

2017 年度 課程博士学位論文

Nigella 属植物クロタネソウに含まれる oxazonigelladine および
damasterpene 類の単離・構造研究と抗 HSV-1 活性評価

小川 慶子

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Keiko Ogawa, Seikou Nakamura, Yumiko Asada, Masayuki Yamashita, Hisashi Matsuda. Oxazonigelladine and dolabellane-type diterpene constituents from *Nigella damascena* seeds. *Tetrahedron*. **2017**, 73, 7054–7060. [第 1 章]
- 2) Keiko Ogawa, Seikou Nakamura, Kohei Hosokawa, Hanako Ishimaru, Natsuki Saito, Kaori Ryu, Masahiro Fujimuro, Souichi Nakashima, Hisashi Matsuda. New diterpenes from *Nigella damascena* seeds and their antiviral activities against herpes simplex virus type-1. *J. Nat. Med.* **2018**, 72, 439–447. [第 1 章, 第 2 章]

目次

序章.....	1
本論.....	7
第一章 クロタネソウ (<i>Nigella damascena</i>) 成分の単離と構造決定.....	7
第一節 クロタネソウ (<i>N. damascena</i>) 種子含有成分の抽出および成分単離.....	7
第二節 クロタネソウ含有成分の化学構造.....	10
第一項 新規成分 oxazonigelladine (1) の化学構造.....	10
第二項 Oxazonigelladine (1) の化学的安定性についての考察.....	11
第三項 新規成分 damasterpene 類 (2-9) の化学構造.....	13
第二章 単離化合物の生物活性評価.....	32
第一節 単離化合物の抗単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 活性.....	32
第二節 ヘルペスウイルスに関する機能性物質.....	41
結 論.....	45
謝 辞.....	47
実験の部.....	48
第一章の実験.....	49
第二章の実験.....	94
引用文献.....	96

序章

過去から現在に至るまで、天然物化学は医薬品開発に多大なる貢献を果たしてきた。近年はペプチド性医薬品や抗体医薬品、ワクチンのような生物学的製剤の開発が盛んであり、低分子化合物をターゲットにした創薬研究は一見下火になっているように思われる。しかしながら 1981 年から 2014 年までに承認された全 1562 種の新薬において、“天然物”及び“天然物誘導体”であるものは 396 種 (25.3%) であり全体の約 4 分の 1 を占めている (Figure 1)。さらに天然物の骨格やファーマコフォアをモデルに設計された“天然物様医薬骨格”も加味すると、791 品目 (50.6%) の医薬品が天然物の貢献により開発されており、現代においても天然物化学は医薬創出率の向上に大きく寄与していることが窺える¹⁾。

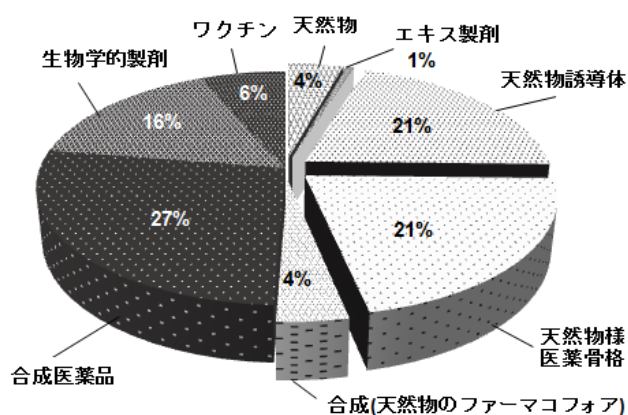


Figure 1. Ratio of natural products in new drugs approved over last 30 years (1981-2014, $n=1562$)¹.

創薬を志向した際の天然物が有する構造的な利点として、①環構造を多く有すること、②一分子中に多くのキラル炭素を有すること、③高度に酸素官能基を有する化合物が得られることが挙げられる^{2,3}。天然物は高い割合で環構造を有することが知られているが、なかでもヘテロ環や架橋構造、スピロ環といった複雑な縮環構造をもつ特徴的な化合物が報告されている。これらの環構造の存在により天然物は合成医薬品と比べてより堅固な構造特性を有し、また多くのキラル中心を持つ。これらの特性は標的特異性や水溶性、生体適合性といった医薬品として有利に働く特性と強く関連することが期待される²。さらに、天然物は合成化合物に比して酸素官能基を多く有することも知られている。これらの特性は標的タンパク質と化合物間の水素結合におけるドナーやアクセプターとしてはたらくことが期待される⁴。一般に、化合物一分子中の酸素原子が多ければ脂溶性の低下が予測されるが、天然物は創薬領域において基礎的な経口バイオアベイラビリティの指標であるリピンスキーの法則⁵に則らない場合があることが報告されている^{6,7}。すなわち、一般的には酸素や窒素を一分子中に 5 つ以上有する化合物は吸収が困難であると予測されるが、天然物ではこのような問題を回避できる可能性がある。以上の特性を踏まえ、Feher らは医薬品、コンビナトリアルケミストリー、天然物についてそれぞれの構造の多様性をコンピュータ計算により点数化して比較している⁸。その結果、医薬品の構造多様性に比べコンビナトリアルケミストリーは構造多様性の幅が狭いのに対し、天然物は医薬品と同程度もしくはそれ以上の構造多様性を示すこと

が明らかとなった。現在、創薬領域における有機合成的アプローチとしてコンビナトリアルケミストリーが知られているが、天然物の構造を参考にする事でコンビナトリアルケミストリーにより作られる化合物の多様性を広げ、また生物活性の予測が容易になることが期待される^{8,9}。以上のように、天然物およびその骨格は医薬品開発において候補化合物の可能性を拡げる役割を果たしており、したがって複雑な骨格を持つ天然物の探索は創薬領域において今日においても重要であると考えられる。そこで、著者は天然物の構造的利点を反映した化合物を天然物から開拓し、その機能性の解明を試みた。具体的には、構造中の複数のキラル中心、多環式の構造、ヘテロ原子を反映した化合物として、高度に酸素官能基を有するジテルペンおよびジテルペンアルカロイドの単離精製・化学構造決定を計画した。

高度に酸素官能基を有するジテルペンおよびジテルペンアルカロイド探索の素材としてキンポウゲ科植物 (Ranunculaceae) を選択した。キンポウゲ科植物はアコニチンをはじめ珍しいテルペンアルカロイドを産生する植物群として知られている¹⁰。また、オウレン (*Coptis japonica*) やトリカブト (*Aconitum carmichaeli*)、サラシナショウマ (*Cimicifuga simplex*) など代表的な薬用植物を含む科であることから、その薬理活性評価においても生体機能性成分を見出す可能性が高いと推察した。特にキンポウゲ科植物の中でもニゲラ属植物は、伝承薬として親しまれる植物を含む点や、これまでの報告において複雑な骨格を有する化合物の報告例がある点¹¹⁻¹³から成分探索研究の素材として優れていると判断した。代表的なニゲラ属植物であるニオイクロタネソウ (*Nigella arvensis*) はその種子に特徴的な構造を持つアルカロイド^{10, 14-16}や多様な生物活性を示す機能性物質^{17, 18}が含まれていることが報告されている。その一方で、クロタネソウ (*Nigella damascena*) は、その含有成分や機能性についてほとんど検討されていない植物であった。このことから、著者はクロタネソウの種子を素材に成分探索研究を行うことで、未開拓な複雑骨格を有する化合物が得られるのではないかと推測した。

クロタネソウ (*N. damascena*) はキンポウゲ科ニゲラ属に分類され、南ヨーロッパを原産とする一年草である。春になると色とりどりの花を咲かせるため、現在では世界中で園芸品種として親しまれている (Figure 2)。しかしながら薬用としての使用経験はなく、その含有成分や生体機能性に対する報告はあまりなされてはいなかった。これまでに含有成分として、種子よりアルカロイド¹⁹、花部よりフラボノール配糖体²⁰、全草よりフェノール性化合物^{21, 22}が種子よりセスキテルペン²³が報告されている (Figure 3)。薬理作用としてはフェノール性化合物においてエストロゲン様作用²⁴や抗微生物作用²⁵が検討されているが、いずれもその活性は強いものではなかった。

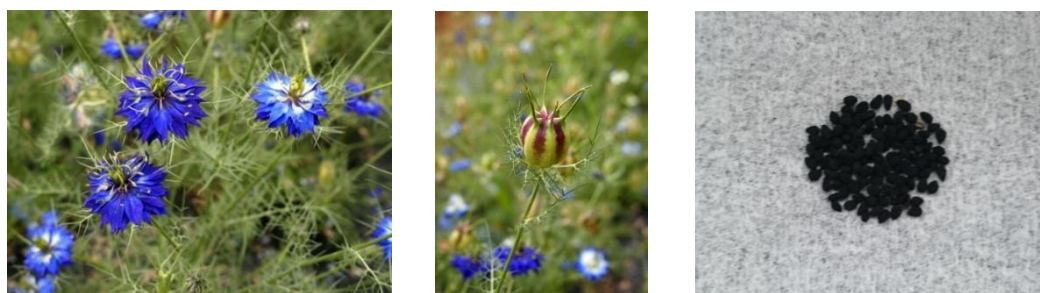


Figure 2. Flowers (left), flower buds (center), seeds (right) of *N. damascena* (variety: Moody Blues).

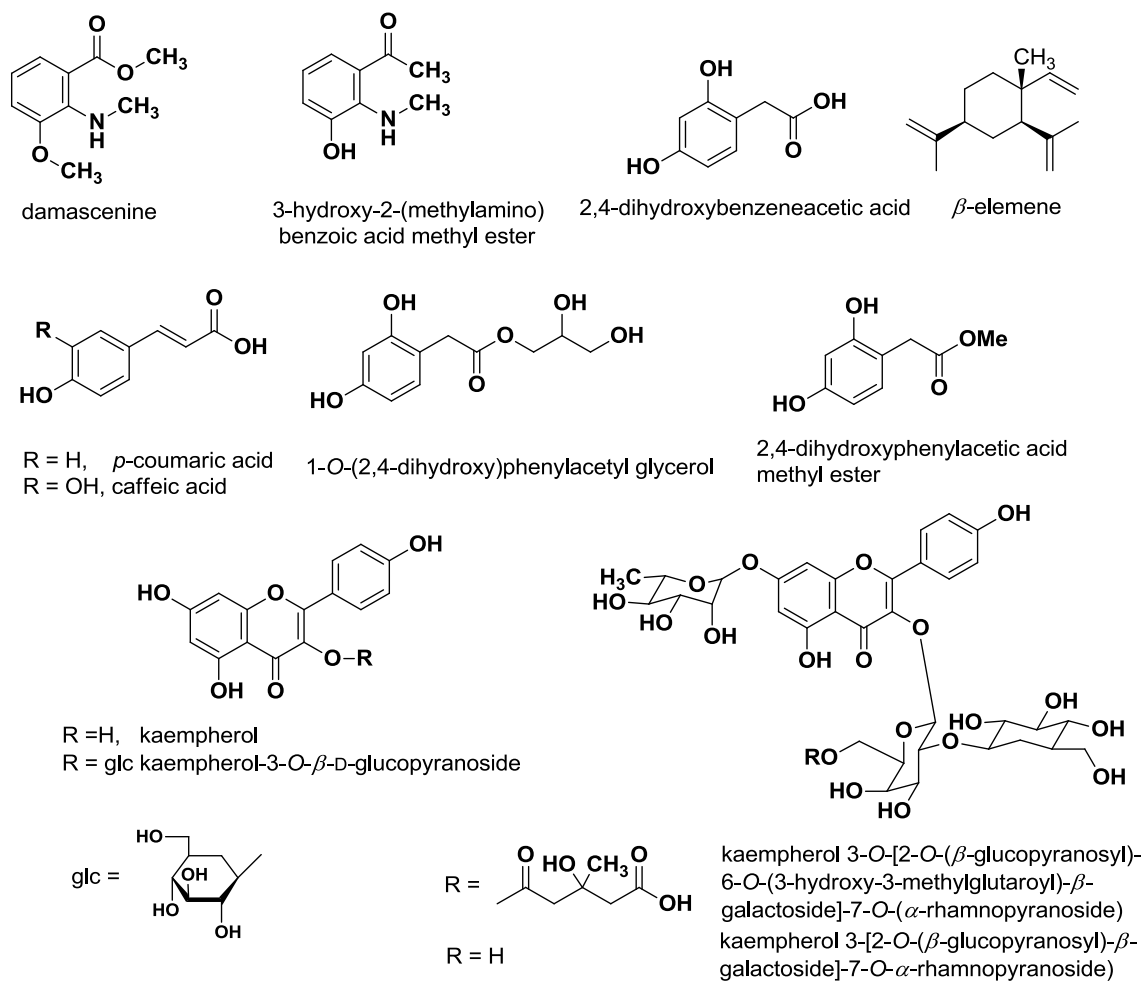


Figure 3. Known compounds from *Nigella damascena*.

また、クロタネソウ種子含有成分と含有成分の化学構造や生物活性を比較する目的で、ニオイクロタネソウに含有される主要ジテルペンについても単離精製を計画した。

ニオイクロタネソウはキンポウゲ科ニゲラ属に属する地中海沿岸を原産とする一年草である。古くから薬用または食用として用いられており、インドでは通経や母乳分泌作用を期待して用いられ、エジプトでは鎮咳作用や利尿、駆風作用を目的に使用されていた²⁶。現在でも種子はサプリメントとして鎮痛作用や抗糖尿病作用などを期待して販売されている。ニオイクロタネソウの含有成分としてはアルカロイド^{14, 16}、テルペン^{27, 28}、サポニン²⁹⁻³¹などが知られている。特にアルカロイドはインダゾール骨格を持つ化合物^{11, 16, 32}が報告されており、この骨格はニゲラ属以外からの報告例がない。また、薬理作用においてもよく研究されており、これまでに抗炎症作用^{33, 34}、抗糖尿病作用³⁵、抗腫瘍作用^{34, 36}および抗酸化作用^{34, 37}などの薬理作用の報告がある。

ところで、天然物の構造的利点を活かした化合物は有機合成的手法では得難いため、その機能性が未解明な化合物群が多く存在する。このような化合物の機能性を明らかにすること

は天然物化学の命題である．そこで，昨今新たな治療薬の開発が強く求められている単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) に焦点を絞った．

HSV-1 はヘルペスウイルス科 (*Herpesviridae*) に属しエンベロープとカプシドを持つ DNA ウィルスである．WHO は全世界で 50 歳未満の約 37 億人 (67%) の人間が HSV-1 に感染していると推計しており³⁸，現代社会に根差した感染症である．HSV-1 は主に口唇や皮膚で発病し初感染後は神経節に潜伏し，宿主の体力が低下した際に再活性化する日和見感染を起こす特徴を持つ³⁹．HSV-1 が引き起こす症状として口唇ヘルペスがよく知られているが，その他にも角膜炎や皮膚炎，ヘルペス性脳炎といった症状を呈することもある．なかでもヘルペス性脳炎は無治療の場合 70%~90% の致死率であり極めて重篤な症状である⁴⁰．また，HSV-1 による角膜炎では重症化し失明に至ったケースも報告されている^{41,42}．現状では潜伏感染期のウィルスに有効な治療薬は存在していないため，単純ヘルペスウイルス感染は大きな健康問題となっている．

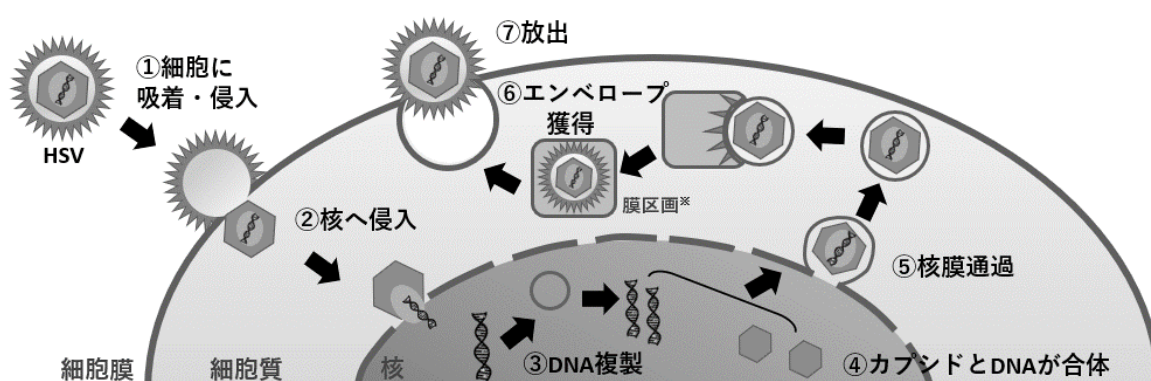


Figure 4. Lifecycle of HSV-1⁴⁰.

Figure 4 に HSV-1 のライフサイクルの概略を示した⁴⁰．

単純ヘルペスウイルスは他のウィルスに比べて比較的複雑な生活環を持っているため，現在臨床応用されている治療薬は全て DNA 複製を阻害するものに限られている．具体的には，ヌクレオシド誘導体であるアシクロビルやバラシクロビル，ピリミジン誘導体であるイドクスウリジンなどが挙げられる (Figure 5)．アシクロビルおよびその誘導体はウィルス性チミジンキナーゼ (TK) により一リン酸化体となったのち細胞性キナーゼによりアシクロビル三リン酸となり DNA 鎖の伸長を抑制することで抗ヘルペス活性を示す．イドクスウリジンはチミジン誘導体であり，ウィルスが DNA を複製する際に競合的に取り込まれることで DNA 鎖の伸長を抑制する．ただしイドクスウリジンは選択性が低く全身毒性が強いため，点眼薬としての局所使用に限られている．以上のようにいずれの医薬品も核酸誘導体であり，またその作用機序がウィルスの DNA 複製を抑制するものに限られており，異なる作用機序を持った医薬品はこれまでに開発されていない．

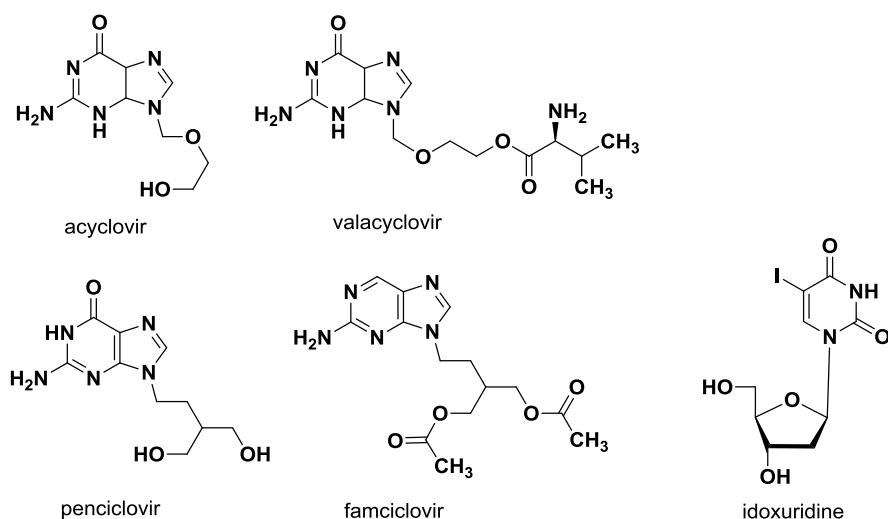


Figure 5. Structure of therapeutic agent of HSV-1.

近年、アシクロビル耐性を持ったヘルペスウイルスの出現が報告されている⁴³。アシクロビル耐性ヘルペスウイルスは特に免疫不全患者で出現しやすく⁴⁴、アシクロビルのみならずバラシクロビルやペンシクロビルといったほかのヌクレオシド誘導体に対しても治療抵抗性を示す⁴⁵。現状では単純ヘルペス治療はヌクレオシド誘導体であるアシクロビル系薬剤が治療の主力であるため、将来的に耐性ウイルスが蔓延した場合、その治療手段が著しく制限される恐れがある⁴⁶。

以上のような背景から、新たな作用機序を有する治療薬、核酸誘導体とは異なる骨格を有するヘルペス治療薬の開発は喫緊の課題である。しかしながらどのような骨格がヘルペスウイルスに有効性を示すのかは未だ体系化されていなかった。

天然物分野においてはこれまでも抗ヘルペス活性物質の探索が行われ、活性化合物が報告されてきている⁴⁷。Zhang らは化合物レベルで抗ヘルペス活性を検討した報告のうちその割合が最も多いものはテルペノイドであり、次いでフラボノイドやポリフェノールが多かったことをまとめている (Figure 6)⁴⁶。このことからテルペノイドは優良なヘルペス治療薬リード化合物の探索素材であることが窺われる。

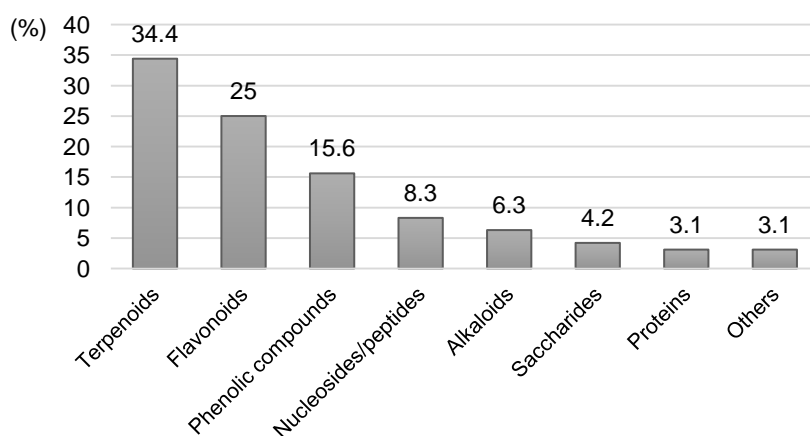


Figure 6. Classification of compounds exhibiting inhibitory effects against HSV-1⁴⁶.

Figure 7 にはこれまでに報告された抗ヘルペス活性を示す特徴的なテルペノイドの一例をまとめた。抗 HSV-1 活性テルペンの構造の特徴として、キラル中心を多く持つ点や酸素官能基を複数持つ点が挙げられる。具体的に活性テルペンを見ていくと、ゴマノハグサ科植物 *Scoparia dulcis* L. から得られた四環性ジテルペン scopadulcic acid B⁴⁸ は強い抗ヘルペス活性を示すことが報告されている⁴⁹。また、その薬理作用はヘルペスウイルス由来の DNA ポリメラーゼ阻害によることが明らかにされている⁵⁰。しかしながらこれらのジテルペンは細胞毒性も強いという問題があった。クロヅル属植物 *Tripterygium wilfordii* Hook fil var. *regelii* から得られたセスキテルペン triptofordin C-2⁵¹ は細胞毒性をほとんど示さずに有意な抗ヘルペス活性を示すことが報告されている⁵²。しかしながらその作用機序がエンベロップに対する作用であり、エンベロップは宿主由来の器官であることから、宿主への影響が懸念される。一方で、Barbosa らは褐藻 *Dictyota pfaffii* から得られたドラベラン型ジテルペン 10,18-diacetoxy-8-hydroxy-2, 6-dolabelladiene⁵³ が細胞毒性をほとんど示さずに抗ヘルペス活性を示すことを報告している。しかしながらドラベラン型ジテルペンの抗 HSV-1 に対する報告はこれ以降ほとんどなされておらず、更なる検討が必要であった。

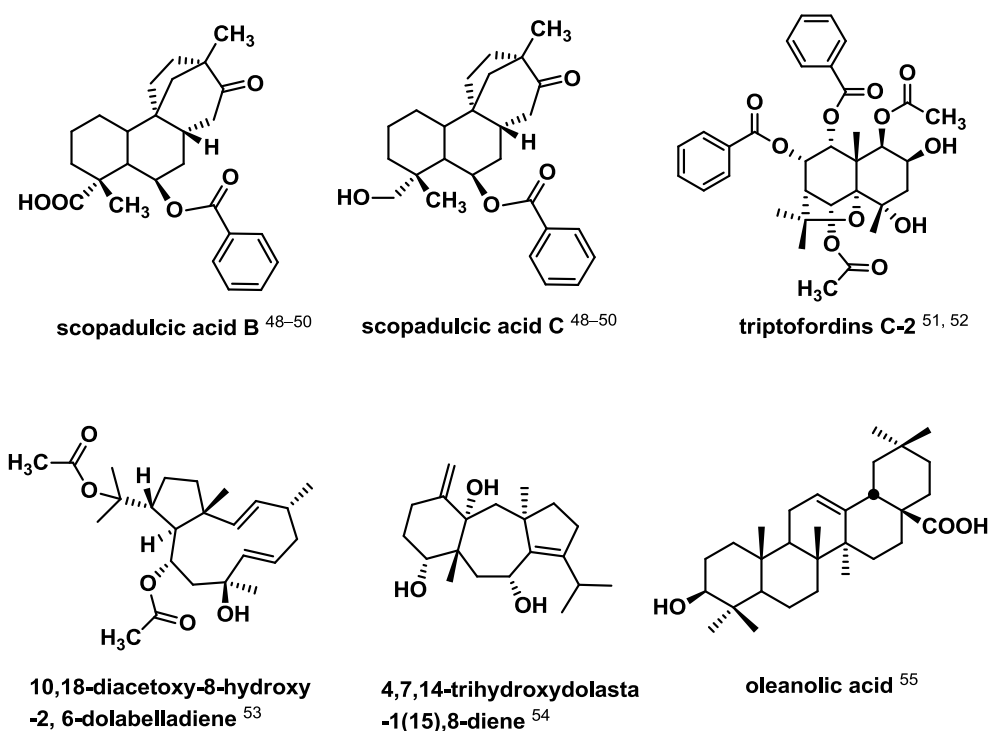


Figure 7. Bioactive terpenoids against HSV-1.

以上に示したように、一部のテルペノイドは有用な抗 HSV-1 活性素材であるが、細胞毒性や選択性の面に問題がある場合や、報告例自体が少ないことから、更なるテルペノイドの機能性評価は重要であると考えられた。このような背景から、本研究において高度に酸素官能基を有するジテルペンおよびジテルペンアルカロイドについて抗 HSV-1 活性を検討する意義は大きいと判断し、Vero 細胞を用いた plaque reduction assay により単離化合物の抗 HSV-1 活性の検討を計画した。

本論

第一章 クロタネソウ (*Nigella damascena*) 成分の単離と構造決定

第一節 クロタネソウ (*N. damascena*) 種子含有成分の抽出および成分単離

日本京都府産クロタネソウ (*N. damascena*, 品種: Moody Blues) の種子 501.0 g をメタノールを用いて熱時抽出しメタノール抽出エキス 58.2 g (11.6%) を作製した. 得られたメタノール抽出エキスを酢酸エチル, *n*-ブタノール, 水を用いてそれぞれ酢酸エチル可溶性分画 (21.8 g, 4.35%), ブタノール可溶性分画 (14.8 g, 3.05%), 水分画 (17.7 g, 3.63%) に分離した. 続いて酢酸エチル可溶性分画について順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 1000 g, Hexane-EtOAc \rightarrow CHCl₃-MeOH-H₂O] を用いて 10 フラクションに分離した.

得られたフラクションについて多波長検出型 HPLC を用いて分析し UV 吸収パターンをそれぞれ検討したところ, Fr. 3-4 において二波長において吸収極大を示す特徴的な UV 吸収パターンが観察された (Figure 9). Fr. 3 と Fr. 4 の UV 吸収パターンは類似していたが, Fr. 4 ではその吸収極大が Fr. 3 に比べややシフトしており, Fr. 3 に含まれる化合物の骨格に若干の変化があるのではないかと予測した. そこで Fr. 4 について夾雑物を除く目的で CH₃CN-H₂O 系により逆相カラムクロマトグラフィーを行い, 目的の成分の集約が見られたフラクションについてさらに HPLC 分取 [Triart PFP (250 \times 10 mm i.d.), mobile phase: MeOH-H₂O (65:35, v/v)] を行うことにより oxazonigelladine (**1**) を分離精製した.

一方で Fr. 5-7 の多波長検出型 HPLC 分析では, 230 nm 付近に吸収極大を持ち, 260 nm 付近まで中等度の UV 吸収傾向を示す特徴的なピークが観察された (Figure 9). そこで Fr. 5-7 をそれぞれ NMR 解析により検討したところ, いずれのフラクションにおいてもテルペン様のシグナルとともに芳香環に由来するシグナルが観察されたことから, 構造中に芳香環を有するテルペンが含まれているのではないかと予測した. 特に Fr. 7 においては 9 ppm 付近にニコチン酸に由来する特徴的なシグナル⁵⁶が観察されたことから, テルペンアルカロイドが含まれている可能性が示された. そこで Fr. 5-7 についてそれぞれ逆相カラムクロマトグラフィー, 次いで HPLC を用いて繰り返し分取を行うことにより, 芳香環を構造中に複数有するドラベラン型ジテルペン, damasterpene 類 (**2-11**) をそれぞれ単離精製した.

結果として, クロタネソウ 'Moody Blues' の種子から得た酢酸エチル可溶性分画より 1 種の新規アルカロイド oxazonigelladine (**1**, 28.1 mg, 0.0056 %), 8 種の新規ドラベラン型ジテルペン damasterpene I (**2**, 318.3 mg, 0.064%), damasterpene II (**3**, 80.7 mg, 0.016%), damasterpene III (**4**, 12.8 mg, 0.0026%), damasterpene IV (**5**, 14.6 mg, 0.0029%), damasterpene V (**6**, 38.4 mg, 0.0077%), damasterpene VI (**7**, 17.6 mg, 0.0035%), damasterpene VII (**8**, 4.4 mg, 0.00088%), damasterpene VIII (**9**, 4.1 mg, 0.00082%) を既知化合物 damascenine (**10**, 104.9 mg, 0.021%)¹⁹, methyl 3-methoxyanthranilate (**11**, 36.1 mg, 0.0072%)⁵⁷, 2-(dimethylamino)-3-methoxy-benzoic acid (**12**, 8.3 mg, 0.0017%)⁵⁸ とともに単離した (Figure 10).

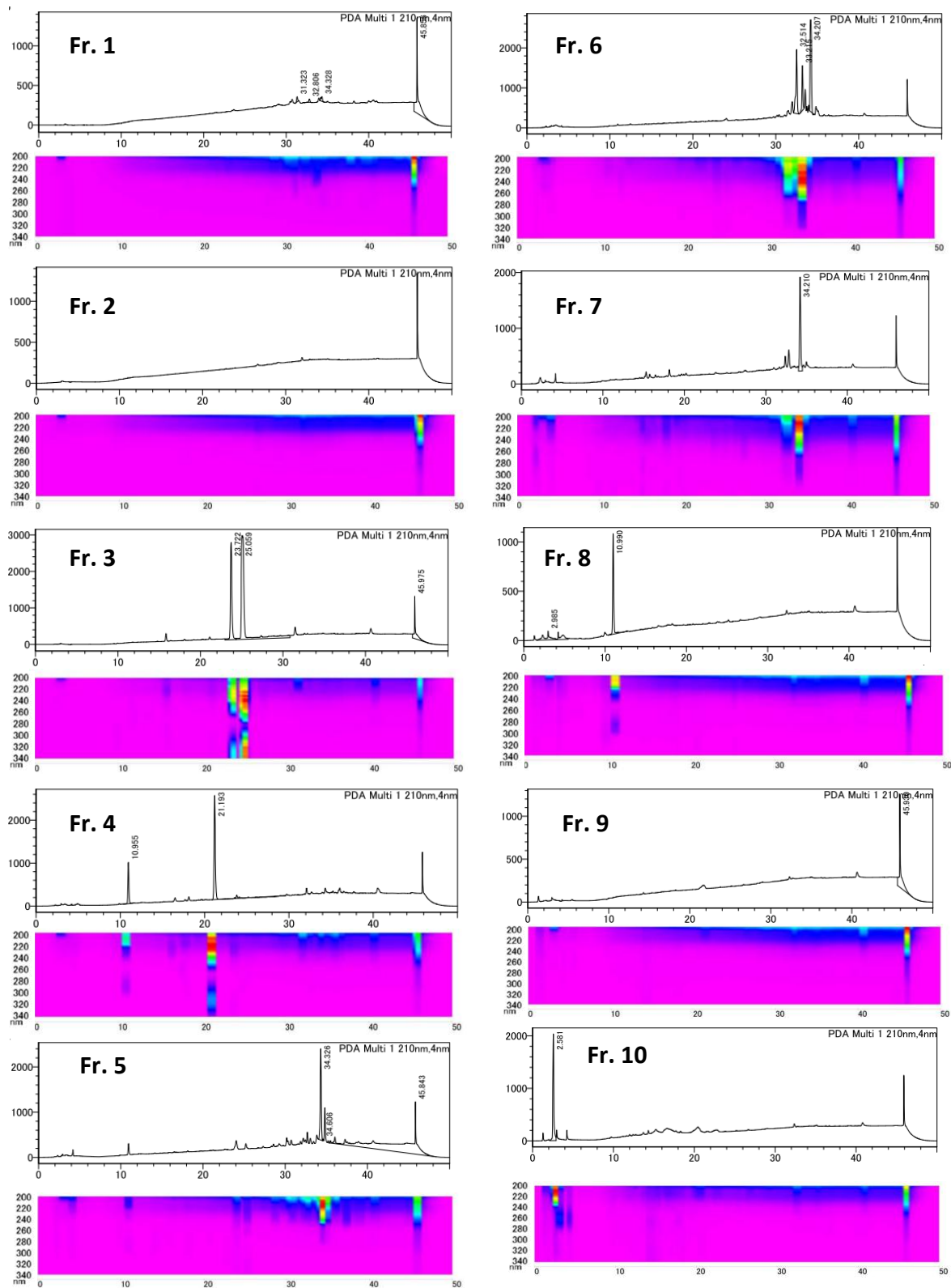
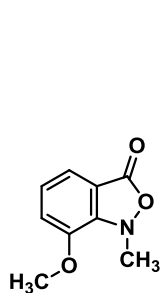
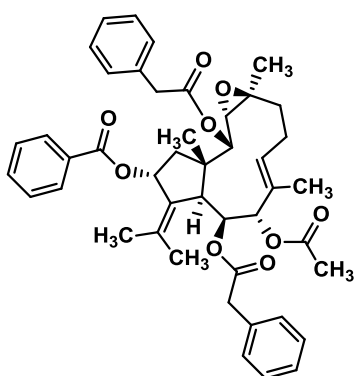


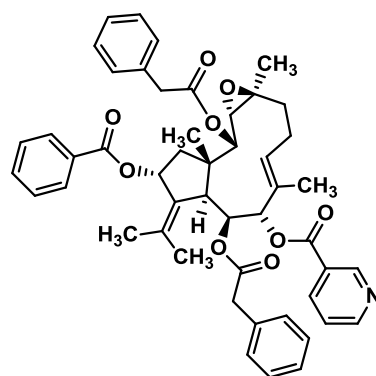
Figure 8. HPLC chromatography of fractions (Fr. 1–10).



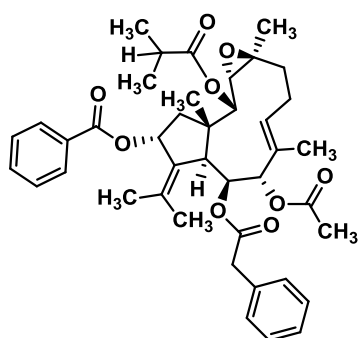
oxazonigelladine (1)



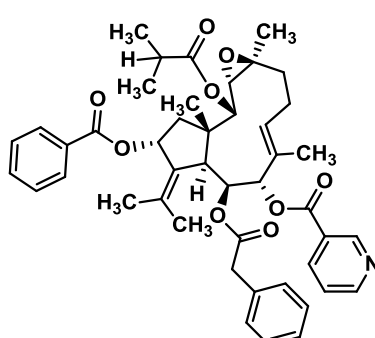
damasterpene I (2)



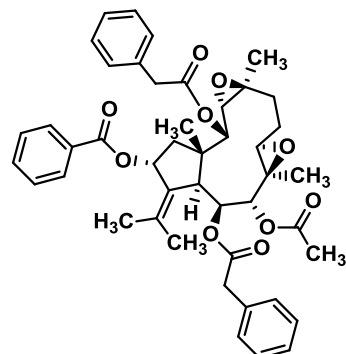
damasterpene II (3)



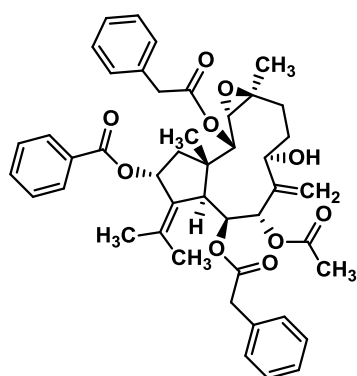
damasterpene III (4)



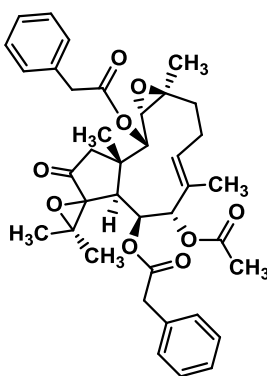
damasterpene IV (5)



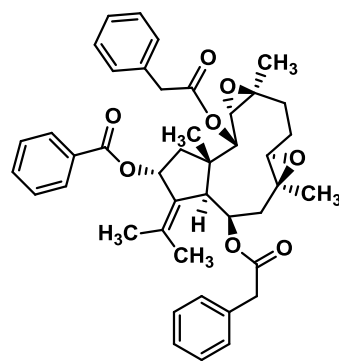
damasterpene V (6)



damasterpene VI (7)



damasterpene VII (8)



damasterpene VIII (9)

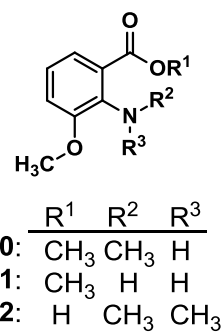
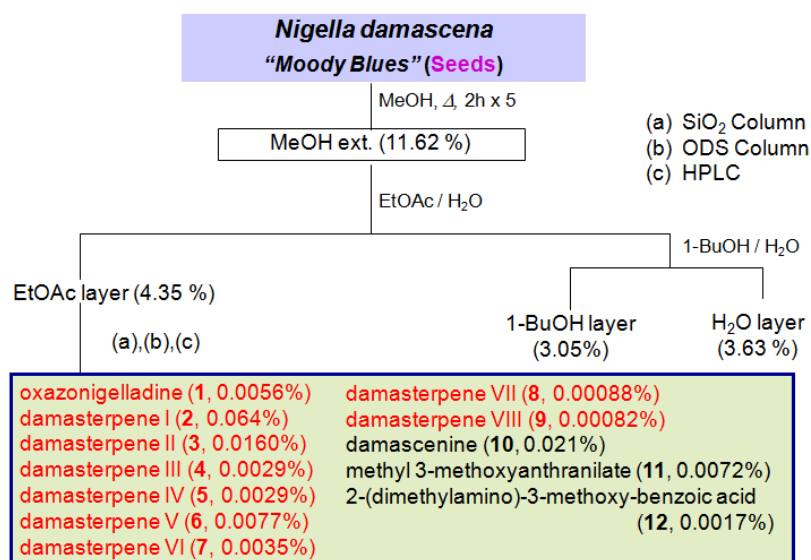


Figure 9. Isolated compounds from *N. damascena* seeds.



Red color: New compounds

Chart 1. Isolation procedure of constituents (1–12) from *N. damascena* seeds.

第二節 クロタネソウ含有成分の化学構造

第一項 新規成分 oxazonigelladine (1) の化学構造

Oxazonigelladine (1) は白色非結晶性粉末として得られた。IR スペクトルからエステル結合および芳香族 (1747, 1608, 1506 cm⁻¹) の存在が示唆された。¹H NMR, ¹³C NMR および二次元 NMR の解析結果から、1 は 3 置換ベンゼン誘導体 [δ 7.09 (dd, 1H, H-5), 7.22 (t, 1H, H-6), 7.41 (dd, 1H, H-7)] であり、置換基としてエステル [δ 168.1 (C-1)], 窒素原子に結合したメチル基 [δ 3.43 (s, 3H, H-8)], メトキシ基 [δ 3.96 (s, H-9)] の存在が示唆されたことから、既知化合物である damascenine に類似した構造を有していることが推察された (Table 1)。さらに EI-MS において分子イオンピーク [M]⁺ が m/z 179 に観察され、加えて高分解能 EI-MS の結果より、1 の分子式は C₉H₉NO₃ であることが判明した。しかし、1 次元 NMR の化学シフト値の傾向が damascenine 類似化合物と比較すると僅かに異なっており、分子式の条件を満たす単純 3 置換ベンゼンの候補がないことから、1 は置換基同士で環状構造を形成している可能性が示された (Figure 11)。そこで窒素原子と酸素原子の直接結合を確認する目的で、単結晶を作製し、X 線単結晶構造解析法を実施した。化合物 1 は結晶性が悪く単一溶媒および二溶媒の混合系では結晶を形成しなかったが、種々の検討をした結果、EtOAc : EtOH : CH₃CN = 1:1:1 の混合溶媒を用いた場合に高い結晶性を示すことを見出した。そこで得られた結晶を用いて X 線単結晶構造解析法を実施したところ、Figure 10 に示したように窒素原子と酸素原子の直接結合を確認することができた。したがって、1 は天然物において報告例が極めて少ない isoxazolidinone 誘導体であることが判明した。

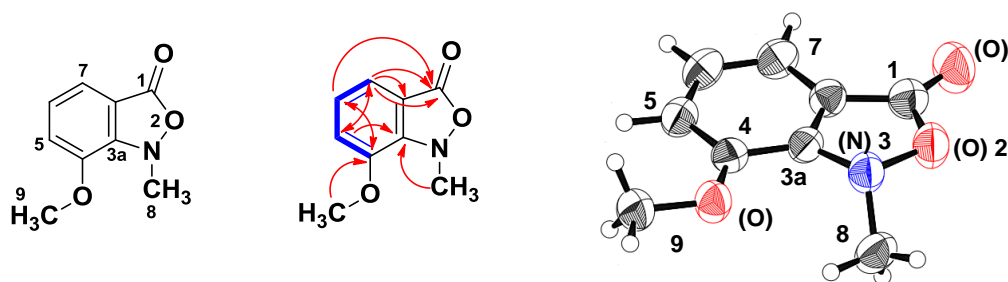


Figure 10. Important 2D NMR correlations and X-ray crystallography of oxazonigelladine (**1**).

Table 1. ^{13}C NMR (125 MHz) and ^1H NMR (500 MHz) data of compound **1** (Measured in CDCl_3).

Position	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	168.1	
3a	148.4	
4	146.2	
5	115.1	7.09 (dd, 7.5, 1.0)
6	125.7	7.22 (t, 7.5)
7	116.9	7.41 (dd, 7.5, 1.0)
7a	115.2	
8	42.8	3.43 (s)
9	55.9	3.96 (s)

また、**1** が damascenine 誘導体のアーチファクトでないことの確認のため、加水分解反応により damascenine (**10**) のメチルエステル部分をカルボン酸へ誘導化し、得られた反応物をエキス作成時と同じ条件 (メタノール溶媒中, 80°C , 10 hr) で加熱したのち、TLC により R_f 値を比較した。その結果、本条件では **1** の生成を認めず、damascenine 誘導体のアーチファクトとして得られたものではないことが明らかとなった。

第二項 Oxazonigelladine (**1**) の化学的安定性についての考察

一般的に、窒素原子と酸素原子の直接結合は電子的反発により不安定であると考えられる。しかしながら **1** はアルコール溶媒を用いた加熱下での抽出条件にも関わらず、比較的安定に単離された。そこで著者は **1** の化学的安定性について X 線単結晶構造解析法および Spartan'14 を用いて検討し、共鳴安定化および芳香族性により **1** の安定性が向上したのではないかと考察した。

はじめに、**1** の共鳴構造として (A) および (B) を考案した (Figure 11)。ただし、(B) ではベンゼン環が崩れていることから、その寄与は小さいと考えた。Spartan'14 により **1** の最安定化構造を計算し、静電ポテンシャル図を作成した。作成した静電ポテンシャル図より、カルボニル酸素および窒素原子と隣接した酸素原子 (O2) において電子密度の偏りが推測され、窒素原子から酸素原子にかけて電子が流れていることが予測された。この静電ポテンシャル図は Figure 12 の共鳴構造 (A) に近い電子の分布をしていることから、**1** は (B) よりも (A) の構造をとっている可能性が高いと推察された。

次に X 線単結晶構造解析法における **1** の二面角を検討したところ、C7a-C1-O2-N3 の二面角が -3.3° 、C1-O2-N3-C3a の二面角が 5.4° であることから、isoxazolidinone 環はほとんど平面で存在していることが推察された。また、(A) の構造では 10π 電子系を満たしていることが考えられたことから (A) は芳香族性を有することが示唆された。したがって化合物を **1** は安定な (A) を共鳴構造として持つことでその安定性が向上しているのではないかと考察した。

なお、Spartan'14 により作製した静電ポテンシャルマップは、**1** の前面と背面で電子密度の傾向が異なる可能性を示した。すなわち、窒素原子と酸素原子の直接結合に注目すると、化合物の前面は電子密度が高いのに対し、化合物の背面は電子密度が低いと計算された。一方で、X 線単結晶構造解析法により得られた Packing 図を検討すると、**1** の分子は前面と背面が向かい合うように交互に配列していることが明らかとなった。このことから、**1** は分子の前面と背面で電子密度に偏りを持ち、電子密度の高い面と低い面が重なるように配列することで安定な結晶を形成していることが示唆された。

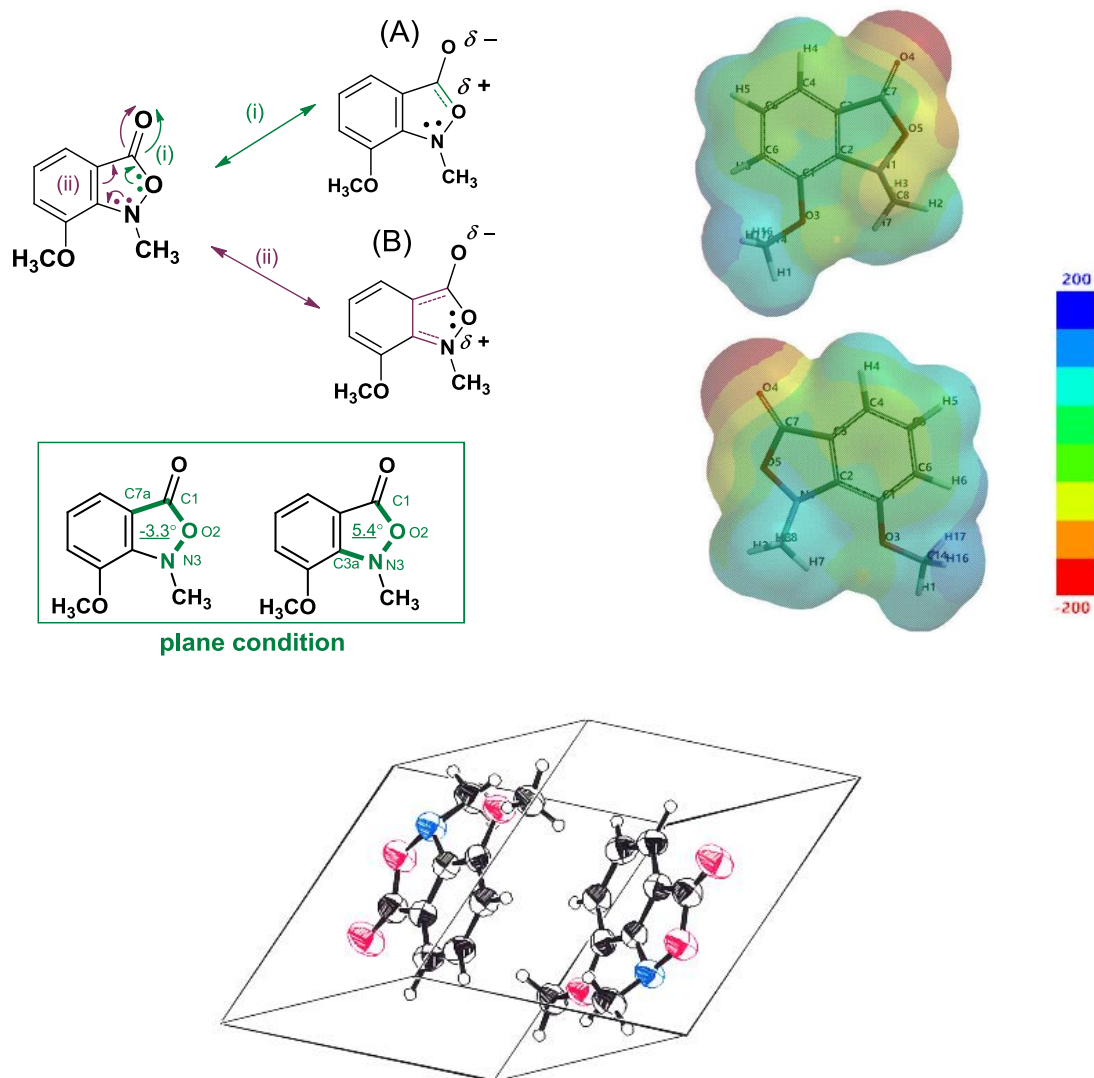


Figure 11. Plausible reasons of the stability of **1** and packing drawing by X-ray crystallography.

第三項 新規成分 damasterpene 類 (2-9) の化学構造

Damasterpene I (**2**), damasterpene II (**3**) は正の旋光性 (**2**: $[\alpha]_D^{18} + 13.7^\circ$, **3**: $[\alpha]_D^{18} + 5.0^\circ$, in chloroform) を有する白色非結晶性粉末として得られた. IRスペクトルから, 芳香環, エステル, エポキシ基に由来する吸収 (**2**: 2934, 1740, 1703, 1495, 1235, 1022 cm^{-1} , **3**: 2922, 1739, 1709, 1592, 1265, 1025 cm^{-1}) が認められた. 続いて, ESI-MSにおいて, 擬似分子イオンピークがそれぞれ **2**: m/z 757 ($\text{M}+\text{Na}^+$), **3**: m/z 798 ($\text{M}+\text{H}^+$) に観測された. 高分解能ESI-MSおよび ^{13}C NMRにより化合物の分子式が**2**: $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{O}_9$, **3**: $\text{C}_{49}\text{H}_{51}\text{NO}_9$ であることが明らかとなった. ^1H NMR, ^{13}C NMRおよび二次元NMRの解析結果より, **2** および **3** はドラベラン型ジテルペン骨格^{59, 60} [**2**: [5カ所のメチル基に由来するプロトン δ 1.46 (H-15), 1.34 (H-16), 1.78 (H-17), 1.83 (H-19), 1.52 (H-20), all s, 3H], 1カ所のメチンプロトン [δ 2.98 (1H, br s, H-11)], 酸素官能基に結合した5つのメチンプロトン [δ 4.70 (d, H-2), 2.94 (d, H-3), 5.72 (d, H-9), 5.59 (dd, H-10), 5.49 (d, H-13)], 3カ所のメチレンプロトン [δ 1.28, 2.19 (H-5), 2.28, 2.41 (H-6), 1.53 (H-14)], 1カ所のオレフィンプロトン [δ 5.56 (H-7)]] を持つことが示された. また, 1カ所のエポキシ基 [**2**, **3**: δ 65.0 (C-3), 61.8 (C-4)], 4カ所のエステル構造 [**2**: δ 168.9 (C-1'), 170.0 (C-1''), 170.4 (C-1'''), 166.1 (C-1'''), **3**: δ 169.0 (C-1'), 164.1 (C-1''), 170.5 (C-1'''), 166.1 (C-1''')] の存在が示された (Table 2, 3). 化合物**2** ではアセチル基に由来するシグナル [δ 1.74 (s, 3H, H-2'')] が観測されたのに対し, 化合物**3** ではニコチノイル基 [δ 164.1 (C-1''), 125.3 (C-2''), δ 9.05 (s like, H-3''), 8.75 (d like, $J = 3.4$ Hz, H-5''), 7.29 (dd like $J = 3.4, 6.2$ Hz, H-6''), 8.04 (dt, $J = 6.2, 2.0$ Hz, H-7'')] に由来するシグナルが観測された. さらに**2** と**3** はそれぞれ9位のプロトンの化学シフト値が異なる [**2**: δ 5.72 (d, 1H, $J = 10.0$), **3**: δ 5.93 (1H, d, $J = 10.3$)] ことから, 9位のアシル基が異なる化合物であることが示唆された. 加えて, 二次元NMRの詳細な解析によりアシル基およびエポキシ基の結合位置をそれぞれ決定した (Figure 12). すなわち, **2** において酸素官能基に結合したメチンプロトン δ 4.70 (H-2), 5.72 (H-9), 5.59 (H-10), 5.49 (H-13) からそれぞれカルボニルカーボン δ 168.9 (C-1'), 170.0 (C-1''), 170.4 (C-1'''), 166.1 (C-1''') とのHMBC相関が観測されたことよりアシル基の結合位置を決定した. また, 16位のメチルプロトン δ 1.34 から δ 65.0, 61.8 とのHMBC相関が見られ, 2位のメチンプロトン δ 4.70 とエポキシドに結合したメチンプロトン δ 2.94 間にDQF COSYの相関が見られたことからエポキシドの位置を決定した. 化合物**3** においても同様の二次元NMR相関が見られた. 以上より**2** および **3** の平面構造を決定した.

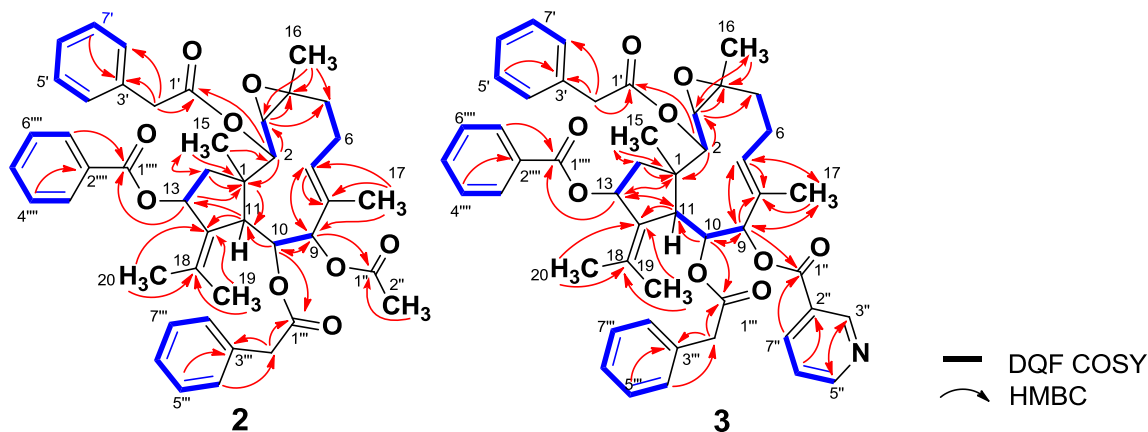


Figure 12. Important 2D NMR correlations of new compounds **2** and **3**.

	2^a	3^b
Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1		
2	4.70 (1H, d, 9.0)	4.74 (1H, d, 9.6)
3	2.94 (1H, d, 9.0)	2.98 (1H, m)
4		
5 α	2.19 (1H, dd, 15.5, 8.0)	2.21 (1H, m)
β	1.28 (1H, m)	1.32 (1H, m)
6 α	2.41 (1H, m)	2.44 (1H, m)
β	2.28 (1H, m)	2.32 (1H, m)
7	5.56 (1H, m)	5.69 (1H, d, 11.7)
8		
9	5.72 (1H, d, 10.0)	5.93 (1H, d, 10.3)
10	5.59 (1H, dd, 10.0, 1.0)	5.79 (1H, d, 10.3)
11	2.89 (1H, br s)	2.98 (1H, m)
12		
13	5.49 (1H, d, 3.5)	5.55 (1H, d, 6.9)
14 α	1.53 (2H, m)	1.63 (2H, m)
β		
15	1.46 (3H, s)	1.53 (3H, s)
16	1.34 (3H, s)	1.37 (3H, s)
17	1.78 (3H, s)	1.83 (3H, s)
18		
19	1.83 (3H, s)	1.89 (3H, s)
20	1.52 (3H, s)	1.55 (3H, s)
1'		
2'	3.37 (2H, s like)	3.40 (1H, d, 15.1)
		3.38 (1H, d, 15.1)
4'	6.78 (2H, dd, 7.5, 1.5)	6.80 (2H, d, 7.6)
5'	7.07 (2H, m)	7.07 (2H, m)
6'	7.13 (1H, m)	7.13 (1H, m)
1''		
2''	1.74 (3H, s)	
3''		9.05 (1H, s like)
5''		8.75 (1H, d, 3.4)
6''		7.29 (1H, dd like, 6.2, 3.4)
7''		8.04 (1H, dt, 6.2, 2.0)
2'''	3.55 (1H, d, 14.0)	3.52 (1H, d, 14.4)
	3.61 (1H, d, 14.0)	3.44 (1H, d, 14.4)
3'''		
4'''	7.26 (2H, m)	7.05 (2H, m)
5'''	7.37 (2H, m)	7.09 (2H, m)
6'''	7.31 (1H, m)	7.11 (1H, m)
3''''	7.96 (2H, dd, 7.5, 1.5)	7.97 (2H, dd, 7.6, 1.4)
4''''	7.37 (2H, m)	7.39 (2H, m)
5''''	7.50 (1H, tt, 7.5, 1.5)	7.51 (1H, m)

^a Measured by 125 MHz NMR. ^b Measured by 150 MHz NMR.

Table 2. ¹H NMR (500 MHz) data of compound **2** and **3** (Measured in CDCl₃).

Damasterpene III (**4**), damasterpene IV (**5**) は負の旋光性 (**4**: $[\alpha]_D^{18} - 13.0^\circ$, **5**: $[\alpha]_D^{18} - 8.5^\circ$, in chloroform) を有する白色非結晶性粉末として得られた. IRスペクトルから, 芳香環, エステル, エポキシ基に由来する吸収 (**4**: 2971, 1740, 1705, 1494, 1234, 1023 cm^{-1} , **5**: 2923, 1740, 1712, 1592, 1264, 1025 cm^{-1}) が認められた. 続いて, ESI-MS において, 擬似分子イオンピークがそれぞれ **4**: m/z 709 ($\text{M}+\text{Na}^+$), **5**: m/z 757 ($\text{M}+\text{H}^+$) に観測された. 高分解能 ESI-MS および ^{13}C NMR により化合物の分子式が **4**: $\text{C}_{41}\text{H}_{50}\text{O}_9$, **5**: $\text{C}_{45}\text{H}_{51}\text{NO}_9$ であることが明らかとなった. ^1H NMR, ^{13}C NMR の結果より, **4** および **5** はどちらもイソブチリル基 [δ_{C} 174.4 (C-1'), 33.6 (C-2'), 18.6, 18.5 (C-3', 4')] を部分構造として有する化合物であることが示唆された. また, 構造中に **4** はアセチル基を含むのに対し, **5** はニコチン酸を含むことが示された. 加えて二次元NMRの解析結果において, 2位のメチンプロトン [**4**: δ 4.70, **5**: δ 4.76] からイソブチリル基 1' 位のカルボニル炭素 [**4**: δ_{C} 174.4, **5**: δ_{C} 174.5] へのHMBC相関が見られたことから, **4** および **5** はそれぞれ **2** および **3** の 2 位のアシル基がイソブチリル基に置換した化合物であると決定した (Figure 13).

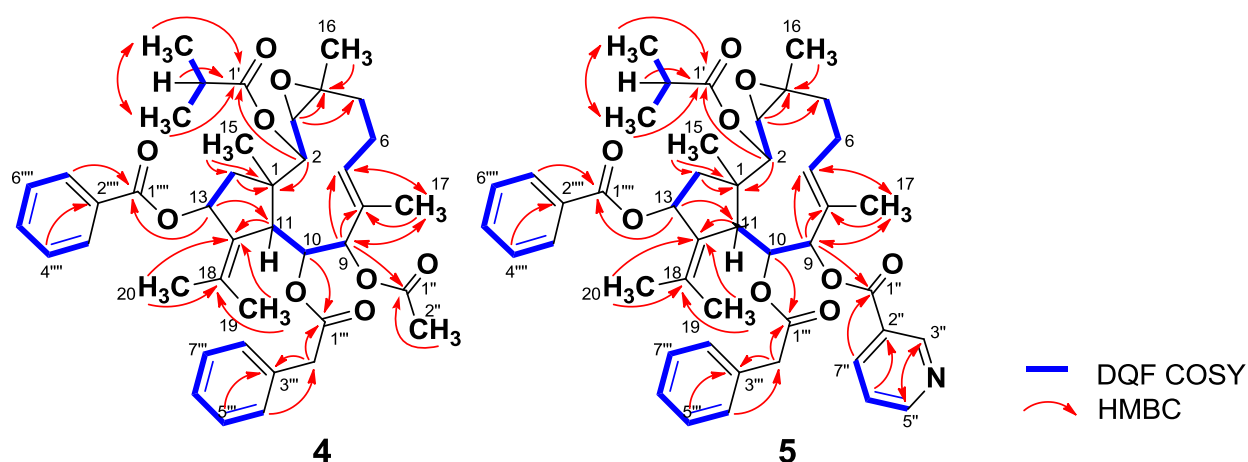


Figure 13. Important 2D NMR correlations of new compounds **4** and **5**.

	2^a	3^b	4^a	5^a
Position	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	47.8	47.9	47.7	47.9
2	73.9	73.9	73.0	73.0
3	65.0	65.0	65.0	65.1
4	61.8	61.8	61.6	61.7
5	38.1	38.1	38.1	38.2
6	23.8	23.9	23.8	24.0
7	132.3	133.0	132.4	133.1
8	131.0	130.7	131.0	130.7
9	78.7	80.0	78.8	80.2
10	75.6	75.4	75.6	75.4
11	45.7	45.7	45.9	46.0
12	135.5	135.5	135.5	135.5
13	73.3	73.3	73.6	73.7
14	43.9	44.1	44.2	44.4
15	19.3	19.4	19.5	19.6
16	16.4	16.5	16.4	16.6
17	12.3	12.4	12.3	12.4
18	136.4	136.6	136.6	136.8
19	22.3	22.4	22.3	22.4
20	22.1	22.1	22.1	22.2
1'	168.9	169.0	174.4	174.5
2'	41.0	41.1	33.6	33.7
3'	133.6	133.6	18.6	18.7
4'	129.0	129.0	18.5	18.6
5'	128.2	128.6		
6'	126.6	126.7		
1''	170.0	164.6	170.0	164.1
2''	20.6	125.3	20.6	125.4
3''		151.0		151.1
5''		153.5		153.5
6''		123.2		123.3
7''		136.9		137.0
1'''	170.4	170.5	170.4	170.6
2'''	41.8	41.8	41.8	41.9
3'''	133.5	133.1	133.5	133.1
4'''	129.1	128.8	129.1	128.8
5'''	128.0	128.2	127.9	128.7
6'''	127.4	127.3	127.4	127.3
1''''	166.1	166.1	166.4	166.5
2''''	129.4	129.5	129.4	129.5
3''''	130.0	130.0	130.1	130.1
4''''	128.8	128.0	128.8	128.0
5''''	132.7	132.8	132.7	132.8

^a Measured by 125 MHz NMR. ^b Measured by 150 MHz NMR.

Table 3. ¹³C NMR data of compounds **2–5** (Measured in CDCl₃).

	4	5
Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
1		
2	4.70 (1H, d, 9.5)	4.76 (1H, d, 9.0)
3	2.93 (1H, d, 9.5)	2.98 (1H, d, 9.0)
4		
5 α	2.18 (1H, m)	2.21 (1H, m)
β	1.28 (1H, m)	1.32 (1H, m)
6 α	2.29 (1H, m)	2.44 (1H, m)
β	2.42 (1H, d)	2.33 (1H, m)
7	5.58 (1H, d, 10.5)	5.71 (1H, d, 11.0)
8		
9	5.74 (1H, d, 10.5)	5.96 (1H, d, 10.5)
10	5.62 (1H, d, 10.5)	5.83 (1H, d, 10.5)
11	2.92 (1H, br s)	3.02 (1H, br s)
12		
13	5.52 (1H, d, 6.9)	5.58 (1H, d, 7.5)
14 α	1.93 (1H, m)	2.00 (1H, m)
β	1.71 (1H, m)	1.85 (1H, m)
15	1.54 (3H, s)	1.62 (3H, s)
16	1.35 (3H, s)	1.39 (3H, s)
17	1.80 (3H, s)	1.85 (3H, s)
19	1.86 (3H, s)	1.92 (3H, s)
20	1.57 (3H, s)	1.60 (3H, s)
2'	2.30 (1H, m)	2.33 (1H, m)
3'	0.84 (3H, d, 7.0)	0.86 (3H, d, 7.0)
4'	0.72 (3H, d, 7.0)	0.74 (3H, d, 7.0)
2''	1.77 (3H, s)	
3''		9.07 (1H, s like)
5''		8.76 (1H, d, 4.0)
6''		7.31 (1H, m)
7''		8.06 (1H, dt, 8.0, 1.5)
2'''	3.57 (1H, d, 14.0)	3.55 (1H, d, 14.5)
	3.62 (1H, d, 14.0)	3.47 (1H, d, 14.5)
4'''	7.29 (2H, m)	7.07 (2H, m)
5'''	7.38 (2H, m)	7.07 (2H, m)
6'''	7.32 (1H, m)	7.09 (1H, m)
3''''	7.97 (2H, dd, 8.0, 1.0)	8.00 (2H, dd, 7.5, 1.5)
4''''	7.38 (2H, m)	7.40 (2H, t like, 7.5)
5''''	7.50 (1H, m)	7.51 (1H, t like, 7.5)

Table 4. ^1H NMR (500 MHz) data of compound **4** and **5** (Measured in CDCl_3).

Damasterpene I-IV (**2-5**) の相対立体配置は NOESY スペクトルの詳細な解析により決定した (Figure 14). なお, **3** は ^1H NMR のシグナルが一部重なっていたため, CDCl_3 と $\text{acetone-}d_6$ の両溶媒による NOESY スペクトルを併せて検討した. すなわち, H-15 と H-3, H-9 および H-13 との NOESY 相関および H-2 と H-10, H-11, H-16 および H-17 の相関が見られたことから **2**, **3**, **4** および **5** の相対立体配置を決定した. また, 7 位のプロトンと 17 位のメチルプロトンの NOESY 相関が見られなかったことから, 7 位の二重結合は *E* 体であることが示唆された.

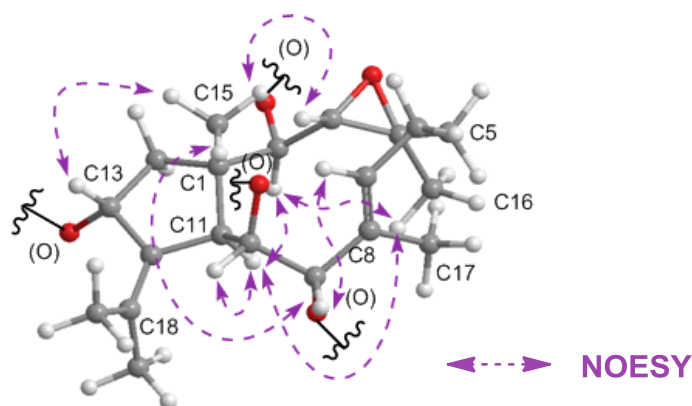


Figure 14. NOE correlations of **2-5** (measured in CDCl_3).

化合物 **2, 3** の絶対立体配置の決定には X 線単結晶構造解析法および励起キラルティー法⁶¹ の 2 つの方法を実施した. まず, X 線単結晶構造解析法を実施するために単結晶の作成を行った. 化合物 **2, 3** はいずれも結晶性が悪く単一溶媒 (CHCl_3 , AcOEt , acetone, acetonitrile, EtOH , MeOH , 1, 4-dioxane), 二溶媒系 (*n*-hexane- EtOAc , *n*-hexane-acetone, CHCl_3 - MeOH , CHCl_3 - EtOH , EtOAc - MeOH , MeOH - H_2O , EtOH - H_2O , CHCl_3 - MeOH - H_2O) では結晶を形成しなかった. しかしながら, アシル基を部分的に切断することで結晶性の改善が見られ, 2-phenylacetyl 13-benzoyl damasterpenol (**17**) が MeOH 溶媒中で単結晶を形成した (Figure 15). 化合物 **17** について X 線単結晶構造解析を実施したところ, Figure 16 に示すような構造が得られた. Flack parameter は 0.1 であり, **17** は重元素を含んでいないことからこの結果だけでは絶対立体構造の決定には至らなかった.

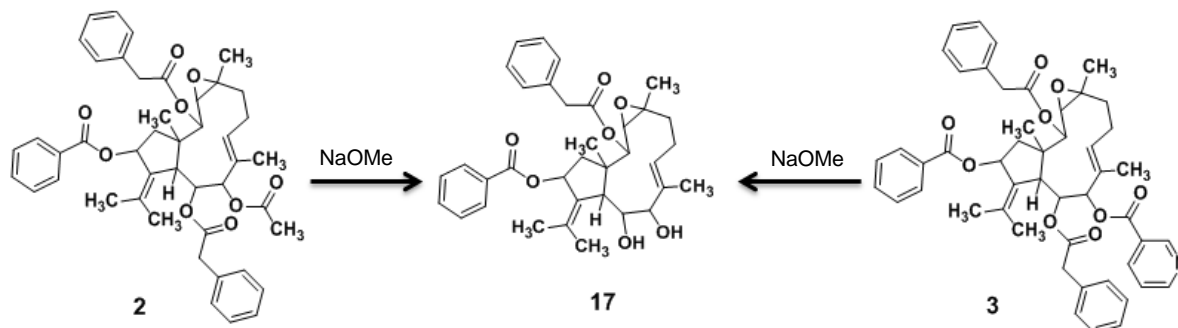


Figure 15. Alkaline methanolysis of **2** and **3**.

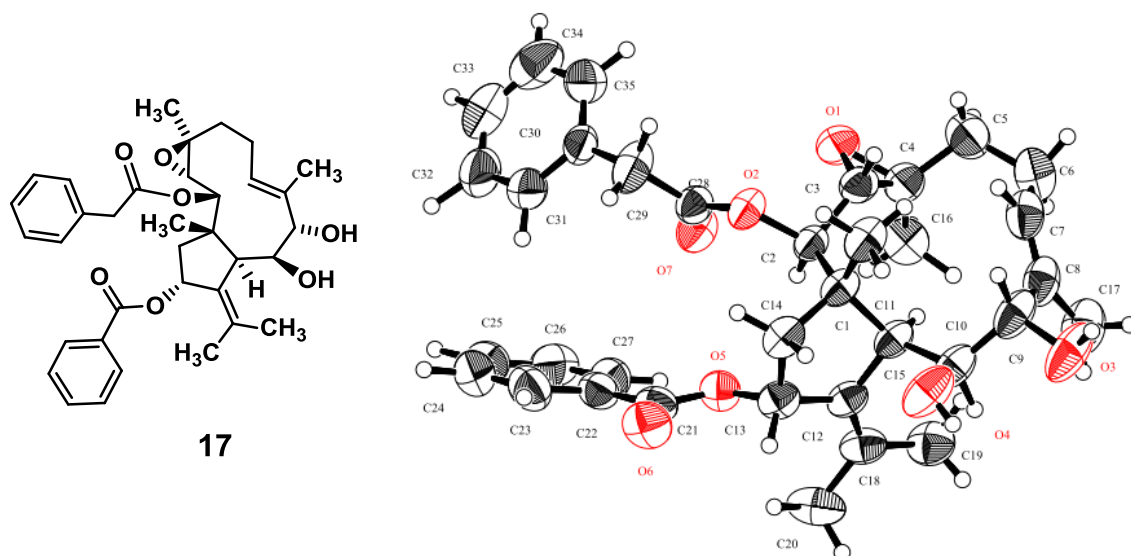


Figure 16. X-ray crystallography of 2-phenylacetyl 13-benzoyl damasterpenol (**17**).

そこで絶対立体構造の決定のため励起子キラリティー法を実施した．励起子キラリティー法は，原田らによって報告された絶対立体構造の決定方法であり，二重結合と隣り合うベンゾイル基など発色団の相互作用による 230 nm 付近の Cotton 効果を測定することにより，ある一点の絶対立体構造を決定することができる^{61, 62}．Damasterpene 類は 12 位に二重結合，13 位にベンゾイル基を有するため，励起キラリティー法が適用可能な部分構造を有していた．化合物 **2**, **3** の CD スペクトルを測定したところ，230 nm 付近の Cotton 効果は不明瞭であった．その理由として **2**, **3** の構造中に存在する複数の芳香環を含むアシル基による相互作用が考えられたため，NaOMe を用いた加溶媒分解により余分なアシル基を切断した **17** について CD スペクトルを測定した．その結果，223 nm においてはっきりとした負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon - 5.55$) が観察されたことから，13 位の絶対立体配置が *R* であると決定した (Figure 17)．

以上の結果から，**2** および **3** は Figure 9 に示すような絶対立体構造であると決定した．

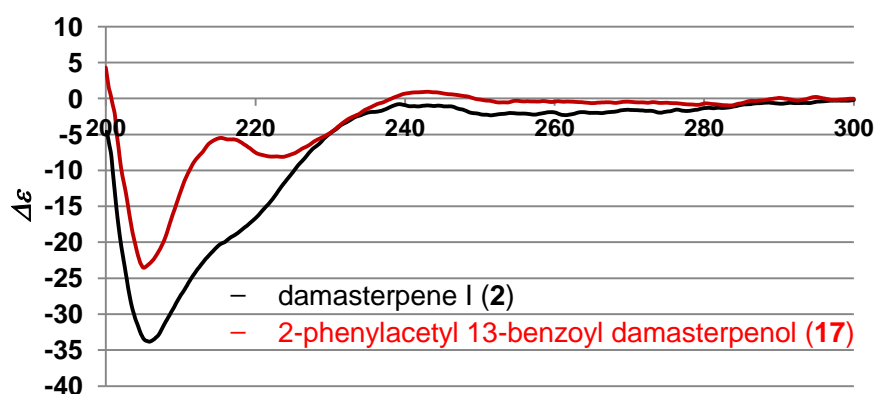


Figure 17. CD spectra of **2** and **17**.

化合物 **4**, **5** についても同様に励起子キラリティー法によって絶対立体構造を決定した (Figure 18) . その結果, アルカリ加溶媒分解により誘導化した **19** が 223.5 nm において負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon$ - 10.50) を示したことから, 13 位の絶対立体配置が *R* であると決定した (Figure 19) .

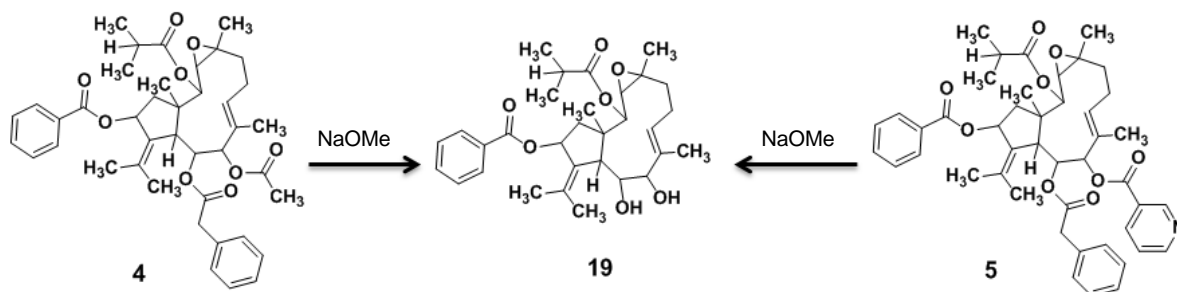


Figure 18. Alkaline methanolysis of **4** and **5**.

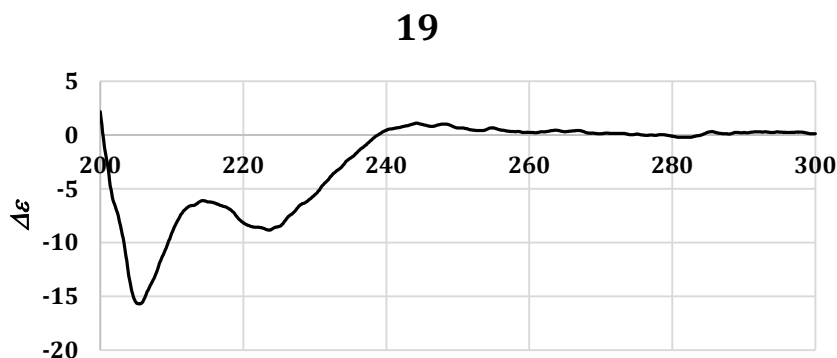


Figure 19. CD spectrum of **19**.

Damasterpene V (**6**), damasterpene VI (**7**) は負の旋光性 (**6**: $[\alpha]_D^{18} -17.3^\circ$; **7**: $[\alpha]_D^{25} +47.9$, in chloroform) を有する白色非結晶性粉末として得られた. IRスペクトルから, **6** は芳香環, エステル, エポキシ基に由来する吸収 (**6**: 2976, 1745, 1708, 1603, 1498, 1231, 1026 cm^{-1}) が認められた. 一方, **7** のIRスペクトルではヒドロキシ基, 芳香環, エステル, エポキシ基に由来する吸収 (**7**: 3505, 1743, 1710, 1498, 1244, 1030 cm^{-1}) が認められた. ESI-MSにおいては, 擬似分子イオンピークは共に m/z 773 ($\text{M}+\text{Na}^+$) を示し, 高分解能ESI-MSおよび ^{13}C NMRにより化合物の分子式は共に $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{O}_{10}$ であることが明らかとなった. ^1H NMR, ^{13}C NMR の結果より, **6** および **7** はそれぞれドラベラン型ジテルペン骨格を持ち, 4カ所のアシル基を有していることが示唆された. 相違点として, **6** ではエポキシ基に起因するシグナル [δ 64.3, 61.1, 62.0, 60.3 (C-3, 4, 7, 8)] よりエポキシ基が2カ所存在していると示唆されたのに対し, **7** ではエポキシ基 [δ 62.7, 61.9 (C-3, 4)] は1カ所であり, 代わりにヒドロキシ基に起因するシグナル [δ 71.1 (C-7)] および末端メチレン [δ 5.61, 5.57 (both s-like, H-17)] に帰属されるシグナルが観測された. 加えて二次元NMRの解析結果により, **6** においてエポキシドに結合したメチン水素 δ 3.14と5位の β 水素 δ 2.01 とのDQF COSYの相関, および17位のメチル基水素から δ 62.0, 60.3 への相関が見られたことから7位および8位にエポキシドが結合していることが示され

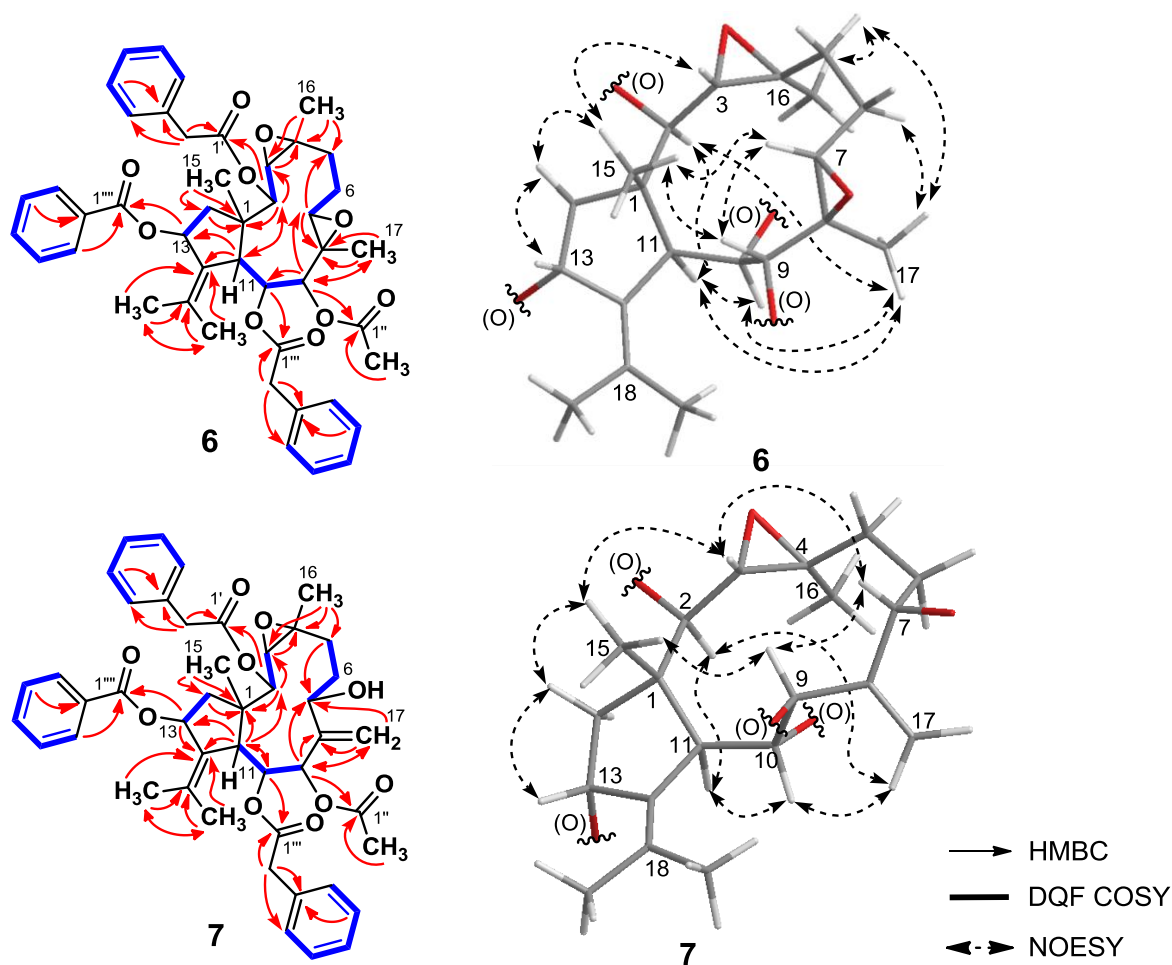


Figure 20. Important 2D NMR correlations of new compounds **6** and **7**.

た. また, **7** において, 水酸基に結合したメチンプロトン $\delta 4.27$ と6位のメチレンプロトン $\delta 2.09$ の DQF COSY 相関, および 9 位のプロトンから $\delta 152.1, 117.2$ への HMBC 相関が観察されたことにより **7** の平面構造を Figure 20 で示したように決定した.

化合物 **6** および **7** の絶対立体構造は励起子キラリティー法および NOESY スペクトルを組み合わせて用いることにより決定した.

まず, NOESY スペクトルの解析によりにより相対立体配置を検討した結果, **6** では7位のプロトンと 9 位のプロトン, 15 位のプロトンの間に相関が認められた一方で, 17 位のメチルプロトンは 2 位のプロトン, 10 位のプロトン, 11 位のプロトンとの相関を示したことから, 7 位のエポキシ基はトランス型であると推察された. 一方で, **7** の 7 位の水酸基の立体化学は, 7 位の水素と 3 位の水素, 9 位の水素, 15 位の水素の間に相関が認められたことから, その相対立体配置を決定した.

続いて, 絶対立体構造の検討は, **6** および **7** をアルカリ加水分解した誘導体 **20**, **21** について CD スペクトルを測定することにより行った (Figure 21). その結果, **20** は 222.4 nm に負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon = -2.98$) を示し, **21** は 222.2 nm に負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon = -6.28$) を示したことから 13 位の絶対立体配置がそれぞれ *R* であると決定した (Figure 22). 以上より, **6** および **7** の絶対立体構造を含めた化学構造を Figure 9 に示したように決定した.

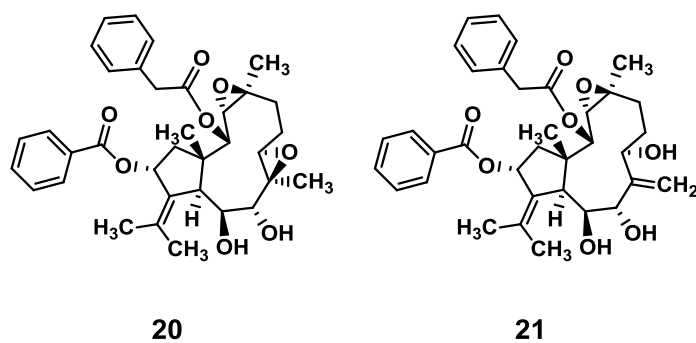


Figure 21. Chemical structures of deacylated derivatives **20** and **21**.

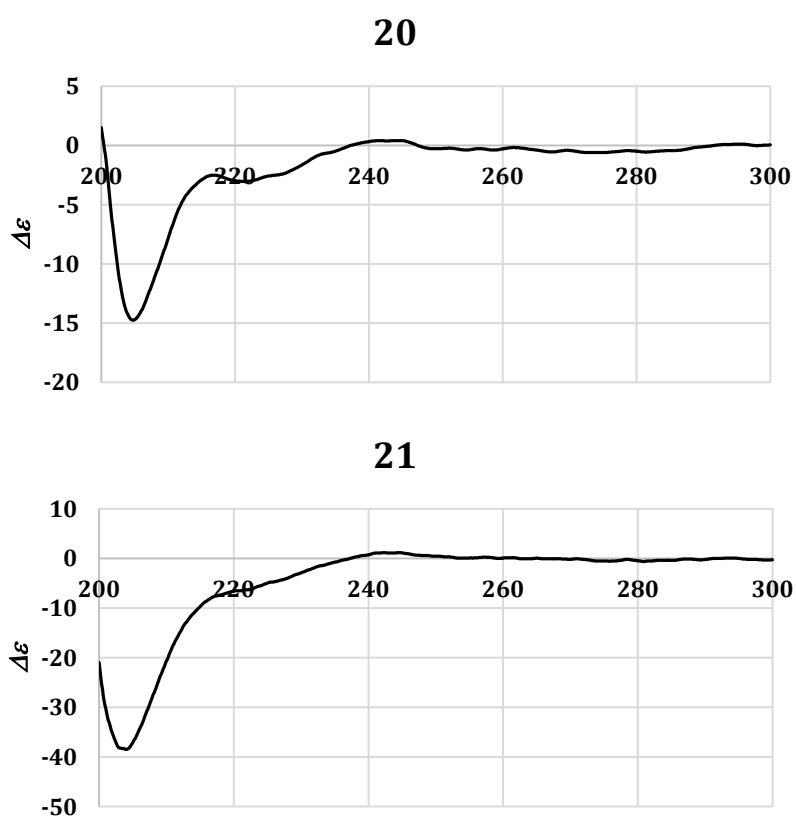


Figure 22. CD spectra of **20** and **21**.

	6	7
Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
2	4.77 (1H, d, 9.5)	4.85 (d, 9.5)
3	3.02 (d, 9.5)	3.12 (d, 9.5)
5 α	2.25 (dt, 13.5, 3.0)	2.14 (m)
β	1.40 (m)	1.37 (m)
6 α	1.72 (m)	2.09 (m, 2H)
β	2.01 (m)	
7	3.14 (d, 8.5)	4.27 (m)
9	5.13 (d, 11.0)	5.08 (d, 11.0)
10	5.51 (dd, 11.0)	5.41 (dd, 11.0, 1.0)
11	2.72 (br s)	2.52 (br s)
13	5.42 (d, 6.5)	5.57 (m)
14 α	1.45 (m, 2H)	1.51 (m)
β		1.67 (m)
15	1.37 (s)	1.42 (s)
16	1.44 (s)	1.37 (s)
17	1.53 (s)	5.61 (s like)
		5.57 (s like)
19	1.90 (s)	1.73 (s)
20	1.54 (s)	1.53 (s)
2'	3.39 (s like)	3.46 (d, 14.5)
		3.42 (d, 14.5)
4'	6.79 (d like, 7.0)	6.86 (dd, 7.0, 1.5)
5'	7.09 (dd like, 7.0)	7.11 (dd, 7.0, 1.5)
6'	7.15 (dd like, 7.0)	7.15 (t like, 7.0)
2''	1.82 (s)	1.73 (s)
4''		
5''		
6''		
2'''	3.52 (d, 15.0)	3.64 (d, 14.5)
	3.57 (d, 15.0)	3.60 (d, 14.5)
3'''		
4'''	7.24 (d, 7.0)	7.28 (dd, 8.5, 1.5)
5'''	7.38 (m)	7.36 (m)
6'''	7.31 (dd like, 7.0)	7.31 (m)
3''''	7.96 (dd, 8.0, 1.5)	7.96 (dd, 7.5, 1.0)
4''''	7.38 (m)	7.40 (m)
5''''	7.52 (dd, 8.0, 1.5)	7.53 (t like, 7.5)

Table 5. ^1H NMR (500 MHz) data of compounds **6** and **7** (Measured in CDCl_3).

	6^a	7^a	8^a	9^b
Position	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	47.8	48.0	42.9	48.0
2	73.5	73.4	73.9	73.9
3	64.3	62.7	64.3	64.6
4	61.1	61.9	62.2	61.3
5	36.8	37.3	38.0	37.0
6	22.9	31.7	24.5	22.8
7	62.0	71.1	133.2	63.2
8	60.3	152.1	130.5	58.9
9	76.8	76.1	78.8	40.5
10	74.9	78.0	74.0	75.5
11	45.9	45.2	44.1	46.0
12	135.4	135.9	68.7	136.2
13	73.4	73.3	211.1	73.5
14	43.5	43.8	48.7	43.7
15	19.0	18.0	20.4	18.9
16	16.6	16.6	17.0	16.6
17	13.8	117.2	12.2	18.2
18	137.2	136.9	66.4	137.5
19	22.1	20.7	24.0	22.7
20	22.4	21.8	19.4	22.3
1'	169.0	169.2	170.0	169.1
2'	41.1	41.2	41.4	41.1
3'	133.5	133.8	133.8	134.1
4'	129.0	128.9	129.3	129.5
5'	128.3	128.3	128.6	128.7
6'	126.8	126.8	127.1	127.2
1''	169.7	171.6	169.9	170.7
2''	20.5	22.6	20.6	41.9
3''				134.0
5''				129.5
6''				129.6
7''				128.0
1'''	170.2	170.2	170.3	166.1
2'''	41.5	42.0	41.4	129.9
3'''	133.1	133.5	132.9	130.5
4'''	129.2	129.0	128.8	128.7
5'''	128.1	129.1	129.3	133.3
6'''	127.6	127.6	127.5	
1''''	166.0	166.1		
2''''	129.4	129.5		
3''''	130.0	130.0		
4''''	129.0	128.1		
5''''	132.8	132.9		

^a Measured by 125 MHz NMR. ^b Measured by 150 MHz NMR.

Table 6. ¹³C NMR data of compounds **6–9** (Measured in CDCl₃).

Damasterpene VII (**8**) は負の旋光性 (**8**: $[\alpha]_D^{24} -81.2^\circ$ in chloroform) を有する白色非結晶性粉末として得られた。IRスペクトルから、**8** はカルボニル基、芳香環、エステル、エポキシ基に由来する吸収 (**8**: 2962, 1740, 1601, 1496, 1234, 1023 cm^{-1}) が認められた。続いて、ESI-MSにおいて擬似分子イオンピークが m/z 773 ($M+Na$)⁺ に観察され、高分解能 ESI-MS および ^{13}C NMRにより化合物の分子式は共に $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_9$ であることが明らかとなった。 ^1H NMR, ^{13}C NMR の結果より、**8** もドラベラン型ジテルペン骨格を有していたが、構造中のアシル基は3カ所であり [δ 170.0 (C-1'), 169.9 (C-1''), 170.3 (C-1''')], カルボニル基 [δ 211.1 (C-13)] を有していることが示唆された。また、エポキシドに由来するシグナル [δ 64.3 (C-3), 62.2 (C-4), 68.7 (C-12), 66.4 (C-18)] が4本観察されたことより構造中に2カ所のエポキシ基を有することも示唆された。二次元NMRの解析結果により、**8** は 13 位にカルボニル基を持ち、12 位の二重結合がエポキシ化した平面構造を有することが明らかになった。**8** の相対立体配置は 12位, 18 位の立体を除き NOESY スペクトルにより決定した (Figure 23)。化合物 **8** は他の damasterpene 類と異なり 13 位にベンゾイル基ではなくカルボニル基を有する構造であったため、励起子キラリティー法を適用可能な二重結合と発色団 (ベンゾイル基) が隣り合った部分構造を持たなかった。加えて微量成分であったことから誘導化も困難であったため、**8** の絶対立体構造は決定することができなかった。

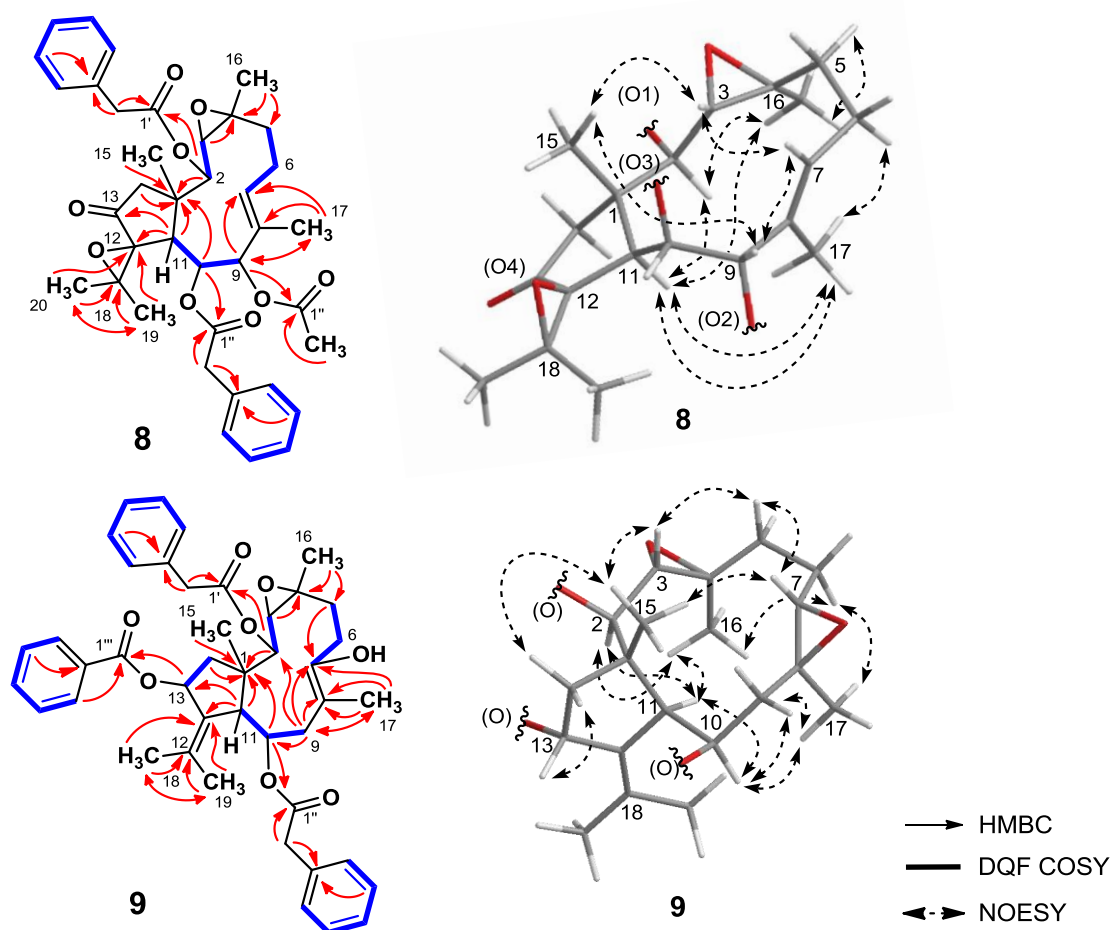
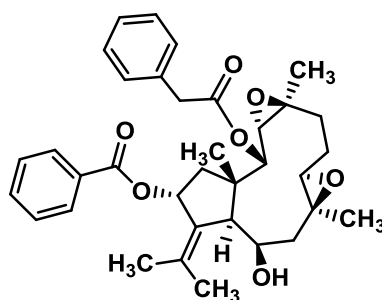


Figure 23. Important 2D NMR correlations of new compounds **8** and **9**.

Damasterpene VIII (**9**) は正の旋光性 (**9**: $[\alpha]_D^{24} +126.1$, both in chloroform in chloroform) を有する白色非結晶性粉末として得られた。IRスペクトルから、**9** は芳香環、エステル、エポキシ基に由来する吸収 (**9**: 2930, 1737, 1708, 1585, 1282, 1026 cm^{-1}) が認められた。ESI-MSにおいては、擬似分子イオンピークが m/z 715 ($\text{M}+\text{Na}^+$) に観察され、高分解能ESI-MSおよび ^{13}C NMRの結果より化合物の分子式が $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{O}_8$ であることが明らかとなった。 ^1H NMR, ^{13}C NMR の解析結果より、**9** もほかのdamasterpene類と同様にドラベラン型ジテルペンであることが示されたが、アシル基は3カ所であることが示唆された [δ 169.1 (C-1'), 170.7 (C-1''), 166.1 (C-1''')]. そこで二次元NMRの解析を行うことにより、3カ所のアシル基の結合部位を決定した結果、**9** は他のdamasterpene類とは異なり9 位に置換基を持たない構造であることが明らかとなった。



22

Figure 24. Chemical structure of deacylated derivatives **22**.

化合物 **9** の相対立体構造を NOESY スペクトルにより検討した結果、**9** の NOESY 相関は他の damasterpene と一致していた (Figure 23). また、**9** のアシル基を部分的に除いた誘導体 **22** (Figure 24) について、励起子キラリティー法により絶対立体構造を検討した結果、CD スペクトルにおいて 223.0 nm に負の Cotton 効果 ($\Delta\epsilon = -20.5$) が観察されたことから **9** の 13 位の絶対立体構造は *R* であると決定された (Figure 26). 以上の実験結果より **9** の立体構造を決定した (Figure 9).

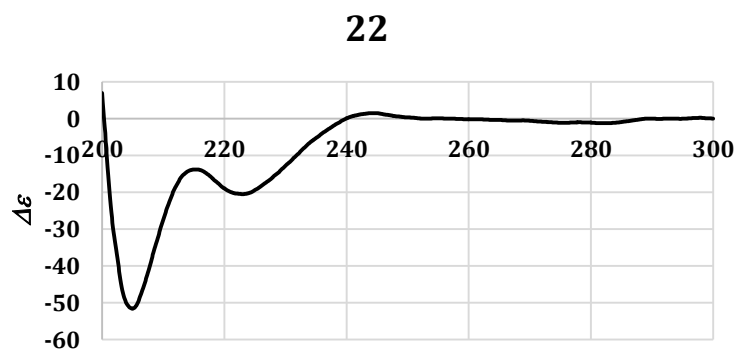


Figure 25. CD spectrum of **22**.

	8^a	9^b
Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{H} (J in Hz)
2	4.83 (d, 9.0)	4.78 (d, 9.0)
3	2.90 (d, 9.0)	3.01 (d, 9.0)
5 α	2.11 (m)	2.25 (ddd, 13.7, 3.5, 3.5)
β	1.19 (m)	1.35 (m)
6 α	2.28 (m)	1.71 (m)
β	2.19 (m)	2.00 (ddd, 10.2, 3.5, 3.5)
7	5.48 (d, 11.0)	2.94 (d, 8.3)
9	5.67 (d, 10.0)	α 2.36 (dd, 13.1, 5.5) β 1.60 (m)
10	5.58 (d, 10.0)	5.27 (ddd, 7.6, 4.0, 1.4)
11	2.06 (br s)	2.70 (br s)
13		5.43 (d, 7.6)
14 α	1.90 (m)	1.52 (m)
β	1.49 (m)	1.63 (m)
15	1.42 (s)	1.25 (s)
16	1.20 (s)	1.43 (s)
17	1.58 (s)	1.49 (s)
19	1.42 (s)	1.85 (s)
20	1.49 (s)	1.51 (s)
2'	3.61 (s like)	3.39 (s like)
4'	7.24 (m)	6.79 (dd, 7.6, 1.4)
5'	7.26 (m)	7.08 (m)
6'	7.22 (m)	7.15 (t like, 7.6)
2''	1.73 (s)	3.64 (d, 15.1) 3.59 (d, 15.1)
4''		7.23 (dd, 8.3, 1.0)
5''		7.38 (m)
6''		7.31 (t like, 8.3)
2'''	3.44 (s like)	
3'''		7.97 (dd, 6.9, 1.4)
4'''	7.10 (dd, 7.0, 1.5)	7.38 (m)
5'''	7.24 (m)	7.52 (m)
6'''	7.22 (m)	
3''''		
4''''		
5''''		

^a Measured by 125 MHz NMR. ^b Measured by 150 MHz NMR.

Table 7. ¹H NMR data of compound **8** and **9** (Measured in CDCl₃).

既知成分 damascenine (10), 2-(dimethylamino)-3-methoxy-benzoic acid (12) の構造解析

クロタネソウ種子より得られた成分 damascenine (10)¹⁹ および 2-(dimethylamino)-3-methoxy-benzoic acid (12)⁵⁸ は既知化合物であったが、そのスペクトルデータが報告されていない化合物であった。そこで、これら二種の既知化合物についてもスペクトルの帰属を行った。

Damascenine (10) の化学構造は既知化合物である methyl 3-methoxyanthranilate (11)⁵⁷ との化学シフト値の比較および二次元 NMR の解析により決定した。化合物 10 の化学シフト値は 11 の化学シフト値と概ね一致したが、窒素原子に隣接したメチル基に由来するシグナル [-NCH₃: δ 3.04 (s, 3H)] のシグナルが観察され、二次元 NMR において -NCH₃ のプロトンから 3 位の 4 級炭素への相関が見られたことから、10 は 11 の 3 位のアミンがメチル化を受けた構造を有していることが明らかとなった。また、ESI-MS の解析結果 [LR MS: m/z 196 (M+H)⁺, HR MS: m/z 196.0965 (calc. 196.0968), (M+H)⁺] により 10 の分子式が C₁₀H₁₃NO₃ であることを確認した (Figure 26)。

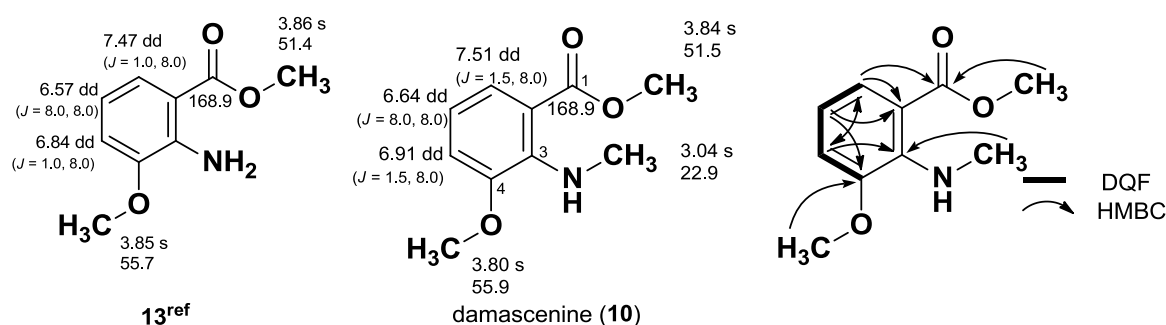


Figure 26. Structural determination of damascenine (10).

2-(Dimethylamino)-3-methoxy-benzoic acid (12) の化学構造は既知化合物である methyl 3-methoxyanthranilate (11) との化学シフト値の比較および二次元 NMR の解析により決定した。¹H NMR において δ 2.95 に 6H のシングレットピークが観察されたことから *N*-ジメチル構造を有していることが示唆された。加えて二次元 NMR において -NCH₃ のプロトンから 3 位の 4 級炭素への相関が見られたこと、-NCH₃ の互いのメチル基プロトンの相関が見られたことから本化合物の構造を決定した。また、ESI-MS の解析結果 [LR MS: m/z 218 (M+Na)⁺, HR MS: m/z 218.0790 (calc. 218.0788), (M+Na)⁺] により 12 の分子式が C₁₀H₁₃NO₃ であることを確認した (Figure 27)。

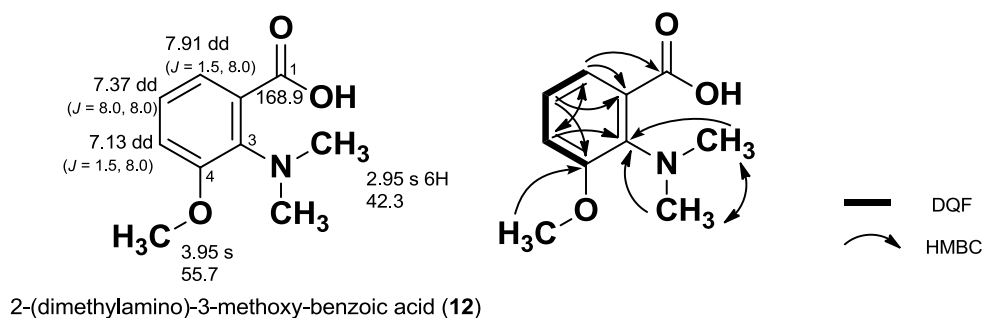


Figure 27. Structural determination of 12.

キンポウゲ科ニゲラ属植物ニオイクロタネソウ (*Nigella sativa*) 含有ジテルペンとの構造比較

クロタネソウから得られた新規ドラベラン型ジテルペンは高度に酸素官能基を有する特徴的な構造を有していた。そこでクロタネソウの類縁種であるニオイクロタネソウについても含有ジテルペンの構造を比較する目的で成分探索研究を実施した。

ニオイクロタネソウ (*N. sativa*) の種子を圧搾したのち、その残滓を *n*-hexane を用いて脱脂した。さらに残渣をメタノールを用いて熱時抽出を繰り返し行い、メタノール抽出エキスを作成した。得られたメタノール抽出エキスについて *n*-hexane と 80% メタノールを用いてさらに液液分配を行った。80% MeOH 可溶性分画について酢酸エチルおよび水を用いて液液分配を行い、得られた酢酸エチル分画について成分分離を行った。

その結果、酢酸エチル可溶性分画より Chart 2 に示すような 4 種の既知主要ドラベラン型ジテルペン、nigellamine B₁ (**13**, 2.8 mg, 0.000056%)²⁷, nigeglamine (**14**, 7.5 mg, 0.00015%)⁶³, nigellamine B₂ (**15**, 2.0 mg, 0.00004%)²⁷, nigellaol (**16**, 10.7 mg, 0.000214%)²⁷ を単離同定した。

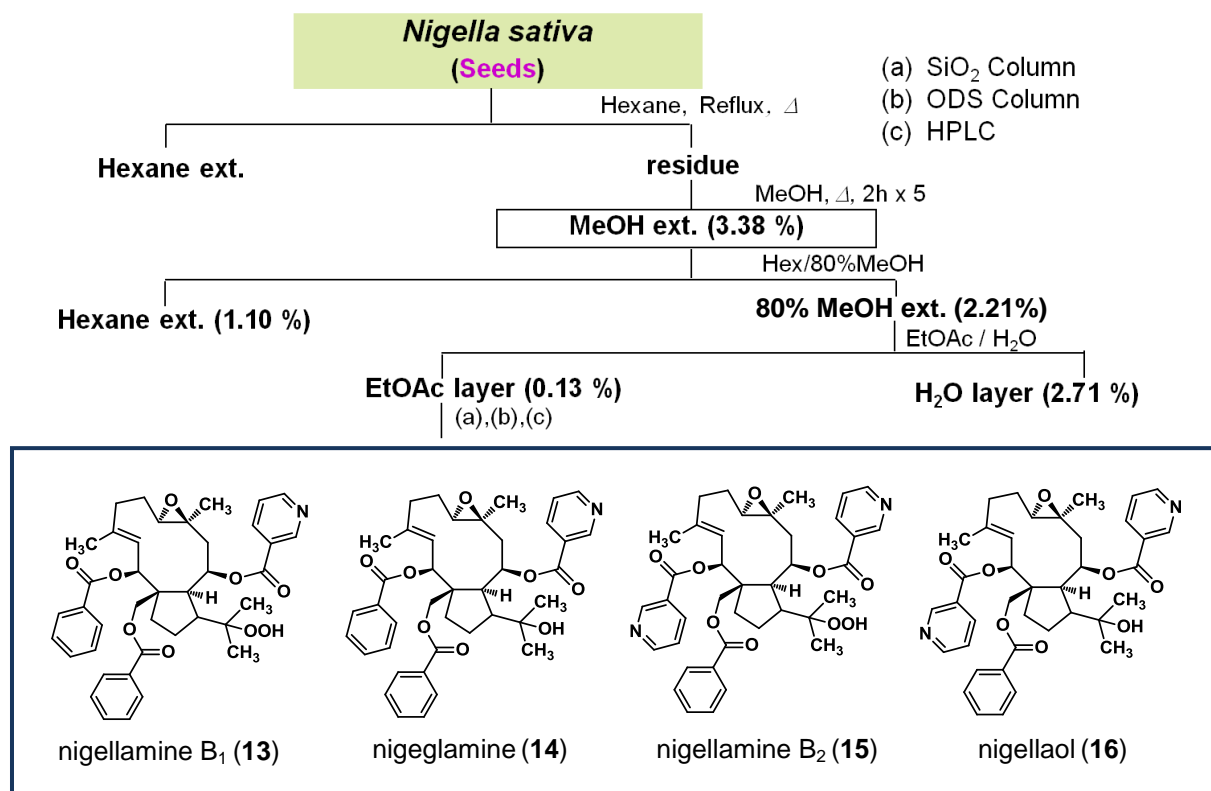


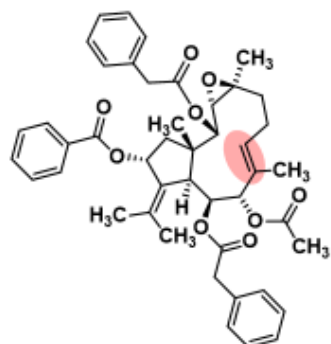
Chart 2. Isolation procedure of constituents (**13–16**) from *N. sativa* seeds.

クロタネソウ由来ジテルペンおよびニオイクロタネソウ由来ジテルペンの構造を比較すると、どちらも酸素官能基を多く有するドラベラン型ジテルペンであったが、アシル基の種類などに若干の違いがあった。アシル基の種類に注目すると、クロタネソウ由来ジテルペンは phenylacetyl 基および acetyl 基を構造中に含むのに対し、ニオイクロタネソウ由来ジテルペンは nicotynoyl 基を構造中に含むことが分かった。また、ニオイクロタネソウ由来ジテルペンの中には構造中にペルオキシ基を持つものが含まれていた。また、二重結合の位置に着目すると、クロタネソウ由来のジテルペンは 7 位に二重結合 (*E* 体) を持つ化合物が多く含まれるのに対し、ニオイクロタネソウ由来のジテルペンは 3 位に二重結合 (*E* 体) を持っていた。こ

のことからそれぞれの化合物は異なるコンフォメーションを取る可能性があり，反応性や機能性の面で異なった性質を持つことが示唆された．そこでこれらの化合物の抗 HSV-1 活性を検討し，構造が活性に与える影響について考察した結果を第 2 章に記述する．

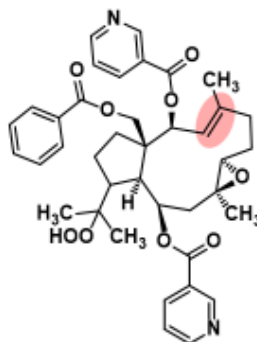
構造比較

N. damascena から得られた
ジテルペン



二重結合：7位
アシル基：4箇所
フェニルアセチル基
アセチル基

N. sativa から得られた
ジテルペン



二重結合：3位
アシル基：3箇所
ニコチノイル基

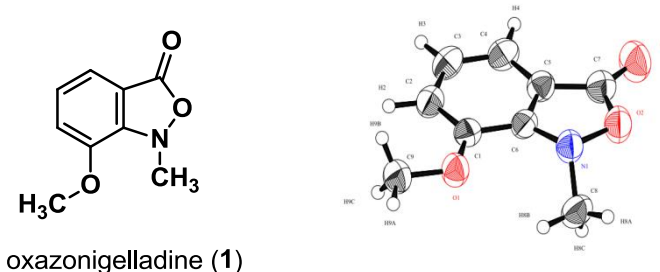
Figure 28. Structural comparison of diterpenes from *N. damascena* and *N. sativa*.

小括

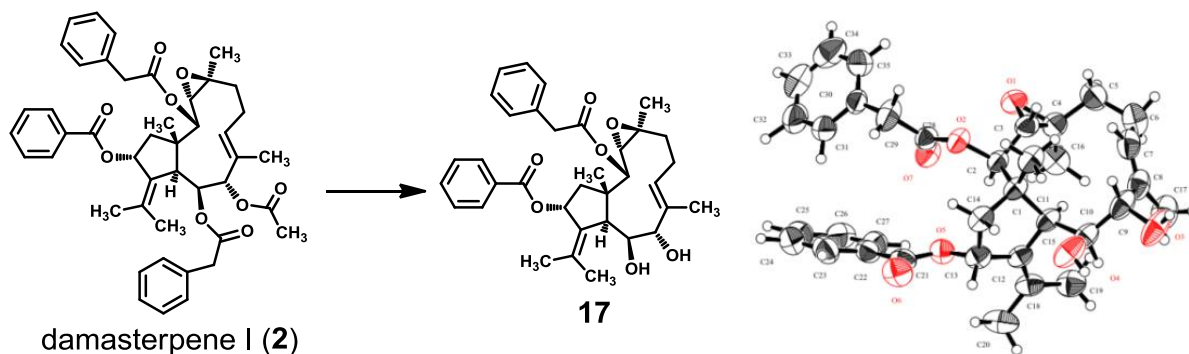
第一章では、天然物の構造的利点である複数のキラル中心、多環式の構造、ヘテロ原子を反映した化合物として、高度に酸素官能基を有するジテルペン、ジテルペンアルカロイドの単離、構造決定について記述した。

結果として、キンポウゲ科ニゲラ属植物クロタネソウ (*N. damascena* 品種:Moody Blues) の種子より、1 種の新規アルカロイド oxazonigelladine (**1**)、8 種の新規ドラベラン型ジテルペン damasterpene I–VIII (**2–9**) を単離構造決定した。

化合物 **1** は一見単純な構造であるが、天然物からはほとんど報告例のない isoxazolidinone 骨格を構造中に有しており、その化学構造は X 線単結晶構造解析法により確認をしている。また、**1** の化学的安定性についても考察した。



一方、damasterpene 類は高度に酸素官能基を有するジテルペンであり、構造中に 8~10 カ所のキラル中心を持っていた。その立体化学構造の決定には、X 線単結晶構造解析法および励起子キラリティー法、NOESY スペクトルを利用し、その絶対立体化学構造を決定した。



第二章 単離化合物の生物活性評価

第一節 単離化合物の抗単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 活性

クロタネソウより単離された化合物 (**1–12**) およびニオイクロタネソウから単離された化合物 (**13–16**) について Vero 細胞を用いた plaque reduction assay により抗 HSV-1 活性を測定した。Vero 細胞を 12 時間培養後、HSV-1 (HF 株) を 100 plaque formation unit (pfu)/well になるように添加し、30 分間感染させた。30 分後、ウイルス液を取り除き、各濃度の化合物を添加した 1%メチルセルロース含有培地を加えて 48 時間培養した。HSV-1 が Vero 細胞に感染すると細胞変性効果 (cytopathic effect) により細胞は形態変化を起こしプラークを形成する。このプラークは染色することで肉眼で観察可能である。48 時間後に固定染色を行い、生じたプラーク数を計数することで抗 HSV-1 活性の指標とした⁶⁴。なおプラークは直径が 0.2 mm より大きいものをポジティブとしてカウントした。比較対照物質として、治療薬であるアシクロビルおよび代表的な抗 HSV-1 活性を有する天然物であるオレアノール酸⁵⁵を用いた (Figure 30)。

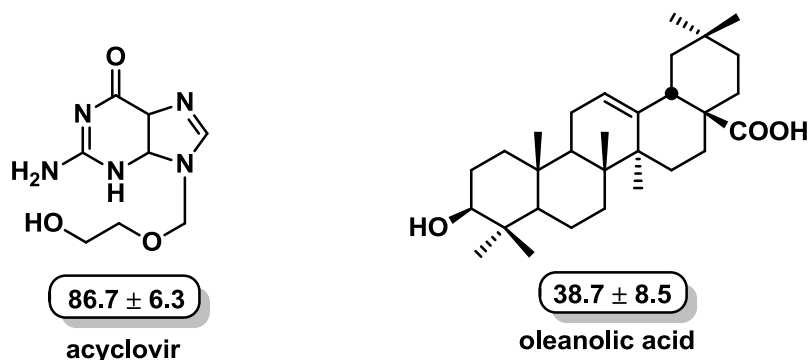
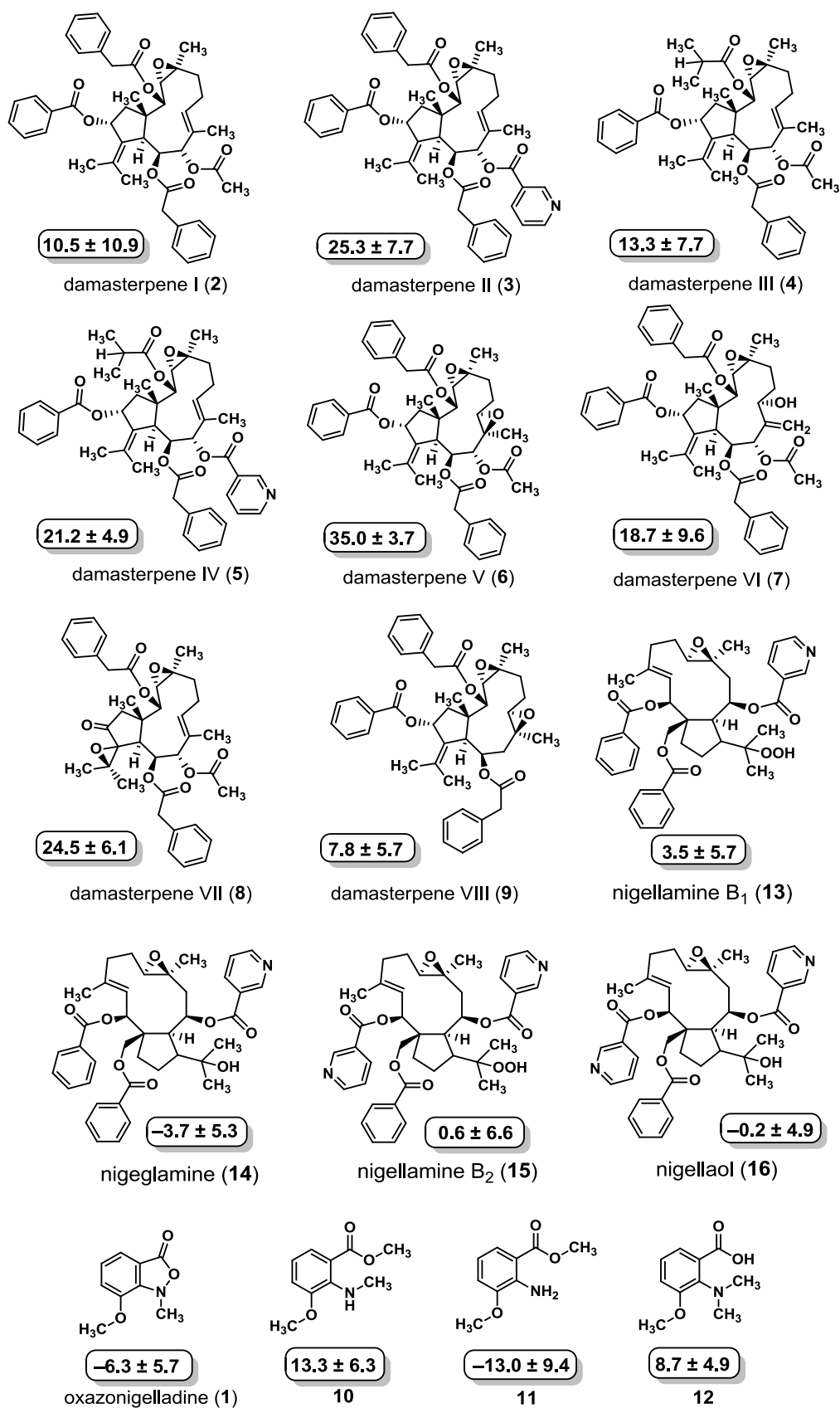


Figure 29. Inhibitory effects (%) of positive controls against HSV-1 at 10 μ M.

はじめに、10 μ Mにおける抗 HSV-1 活性を測定した (Figure 31, Table 8)。その結果、**3** (抑制率: $25.3 \pm 7.7\%$)、**5** ($21.2 \pm 4.9\%$)、**6** ($35.0 \pm 3.7\%$)、**8** ($24.5 \pm 6.1\%$) がコントロール群に対して有意な抗 HSV-1 活性を示した。クロタネソウ由来のジテルペン (**1–9**) はその一部が抗 HSV-1 活性を示したが、ニオイクロタネソウ由来ジテルペン (**13–16**) は抗 HSV-1 活性を全く示さなかった。また、クロタネソウ由来のアルカロイド (**1, 10–12**) も抗 HSV-1 活性を全く示さなかった。



Each value represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3, 4$).

Figure 30. Inhibitory effects (%) of isolated compounds against HSV-1 at 10 μ M.

Table 8. Inhibitory effects of the isolated compounds and its derivatives against HSV-1 in Vero cells.

Concentration (μ M)	Inhibition (%)					Log P	CLogP
	0	1	2.5	10	25		
oxazonigelladine (1)	0.0 \pm 16.8	-	-	-6.3 \pm 5.7	-5.5 \pm 3.7	1.67	2.09
damasterpene I (2)	0.0 \pm 4.9	-	-1.6 \pm 11.0	10.5 \pm 11.0	3.6 \pm 6.7	8.30	9.36
damasterpene II (3)	0.0 \pm 2.4	-	19.0 \pm 4.6*	25.4 \pm 8.3*	34.7 \pm 4.5*	8.82	9.71
damasterpene III (4)	0.0 \pm 4.0	-	-	13.3 \pm 3.7*	17.2 \pm 8.3*	7.53	8.58
damasterpene IV (5)	0.0 \pm 3.4	-	8.3 \pm 5.6	20.5 \pm 2.3*	15.1 \pm 2.1*	8.05	8.93
damasterpene V (6)	0.0 \pm 2.1	-0.6 \pm 11.2	26.3 \pm 4.2*	36.0 \pm 1.8*	-	-	8.19
damasterpene VI (7)	0.0 \pm 7.6	-	-	18.7 \pm 9.7*	-	-	8.09
damasterpene VII (8)	0.0 \pm 3.9	-	16.8 \pm 3.2*	24.4 \pm 3.1*	18.8 \pm 3.6*	3.97	6.49
damasterpene VIII (9)	0.0 \pm 7.6	-	-	-3.8 \pm 9.7	-	6.59	7.86
10	0.0 \pm 6.8	-	-	13.3 \pm 6.2	5.9 \pm 4.3	1.22	2.72
11	0.0 \pm 7.6	-	-	-13.0 \pm 9.4	-18.6 \pm 12.1	0.92	2.18
12	0.0 \pm 5.6	-	-	2.4 \pm 6.7	-9.7 \pm 8.8	1.75	2.27
nigellamine B ₁ (13)	0.0 \pm 6.8	-	-	3.5 \pm 5.7	-	6.18	6.15
nigeglamine (14)	0.0 \pm 6.2	-	-	-3.7 \pm 5.3	-	5.73	6.69
nigellamine B ₂ (15)	0.0 \pm 5.0	-	-	0.6 \pm 6.6	-	4.84	4.81
nigellaol (16)	0.0 \pm 6.2	-	-	-0.2 \pm 4.9	-	4.40	5.34
17	0.0 \pm 5.0	-0.3 \pm 5.8	19.9 \pm 4.5*	32.1 \pm 1.5*	19.5 \pm 7.8	4.87	6.66
18	0.0 \pm 10.3	-	-	12.0 \pm 8.2	-	0.36	1.52
19	0.0 \pm 5.0	-	2.5 \pm 7.7	20.9 \pm 4.6*	-	4.31	4.89
20	0.0 \pm 7.8	9.3 \pm 10.5	19.1 \pm 4.4*	24.9 \pm 8.8*	-	3.88	5.52
oleanolic acid	0.0 \pm 7.5	0.3 \pm 2.3	13.1 \pm 1.8*	38.7 \pm 8.5*	-	7.47	8.63
acyclovir	0.0 \pm 8.2	32.5 \pm 12.9*	57.5 \pm 11.8*	96.0 \pm 11.8*	-	-0.84	-2.40

Each value represets the mean \pm S.E.M., ($n = 3, 4$).

Significantly different from control group, * $p < 0.05$ by Steel's test.

続いてクロタネソウから得られた新規単離ジテルペン damasterpene 類についてそれぞれ脱アシル化した誘導体 (**17–20**) を作成し (Figure 31), 10 μM における抗 HSV-1 活性を同様に測定した (Figure 32). 新規単離ジテルペン (アシル基: 4 カ所) の脱アシル化にはナトリウムメトキシドを用い, その反応温度が室温の条件ではアシル基が 2 カ所の化合物を, 反応温度が 80 $^{\circ}\text{C}$ の条件ではアシル基が全て切断された脱アシル化体を得ることができた. 抗 HSV-1 活性試験の結果として, damasterpene 誘導体のうち **17** ($32.1 \pm 1.5\%$), **19** ($20.7 \pm 7.6\%$), **20** ($25.0 \pm 8.7\%$) がコントロール群と比べて有意な抑制活性を示した.

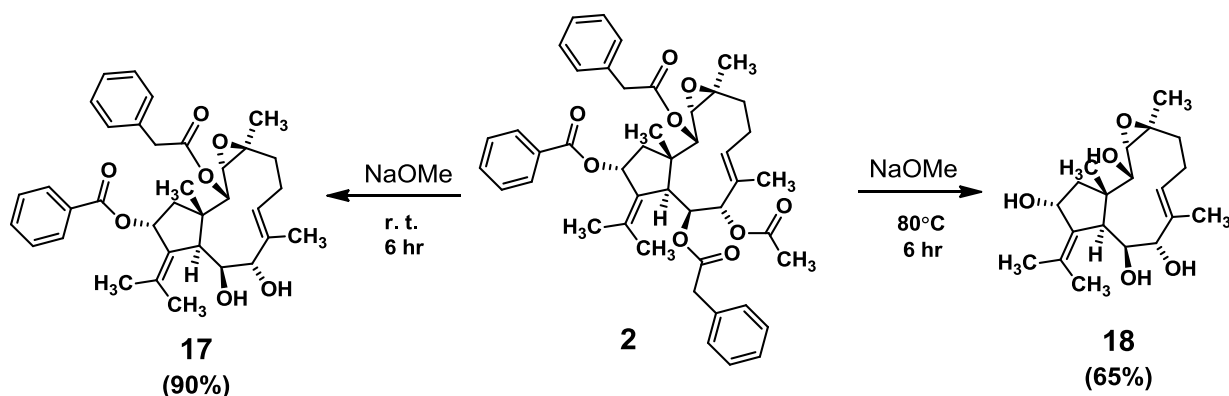
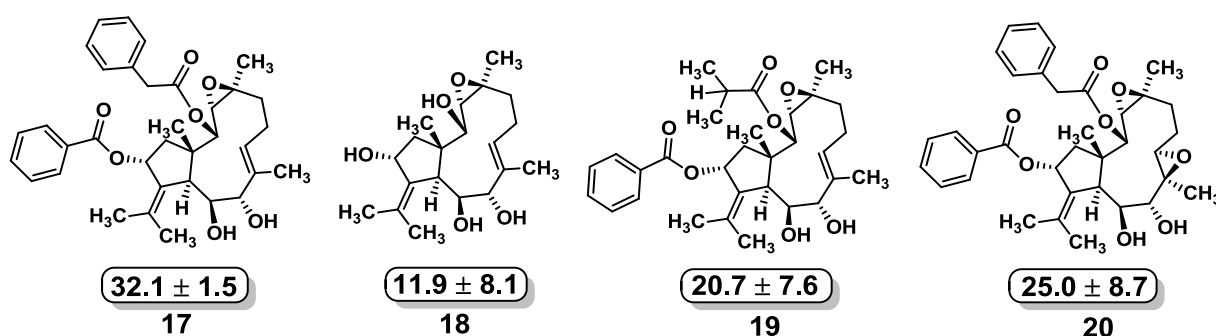


Figure 31. Alkaline methanolysis of damasterpene I (**2**).

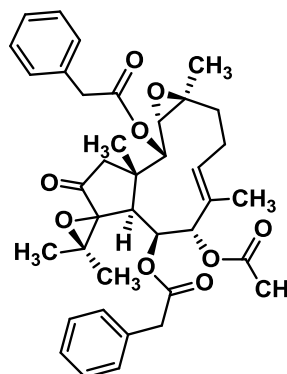
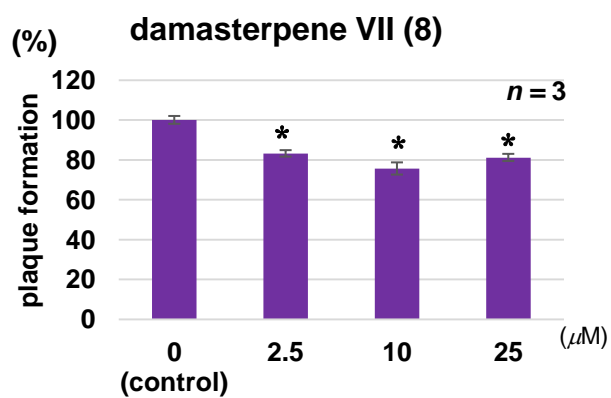
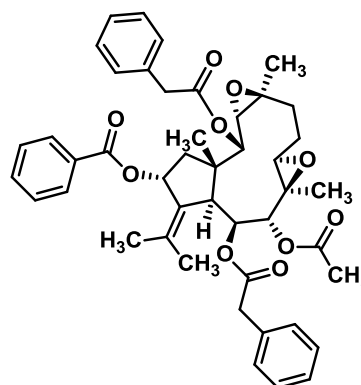
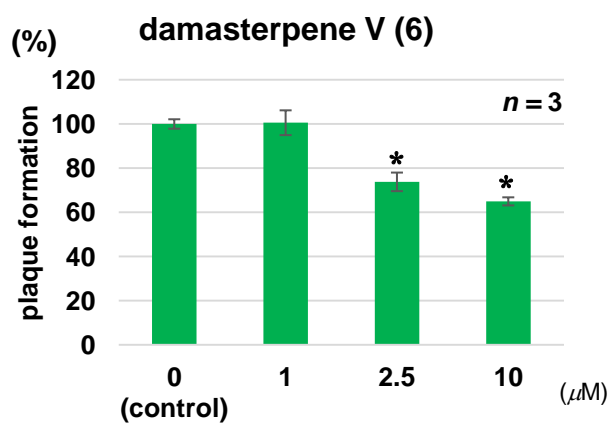
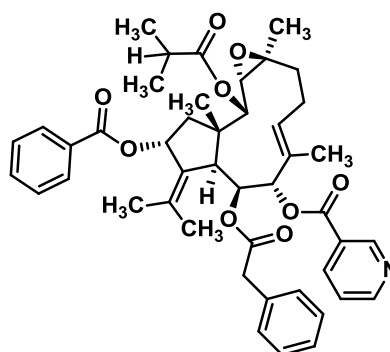
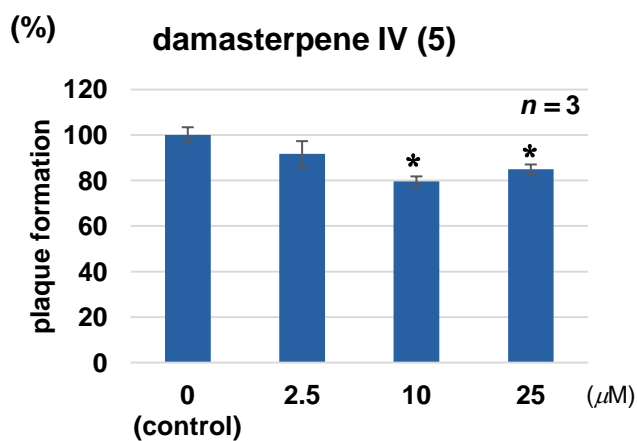
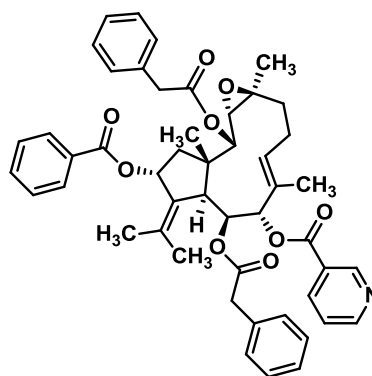
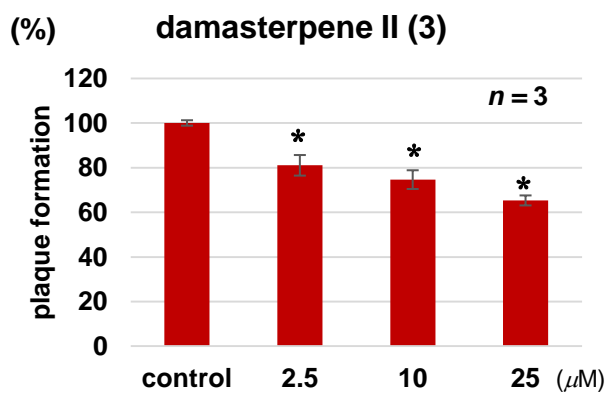


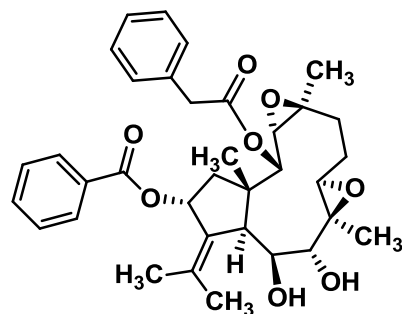
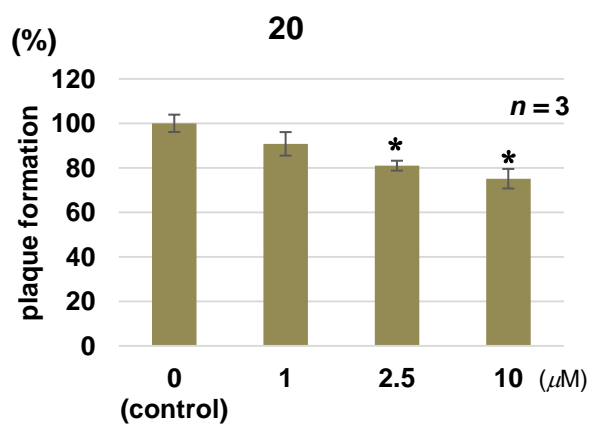
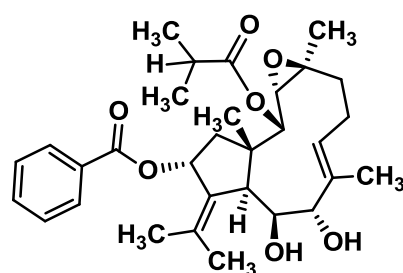
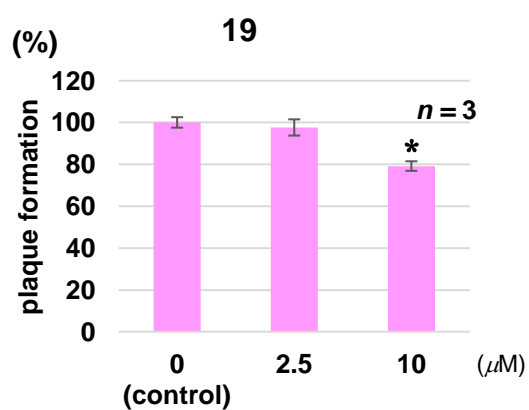
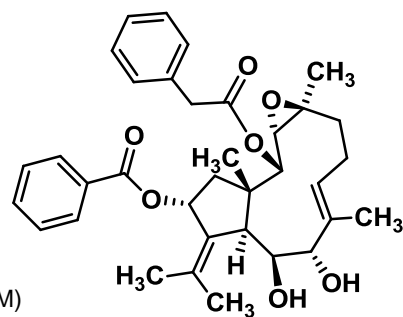
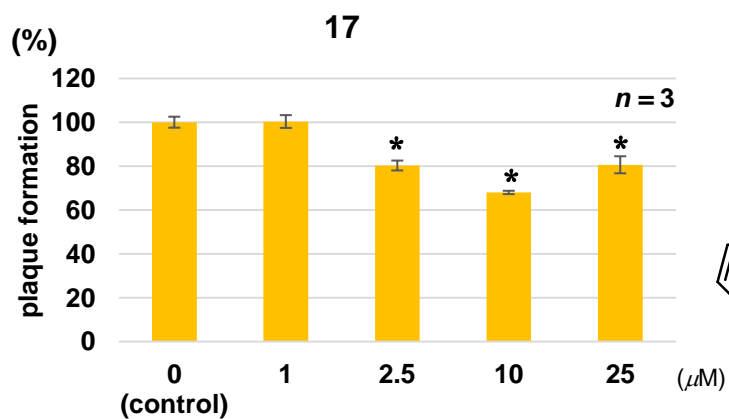
Each value represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3, 4$).

Figure 32. Inhibitory effects (%) of damasterpene derivatives against HSV-1.

ここまででクロタネソウおよびニオイクロタネソウの含有成分とその誘導体について抗 HSV-1 活性を検討し, クロタネソウに含有されるドラベラン型ジテルペンおよびその誘導体の一部が 10 μM において緩やかな抗 HSV-1 活性を呈した. なお, damasterpene V (**6**) および誘導体 **17** は比較対照物質であるオレアノール酸と同等の抑制活性を示した.

そこで 10 μM で 2 割以上の抑制活性を示した化合物 **2, 4, 5, 7, 19, 21** および **22** について異なる濃度での抗 HSV-1 活性を測定し, 濃度と活性の相関について検討を行った. 2.5 μM で 2 割以上の抑制活性を示した化合物 **6, 17** および **20** についてはさらに 1 μM で検討を行った. また, 単離化合物 **3, 5, 8** および誘導体 **17** は 25 μM において抑制活性の増強が見られるかを確認した (Figure 33, Table 8).





Each bar represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.05$ by Steel's test.

Figure 33. Inhibitory effects of compounds 3, 5, 6, 8, 17, 19 and 20.

その結果、いずれのサンプルも 10 μM 以下では活性と濃度の間に相関性がみられたが、化合物 **3** を除いて 25 μM で頭打ちとなった。また、damasterpene V (**6**) は 2.5 μM においてオレアノール酸よりも強い抑制活性を示すことが明らかとなった。また、いずれの化合物も 1 μM では抑制活性を全く示さなかった。

これまで、ドラベラン型骨格化合物の機能性として抗ウイルス作用^{53, 54, 65-67}、抗腫瘍活性⁶⁸、抗炎症作用⁶⁹、抗菌作用⁷⁰が主に報告されていた。ただしこれらのドラベラン型ジテルペンは構造中の酸素官能基の数が少ない点やアシル基の種類の点で今回得られた単離化合物とは構造に違いがある。ドラベラン型ジテルペンの抗ウイルス作用においてはヒト免疫不全ウイルス (HIV) への有効性の報告⁶⁵⁻⁶⁷は複数なされていたが、一方で HSV-1 への報告は Barbosa らによる報告⁵³および Abrantes らによる報告⁵⁴のみであった。したがって、ドラベラン型ジテルペンの HSV-1 への有効性についてはさらなる検討が求められていた。本研究結果により、クロタネソウから得られた高度にアシル基を有するドラベラン型ジテルペン **3, 5, 6, 8** 及びその誘導体 **17, 19, 20** は抗 HSV-1 活性を示すことが明らかとなった。

単離化合物の脂溶性と活性の関係を検討する目的で、Chemdraw を用いて各化合物の log P 値および ClogP 値を算出し、Table 8 に示した。リピンスキーの法則⁵によれば、一般的に、logP 値は 5 以下であれば経口バイオアベイラビリティーが良好であるとされるが、damasterpene 類はその CLogP 値が 5 よりも大きいことから、水への溶解性が乏しいことが予測された。その一方で、アシル基を部分的に取り除いたジアシル誘導体 (**17, 19, 20**) はいずれも LogP 値が 5 以下であり、有意な抗 HSV-1 活性を示したことから、抗 HSV-1 活性物質として有用である可能性が示された。

単離化合物の細胞毒性の検討

抗 HSV-1 活性を考察するうえで、化合物による細胞毒性の影響の検討も行った。細胞毒性の検討は Vero 細胞を用いて、WST-8 がホルマザン色素へ還元されることによる呈色反応を利用しその吸光度を測定することで生細胞の割合を算出した (Table 9)。その結果、クロタネソウから得られた高度にアシル化を受けたドラベラン型ジテルペンは 25 μM まで細胞毒性を全く示さなかったが、例外として damasterpene VI (**7**) が 25 μM において 21.6% の細胞毒性を示した。一般的にジテルペンには細胞毒性が強い化合物が含まれており^{71, 72}、ドラベラン型ジテルペンについても細胞毒性の報告例⁶⁸があることから、クロタネソウ由来のドラベラン型ジテルペンが細胞毒性を示さなかったことは興味深い。一方でニオイクロタネソウから得られたドラベラン型ジテルペンは、構造中に 2 ヲ所のニコチノイル基を有する **15** (細胞毒性: $42.4 \pm 1.6\%$, 25 μM)、**16** ($21.9 \pm 4.1\%$, 25 μM) が細胞毒性を示したが、ニコチン酸が 1 ヲ所の **13** および **14** は細胞毒性を示さなかった。またクロタネソウから得られたアルカロイド類は、**11** のみが 25 μM において 25.0% の細胞毒性を示した。

Table 9. Cytotoxic effects of isolated compounds in Vero cells (WST-8 assay).

Concentration	Viability (%)				
	0	1	2.5	10	25
oxazonigelladine	100.0 ± 2.8	109.8 ± 2.1	105.7 ± 1.7	102.5 ± 0.5	99.6 ± 3.4
damasterpene I (2)	100.0 ± 1.8	115.9 ± 4.5	123.7 ± 7.3	128.8 ± 7.8*	131.8 ± 9.5*
damasterpene II (3)	100.0 ± 0.8	100.9 ± 0.8	98.5 ± 1.1	100.8 ± 0.6	101.5 ± 1.9
damasterpene III	100.0 ± 3.1	122.9 ± 1.5**	138.7 ± 0.9**	132.4 ± 0.8**	134.4 ± 0.7**
damasterpene IV	100.0 ± 1.7	101.9 ± 0.5	96.2 ± 1.5	92.5 ± 1.1**	97.7 ± 1.3
damasterpene V (6)	100.0 ± 4.4	104.8 ± 1.6	109.3 ± 5.4	112.3 ± 3.3	114.2 ± 3.8
damasterpene VI	100.0 ± 0.7	96.6 ± 1.8	100.7 ± 3.0	98.3 ± 0.5	78.4 ± 2.1**
damasterpene VII	100.0 ± 1.5	116.2 ± 1.9**	121.2 ± 1.2**	120.0 ± 2.3**	118.8 ± 1.7**
damasterpene VIII	100.0 ± 0.8	100.1 ± 0.3	98.1 ± 0.7	92.1 ± 1.7	95.3 ± 1.3
10	100.0 ± 2.3	126.2 ± 2.7**	125.8 ± 2.6**	125.2 ± 3.8**	132.7 ± 2.3**
11	100.0 ± 2.9	100.0 ± 3.2	103.4 ± 1.9	87.6 ± 2.7**	75.0 ± 2.3**
12	100.0 ± 0.6	122.2 ± 2.8**	119.6 ± 3.6*	122.7 ± 5.3**	123.4 ± 4.3**
nigellamine B ₁ (13)	100.0 ± 2.0	99.3 ± 1.7	95.6 ± 1.9	102.4 ± 4.2	104.8 ± 5.3
nigeglamine (14)	100.0 ± 2.1	105.9 ± 3.0	103.4 ± 3.2	104.0 ± 1.7	101.8 ± 2.6
nigellamine B ₂ (15)	100.0 ± 3.7	97.8 ± 2.0	97.2 ± 1.4	107.6 ± 4.6	57.6 ± 1.6**
nigellaol (16)	100.0 ± 1.6	95.5 ± 3.5	107.0 ± 2.6	90.2 ± 6.1	78.1 ± 4.1**
17	100.0 ± 5.2	100.9 ± 5.9	99.0 ± 5.8	101.9 ± 4.4	88.5 ± 1.8
18	100.0 ± 1.0	96.6 ± 2.1	90.4 ± 2.3**	92.5 ± 1.4*	96.0 ± 1.7
19	100.0 ± 0.7	101.4 ± 1.4	102.5 ± 1.5	100.4 ± 0.9	92.8 ± 1.0**
20	100.0 ± 1.3	101.4 ± 0.9	101.0 ± 1.4	99.6 ± 2.0	101.5 ± 1.8

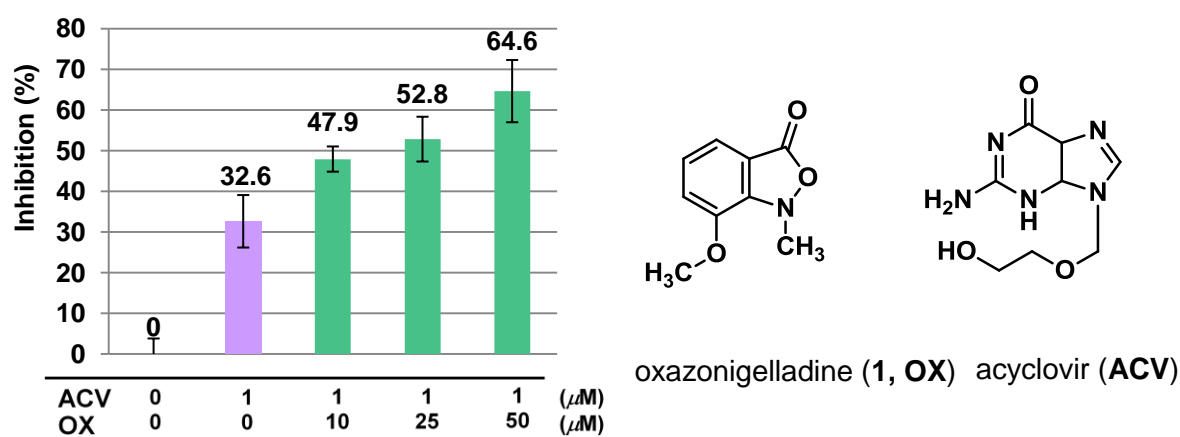
Each value represents the mean ± S.E.M. ($n = 3, 4$).

Significant different from control group, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Dunnett's test.

第二節 ヘルペスウイルスに関する機能性物質

第一節では単離化合物の抗 HSV-1 活性を検討したが、第二節では抗 HSV-1 活性とは異なる機能性を示した化合物について記述する。

新規 isoxazolidinone 誘導体 oxazonigelladine (**1**) は抗 HSV-1 活性を 50 μM まで全く示さなかった。しかしながら、**1** とアシクロビルを併用するとアシクロビルの抗 HSV-1 活性が増強されることが明らかとなった。アシクロビルは 1 μM において HSV-1 に対して 32.6% の抑制率を示す。アシクロビル 1 μM に各濃度の **1** を併用し (10, 25, 50 μM)、同様に抗 HSV-1 活性を測定したところ、濃度依存的に抗 HSV-1 活性の増強が観察された。特に、**1** を 50 μM 併用した群ではアシクロビル単体で用いた群に比べ 2 倍の抑制活性 (抑制率: 64.6%) を示した。また、第二章第一節で言及したように **1** は細胞毒性を示さず、100 μM においても細胞生存率は $102.4 \pm 1.3\%$ であった。この結果から、**1** は抗 HSV-1 活性を示さずにアシクロビルの作用を増強することが示された。



Each bar represents the mean \pm S.E.M. ($n = 3$).

Figure 34. Synergetic effects of **1** with acyclovir.

化合物 **1** は単独では抗 HSV-1 活性を示さないことから、アシクロビルの活性化に関わる過程を促進している可能性が推察された。

林らは熱帯性薬用植物 *Scoparia dulcis* より得られた scopadulciol がアシクロビルの作用を増強することを報告している⁷³。Scopadulciol とアシクロビルを併用した場合、dCTP, dTTP, dATP, dGTP など三リン酸化体の含量がアシクロビル単体投与時に比べ増加した。さらにアシクロビルの三リン酸化体 (活性体) の濃度もアシクロビル単体投与時に比べ 4 倍以上に増加した。Scopadulciol を単独投与時にそのような現象は見られなかったため、1 つの可能性として、scopadulciol はチミジンキナーゼの活性化に関与していると考えられることを述べている。化合物 **1** のアシクロビル増強作用のメカニズムは明らかではないが、scopadulciol のようにチミジンキナーゼの活性化に関与している可能性も考える。

Benzisoxazolidinone 誘導体の生物活性についてははこれまであまり報告されておらず、著者の知る限り抗菌作用の報告^{74, 75}や、真菌の一種である *Fusarium larvarum* より得られた化合物 parnafungin 類の抗真菌作用^{76, 77}の報告などに限られている。今回、isoxazolidinone 誘導体である **1** にアシクロビルの作用増強効果を見出したことは、isoxazolidinone 誘導体の機能性を開拓するうえで新たな知見として意義深いと考えられる。

Damasterpene VIII (**9**) においても抗 HSV-1 活性とは異なる機能性が見出された。第一節で述べた plaque reduction assay においては生じたプラークの数を評価し、プラークの大きさには言及していなかった。Damasterpene VIII (**9**) を除いた他のすべての化合物を投与した場合は、生じたプラークの直径が一定であった。しかし **9** を 10 μM 投与した群では、プラーク径の顕著な拡大が認められた (Figure 35).

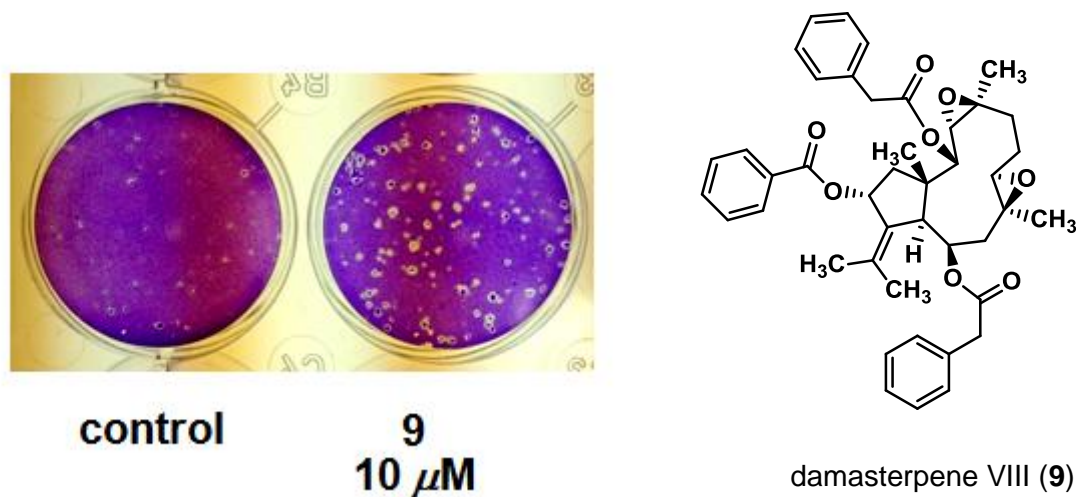
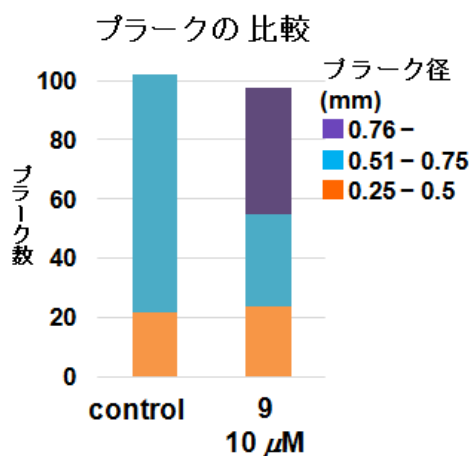


Figure 35. Enlargement of plaque size.

コントロール群と **9** を投与した群について、生じたプラークの直径を、0.76 mm 以上、0.51~0.75 mm, 0.25~0.5 mm の三段階に分けて計数し、結果を Figure 37 に示した。二群を比較すると、プラークの総数に変化はなかったが **9** を加えた群では直径 0.76 mm 以上のプラークが検出された (Figure 36).



Each group displays the mean of 3 wells.

Figure 36. Number of plaques sorted by plaque size.

一般的に、プラークはウイルスが細胞に感染した際に起こる細胞変性効果により形成される。したがって、なんらかの機構により **9** は Vero 細胞における細胞変性効果を増大させていると考えられる。

プラーク径の拡大がどのようなメカニズムによるものかは明らかではないが、化合物 **9** が細胞毒性を示す場合⁷⁸、相対的に HSV-1 が活発化しプラーク径の拡大が予測される。しかし **9** は細胞毒性を 25 μM まで示さなかったことから、**9** によるプラーク径の拡大には別の要因

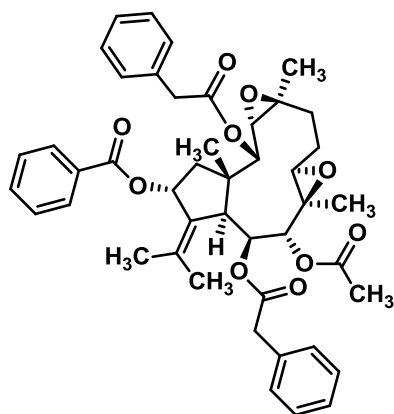
が関係していると考えられる．ウイルスの複製過程が促進された場合，一細胞あたりで產生されるウイルス量が増加することから，プラーク径の拡大が予測される^{78, 79}．この機能性は抗 HSV-1 活性とは逆方向のものであるが，著者の知る限り，細胞変性効果を増大させる化合物の報告はこれまでになく，ウイルスの活動性を上げる実験試薬として応用ができる可能性がある．

小括

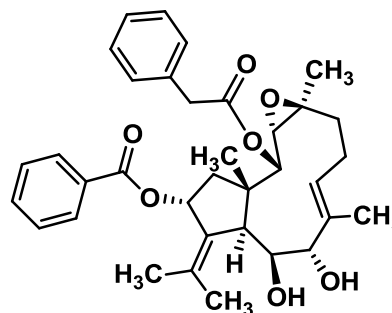
クロタネソウより得られた化合物，すなわち高度にアシル化を受けた新規ドラベラン型ジテルペン damasterpene 類 (2-9) の一部は 10 μ M において細胞毒性を示さずに緩やかな抗 HSV-1 活性を示した．また，新規化合物 damasterpene V (6) と誘導体 17 は比較対照物質として用いたオレアノール酸と同程度の抑制活性であった．一方でニオイクロタネソウより得られたドラベラン型ジテルペン (13-16) はいずれも抗 HSV-1 活性を全く示さなかった．

このことから，活性の発現と化合物の構造を比較して検討し，活性発現に必要な構造の考察を行った結果，ドラベラン型骨格の二重結合の位置や 9 位のアシル基の種類が活性の発現に関与している可能性が示された．一方で細胞毒性試験においてはニコチン酸を構造中に 2 カ所有することで細胞毒性が出現することが示唆された．

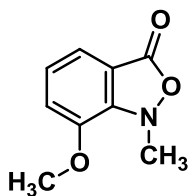
また新規 isoxazolidinone 誘導体 oxazonigelladine (1) によるアシクロビルの活性増強作用や新規ドラベラン型ジテルペン damasterpene VIII (9) によるプラーク径拡大作用を新たに見出した．



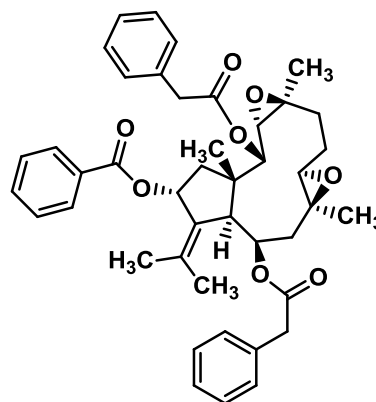
damasterpene V (6)



2-phenylacetyl 13-benzoyl damasterpenol (17)



oxazonigelladine (1)

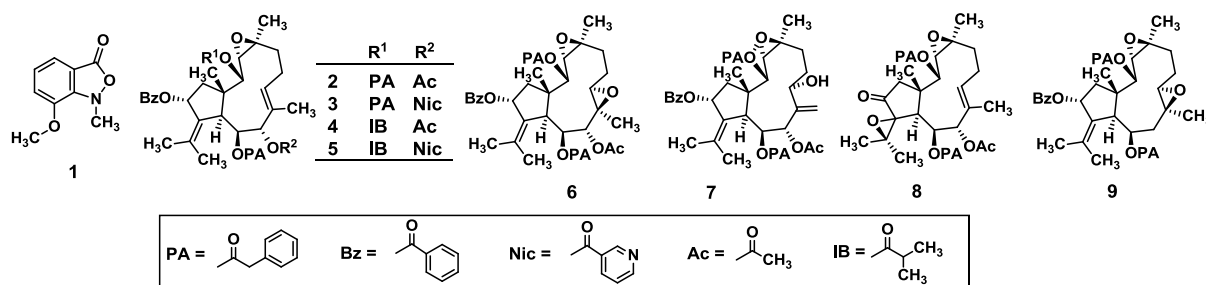


damasterpene VIII (9)

結論

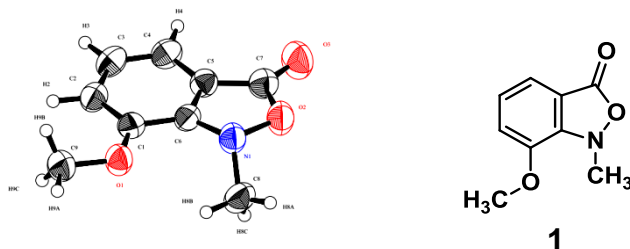
天然物の構造的利点である複数のキラル中心，多環式の構造，ヘテロ原子を反映した化合物として，高度に酸素官能基を有するジテルペンおよびジテルペンアルカロイドの開拓を目的に，キンポウゲ科ニゲラ属植物クロタネソウ (*Nigella damascena*, 品種: Moody Blues) の種子について成分探索研究を行った。

その結果，クロタネソウ種子の酢酸エチル可溶性分画から，高度に酸素官能基を有する新規ドラベラン型ジテルペンとして damasterpene I –VIII (2–9)，新規アルカロイドとして oxazonigelladine (1) を単離，構造決定した。

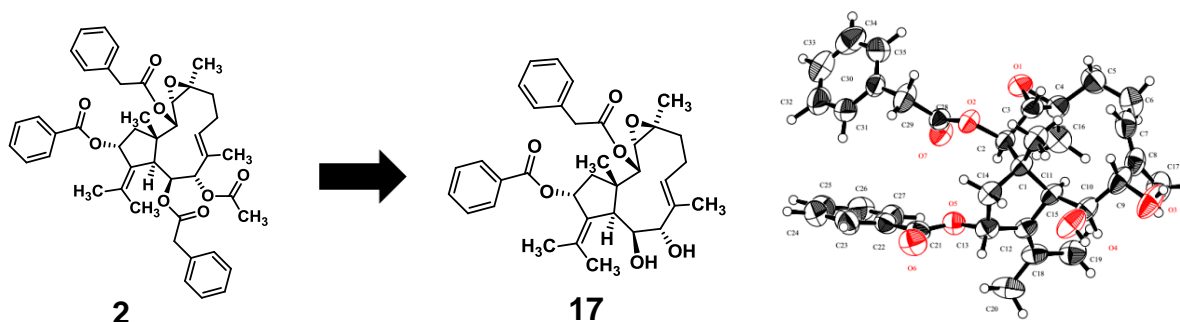


Oxazonigelladine (1) は天然物においてほとんど報告例のない isoxazolidinone 骨格を構造中に有しており X 線単結晶構造解析法でその構造を確認した。化合物 1 は Natural Products Report 誌において珍しい骨格を持つ化合物として紹介された⁸⁰ ことから，1 の構造の希少性や有用性が窺われる。

また，1 は一見不安定な構造であるように思われるが比較的安定な化合物として単離されたことから，1 は芳香族性を有する安定性の高い共鳴構造を持つことによって化学的安定性が向上しているのではないかと考察した。以上のように，1 は特徴的な構造の特性をもつ化合物であり，また二章においてアシクロビルの抗 HSV-1 活性増強作用を認めたことから，医薬素材として有用である可能性のある化合物であると考えられる。



Damasterpene I –VIII (2–9) は構造中に高度にアシル基を有するドラベラン型ジテルペンであった。Damasterpene 類は構造中に 8~10 カ所のキラル中心を有していたが、X 線単結晶構造解析法および励起子キラリティー法を用いてその絶対立体構造を決定した。



Oxazonigelladine (**1**) および damasterpene I –VIII (2–9) はその機能性の検討がほとんどなされていない化合物群であった。そこでこれら化合物群の機能性を解明する目的で plaque reduction assay を用いて HSV-1 に対する機能性を検討した。

その結果、クロタネソウから得られた、damasterpene V (**6**) [抑制率: $36.0 \pm 1.8\%$, $10 \mu\text{M}$] および 2-phenylacetyl 13-benzoyl damasterpenol (**17**) [抑制率: $32.1 \pm 1.5\%$, $10 \mu\text{M}$] をはじめとする一部の damasterpene 類は細胞毒性を示さずに比較対照物質として用いたオレアノール酸 [抑制率: $38.7 \pm 8.5\%$, $10 \mu\text{M}$] と同等の抗 HSV-1 活性を有することを見出した。その一方でニオイクロタネソウから比較のために単離したドラベラン型ジテルペンは活性を全く示さなかったことから、ドラベラン型ジテルペンの二重結合の位置やアシル基の種類が抗 HSV-1 活性の発現に影響していることが示唆された。このことより、クロタネソウから得られたドラベラン型ジテルペンは抗 HSV-1 活性物質として有用である可能性があり、そのアシル化の程度や置換するアシル基の種類を検討することで、抑制活性が増強する可能性がある。

また、oxazonigelladine (**1**) は単独では抗 HSV-1 活性を全く示さなかったが、アシクロビルと併用することによりその抗 HSV-1 活性を増強することを見出した。(アシクロビル $1 \mu\text{M}$ 単独投与時 抑制率: 32.6% , アシクロビル $1 \mu\text{M}$ + **1** $50 \mu\text{M}$ 抑制率: 64.6%) 化合物 **1** のアシクロビルの活性増強作用のメカニズムは明らかではないが、少なくとも $100 \mu\text{M}$ 以下の濃度で細胞毒性を示さなかったため、有用な機能性物質になりうる可能性がある。

一方、damasterpene VIII (**9**) は $10 \mu\text{M}$ において顕著なプラーク径の増大作用を呈した。すなわち **9** は細胞変性効果を増大させる機能性を有することを見出した。その原因の可能性の一つとして、ウイルスの複製過程の促進が考えられるため更なる検討が求められる。このような機能性物質の報告は著者らの知る限りこれまでにない。

以上のように、本研究により天然物の構造的利点を活かした化合物を新規に開拓し、その未解明であった機能性を一部明らかにすることができた。本研究結果が創薬領域における新たな知見に繋がることが期待される。

謝辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 生薬学分野 松田久司教授、ならびに中村誠宏准教授、中嶋聡一助教に衷心より深甚なる敬意を表します。

副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた薬品化学分野 赤路健一教授、並びに、公衆衛生学分野 渡辺徹志教授 に深謝申し上げます。

本研究に際し、数多くの御助言、御協力を賜りました薬品製造学分野 山下正行教授、細胞生物学分野 藤室雅弘教授、薬学教育センター 細井信造教授、京都薬科大学薬用植物園 月岡淳子助教、薬用植物園御陵園 前田晋作助手、生薬学分野 吉川雅之名誉教授に深謝いたします。

高分解能質量測定におきまして、大変お世話になりました 京都薬科大学共同利用機器センター 長谷川功紀准教授、服部恭尚講師、織田佳代子講師 (当時)、照屋千香子技術専門職員 (当時) に深く感謝申し上げます。

また、本研究に際しご協力下さいました諸先生方、細胞生物学分野 細川晃平学士、生薬学分野 深谷匡学士、同 尾田好美修士、同 松本朋子学士、同 矢野真実子学士、同 笠香織学士をはじめとする大学院生、および細胞生物学分野 石丸華子学士、生薬学分野 浅田裕美子氏、同 齋藤菜月氏、同 野口大輔氏、同 林田仁志氏をはじめとする学生諸氏の皆様に深く感謝いたします。

実験の部

水素核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR), 炭素核磁気共鳴スペクトル (^{13}C NMR), Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) スペクトル, Hetero-nuclear Multiple Quantum Coherence (HMQC) スペクトル, Hetero-nuclear Multiple-Bond Connectivity (HMBC), Double Quantum Filtered-COSY (DQF-COSY) スペクトルは JEOL JNM-LA500 (500 MHz), JEOL JNM-ECA 600K (600 MHz) を用いて測定した. NOE correlated spectroscopy (NOESY) スペクトルは JEOL JNM-ECA 600K (600 MHz) を用いて測定した.

旋光度は, Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter ($l = 0.5$) を用いて測定した.

赤外吸収スペクトル (IR) は, JASCO FT/IR-4600 Fourier Transform Infrared Spectrometer を用いて測定した.

紫外可視吸光スペクトル (UV) は, SHIMADZU UV-visible spectrophotometer UV-1600 を用いて測定した.

高分解能質量分析 (High resolution ESI-MS, EI-MS) および質量分析 (ESI-MS, EI-MS) は SHIMADZU LCMS-IT-TOF および JEOL JMS-GCMATE mass spectrometer を用いて測定した.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, ポンプは SHIMADZU LC-6AD を, 紫外可視分光光度計検出器は, SHIMADZU SPD-20A および SPD-10A を, 旋光度検出器は Shodex OR-2 を用いた.

ECD スペクトルは, 日本分光円二色性分散計 J-720WI spectrometer を用いて測定した.

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 Silica Gel BW-200 (Fuji Silysia Chemical, 150–350 mesh), 逆相系は Chromatorex ODS DM1020T (Fuji silysia Chemical, 100–200 mesh) を用いた.

薄層クロマトグラフィー (TLC) には, silica gel 60F₂₅₄ (Merck, 順相), RP-18 60F₂₅₄ (Merck, 逆相) を使用し, スポットの検出は, UV (254, 365 nm), ニンヒドリンスプレー (和光純薬社製試薬), および 1% $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2/10\% \text{H}_2\text{SO}_4$ 水溶液, *N,N*-dimethyl-1, 4-phenylenediammonium dichloride を噴霧し, 加熱時の呈色により行った.

試薬は特に明記しないものは和光純薬株式会社製試薬 (特級) を用いた.

第一章の実験

植物の入手

京都府産クロタネソウ (*Nigella damascena*, 品種: Moody Blues) 種子は京都薬科大学植物園において栽培し 2015 年 4 月に収穫したものを入手した。

第一節の実験

クロタネソウ (*N. damascena*) 種子含有成分の抽出単離

クロタネソウ (*N. damascena*, 'Moody Blues') 乾燥種子 501.0 g をすり鉢を用いて細かくすりつぶし, MeOH を用いて 80 °C で 2 時間, 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 5 回行った. MeOH 抽出液をまとめ, 減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (58.2 g, 種子乾燥品からの収率 11.6%) を得た. 得られた MeOH エキスのうち 57.2 g を EtOAc と H₂O で分配抽出し, さらにその H₂O 可溶性分画を *n*-BuOH および H₂O を用いて分配抽出し, EtOAc 可溶性分画 (21.8 g, 4.4%), *n*-BuOH 可溶性分画 (14.8 g, 3.1%), H₂O 可溶性分画 (17.7 g, 3.6%) を得た.

得られた EtOAc 可溶性分画を *n*-hexane-EtOAc = 20:1 に溶解し, ろ紙を用いたろ過によりろ液と残渣に分離した. 残渣を MeOH に溶解後, シリカゲルを添加したのち溶媒を減圧留去してエキスをシリカゲルに吸着させ, 順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 1.0 kg, *n*-hexane-EtOAc (20:1 → 10:1 → 7:1 → 5:1 → 2:1 → 1:2, v/v) → CHCl₃-MeOH-H₂O (20:3:1 lower layer → 6:4:1, v/v/v) → MeOH] にて分画し, 10 フラクション [Fr. 1 (1016.0 mg), Fr. 2 (3100.7 mg), Fr. 3 (2617.3 mg), Fr. 4 (3367.2 mg), Fr. 5 (1411.1 mg), Fr. 6 (1757.2 mg), Fr. 7 (1047.1 mg), Fr. 8 (1445.5 mg), Fr. 9 (1141.1 mg), Fr. 10 (1157.0 mg)] に分離した.

Fr. 3 (2617.3 mg) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 150 g, CH₃CN-H₂O (40:60 → 70:30 → 90:10, v/v) → isopropanol] により 8 フラクションに分画し, **11** (36.1 mg) を単離するとともに, Fr. 3-1 (17.9 mg), Fr. 3-3 (649.6 mg), Fr. 3-4 (206.6 mg), Fr. 3-5 (9.2 mg), Fr. 3-6 (10.0 mg), Fr. 3-7 (24.4 mg), Fr. 3-8 (1016.1 mg) を得た. Fr. 3-4 (206.6 mg) はさらに順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 10 g, *n*-hexane → *n*-hexane-EtOAc (30:1, v/v) → EtOAc → MeOH] により精製し, **10** (104.9 mg) を単離した.

Fr. 4 のうち 2400.0 mg を逆相カラムクロマトグラフィー [CH₃CN-H₂O (20:80 → 30:70 → 40:60 → 50:50 → 60:40 → 80:20, v/v) → isopropanol] により 9 フラクションに分画し, Fr. 4-1 (60.1 mg), Fr. 4-2 (52.0 mg), Fr. 4-3 (41.7 mg), Fr. 4-4 (11.6 mg), Fr. 4-5 (14.0 mg), Fr. 4-6 (75.0 mg), Fr. 4-7 (63.6 mg), Fr. 4-8 (341.1 mg), Fr. 4-9 (1190.1 mg) を得た. Fr. 4-2 (52.0 mg) はさらに HPLC を用いて精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (65:35, v/v), YMC-Triart PFP (250 × 10 mm i.d.)] し, **1** (28.1 mg) を単離した.

Fr. 6 (1757.2 mg) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 85 g, EtOH-H₂O (50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20, v/v) → EtOH] により 9 フラクションに分画し, Fr. 6-1 (77.9 mg), Fr. 6-2 (123.9 mg), Fr. 6-3 (695.7 mg), Fr. 6-4 (97.5 mg), Fr. 6-5 (55.7 mg), Fr. 6-6 (73.8 mg), Fr. 6-7 (9.4 mg), Fr. 6-8 (88.8 mg), Fr. 6-9 (308.2 mg) を得た. Fr. 6-3 (695.7 mg) はさらに HPLC を用いて分離精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (55:45, v/v), YMC-Triart PFP (250 × 10 mm i.d.)] し, **2** (318.3 mg) を単離するとともに, 粗ジテルペン分画 Fr. 6-3-1 (14.2 mg), Fr. 6-3-2 (31.3 mg), Fr. 6-3-3 (61.8 mg), Fr. 6-3-4 (71.9 mg), Fr. 6-3-5 (31.2 mg) を得た. Fr. 6-3-2 は HPLC によりさら

に精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (75:25, v/v), YMC-Triart C18 (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **7** (17.6 mg) を得た. Fr. 6-3-4 (71.9 mg) は HPLC によりさらに精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (68:32, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **6** (38.4 mg), **4** (12.8 mg), **9** (4.1 mg) を得た. Fr. 6-3-5 (31.2 mg) は HPLC を用いてさらに精製 [mobile phase: CH₃CN–H₂O (73:27, v/v), COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (250 × 10 mm i.d.)] を行い, **8** (4.4 mg) を単離した.

Fr. 7 (1047.1 mg) は逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 50 g, MeOH–H₂O (10:90 → 20:80 → 40:60 → 60:40 → 80:20, v/v) → MeOH → isopropanol] により 10 フラクシオンに分画し, Fr. 7-1 (15.7 mg), Fr. 7-2 (16.3 mg), Fr. 7-3 (3.6 mg), Fr. 7-4 (30.7 mg), Fr. 7-5 (21.0 mg), Fr. 7-6 (11.5 mg), Fr. 7-7 (75.0 mg), Fr. 7-8 (312.2 mg), Fr. 7-9 (15.9 mg), Fr. 7-10 (442.4 mg) を得た. Fr. 7-8 (312.2 mg) を HPLC を用いて精製 [mobile phase: MeOH–H₂O (78:22, v/v), YMC-Triart C18 (250 × 10 mm i.d.)] し, **5** (14.6 mg), **3** (80.7 mg) を単離した.

Fr. 8 (1445.5 mg) を順相カラムクロマトグラフィー [*n*-hexane–CHCl₃ (1:1, v/v) → CHCl₃ → CHCl₃–MeOH–H₂O (50:3:1 → 20:3:1 → 15:3:1 → 7:3:1, v/v) → MeOH] により 6 フラクシオンに分画し, Fr. 8-1 (17.8 mg), Fr. 8-2 (292.8 mg), Fr. 8-3 (305.2 mg), Fr. 8-4 (243.9 mg), Fr. 8-5 (255.2 mg), Fr. 8-6 (57.3 mg) を得た. Fr. 8-3 のうち 69.8 mg を HPLC により精製 [mobile phase : MeOH–H₂O (30:70, v/v), YMC-Triart PFP (250 × 10 mm i.d.)] し, **12** (8.3 mg) を単離した.

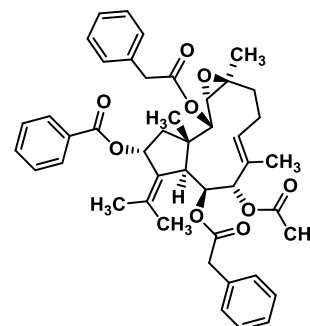
第二節の実験

クロタネソウ (*N. damascena*) 種子含有新規成分の構造解析

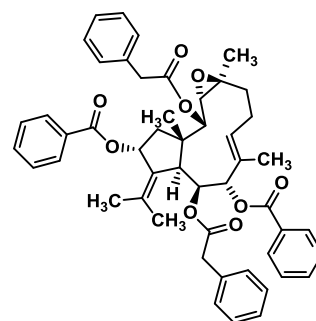
Oxazonigelladine (**1**): 白色非結晶性粉末; UV (CHCl₃, log ϵ): 318.4 (4.06), 246.0 (4.17) nm; IR (ATR): 2934, 1744, 1610, 1505, 1439, 1270, 1174, 1159, 1064, 1024, 783, 745 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : Table 1 に記載; EI-MS: m/z 179 [M]⁺; High resolution EI-MS m/z 179.05797 (calcd for C₉H₉NO₃ [M]⁺, 179.05825).

X 線単結晶構造解析結晶データ: C₉H₉NO₃, $M = 179.17$, triclinic, space group *P*-1 (#2), $a = 7.385(2)$, $b = 7.804(2)$, $c = 8.662(3)$ Å, $\alpha = 65.742(6)^\circ$, $\beta = 75.256(7)^\circ$, $\gamma = 68.529(7)^\circ$, $V = 420.4(2)$ Å³, $Z = 2$, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 1.075$ cm⁻¹, $F(000) = 188$, $D_c = 1.415$ g/cm³, crystal dimensions: 0.250 × 0.200 × 0.150 mm. A total of 4102 reflections (1908 unique) were collected using the ω -2 θ scan technique to a maximum 2 θ value of 54.9°, and 1908 reflections with $I > 2\sigma(I)$ were used in structure determination. Final R value was 0.0569. The data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC 1570353.

Damasterpene I (**2**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{18} +13.1^\circ$ ($c = 0.37$, CHCl₃); UV (MeOH, log ϵ): 265.2 (2.96), 230.2 (3.98) nm; IR (ATR): 2934, 1740, 1703, 1235, 1132, 1071, 1022, 974, 711, 538, 419 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : Table 2, 3 に記載. NOE correlations : H-2 and H-11, 16; H-3 and H-5 β , 7, 15, H-5 α and H-5 β , 16; H-6 α and H-6 β , 16; H-9 and H-15; H-10 and H-17, 19; H-13 and H-14, 15, 20; H-15 and H-3, 9; H-17 and H-6 α , 10, 11; CD: 261.4 (−2.05), 207.0 (−31.7) ($c = 9.9$ $\mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 757 [M+Na]⁺; High resolution ESI-MS m/z 757.3365 (calcd for C₄₅H₅₀O₉ [M+Na]⁺: 757.3347).

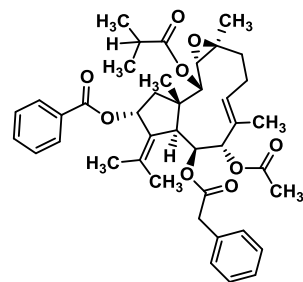


Damasterpene II (**3**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_D^{18} +5.0^\circ$ ($c = 0.5$, CHCl₃); UV (MeOH, log ϵ): 259.5 (3.26), 224.0 (3.95) nm; IR (ATR): 2927, 1739, 1708, 1282, 1265, 1133, 1113, 1071, 1024, 983, 743, 713 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ : Table 2, 3 に記載; ¹H NMR (acetone-*d*₆, 500 MHz): δ 4.79 (1H, d, $J = 9.0$, H-2), 3.13 (1H, d, $J = 9.0$, H-3), 2.14 (1H, m, H-5 α), 1.38 (1H, m, H-5 β), 2.55 (1H, m, H-6 α), 2.27 (1H, m, H-6 β), 5.83 (overlapped with H-10, H-7), 6.00 (1H, d, $J = 10.5$, H-9), 5.83 (overlapped with H-7, H-10), 3.07 (1H, br s, H-11), 5.55 (1H, d, $J = 7.5$, H-13), 1.64 (1H, m, H-14 α), 1.70 (1H, m, H-14 β), 1.56 (3H, s, H-15), 1.33 (3H, s, H-16), 1.88 (3H, s, H-17), 1.92 (3H, s, H-19), 1.53 (3H, s, H-20), 3.46 (1H, d, $J = 15.5$, H-2'a), 3.40 (1H, d, $J = 15.5$, H-2'b), 6.89 (2H, dd, $J = 7.0$, 1.5, H-4', 8'), 7.10 (2H, m, H-5', 7'), 7.14 (1H, m, H-6'), 9.02 (1H, s like, H-3''), 8.78 (1H, d, $J = 2.0$, H-5''), 7.47 (1H, t like, $J = 8.0$, H-6''), 8.14 (1H, dt, $J = 8.0$, 2.0, H-7''), 3.63 (1H, d, $J = 14.5$, H-2'''a), 3.56 (1H, d, $J = 14.5$, H-2'''b), 7.10 (2H, m, H-4''', 8'''), 7.14 (2H, m, H-5''', 7'''), 7.11 (1H, m, H-6'''), 8.00 (2H, dd like, $J = 7.5$, 1.5, H-3''', H-7'''), 7.43 (2H, m, H-4''', 6'''), 7.58 (1H, m, H-5'''); ¹³C NMR (acetone-*d*₆, 125 MHz): δ 48.7 (C-1), 75.0 (C-2), 65.1 (C-3), 62.4 (C-4), 38.7 (C-5), 24.6 (C-6), 134.1 (C-7), 131.4 (C-8), 80.7 (C-9), 76.2 (C-10), 46.7 (C-11), 137.3 (C-12), 74.2 (C-13), 45.0 (C-14), 19.7 (C-15), 16.9 (C-16), 12.6 (C-17), 136.4 (C-18), 22.2 (C-19), 22.8 (C-20), 169.2 (C-1'), 41.5 (C-2'), 135.1 (C-3'), 129.9 (C-4', 8'), 128.9 (C-5', 7'), 127.4 (C-6'), 164.6 (C-1''), 126.5 (C-2'').

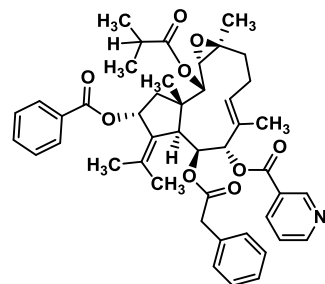


151.4 (C-3''), 154.5 (C-5''), 124.4 (C-6''), 137.6 (C-7''), 171.2 (C-1'''), 42.0 (C-2'''), 134.8 (C-3'''), 129.9 (C-4''', 8'''), 129.2 (C-5''', 7'''), 127.8 (C-6'''), 166.4 (C-1'''), 131.0 (C-2'''), 130.7 (C-3''', 7'''), 129.0 (C-4''', 6'''), 133.5 (C-5'''); NOE correlations: (CDCl₃) H-2 and H-16; H-5 α and H-5 β ; H-6 α and H-6 β ; H-13 and H-14, 20; H-15 and H-9; H-17 and H-6 α , 10, H-10 and H-19. (acetone-*d*₆): H-2 and H-11, 16; H-5 α and H-5 β ; H-6 α and H-6 β ; H-11 and H-2, 16, 19; H-13 and H-14 β , 15, 20; H-15 and H-3, 9, 13, 14 β , H-17 and H-6 α , 10. CD: 251.9 (−2.27), 205.7 (−33.8) (*c* = 10.0 μ mol/L, MeOH). ESI-MS *m/z* 798 [M+H]⁺; High resolution ESI-MS *m/z* 798.3652 (calcd for C₄₉H₅₁NO₉ [M+H]⁺, 798.3637).

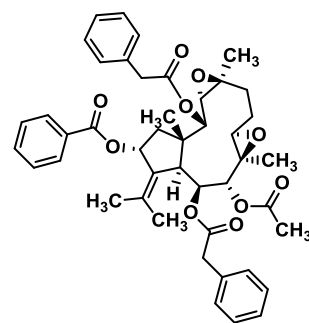
Damasterpene III (**4**): 白色非結晶性粉末; [α]_D¹⁸ −13.0° (*c* = 0.32, CHCl₃). UV (MeOH, log ϵ): 264.8 (2.89), 229.6 (4.00) nm. IR (ATR): 2971, 2932, 1740 1705, 1282, 1234, 1149, 1108, 1069, 1023, 976, 750, 712 cm^{−1}. ESI-MS: *m/z* 709 (M+Na)⁺. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : Table 4, 3 に記載; CD: 205.8 (−43.1) (*c* = 22.6 μ mol/L, MeOH). High resolution ESI-MS: calcd for C₄₁H₅₀O₉ [M+Na]⁺: 709.3355. Found: 709.3347.



Damasterpene IV (**5**): 白色非結晶性粉末; [α]_D¹⁸ −8.5° (*c* = 0.25, CHCl₃); UV (MeOH, log ϵ): 264.4 (3.43), 224.6 (4.07) nm; IR (ATR): 2926, 2854, 1739, 1709, 1282, 1265, 1112, 1024, 979, 714 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) and ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ : Table 4, 3 に記載; CD: 257.1 (−2.42), 205.2 (−28.3) (*c* = 11.4 μ mol/L, MeOH); ESI-MS: *m/z* 750 [M+H]⁺; High resolution ESI-MS: *m/z* 750.3635 calcd for C₄₅H₅₁NO₉ [M+H]⁺: 750.3637.

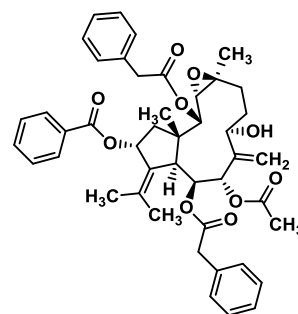


Damasterpene V (**6**): 白色非結晶性粉末; [α]_D¹⁸ −17.3° (*c* = 0.2, CHCl₃); UV (MeOH, log ϵ): 265.0 (3.16), 229.8 (4.32) nm; IR (ATR): ν_{\max} 3488, 3061, 2981, 2935, 1743, 1710, 1244, 1140, 1029, 984, 751 cm^{−1}; ¹H-NMR (chloroform-*d*, 500 MHz) and ¹³C-NMR (chloroform-*d*, 125 MHz) δ : Table 5, 6 に記載; ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 4.66 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-2), 3.12 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-3), 2.11 (1H, m, H-5a), 1.33 (1H, m, H-5b), 1.87 (1H, m, H-6a), 1.75 (1H, m, H-6b), 3.17 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, H-7), 5.04 (1H, d, *J* = 10.3, H-9), 5.43 (1H, dd, *J* = 10.3, 1.4, H-10), 2.67 (1H, br s, H-11), 5.24 (1H, d, *J* = 7.6, H-13), 1.26 (1H, m, H-14 α), 1.20 (1H, m, H-14 β), 1.25 (3H, s, H-15), 1.33 (3H, s, H-16), 1.44 (3H, s, H-17), 1.84 (3H, s, H-19), 1.41 (3H, s, H-20), 3.34 (1H, d, *J* = 14.4, H-2'a), 3.26 (1H, d, *J* = 14.4, H-2'b), 6.74 (2H, dd, *J* = 7.6, 1.0, H-4'), 7.02 (1H, dd like, *J* = 7.6, 7.6, H-5'), 7.09 (1H, t, *J* = 7.6, H-6'), 1.80 (1H, d, *J* = 10.3, H-2''), 3.54 (1H, d, *J* = 14.4, H-2'''), 3.48 (1H, d, *J* = 14.4, H-2''b), 7.17 (1H, dd, *J* = 7.6, 1.4, H-4'''), 7.28 (1H, dd like, *J* = 7.6, 7.6, H-5'''), 7.23 (1H, t, *J* = 7.6, H-6'''), 7.83 (2H, dd, *J* = 7.6, 1.3, H-3'''), 7.34 (2H, dd like, *J* = 7.6, 7.6, H-4'''), 7.49 (1H, t, *J* = 7.6, H-5'''). ¹³C-NMR (CD₃OD, 150 MHz) δ : 49.5 (C-1), 75.4 (C-2), 65.4 (C-3), 62.7 (C-4), 37.5 (C-5), 23.1 (C-6), 63.2 (C-7), 61.4 (C-8), 78.5 (C-9), 76.3 (C-10), 47.2 (C-11), 136.9 (C-12), 75.0 (C-13), 44.5 (C-14), 19.4 (C-15), 17.0 (C-16), 14.2 (C-17), 138.5 (C-18), 23.4 (C-19), 22.4 (C-20), 171.0 (C-1'), 42.1 (C-2'), 135.1 (C-3'), 130.1 (C-4'), 129.5 (C-5'), 127.9 (C-6'), 171.5 (C-1''), 20.6 (C-2''), 171.9 (C-1'''), 42.3 (C-2'''), 134.8 (C-3'''), 130.4 (C-4'''), 130.0 (C-5'''), 7.23 (C-6'''), 167.5 (C-1'''), 130.9 (C-2'''), 131.0 (C-3'''), 129.3 (C-4'''), 134.2 (C-5'''). CD: 258.3 (−1.9), 205.1

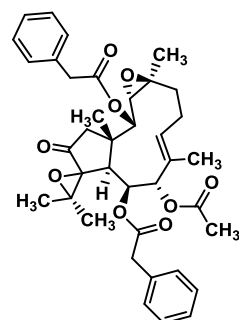


(−44.4) ($c = 4.0 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 773 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-ESI-MS: m/z 773.3298 (calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 773.3296).

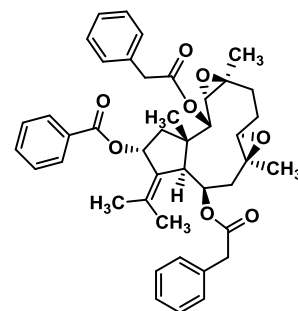
Damasterpene VI (**7**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +47.9^\circ$ ($c = 0.6$, CHCl_3); UV (MeOH, $\log \varepsilon$): 264.8 (2.80), 229.4 (3.90) nm; IR (ATR): ν_{max} 2985, 2938, 1745, 1708, 1282, 1264, 1231, 1136, 1071, 1025, 985, 755, 713 cm^{-1} ; ^1H -NMR (chloroform- d , 500 MHz) and ^{13}C -NMR (chloroform- d , 125 MHz) δ : Table 5, 6 に記載; NOE correlations (CDCl_3) were observed between following protons: H-2 and H-11, 16, 17; H-3 and H-5 β , 7, 15; H-5 α and H-5 β , 6 α , 17; H-6 α and H-6 β . H-7 and H-9; H-9 and H-15; H-10 and H-11, 17; H-13 and H-14 β ; H-14 β and H-14 α , 15. CD: 252.6 (−1.43), 204.1 (−60.2) ($c = 10.0 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 773 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-ESI-MS: m/z 773.3301 (calcd for $\text{C}_{45}\text{H}_{50}\text{O}_{10}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 773.3296).



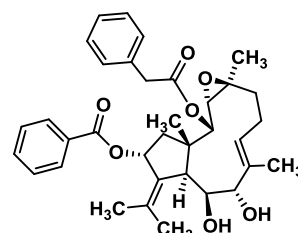
Damasterpene VII (**8**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} -81.2^\circ$ ($c = 0.1$ CHCl_3); UV (MeOH, $\log \varepsilon$): 258.4 (3.54) nm; IR (ATR): ν_{max} 2962, 2926, 1740, 1234, 1132, 1075, 1022, 982, 812, 752, 711 cm^{-1} ; ^1H -NMR (chloroform- d , 500 MHz) and ^{13}C -NMR (chloroform- d , 125 MHz): Table 7, 6 に記載; ESI-MS: m/z 667 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-ESI-MS: m/z 667.2886 (calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{O}_9$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 667.2878).



Damasterpene VIII (**9**): 白色非結晶性粉末; $[\alpha]_{\text{D}}^{24} +126.1^\circ$ ($c = 0.1$, CHCl_3); UV (MeOH, $\log \varepsilon$): 264.8 (3.67), 229.6 (4.72) nm; IR (ATR): ν_{max} 2979, 2927, 2854, 1738, 1708, 1282, 1264, 1231, 1146, 1109, 1025, 978, 756, 712 cm^{-1} ; ^1H -NMR (chloroform- d , 600 MHz) and ^{13}C -NMR (chloroform- d , 150 MHz): Table 7, 6 に記載; CD: 221.4 (−9.0), 205.0 (−29.2) ($c = 27.5 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 715 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HR-ESI-MS: m/z 715.3248 (calcd for $\text{C}_{43}\text{H}_{48}\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 715.3241).

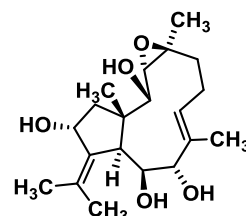


2-Phenylacetyl 13-benzoyl damasterpenol (**17**): 無色単結晶; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} +32.6^\circ$ ($c = 0.22$, MeOH). IR (ATR): 2931, 1743, 1707, 1452, 1348, 1267, 1150, 1112, 1024, 986, 714 cm^{-1} . ^1H NMR (CD_3OD) δ 4.73 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-2), 3.07 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-3), 2.13 (m, H-5 α), 1.30 (m, H-5 β), 2.51 (m, H-6 α), 2.25 (m, H-6 β), 5.45 (1H, d, $J = 11.5$ Hz, H-7), 4.47 (1H, d, $J = 9.5$ Hz, H-9), 3.85 (1H, dd, $J = 9.5, 1.0$ Hz, H-10), 2.82 (1H, br s, H-11), 5.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-13), 2.18 (1H, dd, $J = 15.5, 8.0$ Hz, H-14 α), 1.61 (1H, m, H-14 β), 1.56 (3H, s, H-15), 1.34 (3H, s, H-16), 1.78 (3H, s, H-17), 1.79 (3H, s, H-19), 1.60 (3H, s, H-20), 3.42 (1H, dd, $J = 15.0$, H-2'), 3.35 (H, dd, $J = 15.0$, H-2'), 6.82 (2H, dd, $J = 8.5, 1.5$ Hz, H-4', 8'), 7.07 (2H, m, H-5', 7'), 7.09 (1H, m, H-6'), 7.94 (2H, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-3'', 7''), 7.41 (2H, t, $J = 8.5$ Hz, H-4'', 6''), 7.56 (1H, tt, $J = 8.5, 1.0$ Hz, H-5''). ^{13}C NMR (CD_3OD) δ_{C} 49.5 (C-1), 76.4 (C-2), 66.8 (C-3), 63.7 (C-4), 39.4 (C-5), 24.8 (C-6), 130.0 (C-7), 137.4 (C-8), 80.5 (C-9), 79.9 (C-10), 49.2 (C-11), 134.5 (C-12), 76.0 (C-13), 45.5 (C-14), 19.5 (C-15), 17.1 (C-16), 12.5 (C-17), 140.8 (C-18), 23.0 (C-19), 22.2 (C-20), 171.3 (C-1'), 42.1 (C-2'), 135.3 (C-3'), 130.13 (C-4', 8'), 129.4 (C-5', 7'), 127.8 (C-6'), 167.9 (C-1''), 131.1 (C-2''), 131.1 (C-3'', 7''), 129.3 (C-4'', 6''), 134.0 (C-5''); CD: 223.0 (−5.55), 214.3 (−2.7), 205.8 (−12.8) ($c = 10.0 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 597 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; High resolution ESI-MS m/z 597.2818 (calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{42}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 597.2823).

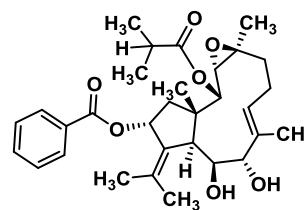


X 線単結晶構造解析結晶データ: $C_{35}H_{42}O_7$, $M = 574.71$, orthorhombic, space group $P2_12_12_1$ (#19), $a = 10.5365(5)$, $b = 16.3114(9)$, $c = 18.0169(9)$ Å, $V = 3096.5(3)$ Å³, $Z = 4$, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.846$ cm⁻¹, $F(000) = 1232$, $D_c = 1.233$ g/cm³, crystal dimensions: $0.400 \times 0.400 \times 0.100$ mm. A total of 29945 reflections (7057 unique) were collected using the ω - 2θ scan technique to a maximum 2θ value of 54.9° , and 7057 reflections with $I > 2\sigma(I)$ were used in structure determination. Final R value was 0.0375. The Flack parameter was 0.1 (3). The data have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication number CCDC 1570387.

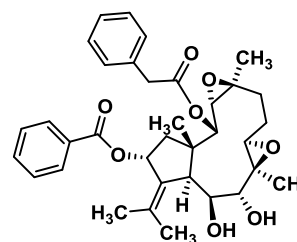
Damasterpenol (**18**): 無色油状物質; $[\alpha]_D^{23} +31.4^\circ$ ($c = 0.22$, CHCl_3); IR (ATR): 3414, 2924, 1436, 1384, 1256, 1115, 1067, 1014, 931, 872, 811, 750 cm⁻¹; ¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz): δ 3.33 (1H, overlapped with solvent peak, H-2), 2.94 (1H, d, $J = 9.6$), 2.12 (1H, m, H-5 α), 1.31 (1H, m, H-5 β), 2.49 (1H, m, H-6 α), 2.20 (1H, m, H-6 β), 5.40 (1H, d, $J = 11.0$, H-7), 4.46 (1H, d, $J = 9.6$, H-9), 3.85 (1H, d, $J = 9.6$, H-10), 2.58 (1H, br s, H-11), 4.70 (1H, d, $J = 7.6$, H-13), 2.14 (1H, m, H-14 α), 2.00 (1H, m, H-14 β), 1.40 (3H, s, H-15), 1.20 (3H, s, H-16), 1.75 (3H, s, H-17), 1.81, 1.71 (both 3H, both s, H-19, 20); ¹³C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ 49.0 (C-1), 73.1 (C-2), 68.2 (C-3), 63.1 (C-4), 38.6 (C-5), 23.7 (C-6), 128.8 (C-7), 136.0 (C-8), 79.5 (C-9), 78.7 (C-10), 48.7 (C-11), 144.2 (C-12), 71.0 (C-13), 46.3 (C-14), 17.6 (C-15), 15.9 (C-16), 11.4 (C-17), 131.2 (C-18), 21.5, 21.7 (C-19, 20); ESI-MS: m/z 375 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; High resolution ESI-MS: m/z 375.2142 (calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 375.2144).



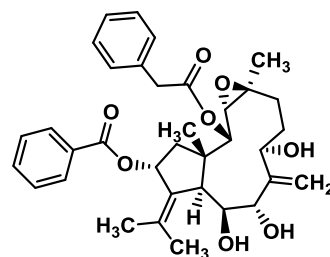
2-Isobutyryloxy 13-benzoyl damasterpenol (**19**): 無色油状物質; $[\alpha]_D^{27} +36.5^\circ$ ($c = 0.28$, CHCl_3); UV (MeOH, log ϵ): 273.5 (2.69), 230.3 (3.73) nm; IR (ATR): 3433, 2923, 1741, 1703, 1451, 1266, 1111, 1070, 1023, 748, 711 cm⁻¹; ¹H NMR (CD_3OD , 500 MHz): δ 7.85 (2H, dd, $J = 8.5, 1.5$), 7.46 (t like, 1H, $J = 8.5$), 7.32 (t like, 1H, $J = 8.5$), 5.77 (1H, d, $J = 7.5$), 5.37 (1H, d, $J = 10.5$), 4.65 (1H, d, $J = 9.5$), 4.41 (1H, d, $J = 9.5$), 3.80 (1H, d, $J = 9.5$), 2.97 (1H, d, $J = 9.5$), 2.76 (1H, br s), 2.46 (1H, m), 2.29 (1H, m), 2.22 (1H, m), 2.15 (1H, m), 2.04 (1H, m), 1.88 (1H, m), 1.73 (3H, s), 1.71 (3H, s), 1.52 (3H, s), 1.47 (3H, s), 1.26 (3H, s), 1.21 (1H, m), 0.73 (3H, d, $J = 7.0$), 0.66 (3H, d, $J = 0.66$); ¹³C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 176.5, 168.2, 140.6, 137.3, 134.8, 134.0, 131.0, 130.0, 129.2, 80.6, 79.9, 76.4, 75.6, 66.8, 63.6, 49.8, 45.8, 39.4, 35.2, 24.8, 23.0, 22.3, 19.1, 17.1, 12.5; CD: 223.5 (-10.5), 205.8 (-18.2) ($c = 13.7$ $\mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 549 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; High resolution ESI-MS m/z 549.2822 (calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 549.2823).



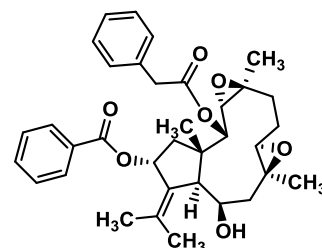
20: 白色非結晶性粉末; ¹H-NMR (CD_3OD , 500 MHz): 7.86 (2H, dd, $J = 8.5, 1.0$), 7.48 (1H, tt, $J = 8.5, 1.0$), 7.33 (2H, dd like, $J = 8.5, 1.0$), 7.02 (1H, m), 7.00 (2H, m), 6.74 (2H, dd, $J = 7.0, 1.5$), 5.74 (1H, d, $J = 7.5$), 4.73 (overlapped with solvent peak), 3.67 (1H, d, $J = 10.0$), 3.09 (1H, d, $J = 9.5$), 3.04 (1H, d, $J = 7.0$), 2.55 (1H, br s), 2.15 (1H, m), 2.11 (1H, m), 1.80 (m), 1.78 (3H, s), 1.50 (3H, s), 1.49 (1H, m), 1.34 (3H, s), 1.32 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.17 (m); ¹³C-NMR (CD_3OD , 125 MHz): 171.4, 167.9, 140.8, 135.2, 135.1, 134.1, 131.1, 130.1, 129.4, 129.3, 127.8, 79.8, 79.1, 76.1, 75.9, 65.8, 63.8, 63.0, 62.9, 49.8, 45.2, 42.1, 37.8, 23.5, 22.5, 19.2, 17.1, 13.2; CD: 222.4 (-3.0), 204.7 (-14.7) ($c = 10.6$ $\mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 613 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



21: 白色非結晶性粉末; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): 7.94 (2H, dd, $J = 8.5, 1.0$), 7.56 (1H, tt, $J = 8.5, 1.0$), 7.41 (2H, dd like, $J = 8.5$), 7.12 (2H, m), 7.11 (1H, m), 6.92 (2H, dd, $J = 8.0, 1.0$), 5.82 (1H, d, $J = 8.0$), 5.52 (1H, s), 5.40 (1H, s), 4.96 (1H, d, $J = 10.0$), 4.37 (1H, d, $J = 8.0$), 4.19 (1H, d, $J = 8.0$), 3.49 (1H, d, $J = 14.5$), 3.42 (1H, d, $J = 14.5$), 3.23 (1H, d, $J = 10.0$), 2.41 (1H, br s), 2.31 (1H, m), 2.08 (overlapped, 3H), 1.69 (3H, s), 1.55 (1H, m), 1.54 (3H, s), 1.49 (3H, s), 1.40 (3H, s), 1.29 (2H, m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): 170.3, 167.9, 156.4, 141.2, 135.5, 134.6, 134.0, 131.3, 131.0, 130.1, 129.4, 129.2, 127.8, 113.9, 85.2, 76.0, 75.9, 75.7, 70.0, 63.9, 63.4, 45.3, 42.2, 36.7, 33.2, 22.9, 21.7, 17.8, 17.4; CD: 222.2 (−6.3), 203.9 (−38.4) ($c = 10.0 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 613 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



22: 白色非結晶性粉末; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): 7.95 (2H, dd, $J = 8.0, 1.0$), 7.57 (1H, tt like, $J = 8.0$), 7.44 (2H, m), 7.12 (2H, m), 7.11 (1H, m), 7.07 (2H, m), 6.84 (2H, dd, $J = 7.5, 1.5$), 5.83 (1H, d, $J = 7.0$), 4.83 (1H, d, $J = 9.5$), 4.11 (1H, ddd, $J = 17.5, 5.0, 1.0$), 3.45 (1H, d, $J = 15.0$), 3.36 (1H, d, $J = 15.0$), 3.21 (1H, d, $J = 9.5$), 3.09 (1H, d, $J = 9.5$), 2.63 (1H, br s), 2.20 (overlapped), 1.87 (3H, s), 1.77 (overlapped), 1.60 (3H, s), 1.44 (3H, s), 1.40 (3H, s), 1.35 (3H, s), 1.28 (m); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): 171.3, 168.0, 141.0, 134.1, 131.1, 130.4, 130.1, 129.5, 129.4, 129.3, 127.8, 76.2, 76.0, 74.6, 73.9, 66.0, 64.8, 63.0, 60.9, 49.8, 46.0, 45.3, 44.7, 42.2, 38.0, 24.1, 23.4, 22.6, 22.5, 18.8, 17.2; CD: 275.8 (−1.1), 223.0 (−20.5), 204.9 (−51.6) ($c = 13.9 \mu\text{mol/L}$, MeOH); ESI-MS: m/z 597 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.



クロタネソウ (*N. damascena*) 種子フラクションの HPLC 分析

Fr. 1–10 の一部を量りとり, 2 mg/mL の濃度になるように MeOH を用いて希釈し, HPLC 分析用サンプルを作成した. 作製した HPLC 用サンプルについて以下の条件で HPLC 分析を行った {mobile phase: $[\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (10:90, v/v) \rightarrow CH_3CN gradient (0-30 min), CH_3CN (30-40 min), $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (10:90, v/v, 40-50 min)], COSMOSIL 5C₁₈-MS-II ($250 \times 4.6 \text{ mm i.d.}$), wave: 200–350 nm}.

Damasterpene I–VIII (2–9) のアルカリ加溶媒分解

ジアシル化体への誘導化

化合物 **2–9** [**2**: 3.0 mg, **3**: 3.0 mg, **4**: 2.8 mg, **5**: 2.7 mg, **6**: 2.5 mg, **7**: 2.2 mg, **9**: 1.5 mg] にナトリウムメトキシド (10.0 mg) を加え脱水 MeOH (1.5 mL) 中で 6 時間, 室温で攪拌した. 得られた反応物を順相ピペットカラム [シリカゲル 0.8 g, MeOH] にて中和し, その流出液を減圧下溶媒留去したのち, 順相ピペットカラム [1.0 g, Hex–EtOAc (1:2, v/v) \rightarrow EtOAc \rightarrow MeOH] により精製し, それぞれ対応した脱アシル化ジテルペンを得た. [**17** (**2** および **3** の脱アシル化体, **2**: 収率 92%, **3**: 収率 90%), **19** (**4** および **5** の脱アシル化体, **4**: 収率 96%, **5**: 収率 96%), **20** (**6** の脱アシル化体, 92%), **21** (**7** の脱アシル化体, 90%), **22** (**9** の脱アシル化体, 60%)]

アグリコンへの誘導化

化合物 **2** (5.8 mg) にナトリウムメトキシド (17.0 mg) を加え超脱水 MeOH (2.0 mL) 中で 6 時間, 80°C で攪拌した. 上述したジアシル化体への誘導化と同じ精製方法により, **2** のアグリコンとして damasterpenol (**19**, 3.8 mg, 65%) を得た.

Oxazonigelladine (1) の DFT 計算

Oxazonigelladine (1) の最安定化構造は Spartan'14 program (Wavefunction Inc., Irvine, CA) を用いて density functional theory (DFT) により算出した [Spartan'14, B3LYP/6-311+ G(2DF, 2p)]. 初期構造モデルは PM3 method により作成した.

アーチファクトの確認

Damascenine (**10**) 5.0mg を 10%KOH-1, 4-dioxane (1:1, v/v) に溶解し, 40°C で 1.5 hr 撹拌した. そのうち, 反応物の溶液を減圧下溶媒留去し, MeOH を 4 mL 添加して, 還流しながら 80°C で 10 hr 加熱した. その後, TLC にて反応液と oxazonigelladine (**1**) との *R_f* 値を比較した.

ニオイクロタネソウ (*N. sativa*) 種子含有成分の抽出単離

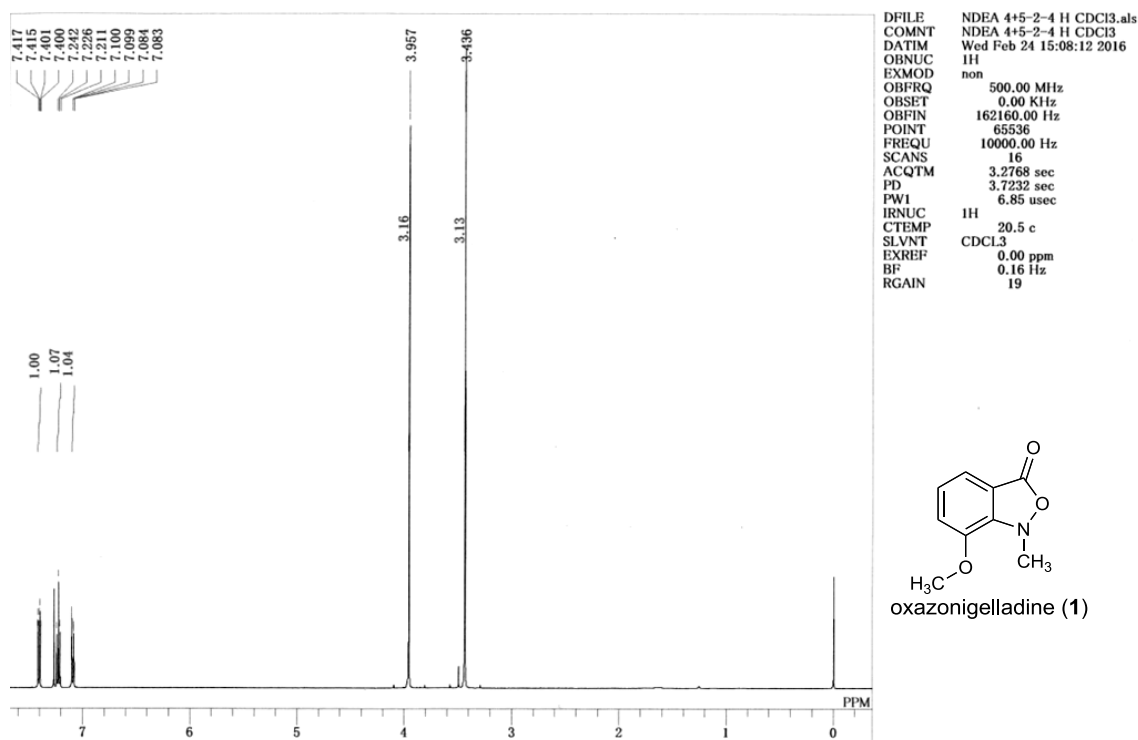
ニオイクロタネソウ (*N. sativa*) 乾燥種子 5000 g を圧搾し, その残滓を *n*-hexane を用いて脱脂した. その後, 残渣に MeOH を加え, 80 °C で 2 時間, 熱時抽出後, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の抽出操作を計 5 回行った. 続いて MeOH 抽出液をまとめ, 減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (165.37 g, 種子乾燥品からの収率 3.3%) を得た. MeOH 抽出エキスを得られた MeOH エキスのうち 164.87 g を *n*-hexane と 80% MeOH で 2 回分配抽出し, さらにその 80% MeOH 可溶性分画を EtOAc および H₂O を用いて分配抽出した. その結果, *n*-hexane 可溶性分画 (54.9 g, 1.10%), EtOAc 可溶性分画 (6.3 g, 0.12%), H₂O 可溶性分画 (103.0 g, 2.06%) を得た.

得られた EtOAc 可溶性分画を, 順相カラムクロマトグラフィー [シリカゲル 315 g, *n*-hexane-EtOAc (10:1 → 5:1 → 3:1 → 1:1, v/v) → EtOAc-CHCl₃ (1:1, v/v) → CHCl₃-MeOH (20:1 → 15:1 → 7:1 → 5:1 → 2:1, v/v) → MeOH] にて分画し, 8 フラクション [Fr. 1 (336.0 mg), Fr. 2 (707.0 mg), Fr. 3 (1151.0 mg), Fr. 4 (579.9 mg), Fr. 5 (1120.1 mg), Fr. 6 (702.9 mg), Fr. 7 (368.1 mg), Fr. 8 (412.4 mg)] に分離した.

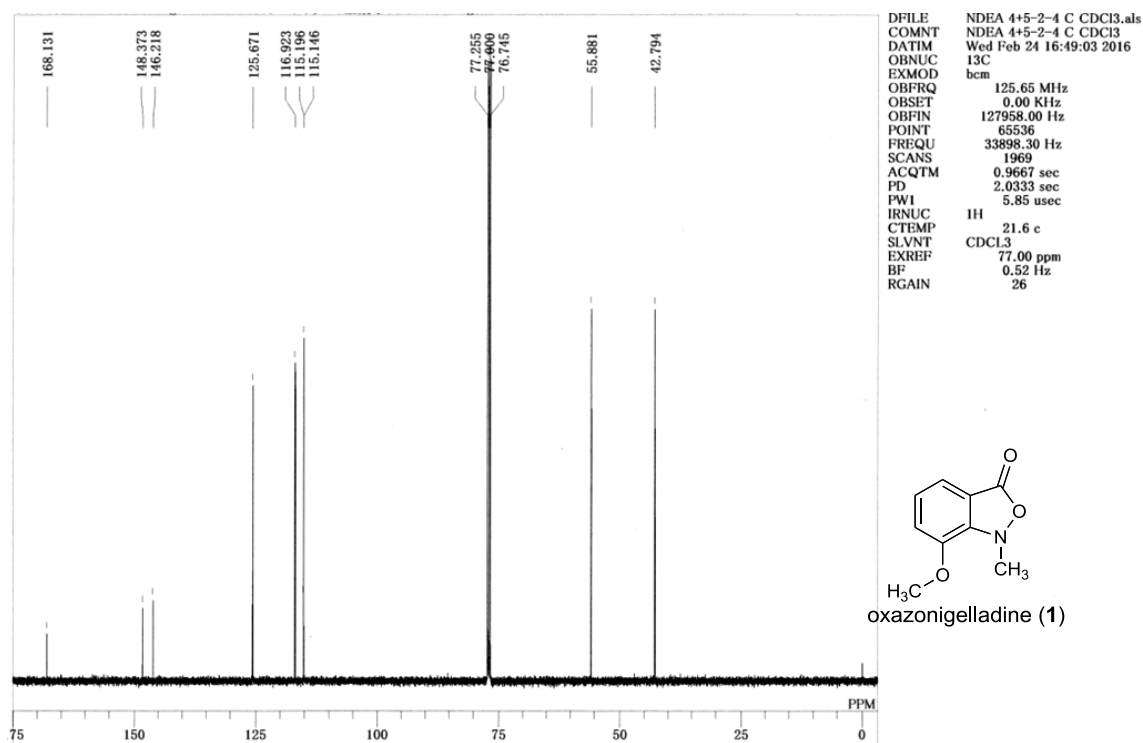
Fr. 3 (1151.0 mg) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 55 g, MeOH-H₂O (20:80 → 40:60 → 60:40 → 80:20, v/v) → MeOH] により 5 フラクションに分画し, Fr. 3-1 (31.1 mg), Fr. 3-2 (96.7 mg), Fr. 3-3 (41.6 mg), Fr. 3-4 (354.2 mg), Fr. 3-5 (375.4 mg) を得た. Fr. 3-4 (354.2 mg) はさらに HPLC を用いて精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (43:57, v/v), YMC-Triart C₁₈ (250 × 10 mm i.d.)] し, **13** (2.8 mg), **16** (10.7 mg) を単離した.

Fr. 4 (579.9 mg) を逆相カラムクロマトグラフィー [ODS 28 g, MeOH-H₂O (40:60 → 50:50 → 60:40 → 70:30 → 80:20, v/v)] → MeOH → isopropanol により 5 フラクションに分画し, Fr. 4-1 (66.4 mg), Fr. 4-2 (91.0 mg), Fr. 4-3 (76.9 mg), Fr. 4-4 (81.9 mg), Fr. 4-5 (92.1 mg) を得た. Fr. 4-2 (91.0 mg) はさらに HPLC を用いて精製 [mobile phase: CH₃CN-H₂O (47:53, v/v), YMC-Triart C₁₈ (250 × 10 mm i.d.)] し, **14** (7.5 mg), **15** (2.0 mg) を単離した.

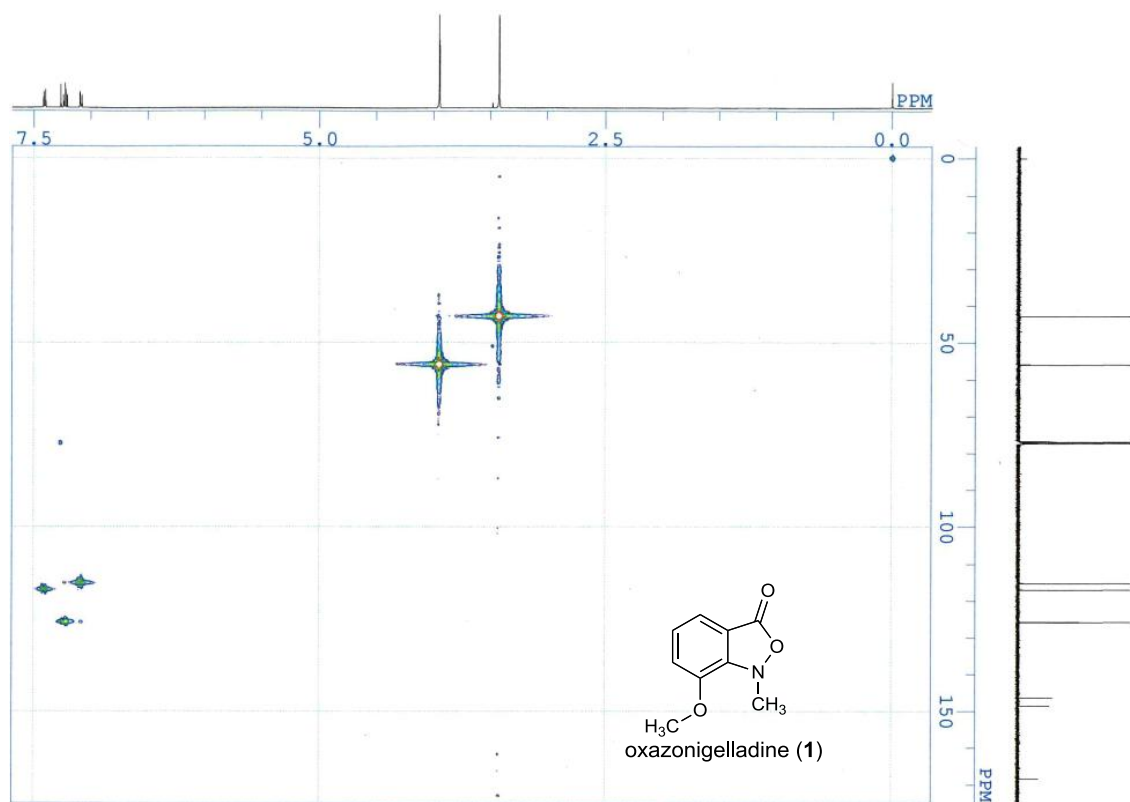
NMR spectroscopic data of oxazonigelladine (1)



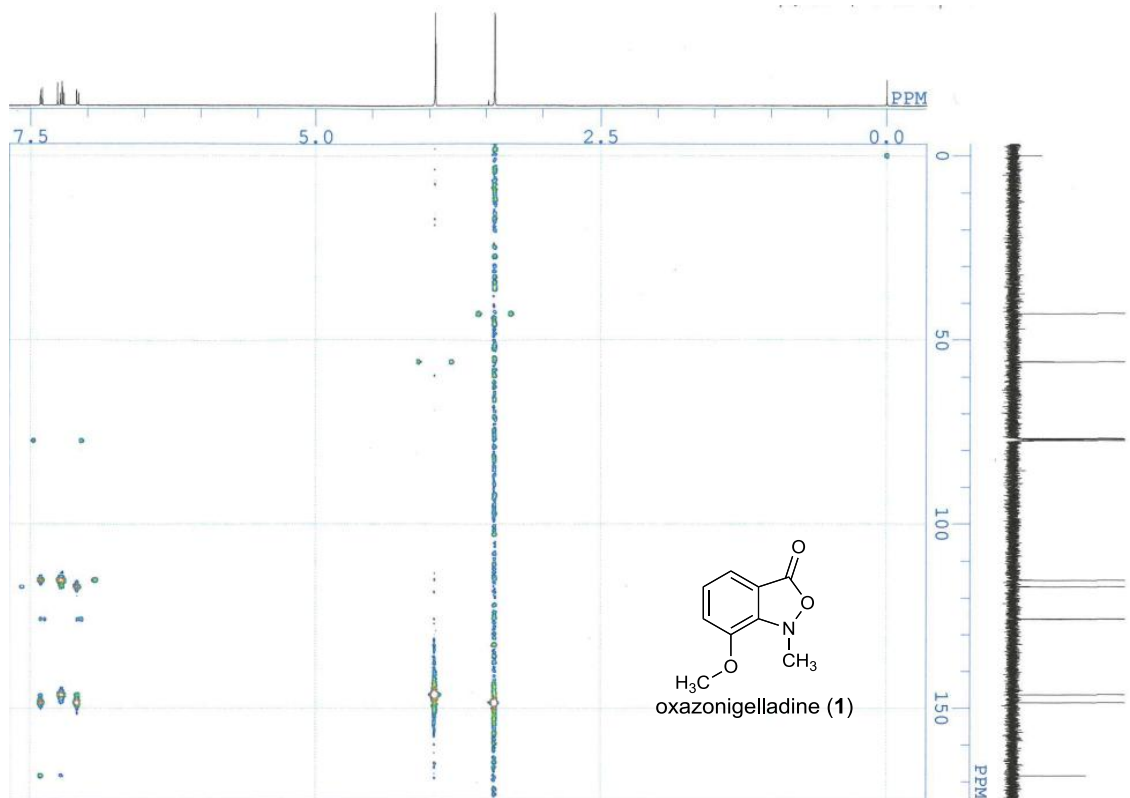
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound 1. Measured in chloroform-*d*.



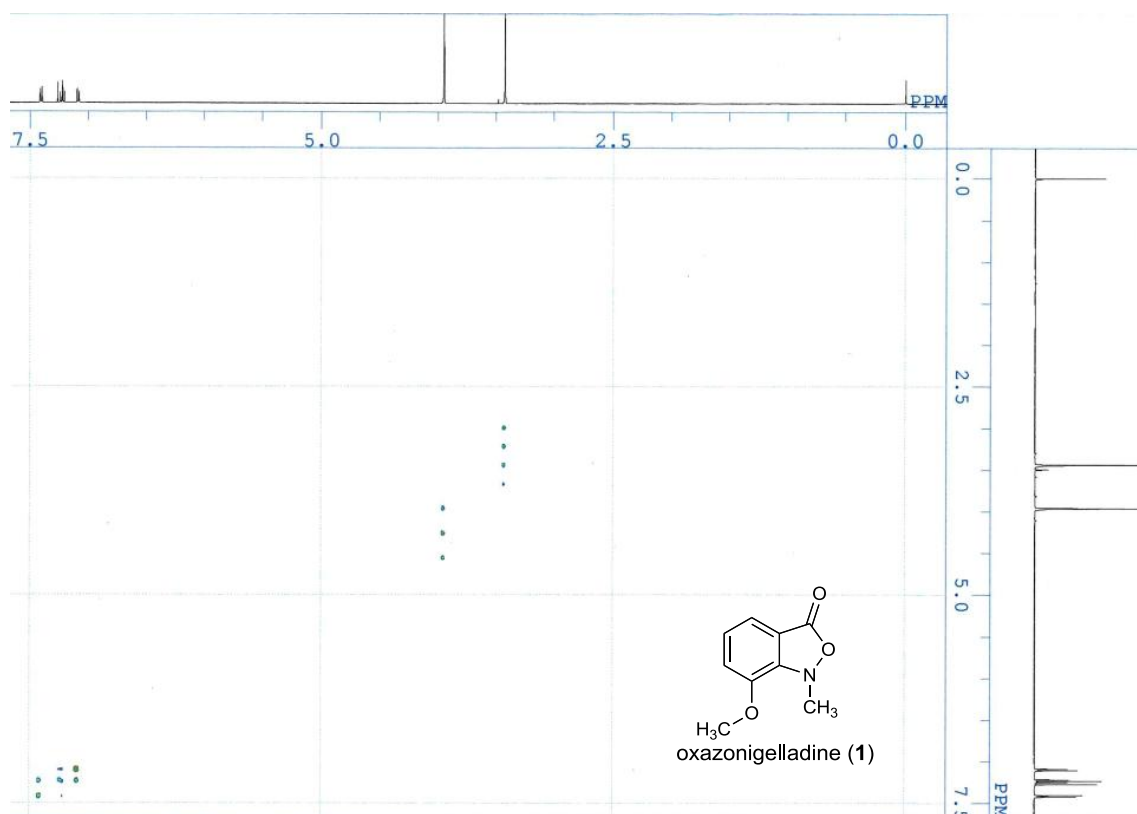
¹³C NMR (125 MHz) spectroscopic data for compound 1. Measured in chloroform-*d*.



HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **1**. Measured in chloroform-*d*.

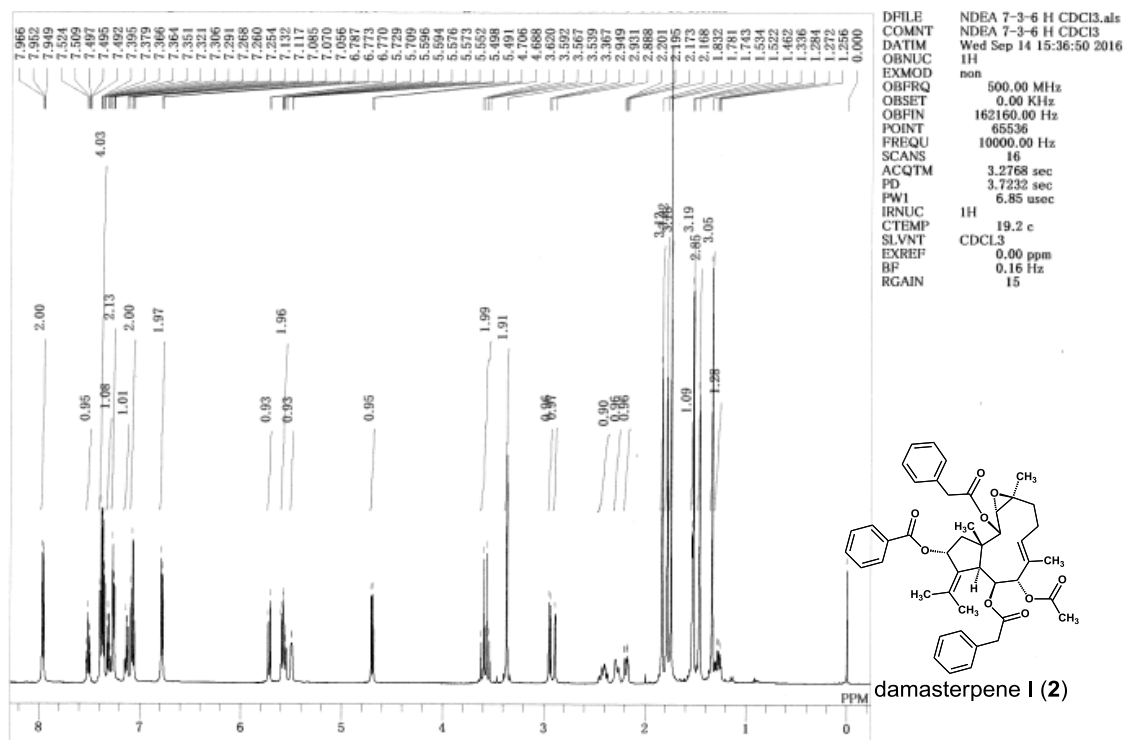


HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **1**. Measured in chloroform-*d*.

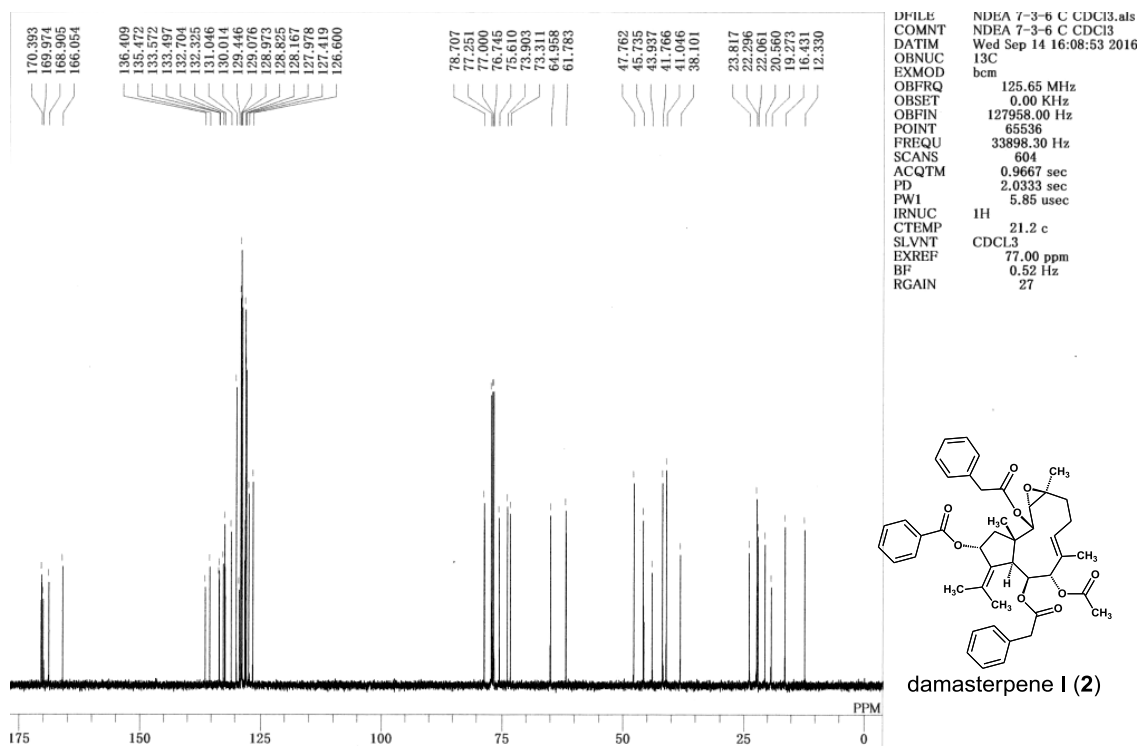


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **1**. Measured in chloroform-*d*.

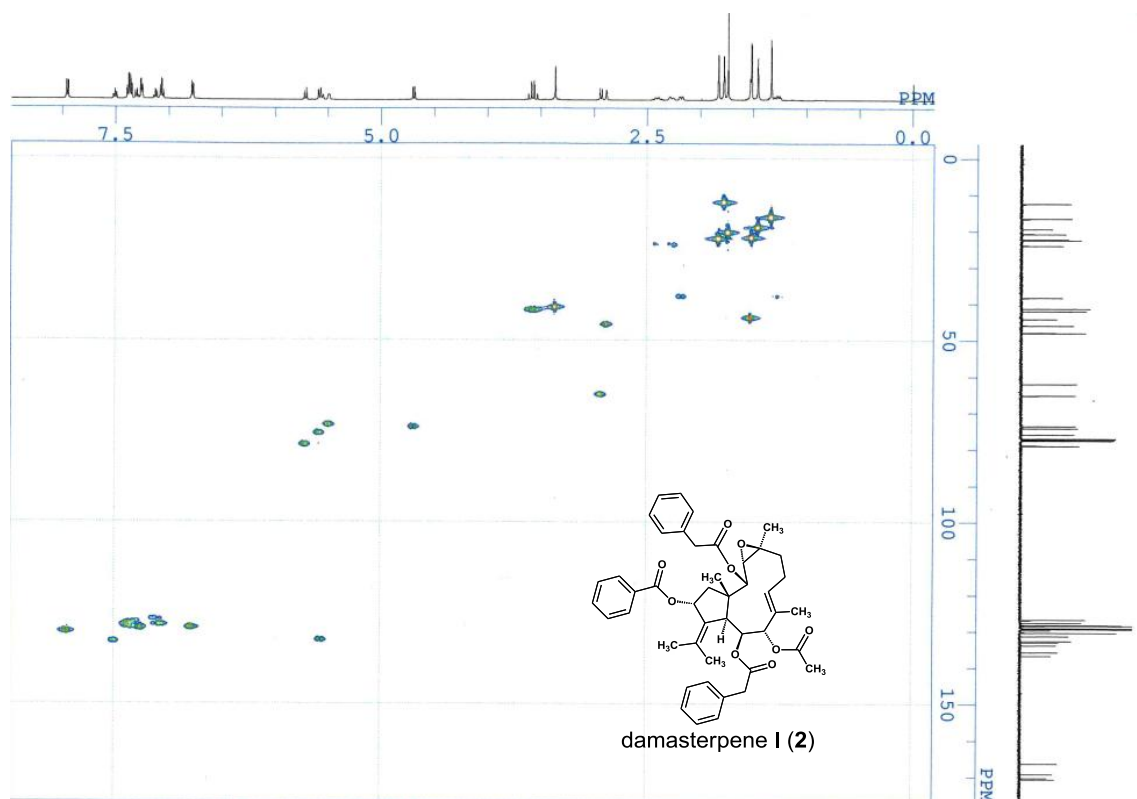
NMR spectroscopic data of damasterpene I (2)



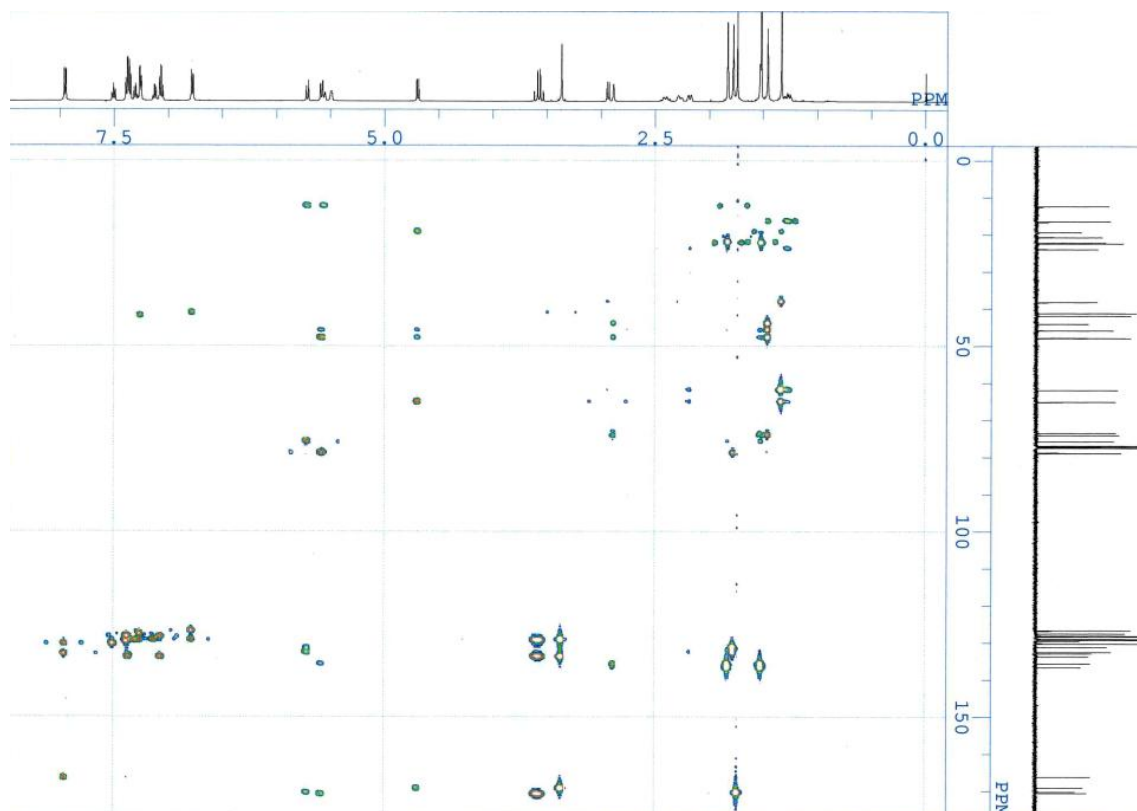
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.



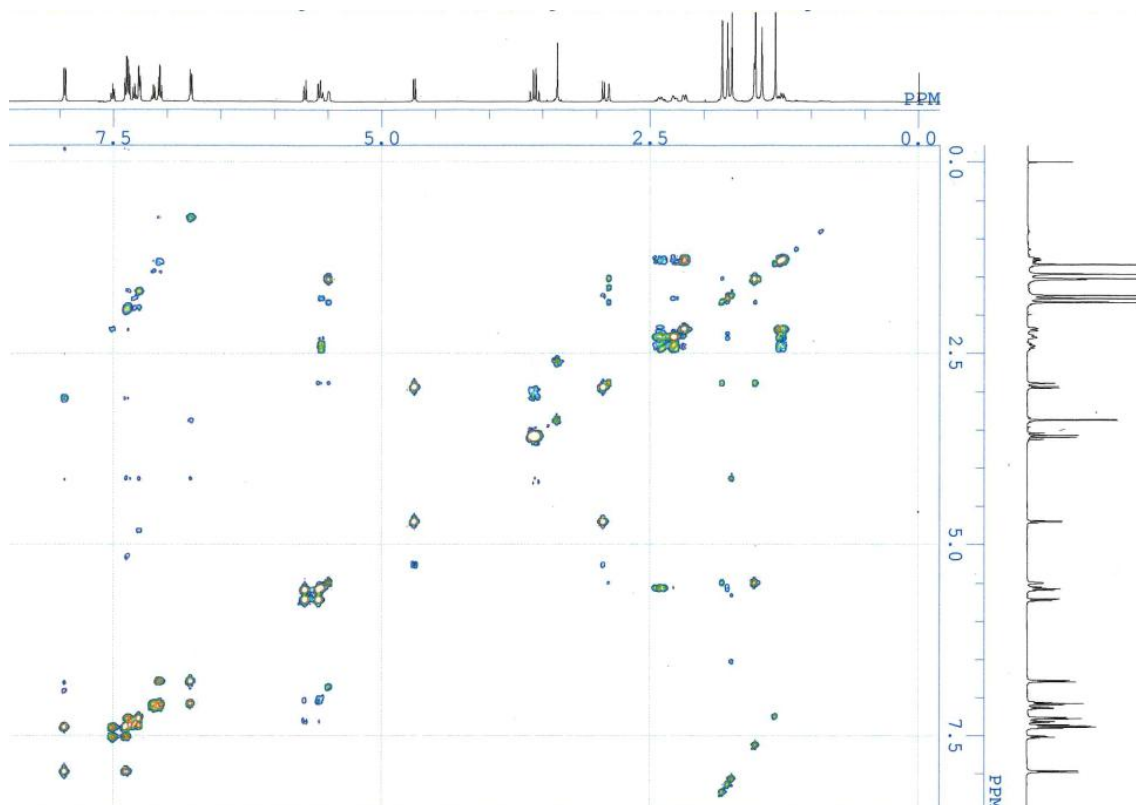
¹³C NMR (125 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.



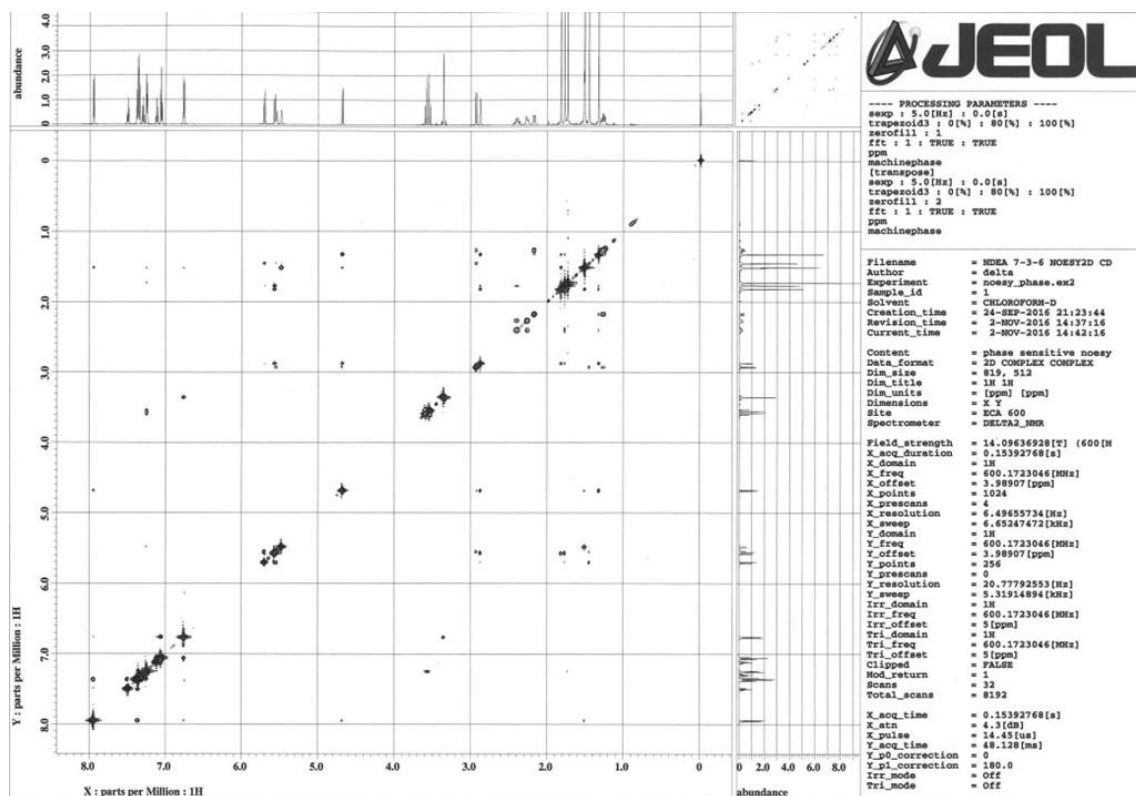
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.



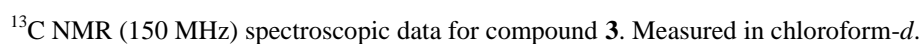
HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.

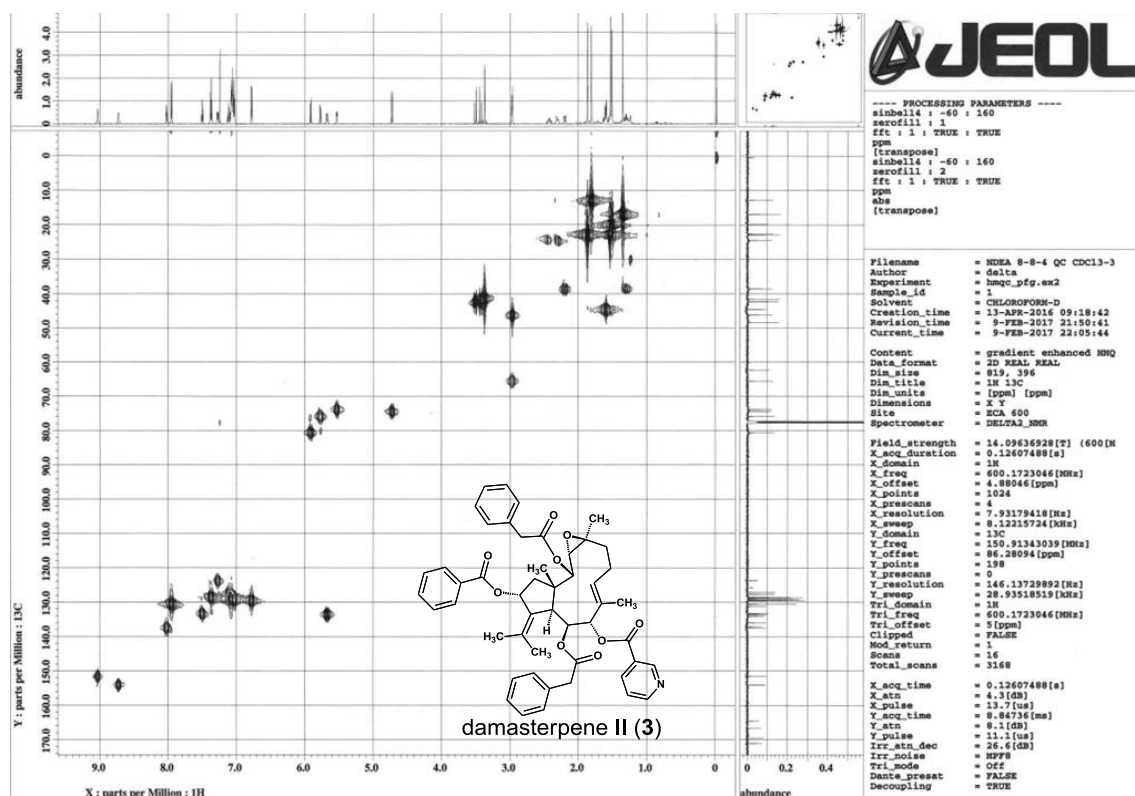


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.

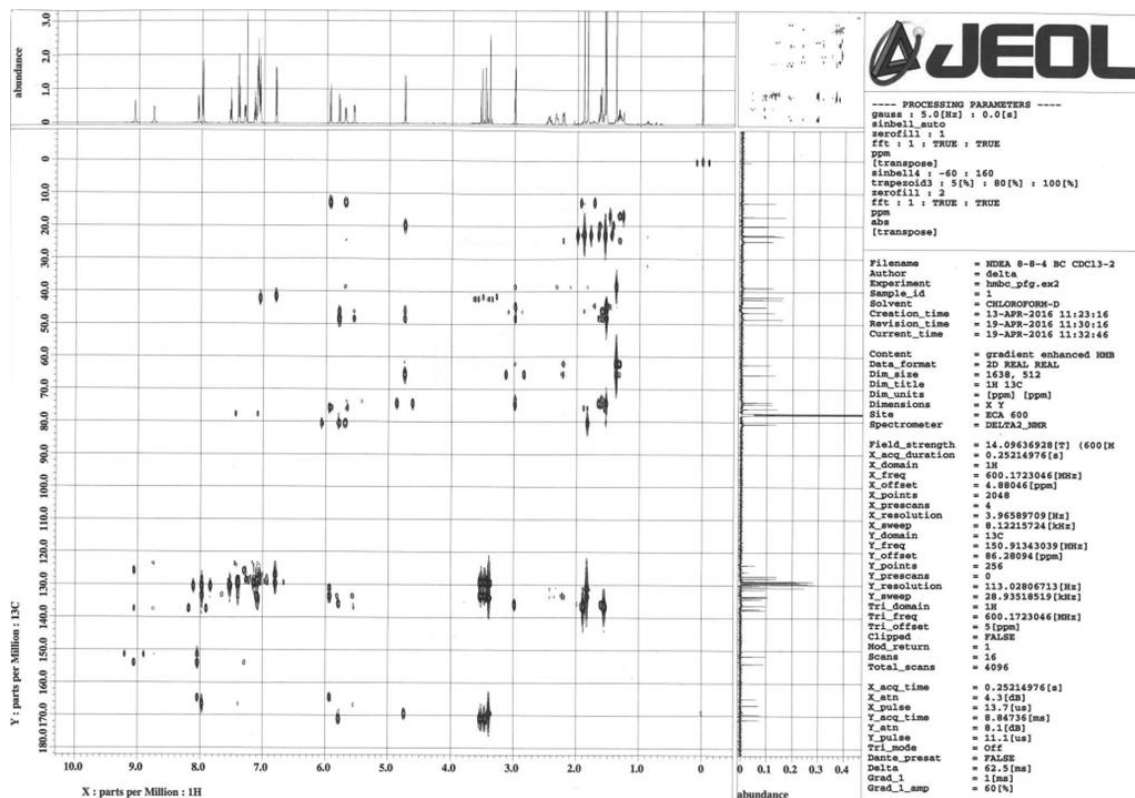


NOESY NMR (600MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.

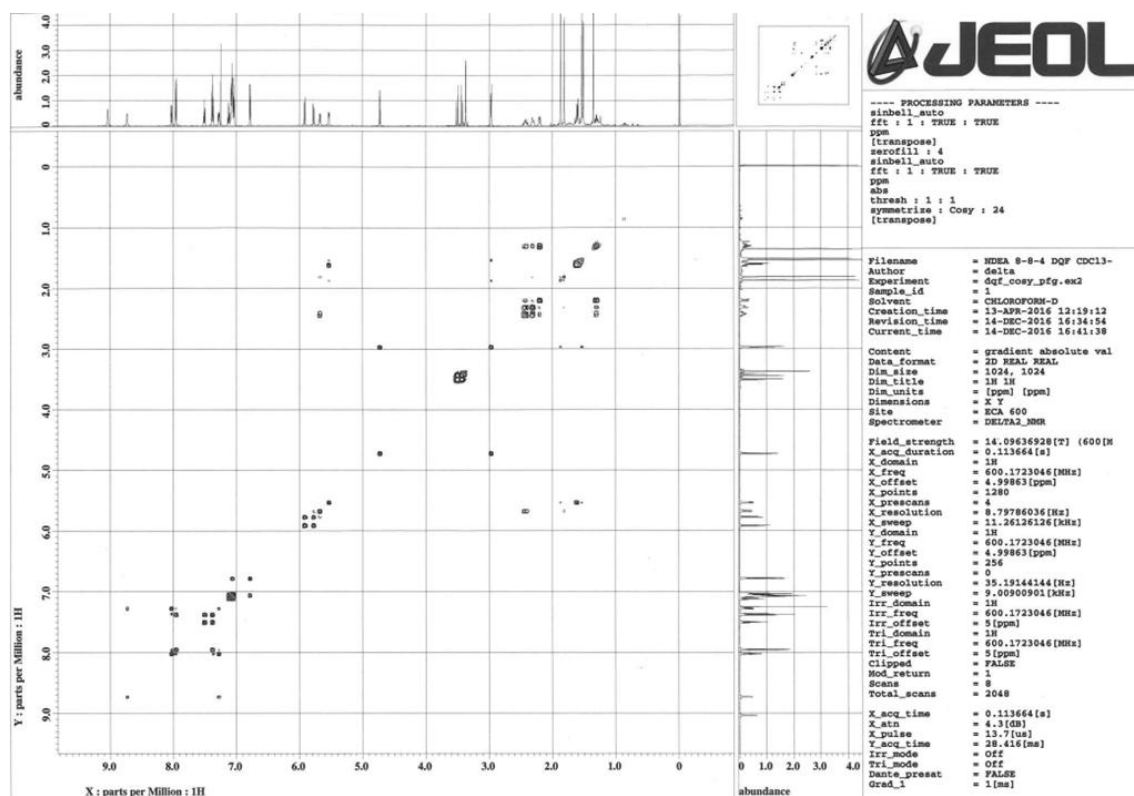
CDCl_3 



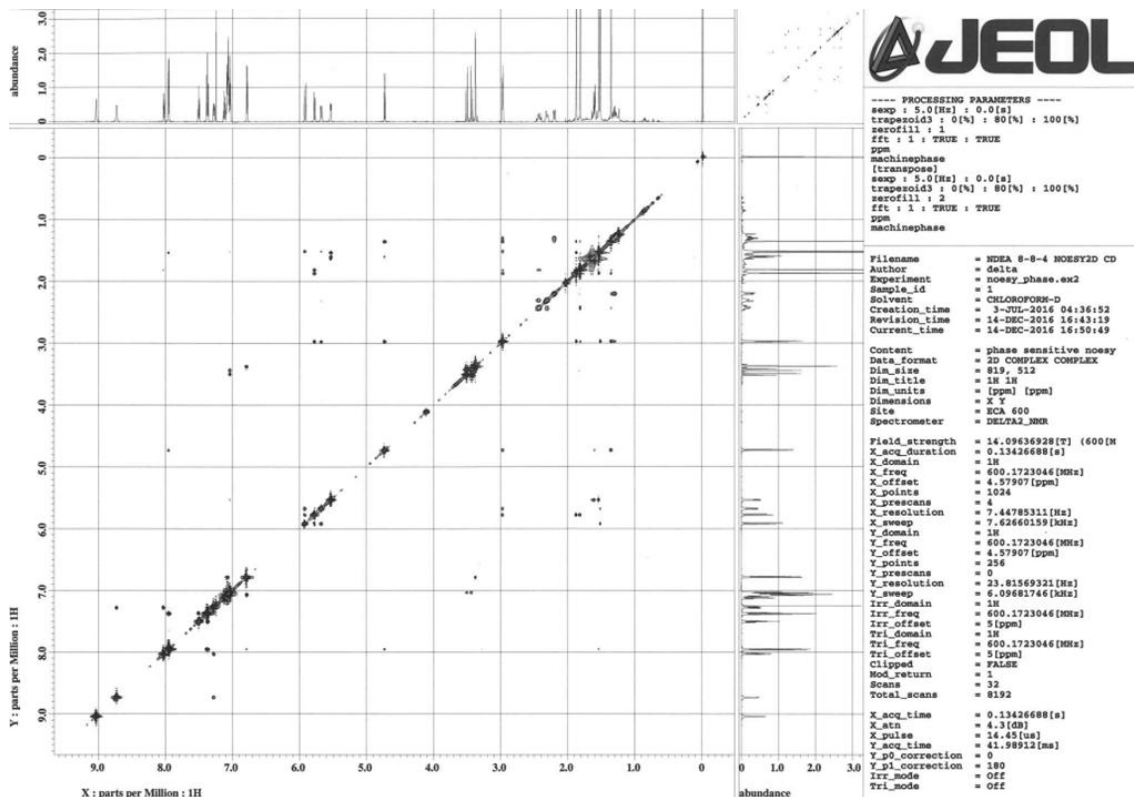
HMQC NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound 3. Measured in chloroform-*d*.



HMBC NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound 3. Measured in chloroform-*d*.



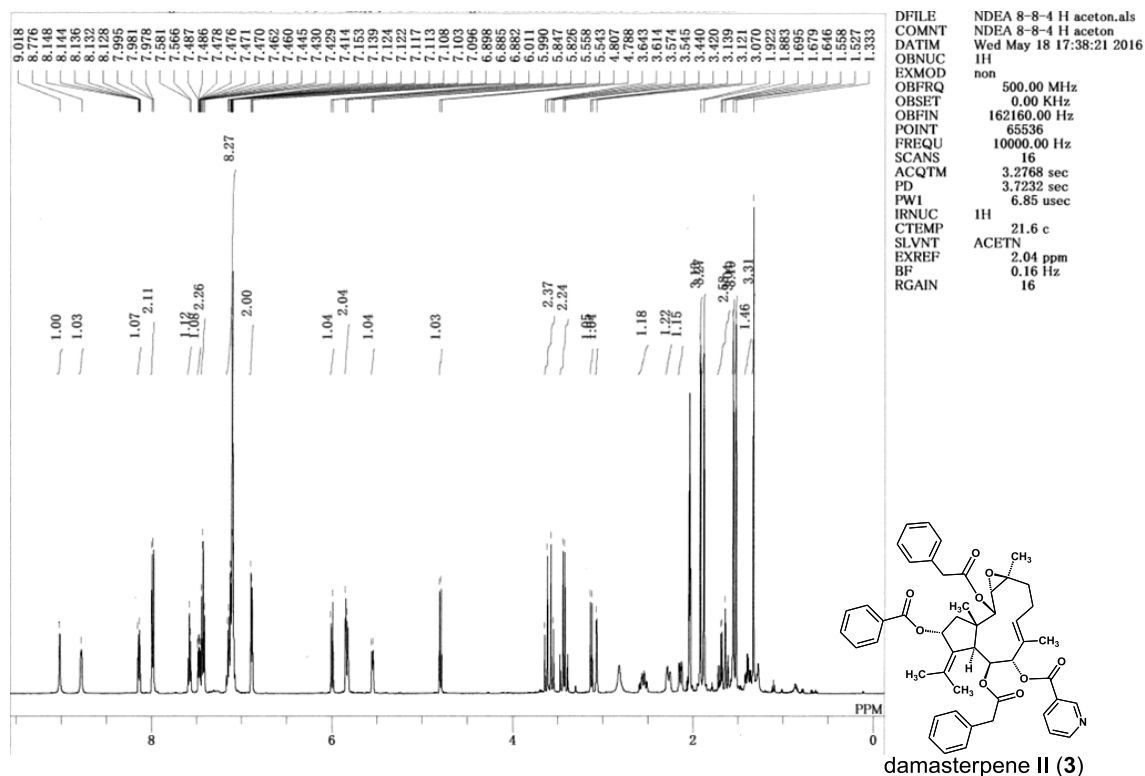
DQF COSY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **3**. Measured in chloroform-*d*.



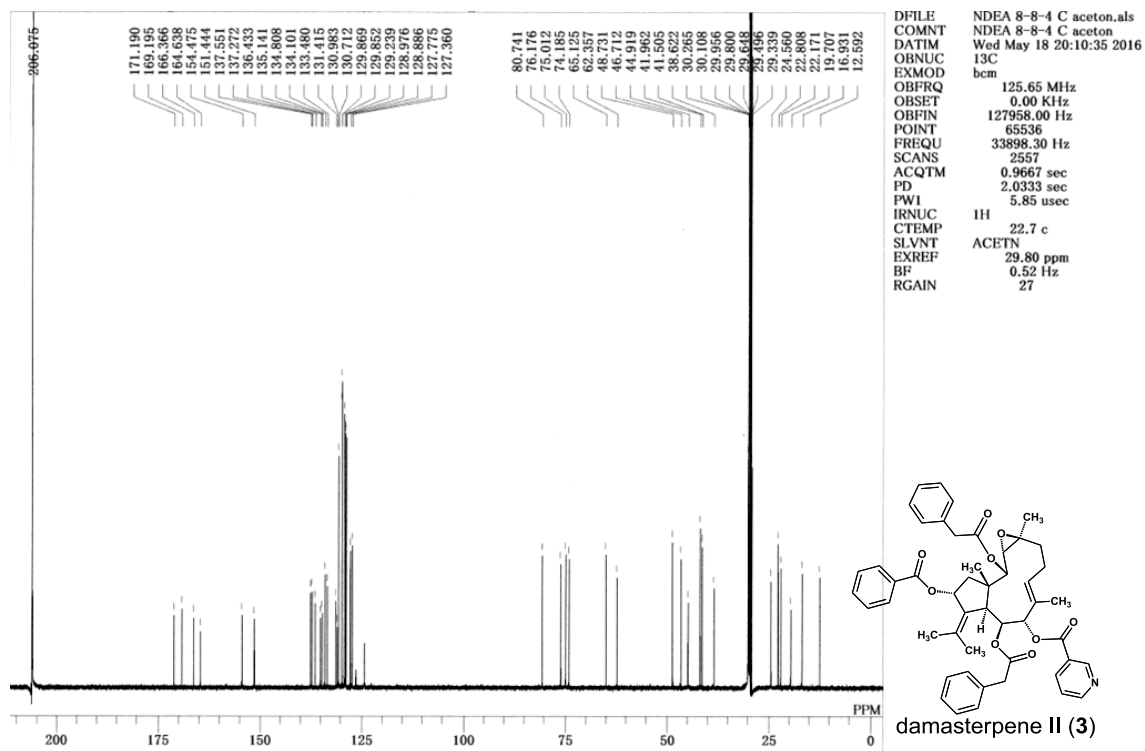
NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **3**. Measured in chloroform-*d*.

NMR spectroscopic data of damasterpene II (3)

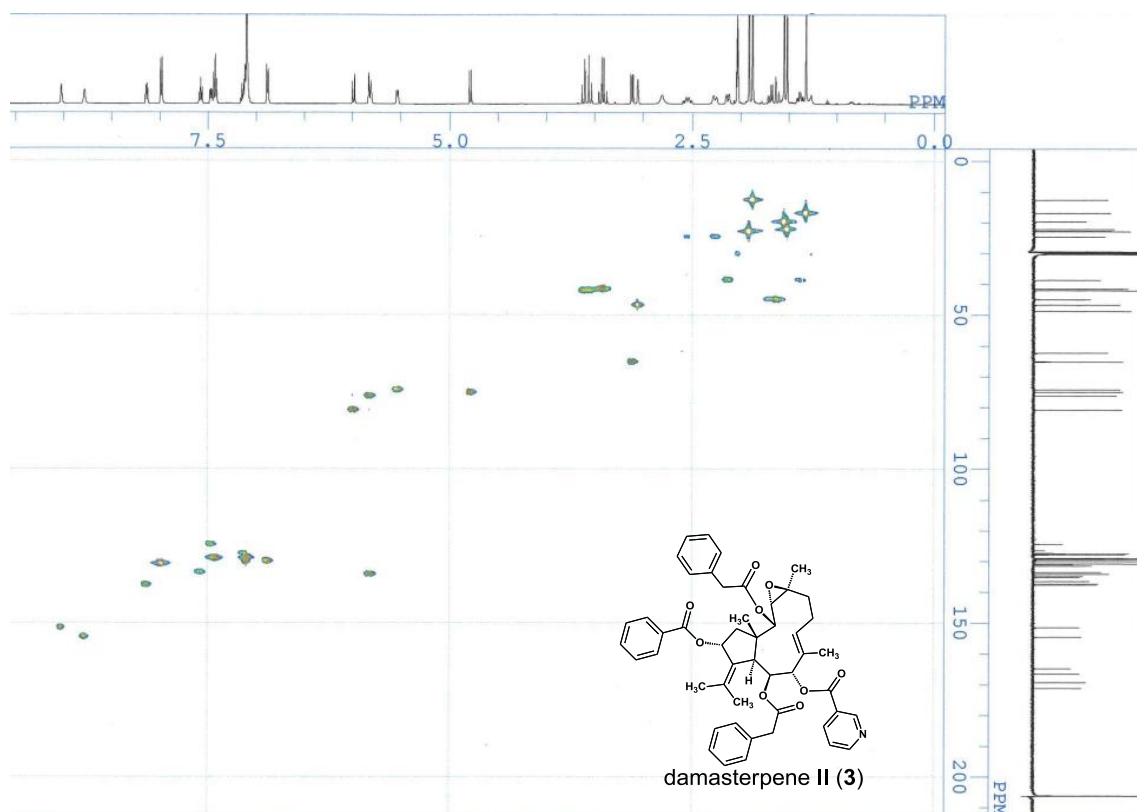
Acetone-*d*₆



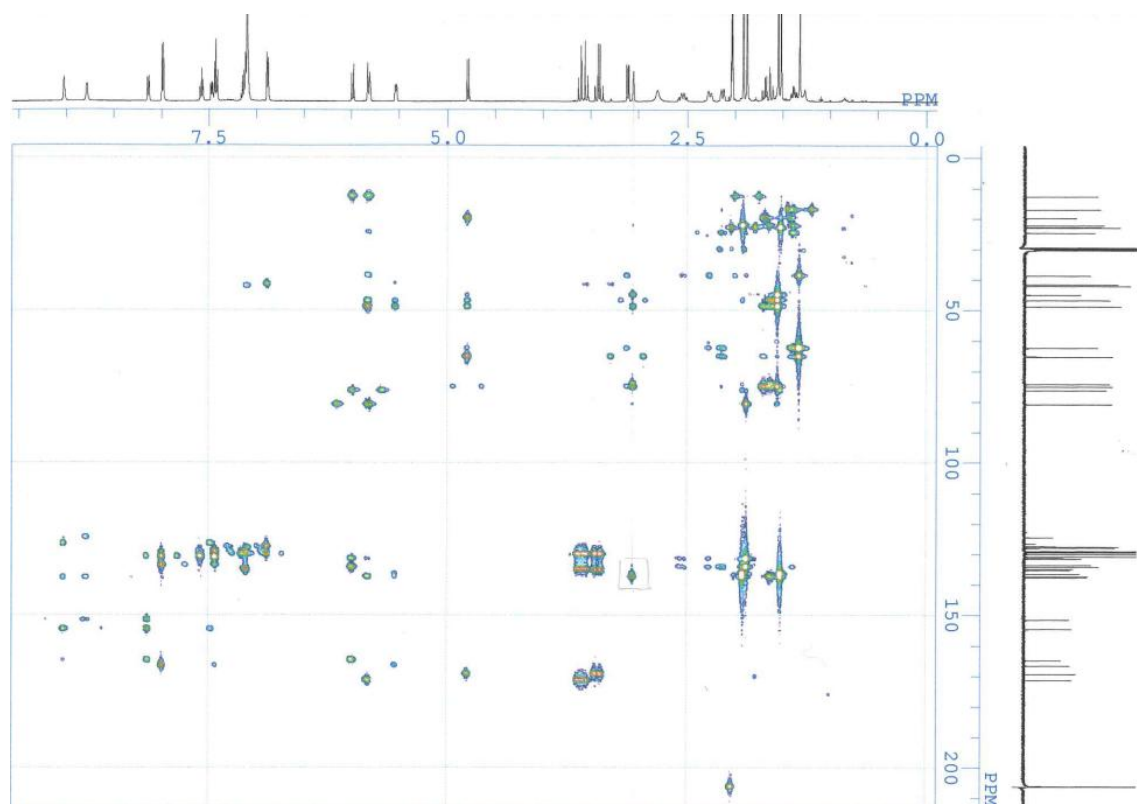
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound 3. Measured in acetone-*d*₆.



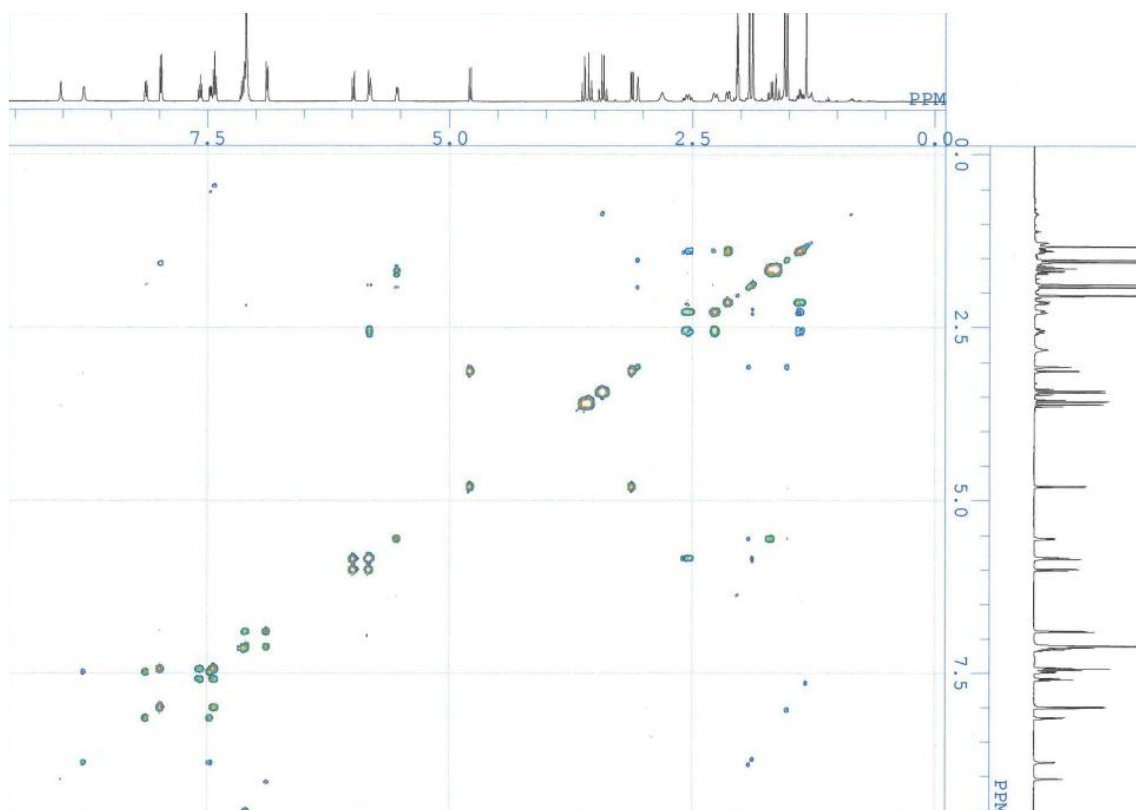
¹³C NMR (125 MHz) spectroscopic data for compound 3. Measured in acetone-*d*₆.



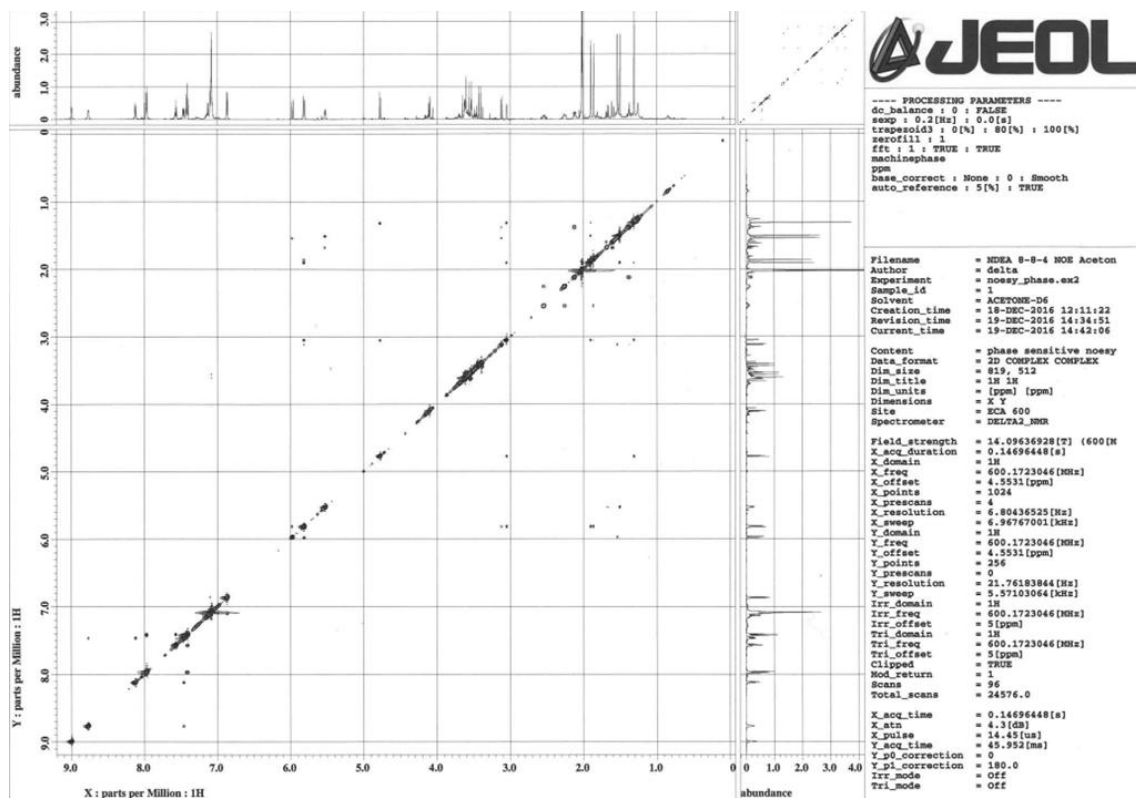
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **3**. Measured in acetone-*d*₆.



HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **3**. Measured in acetone-*d*₆.

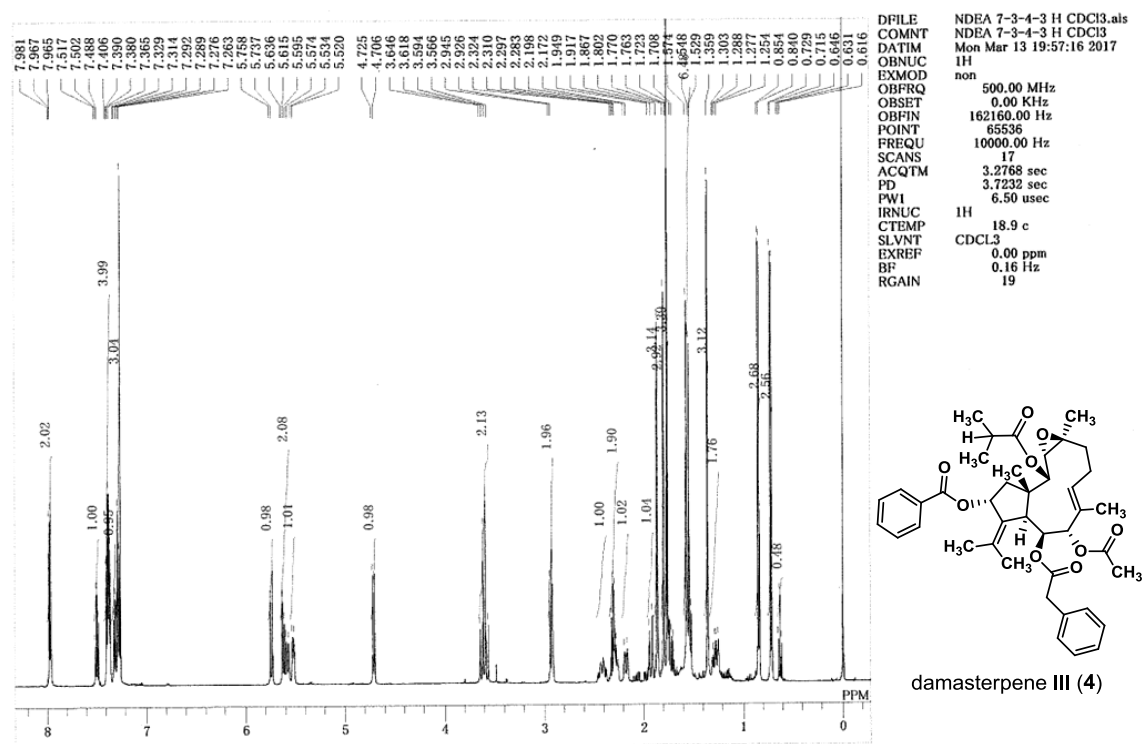


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **1**. Measured in acetone-*d*₆.

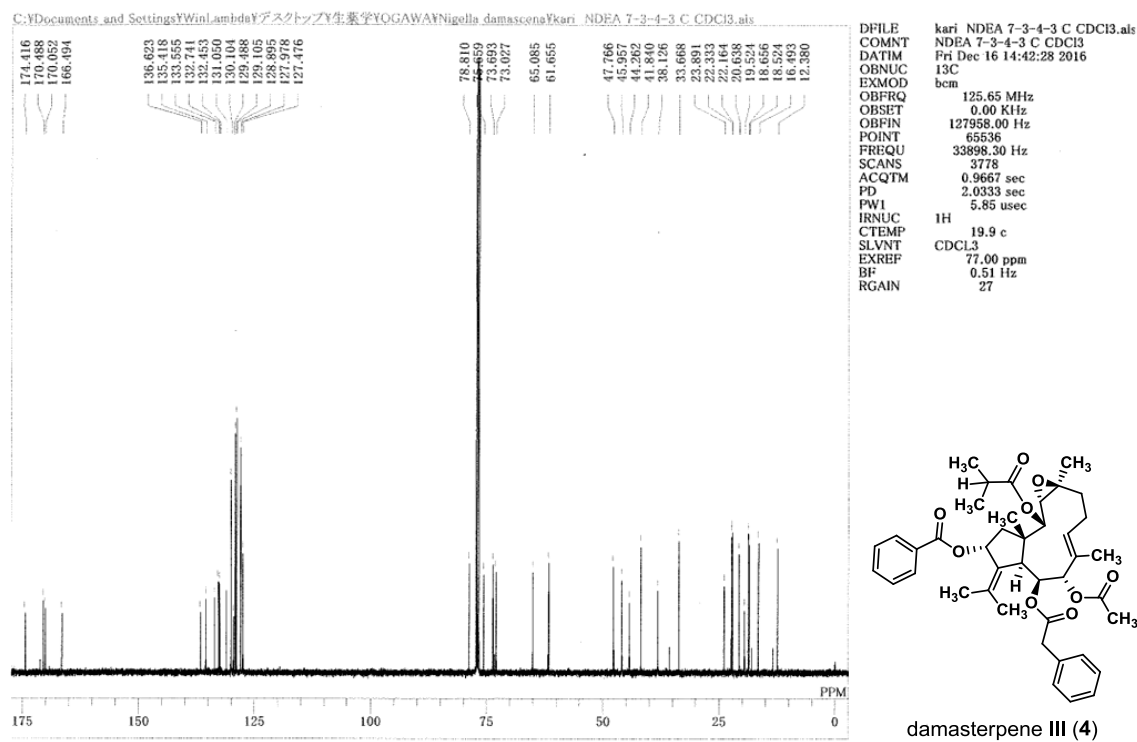


NOESY NMR (600MHz) spectroscopic data for compound **3**. Measured in acetone-*d*₆.

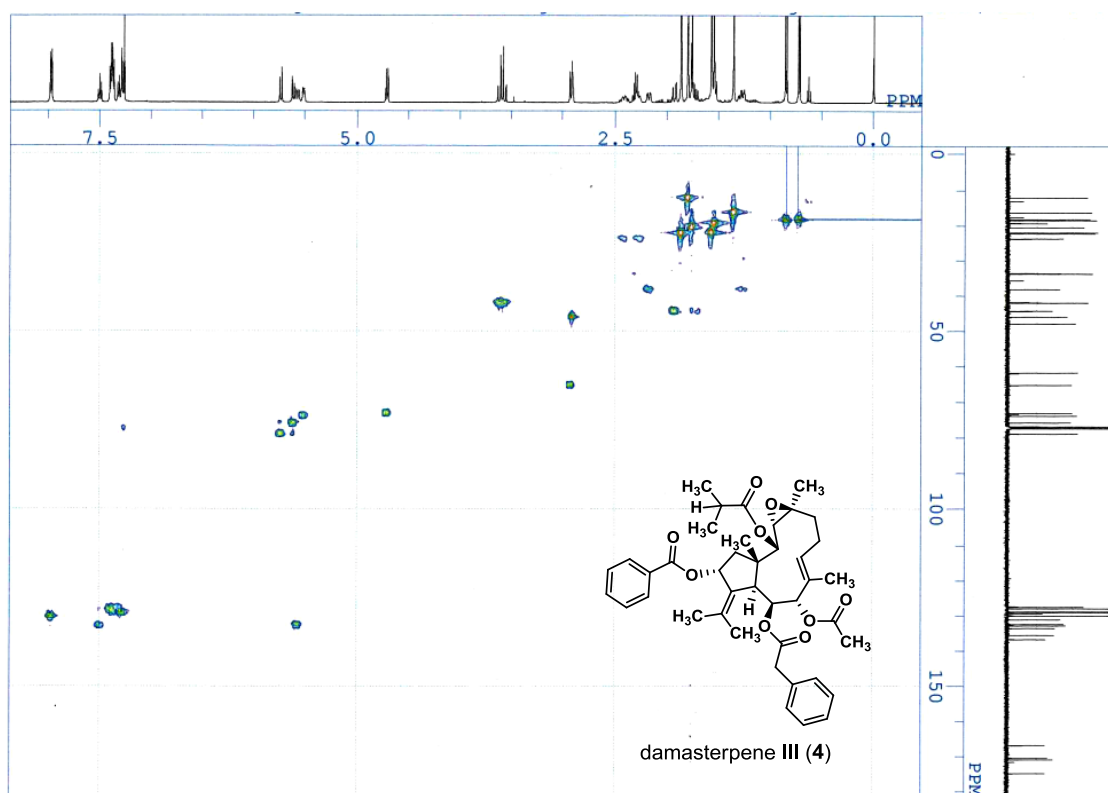
NMR spectroscopic data of damasterpene III (4)



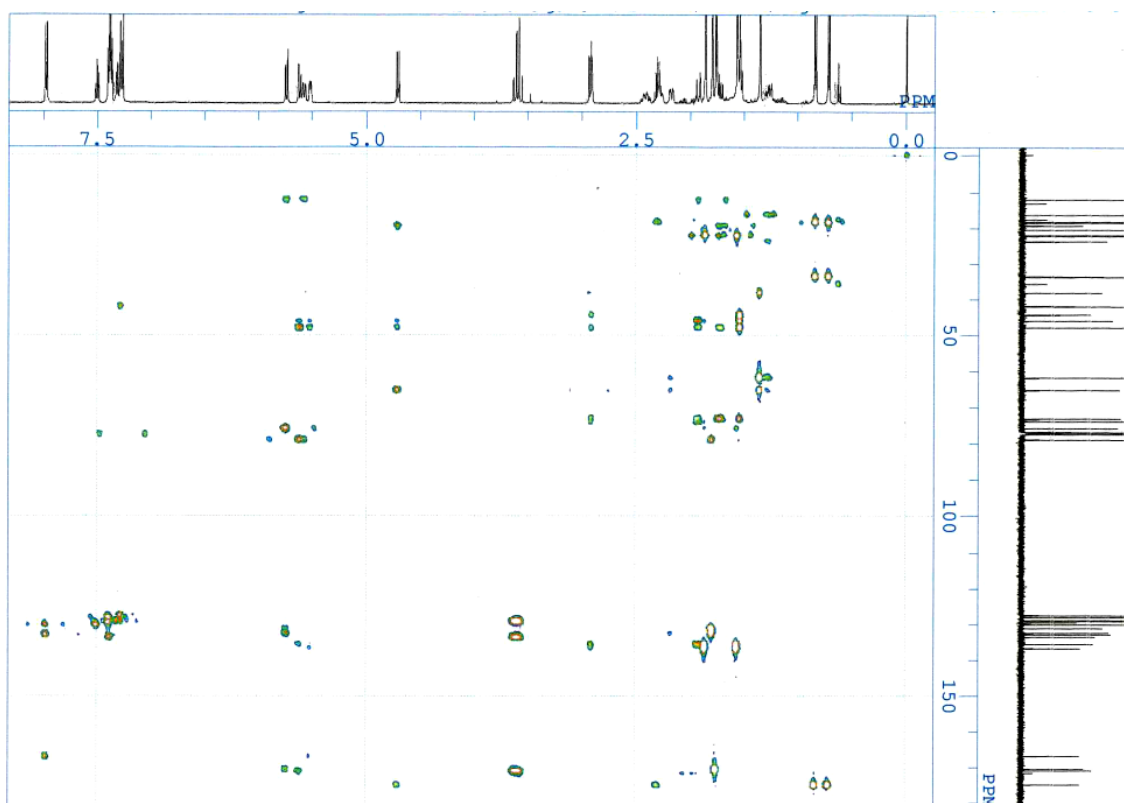
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl₃.



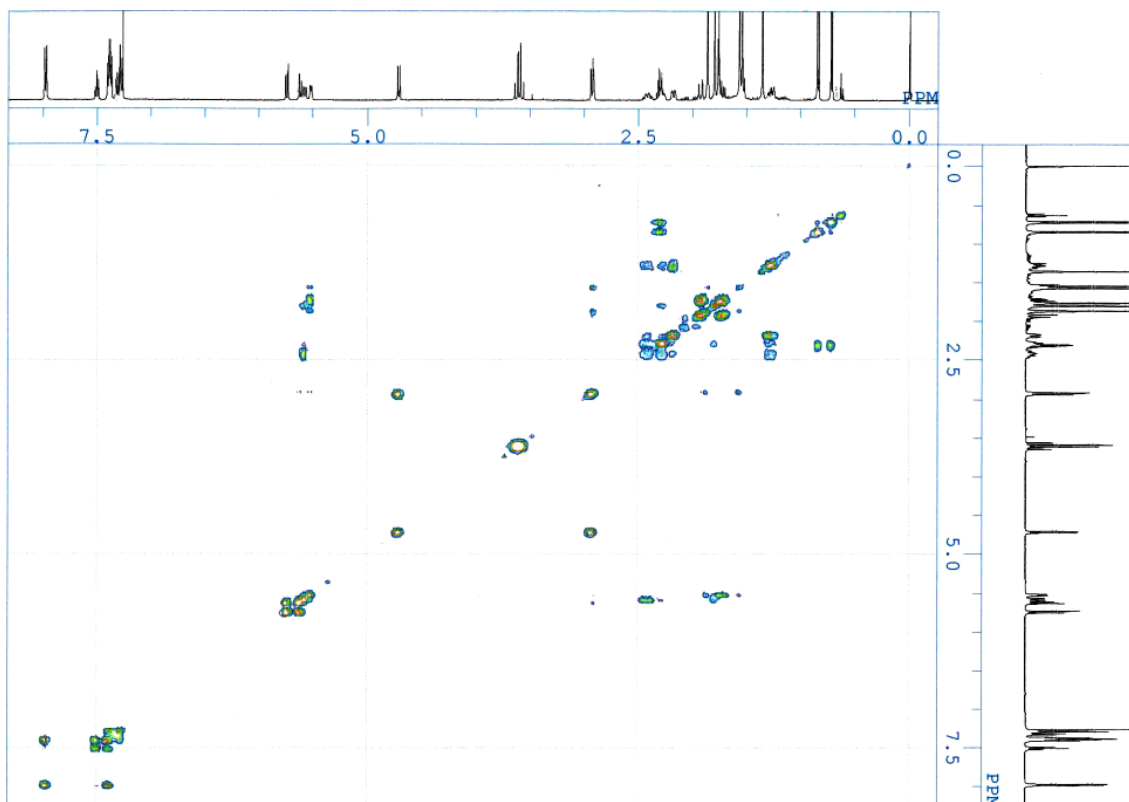
¹³C NMR (125MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl₃.



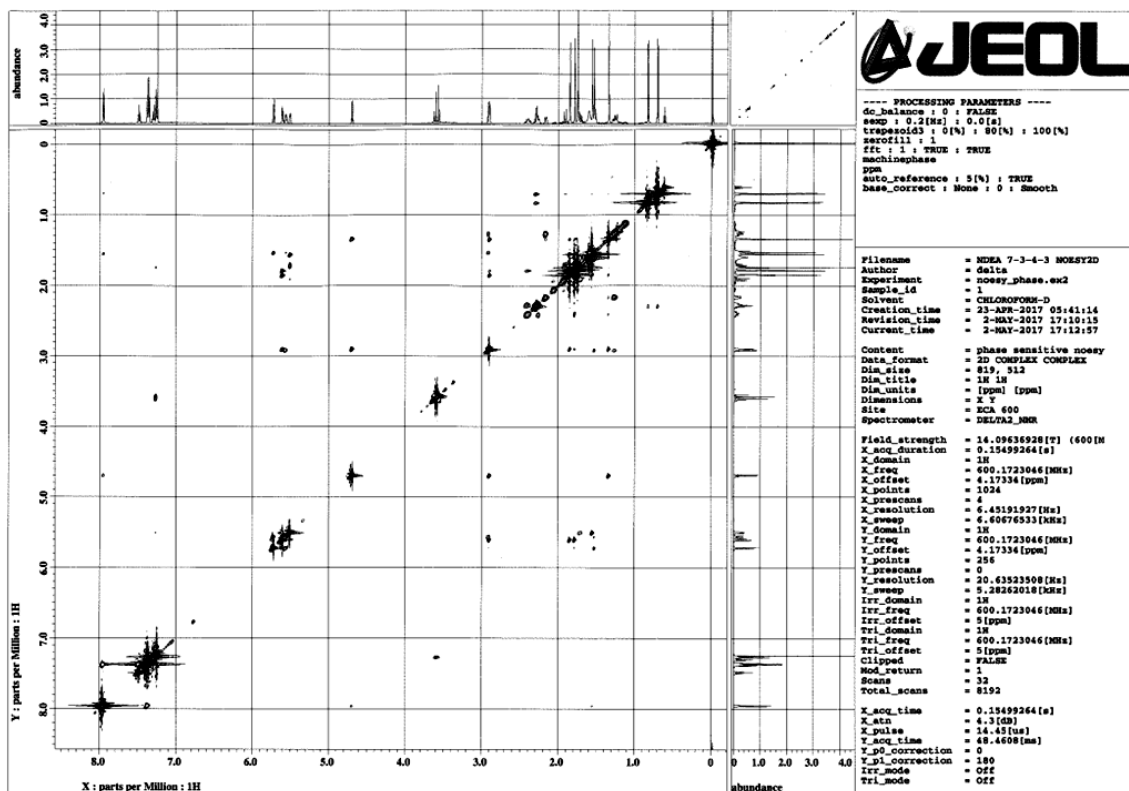
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl₃.



HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl₃.

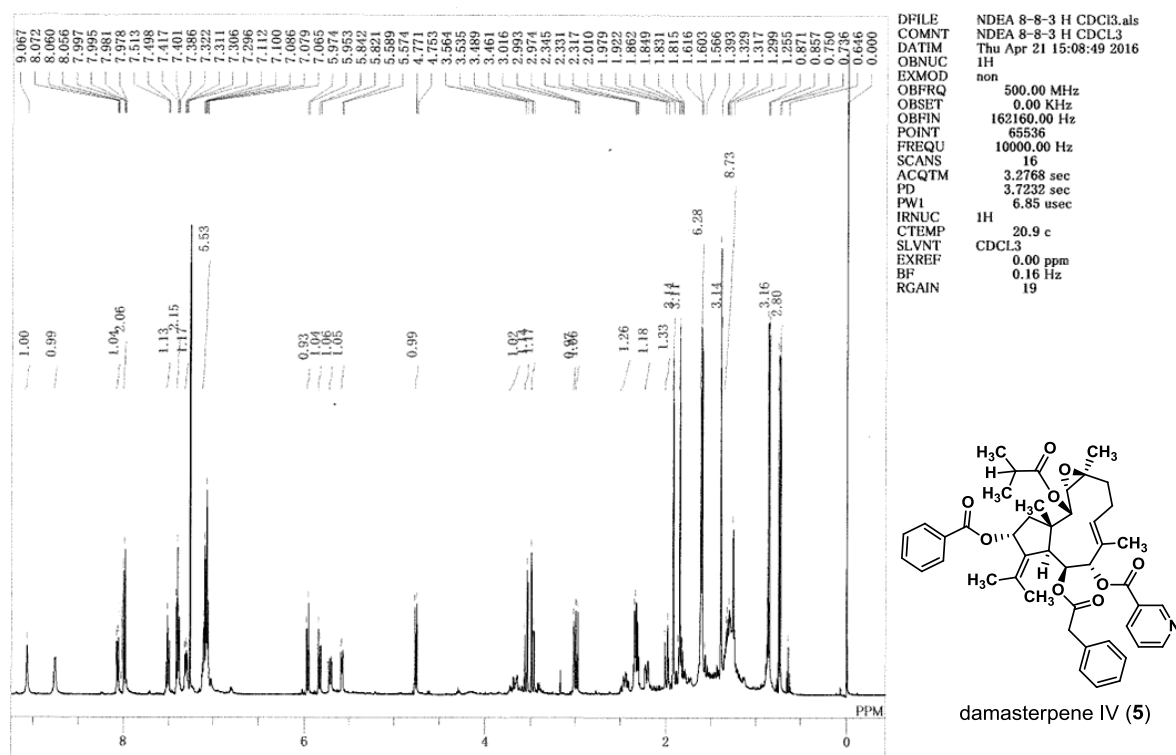


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl_3 .

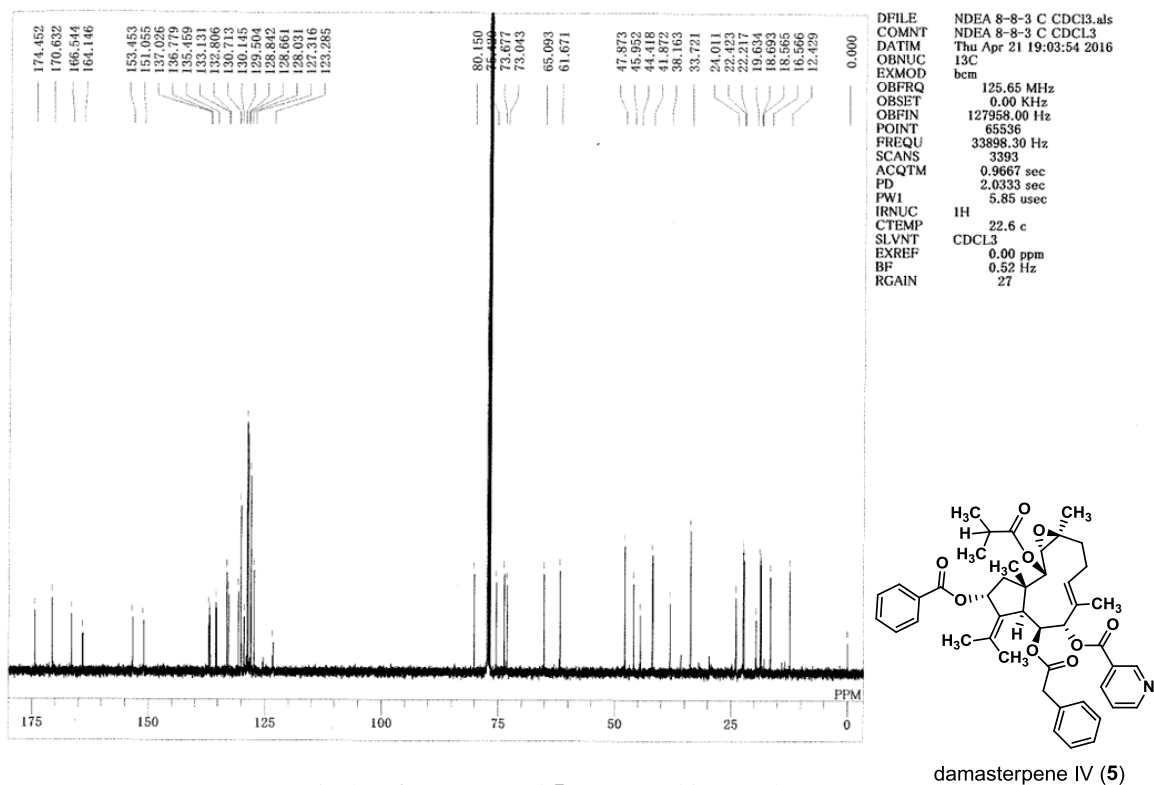


NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **4**. Measured in CDCl_3 .

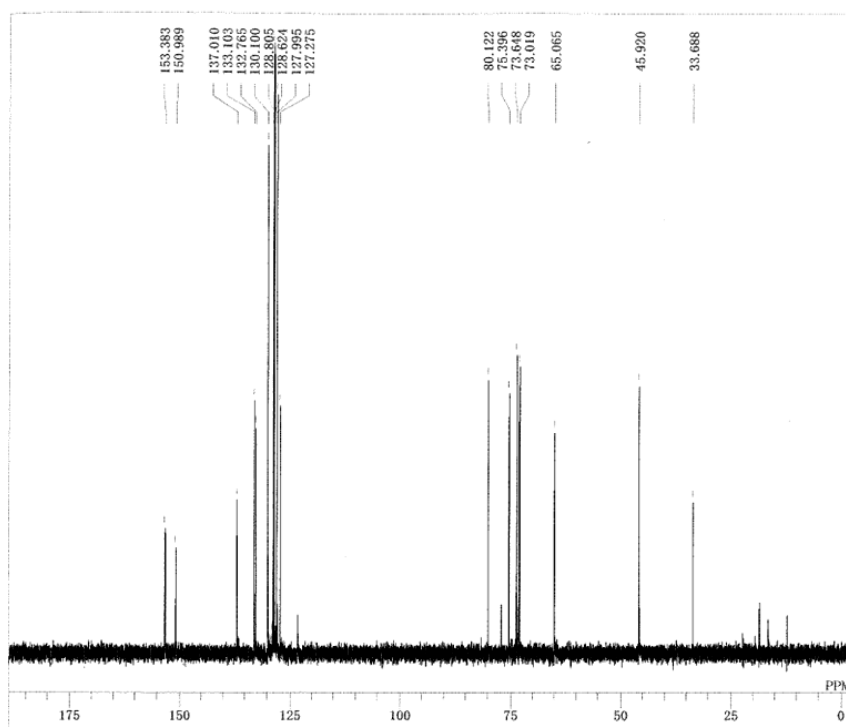
NMR spectroscopic data of damasterpene IV (5)



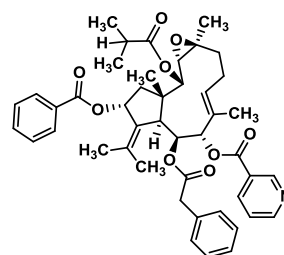
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl₃.



¹³C NMR (125MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl₃.

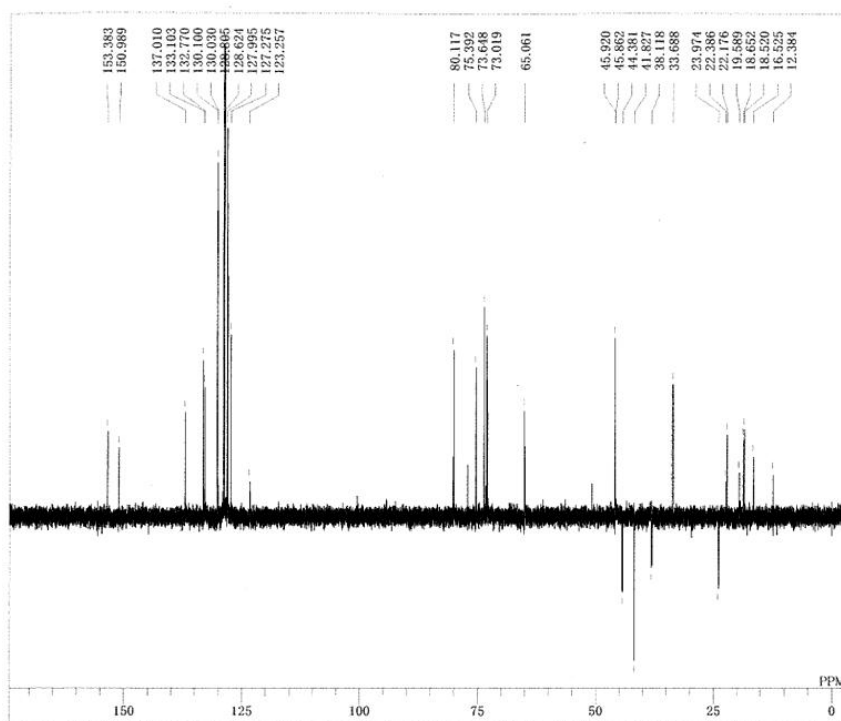


DFILE NDEA 8-8-3 DEPT90 CDCl3.als
 COMNT NDEA 8-8-3 DEPT90 CDCl3
 DATIM Sat Jun 25 17:44:39 2016
 OBNUC 13C
 EXMOD dept
 OBFRQ 125.65 MHz
 OBSET 0.00 KHz
 OBFIN 127958.00 Hz
 POINT 65536
 FREQU 33898.30 Hz
 SCANS 5380
 ACQTM 0.9667 sec
 PD 1.5000 sec
 PW1 13.00 usec
 IRNUC 1H
 CTEMP 23.9 c
 SLVNT CDCl3
 EXREF 77.00 ppm
 BF 0.52 Hz
 RGAIN 27

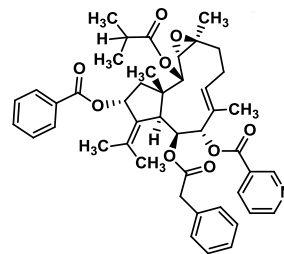


DEPT90 (125 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in chloroform-*d*.

damasterpene IV (**5**)

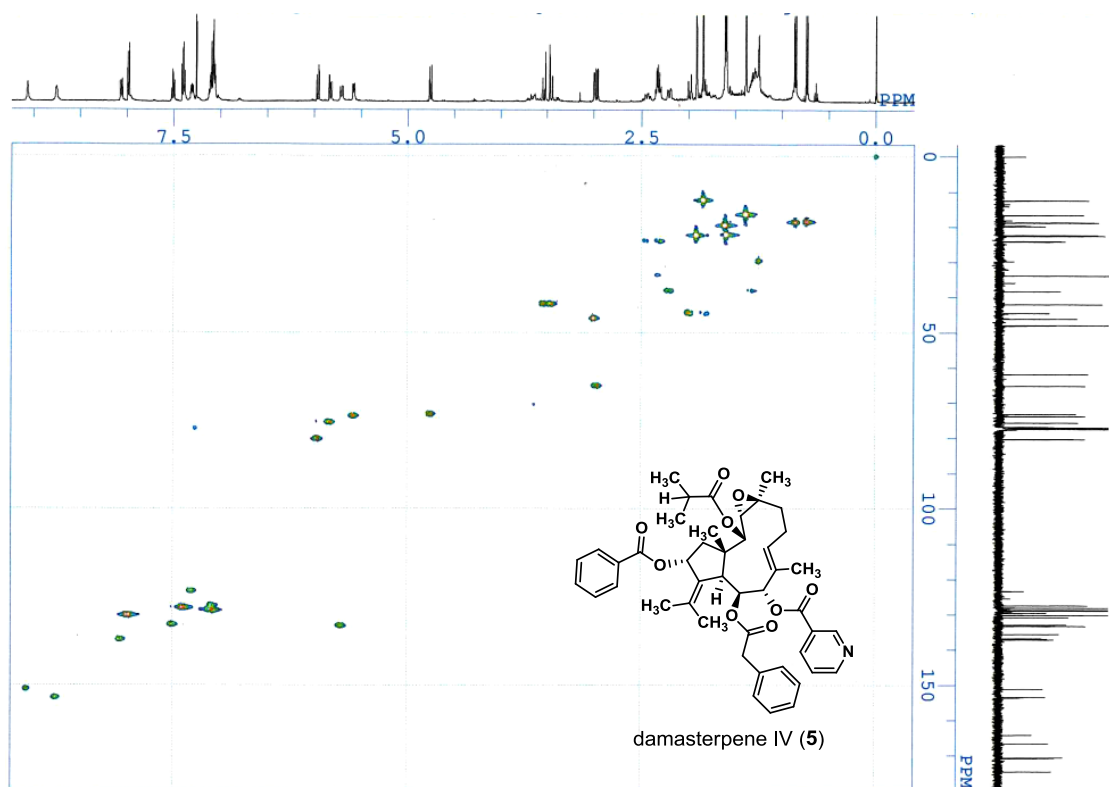


DFILE NDEA 8-8-3 DEPT135 CDCl3.als
 COMNT NDEA 8-8-3 DEPT135 CDCl3
 DATIM Sat Jun 25 14:01:21 2016
 OBNUC 13C
 EXMOD dept
 OBFRQ 125.65 MHz
 OBSET 0.00 KHz
 OBFIN 127958.00 Hz
 POINT 65536
 FREQU 33898.30 Hz
 SCANS 2521
 ACQTM 0.9667 sec
 PD 2.0330 sec
 PW1 13.80 usec
 IRNUC 1H
 CTEMP 24.1 c
 SLVNT CDCl3
 EXREF 77.00 ppm
 BF 0.52 Hz
 RGAIN 27

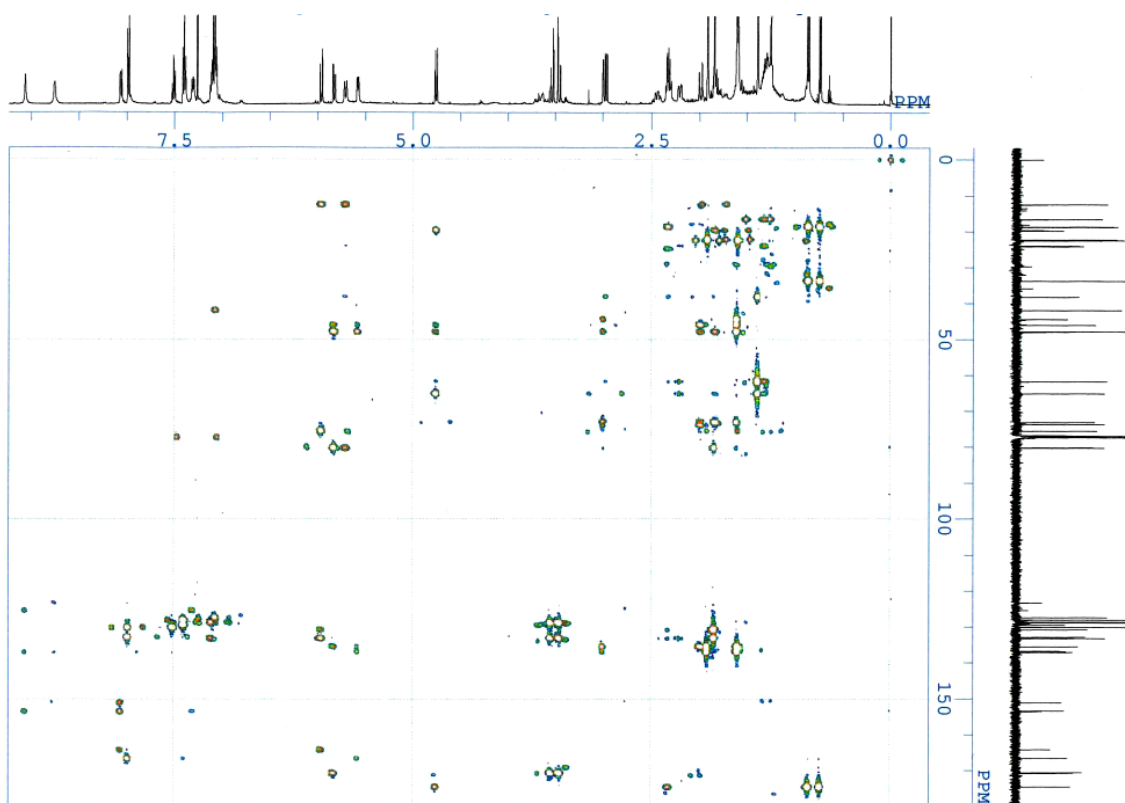


DEPT135 (125 MHz) spectroscopic data for compound **2**. Measured in chloroform-*d*.

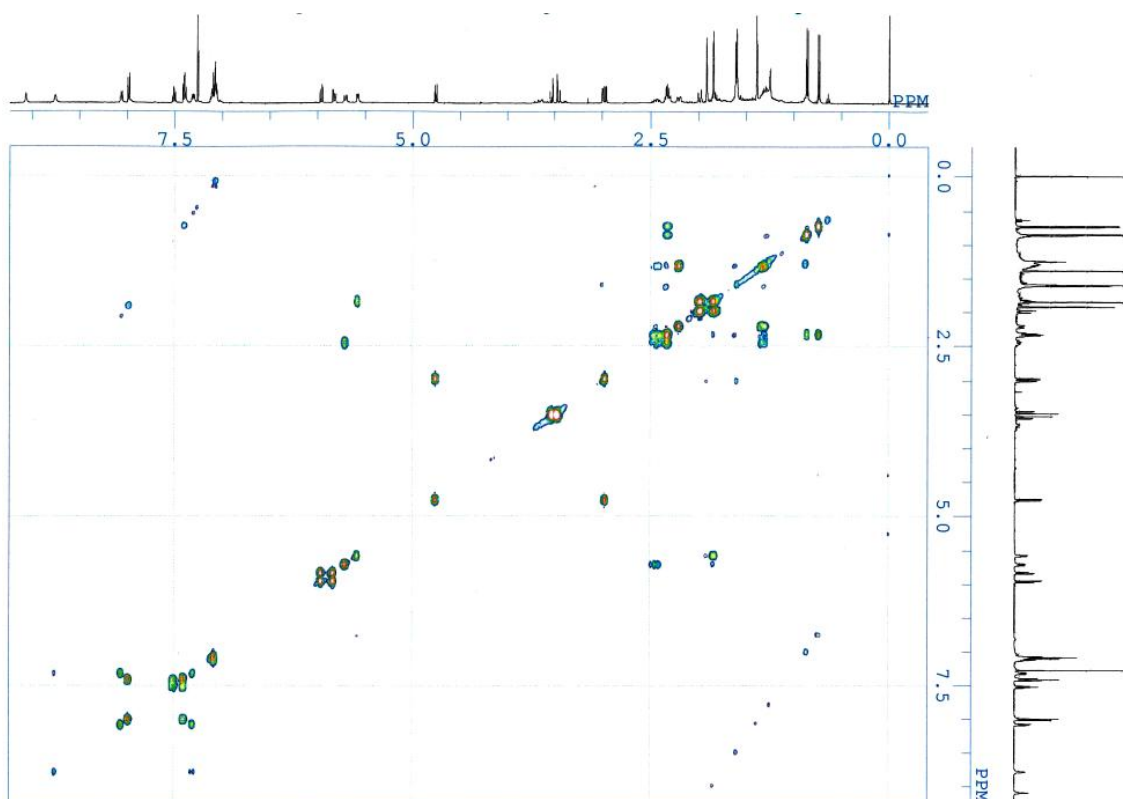
damasterpene IV (**5**)



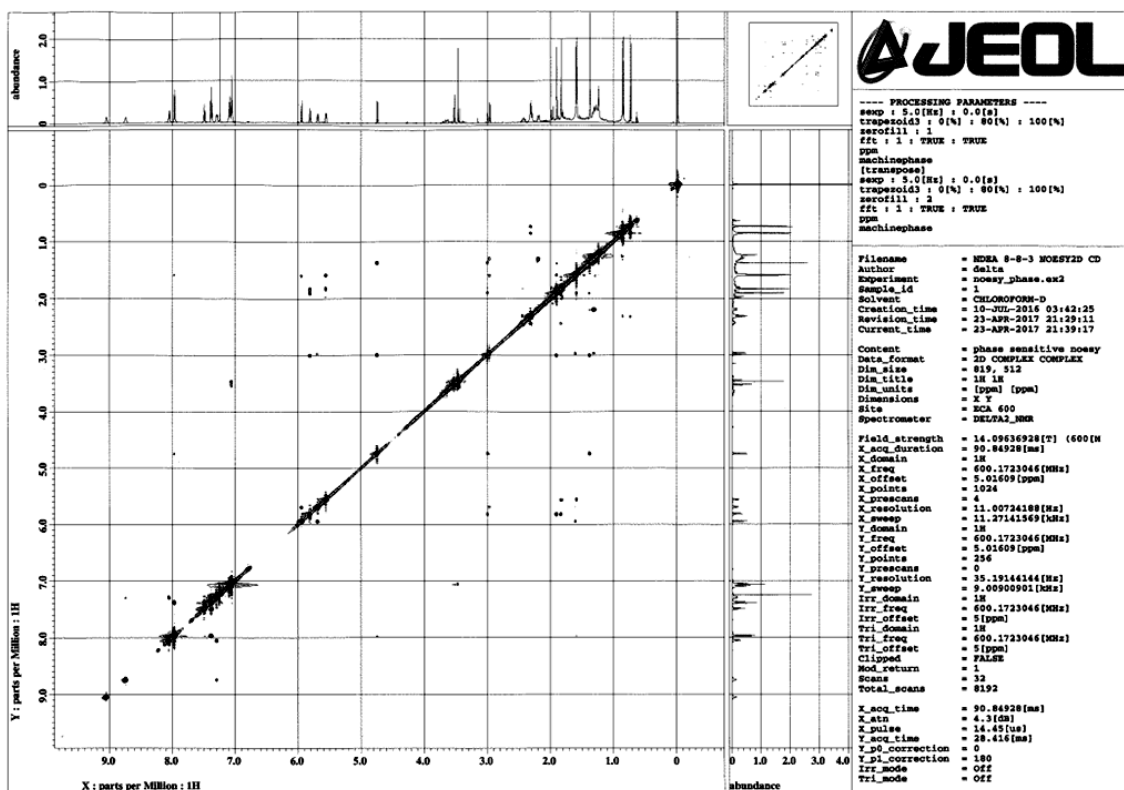
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl_3 .



HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl_3 .



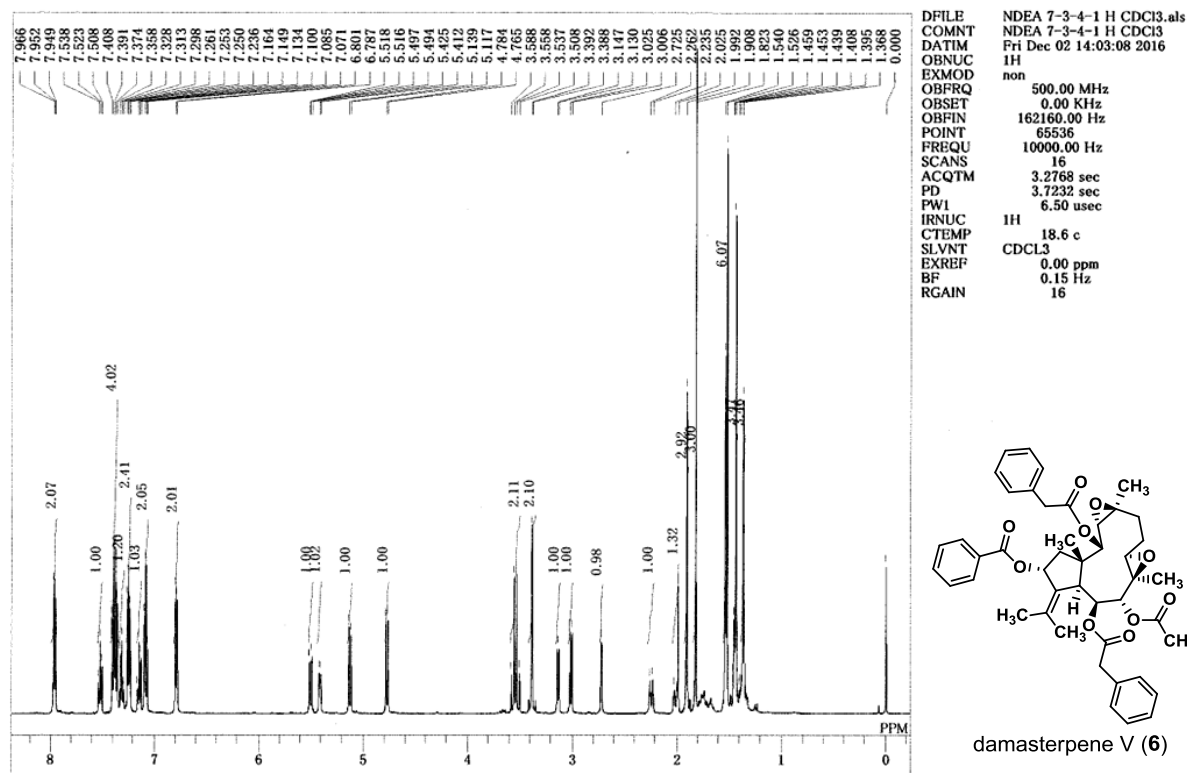
DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl_3 .

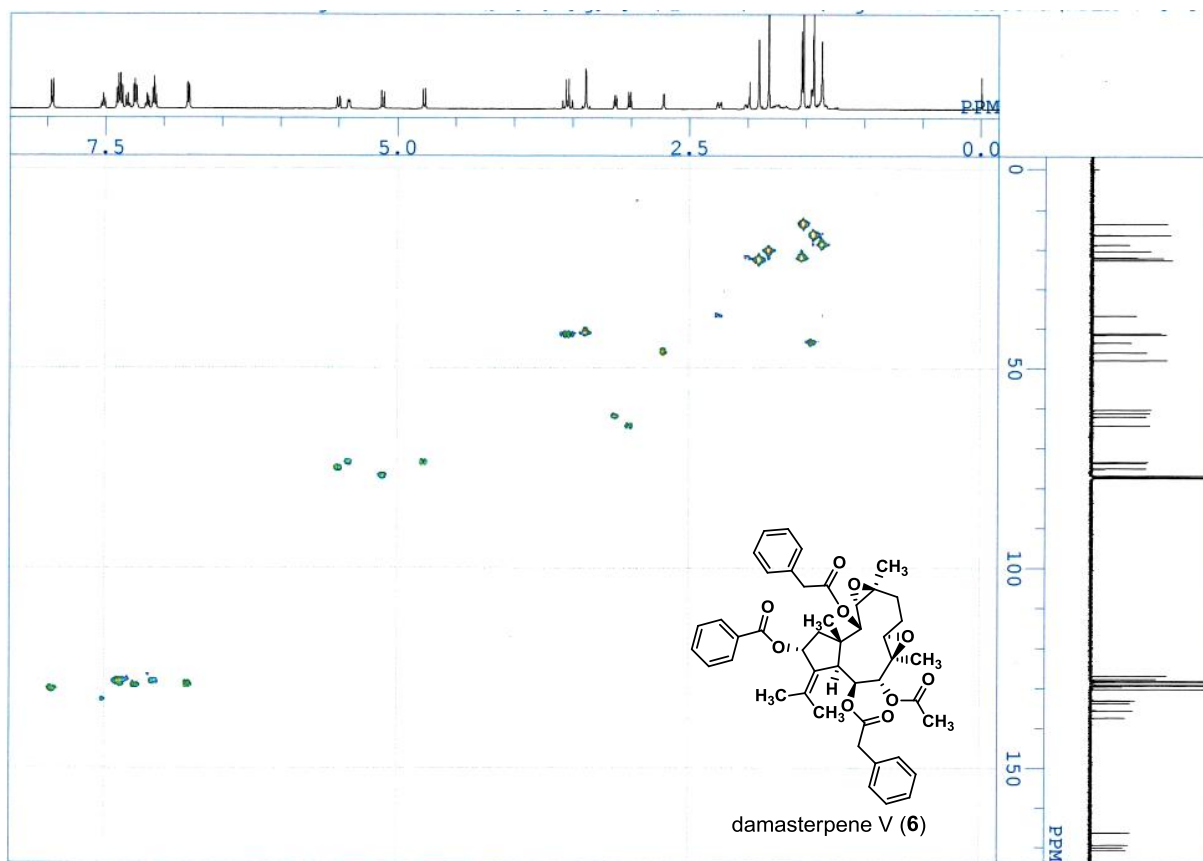


NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **5**. Measured in CDCl_3 .

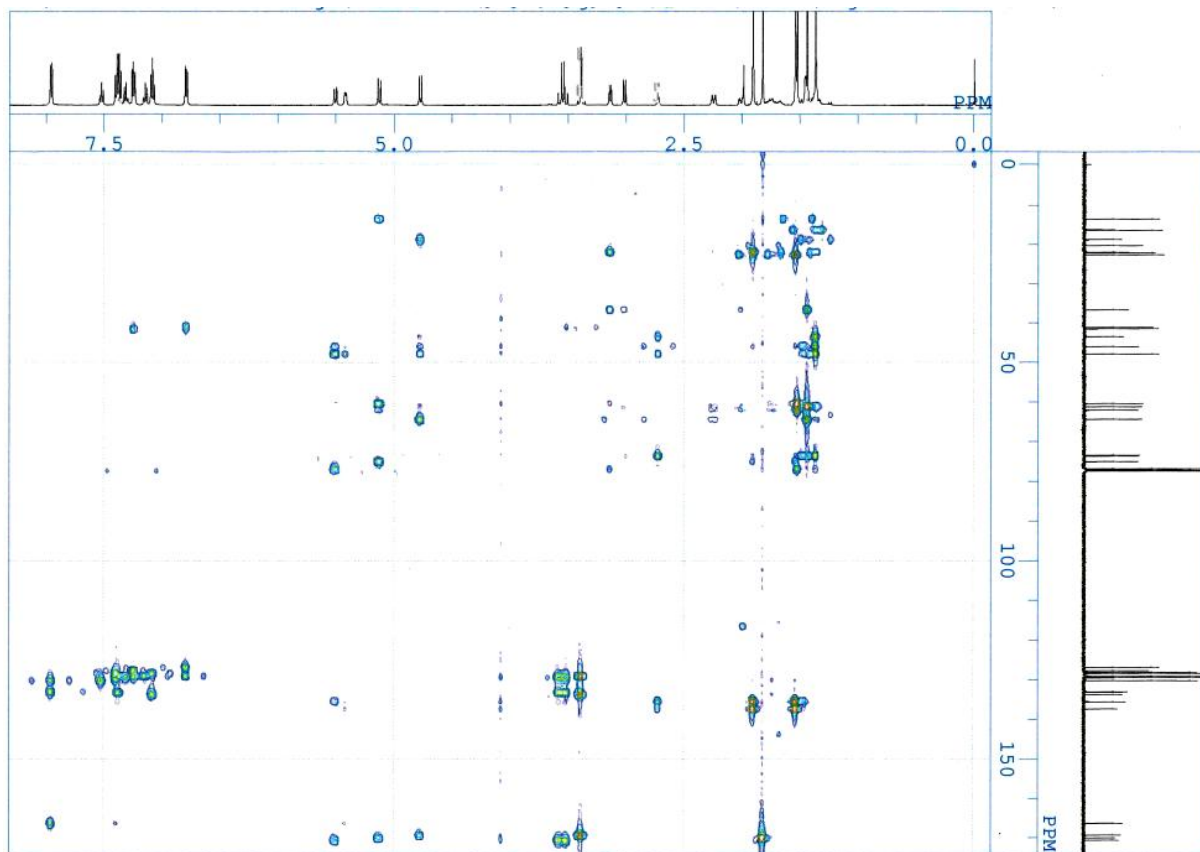
NMR spectroscopic data of damasterpene V (6)

CDCl₃

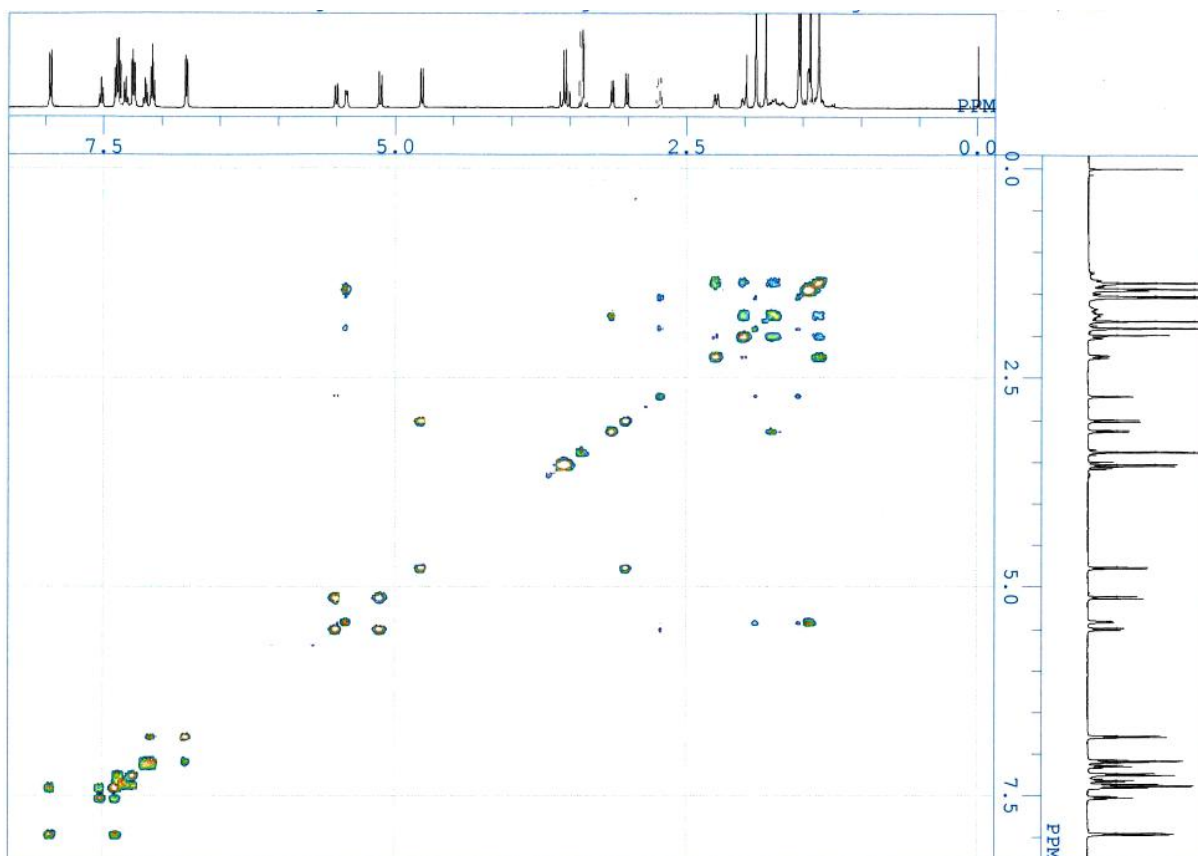




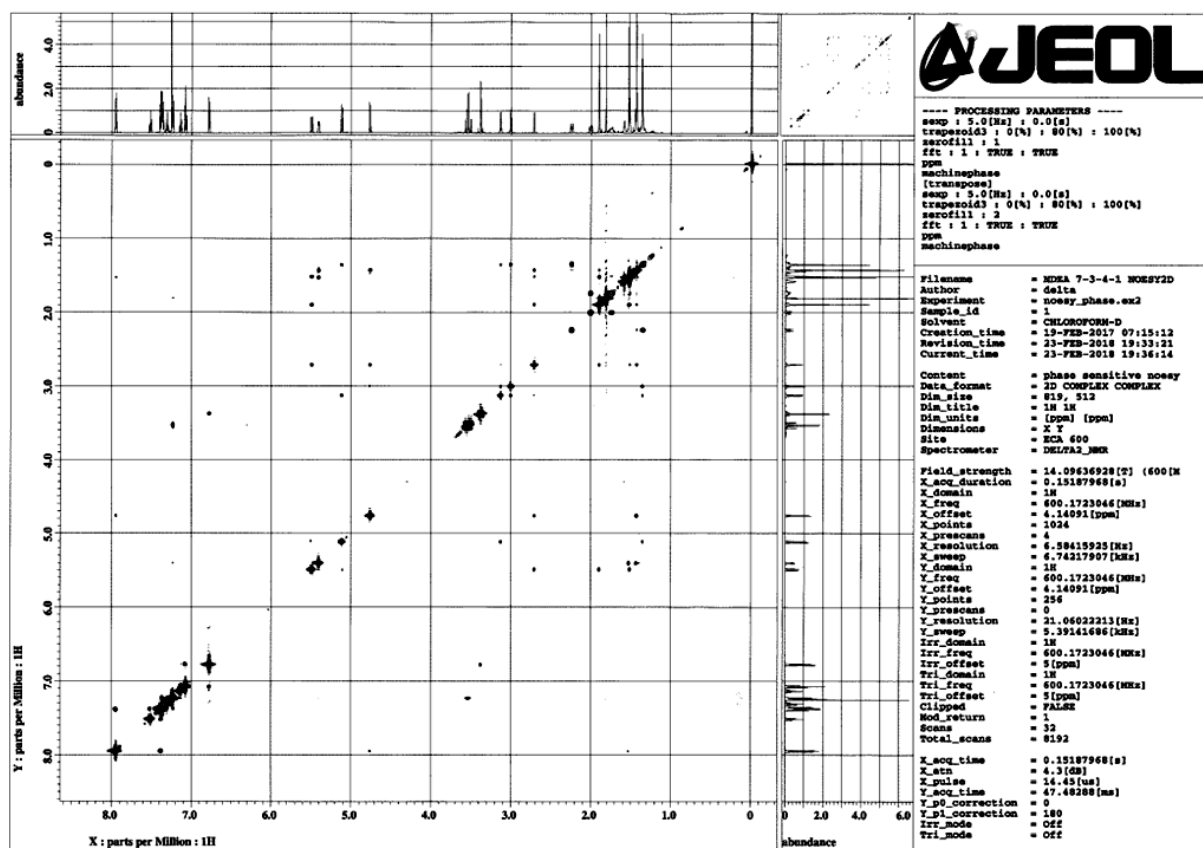
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CDCl₃.



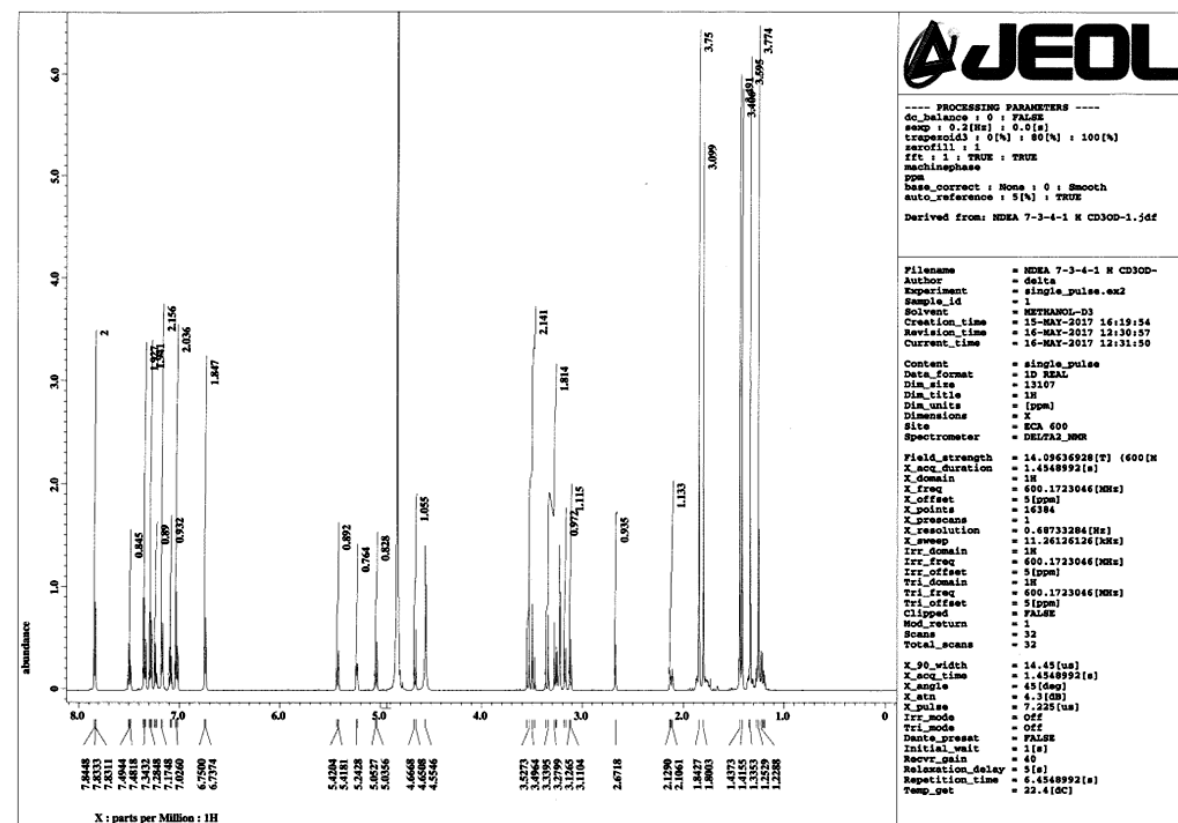
HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CDCl₃.



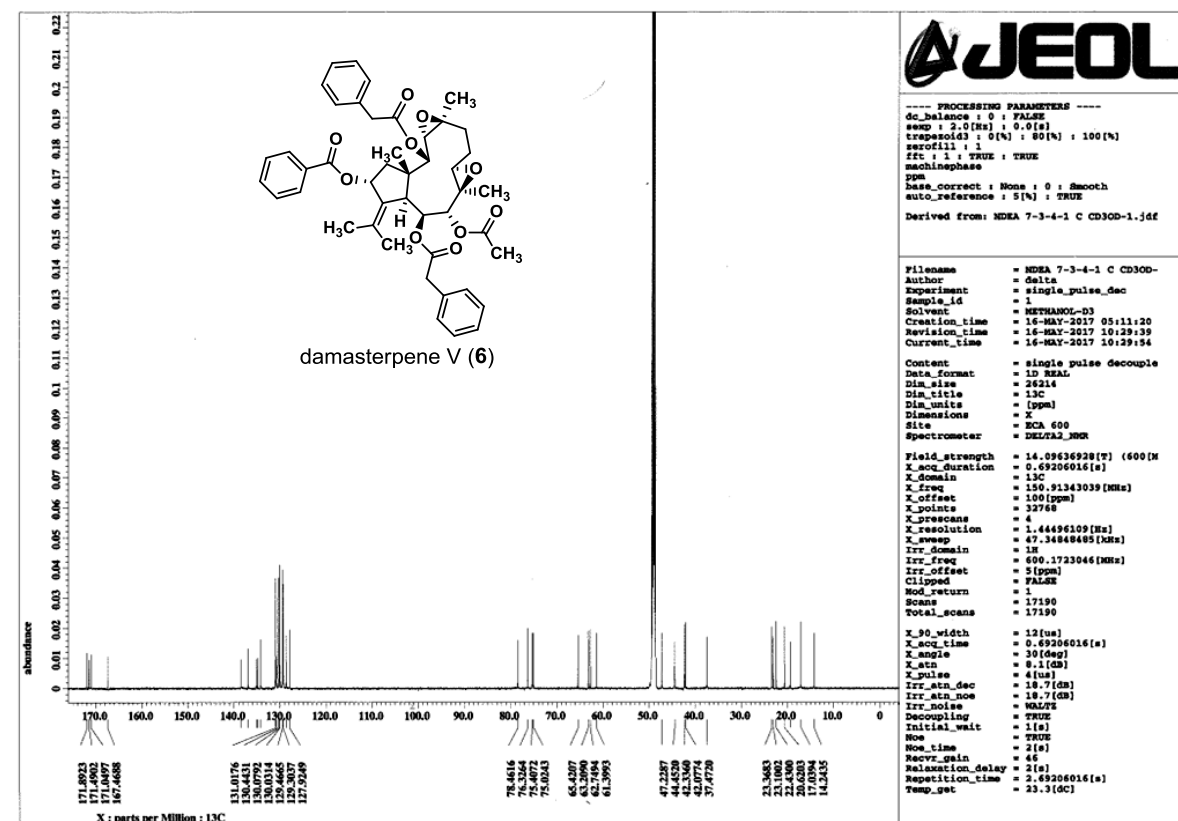
DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CDCl_3 .



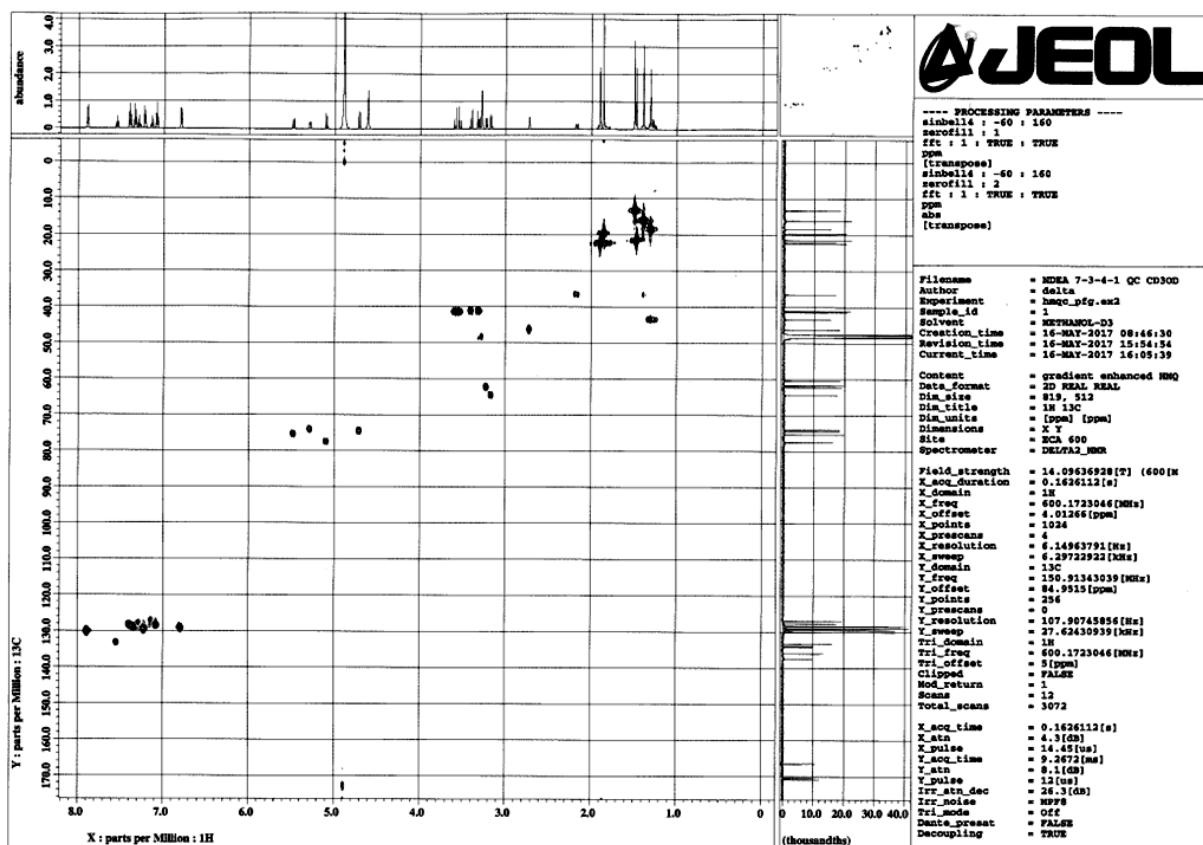
NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CDCl_3 .



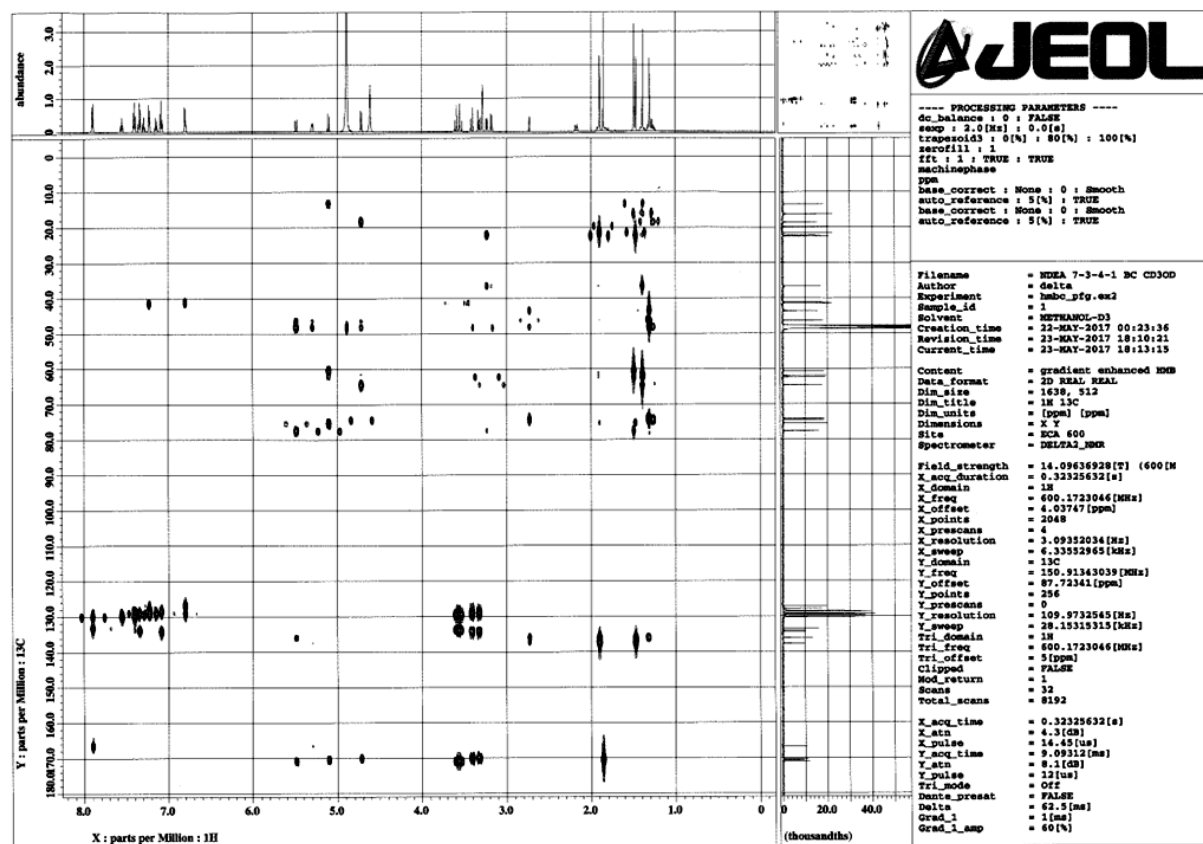
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.



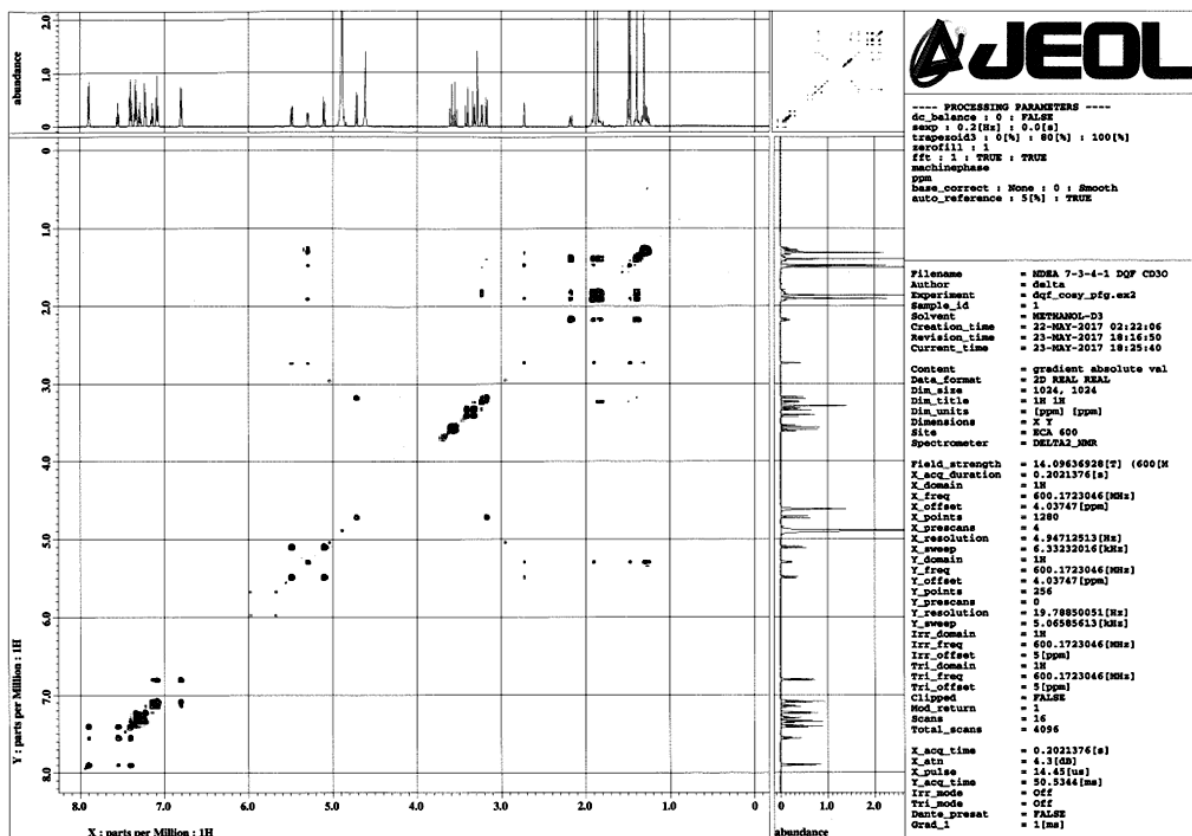
¹³C NMR (150MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.



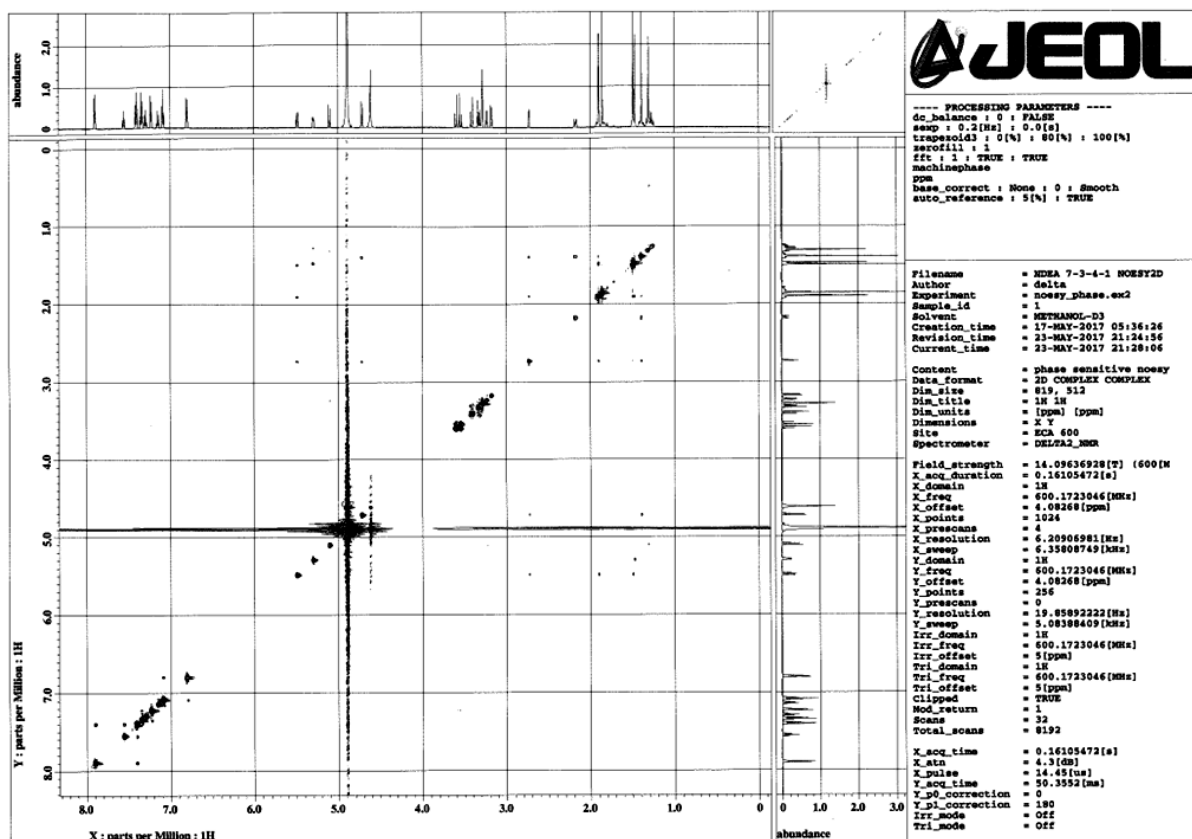
HMQC NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.



HMBC NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.

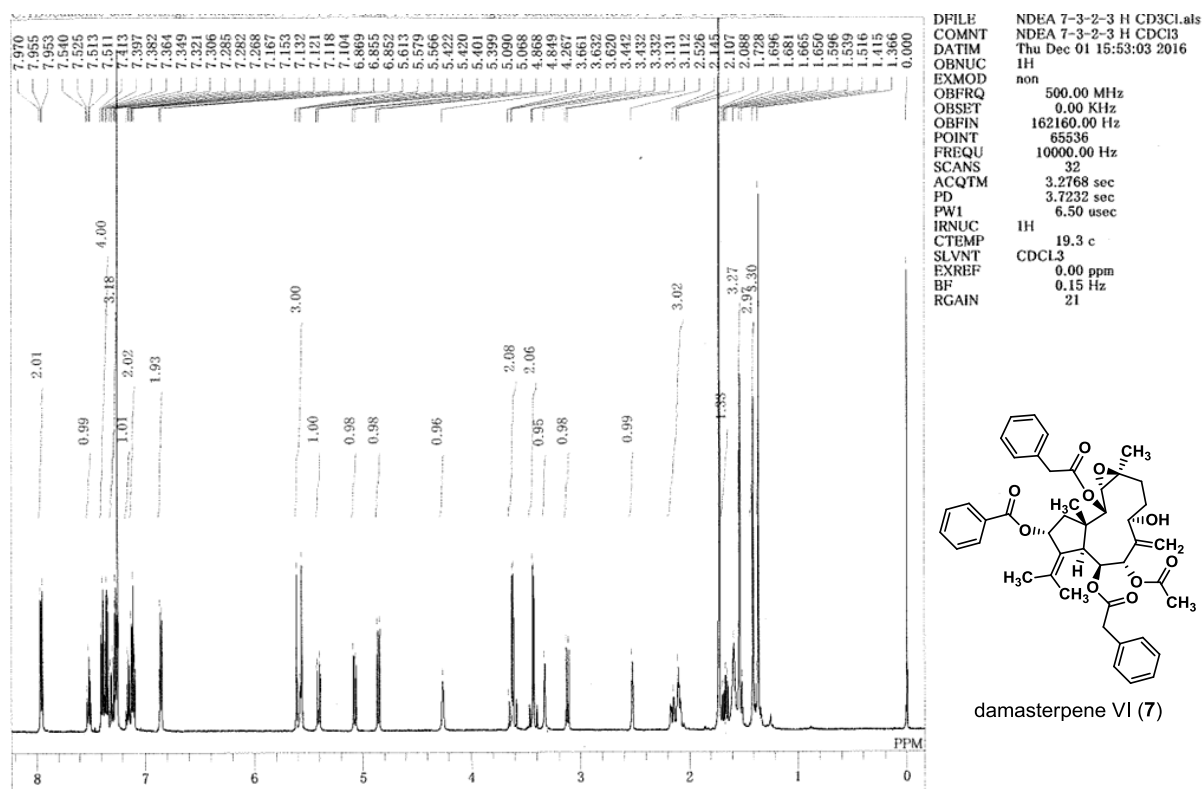


DQF COSY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.

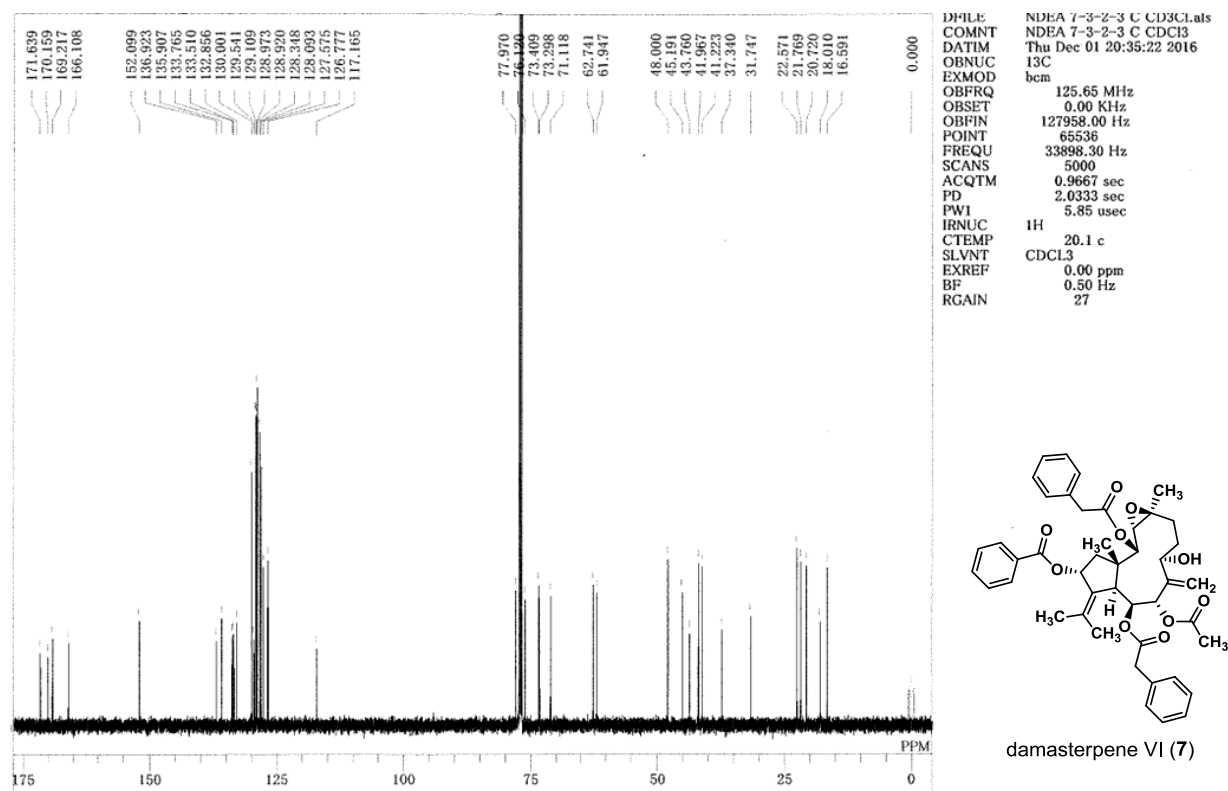


NOESY NMR (600MHz) spectroscopic data for compound **6**. Measured in CD₃OD.

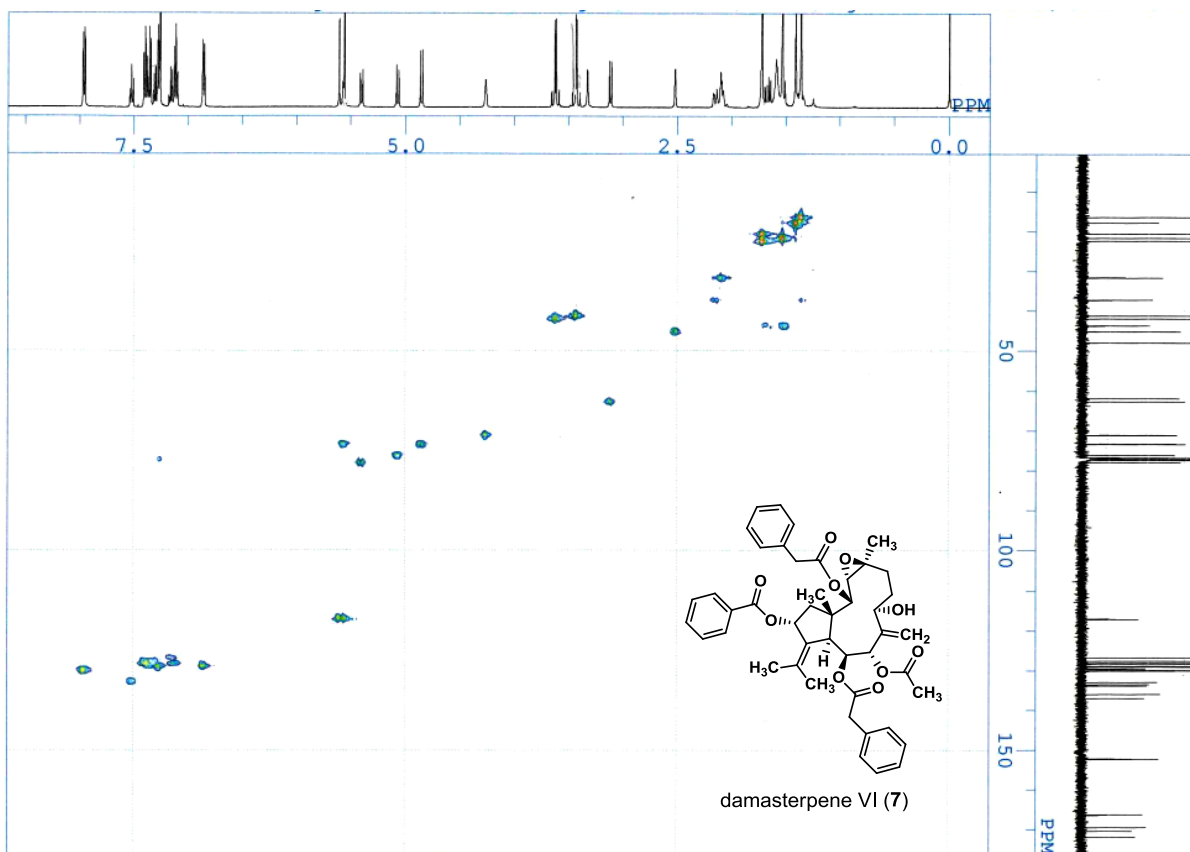
NMR spectroscopic data of damasterpene VI (7)



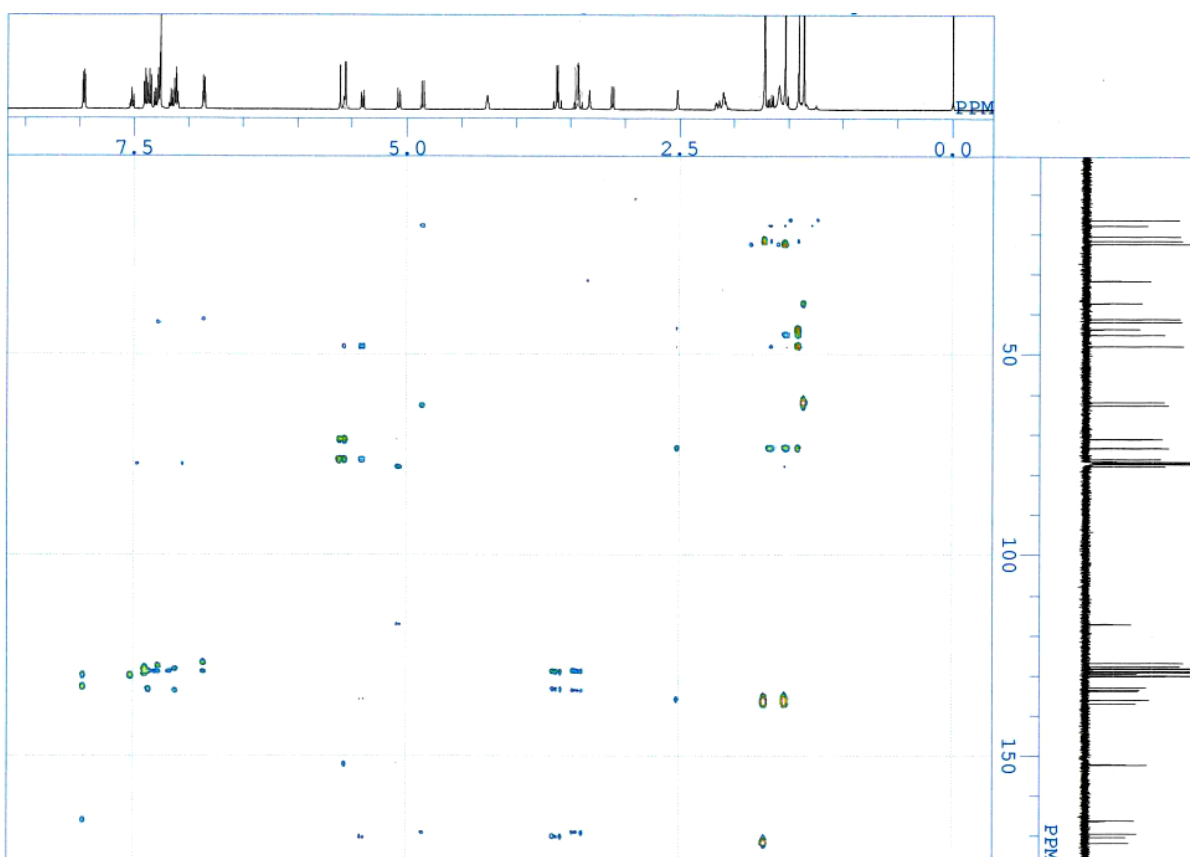
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound 7. Measured in CDCl₃.



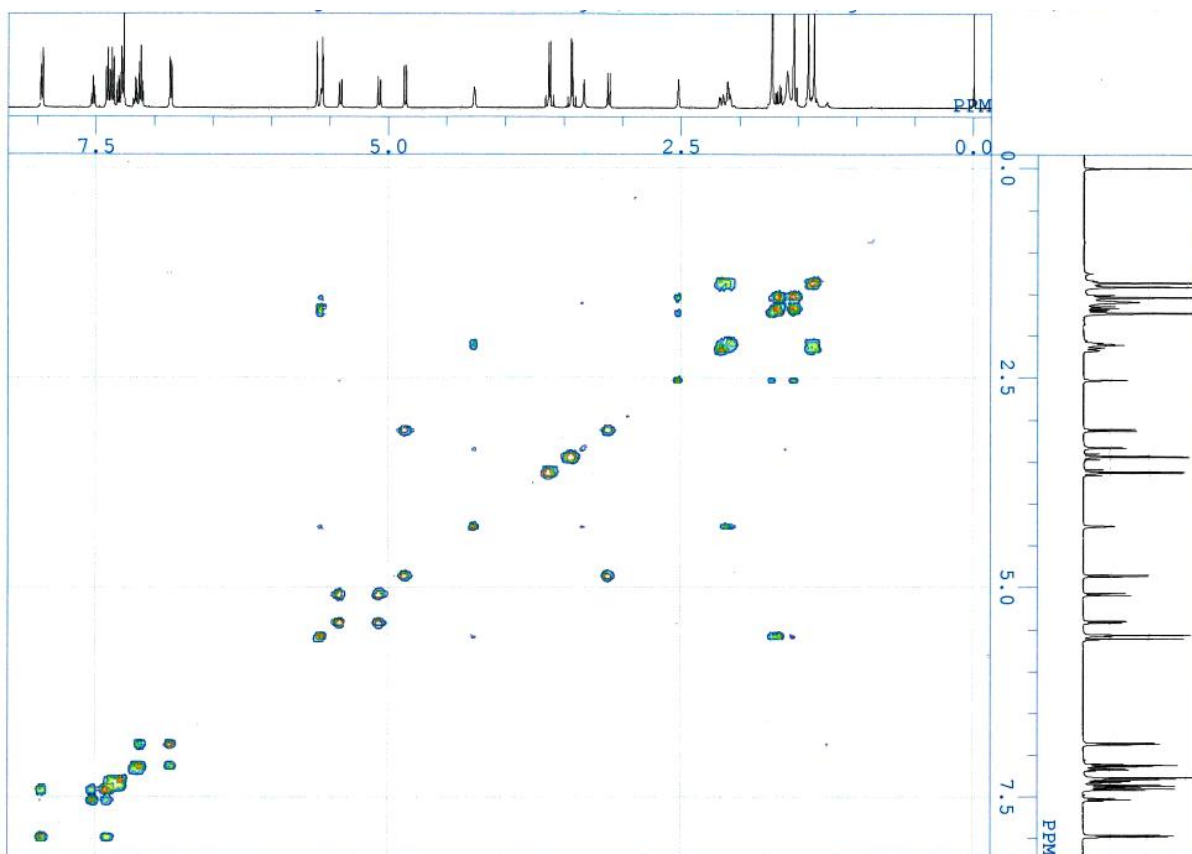
¹³C NMR (125MHz) spectroscopic data for compound 7. Measured in CDCl₃.



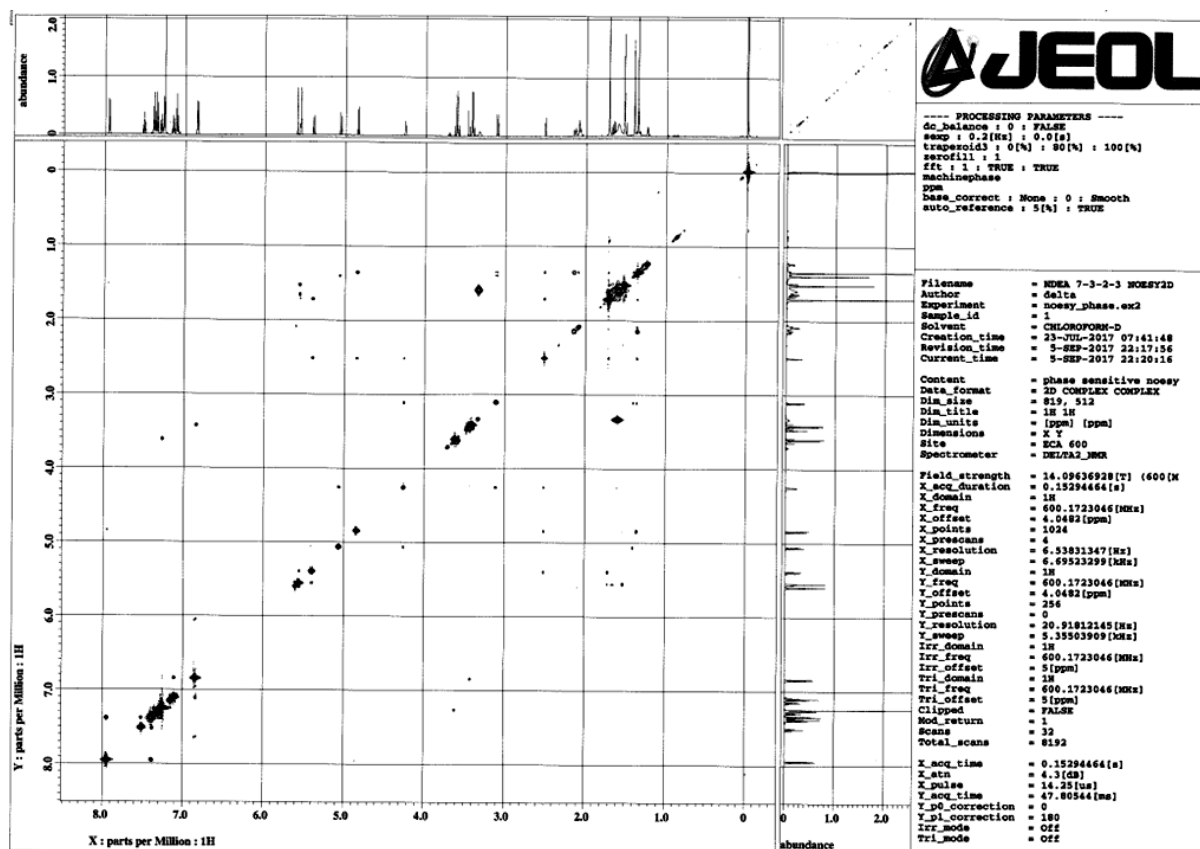
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **7**. Measured in CDCl₃.



HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **7**. Measured in CDCl₃.

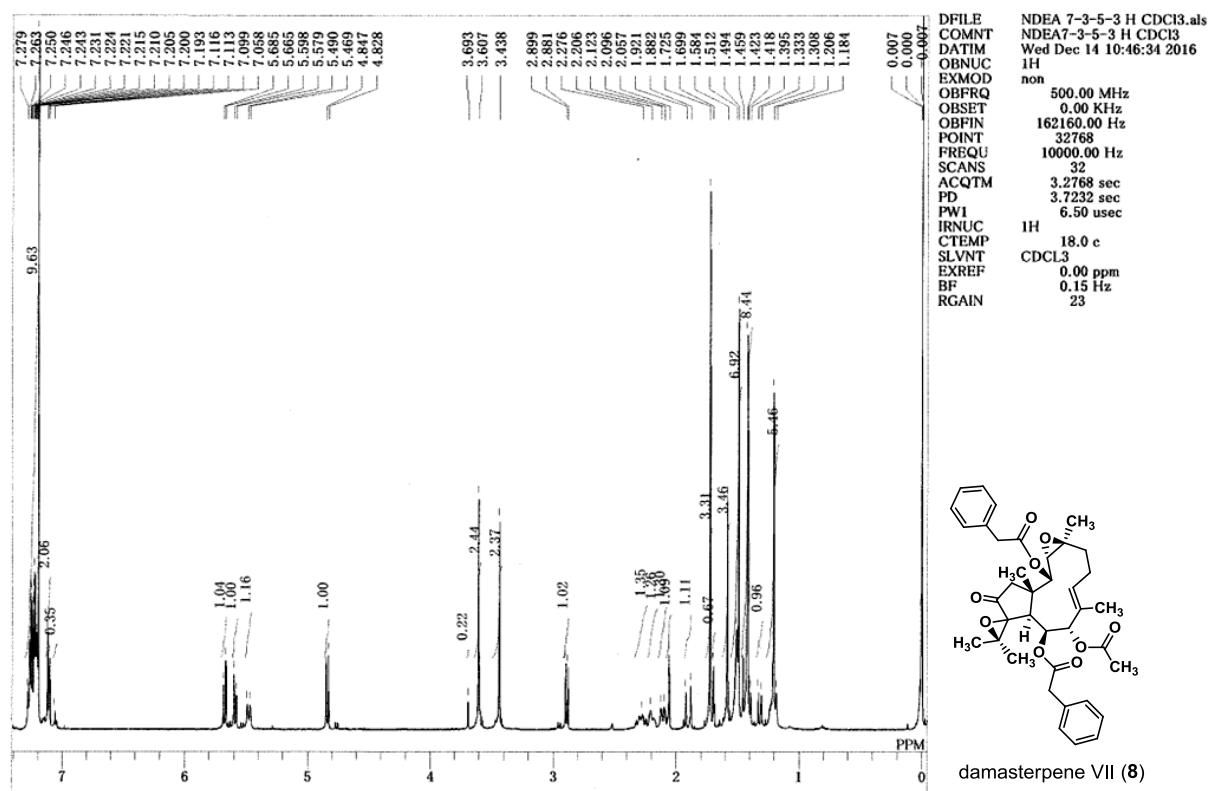


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **7**. Measured in CDCl_3 .

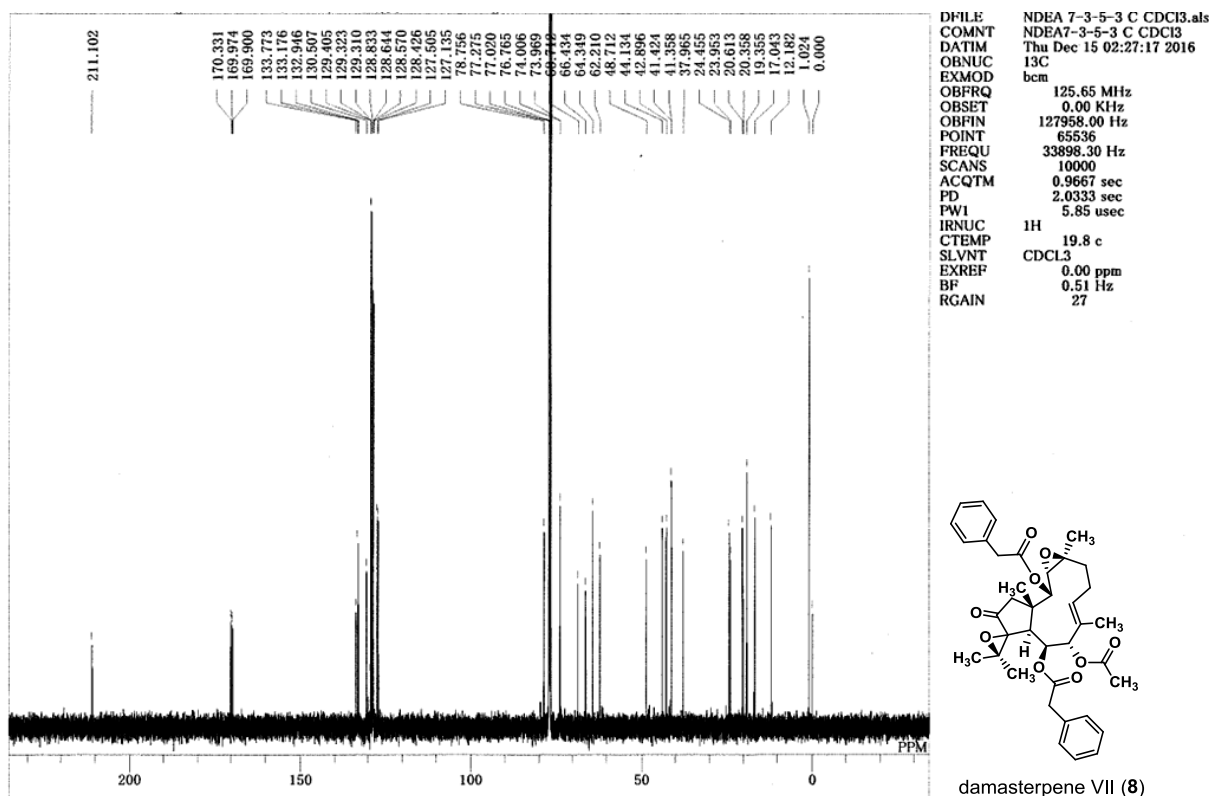


NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **7**. Measured in CDCl_3 .

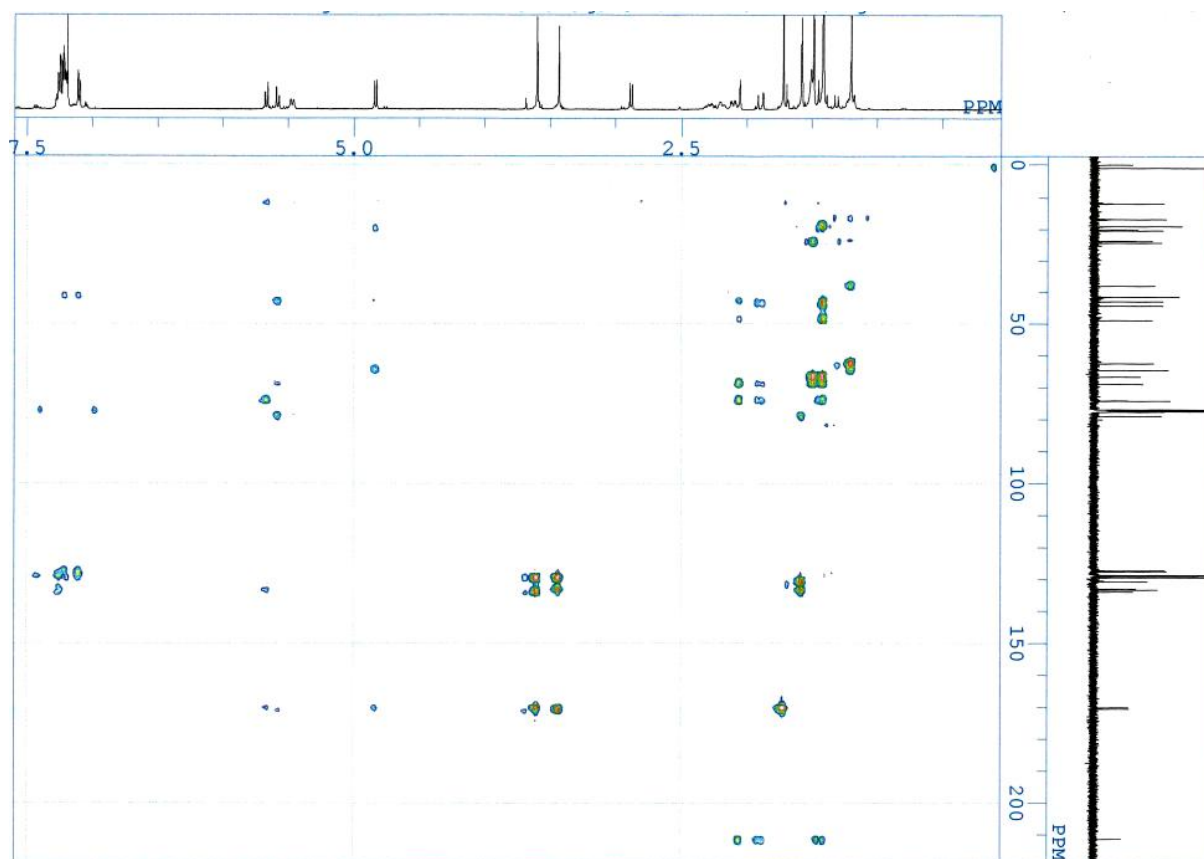
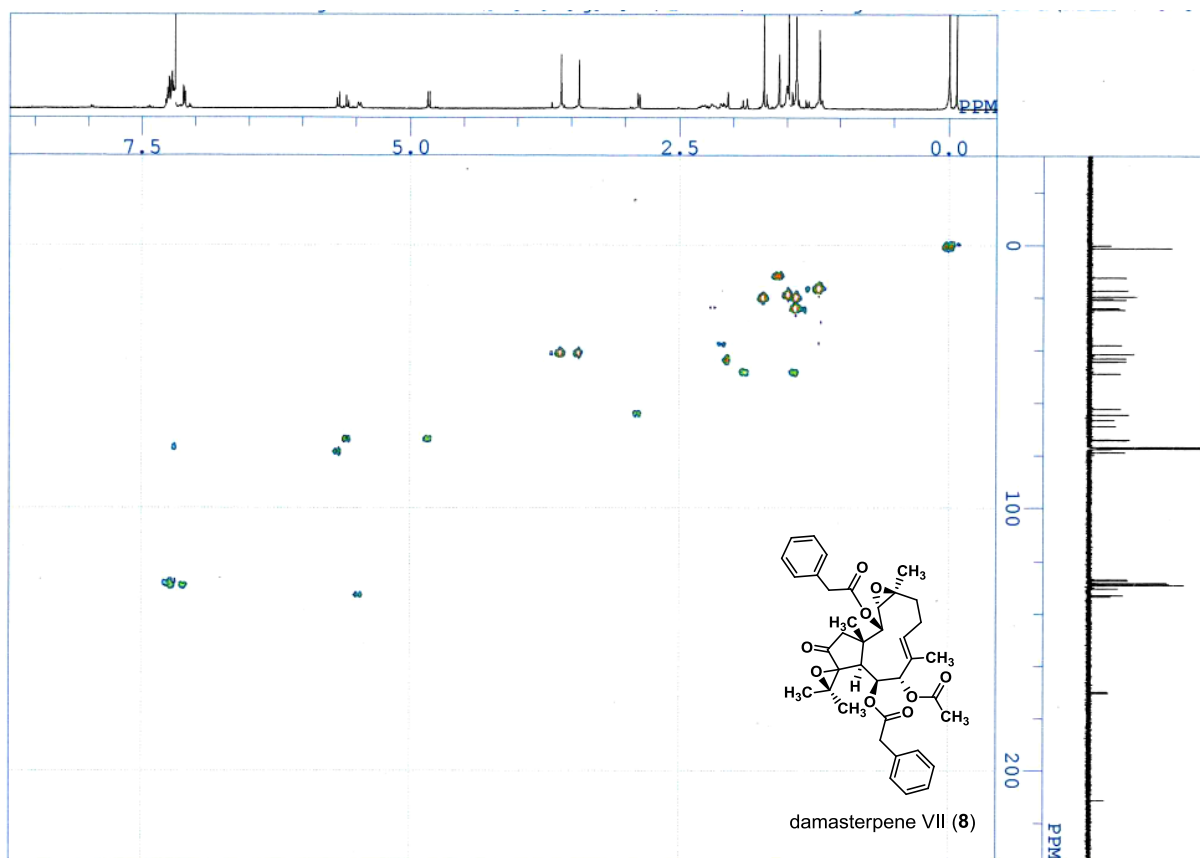
NMR spectroscopic data of damasterpene VII (8)

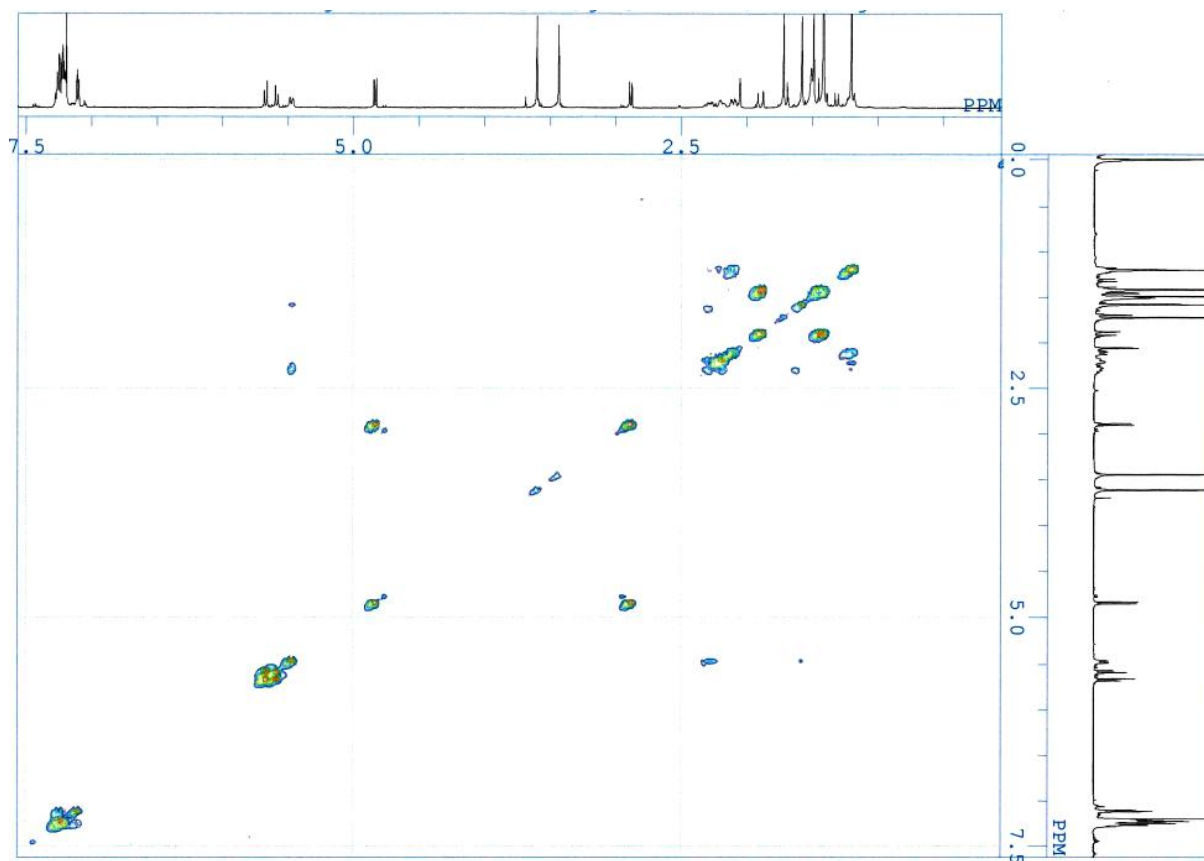


¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound 8. Measured in CDCl₃.

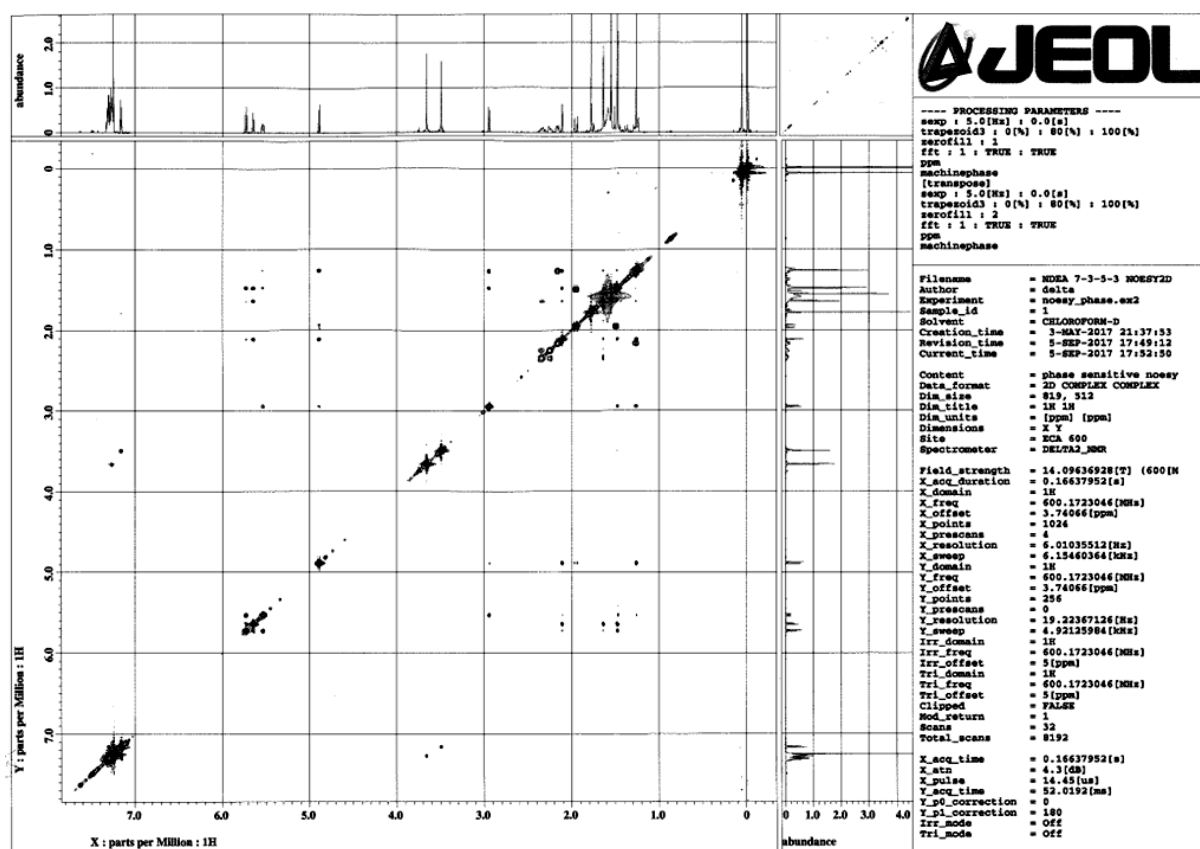


¹³C NMR (125MHz) spectroscopic data for compound 8. Measured in CDCl₃.



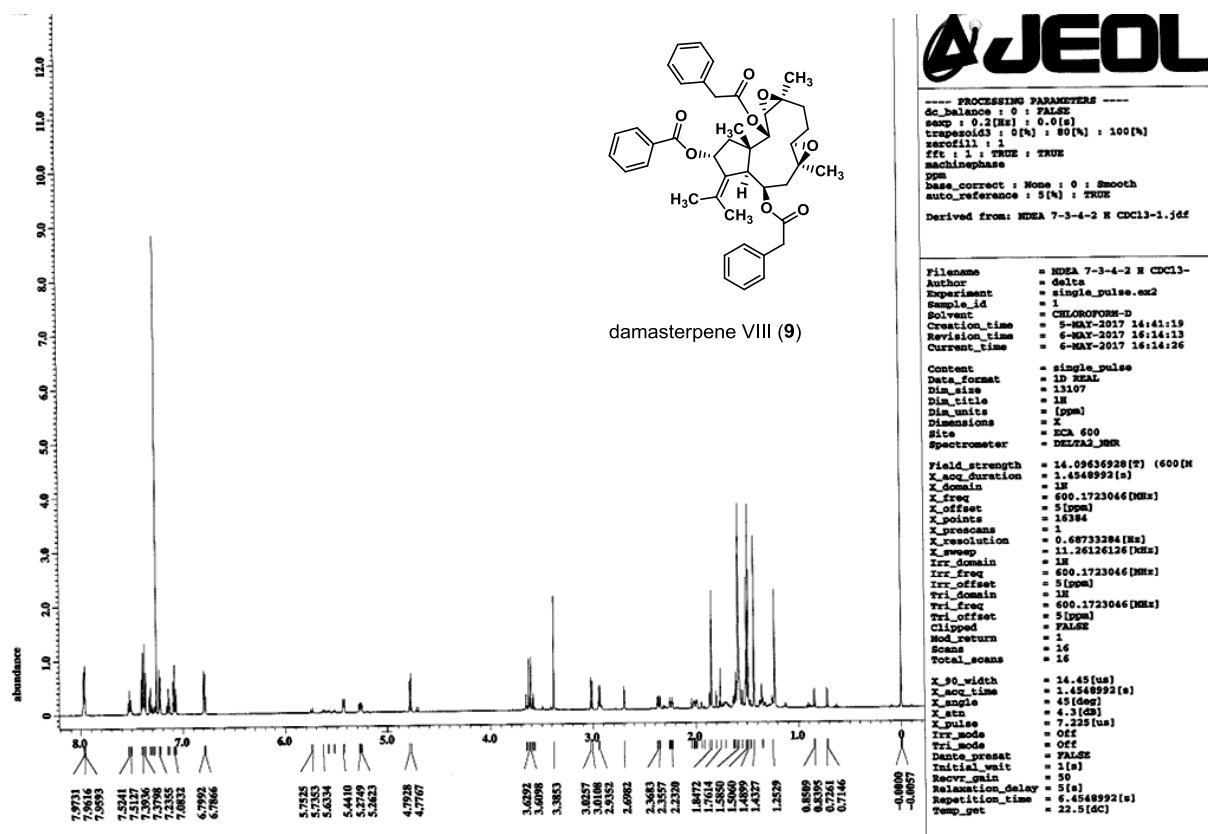


DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **8**. Measured in CDCl_3 .

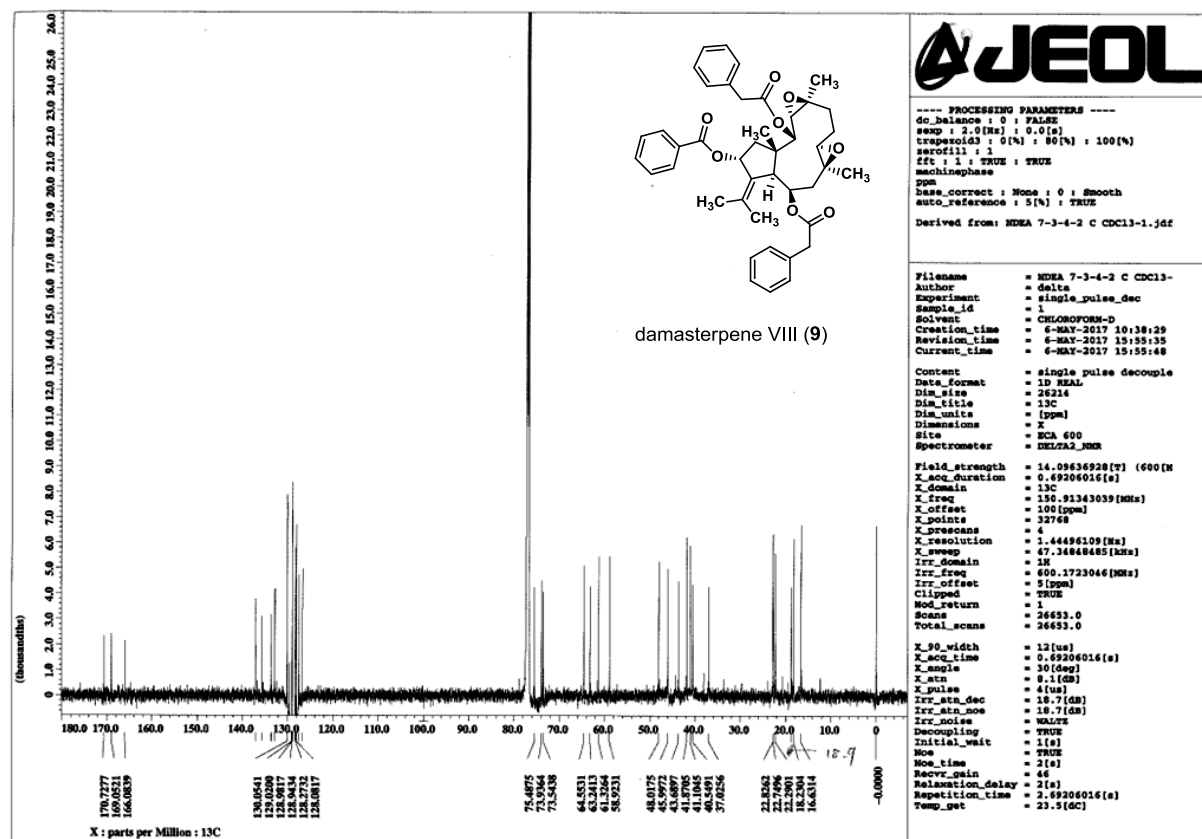


NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **8**. Measured in CDCl_3 .

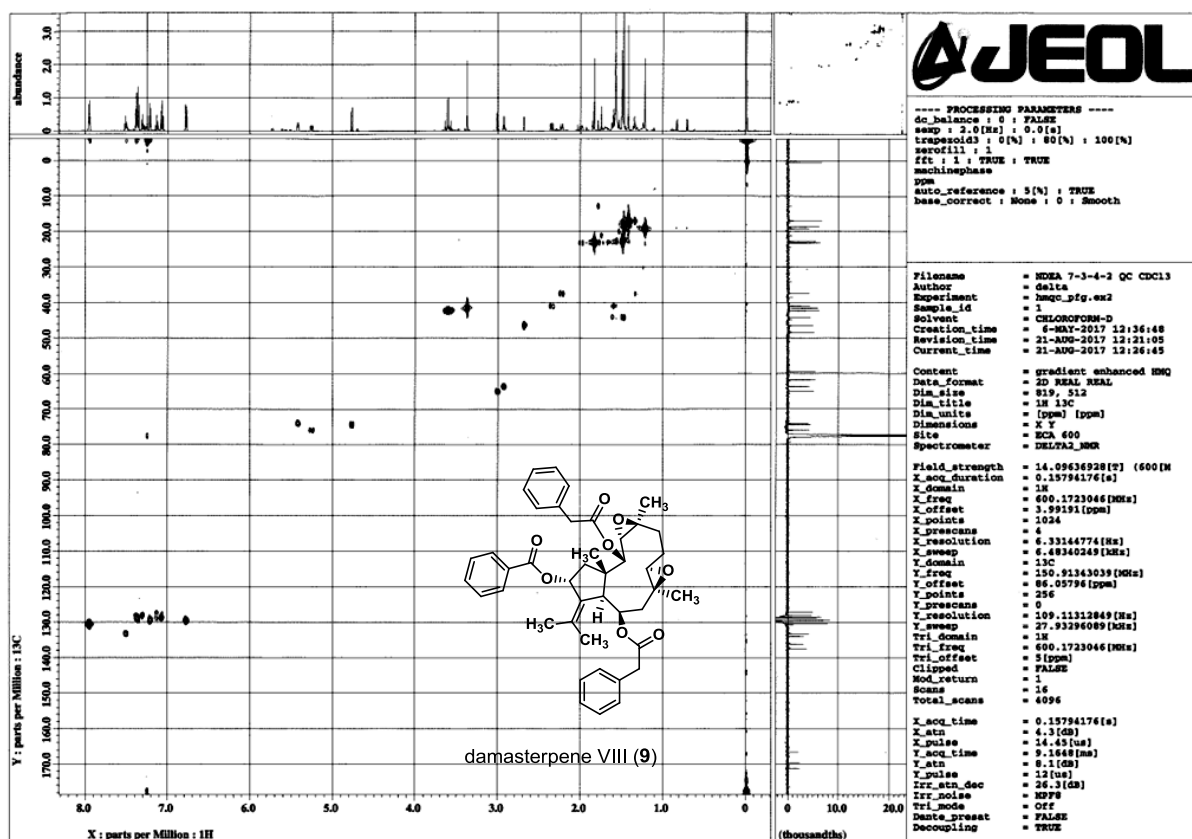
NMR spectroscopic data of damasterpene VIII (9)



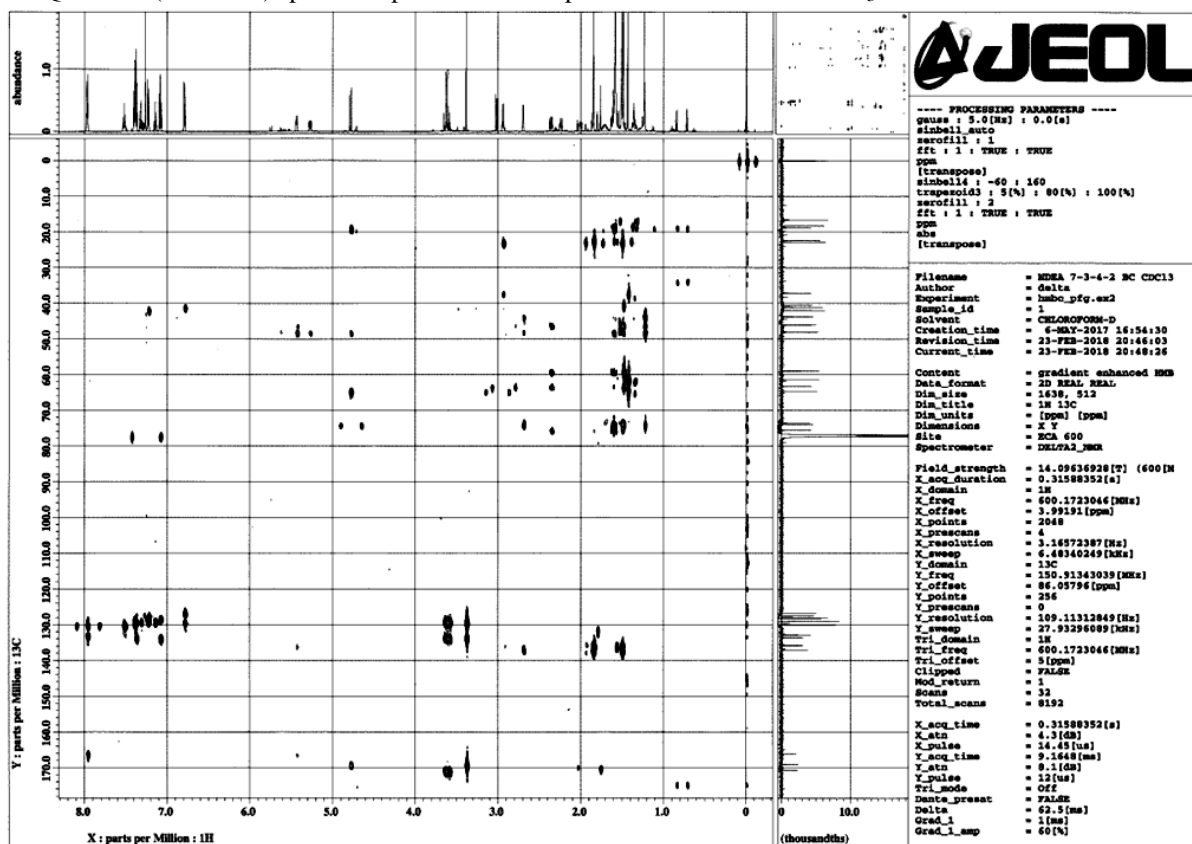
¹H NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound 9. Measured in CDCl₃.



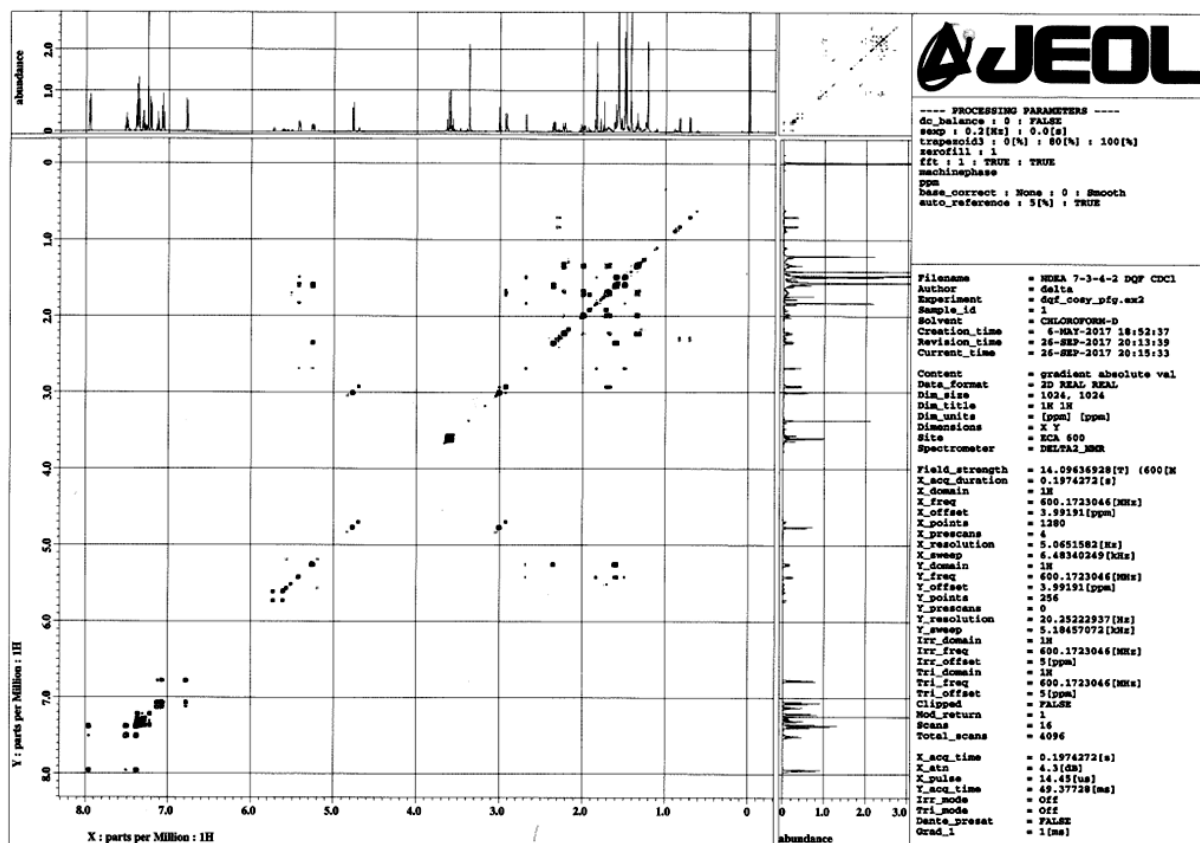
¹³C NMR (125MHz) spectroscopic data for compound 9. Measured in CDCl₃.



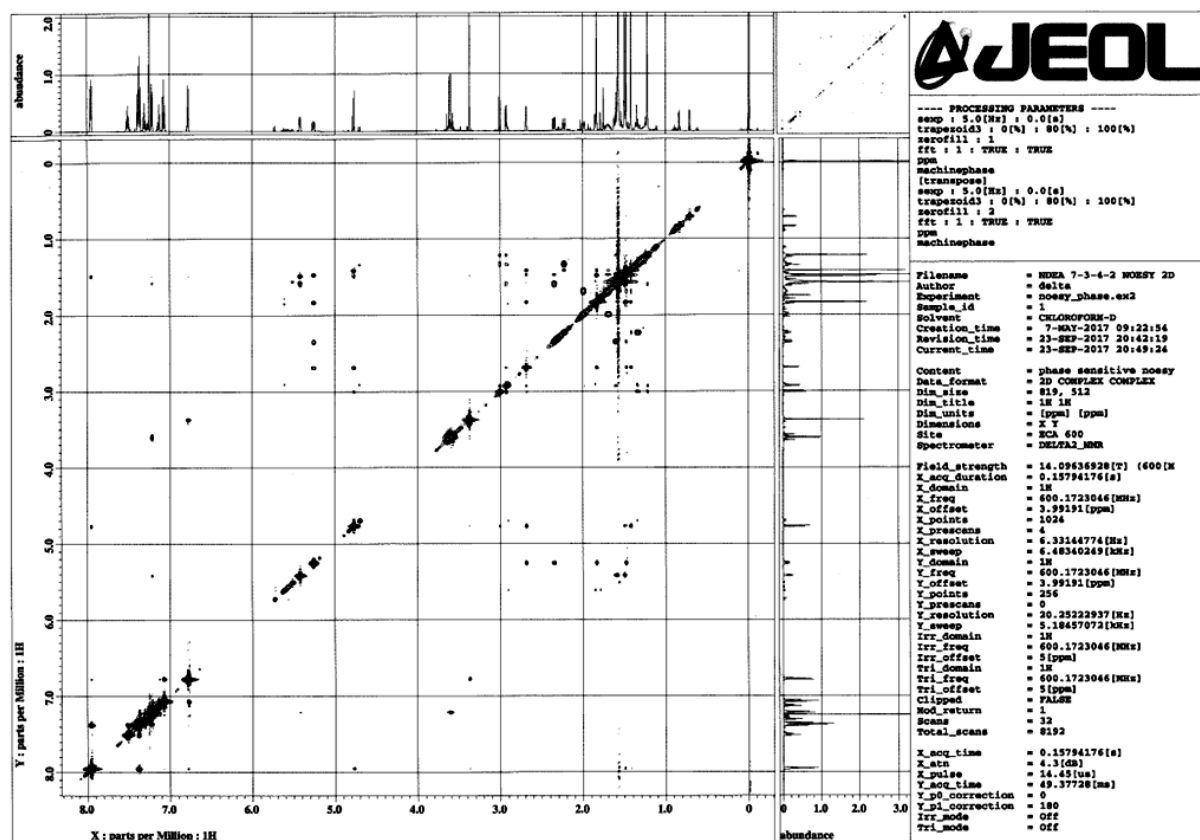
HMQC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **9**. Measured in CDCl₃.



HMBC NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **9**. Measured in CDCl₃.



DQF COSY NMR (500 MHz) spectroscopic data for compound **9**. Measured in CDCl₃.



NOESY NMR (600 MHz) spectroscopic data for compound **9**. Measured in CDCl₃.

第二章の実験

ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM, high-glucose), トリプシンは Sigma-Aldrich より購入した. ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) は株式会社ニチレイバイオサイエンスより購入した. 6 well マイクロプレート, 12 well マイクロプレート, 96 well マイクロプレートは株式会社グライナージャパンより購入した. ヘルペスウイルス (HSV-1, HF 株), Vero 細胞は京都薬科大学細胞生物分野より譲渡されたものを使用した. 細胞培養は MCO-18AIC (SANYO) CO₂ インキュベーターを使用し, 37°C, 5% CO₂, 95% R.H. 雰囲気下で行った. 試薬は特に明記しないものは和光純薬株式会社製試薬 (特級) を用いた.

第一節・第二節の実験

ウイルス液 (HSV-1) の作成

アフリカミドリザル腎臓上皮細胞由来 Vero 細胞を 10%FBS 含有 DMEM (4500 mg/L glucose) 培地で培養 (5%CO₂, 37°C) した.

まず, 6 cm ディッシュに Vero 細胞 1.2×10^6 cells/6 mL/dish を播種し, 24 時間前培養した (5%CO₂, 37°C). 次に, ディッシュの培地を除去し, 無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄したのち, 細胞生物学分野より譲渡されたウイルス液 HSV-1: 2.5×10^6 pfu/ 300 μ L/本 を 5 本分ディッシュに播種し, インキュベータ中で 30 分間感染させた. その後, 10% FBS 含有 DMEM 培地を合計量 6mL になるように添加し, 36 時培養した. 36 時間後, 検鏡により細胞変性効果を確認し, ピペッティングにより細胞をディッシュから剥離させ, 得られた細胞液を超遠心機により 8000 rpm にて 3 分間遠心分離を行った. 得られた上澄み液をウイルス液とし, 再び上記の操作を繰り返すことにより 1.0×10^7 pfu のウイルス液を作成した.

Vero 細胞における plaque reduction assay 法による抗 HSV-1 活性の判定

Vero 細胞を FBS 含有 DMEM (4500 mg/L glucose) 培地で培養 (5%CO₂, 37°C) した.

まず, 12 well マイクロプレートに 2.3×10^5 cells/1000 μ L/well を播種し, 12 時間前培養した (5%CO₂, 37°C). 次に, プレートの培地を除去し, 無血清 DMEM 培地で 2 回洗浄したのち, HSV-1 (HF 株) を 100 pfu/100 μ L/well になるように各 well に播種し, インキュベータで 30 分間感染させた. 30 分後, ウイルス液を除去し, 10%FBS 含有 DMEM 培地で 2 回洗浄をしたのち, 各濃度の被験物質を添加した 1%メチルセルロースおよび 10% FBS 含有 DMEM 培地を各 well に 1 mL/well 添加し 48 時間培養を行った. 48 時間後, 培地を除去し, 80% MeOH を約 1.5 mL/well 添加し, シーソーシェイカーにて 20 分間振盪し固定を行った. その後, 80% MeOH を取り除き, 1%クリスタルバイオレット含有 50%MeOH を約 1.5 mL/well 添加し, シーソーシェイカーにて 2 時間振盪し染色を行った. 2 時間後, 染色液を洗浄し乾燥させたのち, 生じたプラーク数をカウントすることにより抗 HSV-1 活性の指標とした. なお, プラークは直径が 0.2 mm 以上のものをカウントした.

実験で得られた数値は平均値 \pm 標準誤差で表記し, 対照群との平均値の有意差の検定には Steel の検定を採用し, 医薬学データ用統計解析プログラムにより行い, p 値が 0.05 以下のものを有意とみなした.

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

[A: 被験試料未添加 (コントロール) のプラーク数, B: 被験試料添加のプラーク数]

Vero 細胞における WST-8 アッセイ法による細胞毒性の判定

Vero 細胞を FBS 含有 DMEM (4500 mg/L glucose) 培地 (Sigma-Aldrich) で培養 (5%CO₂, 37°C) した。

次に, 96 well マイクロプレートに Vero 細胞 9.0×10^3 cells/90 μ L/well を播種し, 4 時間前培養した後, 各濃度の被験物質を培地添加した。44 時間培養後, WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt 溶液] (Cell Counting Kit-8, 同仁化学) を 10 μ L ずつ添加した。2 時間培養後, 生成した WST-8 ホルマザンの吸光度をマイクロプレートリーダー (model 550, Bio-Rad Laboratories) にて測定した (測定波長 : 450 nm, 参照波長 : 655 nm)。なお, 被験物質は DMSO に溶解し, 培地添加した (DMSO 終濃度 0.1%)。実験で得られた数値は平均値 \pm 標準誤差で表記し, 対照群との平均値の有意差の検定には Dunnett の方法を使用し, p 値が 0.05 以下のものを有意とみなした。

$$\text{Inhibition (\%)} = [(A-B) / A] \times 100$$

[A : 被験試料未添加 (コントロール) の吸光度, B : 被験試料添加の吸光度]

参考文献

- 1) Newman, D. J; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661.
- 2) Stahua, F; Godden, J. W; Ling, X; Bajorath, J. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, 40, 1245–1252.
- 3) Clardy, J; Walsh, C. *Nature* **2004**, 432, 829–837.
- 4) Lipinski, C. A; Lombardo, F; Dominy, B. W; Feeny, P. J. *Adv. Drug. Del. Rev.* **1997**, 23, 3–25
- 5) Lipinski, C. A. *Drug Discovery Today: Technol.* **2004**, 1, 337–341.
- 6) Macarron, R. *Drug Discovery Today.* **2006**, 11, 277–279.
- 7) Keller, T. H; Pichota, A; Yin, Z. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, 10, 357–361.
- 8) Feher, M; Schmidt, J. M. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, 43, 218–227.
- 9) Hall, D. G; Manku, S; Wang, F; *J. Comb. Chem.* **2001**, 3, 125–150.
- 10) Wright, C. R. A; Luff, A. P. J. *Chem. Soc. Perk.* **1978**, 33, 151–174.
- 11) Atta-ur-Rahman; Malik, S; He, C.-H; Clardy, J. *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 2759–2762.
- 12) Tian, J; Han, C; Guo, W. -H; Yin, Y; Wang, X.-B; Sun, H.-B; Yao, H.-Q; Yang, Y; Wang, C; Liu, C; Yang, M.-H; Kong, L.-Y. *Org. Lett.* **2017**, 19, 6348–6351.
- 13) Chen, Q.-B; Xin, X.-L; Yang, Y; Lee, S.-S; Aisa, H. A. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 807–812.
- 14) Atta-ur-Rahman; Malik, S; Ahmad, S; Chaudhary, I; Habib-ur-Rehman. *Heterocycles* **1985**, 23, 953–955.
- 15) Guo, W.-H; Li, X.-M; Huang, S.-S; Yang, M.-H; Kong, L.-Y. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2017**, 19, 9–14.
- 16) Ali, Z; Ferreira, D; Carvalho, P; Avery, M. A; Khan, I. A. *J. Nat. Prod.* **2008**, 71, 1111–1112.
- 17) Burits, M; Bucar, F. *Phytother. Res.* **2000**, 14, 323–328.
- 18) Ali, B. H; Blunden, G. *Phytother. Res.* **2003**, 17, 299–305.
- 19) Hannig, E; Vishin, M. L. *Planta Med.* **1960**, 2, 183–192.
- 20) Toki, K; Saito, N; Nogami, A; Tatsuzawa, F; Shigihara, A; Honda, T. *Heterocycles* **2009**, 78, 2287–2294.
- 21) Fico, G; Braca, A; Tomè, F; Morelli, I. *Fitoterapia* **2001**, 72, 462–463.
- 22) Bykov, V. A; Demina, N. B; Kataeva, N. N; Kamenova, V. A; Bagirova, V. L. *Pharm. Biol.* **2000**, 38, 371–373.
- 23) Tillequin, F; Leconte, C; Paris, M. *Planta Med.* **1976**, 30, 59–61.
- 24) Agradi, E; Fico, G; Cillo, F; Fracisci, C; Tomè, F. *Planta Med.* **2001**, 67, 553–555.
- 25) Fico, G; Panizzi, L; Flamini, G; Braca, A; Morelli, I; Tomè, F; Cioni, P. L. *Phytother. Res.* **2004**, 18, 468–470.
- 26) Akram, M. K. *Inflammopharmacology* **1999**, 7, 15–35.
- 27) Morikawa, T; Xu, F; Kashima, Y; Matsuda, H; Ninomiya, K; Yoshikawa, M. *Org. Lett.* **2004**, 6, 869–872.
- 28) El-Dakhakhny, M. *Planta Med.* **1963**, 11, 465–470.
- 29) Kumara, S. S. M; Huat, B. T. K; *Planta Med.* **2001**, 67, 29–32.
- 30) Ansari, A. A; Hassan, S; Kenne, L; Atta-ur-Rahman, Wehler, T. *Phytochemistry* **1988**, 27, 3977–3999.
- 31) Kumar, M. B; Pranha, M; Meenal, G. *Carbohydr. Res.* **2009**, 344, 149–151.
- 32) Yuan, T; Nahar, P; Sharma, M; Liu, K; Slitt, A; Aisa, H. A; Seeram, N. P. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 2316–2320.
- 33) Houghton, P.J; Zarka, R; Heras, B; Hoult, J. R. S. *Planta Med.* **1995**, 61, 33–36.
- 34) Woo, C. C; Kumar, A. P; Sethi, G; Tan, K. H. B. *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 83, 443–451.

- 35) Fararh, K. M; Shimizu, Y; Shiina, T; Nikami, H; Ghanem, M. M; Takewaki, T. *Res. Vet. Sci.* **2005**, 79, 219–223.
- 36) Gali-Muhtasib, H; Diab-Assaf, M; Boltze, C; Al-Hmaira, J; Hartig, R; Roessner, A; Schneider-Stock, R. *Int. J. Oncol.* **2004**, 25, 857–866.
- 37) Badary, O. A; Taha, R. A; El-Din, A. M. G; Abdel-Wahab, M. H. *Drug Chem. Toxicol.* **2003**, 26, 87–98.
- 38) Herpes simplex virus Fact sheet World Health Organization Media centre.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs400/en/> (accessed Feb 4, 2018).
- 39) Stevens, J. G. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1975**, 70, 31–50.
- 40) Kawaguchi, Y. *Virus* **2010**, 60, 187–196.
- 41) Lairson, D. R; Begley, C. E; Reunolds T. F; Wilhelmus, K. R. *Arch. Ophthalmol.* **2003**, 121, 108–112.
- 42) Thomas, J; Rouse, B. T. *Immunol. Res.* **1997**, 16, 375–386.
- 43) Jiang, Y.-C; Feng, H; Lin, Y. -C; Guo, X.-R. *Int. J. Oral. Sci.* **2016**, 8, 1–6.
- 44) Severson, J. L; Tying, S. K. *Arch. Dermatol.* **1999**, 135, 1393–1397.
- 45) Piret, J; Boivin, G. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2011**, 55, 459–472.
- 46) Zhong, M.-G; Xiang, Y.-F; Qiu, X.-X; Liu, Z; Kitazato, K; Wang, Y.-F. *RSC Adv.* **2013**, 3, 313–328 (2013).
- 47) Khan, M. T. H; Ather, A; Thompson, K. D; Gambari, R. *Antivir. Res.* **2005**, 67, 107–119 (2005).
- 48) Hayashi, T; Kishi, M; Kawasaki, M; Arisawa, M; Shimizu, M; Suzuki, S; Yoshizaki, M; Morita, N; Tezuka, Y; Kikuchi, T; Berganza, L. H; Ferro, E; Basualdo, I. *Tetrahedron Lett.* **1987**, 28, 3593–3596.
- 49) Hayashi, T; Hayashi, K; Uchida, K; Niwayama, S; Morita, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 239–242.
- 50) Hayashi T. *Yakugaku Zasshi.* **2008**, 128, 61–79.
- 51) Takaishi, Y; Ujita, K; Nakano, K; Murakami, K; Tomimatsu, T. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 2325–2329.
- 52) Hayashi, K; Hayashi, T; Ujita, K; Takaishi, Y. *J. Antimicrob. Chemoth.* **1996**, 37, 759–768.
- 53) Barbosa, J. P; Pereira, R. C; Abrantes, J. L; Santos, C. C. C; Rebello, M. A; Frugulhetti, I. C. P. P; Teixeira, V. L. *Planta Med.* **2004**, 70, 856–860.
- 54) Abrantes, J. L; Barbosa, J; Cavalcanti, D; Pereira, R. C; Frederico Fontes, C. L; Teixeira, V. L; Moreno Souza, T. L; Paixao, I. C. *Planta Med.* **2010**, 76, 339–344.
- 55) Ikeda, T; Yokomizo, K; Okawa, M; Tsuchihashi, R; Kinjo, J; Nohara, T; Uyeda, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2005**, 28, 1779–1781.
- 56) Mukaiyama, T; Funasaka, S. *Chem. Lett.* **2007**, 36, 326–327.
- 57) Schuler, E; Juanico, N; Teixidó, J; Michelotti, E. L; Borrell, J. I. *Heterocycles* **2006**, 67, 161–173.
- 58) Kuhn, R; Wanda, B. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. B* **1937**, 70B, 1333–1341.
- 59) Durán, R; Zubía, E; Ortega, M. J; Salvá, J. *Tetrahedron* **1997**, 53, 8675–8688.
- 60) Amico, V; Oriente, G; Piattei, M; Tringali, C. *Tetrahedron* **1980**, 36, 1409–1414.
- 61) Harada, N; Iwabuchi, J; Yokota, Y; Uda, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 5590–5591.
- 62) Harada, N; Nakanishi, K. 7.4 二重結合とベンゾエート発色団間の励起子相互作用を用いたアリルアルコールの絶対構造決定法. 円二色性スペクトル-有機立体化学への応用-; 東京化学同人: Tokyo, 1982; 157–166
- 63) Liu, Y.-M; Sun, L; Liu, Q.-H; Lu, S.-R; Chen, B.-Q. *Biochem. Syst. Ecol.* **2013**, 49, 43–46.
- 64) Nakazawa, T; Ohmae, T; Fujimuro, M; Ito, M; Nishinaga, T; Iyoda, M. *Tetrahedron* **2012**, 68,

- 5368–5374.
- 65) Cirne-Santos, C. C.; Souza, T. M. L.; Teixeira, V. L.; Fontes, C. F. L.; Rebello, M. A.; Castello-Branco, L. R. R.; Abreu, C. M.; Tanuri, A.; Frugulhetti, I. C. P. P.; Bou-Habib, D. C. *Antiviral Research* **2008**, 77, 64–71.
 - 66) Pardo-Vargas, A.; Oliveira, I. B.; Stephens, P. R. S.; Cirne-Santos, C. C.; Paixão, I. C. N. P.; Ramos, F. A.; Jiménez, C.; Rodríguez, J.; Resende, J. A. L. C.; Teixeira, V. L.; Castellanos, L. *Mar. Drugs* **2014**, 12, 4247–4259.
 - 67) Cirne-Santos, C. C.; Teixeira, V. L.; Castello-Branco, L. R.; Frugulhetti, I. C. P. P.; Bou-Habib, D. C. *Planta Med.* **2006**, 72, 295–299.
 - 68) Duh, C.-Y.; Chia, M.-C.; Wang, S.-K.; Chen, H.-J.; El-Gamal, A. A. H.; Dai, C.-F. *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 1028–1031.
 - 69) Yodsaoue, O.; Sonprasit, J.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Tewtrakul, S.; Chantrapromma, C. *Phytochemistry*, **2012**, 76, 83–91.
 - 70) Ioannou, E.; Quesada, A.; Rahman, M. M.; Gibbons, S.; Vagias, C.; Roussis, V. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 213–222.
 - 71) Rowinsky, E. K.; Donehower, R. C.; Jones, R. J.; Tucker, R. W. *Cancer Res.* **1988**, 48, 4093–4100.
 - 72) Kobayashi, J.; Ogiwara, A.; Hosoyama, H.; Shigemori, H.; Yoshida, N.; Sasaki, T.; Li, Y.; Iwasaki, S.; Naito, M.; Tsuruo, T. *Tetrahedron* **1994**, 50, 7401–7416.
 - 73) Hayashi, K.; Hayashi, T. *Antiviral Chem. Chemother.* **1996**, 7, 79–85.
 - 74) Snyder, L. B.; Meng, Z.; Mate, R.; D’Andrea, S. V.; Marinier, A.; Quesnelle, C. A.; Gill, P.; DenBleyker, K. L.; Fung-Tomc, J. C.; Frosco, M.; Martel, A.; Barrett, J. F.; Bronson, J. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 4735–4739.
 - 75) Yu, M.; Wang, J.; Tang, K.; Shi, X.; Wang, S.; Zhu, W.-M.; Zhang, X.-H. *Microbiology* **2012**, 158, 835–842.
 - 76) Overly, D.; Calati, K.; Kahn, J. N.; Hsu, M.-J.; Martín, J.; Collado, J.; Roemer, T.; Harris, G.; Parish, C. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1224–1227.
 - 77) Parish, C. A.; Smith, S. K.; Calati, K.; Zink, D.; Wilson, K.; Roemer, T.; Jiang, B.; Xu, D.; Billis, G.; Platas, G.; Palaez, F.; Diez, M. T.; Tsou, N.; McKeown, A. E.; Ball, R. G.; Powles, M. A.; Yeung, L.; Liberator, P.; Harris, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 7060–7066.
 - 78) Mikloska, Z.; Cunningham, A. L. *J. Virol.* **2001**, 75, 11821–11826.
 - 79) Goldstein, D. J.; Weller, S. K. *J. Virol.* **1988**, 62, 196–205.
 - 80) Hill, R.A.; Sutherland, A. *Nat. Prod. Rep.* **2018**, 35, 132–136.