

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5月24日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590006

研究課題名（和文）

亜熱帯植物の含有成分の構造的多様性とその生物活性

研究課題名（英文）Structural diversity of compounds isolated from subtropical plants and their biological activity

研究代表者

大塚 英昭 (OTSUKA HIDEAKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・名誉教授

研究者番号：00107385

研究成果の概要（和文）：

沖縄産、タイ産、インド産、マダガスカル産の植物より多くの化合物の単離を行った。各種スペクトル分析を行いその構造を、多くの場合、その絶対構造を含めて決定した。単離された化合物の生物活性を評価した。

研究成果の概要（英文）：

Many new compounds were isolated from the plants harvested in Okinawa, Thai., India and Madagascar. Their structures including absolute structures were elucidated using various kinds of spectroscopic data. Biological assays were performed toward isolated compounds

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：生薬・天然物化学・生理活性

1. 研究開始当初の背景

琉球弧は九州から 1000km 近く離れており、その間屋久島の南には渡瀬線、沖縄本島の南には蜂須賀線が渡り、植物相、動物相を異にしている。また亜熱帯気候に由来する南方系植物も多く、またそこが北限となる種も多々ある。さらに数百キロ離れた蜂須賀線以南の先島諸島はマングローブを始め熱帯に近い植物相を展開しており、石垣島、西表島固有の動植物資源は天然物有機的に大変貴重と言える。さらに島々が海で隔絶されているため、その島独自の固有植物種が発生、発達、

維持されてきており、小笠原と共に日本に於ける動植物の固有種、貴重種の宝庫である。資源の有効利用という観点からは、これら貴重な固有種の含有活性成分の検索も鋭意行う。これまで二十数年に及ぶ沖縄県での採集により植物がライブラリー化されており、更に将来にわたって引き続き行われる研究の一環として、未知成分の単離、資源植物利用の可能性の創出を目的として研究を行う。

2. 研究の目的

亜熱帯熱帯に産する資源植物の多様性、そし

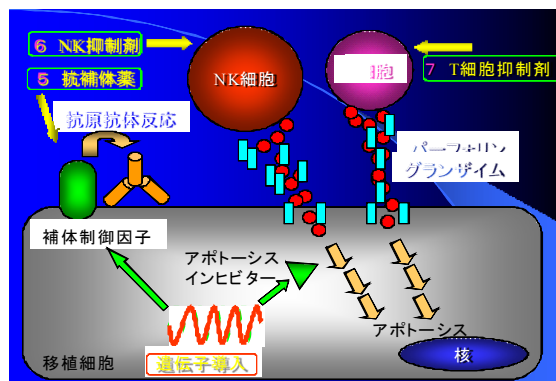
てその多様性が創出する成分と構造式の意外性に注目する。本邦沖縄諸島に産する未利用植物資源に注目し、新規成分の探索、斬新な生物活性検討法を用いて含有成分を検索する。タイ王国との研究者との共同で、タイの薬用植物の活性成分の探索を行う。タイには本邦とは全く異なる植物相が展開しているので共同で薬用資源植物を探索する。

3. 研究の方法

植物サンプルの調達には現地へ赴き、琉球大学農学部、琉球大学熱帯生物圏研究センターの協力のもとで採集を行った。また海外の研究者より熱帯性薬用植物を恵与いただく。それぞれのサンプルは抽出効率を上げるため細かく破碎し、含有有機化合物の溶解性が高いメタノール等の溶媒で十分に抽出する。さらに分配性の異なる数種の有機溶媒を用いて分画し、これを化学的・薬理的スクリーニングの出発材料とする。

スクリーニング方法としては

- (1) 活性酸素（細胞傷害性があり成人病など非常に多くの疾患の原因と考えられている）の除去活性を指標にする系
- (2) 近年臨床的に緊急の課題となっている MRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）や VRSA（バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌）、また真菌類で日和見感染の原因菌でもあるカンジダ菌を使用した抗生物質のアッセイ系
- (3) ヒトの癌細胞（KB 細胞）を用いた抗腫瘍活性物質のスクリーニング
- (4) レクチンの反応性を指標にして、癌細胞の悪性化（転移能の獲得）に重要と考えられている細胞表面糖鎖構造を再構成（リモデリング）する化合物の探索
- (5) 液性免疫で重要な補体反応に影響する薬物（図参照）
- (6) NK（ナチュラルキラー）細胞の活性に影響する薬物（図参照）



(7) T 細胞の活性に影響を与える薬物（図参照）

(8) 高次の生命体として brine shrimp を用いた薬理試験系などを利用する。

特に(5,6,7)については活性化する薬物は免疫力の賦活化につながりウイルスや癌細胞の除去を目的に応用可能で、一方不活性化する薬物は移植免疫における拒絶反応の制御に応用できるためどちらかに作用が現れば医薬品としての開発の可能性が生じる。

(1,2,8)については採集現場にてアッセイ可能であるので現地で活性を有するサンプルを選別して成分研究の効率化をはかる。

次にこれらの活性測定法の結果をもとに種々の分離特性を有するクロマトグラフィーの組み合わせ、例えば疎水性相互作用による多孔性合成樹脂 HP-20、極性官能基の性質の差を利用するシリカゲル、疎水性固定層に対する分配特性に基づく ODS、分離の難しい配糖体などに威力を発揮する液滴向流クロマトグラフ装置 (DCCC) および光学異性体の分離が可能なキラルカラム、高理論段を有して最終精製に多用される高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組み合わせて生物活性成分の単離精製をおこない活性本体に迫る。これらの分離操作中も、分画は絶えずスクリーニングを行い、活性本体を純品として単離する。活性本体が見いだせれば赤外吸収スペクトル (FT-IR) により官能基の識別、紫外吸収スペクトル (UV) で共役系、円偏光二色性スペクトル (CD) で絶対配置、高速原子衝撃質量分析装置 (FAB-MS) により分子量の決定、電子衝撃イオン化質量分析装置 (EI-MS) の開裂パターンによる骨格の推定、一次元、二次元核磁気共鳴スペクトルなどの物理データを詳細に解析することで活性本体の化学構造の解明を目指す。

得られた、活性本体の作用機作を遺伝子レベル、次いでタンパク質レベルで精査する。遺伝子工学的なアプローチにより慢性拒絶反応に対する研究を行う。T 細胞は主に Fas-Fas リガンド経路とパーフォリン・グランザイム経路で外来の細胞を免疫学的に拒絶する。そこでこの両経路のシグナル伝達を制御する抑制因子に着目している。

メラニン生成を抑制する物質の探索

日焼けにより皮膚が茶色に着色するのは、皮膚の中でメラニンが生成されるためである。メラニンはメラノサイトという皮膚組織で、チロシンを出発原料として生成される。チロ

シンはチロシナーゼなどの酵素により数段階の化学変化を経てメラニンになる。つまりメラニンの量を減少させる、もしくは増やさないのが美白の基本である。美白を効能とする化粧品原料は、1)メラニンの生成を抑制するもの、2)生成されたメラニンを還元するもの、3)生成されたメラニンの排出を促進するものに大別される。メラニンの合成ではまず進行の初期であるチロシン→ドーパ→ドーパキノンと変化する段階で、反応の進行に必要なチロシナーゼという酵素の活性化を阻害することが重要となる。また、その後ドーパキノン→メラニンへと進行する段階で作用する酵素 TRP-1, TRP-2 の働きを阻害することや、全体の酸化反応を抑制することができれば、更に効果的であると言える。本研究ではチロシナーゼを阻害する物質の探索を行う。

有用な活性物質が得られれば細胞および遺伝子レベルでの解析を行いたい。

具体的にはリガンド(この場合には薬物)固定化ビーズを用いた薬物結合性タンパク質の同定により作用機序に迫りたい。この過程で見出されたタンパク質がこれまでその薬理作用への関連が報告されていなければ新規の創薬ターゲットとなる可能性がある。また、differential display 法や DNA micro array 法を利用して薬物投与の前後で発現の異なる遺伝子があるかどうかを検討し新規の創薬ターゲット候補となる関連遺伝子を見出したい。

4. 研究成果

亜熱帯沖縄産植物、ハナチョウジ、モクレイシ、グミモドキ、シノブノキ、ヤドリフカノキ、モクレイシ、ヤマヒハツ、ヤンバルアワブキ、シマニシキソウ、オオバヤドリギに加えてインド産インドサルサ、タイ産イランイランノキ、ヒメモダマ、トゲバンレイシ、マダガスカル産シナモスマ属植物、モダマ等について、多様な成分の検索を行った。

モクレイシからは *ent*-labdane 型ジテルペンの配糖体および 2,3-dihydroxy-2-ethylbutanoic acid のエステルを単離した。グミモドキからは多数の *crotofolane* または新規骨格を有する *nor*-*crotofolane* 型ジテルペン、シノブノキからは 5-alkyl resorcinol 配糖体、そしてヤドリフカノキからはトリテルペン配糖体を得た。ヤドリフカノキのサポニンに於いては、核磁気共鳴スペクトルでは最終構造に疑義が生ずる可能性があるため、X-線結晶構造解析を行った。本サポニンの結晶は大変小さ

く、一般の回折計では十分な反射を得られなかったことから、播磨科学公園都市内の大型放射光装置である、Spring-8 を用いた。またイランイランノキからは多くの変形モノテルペンをはじめメガスティグマン配糖体を得た。さらにイランイランノキからはリグナンに変形モノテルペン配糖体が2分子結合した分子量の大きな化合物を単離して、それらは紫外線照射下、蛍光の発光を認めている。ヤマヒハツからはアラビノフラノースを糖部に持つ配糖体がえられている。シマニシキソウからはメガスティグマン配糖体を得られ、インドサルサからはプレグナンをアグリコンとするサポニンが得られた。モダマ、ヒメモダマからは *entagenic acid* をアグリコンとするサポニン類を多く単離するとともに、一分子中に酸素、窒素、硫黄の3種のヘテロ元素を含む配糖体が単離された。シナモスマ属植物からは多彩な生物活性を有するドリマンタイプのセスキテルペンが得られた。

オオバヤドリギの成分については、DPPH のラジカル除去活性試験を行った。ハナチョウジからも新規成分がえられ、それらのNO産生阻害活性についても検討を行った。

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 20 件)

1. Y. Uemura, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, Y., Takeda, M. Kawahata K. Yamaguchi, Microtropins A□I: 6'-*O*-(2"*S*,3"*R*')-2"-Ethyl-2",3"-dihydroxybutyrates of aliphatic alcohol β-D-glucosides from the branches of *Microtropis japonica*, 2012, *Phytochemistry*, 査読有り, 87, 132-136.

2. Y. Takeshige, S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, D. and S. Lhieochaiphant, Oblongionosides A□F, megastigmane glycosides from the leaves of *Croton oblongifolius* Roxburgh, 2012, *Phytochemistry*, 査読有り, 80, 132-136

3. S. Sugimoto, K. Matsunami H. Otsuka, Medicinal plants of Thailand. II Chemical studies on the seed kernels of *Entada rheedei* Sprengel, 2012, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 66, 552-557

4. Y. Iwamoto, S. Sugimoto, L. Harinantenaina, K. Matsunami, H. Otsuka, Entadosides A□D, triterpene saponins and a glucoside of the

- sulphur-containing amide from the kernel nuts of *Entada phaseoloides* (L.) Merrill, 2012, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 66, 321-328
5. A. Matsushige, Y. Kotake, K. Matsunami, H. Otsuka, S. Ohta, Y. Takeda, Annonamine, a new aporphine alkaloid from the leaves of *Annona muricata*, 2012, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 60, 257-259
6. A. Matsushige, K. Matsunami, Y. Kotake, H. Otsuka, S. Ohta, Three new megastigmanes from the leaves of *Annona muricata*, 2012, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 66, 284-291
7. M. Ochi, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, A new iridoid glycoside and NO production inhibitory activity of compounds, isolated from *Russelia equisetiformis*, 2012, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 66, 227-232
8. W.-H. Cai, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, Symplocosionosides A-C, three megastigmane glycosides, a neolignan glucoside, and triterpene glycosyl esters from the leaves of *Symplocos cochinchinensis* var. *philippinensis*, 2012, *American Journal of Plant Sciences*, 査読有り, 2, 609-618
9. K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, Myrsuguinosides A-E, five new glycosides from the fruits of *Myrsine seguinii*, 2011, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 59, 1274-1280
10. Z. Zhao, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, Tareciliosides H-M: Further cycloartane glycosides from the leaves of *Tarenna gracilipes*, 2011, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 59, 902-905
11. S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, Medicinal plants of Thailand. I Structures of rheedeiosides A-D and *cis*-entadamide A β -D-glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei*, 2011, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 59, 466-471
12. W.-H. Cai, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, A glycerol α -D-glucuronide and a megastigmane glycoside from the leaves of *Guettarda speciosa* L., 2011, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 65, 364-369
13. J. Shitamoto, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, Tricalysionoside A, megastigmane gentiobioside, sulfatricalysines A-F and *entkaurane* glucosides, tricalysiosides X-Z from the leaves of *Tricalysia dubia* (Lindl.) Ohwi, 2011, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 58, 72-77
14. S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, Crotoniosides A-G: Megastigmane glycosides from the leaves of *Croton cascarilloides* Rauschel, 2011, *Phytochemistry*, 査読有り, 72, 147-153
15. Z. Zhao, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, M. Kawahata, K. Yamaguchi, Schefflerin A-G: New triterpene glucosides from the leaves of *Schefflera arboricola*, 2010, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 査読有り, 58, 1343-1348
16. Y. Yamashita, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, 5-Alkylresorcinol glucosides from the leaves of *Grevillea robusta* A. Cunn., 2010, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 64, 474-477
17. K. Matsunami, J. Nagashima, S. Sugimoto, H. Otsuka, Y. Takeda, D. Lhieochaiphant, S. Lhieochaiphant, Megastigmane glucosides and unusual monoterpene from the leaves of *Cananga odorata* var. *odorata*, and absolute structures of related megastigmane glucosides isolated from *C. odorata* var. *odorata* and *Breynia officinalis*, 2010, *Journal of Natural Medicines*, 査読有り, 64, 460-467
18. J. Nagashima, K. Matsunami, H. Otsuka, D. Lhieochaiphant, S. Lhieochaiphant, Canangafruticosides A-E: Five monoterpene glucosides, two monoterpenes and a monoterpene glucoside diester of the aryldihydronaphthalene lignan dicarboxylic acid from leaves of *Cananga odorata* var. *fruticosa*, 2010, *Phytochemistry*, 査読有り, 71, 1564-1572
19. S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, M. Kawahata

ata, K. Yamaguchi, crotofolane-type diterpenoid and a rearranged nor-crotofolane-type diterpenoid with a new skeleton from the stems of *Croton cascarilloides*, 2010, *Tetrahedron Letters*, 査読有り, 51, 4320-4322

20. Y. Koyama, K. Matsunami, H. Otsuka, T. Shinzato, Y. Takeda, Microtropioides A-G: *ent*-Labdane diterpenoid glucosides from leaves of *Microtropis japonica* Hallier f., 2010, *Phytochemistry*, 査読有り, 71, 675-681

[学会発表] (計 21 件)

1. 上村有加, 岩見美緒, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, 武田美雄, ナンバンアワブキ葉部の成分研究(2), 日本薬学会第 133 年会, 平成 25 年 3 月 28 日, 横浜, 神奈川

2. 大塚英昭, 熱帯・亜熱帯植物の活性成, 日本生薬学会 第 59 回年会 (招待講演), 平成 24 年 9 月 17 日, 木更津, 千葉

3. S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, Crotofolanes, rare diterpenoids from *Croton cascarilloides*, The 7th KSP-JSP-CCTCNM Joint Symposium on Pharmacognosy, August 24th, 2012, Seoul, Republic of Korea

4. H. Otsuka, S. Sugimoto, K. Matsunami, Triterpene saponins from seed kernel of *Entada phaseoloides* and *E. rheedei* and their cytotoxicity, The 2nd Current Drug Development International Conference (招待講演), May 2nd, 2012, Phuket, Kingdom of Thailand

5. 川上晋, 松浪勝義, 大塚英昭, 武田美雄, グミモイドキより得た稀な構造のジテルペン類およびその生理活性, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

6. 寺澤沙織, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, 武田美雄, モクレイシ (*Microtropis japonica* Hallier f.) 葉部の成分研究 (3), 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

7. 野本裕也, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, シナモスマ・フラグランスより得た新規 drimane 型セスキテルペン, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

8. 浅海慎太郎, 杉本幸子, 松浪勝義, 武田美雄, シシアクチ葉部からの新規ベンゾキノ誘導体を地位新とした成分研究 (2), 日

本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

9. 勝井美果, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, イランイランノキ (*Cananga odorata* var. *odorata*) の新規リグナン誘導体研究, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

10. H. Otsuka, Chemical constituents from the leaves of *Cananga odorata* var. *fruticosa*, 6th CCTCNM-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy (招待講演), 2011 年 10 月 22 日, 瀋陽 (中華人民共和国)

11. S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, Novel diterpenoids from *Croton cascarilloides*, 6th CCTCNM-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2011 年 10 月 21 日, 瀋陽 (中華人民共和国)

12. S. Terazawa, Y. Koyama, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, M. Kawahata, K. Yamaguchi, Chemical constituents from the leaves of *Microtropis japonica*, 6th CCTCNM-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2011 年 10 月 21 日, 瀋陽 (中華人民共和国)

13. Y. Uemura, S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, Acylated glucosides of the stems of *Microtropis japonica*, 6th CCTCNM-KSP-JSP Joint Symposium on Pharmacognosy, 2011 年 10 月 21 日, 瀋陽 (中華人民共和国)

14. 浅海慎太郎, 杉本幸子, 松浪勝義, 武田美雄, シシアクチからの新規ベンゾキノ誘導体を中心とした成分研究, 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 24 日, 東京

15. 野本裕也, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, 武田美雄, シマニシキソウ (*Euphorbia hirta*) 全草の成分研究, 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 24 日, 東京

16. 寺澤沙織, 上村有加, 小山裕加, 杉本幸子, 松浪勝義, 大塚英昭, 武田美雄, モクレイシ葉部の成分研究 (2), 日本生薬学会第 58 回年会, 2011 年 9 月 24 日, 東京

17. Y. Uemura, Y. Koyama, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, Labdane-type diterpene glucosides and acylated glucosides of *Microtropis japonica*, JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Phar

maceutical Science, 9th December 2010, Bangkok, Thailand

18. S. Kawakami, K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, New crotofolane-type diterpenoids from *Croton cascarilloides* Rauschel, JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Science, 9th December 2010, Bangkok, Thailand

19. K. Matsunami, H. Otsuka, Y. Takeda, Absolute stereochemistry of megastigmane glucosides from *Macaranga tanarius*, JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Science, 9th December 2010, Bangkok, Thailand

20. S. Sugimoto, K. Matsunami, H. Otsuka, N-Acetylglucosamine containing saponins from *Entada rheedei*, JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. The Ninth Joint Seminar, 8th December 2010, Bangkok, Thailand

21. H. Otsuka, J. Shitamoto, K. Matsunami, Y. Takeda, Sulfated glucosides from the leaves of *Tricalysia dubia*, JSPS-NRCT Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences. The Ninth Joint Seminar, 8th December 2010, Bangkok, Thailand

[その他]

ホームページ等

[HTTP://WWW6.ocn.ne.jp/~hidjun](http://www6.ocn.ne.jp/~hidjun)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 英昭 (OTSUKA HIDEAKI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・名誉教授

研究者番号：00107385

(2) 研究分担者

松浪 勝義 (MATSUNAMI KATSUYOSHI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：70379890

杉本 幸子 (SUGIMOTO SACHIKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：60549012

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：