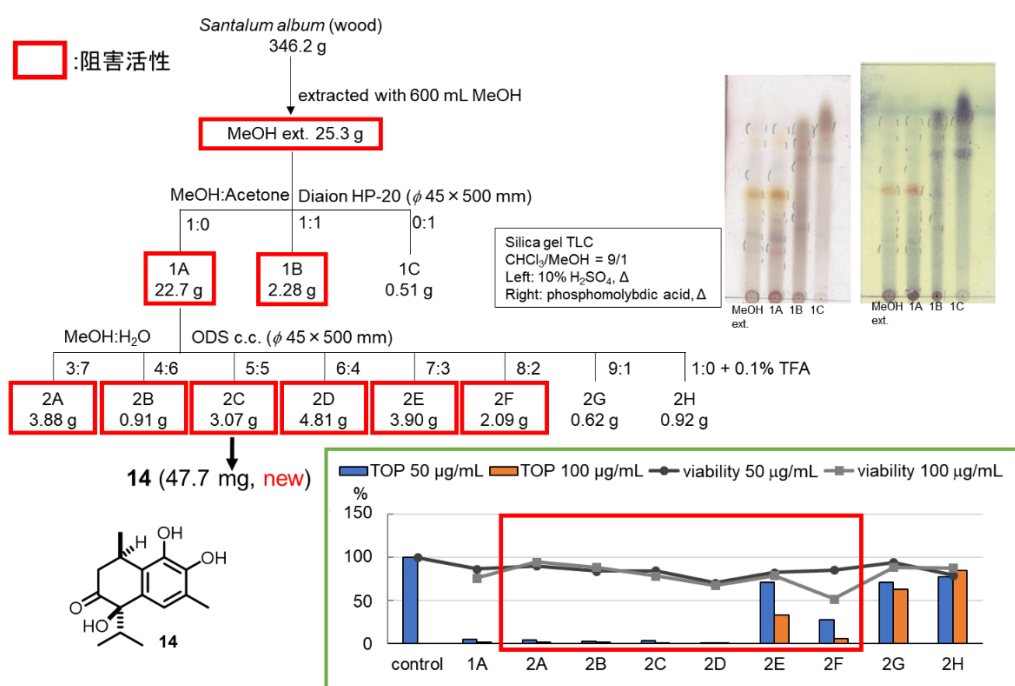
参考文献

- [1] 益西卓瑪 博士論文, **2018**.
- [2] Duan, W.; Tan, S.; Chen, J.; Liu, S.; Jiang, S.; Xiang, H.; Xie, Y. *Anal. Lett.*, **2013**, *46*, 1057-1068
- [3] Kundu, P.A. ; Mhato, B. S. *Phytochemistry*, **1993**, *32*, 999-1002.
- [4] Bisoli, E.; Garcez, S. W.; Hamerski, L.; Tieppo, C.; Garcez, R. F. *Molecules*, **2008**, *13*, 2717-2728.
- [5] Jayasinghe, L.; Wannigama, G. P.; Macleod, J. K. *Phytochemistry*, **1993**, *34*, 1111-1116.
- [6] Adyana, K. I.; Tezuka, Y.; Banskota, H.A.; Xiong, Q.; Tran, Q. K.; Kadota, S. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 496-500.
- [7] Shu, C. J.; Liu, Q. J.; Chou, X. G.; Wang, T. Z. *Chin. Chem. Lett.* **2012**, *23*, 827-830.

## 第7章 *Santalum album* からの成分探索研究

前任者は第6章のタイ産植物 MeOH 抽出物ライブラリーについて TOP 活性のスクリーニングを行った。その後、TOP 阻害活性が見出された *Santalum album* (KKP556, 592, 494) を 9 series まで分画し、新規化合物 **14** を単離・構造決定した<sup>[1]</sup> (Figure 7-1)。

しかし、活性画分である 2D については未分画であったことから、本植物からのさらなる新規化合物や類縁体の探索及び Wnt シグナルへ作用する植物の探索を目的に本植物の分画を進めた。



## 第1節 *Santalum album* の分画

*Santalum album* の TOP 阻害活性を有する 2D から、化合物 **16-23** を得た (Figure 7-1-1)。2D を 2 回 (第2節 第1項、第2項) に分けて分画した。第2節で詳細を述べる。

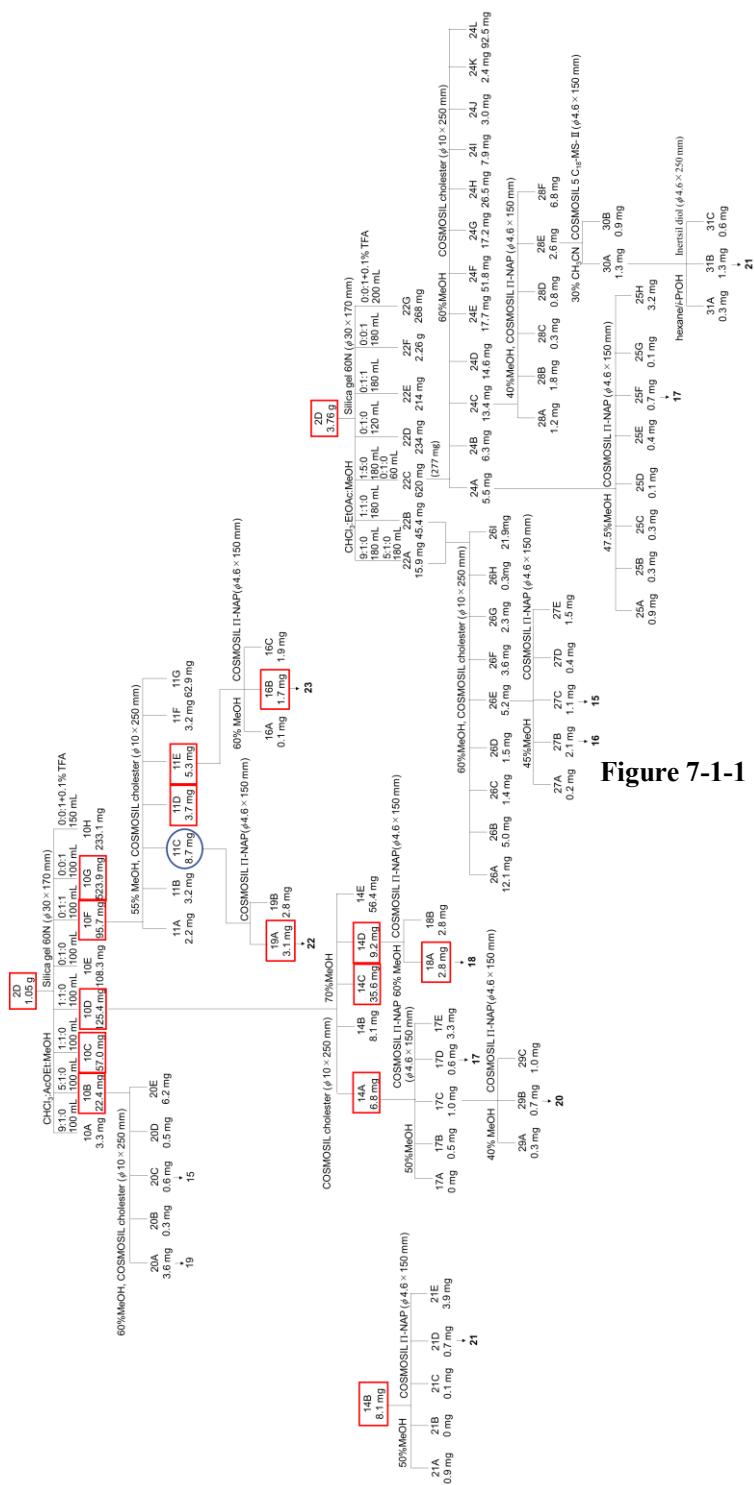


Figure 7-1-1 *Santalum album* の分画

## 第2節 *Santalum album* の分画の詳細

[第1項 2D (1.05 g) からの1回目の分画]

2Dの一部 (1.05 g) について、silica gel カラムクロマトグラフィー ( $\phi 30 \times 170$  mm) を行い、10 series を得た (Figure 7-2-1-1)。10B、10C、10D に弱い TOP 阻害活性が、10F、10G に強い TOP 阻害活性が観察された (Figure 7-2-1-2)。

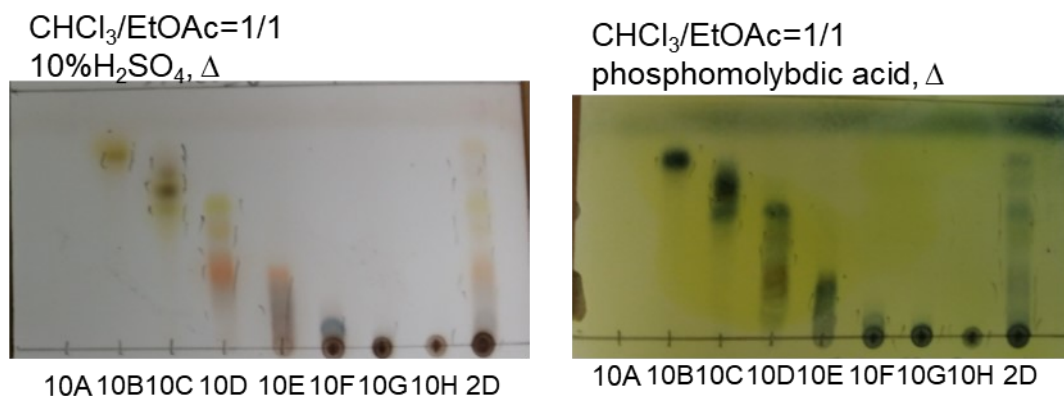


Figure 7-2-1-1 10 series の silica gel TLC

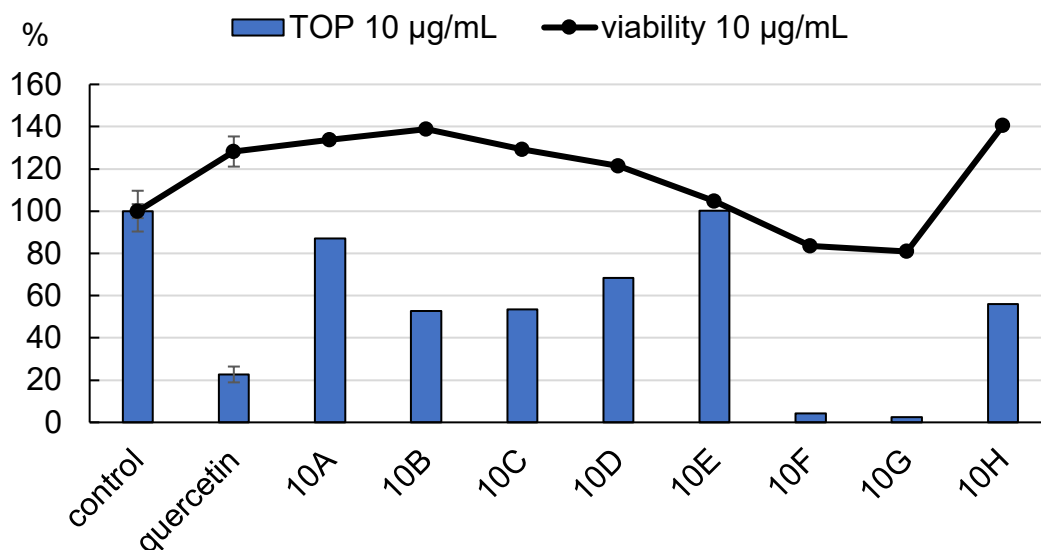


Figure 7-2-1-2 10 series の TOP 活性と細胞生存率

強い阻害活性が観察された 10F について、HPLC (55% MeOH) で分画を行い、11 series を得た (Figure 7-2-1-3, Figure 7-2-1-4)。活性評価の結果、11C は TOP 活性化が、11D、11E は阻害活性が観察された (Figure 7-2-1-5)。

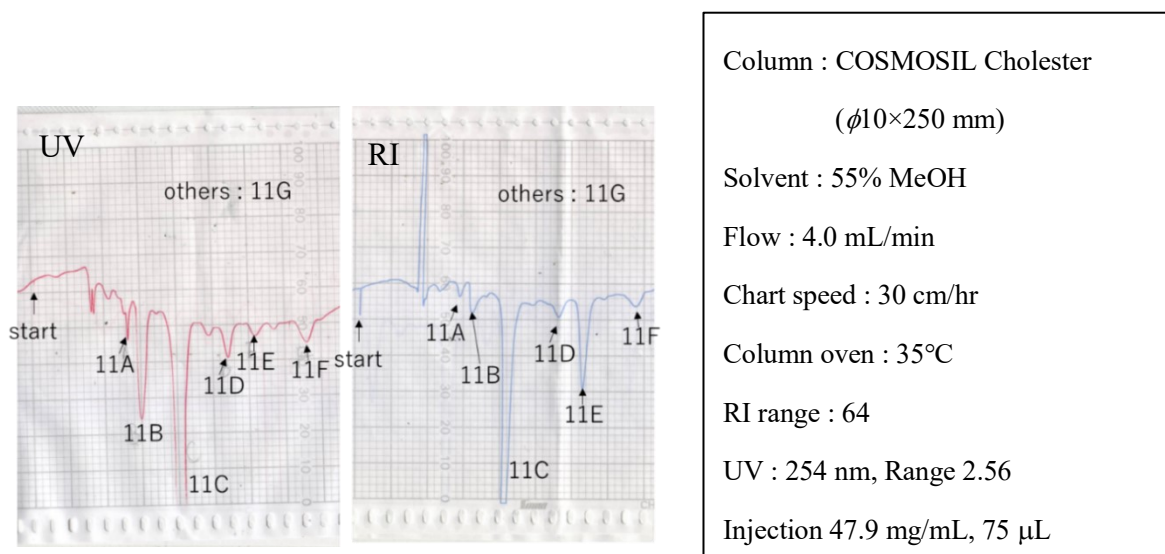


Figure 7-2-1-3 11 series 分取時の HPLC

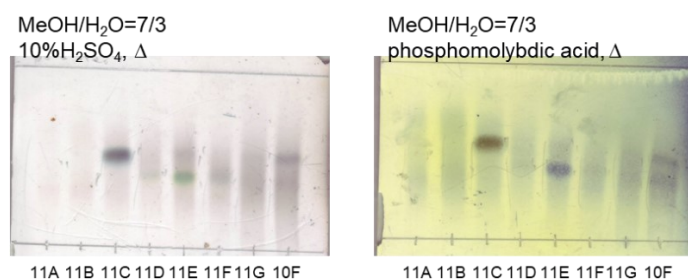


Figure 7-2-1-4 11 series の ODS TLC

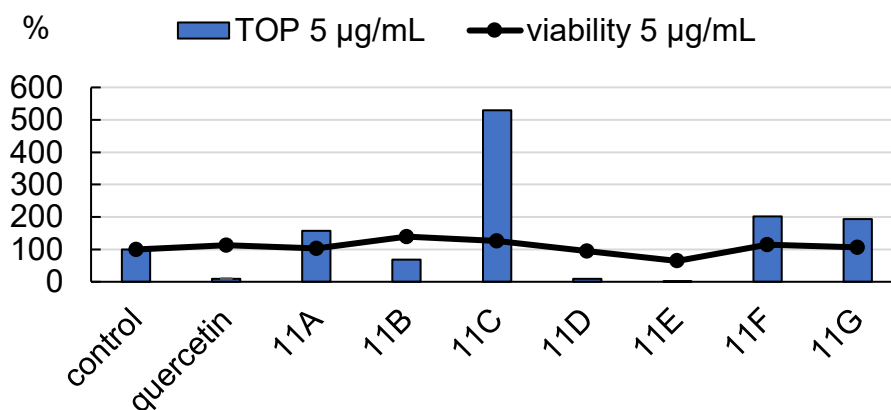


Figure 7-2-1-5 11 series の TOP 活性と細胞生存率

TOP 阻害活性の観察された 11E を HPLC (60% MeOH) により、分画し、16 series を得た(Figure 7-2-1-6, Figure 7-2-1-7) 。 16B ( $t_R$  13.9 min, 1.7 mg) を化合物 **23** として得た。

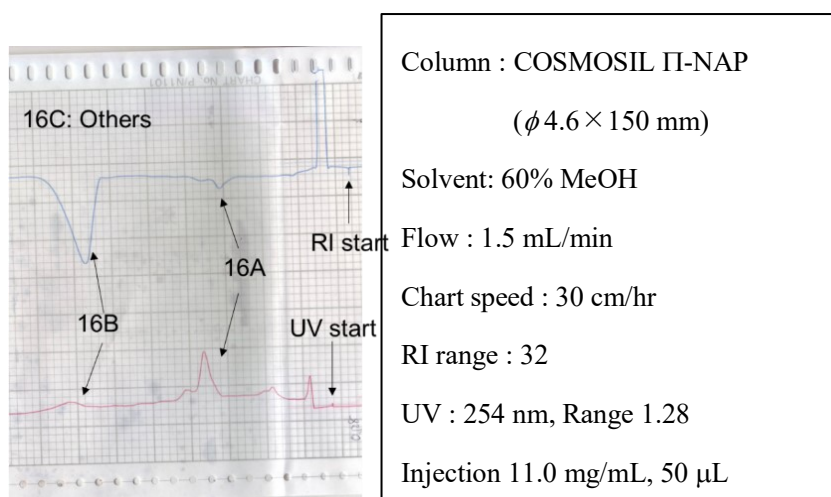


Figure 7-2-1-6 16 series 分取時の HPLC

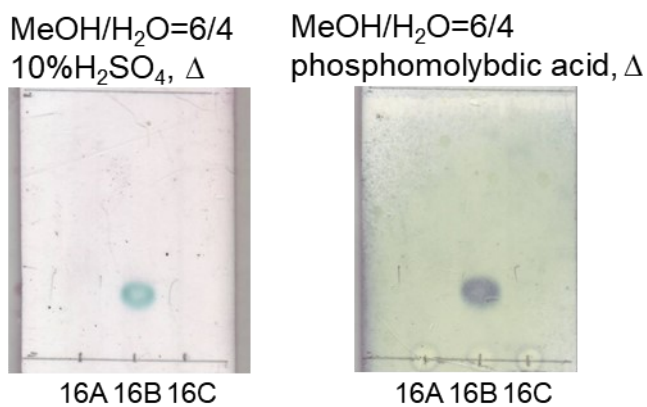


Figure 7-2-1-7 16 series の TLC

また、TOP 活性化作用を示した 11C を HPLC (60% MeOH) で分画し、19 series を得た。これらの内、19A ( $t_R$  6.5 min, 3.1 mg) を化合物 **22** として得た (Figure 7-2-1-8, Figure 7-2-1-9)。

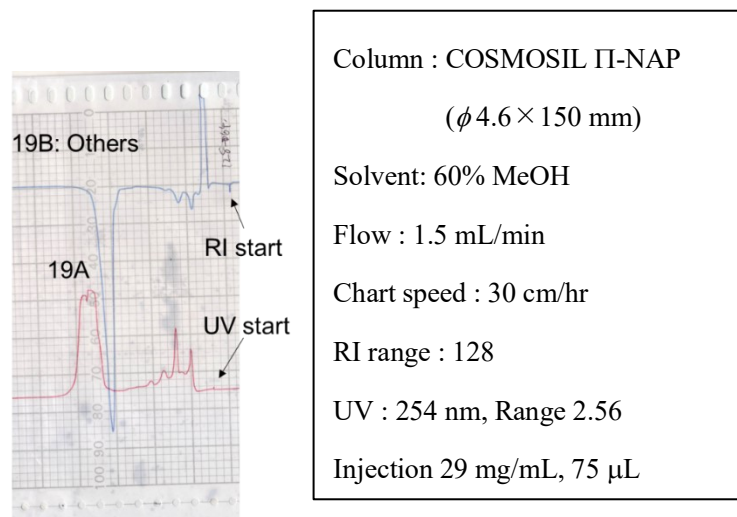


Figure 7-2-1-8 19 series 分取時の HPLC

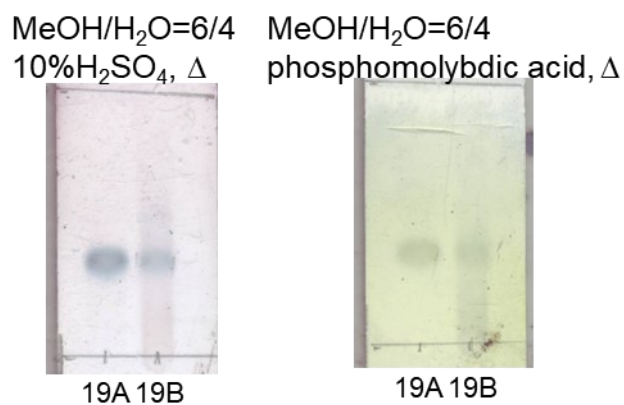


Figure 7-2-1-9 19 series の TLC

さらに、10D を HPLC (70% MeOH) で分画を行い、14 series を得た (Figure 7-2-1-10, Figure 7-2-1-11)。TOP 活性評価の結果、TOP 阻害活性は 14A、14C、14D に観察された (Figure 7-2-1-12)。

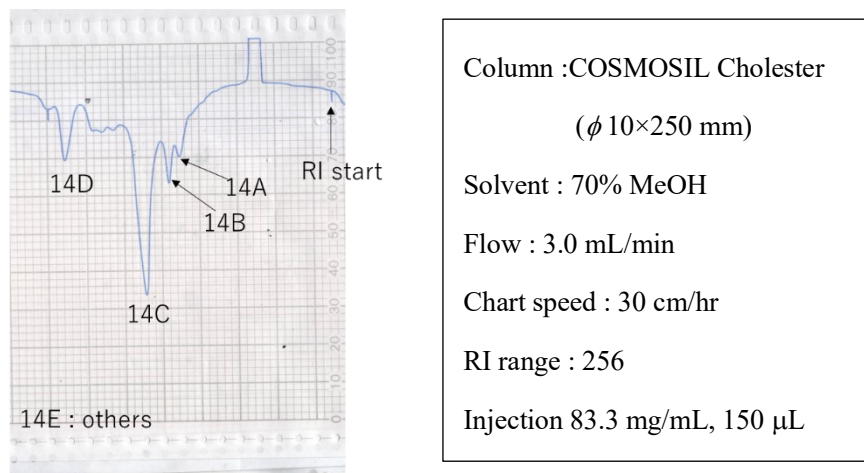


Figure 7-2-1-10 14 series 分取時の HPLC

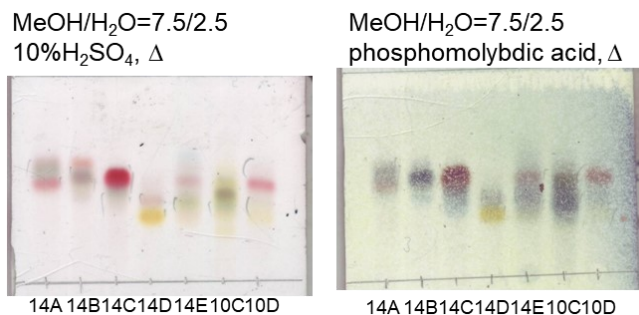


Figure 7-2-1-11 14 series の ODS TLC

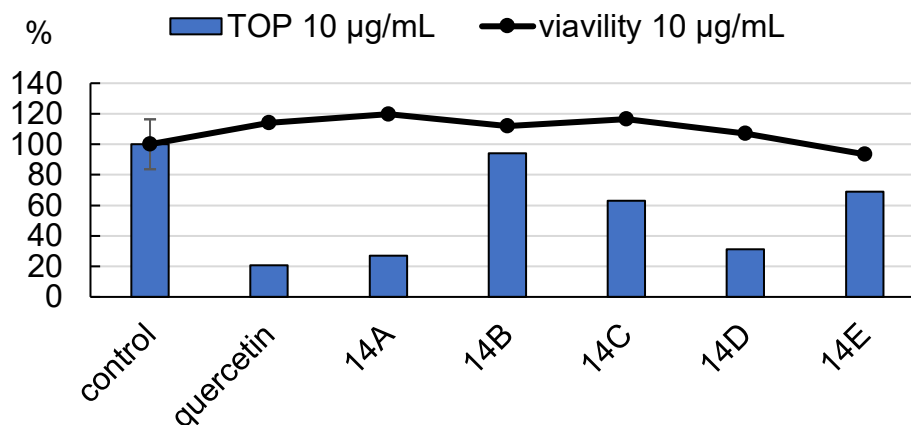


Figure 7-2-1-12 14 series の TOP 活性と細胞生存率

阻害活性の観察された 14D を HPLC で分画し、18 series を得た (Figure 7-2-1-13, Figure 7-2-1-14)。このうち 18A ( $t_R$  15.7 min, 2.8 mg) を化合物 **18** として得た。

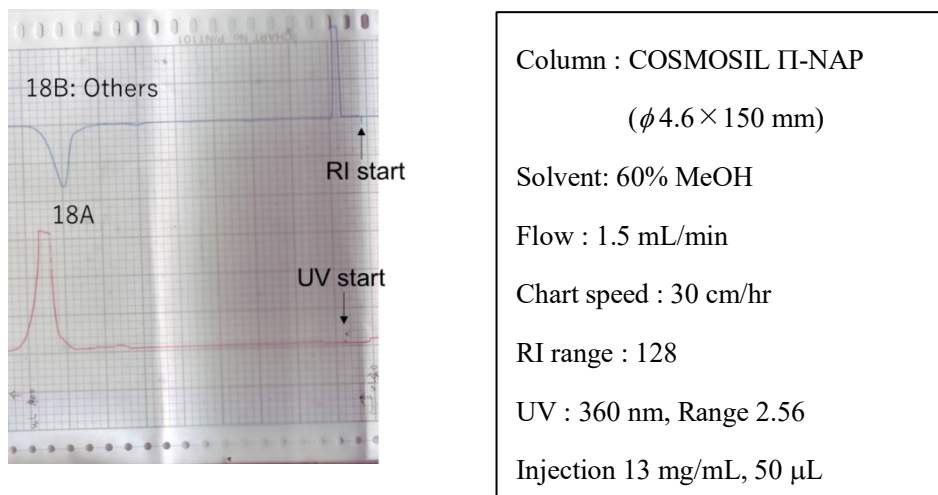


Figure 7-2-1-13 18 series 分取時の HPLC

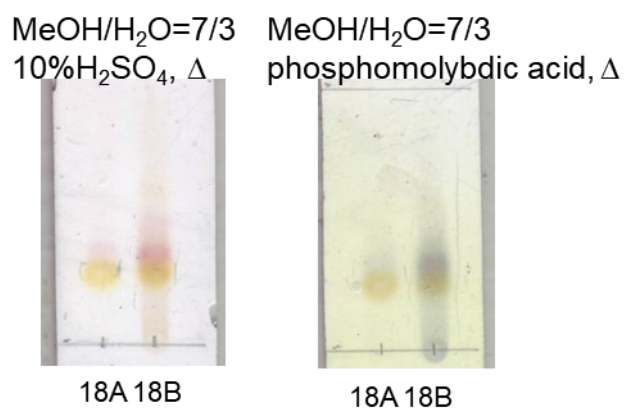


Figure 7-2-1-14 18 series の TLC

また、TOP 阻害活性を示した 14A を HPLC (50% MeOH) で分画し、17 series を得た (Figure 7-2-1-15, Figure 7-2-1-16) 。17D については化合物 **17** を含むフラクションとして得たが、重量が少なく夾雑物を含んでいたため、14B からの増量を試みたが、**17** を得られず、第 2 項で増量を行った。

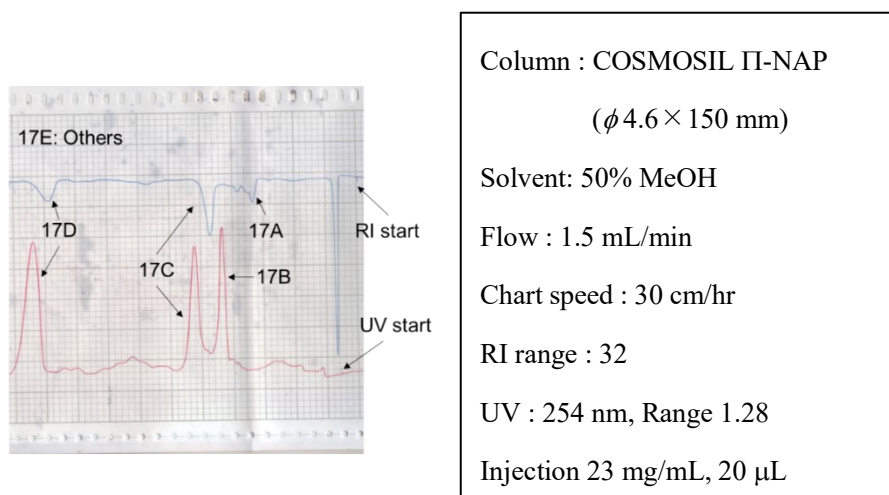


Figure 7-2-1-15 17 series 分取時の HPLC

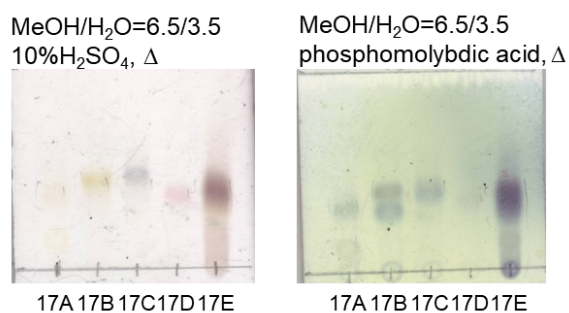


Figure 7-2-1-16 17 series の TLC

TOP 阻害活性を示した 14B は化合物 **17** を含む可能性があったため、14B を HPLC (50% MeOH) で分画した (Figure 7-2-1-17)。この結果、得られた 21D が **17** を含んでいると考え、17D と <sup>1</sup>H-NMR を比較したところ、**17** と類似した化合物 (**21**) であることが分かった (Figure 7-2-1-18)。**17** と構造が類似した **21** も興味深いと感じたため、**21** についても第 2 項で増量した。

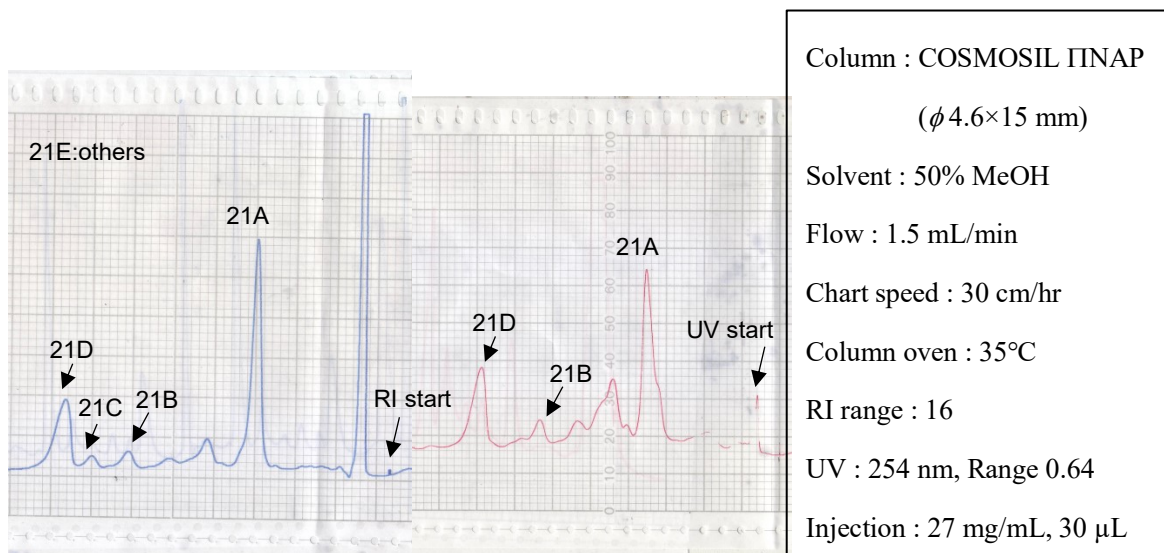


Figure 7-2-1-17 21 series 分取時の HPLC

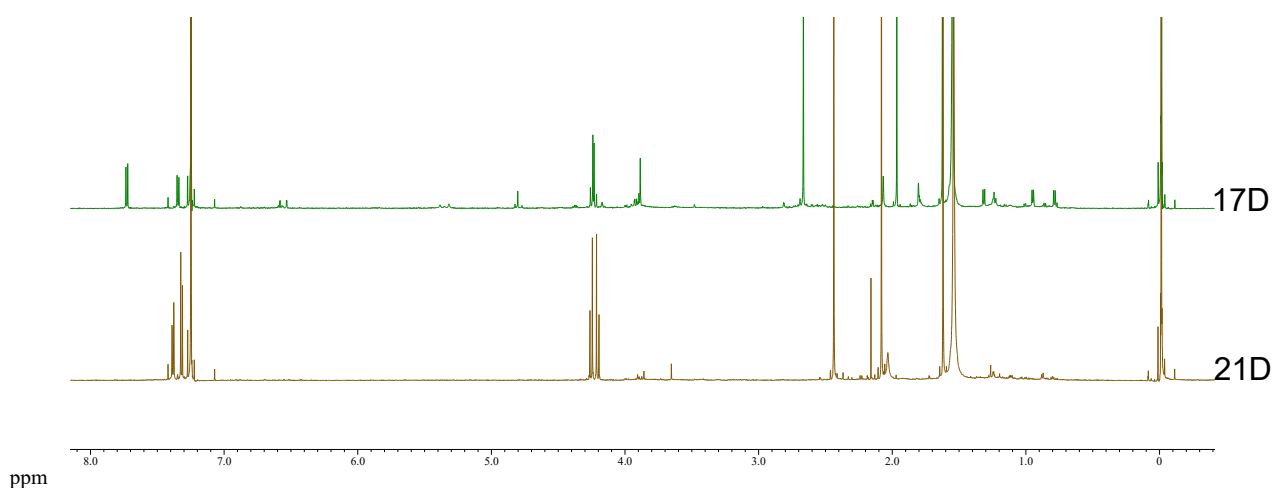
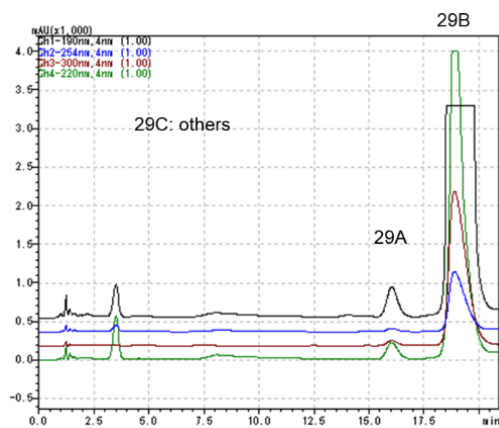


Figure 7-2-1-18 17D 及び 21D の <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

17C について HPLC (40% MeOH) で精製し、29 series を得た (Figure 7-2-1-19) 。  
この際、29B ( $t_R$  18.8 min, 0.7mg) を化合物 **20** として得た。



Column : COSMOSIL INAP  
( $\phi$  4.6 $\times$ 150 mm)  
Solvent : 40% MeOH  
Flow : 1.5 mL/min  
Column oven : 35 $^{\circ}$ C  
UV: 190 nm (黒), 254 nm(青),  
300 nm (茶), 220 nm (緑)  
Injection : 3.3 mg/mL, 30  $\mu$ L

Figure 7-2-1-19 29 series 分取時の HPLC

TOP 阻害活性を示した 10B について、HPLC (60% MeOH) を行い 20 series を得た (Figure 7-2-1-20, Figure 7-2-1-21) 。HPLC のピークの内、20A ( $t_R$  13.6 min, 3.6 mg) を化合物 **19** として得た。

また、20C については NMR から、新規化合物 (**15**) を含んでいる可能性があったため、第 2 項で増量した。

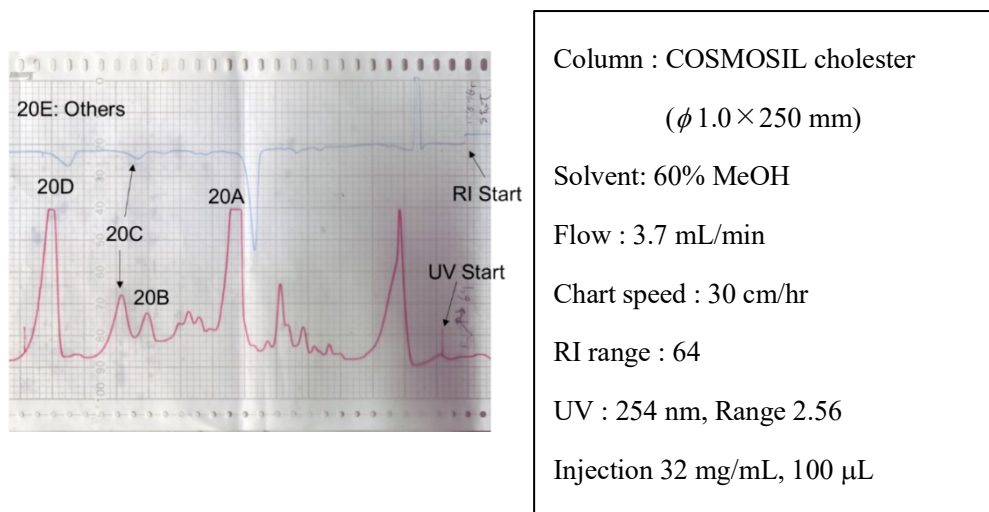


Figure 7-2-1-20 20 series 分取時の HPLC

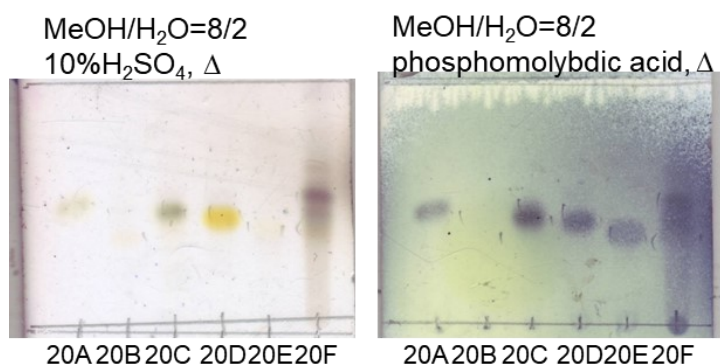


Figure 7-2-1-21 20 series の TLC

[第2項 2D (3.76 g) からの2回目の分画]

20C、17D、21Dの主要成分(15, 17, 21)の増量及びさらなる化合物の探索のため2D (3.76 g)を silica gel カラム ( $\phi 30 \times 170$  mm) で分画し、22 series を得た (Figure 7-2-2-1)。

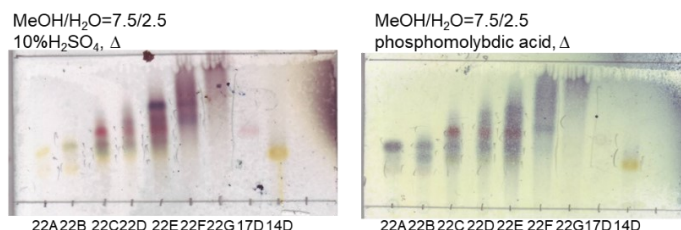
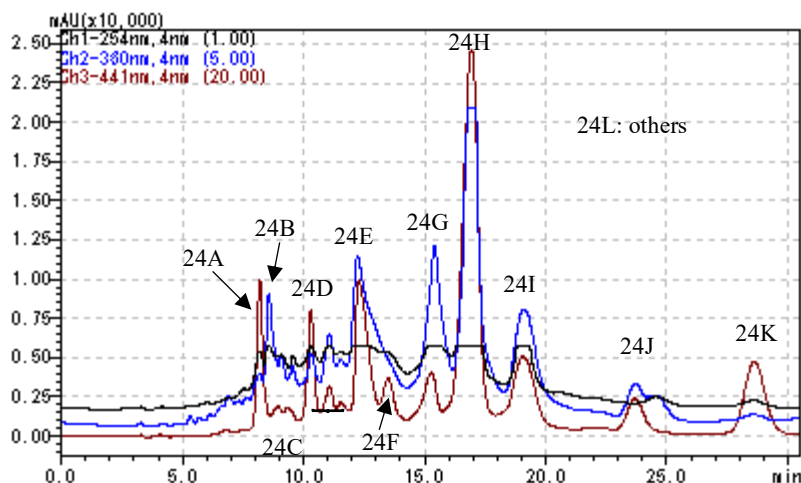


Figure 7-2-2-1 22 series の ODS TLC

これらのフラクションの内 22C は化合物 17 を含んでいると考えられたため、一部 (277 mg) を HPLC で分画し 24 series を得た (Figure 7-2-2-2)。10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> の発色と R<sub>f</sub> 値より、24A が 17 を含むと考えられた (Figure 7-2-2-3)。



Column : COSMOSIL cholester  
( $\phi 10 \times 25$  mm)  
Solvent : 60% MeOH  
Flow : 4 mL/min  
Column oven : 35°C  
UV : 254 nm (黒), 330 nm (青),  
441 nm (茶)  
Injection : 185 mg/mL, 100  $\mu$ L

Figure 7-2-2-2 24 series 分取時の HPLC

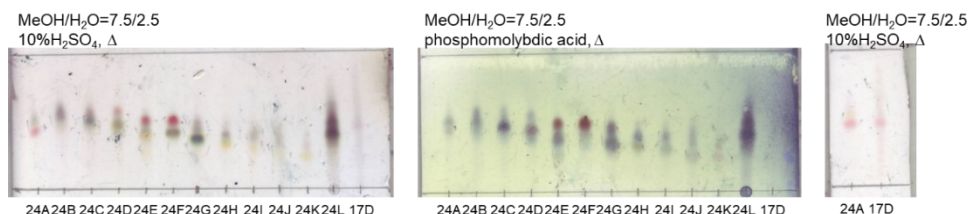
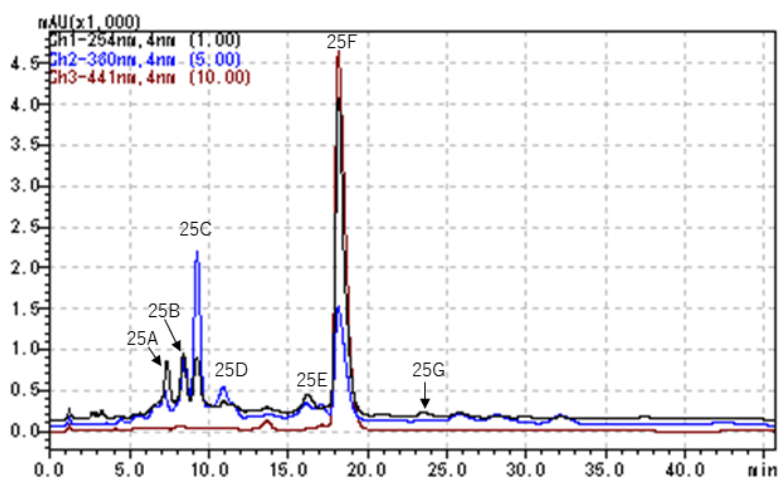


Figure 7-2-2-3 24 series の ODS TLC

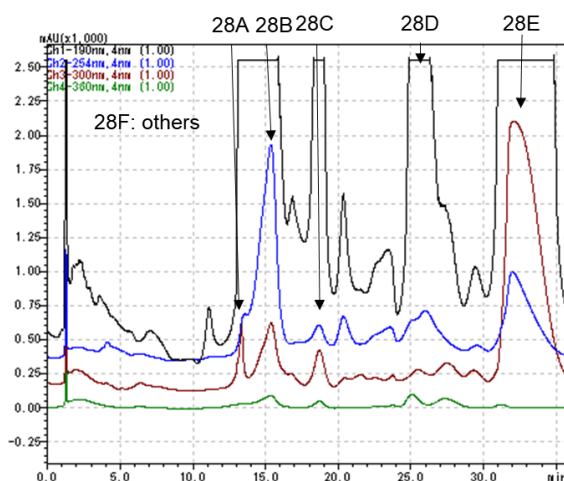
24A を HPLC (47.5% MeOH) で分画し、25 series を得た (Figure 7-2-2-4) 。これらのピークの内、25F ( $t_R$  19.1 min, 0.7 mg) を化合物 **17** として得た。



Column : COSMOSIL IINAP  
 ( $\phi$  4.6×150 mm)  
 Solvent : 47.5% MeOH  
 Flow : 1.5 mL/min  
 Column oven : 35°C  
 UV: 254 nm (黒), 360 nm (青),  
 441 nm (茶)  
 Injection : 9.2 mg/mL, 30  $\mu$ L

Figure 7-2-2-4 25 series 分取時の HPLC

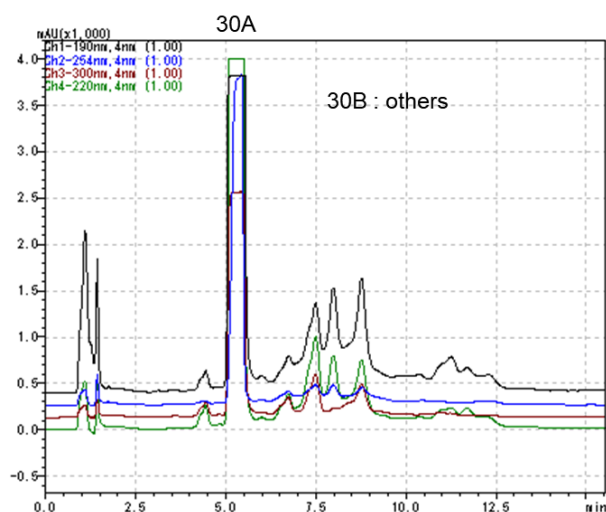
また、化合物 **21** の増量を目的として 24C の分画を行った。まず 24C を HPLC で分画し、28 series を得た (Figure 7-2-2-5) 。これらの内 28E が **21** を主に含むフラクションであったが、 $^1\text{H-NMR}$  上で夾雑物が観察された。



Column : COSMOSIL IINAP  
 ( $\phi$  4.6×150 mm)  
 Solvent : 40% MeOH  
 Flow : 1.5 mL/min  
 Column oven : 35°C  
 UV: 190 nm (黒), 254 nm (青),  
 300 nm (茶), 360 nm (緑)  
 Injection : 33.5 mg/mL, 30  $\mu$ L

Figure 7-2-2-5 28 series 分取時の HPLC

夾雑物が観察されたため、28E を HPLC (30%MeOH) でさらに精製し 30 series を得た (Figure 7-2-2-6)。30A は **21** を主に含んでいたが、微量の夾雑物も含んでいたため、再度 HPLC (hexane/iPrOH=8/2) で精製し、31 series を得た (Figure 7-2-2-7)。31 series の内 31B ( $t_R$  4.2 min, 1.3 mg) を化合物 **21** として単離した。



Column : COSMOSIL C<sub>18</sub>-MS-II  
( $\phi$  4.6×150 mm)

Solvent : 30% CH<sub>3</sub>CN

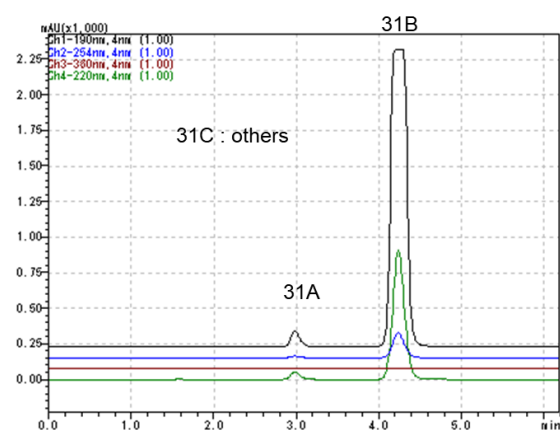
Flow : 1.5 mL/min

Column oven : 35°C

UV: 190 nm (黒), 254 nm (青),  
300 nm (茶), 220 nm (緑)

Injection : 6.5 mg/mL, 30  $\mu$ L

Figure 7-2-2-6 30 series 分取時の HPLC



Column : Inertsil diol ( $\phi$  4.6×150 mm)

Solvent : hexane/*i*-PrOH = 8/2

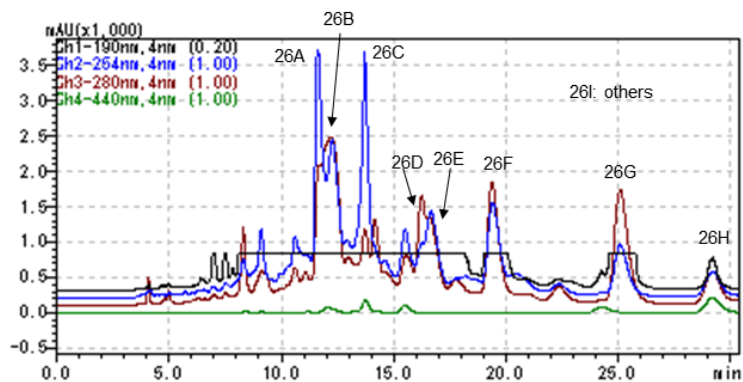
Flow : 1.5 mL/min

Column oven : 35°C

UV: 190 nm (黒), 254 nm (青),  
360 nm (茶), 220 nm (緑)

Figure 7-2-2-7 31series 分取時の HPLC

22A と 22B の TLC (Figure 7-2-2-1) の結果より、この二つの画分は同じ成分を含んでいると予想した。そこで、化合物 **15** の増量を目的として、二つの画分を合わせて HPLC で分画を行い 26 series を得た (Figure 7-2-2-8, Figure 7-2-2-9)。



Column : COSMOSIL cholester  
 (φ 10×250 mm)  
 Solvent : 60% MeOH  
 Flow : 4 mL/min  
 Column oven : 35°C  
 UV : 190 nm (黒), 254 nm (青),  
 280 nm (茶), 441 nm (緑)  
 Injection : 61 mg/mL, 75 μL in

Figure 7-2-2-8 26 series 分取時の HPLC

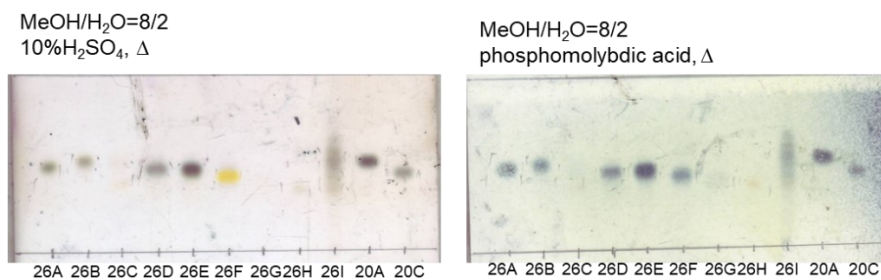
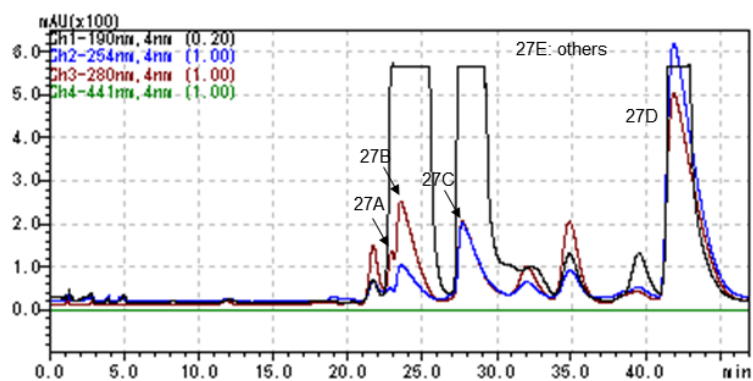


Figure 7-2-2-9 26series の TLC

26E をさらに HPLC (45% MeOH) で分画し、27 series を得た(Figure7-2-2-10)。27B ( $t_R$  23.5 min, 2.1 mg) を化合物 **16** として 27C ( $t_R$  27.7 min, 1.1 mg) を化合物 **15** として単離した。



Column : COSMOSIL IINAP  
( $\phi$ 4.6 $\times$ 150 mm)  
Solvent : 45% MeOH  
Flow : 1.5 mL/min  
Column oven : 35°C  
UV: 190 nm (黒), 254 nm (青),  
280 nm(茶), 441 nm (緑)  
Injection : 10.4 mg/mL, 30  $\mu$ L

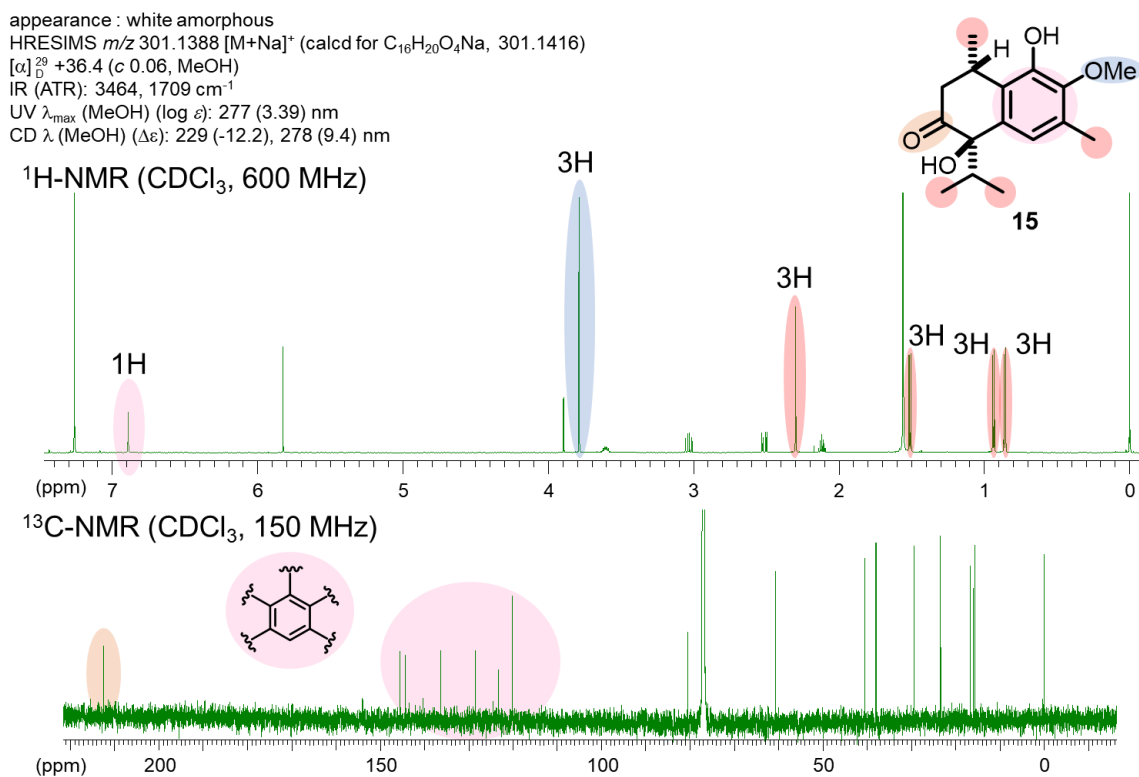
Figure 7-2-2-10 27 series 分取時の HPLC

### 第3節 化合物の構造解析

化合物 **15** は白色非晶質として得られ、高分解能 ESI-MS で  $m/z$  301.1388  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{16}H_{20}O_4Na$ , 301.1416) を観測したため、その分子式を  $C_{16}H_{20}O_4$  と決定した。

IR スペクトルから、ヒドロキシ基 ( $3464\text{ cm}^{-1}$ ) 及びカルボニル基 ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ) の存在を示唆するピークを観測した。

$^1\text{H-NMR}$  から、4つのメチル基を示唆する 3H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  0.86, 0.94, 1.51 and 2.30)、1つのメトキシ基の存在を示唆する 3H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  3.79) が観測された。 $^{13}\text{C-NMR}$  から、ケトン基 ( $\delta_{\text{C}}$  212.5) の存在が示唆された。さらに、 $^1\text{H-NMR}$  の芳香環領域の 1H 分のシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.89, s) 及び、 $^{13}\text{C-NMR}$  の芳香環領域の 6本のシグナル ( $\delta_{\text{C}}$  123.4, 145.5, 144.3, 128.5, 120.2 and 136.3) から 5 置換ベンゼンの存在が示唆された。



$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY のシグナルから部分構造 A [H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2.51, 3.05) /H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  3.60) /H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.51)]及び B [H-11 ( $\delta_{\text{H}}$  2.11) /H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  0.86) /H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  0.94)] が構築された。

HMBC より、H-8、1位 OH ( $\delta_{\text{H}}$  5.82)、H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  6.89) からの C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  123.4) への相関から部分構造 A とベンゼン環が連結された。また、H-13 から C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  80.5) 部分構造 B と6位が連結され、6位 OH ( $\delta_{\text{H}}$  3.90) からの C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  136.3) 及び H-4 からの C-6 への相関から部分構造 B からベンゼン環への結合様式が明らかとなった。さらに1位 OH、2位 OMe ( $\delta_{\text{H}}$  3.79)、3位メチル基 ( $\delta_{\text{H}}$  2.30) 及び H-4 からの HMBC 相関を解析することで、ベンゼン環上の置換基の置換パターンが明らかとなり、6位 OH からの C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  212.5) への相関をより平面構造を決定した (Figure 7-3-2)。

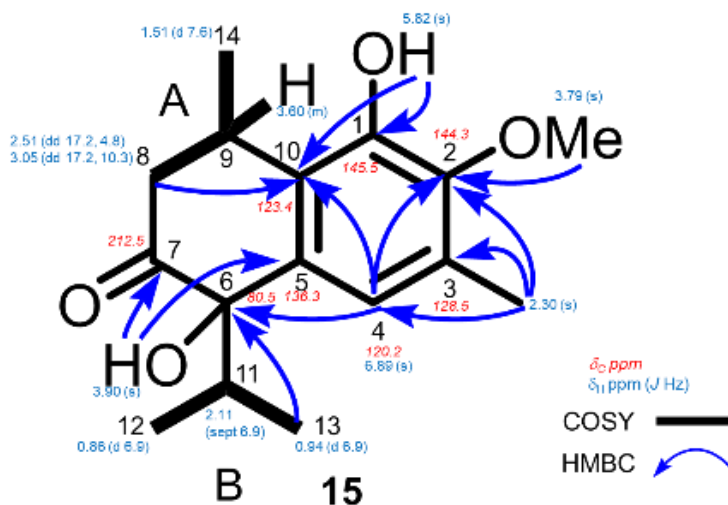


Figure 7-3-2 化合物 15 の 2D-NMR

また、化合物 **15** の相対立体配置については化合物 **14** の解析を参考<sup>[1]</sup>に X 線結晶構造解析でその相対立体配置が決定された類似化合物である mansonone N 及び mansonone Q と 6-14 位の <sup>1</sup>H-NMR 及び <sup>13</sup>C-NMR の測定データを比較し、mansonone N、mansonone Q と測定データが近い、あるいは一致しているため、mansonone Q と同一の相対立体配置であると決定した (Figure 7-3-3)。

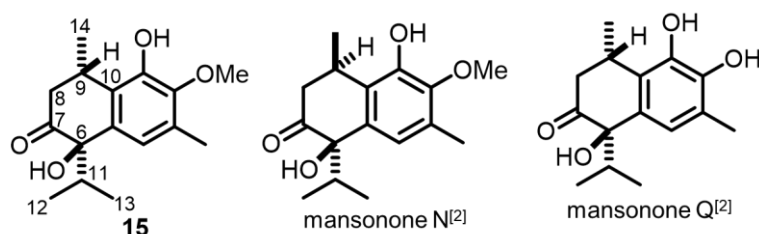


Figure 7-3-3 化合物 **15** と mansonone N、mansonone Q

position	<b>15</b>			mansonone N <sup>[2]</sup>			mansonone Q <sup>[2]</sup>		
	<sup>13</sup> C-NMR $\delta_C$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR $\delta_H$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR <i>J</i> Hz	<sup>13</sup> C-NMR $\delta_C$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR $\delta_H$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR <i>J</i> Hz	<sup>13</sup> C-NMR $\delta_C$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR $\delta_H$ ppm	<sup>1</sup> H-NMR <i>J</i> Hz
8	40.5	2.51	dd 17.2, 4.8	43.8	2.49	dd 12.5, 1.7	40.5	2.50	dd 16.8, 4.6
		3.05	dd 17.2, 10.3		3.21	dd 12.6, 7.8		3.04	dd 16.8, 10.1
9	29.4	3.60	m	32.4	3.79	m	29.3	3.60	m 10.1, 7.3
10	123.4			124.6			123.7		
11	38.0	2.11	sept 6.9	39.6	2.15	sept. 6.9	38.0	2.10	sept 6.9
12	16.7	0.86	d 6.9	18.2	0.79	d 6.9	16.7	0.86	d 6.7
13	15.7	0.94	d 6.9	16.3	0.99	d 6.7	15.6	0.93	d 6.7
14	23.4	1.51	d 7.6	22.0	1.16	d 6.9	23.4	1.52	d 7.3

化合物 **15** は新規カジナン型セスキテルペンであり、2-*O*-methylmansonone Q と命名した (Figure 7-3-4)。

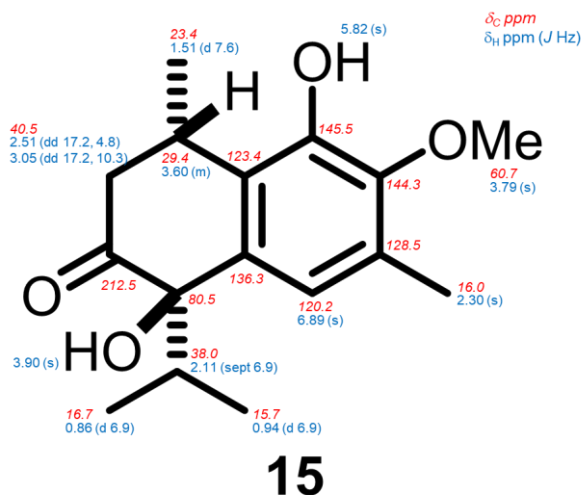
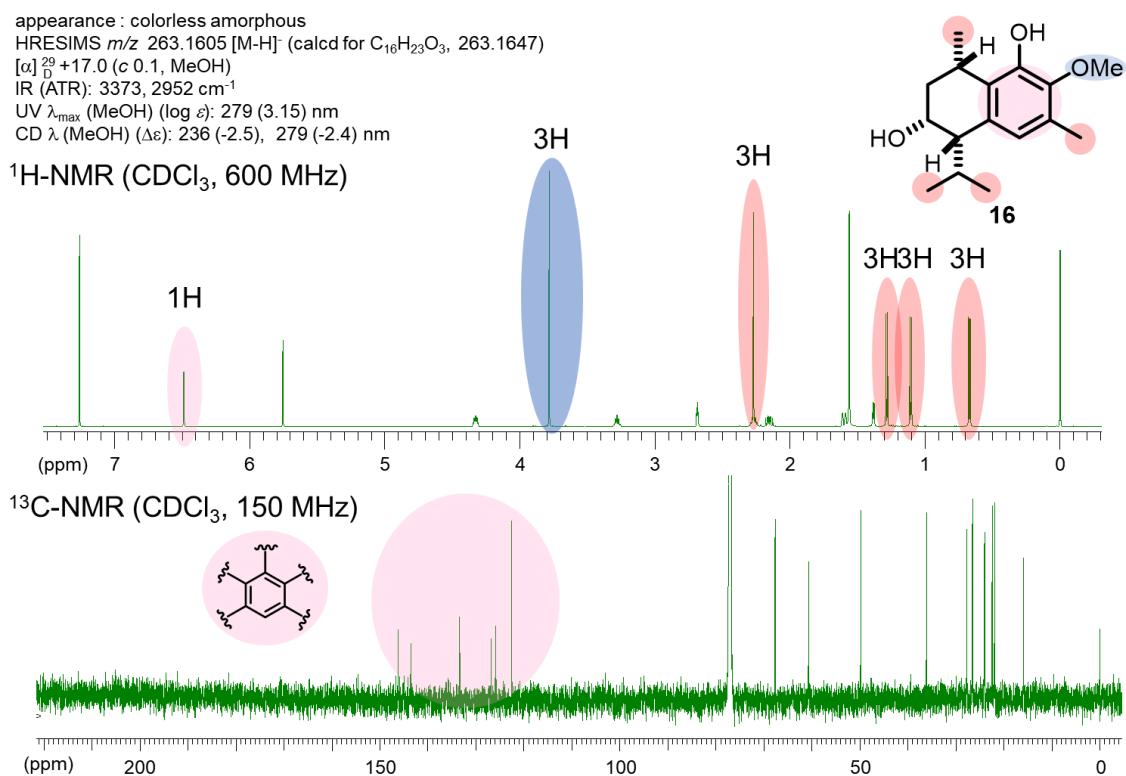


Figure 7-3-4 2-*O*-methylmansonone Q (**15**) のスペクトルデータ

化合物 **16** は無色非晶質として得られ、その分子式は高分解能 ESI-MS の測定結果の 263.1605 [M-H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 263.1647) から C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> と決定された。

IR スペクトルから、ヒドロキシ基 (3373 cm<sup>-1</sup>) の存在が示唆された。

<sup>1</sup>H-NMR から、4つのメチル基 (δ<sub>H</sub> 0.67, 1.11, 1.28 and 2.27)、1つのメトキシ基の存在(δ<sub>H</sub> 3.78) が示唆された。また <sup>1</sup>H-NMR の芳香環領域の 1H 分のプロトン (δ<sub>H</sub> 6.49, s) 及び <sup>13</sup>C-NMR の芳香環領域のシグナル (δ<sub>C</sub> 125.9, 146.2, 143.6, 126.9, 122.5 and 133.4) から 5 置換ベンゼンの存在が示唆された (Figure 7-3-5)。



$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY [H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  2.69) /H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  4.33) /H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2.16, 3.05) /H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  3.28) / H-11 ( $\delta_{\text{H}}$  2.27) /H-12 ( $\delta_{\text{H}}$  0.67) /H-13 ( $\delta_{\text{H}}$  1.11) /H-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.28) ] の結果より炭化水素から部分構造が示唆された。

HMBC では、1 位 OH 基 ( $\delta_{\text{H}}$  5.76)、2 位 OMe 基 ( $\delta_{\text{H}}$  3.75)、3 位メチル基 ( $\delta_{\text{H}}$  2.27)、H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  6.49) からの相関から、置換基の置換パターンが化合物 **15** と同じであることが分かった。さらに、H-8 ( $\delta_{\text{H}}$  2.16, 3.05) から C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  125.9) 及び H-7 ( $\delta_{\text{H}}$  4.33) から C-9 ( $\delta_{\text{C}}$  133.4) 、さらに H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  6.19) から C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  49.8) のシグナルが観察され、ベンゼン環と部分構造が連結されて平面構造が決定された (Figure 7-3-6)。

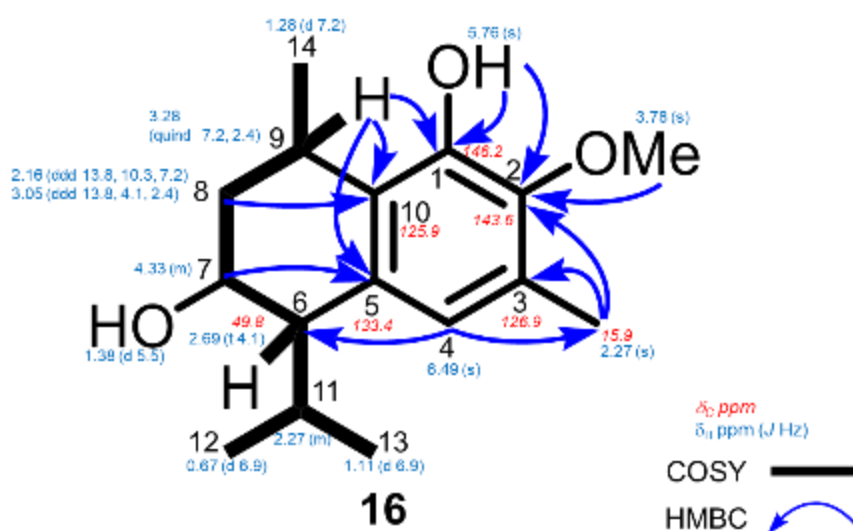


Figure 7-3-6 化合物 **16** の 2D-NMR

6、7、9位の相対立体配置については  $J$  値を解析し、決定した。7位の  $J$  値を測定するために、7位 OH 基 ( $\delta_{\text{H}}$  1.38) をデカップリングした結果、H-6 と H-7 及び H-8b と H-7 が 4.1 Hz、H-8a と H-7 が 10.3 Hz でカップリングしていると分かった (Figure 7-3-7)。

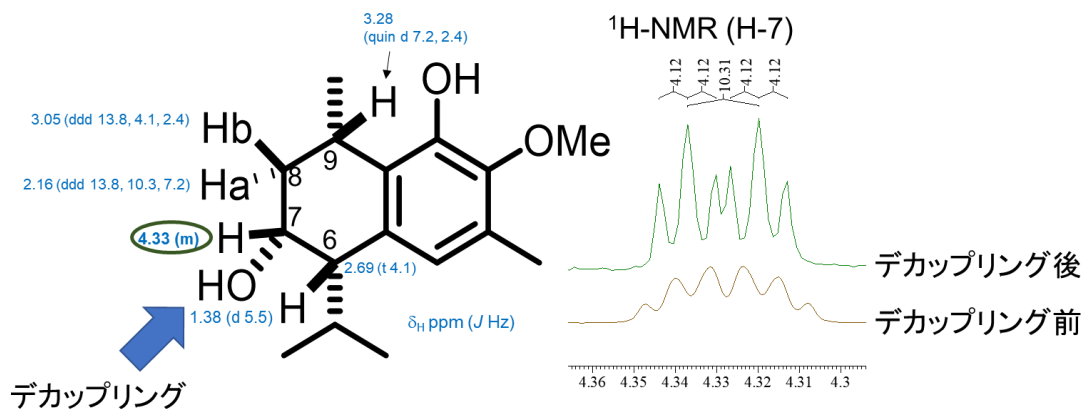


Figure 7-3-7 7位 OH 基をデカップリングした時の H-7

$J_{\text{H-6/H-7}} = 4.1 \text{ Hz}$ 、 $J_{\text{H-7/H-8b}} = 4.1 \text{ Hz}$ 、 $J_{\text{H-8b/H-9}} = 2.4 \text{ Hz}$  から、H-6 と H-7、H-7 と H-8b、H-8b と H-9 はすべて axial-equatorial の関係にあることが分かった。このことから、置換基はすべて同方向に置換していることが判明した (Figure 7-3-8)。

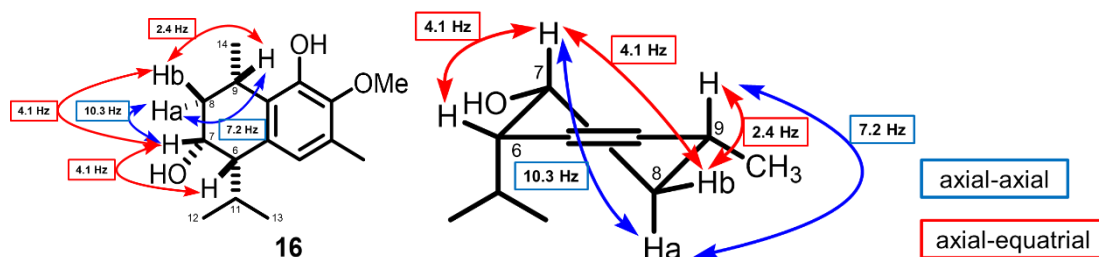


Figure 7-3-8 化合物 16 の相対立体配置

以上より化合物の構造を決定した。

化合物 **16** は新規カジナン型セスキテルペンであった (Figure 7-3-9)。

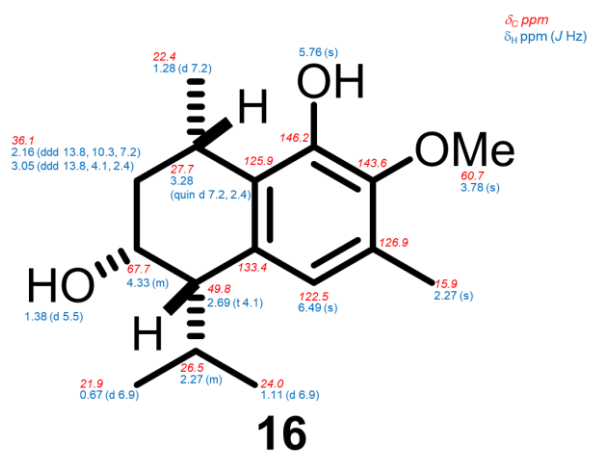


Figure 7-3-9 化合物 **16** の NMR

化合物 **17** は赤色非晶質として得られ、ESI-MS により  $m/z$  259  $[M+H]^+$ 、539  $[2M+Na]^+$ 、303  $[M+HCOO]^-$  が観測されその分子量が 258 であると予想された。また、NMR データを文献値<sup>[3]</sup>と比較し、mansonone I と決定した。

化合物 **18** を橙色非晶質として得て、ESI-MS により、 $m/z$  259  $[M+H]^+$ 、539  $[2M+Na]^+$ 、257  $[M-H]^-$ 、515  $[2M-H]^-$  から、その分子量を 258 であると予測し、NMR データを文献値<sup>[4,5]</sup>と比較し化合物 **18** を mansonone H と決定した。

化合物 **19** は無色非晶質として得られ、ESI-MS で  $m/z$  301  $[M+Na]^+$ 、579  $[2M+Na]^+$  からその分子量を 278 と予想した。NMR データを文献値<sup>[2]</sup>と比較し、化合物 **19** は mansonone N と決定した。

化合物 **20** を無色非晶質として得られ、ESI-MS で  $m/z$  249  $[M+H]^+$ 、497  $[2M+H]^+$ 、247  $[M-H]^-$ 、495  $[2M-H]^-$  からその分子量を 248 と予想した。NMR データを文献値<sup>[6]</sup>と比較し、6-hydroxy-5-[2-hydroxy-1-methylethyl]-3,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-one と決定した。

化合物 **21** は白色非晶質として得られ ESI-MS での  $m/z$  247  $[M+H]^+$ 、493  $[2M+H]^+$ 、291  $[M+HCOO]^-$  からその分子量 246 を予想した。<sup>1</sup>H-NMR データを文献値<sup>[7]</sup>と比較し mansorin III と決定した。

化合物 **22** は黄色非晶質として得られ ESI-MS で  $m/z$  389  $[M+H]^+$ 、799  $[2M+Na]^+$ 、387  $[M-H]^-$ 、775  $[2M-H]^-$  からその分子量を 388 であると予想し、NMR データを文献値<sup>[8]</sup>と比較し、その構造を 5-O-demethylbilagrewin と決定した。

化合物 **23** は無色非晶質として得られ ESI-MS で  $m/z$  579  $[M+H]^+$ 、601  $[M+Na]^+$ 、623  $[M+HCOO]^-$  からその分子量を 578 として予想した。NMR データを文献値<sup>[9]</sup>と比較して **23** を mansonin と決定した。

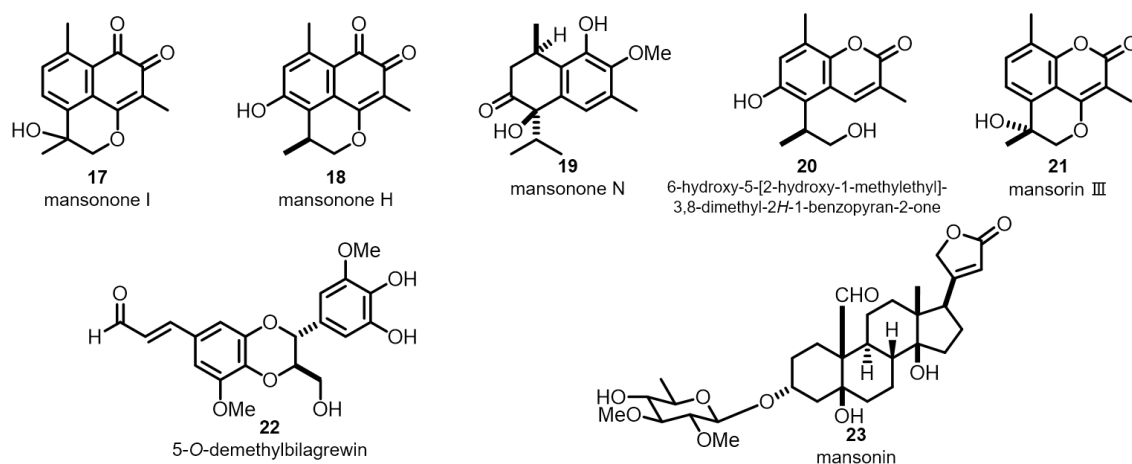


Figure 7-3-4 *Santalum album* から得られた既知化合物

## 第4節 単離化合物の活性評価

化合物の TOP 活性を測定し、TOP 阻害活性が観察された化合物については FOP 活性を測定した。その結果、化合物 **17**、**18**、**22**、**23** に TOP 阻害活性が観察され、その IC<sub>50</sub> はそれぞれ 1.2、41.1、38.4 μM 及び 114 nM であった。

これらの内、化合物 **17**、**23** は FOP に大きな影響を及ぼさず Wnt シグナル阻害活性を持つ化合物であることが示唆された (Figure 7-4-1)。

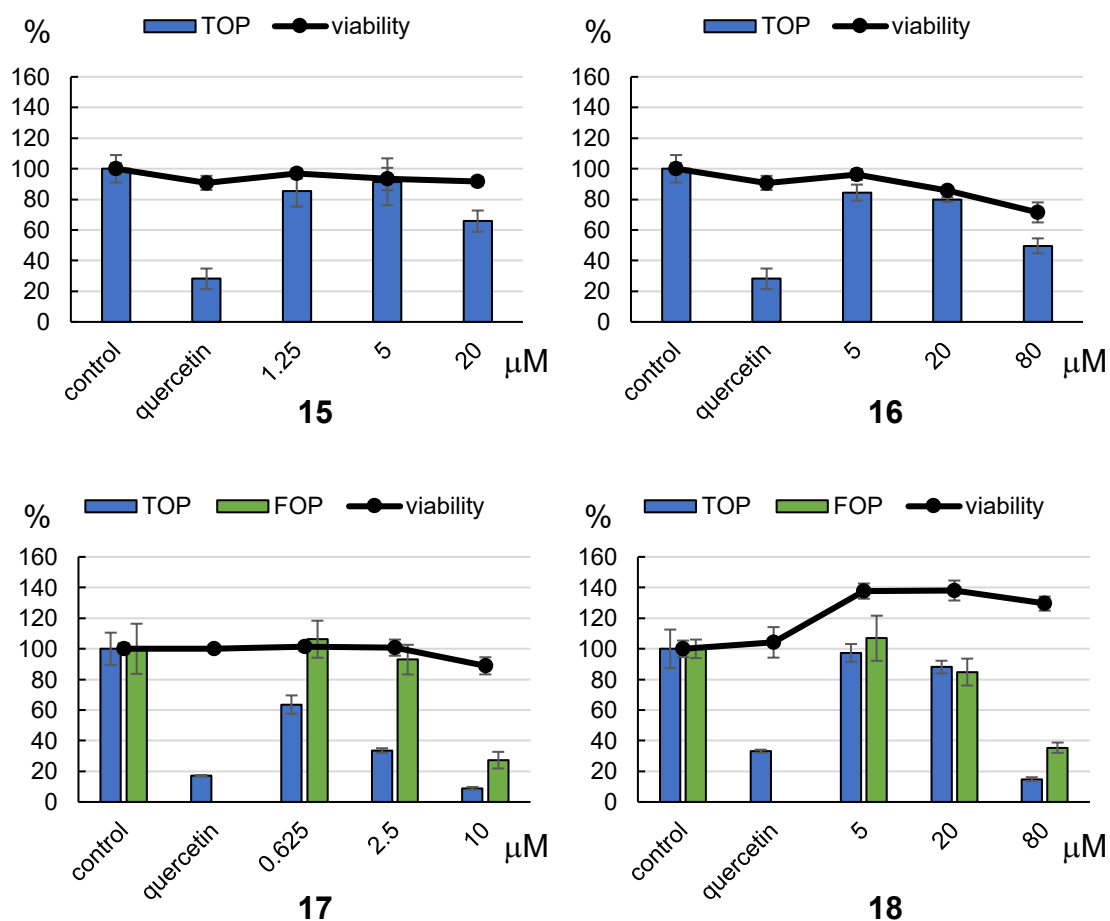


Figure 7-4-1 化合物の luciferase 活性

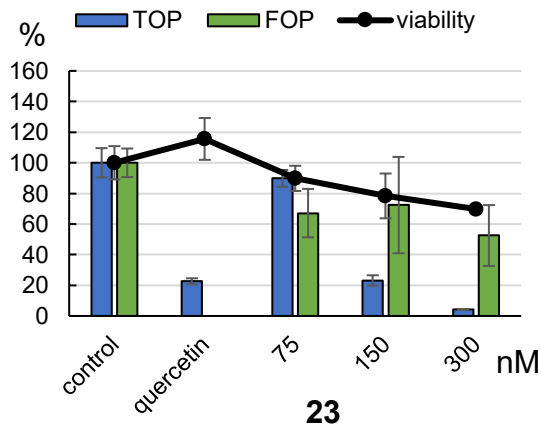
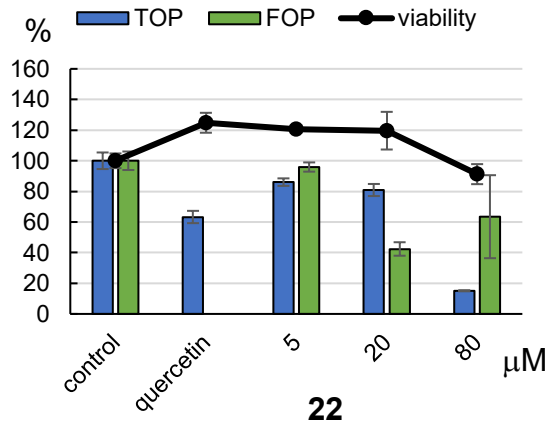
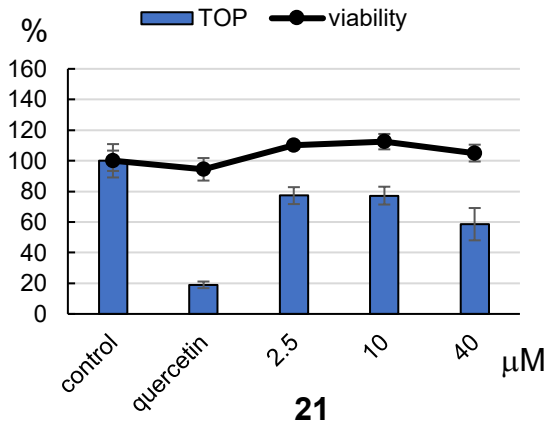
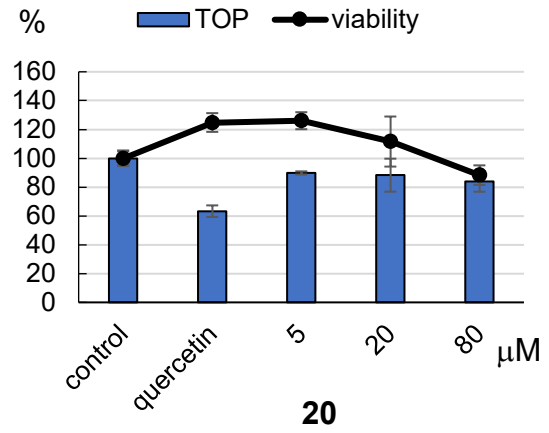
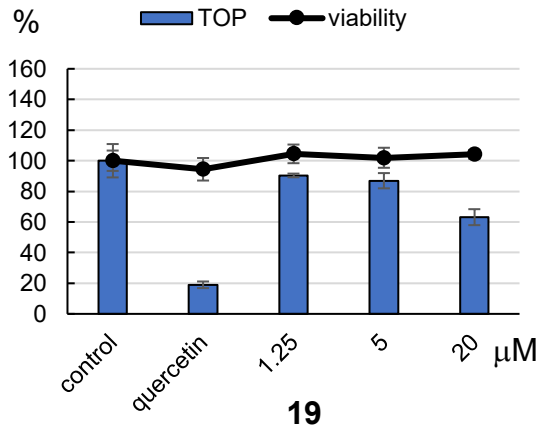


Figure 7-4-1 (continued)

## 第5節 Wnt シグナル阻害活性化合物のがん細胞に対する毒性

第4節で Wnt シグナル阻害活性が示唆された化合物 **17**、**23** についてそれぞれ、大腸がん細胞に対し添加し、FMCA 法により細胞毒性を測定した。

Wnt シグナル関連のタンパク質に変異が観察される HCT116、DLD-1、SW480 細胞、Wnt シグナル非関連の RKO 細胞の4種の大腸がん細胞と正常細胞である 293 細胞について試験した。

DLD-1 および SW480 細胞は APC に変異を持つことが知られている<sup>[10]</sup>。また、HCT116 は  $\beta$ -catenin に変異を持つことで知られている<sup>[11]</sup>。

細胞毒性試験の結果、化合物添加から 24 時間後では、化合物 **17** は SW480 選択的に細胞毒性を示し、化合物 **23** は正常細胞である 293 細胞に対して毒性を示した (Figure 7-5-1)。また、化合物添加から 72 時間後では、化合物 **17** は試験したすべてのがん細胞に毒性を示した (Figure 7-5-2)。

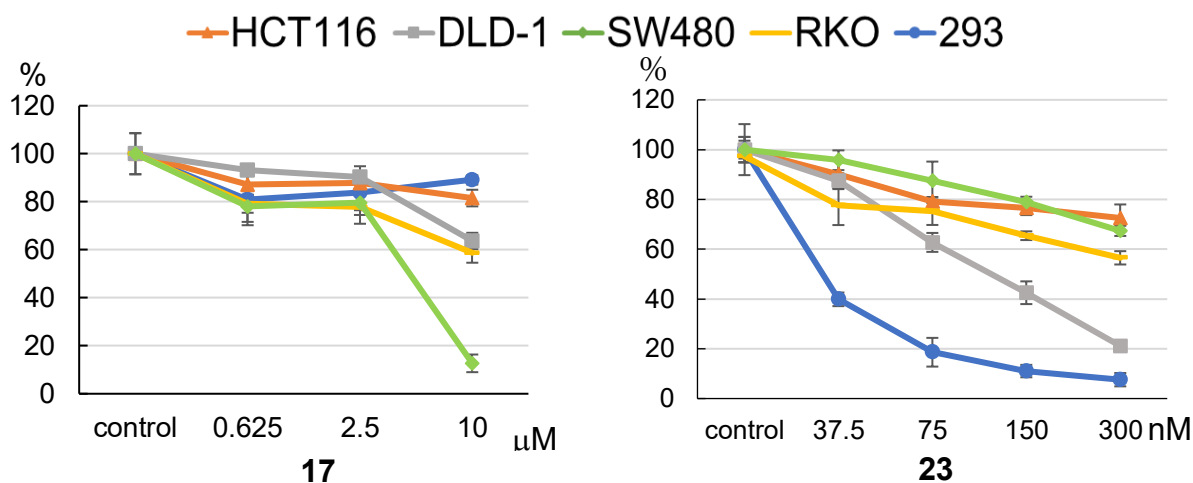


Figure 7-5-1 化合物 **17**、**23** 存在下 24 時間培養後の各細胞への毒性

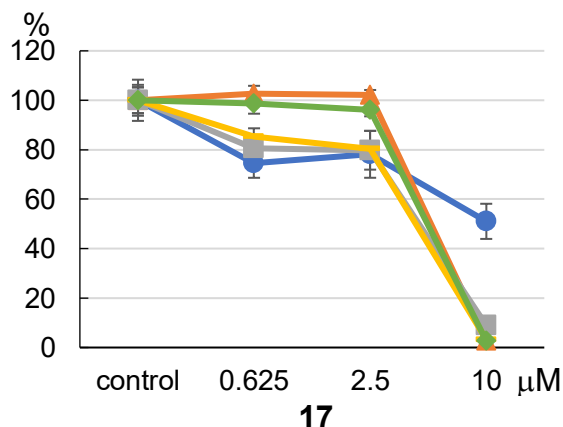


Figure 7-5-2 化合物 **17** 存在下 72 時間培養後の各細胞への毒性

## 第6節 化合物17のウェスタンブロッティング

化合物17についてSW480細胞を用いてウェスタンブロッティング法によるタンパク質発現量の解析を行った。その結果、化合物17は $\beta$ -cateninの量を変化させず、標的遺伝子の転写、翻訳産物の1つであるCyclin D1の量を減少させた。

このことから、 $\beta$ -cateninの分解複合体中のタンパク質へ影響せず、quercetin<sup>[12]</sup>やtrichilin H<sup>[13]</sup>のように $\beta$ -cateninの核内移行から遺伝子発現までの過程に作用している可能性が示唆された。

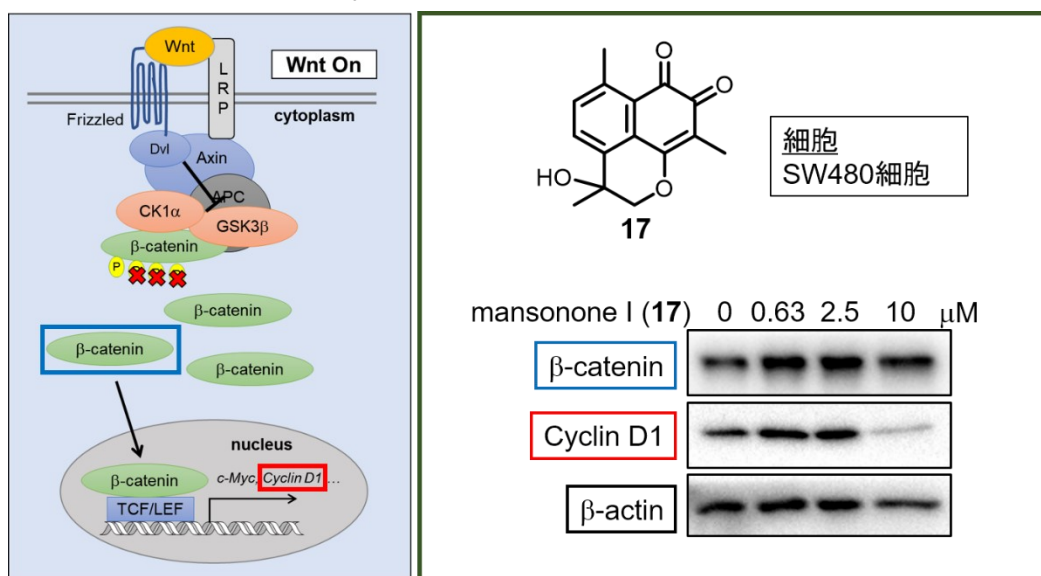


Figure 7-6-1 化合物17のウェスタンブロッティング解析

## 参考文献

- [1] 益西卓瑪 博士論文, **2018**.
- [2] Tiew, P.; Ioset, J.-R.; Kokpol, U.; Schenk K.; Jaiboon, N.; Chaichit, N.; Chavasiri, W.; Hostettmann, K. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1332-1335.
- [3] Kim, J.-P.; Kim, W.-G.; Koshino, H.; Jung, J.; Yoo, I.-D. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 425-430.
- [4] Chen, C.-M.; Chen, Z.-T.; Hong, Y.L. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 980-982.
- [5] Guo, X.; Liao, C.; Ma, L.; Gu, L. *Acta Cryst.* **2003**, *E59*, o558-o560.
- [6] Zhang, Y.; Liu, Y.-B.; Li, L.; Ma, S.-G.; Qu, J.; Jliang, J.-D.; Chen, X.-G.; Zhang, D.; Yu, S.-S. *J.Asian Nat. Prod. Res.* **2015**, *17*, 1025-1038.
- [7] El-Halawany, A. M.; Chung, H. M.; Ma, C.-M.; Komatsu, K.; Nishihara, T.; Hattori, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1332-1335.
- [8] Matuo, Y.; Mimaki, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 587-590.
- [9] Fiebig, M.; Duh, C.-Y.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Farnsworth M. R. *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 981-985.
- [10] Yang, J.; Zhang, W.; Evans, P.M.; Chen, X.; He X.; Liu, C. *J.Biol.Chem.* **2006**, *281*, 17751-17757.
- [11] Ikenoue, T.; Ijichi, H.; Kato, N.; Masaki, T.; Rengifo, W.; Okamoto, M.; Matsumura, M.; Kawabe, T.; Shiratori, Y.; Omata, M. *Jpn. J. Cancer Res.* **2002** *93*, 1213-1220.
- [12] Park, C. H.; Chang J. Y.; Hahn E. R. Park, S.; Kim, H.-K.; Yang C. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 227-234.
- [13] Fuentes, R. G.; Toume, K.; Arai, M. A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M. *Phytochem. Lett.* **2015**, *11*, 280-285.

## 総括

Wnt シグナルは細胞の増殖に関連するシグナル伝達経路である。しかし、Wnt シグナルが異常亢進、抑制されて疾患が引き起こされる場合があり、Wnt シグナルに作用する化合物が治療薬のシーズや疾患の病態解明の研究ツールになり得る。そこで、本研究では天然資源からの Wnt シグナルに作用する化合物の探索を行った。本研究の遂行にあたり Wnt シグナルの標的タンパク質に応じたルシフェラーゼ活性が得られる STF/293 細胞を用いて、TOP assay、FMCA 法を行い、4 種の植物の分画を進めた。

TOP assay、FMCA 法を用いてバングラデシュ植物のメタノール抽出物ライブラリーをスクリーニングし、その結果 KKB408 の *Clinogyne dichotoma* を分画対象に選出した。

*Clinogyne dichotoma* より、既知のステロイド配糖体 (1) 及びパラ置換ベンゼン及びピロガロール型のベンゼン環を持つ 1,4-diarylbutane 型の新規リグナン (2) を単離した。

当研究室で行われた *Ricinus communis* 茎部からの Wnt シグナルを活性化する化合物 ricinine の単離及び作用機序解析についての研究が行われたことから、*Ricinus communis* は、より多くの Wnt シグナルに関連した化合物を含有する可能性があった。そのため、本植物の種子部の油を除いた後の残渣であるヒマシ粕 (伊藤製油製) の分画を行った。その結果、既知のリグナン (3)、ネオリグナン (4)、フラバノン配糖体 (5-7)、ピリドン型アルカロイド (8) を単離した。また、これらの内 3 及び 7 は Wnt シグナルを阻害する可能性が示唆された。

前任者のタイ産植物エキスライブラリーの TOP assay でのスクリーニング結果から、阻害活性が観察された *Canarium album* を選出し分画した。この結果、既知のオレアナン型トリテルペン配糖体 (9, 10) ウルサン型トリテルペン配糖体 (11, 12)、ルパン型トリテルペン配糖体 (13) を得た。これらの化合物には Wnt シグナルに作用する化合物は存在しなかった。しかし、精製過程において LiCl 強化作用という性質を持つフラクションの観察から、このような性質を持つ化合物が天然資源中に存在している可能性を見出した。

タイ産植物の MeOH 抽出物ライブラリーのスクリーニングで TOP 阻害活性が認められた *Santalum album* が前任者により分画され、前任者は新規セスキテルペノイド 14 を得ていた。そこで、未分画の状態で作成されていた TOP 阻害活性を有する 2D について、分画を行い、新規セスキテルペノイド 2 種 (15, 16) を含む既知のセスキテルペノイド 7 種 (15-21) 及びネオリグナン (22)、カルデノライド (23) を単離構造決定した。このうち 2 種の既知化合物 (17, 23) は

Wnt シグナル阻害活性を持つ化合物であることが示唆され、化合物 **17** は $\beta$ -catenin を減少させず、Wnt シグナルの標的遺伝子の一つである Cyclin D1 を減少させた点から、 $\beta$ -catenin の核内移行から遺伝子発現までの過程に作用している可能性が示唆された。

本研究で見いだされた化合物が創薬シーズとなり、Wnt シグナルの異常を原因とする疾患の改善に用いられること、並びに phlorizin のように時代の流れとともに新たな有用性が見出されることを期待する。

## 実験の部

### 【1 使用機器 及び 試薬】

各種機器分析データを得るため、次の装置および試薬を用いて測定した。

#### 1.1 化合物の単離, 構造決定

##### TLC 発色試薬

濃硫酸 : 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (噴霧後加熱)

phosphomolybdic acid : 12 モリブド(IV)リン酸 n 水和物/メタノール (Wako)  
= 25 g / 250 mL (噴霧後加熱)

anisaldehyde 試薬 : *p*-anisaldehyde 9.1 mL/conc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.3 mL/酢酸 3.7 mL/EtOH  
370 mL (加熱後噴霧)

dragendorff 試薬 : (a) 次硝酸ビスマス 0.85 g/酢酸 10mL /H<sub>2</sub>O 40mL; (b) KI 8  
g/H<sub>2</sub>O 20 mL。 (a), (b)を 0.5 mL ずつ混合した後、酢酸 2 mL、H<sub>2</sub>O 10 mL を加え、  
使用した。

また、TLC を展開後 254 nm 及び 360 nm の UV ランプを照射し観察した。

##### 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート

Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck

RP 18 F<sub>254</sub> Merck

HPTLC Silica gel 60 DIOL F<sub>254</sub>S Merck

また、TLC を展開後 254 nm 及び 360 nm の UV ランプを照射し、観察した。

##### オープンカラムクロマトグラフィー担体

Chromatorex PSQ 100B 富士シリシア化学

Chromatorex ODS 富士シリシア化学

Chromatorex DMS 富士シリシア化学

Chromatorex DIOL 富士シリシア化学

Silica gel 60N (spherical, neutral) 関東化学

Dianon HP-20 三菱化成

Sepahdex LH-20 GE Healthcare

## 固相抽出キット

Sep-Pak® Vac 3cc (200mg) C18 Cartridges Waters

## HPLC 装置

カラム : Develosil C30-UG-5 ( $\phi 10 \times 250$ mm)	野村化学
Develosil ODS-SR-5 ( $\phi 10 \times 250$ mm)	野村化学
Develosil RPAQUEOUS-AR-5 ( $\phi 10 \times 250$ mm)	野村化学
COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -AR-II ( $\phi 10 \times 250$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -AR-II ( $\phi 2.0 \times 150$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL COSMOSIL Cholester ( $\phi 10 \times 250$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL COSMOSIL Cholester ( $\phi 4.6 \times 150$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL $\Pi$ -NAP ( $\phi 10 \times 250$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL $\Pi$ -NAP ( $\phi 4.6 \times 150$ mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL 5C <sub>18</sub> -MS-II ( $\phi 4.6 \times 150$ mm)	Nacalai tesque Inc.
CAPCELL PAK C18 MG II ( $\phi 10 \times 250$ mm)	SHISEIDO Inc.
Inertsil Diol ( $\phi 4.6 \times 250$ mm)	GL Sciences Inc.

装置は以下の組み合わせでいずれかを用いた.

### System 1

ポンプ : PU-980 Intelligent HPLC Pump	JASCO
検出器 : UV-970 Intelligent UV / VIS Detector	JASCO
RI-1530 Intelligent RI Detector	JASCO

### System 2

ポンプ : PU-2080 plus Intelligent HPLC Pump	JASCO
検出器 : UV-2075 plus Intelligent UV / VIS Detector	JASCO
RI-2031 plus Intelligent RI Detector	JASCO

### System 3

システムコントローラー : SCL-10A VP	SHIMADZU
フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 : SPD-M10A VP	SHIMADZU
送液ユニット : LC-10AD <i>vp</i>	SHIMADZU
低圧クラジェントユニット : FCV-10AL <i>vp</i>	SHIMADZU
オートサンプラー : SIL-20A	SHIMADZU
カラムオーブン : CTO-10AS <i>vp</i>	SHIMADZU
オンラインテガッサ : DGU-12A	SHIMADZU
LC ワークステーション : CLASS-VP < ver.5.032 >	SHIMADZU

#### System 4

システムコントローラー : CBM-20A	SHIMADZU
フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 : SPD-M20A	SHIMADZU
送液ユニット : LC-10AB	SHIMADZU
オンラインテガッサ : DGU-20A <sub>3</sub>	SHIMADZU
カラムオーブン : CTO 20AC	SHIMADZU
LC ワークステーション: LC-MS solutions	SHIMADZU

#### System 5

ポンプ : LC-10AT	SHIMADZU
LC-10ATvp	SHIMADZU
オンラインテガッサ: DGU-20A <sub>3</sub>	SHIMADZU
カラムオーブン : CTO 10A	SHIMADZU
検出器 : UV-1575 Intelligent UV / VIS Detector	JASCO
RI-1530 Intelligent RI Detector	JASCO

#### LC-MS system

装置は以下の組み合わせで用いた。

システムコントローラー : SCL-10AVP	SHIMADZU
フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 : SPD-M10A VP	SHIMADZU
オートサンプラー : SIL-20A	SHIMADZU
送液ユニット : LC-20AD	SHIMADZU
バルブユニット : FCV-20AH <sub>2</sub>	SHIMADZU
オンラインテガッサ : DGU-20A <sub>3</sub>	SHIMADZU
質量分析装置 : LC-MS2020	SHIMADZU
LC/MS 用窒素ガス発生装置 : N <sub>2</sub> Supplier Model 24F	システムインストルメンツ
LC-MS ワークステーション : Lab solutions	SHIMADZU

本論文で MS を測定する際には 0.1% HCOOH を含む有機溶媒を使用した。

#### 有機溶媒

メタノール、アセトン、クロロホルム、酢酸エチル、ヘキサン、*n*-ブタノール (関東化学) は、試薬一級品を用いた。またエタノール (Wako) は、試薬特級品、ジメチルスルホキシドは、分子生物学用 (Wako) または試薬特級品 (関東化学) を用いた。イソプロパノール (ナカライテスク) を用いた。

凍結乾燥機

FDU-830	EYELA
FDS-2000	EYELA

核磁気共鳴測定装置 (NMR)

JMN ECA 600 spectrometer	JEOL
JMN ECZ 600 spectrometer	JEOL
JMN ECZ 400 spectrometer	JEOL

核磁気共鳴 (NMR) 用溶媒について内部標準として以下の残留溶媒周波数を用いた。CDCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  7.24 (1),  $\delta_{\text{C}}$  77.0 (3) ), CD<sub>3</sub>OD ( $\delta_{\text{H}}$  4.78 (1), 3.30 (5),  $\delta_{\text{C}}$  49.0 (7) ), DMSO-*d*<sub>6</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.49 (5),  $\delta_{\text{C}}$  39.5 (7) ), pyridine-*d*<sub>5</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  8.71 (br), 7.55 (br), 7.19 (br),  $\delta_{\text{C}}$  149.9 (3), 135.5 (3), 123.5 (3) )。重水素化溶媒は Acros 社製、または CIL (Cambridge Isotope Laboratories) 社製を用いた。測定溶媒または TMS を基準として、化学シフトは  $\delta$  値 (ppm) で示した。化学シフト値は  $\delta$  値で表し、 $\delta$  の単位は ppm である。スピン結合定数は *J* 値 (Hz) で表し、開裂様式は s : singlet, d : doublet, t : triplet, q : quartet, quin : quintet, sept : septet, m : multiplet, br : broad とそれぞれ略した。

質量分析計 (MS)

ESIMS : JMS-T100LP	JEOL
--------------------	------

旋光計 ( $[\alpha]_{\text{D}}$ )

P-2200 polarimeter	JASCO
--------------------	-------

円二色性分散計 (CD)

J-1100	JASCO
--------	-------

赤外吸収分光光度計 (IR)

FT-IR 4700 spectrometer	JASCO
-------------------------	-------

紫外可視分光光度計 (UV)

UVmini 1240 UV-VIS Spectrophotometer	SHIMADZU
--------------------------------------	----------

## 1.2 細胞実験

### 使用機器

ボルテックスミキサー: vortex GENIE-2	Scientific Industries
ピペットマン: pipetPAL P-1000, P-200, P-20, P-2	BMBio
オートクレーブ: HA-300M $\alpha$ , HA-300MIV	HIRAYAMA
定温恒温乾燥機: EYELA NDO-400	EYELA
CO <sub>2</sub> インキュベーター: MCO-17AIC	SANYO
クリーンベンチ: MCV-B131S, MCV-710ATS	SANYO
遠心機: M200-IVD	SAKUMA
M150	SAKUMA
プチR まる8 エイト	WAKEN
超音波破碎・洗浄機: UT205S	SHARP
マイクロプレート: 96F NUNCLON DELTA WHITE MICROWELL SI	NUNC.
マイクロプレート: 96F NUNCLON DELTA BLACK MICROWELL SI	NUNC.
マイクロプレート: 24 well culture 3526	CORNING
蛍光測定: Fluoroskan Ascent	Thermo
化学発光測定: Luminoskan Ascent	Thermo
倒立型培養顕微鏡: CKX41	OLYMPUS

### 培養細胞株

- STF/293 細胞 (ヒト胎児腎細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)  
ジョーンホップキンス大学 Dr. Jeremy Nathans より御恵与いただいた
- 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)
- SW480 細胞 (ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)
- HCT116 細胞 (ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)
- DLD1 細胞 (ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)
- RKO 細胞 (ヒト大腸がん細胞, cultivated in 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C)

STF/293 細胞、293 細胞、SW480 細胞、HCT116 細胞、DLD1 細胞、RKO 細胞は 10%FBS 含有 DMEM (Wako) を培養に用いた。Fetal Bovine Serum (FBS, Biowest) は、補体を失活させるため、56 °C、30 分間の加熱処理を行い、非動化を行ったものを使用した。細胞の剥離には、Trypsin EDTA (0.25 % Trypsin-EDTA, Gibco) を用いた。細胞計測には Trypan blue 溶液 (0.4% (w/v) trypan blue, Nacal tesque Inc.) を用い、顕微鏡下で行った。

PBS (-) は以下の組成のものを用いた。

KCl (Wako)	0.2 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Nacalai tesque Inc.)	0.2 g/L
NaCl (Wako)	8.0 g/L
<u>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Wako)</u>	<u>1.11 g/L</u>
dH <sub>2</sub> O up to 1000 mL (autoclaved 121 °C, 20 min.)	

### 1. 2. 1. Wnt 関連実験

使用したプラスミド

pSuperFOPflash ワシントン大学 Dr. Randall Moon より御恵与いただいた.

pRL-CMV Promega

トランスフェクション関連試薬

Lipofectamine 2000 Invitrogen

Opti-MEM Promega

ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5X Promega

Luciferase 1000 Assay System Promega

〔 Luciferase Assay Substrate  
Luciferase Assay Buffer 〕

Passive Lysis Buffer 5X Promega

Dual-Glo Luciferase Assay System Promega

〔 Dual-Glo Luciferase Substrate  
Dual-Glo Luciferase Buffer  
Dual-Glo Stop & Glo Substrate  
Dual-Glo Stop & Glo Buffer 〕

ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット 東洋ビーネット

〔 5倍濃 細胞溶解剤  
ピッカジーン発光試薬II 緩衝液  
ピッカジーン発光基質  
シーパンジー発光試薬緩衝液  
シーパンジー発光基質溶液 〕

LiCl 溶液 (5 M) :

LiCl (Wako) 2.1 g を滅菌水に溶解して 10 mL の 5 M LiCl 溶液とした後, 10 個の 1.5 mL エッペンチューブに分注し, -30°C 保存した.

quercetin 溶液 (27.7 mM) :

quercetin (Wako) を 1.5 mL エッペンドルフチューブ内で DMSO に溶解し、138.5 mM quercetin 溶液とし、冷凍保存した。138.5 mM 溶液を 5 倍希釈し、27.7 mM Quercetin 溶液とした後、1.5 mL エッペンチューブに分注し冷凍保存した。

Fluorescein diacetate (FDA) 溶液 :

FDA (Wako) を DMSO に溶解して FDA 10 mg/mL DMSO 溶液とした。使用時に、この溶液 7  $\mu$ L を PBS 20 mL に添加して FDA 溶液として細胞に添加した。

## 1.2.2. タンパク実験

### Lysis buffer

1 M Tris (Invitrogen) -HCl (Wako)	2 mL	(20 mM)
NaCl (Wako, Invitrogen)	878 mg	(150 mM)
Triton X-100 (Wako)	0.5 mL	(0.5 % (w/v))
Sodium deoxycholate (関東化学)	500 mg	(0.5 % (w/v))
EDTA (DOJINDO)	292.2 mg	(10 mM)
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Wako)	18.4 mg	(1 mM)
NaF (Wako)	0.42 mg	(0.1 mM)

dH<sub>2</sub>O up to 100 mL

溶解後、常温で保存した。使用時に 1% (v/v) の protease inhibitor cocktail (PI) (Nacalai tesque Inc.) を加えて使用した。

### SDS-PAGE gel

Polyacrylamide gel は以下の組成で調製した。

	running gel		stacking gel
	12.5%	10%	5%
Q water	2.2 mL	3.1 mL	3.4 mL
30% acrylamide	4.2 mL	3.3 mL	0.83 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.8)	3.4 mL	3.4 mL	-----
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	-----	-----	0.63 mL
10% SDS	0.1 mL	0.1 mL	0.05 mL
10% APS	0.1 mL	0.1 mL	0.05 mL
TEMED (Wako)	7 μL	7 μL	5 μL

running gel が固まらないうちに、ガラスプレートの間に溶液を流し入れ、水飽和 BuOH を重層して固まるまで待ち、BuOH 及びゲルが固化する際に排出されるゲル中の水を除いた後、stack gel を重層してコームを挿入後 stack gel の固化を待った。

### 10% Sodium dodecylsulfate (SDS)

SDS (Wako) 5.0 g を 50 mL の Q 水に溶解した後、常温で保存した。

### 10% Ammonium persulfate (APS)

APS (Nacalai tesque Inc.) 100 mg を 1 mL の滅菌水に溶解し、1.5 mL エッペンチューブに 150 μL ずつ分注して冷凍保存した。

### 30% Acrylamide

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

溶解後、遮光して 4 °C で保存した。

### 5 × Sample buffer

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8)	15.7 mL	(0.313 M)
SDS (Wako)	2.5 g	(10% (w/v))
sucrose (Nacalai tesque Inc.)	6.25 g	(25% (w/v))
<u>bromo phenol blue (関東化学)</u>	<u>6.25 mg</u>	<u>(0.025% (w/v))</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 25 mL	

溶解後、遮光して常温で保存した。用時 1/4 量の 2-mercaptoethanol (Wako) を添加し 4/5 倍希釈して 4 × sample buffer とした後、泳動サンプルで 4 倍に希釈し 1 × sample buffer として使用した。

また、SDS-PAGE 装置は以下の組み合わせで用いた。

泳動装置 : Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD
電源 : PowerPac Basic Power Supply	BIO-RAD

#### 10 × Running buffer

Tris (UltraPure™, Invitrogen)	30.3 g	(0.25 M)
Glycine (関東化学)	144 g	(1.92 M)
<u>SDS (Wako)</u>	<u>10 g</u>	<u>(1% (w/v))</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 1000 mL	

溶解後、常温保存した。使用時に Q 水で 10 倍希釈して使用した。

#### 転写バッファー

Tris	2.9 g	(48 mM)
Glycine	1.5 g	(39 mM)
<u>MeOH</u>	<u>100 mL</u>	<u>(20% (w/w))</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 500 mL	

溶解後、常温で保存した。

メンブレンへの転写はトランスブロット SD セル (BIO-RAD) を用いて semi-dry 法により行った。

#### TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20)

Tris (Invitrogen)	3.6 g	(10 mM)
NaCl (Wako, Invitrogen)	17.4 g	(100 mM)
conc. HCl (Wako)	adjust pH to about 7.4	
<u>Tween 20 (Wako)</u>	<u>3.0 g</u>	<u>(0.1% (w/v))</u>
Q water	up to 3000 mL	

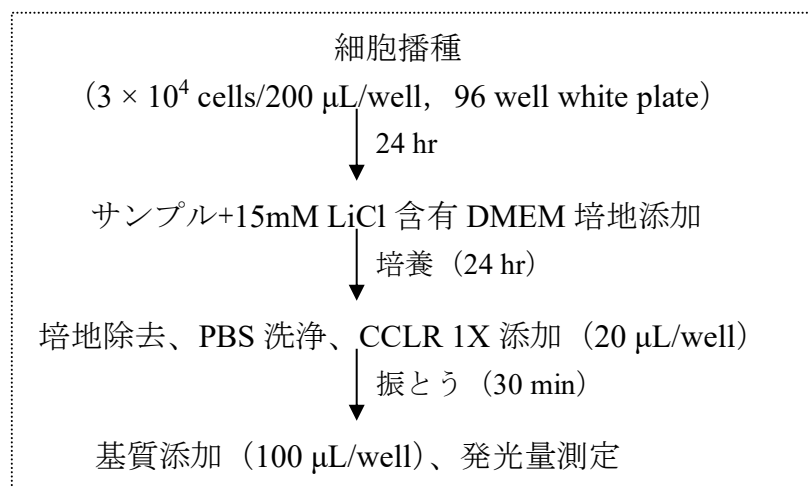
溶解後、常温で保存した。

## 【2. 実験操作】

各章における実験操作について以下に示す手順で行った。

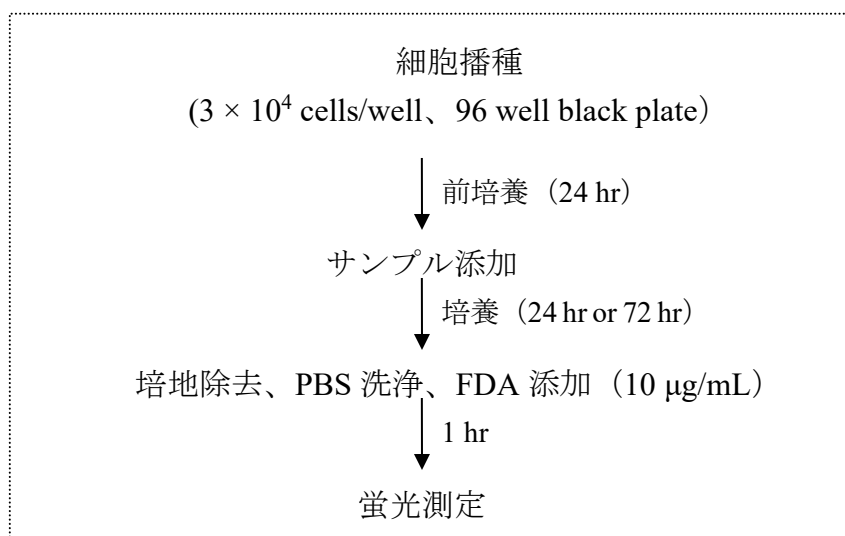
### 2.1. Wnt 関連実験 (第 3, 4, 5, 6, 7 章)

#### 2.1.1 Wnt シグナル阻害活性測定—TOP assay



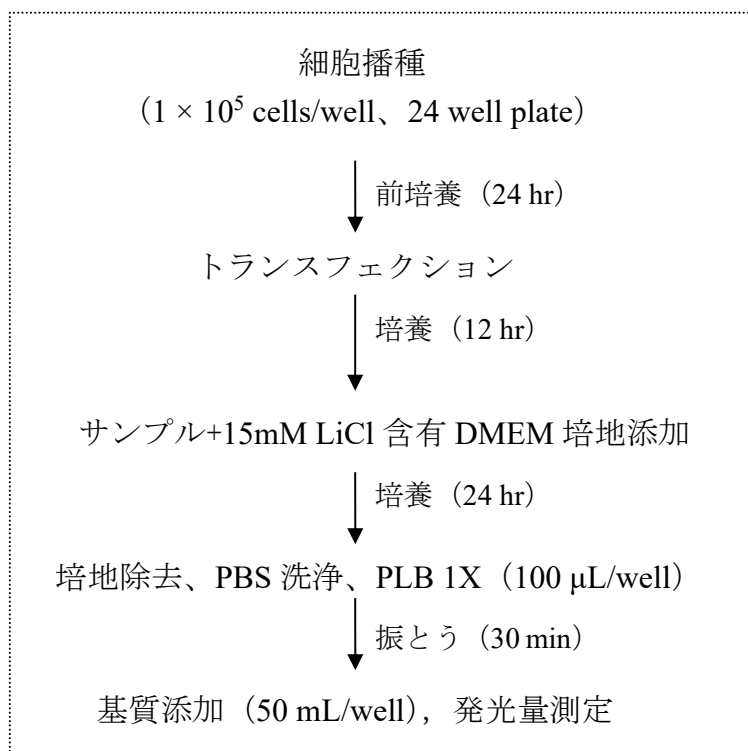
96 穴平底白マイクロプレートに STF/293 細胞 ( $3 \times 10^4$  cells/200  $\mu$ L/well) を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で DMEM 培地を用いて前培養した。24 時間後アスピレーターで培地を取り除き、測定試料及び LiCl 15 mM を含有させた DMEM 培地 200  $\mu$ L を各 well に添加し、24 時間培養した。24 時間後培地を取り除き、PBS 200  $\mu$ L で各 well の細胞を 1 回洗浄し、CCLR 1X 溶液 (細胞溶解液) を各 well に 20  $\mu$ L ずつ添加した。30 分間振とうした後、Luciferase Assay Buffer に溶解した Luciferase Assay Substrate を各 well に 100  $\mu$ L ずつ、Luminoscan Ascent に付属するオートインジェクターもしくは 200  $\mu$ L のマイクロピペットを用いて添加して発光量を測定した。

## 2.1.2 細胞生存試験 (FMCA assay)



96 穴平底黒マイクロプレートに SW480 細胞、HCT116 細胞、DLD1 細胞、RKO 細胞、293 細胞または STF/293 細胞 (サンプル添加後の培養が 24 hr の場合:  $3 \times 10^4$  cells/200  $\mu\text{L}$ /well, 72 hr の場合:  $6 \times 10^3$  cells/200  $\mu\text{L}$ /well) を播種して、CO<sub>2</sub> インキュベーターにて、DMEM 培地を用いて前培養した。24 時間後、DMEM 培地を取り除き、試料を含有 (STF/293 細胞の場合は LiCl 15 mM 共存下) させた DMEM 培地を 200  $\mu\text{L}$  ずつ各 well に添加して、24 時間または 72 時間培養した。24 時間後、培地を取り除いて、PBS 200  $\mu\text{L}$  で各 well の細胞を 1 回洗淨後、FDA 溶液を各 well に 200  $\mu\text{L}$  ずつ添加した。1 時間後、Fluorescein の蛍光測定 (Ex 485 nm, Em 538 nm) を行った。

### 2.1.3 Wnt シグナル特異的阻害活性測定—FOP assay (Dual luciferase assay)



24 穴平底透明マイクロプレートに 293 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/500  $\mu$ L/well) を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した。24 時間後、pSuperFOPflash (最終濃度: 10  $\mu$ g/mL) 及び pRL-CMV (最終濃度: 1  $\mu$ g/mL) を含有する Opti-MEM 培地 (A 溶液) と Lipofectamine 2000 (24  $\mu$ L/mL) を含む Opti-MEM 培地 (B 溶液) を当量混ぜ、各 well に 50  $\mu$ L ずつ滴下した (トランスフェクション)。12 時間培養後培地を除き、測定試料及び LiCl 15 mM を含有させた DMEM 培地 500  $\mu$ L を各 well に加え、24 時間培養した。24 時間後、培地を取り除き PBS で細胞を 1 回洗浄後、Passive lysis buffer (PLB) 1X 溶液を各 well に 100  $\mu$ L ずつ添加した。30 分間振とうし細胞溶解液とした。100  $\mu$ L の細胞溶解液の内 50  $\mu$ L を 96 穴平底白マイクロプレートに移した (この際、白色粘着状固形物を取らなかった。)。マイクロプレートの各 well にピッカジーン発光試薬 II 緩衝液に溶解したピッカジーン発光基質を各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加し、FOPflash に由来する化学発光 (Firefly luminescence) を測定した。その後、シーパンジーン発光試薬緩衝液に溶解したシーパンジーン発光基質溶液を各 well に 50  $\mu$ L ずつ添加し、内部標準である pRL-CMV に由来する化学発光 (Renilla luminescence) を測定した。

## 2.2. たんぱく実験 (第7章)

### ウエスタンブロット

#### 細胞溶解液 (ライセート) の調製

6 cm ディッシュに SW480 を播種し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで前培養した。24 時間後、培地を取り除き、試料を含有させた DMEM 培地を 2.5 mL 各ディッシュに添加後、24 時間培養した。24 時間後、培地を取り除き PBS で洗浄後、cell scraper により細胞を剥し、1.5 mL エッペンチューブに回収した。遠心分離 (4 °C, 3000 rpm, 5 min) を行い、上清を取り除き、1 mL の PBS に懸濁させ、1.5 mL エッペンチューブに入れた。1.5 mL エッペンチューブを遠心分離 (4 °C, 5000 rpm, 5 min) し、細胞を沈殿させた。上清を取り除いた後、1 mL の PBS で懸濁し、再度遠心分離 (4 °C, 5000 rpm, 5 min) して細胞を沈殿させた。上清を除き、200 μL の 1% protease inhibitor cocktail (PI) を含有させた lysis buffer を加え、氷上で 30 分インキュベートした。その後、遠心分離 (13,000 rpm, 30 min, 4 °C) を行い、上清を細胞全体ライセートとした (Figure 2. 2. 1)。

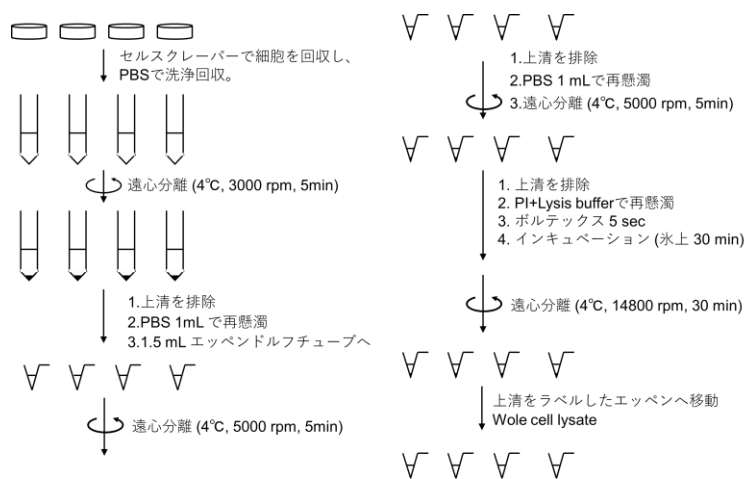


Figure 2. 2. 1 ライセート調整のフロー

## SDS-PAGE

得られたライセートに 5× Sample buffer/2-メルカプトエタノール混合液 (4/1) を加え、98 °C、3min 加熱し、泳動サンプルを作成した。ウェルに泳動サンプルを添加して、電気泳動を行った (20~30 mA)。この際、泳動サンプルを入れないうェルには代わりとして sample buffer を泳動した。分子量マーカーには Precision Plus Protein™ Standards (BIO-RAD) を使用し、泳動はブロモフェノールブルー色素がゲルの下端から 5 mm 程度まで到達したところで終了した。

## メンブレンへの転写

SDS-PAGE の後、ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへ semi-dry 法でタンパク質を転写した。転写バッファーを染み込ませたろ紙 (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD) でゲルとメンブレンを挟み込み、30 分間通電した。

## 一次抗体及び二次抗体処理

PVDF への転写後、5%スキムミルク (森永乳業) を含む TBST で 1 時間、室温下でブロッキングし、メンブレンを TBST で洗浄後 (5 min, 3 回)、一次抗体処理に移った (全操作を通して洗浄操作の際にメンブレンに直接 TBST を吹き付けないように注意した)。

5%スキムミルクを含む TBST または、Can get signal Solution 1 (TOYOBO, c-Myc タンパク質検出時) で希釈した一次抗体を室温にて 1 時間または 4°C 終夜反応後、メンブレンを TBST で洗浄 (5 min, 3 回) し、二次抗体処理に移った。5%スキムミルクを含む TBST または、Can get signal Solution 2 (TOYOBO, c-myc たんぱく質検出時) でそれぞれに希釈した二次抗体を室温にて 1 時間反応後、メンブレンを TBST で洗浄 (5 min, 3 回) し、immunocomplex の検出に移った。

検出は、ECL Advance Western detection system (GE Healthcare/Amersham Biosciences) または Immobilon Western (Millopore) を用いた。内部標準のコントロールとして、 $\beta$ -actin を用いた。

一次抗体として (anti- $\beta$ -catenin, 1:2000, #610153, BD Biosciences; anti-c-myc, 1:250 #sc-40, Santa Cruz Biotechnology, Inc.;  $\beta$ -actin, 1:4000, #A2228, Sigma; anti cyclinD1, 1:10000, #ab134175, abcam) を用いた。また、二次抗体として anti-mouse IgG (1:4000, #NA931VS, GE Healthcare)、anti-goat IgG (1:4000, #A5420, Sigma)、anti-rabbit IgG (1:4000, #111-035-144, Jackson ImmunoResearch) を用いた。

### 一次抗体及び二次抗体の除去

メンブレンを **Stripping buffer** に浸し、室温で1時間振とうした。その後、TBSTで洗浄（5 min, 3回）し、ブロッキングに移った。

#### Stripping buffer

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	3.13 mL (62.5 mM)
10% SDS	10 mL (2% (v/w))
<u>2-mercaptoethanol</u>	<u>349 <math>\mu</math>L (100 mM)</u>
dH <sub>2</sub> O	up to 50 mL

## 2.3 各植物の分画操作

### 2.3.1. *Clinogyne dichotoma* からの化合物の単離

#### *Clinogyne dichotoma* 葉及び小枝の MeOH 抽出

*Clinogyne dichotoma* の葉及び小枝 260.9 g をメタノールにて抽出しメタノール抽出物 (12.29 g) を得た。

#### メタノール抽出物の分画

メタノール抽出物を MeOH/acetone を用いて Diaion-HP20 ( $\phi$  50×230 mm) で分画した。MeOH:acetone=1:0 画分として Fr. 1A (9.03 g)、1:1 画分として Fr. 1B (1.45 g)、0:1 画分として Fr. 1C (0.56 g)、溶媒に溶けなかった固体として Fr. 1D (0.65 g) を得た。

#### Fr. 1A の溶媒分配

Fr. 1A (9.03 g) を 200 mL の 10%MeOH に溶かし、200 mL の hexane、EtOAc、水飽和 BuOH でそれぞれ 3 回ずつ溶媒分配して hexane layer (0.67 g)、EtOAc layer (1.53 g)、BuOH layer (1.66 g)、water layer (4.44 g) を得た。

#### EtOAc layer の分画

EtOAc layer (1.53 g) を Silica gel カラム ( $\phi$  30×450 mm) に付して分画を行い CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:0 溶出画分として Fr. 2A (4 mg)、9:1 溶出画分として Fr. 2B (105 mg)、8:1 溶出画分として Fr. 2C (814 mg)、7:1 溶出画分として Fr. 2D (198 mg)、5:1 溶出画分として Fr. 2E (100 mg)、3:1 溶出画分として Fr. 2F (116 mg) 1:1 溶出画分として Fr. 2G (150 mg)、0:1 溶出画分として Fr. 2H (26 mg)、0:1+0.1%TFA 溶出画分として Fr. 2I (122 mg) を得た。

#### 2C の分画

2C (814 mg) を Silica gel カラム ( $\phi$  15×310 mm) で CHCl<sub>3</sub>:MeOH=9:1 の単一溶媒で分画を行い Fr. 3A (0.8 mg)、Fr. 3B (119.5 mg)、Fr. 3C (354.6 mg)、Fr. 3D (175.1 mg)、Fr. 3E (51.7 mg) を得た。さらにカラム上に残った成分の溶出のために MeOH 溶出画分として Fr. 3F (73.0 mg)、0.1%TFA+MeOH 溶出画分として Fr. 3G (17.7 mg) を得た。

### 3E の溶解性

Fr. 3E (51.7 mg) を MeOH 難溶部として Fr. 5A (7.3 mg, **1**)、MeOH 可溶部として Fr. 5B (40.3 mg) を得た。

### 2D の分画

Fr. 2D (198 mg) を Sephadex LH-20 に付して CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:1 の溶媒系で分画し、Fr. 8A (0 mg)、Fr. 8B (5.9 mg)、Fr. 8C (21.9 mg)、Fr. 8D (38.8 mg)、Fr. 8E (38.1 mg)、Fr. 8F (38.5 mg)、Fr. 8G (15.4 mg)、Fr. 8H (6.9 mg)、Fr. 8I (4.9 mg)、Fr. 8J (3.3 mg)、Fr. 8K (3.8 mg)、Fr. 8L (1.3 mg) を得た。

### 8G の分画

Fr. 8G (15.4 mg) について COSMOSIL Π-NAP (φ 10×250 mm) を用いた HPLC (35% MeOH) により分画を行い Fr. 18 series を得た。それぞれのリテンションタイム (*t<sub>R</sub>*) 及び秤取量は Fr. 18A (*t<sub>R</sub>* 5.0 min, 0.5 mg)、Fr. 18B (*t<sub>R</sub>* 6.7 min, 0.3mg)、Fr. 18C (*t<sub>R</sub>* 13.2 min, 5.5 mg, **2**)、Fr. 18D (others, 4.6 mg)、100%MeOH によるカラム洗浄画分として Fr. 18E (1.9 mg) であった。

化合物の単離には至らなかったが分画を行ったフラクションが存在するため、次ページに分画チャートを示す (Figure 2. 3. 1. 1)。



### 2.3.2 *Ricinus communis* の分画

#### ヒマシ粕の MeOH 抽出

*Ricinus communis* ヒマシ粕 (伊藤製油製, 300 g) を MeOH により抽出し、MeOH 抽出物 (13.1 g) を得た。ヒマシ粕残渣についてはオートクレーブ処理し、無毒化して破棄した。

#### MeOH 抽出物の溶媒分配

MeOH 抽出物 (13.1 g) を 200 mL の 10%MeOH 溶液に溶解し、等量の hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で各溶媒 3 回ずつ溶媒分配し、hexane layer (2.9 g)、EtOAc layer (1.7 g)、BuOH layer (2.3 g)、water layer (6.2 g) を得た。

#### EtOAc layer の分画

EtOAc layer (1.7 g) を silica gel カラム ( $\phi$  25×410 mm) を用いて分画した。hexane:EtOAc:MeOH=2:1:0 で 320 mL 流出させ Fr. 1A (443.7 mg)、続けて 2:1:0 で 80 mL 流出させ Fr. 1B (6.8 mg)、0:1:0 で 120 mL 流出させ Fr. 1C (370.7 mg)、0:1:1 で 200 mL 流出させ Fr. 1D (599.1 mg)、続けて 0:1:1 で 260 mL 流出させ Fr. 1E (71.8 mg)、0:0:1 で 260 mL 流出させ Fr. 1F (33.5 mg)、0:0:1+0.1%TFA で 500 mL 流出しカラム内に残存した成分を洗い出し Fr. 1G (236.4 mg) を得た。

#### Fr. 1C の分画

Fr. 1C (370.7 mg) を silica gel カラム ( $\phi$  15×260 mm) を使用して分画した。

CHCl<sub>3</sub>:acetone=1:0-13:1 溶出画分として Fr. 2A (86.4 mg)、13:1 溶出画分として Fr. 2B (10.6 mg)、13:1-7:1 溶出画分として Fr. 2C (10.4 mg)、7:1-3:1 溶出画分として Fr. 2D (10.1 mg)、3:1-2:1 溶出画分として 2E (109.2 mg)、2:1-1:1 溶出画分として 2F (97.5 mg)、1:1-0:1 溶出画分として 2G (4.3 mg)、MeOH 溶出画分として Fr. 2H (6.1 mg)、MeOH+0.1%TFA 溶出画分として Fr. 2I (33.4 mg)を得た。

#### Fr. 2E の分画

Fr. 2E (109.2 mg) を ODS カラム ( $\phi$  13×140 mm) で分画した。H<sub>2</sub>O:MeOH=1:1 溶出画分として Fr. 3A (0.6 mg)、Fr. 3B (3.7 mg)、9:11 溶出画分として Fr. 3C (4.2 mg)、Fr. 3D (25.3 mg, **6**)、2:3 溶出画分として Fr. 3E (2.8 mg)、Fr. 3F (0.2 mg)、7:13 溶出画分として Fr. 3G (0.4 mg)、Fr. 3H (4.1 mg)、3:7 溶出画分として Fr. 3I (6.6 mg)、Fr. 3J (5.5 mg)、MeOH 溶出画分として Fr. 3K (2.6 mg) を得た。このうち 3D を化合物 **6** とした。

#### Fr. 3I からの分画

Fr. 3I (6.6 mg) を HPLC (70%MeOH) で CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II ( $\phi$  10×250 mm) を用いて分画し Fr. 5A ( $t_R$  2.7 min, 0.4 mg) 、 Fr. 5B ( $t_R$  6.2 min, 0.4 mg) 、 Fr. 5C ( $t_R$  11.8 min, 4.0 mg, **7**)、 Fr. 5D ( $t_R$  12.5 min, 0.1 mg) 、 Fr. 5E (others, 0.8 mg) を得た。

#### Fr. 3A、 Fr. 3B からの分画

Fr. 3A (0.6 mg) 、 Fr. 3B (3.7 mg) を混合し HPLC (50%MeOH) で CAPCELL PAK C<sub>18</sub> MG II ( $\phi$  10×250 mm) を用いて分画し Fr. 7A ( $t_R$  3.3 min, 0.1 mg) 、 Fr. 7B ( $t_R$  4.3 min, 0.3 mg) 、 Fr. 7C ( $t_R$  5.8 min, 2.8 mg, **3**)、 Fr. 7D ( $t_R$  7.9 min, 0.3 mg) 、 Fr. 7E ( $t_R$  25.2 min, 1.0 mg)、 Fr. 7F (others, 1.0 mg) を得た。

#### Fr. 2D の分画

Fr. 2D (10.1 mg) を Sephadex LH-20 ( $\phi$  12×460 mm) で MeOH:CHCl<sub>3</sub> で分画を行い、 Fr. 10A (10.3 mg)、 Fr. 10B (2.7 mg)、 Fr. 10C (0.8 mg)、 Fr. 10D (2.2 mg, **4**)、 Fr. 10E (0.8 mg)、 Fr. 10F (0.4 mg) を得た。

#### Fr. 1D の分画

Fr. 1D を silica gel カラム ( $\phi$  40×160 mm) で分画した。それぞれ、 CHCl<sub>3</sub>:acetone=2:1 溶出画分として Fr.4A (15.5 mg) 、 Fr. 4B (4.6 mg)、 1:1 溶出画分として Fr. 4C (21.2 mg) 、 Fr. 4D (193.3 mg) 、 1:2 溶出画分として Fr. 4E (75.3 mg)、 1:5 溶出画分として Fr. 4F (70.9 mg)、 1:7 溶出画分として Fr. 4G (45.7 mg) 、 1:9 溶出画分として Fr. 4H (22.1 mg)、 MeOH 溶出画分として Fr. 4I (123.7 mg)、 MeOH+0.1%TFA 溶出画分として 4J (212.0 mg)を得た。

#### Fr. 4G の分画

Fr. 4G (45.7 mg) を Sephadex LH-20 ( $\phi$  15×410 mm) に付して CHCl<sub>3</sub>:MeOH=1:1 の溶媒を用いて、 Fr. 12A (0.3 mg) 、 Fr. 12B (1.3mg) 、 Fr. 12C (12.5 mg) 、 Fr. 12D (6.5 mg) 、 Fr. 12E (15.9 mg)、 Fr. 12F (2.2 mg) 、 Fr. 12G (0.3 mg) を得た。

#### Fr. 12E の分画

Fr. 12E (15.9 mg) を HPLC (50%MeOH) を COSMOSIL  $\Pi$ -NAP( $\phi$  10×250 mm) カラムで分画した。、 Fr. 14A ( $t_R$  5.4 min, 1.0 mg) 、 Fr. 14B ( $t_R$  1.8 min, 0.5 mg) 、 Fr. 14C ( $t_R$  13.4 min, 0.5 mg)、 Fr. 14D ( $t_R$  17.7 min, 2.0 mg, **5**) 、 Fr. 14E (others, 3.3 mg)、 Fr. 14F (MeOH 溶出, 4.5 mg) を得た。

#### Fr. 12D の分画

Fr. 12D (6.8 mg) を固相抽出キット Sep-pac<sup>®</sup> Vac 3cc (200 mg) C18 Cartridges を用いて分画した。H<sub>2</sub>O:MeOH=9:1 溶出画分として Fr. 16A (3.6 mg, **8**)、4:1 溶出画分として Fr. 16B (0.6 mg)、7:3 溶出画分として Fr. 16C (0 mg)、1:1 溶出画分として Fr. 16D (0.4 mg)、3:7 溶出画分として、Fr. 16E (1.3 mg)、MeOH 溶出画分として、Fr. 16F (1.4 mg) を得た。

化合物の単離には至らなかったが分画を行ったフラクションが存在するため、次ページに分画チャートを示す (Figure 2. 3. 2. 1)。



### 2.3.3 *Canarium album* の分画

#### *Canarium album* 葉部の MeOH 抽出

*Canarium album* 葉部 (320.9 g) を MeOH で抽出し、MeOH 抽出物 (77.0 g) を得た。

#### MeOH 抽出物の分画

MeOH 抽出物を DiaionHP-20 ( $\phi$  61×310 mm) で分画した。それぞれ MeOH:acetone=1:0 溶出画分として Fr. 1A (63.5 g)、1:1 溶出画分として Fr. 1B (5.70 g)、0:1 溶出画分として Fr. 1C (1.60 g) を得た。

#### 1A の溶媒分配

Fr. 1A (63.5 g) を 10%MeOH 900 mL で溶解し、等量の hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で溶媒分配を各 3 回ずつ行い、hexane layer (0.179 g)、EtOAc layer (12.6 g)、BuOH layer (26.4 g)、water layer (24.0 g) を得た。

#### BuOH layer の分画

BuOH layer (26.4 g) を DMS シリカカラム ( $\phi$  40×200) で分画した。それぞれ MeOH:H<sub>2</sub>O=2:8 溶出画分として Fr. 3A (19.2 g)、4:6 溶出画分として Fr. 3B (1.80 g)、6:4 溶出画分として Fr. 3C (3.06 g)、8:2 溶出画分として Fr. 3D (0.592 g)、1:0 溶出画分として Fr. 3E (0.114 g)、1:0+0.1%TFA 溶出画分として Fr. 3F (0.009 g) を得た。

#### Fr. 3C の分画

Fr. 3C の一部 (468 mg) を ODS カラム ( $\phi$  22×150 mm) で分画し、MeOH:H<sub>2</sub>O=5:5-6:4 溶出画分として Fr. 5A (112mg)、6.5:3.5 溶出画分として Fr. 5B (107 mg)、7:3-7.5:2.5 溶出画分として Fr. 5C (178mg)、8:2-0:1 溶出画分として Fr. 5D (6.2 mg)、0:1+0.1%HCOOH-0:1+0.1%TFA 溶出画分として Fr. 5E (3.4 mg) を得た。

#### Fr. 5C の分画

Fr. 5C を COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II ( $\phi$  10×250 mm) により分画した。それぞれ Fr. 6A ( $t_R$  3.8 min, 29.8 mg)、Fr. 6B ( $t_R$  7.2 min, 9.5 mg)、Fr. 6C ( $t_R$  8.2 min, 73.8 mg, **9**)、Fr. 6D ( $t_R$  9.6 min, 10.3 mg)、Fr. 6E (others 48.2 mg)

#### Fr. 6D の分画

Fr. 6D (10.3 mg) を HPLC (65%MeOH) で COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) を用いて分画して、Fr. 11A ( $t_R$  3.9 min, 0 mg)、Fr. 11B ( $t_R$  11.1 min, 2.0 mg)、Fr. 11C ( $t_R$  11.1-11.7 min, 29.8 mg)、Fr. 11D ( $t_R$  11.7 min, 1.5 mg)、Fr. 11E (others, 1.8 mg) を得た。Fr. 11B を化合物 **10**、Fr. 11D を化合物 **11** を主に含むフラクションとして得た。

#### 2 回目の Fr. 3C の分画

Fr. 3C の一部 (496.3 mg) を HPLC (62.5%MeOH) で COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) により、分画し Fr. 12A ( $t_R$  6.0 min, 47.1 mg)、Fr. 12B ( $t_R$  7.3 min, 8.3 mg)、Fr. 12C ( $t_R$  8.6 min, 19.4 mg)、Fr. 12D ( $t_R$  9.8 min, 15.2 mg, **13**)、Fr. 12E ( $t_R$  10.5 min, 114.4 mg)、Fr. 12F ( $t_R$  12.2 min, 17.5 mg)、Fr. 12G ( $t_R$  13.1 min, 7.2 mg)、Fr. 12H ( $t_R$  14.2 min, 9.7 mg)、Fr. 12I ( $t_R$  14.2-14.9 min, 3.6 mg)、Fr. 12J ( $t_R$  14.9 min, 7.9 mg, **11**)、Fr. 12K (others, 159.6 mg) を得た

#### Fr. 12H の分画

Fr. 12H (9.7 mg) を MeOH を溶媒として Sephadex LH-20 ( $\phi$  13×280 mm) で分画し、Fr. 13A (1.3 mg)、Fr. 13B (4.0 mg)、Fr. 13C (2.2 mg)、Fr. 13D (0.9mg) を得た。

#### Fr. 13B、13C の分画

Fr. 13B (4.0 mg)、Fr. 13C (2.2 mg) をあわせて HPLC (60%MeOH) で COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) を用いて分画し、14 series を得た。それぞれ Fr. 14A ( $t_R$  24.7, 0.8 mg)、Fr. 14B ( $t_R$  27.4, 2.8 mg, **10**)、Fr. 14C (others, 2.3 mg) を得た。

#### Fr. 12G の分画

Fr. 12G を HPLC (27.5%CH<sub>3</sub>CN) により、COSMOSIL Choleser ( $\phi$  10×250mm) カラムを用いて分画し、Fr. 15A ( $t_R$  33.6 min, 0.1 mg)、Fr. 15B ( $t_R$  36.0 min, 1.0 mg, **12**)、Fr. 15C ( $t_R$  36.8 min, .0.1 mg)、Fr. 15D ( $t_R$  39.2 min, 0.6 mg)、Fr. 15E (others, 2.6 mg) を得た。

化合物の単離には至らなかったが分画を行ったフラクションも存在するため、次ページに分画チャートを示す (Figure 2. 3. 3. 1)。



### 2.3.4 *Santalum album* の分画

#### 2D の一部 (1.05 g) の分画

2D (1.05 g) を silica gel カラム ( $\phi$  30×170 mm) で分画した。それぞれ、CHCl<sub>3</sub>:EtOAc:MeOH=9:1:0 溶出画分として、Fr. 10A (3.3 mg)、5:1:0 溶出画分として、Fr. 10B (22.4 mg)、1:1:0 溶出画分として、Fr. 10C (57.0 mg)、同じく 1:1:0 溶出画分として Fr. 10D (125.4 mg)、0:1:0 溶出画分として Fr. 10E (108.3 mg)、0:1:1 溶出画分として、Fr. 10F (95.7 mg)、0:0:1 溶出画分として、Fr. 10G (523.9 mg)、0:0:1+0.1%TFA 溶出画分として、Fr. 10H (233.1 mg) を得た。

#### Fr. 10F の分画

10F (95.7 mg) を HPLC (55%MeOH) で COSMOSIL Choleser ( $\phi$  10×250mm) カラムを用いて、分画し、Fr. 11A-11G を得た。それぞれの  $t_R$  及び秤取量は Fr. 11A ( $t_R$  5.4 min, 3.3 mg)、Fr. 11B ( $t_R$  6.0 min, 3.2 mg)、Fr. 11C ( $t_R$  7.8 min, 8.7 mg)、Fr. 11D ( $t_R$  10.7 min, 3.7 mg)、Fr. 11E ( $t_R$  12.0 min, 5.3 mg)、Fr. 11F ( $t_R$  14.9 min, 3.2 mg)、Fr. 11G (others, 62.9 mg) であった。

#### Fr. 11E の分画

Fr. 11E (5.3 mg) を HPLC (60% MeOH) で COSMOSIL  $\Pi$ -NAP (4.6×150 mm) を用いて分画し、Fr. 16A ( $t_R$  6.8 min, 0.1 mg)、Fr. 16B ( $t_R$  14.0 min, 1.7 mg, **23**)、Fr. 16C (others, 1.9 mg) を得た。

#### Fr. 11C の分画

Fr. 11C (8.7 mg) を HPLC (60%MeOH) で COSMOSIL  $\Pi$ -NAP (4.6×150 mm) を用いて分画し、Fr. 19A ( $t_R$  7.0 min, 3.1 mg, **22**)、Fr. 19B (others, 2.8 mg) を得た。

#### Fr. 10D の分画

Fr. 10D (125.4 mg) を HPLC (70% MeOH) で、COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) を用いて分画し Fr. 14A ( $t_R$  8.0 min, 6.8 mg)、Fr. 14B ( $t_R$  8.6 min, 8.1 mg)、Fr. 14C ( $t_R$  9.8 min, 35.6 mg)、Fr. 14D ( $t_R$  9.9 min, 9.2 mg)、Fr. 14E (others, 56.4 mg) を得た。14D を主に化合物 **18** を含むフラクションとして得た。

#### Fr. 14D の分画

14D (9.2 mg) を HPLC (60%MeOH) で COSMOSIL  $\Pi$ -NAP ( $\phi$  4.6×150 mm) を使用して、Fr. 18A ( $t_R$  15.6 min, 2.8 mg)、Fr. 18B (others 2.8 mg) を得た。

#### 14A の分画

14A を HPLC (50% MeOH) で  $\Pi$ -NAP( $\phi$ 4.6×150 mm) を用いて分画を行い 17A ( $t_R$  6.8 min, 0 mg)、17B ( $t_R$  7.6 min, 0.5 mg)、17C ( $t_R$  9.3 min, 1.0 mg)、17D ( $t_R$  19.7 min, 0.6 mg)、17E (others, 3.3 mg) を得た。17D を化合物 **17** を主に含むフラクションとして得た。

#### 17C の分画

17C を HPLC (40%MeOH) で COSMOSIL  $\Pi$ -NAP ( $\phi$  4.6×150 mm) を用いて分画し、Fr. 29A( $t_R$  16.0 min, 0.3 mg)、Fr. 29B ( $t_R$  18.9 min, 0.7 mg, **20**) を得た。

#### Fr. 10B の分画

10B を 60% MeOH を移動相として COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) を用いて HPLC を行い Fr. 20A ( $t_R$  13.6 min, 3.6 mg)、Fr. 20B ( $t_R$  18.7 min, 0.3 mg)、Fr. 20C ( $t_R$  20.5 min, 0.6 mg)、Fr.20D ( $t_R$  24.8 min, 0.6 mg)、Fr.20E ( $t_R$  others, 6.2 mg) Fr. 20A を化合物 **19** とした。また、Fr. 20C は化合物 **15** を含むフラクションであった。

#### Fr. 14B の分画

Fr. 14B (8.1 mg) を 50%MeOH で COSMOSIL  $\Pi$ -NAP (4.6×150 mm) で分画し、21A ( $t_R$  6.6 min, 0.9 mg)、21B ( $t_R$  13.0 min, 0 mg)、21C ( $t_R$  14.8 min, 0.1 mg)、21D ( $t_R$  16.2 min, 0.7 mg)、21E (others, 3.9 mg) を得た。Fr. 21D は化合物 **21** を含むフラクションであった。

#### 2 回目の 2D の分画

2D (3.76 g) を silica gel カラム ( $\phi$  30 × 170 mm) で分画を行い、CHCl<sub>3</sub>:EtOAc:MeOH=9:1:0、5:1:0 溶出画分として 22A (15.9 mg)、1:1:0 溶出画分として 22B (45.4 mg)、1:5:0、0:1:0 溶出画分として 22C (620 mg)、0:1:0 溶出画分として 22D (234 mg)、0:1:1 溶出画分として 22E (214 mg)、0:0:1 溶出画分として 22F (2.26 g)、0:0:1+0.1%TFA 溶出画分として 22G (268 mg) を得た。

#### Fr. 22C の分画

Fr. 22C の一部 (277 mg) を COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) カラムを用いて HPLC (60%MeOH) で分画し 24A ( $t_R$  8.2 min, 5.5 mg)、24B ( $t_R$  8.6 min, 6.3 mg)、24C ( $t_R$  9.0-10.0 min, 13.4 mg)、24D ( $t_R$  10.3 min, 14.6 mg)、24E ( $t_R$  12.3 min, 17.7 mg)、24F ( $t_R$  13.6 min, 51.8 mg)、24G ( $t_R$  15.4 min, 17.2 mg)、24H ( $t_R$  16.9 min, 26.5 mg)、24I (19.1, 7.9 mg) 24J ( $t_R$  23.7 min, 3.0 mg) 24K ( $t_R$  28.6 min, 2.4 mg) 24L (others, 92.5 mg) を得た。

#### Fr. 24A の分画

Fr. 24A (5.5 mg) を COSMOSIL  $\Pi$ -NAP ( $\phi$  4.6×150 mm) カラムを用いて HPLC (47.5%MeOH) で分画し Fr. 25A-25H を得た。 $t_R$  及び秤取量は 25A ( $t_R$  7.3 min, 0.9 mg)、25B ( $t_R$  8.3 min, 0.3 mg)、25C ( $t_R$  9.3 min, 0.3 mg)、25D ( $t_R$  10.8 min, 0.1 mg)、25E ( $t_R$  16.2 min, 0.4 mg)、25F ( $t_R$  18.2 min, 0.7 mg, **17**)、25G ( $t_R$  23.6 min, 0.1 mg)、25H (others, 3.2 mg) を得た。

#### Fr. 24C の分画

24C (13.4 mg) を COSMOSIL  $\Pi$ -NAP ( $\phi$  4.6×150 mm) カラムを用いて HPLC (40%MeOH) で分画し 28A ( $t_R$  13.3 min, 1.2 mg)、28B ( $t_R$  15.3 min, 1.8 mg)、28C ( $t_R$  18.6 min, 0.3 mg)、28D ( $t_R$  26.0 min, 0.8 mg)、28E ( $t_R$  32.2 min, 2.6 mg)、28F (others, 6.8 mg) を得た。

#### Fr. 28E の分画

28E (2.6 mg) について、COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS- II ( $\phi$  4.6×150 mm) カラムを用いて HPLC (30%CH<sub>3</sub>CN) で分画し 30A ( $t_R$  5.5 min, 1.3 mg)、30B (others, 0.9 mg) を得た。

#### Fr. 30A の分画

30A (1.3 mg) を Inertsil DIOL カラム ( $\phi$  4.6×250 mm) を用いて HPLC (hexane/イソプロパノール=8/2) で分画し 31A ( $t_R$  3.0 min, 0.3 mg)、31B ( $t_R$  4.2 min, 1.3 mg)、31C (others, 0.6 mg) を得た。

#### Fr. 22A、Fr. 22B の分画

Fr. 22A (15.9 mg)、Fr. 22B (45.4 mg) をあわせ、COSMOSIL Cholester ( $\phi$  10×250 mm) を用いて HPLC (60%MeOH) で分画し Fr. 26A-26H を得た。それぞれの  $t_R$  及び秤取量は 26A ( $t_R$  11.6 min, 12.1 mg)、26B ( $t_R$  12.2 min, 5.0 mg)、26C ( $t_R$  13.7 min, 1.4 mg)、26D ( $t_R$  16.2 min, 1.5 mg)、26E ( $t_R$  16.6 min, 5.2 mg)、26F ( $t_R$  19.3 min, 3.6 mg)、26G ( $t_R$  25.0 min, 2.3 mg)、26H ( $t_R$  29.2 min, 0.3 mg)、26I (others, 21.9 mg) であった。

#### Fr. 26E の分画

Fr. 26E (5.2 mg) を COSMOSIL  $\Pi$ -NAP ( $\phi$  4.6×150 mm) を用いて HPLC (45%MeOH) で分画し 27A ( $t_R$  22.8 min, 0.2 mg)、27B ( $t_R$  23.5 min, 2.1 mg, **16**)、27C ( $t_R$  27.6 min, 1.1 mg, **15**)、27D ( $t_R$  41.9 min, 0.4 mg)、27E (others, 1.5 mg)

化合物の単離には至らなかったが分画を行ったフラクションが存在するため、次ページに分画チャートを示す (Figure 2. 3. 4. 1)。

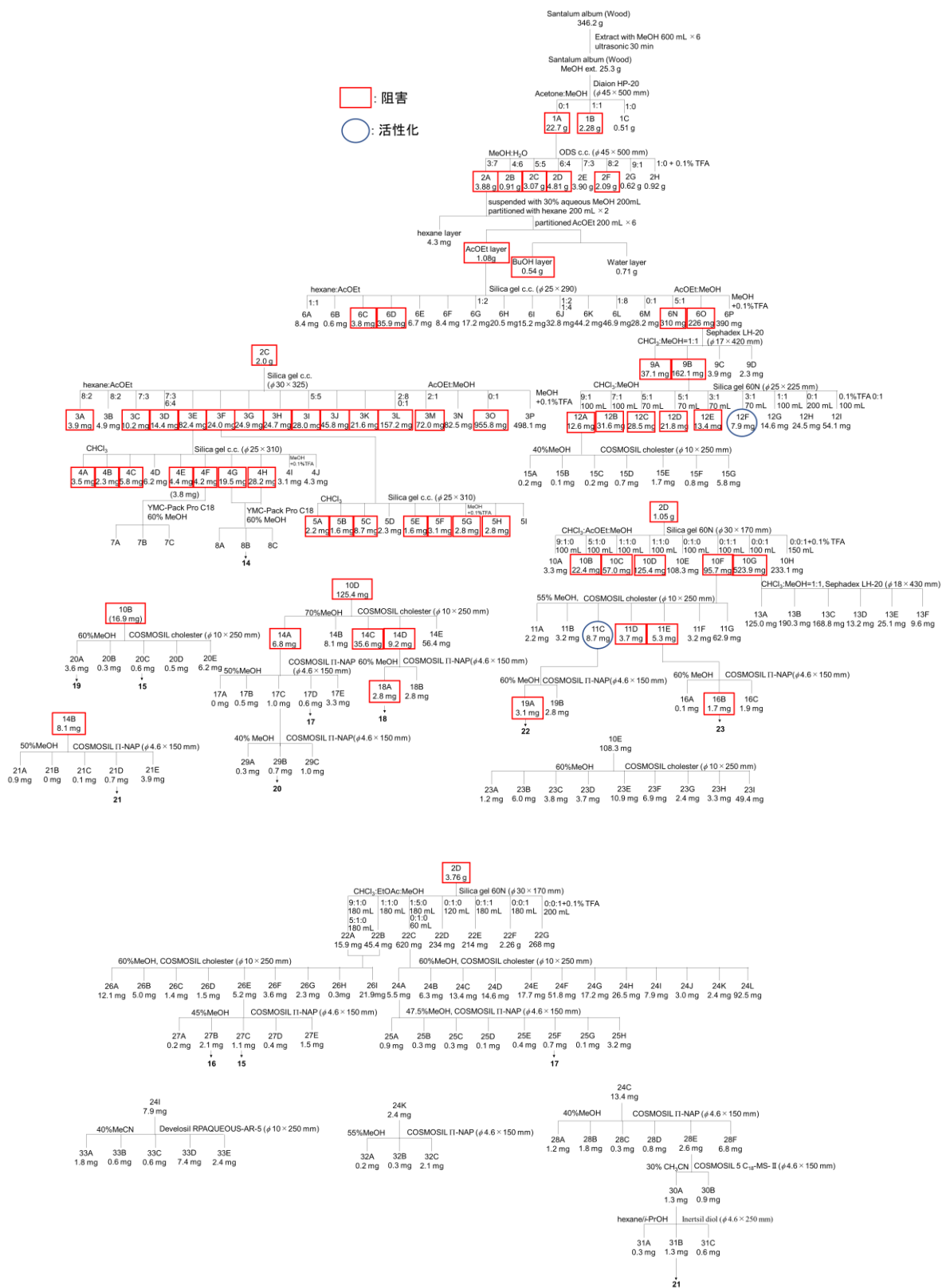


Figure 2. 3. 4. 1 *Santalum album* の分画

### 【3 単離した化合物の物理化学的性状】

#### 3.1 単離した化合物の物理化学的性状

stigma-5-en-3-*O*- $\beta$ -glucoside (**1**)

C<sub>35</sub>H<sub>60</sub>O<sub>6</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 599 [M+Na]<sup>+</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> -54.0 (*c* 0.35, pyridine)

化合物 (**2**)

C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>

無色非晶質

HR-ESIMS *m/z* 413.1192 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>O<sub>8</sub>Na 413.1212)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> +14.5 (*c* 0.1, MeOH)

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 276 (3.22), 231 (3.88) nm

IR (ATR): 3410, 1615, 1518, 1462, 1113 cm<sup>-1</sup>

CD  $\lambda$  (MeOH) ( $\Delta\epsilon$ ): 240 (0.6), 222 (-2.5), 208 (8.6) nm

3',3''-bisdemethylpinoresinol (**3**)

C<sub>18</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub>

褐色非晶質

ESI-MS *m/z* 661 [2M+H]<sup>+</sup>, 659[2M-H]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>21</sup> -4.6 (*c* 0.2, MeOH)

isoamericanin A (**4**)

C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>

褐色非晶質

ESI-MS *m/z* 329 [M+H]<sup>+</sup>, 327 [M-H]<sup>-</sup>, 655 [2M-H]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> +1.3 (*c* 0.47, MeOH)

naringenin 7-*O*- glucoside (**5**)

C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 435 [M+H]<sup>+</sup>, 433 [M-H]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> -37.6 (*c* 0.14, MeOH)

naringenin 7-*O*- (3''-*p*-coumaroylglucoside) (**6**)

C<sub>30</sub>H<sub>28</sub>O<sub>12</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 581 [M+H]<sup>+</sup>, 579 [M-H]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>22</sup> +18.4 (c 0.23, MeOH)

naringenin 7-*O*- (3'',6''-di-*p*-coumaroylglucoside) (**7**)

C<sub>39</sub>H<sub>34</sub>O<sub>14</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 727 [M+H]<sup>+</sup>, 725 [M-H]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>27</sup> -14.1 (c 0.26, MeOH)

*N*-demethylricinine (**8**)

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 151 [M+H]<sup>+</sup>, 149 [M-H]<sup>-</sup>

chebloside II (**9**)

C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>11</sub>

茶色非晶質

ESI MS *m/z* 689 [M+Na]<sup>+</sup>, 711 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> +14.3 (c 0.75, MeOH)

arjunglucoside II (**10**)

C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>

白色非晶質

ESI MS *m/z* 673 [M+Na]<sup>+</sup>, 695 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> +30.2 (c 0.31, MeOH)

quadranoside IV (**11**)

C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>10</sub>

茶色非晶質

ESI MS *m/z* 673 [M+Na]<sup>+</sup>, 695 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[α]<sub>D</sub><sup>21</sup> +122.3 (c 0.137, MeOH)

2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxylurs-12,20(30)-dien-28-oic acid  $\beta$ -D-glucopyranoside (**12**)

C<sub>36</sub>H<sub>56</sub>O<sub>10</sub>

白色非晶質

ESI MS  $m/z$  649 [M+H]<sup>+</sup>, 698 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22</sup> +128.3 (*c* 0.06, MeOH)

quadranside II (**13**)

C<sub>36</sub>H<sub>58</sub>O<sub>11</sub>

茶色非晶質

ESI MS  $m/z$  667 [M+H]<sup>+</sup>, 711 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>23</sup> +52.7 (*c* 0.16, MeOH)

2-*O*-methylmansonone Q (**15**)

白色非晶質

HRESIMS  $m/z$  301.1388 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Na, 301.1416)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>29</sup> +36.4 (*c* 0.06, MeOH)

IR (ATR) : 3464, 1709 cm<sup>-1</sup>

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 277 (3.39) nm

CD  $\lambda$  (MeOH) ( $\Delta\epsilon$ ): 229 (-12.2), 278 (9.4) nm

化合物 (**16**)

無色非晶質

HRESIMS  $m/z$  263.1605 [M-H]<sup>-</sup> (calcd for C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>O<sub>3</sub>, 263.1647)

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>29</sup> +17.0 (*c* 0.1, MeOH)

IR (ATR): 3373, 2952 cm<sup>-1</sup>

UV  $\lambda_{\max}$  (MeOH) (log  $\epsilon$ ): 279 (3.15) nm

CD  $\lambda$  (MeOH) ( $\Delta\epsilon$ ): 236 (-2.5), 279 (-2.4) nm

mansonone I (**17**)

赤色非晶質

C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

ESI-MS  $m/z$  259 [M+H]<sup>+</sup>, 539 [2M+Na]<sup>+</sup>, 303 [M+HCOO]<sup>-</sup>

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>27</sup> -85.0 (*c* 0.02, MeOH)

mansonone H (**18**)

C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

橙色非晶質

ESI-MS *m/z* 259 [M+H]<sup>+</sup>, 539 [2M+Na]<sup>+</sup>, 257 [M-H]<sup>-</sup>, 515 [2M-H]<sup>-</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> +300 (*c* 1.0, DMSO)

mansonone N (**19**)

C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>

無色非晶質

ESI-MS *m/z* 301 [M+Na]<sup>+</sup>, 579 [2M+Na]<sup>+</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> +68.6 (*c* 0.2, CHCl<sub>3</sub>)

6-hydroxy-5-[2-hydroxy-1-methylethyl]-3,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-one (**20**)

C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>O<sub>4</sub>

無色非晶質

ESI-MS *m/z* 249 [M+H]<sup>+</sup>, 497 [2M+H]<sup>+</sup>, 247 [M-H]<sup>-</sup>, 495 [2M-H]<sup>-</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -22.1 (*c* 0.1, MeOH)

mansorin III (**21**)

C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

白色非晶質

ESI-MS *m/z* 247 [M+H]<sup>+</sup>, 493 [2M+H]<sup>+</sup>, 291 [M+HCOO]<sup>-</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>25</sup> -18.0 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

5-*O*-demethylbilagrewin (**22**)

C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>8</sub>

黃色非晶質

ESI-MS *m/z* 389 [M+H]<sup>+</sup>, 799 [2M+Na]<sup>+</sup>, 387 [M-H]<sup>-</sup>, 775 [2M-H]<sup>-</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>23</sup> -5.9 (*c* 0.4, MeOH)

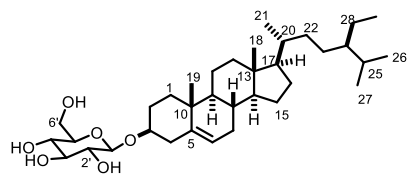
mansonin (**23**)

C<sub>31</sub>H<sub>46</sub>O<sub>10</sub>

無色非晶質

ESI-MS *m/z* 579 [M+H]<sup>+</sup>, 601 [M+Na]<sup>+</sup>, 623 [M+HCOO]<sup>-</sup>  
[α]<sub>D</sub><sup>26</sup> +2.3 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>)

### 3.2 化合物の NMR データ



stigma-5-en-3-*O*- $\beta$ -glucoside (**1**)

position	<b>1</b> *			stigma-5-en-3- <i>O</i> - $\beta$ -glucoside**[1]		
	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	<i>J</i> Hz	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	<i>J</i> Hz
1	36.9	0.98	m	36.8	0.98	m
		1.74	m		1.75	m
2	29.3	1.87	m	29.2	1.88	m
		1.49	m		1.47	m
3	77.0	3.42	※	76.9	3.45	m
4	38.4	2.32	ddd 12.1, 4.1, 1.6	38.3	2.35	ddd 13.0, 4.5, 1.5
		2.08	dt 12.1, 1.8		2.12	dt 13.0, 1.8
5	140.5			140.2		
6	121.3	5.28	d 4.7	121.1	5.31	d 3.7
7	31.5	1.43	m	31.3	1.39	m
		1.91	dd 12.6, 3.0		1.94	dd 13.0, 3.7
8	31.5	1.35	dd 9.2, 4.3	31.4	1.37	dd 10.0, 4.5
9	49.7	0.86	m	49.6	0.85	m
10	36.3			36.2		
11	20.7	1.45	m	20.5	1.41	m
		1.46	m		1.47	m
12	39.6	1.90	m	39.2	1.90	m
		1.09	m		1.13	m
13	41.9			41.8		
14	56.3	0.94	m	56.1	0.96	m
15	23.9	0.99	m	23.8	1.03	m
		1.47	m		1.55	m
16	27.9	1.18	m	27.7	1.79	m
		1.75			1.81	m
17	55.5	1.05	t 10.4	55.4	1.07	dd 7.5, 7.6
18	11.8	0.61	s	11.6	0.64	s
19	19.2	0.91	s	19.0	0.94	s
20	35.6	1.36	m	35.4	1.33	m
21	18.7	0.85	d 6.6	18.1	0.89	d 6.5
22	33.4	1.27	m	33.3	1.25	m
		1.10	m		0.99	m
23	25.5	1.03	m	25.5	1.13	m
					1.13	m
24	45.2	0.87	t 6.6	45.1	0.92	t 7.5
25	28.8	1.58	m	28.7	1.61	m
26	19.0	0.76	d 5.5	18.6	0.78	d 7.0
27	19.8	0.75	d 6.9	19.6	0.80	d 7.0
28	22.7	1.15	m	22.6	1.23	m
		1.20	m		1.28	m
29	11.9	0.77	t 7.2	11.7	0.81	t 7.0
1'	100.8	4.17	d 8.0	100.8	4.20	d 8.0
2'	73.5	2.85	t 8.4	73.4	2.89	dt 8.0, 4.5
		4.85	s		4.83	d 4.5
3'	76.8	3.08	t 8.8	76.7	3.11	dt 8.0, 4.5
					4.84	d 4.5
4'	70.2	2.97	t 9.1	70.1	3.00	dt 8.0, 4.5
					4.82	d 4.5
5'	76.8	3.03	ddd 9.6, 6.0, 1.7	76.5	3.05	dd 8.0, 4.5
6'	61.2	3.60	dd 11.5, 1.7	61.1	3.64	ddd 11.0, 5.5, 4.5
		3.37	※		3.40	dd 11.0, 5.5

※水のピークと重なり確認できなかったため文献値<sup>[1]</sup>を記載する。

\*measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H : 600 MHz, <sup>13</sup>C 150 MHz, \*\*measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz

[1] Faizi, S.; Ali, M.; Saleem, R.; Irfanullah; Bibi, S. *Magn. Reson. Chem.* **2001**, *39*, 399-405.

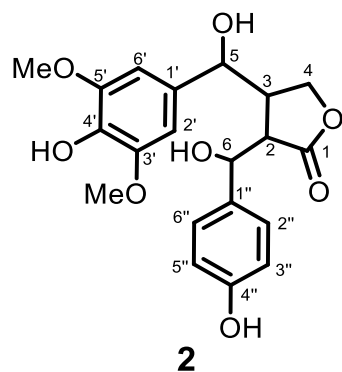
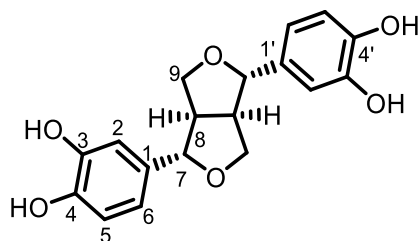


Table 4-3-1 化合物 2 の NMR

2			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	178.8		
2	49.4	2.81	t 3.4
3	43.4	2.78	m
4	71.2	4.31	t 8.1
		4.22	dd 8.1, 3.4
5	75.0	4.61	d 4.1
6	73.1	5.09	m
1'	133.5		
2'	104.1	6.35	s
3'	148.3		
4'	135.8		
5'	148.3		
6'	104.1	6.35	s
1''	134.0		
2''	127.4	7.00	d 9.0
3''	115.5	6.64	d 9.0
4''	157.1		
5''	115.5	6.64	d 9.0
6''	127.4	7.00	d 9.0
3'-OMe	56.4	3.73	s
5'-OMe	56.4	3.73	s

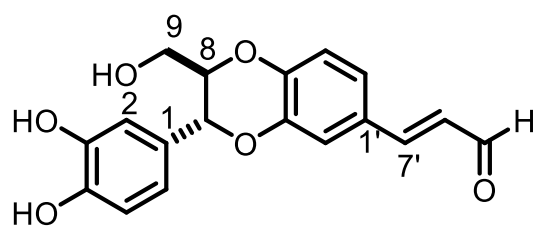
measured in acetone- $d_6$ ,  $^1H$ : 600 MHz,  $^{13}C$ : 150 MHz



3',3''-bisdemethylpinoresinol (**3**)

position	<b>3</b>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	133.9		
2	114.5	6.79	d 1.7
3	146.5		
4	146.1		
5	116.2	6.73	d 8.3
6	118.9	6.68	d 8.3, 1.7
7	87.5	4.62	d 4.1
8	55.3	3.08	m
9	72.6	3.79	dd 3.4, 9.0
		4.19	dd 6.9 9.0
1'	133.9		
2'	114.5	6.79	d 1.7
3'	146.5		
4'	146.1		
5'	116.2	6.73	d 8.3
6'	118.9	6.68	d 8.3, 1.7
7'	87.5	4.62	d 4.1
8'	55.3	3.08	m
9'	72.6	3.79	dd 3.4, 9.0
		4.19	dd 6.9, 9.0

measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz



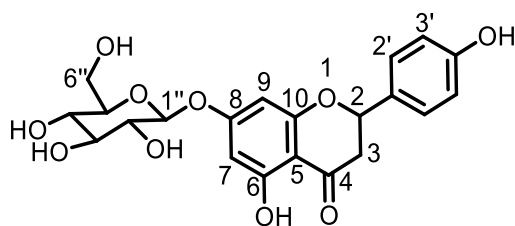
isoamericanin A (**4**)

position	<b>4</b> *			isoamericanin A**[2]		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	129.1			129.2		
2	115.6	6.86	d 1.7	115.6	6.87	d 2.5
3	146.7			146.7		
4	147.3			147.3		
5	116.4	6.81	d 8.3	116.4	6.81	d 8.5
6	120.4	6.79	dd 8.3 1.7	120.5	6.78	dd 8.5 2.5
7	77.6	※		77.6	4.85	d 8.0
8	80.5	4.08	m	80.5	4.08	ddd 8.0 4.5 3
9	61.9	3.49	dd 12.2 5.2	62.0	3.50	dd 12.5 4.5
		3.70	dd 12.2 2.1		3.71	dd 12.5 3.0
1'	129.1			129.2		
2'	118.1	7.26	d 1.7	118.2	7.25	d 2.5
3'	145.7			145.8		
4'	148.2			148.2		
5'	118.6	7.03	d 8.3	118.6	7.03	d 8.5
6'	124.0	7.23	dd 8.3 1.7	124.0	7.23	dd 8.5 2.5
7'	155.3	7.57	d 15.5	155.2	7.57	d 16.0
8'	127.8	6.64	dd 15.5 8.1	127.9	6.64	dd 16.0 8.0
9'	196.0	9.58	d 8.1	196.0	9.58	d 8.0

※H-7 は水のピークと同じ位置にあり、観察できなかった。

\*measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz, \*\*measured in CD<sub>3</sub>OD,360, <sup>1</sup>H: 90 MHz

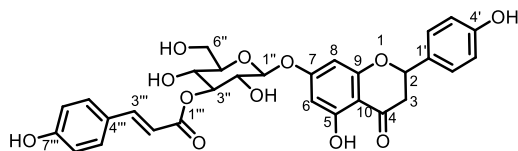
[2] Waibel, R.; Benirschke, G.; Benirschke, M.; Achenbach, H. *Phytochemistry* **2003**, 62, 805-811.



naringenin 7-O- glucoside (**5**)

<b>5</b>			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
2	80.7	5.38	dd 13.1, 2.8
3	44.2	3.17	dd 17.2, 13.1
		2.74	dd 17.2, 2.8
4	198.6		
5	159.1		
6	98.0	6.18	d 2.1
7	167.0		
8	96.9	6.21	d 2.1
9	165.0		
10	104.9		
1'	130.9		
2'	129.1	7.32	d 9.0
3'	116.3	6.81	d 9.0
4'	164.7		
5'	116.3	7.32	d 9.0
6'	129.1	6.81	d 9.0
1''	101.3	4.96	d 6.9
2''	74.6	3.44	m
3''	77.8	3.44	m
4''	71.1	3.38	m
5''	78.3	3.44	m
6''	62.3	3.87	dd 12.4, 2.1
		3.67	dd 12.4, 5.5

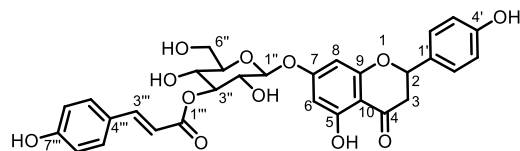
measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C : 150 MHz



naringenin 7-*O*-(3''-*p*-coumaroylglucoside) (**6**)

<b>6</b>			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
2	80.0	5.50	dd 12.7, 3.1
3	43.4	2.78	dd 17.2, 3.1
		3.25	dd 17.2, 12.7
4	198.0		
5	164.7		
6	97.5	6.16	d 2.4
7	166.4		
8	96.4	6.19	d 2.4
9	164.1		
10	104.5		
1'	130.5		
2', 6'	129.1	7.40	d 9.0
3', 5'	116.1	6.90	d 9.0
4'	158.7		
1''	100.7	5.25	d 7.6
2''	72.7	3.70	m
3''	78.3	5.21	t 9.0
4''	77.7	3.75	m
5''	69.2	3.75	m
6''	62.0	3.75	m
1'''	167.3		
2'''	116.1	6.38	d 16.2
3'''	145.4	7.64	d 16.2
4'''	127.0		
5''', 9'''	130.9	7.56	d 8.6
6''', 8'''	116.7	6.90	d 8.6
7'''	160.6		
5-OH		12.09	s
4'-OH		8.69	s
2''-OH		4.88	s
4''-OH		4.61	s
7'''-OH		8.69	s

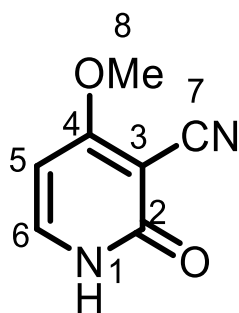
measured in acetone- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 600 MHz,  $^{13}\text{C}$  : 150 MHz



naringenin 7-*O*-(3'',6''-di-*p*-coumaroylglucoside) (**7**)

<b>7</b>			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
2	80.0	5.47	dd 12.6, 2.9
3	43.4	2.76	dd 17.2, 2.9
		3.22	dd 17.2, 12.6
4	198.0		
5	164.8		
6	97.5	6.25	d 2.1
7	166.3		
8	96.5	6.18	d 2.1
9	164.0		
10	104.6		
1'	130.5		
2', 6'	129.0	7.37	d 8.3
3', 5'	116.2	6.89	t 8.3
4'	158.8		
1''	100.7	5.32	d 7.6
2''	72.7	3.76	m
3''	78.1	5.26	t 9.3
4''	75.1	3.76	m
5''	69.6	4.09	ddd 9.6, 6.4, 2.1
6''	63.8	4.36	dd 11.9, 6.4
		4.58	dd 11.9, 2.1
1'''	167.4		
2'''	115.8	6.38	d 16.2
3'''	145.6	7.65	d 16.2
4'''	127.0		
5''', 9'''	130.9	7.57	d 8.3
6''', 8'''	116.7	6.89	d 8.3
7'''	160.6		
1''''	167.3		
2''''	115.2	6.39	d 15.8
3''''	145.8	7.61	d 15.8
4''''	126.9		
5''', 9''''	131.0	7.52	d 8.6
6''', 8''''	116.7	6.89	d 8.6
7''''	160.7		
5-OH		12.12	s
4'-OH		-	
2''-OH		5.00	s
4''-OH		4.85	s
7'''-OH		-	
7''''-OH		-	

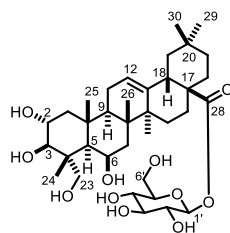
measured in acetone- $d_6$ ,  $^1H$ : 600 MHz,  $^{13}C$  : 150 MHz



*N*-demethylricinine (**8**)

	<b>8</b>		
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1		-	-
2	161.2	-	-
3	86.3	-	-
4	173.6	-	-
5	93.8	6.31	d 7.6
6	142.4	7.77	d 7.6
7	114.7	-	-
8	57.7	3.95	s

measured in DMSO-*d*<sub>6</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz

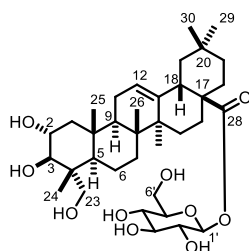


chebloside II (**9**)

position	<b>9</b>			chebloside II <sup>[3]</sup>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	50.2			50.1		
2	69.0	4.44	m	69.0	4.43	m
3	78.3	4.36	d 8.3	78.2	4.25	d 9.0
4	44.5			44.5		
5	48.9			48.7		
6	67.6	5.07	brs	67.5	5.10	brs
7	41.1			41.0		
8	39.5			39.4		
9	48.8			48.8		
10	38.2			38.1		
11	24.0			24.0		
12	123.2			124.2		
13	143.5			143.5		
14	42.8			42.7		
15	28.2			28.2		
16	23.5			23.4		
17	47.0			47.0		
18	41.8	3.20	dd 13.8, 4.1	41.8	3.17	dd 13.8, 3.7
19	46.2			46.2		
20	30.7			30.7		
21	34.0			34.0		
22	32.5			32.4		
23	66.2	4.05	d 10.3	66.1	4.04	d 10.8
		4.45	※		4.40	d 10.8
24	16.0	1.75	s	15.9	1.74	s
25	18.8	1.79	s	18.8	1.78	s
26	19.1	1.72	s	19.0	1.71	s
27	26.1	1.17	s	26.0	1.16	s
28	176.4	0.85	s	176.4	0.86	s
29	33.1	0.84	s	33.0	0.85	s
30	23.6			23.6		
1'	95.8	6.28	d 8.7		6.27	d 9.0
2'	74.1	4.18	d 8.7		4.20	m
3'	78.7	4.23	d 8.7		4.28	m
4'	71.1	4.34	d 8.7		4.30	m
5'	79.2	3.98	ddd 2.4, 4.1, 8.7		4.00	m
6'	62.1	4.46	※		4.40	m
		4.43	※		4.45	m

measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz

[3] Bisoli, E.; Garcez, S. W.; Hamerski, L.; Tieppo, C.; Garcez, R. F.; *Molecules*, **2008**, *13*, 2717-2728.

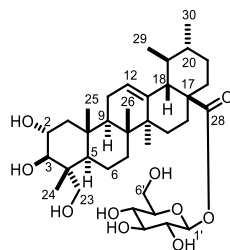


arjunglucoside II (**10**)

position	<b>10</b>			arjunglucoside II <sup>[3]</sup>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	47.8			47.6		
2	68.9	4.24	m	68.8	4.25	m
3	78.2	4.27	m	78.1	4.28	m
4	43.6			43.5		
5	48.2			48.0		
6	18.5			18.4		
7	32.8			32.7		
8	40.0			39.9		
9	47.9			47.7		
10	38.4			38.3		
11	24.0			23.8		
12	122.8	5.40	brs	122.7	5.43	brs
13	144.2			144.0		
14	42.2			42.1		
15	28.2			28.1		
16	23.4			23.2		
17	47.0			46.9		
18	41.7	3.17	dd 13.4, 3.1	41.6	3.19	dd 13.5, 4.2
19	46.1			46.0		
20	30.7			30.6		
21	34.0			33.8		
22	32.5			32.4		
23	66.4	3.70	d 10.3	66.3	3.72	d 10.6
		overlapped			4.22	d 10.6
24	14.4	1.06	s	14.2	1.07	s
25	17.4	1.08	s	17.5	1.10	s
26	17.6	1.14	s	17.6	1.16	s
27	26.1	1.14	s	25.9	1.16	s
28	176.4			176.4		
29	33.1	0.85	s	32.9	0.90	s
30	23.6	0.85	s	23.5	0.88	s
1'	95.8	6.33	d 8.3	95.6	6.33	d 9.0
2'	74.1	4.18-4.49	m	74.0	4.22-4.46	m
3'	78.9	4.18-4.49	m	78.8	4.22-4.46	m
4'	71.1	4.18-4.49	m	71.0	4.22-4.46	m
5'	79.4	4.20	m	79.2	4.21	m
6'	62.2	4.18-4.49	m	62.1	4.22-4.46	m

measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz

[3] Bisoli, E.; Garcez, S. W.; Hamerski, L.; Tieppo, C.; Garcez, R. F.; *Molecules*, **2008**, *13*, 2717-2728.

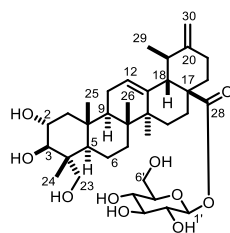


quadranside IV (**11**)

position	<b>11</b>			quadranside IV <sup>[3]</sup>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	48.1			47.9		
2	68.9	4.24	m	68.8	4.25	m
3	78.2	4.28	m	78.1	4.28	m
4	43.6			43.5		
5	48.3			48.1		
6	18.5			18.4		
7	33.2			33		
8	40.2			40.1		
9	48.0			47.8		
10	38.3			38.2		
11	23.8			23.7		
12	126.1	5.42	brs	125.9	5.43	brs
13	138.5			138.3		
14	42.5			42.4		
15	28.6			28.5		
16	24.6			24.5		
17	47.9			47.7		
18	53.3	2.49	d 11.0	53.2	2.52	d 11.2
19	39.3			39.2		
20	39.1			39		
21	30.8			30.7		
22	36.8			36.6		
23	66.5	3.70	dd 10.3, 4.1	66.3	3.72	d 10.6
		overlapped			4.22	d 10.6
24	14.4	1.05	s	14.2	1.07	s
25	17.6	1.08	s	17.3	1.11	s
26	17.8	1.18	s	17.5	1.2	s
27	23.7	1.09	s	23.6	1.1	s
28	176.2			176.1		
29	17.3	0.90	d 6.2	17.2	0.92	d 6.0
30	21.2	0.85	brs	21.1	0.88	brs
1'	95.7	6.26	d 8.3	95.6	6.27	d 9.0
2'	74.1	4.17-4.47	m	73.9	4.22-4.46	m
3'	78.9	4.17-4.47	m	78.8	4.22-4.46	m
4'	71.2	4.17-4.47	m	71.1	4.22-4.46	m
5'	79.2	4.20	m	79.1	4.21	m
6'	62.3	4.17-4.47	m	62.1	4.22-4.46	m

measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz

[3] Bisoli, E.; Garcez, S. W.; Hamerski, L.; Tieppo, C.; Garcez, R. F.; *Molecules*, **2008**, *13*, 2717-2728.

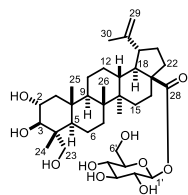


2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,23-trihydroxylurs-12,20(30)-dien-28-oic acid  $\beta$ -D-glucopyranoside (**12**)

position	12*			文献値**[4]		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	41.0	1.11-1.16	m	39.6	1.04-1.07	m
		2.18-2.23	m		2.11-2.13	m
2	69.7	3.64-3.71	m	68.3	3.56-3.62	m
3	78.2	3.38	d 8.3	76.8	3.31	d 8.3
4	44.1	-		42.7	-	
5	48.2	1.94-1.99	m	46.8	1.84-1.89	m
6	19.1	1.42-1.47	m	17.7	1.32-1.37	m
		1.60-1.68	m		1.50-1.58	m
7	33.2	2.18-2.23	m	31.8	2.13-2.16	m
		2.27-2.30	m		2.21-2.25	m
8	39.7	-		38.3	-	
9	overlapped	1.60-1.68	m	48.1	1.50-1.58	m
10	48.1	-		46.7	-	
11	24.5	1.60-1.68	m	23.1	1.50-1.58	m
		1.94-1.99	m		1.84-1.89	m
12	127.3	5.28	t 3.4	125.9	5.19	brs
13	139.1	-		137.6	-	
14	43.5	-		42.1	-	
15	29.2	1.94-1.99	m	27.8	1.84-1.89	m
		1.25-1.35	m		1.18-1.24	m
16	25.3	1.82-1.91	m	23.8	1.74-1.81	m
		1.94-1.99	m		1.84-1.89	m
17	49.6	-		48.2	-	
18	56.4	2.39-2.4	m	55.0	2.30	d 11.2
19	39.0	2.24-2.30	m	37.6	2.16-2.21	m
20	154.3	-		152.9	-	
21	33.6	1.60-1.68	m	32.2	1.50-1.58	m
		1.94-1.99	m		1.84-1.89	m
22	38.5	1.60-1.68	m	37.1	1.50-1.58	m
		1.82-1.91	m		1.74-1.81	m
23	66.3	3.26	d 11.0	64.9	3.17	d 11.0
		3.49	d 11.0		3.41	d 11.0
24	13.9	0.69	s	12.5	0.60	s
25	17.8	1.04	s	16.4	0.95	s
26	17.9	0.83	s	16.5	0.74	s
27	24.0	1.18	s	22.5	1.09	s
28	177.2	-		175.8	-	
29	16.7	1.01	d 6.2	15.3	0.92	d 6.3
30	105.4	4.60	brs	104.0	4.54	brs
1'	95.8	5.34	d 8.3	94.3	5.25	d 8.1
2'	73.9	3.29-3.40	m	72.5	3.19-3.30	m
3'	78.6	3.29-3.40	m	77.2	3.19-3.30	m
4'	71.1	3.29-3.40	m	69.7	3.19-3.30	m
5'	78.3	3.29-3.40	m	76.9	3.19-3.30	m
6'	62.4	3.64-3.72	m	61.0	3.56-3.62	m
		3.79	dd 11.7, 2.0		3.68	dd 12.1, 2.0

\*measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz, \*\*measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz

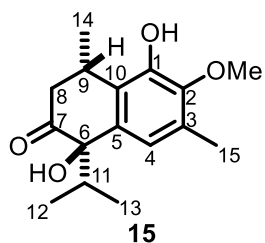
[4] Shu, C.J.; Liu, Q. J.; Chou, X. G.; Wang, T. Z. *Chin. Chem. Lett.*, **2012**, 23, 827-830.



quadranoside II (**13**)

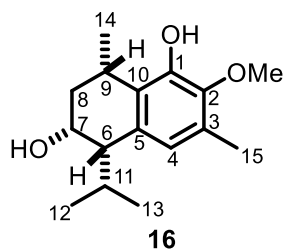
<b>13</b>			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	50.4	1.41	m
		2.41	dd 12.4, 4.1
2	69.3	4.42	d 10.3
3	78.3	4.25	m
4	44.5	1.89	m
5	49.1	5.05	brs
6	67.9	1.88	m
7	42.1		
8	43.0	1.72	m
9	51.8		
10	38.4		
11	21.4	1.65	m
		1.82	m
12	26.2	1.15	m
		1.91	m
13	37.5	2.83	td 12.2, 3.1
14	40.7		
15	30.2	1.23	m
		2.17	m
16	32.2	1.46	m
		2.61	m
17	56.9		
18	49.9	1.74	m
19	47.4	3.40	td 11.0, 4.7
20	150.9		
21	30.8	1.41	m
		2.10	m
22	36.8	2.16	m
		1.48	m
23	66.1	4.05	d 10.3
		4.40	d 10.3
24	15.7	1.70	s
25	19.4	1.71	s
26	17.0	1.78	s
27	15.1	0.93	s
28	174.9		
29	110.0	4.72	brs
		4.85	brs
30	19.7	1.63	s
1'	95.4	6.38	d 8.7
2'	74.3	4.15	t 8.7
3'	78.8	4.27	t 8.7
4'	71.1	4.35	t 8.7
5'	79.4	4.01	m
6'	62.1	4.40	m
		4.43	m

measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz



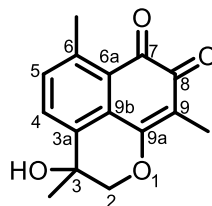
<b>15</b>			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	
position	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1	145.5		
2	144.3		
3	128.5		
4	120.2	6.89	s
5	136.3		
6	80.5		
7	212.5		
8	40.5	2.51	dd 17.2, 4.8
		3.05	dd 17.2, 10.3
9	29.4	3.60	m
10	123.4		
11	38.0	2.11	sept 6.9
12	16.7	0.86	d 6.9
13	15.7	0.94	d 6.9
14	23.4	1.51	d 7.6
15	16.0	2.30	s
1-OH		5.82	s
6-OH		3.90	s
2-OMe	60.7	3.79	s

measured in CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H : 600 MHz, <sup>13</sup>C : 150 MHz



<b>16</b>			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	
position	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1	146.2		
2	143.6		
3	126.9		
4	122.5	6.49	s
5	133.4		
6	49.8	2.69	t 4.1
7	67.7	4.33	m
8	36.1	2.16	ddd 13.8, 10.3, 7.2
		1.60	ddd 13.8, 4.1, 2.4
9	27.7	3.28	quin d 7.2, 2.4
10	125.9		
11	26.5	2.27	m
12	21.9	0.67	d 6.9
13	24.0	1.11	d 6.9
14	22.4	1.28	d 7.2
15	15.9	2.27	s
1-OH		5.76	s
2-OH			
6-OH			
7-OH		1.38	d 5.5
2-OMe	60.7	3.78	s

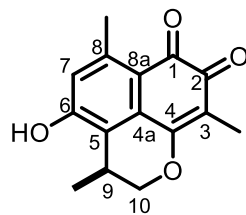
measured in CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H : 600 MHz, <sup>13</sup>C : 150 MHz



mansonone I (**17**)

17			
	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	
position	δ <sub>C</sub> (ppm)	δ <sub>H</sub> (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1	/	/	/
2	76.0	4.23	d 10.7
		4.29	d 10.7
3	67.1		
3a	140.9		
4	136.7	7.82	d 8.3
5	131.6	7.45	d 8.3
6	144.8		
6a	127.9		
7	182.9		
8	181.2		
9	117.4		
9a	164.9		
9b	127.1		
3-Me	25.9	1.55	s
6-Me	22.8	2.64	s
9-Me	7.79	1.92	s

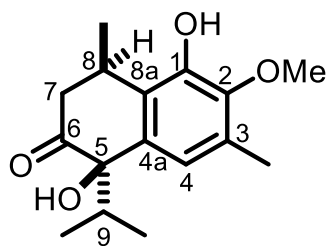
measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz,



mansonone H (**18**)

<b>18</b>			
position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	180.09		
2	179.45		
3	114.53		
4	161.62		
4a	125.40		
5	119.09		
6	159.72		
7	118.85	6.73	s
8	144.56		
8a	127.96		
9	25.54	3.16	m
10	71.63	4.41	d 11.0
		4.27	dd 11.0, 2.8
3-Me	7.88	1.80	s
8-Me	22.70	2.47	s
9-Me	16.95	1.20	d 6.9
6-OH		-	

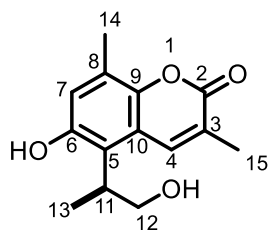
measured in DMSO- $d_6$ ,  $^1H$ : 600 MHz,  $^{13}C$ : 150 MHz



mansonone N (**19**)

	<b>19</b>	
position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)
4	6.86	s
7	2.50	dd 12.4, 1.8
	3.22	dd 12.4, 7.8
8	3.79	m
9	2.15	sept.
OH-1	5.87	s
OMe-2	3.79	s
CH <sub>3</sub> -3	2.30	s
OH-5	4.07	s
CH <sub>3</sub> -8	1.16	d 6.9
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -9	0.80	d 6.9
	1.00	d 6.9

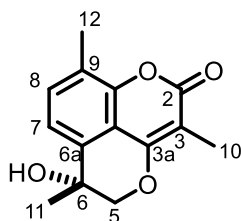
measured in CDCl<sub>3</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz



6-hydroxy-5-[2-hydroxy-1-methylethyl]-3,8-dimethyl-2H-1-benzopyran-2-one (**20**)

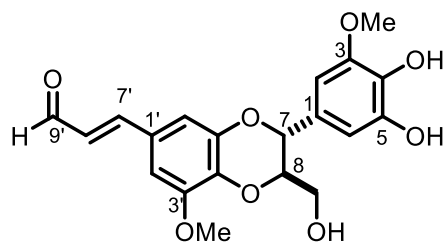
<b>20</b>		
position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)
4	8.08	d 1.0
7	6.85	s
11	3.51	m
12	3.96	dd 10.8, 6.9
	3.90	dd 10.8, 6.2
13	1.37	d 6.9
14	2.33	s
15	2.18	d 1.0

measured in CD<sub>3</sub>OD, <sup>1</sup>H: 600 MHz,



<b>21</b>		
position	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$J$ (Hz)
5	4.22	d 11.0
	4.27	d 11.0
7	7.33	d 7.6
8	7.4	d 7.6
10	2.09	s
11	1.63	s
12	2.45	s

measured in CDCl<sub>3</sub> H: 600 MHz,



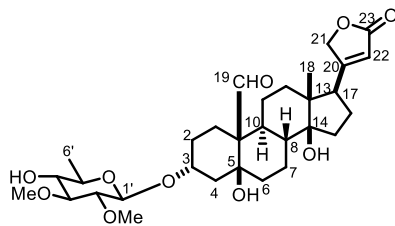
5-*O*-demethylbilagrewin (**22**)

position	<b>22</b>			5- <i>O</i> -demethylbilagrewin <sup>[5]</sup>		
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	<i>J</i> (Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
1	127.6			127.5		
2	103.6	6.99	d 1.7	103.6	7.04	d 1.8
3	149.5			149.6		
4	136.8			136.7		
5	148.1			148		
6	110.1	7.38	d 1.7	110.1	7.39	d 1.8
7	77.2	5.46	d 8.0	77.2	5.47	d 7.9
8	80.3	4.41	ddd 8.0, 3.4, 2.2	80.3	4.43	ddd 7.9, 3.7, 2.8
9	61.1	4.25	dd 12.7, 2.2	61.1	4.26	dd 12.7, 2.8
		3.96	dd 12.7, 3.4		3.99	dd 12.7, 3.7
1'	126.9			126.9		
2'	104.8	7.02	d 2.1	104.8	7.01	d 1.8
3'	149.6			150		
4'	137.4			137.4		
5'	145.5			145.4		
6'	111.7	※		111.7	7.20	d 1.8
7'	153.3	7.48	d 15.7	153.3	7.52	d 15.8
8'	127.6	6.93	dd 15.7, 7.7	127.5	6.94	dd 15.8, 4.0
9'	193.6	9.80	d 7.7	193.5	9.82	d 4.0
3-OMe	56.2	3.76	s	56.1	3.79	s
3'-OMe	56.0	3.84	s	56	3.87	s

※溶媒ピークと重なり、観察できなかった

\*measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 600 MHz, <sup>13</sup>C: 150MHz, \*\*measured in pyridine-*d*<sub>5</sub>, <sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 125 MHz

[5] Matuo, Y.; Mimaki, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **2010**, *58*, 587-590.



mansonin (**23**)

position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
1	24.2		
2	26.8		
3	73.4	4.22	bt 2.8
4	36.3		
5	73.2		
6	34.5		
7	17.9		
8	41.8		
9	39.4		
10	54.6		
11	22.0		
12	39.8		
13	49.4		
14	85.3		
15a,b	32.0	~1.7	m
16a,b	25.3	~1.9	m
		~2.2	td 14.8, 3.8
17	50.4	2.76	dd 9.6, 5.5
18	15.6	0.87	s
19	208.0	10.05	s
20	174.3		
21a,b	73.4	4.95	dd 18.2, 1.7
		4.80	dd 18.2, 1.7
22	117.9	5.89	bt 1.7
23	174.0		
1'	100.1	4.39	d 7.6
2'	84.0	3.02	dd 8.9, 7.6
3'	86.2	3.10	t 8.9
4'	75.0	3.17	td 8.9, 2.8
5'	71.6	3.32	qd 8.9, 6.2
6'	17.7	1.30	d 6.2
2'-OMe	60.9	3.57	s
3'-OMe	60.9	3.63	s
-OH		4.32	s

measured in  $CDCl_3$ ,  $^1H$ : 600 MHz,  $^{13}C$ : 150MHz

### 3.3. 新規化合物 (2, 15, 16) のスペクトルデータ

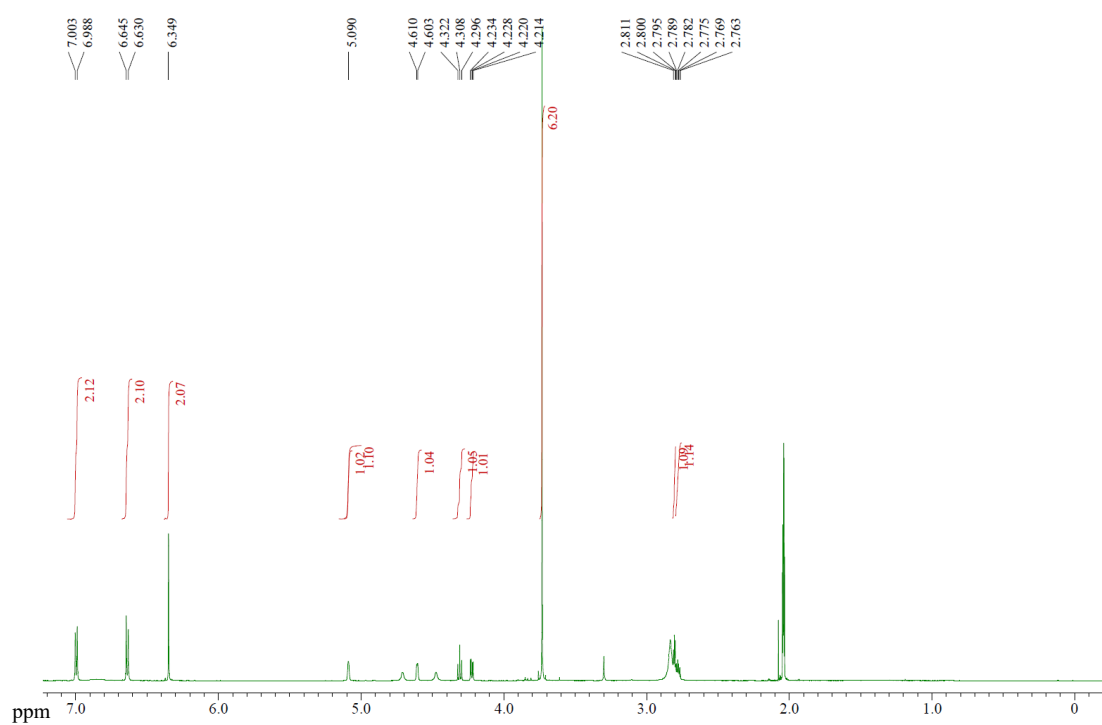


Figure 3.3.1 化合物 2 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz, acetone- $d_6$ )

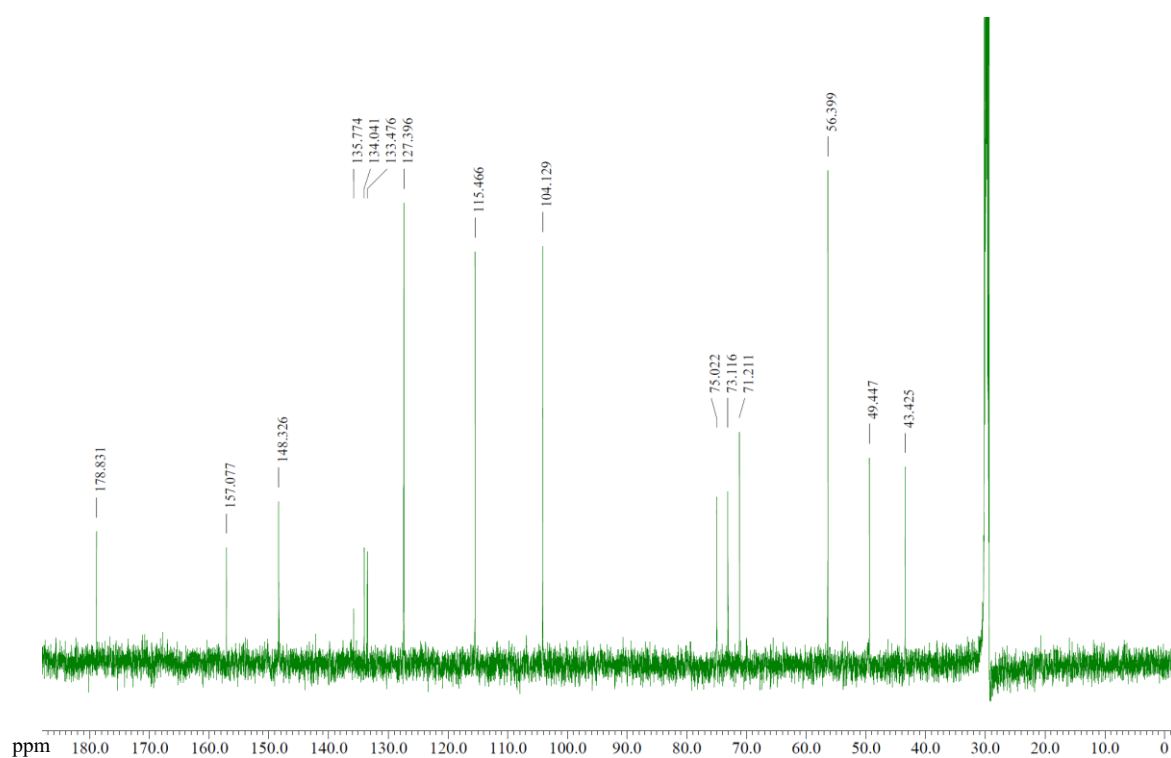


Figure 3.3.2 化合物 2 の  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, acetone- $d_6$ )

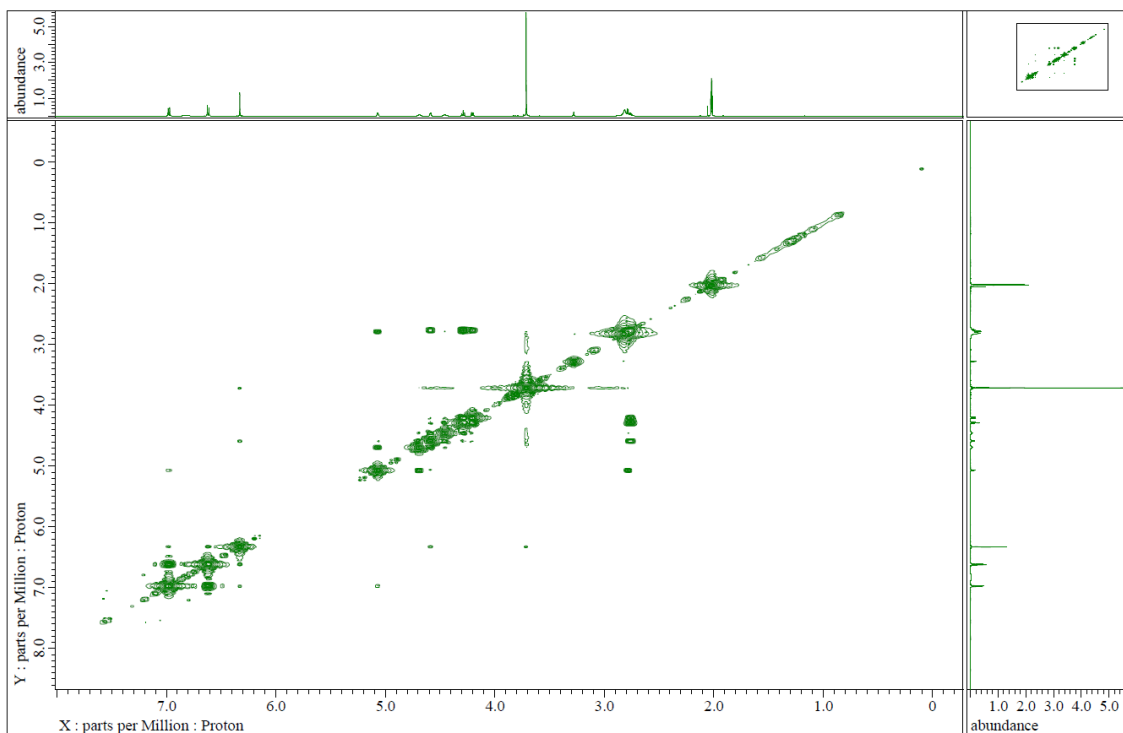


Figure 3.3.3 化合物 2 の COSY (acetone- $d_6$ )

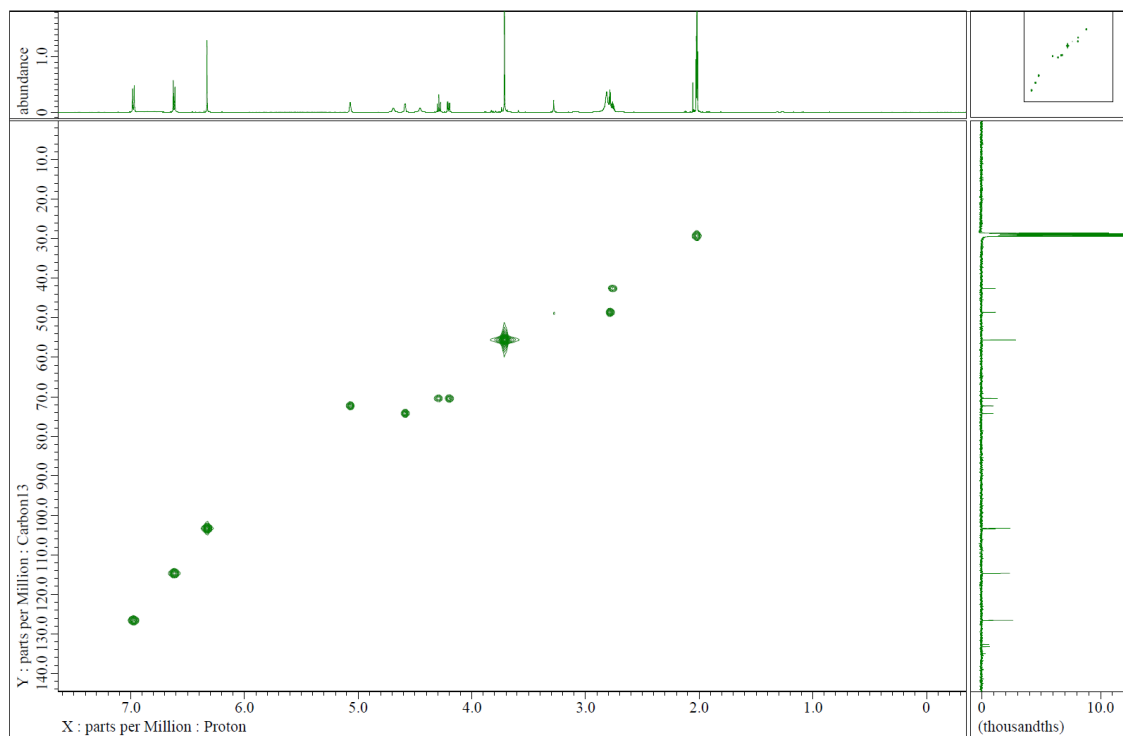


Figure 3.3.4 化合物 2 の HMQC (acetone- $d_6$ )

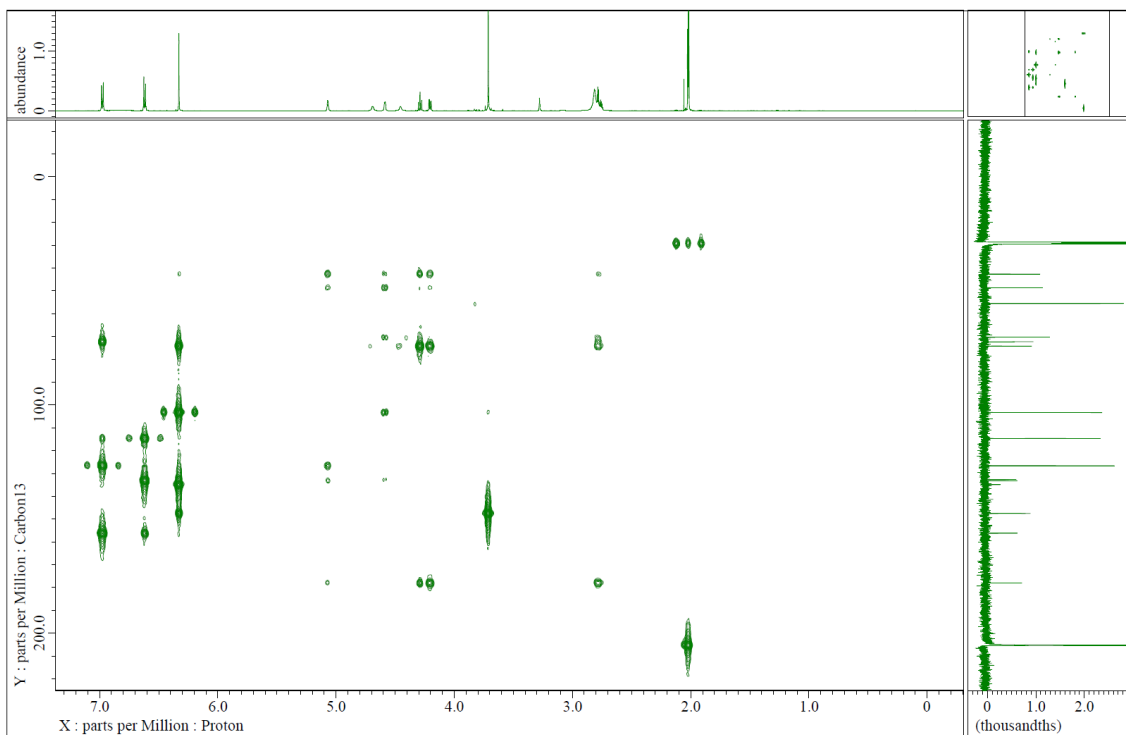


Figure 3.3.5 化合物 2 の HMBC (acetone- $d_6$ )

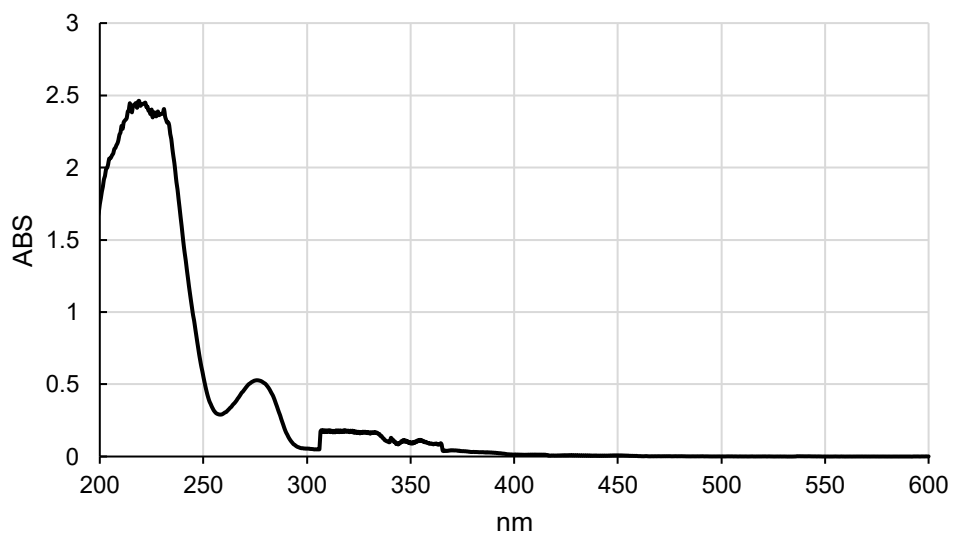


Figure 3.3.6 化合物 2 の UV スペクトル



Figure 3.3.7 化合物 2 の IR スペクトル

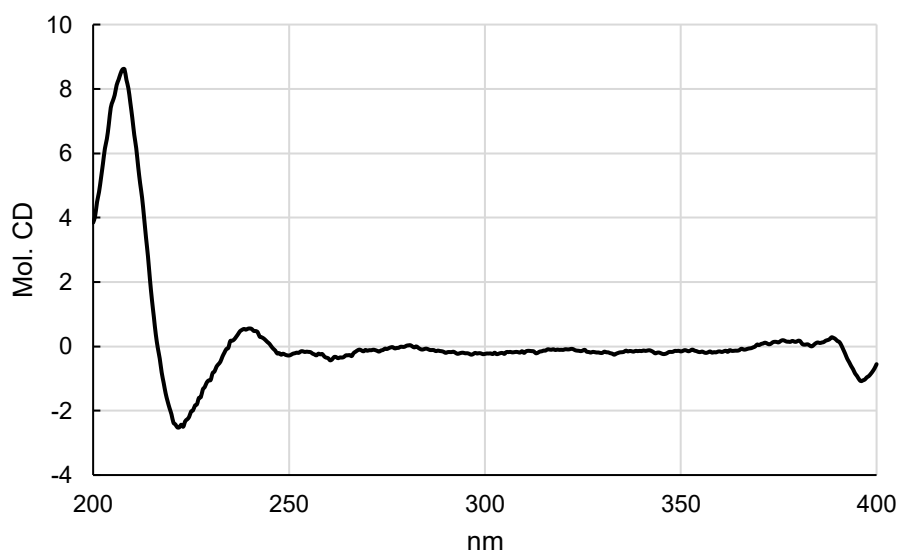


Figure 3.3.8 化合物 2 の CD スペクトル

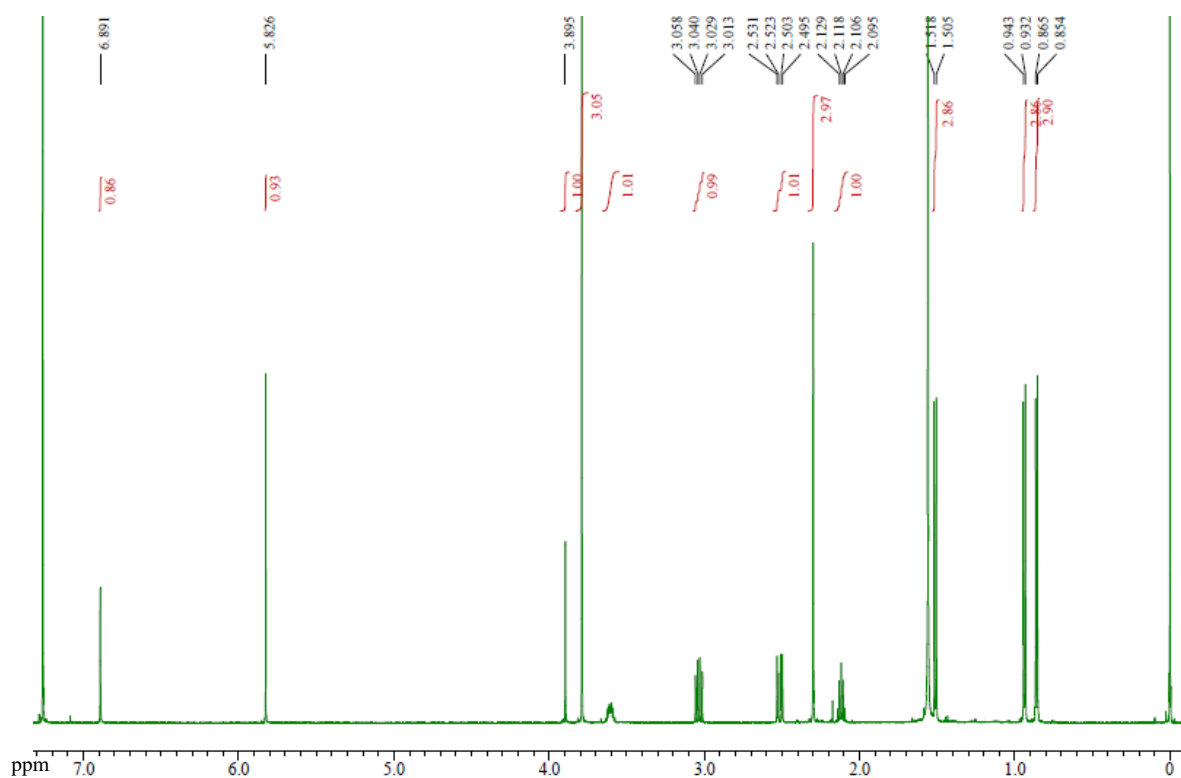


Figure 3. 3. 9 化合物 15 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

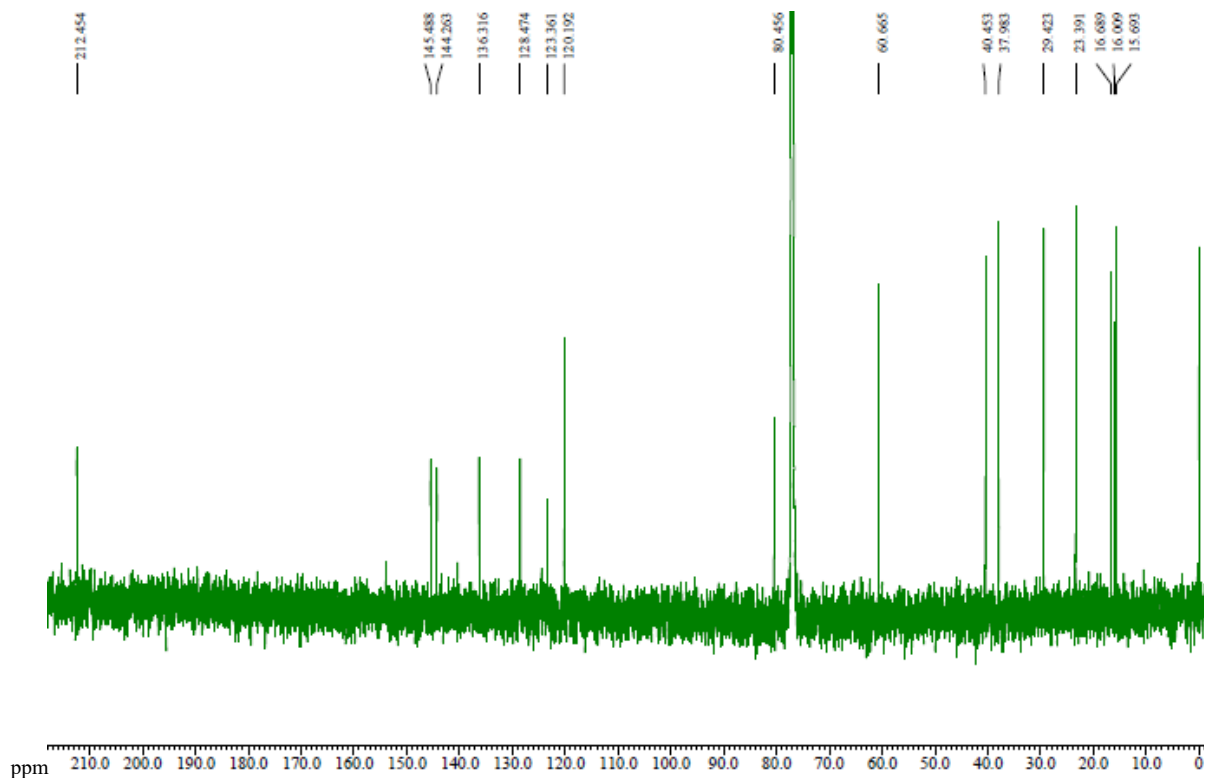


Figure 3. 3. 10 化合物 15 の  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

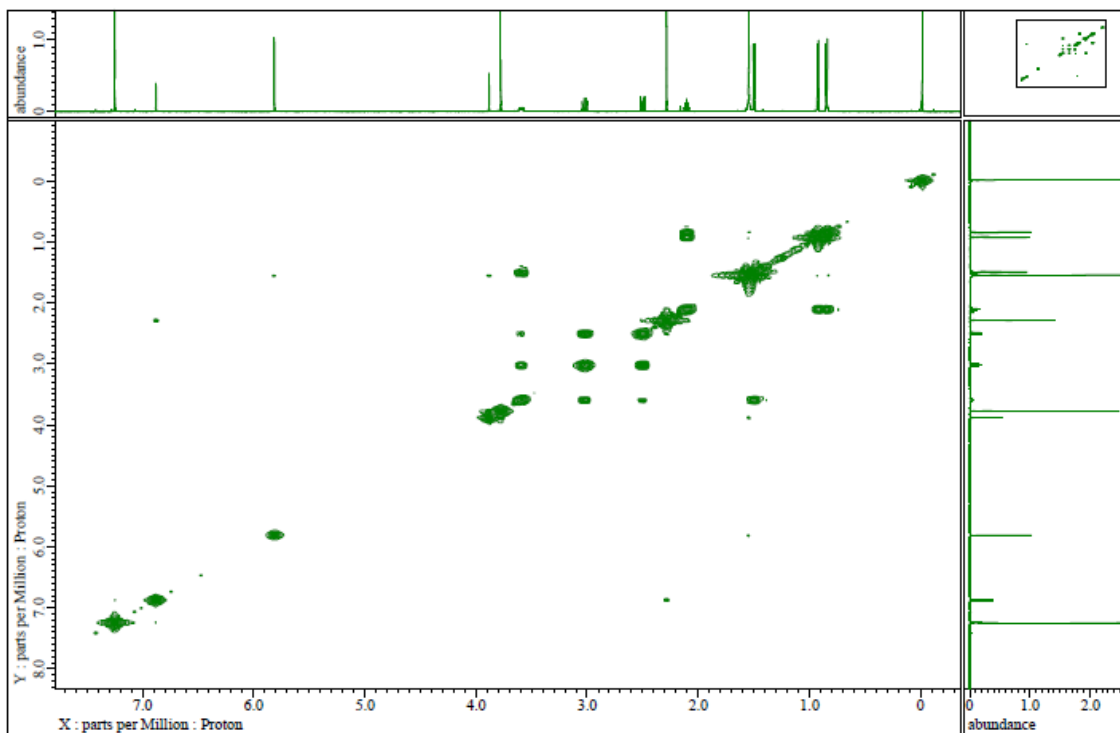


Figure 3.3.11 化合物 15 の COSY (CDCl<sub>3</sub>)

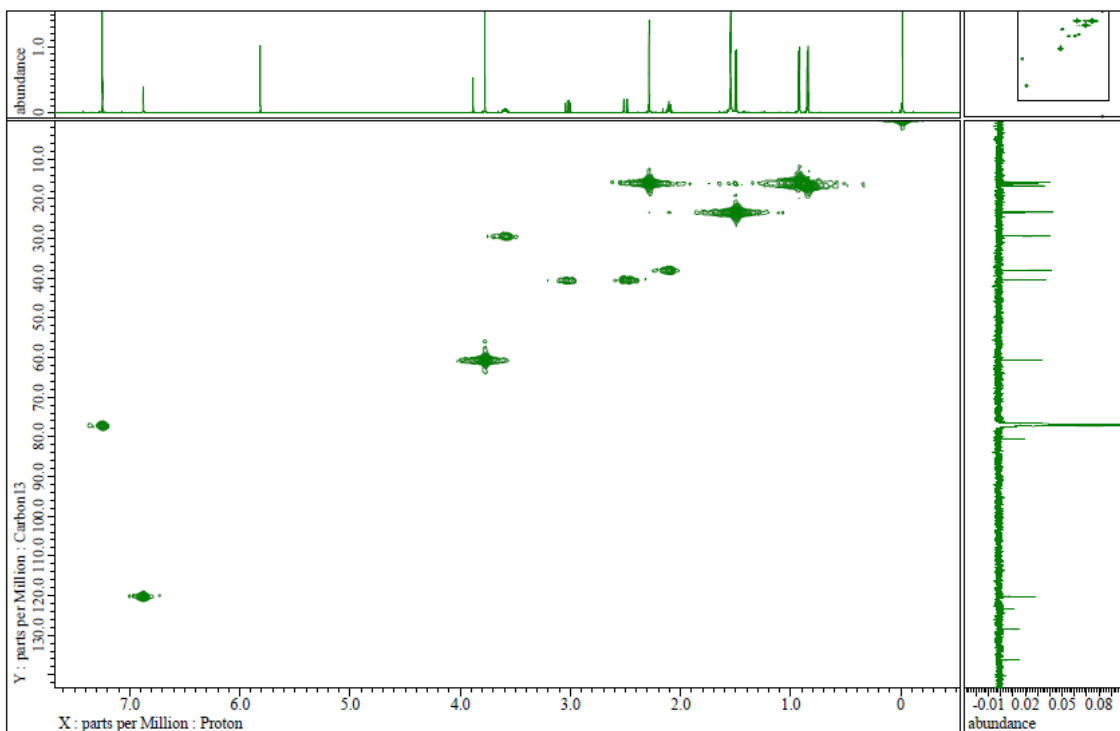


Figure 3.3.12 化合物 15 の HMQC (CDCl<sub>3</sub>)

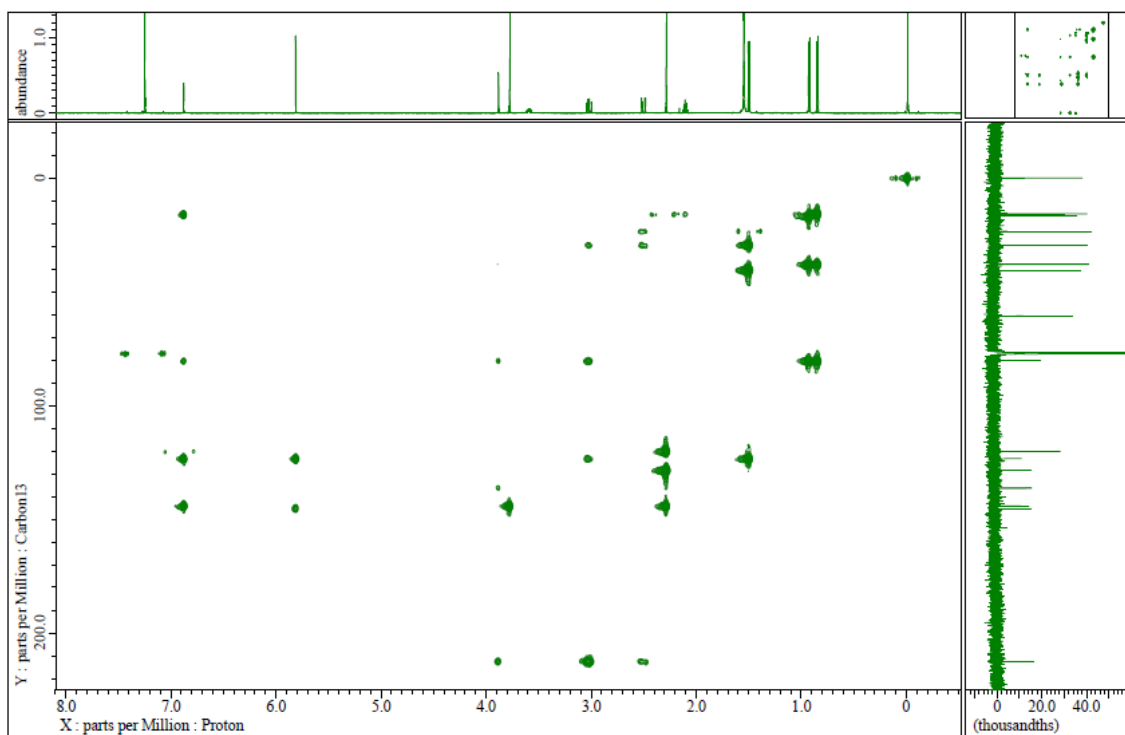


Figure 3.3.13 化合物 15 の HMBC (CDCl<sub>3</sub>)

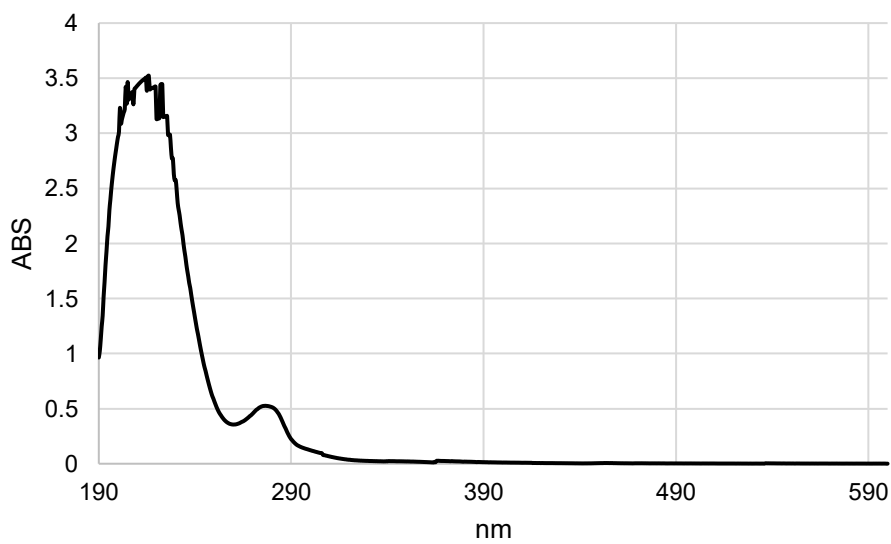


Figure 3.3.14 化合物 15 の UV スペクトル

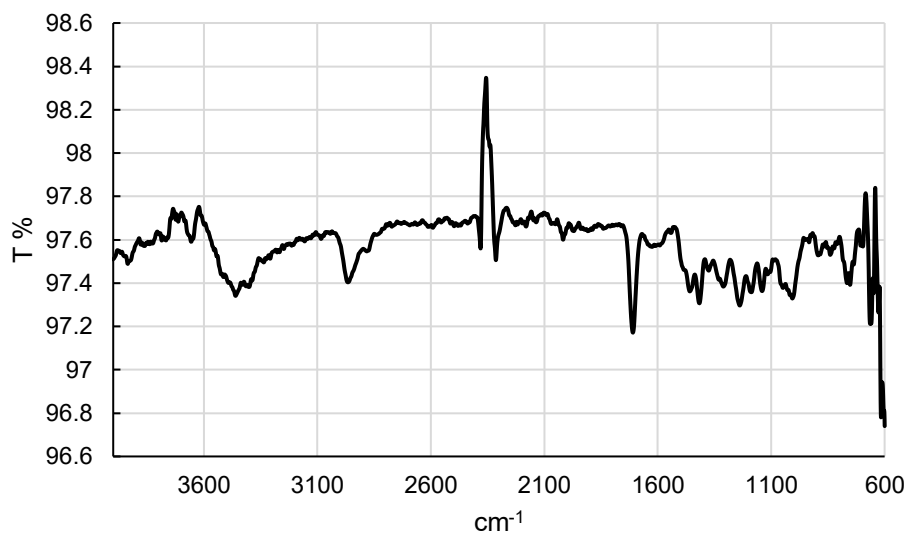


Figure 3.3.15 化合物 15 の IR スペクトル

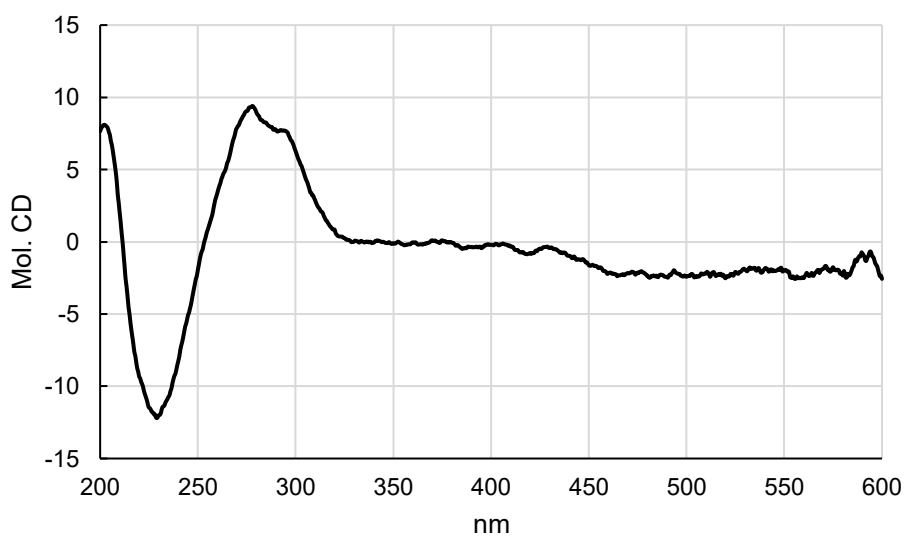


Figure 3.3.16 化合物 15 の CD スペクトル

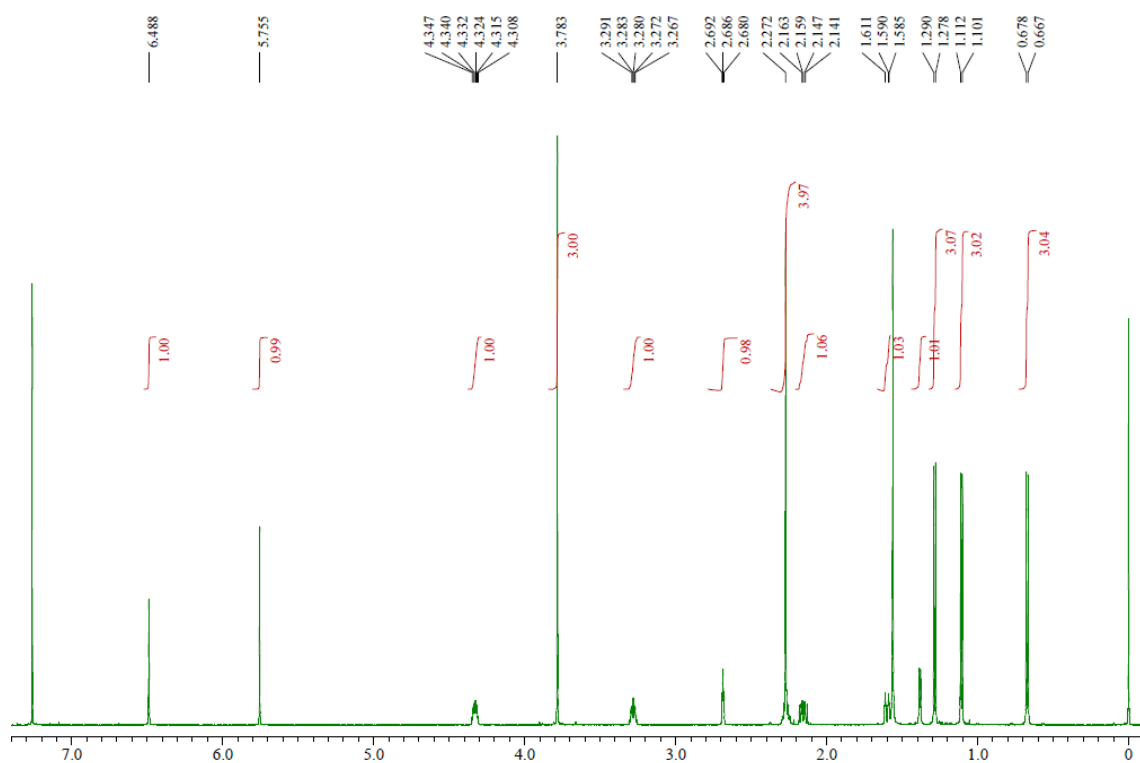


Figure 3. 3. 17 化合物 16 の  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

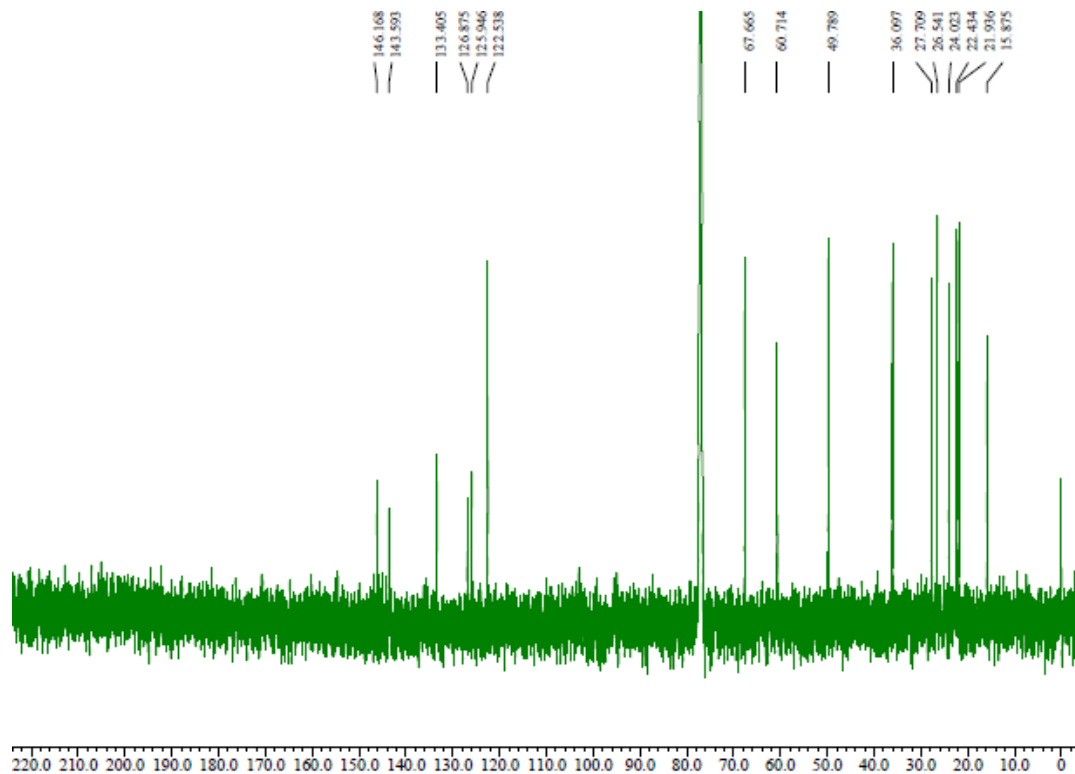


Figure 3. 3. 18 化合物 16 の  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

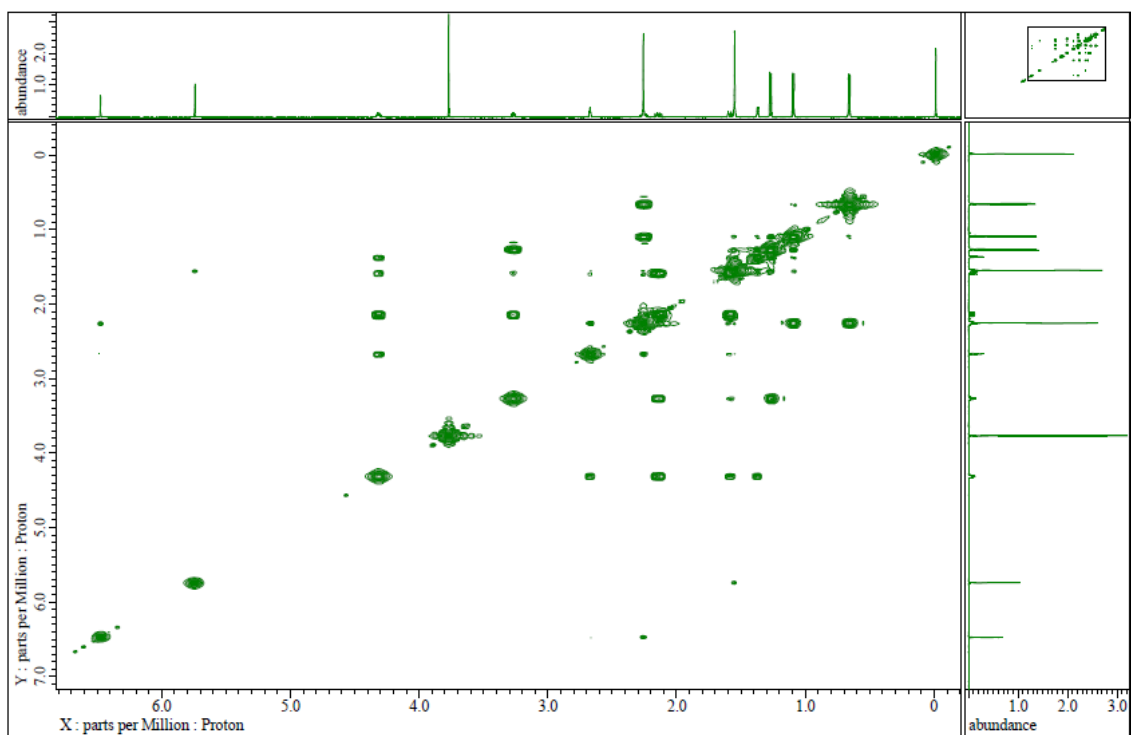


Figure 3. 3. 19 化合物 16 の COSY (CDCl<sub>3</sub>)

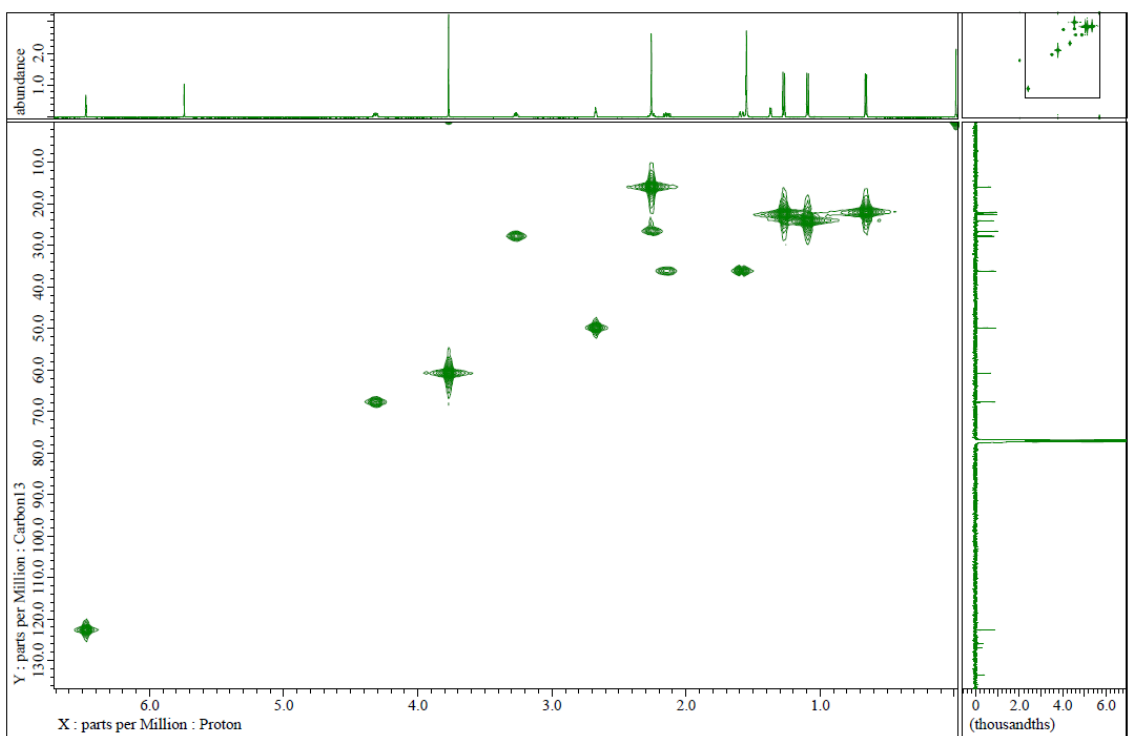


Figure 3. 3. 20 化合物 16 の HMQC (CDCl<sub>3</sub>)

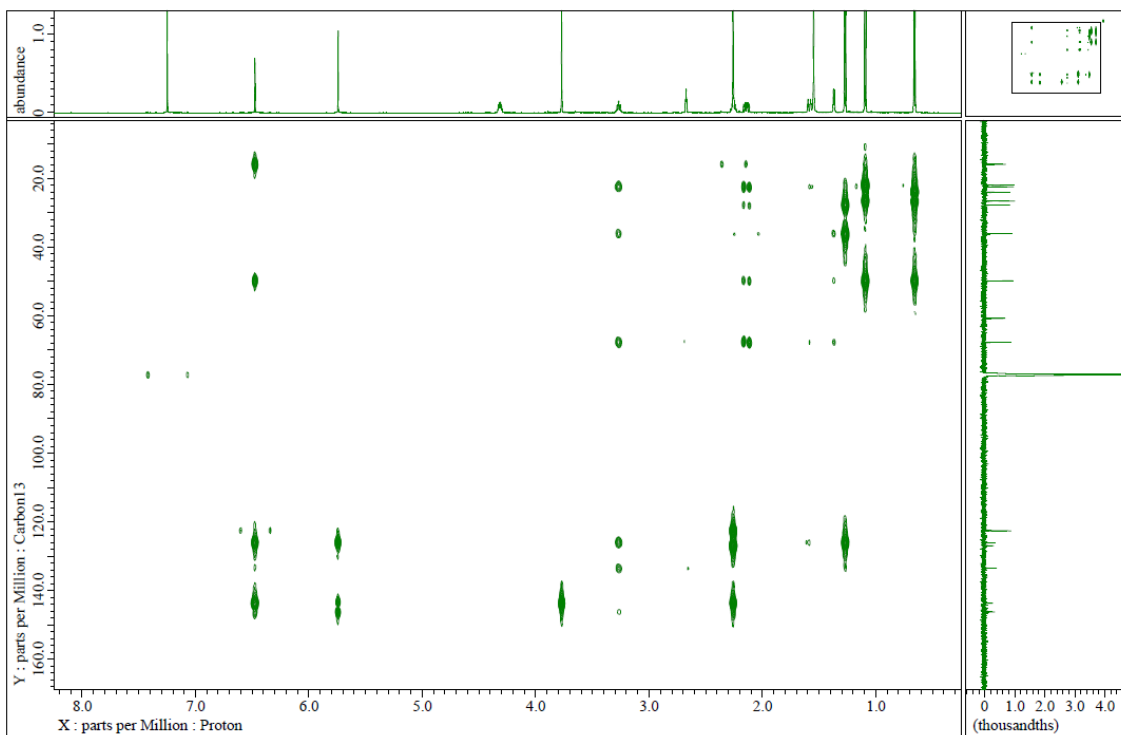


Figure 3.3.21 化合物 16 の HMBC (CDCl<sub>3</sub>)

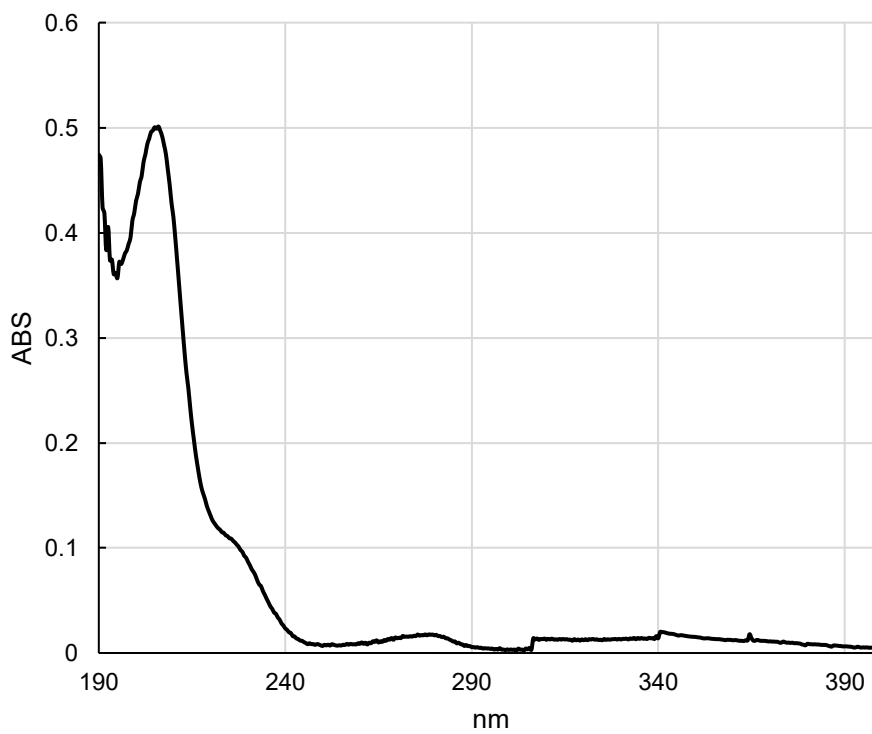


Figure 3.3.22 化合物 16 の UV スペクトル

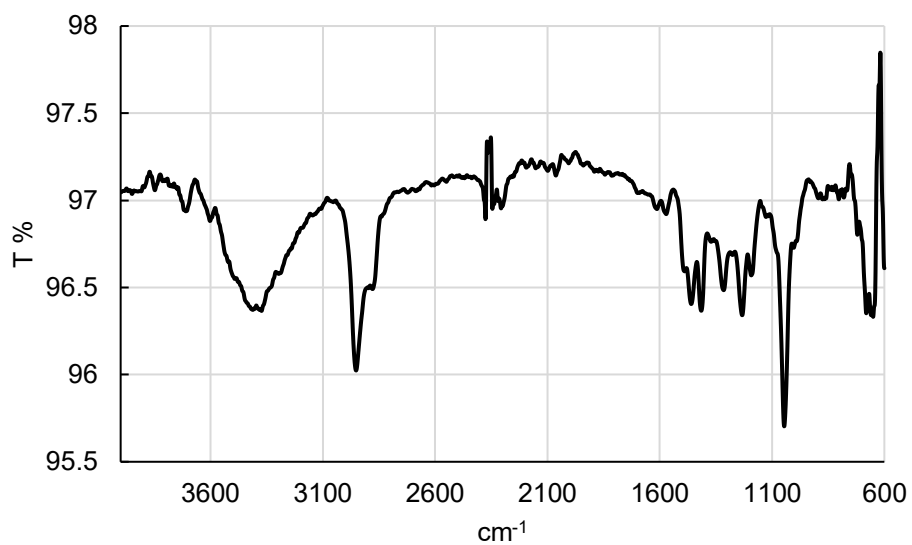


Figure 3. 3. 23 化合物 16 の IR スペクトル

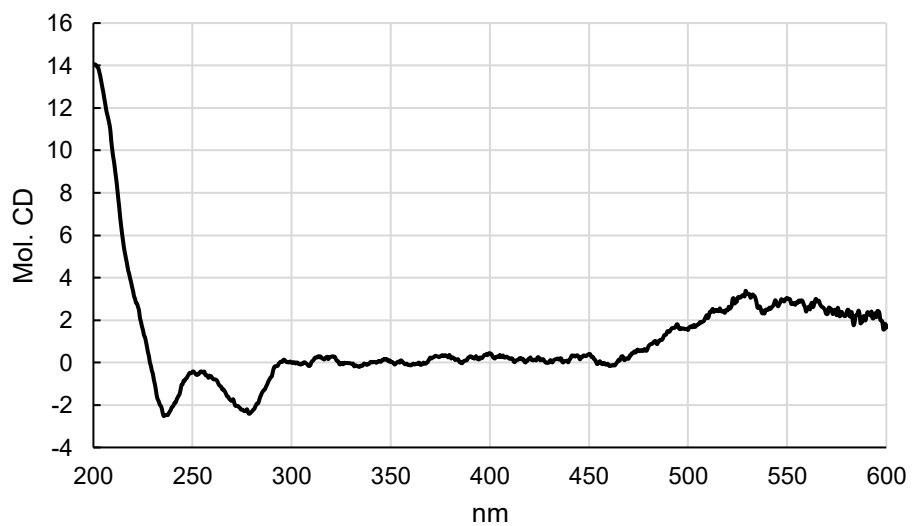


Figure 3. 3. 24 化合物 16 の CD スペクトル

## 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、終始厳しくも温かく懇切丁寧なご指導を賜り、また、あらゆる面で私の研究生生活を温かく見守って下さいました千葉大学 大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 石橋正己教授に心より御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、生物系の実験をはじめとした様々な場面でのご指導、ご助言を賜りました千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室 荒井緑准教授に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、様々な面で直接の指導者として、実験手技等の技巧的な面で非常に多くのご助言、ご指導を頂きました千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室 石川直樹助教、原康雅助教に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、実験手技や考え方、など様々な面で温かいご指導、ご助言を頂きました千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室 原康雅氏、益西卓瑪氏、三瓶真菜氏、劉雪菲丹氏の4名の当研究室の博士課程をご卒業された先輩方並びに、研究資料を残して下さいましたすべての先輩方をはじめとした、同期、後輩の皆様に深く感謝申し上げます。

最後に多くの面で私を支えてくれた友人や、私が生まれてから今日に至るまでのすべての面を支え、温かく接してくれた家族に心より感謝致します。

## 主論文目録

本学位論文の内容は、下記の発表内容による。

1. Sato, T., Arai, A. M., Yixizhuoma, Hara, Y., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Ishibashi, M. Cadinane sesquiterpenoids isolated from *Santalum album* using a screening program for Wnt signal inhibitory activity *J. Nat. Med.* **2020**, *74*, 476-481.

## 学位論文審査

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 高山 廣光

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 西田 篤司

副査 千葉大学大学院教授（薬学研究院） 薬学博士 根本 哲宏

審査を行っていただき、貴重なご助言賜りました諸先生方に深く感謝致します。