

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590030

研究課題名（和文） 幻覚性植物が含有する化学成分の構造多様性解明に向けた化学的研究

研究課題名（英文） Chemical study towards the structural diversity elucidation of the chemical constituents contained in hallucinogenic plants.

研究代表者

代田 修 (SHIROTA OSAMU)

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：90300920

研究成果の概要（和文）：幻覚性植物カト（Khat: *Catha edulis*）に含有されるカチノン類、及びそのカチノンを推定生合成中間体とするエフェドリン類について、それぞれ類縁体の網羅的合成を進めた。また、エフェドリン類が含まれない *Ephedra americana* の成分検索を行った。さらに、生合成研究に用いる光親和性ラベル化試薬と、ラベル化された生合成酵素を釣り上げる光解離性レセプターフィッシングロッドについても合成を進めた。

研究成果の概要（英文）：Comprehensive syntheses of the analogs were proceeded, respectively about cathinone contained in a hallucinogenic plant Khat (*Catha edulis*), and its presumed biosynthetic intermediate ephedrine. Moreover, chemical constituents search of *Ephedra americana* in which ephedrine is not contained was performed. Furthermore, syntheses of the reagents for biosynthetic study were advanced about the photo-affinity labeling reagent and the photo-dissociation receptor fishing rod reagent that has fished the labeled biosynthetic enzyme, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：幻覚性植物、カチノン、エフェドリン、サルビノリンA

1. 研究開始当初の背景

近年、麻薬や覚せい剤等の代用目的で様々な植物がお香（スモークインセンス）や植物標本、観賞用植物などの名目で売られている。これらはいわゆる「植物系違法ドラッグ」あり、含有される成分が麻薬や覚せい剤、医薬品などの化合物とその構造

が類似するものも多い。このような背景の中、2003年にこれらの一つであったマジックマッシュルームが麻薬原料植物として規制された。また、南部メキシコ高地の原住民により祈禱の儀式などで用いられていた幻覚性サルビア (*Salvia divinorum*) から、この植物の活性本態としてジテルペンであ

るサルビノリンAが同定された。諸外国では幻覚性サルビアおよびサルビノリンA、若しくはどちらかを麻薬として規制しているが、日本では2007年からサルビノリンAを含有するサルビア (*Salvia divinorum* の一種のみ) を薬事法の指定薬物に指定した。さらに、エチオピア、イエメン、アフリカ東部等において自生、若しくは栽培される *Catha edulis* (ニシキギ科) の新鮮葉であるカート (khat) においては、その地域の人々は伝統的にこの葉を噛んで使用し、空腹と疲労が和らぐと同時に幸福感も得られるとされるが、長期使用により高血圧、不眠症、躁病を引き起こすと共に、精神的依存性をもたらす。このカートの幻覚性成分は、1970年代末に主活性物質としてカチノンが同定されるまでは、*d*-ノルプソイドエフェドリンが活性形態であると信じられていた。興味深いことに、漢方薬に配合される重要な生薬であるマオウ (*Ephedra sinica*) の主要薬効成分であるエフェドリンの生合成経路は、このカチノンを経由していることが明らかにされている。しかし、マオウとは属する科が全く異なるカートにおけるカチノンの生合成経路については、推定されているのみである。

一方、生物の様々な表現形質はすべてDNAによってコードされており、二次代謝産物である天然有機化合物の構造多様性もまたその遺伝情報に基づくタンパク質の発現、すなわち種に特異的な酵素により生み出されるのであり、前駆体となる物質が多種多様な物質へと変換されている。天然有機化合物をリガンドとし、タンパク質(酵素)をレセプターとするリガンド・レセプター相互作用の解明は、天然物化学研究の新たな方向性の一つと考えられている。そのまず第一歩のステップとして、いかに効率良く対象とするレセプターを捕まえるかという命題に対し、フォトアフィニティーラベル化法(光親和性ラベル化法)を用いた研究は数十年前から行われている。しかし、その手法自体も古く、現在までに画期的な改良はあまり見られない。そのような中、コロンビア大学の中西教授らは、ジアゾアセテートをラベル化試薬とし、アミノ基の置換反応によりビオチン誘導体等をターゲットとなるレセプターに導入する興味深いストラテジーを発表している。しかし、ジアゾアセテート及びアミノ基の反応効率性の低さや、精製に数ステップが必要などの理由の為か、その実効性は未だ示されていない。

2. 研究の目的

本研究では、天然物化学的な精密技術を基盤として、幻覚性サルビアが有するサル

ビノリンAに類縁するジテルペン誘導体を合成し、また、カートにおいて推定されているカチノンの生合成経路上の中間体およびその誘導体及び類縁するエフェドリン類を網羅的に合成し、それらを分子プローブとして、生合成の化学的・分子生物学的研究を進める足掛かりとする。そして、生合成関連酵素を効率良く得るために、コンパクトで反応性が高い光親和性ラベル化試薬を開発すると共に、ラベル化されたレセプターを選択的に釣り上げる手法として、スペシフィックライゲーション(選択的結紮)反応を用いた新規な「レセプターフィッシング」手法の開発を試みる。また、エフェドリンが含まれていないとされる南米ペルー原産の *Ephedra americana* について、その含有成分の構造を明らかにすることで、この植物における二次代謝産物の多様性解明と生合成に関する知見を得ることを一つの目的とした。

3. 研究の方法

(1) 幻覚性天然化合物類縁体の合成

① サルビノリンA類縁体の合成

幻覚性サルビアより単離したサルビノリンA及びサルビノリンBを用い、種々の誘導体を合成することとした。

② エフェドリン類の網羅的合成

L-アラニンを経由するキラルな出発物質とし、フェニルリチウムを作用させることでカチン保護体を合成し、そこから環状カルバメートを経て、メチル化、脱保護することで、全種類のエフェドラアルカロイドを合成することができると考えた。

③ カチノン類縁体の網羅的合成

ノルエフェドリンのヒドロキシ基を酸化することでカチノンを経由して合成する。また、メトカチノンなどの側鎖部分に二重結合を有するカチノン類縁体の合成は、エフェドラアルカロイドと同様に L-アラニンを経由するキラルな出発物質とし、桂皮酸から誘導したスチリルリチウムを作用させることでプソイドメルカチノン保護体を合成し、そこから種々の類縁体が合成できると考えた。

(2) レセプターフィッシング手法の開発

① 光親和性ラベル化試薬の合成

コンパクトで反応性が高い光親和性ラベル化試薬は、トリフルオロメチル基を末端に有したジアジリン環を念頭におき、また天然化合物誘導体への導入を考えて、カルボキシル基を持たせることとした。この光親和性ラベル化試薬を合成するにあたり、トリフルオロメチルピルビン酸エチルエステルを出発物質とすることとした。

② 光解離性レセプターフィッシングロッドの合成

光親和性ラベル化試薬でラベル化した標的タンパク質を釣り上げる光解離性レセプターフィッシングロッドは、スペシフィックライゲーション（選択的結紮）反応を行う釣り竿部分と、それを支える光解離性樹脂部分とから構成することとした。釣り上げる部分には反応性が高いアミノキシ基を持たせ、スペーサーとしてポリエチレンジオキシ基およびポリグリシン基に結合させることを考えた。また、光解離性樹脂部分は、オルトニトロフェニル基に樹脂を結合させることとした。

(3) *Ephedra americana* の成分検索

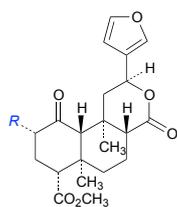
南米ペルー原産 *Ephedra americana* の地上部をメタノール抽出し、得られたメタノールエキスを DIAION HP-20 オープンカラムにて分画した。比較的量が多かった 60% メタノール画分を ODS オープンカラム、続く Toyopearl HW-40 を用いた MPLC により細分画した。最終的に ODS 分取 HPLC により化合物を精製した。得られた化合物は、1D 及び 2D NMR 等によりその構造を解析した。

4. 研究成果

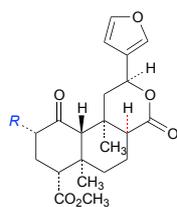
(1) 幻覚性天然化合物類縁体の合成

① サルビノリンA類縁体の合成

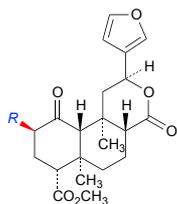
幻覚性サルビアより単離したサルビノリンAの2位アセチル基がヒドロキシ基となっているサルビノリンBを用い、この2位ヒドロキシ基に種々のカルボン酸を定法によりエステル結合させて複数の誘導体を合成した。また、光延エステル化条件により C2-*epi*-サルビノリンAを合成した。さらに、サルビノリンAを水酸化リチウムにて加水分解することにより C8-*epi*-サルビノリンBを得て、これをアセチル化することにより C8-*epi*-サルビノリンAを得た。



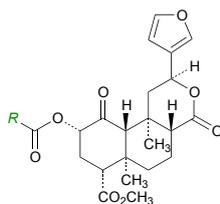
Salvinorin B : R = -OH



C8-*epi*-Salvinorin B : R = -OH



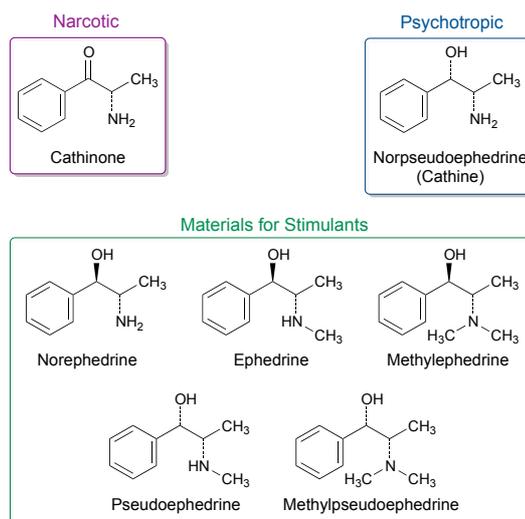
C2-*epi*-Salvinorin B : R = -OH



Butyryl-salvinorin : R = -CH₂CH₂CH₃
 Pivaloyl-salvinorin : R = -C(CH₃)₃
 Benzoyl-salvinorin : R = -C₆H₅

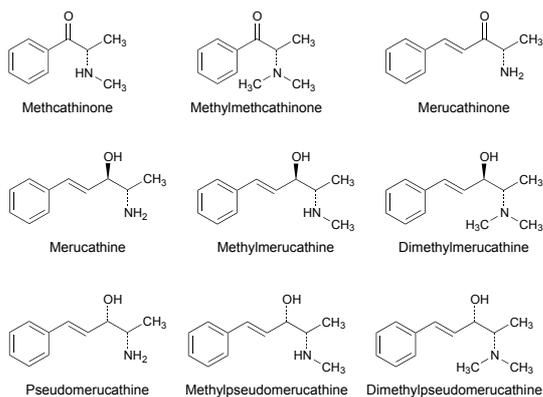
② エフェドリン類の網羅的合成

L-アラニン常法により、アミノ基の *tert*-ブトキシカルボニル (Boc) 保護化、カルボキシ基のメチルエステル化の後、水素化ジイソブチルアルミニウムにて還元を行いアルデヒド体へと導いた。これにフェニルリチウムを作用させることでカチン保護体を合成した。これに対して、メシクロリドとトリエチルアミンを作用させることで(1*R*, 2*S*)-環状カルバメート体を得た。一方、水素化ナトリウムを作用させることで(1*S*, 2*S*)-環状カルバメート体を得た。これらをそれぞれ加水分解することによりノルエフェドリンとノルプソイドエフェドリンを得た。また、(1*R*, 2*S*)-及び(1*S*, 2*S*)-環状カルバメート体をそれぞれメチル化してから加水分解することによりエフェドリン及びプソイドエフェドリンを得た。さらに、メチル化した両環状カルバメート体を水素化アルミニウムリチウムにて還元することにより、それぞれからメチルエフェドリンおよびメチルプソイドエフェドリンを得た。これらにより、エフェドリン類の網羅的合成が達成できた。



③ カチノン類縁体の網羅的合成

ノルエフェドリンをトリフルオロアセチル化により保護した後、二酸化マンガンにてヒドロキシ基を酸化し、脱保護することでカチノンを得た。また、メトカチノンなどのカチノン類縁体については、桂皮酸に *N*-プロモサクシンイミドを作用させて得られる β -プロモスチレンに *n*-ブチルリチウムを作用させ、エフェドラアルカロイドと同様に L-アラニンから導いたアルデヒド体を作用させることでプソイドメルカチノン保護体を合成した。現在、ここからエフェドリン類の網羅的合成と同様な手法により種々の類縁体の合成を進めている。



(2) レセプターフィッシング手法の開発

① 光親和性ラベル化試薬の合成

トリフルオロメチルピルビン酸エチルエステルにヒドロキシルアミンを作用させ、*p*-トシル化後、アンモニアを作用させることでジアジリジン誘導体を得た。これを酸化することで目的とするジアジリンが得られるはずであるが、揮発性・分解性が高く、現在、このステージにおける反応条件及び後処理の検討を行っている。

② 光解離性レセプターフィッシングロッドの合成

o-ニトロベンズアルデヒドに酢酸アンモニウムとマロン酸を作用させ、*o*-ニトロフェニルアミノプロパン酸を得て、さらに 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 保護した。これにアミノ基を有する樹脂を結合させることで目的とする光解離性樹脂が得られることになる。また、スペシフィックライゲーション反応を行う釣り竿部分として、トリエチレングリコールに *p*-トシル化とアセチル化を行い、これにエチル *N*-ヒドロキシアセトイミドを作用させ、脱アセチル化後に 2-プロモ酢酸 *tert*-ブチルエステルを作用させ、酸による脱保護と続く Fmoc 保護化により、ポリエチレンスパーサーを有するアミノオキシ基保護体を得た。今後、合成した各部分をつなぎ合わせて、目的とする光解離性レセプターフィッシングロッドの合成を達成する予定である。

(3) *Ephedra americana* の成分検索

E. americana メタノールエキスを薄層クロマトグラフィーにて検討した結果、エフェドリンは検出されなかった。また、8 個の化合物を単離し、一次元及び二次元 NMR による構造解析を行ったところ、その内 6 個が既知化合物、2 個が新規化合物であることが判明した。新規化合物 **1** は、カテキン類が 2 分子結合したプロアントシアニジン、新規化合物 **2** は、カテキン類が 3 分子結合していた。6 個の既知化合物は、エフェドランニン A の立体異性体、マウアニン B、マ

ウアニン D、マウアニン E、*ent*-エピアフゼレチン-(2 α →0→7, 4 α →8)-ケンフェロール、ケルセチンであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Madan Kumal Paudel, Osamu Shirota, Setsuko Sekita, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Development of an immunochemical differentiation method for *Salvia divinorum*. *Planta Medica*, 78, 2012, PJ11. (査読無)

[学会発表] (計 5 件)

- ① ボウデル マダン クマル, 田中宏幸, 田畑香織, 森元 聡, 代田 修, 関田節子, 免疫化学的手法によるチャット鑑別法の開発. 日本生薬学会第 59 年会, 平成 24 年 9 月 17-18 日, 千葉.
- ② Madan Kumal Paudel, Osamu Shirota, Setsuko Sekita, Hiroyuki Tanaka, Satoshi Morimoto, Development of an immunochemical differentiation method for *Salvia divinorum*. International Congress on Natural Products Research (ICNPR2012), July 28 - August 1, 2012, New York City, USA.
- ③ 橋本 惇, 代田 修, 松川哲英, 関田節子, ペルー産 *Ephedra americana* の成分研究. 日本薬学会第 132 年会, 平成 24 年 3 月 28-31 日, 札幌.
- ④ Madan Kumar Paudel, 代田 修, 田中宏幸, 森元 聡, 関田節子, Development of immunoassays using anti-サルビノリン A monoclonal antibody. 日本生薬学会第 58 年会, 平成 23 年 9 月 24-25 日, 東京.
- ⑤ 田中宏幸, 代田 修, 森元 聡, 関田節子, 抗サルビノリン A monoclonal antibody の作製と ELISA の確立. 日本薬学会第 131 年会, 平成 23 年 3 月 28-31 日, 静岡.

[その他]

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph09/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

代田 修 (SHIROTA OSAMU)

研究者番号: 90300920