

ゲルセミウムアルカロイドの培養細胞を用いた生産研究と  
その化学的・薬理学的研究

(14571996)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）

研究成果報告書

平成 16 年 3 月

研究代表者 北 島 満 里 子

(千葉大学大学院薬学研究院助手)

## は し が き

マチン科 *Gelsemium* 属植物には、アジア大陸産系 *G. elegans* と北米産系 *G. sempervirens*、*G. rankinii* の3種がある。先の2種は非常に有毒な植物として知られているが、一方で有用な薬理活性をもつため、*G. elegans* は、中国において、伝承的に鎮痛・鎮痙薬、皮膚の潰瘍の治療薬として、また漢薬"胡滿強"としてリュウマチ治療に利用されていた。最近ではある種の肝臓ガンの治療に臨床的に用いられているとの報告もある。また、正倉院薬物第二次調査において、本植物が、奈良時代より現存する薬物の1つである"冶葛"の起源植物であることを明らかにした。一方、北米産系 *G. sempervirens* は、かつて偏頭痛治療薬として用いられていた。*G. sempervirens* は、カロライナジャスミンとしてその園芸種が日本においても広く栽培されている。これら *Gelsemium* 属植物には、複雑で歪みのかかったインドール・オキシインドールアルカロイド類が多数含有されている。

本研究課題では、以下の4点について研究を行ったので、その研究成果を報告する。

1. *Gelsemium elegans*、*G. sempervirens* の細胞・組織培養並びにこれを利用した形質転換を行い、生理活性物質とくにアルカロイド生産培養体の取得と培養系の確立を行う。
2. ゲルセミウム属植物の DNA を用いた系統解析を行い、正倉院薬物"冶葛"の基原について DNA レベルでの調査を行う。
3. *Gelsemium elegans*、*G. sempervirens* Ait. f. (カロライナジャスミン) の部位別含有アルカロイドの精査を行う。
4. 特異な構造を有するゲルセミウムアルカロイド類の薬理活性評価を行う。

## 研 究 組 織

|        |       |                    |
|--------|-------|--------------------|
| 研究代表者： | 北島満里子 | (千葉大学大学院薬学研究院・助手)  |
| 研究分担者： | 相見 則郎 | (千葉大学大学院薬学研究院・教授)  |
|        | 高山 廣光 | (千葉大学大学院薬学研究院・助教授) |
|        | 山崎 真巳 | (千葉大学大学院薬学研究院・助教授) |
|        | 矢野 眞吾 | (千葉大学大学院薬学研究院・教授)  |

## 研究経費

|        |          |
|--------|----------|
| 平成14年度 | 2, 400千円 |
| 平成15年度 | 1, 200千円 |
| 計      | 3, 600千円 |

## 研究発表

### (1) 学会誌等

1. M. Kitajima, S. Yoshida, K. Yamagata, M. Nakamura, H. Takayama, K. Saito, H. Seki, and N. Aimi : Camptothecin-related Alkaloids from Hairy Roots of *Ophiorrhiza pumila*. M. Kitajima, S. Yoshida, K. Yamagata, M. Nakamura, H. Takayama, K. Saito, H. Seki, and N. Aimi. *Tetrahedron*, **58** (45), 9169-9178 (2002).
2. M. Kitajima, M. Niwa, C. Yanagisawa, H. Takayama, H. Sudo, K. Saito, and N. Aimi : Camptothecin-related Alkaloids from Culture Medium of Hairy Roots of *Ophiorrhiza pumila*. *Natural Medicines* **56**(6), 275 (2002).
3. M. Kitajima, M. Yokoya, H. Takayama, and N. Aimi : Synthesis and Absolute Configuration of a New 3,4-Dihydro- $\beta$ -carboline-Type Alkaloid, 3,4-Dehydro-5(*S*)-5-carboxystrictosidine, Isolated from Peruvian Una de Gato (*Uncaria tomentosa*). *Chem. Pharm. Bull.*, **50** (10), 1376-1378 (2002).
4. H. Takayama, M. Arai, M. Kitajima, and N. Aimi : First Total Synthesis of a Novel Monoterpenoid Isoquinoline Alkaloid, ( $\pm$ )-Alangine. *Chem. Pharm. Bull.*, **50** (8), 1141-1143 (2002).
5. M. Kitajima, N. Kogure, K. Yamaguchi, H. Takayama, and N. Aimi : Structure Reinvestigation of Gelsemoxonine, a Constituent of *Gelsemium elegans*, Reveals a Novel, Azetidine-Containing Indole Alkaloid. *Org. Lett.*, **5** (12), 2075-2078 (2003).
6. M. Kitajima, A. Urano, N. Kogure, H. Takayama, and N. Aimi : New Oxindole Alkaloids and Iridoid from Carolina jasmine (*Gelsemium sempervirens* Ait. f.). *Chem. Pharm. Bull.*, **51** (10), 1211-1214 (2003).
7. H. Takayama, R. Fujiwara, Y. Kasai, M. Kitajima, and N. Aimi : First Asymmetric Total Synthesis of Us-7 and -8, Novel *D-seco* Corynanthe-Type Oxindole Alkaloids from *Uncaria attenuata*: Structure Revision of Us-7 and Determination of Absolute Stereochemistry. *Org. Lett.*, **5** (16), 2967-2970 (2003).

8. Y. Yamazaki, A. Urano, H. Sudo, M. Kitajima, H. Takayama, M. Yamazaki, N. Aimi, and K. Saito : Metabolite Profiling of Alkaloids and Strictosidine Synthase Activity in Camptothecin Producing Plants. *Phytochem.*, **62** (3), 461-470 (2003).

(2) 学会発表

1. 北島満里子, 小暮紀行, 浦野晶子, 高山廣光, 相見則郎 : マチン科 *Gelsemium* 属植物葉部含有成分について. 第 49 回日本生薬学会年会講演要旨集 36 (2002).
2. 相見則郎 : 正倉院の冷葛. 第 49 回日本生薬学会年会講演要旨集 1-5 (2002).
3. 中村智徳, 三野由加, 長島昌嗣, 北島満里子, 高山廣光, 相見則郎, 坂井進一郎, 上野光一, 渡辺和夫, 矢野眞吾 : 冷葛含有アルカロイドの薬理活性 (第 2 報) : 筋弛緩作用と腫瘍細胞殺傷作用. 第 49 回日本生薬学会年会講演要旨集 202 (2002).
4. 矢野眞吾, 長島昌嗣, 三野由加, 中村智徳, 上野光一, 北島満里子, 高山廣光, 相見則郎, 坂井進一郎, 渡辺和夫 : 冷葛含有アルカロイドの薬理活性 (第 1 報) : 毒性発現機序と抗腫瘍活性に関する検討. 第 19 回和漢医薬学会大会要旨集, 125 (2002).
5. 矢野眞吾, 中村智徳, 長島昌嗣, 北島満里子, 高山廣光, 相見則郎, 坂井進一郎, 渡辺和夫 : 冷葛含有アルカロイドの薬理活性 (第 3 報) : 心血管系作用に関する検討. 第 19 回和漢医薬学会大会要旨集, 126 (2002).
6. 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光, 山口健太郎, 相見則郎 : マチン科植物 *Gelsemium elegans* 葉部含有成分に関する研究. 日本薬学会第 123 年会講演要旨集 2, 159 (2003).
7. 北島満里子, 西谷知香, 高山廣光, 相見則郎 : カロライナジャスミン(*Gelsemium sempervirens*)含有アルカロイドの化学的研究. 日本薬学会第 124 年会 講演要旨集 2, 147 (2004).
8. 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光, 相見則郎 : マチン科植物 *Gelsemium elegans* 葉部含有成分に関する研究 (2). 日本薬学会第 124 年会講演要旨集 2, 148 (2004).

## 研究 成 果

### 1. *Gelsemium* 属植物組織培養体の取得の試み

#### 1-1. *Gelsemium* 属植物よりカルスの誘導

千葉大学薬学部附属薬用植物園にて採取した *Gelsemium sempervirens* Ait. f. (カロライナジャスミン)、*G. elegans* の若葉を用い、23-25°C、暗所下、カルスの誘導を試みた。カルス誘導培地として Gamborg's B5 (B5)培地、Murashige & Skoog(MS)培地、植物生長調節物質として 1-ナフタレン酢酸 (NA)、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(D)、カイネチン(K)を用いた。また、Sucrose 2 or 3%を添加した。その結果、下記の表に示した通り、*G. sempervirens* では、(D  $5 \times 10^{-5}$  M-K  $10^{-6}$  M)、(D  $10^{-5}$  M-K  $10^{-7}$  M)、(N  $10^{-5}$  M-K  $10^{-7}$  M)の組み合わせで植物生長調節物質を添加した B5 培地、並びに、(N  $10^{-5}$  M-K  $10^{-7}$  M)、(N  $10^{-6}$  M-K  $10^{-7}$  M)の MS 培地において誘導・増殖とも良好な結果を示した。一方、*G. elegans* では、(D  $10^{-6}$  M-K  $10^{-6}$  M)の B5 培地において良好な結果を示した。

| <i>G. sempervirens</i> |    |       |    |       |    | <i>G. elegans</i>                                                                                                                                          |    |       |    |
|------------------------|----|-------|----|-------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-------|----|
|                        |    | B5 培地 |    | MS 培地 |    |                                                                                                                                                            |    | B5 培地 |    |
|                        |    | 誘導    | 増殖 | 誘導    | 増殖 |                                                                                                                                                            |    | 誘導    | 増殖 |
| D4                     | K5 | ○     | △  | ○     | ×  | D5                                                                                                                                                         | K5 | ○     | △  |
| D4                     | K6 | ×     | —  | ○     | △  | D5                                                                                                                                                         | K6 | ○     | △  |
| D4                     | K7 | ○     | △  | ○     | △  | D5                                                                                                                                                         | K7 | ○     | △  |
| D4.5                   | K6 | ○     | ○  |       |    | D6                                                                                                                                                         | K6 | ○     | ○  |
| D4.5                   | K7 | ×     | ×  |       |    | D6                                                                                                                                                         | K7 | ○     | △  |
| D5                     | K5 | ○     | △  | ○     | △  | 4: 10 <sup>-4</sup> M<br>4.5: 5x10 <sup>-5</sup> M<br>5: 10 <sup>-5</sup> M<br>6: 10 <sup>-6</sup> M<br>7: 10 <sup>-7</sup> M<br>○ 良好<br>△ あまり良くない<br>× 全滅 |    |       |    |
| D5                     | K7 | ○     | ○  | ○     | △  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| D6                     | K6 | ○     | ×  |       |    |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| D6                     | K7 | ×     | —  |       |    |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N4                     | K5 | ○     | △  | ○     | ×  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N4                     | K6 | ○     | ×  | ○     | △  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N4                     | K7 | ○     | △  | ○     | ×  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N5                     | K5 | ○     | △  | ○     | ×  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N5                     | K7 | ○     | ○  | ○     | ○  |                                                                                                                                                            |    |       |    |
| N6                     | K7 |       |    | ○     | ○  |                                                                                                                                                            |    |       |    |

続いて、*G. sempervirens* において良好な結果を示した 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(D)、カイネチン(K)を添加した Gamborg's B5 固型培地(Sucrose 3%含有)について、最適濃度の検討を行った。その結果、下記の表に示したように(D  $2 \times 10^{-6}$  M-K  $2 \times 10^{-6}$  M)、(D  $20 \times 10^{-6}$  M-K  $2 \times 10^{-6}$  M)において細胞分裂誘発作用、カルス増殖作用ともに良好であった。

| D (x10 <sup>-6</sup> M) \ K (x10 <sup>-6</sup> M) | 0.2 |    | 2  |    | 20 |    |
|---------------------------------------------------|-----|----|----|----|----|----|
|                                                   | 誘導  | 増殖 | 誘導 | 増殖 | 誘導 | 増殖 |
| 0.2                                               | ○   | △  | ◎  | ○  | ◎  | ○  |
| 2                                                 | △   | △  | ◎  | ◎  | ◎  | ◎  |
| 20                                                | ×   | ×  | △  | △  | ○  | △  |

良好な順に ◎ > ○ > △ > ×

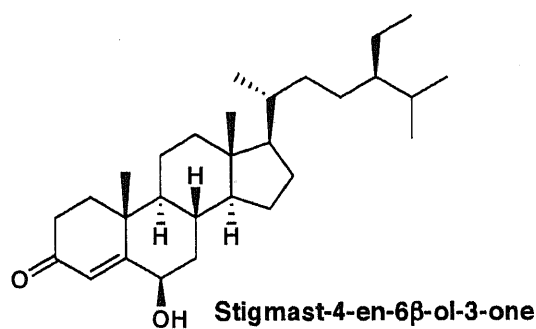
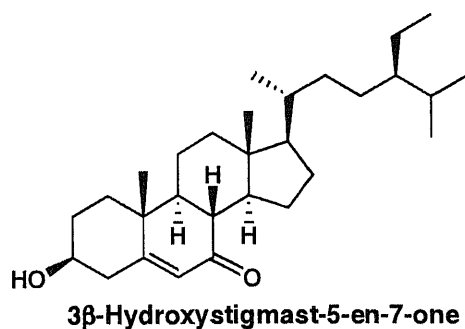
## 1-2. *Gelsemium sempervirens* カルスの成分探索

得られたカルスの少量を用いて MeOH エキスを調製し、各エキスについてアルカロイド検出試薬 (Dragendorff's reagent, Schlittler reagent)を用いてアルカロイドの確認を行った。呈色が認められたエキスについて HPLC 分析を行ったが、アルカロイドと予想されるピーク・UV スペクトルは観測されなかった。

そこで、増殖の良好な *G. sempervirens* カルス 2 種について成分探索を行った。

カルス A: 培養条件 25°C、暗所、B5 培地、Sucrose 2%、D 5x10<sup>-5</sup> M、K 10<sup>-6</sup> M

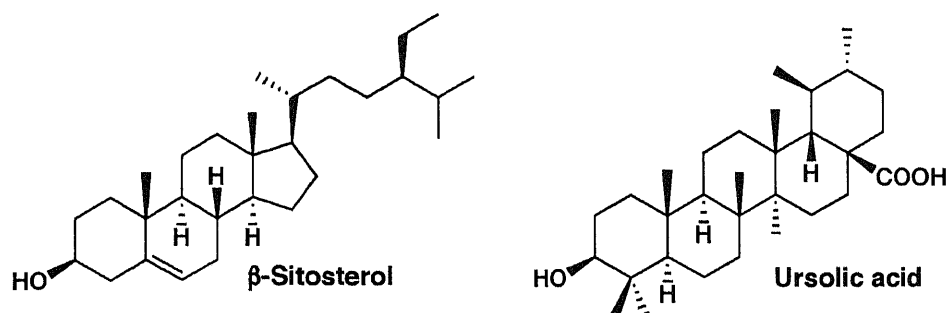
カルス 260 g (湿重量) を熱 MeOH にて抽出を行い、MeOH エキス 8.0 g を得た。これを水に溶解後、5% MeOH-CHCl<sub>3</sub>、*n*-BuOH にて液-液分配し、それぞれ 0.28 g、1.38 g の分画を得た。得られた 5% MeOH-CHCl<sub>3</sub> 分画を各種クロマトにより精製し、既知のステロール 2 種 (3β-Hydroxystigmast-5-en-7-one, Stigmast-4-en-6β-ol-3-one)を得たが、アルカロイドの存在は認められなかった。



カルス B: 培養条件 25°C、暗所、B5 培地、Sucrose 3%、D 10<sup>-5</sup> M、K 10<sup>-7</sup> M

カルス 1208 g (湿重量) を熱 MeOH にて抽出を行い、MeOH エキス 37.7 g を得た。これを前述と同様に液-液分配し、5% MeOH-CHCl<sub>3</sub> 分画 3.62 g、*n*-BuOH 分画 9.46 g を得た。得られた 5% MeOH-CHCl<sub>3</sub> 分画を各種クロマトにより精製し、既知ステロール 1 種 (β-

Sitosterol)と既知トリテルペン 1 種(Ursolic acid)を得た。



### 1-3. カルス以外の組織培養体取得の試み並びにエリシター処理による二次代謝成分の誘導の試み

これまでに取得した *G. sempervirens* カルスにおいてアルカロイド生産が認められなかったことから、カルス以外の組織培養体の取得を目指した。

*G. sempervirens* カルス並びに植物本体より毛状根の取得を試みたが、これまでのところ誘導できていない。また、無菌植物体を取得し、その根を用いて Root culture を試みたが、培養には至っていない。

一方、二次代謝成分の変化を期待して、*G. sempervirens* カルスの液体培養体のエリシター処理を行った。すなわち、 $N\ 10^{-6}M$ ,  $K\ 10^{-7}M$  を添加した MS 固型培地にて培養したカルスを同条件の液体培地に移し震盪培養した。続いて、エリシターの Yeast extract、サリチル酸、ジャスモン酸メチルを添加した。6 日間後収穫したカルスを MeOH 抽出し、液液分配後、5% MeOH- $CHCl_3$  分画について TLC 分析を行った。エリシター無添加のカルスと比較したところ、TLC において変化が認められず、エリシター添加による二次代謝成分の誘導は起こらなかったと考える。

## 2. マチン科植物における RAPD 分析による鑑定の試み

正倉院薬物「治葛」の基原植物がマチン科 *Gelsemium elegans* であることが形態学的研究<sup>1)</sup>及びその含有成分<sup>2)</sup>より確証されたが、更に種の同定を行うために DNA レベルでの鑑定が必要である。そこで、「治葛」から DNA を抽出し、RAPD 分析による鑑定を試み

るための基礎研究として、今回、基原植物であるマチン科 *G. elegans* とその同属植物 *G. sempervirens*、並びに同じマチン科に属する *Strychnos nux-vomica* (マチン)、*Gardneria nutans* (ホウライカズラ)を材料として DNA を抽出し、ランダムプライマーを用いて PCR を行い、その RAPD プロファイルバンド多型から系統樹を作成することを試みた。

用いた植物材料は以下の通りである。

| 植物名                           | サンプル名 | 栽培場所                    |
|-------------------------------|-------|-------------------------|
| <i>Gelsemium sempervirens</i> | S1    | 千葉大学薬学部附属薬用植物園          |
| <i>Gelsemium sempervirens</i> | S2    | 千葉大学薬学部附属薬用植物園          |
| <i>Gelsemium elegans</i>      | ET    | 東京薬科大学薬用植物園             |
| <i>Gelsemium elegans</i>      | EB    | 熱川バナナワニ園                |
| <i>Strychnos nux-vomica</i>   | ST    | 国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場 |
| <i>Gardneria nutans</i>       | GN    | 千葉大学薬学部附属薬用植物園          |

試料の葉部を凍結乾燥後粉碎し、DNA を抽出した。得られた DNA を TE バッファーに溶解し、PCR の鋳型とした。この鋳型 DNA と、10mer のプライマー (OPERON 社、OPB シリーズ) を用いて、PCR 反応を行った。

系統樹の作成には、RAPD プロファイルから各個体間の類縁度を推定し、平均距離法 (UPGMA) <sup>3)</sup> によって系統樹を作成するプログラムである「Octan」(農林水産省九州農業試験場 奥田 充氏による) を利用した。

遺伝的類似度 (Genetic similarity、GS 値)

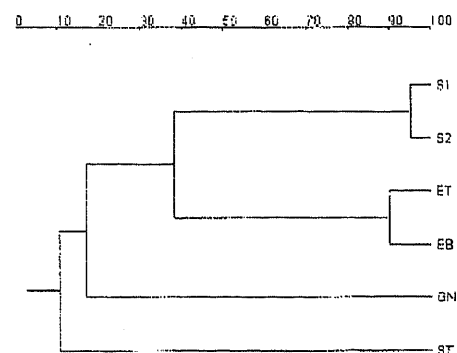
$$GS = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$$

$N_{xy}$  : 共通なフラグメントの数

$N_x, N_y$  : 個々のフラグメントの数

マチン科植物個体間・種間の遺伝的類似度

|    | S1   | S2   | ET   | EB   | ST   |
|----|------|------|------|------|------|
| S2 | 0.95 | —    | —    | —    | —    |
| ET | 0.39 | 0.41 | —    | —    | —    |
| EB | 0.36 | 0.38 | 0.90 | —    | —    |
| ST | 0.05 | 0.06 | 0.03 | 0.05 | —    |
| GN | 0.15 | 0.16 | 0.17 | 0.19 | 0.16 |



以上の結果より、*Gelsemium* 属植物の *G. sempervirens*、*G. elegans* 間の遺伝的類似度は36~41%であり、同属植物でもその遺伝的類似度は高くないことが示された。また、各々の個体間の違いはほとんどないことが示唆された。また、*G. sempervirens*、*G. elegans* と同じマチン科植物である *Strychnos nux-vomica*、*Gardneria nutans* との遺伝的關係が遠いことが示された。*Gelsemium elegans* と他の植物の DNA レベルでの類似度は低いことから、RAPD 法によって *Gelsemium elegans* と他の種を区別することが可能であり DNA レベルでの鑑定は有用と考えられる。

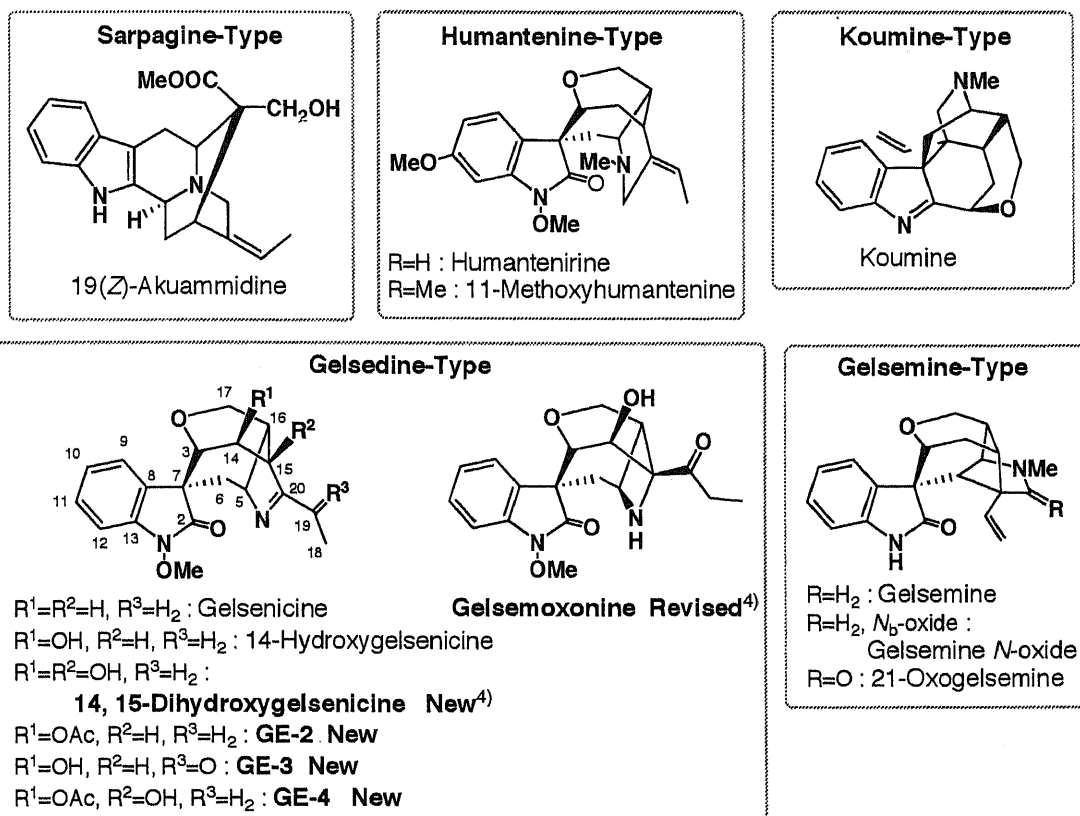
### 3. *Gelsemium* 属植物の成分探索

#### 3-1. *Gelsemium elegans* 葉部の成分探索

熱川バナナワ二園より御供与された *Gelsemium elegans* 葉部 1.48 Kg (乾燥重量) を熱 MeOH にて抽出を行い、MeOH エキス 203.6 g を得た。得られた MeOH エキス 100.0 g を 1N HCl に溶解し、AcOEt で抽出した。水層を  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  にてアルカリ性とした後、5% MeOH- $\text{CHCl}_3$  にて抽出を行い、Crude Base 2.47 g を得た。これを各種クロマトにより精製を行い、新規アルカロイド 4 種(14,15-Dihydroxygelsenicine<sup>4)</sup>, GE-2, GE-3, GE-4)を含む計 14 種のアルカロイドを得た。主アルカロイドは 14-Hydroxygelsenicine であった。新規アルカロイドの構造決定について以下述べる。また、既知化合物として得た Gelsemoxonine の構造訂正<sup>4)</sup>を行ったので、次項で述べる。

新規アルカロイド 14,15-Dihydroxygelsenicine<sup>4)</sup>は、オキシインドールに特徴的な UV 吸収を示し、HR-FAB-MS より、既知アルカロイド 14-Hydroxygelsenicine より 1 酸素多い分子式( $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$ )を持つことが明らかとなった。<sup>1</sup>H-NMR においては、オキシインドール A 環部に由来する 4 本の芳香族プロトン、*N*<sub>a</sub>-メトキシ基(δ3.91, 3H, s)、イミン窒素が結合したメチンのプロトン(δ4.44, m, H-5)、オキシメチレンのプロトン(H<sub>2</sub>-17)、オキシメチンのプロトン(δ3.82, d, H-3)、エチル基のプロトン[δ1.28 (3H, s, H<sub>3</sub>-18), δ2.54 (2H, m, H<sub>2</sub>-19)]が観測され、14-Hydroxygelsenicine とよく類似していた。<sup>13</sup>C-NMR では、オキシインドール 2 位のカルボニル炭素(δ170.6)、イミン炭素(δ184.0)を含む 19 本のシグナルが観測され、14-Hydroxygelsenicine と比較して、そ

## Isolated Alkaloids from *Gelsemium elegans*



の中の $\delta 78.8$ の4級炭素が大きく異なっていた。各種2次元NMRの解析により、本化合物は14, 15位に水酸基を有する14,15-Dihydroxygelsenicineであると推定された。14, 15位の水酸基の立体配置については、アセトナイド体への変換と $^1\text{H}$ -NMRにおける3位と14位の結合定数( $J=2.1$ )より、ともに $\beta$ 配置であると推定した。本化合物は、隣接ジオール基を有する初めての*Gelsemium*アルカロイドである。

新規アルカロイドGE-2は、 $^1\text{H}$ -NMRにおいてアセチルメチル基のプロトン( $\delta 2.08$ , 3H, s)並びに低磁場シフトした14位プロトン( $\delta 5.50$ , d,  $J=2.4$ )が観測され、既知アルカロイド14-Hydroxygelsenicineの14位水酸基がアセチル化された構造であることが推定された。さらに、14-Hydroxygelsenicineをアセチル化して得た化合物と本化合物のNMR、CDのデータが完全に一致したことにより、その構造を確認した。

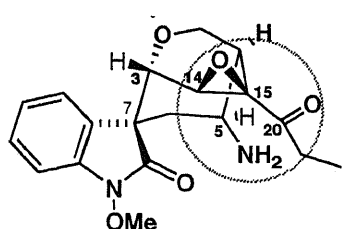
新規アルカロイドGE-3は、UVにおいてオキシインドールに特徴的な吸収とともに240 nm付近に弱い吸収が認められた。また、HR-FAB-MSから分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5$ が得られた。 $^1\text{H}$ -NMRにおいては、4本の芳香族プロトン、 $N_b$ -メトキシ基( $\delta 3.93$ , 3H, s)、水酸基が結合したメチンプロトン( $\delta 4.46$ , m, H-14)、オキシメチレンのプロトン(H<sub>2</sub>-17)、オキシメチンのプロトン( $\delta 3.74$ , dd, H-3)とともに、イミン窒素が結合した

メチンのプロトン( $\delta$ 4.75, ddd, H-5)とシングレットのメチル基のシグナル( $\delta$ 2.65, 3H, s, H<sub>3</sub>-18)が観測された。<sup>13</sup>C-NMR では、オキシインドール 2 位のカルボニル炭素( $\delta$ 170.8)、イミン炭素( $\delta$ 174.7)とともに、 $\delta$ 197.3 にケトンのシグナルが認められた。HMBC 測定より、18 位のメチル基からケトン炭素、イミン炭素に相関が認められたことから、基本骨格は 19-Oxo-gelsenicine であり、その他各種スペクトルより本化合物の構造を 14-Hydroxy-19-oxo-gelsenicine であると推定した。

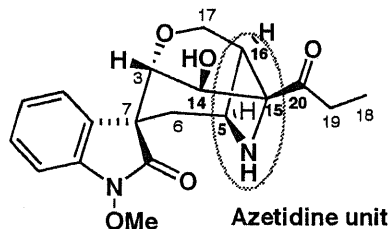
新規アルカロイド GE-4 は、<sup>1</sup>H-NMR においてアセチルメチル基のプロトン( $\delta$ 2.16)並びに低磁場シフトした 14 位プロトン( $\delta$ 5.57, d,  $J=2.4$ )が観測された。本チャートを GE-2 のチャートと比較すると、観測されたプロトンの数が 1 つ少ないことを除いて、よく類似していた。また、得られた分子量(Mw 400)が GE-2 より 16 マス多いことから、もう 1 分子の水酸基が結合していると考えられた。その他各種スペクトルの解析により、本化合物は、今回得られた新規アルカロイド 14,15-Dihydroxygelsenicine の 14 位水酸基がアセチル化された構造を持つと推定した。

### 3-2. Gelsemoxonine の構造訂正 <sup>4)</sup>

Gelsemoxonine は 1991 年 Cordell らによって *G. elegans* より単離された Gelsedine 型アルカロイドである <sup>5)</sup>。スペクトル解析により、その化学構造は 14,15 位にエポキシ環を有し、N<sub>6</sub>-C20 が解裂した特異な *seco*-oxindole であると報告された。今回、この Gelsemoxonine と各種スペクトルデータが一致する化合物を単離し、その詳細なスペクトルの解析により、4 員環アゼチジン骨格を有する構造へと訂正するに至った。



Gelsemoxonine (reported by Cordell)<sup>5)</sup>



Gelsemoxonine (revised)<sup>4)</sup>

単離した化合物を Ac<sub>2</sub>O, Pyridine にてアセチル化したところ、得られた生成物は、<sup>1</sup>H-並びに <sup>13</sup>C-NMR において 2 本のアセチル基由来のシグナル( $\delta$ <sub>H</sub>2.20,  $\delta$ <sub>H</sub>1.91,

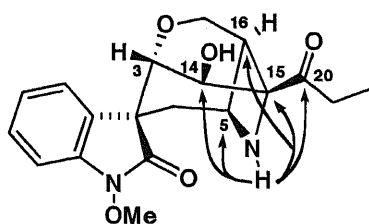
$\delta_c 169.5$ ,  $\delta_c 169.3$ )を与えた。

予期に反してジアセチル体が得られたことから、Gelsemoxonine の化学構造に疑問が持たれ、その化学構造の再調査を行った。

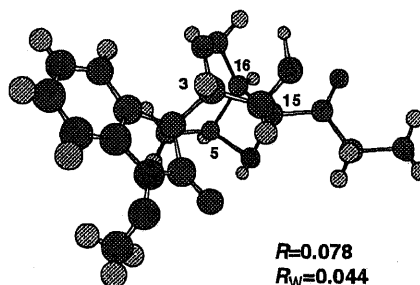
$\text{CDCl}_3$  中での NMR 測定では、本化合物が  $N_b$ -C20 が閉環した Gelsedine-type の骨格を持つか、Cordell らによって報告されたような  $N_b$ -C20 *seco* 型構造を持つか断定できなかった。そこで、測定溶媒を Pyridine- $d_6$  に変更し、 $-30^\circ\text{C}$  にて NMR 測定したところ、室温ではブロードしていた  $N_b$ -H のプロトンがシャープに観測された。本条件にて HMBC 測定を行った結果、 $N_b$ -H から C5, C14, C15, C16, C20 へ HMBC 相関が認められた。特に C14, C20 との相関は、Cordell らの報告した構造では説明がつかず、これらの相関を矛盾なく説明するために、 $N_b$ -C15-C16-C5 で含窒素 4 員環アゼチジンを形成した構造を推定した。今回、本化合物の結晶化に成功し、X 線結晶構造解析を行った結果、Gelsemoxonine がアゼチジン環を有することを確認し、構造訂正するに至った。

本化合物は、アゼチジン環を有する初めてのモノテルペノイドインドールアルカロイドである。

Selected HMBC

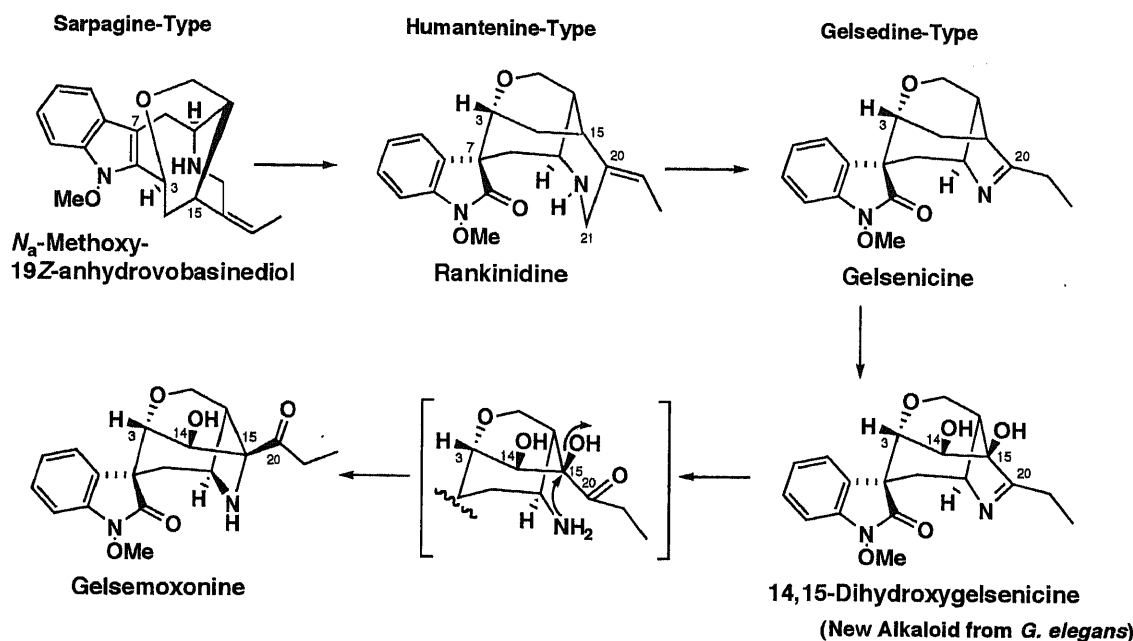


X-ray Structure of Gelsemoxonine



Gelsemoxonine の生合成経路は次のように考えた。すなわち今回単離した新規アルカロイド 14,15-Dihydroxygelsenicine から、 $N_b$ -C20 のイミンが開環することにより 1 級アミンとケトンが生じ、続いて  $N_b$  と C-15 で閉環が起こることにより Gelsemoxonine が生成すると推定した。

### Hypothetical Biogenetic Route of Gelsemoxonine



### 3-3. カロライナジャスミン(*Gelsemium sempervirens* Ait. f.)の成分探索<sup>6)</sup>

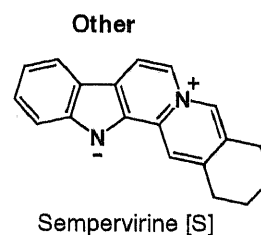
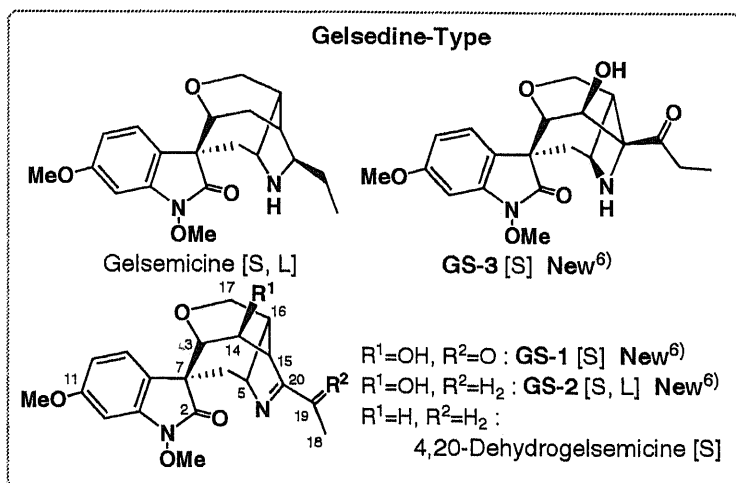
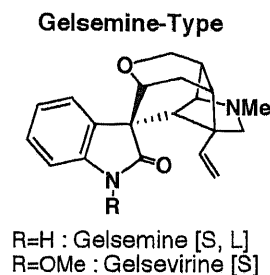
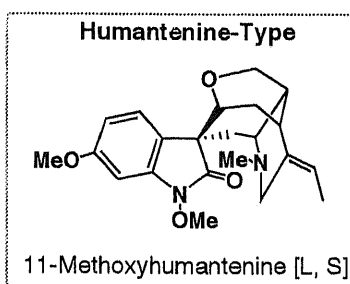
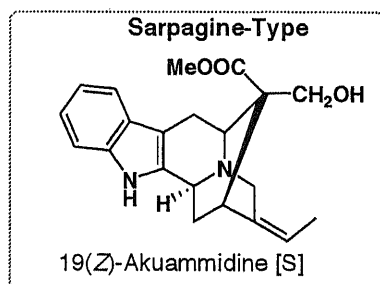
千葉大学薬学部附属薬用植物園にて採取したカロライナジャスミン(*Gelsemium sempervirens* Ait. f.)茎部 1.29 Kg (乾燥重量) を熱 MeOH にて抽出を行い、MeOH エキス 129.8 g を得た。得られた MeOH エキス 70.3 g を 1N HCl に溶解し、AcOEt で抽出した。水層を Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> にてアルカリ性とした後、5% MeOH-CHCl<sub>3</sub> にて抽出を行い、Crude Base 4.32 g を得た。これを各種クロマトにより精製を行い、新規アルカロイド 3 種(GS-1, GS-2, GS-3)、既知アルカロイド 7 種、新規イリドイド 1 種(GSIR-1)、既知イリドイド 2 種、既知クマリン 1 種の計 14 種の化合物を得た。主アルカロイドは Gelsemine であった。

各種スペクトルの解析により、新規アルカロイド GS-1、GS-2、GS-3 は、それぞれ、GE-3、14-Hydroxygelsenicine、Gelsemoxonine の 11-メトキシ体と推定した。

新規アルカロイド GS-1 は、6-メトキシオキシインドールに特徴的な UV 吸収を示し、HR-FAB-MS から分子式 C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> を与えた。<sup>1</sup>H-NMR においては、3 本の芳香族プロトン、*N*<sub>α</sub>-メトキシ基(δ3.92)、芳香環上のメトキシ基(δ3.81)、水酸基が

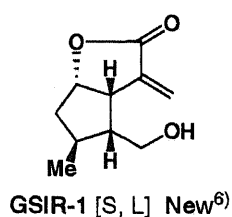
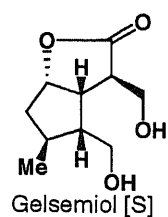
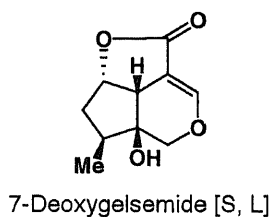
## Isolated Compounds from Carolina jasmine (*Gelsemium sempervirens* Ait. f.)

### < Alkaloids >

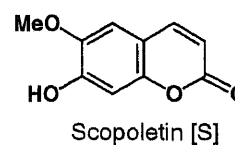


isolated from  
S : stems  
L : leaves

### < Iridoids >



### < Coumarin >



結合したメチンプロトン(H-14,  $\delta$ 4.43 d)、オキシメチレンのプロトン(H<sub>2</sub>-17)、オキシメチンのプロトン( $\delta$ 3.71, br-d, H-3)とともに、イミン窒素が結合したメチンのプロトン( $\delta$ 4.72 br-ddd, H-5)とシングレットのメチル基のシグナル( $\delta$ 2.64, 3H, s, H<sub>3</sub>-18)が観測された。<sup>13</sup>C-NMR では、オキシインドール 2 位のカルボニル炭素( $\delta$ 171.3)、イミン炭素( $\delta$ 174.8)とともに、 $\delta$ 197.3 にケトンのシグナルが認められた。以上の結果と 2D-NMR スペクトルの解析により本化合物の構造を 11-Methoxy-14-hydroxy-19-oxo-gelsenicine であると推定した。

新規アルカロイド GS-2 は、6-メトキシオキシインドールの UV 吸収を示した。HR-FAB-MS では、既知アルカロイド 14-Hydroxygelsemicine と比較して CH<sub>2</sub>O 分多

い分子式  $C_{20}H_{24}N_2O_5$  を与えた。また、 $^1H$ -NMR は、芳香族領域と芳香環上のメトキシ基( $\delta$ 3.93)のシグナルを除いて 14-Hydroxygelsenicine とよく類似していた。その他各種スペクトルより、本化合物を 11-Methoxy-14-hydroxygelsenicine と推定した。

新規アルカロイド GS-3 は、分子式  $C_{20}H_{24}N_2O_6$  を有し、UV、NMR より、6-メトキシオキシインドール骨格の存在が示唆された。 $^1H$ -並びに  $^{13}C$ -NMR は、今回構造訂正した Gelsemoxonine によく類似しており、 $^{13}C$ -NMR においてアゼチジン環に由来する炭素のシグナルが $\delta$ 55.8 (C-5)、 $\delta$ 67.3 (C-15)、 $\delta$ 33.7 (C-16)に観測された。さらに HMBC の解析により本化合物を 11-Methoxygelsemoxonine と推定した。

新規イリドイド GSIR-1 は、 $\alpha,\beta$ -不飽和エステルの UV 吸収を示し、HR-FAB-MS より分子式  $C_{10}H_{15}O_3$  が得られた。 $^1H$ -NMR においては、エキソメチレンのプロトン( $\delta$ 6.43 and  $\delta$  5.93, each d,  $J=2.2$ )、酸素が結合したメチレンプロトン( $\delta$ 3.82, dd,  $\delta$  3.58, dd)、ダブルットのメチル基( $\delta$  1.03, d,  $J=6.4$ )が観測された。 $^{13}C$ -NMR においては、ラクトンカルボニル炭素( $\delta$  171.2)、2 本のオレフィン炭素( $\delta$ 135.0,  $\delta$ 125.7)、酸素官能基が結合したメチン炭素( $\delta$ 81.9)、ヒドロキシメチレン炭素( $\delta$ 60.8)が観測された。以上の結果と、2 次元 NMR、NOE の解析により、本化合物の構造を推定した。

次に、葉部の含有アルカロイドの探索を行った。千葉大学薬学部附属薬用植物園にて採取したカロライナジャスミン(*Gelsemium sempervirens* Ait. f.)葉部 996.4 g(新鮮重量)を熱 MeOH にて抽出を行い、MeOH エキス 217.6 g を得た。得られた MeOH エキス 214.9 より、前述と同様に処理を行い、Crude Base 7.42 g を得た。これを各種クロマトにより精製を行い、新規アルカロイド 1 種(GS-2)、既知アルカロイド 3 種、新規イリドイド 1 種(GSIR-1)、既知イリドイド 1 種の計 6 種の化合物を得た。主アルカロイドは、茎部と同様 Gelsemine であった。

#### 4. *Gelsemium* アルカロイドの生物活性評価

*Gelsemium* 属植物は、薬物として利用されていた有毒植物であるが、本植物や含有アルカロイドの薬理学的・毒性学的特性についての詳細な検討は少ない。今回、代表的な *Gelsemium* アルカロイドについて急性毒性と腫瘍細胞殺傷作用を検討した。

#### 4-1. 急性毒性の評価

Gelsemine 型の Gelsemine、Gelsevirine、Gelsendine 型の Gelsenicine、14-Hydroxygelsenicine、Koumine 型の Koumine について急性毒性を評価した。

検体を ddY 系雄性マウス(体重 20-30g、1 群 5 匹)に尾静脈投与(5 mg/kg)した。更に静脈内投与で死亡を認めた化合物を腹腔内投与(5mg/kg)し、60 分後の生死判定に基づく Up-down 法により、各化合物の 50%致死用量(LD<sub>50</sub> 値)を算出した。

Gelsemine、Gelsevirine、Koumine については致死毒性を示さず、一般症状にも変化は見られなかった。一方、Gelsenicine 及び 14-Hydroxygelsemicine は致死毒性を示し(5 匹中 5 匹)、LD<sub>50</sub> 値は以下の通りであった。

|                       | <i>i.v.</i> | <i>i.p.</i> [μg/kg] |
|-----------------------|-------------|---------------------|
| Gelsenicine           | 70          | 219                 |
| 14-Hydroxygelsemicine | 136         | 190                 |

#### 4-2. 腫瘍細胞殺傷作用の検討

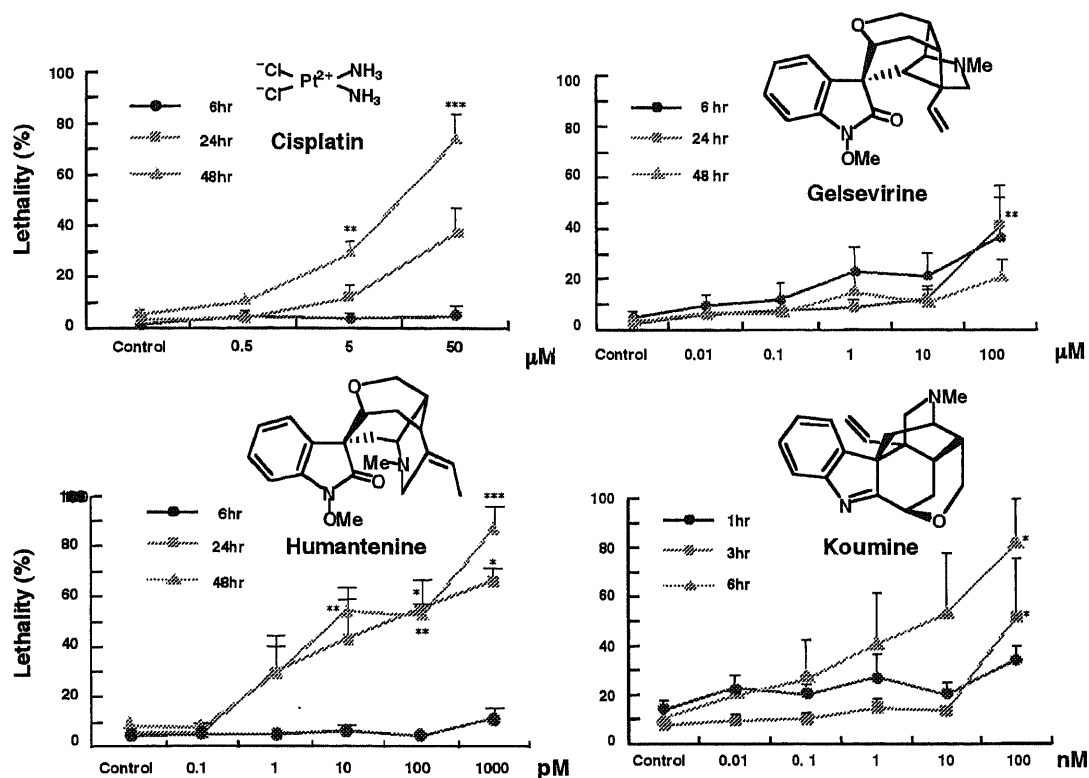
骨格の異なる 3 種の *Gelsemium* アルカロイド、Gelsevirine、Humantenine、Koumine についてラット肝癌細胞 H4-II-E-C3(以下 H4 細胞)に対する腫瘍細胞殺傷力を比較した。

セミコンフルエントの H4 細胞を 3 時間スターブし、サンプルを処置した後、色素排除法(Dye exclusion test)により死細胞をカウントし、細胞殺傷率(Lethality)を死細胞/全細胞数 の比として評価した。比較対象として抗癌剤 Cisplatin を用い、本化合物について H4 細胞に対する用量依存的細胞障害性を確認した。

Gelsevirine の細胞殺傷力は 3 化合物中最も弱く、100μM の 24 時間刺激で 41.3% の致死率を示すに留まった。Humantenine 及び Koumine については、それぞれ Humantenine は 0.01nM、Koumine は 1fM という濃度で致死率が 100%に達し、Gelsevirine と比べ非常に強い毒性を示した。そこで、Humantenine は最高用量を 100 分の 1 に設定し、Koumine は同用量で作用時間を短縮し、殺傷力を比較した。その結果、Humantenine は、100pM の 24 時間刺激で 56.0%の細胞殺傷率を示した。Koumine の細胞殺傷力は 3 化合物中最も強力と考えられ、100nM の 3 時間刺激で 51.0%、6 時間刺激で 82.0%に達した。

## Lethal Effect of *Gelsemium* Alkaloids on Rat Hepatocytes

(H4-II-E-C3 Cell)



The lethality is expressed as a percentage to the total cell numbers. It was assessed by the dye exclusion test. Data are mean  $\pm$  S.E. of three experiments, \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ , significantly different from each control value.

## 参考文献

1. 柴田承二監修、図説 正倉院薬物、宮内庁正倉院事務所編、中央公論新社 (2000).
2. M. Kitajima, Y. Arai, H. Takayama, and N. Aimi, *Proc. Japan Acad.*, **74**, Ser. B, 159-163 (1998).
3. R. R. Sokai, and C. D. Michaener, *University Kansas Sci. Bull.*, **28**, 1409 (1958).
4. M. Kitajima, N. Kogure, K. Yamaguchi, H. Takayama, and N. Aimi, *Org. Lett.*, **5**, 2075-2078 (2003).
5. L.-Z. Lin, G. A. Cordell, C.-Z. Ni, J. Clardy, *Phytochem.*, **30**, 1311-1315 (1991).
6. M. Kitajima, A. Urano, N. Kogure, H. Takayama, and N. Aimi, *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 1211-1214 (2003).

## あ と が き

マチン科ゲルセミウム(*Gelsemium*)属植物 2 種 *G. elegans*, *G. sempervirens* は、有毒植物であることが知られ、複雑で歪みのかかったインドール・オキシインドールアルカロイド類を多数含有している。本植物並びに含有アルカロイドに関する研究を行い、いくつかの新知見を得ることができた。

これら植物の細胞・組織培養研究を行い、生長良好なカルスの取得と継代培養に成功した。カルスの成分探索よりゲルセミウムアルカロイド類の存在が認められず、今回取得したカルスにおいてはアルカロイド生産酵素系が発現していないことが明らかとなった。そこで、他の組織培養体の取得を試みたが、現在のところ取得するには至っておらず、今後、アルカロイド生産培養体の取得を検討していく予定である。

正倉院薬物「治葛」の基原植物について DNA レベルでの鑑定を行うための基礎研究として 4 種のマチン科植物、すなわち 2 種の *Gelsemium* 属植物、マチン、ホウライカズラの葉部の DNA を用いた系統解析を行った。その結果、*G. elegans* と *G. sempervirens* 間の遺伝的類似度が高くないこと、他の植物との遺伝的関係が遠いことを明らかにすることができた。

また、*G. elegans*, *G. sempervirens* について部位別含有成分の精査を行った。*G. elegans* 葉部からは、新規アルカロイド 4 種(14,15-Dihydroxygelsenicine, GE-2, GE-3, GE-4)を含む計 14 種のアルカロイドを単離することができた。14,15-Dihydroxygelsenicine は、隣接ジオール基を有する初めてのゲルセミウムアルカロイドである。さらに既知化合物 Gelsemoxonine の構造を訂正し、アゼチジン環を有する初めてのモノテルペノイドインドールアルカロイドであることを明らかにすることができた。*G. sempervirens* 茎部からは新規アルカロイド 3 種(GS-1, GS-2, GS-3)、新規イリドイド 1 種(GSIR-1)を含む計 14 種の化合物を単離し、その葉部からは、茎部において見いだされた新規化合物(GS-2, GSIR-1)を含む計 6 種の化合物を単離した。

代表的なゲルセミウムアルカロイドの薬理活性評価を行い、ラット肝癌細胞 H4-II-E-C3 を用いて細胞毒性を評価した結果、Koumine、Humantenine に抗腫瘍薬シスプラチンを上回る腫瘍細胞殺傷作用が認められた。今後、特異な構造を有するゲルセミウムアルカロイド類の詳細な薬理活性評価を進め、活性発現の構造的要因を明らかにするための各種誘導体の合成と構造活性相関の検討を計画している。

本研究は、千葉大学大学院薬学研究院生体機能性分子研究室（小暮紀行修士、浦野晶子修士、西谷知香氏）、同遺伝子資源応用研究室（須藤浩博士）、および同薬物治療学研究室（中村智徳博士、三野由加氏）の実験の成果であり、深くお礼申し上げます。

貴重な *Gelsemium elegans* をご供与下さいました東京薬科大学薬学部 指田豊教授、伊豆熱川バナナワニ園 木村智氏、清水秀男氏に深謝いたします。

貴重な *Strychnos nux-vomica* の葉をご供与下さいました国立医薬品食品衛生研究所筑波薬用植物栽培試験場 下村講一郎博士に深謝いたします。

稿を終えるに当たり、本研究に対して与えられた日本学術振興会科学研究費補助に深く感謝いたします。