厚生労働行政推進調査事業費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）

分担研究報告書

グレーゾーンの植物体に関する研究
ツツジ科スノキ属ギイマの成分研究

分担研究者　大塚　英昭　安田女子大薬学部　教授

研究要旨
ツツジは本邦で広く植栽されている園芸植物である。またブルーベリーの基原植物アメリカスノキはツツジ科スノキ属であり、その果実は生食またはジャム等に加工されている。しかしながら本科の植物であるハナヒリノキの全草には神経毒となるグラヤノトキシン類（図１）、アセビにはアセボトキン（＝グラヤノトキシンI）などの毒成分が含まれている。観賞用のシャクナゲにも同様の成分が含有されている。ギイマ（ギーマ）は奄美大島、沖縄本島台湾に分布するツツジ科植物である。葉は互生しギイマの実は秋に黒熟し、甘酸っぱくて美味いとされ果実酒等に用いられる。ギイマ（*Vaccinum wrightii*）はスノキ属であるので一応安全とは思われるが、ツツジ科植物であるので、その成分を検討することとした。

研究協力者名
広島大学　教授　松浪勝義
安田女子大学　教授　稲垣昌宣、助教　川上　晋

A.　研究目的

ギイマ（*Vaccinium wrightii* A. Gray.）はツツジ科スノキ属の植物で奄美大島、沖縄および台湾の亜熱帯地方に分布する低木で、高さ約 3 m である（図１）[1]。葉は互生し、長さ約 2~5 cm で楕円形、革質で縁にかすかに鈍い鋸歯がある。総状花序に 10 個ほどの花をつけ、花冠は鐘状で紅白色を帯び、長さは約 5 mm である。液果は紫褐色に熟し、径は約 5 mm である。液果は甘酸っぱく美味であり果実酒などに加工される。

しかしツツジ科の植物の多くに神経に毒性を示す多環性ジテルペン類の含有が報告されており、本年度の研究ではギイマの葉に同様の成分が含有されいるかを精査をす

ることを目的とした。

写真１ギイマの葉

写真２ギイマの未熟実

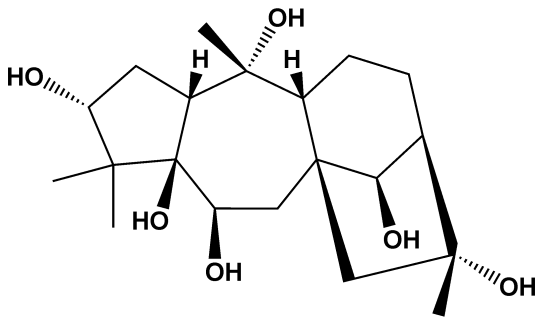


図１Grayanotoxin I (=Asebotoxin)

B.　研究方法

沖縄県国頭郡で採集したギイマの葉（9.69 kg）MeOH で抽出し、濃縮残渣を

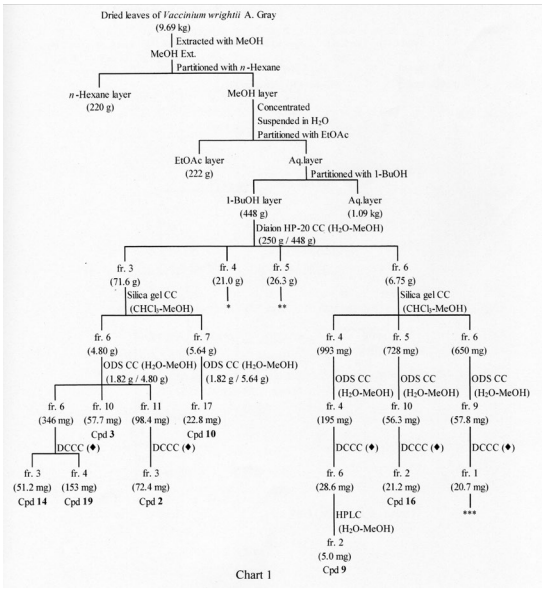
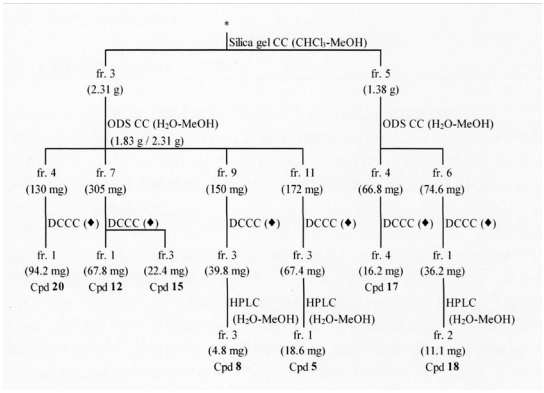


Chart 1



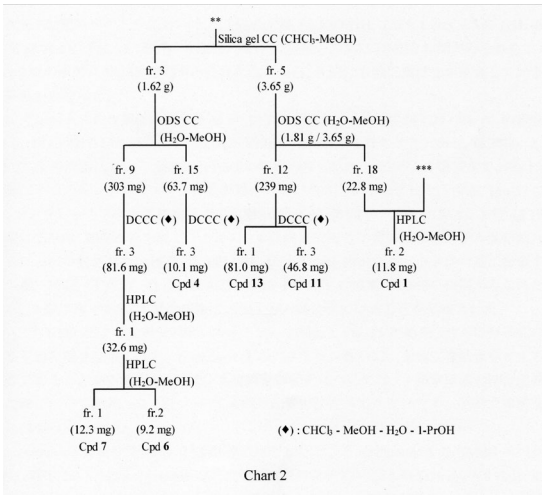


Chart 2

水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分と水可溶画分を得た。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を 448 g 得た。1-BuOH 画分を順相、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、液滴向流クロマトグラフィー(DCCC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製して２０種の化合物を得た(Chart 2)。

C. 研究結果

化合物 **1**～**9** は文献未記載の化合物であった。化合物 **10**～**20** は既知化合物であり、核磁気共鳴スペクトルを中心とする、機器分析によって、quercetin 3-*O*-rutinoside (**10**)、quercetin 3-*O*-*α*-L-rhamonopyranoside (**11**)、taxifolin 3-*O*-*β*-D-xylopyranoside (**12**)、kaempferol 3-*O*-rutinoside (**13**)、(3*S*,5*R*,6*R*,7*E*,9*S*)-megastigman-7-ene-3,5,6,9-tetrol 3-*O*-*β*-D-glucopyanoside (**14**)、macangaside D (**15**)、nigaichigoside F1 (**16**)、(+)-lyoniresin-4'-yl *β*-glucopyanoside (**17**)、1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4(3-hydroxypropyl)-2-hydroxyphenoxy]-1,3-propanediol (**18**)、chlorogenic acid (**19**)、neocholorogenic acid methyl ester (**20**)と構造を決定した。

化合物 **1** は比旋光度$[\alpha]_D$ -7.6 を示す無色粉末として得られた。赤外線吸収スペクトルにおいて二重結合（1650 m^{-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 $C_{26}H_{50}O_{10}$ と決定された。NMR スペクトルにおいて４つのメチル基、８つのメチレン基、１つの酸素原子を有するメチレン基、１つの酸素原子を有する二級炭素と１つの酸素原子を有する三級炭素、エキソサイクリックな二重結合とともに*β*-D-glucopyranoside に由来するシグナルが観測された。高分解能質量分析から不飽和度は２であり、グルコースとエキソメチレンを除く炭素は直鎖であることが示唆された。これらの官能基の結合性を ^{1}H-^{1}H COSY と HMBC スペクトルで解析し、図２の構造を有すると結論した。

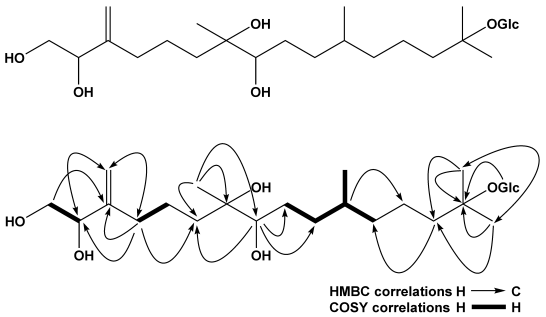


図２化合物 **2** の構造と２次元解析の結果

三級水酸基その他の三か所の不斉炭素の絶対配置は決定に至ってない。

化合物 **2**（$[\alpha]_D$ -13.6）と **3**（$[\alpha]_D$ -1.72）の分子式は高分解能質量分析ではいずれも $C_{24}H_{48}O_{10}$ であり、化合物 **1** より二個減炭している。NMR スペクトルにおいて両化合物は同じ官能基を有し*β*-D-glucopyranoside に由来するシグナルが認められることとより、残りの炭素は直鎖状であることが示唆された。これらの官能基の結合性を ^{1}H-^{1}H COSY と HMBC スペクトルで解析し、図３の構造を有するとの結論に達した。

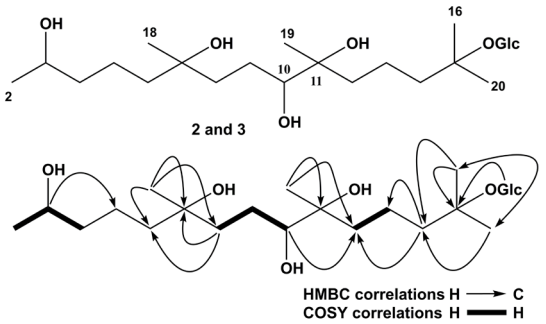


図３化合物 **2** と **3** の構造と、二次元相関図

化合物 **2** と **3** の ^{13}C-NMR スペクトルを比

較すると極めて類似しており、ほぼ同一物質と見做してもよいほどである。しかし、キラル中心を有さない担体のカラムで分離されているので明らかに異なる化合物である。４つの不整炭素の絶対配置の異なるジアステレオマーであると思われるが、それらの絶対配置の決定には至っていない。

化合物 **4**（$[\alpha]_D$ -14.3）は無色粉末としてえられ、その分子式は $C_{24}H_{44}O_9$ であった。赤外線吸収スペクトルにおいてケトン基に由来する強い吸収（1709 cm^{-1}）が認められた。NMR スペクトルではβ-glucopyranoside に由来する６本のシグナル以外に５本のメチル基、８本のメチレン基、酸素官能基を有する二級炭素、２本の酸素官能基を有する三級炭素並びにケトン基に由来するシグナルが観測された。分子式の要求する不飽和度から１個の環状構造の存在が示唆された。２次元スペクトルの解析から図４の構造を有すると結論された。

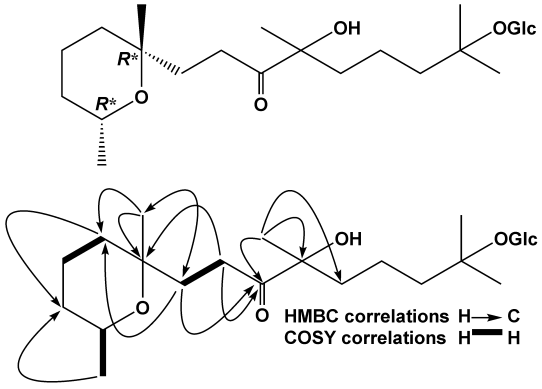


図４化合物 **4** の構造と、二次元相関図

環構造部の相対配置は位相検波型 NOE スペクトルを解析して決定した（図５）。側鎖部はエカトリアル配置をしており、環上のメチル基もエカトリアル配置であった。よって側鎖結合部のメチルはアキシャル位であった。絶対構造の決定には至らなかった。

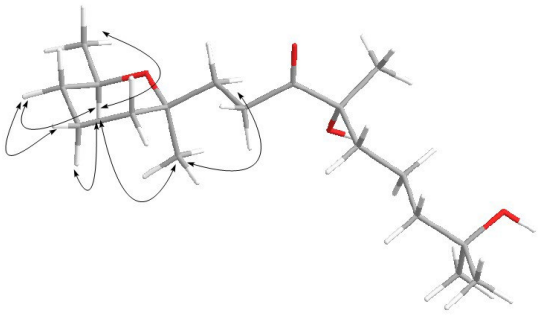
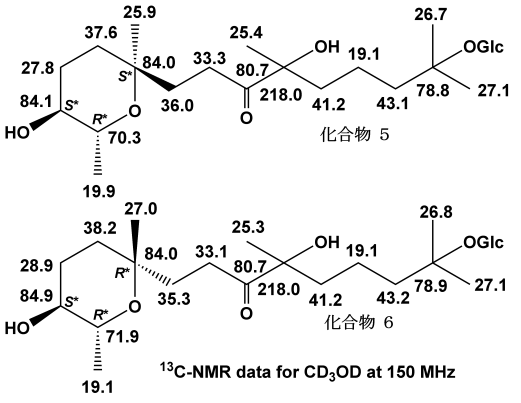


図５化合物 **4** の NOESY 相関図

化合物 **5**（$[\alpha]_D$ -7.0），**6**（$[\alpha]_D$ -8.0）の分子式は同じであり（$C_{24}H_{44}O_{10}$）、化合物 **4** より酸素原子を１つ多く有していた。NMR スペクトルを化合物４と比較すると側鎖部は同一であり、環上に水酸基を有している推定された。そこで２次元スペクトルを検討、水酸基の位置を図６に示す様に決定した。両化合物の環状部の ^{13}C-NMR データには有意の差が認められ、三か所に存在する不斉炭素の立体配置が異なると思われ、このことを NOE スペクトルを用いて明らかにした。



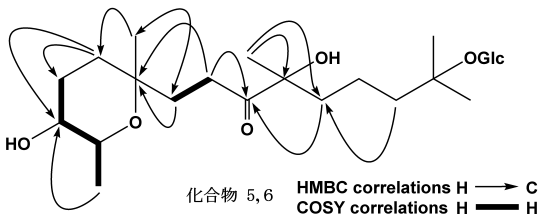


図６化合物 **5** と **6** の構造と ^{13}C-NMR スペクトルデータおよび二次元相関図

化合物５では３位のアキシャル水素と 7 位の水素に相関が見られることより側鎖はアキシャル位に、化合物６では３位のアキシャル水素と１８位のメチル基と相関が見られることより１８位メチルはアキシャル位であいることが明らかになった。３位の水素と４位の水素の結合定数はアキシャル同士としてはやや小さく、それぞれ 6 Hz および 7 Hz であることより６員環はやや椅子型から少々歪んだ構造を採っていると思われる（図７）。

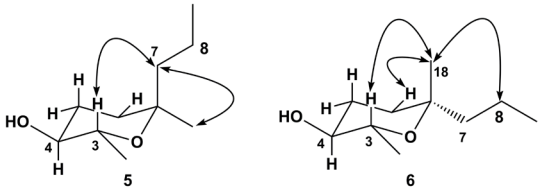


図７化合物 **5** と **6** の NOE 相関図

化合物 **7**（[α]D -13.6）は無色粉末として得られ、高分解能質量分析の要求する分子式は前化合物と同様 $C_{24}H_{44}O_{10}$ で、その不飽和度は３であった。^{13}C-NMR スペクトルにおいて、８位から２０位の炭素は化合物４～６と同様な値を示し、１８位メチルを含む２位から７位の部分が６員環構造である６，７と類似していたが３，５、６位に微妙な差異がみられた。位相検波型 NOE スペクトルを測定し検討した結果、１８位メチルと４位の水素の間に相関がみられたことより、２位から７位は５員環を形成しておると判断され、図７の構造であると結論された。同時に同相関により相対配置も図のような結論で間違いないと判断された。化合物１～７のグルコースに関しては酸加水分解後、旋光度検出器装備の HPLC で分析した結果、D-体であると決定した。化合物 **1**～**7** まで水酸基の結合した３級不整炭素が存在し絶対構造の決定は不可能に近く、よってその他の不整炭素も全体構造の決定には至らなく、相対配置までの決定である。

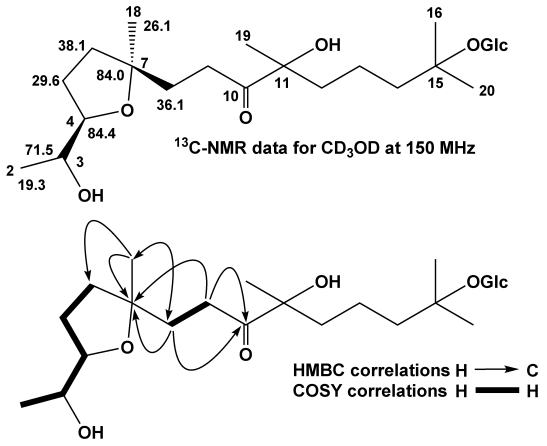


図７化合物 **7** の構造と二次元相関図

化合物 **8** は（[α]D -33.2）無色粉末として得られ、高分解能質量分析により分子式は $C_{25}H_{34}O_{11}$ と決定された。構成糖は ^{13}C-NMR スペクトル（δC 105.4, 74.9, 77.7, 71.2, 66.9）よりキシロースと予想された。酸加水分解後、旋光度検出器装備の HPLC で分析した結果、移動度からキシロース断定し、その絶対構造は D-体である判明した。

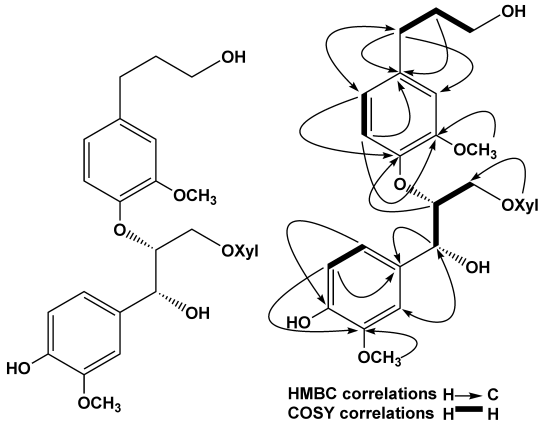


図８化合物 **8** の構造と二次元相関図

^{13}C-NMR スペクトルにおいて１２本の芳香環に由来するシグナル、二つのメチレン基、二つの２級水酸基を有する炭素、２つの一級水酸基を有する炭素および２つのメ

トキシ基に由来するシグナルが観測された。^{1}H-NMR スペクトルでは２組の ABX 型に結合した芳香族水素シグナル、２つの水酸基を有するメチン基および２つの一級水酸基を有するメチレンシグナルが観測され、これらのことを勘案すると C_6-C_3 の二量体すなわちネオリグナンであると推定した。^{1}H-^{1}H COSY および HMBC スペクトルを解析すると図８の構造を有することが判明した。化合物８を加水分解して得られた８a の７位と８位の結合定数が 8Hz であることから、７位、８位の相対配置をエリトロと決定した[2]。さらに円偏光二色性スペクトルより、236 nm に負のコットン効果がみられたことより、７位、８位の絶対配置を 7*R*,8*R* と決定した[2]。

化合物 **9**（$[\alpha]_D$ -19.9）は無色粉末として得られ、高分解能質量分析により分子式は $C_{26}H_{36}O_{12}$ と決定された。構成糖は ^{13}C-NMR スペクトルよりキシロースと判断された。さらに炭素六個分の対称芳香環のシグナルおよび芳香環に由来する芳香環シグナルが６本観測され、残りの炭素はメチレン基が３本、２級水酸基を有する炭素が１本、一級水酸基を有する炭素が２本観測された。対称置換芳香環にプロピル側鎖が結合していることは２次元スペクトルを解析することで明らかとなり非対称芳香環も 1,3,4,5 であることが明らかとなり３′メトキシ、４′、５′ジヒドオキシであるとおもわれる。^{13}C-NMR スペクトルでは非対称芳香環に由来するシグナル６本の化学シフトそれぞれ異なる値をしめしているが、^{1}H-NMR スペクトル芳香環シグナルは２個分、一本しか観測されなかった。偶然に２′、６′のシグナルの化学シフトが同じであると思われる。２つのユニットの結合位置は８位水酸基と-４′位と推察されたが、８位水酸基と-５′位の可能性も否定できなかった。これらいずれかあをを支持するスペクトル的結果は得られなかった。そこで化合物 9 をジアゾメタンでメチル化を行い化合物 9a を得た。非対称の芳香環は対称となり、HMBC スペクトルもそれを支持したので、結合位置は８位水酸基と-４′位と結論された。８位のの絶対対配置は円偏光二色性スペクトルに於いて、**8** と同様な波長に負のコットン効果を示すことより 8*R* であろうと推察している。

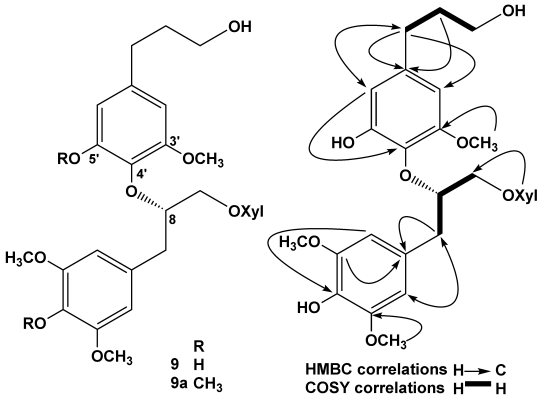


図９化合物 **9**、**9a** の構造と **9** の二次元相関図

ギイマ葉部より得られた化合物２０種についてDPPH ラジカル除去活性試験を行った。フェノール性水酸基を有する化合物 **8** から１２および１９、２０に概ね強い活性がみられた。このうち新規化合物 **8**、**9** および **9a** について詳細に検討した。Trolox をポジティブコントロールとして用いた。それぞれの IC_{50} は torolox: 14.4 ± 0.3 μM, 化合物 **8**: 80.2 ± 2.6 μM、化合物 **9**: 21.3 ± 0.7 μM であった。化合物 **9** では trolox とほぼ同等の活性を示したが、ジアゾメタンでメチル化され遊離の芳香性水酸基の消失し

た化合物 **9a** は全く活性を示さなかった。

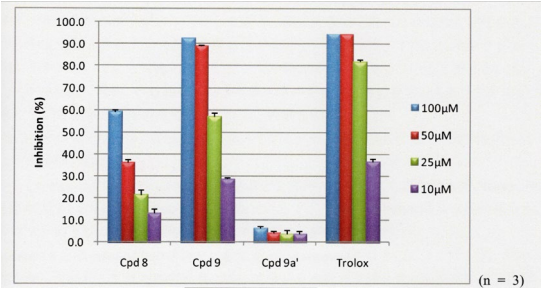


図１０化合物 **8**，**9**，**9a** および trolox の濃度依存的活性評価

D.考察

本研究ではギイマ（*Vaccinium wrightii*）の葉部より直鎖状ジテルペンの配糖体（**1**）並びに bisnor 体でジテルペンより炭素２個が失われた化合物が６種（**2**～**7**）得られた。これらの化合物の神経に対する生物活性の精査はまだ行ってないが、ギイマの実可食からすると、劇的な活性はないものと思われる。またこれらがゲラニルゲラニルピロリン酸から生合成されていることは明らかである。毒性等生物活性を有するグラヤノトキシン類は図１に示すように多環性の化合物であり、サイクリゼーション酵素、酸化酵素の関与など数工程を経てゲラニルゲラニルピロリン酸より生合成されている。ギイマはゲラニルゲラニルピロリン酸を生合成する酵素は持ち合わせているが、その後の環化等に関与する酵素を有しないか、または何らかの理由で発現していないと考えられる。遺伝子解析を行いこれらの疑問を明らかにすることは、ジテルペンを産生する植物の相互比較の点にについても興味深い。

E. 研究発表

1.　論文発表

なし

2.　学会発表等

なし

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] 初島住彦　琉球植物誌（追加・訂正）462頁　沖縄生物教育研究会　1975、那覇、沖縄

[2] Huo, C.H., Liang, H., Zhao, Y., Wang, B., Zhang, Q.Y.: Neolignan glycosides from *Symplocos caudata*. *Phytochemistry*, **69**, 788-795 (2008).