

2021 年度課程博士学位論文

Adriamycin 誘発アポトーシス様細胞死を指標とした  
抗がん剤感受性増強作用を有する天然有機化合物の探索研究

【薬学】 公衆衛生学分野 今堀 大輔

本論文は以下の論文の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表データも含んでいる。

1) Daisuke Imahori, Takahiro Matsumoto, Youhei Saito, Tomoe Ohta, Tatsusada Yoshida, Yuji Nakayama, Tetsushi Watanabe. Cell death-inducing activities via P-glycoprotein inhibition of the constituents isolated from fruits of *Nandina domestica*. *Fitoterapia* **2021**, 154, 105023.

[第一章、第二章、第三章]

2) Takahiro Matsumoto, Daisuke Imahori, Erika Ohnishi, Masaya Okayama, Takahiro Kitagawa, Tomoe Ohta, Tatsusada Yoshida, Naoto Kojima, Masayuki Yamashita, Tetsushi Watanabe. Chemical structures and induction of cell death via heat shock protein inhibition of the prenylated phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum erectum*. *Fitoterapia* **2022**, 156, 105097.

[第一章、第二章、第三章]

## 目次

序論.....	1
本論.....	6
第一章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分の単離および構造決定 .....	6
緒言 .....	6
第一節 ナンテン ( <i>Nandina domestica</i> ) 果実含有成分の抽出および単離 .....	6
第二節 新規成分の化学構造 .....	6
第三節 オトギリソウ ( <i>Hypericum erectum</i> ) 全草含有成分の抽出および単離 .....	14
第四節 新規成分の化学構造 .....	14
考察 .....	20
小括 .....	22
第二章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価 .....	23
緒言 .....	23
第一節 ナンテン ( <i>N. domestica</i> ) 含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価 .....	25
第二節 オトギリソウ ( <i>H. erectum</i> ) 含有成分の抗がん剤感受性増強作用評価 .....	29
考察 .....	31
小括 .....	32
第三章 ピロールアルカロイドおよびプレニル化フロログルシノールの抗がん剤感受性増強作用機序の解明 .....	33
緒言 .....	33
第一節 新規成分ピロールアルカロイド類 ( <b>1</b> および <b>2</b> ) の rhodamine 123 排出抑制能評価 .....	34
第二節 新規成分プレニル化フロログルシノール類 ( <b>15a–16b</b> ) の rhodamine 123 排出抑制能評価 .....	36
第三節 新規成分プレニル化フロログルシノール類 ( <b>15a</b> および <b>16b</b> ) の HSP 105 発現抑制能評価 .....	38
考察 .....	39
小括 .....	40
結論.....	41
謝辞.....	42
実験の部.....	43
第一章の実験.....	43
第二章の実験.....	49
第三章の実験.....	50
引用文献.....	52
Supplemental data .....	60

## 略語表

ABC	: ATP-binding cassette
ADR	: Adriamycin
ATP	: Adenosine triphosphate
BCRP	: Breast cancer resistance protein
BuOH	: Butanol
CCDC	: Cambridge Crystallographic Data Centre
CCK-8	: Cell Counting Kit-8
DFT	: Density functional theory
DMEM	: Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
DQF(-COSY)	: Double-quantum filter (-correlated spectroscopy)
ECD	: Electronic circular dichroism
ECL	: Enhanced chemiluminescence
EI	: Electron ionization
ESI	: Electrospray ionization
EtOAc	: Ethyl acetate
FBS	: Fetal bovine serum
Glc	: $\beta$ -D-glucopyranosyl
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum correlation
h	: hours
HPLC	: High-performance liquid chromatography
HRMS	: High-resolution mass spectrometry
HRP	: Horseradish peroxidase
HSP	: Heat Shock Protein
HSE	: Heat shock element
HSF1	: Heat Shock Factor 1
IC <sub>50</sub>	: 50% inhibition concentration
IEFPCM	: Integral equation formalism polarizable continuum model
MDR 1	: Multidrug resistance 1
Me	: Methyl
MeCN	: Acetonitrile
MeOH	: Methanol
MMFF	: Merck molecular force field
MRP 1	: Multidrug resistance-associated protein 1

MS	: Mass spectrometry
NMR	: Nuclear magnetic resonance
NOESY	: Nuclear overhauser effect spectroscopy
ODS	: Octadecylsilyl
P-gp	: P-glycoprotein
Rh 123	: Rhodamine 123
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	: Tris-buffered saline
TD-DFT	: Time-dependent density-functional theory
TLC	: Thin-layer chromatography
Tris	: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	: Ultraviolet
WST-8	: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-
WST-8	: tetrazolium, monosodium salt tetrazolium, monosodium salt

## 序論

がんの罹患数の 2020 年推計値は、約 101 万人であり、おおよそ 2 人に 1 人が一生のうちのがんと診断される<sup>1</sup>。がんの治療法は、大きく、手術療法、放射線療法、化学療法および免疫療法に分けられる。化学療法において従来から広く用いられてきた細胞障害性抗がん剤は、その細胞増殖抑制および細胞死誘導作用によって、がん治療効果を示す<sup>2</sup>。しかしながら、これらの抗がん剤は正常細胞にも共通して存在している DNA 合成機構や細胞分裂機構などを標的とするため、正常細胞に対しても作用する。このため、強い副作用が生じ<sup>2</sup>、このような副作用は抗がん剤治療の大きな問題となっている。アントラサイクリン系抗がん剤であるアドリアマイシン (Adriamycin: ADR) は、肺がん、乳がん、悪性リンパ腫など、多くのがん種の治療に使用されている。一方で ADR は、心毒性、骨髄抑制、悪心や嘔吐などの副作用があり (表 1)、心毒性による副作用の管理のため、生涯投与量が制限される<sup>3</sup>。

表 1 アドリアマイシンの作用機序と主な副作用

薬剤	作用機序	副作用
アドリアマイシン	トポイソメラーゼ II 阻害 DNA インターカレーション	心毒性、骨髄抑制、悪心、嘔吐

がんの薬物治療における 2 つ目の問題点として、薬剤耐性 (抗がん剤抵抗性) が挙げられる。抗がん剤治療時に、薬剤に抵抗性を有するがん細胞が残存し、残存したがん細胞が増殖することにより、がんの再発を起こすことが報告されている<sup>4,5</sup> (図 1)。がん細胞が抗がん剤抵抗性を示す原因は、薬剤に対する抵抗性と細胞死に対する抵抗性に分けられる<sup>6</sup>。薬剤に対する抵抗性は、P-糖タンパク質 (P-glycoprotein: P-gp) による抗がん剤の排出<sup>7</sup>、治療標的タンパク質の遺伝子変異<sup>8</sup>、解毒酵素の活性化<sup>9</sup>などがある。また、細胞死に対する抵抗性として、がん細胞における熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein: HSP) の抗アポトーシス機能<sup>10</sup>、Bcl-2、Bcl-x1 など抗アポトーシスタンパク質の発現増加<sup>11,12</sup>、DNA の修復<sup>13</sup>などがある。

抗がん剤抵抗性のがん細胞

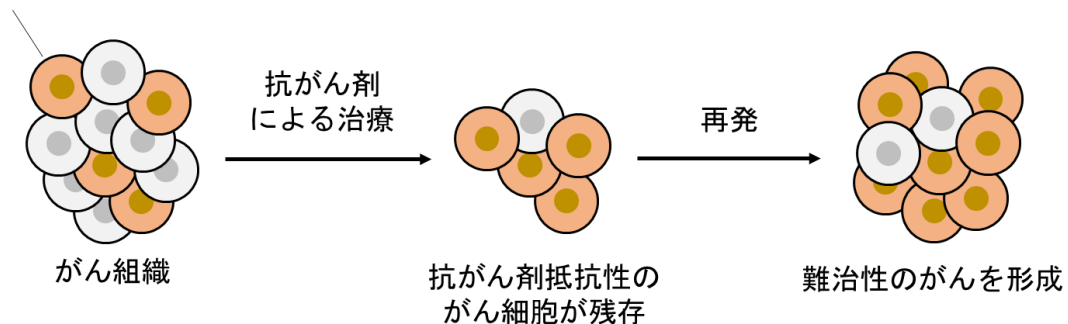


図 1 抗がん剤治療における抗がん剤抵抗性のがん細胞によるがんの再発についての概念図  
がん組織の中に存在する抗がん剤抵抗性のがん細胞は抗がん剤治療後に残存する。残存したがん細胞が増殖することにより、がんの再発を引き起こす。

がん細胞における抗がん剤耐性の原因の一つである adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) 多剤排出トランスポーターは、P-gp/multidrug resistance 1 (P-gp/MDR 1)、multidrug resistance-associated protein 1 (MRP 1) や breast cancer resistance protein (BCRP) などに分類される<sup>7</sup>。これらの ABC 多剤排出トランスポーターは、ADR<sup>14</sup>、パクリタキセル<sup>15</sup>や分子標的治療薬<sup>16</sup>(イマチニブ、エルロチニブ、スニチニブ)などの抗がん剤を基質として認識することから、多剤耐性の原因となっている。P-gp は、様々ながんにおいて高発現している膜タンパク質である<sup>17-19</sup>。P-gp は ATP 結合部位に ATP が結合し、結合した ATP が加水分解されることにより得られるエネルギーを利用して、種々の抗がん剤の取り込みや排出に関与することにより、細胞内の薬剤濃度を低下させることで、抗がん剤のがん治療効果を減弱させる<sup>20</sup>。このため、P-gp は有望な創薬標的分子と考えられており、多くの P-gp 阻害剤が見出されてきた。これまでに P-gp 阻害剤として、第一世代の P-gp 阻害剤 (verapamil、cyclosporin A など)<sup>21,22</sup>、第二世代の P-gp 阻害剤 (GF120918、VX-710、MS-209 など)<sup>23</sup>、第三世代の p-gp 阻害剤 (LY335979、XR9576、R101933 など)<sup>24-26</sup> が報告されている (図 2)。また、天然物由来の P-gp 阻害剤として、フラボノイド (tangeretin や nobiletin など)<sup>27</sup> やアルカロイド (lamellarin など)<sup>28</sup> も報告されている (図 2)。

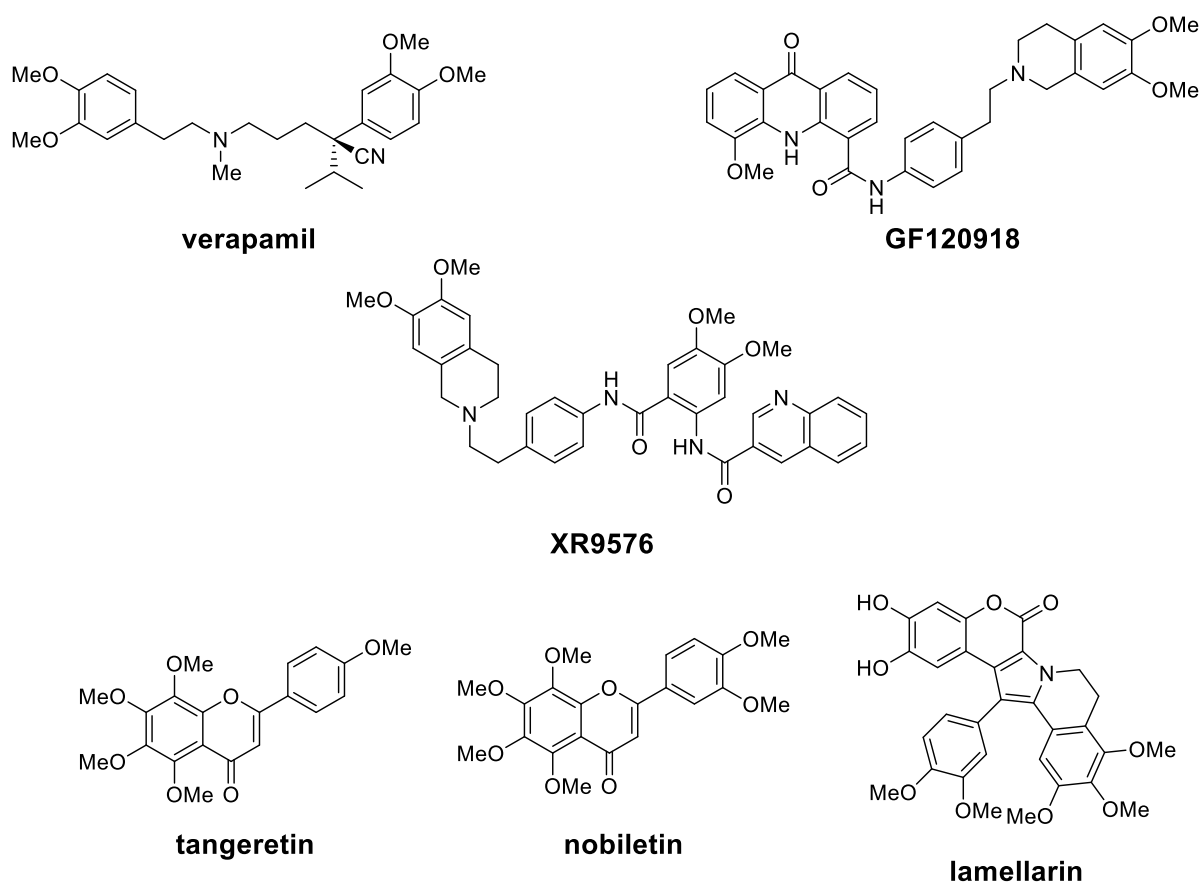


図 2 これまでに報告されている P-gp 阻害剤の化学構造

Verapamil は第一世代の P-gp 阻害剤、GF120918 は第二世代の P-gp 阻害剤、XR9576 は第三世代の p-gp 阻害剤であり、tangeretin、nobiletin および lamellarin は天然物由来の P-gp 阻害剤である。Me: methyl

HSPs は分子量に従って、HSP 70、HSP 90、HSP 105 などに分類される<sup>29</sup>。HSP 70 および HSP 90 はがん細胞において高発現していることが知られている (表 2)<sup>30-35</sup>。近年、HSP 105 が大腸がん<sup>36,37</sup>、膵がん<sup>36,37</sup>、肺がん<sup>38</sup> および子宮頸がん<sup>39</sup> などで高発現していることが報告されている (表 2)。HSPs は抗がん剤によるアポトーシスを抑制することで抗がん剤抵抗性に関与していると考えられている<sup>29</sup>。

HSPs は熱ショック因子 (Heat Shock Factor 1: HSF1) によって制御されている<sup>40,41</sup>。通常、HSF1 は、HSP 70 や HSP 90 などと複合体を形成して不活化されている。細胞が、熱や重金属の暴露などによるストレスにさらされると、HSP 70 や HSP 90 が遊離し、HSF1 は活性化する<sup>40,41,42</sup>。活性化した HSF1 は熱ショックエレメント (Heat Shock Element: HSE) に結合し、HSP 遺伝子の転写を促進する (図 3)<sup>43</sup>。抗がん剤抵抗性改善を目的として、HSP 70 阻害剤<sup>44,45</sup> や HSP 90 阻害剤<sup>46-48</sup> が開発された (図 4、5)。しかしながら、HSP 90 阻害剤は、HSF1 の活性化、多くの HSPs の誘導により、がん細胞のストレス抵抗性を亢進させることが問題となっている<sup>49-51</sup>。そのため、HSP 70 および HSP 105 が有望なターゲットとして考えられており、HSP 70 阻害剤はいくつか報告されている (図 4)。HSP 105 は siRNA によるノックダウンにより腫瘍形成抑制が報告されていることから<sup>52</sup>、有望な標的分子であるが、低分子阻害剤がほとんど見いだされていない。

表 2 HSPs とがん

ファミリー	がん種
HSP 70	膵がん <sup>30</sup> 、大腸がん <sup>31</sup> 、胃がん <sup>32</sup> など
HSP 90	悪性黒色腫 <sup>33</sup> 、膵がん <sup>34</sup> 、食道がん <sup>35</sup> など
HSP 105	大腸がん <sup>36,37</sup> 、膵がん <sup>36,37</sup> 、肺がん <sup>38</sup> 、子宮頸がん <sup>39</sup> など

HSP: Heat Shock Protein

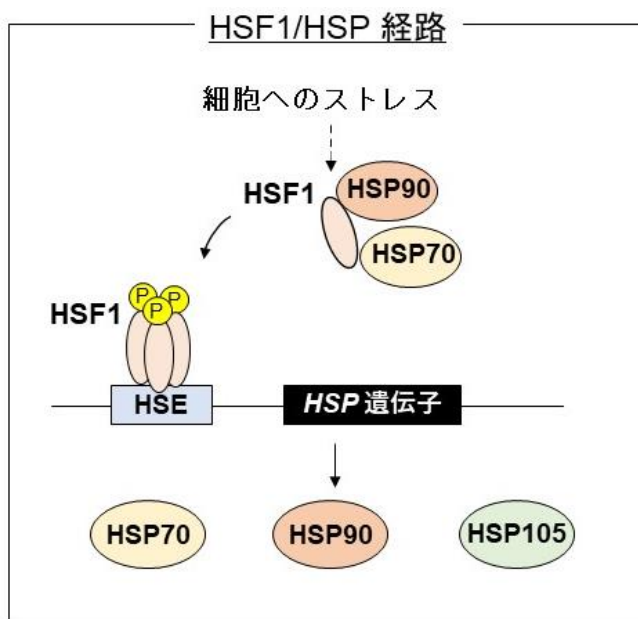
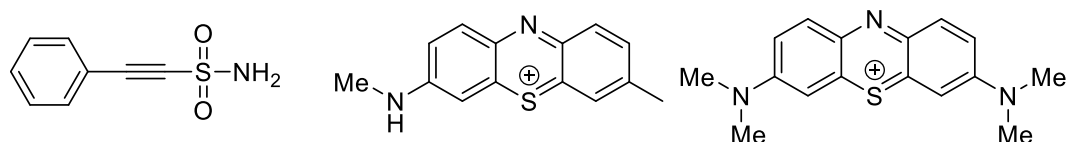


図 3 HSF1/HSP 経路

通常、細胞へのストレスがないときは、HSF1 は、HSP 70 や HSP 90 などと複合体を形成して不活化されている。細胞がストレスにさらされると HSP 70 や HSP 90 が遊離し、HSF1 は活性化する。活性化した HSF1 は HSE に結合し、各種 HSP 遺伝子の転写を促進する。

HSP: Heat Shock Protein、HSE: Heat Shock Element、HSF1: Heat Shock Factor 1





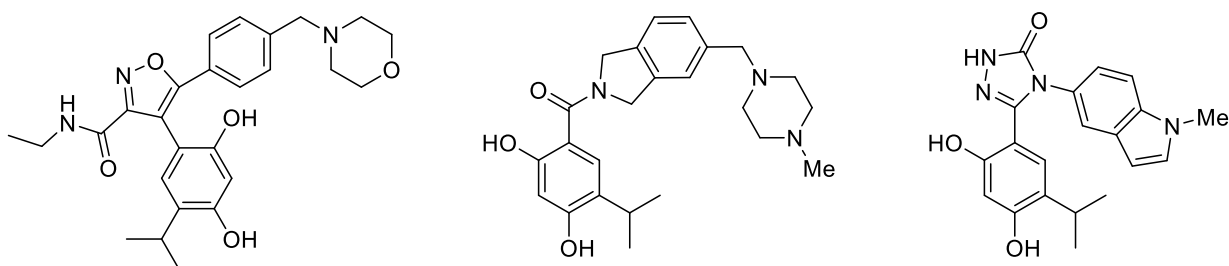
**2-phenylethynylsulfonamide**

**azure C**

**methylene blue**

図 4 これまでに報告されている HSP 70 阻害剤の化学構造

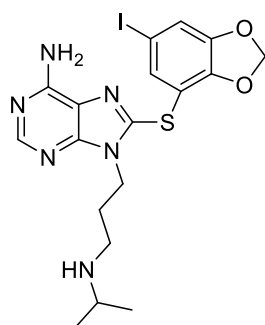
2-phenylethynylsulfonamide は最も早く同定された HSP 70 阻害剤である。Azure C および methylene blue は HSP 70 の ATPase 活性を阻害する化合物として報告された。Me: methyl



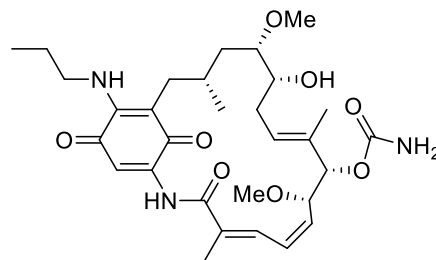
**NVP AUy-922**

**AT13387**

**STA-9090**



**PU-H71**



**17-AAG**

図 5 これまでに報告されている HSP 90 阻害剤の化学構造

NVPAUY-922 および AT 13387 はイソキサゾールレゾルシノール誘導体である。STA-9090 はトリアゾールレゾルシノール誘導体である。PU-H71 はプリン誘導体である。ベンゾキノンアンサマイシン誘導体 17-AAG はヒトの臨床試験に使用された最初の HSP 90 阻害剤である。Me: methyl

上述したように、P-gp および HSP 等、がん細胞が薬剤耐性を示す原因分子の機能を阻害する薬剤を細胞障害性抗がん剤と併用することにより、がん治療効果を高め、がんの再発を効果的に予防できると考えられる。

これまで、P-gp および HSP 105 の機能阻害では、がん細胞の細胞障害性抗がん剤への感受性が上昇するものの、細胞増殖抑制や細胞死は引き起こされないことが報告されている<sup>53-55</sup>。このため、P-gp や HSP 105 に対する阻害剤を見出すには、抗がん剤との併用時に、細胞死を誘導する化合物を探索する必要がある。そこで著者は、抗がん剤との併用時および非併用時に引き起こされる細胞死に伴う形態変化を観察することで、単独では細胞増殖に影響を与えず、抗がん剤への感受性を高める物質を効率的に見出せると考えた。本研究では経時的な形態変化を観察可能であるライブセルイメージング解析を用いて、細胞障害性抗がん剤と併用することにより、がん細胞の抗がん剤への感受性を増強させる天然有機化合物を探索するとともに、その機序解明を行った。

## 本論

### 第一章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分の単離および構造決定

#### 緒言

ナンテン (*Nandina domestica*) は日本や中国に分布しているメギ科の常緑低木である<sup>56</sup>。中国では喘息、百日咳、咽頭腫瘍および子宮出血等、様々な疾患の治療に用いられている<sup>56,57</sup>。含有成分としてはこれまでにアルカロイド<sup>56</sup>やフラボノイド<sup>57</sup>などが報告されており、アルカロイド成分の中でも、アポルフィン骨格を有するナンテニンやドメスチンは比較的含有量が多く<sup>56</sup>、 $\alpha_1$ 受容体阻害作用などを示すこと<sup>58</sup>が報告されている。

オトギリソウ (*Hypericum erectum*) は日本と中国で自生し、500種近くのオトギリソウ科に属している。これらの種は、熱帯地域の温暖な地域に分布している<sup>59</sup>。オトギリソウ含有成分が、抗菌や抗ウイルス作用を示すことが報告されている<sup>60-62</sup>。一般にセントジョンズワートと呼ばれるセイヨウオトギリソウは、抗うつ効果が最もよく知られており<sup>62</sup>、その含有成分として、テルペノイド、フラボノイド、キサントン、ナフトジアントロン、プレニル化アシルフロログルシノールなどが報告されている<sup>63-67</sup>。また、特有のかご状多環式構造を有するプレニル化アシルフロログルシノールも報告されている<sup>68,69</sup>。これらの化合物は、肝保護、免疫抑制など生物活性を有することが報告されている<sup>61,66,70,71</sup>。このようにオトギリソウから、複数の不斉炭素が存在する複雑な化学構造を有し、様々な生物活性を示す化合物が見出されている。

これらのことから、ナンテンに含有する多様な生物活性を示すアルカロイド成分およびオトギリソウより特有かつ複雑な化学構造を有するプレニル化フロログルシノール成分は新規生体機能性が期待されると考え、抽出および単離を行った。

#### 第一節 ナンテン (*N. domestica*) 果実含有成分の抽出および単離

奈良県産ナンテン果実より得られたメタノール (Methanol: MeOH) 抽出エキスを酢酸エチル (ethyl acetate: EtOAc) と H<sub>2</sub>O で分液し、さらに *n*-ブタノール (*n*-Butanol: *n*-BtOH) と H<sub>2</sub>O で分液し、EtOAc 可溶画分、*n*-BtOH 可溶画分および H<sub>2</sub>O 可溶画分を得た。EtOAc 可溶画分および *n*-BtOH 可溶画分を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー、逆相オクタデシルシリル (octadecylsilyl: ODS) オープンカラムクロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) により繰り返し分離精製し、2 種の新規アルカロイド methyl-*E*-magnolamide (**1**, 0.000036%)、methyl-*Z*-magnolamide (**2**, 0.00001%)、4 種の新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmane I (**3**, 0.00077%)、II (**4**, 0.0008%)、III (**5**, 0.000048%)、IV (**6**, 0.000071%) および 8 種の既知化合物 (6*S*,9*S*)-roseoside (**7**, 0.000022%)<sup>72</sup>、(6*S*,9*R*)-roseoside (**8**, 0.000078%)<sup>72</sup>、(6*R*,9*R*)-9-hydroxy-4-megastigmen-3-one (**9**, 0.000016%)<sup>73</sup>、(+)-dehydrovomifoliol (**10**, 0.00001%)<sup>74</sup>、loliolide (**11**, 0.000056%)<sup>75</sup>、4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbenzyl-(*E*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acrylate (**12**, 0.0009%)<sup>76</sup>、4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosylbenzyl-(*Z*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acrylate (**13**, 0.00023%)<sup>76</sup>、1-*p*-formylphenyl-6-caffeoyl- $\beta$ -D-glucopyranoside (**14**, 0.00025%)<sup>76</sup> を単離し、構造決定した (図 7)。

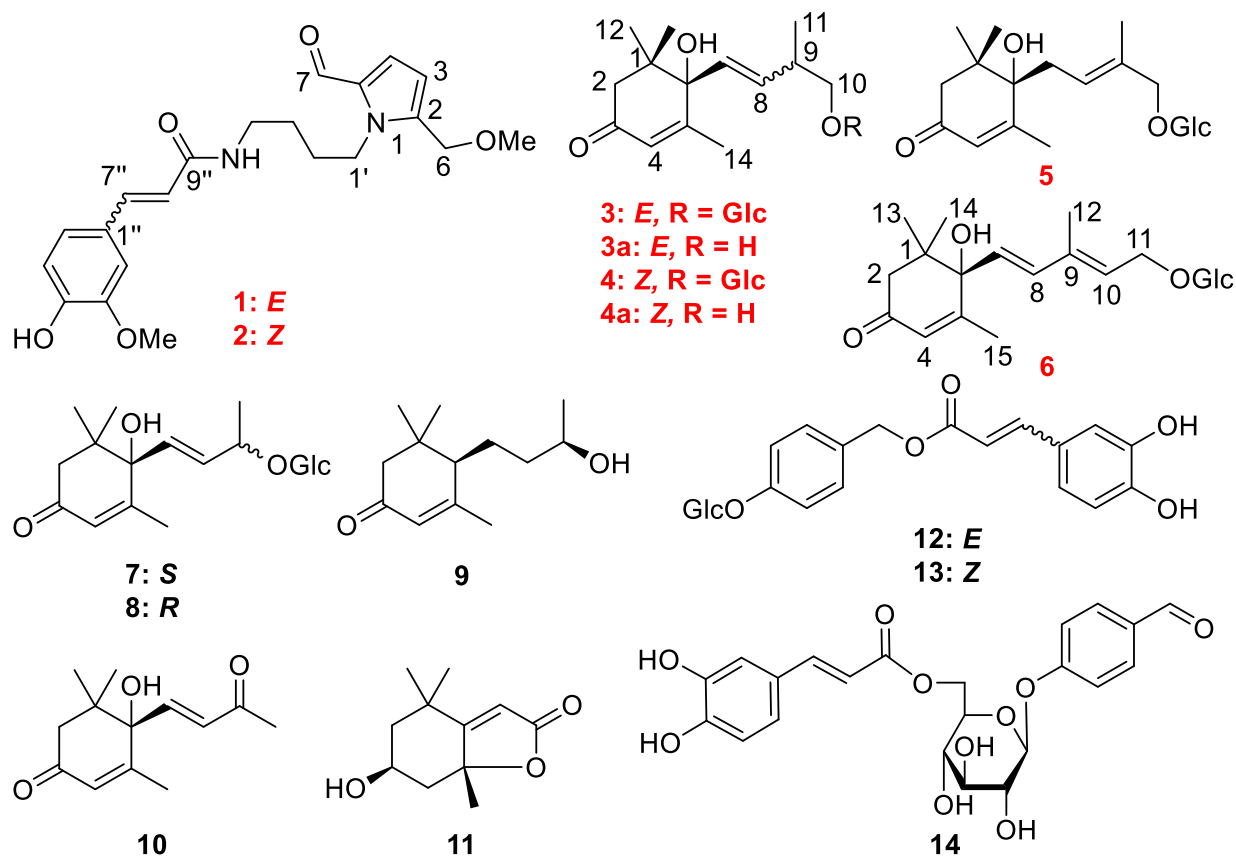


図 7 ナンテン (*Nandina domestica*) より得られた化合物 (1-14) の化学構造

ナンテン果実 (5.0 kg) より得られた MeOH 抽出エキス (1160 g, 23.2%) を各種カラムクロマトグラフィーにより分離精製し、各種化合物を単離した。得られた化合物 (1-6) について、NMR などの各種スペクトルデータの解析を行った。既知化合物 (7-14) については、各種スペクトルデータの実測値を文献値と比較することにより同定した。Me: methyl、Glc:  $\beta$ -D-glucopyranosy (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 1 より引用)

## 第二節 新規成分 (1-6) の化学構造

Methyl-*E*-magnolamide (1) は非結晶の粉末として得られ、高分解能電子イオン化質量分析法 (HR-EI-MS) および炭素-13 核磁気共鳴 ( $^{13}\text{C}$  NMR) スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$  を有することが明らかになった。また、EI-MS において、分子イオンピークが  $m/z$  386  $[\text{M}]^+$  に観察された。さらに、1 についてプロトン核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMR) および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 3) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは magnolamide group<sup>77</sup> と高い一致を示した。そのため、2-ヒドロキシメチル-5-ホルミルピロール [ $\delta_{\text{H}}$  6.18 (d,  $J=4.1$ , H-3)、6.88 (d,  $J=4.1$ , H-4)、4.40 (s, H-6)、9.35 (s, H-7)]、1,4-ブタンジアミン [ $\delta_{\text{H}}$  4.26 (t-like,  $J=7.5$ , H-1'), 1.69 (t-like,  $J=7.5$ , H-2'), 1.50 (t-like,  $J=7.5$ , H-3'), 3.22 (overlapped, H-4')]、フェルラミド [ $\delta_{\text{H}}$  7.02 (d,  $J=2.1$ , H-2''), 6.69 (d,  $J=8.3$ , H-5''), 6.92 (dd,  $J=2.1, 8.3$ , H-6''), 7.32 (d,  $J=15.2$ , H-7''), 6.31 (d,  $J=15.2$ , H-8''), 3.79 (s, H-3''-OMe)、メトキシ基 [ $\delta_{\text{H}}$  (s, H-6-OMe)] の存在が示唆された。1 の平面構造を異種核多結合コヒーレンス

(heteronuclear multiple bond coherence: HMBC) スペクトル (Fig. 2) の詳細な解析より決定した。すなわち、HMBC 相関が H-1'/C-5 と H-4'/C-9" と H-8"/C-9" と H-3"-OMe/C-3" と H-6-OMe/C-6 との間に観測された。これらの相関関係から、メトキシ基が C-6 位置にあり、フェルラミド部分がアミド結合によって C-4' 位に結合していることが示唆された。**1** の C-7" 位の幾何異性は、核オーバーハウザー分光法 (nuclear overhauser effect spectroscopy: NOESY) スペクトルおよび H-7" と H-8" 間の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの結合定数 ( $J=15.2$  Hz) により、*E* 配置であると決定した (図 8)。以上の結果により、methyl-*E*-magnolamide (**1**) の化学構造は、図 7 に示したものであると決定した。

Methyl-*Z*-magnolamide (**2**) は非結晶の粉末として得られ、HR-EI-MS および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5$  を有することが明らかになった。EI-MS においては、分子イオンピークが  $m/z$  386  $[\text{M}]^+$  に観察された。さらに、**2** についてプロトン核磁気共鳴 ( $^1\text{H}$  NMR) および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 3) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは magnolamide group<sup>77</sup> および **1** と高い一致を示した。そのため、2-ヒドロキシメチル-5-ホルミルピロール [ $\delta_{\text{H}}$  6.17 (d,  $J=4.1$ , H-3)、6.88 (d,  $J=4.1$ , H-4)、4.37 (s, H-6)、9.31 (s, H-7)], 1,4-ブタンジアミン [ $\delta_{\text{H}}$  4.21 (t-like,  $J=7.6$ , H-1'), 1.61 (m, H-2'), 1.44 (m, H-3'), 3.21 (m, H-4'), 3.22 (overlapped, H-4')、フェルラミド [ $\delta_{\text{H}}$  7.24 (d,  $J=2.0$ , H-2''), 6.61 (d,  $J=8.2$ , H-5''), 6.82 (dd,  $J=2.0$ , 8.2, H-6''), 6.51 (d,  $J=12.4$ , H-7''), 5.73 (d,  $J=12.4$ , H-7''), 3.71 (s, H-3"-OMe)], メトキシ基 [ $\delta_{\text{H}}$ (s, H-6-OMe)] の存在が示唆された。**2** の平面構造を HMBC スペクトル (図 8) の詳細な解析より決定した。すなわち、HMBC 相関が H-1'/C-5 と H-4'/C-9" と H-8"/C-9" と H-3"-OMe/C-3" と H-6-OMe/C-6 との間に観測された。これらの相関関係から、メトキシ基が C-6 位置にあり、フェルラミド部分がアミド結合によって C-4' 位に結合していることが示唆された。**2** の C-7" 位の幾何異性は、NOESY スペクトルおよび H-7" と H-8" 間の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの結合定数 ( $J=12.4$  Hz) により、*Z* 配置であると決定した (図 8)。以上の結果により、methyl-*Z*-magnolamide (**2**) の化学構造は、図 7 に示したものであると決定した。

Nandinamegastigmanes I (**3**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +51.3$  in MeOH) を示す、無色の非結晶個体として得られた。高分解能エレクトロスプレーイオン化質量分析法 (HR-ESI-MS) および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8$  を有することが明らかになった。ESI-MS において、擬似分子イオンピークが  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に観察された。さらに、**3** について  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 4) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは 9 位の炭素原子付近が roseoside<sup>78</sup> と高い一致を示した。**3** の C-7 位の幾何異性は NOESY スペクトルおよび H-7 と H-8 間の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルの結合定数 ( $J=15.1$  Hz) により、*E* 配置であると決定した (図 8)。次に、**3** を 20% aqueous  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -1,4-dioxane で酸加水分解し、D-glucose を得た。D-glucose は、tolylthiocarbamoyl thiazolidine へと誘導され、HPLC の保持時間を標品と比較することにより同定した<sup>79</sup>。6 位の絶対立体配置は電子円二色性 (electronic circular dichroism: ECD) スペクトルの測定値と理論計算値を比較することにより決定した。**3** の酵素による加水分解により得られた **3a** の ECD スペクトル実測値を **3b** の ECD スペクトル理論計算値と比較した (図 9)。また、ECD スペクトル理論計算値のため

に設計した **3b** の化学構造は **3a** のスペクトルと同じであると仮定し、解析した結果、**3** の C-6 位の絶対立体配置は *S* であると決定した。以上の結果より、nandinamegastigmanes I (**3**) の化学構造は、図 7 に示したのものであると決定した。

Nandinamegastigmanes II (**4**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +36.7$  in MeOH) を示す、無色の非結晶個体として得られた。HR-ESI-MS および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8$  を有することが明らかになった。ESI-MS において、擬似分子イオンピークが  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に観察された。さらに、**4** について  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 4) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは 9 位の炭素原子付近が roseoside<sup>78</sup> および **3** と高い一致を示した。**4** の C-7 位の幾何異性は NOESY スペクトルおよび H-7 と H-8 間の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの結合定数 ( $J=9.7$  Hz) により、*Z* 配置であると決定した (図 8)。構成糖および絶対立体配置の決定は、上記 **3** と同様の方法を用いた。すなわち、次に、**4** を 20% aqueous  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -1,4-dioxane で酸加水分解し、D-glucose を得た。D-glucose は、tolylthiocarbamoyl thiazolidine へと誘導され、HPLC の保持時間を標品と比較することにより同定した<sup>79</sup>。6 位の絶対立体配置は ECD スペクトルの測定値と理論計算値を比較することにより決定した。**4** の酵素による加水分解により得られた **4a** の ECD スペクトル実測値を **3b** の ECD スペクトル理論計算値と比較した。**4** から得られた **4a** の ECD スペクトルは同様の cotton 効果 [242.4 nm ( $\Delta\epsilon+15.5$ )] が観察された。この結果より、**4** の C-6 位の絶対立体配置は *S* であると決定した。以上の結果より、nandinamegastigmanes II (**4**) の化学構造は、図 7 に示したのものであると決定した。

Nandinamegastigmane III (**5**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +7.4$  in MeOH) を示す、無色の非結晶個体として得られた。HR-ESI-MS および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8$  を有することが明らかになった。ESI-MS において、擬似分子イオンピークが  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  に観察された。さらに、**5** について  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 4) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは C-7、8、9、10、11 位を除き、**3** および **4** と高い一致を示した。そのため、側鎖のメチレン基 [ $\delta_{\text{H}}$  2.49 (m, H-7a)、2.65 (overlapping, H-7b)]、オレフィン基 [ $\delta_{\text{C}}$  124.5 (C-8) および 135.4 (C-9)]、酸素官能基に結合したメチレン基 [ $\delta_{\text{H}}$  4.01 (d,  $J=8.2$ , H-10a)、 $\delta_{\text{H}}$  4.17 (d,  $J=8.2$ , H-10b)]、メチル基 [ $\delta_{\text{H}}$  1.65 (s, H-11)] の存在が示唆された。上述の分析結果より、**3** と **5** は側鎖上の二重結合の位置が異なる化合物であることが明らかになった。上記の二重結合の位置は、H-10/C-9 と H-11/C-8 と H-11/C-9 と H-11/C-10 との間に観測された HMBC 相関より、C-8/C-9 であると決定された (図 8)。次に、**5** を 20% aqueous  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -1,4-dioxane で酸加水分解し、**3** および **4** と同様に、D-glucose を得た。最後に、**5** の C-6 位の絶対立体配置は **3** および **4** と同様であると推測した。以上の結果より、nandinamegastigmanes III (**5**) の化学構造は、図 7 に示したのものであると決定した。

Nandinamegastigmane IV (**6**) は正の旋光性 ( $[\alpha]_D^{25} +62.8$  in MeOH) を示す、無色の非結晶個体として得られた。HR-ESI-MS および  $^{13}\text{C}$  NMR を解析することにより、分子式  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_8$  を有することが明らかになった。 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  および 2D NMR スペクトル (表 4) の詳細な解析を行い、**6** の化学構造は 図 7 に示したのものであると決定した。この化合物の化学構造は MS 分析のみによる構造推定が以前の報告<sup>80</sup>に記載されているため、NMR や MS スペクトルな

どについて記載した。化学構造は、他の新規化合物 (1-5) と同様の手法で決定した。

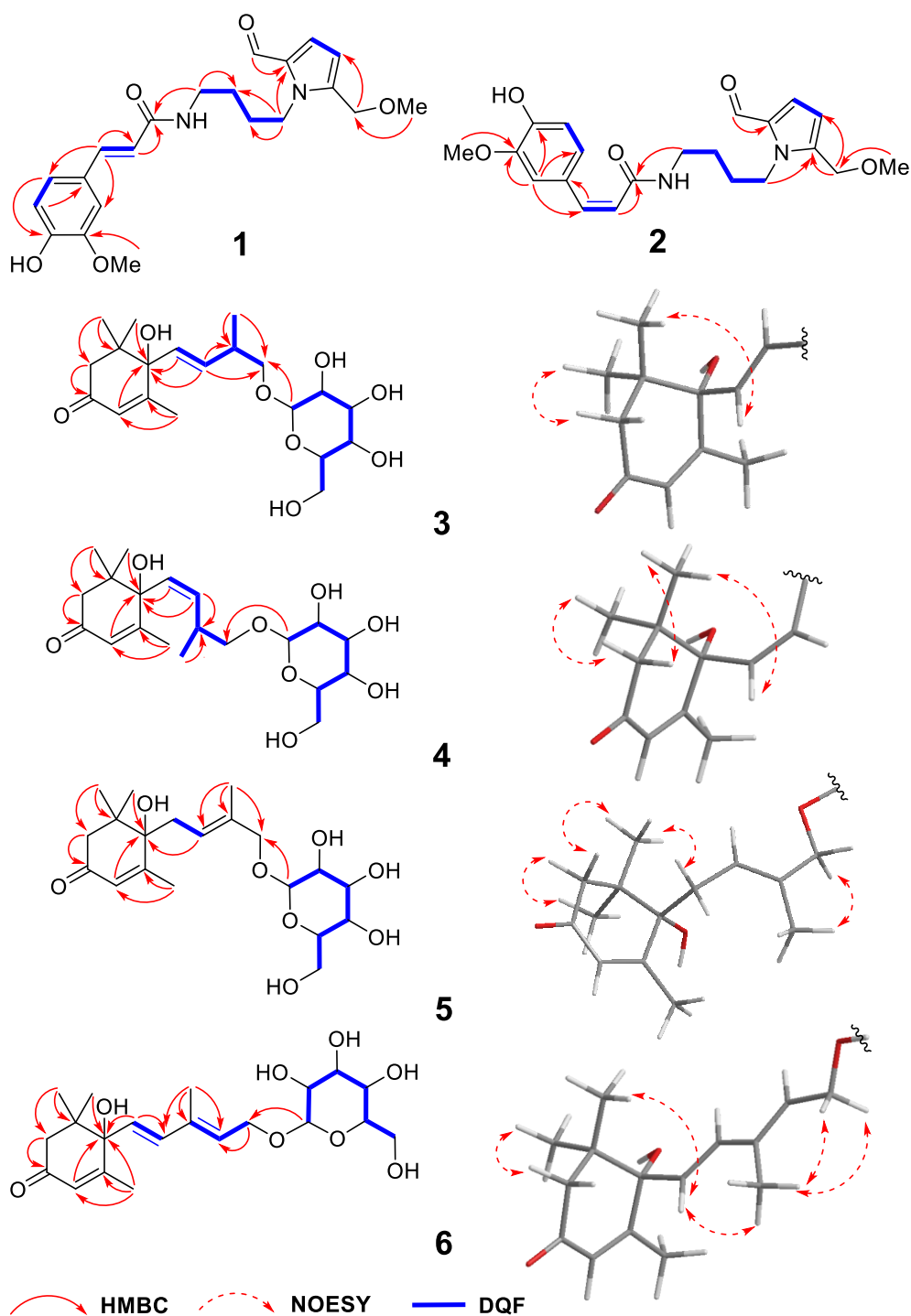


図 8 新規化合物 (1-6) の 2D NMR の相関図

新規化合物 (1-6) について、HMBC および DQF-COSY 相関の解析を行った。また、新規化合物 (1-6) の幾何異性については  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルの結合定数および NOESY 相関の解析を行った。Me: methyl、HMBC: heteronuclear multiple bond coherence、NOESY: nuclear overhauser effect spectroscopy、DQF(-COSY): double-quantum filter (-correlated spectroscopy) (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 2 より引用)

表 3. Methyl-*E*- magnolamide (1) および methyl-*Z*- magnolamide (2) の  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) および  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) スペクトル

Position	1		2	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ ( <i>J</i> in Hz)
2	142.0		140.9	
3	112.9	6.18 (d, 4.1)	112.9	6.17 (d, 4.1)
4	126.0	6.88 (d, 4.1)	126.0	6.88 (d, 4.1)
5	133.8		133.8	
6	66.4	4.40 (s)	66.4	4.37 (s)
7	181.1	9.35 (s)	181.1	9.31 (s)
1'	46.2	4.26(t-like, 7.5)	46.2	4.21(t-like, 7.6)
2'	29.8	1.69 (t-like, 7.5)	29.8	1.61 (m)
3'	27.7	1.50(t-like, 7.5)	27.4	1.44 (m)
4'	40.0	3.22(over lapped solvent signal)	39.9	3.21 (m)
1''	128.2		128.5	
2''	111.5	7.02 (d, 2.1)	113.8	7.24 (d, 2.0)
3''	149.3		148.5	
4''	149.9		148.5	
5''	116.5	6.69 (d, 8.3)	115.8	6.61 (d, 8.2)
6''	123.2	6.92 (dd, 2.1, 8.3)	124.8	6.82 (dd, 2.0, 8.2)
7''	141.0	7.32 (d, 15.2)	138.1	6.51 (d, 12.4)
8''	118.7	6.31 (d, 15.2)	121.7	5.73 (d, 12.4)
9''	169.2		170.4	
6-OMe	58.2	3.24 (s)	58.1	3.24 (s)
3''-OMe	56.4	3.79 (s)	56.4	3.71 (s)

スペクトルは CD<sub>3</sub>OD を用いて測定。

(*Fitoterapia* **2021**, 154, 105023, **Table 1** より引用)



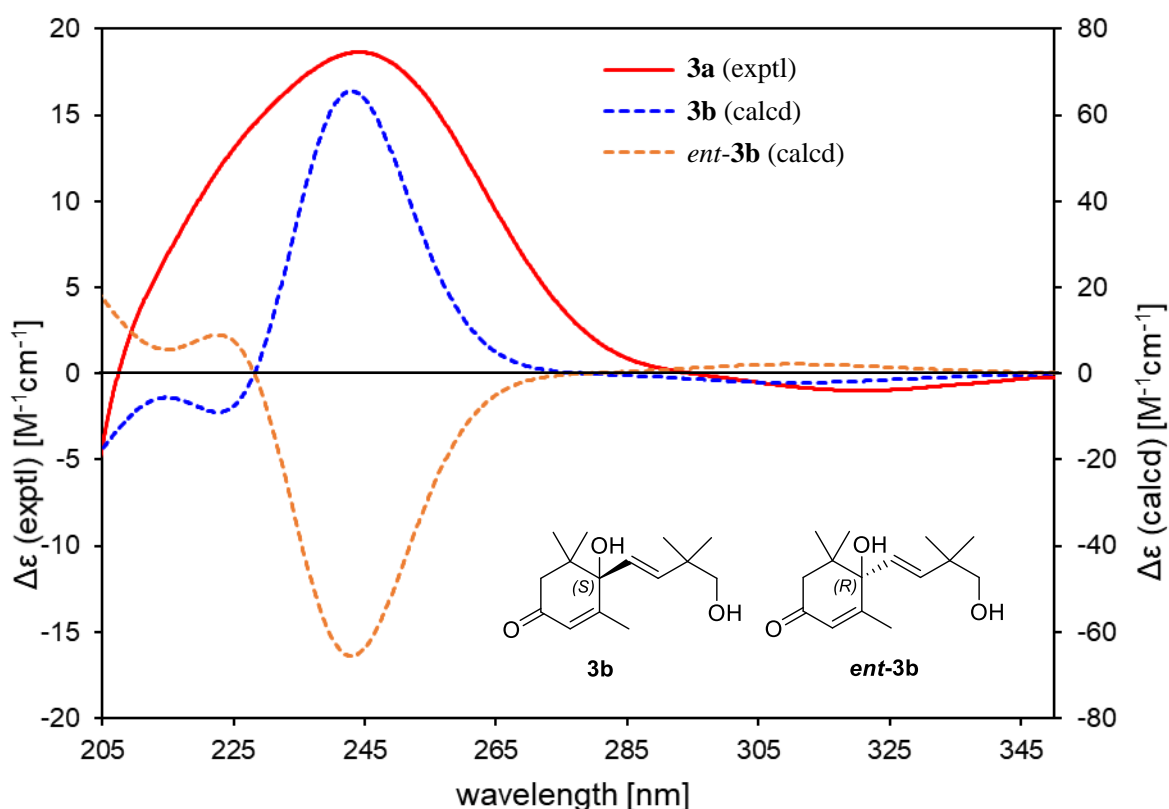


図 9 **3a** の実験 ECD スペクトルと **3b** および *ent-3b* の理論計算 ECD スペクトルの比較  
**3** の酵素による加水分解により得られた **3a** の ECD スペクトルを測定した。次に、**3a** の ECD スペクトル実測値を ECD スペクトル理論計算値のために設計した **3b** の理論計算 ECD スペクトルと比較した。**3b** の理論計算 ECD スペクトルは、242 nm 付近に正の Cotton 効果を示した **3a** の ECD スペクトルをよく再現した。exptl: experimental、calcd: calculated (*Fitoterapia* **2021**, 154, 105023, **Fig. 3** より一部改変して引用)

表 4. *Nandinamegastigmanes* I–IV (3–6) の  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) および  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) スペクトル

Position	3		4		5		6	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	42.5		42.5		42.3		42.7	
2	50.8	$\alpha$ 1.97 (d, 17.2) $\beta$ 2.51 (m)	50.1	$\alpha$ 2.10 (d, 16.5) $\beta$ 2.49 (d, 16.5)	50.5	$\alpha$ 2.10 (d, 17.2) $\beta$ 2.6 (over lapping)	50.7	$\alpha$ 2.08 (d, 17.2) $\beta$ 2.3 (d, 17.2)
3	201.8		201.5		201.1		201.2	
4	127.2	5.79 (s)	127.1	5.87 (s)	127.2	5.83 (s)	127.1	5.80 (s)
5	167.7		167.7		170.3		167.3	
6	80.4		80.3		79.7		80.4	
7	131.0	5.54 (d, 15.1)	130.9	5.67 (d, 9.7)	36.5	$\alpha$ 2.49 (m) $\beta$ 2.65 (m)	130.0	5.71 (d, 15.8)
8	135.6	5.49 (dd, 7.6, 15.1)	135.5	5.68 (m)	124.5	5.59 (t, 7.6)	135.7	6.26 (d, 15.8)
9	38.2	2.47 (m)	38.7	2.58 (m)	135.4		137.5	
10	74.9	$\alpha$ 3.31 (dd, 6.2, 8.9) $\beta$ 6.67 (t-like, 8.9)	75.2	$\alpha$ 3.77 (dd, 8.9, 6.2) $\beta$ 3.44 (dd, 6.8, 8.9)	75.5	$\alpha$ 4.01 (d, 8.2) $\beta$ 4.17 (d, 8.2)	129.4	5.61 (d, 7.6)
11	17.3	0.94 (d, 6.9)	17.3	1.05 (d, 6.2)	14.4	1.65 (s)	66.4	$\alpha$ 4.28 (dd, 7.6, 12.8) $\beta$ 4.40 (dd, 7.6, 12.8)
12	23.5	0.93 (s)	23.4	1.02 (s)	24.9	0.99 (s)	13.0	1.73 (s)
13	24.5	0.92 (s)	24.5	1.01 (s)	24.2	1.09 (s)	23.5	0.95 (s)
14	19.8	1.82 (s)	19.7	1.91 (s)	21.2	2.00 (s)	24.6	0.91 (s)
15							19.6	1.81 (s)
1'	104.2	4.13 (d, 7.6)	104.4	4.23 (d, 8.2)	102.8	4.17 (d, 8.2)	103.2	4.18 (d, 8.2)
2'	75.2	3.04 (t, 7.6)	75.2	3.15 (t, 8.2)	75.1	3.15 (t, 8.2)	75.1	3.08 (t, 8.2)
3'	78.0	3.13 (m)	78.0	3.26 (m)	77.9	3.18 (m)	78.1	3.19 (m)
4'	71.7	3.15 (m)	71.7	3.24 (m)	71.7	3.22 (m)	71.7	3.17 (m)
5'	78.2	3.23 (m)	78.2	3.32 (m)	78.1	3.31 (m)	78.1	3.16 (m)
6'	62.8	$\alpha$ 3.53 (dd, 4.8, 11.6) $\beta$ 3.74 (dd, 1.2, 11.6)	62.8	$\alpha$ 3.63 (dd, 5.5, 12.4) $\beta$ 3.84 (dd, 1.2, 12.4)	62.8	$\alpha$ 3.63 (dd, 5.5, 11.7) $\beta$ 3.83 (dd, 1.2, 11.7)	62.8	$\alpha$ 3.56 (dd, 5.6, 12.0) $\beta$ 3.76 (d-like, 12.0)

スペクトルは  $\text{CD}_3\text{OD}$  を用いて測定。

(*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Table 2 より引用)

### 第三節 オトギリソウ (*H. erectum*) 全草含有成分の抽出および単離

青森県産オトギリソウ全草より得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O で分液し、さらに *n*-BtOH と H<sub>2</sub>O で分液し、EtOAc 可溶画分、*n*-BtOH 可溶画分および H<sub>2</sub>O 可溶画分を得た。EtOAc 可溶画分を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー、逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィーおよび HPLC により繰り返し分離精製し、4 種の新規化合物 (+)-erectumol I (**15a**, 0.0027%)、(-)-erectumol I (**15b**, 0.0018%)、(-)-erectumol II (**16a**, 0.00077%) および (+)-erectumol II (**16b**, 0.00076%) を単離し、構造決定した (図 10)。

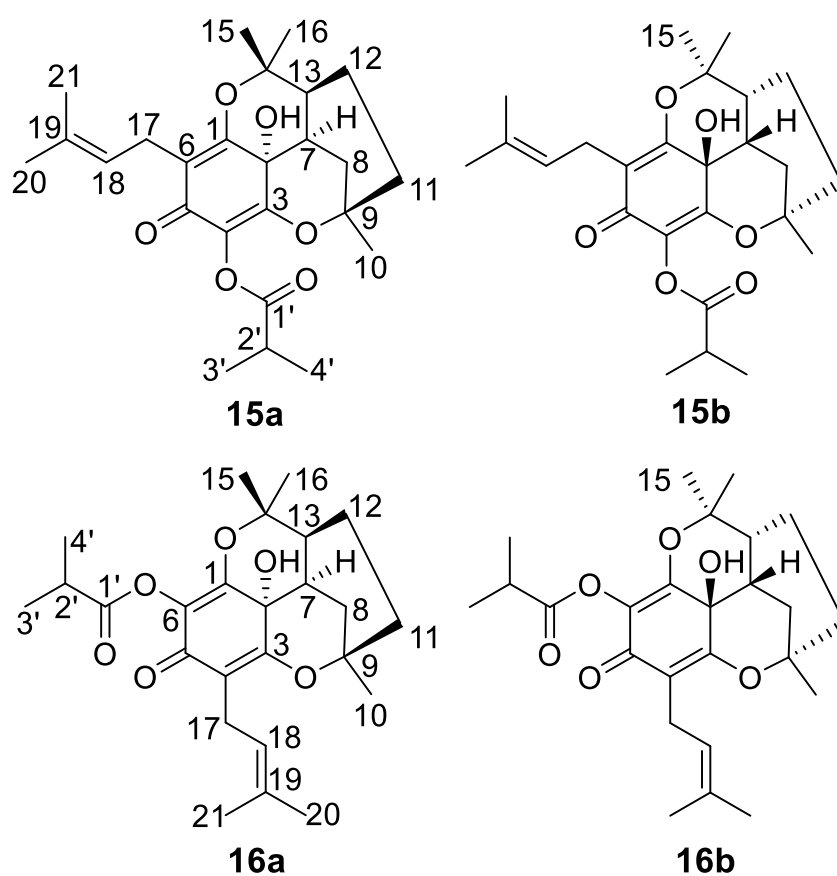


図 10 オトギリソウ (*Hypericum erectum*) より得られた化合物 (15a、15b、16a および 16b) の化学構造

オトギリソウ全草 (7.5 kg) より得られた MeOH 抽出エキス (1150 g, 15.3%) を各種カラムクロマトグラフィーにより分離精製し、各種化合物を単離した。得られた化合物 (15a、15b、16a および 16b) について、NMR などの各種スペクトルデータの解析や X 線結晶構造解析を行った。(Fitoterapia 2022, 156, 105097, Fig. 1 より引用)

#### 第四節 新規成分 (15a、15b、16a および 16b) の化学構造

Errectumol I (15) は旋光性を示さない、無色の板状結晶として得られた。HR-EI-MS および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_6$  を有することが明らかになった。また、EI-MS において、分子イオンピークが  $m/z$  430  $[\text{M}]^+$  に観察された。さらに、15 の  $^1\text{H}$  および  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 5) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルはフロログルシノール類と高い一致を示した。そのため、カルボニル基 {6 つの四級炭素 [ $\delta_{\text{C}}$  169.2 (C-1)、65.2 (C-2)、164.2 (C-3)、125.8 (C-4)、183.0 (C-5)、122.3 (C-6)]}、2-メチル-2-ブテン {2 つのメチル基 [ $\delta_{\text{H}}$  1.63 (s, H-20)、1.68 (s, H-21)]}、メチレン基 [ $\delta_{\text{H}}$  2.95 (dd,  $J=7.6, 14.0$ , H-17a)、2.96 (dd,  $J=7.6, 14.0$ , H-17b)]、オレフィン基 [ $\delta_{\text{C}}$  121.7 (C-18)、131.5 (C-19)]、イソ酪酸基 {2 つのメチル基 [ $\delta_{\text{H}}$  1.28 (d,  $J=6.9$ , H-3')、1.25 (d,  $J=6.9$ , H-4')]、メチン基 [ $\delta_{\text{H}}$  2.80 (sep,  $J=6.9$ , H-2')] } およびカルボニル炭素 [ $\delta_{\text{C}}$  175.2 (C-1')] } に加え、メバロン酸経路由来であると推測される 10 の炭素 (C-7-C-16) の存在が示唆された。これらの上記の官能基が結合するすべての位置は、フロログルシノール類の四級炭素に対応していたため、2D NMR スペクトルによる平面構造の決定が困難であった。15 の結晶化を試みたところ、MeOH 水溶液中にて良質な結晶が得られた。そのため、得られた結晶について X 線結晶構造解析 (CCDC 2109591) を行い、化学構造が図 10 に示したものであると決定した。X 線結晶構造解析の結果 (図 11) より、15 が三環化プレニル化フロログルシノール類であることが明らかになった。相対立体配置は DQF-COSY、HMBC および NOESY スペクトルの解析や X 線結晶構造解析により決定した (図 11 および 12)。すなわち、HMBC 相関が H-7/C-2 と H-8/C-2 と H-13/C-2 と H-10/C-8、9、11 と H-15/C-13、14 と H-17/C-1、5、6 との間に観測されたことから、2-メチル-2-ブテンは C-6 に結合していることが明らかになった (図 12)。また、NOESY 相関が H-7/H-8  $\alpha$ 、H-8  $\alpha$ /H-10、H-7/H-16 との間に観測されたことから、H-7、C-10 および C-16 は分子の同一側面に位置していることが明らかになった (図 12)。また、H-12/H-15 においても NOESY 相関が観測されたことから C-12 および C-15 が同一側面に位置していることも示している (図 12)。X 線結晶構造解析により、15 はエナンチオマーの混合物であるということが明らかになった。そこで、このラセミ混合物を HPLC により {YMC CHIRAL ART Amylose-C (250 $\times$ 4.6 mm i.d.)、(+)-errectumol I (15a、 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  +45.4 in MeOH) および (-)-errectumol I (15b、 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -53.1 in MeOH) を単離した。15a と 15b の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルおよび HR-EI-MS は同一のものであった。しかしながら、ECD スペクトルはそれぞれの化合物で逆のコットン効果を示した。そのため、15a および 15b の絶対立体配置は ECD スペクトルの測定値と理論計算値を比較することにより決定した (図 13)。(2*S*, 7*R*, 9*R*, 13*S*) の立体の ECD スペクトル理論計算値は 15a の実測値と同様であり、(2*R*, 7*S*, 9*S*, 13*R*) の立体の ECD スペクトル理論計算値は 15b の実測値と同様であった。以上の結果より、(+)-errectumol I (15a) および (-)-errectumol I (15b) の化学構造は、図 10 に示したものであると決定した。

Errectumol II (16) は旋光性を示さない、無色の板状結晶として得られた。HR-EI-MS および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルを解析することにより、分子式  $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_6$  を有することが明らかになった。また、EI-MS において、分子イオンピークが  $m/z$  430  $[\text{M}]^+$  に観察された。16 の  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル (表 5) の詳細な解析を行ったところ、その NMR スペクトルは 2 と高い

一致を示した。そのため、カルボニル基 {6つの四級炭素 [ $\delta_c$  160.5 (C-1)、65.4 (C-2)、171.8 (C-3)、114.9 (C-4)、182.4 (C-5)、131.5 (C-6)}、2-メチル-2-ブテン {2つのメチル基 [ $\delta_H$  1.64 (s, H-20)、1.69 (s, H-21)]、メチレン基 [ $\delta_H$  2.91 (dd,  $J=7.8, 14.1$ , H-17a)、2.97 (dd,  $J=7.8, 14.1$ , H-17b)]、オレフィン基 [ $\delta_c$  121.6 (C-18)、131.3 (C-19)]、イソ酪酸基 {2つのメチル基 [ $\delta_H$  1.28 (d,  $J=7.2$ , H-3')、1.26 (d,  $J=7.2$ , H-4')]、メチン基 [ $\delta_H$  2.80 (sep,  $J=7.2$ , H-2')] } およびカルボニル炭素 [ $\delta_c$  175.1 (C-1')] } に加え、メバロン酸経路由来であると推測される 10 の炭素 (C-7-C-16) の存在が示唆された。これらの上記の官能基が結合位置は、X線結晶構造解析 (CCDC 2109606) により決定した (図 11)。以上の解析結果より示された化学構造は、2-メチル-2-ブテンおよびイソ酪酸基の結合部位を除いて、**15** とほぼ同様のものではあった。HMBC 相関が H-7/C-2 と H-8/C-2 と H-13/C-2 と H-10/C-8、9、11 と H-15/C-13、14 と H-17/C-1、5、6 との間に観測されたことから X線結晶構造解析の結果が確からしいものであることを支持している (図 12)。また、NOESY 相関が H-7/H-8  $\alpha$ 、H-8  $\alpha$ /H-10、H-7/H-16 との間に観測されたことから、H-7、C-10 および C-16 は分子の同一側面に位置しており、H-12/H-15 においても NOESY 相関が観測されたことから C-12 および C-15 が同一側面に位置していることが示唆された (図 12)。次に、ラセミ混合物を HPLC により {YMC CHIRAL ART Amylose-C (250×4.6 mm i.d.)、(-)-erectumol II (**16a**, [ $\alpha_D^{25}$  -39.4 in MeOH) および (+)-erectumol II (**16b**, [ $\alpha_D^{25}$  +34.0 in MeOH) を単離した。そのため、**16a** および **16b** の絶対立体配置は ECD スペクトルの測定値と理論計算値を比較することにより決定した (図 13)。(2*R*, 7*R*, 9*R*, 13*S*) の立体の ECD スペクトル理論計算値は **16a** の実測値と同様であり、(2*S*, 7*S*, 9*S*, 13*R*) の立体の ECD スペクトル理論計算値は **16b** の実測値と同様であった。以上の結果より、(-)-erectumol II (**16a**) および (+)-erectumol II (**16b**) の化学構造は、図 10 に示したものであると決定した。

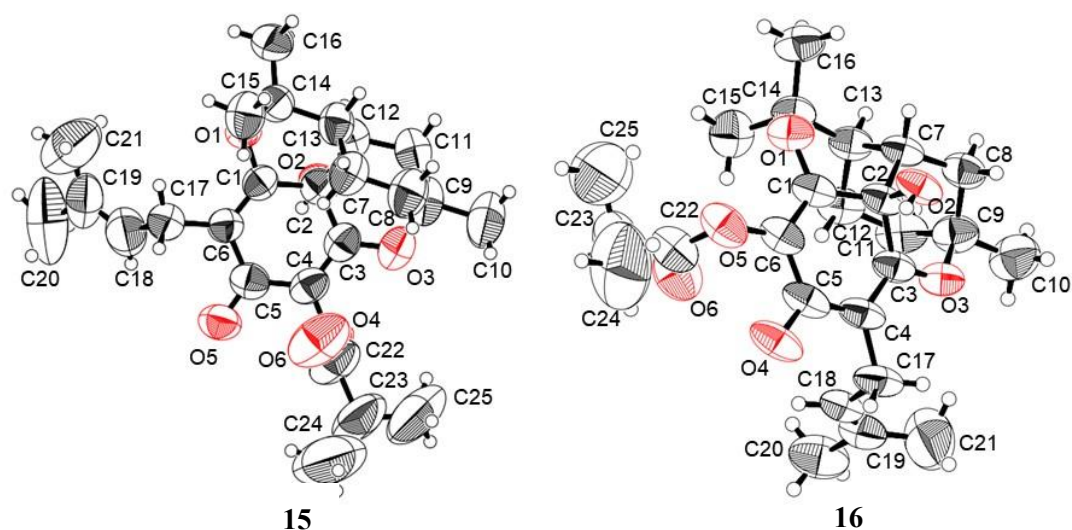


図 11 erectumols I および II (**15** および **16**) の ORTEP 図

Erectumols I および II (**15** および **16**) について、X線結晶構造解析を行った。

(*Fitoterapia* 2022, 156, 105097, Fig. 2 より引用)

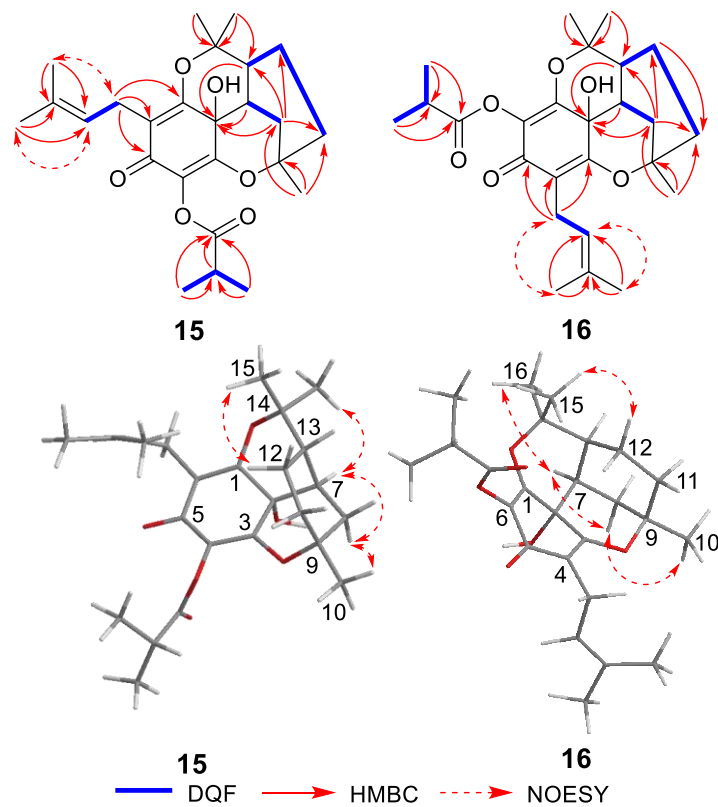


図 12 Erectumols I および II (15 および 16) の 2D NMR の相関図

Erectumols I および II (15 および 16) について、HMBC および DQF-COSY 相関の解析を行った。また、erectumols I および II (15 および 16) の相対立体配置については、NOESY 相関の解析を行った。(Fitoterapia 2022, 156, 105097, Fig. 3 より引用)

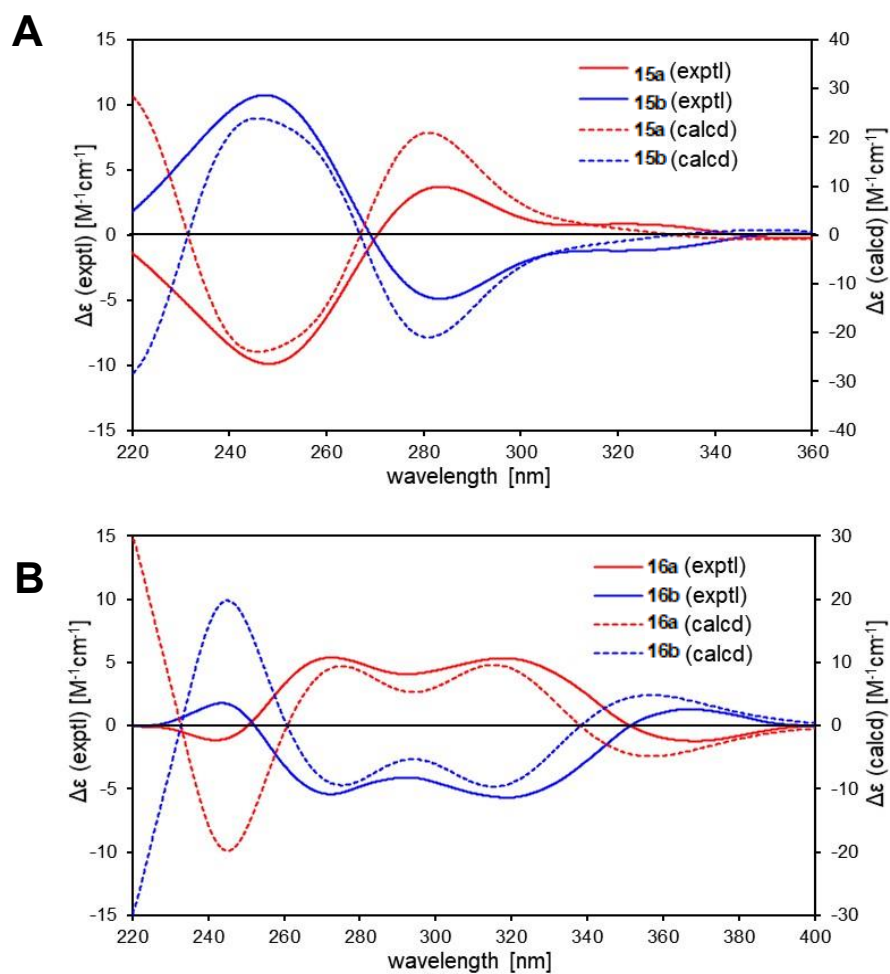


図 13 化合物 (15a、15b、16a および 16b) の実験 ECD スペクトルと理論計算 ECD スペクトルの比較

(A および B) 化合物 (15a、15b、16a および 16b) の ECD スペクトルを測定し、理論計算 ECD スペクトルと比較した。exptl: experimental、calcd: calculated

(*Fitoterapia* 2022, 156, 105097, Fig. 4 より一部改変して引用)

表 5 Erectumols I および II (15 および 16) の  $^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz) および  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz) スペクトル

Position	15		16	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)
1	169.2		160.5	
2	65.2		65.4	
3	164.2		171.8	
4	125.8		114.9	
5	183.0		182.4	
6	122.3		131.5	
7	33.8	2.43 (m)	34.0	2.45 (m)
8	33.8	$\alpha$ 2.38 (m)	33.7	$\alpha$ 2.39 (m)
		$\beta$ 1.58 (dd, 2.8, 13.7)		$\beta$ 1.58 (dd, 2.4, 13.5)
9	78.6		77.9	
10	27.9	1.37 (s)	28.2	1.41 (s)
11	36.4	$\alpha$ 1.83 (d-like, 13.7)	36.4	$\alpha$ 1.80 (dd, 3.0, 13.8)
		$\beta$ 1.41 (m)		$\beta$ 1.44 (m)
12	21.0	1.54 (m)	21.1	1.56 (m)
13	41.1	1.58 (m)	41.5	1.66 (m)
14	85.9		86.9	
15	24.2	1.19 (s)	24.6	1.17 (s)
16	29.0	1.52 (s)	28.8	1.50 (s)
17	22.0	$\alpha$ 2.95 (dd, 7.6, 14.0)	21.5	$\alpha$ 2.91 (dd, 7.8, 14.1)
		$\beta$ 2.96 (dd, 7.6, 14.0)		$\beta$ 2.97 (dd, 7.8, 14.1)
18	121.7	5.03 (t, 7.6)	121.6	5.05 (t, 7.8)
19	131.5		131.3	
20	25.6	1.63 (s)	25.7	1.64 (s)
21	17.8	1.68 (s)	17.8	1.69 (s)
1'	175.2		175.1	
2'	33.5	2.80 (sep, 6.9)	33.6	2.73 (sep, 7.2)
3'	19.1	1.28 (d, 6.9)	19.0	1.21 (d, 7.2)
4'	18.8	1.25 (d, 6.9)	18.9	1.26 (d, 7.2)

スペクトルは  $\text{CDCl}_3$  を用いて測定。

(*Fitoterapia* 2022, 156, 105097, Table 1 より引用)



## 考察

既知の P-gp 阻害剤や HSP 阻害剤の化学構造中に窒素原子が含まれていることから (図 4、5)、アルカロイド成分の探索を目的とし、ナンテン (*Nandina domestica*) の EtOAc 可溶画分から新規ピロールアルカロイド methyl-*E*- magnolamide (**1**) および methyl-*Z*- magnolamide (**2**) を単離し、構造決定した。本化合物の類縁体としてはサジオモダカ (*Alisma plantago-aquatica*) などから単離された magnolamide が報告されており<sup>77,81,82</sup>、生物活性として NO 産生抑制作用が報告されている<sup>81,82</sup>。加えて、**1** および **2** の生合成経路について考察した。**1** および **2** が有する含窒素複素環骨格はメイラード反応によって形成されることが報告されている<sup>83,84</sup>。すなわち、グルコースから 3-デオキシ-D-グルコソン(3-deoxy-D-glucosone: 3-DG) が生成し、生成した 3-DG とプトレスシン<sup>85</sup> が縮合することで 2-ヒドロキシ-5-ホルミルピロールが形成される<sup>83,84</sup>。その後、2-ヒドロキシ-5-ホルミルピロールが植物内においてケイヒ酸モノリグノール経路により生成するフェルラ酸<sup>86</sup> と縮合することで magnolamide が生合成した<sup>87</sup>と考察した。**1** および **2** は、 $\alpha\beta$  不飽和カルボニル構造を有しており、マイケルアクセプターであると考えられる<sup>88</sup>。一部のマイケルアクセプターとして機能する  $\alpha\beta$  不飽和カルボニル構造を有する化合物は、生体内のタンパク質などと非特異的に共有結合することによる毒性を示すことが報告されている<sup>89</sup>。しかしながら、**1** および **2** は、 $\alpha\beta$  不飽和カルボニル構造の周囲に芳香環やアミド構造が存在するため、共鳴構造をとることができ、電子不足が軽減されるのではないかと考えられる。

また、*n*-BtOH 可溶画分から新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmane I-IV (**3-6**) を単離し、構造決定した。新規配糖体成分の絶対立体配置の決定を目的として、**3** を加水分解することにより、誘導體 **3a** を得た。次に、**3a** の ECD スペクトルの測定で正のコットン効果が得られた。しかしながら、ECD スペクトル理論計算を行うにあたり、9 位の炭素原子上のメチル基の配座が固定されていないため、理論計算スペクトルを求めることが困難であった。新規配糖体成分は環状構造上のケトン基を発色団とするため、鎖状構造上の 9 位の水素原子のメチル化を行ってもコットン効果に与える影響は少ないのではないかと考えた。そこで、9 位の水素原子をメチル基へと置換した **3b** と **3a** のスペクトルを比較することで絶対立体配置を決定することとした。**3b** の理論計算 ECD スペクトルは、242 nm 付近に正の Cotton 効果を示し、**3a** の ECD スペクトルをよく再現した。このことから、新規配糖体成分の 6 位の絶対立体配置が *S* であることを明らかにした。高等植物における二次代謝産物の修飾反応としての配糖化は、plant secondary product glycosyltransferase (PSPG) と総称される糖転移酵素によって触媒される<sup>90</sup>。PSPG による糖転移反応は、様々な糖が供与体基質となり得ること、アクセプター基質の酸素原子をはじめとする種々の原子に糖を結合し得ること、糖は monoglycoside を生成するだけでなく、oligoglycoside を生成することなどから二次代謝産物を生み出す上で最も重要な役割を果たしている<sup>90</sup>。このことから、新規配糖体成分について、glucose が単独で結合するもの以外の新規化合物の存在が推察される。

オトギリソウ (*H. erectum*) の EtOAc 可溶画分から、4 種の新規プレニル化フロログルシノール (+)-erectumol I (**15a**)、(-)-erectumol I (**15b**)、(-)-erectumol II (**16a**) および (+)-erectumol II (**16b**) を単離し、構造決定した。植物に存在するアセチル CoA カルボキシラーゼ (acetyl-CoA

carboxylase: ACC) により、アセチル CoA から生成した 3 分子のマロニル CoA と 1 分子のアセチル CoA を出発原料とし、フロログルシノールが生成する。ジメチルアリルトランスフェラーゼによりジメチルアリル 2 リン酸とイソペンテル 2 リン酸 (dimethylallyl diphosphate: DPP) よりゲラニル 2 リン酸やイソペンテル 2 リン酸 (isopentenyl diphosphate: IPP) がフロログルシノールに縮合を繰り返す。その後、酵素による立体選択的な反応ではなく、化学的な環化反応が進行することで erectumol が生成するものと考察した (図 14)。本研究で得られた新規プレニル化フロログルシノール類の架橋構造はエンドおよびエキソ構造の双方が等量得られたため、最終的な閉環反応は化学的な反応であると考察しているが、アルテミシニンなどにおいて報告されるように酵素反応による可能性も考えられるため、生合成に関するさらなる検討が必要である。

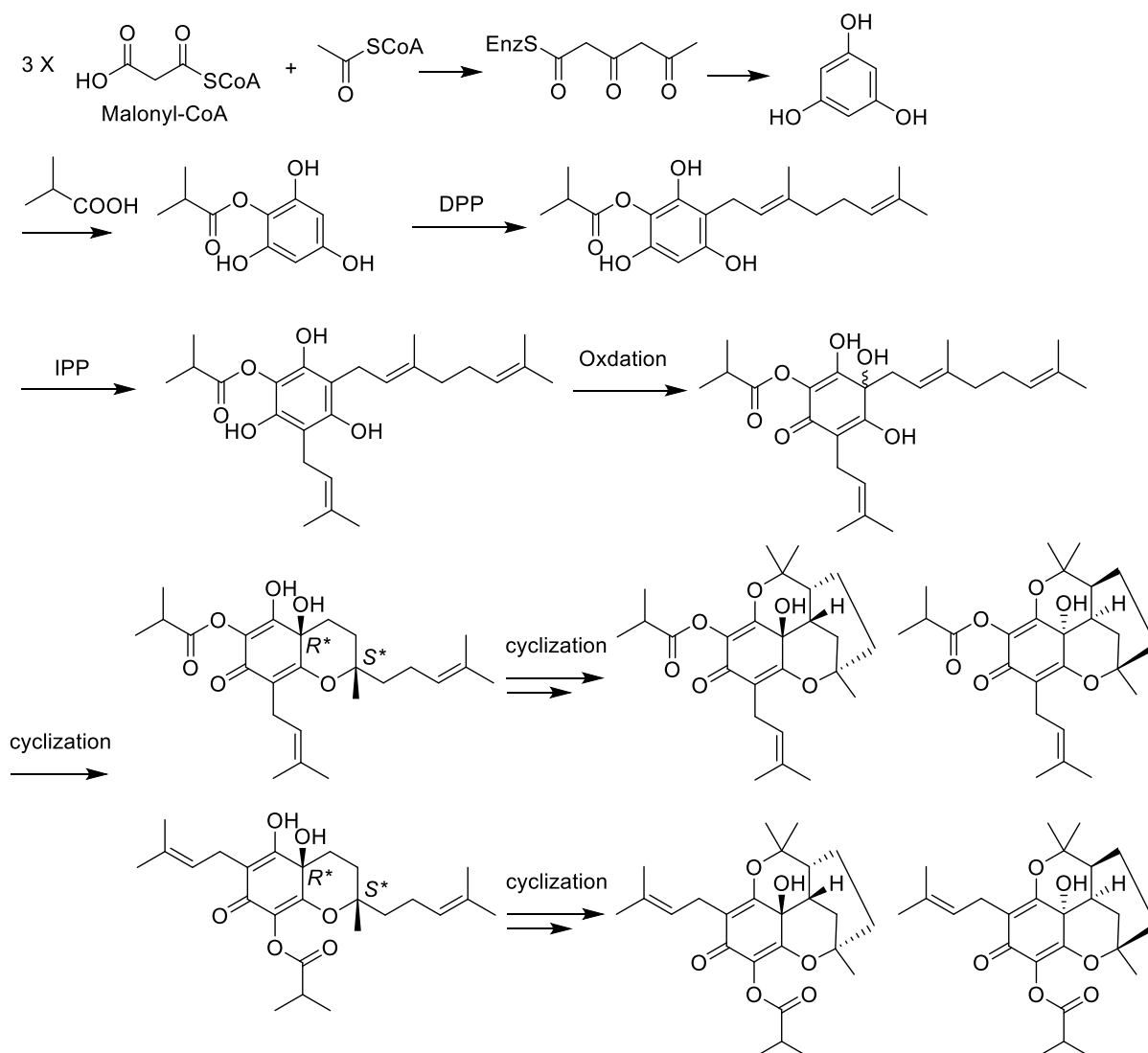


図 14 オトギリソウより得られた新規プレニル化フロログルシノール類の推定生合成経路  
3 分子のマロニル CoA からの縮合反応によりフロログルシノールが生成する。DPP や IPP が生成したフロログルシノールに縮合を繰り返す。その後、環化反応が進行することで erectumol が生成するものと推察した。DPP: dimethylallyl diphosphate、IPP: isopentenyl diphosphate

## 小括

多様な生物活性を示すアルカロイドの含有が報告されているナンテン (*Nandina domestica*) および特有かつ多様な環化構造を形成するプレニル化フロログルシノールを含有するオトギリソウ (*Hypericum erectum*) について含有成分の探索を行った。

ナンテン (*N. domestica*) 果実より得られた EtOAc 可溶画分について各種カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離精製し、2 種の新規ピロールアルカロイド methyl-*E*-magnolamide (**1**) および methyl-*Z*-magnolamide (**2**) を単離し、構造決定した。また、配糖体成分を得ることを目的として、*n*-BtOH 可溶画分について各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製したところ、4 種の新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmane I-IV (**3-6**) を単離し、それらの化学構造を NMR をはじめとする各種スペクトル解析および構成糖の加水分解の結果をもとに明らかにした。なお、メガスチグマン配糖体の立体配置は、NOESY スペクトルの解析および ECD スペクトル理論計算値と実測値との比較により、絶対立体配置を決定した。

オトギリソウ (*H. erectum*) 全草より得られた EtOAc 可溶画分について各種カラムクロマトグラフィーにより繰り返し分離精製し、4 種の新規プレニル化フロログルシノール (+)-erectumol I (**15a**)、(-)-erectumol I (**15b**)、(-)-erectumol II (**16a**) および (+)-erectumol II (**16b**) を単離し、構造決定した。**15** および **16** は、それぞれエナンチオマー混合物として得られたため、各種 NMR スペクトル解析および X 線結晶構造解析により、その平面構造および相対立体配置を決定した。**15** および **16** の立体配置は、キラルカラムを用いた光学分割後、ECD スペクトル理論計算値と実測値との比較により、各光学活性体の絶対立体配置を決定した。

## 第二章 ナンテンおよびオトギリソウ含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価

### 緒言

抗がん剤感受性増強評価において用いる抗がん剤は、多くのがん種の治療に使用されている ADR を選択した。ADR は低濃度ではがん細胞の細胞分裂を停止させ、高濃度では致死作用を示し、がん細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。ADR の作用増強作用を示す化合物はケルセチン<sup>91,92</sup>などが報告されている。しかしながら、ケルセチンはがん細胞増殖抑制作用、細胞死誘導作用、抗酸化作用など様々な作用を有することから<sup>93</sup>、副作用の発現が予想されるため、臨床応用には至っていない。そのため、本研究では、抗がん剤感受性増強作用を有する化合物を効率的に見出すことを目的として、単独ではがん細胞へ影響を与えないこと、化合物と ADR との併用処理において ADR の作用増強作用を示す化合物を探索することとした。そこで本章では、本研究で標的とする P-gp の発現<sup>94</sup>および HSP105 の発現<sup>39</sup>が報告されている HeLa 細胞を用い、抗がん剤感受性増強作用評価を行った (図 15)。化合物の抗がん剤感受性増強作用は、観察した ADR によるアポトーシス様細胞死を指標とし、24 時間ライブセルイメージング解析を用いて評価した (図 15)。ADR は 1.7  $\mu\text{M}$  の低濃度処理において細胞増殖抑制作用を示した一方で、細胞死は引き起こされなかった。このことから、本濃度を被験化合物との併用濃度と、ADR 単独処置群と併用群における死細胞数を比較検討した。

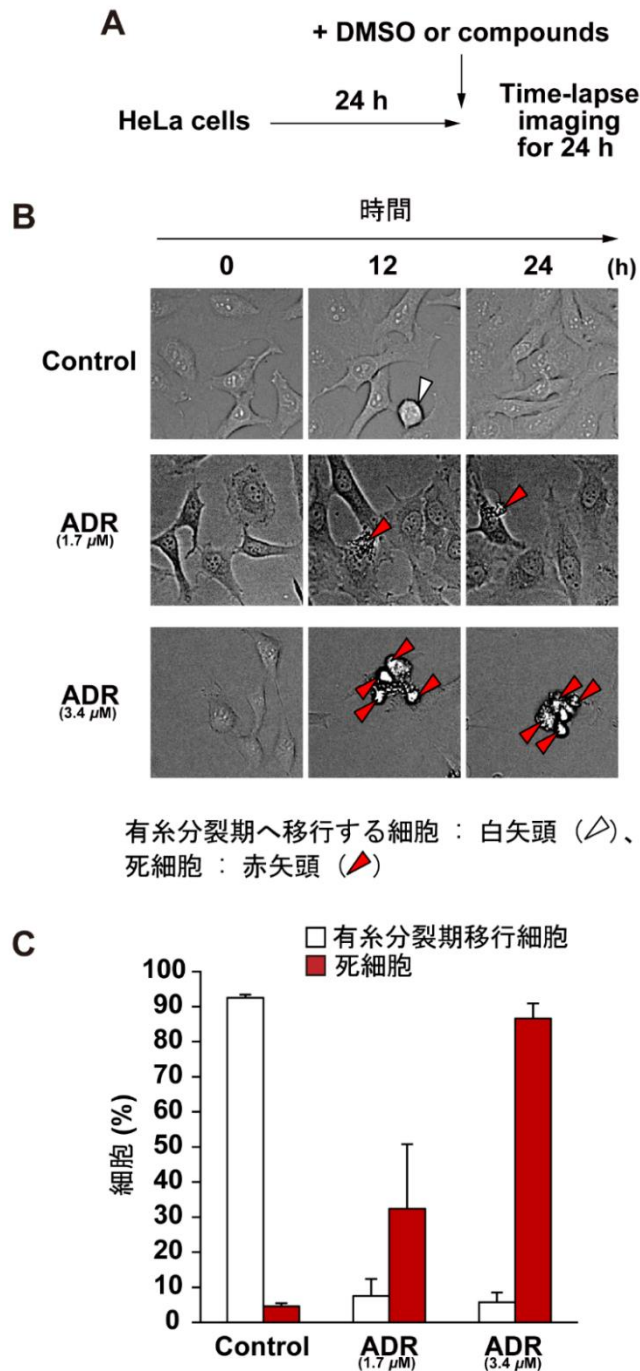


図 15 抗がん剤感受性増強作用の評価における ADR 単独処理時の細胞増殖抑制および細胞死誘導作用

(A) 実験の流れを示す。(B および C)  $3 \times 10^3$  個/well の HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種してから 24 時間後に 1.7、3.4  $\mu\text{M}$  の ADR または DMSO を処理し、24 時間細胞をタイムラプスイメージングで観察した。(B) 観察した有糸分裂期移行細胞 (白矢頭) および死細胞 (赤矢頭) の写真を示す。(C) グラフは有糸分裂期移行細胞 (白棒) および死細胞 (赤棒) の割合を求め、それぞれの割合を 3 回の実験の平均 + 標準偏差で示した。DMSO: dimethyl sulfoxide、h: hours、ADR: Adriamycin (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 5 より一部改変して引用)

## 第一節 ナンテン (*N. domestica*) 含有成分等の抗がん剤感受性増強作用評価

初めに、ナンテンより得られた化合物に **3** および **4** の加水分解により得られた **3a** および **4a** を加えた、計 16 種の化合物 (**1-14**) の化合物単独および陽性対照として ADR (0.9、1.7、3.4  $\mu\text{M}$ ) を用いて、被験化合物単独 (60  $\mu\text{M}$ ) および低濃度 ADR (1.7  $\mu\text{M}$ ) との併用による 24 時間処理した HeLa 細胞へ与える影響を評価した。24 時間処理し、クリスタルバイオレット染色を使用し、視覚的に確認した後、細胞生存率を算出した。各種化合物単独では、細胞毒性は示さなかった (図 16A) が、各種化合物と低濃度 ADR との併用処理は、試験された濃度で細胞毒性を示し、特に **1** および **2** と低濃度 ADR 併用では、低濃度 ADR 処理群と比較して、細胞生存率が低下することが示された (図 16B、C)。

次に、細胞毒性の機序を明らかにするために、ライブセルイメージング解析を行った。すなわち、被験化合物処理後、24 時間ライブセルイメージング解析を行い、細胞増殖および細胞死に伴う形態変化を観察することで、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合を計測した。その結果、コントロール群および被験化合物 (**1-14**、**3a** および **4a**) 処理 (60  $\mu\text{M}$ ) 群では、ほとんどすべての細胞が 24 時間以内に有糸分裂期に移行したが、ADR 処理群は有糸分裂期に移行しなかった (図 17A、B)。さらに、低濃度 ADR 処理群 (1.7  $\mu\text{M}$ ) においては細胞の約 70% が生存した。特に、**1** および **2** と低濃度 ADR 処理との併用処理群では、ADR 処理による死細胞の割合を有意に増加させた (\*\* $P < 0.001$ ) (図 17A、B)。また、**1** および **2** は、ほぼ同程度の ADR の作用増強作用を示した。このことから、C-7" 位の幾何異性は ADR の作用増強作用に影響を与えないことが示された。メガスチグマン (**3**、**3a**、**4** および **4a**) において、糖の部分構造は ADR の作用増強作用を減弱させることがわかった。カフェオイル基を有する化合物 (**12**、**13** および **14**) は ADR の作用減弱作用を示すことがわかった。上記の結果より、がん細胞の ADR への感受性増強作用を有する物質として、試験化合物の中から **1** および **2** を選択し、ADR の作用増強作用を WST-8 assay により詳細に検討した。その結果、ADR を 24 時間処理すると、ADR 単独処理群の  $\text{IC}_{50}$  値 :  $1.69 \pm 0.11 \mu\text{M}$  と比較して、**1** と ADR との併用処理群の  $\text{IC}_{50}$  値 :  $0.72 \pm 0.04 \mu\text{M}$  (\*\* $P < 0.001$ ) および **2** と ADR との併用処理群の  $\text{IC}_{50}$  値 :  $0.65 \pm 0.08 \mu\text{M}$  (\*\* $P < 0.001$ ) が有意な低下を示すことが明らかになった (図 18 A、B)。

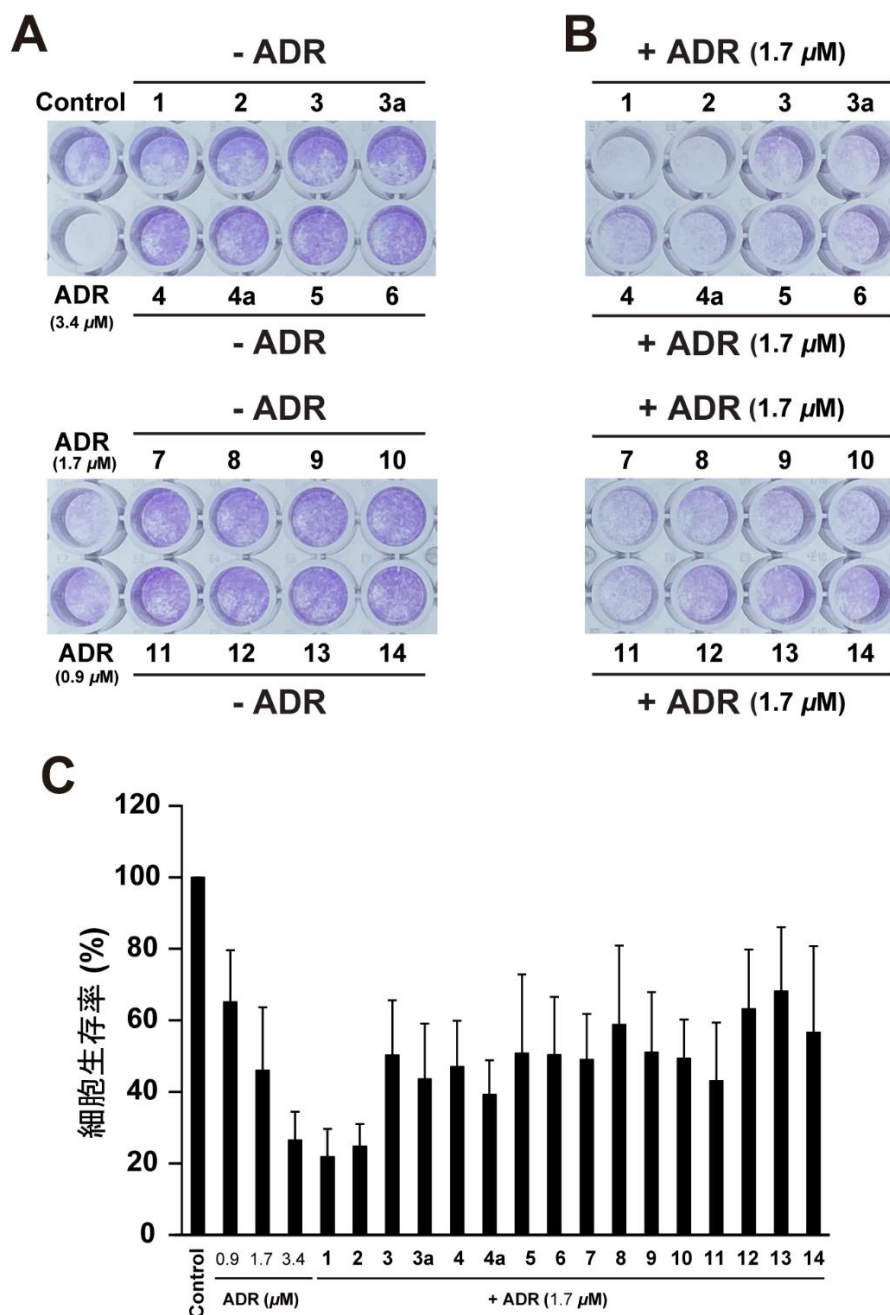
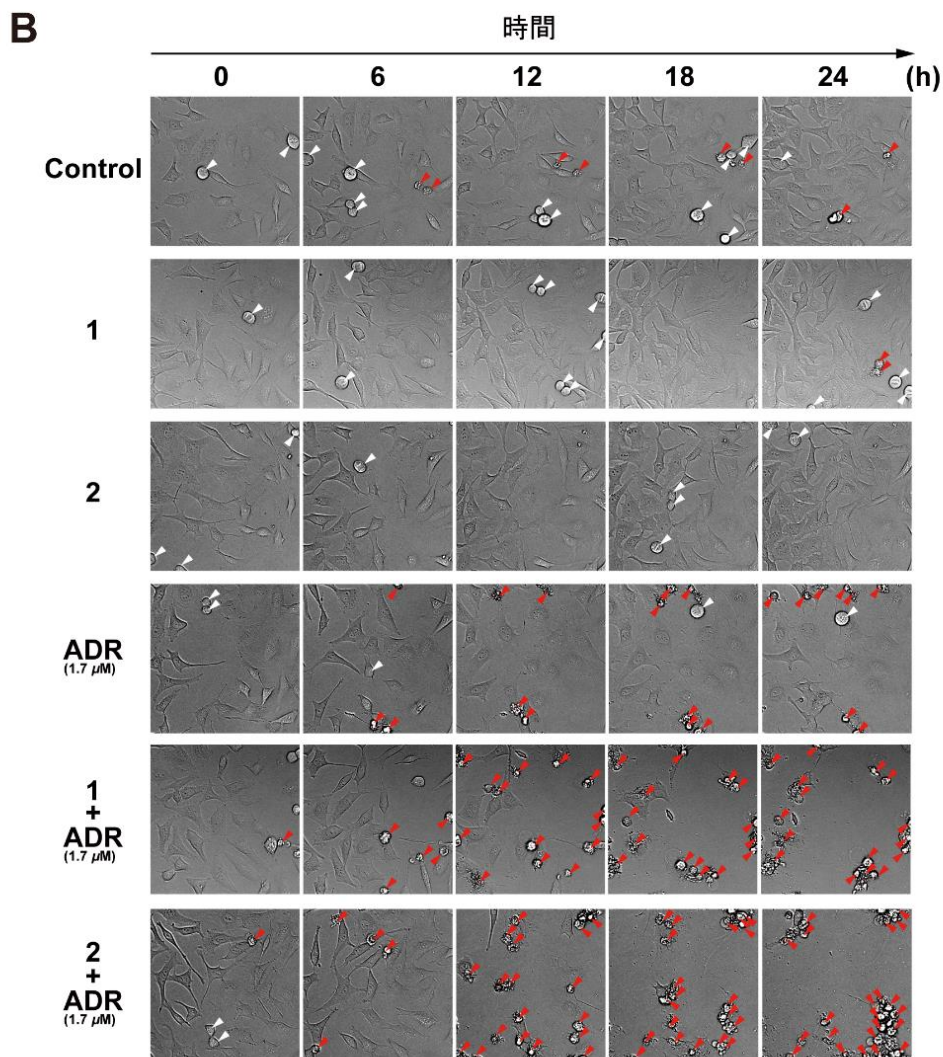
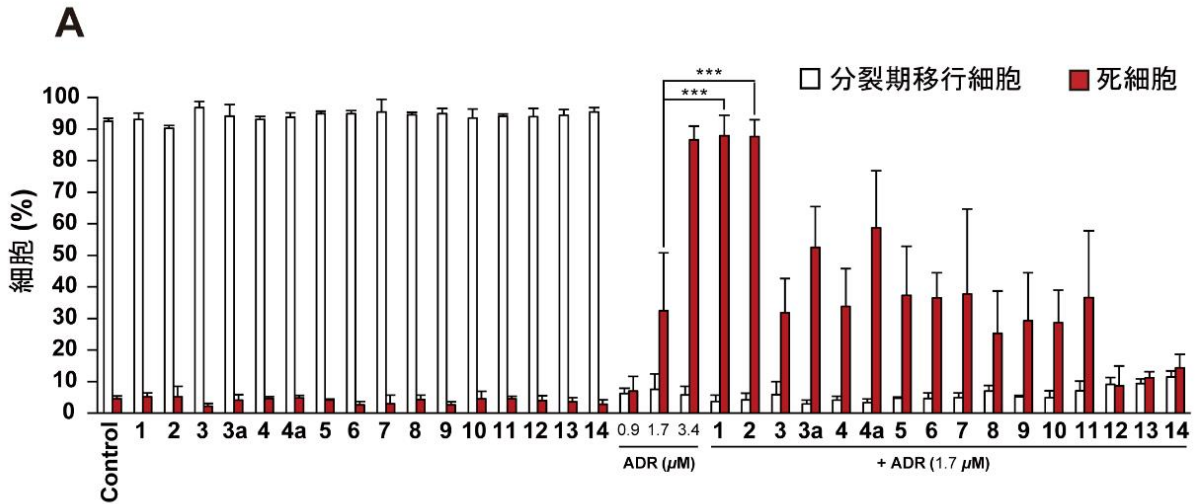


図 16 ナンテン (*N. domestica*) より単離した化合物 (1-14) および誘導体 (3a および 4a) の抗がん剤感受性増強作用の評価

(A-C)  $3 \times 10^3$  個/well の HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種してから 24 時間後に  $60 \mu\text{M}$  の各種化合物 (1-14)、 $0.9$ 、 $1.7$ 、 $3.4 \mu\text{M}$  の ADR 単独もしくは各種化合物と  $1.7 \mu\text{M}$  の ADR を 24 時間併用処理した。その後、細胞を crystal violet 溶液で 5 分間固定および染色した。(A) 各種化合物または ADR 単独処理した細胞の crystal violet 染色の写真を示した。(B) 各種化合物と  $1.7 \mu\text{M}$  の ADR を併用処理した細胞の crystal violet 染色の写真を示した。(C) 染色後、crystal violet を  $595 \text{ nm}$  の波長で吸光度を測定し、細胞生存率を計算した。コントロールの 3 回の吸光度を 100% とし、コントロールに対する各処理群吸光度の割合を求めた。グラフは 3 回の実験の平均 + 標準偏差を示している。ADR: Adriamycin (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 4 より一部改変して引用)



有糸分裂期へ移行する細胞：白矢頭 (◇)、  
死細胞：赤矢頭 (▲)

図 17 ナンテン (*N. domestica*) より単離した化合物 (1-14) および誘導体 (3a および 4a) の抗がん剤抗がん剤感受性増強作用の評価 説明は次ページ



(A および B)  $3 \times 10^3$  個/well の HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種してから 24 時間後に  $60 \mu\text{M}$  の各種化合物 (1–14)、 $0.9$ 、 $1.7$ 、 $3.4 \mu\text{M}$  の ADR 単独もしくは各種化合物と  $1.7 \mu\text{M}$  の ADR を併用処理し、24 時間細胞をタイムラプスイメージングで観察した。(A) グラフは有糸分裂期移行細胞 (白棒) および死細胞 (赤棒) の割合を求め、それぞれの割合を 3 回の実験の平均 + 標準偏差で示した。アスタリスクは Tukey–Kramer 検定から計算した有意差を示す (\*\* $P < 0.001$ )。 (B) 観察した有糸分裂期移行細胞 (白矢頭) および死細胞 (赤矢頭) の写真を示す。ADR: Adriamycin (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 5 より一部改変して引用)

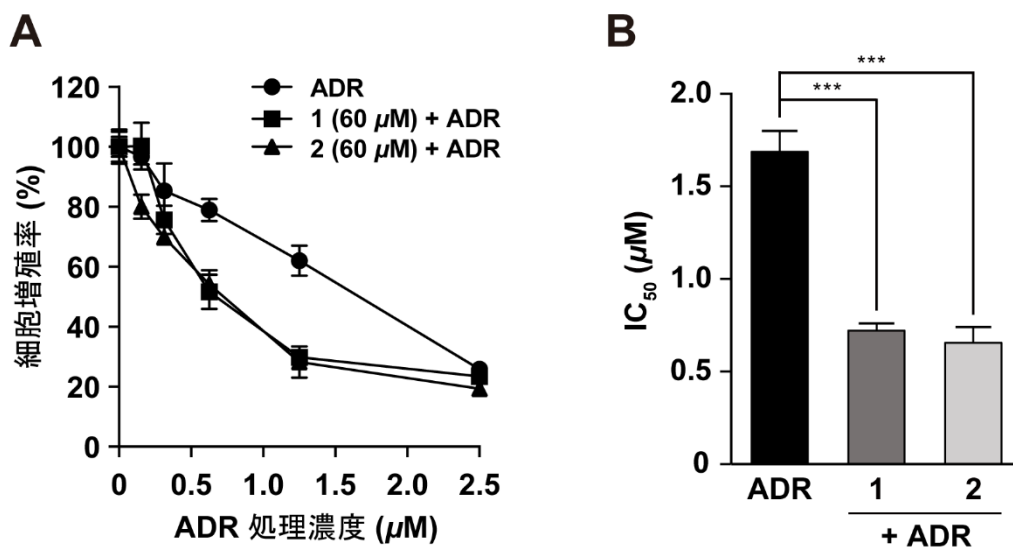


図 18 化合物 (1 および 2) の ADR の作用増強作用

(A)  $3 \times 10^3$  個/well の HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種してから 24 時間後に ADR 単独もしくは  $60 \mu\text{M}$  の 1 または 2 を 24 時間処理した。その後、WST-8 から生成したホルマザンを  $450 \text{ nm}$  の波長で測定した。コントロールの 3 回の吸光度を 100% とし、コントロールに対する各処理群の吸光度の割合を求めた。グラフは平均  $\pm$  標準偏差 ( $n=3$ ) で示した。(B)  $\text{IC}_{50}$  は 3 回の実験の平均 + 標準偏差より計算した。アスタリスクは Tukey-Kramer 検定から計算した有意差を示す ( $***P < 0.001$ )。WST-8: [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]  $\text{IC}_{50}$ : 50% inhibition concentration、ADR: Adriamycin (*Fitoterapia* 2021, 154, 105023, Fig. 4 より一部改変して引用)

## 第二節 オトギリソウ (*H. erectum*) 含有成分の抗がん剤感受性増強作用評価

次に、オトギリソウより得られた化合物 (15a–16b) について、ライブセルイメージング解析による抗がん剤感受性増強作用評価を行った。すなわち、HeLa 細胞を被験化合物単独 ( $50 \mu\text{M}$ ) および低濃度 ADR ( $1.7 \mu\text{M}$ ) との併用下において、24 時間ライブセルイメージング解析した。その結果、コントロール群および試験化合物 (15a–16b) 処理 ( $50 \mu\text{M}$ ) 群では、ほとんどすべての細胞が 24 時間以内に有糸分裂期に移行し、コントロール群と比較して、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合に影響を与えなかった (図 19)。一方、15b と低濃度 ADR との併用処理群 ( $*P = 0.0044$ ) および 16b と低濃度 ADR との併用処理群 ( $*P = 0.0215$ ) は、低濃度 ADR 処理群による死細胞の割合を有意に増加させた (図 19)。この結果より、15b および 16b は ADR の作用増強作用を示すことが明らかになった。それらのエナンチオマー 15a および 16a は、ADR の作用増強作用を示さなかった。

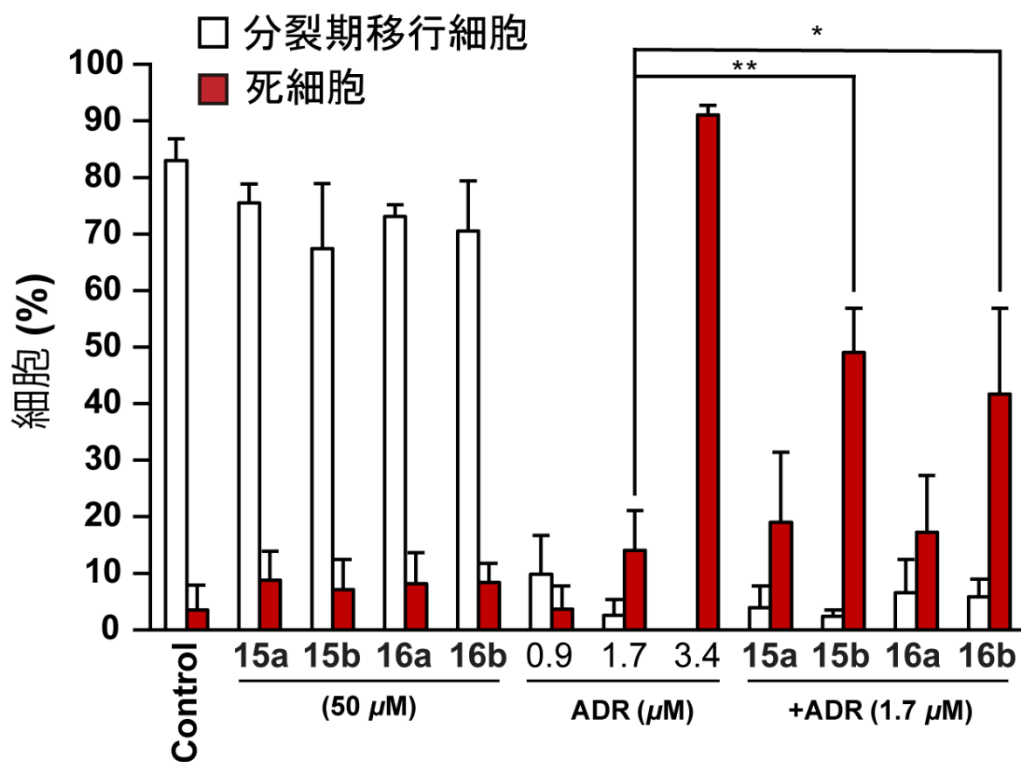


図 19 オトギリソウ (*H. erectum*) より単離した化合物 (15a、15b、16a および 16b) の抗がん剤感受性増強作用の評価

$3 \times 10^3$  個/well の HeLa 細胞を 96 穴プレートに播種した。細胞は播種してから 24 時間後に  $50 \mu\text{M}$  の各種化合物 (15a、15b、16a および 16b)、0.9、1.7、 $3.4 \mu\text{M}$  の ADR 単独もしくは各種化合物 (15a、15b、16a および 16b) と  $1.7 \mu\text{M}$  の ADR を併用処理し、24 時間細胞をタイムラプスイメージングで観察した。グラフは有糸分裂期移行細胞 (白棒) および死細胞 (赤棒) の割合を求め、それぞれの割合を平均 + 標準偏差 ( $n=3$ ) で示した。アスタリスクは Dunnet 検定から計算した有意差を示す。ADR: Adriamycin ( $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ )。(*Fitoterapia* 2022, 154, 105097, Fig. 5 より一部改変して引用)

## 考察

クリスタルバイオレット染色による生細胞数の評価や WST-8 assay による細胞増殖の評価に対し、ライブセルイメージング解析は個々の細胞における経時的な形態変化を観察することにより被験化合物の細胞増殖および細胞死誘導作用を同時に評価することが可能である。本研究の実施にあたり、ライブセルイメージング解析を用い、ADR の作用を評価したところ、低濃度において細胞増殖が抑制され、高濃度において致死作用を示した。この結果は他の報告と同様の結果であり、本解析は化合物の抗がん剤感受性増強作用の評価に利用可能であると考えた。しかしながら、本研究において細胞死誘導作用をアポトーシス様の細胞死と表現したように、アポトーシスの検出を行うためには、Annexin V 染色、Caspase の検出、DNA の断片化の検出が必要である。細胞死を評価する際には上記の方法と組み合わせて検討を行う必要があると考える。

ナンテンより得られた成分 (**1-14**) は、60  $\mu\text{M}$  の単独処理では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えなかった。さらに、被験化合物を低濃度 ADR と共に処理したところ、**1** および **2** が低濃度 ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。**1** および **2** は単独では細胞増殖抑制および細胞死誘導作用を示さなかったことから、これらの化合物は抗がん剤の薬剤耐性を標的としている可能性があることが考えられた。また、被験化合物間で化学構造を比較すると、ADR の作用増強作用を示した **1** および **2** はカテコールの水酸基がメトキシ基へと置換されていた。一方で、ADR の作用減弱作用を示した化合物 (**12-14**) はカテコールの部分構造を有していた。このことから、化合物 (**12-14**) はカテコールのラジカル補足作用により ADR の作用を減弱させた一方で、**1** および **2** には、水酸基がメトキシ基へと置換されているため、ADR の作用を減弱させなかったと考えられる。しかしながら、メガスチグマン類において構造中に糖を有する化合物は糖を有さない化合物と比較して ADR の作用増強作用の減弱が見られたことから、カテコール骨格上のメトキシ基や糖構造に関して更なる検討が必要である。また、**1** および **2** が有する化学構造から、P-gp の基質となることが予想されることから<sup>95</sup>、これらの化合物が p-gp の阻害により ADR の細胞内濃度を上昇させ、ADR の細胞死誘導作用を増強している可能性が考えられた。

オトギリソウより得られた成分について検討したところ、50  $\mu\text{M}$  の単独処理では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えなかった。**15b** および **16b** が低濃度 ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。**15b** および **16b** はエナンチオマー間で ADR の作用増強作用に差があることから、化合物が示した作用に立体化学が影響している可能性が示唆された。オトギリソウと同じオトギリソウ属であるセイヨウオトギリソウ (*Hypericum perforatum*) は各種 CYP や P-gp 誘導作用を有することが知られている<sup>96</sup>。また、フロログルシノール類の含有成分であるハイパフォリンは P-gp 誘導および阻害作用の両方が報告されている<sup>96,97,98</sup>。これらのことから、オトギリソウ単離化合物は P-gp の機能に影響を与える可能性が示唆され、**1** および **2** と同様に、ADR の細胞内濃度を上昇させることにより、ADR の作用増強作用を示している可能性が考えられた。

## 小括

第一章で得られた化合物に、**3** および **4** の加水分解により得られた **3a** および **4a** を加えた、計 20 種の化合物について、低濃度 ADR 処理時に被験化合物を併用し、がん細胞の ADR への感受性の増強による ADR 誘発アポトーシス様細胞死を指標として、ライブセルイメージング解析を用いた抗がん剤感受性増強作用を評価した。

ナンテンより得られた成分 (**1-14**) は、60  $\mu\text{M}$  の単独処理では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えなかった。さらに、各種化合物 (**1-14**) と低濃度 ADR との併用処理について検討したところ、新規ピロールアルカロイド methyl-*E*-magnolamide (**1**) および methyl-*Z*-magnolamide (**2**) が低濃度 ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。一方で、**12-14** と低濃度 ADR との併用処理においては ADR による細胞死誘導作用が減弱するということが示された。これらのことより、化学構造と作用を比較したところ、カテコール骨格の 3" 位の水酸基のメチル化が作用増強に、カテコール骨格が作用減弱に関与している可能性が示唆された。次に、有意な ADR の作用増強作用を示した methyl-*E*-magnolamide (**1**) および methyl-*Z*-magnolamide (**2**) について WST-8 assay を用いて ADR 単独および ADR と化合物 (**1** および **2**) との併用処理における細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、ADR 単独処理群と比較して、ADR と化合物 (**1** および **2**) との併用処理 (60  $\mu\text{M}$ ) 群における  $\text{IC}_{50}$  値が低下するが明らかになった (ADR の  $\text{IC}_{50}$ :  $1.69 \pm 0.11 \mu\text{M}$ 、**1**+ADR の  $\text{IC}_{50}$ :  $0.72 \pm 0.04 \mu\text{M}$ 、**2**+ADR の  $\text{IC}_{50}$ :  $0.65 \pm 0.08 \mu\text{M}$ )。このことから、**1** および **2** の併用処理は、ADR の使用量を減らし、副作用を低減させる可能性があることが示唆された。

オトギリソウより得られた新規フロログルシノール成分について検討したところ、いずれの化合物においても、50  $\mu\text{M}$  の単独処理では HeLa 細胞の増殖・形態等に影響を与えなかった。また、第一節と同様に、4 種の化合物 (**15a**、**15b**、**16a** および **16b**) と低濃度 ADR との併用処理について検討したところ、(-)-erectumol I (**15b**) および (+)-erectumol II (**16b**) が低濃度 ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。一方、それらのエナンチオマーである **15a** および **16a** は ADR の作用増強作用を示さなかった。

### 第三章 ピロールアルカロイドおよびプレニル化フロログルシノールの抗がん剤感受性増強作用機序の解明

#### 緒言

抗がん剤抵抗性の要因である P-gp は HeLa 細胞において高発現していることが知られており、その機能を介して抗がん剤の働きを抑制する。第二章において、**1**、**2**、**15b** および **16b** が ADR の作用増強作用を示したことから、これらの化合物が ADR を基質として認識する P-gp の機能を阻害している可能性が考えられた。そこで、P-gp 阻害作用について、ライブセルイメージング解析を用い、p-gp 阻害剤である verapamil および被験化合物が与える影響を P-gp の蛍光基質である rhodamine 123 (Rh 123) の細胞外排出を評価することにより検討した。また、抗がん剤抵抗性をもたらす要因である HSP 105 は、がん細胞において高発現している。HSP 105 は抗がん剤によるアポトーシスを抑制することで抗がん剤抵抗性に関与しており、HSP 105 のノックダウンは、がん細胞の ADR などの感受性を増強させることが報告されている。そこで、第二章で ADR の作用増強作用が見られた化合物について、HSP 105 の発現量に与える影響をウエスタンブロット法により検討した。

### 第一節 新規成分ピロールアルカロイド類 (1 および 2) の rhodamine 123 排出抑制能評価

HeLa 細胞に Rh 123 (1  $\mu$ M) を 2 時間処理し、Rh 123 を除去および PBS (-) による洗浄後、被験化合物を処理し 6 時間ライブセルイメージング解析を行った。コントロール群においては時間経過に伴い、蛍光基質である Rh 123 の排出が認められた一方、P-gp 阻害剤である verapamil 処理群においては Rh123 が細胞内に保持された (図 20A)。また、1 および 2 は、3 および 6 時間後において Rh 123 の排出傾向が認められたものの、コントロール群と比較して、3 および 6 時間後において、Rh 123 を細胞内に保持していることが示された (図 20A)。各処理群における細胞内 Rh 123 の蛍光強度を ImageJ により解析したところ、コントロール群では、相対蛍光強度は  $58.9 \pm 24\%$  (3 時間) および  $24.1 \pm 21\%$  (6 時間) に減少し、処理直後と比較し 6 時間後は有意な差が認められた ( $**P < 0.01$ ) (図 20B)。一方、verapamil、1 および 2 処理群は、6 時間後の相対蛍光強度の減少が抑制され、それぞれの相対蛍光強度は、 $99.0 \pm 45\%$  (verapamil) 、  $67.3 \pm 19\%$  (1) 、  $57.9 \pm 22\%$  (2) であり、処理直後と比較して 6 時間後では有意な差は認められなかった (図 20B)。これらの結果から、1 および 2 が P-gp の機能を阻害している可能性が示唆された。

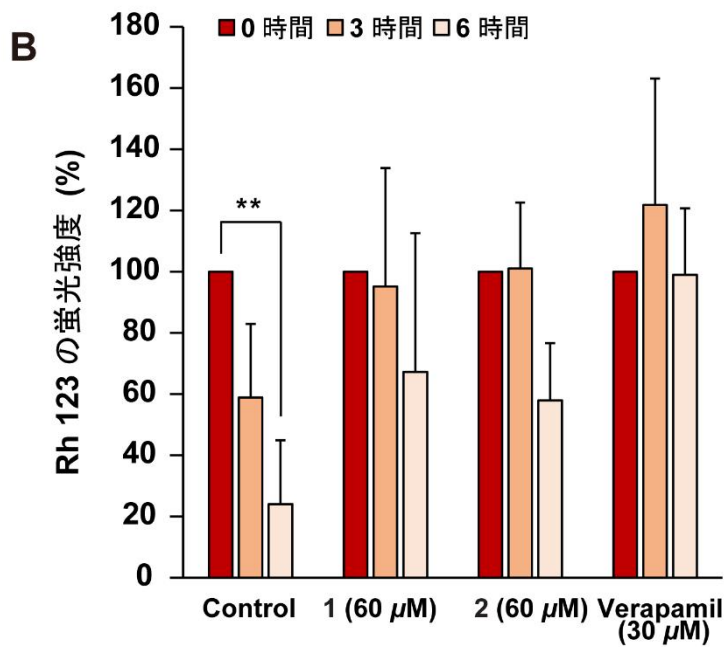
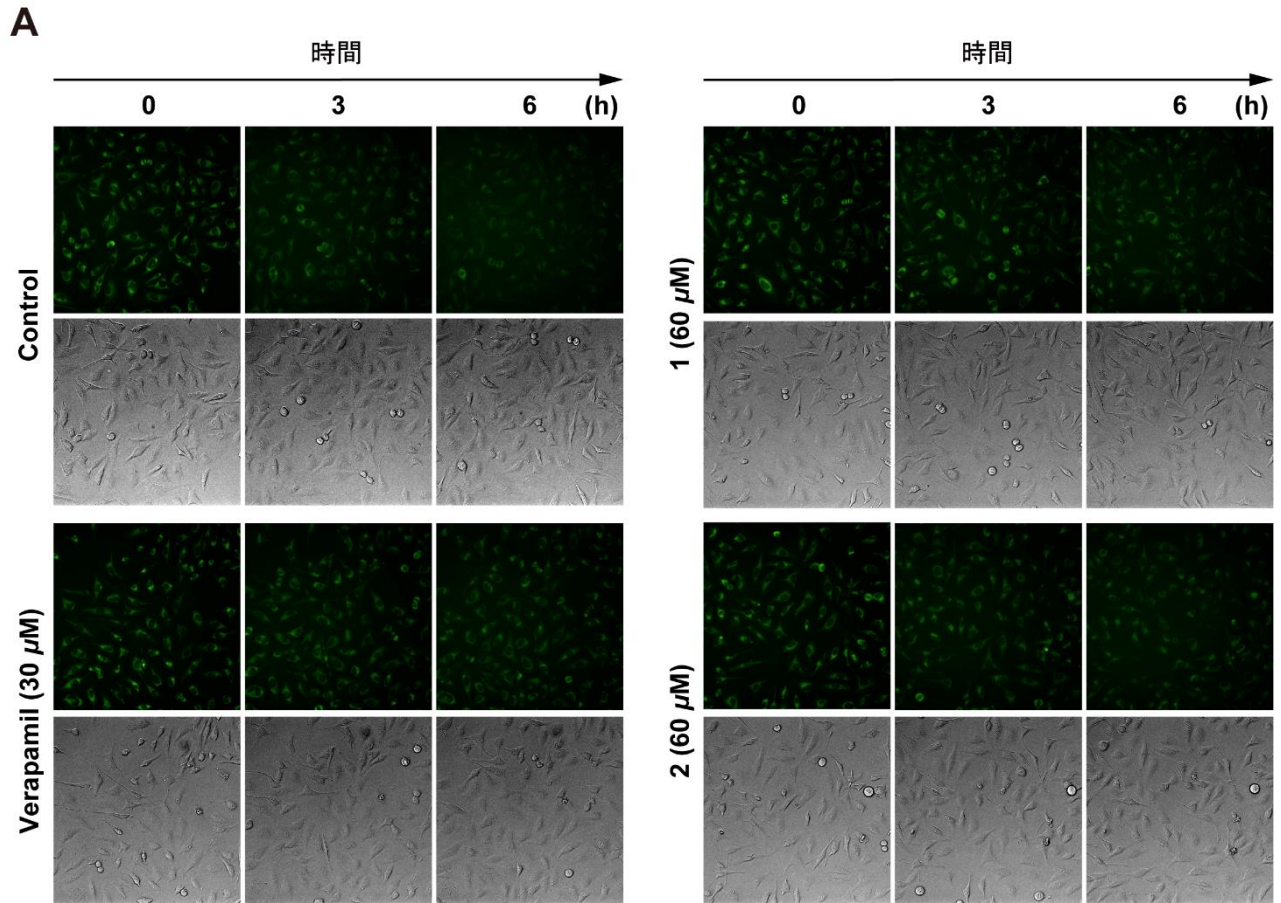


図 20 新規成分ピロールアルカロイド類 (1 および 2) の rhodamine 123 排出抑制能評価  
説明は次ページ



(A および B)  $4 \times 10^4$  個/well の HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、約 12 時間培養後、Rh 123 ( $1 \mu\text{M}$ ) を 2 時間処理した。その後、各種化合物 (1 および 2) および P-gp 阻害剤である verapamil を 6 時間処理した。Operetta high-content imaging system を使用し、Rh123 の蛍光強度を取得し、排出能を評価した。(A) 各種化合物 (1 および 2)、verapamil および DMSO 処理群の蛍光画像および明視野画像を経時的に示している。(B) 各処理群の処理直後における蛍光強度を 100% とし、各処理群の処理直後に対する各処理群の蛍光強度の割合を算出した。グラフは 3 回の実験の平均 + 標準偏差で示している。アスタリスクは Dunnett 検定から計算した有意差を示す。Rh 123: rhodamine 123 (\*\* $P < 0.01$ ) (Fitoterapia 2021, 154, 105023, Fig 6 より一部改変して引用)

## 第二節 新規成分プレニル化フロログルシノール類 (15a、15b、16a および 16b) の rhodamine 123 排出抑制能評価

第二章において、ADR の作用増強作用を示した 15b および 16b にそれぞれのエナンチオマーである 15a および 16a を加えた 4 種の化合物についても、同様の方法により P-gp 阻害作用の検討を行った (図 21)。コントロール群および化合物 (15b–16b) 処理群においては時間経過に伴い、蛍光基質である Rh 123 の排出が認められた一方、P-gp 阻害剤である verapamil 処理群においては Rh 123 が細胞内に保持された。各処理群における細胞内 Rh 123 の蛍光強度は ImageJ により解析したところ、コントロール (処理直後に対し 6 時間: \*\*\* $P < 0.001$ )、15a (処理直後に対し 6 時間: \*\*\* $P < 0.001$ )、15b (処理直後に対し 6 時間: \*\*\* $P < 0.001$ )、16a (処理直後に対し 6 時間: \*\*\* $P < 0.001$ ) および 16b (処理直後に対し 6 時間: \*\*\* $P < 0.001$ ) 処理群において、処理直後と比較し 6 時間後は相対強度の有意な減少が認められた (図 21)。これらの結果から、化合物 (15b–16b) が P-gp の機能に影響を与えないことが示唆された。

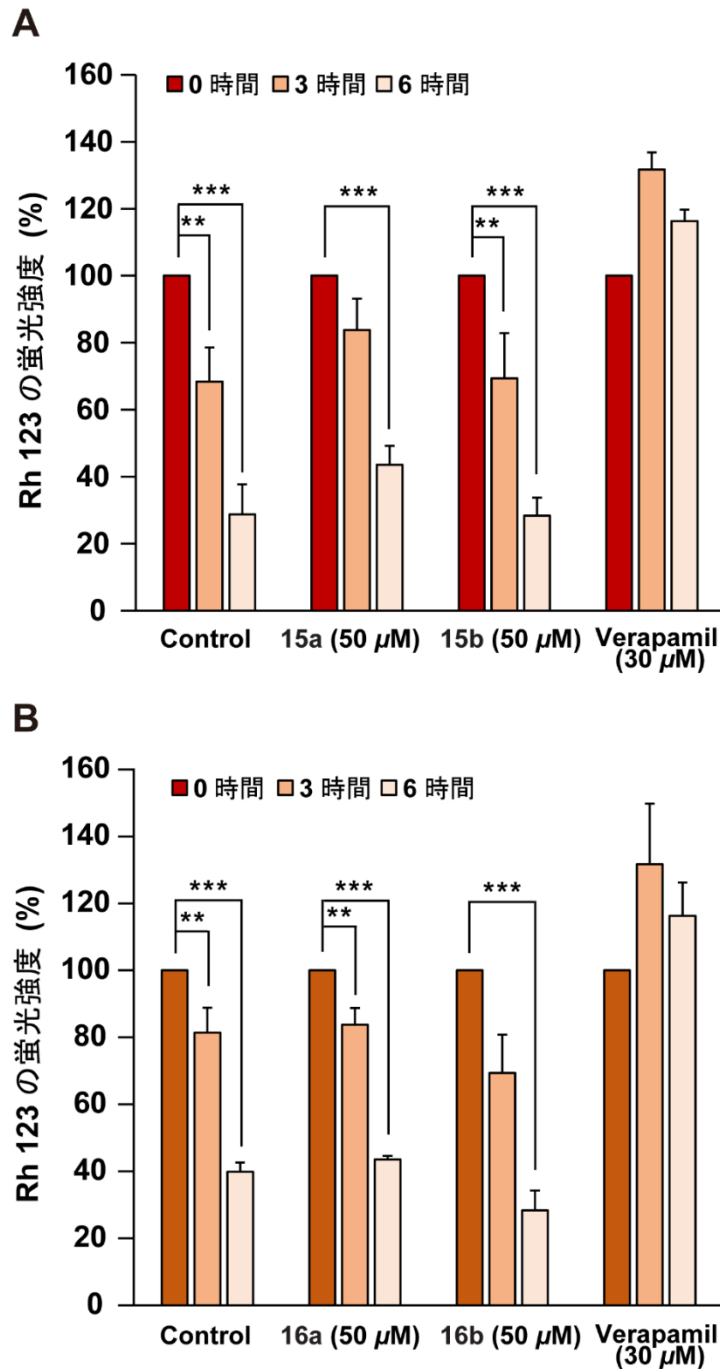


図 21 新規成分プレニル化フロログルシノール類 (15a、15b、16a および 16b) の rhodamine 123 排出抑制能評価

(A および B)  $4 \times 10^4$  個/well の HeLa 細胞を 24 穴プレートに播種し、約 12 時間培養後、Rh 123 (1  $\mu$ M) を 2 時間処理した。その後、各種化合物 (15a、15b、16a および 16b) および verapamil を 6 時間処理した。Operetta high-content imaging system を使用し、Rh123 の蛍光強度を取得し、排出能を評価した。各種化合物 (15a、15b、16a および 16b)、verapamil および DMSO 処理群の処理直後における蛍光強度を 100%とし、各処理群の処理直後に対する各処理群の蛍光強度の割合を算出した。グラフは平均 + 標準偏差で示している ( $n=3$ )。アスタリスクは Dunnet 検定から計算した有意差を示す。Rh 123: rhodamine 123 (\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )

### 第三節 新規成分プレニル化フロログルシノール類 (15a および 15b) の HSP 105 発現抑制能評価

第二章において、ADR の作用増強作用を示した **15b** に加えて、**15b** のエナンチオマーである **15a** についても同時に HSP 105 の発現量に与える影響を評価した。その結果、25  $\mu\text{M}$  および 50  $\mu\text{M}$  の **15b** 処理 24 時間後において、HSP 105 発現量の濃度依存的な抑制が見られた (図 22)。さらに、同様の条件において HSP の発現を制御する HSF1 に与える影響を検討したところ、**15b** 処理により、HSF1 の発現量の抑制がみられた (図 22)。これらの結果から、**15b** が HSF1 の発現量の抑制を介して、HSP 105 の発現を抑制していることが示唆された。

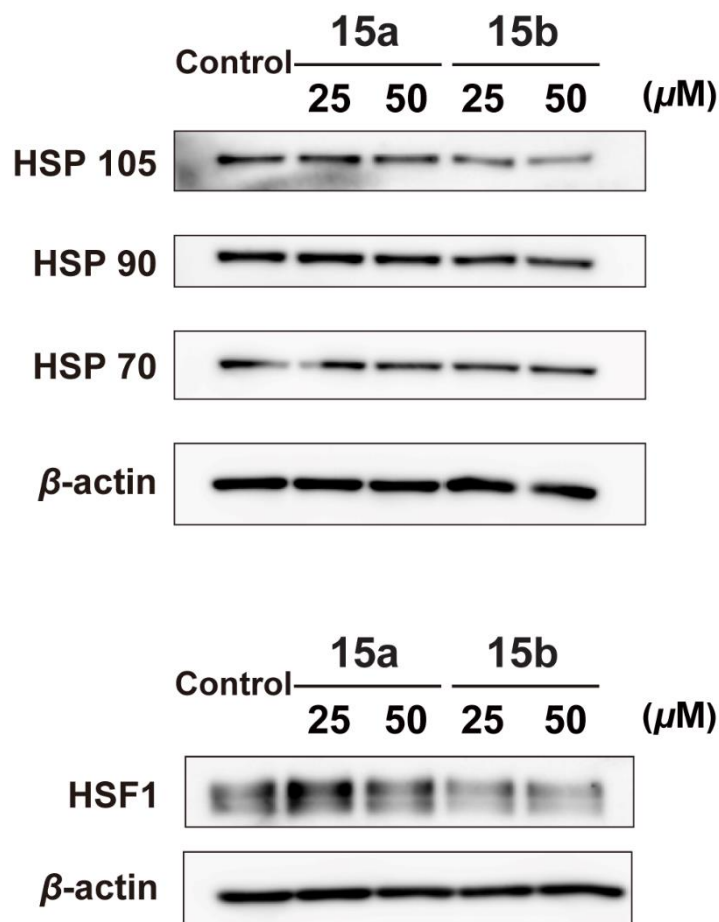


図 22 新規成分プレニル化フロログルシノール類 (15a および 15b) の HSP 105 発現抑制能評価 説明は次ページ

HeLa 細胞を播種してから 24 時間後に 25  $\mu\text{M}$  および 50  $\mu\text{M}$  の各種化合物 (**15a** および **15b**) で 24 時間処理し、抗 HSP 105、90、70、HSF1 抗体で検出した。: HSF1: Heat Shock Factor 1 (*Fitoterapia* 2022, 156, 105097, Fig 6 より一部改変して引用)

## 考察

有意な ADR の作用増強作用を示した化合物は P-gp の機能を阻害している可能性があると考えられたことから、**1**、**2**、**15b** および **16b** が、P-gp の基質である Rh 123 の細胞外排出へ与える影響を検討した。Rh 123 の排出能について細胞内 Rh 123 の蛍光強度の変化を検討したところ、verapamil、**1** および **2** 処理群は、6 時間後の相対蛍光強度の減少が抑制された。これらの結果より、**1** および **2** が示した ADR の作用増強作用は P-gp の機能阻害により ADR の細胞外排出を抑制させるものである可能性が示唆された。P-gp の基質は、芳香環や短いアルキル鎖に結合した第二級アミン構造を有することが報告されている<sup>95</sup>。**1** および **2** は上記の部分構造を有していることから、P-gp の基質である可能性が示唆された。しかしながら、Rh123 排出抑制能評価において **1** および **2** は処理直後と比較して 6 時間後の蛍光強度が低下したことから、その作用は verapamil と比較して弱い競合阻害作用である可能性が考えられる。**1** および **2** の P-gp 機能阻害作用は、P-gp を高発現している Caco-2 細胞を用いた透過性試験、薬剤耐性がん細胞を用いた P-gp 機能評価やヒト P-gp 遺伝子導入細胞での P-gp 機能評価などによる詳細な評価が必要であると考えられる。

**15a**、**15b**、**16a** および **16b** について Rh123 の排出能評価を検討した結果、**15a**、**15b**、**16a** および **16b** はコントロール群と同様に、時間経過に伴い、細胞内 Rh 123 の排出の抑制作用は認められなかった。このことから、**15a**、**15b**、**16a** および **16b** は P-gp の機能へ影響を与えないことが示唆された。また、P-gp の非基質は短いアルキル鎖やエステル構造を有することが報告されている<sup>95</sup>。**15a**、**15b**、**16a** および **16b** は上記の部分構造を有していることから、P-gp の非基質である可能性が示唆された。

HSP 105 はがん細胞のアポトーシスを抑制することで、ADR 抵抗性を引き起こすことが報告されている。そのため、**15b** およびそのエナンチオマーである **15a** が、HSP 105 の発現に与える影響を検討した。その結果、**15b** において、HSP 105 発現量の濃度依存的な低下が見られた。さらに、同様の条件において HSF1 に与える影響を検討したところ、発現量の低下がみられた。これまでに、Quercetin が、HSF1 のリン酸化抑制作用により HSPs の発現を抑制することが報告されている<sup>99</sup>。また 2, 4-Bis(4-hydroxybenzyl)phenol は、HSF1 のリン酸化抑制および HSF1 の発現抑制作用が報告されている<sup>100</sup>。Triptolide は RNA ポリメラーゼ活性を阻害し、HSP mRNA への転写を抑制することが報告されている<sup>101, 102</sup>。さらに HSF1 はプロテアソーム系によって分解されることが明らかにされている<sup>103</sup>。これらのことを踏まえると、**15b** が示した HSP105 および HSF1 のタンパクレベルでの発現抑制が、HSF1 のリン酸化抑制、mRNA の転写抑制、タンパク質への翻訳抑制、またはプロテアソーム系による分解亢進が想定されるが、いずれの機序によるものなのかを明らかにするには、更なる検討が必要である。

## 小括

第二章において、ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用増強作用を示した化合物の作用機序を解明するため、各種化合物 (**1**、**2**、**15b** および **16b**) が細胞傷害性抗がん剤の抵抗性の原因である P-gp および HSPs へ与える影響を検討した。

有意な ADR の作用増強作用を示した化合物は P-gp の機能を阻害している可能性があると考えられたことから、**1** および **2** が、P-gp の基質である Rh 123 の細胞外排出へ与える影響を検討した。その結果、P-gp 阻害剤である verapamil はコントロール群と比較して、**3** および **6** 時間後において、Rh 123 を細胞内に保持していることが確認された。また、**1** および **2** においても Rh 123 の細胞内の保持が確認されたが、**6** 時間後において多少の輝度の低下が認められた。さらに、細胞内 Rh 123 の蛍光強度の変化を検討したところ、ベラパミル、**1** および **2** 処理群は、**6** 時間後の相対蛍光強度の減少が抑制された。これらの結果より、**1** および **2** が示した ADR の作用増強作用は P-gp の機能阻害により ADR の細胞外排出を抑制させるものである可能性が示唆された。

ADR の作用増強作用を示した **15b** および **16b** にそれらのエナンチオマーである **15a** および **16a** を加えた 4 種の化合物について第一節と同様に P-gp の機能へ与える影響を検討した。その結果、**15a**、**15b**、**16a** および **16b** はコントロール群と同様に、時間経過に伴い、細胞内 Rh 123 の排出が認められた。これらのことから、**15b** および **16b** が示した ADR の作用増強作用は **1** および **2** と異なる作用機序である可能性が示唆された。

HSP 105 はがん細胞のアポトーシスを抑制することで、ADR 抵抗性を引き起こすことが報告されている。そのため、第三節では、**15b** および そのエナンチオマーである **15a** が、HSP 105 の発現に与える影響を検討した。その結果、**15b** において、HSP 105 発現量の濃度依存的な低下が見られた。さらに、同様の条件において HSF1 に与える影響を検討したところ、発現量の低下がみられた。このことから、**15b** は HSF1 の発現低下を介し、HSP 105 の発現を低下させることにより、ADR の作用を増強することが示唆された。

## 結論

本研究は、抗がん剤感受性増強作用を有する天然有機化合物の探索を目的として行った。研究素材として、多様な生物活性を有するアルカロイドの含有が報告されているナンテン (*Nandina domestica*) および特有かつ多様な環化構造を形成するプレニル化フロログルシノール類を含有するオトギリソウ (*Hypericum erectum*) に着目し、含有成分の探索を行った。その結果、ナンテンより、2 種の新規ピロールアルカロイド methyl-*E*-magnolamide (**1**) および methyl-*Z*-magnolamide (**2**) および 4 種の新規メガスチグマン配糖体 nandinamegastigmanes I–IV (**3–6**) を単離し、構造決定した。また、オトギリソウより、4 種の新規プレニル化フロログルシノール (+)-erectumol I (**15a**)、(-)-erectumol I (**15b**)、(-)-erectumol II (**16a**) および (+)-erectumol II (**16b**) を単離し、構造決定した。

計 20 種の化合物について、被験化合物と低濃度 ADR を併用処理し、がん細胞の ADR 感受性の増強による ADR 誘発アポトーシス様細胞死を指標として、ライブセルイメージング解析を用いた抗がん剤感受性増強作用評価を行った。その結果、新規ピロールアルカロイド **1** および **2** と新規プレニル化フロログルシノール **15b** および **16b** が低濃度 ADR によるアポトーシス様の細胞死誘導作用を有意に増強することが明らかになった。

ADR の作用増強作用を示した化合物の作用機序を解明するため、各種化合物 (**1**、**2**、**15b** および **16b**) が細胞傷害性抗がん剤の抵抗性の原因である P-gp および HSPs へ与える影響を検討した。その結果、ADR の作用増強が、**1** および **2** は P-gp 阻害作用による ADR の細胞外排出抑制作用によるものであり、**15b** は HSP105 の発現量を低下させる作用によるものであることを明らかにした。

本研究では、がん細胞の ADR への感受性の増強による ADR 誘発アポトーシス様細胞死を指標として、ライブセルイメージング解析を用いた抗がん剤感受性増強作用評価を行い、抗がん剤感受性増強作用を有する天然有機化合物として、methyl-*E*-magnolamide (**1**)、methyl-*Z*-magnolamide (**2**)、(-)-erectumol I (**15b**) および (+)-erectumol II (**16b**) を見出した。

本研究で見出した化合物は細胞障害性抗がん剤のがん治療効果を高め、がんの再発予防に貢献する可能性があると考えられる。

## 謝辞

本研究に際し、終始懇切なご指導、ご鞭撻を戴いた京都薬科大学 公衆衛生学分野 渡辺徹志教授および松本崇宏助教に心より感謝申し上げます。

また、本研究に際しご指導いただいた京都薬科大学 生化学分野 中山祐治教授、同 齊藤洋平助教に感謝申し上げます。

X線結晶構造解析を行っていただいた京都薬科大学 薬品製造学分野 山下正行教授、同 小島直人准教授、同 岩崎宏樹助教に感謝申し上げます。

質量分析を行っていただいた京都薬科大学 共同利用機器センター 長谷川功紀准教授（当時）、服部恭尚講師、安東友繁助教（当時）に感謝申し上げます。

ECD スペクトルシミュレーションを行っていただいた長崎国際大学 薬品資源学研究室 太田智絵講師、長崎国際大学 計算創薬学研究室 吉田達貞講師に感謝申し上げます。

研究実施にご協力いただいた京都薬科大学 生薬学分野 中村誠宏准教授に感謝申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査としてご助言戴くとともに、ご指導戴いた京都薬科大学 病態生理学分野 芦原英司教授、ならびに臨床薬学分野 西口工司教授に心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、適切な助言をいただきました北川翔大学士に深く感謝いたします。

本研究にご協力いただいた学生諸氏の皆様に深く感謝いたします。

また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費（20J14567）の助成を受けたものです。最後に、学生生活を支えてくれた家族に感謝の意を表します。

## 実験の部

### 第一章の実験

#### 実験材料および機器

奈良県産ナンテン (*N. domestica*) の果実は栃本天海堂 (Osaka, Japan) より入手した。

青森県産オトギリソウ (*H. erectum*) 全草は栃本天海堂より入手した。

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は、順相系はシリカゲル 60N (Kanto Chemical, Tokyo, Japan: 63–210  $\mu\text{m}$ )、逆相系は C<sub>18</sub>-OPN (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan: 140  $\mu\text{m}$ ) を用いた。

薄層クロマトグラフィー (TLC) には、silica gel 60F<sub>254S</sub> (Merck, Darmstadt, Germany: 順相)、RP-18 60F<sub>254S</sub> (Merck: 逆相) を使用し、スポットの検出は、UV (254nm)、ニンヒドリンスプレー (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) および 1% Ce (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>/10%H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水溶液を噴霧し、加熱時の呈色により行った。

旋光度は、P-2200 digital polarimeter (JASCO, Tokyo, Japan) ( $l = 5 \text{ cm}$ ) を用いて測定した。

ECDスペクトルは、J-1500 spectrometer (JASCO) を用いて測定した。

質量分析 (ESI-MS) は、LCMS-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

高分解能質量分析 (HR-EI-MS, HR-ESI-MS) は、JMS-GCMATE II (JEOL)、LCMS-IT-TOF (Shimadzu) のいずれかを用いて測定した。

プロトン核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H-NMR) は、JNM-ECA 600 K (600 MHz) spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて測定した。分裂様式の記載は、singlet、doublet、triplet、quartet、quintet、septet、multiplet、broad singlet をそれぞれ s、d、t、q、qn、sep、m、brs と略す。

炭素核磁気共鳴スペクトル (<sup>13</sup>C-NMR) は、JNM-ECA 600 K (150 MHz) spectrometer (JEOL) を用いて測定した。

2次元 NMR スペクトルはJNM-ECA 600 K (600 MHz) spectrometer (JEOL) を用いて測定した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) において、フォトダイオードアレイ検出器は SPD-M10A<sub>vp</sub> (Shimadzu) を用いた。

各種有機溶媒 (MeOH、EtOAc、*n*-BtOH、CHCl<sub>3</sub>、*n*-Hexane、MeCN) は一級溶媒 (Nacalai Tesque) を使用した。

#### ナンテン含有成分の抽出・単離

奈良県産ナンテン果実 (5.0 kg) を MeOH で 3 回熱時抽出後、抽出液を濾取した。残渣に MeOH を加え、同様の抽出操作を計 4 回行った、MeOH 抽出液を合わせ、減圧下溶媒留去し、MeOH 抽出エキス (1160 g, 23.2%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O で分液し (1:1, v/v)、さらに *n*-BtOH と H<sub>2</sub>O で分液し (1:1, v/v)、EtOAc 可溶画分 (40.6 g, 0.81%)、*n*-BtOH 可溶画分および H<sub>2</sub>O 可溶画分を得た。MeOH 抽出エキス (1.16 kg, 23%)、EtOAc 可溶画分 (40.6 g, 0.81%)、*n*-BtOH 可溶画分 (111.7 g, 2.2%) および H<sub>2</sub>O 可溶画分を得た。



また、EtOAc 可溶画分 (40.6 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.2 kg, *n*-Hexane-CHCl<sub>3</sub> (1:1 → 1:5, v/v) → CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>- MeOH (1:0 → 50:1 → 20:1 → 10:1 → 1:1, v/v)] にて分画し、[NDEA1 (5.01 g)、NDEA2 (2.85 g)、NDEA3 (8.42 g)、NDEA4 (1.41 g)、NDEA5 (3.02 g)、NDEA6 (1.04 g)、NDEA7 (2.54 g)、NDEA8 (11.31 g)] を得た。

NDEA4 (1.4 g) を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [30 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1 v/v), → MeOH → CH<sub>3</sub>CN] にて分画し、7つの画分を得た (EA4-1-7)。EA4-3 (72.5 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (80:20, v/v)} により **10** (5.2 mg) および **11** (2.8 mg) を単離した。EA4-4 (36.6 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (80:20, v/v)} により **9** (0.8 mg) を単離した。NDEA5 (3.02 g) 画分を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [60 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1 v/v), → MeOH → CH<sub>3</sub>CN] にて分画し、9つの画分を得た (EA5-1-9)。EA5-4 (163.6 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN-CH<sub>3</sub>COOH (65:35:0.3, v/v/v)} により **1** (1.8 mg) および **2** (0.5 mg) を単離した。

また、*n*-BtOH 可溶画分 (60.0 g) を順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.2 kg, *n*-Hexane-CHCl<sub>3</sub> (1:1 → 1:4, v/v) → CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>- MeOH (1:0 → 50:1 → 40:1 → 30:1 → 20:1 → 10:1 → 1:1, (v/v))] にて分画し、[NDB1 (2.37 g)、NDB2 (2.85 g)、NDB3 (0.94 g)、NDB4 (1.16 g)、NDB5 (4.12 g)、NDB6 (5.81 g)、NDB7 (17.3 g)、NDB8 (8.24 g)] を得た。

NDB6 (5.81 g) 画分を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [150 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1, v/v), → MeOH → CH<sub>3</sub>CN] にて分画し、10の画分を得た (B6-1-10)。B6-3 (383.3 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (90:10, v/v)} により **7** (0.6 mg) および **8** (2.1 mg) を単離した。B6-4 (474.2 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (85:15, v/v)} により **3** (20.8 mg)、**4** (21.6 mg)、**5** (1.3 mg) および **6** (1.9 mg) を単離した。B7 (17.3 g) 画分を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [600 g, MeOH-H<sub>2</sub>O (0:10 → 1:9 → 2:8 → 3:7 → 4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1, v/v), → MeOH → CH<sub>3</sub>CN] にて分画し、9つの画分を得た (B7-1-9)。B7-4 (223.4 mg) 画分から HPLC {H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (80:20, v/v)} により **12** (24.1 mg)、**13** (6.2 mg) および **14** (6.6 mg) を単離した。

### 新規化合物の構造解析

#### Methyl-E-mangolamide (**1**)

Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz), see Table 1; EI-MS *m/z* 386 [M]<sup>+</sup>; HR-EI-MS *m/z* 386.1845 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 386.1842)

#### Methyl-Z-mangolamide (**2**)

Amorphous powder; <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 150 MHz), see Table 1; EI-MS *m/z* 386 [M]<sup>+</sup>; HR-EI-MS *m/z* 386.1841 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 386.1842)

#### Nandinamegastigmane I (**3**)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +51.3$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz), see Table 2; ESI-MS  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  423.1994 (calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 423.1989)

#### Nandinamegastigmane II (4)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +36.7$  (c 0.1, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz), see Table 2; ESI-MS  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  423.1991 (calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 423.1989)

#### Nandinamegastigmane III (5)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +7.4$  (c 0.3, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz), see Table 2; ECD:  $\Delta\epsilon$  (nm) -2.80 (199.4), +0.52 (214.0), -0.18 (234.7), +0.49 (268.1) (MeOH); ESI-MS  $m/z$  423  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  423.1984 (calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 423.1989)

#### Nandinamegastigmane IV (6)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +62.8$  (c 0.3, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 MHz) and  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 MHz), see Table 2; ECD:  $\Delta\epsilon$  (nm) -2.2 (221.7), +2.4 (250.3) (MeOH); ESI-MS  $m/z$  435  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  435.1984 (calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_8\text{Na} [\text{M}+\text{Na}]^+$ , 435.1989)

#### Nandinamegastigmanes I–IV (3–6) の酸加水分解と構成糖の同定

化合物 **3–6** それぞれ 2 mg を 20% aqueous  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -1,4-dioxane に溶解し、90°C で還流装置にて 2 時間攪拌した。化合物 **3–6** の酸加水分解後、反応液を中和し、 $\text{EtOAc}-\text{H}_2\text{O}$  で液-液分配した。減圧下、 $\text{H}_2\text{O}$  可溶画分の溶媒を留去し、得られた生成物を L-cysteine methyl ester hydrochloride (0.5 mg) を含むピリジン (0.1 mL) に溶解し、60°C で 1 時間攪拌した。さらに、*o*-tolylisothiocyanate (0.5 mg) をピリジン (0.1 mL) に溶解させたものを加え、60°C でさらに 1 時間攪拌した。得られた生成物それぞれを逆相 HPLC [カラム: Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II (Nacalai Tesque), 250×4.6 mm i.d. (5 μm); 移動相: 20%CH<sub>3</sub>CN-50 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 緩衝液; 検出: UV (254 nm); 流速: 1.0 mL/min; カラム温度: 25°C] より分析し、これらの保持時間を標品 (保持時間: D-glucose, 37.5 分; L-glucose, 29.9 分) と比較することで、化合物 **3–6** の構成糖が D-glucose であると決定した。

#### Nandinamegastigmanes I and II (3 and 4) の酵素による加水分解

化合物 **3** および **4** それぞれ 5 mg を 20 mM 酢酸緩衝液 (3.0 mL, pH = 5.0) に溶解し、 $\beta$ -glucosidase (2 mg, from Sweet armond) を加え、37°C で 24 時間攪拌した。減圧下、反応液の上澄みを留去し、残渣を得た。これを HPLC [カラム: OSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (Nacalai Tesque, 250 × 20 mm i.d) mobile phase: CH<sub>3</sub>COOH-MeCN-H<sub>2</sub>O (0.1:35:65, v/v/v)] を用いて精製し、**3a** (1.3mg) および **4a** (0.8mg) を得た。

### Aglycone of **3** (**3a**)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +64.7$  (c 0.26, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,)  $\delta$  2.22 (d,  $J = 17.2$ , H-2), 2.43 (d,  $J = 17.2$ , H-2), 5.91 (s, H-4), 5.62 (d,  $J = 15.8$ , H-7), 5.66 (dd,  $J = 15.8$ , 6.8, H-8), 2.45 (m, H-9), 3.47 (m, H-10), 3.54 (m, H-10), 1.04 (d,  $J = 6.9$ , H-11), 1.08 (s, H-12), 1.01 (s, H-13), 1.90 (s, H-14);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz);  $\delta$  41.1 (C-1), 49.8 (C-2), 198.1 (C-3), 126.9 (C-4), 162.9 (C-5), 79.3 (C-6), 130.4 (C-7), 134.3 (C-8), 39.4 (C-9), 67.3 (C-10), 16.5 (C-11), 22.9 (C-12), 24.1 (C-13), 19.0 (C-14); EI-MS  $m/z$  238  $[\text{M}]^+$ ; HR-EI-MS  $m/z$  238.1568 (calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}_3$   $[\text{M}]^+$ , 238.1569).

### Aglycone of **4** (**4a**)

Amorphous powder;  $[\alpha]_D^{25} +63.7$  (c 0.5, MeOH);  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz,)  $\delta$  2.22 (d,  $J = 17.2$ , H-2), 2.43 (d,  $J = 17.2$ , H-2), 5.91 (s, H-4), 5.64 (d,  $J = 6.0$ , H-7), 5.64 (m, H-8), 3.48 (m, H-9), 3.47 (m, H-10), 3.55 (m, H-10), 1.02 (d,  $J = 6.9$ , H-11), 1.08 (s, H-12), 1.02 (s, H-13), 1.90 (s, H-14);  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 150 MHz);  $\delta$  41.1 (C-1), 49.7 (C-2), 198.1 (C-3), 126.9 (C-4), missing (C-5), 79.3 (C-6), 130.5 (C-7), 134.3 (C-8), 39.6 (C-9), 67.3 (C-10), 16.6 (C-11), 22.9 (C-12), 24.1 (C-13), 18.9 (C-14); ESI-MS  $m/z$  239  $[\text{M}]^+$ ; HR-ESI-MS  $m/z$  239.1617 (calcd for  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 239.1642).

### 化合物 **3b** の理論 ECD スペクトルの計算

エナンチオマー**3b** (**6S**) および **ent-3b** (**6R**) の初期配座について、Spartan<sup>7</sup> 10 プログラム<sup>104</sup> で実装された Merck 分子力場 (MMFF) により真空中で幾何学的に最適化を行った。さらに、ボルツマン分布が 1%を超える各エナンチオマーの初期の低エネルギー配座異性体について、長距離補正密度汎関数理論 (DFT) により最適化 (計算条件: CAM-B3LYP/6-31G (d)) して安定性を検証した。続けて、ボルツマン分布が 1%を超える各エナンチオマーの 20 個の低エネルギー配座異性体について、時間依存密度汎関数理論 (TD-DFT) を使用して ECD 計算した (計算条件: CAM-B3LYP/def2-TZVP)。また、ジオメトリーの最適化と ECD 計算は、Gaussian 16 プログラム<sup>105</sup> を使用して MeOH 中の積分方程式形式分極連続体モデル (IEFPCM) で実行した。計算された ECD 曲線は、SpecDis v1.71<sup>106</sup> を使用して生成した。

### オトギリソウ含有成分の抽出・単離

乾燥したオトギリソウ (*H. erectum*) 全草 (7.5 kg) を、MeOH で 3 回熱時抽出後、抽出液を濾取した。減圧下溶媒留去し、MeOH 抽出エキス (1150 g, 15.3%) を得た。得られた MeOH 抽出エキスを EtOAc と H<sub>2</sub>O で分液し (1:1, v/v)、さらに *n*-BtOH と H<sub>2</sub>O で分液し (1:1, v/v)、EtOAc 可溶画分 (315.7 g, 4.2%)、*n*-BtOH 可溶画分および H<sub>2</sub>O 可溶画分を得た。また、EtOAc 可溶画分 (65 g) 順相シリカゲルオープンカラムクロマトグラフィー [1.2 kg, *n*-Hexane-CHCl<sub>3</sub> (2:1 → 1:1 → 1:4, v/v) → CHCl<sub>3</sub> → CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:0 → 50:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1 → 1:1, v/v)] にて分画し、[HEEA1 (0.68 g)、HEEA2 (2.28 g)、HEEA3 (3.72 g)、HEEA4 (24.53 g)、HEEA5 (5.76 g)、HEEA6 (6.87 g)、HEEA7 (4.57 g)、HEEA8 (18.42 g)] を得た。EA4 (24.6 g) 画分を逆相 ODS オープンカラムクロマトグラフィー [500 g, MeOH-H<sub>2</sub>O

(4:6 → 5:5 → 6:4 → 7:3 → 8:2 → 9:1v/v), → MeOH → CH<sub>3</sub>CN] にて分画し、10 の画分を得た (EA4-1-10)。EA4-6 (1.1 g) 画分から HPLC {COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-MS-II (250 × 4.6 mm i.d. and 250 × 20 mm i.d.), mobile phase; H<sub>2</sub>O-CH<sub>3</sub>CN (2:3, v/v)} により **15** (41.8 mg) および **16** (27.1 mg) を単離した。**15** から HPLC {YMC CHIRAL ART Amylose-C (250 × 4.6 mm i.d.) を用いて *n*-hexane-2-propanol (9 : 1, v/v)} により、**15a** (18.5 mg、保持時間 : 7.8 分) および **15b** (17.8 mg、保持時間 : 10.1 分) を単離した。**16** から HPLC {YMC CHIRAL ART Amylose-C (250 × 4.6 mm i.d.) を用いて *n*-hexane-2-propanol (9 : 1, v/v)} により、**16a** (11.9 mg、保持時間 : 12.8 分) および **16b** (11.7 mg、保持時間 : 15.2 分) を単離した。

### 新規化合物の化学構造

#### (+) -Erectumol I (**15a**)

A colorless platelet crystal,  $[\alpha]_D^{25} +45.4$  in MeOH, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) see Table 1, ECD spectra (MeOH) [248.1 nm ( $\Delta\epsilon$  -9.9), 283.4 nm ( $\Delta\epsilon$  +3.7)], EI-MS m/z 430 [M]<sup>+</sup>, HR-EI-MS m/z 430.2356 [M]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 430.2355)

#### (-) -Erectumol I (**15b**)

A colorless platelet crystal,  $[\alpha]_D^{25} -53.1$  in MeOH, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) see Table 1, ECD spectra (MeOH) [247.3 nm ( $\Delta\epsilon$  +10.7), 283.3 nm ( $\Delta\epsilon$  -4.9)], EI-MS m/z 430 [M]<sup>+</sup>, HR-EI-MS m/z 430.2357 [M]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 430.2355)

#### (-) -Erectumol II (**16a**)

A colorless platelet crystal,  $[\alpha]_D^{25} -39.4$  in MeOH, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) see Table 1, ECD spectra (MeOH) [241.9 nm ( $\Delta\epsilon$  -1.1), 272.4 nm ( $\Delta\epsilon$  +5.4), 292.4 nm ( $\Delta\epsilon$  +4.1), 317.9 nm ( $\Delta\epsilon$  +5.3), 368.5 nm ( $\Delta\epsilon$  -1.2)], EI-MS m/z 430 [M]<sup>+</sup>, HR-EI-MS m/z 430.2353 [M]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 430.2355)

#### (+) -Erectumol II (**16b**)

A colorless platelet crystal,  $[\alpha]_D^{25} +34.0$  in MeOH, <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) and <sup>13</sup>C NMR (150 MHz) see Table 1, ECD spectra (MeOH) [243.5 nm ( $\Delta\epsilon$  +1.8), 272.2 nm ( $\Delta\epsilon$  -5.4), 292.5 nm ( $\Delta\epsilon$  -4.1), 319.0 nm ( $\Delta\epsilon$  -5.7), 366.7 nm ( $\Delta\epsilon$  -1.3)], EI-MS m/z 430 [M]<sup>+</sup>, HR-EI-MS m/z 430.2359 [M]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>, 430.2355)

### erectumol I (**15**) の X 線結晶構造解析

A colorless platelet crystal of **15** (C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>) with approximate dimensions of 0.200 × 0.200 × 0.050 mm was mounted on a Dual-Thickness MicroMount™. All measurements were performed using a Rigaku R-Axis RAPID II diffractometer with graphite monochromated Cu-K $\alpha$  radiation. The crystal-to-detector distance was 127.40 mm. MW 430, monoclinic, space group C2/c (#15), a = 54.4610 (15) Å, b = 12.7716 (4) Å, c = 23.7073 (7) Å,  $\beta$  = 112.721 (8) °, V = 15210.1 (12) Å<sup>3</sup>, Z = 24, D<sub>calcd</sub> = 1.128

$\text{g/cm}^3$ ,  $\mu$  (Cu-K $\alpha$ ) = 6.476  $\text{cm}^{-1}$ ,  $F(000) = 5568.00$ , No. of reflections measured: Total, 87307; unique, 13795 ( $R_{\text{int}} = 0.0559$ ); Further crystallographic data regarding the compound structure can be found in the supporting information. Crystallographic data for **15** have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (deposition number: 2109591).

#### erectumol II (16) の X 線結晶構造解析

A colorless platelet crystal of **16** ( $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_6$ ) with approximate dimensions of  $0.500 \times 0.400 \times 0.100$  mm was mounted on a Dual-Thickness MicroMount<sup>TM</sup>. All measurements were performed using a Rigaku R-Axis RAPID II diffractometer with graphite monochromated Cu-K $\alpha$  radiation. The crystal-to-detector distance was 127.40 mm. MW 430, monoclinic, space group C2/c (#15),  $a = 23.6487$  (9) Å,  $b = 12.8351$  (5) Å,  $c = 17.8296$  (7) Å,  $\beta = 110.344$  (8)°,  $V = 5074.3$  (4) Å<sup>3</sup>,  $Z = 8$ ,  $D_{\text{calc}} = 1.127$   $\text{g/cm}^3$ ,  $\mu$  (Cu-K $\alpha$ ) = 6.470  $\text{cm}^{-1}$ ,  $F(000) = 1856.00$ , No. of reflections measured: Total, 28567; unique, 4622 ( $R_{\text{int}} = 0.0515$ ); Further crystallographic data regarding the compound structure can be found in the supporting information. Crystallographic data for **16** have been deposited with the CCDC (deposition number: 2109606).

#### 化合物 15a, 15b, 16a および 16b の理論 ECD スペクトルの計算

エナンチオマー **15a** (2*S*, 7*R*, 9*R*, 13*S*) および **15b** (2*R*, 7*S*, 9*S*, 13*R*) の初期配座について、Spartan' 10 プログラム<sup>104</sup> で実装された MMFF により真空中で幾何学的に最適化を行った。さらに、ボルツマン分布が 1% を超える各エナンチオマーの初期の低エネルギー配座異性体について、DFT により最適化 (計算条件: CAM-B3LYP/6-31G(d)) して安定性を検証した。ボルツマン分布が 1% を超える各エナンチオマーの 17 個の低エネルギー配座異性体を、TD-DFT を使用して ECD 計算した (計算条件: CAM-B3LYP/def2-TZVP)。また、ジオメトリーの最適化と ECD 計算は、Gaussian 16 プログラム<sup>105</sup> を使用して MeOH 中の IEFPCM で実行した。計算された ECD 曲線は、SpecDis v1.71<sup>106</sup> を使用して生成した。エナンチオマー **16a** (2*R*, 7*R*, 9*R*, 13*S*) および **16b** (2*S*, 7*S*, 9*S*, 13*R*) における計算された ECD 曲線においても同様の方法を用いた。

## 第二章の実験

### 実験材料および機器

ライブセルイメージングは Operetta high-content imaging system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて観察した。

### ヒト子宮頸がん細胞の培養

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞は、5%ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を添加した低グルコース (Wako Pure Chemical Industries) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM) を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養を行った。

### Crystal violet staining

HeLa 細胞を、100  $\mu$ L の crystal violet 溶液 [50 %MeOH - 0.5%crystal violet 溶液 (1:1, v/v)] (V5265; Sigma-Aldrich) で 5 分間固定および染色した。固定および染色後、溶液を除去し、プレートを水道水で洗浄し、室温で乾燥させた。crystal violet 染色後、細胞生存率を測定した。固定および染色した細胞を MeOH (100  $\mu$ L) に溶解し、マイクロプレートリーダー (Sunrise Thermo RC-R; Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria) を用いて、crystal violet を 595nm の波長で吸光度を測定した。

### WST-8 assay

細胞増殖率は、cell counting kit 8 (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて評価した。細胞は、96 穴細胞培養プレート (Coster 3596; Corning, NY, USA) に、1 穴あたり  $3.0 \times 10^3$  細胞/100  $\mu$ L の密度で播種した。約 24 時間後、細胞を ADR (Wako Pure Chemical Industries) で、単離された化合物 (60  $\mu$ M) の有無にかかわらず 24 時間処理した。その後、WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt]を含む CCK-8 溶液 (10  $\mu$ L) を添加し、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 時間培養した後にマイクロプレートリーダー (Sunrise Thermo RC-R) を用いて、WST-8 から生成したホルマゼンを 450nm の波長で測定した。IC<sub>50</sub> 値は、GraphPad Prism 8.21 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて算出した。

### タイムラプスイメージング

細胞を 96 穴細胞培養プレートで培養し、70~80%のコンフルエンスに到達させた。次に、タイムラプスイメージングの直前に、細胞を各種単離化合物 (**1-16b**) について、被験化合物単独および ADR との併用下で処理した。画像は、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で、10 分ごとに 24 時間撮影した (対物レンズ: 20 倍)。タイムラプスイメージングでは、細胞増殖および細胞死に伴う形態変化を観察することで、有糸分裂期移行細胞および死細胞の割合を計測した。すなわち、有糸分裂期移行細胞については、細胞形態変化と DNA の凝集を指標に、細胞形態が丸くなると共に染色体が凝集を開始し、分裂溝形成が完了するまでを有糸分裂期と判断し、

被験化合物処理後 24 時間観察を行った。また、死細胞については、ADR 処理によるアポトーシス様細胞死を指標に、被験化合物処理後、24 時間観察を行った。

### 統計処理

多群比較検定を行う時には、一元配置分散分析 (ANOVA) で等分散であることを検定し、Tukey-Kramer または Dunnett 検定で有意差を検定した。\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$  または \*  $P < 0.05$  の場合、差は有意であるとみなした。統計解析は、GraphPad Prism8.43 を使用した。

## 第三章の実験

### 実験材料および機器

電気泳動槽は、AE 6530M 型 ラピダス・ミニスラブ電気泳動槽 (AE 6530M, ATTO, Tokyo, Japan) を使用し、転写装置はミニ転写装置 (NA 1510, NIHON EIDO, Tokyo, Japan) を使用した。

ウエスタンブロットにおける各種タンパク質の化学発光シグナルは、LAS-4000 mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。

### HeLa 細胞に対する P-gp 活性の評価

P-gp による薬物排出活性は、Rhodamine 123 (Rh 123, Wako Pure Chemical Industries) の緑色蛍光の変化を評価した。HeLa 細胞を 24 ウェルプレート (Coster 3526; Corning) に、 $4 \times 10^4$  細胞/500 $\mu$ L の密度で播種した。約 12 時間培養後、培地を Rh 123 (1  $\mu$ M) を含む培地に交換し、細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間暗所にて培養した。次に、細胞を氷冷培地で 3 回洗浄し、吸収されなかった Rh 123 を除去し、タイムラプス細胞イメージングの直前に、50  $\mu$ M もしくは 60  $\mu$ M のいずれかの濃度において個々の単離化合物 (**1**、**2**、**15a**、**15b**、**16a** および **16b**) および陽性対照として 30  $\mu$ M の verapamil (V4629; Sigma-Aldrich) を処理した。画像は、37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 30 分ごとに 6 時間撮影した。蛍光画像は、Operetta high-content imaging system (PerkinElmer) を使用して取得した。励起波長と発光波長は、それぞれ 460–490 nm と 500–550nm とした。画像は 20 倍の対物レンズを使用して観察した。ランプパワーと露光時間は、蛍光シグナルの過剰露光を避けるために、各実験を通して設定し、一定に保った。図は、Photoshop 2021 (Adobe, San Jose, CA, USA) および Illustrator 2021 (Adobe) を使用して作成した。統合された蛍光強度は、3 つの独立した実験の画像から ImageJ software (NIH, USA) によって決定した。

### ウエスタンブロットィング解析

HeLa 細胞を 35mm ディッシュに  $1.0 \times 10^5$  細胞/2 mL の密度で播種した。約 24 時間後、細胞を様々な濃度の各化合物で 24 時間処理した。細胞を 2%ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate; SDS)、10%glycerol、5%2-mercaptoethanol、62.5 mM Tris-HCl [pH 6.8]、および 0.0125% bromophenol blue を含む SDS sample buffer で溶解し、100°C で 5 分間煮沸した。タンパク質は SDS-PAGE で分離し、polyvinylidene difluoride membrane (Pall Corporation, Port

Washington, NY, USA) に転写した。BlockingOne (Nacalai Tesque) でブロッキング後に、0.1%Tween 20 および 5%Blocking One を含む Tris buffered saline (TBS) で希釈した適切な一次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合二次抗体をそれぞれ順次インキュベートした。次抗体と二次抗体をそれぞれ反応させた。リプロービングは、0.1% NaN<sub>3</sub> で西洋ワサビペルオキシダーゼを失活させた後行った。化学発光は、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を使用した LAS-4000 ミニ画像解析システム (Fujifilm, Tokyo, Japan) で検出した。一次抗体はマウスモノクローナル抗 HSP 105 抗体 (1:1000–2000; clone B-7, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)、抗 HSP 90 抗体 (1:2000; clone AC88, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)、抗 HSP 70 抗体 (1:2000; clone C92F3A-5, Enzo Life Sciences)、およびウサギモノクローナル抗  $\beta$ -actin 抗体 (1:1000–2000; clone 13E5, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) および抗 HSF1 抗体 (1:000; Abcam, Cambridge, MA, USA) を使用した。二次抗体は、HRP 結合ロバ抗マウス抗体 (1; 4000; 712-035-151, Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA, USA) および HRP 結合ロバ抗ウサギ抗体 (1; 4000; 712-035-152, Jackson Immuno Research Laboratories) を使用した。

#### 統計処理

多群比較検定を行う時には、一元配置分散分析 (ANOVA) で等分散であることを検定し、Dunnnett 検定で有意差を検定した。\*\*\*  $P < 0.001$ 、\*\*  $P < 0.01$  または\*  $P < 0.05$  の場合、差は有意であるとみなした。統計解析は、GraphPad Prism 8.43 を使用した。



## 引用文献

- 1) National Cancer Center Japan Home Page.  
[https://ganjoho.jp/public/qa\\_links/report/statistics/pdf/cancer\\_statistics\\_2021.pdf](https://ganjoho.jp/public/qa_links/report/statistics/pdf/cancer_statistics_2021.pdf) (accessed February 3, 2022).
- 2) Hannun Y. A. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy. *Blood* **1997**, 89(6), 1845–1853.
- 3) Von Hoff D. D., Layard M. W., Basa P., Davis Jr H. L., Von Hoff A. L. Rozenzweig M., Muggia F. M., Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Annals of Internal Medicine* **1979**, 91(5), 710–717.
- 4) Marine J. C., Dawson S. J., Dawson M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nature Reviews Cancer* **2020**, 20(12), 743–756.
- 5) Gomez K., Rabadan R. A persistent look at how tumours evade therapy. *Nature* **2021**, 596(7873), 491–493.
- 6) Sakai T. 化学療法薬からの癌細胞のサバイバルメカニズム. *Folia Pharmacologica Japonica* **2006**, 127, 342–347.
- 7) Szakács G., Paterson J. K., Ludwig J. A., Booth-Genthe C., Gottesman M. M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, 5(3), 219–234.
- 8) Harker W. G., Slade D. L., Parr R. L., Feldhoff P. W., Sullivan D. M., Holguin M. H. Alterations in the topoisomerase II $\alpha$  gene, messenger RNA, and subcellular protein distribution as well as reduced expression of the DNA topoisomerase II $\beta$  enzyme in a mitoxantrone-resistant HL-60 human leukemia cell line. *Cancer Research* **1995**, 55(8), 1707–1716.
- 9) Kondo Y., Woo E. S., Michalska A. E., Choo K. H., Lazo J. S. Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Research* **1995**, 55(10), 2021–2023.
- 10) Wu J., Liu T., Rios Z., Mei Q., Lin X., Cao S. Heat shock proteins and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* **2017**, 38(3), 226–256.
- 11) Maji S., Panda S., Samal S. K., Shriwas O., Rath R., Pellecchia M., Emdad L., Das S. K., Fisher P. B., Dash R. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Advances in Cancer Research* **2018**, 137, 37–75.
- 12) Ball S., Borthakur G. Apoptosis targeted therapies in acute myeloid leukemia: an update. *Expert Review of Hematology* **2020**, 13(12), 1373–1386.
- 13) Miyaki M., Ono T., Hori S., Umezawa H. Binding of bleomycin to DNA in bleomycin-sensitive and-resistant rat ascites hepatoma cells. *Cancer Research* **1975**, 35(8), 2015–2019.
- 14) Grant C. E., Valdimarsson G., Hipfner D. R., Almquist K. C., Cole S. P. C., Deeley R. G. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Research* **1994**, 54(2), 357–361.
- 15) Allen J. D., Brinkhuis R. F., Van Deemter L., Wijnholds J., Schinkel A. H. Extensive contribution of the multidrug transporters P-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. *Cancer Research* **2000**, 60(20), 5761–5766.

- 16) Shukla S., Chen Z. S., Ambudkar S. V. Tyrosine kinase inhibitors as modulators of ABC transporter-mediated drug resistance. *Drug Resistance Updates* **2012**, 15(1–2), 70–80.
- 17) Schneider J., Centeno M. M., Rodriguez-Escudero F. J., Efferth T., Mattern J., Volm M. High rate of expression of multidrug resistance-associated P-glycoprotein in human endometrial carcinoma and normal endometrial tissue. *European Journal of Cancer* **1993**, 29(4), 554–558.
- 18) Goldstein L. J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S. L., Gazdar A., Pirker R., Green A., Crist W., Brodeur G. M., Lieber M., Cossman J., Gottesman M. M., Pastan I. Expression of multidrug resistance gene in human cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **1989**, 81(2), 116–124.
- 19) Robey R. W., Pluchino K. M., Hall M. D., Fojo A. T., Bates S. E., Gottesman M. M. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018, 18(7), 452–464.
- 20) Ambudkar S. V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z. E., Gottesman M. M. P-glycoprotein: From genomics to mechanism. *Oncogene* **2003**, 22(47), 7468–7485.
- 21) Tsuruo T., Iida H., Tsukagoshi S., Sakurai Y. Overcoming of vincristine resistance in p388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Research* **1981**, 41(5), 1967–1972.
- 22) Romiti N., Tramonti G., Chieli E. Influence of different chemicals on MDR-1 P-glycoprotein expression and activity in the HK-2 proximal tubular cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2002**, (2), 83–91.
- 23) Germann U.A., Ford P.J., Shlyakhter D., Mason V. S., Harding M.W. Chemosensitization and drug accumulation effects of VX-710, verapamil, cyclosporinA, MS-209 and GF120918 in multidrug resistant HL60/ADR cells expressing the multidrug resistance-associated protein MRP. *Anticancer Drugs* **1997**, 8(2), 141–155.
- 24) Dantzig A. H., Shepard R. L., Law K. L., Tabas L., Pratt S., Gillespie J. S., Binkley S. N., Kuhfeld M. T., Starling J. J., Wrighton S. A. Selectivity of the multidrug resistance modulator, LY335979, for P-glycoprotein and effect on cytochrome P-450 activities. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1999**, 290(2), 854–862.
- 25) Fox E., Bates S. E. Tariquidar (XR9576): A P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor. *Expert Review of Anticancer Therapy* **2007**, 7(4), 447–459.
- 26) van Zuylen L., Sparreboom A., van der Gaast A., Nooter K., Eskens F. A. L. M., Brouwer E., Bol C. J., de Vries R., Palmer P. A., Verweij J. Disposition of docetaxel in the presence of P-glycoprotein inhibition by intravenous administration of R101933. *European Journal of Cancer* **2002**, 38(8), 1090–1099.
- 27) Takanaga H., Ohnishi A., Yamada S., Matsuo H., Morimoto S., Shoyama Y., Ohtani H., Sawada Y. Polymethoxylated flavones in orange juice are inhibitors of P-glycoprotein but not cytochrome P450 3A4. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, 293(1), 230–236.
- 28) Quesadal A. R., Gratvalos G., Fernandez J. L. Polyaromatic alkaloids from marine invertebrates as cytotoxic compounds and inhibitors of multidrug resistance caused by P-glycoprotein. *British*

- Journal of Cancer* **1996**, 74(5), 677–682.
- 29) Dubrez L., Causse S., Borges Bonan N., Dumétier B., Garrido C. Heat-shock proteins: chaperoning DNA repair. *Oncogene* **2020**, 39(3), 516-529.
  - 30) Murphy M. E. The HSP70 family and cancer. *Carcinogenesis* **2013**, 34(6), 1181–1188.
  - 31) Hwang T. S., Han H. S., Choi H. K., Lee Y. J., Kim Y. J., Han M. Y., Park Y. M. Differential, stage-dependent expression of HSP70, HSP110 and Bcl-2 in colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* **2003**, 18(6), 690–700.
  - 32) Lee H. W., Lee E. H., Kim S. H., Roh M. S., Jung S. B., Choi Y. C. Heat shock protein 70 (HSP70) expression is associated with poor prognosis in intestinal type gastric cancer. *Virchows Archiv* **2013**, 463(4), 489–495.
  - 33) McCarthy M. M, Pick E., Kluger Y., Gould-Rothberg B., Lazova R., Camp R. L., Rimm D. L., Kluger H. M. HSP90 as a marker of progression in melanoma. *Annals of Oncology* **2008**, 19(3), 590–594.
  - 34) Giessrigl B., Krieger S., Rosner M., Huttary N., Saiko P., Alami M., Messaoudi S., Peyrat J. F., Maciuk A., Gollinger M., Kopf S., Kazlauskas E., Mazal P., Szekeres T., Hengstschlager M., Matulis D., Jager W., Krupitza G. HSP90 stabilizes Cdc25A and counteracts heat shock-mediated Cdc25A degradation and cell-cycle attenuation in pancreatic carcinoma cells. *human molecular genetics* **2012**, 21(21), 4615–4627.
  - 35) Huang T., Chen S., Han H., Li H., Huang Z., Zhang J., Yin Q., Wang X., Ma X., Dai P., Duan D., Zou F., Chen X. Expression of HSP90 $\alpha$  and cyclin B<sub>1</sub> were related to prognosis of esophageal squamous cell carcinoma and keratin pearl formation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **2014**, 7(4), 1544–1552.
  - 36) Kai M., Nakatsura T., Egami H., Senju S., Nishimura Y., Ogawa M. Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology Reports* **2003**, 10(6), 1777–1782.
  - 37) Nakatsura T., Senju S., Yamada K., Jotsuka T., Ogawa M., Nishimura Y. Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2001**, 281(4), 936–944.
  - 38) Oda T., Morii E., Inoue M., Ikeda J., Aozasa K., Okumura M. Prognostic significance of heat shock protein 105 in lung adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports* **2009**, 2(4), 603–607.
  - 39) Nosaka K., Suzuki S., Yoshikawa T., Shimomura M., Kitami K., Yoshida K., Yoshihara M., Kikkawa F., Nakatsura T., Kajiyama H. Heat shock protein 105 as an immunotherapeutic target for patients with cervical cancer. *Anticancer Research* **2021**, 41(10), 4741–4751.
  - 40) Li J., Labbadia J., Morimoto R. I. Rethinking HSF1 in Stress, Development, and Organismal Health. *Trends in Cell Biology* **2017**, 27(12):895–905.
  - 41) Abravaya K., Myers M. P., Murphy S. P., Morimoto R. I. The human heat shock protein HSP70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression. *Genes and Development* **1992**, 6(7), 1153–1164.
  - 42) Zou J., Guo Y., Guettouche T., Smith D. F., Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor

- HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **1998**, 94(4), 471–480.
- 43) Subjeck J. R., Sciandra J. J., Johnson R. J. Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. *British Journal of Radiology* **1982**, 55(656), 579–584.
  - 44) Leu J. I., Pimkina J., Frank A., Murphy M. E., George D. L. A small molecule inhibitor of inducible heat shock protein 70. *Mol. Cell* **2009**, 36(1), 15–27.
  - 45) Jinwal U. K., Miyata Y., Koren J. 3rd, Jones J. R., Trotter J. H., Chang L., O'Leary J., Morgan D., Lee D. C., Shults C. L., Rousaki A., Weeber E. J., Zuiderweg E. R., Gestwicki J. E., Dickey C. A. Chemical manipulation of HSP70 ATPase activity regulates tau stability. *Journal of Neuroscience* **2009**, 29(39), 12079–12088.
  - 46) Whitesell L., Mimnaugh E. G., De Costa B., Myers C. E., Neckers L. M. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91(18), 8324–8328.
  - 47) Jhaveri K., Taldone T., Modi S., Chiosis G. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* **2012**, 1823(3), 742–755.
  - 48) Seggewiss-Bernhardt R., Bargou R. C., Goh Y. T., Stewart A. K., Spencer A., Alegre A., Bladé J., Ottmann O. G., Fernandez-Ibarra C., Lu H., Pain S., Akimov M., Iyer S. P. Phase 1/1B trial of the heat shock protein 90 inhibitor NVP-AUY922 as monotherapy or in combination with bortezomib in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Cancer* **2015**, 121(13), 2185–2192.
  - 49) Bagatell R., Paine-Murrieta G. D., Taylor C. W., Pulcini E. J., Akinaga S., Benjamin I. J., Whitesell L. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of HSP90-binding agents. *Clinical Cancer Research* **2000**, 6(8), 3312–3318.
  - 50) Wang Y., McAlpine S. R., Heat-shock protein 90 inhibitors: will they ever succeed as chemotherapeutics?. *Future Medicinal Chemistry* **2015**, 7(2), 87–90.
  - 51) Wang Y., McAlpine S. R. Regulating the cytoprotective response in cancer cells using simultaneous inhibition of HSP90 and HSP70. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2015**, 13(7), 2108–2116.
  - 52) Hosaka S., Nakatsura T., Tsukamoto H., Hatayama T., Baba H., Nishimura Y. Synthetic small interfering RNA targeting heat shock protein 105 induces apoptosis of various cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Science* **2006**, 97(7), 623–632.
  - 53) MacDiarmid J. A., Amaro-Mugridge N. B., Madrid-Weiss J., Sedliarou I., Wetzel S., Kochar K., Brahmabhatt V. N., Phillips L., Pattison S. T., Petti C., Stillman B., Graham R. M., Brahmabhatt H. Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nature Biotechnology* **2009**, 27(7), 643–651.
  - 54) Nanayakkara A. K., Follit C. A., Chen G., Williams N. S., Vogel P. D., Wise J. G. Targeted inhibitors of P-glycoprotein increase chemotherapeutic-induced mortality of multidrug resistant tumor cells. *Scientific Reports* **2018**, 8(1), 967.
  - 55) Yamane T., Saito Y., Teshima H., Hagino M., Kakihana A., Sato S., Shimada M., Kato Y., Kuga T.,

- Yamagishi N., Nakayama Y. HSP105 $\alpha$  suppresses Adriamycin-induced cell death via nuclear localization signal-dependent nuclear accumulation. *Journal of Cellular Biochemistry* **2019**, 120(10), 17951–17962.
- 56) Kodai T., Horiuchi Y., Nishioka Y., Noda N. Novel cycloartane-type triterpenoid from the fruits of *Nandina domestica*. *Journal of Natural Medicines* **2010**, 64(2), 216–218.
- 57) Peng, C. Y., Liu, J. Q., Zhang, R., Shu, J. C. A new alkaloid from the fruit of *Nandina domestica* Thunb. *Natural Product Research* **2014**, 28(15), 1159–1164.
- 58) Indra B, Matsunaga K, Hoshino O, Suzuki M, Ogasawara H, Ohizumi Y. Structure-activity relationship studies with (+/-)-nantenine derivatives for  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist activity. *European Journal of Pharmacology* **2002**, 22;437(3), 173–178.
- 59) Lu S., Tanaka N., Tatano Y., Kashiwada Y. Erecricins A–E, prenylated acylphloroglucinols from the roots of *Hypericum erectum*. *Fitoterapia* **2016**, 114, 188–193.
- 60) Tanaka N., Kashiwada Y., Kim S. Y., Hashida W., Sekiya M., Ikeshiro Y., Takaishi Y. Acylphloroglucinol, biyouyanagiol, biyouyanagin B, and related spiro-lactones from *Hypericum chinense*. *Journal of Natural Products* **2009**, 72(8), 1447–1452.
- 61) Ma J., Zang Y. D., Zhang J. J., Li C. J., Li Y., Su Y. L., Wang A. G., Zhang D. M. Nine prenylated acylphloroglucinols with potential anti-depressive and hepatoprotective activities from *Hypericum scabrum*. *Bioorganic Chemistry* **2021**, 107, 104529.
- 62) Ma J., Zang Y. D., Zhang J. J., Li C. J., Li Y., Su Y. L., Wang A. G., Zhang D. M. Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. *Journal of Natural Medicines* **2011**, 65(1), 122–128.
- 63) Grafakou M. E., Barda C., Pintać D., Lesjak M., Heilmann J., Skaltsa H. Prenylated acylphloroglucinols from *Hypericum jovis* with anti-inflammatory potential. *Planta Medica* **2021**, 87(14), 1184–1191.
- 64) Peng X., Tan Q., Zhou H., Xu J., Gu Q. Discovery of phloroglucinols from *Hypericum japonicum* as ferroptosis inhibitors. *Fitoterapia* **2021**, 153, 104984.
- 65) Machida K., Matsuoka E., Kikuchi M. Five new glycosides from *Hypericum erectum* Thumb. *Journal of Natural Medicines* **2009**, 63(2), 223–226.
- 66) Niwa K., Tanaka N., Shimomoto Y., Tsuji D., Kim S. Y., Kojoma M., Itoh K., Chen C. H., Lee K. H., Kashiwada Y. Hyperdioxanes, dibenzo-1,4-dioxane derivatives from the roots of *Hypericum ascyron*. *Journal of Natural Medicines* **2021**, 75(4), 907–914.
- 67) Tanaka N., Kashiwada Y. Characteristic metabolites of *Hypericum* plants: their chemical structures and biological activities. *Journal of Natural Medicines* **2021**, 75(3), 423–433.
- 68) Ishida Y., Shirota O., Sekita S., Someya K., Tokita F., Nakane T., Kuroyanagi M. Polyprenylated benzoylphloroglucinol-Type derivatives including novel cage compounds from *Hypericum erectum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2010**, 58(3), 336–343.
- 69) An T. Y., Shan M. D., Hu L. H., Liu S. J., Chen Z. L. Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum*. *Phytochemistry* **2002**, 59(4), 395–398.

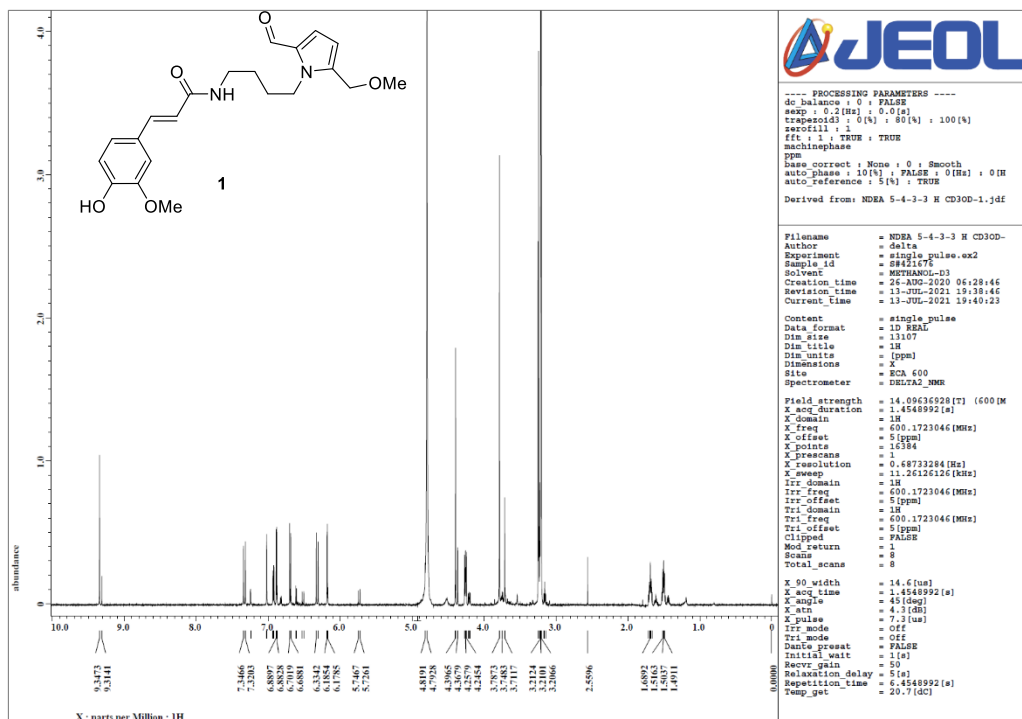
- 70) Wang Q. Q., Wang X. D., Wu L. Z., Fang Q. Q., Liu Y. N., Jiang K., Qu S. J., Tan C. H. Polyprenylated acylphloroglucinols as deubiquitinating protease USP7 inhibitors from *Hypericum hookerianum*. *Fitoterapia* **2020**, 146, 104678.
- 71) Duan Y., Xie S., Guo Y., Qiao Y., Shi Z., Tao L., Deng M., Cao Y., Xue Y., Qi C., Zhang Y. Przewalcyrones A – F, epoxychromene-containing polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols with immunosuppressive activity from *Hypericum przewalskii* Maxim. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2019**, 17(35), 8234–8242.
- 72) Yajima A., Oono Y., Nakagawa R., Nukada T., Yabuta G. A simple synthesis of four stereoisomers of roseoside and their inhibitory activity on leukotriene release from mice bone marrow-derived cultured mast cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2009**, 17(1), 189–194.
- 73) D'Abrosca B., DellaGreca M., Fiorentino A., Monaco P., Oriano P., Temussi F. Structure elucidation and phytotoxicity of C<sub>13</sub> nor-isoprenoids from *Cestrum parqui*. *Phytochemistry* **2004**, 65(4), 497–505.
- 74) Kai H., Baba M., Okuyama T. Two new megastigmanes from the leaves of *Cucumis sativus*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2007**, 55(1), 133–136.
- 75) Hong Y. H., Wang S. C., Hsu C., Lin B. F., Kuo Y. H., Huang C. J. Phytoestrogenic compounds in alfalfa sprout (*Medicago sativa*) beyond coumestrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59(1), 131–137.
- 76) Kulkarni R. R., Lee W., Jang T. S., Lee J. I., Kwak S., Park M. S., Lee H. S., Bae J. S., Na M. K. Caffeoyl glucosides from *Nandina domestica* inhibit LPS-induced endothelial inflammatory responses. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2015**, 25(22), 5367–5371.
- 77) His-Jung Yu, Chien-Chih Chen, Bor-Jinn Shieh, Two new constituents from the Leaves of *Magnolia coco*. *Journal of Natural Products* **1998**, 61(8), 1017–1019.
- 78) Yamano Y., Ito M. Synthesis of optically active vomifoliol and roseoside stereoisomers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **2005**, 53(5), 541–546.
- 79) Matsumoto T., Nakamura S., Nakashima S., Ohta T., Ogawa K., Fukaya M., Tsukioka J., Hasei T., Watanabe T., Matsuda H. Neolignan and megastigmane glucosides from the aerial parts of *Isodon japonicus* with cell protective effects on BaP-induced cytotoxicity. *Phytochemistry* **2017**, 137, 101–108.
- 80) Kraepiel Y., Rousselin P., Sotta B., Kerhoas L., Einhorn J., Caboche M., Miginiac E. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The Plant Journal* **1994**, 6(5), 665–672.
- 81) Zhao X. Y., Wang G., Wang Y., Tian X. G., Zhao J. C., Huo X. K., Sun C. P., Feng L., Ning J., Wang C., Zhang B. J., Wang X. Chemical constituents from *Alisma plantago-aquatica* subsp. *orientale* (Sam.) Sam and their anti-inflammatory and antioxidant activities. *Natural Product Research* **2018**, 32(23), 2749–2755.
- 82) Qin B.H., Yuan Q. Y., Liu X. Q., Han Y. H., Jing W. A new phenolic compound with anti-inflammation activity from *Caulophyllum robustum*. *Chemistry of Natural Compounds* **2019**, 55,

- 465–468.
- 83) Kato H., Fujimaki M. Chemical studies on amino-carbonyl reaction part III. formation of substituted pyrrole-2-aldehydes by reaction of aldoses with alkylamines. *Agricultural and biological chemistry* **1967**, 31(9), 1086–1090.
  - 84) Wood J. M., Furkert D. P., Brimble M. A. 2-Formylpyrrole natural products: origin, structural diversity, bioactivity and synthesis. *Natural Product Reports* **2019**, 20;36(2), 289–306
  - 85) Hanzawa Y., Imai A., Michael A. J., Komeda Y., Takahashi T. Characterization of the spermidine synthase-related gene family in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **2002**, 11;527(1–3), 176–180.
  - 86) Umezawa T. リグナン, リグニンおよびノルリグナンの生合成ケイヒ酸モノリグノール経路研究の最近の進歩. *化学と生物* **2005**, 43(7), 461–467.
  - 87) Yuen Tsz-Y., Eaton S. E., Woods T. M., Furkert, D. P., Choi K. W., Brimble M. A. A Maillard Approach to 2-Formylpyrroles: Synthesis of Magnolamide, Lobechine and Funebrial. *European Journal of Organic Chemistry* **2014**, 2014(7), 1431–1437.
  - 88) Daina A., Michielin O., Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports* **2017**, 3;7:42717.
  - 89) Guengerich F. P., MacDonald J. S. Applying mechanisms of chemical toxicity to predict drug safety. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, 20(3):344–369.
  - 90) Mizukami H. [Sugar Chain Construction of Functional Natural Products Using Plant Glucosyltransferases]. *Yakugaku Zasshi* **2015**, 135(7), 867–882.
  - 91) Xu W., Xie S., Chen X., Pan S., Qian H., Zhu X. Effects of Quercetin on the Efficacy of Various Chemotherapeutic Drugs in Cervical Cancer Cells. *Drug Design, Development and Therapy* **2021**, 15, 577–588.
  - 92) Navarro-Hortal M. D., Varela-López A., Romero-Márquez J. M., Rivas-García L., Speranza L., Battino M., Quiles J. L. Role of flavonoids against adriamycin toxicity. *Food and Chemical Toxicology* **2020**, 146, 111820.
  - 93) Ghafouri-Fard S., Shabestari F. A., Vaezi S., Abak A., Shoorei H., Karimi A., Taheri M., Basiri A. Emerging impact of quercetin in the treatment of prostate cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2021**, 138, 111548.
  - 94) Jacqueline V. C., Valerie, Gouaze-andresson Myles, C. C. Expression of P-glycoprotein in HeLa cells confers resistance to ceramide cytotoxicity. *International Journal of Oncology* **2010**, 37(6), 1591–1597.
  - 95) Levatić J., Ćurak J., Kralj M., Šmuc T., Osmak M., Supek F. Accurate models for P-gp drug recognition induced from a cancer cell line cytotoxicity screen. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 25;56(14), 5691–5708.
  - 96) Rahimi R., Abdollahi M. An update on the ability of St. John's wort to affect the metabolism of other drugs. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* **2012**, 8(6), 691–708.
  - 97) Quiney C., Billard C., Faussat A. M., Salanoubat C., Kolb J. P. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP

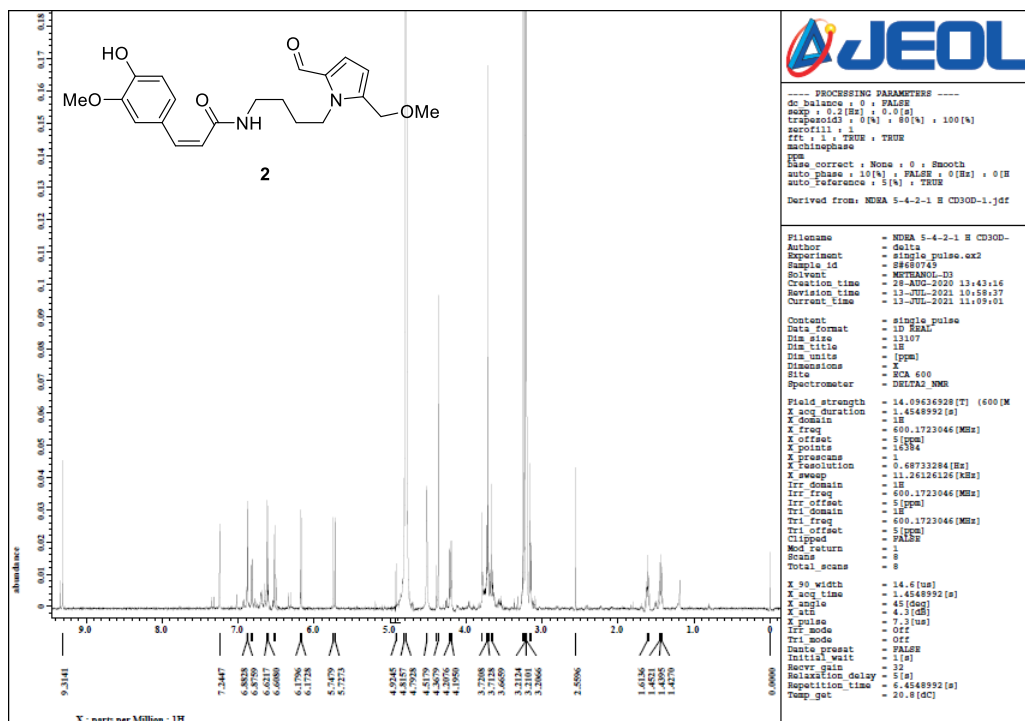
- activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leukemia and Lymphoma* **2007**, 48(8), 1587–1599.
- 98) Wang E. J., Barecki-Roach M., Johnson W. W. Quantitative characterization of direct P-glycoprotein inhibition by St John's wort constituents hypericin and hyperforin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2004**, 56(1), 123–128.
- 99) Dong B., Jaeger A. M., Thiele D. J. Inhibiting Heat Shock Factor 1 in Cancer: A Unique Therapeutic Opportunity. *Trends in Pharmacological Sciences* **2019**, 40(12), 986–1005.
- 100) Yoon T., Kang G. Y., Han A. R., Seo E. K., Lee Y. S. 2,4-bis(4-hydroxybenzyl)phenol inhibits heat shock transcription factor 1 and sensitizes lung cancer cells to conventional anticancer modalities. *Journal of Natural Products* **2014**, 77(5), 1123–1129.
- 101) Westerheide S. D., Kawahara T. L., Orton K., Morimoto R. I. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, 281(14), 9616–9622.
- 102) Titov D. V., Gilman B., He Q. L., Bhat S., Low W. K., Dang Y., Smeaton M., Demain A. L., Miller P. S., Kugel J. F., Goodrich J. A., Liu J. O. XPB, a subunit of TFIIH, is a target of the natural product triptolide. *Nature Chemical Biology* **2011**, 7(3), 182–188.
- 103) Dayalan N. S., Dinkova-Kostova A. T. Regulation of the mammalian heat shock factor 1. *FEBS Journal* **2017**, 284(11), 1606–1627.
- 104) Wavefunction Inc.: Irvine, CA.
- 105) Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Scuseria G. E., Robb M. A., Cheeseman J. R., Scalmani G., Barone V., Petersson G. A., Nakatsuji H., Li, X., Caricato M., Marenich A. V., Bloino J., Janesko B. G., Gomperts R., Mennucci B., Hratchian H. P., Ortiz J. V., Izmaylov A. F., Sonnenberg J. L., Williams-Young D., Ding F., Lipparini F., Egidi F., Goings J., Peng B., Petrone A., Henderson T., Ranasinghe D.; Zakrzewski V. G.; Gao J.; Rega N.; Zheng G.; Liang W.; Hada M.; Ehara M., Toyota K., Fukuda R., Hasegawa J., Ishida M., Nakajima T., Honda Y., Kitao O., Nakai H., Vreven T., Throssell K., Montgomery Jr J. A., Peralta J. E., Ogliaro F., Bearpark M. J., Heyd J. J., Brothers E. N., Kudin K. N., Staroverov V. N., Keith T. A., Kobayashi R., Normand J., Raghavachari K., Rendell A. P., Burant J. C.; Iyengar S. S., Tomasi J., Cossi M., Millam J. M., Klene M., Adamo C., Cammi R., Ochterski J. W., Martin R. L., Morokuma K., Farkas O., Foresman J. B., Fox D. J. Gaussian 16, Revision A.03; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT, 2016.
- 106) Bruhn T., Schaumlöffel A., Hemberger Y., Pecitelli G. SpecDis: Quantifying the comparison of calculated and experimental electronic circular dichroism spectra. *Chirality* **2013**, 25(4), 243–249.



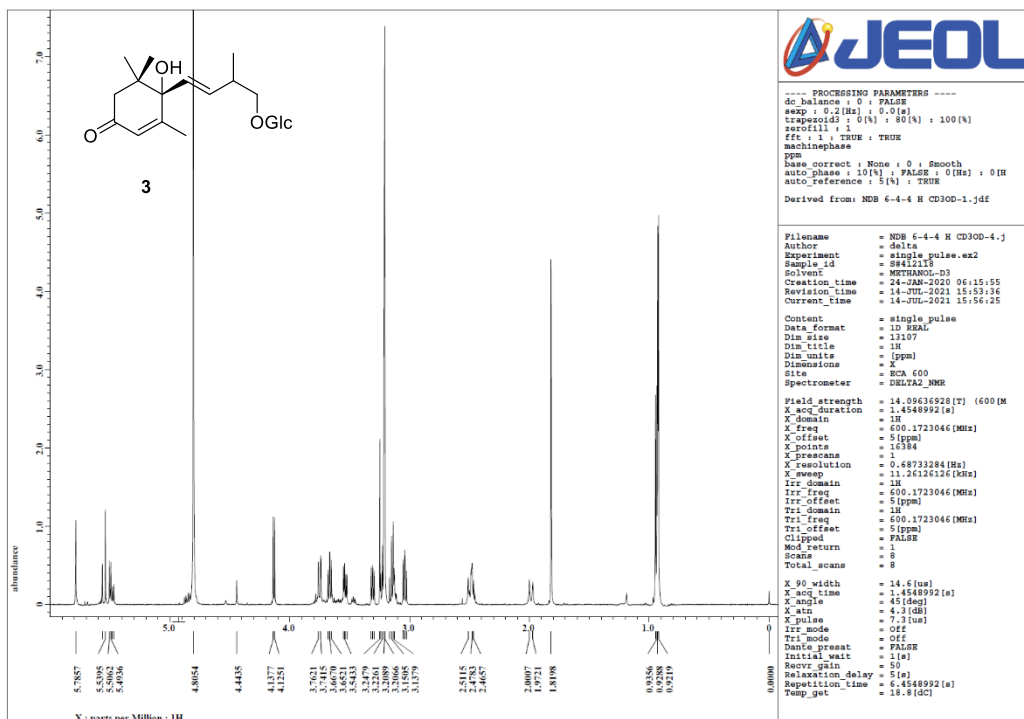
## Supplemental data



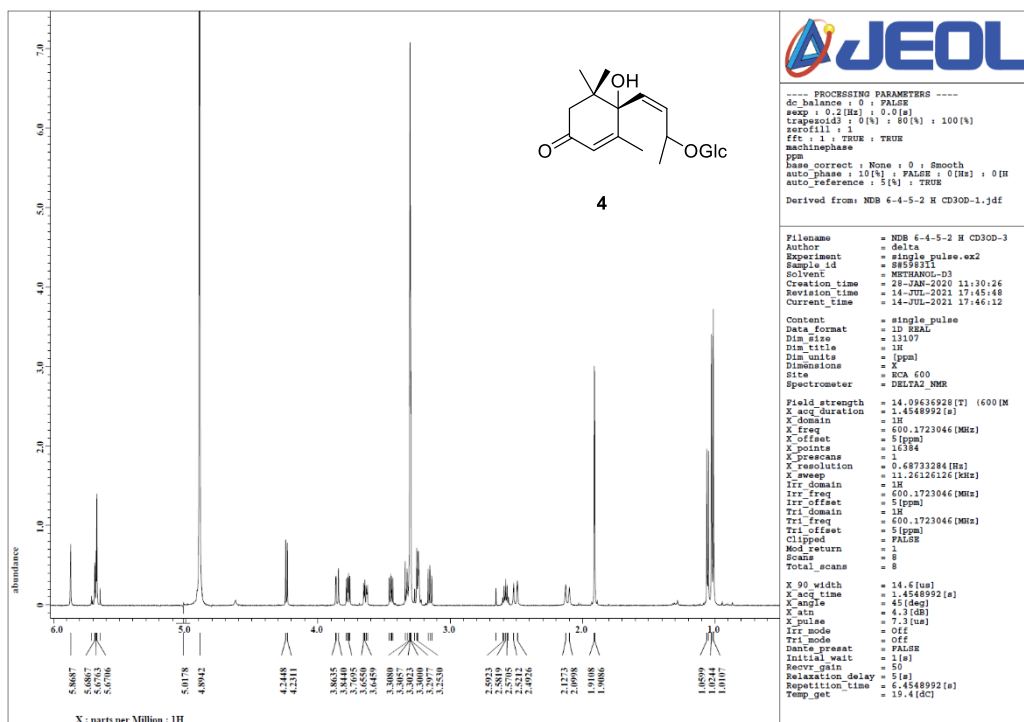
23 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 1



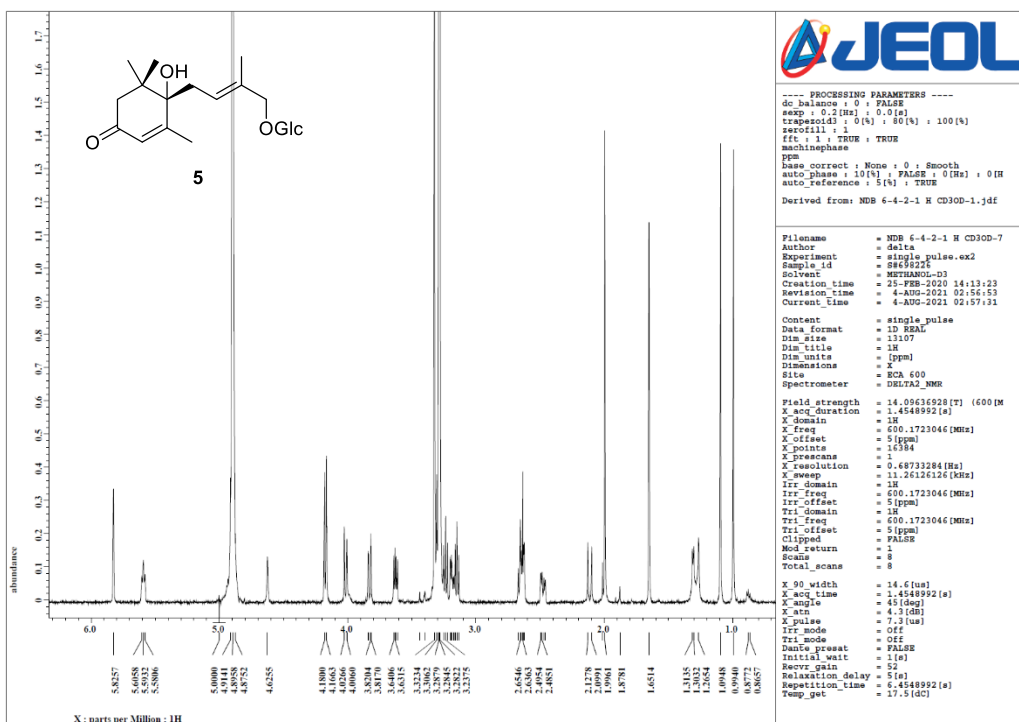
24 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 2



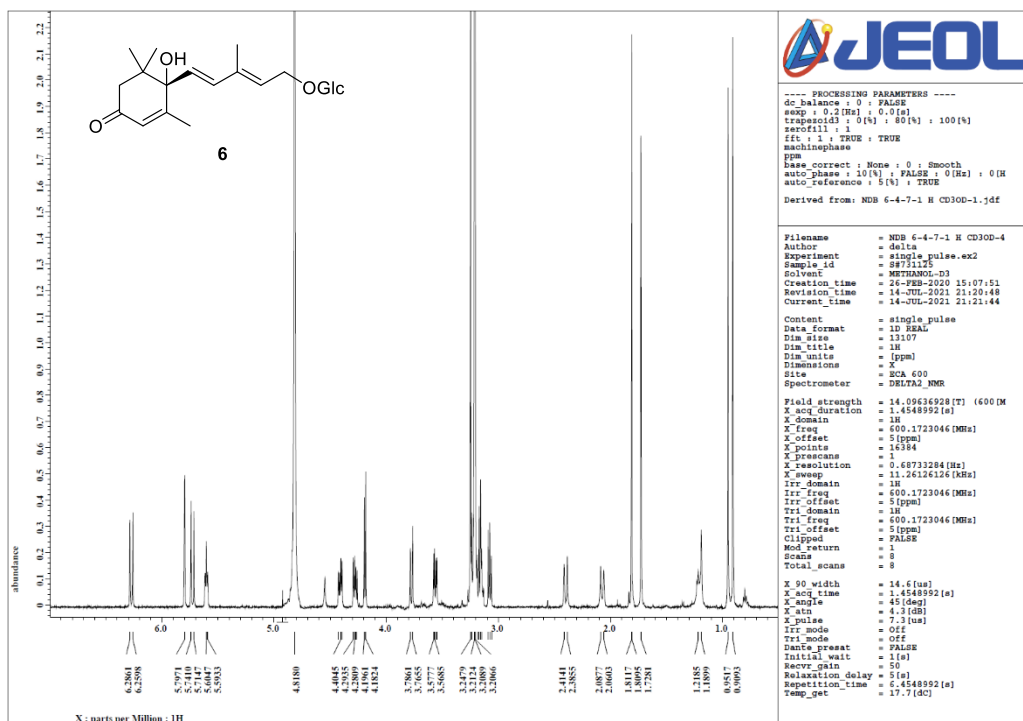
25 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 3



26 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 4



27  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 5



28  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 6

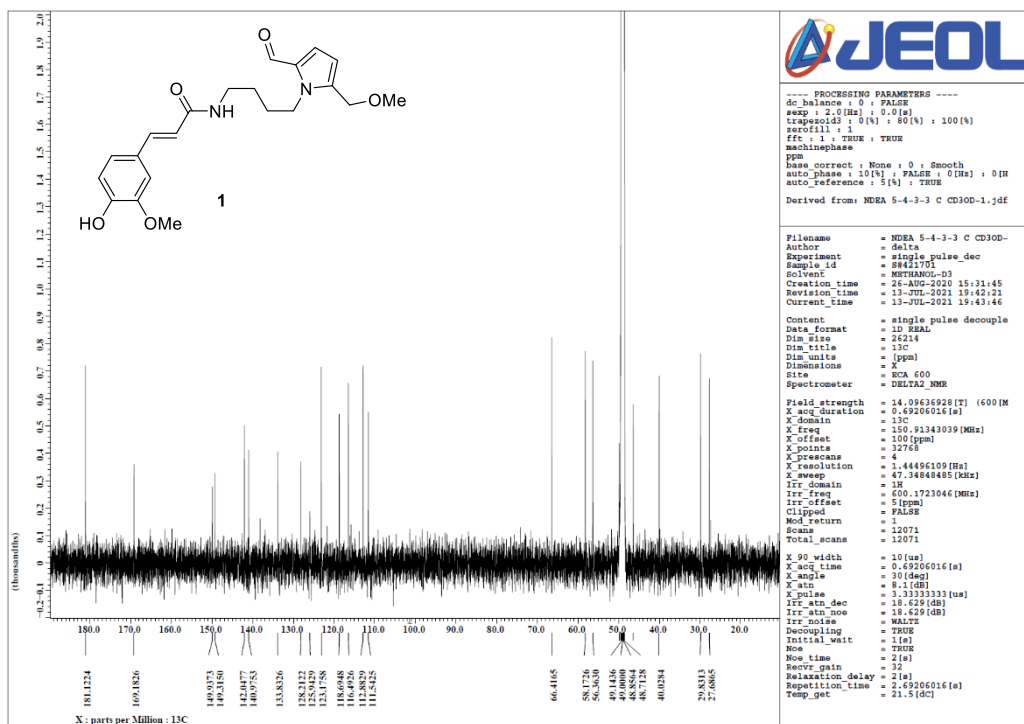


图 29  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 1

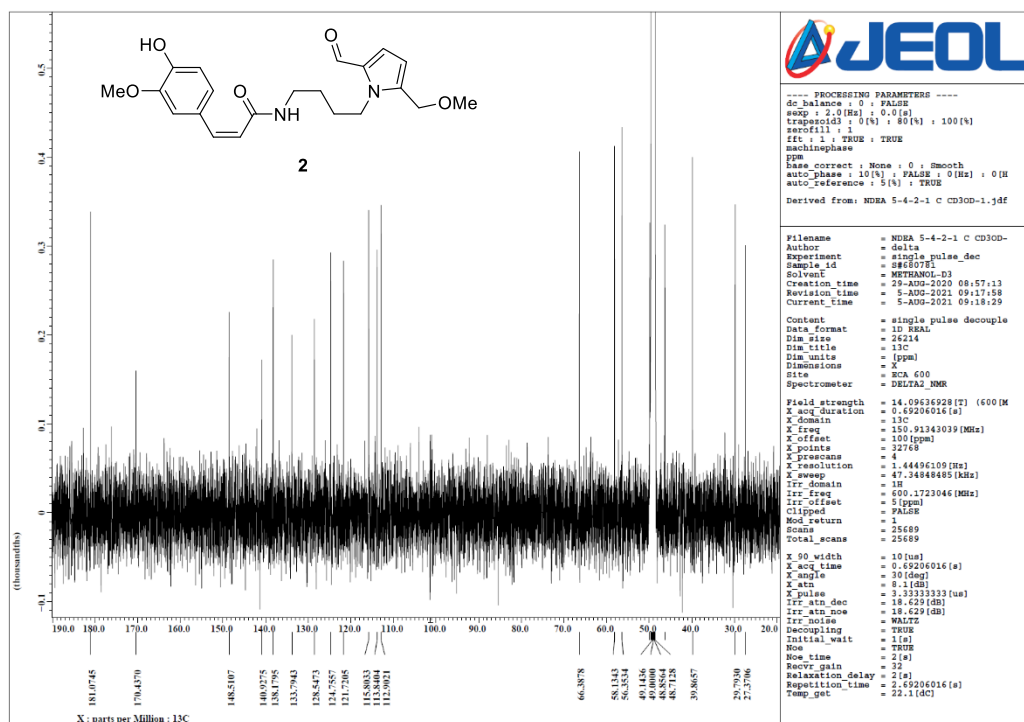
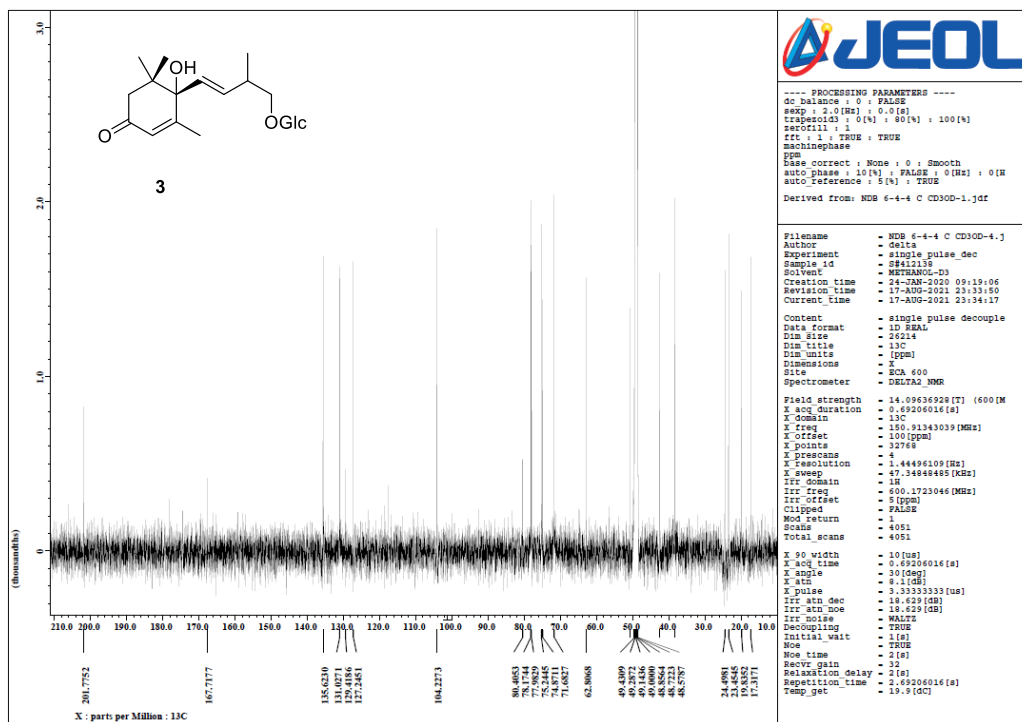
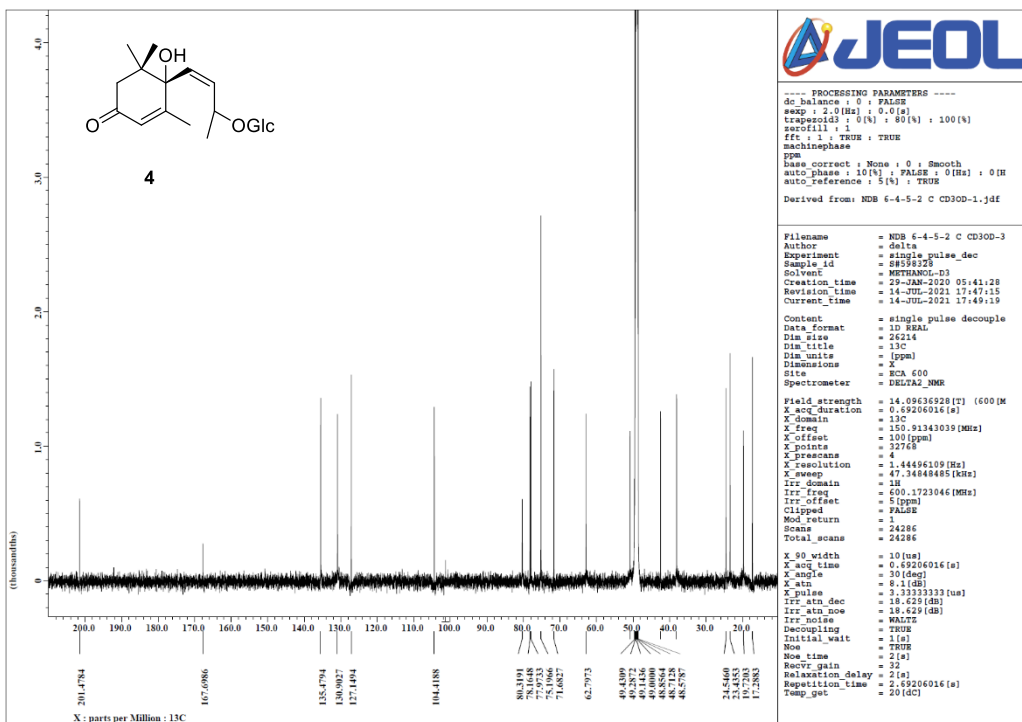


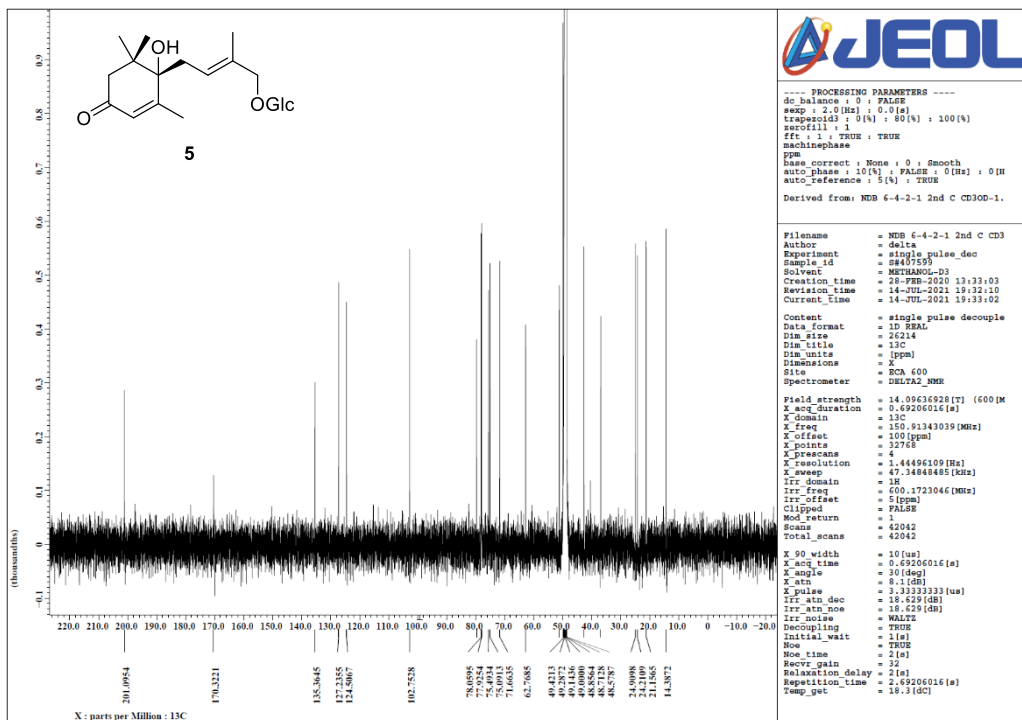
图 30  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 2



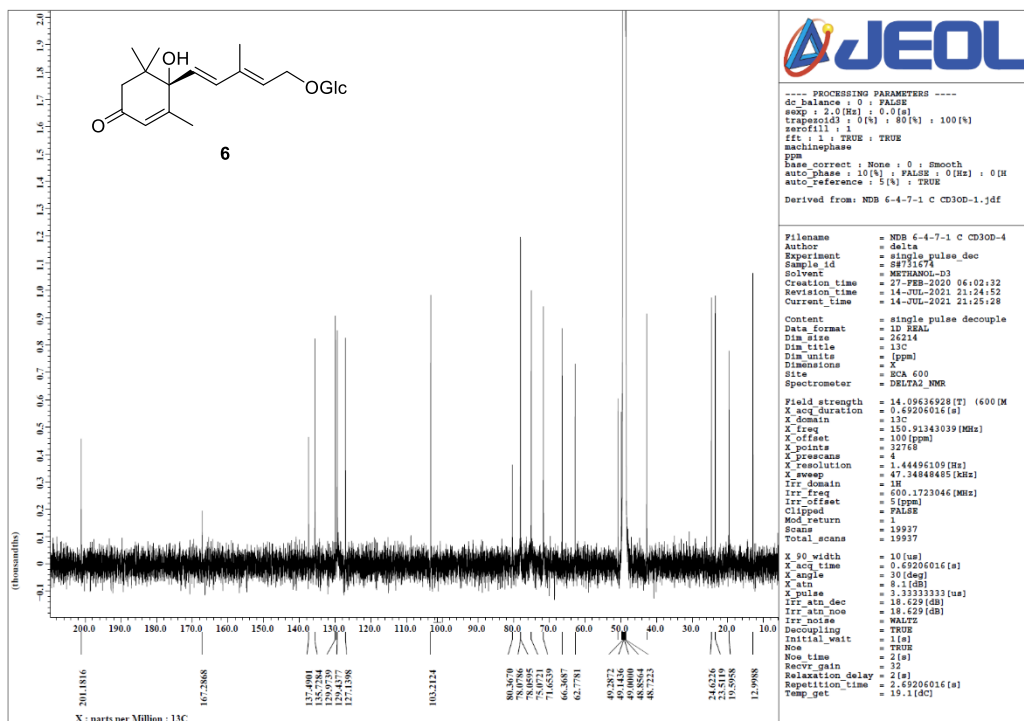
32  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3



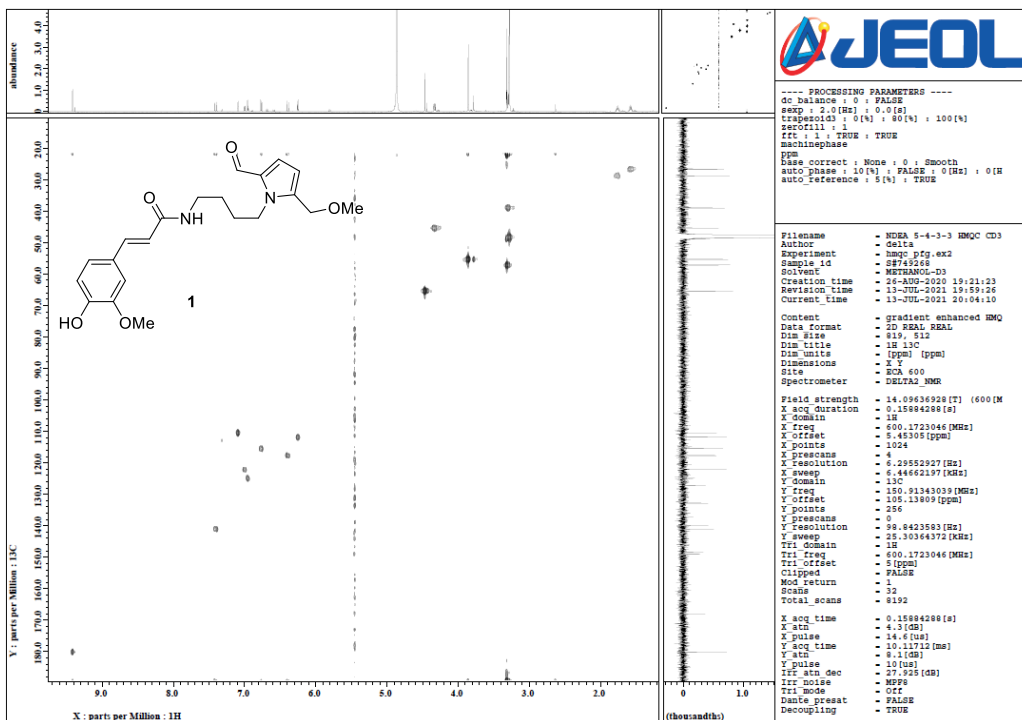
33  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4



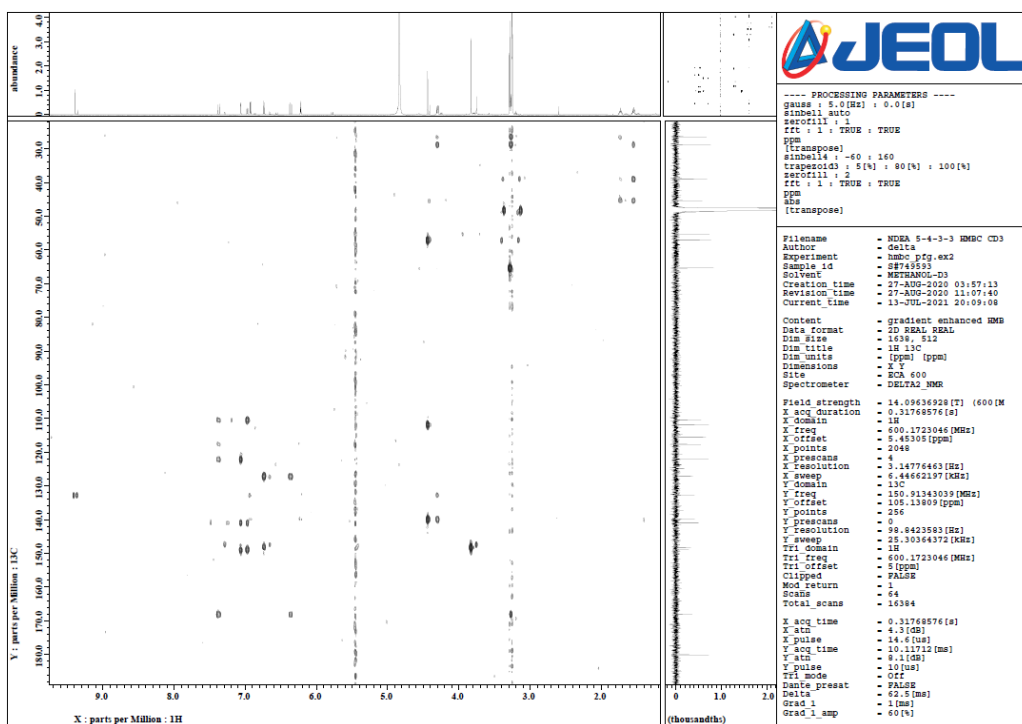
34 <sup>13</sup>C NMR spectrum of 5



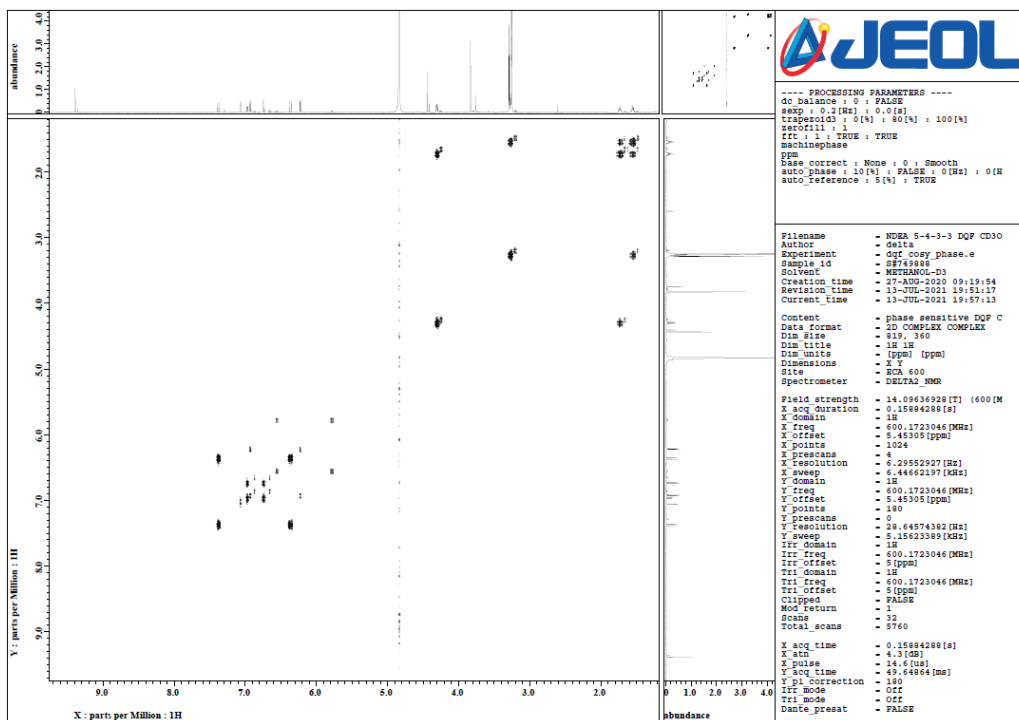
35 <sup>13</sup>C NMR spectrum of 6



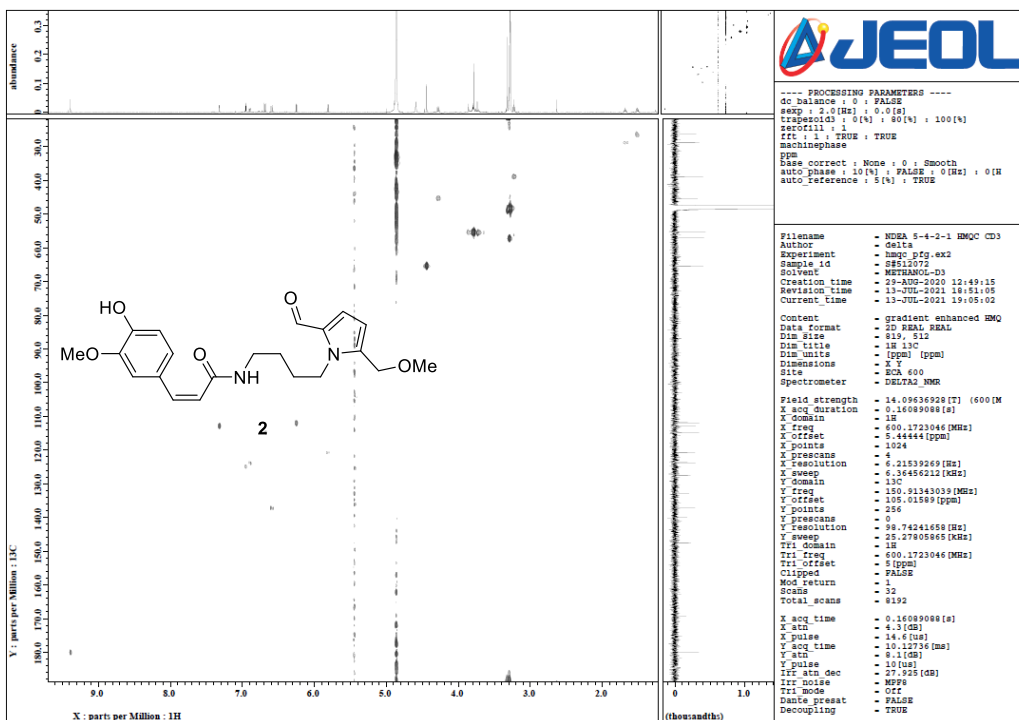
36 HMQC spectrum of 1



37 HMBC spectrum of 1

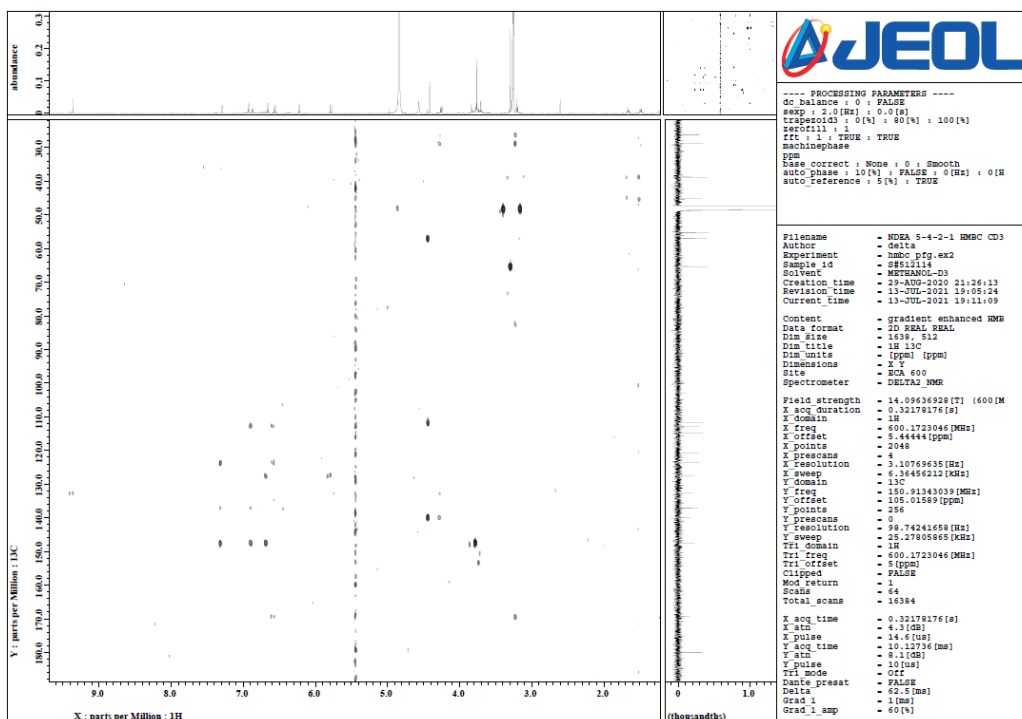


38 DQF COSY spectrum of 1

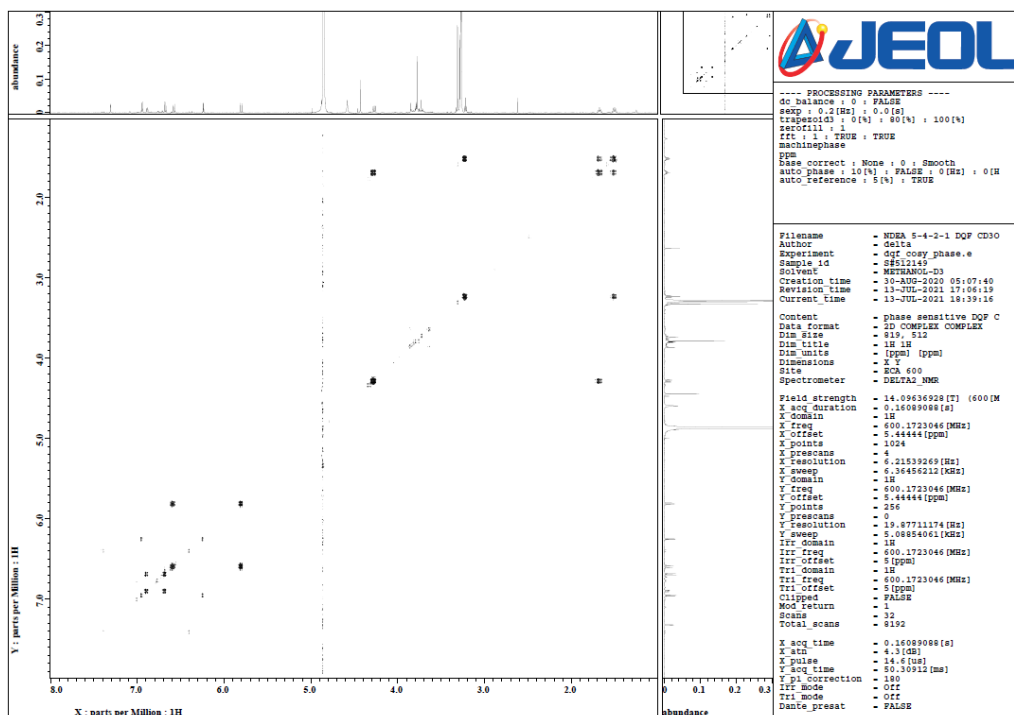


39 HMQC spectrum of 2

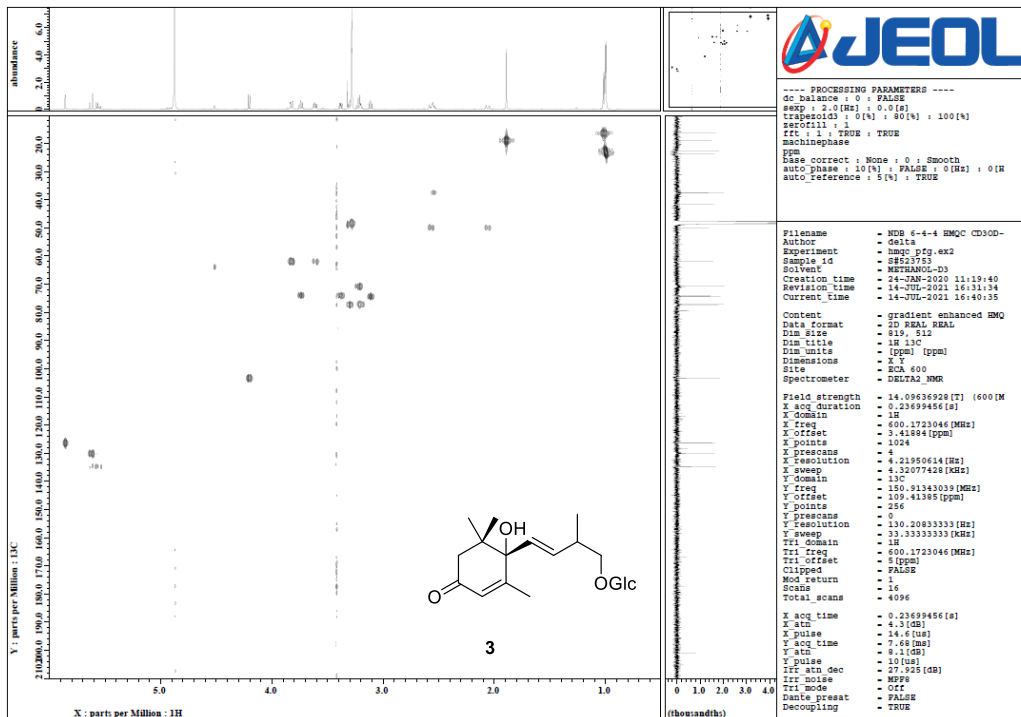




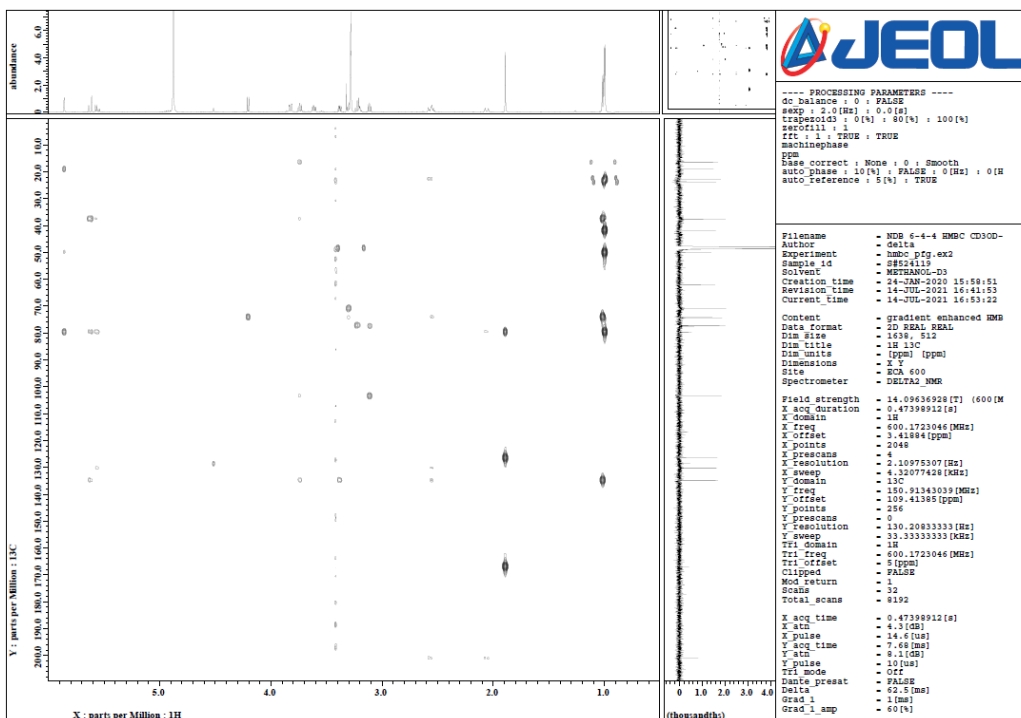
☒ 40 HMBC spectrum of 2



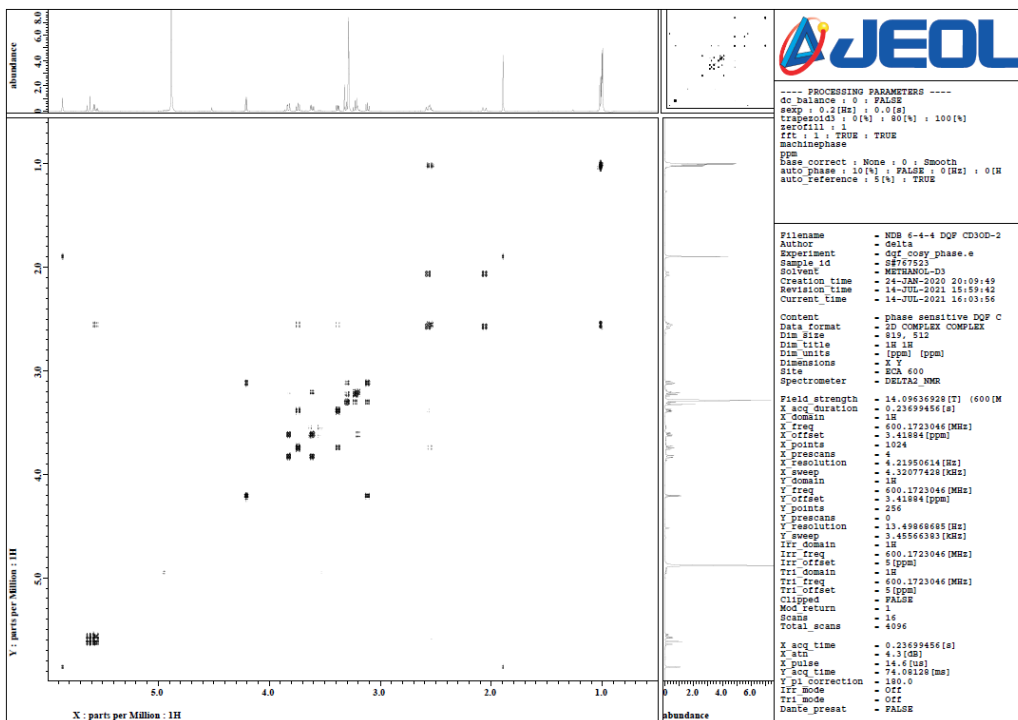
☒ 41 DQF COSY spectrum of 2



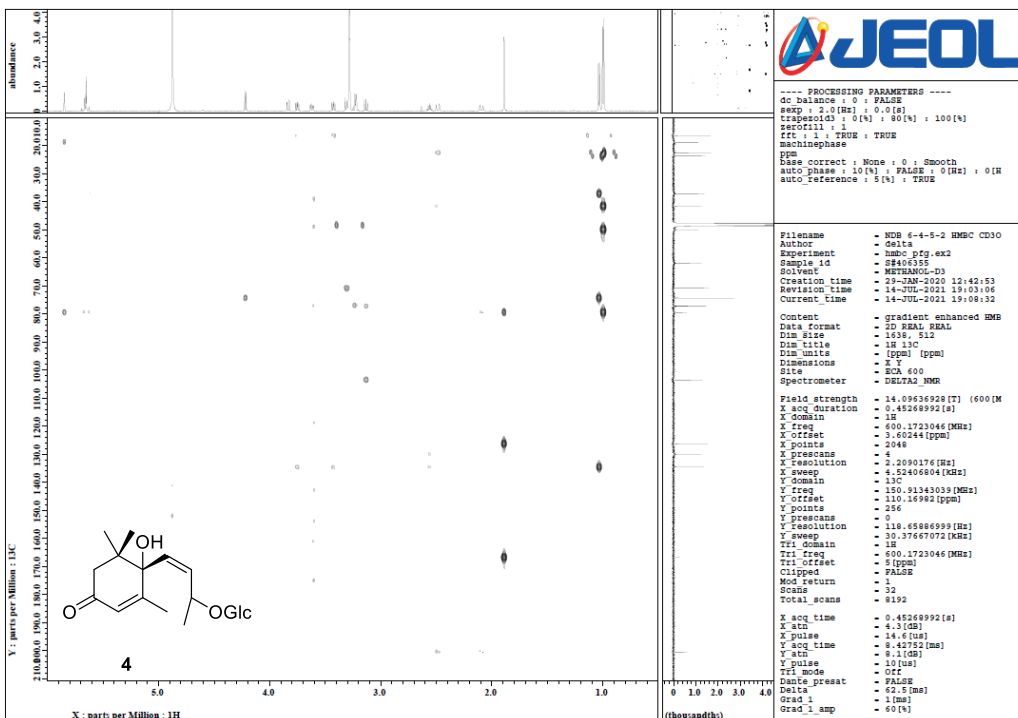
42 HMQC spectrum of 3



43 HMBC spectrum of 3



44 DQF COSY spectrum of 3



45 HMQC spectrum of 4

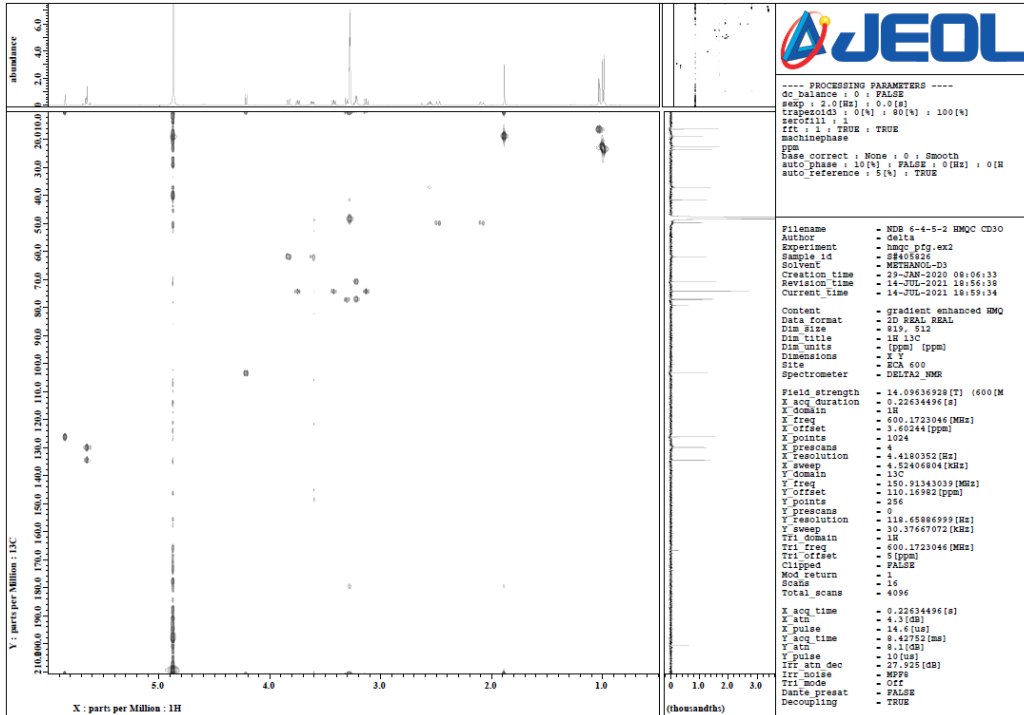


图 46 HMBC spectrum of 4

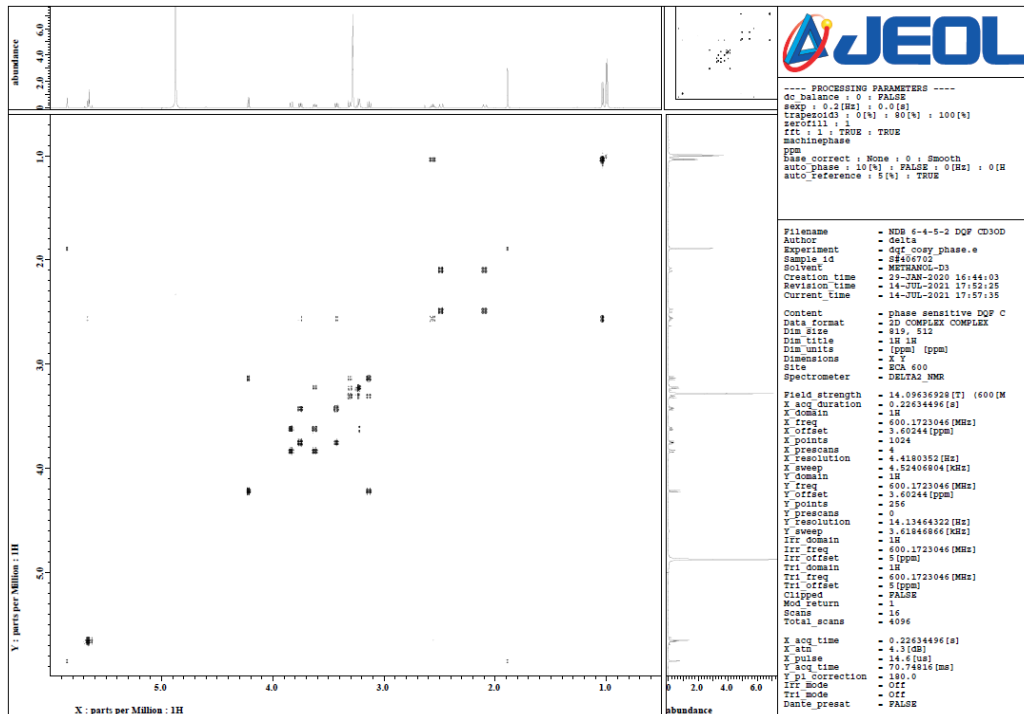
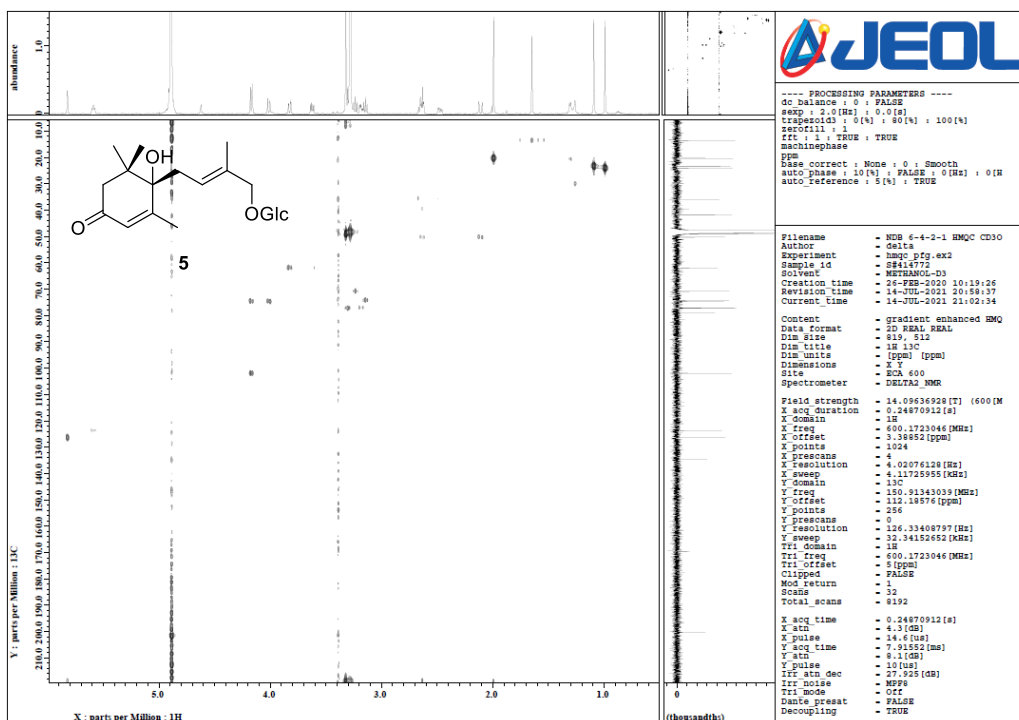
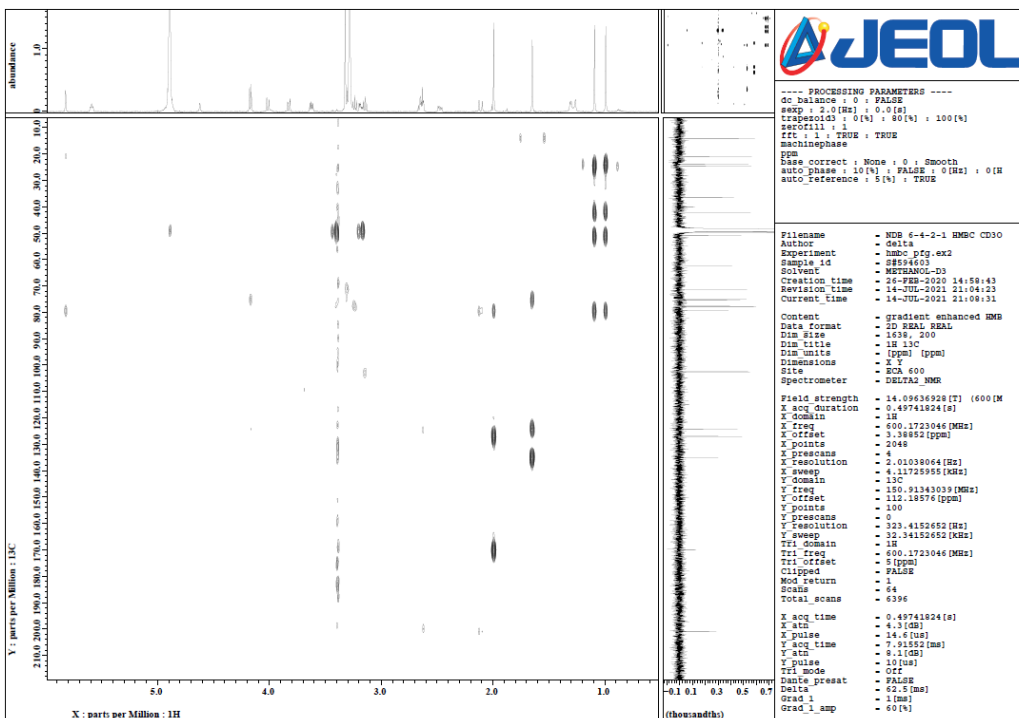


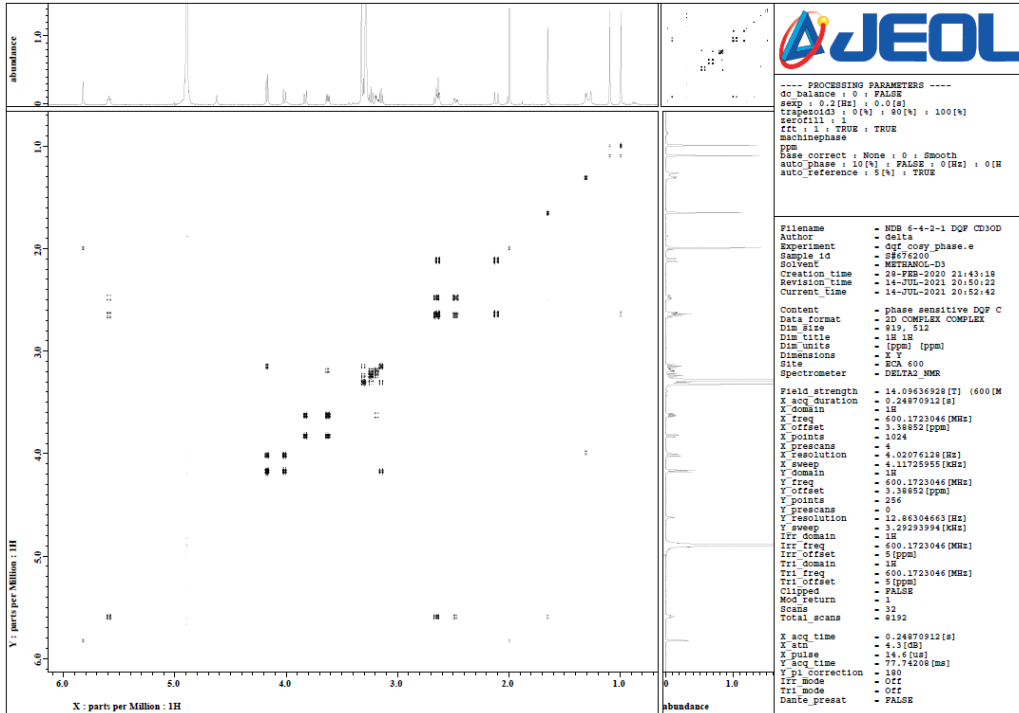
图 47 DQF COSY spectrum of 4



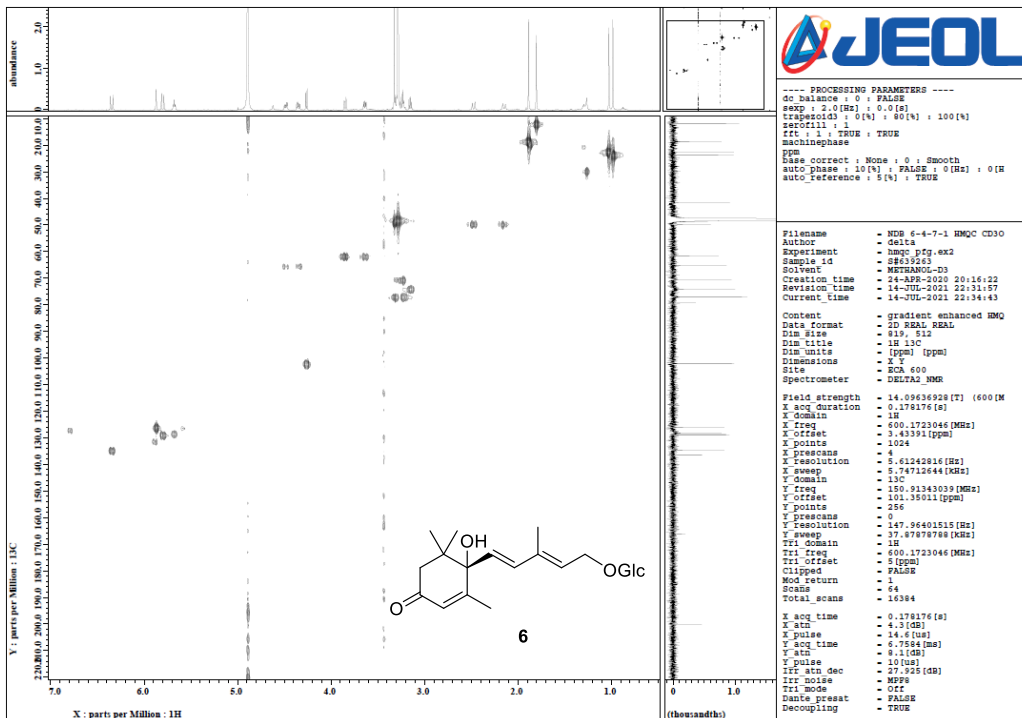
48 HMQC spectrum of 5



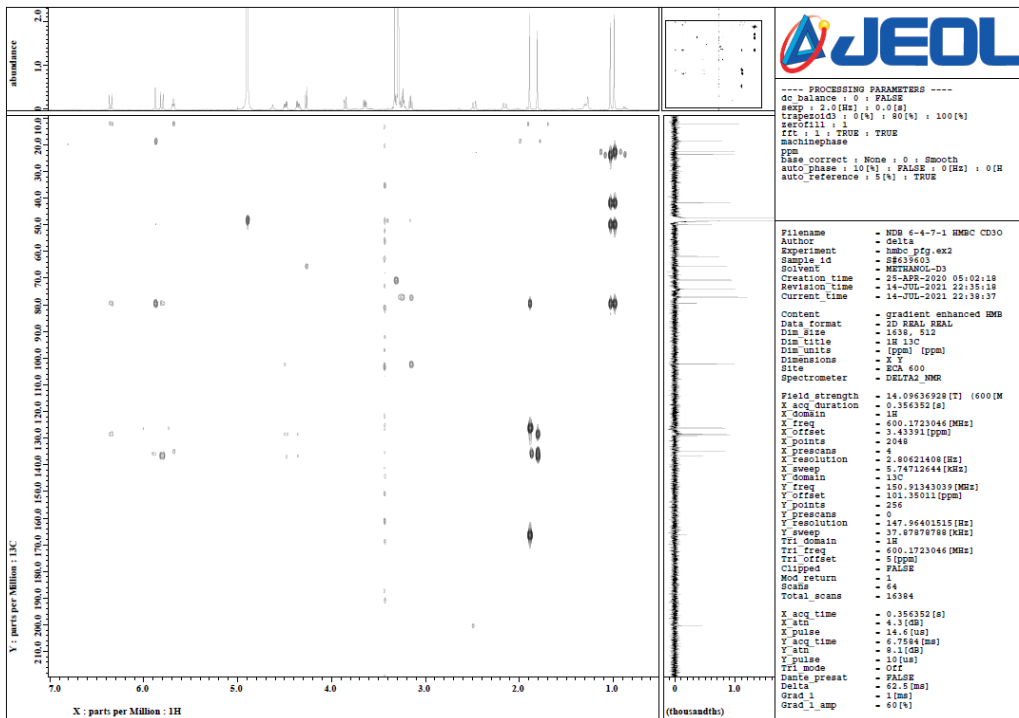
49 HMBC spectrum of 5



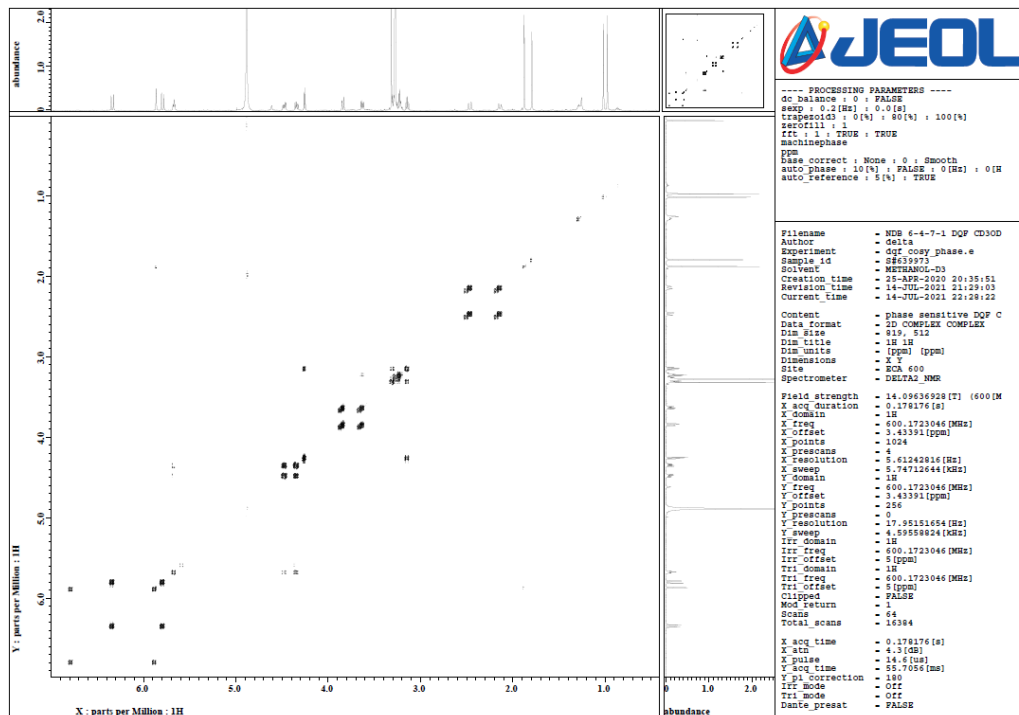
☒ 5D DQF COSY spectrum of 5



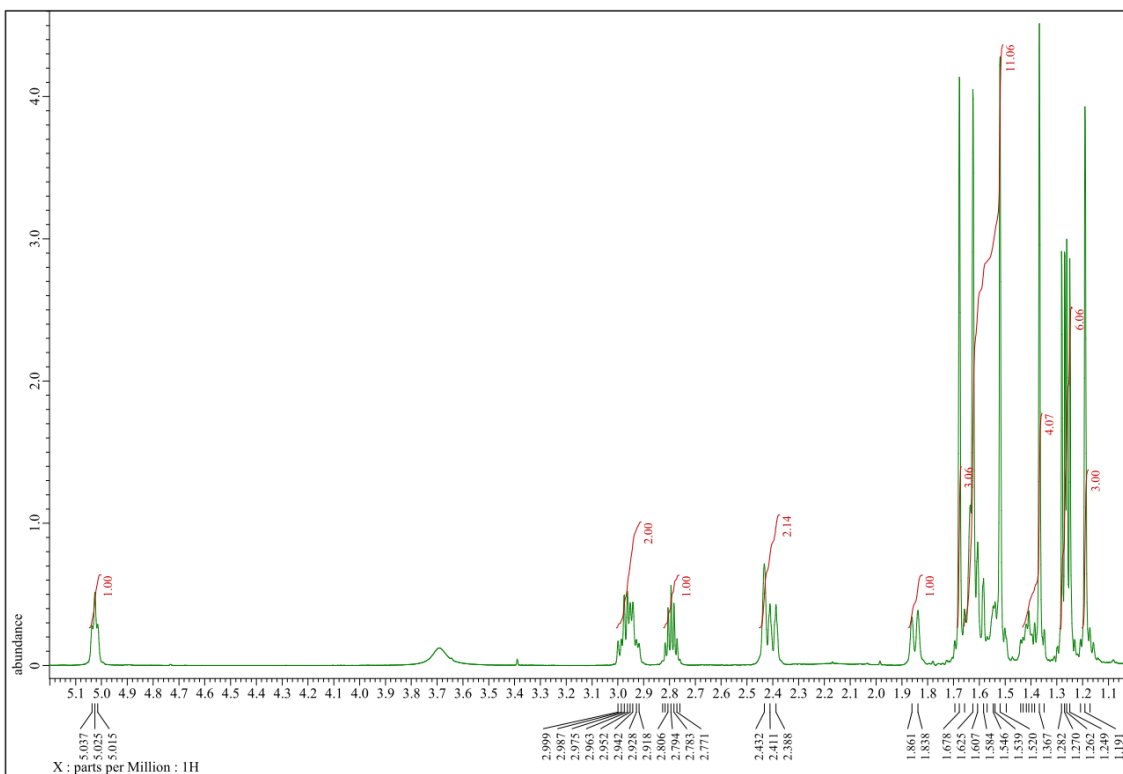
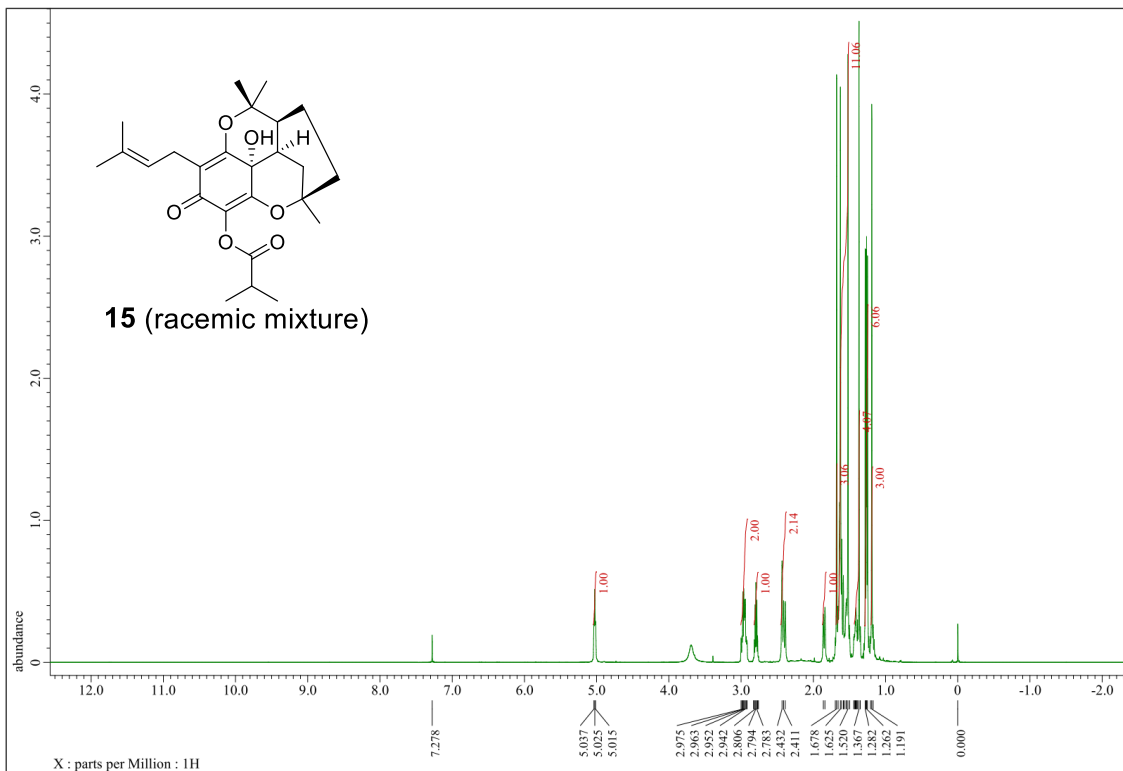
☒ 51 HMQC spectrum of 6



52 HMBC spectrum of 6

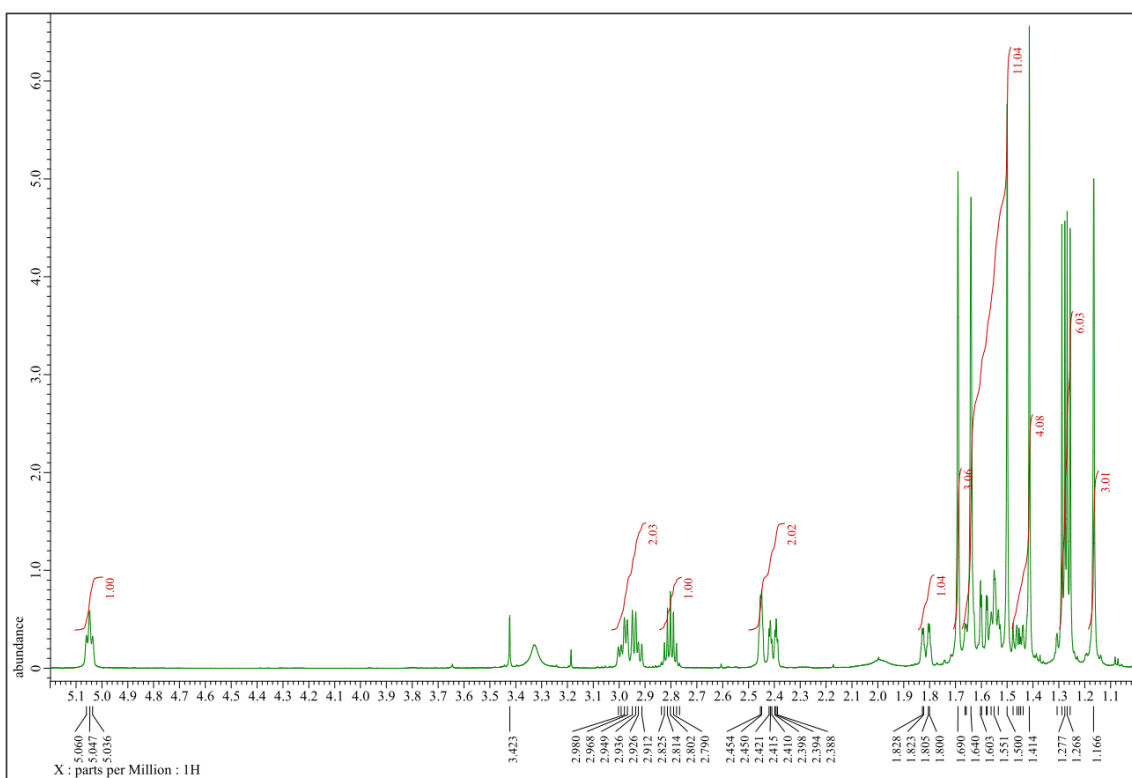
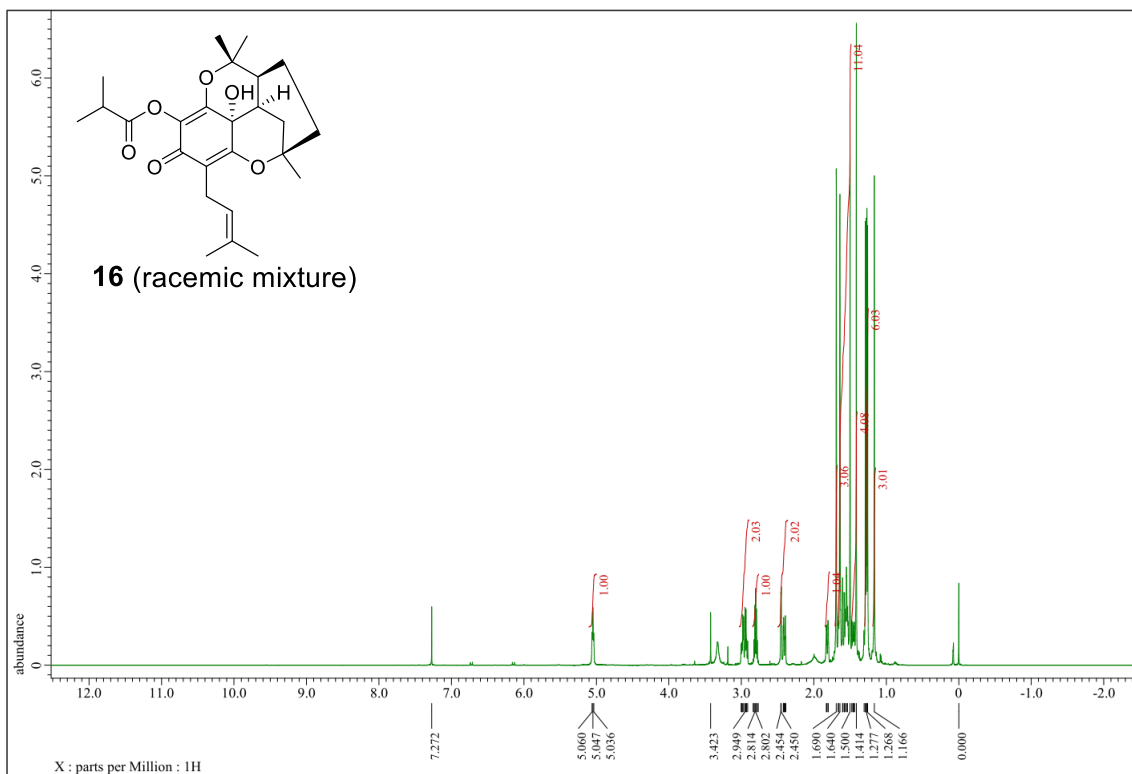


53 DQF COSY spectrum of 6



☒ 54 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 15





☒ **55**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **16**

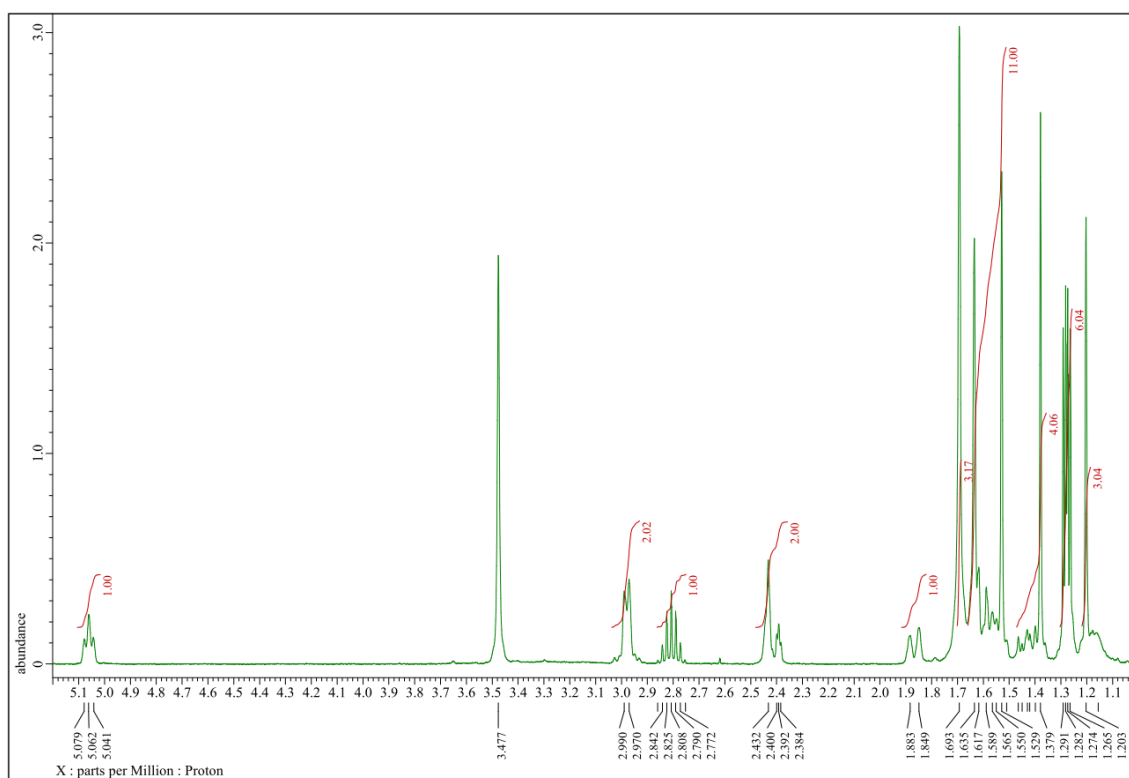
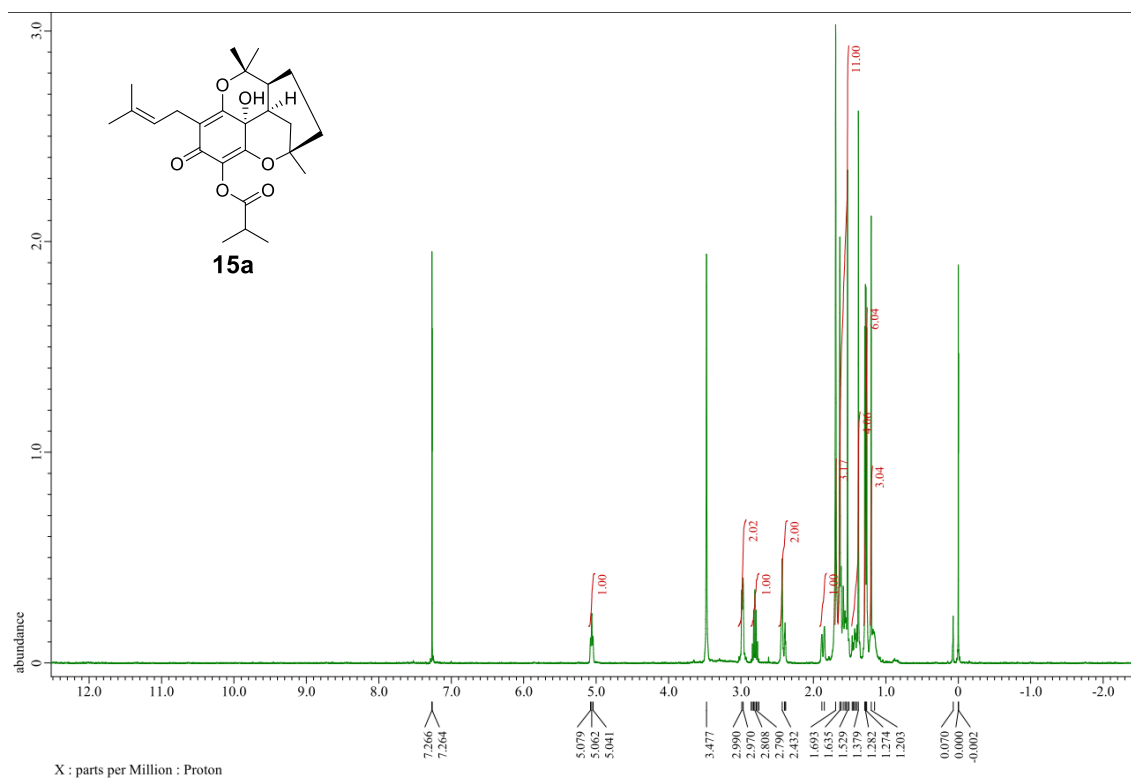
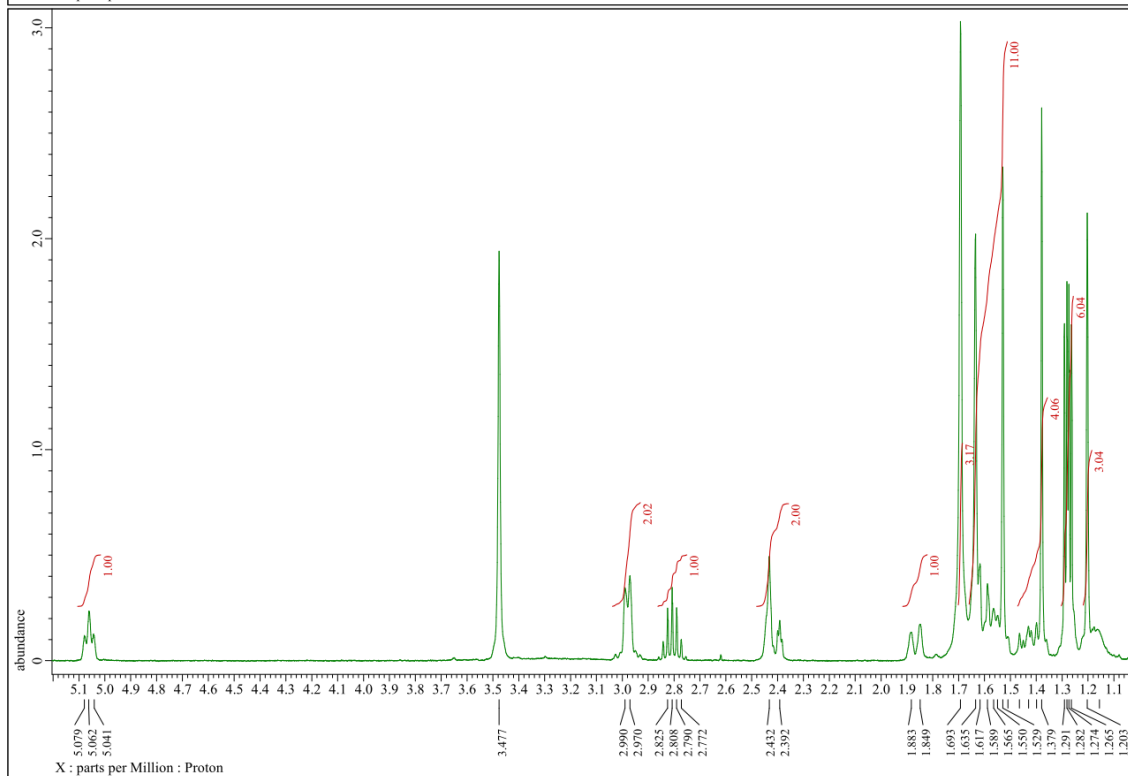
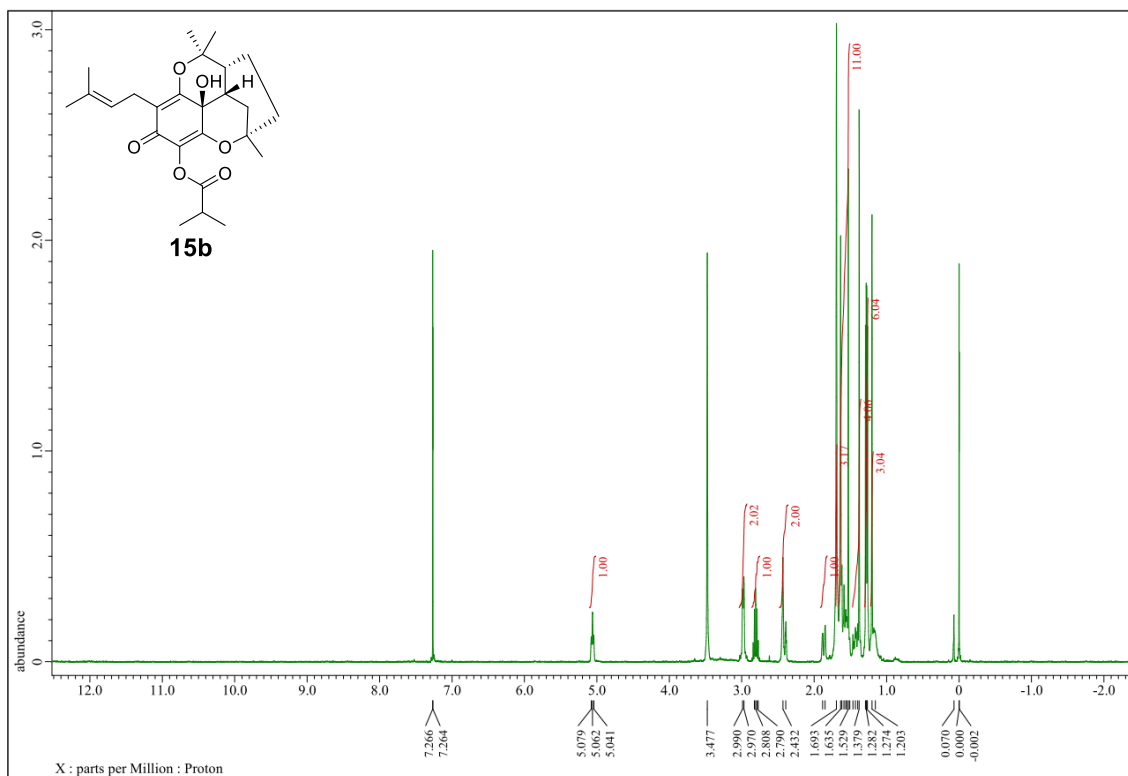
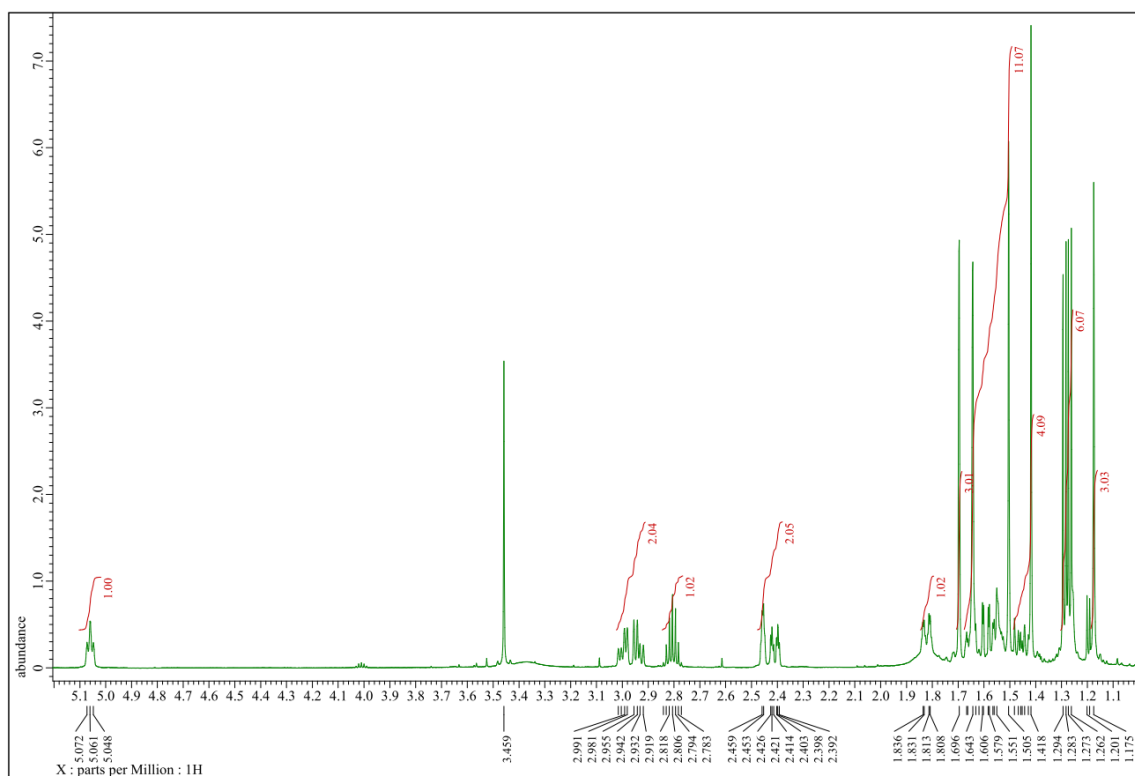
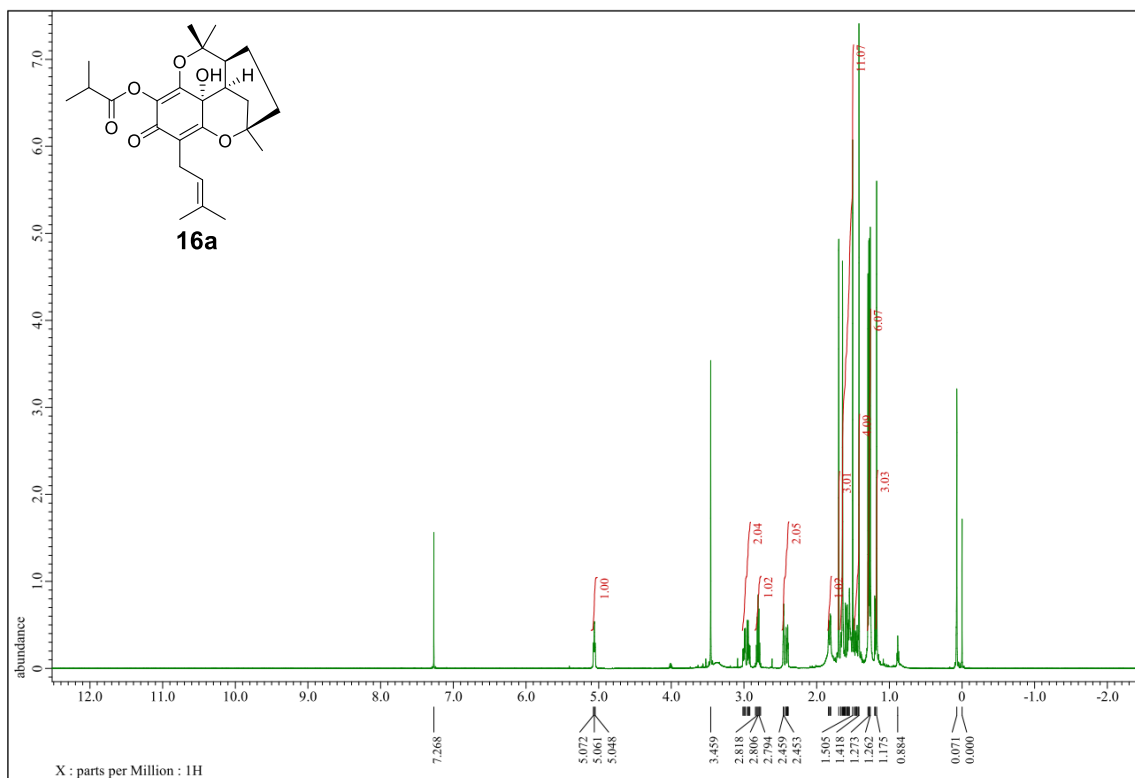


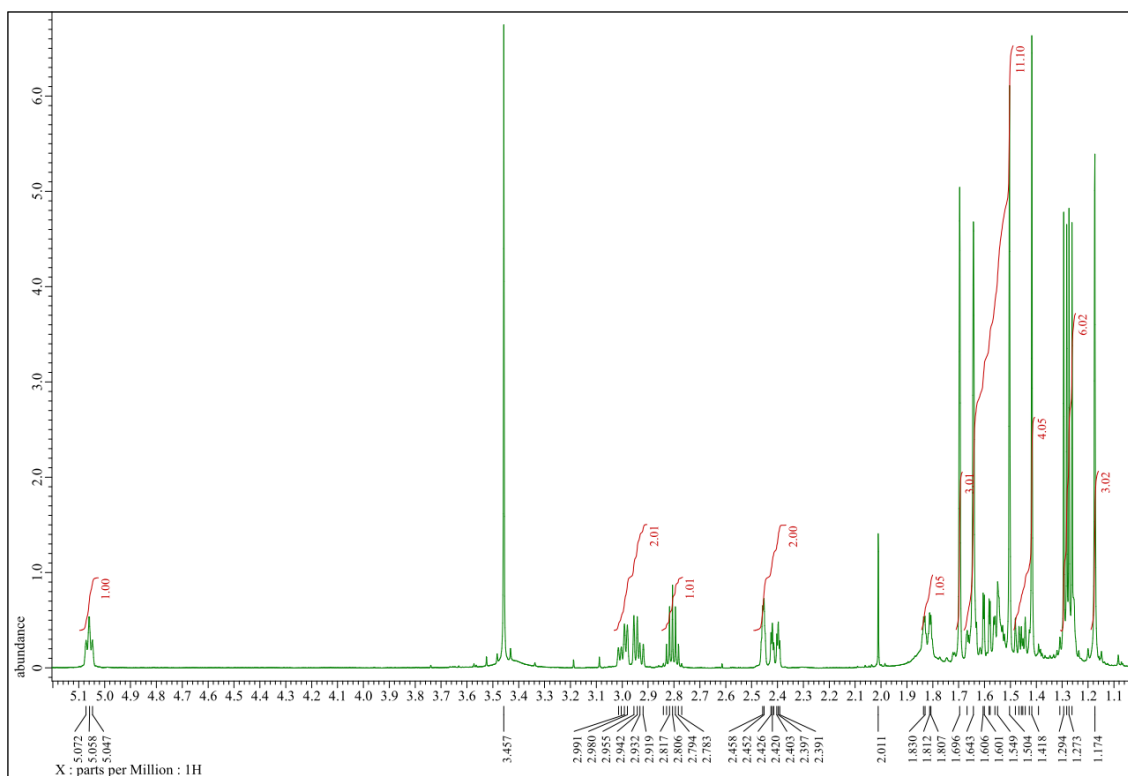
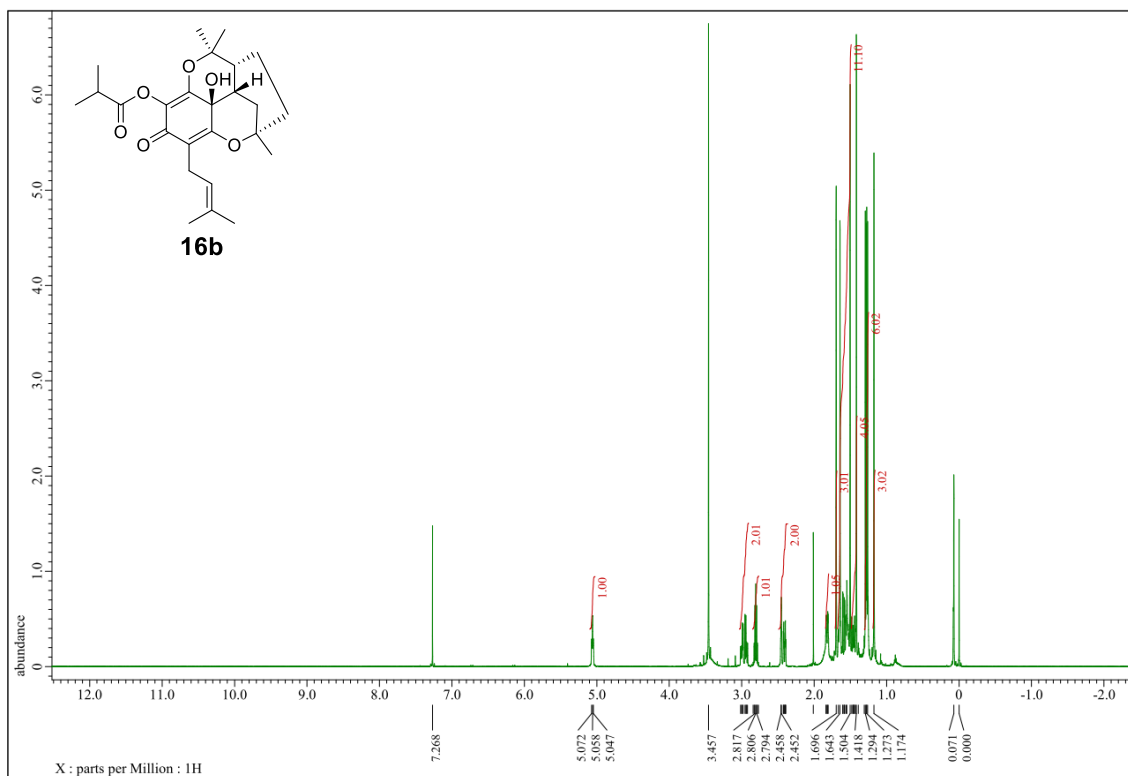
图 56  $^1\text{H}$  NMR spectrum of **15a**



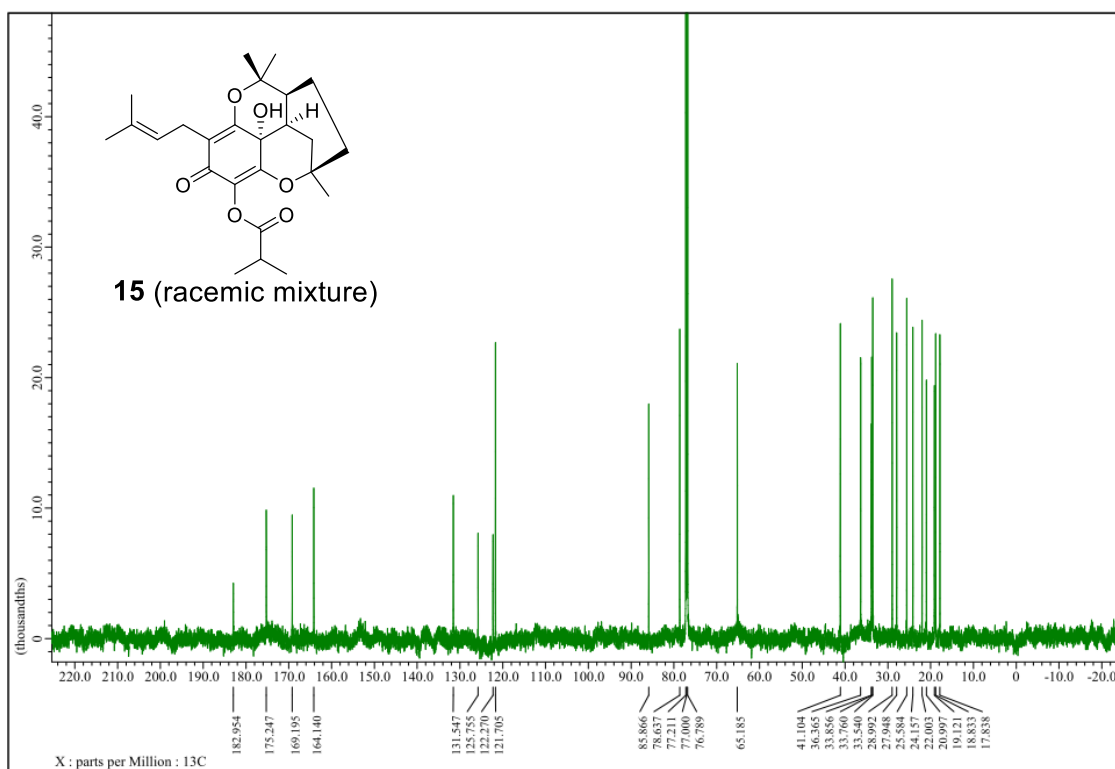
57 <sup>1</sup>H NMR spectrum of 15b



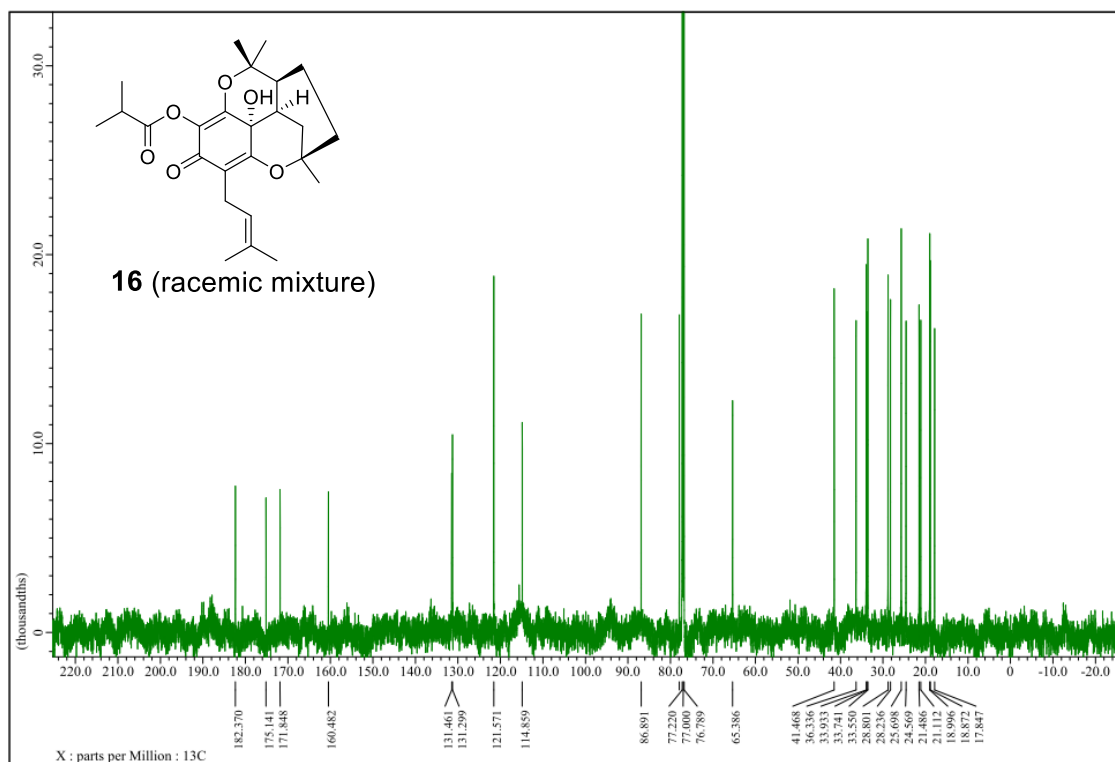
58  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 16a



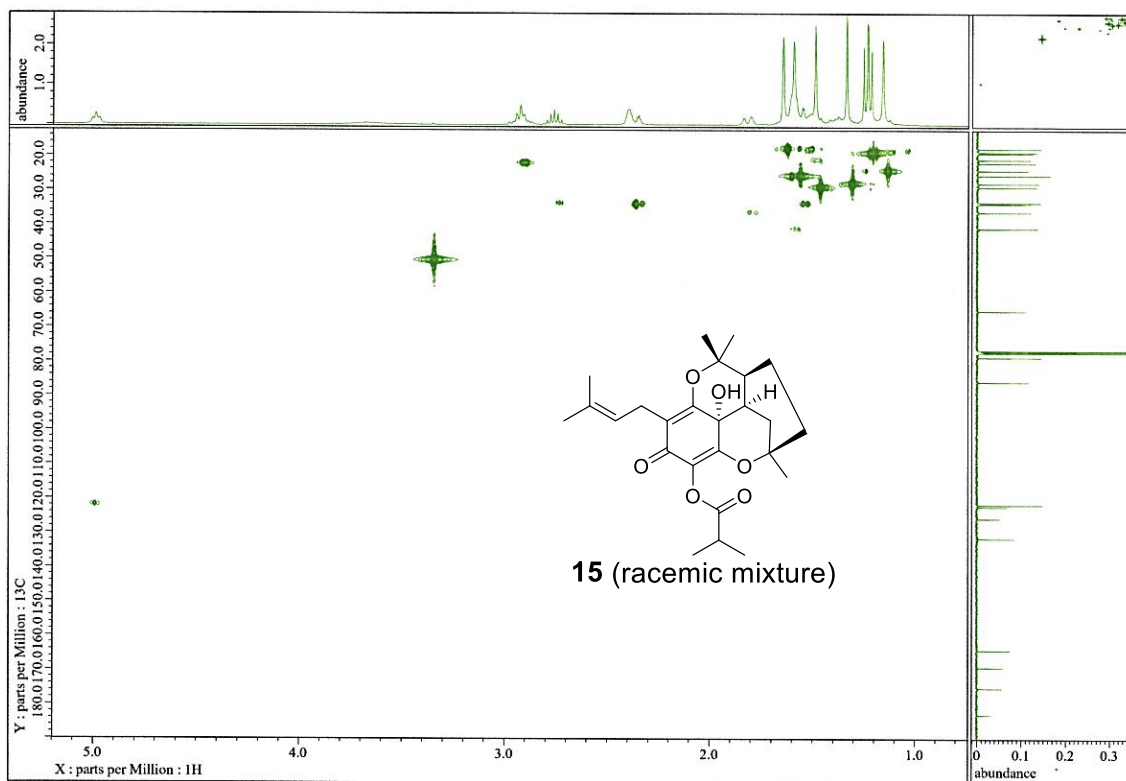
59  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 16b



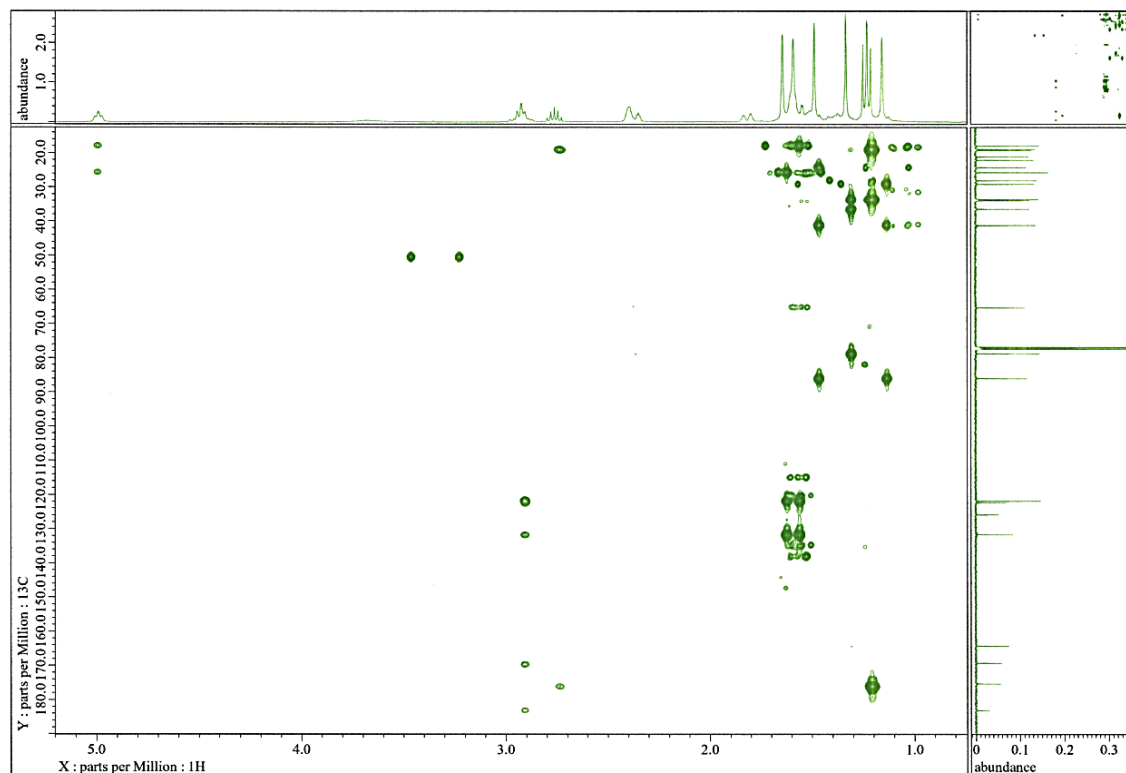
60 <sup>13</sup>C NMR spectrum of 15



61 <sup>13</sup>C NMR spectrum of 16



62 HMQC spectrum of 15



63 HMBC spectrum of 15

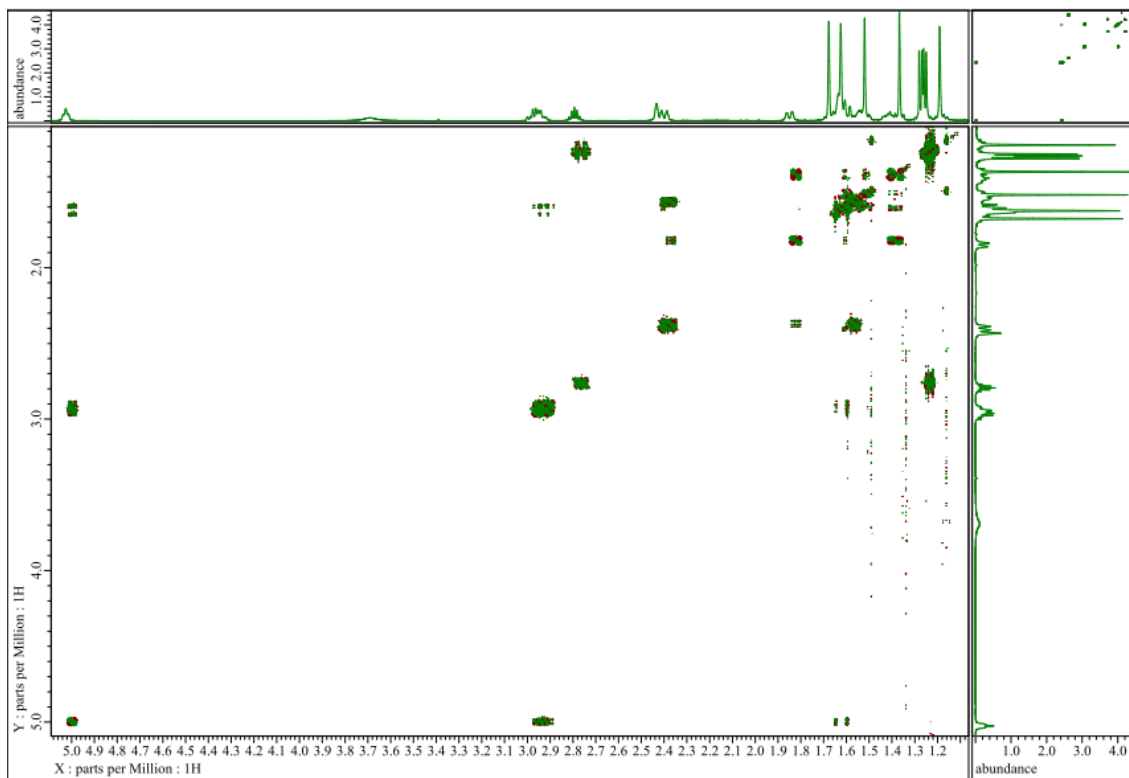


图 64 DQF spectrum of **15**

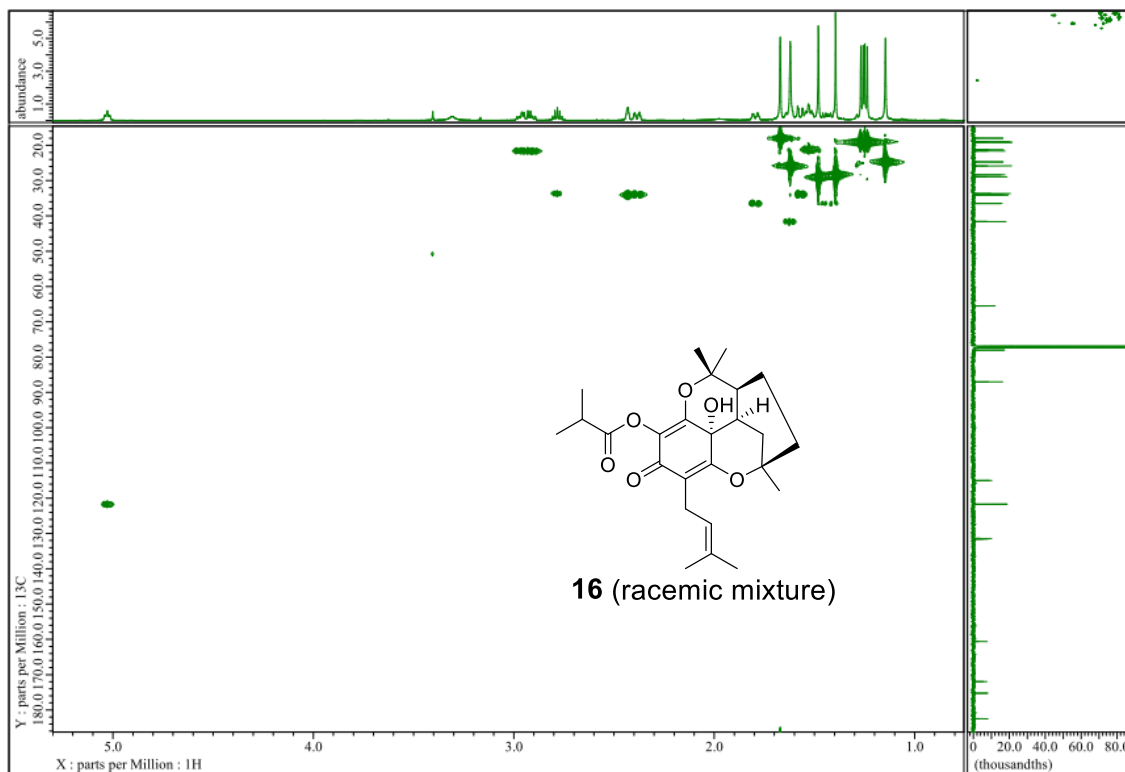
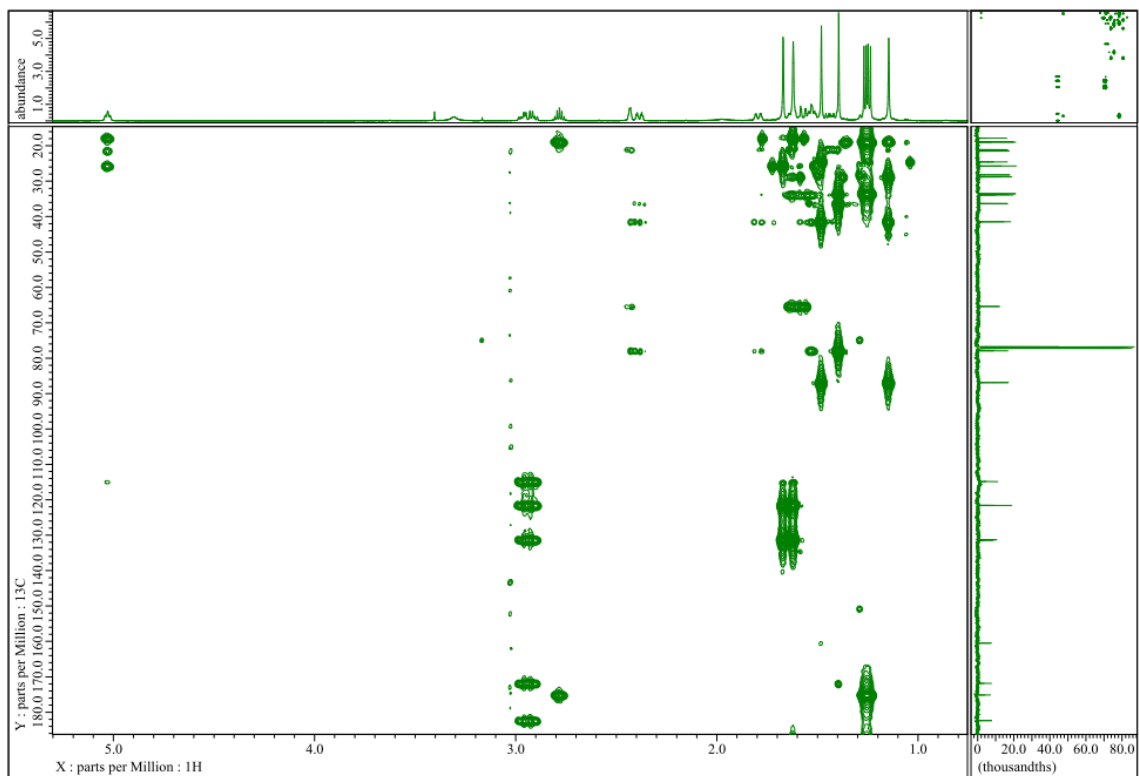
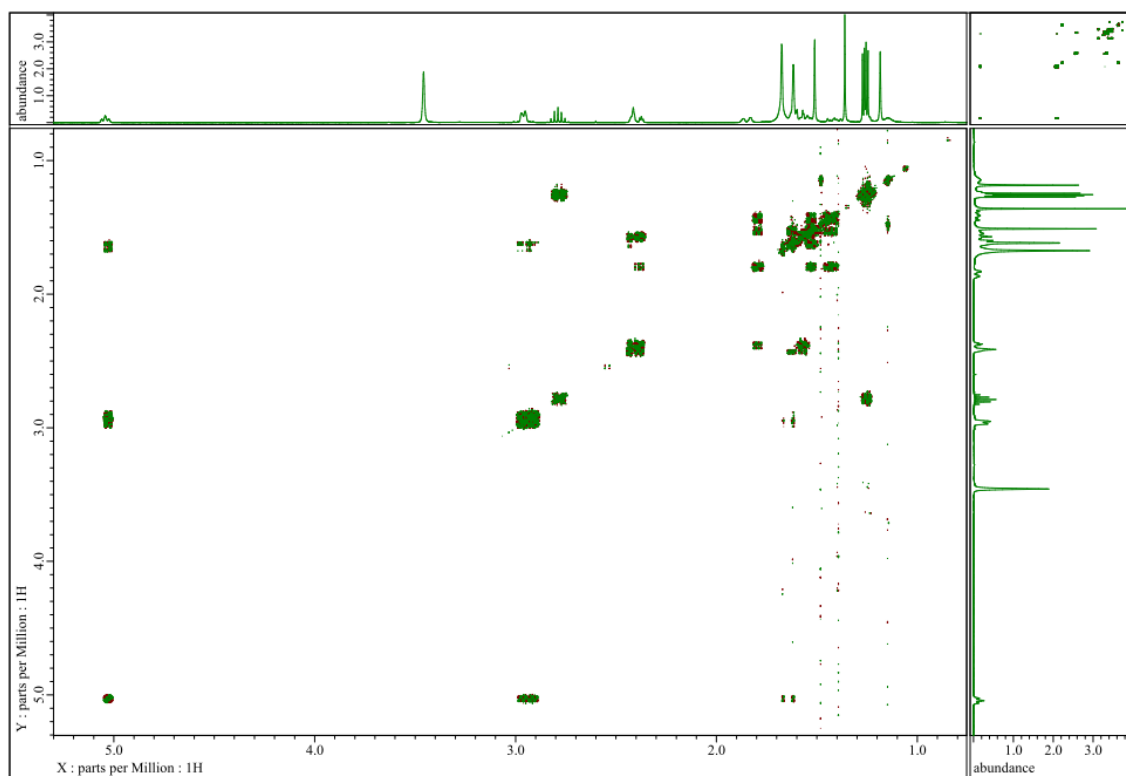


图 65 HMQC spectrum of **16**





66 HMBC spectrum of 16



67 DQF spectrum of 16