

BMI1 プロモーター阻害作用等をもつ
植物成分の探索研究

千葉大学大学院 医学薬学府 先端医学薬学専攻
活性構造化学研究室
藤井 一樹

目次

序論	4
第 1 章 研究背景・目的	8
第 1 章 BMI1 プロモーターアッセイシステムの概要	14
第 2 章 熱帯植物エキ斯科レクションのスクリーニング	17
第 3 章 <i>Andrographis paniculata</i> からの成分探索	27
第 1 節 <i>Andrographis paniculata</i> の分画	28
第 2 節 BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画	29
第 3 節 <i>Andrographis paniculata</i> からの単離化合物	40
第 4 節 単離化合物の生物活性評価	41
第 5 節 化合物 1 の細胞毒性試験	42
第 6 節 化合物 1 の機序解明	43
第 5 章 <i>Mammea siamensis</i> からの成分探索	47
第 1 節 <i>Mammea siamensis</i> の分画	48
第 2 節 BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画	49
第 3 節 <i>Mammea siamensis</i> からの単離化合物	59
第 4 節 化合物 20 の構造解析	61
第 5 節 化合物 17, 18 の理論計算による立体配置の決定	64
第 6 節 単離化合物の生物活性評価	66

第 7 節	化合物 16-19, 22-27 の細胞毒性試験	68
第 8 節	化合物 18 の機序解明	69
第 6 章	<i>Caesalpinia digyna</i> からの成分探索	73
第 1 節	<i>Caesalpinia digyna</i> の分画	74
第 2 節	BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画	75
第 3 節	<i>Caesalpinia digyna</i> からの単離化合物	86
第 4 節	化合物 35 の構造解析	87
第 5 節	化合物 33 の構造解析	94
第 6 節	単離化合物の生物活性評価	97
第 7 節	化合物 37 の Western blotting	99
第 7 章	関節リウマチ滑膜線維芽細胞に細胞毒性を持つ植物成分 の探索研究	101
第 1 節	研究背景・目的	101
第 2 節	細胞毒性評価法	103
第 3 節	<i>Xylia kerrii</i> からの成分探索	104
第 4 節	細胞毒性を指標とした <i>Xylia kerrii</i> の分画- 1	105
第 5 節	細胞毒性を指標とした <i>Xylia kerrii</i> の分画- 2	110
第 6 節	<i>Xylia kerrii</i> からの単離化合物	113
第 7 節	化合物 40 の構造解析	114
第 8 節	化合物 41 の構造解析	119
第 9 節	化合物 42 の構造解析	122
第 10 節	単離化合物の細胞毒性試験	124

総括	127
実験の部	129
謝辞	206
主論文	207
学位論文審査	208

序論

現在、世界中で用いられている医薬品の約半数は、天然物、あるいは天然物由来の半合成品である。Newman らの解析によると、1981 年 1 月から 2019 年 9 月の間に医薬品として上市された医薬品の内、多彩な動植物や微生物などから得られた天然物そのものの医薬品としての利用率は 3.8 % である一方で、天然物を基にした天然物誘導体や、天然物を起源としたファーマコアを有する化合物を含めると、その割合は約 49.1 % にもものぼる¹⁾(Figure 1)。また、治療領域を抗がん剤に限ると、天然物そのもの、あるいは天然物由来の医薬品の割合は、約 63.2 % である。多彩な動植物や微生物には、複雑かつ多様な天然物が含有しており、その骨格多様性から、多数の生理活性を持つ。そのため、これらからの探索研究は、創薬資源として未だ魅力的である。

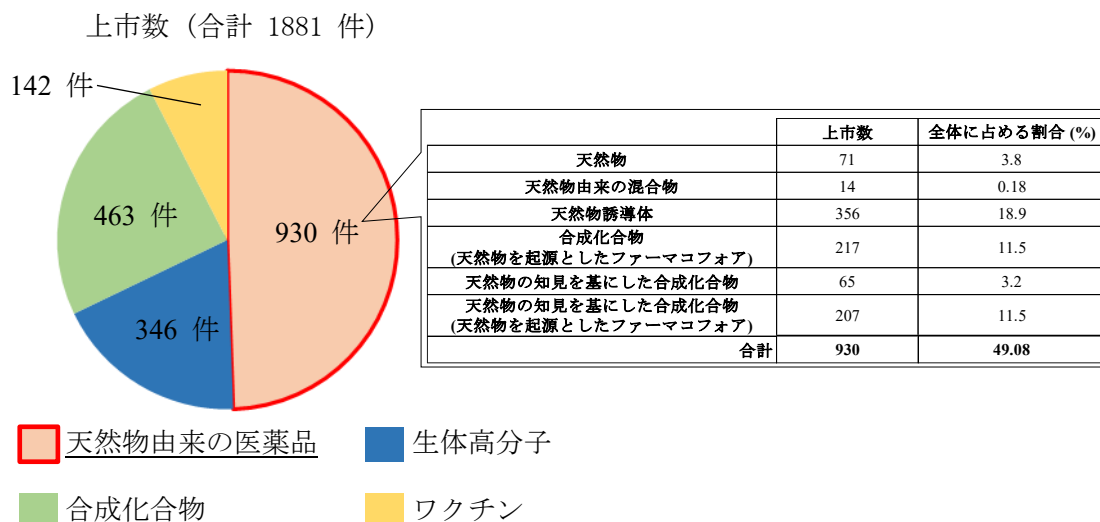


Figure 1 1981-2019 年の上市された医薬品の内訳

天然資源としての植物は、人々によって病気や怪我に対処するクスリとして用いられた。やがて、人々は効果が高いクスリを探求するために天然資源から薬効成分を抽出、単離することを試みた。この試みが達成されたのは、19 世紀のことであった。アヘンは、ケシの実 (*Papaver somniferum*) から抽出した乳液を固めたものであるが、古来よりその存在が認知されており、紀元前 3400 年頃から栽培されていたとされる。このアヘンから、ドイツの Friedrich Sertürner が morphine を見出した。

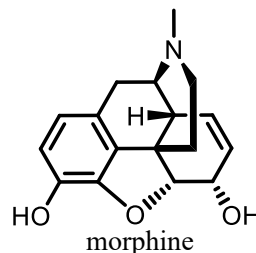


Figure 2 morphine の構造

しかし、morphine の平面構造が報告されたのは、120 年後であった。その後、150 年後の 1952 年にロチェスター大学の Gates らが全合成を達成し、構造決定に至った²⁾ (Figure 2)。

また、マオウ (*Ephedra sinica*) は中国最古の薬物学書「神農本草経」に記載されている中薬 120 種の中の 1 種である。これは、日本に自生しない植物であるが、江戸時代には喘咳や浮腫等の症状を改善できる天然資源であると認知されていた。東京帝国大学 (現 東京大学) 薬学科の長井長義はマオウから ephedrine を単離し、その 40 年後に ephedrine の気管支喘息に対する効能が見出され、医薬品として利用されてきた³⁾ (Figure 3)。

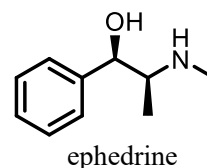


Figure 3 ephedrine の構造

このように、植物の生物活性成分の探索は膨大な年月をかけられ行われていた。現代では、知見の蓄積や分析技術の発展により、膨大な年月は短縮され、天然資源からの多様な天然物が発見されるようになった。

見出された天然物には、医薬品のリード化合物となる多くの有用な化合物が含まれていた。その例として、中国原産の喜樹 (*Camptotheca acuminata*) から単離、精製された camptothecin を挙げる。camptothecin は、優れた抗がん作用を持つことが知られていたが、その毒性と強い副作用のため、医薬品としての利用は困難であった。昭和大学薬学部の Mutai らが camptothecin をリード化合物として、塩酸イリノテカンを生んだ⁴⁾ (Figure 4)。

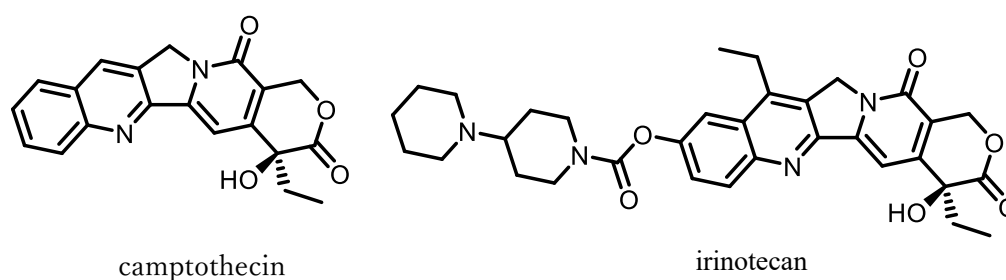


Figure 4 camptothecin と irinotecan の構造

天然資源からの天然物の探索は、医薬品開発の起点であり、新たな生理活性に関わる分子骨格の発見は、将来に渡り有機合成化学や生体分子化学等の異分野で最適化され、研究や臨床現場において使用される可能性を秘めている。

そこで、本研究では、多様な天然物を含有する熱帯植物から、がん、がん幹細胞等に関わる BMI1 プロモーター阻害活性を持つ天然物を得ることを目的とした。第 1 章から第 6 章では、BMI1 プロモーター阻害活性を持つ植物成分の探索研究について述べる。また、BMI1 プロモーター阻害活性を持つ天然物の探索のほかに、第 7 章より、関節リウマチ滑膜線維芽細胞に細胞毒性を持つ天然物の探索をについて述べる。

[参考文献]

1. Newman D. J., Cragg G. M., *J. Nat. Prod.*, **2020**, 83, 770-803.
2. Gate M., Tschudi G., *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 1380-1393.
3. Chen K. K., Schmidt C. F., *J. Pharmacol. Exp.*, **1924**, 24, 339-357.
4. Kunimoto T., Nitta K., Tanaka T., Uehara N., Baba H., Takeuchi M., Yokokura T., Sawada S., Miyasaka T., Mutai M., *Cancer Res.*, **1987**, 47, 5944-5947.

第 1 章 研究背景・目的

近年、がんの発生、維持に関する Wnt シグナル¹⁾などの細胞内伝達シグナルの異常解明やがん微小環境によるがんの浸潤機構解明などの生理学的研究が盛んに行われ、多様な観点からがん発生メカニズムが明らかにされている。中でも、「がん幹細胞」の存在は多くの研究者によって支持されている。

生体内の組織は、幹細胞を起源として様々な分化状態の細胞により構築されていることが知られている。腫瘍組織もまた、不死化した均一集団の集合体ではなく、様々な分化状態の細胞が混在していることが明らかとなった。これは階層性モデル²⁾と呼ばれ、その中でも比較的未分化状態にある細胞は、高い自己複製能と多分化能を持ち、化学療法や放射線療法に対して抵抗性を示すことが知られている。これをがん幹細胞 (cancer stem cell) と呼ぶ。

がん幹細胞の存在について盛んに議論された契機は 1997 年の Dick らによる白血病幹細胞の発見である³⁾。Dick らは免疫不全マウスにヒト白血病細胞を移植し、白血病細胞を CD 分類によって詳細に分類し、各分画ごとに実験を行ったところ、CD34⁺/CD38⁻ 分画が最も強い生着性を示した。これが幹細胞として自己複製能および、白血病細胞への分化能をもった、白血病幹細胞である。

更に、2003 年には Clarke らによって乳がん細胞などの固形腫瘍にも同様に自己複製能の強い細胞集団が発見され、がん幹細胞の存在は支持されるようになった⁴⁾。その後、神経膠芽腫、すい臓がん、肺がん、肝臓がん、前立腺がん、大腸がん細胞にもまた、がん幹細胞の存在が支持されており⁵⁾、その腫瘍形成能の高さから、腫瘍開始細胞とも呼ばれる。

がん幹細胞は、いくつかの特徴的なふるまいによって様々ながん治療に対して抵抗性を持つ⁶⁾。例として、白血病治療薬として顕著な効果を示し、治療を一変させたチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブに対する、白血病幹細胞の抵抗性が挙げられる。つまり、白血病幹細胞に対するイマチニブの治療は効果的ではないということである。慢性骨髄性白血病の原因のひとつは BCR-ABL1 融合遺伝子であり、イマチニブは選択的な BCR-ABL1 チロシンキナーゼを阻害し、RAS、JAK/STAT 等の下流分子の活性化を止め、がん化を抑制する⁷⁾。しかし、白血病幹細胞においては、BCR-ABL 遺伝子の転写活性が低下しているため、生存できる⁸⁾。このような化学療法に対する抵抗性は、乳がんのほかに、前立腺がん、肝臓がんなどの複数のがん種由来のがん幹細胞にも認められており、その機序として、TGF- β や Notch シグナルなどが関わるということが明らかになっている⁹⁾。

もう一つの例として、放射線治療に対する抵抗性に関して述べる。放射線治療とは、がん腫瘍に放射線を照射し、DNA 損傷を引き起こし、がん腫瘍をアポトーシス等により細胞死へと導くが、がん幹細胞は細胞周期の G2 期でストップさせることで DNA 修復を活性化、自己複製能を維持したまま治療後も患部に残存することが知られている¹⁰⁾。がん幹細胞が放射線療法に対して抵抗性を示し、生存につながることに加えて、がん幹細胞が放射線により、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) を誘発し、がんの再発、転移、がん幹細胞の増加に寄与することが報告されている¹¹⁾。EMT とは、上皮系の細胞が、間葉系形質を得ることを指し、浸潤能が亢進することで転移に寄与する。

がん幹細胞はこれらをはじめとする様々なメカニズムによってがん治療をかいくぐり、再発や転移の原因となっており、その治療は困難を極める。

これまでの研究により、がん幹細胞は、正常幹細胞のエピジェネティックな遺伝子発現機構の異常により発生することが明らかにされている^{12, 13)}。エピジェネティックとは、DNA メチル化やヒストン修飾等が挙げられ、DNA 配列に変異を引き起こさずに染色体を修飾する遺伝子発現機構である。ヒストン修飾に関わる因子として知られている主なタンパク質として、ポリコーム複合体 PRC (polycomb repressive complex) である PRC1 及び PRC2 複合体がある。PRC は H3K27 のトリメチル化、H2AK119 のモノユビキチン化によって遺伝子転写を抑制し、正常幹細胞においては、この 2 つのバランスが保たれることで細胞の分化、増殖が調節されているが、このバランスが崩壊すると遺伝子転写の様々な部分に異常が起こり、がんの発生の原因であるがん幹細胞へと変化してしまうとされている¹⁴⁾。

このエピジェネティックな遺伝子発現に関わるタンパクとして、BMI1 に着目した¹⁵⁾。BMI1 は PRC1 の主要な構成因子であり、INK4A/ARF 遺伝子座を抑制することで、がん抑制遺伝子 p14ARF 遺伝子の転写を抑制する。この p14ARF タンパクは、アポトーシスや細胞周期停止に関わる p53 タンパクや p21 タンパクを増加させる^{12, 16, 17)}。BMI1 は、造血幹細胞、神経幹細胞、乳腺幹細胞などの複数の幹細胞に必要な自己複製調節因子である。また、BMI1 はがん幹細胞に高発現しており、化学療法への抵抗性に関わり¹⁸⁾、がんの再発や転移に寄与している^{19, 20)}。

従って、これらの異常な発現亢進や発現低下はがん幹細胞発生の鍵であり、それをコントロールできる低分子化合物は、がんを根本から治療することのできる画期的な新薬となり得ることが期待される。

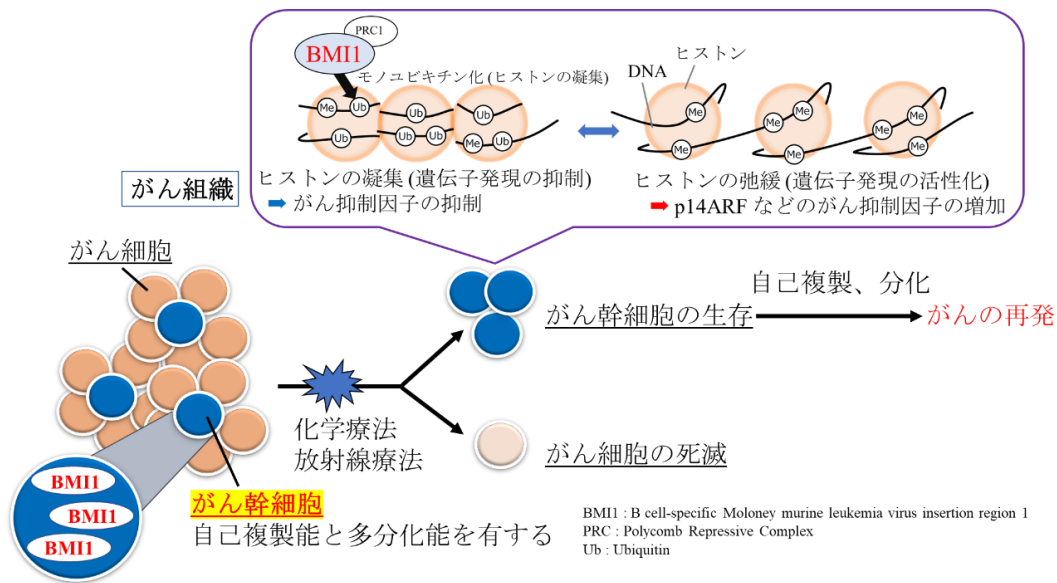


Figure 1 BMI1 とがん幹細胞

そこで、近年 BMI1 を標的とする小分子が開発されている。これまでに BMI1 阻害化合物として、様々ながん細胞の BMI1 転写量を減少させる PTC-209 や PTC596、大腸がん細胞の BMI1 転写量の減少させる SH498 などが報告されている²¹⁾ (Figure 2)。

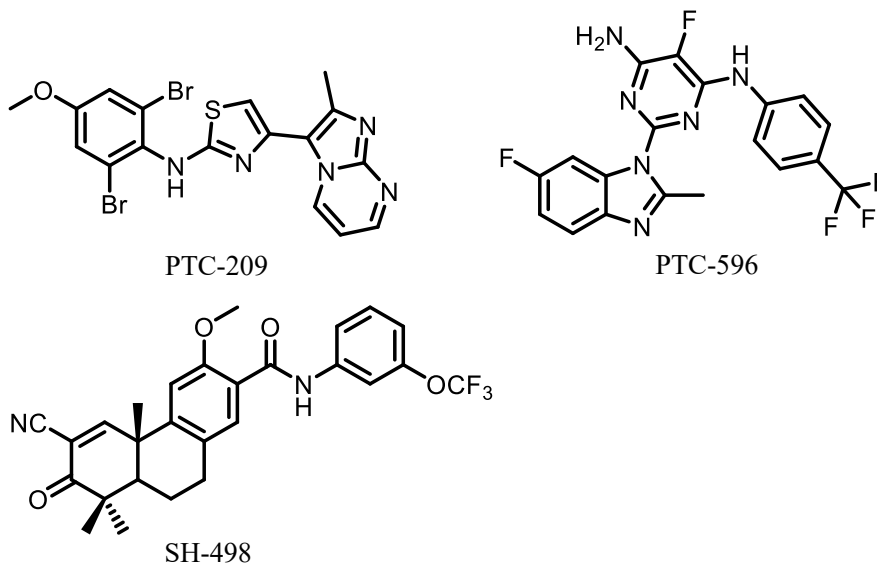


Figure 2 PTC-209, PTC-596, SH-498 の構造

当研究室では、2014 年から、タイ産 キョウチクトウ科植物 *Beaumontia murtoni*、タイ産 フトモモ科植物 *Eugenia operculate* より、wallichoside、digitoxigenin、maslinic acid²²⁾ を、放線菌 *Streptomyces* sp. IFM11958 より、elaiophylin、nocardamin^{23,24)} を初めて「BMI1 プロモーター阻害天然物」として単離してきた²⁵⁾ (Figure 3)。

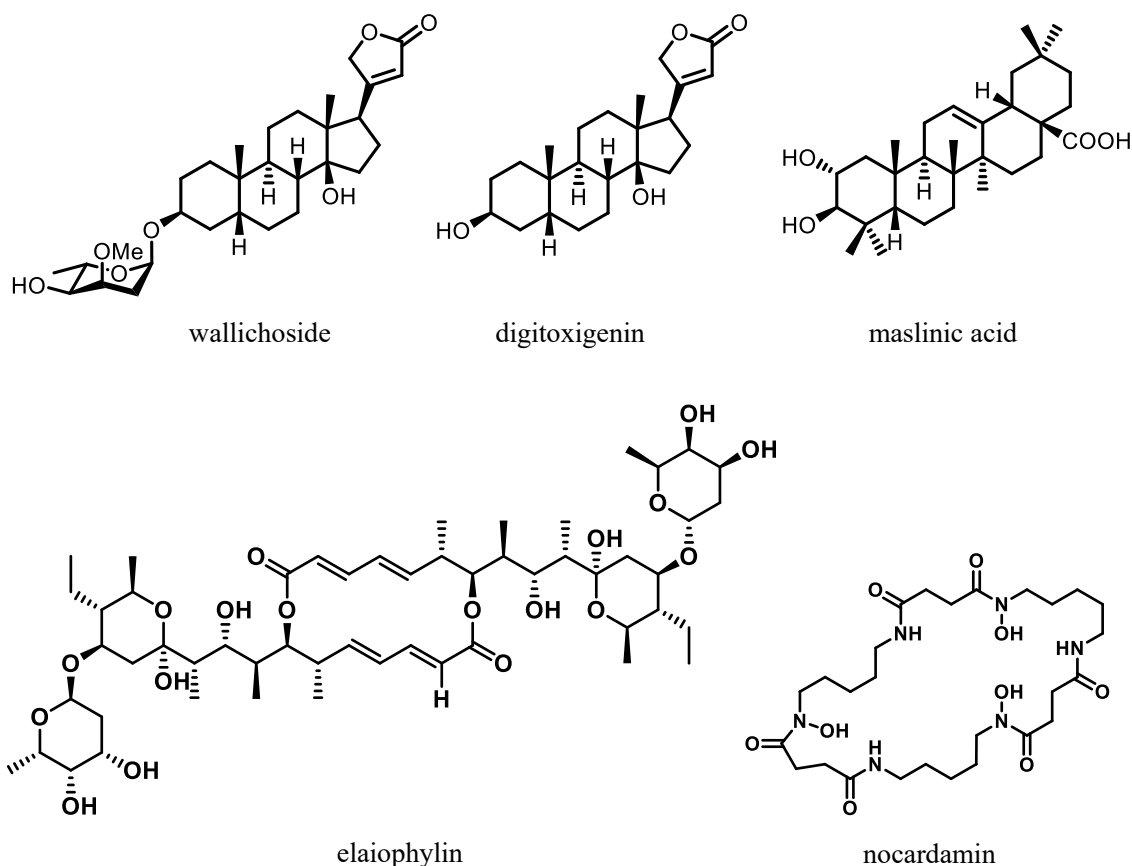


Figure 3 BMI1 プロモーター阻害天然物として報告した化合物

しかし報告した天然物数は少なく、植物由来の BMI1 プロモーター阻害天然物の多くがカルデノライドと呼ばれる分子骨格を有する天然物であった。そのため、未だに BMI1 遺伝子発現を抑制する天然物の骨格多様性は乏しく、天然物と BMI1 遺伝子発現抑制の関係性の詳細は未解明である。そこで、多様な天然物を含む熱帯植物からさらなる「BMI1 プロモーター阻害天然物」を単離し、その生物活性評価、作用機序の解明を行うべく、本研究に着手した。

[参考文献]

1. Loh K. M., Amerongen R., Nusse R., *Dev. Cell*, **2016**, 38, 643-655.
2. Dick J. E. *Blood*, **2008**, 112, 4793-4807.
3. Bonnet D., Dick J. E., *Nat. Med.* **1997**, 3, 730-737.
4. Al-Hajj M., Wicha M. S., Hernandez B. A., Morrison S. J., Clarke F. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100, 3983-3988.
5. Schulte L.-A., Lopez-Gil J. C., Sainz Jr B., Hermann P. C., *cancers*, 2020, 12, 684.
6. Aponte M. P., Caicedo A., *Stem Cells Int.*, **2017**, 5619472.
7. Druker D. J., Talpaz M., Resta D. J., Peng B., Buchdunger E., Ford J. M., Lydon N. B., Kantarjian H., Capdeville R., Ohno-Jones S., Sawyers C. L., *N. Engl. J. Med.*, **2001**, 344, 1031-1037.
8. Roeder I., Horn M., Glauche I., Hochhaus A., Mueller M. C., Loeffler M., *Nat. Med.*, **2006**, 12, 1181-1184
9. Kuşoğlu A., Avcı C. B., *Gene*, **2019**, 681, 80-85.
10. Viale A., De Franco F., Orleth A., Cambiaghi V., Giuliani V., Bossi D., Ronchini C., Ronzoni S., Muradore I., Monestiroli S., Gobbi A., Alcalay M., Minucci S., Pelicci P. G., *Nature*, **2009**, 457, 51-56.
11. Chi H.-C., Tsai C.-Y., Tsai M.-M., Yeh C.-T., Lin K.-H., *Int. J. Mol. Sci.*, **2017**, 18, 1903.
12. Avgustinova A., Benitah S. A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2016**, 17, 643-658.
13. Baylin S. B., Ohm J. E., *Nat. Rev. Cancer*, **2006**, 6, 107-116.
14. Chan H. L., Morey L., *Trends Biochem.*, **2019**, 44, 688-700.
15. Gray F., Cho J. H., Shukla S., He S., Harris A., Boytsov B., Jaremko L., Jaremko M., Demeler B., Lawlor R. E., Grembecka J., Cierpicki T., *Nat. Commun.*, **2016**, 7, 13343.
16. Lin X., Ojo D., Wei F., Wong F., Gu Y., Tang D., *Biomolecules*, **2015**, 5, 3396-3415.
17. Zhou M., Xu Q., Huang D., Luo L., *Biomedical Reports*, **2021**, 14, 52.
18. Siddique H. R., Saleem M., *Stem Cells Int.*, **2012**, 30, 372-378.
19. Yang D., Liu H. Q., Yang Z., Fan D., Tang Q.-Z., *eBioMedicine*, **2021**, 63, 103193.
20. Kreso A., van Galen P., Pedley N. M., Lima-Fernandes E., Frelin C., Davis T., Cao L., Baiazitov R., Du W., Sydorenko N., Moon Y. C., Gibson L., Wang Y., Leung C., Iscove N. N., Arrowsmith C. H., Szentgyorgyi E., Gallinger S., Dick J. E., O'Brien C. A., *Nat. Med.*, **2014**, 20, 29-36.
21. Xu J., Li L., Shi P., Cui H., Yang L., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23, 8231.
22. Kaneta Y., Arai M. A., Ishikawa N., Toume K., Koyano T., Kowithayakorn T., Chiba T., Iwama A., Ishibashi M., *J. Nat. Prod.*, **2017**, 80, 1853-1859.

23. Yokoyama Y., Arai M. A., Hara Y., Ishibashi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **2019**, *27*, 2998-3003.
24. Yokoyama Y., Arai M. A., Hara Y., Ishibashi M., *Nat. Prod. Commun.*, **2019**, *14*, 1934578X19866583.
25. Ishibashi M., *J. Antibiot.*, **2021**, *74*, 629-638.

第 2 章 BMI1 プロモーターアッセイシステムの概要

本章では、BMI1 プロモーター阻害活性を有する天然物の探索を目的とし、構築された細胞を用いた BMI1 プロモーターアッセイシステム¹⁾について述べる。

BMI1 プロモーターは、c-Myc が BMI1 プロモーター内の E-box 配列 (CACGTG) に結合することで制御される²⁾。本アッセイ系にて用いているレポータープラスミドは、BMI1 の主に c-Myc による転写調節の検出を評価する。レポータープラスミドである pGL4.20-BMI1 Pr は、pGL4.20 [*luc2*/Puro] (5404 bp) に BMI1 プロモーター配列 (291 bp) をライゲーションし、作成した。pGL4.20-BMI1 Pr は、BMI1 プロモーターの下流に *Luciferase* 遺伝子 (*Luc2*: 1653 bp) を含み、これを細胞にトランスフェクションすると、核内の c-Myc が BMI1 プロモーター配列に結合し、*Luciferase* タンパクを発現する。これに基質である *Luciferin* を添加すると *Luciferase* タンパク量に比例した発光が得られ、これを測定することで、BMI1 プロモーターの活性の程度を評価できる。本実験における BMI1 プロモーターアッセイシステムでは、pGL4.20-BMI1 Pr を、ヒト胎児上皮細胞株 (HEK293T 細胞) へ安定発現させた細胞株 (BMI1/293T) を用いた (Figure 2-1)。

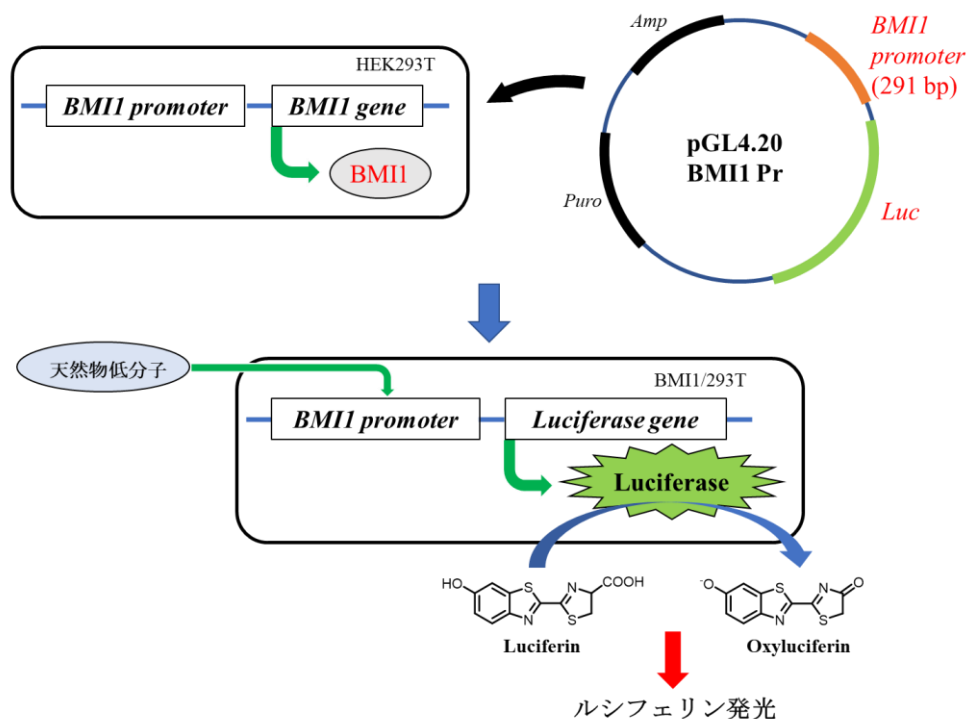


Figure 2-1 BMI1 プロモーターアッセイシステム

試料の BMI1 プロモーター阻害活性の評価には、control (DMSO 0.1 %) を基準として、発光量の増減を評価した。

試料の毒性により、発光量が低下することがあるため、Fluorometric Microculture Cytotoxicity Assay (FMCA) 法³⁾により、細胞生存率を測定した。FMCA 法では生細胞が持つ酵素であるエステラーゼにより分解される fluorescein diacetate (FDA) を用いて行う。つまり、エステラーゼを持つ生細胞は FDA を分解し、fluorescein を生成する一方で、死細胞では FDA を分解しないということである。すなわち、生細胞は FDA により染色されることから、蛍光強度を測定 (Ex: 485 nm, Em: 538 nm) することで、生細胞の相対的な割合を算出することができる (Figure 2-2)。

試料を添加していない control のルシフェラーゼ活性、細胞生存率を 100 % とし、ルシフェラーゼ活性が低く、細胞生存率が高い試料をポジティブサンプルとした。なお、positive control として c-Myc inhibitor II 10074G5⁴⁾ を使用した (Figure 2-3)。

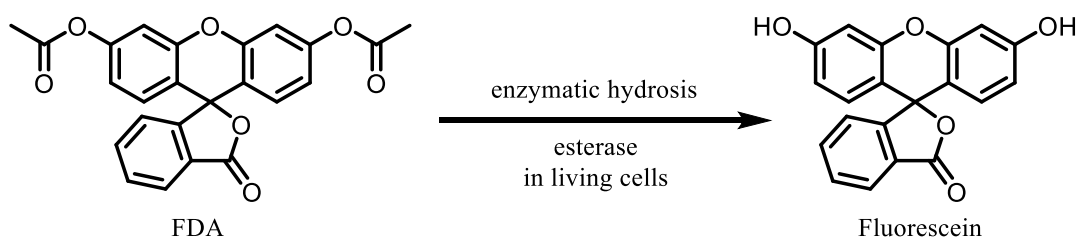


Figure 2-2 FDA のエステラーゼによる分解

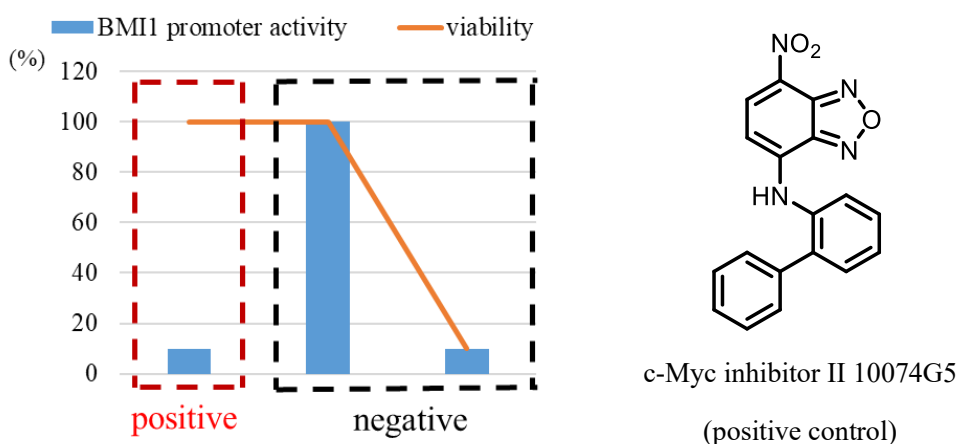


Figure 2-3 BMI1 プロモーターアッセイの評価方法、positive control の構造

[参考文献]

1. Kaneta Y., Arai M. A., Ishikawa N., Toume K., Koyano T., Kowithayakorn T., Chiba T., Iwama A., Ishibashi M., *J. Nat. Prod.*, **2017**, *80*, 1853-1859.
2. Zhou M., Xu Q., Huang D., Luo L., *Biomed. Rep.*, **2021**, *14*, 52.
3. Lindhagen E., Nygren P., Larsson R., *Nat. Protoc.*, **2008**, *3*, 1364-1369.
4. Yin X., Giap C., Lazo J. S., Prochownik E. V., *Oncogene*, **2003**, *22*, 6151-6159.

第 3 章 熱帯植物エキスコレクションのスクリーニング

前述のアッセイ系を用いて、バングラデシュ産植物エキスコレクション (KKB) 139 種 (Table 3-1)、タイ産植物エキスコレクション (KKP) 215 種 (Table 3-2) について、サンプル濃度 50 µg/mL にてスクリーニングを行った。

Table 3-1 バングラデシュ産植物エキス (KKB) 139 種のスクリーニング

KKB	植物名	部位	BMI promoter activity (%)	viability (%)
84	<i>Phyllanthus reticulatus</i>	aerial parts	39	66
86	<i>Argyrea nervosa</i>	seeds	54	76
87	<i>Hyptis suaveolens</i>	aerial parts	84	64
88	<i>Clerodendrum inerme</i>	leaves	96	74
91	<i>Phyllanthus emblica</i>	leaves	111	98
92	<i>Tamarindus indica</i> Linn.	leaves	54	67
93	<i>Ammannia baccifera</i> Linn	leaves	54	65
94	<i>Annona squamosa</i> Linn.	leaves	46	48
95	<i>Aphanamixis polystachya</i> .	leaves	52	63
96	<i>Derris trifoliata</i> Lour., <i>Derris uliginosa</i> Benth.	whole plants	43	43
97	<i>Dillenia indica</i> Linn.	leaves	76	76
99	<i>Myrica nagi</i> Thumb., <i>Myrica integrifolia</i> Roxb.	leaves	81	71
101	<i>Murraya koenigii</i>	leaves	46	87
103	<i>Aegle marmelos</i>	leaves	96	106
104	<i>Seseli diffusum</i>	seeds	66	101
105	<i>Alostonia scholaris</i>	stem barks	103	99
106	<i>Vallisneria spiralis</i>	leaves	51	66
107	<i>Vallisneria spiralis</i>	stem	29	47
110	<i>Primna integrifolia</i>	leaves/stems	135	130
112	<i>Terminalia bellirica</i>	fruits	126	91
113	<i>Terminalia chebula</i>	fruits	126	98
114	<i>Boerhavia diffusa</i>	leaves/stems	120	75
115	<i>Ruellia tuberosa</i>	stem	70	125
117	<i>Solanum indicum</i>	leaves/stems	93	126
118	<i>Phragmites karka</i>	whole plants	112	90
119	<i>Myriostachya wightiana</i>	whole plants	142	114
120	<i>Rhizophora mucronata</i>	leaves	116	111
121	<i>Rhizophora mucronata</i>	bark	59	53
123	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	leaves	112	105
133	<i>Melastoma malabathricum</i> L.	aerial part	169	77
134	<i>Ziziphus oenoplea</i> (L.) Mill.	aerial part	220	161
135	<i>Thysanolaena maxima</i> (Rox) O. Kulze.	aerial part	171	140
136	<i>Solanum indicum</i>	aerial part	162	105
137	<i>Spilanthes acemella</i>	aerial part	147	111
138	<i>Eupatorium odoratum</i>	aerial part	289	129
139	<i>Microcos paniculata</i>	aerial part	150	126

KKB	植物名	部位	BMI promoter activity (%)	viability (%)
140	<i>Lantana camara</i>	aerial part	176	94
141	<i>Achyranthes aspera</i> Linn.	aerial part	102	104
142	<i>Ocimum sanctum</i>	aerial part	105	82
144	<i>Allamanda</i> spp.	aerial part	165	86
145	<i>Anisomeles indica</i>	aerial part	112	62
146	<i>Hibiscus surattensis</i> L.	aerial part	132	87
148	<i>Tecoma stans</i> (L.) Juss	aerial part	71	106
149	<i>Clinogyne dichotoma</i> Salisb	leaves/small branches	54	82
150	<i>Flemingia congesta</i>	leaves	82	81
151	<i>Ardisia humilis</i>	leaves	443	155
152	<i>Ecbolium linnaeum</i>	leaves	162	88
153	<i>Polygonum lanatum</i>	leaves	143	107
155	<i>Sonneratia apetala</i>	fruit stalk	163	125
156	<i>Gendarussa vulgaris</i>	leaves	197	155
157	<i>Nymphaea nouchali</i>	roots	137	137
158	<i>Sida rhombifolia</i> Linn.	aerial Parts	183	156
159	<i>Bacopa monnieri</i>	whole plants	187	172
160	<i>Rumex maritimus</i>	aerial part	214	173
161	<i>Aloe vera</i>	stem	196	138
163	<i>Calotropis procera</i>	leaves	67	116
165	<i>Diospyros blancoi</i>	fruit	103	67
166	<i>Vitex negundo</i>	stem	65	87
167	<i>Vitex negundo</i>	leaves	49	68
168	<i>Azadirachta indica</i>	stem	69	90
169	<i>Azadirachta indica</i>	leaves	63	88
170	<i>Aphanamixis polystachya</i>	stem	75	68
171	<i>Aphanamixis polystachya</i>	leaves	110	78
172	<i>Tagetes erecta</i>	stem	83	79
173	<i>Tagetes erecta</i>	leaves	107	91
174	<i>Ipomoea mauritiana</i>	stem	118	68
175	<i>Ipomoea mauritiana</i>	fruit	122	92
176	<i>Argemone mexicana</i>	stem	112	102
177	<i>Argemone mexicana</i>	leaves	91	96
178	<i>Manihot esculenta</i>	stem	132	76
179	<i>Manihot esculenta</i>	leaves	97	92
180	<i>Coccinea cordifolia</i>	stem	120	95
182	<i>Moringa oliefera</i>	stem	124	88
183	<i>Ficus benghalensis</i>	root bulb	92	64
184	<i>Datura stramonium</i>	stem	107	88
185	<i>Datura stramonium</i>	fruit	158	88
187	<i>Cyperus rotundus</i>	leaves	117	98
188	<i>Terminalia arjuna</i>	fruit	101	82
189	<i>Terminalia arjuna</i>	bark	65	87
190	<i>Sida cordifolia</i>	leaves	172	101
191	<i>Sida cordifolia</i>	stem	258	74

KKB	植物名	部位	BMI promoter activity (%)	viability (%)
192	<i>Achyramthes aspera</i>	leaves	102	80
193	<i>Achyramthes aspera</i>	stem	255	97
194	<i>Datura metel</i>	leaves	17	59
195	<i>Datura metel</i>	stem	126	75
196	<i>Datura metel</i>	roots	132	76
197	<i>Acalypha indica</i>	stem	99	98
198	<i>Ficus religiosa</i>	leaves	125	91
199	<i>Ficus religiosa</i>	stem	149	86
200	<i>Ficus religiosa</i>	bark	106	99
201	<i>Hyptis suaveolens</i>	flower	69	93
202	<i>Hyptis suaveolens</i>	stem	55	62
203	<i>Boerhaavia diffusa</i>	leaves	69	68
204	<i>Solanum nigrum</i>	leaves	48	98
205	<i>Eugenia jambolana</i>	leaves	42	108
206	<i>Eugenia jambolana</i>	seed	20	57
210	<i>Piper longum</i>	leaves	76	108
211	<i>Smilax zeylanica</i>	leaves	66	94
212	<i>Smilax zeylanica</i>	stem	73	93
213	<i>Coccinea cordifolia</i>	leaves	112	102
215	<i>Aegle marmelos</i>	leaves	97	84
216	<i>Withania somnifera</i>	roots	91	111
218	<i>Passiflora foetida</i>	stem	81	72
239	<i>Andrographis paniculata</i>	whole plant	19	69
344	<i>Mangifera indica</i>	bark	45	94
404	<i>Ficus benjamina</i>	leaves/small branches	60	74
405	<i>Barringtonia acutangula</i>	leaves/small branches	73	88
406	<i>Crataeva nurvala</i>	leaves	21	60
407	<i>Syzygium grandis</i>	leaves/small branches	38	53
409	<i>Calamus viminalis</i>	leaves	43	84
410	<i>Melastoma malabathricum</i>	leaves	62	77
411	<i>Cleome hassleriana</i>	roots/stems	108	102
412	<i>Acanthus ilicifolius</i>	leaves	74	57
413	<i>Myriostachya wightiana</i>	aerial part	87	64
414	<i>Phoenix paludosa</i>	stem	88	64
415	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	leaves	53	88
416	<i>Phoenix paludosa</i>	leaves	47	66
417	<i>Cynometra ramiflora</i>	bark	46	77
418	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	leaves	64	79
420	<i>Avicenia officinalis</i>	leaves	77	85
421	<i>Heritiera fomes</i>	leaves	66	72
422	<i>Ficus racemosa</i>	leaves	89	93
423	<i>Calophyllum inophyllum</i>	leaves	75	102
425	<i>Solanum nigrum</i>	aerial part/flowers/fruits	92	87
426	<i>Ranunculus sceleratus</i>	whole plant	88	86
427	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	whole plant	24	19

KKB	植物名	部位	BMI promoter activity (%)	viability (%)
430	<i>Spilanthes calva</i>	aerial Parts	124	81
431	<i>Acalypha indica</i>	whole plant	66	89
432	<i>Pouzolzia indica</i>	whole plant	44	63
434	<i>Heliotropium indicum</i>	aerial Parts	89	60
435	<i>Lagerstroemia reginae</i>	leaves	89	101
437	<i>Nasturtium indicum</i>	whole plant	76	96
438	<i>Phyla nodiflora</i>	whole plant	92	57
439	<i>Sida acuta</i>	aerial Parts	114	51
440	<i>Moringa oleifera</i>	bark	87	81
441	<i>Albizia saman</i>	fruits	102	114
442	<i>Mangifera indica</i>	seed	20	62
445	<i>Polycarpon prostratum</i>	aerial Parts	117	84
446	<i>Litsea glutinosa</i>	leaves	18	39
447	<i>Lagerstroemia reginae</i>	fruits	35	73

Table 3-2 タイ産植物エキス (KKP) 215 種のスクリーニング

KKP	植物名	部位	BMI promoter activity (%)	viability (%)
487	<i>Ipomoea aquatica</i>	whole	100	124
489	<i>Merremia umbellata</i>	leaves	116	92
490	<i>Wolffia globosa</i>	whole	73	95
491	<i>Phyllanthus reticulatus</i>	leaves	92	112
492	<i>Jatropha multifida</i>	leaves	490	114
493	<i>Curcuma parviflora</i>	rhizome	98	91
494	<i>Santalum album</i>	wood	46	64
495	<i>Salacca edulis</i>	peel	48	61
496	<i>Musa sapientum</i>	flower	104	121
497	<i>Tradescantia spathacea</i>	leaves	91	117
498	<i>Clausena lansium</i>	leaves	63	62
499	<i>Murraya paniculata</i>	leaves	32	37
500	<i>Eleutherine palmifolia</i>	bulb	144	91
501	<i>Garcinia mangostana</i>	peel	58	49
502	<i>Derris scandens</i>	leaves	91	39
503	<i>Dianella ensifolia</i>	leaves	105	106
505	<i>Hyptis suaveolens</i>	aerial parts	106	115
506	<i>Annona reticulata</i>	leaves	148	56
508	<i>Garcinia speciosa</i>	leaves	112	102
509	<i>Melia azedarach</i>	leaves	110	85
512	<i>Centotheca lappacea</i>	leaves	122	131
514	<i>Merremia umbellata</i>	leaves	98	103
515	<i>Curcuma comosa</i>	rhizome	69	87
516	<i>Costus speciosus</i>	rhizome	116	89
517	<i>Alpinia oxymitra</i>	rhizome	44	54
518	<i>Amomum villosum</i>	rhizome	34	6
519	<i>Zingiber officinale</i>	rhizome	91	90
520	<i>Stephania rotunda</i>	stem	99	76
521	<i>Rhoeo discolor</i>	whole	98	129
523	<i>Canarium album</i>	leaves	61	60
526	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	leaves	136	76
527	<i>Garcinia speciosa</i>	leaves	88	76
528	<i>Melia azedarach</i>	leaves	133	101
529	<i>Nerium indicum</i>	leaves	41	56
530	<i>Vernonia cinerea</i>	whole	99	94
531	<i>Dalbergia latifolia</i>	bark	70	77
534	<i>Melia azedarach</i>	leaves	93	67
535	<i>Merremia umbellata</i>	leaves	113	93
536	<i>Curcuma comosa</i>	rhizome	87	106
537	<i>Curcuma parviflora</i>	rhizome	59	70
538	<i>Alpinia oxymitra</i>	rhizome	33	5
539	<i>Amomum villosum</i>	rhizome	32	6
540	<i>Stephania rotunda</i>	leaves	81	52
541	<i>Rhoeo discolor</i>	whole	105	98
542	<i>Spondias mangifera</i>	bark	102	79
543	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	leaves	130	98

KKP	植物名	部位	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
545	<i>Clausena lansium</i>	leaves	121	83
546	<i>Erythrina variegata</i>	leaves	129	101
547	<i>Erythrophlem succirubrum</i>	leaves	49	48
548	<i>Beaumontia murtonii</i>	branch	92	74
549	<i>Adenium obesum</i>	leaves	35	42
550	<i>Impatiens balsamina</i>	leaves	97	89
551	<i>Dianella ensifolia</i>	root	114	90
552	<i>Wolffia globosa</i>	whole	123	92
553	<i>Durio zibethinus</i>	seed	132	92
554	<i>Gynura pseudochina</i>	tuber	117	81
555	<i>Canarium album</i>	leaves	120	96
556	<i>Santalum album</i>	wood	53	72
557	<i>Hypericum garretti</i>	leaves	120	96
562	<i>Eucalyptus citriodora</i>	leaves	79	84
580	<i>Dalbergia floribunda</i>	bark	73	71
581	<i>Erythrophlem succirubrum</i>	leaves	26	13
583	<i>Curcuma domestica</i>	rhizome	88	91
584	<i>Costus speciosus</i>	rhizome	44	67
585	<i>Spondias mangifera</i>	leaves	40	18
586	<i>Melanorrhoea usitata</i>	bark	90	109
587	<i>Punica granatum</i>	peel	97	71
588	<i>Eugenia polyantha</i>	leaves	128	102
589	<i>Eugenia operculata</i>	leaves	61	62
591	<i>Stephania rotunda</i>	root/branch	87	49
592	<i>Santalum album</i>	wood	45	63
594	<i>Phyllanthus pulcher</i>	leaves	89	62
595	<i>Gynura pseudochina</i>	tuber	135	81
596	<i>Canarium album</i>	leaves	85	49
597	<i>Merremia umbellata</i>	leaves	253	72
598	<i>Solanum trilobatum</i>	branch	115	78
599	<i>Buddleia asiatica</i>	leaves	111	87
600	<i>Bauhinia scandens</i>	leaves	96	88
602	<i>Cinnamomum iners</i>	bark	104	62
603	<i>Myristica officinalis</i>	wood	112	80
605	<i>Abutilon indicum</i>	aerial part	48	61
606	<i>Abutilon indicum</i>	leaves/branch	43	65
607	<i>Acacia pennata</i>	leaves	36	56
608	<i>Acronychia laurifolia</i>	Leaves	49	61
609	<i>Adenantha pavonina</i>	seeds	68	55
610	<i>Adenium obesum</i>	leaves	13	30
611	<i>Afgekia sericea</i>	leaves	30	37
613	<i>Aganosma marginata</i>	leaves	48	61
614	<i>Aganosma marginata</i>	leaves/branches	47	70
615	<i>Aganosma marginata</i>	leaves/branches	50	67
616	<i>Aglaiia odorata</i>	leaves	27	76
618	<i>Allamanda cathartica</i>	leaves	51	60
619	<i>Allamanda cathartica</i>	branch	55	64

KKP	植物名	部位	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
620	<i>Alpinia oxymitra</i>	Rhizome	37	35
623	<i>Alstonia scholaris</i>	leaves	45	57
624	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	leaves	60	66
625	<i>Alternanthera sessilis</i>	whole plant	61	55
626	<i>Amomum villosum</i>	Rhizome	13	66
627	<i>Amomum villosum</i>	bark	3	5
628	<i>Amomum villosum</i>	wood	9	34
629	<i>Anacardium occidentale</i>	seed/peel	14	30
631	<i>Anethum graveolens</i>	whole	55	70
632	<i>Antidesma ghaesembilla</i>	leaves	56	91
634	<i>Ardisia colorata</i>	bark	90	61
635	<i>Ardisia colorata</i>	branches	44	58
636	<i>Arenga saccharifera</i>	Flower	57	108
637	<i>Artocarpus champeden</i>	branches	87	106
638	<i>Artocarpus communis</i>	leaves	96	107
639	<i>Artocarpus communis</i>	root/rhizome	71	96
640	<i>Artocarpus communis</i>	wood	12	32
641	<i>Artocarpus integra</i>	leaves	82	104
642	<i>Baccaurea sapida</i>	fruits	80	97
643	<i>Baccaurea sapida</i>	leaves	51	85
644	<i>Baccaurea sapida</i>	peel	83	113
646	<i>Barleria prionitis</i>	root	109	88
647	<i>Beaumontia murtonii</i>	leaves	15	41
648	<i>Blumea balsamitera</i>	leaves	76	56
649	<i>Blumea lacera</i>	whole plant	64	65
650	<i>Boesenbergia pandurata</i>	rhizome	75	85
651	<i>Boesenbergia pandurata</i>	root/rhizome	68	90
652	<i>Boesenbergia pandurata</i>	root	59	74
653	<i>Boesenbergia pandurata</i>	root	59	98
654	<i>Boesenbergia pandurata</i>	wood/root	51	86
655	<i>Boesenbergia pandurata</i>	leaves/root/rhizome	84	92
656	<i>Borassus flabellifer</i>	leaves	74	64
659	<i>Borassus flabellifer</i>	root/rhizome	76	89
663	<i>Caesalpinia digyna</i>	leaves	50	106
664	<i>Calamus insignis</i>	tuber/root	52	65
665	<i>Calamus insignis</i>	rhizome	39	22
666	<i>Calophyllum inophyllum</i>	leaves	94	89
667	<i>Canarium album</i>	fruits	61	67
669	<i>Cassia bakeriana</i>	leaves	74	75
670	<i>Cassia fistula</i>	leaves	52	40
672	<i>Casuarina equisetifolia</i>	Bark	64	65
673	<i>Catimbium speciosum</i>	rhizome	152	78
677	<i>Claoxylon indicum (polot)</i>	leaves/branches	110	80
679	<i>Codiaeum variegatum</i>	leaves	122	98
680	<i>Colubrina asiatica</i>	leaves/branch	105	97
681	<i>Combretum quadrangulare</i>	leaves	4	12
682	<i>Costus speciosus</i>	rhizome	33	67

KKP	植物名	部位	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
683	<i>Cratoxylum formosum</i>	leaves	77	111
684	<i>Crotalaria bracteata</i>	aerial part	122	99
685	<i>Crotalaria bracteata</i>	leaves/root/rhizome	114	81
686	<i>Crotalaria bracteata</i>	leaves	107	78
687	<i>Crotalaria juncea</i>	leaves	100	76
688	<i>Curcuma comosa</i>	rhizome	39	54
689	<i>Curcuma domestica</i>	rhizome	38	85
691	<i>Curcuma parviflora</i>	rhizome	82	79
692	<i>Curcuma parviflora</i>	wood/root	41	90
693	<i>Curcuma parviflora</i>	root	71	95
694	<i>Dalbergia latifolia</i>	bark	74	93
696	<i>Decaschistia eximia</i>	Aerial parts	85	91
697	<i>Decaschistia eximia</i>	leaves	77	97
699	<i>Dolichos lablab</i>	leaves	117	91
700	<i>Ecdysanthera rosea</i>	leaves	109	88
701	<i>Ehretia microphylla</i>	aerial parts	111	77
702	<i>Eleutherine palmifolia</i>	bulb	82	87
704	<i>Eryngium foetidum</i>	whole	32	62
705	<i>Erythrina variegata</i>	leaves	139	99
706	<i>Erythrophleum succirubrum</i>	leaves	31	52
708	<i>Eupatorium odoratum</i>	leaves	94	61
709	<i>Euphorbia neriifolia</i>	leaves	211	75
710	<i>Eurycoma longifolia</i>	bark	26	52
711	<i>Eurycoma longifolia</i>	wood	51	62
712	<i>Eurycoma longifolia</i>	leaves	39	34
713	<i>Ficus hispida</i>	wood	26	50
714	<i>Ficus hispida</i>	wood	28	66
753	<i>Mammea siamensis</i>	leaves	40	77
754	<i>Mangifera odorata</i>	bark	115	96
755	<i>Melastoma polyanthum</i>	leaves	4	7
756	<i>Merremia mammosa</i>	tuber	78	62
757	<i>Merremia umbellata</i>	leaves/branches	65	60
758	<i>Merremia umbellata</i>	leaves	77	72
759	<i>Millettia brandisiana</i>	leaves	45	42
760	<i>Millingtonia hortensis</i>	leaves/bark	26	31
761	<i>Millingtonia hortensis</i>	leaves	117	87
767	<i>Myristica fragrans</i>	wood	17	72
768	<i>Myristica moschata</i>	wood	68	102
769	<i>Myristica moschata</i>	fruits	53	72
770	<i>Myristica maschata</i>	flower	18	56
776	<i>Pandanus amaryllifolius</i>	leaves	98	96
777	<i>Parkia speciosa</i>	seed	98	110
778	<i>Passiflora laurifolia</i>	leaves	61	86
779	<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	leaves	139	65
780	<i>Pedilanthus tithymaloides</i>	branches	152	104
781	<i>Perilla ocymoides</i>	seed	81	92
782	<i>Phyllanthus niruri</i>	leaves	51	79

KKP	植物名	部位	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
784	<i>Phyllanthus reticulatus</i>	leaves	59	117
785	<i>Physalis minima</i>	whole plant	35	81
786	<i>Pluchea indica</i>	leaves	99	106
787	<i>Pueraria hirsuta</i>	root	89	73
788	<i>Punica granatum</i>	leaves/root/rhizome	57	37
790	<i>Saccharum spontaneum</i>	trunk	87	95
793	<i>Sandoricum indicum</i>	bark	75	96
794	<i>Santalum album</i>	wood	19	66
795	<i>Sapindus emarginatus</i>	fruits	5	13
796	<i>Sapindus rarak</i>	fruits	91	42
801	<i>Sida acuta</i>	leaves	26	66
802	<i>Sindora siamensis</i>	leaves	67	96
803	<i>Solanum trilobatum</i>	leaves	39	68
804	<i>Solanum verbascifolium</i>	branches	88	89
805	<i>Spilanthes acmella</i>	aerial part	101	101
807	<i>Spondias mangifera</i>	root	22	16
809	<i>Swietenia mahogoni</i>	bark	31	45
811	<i>Themeda arguens</i>	leaves/root/rhizome	79	102
812	<i>Themeda arguens</i>	whole plant	41	66
813	<i>Themeda arguens</i>	leaves	66	103
814	<i>Themeda arguens</i>	aerial parts	57	98
815	<i>Trigonostemon reidioides</i>	bark	118	86
818	<i>Vallis glabra</i>	leaves	6	27
819	<i>Wolffia globosa</i>	whole plant	67	85
820	<i>Wolffia globosa</i>	leaves	71	78
821	<i>Wrightia religiosa</i>	branches/leaves	27	66
822	<i>Xylia kerrii</i>	leaves	80	91
824	<i>Ziziphus cambodiana</i>	leaves/branch	62	87

BMI1 プロモーター阻害活性約 40 % 以下であることに加え、細胞生存率と BMI1 プロモーター阻害活性の差が約 30 % 以上の植物エキスをヒット植物エキスとした。熱帯植物エキスコレクションのスクリーニングの結果、以下の 17 種のヒット植物エキスを見出した (Table 3-3)。

Table 3-3 17 種のヒット植物エキス

KKB	植物名	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
194	<i>Datura metel</i>	17	59
204	<i>Solanum nigrum</i>	48	98
205	<i>Eugenia jambolana</i>	42	108
239	<i>Andrographis paniculata</i>	19	69
442	<i>Mangifera indica</i>	20	62

KKP	植物名	BMI1 promoter activity (%)	viability (%)
616	<i>Aglaia odorata</i>	27	76
626	<i>Amomum villosum</i>	13	66
663	<i>Caesalpinia digyna</i>	50	106
689	<i>Curcuma domestica</i>	38	85
692	<i>Curcuma parviflora</i>	41	90
714	<i>Ficus hispide</i>	28	66
753	<i>Mammea siamensis</i>	40	77
767	<i>Myristica fragrans</i>	17	72
770	<i>Myristica maschata</i>	18	56
785	<i>Physalis minima</i>	35	81
794	<i>Santalum album</i>	19	66
801	<i>Sida acuta</i>	26	66

17 種のヒット植物エキスには、成分探索例が多数報告されている植物 (KKB194 *Datura metel*: チョウセンアサガオ, KKP626 *Amomum villosum* など) や、Wnt シグナルに関する成分探索例 (KKP616 *Aglaia odorata*, KKP794 *Santalum album* など)、Hedghog シグナルに関する成分探索例 (KKP785 *Physalis minima*) が含まれている。そのため、文献数や乾燥植物重量を考慮し、KKB239 *Andrographis paniculata*, KKP753 *Mammea siamensis*, KKP663 *Caesalpinia digyna* の 3 種の植物を分画対象とした。

第4章 *Andrographis paniculata* からの成分探索



Figure 4-1 *Andrographis paniculata*

第4章では、第3章のスクリーニングにて、BMI1プロモーター阻害活性 (50 $\mu\text{g/mL}$ においてルシフェリン発光を 81 % 減弱) を示した *Andrographis paniculata* の分画、生物活性評価について述べる。

Andrographis paniculata はキツネノマゴ科の植物であり、本研究での使用部位は葉部である。日本では、センシンレン (穿心蓮) とも呼ばれる。インド、スリランカ原生であり、主に葉や根が伝統的に風邪の諸症状に対して用いられている薬草。本植物は、抗炎症活性、抗ウイルス活性、肝保護などの生理活性作用が報告されている¹⁾。

第1節 *Andrographis paniculata* の分画

Andrographis paniculata より、BMI1 プロモーター阻害活性を基に分画し、化合物 1-14 を単離した (Figure 4-1-1)。

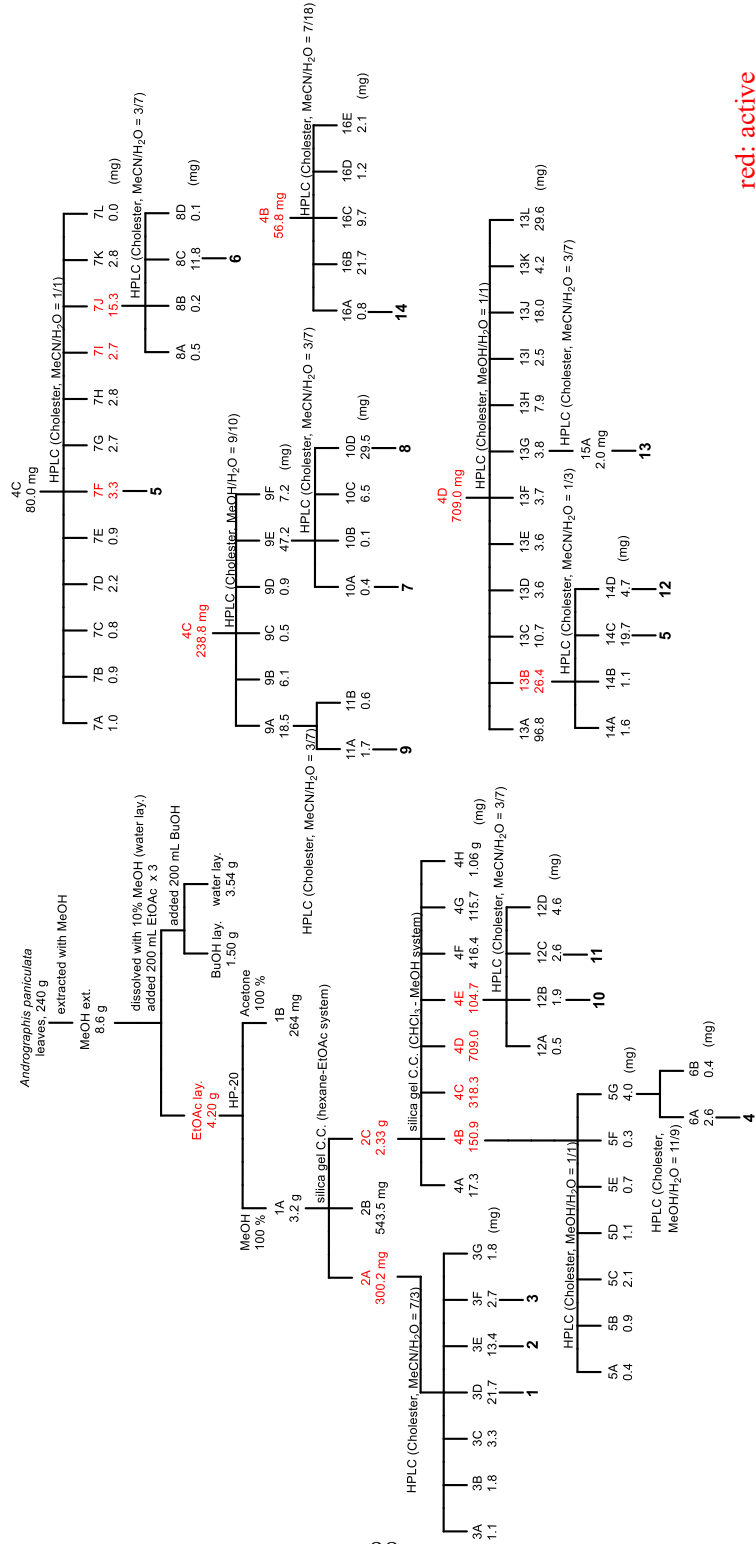


Figure 4-1-1 *Andrographis paniculata* の分画チャート

red: active

第 2 節 BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画

A. paniculata の葉部をメタノール (MeOH) にて抽出した。得られた MeOH 抽出物 (8.6 g) を 10% MeOH に溶解させ、酢酸エチル (EtOAc)、水飽和ブタノール (BuOH) にて液液分配することで EtOAc 層 (4.16 g)、BuOH 層 (1.10 g)、H₂O 層 (3.14 g)を得た。BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、EtOAc 層に阻害活性が移行した (Figure 4-2-1)。

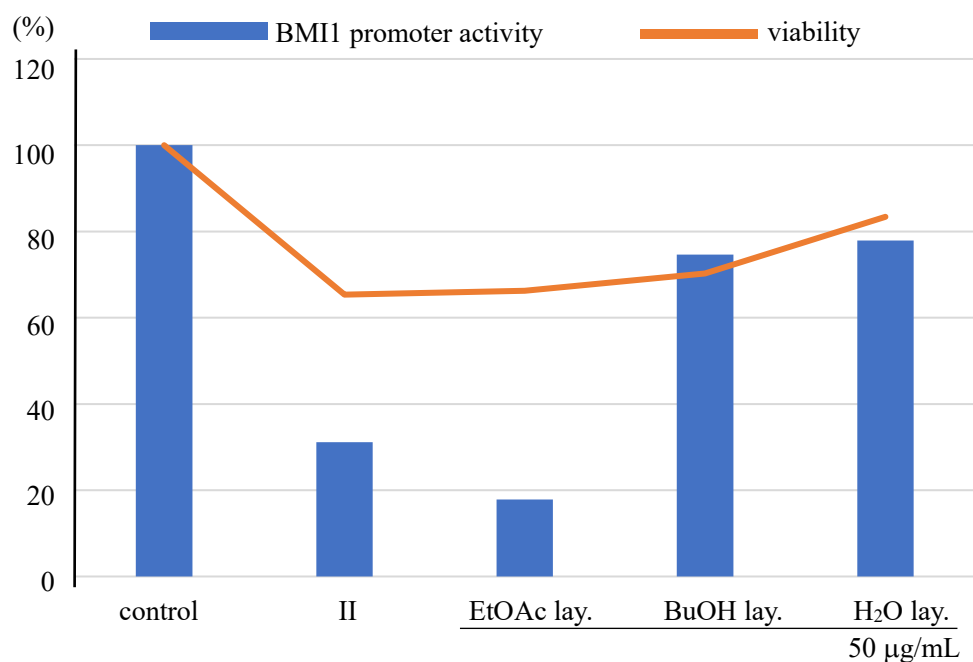
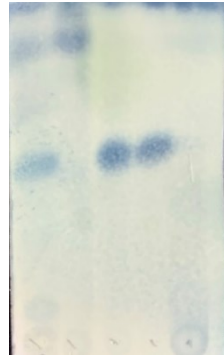


Figure 4-2-1 各層の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率
(control = DMSO 0.1 %, II = c-Myc inhibitor II 50 µg/mL)

BMI1 プロモーター阻害活性が見出された EtOAc 層を Diaion HP-20 カラム (ϕ 40x200 mm) を用いて分画することで、1 series (1A: 3.2 g, 1B: 264 mg) を得た。続いて、主要成分である 1A を hexane/EtOAc を用いた silica gel カラム (ϕ 40x150 mm) で分画し、2 series (2A-2C) を得た。1A から得られた 2 series と 1B を silica gel TLC にて分析した (Figure 4-2-2)。2 series の BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、2A、2C に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 4-2-3)。

silica gel TLC hexane/EtOAc = 2/9
phosphomolybdic acid, Δ



E 1B 2A 2B 2C

Figure 4-2-2 1B と 2 series の silica gel TLC

E = EtOAc 層

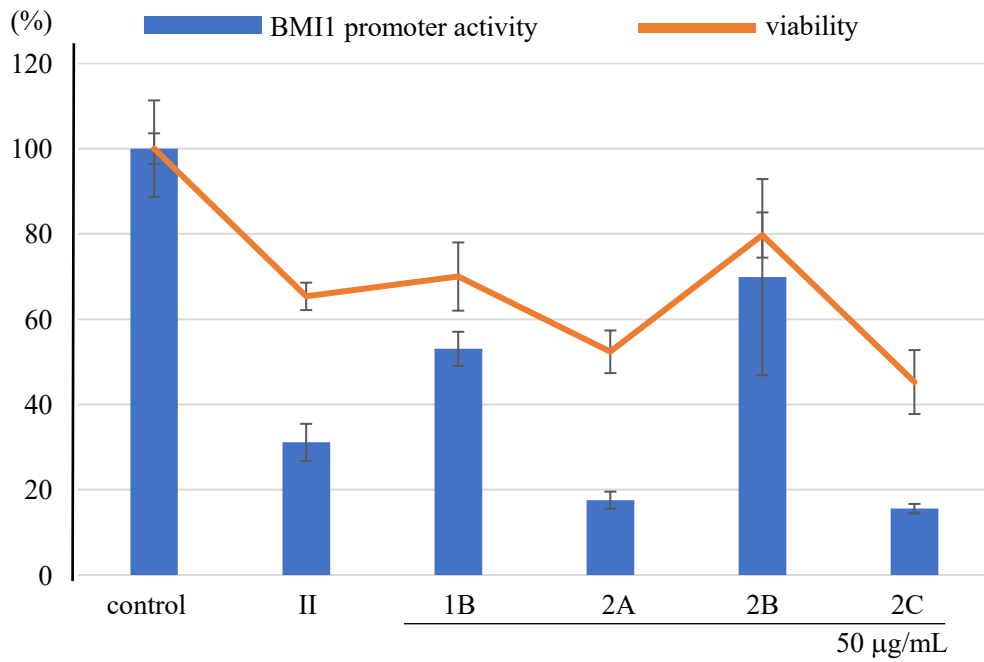


Figure 4-2-3 1B と 2 series の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 2A を HPLC (COSMOSIL Cholester、アセトニトリル (MeCN) /H₂O = 3/7) を用いて分画することで、3 series (3A-3F) を得た。3 series の内、3D (*t_R* 31.2, 21.7 mg) を化合物 1、3E (*t_R* 33.6, 13.4 mg) を化合物 2、3F (*t_R* 38.2, 2.7 mg) を化合物 3 とした (Figure 4-2-4)。

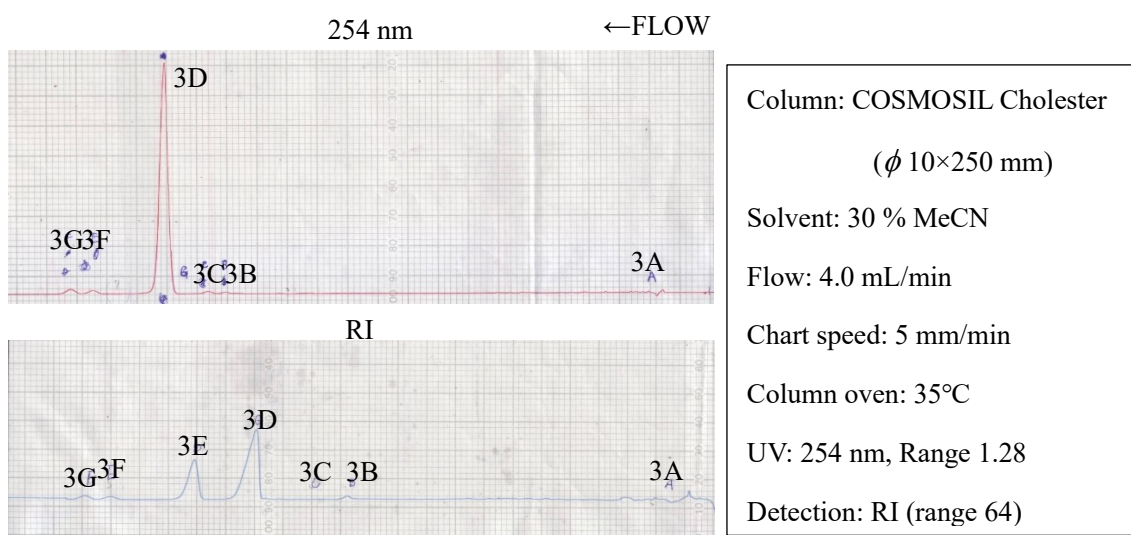


Figure 4-2-4 2A の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 2C をクロロホルム (CHCl₃)/MeOH を用いた silica gel カラム (φ40x170 mm) にて分画することで、4 series (4A-4H) を得た。4 series を silica gel TLC にて分析した (Figure 4-2-5)。4 series の BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、4B-4E に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 4-2-6)。

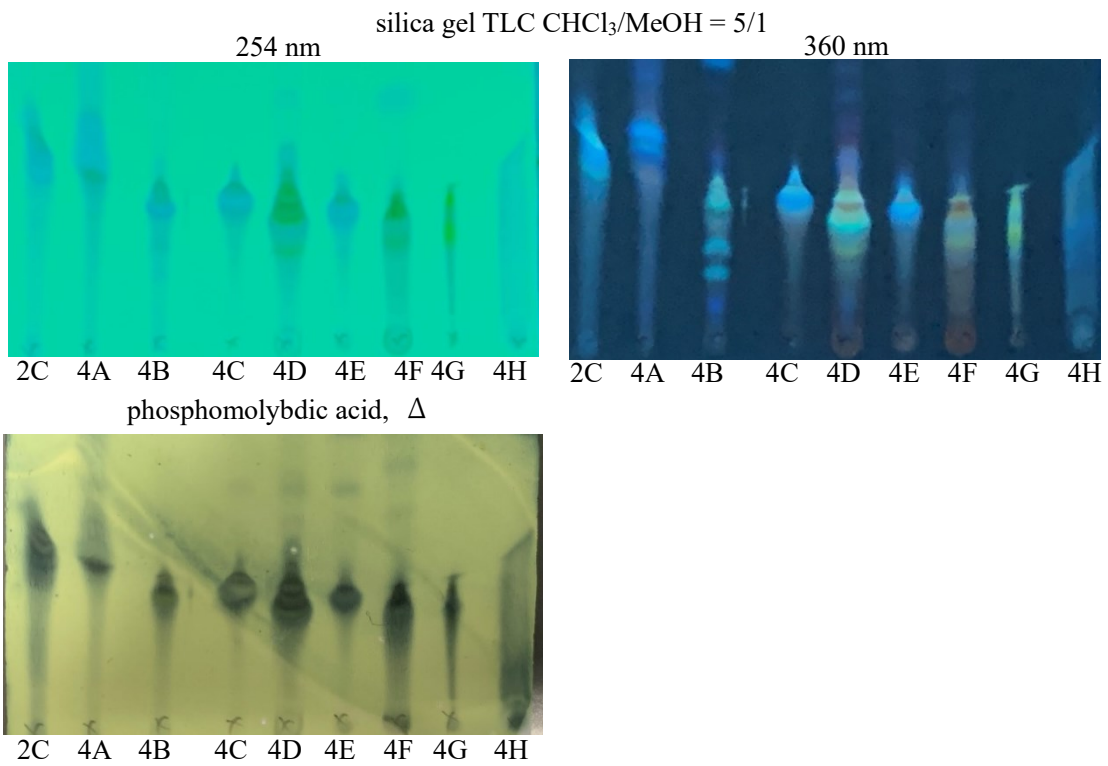


Figure 4-2-5 4 series の silica gel TLC

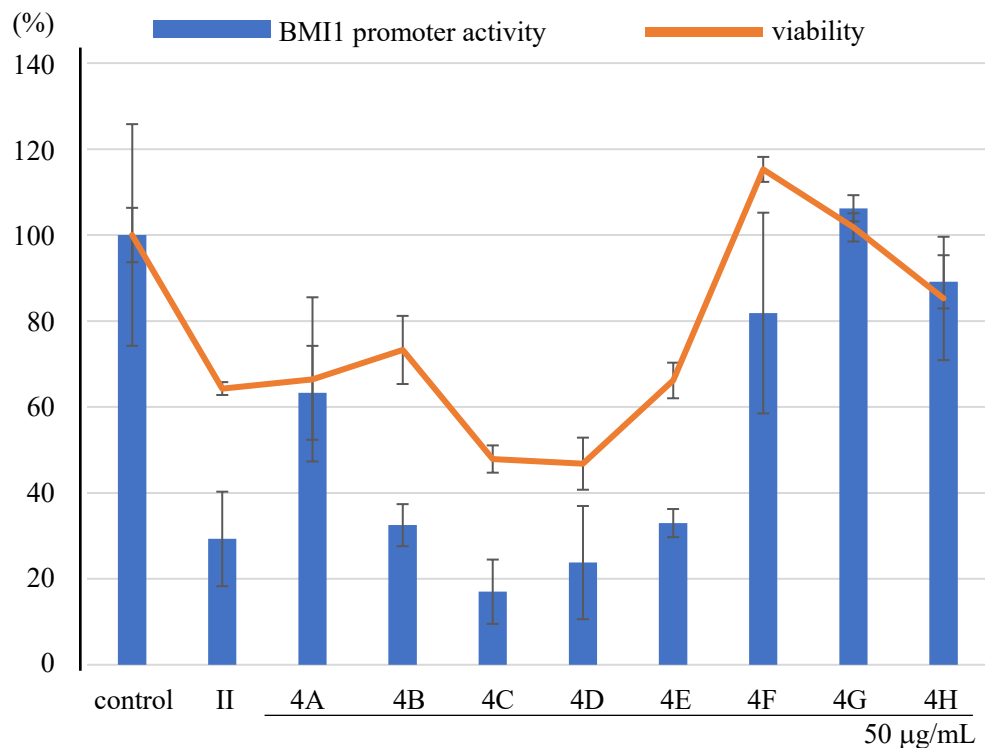


Figure 4-2-6 4 series の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4B を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeOH/H₂O = 1/1) を用いて分画することで、5 series (5A-5G) を得た (Figure 4-2-7)。

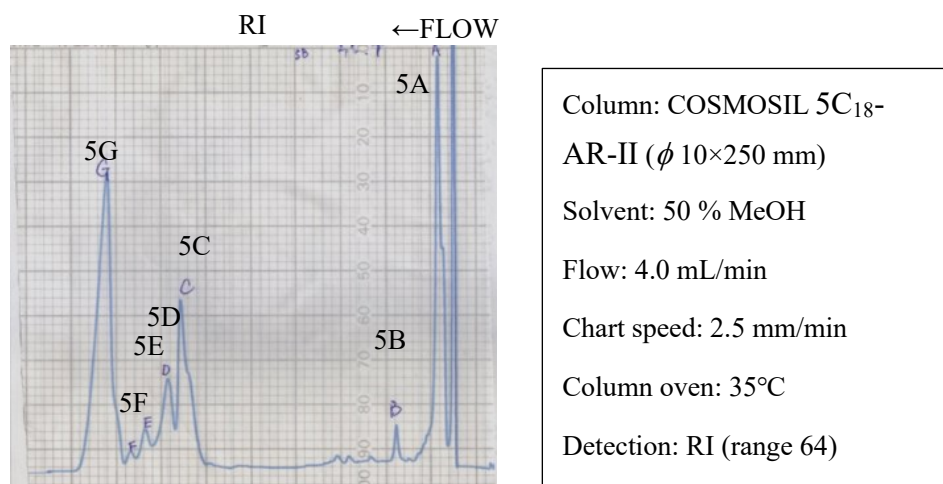


Figure 4-2-7 4B の HPLC による分画

5G を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeOH/H₂O = 11/9) を用いて分画することで、6 series を得た。6 series の内、6A を 4 (t_R 30.4, 2.6 mg) とした (Figure 4-2-8)。

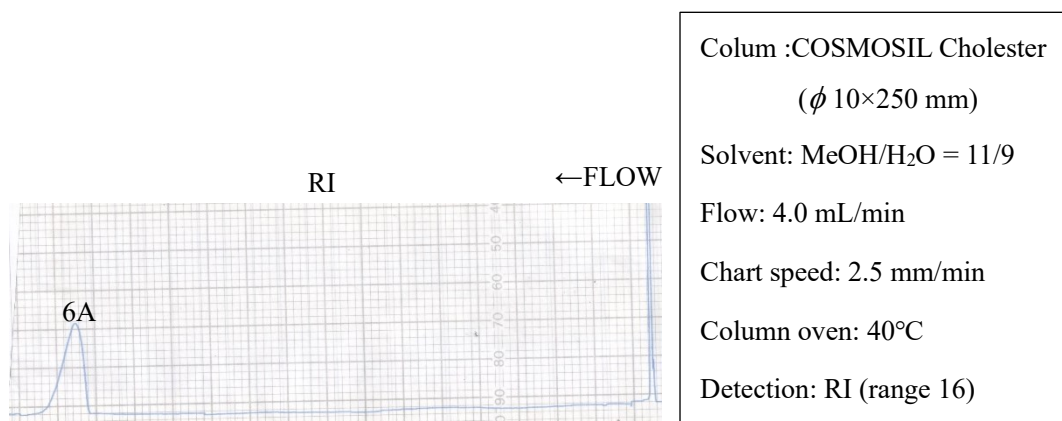


Figure 4-2-8 5G の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4C を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 1/1) を用いて分画することで、7 series (7A-7L) を得た (Figure 4-2-9)。BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、7F、7I、7J に BMI1 プロモーター阻害活性が観察された (Figure 4-2-10)。7 series の内、7F は **5** (t_R 18.2, 3.3 mg) とした。

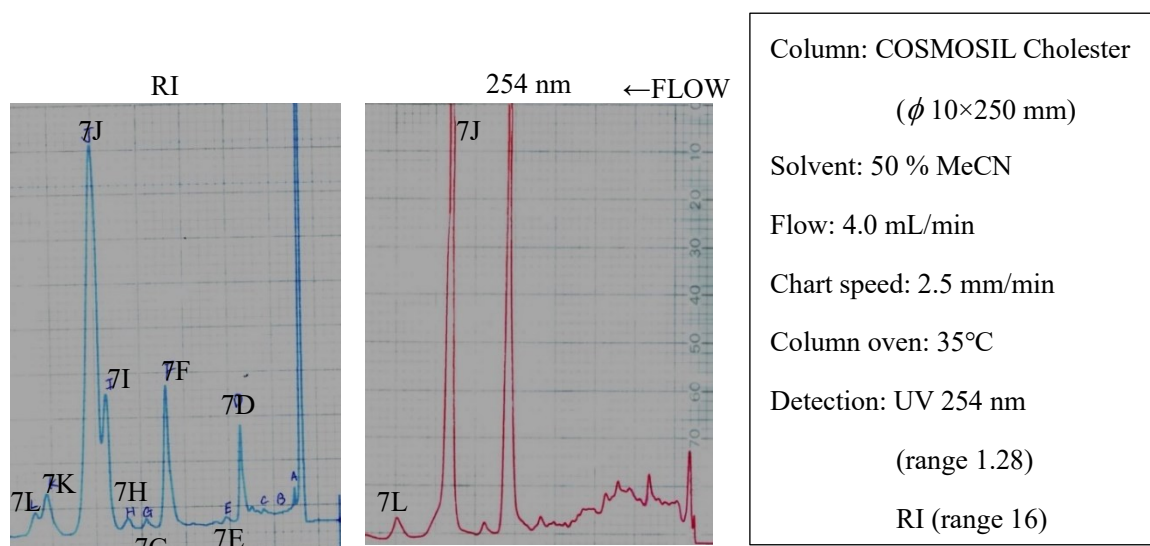


Figure 4-2-9 5C の HPLC による分画

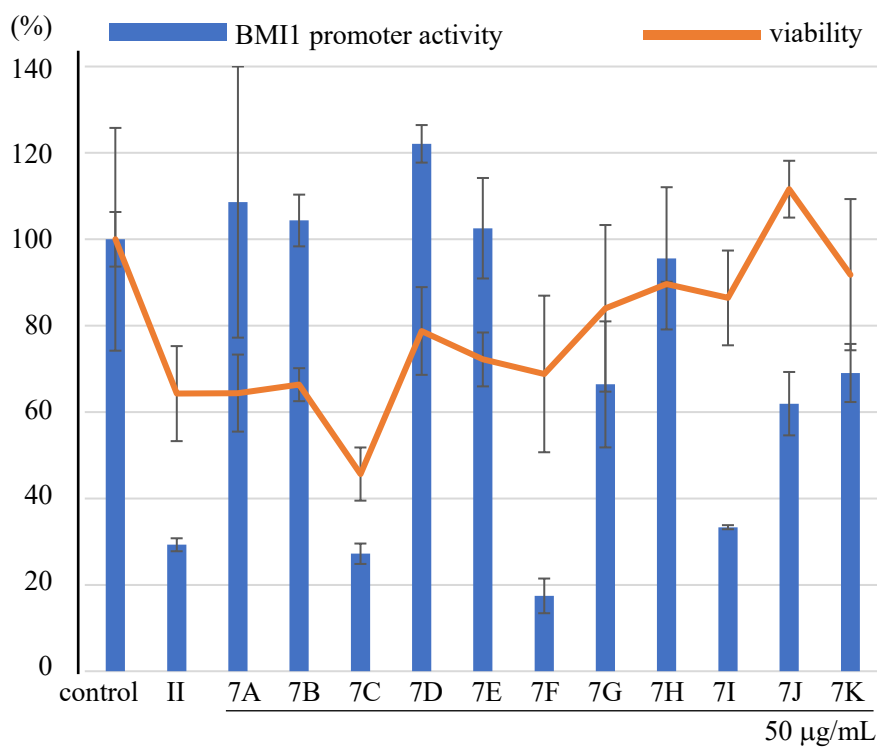


Figure 4-2-10 7 series の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 7J を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O=3/7) を用いて分画することで、8 series (8A-8D) を得た (Figure 4-2-11)。8 series の内、8C は **6** (t_R 24.2, 11.8 mg) とした。

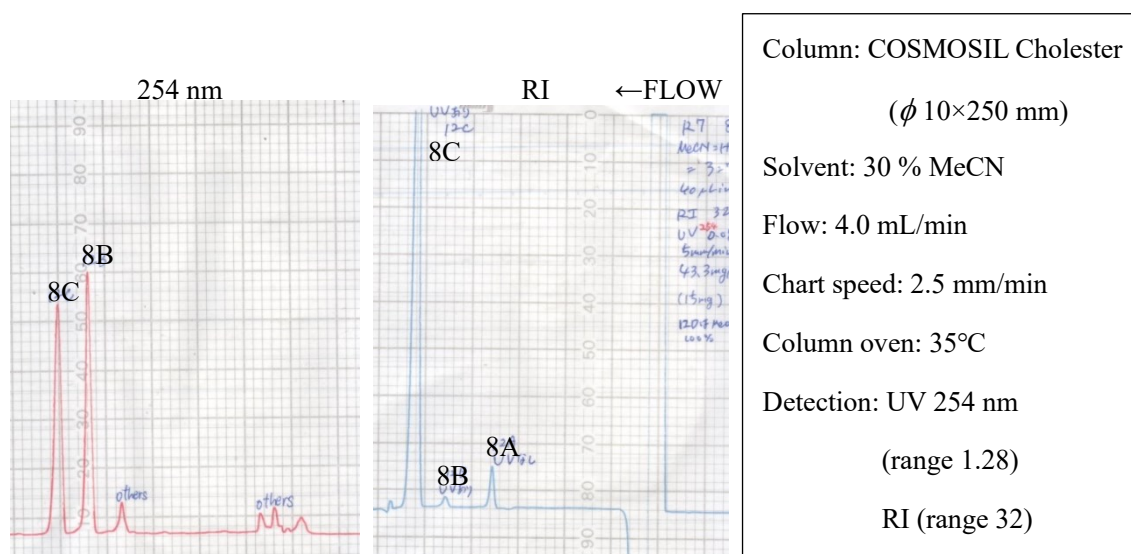


Figure 4-2-11 7J の HPLC による分画

次に、BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 7I を増量するため、4C を再度分画することで、9 series (9A-9E) を得た。9 series の内、9E を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 3/7) を用いて分画し、10 series (10A-10D) を得た (Figure 4-2-12)。10 series の内、10A を **7** (t_R 15.6, 0.4 mg)、10C を **8** (t_R 16.0, 6.5 mg) とし、10D は **6** であった。

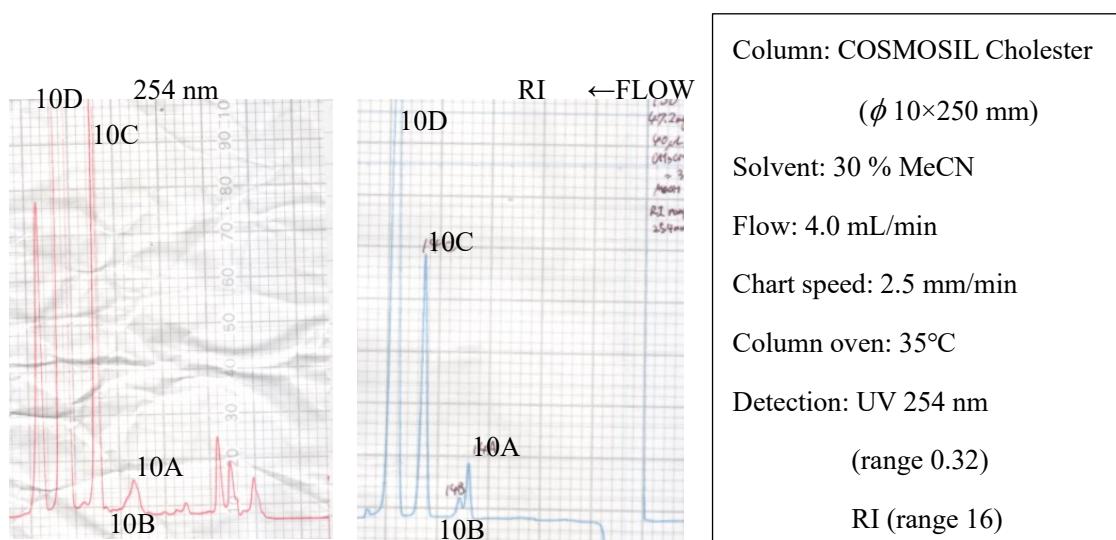


Figure 4-2-12 9E の HPLC による分画

また、得られた 9A を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 3/7) を用いて分画することで、11 series (11A-11B) を得た (Figure 4-2-13)。11 series の内、11A を **9** (t_R 28.0, 1.7 mg) とした。

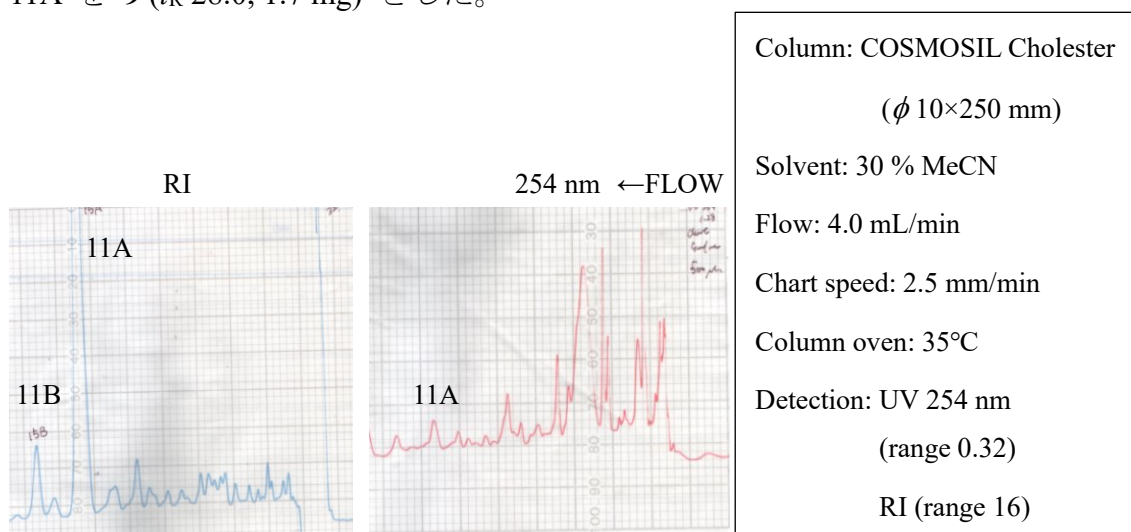


Figure 4-2-13 9A の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4E を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 3/7) を用いて分画することで、12 series (12A-12D) を得た (Figure 4-2-14)。12 series の内、12B を **10** (t_R 12.0, 1.9 mg)、12C を **11** (t_R 18.4, 2.6 mg) とし、12D は **5** であった。

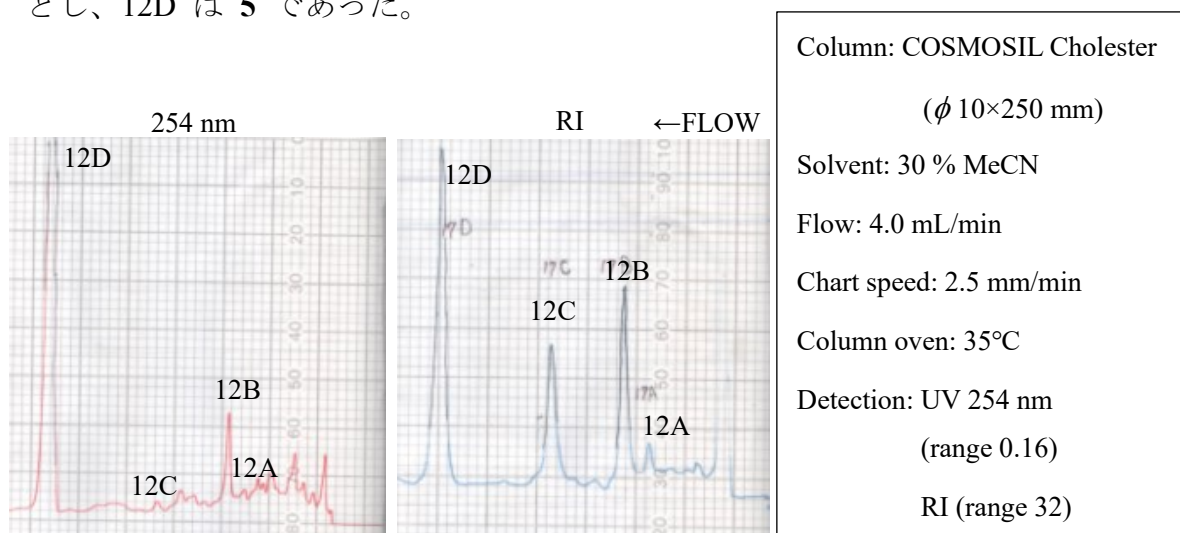


Figure 4-2-14 4E の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4D を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeOH/H₂O = 1/1) を用いて分画することで、13 series (13A-13L) を得た (Figure 4-2-15)。13 series の内、十分なフラクション重量が得られた 13A-13C、13I、13J について BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、13B に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 4-2-16)。

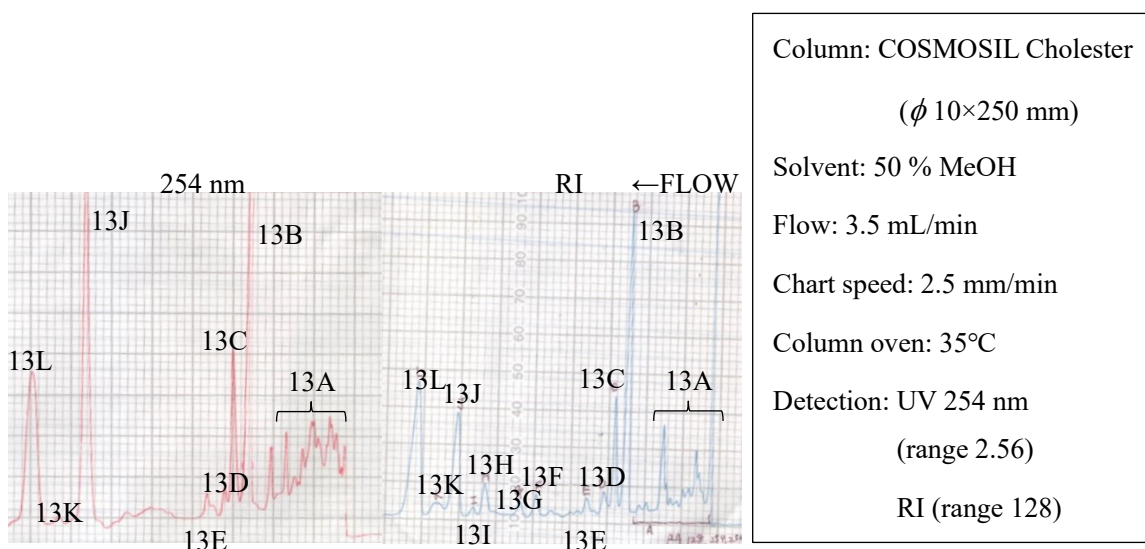


Figure 4-2-15 4D の HPLC による分画

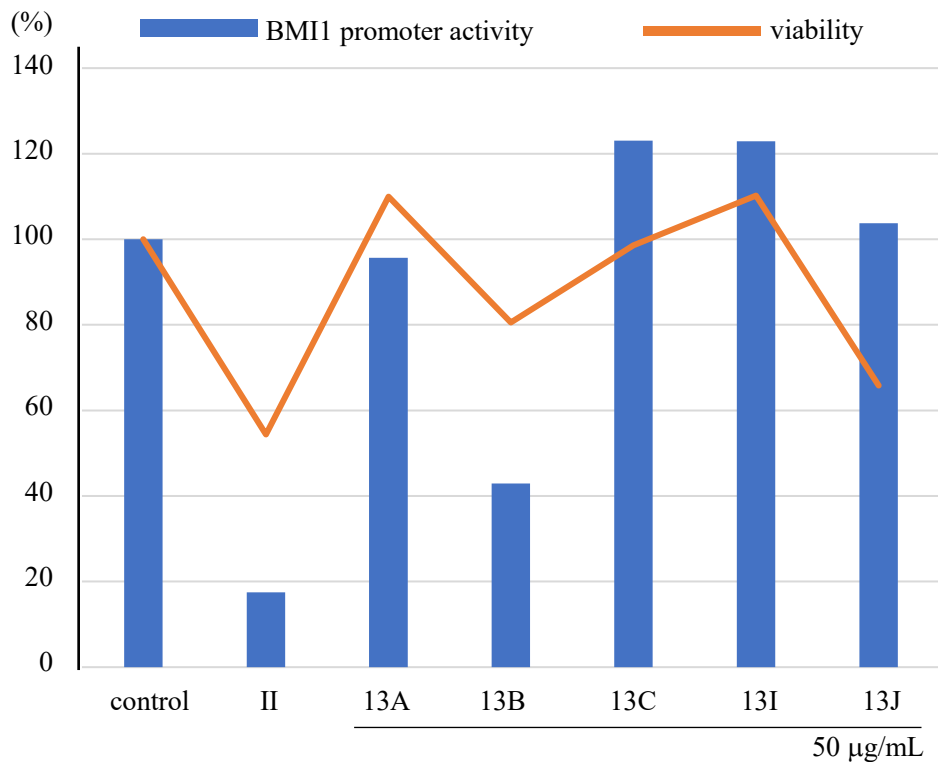


Figure 4-2-16 13A-13C、13I、13J の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 13B を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 1/3) を用いて分画することで、14 series (14A-14D) を得た (Figure 4-2-17)。14 series の内、14C は **5**、14D を **12** (*t_R* 48.0, 4.7 mg) とした。

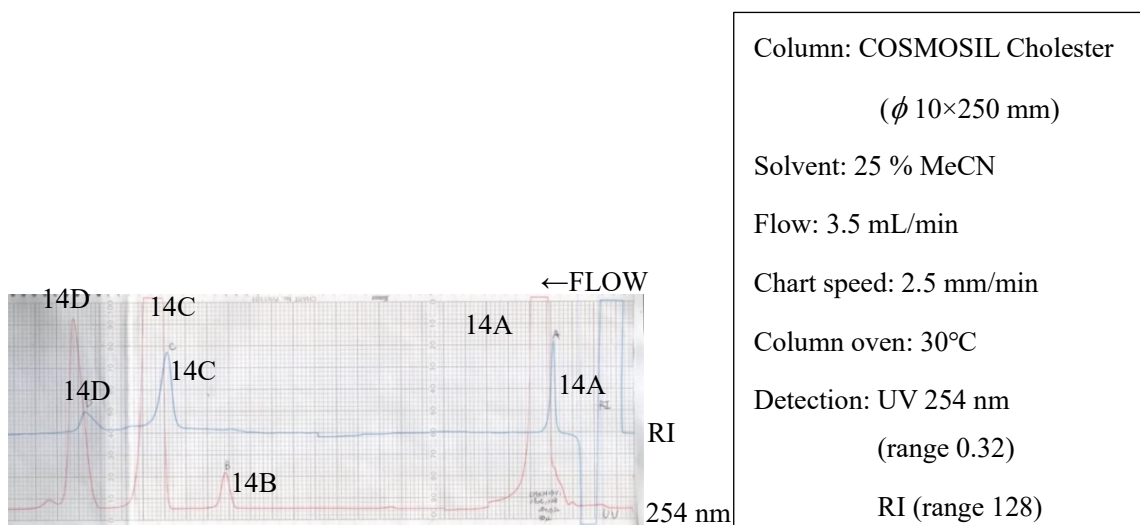


Figure 4-2-17 13B の HPLC による分画

次に、13G を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 3/7) を用いて分画することで、15A を得た (Figure 4-2-18)。15A を **13** (t_R 41.6, 2.0 mg) とした。

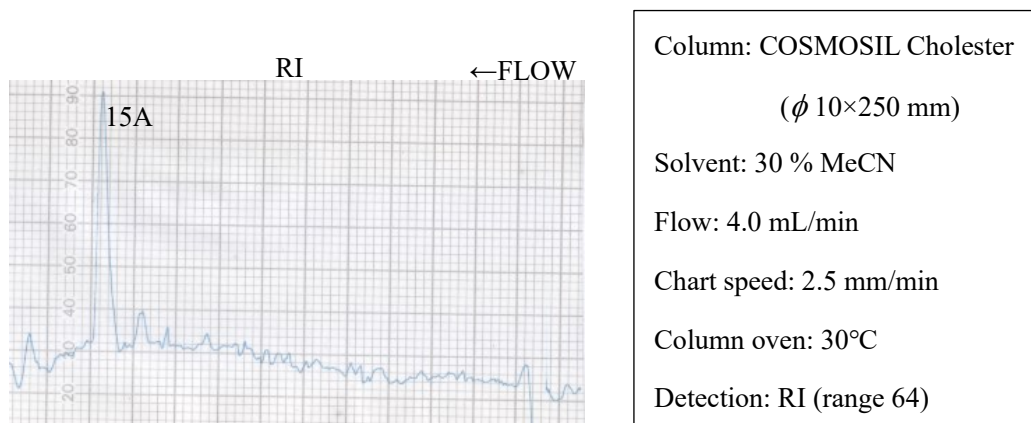


Figure 4-2-18 13G の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4B を再度 HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 7/18) を用いて分画することで、16 series (16A-16E) を得た (Figure 4-2-19)。16 series の内、16A を **14** (t_R 36.4, 0.8 mg) とした。

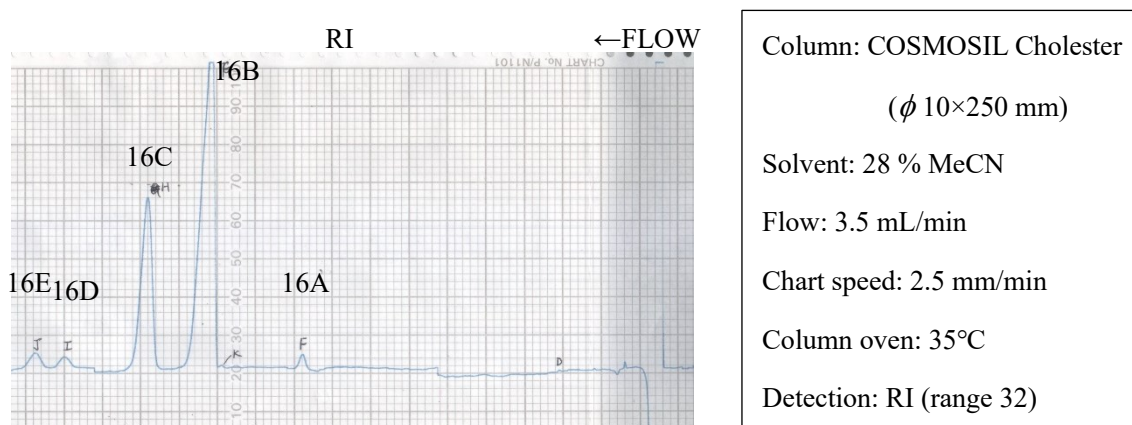


Figure 4-2-19 4B の HPLC による分画

第 3 節 *Andrographis paniculata* から単離された化合物

Andrographis paniculata の葉部より、単離した化合物 **1-14** について、NMR および MS スペクトルを測定し、文献値と比較することで、それぞれ 13 種類の既知ラブダン型ジテルペノイド (14-deoxy-11,12-dehydroandrographolide (**1**)²), 14-deoxyandrographolide(**2**)²), 14-deoxy-12-methoxyandrographolide (**3**)³), *neo*-andrographolide (**4**)^{2,4}), andrographolide (**5**)^{2,4}), 3,18,19-trihydroxy-ent-labda-8(17),13-diene-15,16-olide (**6**)⁵), 13-dien-16,15-olide(9)13,14,15,16-tetranor-ent-labd-8(17)-ene-3,12,19-triol (**7**)⁵), isoandrographolide (**8**)²), 14-deoxy-17 β -hydroxyandrographolide (**9**)⁶), 7*R*-hydroxy-14-deoxyandrographolide (**10**)⁸), 7*S*-hydroxy-14-deoxyandrographolide (**11**)⁷), 14-deoxy-15-methoxyandrographolide (**13**)⁷), 3-dehydrodeoxyandrographolide (**14**)⁸ および、1 種のフラボノイド (andrographidine C (**12**)⁹) と決定した。

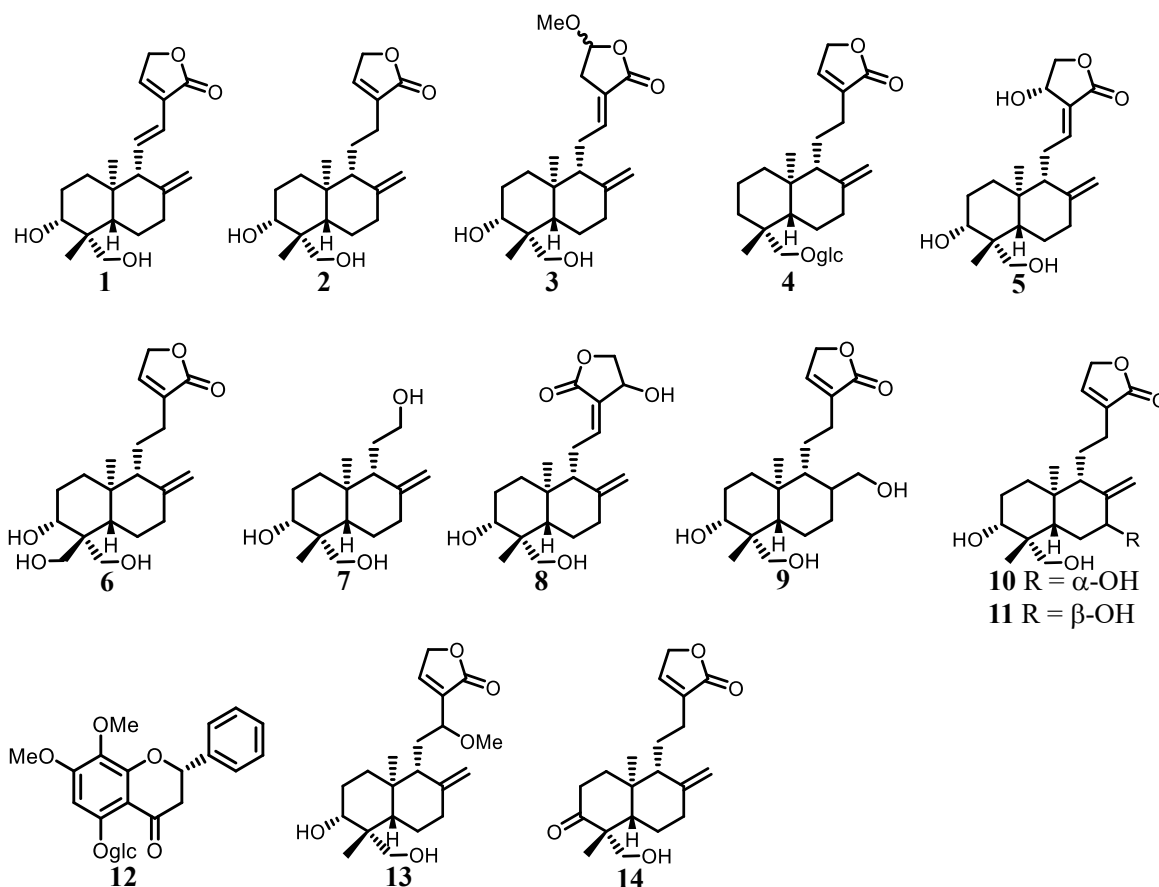


Figure 4-3-1 *Andrographis paniculata* から単離された化合物の構造

第 4 節 単離化合物の生物活性評価

化合物 **1-14** について、BMI1 プロモーター阻害活性について評価を行った。

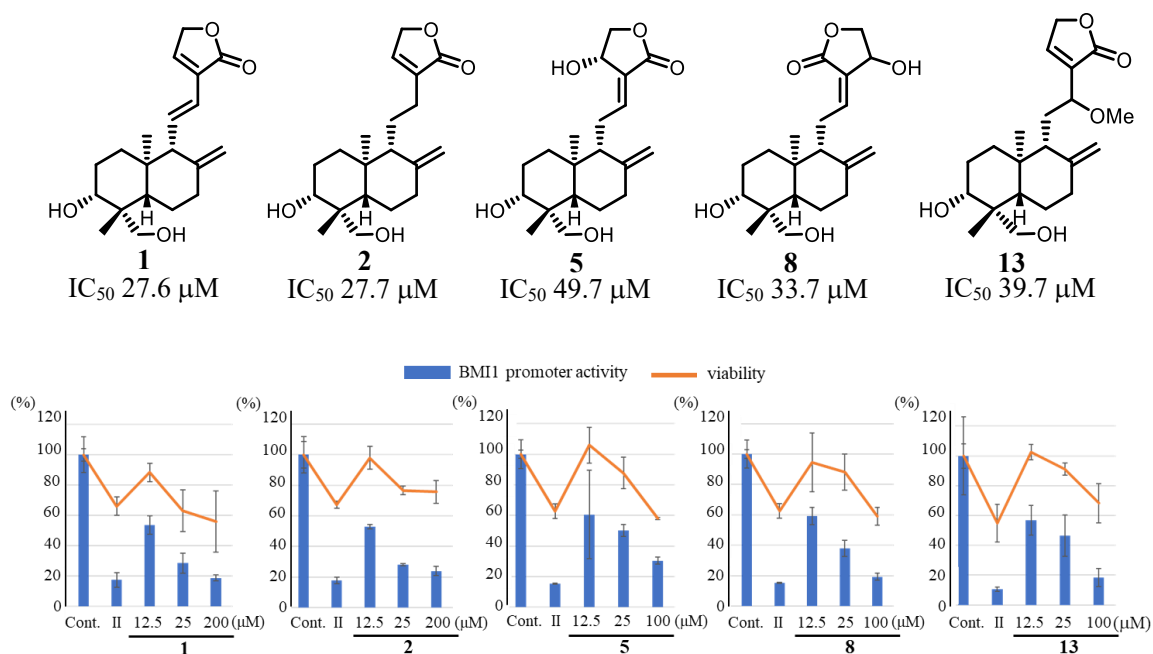


Figure 4-4-1 化合物 **1-14** の BMI1 プロモーター阻害活性についての評価

化合物 **1-14** の内、**1-2, 5, 8, 13** は BMI1 プロモーター阻害活性を示し、その IC₅₀ はそれぞれ 27.6 μM 、27.7 μM 、49.7 μM 、33.7 μM 、39.7 μM であった。化合物 **3-4, 5-7, 9-12, 14** は、IC₅₀ >100 μM であった。

第 5 節 化合物 1 の細胞毒性試験

BMI1 プロモーター阻害活性が最も強かった化合物 1 について、BMI1 が高発現していることで知られている 3 種のがん細胞 (DU145: ヒト前立腺がん細胞株、Huh7: ヒト肝がん細胞株、HCT116: ヒト大腸がん細胞株) および、比較対象として組織由来細胞 (HEK293: ヒト胎児腎細胞株) を用いて細胞毒性試験を行った。

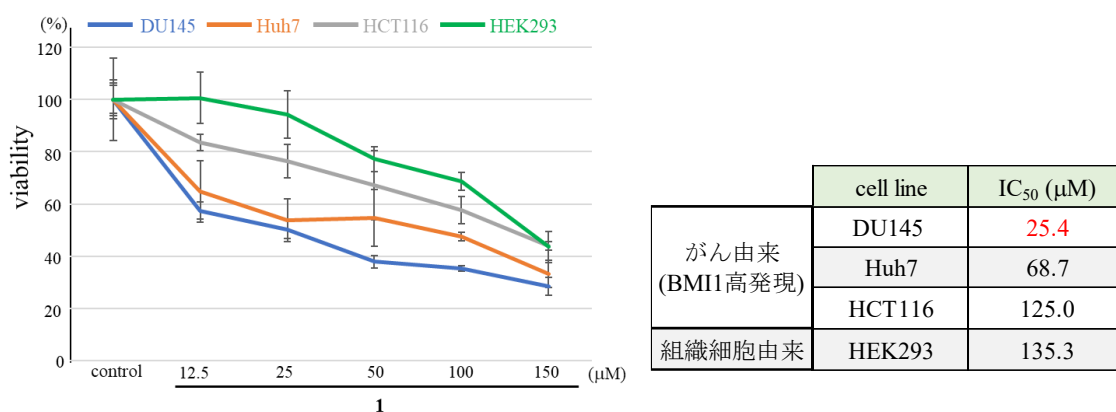


Figure 4-5-1 化合物 1 の細胞毒性試験

化合物 1 の細胞毒性試験の結果、1 は HEK293 に比べ、BMI1 が高発現している 3 種のがん由来細胞に対して強い毒性を示した。中でも、DU145 に対して最も強い毒性を示し、その IC₅₀ は 25.4 μM であった。そこで、化合物 1 が DU145 に対して、細胞毒性を示す機序解明を試みた。

第 6 節 化合物 1 の機序解明

次頁にて述べるが、化合物 1 は BMI1 タンパクを減少させた。そこで、BMI1 に関連する c-Myc、p14ARF に着目した。

c-Myc は BMI1 プロモーターを活性化することで、下流の *BMI1* 遺伝子の転写を促進する。その結果、BMI1 タンパクは増加し、ヒストンのモノユビキチン化を介して凝集させる。ヒストンの凝集は、下流の *p14ARF* 遺伝子の転写を抑制することで、がん抑制因子の p14ARF タンパクが減少させる。つまり、c-Myc は BMI1 の発現を制御することで、p14ARF の発現を抑制し、がん細胞の生存に寄与する¹⁰⁾。

化合物により、c-Myc の生成あるいは、BMI1 プロモーターへの結合が阻害されると、下流の BMI1 プロモーター、*BMI1* 遺伝子の活性は低下する。その結果、ヒストンは弛緩し、p14ARF は増加する。すなわち、c-Myc の阻害は、p14ARF の増加をもたらし、がん細胞における細胞毒性亢進に寄与する (Figure 4-6-1)。

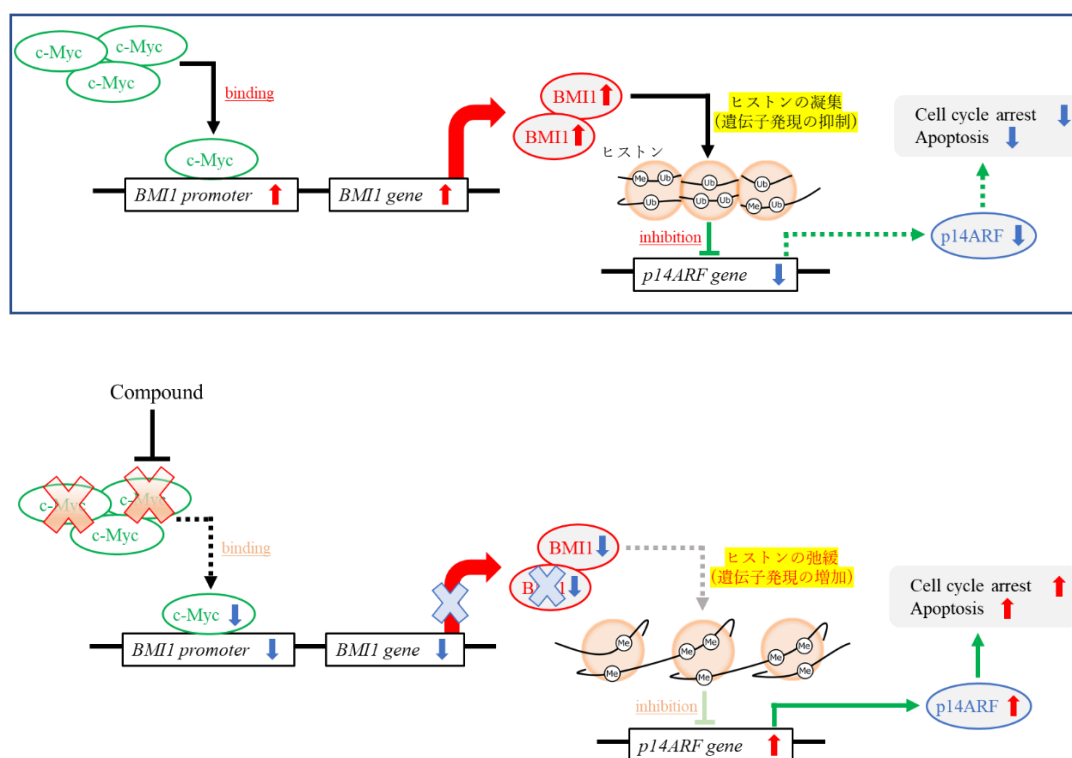


Figure 4-6-1 BMI1 に関連するタンパクおよび遺伝子

化合物 **1** を DU145 に作用させ、BMI1、c-Myc、p14ARF のタンパク量を Western blotting にて評価した (Figure 4-6-2)。その結果、化合物 **1** は DU145 の BMI1 を減少させた。また、BMI1 プロモーターを制御する c-Myc については減少し、細胞死に寄与する p14ARF は増加した。そのため、化合物 **1** が c-Myc を減少させることで、p14ARF を増加させ、DU145 に対して細胞毒性を示していることが示唆された。

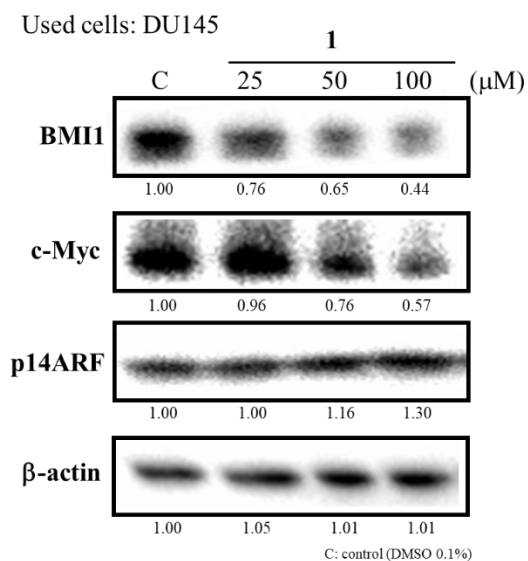


Figure 4-6-2 化合物 **1** の Western blotting

ただし、化合物 **1** の各濃度における **c-Myc** の減少率と **BMI1** の減少率は一致していない。

c-Myc が下流の **BMI1** プロモーターを制御するためには、**Max** と呼ばれるタンパクと **c-Myc-Max** 複合体の形成が必要不可欠である。この **c-Myc-Max** 複合体は、**BMI1** プロモーターの **E-box** 配列 (CACGTG) に結合することで **BMI1** プロモーターを活性化させる¹⁾。そのため、両者の減少率が一致するとは限らないが、化合物 **1** は **c-Myc** の生成の阻害に加えて、**c-Myc-Max** 複合体の形成阻害、あるいは **E-box** 配列への結合を阻害することが考えられる。しかし、50 μ M、100 μ M 濃度における **c-Myc** の減少率と **BMI1** の減少率に大きな差異は見られないため、化合物 **1** の **BMI1** を減少させる主要な機序は、**c-Myc** を減少させることに起因すると考えられる (Figure 4-6-2)。

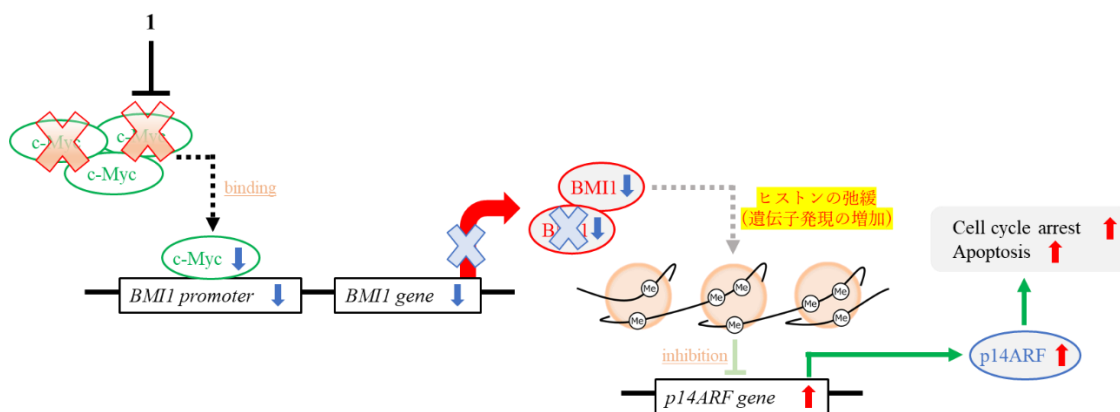


Figure 4-6-2 化合物 **1** の作用機序

[参考文献]

1. Jarukamjorn K., Nemoto N., *J. Health Sci.*, **2008**, *54*, 370-381.
2. Matsuda T., Kuroyanagi M., Sugiyama S., Umehara K., Ueno A., Nishi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1994**, *42*, 1216-1225.
3. Gan L., Zheng Y., Deng L., Sun P., Ye J., Wei X., Liu F., Yu L., Ye W., Fan C., Liu J., Zhang W., *Molecules*, **2019**, *24*, 2726.
4. Sun X., Yan H., Zhang Y., Wang X., Qin D., Yu J., *Molecules*, **2019**, *24*, 620.
5. Chen L., Qiu F., Wei H., Qu G., Yao X., *Helv. Chim. Acta.*, **2006**, *89*, 2654-2664.
6. Shen Y., Li L., Xiao W., Xu G., Lin Z., Zhao Q., Sun H., *J. Nat. Prod.*, **2006**, *69*, 319-322.
7. Chen L., Zhu H., Wang R., Zhou K., Jing Y., Qiu F., *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 852-855.
8. Cava M. P., Chan W. R., Stein R. P., Willis C. R., *Tetrahedron*, **1965**, *21*, 2617-2632
9. Kuroyanagi M., Sato M., Ueno A., Nishi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, *35*, 4429-4435.
10. Xu J., Li L., Shi P., Cui H., Yang L., *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 8231.
11. Zhou M., Xu Q., Huang D., Luo L., *Biomed. Rep.*, **2021**, *14*, 52.

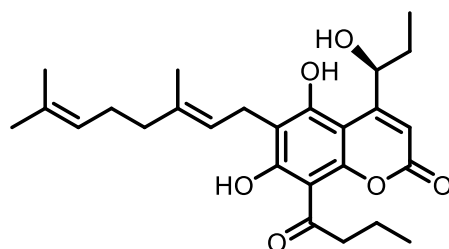
第 5 章 *Mammea siamensis* からの成分探索



Figure 5-1 *Mammea siamensis*

第 5 章では、第 3 章のスクリーニングにおいて、阻害活性 (50 $\mu\text{g/mL}$ においてルシフェリン発光を 60% 減少) を示した *Mammea siamensis* の分画、生物活性評価について述べる。

Mammea siamensis はテリハボク科の植物であり、本研究での使用部位は葉部である。タイなど東南アジアの湿気の多い熱帯地域に広く分布する常緑性の高木であり、花部を強壯剤、解熱剤、食欲増進剤として用いられている¹⁾。本植物の花部から単離されたクマリン *kayeassamin A* は、HL-60 (ヒト白血病細胞株) の Caspase-3/-8 を活性化することで細胞毒性を示すことが報告されている²⁾。



kayeassamin A

第 2 節 BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画

M. siamensis の葉部を MeOH にて抽出した。得られた MeOH 抽出物を 10 % MeOH に溶解し、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH にて液液分配を行った。各層を silica gel TLC、ODS TLC にて分析した (Figure 5-2-1)。また、BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、hexane 層、EtOAc 層に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 5-2-2)。

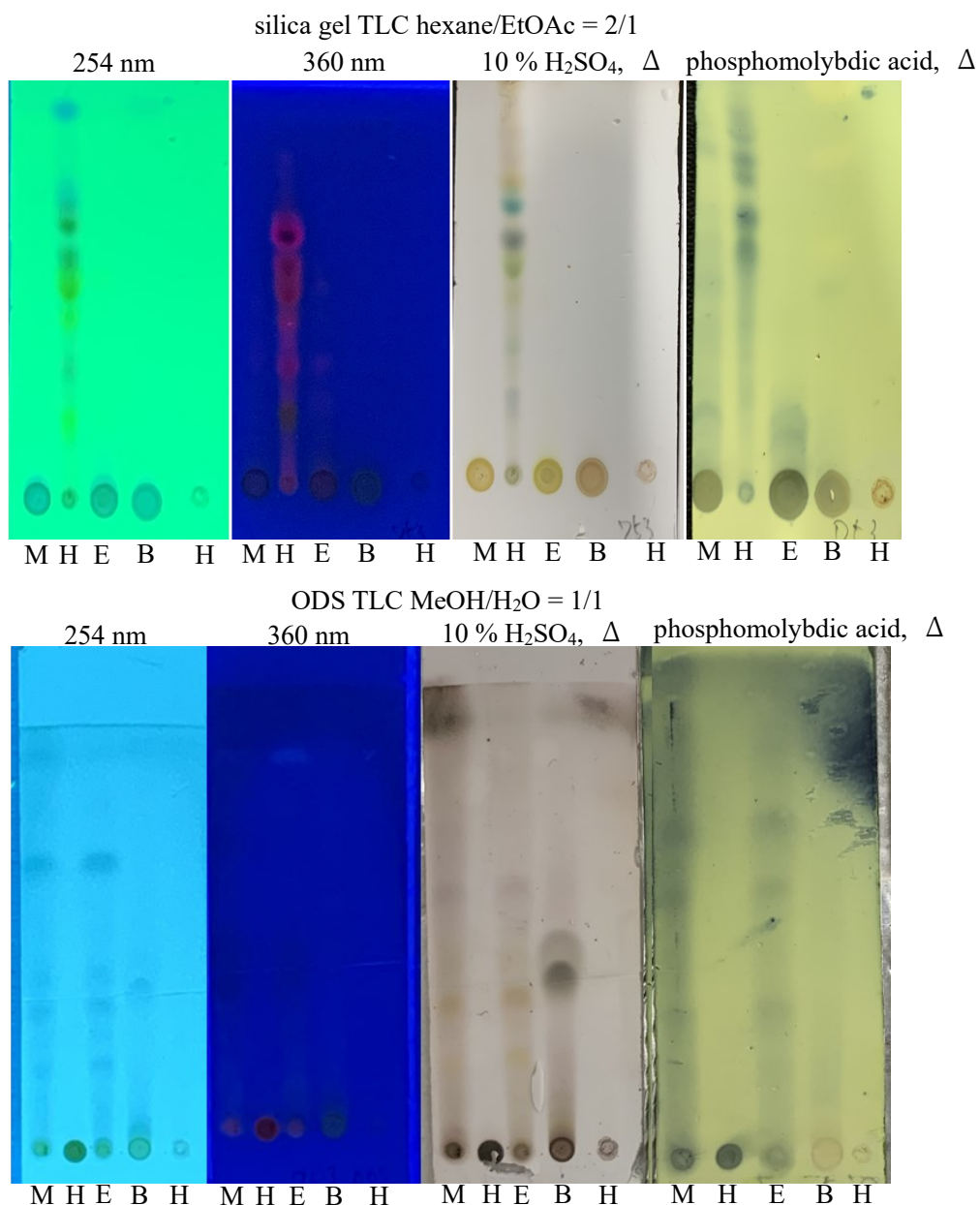


Figure 5-2-1 各層の silica gel TLC、ODS TLC

MeOH 抽出物: M hexane 層: H EtOAc 層: E 水飽和 BuOH 層: B 水層: W

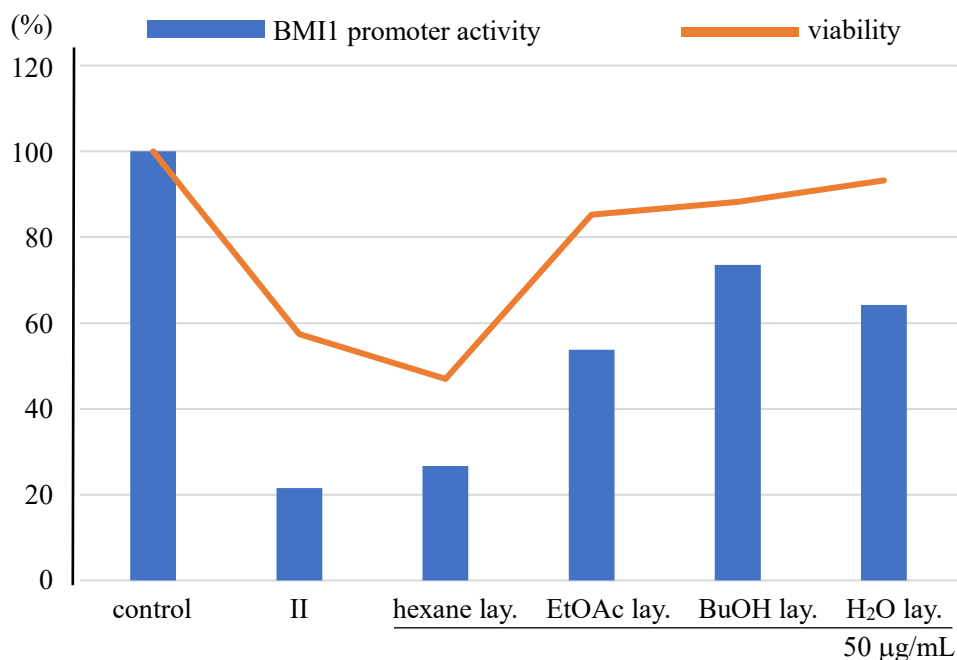


Figure 5-2-2 各層の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率
(control = DMSO 0.1 %, II = c-Myc inhibitor II 50 µg/mL)

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した hexane 層を Diaion HP-20 カラム (ϕ 40x200 mm) を用いて分画することで、1 series (1A: 1.63 g, 1B: 261 mg, 1C: 1.50 g) を得た。次に、主要成分である 1A を hexane/EtOAc/MeOH を用いた silica gel カラム (ϕ 70x250 mm) を用いて分画することで、2 series (2A-2U) を得た。1A から得られた 2 series を silica gel TLC で分析した (Figure 5-2-3)。また、得られた 2 series の内、十分なフラクション重量のある 2A、2C、2E、2I、2P、2S、2I の BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、2C、2E、2I に BMI1 プロモーター阻害活性が移行したことから、2C、2E、2I 周辺には BMI1 プロモーター阻害活性が存在していることが示唆された。(Figure 5-2-4)。

silica gel TLC

hexane/EtOAc = 10/3,
phosphomolybdic acid, Δ

CHCl₃/MeOH = 5/1,
phosphomolybdic acid, Δ

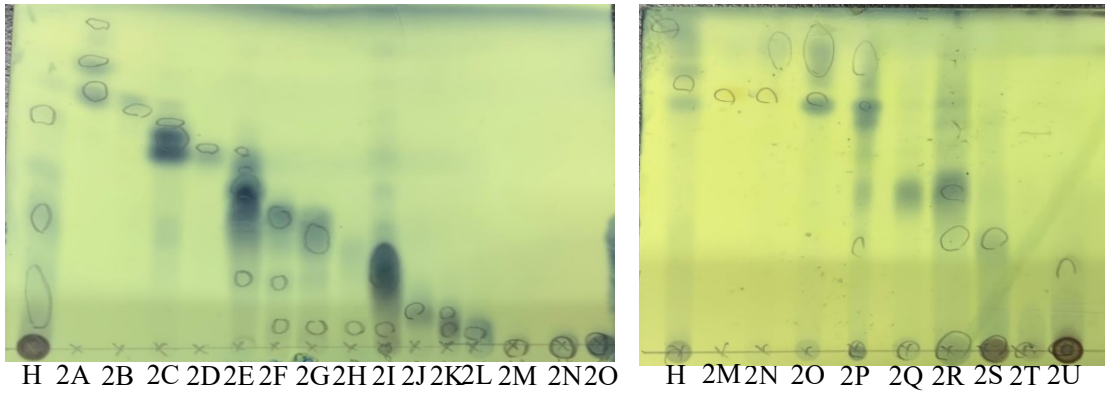


Figure 5-2-3 2 series の silica gel TLC

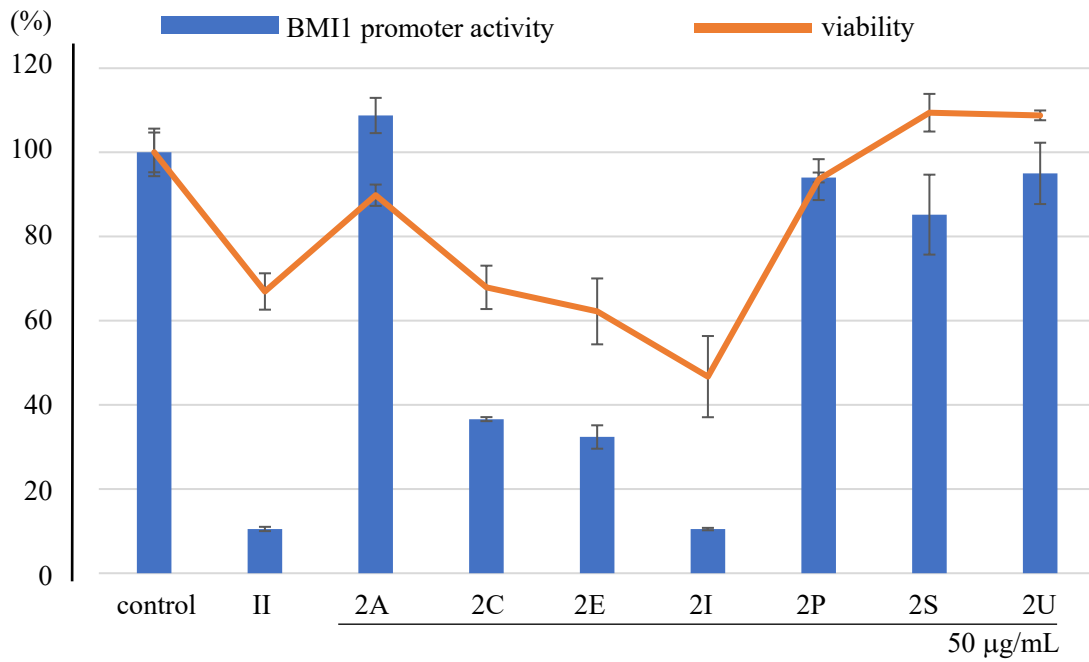


Figure 5-2-4 2 series の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

得られた 2J を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ を用いた silica gel カラム ($\phi 50 \times 140 \text{ mm}$) にて分画することで、3 series (3A-3H) を得た。2J から得られた 3 series を silica gel TLC で分析した (Figure 5-2-5)。

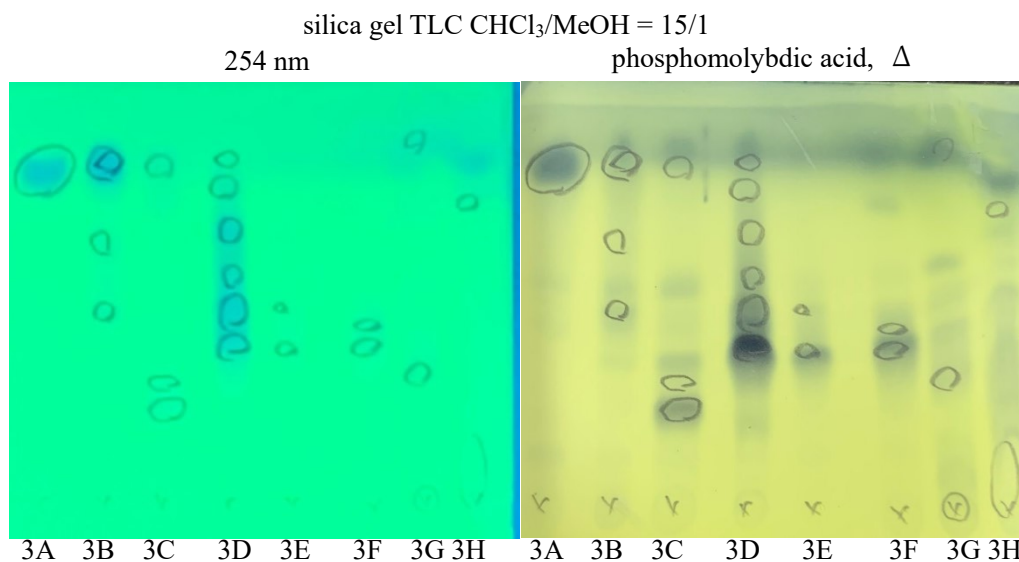


Figure 5-2-5 3 series の silica gel TLC

得られた 3D を HPLC (COSMOSIL Cholester, $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 12/13$) により分画することで、4 series (4A-4B) を得た (Figure 5-2-6)。4 series の内、4B を **15** (t_R 44.0, 2.0 mg) とした。

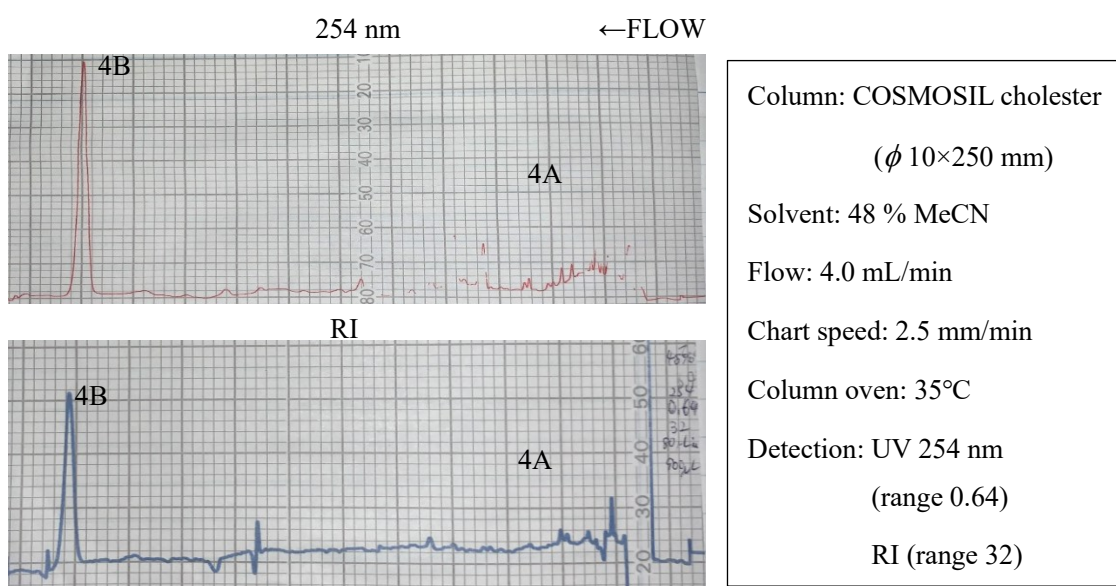


Figure 5-2-6 3D の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 2E を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeOH/H₂O = 7/3) を用いて分画することで、5 series (5A-5I) を得た (Figure 5-2-7)。5 series の内、5H を **16** (t_R 33.6, 8.3 mg) とした。

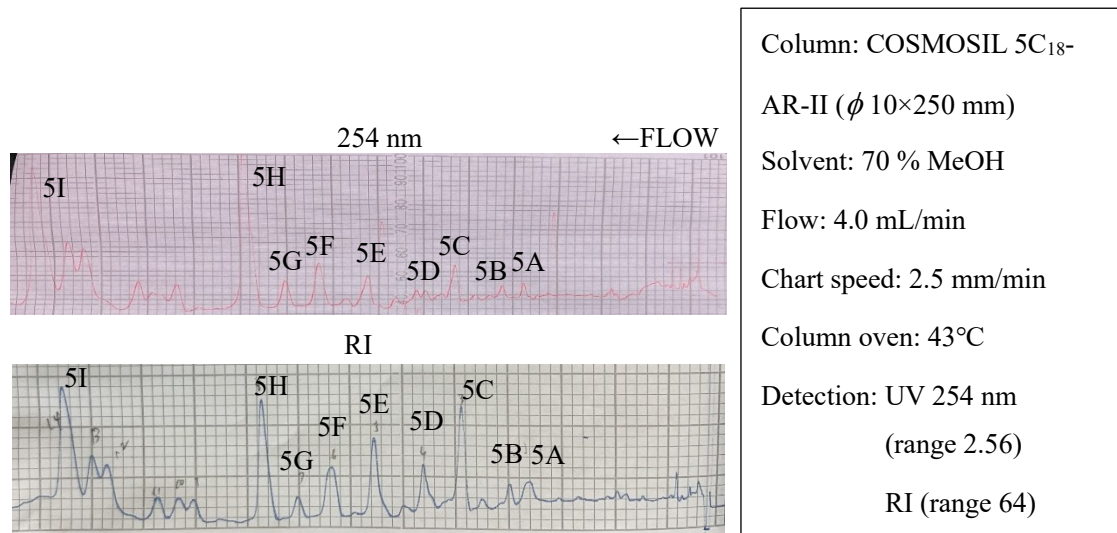


Figure 5-2-7 2E の HPLC による分画

得られた 5M を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O = 3/2) を用いて分画することで、6 series (6A-6B) を得た (Figure 5-2-8)。6 series の内、6A を **17** (t_R 20.8, 2.2 mg)、6B を **18** (t_R 22.4, 5.4 mg) とした。

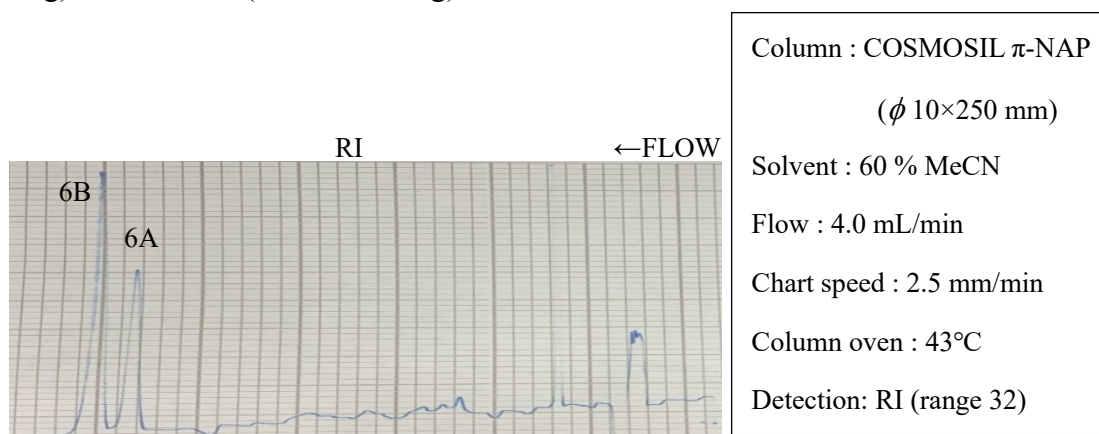


Figure 5-2-8 5M の HPLC による分画

得られた 5C を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O = 3/2) を用いて分画することで、7 series (7A-7B) を得た (Figure 5-2-9)。7 series の内、7B を **19** (t_R 21.0, 4.0 mg) とした。

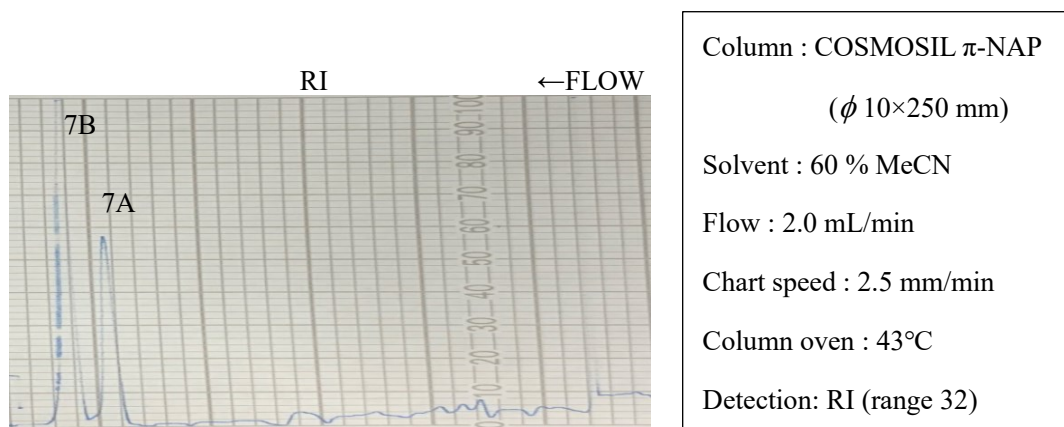


Figure 5-2-9 5C の HPLC による分画

得られた 2F、2G を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O = 23/27) により分画することで、8 series (8A-8K) を得た (Figure 5-2-10)。得られた 8 series の内、8I を **20** (t_R 48.8, 3.8 mg) とした。

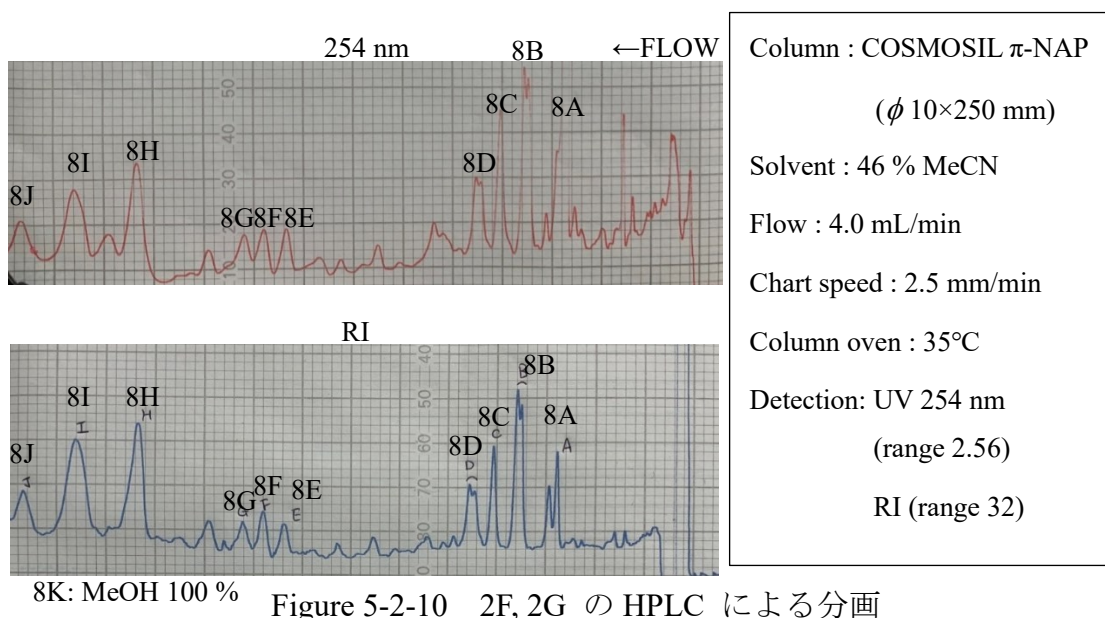


Figure 5-2-10 2F, 2G の HPLC による分画

得られた 8K を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN/H₂O = 24/25) を用いて分画することで、9 series (9A, 9B) を得た (Figure 5-2-11)。9 series の内、9A を **21** (t_R 9.6 min, 2.4 mg) とした。

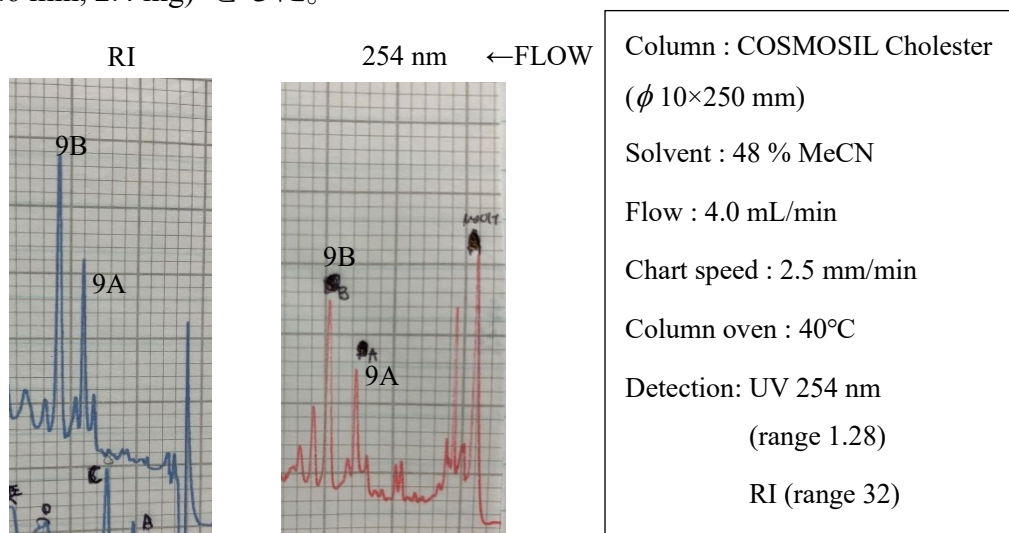


Figure 5-2-11 8K の HPLC による分画

得られた 2C、2D を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeCN/H₂O = 16/9) を用いて分画することで、10 series (10A-10I) を得た (Figure 5-2-12)。10 series の内、10A を **22** (t_R 11.2, 1.5 mg)、10B を **23** (t_R 32.0, 2.2 mg)、10D を **24** (t_R 49.6, 3.2 mg)、10H を **25** (t_R 68.4, 2.3 mg)、10I を **26** (t_R 72.0, 2.0 mg) とした。

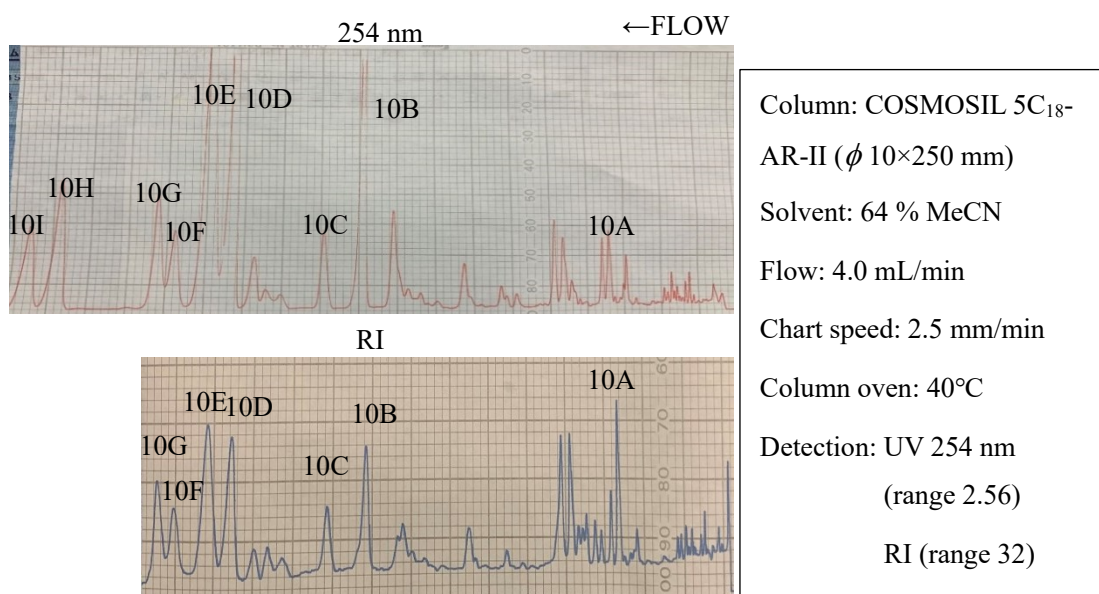


Figure 5-2-12 2C, 2D の HPLC による分画

10E を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O = 13/7) を用いて分画することで、11 series (11A-11B) を得た (Figure 5-2-13)。11 series の内、11B を **27** (t_R 29.2, 0.8 mg) とした。

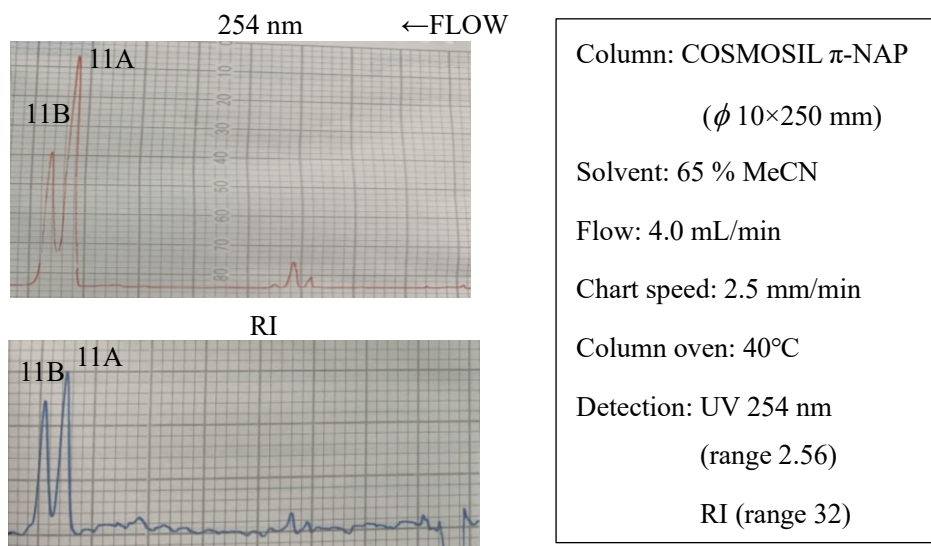
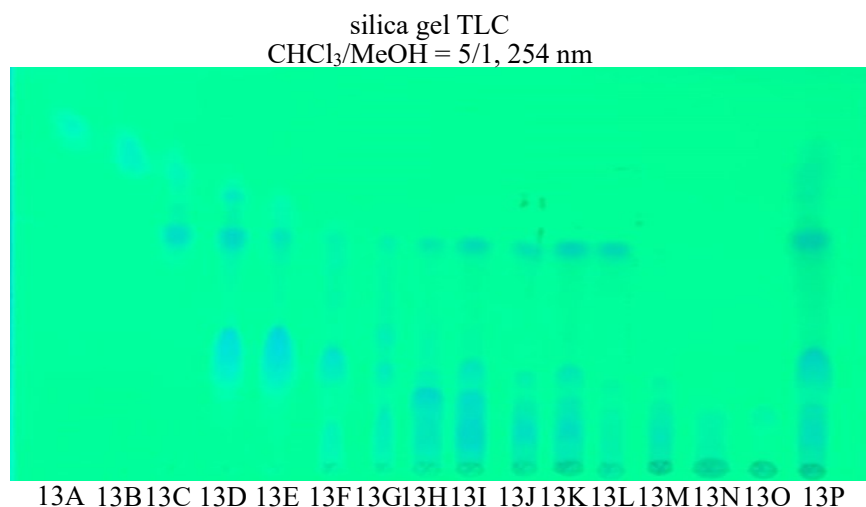


Figure 5-2-13 10E の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した EtOAc 層を Diaion HP-20 カラム (ϕ 40 \times 240 mm) を用いて分画することで、12 series (12A: 2.13 g, 12B: 543.9 mg) を得た。次に、主要成分である 12A を CHCl₃/MeOH を用いた silica gel カラム (ϕ 70 \times 200 mm) にて分画し、13 series (13A-13U) を得た。12A から得られた 13 series を silica gel TLC で分析した (Figure 5-2-14)。得られた 13 series の BMI1 プロモーター阻害活性の評価を行った結果、13A-13D に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 5-2-15)。



CHCl₃/MeOH = 5/1, 10 % H₂SO₄, Δ

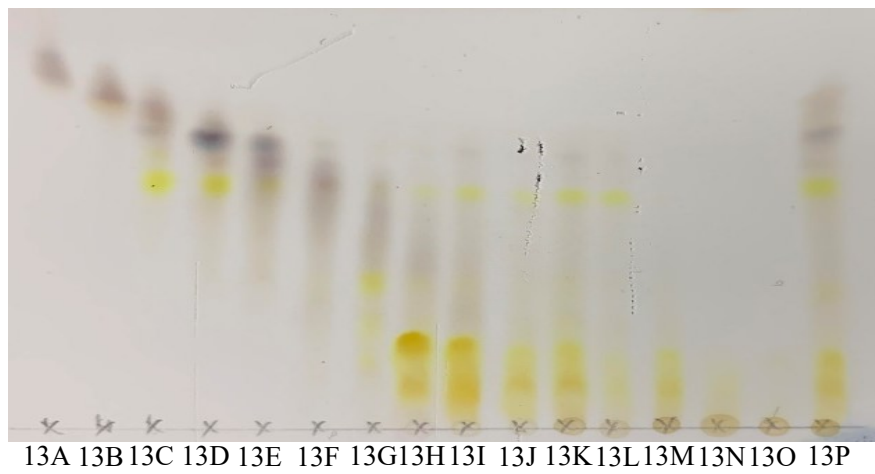


Figure 5-2-14 13 series の silica gel TLC

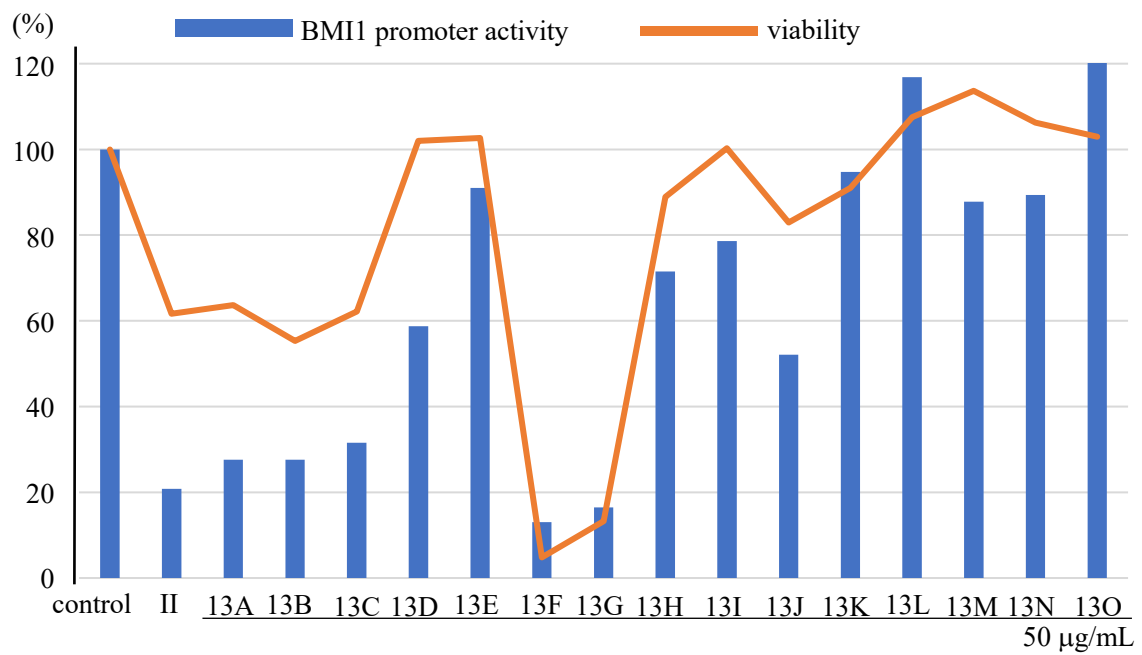


Figure 5-2-15 13 series の BMI1 プロモーター阻害活性と細胞生存率

13B を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeOH/H₂O = 1/1) を用いて分画することで、14 series (14A-14H) を得た (Figure 5-2-16)。14 series の内、14C を **28** (*t_R* 16.0, 1.7 mg)、14G を **29** (*t_R* 28.0, 3.8 mg) とした。

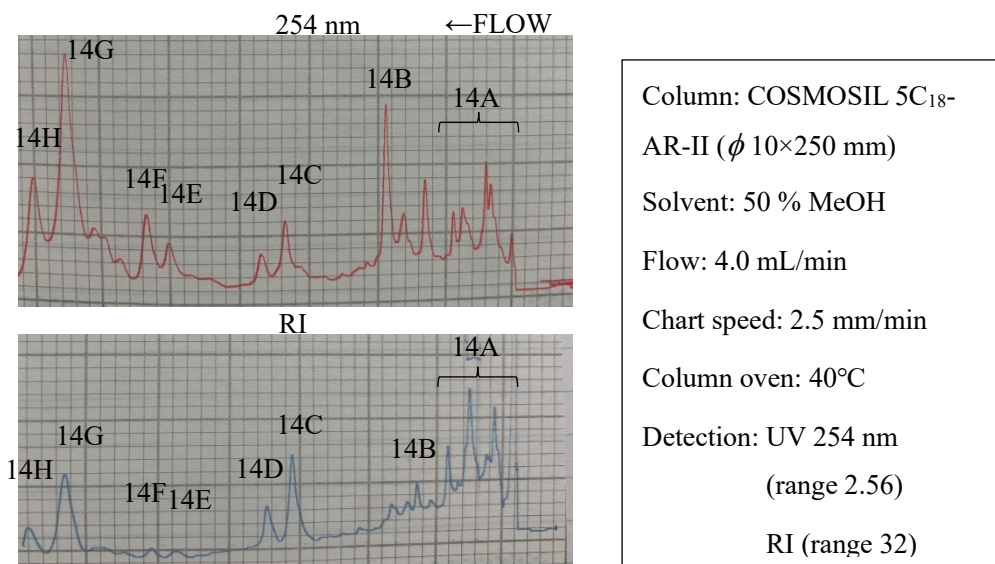


Figure 5-2-16 13B の HPLC による分画

13C を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeCN/H₂O = 3/7) を用いて分画することで、15 series (15A-15H) を得た (Figure 5-2-17)。15 series の内、15E を **30** (*t_R* 14.4, 9.5 mg)、15G を **31** (*t_R* 48.0, 30.0 mg) とした。

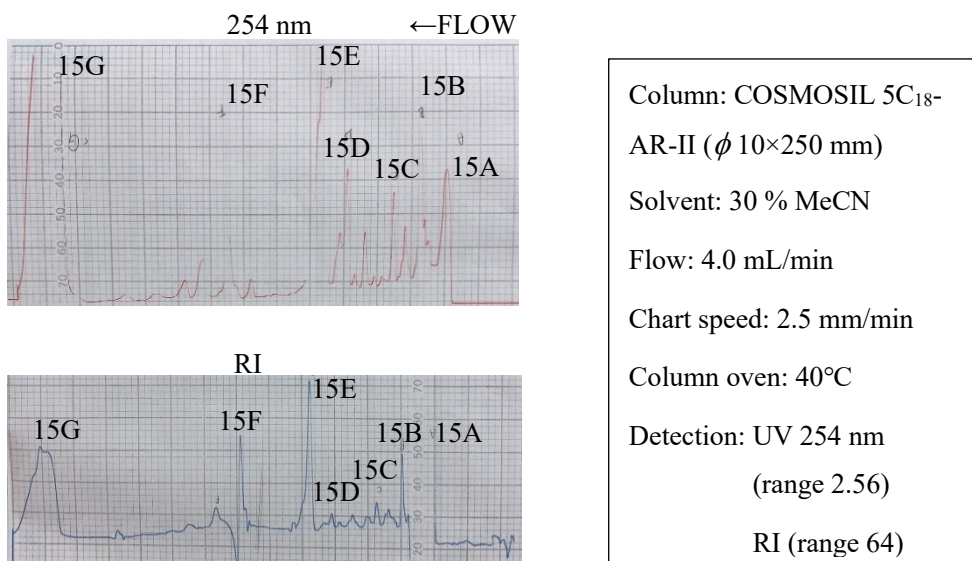


Figure 5-2-17 13C の HPLC による分画

第 3 節 *Mammea siamensis* から単離された化合物

Mammea siamensis の葉部より単離した化合物について NMR および MS スペクトルによる構造解析を実施し、既知ペプチド由来化合物 1 種 (*N*-benzoylphenylalaninyl-*N*-benzoylphenylalaninate (**15**))³⁾、新規クマリン 1 種 (**20**)、既知クマリン 11 種 (mammea A/AC cyclo F (**16**)⁴⁾, mammea B/AC cyclo F (**17**)⁵⁾, mammea A/AA cyclo F (**18**)⁵⁾, mammea E/BB cyclo F (**19**)⁶⁾, mammea E/BA cyclo F (**21**)⁶⁾, mammea B/BC cyclo F (**22**)⁷⁾, mammea E/BC cyclo D (**23**)⁸⁾, mammea E/BB cyclo D (**24**)⁹⁾, mammea A/AB cyclo D (**25**)¹⁰⁾, mammea A/AA cyclo D (**26**)⁴⁾, mammea B/AC cyclo D (**27**)¹¹⁾、既知フラボノイド 4 種 (naringenin (**28**)¹²⁾, apigenin (**29**)¹³⁾, luteolin (**30**)¹⁴⁾, amentoflavone (**31**)¹²⁾) を得た (Figure 5-3-1)。

化合物 **20** は新規化合物であったことから、次節に詳細を述べる。化合物 **19**, **21** は化学的誘導体として報告されていたが⁶⁾、天然物からの単離は初めてであり、スペクトルデータを初報告した。

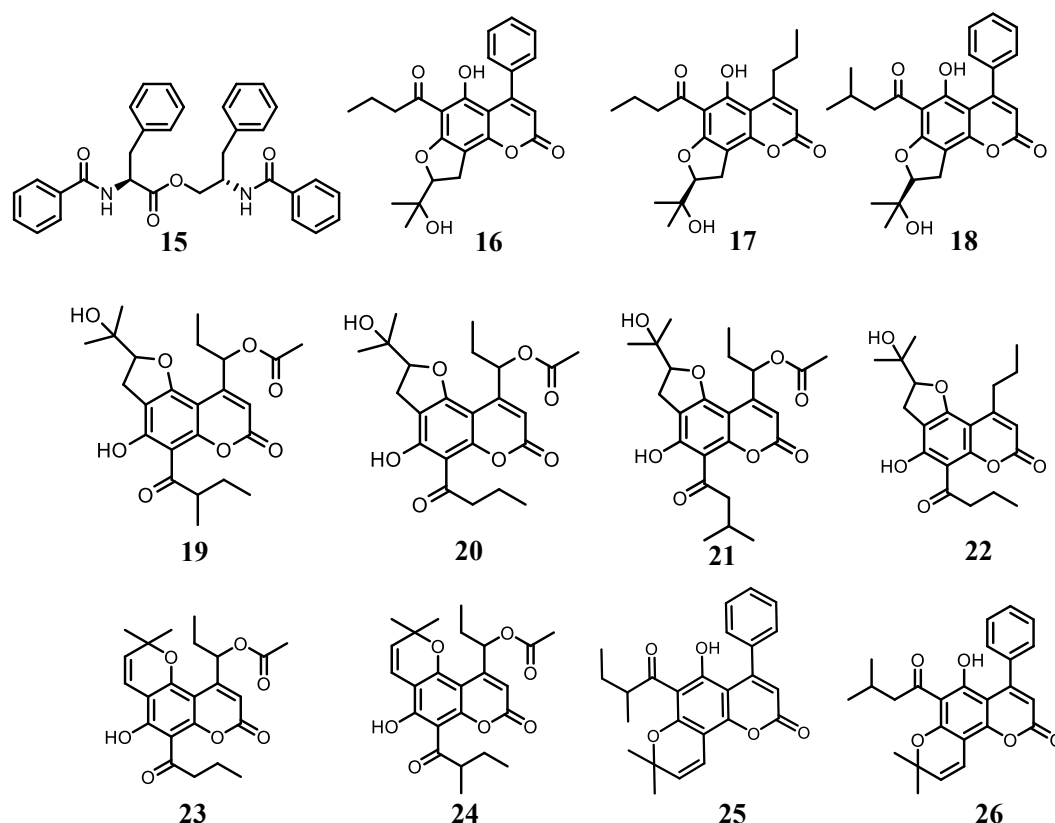
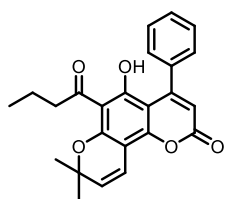
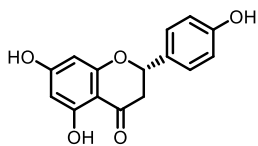


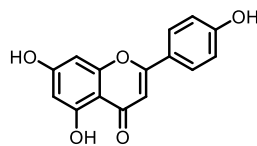
Figure 5-3-1 *Mammea siamensis* から単離された化合物の構造



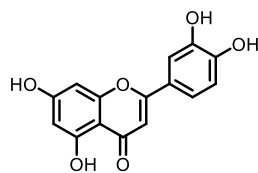
27



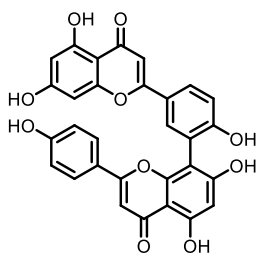
28



29



30



31

Figure 5-3-1 continued

第 4 節 化合物 20 の構造解析

化合物 20 は白色粉末であり、HR-ESI-MS にて m/z 455.1687 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{23}H_{28}O_8Na$, 455.1682) であったことから、分子式を $C_{23}H_{28}O_8$ であると決定した。IR スペクトルからヒドロキシ基 (3320 cm^{-1})、エステルまたはケトン ($1635, 1610\text{ cm}^{-1}$) の存在が示唆された。

$^1\text{H-NMR}$ から、5 つのメチル基 [δ_{H} 1.04 (3H, overlap, $\text{H}_3\text{-4}''$), 1.04 (3H, overlap, $\text{H}_3\text{-3}'$), 1.29 (3H, s, $\text{H}_3\text{-6}''$), 1.38 (3H, s, $\text{H}_3\text{-5}''$), 2.17 (3H, s, $\text{H}_3\text{-2}'''$)], 1 つのヒドロキシ基 [δ_{H} 14.18 (1H, s, 7-OH)] の存在が示唆された (Figure 5-4-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ から、1 つのケトン基 [δ_{C} 206.2 (C-1'')], 芳香環 [δ_{C} 97.2 (C-4a), 161.4 (C-5), 110.2 (C-6), 163.3 (C-7), 105.2, (C-8), 157.5 (C-8a)], エステル [δ_{C} 170.2 (C-1''')] の存在が示唆された (Figure 5-4-2)。

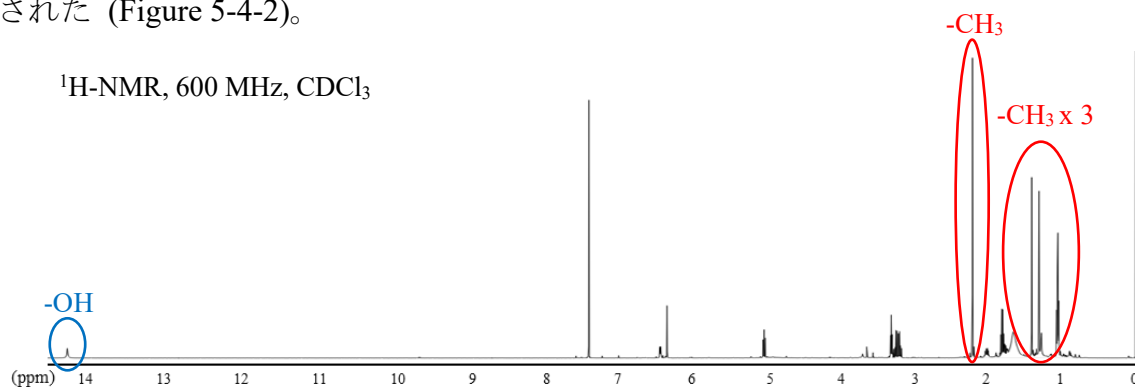


Figure 5-4-1 化合物 20 の $^1\text{H-NMR}$

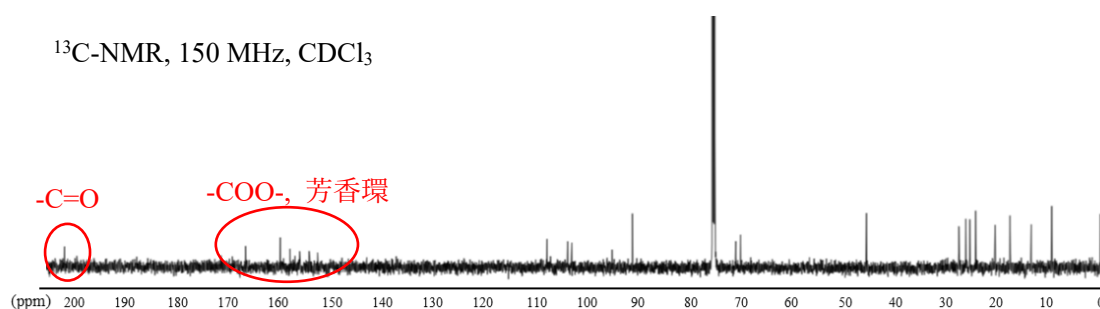


Figure 5-4-2 化合物 20 の $^{13}\text{C-NMR}$

^1H - ^1H COSY より、 $\text{H}_1\text{-1}'$ (δ_{H} 6.31)/ $\text{H}_2\text{-2}'$ (δ_{H} 1.98, 1.77), $\text{H}_2\text{-2}'$ / $\text{H}_3\text{-3}'$ (δ_{H} 1.04), $\text{H}_1\text{-2}''$ (δ_{H} 4.93)/ $\text{H}_2\text{-3}''$ (δ_{H} 3.14), $\text{H}_2\text{-2}'''$ (δ_{H} 3.25)/ $\text{H}_2\text{-3}'''$ (δ_{H} 1.77), $\text{H}_2\text{-3}'''$ / $\text{H}_3\text{-4}'''$ への相関が観測され、HMBC の解析では、 $\text{H}_1\text{-3}$ (δ_{H} 6.22) から C-2 (δ_{C} 159.4), $\text{C-1}'$ (δ_{C} 72.6), C-4a へ、 $\text{H}_3\text{-2}''''$ から $\text{C-1}''''$ へ、 $\text{H}_1\text{-1}'$ から C-4 への相関が観測されたことから、部分構造 **B** を推定した。また、HMBC の解析により、 $\text{H}_2\text{-3}''$ から C-5 , C-6 , C-7 へ、 $\text{H}_3\text{-5}''$, $6''$ から $\text{C-2}''$ (δ_{C} 93.2) へ、 $\text{C-4}''$ (δ_{C} 71.6), $\text{H}_2\text{-2}''''$ から $\text{C-1}''''$ (δ_{C} 206.2) へ、 7-OH から C-6 , C-7 , C-8 への相関が観測されたことから、部分構造 **A** を推定した。

しかし、部分構造 **A**, **B** 間の HMBC 相関は確認できなかった。そこで、遠隔スピン結合定数を変更した HMBC¹⁵⁾ を測定したが、相関は得られなかった。

部分構造 **A**, **B** の連結方法は 2 通り考えられ、推定される 2 つの構造間において、クマリン骨格上の ^{13}C ケミカルシフト値 (特に $4a$ 位, $8a$ 位) が異なることが予想された。そこで、側鎖を省略し簡略化したモデル化合物 (**a**, **b**) の ^{13}C ケミカルシフト値を理論計算により推定し、実測値と比較した (Figure 5-4-3)。

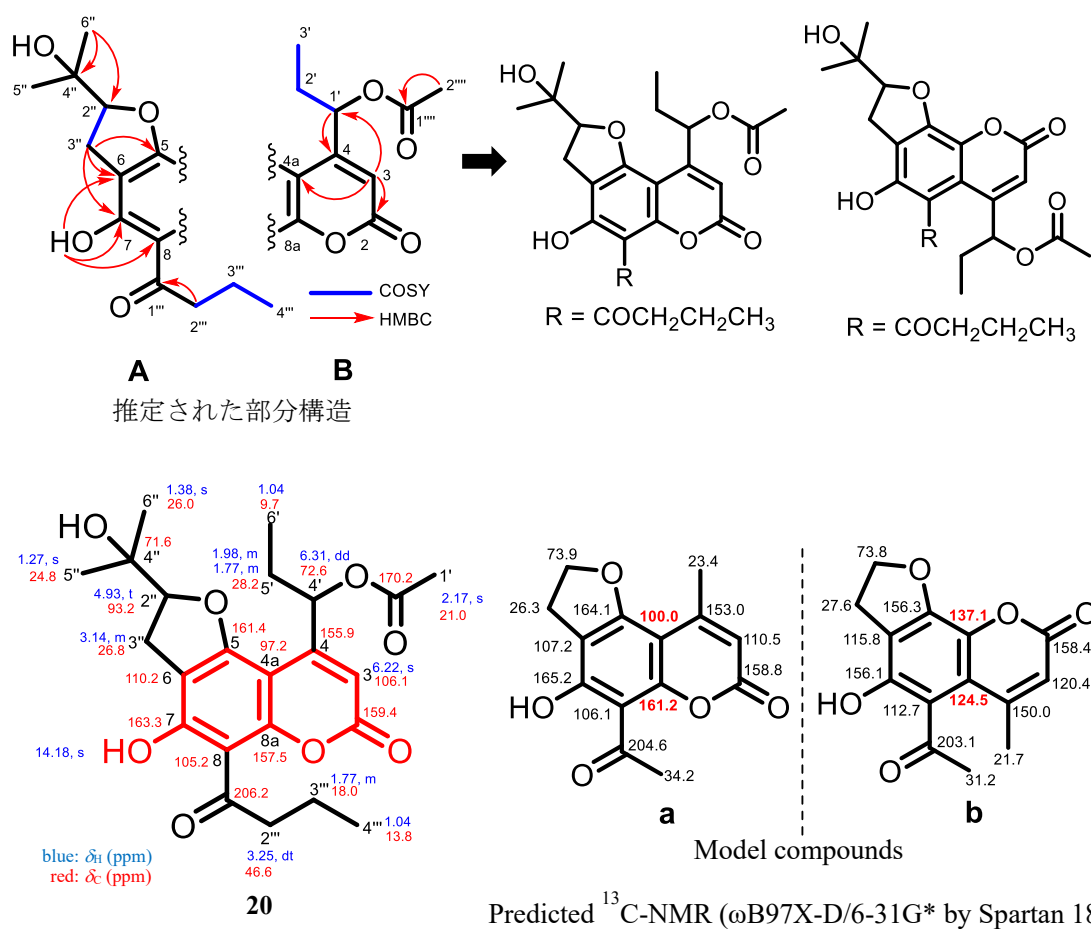


Figure 5-4-3 推定できる部分構造 **A**, **B** とモデル化合物 **a**, **b**

計算の結果、化合物 **20** の ^{13}C ケミカルシフト値の実測値 $\delta_{\text{C}4\text{a}}$: 97.2, 8a: 157.5 に対して、モデル化合物 **a** の ^{13}C ケミカルシフト値は $\delta_{\text{C}4\text{a}}$: 100.0, 8a: 161.2 と近い値を示し、その他クマリン骨格上の ^{13}C ケミカルシフト値もよい一致を示したことから、化合物 **20** の構造の決定に至った。

第 5 節 化合物 17, 18 の理論計算による立体配置の決定

化合物 17 は、第 6 節にて最も強い BMI1 プロモーター阻害活性を示した。化合物 18 は、第 7 節にて Huh7 に対して最も強い細胞毒性を示した。いずれもフラン環の 2 位に不斉中心を持つが、既報⁵⁾ではその立体配置は未決定であった。そこで、化合物 17, 18 の CD スペクトルと、側鎖を省略し、簡略化したモデル化合物 c, d の CD スペクトルを理論計算にて推定し、比較した (Figure 5-5-1, 2)。

モデル化合物 c は、計算ソフト Spartan 18 を用いて安定配座を導き、Gaussian 16¹⁶⁾にて CD スペクトルを計算した。化合物 17 は、275 nm に正のコットン効果が観察され、モデル化合物 S-c もまた 270 nm に正のコットン効果が観察されたことから、化合物 17 のフラン環 2 位の不斉中心は S 体であると決定した (Figure 5-5-1)。

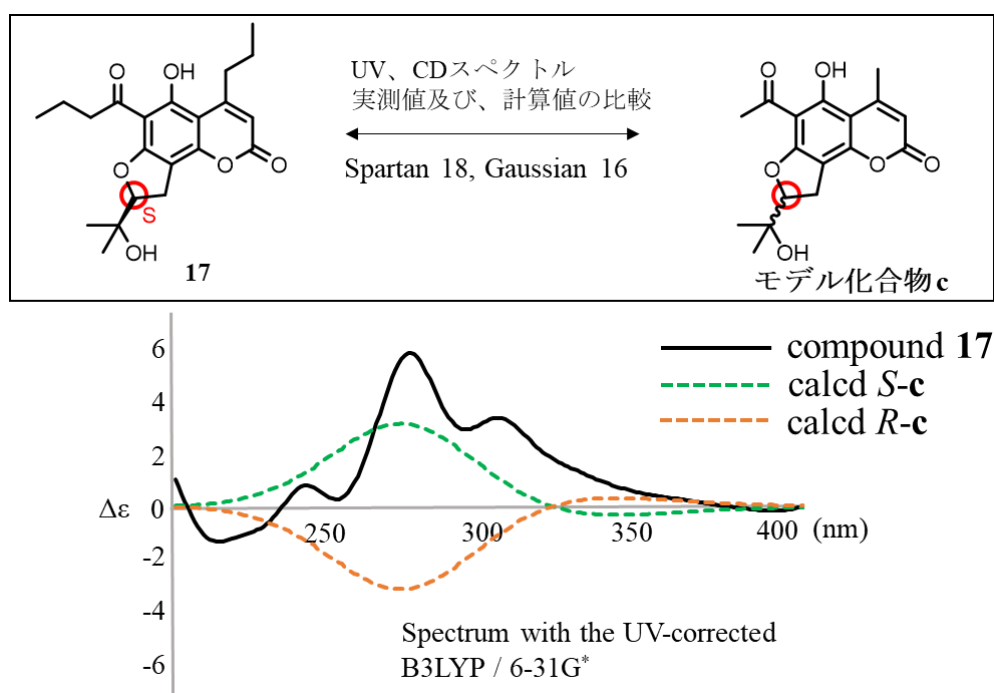


Figure 5-5-1 化合物 17 と モデル化合物 c の CD スペクトルの比較

モデル化合物 **d** もモデル化合物 **c** と同様に、CD スペクトルを計算し、化合物 **18** の CD スペクトルと比較した。化合物 **18** は、297 nm に正のコットン効果、240 nm に負のコットン効果が観察され、モデル化合物 *S-d* もまた 303 nm に正のコットン効果、255 nm に負のコットン効果が観察されたことから、化合物 **18** のフラン環 2 位の不斉中心は *S* 体であると決定した (Figure 5-5-2)。

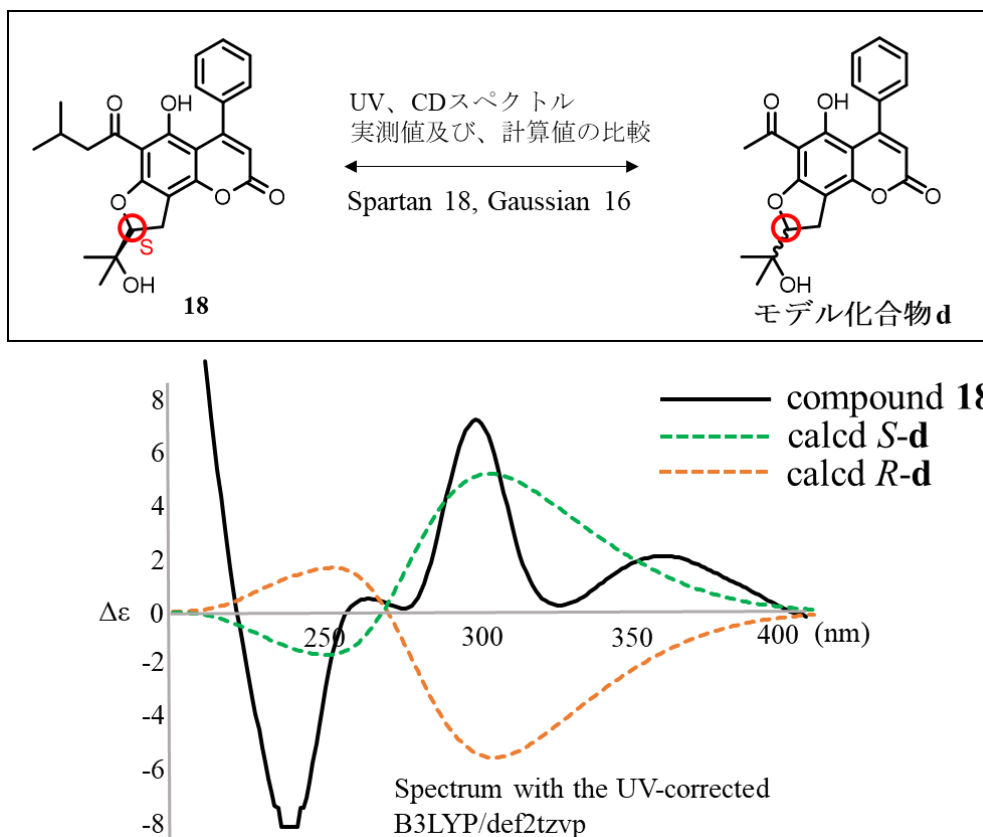


Figure 5-5-2 化合物 **18** と モデル化合物 **d** の CD スペクトルの比較

第 6 節 単離化合物の生物活性評価

単離された化合物 **15-31** について、BMI1 プロモーター阻害活性について評価を行った。

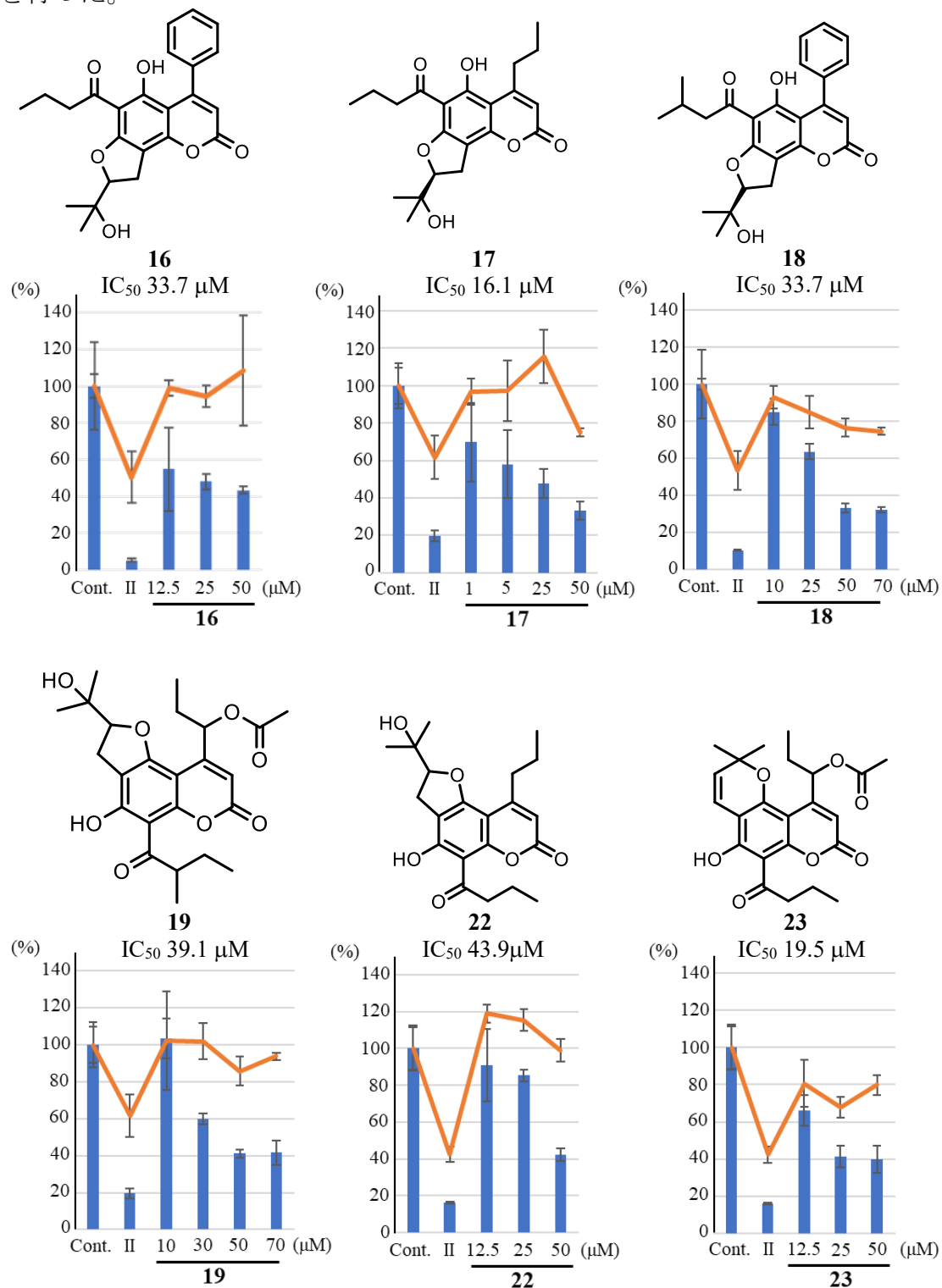


Figure 5-6-1 化合物 **15-31** の BMI1 プロモーター阻害活性についての評価

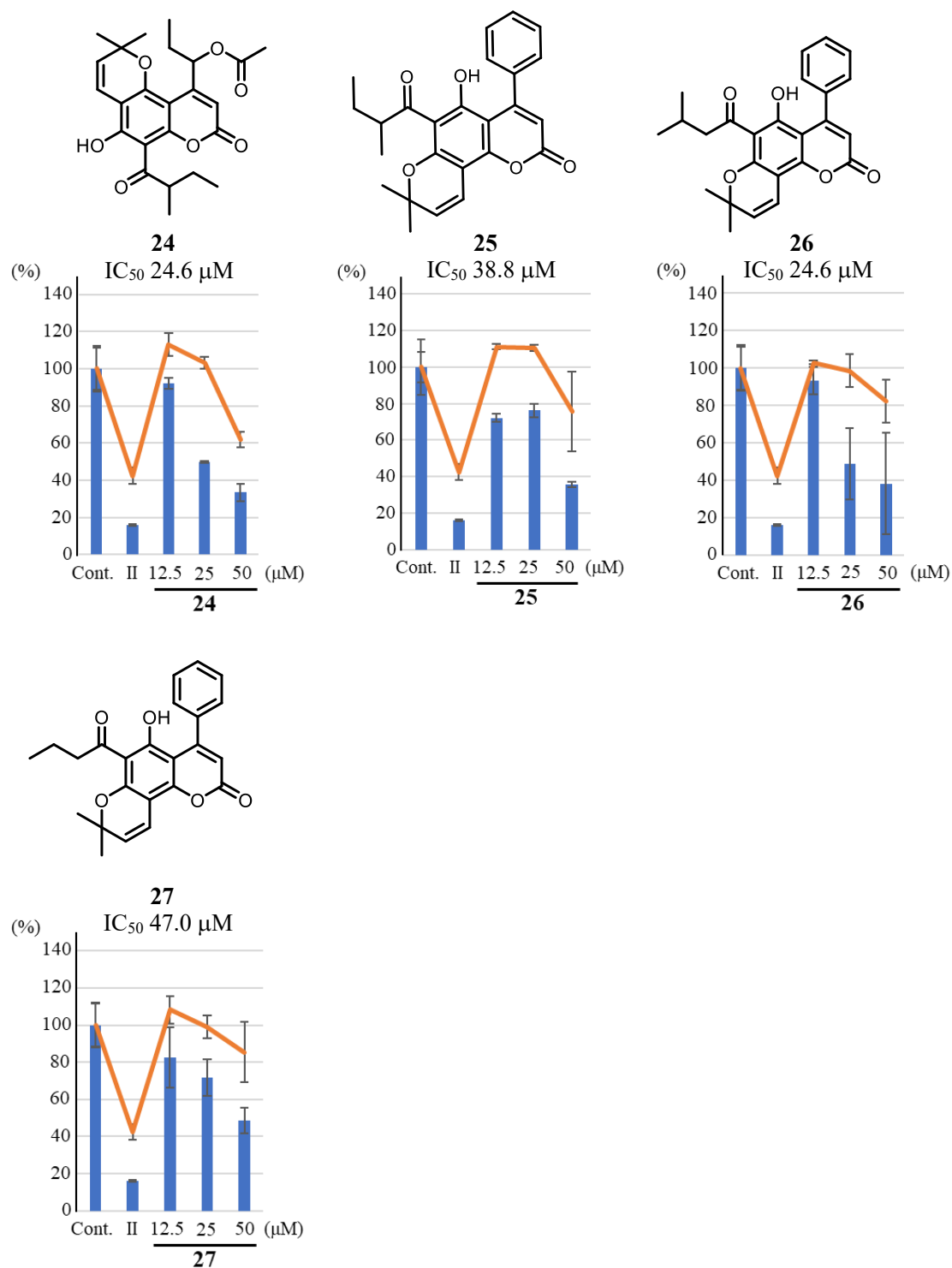


Figure 5-6-1 continued

化合物 **15-31** の内、**16-19, 22-27** は BMI1 プロモーター阻害活性を示し、その IC₅₀ はそれぞれ 33.7 µM、16.1 µM、33.7 µM、39.1 µM、43.9 µM、19.5 µM、24.6 µM、38.8 µM、24.6 µM、47.0 µM であった。化合物 **20-21** は、IC₅₀ >50 µM、**15, 28-31** は、IC₅₀ >100 µM であった。

第 7 節 化合物 16-19, 22-27 の細胞毒性試験

BMI1 プロモーター阻害活性を示した化合物 16-19, 22-27 について細胞毒性試験を行った。この内、化合物 18, 23, 26 は Huh7 に細胞毒性を示した。化合物 18 は、Huh7 のほかにも HCT116 にも細胞毒性を示した (Figure 5-7-1)。

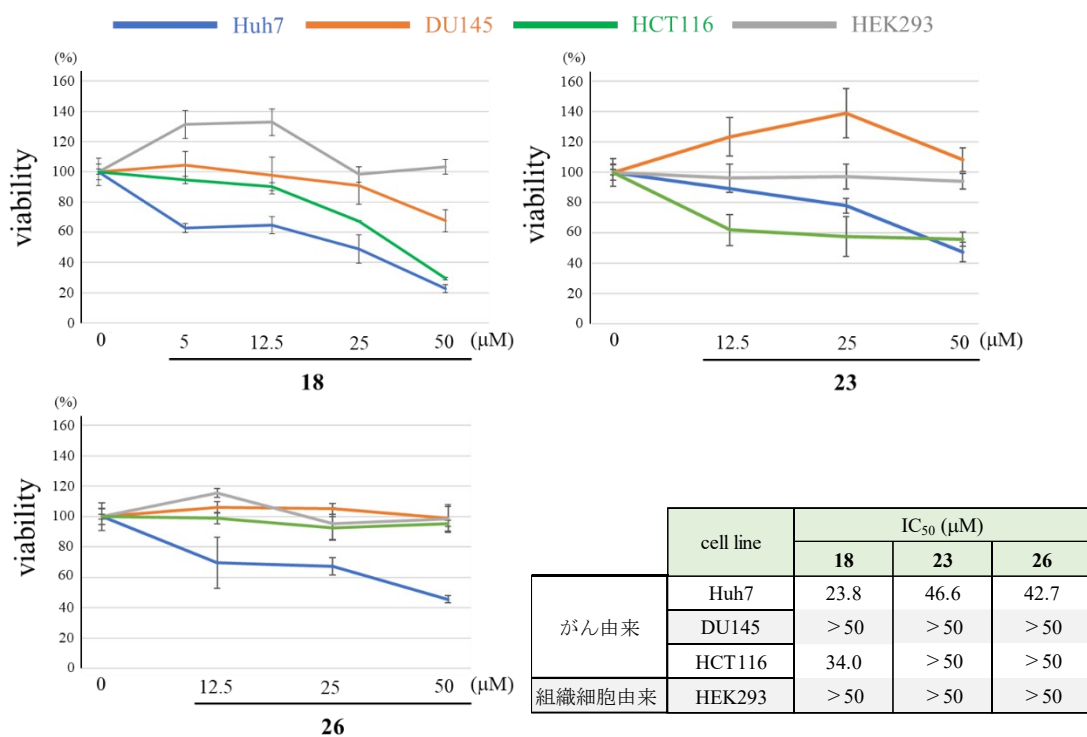


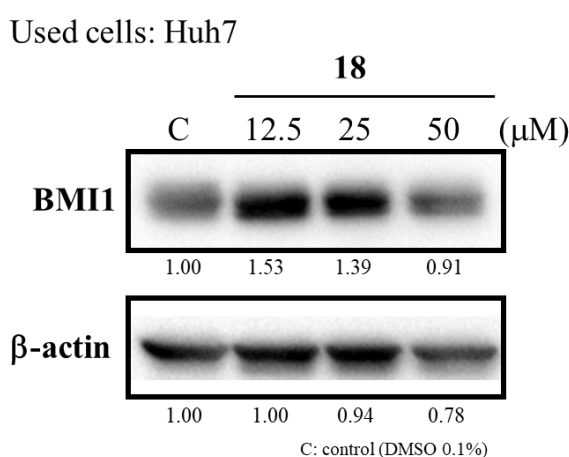
Figure 5-7-1 化合物 18, 23, 26 の細胞毒性試験

第 8 節 化合物 18 の機序解明

8-1. BMI1 タンパクについての Western blotting

化合物 18 は、Huh7 に対して IC₅₀ 23.8 μM の細胞毒性を示した。そこで、化合物 18 が Huh7 に細胞毒性を示す機序解明を試みた。

化合物 18 を Huh7 に作用させ、BMI1 タンパク量を測定した (Figure 5-8-1-1)。



	Control	12.5 μM	25 μM	50 μM
BMI1/β-actin	1.00	1.53	1.47	1.16

Figure 5-8-1-1 化合物 18 の BMI1 についての Western blotting

化合物 18 は、50 μM の濃度において BMI1 タンパク量の減少は認められなかった。つまり、化合物 18 は BMI1 プロモーターアッセイに対して活性を示した一方で、BMI1 タンパク量を減少させなかった。しかし、細胞毒性試験の結果において、組織細胞由来の HEK293 に対して細胞毒性を示さない一方で、がん由来の Huh7 に対して細胞毒性を示した。すなわち、化合物 18 は、がん細胞特異的に活性を示すことが示唆された。そこで、がんに関連するシグナルの 1 つである、Wnt シグナル関連タンパクについて検討を行った。

8-2. Wnt シグナル関連タンパクについての Western blotting

Wnt シグナルは、がん細胞の生存、増殖に関わるシグナルとして知られている¹⁷⁾。Wnt シグナルが活性化しているがん細胞の細胞質内では、 β -catenin が分解されず過剰に蓄積する。この β -catenin は核内に移行し、TCF/LEF に結合することで、下流のがん原遺伝子の転写を活性化する¹⁸⁾ (Figure 5-8-2-1)。

そこで、Wnt シグナル関連タンパクである β -catenin, cyclin D1 について、Huh7 を用いた Western blotting を行った (Figure 5-8-2-2)。

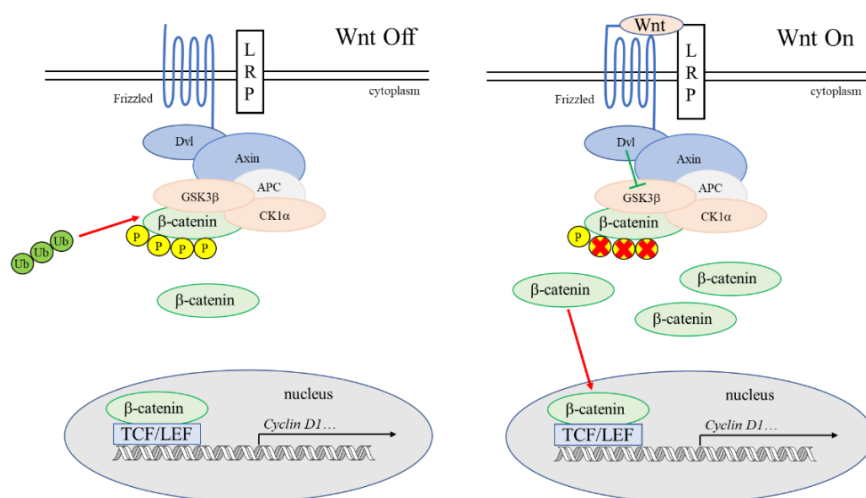


Figure 5-8-2-1 Wnt シグナル

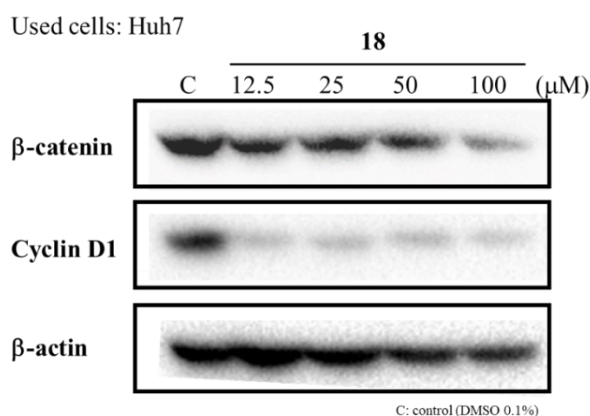


Figure 5-8-2-2 化合物 **18** の β -catenin, cyclin D1 についての Western blotting

その結果、化合物 **18** 添加により、 β -catenin、cyclin D1 は減少した。Cyclin D1 は細胞周期の S 期から G1 期進行に必須のタンパクである¹⁹⁾ ため、化合物 **18** は cyclin D1 を減少させることで、Huh7 に対して細胞毒性を示すことが示唆された。

8-3. Wnt シグナルについてのルシフェラーゼアッセイ

化合物 **18** の Wnt シグナル活性の状態 (TCF/LEF/ β -catenin 転写活性) についても検討を行うため、この活性を評価することができるアッセイ系を用いた。本アッセイ系は、 β -catenin が結合する TCF/LEF 結合領域下流に *Luciferase* 遺伝子を導入したプラスミドをヒト胎児腎細胞株 (293 細胞) に安定導入した STF/293 細胞である²⁰⁾。すなわち、TCF/LEF への β -catenin 結合量によって、*Luciferase* タンパク質の生成量が増減するため、*Luciferin* の発光強度により、Wnt シグナルの活性を評価することができる。

本アッセイ系にて活性評価を行った結果、化合物 **18** は活性を示し、その IC₅₀ は 26.3 μ M であった (Figure 5-8-3-1)。

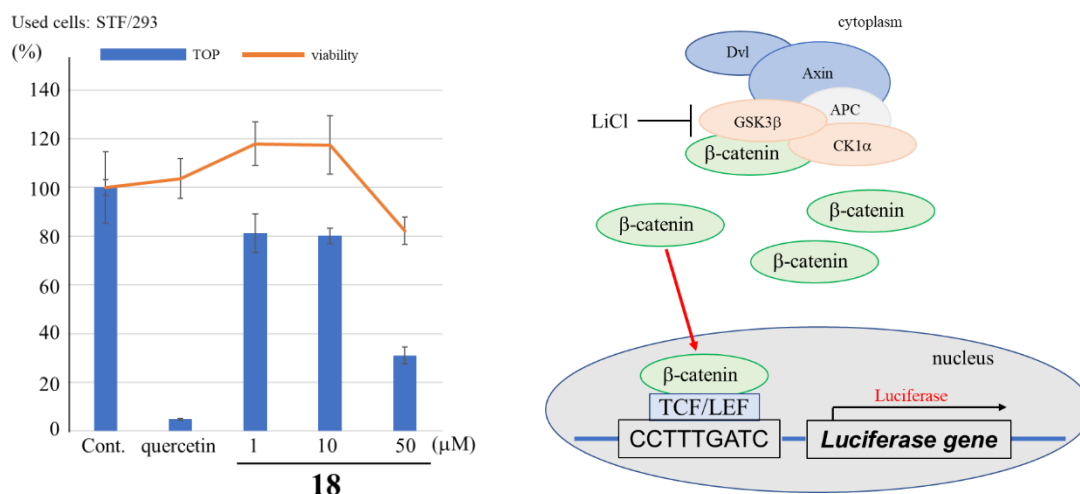


Figure 5-8-3-1 化合物 **18** の Wnt シグナルについてのルシフェラーゼアッセイ

化合物 **18** は、Wnt シグナルに関するルシフェラーゼアッセイシステムでは、ルシフェリン発光を減弱させた。加えて、 β -catenin、cyclin D1 についての Western blotting では、Huh7 のタンパク発現を抑制した。すなわち、化合物 **18** は Wnt/ β -catenin 経路内の β -catenin を減少させることで、cyclin D1 を減少させ、Huh7 に対して細胞毒性を示すことが示唆された。

[参考文献]

1. Morikawa T., Luo F., Manse Y., Sugita H., Saeki S., Chaipech S., Pongpiriyadacha Y., Muraoka O., Ninomiya K., *Front. Chem.*, **2020**, *8*, 199.
2. Uto T., Tung N. H., Thongjankaew P., Lhieochaiphant S., Shoyama Y., *Pharmacognosy Res.*, **2016**, *8*, 244-248.
3. Catalána A. C., Heluania S. C., Kotowicza C., Gedrisb E. T., Herz W., *Phytochemistry*, **2003**, *64*, 625-629.
4. Verotta L., Lovaglio E., Vidari G., Finzi P. V., Neric G. M., Raimondi A., Parapini S., Taramelli D., Riva A., Bombardelli E., *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 2867-2879.
5. Prachyawarakorn V., Mahidol C., Ruchirawat S. *Pharm Biol.*, **2000**, *38*, 58-62.
6. Crombie L., Games D. E., Haskins N. J., Reed G. F., *J. C. S. Perkin I*, **1972**, 2255-2260.
7. Crombie L., Games D. E., Haskins N. J., Reed G. F., *Tetrahedron*, **1970**, *46*, 3975-3978.
8. Mahidol C., Kaweetripob W., Prawat H., Ruchirawat S., *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 757-760.
9. Laphookhieo S., Promnart P., Syers J. K., Kanjana-Opas A., Ponglimanont C., Karalai C., *J. Braz. Chem. Sci.*, **2007**, *18*, 1077-1080.
10. Prachyawarakorn V., Mahidol C., Ruchirawat S., *Pharm. Biol.*, **2000**, *38*, 58-62.
11. Kaweetripod W., Mahidol C., Prawat H., Ruchirawat., *Pharm. Biol.*, **2000**, *38*, 55-57.
12. K.R. Markham, C. Sheppard, H. Geiger., *Phytochemistry*, **1987**, *26*, 3335-3337.
13. Christophoridou S., Dais P., *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, *633*, 283-292.
14. Park Y., Moon B.H., Lee E., Lee Y., Yoon Y., Ahn J.H., Lim Y., *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, *45* 674-679.
15. Araya-Maturana R., Delgado-Castro T., Cardona W., Weiss-López B. E., *Curr. Org. Chem.*, **2018**, *5*, 253-263.

第 6 章 *Caesalpinia digyna* からの成分探索

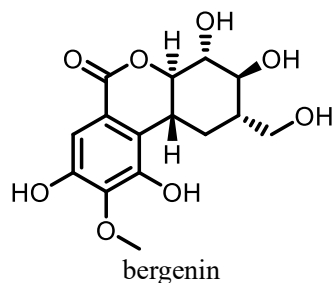


Figure 6-1 *Caesalpinia digyna*

(<https://tracuuduoclieu.vn/wp-content/uploads/2018/05/2334-1.jpg> より引用)

第 6 章では、第 3 章のスクリーニングにおいて、阻害活性 (50 $\mu\text{g/mL}$ においてルシフェリン発光を 50 % 減少) を示した *Caesalpinia digyna* の分画、活性評価について述べる。

Caesalpinia digyna はマメ科の植物であり、本研究での使用部位は葉部である。インド等では、伝統的に根を糖尿病への治療や解熱剤として用いられている¹⁾。本植物の根から単離された **bergenin** は、2 型糖尿病ラットにおいて、脂質低下活性、抗酸化活性を持ち、抗糖尿病活性を持つことがわかっている²⁾。また、抗不安活性を持つ³⁾。



第 1 節 *Caesalpinia digyna* の分画

Caesalpinia digyna より、BMI1 プロモーター阻害活性を基に分画することで、化合物 **32-37** を得た (Figure 6-1-1)。

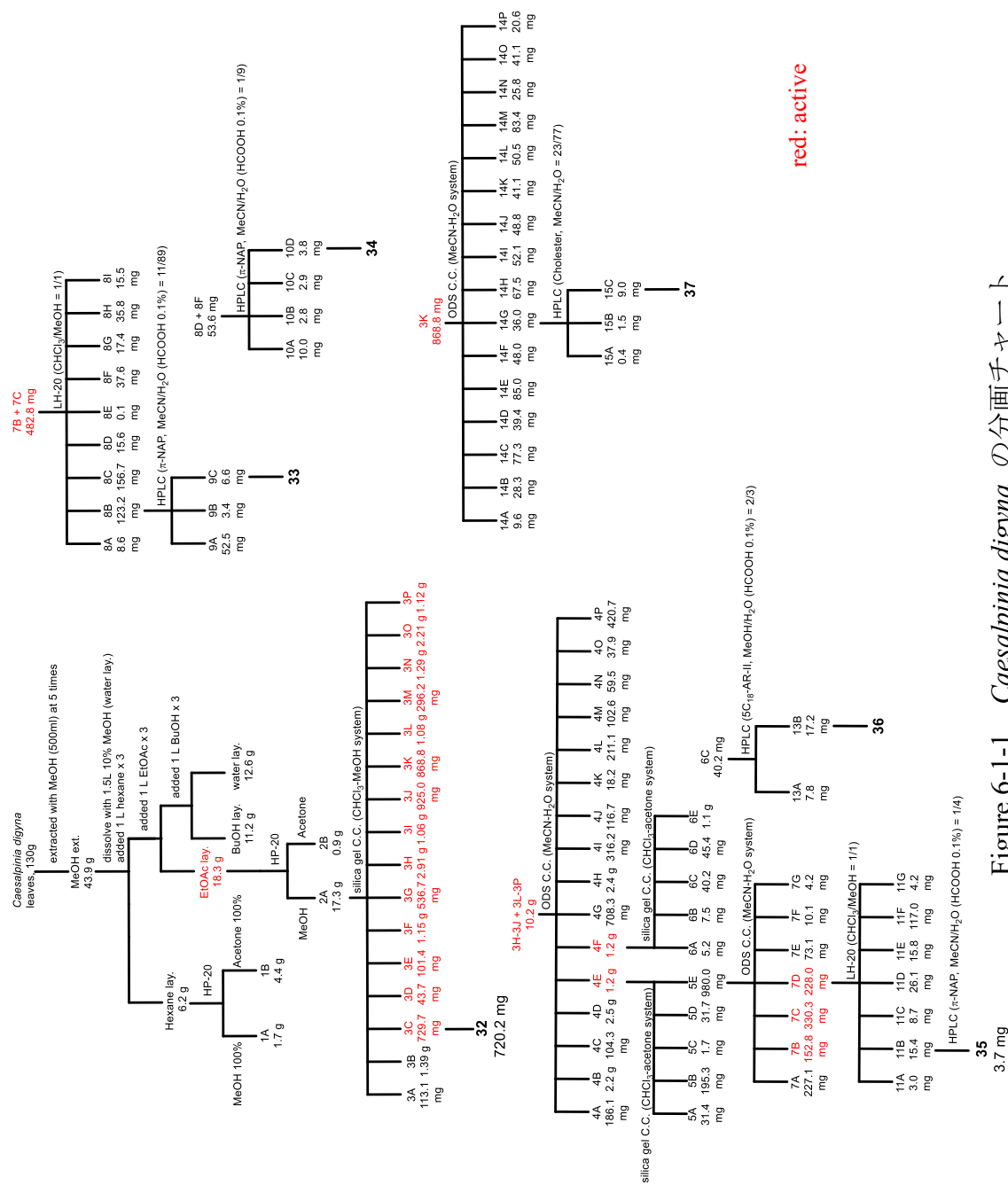


Figure 6-1-1 *Caesalpinia digyna* の分画チャート

第 2 節 BMI1 プロモーター阻害活性を指標とした分画

Caesalpinia digyna の葉部 (130 g) を MeOH にて抽出した。得られた MeOH 抽出物 (43.9 g) を 10% MeOH に溶解し、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH を用いて液液分配を行った。各層を silica gel TLC で分析した (Figure 6-2-1)。また、BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、hexane 層 (6.2 g)、EtOAc 層 (18.3 g) に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 6-2-2)。

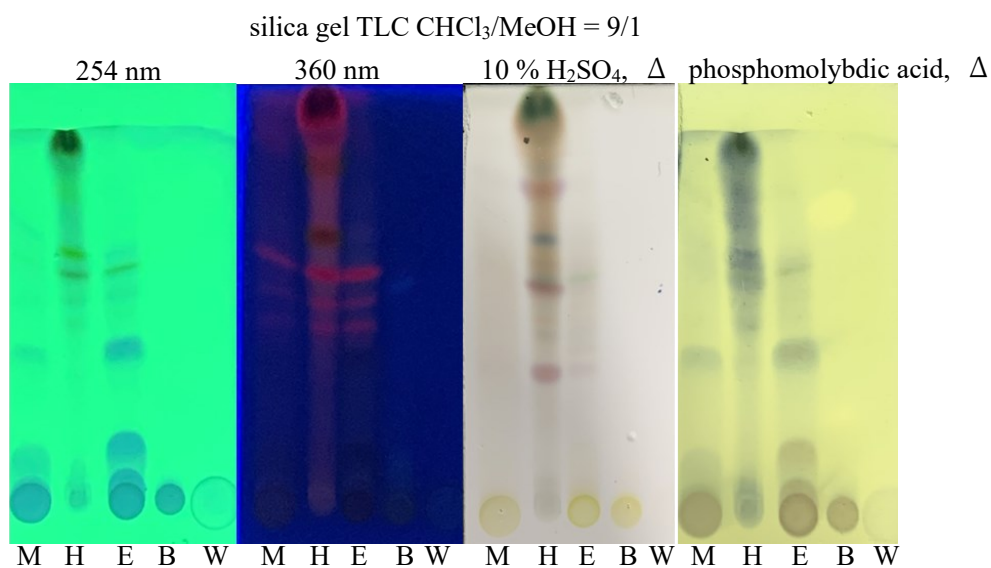
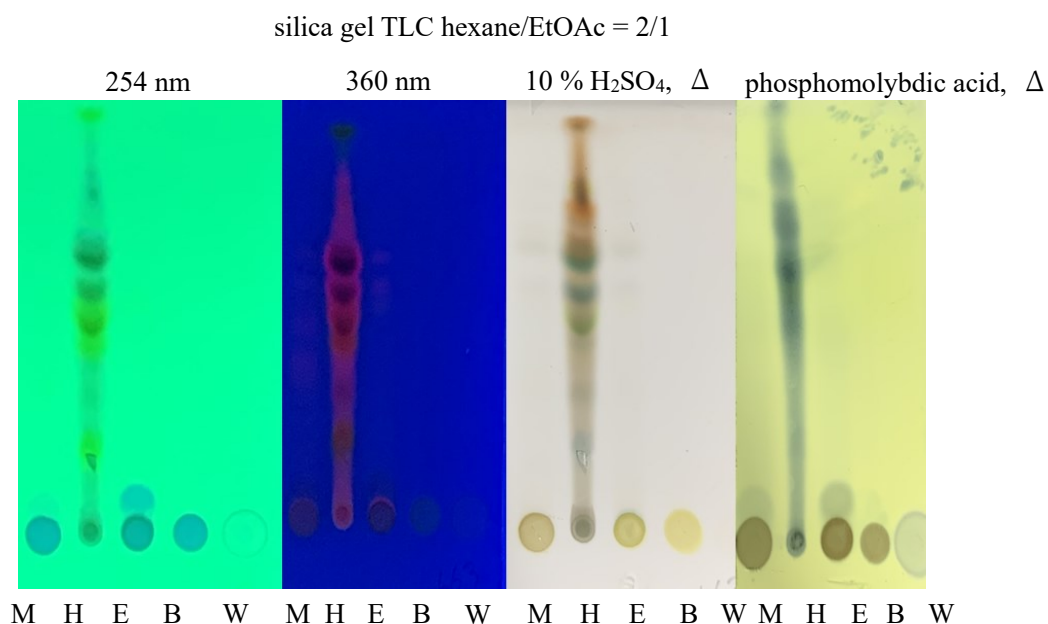


Figure 6-2-1 各層の silica gel TLC による分析

MeOH 抽出物: M hexane 層: H EtOAc 層: E 水飽和 BuOH 層: B 水層: W

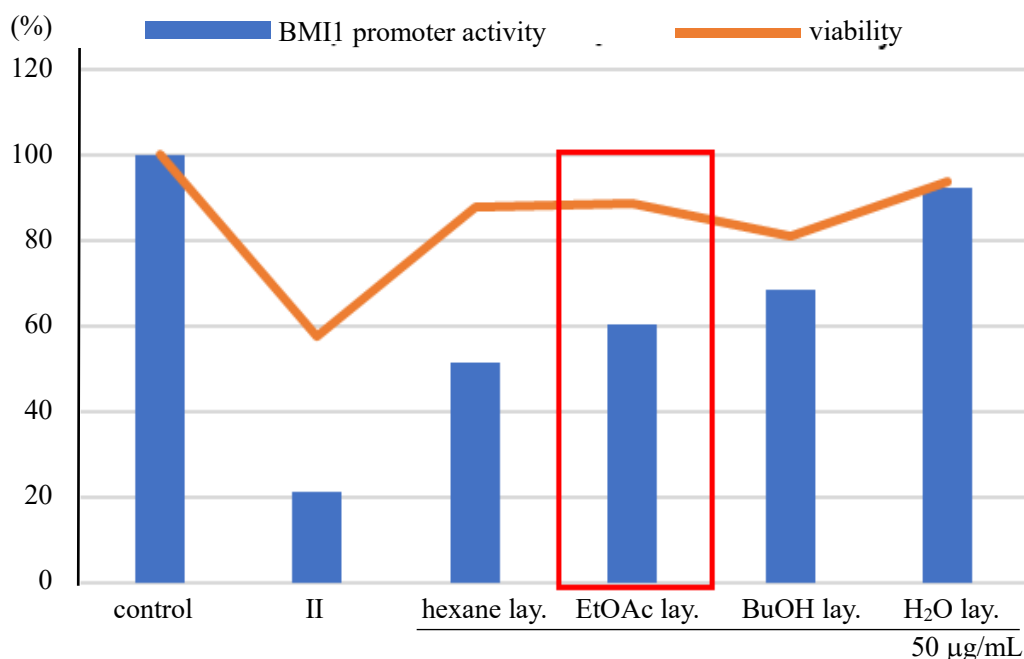


Figure 6-2-2 各層の BMI1 プロモーター阻害活性の評価
(control = DMSO 0.1 %, II = c-Myc inhibitor II 50 µg/mL)

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した hexane 層を Diaion HP-20 カラム ($\phi 40 \times 250$ mm) を用いて分画することで、1 series (1A: 1.7 g, 1B: 4.4 g) を得た。主要成分が含まれていた 1A のフラクション重量は 1.7 g であり、EtOAc 層は 18.3 g であったため、重量の大きい EtOAc 層の分画を行うこととした。

EtOAc 層を Diaion HP-20 カラム ($\phi 40 \times 200$ mm) を用いて分画することで、2 series (2A: 17.3 g, 2B: 0.9 g) を得た。次に、主要成分である 2A を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ を用いた silica gel カラム ($\phi 45 \times 140$ mm) で分画し、3 series (3A-3P) を得た。2A から得られた 3 series を silica gel TLC で分析した (Figure 6-2-3)。BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、3C-3P に活性は移行した (Figure 6-2-4)。

silica gel TLC $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 9/2$

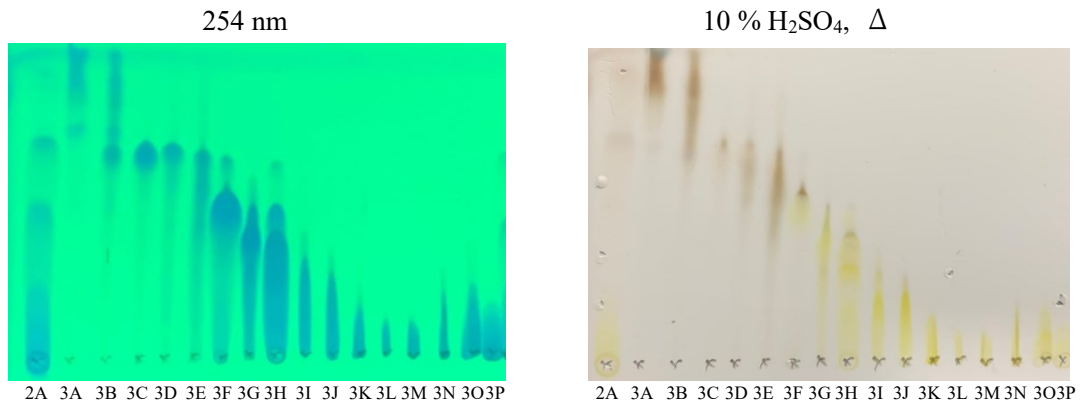


Figure 6-2-3 3 series の silica gel TLC

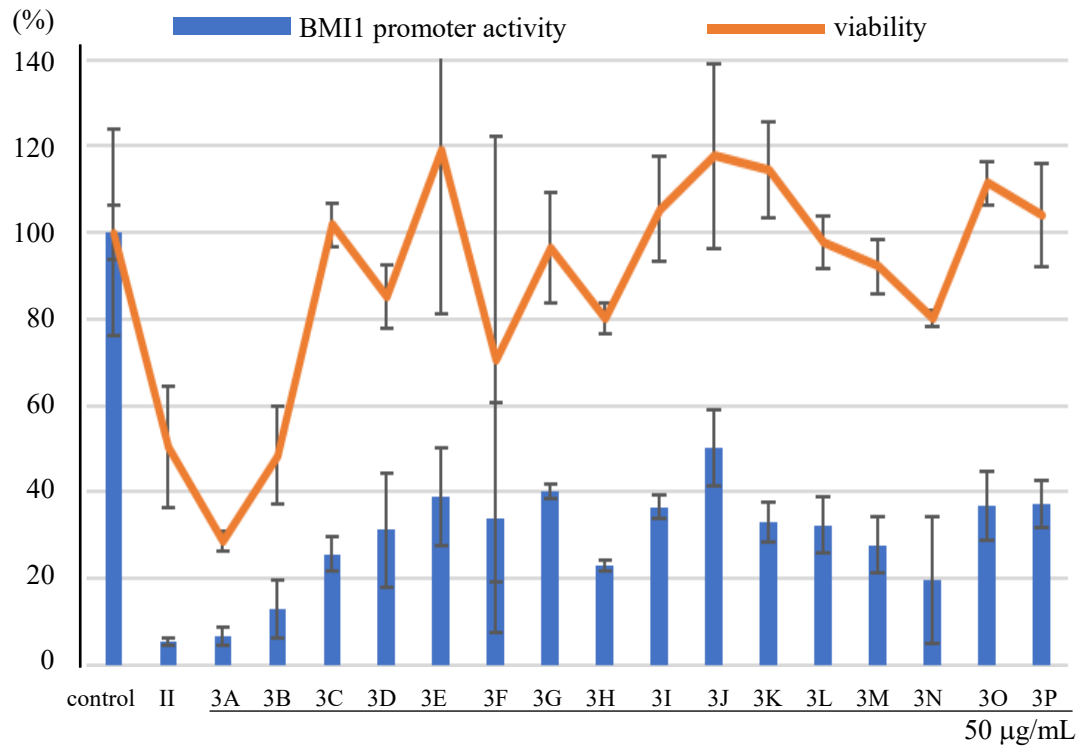


Figure 6-2-4 3 series の活性評価

得られた 3C を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeOH/H₂O = 3/2) により分析を行った結果、3C は単一成分であった。そのため、3C を **32** (720.2 mg) とした (Figure 6-2-5)。

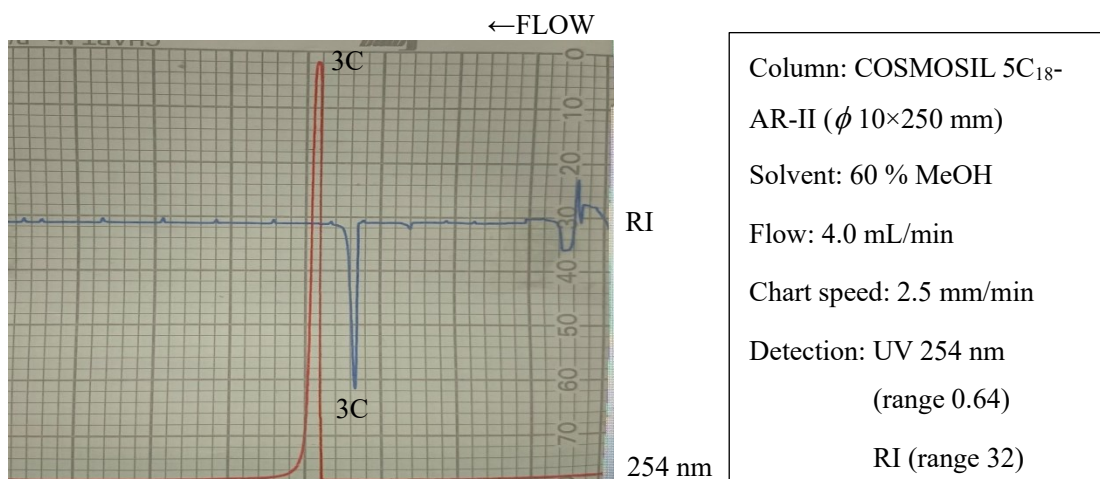


Figure 6-2-5 3C の HPLC による分析

得られた 3series の内、ODS TLC による分析から、3H-3J, 3L-3P は類似した成分が含有していることが示唆された (Figure 6-2-6)。そのため、これらのフラクションをまとめ、ODS カラム (φ65x150 mm) を用いて分画することで、4 series を得た。4 series を ODS TLC で分析した (Figure 6-2-7)。

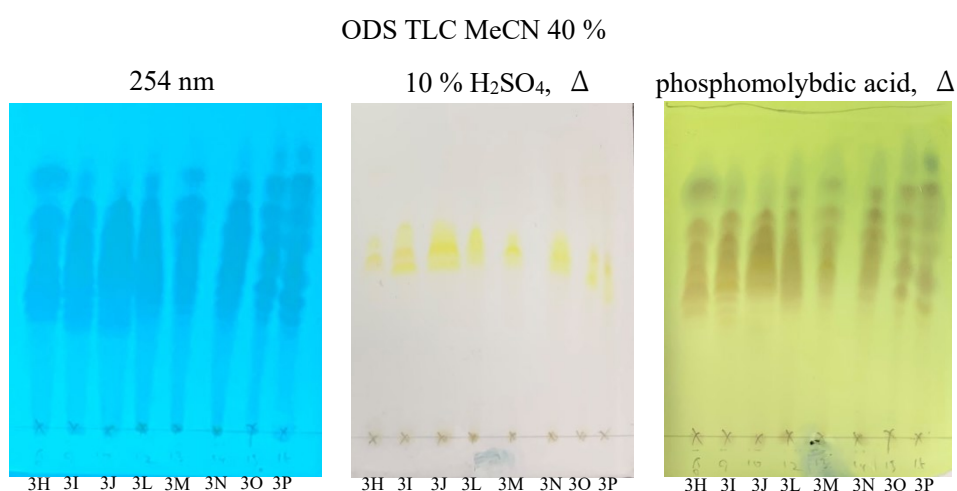


Figure 6-2-6 3H-3J, 3L-3P の ODS TLC による分析

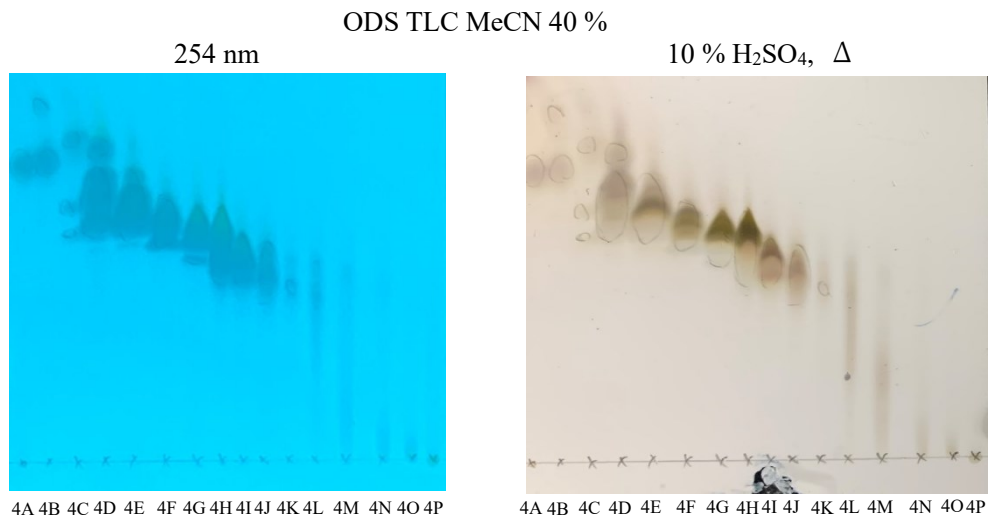


Figure 6-2-7 4 series の ODS TLC

得られた 4 series の BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、4E, 4F に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 6-2-8)。

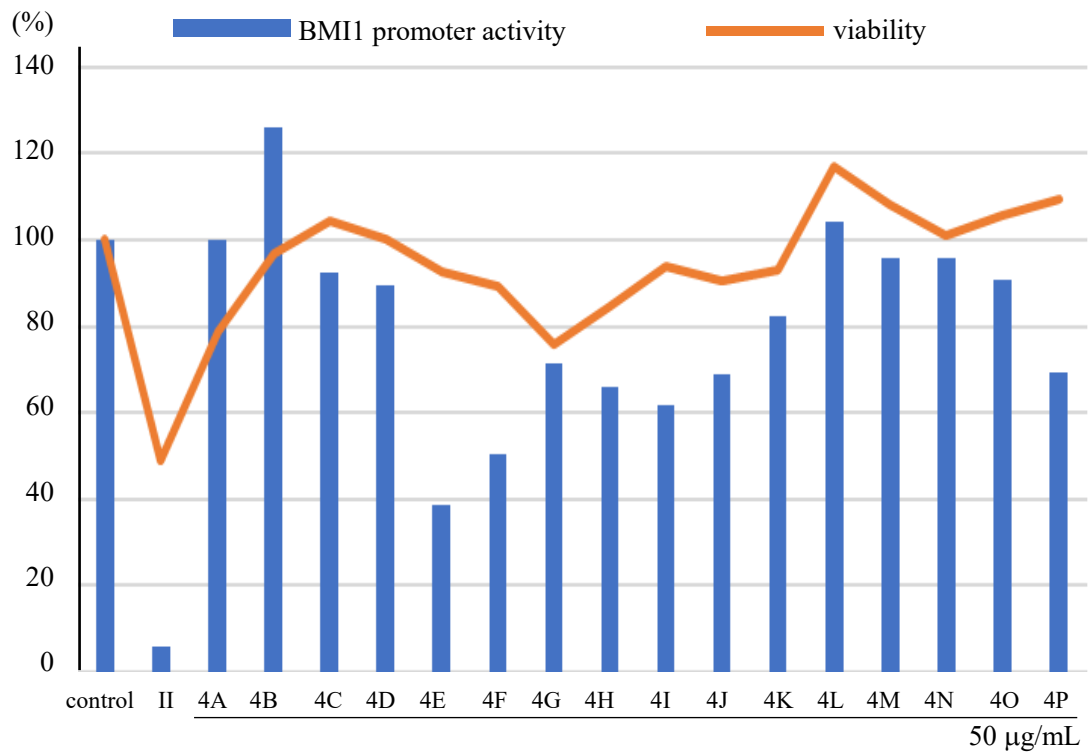


Figure 6-2-8 4 series の活性評価

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 4E, 4F をそれぞれ CHCl₃/アセトン (acetone) = 3/2 を用いた silica gel カラム (φ30x150 mm) にて分画することで、4E から 5 series (5A-5E) を得た。4F から 6 series (6A-6E) を得た。5E は 5A-5D を分取後に MeOH 100% を用いることで得た。6E も同様に 6A-6D を分取後に MeOH 100% を用いることで得た。5, 6 series を silica gel TLC で分析した (Figure 6-2-9)。

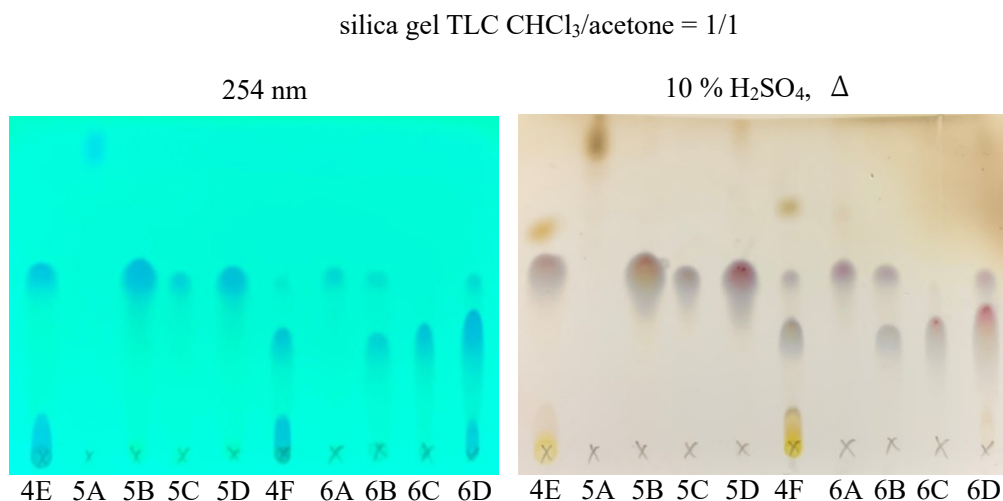


Figure 6-2-9 5, 6 series の silica gel TLC

得られた 5 series の内、5E を MeCN/H₂O を用いた ODS カラム (φ50x250 mm) にて分画することで、7 series (7A-7G) を得た。5E から得られた 7 series を ODS TLC で分析した (Figure 6-2-10)。7 series の BMI1 プロモーター阻害活性を評価した結果、7B, 7C, 7D に BMI1 プロモーター阻害活性が移行した (Figure 6-2-11)。

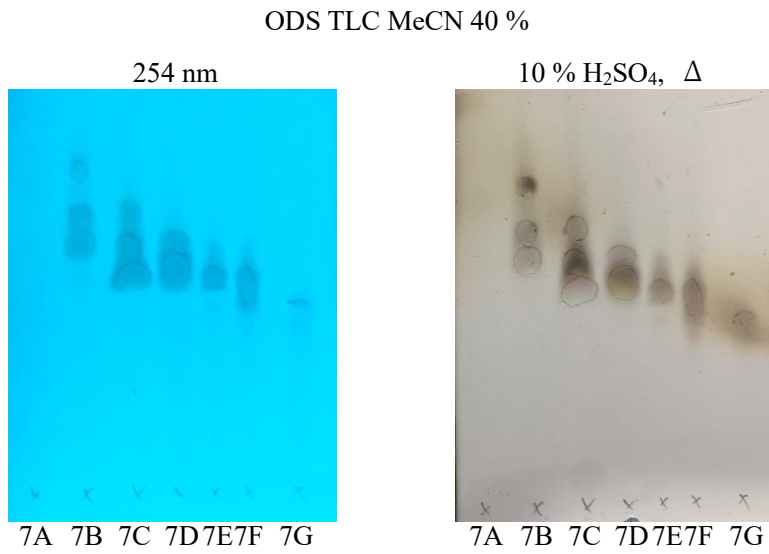


Figure 6-2-10 7 series の ODS TLC

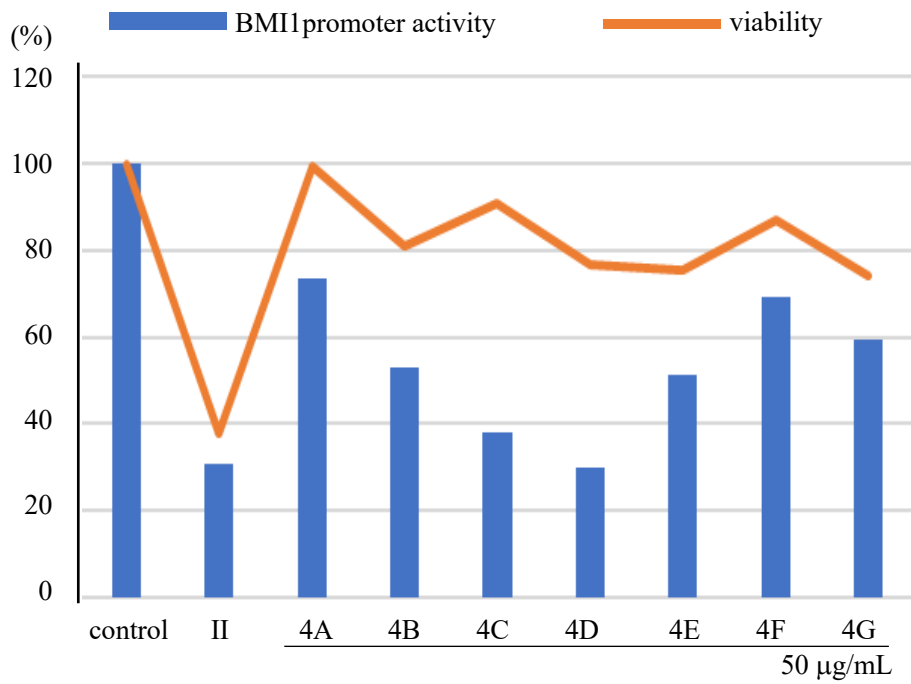


Figure 6-2-11 7 series の ODS TLC

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 7B, 7C を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/1$ を用いた Sephadex LH-20 カラム ($\phi 15 \times 600 \text{ mm}$) にて分画することで、8 series (8A-8H) を得た。7B, 7C から得られた 8 series を ODS TLC で分析した (Figure 6-2-12)。

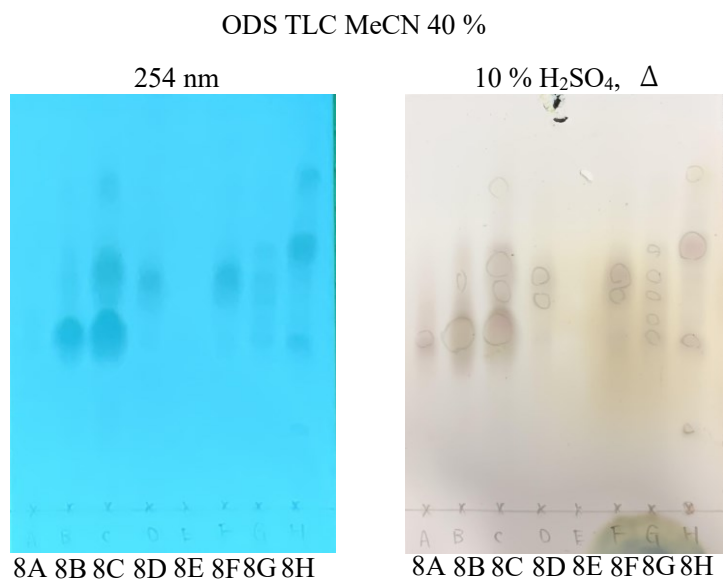


Figure 6-2-12 8 series の ODS TLC

得られた 8B を HPLC (COSMOSIL π -NAP、 $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 % HCOOH) = 11/89) により分画することで、9 series (9A-9C) を得た (Figure 6-2-13)。得られた 9 series の内、9C を **33** (t_R 32.8, 6.6 mg) とした。

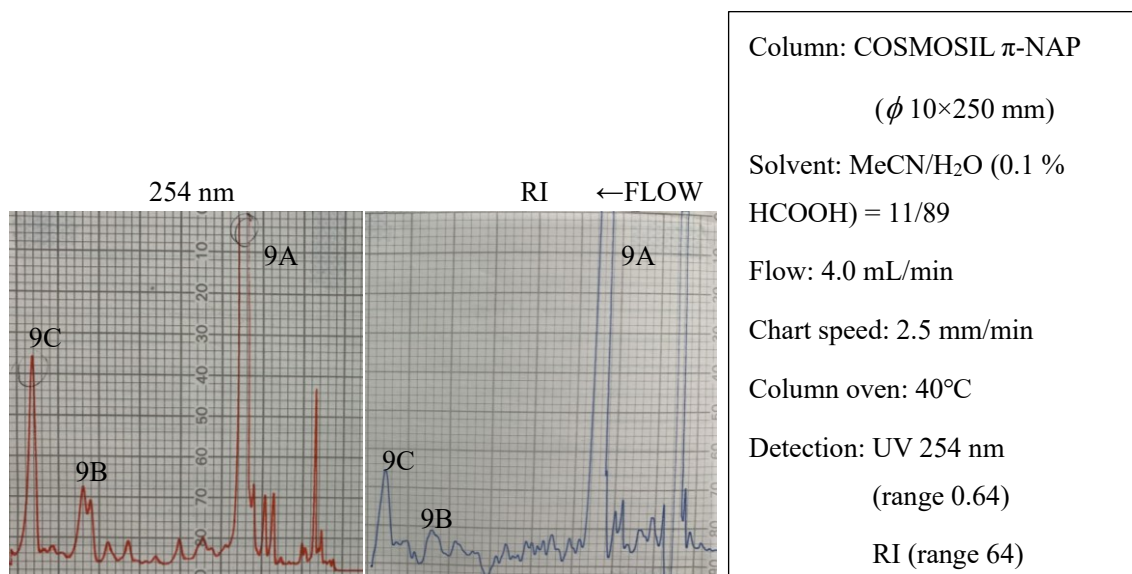


Figure 6-2-13 8B の HPLC による分画

得られた 8D, 8F を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 1/9) により分画することで、10 series (10A-10D) を得た (Figure 6-2-14)。得られた 10 series の内、10D を **34** (t_R 36.8, 3.8 mg) とした。

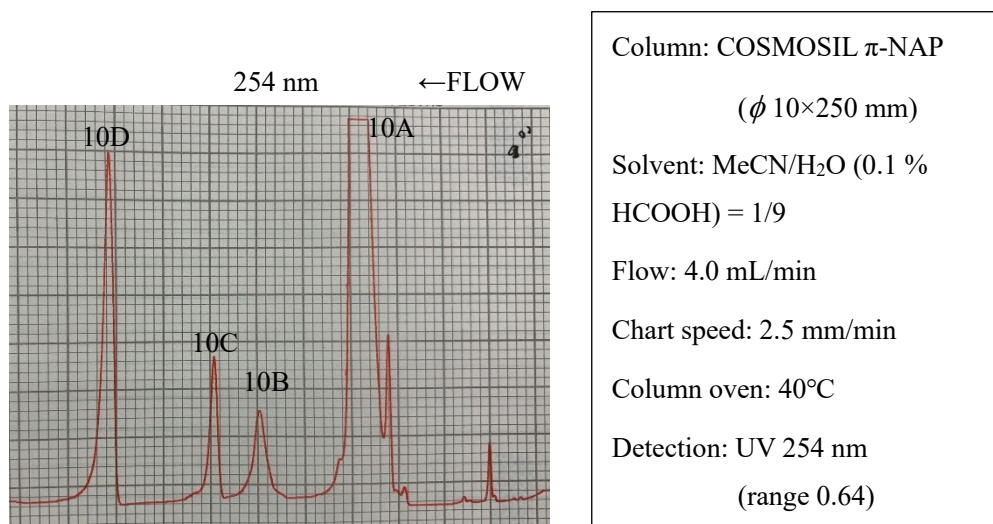


Figure 6-2-14 8D, 8F の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 7D を CHCl₃/MeOH = 1/1 を用いた Sephadex LH-20 カラム (ϕ 15x650 mm) にて分画することで、11 series (11A-11G) を得た。7D から得られた 11 series を ODS TLC で分析した (Figure 6-2-15)。

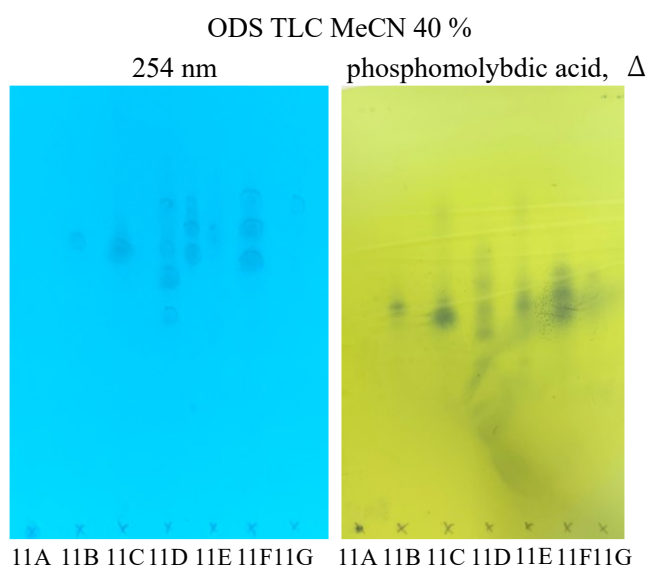


Figure 6-2-15 11 series の ODS TLC

得られた 11B を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 1/4) により分画することで、12A を得た (Figure 6-2-16)。得られた 12A を **35** (t_R 8.0, 3.7 mg) とした。

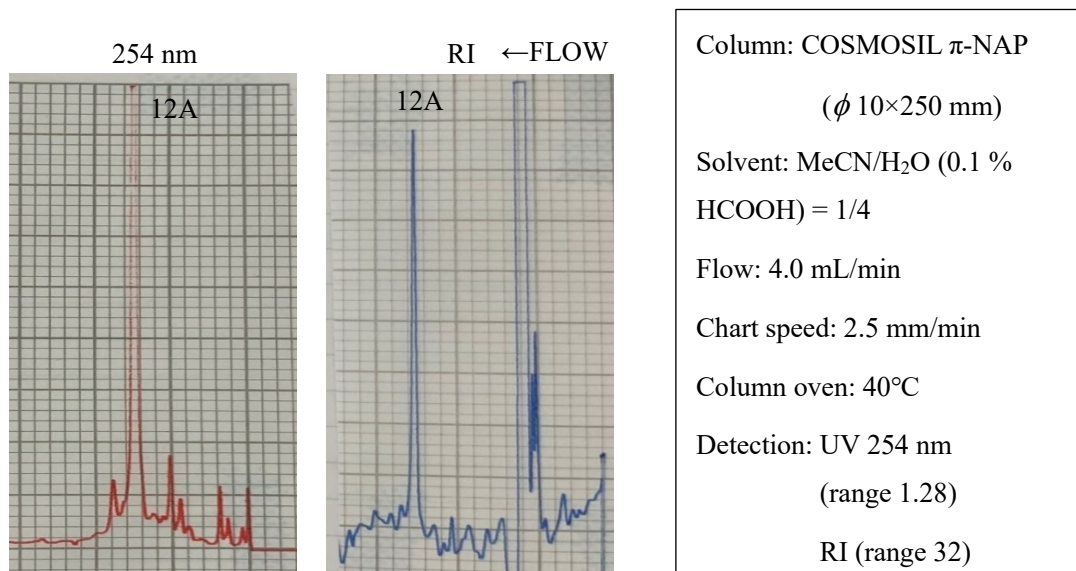


Figure 6-2-16 11B の HPLC による分画

次に、6C を HPLC (COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、MeOH/H₂O (0.1 % HCOOH) = 2/3) により分画することで、13 series (13A, 13B) を得た (Figure 6-2-17)。得られた 13B を **36** (t_R 11.2, 17.2 mg) とした

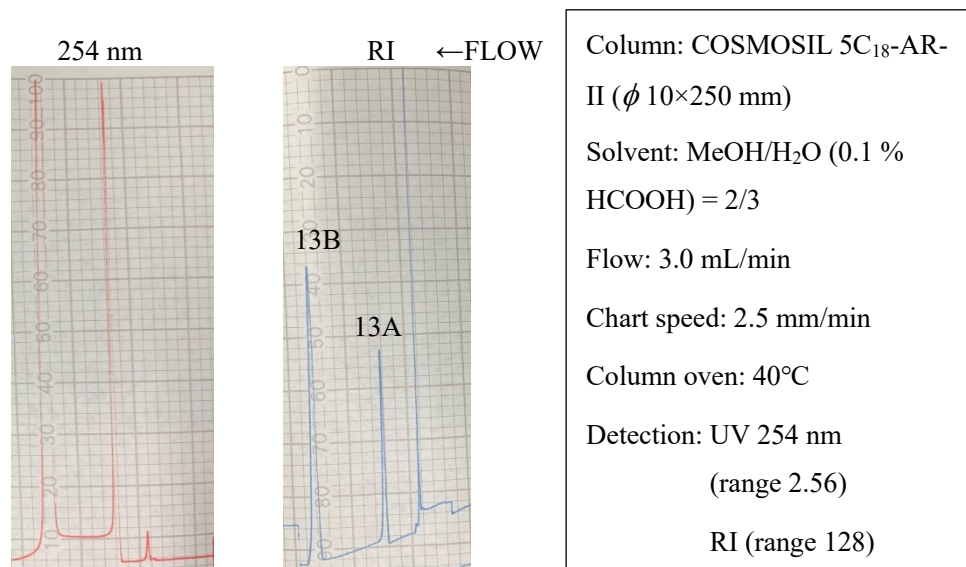


Figure 6-2-17 6C の HPLC による分画

BMI1 プロモーター阻害活性が移行した 3K をそれぞれ MeCN/H₂O を用いた ODS カラム ($\phi 35 \times 200$ mm) にて分画することで、3K から 14 series (14A-14V) を得た。14 series を ODS TLC で分析した (Figure 6-2-18)。

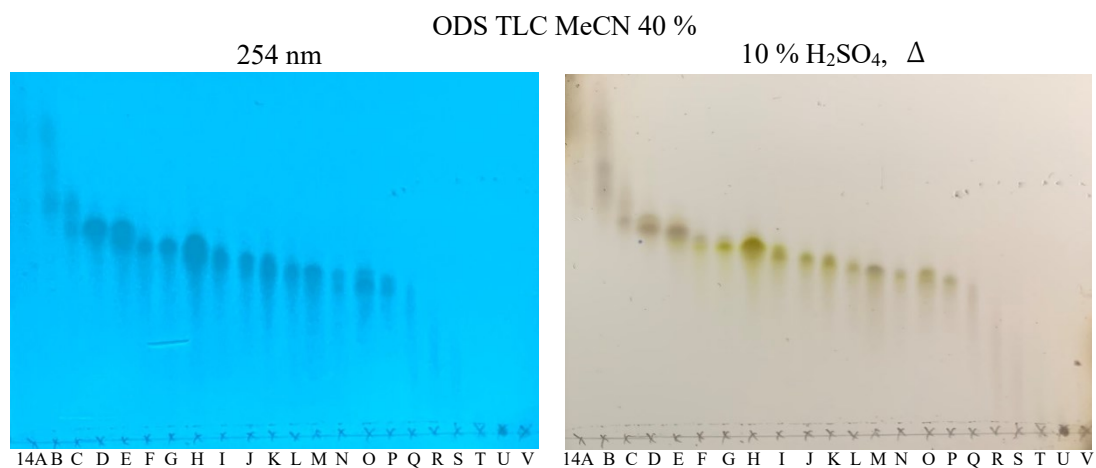


Figure 6-2-18 14 series の ODS TLC

得られた 14G を HPLC (COSMOSIL Cholester、MeCN 23 %) にて分画し、15 series (15A-15C) を得た (Figure 6-2-19)。得られた 15C を 37 (t_R 12.0, 9.0 mg) とした。

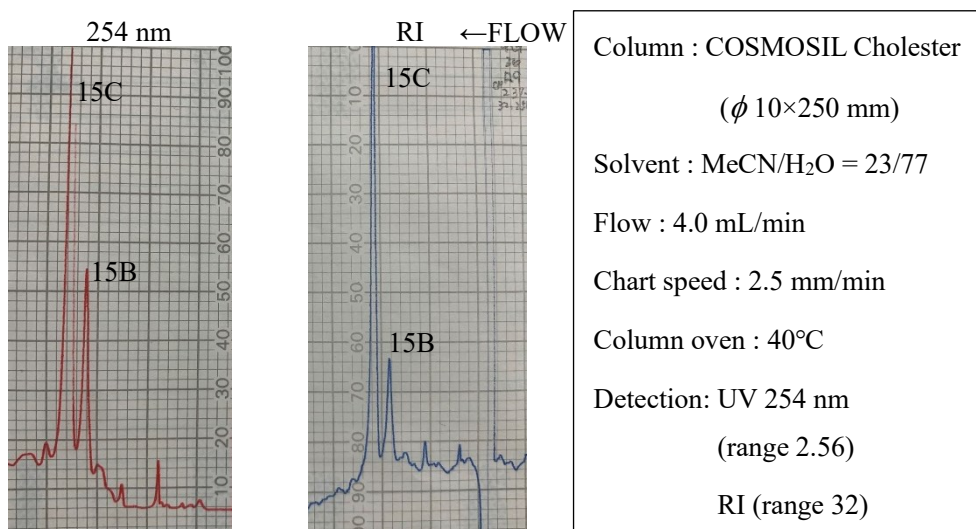


Figure 6-2-19 14G の HPLC による分画

第 3 節 *Caesalpinia digyna* から単離された化合物

Caesalpinia digyna の葉部より単離した化合物について NMR および MS スペクトルによる構造解析を実施し、新規没食子酸関連化合物 (35)、既知没食子酸関連化合物 4 種 (methyl gallate (32)⁴⁾, 5-di-*O*-galloylquinic acid methyl ester (33)^{5,6,7)}, (-)-shikimic acid 3,4-di-*O*-gallate (34)⁸⁾, methyl *m*-digalate, methyl *p*-digalate (36)⁹⁾、既知フラボノイド 1 種 (kaempferol 3-rutinoside (37)¹⁰⁾) を得た (Figure 6-3-1)。化合物 35 は新規化合物であったことから、次節に詳細を述べる。化合物 33 は天然物からの単離例が 1 例報告されていたが、詳細な NMR データ等は未報告であったことから、第 5 節にて詳細を述べる。

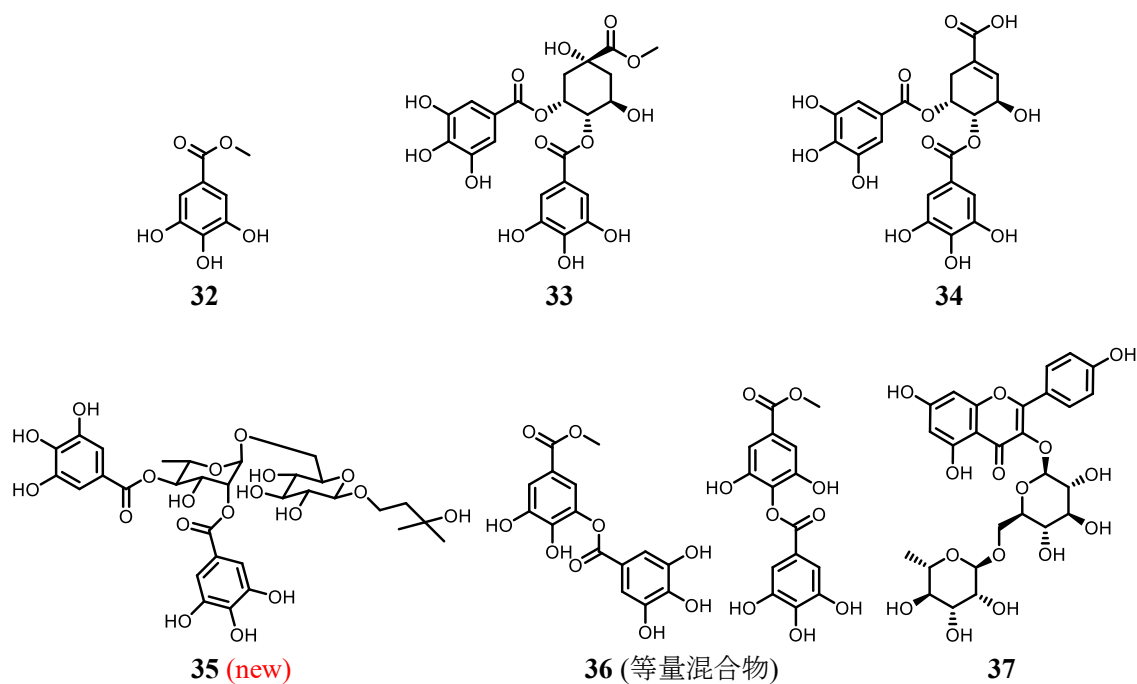


Figure 6-3-1 *Caesalpinia digyna* から単離された化合物の構造

第 4 節 化合物 35 の構造解析

化合物 35 は白色粉末であり、HR-ESI-MS にて m/z 739.2061 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{31}H_{40}O_{19}Na$, 739.2062) であったことから、分子式を $C_{31}H_{40}O_{19}$ であると決定した。IR スペクトルからヒドロキシ基 (3350 cm^{-1})、エステル ($1660, 1630\text{ cm}^{-1}$) の存在が示唆された。

$^1\text{H-NMR}$ から、3 つのメチル基 [δ_{H} 1.03 (3H, s, $\text{H}_3\text{-5}''''$), 1.05 (3H, s, $\text{H}_3\text{-4}''''$), 1.13 (3H, d, $\text{H}_3\text{-6}''$)], 糖由来のシグナル [δ_{H} 2.94 (1H, t, $\text{H}_1\text{-2}'''$), 3.03 (1H, t, $\text{H}_1\text{-4}'''$), 3.14 (1H, t, $\text{H}_1\text{-3}'''$), 3.32 (1H, dt, $\text{H}_1\text{-5}'''$), 3.58 (1H, m, $\text{H}_1\text{-6}'''$), 3.86 (1H, overlap, $\text{H}_1\text{-6}'''$), 3.86 (1H, overlap, $\text{H}_1\text{-5}''$), 4.02 (1H, dd, $\text{H}_1\text{-3}''$), 4.15 (1H, d, $\text{H}_1\text{-1}''$), 4.81 (1H, d, $\text{H}_1\text{-1}''$), 5.04 (1H, t, $\text{H}_1\text{-4}''$), 5.14 (1H, dd, $\text{H}_1\text{-2}''$)], 芳香環 [δ_{H} 6.96 (1H, s, $\text{H}_1\text{-3}$, 1H, s, $\text{H}_1\text{-7}$), 6.98 (1H, s, $\text{H}_1\text{-3}'$, 1H, s, $\text{H}_1\text{-7}'$)] の存在が示唆された (Figure 6-4-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ から、2 つのエステル [δ_{C} 165.4 (C-1), 165.3 (C-1')], 芳香環 [δ_{C} 119.2 (C-2), 108.8 (C-3, 7), 145.6 (C-4, 6), 138.7 (C-5), 119.1 (C-2'), 108.9 (C-3', 7'), 145.5 (C-4', 6'), 138.9 (C-5')], 糖由来のシグナル [δ_{C} 97.7 (C-1''), 72.2 (C-2''), 66.4 (C-3''), 73.1 (C-4''), 66.1 (C-5''), 103.0 (C-1'''), 73.4 (C-2'''), 76.6 (C-3'''), 70.0 (C-4'''), 75.1 (C-5'''), 67.2 (C-6''')] の存在が示唆された (Figure 6-4-2)。

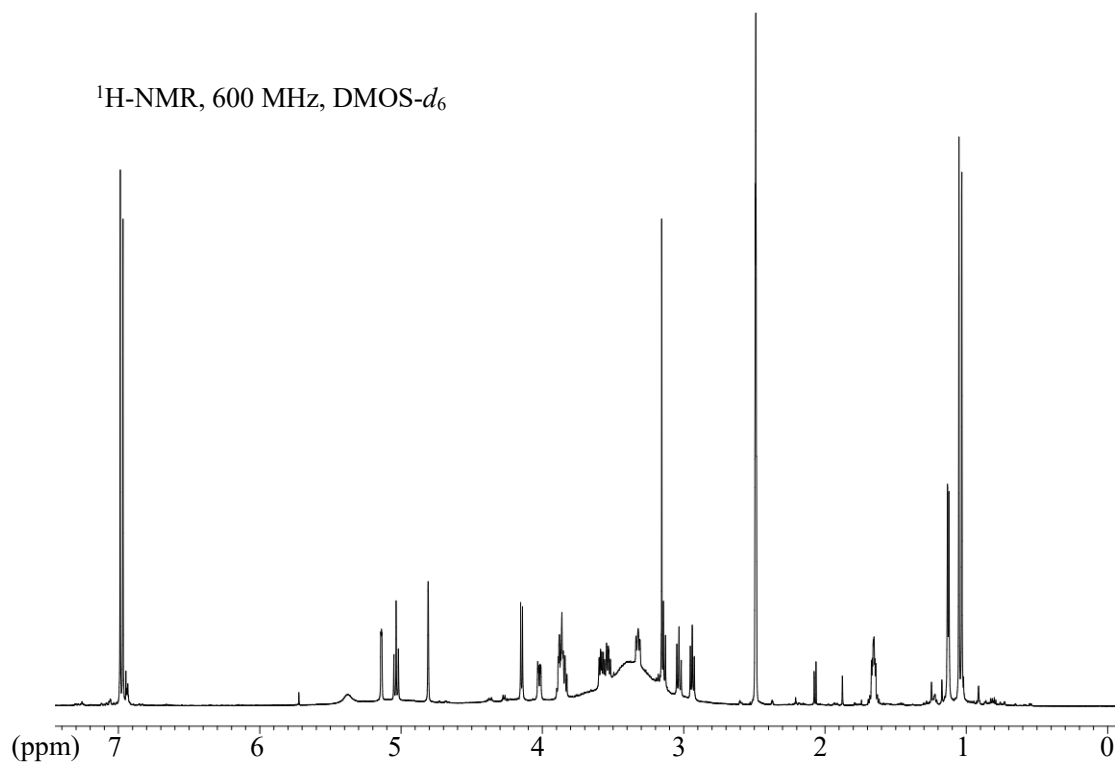


Figure 6-4-1 化合物 35 の $^1\text{H-NMR}$

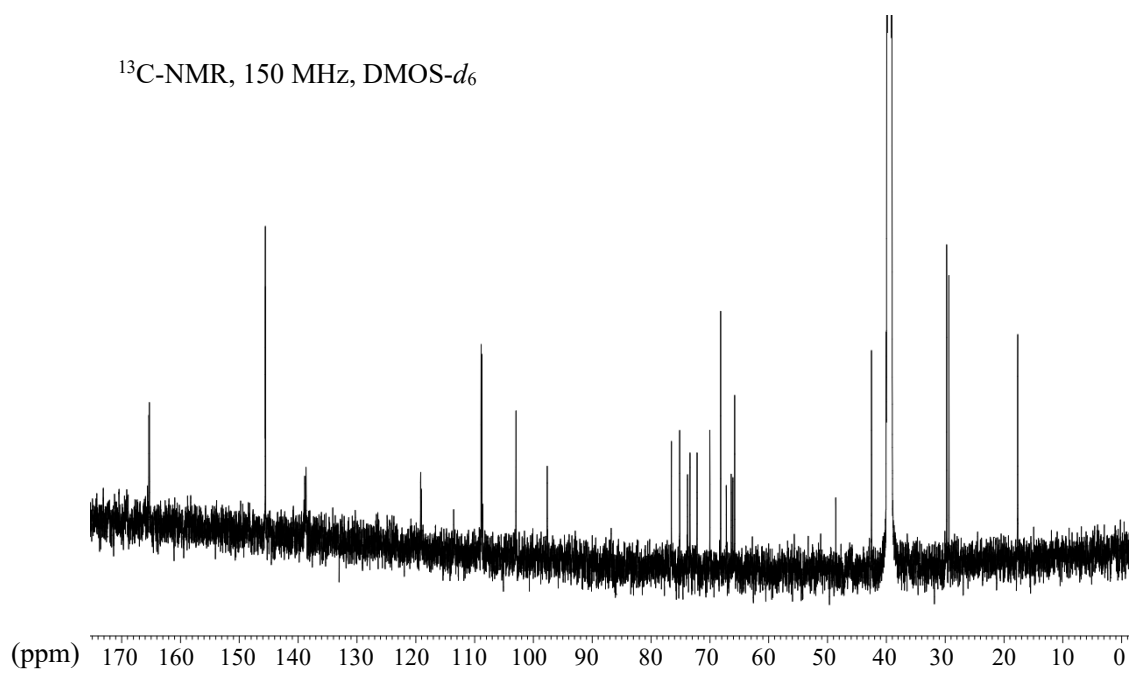


Figure 6-4-2 化合物 **35** の ^{13}C -NMR

1D-TOCSY の解析から、糖の平面構造を推定することを試みた。H₃-6'' を選択励起し、緩和時間を変更し測定した結果、H₁-5'', H₁-4'', H₁-3'', H₁-2'', H₁-1'' のピークが順に観測されたことから、6-deoxy hexose の存在が示唆された (Figure 6-4-3)。

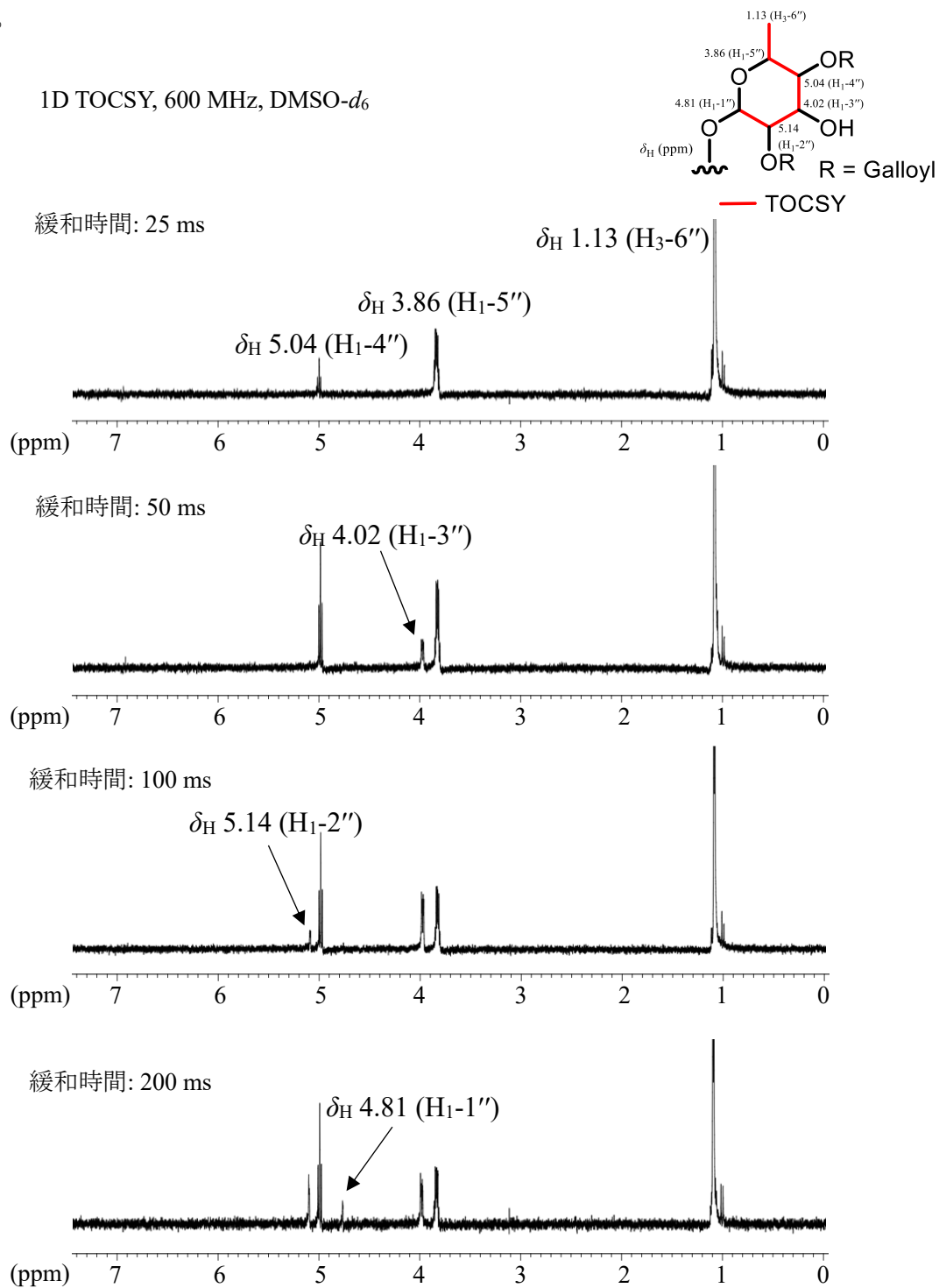


Figure 6-4-3 H₃-6'' を選択励起した 1D-TOCSY

次に、 $H_{1-1''}$ を選択励起した 1D TOCSY の解析から、 $H_{1-2''}$, $H_{1-3''}$, $H_{1-4''}$, $H_{1-5''}$, $H_{2-6''}$ との相関が順に観測されたことから、hexose の存在が示唆された (Figure 6-4-4)。

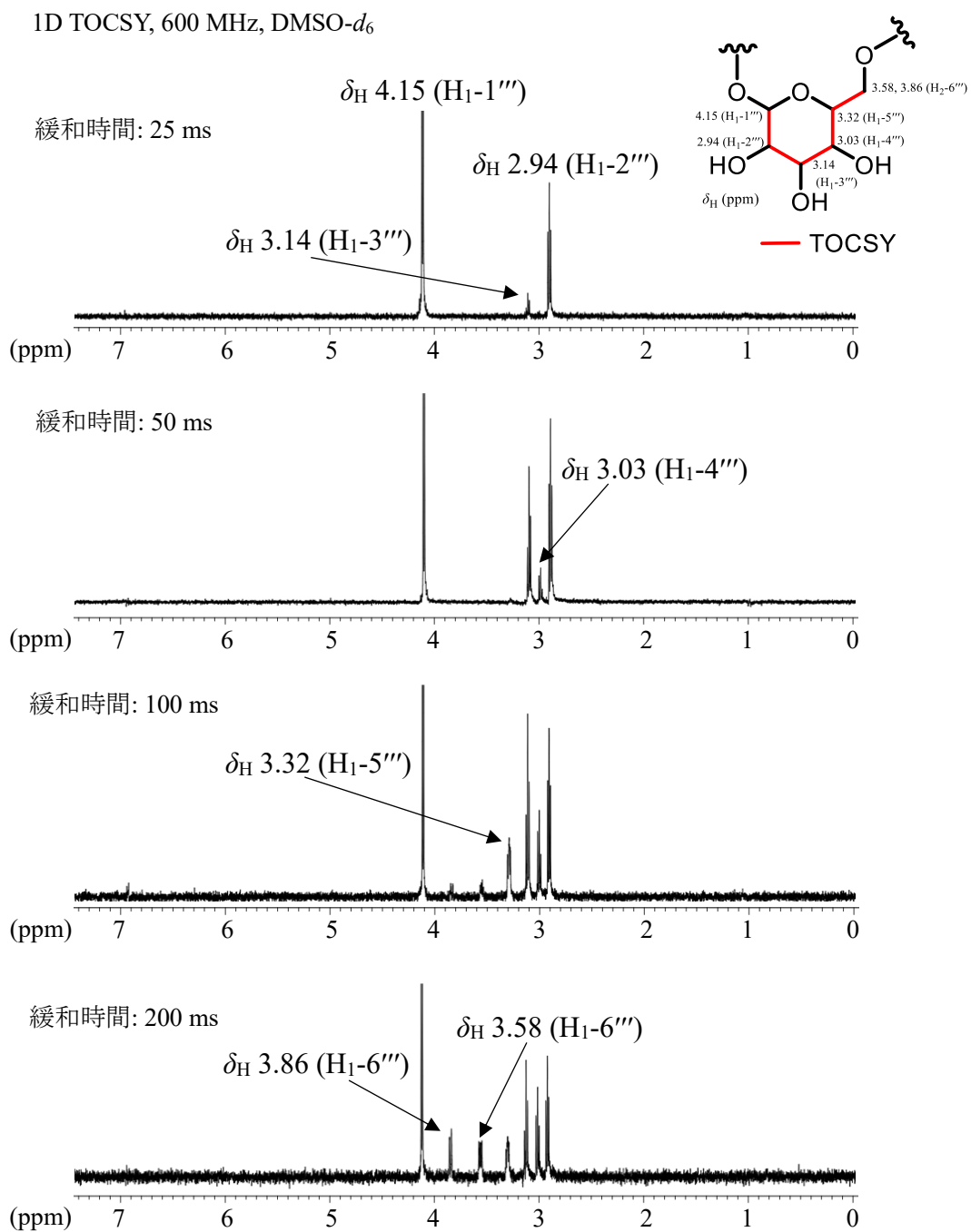


Figure 6-4-4 $H_{1-1''}$ を選択励起した 1D-TOCSY

NOESY の解析では、 $H_{1-3''}/H_{1-5''}$ の相関が観測でき、 $H_{1-1''}/H_{1-3''}, H_{1-5''}$ の相関は確認できなかった。 1H -NMR の解析から、 $H_{1-1''}$ のカップリング定数は 1.4 Hz であったため、 α -rhamnose であることが示唆された。次に、 $H_{1-1'''}/H_{1-3'''}, H_{1-5'''}, H_{1-2'''}/H_{1-4'''}$ の相関が観測でき、 1H -NMR の解析から、 $H_{1-1'''}$ のカップリング定数は 7.6 Hz であったため、 β -glucose であることが示唆された (Figure 6-4-5)。

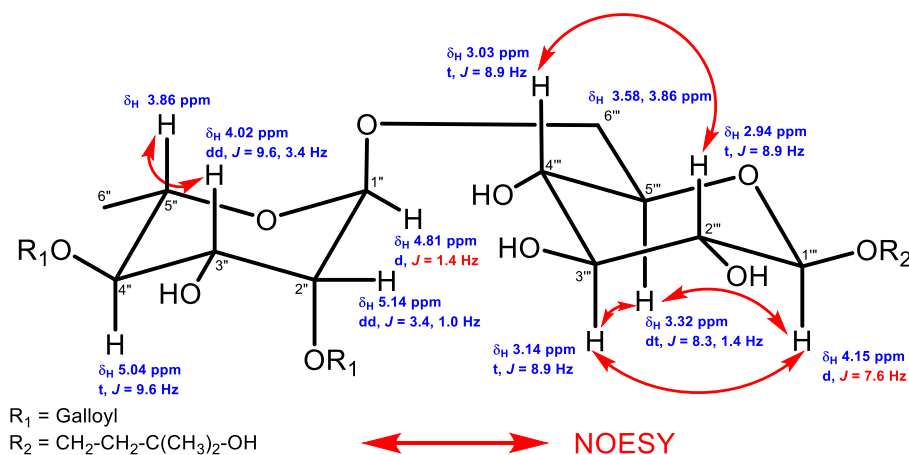


Figure 6-4-5 化合物 35 の NOESY 相関

HMBC の解析から、 H_{1-3} から $C-1, C-2, C-4, C-5, C-7$ へ、 $H_{1-3'}$ から $C-1, C-2, C-4, C-5, C-7$ への相関が観測されたことから、2 つのガロイル基の存在が示唆された。 α -rhamnose の $H_{1-2''}$ から $C-1'$ への相関と、 $H_{1-4''}$ から $C-1$ への相関が観測されたことから、 α -rhamnose と galloyl 基が連結された。 β -glucose の $H-6'''$ から、 α -rhamnose の $C-1''$ への相関が観測されたことから、 β -glucose と α -rhamnose が連結された。

1H - 1H COSY から、 $H_{2-1''''}$ (δ_H 3.86, 3.53)/ $H_{2-2''''}$ (δ_H 1.67) への相関が観測され、HMBC の解析では、 $H_{3-4''''}$ から $C-2''''$ (δ_C 42.5), $C-3''''$ (δ_C 68.2), $C-5''''$ (δ_C 29.4) への相関が観測されたことから、1,1-dimethyl-1-propanol であることが示唆され、 $H_{2-1''''}$ から $C-1'''$ への相関が観測されたことから、1,1-dimethyl-1-propanol 側鎖と β -glucose が連結された (Figure 6-4-6)。

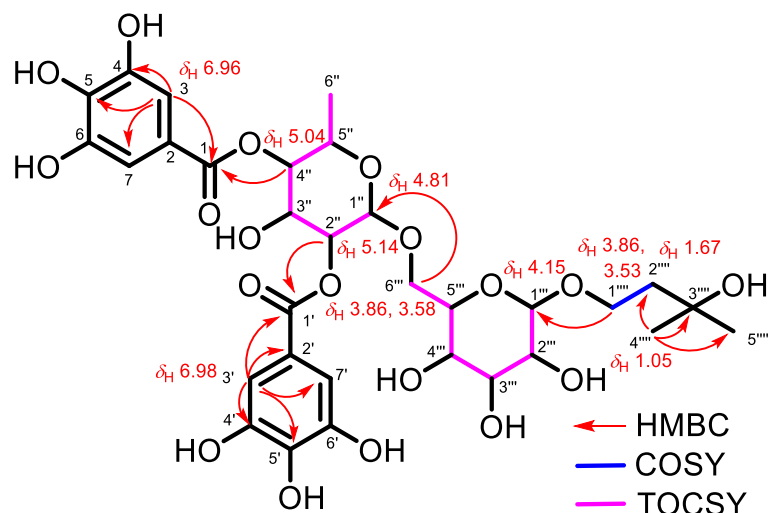


Figure 6-4-6 化合物 **35** の HMBC, COSY, TOCSY

次に、化合物 **35** に含有する糖の絶対配置を決定するため、5% H_2SO_4 を用いて加水分解を行った。得られた反応液を陰イオン交換樹脂 IRA96SB に通した後、L-cysteine methyl ester 塩酸塩および、pyridine による糖の誘導體化を行った¹¹⁾ (Figure 6-4-7)。同時に、4 種の糖標準品 (D, L-rhamnose、D, L-glucose) についても同様の方法で誘導體化を行い、得られたサンプルを HPLC にて分析し、保持時間を比較した (Figure 6-4-8)。その結果、**35** に含まれる糖は、L-rhamnose、D-glucose であると決定し、**35** の構造の決定に至った。

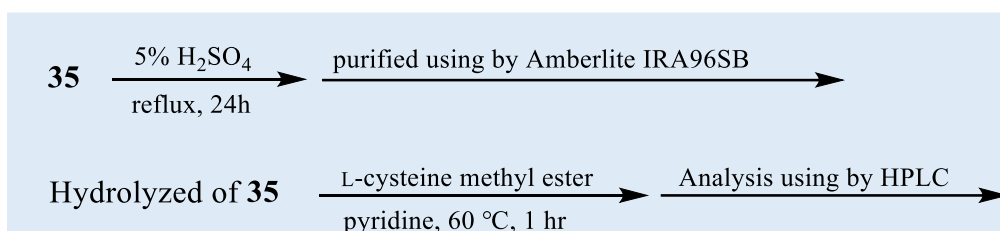


Figure 6-4-7 化合物 **35** の加水分解と誘導體化

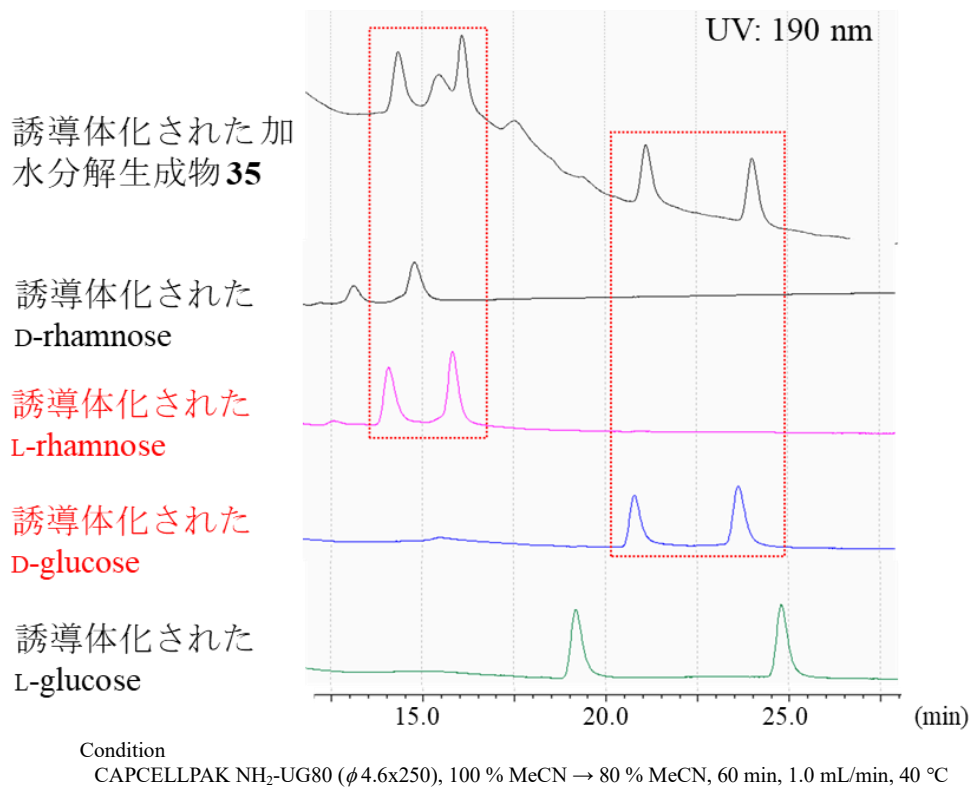


Figure 6-4-8 化合物 **35** と糖標品の HPLC による分析

第 5 節 化合物 33 の構造解析

化合物 33 は既知化合物であるが、 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 等未報告であったため、詳細な構造解析について述べる。

$^1\text{H-NMR}$ から、1 つのメトキシ基 [δ_{H} 3.37 (3H, s, H_{3-3'})]、芳香環 [δ_{H} 6.83 (1H, s, H_{1-3''}), 1H, s, H_{1-7''}], 6.99 (1H, s, H_{1-3'''}), 1H, s, H_{1-7'''}] の存在が示唆された (Figure 6-5-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ から、3 つのエステル [δ_{C} 173.2 (C-1'), 165.2 (C-1''), 164.5 (C-1''')], 芳香環 [δ_{C} 119.0 (C-2''), 108.8 (C-3'', 7''), 145.6 (C-4'', 6''), 139.7 (C-5''), 118.3 (C-2'''), 108.6 (C-3''', 7'''), 145.6 (C-4''', 6'''), 139.5 (C-5''')] の存在が示唆された (Figure 6-5-2)。

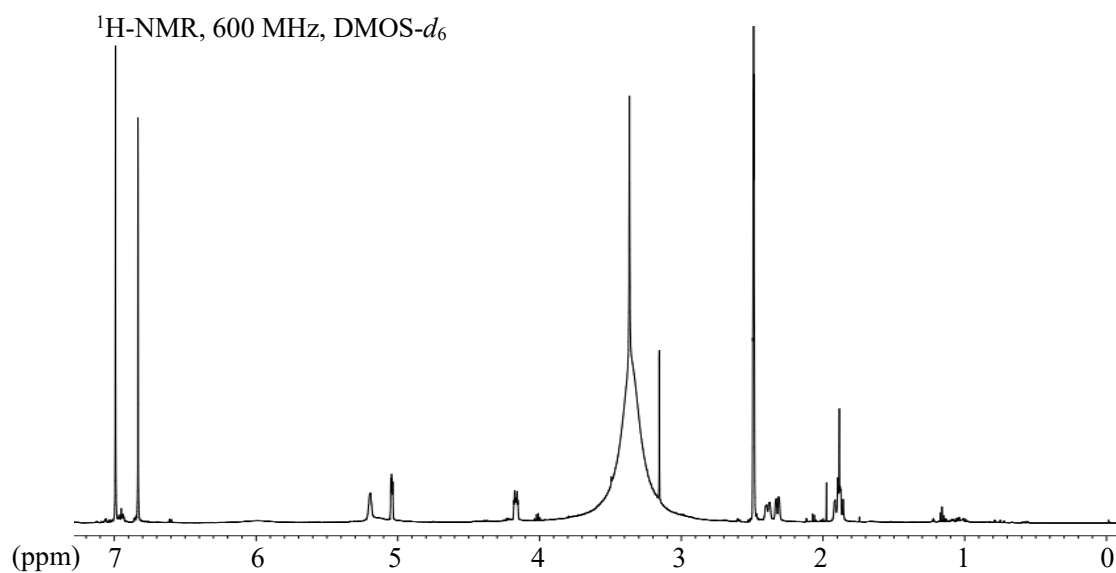


Figure 6-5-1 化合物 33 の $^1\text{H-NMR}$

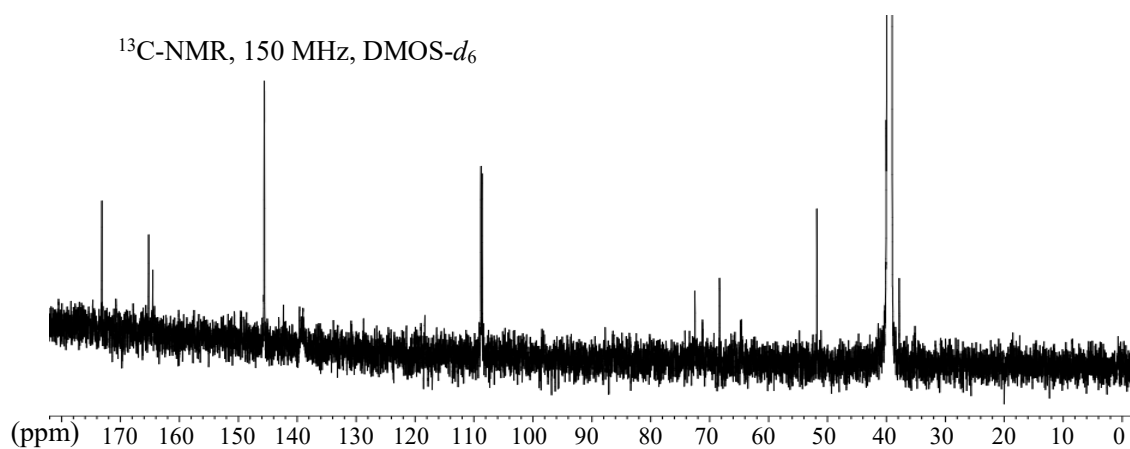


Figure 6-5-2 化合物 33 の $^{13}\text{C-NMR}$

^1H - ^1H COSY から、 $\text{H}_2\text{-2}$ (δ_{H} 1.89, 2.32)/ $\text{H}_1\text{-3}$ (δ_{H} 4.17)、 $\text{H}_1\text{-3}/\text{H}_1\text{-4}$ (δ_{H} 5.20)、 $\text{H}_1\text{-4}/\text{H}_1\text{-5}$ (δ_{H} 5.04)、 $\text{H}_1\text{-5}/\text{H}_2\text{-6}$ (δ_{H} 1.86, 2.39) への相関が観測されたことから、シクロヘキサンの骨格を持つことが示唆された。HMBC の解析から、 $\text{H}_1\text{-3}''$ から $\text{C-1}''$, $\text{C-2}''$, $\text{C-4}''$, $\text{C-5}''$, $\text{C-7}''$ へ、 $\text{H}_1\text{-3}'''$ から $\text{C-1}'''$, $\text{C-2}'''$, $\text{C-4}'''$, $\text{C-5}'''$, $\text{C-7}'''$ への相関が観測されたことから、2 つの galloyl 基の存在が示唆された。シクロヘキサン環の $\text{H}_1\text{-4}$ から $\text{C-1}''$ への相関と、 $\text{H}_1\text{-5}$ から $\text{C-1}'''$ への相関が観測されたことから、ガロイル基が連結された。また、メチルエステルは $\text{H}_2\text{-2}$ から $\text{C-1}'$ 、 $\text{H}_3\text{-3}'$ から $\text{C-1}'$ への相関が観測されたことから、シクロヘキサン環の 1 位に連結された (Figure 6-5-3)。

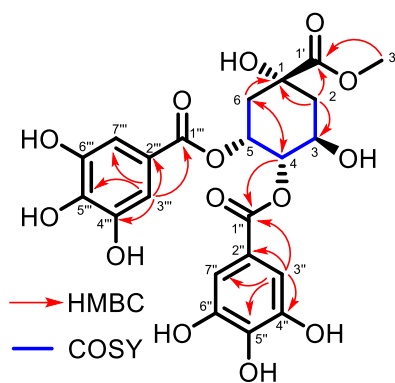


Figure 6-5-3 化合物 33 の COSY, HMBC 相関

次に、 $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数を解析することにより、シクロヘキサン環の構造の推定を試みた。H₁-3 (δ_{H} 4.17, $J = 9.6, 3.2$ Hz)、H₁-4 (δ_{H} 5.20, $J = 9.6, 5.4$ Hz)、H₁-5 (δ_{H} 5.04, $J = 5.4, 3.8$ Hz) であることから、H₁-3, H₁-4 は axial、H₁-5 は equatorial であることが示唆された (Figure 6-5-4)。

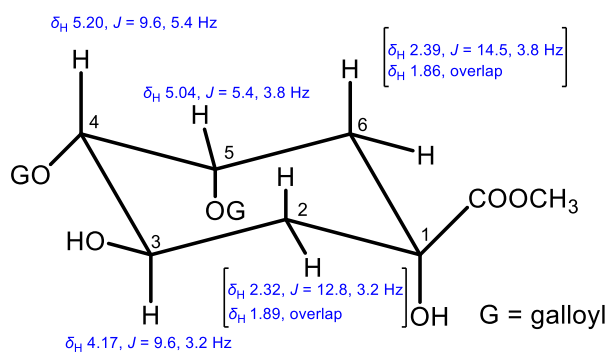


Figure 6-5-4 化合物 **33** のカップリング定数の解析

化合物 **33** について、類似化合物である 4,5-D-*O*-galloylquinic acid⁶⁾ と比旋光度を比較した。その結果、化合物 **33** の比旋光度と 4,5-D-*O*-galloylquinic acid の比旋光度はそれぞれ、 $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -50.4$ (c 0.2, MeOH)、 $[\alpha]_{\text{D}}^{23} -35.5$ (c 0.2, acetone) であった (Figure 6-5-5)。

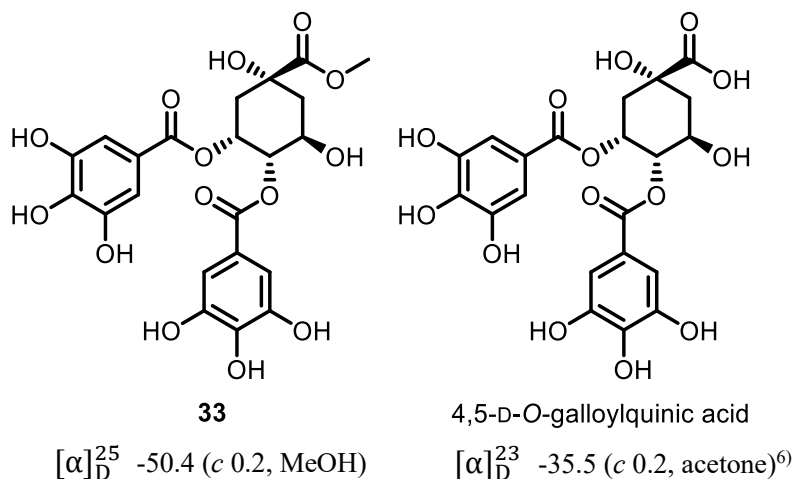


Figure 6-5-5 化合物 **33** と類似化合物の比旋光度の比較

第 6 節 単離化合物の生物活性評価

単離された化合物 **32-37** について、BMI1 プロモーター阻害活性について評価を行った。

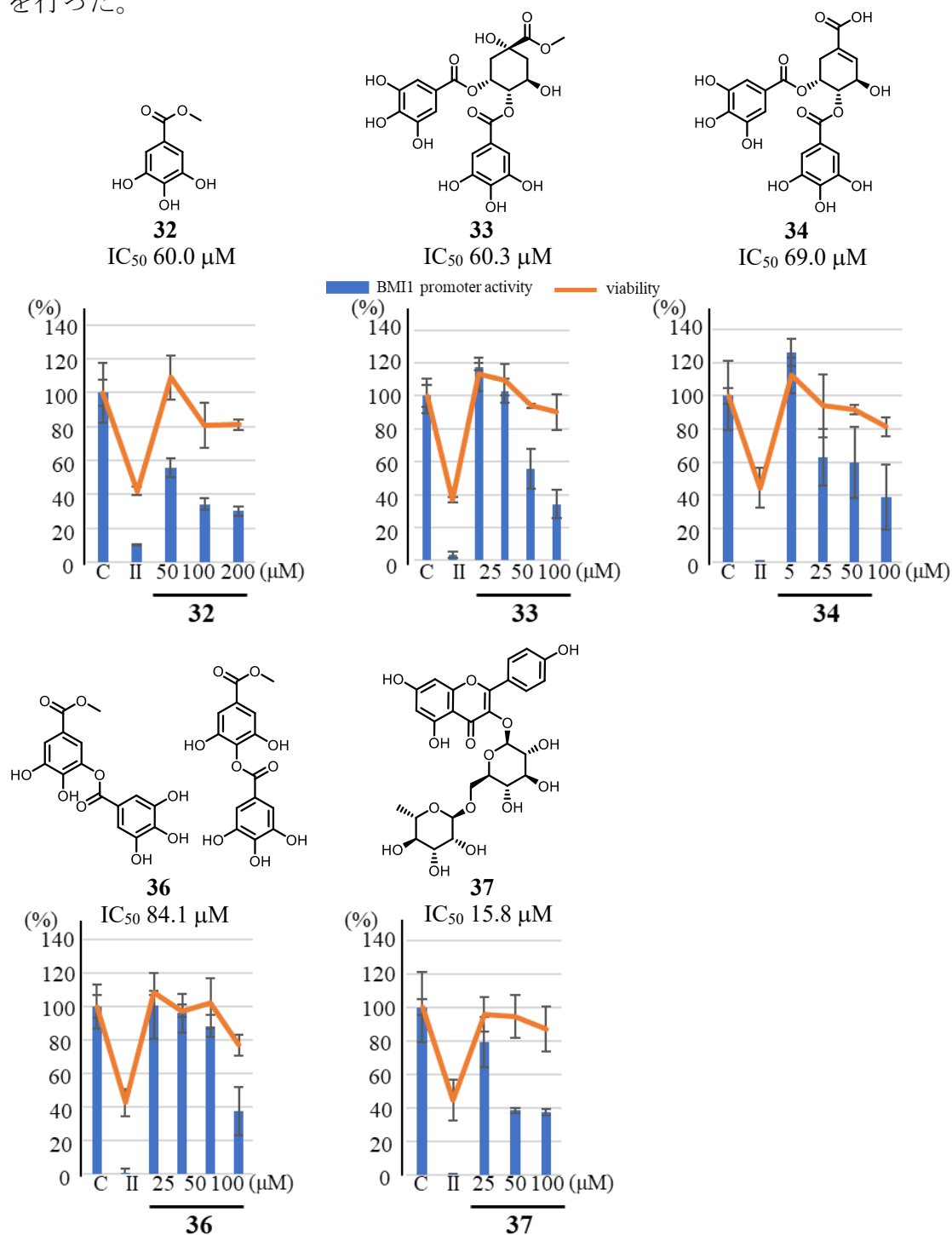


Figure 6-6-1 化合物 **32-37** の BMI1 プロモーター阻害活性についての評価

化合物 **32-37** の内、**32-34, 36-37** は BMI1 プロモーター阻害活性を示し、その IC₅₀ はそれぞれ 60.0 μM、60.3 μM、69.0 μM、84.1 μM、15.8 μM であった。化合物 **35** は、IC₅₀ >100 μM であった。

第 7 節 化合物 37 の Western blotting

Caesalpinia digyna から得られた化合物の中で、最も強い BMI1 プロモーター阻害活性が見出された化合物 37 について、Western blotting を行った。

化合物 37 を BMI1/293T に作用させ、BMI1 タンパクを測定した。その結果、化合物 37 は BMI1 タンパクを減少させた (Figure 6-7-1)。

Used cells: 293T/BMI1 (HEK293)

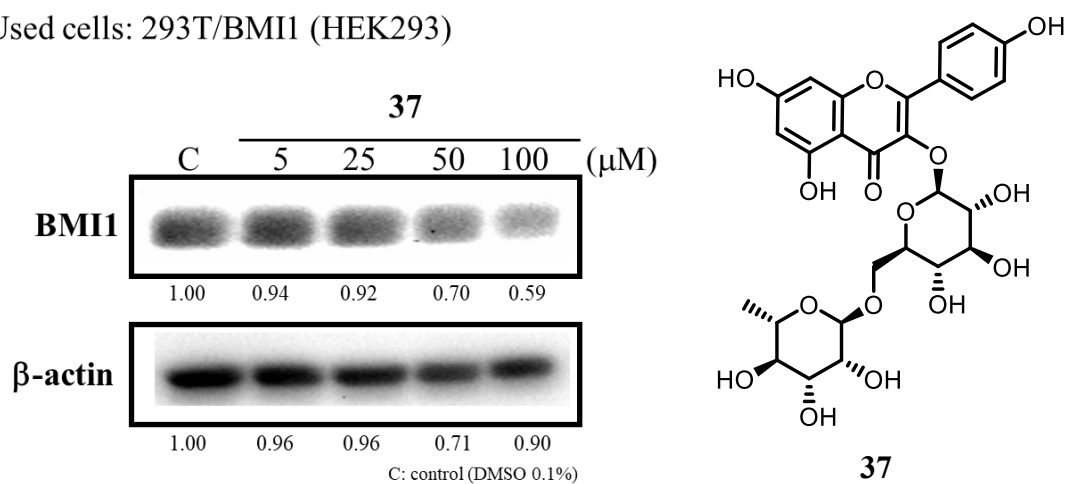


Figure 6-7-1 化合物 37 の Western blotting

[参考文献]

1. Srinivasan R., Chandrasekar J. N. M., Nanjan J. M., Suresh B., *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *113*, 284-291.
2. Kumar R., Patel D. K., Prasad S. K., Laloo D., Krishnamurthy S., Hamalatha S., *Fitoterapia*, **2012**, *83*, 395-401.
3. Singh J., Kumar A., Sharma A., *J. Ethnopharmacol.*, **2017**, *195*, 182-187.
4. Lee H.Y., Jeong H.S., *Food Sci. Biotechnol.*, **2005**, *14*, 268-274.
5. Kondo K., Takaishi Y., Shibata H., Higuti T., *Phytomedicine*, **2006**, *13*, 209-212.
6. Nishimura H., Nonaka G., Nishioka I., *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 2621-2623.
7. Forino M., Tenore C. G., Tartaglione L., Carmela D., Novellino E., Ciminiello P., *Food Chemistry*, **2015**, *178*, 306-310.
8. Nonaka G., Ageta M., Nishioka I., *Chem. Pharm. Bull.*, **1985**, *33*, 96-101.
9. Horgen D. F., Madulid A. D., Angerhofer K. C., Pezzuto M. J., Soejarto D. D., Farnsworth R. N., *Phytomedicine*, **1997**, *4*, 353-356.
10. Kazuma K., Noda N., Suzuki M., *Phytochemistry*, **2003**, *62*, 229-237.
11. Hara S., Okabe H., Mihashi K., *Chem. Pharm. Bull.*, **1987**, *35*, 501-506.

第 7 章 関節リウマチ滑膜線維芽細胞に細胞毒性を持つ

植物成分の探索研究

第 1 節 研究背景、目的

関節リウマチは、関節の炎症、変形・不安定化を引き起こす自己免疫疾患である。本疾患の発症メカニズムは、抗原提示細胞が T 細胞を活性化することで IL-1、IL-6 等のサイトカインの産生および、腫瘍壊死因子 TNF- α が産生されることから始まる。そして、サイトカインにより活性化した B 細胞やマクロファージからのさらなるサイトカイン産生により、活性化した滑膜線維芽細胞による骨破壊が生じる。病理学的特徴として、滑膜の肥厚化・炎症性細胞の浸潤・血管新生などがあるが、特に代表的な所見は、滑膜線維芽細胞による骨破壊・パンヌス形成である¹⁾。

関節リウマチの治療薬の第一選択は、免疫抑制剤の 1 つである methotrexate である (Figure 7-1-1)。また、近年では、関節リウマチの発症メカニズムにおける重要なファクターである腫瘍壊死因子 (TNF) や IL-6 を標的とする生物学的製剤、新たな小分子医薬品である JAK (Janus kinase) 阻害薬も承認されており、関節リウマチ治療の環境は大きく向上してきている²⁾。

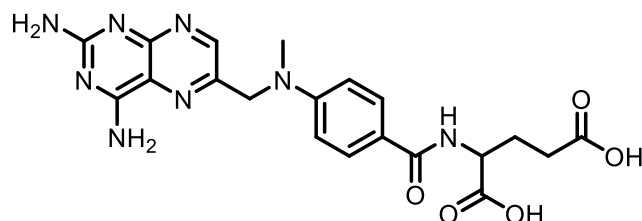


Figure 7-1-1 methotrexate の構造

しかし、上記の治療薬にはいくつかの問題点がある。第 1 に、従来の抗リウマチ薬では、痛みや腫れのコントロールは可能であっても機能障害を防ぐことは難しい。近年登場してきている生物学的製剤や JAK 阻害薬は、この課題を克服しているが、発症早期からの治療が必要であり、これらの薬価は高額である。第 2 に、現在主流の抗リウマチ薬は、強力な免疫抑制作用を持つために、副作用として日和見感染や結核、敗血症などの感染症のリスクがあり、十分なコントロールが必要である。

近年、関節の炎症を引き起こしている根本的な部分である滑膜線維芽細胞に新たな治療標的としての注目が集まっている。滑膜線維芽細胞については、以前から IL-6 などの炎症性サイトカインやタンパク質分解酵素を放出することで関節の炎症に関わっていることがわかっていた。さらに、2021 年には東京大学大学院医学研究科の小松紀子助教、高柳広教授らによって、破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) を発現することで破骨細胞を誘導し、骨破壊を引き起こすことも明らかにされた³⁾。従って、滑膜線維芽細胞の増殖を抑制するような低分子化合物は、既存の抗リウマチ薬では無効・禁忌であった症例でも有効である可能性がある。他、免疫抑制作用を持たないために感染症のリスクが抑えられ、また医療費の抑制にも貢献しうることが期待できる。

関節リウマチ患者由来の滑膜線維芽細胞は、東京大学の宮沢敬治博士により株化され、MH7A として今日研究に利用されている⁴⁾。MH7A に増殖抑制作用を示した化合物はこれまでに複数報告されており、天然物としてはツルボラン科植物 *Aloe vera* から aloe emodin⁵⁾、シソ科植物 *Salvia miltiorrhiza* から cryptotanshinone⁶⁾ などが単離されている (Figure 7-1-2)。しかし、MH7A のみに対して生物活性評価を行なったものがほとんどであり、その他の細胞株に対する影響は評価されていない。

そこで、本研究では、次節にて述べる細胞毒性評価法を用いて、当研究室の岩田樹修士により行われたタイ産植物エキスコレクションのスクリーニングにより見出されたマメ科 *Xylia kerrii* 葉部の未分画な活性画分の分画を行うことで、関節リウマチ滑膜線維芽細胞 MH7A に対して選択的な細胞毒性を示す天然物を探索した。

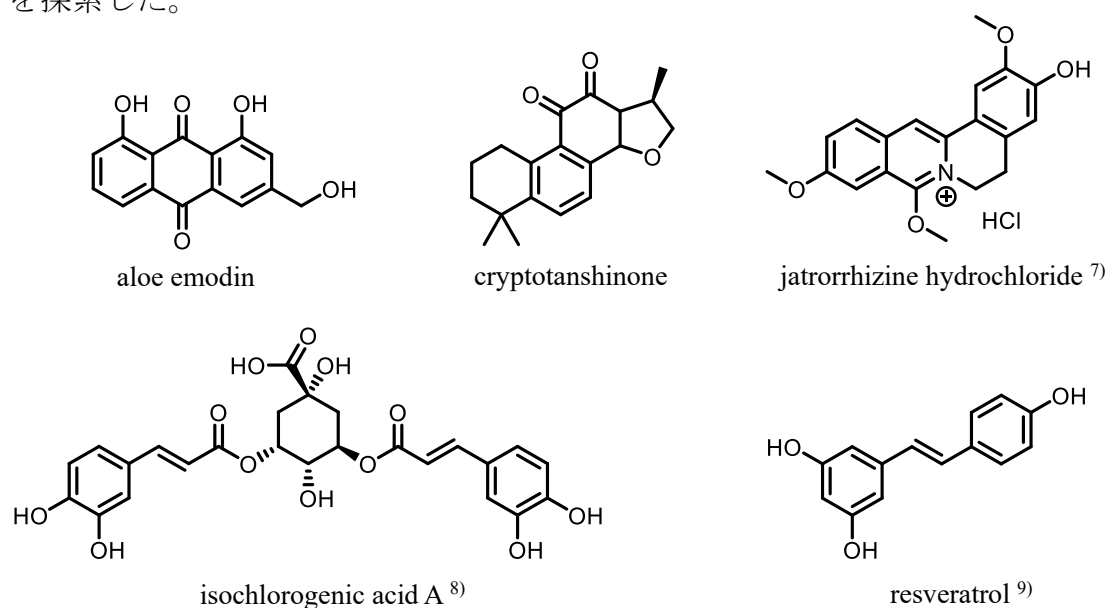


Figure 7-1-2 過去に MH7A 増殖抑制作用が報告されている天然物

第 2 節 細胞毒性評価法

滑膜線維芽細胞への増殖抑制作用を評価するため、理化学研究所から購入した関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株 MH7A を用いた、FMCA 法による細胞毒性評価法が当研究室の山崎秀太修士により構築された。本評価法では、滑膜線維芽細胞に選択的な細胞毒性を有するサンプルを見出すとともに、methotrexate による重大な副作用である間質性肺炎を誘発しにくいサンプルも探索するために、比較対象として国立研究開発法人医薬基盤 健康 栄養研究所 JCRB 細胞バンクから購入した正常ヒト肺胞線維芽細胞株 WI38VA13 sub 2 RA (以下、WI38VA13) についても同様の細胞毒性試験を行った¹⁰⁾。

本評価法では、細胞生存率が $MH7A < WI38VA13$ となるサンプルを関節リウマチ滑膜線維芽細胞株 MH7A に選択的な細胞毒性を示すサンプルとした (Figure 7-2-1)。なお、positive control には actinomycin D (Act. D, 5 nM) を用いた。

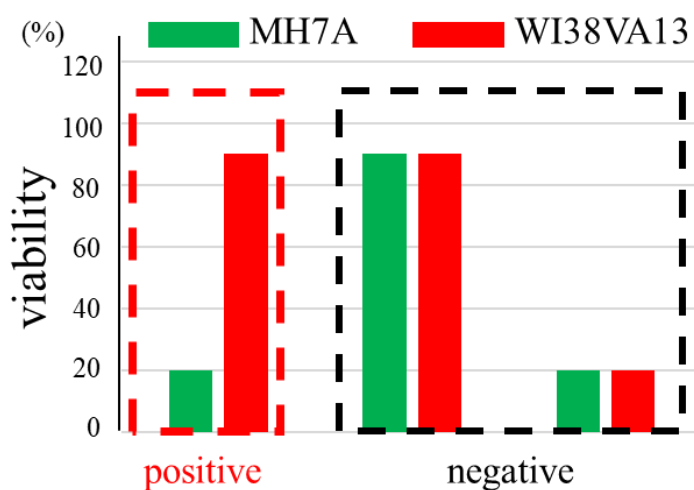


Figure 7-2-1 細胞毒性評価法

第 3 節 *Xylia kerrii* からの成分探索



Figure 7-3-1 *Xylia kerrii*

(<http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Xylia+xylocarpa> より引用)

マメ科植物 *Xylia kerrii* は主にタイなど南アジア、東南アジアに分布しており、epiafzelechin などのフラバノールや、gallic acid が単離されている¹¹⁾。また、lupeol、betulin などのトリテルペノイドが単離報告されている¹²⁾ (Figure 7-3-2)。本植物の抽出エキスは、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* への抗菌活性および、抗酸化活性が報告されている¹¹⁾。

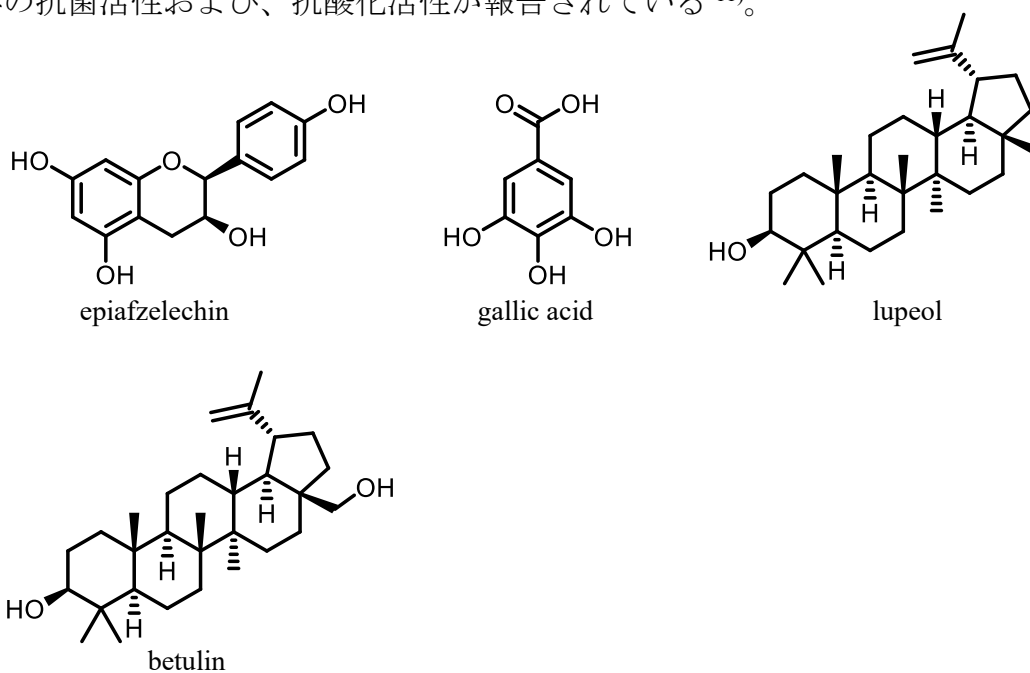


Figure 7-3-2 *Xylia kerrii* から単離報告がある天然物

第 4 節 細胞毒性を指標とした *Xylia kerrii* の分画-1

本節では、当研究室の岩田樹修士により行われた *Xylia kerrii* の 3 series までの分画について記載する¹³⁾ (Figure 7-4-1)。次節にて、3 series 以降の分画について述べる。

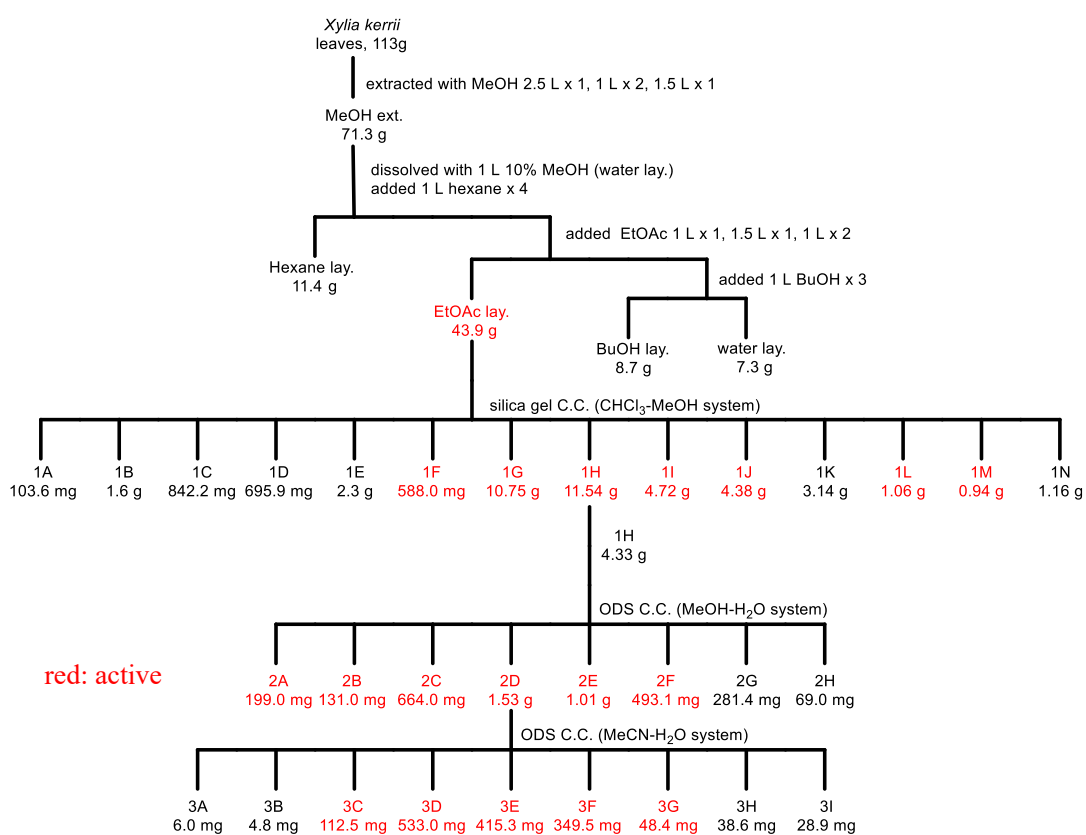


Figure 7-4-1 *Xylia kerrii* の分画

X. kerrii の葉部を MeOH にて抽出した。得られた MeOH 抽出物 (71.3 g) を 10% MeOH に溶解させ、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で液液分配することで hexane 層 (11.4 g)、EtOAc 層 (43.9 g)、BuOH 層 (8.7 g)、H₂O 層 (7.3 g) を得た。各層を silica gel TLC で分析した (Figure 7-4-2)。各層の活性評価の結果、EtOAc 層に活性が移行した (Figure 7-4-3)。

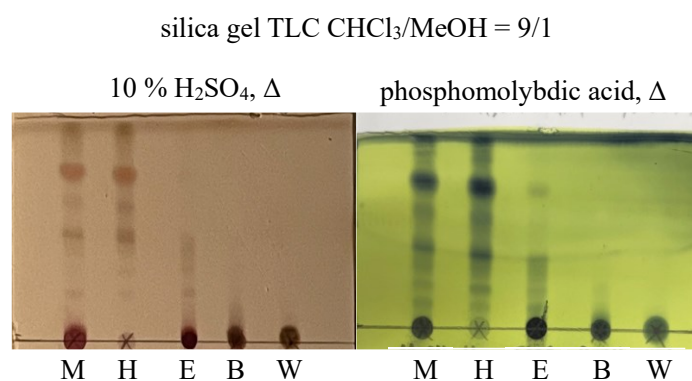


Figure 7-4-2 各層の silica gel TLC による分析

MeOH 抽出物: M hexane 層: H EtOAc 層: E 水飽和 BuOH 層: B 水層: W

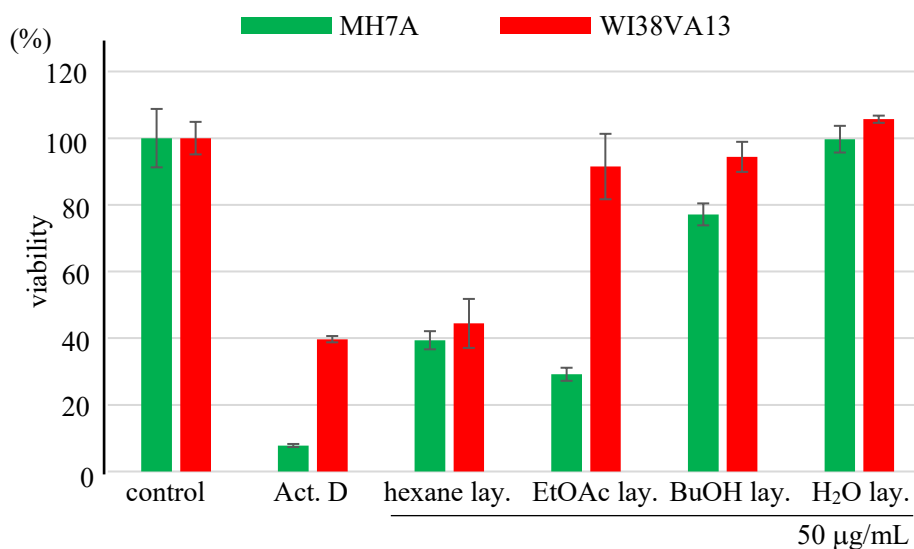


Figure 7-4-3 各層の細胞毒性の評価

(control = DMSO 0.1%, Act. D = actinomycin D 5nM)

MH7A 選択的な細胞毒性を示した EtOAc 層について、CHCl₃/MeOH を用いた silica gel カラム (φ80x340 mm) にて分画することで、1 series (1A-1N) を得た。EtOAc 層から得られた 1 series を silica gel TLC で分析した (Figure 7-4-4)。また、細胞毒性を評価したところ、1F-1J, 1L, 1M に活性は移行した (Figure 7-4-5)。

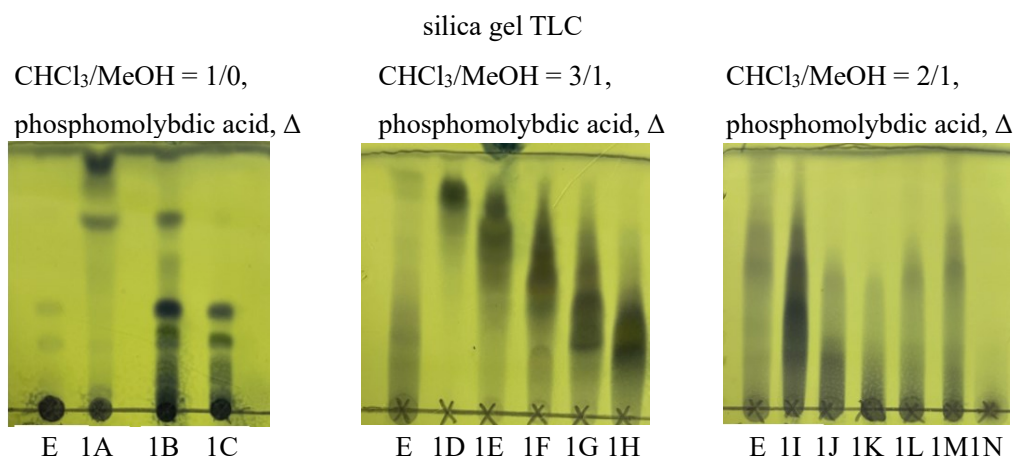


Figure 7-4-4 1 series の silica gel TLC

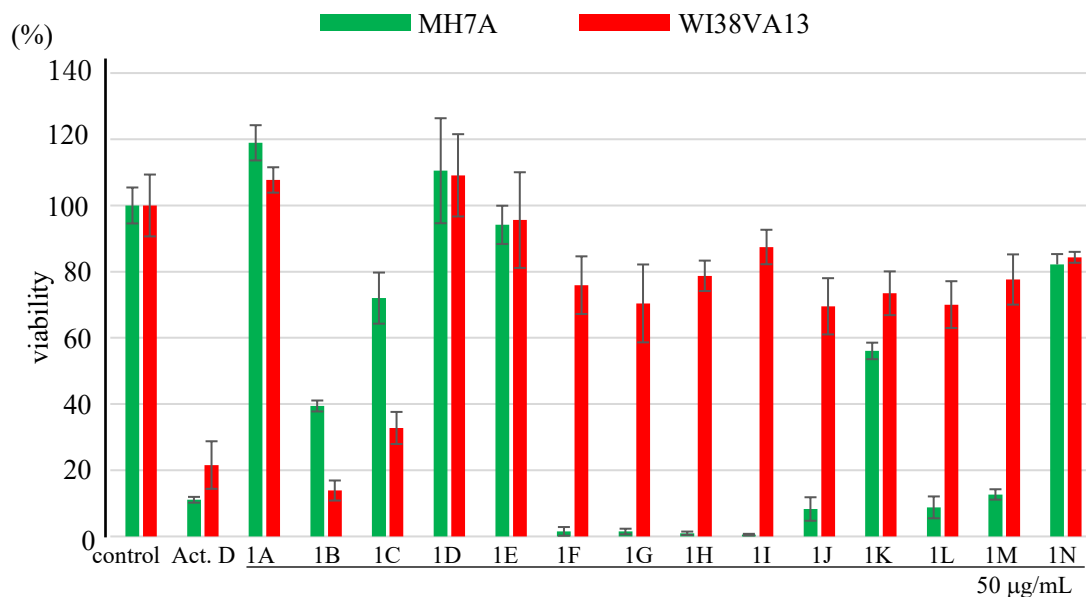


Figure 7-4-5 1 series の細胞毒性の評価

MH7A 選択的な細胞毒性を示した 1H の一部 (4.3 g) について、MeOH/H₂O を用いて ODS カラム (φ80x185 mm) にて分画することで、2 series (2A-2H) を得た。1H から得られた 2 series を ODS TLC で分析した (Figure 7-4-6)。また、細胞毒性を評価したところ、2A-2F に活性は移行した (Figure 7-4-7)。

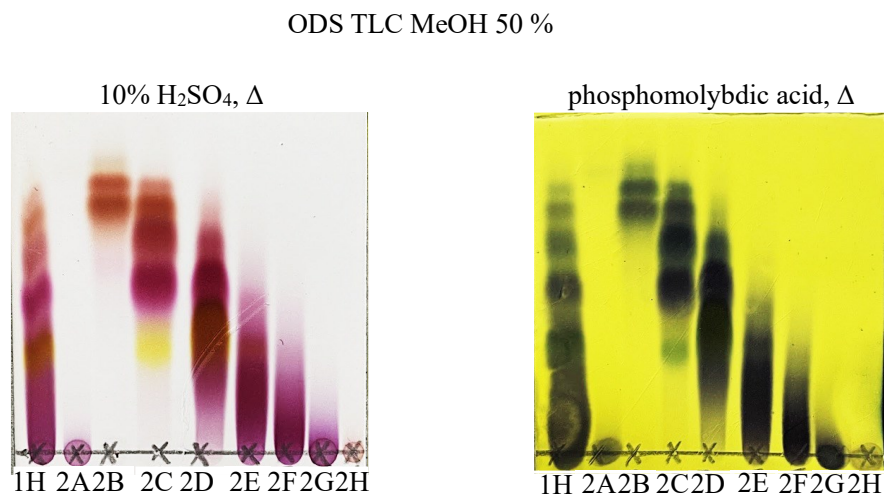


Figure 7-4-6 2 series の ODS TLC

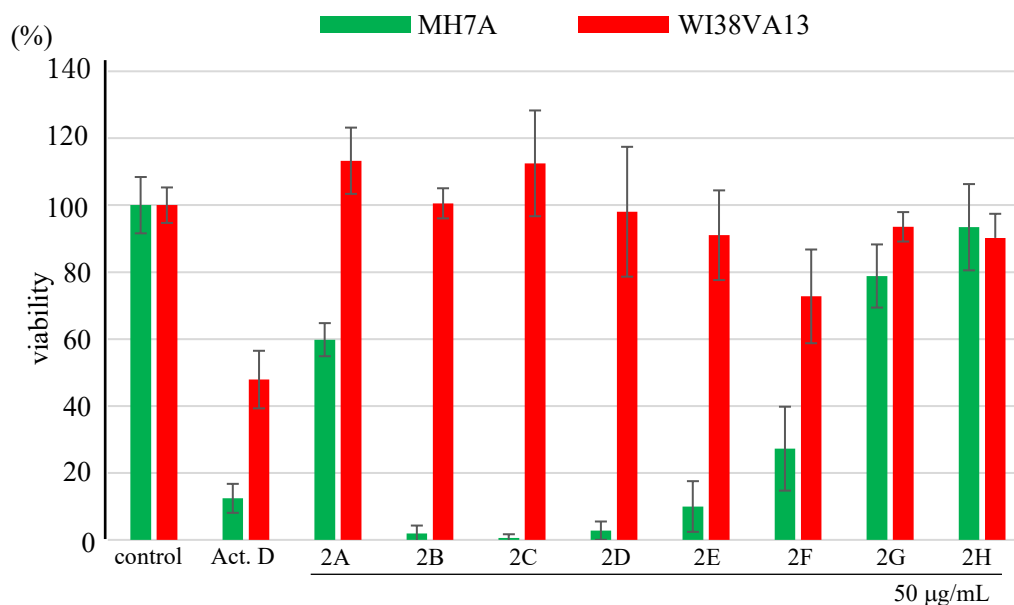


Figure 7-4-7 2 series の細胞毒性の評価

MH7A 選択的な細胞毒性を示した 2D について、MeCN/H₂O を用いて ODS カラム (φ80x180 mm) にて分画することで、3 series (3A-3I) を得た。2D から得られた 3 series を ODS TLC で分析した (Figure 7-4-8)。また、細胞毒性を評価したところ、3C-3G に活性は移行した (Figure 7-4-9)。

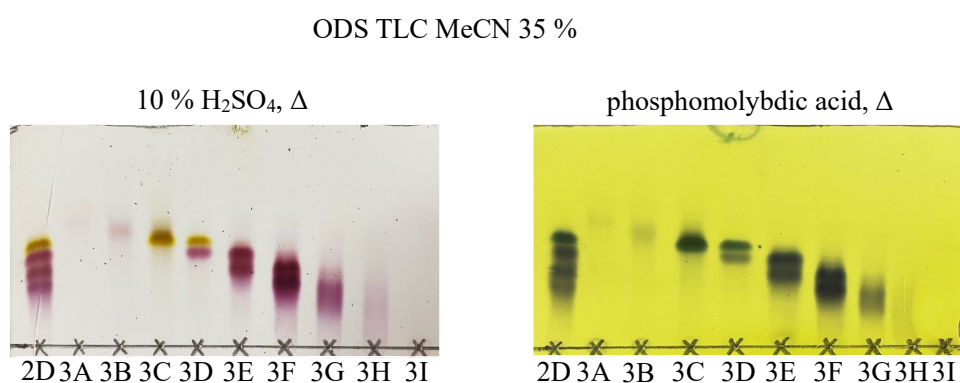


Figure 7-4-8 3 series の ODS TLC



Figure 7-4-9 3 series の細胞毒性の評価

第 5 節 細胞毒性を指標とした *Xylia kerrii* の分画-2

本節では、著者により行われた *Xylia kerrii* の 3 series 以降の分画について記載する。

MH7A 選択的な細胞毒性を示した 3D を $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 1/1$ を用いた Sephadex LH-20 カラム ($\phi 20 \times 500 \text{ mm}$) にて分画することで、4 series (4A-4H) を得た。3D から得られた 4 series を ODS TLC で分析した (Figure 7-5-1)。また、得られた 4 series の細胞毒性を評価したところ、4E, 4F に細胞毒性が観察された (Figure 7-5-2)。

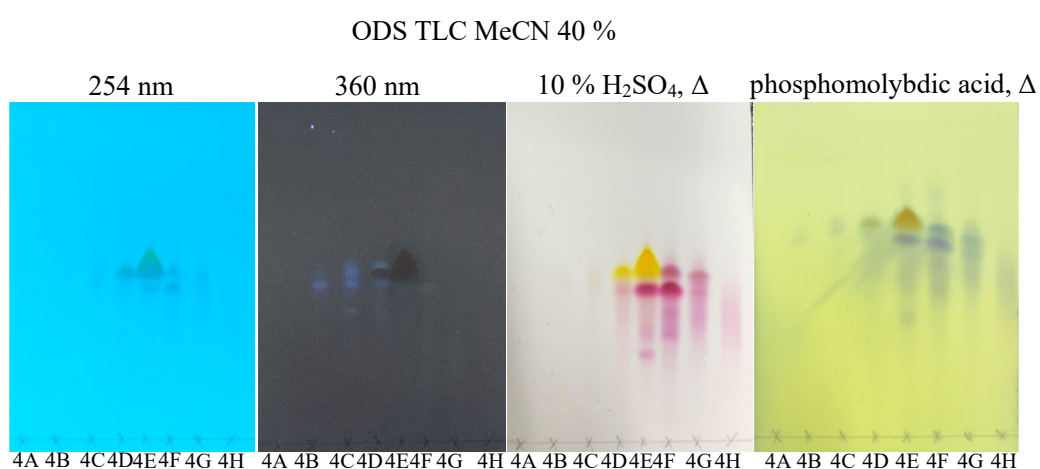


Figure 7-5-1 4 series の ODS TLC

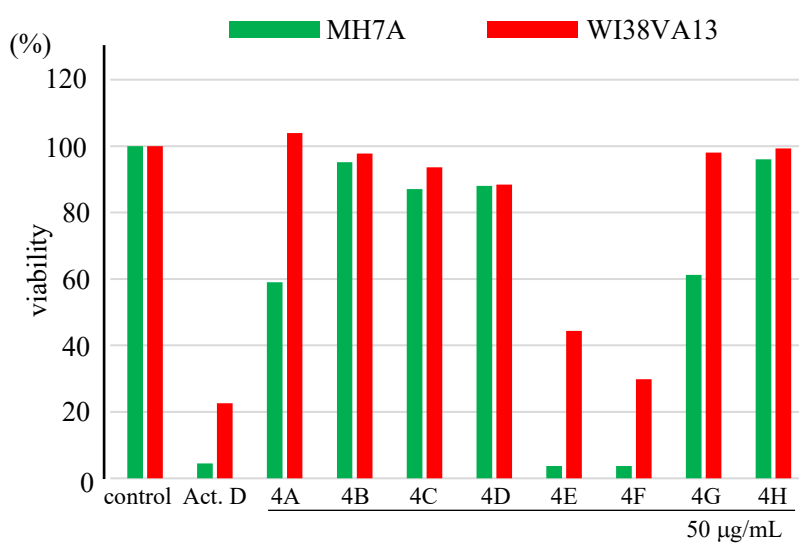


Figure 7-5-2 4 series の細胞毒性の評価

MH7A 選択的な細胞毒性を示した 4E を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 4/21) により分画することで、5 series (5A-5G) を得た (Figure 7-5-3)。4E から得られた 5 series を ODS TLC で分析した (Figure 7-5-4)。5 series の内、5B を **38** (t_R 13.6, 2.5 mg)、5C を **39** (t_R 15.2, 63.7 mg)、5F を **40** (t_R 32.8, 3.3 mg) とした。

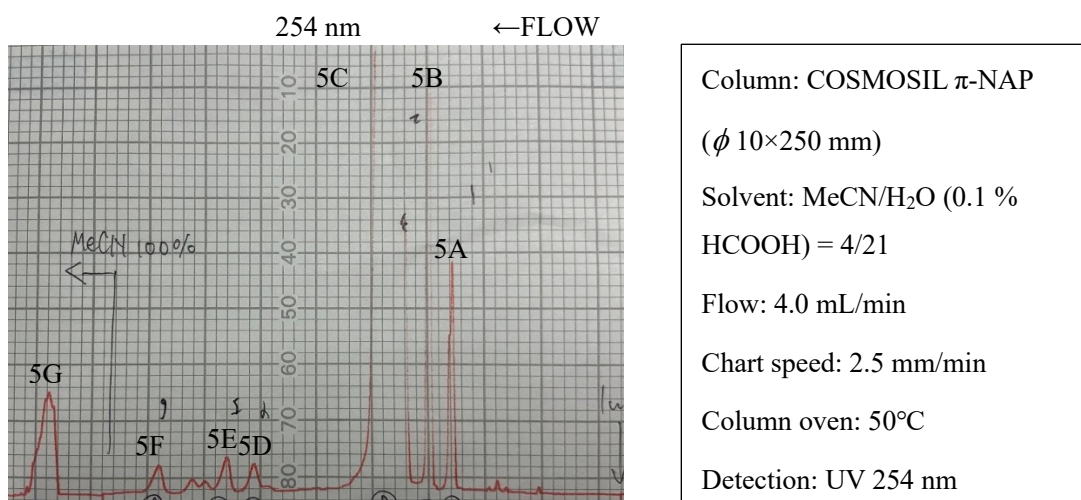


Figure 7-5-3 4E の HPLC による分画

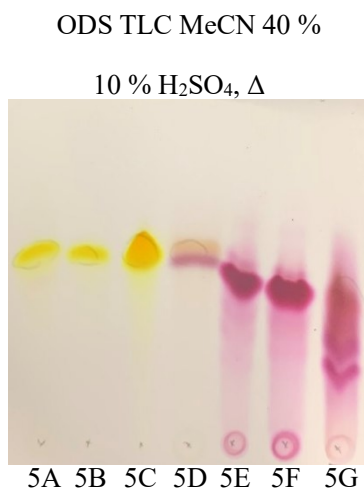


Figure 7-5-4 5 series の ODS TLC

MH7A 選択的な細胞毒性を示した 4F を HPLC (COSMOSIL π -NAP、MeCN/H₂O (0.1% HCOOH) = 7/43) により分画することで、6 series (6A-6F) を得た (Figure 7-5-5)。4F から得られた 6 series を ODS TLC で分析した (Figure 7-5-6)。6 series の内、6C を **41** (t_R 26.0, 2.6 mg)、6E を **42** (t_R 42.4, 1.9 mg)、6F を **40** (t_R 46.4, 5.6 mg) とした。

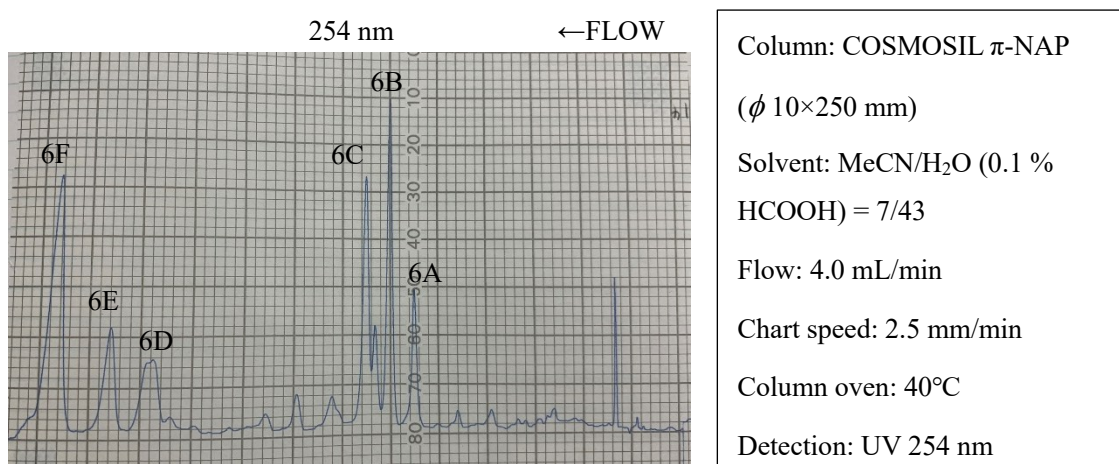


Figure 7-5-5 4F の HPLC による分画

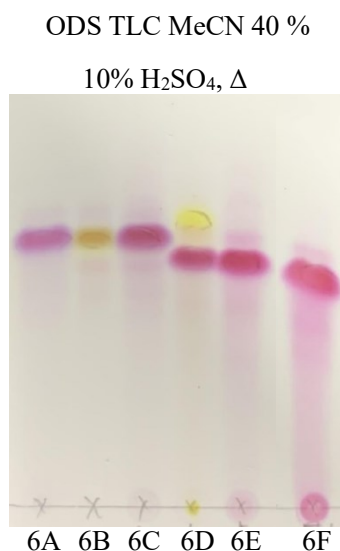


Figure 7-5-6 6 series の ODS TLC

第 6 節 *Xylia kerrii* から単離された化合物

Xylia kerrii の葉部より単離した化合物について NMR および MS スペクトルによる構造解析を実施し、新規ビフラボノイド 3 種 (**40-42**)、既知フラボノイド 2 種 (myricetin-3-*O*- β -D-xyloside (**38**)^{13,14}、myricitrin (**39**)¹⁵) を得た (Figure 7-6-1)。化合物 **40-42** は新規化合物であったことから、次節以降にて詳細を述べる。

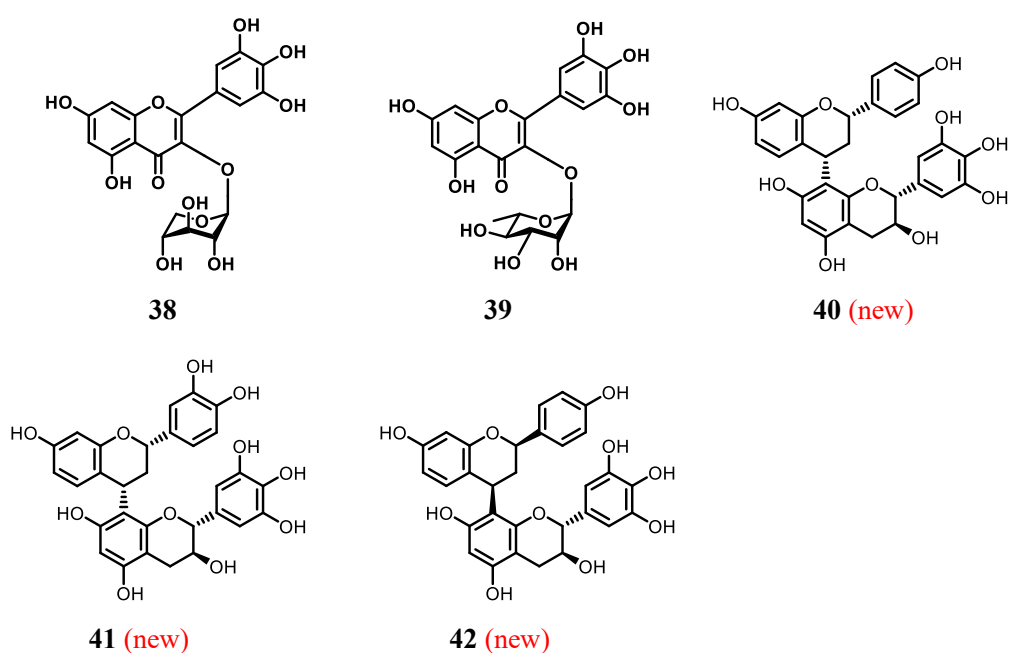


Figure 7-6-1 *Xylia kerrii* からの単離化合物

第 7 節 化合物 40 の構造解析

化合物 40 は黄色粉末であり、HR-ESI-MS にて m/z 569.1424 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{30}H_{26}O_{10}Na$, 569.1424) であったことから、分子式を $C_{30}H_{26}O_{10}$ であると決定した。IR スペクトルからヒドロキシ基 (3350 cm^{-1}) の存在が示唆された。

$^1\text{H-NMR}$ から、芳香環 [δ_{H} 6.43 (1H, d, H₁₋₄), 6.11 (1H, dd, H₁₋₆), 6.08 (1H, d, H₁₋₈), 7.22 (1H, d, H_{1-2'}), 1H, d, H_{1-6'}), 6.74 (1H, d, H_{1-3'}), 1H, d, H_{1-5'}), 5.90 (1H, s, H_{1-6''}), 6.24 (1H, s, H_{1-2'''}), 1H, s, H_{1-6'''})] の存在が示唆された (Figure 7-7-1)。 $^{13}\text{C-NMR}$ から、芳香環 [δ_{C} 128.2 (C-5), 107.6 (C-6), 155.5 (C-7), 102.4 (C-8), 155.5 (C-9), 118.0 (C-10), 132.2 (C-1'), 127.6 (C-2', 6'), 115.0 (C-3', 5'), 156.9 (C-4'), 154.4 (C-5''), 96.0 (C-6''), 153.9 (C-7''), 107.4 (C-8''), 153.9 (C-9''), 98.6 (C-10''), 130.1 (C-1'''), 105.7 (C-2''', 6'''), 145.6 (C-3''', 5'''), 132.5 (C-4''')] の存在が示唆された (Figure 7-7-2)。

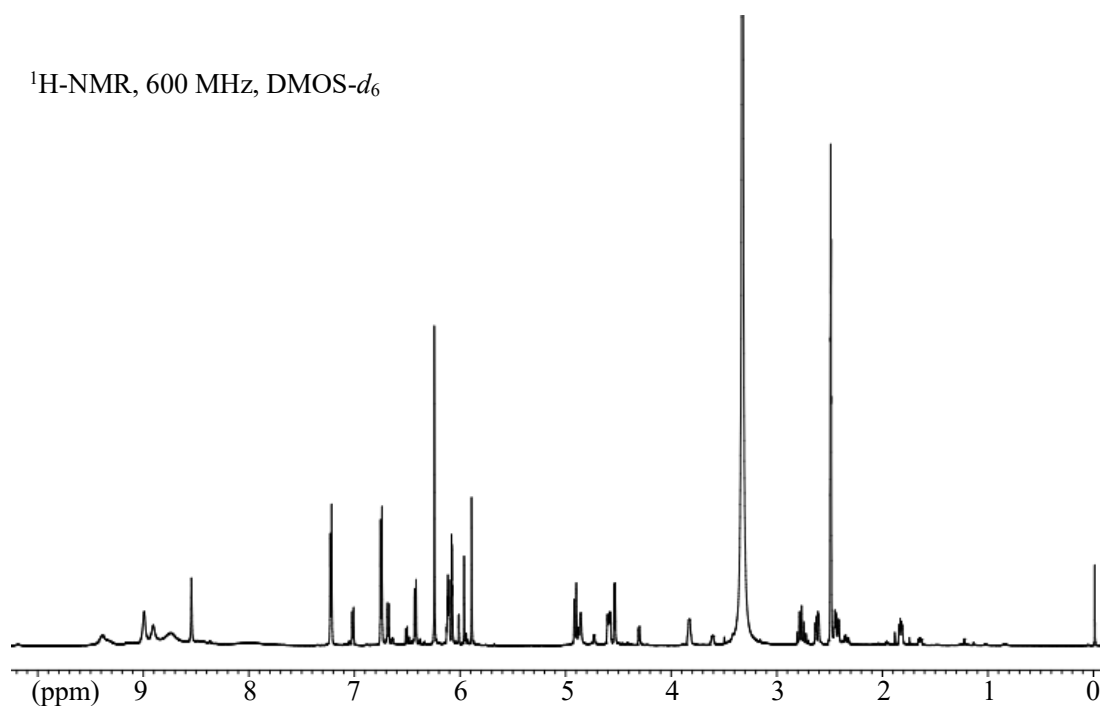


Figure 7-7-1 化合物 40 の $^1\text{H-NMR}$

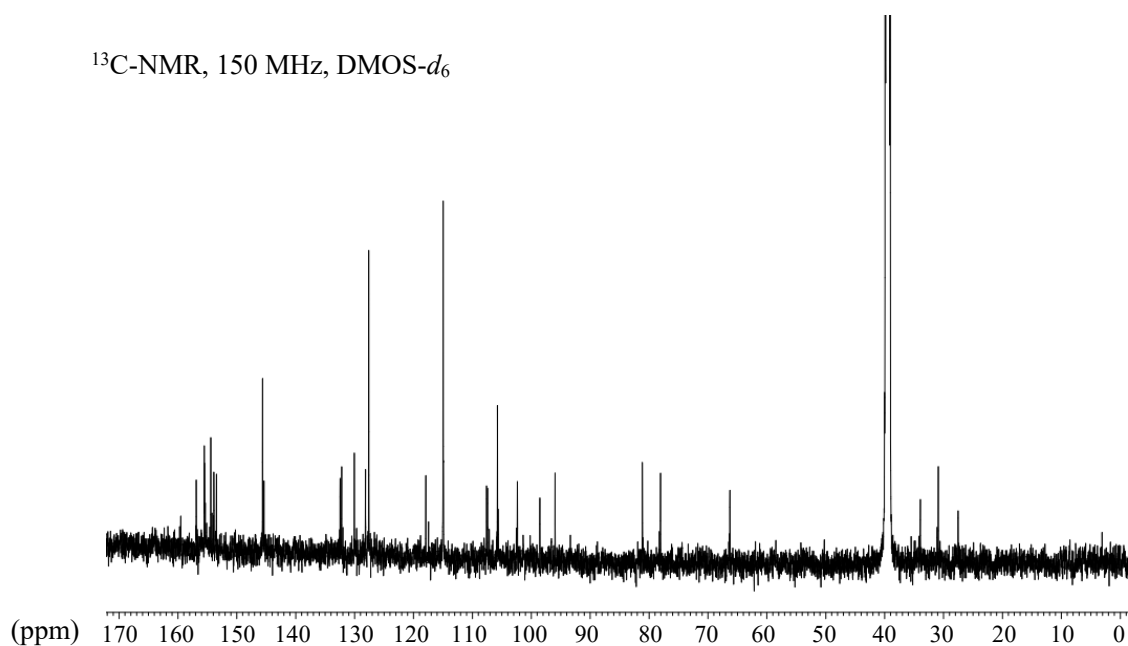


Figure 7-7-2 化合物 **40** の $^{13}\text{C-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ より、2 つの化合物の存在が示唆されたが、既知ビフラボノイドにて、rotamer が報告されていることから¹⁶⁾、C-4 → C-8'' に由来する 2 つの rotamer が示唆された。また、 $^1\text{H-NMR}$ の積分定数より、2 つの rotamer の存在比は major rotamer/minor rotamer = 4/1 であった。そのため、major rotamer の構造解析を行った。

^1H - ^1H COSY より、 $\text{H}_1\text{-2}$ (δ_{H} 4.91)/ $\text{H}_2\text{-3}$ (δ_{H} 2.78, 1.83), $\text{H}_2\text{-3}/\text{H}_1\text{-4}$ (δ_{H} 4.59) への相関が観測され、HMBC の解析より、 $\text{H}_1\text{-2}$ から C-4 (δ_{C} 31.0), $\text{C-1}'$ へ、 $\text{H}_2\text{-3}$ から C-10 へ、 $\text{H}_1\text{-5}$ から C-4 , C-9 へ、 $\text{H}_1\text{-6}$ から C-10 へ、 $\text{H}_1\text{-8}$ から C-7 , C-10 へ、 $\text{H}_1\text{-2}'$ から C-2 (δ_{C} 78.1), $\text{C-3}'$, $\text{C-4}'$ へ、 $\text{H}_1\text{-5}'$ から $\text{C-1}'$, $\text{C-3}'$ への相関が観測されたことから、フラバンを推定した。次に、 ^1H - ^1H COSY より、 $\text{H}_1\text{-2}''$ (δ_{H} 4.54)/ $\text{H}_1\text{-3}''$ (δ_{H} 3.83), $\text{H}_1\text{-3}''/\text{H}_2\text{-4}''$ (δ_{H} 2.62, 2.43) への相関が観測され、HMBC の解析より、 $\text{H}_1\text{-2}''$ から $\text{C-4}''$ (δ_{C} 27.6), $\text{C-9}''$, $\text{C-1}'''$ へ、 $\text{H}_2\text{-4}''$ から $\text{C-5}''$, $\text{C-10}''$ へ、 $\text{H}_1\text{-6}''$ から $\text{C-7}''$, $\text{C-10}''$ へ、 $\text{H}_1\text{-2}'''$ から $\text{C-2}''$ (δ_{C} 81.2), $\text{C-3}'''$, $\text{C-4}'''$, $\text{C-6}'''$ への相関が観測されたことから、フラバン-3-オールを推定した。フラバン、フラバン-3-オールは、HMBC の解析より、 $\text{H}_1\text{-4}$ から $\text{C-8}''$, $\text{C-8}'$ へ、 $\text{H}_1\text{-6}''$ から $\text{C-8}''$ への相関が観測されたことから連結された (Figure 7-7-3)。

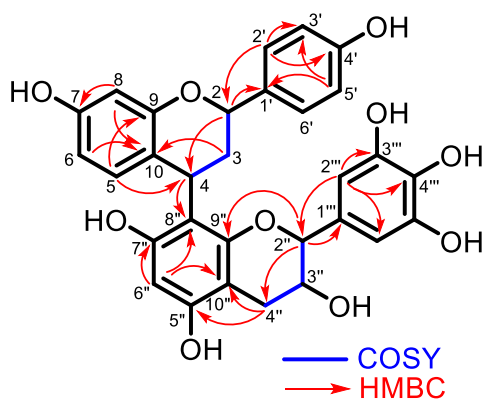


Figure 7-7-3 化合物 40 の COSY, HMBC

化合物 **40** の相対配置の解析のため、 $^1\text{H-NMR}$ のカップリング定数、NOESY の解析を試みた。フラバン-3-オール の $\text{H}_1\text{-}2''/\text{H}_1\text{-}3''$ の $^1\text{H-NMR}$ カップリング定数は 6.9 Hz であった。カップリング定数が $J > 5.0\text{ Hz}$: *trans*, $J < 2.0\text{ Hz}$: *cis* であることが知られているため¹⁷⁾、フラバン-3-オール の $2''/3''$ は *trans* の関係であることが示唆された。NOESY の解析から、 $\text{H}_1\text{-}2/\text{H}_1\text{-}4$ との相関が観測され、それぞれの $^1\text{H-NMR}$ カップリング定数は 11.7 Hz であったことから、2 位および 4 位は *axial* であり、*syn* 配置であることが示唆された (Figure 7-7-4)。

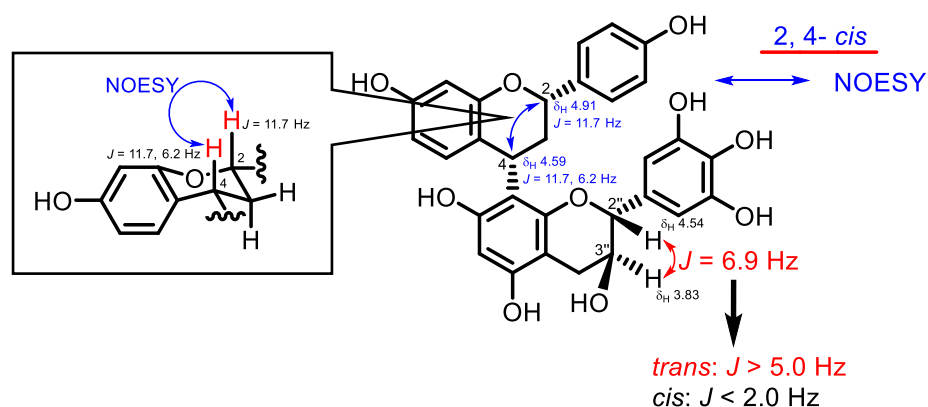


Figure 7-7-4 化合物 **40** の相対配置の推定

次に、化合物 **40** の絶対配置の推定を CD スペクトルにより決定した。

化合物 **40** の CD スペクトル値は、 $218.5 (-21.0)$ 、 $273.5 (+1.2)$ 、 $287.0 (-1.2)\text{ nm}$ であった。初めに、 218.5 nm について着目した。4 位、 $8''$ 位が結合しているビフラボノイドの場合、 220 nm 付近に $4R$: 正のコットン効果、 $4S$: 負のコットン効果が観測されることが報告されている^{16, 17, 18, 19)}。化合物 **40** は 218.5 nm に負のコットン効果が観測されていることから、4 位の立体は *S* であると決定した。次に、 287.0 nm に着目した。化合物 **40** の 2 位、 $2''$ 位には、 $\pi\text{-}\pi^*$ 吸収帯を有する最大吸収波長の近い発色団が存在する。つまり、 287.0 nm の正負のコットン効果は、2 位、 $2''$ 位の立体により制御されている。化合物 **40** は、*major rotamer* と *minor rotamer* の存在が $^1\text{H-NMR}$ より示唆されているが、*major rotamer* の存在比は *minor rotamer* の約 4 倍であることから、*minor rotamer* の CD スペクトルへの寄与は小さいことが考えられる。そのため、化合物 **40** と類似化合物の CD スペクトルを比較した。

Lou ら、Phansalkar らが報告した CD スペクトルによると、287.0 nm 付近に 2 位、2''位が (S, S), (S, R), (R, S) の場合、正のコットン効果が生じる。一方で (R, R) の場合、負のコットン効果が生じることがわかっている^{18,19}。化合物 **40** は 287.0 nm に負のコットン効果が観測されていることから、2 位、2''位は (R, R) であると決定した (Figure 7-7-6, 7)。

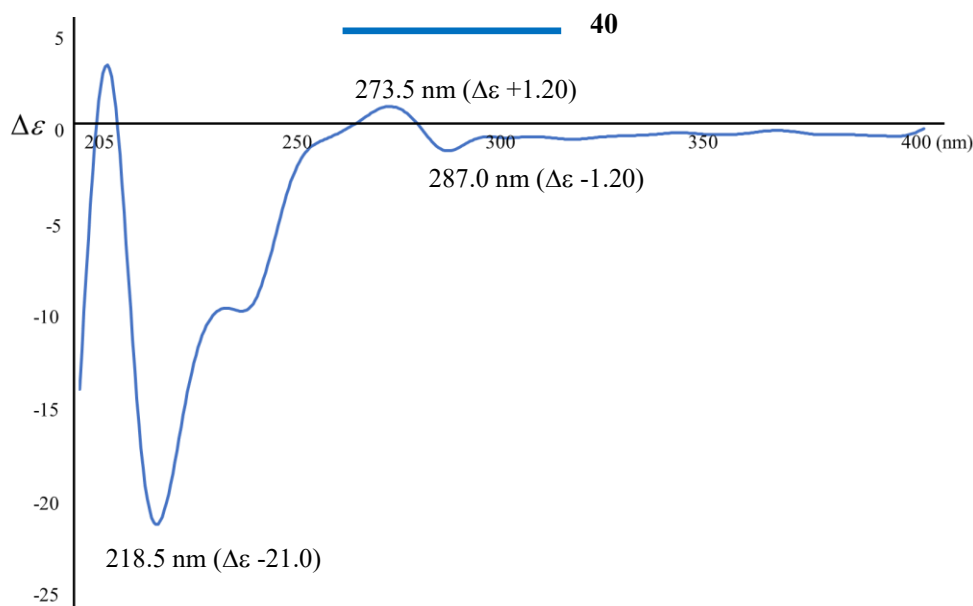


Figure 7-7-6 化合物 **40** の CD スペクトル

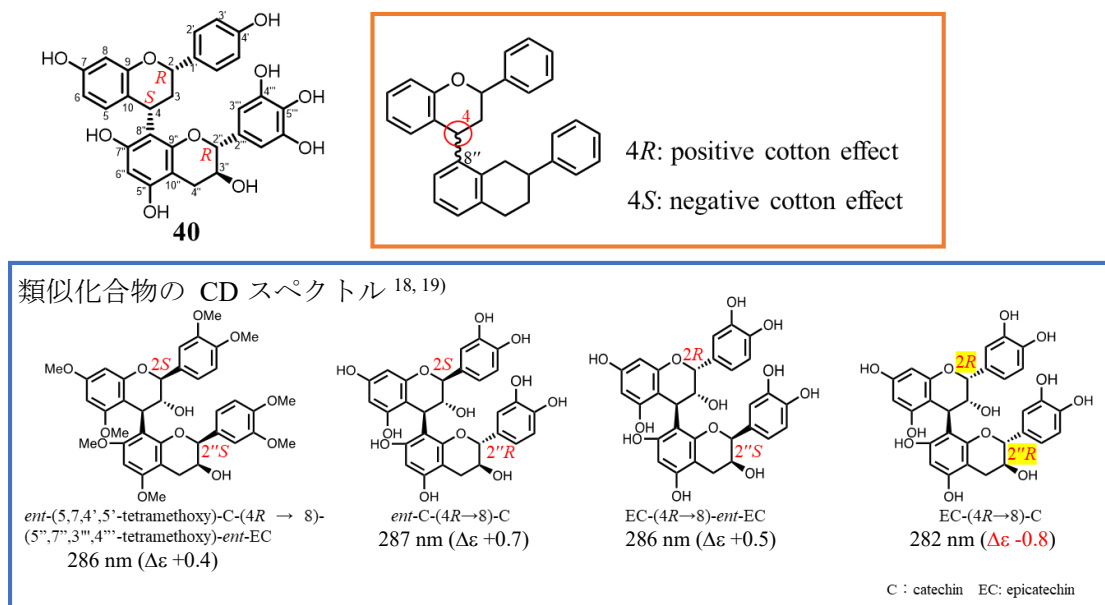


Figure 7-7-7 化合物 **40** の立体配置の決定

第 8 節 化合物 41 の構造解析

化合物 41 は黄色粉末であり、HR-ESI-MS にて m/z 585.1402 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{30}H_{26}O_{11}Na$, 585.1373) であったことから、その分子式を $C_{30}H_{26}O_{11}$ であると決定した。IR スペクトルからヒドロキシ基 (3320 cm^{-1}) の存在が示唆された。化合物 40 の分子式および、分子量は $C_{30}H_{26}O_{10}$, 562 であったため、化合物 41 はヒドロキシ基 1 つ増加した構造であることが推定された。そこで、化合物 40 と $^1\text{H-NMR}$ を比較した結果、7.0 ppm 付近のシグナルピークが異なっていた。化合物 40 の 7.0 ppm 付近のシグナルピークは、1'-6' の芳香環上のプロトンに相当するため、この部分構造が異なることが示唆された (Figure 7-8-1)。

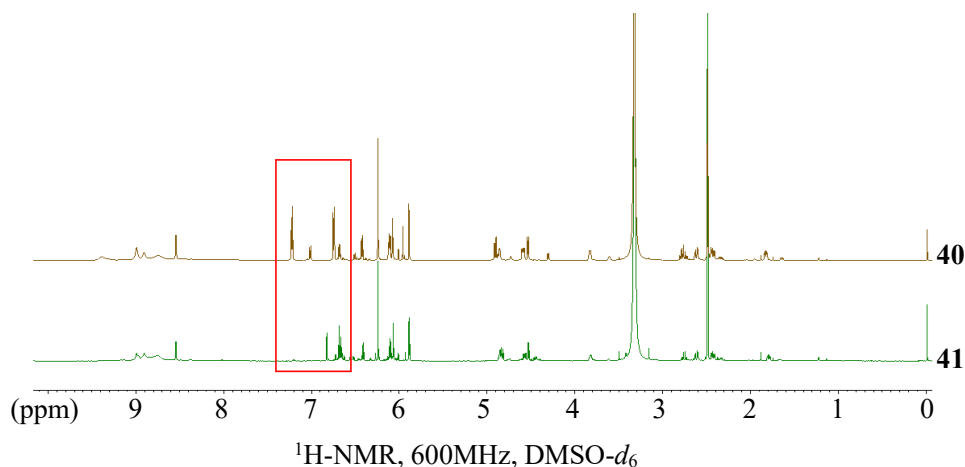


Figure 7-8-1 化合物 40, 41 の $^1\text{H-NMR}$ 比較

HMBC の解析から、 $H_{1-2'}$ ($\delta_H 6.83$) から $C-6'$ ($\delta_C 117.9$) へ、 $H_{1-5'}$ ($\delta_H 6.69$) から $C-1'$ ($\delta_C 132.5$), $C-3'$ ($\delta_C 144.9$) へ、 $H_{1-6'}$ ($\delta_H 6.67$) から $C-4'$ ($\delta_C 144.9$), $C-5'$ ($\delta_C 115.2$) への相関が観測されたことから、3 置換ベンゼンの存在が示唆された。また、 H_{1-2} ($\delta_H 4.83$) から $C-1'$ へ、 $H_{1-2'}$ から $C-2$ ($\delta_C 78.2$) への相関が観測されたことから、3 置換ベンゼンは 2 位に連結された。この芳香環を除いた部分構造は化合物 **40** と同様であったことから、化合物 **41** の平面構造の決定に至った (Figure 7-8-2)。

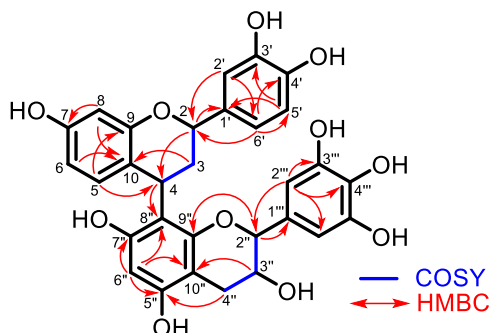


Figure 7-8-2 化合物 **41** の HMBC, COSY の解析

化合物 **41** の相対配置の解析のため、 1H -NMR のカップリング定数、NOESY の解析を試みた。フラバン-3-オール の $H_{1-2''}$ ($\delta_H 4.53$) / $H_{1-3''}$ ($\delta_H 3.82$) の 1H -NMR カップリング定数は 6.9 Hz であったため、 $2''/3''$ は *trans* の関係であることが示唆された。NOESY の解析から、 H_{1-2} ($\delta_H 4.83$) / H_{1-4} ($\delta_H 4.57$) との相関が観測され、それぞれの 1H -NMR カップリング定数は 11.7 Hz であったことから、2 位および 4 位は *axial* であり、*syn* 配置であることが示唆された (Figure 7-8-3)。

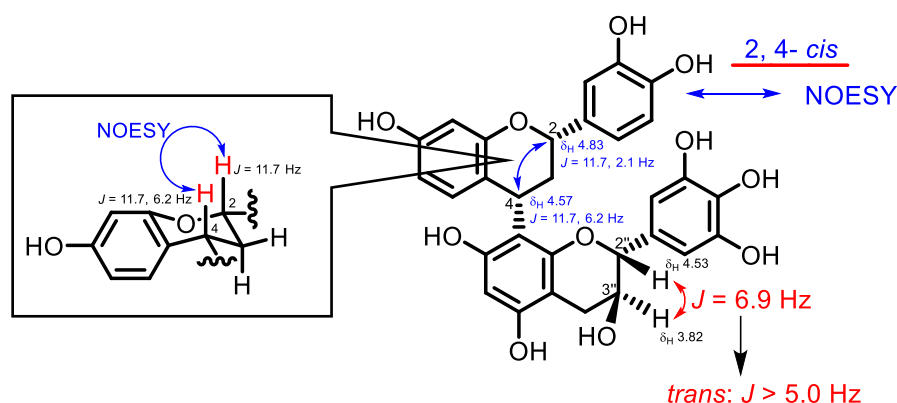


Figure 7-8-3 化合物 **41** の 1H -NMR, NOESY の解析

次に、化合物 **41** と化合物 **40** との CD スペクトルの比較を行った。

化合物 **41** の CD スペクトルは、224.5 nm ($\Delta\epsilon$ -16.9)、273.5 nm ($\Delta\epsilon$ +1.46)、287.5 nm ($\Delta\epsilon$ -1.43) であった。一方、化合物 **40** は、218.5 nm ($\Delta\epsilon$ -21.0)、273.5 nm ($\Delta\epsilon$ +1.20)、287 nm ($\Delta\epsilon$ -1.20) であり、良い一致を示したことから、化合物 **41** は **40** と同様の立体構造を持つことが示唆され、立体構造の決定に至った (Figure 7-8-4)。

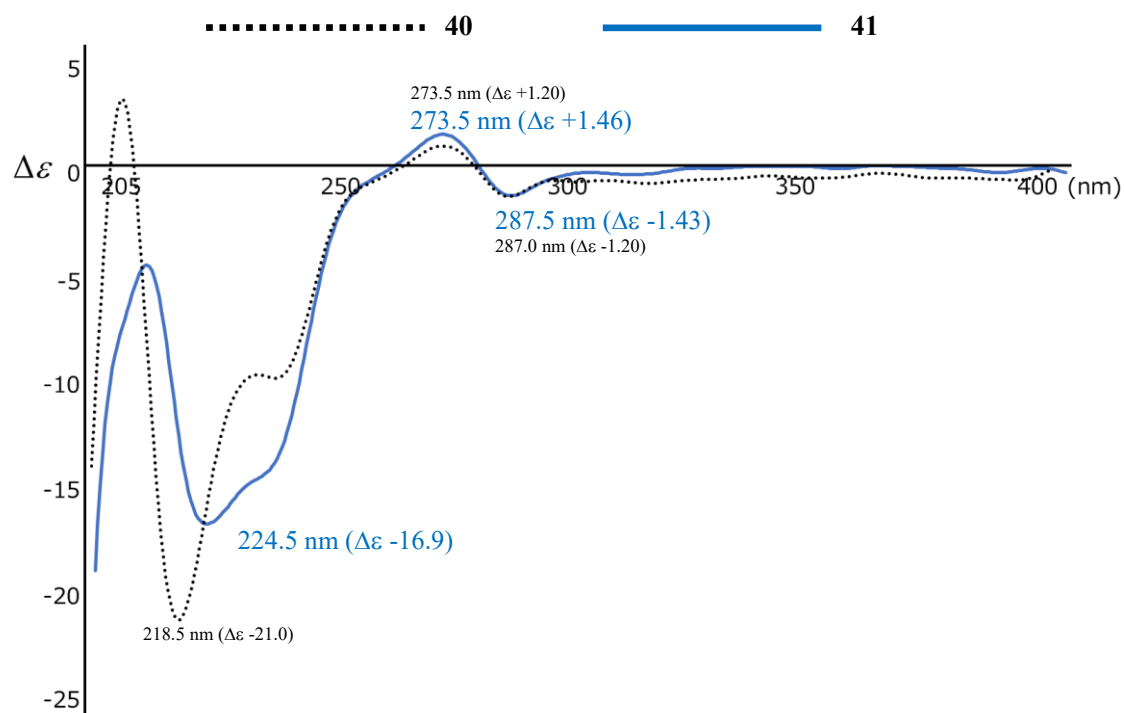


Figure 7-8-4 化合物 **40**, **41** の CD スペクトル

第 9 節 化合物 42 の構造解析

化合物 42 は黄色粉末であり、HR-ESI-MS にて m/z 569.1422 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{30}H_{26}O_{10}Na$,) であったことから、その分子式を $C_{30}H_{26}O_{10}$ であると決定した。IR スペクトルからヒドロキシ基 (3310 cm^{-1}) の存在が示唆された。化合物 42 は、40 と同様の分子式および、分子量 ($C_{30}H_{26}O_{10}$, 546) であった。しかし、 $^1\text{H-NMR}$ シフト値は異なり、HPLC の保持時間が異なることから、化合物 42 は 40 のジアステレオマーであることが示唆された (Figure 7-9-1)。

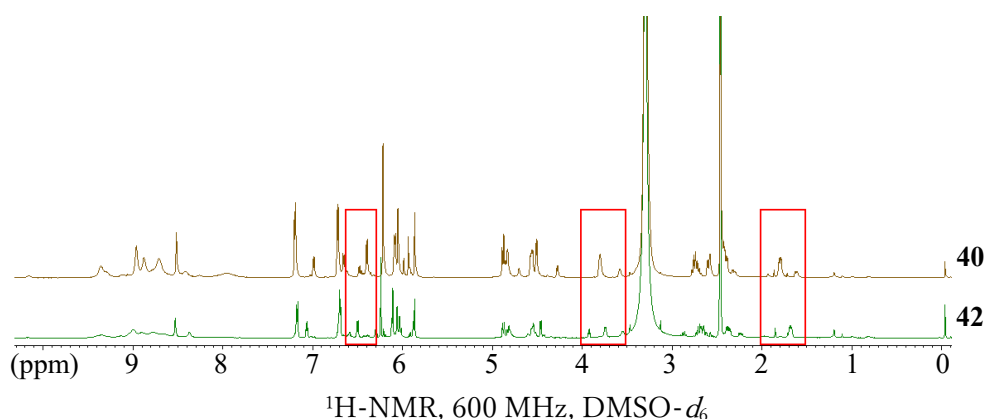


Figure 7-9-1 化合物 40, 42 の $^1\text{H-NMR}$ 比較

相対配置の推定のため、 $^1\text{H-NMR}$, NOESY の解析を行った。フラバノールの $\text{H}_{1-2''}$ ($\delta_{\text{H}} 4.49$) / $\text{H}_{1-3''}$ ($\delta_{\text{H}} 3.77$) の $^1\text{H-NMR}$ カップリング定数は 6.9 Hz であったため、フラバノールの $2''/3''$ は *trans* の関係であることが示唆された。NOESY の解析から、 H_{1-2} ($\delta_{\text{H}} 4.91$) / H_{1-4} ($\delta_{\text{H}} 4.58$) との相関が観測され、それぞれの $^1\text{H-NMR}$ カップリング定数は 11.7, 12.1 Hz であったことから、2 位および 4 位は *axial* であり、*syn* 配置であることが示唆された (Figure 7-9-2)。

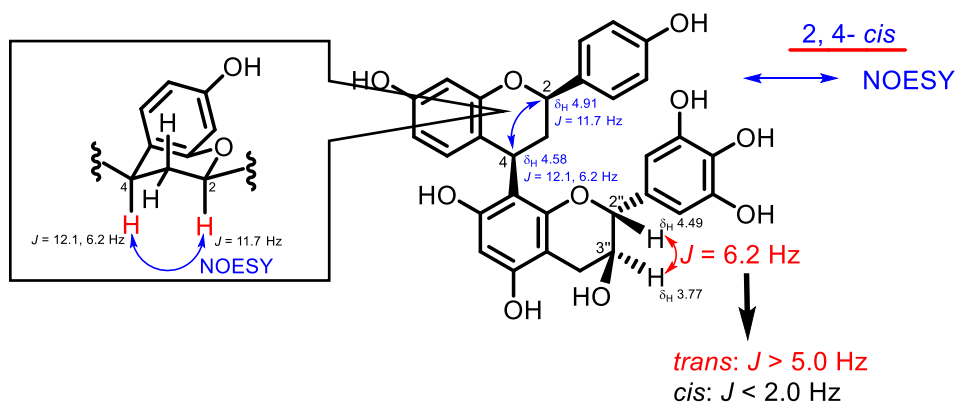


Figure 7-9-2 化合物 42 の $^1\text{H-NMR}$, NOESY の解析

次に、化合物 **42** と化合物 **40** との CD スペクトルの比較を行った。
 化合物 **42** の CD スペクトルは、218.5 nm (+7.0)、274.5 nm (-1.60)、288.0 nm (+0.48) であった。一方、化合物 **40** は、218.5 nm (-21.0)、273.5 nm (+1.20)、287.0 nm (-1.20) であり、正負のコットン効果が異なった (Figure 7-9-3)。

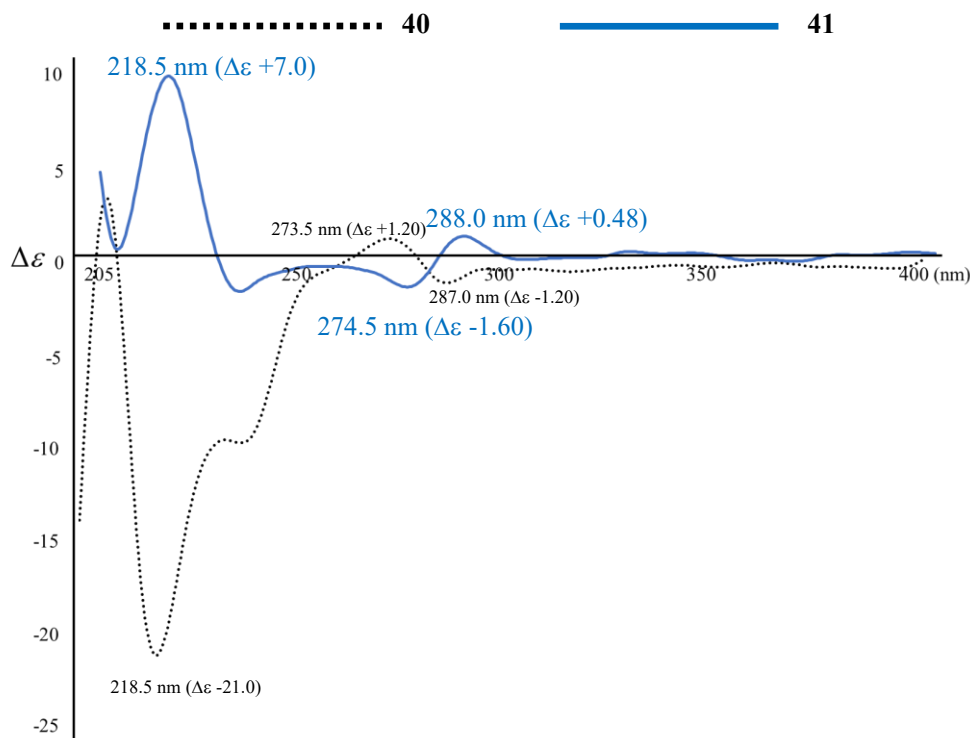


Figure 7-9-3 化合物 **40**, **42** の CD スペクトル

Phansalkar らが報告した類似化合物である *ent*-C-(4b→8)-C, C-(4a→8)-C の CD スペクトル¹⁹⁾ を参考にしたところ、2, 4 位の立体構造が (*R*, *R* → *S*, *S*) となると、CD スペクトルの正負のコットン効果が異なることから、化合物 **42** の立体構造の決定に至った (Figure 7-9-4)。

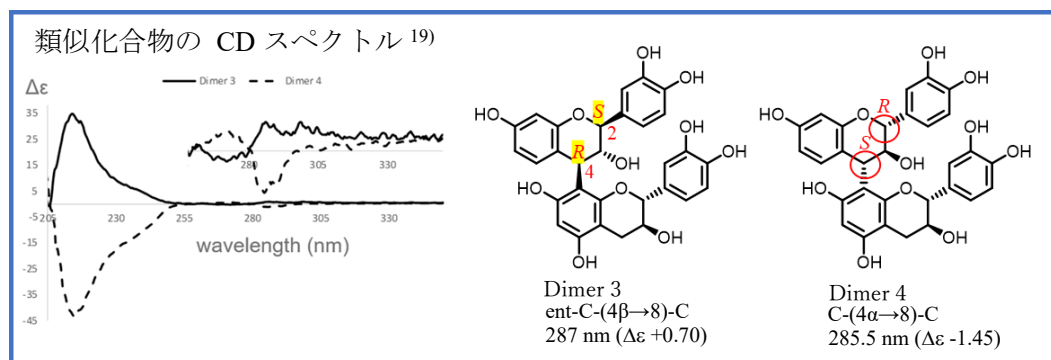


Figure 7-9-4 Phansalkar らが報告した Dimer 3, Dimer 4 の CD スペクトル

第 10 節 単離化合物の細胞毒性試験

化合物 **38-42** について、活性評価を行ったところ、全ての化合物において、MH7A 選択的な細胞毒性を示すことが見出された。それぞれの MH7A に対する IC₅₀ は 16.9, 12.9, 6.9, 14.6, 36.2 μM であり、WI38VA13 に対しては IC₅₀ >100 μM であり、生存率の差は顕著であった。特に化合物 **40** は MH7A に対して最も強い細胞毒性を示した。

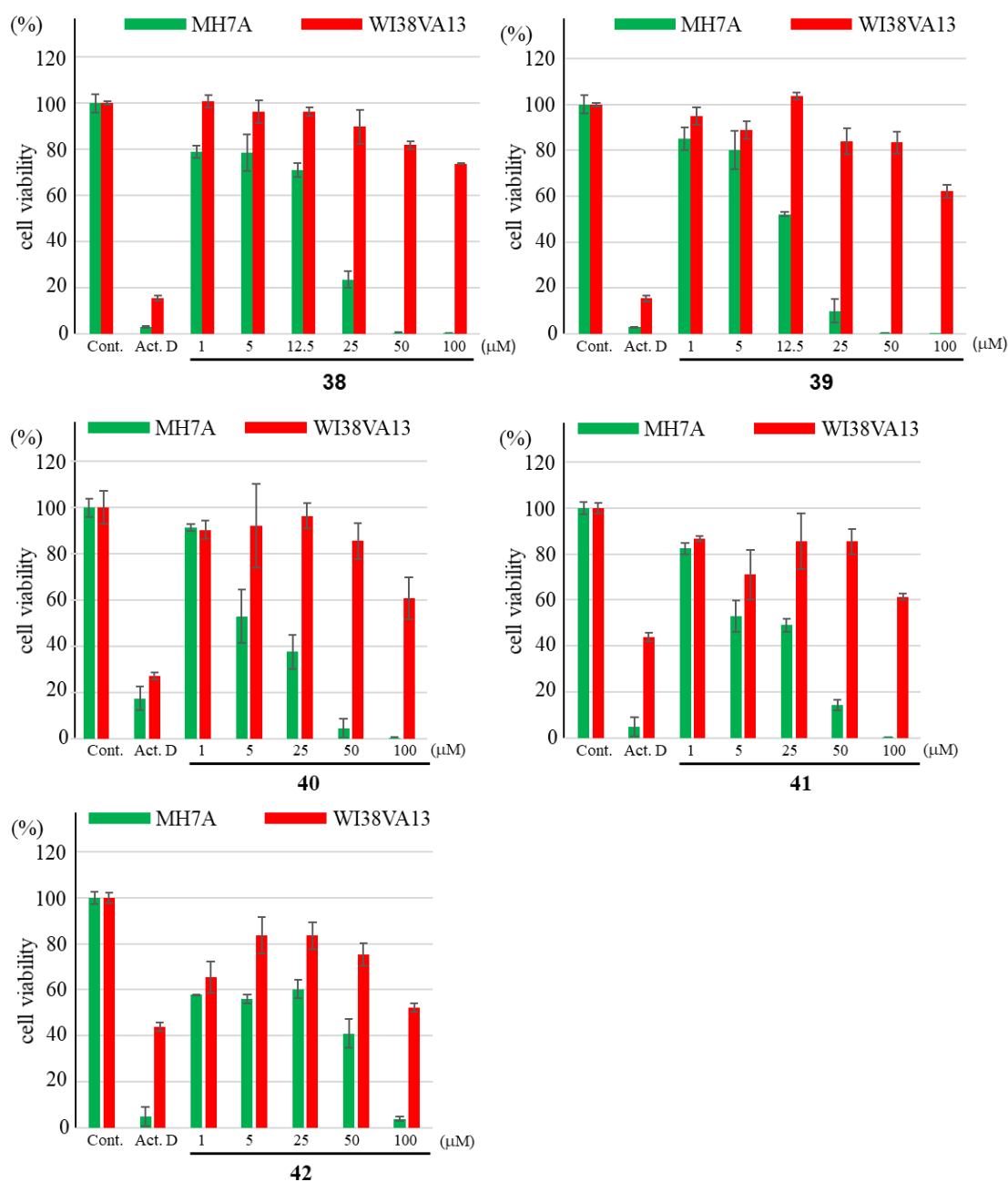


Figure 7-10-1 化合物 **38-42** の活性評価

単離されたすべての化合物が MH7A 選択的な細胞毒性を示し、特に **40** が最も強い細胞毒性を示したため、ビフラボノイドの構造が重要であり、選択的な細胞毒性を示すために必要であることが示唆された。そこで、第 5 章 *Mammea siamensis* から得られた、結合様式の異なるビフラボノイド **31** について、MH7A、WI38VA13 を用いた活性評価を行ったところ、MH7A 選択的な細胞毒性を示さず、その毒性の程度も弱い結果であった (Figure 7-10-2)。そのため、本章にて単離された C4 → C8 の結合様式を持つビフラボノイドが、MH7A 選択的な細胞毒性を示すために重要であることが考えられた。

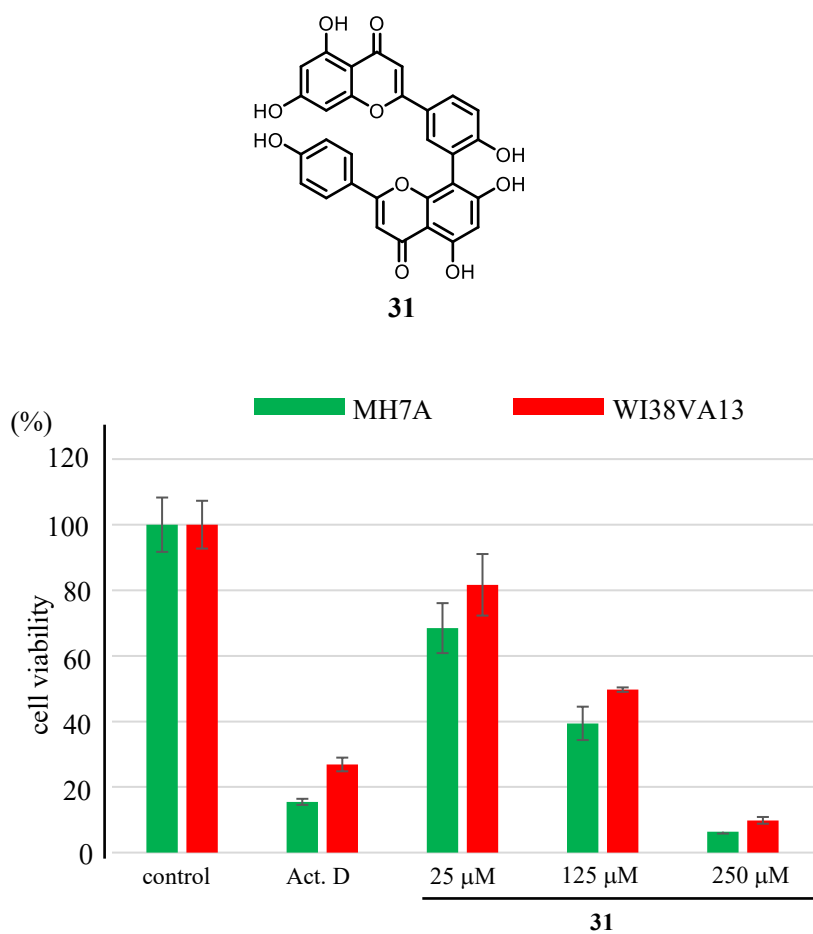


Figure 7-10-2 *Mammea siamensis* から得られた化合物 **31** の活性評価

[参考文献]

1. Bartok B., Firestein G. S., *Immunol. Rev.*, **2010**, 233, 233-255.
2. Bullock J., Rizvi A. A. S., Saleh A. M., Ahmed S. S., Do D. P., Ansari R. A., Ahmed J., *Med. Princ. Pract.*, **2019**, 27, 501-507.
3. Komatsu N., Win S., Yan M., Huynh N. C., Sawa S., Tsukasaki M., Terashima A., Pluemsakunthai W., Kollias G., Nakashima T., Takayanagi H., *J. Clin. Invest.* **2021**, 131, e143060.
4. Miyazawa K., Mori A., Okudaira H., *J. Biochem.* **1998**, 124, 1153-1162.
5. Hashiguchi M., Suzuki K., Kaneko K., Nagaoka I., *Mol. Med. Rep.* **2017**, 15, 4398-4404.
6. Sun H. N., Luo Y. H., Meng L. Q., Piao X. J., Wang Y., Wang J. R., Wang H., Zhang Y., Li J. Q., Xu W. T., Liu Y., Zhang Y., Zhang T., Han Y. H., Jin M. H., Shen G. N., Zang Y. Q., Cao L. K., Zhang D. J., Jin C. H., *Int. J. Mol. Med.* **2019**, 43, 1067-1075.
7. Qiu H., Sun S., Ma X., Cui C., Chen G., Liu Z., Liand H., Liu, M., *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 151-168.
8. Fu X., Lyu X., Liu H., Zhong D., Xu Z., He F., Huang G., *J. Immunol. Res.* **2019**, 8042097.
9. Nakayama H., Yaguchi T., Yoshiya S., Nishizaki T., *Rheumatol. Int.* **2012**, 32, 151-157.
10. 山崎秀太 修士論文 **2021**
11. Nakmee P. S., Khuntong S., Nuengchamnong N., *Chiang Mai J. Sci.* **2016**, 43, 11-21.
12. Thi Lam L. M., Thi Nguyen M. T., Xuan Nguyen H., Hoang Dang P., Trung Nguyen N., Manh Tran H., Thi Nguyen H., Minh Nguyen N., Sun Min B., Ah Kim J., Sue Choi J., Van Can M., *Chem. Cent. J.* **2016**, 10, 48.
13. 岩田樹 修士論文 **2022**
14. Kadota S., Takamori Y., Kim N., Kikuchi T., *Chem. Pharm. Bull* **1990**, 38, 2687-2697.
15. Chung S., Kim Y., Takaya Y., Terashima K., Niwa M., *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 4664-4668.
16. Coetzee J., Mciteka L., Malan E., Ferreira D., *Phytochemistry*, **2000**, 53, 795-804.
17. de Mello J. P., Petereit F. P., Nahrstedt A., *Phytochemistry*, **1996**, 42, 857-862.
18. Lou H., Yamazaki Y., Sasaki T., Uchida M., Tanaka H., Oka S., *Phytochemistry*, **1999**, 51, 297-308.
19. Phansalkar R. S., Nam J.-W., Leme-Kraus A. A., Gan L.-S., Zhou B., McAlpine J. B., Chen S.-N., Bedran-Russo A. K., Pauli A. K., *J. Nat. Prod.*, **2019**, 82, 2387-2399.

総括

BMI1 は、細胞のエピジェネティックな遺伝子発現に関わるタンパクである。BMI1 はエピジェネティックな遺伝子発現機構を通して、細胞死へと導くがん抑制遺伝子の転写を抑制する。また、BMI1 は幹細胞に必須の自己複製制御因子であり、多様ながん組織にて高発現している。中でも、BMI1 は、化学療法などに抵抗性を示し、がんの再発や転移に寄与するがん幹細胞に高発現している。そのため、BMI1 の発現に寄与するプロモーターを阻害する化合物は、がん幹細胞を減少させ、がんの根本的な治療となりうることから、本研究に着手した。本研究では、多様な天然物を含有する熱帯植物から BMI1 プロモーター阻害活性を持つ天然物を探索した。

本研究の遂行にあたり、BMI1 プロモーターの活性をルシフェラーゼによる化学発光により評価できる BMI1/293T を用いて、バングラデシュ産植物エキ斯科レクション、タイ産植物エキ斯科レクションのスクリーニングを行った。その結果、17 種のヒット植物の内、*Andrographis paniculata*、*Mammea siamensis*、*Caesalpinia digyna* の 3 種の植物を分画対象とした。

第 4 章では、*Andrographis paniculata* の葉部 MeOH 抽出物より、13 種の既知ラブダン型ジテルペンノイド (1-11, 13-14)、1 種の既知フラボノイド (12) を単離し、その内 5 種 (1, 2, 5, 8, 13) に BMI1 プロモーター阻害活性を見出した。単離化合物の中で最も強い BMI1 プロモーター阻害活性を示した化合物 1 は、DU145 に対して IC₅₀ 25.4 μM の細胞毒性を示した。DU145 に対して 1 が細胞毒性を示す機序解析の結果、1 は BMI1 プロモーターを制御する c-Myc を減少させることで、細胞死に寄与する p14ARF を増加させることで、DU145 に対して細胞毒性を示すことが示唆された。

第 5 章では、*Mammea siamensis* の葉部 MeOH 抽出物より、既知ペプチド由来化合物 (15)、1 種の新規クマリン (20)、11 種の既知クマリン (16-19, 21-27)、4 種の既知フラボノイド (28-31) を単離し、その内 10 種 (16-19, 22-27) に BMI1 プロモーター阻害活性を見出した。この 10 種について、細胞毒性試験を行った結果、化合物 18, 23, 26 は Huh7 に細胞毒性を示し、中でも 18 は IC₅₀ 23.8 μM の細胞毒性を示した。Huh7 に対して 18 が細胞毒性を示す機序解析の結果、18 は BMI1 を減少させなかった。しかし、細胞毒性試験の結果より、HEK293 に対して細胞毒性を示さず、Huh7 に細胞毒性を示したことから、がん細胞特異的に活性を示すことが示唆された。そこで、がんに関わるシグナルである Wnt シ

グナルについて検討を行った結果、**18** は Wnt シグナルに関わる β -catenin を減少させ、細胞周期の進行に必要な cyclin D1 を減少させることで、Huh7 に細胞毒性を示すことが示唆された。

第 6 章では、*Caesalpinia digyna* の葉部 MeOH 抽出物より、新規没食子酸関連化合物 (**35**)、既知没食子酸関連化合物 4 種 (**32-34, 36**)、既知フラボノイド 1 種 (**37**) を単離し、その内 5 種 (**32-34, 36-37**) に BMI1 プロモーター阻害活性を見出した。単離化合物の中で最も強い BMI1 プロモーター阻害活性を示した化合物 **37** は、BMI1/293T の BMI1 タンパクを減少させることを見出した。

また、関節リウマチ滑膜線維芽細胞に細胞毒性を持つ植物成分の探索研究を行った。関節リウマチ滑膜線維芽細胞は、関節の慢性的な炎症、破壊に大きく寄与する細胞であるため、関節リウマチ滑膜線維芽細胞を制御する小分子化合物は、関節リウマチの根本的な治療薬となりうる。この細胞を制御する治療薬は、未だ存在していないことから、本研究に着手した。

本研究の遂行にあたり、関節リウマチ滑膜線維芽細胞 MH7A と正常ヒト肺胞線維芽細胞株 WI38VA13 を用いて、細胞生存率が MH7A < WI38VA13 となる MH7A に選択的な細胞毒性を示す化合物を探索した。

Xylia kerrii の葉部 MeOH 抽出物より、新規ビフラボノイド 3 種 (**40-42**)、既知フラボノイド (**38-39**) を単離し、単離した全ての化合物において、MH7A 選択的な細胞毒性を示すことを見出した。中でも、ビフラボノイド (**40**) は、MH7A 選択的な細胞毒性 (MH7A: IC₅₀ 6.9 μ M, WI38VA13: IC₅₀ >100 μ M) を示し、50 μ M の濃度における細胞生存率はそれぞれ MH7A: 4.4 %, WI38VA: 85.7 % であり、差は明確であった。そのため、ビフラボノイドやフラボノイドは、選択的な関節リウマチ滑膜線維芽細胞への毒性を示す化合物として有望であることが示唆された。

本研究により得られた単離化合物が、創薬シーズとなり、がん領域および、関節リウマチの治療に貢献することを期待する。

実験の部

1. 《使用機器・試薬》

1-1. 化合物の単離、構造決定

核磁気共鳴測定装置 (NMR):

JEOL ECZ 600 spectrometer

JEOL ECA 600 spectrometer

JEOL ECZ 400 spectrometer

溶媒

核磁気共鳴測定装置 (NMR) 用溶媒は以下を用いた。また、内部標準は残留溶媒周波数を用いた。CDCl₃ (δ_{H} : 7.24, δ_{C} : 77.0)、CD₃OD (δ_{H} : 3.30, δ_{C} : 49.0)、DMSO-*d*₆ (δ_{H} : 2.49, δ_{C} : 39.5)、pyridine-*d*₅ (δ_{H} : 7.26, δ_{C} : 77.0)。測定溶媒を基準として、化学シフト値は δ 値、その単位は ppm である。スピン結合定数は *J* 値、その単位は Hz である。

開裂様式は、s (singlet)、d (doublet)、t (triplet)、dd (double-doublet)、dt (double-triplet)、ddd (double-double-doublet)、br (broad)、および m (multiplet) とそれぞれ省略して表記した。

薄層クロマトグラフィー (TLC):

TLC ガラスプレート Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

TLC ガラスプレート RP-18 F₂₅₄ (Merck)

TLC 展開後 254nm、360 nm の UV ランプを照射した。

TLC 発色試薬

10 % H₂SO₄ (Wako) (噴霧後加熱)

Phosphomolibdic acid (噴霧後加熱) (Phosphomolibdate (Wako) 25 g、MeOH 250 mL)

オープンカラムクロマトグラフィー担体

Chromatorex ODS

Silica gel 60N (spherical, neutral)

Dianon HP-20

Sephadex LH-20

IRA96SB HG

富士シリシア化学

関東化学

三菱化成

GE Healthcare

ORGANO Corp.

質量分析計 (MS)

質量分析計: ESIMS AccuTOF LC-plus JMS-T100LP mass spectrometer JEOL

LCMS 装置

システムコントローラー: CBM-20Alite	SHIMADZU
フォトダイオードアレイ紫外可視検出器: SPD-M20A	SHIMADZU
オートサンプラー: SIL-20A	SHIMADZU
送液ユニット: LC-20AT	SHIMADZU
バルブユニット: FCV-20AH ₂	SHIMADZU
カラムオーブン: CTO-10A	SHIMADZU
オンラインテガッサ: DGU-20A ₃	SHIMADZU
質量分析装置: LC-MS2020	SHIMADZU
LC-MS 用窒素ガス発生装置: N ₂ Supplier Model 24F	SHIMADZU
LC-MS ワークステーション: Lab solutions (version 5.114)	SHIMADZU

本論文で MS を測定する際には 0.1 % HCOOH を含む溶媒を使用した.

旋光計: P-2200 polarimeter	JASCO
紫外可視分光光度計: UV-1280 UV-VIS spectrometer	SHIMADZU
赤外分光光度計: FT-IR4700 spectrometer	JASCO
円二色性分散計: J-1100	JASCO

有機溶媒

メタノール、アセトン (大伸化学)、クロロホルム、酢酸エチル、ヘキサン、*n*-ブタノール (関東化学) は、試薬一級品を用いた。ジメチルスルホキシドは、分子生物学用 (Wako) または試薬特級品 (関東化学) を用いた。

冷却遠心機

CT15RE	HITACHI
--------	---------

凍結乾燥機

FDS-2000	EYELA
----------	-------

HPLC 装置

カラム:

COSMOSIL 5C ₁₈ -AR-II (φ 10×250 mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL π-NAP (φ 10×250 mm)	Nacalai tesque Inc.
COSMOSIL Cholester (φ 10×250 mm)	Nacalai tesque Inc.
CAPCELLPAK NH ₂ -UG80 (φ 4.6×250 mm)	Shiseido

装置は以下の組み合わせでいずれかを用いた。

System 1

ポンプ: PU-1580 Intelligent HPLC Pump	JASCO
検出器: UV-970 Intelligent UV / VIS Detector	JASCO
RI-1530 Intelligent RI Detector	JASCO

System 2

ポンプ: LC-20AB plus Intelligent HPLC Pump	SHIMADZU
検出器: UV-2075 plus Intelligent UV / VIS Detector	JASCO
RI-2031 plus Intelligent RI Detector	JASCO

System 3

システムコントローラー: CBM-20AB	SHIMADZU
フォトダイオードアレイ紫外可視検出器: SPD-M20A	SHIMADZU
送液ユニット: LC-20AD	SHIMADZU
低圧クラジェントユニット: FCV-10AL vp	SHIMADZU
オートサンプラー: SIL-20A	SHIMADZU
カラムオーブン: CTO-10ASvp	SHIMADZU
オンラインテガッサ: DGU-12A	SHIMADZU
LC ワークステーション: Lab solutions (version 5.101)	SHIMADZU

System 4

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

1-2. 細胞実験

Vortex: vortex GENIE-2	Scientific Industries
ピペットマン: P-1000、P-200、P-20、P-2	GILSON
CO ₂ インキュベーター: MCO-170AIC-PJ	PHCbi
クリーンベンチ: MCV-B131S、MCV-710ATS	SANYO
遠心機: M200-IVD	SAKUMA
超音波破碎、洗浄機: MCS-10	AS ONE
96 well plate: F96 WHITE、F96 BLACK	Thermo
6 well plate: TR5000	Trueline
蛍光測定: Fluoroskan Ascent	Thermo
化学発光測定: Luminoskan Ascent	Thermo
倒立型培養顕微鏡: CKX53	OLYMPUS

培養細胞株

BMI1/293T 細胞 (ヒト胎児腎細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

HEK293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

DU145 細胞 (ヒト前立腺がん細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

Huh7 細胞 (ヒト肝がん細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

HCT116 細胞 (ヒト大腸がん細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

STF/293 細胞 (ヒト胎児腎細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

ジョーンホップキンス大学 Dr. Jeremy Nathans より御恵与いただいた

上記の細胞は、Fetal Bovine Serum (FBS、Biowest) (final conc. 10 %) と penicillin (10,000 unit/mL)/streptomycin (10 mg/mL) (Sigma-aldrich) 含有 DMEM (Wako)を培養に用いた。

MH7A (関節リウマチ患者由来滑膜線維芽細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

WI38VA13 sub 2RA (正常ヒト由来肺線維芽細胞株、cultivated in 5 % CO₂、37 °C)

MH7A は理化学研究所、WI38VA13 sub 2RA は JCRB 細胞バンクから購入した。

MH7A は RPMI-1640 (RPMI-1640 with L-glutamine and phenol red, Wako) を、WI38VA13 は E-MEM (E-MEM with L-Glutamine, Phenol Red, Sodium Pyruvate, Non-essential Amino Acids and 1500 mg/L Sodium Bicarbonate, Wako) を用いて培養を行った。なお、それぞれの培地には FBS (final conc. 10 %) と penicillin (10,000 unit/mL) / streptomycin (10 mg/mL) を加えた。

FBS は、補体を失活させるため、56 °C、30 分間の加熱処理を行い、非動化を行った。細胞の剥離には、Trypsin EDTA (0.25 % Trypsin-EDTA、Gibco) を用いた。

細胞計測には Trypan blue 溶液 (0.4 % (w/v) trypan blue、Nacalai tesque Inc.)、血球計数盤を用い、顕微鏡下で行った。

PBS (-) は以下の組成のものを用いた。

KCl (Wako)	0.2 g
KH ₂ PO ₄ (Wako)	0.2 g
NaCl (Wako)	8.0 g
Na ₂ HPO ₄ (Nacalai tesque Inc.)	1.11 g
Q 水	up to 1.0 L (autoclaved 121 °C、20 min)

BMI1 関連実験

ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5x (Promega)

使用時に滅菌水で 5 倍希釈した。

Luciferase 1000 Assay System (Promega)

Luciferase Assay Substrate

Luciferase Assay Buffer

c-Myc inhibitor II 溶液

c-Myc inhibitor II 10074G5 (Merk Millipore) を DMSO に溶解させ、100 mM 溶液とし、-30 °C で保存した。

Fluorescein diacetate (FDA) 溶液:

FDA (Wako) 5 mg を DMSO 500 μL に溶解し、FDA 10 mg/mL DMSO 溶液とした。使用時に PBS に添加 (PBS 10 mL に対して 3.5 μL) して FDA 溶液とした。

Wnt 関連実験

ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 5x (Promega)

使用時に滅菌水で 5 倍希釈した。

Luciferase 1000 Assay System (Promega)

Luciferase Assay Substrate

Luciferase Assay Buffer

LiCl 溶液 (5 M):

LiCl (Wako) 2.1 g を滅菌水に溶解して 10 mL の 5 M LiCl 溶液とし -30 °C 保存した。

quercetin 溶液 (27.7 mM) :

quercetin (Wako) を 1.5 mL エッペンドルフチューブ内で DMSO に溶解し、138.5 mM quercetin 溶液とし、冷凍保存した。138.5 mM 溶液を 5 倍希釈し、27.7 mM quercetin 溶液とし -30 °C で保存した。

FDA 溶液:

FDA 5 mg を DMSO 500 μ L に溶解し、FDA 溶液とした。使用時に PBS に添加 (PBS 10 mL に対して 3.5 μ L) して FDA 溶液とした。

関節リウマチ滑膜線維芽細胞関連実験

actinomycin D 溶液

actinomycin D (Nacalai tesque Inc.) 6.3 mg を DMSO 1 mL に溶解して 5 mM actinomycin D 溶液とした後、1.5 mL tube に分注し、-30 °C で保存した。次に、この 1 μ L を DMSO 1 mL に溶解して actinomycin D 溶液 (5 μ M) とした後、1.5 mL tube に分注し、-30 °C で保存した。

FDA 溶液:

FDA 5 mg を DMSO 500 μ L に溶解し、FDA 溶液とした。使用時に PBS に添加 (PBS 10 mL に対して 3.5 μ L) して FDA 溶液とした。

1.2.2. ウェスタンブロット法

使用機器

SDS-PAGE 電気泳動装置: ミニプロテイン Tetra セル (Bio-Rad)

ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad)

使用試薬

Lysis buffer

1 M Tris (Invitrogen) -HCl (Wako)	2 mL (20 mM)
NaCl (Wako)	878 mg (150 mM)
Triton X-100 (Wako)	0.5 mL (0.5 % (w/v))
Sodium deoxycholate (関東化学)	500 mg (0.5 % (w/v))
EDTA (DOJINDO)	292.2 mg (10 mM)
Sodium orthovanadate (Wako)	18.4 mg (1 mM)
<u>Sodium fluoride (Wako)</u>	<u>0.42 mg (0.1 mM)</u>
Q 水	up to 100 mL

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

SDS-PAGE gel

Polyacrylamide gel は以下の組成にて調製した。

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

10 % Sodium dodecylsulfate (SDS)

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

TBST (Tris-Buffered Saline Tween 20)

Tris (UltraPure™、Invitrogen)	3.6 g
NaCl (Wako)	17.4 g
Tween 20 (関東化学)	3.0 g
<u>Conc. HCl (Wako)</u>	<u>adjust pH to 7.4</u>
Q 水	up to 3 L

溶解後、常温で保存した。

30 % acrylamide

acrylamide	29.2 g
<u>N', N', -methylene-bis(acrylamide) (Wako)</u>	<u>0.8 g</u>
Q 水	up to 100 mL

溶解後、遮光し、4 °C で保存した。

10 % Ammonium persulfate (APS)

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

5 x Sample buffer

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

遮光し、常温保存した。用時 1/4 量の 2-mercaptoethanol (Wako) を添加し 4/5 倍希釈して 4 x sample buffer とし、サンプルで 4 倍に希釈し 1 x sample buffer とした。

10 x Running buffer

Tris	30.3 g
Glycine (関東化学)	144 g
<u>SDS</u>	<u>10 g</u>
Q 水	up to 1 L

溶解後、常温保存した。用時、Q 水で 10 倍希釈して使用した。

10 x Towbin buffer

Tris	24.25 g
<u>Glycine</u>	<u>111.5 g</u>
Q 水	up to 1 L

溶解後、常温で保存した。

2. 《実験操作》

2-1. BMI1 プロモーター阻害活性の測定 (Luciferase assay)

2-1-1. BMI1 プロモーターアッセイ

96 well white plate に BMI1/293 T を 3×10^4 cells/100 μ L/well になるよう播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料含有培地を 100 μ L 加え、24 hr 培養した。その後培地を除去し、PBS 100 μ L にて洗浄後、30 μ L の Cell Culture Lysis Reagent (CCLR) 1X 溶液を加え、30 min 振とうした。細胞溶解後、100 μ L の Luciferase 1000 Assay System を添加し、Luminoskan Ascent (Thermo) にて化学発光量を測定することで、BMI1 プロモーター阻害活性を評価した。

2-1-2. 細胞生存率 (FMCA assay)

BMI1 プロモーター阻害活性測定と同時に細胞生存試験 (FMCA assay)¹⁾ も行った。

FDA は細胞内に取り込まれると、生細胞の酵素により加水分解され、蛍光を発する fluorescein となる。つまり、fluorescein の蛍光強度は生細胞数に比例する。96 well black plate に BMI1/293 T を 3×10^4 cells/100 μ L/well になるよう播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料含有培地を 100 μ L 加え、24 hr 培養した。その後培地を除去し、PBS 100 μ L にて洗浄後、200 μ L/well の FDA 溶液を加え、60 min インキュベートした後、Fluoroskan ascent (Thermo) にて蛍光量を測定した (Ex: 485 nm, Em: 538 nm)。

スクリーニング及び、植物の分画

BMI1 プロモーター活性 (%) = (サンプルのルシフェリン発光 / control のルシフェリン発光) x 100

細胞生存率 (%) = (サンプルの蛍光量 / control の蛍光量) x 100

2-1-3. 細胞毒性試験

96 well black plate に HEK293、Huh 7、HCT116、DU145 を 2×10^3 cells/100 μ L/well になるよう播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料含有培地を 100 μ L 加え、72 hr 培養した。その後培地を除去し、PBS 100 μ L にて洗浄後、200 μ L/well の FDA 溶液を加え、60 min インキュベートした後、Fluoroskan ascent にて蛍光量を測定した (Ex: 485 nm, Em: 538 nm)。

2-2. Wnt シグナル阻害活性の測定 TOPflash (Luciferase assay)

2-2-1. Wnt シグナル阻害活性試験 (TOPflash)

96 well white plate に STF/293 (3×10^4 cells/200 μ L/well) を播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料及び LiCl 15 μ M を含有する培地を各 well に添加し、24 hr 培養した。その後培地を除去し、PBS 100 μ L にて洗浄後、20 μ L の CCLR 1X 溶液を加え、30 min 振とうした。30 min 振とうした後、Luciferase 1000 Assay System を各 well に 100 μ L ずつ添加し、Luminoscan Ascent にて、発光量を測定した。

2-2-2. 細胞生存率 (FMCA assay)

96 well black plate に STF/293 を 3×10^4 cells/200 μ L/well になるよう播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料含有培地を 100 μ L 加え、24 hr 培養した。その後培地を除去し、PBS 100 μ L にて洗浄後、200 μ L/well の FDA 溶液を加え、60 min インキュベートした後、Fluoroskan ascent にて蛍光量を測定した (Ex: 485 nm, Em: 538 nm)。

2-3. MH7A、WI38VA13 sub2RA の活性評価 (細胞毒性試験)

MH7A を 96-well black plate に 4×10^3 cells/200 μ L/well 播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、適当な試料濃度に調製した試料含有培地を 200 μ L ずつ各 well に添加し、72 hr 培養した。培地を除去し、FDA 溶液を各 well に 200 μ L ずつ添加し、1 hr インキュベートした後、Fluoroskan ascent にて蛍光量を測定した (Ex: 485 nm、Em: 538 nm)。

2-4. ウェスタンブロット法

2-4-1. 細胞溶解液（ライセート）の調製

6 well plate に DU145、Huh 7、BMI1/293T を 3×10^5 cells/well で播種し、CO₂ インキュベーターで 24 hr 培養した。培地を除去し、サンプルを含有させた DMEM 培地を 2.0 mL 加え、24 hr あるいは、72 hr 培養した。培地を除去し、PBS で洗浄後、cell scraper により細胞を剥し、1.5 mL エッペンチューブに回収した。遠心分離 (4 °C、3000 rpm、5 min) を行い、上清を除去した。再度、6 well plate に 1 mL の PBS を加え懸濁させ、1.5 mL エッペンチューブに加えた。1.5 mL エッペンチューブを遠心分離 (4 °C、5000 rpm、5 min) し、細胞を沈殿させた。上清を除き、100 μ L の 1 % protease inhibitor cocktail (PI) を含有させた lysis buffer を加え、十分懸濁させた後、氷上で 30 min インキュベートした。その後、遠心分離 (13,000 rpm、30 min、4 °C) を行い、上清をライセートとした。

2-4-2. SDS-PAGE

得られた細胞溶解液 (lysate) は 12.5 % polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行った。lysate に 5 x SDS Buffer/2-メルカプトエタノール混合液 (4/1) を lysate/混合液 = 4/1 の割合で加え、加熱 (100 °C、3 min) した。stacking gel を 20 mA で、running gel を 25 mA で分離した。なお、分子量マーカーとして (Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad) を用いた。

2-4-3. メンブレンへの転写

SDS-PAGE の後、ゲルから polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンへ Wet 法にてタンパク質の転写を行った。ゲル、ろ紙 (Extra Thick Blot Paper, BIO-RAD) は転写バッファーに浸し、室温で 10 min 振とうした。メンブレンは、MeOH に浸し、5 min 振とうした後、転写バッファーに浸し、10 min 振とうした。ろ紙でゲルとメンブレンを挟み込み、70 V、120 min にて転写を行った。

2-4-4. 一次抗体及び二次抗体処理

PVDF への転写後、5 % skim milk (森永乳業) を含む TBST で 1 hr、室温下でブロッキングし、TBST で洗浄した後 (5 min、3 times)、一次抗体処理に移った。5 % skim milk を含む TBST または、Can get signal Solution 1 (TOYOBO、c-Myc、p14ARF 検出時) にて希釈した一次抗体を室温にて 1 hr または 4 °C 終夜反応後、TBST で洗浄 (5 min、3 times) し、二次抗体処理に移った。5 % skim milk を含む TBST または、Can get signal Solution 2 (TOYOBO、c-Myc、p14ARF 検出時)

にて希釈した二次抗体を室温にて 1 hr または 4 °C 終夜反応後、TBST で洗浄 (5 min, 3 times) し、immunocomplex の検出に移った。

検出は、ECL Advance Western detection system (GE Healthcare/Amersham Biosciences) または Immobilon Western (Millopore) を用いた。タンパク量の基準として、 β -actin を用いた。

一次抗体として (anti-BMI1, 1:1000, #6964, Cell Signaling; anti- β -catenin, 1:2000, #610153, BD Biosciences; anti CDKN2A/p14ARF, 1:200, ab3642, abcam; anti-c-myc, 1:250 #sc-40, Santa Cluz Biotechnology, Inc.; β -actin, 1:4000, #A2228, Sigma; anti cyclinD1, 1:10000, ab134175, abcam) を用いた。また、二次抗体として anti-mouse IgG (1:4000, #NA931VS, GE Healthcare)、anti-rabbit IgG (1:4000, #111-035-144, Jackson ImmunoResearch) を用いた。

2-4-5. 一次抗体及び二次抗体の除去

メンブレンを Stripping buffer に浸し、室温で 30 min 振とうした。TBST で洗浄 (10 min, 2 times) した。

Stripping buffer

1M Tris-HCl (pH 6.8)	3.125 mL
10 % SDS	10 mL
<u>Tween 20</u>	<u>348.8 μL</u>
Q 水	up to 50 mL

溶解後、4 °C で保存した。

2-5. Spartan、Gaussian による計算

モデル化合物 **a**、**b**:

安定配座の計算は、PC (Windows 10 Home; Intel Core i7-10770; 2.90 GHz; RAM 16 GB) にて、Spartan 18 (Wavefunction Inc.) を用いて行った。

Stable conformers は、Merck molecular force field (MMFF) 法を用いて計算し、MMFF 法により算出した stable conformers を、Hartree-Fock (HF)/3-21G により計算した。その後、安定配座より 40 kJ/mol 以下の stable conformers を ω B97X-D/6-31G* 法 (energy) により計算し、安定配座より 15 kJ/mol 以下の stable conformers に絞り込み、 ω B97X-D/6-31G* 法により計算した。次に、安定配座より 10 kJ/mol 以下の stable conformers を ω B97X-D/6-311+G (2df,2p) 法により計算し、安定配座を算出した。得られた各配座の ^{13}C -NMR は、 ω B97X-D/6-31G* 法により算出した。

モデル化合物 **c**、**d**:

モデル化合物 **c**、**d** の UV/ECD を計算するため、Spartan 18 を用いて安定配座を算出した。安定配座の計算は、PC (Windows 10 Home; Intel Core i7-10770; 2.90 GHz; RAM 16 GB) にて、Spartan 18 を用いて行った。

Stable conformers は、MMFF 法を用いて計算し、MMFF 法により算出した stable conformers を、Hartree-Fock (HF)/3-21G により計算した。その後、安定配座より 40 kJ/mol 以下の stable conformers を B3LYP/6-31G 法 (energy) により計算し、安定配座より 15 kJ/mol 以下の stable conformers に絞り込み、 ω B97X-D/6-31G* 法により計算した。次に、安定配座より 10 kJ/mol 以下の stable conformers に絞り込み、 ω B97X-D/6-311+G (2df, 2p) 法により計算し、安定配座を算出した。

UV/ECD は PC (Windows 10 Education; Intel Xeon E31245; 3.30 GHz; RAM 16 GB) にて、Gaussian R16W (Gaussian) を用いて、Spartan 18 により得られた安定配座を計算することで算出した。Spartan 18 により得られた安定配座の内、ボルツマン分布に基づき >90% の存在比となるように安定配座を取捨選択した。選択された安定配座を、モデル化合物 **c** は time-dependent density functional theory (TDDFT)、B3LYP/6-31G* 法、モデル化合物 **d** は TDDFT、B3LY/def2tzvp によりそれぞれ計算し、各配座の UV/ECD を得た。得られた UV/ECD をボルツマン分布に基づき平均化し、モデル化合物 **c**、**d** の ECD スペクトルとした。

2-6. 化合物 **35** の加水分解と L-cysteine methyl ester HCl による誘導體化

化合物 **35** (0.5 mg) を耐圧ねじ口試験管に測り取り、5 % H₂SO₄ 1.5 mL 加え、100 °C、24 hr 反応させた。反応液を冷却した後、IRA96SB AG (弱塩基性陰イオン交換樹脂) (φ 15x200 mm) に充填し、H₂O/MeOH = 1/0、0/1 にて溶出させることで H₂SO₄ を除去した。得られた溶液をエバポレーターにて減圧乾燥した後、L-cysteine methyl HCl (関東化学) 4.9 mg、pyridine (超脱水) (Wako) 1.3 mL 加え、60 °C、1 hr 反応させることで、誘導體化された化合物 **35** を得た。また、糖標品 (D-glucose (Wako)、L-glucose (Wako)、D-rhamnose (BIOSYNTH)、L-rhamnose (Wako)) についても同様の方法にて、誘導體化された各糖標品を得た。IRA96SB AG は、使用時に R 水に 1 hr 浸し膨潤させ、カラムに充填し、1 N NaOH、Q 水の順に置換させた後に使用した。

2-7. 植物エキスの分画、化合物の構造決定

2-7-1. KKB239 *Andrographis paniculata* からの化合物の単離

植物エキスの抽出

A. paniculata 葉部の植物乾燥サンプル (240 g) を MeOH に浸し、抽出液を濾過したものを MeOH 抽出物 (8.6 g) とした。

植物エキスの分画

A. paniculata 葉部 MeOH 抽出物を 10 % MeOH に溶解させ、EtOAc、水飽和 BuOH で順次溶媒分配を行い、EtOAc lay. (4.2 g)、BuOH lay. (1.1 g)、water lay. (3.1 g) を得た。

EtOAc lay. の分画

EtOAc lay. (4.2 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x200 mm) により分画し、MeOH/acetone = 1/0 溶出画分として 1A (3.2 g) を、0/1 溶出画分として 1B (264.0 mg) を得た。

1A の分画

1A (3.2 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x150 mm) により分画し、hexane/EtOAc = 1/1 溶出画分として 2A (300.2 mg)、hexane/EtOAc = 1/2 溶出画分として 2B (543.5 mg)、MeOH 100% 溶出画分として 2C (2.33 g) を得た。

2A の分画

2A (300.2 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、3A (1.1 mg)、3B (1.8 mg)、3C (3.3 mg)、3D (化合物 1、 t_R 31.2, 21.7 mg)、3E (化合物 2、 t_R 33.6, 13.4 mg)、3F (化合物 3、 t_R 38.2, 2.7 mg)、3G (1.8 mg) を得た。

2C の分画

2C (2.33 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x170 mm) により分画し、CHCl₃/MeOH = 25/1 溶出画分として 4A (17.3 mg)、4B (150.9 mg)、CHCl₃/MeOH = 20/1 溶出画分として 4C (318.3 mg)、CHCl₃/MeOH = 18/1 溶出画分として 4D (709.0 mg)、CHCl₃/MeOH = 15/1 溶出画分として 4E (104.7 mg)、4F (416.4 mg)、4G (115.7 mg)、MeOH 100% 溶出画分として 4H (1.06 g) を得た。

4B の分画

4B (50.9 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 1/1、流速: 4.0 mL/min.、検出: RI) により分画を行い、5A (0.4 mg)、5B (0.9 mg)、5C (2.1 mg)、5D (1.1 mg)、5E (0.7 mg)、5F (0.3 mg)、5G (t_R 34.0、4.0 mg) を得た。

5G の分画

5G (4.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 11/9、流速: 4.0 mL/min.、検出: RI) により分画を行い、6A (化合物 4、 t_R 30.4、2.6 mg)、6B (0.4 mg) を得た。

4C の分画

4C (80.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 1/1、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、7A (1.0 mg)、7B (0.9 mg)、7C (0.8 mg)、7D (2.2 mg)、7E (0.9 mg)、7F (化合物 5、 t_R 18.2、3.3 mg)、7G (2.7 mg)、7H (2.8 mg)、7I (2.7 mg)、7J (t_R 23.8、15.3 mg)、7K (2.8 mg)、7L (0.0 mg) を得た。

7J の分画

7J (15.3 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により精製を行い、8A (0.5 mg)、8B (0.2 mg)、8C (化合物 6、 t_R 24.2、11.8 mg)、8D (0.1 mg) を得た。

4C の再分画

4C (238.3 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 9/10、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、9A (t_R 8.4、18.5 mg)、9B (6.1 mg)、9C (0.5 mg)、9D (0.9 mg)、9E (t_R 28.2、47.2 mg)、9F (7.2 mg) を得た。

9E の分画

9E (47.2 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、10A (化合物 7、 t_R 15.6、0.4 mg)、10B (0.1 mg)、10C (6.5 mg)、10D (化合物 8、 t_R 16.0、29.5 mg) を得た。

9A (18.5 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、11A (化合物 **9**、 t_R 28.0、1.7 mg)、11B (0.6 mg) を得た。

4E の分画

4E (104.7 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、12A (0.5 mg)、12B (化合物 **10**、 t_R 12.0、1.9 mg)、12C (化合物 **11**、 t_R 18.4、2.6 mg)、12D (化合物 **5**、4.6 mg) を得た。

4D の分画

4D (709.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 1/1、流速: 3.5 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、13A (96.8 mg)、13B (t_R 11.8、26.4 mg)、13C (10.7 mg)、13D (3.6 mg)、13E (3.6 mg)、13F (3.7 mg)、13G (t_R 23.8、3.8 mg)、13H (7.9 mg)、13I (2.5 mg)、13J (18.0 mg)、13K (4.2 mg)、13L (29.6 mg) を得た。

13B の分画

13B (26.4 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 1/3、流速: 3.5 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、14A (1.6 mg)、14B (1.1 mg)、14C (化合物 **5**、19.7 mg)、14D (化合物 **12**、 t_R 48.0、4.7 mg) を得た。

13G の分画

13G (3.8 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出: RI) により精製を行い、15A (化合物 **13**、 t_R 41.6、2.0 mg) を得た。

4B の分画

4B (56.8 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 7/18、流速: 3.5 mL/min.、検出: RI) により分画を行い、16A (化合物 **14**、 t_R 36.4、0.8 mg)、16B (21.7 mg)、16C (9.7 mg)、16D (1.2 mg)、16E (2.1 mg) を得た。

2-7-2. KKP753 *Mammea siamensis* からの化合物の単離

植物エキスの抽出

M. siamensis 葉部の植物乾燥サンプル (134 g) を MeOH に浸し、抽出液を濾過したものを MeOH 抽出物 (15.8 g) とした。

植物エキスの分画

M. siamensis 葉部 MeOH 抽出物を 10 % MeOH に溶解させ、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で順次溶媒分配を行い、hexane lay. (3.5 g)、EtOAc lay. (2.7 g)、BuOH lay. (1.8 g)、water lay. (7.3 g) を得た。

Hexane lay. の分画

Hexane lay. (3.5 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x200 mm) により分画し、MeOH/acetone = 1/0 溶出画分として 1A (1.6 g) を、1/1 溶出画分として 1B (0.3 g) を、0/1 溶出画分として 1C (1.5 g) を得た。

1A の分画

1A (1.6 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 70x250 mm) により分画し、hexane/EtOAc = 5/1 溶出画分として 2A (116.0 mg)、hexane/EtOAc = 10/3 溶出画分として 2B (4.5 mg)、2C (40.4 mg)、2D (0.9 mg)、hexane/EtOAc = 5/3 溶出画分として 2E (263.0 mg)、2F (36.5 mg)、2G (38.0 mg)、2H (12.9 mg)、2I (103.6 mg)、hexane/EtOAc = 1/1 溶出画分として 2J (66.8 mg)。hexane/EtOAc = 1/2 溶出画分として 2K (74.6 mg)、2L (5.7 mg)、2M (25.3 mg)、hexane/EtOAc = 0/1 溶出画分として 2N (16.6 mg)、2O (62.2 mg)、2P (134.1 mg)、EtOAc/MeOH = 9/1 溶出画分として 2Q (16.2 mg)、2R (48.8 mg)、EtOAc/MeOH = 4/1 溶出画分として 2S (159.5 mg)、EtOAc/MeOH = 7/3 溶出画分として 2T (287.0 mg)、MeOH 100% 溶出画分として 2U (156.4 mg) を得た。

2J の分画

2J (66.8 mg) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 50x140 mm) により分画し、CHCl₃/MeOH = 25/1 溶出画分として 3A (2.3 mg)、3B (4.0 mg)、3C (1.8 mg)、3D (10.7 mg)、3E (0.8 mg)、3F (0.7 mg)、3G (1.6 mg)、MeOH 100% 溶出画分として 3H (44.8 mg) を得た。

3D の分画

3D (10.7 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 12/13、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、4A (9.6 mg)、4B (化合物 **15**, t_R 44.0, 2.0 mg) を得た。

2E の分画

2E (263.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 7/3、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、5A (0.3 mg)、5B (1.1 mg)、5C (t_R 19.2, 6.4 mg)、5D (2.4 mg)、5E (4.6 mg)、5F (4.1 mg)、5G (1.4 mg)、5H (化合物 **16**, t_R 30.4, 2.6 mg)、5I (1.1 mg)、5J (0.7 mg)、5K (3.0 mg)、5L (3.2 mg)、5M (t_R 43.2, 10.2 mg) を得た。

5M の分画

5M (10.2 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/2、流速: 4.0 mL/min.、検出: RI) により分画を行い、6A (化合物 **17**, t_R 20.8, 2.2 mg)、6B (化合物 **18**, t_R 22.4, 5.4 mg) を得た。

5C の分画

5C (6.4 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/2、流速: 4.0 mL/min.、検出: RI) により分画を行い、7A (2.4 mg)、7B (化合物 **19**, t_R 21.0, 4.0 mg) を得た。

2F + 2G の分画

2F + 2G (74.5 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 23/27、流速: 4.0 mL/min.、検出: 254 nm、RI) により分画を行い、8A (1.7 mg)、8B (3.5 mg)、8C (2.1 mg)、8D (2.5 mg)、8E (2.1 mg)、8F (1.8 mg)、8G (1.9 mg)、8H (4.6 mg)、8I (化合物 **20**, t_R 48.8, 3.8 mg)、8J (2.3 mg)、MeOH 100% 溶出画分として 8K (34.0 mg) を得た。

8K の分画

8K (34.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 24/25、流速: 4.0 mL/min.、検出: 254 nm、RI) により分画を行い、9A (化合物 **21**, t_R 9.6, 2.4 mg)、9B (3.4 mg) を得た。

2C + 2D の分画

2C + 2D (48.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 16/9、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、10A (化合物 **22**、 t_R 11.2、1.5 mg)、10B (化合物 **23**、 t_R 32.0、2.2 mg)、10C (1.7 mg)、10D (化合物 **24**、 t_R 46.9、3.2 mg)、10E (t_R 49.0、3.3 mg)、10F (2.4 mg)、10G (1.9 mg)、10H (化合物 **25**、 t_R 68.4、2.3 mg)、10I (化合物 **26**、 t_R 72.0、2.0 mg) を得た。

10E の分画

10E (3.3 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 13/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、11A (0.5 mg)、11B (化合物 **27**、 t_R 29.2、0.8 mg) を得た。

EtOAc lay. の分画

EtOAc lay. (2.7 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x240 mm) により分画し、MeOH/acetone = 1/0 溶出画分として 12A (2.1 g) を、0/1 溶出画分として 12B (543.9 mg) を得た。

12A の分画

12A (2.1 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 70x200 mm) により分画し、CHCl₃/MeOH = 5/1 溶出画分として 13A (20.7 mg)、13B (64.1 mg)、13C (196.1 mg)、13D (272.6 mg)、13E (134.4 mg)、CHCl₃/MeOH = 3/1 溶出画分として 13F (63.5 mg)、13G (110.0 mg)、CHCl₃/MeOH = 2/1 溶出画分として 13H (166.5 mg)、13I (203.2 mg)、13J (152.0 mg)、13K (376.5 mg)、13L (79.2 mg)、13M (279.5 mg)、13N (357.4 mg)、を得た。

13B の分画

13B (64.1 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O = 1/1、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、14A (9.7 mg)、14B (1.1 mg)、14C (化合物 **28**、 t_R 16.0、1.7 mg)、14D (0.8 mg)、14E (0.4 mg)、14F (0.4 mg)、14G (化合物 **29**、 t_R 28.0、3.8 mg)、14H (0.9 mg) を得た。

13C の分画

13C (196.1 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 3/7、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、15A (7.2 mg)、15B (4.7 mg)、15C (2.4 mg)、15D (1.9 mg)、15E (化合物 **30**、 t_R 14.4、9.5 mg)、15F (2.1 mg)、15G (化合物 **31**、 t_R 48.0、30.0 mg) を得た。

2-7-3. KKP663 *Caesalpinia digyna* からの化合物の単離

植物エキスの抽出

C. digyna 葉部の植物乾燥サンプル (130 g) を MeOH に浸し、抽出液を濾過したものを MeOH 抽出物 (43.9 g) とした。

植物エキスの分画

C. digyna 葉部 MeOH 抽出物を 10% MeOH に溶解させ、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で順次溶媒分配を行い、hexane lay. (6.2 g)、EtOAc lay. (18.3 g)、BuOH lay. (11.2 g)、water lay. (12.6 g) を得た。

EtOAc lay. の分画

EtOAc lay. (18.3 g) を Diaion HP-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 40x200 mm) により分画し、MeOH/acetone = 1/0 溶出画分として 2A (17.3 g) を、0/1 溶出画分として 2B (0.9 g) を得た。

2A の分画

2A (17.3 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 45x140 mm) により分画し、CHCl₃/MeOH = 7/1 溶出画分として 3A (113.1 mg)、3B (1.4 g)、3C (化合物 **32**, 720.2 mg)、3D (43.7 mg)、CHCl₃/MeOH = 5/1 溶出画分として 3E (101.4 mg)、3F (1.2 g)、3G (536.7 mg)、CHCl₃/MeOH = 4/1 溶出画分として 3H (2.9 g)、3I (1.1 g)、CHCl₃/MeOH = 3/1 溶出画分として 3J (925.0 mg)、CHCl₃/MeOH = 2/1 溶出画分として 3K (868.8 mg)、CHCl₃/MeOH = 0/1 溶出画分として 3L (1.1 g)、3M (296.2 mg)、3N (1.3 g)、3O (2.2 g)、3P (1.1 g) を得た。

3H-3J + 3L-3P の分画

3H-3J + 3L-3P (10.2 g) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 65x150 mm) により分画し、MeCN/H₂O = 1/4 溶出画分として 4A (186.1 mg)、4B (2.2 g)、4C (104.3 mg)、MeCN/H₂O = 1/3 溶出画分として 4D (2.5 g)、4E (1.2 g)、4F (1.2 g)、4G (708.3 mg)、4H (2.4 g)、4I (316.2 mg)、4J (116.7 mg)、4K (18.2 mg)、MeCN/H₂O = 1/2 溶出画分として 4L (211.1 mg)、4M (102.6 mg)、MeOH/H₂O = 1/0 溶出画分として 4N (59.5 mg)、4O (37.9 mg)、4P (420.7 mg) を得た。

4E の分画

4E (1.2 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 30x150 mm) により分画し、 $\text{CHCl}_3/\text{acetone} = 3/2$ 溶出画分として 5A (31.4 mg)、5B (195.3 mg)、5C (1.7 mg)、5D (31.7 mg)、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 0/1$ 溶出画分として 5E (980.0 mg) を得た。

4F の分画

4F (1.2 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 30x150 mm) により分画し、 $\text{CHCl}_3/\text{acetone} = 3/2$ 溶出画分として 6A (5.2 mg)、6B (7.5 mg)、6C (40.2 mg)、6D (45.4 mg)、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 0/1$ 溶出画分として 6E (1.1 g) を得た。

5E の分画

5E (980.0 mg) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 50x250 mm) により分画し、 $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O} = 1/4$ 溶出画分として 7A (227.1 mg)、7B (152.8 mg)、7C (330.3 mg)、7D (228.0 mg)、7E (73.1 mg)、7F (10.1 mg)、7G (4.2 mg) を得た。

7B + 7C の分画

7B + 7C (482.8 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 15x600 mm) により分画し、 $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3 = 1/1$ 溶出画分として 8A (8.6 mg)、8B (123.2 mg)、8C (156.7 mg)、8D (15.6 mg)、8E (0.1 mg)、8F (37.6 mg)、8G (17.4 mg)、8H (35.8 mg)、8I (15.5 mg) を得た。

8B の分画

8B (123.2 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 % HCOOH) = 11/89、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、9A (52.5 mg)、9B (3.4 mg)、9C (化合物 **33**、 t_R 32.8、6.6 mg) を得た。

8D + 8F の分画

8D + 8F (53.6 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$ (0.1 % HCOOH) = 1/9、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm) により分画を行い、10A (10.0 mg)、10B (2.8 mg)、10C (2.9 mg)、10D (化合物 **34**、 t_R 36.8、3.8 mg) を得た。

7D の分画

7D (228.0 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 15x650 mm) により分画し、MeOH/CHCl₃ = 1/1 溶出画分として 11A (3.0 mg)、11B (15.4 mg)、11C (8.7 mg)、11D (26.1 mg)、11E (15.8 mg)、11F (117.0 mg)、11G (4.2 mg) を得た。

11B の分画

11B (15.4 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 1/4、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、12A (化合物 **35**、 t_R 8.0、3.7 mg) を得た。

6C の分画

6C (40.2 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL 5C₁₈-AR-II、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeOH/H₂O (0.1 % HCOOH) = 2/3、流速: 3.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、13A (7.8 mg)、13B (化合物 **36**、 t_R 11.2、17.2 mg) を得た。

3K の分画

3K (868.8 mg) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 35x200 mm) により分画し、MeCN/H₂O = 1/5 溶出画分として 14A (9.6 mg)、14B (28.3 mg)、MeCN/H₂O = 1/3 溶出画分として 14C (77.3 mg)、14D (39.4 mg)、14E (85.0 mg)、14F (48.0 mg)、14G (36.0 mg)、14H (67.5 mg)、14I (52.1 mg)、14J (48.8 mg)、14K (41.1 mg)、14L (50.5 mg)、14M (83.4 mg)、14N (25.8 mg)、14O (41.1 mg)、14P (20.6 mg) を得た。

14G の分画

14G (36.0 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL Cholester、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O = 23/77、流速: 4.0 mL/min.、検出波長: 254 nm、RI) により分画を行い、15A (0.4 mg)、15B (1.5 mg)、15C (化合物 **37**、 t_R 12.0、9.0 mg) を得た。

2-7-4. KKP822 *Xylia kerrii* からの化合物の単離

植物エキスの抽出

X. kerrii 葉部の植物乾燥サンプル (113 g) を MeOH に浸し、抽出液を濾過したものを MeOH 抽出物 (71.3 g) とした。

植物エキスの分画

X. kerrii 葉部 MeOH 抽出物を 10% MeOH に溶解させ、hexane、EtOAc、水飽和 BuOH で順次溶媒分配を行い、hexane lay. (11.4 g)、EtOAc lay. (43.9 g)、BuOH lay. (8.7 g)、water lay. (7.3 g) を得た。

EtOAc lay. の分画

EtOAc lay. (43.9 g) を silica gel 60N カラムクロマトグラフィー (ϕ 80x340 mm) により分画し、CHCl₃/MeOH = 1/0 溶出画分として 1A (103.6 mg)、1B (1.6 g)、1C (842.2 mg)、1D (695.9 mg)、CHCl₃/MeOH = 10/1 溶出画分として 1E (2.3 g)、CHCl₃/MeOH = 5/1 溶出画分として 1F (588.0 mg)、1G (10.7 g)、1H (11.5 g)、CHCl₃/MeOH = 3/1 溶出画分として 1I (4.7 g)、1J (4.4 g)、CHCl₃/MeOH = 2/1 溶出画分として 1K (3.1 g)、CHCl₃/MeOH = 1/1 溶出画分として 1L (1.1 g)、CHCl₃/MeOH = 0/1 溶出画分として 1M (923.5 mg)、CHCl₃/MeOH = 0/1 + 0.1 % TFA 溶出画分として 1N (1.2 g) を得た。

1H の分画

1H (4.3 g) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 80x185 mm) により分画し、MeOH/H₂O = 1/4 溶出画分として 2A (199.0 mg)、MeOH/H₂O = 3/7 溶出画分として 2B (131.0 mg)、MeOH/H₂O = 2/3 溶出画分として 2C (664.0 mg)、MeOH/H₂O = 1/1 溶出画分として 2D (1.5 g)、MeOH/H₂O = 3/2 溶出画分として 2E (1.0 g)、MeOH/H₂O = 7/3 溶出画分として 2F (493.1 mg)、MeOH/H₂O = 1/0 溶出画分として 2G (281.4 mg)、MeOH/H₂O = 1/0 + 0.1 % TFA 溶出画分として 2H (69.0 mg) を得た。

2D の分画

2D (1.5 g) を ODS カラムクロマトグラフィー (ϕ 80x180 mm) により分画し、MeCN/H₂O = 1/9 溶出画分として 3A (6.0 mg)、MeCN/H₂O = 3/17 溶出画分として 3B (4.8 mg)、MeCN/H₂O = 1/4 溶出画分として 3C (112.5 mg)、MeCN/H₂O = 1/3 溶出画分として 3D (533.0 mg)、MeCN/H₂O = 3/7 溶出画分として 3E (415.3 mg)、MeCN/H₂O = 7/13 溶出画分として 3F (349.5 mg)、MeCN/H₂O = 2/3 溶出画分として 3G (48.4 mg)、MeOH/H₂O = 1/0 溶出画分として 3H (38.6 mg)、MeOH/H₂O = 1/0 + 0.1 % TFA 溶出画分として 3I (28.9 mg) を得た。

3D の分画

3D (533.0 mg) を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 20x500 mm) により分画し、MeOH/CHCl₃ = 1/1 溶出画分として 4A (0.9 mg)、4B (1.8 mg)、4C (10.5 mg)、4D (27.2 mg)、4E (390.8 mg)、4F (40.4 mg)、4G (43.3 mg)、4H (3.4 mg) を得た。

4E の分画

4E (390.8 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 4/21、流速: 4.0 mL/min.、検出: 254 nm) により分画を行い、5A (1.8 mg)、5B (化合物 **38**、 t_R 13.6、2.5 mg)、5C (化合物 **39**、 t_R 15.2、63.7 mg)、5D (1.8 mg)、5E (3.0 mg)、5F (化合物 **40**、 t_R 32.8、3.3 mg) を得た。また、5G (8.0 mg、MeOH/H₂O = 1/0) を得た。

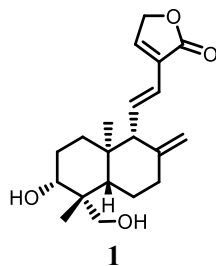
4F の分画

4F (40.4 mg) を HPLC (カラム: COSMOSIL π -NAP、 ϕ 10x250 mm、溶媒: MeCN/H₂O (0.1 % HCOOH) = 7/43、流速: 4.0 mL/min.、検出: 254 nm) により分画を行い、6A (1.7 mg)、6B (1.2 mg)、6C (化合物 **41**、 t_R 26.0、2.6 mg)、6D (2.6 mg)、6E (化合物 **42**、 t_R 42.4、1.9 mg)、6F (化合物 **40**、 t_R 46.4、5.6 mg) を得た。

2-7-5. 単離した化合物の物理化学的性状

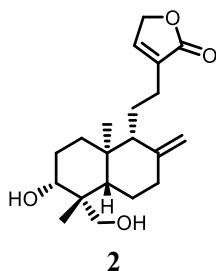
Compound 1

ESI-MS m/z 355 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ 8.3 (c 1.0, MeOH).



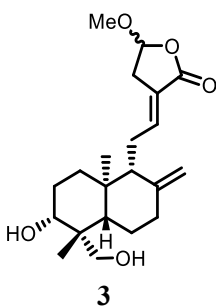
Compound 2

ESI-MS m/z 357 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -27.7 (c 0.9, MeOH).



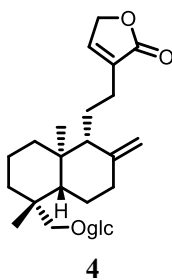
Compound 3

ESI-MS m/z 365 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{29}$ -39.1 (c 0.1, MeOH).



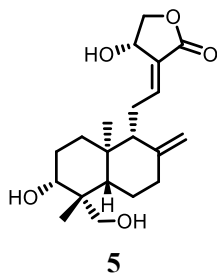
Compound 4

ESI-MS m/z 481 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -34.6 (c 1.1, MeOH).



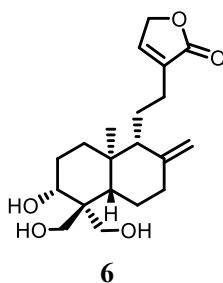
Compound 5

ESI-MS m/z 355 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -61.1 (c 0.5, MeOH).



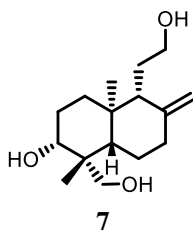
Compound 6

ESI-MS m/z 373 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -43.5 (c 0.2, MeOH).



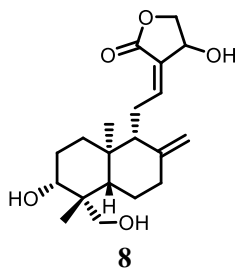
Compound 7

ESI-MS m/z 291 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{23}$ -27.3 (c 0.22, MeOH).



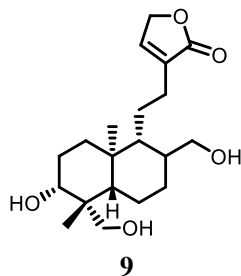
Compound 8

ESI-MS m/z 373 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -49.0 (c 0.6, MeOH).



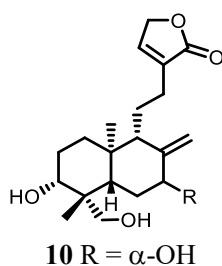
Compound 9

ESI-MS m/z 353 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -8.8 (c 0.8, MeOH).



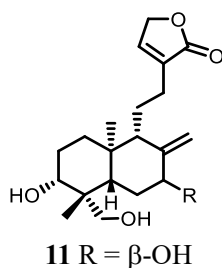
Compound 10

ESI-MS m/z 373 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -19.5 (c 0.2, MeOH).



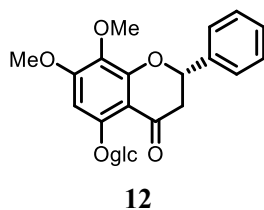
Compound 11

ESI-MS m/z 373 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ 8.3 (c 0.2, MeOH).



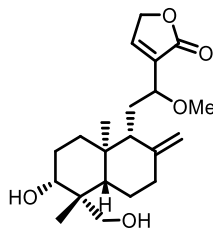
Compound 12

ESI-MS m/z 463 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{20}$ -103.6 (c 0.3, MeOH).



Compound 13

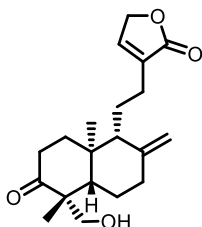
ESI-MS m/z 365 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -132.4 (c 0.2, MeOH).



13

Compound 14

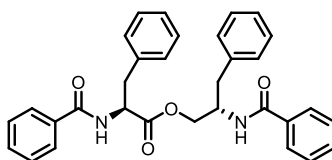
ESI-MS m/z 333 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{22}$ -42.2 (c 0.4, $CHCl_3$).



14

Compound 15

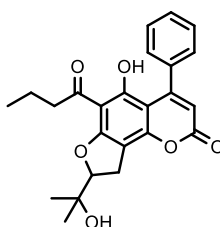
ESI-MS m/z 529 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{23}$ -85.6 (c 0.38, pyridine).



15

Compound 16

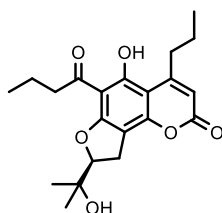
ESI-MS m/z 409 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -2.4 (c 0.45, $CHCl_3$).



16

Compound 17

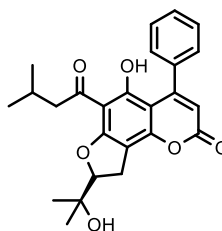
White powder; ESI-MS m/z 375 $[M+H]^+$; $[\alpha]_D^{25}$ -2.2 (c 0.1, MeOH); UV λ_{\max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 332 (0.72) and 283 (1.82); CD λ_{\max} (MeOH) nm ($\Delta\epsilon$): 305 (2.88), 273 (5.00), 240 (0.66) and 214 (-1.16).



17

Compound 18

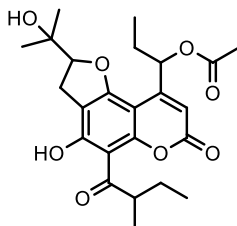
Yellow powder; ESI-MS m/z 423 $[M+H]^+$; $[\alpha]_D^{27}$ -13.4 (c 0.1, MeOH); UV λ_{\max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 343 (0.48), 281 (1.14), and 201 (1.29); CD λ_{\max} (MeOH) nm ($\Delta\epsilon$): 344 (1.84), 285 (6.22), and 227 (-7.34).



18

Compound 19

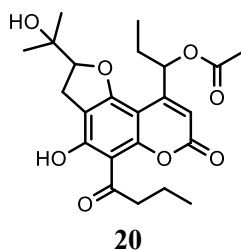
White powder; HR-ESI-MS m/z 469.1806 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{24}H_{30}O_8Na$, 469.1838); $[\alpha]_D^{26}$ -67.4 (c 0.1, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3320, 2940, 2830, 1650, 1450, 1020, 630, and 620; UV λ_{\max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 297 (1.20) and 222 (1.17); for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-1.



19

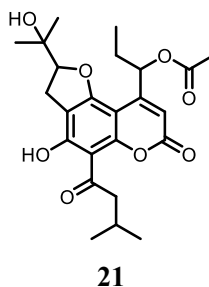
Compound 20

White powder; HR-ESI-MS m/z 455.1687 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{23}H_{28}O_8Na$, 455.1682); $[\alpha]_D^{25}$ -38.4 (c 0.1, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3320, 2940, 2830, 1635, 1610, 1450, 1410, 1110, 1020, and 610; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 295 (4.09) and 221 (4.11); for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-2.



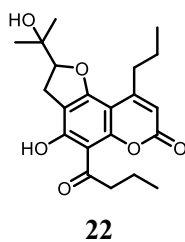
Compound 21

White powder; HR-ESI-MS m/z 469.1810 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{24}H_{30}O_8Na$, 469.1838); $[\alpha]_D^{26}$ -17.1 (c 0.1, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3330, 2940, 2830, 1630, 1610, 1450, 1410, 1120, and 1020; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 294 (1.54) and 221 (1.66); for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-3.



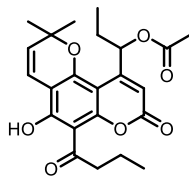
Compound 22

ESI-MS m/z 397 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{26}$ -16.7 (c 0.1, MeOH).



Compound 23

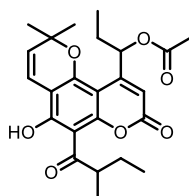
ESI-MS m/z 437 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{26}$ -39.8 (c 0.205, $CHCl_3$).



23

Compound 24

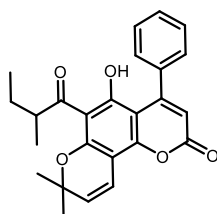
ESI-MS m/z 451 $[M+Na]^+$, $[\alpha]_D^{27}$ -15.0 (c 0.1, MeOH).



24

Compound 25

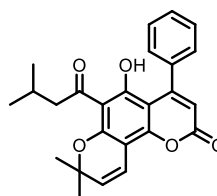
ESI-MS m/z 405 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{27}$ -14.9 (c 0.1, MeOH).



25

Compound 26

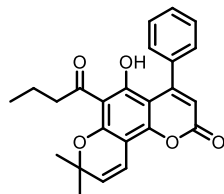
ESI-MS m/z 437 $[M+Na]^+$.



26

Compound 27

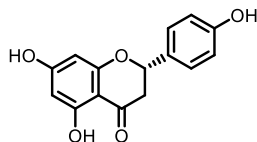
ESI-MS m/z 391 $[M+H]^+$.



27

Compound 28

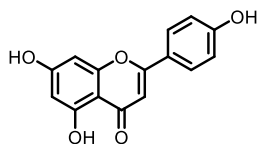
ESI-MS m/z 271 $[M-H]^-$, $[\alpha]_D^{24}$ -6.4 (c 0.12, MeOH).



28

Compound 29

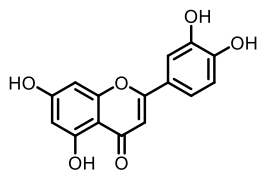
ESI-MS m/z 269 $[M-H]^-$.



29

Compound 30

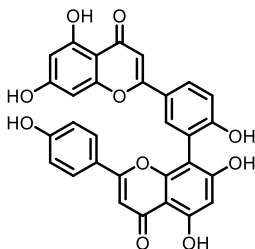
ESI-MS m/z 287 $[M+H]^+$.



30

Compound 31

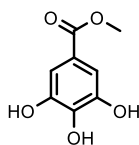
ESI-MS m/z 539 $[M+H]^+$.



31

Compound 32

ESI-MS m/z 185 $[M+H]^+$.



32

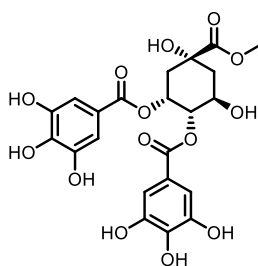
Compound 33

Yellow powder; HR-ESI-MS m/z 533.0872 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{22}H_{22}O_{14}Na$, 533.0907);

$[\alpha]_D^{25}$ -50.4 (c 0.2, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3310, 2940, 2930, 1450, 1410, 1110, and

1020 cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 279 (4.18) and 219 (4.48); for 1H - and ^{13}C -NMR

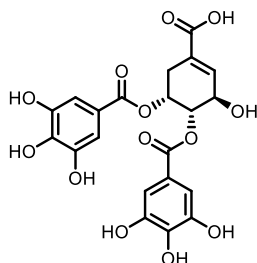
see Table 2-7-5-4.



33

Compound 34

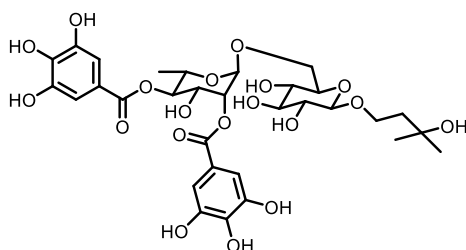
ESI-MS m/z 479 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -258.2 (c 0.1, acetone).



34

Compound 35

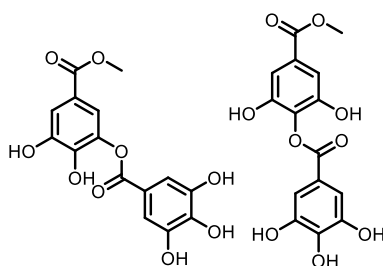
Yellow powder; HR-ESI-MS m/z 739.2061 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{31}H_{40}O_{19}Na$, 739.2062); $[\alpha]_D^{26}$ 40.6 (c 1.0, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3350, 2920, 2850, 2830, 1660, 1630, 1450, 1410, 1110, and 1020 cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) nm (log ϵ): 279 (4.31) and 218 (4.63); for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-5.



35

Compound 36

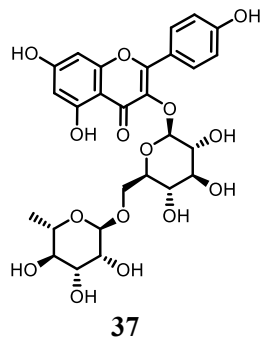
ESI-MS m/z 337 $[M+H]^+$.



36

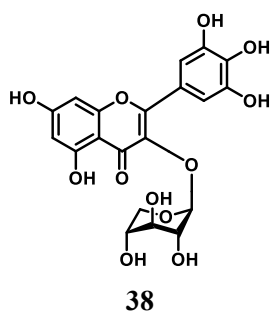
Compound 37

ESI-MS m/z 593 $[M-H]^-$, $[\alpha]_D^{27}$ -10.4 (c 1.0, MeOH).



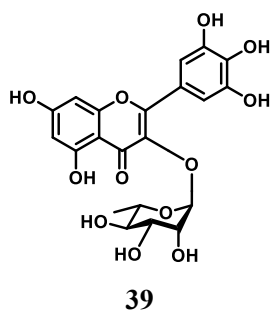
Compound 38

ESI-MS m/z 465 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -46.2 (c 0.03, MeOH).



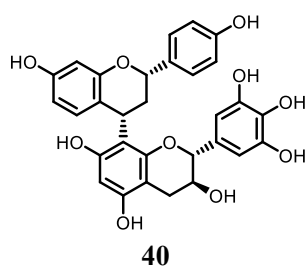
Compound 39

ESI-MS m/z 451 $[M+H]^+$, $[\alpha]_D^{25}$ -144.0 (c 1.8, MeOH).



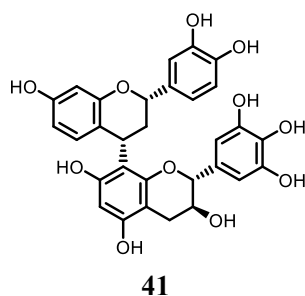
Compound 40

Yellow powder; HR-ESI-MS m/z 569.1424 $[M+Na]^+$ (calcd $C_{30}H_{26}O_{10}Na$ 569.1424); $[\alpha]_D^{26}$ -71.2 (c 0.5, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3350, 2920, 1610, 1600, 1450, 1440, 1120 and 1020 cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 281 (3.4) and 210 (4.4) nm; CD λ_{max} (MeOH) nm ($\Delta\epsilon$): 218.5 (-21.0), 273.5 (1.2), and 287 (-1.2) nm; for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-6.



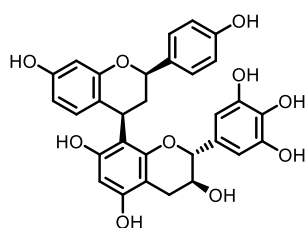
Compound 41

Yellow powder; HR-ESI-MS m/z 585.1402 $[M+Na]^+$ (calcd $C_{30}H_{26}O_{11}Na$ 585.1373); $[\alpha]_D^{26}$ -97.6 (c 0.1, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3320, 2940, 2830, 1450, 1420, and 1020 cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 282 (3.76) and 217 (4.53) nm; CD λ_{max} (MeOH) nm ($\Delta\epsilon$): 224.5 (-16.9), 274 (4.4), 287.5 (-1.4) nm; for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-7.



Compound 42

Yellow powder; HR-ESI-MS m/z 569.1422 $[M+Na]^+$ (calcd $C_{30}H_{26}O_{10}Na$ 569.1424); $[\alpha]_D^{27}$ -39.5 (c 0.05, MeOH); IR (ATR) cm^{-1} : 3310, 2950, 2830, 1660, 1650, 1450, 1410, and 1020 cm^{-1} ; UV λ_{max} (MeOH) nm ($\log \epsilon$): 280 (3.89) and 222 (4.56) nm; CD λ_{max} (MeOH) nm ($\Delta\epsilon$): 218 (7.0), 274.5 (-1.6), 288 (0.5) nm; for 1H - and ^{13}C -NMR see Table 2-7-5-8.



42

2-7-6. 化合物 19-21, 33, 35, 40-42 の ¹H-NMR ¹³C-NMR シフト値

Compound 19

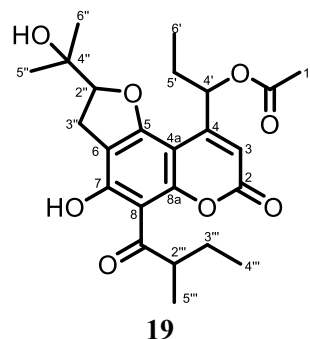
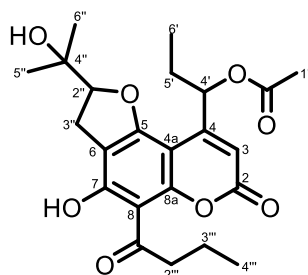


Table 2-7-5-1 19 の ¹H-NMR, ¹³C-NMR

Position	19		
	¹ H-NMR		¹³ C-NMR
	δ_H (ppm)	<i>J</i> (Hz)	δ_C (ppm)
2			159.4
3	6.23 (1H)	s	106.1
4			155.9
4a			97.2
5			161.3
6			110.3
7			163.5
8			104.9
8a			157.2
1'	6.32 (1H)	dd, <i>J</i> = 7.4, 4.1 Hz	72.6
2'	1.99 (1H)	m	28.2
	1.74 (1H)	m	
3'	1.05 (3H)	t, <i>J</i> = 7.4 Hz	9.7
2''	4.94 (1H)	t, <i>J</i> = 9.0 Hz	93.1
3''	3.16 (2H)	overlap	26.8
4''			71.6
5''	1.39 (3H)	s	26.0
6''	1.29 (3H)	s	24.8
1'''			210.5
2'''	3.87 (1H)	m	46.9
3'''	1.89 (1H)	m	27.1
	1.46 (1H)	m	
4'''	0.98 (3H)	t, <i>J</i> = 7.4 Hz	11.8
5'''	1.24 (3H)	d, <i>J</i> = 7.4 Hz	16.6
1''''			170.2
2''''	2.17 (3H)	s	21.0
7-OH	14.21 (1H)	s	

CDCl₃, ¹H-NMR: 600 MHz, ¹³C-NMR: 150 MHz

Compound 20



20

Table 2-7-5-2 **20** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	20		
	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	δ_{C} (ppm)
2			159.4
3	6.22 (1H)	s	106.1
4			155.9
4a			97.2
5			161.4
6			110.2
7			163.3
8			105.2
8a			157.5
1'	6.31 (1H)	dd, $J = 8.3, 3.3$ Hz	72.6
2'	1.98 (1H)	m	28.2
	1.77 (1H)	m	
3'	1.04 (3H)	overlap	9.7
2''	4.93 (1H)	t, $J = 9.0$ Hz	93.2
3''	3.16 (2H)	overlap	26.8
4''			71.6
5''	1.38 (3H)	s	26.0
6''	1.29 (3H)	s	24.8
1'''			206.2
2'''	3.25 (2H)	dt, $J = 7.4, 1.6$ Hz	46.6
3'''	1.77 (2H)	m	18.0
4'''	1.04 (3H)	overlap	13.8
1''''			170.2
2''''	2.17 (3H)	s	21.0
7-OH	14.18 (1H)	s	

CDCl_3 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 21

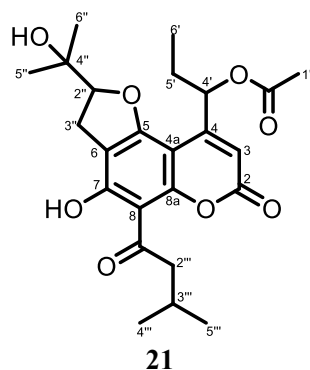


Table 2-7-5-3 **21** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	21		$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm)
	$^1\text{H-NMR}$		
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
2			159.4
3	6.23 (1H)	s	106.5
4			156.1
4a			96.4
5			160.5
6			110.3
7			163.5
8			105.2
8a			157.4
1'	6.50 (1H)	dd, $J = 8.3, 3.3$ Hz	72.5
2'	1.90 (1H)	m	28.6
	1.75 (1H)	m	
3'	1.03 (3H)	overlap	10.1
2''	4.90 (1H)	t, $J = 9.0$ Hz	93.1
3''	3.19 (2H)	d, $J = 9.0$ Hz	26.6
4''			71.6
5''	1.41 (3H)	s	26.2
6''	1.26 (3H)	s	24.2
1'''			206.5
2'''	3.12 (2H)	d, $J = 6.6$ Hz	53.5
3'''	2.26 (1H)	m	25.5
4'''	1.03 (3H)	overlap	22.6
5'''	1.03 (3H)	overlap	22.6
1''''			170.6
2''''	2.15 (3H)	s	21.0
7-OH	14.23 (1H)	s	

CDCl_3 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 33

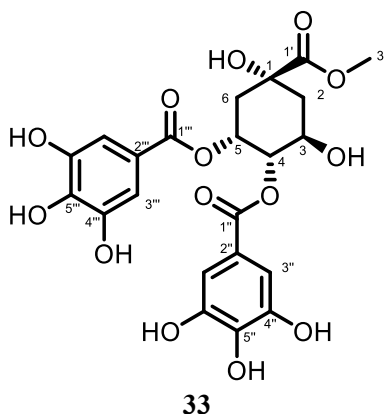


Table 2-7-5-4 **33** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	33		$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm)
	$^1\text{H-NMR}$		
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
1			72.5
2	2.32	dd, $J = 12.8, 3.2$	37.8
	1.89	overlap	
3	4.17	td, $J = 9.6, 3.2$	64.6
4	5.20	dd, $J = 9.6, 5.4$	68.3
5	5.04	dd, $J = 5.4, 3.8$	71.2
6	2.39	dd, $J = 14.5, 3.8$	35.2
	1.86	overlap	
1'			173.2
3'	3.37	s	51.8
1''			165.2
2''			119.0
3'', 7''	6.83	s	108.8
4'', 6''			145.6
5'', 1'''			139.7
2'''			118.3
3''', 7'''	6.99	s	108.6
4''', 6'''			145.6
5'''			139.5

DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 35

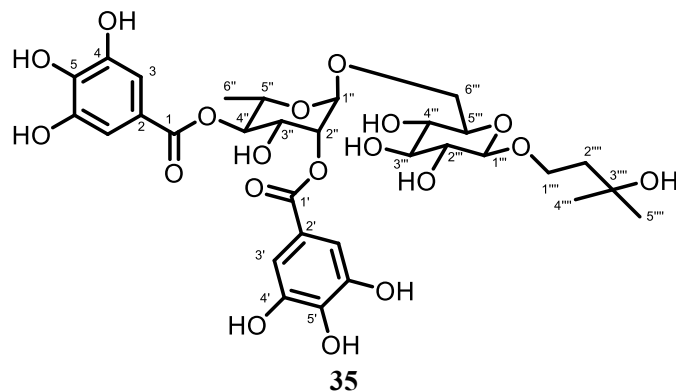


Table 2-7-5-5 **35** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	35		
	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm)
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
1			165.4
2			119.2
3, 7	6.96	s	108.8
4, 6			145.6
5			138.7
1'			165.3
2'			119.1
3', 7'	6.98	s	108.9
4', 6'			145.5
5'			138.9
1''	4.81	d, $J = 1.4$ Hz	97.7
2''	5.14	dd, $J = 3.4, 1.4$ Hz	72.2
3''	4.02	dd, $J = 9.6, 3.4$ Hz	66.4
4''	5.04	t, $J = 9.6$ Hz	73.1
5''	3.86	overlap	66.1
6''	1.13	d, $J = 6.2$ Hz	17.7
1'''	4.15	d, $J = 7.6$ Hz	103.0
2'''	2.94	t, $J = 8.9$ Hz	73.4
3'''	3.14	t, $J = 8.9$ Hz	76.6
4'''	3.03	t, $J = 8.9$ Hz	70.0
5'''	3.32	dt, $J = 8.3, 1.4$ Hz	75.1
6'''	3.86	overlap	67.2
	3.58	m	
1''''	3.86	overlap	65.8
	3.53	m	
2''''	1.67	dt, $J = 7.5, 3.4$ Hz	42.5
3''''			68.2
4''''	1.05	s	29.7
5''''	1.03	s	29.4

DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 40

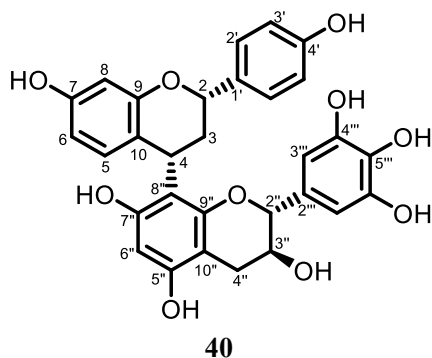


Table 2-7-5-6 **40** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	40		
	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
2	4.91	d, $J = 11.7$ Hz	78.1
3	2.78	dd, $J = 25.1, 11.7$ Hz	34.0
	1.83	dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz	
4	4.59	dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz	31.0
5	6.43	d, $J = 8.3$ Hz	128.2
6	6.11	dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz	107.6
7			155.5
8	6.08	d, $J = 2.1$ Hz	102.4
9			155.5
10			118.0
1'			132.2
2', 6'	7.22	d, $J = 8.3$	127.6
3', 5'	6.74	d, $J = 8.3$	115.0
4'			156.9
2''	4.54	d, $J = 6.9$	81.2
3''	3.83	dd, $J = 13.1, 6.9$	66.3
4''	2.62	dd, $J = 15.7, 5.8$	27.6
	2.43	dd, $J = 15.7, 5.8$	
5''			154.4
6''	5.90	s	96.0
7''			153.9
8''			107.4
9''			153.9
10''			98.6
1'''			130.1
2'', 6'''	6.24	s	105.7
3''', 5'''			145.6
4'''			132.5

DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 41

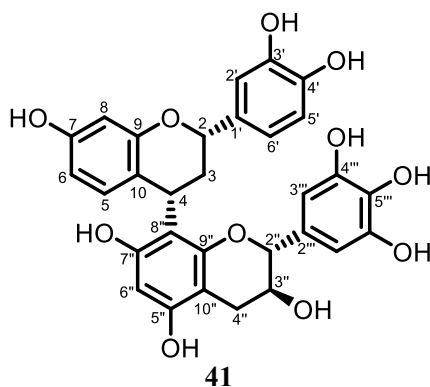


Table 2-7-5-7 **41** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	41		
	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm)
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
2	4.83	dd, $J = 11.7, 2.1$ Hz	78.2
3	2.76	dd, $J = 25.1, 11.7$ Hz	34.0
	1.80	ddd, $J = 11.7, 6.2, 2.1$ Hz	
4	4.57	dd, $J = 11.7, 6.2$ Hz	30.9
5	6.41	d, $J = 8.3$ Hz	128.1
6	6.10	dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz	107.5
7			155.5
8	6.07	d, $J = 2.1$ Hz	102.5
9			155.5
10			117.5
1'			132.5
2'	6.83	d, $J = 2.1$ Hz	113.8
3'			144.9
4'			144.9
5'	6.69	overlap	115.2
6'	6.67	overlap	117.9
2''	4.53	d, $J = 6.9$ Hz	81.2
3''	3.82	dd, $J = 13.1, 6.9$ Hz	66.3
4''	2.62	dd, $J = 13.1, 5.5$ Hz	27.4
	2.43	dd, $J = 13.1, 5.5$ Hz	
5''			154.4
6''	5.89	s	96.0
7''			153.9
8''			107.4
9''			153.5
10''			98.5
1'''			130.1
2''', 6'''	6.24	s	105.7
3''', 5'''			145.7
4'''			132.8

DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

Compound 42

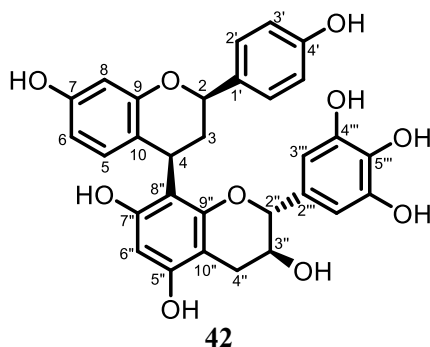


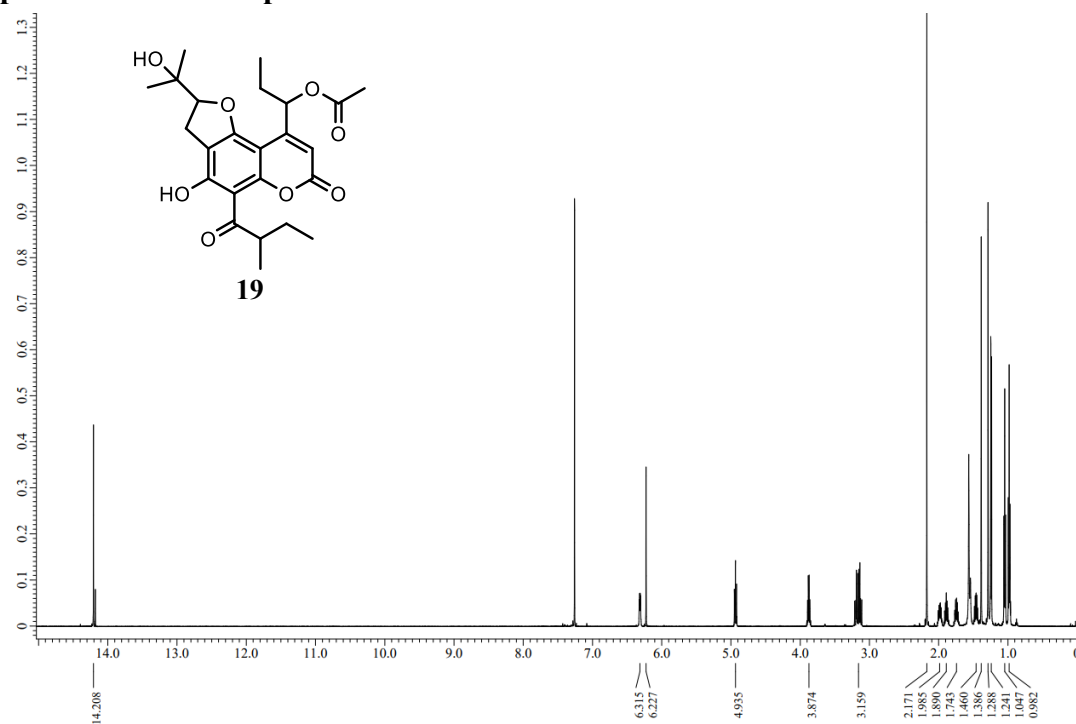
Table 2-7-5-8 **42** の $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$

Position	42		
	$^1\text{H-NMR}$		$^{13}\text{C-NMR}$ δ_{C} (ppm)
	δ_{H} (ppm)	J (Hz)	
2	4.91	d, $J = 11.7$ Hz	78.1
3	2.73	dd, $J = 23.8, 11.7$ Hz	34.2
	1.71	dd, $J = 12.1, 6.2$ Hz	
4	4.58	dd, $J = 12.1, 6.2$ Hz	30.9
5	6.53	d, $J = 8.3$ Hz	128.1
6	6.14	dd, $J = 8.3, 2.1$ Hz	107.7
7			155.5
8	6.09	d, $J = 2.1$ Hz	102.3
9			155.5
10			118.0
1'			132.3
2', 6'	7.20	d, $J = 8.3$ Hz	127.4
3', 5'	6.72	d, $J = 8.3$ Hz	114.9
4'			156.8
2''	4.49	d, $J = 6.2$ Hz	81.3
3''	3.77	dd, $J = 13.1, 6.2$ Hz	69.8
4''	2.41	dd, $J = 16.2, 6.2$ Hz	27.7
	2.69	dd, $J = 16.2, 6.2$ Hz	
5''			154.5
6''	5.89	s	95.9
7''			153.9
8''			107.3
9''			153.9
10''			98.5
1'''			130.2
2''', 6'''	6.27	s	105.9
3''', 5'''			145.7
4'''			132.6

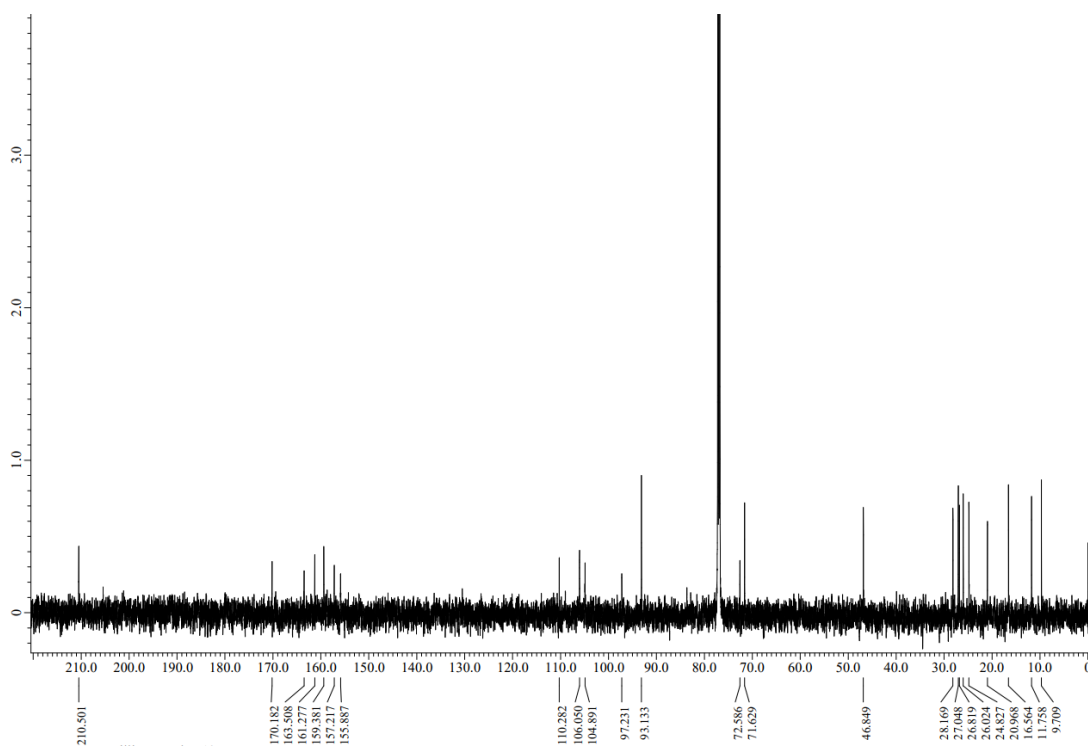
DMSO- d_6 , $^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 150 MHz

2-7-7. 単離した新規化合物などのスペクトルデータ

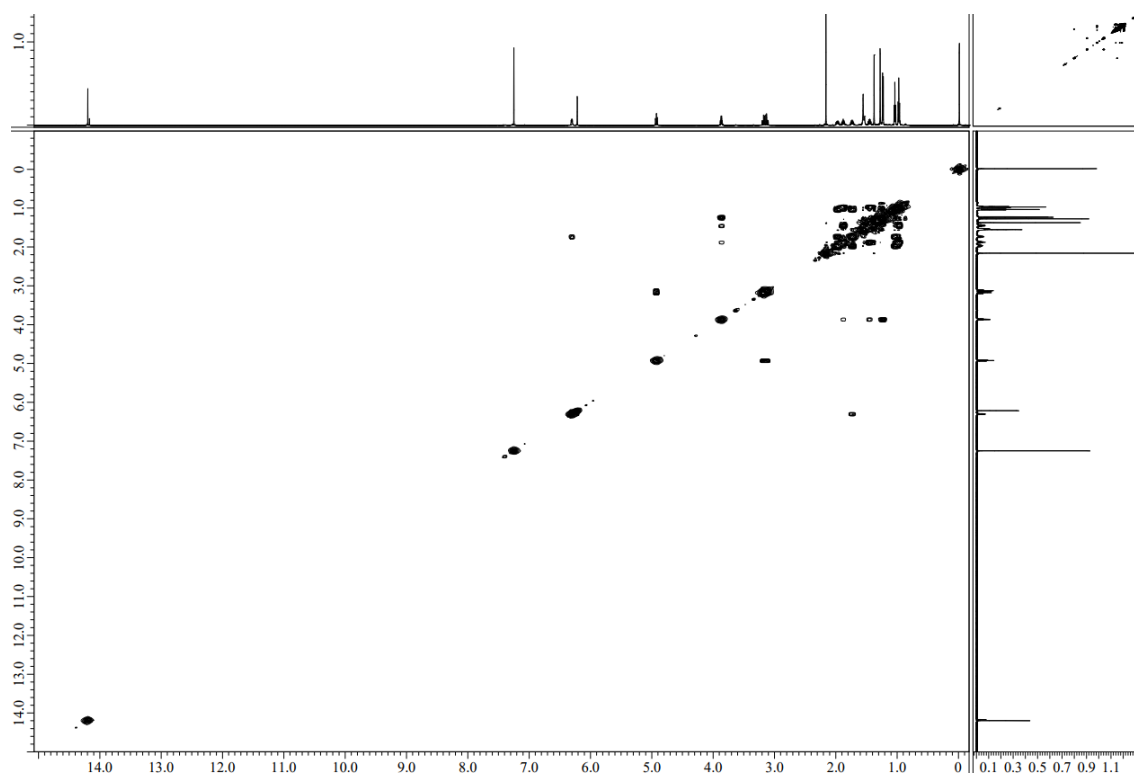
Spectral data of compound **19**



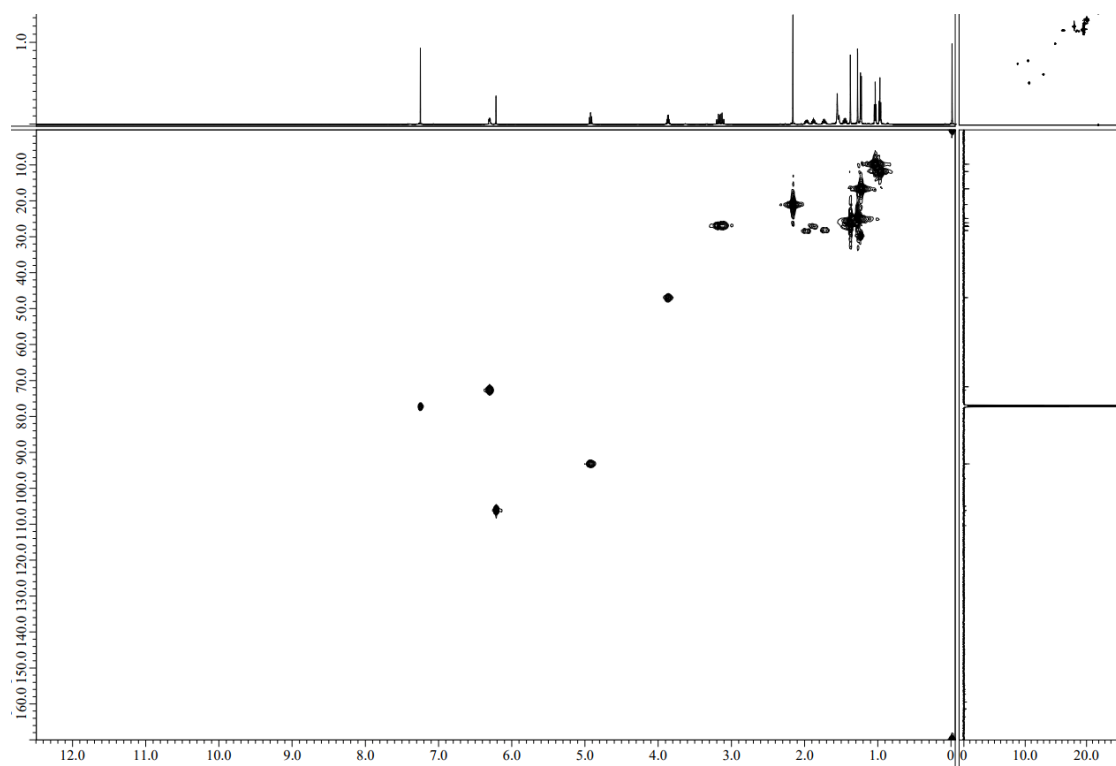
¹H-NMR spectrum of compound **19** (600 MHz, CDCl₃).



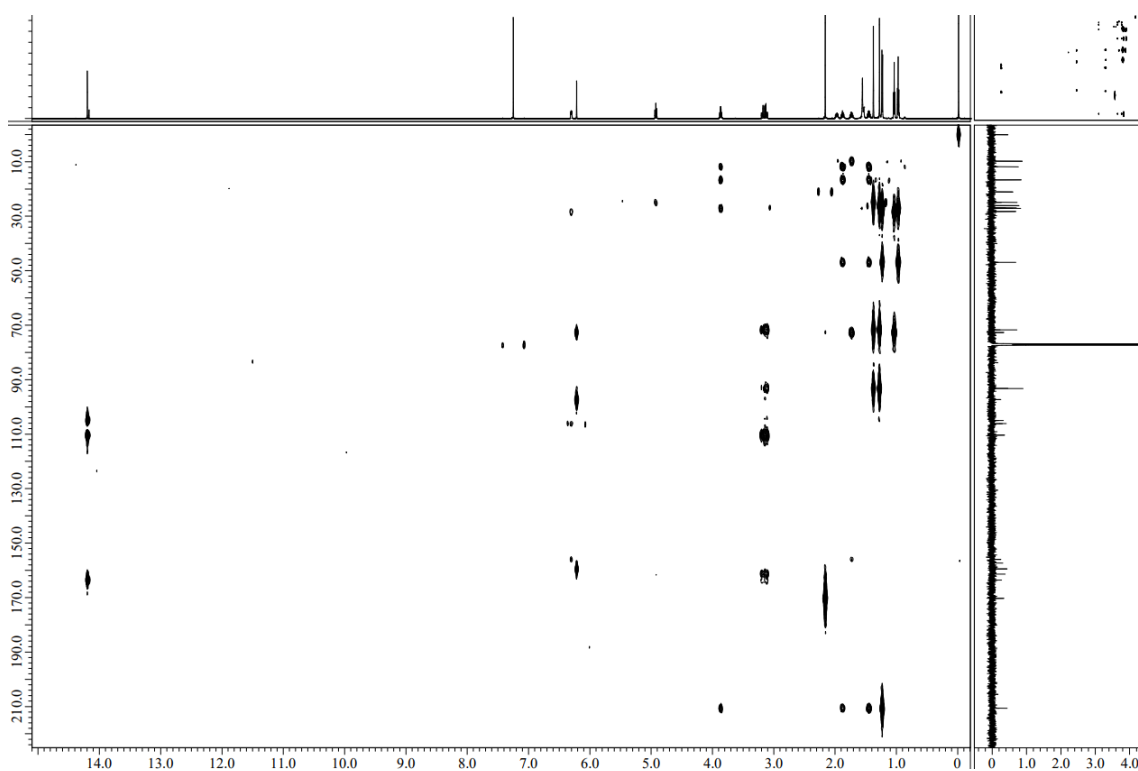
¹³C-NMR spectrum of compound **19** (150 MHz, CDCl₃).



COSY spectrum of compound **19** (600 MHz, CDCl₃).

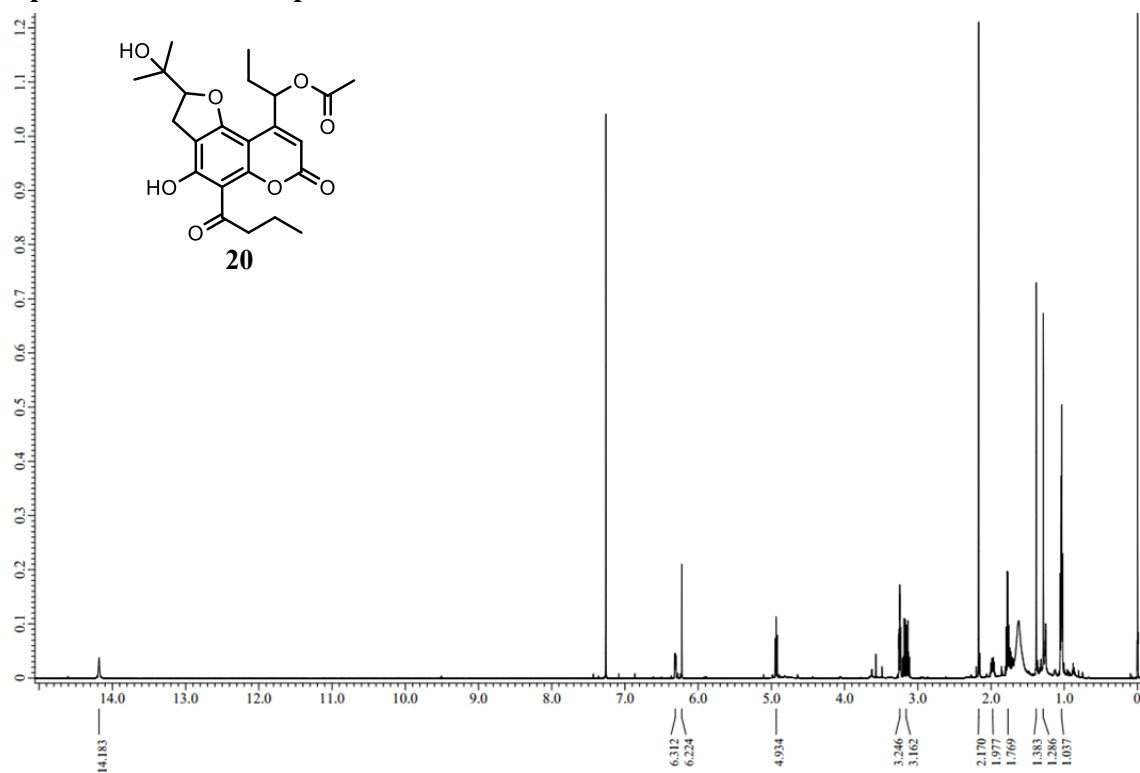


HMQC spectrum of compound **19** (600 MHz, CDCl₃).

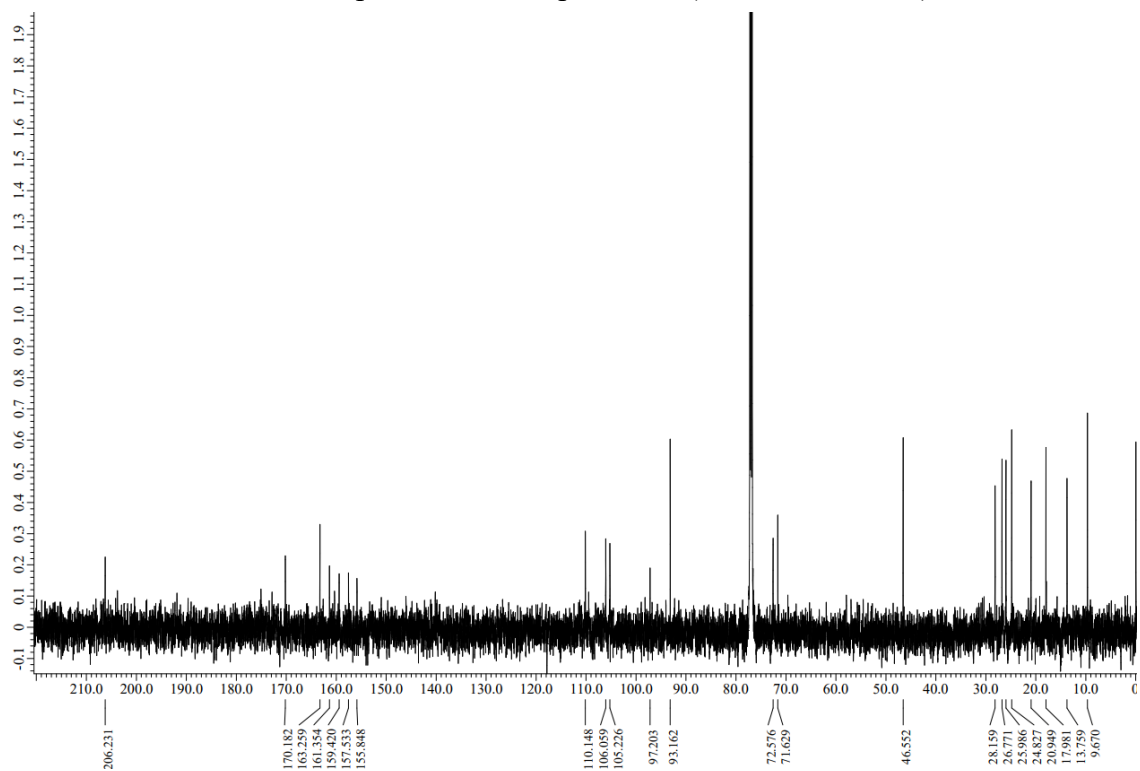


HMBC spectrum of compound **19** (600 MHz, CDCl₃).

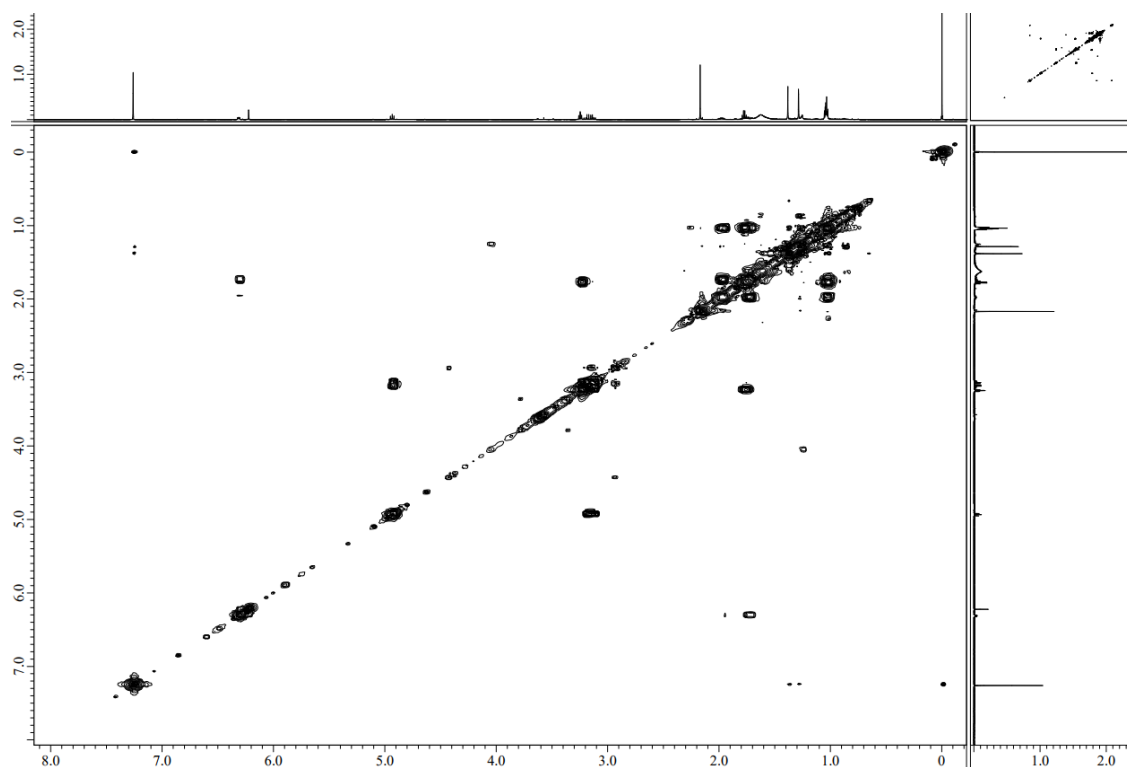
Spectral data of compound 20



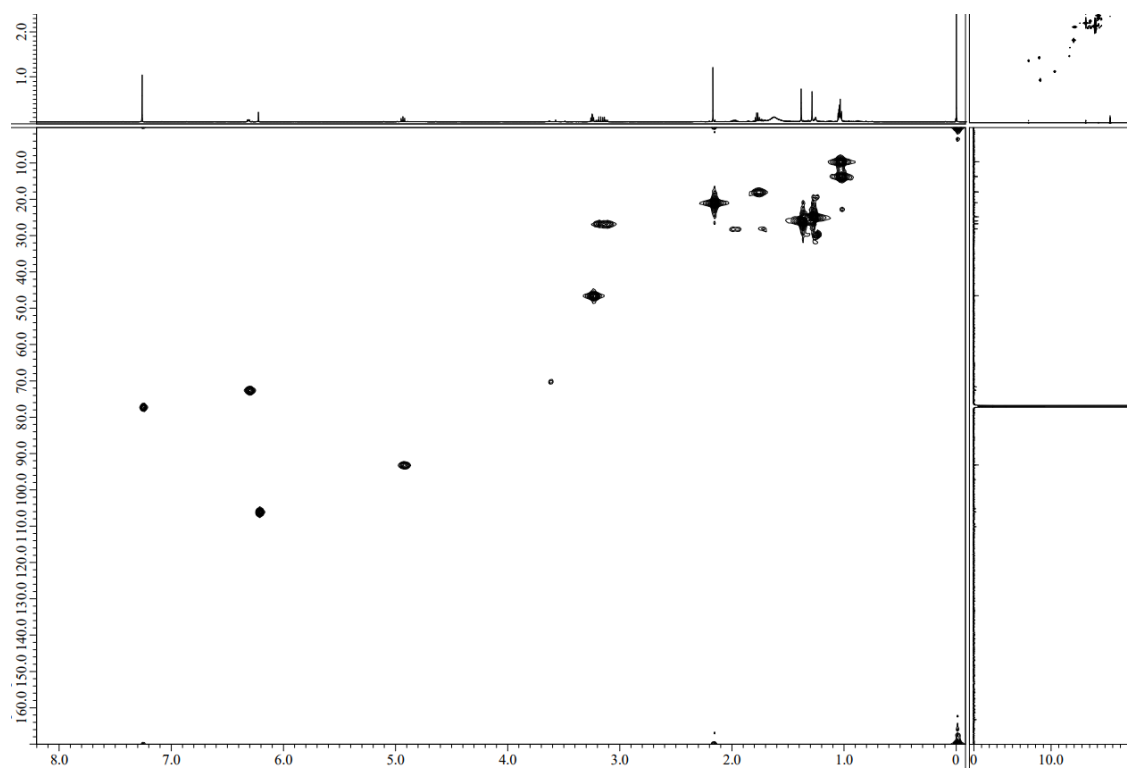
¹H-NMR spectrum of compound 20 (600 MHz, CDCl₃).



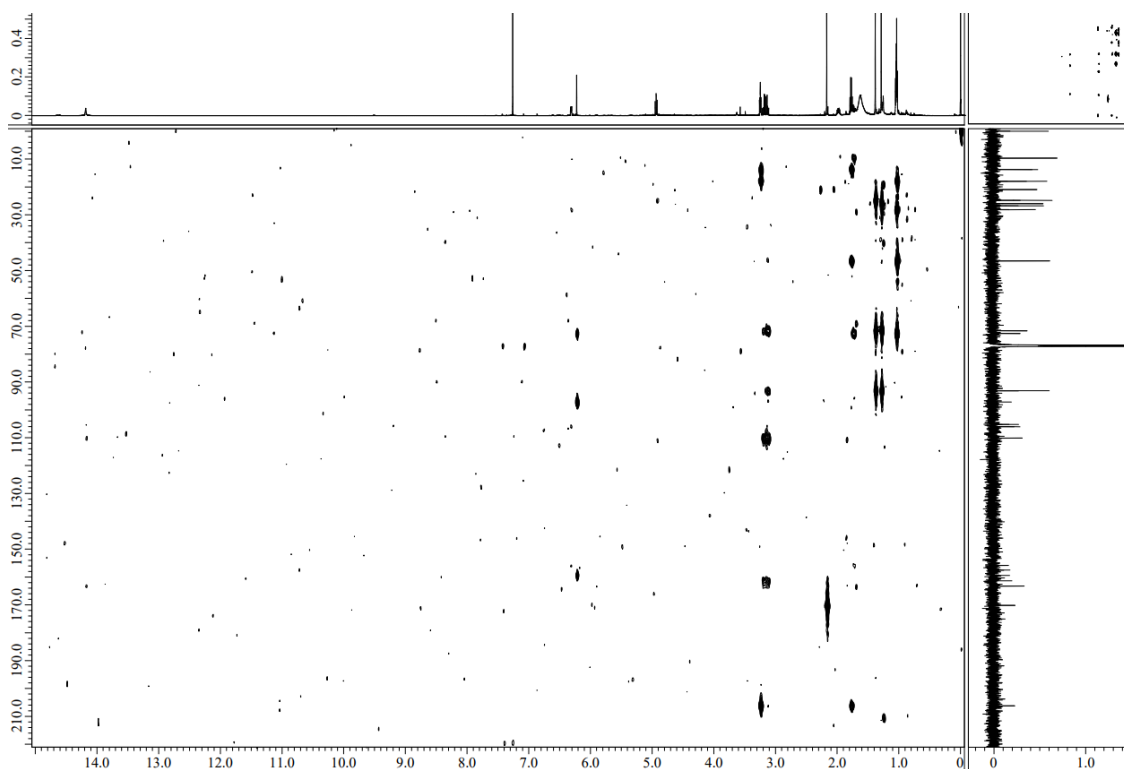
¹³C-NMR spectrum of compound 20 (150 MHz, CDCl₃).



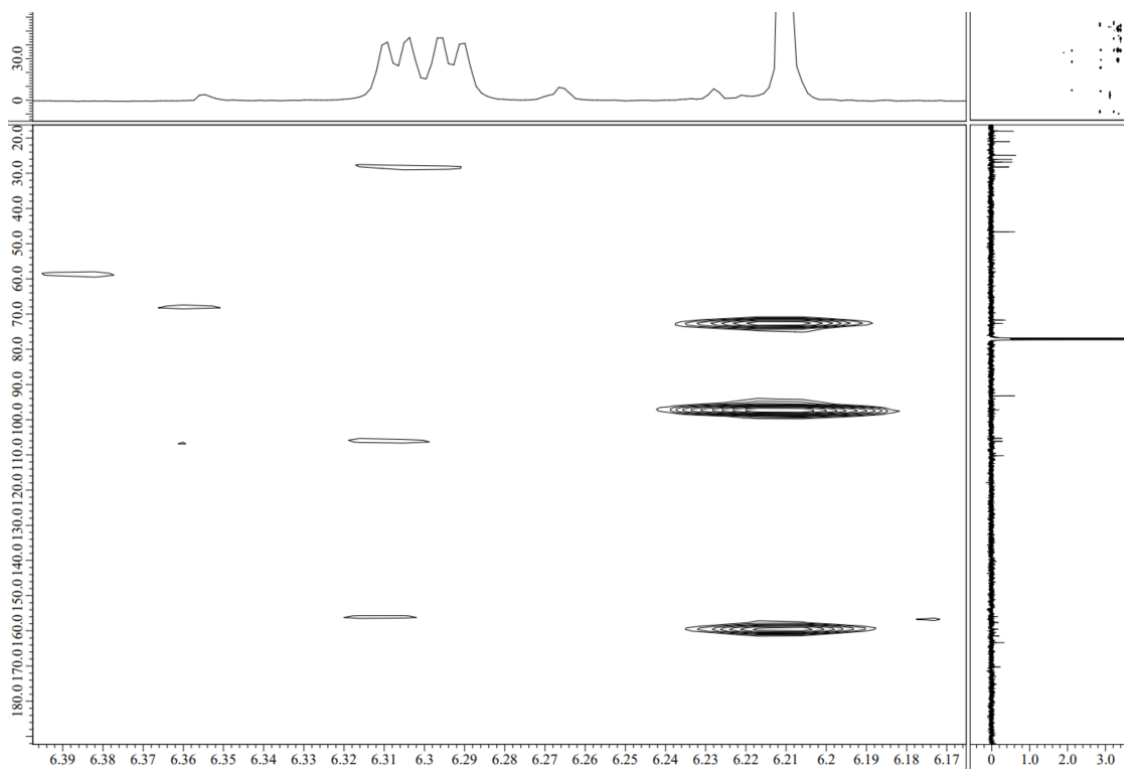
COSY spectrum of compound **20** (600 MHz, CDCl₃).



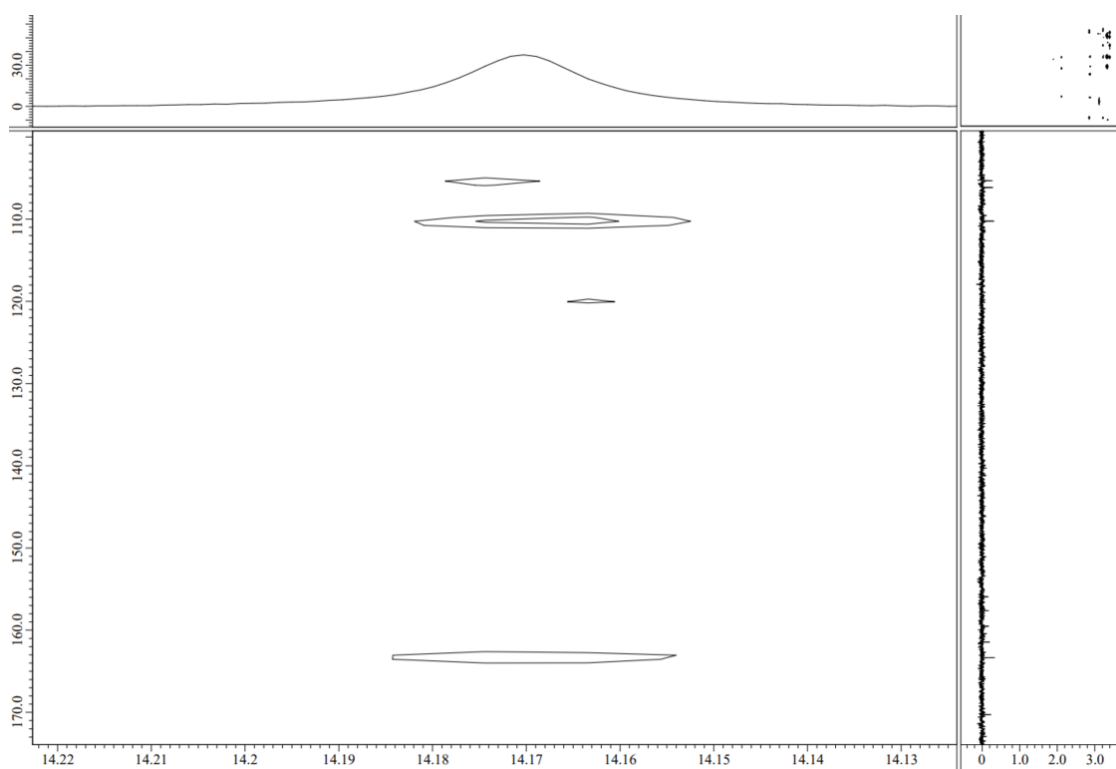
HMQC spectrum of compound **20** (600 MHz, CDCl₃).



HMBC spectrum of compound **20** (600 MHz, $CDCl_3$).

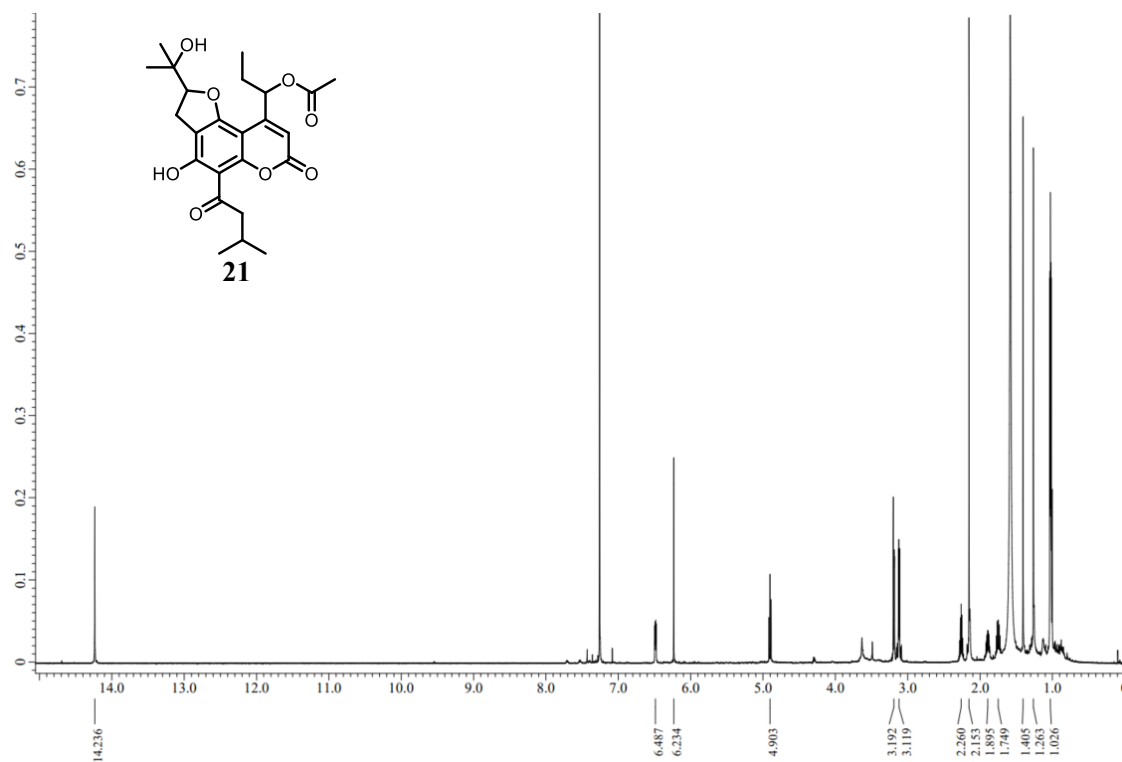


HMBC spectrum of compound **20** (δ_H 6.17-6.40).

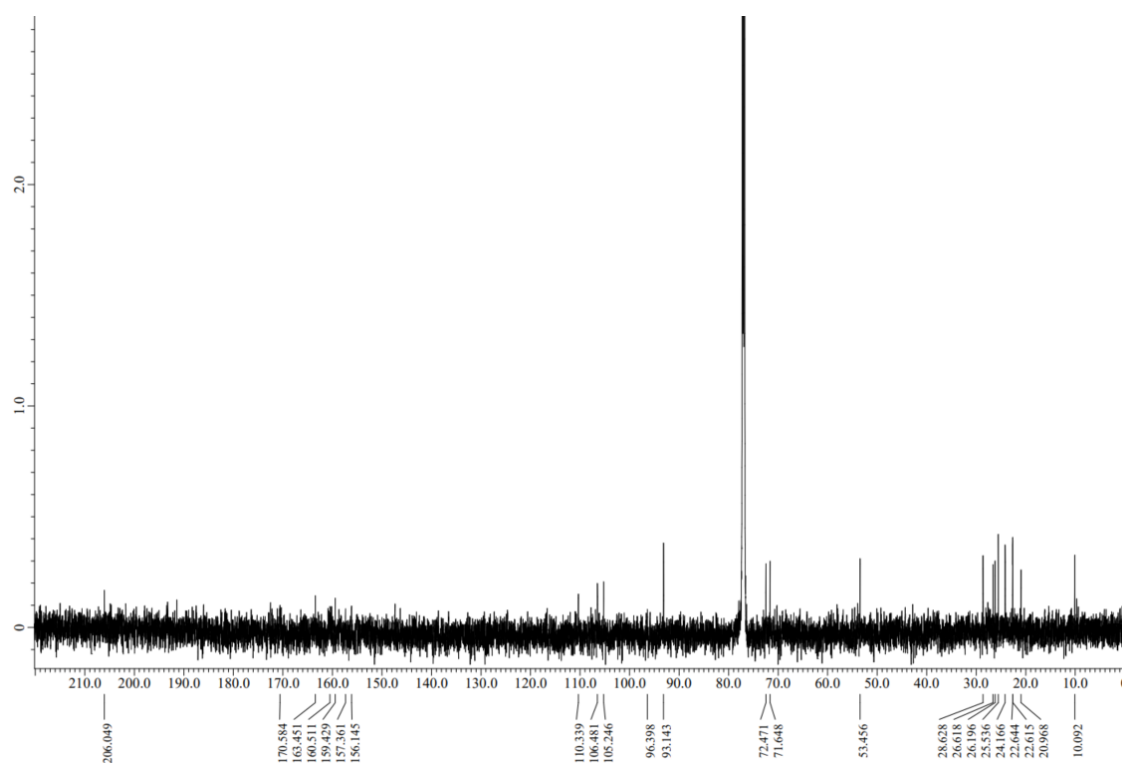


HMBC spectrum of compound **20** (δ_{H} 14.12-14.22).

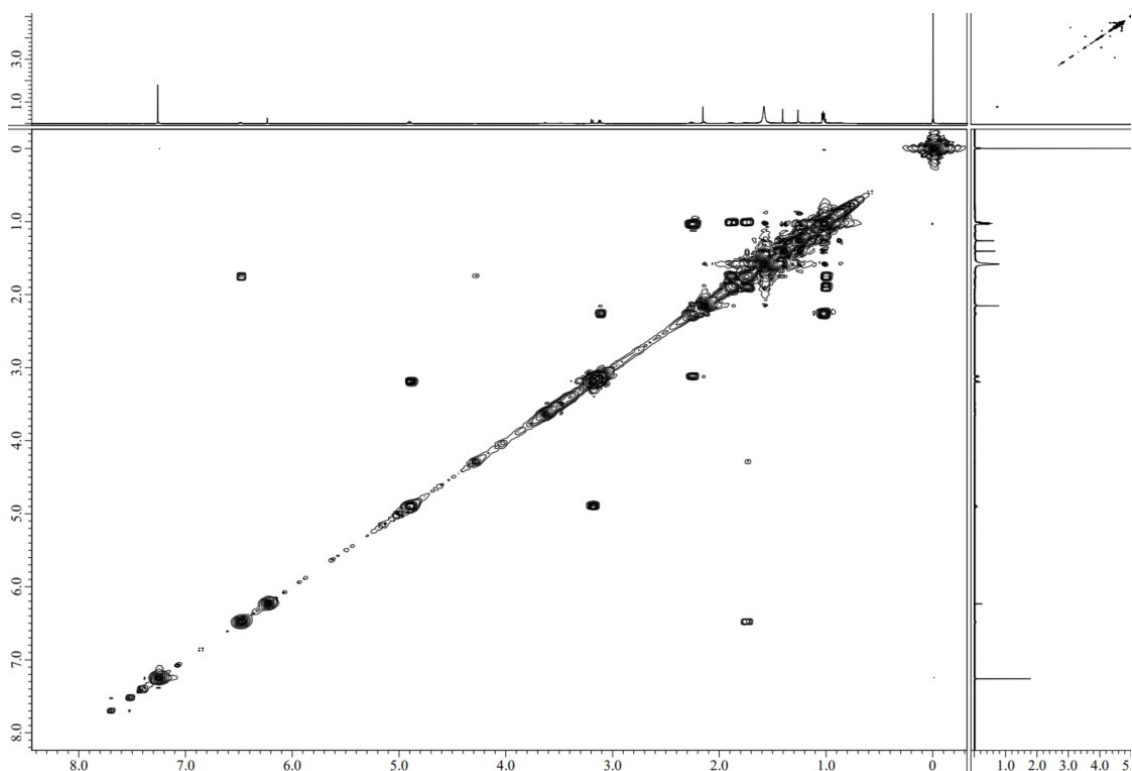
Spectral data of compound **21**



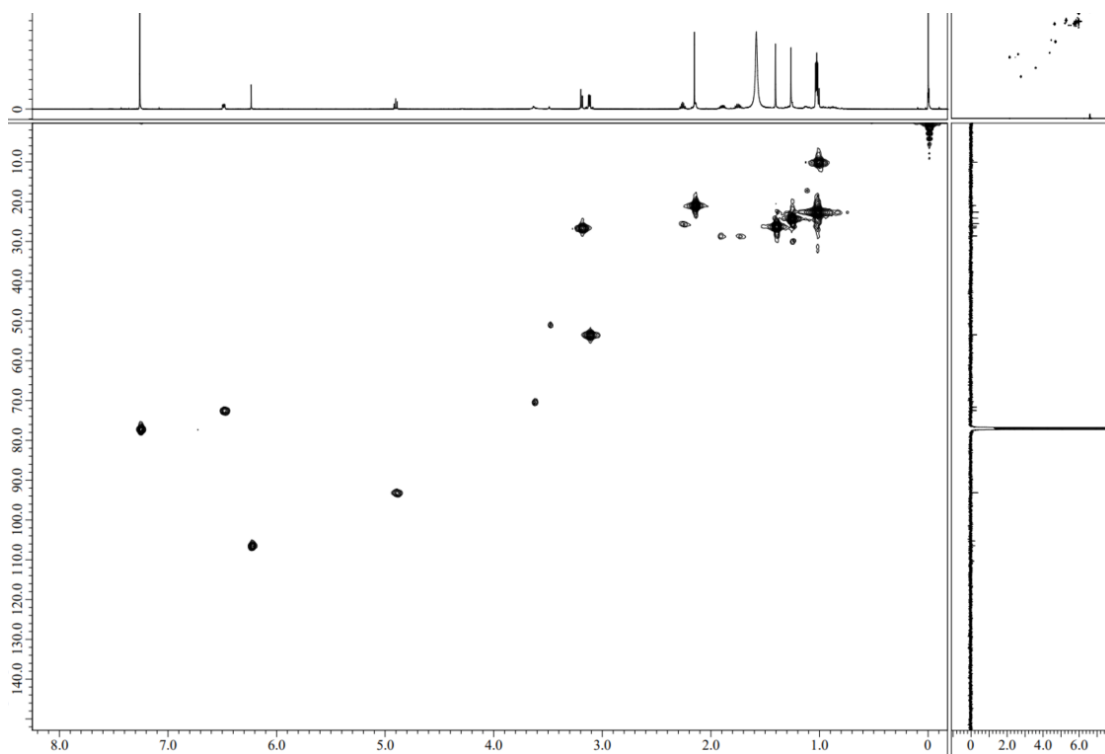
¹H-NMR spectrum of compound **21** (600 MHz, CDCl₃).



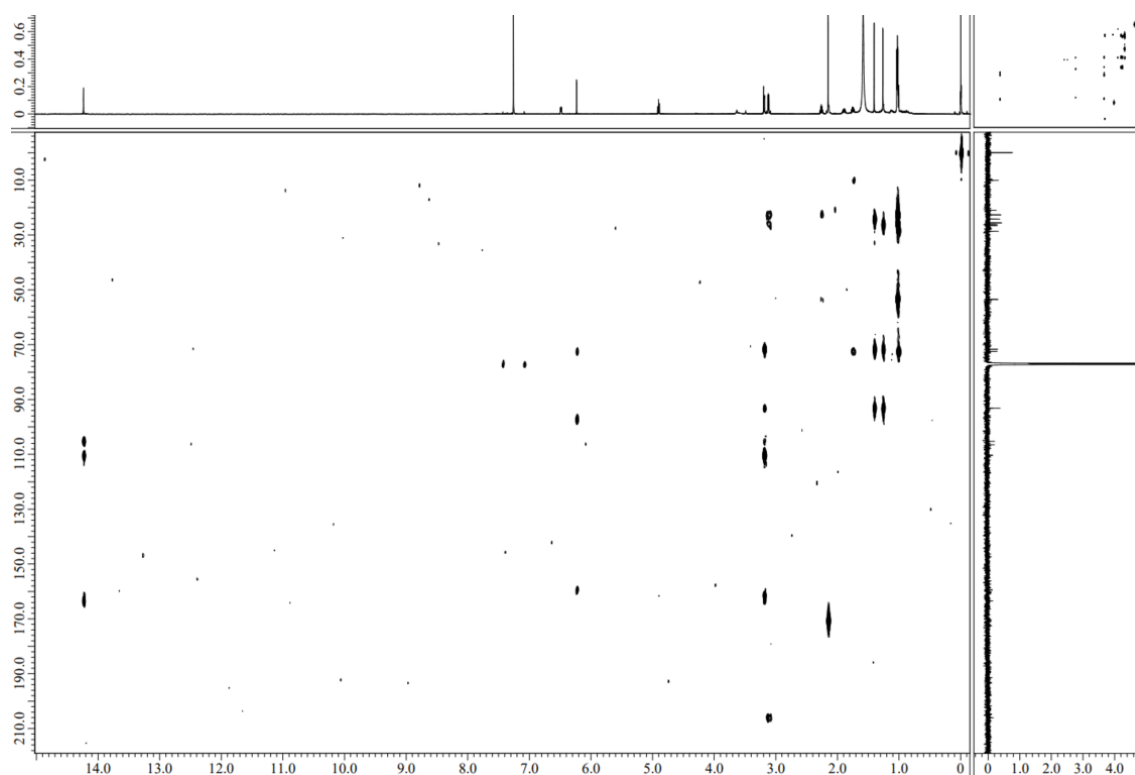
¹³C-NMR spectrum of compound **21** (150 MHz, CDCl₃).



COSY spectrum of compound **21** (600 MHz, CDCl₃).

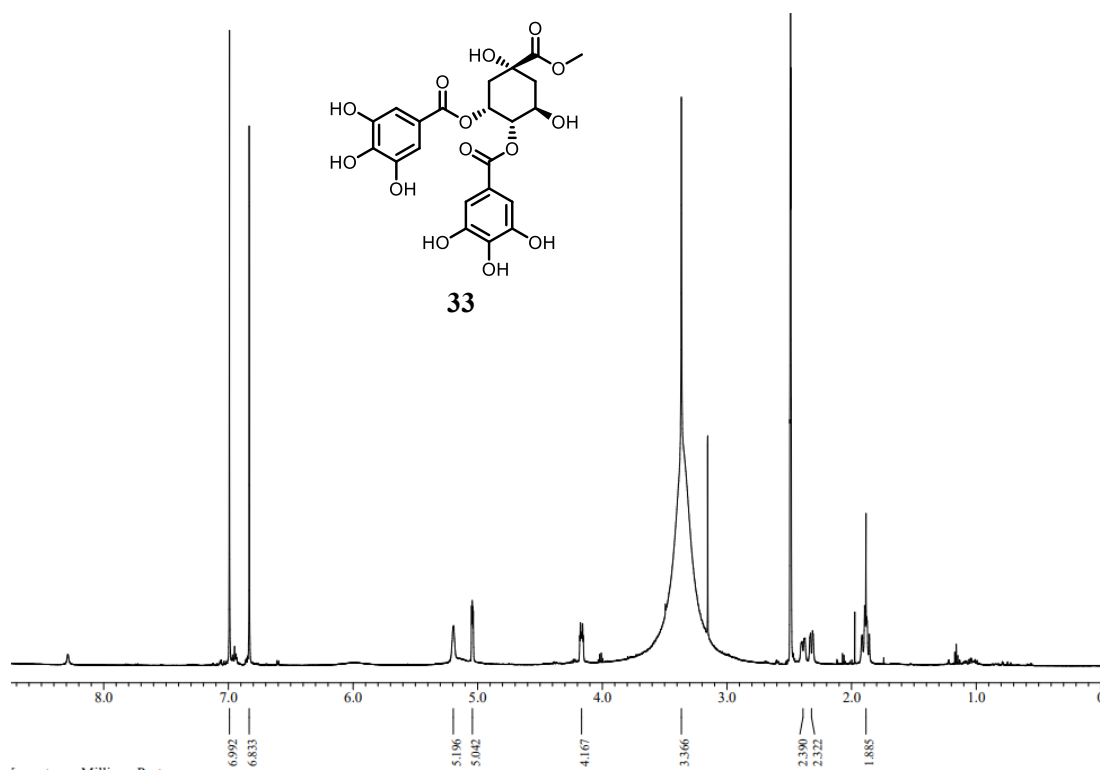


HMQC spectrum of compound **21** (600 MHz, CDCl₃).

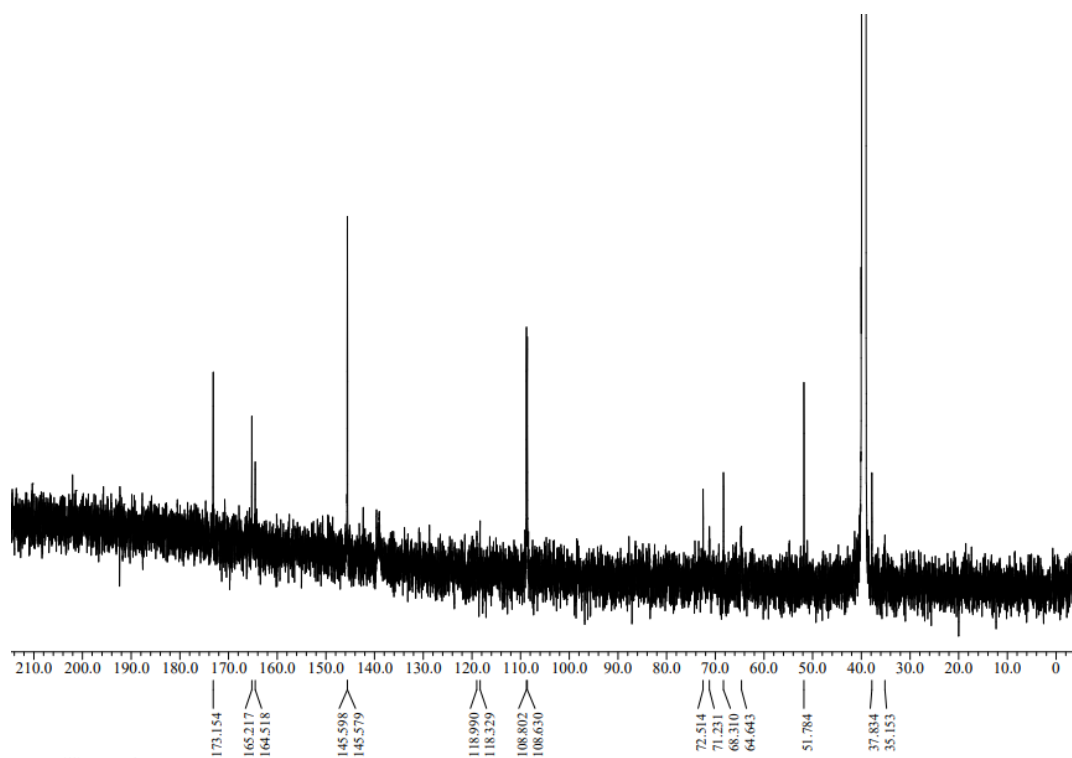


HMBC spectrum of compound **21** (600 MHz, CDCl₃).

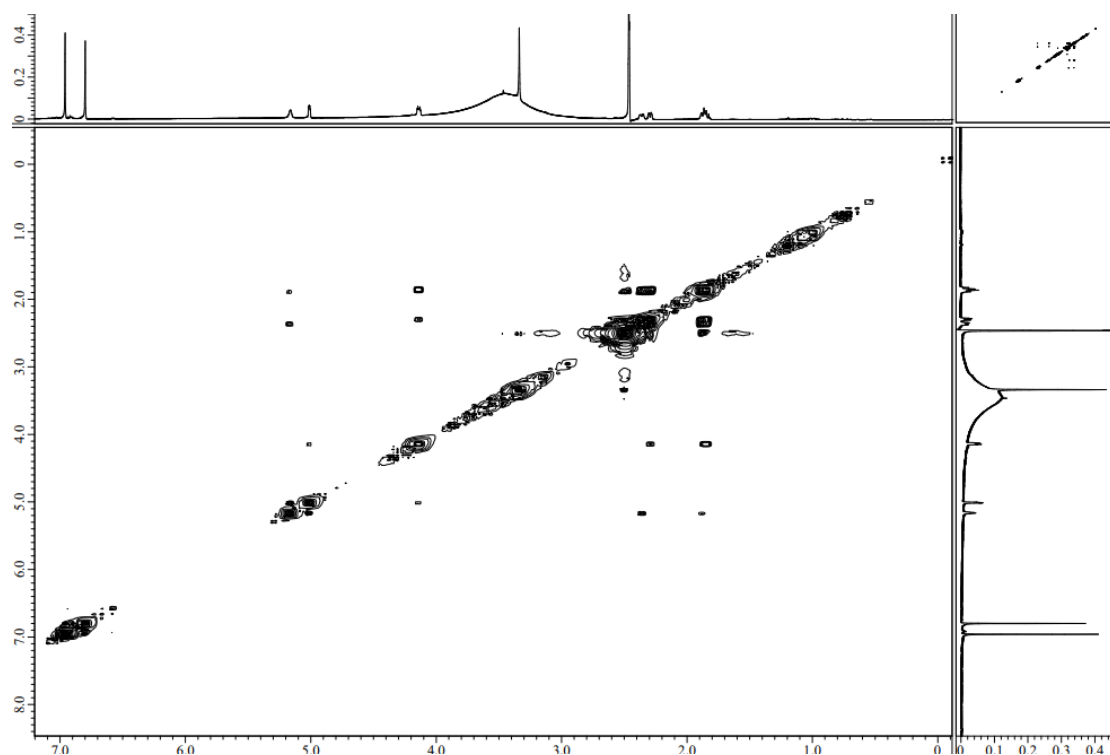
Spectral data of compound **33**



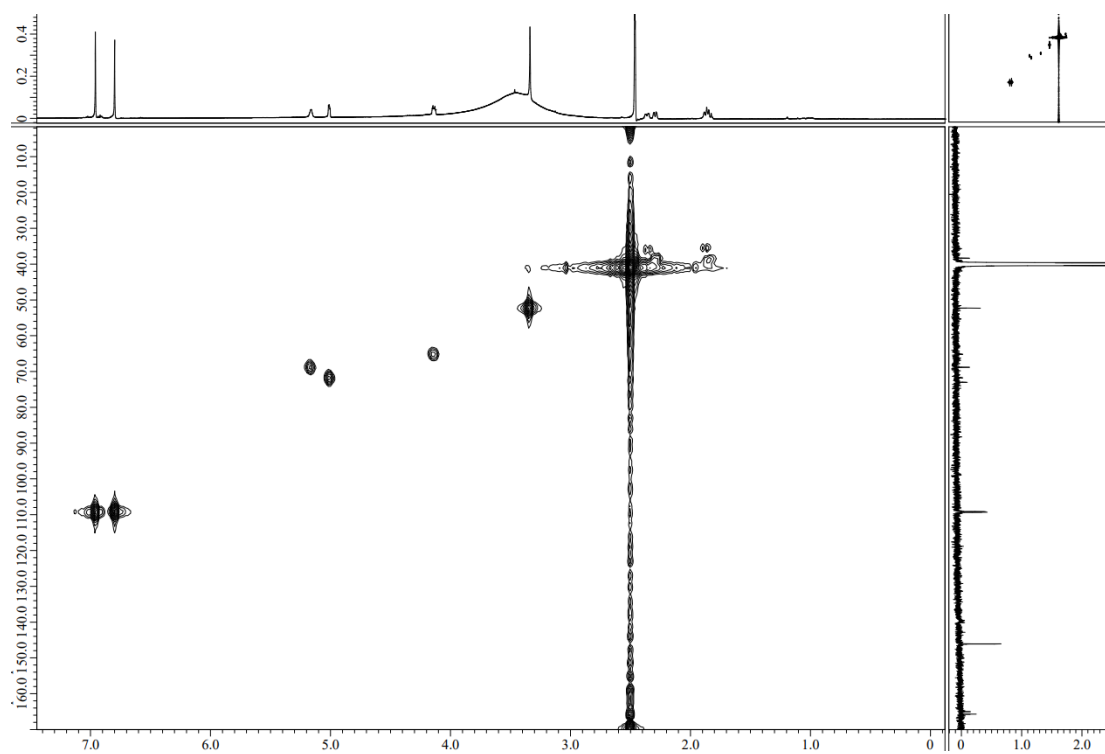
$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **33** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



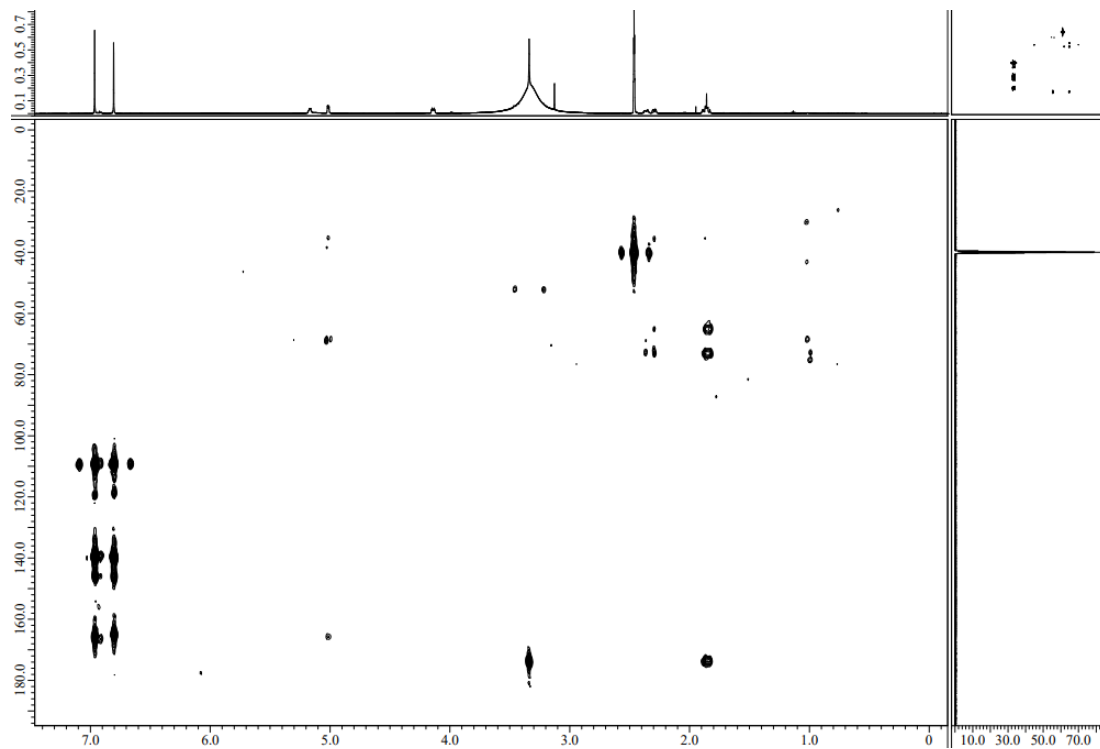
$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **33** (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



COSY spectrum of compound **33** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

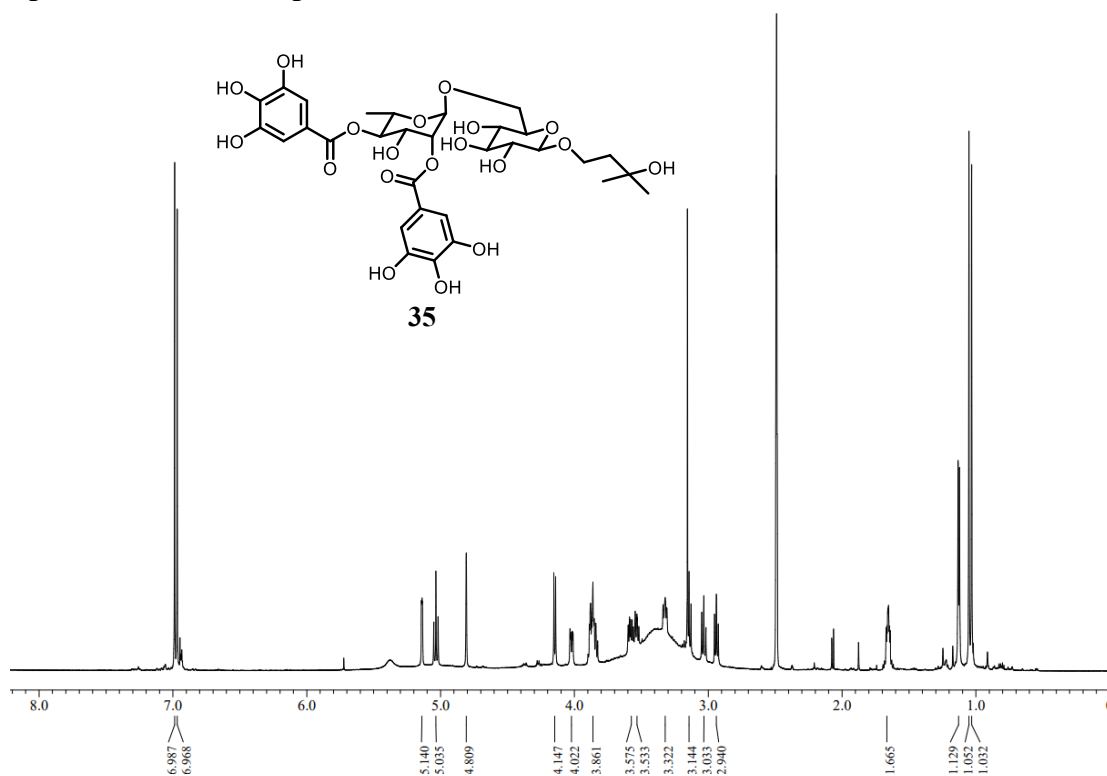


HMQC spectrum of compound **33** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

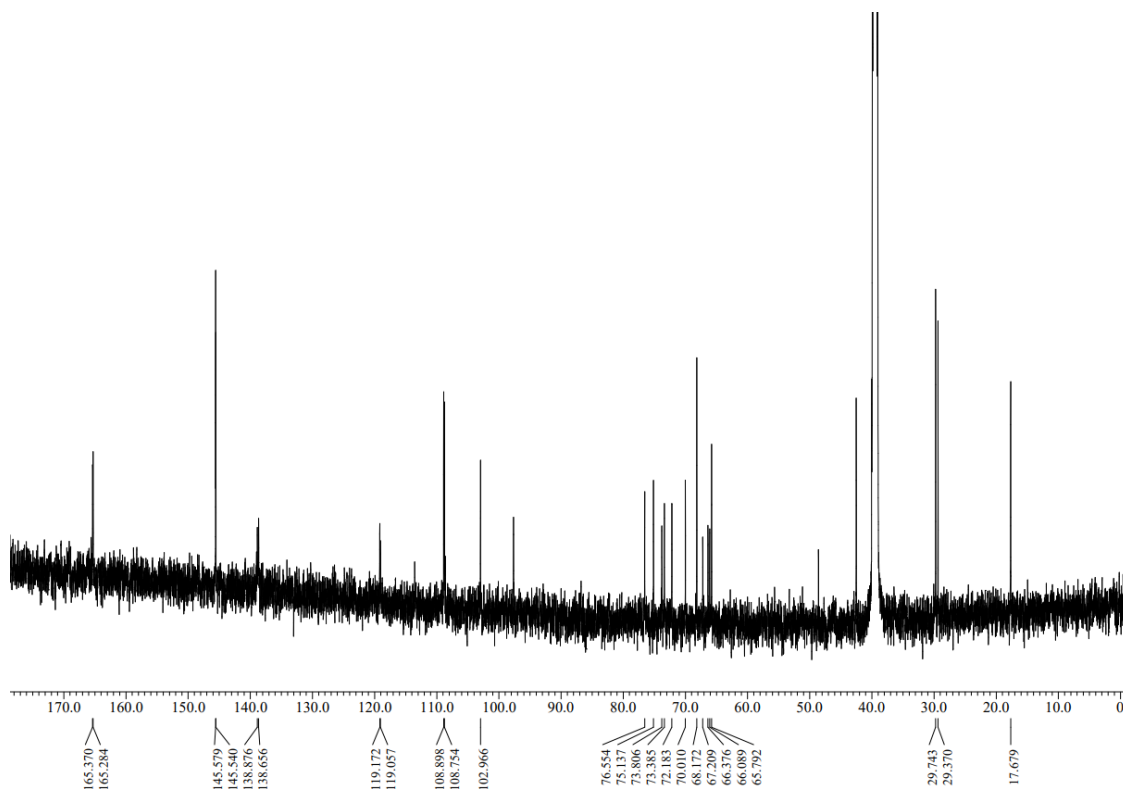


HMBC spectrum of compound **33** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

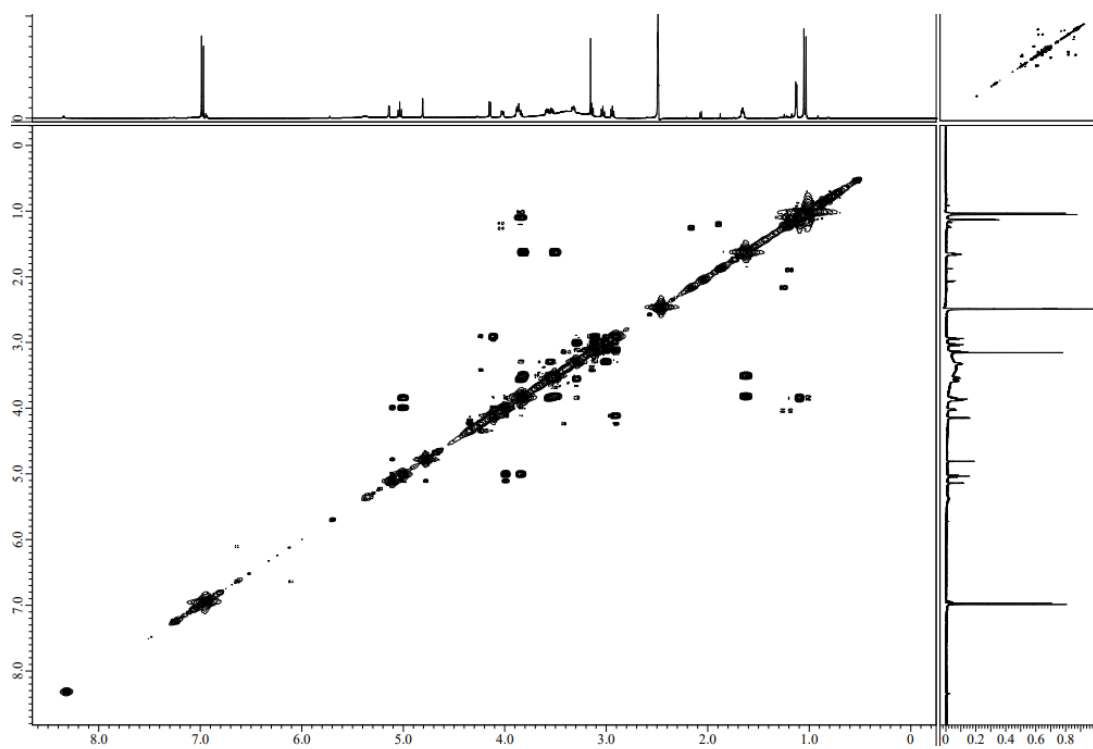
Spectral data of compound **35**



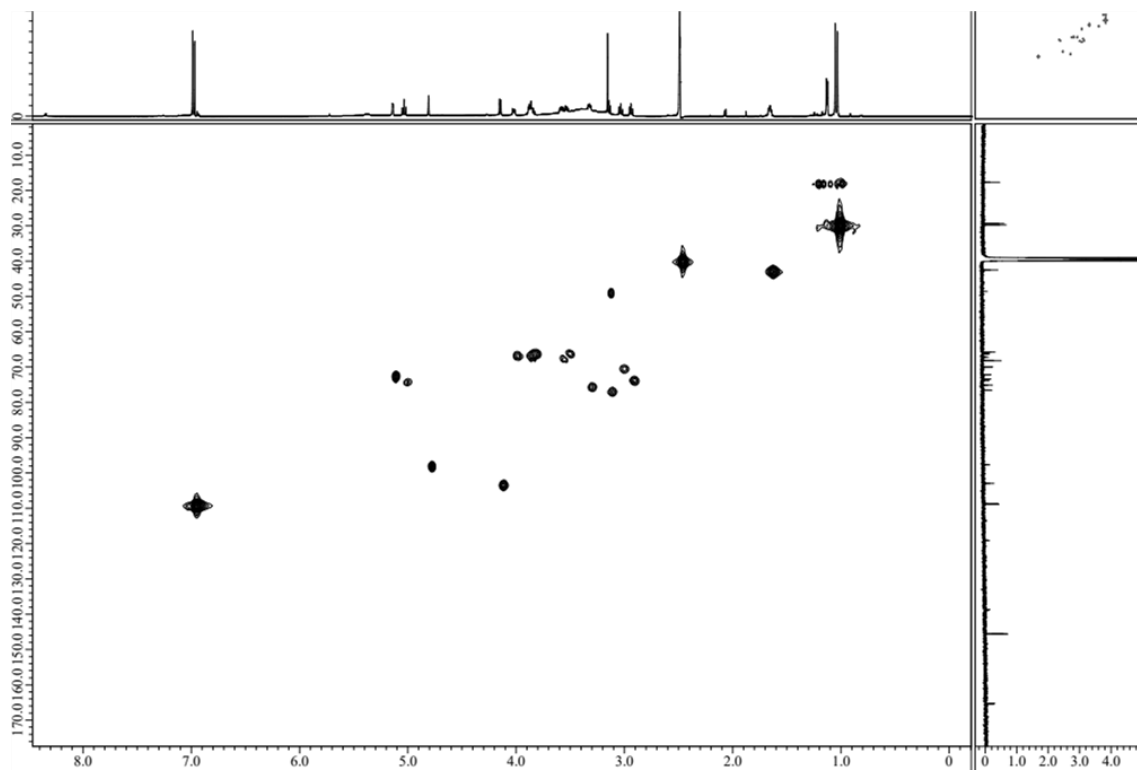
$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **35** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



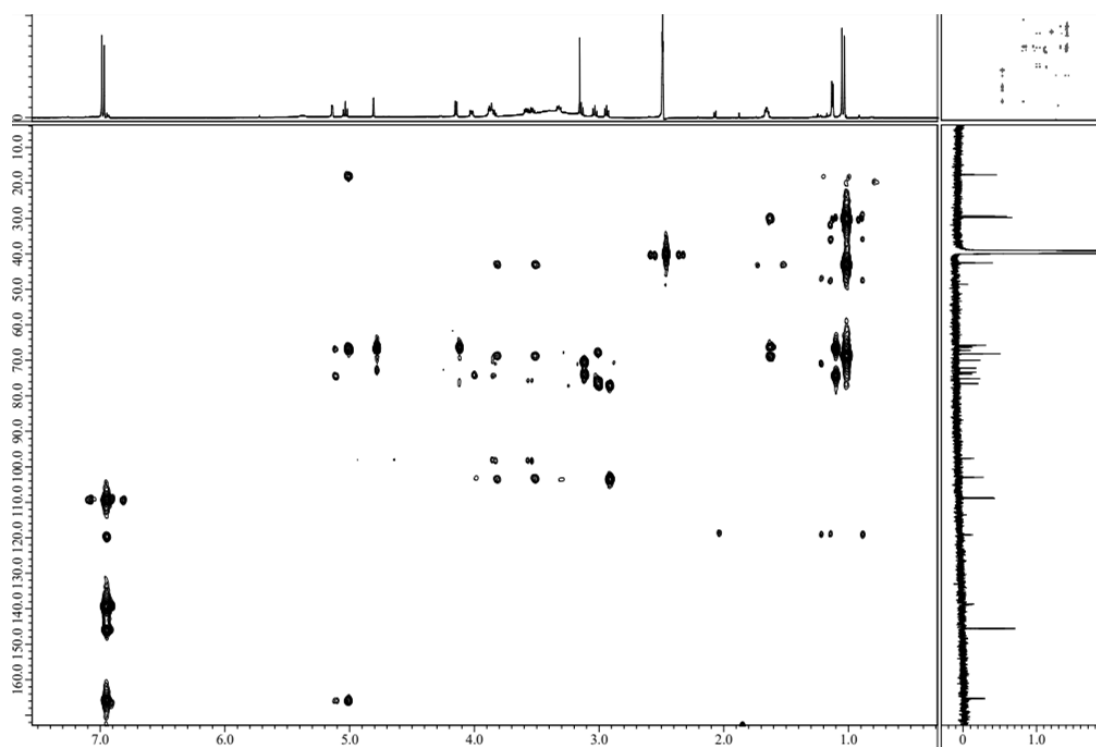
$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **35** (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



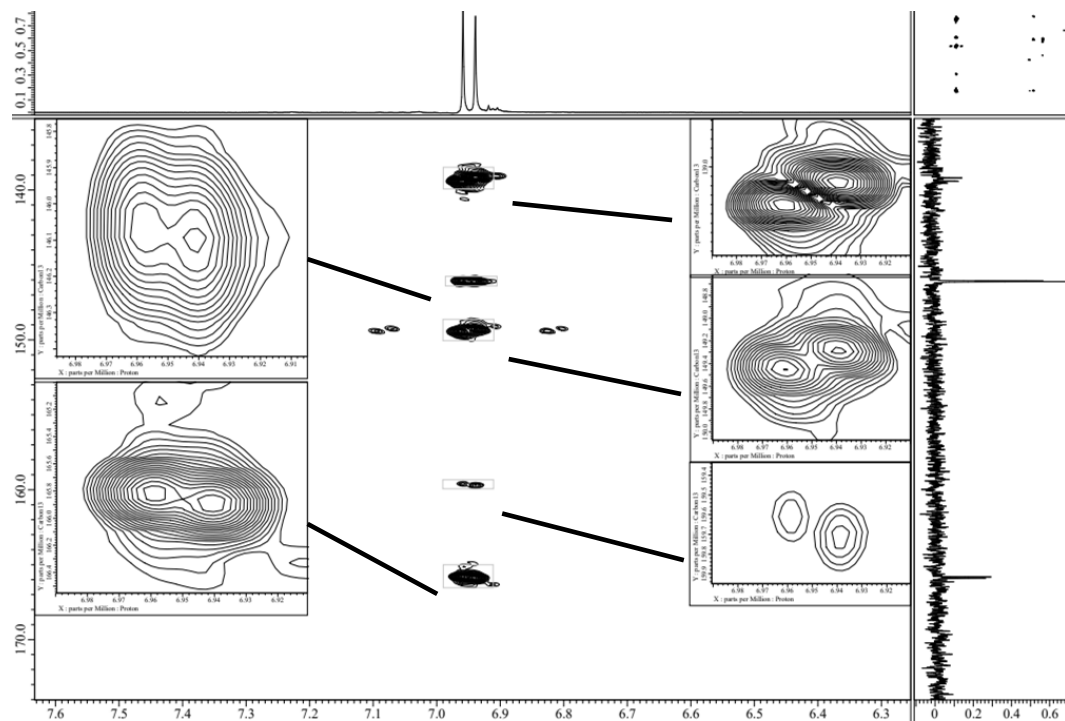
COSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).



HMQC spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

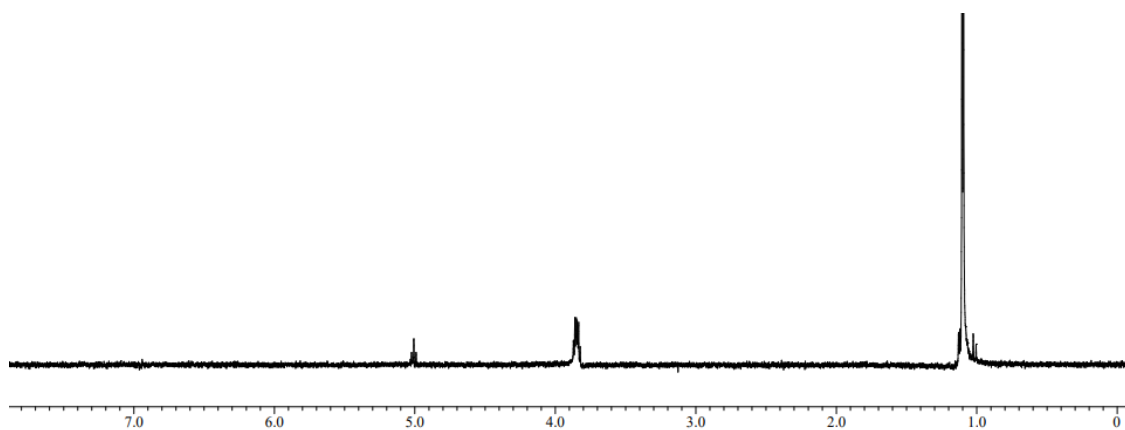


HMBC spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO- d_6).



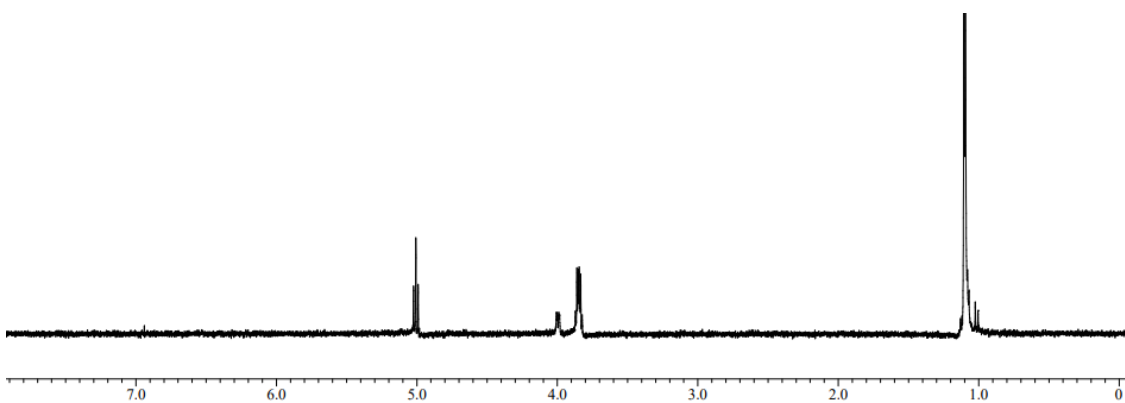
HMBC spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO- d_6).

(HMBC spectrum, measurement range; x-axis: 0 ppm-8 ppm, y-axis: 130 ppm-170 ppm)



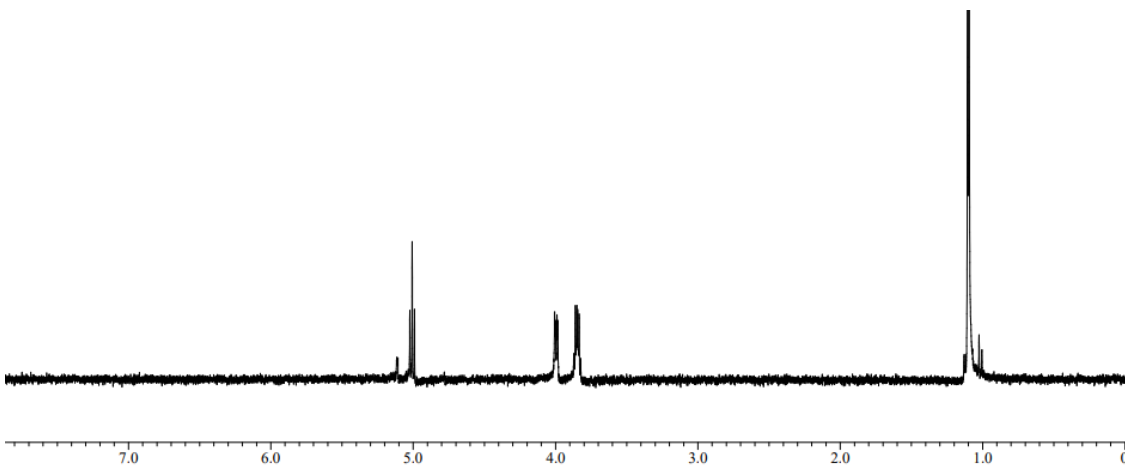
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 1.13 ppm, mixing time: 25 ms



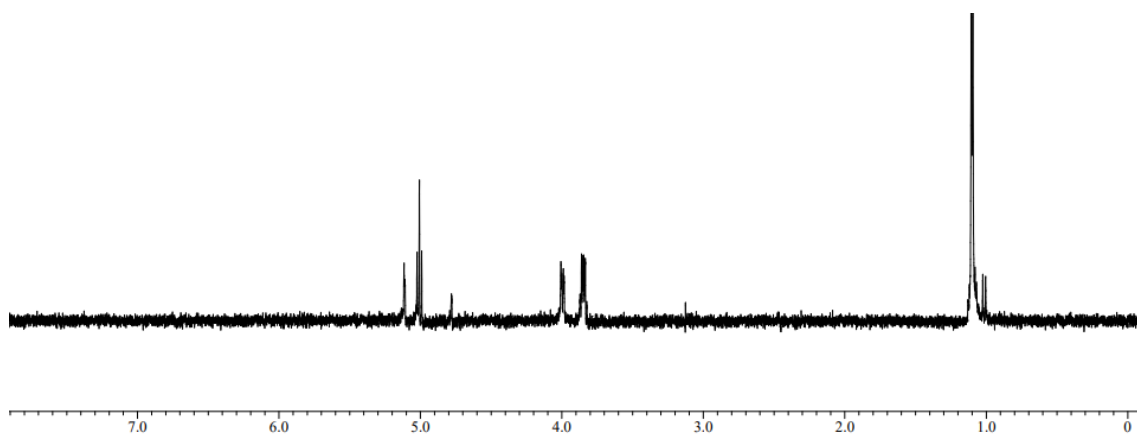
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 1.13 ppm, mixing time: 50 ms



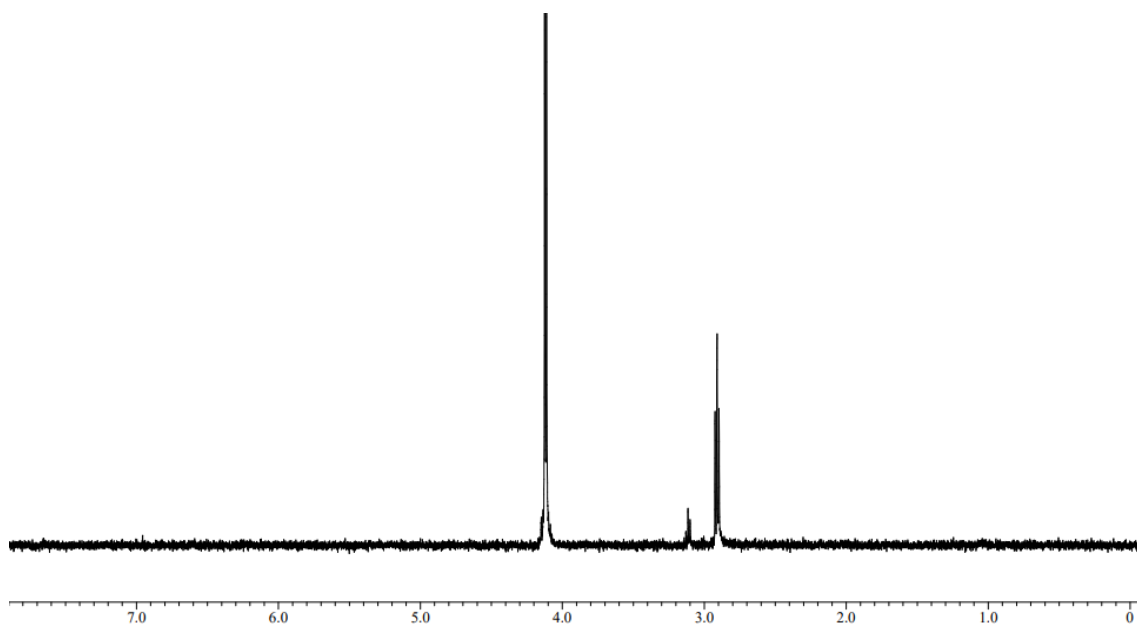
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 1.13 ppm, mixing time: 100 ms



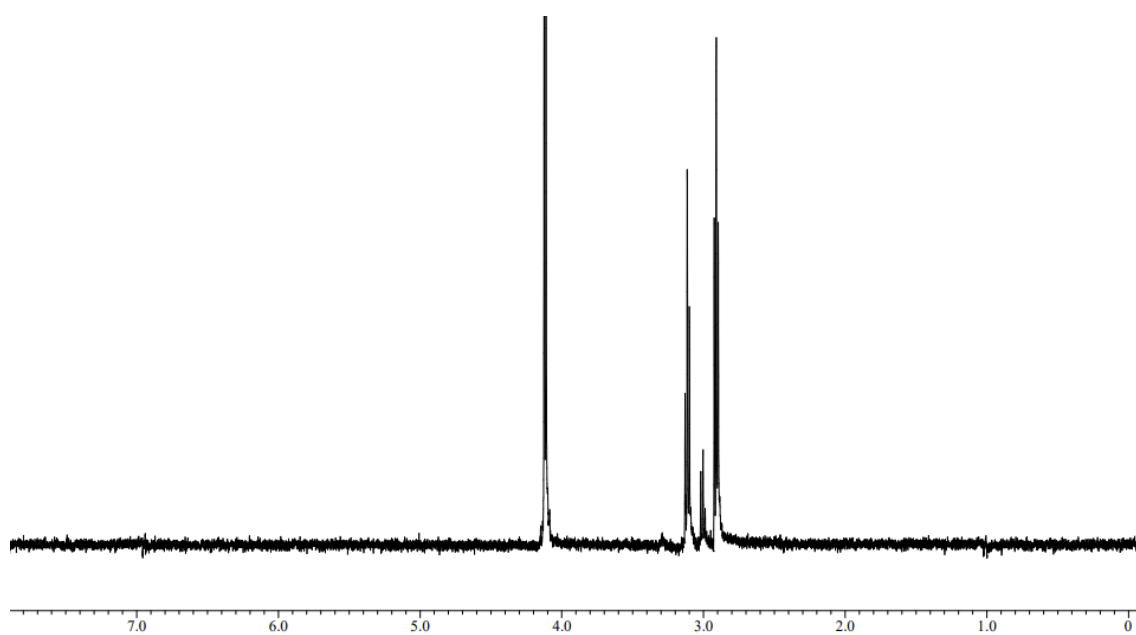
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 1.13 ppm, mixing time: 200 ms



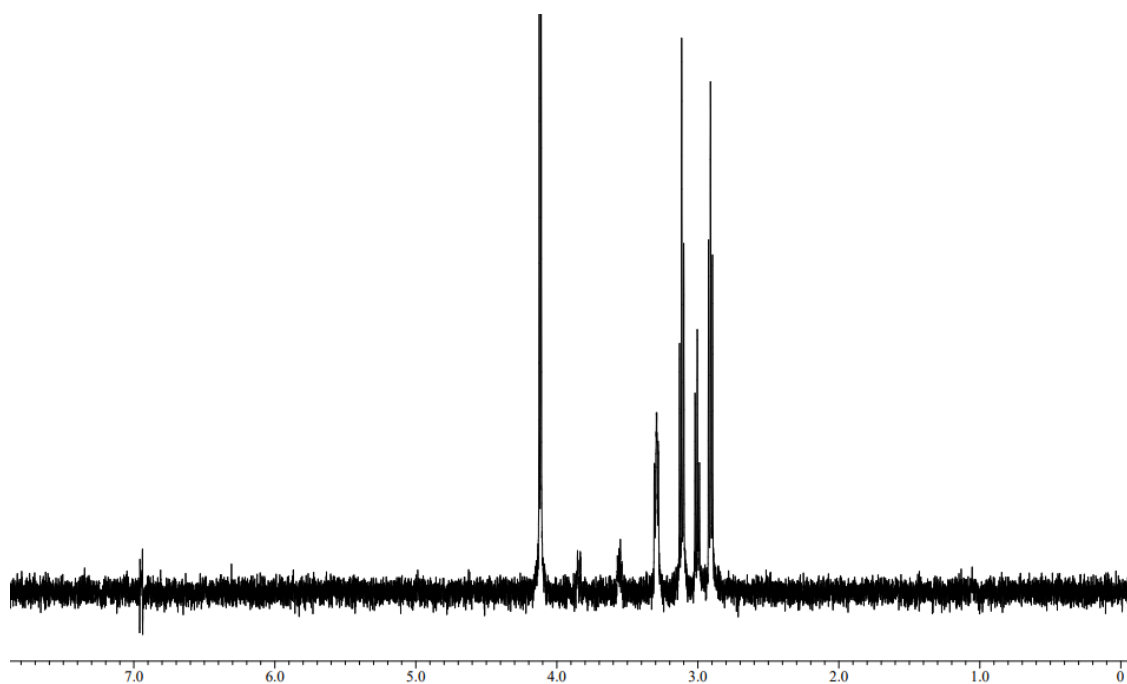
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 4.15 ppm, mixing time: 25 ms



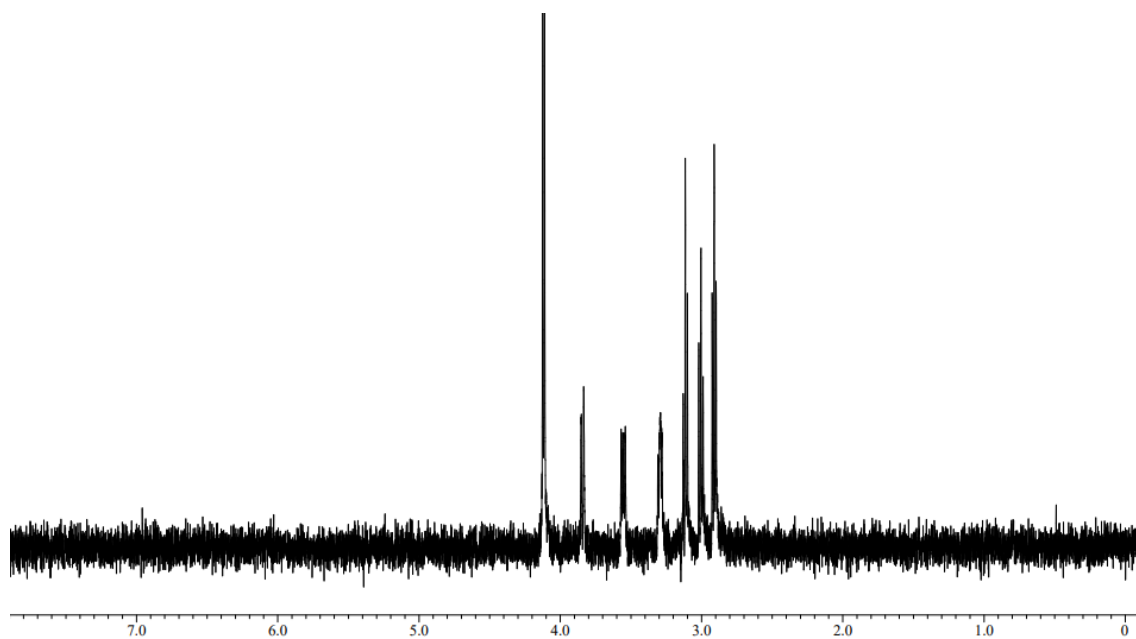
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 4.15 ppm, mixing time: 50 ms



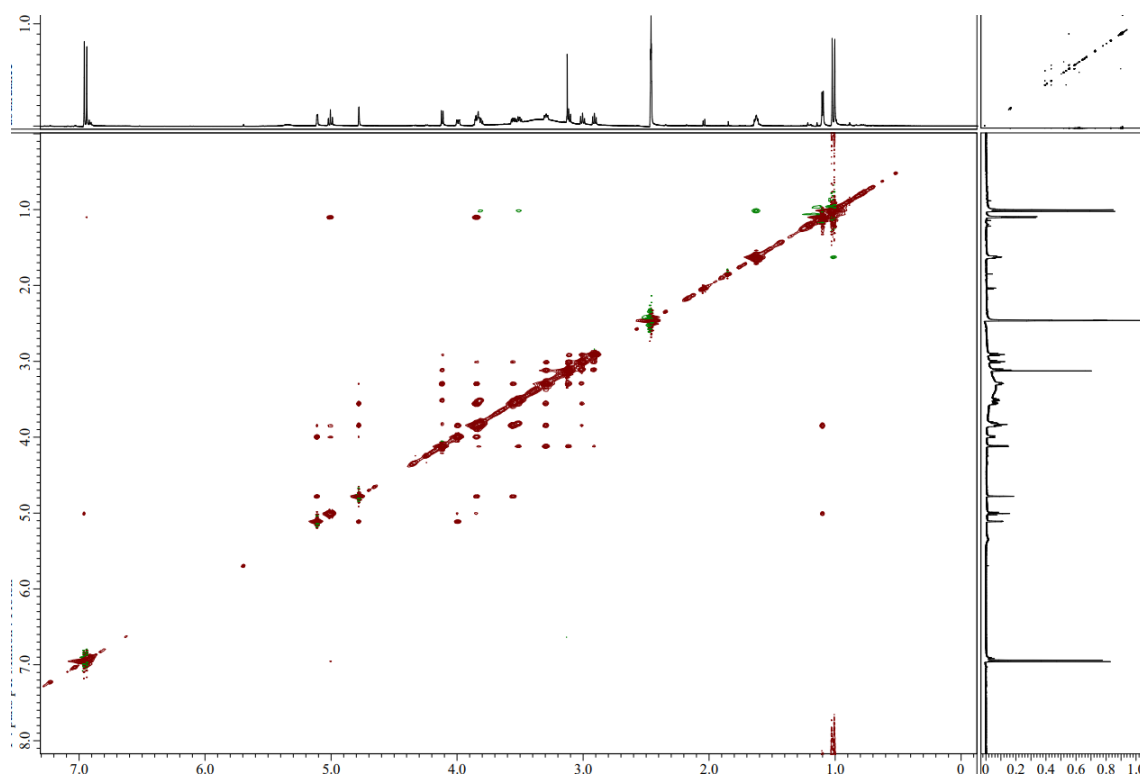
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

Selective excitation: δ_{H} 4.15 ppm, mixing time: 100 ms



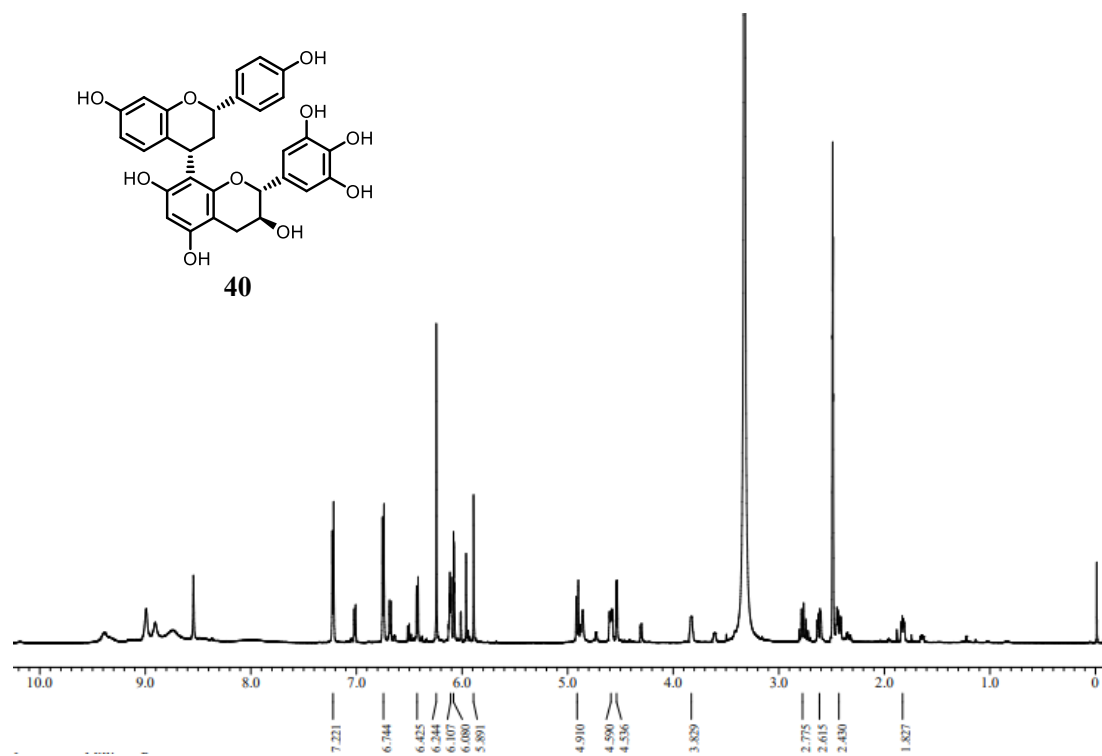
1D-TOCSY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO- d_6).

Selective excitation: δ_{H} 4.15 ppm, mixing time: 200 ms

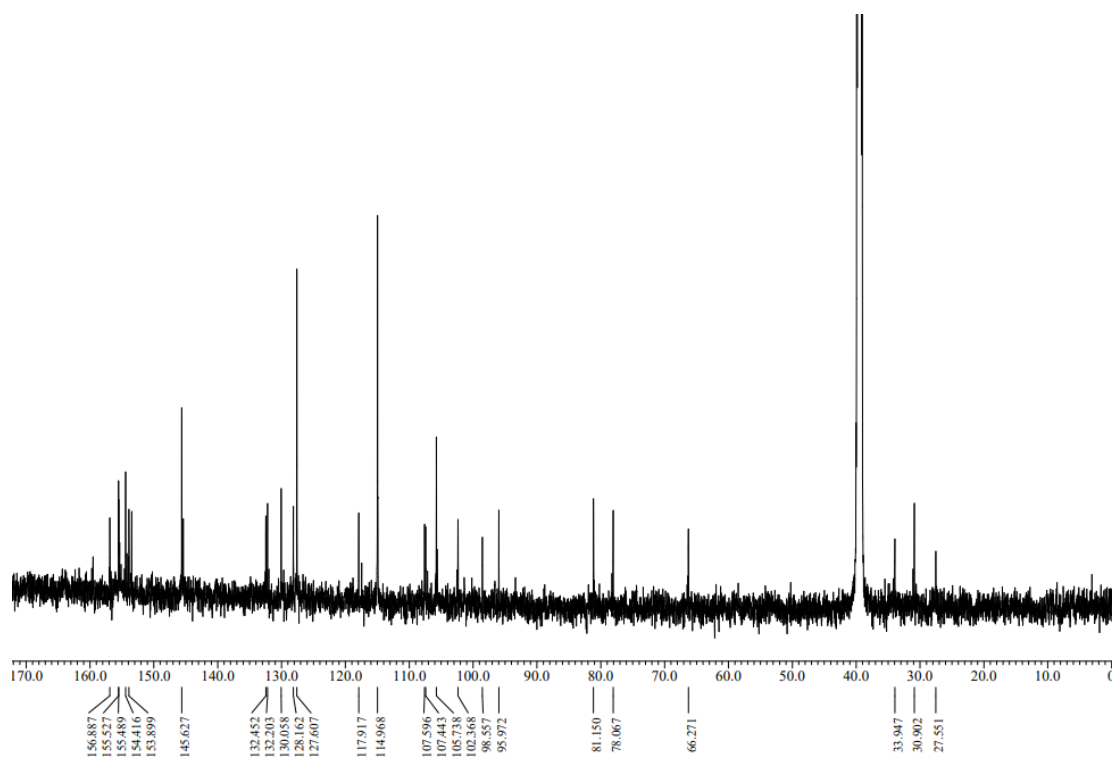


NOESY spectrum of compound **35** (600 MHz, DMSO- d_6)

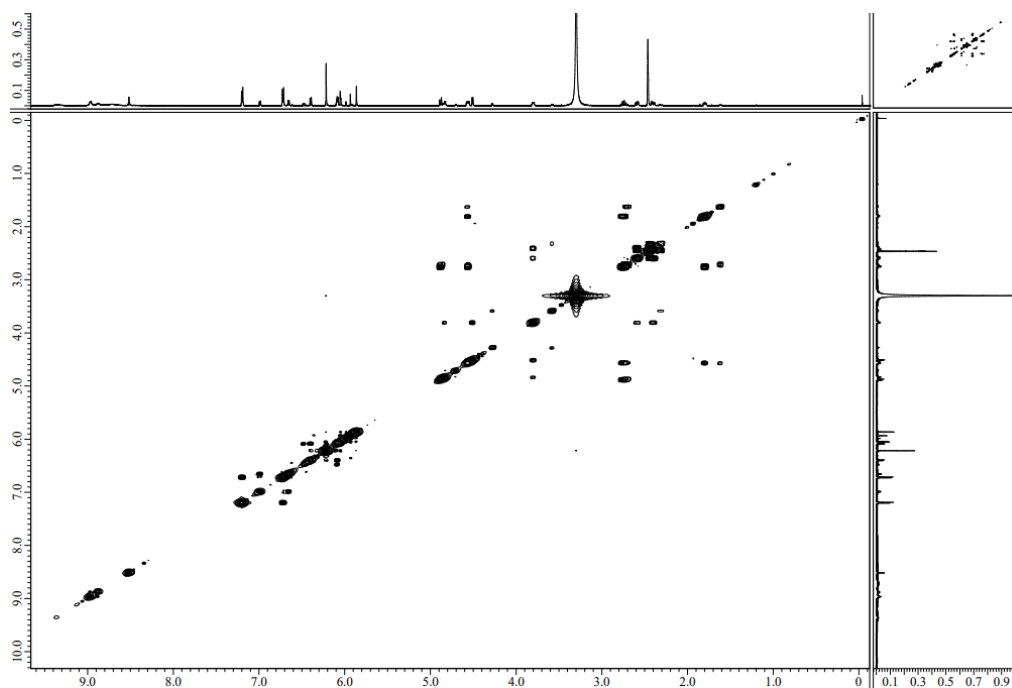
Spectral data of compound **40**



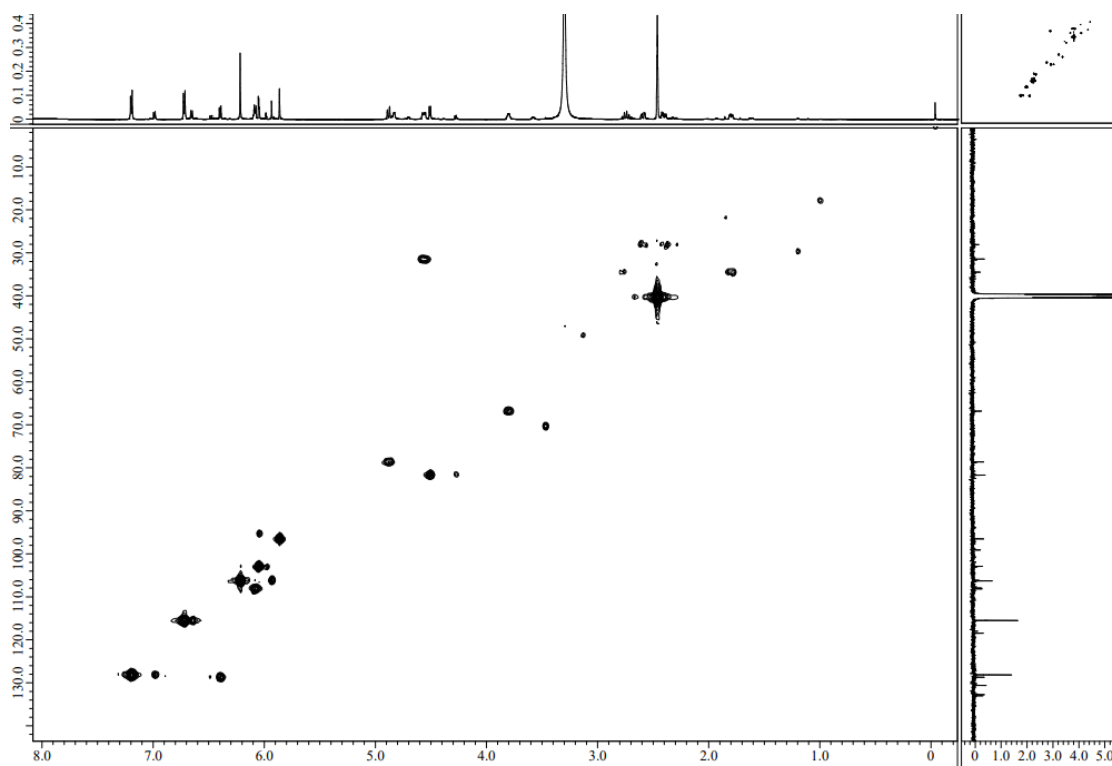
¹H-NMR spectrum of compound **40** (600 MHz, DMSO-*d*₆).



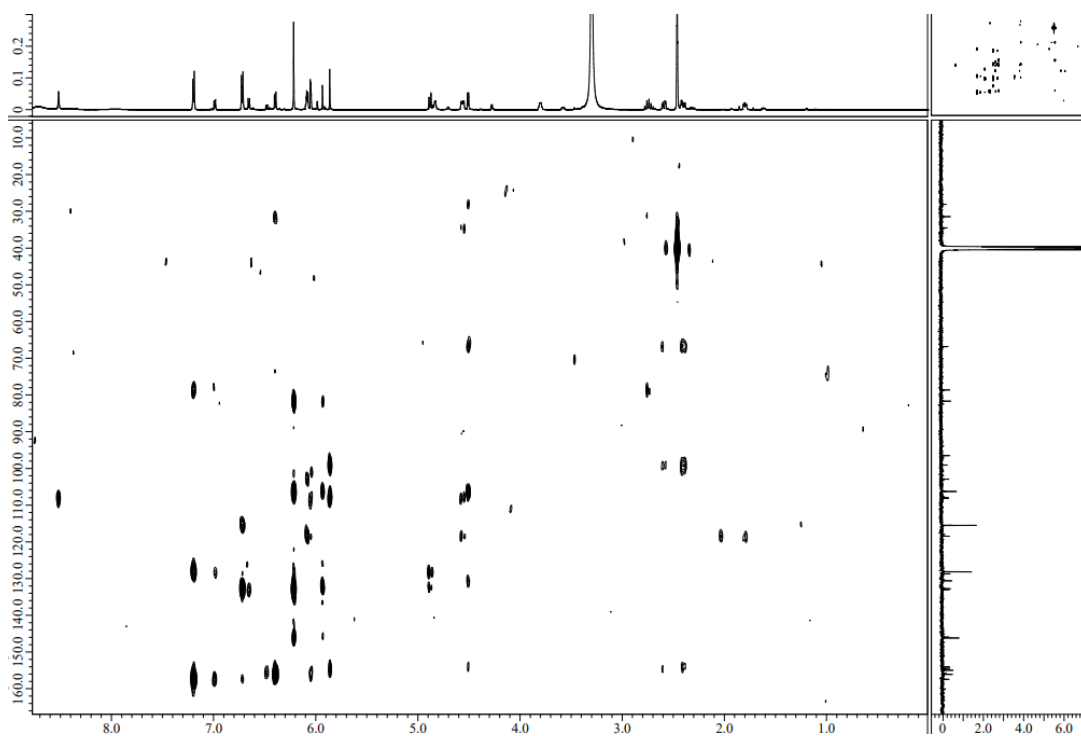
¹³C-NMR spectrum of compound **40** (150 MHz, DMSO-*d*₆).



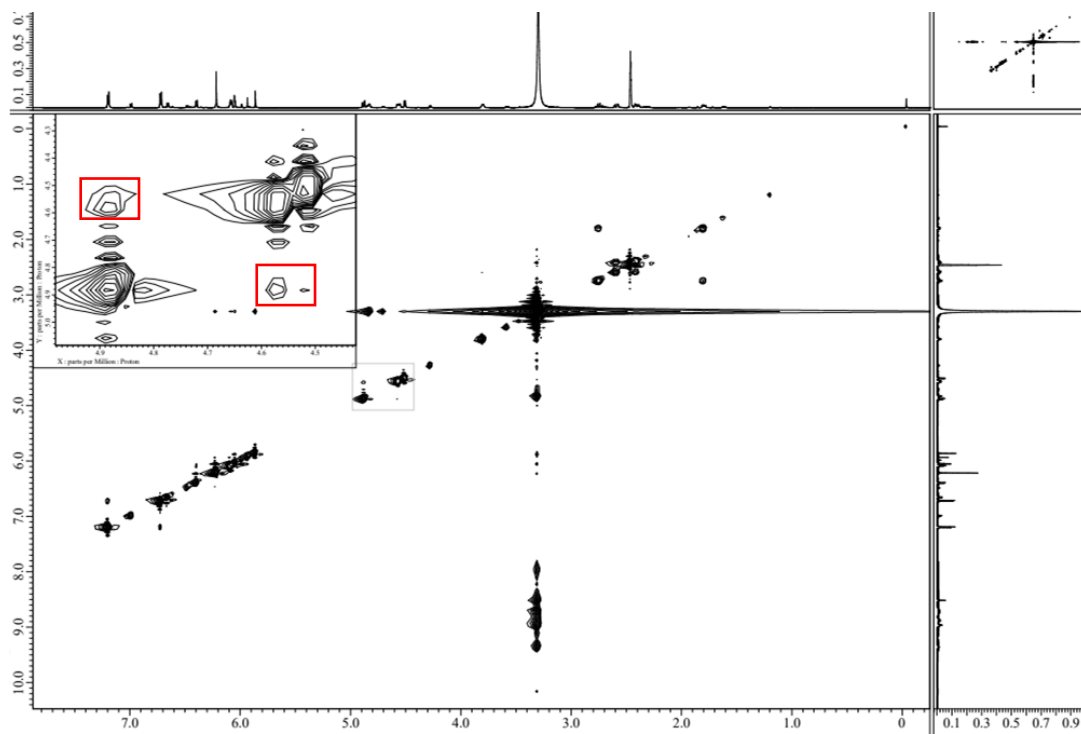
COSY spectrum of compound **40** (600 MHz, DMSO-*d*₆).



HMQC spectrum of compound **40** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

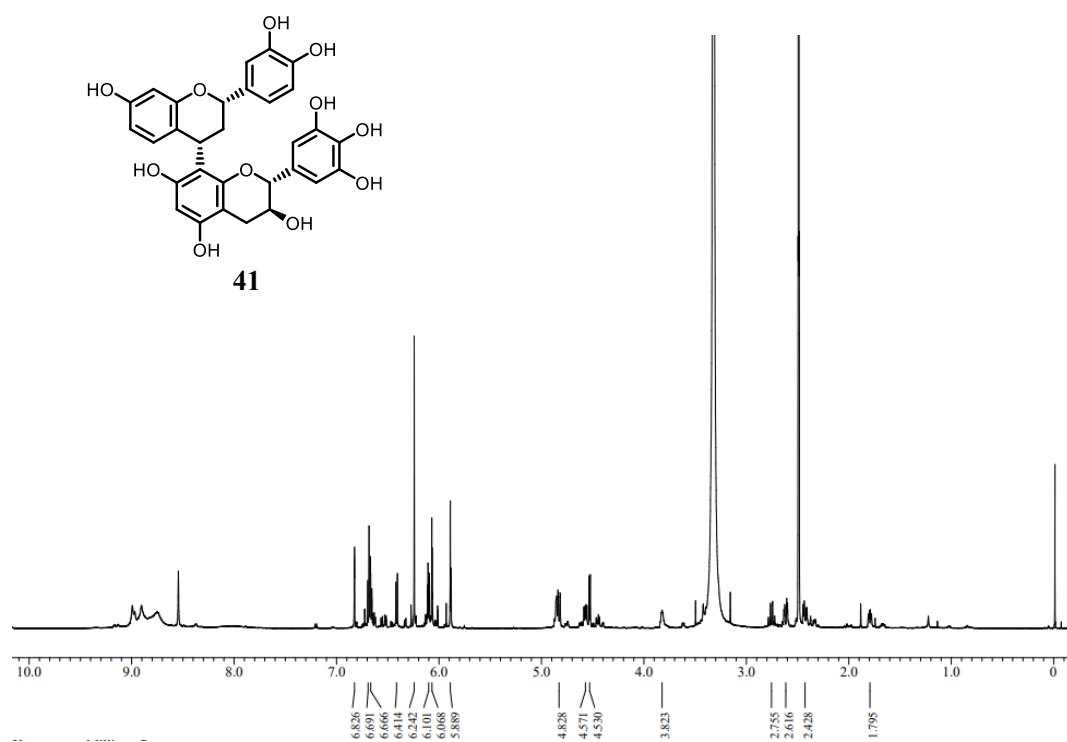


HMBC spectrum of compound **40** (600 MHz, DMSO- d_6).

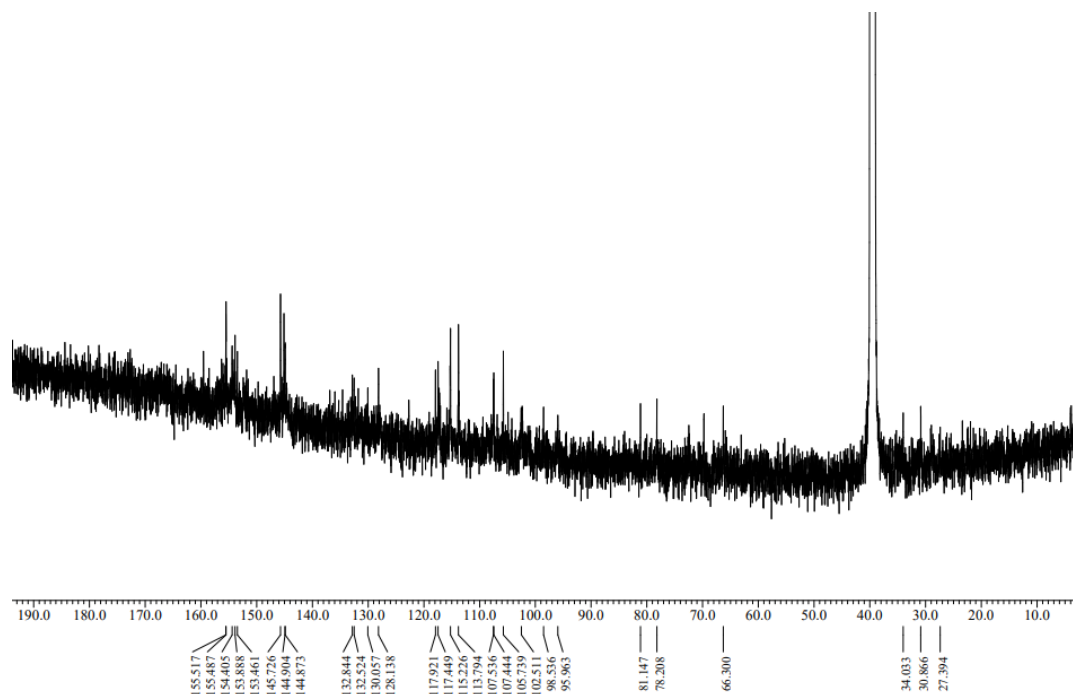


NOESY spectrum of compound **40** (600 MHz, DMSO- d_6).

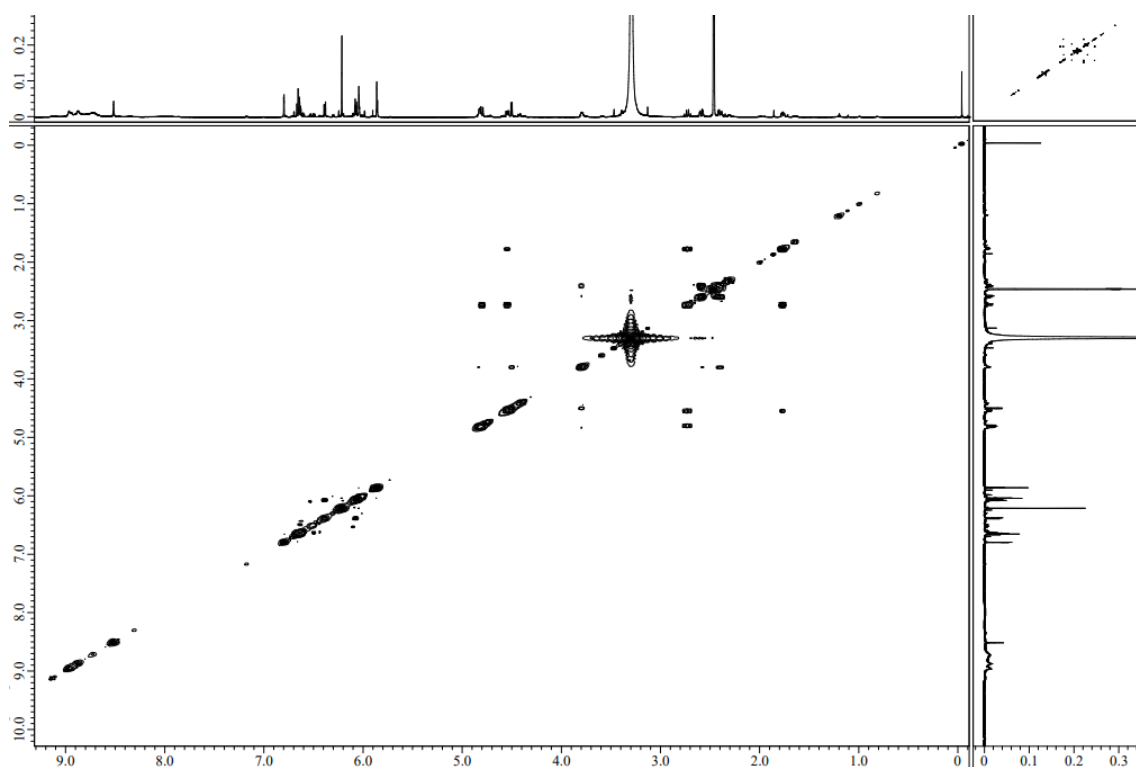
Spectral data of compound 41



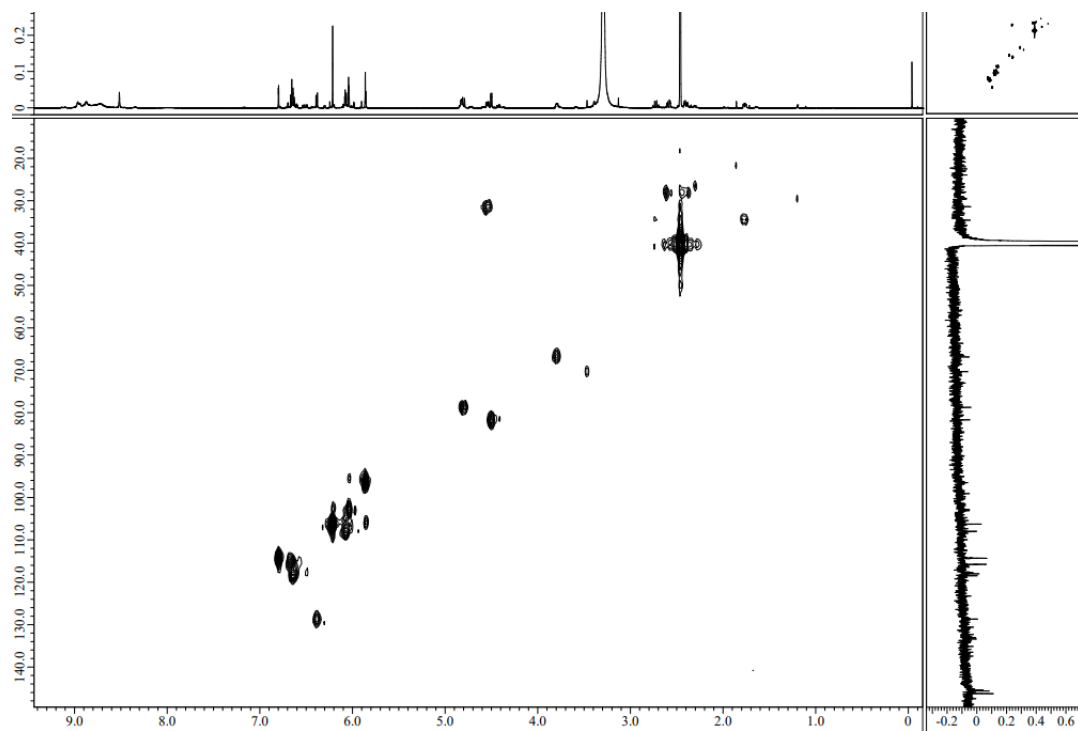
¹H-NMR spectrum of compound 41 (600 MHz, DMSO-*d*₆).



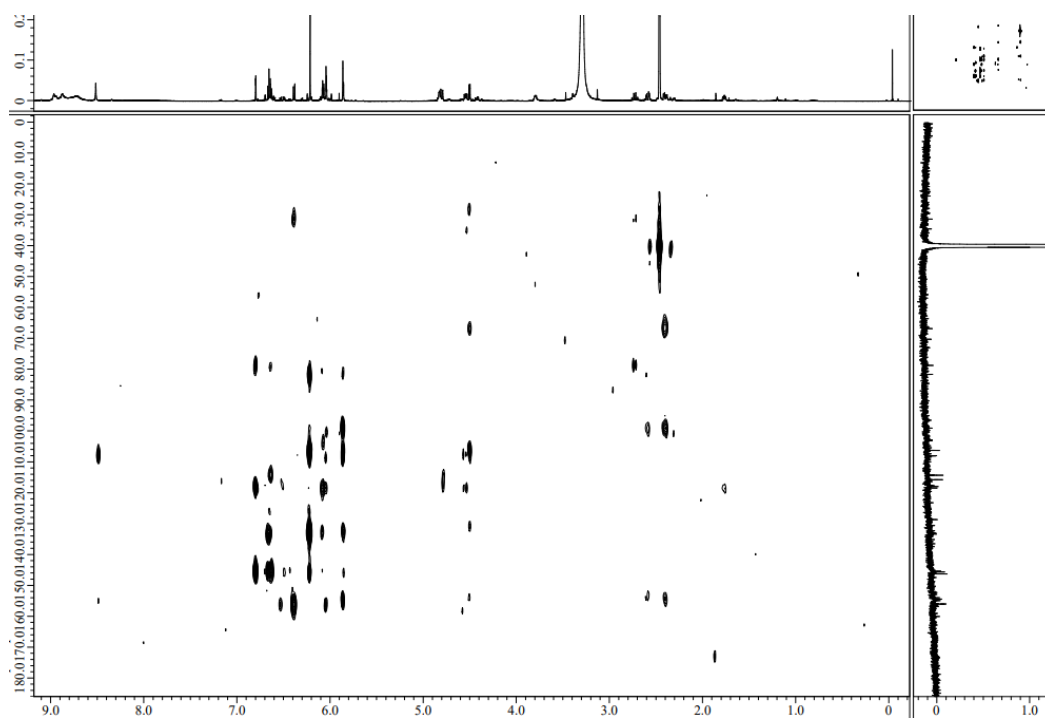
¹³C-NMR spectrum of compound 41 (150 MHz, DMSO-*d*₆).



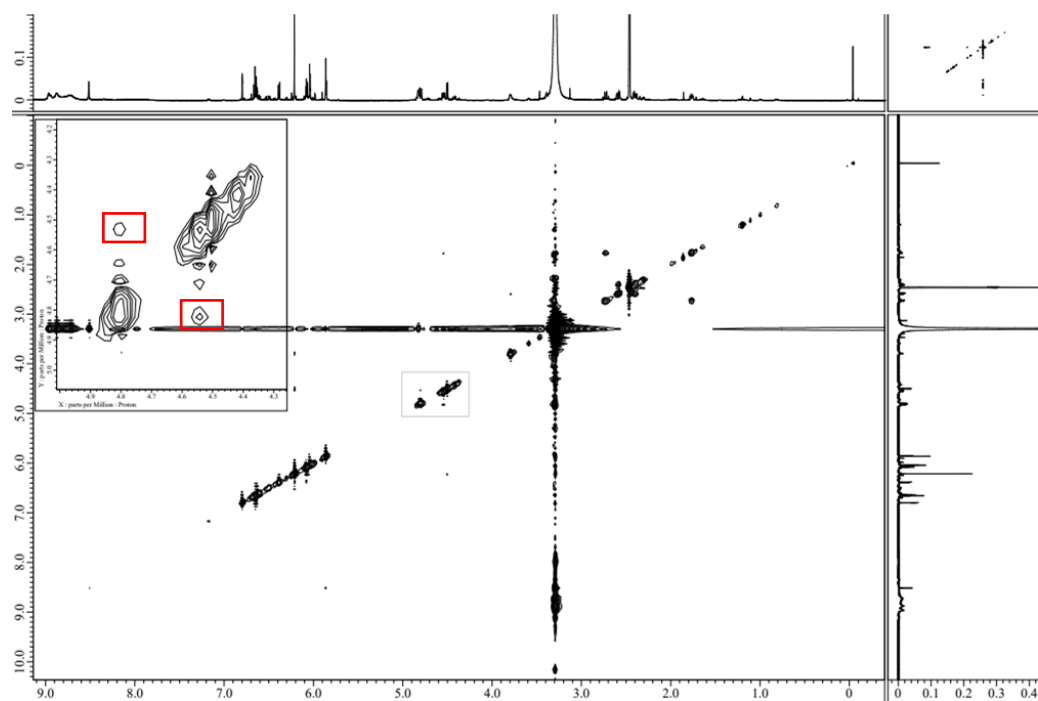
COSY spectrum of compound **41** (600 MHz, DMSO-*d*₆).



HMQC spectrum of compound **41** (600 MHz, DMSO-*d*₆).

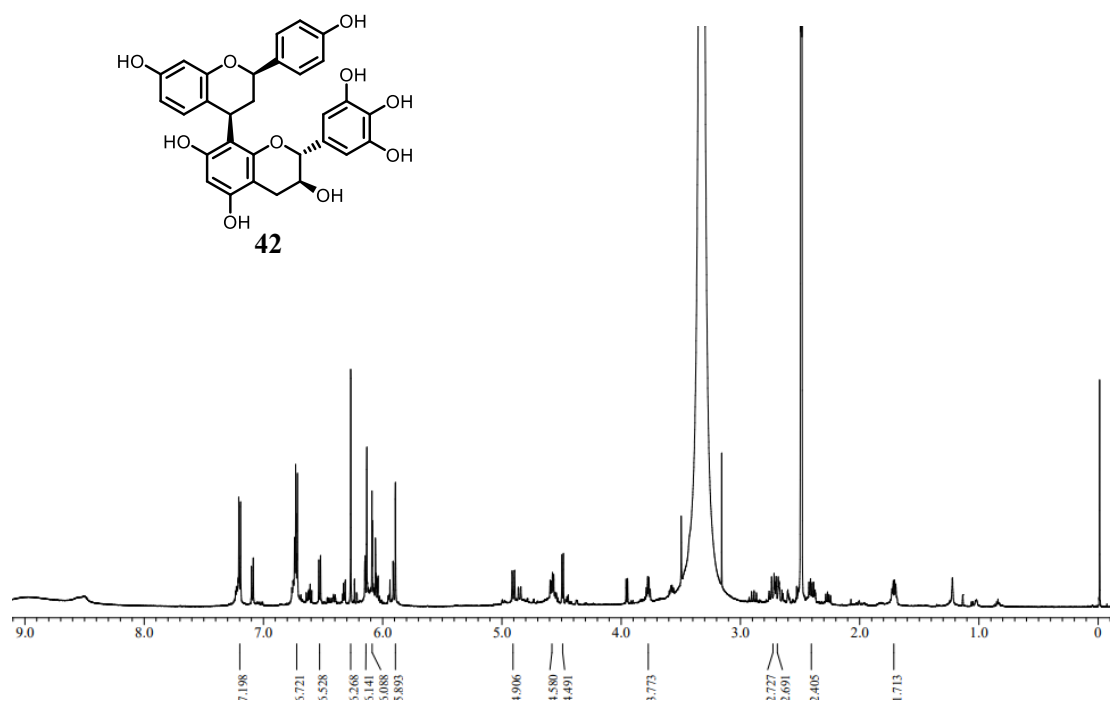


HMBC spectrum of compound **41** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

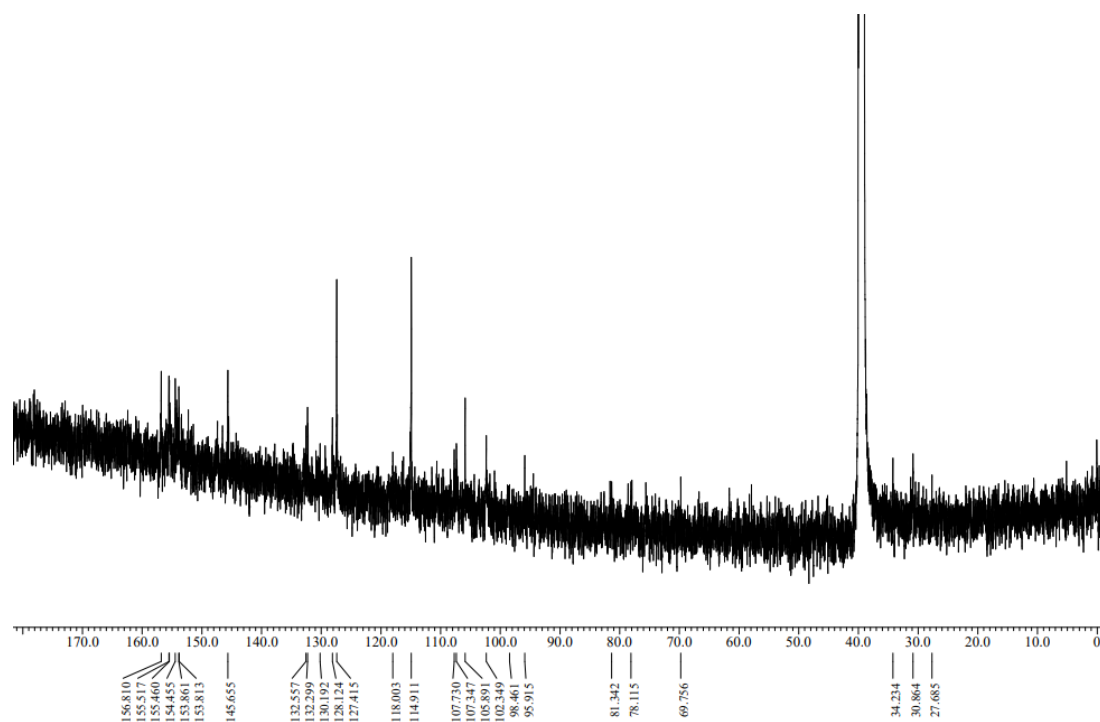


NOESY spectrum of compound **41** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).

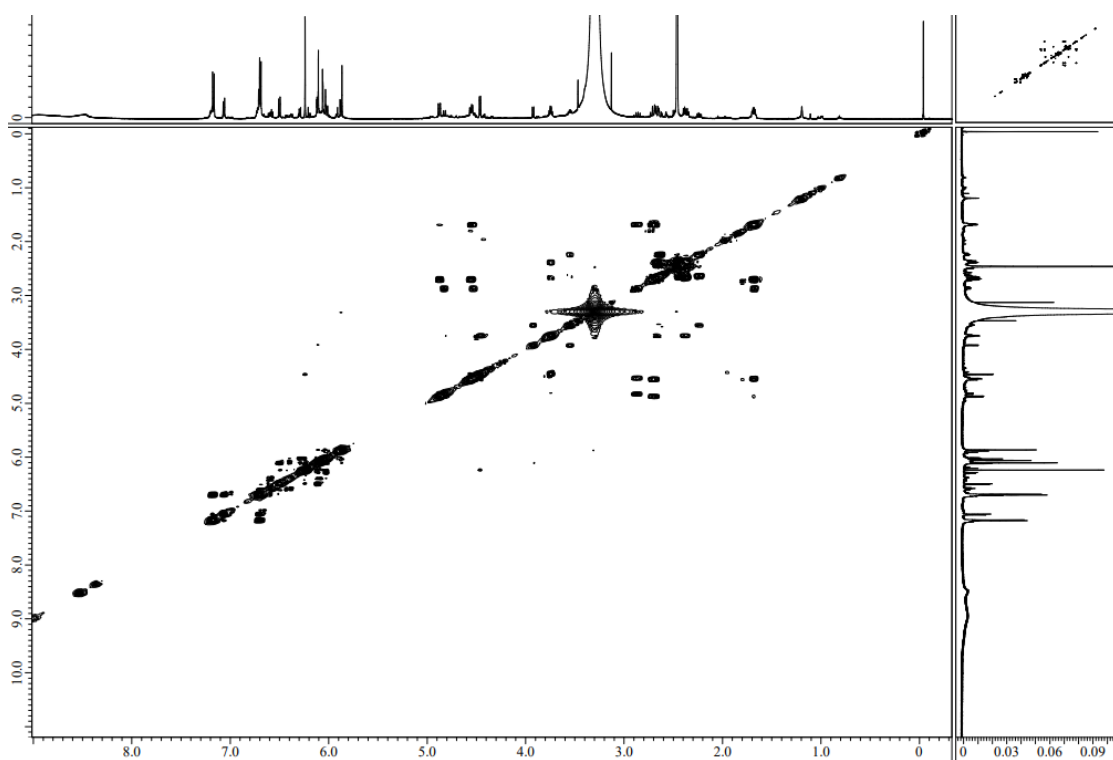
Spectral data of compound **42**



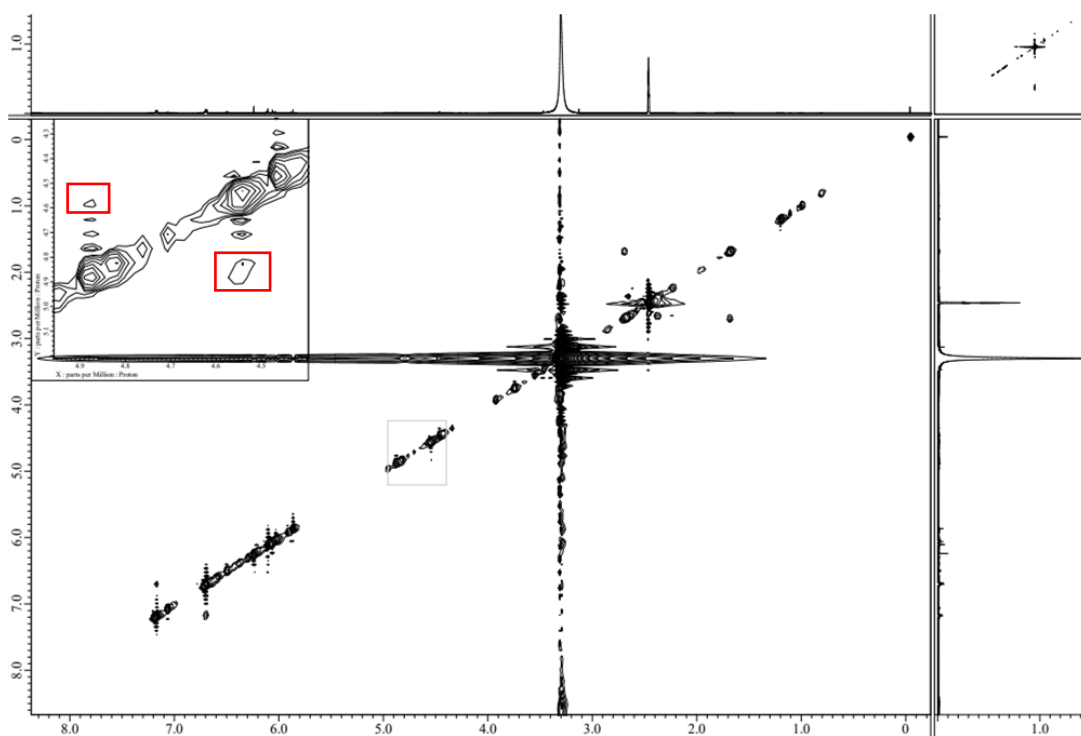
$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound **42** (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound **42** (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$).



COSY spectrum of compound **42** (600 MHz, DMSO- d_6).



NOESY spectrum of compound **42** (600 MHz, DMSO- d_6).

[参考文献]

1. Lindhagen E., Nygren P., Larsson R., *Nat. Protoc.*, **2008**, 3, 1364-1369.

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始懇切丁寧な御指導、御鞭撻を賜りました、千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 石橋正己 教授に厚く感謝すると共に、心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々な場面で有益な御助言を賜りました、千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 荒井緑 准教授 (現 慶應義塾大学 理工学部 生命情報学科 ケミカルバイオロジー研究室 荒井緑教授) に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、様々な場面で有益な御助言、御指導を賜りました、千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 高屋明子 准教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、直接的な御指導、多くの御助言を賜り、多くの有意義な御討論を賜りました千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 原康雅 助教に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験手技や考え方など、多くの貴重な御指導、御助言を頂きました千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 佐藤知幸氏、岩田樹氏をはじめ、研究室の皆様には深く感謝申し上げます。

最後に、研究生生活を温かく見守って下さいました家族と、共に過ごした友人たちに深く感謝申し上げます。

主論文目録

本学位論文は、下記の発表は内容による。

Fujii K., Hara Y., Arai M. A., Sadhu S. K., Ahmed F., Ishibashi M., Natural Compounds with BMI1 Promoter Inhibitory Activity from *Mammea siamensis* and *Andrographis paniculata* *Chem. Pharm. Bull.*, **2022**, 70, 885-891.

学位論文審査

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

主査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 根本 哲宏

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 石川 勇人

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 山崎 真巳

審査を行っていただき、御助言賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。