

分担研究課題 グレーズ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

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 教授 西村基弘、准教授 稲垣昌宣、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。

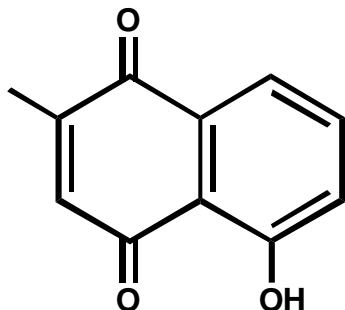


図 2

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)。

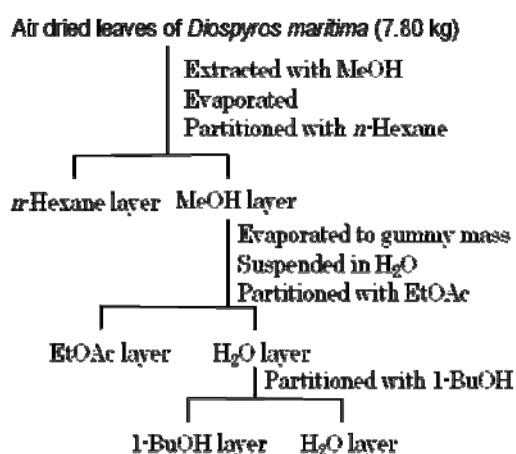


Chart 1

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 と命名した新規化合物 8 種および既知化合物 2 種を得た (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。

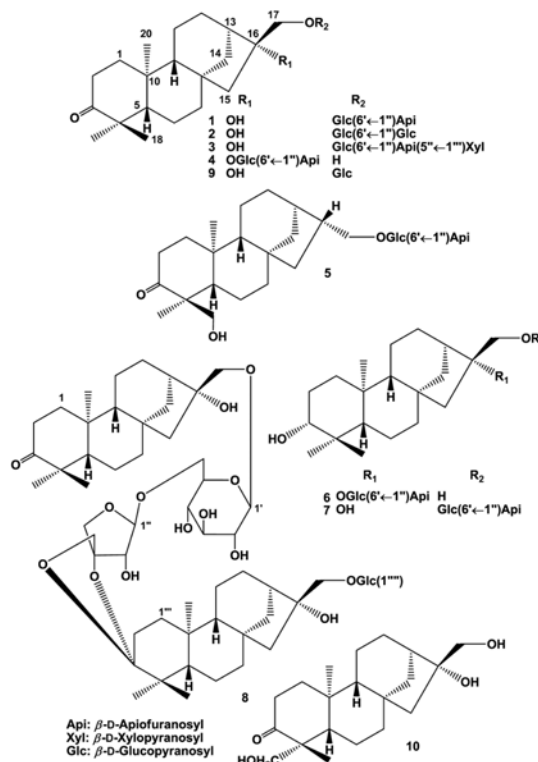


図 3 既に単離報告した化合物

今回更に詳細な成分検索を進めた結果、ebenamrioides A-D と命名した新規トリテルペンサポニン 4 種 (図 4 の 1-4) と、2 種のメガスティグマン (図 4 の 5,6) を単離、その構造を決定した。トリテルペンサポニン及びその加水分解物については A549 細胞におよび *Leishmania major* に対する生物活性も検討した。

C. 研究結果

Ebenamrioideside A (1) は比旋光度 $[\alpha]_D^{25} +15.1$ を示す無晶系粉末として得られた。赤外線吸収スペクトルにおいて水酸基

(3439 m^{-1}) 及びカルボニル基 (1745 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 $\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{14}$ と決定された。

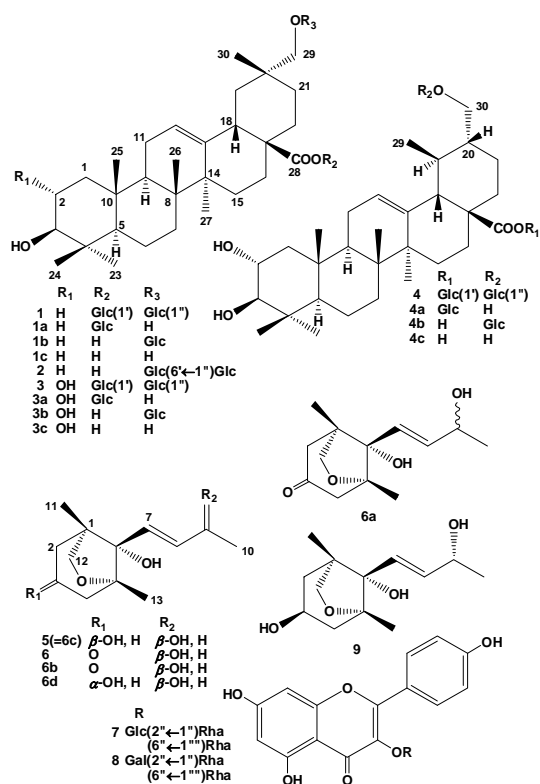


図4今回単離された化合物

その分子式は $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_{12}$ と決定された。 $^1\text{H-NMR}$ において6本のシングレットメチル基、オキシメチレン水素、オキシメチン水素、一個のオレフィン水素と2個のアノマー水素シグナルが観測された。HPLC 分析によってD-グルコースの存在が明らかとなったため、2分子のグルコースが含まれていることが証明された。 $^{13}\text{C-NMR}$ において12本のグルコース由来と思われるシグナルのほか、30本のシグナルが観測された。30本のシグナルは、6本のメチル基、11本のメチレン基が存在し、そのうち1本には水酸基が結合していた。さらに、4本のメチン基、6本の四級炭素、2本のオレフィン

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、ならびに質量分析から得られる不飽和数7を勘案すると、Ebenamarioside A (1)は一級水酸基を有するオレアノール酸誘導体であろうと推測された。

HMBC スペクトルにおいて (図5)、オキシメチレンのジェミナル水素は C-30 のメチル炭素、C-19 及び C-21 のメチレン炭素と更に C-20 の四級炭素と交差シグナル示した。また位相検波型の NOESY スペクトルにおいて、H-18 の水素と C-30 炭素上の水素 $\text{H}_3\text{-30}$ と顕著な相関が見られたことによりオキシメチレン炭素は C-29 であると決定した。さらに HMBC 相関が、H-3 と C-4、C-23、C-24に見られたことにより、オキシメチン水素は3位であると結論付けられた (図5)。

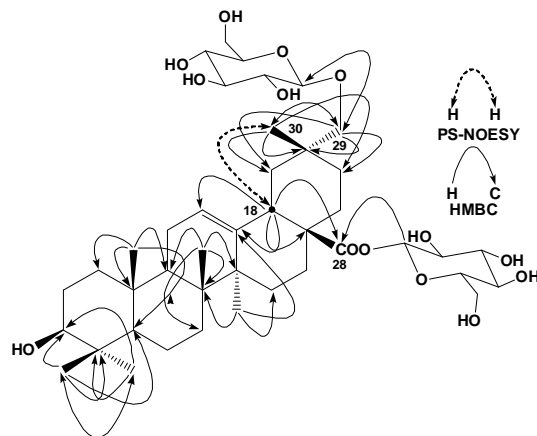


図5 Ebenamarioside A (1)の HMBC および PS-NOESY 相関

3位の水素の結合定数がアキシアルとエクソトリアルであったため、3位の水酸基はエクソトリアル配置であると決定した。糖の結合位置は同様に HMBC スペクトルにおいて、H-1'と C-28、H-1''と C-29 の相

関により、28位のカルボニル基と29位の水酸基であると決定され、それらの結合様式はアノマー水素の結合定数より β であった。よって **ebenamarioside A (1)** の構造は図4の **1** 示すものと決定された。粗グルコシダーゼに酵素加水分解で、**1a**、**1b** 並びにアグリコンである **1c** が得られた。部分加水分解物 **1a**、**1b** の構造は既知化合物とスペクトルの比較により決定された。アグリコン **1c** は既知で *mesembryanthenoidigenic acid* であった (図4)。粗グルコシダーゼは愛知県の酵素会社からの恵与であったが、グリコシド結合だけではなく、アルカリ加水分解の難しいとされる C-28 のグルコシルエステル体も容易に加水分解することが出来、この酵素を用いることで、オレアナン型トリテルペンで28位にエステル型糖鎖を有する、化合物の構造決定に大変有用であることが判明した。**Ebenamariosides B-D (2-4)** も同様な手法を用いて、その構造を決定した。

化合物 **5** は比旋光度 $[\alpha]_D +10.2$ を示す無晶系粉末として得られ、高分解能質量分析の結果、その分子式は $C_{13}H_{22}O_4$ 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1本のダブルットメチル基が観測された。更に、トランス二重結合に由来する2本のオレフィニック水素、二つのメチレンキに由来する4本の水素、酸素官能基を有する、メチレン基とメチン基の水素観測された。 ^{13}C -NMR においては13本のシグナルが観測され、それらは、3本のメチル基、3本のメチレン基、酸素官能基を有する2本のメチン基、一組の2結合に由来するシグナル及び酸素官能基を有する3級炭素と4級炭素に由来するシグナルで

あった。質量スペクトルより得られる情報の不飽和度3より2環性化合物と推測された。 $COSY$ スペクトル、ならびに $HMBC$ スペクトルの相関 H₂-11 と C-5 より化合物 **5** は 5,11-epoxy-3,6,9-trihydroxymegastigman-7-ene と推察された (図6)。

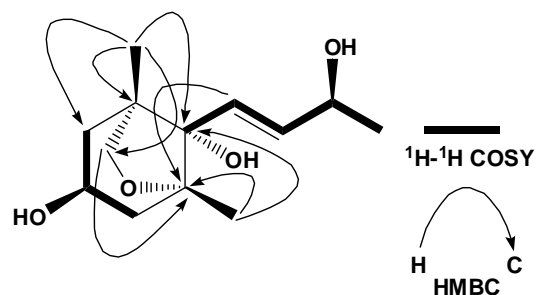


図6 化合物 **5** の $COSY$ 、 $HMBC$ 相関 PS - $NOESY$ スペクトルにおいて、H-7 と H-2ax、H₃-12、H₃-13 に相関が見られたことより、これらの置換基はすべて同じ面にあることが推察され、H-11b、H₂eq、H-3 と H-4eq は同じ面にあり、それらは側鎖とは反対の面にあることが明らかとなった (図7)。

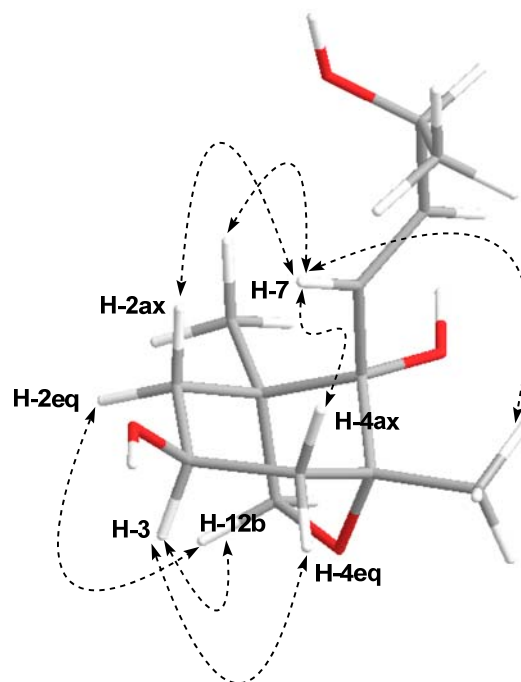


図7 化合物 **5** の PS - $NOESY$ 相関

本化合物と同一の平面構造を有す化合物が *Asclepias fruticosa* から単離されており、その絶対構造は Mosher 変法により 1*R*,3*S*,5*R*,6*S*,9*R* と決定されている[2]。そこで、化合物 5 にも Mosher 変法を適用して、全体構造の決定を試みた。その結果は 1*R*,3*S*,5*R*,6*S*,9*S* であり、9 位に絶対配置がことなる新規化合物であることが明らかとなった (図 8)。

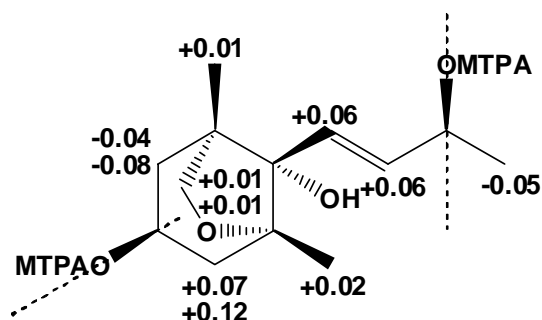


図 8 Mosher 変法の結果

化合物 6 は比旋光度 $[\alpha]_D -0.742$ を示す無晶系粉末として得られ、高分解能質量分析の結果、その分子式は $C_{13}H_{20}O_4$ と決定され、これは化合物 5 と比較して 2 マスユニット少なかった。NMR スペクトルから得られる情報を総合すると、化合物 5 の環上水酸基がケトン基に酸化された化合物であることが明らかとなり、本化合物を同じ平面構造を有する drummondol が単離されている[3]。しかしながら drummondol の環状部分と側鎖の絶対配置の決定には至っていない。一方、drummondol の 9-*O*- β -D-glucopyranoside が得られており、その環状部分の絶対構造は円偏光二色性スペクトルで、その側鎖の絶対構造は Mosher 変法で決定している[4]。化合物 6 の環状部分の絶対構造は円偏光二色性スペクトルの比較により、配糖体のアグリコンと同じとかが

えられ、側鎖部分は独立に決定する必要がある。そこで、化合物 6 を $NaBH_4$ で還元して、6a と 6b と同じ平面構造を有する化合物を得た (図 9)。

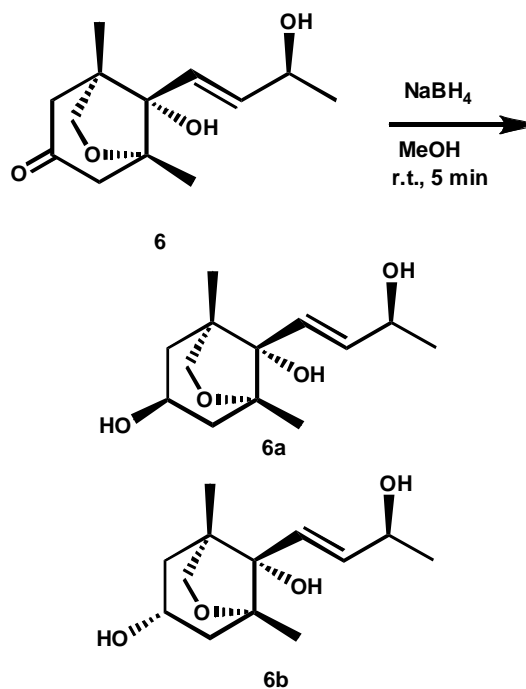


図 9 $NaBH_4$ による還元

立体障害の関係で 6b が主生成物であったが、6a は化合物 5 と同一で、それに Mosher 変法を適用すると、5 の MTPA エステルと同じ化合物を与えた。その結果、drummondol の配糖体として得られて化合物のアグリコンと一致したが、非糖体として新規化合物であった。

得られたトリテルペンの配糖体 1-4、およびそれらの部分加水分解物の A549 細胞に対する毒性を検討したが、一部化合物に弱い活性が見られた。

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を更なる検索を行っ

た。今回の探索研究では4種のトリテルペン配糖体と2種のメガスティグマンを単離したが、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。リュウキュウガキに魚毒活性があることが知られており、両親媒性である、サポニンが得られたことは、言い伝えと符合するものであった。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kawakami, S., Miura, E., Nobe, A., Inagaki, M., Nishimura, M., Matsunami, K., Otsuka, H., Aramoto, M.: Ebenamariosides A-D: Triterpene glucosides and megastigmanes from the leaves of *Diospyros maritime*. *Chem. Pharm. Bull.*, **67**, 1337–1346 (2019).

2. 学会発表等

川上晋, 稲垣昌宣, 西村基弘, 松浪勝義, 大塚英昭 リュウキュウガキ葉部より得られた新規メガスティグマン2種およびトリテルペン配糖体の酵素加水分解誘導体
日本生薬学会第66回年会(東京) 令和元年09月23日(2019)

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).

[2] Abe, F., Yamauchi T.: 5,11-Epoxy-megastigmanes from the leaves of *Asclepias fruticosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1908–1911 (2000).

[3] Powell R.G., Smith, Jr., C.R.: An investigation of the antitumor activity of *Sesbania drummondii*. *J. Nat. Prod.*, **44**, 86–90 (1981).

[4] Çalis, I., Kuruüzüm-Uz, A., Lorenzetto, P.A., Rüedi, P.: (6*S*)-Hydroxy-3-oxo- α -ionol glucosides from *Capparis spinosa* fruits. *Phytochemistry*, **59**, 451–457 (2002).