

病原性微生物が産出する新規環状ポリペプチド M10709 に関する研究  
および

熱帯原産植物からの腓リパーゼ阻害活性成分の探索研究

千葉大学大学院医学薬学府  
薬品製造学研究室  
渡邊 大輔

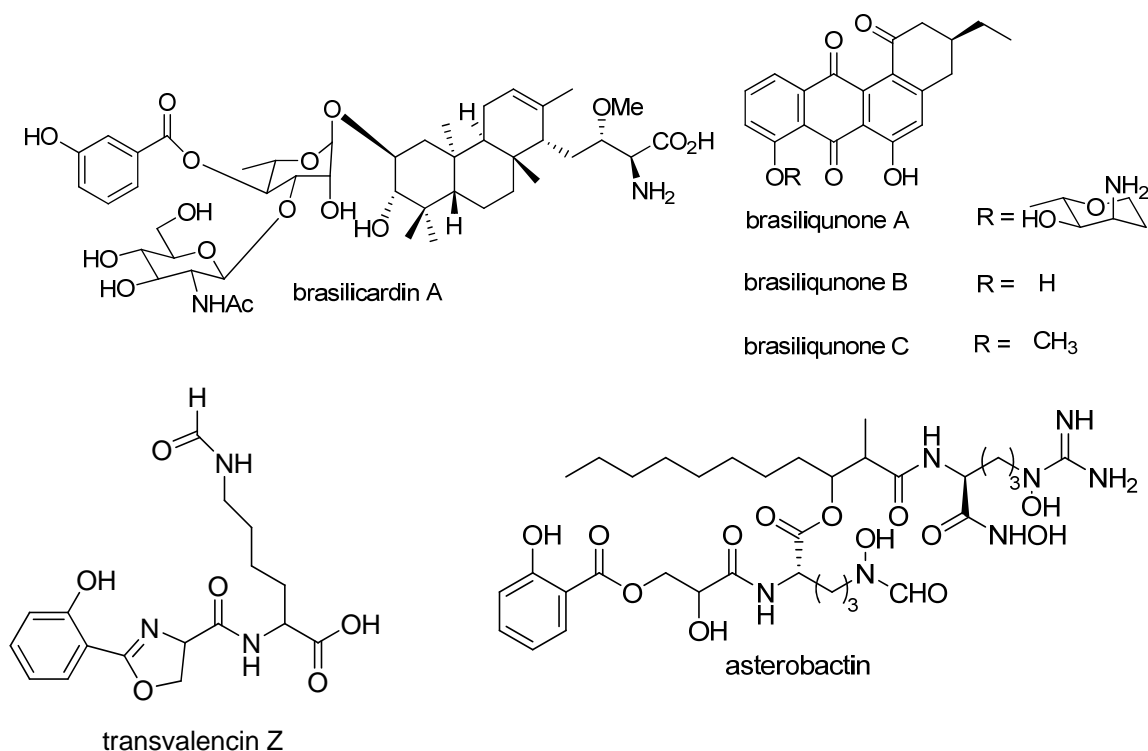
# 目次

第一部 病原菌微生物が産出する新規環状ポリペプチドについて	
第一章 序論	3
第二章 実験方法	6
第三章 結果	7
第一節 平面構造の決定について	7
第二節 立体化学	10
第三節 抗菌活性について	13
第四章 結語	14
第二部 熱帯原産植物からの腭リパーゼ阻害活性物質の探索研究	
第一章 序論	16
第二章 研究方針	18
第三章 タイ原産植物エキスの腭リパーゼ阻害活性	
第一節 タイ原産植物エキスの腭リパーゼ阻害活性	19
第二節 腭リパーゼ活性試験	21
第一項 試験方法の原理について	21
第二項 実験方法について	21
第三節 <i>Citrus hystrix</i> の分画	24
第一項 抽出方法の検討	24
第二項 <i>C. hystrix</i> 葉からの抽出・分離	25
第三項 大量スケールでの分離	32
第四項 腭リパーゼ活性成分の構造決定について	33
第四章 考察	38
第三部 ペルー原産薬用植物からの有用成分の探索	
第一章 序論	40
第二章	
第一節 <i>Artemia salina</i> に対する毒性を指標としたスクリーニング	44
第二節 結果	45
第三章	
第一節 実験	47
第二節 結果	49
第四章 結論	50
第五章 活性を示した植物の文献上の情報と考察	
第一節 <i>Artemia salina</i> に毒性を示した植物	51
第一項 <i>Kameria triandro</i>	51
第二項 <i>Achornea castaneifolia</i>	52
第二節 AchE 阻害活性を示した植物	
第一項 <i>Banisteriopsis cippi</i>	54
第二項 <i>Eleutherine bulbosa</i>	55
リファレンス	56
補足 (スペクトルデータ)	61
謝辞	79

## 第一部 病原性微生物が産出する新規環状ポリペプチド M10709 に関する研究

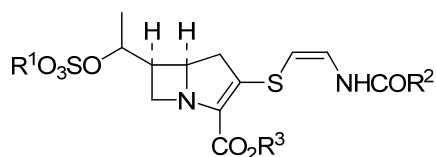
## 第一章 序論

天然からの新規活性化合物の探索対象は、森林・海洋等、様々な生態系に及び天然物化学を発展させてきた<sup>1)</sup>が、病原性微生物の代謝物を対象にした研究はあまり盛んに行われていない。病原微生物は生育の際、他の生物と競合することが多く、また一般の微生物とは異なった特有の代謝経路を持ちうることから新たな天然資源として期待される。実際、共同研究者の三上らは、これまでに病原菌 *Nocardia brasiliensis* の産出する新規化合物として、免疫抑制作用を持つ brasilicardin A<sup>2)</sup>や抗菌作用を持つ brasiliquinones<sup>3)</sup>, *Nocardia transvalensis* から抗菌作用を持つ transvalencin Z<sup>4)</sup>, Asterobactin<sup>5)</sup> を単離・同定し、報告している。

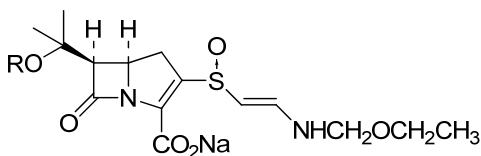
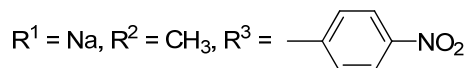
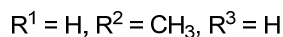
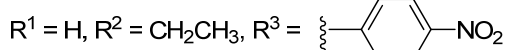
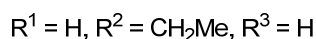


今回我々は、胃癌の患者から単離・培養した *Streptomyces* sp. IFM10709 の菌株から新規化合物の探索を試みた。*Streptomyces* 属は、ヒト病原菌の *Nocardia*, *Actinomyces*, *Dermatophilus*, *Mycobacterium* と同じ放線菌であるものの、感染による人への影響は免疫不全の患者を除き、創傷合併症、膿瘍形成、菌腫等に限られると考えられてきた。しかしながら、近年、*Streptomyces* 属が健全なヒトにおける肺炎の原因となっていた症例が報告されておりヒト病原菌になりえることが分かってきた<sup>6)</sup>。1940 年頃から *Streptomyces* 属を対象とした新規活性化合物の探索が行われ、その結果多くの化合物が単離されており、例えば  $\beta$ -lactams (Olivanic acids<sup>7)</sup>, C-19393s<sup>8)</sup>, amino glycosides (streptomycin<sup>9)</sup>, bialaphos<sup>10)</sup>, kanamycin<sup>11)</sup>, polyketides (tautomycin<sup>12)</sup>, kendomycin<sup>13)</sup>, avermectin<sup>14)</sup>, cyclic peptides (YM-216391<sup>15)</sup>, zelvomycin<sup>16)</sup>, RP-7116<sup>17)</sup> 等が報告されて

いる。しかしながら、*Streptomyces* 属における種数は 500 を超え、幅広く土壌・海洋等幅広く生息し、様々な代謝経路を持ち、また生体変化をすることから多様性に富んでおり、既存の化合物とは異なった未だ知られていない代謝物を産出することが考えられる。今回我々は、現在までに病原性微生物として確認はされていないものの、がん患者の胃から単離された経緯のある *Streptomyces* sp. IFM 10709 の生産する化合物として新規環状ポリペプチド M10709 を単離・構造決定し、その抗菌活性試験を行った。

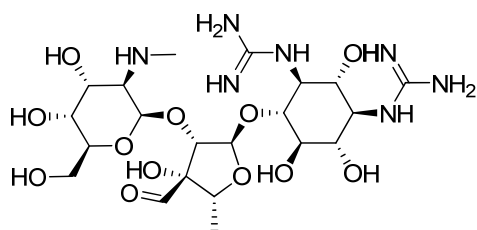


olivanic acids

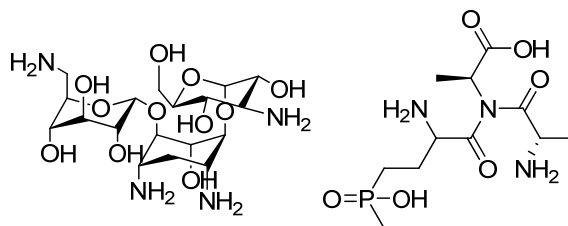


C-19393 S<sub>2</sub> : R = SO<sub>3</sub>Na

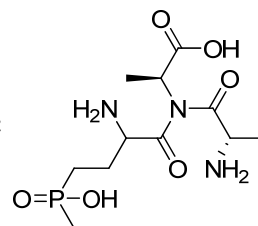
C-19393 H<sub>2</sub> : R = H



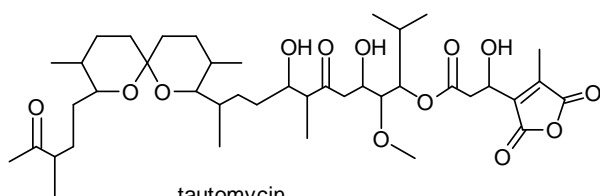
streptomycin



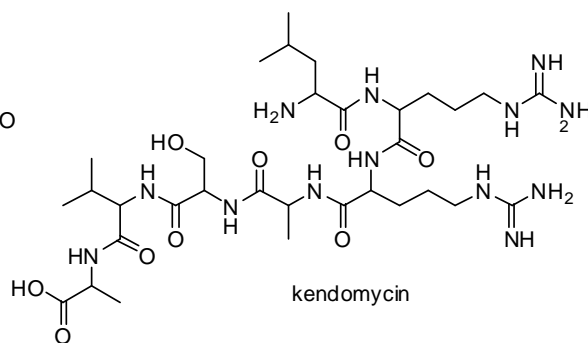
kanamycin



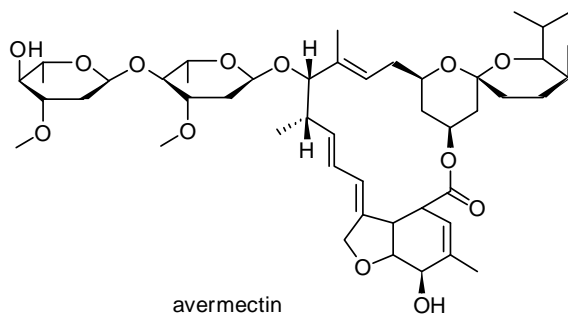
bialaphos



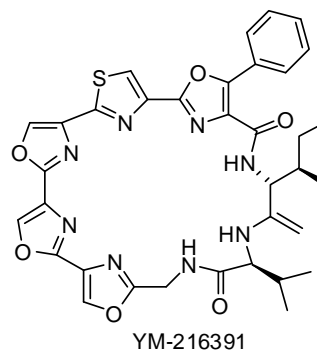
tautomycin



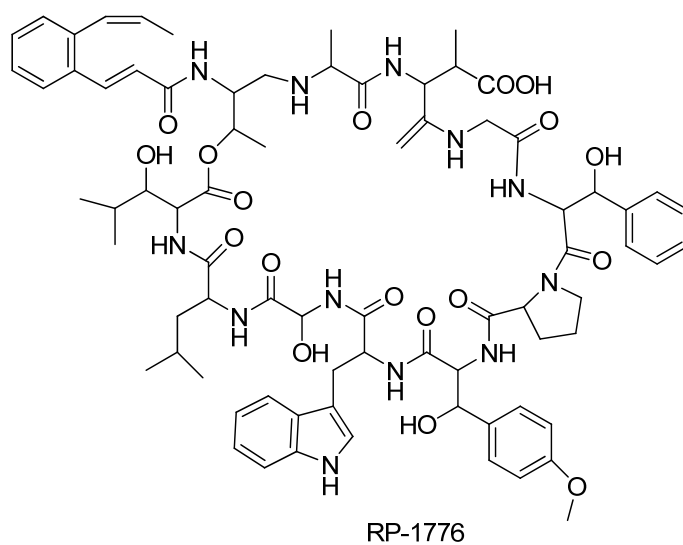
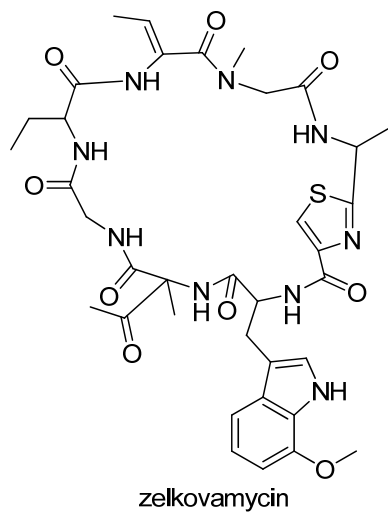
kendomycin



avermectin



YM-216391



## 第二章 実験方法

### ● 菌について

現在の放線菌の定義は 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による分子系統学に基づいている<sup>18)</sup>. そこで、*Streptomyces* sp. IFM10709 の 16S rRNA における 遺伝子配列の解読をしたところ、*S. rectiverticillatus*, *S. aureoversilis* と それぞれ 99.85% の相同性を示し、*S. rectiverticillatus*, *S. aureoversilis* と近縁種であることが判明した.

### ● 菌の培養

*Streptomyces* sp. IFM10709 を BHI agar (Difco, Detroit, 2% glucose 含有) に添加し、回転式振とう培養機 (250rpm) にて 96 時間培養した. その後、他の容器に分注し、新たな培地 (meat extract 0.5 %, peptone 0.5%, glucose 1.0 %, starch 1.0 %, antifoam 0.005%,) を加え pH 7.4 に戻した後、回転式振とう培養機にて 6 日間培養した. 培養後、培養液をろ過し、MeOH を用いて菌株から成分を抽出し、そのろ液とあわせて濃縮し、粗抽出物を得た.

### ● 抗菌活性試験

検体の最小生育阻害濃度 (MIC) は、Microbroth dilution 法<sup>19)</sup>により、決定した. 細菌には BHI 培地を用い、糸状菌には Sabouraud dextose 培地 (Difco, Detroit) を用いた.

### ● 活性成分の単離について

*Streptomyces* sp. IFM10709 の MeOH 抽出物を H<sub>2</sub>O-AcOEt (1 : 3) で液液抽出し、得られた AcOEt 抽出物を H<sub>2</sub>O-MeCN (1 : 1) に懸濁した. 懸濁液を遠心分離 (3000 rpm, 10 min) した後、逆相 HPLC [H<sub>2</sub>O-MeCN (40 : 60), Cosmosil, 5C18-ARII] にて分離し、更に Hexane-AcOEt (10 : 1) で洗浄することで精製し、新規環状ペプチドである M10709 (**1**) を単離した (Chart. 1-1.).

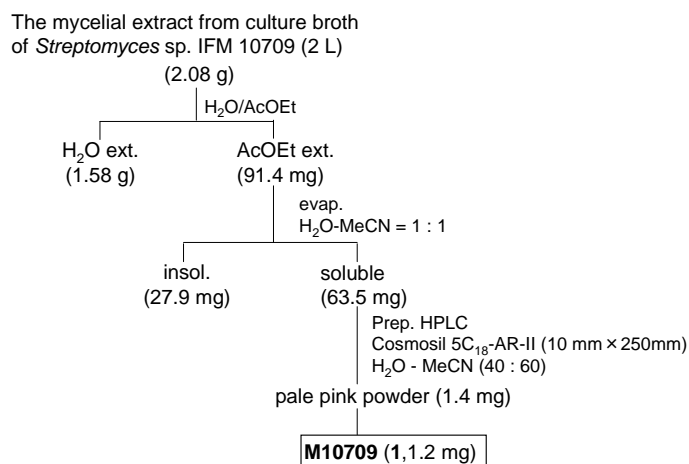


Chart. 1-1. Isolation of M10709 (**1**) from *streptomyces* sp. IFM 10709

### 第三章 結果

#### 第一節 平面構造の決定について

HRESIMS [ $m/z$  1009.5721 (calculated for  $C_{53}H_{78}N_8O_{10}Na = 1009.5739$ )] から分子式が  $C_{53}H_{78}N_8O_{10}$  であると決定した (Table 1-1). IR (3600-3250, 1639  $cm^{-1}$ )からヒドロキシ基とアミドカルボニル基の存在が示唆された. また、FABMS において、969 ( $MH^+-H_2O$ ) が基準ピークとして見られたことからヒドロキシ基の存在が示唆された.  $^{13}C$  NMR により、メチル が 13 個、メチレン が 3 個、メチン が 25 個、4 級炭素 が 12 個、アミドカルボニル炭素が 7 個あることが分かった. また、2D DQFCOSY と TOCSY による  $^1H$  NMR 分析から、5 つのアミド基の NH シグナルと 2 つの *N*-methyl シグナルが明らかになった. これらによって、M10709 は、7 つのペプチドで構成されていることが示唆された. 221 nm と 283 nm に UV 吸収があることから、トリプトファンか、類似のインドール骨格が存在することが示唆された (Table 1-1.). これらのデータを、*Streptomyces* sp. CNB982 から単離・同定された cyclomarin C (**2**)<sup>20</sup>と構造比較したところ、**2** の 2-amino-3,5-dimethylhex-4-enoic acid (ADH) 部位以外を除くデータが類似していた (Table 1-2.). 分子式と NMR シグナルパターンから、cyclomarin C の ADH 残基が valine 残基に置き換わったものであることが推測できた (Fig. 1-1.).

Table 1-1. Physico-chemical properties of M10709 (**1**) and cyclomarin C (**2**).

Compound	M10709 ( <b>1</b> )	cyclomarin C ( <b>2</b> )
Appearance	White powder	White solid
Mp	158-163 °C	Not refered
[ $\alpha$ ]	(ORD) [ $\alpha$ ] <sub>589</sub> <sup>24</sup> -106.3, [ $\alpha$ ] <sub>510</sub> <sup>24</sup> -133.8, [ $\alpha$ ] <sub>436</sub> <sup>24</sup> -155.1 (c 1.9 x 10 <sup>-2</sup> , MeOH)	[ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup> -19.7 (c 1.0, CHCl <sub>3</sub> )
Molecular formula	$C_{53}H_{78}N_8O_{10}$	$C_{56}H_{82}N_8O_{10}$
HRMS ( $m/z$ , pos)	(HRESIMS)	(HRFABMS)
Found:	1009.5721	1049.6195
Calcd:	1009.5739 (for $C_{53}H_{78}N_8O_{10}Na$ )	1049.6052 (for $C_{56}H_{82}N_8O_{10}Na$ )
IR $\nu_{max}$ $cm^{-1}$	3600-3250, 1639	3400-3295, 1644
UV $\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ ) (MeOH)	221 (20,900), 283 (5,200)	220 (16,400)



Table. 1-2.  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^{15}\text{N}$  NMR data of M10709 (**1**) and cyclomarin C (**2**) (in  $\text{CDCl}_3$ )

		M10709 ( <b>1</b> )				Cyclomarin C ( <b>2</b> )			
	no.	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	multi, $J$ (Hz)	$^{15}\text{N}$	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$	multi, $J$ (Hz)	
<i>N</i> -Me <sub>2</sub> C(CH=CH <sub>2</sub> )- $\beta$ -OMe-Trp	1	171.03				170.5			
	2	53.98	4.70	dd, 5.1, 4.0		52.7	4.56	t, 4	
	3	69.08	5.31	d, 5.1		68.4	5.30	d, 4.4	
	4	123.22	7.27	S		123.0	7.30	s	
	5	111.19				111.2			
	6	126.83				126.7			
	7	119.10	7.60	d, 7.6		118.6	7.49	d, 8	
	8	119.58	7.05	dd, 7.6, 7.1		119.4	7.04	dd, 7, 7	
	9	121.57	7.11	dd, 8.1, 7.1		121.4	7.18	dd, 8, 8	
	10	114.36	7.49	d, 8.1		114.2	7.52	d, 8	
	11	135.78				135.7			
	12	59.24				57.6			
	13	143.67	6.06	dd, 17.6, 11.1		143.6	6.06	dd, 17, 10	
	14	113.82	5.22	d, 11.1		111.2	5.22	d, 10	
Val	15	27.81	1.69	S		24.9	1.56	s	
	16	27.89	1.70	S		24.9	1.70	s	
	17	172.38				172.5			
	18	58.99	4.05	dd, 9.5, 9.1		57.9	4.08	t, 5	
	19	31.70	0.75	M		35.4	1.63	m	
	20	18.49	0.64	d, 6.6		<sup>a</sup>	<sup>a</sup>		
<i>N</i> -Me-Leu	21	19.97	0.61	d, 6.6		18.4	0.64	d, 6.8	
	22	168.45				168.3			
	23	58.83	4.78	br, d, 10.6		58.4	4.83	t, 10	
	24	38.84	1.08	M		38.3	1.06	M	
Val	25	25.10	1.47	M		25.6	1.42	M	
	26	22.49	0.88	d, 6.6		23.3	0.82	d, 6.8	
	27	23.51	0.91	d, 6.6		23.4	0.87	d, 6.3	
	28	170.58				171.4			
	29	55.23	4.41	dd, 8.5, 8.5		55.2	4.36	t, 8.5	
	30	30.79	2.21	M		30.7	2.20	M	
$\beta$ -OMe-Phe	31	19.97	0.95	d, 6.6		18.6	1.05	d, 6.8	
	32	19.27	1.06	d, 7.1		19.2	0.94	d, 6.5	
	33	169.73				169.5			
	34	55.83	4.86	dd, 5.5, 4.5		55.8	4.89	t, 5	
	35	79.85	5.08	d, 5.5		79.8	5.07	d, 5	
	36	134.97				135.0			
Ala	37	127.99	7.18	M		<sup>b</sup>	<sup>b</sup>		
	38	128.11	7.24	M		<sup>b</sup>	<sup>b</sup>		
	39	128.63	7.24	M		<sup>b</sup>	<sup>b</sup>		
	40	57.77	3.36	S		57.6	3.36	S	
	41	171.52				171.5			
	42	50.81	4.78	dd, 4.3, 7.1		50.5	4.88	M	
<i>N</i> -Me- $\gamma$ -OH-Leu	43	20.83	1.22	d, 7.1		20.7	1.30	d, 7.3	
	44	168.64				168.7			
	45	59.46	4.65	br, d, 9.6		59.2	4.78	M	
	46	32.34	0.33	br, m		33.0	0.67	M	
			2.18	br, m			2.28	M	
	47	33.25	1.30	br, m		33.2	1.42	M	
	48	66.18	3.12	br, dd, 10.5, 5.0		66.2	3.18	dd, 11, 5	
			3.18	br, dd, 10.5, 3.0			3.23	dd, 11, 4	
	49	17.68	0.63	br, d, 6.6		17.7	0.75	d, 6.8	
	N-1				150.4				
	NH-2		7.24	d, 4.0	118.5		6.80	d, 3	
	NH-3		8.17	d, 9.5	116.2		8.05	d, 10	
	NH-5		8.03	br, d, 8.5	120.1		7.93	d, 8	
	NH-6		7.10	br, d, 4.5	121.5		7.12	d, 5	
	NH-7		8.48	d, 4.3	100.8		8.17	d, 10	
	NMe-4	29.51	2.81	S	117.7	29.4	2.82	S	
	NMe-8	29.28	2.66	br, s	120.2	29.2	2.71	S	

<sup>a</sup> Resonances on 124.7 ppm (for  $^{13}\text{C}$ ); 4.78 ppm (for  $^1\text{H}$ ,  $d$ ,  $J = 10$  Hz) for CH=, and 19.9, 27.7 ppm (for  $^{13}\text{C}$ ); 1.24, 1.27 ppm (for  $^1\text{H}$ ) for 2 x Me were observed. <sup>b</sup> Assigned as 127-128 ppm and 7.24-.26 ppm for  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR, respectively.

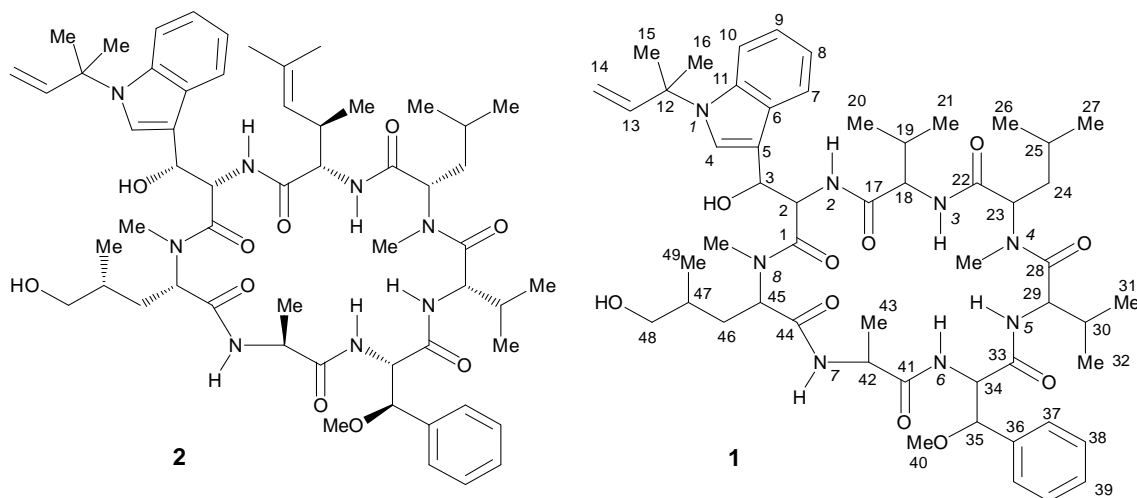


Fig. 1-1. structures of cyclomarlin C (**2**) and proposed planer one of M10709 (**1**).

また、DQFCOSY, TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC により、残りの 6 個のアミノ酸は、*N*-methyl- $\gamma$ -hydroxyleucine, alanine,  $\beta$ -methoxyphenylalanine, *N*-methylleucine, valine (2 つ分) であることが判明した。7 つのアミノ酸配列の決定は、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC,  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC, NOESY によって決定した。*N*-(1,1-dimethylallyl)tryptophan と valine 残基の結合は、NOE によって確かめ、他の結合は  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{C}$  HMBC のロングレンジ相関によって確かめた。また、単なるロングレンジ相関からは決定できないアミノ酸同士の結合様式については、2 ヶ所に存在する *N*-methyl 基が鍵となった。すなわち、*N*-methyl leucine 由来の methyl 基 H は Valine の 26 位に相当するカルボニルと相関を持つこと、また *N*-methyl- $\gamma$ -hydroxy-lucine 由来のものは alanine 由来のカルボニルではなく、修飾された tryptophan 由来のカルボニルと相関をもつことから Fig. 1-2 のように決定した。tryptophan と上の 1 位 1,1-dimethylallyl 基と 2 つの *N*-methyl 基の存在は、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC によって裏付けた(Fig. 1-3.).

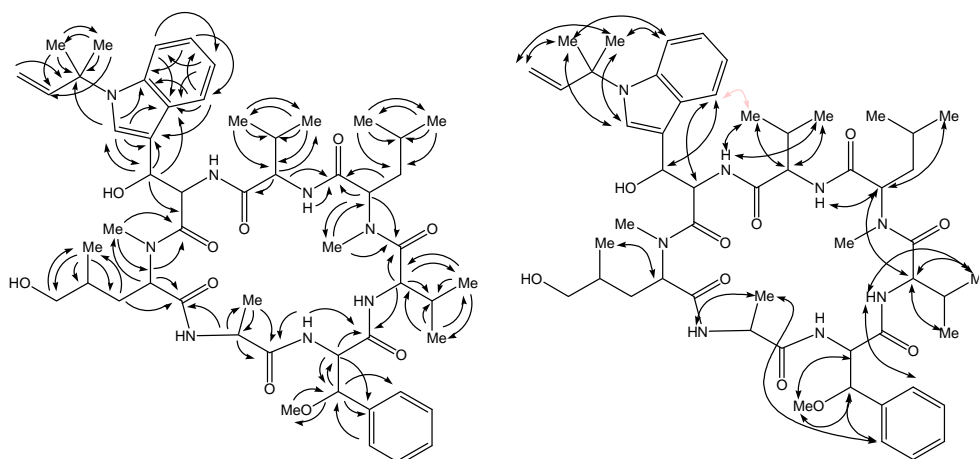


Fig. 1-2. Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear correlations (left) and NOESY (right) of M10709 (**1**)

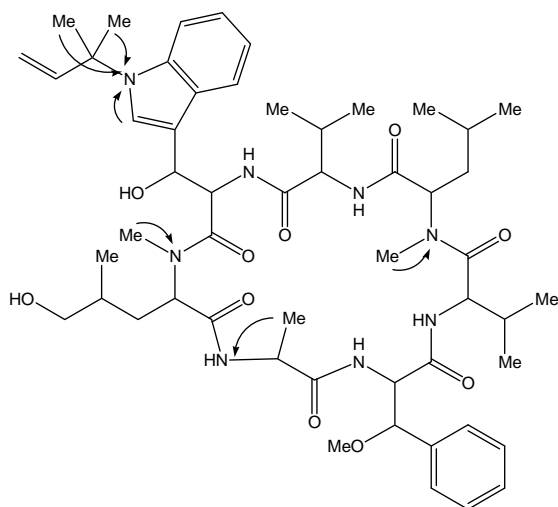
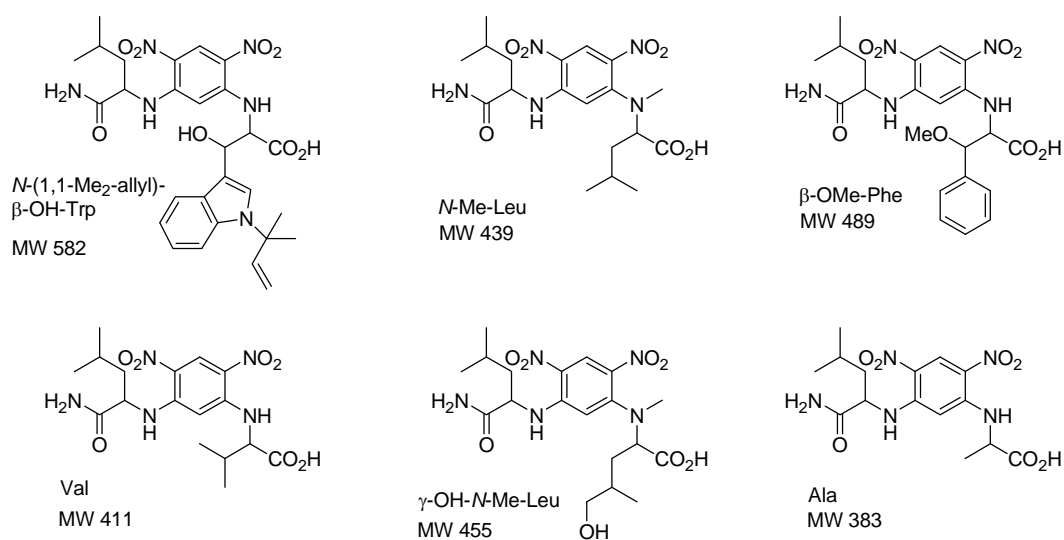


Fig. 1-3. Long-range  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  heteronuclear correlations of M10709 (**1**).

## 第二節 立体化学

アミノ酸の立体配置の決定は、advanced Marfey 法<sup>21)</sup>により行った。この方法は、ポリペプチドなどのサンプルを加水分解して得た絶対配置不明のアミノ酸の混合物に対し、1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide (FDLA) の L 体および D 体を別個に反応させて、相当するアミノ酸 - L- 若しくは D-DLA 誘導体を得る。そして、この混合物をそれぞれ LC/MS 分析する。そこで、用いた FDLA とアミノ酸が同じ絶対配置 (L 体若しくは D 体) を持つほうが、異なる絶対立体配置を持つものよりも短い保持時間を示すことが経験的に知られており、そこから元のアミノ酸の絶対配置を決定する方法である。そこで常法<sup>21)</sup>に従い、M10709 (**1**) を 6 N HCl 存在下、9 時間加熱還流させ、濃縮後、弱塩基条件下で L- および D-FDLA と反応させた。こうして得られた混合物について LC/MS 分析を行った。Fig. 1-4. に想定される 6 種の DLA 誘導体の構造とその分子量を示した。ここで示されている MS 値についての LC/MS 分析の結果を Fig. 1-5 に示す (MS は negative mode で行ったため、Fig. 1-4. に示す分子量 -1 を観測した)。その結果、6 種のうち 4 種 ( $\beta$ -OMe-Phe, Val,  $\gamma$ -OH-*N,N*-Me-Leu, Ala) については L-DLA 誘導体の保持時間が対応する D 体のものよりも短かったため、L-体であると決定した。一方、tryptophan 誘導体については強い酸性条件で分解したためか、誘導体のピークは観測されなかった。また、*N*-Me-Leu については、一部ラセミ化したことで、L-体 および D-体の DLA 誘導体において、6 : 4 の比を持つジアステレオマーの混合物となっていた。このラセミ化は加水分解反応の時間を 2 時間、さらに 30 分まで短縮しても同じ割合で観測された。M10709 (**1**) の NMR より、推定される純度よりこのものが単一のジアステレオマーで構成させていると考えられたことから、このラセミ化は酸による加水分解中に起きたと推定された。また、L-DLA 誘導体では保持時間の短いピークの方が強度が強かったことから M10709 (**1**) に含まれる

*N*-Me-Leu を L 体であると決定した。これにより、M10709 を構成する 7 つのアミノ酸の内、加水分解時に壊れた *N*-(dimethylallyl) tryptophan 残基を除く、6 つの立体配置を L と決定した (Fig. 1-5)。NMR の類似性から、他の不斉点についても、cyclomarin (2) と同様の絶対配置を持っているものと結論した (Fig. 1-6)。



DLA: 2,4-dinitrophenyl-5-leucinamide.

Fig. 1-4. Structures of Amino Acid - DLA Derivatives

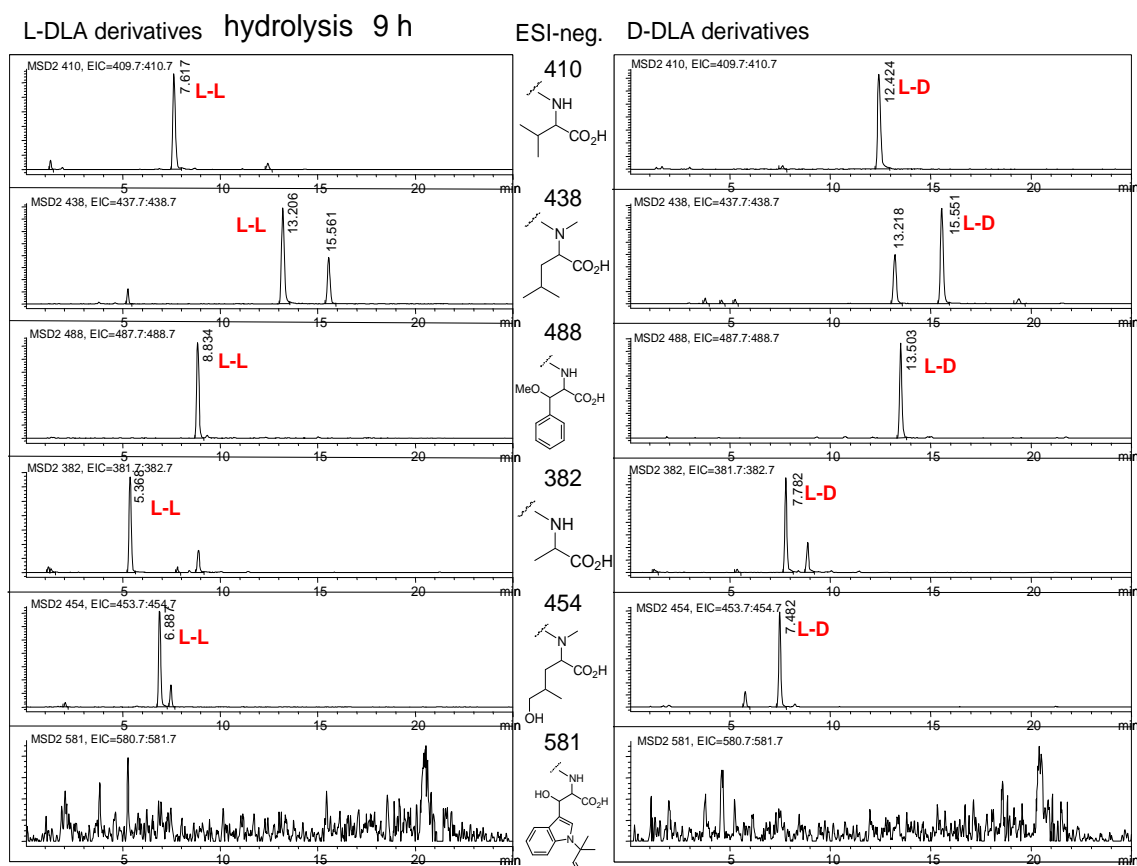


Fig. 1-5. Results of advanced Marfey's method

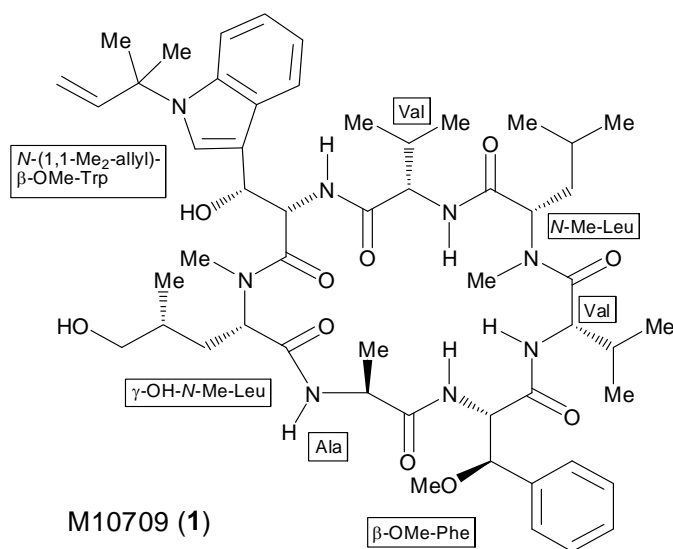


Fig. 1-6 Structure of M10709 (1)

### 第三節 抗菌活性について

M10709 (**1**) は、*Micrococcus luteus* IFM 2066 に対して、MIC 5.0 g/ml の抗菌活性を示した。しかし、*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* に対して、抗菌活性は認められなかった (Table 1-3.).

Table 1-3. *In vitro* antimicrobial activity of M10709 (**1**).<sup>a</sup>

Test organisms	MIC values (μg/ml)
<i>Micrococcus luteus</i> IFM 2066	5
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	> 80 <sup>b</sup>
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	> 80
<i>Escherichia coli</i> NIH JC-2	> 80
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	> 80
<i>Aspergillus niger</i> IFM 5368	> 80
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 40092	> 80

<sup>a</sup> MIC values were determined by microbroth dilution method using BHI medium for bacteria and Sabouraud dextrose broth for fungi, respectively. <sup>b</sup> Partial inhibition was observed.

#### 第四章 結語

今回、胃癌患者から単離培養した *Streptomyces* sp. M10709 より新規化合物 M10709 (**1**) を単離同定した. この M10709 (**1**) は、cyclomarin C (**2**) と類似の heptapeptide で構成されており、*N*-(1,1-Me<sub>2</sub>-allyl)-β-OH-Trp を除くアミノ酸で、L 体であることが確認できた. また、*M. luteus* に対し、MIC 値 5 μg/ml の抗菌活性を示したが、他の菌に対しては抗菌活性を示さなかった.

## 第二部 熱帯原産植物からの腓リパーゼ阻害活性物質の探索研究



## 第一章 序論

近年、アメリカ合衆国や西欧諸国を中心とした先進諸国において、肥満症が増加傾向にある。アメリカ合衆国・イギリスは特にその傾向が顕著であり、2005 年に行われた 15 歳以上を対象にした調査<sup>22)</sup>で、WHO 体格評価 BMI (体重 kg/身長 m<sup>2</sup>) 基準における「肥満」(BMI  $\geq$  30) の割合はそれぞれ 32.2%、23.0%を占め、この 20 年間でそれぞれ 2 倍以上、3 倍以上に増加している。また、「標準」域より高い人 (BMI  $\geq$  25) の割合はそれぞれ 66.3%、60.0% であり、過半数を超える (Fig. 2-1.)。さらに、アメリカ合衆国においては、15 歳未満の子供においても肥満者の増加が顕著であり、ここ 20~30 年の間に 2 倍から 3 倍に増加している<sup>23)</sup>。肥満は生活習慣病の発症や更には動脈硬化症による様々な疾病の重大な要因となっている<sup>24)</sup>。しかし、摂食は生きるための本能であると共に複雑な遺伝的、感情的、そして社会文化的要因から、人間における最も強い欲求の一つである。また急激な摂食の抑制はエネルギー恒常性を乱し、その反動により更なる食欲増進欲求に繋がる<sup>25)</sup>。そこで我々は、肥満の予防・解消対策として、腓リパーゼ活性阻害に着目した。腓リパーゼ活性阻害物質は、摂食量を変えずにトリグリセライドの体内吸収を抑制し、体重の増加を防ぐことができる<sup>26)</sup>。

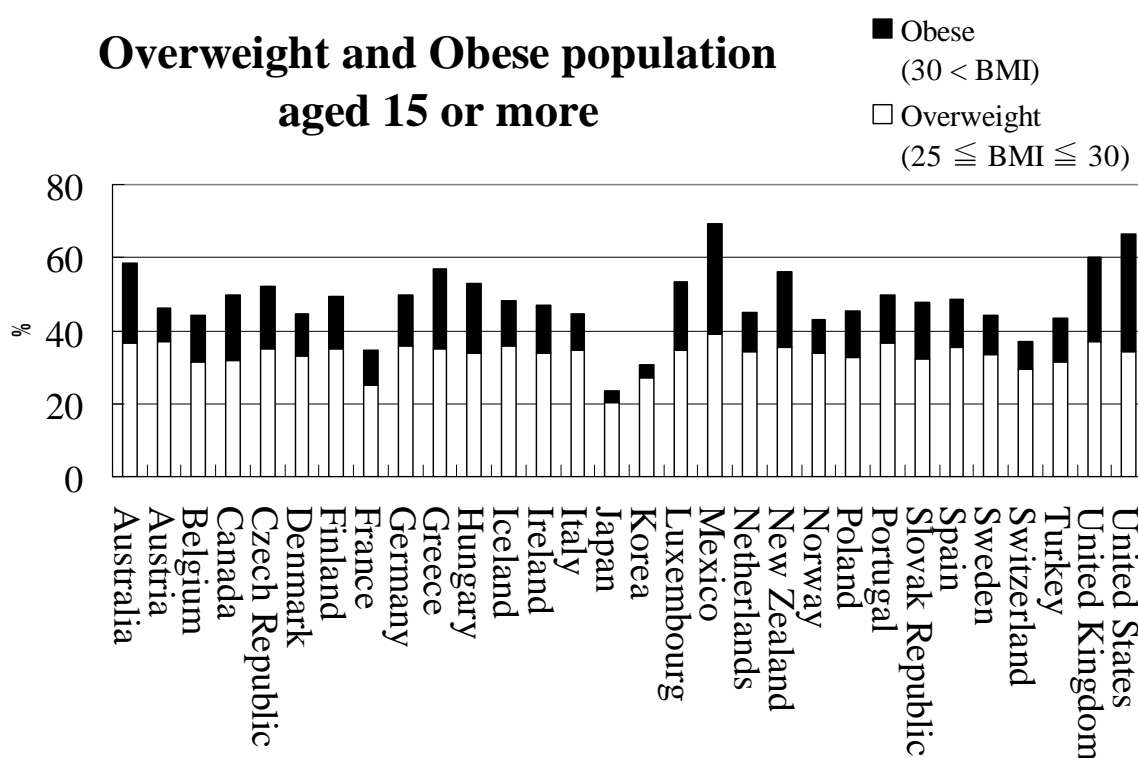
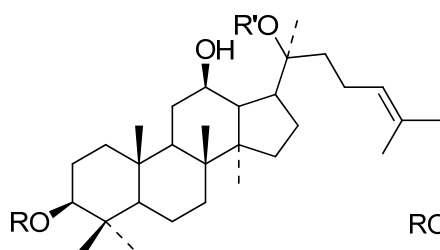
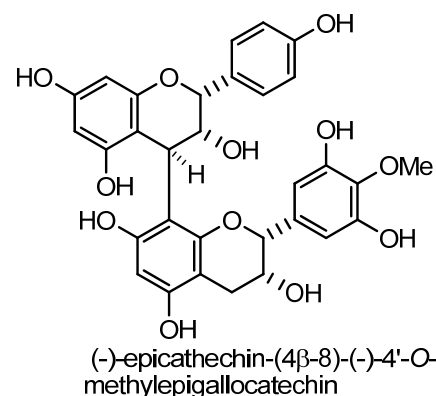
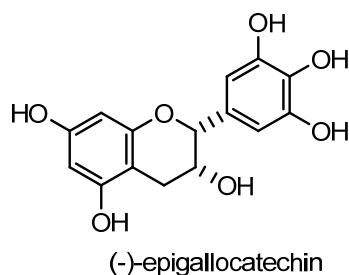
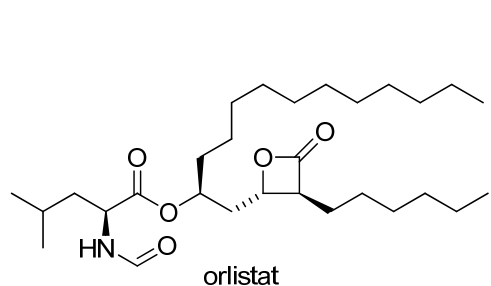


Fig. 2-1. Rate of the people over BMI standard region.

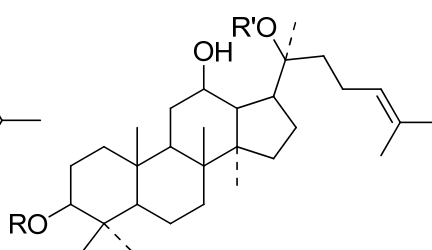
食物に含まれる脂質のトリグリセリド(中性脂肪)は、そのままの形では消化管で吸収されず、舌リパーゼによって微量、胃リパーゼによって 10~30%、膵リパーゼ によって 50~70% が加水分解され、吸収されやすい脂肪酸とグリセロールになる<sup>27)</sup>。そこで、膵リパーゼを阻害すれば、大半の摂取した脂質はそのまま消化吸収されることなく、体外へ排出できる。

Orlistat<sup>28)</sup>は、FDA から承認済みの世界で最も頻用されている抗肥満薬の一つである。しかしながら、服用時に副作用である油性便・油性下痢・便失禁等が見られる場合があり、また親油性ビタミンが欠乏する傾向がある。近年、植物から膵リパーゼ阻害物質の探索が盛んに進められている。例えば、クルミ科 *Juglans mandshurica* の実から 1,4,8-trihydroxynaphthalene-1-*O*- $\beta$ -D-[6'-*O*-(3",4",5"-trihydroxybenzoyl)]glucopyranoside<sup>29)</sup>、ニシシギ科 *Salacia reticulata* の根から、(-)-epigallocatechin 及び (-)-epicatechin-(4 $\beta$ -8)-(-)-4'-*O*-methylepigallocatechin<sup>31)</sup>、ウコギ科 *Panax ginseng* の根から、ginsenosides<sup>29)</sup> が阻害物質として報告されている。



Ginsenoside

R<sub>b1</sub> R = D-Glc ( $\beta$ 1-2) D-Glc  
R' = D-Glc ( $\beta$ 1-6) D-Glc  
R<sub>b2</sub> R = D-Glc ( $\beta$ 1-2) D-Glc  
R' = L-Ara (pyr) ( $\alpha$ 1-6) D-Glc  
R<sub>c</sub> R = D-Glc ( $\beta$ 1-2) D-Glc  
R' = L-Ara (fur) ( $\alpha$ 1-6) D-Glc  
R<sub>d</sub> R = D-Glc ( $\beta$ 1-2) D-Glc  
R' = D-Glc



Ginsenoside

R<sub>c</sub> R = L-Rha ( $\alpha$ 1-2) D-Glc  
R' = D-Glc  
R<sub>f</sub> R = D-Glc ( $\beta$ 1-2) D-Glc  
R' = H  
R<sub>g1</sub> R = D-Glc  
R' = D-Glc  
R<sub>g2</sub> R = L-Rha ( $\alpha$ 1-2) D-Glc  
R' = H

## 第二章 研究方針

今回我々は、新規腓リパーゼ阻害活性物質の探索の対象として、熱帯原産植物、特にタイを原産とする植物を選択した。まずそれぞれの植物のエキスについて阻害活性を調べ、実際に阻害活性を有する植物を選定する。この植物について、活性試験と平行して分画を進めることにより、活性本体を単離・同定すべく、検討を開始した。

### 第三章

#### 第一節 タイ原産植物エキスの膵リパーゼ阻害活性

福山大学の森田らによって、タイ原産植物 44 種の葉部のエキスに対して、膵リパーゼ阻害活性を持つ植物のスクリーニングが行われた (Fig. 2-2.). その結果、*Adenanthera pavonina* (no. 14), *Citrus hystrix* (no. 21), *Micheliasia alba* (no. 23), *Gustavia gracillima* (no. 25), *Phyllanthus acidus* (no. 27) の各植物抽出標品において濃度増加に依存した著しい膵リパーゼ活性抑制が見られた. その中でミカン科 *C. hystrix* 葉は、東南アジアではスープやカレー等への一般的な調味料として用いられており、諸外国においても食生活への導入が期待できた. そこで、*C. hystrix* 抽出物の成分探索をすることにした.

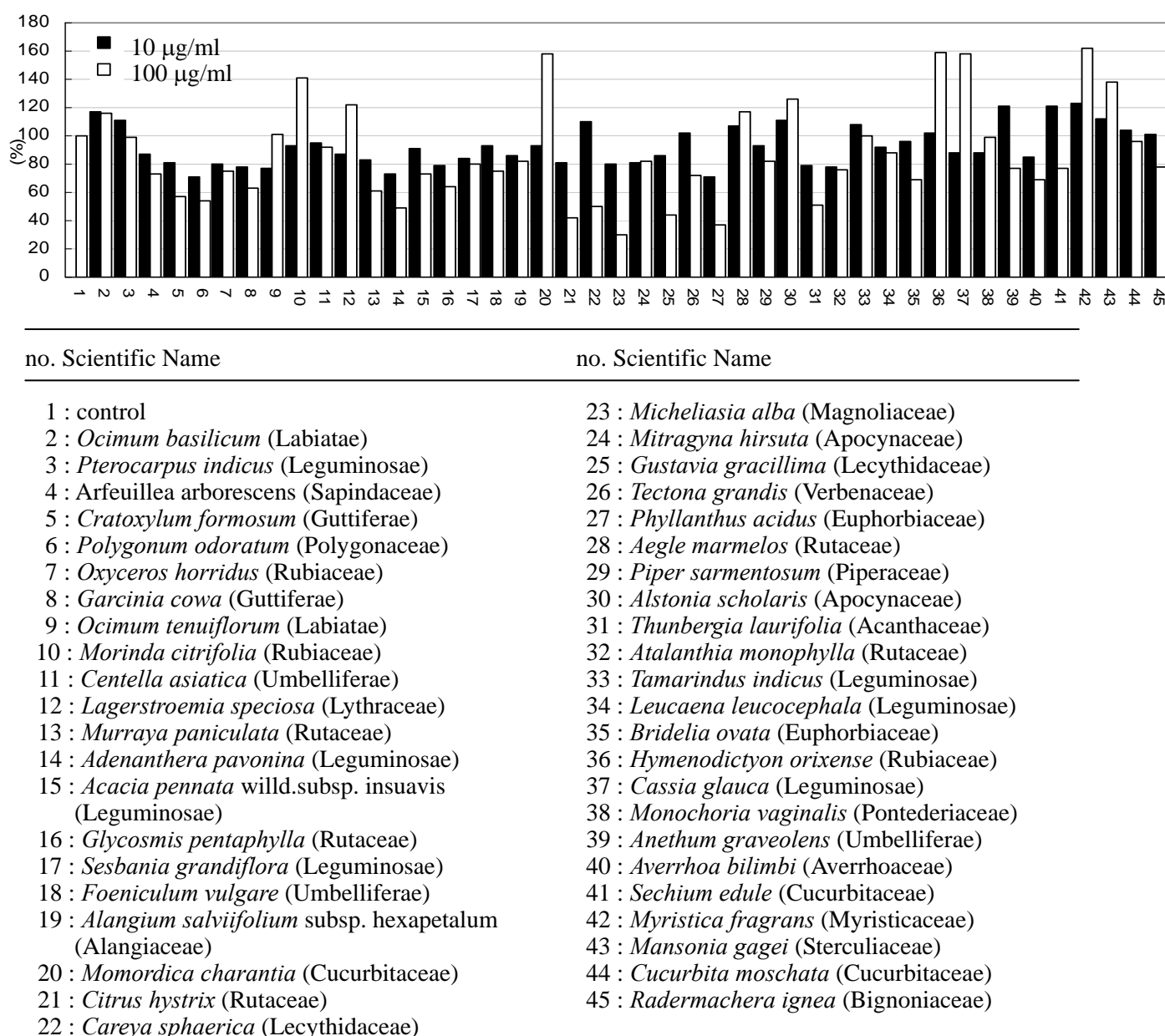


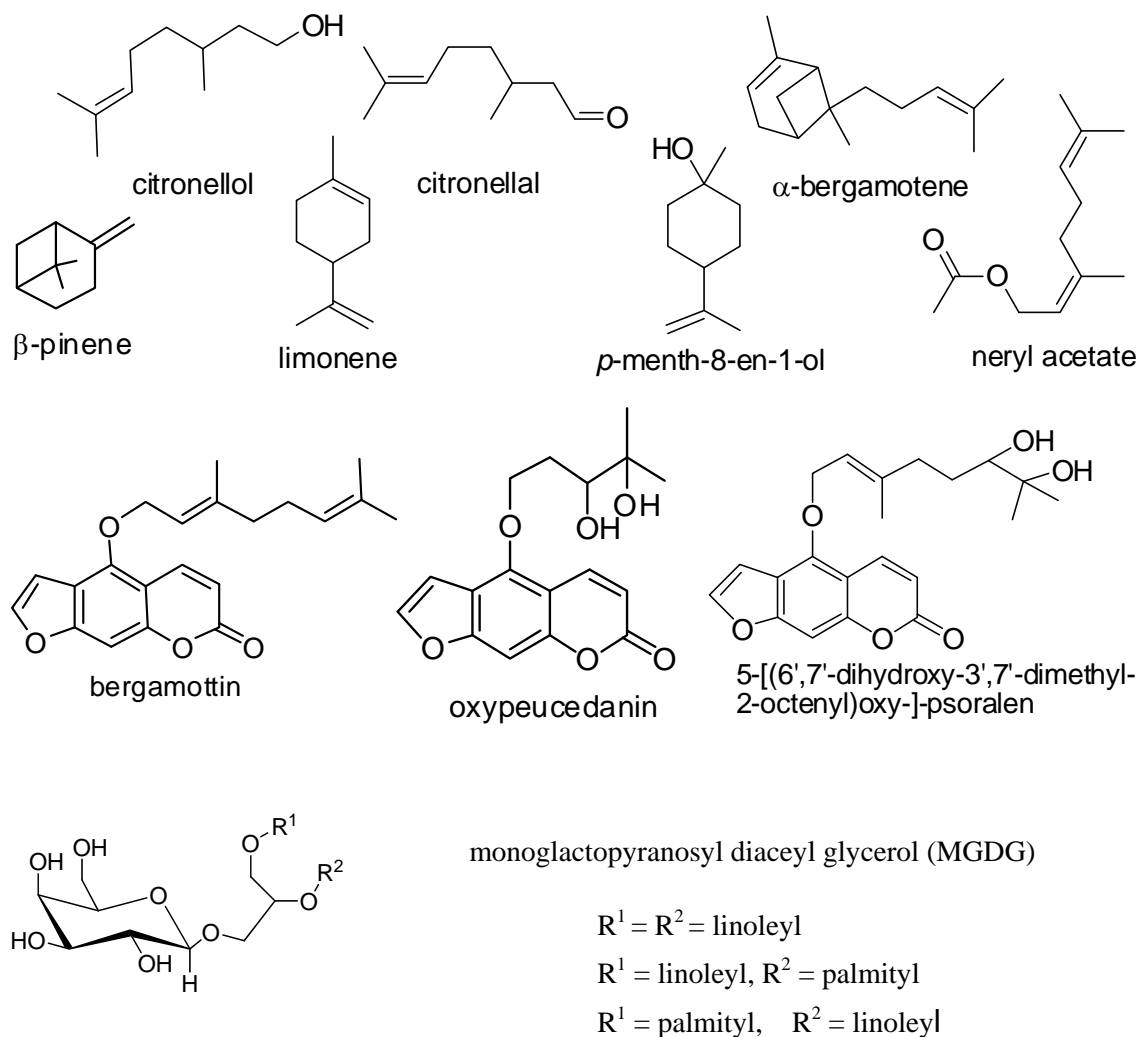
Fig. 2-2. Preliminary inhibitory effect of the ethanol extracts of 44 Thai plants against pancreatic lipase

*C. hystrix* には芳香があり、水蒸気蒸留法によって得られた精油は、 (-)-citronellal を主成分として、citronellol、linalool、sabinene 等を含むことが報告されている<sup>34)</sup>。

この精油は、*Bacillus subtilis* 変異株、*Staphylococcus aureus* に対して抗菌活性、*Aedes aegyptii* に対して弱い殺虫作用を示すことが報告されている<sup>33)</sup>。

また、葉部の乾燥粉末についてラットに対する肝臓癌誘発物質効果増幅作用<sup>34)</sup>、EtOH 抽出エキシによる NO 産出阻害、慢性関節炎抑制作用<sup>35)</sup>、抗酸化作用<sup>36)</sup>、発癌プロモーション抑制作用<sup>37)</sup>、防腐効果<sup>38)</sup> が報告されている。また実においては、メタノール抽出物の育毛効果<sup>39)</sup>、bergamottin、oxypeucedanin 等の coumarins によるマウスマクロファージ細胞 264.7 での NO 産出阻害<sup>40)</sup>が報告されており、果皮においては避妊効果<sup>41)</sup>、茎と茎皮においては、抗菌活性を持つことが報告されている<sup>42)</sup>。

Fig. 2-3. *C. hystrix* が含有する既知化合物



## 第二節 腭リパーゼ活性試験

### 第一項 試験法の原理について

腭リパーゼ活性測定法には、天然基質を用いる方法と合成基質を用いる方法がある。今回は、後者の *p*-nitrophenyl palmitate (NPP) を用いた試験法を用いた。NPP は、腭リパーゼによって *p*-nitrophenolate と palmitate に加水分解される。*p*-Nitrophenolate は、405 nm において吸光を示すため、その吸光度を測定することで腭リパーゼ活性を測定することができる (Fig. 2-4.)。

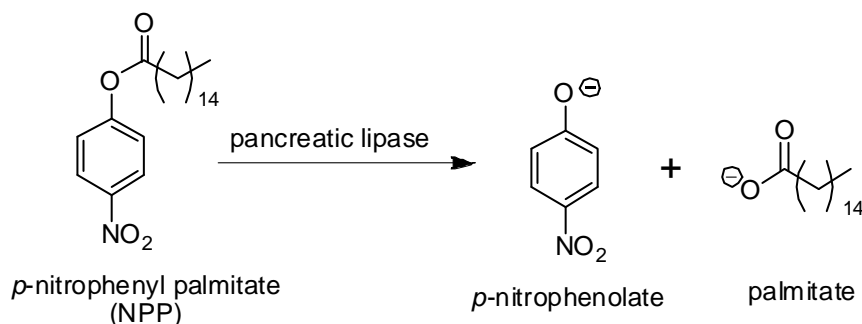


Fig. 2-4. Mechanism of pancreatic lipase activity test.

NPP を基質として用いた方法は、エマルジョン調製や抽出操作が省けるため、96 穴プレートを用いることが可能である。そのため、多くのサンプルを測定でき、また複雑な操作がないため短時間で安定したデータを得られることが期待できる。

当初、酵素反応後に有機溶媒を加えない Slanc<sup>43)</sup> らの方法に従って腭リパーゼ活性試験を行った。しかしながら、NPP の H<sub>2</sub>O に対する溶解性が低く、測定時の溶液中に析出したため、吸光度が安定せずデータの再現性が得られなかった。そこで、測定直前に有機溶媒を加えることで、析出している基質を溶解させると共に酵素を変性させ、一定時間後の吸光度で腭リパーゼ阻害活性を測定することとした。

### 第二項 実験方法について

#### [準備]

- 基質の調製

NPP を有機溶媒 MeCN : EtOH = 3 : 1 に溶解し 3.33 M にした。

- 腭リパーゼの調製

腭リパーゼ (Type II, Sigma) を 75 mM Tris-HCl (pH 8.5) に溶解し 0.5 mg/mL にした。

- 植物抽出物

植物抽出物を DMSO に溶解し 1mg/mL にした。

- Orlistat

Orlistat を DMSO に溶解し 1 μg/mL にした。

#### [方法]

96 穴プレート 1 ウェルにつき、75 mM Tris-HCl (pH 8.5) 40  $\mu$ L, 3.33 mM NPP 溶液 10  $\mu$ L, 1 mg/mL 植物抽出液 (positive control については、1  $\mu$ g/mL orlistat) 10  $\mu$ L をそれぞれ加え、さらに 0.5 mg/mL 酵素溶液 40  $\mu$ L を添加し、37°C で 30 分間 incubation した。その後 有機溶媒 100  $\mu$ L を各ウェルに加え、3 分間 sonication 後 405 nm の吸光を micro plate reader で測定した。

#### [予備実験]

前述の方法は、以下の実験結果を参考にした。

##### ● 反応後添加する有機溶媒の検討

酵素を変性させ、酵素反応を止めることを目的とし、MeCN, EtOH, DMSO を用いて溶媒の酵素に及ぼす影響について調べた (Fig. 2-5)。酵素反応の後に有機溶媒を加えた区 (下図の斜線棒)、酵素反応前に有機溶媒を加えた区 (下図の黒棒) をそれぞれ設け、各斜線棒の腓リパーゼ活性を 100% とした時に、黒棒の腓リパーゼ活性がどの程度抑制されるかを比較することとした。この結果 MeCN が最も酵素活性を失活させられることが分かった。そこで、今回は酵素反応後に添加する溶媒を MeCN とした。

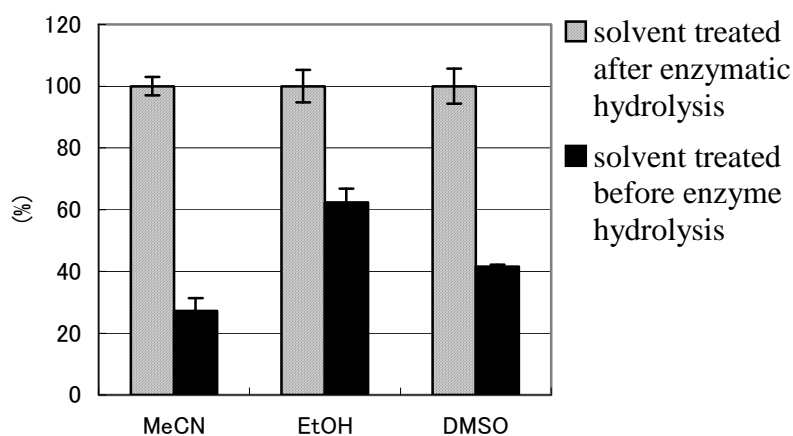


Fig. 2-5. Pancreatic lipase activity affected by solvents.

### ● Orlistat の至適濃度検討

膵リパーゼ阻害作用を比較するために orlistat を用いることとし、最適濃度の検討を行った(Fig. 2-6). この結果により orlistat がもっとも阻害効果を示した最終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  の 10 倍希釈液を 100  $\text{ng/ml}$  を最適活性阻害濃度とみなし、実験に用いることにした.

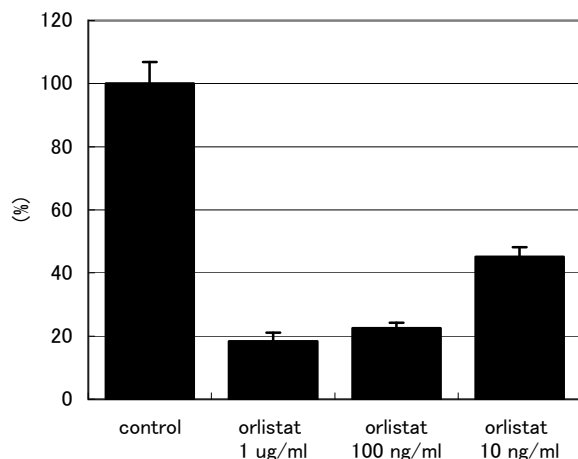


Fig. 2-6. Effect orlistat concentration for pancreatic lipase activity test

### ● 活性への溶媒の影響

今回の実験では、植物抽出液の溶解や基質に有機溶媒を使用しているが、酵素反応後に有機溶媒を加える容量を確保するために、バッファーの量を半分になっている（文献では最終濃度 10%に対して、我々が用いた実験系では 20%）。そのため、膵リパーゼ活性に影響を与える濃度の確認を行った (Fig. 2-7). この結果 30 % から DMSO 添加の影響を受け始め、40% では活性が約半分に減少し、80% では、活性がほぼみられなくなることが分かった. よって、今回の実験で用いた溶媒濃度（20%）は膵リパーゼ活性に影響しないことが分かった.

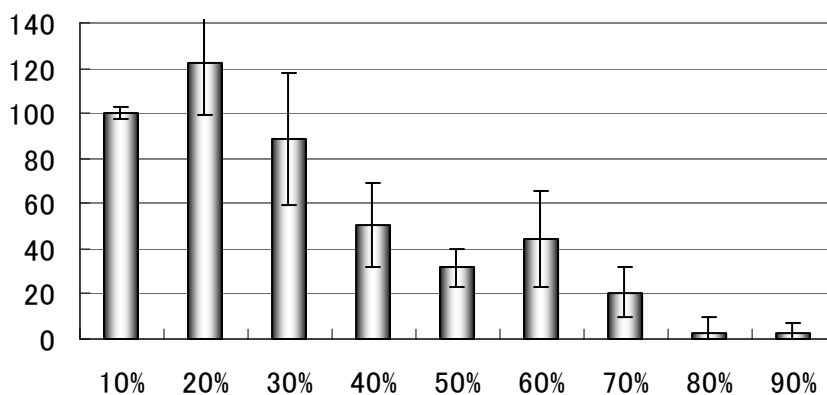


Fig. 2-7. Effect on the concentration of DMSO

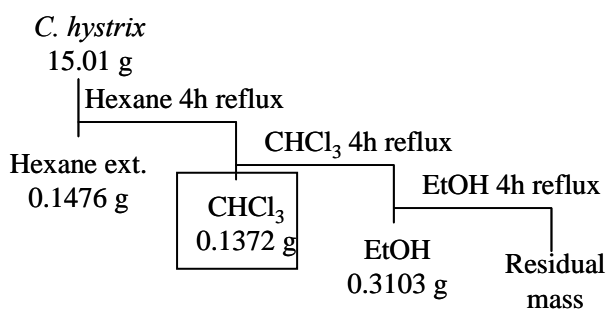


### 第三節 *C. hystrix* の分画

#### 第一項 抽出方法の検討

*C. hystrix* 葉部の抽出について、 Soxhlet による溶媒の極性を段階的に変化させる方法と、一種類の溶媒のみで抽出する方法を検討した. まず前者について、粉碎された *C. hystrix* 葉部 を hexane、 $\text{CHCl}_3$ 、EtOH で段階的に抽出した. 一方、後者については同葉部を EtOH によって室温で抽出する方法、および加熱還流下抽出する方法を検討した (Chart 2-1). ここで得られた抽出物の膵リパーゼ活性試験は、福山大学の森田らによって行われた. その結果、段階的抽出での  $\text{CHCl}_3$  と 加熱還流下における EtOH 抽出物に比較的強い阻害活性が見られた(Fig. 2-8).

#### Extraction using Soxhlet



#### Directly EtOH Extraction

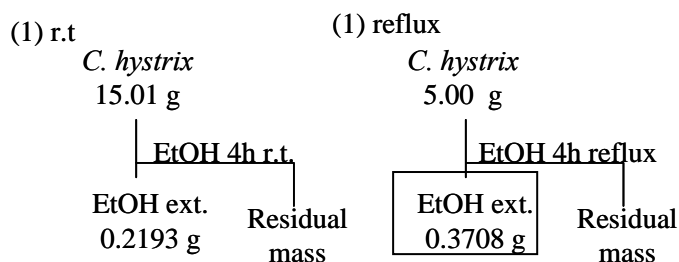


Chart 2-1. Comparative study for extraction

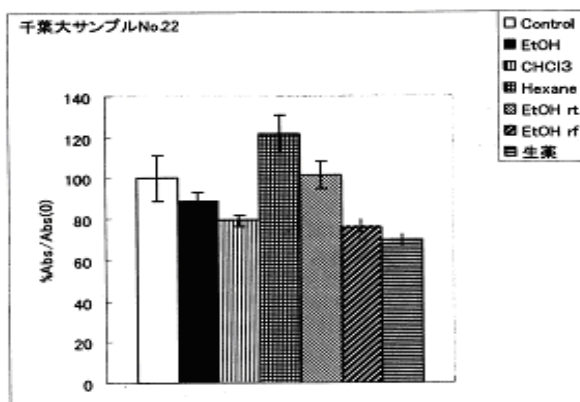


Fig. 2-8. Pancreatic lipase activity test of each extracts.

第二項 *C. hystrix* 葉からの抽出・分離 (小スケール)

前項での腓リパーゼ阻害活性試験の結果を参考に、粉碎した葉 473.24 g より EtOH 中加熱還流下抽出した。得られた緑色粘性オイルを、MeOH の溶解性により不溶部、可溶部の 2 つに分離した (Chart 2-2)。その結果 MeOH 可溶部において腓リパーゼ阻害活性が比較的強く見られた (Fig. 2-9.)。

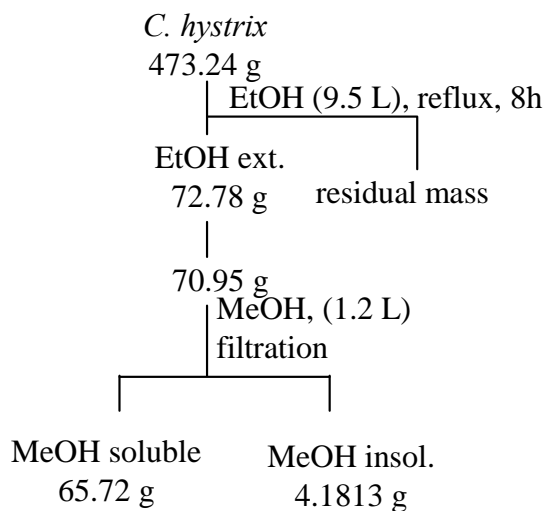


Chart 2-2. Separation of *C. hystrix* EtOH ext.

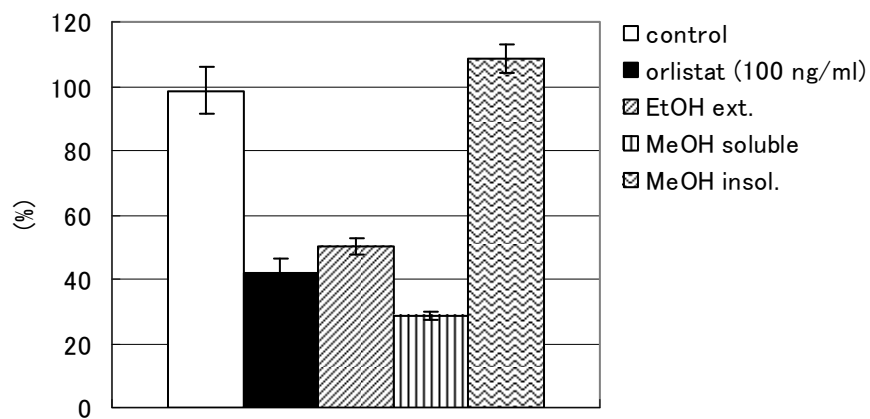


Fig. 2-9. Pancreatic lipase activity test of each fractions (100 µg/mL)

ここで得られた MeOH 可溶部 (65.72 g) を、silica gel column chromatography (以下 C.C. と略記) [hexane-AcOEt (32 : 1, 16 : 1, 1 : 1) and MeOH] によって分離し、11 個のフラクションに分画した。得られた分画に対して腭リパーゼ活性試験を行い、リパーゼ活性が 50% 以下に抑制された Fr. 4 (3.75 g, **Fr. IV**), Fr. 8 (13.22 g, **Fr. VIII**) に対して更なる分画を試みることにした (Fig. 2-10.).

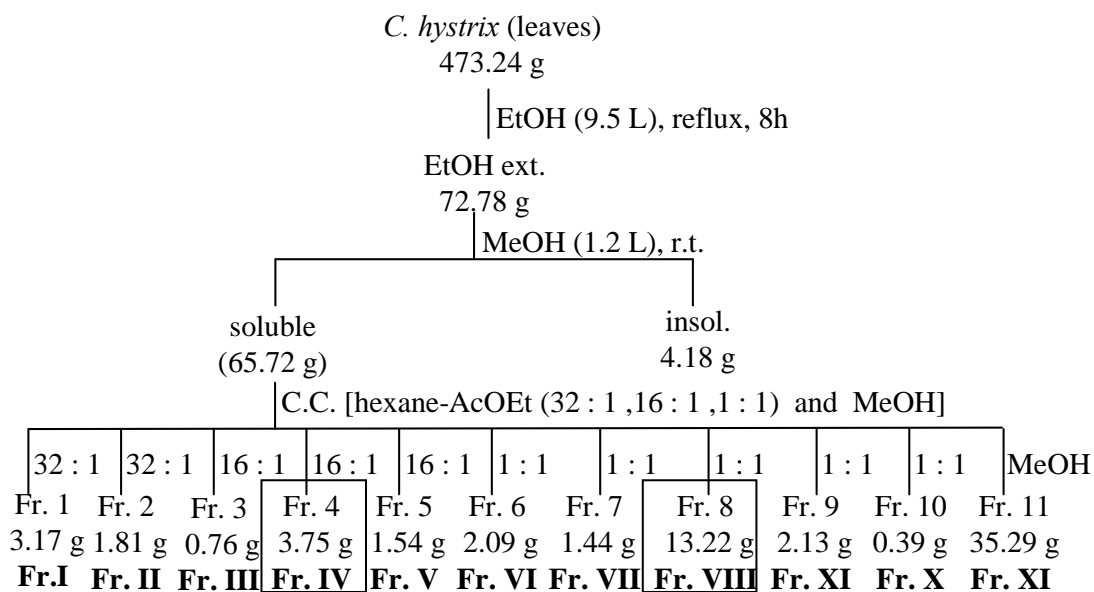


Chart 2-3. Separation of *C. hystrix* MeOH soluble

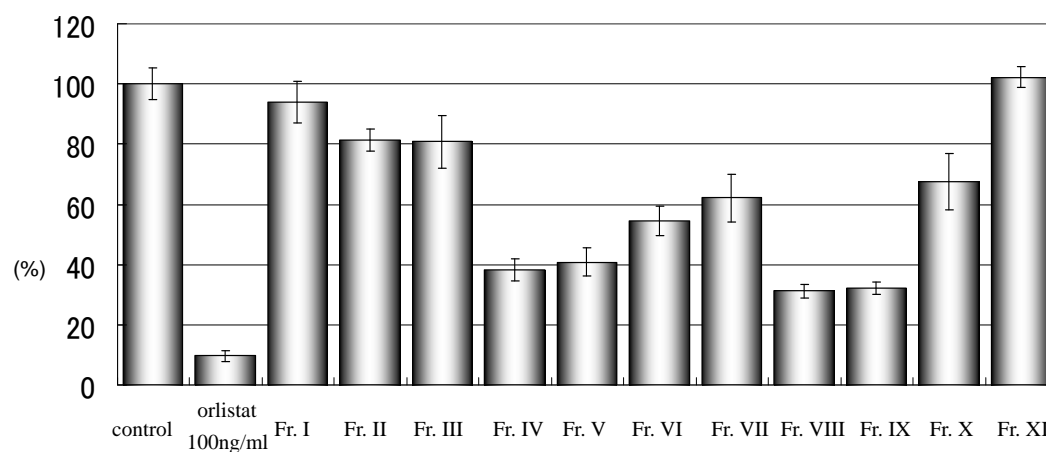


Fig. 2-10. Pancreatic lipase activity test of each fractions from MeOH soluble (100 µg/mL)

**Fr. IV** の一部 (315 mg) を C.C. [hexane-AcOEt (16 : 1, 10 : 1, 8 : 1, 4 : 1), and MeOH] で分画したところ、Fr. 4.14-4.24 (40.8 mg, **Fr. A**) に TLC で主要成分と思われるスポットを得ることができた。この一部 (29.9 mg) を ゲルろ過 recycle HPLC (CHCl<sub>3</sub>) を用いて精製し、得られた白色粉末 (15.3 mg) を AcOEt-MeOH で再結晶したところ、無色透明針状結晶 (5.8 mg) を得た。この化合物は、融点 135-139°C (lit. 140°C)<sup>44)</sup>, EIMS [M]<sup>+</sup> : *m/z* 414、さらに、当研究室保有の  $\beta$ -sitosterol のサンプル<sup>45)</sup>と <sup>1</sup>H NMR が完全に一致したことから  $\beta$ -sitosterol であると結論付けた。この単離した  $\beta$ -sitosterol における膵リパーゼ活性を見たところ、20.87% に抑制された (Chart 2-4, Fig. 2-11.).

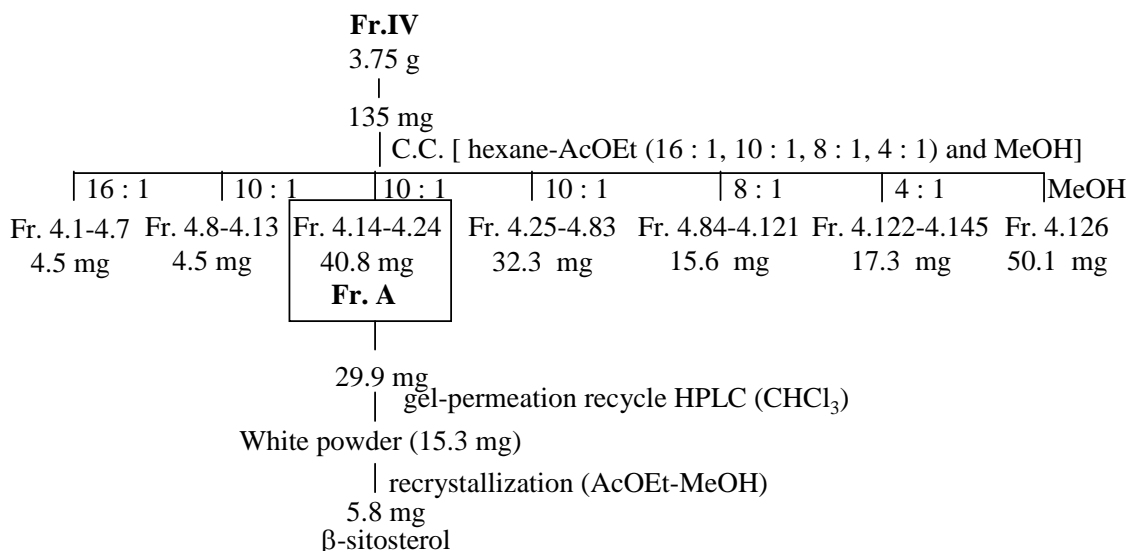


Chart 2-4. Isolation of  $\beta$ -sitosterol form Fr. IX.

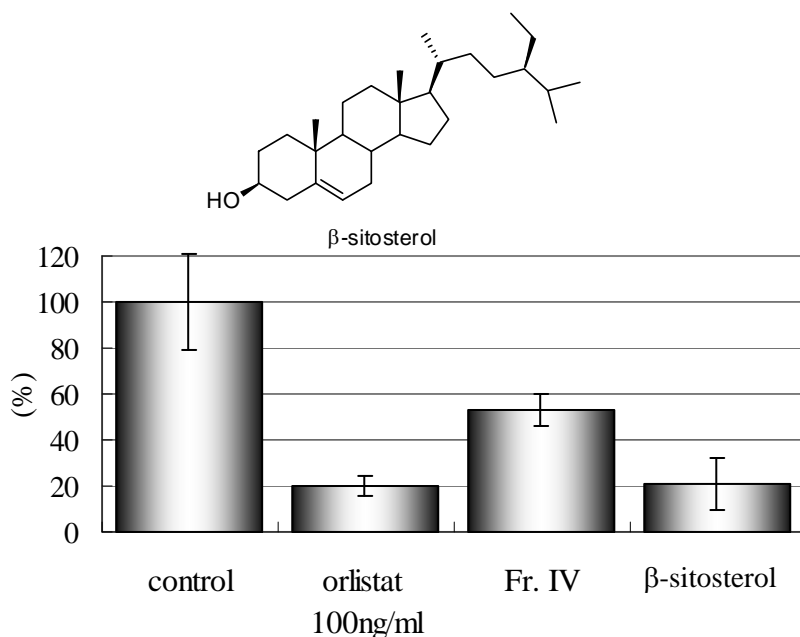


Fig. 2-11. Pancreatic lipase activity test of  $\beta$ -sitosterol (100  $\mu$ g/mL)

次に **Fr. VIII** の一部 (3.075 g) を、TLC を参考にして C.C. [hexane-AcOEt (1 : 16)] で分離し、61 のフラクションに分画した. その中で活性が見られた MeOH 画分 (3.09 g, **Fr. B**) について、再度 C.C.[CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH (6 : 6 : 1, 2 : 2 : 1, 0 : 0 : 1)] を行い、3 つの画分に分離したところ、Fr. 2 (687.6 mg, **Fr. C**) に活性が見られた. さらにこの一部 (13.2 mg) を LH-20 (MeOH) で分離したところ、Fr. 28-30 (1.4 mg, **Fr. H**) において TLC [CHCl<sub>3</sub>-MeOH (5 : 1)] 上に比較的是っきりしたスポットを観察した (Fig. 2-13). 豚リパーゼ活性試験の結果、この **Fr. H** に強い活性を確認した (Fig. 2-12, Chart 2-5).

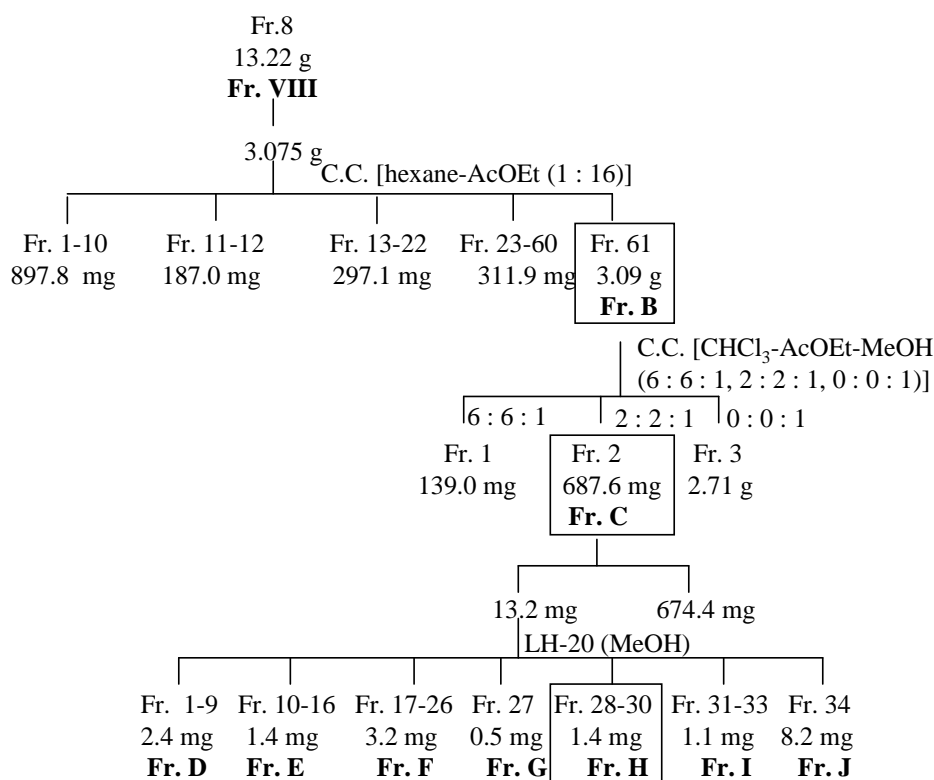


Chart 2-5. Trial for the isolation of pancreatic lipase activity inhibitor from **Fr. VIII**.

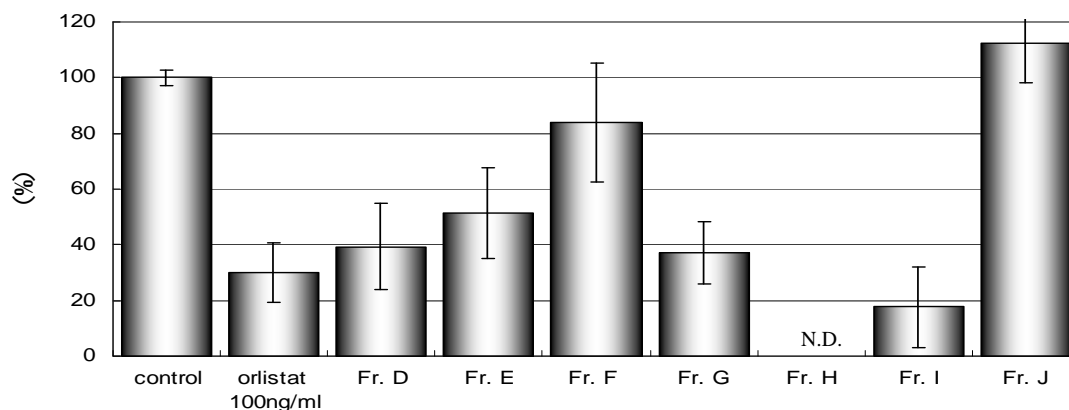


Fig. 2-12. Pancreatic lipase activity test of each fractions from **Fr. C** (100 µg/ml)

$\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 5 : 1$

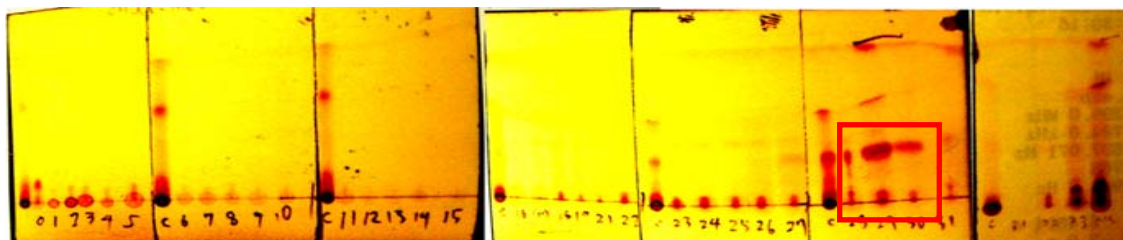


Fig. 2-13. TLC analysis of fractions after LH-20 separation.

そこで、**Fr. C** の残りに関する分画を試みた。その際、強い活性の見られた **Fr. H** の TLC で検出された化合物 [TLC 上 ( $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 5 : 1$ )、 $R_f$  値 0.54 (Fig. 2-12 の赤い枠内)] を分画の際の指標とした。

**Fr. C** の一部 (109.6 mg) を LH-20 ( $\text{MeOH} : \text{CHCl}_3 = 1 : 5$ ) で、61 つのフラクションに分画したところ、**Fr. 27-31** (14.9 mg, **Fr. K**) において TLC [ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (5 : 1)] 上で **Fr. H** と類似した  $R_f$  値 0.55 付近のスポットが見られた。そこで、**Fr. K** (14.9 mg) をさらに C.C. [ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (6 : 1)] で分画したところ、43 つのフラクションを得た (Fig. 2-13. left)。しかし、ここで得られた各フラクションの溶媒を留去後、サンプル管に移し、再度 TLC 分析を行ったところ、TLC 上において 1 スポットで見られていた化合物のブロード化が見られ、さらに分画する前には観察できなかった  $r_f$  値のスポットが複数観察された (Fig. 2-14. right)。再度同じ方法で分画を試みたが、結果は同様のものとなった。そこで、C.C. による分画過程において化合物が壊れてしまっている可能性が考えられたため、Biotage による短時間での溶出を試みたところ、TLC 上での化合物のブロード化は抑制できた。しかし、それ以前に大部分のサンプルを使用してしまっていたため精製するには充分な量を得ることができず単離には至らなかった。

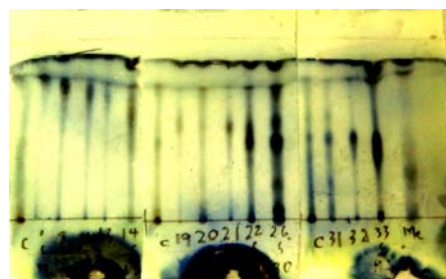
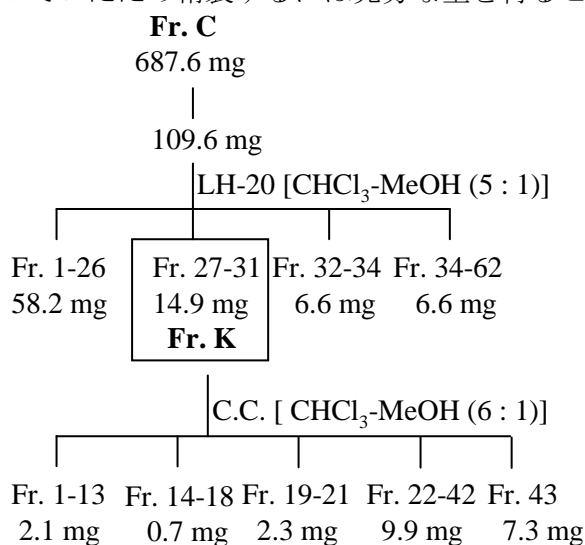


Fig. 2-14. Trail for the isolation of activity compounds (left) and TLC analysis of fractions after LH-20 separation (right)

そこで、**Fr. VIII** の再分離を試みることにした。前回の **Fr. VIII** の分画は、繰り返しクロマト的分画をしているのに関わらず活性化化合物がなかなか精製できなかったこと、阻害活性の見られた **Fr. H** の化合物が TLC 分析によって、 $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} = 5 : 1$  の条件で展開されたことから、 $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  の溶媒系で分画することとした。

**Fr. VIII** (13.22 g) の内の 1.1371 g を C.C. [ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (30 : 1, 15 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 1 : 1, 0 : 1)] で分離し、6 つに分画した。その内  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (10 : 1) によって得られた **Fr. 3** (110.5 mg, **Fr. L**) に関して、TLC 分析を行ったところ、前回分離した **Fr. H** と同程度の  $R_f$  値 (0.55) を示す化合物を含有していた。そこでさらに **Fr. L** を C.C. [ $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$  (15 : 1, 10 : 1)] で分離したところ **Fr. 86-105** (26.8 mg, **Fr. M**) に、TLC 上で 1 スポットの化合物が見られた。そこで、このものを  $\text{EtOH}$  で洗浄後、 $\text{EtOH-CHCl}_3$  で再結晶し白色粉末 (4.4 mg、m.p. 292-295) を得た (Chart 2-6)。MS で測定したところ、FABMS :  $m/z$  414 をメインとした  $\beta$ -sitosterol と類似した形状のピークが現れたこと、m.p. 295-298 °C (lit. 284-286 °C)<sup>46)</sup>、以前当研究室で単離・同定した  $\beta$ -sitosterol glycoside のサンプル<sup>44)</sup>と  $^1\text{H}$  NMR を比較したところ完全に一致したことから、 $\beta$ -sitosterol glycoside と結論付けた。しかしながら、ここで精製し得られた  $\beta$ -sitosterol glycoside は、ほとんど腓リパーゼ阻害活性を示さなかった (Fig. 2-15)。

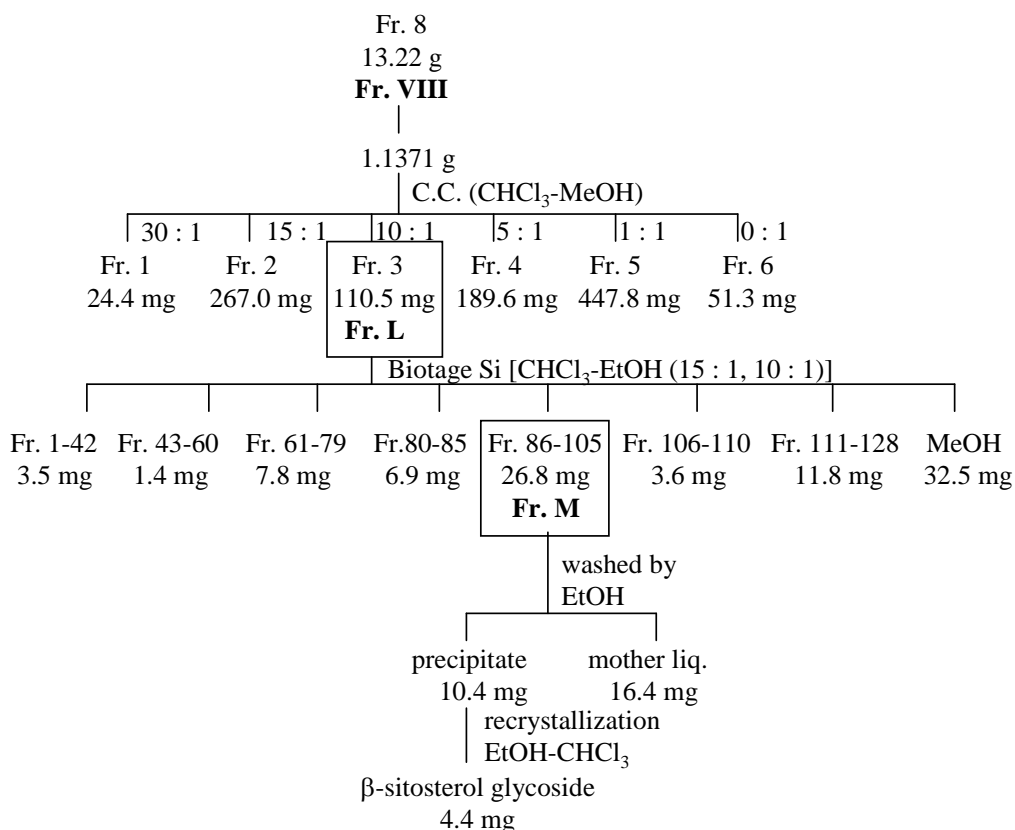


Chart 2-6. Isolation of  $\beta$ -sitosterol glycoside from **Fr. VIII**

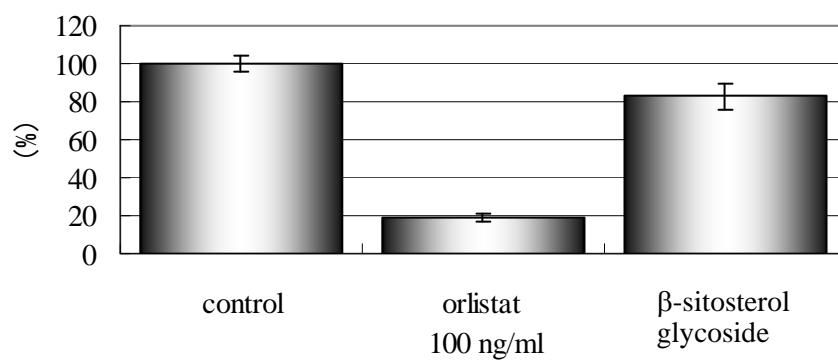
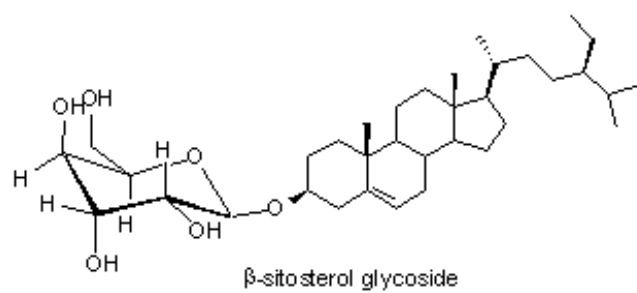


Fig 2-15. Pancreatic lipase activity test of β-sitosterol glycoside



### 第三項 大量スケールでの分離

前述の **Fr. VIII** の分離で活性化合物が壊れやすいことが分かった. また単離してきた時点での **Fr. VIII** と、保存していた **Fr. VIII** における TLC の様子が異なっていた ( $\text{CHCl}_3\text{-MeOH} = 5 : 1$  で展開されるスポットが少なくなり、原点が濃くなった) ため、活性化合物の状態が変化している可能性が考えられた. そこで、改めて *C. hystrix* 葉からの抽出を試みた.

粉碎した葉 3057.35 g から EtOH エキス (481.13 g) を調製し、 $\text{H}_2\text{O-AcOEt}$  で液液分配し、AcOEt 抽出物 (314.99 g) を得た. この一部 (109.74 g) を C.C. で、6 フラクションに分離した. その内特に活性の見られた Fr. 4 (9.82 g, **Fr. R**) について、Biotage C18 で更なる分画を行った (Chart 2-7). その結果 TLC [ $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$  (4 : 1)] : Rf. 0.44 のスポットを示す Fr. 22-25 (253.3 mg, **Fr. U**) が得られた. さらにこれを含水系の溶媒で再度精製し、Fr. 17-24 (203.7 mg, **Fr. W**) を得た. このものは比較的高い阻害活性 (11.8 %) を示した (Fig. 2-16). 次項にてこの構造決定について概説する.

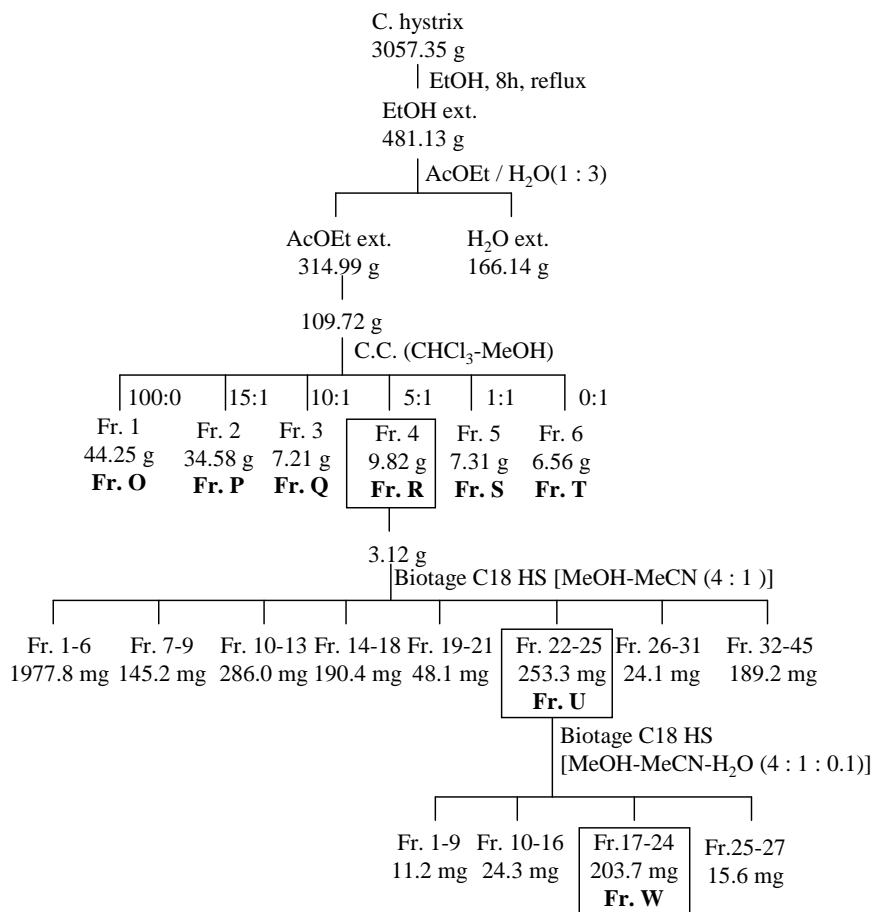


Chart 2-7. Isolation of **Fr. W**

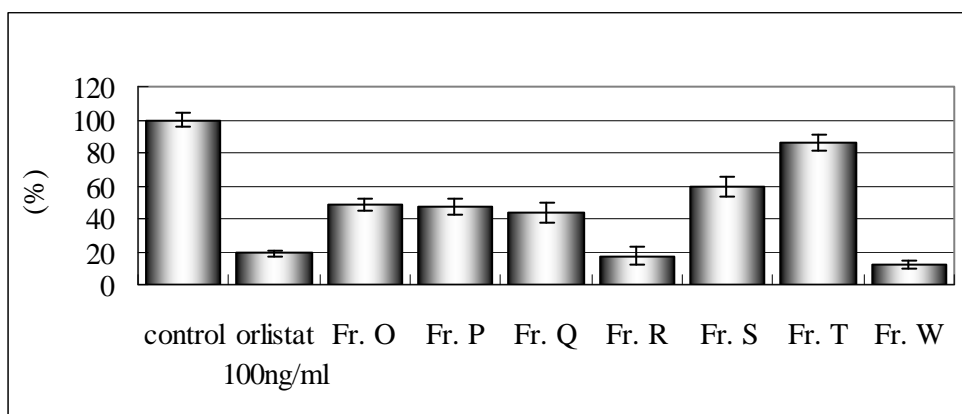


Fig. 2-16. Pancreatic lipase activity test of each fractions

第四項 **Fr. W** の構造決定について  
今回得られた阻害活性成分のデータを以下に示す.

Table 2-1. Property of **Fr. W**

Appearance	Colorless oil
$[\alpha]$	$[\alpha]_D^{19.4} + 37.4^\circ$ (c = 0.6, MeOH)
MALDITOFMS ( $m/z$ )	937.7137 (M+Na) <sup>+</sup>
IR (ATR) $\nu_{\max}$ cm <sup>-1</sup>	3381, 1732

Table 2-2. NMR data of **Fr. W**

#	<sup>1</sup> H (600 MHz)	<sup>13</sup> C (150 MHz)
CaH3	0.86 (3H, t, J = 6.9 Hz)	14.7
CbH3	0.94 (3H, t, J = 7.6 Hz)	14.9
CcH2	1.20-1.40 (32H, s-like)	23.9, 30.3, 30.36, 30.41, 30.50, 30.60, 30.8, 30.88, 30.91, 31.0, 33.2
CdH <sub>2</sub>	1.54-1.60 (4H, br)	26.16, 26.18
CeH <sub>2</sub>	2.10-2.08 (4H, m)	21.7, 28.3
CfH <sub>2</sub>	2.28 (2H, t, J = 7.5 Hz)	35.1
	2.29 (2H, t, J = 7.4 Hz)	35.3
CgH <sub>2</sub>	2.77 (4H, t, J = 5.9 Hz)	26.6, 26.7
C3'H	3.46 (1H, dd, J = 9.6, 3.1 Hz)	72.5
C2'H	3.48 (1H, dd, J = 9.6, 7.6 Hz)	74.8
C6'H <sub>2</sub>	3.64 (1H, dd, J = 10.2, 6.1 Hz)	67.9
	3.84-3.88 (1×2H, m)	
C6''H <sub>2</sub>	3.67-3.73 (2×4H, m)	62.9
C3''H	3.71 (1H, dd, J = 10.3, 3.8 Hz)	71.6
C5'H	3.67-3.73 (1×4H, m)	74.6
C3H <sub>2</sub>	3.67-3.73 (1×4H, m)	68.9
	3.90 (1H, dd, J = 10.9, 5.4 Hz)	
C2''H	3.75 (1H, dd, J = 10.1, 3.7 Hz)	70.3
C5''H	3.82 (1H, t, J = 6.2 Hz)	72.6
C4'H	3.86 (1H, d, J = 3.6 Hz)	70.1
C4''H	3.84-3.88 (1×2H, m)	71.2
C1H <sub>2</sub>	4.20 (1H, dd, J = 12.1, 6.9 Hz)	64.2
	4.40 (1H, dd, J = 12.1, 2.8 Hz)	
C1'H	4.22 (1H, d, J = 7.1 Hz)	105.4
C1''H	4.84 (1H, d, J = 3.8 Hz)	100.7
C2H	5.20-5.36 (1×7H, m)	71.9
CkH	5.20-5.36 (6×7H, m)	128.3, 129.0, 129.3, 129.4, 131.2, 132.9
CO	-	174.9, 175.3

このものは IR に 3381, 1732 cm<sup>-1</sup> に吸収を示し、水酸基とエステルカルボニルの存在が示唆された。また、MALDITOFMS では  $m/z$  937.7137 [(M+Na)<sup>+</sup>] が観測され、その分子式を C<sub>49</sub>H<sub>86</sub>O<sub>15</sub> と推定した。一方 <sup>1</sup>H NMR について、末端メチル a, b が一番高磁場に観測され、それぞれ 3H 分の積分比を持つ。カルボン酸側鎖のメチレンのうち比較的高磁場のメチレン c (32H) が 1.2 ppm 付近に、エステル結合β位のメチレン d (4H) が 1.5 ppm 付近に、オレフィンの両隣のメチレン e (4H) が 2.0 ppm 付近に、エステル基α位のメチレン f (4H) が 2.2 ppm 付近に、オレフィンとオレフィンにはさまれたメ

チレン g (4H) が 2.7 ppm 付近に観察された. そして、 3.4 ppm から 3.9 ppm の範囲に糖鎖由来のプロトン n (2H), o (7H), p (3H), 及びグリセロール部位の糖鎖側のメチレン H-3 (2H) が観察され、4.2 ppm 付近に、グリセロール部位のメチレン H-1 の 1H 分と糖鎖のアノメリックプロトン l' の 1H 分、そして 4.4 ppm 付近にグリセロール部位のメチレン H-1 の残りの 1H 分が観察された. さらにはグリセロール部位の中心のメチン H-2 (1H) が 5.2 ppm 付近に、5.3 ppm 付近にオレフィンプロトン k の 6H 分が観察された (Table 2-2, Fig. 2-17).

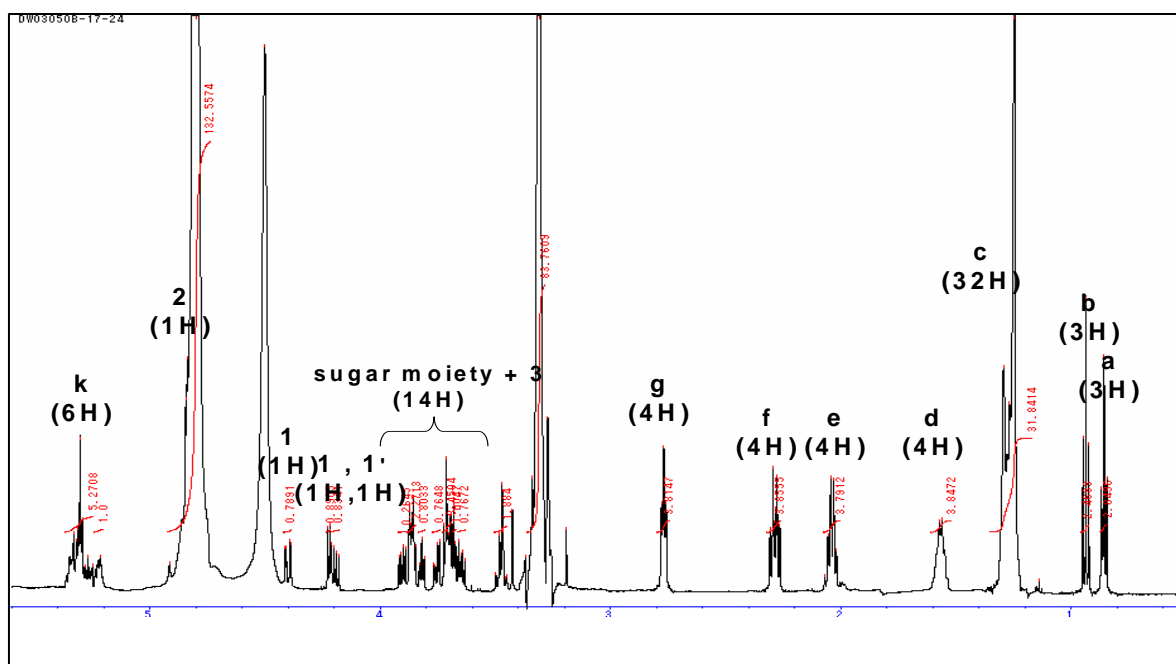


Fig.2-17.  $^1\text{H}$ NMR of Fr. W

#### <脂肪鎖について>

HMBC において末端メチル基炭素 b と、アリル位プロトン e 及びオレフィンプロトン k との相関が見られたこと、オレフィンには含まれたメチレン g が 4H 分であること、オレフィンプロトン k が 6H 分あることから、末端メチル b を有する脂肪鎖は、undeca-2,5,8-triene 部位を持つ不飽和脂肪酸であることが分かり、同時に末端メチル a を有する脂肪酸は、飽和脂肪酸であることが分かった (Fig. 2-17). また  $^{13}\text{C}$  NMR において、アリル位炭素 (g, e) の chemical shift が 30 未満であることから、cis オレフィンであることが分かった<sup>47)</sup>(table 2-2). また MeOH 溶液の中に長い時間放置しておくこと、末端メチル b のピーク・オレフィンに由来する e, g, k のピークが消えていくことから、末端メチル b を含む不飽和脂肪酸は、分解が進みやすい 1 級炭素に、末端

メチル **a** を含む飽和脂肪酸は分解の進みにくい 2 級炭素に結合していることが推測された。

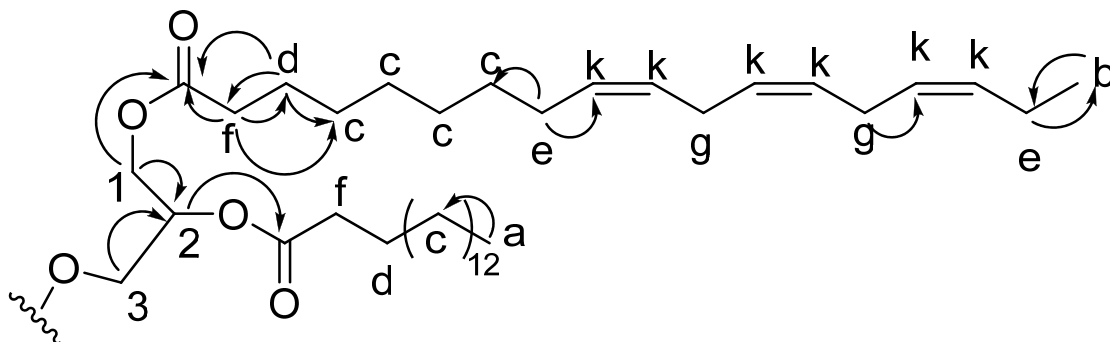


Fig. 2-18. Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear correlations of fatty acid chain

#### <糖鎖について>

3.4 ppm から 3.9 ppm の範囲に見られたピークに関して、グリセロール部位の糖鎖側のメチレン  $\text{H-3}$  2H 分を除いたプロトンの数が 12H 分であることから構造の中に 2 糖の部位があることが推定でき、 $\text{HMQC}$  で 2 つの  $^{13}\text{C}$  NMR 105 ppm 付近のピークと  $^1\text{H}$  NMR 4.8 ppm 付近のピークの相関から アノメリックプロトン  $\text{H-1}''$  が 4.8 ppm 付近にあることを確認した。また、 $\text{HMBC}$  でアノメリックプロトン  $\text{H-1}''$  と グリセロール部位の糖鎖側のメチレン  $\text{C-3}$ 、もう一つのアノメリックプロトン  $\text{H-1}''$  と糖のメチレン  $\text{C-6}'$  との相関が観測されたことから、グリセロールの  $\text{C-3}$  に糖が結合しており、 $\text{C-6}'$  においても一つの糖とグリコシド結合していると考えられた (Fig. 2-18)。さらに、 $\text{HSQC}$  において  $\text{C-1}'$  とそのプロトンのカップリングが  $^1J[^{13}\text{CH}(1)] = 160 \text{ Hz}$  であることから、 $\beta$ -anomer、 $\text{C-1}''$  とそのプロトンのカップリングが 170 Hz であることから、 $\alpha$ -anomer であることが分かった<sup>48)</sup>。また 1D TOCSY で  $\alpha$ -anomer の  $\text{H-1}''$  プロトンの化学シフト 4.84 ppm ( $d, J = 3.8 \text{ Hz}$ ) に照射した所、混合時間が 40 ms のときに 3.75 ppm ( $dd, J = 10.1, 3.7 \text{ Hz}$ ), 60 ms のときに 3.71 ppm ( $dd, J = 10.3, 3.8 \text{ Hz}$ ), 80ms のときに 3.88 ppm (br) がそれぞれ観測された。これらの結合定数から、 $\text{H-2}''$ ,  $\text{H-3}''$ ,  $\text{H-4}''$  が axial-equatorial の関係であることが示された。一方、 $\beta$ -anomer  $\text{H-1}'$  プロトン 4.22 ppm ( $d, J = 7.1 \text{ Hz}$ ) に照射したところ、3.48 ppm ( $d, J = 9.6, 7.6 \text{ Hz}$ ), 3.46 ppm ( $dd, J = 9.6, 3.1 \text{ Hz}$ ), 3.86 ppm ( $br.d, J = 3.6 \text{ Hz}$ ) の相関が見られた。この結合定数から、 $\text{H-2}'$ ,  $\text{H-3}'$ ,  $\text{H-4}'$  がそれぞれ axial-equatorial であることが分かった。いずれの糖についても、5 位と 6 位のプロトンは他と overlap しているために正確には assign ができていないが、文献値<sup>49)</sup>との比較 ( $\text{H-2}'$  においては多少ずれが大きい) の結果も含め、 $\alpha$ -Gal-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -Gal 構造を持つことが分かった (Fig. 2-19)。以上の情報を総合すると **Fr. W** で得られた化合物

は、1-*O*-linolenyl-2-*O*-palmityl-3-*O*-(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl - $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol  
であると推定された。

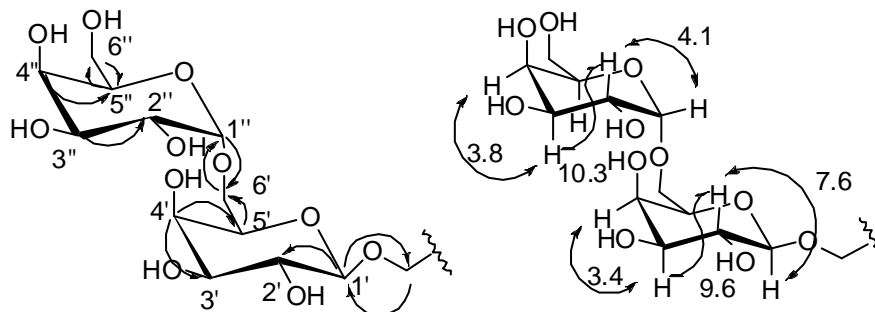


Fig. 2-19. Long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronuclear correlations (left) and TOCSY(right) of sugar moiety (coupling constants were shown in)

Table 2-3.  $^1\text{H}$  NMR data of sugar moiety

$\beta$ -Gal	Obs		Lit	
1'	4.22	(d, 7.1)	4.26	(d, 7.6)
2'	3.48	(dd, 9.6, 7.6)	3.58	(dd, 9.6, 7.6)
3'	3.46	(dd, 9.6, 3.1)	3.52	(dd, 9.6, 3.2)
4'	3.86	(d, 3.6)	3.90	(br d, 3.2)
5'		(m)	3.76	(m)
6'	3.64	(dd, 10.2, 6.1)	3.70	(dd, 11.2, 6.0)
		(m)	3.94	(dd, 11.2, 5.4)
$\alpha$ -Gal				
1''	4.84	(d, 3.8)	4.90	(d, 3.6)
2''	3.75	(dd, 10.1, 3.7)	3.81	(dd, 9.6, 3.6)
3''	3.71	(dd, 10.3, 3.8)	3.76	(dd, 9.6, 3.6)
4''	3.88	(br s ?)	3.92	(br d, 3.6)
5''	3.82	(t, 6.2)	3.88	(m)
6''	3.67-3.73	(m)	3.74	(dd, 5.4, 11.2)
		(m)	3.77	(dd, 6.0, 11.2)

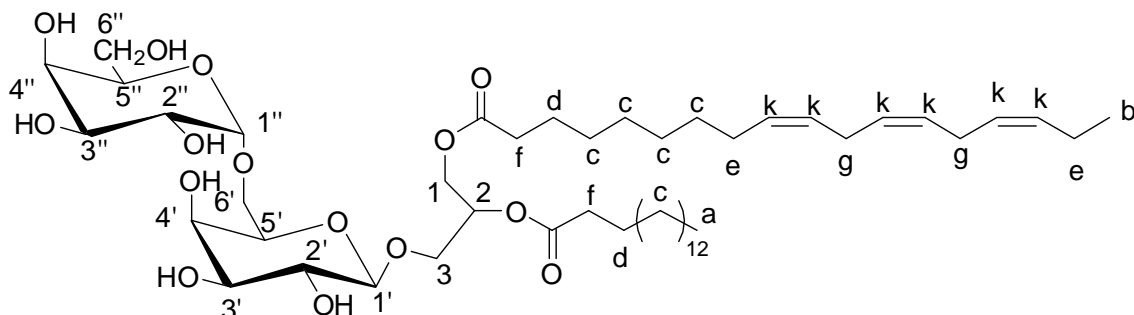


Fig. 2-20. Structure of **Fr. W**

#### 第四章 考察

*C. hystrix* から腓リパーゼ阻害作用を持つ化合物として、 $\beta$ -sitosterol と 1-*O*-linolenyl-2-*O*-palmityl-3-*O*-(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol を単離した。 $\beta$ -sitosterol は、既に 1964 年にラットにおける体脂肪を減少させる効果が報告されており<sup>50)</sup>、また 2003 年に腓リパーゼ阻害作用を持つ化合物として特許が取得されている<sup>51)</sup>。しかしながら、 $\beta$ -sitosterol glycoside に関しては腓リパーゼ阻害活性を認めることができなかった。1-*O*-Linolenyl-2-*O*-palmityl-3-*O*-(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-glycerol は糖脂質であり、糖脂質は植物において葉緑体膜の主構成成分であることが知られていて、複合体形成時の安定化<sup>52)</sup>や細胞の増殖<sup>53)</sup>、外部物質からの保護作用<sup>54)</sup>に間接的に関与していると考えられている。また、抗ウイルス作用<sup>55)</sup>、抗癌作用<sup>56)</sup>、抗炎症作用<sup>57)</sup>を持つことが報告されている。糖脂質の腓リパーゼ活性阻害物質としては、2006 年 韓らによってスピルリナから 1-*O*-(palmitonyl)-2-*O*-(caprylonyl) glyceryl- $\beta$ -D-galactopyranoside が単離されてきている<sup>58)</sup>が、2 糖の糖脂質の腓リパーゼ活性阻害物質としての報告はない。また *C. hystrix* から以前に単離された糖脂質として 1-*O*-palmitoyl-2-*O*-linolenoyl-3-*O*- $\beta$ -galactopyranosyl-*sn*-glycerol があり、抗腫瘍活性を示すことが報告されている<sup>37)</sup>。

なお、本化合物については数種の報告がある。そのうち、村上らの例<sup>59)</sup>では、2-palmitelamidoyl 体との混合物として単離されており、詳細なスペクトルデータは示されていない。今後より詳細な構造解析を行っていく予定である。

### 第三部 ペルー原産薬用植物からの有効成分の探索



## 第一章 序論

### ＜ペルーの植物について＞

ペルーの国土面積は 128.5 万 km<sup>2</sup> でその 50% は密林におおわれたアマゾン川流域であり、25% はアンデス山脈の山岳地帯である。南米アマゾンの植生は多種多様であり、地球上の植物およそ二万五千種のうち四分の一にあたる約六千種の植物が生えているとされる。これまでに南米を原産とする植物から 抗マラリア薬 quinine, 抗不整脈薬 quinidine, 局所麻酔薬 cocaine, 副交感作動薬 pilocarpine 等多くの医薬品が開発されてきた。これらのことは、南米熱帯雨林の植物の独自性と可能性を示すものである。今後も、民間薬として使用されてきた植物の有用性を様々な試験によって検証し、効能を科学的に示すことで我々の生活への利用が期待できるものと考えられる。

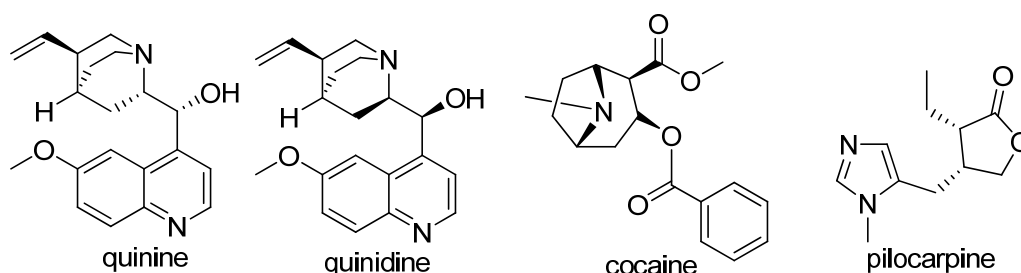
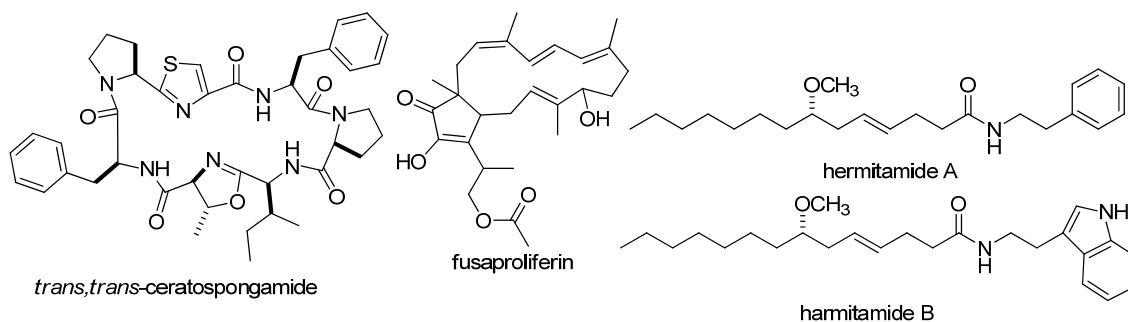


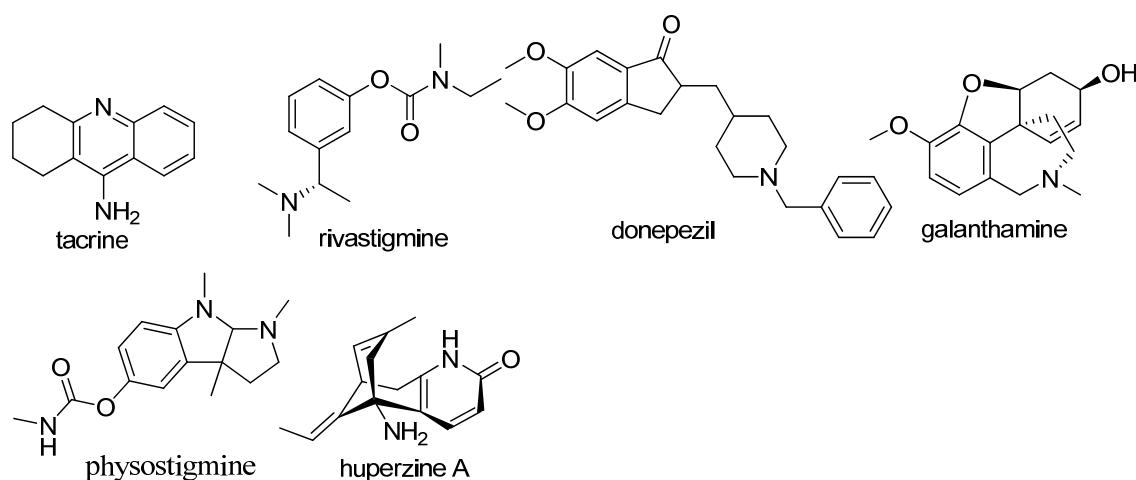
Fig. 3-1. Representative bioactive natural products isolated from Peruvian medicinal plants

今回我々は、白鳥製薬 樋口 義洋 博士より供与されたペルー原産植物について、生物活性物質の探索を行うこととした。活性の対象としては、1) *Artemia Salina* に対する毒性を指標とした細胞毒性・抗菌効果 2) アセチルコリンエステラーゼ (AchE) 阻害活性を選択した。

*A. salina* に対する毒性試験<sup>60)</sup>は、甲殻類の一種 *A. salina* に対する毒性を指標とするものである。本法は、*A. salina* の感受性が強いいため低濃度で行うことができ、腫瘍に対する細胞毒性や殺菌効果と相関があることが知られている<sup>61)</sup>。本試験法を指標として、海藻 *Ceratodictyon spongiosum* から *trans,trans*-ceratospongamide (抗炎症作用)<sup>62)</sup> やシアノバクテリア *Lyngbya majuscula* から hermitamides A and B (マウス神経芽細胞腫に毒性)<sup>63)</sup>、子囊菌 *Fusarium subglutinans* から fusaproliferin (昆虫培養細胞 SF-9や B 細胞に毒性) 等が単離・同定されている<sup>64)</sup>。



アセチルコリンは短期間記憶に関与しているとされ、アルツハイマー病 (AD)においてコリン作動性神経伝達の欠損が報告されている。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (AChE 阻害剤) にはアセチルコリンの分解を抑制することで欠損したコリンの機能を補うことが期待される。FDA に AD 治療薬として認可された tacrine、rivastigmine、donepezil の他に、天然から単離された galanthamine (ヒガンバナ科 *Galanthus nivalis/Narcissus pseudonarcissus*)、physostigmine (マメ科 *Physostigma venenosum*)、huperzine A (ヒカゲノカズラ科 *Huperzia serrata*) 等が知られている<sup>65)</sup>。様々な AD に効果のある食べ物や薬が使われているが、効果に関して不十分となるケースがしばしば見られ、替わりとなる薬の開発が望まれている。



これらの方法により、以下に示すペルー原産植物 63 種の EtOH エキスについて、スクリーニングを行った。なお、植物の供与が現地で用いられている呼称に基づいて行われたため、詳細が不明なものについては一で示してある。

Table 3-1. Peruvian medicinal plants list

No.	Local Name	Scientific Name	Availability
S1	CULEN	<i>Psoralea glandulosa</i> .L	健胃、下剤効果
S2	HUANARPO	<i>Jatropha macrantha</i>	媚薬、強精
S3	MARCO	<i>Ambrosia peruviana</i>	抗炎症
S4	MUNA MUNA	<i>Minthostachys</i> spp.	健胃効果、風邪の治療
S5	ARENILLA	-	抗腎炎、利尿効果
S6	ARAYAN	<i>Eugenia mirtomimeta</i>	老化防止
S7	HIERBA SANTA	<i>Cestrum auriculatum</i> . Lher	解熱、風邪の治療
S8	CULANTRILLO DEL POZO	<i>Adiantum poiretii</i>	月経調節
S9	COLA DE CABALLO	<i>Equisetum</i> spp.	利尿効果、にきび改善
S10	CHINCHILCOMA	<i>Mutisia acuminata</i>	肝臓改善、体重減少促進

Table 3-1. continuous

No.	Local Name	Scientific Name	Availability
S11	CUTI CUTI	<i>Asplenium fragile</i>	糖尿病の治癒
S12	MATICO DE LA SIERRA	<i>Jungia paniculata</i> DC Gray	外傷の治癒
S13	PINCO PINCO	<i>Ephedra americana</i> HyB	抗胃炎、利尿効果
S14	ANIS DEL MONTE	<i>Tagetes filifolia</i> . Lagasca	アロマ、利尿、健胃効果
S15	MANAYUPA	<i>Desmodium spp.</i>	解毒、浄血効果
S16	HUAMANPINTA	<i>Chuquiraga spinoza</i> RyP	利尿、前立腺の治癒
S17	CARQUEJA	<i>Baccharis genistelloides</i>	肝保護、利尿効果
S18	CANCHALAGUA	<i>Schukuhria pinnata</i> Lam Kuntze	浄血、にきび改善、体重減少促進効果
S19	BERROS	<i>Cardamine bonariensis</i> Pers	浄血、健胃効果
S20	MULLACA	-	利尿、前立腺の治癒
S21	AGRASEJO	-	肝炎の治癒、体重減少促進効果
S22	CONGONA	<i>Perperomia galioides</i>	肝機能、心臓病の治癒
S23	CHUPA SANGRE	<i>Oenothera rosea</i> Ait	肺炎、リウマチの治癒
S24	AMARGON	<i>Baccharis latifolia</i>	肝炎の治癒、体重減少促進効果
S25	PACHAMUNA	-	抗胃炎効果
S26	VALERIANA ANDINA	-	リラックス効果
S27	FLOR DE RETAMA	-	催吐、下剤効果
S28	PIMPINELA	<i>Sanguisorba minor</i>	リラックス効果
S29	RAIZ DE ALTEA	<i>Acuaulimalva dryadifolia</i>	肝臓病の治癒、利尿効果
S30	PAJARO BOBO	<i>Tessaria integrifolia</i> RyP	肝臓病の治癒、利胆、利尿効果
S31	AGUJA	<i>Erodium cicutarium</i> (L) L"Her	強壮、浄血効果
S32	RATANIA	<i>Krameria triandra</i> RP	収斂、口内炎の治癒
S33	SUELDA CON SUELDA	<i>Psittacanthus cuneifolius</i>	喘息の治癒、抗うつ効果
S34	PATA DE GALLO	-	-
S35	INCA MUNA	-	健胃効果、胃腸、気管支炎の治癒
S36	PACHA SALVIA	<i>Salvia sagittata</i> RyP	利尿効果
S37	ARNICA	<i>Pseudodites griseb</i>	抗アングナ(口狭炎、扁桃炎、狭心症)効果
S38	AMANUSHICO	-	健胃効果、胃腸、気管支炎の治癒
S39	ULMISH	-	胃もたれ改善効果
S40	ROSA VERDE	-	肝臓病の治癒
S41	AYAHUASCA	<i>Banisteriopsis caapi</i>	幻覚、緩下剤効果
S42	UNA DE GATO	<i>Uncaria tomentosa</i>	抗炎症、免疫効果
S43	MATICO	<i>Piper spp.</i>	抗炎症、抗性病、皮膚病、細気管支炎の治癒

Table 3-1 continuous

No.	Local Name	Scientific Name	Availability
S44	OJE	<i>Ficus antialmintico</i>	虫下し
S45	PIRI PIRI	<i>Peperomia quadrifolia</i>	火傷の治癒
S46	YAWAR PIRIPIRI	<i>Eleutherine bulbosa</i> Miller	-
S47	IPORURO	<i>Alchornea castaneifolia</i> . Jussieu	-
S48	MUCURA	<i>Petiveria alliacea</i>	-
S49	AZAFRAN	<i>Curcuma longa</i>	-
S50	BOBINZANA	<i>Calliandra angustifolia</i>	-
S51	CHACRUNA	-	-
S52	CHILCA-CHILCA	<i>Baccharis latifolia</i>	-
S53	CHARICHIRE	-	-
S54	COPAIBA	-	-
S55	CULEN (WHITE FLOWER)	-	-
S56	ENCIRA	-	-
S57	PUSHPO POROTO	-	-
S58	SACHA CULANTRO	<i>Coriandrum sativum</i>	-
S59	SAPO HUASCA	-	-
S60	TOMILLO	<i>Thymus vulgaris</i> L.	-
S61	UBUS	<i>Spondias mombin</i>	-
S62	VERONICA	<i>Alternanthera brasiliana</i>	-
S63	WIRA-WIRA	-	-

## 第二章 *A. salina*<sup>60)</sup> に対する毒性を指標としたスクリーニング

### 第一節 実験方法

以下の操作は、全て室温 25 °C の条件下で行った。

#### ● 人口海水の調整

ドライイースト (共立食品製) を 6 mg/L になるように加えた人口海水 (デルフィス製, Live Sea Salt) を作り、そこに、エアーポンプで 1 日間空気を含ませた。

#### ● *A. salina* の孵化

中央に隔壁を有する約 20 cm × 9 cm × 5 cm の四角い容器を用意し、その隔壁の中央部に直径 5 mm の穴を 3 つ空け、その穴に綿を詰めた。両方に人口海水を注いぎ、その一方の容器の口に *A. salina* (日本動物薬品製) の卵を適量蒔き、もう一方にはポンプで空気を含ませた。24 時間後 ポンプを外し、穴に詰めた綿を除いた。卵を蒔いた廻りをアルミホイルで包むことで暗くし、蒔いていない方を蛍光灯で明るくした。24 時間置くことで、孵化した *A. salina* が集光性により暗い口から明るい口へ移動することで、卵と孵化した *A. salina* を分離し、その日の内に実験に用いた。

#### ● エキスの溶解調整

2 mg/mL, 200 µg/mL のエキスを調製し、最終濃度が 1 mg/mL, 100 µg/mL となるようにした。調製時の希釈には DMSO 2% を含んだ人口海水を用い、最終濃度が 1% DMSO となるようにした。Blank には、2% DMSO/人口海水を用いた。Positive control には CuSO<sub>4</sub> 溶液 (2 mg/mL, 200 µg/mL, 20 µg/mL) を調整し、実験に供した。

#### ● 分注と毒性測定

孵化した *A. salina* の入った海水 (10-20 匹) を 90 µL ずつ分注した。次に前項で調製したエキスをそれぞれ 3 つのウェルに 90 µL ずつ分注した。24 時間後、各ウェルの *A. salina* の様子を顕微鏡で観察し、それぞれのウェルにおいて、動かなくなった *A. salina* の数をカウントした。その後、MeOH を添加し、*A. salina* の動きが止まった後、各 well における *A. salina* の総数をカウントすることで死亡率を計算した。

Table. 3-2. Death rate of *A. salina*.

		after 24 h
Blank		no death
CuSO <sub>4</sub>	1 mg/mL	Mortality more than 2/3
	100 µg/mL	Mortality about 1/3 – 2/3
	10 µg/mL	mortality less than 1/3

## 第二節 結果

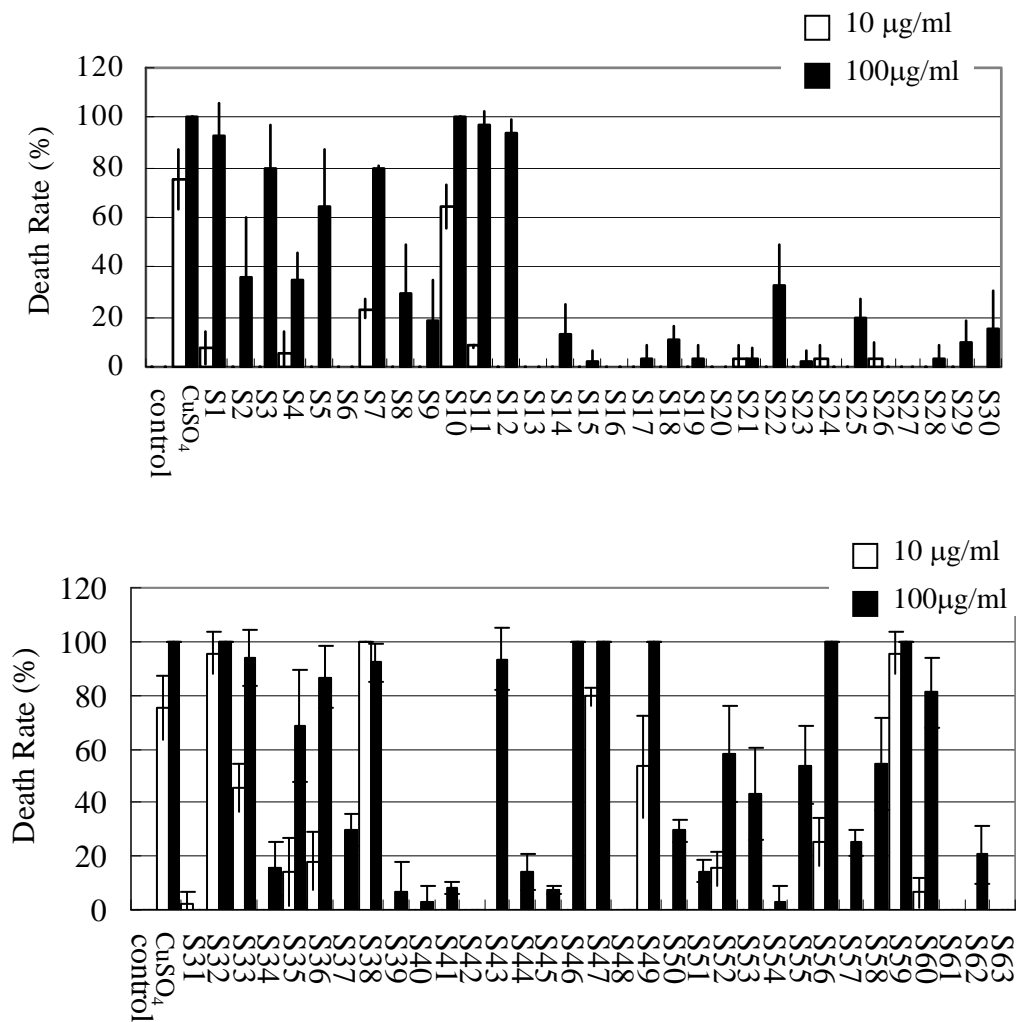


Fig. 3-2. *A. salina* toxicity assay for peruvian plants screening

最終濃度 100 µg/ml で、S1, S3, S10, S11, S12, S32, S33, S36, S38, S43, S46, S47, S49, S56 S59, S60 の 16 種の植物で 80% 以上の *A. Salina* に対する毒性を示した (Fig. 3-2).そこで、以下のように、活性の見られた植物に対して追試を行った。

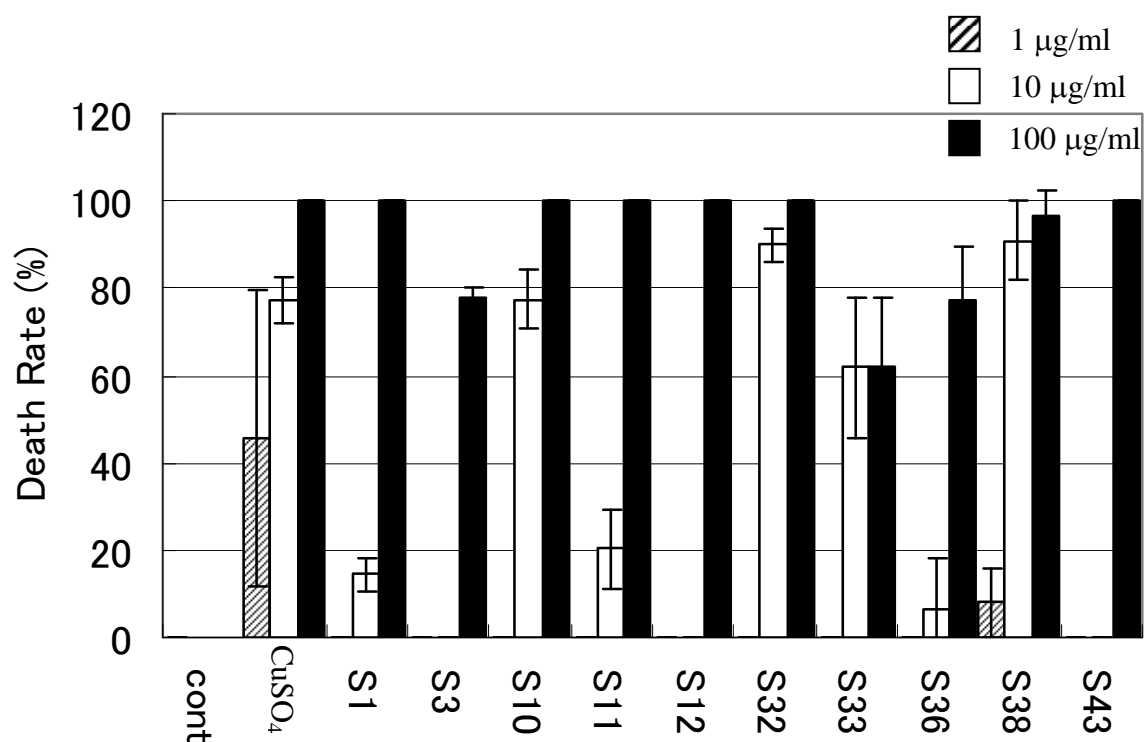
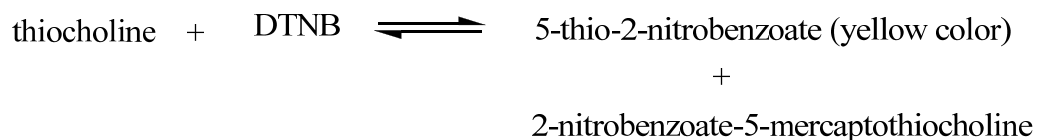


Fig. 3-3. *A. salina* toxicity assay for selective plants screening

その結果、S32 : *Krameria triandra* (RATANIA), S38 (AMANUSHICO), S47 : *Alchornea castaneifolia*. Jussieu, (IPORURO), S49 : *Curcuma longa* (AZAFRAN), S59 (SAPO HUASCA) において、比較的強い活性がみられた (Fig. 3-3.).

今回 AchE 阻害活性を検出する方法として Ellman's 法を用いた.<sup>66)</sup> Ellman's 法は、AchE によって acetylthiocholine を加水分解してできた thiocholine と 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) が反応することにより生じる 5-thio-2-nitrobenzoate と、2-nitrobenzoate-5-mercaptothiocholine との黄色を 405 nm で検出することで AchE の活性を測定する方法である (Scheme 3-1.).



## 47



#### [実験方法]

96-well plates のウェルに対して、15 mM ATCI (25  $\mu$ L)、3 mM DTNB (125  $\mu$ L)、0.1% BSA in 50 mM Tris-HCl (50  $\mu$ L)、1 mg/mL エキス (25  $\mu$ L) それぞれ加え、攪拌した。その後、0.22 U/ml AchE を 25  $\mu$ L 添加し (Blank には buffer A を 25  $\mu$ L 添加)、マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸収を 1 分間毎に計 6 回測定した。AchE 添加測定値から blank 値を差し引いた値における 1 分毎の変化率を計算した。Blank を用いたときの AchE 活性を control (AchE 活性 100%) とした。以上によって、各エキスを加えたときにおける AchE 活性を比較した。

## 第二節 結果

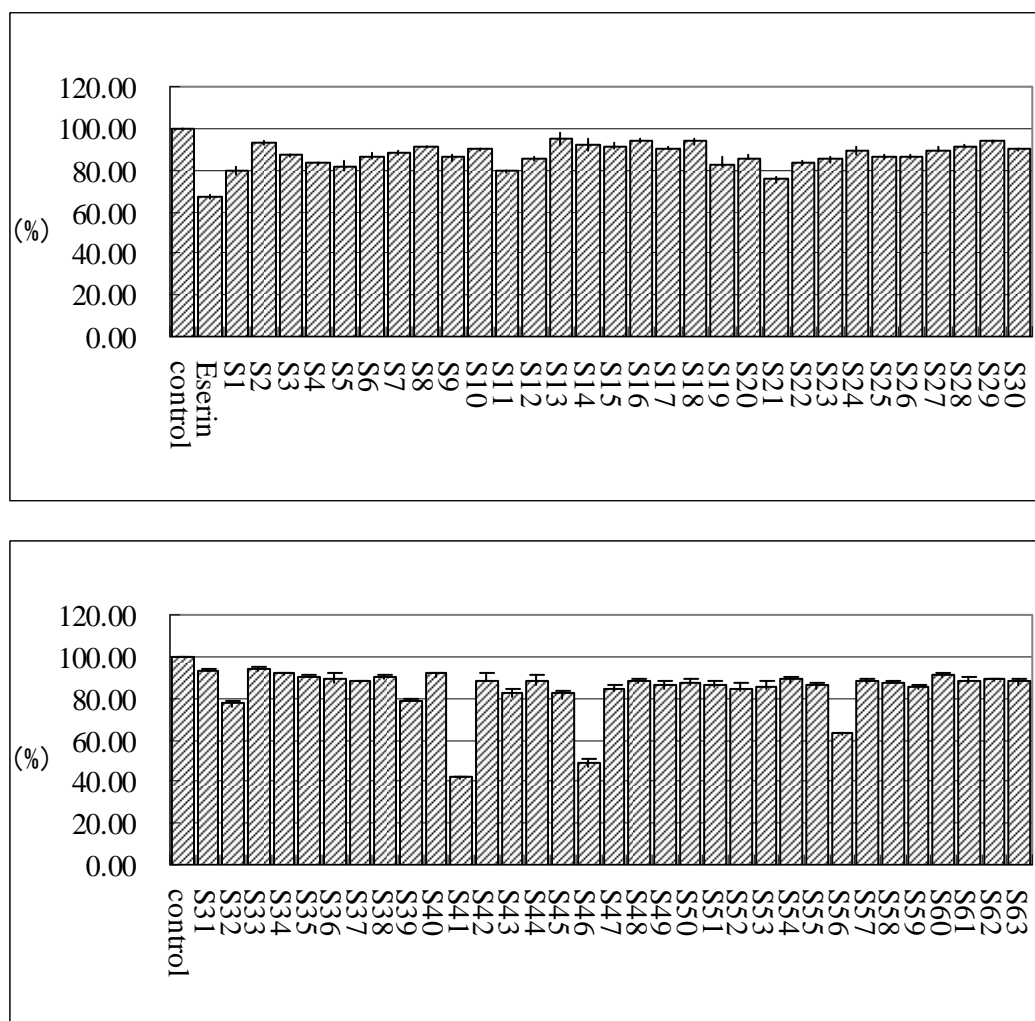


Fig. 3-3. AchE activity test for peruvian plant screening

サンプル番号 S41 : *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA), S46 *Eleutherine bulbosa* (YAWAR PIRIPIRI) において AchE 阻害が見られた (Ach 活性は、それぞれ S41: 42.08%; S46: 48.59% , Fig. 3-3.).

#### 第四章 結論

以上、ペルー原産 63 種の植物エキスについて、*A. salina* に対する毒性試験および AchE 阻害活性試験を行い、いくつかの植物エキスについてその活性を見出した。

前者については、S32 : *K. triandra* (RATANIA), S38 : (AMANUSHICO), S47 : *A. jussieu*, (IPORURO), S49 : *C. longa* (AZAFRAN), S59 : (SAPO HUASCA) の 4 種、後者については、S41 : *Banisteriopsis caapi* (AYAHUASCA), S46 : *E. bulbosa* (YAWAR PIRIPIRI) の 2 種であった。残念ながら、これらの植物について、さらなる供与が受けられなかったため、詳細な成分研究と活性試験を行うことができなかった。しかしながら、これらの植物の安定した供給を受けることにより、生物活性物質の発見が期待される。

## 第五章 活性を示した植物の文献上の情報と考察

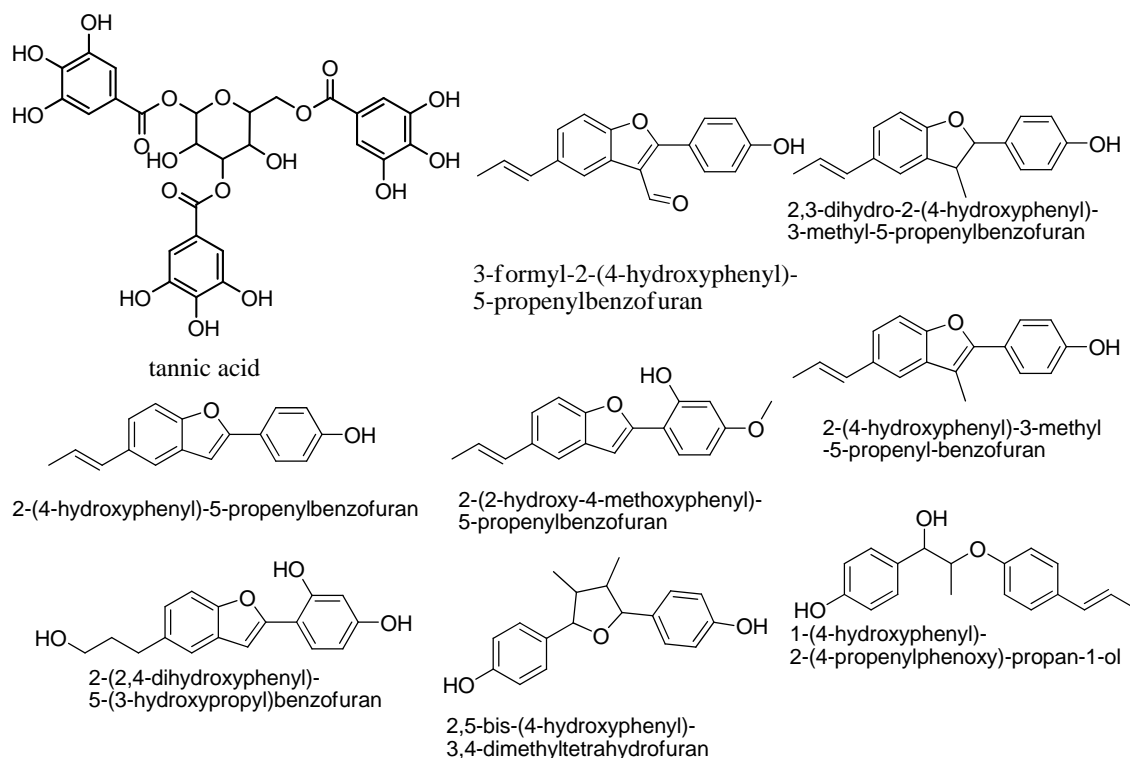
学名が明確に分かっている植物に関して以下に示した.

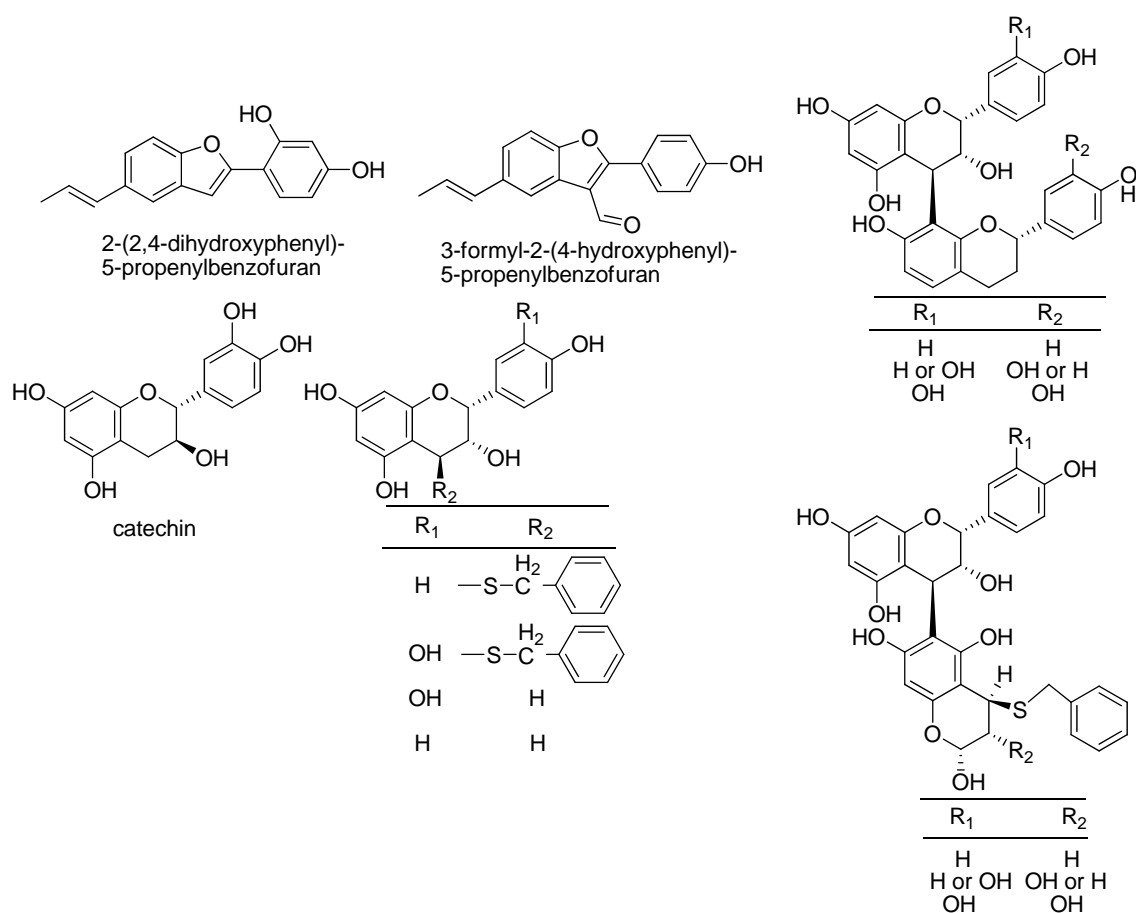
### 第一節 *A. salina* に対する毒性を示した植物

#### 第一項 S32 : *Krameria triandra* (RATANIA)

クラメリア科 *K. triandra* は、ペルーで収斂作用・抗菌作用が持つことが知られており、下痢、咽頭炎、口内炎、月経過多、尿失禁、血尿、霜焼けへの治療のために用いられ、また歯磨きやガムの補強剤として親しまれてきた<sup>67)</sup>. この植物は、以下の化合物を含有していることが報告されており、tannin による *Enterococcus faecalis* や *Corynebacterium diphtheriae*、*Staphylococcus spp.* への抗菌活性<sup>68)</sup>、lignans による抗酸化作用/UV からの保護作用<sup>69)</sup>、proanthocyanidins による Herpes simplex virus type 1 に対する抗ウイルス作用が知られている<sup>70)</sup>. 今回の *A. salina* に対する毒性は、tannin による抗菌活性の影響が高いと考えられる.

[既知化合物]





## 第二項 S47 : *Alchornea castaneifolia* (IPORURO)

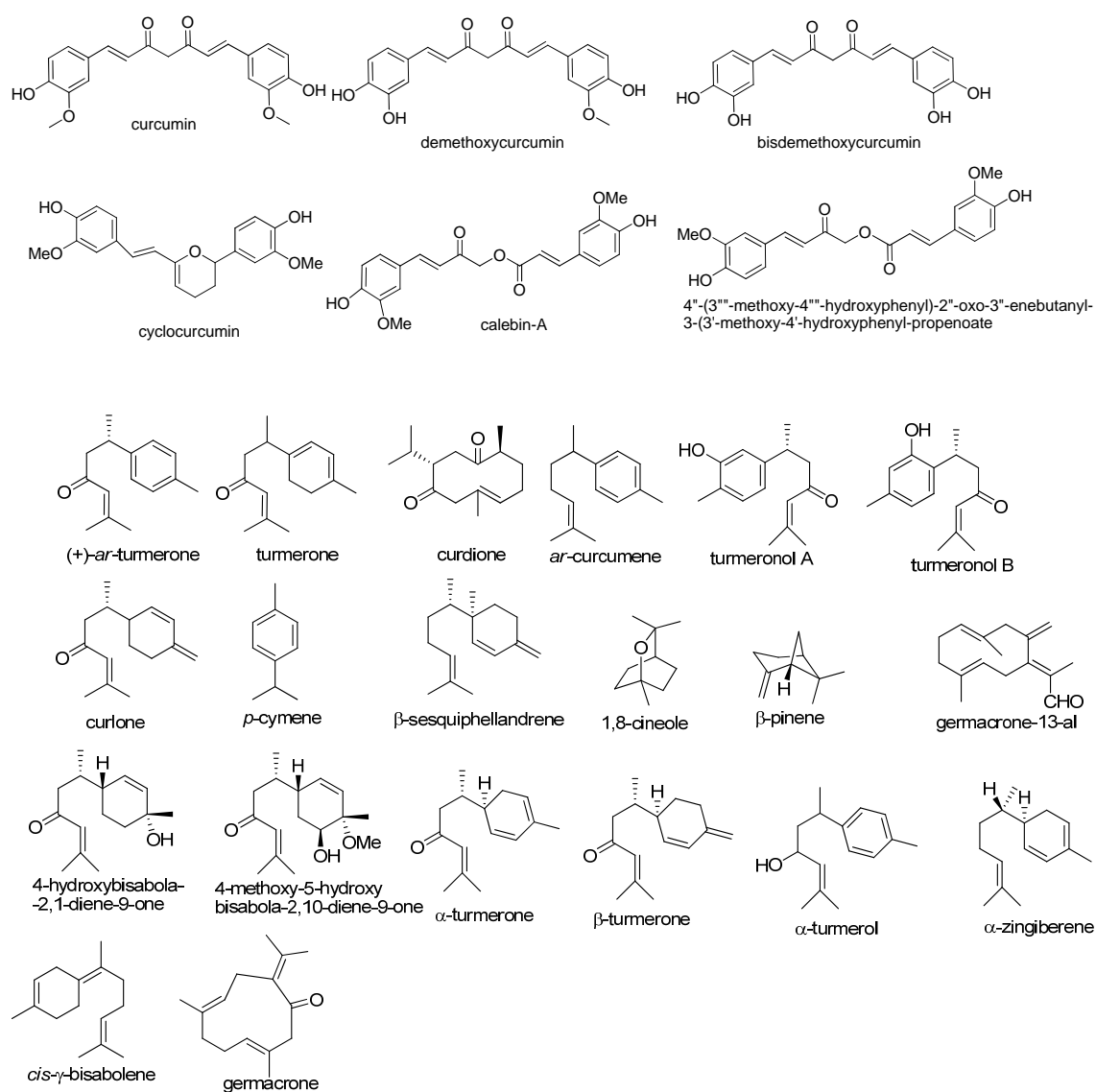
トウダイグサ科 *A. castaneifolia* は、ペルーでは、炎症や潰瘍の治療に用いられてきた。抽出物は、*staphylococcus epidermidis* への抗菌活性を示し<sup>71)</sup>、COX-1 触媒 prostaglandin 生合成を阻害する<sup>72)</sup>。flavonoids、saponins、tannins、catechin、isoquercitrin を含むとの報告があるが、具体的な含有化合物について書いた論文は公表されていない<sup>73)</sup>。

## 第三項 S49 : *Curcuma longa* (AZAFRAN)

ショウガ科 *C. longa* は、ペルー以外にもインドや中国を中心に熱帯、亜熱帯地域で広く栽培されている植物で、粉末状のものは turmeric と言われ調味料として親しまれている。インドでは、伝統的に、胆機能障害、食欲不振、鼻感冒、風邪、糖尿病患者の創傷、肝機能障害、副鼻腔炎への治療に使用されてきた<sup>74)</sup>。本植物は、盛んに研究されており、turmeric の黄色色素として単離された curcuminoids は、本植物の主成分となっている。抗炎症作用<sup>75)</sup>、抗腫瘍効果<sup>75)</sup>、鎮痛作用<sup>76)</sup>、抗菌作用<sup>77)</sup>、抗酸化作用<sup>78)</sup>、脂質低下作用<sup>79)</sup>、抗原虫作用<sup>80)</sup>、抗バクテリア作用<sup>81)</sup>、ヘビ毒

の解毒作用<sup>82)</sup>、慢性関節炎緩和作用<sup>83)</sup>、避妊作用（精子産生抑制効果）<sup>84)</sup>、抗アレルギー作用（Type I, IV）<sup>85)</sup>、 $\alpha$ -Glucosidase 活性阻害効果<sup>86)</sup>等様々な生理活性を持つことが報告されている。これらの curcuminoids の作用（特に、抗腫瘍効果・抗菌作用）によって、*A. salina* の毒性が検出されたことが推測された。

[既知化合物]

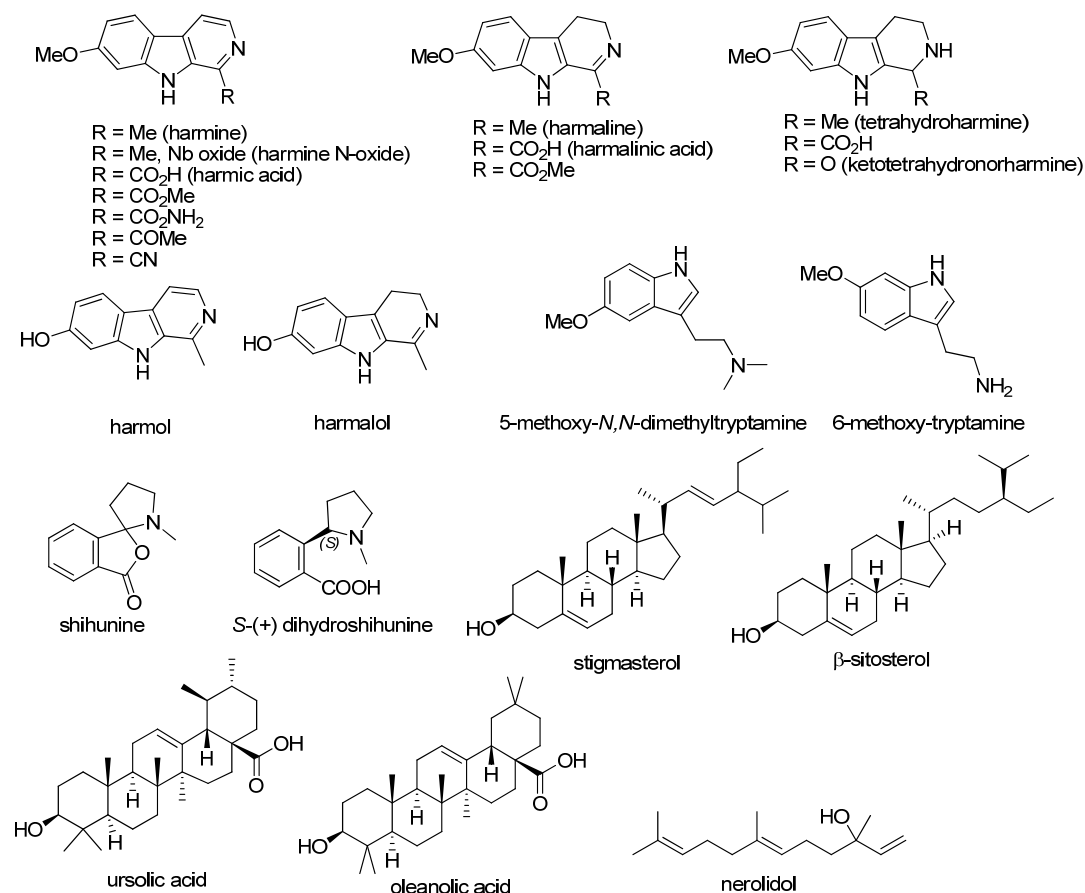


## 第二節 AchE 阻害活性を示す植物

### 第一項 S41 : AYAHUASCA (*Banisteriopsis caapi*, AChE 活性 42.08%)

キントラノオ科 *Banisteriopsis caapi* は、ペルーでは ayahuasca (魂の宿った蔓) と呼ばれ、シャーマンによって病気の治療や心身の浄化のための儀式に用いられてきた<sup>87)</sup>。また、局部麻酔や記憶力の増加、幻覚誘発作用を持つ神聖な植物として親しまれている。この精神活性作用はモノアミンオキシダーゼ (MAO) 阻害作用を持つ  $\beta$ -carboline alkalids 由来であることが報告されており<sup>88)</sup>、以下に示すような harmine, harmol, tetrahydroharmine 等が単離同定されている<sup>89)</sup>。また  $\beta$ -carboline alkalids と同様に精神活性作用を持つ tryptamines の 6-methoxy-tryptamine も含有する。実際に現地でドリンクして飲まれる場合は、*N,N*-dimethyltryptamine を含有する *Psychotria viridis* と混ぜて飲まれる<sup>90)</sup>。また、*B. caapi* は抗菌作用、虫下し、血管弛緩、薬物中毒のリハビリ作用が報告されている<sup>91)</sup>。*B. caapi* の含有化合物である  $\beta$ -carbolines は、既に Acetylcholinesterase/Choline acetyltransferase 阻害作用に関して報告されており<sup>92)</sup>、本実験によって明らかになった *B. caapi* の AChE 阻害作用も  $\beta$ -carbolines によるものであると推測することができた。

#### [既知化合物]

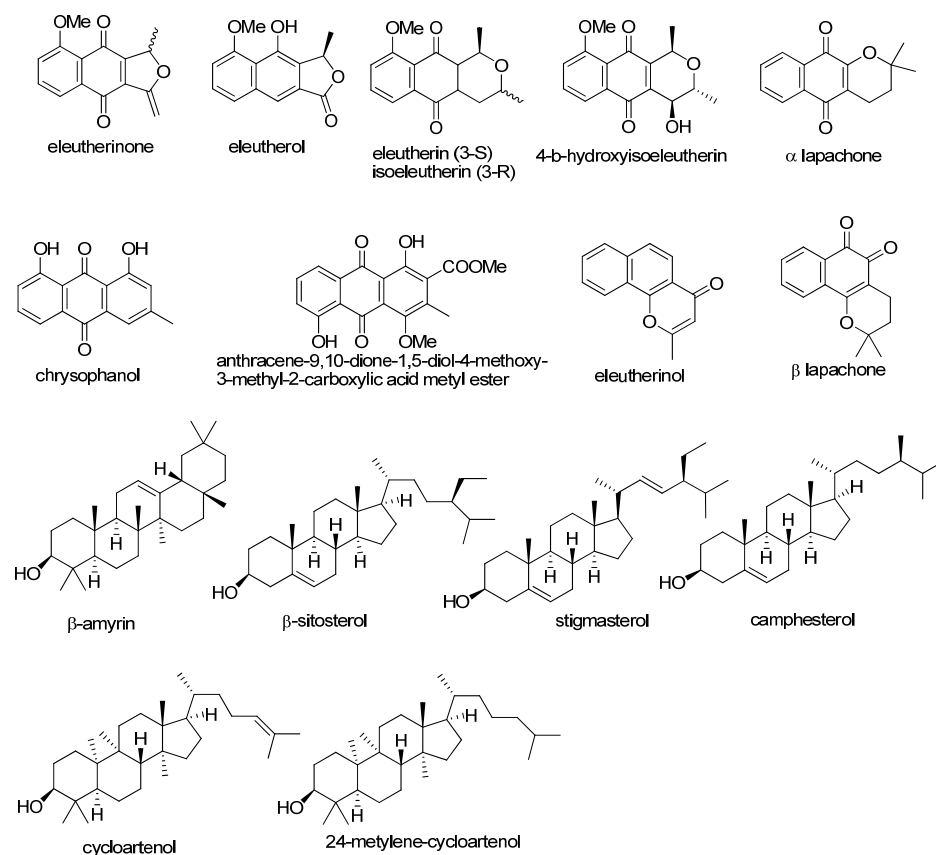


## 第二項 YAWAR PIRIPIRI (*Eleutherine bulbosa* Miller, AChE 活性 48.59%)

ペルーでは、痛みを伴う不規則な生理・腸・冠動脈疾患に対する治療、虫下し、避妊薬として用いられてきた<sup>93,94)</sup>。これまでに、植物体もしくはその抽出エキスをを用いた実験によって、*E. bulbosa* の体温降下、鎮痛、腹部筋痙攣、下痢抑制、抗ウイルス活性、ラットへの避妊作用や肝・脾臓への毒性を持つ可能性、弱い瘢痕形成作用が報告されている<sup>95)</sup>。*E. bulbosa* からは、以下の化合物が単離されており、特に **eleutherin** は、ラットにおける一時的な 血液凝固関連因子 **prothrombin 時間** の短縮効果、*Mycobacterium smegmatis*/*Bacillus subtilis*/*Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性<sup>96)</sup>、DNA topoisomerase II 阻害作用<sup>97)</sup>、**isoelutherin**/**isoelutherol** は HIV 複製阻害作用、*Cladosporium sphaerospermum* へ抗菌作用が知られている<sup>94)</sup>。

今回、本植物から AChE 阻害作用を見出した。AChE 阻害効果によって、体内 ACh 量が高まり、副交感神経興奮効果が現れる。このことは、以前の *E. bulbosa* における報告で、腹部筋痙攣へは腸の運動と緊張の高まり、冠状脈疾患へは血管拡張効果、体温降下は熱放散中枢活性化作用等が関与している可能性が考えられる。しかしながら、これまでに *E. bulbosa* や報告されている含有化合物が AChE 阻害作用を持つという報告はなく更なる研究が期待できる。

[既知化合物]





<references>

● 第一部

- 1) Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Prawat, H.; Pisutjaroenpong, S.; Engprasert, S.; Chumsri, P.; Tengchaisri, T.; Sirisinha, S.; Picha, P. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 2065-2072.
- 2) Shigemori, H.; Komaki, H.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Nemoto, A.; Tanaka, Y.; Sasaki, T.; In, Y.; Ishida, T.; Kobayashi, J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6900-6904.
- 3) Nemoto, A.; Tanaka, Y.; Karasaki, Y.; Komaki, H.; Yazawa, K.; Mikami, Y. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 18-21.
- 4) Mukai, A.; Fukai, T.; Matsumoto, Y.; Ishikawa, J.; Hoshino, Y.; Yazawa, K.; Harada, K. I.; Mikami, Y. *J. Antibiot.* **2006**, *59*, 366-369.
- 5) Nemoto, A.; Hoshino, Y.; Yazawa, K.; Ando, A.; Mikami, Y.; Komaki, H.; Tanaka, Y.; Gräfe, U. *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 593-597.
- 6) Kofteridis, P. D.; Maraki, S.; Scoulica, E.; Tsioutis, C.; Maltezas, G.; Gikas, A. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2007**, *59*, 459-462.
- 7) Box, S. J.; Corbett, D. F.; Robins, K. G.; Spear, S. R.; Verrall, M. S. *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 1394-1396.
- 8) Harada, S.; Shinagawa, S.; Nozaki, Y. *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1425-1430.
- 9) Jones, D.; Metzger, H. J.; Schatz, A.; Waksman, S. A. *Science* **1944**, *100*, 103-105.
- 10) Bayer, E.; Gugel, K. H.; Hagele, K.; Hagenmaier, H.; Jessipow, S.; König, W. A.; Zähler, H. *Helv. Chim. Acta* **1972**, *55*, 224-239.
- 11) Umezawa, H.; Ueda, M.; Maeda, K.; Yagishita, K.; Kondo, S.; Okami, Y.; Utahara, R.; Osato, Y.; Nitta, K.; Takeuchi, T. *J. Antibiot.* **1957**, *A10*, 181-188.
- 12) Mackintosh, C.; Klumpp, S. *FEBS Lett.* **1990**, *277*, 137-140.
- 13) Bode, H. B.; Zeeck, A. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **2000**, 323-328.
- 14) Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y.-L.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E. O.; Oiwa, R.; Omura, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1979**, *15*, 361-367.
- 15) Sohda, K.; Hiramoto, M.; Suzumura, K.; Takebayashi, Y.; Suzuki, K.; Tanaka, A. *J. Antibiot.* **2004**, *58*, 32-36.
- 16) Zhang, H.; Tomoda, H.; Tabata, N.; Otori, M.; Shinose, M.; Takahashi, Y.; Omura, S. *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 29-33.
- 17) Toki, S.; Agatsuma, T.; Ochiai, K.; Saitho, Y.; Ando, K.; Nakanishi, S.; Lokker, N. A.; Giese, N. E.; Matsuda, Y. *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 405-414.
- 18) Anderson, S. A.; Wellington, M. H. E. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2001**, *51*, 797-814.
- 19) Wakabayashi, H.; Abe, S.; Okutomi, T.; Tansho, S.; Kawase, K.; Yamaguchi, H. *Microbiol. Immunol.* **1996**, 821-825.
- 20) Renner, M. K.; Shen, Y. C.; Cheng, X. C.; Jensen, P. R.; Frankmoelle, W.; Kauffman, C. A.; Fenical, W.; Lobkovsky, E.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11273-11276.
- 21) Fujii, K.; Ikai, Y.; Oka, H.; Suzuki, M.; Harada, K. I. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 5146-5151.

<references>

● 第二部

- 22) *OECD factbook : economic, environmental and social statistics*; Organisation for Economic Co-operation and Development Ed.: Paris, **2008**, 238-239.
- 23) Wieting, J. M. *J. AM. Osteopatic assoc.* **2008**, *108*, 545-552.
- 24) Tanaka, K.; Nakanishi, T. *Appl. Human Sci.* **1996**, *15*, 139-148.
- 25) Woods, C. S.; Seeley, J. R.; Porte, D.; Schwartz, W. M. *Science* **1998**, *280*, 1378-1383.
- 26) Drent, M. L.; Van Der Veen, E. A. *Int. J. Obesity* **1993**, *17*, 241-244.
- 27) Birari, B. Rahul.; Bhutani, K. K. *Drug Discov. Today* **2007**, *12*, 879-889.
- 28) Padwal, S. R.; Majumdar, R. S. *New Drug Class* **2007**, *369*, 71-77.
- 29) Han, L.; Li, W.; Narimatsu, S.; Liu, L.; Fu, H.; Okuda, H.; Koike, K. *J. Nat. Med.* **2007**, *61*, 184-186.
- 30) Yoshikawa, M.; Shimoda, H.; Nishida, N.; Takada, M.; Matsuda, H. *J. Nutr.* **2002**, *132*, 1819-1824.
- 31) Karu, N.; Reifen, R.; Kerem, Z. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2824-2828.
- 32) (a) Sato, A.; Asano, K.; Sato, T. *J. Ess. Oil. Res.* **1989**, *2*, 179-183. (b) Huang, Y.; Pu, Z. *Perfumer and Flavorist* **2000**, *25*, 53-66. (c) Taufiq-Yap, Y. H.; Peh, T. H.; Ee, G. C. L.; Ali, A. M.; Rahmani, M.; Sukari, M. A.; Muse, R. *Orient. J. Chem.* **2001**, *17*, 387-390. (d) Jantan, I.; Ahmad, A. S.; Ahmad, A. R.; Ali, N. A. M.; Ayop, N. *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 627-632.
- 33) Taufiq-Yap, Y. H.; Peh, T. H.; Ee, G. C. L.; Ali, A. M.; Rahmani, M.; Sukari, M. A. Muse, R. *Orient. J. Chem.* **2001**, *17*, 387-390.
- 34) Tiwawech, D.; Hirose, M.; Futakuchi, M.; Lin, C.; Thamavit, W.; Ito, N.; Shirai, T. *Cancer Lett.* **2000**, *158*, 195-201.
- 35) Moriya, K.; Kinase, K.; Ozawa, O. JP Patent P2006-22002A, **2006**.
- 36) Takai, M.; Nishijima, K.; Kubota, K. JP Patent P1999-199427A, **1999**.
- 37) Murakami, A.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H. *Bio Industry* **1996**, *13*, 28-35.
- 38) Ohama, C. JP Patent P1999-169149A, **1999**.
- 39) Nakaguchi, O.; Katsurada, M. JP Patent P2001-31428A, **2001**.
- 40) Murakami, A.; Gao, G.; Kim, O. K.; Omura, M.; Masamichi, Y.; Ito, C.; Furukawa, H.; Jiwajinda, S.; Koshimizu, K.; Ohigashi, H. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 333-339.
- 41) Piyachaturawat, P.; Glinsukon, T.; Chanjarunee, A. *J. Ethnopharmacol.* **1985**, *13*, 105-110.
- 42) Pyo, D.; Oo, H. H. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2007**, *30*, 377-392.
- 43) Slanc, P.; Doljak, B.; Mlinarič, A.; Štrukelj, B. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 758-762.
- 44) Merck index 12nd Ed.
- 45) isolated by Sunee Chansakaow (Unpublished data)
- 46) Gupta, O. C. Dass; Rizui, S. A.I.; Gupta, P.C. *Planta Med.* **1971**, *20*, 172-177.
- 47) Marcel, S. F.; Jie, L. K.; Mustafa, J. *lipids* **1997**, *32*, 1019-1034.
- 48) Bock, K.; Pedersen, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* **1974**, 293-296.
- 49) Wu, J.; Long L.; Song, Y.; Zhang, S.; Li, Q.; Jianshe, H.; Zhilui, X. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 330-332.
- 50) Gerson, T.; Shorland, B. F. *Biochem. J.* **1964**, *92*, 385-390.
- 51) Kasai, N.; Maeda, Y. JP Patent P2003-246746A, **2003**.
- 52) Murakami, N.; Shirahashi, H.; Nagatsu, A.; Sakakibara, J. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1177-1179.
- 53) Sakurai, I.; Mizusawa, N.; Wada, H.; Sato, N. *Plant Physiol.* **2007**, *145*, 1361-1370.
- 54) Matsufuji, M.; Nagamatsu, Y.; Yoshimoto, A. *J. Biosci. Bioeng.* **2000**, *89*, 345-349.
- 55) Reshef, V.; Mizrachi, E.; Marezki, T.; Silberstein, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Carmeli, S. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 1251-1260.
- 56) Maeda, N.; Hada, T.; Murakami-Nakai, C.; Kuriyama, I.; Ichikawa, H.; Fukumori, Y.; Hiratsuka, J. Yoshida, H. Sakaguchi, Y. Mizushina, Y. *J. Nutr. Biochem.* **2005**, *16*, 121-128.
- 57) Cateni, F.; Falsone, G.; Zilic, J.; Bonivento, P.; Zacchigna, M.; Žigon, D.; Sosa, S.; Altinier, G. *Arch. Org. Chem.* **2004**, *5*, 54-65.

- 58) Han, L. K.; Li, D. X.; Xiang, L.; Gong, X. J.; Kondo, Y.; Suzuki, I.; Okuda, H. *Yakugaku Zasshi* **2006**, *126*, 43-49.
- 59) Murakami, N.; Morimoto, T.; Imamura, H.; Ueda, T.; Nagai, S. I.; Sakakibara, J.; Yamada, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2277-2281.

<references>

● 第三部

- 60) Solis, N. P.; Wright, W. C.; Anderson, M. M.; Gupta, P. M.; Phillipson, D. J. *Planta Med.* **1993**, *59*, 250-252.
- 61) Goh, K. C. N.; Chou, M. L. *Zoolog. Sci.* **1998**, *15*, 805-812.
- 62) Tan, T. L.; Williamson, T. R.; Gerwick, H. W. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 419-425.
- 63) Tan, T. L.; Okino, T.; Gerwick, H. W. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 952-955.
- 64) Logrieco, A.; Moretti, A.; Fornelli, F.; Fogliano, V.; Ritieni, A.; Caiaffa, F. M.; Randazzo, G.; Bottalico, A.; Macchia, L. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 3378-3384.
- 65) (a) Ibach, B.; Haen, Ekkehard. *Curr. Pharm. Des.* **2004**, *10*, 231-251. (b) Perry, K. E.; Pickering, T. A.; Wang, W. W.; Houghton, J. P.; Perry, S. L. N. *CNS drugs* **1999**, *51*, 527-534.
- 66) (a) Ellman, G. L.; Courtney, D.; Andres, V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharm.* **1961**, *7*, 88-95. (b) Rhee, I. K.; Meent, M.; Ingkaninan, K.; Verpoorte, R. *J. Chromatogr., A* **2001**, *915*, 217-223.
- 67) Scholz, E.; Rimpler, H. *Planta Med.* **1989**, *55*, 379-384.
- 68) Djipa, D. C.; Delmée, M.; Quetin-Leclercq, J. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71*, 307-313.
- 69) Carini, M.; Aldini, G.; Orioli, M. Maffei-Facino, R. *Planta Med.* **2002**, *68*, 193-197.
- 70) Scholz, E.; Rimpler, H. *Planta Med.* **1989**, *55*, 379-384.
- 71) Costa, S. E.; Hiruma-Lima, A. C.; Lima, O. E.; Sucupira, C. G.; Bertolin, O. A.; Lolis, F. S.; Andrade, D. P. F.; Vilegas, W.; Souza-Brito, R. M. A. *Phytother. Res.* **2008**, *22*, 705-707.
- 72) Dunsta, A. C.; Noreen, Y.; Serrano, G.; Cox, A. P.; Perera, P.; Bohlin, L. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *57*, 35-56.
- 73) Eigner, D.; Scholz, D. *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *67*, 1-6.
- 74) (a) Kawamori, T.; Lubet, R.; Steele, V. E.; Kelloff, G. J.; Kaskey, R. B.; Rao, C. V.; Reddy, B. S. *Cancer Res.* **1999**, *59*, 597-601. (b) Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. *Cancer Lett.* **2005**, 181-190.
- 75) Gautam, V.; Sahni, Y. P. *Indian Vet. J.* **2008**, *85*, 1034-1036.
- 76) Apisariyakul, A.; Vanittanakom, N.; Buddhasukh, D. *J. Ethnopharmacol.* **1995**, *49*, 163-169.
- 77) Toda, S.; Miyase, T.; Arichi, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, *33*, 1725-1728.
- 78) Suresh-Babu, P.; Srinivasan, K. *Mol. Cell. Biochem.* **1997**, *166*, 169-175.
- 79) Rasmussen, H. B.; Christensen, S. B.; Kvist, L. P.; Karazmi, A. *Planta Medica*, **2000**, *66*, 396-398.
- 80) Singh, R. Chandra, R.; Bose, M.; Luthra, P. M. *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 737-740.
- 81) Ferreira, L. A. F.; Henriques, O. B.; Andreoni, A. A. S.; Vital, G. R. F.; Campos, M. M. C.; Habermehl, G. G.; De Moraes, V. L. G. *Toxicon*, **1992**, *30*, 1211-1218.
- 82) Chandra, D.; Gupta, S. S. *Indian J. Med. Res.* **1972**, *60*, 138-142.
- 83) Ashok, P.; Meenakshi, B. *Asian J. Andrology* **2004**, *6*, 71-74.
- 84) Yano, S.; Terai, M.; Shimizu, K. L.; Horie, S.; Futagami, Y.; Tsuchiya, S.; Ikegami, F.; Sekine, T.; Yamamoto, Y.; Fujimori, H.; Takamoto, K.; Saito, K.; Ueno, K.; Watanabe, K. *Nat. Med.* **2000**, *54*, 318-324.
- 85) Du, Z. Y.; Liu, R. R.; Shao, W. Y.; Mao, X. P.; Ma, L.; Gu, L. Q.; Huang, Z. S.; Chan, A. S. C. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, *41*, 213-218.
- 86) (a) Meckenna, J. D.; Towers, H. N. G.; Abbot, F. *J. Ethnopharmacol.* **1984**, *10*, 195-223. (b) Desmarchelier, C.; Gurni, A.; Ciccia, G. Giulietti, M. A. *J. Ethnopharmacol.* **1996**, *52*, 45-51.
- 87) Carlini, A. E. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2003**, *75*, 501-512.
- 88) (a) Hashimoto, Y.; Kawanishi, K. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1559-1560. (b) Hashimoto, Y.; Kawanishi, K. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1633-1635. (c) Rivier, L.; Lindgren, E. *J. Econ. Botany* **1972**, *26*, 101-129. (d) Aquino, R.; Crescenzo, D. S.; Simone, D. F. *Fitoterapia*, **1991**, *5*, 453.
- 89) Callaway, C. J.; Brito, S. G.; Neves, S. E. *J. Psychoactive Drugs* **2005**, *37*, 145-150.
- 90) Callaway, C. J. *J. Psychoactive Drugs* **2005**, *37*, 151-155.
- 91) Skup, M.; Oderfeld-Nowak, B.; Rommelspacher, H. *J. Neurochem.* **1983**, *41*, 62-68.

- 92) Weniger, B.; Haag-Berrurier, M.; Anton, R. *J. Ethnopharmacol.* **1982**, *6*, 67-84.
- 93) Alves, T. M. A.; Kloos, H.; Zani, C. L. *Mem. Inst. Butantan.* **2003**, *98*, 709-712.
- 94) (a) Lin, J.; Puckree, T.; Mvelase, T. P. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *79*, 53-56. b) Villegas, F. L.; Fernández, D. I.; Maldonado, H.; Torres, R.; Zavaleta, A.; Vaisberg, J. A.; Hammond, B. G. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, *55*, 193-200.
- 95) Bianchi, C.; Ceriotti, G. *J. Pharm. Sci.* **1975**, *64*, 1305-1312.
- 96) Krishnan, P.; Bastow, F. K. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1367-1379.

補足 (スペクトルデータ)

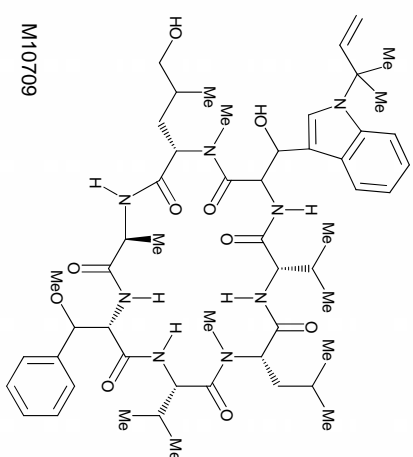
For **M10709**

- S1.  $^1\text{H}$  MNR (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S2.  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S3.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S4.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S5.  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S6.  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S7. ROESY (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$
- S8. TOCSY (600 MHz) of M10709 in  $\text{CDCl}_3$

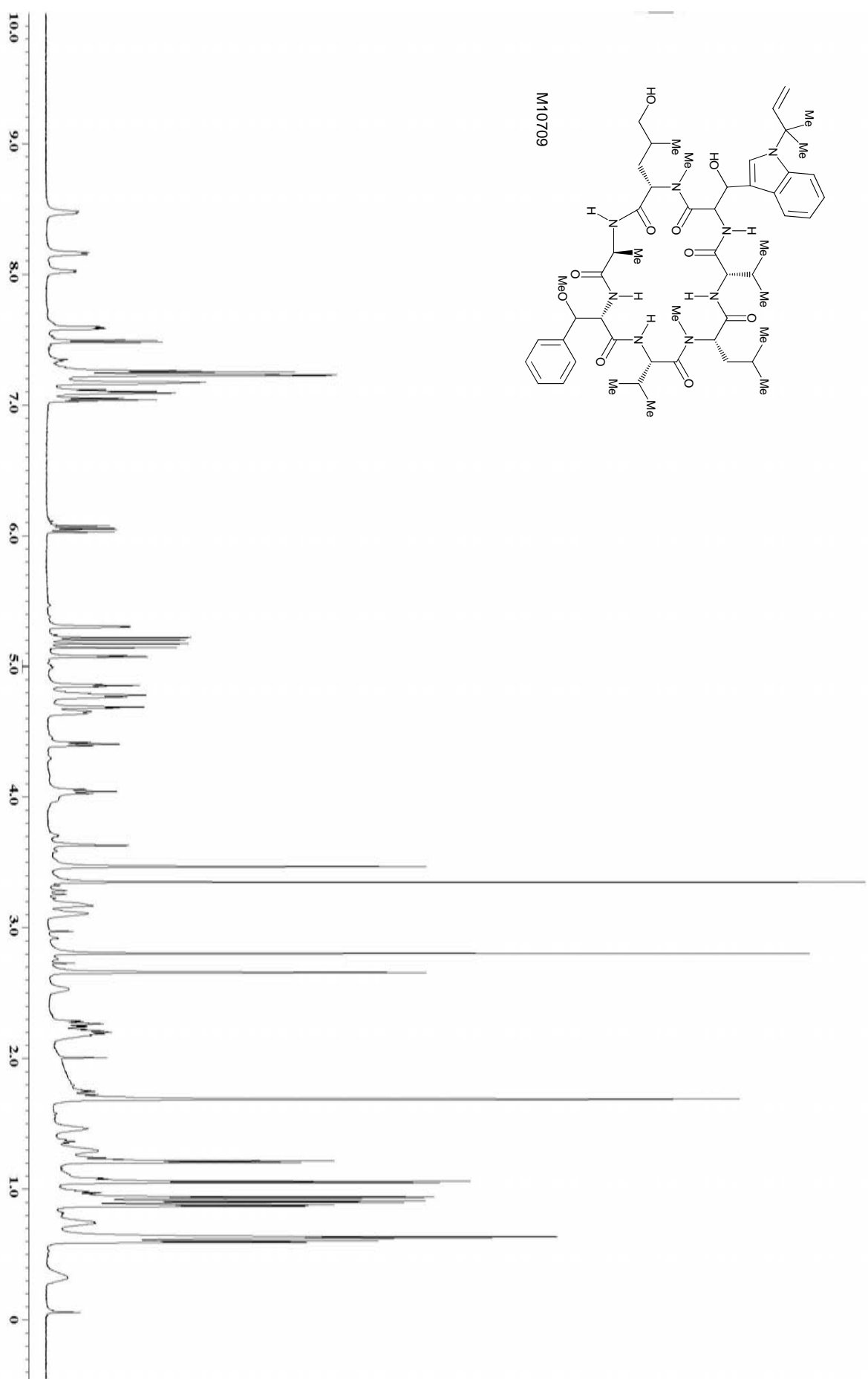
For **1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol**

- S9.  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S10.  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S11. DEPT (150 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (600 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S13. HMQC (600 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S14. HMBC (600 MHz) of 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S15. TOCSY (600 MHz) of the b-galacopyranosyl moiety on 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S16. TOCSY (600 MHz) of the  $\alpha$ -galacopyranosyl moiety on 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH
- S17. Key HSQC spectrum of the anomer carbons on 1-*O*(linolenyl)-2-*O*(palmityl)-3-*O*(6'-*O*- $\alpha$ -galactopyranosyl-b-galactopyranosyl)-glycerol in MeOH

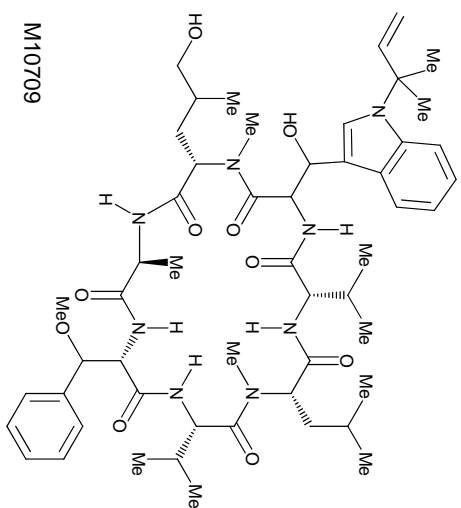
# S1. <sup>1</sup>H MNR (600 MHz) of M10709 in CDCl<sub>3</sub>



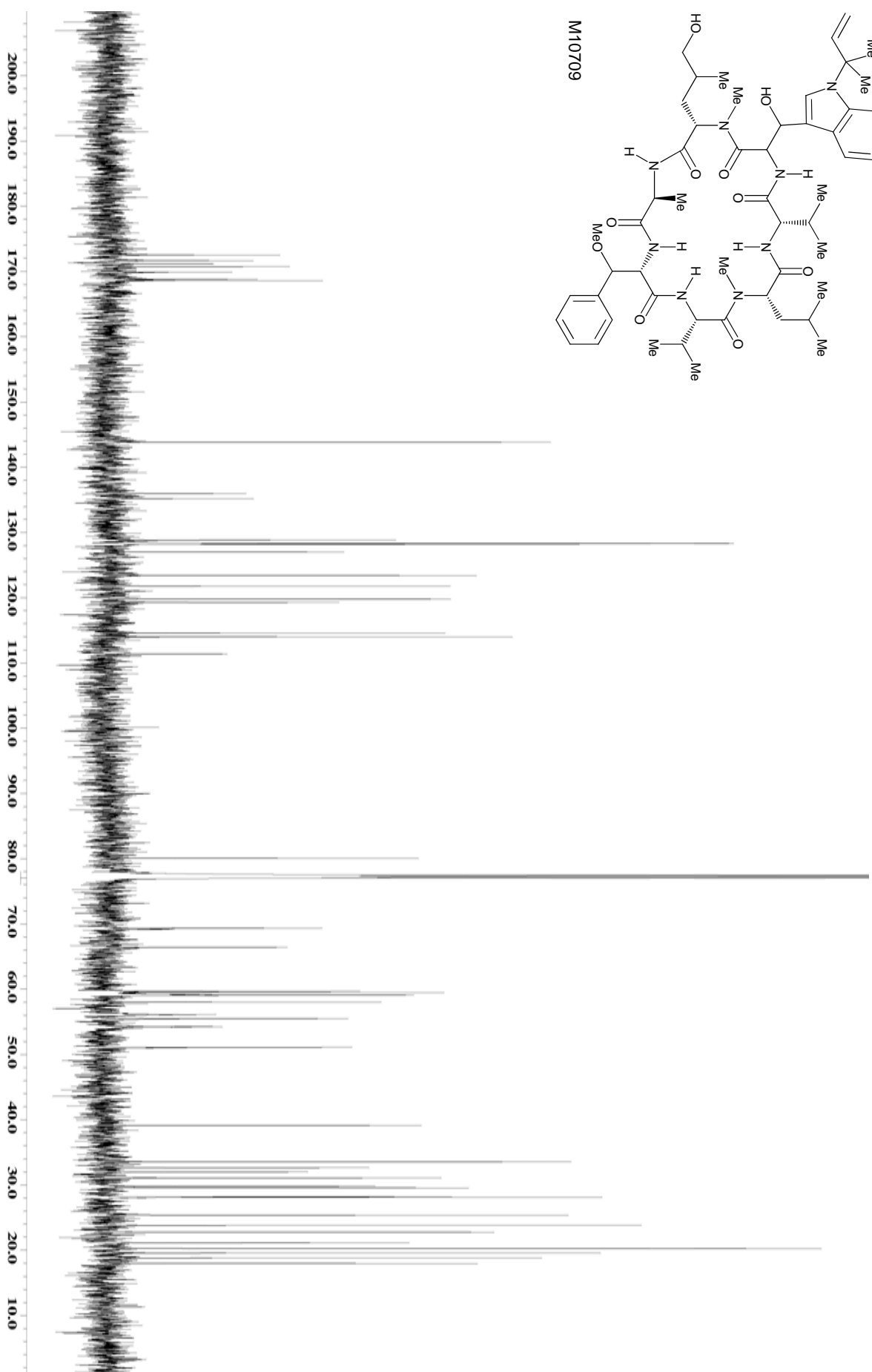
M10709



## S2. $^{13}\text{C}$ NMR (150 MHz) of M10709 in $\text{CDCl}_3$

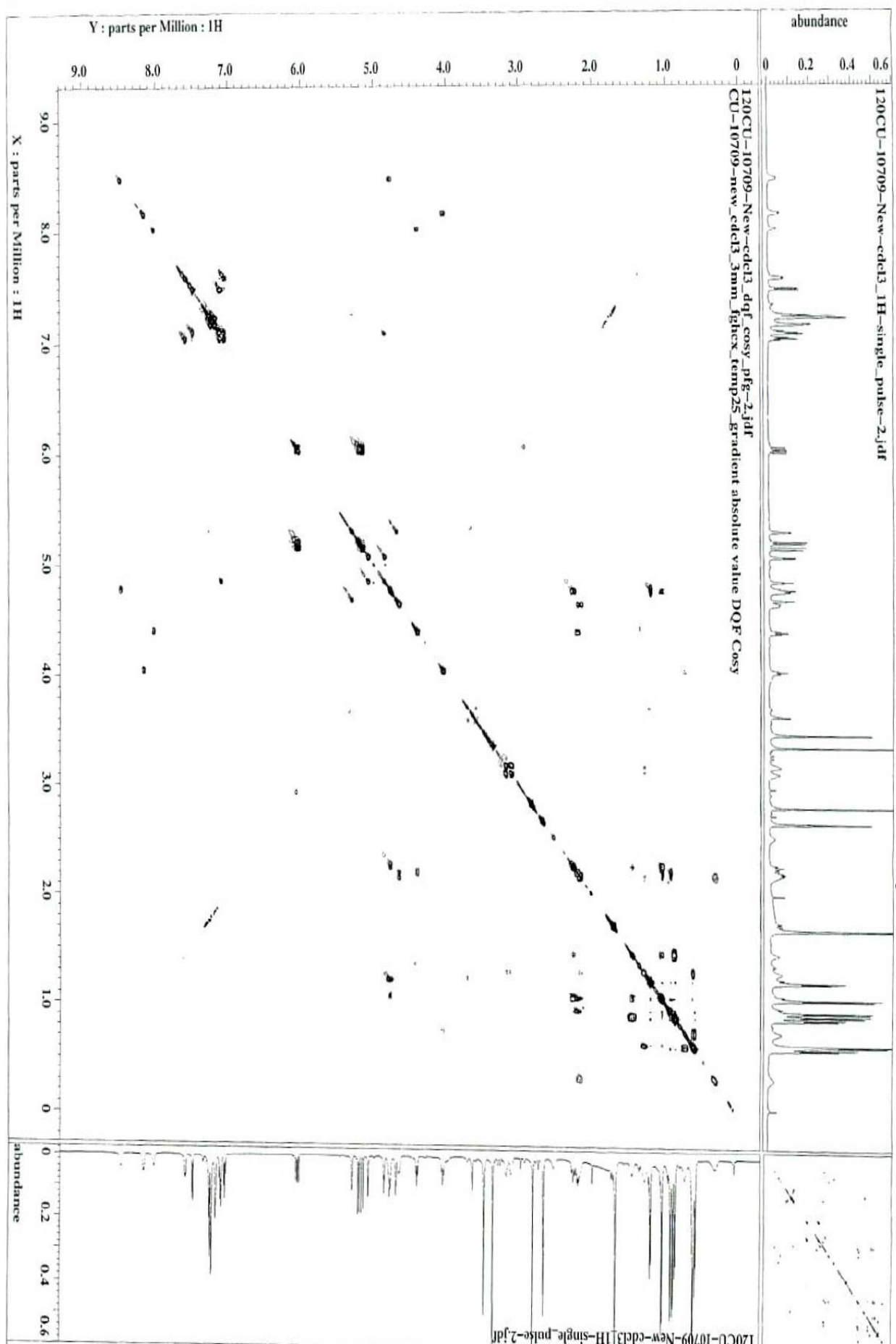


M10709

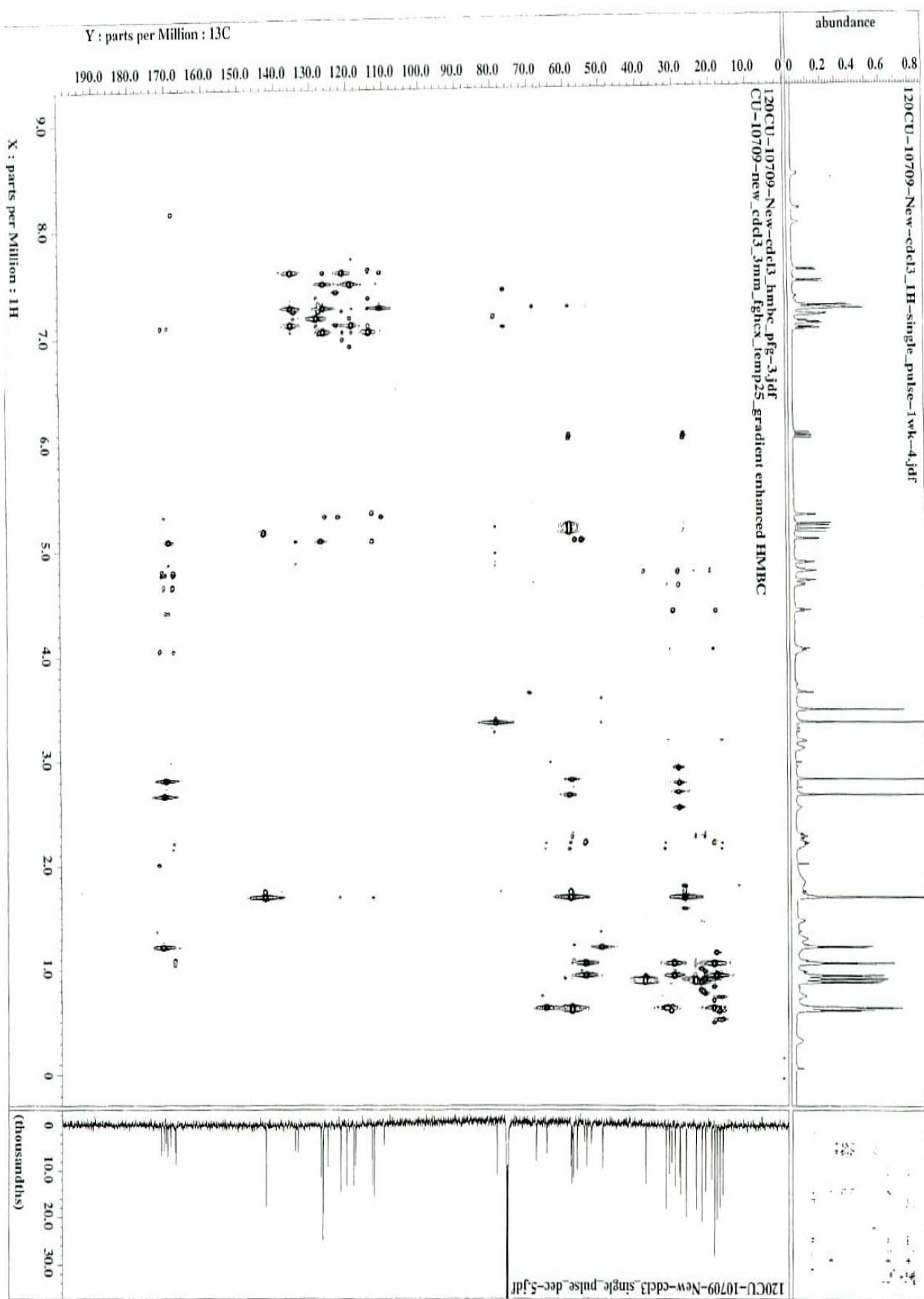




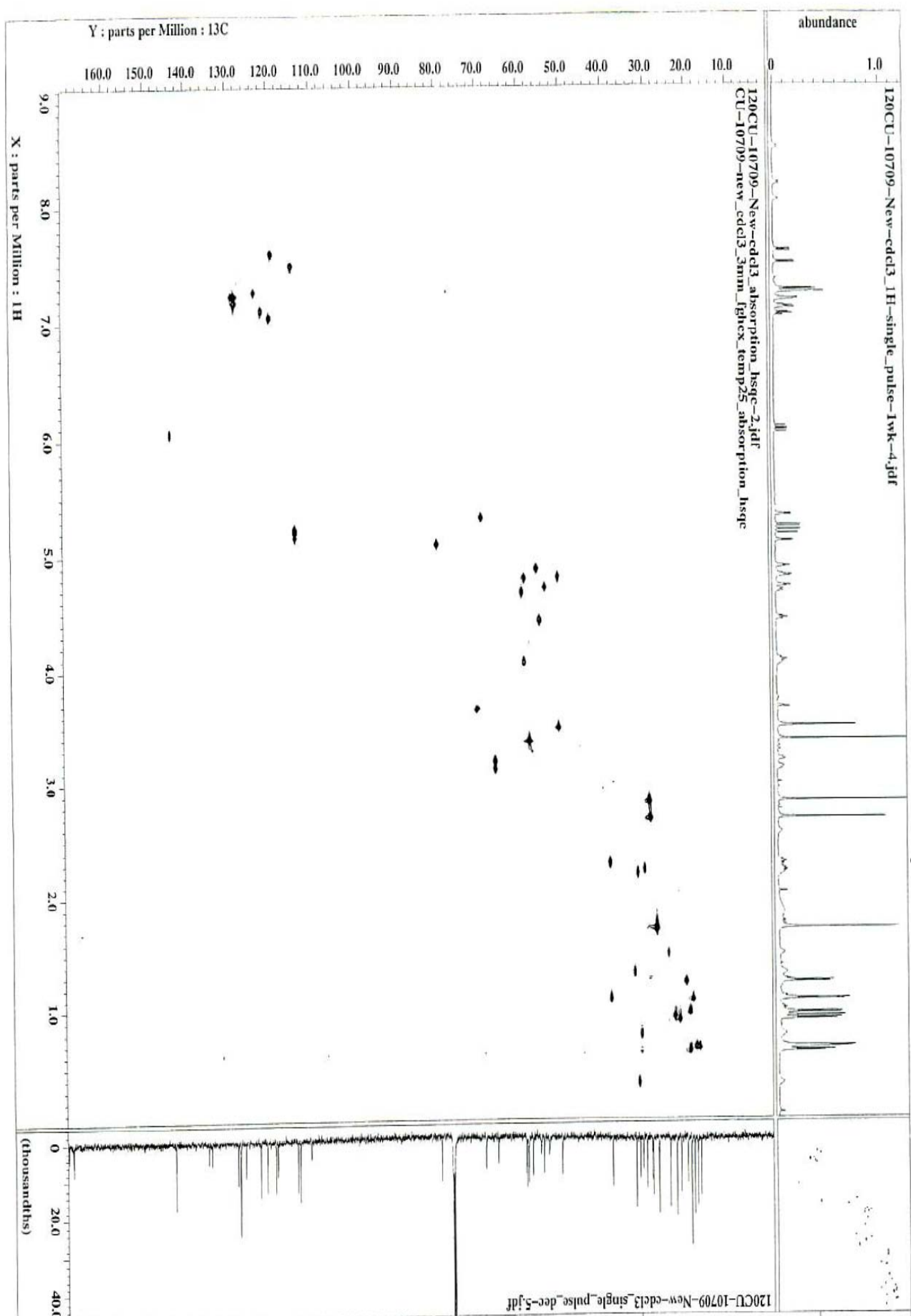
# S3. $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY (600 MHz) of M10709 in $\text{CDCl}_3$



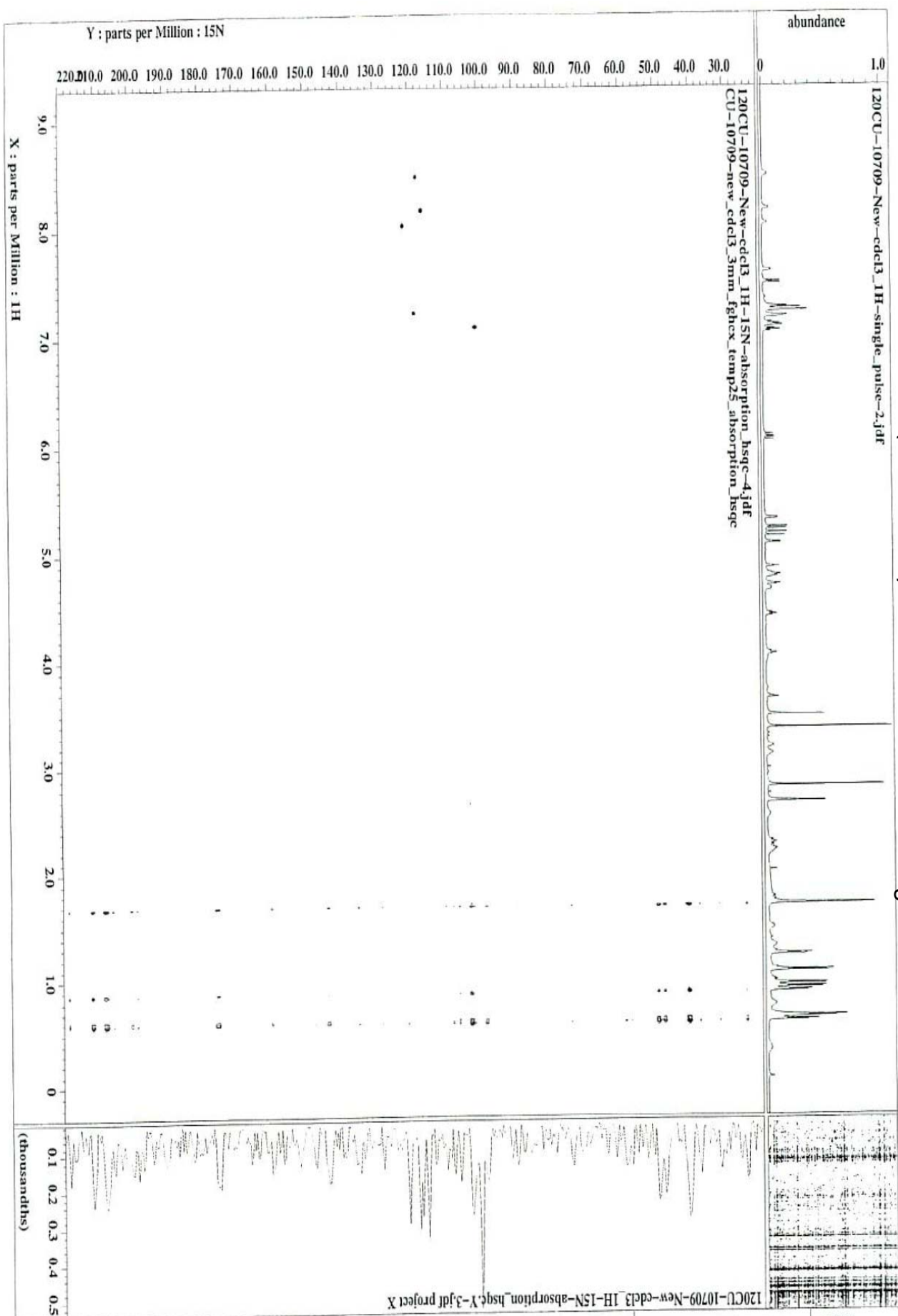
# S4. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC (600 MHz) of M10709 in $\text{CDCl}_3$



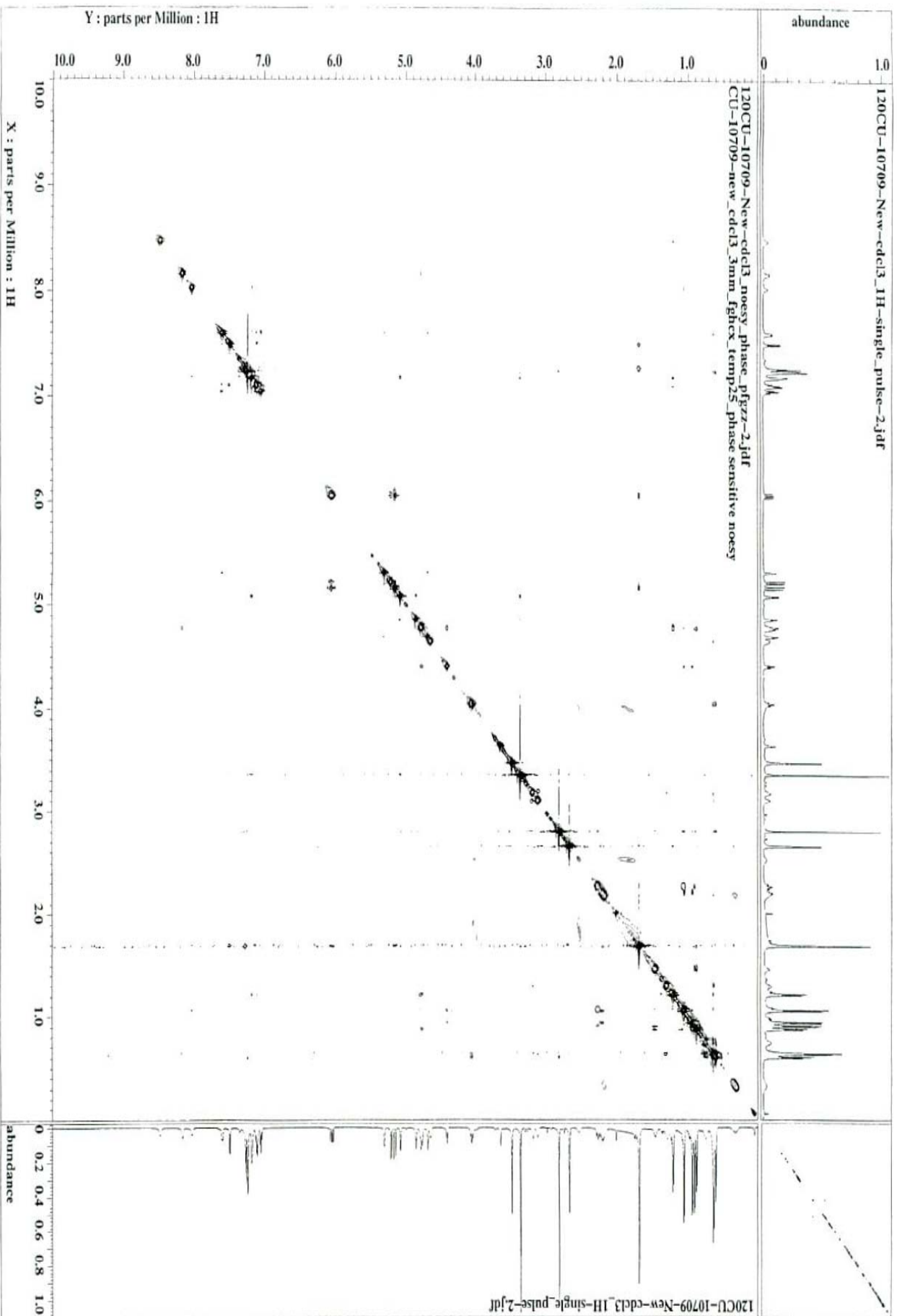
# S5. $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC (600 MHz) of M10709 in $\text{CDCl}_3$



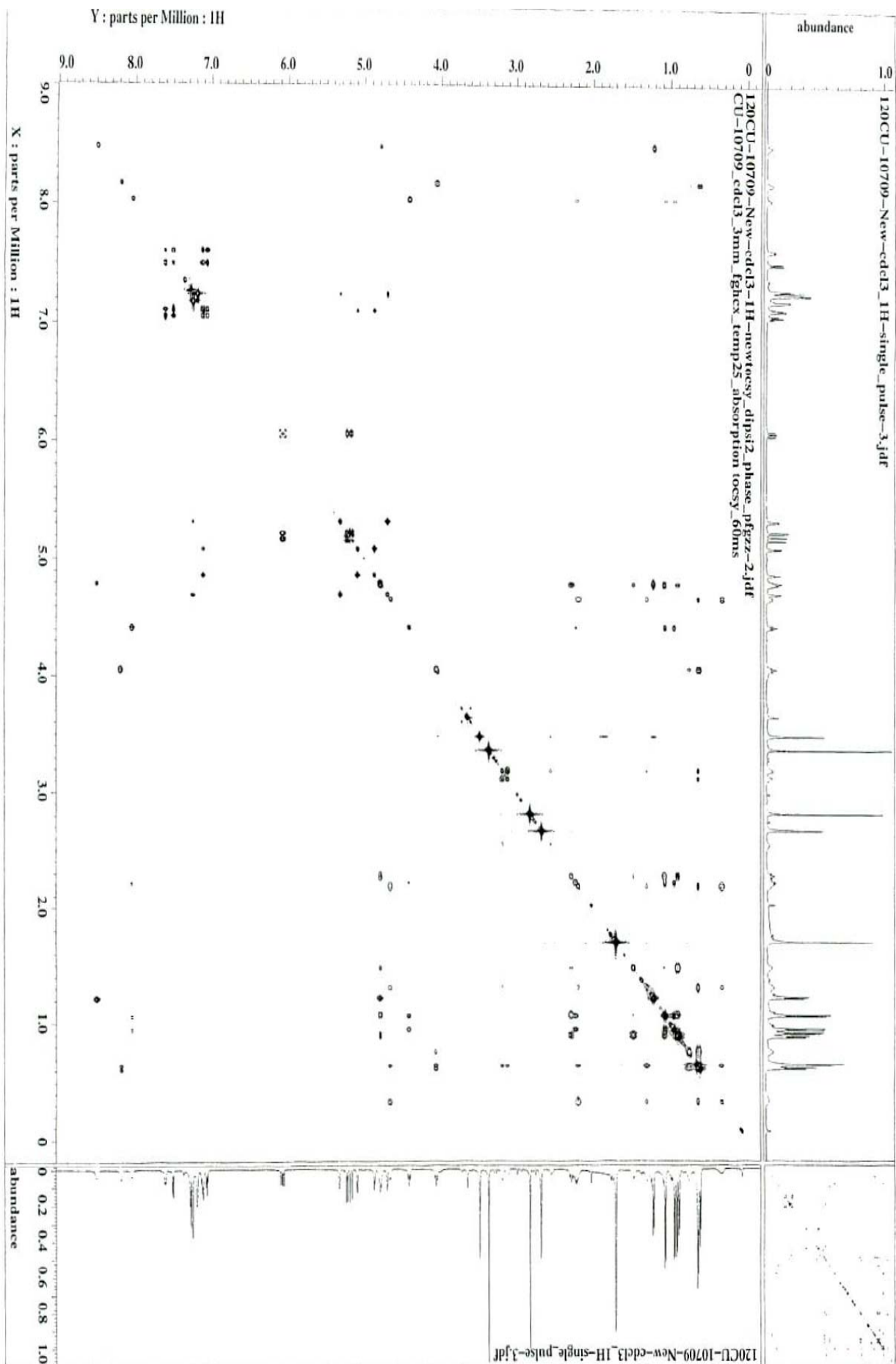
# S6. $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC (600 MHz) of M10709 in $\text{CDCl}_3$



# S7. ROESY (600 MHz) of M10709 in CDCl<sub>3</sub>



# S8. TOCSY (600 MHz) of M10709 in CDCl<sub>3</sub>

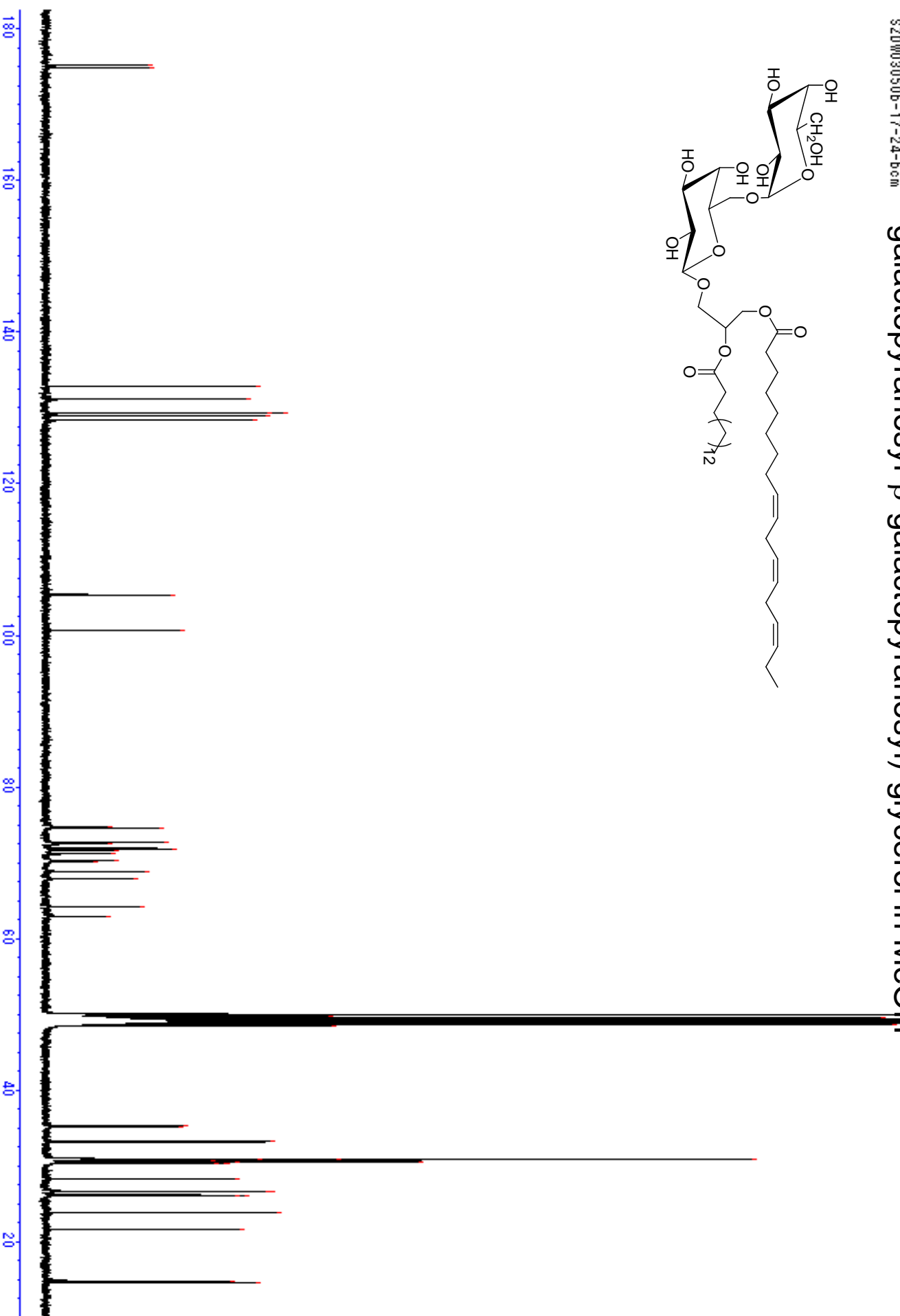
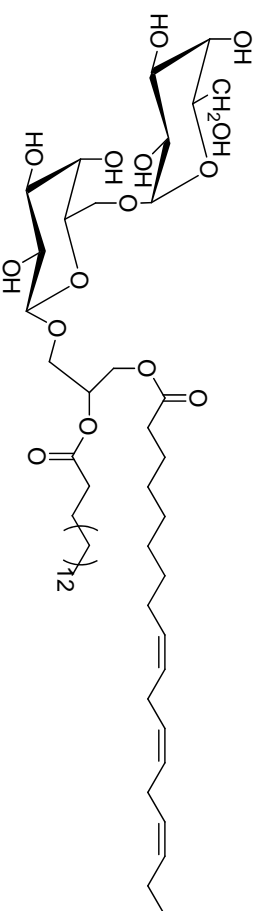






**S10.  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) of 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl)- $\beta$ -galactopyranosyl-glycerol in MeOH**

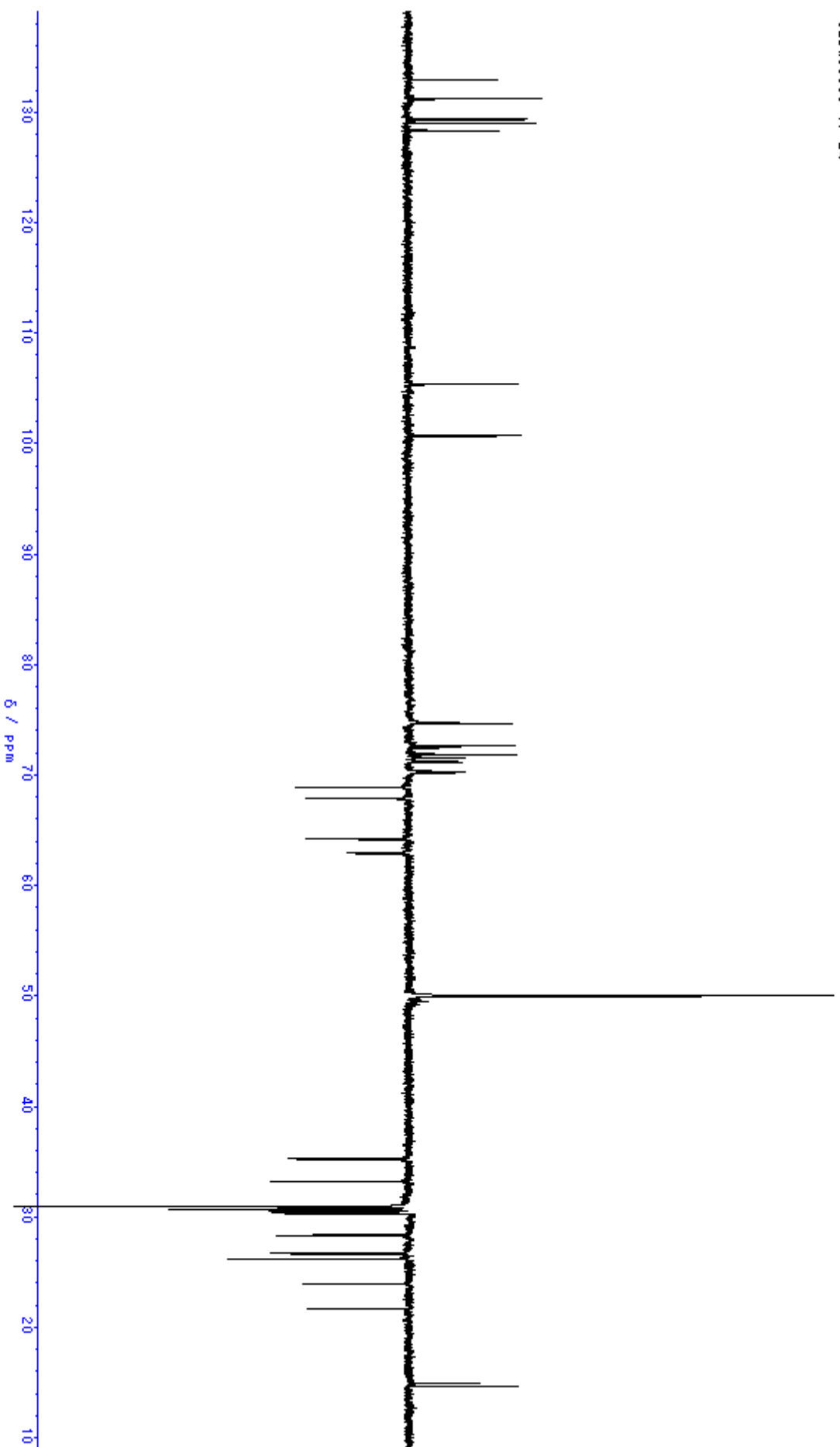
S2DWD03050b-17-24-bcm



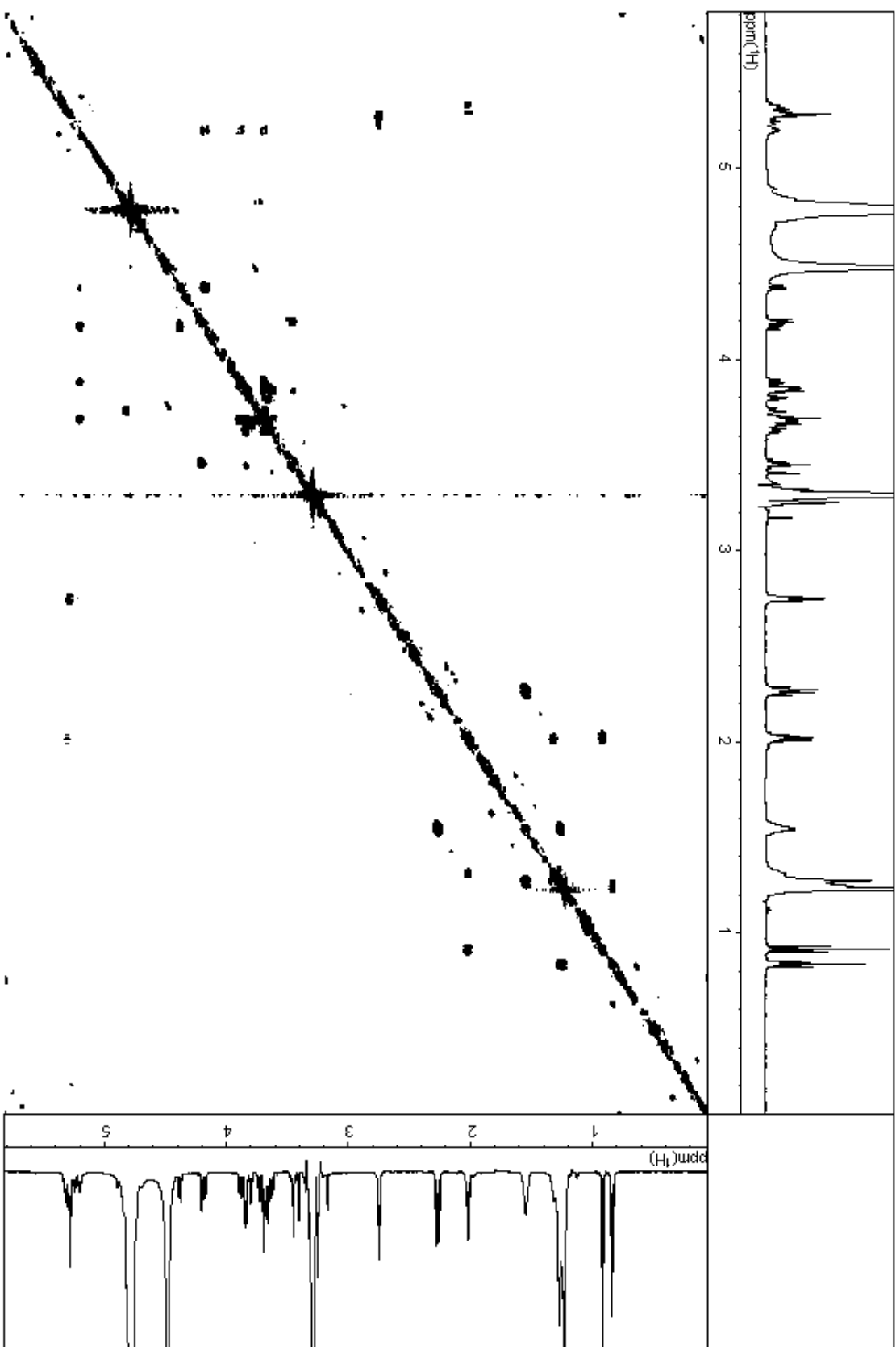


S11. DEPT (150 MHz) of 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol in MeOH

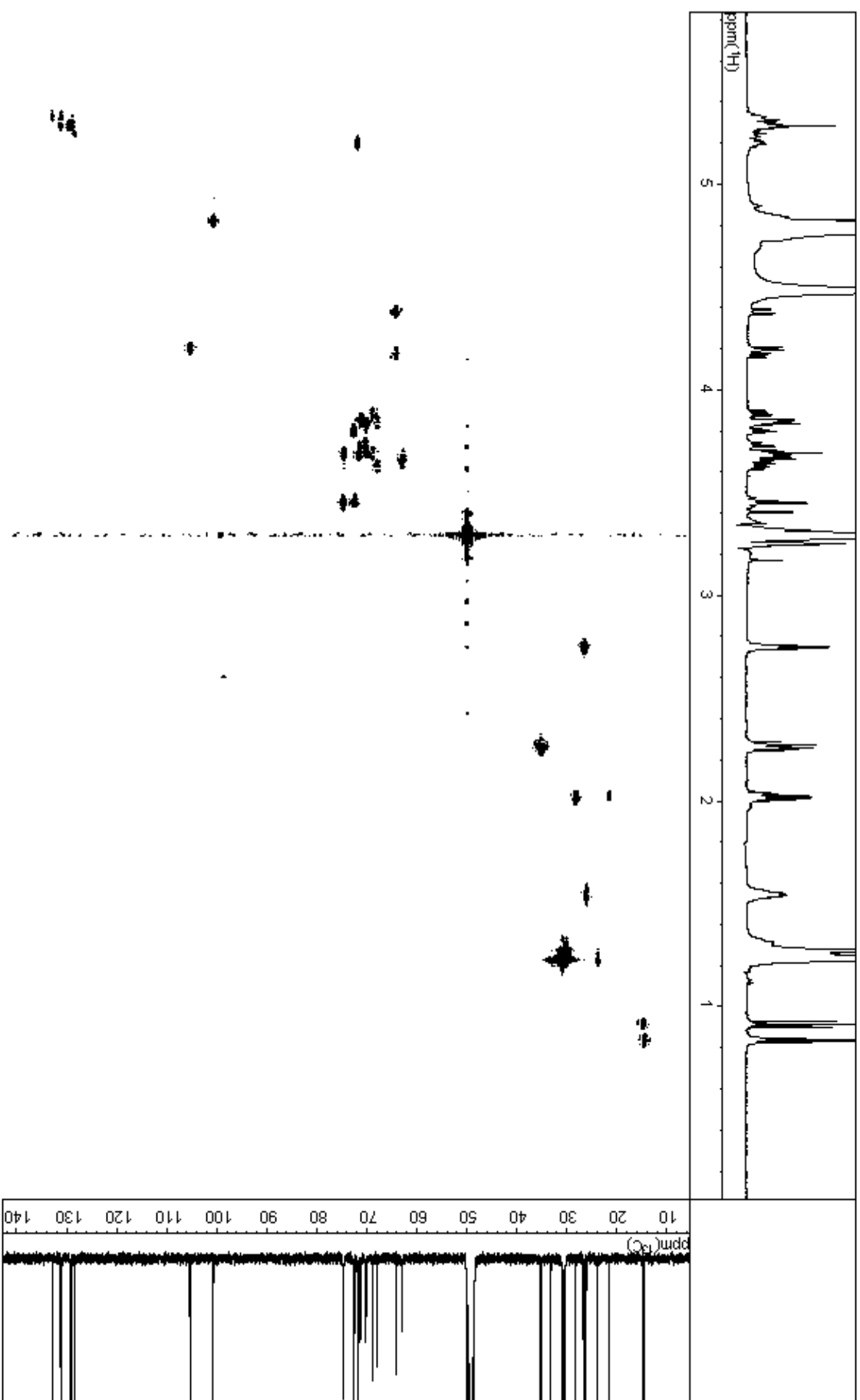
SZDW03050-17-24



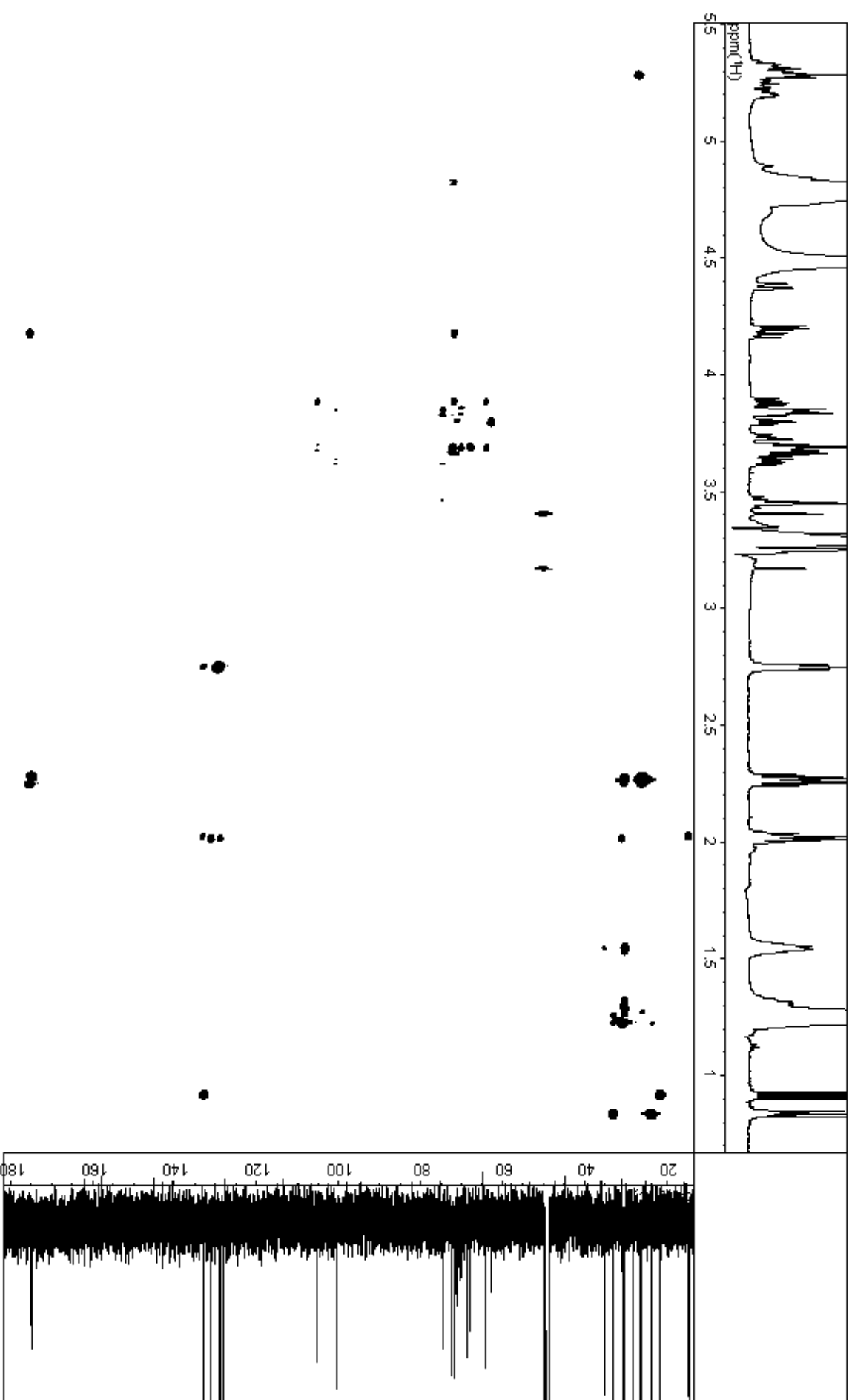
S12.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (600 MHz) of 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol in MeOH



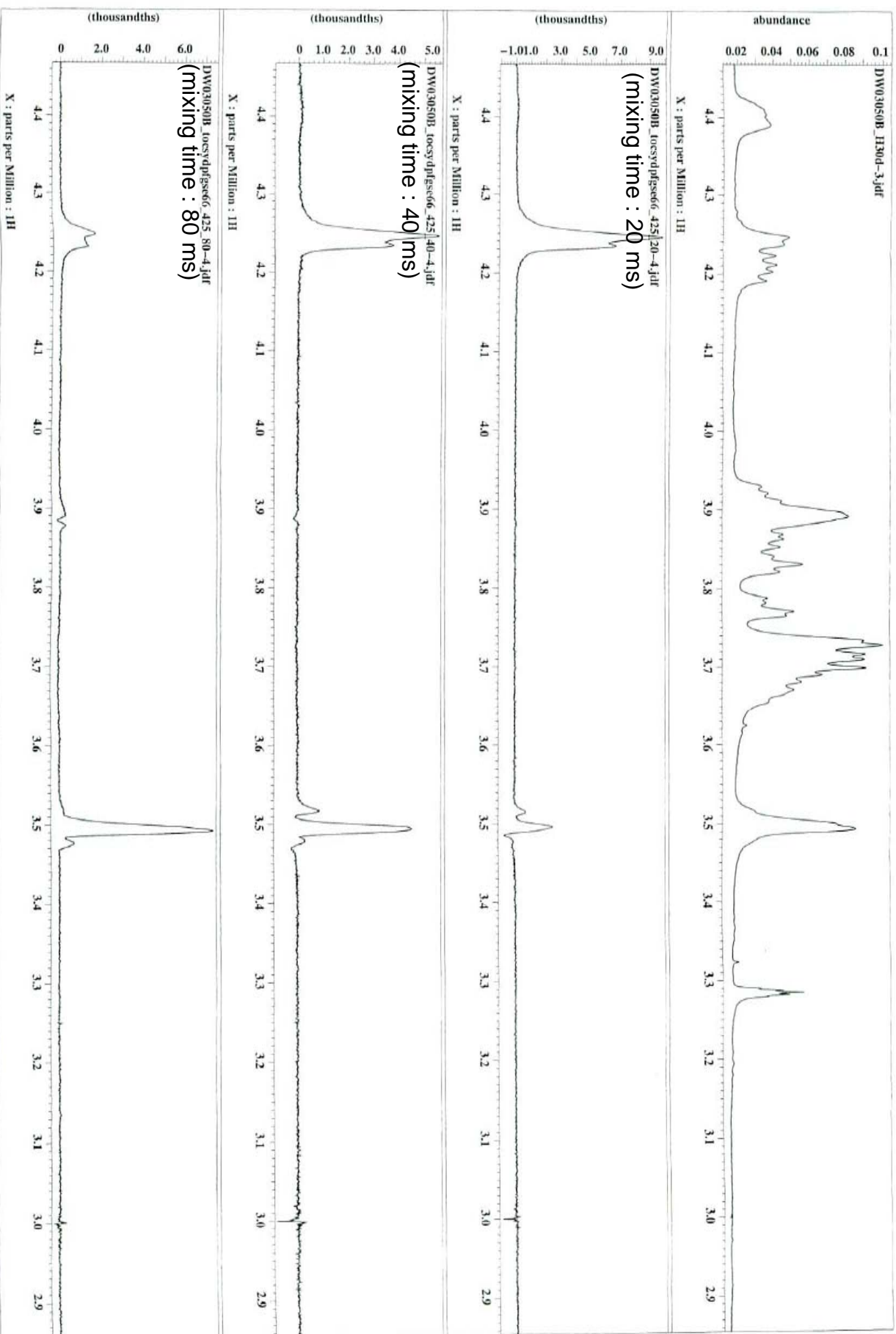
S13. HMQC (600 MHz) of 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol in MeOH



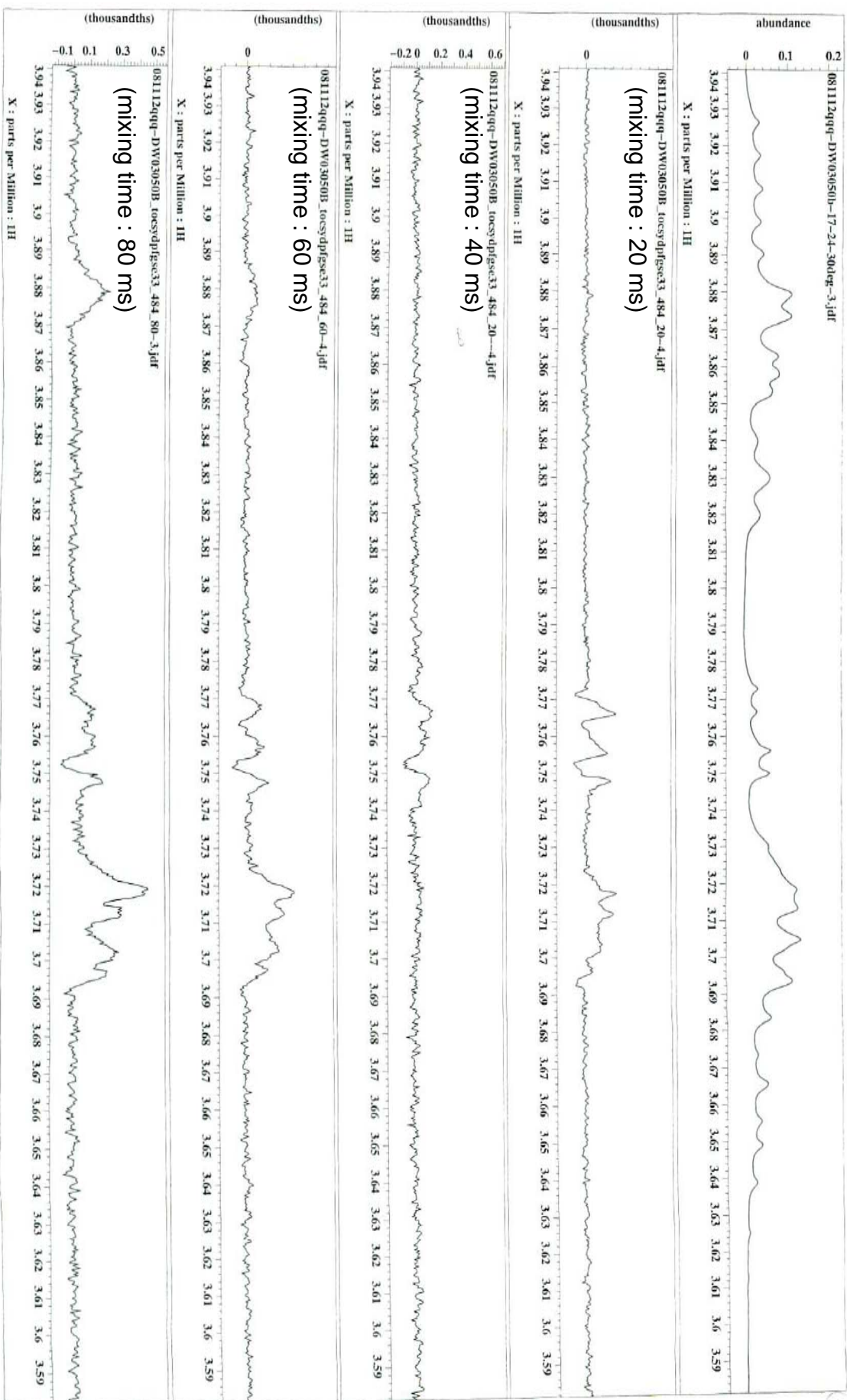
S14. HMBC (600 MHz) of 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -galactopyranosyl)-glycerol in MeOH



S15. TOCSY (600 MHz) of the  $\beta$ -galactopyranosyl moiety on  
 1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -  
 galactopyranosyl)-glycerol in MeOH



S16. TOCSY(600 MHz) of the  $\alpha$ -galacopyranosyl moiety on  
1-O-(linolenyl)-2-O-(palmityl)-3-O-(6'-O- $\alpha$ -galactopyranosyl- $\beta$ -  
galactopyranosyl)-glycerol in MeOH



MeOH



## 謝辞

終わりに臨み、本研究及び本論文作成に際し、終始多大な御指導と御助力を賜りました千葉大学薬学研究院 石川 勉 教授に心から深く感謝致します。

また、本研究及び本論文作成に際し、有益な助言と御助力を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 熊本 卓哉 准教授に心より感謝致します。

また、本研究に、有益な助言と御助力を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 中西 和嘉 助教に心より感謝致します。

また、*Streptomyces* IFM 10709 から単離した環状 heptapeptide M 10709 の研究に御助力賜りました千葉大学薬学研究院 三上 譲 教授に心より感謝致します。また、各種スペクトルデータの測定をおこなって頂きました理化学研究所 越野 広雪 博士に深く感謝致します。adv. marfey 法のデータ測定を行って下さいました名城大学 原田 健一 教授に深く感謝致します。

また、植物を供与下さいました白鳥製薬 樋口 義洋 博士、Chulalongkorn Univ. Dr. Chaiyo Chaichantipyuth に心より感謝致します。

また、腓リパーゼ活性試験の評価に御指導と御助力を下さいました、千葉大学薬学研究院 上野 光一 教授と、中村 智徳 講師に心より感謝致します。そして、実験を行うに際し、常に温かく受け入れて下さった高齢者薬剤学の方々に深く感謝致します。

また、腓リパーゼ活性試験の評価にご協力下さいました福山大学 森田 哲生 教授と 螻川内 理恵 助手 に深く感謝致します。

また、AchE 阻害活性評価の御指導、ご助言を下さいました、Chulalongkorn Univ. Prof. Nijisiri Ruangrunsi に深く感謝致します。

また、*A. salina* に対する毒性試験の御指導、ご助言を下さいました、千葉大学薬学研究院 石橋 正己 教授、荒井 緑 准教授、大槻 崇 助手、Dr. Samir K. Sadhu に深く感謝致します。

また、各種スペクトルデータの測定を行って頂きました千葉大学分析センターの皆様 に深く感謝致します。

そして、様々な助言を下さった先輩方、応援や支援して下さいました千葉大学大学院薬品製造学研究室の皆様方に心より感謝致します。



## 主論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による

1. Watanabe, D.; Kerakawati, R.; Morita, T.; Nakamura, T.; Ueno, K.; Kumamoto, T.; Nakanishi, W.; Ishikawa, T.; Uzawa, J.; Seki, H.; Tachi, M.; Harada, K-I.; Higuchi, Y.; Chaichantipyuth, C. : Isolation of  $\beta$ -sitosterol and digalactopyranosyl-diacylglyceride from *Citrus hystrix*, a thai traditional herb, as pancreatic lipase inhibitors. *Heterocycles* **2009**, *78*, *in Press*.
2. Kumamoto, T.; Koshino, H.; Watanabe D.; Matsumoto, Y.; Aoyama, K.; Harada, K-I.; Ishikawa, T.; Mikami, Y. : M10709, a novel cyclic peptide antibiotic from clinically isolated *streptomyces* sp. *J. antibiot.* *Submitted*.

#### 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	千葉大学教授	(薬学研究院)	薬学博士	石橋	正己
副査	城西国際大学教授	(薬学部)	薬学博士	奥山	恵美
副査	千葉大学教授	(薬学研究院)	薬学博士	高山	廣光
副査	千葉大学教授	(薬学研究院)	薬学博士	西田	篤司

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