

研究課題名 グレーゾーンの植物体に関する研究

分担研究者 大塚 英昭 安田女子大薬学部 教授

分担課題名 リュウキュウガキの化学成分に関する研究

#### 研究要旨

沖縄に産するカキノキ科植物であるリュウキュウガキ(*Diospyros maritima*)は沖縄本島から先島諸島にわたって自生しており、その果実は毒とされている。時として、「柿」という名称から、誤食の可能性もあり、実際危険を及ぼすであろう成分の検討をおこなっている。さらに本植物は魚毒作用を持つことが知られており、本活性を示す成分の検索も行う予定である。

#### 研究協力者名

広島大学 教授 松浪勝義

安田女子大学 准教授 稲垣昌宣、西村基弘、助教 川上 晋

#### A. 研究目的

多くの地域にカキノキ科植物は自生、また栽培され、その果実を生食する。渋柿であっても渋をぬいて食用に供している。沖縄にはカキノキ科植物は本邦にも産するカキを初めとして、数種類が知られている。リュウキュウコクタン (*Diospyros egyptica*) の果実は貧弱で、食用としてもちいられることはなく、その材の多くは琉球楽器である三線（さんしん）の棹として用いられている。近縁植物のリュウキュウガキ (*D. maritima*) は沖縄本島から先島諸島にわたって自生しており、芳醇な果実を結ぶことが知られ、一般に毒といわれているが、一

見喫食が可能であると見間違えられる可能性がある。この実にはナフトキノンである **plumbagin** (図2)



図1 リュウキュウガキ

が含まれ毒性を示す物質であるとされている。この点に鑑み、リュウキュウガキの成分の検索を行った。

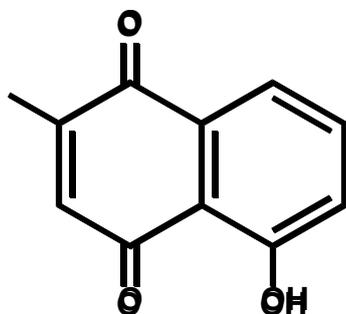


図 2

ちなみに近年の報告では、ナフトキノンの配糖体が近縁種 (*D. mollis*) [1]から報告されている。

## B. 研究方法

先島諸島八重山郡竹富町で採集したリュウキュウガキ (*D. maritima*) の葉 (7.80 kg) を MeOH で抽出し、濃縮残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分と水可溶画分をえた。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を 215 g 得た (Chart 1)。

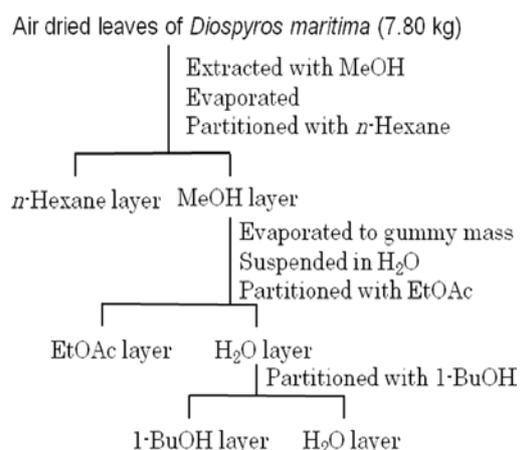


Chart 1

1-BuOH 画分を Diaion HP-20、silica gel カラムクロマトグラフィーで精製して

diosmariosides A-H (1-8) と命名した新規化合物および既知化合物 9、10 を得た (図 3)。得られた化合物は、核磁気共鳴スペクトルを中心とする、機器分析によってその構造を明らかとした。

## C. 研究結果

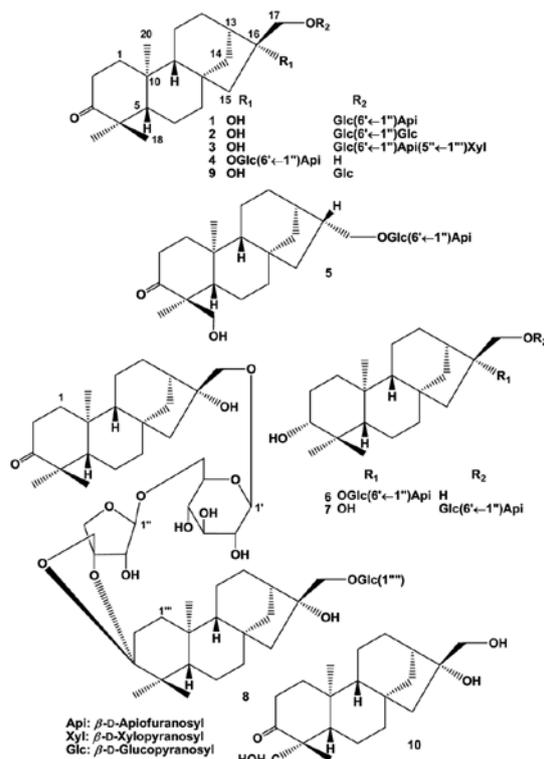


図 3 単離した化合物

Diosmariosides D (4) および化合物 9、10 に関しては前回の報告書で詳述したので、今回はそのほかの化合物について報告するが、特に diosmarioside E (5) と diosmarioside H (8) についてその詳細を述べることにする。

Diosmarioside E (5) は比旋光度  $[\alpha]_D -96.0$  を示す無色針状結晶として得られ、その融点は 129-131 °C であった。赤外線吸収スペクトルにおいて水酸基 (3257  $\text{cm}^{-1}$ ) 及びカルボニル基 (1703  $\text{cm}^{-1}$ ) に由来する吸収が認められ、高分解能質量分析の結

果、その分子式は  $C_{31}H_{50}O_{12}$  と決定された。 $^1H$ -NMR において 2 本のシングレットメチル基と 2 組の一級水酸基に由来するシグナルが観測された。 $^{13}C$ -NMR においては高分解能質量分析の結果どおり、31 本のシグナルが観測され、そのうち 11 本はグルコースとアピオースに由来するものであった。残りの 20 本は、2 本のメチル基、10 本のメチレン基が存在し、そのうち 2 本には水酸基が結合していた。さらに、4 本のメチン基、3 本の四級炭素およびカルボニル炭素のシグナルが観測された。

以上のことを勘案すると、diosmarioside E (5) はカルボニル基および二個の一級水酸基からなるカウラン型ジテルペンであろうと予想された。

これを確証するために、COSY、HSQC、HMBC スペクトル等の二次元スペクトルを測定し、解析を行った結果、図 2 に示す構造が妥当であるとの結論に達した。本構造は diosmariosides D (4) の 16 位の水酸基が失われたものである。円偏光二色性スペクトルの 294 nm の負の Cotton 効果 ( $\Delta\epsilon: -0.71$ ) より、同様に母核はエナンチオ型であることが明らかとなったが、16 位の立体については再考の余地が残された。そこで位相検波 NOESY スペクトルを用いて検討を行った (図 5)。その結果 H-17b ( $\delta_H$  3.47) と H-14b ( $\delta_H$  1.06) の間、H-16 ( $\delta_H$  2.18) と H-11a ( $\delta_H$  1.53) および H-12b ( $\delta_H$  1.32) の間に相関が見られたことより、17 位の一級水酸基は  $\alpha$  側に有ることになり、16 位の絶対配置は  $R$  と決定された (図 4)。しかしながら、このことは 17 位の炭素が他に得られている化合物とは逆の配位となり、このことの確認を得るために、X-

線結晶構造解析を行った。Diosmarioside E (5) を加水分化して、アグリコンを得て結晶

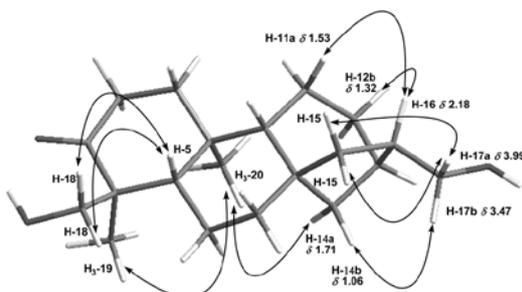


図 4 Diosmarioside E (5) の NOESY 相関化を行い解析した結果を図 5 に示すが、NOESY から得られた結果を支持していた。

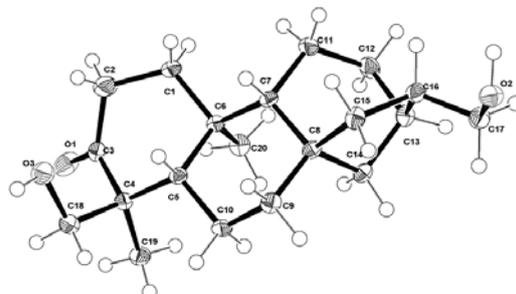


図 5 X 線結晶解析の結果

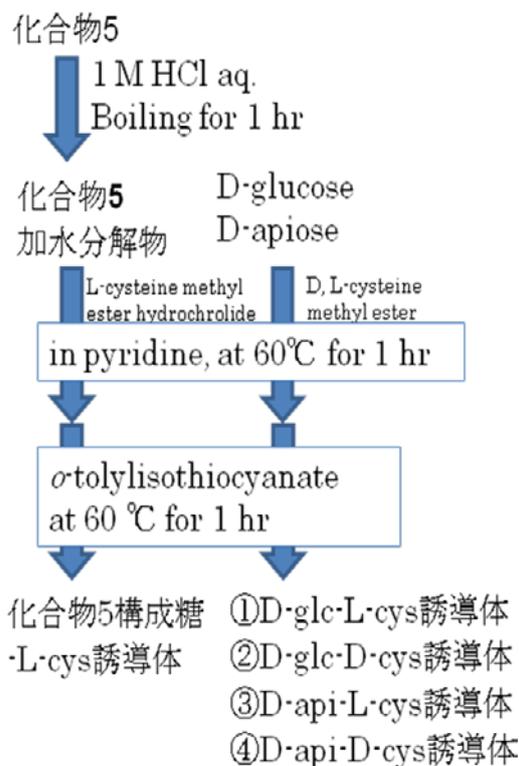


図 6 糖分析

## HPLC 条件

Column: Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR II 4.6 mm × 250 mm

Detector: Photo Diode Array

Flow rate 0.8ml/min

糖の絶対配置の決定は D-, L-システインを用いて誘導体とし、以下の方法を用いて行った。Diosmarioside E (5)の加水分解物からは 19.2 min および 32.2 min のピークが検出され、①③と同様の保持時間を示した。よって 5 の構成糖は D-glucose と D-apiose であると結論された (図 6)。

さらに糖の結合位置は HMBC の結果から、グルコースは 17 位の水酸基に、アピオースはグルコースの 6 位に結合していることが明らかとなった。

Diosmarioside H (8)は比旋光度 ( $[\alpha]$ )  $-49.4$  を示す無色非結形粉末として得られ、分子式は C<sub>57</sub>H<sub>90</sub>O<sub>19</sub> と決定された。赤外線吸収スペクトルにおいて水酸基に由来する吸収とともにカルボニル基に由来する吸収が 1703 cm<sup>-1</sup> に認められた。<sup>13</sup>C-NMR においては高分解能質量分析の結果どおり、57 本のシグナルが観測され、糖由来のシグナルと思われる 17 本のシグナルを除くと、残りは 20 本となった。糖分析では D-glucose と D-apiose が確認されたが、NMR のアノマーシグナルの解析からグルコースが 2 分子存在することが明らかになった。二次元 NMR スペクトル、特に HMBC スペクトル (図 7) を詳細に検討した結果、ジテルペン部分の 3 位にケトン基がアピオースの 3 位と 5 位の水酸基との間でケタール構造を有していることが明となり、図 2 の 8 に示すような 2 量体構造を有することが結論づけられた。

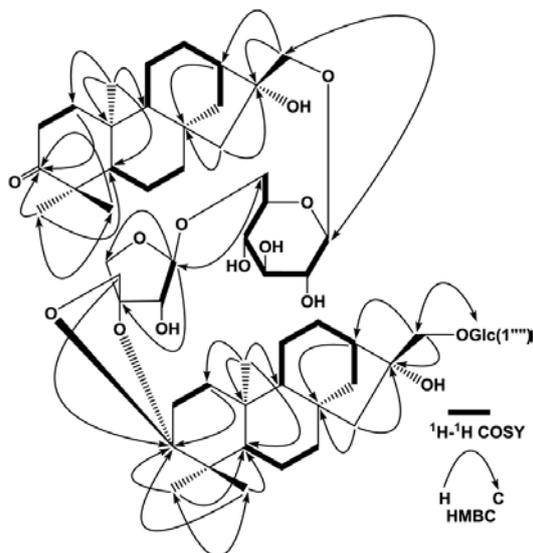


図 7 Diosmarioside H (8)の HMBC 相関円偏光二色性スペクトルの Cotton 効果からケトン基有するジテルペン部はエント型であることがあきらかとなった。一方のジテルペン部の絶対配置は同様にエンチオ型と推測されたが NOESY スペクトルによって、ケタール部分を構成する 3'''位が R 配置と考えられるため、推測が確認された (図 8)。

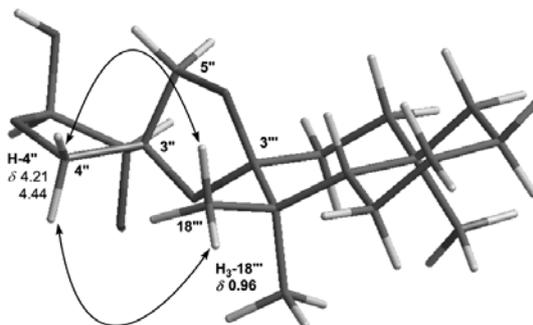


図 8 Diosmarioside H (8)の NOESY 相関得られたジテルペン類の細胞毒性をヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 を用いてアッセイした。その結果、dismaruosides E (5)と sugeroside (9)にポジティブコントロールの etoposide より強い活性がみとめられた (Table 1)。現時点において活性構造

相関については言及できる情報は持ちあわせていない。

Table 1. Cytotoxicity toward A549 Cells (IC<sub>50</sub>: μM)

1	>100
2	>100
3	>100
4	5.11±0.23
5	>100
6	100
7	>100
8	>100
9	2.39±0.27
10	>100
Etoposide	36.5±7.84

Etoposide: Positive control. Each value represents the mean ± standard deviation (S.D.) with triplicate experiments.

#### D. 結論

沖縄県八重山郡竹富町で採集したリュウキュウガキの葉の成分検索を行った。今回の探索研究では 10 種のカウレン誘導体を単離したが、いまだナフトキノン誘導体の単離には至らなかった。今後、ナフトキノン誘導体の単離にも鋭意努力する。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kawakami, S., Nishida, S., Nobe, A., Inagaki, M., Nishimura, M., Matsunami, K., Otsuka, H., Aramoto, M., Hyodo, T., Yamaguchi, K.: Eight *ent*-kaurane diterpenoid glycosides named

diosmariosides A–H from the leaves of *Diospyros maritima* and their cytotoxic activity. *Chem. Pharm. Bull.*, **66**, 1057–1064 (2018).

##### 2. 学会発表等

川上 晋、野辺彩香、西村基弘、稲垣昌宣、大塚英昭、松浪勝義 リュウキュウガキ葉部の成分研究 (5) 日本薬学会第138年会、金沢(2018.03.)

野辺彩香、西田祥子、川上 晋、西村基弘、稲垣昌宣、松浪勝義、大塚英昭、兵頭直、山口健太郎 リュウキュウガキ葉部より得られた*ent*-カウランジテルペンと細胞毒性 日本生薬学会第65回年会、広島(2018.09.)

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他なし

#### G. 参考文献

[1] Suwama, T., Watanabe, K., Monthakantirat, O., Luecha, P., Noguchi, H., Watanabe, K., Umehara, K.: Naphthalene glycosides in the Thai medicinal plant *Diospyros mollis*. *J. Nat. Med.*, **72**, 220–229 (2018).