

博士論文

タイ薬用植物 *Diospyros mollis* (Ebenaceae) 中の
熱帯風土病に対する有効成分の探索

本論文は静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府
博士論文である

2019 年 2 月

諏訪間 崇治

Phytochemicals against tropical diseases
from Thai medicinal plant
Diospyros mollis (Ebenaceae)

February 2019

Takaharu Suwama

目次

序論	3
第1章 タイ国薬用植物エキスの抗原虫活性の測定	7
1-1 抗リーシュマニア活性試験の結果	9
1-2 考察	9
第2章 <i>Diospyros mollis</i> に含まれる成分の分離, 構造決定	11
2-1 化合物の抽出, 単離	11
2-2 ナフタレン配糖体の構造決定	17
2-2-1 新規ナフタレン配糖体 (1-5) の構造決定	17
2-2-2 既知ナフトキノン配糖体の同定	21
2-3 トリテルペン類の同定	28
2-4 リグナン類の同定	35
2-5 フェノール性化合物の同定	39
2-6 キノン, アミノ酸, ピリジン誘導体などの同定	47
2-7 考察	51
第3章 単離化合物の抗原虫活性	53
3-1 抗トリパノソーマ活性試験の結果	55
3-2 抗リーシュマニア活性試験の結果	56
3-3 Makluoside B (2) の細胞毒性試験の結果	56
3-4 考察	57
第4章 単離化合物のヒアルロニダーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性	61
4-1 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験	61
4-1-1 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験の結果	61
4-1-2 考察	62
4-2 単離化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性	64
4-2-1 α -グルコシダーゼ阻害活性試験の結果	64
4-2-2 考察	66
総括	67
実験の部	69
謝辞	76
引用文献	77

略語表

^{13}C NMR	: Carbon-13 nuclear magnetic resonance
COSY	: Chemical shift correlation spectroscopy
FBS	: Fetal bovine serum
HMBC	: Heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
HRFABMS	: High resolutions fast atom bombardment mass spectroscopy
IC_{50}	: Half maximal inhibitory concentration
LD_{50}	: Lethal dose 50
MIC	: Minimum inhibitory concentration
NTDs	: Neglected Tropical Diseases
NOE	: Nuclear overhauser effect
ODS	: Octadecylsilica
PDB	: Protein data bank
^1H NMR	: Proton nuclear magnetic resonance
SiCC	: Silica-gel column chromatography
SD	: Standard deviation
TAO	: Trypanosome alternative oxidase
tPSA	: Topological polar surface area
WHO	: World health organization
WIPO	: World intellectual property organization

序論

熱帯地方の開発途上国には収益を見込めないことにより新薬開発や治療法の発展の遅れている風土病が数多く存在し、人々の生活を脅かしている。世界保健機関 (WHO) が「顧みられない熱帯病 (NTDs : Neglected Tropical Diseases)」に指定した 20 種の感染症は熱帯地域を中心に蔓延し、149 カ国に 10 億人の罹患者が推定されている。NTDs の多くは貧困地域や紛争地域に集中し、1975 年から 30 年間、NTDs 対象の新薬は全体の 1 % にすぎず、しかもそれらの適用には整備された医療環境を必要とし、浸淫地における治療の実効性に乏しかった。¹⁾ 熱帯風土病に対しては、公衆衛生の向上、経済状態の改善、治療法や治療薬の新規開発など幅広い分野での対策が必要と考えられる。とりわけ安価かつ現地で使用可能な内服薬の開発は、一連の対策の成否を大きく左右する重要事項である。薬の新規開発には優れたリード化合物が必要であるが、天然物はその構造の多様性から上市されている医薬品の中で大きな割合を占めており、²⁾ 新規熱帯風土病治療薬も天然物やその誘導体から見出される可能性が高いと考えられる。2011 年に熱帯病治療薬開発のための国際共同事業 (WIPO コンソーシアム) が発足し、2020 年に向けてリーシュマニアなど 10 種類の疾患の抑制、撲滅に向けた取り組みが開始された。

このような状況下、関田らは、ヒューマンサイエンス財団プロジェクトを実施し各国の 75 種の熱帯植物エキスをを用いたリーシュマニア症に対する有効物質のスクリーニングを行い、10 種のエキスに活性を認め特許を取得している。³⁾ 世界的にも低分子の抗 NTDs 薬リードが見出されつつある。⁴⁾ 本研究は関田らのプロジェクトに続き科学研究費の支援を受け進められた研究課題である、熱帯植物由来新規 NTD 治療候補薬の探索 (研究代表者: 梅原薫) の一環として実施された。本研究で、私は、有用な天然物のソースとして伝統薬に注目した。アーユルベダ、中国医学、ユナニ医学などに代表される伝統医学の体系の中で使われる伝統薬は、現代に伝わる過程で風土病を含む種々の疾患治療の知見が蓄積されていることが想定される。そこで流行地域近傍の伝統薬を検索すれば、その NTDs に有効な天然物が含まれているとする仮説を立て、伝統薬の NTDs 治療への応用可能性を模索した。この方法論が成立すれば安価な薬用資源の入手が可能となるばかりか、安価でかつ実効性を持った感染症治療薬供給に道を拓くことになる。

NTDs の病原体は原虫、ウイルス、蠕虫、細菌、真菌など多岐にわたる。⁵⁾ その中でも原虫が病原体とされる NTDs にはリーシュマニア原虫感染により起こるリーシュマニア症、トリパノソーマ原虫の感染で起こるアフリカトリパノソーマ病とシャーガス病がある。リーシュマニア原虫とトリパノソーマ原虫は近縁であり、どちらもキネトプラスト綱トリパノソーマ目トリパノソーマ科に属している。治療薬は、リーシュマニア症に pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidine, miltefosine, paromomycin が、アフリカトリパノソーマ病とシャーガス病に eflornithine, melarsoprol, suramin, pentamidine, nifurtimox などが使われる。amphotericin B,

eflornithine, melarsoprol, pentamidine, suramin は投与方法が注射，吸入などであるため整った医療設備を必要とし，⁶⁾ しかも強い副作用の可能性があることから，適切な治療を継続して流行地域で行うことは現状では困難である。

既存の植物由来抗原虫薬では，*Cinchona pubescens* から単離された quinine や *Artemisia annua* から単離された artemisinin などが知られているが，⁷⁾ アフリカトリパノソーマ病，シャーガス病とリーシュマニア症の治療薬中で，植物由来天然物は存在しない。⁸⁾ 細菌類の *Streptomyces nodosus* から単離された amphotericin B と *Streptomyces krestomuceticus* から単離された paromomycin 以外の治療薬は，綿密な合成戦略により誕生した化合物の抗原虫活性を検討した結果見出されている。このため植物由来天然物からリード化合物を探す試みはこれまでの NTDs 治療薬創薬戦略とは異なった方向からアプローチしていると言える。既存の治療薬にないとはいえ，多様な構造を持つ植物由来天然物からリード化合物が見つかる可能性は高いと考えられる。実際，抗原虫活性を持った植物由来化合物の報告は複数なされている。⁷⁾ 本研究ではさらに伝統薬に注目し，研究対象の植物を選別しており，これまでの植物由来リード化合物探索とは異なった，新しい戦略を採っている。

私は東南アジアの熱帯風土病流行地域であるタイ国に注目した。タイ国は熱帯モンスーン気候帯にあり，2014 年の統計では平均気温は 29 °C ，平均湿度 73 % あり，1 年を通じ高温多湿である。⁹⁾ この気候の恩恵を受け，少なくとも 245 科 1763 属 10000 種の植物が生息していると思積もられている。¹⁰⁾ この多様で豊富な植物には多くの薬用植物が含まれており，それをういた伝統薬草学が現代に伝わっている。

タイ国は Dengue 熱など NTDs の流行地域であるほか，¹¹⁾ リーシュマニア症への感染や，¹²⁾ 家畜に寄生する *Trypanosoma evansi* の流行が確認されている。¹³⁾ 様々な感染症の影響に曝されている国であることから，伝統薬に原虫を始めとする種々の病原体に有効な天然物が含まれている可能性があると考えた。そこでタイ国薬用植物の抗原虫活性スクリーニングを，抗リーシュマニア活性を指標に実施したところ，*Diospyros mollis* に活性を見出したため，抗原虫活性成分の単離を行った。

D. mollis は東南アジアにみられる高さ 10–20 m に達するカキノキ科の高木である。タイ国内で本植物は若い果実が胃腸薬，駆虫薬として伝統的に利用されてきた。^{14–16)} 同国の Wat Pho の記録にはその根を吐き気，嘔吐の薬として用い，またその表皮を慢性疾患による衰弱，疲労に対して用いると記載されている。¹⁶⁾

本植物に関する過去の研究を確認し，以下のことに注目した。

- 1, これまでに本植物より 6,6'-dimethyl-2,2'-binaphthalene-1,1',8,8'-tetrol (diospyrol, Fig. 1) が単離され，¹⁷⁾ 鉤虫に効果を示したことから，¹⁸⁾ この化合物が駆虫薬としての活性本体と言われている。しかし，本植物の含有成分の詳細は明らかでないため，含有化合物の精査と，その生理活性の検討により，新規有用化合物を見出せる可能性が高いと考えられたこと。
- 2, 本植物の駆虫作用の報告は一部の蠕虫などを対象としたものに限られているが，対象の範囲を広げてリーシュマニアやトリパノソーマなど他の病原性微生物に対する

効果を検討するべきと考えられること。

- 3, 本植物の地上部の成分は未精査であり, 応用の可能性は検討されていない. これを明らかにすることで本植物の伝統的な用途を応用, 発展させた知見が得られると考えられること.

これらを踏まえて, タイ国伝統薬を熱帯風土病治療に応用するためにタイ国薬用植物 *Diospyros mollis* の地上部に含まれる化合物を精査し, 熱帯風土病の病原性原虫に対する有効成分を同定した.

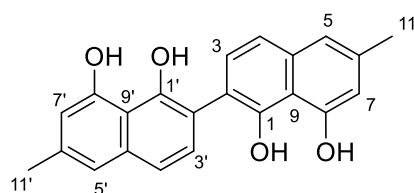


Fig. 1 Structure of diospyrol

第 1 章ではタイ国薬用植物 38 種の植物エキスを使った抗原虫活性のスクリーニングについて記述する. これまで行われたタイ薬用植物抽出エキスを用いた駆虫活性のスクリーニングによって, 線虫 *Caenorhabditis elegans*, 内部寄生吸虫 *Paramphistomum epiclitum*, マンソン住血吸虫 *Schistosoma mansoni*, 腸管寄生性原生動物 *Blastocystis hominis* に対する活性は報告されているが,^{19, 20)} 新たに抗リーシュマニア活性を示す植物エキスの存在を明らかとしたことを報告する.

第 2 章では第 1 章で活性を見出した *Diospyros mollis* メタノールエキスから単離された化合物の構造決定について記述する. これまでナフタレン誘導体,^{18, 21-24)} トリテルペン類のほかにも単離報告のなかった本植物中より,¹⁸⁾ 新規 5 種 (1-5) を含むナフタレン配糖体 (1-7) のほか, トリテルペン類 (8-14), リグナン (15-18), キノン (27), アミノ酸 (28), フェノール性化合物 (19-26), ピリジン誘導体 (29) の 29 種の多様な化合物を単離, 同定したことを報告する.

第 3 章では抗原虫活性を調べるために行った, 抗トリパノソーマ活性試験と抗リーシュマニア活性試験の結果を示す. 本植物に含まれるナフタレン配糖体 (2 と 3) にそれぞれ IC_{50} 11.8 μ M と 9.4 μ M, トリテルペンの betulin (9) と betulinic acid (10) にそれぞれ IC_{50} 13.0 μ M と 21.5 μ M の抗トリパノソーマ活性を見出したことを報告する. また, 構造近縁の単離化合物の活性や誘導体の報告例との比較を行い, 抗原虫活性の構造活性相関を考察した結果を報告する.

第 4 章ではヒアルロニダーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性試験の結果を示す. 単離化合物の lupeol caffeate (14) に IC_{50} 1.65 mM のヒアルロニダーゼ阻害活性を見出した. 皮膚や臓器の水分保持に関与し, 恒常性の維持に貢献するヒアルロン酸を基質とするヒアルロニダーゼと, 消化管で α -1, 4 グルコシド結合を切断し, 糖の吸収に関

わる α -グルコシダーゼの阻害活性から、単離化合物の副作用発現の可能性を考察した。

総括では上記の結果を踏まえて、タイ国薬用植物を薬用資源として評価した。以下、それぞれの内容について詳述する。

なお本研究は、静岡県立大学とタイ国立 **Khon Kaen University** との機関協定に基づき、両薬学部間の共同研究として実施された。

第1章 タイ国薬用植物エキスの抗原虫活性の測定

この章では、抗原虫活性を持ったタイ国薬用植物の同定を目的とし実験を行った。原虫による疾患はマラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、アメーバ赤痢、クリプトスポリジウム症など多数知られている。⁵⁾ その中でリーシュマニア症はキネトプラスト綱トリパノソーマ目トリパノソーマ科リーシュマニア属に属する、20種を超えるリーシュマニア原虫によって引き起こされる疾患の総称であり、NTDsの一つとして知られている。2013年のWHOの試算では世界102カ国に130万人以上の患者がおり、1億人が感染のリスクにさらされている。²⁵⁾ リーシュマニア原虫はベクターであるサシチョウバエ類の体内でプロマスチゴートと呼ばれる形態をとる。ヒトなど宿主の体内ではマクロファージに感染し、アマスチゴートと呼ばれる形態に変化する。リーシュマニア症は感染するリーシュマニア原虫種によって異なる病態を呈し、皮膚に潰瘍ができる皮膚型、粘膜組織の崩壊が起こる粘膜皮膚型、リンパ節腫脹や肝脾腫、体重減少などが起こる内臓型の3つに分類される。²⁵⁾ 薬物治療は pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidine が使われてきたが、近年、miltefosine, paromomycin, liposomal amphotericin B などが開発された。しかし、主な流行地域である発展途上国では高い薬価や不安定な薬の供給が治療を行ううえで障害となっていることが指摘されており、より安価で有効性の高い新薬の開発が望まれている。²⁵⁾

タイ国伝統医学は伝統薬草学、精神療法、マッサージや理学療法に分けることができる。²⁶⁾ その中でタイの伝統薬草学は古代のタイ社会に生きた人々の個人的な経験の蓄積と、インドのアーユルベータの知識により成立したとされる。タイ国はリーシュマニア症、デング熱など複数の感染症が確認されている地域である。そのタイ国の伝統薬は感染症に対する使用経験を織り込んで成立していると考えられるため、伝統薬の抗原虫活性に興味を持ち、タイ国薬用植物を対象とした抗リーシュマニア活性スクリーニングを計画した。リーシュマニア原虫と近縁のトリパノソーマ原虫には pentamidine など複数の化合物が両方に有効性を示すことが知られており、^{27,28)} このスクリーニングの結果は近縁のトリパノソーマに対する活性の指標にもなると考えた。

スクリーニングはタイ国薬用植物抽出エキスを用い、リーシュマニア増殖抑制試験で実施した。使用したリーシュマニア原虫は皮膚型リーシュマニア症の病原体の一つとして知られる *Leishmania major* を用いた。活性試験は徳島文理大学香川薬学部 生薬天然物化学講座助教 安元加奈未先生とともに実施した。スクリーニングに使用した植物は、Table 1 に示す 20科 33属 38種である。

Table 1 Selected Thai medicinal plants

No.	Family	Genus	Plant name
1	Acanthaceae	<i>Avicennia</i>	<i>Avicennia marina</i>
2		<i>Barleria</i>	<i>Barleria cristata</i>
3	Amaranthaceae	<i>Alternanthera</i>	<i>Alternanthera bettzickiana</i>
4			<i>Alternanthera sessilis</i>
5	Annonaceae	<i>Uvaria</i>	<i>Uvaria rufa</i>
6	Apocynaceae	<i>Spirolobium</i>	<i>Spirolobium cambodianum</i>
7		<i>Telosma</i>	<i>Telosma minor</i>
8	Balanophoraceae	<i>Balanophora</i>	<i>Balanophora abbreviate</i>
9	Caesalpiniaceae	<i>Caesalpinia</i>	<i>Caesalpinia digyna</i>
10	Celastraceae	<i>Salacia</i>	<i>Salacia chinensis</i>
11			<i>Salacia verrucosa</i>
12	Ebenaceae	<i>Diospyros</i>	<i>Diospyros mollis</i>
13	Leguminosae	<i>Afgekia</i>	<i>Afgekia sericea</i>
14		<i>Albizia</i>	<i>Albizia lebbeck</i>
15			<i>Albizia odoratissima</i>
16		<i>Bohenia</i>	<i>Bohenia malabarica</i>
17		<i>Butea</i>	<i>Butea monosperma</i>
18		<i>Crotalaria</i>	<i>Crotalaria retusa</i>
19		<i>Dalbergia</i>	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>
20		<i>Derris</i>	<i>Derris elliptica</i>
21		<i>Millettia</i>	<i>Millettia brandisiana</i>
22		<i>Senna</i>	<i>Senna garrettiana</i>
23			<i>Senna timoriensis</i>
24	Malpighiaceae	<i>Hiptage</i>	<i>Hiptage benghalensis</i>
25	Malvaceae	<i>Pterygota</i>	<i>Pterygota alata</i>
26	Moraceae	<i>Maclura</i>	<i>Maclura cochinchinensis</i>
27	Myristicaceae	<i>Myristica</i>	<i>Myristica fragans</i>
28	Ochnaceae	<i>Ochna</i>	<i>Ochna integerrima</i>
29	Oleandraceae	<i>Oleandra</i>	<i>Oleandra musifolia</i>
30	Plantaginaceae	<i>Bacopa</i>	<i>Bacopa monnieri</i>
31		<i>Scoparia</i>	<i>Scoparia dulcis</i>
32	Poaceae	<i>Leersia</i>	<i>Leersia hexandra</i>
33	Polygonaceae	<i>Persicaria</i>	<i>Persicaria tomentosum</i>
34	Rubiaceae	<i>Randia</i>	<i>Randia horrida</i>
35		<i>Tarenna</i>	<i>Tarenna fragrans</i>
36			<i>Tarenna hoaensis</i>
37	Rutaceae	<i>Micromelum</i>	<i>Micromelum minutum</i>
38		<i>Zanthoxylum</i>	<i>Zanthoxylum limonella</i>

1-1 抗リーシュマニア活性試験の結果

文献記載の方法に従い,²⁹⁾ *L. major* のプロマスチゴートを 96 穴マイクロプレートに播種し,そこに各濃度に調製したタイ薬用植物エキスサンプルを加え,48 時間培養後,細胞数を測定した.活性は MIC (minimum inhibitory concentration) で評価した.今回試験した植物と,その抗リーシュマニア活性を Table 2 に示す. *Salacia verrucosa*, *Avicennia marina*, *Diospyros mollis*, *Persicaria tomentosum*, *Pterygota alata*, *Salacia chinensis* で MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の良好な結果を得た.

このスクリーニングの結果と,別の予備スクリーニングでデングウイルス増殖抑制活性(未発表データ)が認められた *Diospyros mollis* は種々の生理活性を持った多様な化合物を含むと考えられたことから,第 2 章で含有成分の精査を行った.

1-2 考察

タイ薬用植物エキスを用いた抗原虫活性の探索を目的としたスクリーニングは, Sawangjaroen らが腸管寄生性原虫 *Blastocystis hominis* への効果を 5 種の植物で検討し, 3 種の植物で抗原虫活性を見出している.²⁰⁾ さらに Atjanasuppat らが,モデル生物として著名な線虫 *Caenorhabditis elegans*, 双口吸虫類の *Paramphistomum epiclitum*, 日本住血吸虫と並んで著名なマンスン住血吸虫 *Schistosoma mansoni* への駆虫効果を 32 種の植物エキスで検討している. *Caenorhabditis elegans* には *Plumbago indica* (Plumbaginaceae) が, *Schistosoma mansoni* には *Piper chaba* (Piperaceae) が有効とする報告はあるが,¹⁹⁾ *L. major* に対する有効性は検討されていない. 今回のスクリーニングで *L. major* に対して MIC 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の活性を示す薬用植物が 6 種見つかったことにより,これまで知られていなかったタイ薬用植物の抗リーシュマニア活性が明らかとなった. Pentamidine のような,抗リーシュマニア活性,抗トリパノソーマ活性の両方を持った抗原虫薬の存在を考えると,これら薬用植物は抗トリパノソーマ活性を示す化合物を持つ可能性が考えられた.タイ薬用植物の抗リーシュマニア活性は,これまでに報告されているコロンビアの薬用植物や,³⁰⁾ パナマ,メキシコ,オマーン,ナイジェリアなどの薬用植物の活性に伍するものであり,³¹⁾ その活性本体の探索が抗原虫薬の開発に繋がると考えた.タイ国伝統薬が抗リーシュマニア活性を示したのは,リーシュマニア症を含む種々の感染症に有効性を示した伝統薬がいわば「効く薬」として伝承され続ける一方で,有効性の乏しい薬は廃れてゆくという,使用経験を織り込んだシステムで伝統薬の取捨選択が行われ,現代に伝わったためと考えている.

Table 2 Leishmanicidal activity of Thai medicinal plants

No.	Plant name	Family name	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
1	<i>Salacia verrucosa</i>	Celastraceae	12.5
2	<i>Avicennia marina</i>	Acanthaceae	25
3	<i>Diospyros mollis</i>	Ebenaceae	50
4	<i>Persicaria tomentosum</i>	Polygonaceae	50
5	<i>Pterygota alata</i>	Malvaceae	50
6	<i>Salacia chinensis</i>	Celastraceae	50
7	<i>Caesalpinia digyna</i>	Caesalpinaceae	100
8	<i>Dalbergia cochinchinensis</i>	Leguminosae	100
9	<i>Oleandra musifolia</i>	Oleandraceae	100
10	<i>Millettia brandisiana</i>	Leguminosae	100
11	<i>Scoparia dulcis</i>	Plantaginaceae	100
12	<i>Spirolobium cambodianum</i>	Apocynaceae	100
13	<i>Tarenna fragrans</i>	Rubiaceae	100
14	<i>Zanthoxylum limonella</i>	Rutaceae	100
15	<i>Albizia lebbek</i>	Leguminosae	200
16	<i>Bohenia malabarica</i>	Leguminosae	200
17	<i>Butea monosperma</i>	Leguminosae	200
18	<i>Hiptage benghalensis</i>	Malpighiaceae	200
19	<i>Micromelum minutum</i>	Rutaceae	200
20	<i>Myristica fragrans</i>	Myristicaceae	200
21	<i>Randia horrida</i>	Rubiaceae	200
22	<i>Senna garrettiana</i>	Leguminosae	200
23	<i>Senna timoriensis</i>	Leguminosae	200
24	<i>Tarenna hoensis</i>	Rubiaceae	200
25	<i>Albizia odoratissima</i>	Leguminosae	400
26	<i>Alternanthera sessilis</i>	Amaranthaceae	400
27	<i>Bacopa monnieri</i>	Plantaginaceae	400
28	<i>Balanophora abbreviate</i>	Balanophoraceae	400
29	<i>Crotalaria retusa</i>	Leguminosae	400
30	<i>Derris elliptica</i>	Leguminosae	400
31	<i>Leersia hexandra</i>	Poaceae	400
32	<i>Ochna integerrima</i>	Ochnaceae	400
33	<i>Uvaria rufa</i>	Annonaceae	400
34	<i>Afgekia sericea</i>	Leguminosae	>400
35	<i>Alternanthera bettzickiana</i>	Amaranthaceae	>400
36	<i>Barleria cristata</i>	Acanthaceae	>400
37	<i>Maclura cochinchinensis</i>	Moraceae	>400
38	<i>Telosma minor</i>	Apocynaceae	>400

第2章 *Diospyros mollis* に含まれる成分の分離, 構造決定

本章では, 抗原虫活性を持った化合物を同定 (第3章) するために, 前章で抗原虫活性を示した *Diospyros mollis* メタノールエキス含有成分を精査した結果について記述する.

Diospyros mollis は東南アジアにみられる高さ 10–20 m に達するカキノキ科の高木である. 本植物は多くの用途で利用されてきた長い歴史がある. 若い果実はタイ国内で胃腸薬として伝統的に利用されてきた.^{14–16)} Sadun らによる本植物の抗鉤虫作用の報告では 1930 年代にタイ国内の大学病院で本植物の若い実を鉤虫の駆虫薬として盛んに使用していたことに言及している.¹⁴⁾ 根は吐き気, 嘔吐の薬として用い, 表皮は慢性, 患による衰弱, 疲労に対して用いると Wat Pho の記録に残されている.¹⁶⁾

D. mollis 抽出エキスや本植物由来単離化合物の抗病原微生物活性に関して, Loder らは本植物果実のメチレンクロライド抽出エキスを *Caenorhabditis elegans*, *Paramphistomum epiclitum* に対する活性があることを報告している.¹⁷⁾ また Yoshihira らは, 6,6'-dimethyl-2,2'-binaphthalene-1,1',8,8'-tetrol (diospyrol) が駆虫薬としての活性本体であると報告している.¹⁸⁾ 単離化合物は他に elliptinone,¹⁸⁾ mamegakinone,¹⁸⁾ 4,5,8-trimethoxy-2-naphthaldehyde などのキノン類,¹⁸⁾ 3-methylnaphthalene-1,8-diol,²³⁾ diospyrol 8,8-di-*O*-(6-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside) などのナフタレン類と,²⁴⁾ lupeol, lupenone, betulin, taraxerol などのトリテルペンが報告されている.¹⁸⁾ Mallavadhani らによると, *Diospyros* 属の葉や枝から脂質, タンニン, 芳香族化合物, カロテノイドなど多様な化合物が単離されているが,³²⁾ *D. mollis* からはナフタレン類とトリテルペン以外の化合物は報告されていない. このことから, 化合物の単離を進めることで多様な化合物を新たに単離できる可能性が高いと考えた.

2-1 化合物の抽出, 単離

タイ国 Khon Kaen で採集した *D. mollis* の葉と枝 (3.0 kg) をメタノールで熱抽出し, ろ過した. 溶媒を留去し残渣をメタノールエキス (85.6 g) として得た. その後, メタノールエキス (85.6 g) を水に懸濁して水と酢酸エチルによる液-液分配を行った. 水層と酢酸エチル層をそれぞれ各種クロマトグラフィーで分画し, 新規 5 種 (1–5) を含むナフタレン配糖体 (1–7) のほか, トリテルペン類 (8–14), リグナン(15–18), キノン (27), アミノ酸 (28), フェノール性化合物 (19–26), ピリジン誘導体 (29) の 29 種の化合物を単離した. 抽出のスキームを Charts 1–3 に, Fractions A–O の重量を Table 3 に, WL30MeOH-a–h の重量を Table 4 に, 単離化合物を Table 5 に示す.

Chart 1 Separation of *Diospyros mollis* MeOH extract

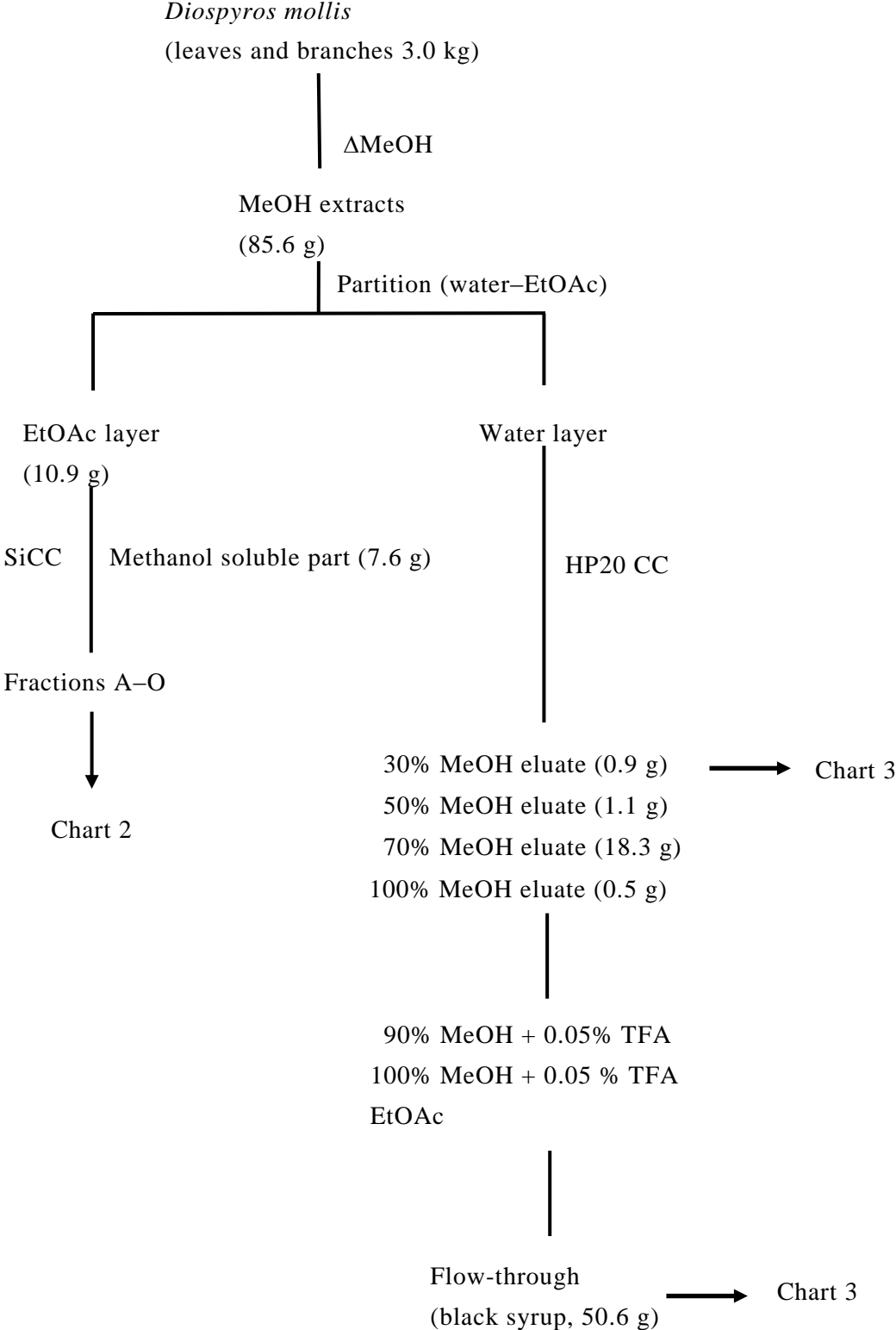


Chart 2 Isolation of **1–18, 27** from EtOAc fraction

Fraction A (0.43 g)

TSK-gel
ODS-100v
MeCN–H₂O (100:0)

13 (2.0 mg, t_R 47 min)

Fraction C (0.41 g)

GL science
Inertsil ODS-EP
MeCN–H₂O (95:5)

8 (294.3 mg, t_R 39 min)

Fraction D (1.73 g)

GL science Inertsil ODS-EP, MeCN–H₂O (95:5)
(**8, 9, 11**)
TSK-gel ODS-100v, MeOH–MeCN (1:1) (**10**)
TSK-gel ODS-100v, MeOH–H₂O (100:0) (**12**)

8 (159.5 mg, t_R 39 min)

9 (31.0 mg, t_R 22 min)

10 (23.0 mg, t_R 16 min)

11 (53.0 mg, t_R 69 min)

12 (69.0 mg, t_R 55 min)

Fraction E (0.36 g)

TSK-gel ODS-100v,
MeOH–H₂O (100:0) (**14**)
TSK-gel ODS-100v,
MeOH–H₂O (4:6) (**15, 16, 27**)

14 (28.2 mg, t_R 68 min)

15 (2.2 mg, t_R 78 min)

16 (6.0 mg, t_R 72 min)

27 (1.7 mg, t_R 15 min)

Fraction I (0.36 g)

TSK-gel ODS-100v
MeOH–H₂O (55:45)

17 (7.1 mg, t_R 23 min)

18 (7.3 mg, t_R 27 min)

Fraction L (0.44 g)

TSK-gel ODS-100v
MeOH–H₂O (4:6)

3 (4.2 mg, t_R 94 min)

Fraction M (0.68 g)

TSK-gel ODS-100v
MeOH–H₂O (4:6)40% MeOH

4 (5.8 mg, t_R 77 min)

5 (85.5 mg, t_R 86 min)

Fraction O (0.99 g)

TSK-gel ODS-100v
MeOH–H₂O (55:45)

1 (15.0 mg, t_R 59 min)

2 (3.4 mg, t_R 48 min)

6 (238.4 mg, t_R 80 min)

7 (8.6 mg, t_R 105 min)

Chart 3 Isolation of **19–26, 28, 29** from 30% MeOH eluate

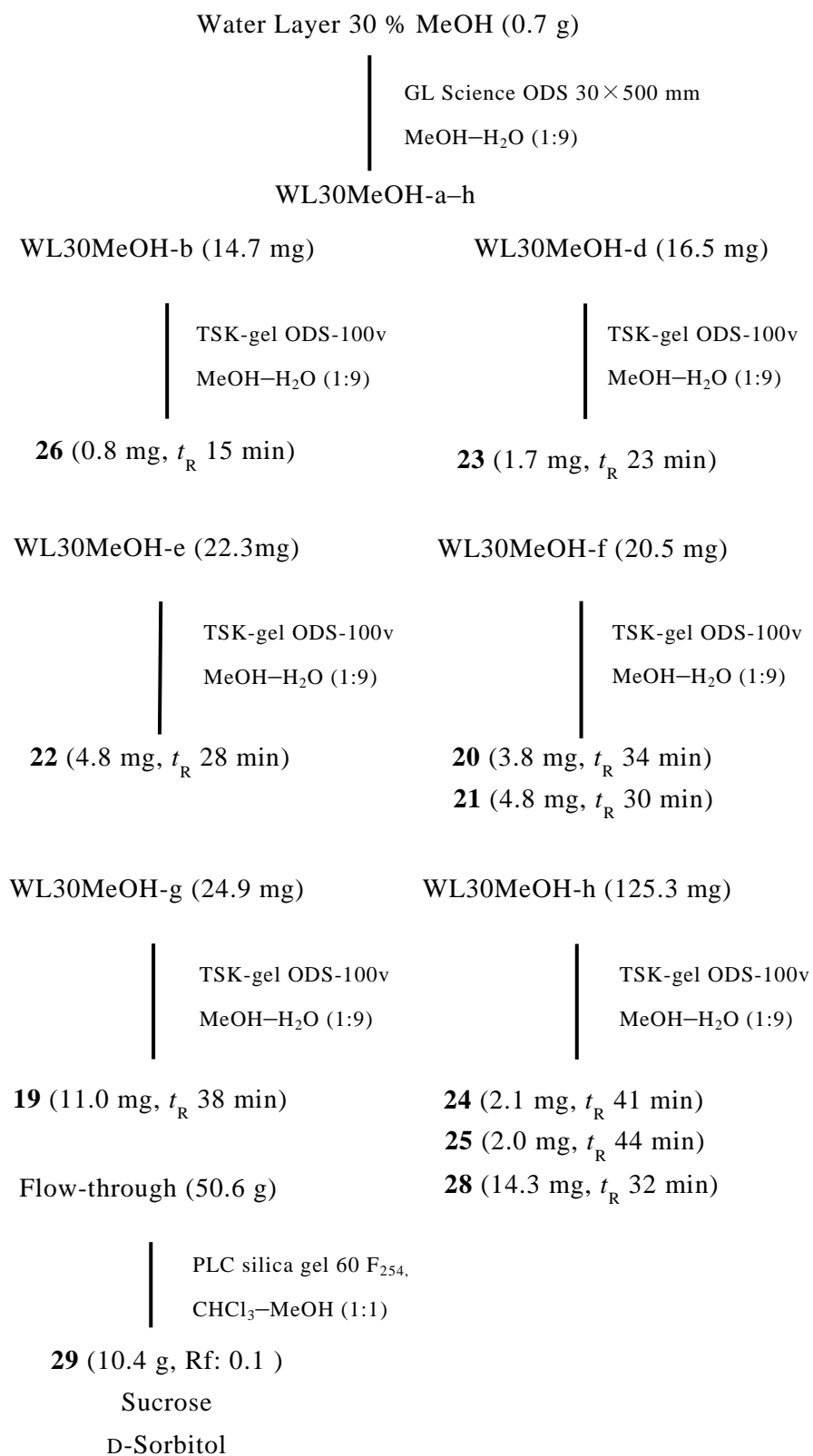


Table 3 Weight of Fractions A–O

Fraction	Weight (g)
A	0.43
B	0.13
C	0.41
D	1.73
E	0.36
F	0.24
G	0.09
H	0.02
I	0.36
J	0.35
K	0.43
L	0.44
M	0.68
N	0.69
O	0.99

Table 4 Weight of WL30MeOH-a–h

Fraction	Weight (mg)
WL30MeOH-a	71.8
WL30MeOH-b	14.7
WL30MeOH-c	15.7
WL30MeOH-d	16.5
WL30MeOH-e	22.3
WL30MeOH-f	20.5
WL30MeOH-g	24.9
WL30MeOH-h	125.3

Table 5 Isolates from methanol extract

No.	Compound
1	makluoside A
2	makluoside B
3	makluoside C
4	makluoside D
5	makluoside E
6	diospyrol 8,8'-di- <i>O</i> -(6- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranoside)
7	diospyrol 8- <i>O</i> -(β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranosyl)-8'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
8	lupeol
9	betulin
10	betulinic acid
11	stigmasterol
12	β -sitosterol
13	lupenone
14	lupeol caffeate
15	pinoresinol
16	syringaresinol
17	hedyotisol A
18	hedyotisol B
19	capparoside A
20	canthoside D
21	digupigan A
22	osmantolide
23	isotachioside
24	cinnacassoside C
25	4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl 1- <i>O</i> - β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside
26	guaiacylglycerol
27	2,6-dimethoxy- <i>p</i> -benzoquinone
28	L-tryptophan
29	trigonelline

2-2 ナフタレン配糖体の構造決定

今回単離されたナフタレン配糖体 (1-7) と, 1, 6, 7 のアグリコンである diospyrol の構造を Fig. 2 に示す.

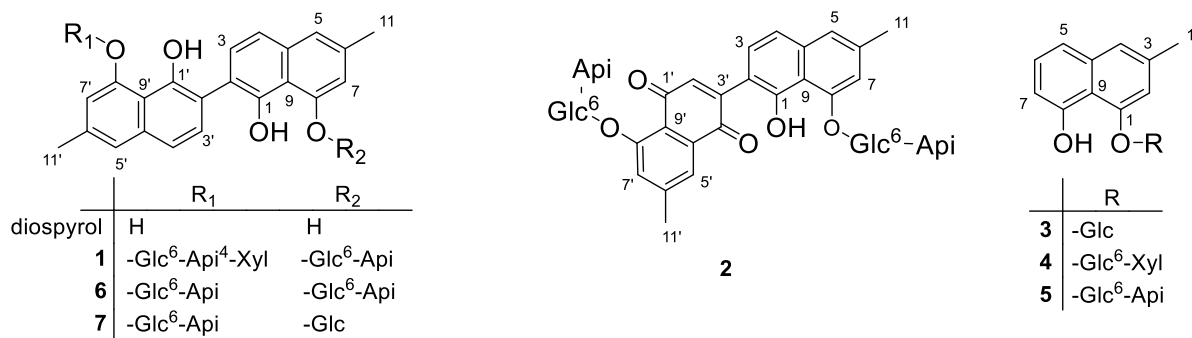


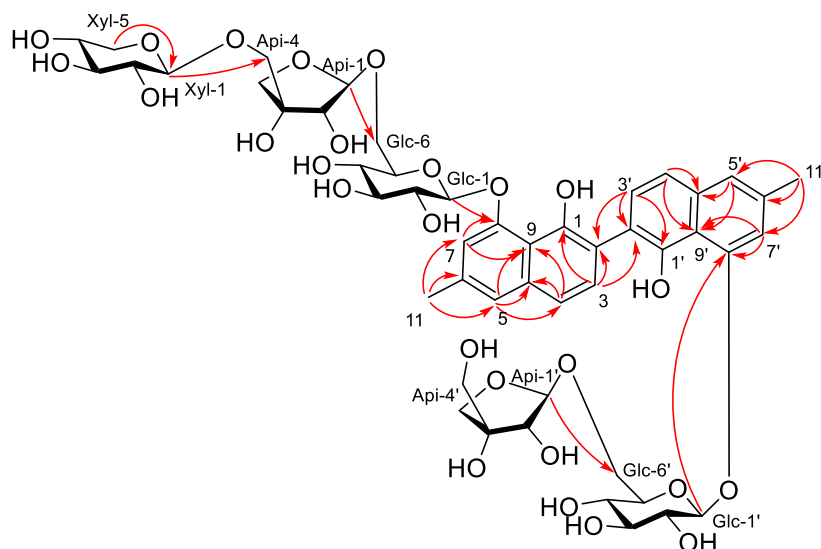
Fig. 2 Structures of isolated naphthalene glycosides (1-7) from *D. mollis*

2-2-1 新規ナフタレン配糖体 (1-5) の構造決定

化合物 **1** (makluoside A) は, HRFABMS から $C_{49}H_{62}O_{26}$ ($[M]^+ m/z$ 1066.3546, calcd for 1066.3529) の分子式を有する褐色無晶系物質として得られた. 化合物 **1** の 1H NMR では, 2 つのメタカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.18 (brs, H-7,7'), 7.32 (brs, H-5,5')], 2 つのオルトカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, H-4,4'), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3,3')], 1 つの二重結合上のメチル基 [δ_H 2.47 (s, C-11,11')], 5 個のアノメリックプロトン [δ_H 5.14 (1H, d, $J = 8$ Hz, Glc-1'), 5.12 (1H, d, $J = 8$ Hz, Glc-1), 5.00 (1H, d, $J = 2$ Hz, Api-1'), 4.95 (1H, d, $J = 2$ Hz, Api-1), 4.09 (1H, d, $J = 7$ Hz, Xyl-1)] 由来のシグナルが観測された (Table 6). また ^{13}C NMR スペクトルでは, 対をなす 10 組 20 本の芳香族炭素シグナルが観測されたことから, バイナフタレン配糖体と推測された. 本化合物の HMBC のデータでは, 2 つのメタカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.18 (brs, H-7,7'), 7.32 (brs, H-5,5')] からメチル基 [δ_C 22.0 (C-11,11')] への相関, 2 つのオルトカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, H-4,4'), 7.37 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3,3')] から 4 級炭素 [δ_C 121.4 (C-2,2')] への相関が観測された. さらに, このオルトカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.26 (d, $J = 8.5$ Hz, H-4,4')] とメタカップリングした芳香族プロトン [δ_H 7.32 (brs, H-5,5')] は, ナフタレン骨格の隔環炭素と推定出来る 2 組の第 4 級炭素 [δ_C 115.3 (C-9), 115.5 (C-9'), 137.7 (C-10,10')] へ共通して相関を示した. これらの事実から **1** を 6,6'-dimethyl-2,2'-binaphthalene-1,1',8,8'-tetrol (diospyrol) の配糖体と推定した.

酸加水分解の後, 高極性画分は D-cysteine と反応させチアゾリジン誘導体とした. HPLC 分析を行い, 化合物 **1** の糖部分が β -D-グルコース 2 分子, β -D-アピオース 2 分子, β -D-キシロース 1 分子からなることを確認した.²⁷⁾ 糖鎖の結合様式は HMBC スペクトルの H-C ロングレンジ相関から推測を行った. 最も低磁場に観測されるアノメリックプロトン [δ_H 5.12

(1H, d, $J = 8$ Hz, Glc-1), 5.14 (1H, d, $J = 8$ Hz, Glc-1')] はその J 値からグルコース由来と考えられた. HMBC スペクトルで両プロトンシグナルは芳香族炭素原子 [δ_c 155.7 (C-8), 155.8 (C-8')] との相関を示し, さらにこの芳香族炭素は 7,7' 位の芳香族プロトン [δ_H 7.18 (brs, H-7,7')] ともロングレンジ相関を有していたことから, グルコースはアグリコン 8, 8' 位に結合していることが示唆された. 一方, アピオースのアノメリックプロトン [δ_H 4.95 (d, $J = 2$ Hz, Api-1), 5.00 (d, $J = 2$ Hz, Api-1')] からはグルコース 6 位炭素への相関 [δ_c 67.3 (Glc-6), 68.4 (Glc-6')], さらにキシロースのアノメリックプロトン [δ_H 4.09 (d, $J = 7$ Hz, Xyl-1)] からアピオースの 4 位 [δ_c 73.3 (Api-4)] への HMBC 相関が観測されたことから, グルコース 6 位にアピオースが結合し, その 4 位にキシロースが 1 分子結合した糖鎖構造が明らかとなった. これはアピオース 4 位のプロトンシグナル [δ_H 3.37 (d, $J = 10$ Hz, Api-4), 3.90 (d, $J = 10$ Hz, Api-4), 3.55 (s, Api-4')] の差異からも支持された. これらのデータから **1** (makluoside A) を diospyrol-8-*O*-(β -xylopyranosyl-1-*O*- β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl)-8'-*O*- β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranoside と決定した. これまでに 4 種の diospyrol 配糖体が *Diospyros* 属から単離され, その糖鎖に β -apiofuranosyl と β -glucopyranose を含むことが報告されている. ^{21, 22, 24)} 化合物 **1** は diospyrol 配糖体でキシロースを含む最初の例である. 化合物 **1** の



構造と主要な HMBC 相関を Fig. 3 に示す. NMR スペクトルデータは Table 6 に示す. 各種 NMR チャートは巻末に Fig. S1-5 として掲載した.

Fig. 3 Key HMBC correlations of **1**

化合物 **2** (makluoside B) は HRFABMS ($[M + Na]^+$ m/z 971.2812, calcd for 971.2797) の結果より $C_{44}H_{52}O_{23}$ の分子式を有する, 赤褐色無晶系物質として得られた. 化合物 **2** は **1** と同様に, 1 組のメタカップリングした芳香族プロトンシグナル [δ_H 7.35 (brs, H-5), 7.24, (brs, H-7)], 1 組のオルトカップリングした芳香族プロトンシグナル [δ_H 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, H-3), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, H-4)] とシングレットメチルシグナル [δ_H 2.49 (s, H-11)] から支持される, 3-methyl-1,8-naphthalenediol の部分構造を有することが COSY, HMQC, HMBC の結果から示

唆された。一方で **2** の NMR スペクトルでは、**1** で認められたもう 1 組のオルトカップリング芳香族プロトンシグナルに代わるシングレット芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 7.00 (s, H-2')] の存在に加え、2 つのカルボニル炭素シグナル [δ_{C} 185.5 (C-1'), 186.3 (C-4')] が新たに確認できたことから、1,4-naphthoquinone の部分構造が推測された。化合物 **2** の HMBC スペクトルでは、メタカップリングしている芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 7.67 (brs, H-5')] からメチル炭素 [δ_{C} 22.2 (C-11')] およびカルボニル炭素 [δ_{C} 186.3 (C-4')] への相関が観察された。また、シングレット芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 7.00 (s, H-2')] から 2 つのカルボニル炭素 [δ_{C} 185.5 (C-1'), 186.3 (C-4')] および 3-methyl-1,8-naphthalenediol の C-2 [δ_{C} 135.0] との相関が観察されたことから、1,4-naphthoquinone 基の C-3' 位と 3-methyl-1,8-naphthalenediol 基の C-2 位間で結合していることが示唆された。

本化合物は加水分解の結果、D-グルコース、D-アピオスをそれぞれ 2 分子有することが示された。結合定数から β -D-グルコースのアノメリックプロトンと帰属出来るプロトンシグナル [δ_{H} 4.95 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1'), 5.10 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1)] はいずれも HMBC スペクトルにおいて、芳香族炭素 [δ_{C} 158.8 (C-8'), 156.0 (C-8)] と相関を示す。この芳香族炭素はメタカップリングした芳香族プロトンからのロングレンジ相関も認めることから、グルコースの結合位置をアグリコンの C-8', C-8 位に決定した。また、アピオスのアノメリックプロトン [δ_{H} 5.00 (d, $J = 2$ Hz, Api-1,1')] が、グルコース 6 位炭素 [δ_{C} 68.6 (C-6), 68.5 (C-6')] と相関を示したことから、**2** (makluoside B) の構造を 8,8'-di-*O*-6- β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl-6,6'-dimethyl-2,3'-binaphthalene-1-ol-1',4'-dione と決定した。化合物 **2** の構造と主要な HMBC 相関を Fig. 4 に示す。NMR スペクトルデータは Table 6 に示す。各種 NMR チャートは巻末に Fig. S6–10 として掲載した。

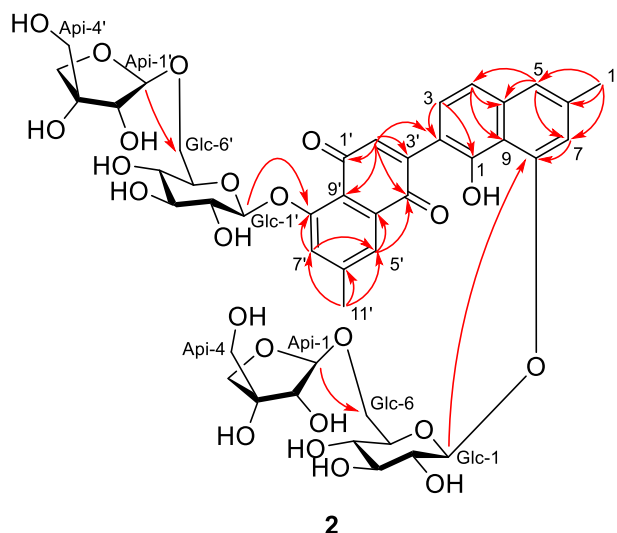


Fig. 4 Key HMBC correlations of **2**

化合物 **3** は、HRFABMS の分子イオンピーク m/z 337.1286 [$\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd 337.1287) から $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_7$ の分子式を有する黄色無晶系物質として得られた。本化合物の ^1H NMR スペクトルでは、1 組のメタカップリングしたプロトン [δ_{H} 7.21 (brs, H-2), 7.29 (brs, H-4)], オルト、メ

タカップリングした 3 つのプロトン [δ_{H} 6.72 (dd, $J = 7, 1$ Hz, H-7), 7.20 (dd, $J = 7, 1$ Hz, H-5), 7.25 (t, $J = 7$ Hz, H-6)], シングレットメチル [δ_{H} 2.43 (s, H-11)], アノメリックプロトン [δ_{H} 5.09 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1)] 由来のシグナルが観測された。 ^{13}C NMR では 1 本のメチル基炭素, 10 本の芳香族炭素, 6 本の糖由来のシグナルが観測された。これらのデータは **3** がナフタレン誘導体であることを示唆している。本化合物は糖部分に β -D-グルコースを持つことが酸加水分解の結果, 明らかとなった。化合物 **3** の HMBC スペクトルで酸素官能基が結合した芳香族炭素 [δ_{C} 155.7 (C-1)] は, メチル炭素 (δ_{C} 21.8) と相関を示す高磁場側のメタカップリング芳香族プロトン [δ_{H} 7.21 (brs, H-2)] およびグルコースアノメリックプロトン [δ_{H} 5.09 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1)] と相関を示した。また, メチルプロトン [δ_{H} 2.43 (s, H-11)] とロングレンジ相関の見られる芳香族炭素 [δ_{C} 123.6 (C-4)] は, オルト, メタカップリングした芳香族プロトン [δ_{H} 7.20 (dd, $J = 7, 1$ Hz, H-5)] とも HMBC スペクトル上で相関を示したことから, **3** (makluoside C) の構造を 1-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-methyl-naphthalene-8-ol と決定した。化合物 **3** の NMR スペクトルデータを Table 7 に示す。化合物 **3** の各種 NMR チャートは巻末に Fig. S11–15 として掲載した。

化合物 **4** と **5** は褐色無晶系物質として得られ, HRFABMS で **4**: m/z 491.1531 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for 491.1529) および **5**: 468.1643 [M] $^+$ (calcd 468.1632) のシグナルを観察したことから分子式をいずれも $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ と決定した。両化合物の ^1H , ^{13}C NMR データは化合物 **3** のそれらと非常によく似ており, アグリコンは 3-methyl-1,8-naphthalenediol と推定した。また **4**, **5** の NMR スペクトルでは, **3** と比較して新たに 1 つのアノメリックプロトン, 炭素シグナル [**4**: δ_{H} 4.32 (d, $J = 7$ Hz, Xyl-1), δ_{C} 105.8; **5**: δ_{H} 5.00 (d, $J = 2$ Hz, Api-1, δ_{C} 110.7)] が観測され, 酸加水分解によって **4** が D-キシロース, **5** が D-アピオースを有することが示された。それらのアノマー中心は ^1H NMR の結合定数から β 配置と決定した。化合物 **4**, **5** の HMBC スペクトルではグルコースのアノメリックプロトン [**4**: δ_{H} 5.07 (d, $J = 8$ Hz); **5**: δ_{H} 5.05 (d, $J = 8$ Hz)] とアグリコンの C-1 [**4**: δ_{C} 155.5; **5**: δ_{C} 155.4] 間に相関が観察され, またもう一つの糖のアノメリックプロトン [**4**: δ_{H} 4.32 (d, $J = 7$ Hz, Xyl-1); **5**: δ_{H} 5.00 (d, $J = 2$ Hz, Api-1)] とグルコース [**4**: δ_{C} 70.6 (Glc-6); **5**: δ_{C} 68.4 (Glc-6)] にも相関が確認されたことから, **4** (makluoside D) の構造を 1-*O*-6- β -D-xylopyranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-methyl-naphthalene-8-ol, **5** (makluoside E) を 1-*O*-6- β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl-3-methyl-naphthalene-8-ol と決定した。化合物 **4** の構造と主要な HMBC 相関を Fig. 5 に示す。化合物 **4** と **5** の NMR スペクトルデータは Table 7 に示す。化合物 **4** と **5** の各種 NMR チャートは巻末に Fig. S16–25 として掲載した。

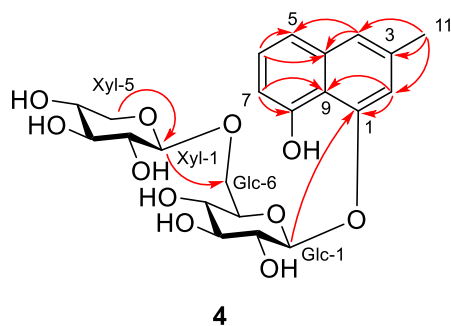


Fig. 5 Key HMBC correlations of **4**

2-2-2 既知ナフトキノン配糖体の同定

化合物 **6** と **7** はいずれも褐色無晶系物質として得られた。両化合物共に、化合物 **1** とよく類似した diospyrol の配糖体の特徴的な NMR スペクトルデータを与えた。酸加水分解によって化合物 **6** は D-glucose と D-apiose を 1 : 1 で、化合物 **7** は 2 : 1 の存在比で確認した。HMBC スペクトルデータより、グルコースのアノメリックプロトン [**6**: δ_{H} 5.10 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1,1'), **7**: δ_{H} 5.10 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1), 5.14 (d, $J = 8$ Hz, Glc-1')] とアグリコンの C-8, 8' (**6**: δ_{C} 155.8, **7**: δ_{C} 155.7, 155.8), さらにアピオースアノメリックプロトン [**6**: δ_{H} 4.99 (d, $J = 2$ Hz, Api-1), **7**: δ_{H} 4.99 (d, $J = 2$ Hz, Api-1)] とグルコース 6 位炭素 (**6**: δ_{C} 68.5, **7**: δ_{C} 68.5) 間に相関を確認した。文献値と ^1H , ^{13}C NMR スペクトルデータの比較を行い、**6** を diospyrol 8,8'-di-*O*-(6- β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranoside), ²¹⁾ **7** を diospyrol 8-*O*-(β -D-apiofuranosyl-1-*O*- β -D-glucopyranosyl)-8'-*O*- β -D-glucopyranoside と同定した。²²⁾ 化合物 **6**, **7** の NMR スペクトルデータを Table 8 に示す。

Table 6 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **1** and **2** in CD_3OD

Position	1			2		
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1		151.6			153.3	
2		121.4			135.0	
3	7.37 (d, 8.5)	132.1	1, 2, 10, 2'	7.28 (d, 8.5)	129.4	1, 2, 10
4	7.26 (d, 8.5)	118.8	2, 5, 9, 10	7.30 (d, 8.5)	119.5	9, 10
5	7.32 (brs)	123.7	4, 9, 10, 11	7.35 (brs)	123.7	4, 7, 10, 11
6		137.1			138.6	
7	7.18 (brs)	114.0	5, 8, 9, 11	7.24 (brs)	114.6	5, 8, 11
8		155.7			156.0	
9		115.3			114.6	
10		137.7			139.0	
11	2.47 (s)	22.0	5, 6, 7	2.49 (s)	22.0	5, 6, 7
1'		151.6			185.5	
2'		121.4		7.00 (s)	135.4	2, 1', 3', 4', 9'
3'	7.37 (d, 8.5)	132.2	2, 1', 2', 10'		152.3	
4'	7.26 (d, 8.5)	118.9	2', 5', 9', 10'		186.3	
5'	7.32 (brs)	123.8	4', 9', 10', 11'	7.67 (brs)	122.7	4', 7', 10', 11'
6'		137.1			148.1	
7'	7.18 (brs)	114.4	5', 8', 9', 11'	7.54 (brs)	125.4	5', 8', 11'
8'		155.8			158.8	
9'		115.5			117.0	
10'		137.7			121.1	
11'	2.47 (s)	22.0	5', 6', 7'	2.52 (s)	22.2	5', 6', 7'
Glc-1	5.12 (d, 8)	104.4	8	5.10 (d, 8)	104.0	8
2	3.54 (overlapped)	75.0		3.56 (overlapped)	74.8	Glc-1
3	3.47 (t, 9)	78.1		3.67 (t, 9)	77.5	Glc-1, 2, 4
4	3.48 (t, 9)	70.9	Glc-2	3.40 (t, 9)	71.4	Glc-3, Glc-5
5	3.65 (overlapped)	77.1		3.50 (t, 9)	77.3	
6	3.98 (brd, 10)	67.3	Api-1	3.65 (overlapped)	68.6	Api-1
	3.59 (brd, 10)			4.06 (brd, 9)		

Api-1	4.95 (d, 2)	110.4	Glc-6, Api-3, 5	5.00 (d, 2)	110.9	Glc-6, Api-5
2	4.13 (d, 2)	78.2		3.93 (d, 2)	78.0	
3		79.8			80.5	
4	3.37 (d, 10) 3.90 (d, 10)	73.3	Api-3, Xyl-1	3.59 (s)	65.6	Api-2, 3, 5
5	3.79 (d, 10) 3.96 (d, 10)	75.0	Api-4	3.76 (d, 9) 3.99 (d, 9)	75.0	Api-1, 2, 3, 4
Xyl-1	4.09 (d, 7)	105.3	Api-4			
2	3.16 (dd, 9, 7)	74.9	Xyl-1, 3			
3	3.26 (t, 9)	77.6	Xyl-2			
4	3.43 (m)	71.4				
5	3.13 (dd, 11.5, 10) 3.84 (dd, 11.5, 5.5)	67.0	Xyl-1,4			
Glc-1'	5.14 (d, 8)	104.8	8'	4.95 (d, 8)	104.3	8'
2'	3.54 (overlapped)	75.0		3.60 (overlapped)	74.9	Glc-1'
3'	3.47 (t, 9)	78.2		3.67 (t, 9)	77.5	Glc-1', 2', 4'
4'	3.48 (t, 9)	71.2	Glc-2', 3', 6'	3.39 (t, 9)	71.4	Glc-3', 5'
5'	3.60 (overlapped)	77.4		3.48 (t, 9)	77.3	
6'	4.06 (d, 9) 3.67 (overlapped)	68.4	Api-1'	3.65 (overlapped) 4.08 (brd, 9)	68.5	Api-1'
Api-1'	5.00 (d, 2)	110.8	Glc-6', 3', 5'	5.00 (d, 2)	110.9	Glc-6', Api-5'
2'	3.94 (d, 2)	78.1		3.95 (d, 2)	78.1	
3'		80.6			80.5	
4'	3.55 (s)	65.6	Api-2', 3', 5'	3.57 (s)	65.7	Api-2', 3', 5'
5'	3.72 (d, 9.5) 3.94 (d, 9.5)	74.9	Api-1', 2'	3.74 (d, 9) 3.97 (d, 9)	75.0	Api-1', 2', 3', 4'

Table 7 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **3–5** in CD_3OD

Position	3			4		
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1		155.7			155.5	
2	7.21 (brs)	113.9	1, 4, 9, 11	7.20 (brs)	113.8	1, 4, 9, 11
3		137.2			137.3	
4	7.29 (brs)	123.6	2, 5, 10, 11	7.29 (brs)	123.6	2, 5, 10, 11
5	7.20 (dd, 7, 1)	119.6	4, 7, 9, 10	7.19 (dd, 8, 1)	119.6	4, 7, 9, 10
6	7.25 (t, 7)	128.4	5, 8, 10	7.25 (t, 8)	128.4	5, 8, 10
7	6.72 (dd, 7, 1)	110.9	5, 8, 9	6.72 (dd, 8, 1)	110.8	5, 8, 9
8		155.0			155.0	
9		115.2			115.1	
10		138.4			138.4	
11	2.43 (s)	21.8	2, 3, 4	2.45 (s)	21.9	2, 3, 4
Glc-1	5.09 (d, 8)	104.5	1	5.07 (d, 8)	104.3	1
2	3.56 (dd, 9, 8)	75.2	Glc-1, 3	3.55 (dd, 9, 8)	75.0	Glc-1, 3
3	3.52 (t, 9)	78.9	Glc-2, 4	3.49 (t, 9)	78.1	Glc-2, 4
4	3.42 (t, 9)	71.5	Glc-3, 5, 6	3.41 (t, 9)	71.5	Glc-3, 6
5	3.54 (m)	78.3	Glc-4	3.75 (m)	77.7	Glc-1, 4
6	3.74 (dd, 12, 5)	62.6		3.85 (d, 12)	70.6	Glc-5, Xyl-1
	3.96 (dd, 12, 2)			4.14 (dd, 12, 2)		
Xyl-1				4.32 (d, 7)	105.8	Glc-6
2				3.23 (m)	75.1	Xyl-1, 3
3				3.28 (t, 12)	77.7	Xyl-2, 4
4				3.48 (m)	71.2	
5				3.17 (dd, 12, 10)	66.9	Xyl-1, 3, 4
				3.86 (d, 12)		

Table 7 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **3–5** in CD_3OD (continued)

Position	5		
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC (H to C)
1		155.4	
2	7.18 (d, 1)	113.8	1, 4, 9, 11
3		137.1	
4	7.29 (brs)	123.4	2, 5, 10, 11
5	7.20 (dd, 8, 1)	119.4	4, 7, 9, 10
6	7.25 (t, 8)	128.2	5, 8, 10
7	6.72 (dd, 8, 1)	110.7	5, 8, 9
8		154.8	
9		115.0	
10		138.2	
11	2.45 (s)	21.8	2, 3, 4
Glc-1	5.05 (d, 8)	104.3	1
2	3.54 (dd, 9, 8)	74.9	Glc-1, 3
3	3.48 (t, 9)	78.0	Glc-2, 4, 5
4	3.40 (m)	71.4	Glc-3, 5, 6
5	3.65 (m)	77.3	Glc-6
6	4.07 (dt, 10, 4) 3.65 (m)	68.4	Glc-4, 5, Api-1
Api-1	5.00 (d, 2)	110.7	Glc-6, Api-3, 5
2	3.94 (d, 2)	77.9	Api-1, 4
3		80.4	
4	3.58 (s)	65.5	Api-2, 3, 5
5	3.97 (d, 10) 3.75 (d, 10)	74.9	Api-1, 2, 3, 4

Table 8 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **6** and **7** in CD_3OD

Position	6		Reported		7		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		151.6		151.6		151.6		151.5
2		121.4		121.5		121.4		121.4
3	7.37 (d, 8.5)	132.1	7.37 (d, 8.4)	132.1	7.38 (d, 8.5)	132.2	7.38 (d, 8.5)	132.1
4	7.26 (d, 8.5)	118.9	7.24 (d, 8.4)	118.9	7.25 (d, 8.5)	118.9	7.25 (d, 8.5)	118.9
5	7.32 (brs)	123.7	7.31 (brs)	123.7	7.32 (brs)	123.7	7.32 (brs)	123.6
6		137.0		137.0		137.1		137.0
7	7.19 (brs)	114.1	7.19 (brs)	114.1	7.20 (brs)	114.0	7.20 (brs)	114.0
8		155.8		155.8		155.7		155.8
9		115.4		115.4		115.3		115.3
10		137.8		137.8		137.8		137.3
11	2.47 (s)	22.0	2.47 (s)	22.0	2.49 (s)	21.8	2.47 (s)	21.8
1'		151.6		151.6		151.6		151.7
2'		121.4		121.4		121.4		121.4
3'	7.37 (d, 8.5)	132.1	7.37 (d, 8.4)	132.1	7.38 (d, 8.5)	132.2	7.38 (d, 8.5)	132.1
4'	7.26 (d, 8.5)	118.9	7.24 (d, 8.4)	118.9	7.25 (d, 8.5)	118.9	7.25 (d, 8.5)	118.9
5'	7.32 (brs)	123.7	7.31 (brs)	123.7	7.32 (brs)	123.8	7.32 (brs)	123.7
6'		137.0		137.0		137.1		137.1
7'	7.19 (brs)	114.1	7.19 (brs)	114.1	7.23 (brs)	114.4	7.23 (brs)	114.1
8'		155.8		155.8		155.8		155.8
9'		115.4		115.4		115.5		115.4
10'		137.8		137.8		137.7		137.3
11'	2.47 (s)	22.0	2.47 (s)	22.0	2.49 (s)	22.0	2.45 (s)	22.0
Glc-1	5.10 (d, 8)	104.5	5.09 (d, 7.5)	104.5	5.10 (d, 8)	104.6	5.10 (d, 8)	104.6
2	3.54 (t, 8)	75.0	3.54 (t, 8)	75.0	3.48 (t, 9)	75.1	3.48 (t, 9)	75.0
3	3.47 (t, 9)	78.2	3.47 (t, 9)	78.1	3.49 (t, 9)	78.2	3.49 (t, 9)	78.1
4	3.39 (t, 9)	71.5	3.39 (t, 9)	71.4	3.39 (t, 9)	71.4	3.39 (t, 9)	71.5
5	3.64 (overlapped)	77.4	3.65 (m)	77.4	3.64 (m)	77.5	3.64 (m)	77.4
6	4.06 (m)	68.5	4.06 (m)	68.4	3.66 (m)	68.5	3.66 (m)	68.4
	3.65 (overlapped)		3.65 (m)		4.06 (m)		4.06 (m)	

Api-1	4.99 (d, 2)	110.9	4.98 (d, 2.4)	110.8	4.99 (d, 2)	110.9	4.99 (d, 2)	110.9
2	3.93 (d, 2)	78.2	3.96 (d, 2.4)	78.2	3.93 (d, 2)	78.3	3.93 (d, 2)	78.2
3		80.6		80.6		80.6		80.6
4	3.54 (s)	65.7	3.56 (s)	65.9	3.54 (s)	65.7	3.54 (s)	65.7
5	3.72 (d, 10)	75.0	3.72 (d, 9.8)	75.0	3.72 (d, 9)	75.0	3.72 (d, 9)	75.0
	3.93 (d, 10)		3.95 (d, 9.8)		3.94 (d, 9)		3.94 (d, 9)	
Glc-1'	5.10 (d, 8)	104.5	5.09 (d, 7.5)	104.5	5.14 (d, 8)	104.7	5.14 (d, 8)	104.6
2'	3.54 (t, 8)	75.0	3.54 (t, 8)	75.0	3.53 (t, 9)	75.1	3.53 (t, 9)	75.0
3'	3.47 (t, 9)	78.2	3.47 (t, 9)	78.1	3.53 (t, 9)	78.8	3.53 (t, 9)	78.2
4'	3.39 (t, 9)	71.5	3.39 (t, 9)	71.4	3.40 (t, 9)	71.5	3.40 (t, 9)	71.3
5'	3.64 (overlapped)	77.4	3.65 (m)	77.4	3.49 (t, 9)	78.2	3.49 (t, 9)	78.8
6'	4.06 (m)	68.5	4.06 (m)	68.4	3.73 (m)	62.6	3.73 (m)	62.4
	3.65 (overlapped)		3.65 (m)		3.95 (overlapped)		3.95 (overlapped)	
Api-1'	4.99 (d, 2)	110.9	4.98 (d, 2.4)	110.8				
2'	3.93 (d, 2)	78.2	3.96 (d, 2.4)	78.2				
3'		80.6		80.6				
4'	3.54 (s)	65.7	3.56 (s)	65.9				
5'	3.72 (d, 10)	75.0	3.72 (d, 9.8)	75.0				
	3.93 (d, 10)		3.95 (d, 9.8)					

2-3 トリテルペン類の同定

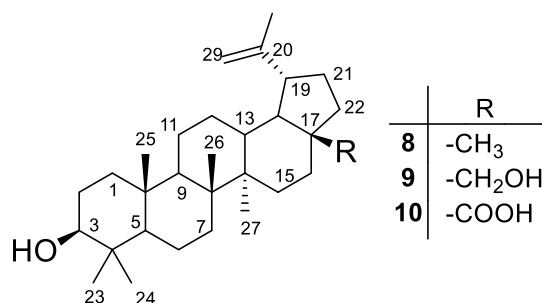


Fig. 6 Structures of 8–10

Lupeol (8)

化合物 **8** は無色無晶系物質として得られた。本化合物の ¹H NMR のスペクトルではトリテルペン 3 位に特徴的なカルビノールプロトンシグナル [δ_{H} 3.16 (dd, $J = 10, 6$ Hz)], 7 本のシングレットメチルシグナル (δ_{H} 0.74, 0.76, 0.80, 0.92, 0.94, 1.00, 1.66), エキシメチレン由来のシグナル (δ_{H} 4.54, 4.66) を認めた。また ¹³C NMR スペクトルでは 30 本のシグナルを観測したことから lupeol と推定し、文献と ¹H, ¹³C NMR スペクトルデータの比較を行い,³⁴⁾ lupeol と同定した。本化合物の構造を Fig. 6 に、NMR スペクトルデータを Table 9 に示す。

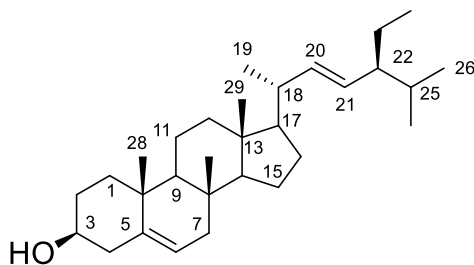
Betulin (9), betulinic acid (10)

化合物 **9**, **10** はいずれも無色無晶系物質として得られた。両化合物共に **8** と良く似た NMR スペクトルデータを与えた。¹H NMR では 6 本のシングレットメチルシグナル (**9**: δ_{H} 0.76, 0.82, 0.97, 0.98, 1.02, 1.66, **10**: δ_{H} 0.76, 0.83, 0.94, 0.96, 0.98, 1.69), カルビノールプロトンシグナル [**9**: δ_{H} 3.18 (dd, $J = 10, 5$ Hz, H-3), **10**: δ_{H} 3.19 (dd, $J = 10, 5$ Hz, H-3)], 2 本のエキシメチレンシグナル [**9**: δ_{H} 4.54 (d, $J = 2$ Hz), 4.66 (d, $J = 2$ Hz), **10**: δ_{H} 4.61 (d, $J = 2$ Hz), 4.74 (d, $J = 2$ Hz)] が認められたことに加え、¹³C NMR で 30 本のシグナルが確認された。化合物 **8** の ¹H NMR スペクトルで δ 0.8 付近に 3 本認められたメチルシグナルは、**9**, **10** では 2 本観察された。一方で、**9** ではオキシメチレンシグナル [δ_{H} 3.33 (d, $J = 10$ Hz, H-28), 3.79 (dd, $J = 10, 2$ Hz, H-28), δ_{C} 60.6), **10** ではカルボニル炭素シグナル (δ_{C} 180.7) を認めたことから、各種スペクトルデータの文献値との比較を行い、**9** を betulin,³⁵⁾ **10** を betulinic acid と同定した。³⁶⁾ 化合物 **9**, **10** の構造を Fig. 6 に示す。化合物 **9** の NMR スペクトルデータを Table 9 に、**10** の NMR スペクトルデータを Table 10 に示す。

Stigmasterol (11)

化合物 **11** は無色無晶系物質として得られた。¹H NMR スペクトルでは、シングレットメチルシグナル 2 つ (δ_{H} 0.63, 0.94), ダブルレットメチルシグナル 3 つ [δ_{H} 0.73 (d, $J = 7$ Hz), 0.78 (d, $J = 7$ Hz), 0.95 (d, $J = 7$ Hz)], トリプレットメチルシグナル 1 つ [δ_{H} 0.73 (t, $J = 8$ Hz)]

を確認した。また、オレフィンプロトンシグナル 3 本 [δ_{H} 4.96 (m, H-20), 5.08 (m, H-21), 5.28 (m, H-6)] を確認した。 ^{13}C NMR で 29 本のシグナルを認めたことから, stigmasterol と考え ^1H , ^{13}C NMR を文献と比較し, stigmasterol と同定した。³⁷⁾ 本化合物の構造を Fig. 7 に, NMR スペクトルデータを Table 10 に示す。

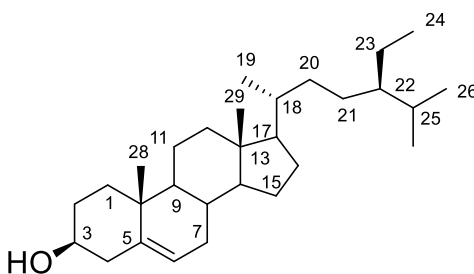


11

Fig. 7 Structure of stigmasterol (11)

β -Sitosterol (12)

化合物 12 は無色無晶系物質として得られた。 ^1H NMR スペクトルでシングレットメチルシグナル 2 つ (δ_{H} 0.67, 1.00), ダブルレットメチルシグナル 3 つ [δ_{H} 0.81 (d, $J = 7$ Hz), 0.83 (d, $J = 7$ Hz), 0.91 (d, $J = 7$ Hz)], トリプレットメチルシグナル 1 つ [δ_{H} 0.84 (t, $J = 7$ Hz)] を確認した。またオレフィンプロトンシグナルを 1 つ [δ_{H} 5.35 (m, H-6)] 確認した。 ^{13}C NMR で 29 本のシグナルを認めたため, β -sitosterol と考え, NMR データの文献値との比較を行い, β -sitosterol と同定した。³⁸⁾ 本化合物の構造を Fig. 8 に, NMR スペクトルデータを Table 11 に示す。



12

Fig. 8 Structure of β -sitosterol (12)

Lupenone (13)

化合物 13 は無色無晶系物質として得られた。本化合物の ^1H NMR スペクトルは lupeol (8) と似た 7 つのシングレットメチル (δ_{H} 0.79, 0.93, 0.95, 1.03, 1.07, 1.07, 1.69), エキソメチレン [δ_{H} 4.50, 4.63 (brs, H-29)] の存在を示すが, lupeol 3 位のカルビノールプロトンシグナルが消失し, ^{13}C NMR スペクトルでカルボニル炭素の存在 (δ_{C} 218.2) を確認した。各種スペクトルデータを文献値と比較して lupenone と同定した。³⁹⁾

本化合物の構造を Fig. 9 に, NMR スペクトルデータを Table 11 に示す.

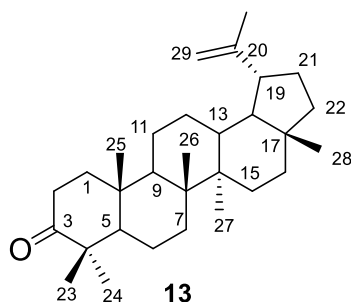


Fig. 9 Structure of lupenone (13)

Lupeol caffeate (14)

化合物 **14** は淡緑色無晶系物質として得られた. その ^1H NMR では, 7本のシングレットメチルシグナル (δ_{H} 0.79, 0.88, 0.88, 0.91, 0.96, 1.04, 1.69), 3位のオキシメチンプロトンシグナル (δ_{H} 4.60, m), エキソメチレンプロトンシグナル [δ_{H} 4.57 (d, $J=2$ Hz), 4.69 (d, $J=2$ Hz)] に加え, 3置換ベンゼンのシグナル [δ_{H} 6.87 (d, $J=8$ Hz), 7.00 (d, $J=8$ Hz), 7.12 (s)] およびトランスオレフィンプロトンシグナル [δ_{H} 6.26 (d, $J=16$ Hz), 7.56 (d, $J=16$ Hz)] を確認したことから lupeol 誘導体が示唆された. さらに, ^{13}C NMR では 39本のシグナルの存在が示されたことから, 本化合物のスペクトルデータを文献値と比較し, lupeol caffeate と同定した.⁴⁰⁾

文献に記載のなかったエキソメチレンプロトンシグナル [δ_{H} 4.57 (d, $J=2$ Hz), 4.69 (d, $J=2$ Hz)] は類縁化合物の lupeol (**8**) の値 [δ_{H} 4.54 (d, $J=2$ Hz), 4.66 (d, $J=2$ Hz)] と, トランスオレフィンプロトンシグナル [δ_{H} 6.26 (d, $J=16$ Hz), 7.56 (d, $J=16$ Hz)] は betulin 3-caffeate のスペクトルデータ [δ_{H} 6.24 (d, $J=16.2$ Hz), 7.56 (d, $J=16.2$ Hz)] と比較し帰属した.³⁵⁾ 本化合物の構造を Fig. 10 に, NMR スペクトルデータを Table 12 に示す.

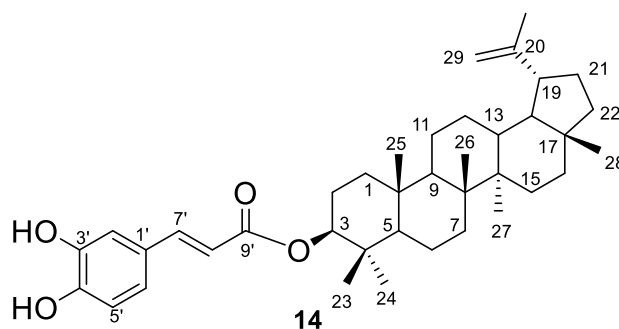


Fig. 10 Structure of lupeol caffeate (14)

Table 9 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **8** and **9** in CDCl_3

Position	8		Reported		9		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		38.7		38.0		38.9		38.9
2		27.4		27.4		27.5		27.5
3	3.16 (dd, 10, 6)	79.0	3.18 (dd, 9.6, 6.2)	78.0	*3.18 (dd, 10, 5)	79.1	3.18 (dd, 5.3)	79.2
4		38.8		38.7		38.8		38.8
5		55.2		55.3		55.4		55.4
6		18.3		18.3		18.4		18.4
7		34.2		34.0		34.3		34.3
8		40.8		40.1		41.0		41.0
9		50.4		50.4		50.5		50.5
10		37.1		37.7		37.4		37.4
11		20.9		20.9		20.9		20.9
12		25.1		25.1		25.3		25.3
13		38.0		38.0		37.2		37.2
14		42.8		42.8		42.8		42.8
15		27.4		27.4		27.1		27.1
16		35.5		35.6		29.2		29.2
17		43.0		42.8		47.9		47.9
18		48.3		48.2		47.9		47.9
19		48.0		48.0		48.8		48.8
20		151.0		150.8		150.6		150.6
21		29.8		28.5		29.8		29.8
22		40.0		40.0		34.1		34.1
23	0.76 (s)	28.0	0.77 (s)	28.1	0.76 (s)	28.1	0.75 (s)	28.1
24	0.80 (s)	15.4	0.81 (s)	15.4	0.82 (s)	15.4	0.80 (s)	15.4
25	0.92 (s)	16.1	0.90 (s)	16.1	0.97 (s)	16.2	0.96 (s)	16.2
26	0.94 (s)	15.9	0.94 (s)	15.9	0.98 (s)	16.1	0.97 (s)	16.1
27	1.00 (s)	14.5	1.03 (s)	14.6	1.02 (s)	14.8	0.99 (s)	14.8
28	0.74 (s)	18.0	0.74 (s)	18.0	3.33 (d, 10)	60.6	3.33 (d, 11)	60.6
					3.79 (dd, 10, 2)		3.79 (d, 11)	
29	4.54 (d, 2)	109.3	4.57 (d, 0.4)	109.3	4.54 (d, 2)	109.8	4.58 (d)	109.8
	4.66 (d, 2)		4.67 (dq, 0.4, 0.5)		4.66 (d, 2)		4.70 (d)	
30	1.66 (s)	19.3	1.66 (s)	19.4	1.66 (s)	19.2	1.67 (s)	19.2

*文献中に一部結合定数のデータが確認できなかったため、類縁化合物のデータと比較し同定した。

Table 10 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **10** and **11** in CDCl_3

Position	10		Reported		11		Reported	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1		38.9		38.7		37.4		37.4
2		27.4		27.4		32.0		32.0
3	3.19 (dd, 10, 5)	79.0	3.21 (dd, 11.2, 5)	79.0	3.51 (m)	71.9	3.51 (m)	71.9
4		38.8		38.8		42.4		42.4
5		55.3		55.3		140.8		140.8
6		18.2		18.2	5.28 (m)	121.8	5.28 (m)	121.8
7		34.3		34.3		31.8		31.8
8		40.7		40.7		32.0		32.0
9		50.5		50.5		50.2		50.2
10		37.2		37.2		36.6		36.6
11		20.9		20.8		21.2		21.2
12		25.5		25.5		39.8		39.8
13		38.4		38.4		42.3		42.3
14		42.5		42.4		57.0		57.0
15		29.4		29.7		24.4		24.4
16		32.1		32.1		29.0		29.0
17		56.2		56.3		56.0		56.0
18		49.3		49.3		40.6		40.6
19		46.9		46.9	0.95 (d, 7)	21.3	0.95 (d, 7)	21.3
20		150.4		150.3	4.96 (m)	138.4	4.96 (m)	138.4
21		29.7		30.5	5.08 (m)	129.4	5.08 (m)	129.4
22		37.0		37.0		51.3		51.3
23	0.96 (s)	28.0	0.99 (s)	27.9		25.5		25.5
24	0.76 (s)	15.3	0.78 (s)	15.3	0.73 (t, 8)	12.1	0.73 (t, 8)	12.1
25	0.83 (s)	16.1	0.85 (s)	16.1		32.0		32.0
26	0.94 (s)	16.0	0.96 (s)	16.0	0.78 (d, 7)	21.2	0.78 (d, 7)	21.2
27	0.98 (s)	14.8	1.00 (s)	14.7	0.73 (d, 7)	19.5	0.73 (d, 7)	19.5
28		180.7		180.7	0.94 (s)	19.1	0.94 (s)	19.1
29	4.61 (d, 2) 4.74 (d, 2)	109.7	4.64 (d, 2) 4.77 (d, 2)	109.6	0.63 (s)	12.3	0.63 (s)	12.3
30	1.69 (s)	19.4	1.71 (s)	19.3				

Table 11 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **12**, **13** in CDCl_3

Position	12		Reported		13		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		37.3		37.5		39.6		39.6
2		31.7		31.9		34.2		34.1
3	3.52 (m)	71.8	3.53 (tdd, 4.5, 4.2, 3.8)	72.0		218.2		218.2
4		42.3		42.5		47.3		47.2
5		140.8		140.9		55.0		54.9
6	5.35 (m)	121.7	5.36 (t, 6.4)	121.9		19.7		19.6
7		31.9		32.1		33.6		33.5
8		31.9		32.1		40.8		40.7
9		50.2		50.3		49.8		49.8
10		36.5		36.7		36.9		36.8
11		21.1		21.3		21.5		21.4
12		39.8		39.9		25.1		25.1
13		42.3		42.6		38.2		38.1
14		56.8		56.9		42.9		42.8
15		26.1		26.3		27.4		27.4
16		28.3		28.5		35.5		35.5
17		56.1		56.3		43.0		42.9
18		36.2		36.3		48.0		47.9
19	0.91 (d, 7)	19.0	0.93 (d, 6.5)	19.2		48.2		48.2
20		34.0		34.2		150.9		150.8
21		26.1		26.3		29.8		29.8
22		45.9		46.1		40.0		39.9
23		23.1		23.3	1.07 (s)	26.7	1.07 (s)	26.6
24	0.84 (t, 7)	12.0	0.84 (t, 7.2)	12.2	1.03 (s)	21.1	1.02 (s)	20.9
25		29.2		29.4	1.07 (s)	15.8	1.07 (s)	15.7
26	0.83 (d, 7)	19.8	0.83 (d, 6.4)	20.1	0.93 (s)	16.0	0.93 (s)	15.9
27	0.81 (d, 7)	19.4	0.81 (d, 6.4)	19.6	0.95 (s)	14.5	0.97 (s)	14.4
28	0.67 (s)	18.8	0.68 (s)	19.0	0.79 (s)	18.0	0.78 (s)	17.9
29	1.0 (s)	11.9	1.0 (s)	12.0	4.50 (brs)	109.4	4.50 (brs)	109.5
					4.63 (brs)		4.63 (brs)	
30					1.69 (s)	19.3	1.69 (s)	19.2

Table 12 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **14** in CDCl_3

Position	14		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		38.4		38.4
2		23.9		23.9
3	4.60 (m)	81.5	4.60 (m)	81.0
4		38.1		38.1
5		55.4		55.4
6		18.2		18.2
7		34.2		34.2
8		40.9		40.9
9		50.4		50.3
10		37.1		37.1
11		21.0		21.0
12		25.1		25.1
13		38.1		38.1
14		42.9		42.9
15		27.5		27.4
16		35.6		35.6
17		43.0		43.0
18		48.3		48.3
19		48.0		48.0
20		151.0		151.0
21		29.9		29.9
22		40.0		40.0
23	0.91 (s)	28.0	0.90 (s)	28.0
24	0.96 (s)	16.7	0.95 (s)	16.7
25	0.88 (s)	16.0	0.88 (s)	16.0
26	0.88 (s)	16.2	0.88 (s)	16.2
27	0.79 (s)	14.6	0.79 (s)	14.6
28	1.04 (s)	18.0	1.04 (s)	18.0
29	*4.57 (d, 2)	109.4	-	109.4
	*4.69 (d, 2)		-	
30	1.69 (s)	19.3	1.69 (s)	19.3
1'		127.5		127.1
2'	7.12 (s)	115.4	7.09 (s)	115.1
3'		144.8		144.9
4'		146.5		147.3
5'	7.00 (d, 8)	114.4	6.96 (d, 7.6)	113.9
6'	6.87 (brd, 8)	122.3	6.86 (brd, 7.6)	122
7'	*7.56 (d, 16)	143.9	7.54 (d, 15.5)	144.9
8'	*6.26 (d, 16)	116.1	-	115.7
9'		167.9		167.7

*文献中にデータが確認できなかったため、類縁化合物のデータと比較し帰属した。

2-4 リグナン類の同定

Pinoresinol (15)

化合物 **15** は無色無晶系物質として得られた。NMR スペクトルで 3 置換ベンゼン由来プロトンシグナル [δ_{H} 6.82 (2H, dd, $J = 8, 2$ Hz), 6.89 (2H, d, $J = 8$ Hz), 6.90 (2H, d, $J = 2$ Hz)], オキシメチン [δ_{H} 4.74 (2H, d, $J = 4$ Hz), δ_{C} 85.9], オキシメチレン [δ_{H} 3.88 (2H, dd, $J = 9, 4$ Hz), 4.25 (2H, dd, $J = 9, 7$ Hz), δ_{C} 71.7], メチン [δ_{H} 3.10 (2H, m), δ_{C} 54.2] シグナルおよびメトキシシグナル [δ_{H} 3.91 (6H, s), δ_{C} 56.0] を確認したことから、フロフランリグナンの pinoresinol と推定し、文献との比較の結果同定した。⁴¹⁾ 本化合物の構造を Fig. 11 に、NMR スペクトルデータを Table 13 に示す。

Syringaresinol (16)

化合物 **16** は無色無晶系物質として得られた。¹H NMR で 1 本の芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 6.59 (4H, s)], メトキシ基由来のシグナル [δ_{H} 3.90 (12H, s)] に加えてフロフランリグナンに特徴的なオキシメチン [δ_{H} 4.73 (2H, d, $J = 5$ Hz, H-7,7')], オキシメチレン [δ_{H} 3.91 (2H, overlapped, H-9a, 9'a), 4.29 (2H, dd, $J = 9, 7$ Hz, H-9b, 9'b)], メチンプロトンシグナル [δ_{H} 3.09 (1H, m, H-8, 8')] が確認されたことから syringaresinol と推定し、文献との比較で同定した。⁴²⁾ 本化合物の構造を Fig. 11 に、NMR スペクトルデータを Table 13 に示す。

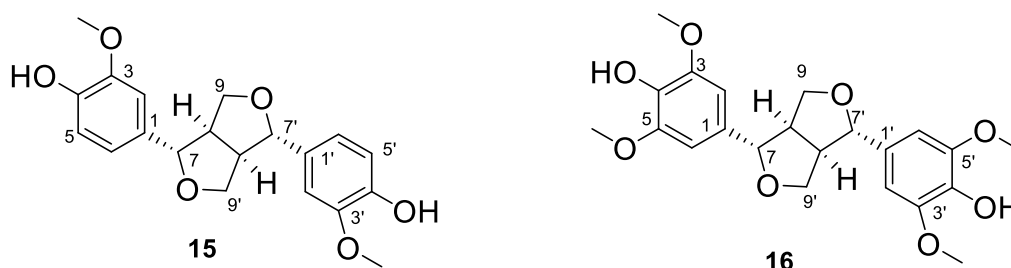


Fig. 11 Structure of pinoresinol (15) and syringaresinol (16)

Table 13 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **15**, **16** in CDCl_3

Position	15		Reported		16		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1, 1'		132.9		132.9		132.1		132.1
2, 2'	6.90 (d, 2)	108.6	6.89 (d, 1.5)	108.7	6.59 (s)	102.7	6.58 (s)	102.7
3, 3'		146.8		146.7		147.2		147.2
4, 4'	5.59 (brs)	145.3		145.3	5.50 (s)	134.3	5.49 (s)	134.3
5, 5'	6.89 (d, 8)	114.3	6.88 (d, 8)	114.3		147.2		147.2
6, 6'	6.82 (dd, 8, 2)	119.0	6.82 (dd, 8, 1.5)	118.9	6.59 (s)	102.7	6.58 (s)	102.7
7, 7'	4.74 (d, 4)	85.9	4.73 (d, 5)	85.9	4.73 (d, 5)	86.1	4.72 (d, 5)	86.1
8, 8'	3.10 (m)	54.2	3.10 (m)	54.2	3.09 (m)	54.4	3.10 (m)	54.2
9, 9'	3.88 (dd, 9, 4)	71.7	3.88 (dd, 9.5, 4)	71.7	3.91 (overlapped)	71.8	3.91 (m)	71.8
	4.25 (dd, 9, 7)		4.24 (dd, 9.5, 7)		4.29 (dd, 9, 7)		4.29 (m)	
3, 3'-OCH ₃	3.91 (s)	56.0	3.90 (s)	56.0	3.90 (s)	56.4	3.91 (s)	56.4
5, 5'-OCH ₃					3.90 (s)	56.4	3.91 (s)	56.4

Hedyotisol A (17)

化合物 **17** は、無色無晶系物質として得られた。本化合物の ^1H NMR では、**15**, **16** 同様フロフラン環由来プロトンシグナル [δ_{H} 4.75 (brs, H-7, 7'), 4.30 (dd, $J = 9, 7$ Hz, H-9a, 9'a), 3.93 (brd, $J = 9$ Hz, H-9b, 9'b), 3.13 (m, H-8, 8')] の他、2つのオキシメチンプロトン [δ_{H} 4.25 (ddd, $J = 9, 6, 5$ Hz, H-8'', 8''), 4.88 (brd, $J = 5$ Hz, H-7'', 7'')] と1つのオキシメチレンプロトン [δ_{H} 3.90 (dd, $J = 12, 6$ Hz, H-9''a, 9''a), 3.59 (dt, $J = 12, 3$ Hz, H-9''b, 9''b)] の存在を認めた。さらに2種のメトキシ基シグナル [δ_{H} 3.82 (6H, s), 3.81 (12H, s)] の存在、低磁場領域にシリンギルタイプの芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 6.68 (4H, s, H-2, 2', 6, 6')] およびグアイアシルタイプの芳香族プロトンシグナル [δ_{H} 6.72 (d, $J = 8$ Hz, H-5'', 5''), 6.77 (brd, $J = 8$ Hz, H-6'', 6''), 6.96 (brs, H-2'', 2'')] を認める。本化合物の COSY スペクトル (Fig. 13) で上記の2つのオキシメチンプロトン [δ_{H} 4.25 (ddd, $J = 9, 6, 5$ Hz, H-8'', 8''), 4.88 (brd, $J = 5$ Hz, H-7'', 7'')] は互いに相関を示し、また高磁場側のオキシメチン [δ_{H} 4.25 (ddd, $J = 9, 6, 5$ Hz, H-8'', 8'')] からオキシメチレン [δ_{H} 3.90 (dd, $J = 12, 6$ Hz, H-9''a, 9''a), 3.59 (dt, $J = 12, 3$ Hz, H-9''b, 9''b)] への相関も認められたことから、本化合物はジリグナンと推定された。HMBC スペクトルでは、グアイアシルタイプの芳香環上プロトン [δ_{H} 6.77 (brd, $J = 8$ Hz), 6.96 (brs)] からオキシメチン炭素 (δ_{C} 74.1, C-7'', 7'') への相関、シリンギルタイプの芳香環プロトン [δ_{H} 6.68 (s)] からフロフラン環を形成するオキシメチン炭素 (δ_{C} 87.2, C-7,7') への相関、オキシメチンプロトンから C-4,4' (δ_{C} 138.9) への相関も確認できたことから、1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2,3-triol と syringaresinol の部分構造を持つ hedyotisol と推定した。^{43,44)} 化合物 **17** の構造を Fig. 12 に、Fig. 13 に **17** の主要な COSY スペクトルを示す。

Hedyotisol B (18)

化合物 **18** は、無色無晶系物質として得られた。その NMR スペクトルは **17** に酷似して

いるが、オキシメチン由来のシグナルに若干の差異を認めたことから、本化合物は **17** の異性体である可能性が示唆された。

Hedyotisol には, 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propane-1,2,3-triol 基の 2 つの不斉炭素に由来する 3 種類の立体異性体の報告があり, hedyotisol A (7,8"-7"', 8'''-*erythro* 体), B (7'',8''- *erythro*, 7''', 8'''-*threo* 体), C (7'',8''-,7''', 8'''-*threo* 体) と命名され, それぞれ 7'', 7''' 位の ¹H ケミカルシフトとカップリング定数に違いが見られる. 化合物 **17**, **18** の H-7'', 7''' のケミカルシフトと結合定数を文献値と比較して δ_{H} 4.88 (brd, $J = 5$ Hz, H-7'', 7''') を示す **17** を *erythro*, *erythro* 体の hedyotisol A (**17**), δ_{H} 4.97 (d, $J = 7$ Hz, H-7''), 4.92 (overlapped, H-7''') を示す **18** を hedyotisol B (**18**) と同定した.⁴³⁻⁴⁵ 化合物 **18** の構造を Fig. 12 に, NMR スペクトルデータを Table 14 に示す.

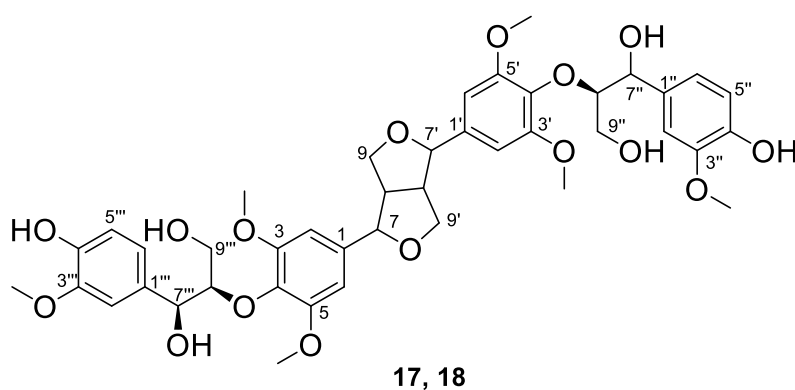


Fig. 12 Structure of hedyotisol A (**17**) and hedyotisol B (**18**)

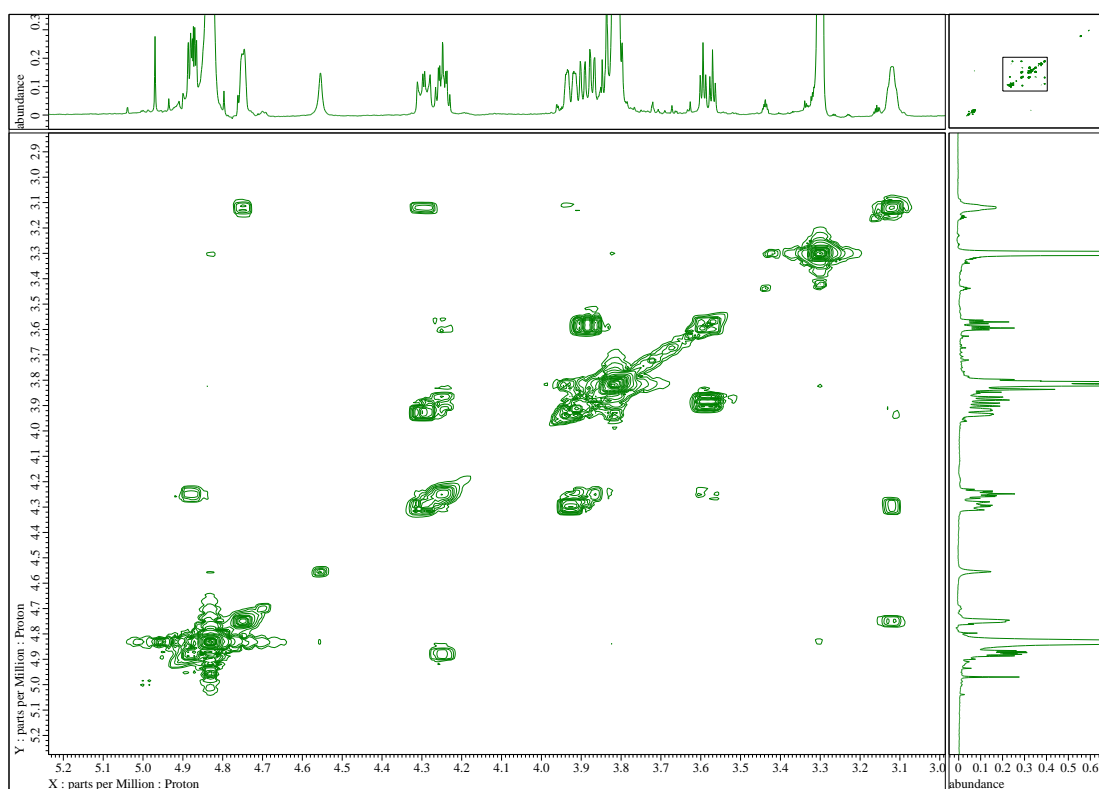
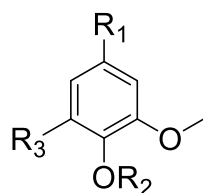


Fig. 13 Selected COSY spectrum of hedyotisol A (**17**)

Table 14 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **17** and **18** in CDCl_3

Position	Reported (hedyotisol A)				18	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1,1'		136.2		135.7		136.2
2, 6, 2', 6'	6.68 (s)	104.3	6.68 (s)	104.1	6.68 (s)	104.3
3, 5, 3, '5'		154.6		154.4		154.4
4, 4'		138.9		139.0		138.9
7, 7'	4.75 (brs)	87.2	4.74 (brs)	87.2	4.76 (brs)	87.2
8, 8'	3.13 (m)	55.7	3.11 (m)	55.6	3.12 (m)	55.7
9, 9'	3.93 (brd, 9)	73.1	3.92 (m)	73.0	3.91 (br dd, 9,2)	73.1
	4.30 (dd, 9, 7)		4.28 (m)		4.3 (br tt, 8,2)	
1''		133.8		133.8		133.9
2''	6.96 (brs)	111.4	6.95 (brs)	111.2	6.98 (brs)	111.7
3''		148.6		148.6		148.8
4''		146.9		146.8		147.2
5''	6.72 (d, 8)	115.6	6.72 (d, 7.8)	115.6	6.72 (d, 8)	115.8
6''	6.77 (brd, 8)	120.7	6.75 (d, 7.8)	120.6	6.84 (brd, 8)	120.8
7''	4.88 (brd, 5)	74.1	4.86 (m)	74.0	4.97 (d, 7)	74.4
8''	4.25 (ddd, 9, 6, 5)	87.2	4.26 (m)	87.1	4.09 (dt, 6, 3)	88.8
9''	3.59 (dt, 12, 3)	61.7	3.60 (d, 11.9)	61.3	3.59 (dt, 12, 3)	61.9
	3.90 (dd, 12, 6)		3.91 (m)		3.76(dd, 12,6)	
1'''		133.8		133.8		133.5
2'''	6.96 (brs)	111.4	6.95 (s)	111.2	6.95 (brs)	111.5
3'''		148.6		148.6		148.7
4'''		146.9		146.8		146.9
5'''	6.72 (d, 8)	115.6	6.72 (d, 7.8)	115.6	6.71 (d, 8)	115.7
6'''	6.77 (brd, 8)	120.7	6.75 (d, 7.8)	120.6	6.76 (brd, 8)	120.8
7'''	4.88 (brd, 5)	74.1	4.86 (m)	74.0	4.92 (overlapped)	74.1
8'''	4.25 (ddd, 9, 6, 5)	87.2	4.26 (m)	87.1	4.25 (dd, 9, 5)	87.2
9'''	3.59 (dt, 12, 3)	61.7	3.60 (d, 11.9)	61.3	3.59 (dt, 12, 3)	61.7
	3.90 (dd, 12, 6)		3.91 (m)		3.89 (dd, 12, 6)	
3,5,3',5'-OMe	3.81 (s)	56.7	3.85 (s)	56.6	3.83 (s), 3.87(s)	56.7
3''-OMe	3.82 (s)	56.3	3.83 (s)	56.3	3.82 (s)	56.4
3'''-OMe	3.82 (s)	56.3	3.83 (s)	56.3	3.82 (s)	56.4

2-5 フェノール性化合物の同定



	R ₁	R ₂	R ₃
19	OH	-Glc ⁶ -Xyl	H
20	OH	-Glc ⁶ -Api	H
21	O-Glc ⁶ -Xyl	H	H
22	O-Glc ⁶ -Api	H	H
23	OH	-Glc	H
24	O-Glc ⁶ -Api	CH ₃	OH
25	CH ₂ OH	-Glc ⁶ -Api	H
26	CH(OH)-CH(OH)-CH ₂ OH	H	H

Fig. 14 Structures of **19–26**

Capparoside A (**19**)

化合物 **19** は、無色無晶系物質として得られた。¹H NMR では 3 置換ベンゼン環上のプロトンシグナル [δ_{H} 6.31 (dd, $J = 9, 3$ Hz), 6.46 (d, $J = 3$ Hz), 7.02 (d, $J = 9$ Hz)], 糖のアノメリックプロトンシグナル 2 本 [δ_{H} 4.29 (d, $J = 8$ Hz), 4.69 (d, $J = 8$ Hz)], メトキシ基シグナル (δ_{H} 3.80) を認めた。本化合物の HMBC スペクトルデータより、グルコースアノメリックプロトンと芳香環上の炭素、キシロースのアノメリックプロトンとグルコース 6 位間に相関があることを確認した。また、グルコースアノメリックプロトンと、オルトカップリングした芳香族プロトン (δ_{H} 7.02) 間に NOE 相関を観測したことから、本化合物を 3-methoxy-4-[6-*O*-(β -D-xylopyranosyl)- β -D-glucopyranosyloxy]phenol (capparoside A) と推定し、単離化合物のスペクトルを Luecha らが単離報告した capparoside A のものと直接比較して同定した。⁴⁶⁾ 化合物 **19** の構造を Fig. 14 に、NMR スペクトルデータを Table 15 に示す。

Canthoside D (**20**)

化合物 **20** は、無色無晶系物質として得られた。本化合物の NMR スペクトルは **19** と良く似たデータを与えるものの、糖のアノメリックプロトンシグナルの内の 1 本はアピオースに特徴的なシグナル [δ_{H} 4.98 (d, $J = 2$ Hz)] であることが示された。HMBC スペクトルにおいてこのアノメリックプロトン [δ_{H} 4.98 (d, $J = 2$ Hz)] とグルコース 6 位 (δ_{C} 68.6) に相関が認められたことから、本化合物を 4-hydroxy-2-methoxyphenyl 1-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranoside (canthoside D) と推定し、文献とスペクトルデータを詳細に比較検討した結果一致したため canthoside D と同定した。⁴⁷⁾ 化合物 **20** の構造を Fig. 14 に、NMR スペクトルデータを Table 15 に示す。

Digupigan A (**21**)

化合物 **21** は、無色無晶系物質として得られた。化合物 **21** の NMR スペクトルは **19** のそれと非常に類似したデータを与え、3 置換ベンゼン環上のプロトン [δ_{H} 6.60 (d, $J = 9$ Hz), 6.70

(dd, $J = 9, 3$ Hz), 6.75 (d, $J = 3$ Hz)], メトキシ基 ($\delta_{\text{H}} 3.83$), 糖のアノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.29$ (d, $J = 8$ Hz), 4.73 (d, $J = 8$ Hz)] に由来するシグナルを確認した. 本化合物の HMBC スペクトルデータからグルコースが芳香環に結合し, その 6 位にキシロースが結合することおよびメトキシ基の結合位置が示唆された. NOE スペクトルで, グルコースアノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.73$ (d, $J = 8$ Hz)] と 2 つの芳香環上のプロトン [$\delta_{\text{H}} 6.70$ (dd, $J = 9, 3$ Hz), 6.75 (d, $J = 3$ Hz)] 間に相関を観測できたことから, 本化合物を 4-hydroxy-3-methoxyphenyl β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (digupigan A) と推定し, 文献値と比較を行い digupigan A と同定した.⁴⁸⁾ 化合物 **21** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 16 に示す.

Osmantolide (**22**)

化合物 **22** は, 無色無晶系物質として得られ, その NMR は **20** の類縁体構造を示唆する. 本化合物の NOE スペクトルで, グルコースアノメリックプロトン ($\delta_{\text{H}} 4.70$) を照射したところ 2 つの芳香環上のプロトン [$\delta_{\text{H}} 6.70$ (dd, $J = 9, 3$ Hz), 6.75 (d, $J = 3$ Hz)] に相関を観測できたことから, 本化合物を 4-hydroxy-3-methoxyphenyl 1-*O*- β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glucopyranoside (osmantolide) と推定した. 文献とスペクトルデータが一致したため osmantolide と同定した.⁴⁹⁾ 化合物 **22** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 16 に示す.

Isotachioside (**23**)

化合物 **23** は, 無色無晶系物質として得られた. ¹H NMR で 3 置換芳香環上のプロトン [$\delta_{\text{H}} 6.28$ (dd, $J = 9, 3$ Hz), 6.46 (d, $J = 3$ Hz), 7.01 (d, $J = 9$ Hz)], メトキシ基 ($\delta_{\text{H}} 3.80$), 糖アノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.68$ (d, $J = 8$ Hz)] 由来のシグナルを確認した. 本化合物の NOE スペクトルにおいて, グルコースアノメリックプロトン ($\delta_{\text{H}} 4.68$) とオルトカップリングしている芳香族プロトン [$\delta_{\text{H}} 7.01$ (d, $J = 9$ Hz)] 間に NOE 相関を観測できたことから, 本化合物を 3-methoxy-4-(6-*O*- β -D-glucopyranosyloxy)phenol (isotachioside) と推定し, 文献とスペクトルデータを詳細に比較した結果 isotachioside と同定した.⁵⁰⁾ 化合物 **23** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 17 に示す.

Cinnacassoside C (**24**)

化合物 **24** は, 無色無晶系物質として得られた. 化合物 **24** の NMR スペクトルでは, 4 置換芳香環上のプロトン [$\delta_{\text{H}} 6.30$ (2H, s)], メトキシ基 ($\delta_{\text{H}} 3.72, 3.80$), 糖のアノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.74$ (d, $J = 8$ Hz), 4.97 (d, $J = 2$ Hz)] の存在を確認した. HMBC スペクトルデータからは, メトキシ基 [$\delta_{\text{H}} 3.72$ (4-OMe), 3.80 (3-OMe)] の結合位置 [$\delta_{\text{C}} 133.0$ (C-4), 154.8 (C-3)] と, グルコースアノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.74$ (d, $J = 8$ Hz)] と芳香族炭素 ($\delta_{\text{C}} 155.8$) 間の相関が確認できた. またアピオースアノメリックプロトン [$\delta_{\text{H}} 4.97$ (d, $J = 2$ Hz)] とグルコース 6 位 ($\delta_{\text{C}} 68.7$) 間にも相関を確認した. 本化合物のスペクトルデータが 3-hydroxy-4,5-dimethoxyphenyl β -D-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (cinnacassoside C) と一致したことから,

cinnacassoside C と同定した。⁵¹⁾ 化合物 **24** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 17 に示す.

4-Hydroxymethyl-2-methoxyphenyl 1-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-*O*-β-D-glucopyranoside (**25**)

化合物 **25** は無色無晶系物質として得られた. 本化合物の ¹H NMR では, 3 置換芳香環上のプロトンシグナル [δ_{H} 6.90 (dd, $J = 9, 3$ Hz), 7.02 (d, $J = 3$ Hz), 7.12 (d, $J = 9$ Hz)], メトキシシグナル (δ_{H} 3.87), グルコースおよびアピオース由来と推測出来るアノメリックプロトンシグナル [δ_{H} 4.82 (d, $J = 8$ Hz), 4.95 (d, $J = 2$ Hz)], オキシメチレンシグナル [δ_{H} 4.54 (s)]を確認した. HMBC スペクトルデータにおいてメトキシ基 [δ_{H} 3.87 (s)]と芳香族炭素 (δ_{C} 150.9) 間, グルコースアノメリックプロトン [δ_{H} 4.82 (d, $J = 8$ Hz)] と芳香族炭素 (δ_{C} 147.2) 間, オキシメチレンシグナル [δ_{H} 4.54 (s)] と芳香族炭素 (δ_{C} 112.6, 120.8, 137.8) 間に相関を確認した. グルコースアノメリックプロトン [δ_{H} 4.82 (d, $J = 8$ Hz)] は芳香環上のプロトン [δ_{H} 7.12 (d, $J = 9$ Hz)] と NOE 相関を有していたことから, 本化合物を 4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl-1-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-*O*-β-D-glucopyranoside と推定し, 文献値と NMR 実測値が一致したため, 4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl 1-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-*O*-β-D-glucopyranoside と同定した.⁵²⁾ 化合物 **25** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 18 に示す.

Guaiacylglycerol (**26**)

化合物 **26** は, 無色無晶系物質として得られた. 本化合物の ¹H NMR では, 3 置換ベンゼン環上のプロトンシグナル [δ_{H} 6.75 (d, $J = 8$ Hz), 6.79 (dd, $J = 8, 2$ Hz), 6.98 (d, $J = 2$ Hz)], メトキシシグナル (δ_{H} 3.85), オキシメチレンシグナル [δ_{H} 3.34 (dd, $J = 11, 7$ Hz), 3.46 (dd, $J = 11, 4$ Hz)], オキシメチンシグナル 2 本 [δ_{H} 3.65 (td, $J = 7, 4$ Hz), 4.51 (d, $J = 7$ Hz)] を認めた. また ¹³C NMR では, 芳香族炭素シグナル (δ_{C} 111.5, 115.9, 120.6, 134.8, 147.1, 148.9), メトキシシグナル (δ_{C} 56.3), 酸素官能基に隣接する sp^3 炭素シグナル 3 本 (δ_{C} 64.2, 75.5, 77.6) を確認した. その HMBC スペクトルデータからは, メトキシ基 (δ_{H} 3.85) と芳香族炭素 (δ_{C} 148.9) 間, オキシメチンプロトン [δ_{H} 4.51 (d, $J = 7$ Hz)] と芳香族炭素 (δ_{C} 134.8) および側鎖 (δ_{C} 75.5, 77.6) 間に相関が確認できた. メトキシプロトン [δ_{H} 3.85 (s)] がメタカップリングした芳香環上のプロトン [δ_{H} 6.98 (d, $J = 2$ Hz)] と NOE 相関を示したことから, 本化合物を 4-(1,2,3-trihydroxypropyl)-2-methoxyphenol (guaiacylglycerol) と推定した. 文献と NMR 測定値が一致したため guaiacylglycerol と同定した.⁵³⁾ 化合物 **26** の構造を Fig. 14 に, NMR スペクトルデータを Table 19 に示す.

Table 15 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **19** and **20** in CD_3OD

Position	19		Reported		20		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		141.0		141.0		141.0		141.0
2		152.0		152.1		152.1		152.0
3	6.46 (d, 3)	101.8	*6.46 (d, 3)	102.1	6.46 (d, 3)	101.8	6.46 (d, 2.7)	101.9
4		154.9		154.9		154.9		154.9
5	6.31 (dd, 9, 3)	107.7	6.31 (dd, 9, 3)	107.8	6.21 (dd, 9, 3)	107.7	6.31 (d, 8.5)	107.7
6	7.02 (d, 9)	120.5	7.02 (d, 9)	120.7	6.99 (d, 9)	120.6	6.99 (d, 8.5, 2.7)	120.6
1'	4.69 (d, 8)	104.1	4.68 (d, 8)	104.2	4.69 (d, 8)	104.3	4.65 (d, 7.8)	104.3
2'	3.41 (t, 8)	75.0	3.41 (t, 8)	74.9	3.41 (t, 8)	75.0	3.34 (dd, 9.0, 7.8)	75.0
3'	3.40 (t, 8)	77.7	3.42 (t, 8)	77.8	3.40 (t, 8)	77.8	3.56 (dd, 8.6, 7.8)	78.0
4'	3.38 (t, 8)	71.4	3.39 (t, 8)	71.5	3.38 (t, 8)	71.6	3.42 (dd, 9.0, 8.6)	71.6
5'	3.51 (m)	77.3	3.48 (m)	77.3	3.51 (m)	77.0	3.46 (m)	77.0
6'	3.77 (dd, 12, 6)	69.6	3.75 (dd, 11.5, 6)	69.7	3.77 (dd, 12, 6)	68.6	3.61 (dd, 11.0, 5.9)	68.6
	4.06 (dd, 12, 2)		4.06 (dd, 11.5, 2)		4.06 (dd, 12, 2)		4.00 (dd, 11.0, 2.0)	
1''	4.29 (d, 8)	105.3	4.30 (d, 7.5)	105.3	4.98 (d, 2)	111.0	4.97 (d, 2.2)	111.0
2''	3.18 (dd, 9, 8)	74.9	3.19 (dd, 9, 7.5)	74.9	3.88 (d, 2)	78.0	3.87 (d, 2.2)	77.8
3''	3.30 (t, 9)	77.6	3.30 (t, 9)	77.6		80.5		80.5
4''	3.48 (m)	71.2	3.48 (m)	71.2	3.56 (s)	65.7	3.56 (s)	65.7
5''	3.13 (dd, 12, 10)	66.8	3.15 (dd, 12, 10)	66.8	3.73 (d, 10)	75.0	3.73 (d, 9.8)	75.2
	3.84 (dd, 12, 6)		3.84 (dd, 12, 6)		3.92 (d, 10)		3.92 (d, 9.8)	
2-OMe	3.80 (s)	56.5	3.80 (s)	56.6	3.80 (s)	56.5	3.80 (s)	56.6

*文献値 (δ_{H} 6.96) は文献の supporting information の値 (δ_{H} 6.46) と齟齬がみられることから誤植と判断し,⁴¹⁾ チャート上の数値 (δ_{H} 6.46) を記載した.

Table 16 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **21** and **22** in CD_3OD

Position	21		Reported (in pyridine- d_5)		22		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{C}	
1		152.7	152.2			152.8	152.8	
2	6.75 (d, 3)	103.7	103.7		6.75 (d, 3)	104.0	104.0	
3		149.3	149.0			149.5	149.3	
4		143.1	143.5			143.0	143.1	
5	6.70 (dd, 9, 3)	116.2	116.6		6.70 (dd, 9, 3)	116.1	116.1	
6	6.60 (d, 9)	110.2	110.0		6.59 (d, 9)	110.1	110.1	
1'	4.73 (d, 8)	104.0	104.1		4.70 (d, 8)	103.8	103.8	
2'	3.41 (t, 8)	75.0	75.0		3.40 (t, 8)	75.0	75.0	
3'	3.45 (t, 8)	77.9	78.3		3.42 (t, 8)	77.9	78.1	
4'	3.35 (t, 8)	71.5	71.5		3.33 (t, 8)	71.7	71.7	
5'	3.59 (m)	77.2	78.5		3.53 (m)	76.9	77.0	
6'	3.78 (dd, 12, 6) 4.09 (12, 2)	70.1	70.2		3.60 (dd, 12, 6) 4.01 (12, 2)	68.8	68.8	
1''	4.29 (d, 8)	105.5	106.1		4.97 (d, 2)	111.0	111.0	
2''	3.18 (dd, 9, 8)	74.9	75.0		3.89 (d, 2)	78.0	78.0	
3''	3.27 (t, 9)	77.7	77.4			80.5	80.6	
4''	3.46 (m)	71.2	71.2		3.56 (s)	65.5	65.6	
5''	3.15 (dd, 12, 10) 3.84 (dd, 12, 6)	66.9	67.2		3.74 (d, 10) 3.95 (d, 10)	75.0	75.0	
3-OMe	3.83 (s)	56.6	3.83 (s)		3.80 (s)	56.6	56.5	

Table 17 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **23** and **24** in CD_3OD

Position	23		Reported		24		Reported	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	
1		141.1	141.1		155.8		155.8	
2		152.0	152.0	6.30 (s)	95.1	6.30 (s)	95.2	
3	6.46 (d, 3)	104.4	104.4		154.8		154.8	
4		155.0	155.0		133.0		133.2	
5	6.28 (dd, 9, 3)	107.6	107.6		151.8		152.0	
6	7.01 (d, 9)	120.6	120.6	6.30 (s)	98.8	6.30 (s)	99.1	
1'	4.68 (d, 8)	101.9	101.9	4.74 (d, 8)	103.0	4.75 (d, 7.5)	103.0	
2'	3.42 (t, 8)	75.0	75.0	3.41 (t, 8)	74.9	3.75 (d, 9.8)	74.9	
3'	3.43 (t, 8)	78.2	78.2	3.43 (t, 8)	77.9	3.92 (m)	78.0	
4'	3.36 (t, 8)	71.4	71.4	3.34 (t, 8)	71.6	3.32 (m)	71.7	
5'	3.30 (m)	78.1	78.1	3.54 (m)	77	3.56 (m)	77.1	
6'	3.68 (dd, 12, 5)	62.6	62.6	3.62 (dd, 12, 6)	68.7	3.60 (m)	68.7	
	3.85 (12, 4)			4.02 (12, 2)		4.03 (d,10.7)		
1''				4.97 (d, 2)	111.0	4.98 (d, 2.5)	111.0	
2''				3.91 (d, 2)	78.0	3.42 (d, 8.6)	78.0	
3''					80.5		80.5	
4''				3.56 (s)	65.6	3.58 (m)	65.7	
5''				3.74 (d, 10)	75.0	3.76 (d, 7.4)	75.0	
				3.97 (d, 10)		3.98 (d, 9.6)		
2-OMe	3.80 (s)	56.6	56.6					
3-OMe				3.80 (s)	56.5	3.80 (s)	56.5	
4-OMe				3.72 (s)	61.1	3.72 (s)	61.1	

Table 18 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **25** in CD_3OD

Position	25		Reported	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1		147.2		147.3
2		150.9		151.0
3	7.02 (d, 3)	112.6	7.03 (d, 2)	112.8
4		137.8		137.9
5	7.12 (d, 9)	118.1	7.13 (d, 8)	118.4
6	6.90 (dd, 9, 3)	120.8	6.90 (dd, 8, 2)	120.9
1'	4.82 (d, 8)	103.0	4.82 (d, 8)	103.1
2'	3.48 (t, 8)	75.0	3.48 (t, 8)	75.0
3'	3.44 (t, 8)	77.8	3.44 (t, 8)	78.1
4'	3.34 (t, 8)	71.6	3.34 (t, 8)	71.7
5'	3.53 (m)	77.1	3.53 (m)	77.1
6'	3.61 (dd, 11.5, 6.5) 3.98 (dd, 12, 2)	68.6	3.61 (dd, 11.5, 6.5) 3.98 (dd, 12, 2)	68.7
1''	4.95 (d, 2)	111.0	4.95 (d, 2)	111.0
2''	3.87 (overlapped)	78.0	3.87 (overlapped)	77.9
3''		80.5		80.5
4''	3.56 (s)	65.7	3.56 (s)	65.7
5''	3.73 (d, 10) 3.93 (d, 10)	75.0	3.73 (d, 10) 3.93 (d, 10)	75.0
2-OMe	3.87 (s)	56.7	3.87 (s)	56.8
4-CH ₂ OH	4.54 (s)	65.0	4.54 (s)	65.0

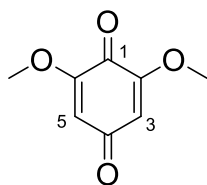
Table 19 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **26** in CD_3OD

Position	26		Reported	
	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)	δ_{C}
1		134.8		134.8
2	6.98 (d, 2)	111.5	6.98 (d, 1.8)	111.6
3		148.9		148.9
4		147.1		147.1
5	6.75 (d, 8)	115.9	6.75 (d, 8.2)	115.9
6	6.79 (dd, 8, 2)	120.6	6.79 (dd, 8.2, 1.8)	120.7
7	4.51 (d, 7)	75.5	4.51 (d, 6.3)	75.5
8	3.65 (td, 7, 4)	77.6	3.66 (ddd, 6.3, 6.3, 3.9)	77.6
9	3.34 (dd, 11, 7)	64.2	3.34 (dd, 11.4, 6.3)	64.3
	3.46 (dd, 11, 4)		3.47 (dd, 11.4, 3.9)	
3-OMe	3.85 (s)	56.3	3.85 (s)	56.4

2-6 キノン, アミノ酸, ピリジン誘導体などの同定

2,6-Dimethoxy-*p*-benzoquinone (**27**)

化合物 **27** は黄色無晶系物質として得られた。 ^1H NMR においてはいずれもシングレットの 2 本のシグナル (δ_{H} 5.85, 3.82), ^{13}C NMR では 5 本 (δ_{C} 56.5, 107.4, 157.4, 176.7, 186.9) のシグナルが確認され, 低磁場に多くのシグナルを見いだすことから高度に酸化された構造が示唆された。HMBC スペクトルでシングレットプロトン (δ_{H} 5.85) から自身の結合する炭素を含む 4 つの炭素 (δ_{C} 107.4, 157.4, 176.7, 186.9) に相関が確認できたことから, 対称構造を持つ 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone と推定し, 文献値と比較して同定した。⁵⁴⁾ この化合物は 同属 *Diospyros eriantha* から単離の報告があるものの, 本植物からは初めての単離報告となる。化合物 **27** の構造を Fig. 15 に, NMR スペクトルデータを Table 20 に示す。



27

Fig. 15 Structure of 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone (**27**)

Table 20 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **27** in CDCl_3

Position	27		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		176.7		176.8
2, 6		157.4		157.2
3, 5	5.85 (s)	107.4	5.83 (s)	107.4
4		186.9		187.0
2, 6-OMe	3.82 (s)	56.5	3.80 (s)	56.5

L-Tryptophan (**28**)

化合物 **28** は, 無色無晶系物質として得られた。 ^1H NMR で低磁場側の芳香族領域にシングレットシグナル 1 つ (δ_{H} 7.18), 隣接する 4 つの芳香族プロトン由来のシグナル [δ_{H} 7.04 (td, $J = 8, 1$ Hz), 7.11 (td, $J = 8, 1$ Hz), 7.35 (d, $J = 8$ Hz), 7.69 (d, $J = 8$ Hz)], が観測された。各種スペクトルデータを詳細に検討した結果 L-tryptophan と推定し, 文献データとの比較から同定した。⁵⁵⁾ 化合物 **28** の構造を Fig. 16 に, NMR スペクトルデータを Table 21 に示す。

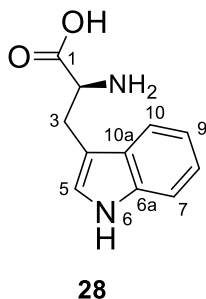


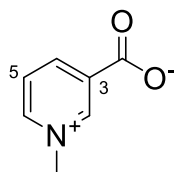
Fig. 16 Structure of L-tryptophan (**28**)

Table 21 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **28** in CD_3OD

Position	28		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1		174.4		174.4
2	3.85 (dd, 9, 4)	56.7	3.85 (dd, 9.4, 4)	56.7
3	3.14 (dd, 15, 9) 3.51 (dd, 15, 4)	28.5	3.14 (dd, 9.4, 5.8) 3.51 (dd, 15.3, 4.5)	28.5
4		109.6		109.6
5	7.18 (s)	125.1	7.18 (s)	125.1
6				
6a		138.4		138.4
7	7.69 (d, 8)	112.4	7.69 (d, 7.8)	112.4
8	7.11 (td, 8, 1)	122.8	7.11 (td, 7.9, 1.1)	122.8
9	7.04 (td, 8, 1)	120.1	7.04 (td, 7.9, 1.1)	120.1
10	7.35 (d, 8)	119.3	7.35 (d, 7.9)	119.3
10a		128.5		128.5

Trigonelline (**29**)

化合物 **29** は褐色無晶系物質として得られた。本化合物の ^1H NMR では、シングレットメチルシグナル (δ_{H} 4.43), 互いにカップリングする 4 つの芳香族プロトンシグナル (δ_{H} 8.06, 8.86, 8.90, 9.20) を確認した。 ^{13}C NMR では、カルボニル炭素 (δ_{C} 166.8) の存在も確認できた。各種スペクトルデータの検討の結果、本化合物を trigonelline と推定し、文献との比較により trigonelline と同定した。⁵⁶⁾ 化合物 **29** の構造を Fig. 17 に、NMR スペクトルデータを Table 22 に示す。



29

Fig. 17 Structure of trigonelline (**29**)

Table 22 ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of **29** in D_2O

Position	29		Reported	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1				
2	9.20	147.5	9.21	147.6
3		139.9		140.0
4	8.86	146.8	8.87	146.9
5	8.06	128.5	8.06	128.5
6	8.90	145.9	8.87	146.0
COO ⁻		166.8		167.0
N ⁺ Me	4.43	48.9	4.43	48.9

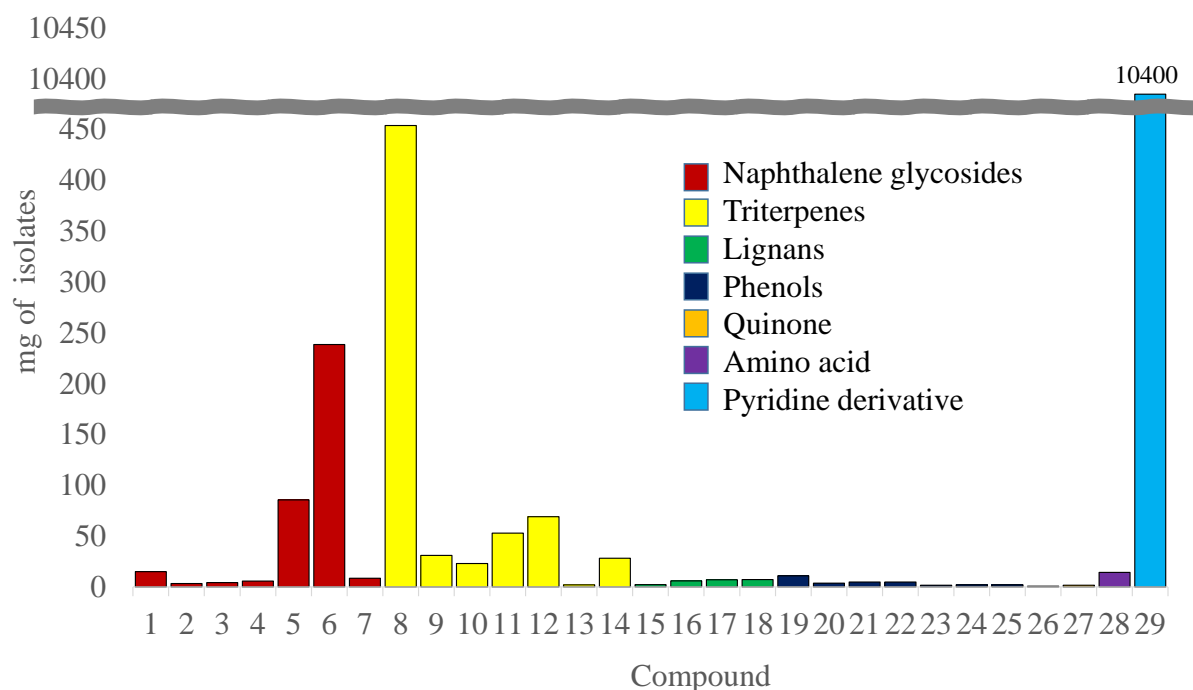
その他の化合物

この他に, trigonelline 精製時の残渣の ^{13}C NMR スペクトルデータをデータベースの値と比較することで D-sorbitol, sucrose を同定した.⁵⁷⁾ Table 23 に sucrose, D-sorbitol の NMR スペクトルデータを示す.

Table 23 ^{13}C (125 MHz) NMR spectroscopic data of sucrose and D-sorbitol in D_2O

Position	Sucrose		Position	D-Sorbitol	
	δ_{C}	Reported δ_{C}		δ_{C}	Reported δ_{C}
Glc-1	93.1	93.2	1	63.4	63.6
2	72.0	72.1	2	73.9	74.0
3	73.5	73.7	3	70.6	70.8
4	70.1	70.3	4	72.0	72.3
5	73.3	73.4	5	71.9	72.2
6	61.0	61.2	6	63.8	63.9
Flu-1	62.3	62.5			
2	104.6	104.7			
3	77.3	77.5			
4	74.9	75.1			
5	82.3	82.4			

今回得られた化合物の収量を Fig. 18 に示す. 図中の灰色の波型は数値の省略を表す.

**Fig. 18** Yields of isolates

2-7 考察

今回、新規 5 種 (1-5) を含むナフタレン配糖体 (1-7) のほか、トリテルペン類 (8-14)、リグナン (15-18)、フェノール性化合物 (19-26)、キノン (27)、アミノ酸 (28)、ピリジン誘導体 (29) の、29 種の化合物を単離することに成功した。ナフタレン配糖体 (7)、トリテルペン類の *betulinic acid* (10)、*lupeol caffeate* (14)、ステロイド類の *stigmasterol* (11)、 β -*sitosterol* (12)、リグナン類 (15-18)、2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone (27)、*tryptophan* (28)、フェノール性化合物 (19-26)、*trigonelline* (29) は今回初めて本植物中の存在が明らかとなった。

各成分の含有量に注目すると、*trigonelline* (29) が突出して多く、*lupeol* (8)、*diospyrol* 配糖体 (6) と続く。

Trigonelline (29) には腸管の細菌に対する有効性を示す報告がなされている。⁵⁸⁾ 伝統的に胃腸薬に用いられる果実部に本成分の存在は明らかとなっていないが、今回用いた枝葉部分も同目的での使用に適用可能性が示唆された。

本植物に含まれる *betulinic acid* (10) は *L. major* に対する有効性が明らかにされており、⁵⁹⁾ 本植物エキスの抗リーシュマニア活性に *betulinic acid* (10) の寄与が予想される。

本植物含有化合物の構造に目を向けると、糖鎖の構造に特徴があり、*glucose*、*apiose* からなる糖鎖を有する配糖体が多数認められた。特に新規化合物 1 はさらに *xylose* を糖鎖末端に有する *diospyrol* 配糖体で、この糖鎖を持つ芳香族化合物は、アマゾン先住民の間で強壮、抗炎症作用などに用いられる *Tynanthus panurensis* (Bignoniaceae) に豊富に含まれる *eugenol* 配糖体に続く 2 例目である。⁶⁰⁾ 糖鎖に *glucose*、*apiose* を有する芳香族配糖体はこれまでに 200 例以上が報告されているものの、その生物活性については殆ど明らかとなっていないため、本植物に含まれる配糖体と伝承用法の関係を解明することでこれら配糖体の応用に繋がる知見が得られる可能性がある。また、本植物はバラエティに富み稀有な糖鎖を持つ化合物を多数含有しており、新たな薬用資源として利用できる可能性がある。

化合物 2 は 3-methyl-1,8-naphthalenediol 配糖体の 7 位と 5-hydroxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone 配糖体の 2 位が結合した珍しい構造を有する。ナフタレン誘導体とナフトキノン誘導体が結合した化合物は Sankaram らが *Diospyros ebenum* から単離、構造決定を行った、3-methyl-1,8-naphthalenediol と 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone の結合した *ebenone* などがあるが、⁶¹⁾ 本化合物のように 5-hydroxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone とナフタレン誘導体が結合した化合物の報告例は無い。Fig. 19 に *ebenone* の構造を示す。

新規化合物 3-5 のアグリコン 3-methyl-1,8-naphthalenediol は本植物中から単離報告されているが、²³⁾ 配糖体の報告は初めてである。

ナフタレン配糖体のアグリコンである *diospyrol* や 3-methyl-1,8-naphthalenediol が

単離されなかったことは、過去の報告では若い果実を抽出に用いていることや、^{18, 23)} 化合物の安定性が低いとされていることと関連があると考えている。^{18, 23)}

化合物 **1**, **2** のアグリコンの生合成について、Bringmann らがナフチルイソキノリンの生合成で示したように、⁶²⁾ 3-methyl-1,8-naphthalenediol や 5-hydroxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone がカップリングすることで形成されると考えられる。*D. mollis* からは 5-hydroxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone が 3 位で結合した 2 量体 mamegakinone の単離報告があることから、¹⁸⁾ 5-hydroxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone が本植物中 2 次代謝産物の構造に確認される可能性はあったと言えるが、mamegakinone のように 2 位と 2' 位が結合するのではなく、2 位と 3' 位が結合している化合物 **2** の構造は非常に興味深い。

近縁の植物は二次代謝産物の組成が類似していることが知られており、*Diospyros* 属からは、単量体、2 量体を含む、数多くのナフタレン関連化合物が見つかった。しかし、同時にそれぞれのナフタレンユニットの構造や結合位置は種によって異なっていることが知られており、³²⁾ 化合物 **2** は本植物特有のカップリング反応により生成した、類例の乏しい構造を持った新規化合物と考えている。

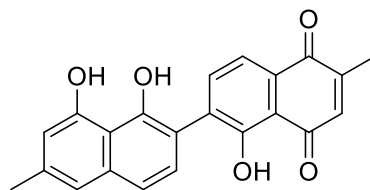


Fig. 19 Structure of ebenone

第 3 章 単離化合物の抗原虫活性

本章では、前章で得られた化合物から抗原虫活性を見出すことを目的に実験を行った。

原虫による疾患はマラリア、リーシュマニア症、トリパノソーマ症、アメーバ赤痢、クリプトスポリジウム症など多数知られている。⁵⁾ 治療に用いる抗原虫薬として植物由来天然物では抗マラリア活性を持つ *quinine* と *artemisinin*, アメーバ赤痢治療薬である *emetine* などが知られている。^{5,7)} 一方, NTDs であるアフリカトリパノソーマ病, シャーガス病とリーシュマニア症治療薬中の天然物は, *Streptomyces nodosus* から単離された *amphotericin B* と *Streptomyces krestomuceticus* から単離された *paromomycin* のみであり, それ以外の治療薬は綿密な合成戦略により誕生した化合物である。⁸⁾ 抗原虫活性をもった植物由来天然物の報告はいくつもなされており,⁸⁾ 今後優れた活性を持った化合物が植物から単離される可能性は高いと考える。そこで NTDs 治療薬開発につながるリード化合物を植物から探すために本実験を行った。

トリパノソーマは、キネトプラスト綱トリパノソーマ目トリパノソーマ科トリパノソーマ属に属する原虫である。哺乳類に感染し、様々な疾患を引き起こすことが知られている。NTDs には現在、アフリカトリパノソーマ病とシャーガス病の 2 つのトリパノソーマ症が登録されている。¹⁾ ヒト睡眠病として著名なアフリカトリパノソーマ病は *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* の感染で起こる疾患である。^{1,5,8)} 初期には頭痛, 発熱, 関節痛が, その後睡眠障害や震戦, 錯乱などが起こったのちに昏睡に至り, やがて命を落とす。シャーガス病はアメリカトリパノソーマ症とも言われ, *Trypanosoma cruzi* の感染で起こり,^{1,5)} リンパ節や脾臓, 肝臓の腫脹, 心臓肥大が症状として現れる疾患である。

NTDs 以外では家畜を含む哺乳類への感染症として *Trypanosoma congolense* などの感染で, 衰弱, 体重減少などが起こるナガナ病, *Trypanosoma evansi* などの感染で食欲低下, 体重減少, 発熱, 衰弱が起こるスーラ病が知られている。いずれも家畜を衰弱させるため, 現地の生活環境の改善が求められている。

治療薬は *eflomithine*, *melarsoprol*, *suramin*, *pentamidine*, *nifurtimox* などが症状に応じて使い分けされるが, 副作用の頻度や重篤度が問題となっており, 安全な薬物治療の方法が確立されたとは言えない。⁶³⁾

抗トリパノソーマ薬として使用される *pentamidine* はリーシュマニア原虫に有効性を示す例があることが知られている。²⁷⁾ *Pentamidine* 以外でもリーシュマニア原虫とトリパノソーマ原虫の両方に有効性を示す化合物は報告されている。²⁸⁾ このため今回得られた化合物の抗トリパノソーマ活性を抗リーシュマニア活性とともに検討することを計画した。

D. mollis は Sadun らの報告により鉤虫に対する活性が知られていた。¹⁴⁾ しかし, 別の寄生虫や病原微生物を対象を拡張した活性試験の報告は Atjanasuppat ら,¹⁹⁾ Maki

らによるものなど少数例にとどまり、⁶⁴⁾ トリパノソーマ原虫に対する有効性が検討されたことはない。今回、本植物のナフトレン誘導体の特徴づけている diospyrol 骨格、6,6'-dimethyl-2,3'-binaphthalene-1-ol-1',4'-dione 骨格、3-methyl-1,8-naphthalenediol 骨格の抗トリパノソーマ、抗リーシュマニア活性への影響に注目した。

抗トリパノソーマ活性試験には、*T. congolense* を用いた。*T. congolense* はヒトの体内では増殖しないため実験の安全性が高い点、同じトリパノソーマ属同士で有効性を示す化合物に共通性がみられる点で今回の研究に適していると考えた。^{29, 65)}

抗トリパノソーマ活性試験は、帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター原虫病研究センター 特任助教 菅沼啓輔先生とともに実施した。この実験系では、*T. congolense* の錘鞭毛型を対象としており、脊椎動物の血流内に生息するトリパノソーマ原虫への活性を評価できることが特徴となっている。試験化合物はナフトレン配糖体とトリテルペン類に加え、腸管の細菌に対する有効性が示されている trigonelline (**29**),⁵⁸⁾ 豊富に含まれていたフェノール性化合物の代表として capparoside A (**19**) を選択した。

リーシュマニア原虫増殖抑制試験は、第 1 章と同様に徳島文理大学香川薬学部 生薬天然物化学講座助教 安元加奈未先生とともに実施した。

3-1 抗トリパノソーマ活性試験の結果

抗トリパノソーマ活性試験の結果を Table 24 に、用量作用曲線を Fig. 20 に示す。ナフトレン配糖体の makluoside C (3) が最も強い活性を示した。Makluoside B (2), トリテルペンの betulin (9) も makluoside C (3) と同等の活性を示した。Makluoside D (4), makluoside E(5), betulinic acid (10), も活性を示した。

Table 24 Trypanocidal activity of isolates

Compound	IC ₅₀ (μM)
1	-
2	11.8
3	9.4
4	20.9
5	25.8
6	59.5
7	38.7
8	229.5
9	13.0
10	21.5
13	98.2
14	-
19	-
29	-
diminazene aceturate	0.10
pentamidine	0.15

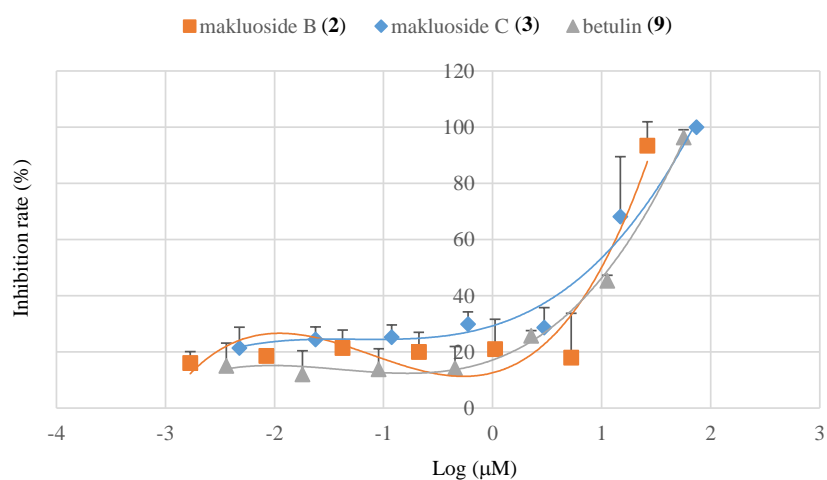


Fig. 20 Dose–response of trypanocidal activity of isolates

3-2 抗リーシュマニア活性試験の結果

抗リーシュマニア活性試験の結果を Table 25 に示す. 今回の試験化合物は, いずれも抗リーシュマニア活性を示さなかった.

Table 25 Leishmanicidal activity of isolates

Compound	IC ₅₀ (μg/mL)	MIC (μg/mL)
1	> 100	-
2	> 100	-
4	-	> 400
5	-	> 400
6	> 100	-
7	> 100	-
amphotericin B	0.02	-

3-3 Makluoside B (2) の細胞毒性試験の結果

抗トリパノソーマ活性が確認できた makluoside B (2) について, 細胞毒性試験をヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞である TIG-1 を用いて行った. TIG-1 細胞を 4 日間, 1 mM, 0.1 mM, 0.01 mM の 3 濃度の 2 と共に培養し, makluoside B (2) 非添加の細胞と比較し, 細胞増殖に対する影響から細胞毒性を評価した. 本細胞は, 2 の濃度が 1 mM では 51.7 %, 0.1 mM では 93.9 % の細胞増殖率を示したことから, LD₅₀ は > 1 mM と決定した (Fig. 21).

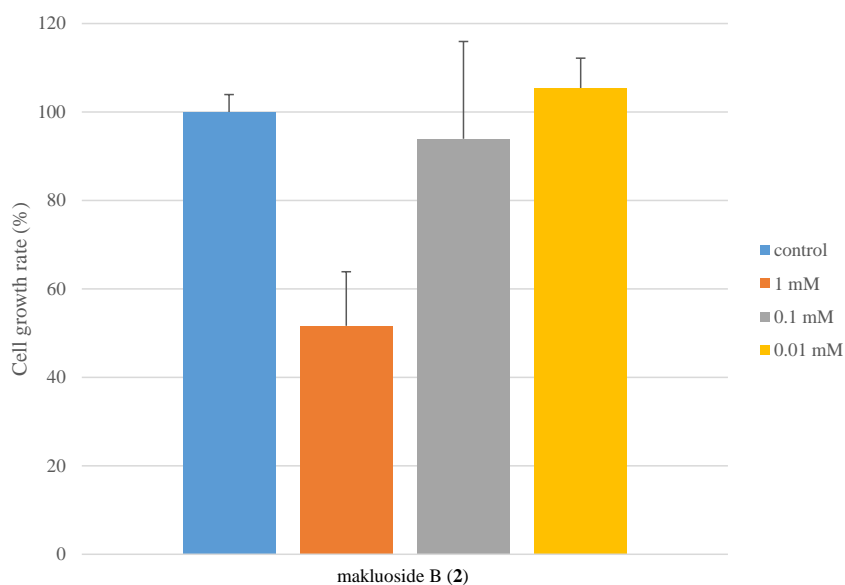


Fig. 21 Cytostatic effect of makluoside B (2) on TIG-1 cells

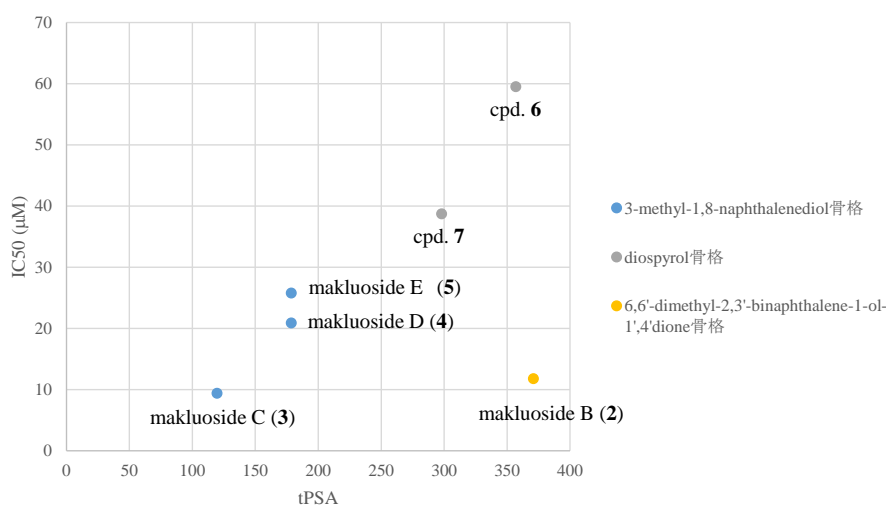
3-4 考察

ナフタレン配糖体 (**2** と **3**)およびトリテルペン類 (**9** と **10**)に良好な抗トリパノソーマ活性を見出した。今回使用した *T. congolense* はナガナ病の病原体であり、今回良好な結果を得た化合物がナガナ病治療薬へ応用されうる可能性があることを示している。また、近縁種である NTDs の病原体の *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi* に有効性を示す可能性は高いと考える。これまでにナフチルイソキノリン, ナフトキノン, テルペノイド, フラボノイド, フェノール性化合物などで抗トリパノソーマ活性が報告されている。⁶⁶⁾ 構造類似のナフタレン誘導体の抗トリパノソーマ活性は Gapany らや, Ellendorff らによる報告があるが,^{67, 68)} 今回は配糖体が豊富に得られたことで, 基本骨格の抗トリパノソーマ活性への寄与だけでなく, 糖鎖の影響を詳細に検討できた。ナフタレン配糖体同士で結果を比較すると, 糖鎖が伸びるほど活性は低下していた。これは, 立体的な障害や分子の極性の高さがその活性にマイナスの寄与をしていることを示唆している。Yardley らはナフトキノン誘導体である diospyrin の水酸基をメチル化, アセチル化した際に抗トリパノソーマ活性が増強したことを報告しており,⁶⁹⁾ 分子の極性は各ナフタレン配糖体の抗トリパノソーマ活性の差に特に大きな影響を与えている可能性がある。そこで, 分子の極性が抗トリパノソーマ活性へ与える影響を, トポロジカル極性表面積 (tPSA: Topological Polar Surface Area) を用いて検証した。tPSA は分子表面の極性を持った面積を計算で近似した値であり, 糖鎖の鎖長や極性官能基がその値に反映されるため, 今回の考察に適していると考えた。Chem Bio Draw を用いて各分子の tPSA を計算し, Table 26 の結果を得た。また Table 26 の tPSA の値と IC₅₀ の値をプロットしたところ (Fig. 22), 同一の基本骨格を持つ化合物同士では, この tPSA の値と IC₅₀ の値の間に相関関係が確認できた。

ナフタレン配糖体の基本骨格同士を比較すると, Fig. 22 に示す通り, makluoside B (**2**) の 6,6'-dimethyl-2,3'-binaphthalene-1-ol-1',4'-dione 骨格が makluosides C-E (**3-5**) の 3-methyl-1,8-naphthalenediol 骨格や makluoside A (**1**) の diospyrol 骨格よりも抗トリパノソーマ活性に関して優位性を持つが, 3-methyl-1,8-naphthalenediol 骨格と diospyrol 骨格は骨格間の差は小さく, 糖鎖が分子表面を占める割合の差により各化合物の活性が決定されていると考えられた。トリテルペン類の抗トリパノソーマ活性について Dominguez-Carmona らによる *T. cruzi* を対象とした報告はあるものの,⁷⁰⁾ *T. congolense* に対する有効性の報告は今回が初めてである。

Table 26 tPSA and trypanocidal activity of naphthalene glycosides

	tPSA	IC ₅₀ (μM)
1	415.98	-
2	370.97	11.8
3	119.61	9.4
4	178.53	20.9
5	178.53	25.8
6	357.06	59.5
7	298.14	38.7

**Fig. 22** Correlation between tPSA and IC₅₀ value of naphthalene glycosides

トリテルペン類は **betulin (9)** と **betulinic acid (10)** に抗トリパノソーマ活性が確認できた。化合物 **9** および **10** と同じ lupane 型の骨格を持つ **lupeol (8)** がはるかに弱い活性しか示さなかったことは 28 位の水酸基やカルボキシル基が活性に大きく寄与することを示している。**betulin (9)** および **betulinic acid (10)** が抗トリパノソーマ活性を示したことは Dominguez-Carmona らが *T. cruzi* を対象に **betulinic acid** 誘導体で試験した結果と一致している。⁶⁹⁾ Dominguez-Carmona らは **betulinic acid (10)** より **betulin (9)** の抗トリパノソーマ活性が低いことを報告しており、我々の得た結果とは異なるが、これは種差によるタンパク質の構造や生理機能のわずかな違いに起因する可能性がある。また **lupenone (13)** が **lupeol (8)** より強い活性を示したことから、3 位は水酸基よりもカルボニル基の方が活性の発現により有利に働くと考えられる。これは Alakurtti らが **betulin** 誘導体で抗リーシュマニア活性を調べた結果と同様の傾向であり、トリテルペンは Trypanosoma 科の *Leishmania* 属と *Trypanosoma* 属に対して同じ作用機序を通じて抗原虫活性を示している可能性がある。⁷¹⁾

抗リーシュマニア活性は今回の試験では確認できなかった。今回の試験化合物に含まれて

いないが, betulinic acid (10) には *L. major* への有効性が報告されており,⁵⁹⁾ 第 1 章で本植物メタノールエキスが示した抗リーシュマニア活性に寄与している可能性がある。

Makluoside B (2) の細胞毒性試験の結果, LD₅₀ は > 1 mM であった. 抗トリパノソーマ活性の IC₅₀ の 11.8 μM と開きがあることは, 細胞毒性を示さず抗トリパノソーマ活性のみを示す濃度域の存在を示唆している。

Makluoside B (2) のようなナフトキノンにはトリパノソーマ内で酸化ストレスを誘発する作用を有するとの報告があり,^{66, 72, 73)} 酸化ストレスを通じ細胞死が誘導された可能性がある. ナフタレン配糖体が *L. major* では阻害活性を示さず, *T. congolense* で阻害活性を示したことは, 標的分子に種差がある可能性を示唆する. Trypanosome alternative oxidase (TAO) はミトコンドリアで電子伝達系の終末でユビキノールから酸素に電子伝達を行い, 水を生成する酵素であり, 抗トリパノソーマ薬の標的分子として知られている.⁷⁴⁾ その存在は, *T. congolense* 中では確認されているが, *L. major* 中には確認されていないことから makluoside B (2) の標的分子の候補と考えられる. 本酵素は結晶構造の報告がされている.⁷⁵⁾ そこで makluoside B (2) が活性部位に取り込まれるか AutoDock vina を用いて *in silico* で検証した結果, -12.5 kcal/mol の結合自由エネルギーを示す配座の存在が明らかとなった. この値は文献で本酵素と共結晶を作ったリガンドである 3-chloro-4,6-dihydroxy-5-[(2*E*,6*E*,8*S*)-8-hydroxy-3,7-dimethylnona-2,6-dien-1-yl]-2-methylbenzaldehyde と同等の数値であることから,⁷⁵⁾ makluoside B (2) は TAO の活性部位に取り込まれる化合物の候補と確認できた. 計算の結果得られた, 最も低い結合自由エネルギーを示す配座を Fig. 23 に示す.

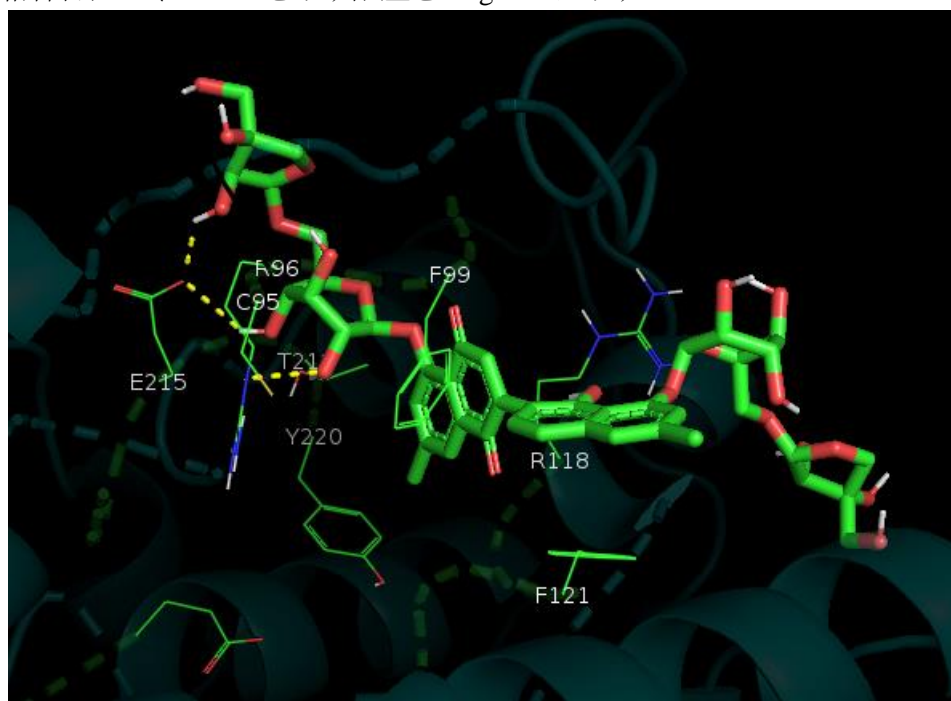


Fig. 23 Predicted docking model of makluoside B (2) with TAO from *T. b. brucei*
The yellow dashed line shows hydrogen bond.

トリテルペンの作用機序に関しては Chowdhury らがジヒドロベツリン酸の DNA トポイソメラーゼ阻害作用を報告しており,⁷⁶⁾ 今回の結果も同様の作用機序に基づく可能性がある。

第 4 章 単離化合物のヒアルロニダーゼおよび α -グルコシダーゼ阻害活性

この章では前章で抗原虫活性を示した化合物が生理機能に影響を与える副作用を示すかを確認する目的で実験を行った。

4-1 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

ヒアルロン酸は glucuronic acid と *N*-acetyl-D-glucosamine が β -1, 3 および β -1, 4 結合で結合し、繰り返し構造を取っているグルコサミノグリカンであり、生体内では関節などの結合組織や皮膚の柔軟性、水分保持に関わるとされる分子である。ヒアルロニダーゼ (EC3.2.1.35) はヒアルロン酸の β -1, 4 結合の切断を触媒する酵素であり、前述のヒアルロン酸の機能の恒常性に関わるほか、ガンの血管新生やハチ、ヘビの毒液中のタンパクによる患部の腫脹、細菌や蠕虫の宿主への侵入、拡散、炎症反応に関わっているとされる。⁷⁷⁻⁷⁹⁾ また、ヒアルロニダーゼの活性で生じたヒアルロン酸はリーシュマニアの炭素源となっている可能性が示唆されている。⁸⁰⁾ ヒアルロニダーゼ存在下ではトリパノソーマ原虫の感染が促進されることも報告されている。⁸¹⁾ 蛇に咬まれることで様々な症状が起こる蛇咬症は世界中で毎年 10 万人以上の死者を出す疾患として知られ、2017 年 5 月に WHO の指定する NTDs に追加された、強く対策が求められている疾患である。⁸²⁾ *Diospyros* 属の *Diospyros peregrina* はヘビ毒に有効とされていることから、³¹⁾ *Diospyros* 属に広くヒアルロニダーゼ阻害活性を持つ化合物が含有されている可能性があると考えられる。

これらの背景から、ヒアルロニダーゼ阻害作用を検討することで、結合組織や皮膚の柔軟性、水分保持への影響を評価できると考えた。さらに細菌、蠕虫などの感染予防作用、ハチ、ヘビの毒液中のタンパクによる患部腫脹の抑制作用、リーシュマニア原虫増殖抑制作用を示す化合物を見出せる可能性がある。*D. mollis* メタノールエキスを 1 mg/mL に希釈してヒアルロニダーゼ阻害活性試験の予備試験を行ったところ、74.3 % の阻害活性を示したため (未発表データ)、単離化合物を用いた試験を行った。

4-1-1 ヒアルロニダーゼ阻害活性試験の結果

ヒアルロニダーゼ阻害活性試験の結果を Table 27 に示す。各化合物の試験濃度は 1 mg/mL で行った。ポジティブコントロールは強い阻害活性の知られている rosmarinic acid (0.32 mM) とした。Lupeol caffeate (**14**) は IC_{50} 算出のため 0.5, 1, 2, 4 (mg/mL) の 4 点で阻害活性を測定した。

Table 27 Hyaluronidase inhibitory activity of isolates

Compound	Inhibition rate (%)	IC ₅₀ (mM)
1	7.2	-
2	1.1	-
3	0.2	-
4	13.7	-
5	-1.2	-
6	8.4	-
7	10.9	-
8	-0.4	-
9	3.0	-
10	4.4	-
11	-0.9	-
12	0.5	-
13	-24.1	-
14	34.2	1.65
15	7.8	-
16	19.2	-
17	-7.8	-
18	-5.3	-
19	3.7	-
20	21.1	-
21	6.9	-
22	9.8	-
23	14.5	-
24	-7.0	-
25	0.8	-
26	-5.1	-
27	13.1	-
28	13.3	-
rosmarinic acid	96.5	0.32

4-1-2 考察

ヒアルロニダーゼ阻害活性は、グリコサミノグリカン、多糖類、脂肪酸、フラボノイド、テルペノイド、サポニンなど多彩な化合物に確認されているが、*D. mollis* から得た単離化合物では **lupeol caffeate (14)** にのみ弱い活性が確認された。この結果から抗トリパノソーマ活性を持った単離化合物は、少なくとも抗トリパノソーマ活性を示す濃度域においてヒアルロン酸が関わる、皮膚や臓器の水分保持に影響を与えないと考えた。**Lupeol caffeate (14)** にのみ活性が確認される一方で、カフェー酸の結合していない **lupeol (8)** には活性が確認されなかったことから、カフェー酸エステル部位が阻害活性に決定的な役割を果たしていると考えられ

た. 同じカフェー酸エステルであり, 本実験のポジティブコントロールである *rosmarinic acid* や, その関連化合物のカフェー酸オリゴマー類が強い阻害活性を示したとする報告はこの考えを裏付けている.^{83, 84)} 今回 *lupeol caffeate* (**14**) が阻害活性を示したことは, 本酵素の阻害活性発現は, カフェー酸程度の大きさの, 阻害活性を示す部分構造の有無に集約できる可能性を示唆している.

今回の結果から, 本植物の主要な成分から強いヒアルロニダーゼ阻害活性を見出すのは難しいと考えている. メタノール抽出エキスに強いヒアルロニダーゼ阻害活性が認められたものの, 主要な単離化合物には強い活性が認められなかったことから, 今回単離されていないごく微量に含まれる化合物が強い阻害活性を示す可能性や, 多種の化合物による相乗効果で強い阻害活性を示した可能性が考えられる.⁸⁵⁾

4-2 単離化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性

α -グルコシダーゼは α -1, 4 グルコシド結合を切断する酵素として知られ、小腸内での糖の分解に関わっている。また、そのアイソザイムは糖タンパクの生合成に関わることが知られている。Celgosivir に代表される、糖タンパク生合成に関わる α -グルコシダーゼ阻害剤はデングウイルス、C 型肝炎ウイルスなどフラビウイルスのエンベロープ生合成を阻害することで、その増殖を抑制できることが報告されている。⁸⁶⁾

糖尿病治療に用いられている α -グルコシダーゼ阻害薬は副作用として低血糖、腹部膨満感などを生じる可能性があることはよく知られている。単離化合物がこの α -グルコシダーゼ阻害活性を示すならば、抗原虫薬として応用を考えた場合には低血糖、腹部膨満感といった副作用が応用の障害となることが考えられた。このことから、単離化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性を調べ、抗原虫活性を持った化合物の副作用発現の可能性を検討した。また、抗ウイルス活性を持ち、かつ α -グルコシダーゼ阻害活性を持つ化合物は、糖タンパクの生合成を阻害することでウイルスの増殖抑制が起こり、その結果抗ウイルス活性を示している可能性がある。*Diospyros* 属では *D. chloroxylon*, *D. peregrina* など複数の種に抗ウイルス活性が報告されていることから、³²⁾ 単離化合物の α -グルコシダーゼ阻害活性を検討した。

4-2-1 α -グルコシダーゼ阻害活性試験の結果

α -グルコシダーゼ阻害活性試験の結果を Tables 28–30 に示す。サンプルの濃度は全て 100 $\mu\text{g/mL}$ で行っている。ポジティブコントロールにはキット添付の castanospermine をキット添付の方法に従い調製し、終濃度 0.98 mg/mL で用いた。

Table 28 α -Glucosidase inhibitory activity of isolates

Compound	Inhibitory activity (%)	SD
1	-0.6	0.9
2	0.1	0.8
3	0.7	1.6
4	3.1	0.4
5	3.1	1.7
6	-2.1	1.6
7	-0.2	1.3
8	6.6	2.4
9	5.3	1.0
10	-0.9	0.5
11	3.6	1.8
12	-0.4	1.4
13	-0.9	1.3
14	5.0	0.7
16	0.1	2.2
castanospermine	86.7	4.7

Table 29 α -Glucosidase inhibitory activity of EtOAc layer fractions

Fraction	Inhibitory activity (%)	SD
A	6.4	6.1
B	0.7	6.4
C	9.6	5.1
D	10.1	2.6
E	2.8	2.1
F	7.1	4.9
G	4.0	3.7
H	4.0	4.8
I	-1.5	3.6
J	7.4	4.6
K	2.5	4.8
L	9.0	1.7
M	-2.3	6.9
N	2.9	3.1
O	0.7	2.5
Residue	-1.5	2.9
castanospermine	86.7	4.7

Table 30 α -Glucosidase inhibitory activity of water layer fractions

Fraction	Inhibitory activity (%)	SD
30 % MeOH eluate	0.3	1.2
50 % MeOH eluate	1.8	1.6
70 % MeOH eluate	1.2	1.2
100 % MeOH eluate	0.3	0.6
90 % MeOH + 0.05% TFA	-2.6	1.7
100 % MeOH + 0.05% TFA	0.4	1.8
EtOAc	0.3	2.0
flow through	4.0	1.8
castanospermine	86.7	4.7

4-2-2 考察

単離化合物のうち主要成分であるトリテルペン類とナフトレン配糖体を中心に活性を確認したが、強い α -グルコシダーゼ阻害活性を持つものはなかった。この結果からトリテルペン類とナフトレン配糖体は消化管の α -グルコシダーゼを阻害することで副作用を起こす可能性は低いと言える。また、この結果から、 α -グルコシダーゼ阻害活性を介して抗ウイルス作用を示す化合物が本植物に存在する可能性は低いと考える。

総括

第 1 章ではタイ薬用植物を対象に抗リーシュマニア活性のスクリーニングを実施し、良好な活性を持った植物 *Salacia verrucosa* (Celastraceae), *Avicennia marina* (Acanthaceae), *Diospyros mollis* (Ebenaceae), *Persicaria tomentosum* (Polygonaceae), *Pterygota alata* (Malvaceae), *Salacia chinensis* (Celastraceae) を見出し, *D. mollis* の成分研究を進めることに決定した. 今回調べたタイ薬用植物はこれまでに抗原虫活性の報告のあるコロンビア, パナマ, メキシコ, オマーン, ナイジェリアなどの薬用植物と比較した際にその優位性を示すことはできなかったが, タイ国薬用植物に抗原虫活性を確認できた点は今回の研究の 1 つの成果と考える.

第 2 章では *D. mollis* 中の化合物の分離, 構造決定について記述した. 新規 5 種を含むナフタレン配糖体 7 種, トリテルペン 7 種, リグナン 4 種, キノン 1 種, アミノ酸 1 種, フェノール性化合物 8 種, ピリジン誘導体 1 種を得た. ナフタレン配糖体のアグリコンを今回単離することはできなかったが, 抽出に使用した部位の違いや化合物の安定性の低さが原因と考察した.

第 3 章では単離化合物の抗原虫活性について記述した. 新規ナフタレン配糖体 (**2** と **3**) にそれぞれ IC_{50} 11.8 μ M と 9.4 μ M の, トリテルペンの *betulin* (**9**) と *betulinic acid* (**10**) にそれぞれ IC_{50} 13.0 μ M と 21.5 μ M の抗トリパノソーマ活性を明らかにした. また, *T. congolense* と近縁の *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. cruzi* によって引き起こされる NTDs であるアフリカトリパノソーマ病とシャーガス病への応用可能性を示した. *Betulinic acid* (**10**) には抗リーシュマニア活性が報告されており,⁵⁹⁾ 本植物メタノールエキスの抗リーシュマニア活性に *betulinic acid* (**10**) が寄与している可能性があることを考察した. ナフタレン配糖体の極性の指標として算出した *tPSA* と, 抗トリパノソーマ活性との間で相関関係を見出し, 抗トリパノソーマ活性には分子の極性が重要であることを示した. 抗リーシュマニア活性は試験したナフタレン配糖体には確認できなかったが, この結果と AutoDockVina によるシミュレーションにより得られた結果から, トリパノソーマの呼吸鎖関連の TAO を化合物 **2** の標的分子の候補として考えることが出来るが, その検証には更なる検討が必要である. 化合物 **2** の細胞毒性試験の結果, LD_{50} は > 1 mM と IC_{50} との差異が大きく, 細胞の生育に影響を与えず抗トリパノソーマ活性を示す濃度域の存在を示唆していると考えた.

第 4 章ではヒアルロニダーゼの阻害活性試験および α -グルコシダーゼ阻害活性試験の結果を記述した. 抗トリパノソーマ活性の認められた単離化合物にヒアルロニダーゼ阻害活性および α -グルコシダーゼ阻害活性は確認できなかった. このことは, 単離化合物はヒアルロン酸が関わる皮膚や臓器の水分保持や, α -グルコシダーゼが関わる消化管での糖の吸収に影響を与えないことを示唆していると考えた. ヒアルロニダーゼの阻害活性試験では *lupeol caffeate* (**14**) に IC_{50} 1.65 mM の阻害活性を見出した. この結果は, 阻害活性発現にはカフェー酸程の大きさを持った部分構造の有無が鍵となることを示唆している. *Lupeol caffeate* (**14**) 以外に活性を示す化合物が見出せなかったことは, 本植物の主要成分はヒアルロニダーゼ阻害活性を通じて感染予防や蛇咬症に有効性を示さないことを示唆していると考えた. α -グル

コシダーゼ阻害活性試験では、単離化合物からは本活性はほとんど確認できず、本活性を通じた抗ウイルス活性や駆虫活性は望めないと考えた。

第 3 章と第 4 章での結果を踏まえると、単離化合物の中で特に makluoside B (2) は *T. congolense* に有効性を示す濃度域でヒト培養細胞の増殖を抑制せず、皮膚や臓器の水分保持に関与するヒアルロニダーゼを阻害せず、消化管で糖の吸収に関与する α -グルコシダーゼを阻害しなかったことからナガナ病治療薬としての可能性を見出した。

序論で示した、流行地域近傍の伝統薬を検索すれば、その NTDs に有効な天然物が含まれているという仮説は、本植物から発見された makluoside B (2) を始めとする新規化合物に抗トリパノソーマ活性が認められたことにより支持されており、本仮説に基づき、更に化合物の探索を進めるべきと考える。今後、同様の条件で選別した他の薬用植物から既存の治療薬と同等の抗トリパノソーマ活性、抗リーシュマニア活性を示す天然物が見出されるかという点、他の NTDs を対象としたときにも本仮説が成り立つのかに注目が必要と考える。

本植物 *D. mollis* は抗トリパノソーマ活性を始めとして様々な駆虫作用を持つナフトレン配糖体やトリテルペンなどの薬用成分を豊富に含む伝統薬であり、伝統医学の用途にとどまらず、さらなる応用を検討する意義のある薬用資源であると考えられる。本植物が伝統薬として現代に伝わった背景には、タイ国が様々な病原微生物に曝露される環境にあったことと、その中で有用な薬草を選別し発展してきた伝統薬草学の歴史と密接に関わっていると考える。

今後、タイ国伝統薬を研究対象として理解を深め、それと同時に NTDs を始めとする各種病原微生物に対する知見を重ねてゆくことが、その治療薬や治療法研究の前進につながると考える。

実験の部

第 1 章に関する実験

第 1 章のタイ国薬用植物エキスは全て 2014 年 9 月 12, 13 日にタイ国 Khon Kaen にて, Orawan Monthakantirat 博士, Prathan Luecha 博士が採集し, 同国 Khon Kaen University 薬学部の植物学者 T. Thitimetharoj 博士によって鑑定された植物を Orawan Monthakantirat, Prathan Luecha 両博士が熱メタノール抽出したものをを用いた.

リーシュマニア原虫の培養, 抗リーシュマニア活性試験は文献に従い行った.²⁹⁾

リーシュマニアの培養

非働化した FBS を終濃度 10% で加えた 199 培地を用い, 27 °C 5% CO₂ 存在下で *L. major* のプロマスチゴートを培養した.

抗リーシュマニア活性試験

96 穴マイクロプレートに 4×10^5 / 50 μ L に調製した上記プロマスチゴートを播種し, ここに, 終濃度 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 μ g/mL になるよう調製したサンプル 50 μ L を加え, 総量を 100 μ L とした. サンプル数は各濃度 3 とした.

マイクロプレートは 5% CO₂ 存在下 27 °C で 48 時間培養した後, Tetra Color One を 10 μ L 加え, さらに 5% CO₂ 存在下 27 °C で 6 時間培養した. その後, 試験波長 450 nm 基準波長 630 nm で細胞数を測定した. 活性は MIC (minimum inhibitory concentration) で評価した.

第 2 章に関する実験

Diospyros mollis の入手と鑑定

D. mollis の葉や枝は 2014 年 9 月 12, 13 日にタイ国 Khon Kaen にて採集し, 同国 Khon Kaen University 薬学部 T. Thitimetharoj 博士によって鑑定された.

単離操作

D. mollis の乾燥させた葉と枝 (3.0 kg) を 60 °C のメタノールで 4 回抽出し, ろ過後, 溶媒を留去し 85.6 g の残渣を得た. *D. mollis* の入手から 85.6 g の残渣を得るまでの手順は Orawan Monthakantirat 博士, Prathan Luecha 博士がタイ国 Khon Kaen University で行った. こ

の残渣をメタノールエキスとして、以後の操作に供した。

メタノールエキス (85.6 g) は水に懸濁し、酢酸エチルを加えて液-液分配を行った後、溶媒を留去し酢酸エチル層 (10.9 g)、水層 (74.7 g)を得た。

酢酸エチル層 (10.9 g) はシリカゲルカラムに重層し、*n*-hexane-CHCl₃-MeOH (3 : 1.9: 0.1, 1 : 1.9 : 0.1), CHCl₃-MeOH (95 : 5, 9 : 1, 8 : 2, 1 : 1), CHCl₃-MeOH-H₂O (8 : 2 : 0.2) の溶媒系で 15 のフラクション (Fractions A-O)に分離した。

水層 (74.7 g) は HP20 カラムクロマトグラフィー [solvent: MeOH-H₂O (3 : 7, 1 : 1, 7 : 3), MeOH] によって、4つのフラクションとした。その後、さらに 90 %MeOH + 0.05 % TFA, 100% MeOH + 0.05 % TFA, EtOAc を溶出溶媒としたそれぞれのフラクションを得た。HP20 に吸着されず、カラムを通過したフロースルー液も回収した。

Fraction A (0.43 g) は HPLC [column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeCN-H₂O (100 : 0)] で処理し, lupenone (**13**, 2.0 mg, *t_R* 47 min) を得た。

Fraction C (0.41 g) は HPLC [column: Inertsil ODS-EP ODS 20 × 250 mm, solvent: MeCN-H₂O (95 : 5)] で処理し, lupeol (**8**, 294.3 mg, *t_R* 39 min) を得た。

Fraction D (1.73 g) は HPLC [column: Inertsil ODS-EP ODS 20 × 250 mm, solvent: MeCN-H₂O (95 : 5), flow rate: 9 mL/min]で処理し, lupeol (**8**, 159.5 mg, *t_R* 39 min), betulin (**9**, 31.0 mg, *t_R* 22 min), stigmasterol (**11**, 53.0 mg, *t_R* 69 min) を得た。分離条件を検討した結果、より良好な分離が得られた TOSOH TSK-gel ODS 100v 20 × 250 mm にカラムを変更し, betulinic acid [**10**, 23.0 mg, solvent: MeOH-MeCN (1 : 1), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 16 min], β-sitosterol [**12**, 69.0 mg, solvent: MeOH-H₂O (100 : 0), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 55 min] を得た。

Fraction E (0.36 g) は HPLC [column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm] で処理し, lupeol caffeate [**14**, 28.2 mg, solvent: MeOH-H₂O (100 : 0), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 68 min], 2,6-dimethoxy-*p*-benzoquinone [**27**, 1.7 mg, solvent: MeOH-H₂O (4 : 6), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 14.6 min], (+)-syringaresinol [**16**, 6.0 mg, solvent: MeOH-H₂O (4 : 6), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 72 min], (-)-pinoresinol [**15**, 2.2 mg, column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeOH-H₂O (4 : 6), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 78 min] を得た。

Fraction I (0.36 g) は HPLC [column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeOH-H₂O (55 : 45), flow rate: 10 mL/min] で処理し, hedyotisol A (**17**, 7.1 mg, *t_R* 23 min), hedyotisol B (**18**, 7.3 mg, *t_R* 27 min) を得た。

Fraction L (0.44 mg) は HPLC [column, TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent, MeOH-H₂O (4:6)] により精製し makluoside C (**3**, 4.2 mg, *t_R* 94 min) を得た。

Fraction M (0.68 mg) は HPLC により精製し, makluoside D [**4**, 5.8 mg, column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeOH-H₂O (4 : 6), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 77 min], makluoside E [**5**, 85.54 mg, column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeOH-H₂O (4 : 6), flow rate: 9 mL/min, *t_R* 86 min] を得た。

Fraction O (0.99 g) は HPLC [column, TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent:

MeOH-H₂O (55 : 45), flow rate: 10 mL/min] で処理し, makluoside A (**1**, 15.0 mg, *t_R* 59 min), makluoside B (**2**, 3.4 mg, *t_R* 48 min), diospyrol 8,8'-di-*O*-(6-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranoside) (**6**, 238.4 mg, *t_R* 80 min), diospyrol 8-*O*-(6-β-D-apiofuranosyl-β-D-glucopyranosyl)-8'-*O*-β-D-glucopyranoside (**7**, 8.6 mg, *t_R* 105 min) を得た.

水層 30% MeOH elute は GL Science ODS 30 × 500 mm, solvent: 10% MeOH, flow rate: 10 mL/min で処理し, WL30MeOH-a-h の 8 つのフラクションに分けた.

各フラクションはHPLC [column: TOSOH TSK-gel ODS-100v 20 × 250 mm, solvent: MeOH-H₂O (1 : 9)] で精製し, WL30MeOH-b から guaiacylglycerol (**26**, 0.8 mg, *t_R* 15 min), WL30MeOH-d から isotachioside (**23**, 1.7 mg, *t_R* 23 min), WL30MeOH-e から osmantolide (**22**, 4.8 mg, *t_R* 28 min), WL30MeOH-f から canthoside D (**20**, 3.8 mg, *t_R* 34 min), digupigan A (**21**, 4.8 mg, *t_R* 30 min), WL30MeOH-g から capparoside A (**19**, 11.0 mg, *t_R* 38 min), WL30MeOH-h から cinnacassoside C (**24**, 2.1 mg, *t_R* 41 min), 4-hydroxymethyl-2-methoxyphenyl-1-*O*-β-D-apiofuranosyl-(1→6)-*O*-β-D-glucopyranoside (**25**, 2.0 mg, *t_R* 44 min), L-tryptophan (**28**, 14.3 mg, *t_R* 32 min)を得た.

フロースルー液を TLC [PLC silica gel 60 F₂₅₄, solvent: CHCl₃-MeOH (1:1)] で確認したところ, 強い UV 吸収を認めたため, これを掻き取り精製し, trigonelline (**29**, 10.4 g, R_f 0.1) を得た.

Makluoside A (**1**)

Brown amorphous powder, $[\alpha]_D^{26} -50.0$ (*c* 0.70, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 232.5 (4.86), 253.5 (4.71), 308.5 (4.29) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR, Table 6; HRFABMS *m/z* 1066.3546 [M]⁺ (calcd for C₄₉H₆₂O₂₆ 1066.3529).

Makluoside B (**2**)

Dark red amorphous powder, $[\alpha]_D^{23} -124.5$ (*c* 0.16, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 209.5 (3.88), 233 (3.88), 261.5 (3.94), 300 (3.33) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR, Table 6; HRFABMS *m/z* 971.2812 [M+Na]⁺ (calcd for C₄₄H₅₂O₂₃Na 971.2797).

Makluoside C (**3**)

Light brown amorphous powder, $[\alpha]_D^{26} -57.3$ (*c* 0.19, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 203.5 (4.77), 225 (4.56), 276.5 (3.99) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR, Table 7; HRFABMS *m/z* 337.1286 [M+H]⁺ (calcd for C₁₇H₂₁O₇ 337.1287).

Makluoside D (**4**)

Brown amorphous powder, $[\alpha]_D^{23} -50.0$ (*c* 0.14, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 226 (4.08), 331 (3.30) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR, Table 7; HRFABMS *m/z* 491.1531 [M+Na]⁺ (calcd for

C₂₂H₂₈O₁₁Na 491.1529).

Makluoside E (5)

Brown amorphous powder, [α]_D²³ -93.6 (c 0.25, MeOH); UV (MeOH) λ max (log ϵ) 316 (3.58), 330.5 (3.56) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR, Table 7; HRFABMS m/z 468.1643 [M]⁺ (calcd. for C₂₂H₂₈O₁₁ 468.1632).

第 3 章に関する実験

トリパノソーマ原虫の培養および抗トリパノソーマ活性試験は文献記載の方法に従って行った.⁸⁷⁾

トリパノソーマ原虫の培養

T. congolense IL3000 をイスコフ改変ダルベッコ培地に、非働化した 20% FBS, 60 mM HEPES, 1 mM ピルビン酸, 0.1 mM バソクプロイン, 1 mM ヒポキサンチン, 16 μ L チミジン, 10 μ g/L インスリン, 5.5 μ g/L トランスフェリン, 6.7 ng/L 亜セレン酸ナトリウム, 0.0001% β -メルカプトエタノール, 0.4 g/L BSA, 2 mM L-システインを添加して調製した Hirus's modified Iscove's medium (HMI-9) 33 °C で増殖させた.

抗トリパノソーマ活性試験

T. congolense を 2×10^5 /mL で含む培地 50 μ L を 96 穴プレートに分注し, 50 μ L のサンプルを含む培地を加え, 96 時間培養した. 培養後, CellTiter-GloTM Luminescent Cell Viability Assay reagent を加えて, 生細胞に由来する ATP を発光強度から定量した.

TIG-1 の培養

TIG-1 は理研セルバンクから分譲された TIG-1-20 を用いた. 10 % ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 培地で 37 °C 5 % CO₂ 存在下培養し, 1 週間毎に培地の交換を行った.

細胞毒性試験

培養した細胞を PBS で洗い, トリプシン処理をして 10 分後に培地を加えた. 血球計算板で細胞を計数した後, 1 万/90 μ L に希釈して, 96 穴プレートの各ウェルに撒いた. 終濃度の 100 倍 (100 mM) に調製した試料溶液を培地で 10 倍希釈し, 10, 1, 0.1 mM の 3 つの濃度を用意した. それぞれ 10 μ L ずつ, 90 μ L の細胞希釈液の入った各ウェルに加えることで

終濃度 1 mM, 0.1 mM, 0.01 mM とした. 4 日間培養後, アラマーブルーを 10 uL 加えて 4 時間培養し, 励起波長 550 nm 吸収波長 590 nm の蛍光強度を測定した.

tPSA の計算

Chem Bio Draw ultra にて各化合物の構造式を描画した. 描画した構造式を選択し, view コマンドから show chemical properties を選択し, tPSA を表示した. 必要に応じて Paste をクリックして数値を構造式近傍に表示した.

Auto Dock Vina による計算

In silico docking simulation には Auto Dock Vina 1.1.2, MGL Tools 1.5.6, Pymol 2.1, Accelrys ViewerLite 5.0 (Windows 版)を用いた. タンパクデータは TAO とリガンドの共結晶モデル (PDB ID: 3VVA) のデータを PDB よりダウンロードして用いた.

タンパクおよびリガンドファイルの作成のために, ダウンロードしたタンパクデータは viewer lite を用いて, 水分子, リガンド, 計算に使用しないタンパクを削除し, タンパクのみのデータとして一時保存した. 同様の手法でリガンドのみのファイルを作成し保存した.

タンパクファイルは AutoDockTools を用いて, タンパク質中で活性中心の内側にあると報告されている 92, 95, 96, 99, 100, 118, 119, 121, 122,123, 125,162, 165, 190, 212, 213, 215, 216, 219, 220, 266, 269 番目のアミノ酸を Flexible residue として,⁷⁰⁾ それ以外を rigid part として個々にファイル (拡張子: .pdbqt) を作成した. ドッキングで用いた共結晶中のリガンドと makluoside B のリガンドファイルはその構造を Chem Bio Draw で描画し, 最適化を行った後, .Auto DockTools で作成した. (拡張子: .pdbqt)

ドッキングパラメーターは AutoDockTools の Grid Box を用いて共結晶モデル 3VVA のリガンドを基準に決定した. 決定したパラメーターは以下の通りである.

```
receptor = 3vva1rigid.pdbqt
flex = 3vva1fle.pdbqt
ligand = makluosideB.pdbqt
center_x = -48.54
center_y = -0.8
center_z = -23.845
size_x = 40
size_y = 40
size_z = 40
exhaustiveness = 8
num_modes = 50
```

energy_range = 3

計算処理の実行は Windows のプログラムからコマンドプロンプトを呼び出し、ディレクトリを移動させた後、--config (メモ帳で作ったファイル名).txt --log (計算結果のファイルに付ける名前).txt を入力後、enter を入力して行った。計算終了後に .pdbqt ファイルと .txt ファイルを得た。

第 4 章に関する実験

ヒアルロニダーゼ阻害活性試験

ヒアルロニダーゼ阻害活性は前田らの方法を基に⁸⁸⁾ Davidson および Aronson により応用された Morgan-Elson 法を改良し、⁸⁹⁾ ヒアルロン酸からヒアルロニダーゼの作用により遊離する *N*-アセチルグルコサミンに *p*-dimethylaminobenzaldehyde を作用させ、595 nm における吸光度を測定し、コントロールとの比較から阻害率を算出した。

アッセイは 96 穴プレートで行った。コントロール溶液としてサンプルの代わりに酢酸緩衝液を加えた溶液を、ブランクとしてヒアルロニダーゼ溶液の代わりに酢酸緩衝液を加えた溶液を同時に調製した。

同条件のサンプル溶液は 5 つ (n=5)、ブランクは 3 つ (n=3) 用意した。

サンプルを 0.1 M 酢酸緩衝液に溶解し、一部 (8 μ L) をプレートに分注した。酢酸緩衝液に溶かしたヒアルロニダーゼ (Type IV-S bovine testis, 2140 units/mg solid, Sigma Chemical Co., final 400 unit/mL, 4 μ L) を加え、37 $^{\circ}$ C 20 分インキュベートした。

次にアクチベーターとして compound 48/80 (Sigma Chemical Co., final 0.3 mg/mL, 8 μ L) を緩衝液に溶かして加え 37 $^{\circ}$ C 20 分インキュベートした。

本酵素反応の基質となるヒアルロン酸カリウム (Sigma Chemical Co., final 0.4 mg/mL, 20 μ L) を加えた後、37 $^{\circ}$ C 40 分インキュベートした。

0.4 M NaOH で酵素反応を停止させ、ホウ酸溶液で中和し、3 分間煮沸し、氷冷した。

p-Dimethylaminobenzaldehyde 溶液(240 μ L) を加え、37 $^{\circ}$ C 20 分インキュベートした後、595 nm で吸光度測定を行った。

阻害率の計算は以下の式で行った。

$$\text{阻害率(\%)} = \{(A-B) - (C-D)\} / (A-B) \times 100$$

A) コントロール溶液の 595 nm における吸光度

B) コントロール溶液のブランクの吸光度

C) サンプル溶液の吸光度

D) サンプル溶液のブランクの吸光度

α-グルコシダーゼ阻害活性試験

α-グルコシダーゼ粗酵素液の調製

ラット腸管アセトン粉末 0.5 g を氷冷したマレイン酸緩衝液 (0.05 M, pH 6.0) 4.5 mL に添加した。

ガラス製ホモジナイザーを使って氷上でホモジナイズした後 3000 rpm, 4 °C, 10 min で遠心し、上清を粗酵素液とした。

α-グルコシダーゼ阻害活性試験

α-Glucosidase Assay (Roche diagnostics) を使用し、添付のプロトコールに従い、サンプル存在下および非存在下で、4-ニトロフェノール-α-D-グルコピラノシドから α-グルコシダーゼにより 4-ニトロフェノールを遊離させ、405 nm の吸光度を測定し、α-グルコシダーゼ酵素反応のサンプル存在下の阻害率を計算した。

まず 96 穴プレートにキット添付の Reaction buffer (18 μL), substrate concentrating solution (2 μL) を分注した。

そこに α-グルコシダーゼ粗酵素液 (2 μL) とマレイン酸緩衝液で調製したサンプル溶液 (1 μL) を加え、よく混合し、37 °C, 30 分間インキュベートした。

その後 キット添付の stopping buffer (200 μL) で酵素反応を止めて混合し、プレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定した。

コントロール溶液としてサンプルの代わりにマレイン酸緩衝液を加えた溶液を、ブランクとして α-グルコシダーゼ溶液の代わりにマレイン酸緩衝液を加えた溶液を同時に調製した。

同条件のサンプル溶液は 5 つ (n = 5), ブランクはコントロール溶液, サンプル溶液共に 3 つ (n = 3), コントロール溶液は 3 つ (n = 3) 用意した。

阻害率の計算は以下の式で行った。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(A - B) - (C - D)\} / (A - B) \times 100$$

A) コントロール溶液の 405 nm における吸光度

B) コントロール溶液ブランクの吸光度

C) サンプル溶液の吸光度

D) サンプル溶液のブランクの吸光度

謝辞

本研究において御懇篤なるご指導，ご助言を賜りました静岡県立大学生薬学講座教授，渡辺賢二先生に深甚なる謝意を表すものであります。本研究を行うにあたり，終始熱心なご指導，ご鞭撻を賜りました横浜薬科大学漢方天然物化学研究室准教授，梅原 薫先生に厚く御礼申し上げます。

さらに本研究を開始するにあたり一方ならず鼓舞督励賜った日本薬科大学教授，野口博司先生に深く感謝いたします。

本研究の抗リーシュマニア活性を測定していただきました，徳島文理大学香川薬学部生薬天然物化学講座助教，安元加奈未博士，本研究の抗トリパノソーマ活性を測定していただきました帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター原虫病研究センター 特任助教，菅沼啓輔博士に深謝いたします。

本研究の植物を鑑定してくださいました，Thaweesak Thitimetharaj 博士，植物メタノールエキスを作成してくださいましたタイ国 Khon Kaen University 薬学部 Orawan Monthakantirat 博士，Prathan Luecha 博士に深謝いたします。

最後に大学院進学を許可してくれた両親と，大学院生活の様々な面でお世話になった生薬学講座の皆様から心から感謝いたします。

引用文献

- 1) World Health Organization. “Neglected Tropical Disease” :
(http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/), accessed July 7, 2017.
- 2) Newman D. J., Gragg, G. M., *J. Nat. Prod.*, **79**, 629–661 (2016).
- 3) ヒューマンサイエンス振興財団 “創薬等ヒューマンサイエンス研究国際共同研究事業研究報告書 平成 15 年度”, ヒューマンサイエンス振興財団, 2004
- 4) Ortiz D., Guiguemde W. A., Hammill J. T., Carrillo A. K., Chen Y., Connelly M., Stalheim K., Elya C., Johnson A., Min J., Shelat A., Smithson D. C., Yang L., Zhu F., Guy R. K., Landfear S. M., *PLoS Negl Trop Dis.*, **11**, e0006157 (2017).
- 5) Khaw M., Panosian C. B., *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**, 427–439 (1995).
- 6) World Health Organization, “Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO expert committee” 2013, p. 153–161
- 7) Wink M., *Molecules*, **17**, 12771–12791 (2012).
- 8) Nagle A. S., Khare S., Kumar A. B., Supek F., Buchynskyy A., Mathison C. J. N., Chennamaneni N. K., Pendem N., Buckner F. S., Gelb M. H., Molteni V., *Chem. Rev.*, **114**, 11305–11347 (2014).
- 9) 在タイ日本国大使館ウェブサイト (www.th.emb-japan.go.jp/jp/mamechishiki/bangkok.htm), accessed September 22, 2018
- 10) Baimai V., *J. R. Inst. Thail.*, **2**, 107–114 (2010).
- 11) World Health Organization, “fourth WHO report on neglected tropical diseases” 2017, p. 165
- 12) Manomat J., Leelayoova S., Bualert L., Tan-ariya P., Siripattanapipong S., Mungthin M., Naaglor T., Piyaraj P., *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **11**, e0006095 (2017).
- 13) Desquesnes M., Holzmuller P., Lai D. H., Dargantes A., Lun Z. R., Jittaplapong S., *Biomed. Res. Int.*, **2013**, 194716 (2013).
- 14) Sadun E. H., Vajrasthira S., *J. Parasit.*, **40**, 49–53 (1954).
- 15) Bechtold T., Mussak R., “Handbook of Natural Colorants”, WILEY, 2009, p. 68.
- 16) Salguero C. P., “A Thai Herbal”, Findhorn Press, 2003, p. 98.
- 17) Loder J. W., Mongkolsuk S., Robertson A., Whalley W. B., *J. Chem. Soc.*, 2233–2237 (1957).
- 18) Yoshihira K., Tezuka M., Kanchanapee P., Natori S., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2271–2277 (1971).
- 19) Atjanasuppat K., Wongkham W., Meepowpan P., Kittakoo P., Sobhon P., Bartlett A., Whitfield P. J., *J. Ethnopharmacol.*, **123**, 475–482 (2009).
- 20) Sawangjaroen N., Sawangjaroen K., *J. Ethnopharmacol.*, **98**, 67–72 (2005).
- 21) Paphassarang S., Becchi M., Raynaud B., *Tetrahedron Lett.*, **25**, 523–526 (1984).
- 22) Tanaka T., Furusawa M., Ito T., Iliya I., Oyama M., Iinuma M., Tanaka N., Murata J., *Nat. Prod. Commun.*, **2**, 55–59 (2006).
- 23) Mongkolsuk S., Sdarwonvivat C., *J. Chem. Soc.*, 1533 (1965).
- 24) Borsub L., Thebtaranonth Y., Ruchirwat S., Sadavongvivad C., *Tetrahedron Lett.*, **17**, 105–108

- (1976).
- 25) WHO/Regional Office for Europe “Manual on case management and surveillance of the leishmaniases in the WHO European Region” (2017).
 - 26) Disayavanish C., Disayavanish V., *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **52** (Suppl.) S334–S337 (1998).
 - 27) Pearson R. D., Hewlett E. L., *Ann. Intern. Med.*, **103**, 782–786 (1985).
 - 28) Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T. J., Tosun F., Rüedi P., *Antimicrob. Agent Chemother.*, **50**, 1352–1364 (2006).
 - 29) Mori K., Kawano M., Fuchino H., Ooi T., Satake M., Agatsuma Y., Kusumi T., Sekita S., *J. Nat. Prod.*, **71**, 18–21 (2008).
 - 30) Weniger B., Robledo S., Arango G. J., Deharo E., Aragón R., Muñoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R., *J. Ethnopharmacol.*, **78**, 193–200 (2001).
 - 31) Camacho Md., Phillipson J. D., Croft S. L., Solis P. N., Marshall S. J., Ghazanfar S. A., *J. Ethnopharmacol.*, **89**, 185–191 (2003).
 - 32) Mallavadhani U. V., Panda A. K., Rao Y. R., *Phytochemistry*, **49**, 901–951 (1998).
 - 33) Tanaka T., Nakashima T., Ueda T., Tomii K., Kouno I., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 899–901 (2007).
 - 34) Haque Md. E., Shekhar H. U., Mohamad A. U., Rahman H., Islam A. K. M. M., Hossain M. S., *Dhaka University J. Pharm. Sci.*, **5**, 53–57 (2006).
 - 35) Tijjani A., Ndukwe I. G., Ayo R. G., *Trop. J. Pharm. Res.*, **11**, 259–262 (2012).
 - 36) Khaliq S., Volk F.J., Frahm A. W., *Planta Med.*, **73**, 77–83 (2007).
 - 37) Ragasa C. Y., Lorena G. S., Mandia E. H., Raga D. D., Shen C. C., *Am. J. Essent. Oil. Nat. Prod.*, **1**, 7–10 (2013).
 - 38) Chaturvedula V. S. P., Prakash I., *Int Curr. Pharm. J.*, **1**, 239–242 (2012).
 - 39) Yonemoto R., Shimada M., Maria D. P. T., Gunawan-Puteri M. D. P. T., Kato E., Kawabara J., *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 8411–8414 (2014).
 - 40) Fuchino H., Satoh T., Tanaka N., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1937–1942 (1995).
 - 41) Diep T. T., Kiem P. V., Dong N. T., Tung N. H., Bang B. T., Minh C. V., Braca A., *J. Chem.*, **45**, 219–222 (2007).
 - 42) Rahman M. D. A., Katayama T., Suzuki T., Nakagawa T., *J. Wood Sci.*, **53**, 161–167 (2007).
 - 43) Yang X. W., Zhao P. J., Ma Y. L., Xiao H. T., Zuo Y. Q., He H. P., Li L., Hao X. J., *J. Nat. Prod.*, **70**, 521–525 (2007).
 - 44) Matsuda S., Kadota S., Tai T., Kikuchi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 5066–5069 (1984).
 - 45) Machida K., Sakamoto S., Kikuchi M., *J. Nat. Med.*, **63**, 227–231 (2009).
 - 46) Luecha P., Umehara K., Miyase T., Noguchi H., *J. Nat. Prod.*, **72**, 1954–1959 (2009).
 - 47) Kanchanapoom T., Kasai R., Yamasaki K., *Phytochemistry*, **61**, 461–464 (2002).
 - 48) Kitajima J., Kamoshita A., Ishikawa T., Takano A., Fukuda T., Isoda S., Ida Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 152–157 (2003).
 - 49) Sugiyama M., Kikuchi M., *Phytochemistry*, **30**, 3147–3149 (1991).

- 50) Zhong X. N., Otsuka H., Ide T., Hirata E., Takeda Y., *Phytochemistry*, **52**, 923–927 (1999).
- 51) Luo Q., Wang S. M., Lu Q., Luo J., Cheng Y. X., *Molecules*, **18**, 10930–10943 (2012).
- 52) Warashina T., Nagatani Y., Noro T., *Phytochemistry*, **66**, 589–597 (2005).
- 53) Comte G., Vercauteren J., Chulia A. J., Allais D. P., Delage C., *Phytochemistry*, **45**, 1679–1682 (1997).
- 54) Rudiyanasyah, Garson M. J., *J. Nat. Prod.*, **69**, 1218–1221 (2006).
- 55) Yan X., Suzuki M., Ohnishi-Kameyama M., Sada Y., Nakanishi T., Nagata T., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 4711–4713 (1999).
- 56) Tohda C., Nakamura N., Komatsu K., Hattori M., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 679–682 (1999).
- 57) SDBSWeb : <http://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), accessed December 22, 2016.
- 58) Almeida A. A., Farah A., Silva D. A., Nunan E. A., Glória M. B., *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 8738–8743 (2006).
- 59) Takahashi M., Fuchino H., Sekita S., Satake M., *Phytother. Res.*, **18**, 573–578 (2004).
- 60) Plaza A., Montoro P., Benavides A., Pizza C., Piacente S., *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2853–2858 (2005).
- 61) Sankaram A. V. B., Reedy V. V. N., *Phytochemistry*, **23**, 2039–2042 (1984).
- 62) Bringmann G., Feineis D., *J. Exp. Bot.*, **52**, 2015–2022 (2001).
- 63) Phillips M. A., *Mol. Microbiol.*, **86**, 10–14 (2012).
- 64) Maki J., Kondo A., Yanagisawa T., *Parasitol.*, **87**, 103–111 (1983).
- 65) Merschjohann K., Sporer F., Steverding D., Wink M., *Planta Med.*, **67**, 623–627 (2001).
- 66) Hoet S., Opperdoes F., Brun R., Quetin-Leclercq J., *Nat. Prod. Rep.*, **21** 353–364 (2004).
- 67) Gapany S., Thomas P. S., Karagianis G., Waterman P. G., Brun R., *Phytochemistry*, **67**, 1950–1956 (2006).
- 68) Ellendorff T., Brun R., Kaiser M., Sendker J., Schmidt T. J., *Molecules*, **20**, 10082–10094 (2015).
- 69) Yardley V., Snowdon D., Croft S., *Phytother. Res.*, **10**, 559–562 (1996).
- 70) Dominguez-Carmona D. B., Escalante-Erosa F., Garcia-Sosa K., Ruiz-Pinell G., Gutierrez-Yapu D., Chan-Bacab M. J., Gimenez-Turba A., Pena-Rodriguez L. M., *Phytomedicine*, **17**, 379–382 (2010).
- 71) Alakurtti S., Bergstrom P., Sacerdoti-Sierra N., Jaffe C. L., Yli-Kauhaluoma J., *J. Antibiot.*, **63**, 123–126 (2010).
- 72) Cenas N. K., Arscott D., Williams C. H. Jr., Blanchard J. S., *Biochemistry*, **33**, 2509–2515 (1994).
- 73) Salmon-Chemin L., Buisine E., Yardley V., Kohler S., Debreu M. A., Landry V., Sergheraert C., Croft S. L., Krauth-Siegel R. L., Davioud-Charvet E., *J. Med. Chem.*, **44**, 548–565 (2001).
- 74) Chaudhuri M., Ott R. D., Hill G. C., *Trends Parasitol.*, **22**, 484–491 (2006).
- 75) Shiba T., Kido Y., Sakamoto K., Inaoka D. K., Tsuge C., Tatsumi R., Takahashi G., Balogun E. O., Nara T., Aoki T., Honma T., Tanaka A., Inoue M., Matsuoka S., Saimoto H., Moore A. L., Harada

- S., Kita K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **110**, 4080–4085 (2013).
- 76) Chowdhury A. R., Mandal S., Goswami A., Ghosh M., Mandal L., Chakraborty D., Ganguly A., Tripathi G., Mukhopadhyay S., Bandyopadhyay S., Majumder H. K., *Mol. Med.*, **9**, 26–36 (2003).
- 77) Frost G., Csoka T., Stern R., *Trends Glycosci Glycotecnol.*, **8**, 419–434 (1996).
- 78) Warrel D. A., *Lancet.*, **375**, 77–88 (2010).
- 79) Naderer T., Heng J., Saunders E. C., Kloehn J., Rupasinghe T. W., Brown T. J., McConville M. J., *PLoS Pathog.*, **11**, e1105136 (2015).
- 80) Girish K. S., Kemparaju K., Nagaraju S., Vishwanath B. S., *Curr. Med. Chem.*, **16**, 2261–2288 (2009).
- 81) Matsubara M., *J. Juzen Med. Soc.*, **60**, 766–773 (1958).
- 82) Gutiérrez J. M., Calvete J. J., Habib A. G., Harrison R. A., Williams D. J., Warrell D. A., *Nat. Rev. Dis. Primers.*, **3**, 17064 (2017).
- 83) Ippoushi K., Yamaguchi Y., Itou H., Azuma K., Higashino H., *Food Sci. Technol. Res.*, **6**, 74–77 (2000).
- 84) Aoshima H., Miyase T., Warashina T., *Chem. Pharm. Bull.*, **60**, 499–507 (2012).
- 85) Iino M., Ochiai N., Tsunenaga M., Japan Patent JP6099397B2 (2012).
- 86) Mehta A., Zitzmann N., Rudd P. M., Block T. M., Dwek R. A., *FEBS Lett.*, **430**, 17–22 (1998).
- 87) Sukanuma K., Allamanda P., Hakimi H., Zhou M., Angeles J. M., Kawazu S., Inoue N., *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 1437–1441 (2014).
- 88) Maeda Y., Yamamoto M., Takahashi I., Kobayashi T., Kobayashi E., *Syokueishi*, **31**, 233–237 (1990).
- 89) Davidson E. A., Aronson N. N., *J. Biol. Chem.*, **242**, 437–440 (1967).

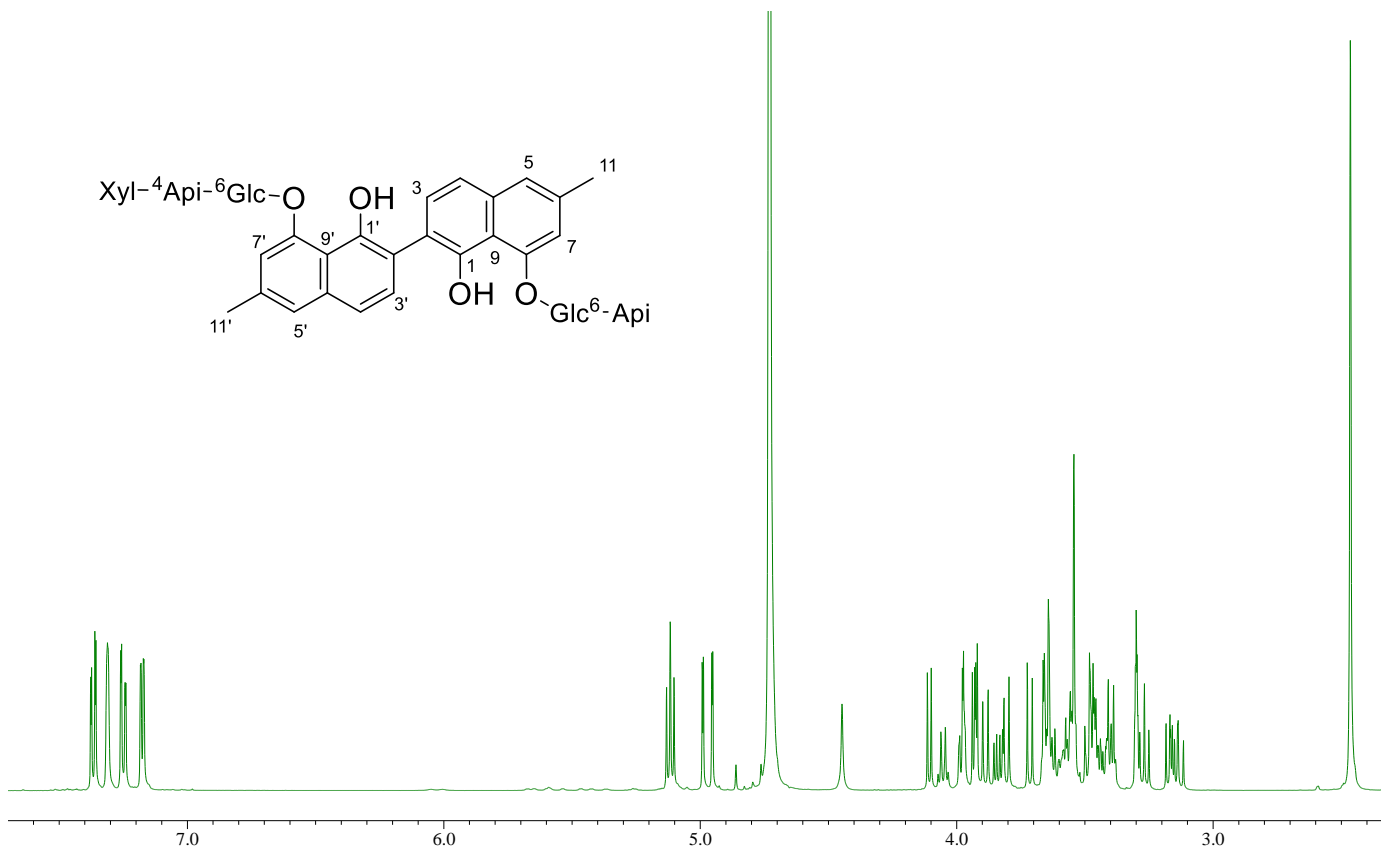


Fig. S1 ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD) of makuloside A (**1**)

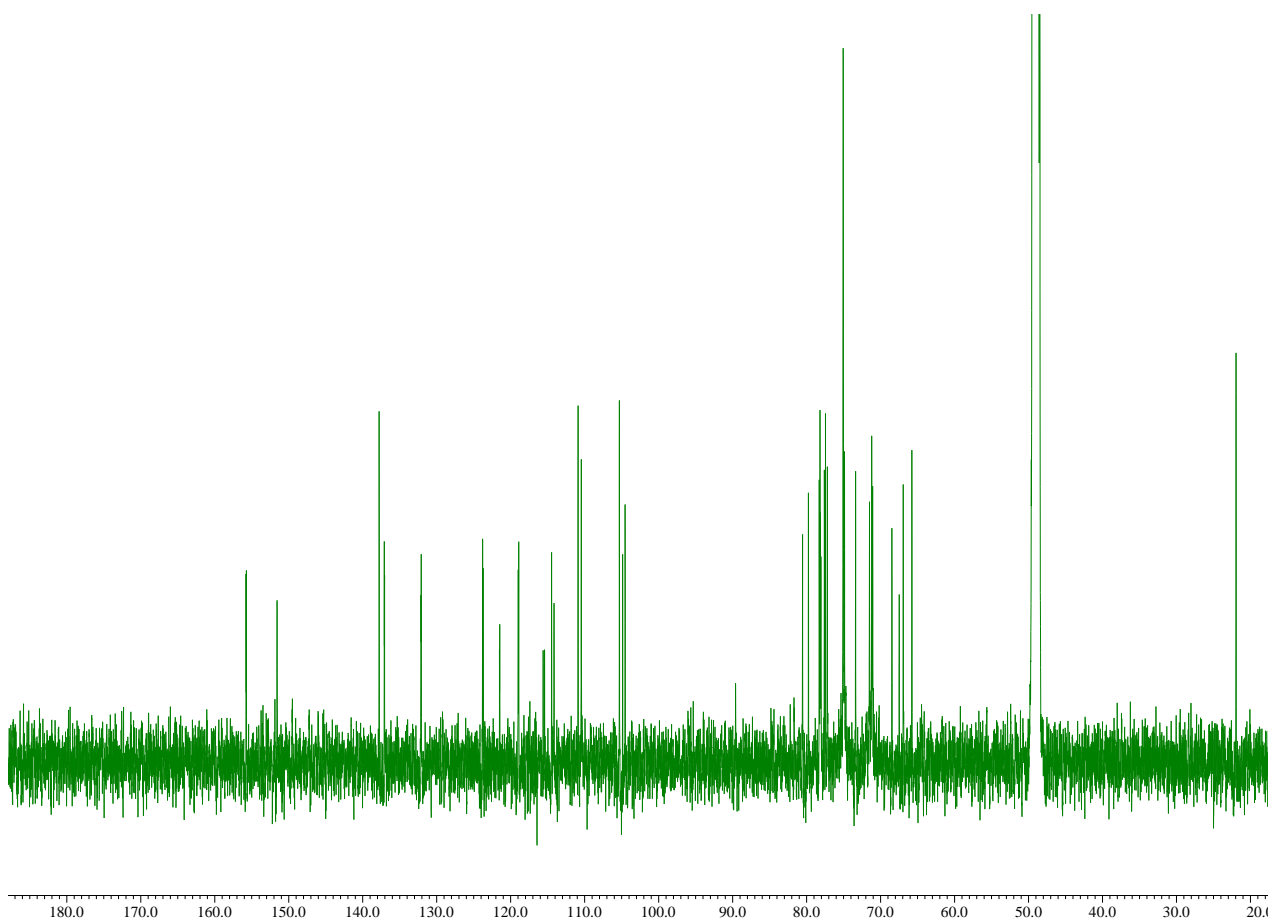


Fig. S2 ¹³C NMR spectrum (125 MHz, CD₃OD) of makuloside A (**1**)

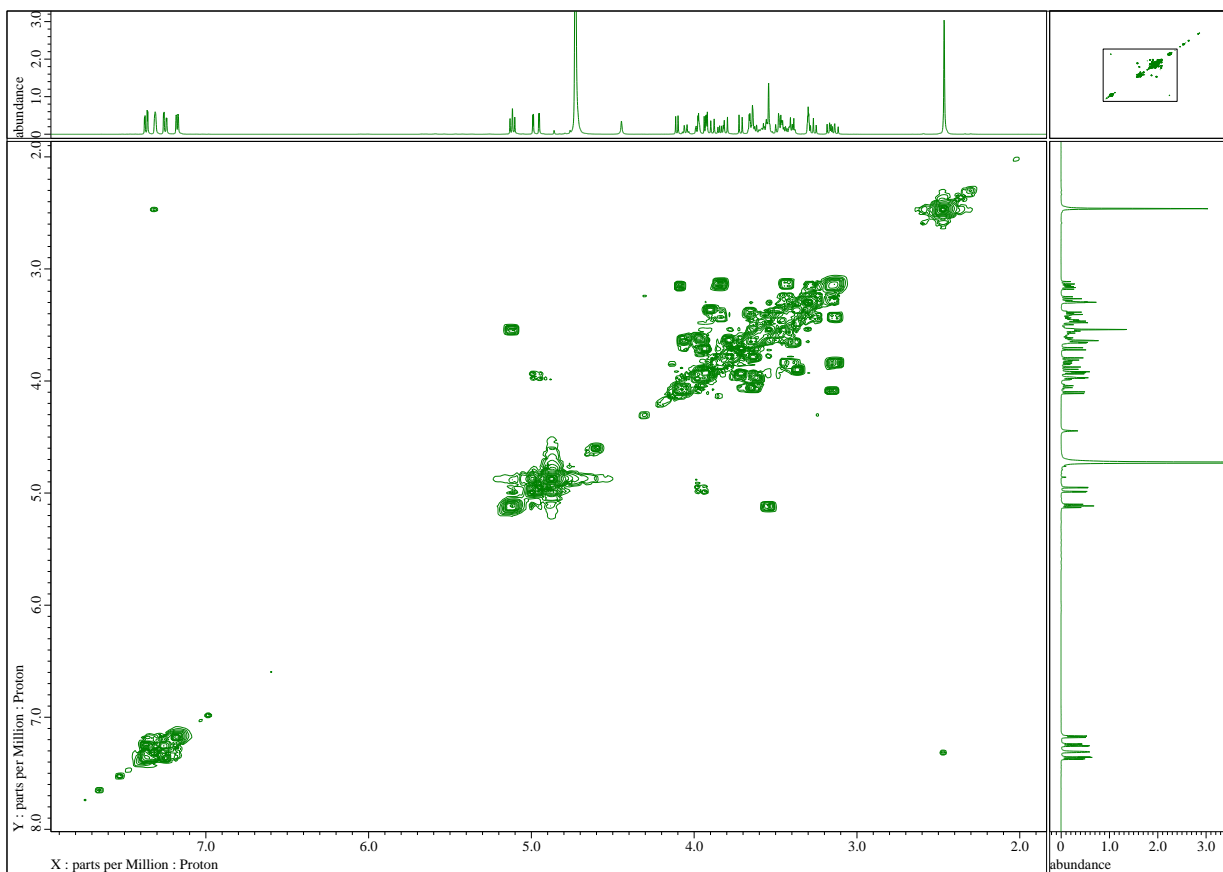


Fig. S3 COSY spectrum of makluoside A (1)

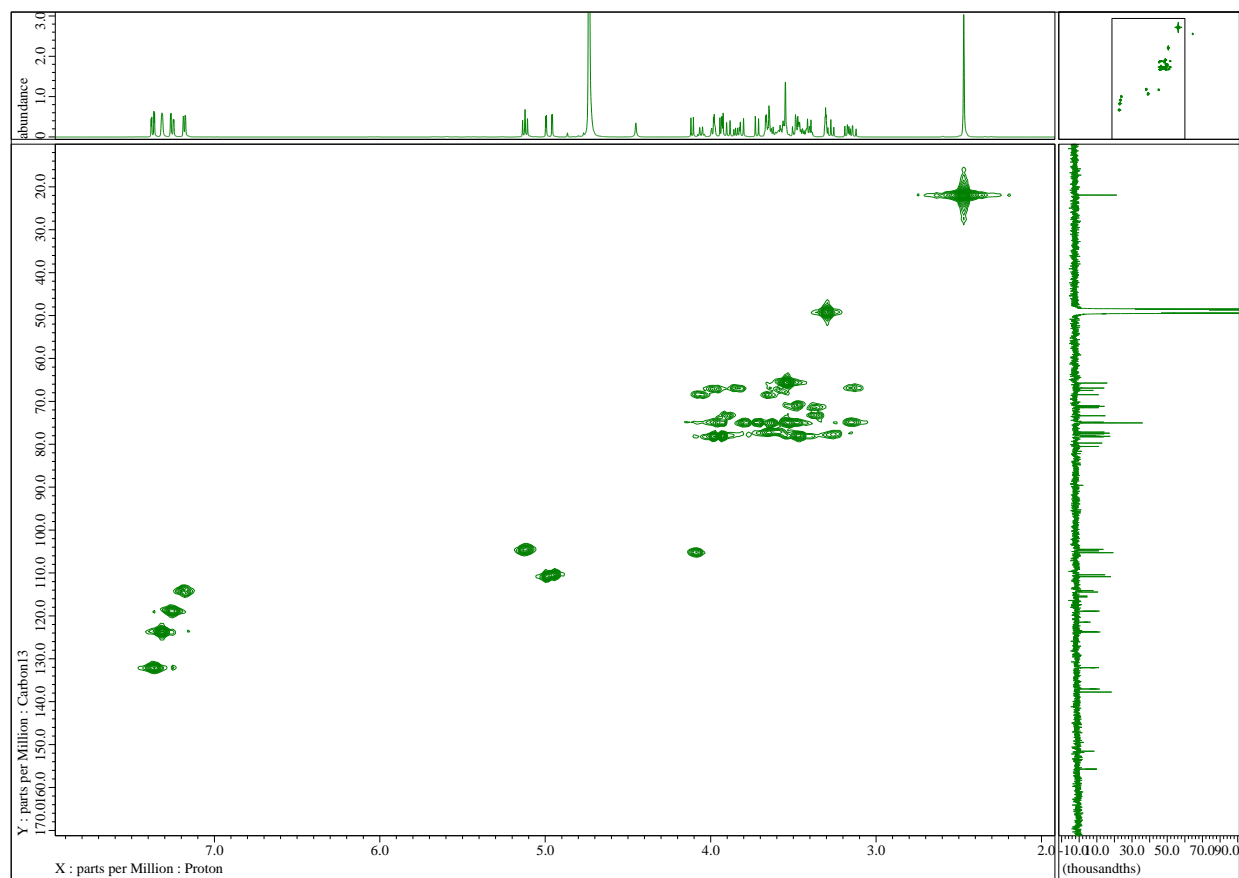


Fig. S4 HMQC spectrum of makluoside A (1)

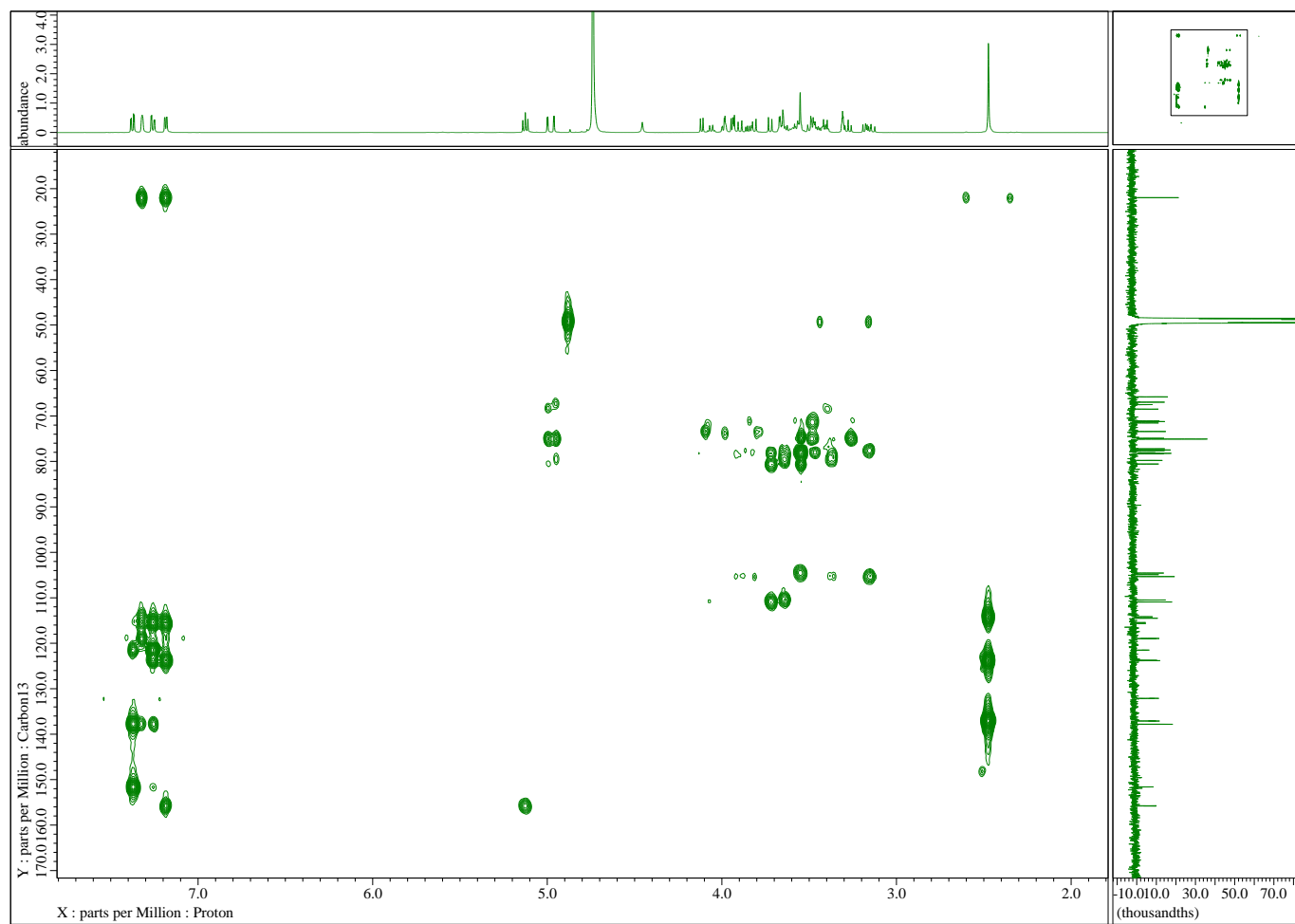


Fig. S5 HMBC spectrum of makluoside A (**1**)

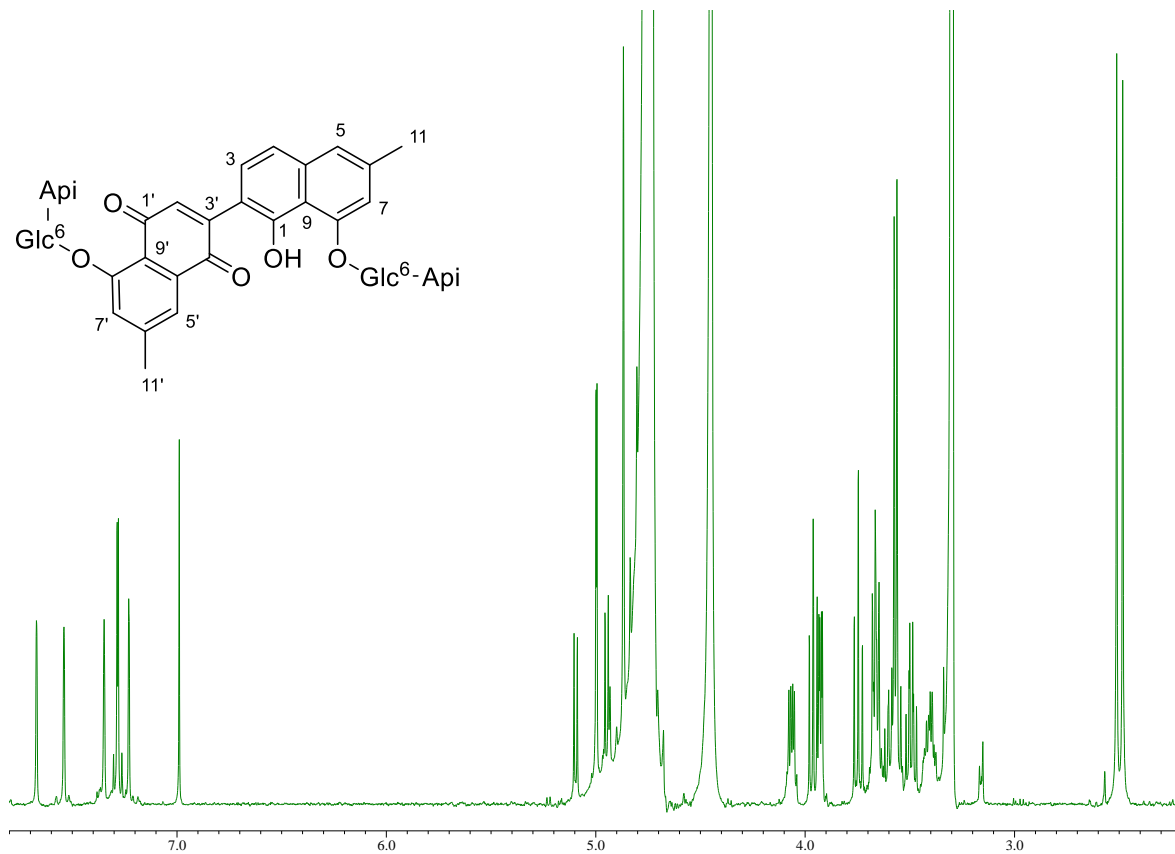


Fig. S6 ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD) of makuloside B (2)

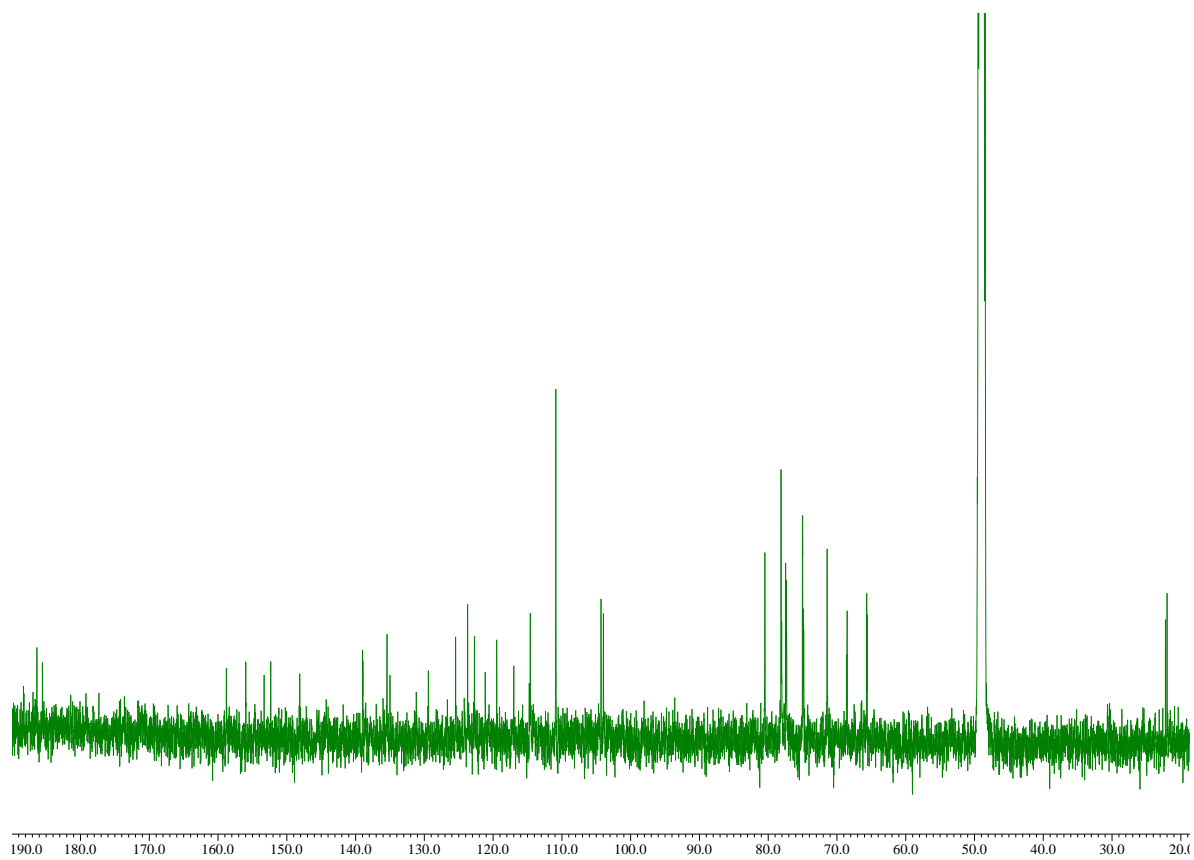


Fig. S7 ¹³C NMR spectrum (125 MHz, CD₃OD) of makuloside B (2)

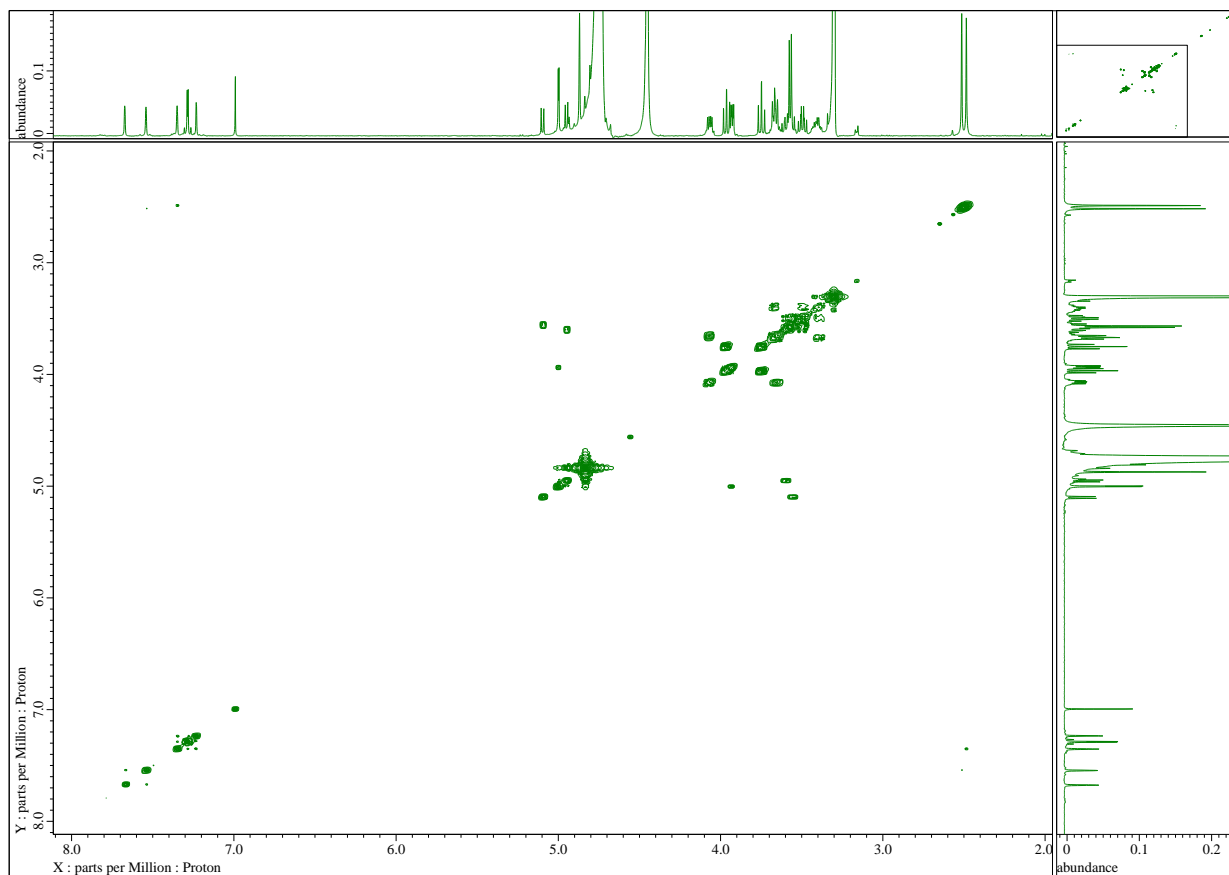


Fig. S8 COSY spectrum of makluoside B (2)

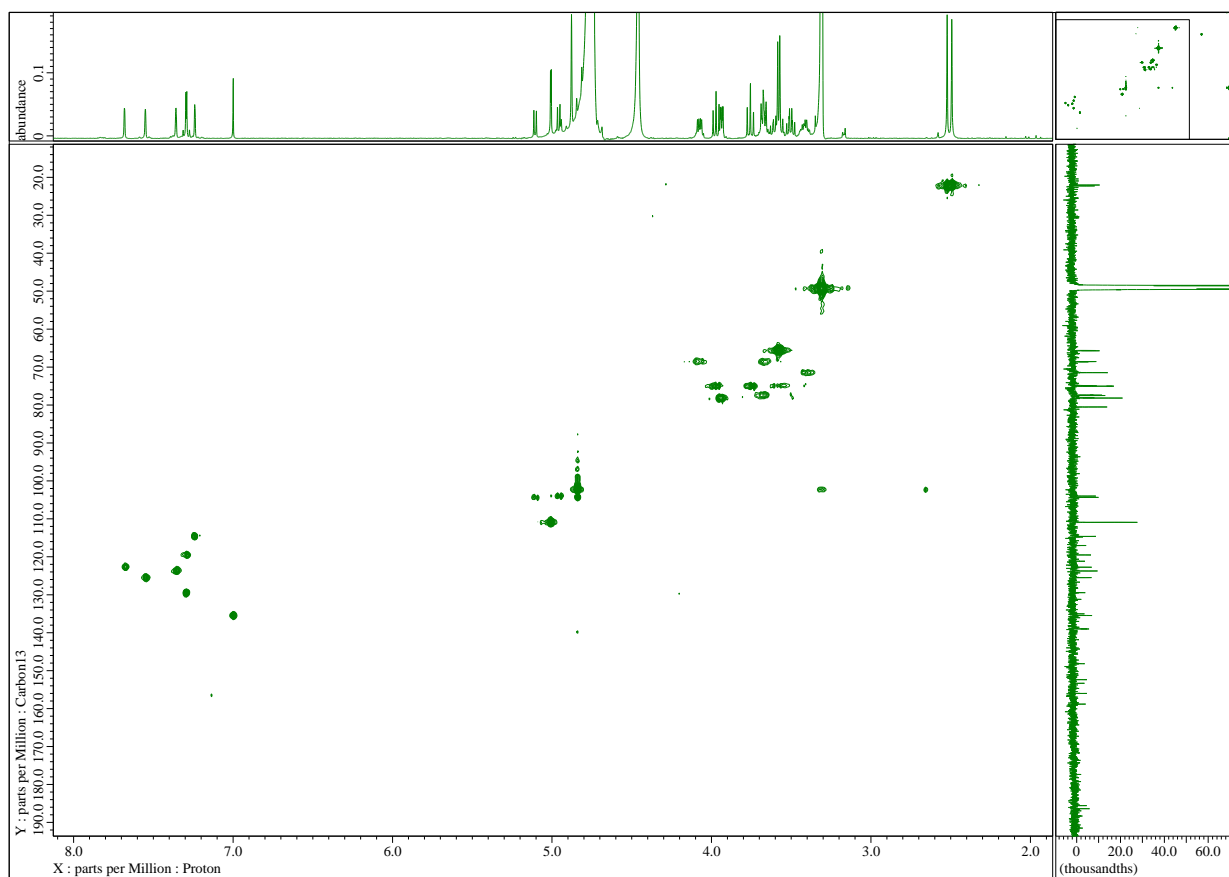


Fig. S9 HMQC spectrum of makluoside B (2)

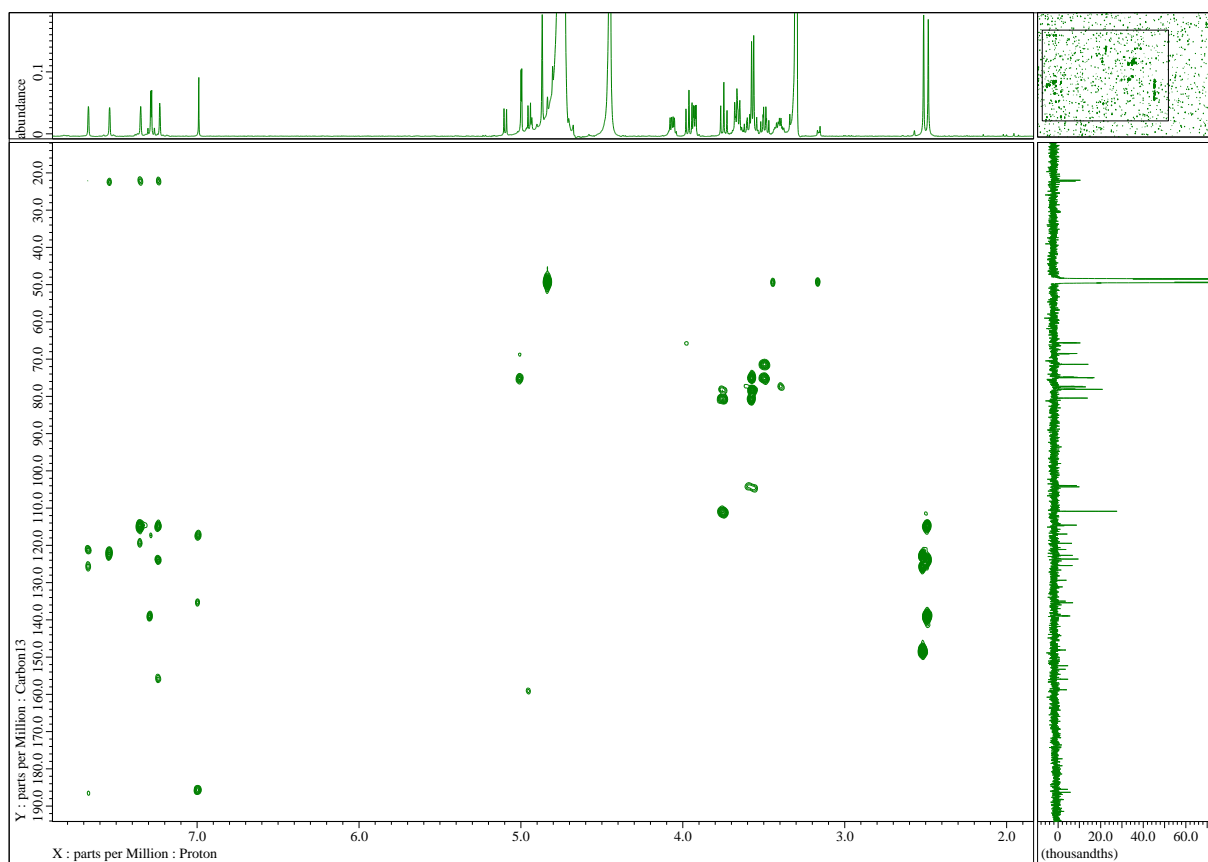


Fig. S10 HMBC spectrum of makluoside B (2)

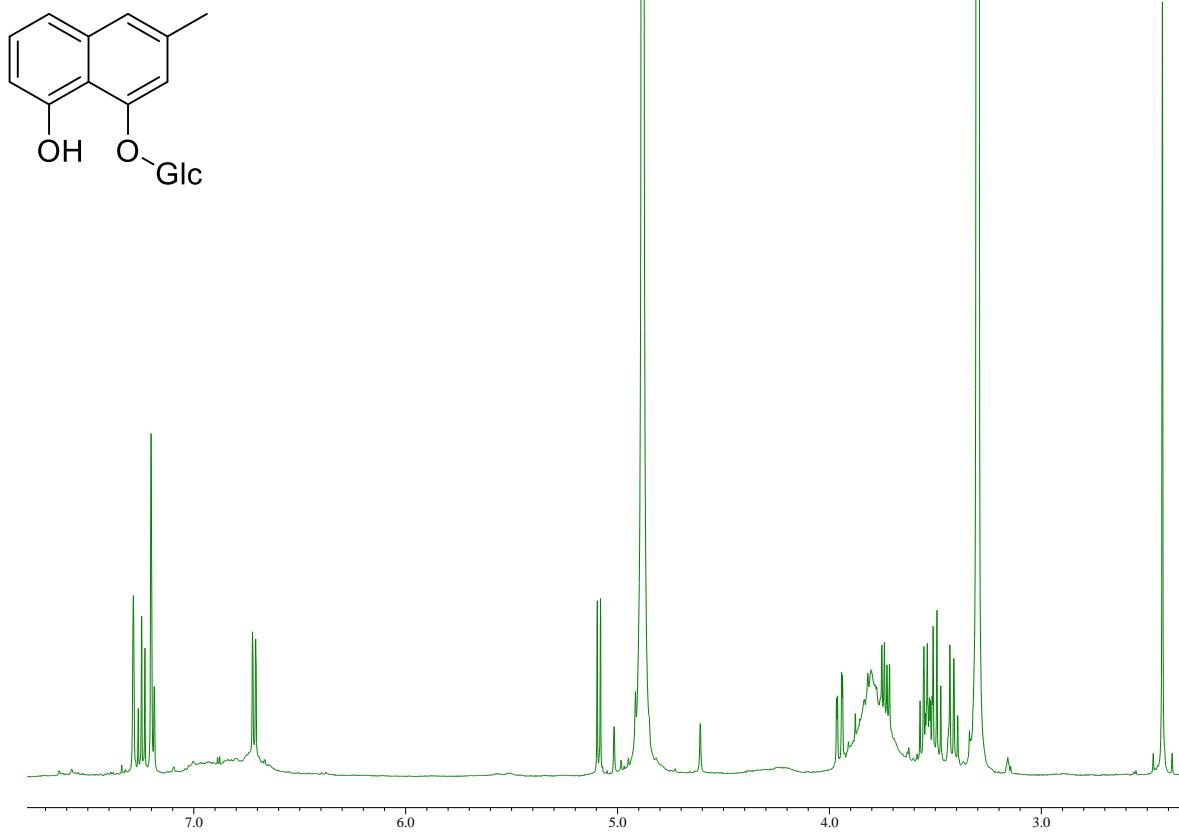


Fig. S11 ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD) of makuloside C (**3**)

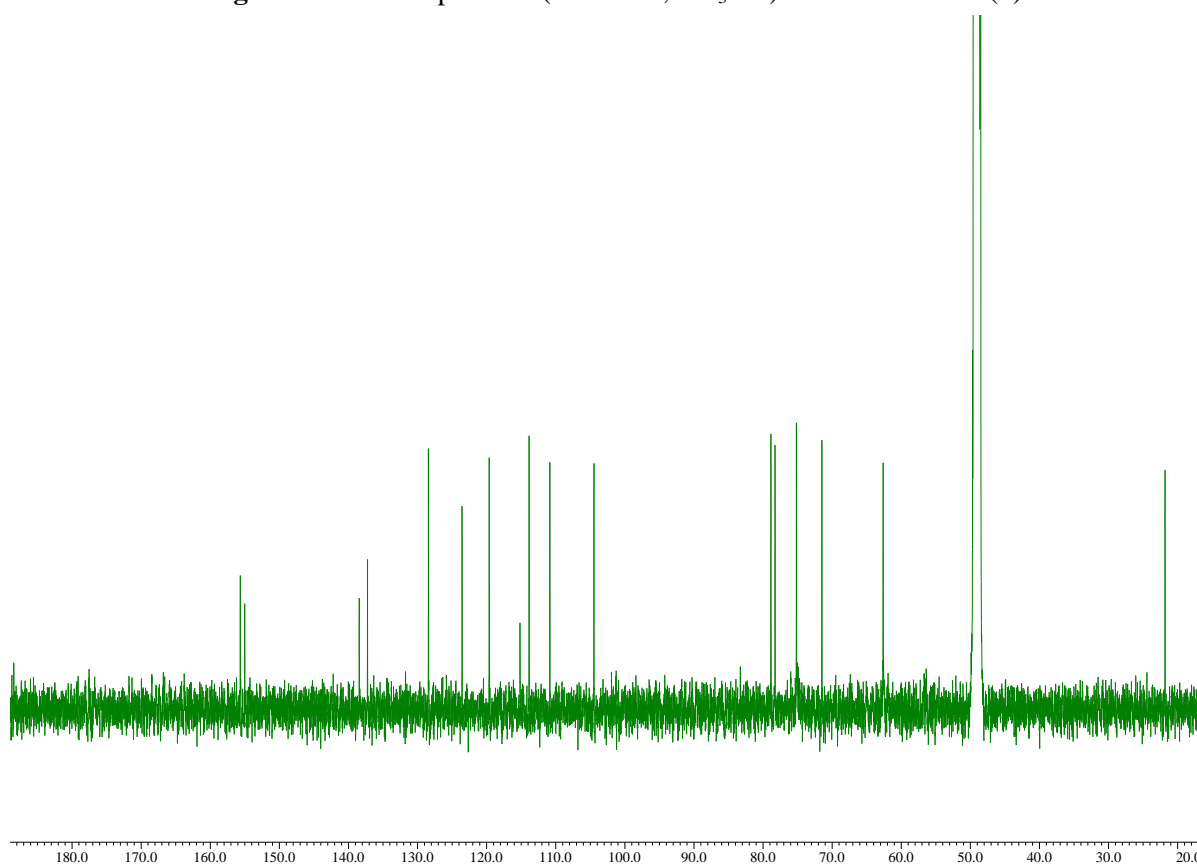


Fig. S12 ¹³C NMR spectrum (125 MHz, CD₃OD) of makuloside C (**3**)

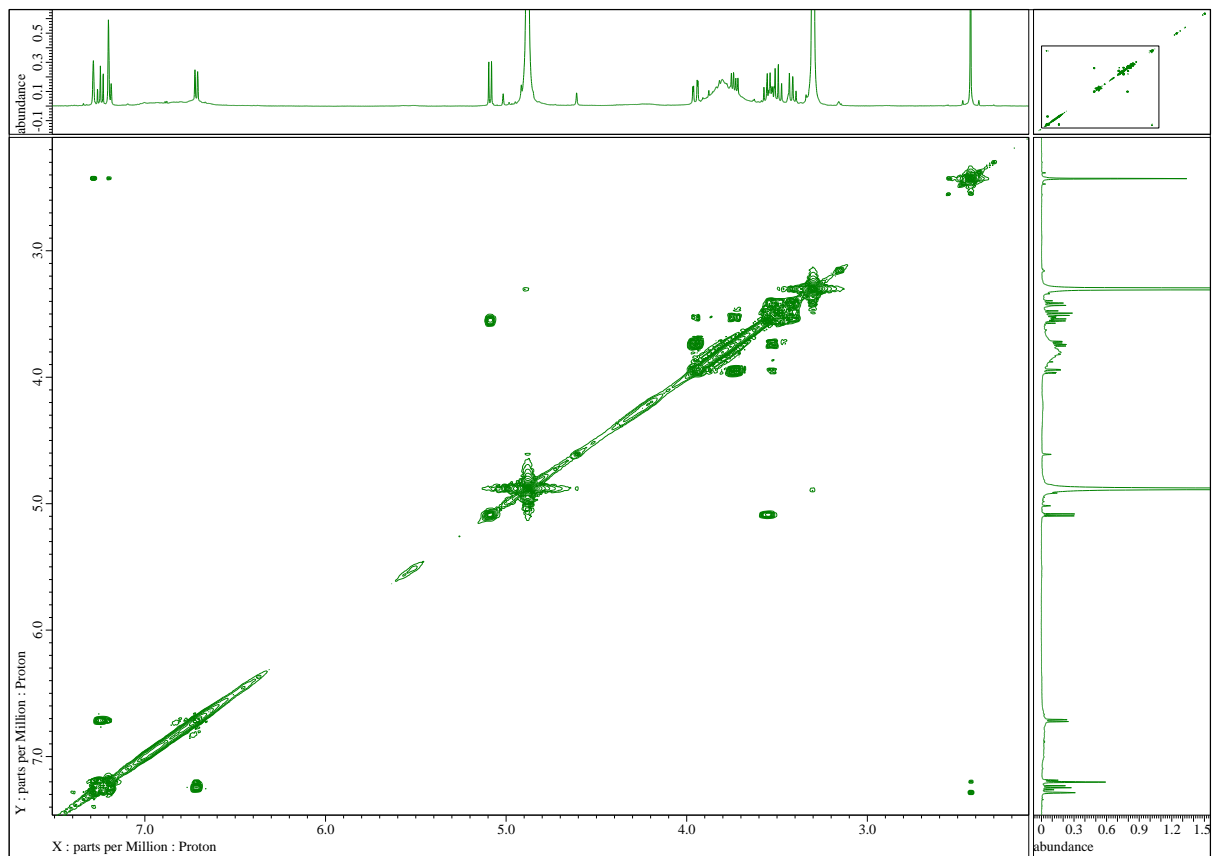


Fig. S13 COSY spectrum of makluoside C (3)

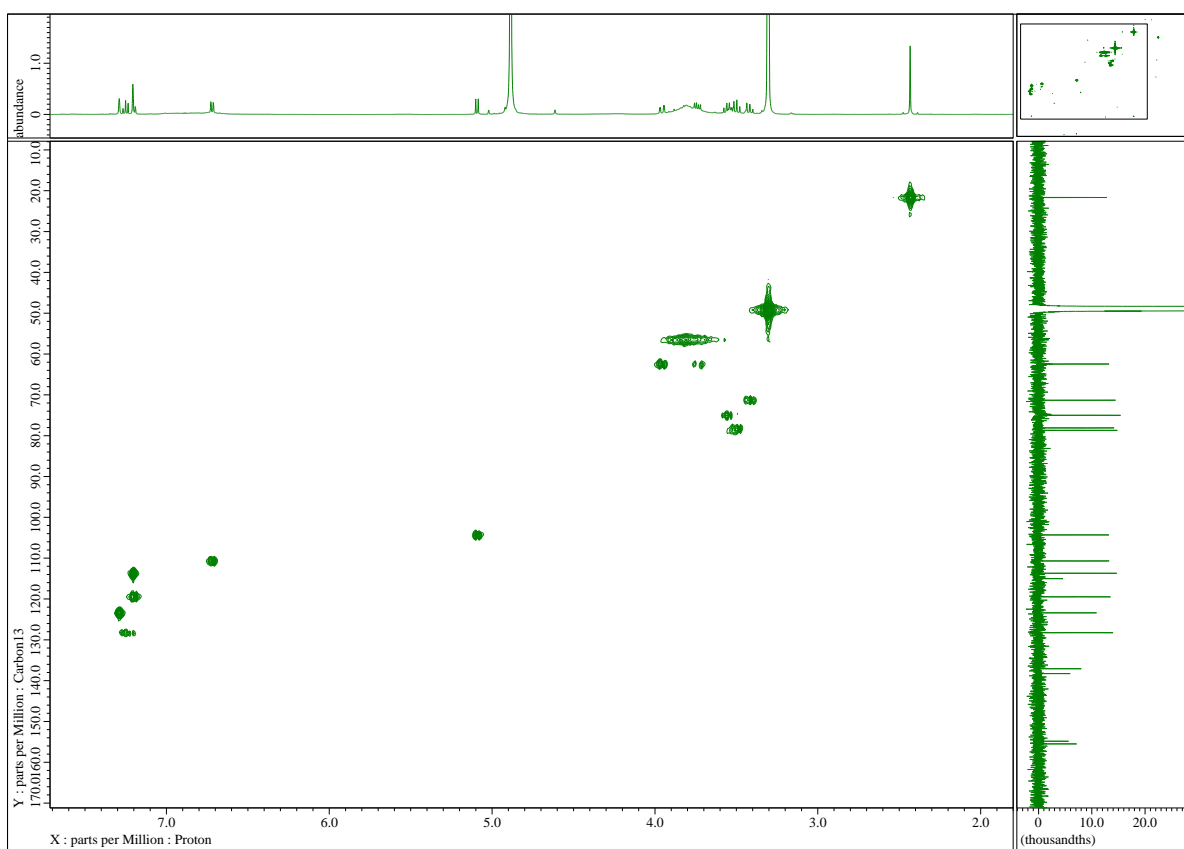


Fig. S14 HMQC spectrum of makluoside C (3)

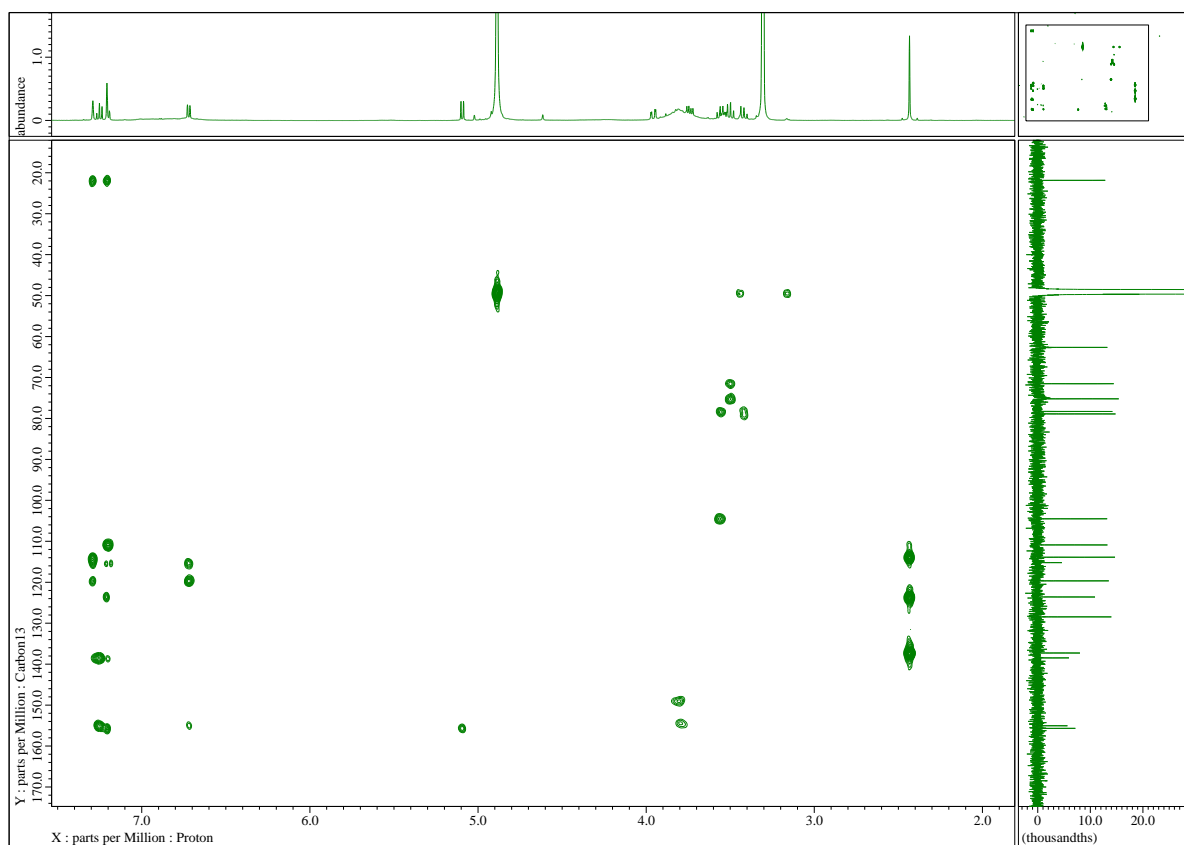


Fig. S15 HMBC spectrum of makuoside C (**3**)

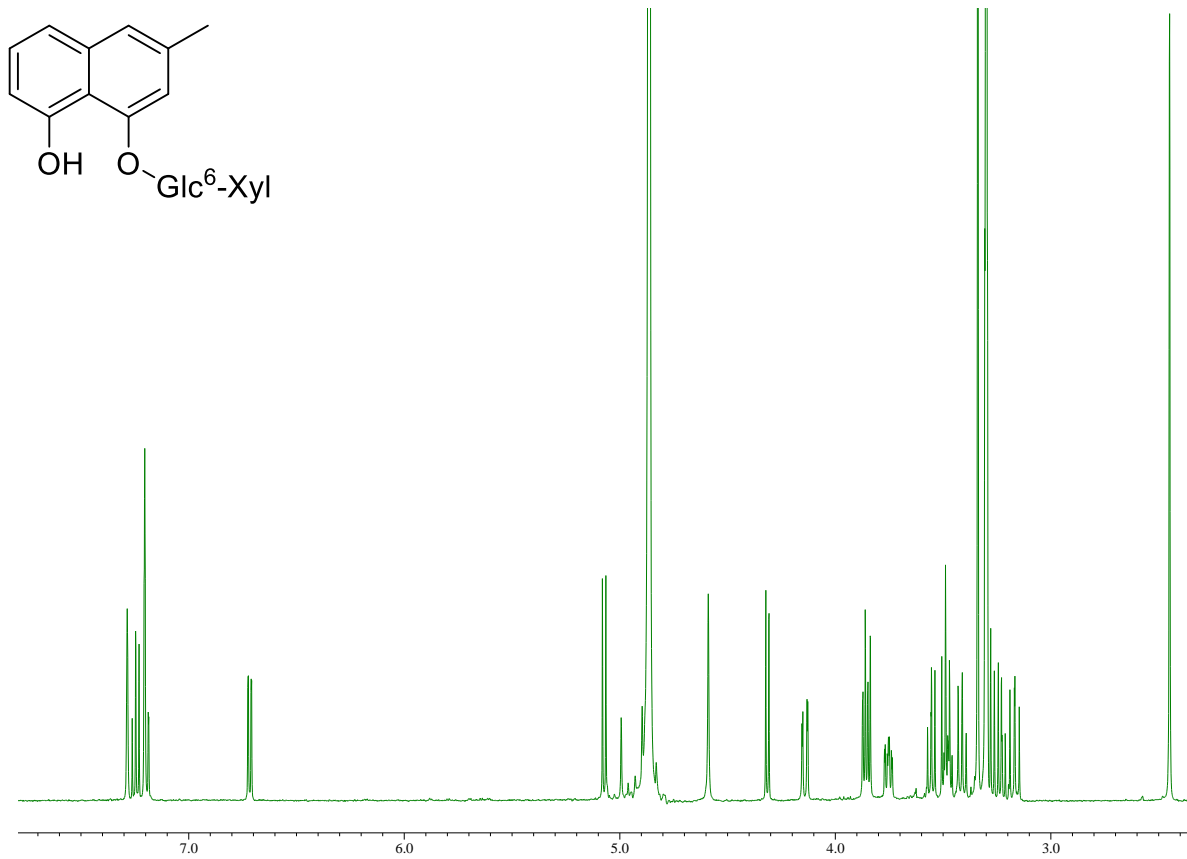


Fig. S16 ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD) of makuloside D (**4**)

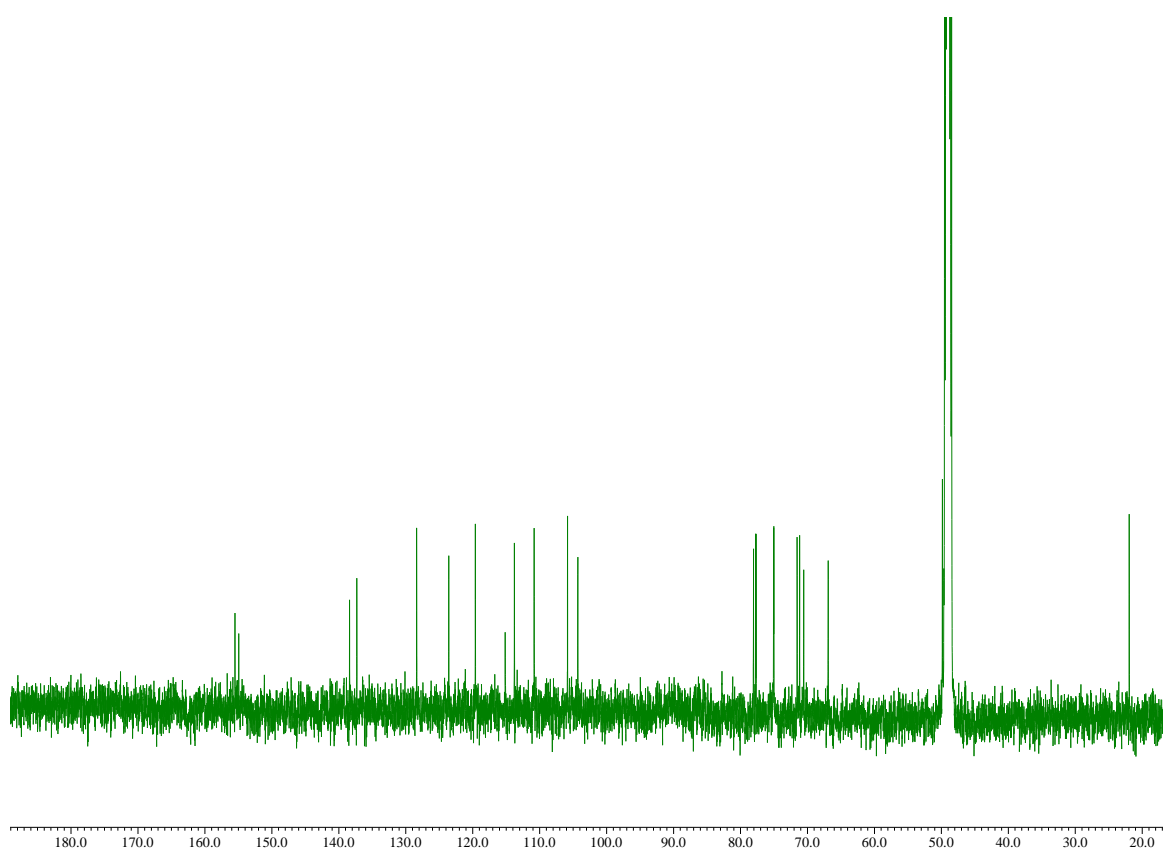


Fig. S17 ¹³C NMR spectrum (125 MHz, CD₃OD) of makuloside D (**4**)

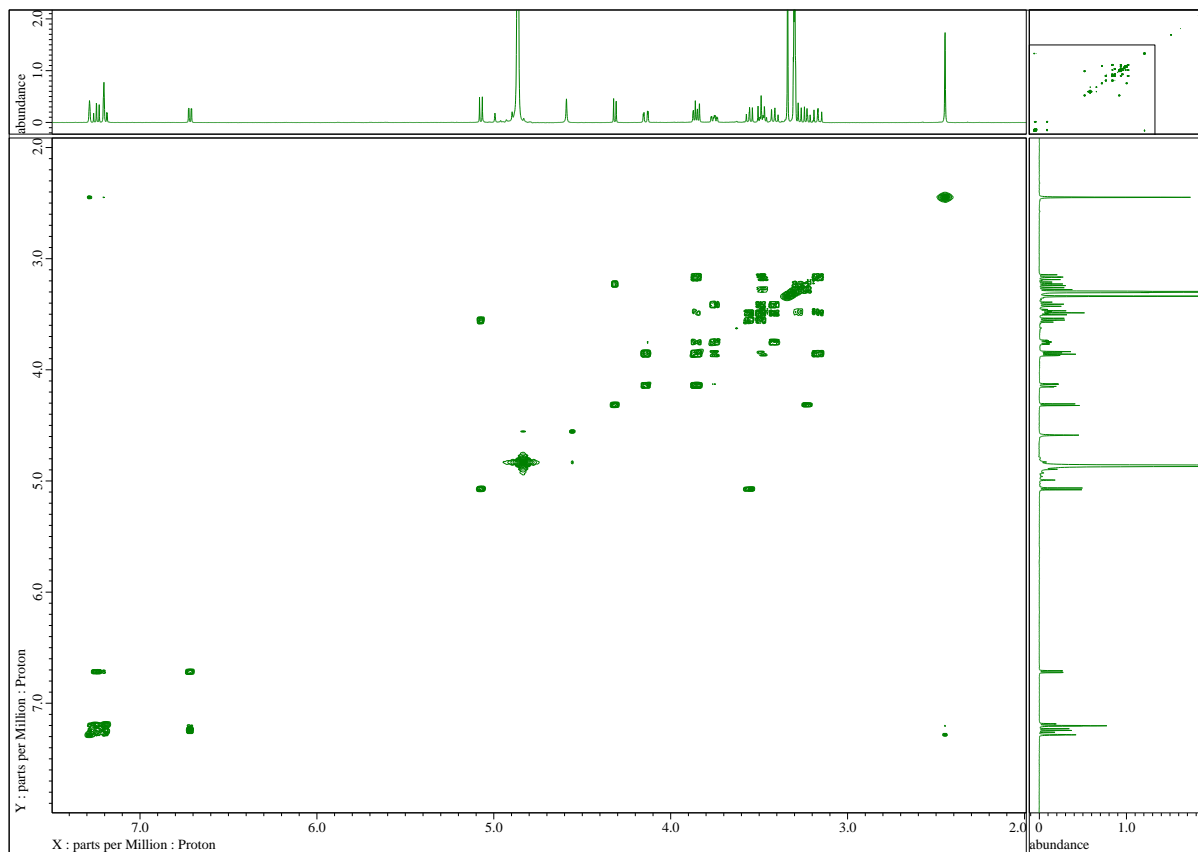


Fig. S18 COSY spectrum of makluoside D (4)

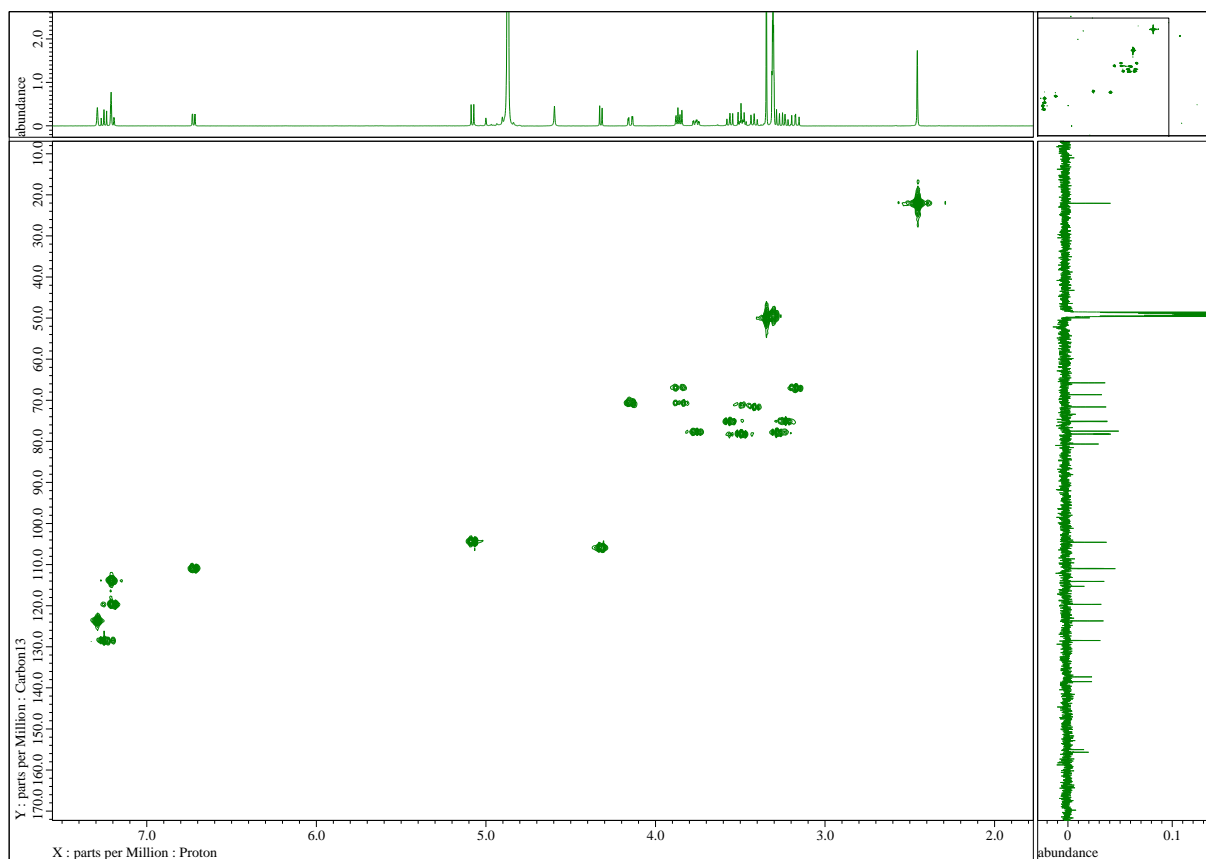


Fig. S19 HMQC spectrum of makluoside D (4)

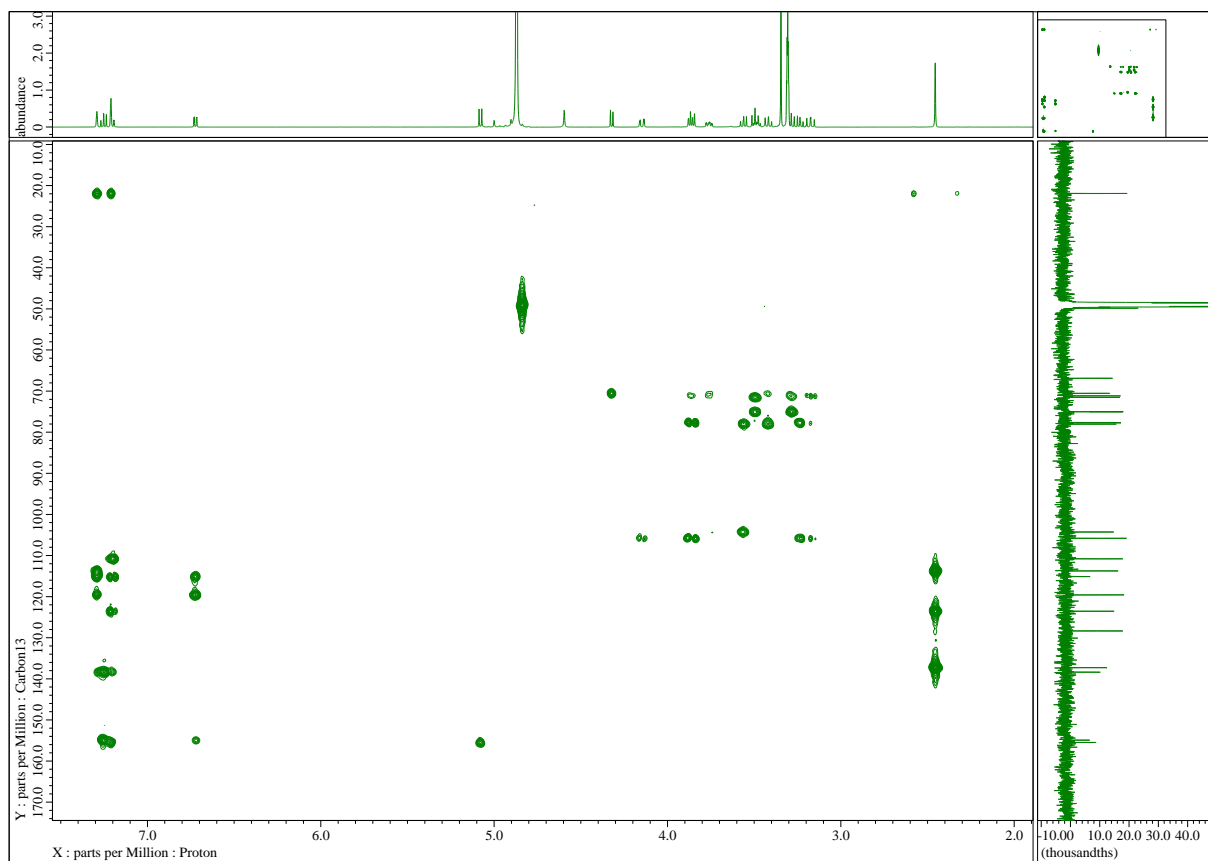


Fig. S20 HMBC spectrum of makluoside D (**4**)

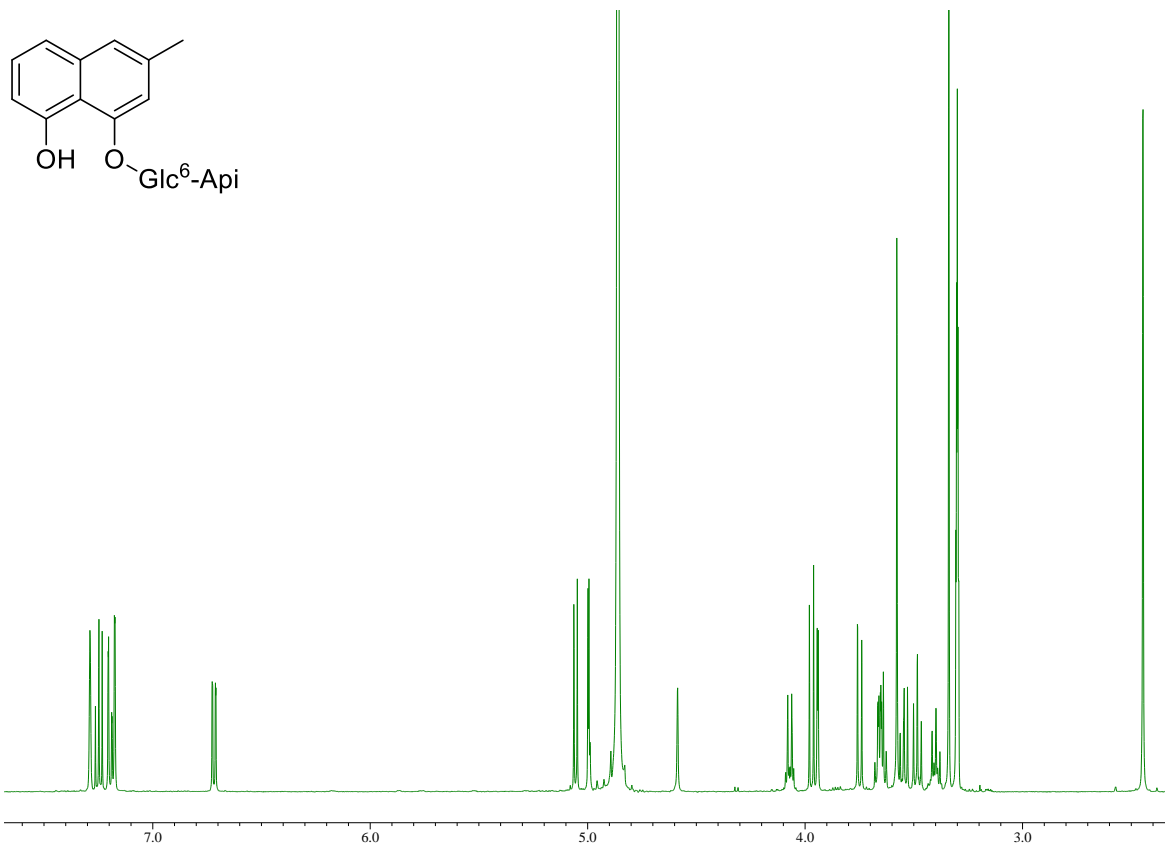


Fig. S21 ¹H NMR spectrum (500 MHz, CD₃OD) of makuloside E (**5**)

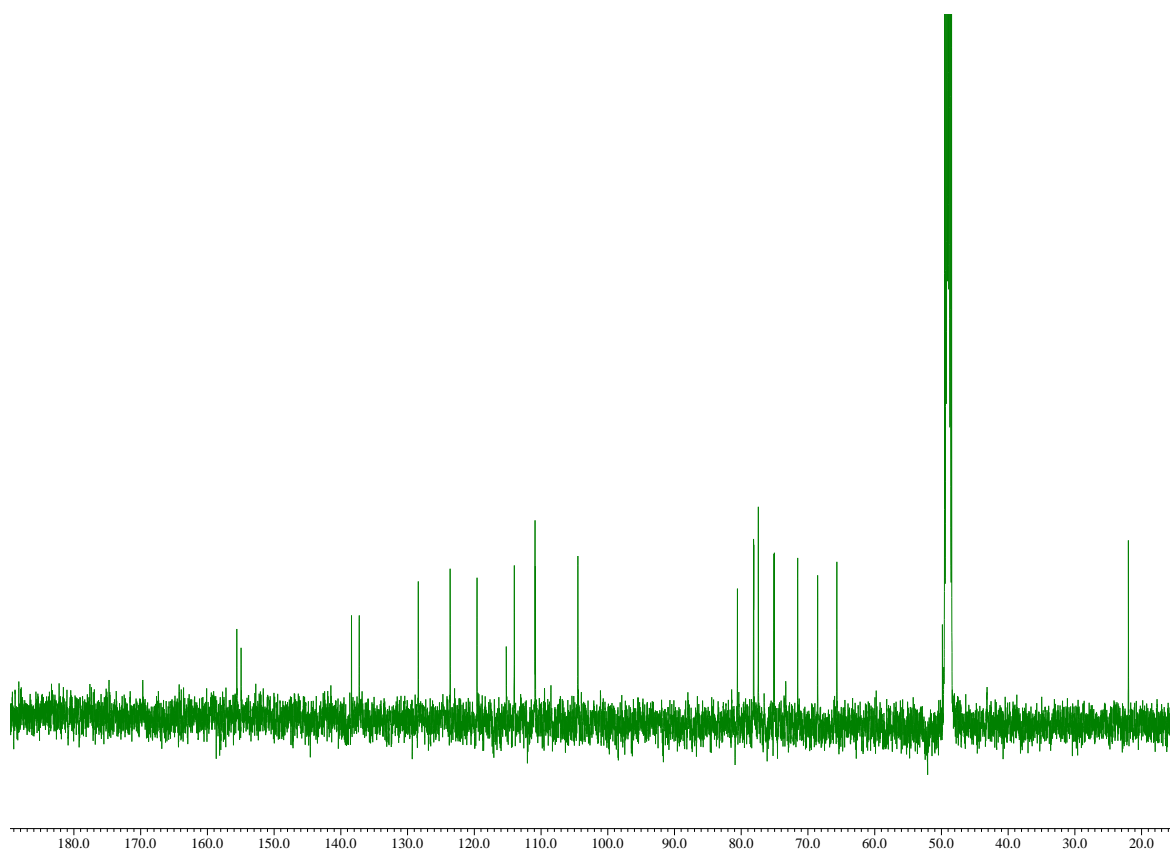


Fig. S22 ¹³C NMR spectrum (125 MHz, CD₃OD) of makuloside E (**5**)

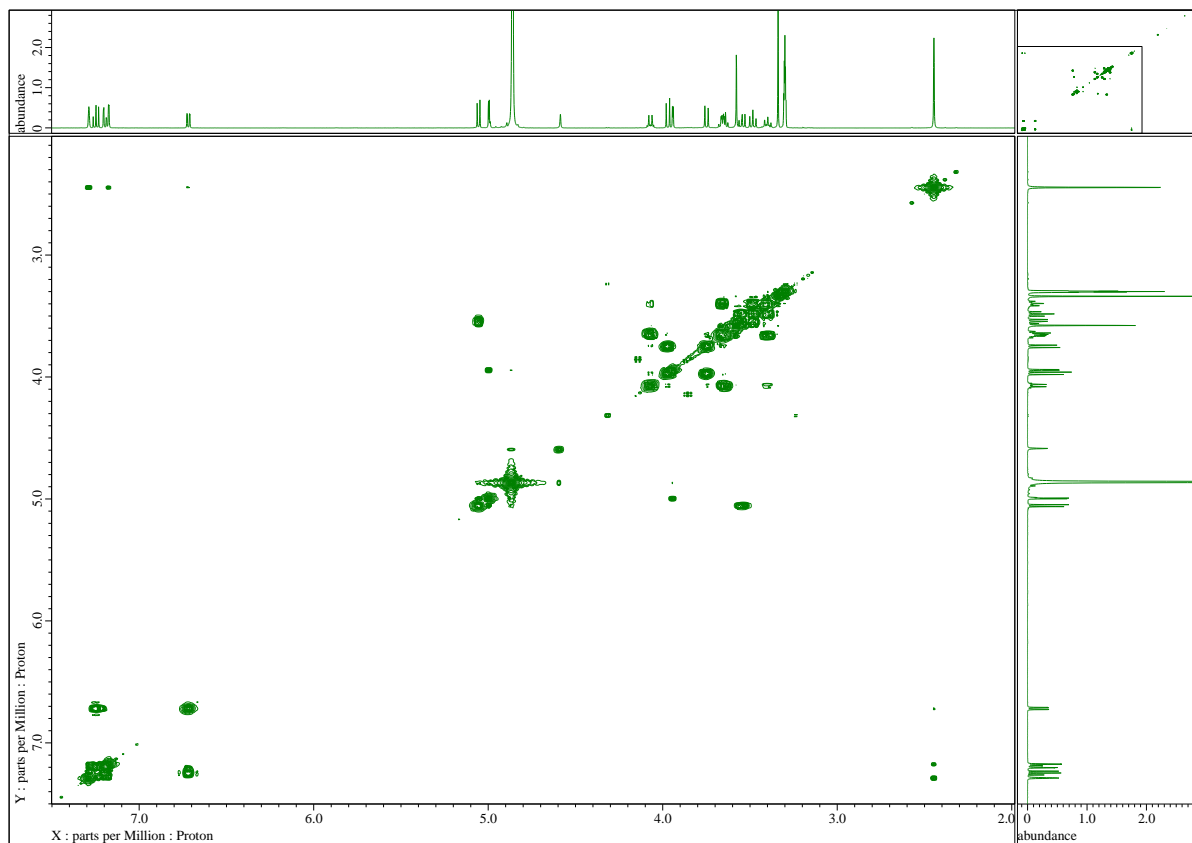


Fig. S23 COSY spectrum of makluoside E (**5**)

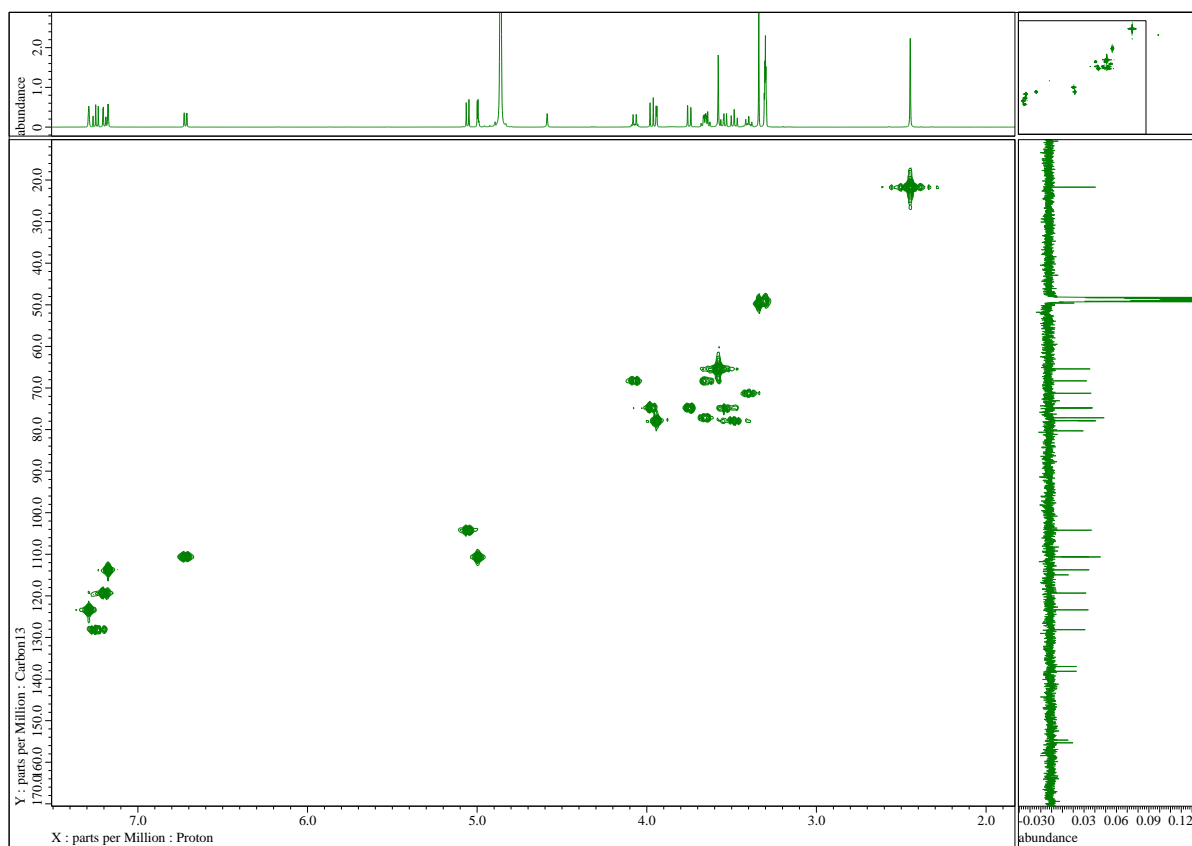


Fig. S24 HMBC spectrum of makluoside E (**5**)

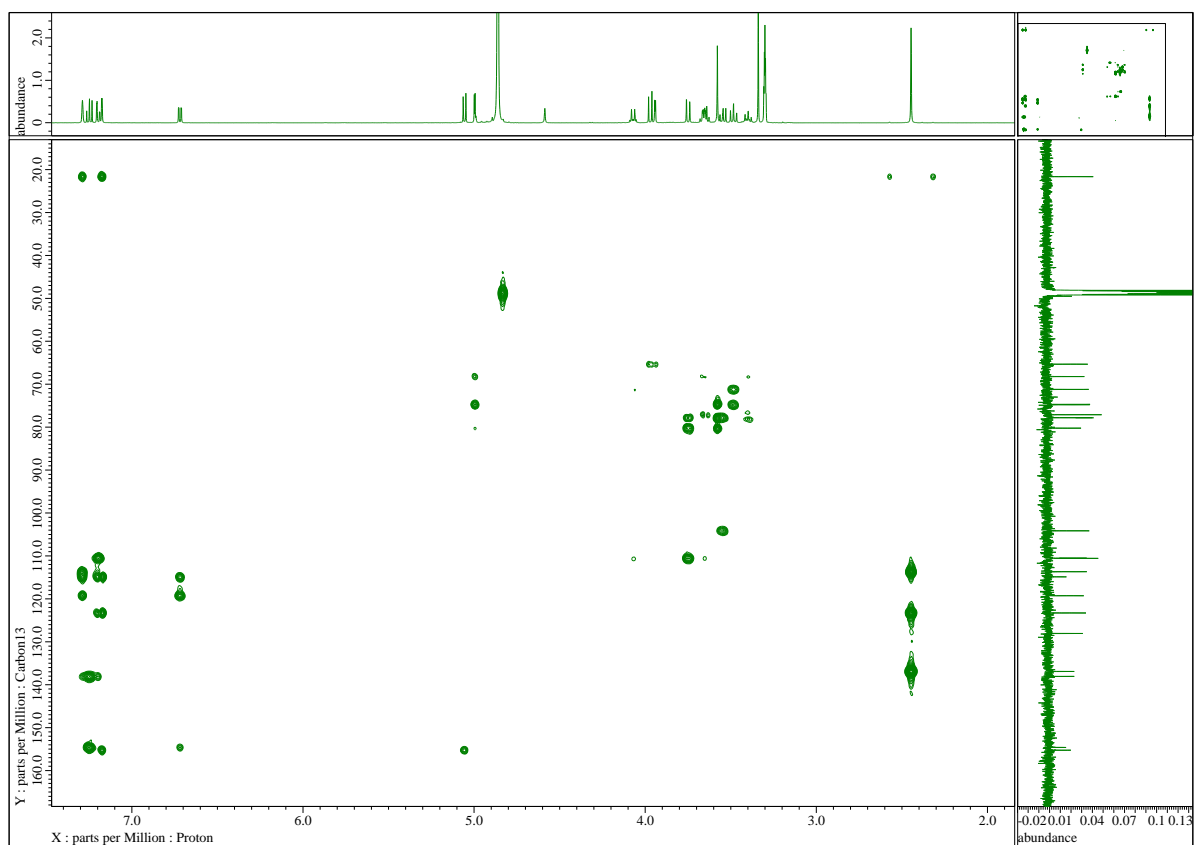


Fig. S25 HMBC spectrum of makuoside E (5)