

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	ジンチョウゲ科アオガンピ属植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究
別タイトル	Discover of bioactive diterpenoids from Wikstroemia genus
作成者(著者)	張, 米
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院薬学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 福島, 健/
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1113号
学位記番号	甲第144号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225122">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD28225122</a>

# ジンチョウゲ科アオガンピ属植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究

所属 医薬品分子設計学講座

氏名 張 米 印

## 【序論】

ジンチョウゲ科植物にはチグリアン (tiglane) 型やダフナン (daphnane) 型ジテルペノイドが特徴的に分布しており、これらジテルペノイドは抗がん、抗 HIV および鎮痛作用など多彩な生物活性を有することが報告されている。一方、ジンチョウゲ科アオガンピ属 (*Wikstroemia*) 植物は約 70 種が世界中に分布するが、ジテルペノイドに関する成分研究は少なく、これまでに数種の植物についてしか行われていない。本研究はジンチョウゲ科植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究の一環として、アオガンピ属植物について生物活性ジテルペノイドの探索研究を行った。

## 【本論】

### 1. *W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* に含まれるチグリアン型ジテルペノイドの成分研究

#### 1) 植物材料および抽出単離

本研究は中国雲南省にて採取した *W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* の全木を植物材料として用いた。*W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* の 95%エタノール抽出エキスについて酢酸エチルと水で分配操作を行い、酢酸エチル画分を粗ジテルペノイド画分とした。それぞれの粗ジテルペノイド画分について、ODS および PEI シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて分画を行い、順相および逆相分取 HPLC により単離精製を行った。その結果、*W. scytophylla* からは 6 種のチグリアン型ジテルペノイド (1-6)、*W. lamatsoensis* からは 8 種のチグリアン型ジテルペノイド (1, 2, 4-9) を単離した (図 1)。単離したジテルペノイドのうち、5 種 (1, 2, 4-6) は共通成分であった。

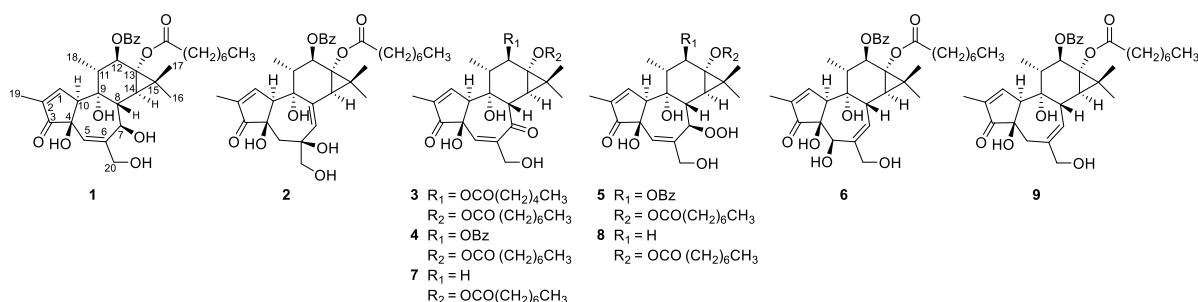


図 1. *W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* より単離したチグリアン型ジテルペノイドの化学構造

#### 2) 構造決定

単離した化合物 (1-9) の化学構造は UV、IR、MS、NMR、ECD など各種スペクトル解析により決定した。そのうち、5 種の化合物は新規化合物であり、それぞれ wikstrocin A-E (1-3, 7 および 8) と命名した。新規化合物の構造決定の詳細は以下の通りである。

新規化合物 1-3, 7, 8 は <sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR における特徴的なシグナルの観察により、A 環 (チグリアン骨格の 5 員環) に共通して 1(2)-en-3-one 構造を有する高度に酸化修飾されたチグリアン型ジテルペノイドであることを推定した。即ち、①gem-dimethyl cyclopropane 基に帰属できる一連のシグナル、②18 位と 19 位メチル基由来のプロトンシグナル、③1(2)-en-3-one 構造由来のシグナルが観察された。

化合物 1 と 2 は同じ分子式を有する構造異性体であり、B 環 (チグリアン骨格の 7 員環) の二重結合の位置が異なった。化合物 1 は 5(6)-ene、化合物 2 は 7(8)-ene を有することは HMBC スペクトルの解析により決定した。化合物 1 の相対配置は ROESY スペクトルの解析により、7 位以外には既知化合物 4 と同じであると決定した。化合物 2 の相対配置は H-5 $\alpha$ /H<sub>2</sub>-20, H<sub>2</sub>-20/H-7, H-7/H-14 に NOESY 相関が観察されたことから 6 位水酸基を  $\beta$  配置と決定した。

新規化合物 **3** は既知化合物 **4** と同じチグリアン構造を有し、12 位に結合するアシル基のみが異なる化合物であった。即ち、化合物 **3** においてはヘキサノイルオキシ基由来の NMR シグナルが観察され、HMBC スペクトルの解析により 12 位に結合すると決定した。新規化合物 **7** と **8** は、それぞれ化合物 **4** と **5** と  $^1\text{H-NMR}$  および  $^{13}\text{C-NMR}$  データを比較したところ、12 位に結合するベンゾイルオキシ基由来の NMR シグナルが観察されず、12 位はメチレンであることが示唆された。このことは  $\text{H}_3\text{-18/C-12}$  の HMBC 相関が観察されたことから支持された。

新規化合物の絶対配置は、ECD スペクトルにおいて、A 環の  $\alpha,\beta$ -不飽和ケトン由来の発色団 ( $\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ ) に帰属される 240-260 nm 領域に負のコットン効果および 220-240 nm 領域に正のコットン効果が観察されたことにより決定した。

### 3) 抗 HIV 活性

化合物 **1-9** については、HIV-1 NL4-3 株を感染させた MT4 リンパ球を用いた HIV 複製阻害活性を評価した結果、化合物 **9** ( $\text{IC}_{50} = 0.18 \text{ nM}$ ), **4** ( $\text{IC}_{50} = 3.8 \text{ nM}$ ) および **6** ( $\text{IC}_{50} = 12.8 \text{ nM}$ ) は強い抗 HIV 活性を示した。構造活性相関については、B 環に 6(7)-ene を有する化合物が特に強力な抗 HIV 活性を示すことが明らかになった。

## 2. LC-MS/MS を用いたジンチョウゲ科アオガンピ属植物に含まれるジテルペノイドの成分解析

### 1) 植物材料および LC-MS/MS 分析

本研究はこれまでに当教室および共同研究先にて化学成分研究を行った 6 種のアオガンピ属植物について、さらなるジテルペノイドの探索のため LC-MS/MS を活用したジテルペノイドに関する成分解析を行った。植物材料には中国雲南省または広西省にて採取した 6 種のアオガンピ属植物 *W. scytophylla*, *W. lamatsoensis*, *W. pilosa*, *W. indica*, *W. ligustrina* および *W. lichiangensis* を用いた。各植物の 95%エタノール抽出物について水と酢酸エチルにて分配操作を行い、酢酸エチル可溶画分をさらに Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  固相抽出カートリッジを用いて前処理し、分析用サンプルとした。LC-MS/MS 分析には Q Exactive 四重極-Orbitrap ハイブリッド質量分析計を使用し、Full MS モードおよび data dependent MS/MS モードにて分析を行った。

### 2) ジンチョウゲ科植物由来ジテルペノイドの MS/MS フラグメンテーション解析

最初にこれまでアオガンピ属植物の化学成分研究により単離したチグリアン型およびダフナン型ジテルペノイドについてマスマスペクトルおよびプロダクトイオンスペクトルの解析を行った。

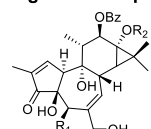
チグリアン型ジテルペノイドはポジティブイオンモードでは、マスマスペクトルにおいてチグリアン骨格上の 12 位に結合する置換基および第三級炭素原子に結合した水酸基が順次脱離したフラグメントイオンが特徴的に観察された。プロダクトイオンスペクトルでは  $m/z$  290-350 の範囲に  $\text{C}_{20}$  のプロダクトイオンより  $\text{H}_2\text{O}$  や  $\text{C}=\text{O}$  が連続して脱離したプロダクトイオンが観察された。さらに、12 位に置換基が結合していないチグリアンは、retro Diels-Alder 反応により C 環から分子式  $\text{C}_5\text{H}_6$  のユニットが脱離し、 $m/z$  241 ( $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_3$ ) のプロダクトイオンが観察された。一方、ネガティブイオンモードでは、プロダクトイオンスペクトルにおいて 12 位または 13 位に結合するアシル基に由来するプロダクトイオンが高い強度で観察された。

ダフナン型ジテルペノイドはポジティブイオンモードでは、マスマスペクトルにおいてチグリアン型ジテルペノイドと異なり 12 位に結合する置換基の脱離は観察されなかった。プロダクトイオンスペクトルにおいては、 $m/z$  250-400 の範囲に  $\text{C}_{20}$  のプロダクトイオンより  $\text{H}_2\text{O}$  や  $\text{C}=\text{O}$  が連続して脱離したプロダクトイオンが観察された。また、12 位に置換基が結合しない化合物は 20 位のオキシメチレンとともにエポキシ基部分が開裂して生じる  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$  のユニットが脱離して、 $m/z$  253 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_2$ ) のプロダクトイオンが観察された。12 位に置換基が結合する化合物は、 $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$  のユニットが脱離して  $m/z$  269 ( $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{O}_3$ ) のプロダクトイオンが観察された。さらに、ダフナン型ジテルペノイドのうち、C 環にオルトエステル結合した脂肪族鎖が骨格を跨り A 環に結合して形成した大環状環を有する大環状型ダフナンは、 $m/z$  400-500 付近に  $\text{H}_2\text{O}$  や  $\text{C}=\text{O}$  が連続的に脱離した  $\text{C}_{30}$

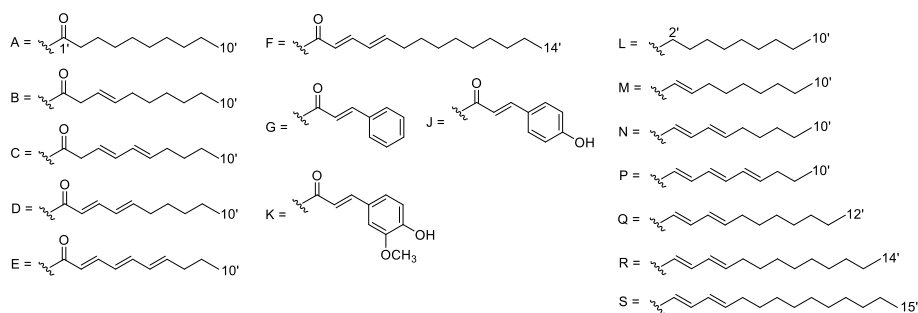
から C<sub>28</sub> のプロダクトイオンが観察されたことに加えて、*m/z* 400 以下に大環状環由来の C<sub>10</sub> のニュートラルロスが脱離して生じる一連の C<sub>20</sub> のプロダクトイオンが観察された。一方、ネガティブイオンモードではチグリアン型ジテルペノイドと同様に、プロダクトイオンスペクトルにおいてダフナン骨格または大環状環部分に結合したアシル基に由来するプロダクトイオンが高い強度で観察された。

次に、各植物の抽出エキスの LC-MS/MS 分析結果について、精密質量による組成式推定およびマススペクトルとプロダクトイオンスペクトルの解析によりジテルペノイド由来のイオンを検出し、上述の MS/MS フラグメンテーションの解析により化学構造を推定した (図 2)。

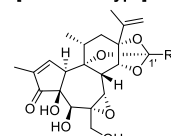
#### Tiglane Diterpenoids



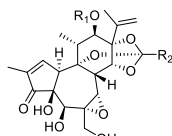
- 10 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = A
- 11 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = B
- 12 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = C
- 13 R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = A
- 14 R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = B
- 15 R<sub>1</sub> = OH R<sub>2</sub> = C



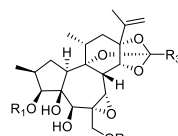
#### Daphnane Diterpenoids [orthoester type]



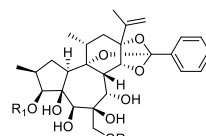
- 16 R = Ph
- 17 R = L
- 18 R = N
- 19 R = Q
- 20 R = R
- 21 R = S



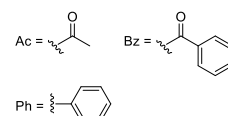
- 22 R<sub>1</sub> = Ac R<sub>2</sub> = R
- 23 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = P
- 24 R<sub>1</sub> = G R<sub>2</sub> = N
- 25 R<sub>1</sub> = G R<sub>2</sub> = P
- 26 R<sub>1</sub> = J R<sub>2</sub> = N
- 27 R<sub>1</sub> = K R<sub>2</sub> = N
- 28 R<sub>1</sub> = K R<sub>2</sub> = P



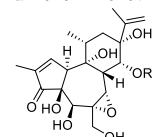
- 32 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 33 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 34 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz R<sub>3</sub> = Ph
- 35 R<sub>1</sub> = G R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 36 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = G R<sub>3</sub> = Ph
- 37 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz R<sub>3</sub> = M
- 38 R<sub>1</sub> = A R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 39 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = A R<sub>3</sub> = Ph
- 40 R<sub>1</sub> = D R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 41 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = D R<sub>3</sub> = Ph
- 42 R<sub>1</sub> = E R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Ph
- 43 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = E R<sub>3</sub> = Ph



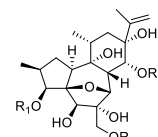
- 44 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H
- 45 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz
- 46 R<sub>1</sub> = D R<sub>2</sub> = H



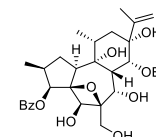
#### [polyhydroxy type]



- 47 R = D
- 48 R = F

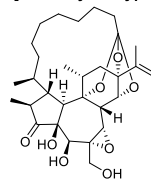


- 49 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = Bz R<sub>3</sub> = H
- 50 R<sub>1</sub> = D R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = Bz

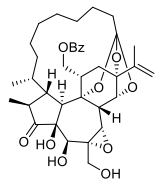


- 51

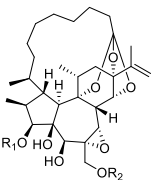
#### [macrocyclic type]



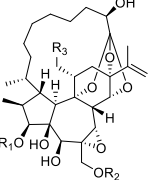
- 52



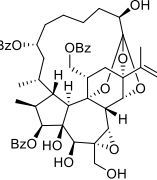
- 53



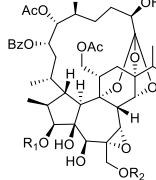
- 54 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H
- 55 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz
- 56 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = H
- 57 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H R<sub>3</sub> = OBz
- 58 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz R<sub>3</sub> = OBz



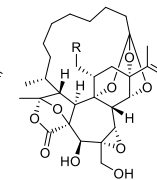
- 59



- 59



- 60 R<sub>1</sub> = Bz R<sub>2</sub> = H
- 61 R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = Bz



- 62 R = H
- 63 R = OBz

図 2. 6 種のアオガンピ属植物より同定したジテルペノイドの化学構造

### 3) *W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* に含まれるジテルペノイドの成分解析

これまでの成分研究にてチグリアン型ジテルペノイドを単離した *W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* の全木について LC-MS/MS 分析を行った結果、いずれもチグリアン型ジテルペノイドに加えてダフナン型ジテルペノイドを検出した。*W. scytophylla* からは単離した化合物を除く 17 種のジテルペノイド由来のピークを検出した。そのうち、3 種はチグリアン型ジテルペノイド (10–13)、14 種はダフナン型ジテルペノイド (16–18, 30, 32–35, 41, 42, 44, 50, 51, 54) であると同定した。同定した化合物のうち 1 種のポリヒドロキシ型ダフナン (51) はこれまでに未報告の化合物であった。一方、*W. lamatsoensis* からは単離した化合物を除く 13 種のジテルペノイド由来のピークを検出した。そのうち、3 種はチグリアン型ジテルペノイド (10–13)、10 種はダフナン型ジテルペノイド (16–18, 20, 21, 29, 31, 33, 40, 47) であると同定した。また、同定した化合物のうち 2 種のオルトエステル型ダフナン (29 および 31) はこれまでに未報告の化合物であった。

#### 4) *W. pilosa* に含まれるジテルペノイドの成分解析

*W. pilosa* の全木については成分研究を行ったが、ジテルペノイドを単離することはできなかった。しかし、成分研究の過程で 1 種の新規フェルロイルグリセロールを単離し、グリセロール類は単離過程でジテルペノイドと類似する挙動を示すことがわかった。一方、LC-MS/MS 分析により微量ではあるが 1 種のジテルペノイド由来のピークを検出し、ダフナン型ジテルペノイドの simplexin (17) であると同定した。

#### 5) *W. indica* に含まれるジテルペノイドの成分解析

*W. indica* の茎に関する成分研究においては、6 種の既知ダフナン型ジテルペノイド (17, 20, 24, 54, 55, 59) を単離した。LC-MS/MS 分析により微量ジテルペノイドについてさらなる解析を行った結果、単離した化合物を除く 15 種のジテルペノイド由来のピークを検出した。そのうち、6 種はオルトエステル型ダフナン (17, 19, 22, 26–28)、1 種はポリヒドロキシ型ダフナン (48) および 8 種は大環状型ダフナン (52, 56–58, 60–63) であると同定した。

#### 6) *W. ligustrina* および *W. lichiangensis* に含まれるジテルペノイドの成分解析

先行研究にて *W. ligustrina* の全木からは 1 種の新規大環状ダフナンを含む計 5 種のダフナン型ジテルペノイド (17, 18, 54, 55, 58) が単離・構造決定された。LC-MS/MS 分析の結果では、単離された化合物を除く 22 種のジテルペノイド由来のピークを検出した。MS/MS フラグメンテーション解析による構造推定により 16 種はオルトエステル型ダフナン (16, 20–22, 30, 32–39, 43–45)、2 種はポリヒドロキシ型ダフナン (47 および 49) および 4 種は大環状型ダフナン (53, 56, 57, 60) であると同定した。また、そのうち 4 種のオルトエステル型 (37–39, 43) および 1 種のポリヒドロキシ型ダフナン (49) はこれまでに未報告の化合物であった。一方、*W. lichiangensis* の地上部からは 4 種の新規化合物を含む計 5 種のチグリアン型ジテルペノイド (11–15) が単離・構造決定された。LC-MS/MS 分析の結果では、単離した化合物を除く 5 種のジテルペノイド由来のピークを検出した。そのうち、1 種はチグリアン型ジテルペノイド (10)、4 種はダフナン型ジテルペノイド (33, 34, 46, 49) であると同定した。

#### 【結論】

本研究はジンチョウゲ科アオガンピ属植物の生物活性ジテルペノイドに着目した探索研究である。*W. scytophylla* および *W. lamatsoensis* の成分研究では、新規化合物 5 種を含む計 9 種の多様な B 環構造を有するチグリアン型ジテルペノイドを単離し、構造決定した。さらに抗 HIV 活性評価により、チグリアンの B 環構造が抗 HIV 活性の発現に大きく影響することが明らかになった。一方、LC-MS/MS を用いて 6 種のアオガンピ属植物に含まれるジテルペノイドについて成分解析を行った結果、これまでのジテルペノイドの単離の有無にかかわらず、いずれの植物からもチグリアン型またはダフナン型ジテルペノイドを検出した。MS/MS フラグメンテーション解析に基づいた構造推定により、6 種のアオガンピ属植物よりこれまでの成分研究で単離した化合物を含めた計 15 種のチグリアン型ジテルペノイドおよび 48 種のダフナン型ジテルペノイドを同定した。そのうち 8 種はこれまでに未報告の化合物であった。本研究から得られた知見は今後さらなるジンチョウゲ科植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究へ活用されることが期待される。

#### 【対象論文】

- (1) Otsuki K<sup>#</sup>, Zhang M<sup>#</sup>, Li W, Koike K, et. al. *J. Nat. Prod.* 83, 3584–3590 (2020). <sup>#</sup> Co-first author
- (2) Zhang M, Otsuki K, Kikuchi T, Koike K, Li, W, et. al. *J. Nat. Prod.* 84, 2366–2373 (2021).
- (3) Zhang M, Otsuki K, Kikuchi T, Koike K, Li W, et. al. *J. Nat. Med.* 76, 680–685 (2022).
- (4) Zhang M, Otsuki K, Kikuchi T, Li W, et. al. *Plants* 12, 3620 (2023).

# 学位論文審査報告書

報告書記載:2024年 02月 16日

学位申請者名	張 米
論文題目	ジンチョウゲアオガンピ属植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究
審査委員名	主査 福島 健 副査 加藤 恵介、東屋 功
学位論文の審査結果の要旨： <p>張米氏より提出された学位論文（題目：ジンチョウゲアオガンピ属植物由来の生物活性ジテルペノイドの探索研究）の審査結果について記す。本論文は、創薬資源として可能性を秘めているジンチョウゲ科アオガンピ（<i>Wikstroemia</i>）属植物に含まれるジテルペノイドの化学構造解析ならびにその抗HIV活性に関する研究について記述されている。</p> <p>第一章では、中国雲南省を起源とするアオガンピ属植物<i>W. scytophylla</i>, および <i>W. lamatsoensis</i>の全木を植物材料として、5/7/6/3-炭素縮合四環系構造を有するチグリアン型ジテルペノイド6種を単離し、高分解能ESI-MS、NMR、IR、ECDによって、それらの化学構造を決定し、新規化合物（5種）をwikstrocin A-Eと命名した。単離した既知の化合物も含め、9種の化合物の抗HIV活性を評価し、それらの内、3種に強い抗HIV活性（<math>IC_{50} = 0.18-12.8</math> nM）を見出すことに成功した。</p> <p>第二章では、主として高速液体クロマトグラフィー-高分解能質量分析計（LC-HR-MS/MS）を活用し、第一章の<i>W. scytophylla</i>, <i>W. lamatsoensis</i>のほかに、<i>W. indica</i>, <i>W. pilosa</i>, <i>W. ligustrina</i>, <i>W. lichiangensis</i>のアオガンピ属植物に含まれるジテルペノイドの探索を行った。はじめに、第一章で単離したチグリアン型ジテルペノイドのマスペクトルによる開裂パターンの解析を行い、次に<i>W. indica</i>の茎から5/7/6/3-炭素縮合四環系構造を有する6種の既知ダフナン型ジテルペノイドを単離し、マスペクトルによる開裂パターンを解析した。これらのチグリアン型またはダフナン型ジテルペノイドに特徴的な、MS/MSによる開裂パターンの規則性を基にして、上記6種のアオガンピ属植物から合計63種のジテルペノイド（チグリアン型15種、ダフナン型48種）の同定に成功した。</p> <p>本論文は、序論、本論、結論と適切に文献を引用しながら、論理的かつ明確に書かれており、全体的として良くまとめられている。MSスペクトル、NMRスペクトルおよび各種分光測定から化合物の構造が論理的に決定され、また、LC-HR-MS/MSのデータに基づいた迅速な成分分析の手法を確立している。ECDスペクトルがチグリアン型ジテルペノイドの絶対構造の決定に有用である点や強い抗HIV活性を示す化合物の単離に成功した点は独創性ならびに新知見として十分である。研究の目的に対する結論の導き方や各種分析機器によるデータ収集、それらの記載は適切であった。</p> <p>また、これらの研究成果は、張米氏が筆頭著者とする4報の英文原著論文にて公開されており、論文審査基準を十分に満たしていることを確認した。</p> <p>以上、審査員3名の審査結果より、本論文の著者である張米氏は博士（薬学）の学位に相応しいと判断された。</p>	