

（総合）分担研究報告書

グレーズーンの植物体に関する研究

ナス科イヌホウズキの化学成分に関する研究及び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 安田女子大学薬学部 教授

研究要旨

本邦に産するナス科植物であるイヌホウズキ(*Solanum nigrum*)及びその近縁種は世界の温帯、熱帯に広く分布する。本邦では史前帰化植物だと考えられている。全草にステロイドアルカロイドを有毒とされているが、茹でることによりアルカロイドを除き食用としている国もある。その果実は黒熟し、アメリカスノキの果実（ブルーベリー）を彷彿とさせ、ジャムなどに加工される例が認められるので健康被害が懸念されている。そこで、本研究ではイヌホウズキの成分検索を行うこととした。

一方、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、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（*Vaccinium 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

広島大学 教授 松浪勝義 准教授 山野幸子

安田女子大学 教授 稲垣昌宣、助教 川上 晋

イヌホウズキ

A. 研究目的

イヌホウズキ（犬酸漿、犬鬼灯 *Solanum nigrum* L.）はナス科ナス属の植物で日本全

国に雑草として自生している (図1)。名の通り、ホウズキやナスに似ているが役に立たないという意味の「いぬ (犬)」と形容されている。その果実は黒熟し、アメリカスノキの果実(ブルーベリー)を彷彿とさせ、ジャムなどに加工され誤用する例が認められるので健康被害が懸念されている。イヌホウズキの近縁種、アメリカイヌホウズキ (*S. ptychanthum*)、テリミノイヌホウズキ (*S. americanum*) 等も自生しており、



写真1 イヌホウズキ

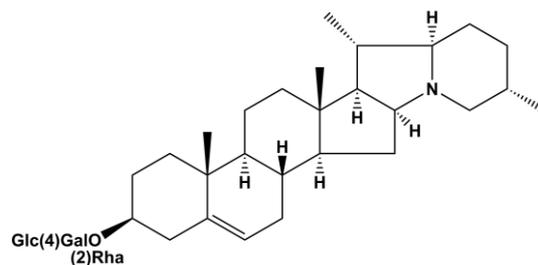
それらの判別は液果ではなくその中に存在する小さな種子の大きさや、種子の数で行うため極めて困難である。



写真2 アメリカスノキ (ブルーベリー) の果実

イヌホウズキにはナス科特有の成分で

あるステロイドアルカロイドの配糖体、**solanine** の含有が知られている。しかし、外国の一部地域では地上部を茹でて、有毒成分を除いたうえ食品としての利用もあり、その他の成分の検討を行った (2021 年度)。



α -Solanine

B. 研究方法

広島県広島市南区で採集したイヌホウズキ (*S. nigrum*) の地上部 (3.28 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 70.9 g 得た。1-BuOH 画分を順相、逆相 silica gel カラムクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフ(HPLC)で精製して6種の化合物を得た

C. 研究結果

化合物 **1**、**2** は文献未記載の化合物であった。化合物 **3**~**6** 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、(6*S*,9*R*)-roseoside (**3**)、1-*O*-palmitoyl 6-*O*- α -D-galactopyranosyl- β -D-galactopyranosyl glycerol (**4**)、tigogenin 3-*O*- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4) β -D-galactopyranoside (**5**)、5 α -pregn-16-en-3 β -ol-20-one 3-*O*- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-xylopyranosyl

yl(1→3)]-O-β-D-glucopyranosyl(1→4)-O-β-D-galactopyranoside (6)と構造を決定した(図 1)。

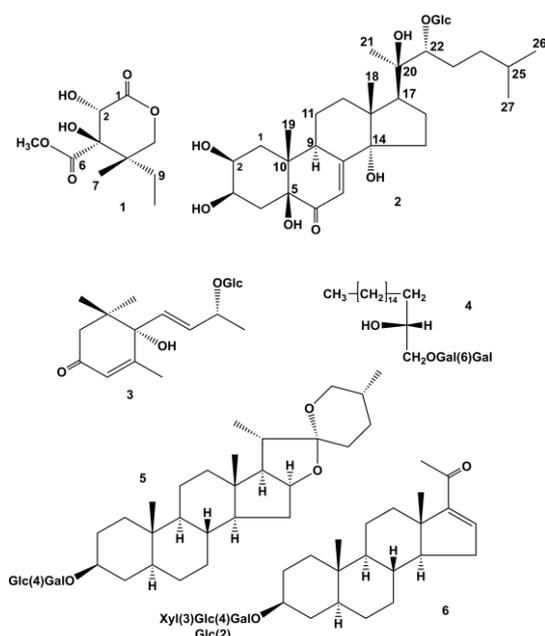


図 1

蚊を媒介とする疾患は重大な被害をもたらしている。以前は日本脳炎が蚊の媒介では有名であったが、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) やネッタイシマカ (*A. aegypti*) はデング熱の媒介主であり、世界においてデング熱の感染者数は年間推定 1 億人である。マラリアは雌のハマダラカ (*Anopheles spp.*) が原虫を媒介するなど、蚊の関与の枚挙にいとまがない。そのため、ベクターコントロールが非常に重要となってくる。今回イヌホウズキから単離された化合物の殺虫活性について検討した。ネッタイイエカ (*Cx. Quinquelifasciatus*) の幼虫(ボウフラ) に対する殺虫活性を評価した(図 7)。

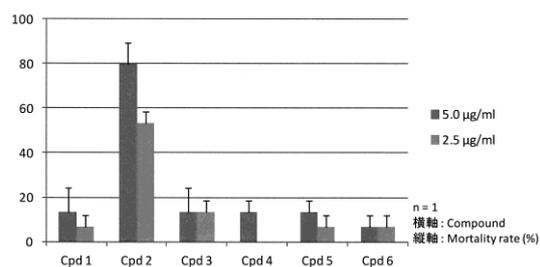


図 7 単離化合物の幼虫殺虫活性 (n=3)

得られた各化合物において 2 段階濃度でネッタイイエカ幼虫殺虫活性試験を行った結果、化合物 2 に最も強い活性がみられた。

今回の検討では、ソラニンの単離には至らなかったが、確実に含まれているという情報は存在する[4]。多分にそれが含まれるフラクションを精査しなかったのではないかと思われる。近年ソラニンに抗腫瘍活性の報告が多々見られる[5]。しかし、今回イヌホウズキには強い蚊幼虫に対する殺虫活性成分が含まれていることが明らかとなった。今後の検討に期待が持たれる。

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] Bai, M., Zhang, Q., Hou, Z.-L., Li, C., Zhou, W.-Y., Yao, G.-D., Huang, X.-X., Song, S.-J.: Chemical constituents from *Solanum nigrum* and their neuroprotective activities. *Journal of Asian Natural Products Research*, On line ahead of print.
<https://doi.org/10.1080/10286020.2021.1978987>.
- [2] Matsuno, Y., Shinoda, D., Nakamura, A., Mimaki, Y.: Steroidal glycosides from the bulbs of *Fritillaria meleagris* and their cytotoxic activities. *Steroids*, **78**, 670-682 (2013).
- [3] Shigemori, H., Sato, Y., Kagata, T., Kobayashi, J.: Palythoalones A and B, New ecdysteroids from the marine zoanthid *Palythoa australiae*. *Journal of Natural Products*, **62**, 372-374 (1999).
- [4] <https://ja.wikidpedia.org/wiki/ソラニ>
↘ March 31st, 2022.
- [5] Yan, X., Li, M., Chen, L., Peng, X., Que, Z.-J., An, H.-M., Shen, K.-P., Hu, B.: α -Solanine inhibits growth and metasttic potential of human colorectal cancer cells. *Oncology Reports*, **43**, 1387-1396 (2020).

ギイマ (葉)

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 (写真 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 (写真 2)。

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 (図 1) の含有が報告されており、2022 年度の研究ではギイマの葉に、2023 年度では材に同様の成分が含有されているかを精査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

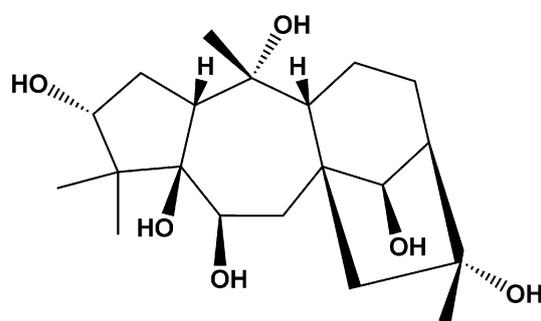


図 1 Grayanotoxin I (=Asebotoxin)

B. 研究方法

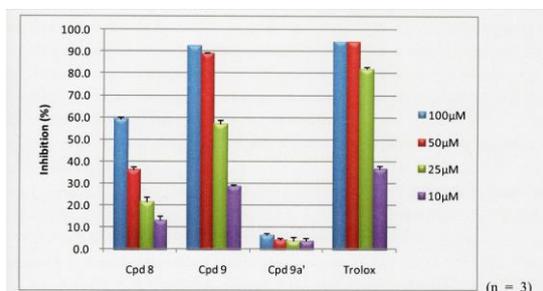
沖縄県国頭郡で採集したギイマの葉 (9.69 kg) を MeOH で抽出し、濃縮残渣を水に懸濁して、EtOAc で分配して EtOAc 可溶画分と水可溶画分を得た。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を 448 g 得た。1-BuOH 画分を順相、逆相シリカゲルカラムクロマトグラフィー、液滴向流クロマトグラフィー (DCCC)、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製して 20 種の化合物を得た。

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-glucopyranoside (14)、macangaside D (15)、nigaichigoside F1 (16)、(+)-lyoniresin-4'-yl β -glucopyranoside (17)、1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-[4(3-hydroxypropyl)-2-hydroxyphenoxy]-1,3-propanediol (18)、chlorogenic acid (19)、neochlorogenic acid methyl ester (20)と構造を決定した (図2、図3)。

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IC₅₀はtrolox: 14.4 ± 0.3 μ M、化合物8: 80.2 ± 2.6 μ M、化合物9: 21.3 ± 0.7 μ M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。



化合物8、9、9aおよびtroloxの濃度依存的活性評価

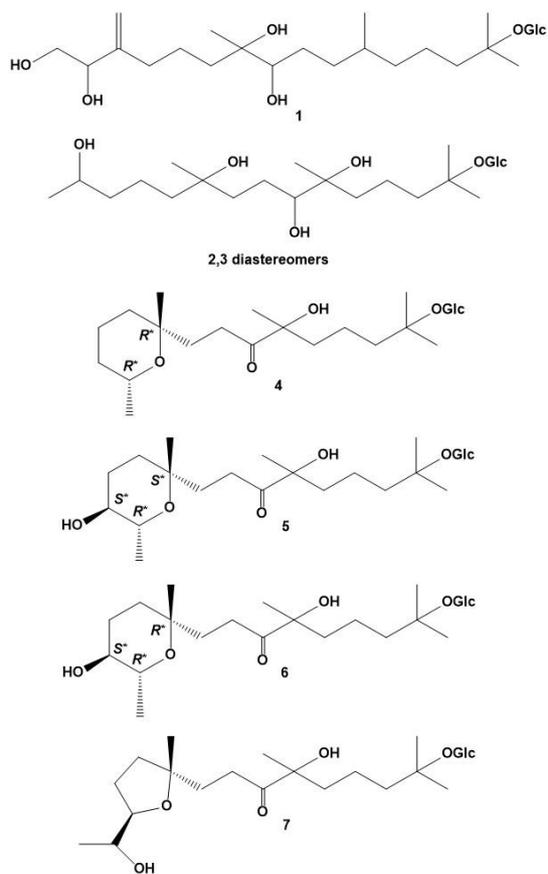


図2

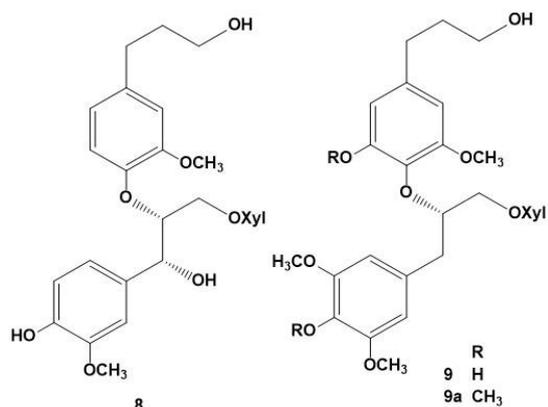


図3

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おいても興味深い。

ギイマ (材)

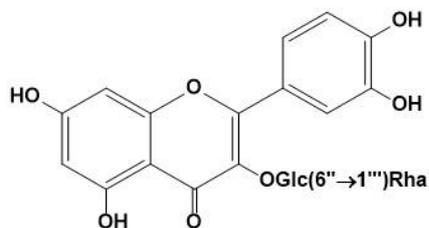
B. 研究方法

沖縄県国頭郡で採集したギイマの乾燥材 (6.22 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得た。水画分はさらに 1-BuOH と分配して 1-BuOH 画分を 134 g 得た (Chart 1)。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、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製して 13 種の化合物を得た (化合物 A~M)。

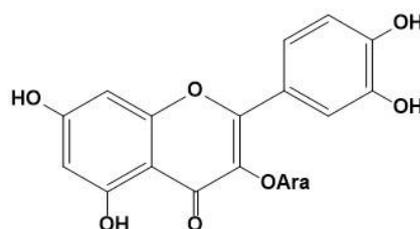
C. 研究結果

得られた化合物 A~M の構造は核磁気共鳴スペクトルを中心とする、機器分析によって推定し、文献値と比較することにより決

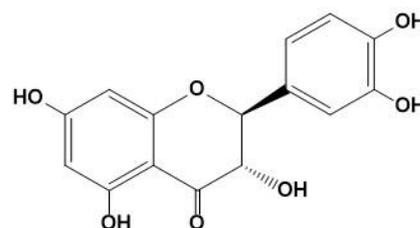
定した。その結果化合物 A: quercetin 3-O-rutinoside、化合物 B: quercetin 3-O-arabinopyranoside、化合物 C: (-)-taxifolin、化合物 D: (+)-taxifolin 3-O-xylopyranoside、化合物 E: (-)-epicatechin、化合物 F: epicatechin-(4 β →8,2 β →O→7)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin、化合物 G: 2 α ,3 α -epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 β →8)-epicatechin、



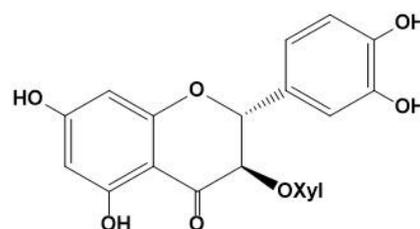
Quercetin 3-O-rutinoside (Comp. A)



Quercetin 3-O-arabinopyranoside (Comp. B)

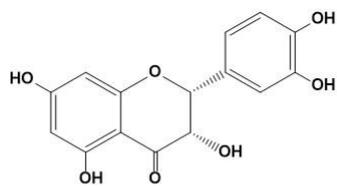


(-)-Taxifolin (Comp. C)

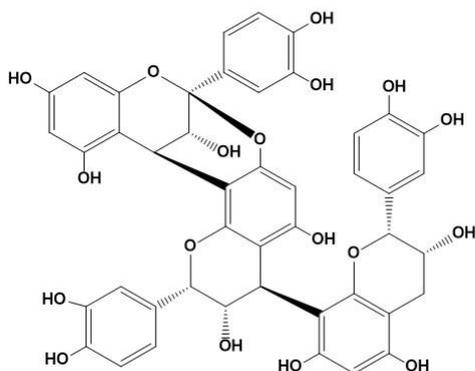


(+)-Taxifolin 3-O-xylopyranoside (Comp. D)

図 4

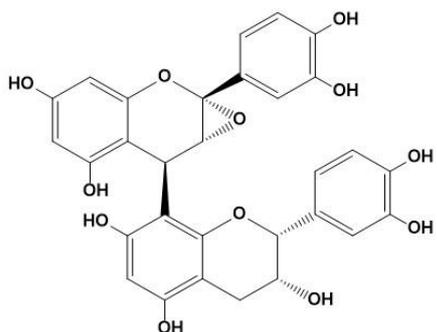


(-)-Epicatechin (Comp. E)

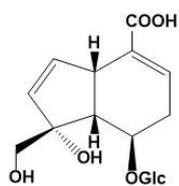


Epicatechin-(4β→8,2β→7)-epicatechin-(4β→8)-epicatechin (Comp. F)

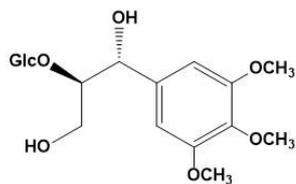
☒ 5



2 α ,3 α -Epoxy-5,7,3',4'-tetrahydroxyflavan-(4 β →8)-epicatechin (Comp. G)

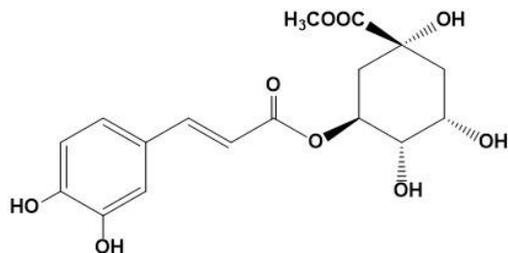


Monotropein (Comp. H)

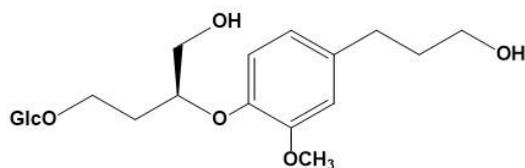


1,2-Erythro-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-(β -D-glucopyranosyloxy)propan-1,3-diol (Comp. I)

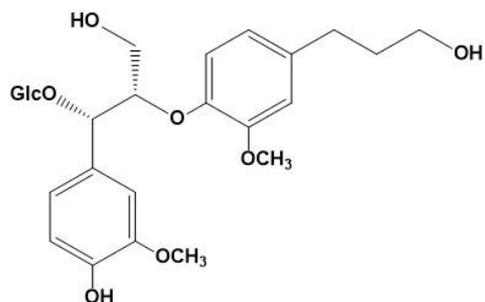
☒ 6



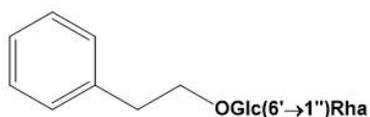
5-O-Caffeoylquinic acid methyl ester (Comp. J)



(2R)-O-[3''-Hydroxypropyl]-2'-methoxyphenyl]-3- β -D-glucopyranosylglycerol (Comp. K)



4,7,9-Trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan 3'-O-glucopyranoside (Comp. L)



2-Phenethyl rutinose (Comp. M)

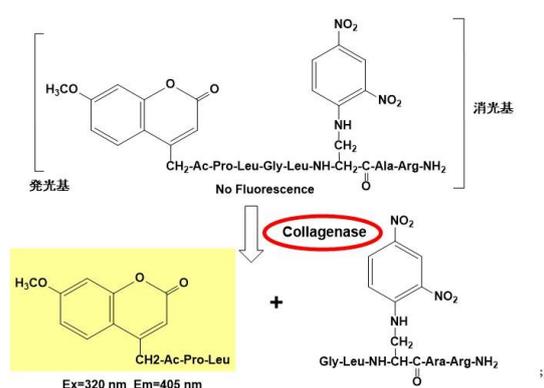
☒ 7

化合物 **H**: monotropein、化合物 **I**: 1,2-erythro-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-(β -D-glucopyranosyloxy)propan-1,3-diol、化合物 **J**: 5-O-caffeoylquinic acid methyl easter、化合物 **K**: (2R)-O-[4'-hydroxypropyl]-2'-methoxyphenyl]-3-O- β -D-glucopyranosyl-glycerol、化合物 **L**: 4,7,9-trihydroxy-3,3'-dimethoxy-8-O-4'-neolignan 3'-O-glucopyranoside、化合物 **M**: 2-phenyl-

ethylrutinoside とそれらの構造を決定した (図4、5、6、7)。

キイマ葉部より得られたフラボノイド骨格を有する化合物7種 (A~G) についてコラゲナーゼ阻害活性試験を行った。ヒトの表皮は真皮から形成されている。真皮は表皮と比較して10~15倍の厚みを有し、皮膚の弾力性やハリを保つ役割を担っている。真皮の主要成分はコラーゲンであり、コラーゲンが減少、変性することにより皺や弛み等の皮膚の老化現象が進行すると考えられている。故にコラーゲンの減少を防ぐことにより、皮膚の老化を防止が可能と思われるコラーゲンはコラゲナーゼと呼ばれる酵素で分解されるため、コラゲナーゼを阻害する化合物は皮膚の老化を防ぐ有効な手段となると考えられる。

コラゲナーゼ阻害活性を指標としたスクリーニングを行った結果、ギイマ材部の1-BuOH可溶画分が、比較的強い阻害活性を示したので活性成分の精査を行い、生物学的評価を行った。



96-well plate に最大濃度が 100 μ M になるように調整したサンプル溶液 (DMSO) 10mM を 50 μ L 及び酵素溶液 100 μ L を加え、10 秒間攪拌した後 37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュ

ベートした。インキュベートした後に 20 μ M に調整した基質溶液 50 μ L を加え、基質溶液添加直後の蛍光強度を 0 分とし、15 分、30 分、60 分の蛍光強度を測定した。コラゲナーゼ阻害率は、励起波長 320nm、蛍光波長 405nm の蛍光強度から、以下の式で算出した。

$$\text{Inhibition(\%)} = [1 - (30\text{min sample FI} - 0\text{min sample FI}) / (30\text{min control FI} - 0\text{min control FI})] \times 100$$

| Comp | A | B | C | D |
|-----------------------------|------|------|------|------|
| IC ₅₀ (μ M) | 64.9 | >100 | >100 | >100 |
| Comp | E | F | G | |
| IC ₅₀ (μ M) | >100 | 11.8 | 25.1 | |

表 1

表 1 に簡易法を用いて算出した各化合物の IC₅₀ を示す。

D. 考察

本研究ではギイマ (*Vaccinium wrightii*) の材部よりフラボノイド骨格を有する化合物が多数得られた。それらには特に重篤な活性はないものと思われる。毒性を有すると考えられるジテルペン類は得られなかった。さらなる研究として EtOAc 可溶画分の精査を行う必要があると判断される。

フラボノイド骨格を有する Compound A ~ G のうちフラボノイドの重合体である Compound F 及び Compound G には強いコラゲナーゼ阻害活性がみられた。フラボノイドの重合体である Compound F 及び Compound G では二量体である Compound G に対して、三量体である

Compound Fにより強い活性が見られた。
これが本化合物に構造特異な活性か、所謂
タンニンによる酵素阻害活性によるものか
興味を持たれる。

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