薬用植物及び単離培養地衣菌の二次代謝物の多様性

棚 橋 孝 雄

Diversity of Secondary Metabolites from Some Medicinal Plants and Cultivated Lichen Mycobionts

Takao Tanahashi

Kobe Pharmaceutical University; 4-19-1 Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan.

(Received June 26, 2017)

Studies on the structural determination, biosynthesis, and biological activities of secondary metabolites from natural sources are significant in the field of natural products chemistry. This review focuses on diverse secondary metabolites isolated from medicinal plants and cultivated mycobionts of lichens in our laboratory. Monoterpene-tetrahydroisoquinoline glycosides and alkaloids isolated from *Cephaelis acuminata* and *Alangium lamarckii* gave important information on the biosynthesis of ipecac alkaloids. A variety of glycosides linked with a secologanin unit and indole alkaloids were obtained from medicinal plants belonging to the families of Rubiaceae, Apocynaceae, and Loganiaceae. Plant species of the four genera *Fraxinus*, *Syringa*, *Jasminum*, and *Ligustrum* of the family Oleaceae were chemically investigated to provide several types of secoiridoid and iridoid glucosides. The biosynthetic pathway leading from protopine to benzophenanthridine alkaloids in suspension cell cultures of *Eschscholtzia californica* was elucidated. The structures and biological activities of the bisbenzylisoquinoline alkaloids of *Stephania cepharantha* and *Nelumbo nucifera* were also investigated. In addition, the mycobionts of lichens were cultivated to afford various types of metabolites that differ from the lichen substances of intact lichens but are structurally similar to fungal metabolites. The biosynthetic origins of some metabolites were also studied. These findings suggest that cultures of lichen mycobionts could be sources of new bioactive compounds and good systems for investigating secondary metabolism in lichens.

Key words—secondary metabolite; medicinal plant; cultivated lichen mycobiont; structure determination; biosynthesis; biological activity

1. はじめに

京都大学薬学部を卒業後、引き続き京都大学大学院薬学研究科に進学し、恩師井上博之先生の主宰する薬用植物化学講座で天然物化学の基礎を学び研究の道に進んだ。その後、ドイツ・ミュンヘン大学 M. H. Zenk 教授の下での留学を経て、神戸女子薬科大学（当時、現神戸薬科大学）の永倉直敬教授の研究室のスタッフとなり、以後、天然物化学の分野で研究を行ってきた。三教授は、かねてよりイリドイド、アルカロイドの生合成研究で緊密な協力関係にあり、必然的に筆者も関連分野の研究を継続発展させることとなった。その後、地衣成分研究の大家

である故 S. Huneck 教授とドイツのハレにおける出会いと交流を通して触発を受け、単離培養地衣菌の代謝物の研究にも精力を注ぐようになった。それ以外にも、高等植物が生産するフラボノイドやキサントン、クマリンなどのフェノール性化合物、テルペノイド類の構造や活性に関する研究にも取り組んだが、本稿ではセコイリドイド、アルカロイド、及び単離地衣菌の代謝物の研究成果について述べる。

2. セコイリドイド配糖体及び関連化合物に関する研究

置換シクロペンタン環を持つモノテルペンであるイリドイドのシクロペンタン環が開裂した一連の化合物はセコイリドイドと称される。¹⁾ イリドイド、セコイリドイドは双子葉植物にかなり広く分布しており、その大部分は配糖体として存在している。1960 年代初頭より構造解明が開始され、セコイリドイドがインドールアルカロイドの非トリプタミン

神戸薬科大学（〒658-8558 神戸市東灘区本山北町 4-19-1）

e-mail: tanahash@kobepharm-u.ac.jp

本総説は、平成 27 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Biosynthetic Pathway from Loganin to Secologanin, a Key Intermediate for Monoterpenoid-Indole Alkaloids, Ipecac Alkaloids, and Secoiridoids

部の起源に関連していることから、生合成研究も活発に行われた。インドールアルカロイドや、トコンアルカロイドは、イリドイド配糖体 loganin (1) のシクロペンタン環が開裂して生じた secologanin (2) がトリプタミンあるいはドーパミンと結合後、脱グルコシル化し、さらに種々の反応を経て生成することが明らかとなっている。

Battersby は loganin (1) より生成する 10-hydroxyloganin の 10-phosphate よりリン酸基が脱離する際に、シクロペンタン環が協奏的に開裂して secologanin (2) が生成するという機構を提出した。²⁾ しかし、この説を実証するために、日欧で競って 10-hydroxyloganin を合成し、その投与実験が行われたが、この魅力的な説は否定されるに至った。^{3,4)} 後年、Inoue らが、シトクロム P-450 酸化酵素によるシクロペンタン環の開裂により、1 から 2 が直接生成することを明らかにし、ようやくこの問題は解決した。⁵⁾ この secologanin (2) は、インドールアルカロイドやトコンアルカロイドのみならず、多様なセコイリドイドの前駆物質として重要性が認識されていた (Fig. 1)。¹⁾ そこで、secologanin (2) に関連する化合物について、その生合成に関心を払いつつ、種々の植物の成分検索に取り組むことにした。

2-1. テトラヒドロイソキノリン-モノテルペン配糖体及び関連化合物 トコン及び *Alangium lamarckii* におけるトコンアルカロイドの生合成研究は、Battersby ら^{6,7)} や Nagakura, Zenk^{8,9)} によって行われ、secologanin (2) と dopamine の Pictet-Spengler 縮合により生成する *N*-deacetylisoipecoside (3) (*S* 体) 及び *N*-deacetylpecoside (4) (*R*

体) のうち、3 が emetine (5), cephaeline (6) などトコンアルカロイドの生合成中間体であることの証明がなされた。一方、4 は ipecoside (7) あるいは alangiside (8) など含窒素配糖体に代謝されることが示された。すなわち、これらはともにその生合成過程で立体配置は保持されることが明らかとなっている (Fig. 2)。しかし、*N*-deacetylisoipecoside (3) がトコンアルカロイドの前駆体であることは証明されたが、実際に植物体から *S* 体の配糖体が単離された例はなく、また 3 からトコンアルカロイドへの詳細な生合成経路についても検討されていなかった。そこで、生合成中間体など重要な示唆を与える化合物の単離を目指して、トコンアルカロイド含有植物の成分検索を行った。

植物界で、benzo[*a*]quinolizine 骨格を有するトコンアルカロイドの分布は極めて限られており、アカネ科 *Cephaelis ipecacuanha*, *Psychotria grana-densis*, ウリノキ科 *Alangium lamarckii*, クロタキカズラ科 *Cassinopsis ilicifolia* など数種が知られているのみであった。筆者らは日本薬局方収載のトコン及び数種のウリノキ科植物の含窒素配糖体及びアルカロイド成分を主な研究対象とし、各種スペクトル解析と化学的手法により構造決定した。

棚橋孝雄

1981 年京都大学大学院薬学研究科博士課程修了。ドイツ・ミュンヘン大学博士研究員を経て、1984 年神戸女子薬科大学講師、助教授、2001 年より神戸薬科大学教授。2005–2007 年副学長。2007–2013 年神戸薬科大学学長。2016 年定年退職。神戸薬科大学特別教授・名誉教授。2014–2017 年日本地衣学会会長。

Fig. 2. Schematic Representation of the Biosynthetic Pathway of Ipecac Alkaloids and Related Alkaloidal Glucosides

Fig. 3. New Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glycosides 9–25 from *Cephaelis acuminata*

2-1-1. トコンの含窒素配糖体¹⁰⁻¹⁴⁾ トコン (吐根) はブラジル原産のアカネ科植物 *Cephaelis ipecacuanha* A. RICHARD の根部で、日本薬局方に収載されている重要な生薬である。本生薬は強い催吐作用を有し、催吐薬、去痰薬として用いられている。トコンのアルカロイドとしては emetine (5) や cephaeline (6) などが知られているが、配糖体成分については ipecoside (7) が報告されているのみであった。トコンアルカロイドの薬理活性については、催吐、鎮咳、去痰作用に加えて、抗アメーバ活性、抗腫瘍活性、タンパク合成阻害活性など多くの報告がある。

市場品の生薬トコン (日本薬局方に従い、当初は筆者らも *C. ipecacuanha* の種名を用いていたが、国立衛試の佐竹元吉先生の指摘により、*C.*

acuminata KARSTEN と改めた。¹⁵⁾ 日本薬局方の初版から第 12 改正版までは基原を *C. ipecacuanha* としていたが、第 13 改正以降 *C. acuminata* が追加された) を植物材料として用いた。生薬トコンから多量の ipecoside (7) とともに、既知配糖体 sweroside, ketologanin, alangiside (8) 及び 17 種の新規含窒素配糖体 9–25 が得られた (Fig. 3)。

配糖体の含量は主成分の ipecoside (7) について、6-*O*-methylipecoside (9) が多く、7-*O*-methylipecoside (10) も極少量得られたが、7 の 6,7-ジメチル体は得られなかった。

興味深い化合物として、neoipecoside (13) と 7-*O*-methylneoipecoside (14)、3,4-dehydroneoipecoside (15) を単離した。Neoipecoside (13) は、芳香環の置換様式が異なる ipecoside (7) の異性体で、

Fig. 4. Preparation of Compounds 27–31 for Determination of the Absolute Configuration of Neoipecoside (13)

neoipecoside hexaacetate (26) の NOE 実験により、7,8-dihydroxy 体と決定した。Neoipecoside (13) の C-1 位の絶対配置は、26 をラクタム 27 に変換し、27 と化合物 28–31 を比較することにより決定した。化合物 28–31 については、既に立体化学と NMR スペクトルの関連が報告されていたからである。¹⁶⁾ Secologanin (2) と dopamine を弱酸性条件下で縮合させると C-1 位の立体異性体 *N*-deacetylipecoside (3) と *N*-deacetylipecoside (4) が生じる。3, 4 を弱アルカリ性でラクタム化、ついでメチル化して C-13a 位立体異性体 methylisoalangiside (32) と methylalangiside (33) (ipecoside 骨格の C-1 は alangiside 骨格では C-13a に対応) とし、アセチル化することにより 28 と 29 が得られる。3 と 4 のアセテート 30 と 31 及び 29 の ¹H-NMR スペクトルでは、アセチル基のシグナルは正常な化学シフトで観測される。一方、28 ではアセチル基のシグナルの 1 つが大きく高磁場シフトする。これは、13aS 配置を持つ 28 では、グルコースがベンゼン環の上に近接する立体配座をとるため、ベンゼン環の遮蔽効果があるためと説明される。また化合物 28 と 29 では H-13 と H-13a 間の結合定数が大きく異なることが報告されている。化合物 27 ではアセチル基が高磁場シフトしていないことと、結合定数の解析より *R* 体と決定した。また 27 と 28, 29 の CD スペクトルの比較からも *R* 体であることが支持され、neoipecoside (13) の C-1 位の絶対配置は *R* と決定した (Fig. 4)。

trans-Cephaeloside (16) 及び *cis*-cephaeloside (18) は ipecoside (7) の *N*-アセチル基が *N-trans*-フェルロイル基あるいは *N-cis*-フェルロイル基に置

換した配糖体である。また 17 と 19 は、16 と 18 の 6 位ヒドロキシ基がメチル化された化合物と決定した。また alangiside (8) や新規化合物 demethylalangiside (22) 及び 3-*O*-demethyl-2-*O*-methylalangiside (23) などラクタム環を持つ化合物も得られた。

高極性の水溶性画分からは、11, 12, 20, 21, 24 が得られた。さらに、*Alangium lamarckii* から 13aS 配置のアランギサイド型配糖体を単離した後ではあるが、本植物材料からも 13aS 配置を有する demethylisoalangiside (25) を単離することができた。

2-1-2. ウリノキ科植物の含窒素配糖体及び関連化合物^{17–22)} ウリノキ科の *Alangium lamarckii* THWAITES はインド及び東南アジアに自生する灌木で、インド地方では民間薬として用いられている。アルカロイド成分の報告は多くあるが、配糖体成分に関しては loganic acid と alangiside (8) が報告されているのみであった。そこで、*A. lamarckii* の乾燥果実の成分検索を行い、23 とともに新規含窒素配糖体 32–56 とイリドイド配糖体 57 を単離、構造決定した (Fig. 5)。

配糖体 32 は ¹H-NMR スペクトルから methylalangiside (33) の可能性が考えられたが、33 の ¹H-NMR スペクトルと比較すると、13 位メチレン水素と 13a 位メチン水素の結合定数に大きな差が認められた。さらに、¹³C-NMR スペクトルにおいても、33 と比較すると、6, 12a, 13 位炭素シグナルのケミカルシフトに顕著な差があることから、配糖体 32 は 13a 位に関する立体異性体である methylisoalangiside の可能性が考えられた。そこで、天然物 32 及びそのアセテートを、secologanin

Fig. 5. New Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene and Related Glycosides 32–57 from *Alangium lamarckii* Fig. 6. New Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene and Related Glucosides 58–62 from *Alangium* spp.

から誘導した標品と直接比較することにより, 32 を methylisoalangiside と同定した. また, isoalangiside (34), 3-*O*-demethyl-2-*O*-methylisoalangiside (35) やカルボン酸 36–39 も得られ, トコンアルカロイドの生合成中間体 3 と同じ *S* 配置を有する配糖体を, 天然物として初めて単離することができた.

Demethylneoalangiside (40) 及び neoalangiside (41) は, トコンから単離した 13, 14 と同様, 芳香環の置換様式が通常と異なる化合物である. さらに, アランギサイド型配糖体のグルコース部がアシル化した 42–48, もう一分子の糖が結合した 49–53 が得られた. また, 2-メトキシジヒドロピラン環を持つ配糖体 54, 55 及び 10-hydroxyvincoside lactam (56), 6'- α -D-glucopyranosylloganic acid (57) を単離した. *A. lamarckii* では, tubulosine などテトラヒドロ- β -カルボリン骨格を持つアルカロイドが知られているが, secologanin と縮合して生じる含窒素配糖体にはこの骨格の配糖体の例はなく, 56 が

単離されたことは興味深い.

さらに, 他のウリノキ科植物の葉部の成分検索を行った (Fig. 6). *A. platanifolium* var. *trilobum* の葉部からは demethylalangiside (22) とともに新規配糖体 58–60 が得られた.^{23,24)} *A. kurzii* からは 8, 22 とともに 6-*O*-methyl-*N*-deacetylpecosidic acid (61) と 62 を単離した.²⁵⁾ *A. chinense* からは, 含窒素配糖体としては 22 が得られたのみであった.²⁶⁾ Demethylalangiside (22) は *Alangium* 属植物に共通の配糖体と考えられる.

2-1-3. トコン及び *Alangium lamarckii* のアルカロイド トコンからは既知のトコンアルカロイド²⁷⁾ emetine (5), cephaeline (6), psychotrine (63), protoemetine (64), 9-demethylprotoemetinol (65), isocephaeline (66) とともに新規アルカロイド neocephaeline (67), 7'-*O*-demethylcephaeline (68), 10-*O*-demethylcephaeline (69), 2'-*N*-(1''-deoxy-1''- β -D-fructopyranosyl) cephaeline

Fig. 7. New Ipecac Alkaloids **67–71**, **76** and **77** from *Cephaelis acuminata* and *Alangium lamarckii*

Fig. 8. Condensation of Secologanin with Dopamine in *Cephaelis acuminata* and *Alangium lamarckii*

(**70**), 2'-N-(1"-deoxy-1"-β-D-fructopyranosyl) neo-cephaeline (**71**) を得た (Fig. 7).¹⁵⁾ そのうち neo-cephaeline (**67**) は、ベンゼン環 (E 環) の酸素官能基の置換様式が従来のトコンアルカロイドと異なるものである。**68** と **69** は、**6** のメトキシ基 1 つがヒドロキシ基に置き換わったもので、生合成的に興味深い。また **70** と **71** は N-(1-deoxy-1-β-D-fructopyranosyl) 基を持つユニークなものである。両化合物は、**6** あるいは **67** と D-glucose を酢酸とトリエチルアミン中加熱することにより得られることから、抽出過程でトコンアルカロイドから Amadori 転位により生じるアーティファクトの可能性も考えられる。しかし、emetine (**5**) から生じると予想される化合物は、合成的には得られたが、本植物材料からは検出されなかった。

A. lamarckii の乾燥果実からは、既知アルカロイドの **6**, **63**, **64**, **66**, deoxytubulosine (**72**), tubulo-

sine (**73**), isotubulosine (**74**), protoemetinol (**75**), salsoline に加えて、トコンから新規化合物として単離した **67**, **69**, **70** が得られた。また、新規化合物として 1',2'-dehydrotubulosine (**76**) と alangine (**77**) を構造決定した (Fig. 7).²⁸⁾ Alangine (**77**) は新規骨格を持つアルカロイドである。

2-1-4. 生合成経路の考察 *A. lamarckii* より methylisoalangsideside (**32**) など S 配置を持つ配糖体を単離することにより、トコンアルカロイド生合成の想定中間体 **3** の存在が間接的に証明できた。さらに置換様式の異なる **40** を単離したことから、dopamine と secologanin の縮合において、3 種類の閉環機構が植物内に存在することが示唆された。すなわち、中間体となるイミンが A の方向に閉環すれば **3** が、B の方向に閉環すれば **4** が、C の方向に閉環すれば N-deacetylneoipecoside (**78**) が生成すると考えられる (Fig. 8)。そこで、De-Eknamkul,

Fig. 9. Possible Biosynthetic Pathway of Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glucosides in *Cephaelis acuminata*

Kutchan, Zenk らと協力して, *A. lamarckii* の葉部の無細胞抽出液より, dopamine と secologanin から 3 及び 4 を生成する 2 種の縮合酵素を発見した.²⁹⁾ しかし, 78 へ変換する酵素活性は見い出せなかった. De-Eknamkul らは, 引き続き酵素の精製に取り組み, deacetylisopecoside synthase については不安定なため精製はできなかったが, deacetyl-ipecoside synthase を精製し, この酵素が dopamine と secologanin から立体特異的に 4 を生成することを明らかにした.³⁰⁾

最近, Kutchan らは *Psychotria ipecacuanha* (= *C. ipecacuanha*) の培養細胞より β -D-glucosidase 及び O-methyltransferase の cDNA をクローニングし, リコンビナントタンパク質を用いて, トコンアルカロイドの生合成に係わる β -D-glucosidase IpeGlu1 と 3 種の O-methyltransferase IpeOMT1, IpeOMT2, IpeOMT3 の機能を論じている.^{31,32)} その知見を考慮にいれ, われわれの研究室で得られた化合物の生合成経路を考察する.

トコンでは, 9, 10, 17, 19 などの N-アシル化配糖体は, N-deacetylipoecside (4) のメチル化, アシル化により生合成され, その順序が問題となるが, メチル化酵素の基質特異性から,³²⁾ ipecoside (7)

や cephaeloside 類 16, 18 などのメチル化は起こらず, 4 の 6 位あるいは 7 位のメチル化が先行して起こり, その後にアシル化が起これと考えられる. アランギサイド型配糖体 8, 22, 23 は, 4 やそのメチル体のラクタム化により生じる. このラクタム化反応は容易に起こり, 非酵素的反応と考えられるが, 23 は 22 のメチル化酵素によるメチル化によっても生じる可能性がある.³²⁾ トコンの成分検索では 6,7-dimethylipoecside や methylalangiside の存在を確認できなかったが, 想定される両化合物の前駆物質をいずれのメチル化酵素もメチル化しないという報告とよく符合している.³²⁾ 78 も同様にして, メチル化, アセチル化反応により 13 と 14 を与える. 3 はアシル化を受けず, 大部分はトコンアルカロイドへ至る生合成経路にのり, 一部が非酵素的なラクタム化により 25 を生成したと考えられる (Fig. 9).

A. lamarckii では, N-アシル化配糖体は認められず, ラクタム化した配糖体が得られた. トコンの場合と同様にメチル化, 非酵素的なラクタム化により, 4 から 8, 22, 23 を生成し, 78 からは 40, 41 を生じる. 3 からは, 4 の場合と異なり, dimethyl 体 32 が生成するが, これはメチル化酵素の基質特異性に基づいていると考えられる.³²⁾ トコンでは 2 種のメ

Fig. 10. Possible Biosynthetic Pathway of Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glucosides in *Alangium lamarckii*

チル化酵素の組み合わせにより *N*-deacetylisoipecoside (3) から, 79 と 80, 81 が生成することが明らかにされている。植物種が異なるが, *A. lamarckii* においても同様に, 3 がメチル化後, ラクタム化が進行して, 25, 32, 34, 35 が生じると考えられる。配糖体 37 や *A. kurzii* の 61 は, カルボン酸誘導体であるため容易にラクタム化しない。これらは, *N*-deacetylisoipecosidic acid 又は *N*-deacetylpecosidic acid のメチル化によって生成する。*N*-deacetylisoipecosidic acid 及び *N*-deacetylpecosidic acid は, 3 及び 4 の脱メチル化, あるいは secologanin (2) のデメチル体 secologanic acid と dopamine の縮合により生合成される可能性が考えられる (Fig. 10)。

トコンアルカロイドの cephaeline (6), emetine (5) は 3 から protoemetine (64) を経て生合成されるが, 3 から 64 へ至るには, メチル化と脱グルコシル化が起こる必要がある。*A. lamarckii* から 34, 35, 32 を単離したことから, トコンアルカロイド生合成において第 1 のイソキノリン骨格のフェノール性ヒドロキシ基のメチル化は配糖体の段階で起こる

ことが示唆された。Kutchan らにより, 3 や 79 はグルコシダーゼ IpeGlu1 の基質となるが, 80, 81 は有効な基質ではないこと, また 3 種のメチル化酵素の基質特異性から, 3 が 6 位のメチル化を受けて 79 へ変換された後に, 脱グルコシル化によりアグリコンを与え, アグリコンがイミニウムカチオンの形成, 還元, メチルエステルの加水分解と脱炭酸, エノールのアルデヒド基への異性化などの過程と, メチル化酵素 IpeOMT3 によるメチル化を経て 64 が生成する機構が示された。^{31,32} Protoemetine (64) のアルデヒド基は第二の dopamine との縮合反応に供される。この縮合反応には, secologanin と dopamine の場合と同様に, 3 種の機構が想定される。その生成物の 1 つである 68 をトコンから単離した。これはメチル化酵素 IpeOMT2 によって特異的に 7' 位がメチル化され 6 となり, さらに IpeOMT1 により 5 を与えることが確認されている。³² 他の 2 種の縮合反応生成物は単離されていないが, それぞれがメチル化酵素によってメチル化を受け neocephaline (67) と isocephaline (66) が

Fig. 11. Possible Biosynthetic Pathway of Alkaloids in *Cephaelis acuminata* and *Alangium lamarckii*

生じると説明できる。しかし、**6**と**66**はエピマーであり、両者のデヒドロ体に対応する psychotrine (**63**) が共存することから、(*S*)-reticuline から 1, 2-dehydroreticulium ion を経て、(*R*)-reticuline への変換にみられるような、³³⁾ 酸化-水素化の機構により **6** から **63** を経て **66** を生じる可能性も否定はできないが、最近、*A. lamarckii* における投与実験で **6** が **63** へ変換されなかったことから、**6** から **63** への 1', 2'-位の脱水素は起こらないとする報告がある。³⁴⁾ なお詳細な検討が必要であろう。

79 の脱グルコシル化後に、メチル化を受けなければ **82** となり、**3** が脱グルコシル化後に、IpeOMT2 によるメチル化を受けると **83** を生じる。³²⁾ **82** が第二の dopamine との縮合反応、メチル化により **69** が生成し、一方、**83** の還元により **65** が生成すると考えられる (Fig. 11)。

A. lamarckii におけるトコンアルカロイド生合成経路はトコンと同様に考えられるが、**64** が dopamine ではなく、tryptamine と縮合すると β -カルボリン骨格を持つ **72** が生成し、**72** のヒドロキシ化に

より tubulosine (**73**) が生成する。Isotubulosine (**74**) は、**64** と dopamine の縮合によって生じた **72** のエピマーがヒドロキシ化を受けるか、あるいは **64** が serotonin と縮合することにより生成する可能性が考えられる。しかし、**73**, **74** とともに 1', 2'-dehydrotubulosine (**76**) を単離したことから、一方のエピマーのみが生成し、デヒドロ体を中間体とする酸化-水素化反応が起こる可能性も排除はできない。

Alangine (**77**) は新規骨格を有するアルカロイドである。**79** から脱グルコシル化により生じるアグリコンのアミノ基が、**82** の場合とは異なるアルデヒド基との間でイミニウムカチオンを形成し、還元、メチルエステルの加水分解と脱炭酸、アルデヒド基の還元を経て、**77** が生成すると考えられる (Fig. 11)。

最近、分子生物学的手法により、トコンアルカロイドの生合成に大きな進展がみられるが、*N*-deacetylneoipecoside (**78**) の合成酵素, protoemetine (**64**) と第二の dopamine あるいは tryptamine との

Fig. 12. Chemical Conversion of Tetrahydroisoquinoline-Monoterpene Glucosides into Benzopyridoquinolizine Alkaloids

縮合反応を触媒する酵素, また protoemetine (**64**) や alangine (**77**) の詳細な生成機構などは, 今後に残された興味深い課題である。

2-1-5. Alangimaridine, isoalangimarine 及び alangimarine への化学変換 Alangimaridine (**84**) は alangimarine (**85**) や isoalangimarine (**86**) とともに benzo[*a*]pyrido[3,4-*g*]quinolizine 骨格を持つユニークな *A. lamarckii* のアルカロイドである。Pakrashi らは **84** の C-13a 位の絶対配置は, 旋光度の符号から *R* 配置と予想し, 6-*O*-methyl-*N*-deacetyl-ipecoside からの推定生合成経路を提案していた。³⁵⁾ しかし, **84** の推定立体配置はトコンアルカロイド **5** や **6** とは異なっていることから, **84** の立体配置を確定しておくことが必要と考えた。そこで, **8** から **84** を, **23** から **86** の前駆体に相当する (+)-isoalangimaridine (**87**) へ生合成仮説を模倣した変換を試みた。Alangiside (**8**) を β -glucosidase で加水分解後, アンモニア, ついで TFA で処理すると (+)-alangimaridine が得られたことから, Pakrashi らの予想通り **84** の C-13a 位は *R* 配置であることを明らかにした。また同様に, **23** から **87** に変換し, さらに酸化して **86** が得られた (Fig. 12)。³⁶⁾

一方, 前述のように *A. lamarckii* から配糖体 **54**, **55** を単離した。これらは alangiside pentaacetate (**88**) を DDQ で酸化後, 脱アセチル化することにより得られるが, また **8** をメタノール中で長期間放置することによっても得られた。したがって, **54** と **55** は, 抽出過程で **8** の酸化と MeOH の付加により生じたアーティファクトと考えられる。また, **55** を希塩酸, ついでアンモニアで処理することに

より, **85** が得られた。この事実から, これらアルカロイドが天然物である可能性は否定できないものの, 少なくとも部分的には非酵素的に生成していることが考えられる (Fig. 12)。²¹⁾

2-1-6. モノテルペノイド-インドールアルカロイド含有植物の配糖体とアルカロイド モノテルペノイド-インドールアルカロイド含有植物の含窒素配糖体についても関心を持ち, 成分検索を行った。インドールアルカロイドは強い生物活性から医薬品として重要なものも多く, tryptamine と secologanin から Pictet-Spengler 反応により生成する strictosidine (**89**) を経て生合成されることが明らかにされている。含窒素配糖体として **89** のほか, strictosidinic acid (**90**), (5*S*)-5-carboxy-strictosidine (**91**), vincosamide (**92**), strictosamide (**93**), 3 α -dihydrocadambine (**94**) などが知られている (Fig. 13)。

アカネ科 (Rubiaceae), キョウチクトウ科 (Apocynaceae), マチン科 (Loganiaceae) 植物にモノテルペノイド-インドールアルカロイドが多く含まれていることから, 含窒素配糖体あるいは secologanin 由来の配糖体を予想して, アカネ科の *Neonauclea sessilifolia*, *Adina racemosa*, *Uncaria setiloba*, マチン科の *Strychnos spinosa*, *S. axillaris* の成分検索を行った。種々の成分を単離したが, セコイリド配糖体及び関連化合物についてのみ記述する (Fig. 14)。

N. sessilifolia からは, strictosidine のアミノ基にもう 1 分子の secologanin が縮合した neonaucleoside A (**95**) や, neonaucleoside B (**96**) と C (**97**)

Fig. 13. Representative Tetrahydro-β-carboline-Monoterpene Glucosides

Fig. 14. New Glucosides **95–109** Isolated from *Neonauclea sessilifolia*, *Adina racemosa*, *Strychnos spinosa*, and *Strychnos axillaris*

が得られた。またクマリン骨格を持つ特異な構造の化合物 sessilifoside (**98**) と **99** が得られた。³⁷⁾ **98** と **99** は, secologanin が酢酸-マロン酸経路の C₁₀ ポリケチド鎖とアルドール型縮合することにより生成されると考えられる。 *A. racemosa* からは既知物質として **92**, **93** 及び secologanin とその誘導体が得られたほか, 新規配糖体 adinoside A–E (**100–104**) と grandifloroside 11-methyl ester (**105**) を単離した。³⁸⁾ また, *U. setiloba* からは含窒素配糖体は単離されず, 既知オキシインドールアルカロイドが同定された。³⁹⁾ *S. axillaris* からは **90** が, *S. spinosa* からは **91** が単離されたが, 新規含窒素配糖体は得られ

なかった。新規セコイリドイド配糖体として, *S. spinosa* からは stryposide (**106**), 及び strycho-side A (**107**) と B (**108**),⁴⁰⁾ *S. axillaris* からは axillaroside (**109**) を単離, 構造決定した。⁴¹⁾ **106** はユニークな構造を持つ化合物で, secologanin とマロン酸由来の C₃ ユニットから生合成されると考えられる。類似の架橋構造を持つ化合物は secologanin より tandem-Knoevenagel-hetero-Diels-Alder 反応によって化学的に合成されている。⁴²⁾

これら植物では, secologanin (**2**) は tryptamine と縮合反応をするだけではなく, secologanin が持つアルデヒド基, 活性メチレン基またビニル基など

Fig. 15. Possible Biogenetic Formation of Diverse Glucosides from Secologanin

Fig. 16. Indole Alkaloids Isolated from *Rauwolfia serpentina*
Asterisks indicate new compounds.

の官能基により、種々の化合物と縮合し、多様な化合物を生成することが明らかとなった (Fig. 15).

キョウチクトウ科のインドジャボク *Rauwolfia serpentina* の乾燥根には、抗不整脈作用のある ajmaline (110) や、降圧作用のある reserpine (111) など多くのアルカロイドが知られている。インドジャボクからは含窒素配糖体は検出できなかったが、イリドイド配糖体 loganic acid, 7-deoxyloganic acid, secoxyloganin, 7-epiloganin と多くのアルカロイドを得た。また新規アルカロイド *N*₆-methylajmaline (112), *N*₆-methylisoajmaline (113), 3-hydroxysarpagine (114), yohimbic acid (115), isorauhimbinic acid (116) を単離し、構造決定を行った。さらに、アルカロイド 115, 116 と、既知アルカロイドのうち reserpine (111), yohimbine (117), isorau-

himbine (118), 18-hydroxyepialloyohimbine (119), methyl reserpine (120) について DNA トポイソメラーゼ阻害活性を評価した。115, 116 及び 111 が強い阻害作用を示したが、それ以外のアルカロイドは阻害しなかった。115, 116 の topo I に対する IC₅₀ はそれぞれ、30 μM, 40 μM であり、111 の topo II に対する IC₅₀ は 20 μM であった。同条件下で、camptothecin の topo I に対する IC₅₀ は 20 μM, etoposide の topo II に対する IC₅₀ は 40 μM であったので、これらのアルカロイドは比較的強いトポイソメラーゼ阻害活性を示した (Fig. 16).⁴³⁾

2-2. モクセイ科のセコイリドイド配糖体及び関連化合物 モクセイ科植物は 25 属、約 600 種からなり、薬用植物として用いられているものも多い。オリーブ (*Olea europaea*) は食用として重要

Fig. 17. Representative Secoiridoid Glucosides of the Family Oleaceae

Fig. 18. New Secoiridoid Glucosides and Related Aglycones 131–149 Isolated from *Fraxinus* spp.

なばかりではなく、降圧作用、血糖降下作用など様々な活性が注目されている。また、中医薬として、抗炎症、抗菌、強壯の目的で用いられている秦皮 (*Fraxinus rhynchophylla*) がある。また女貞 (*Ligustrum lucidum* AIT.) の果実は伝統漢方薬であり、肝腎を補う効能があるとされている。モクセイ科植物にはイリドイド配糖体やセコイリドイド配糖体が広く分布している。⁴⁴⁾ 代表的なセコイリドイド配糖体として、オリーブの oleuropein (121) や ligstroside (122)、ウンナンオウバイの jasminin (123) が知られており、これらは、7位がカルボキシ基まで酸化され、9位にエチリデン基を持つ oleoside (124) あるいは oleoside 11-methyl ester (125) を基本骨格とする。また、10-hydroxyoleoside 11-methyl ester (126) を基本骨格とする 10-

hydroxyoleuropein (127) や 10-hydroxyligstroside (128)、さらには 10 位にアルデヒド基を持つ ligustalose A (129), B (130) がある (Fig. 17)。これらの配糖体は、モクセイ科植物にのみ含まれている。モクセイ科植物のイリドイド及びセコイリドイド配糖体は、構造的な特徴が属によって異なることから、化学分類学上の重要な指標とされている。モクセイ科植物 13 種の成分検索を行い、多様な配糖体の構造研究を行った。

2-2-1. トネリコ属 (*Fraxinus*) 植物のセコイリドイド配糖体⁴⁵⁻⁵¹⁾ トネリコ属植物には秦皮など数種の生薬があり、これらの生薬では樹皮が薬用に供されている。樹皮部にはクマリン配糖体が含まれている例は多い。しかし、トネリコ属植物の葉部には 121 や 122 などモクセイ科植物を代表するセコイ

Fig. 19. Plausible Biogenetic Mechanism of the Formation of Glucosides **138** and **144** from **136**

リドイド配糖体が報告されていた。そこで、*F. formosana*, *F. insularis*, *F. americana* の葉部の成分検索を行った。また、*F. rhychophylla* に関しては、果実を材料とした (Fig. 18)。

台湾産の *F. formosana* の葉部を検索すると、新規配糖体 **131–136** が得られた。^{45,46)} *F. insularis* からは **137–142**,^{47–49)} *F. rhychophylla* からは、クマリンとエステル結合した oleoside aglycone methyl ether の **143** とともに、ベンゾフラン誘導体と oleoside が結合した配糖体 **144** が得られた。⁵⁰⁾ 配糖体 **131–134** では **122** などと異なり、フェノール性ヒドロキシ基が oleoside の 7 位のカルボキシル基とエステル結合していた。Insularoside (**138**) では、ジフェニルエーテルとエステル結合しているという特徴がみられた。**138** 及び **144** は、framerside (**136**) の酸化的フェノールカップリング反応によって生合成されることが考えられる (Fig. 19)。Framerside (**136**) の 2 分子の *p*-ヒドロキシフェニルエチルアルコール部分からフェノキシラジカルが生じ、*F. insularis* では分子内で C-O 結合して **138** となり、一方 *F. rhychophylla* では C-C 結合したのち閉環反応、還元反応により **144** へと変換されると推定される。

F. americana からは配糖体 **145–148** が得られた。これらではフェニルエチルアルコール部のメチレンがヒドロキシ化されていた。また、モノテルペン部を持つ framerside (**149**) を単離した。⁵¹⁾ このモノテルペン部のシクロペンタン環の絶対配置は

geniposide (**150**) と化学的に関連づけることにより決定した (Fig. 20)。Geniposide (**150**) を文献記載の方法により deoxyloganin (**151**) とし、酵素で加水分解すると deoxyloganin aglycone (**152**) が得られる。これを PCC 酸化後、**153** をアルカリ条件下、NaBH₄ で還元を行うと 2 種の 4-epimer の混合物 **154** が得られた。(R)-PGME と縮合後、分離精製して 2 種の (R)-PGME アミド **155** と **156** を得た。両化合物のラクトン環の立体配座と C-4 の相対配置は、¹H-NMR スペクトルにおける結合定数の解析と NOE 相関より推定し、**150** の C-5 位の絶対配置は R であることから、**155** と **156** の C-4 の絶対配置はそれぞれ S と R と決定した。アミド **155** と **156** の C-4 の絶対配置は、(S)-PGME アミド **157** と **158** の ¹H-NMR の化学シフトとの比較からも証明された。最終的に、framerside (**149**) をアルカリ加水分解し、モノテルペン部を (R)-PGME アミドに誘導し、これが ¹H-NMR 及び HPLC で **155** と一致したことから、**149** 由来のアミドの絶対配置は 4S, 5R, 8S, 9R であることが明らかとなり、framerside の絶対構造を決定した。

2-2-2. ハシドイ属 *Syringa afghanica* のセコイリドイド配糖体 *Syringa afghanica* からは新規化合物 **159–166** が得られた。さらに **149** と類似の配糖体 **167** と **168** が得られた (Fig. 21)。⁵²⁾ 配糖体 **167** は **149** の立体異性体と推定されたが、**167** をメチル化したところ、予想に反して **149** のメチル化生成物

Fig. 20. Chemical Correlation of Secoiridoid Glucosides **149** and **167** with **150**

Reagents: (a) (1) Ac_2O -pyridine, (2) H_2 , Pd/C, EtOH, (3) 0.1 M NaOMe, MeOH; (b) β -glucosidase, H_2O ; (c) PCC, CH_2Cl_2 ; (d) (1) NaBH_4 , 0.5 M NaOH, (2) Amberlite IR-120; (e) (*R*)- or (*S*)-PGME $\cdot$ HCl, PyBOP, HOBT, TEA, DMF; (f) (1) 0.5 M NaOH, (2) Amberlite IR-120, (3) (*R*)-PGME $\cdot$ HCl, PyBOP, HOBT, TEA, DMF; (g) CH_2N_2 , MeOH.

Fig. 21. New Secoiridoid Glucosides and Related Glucosides **159-168** from *Syringa afghanica*

と同一物が得られた (Fig. 20). NMR スペクトルと NOESY 相関を検討することにより, **149** のメチルエステルでは C-2'' でエピメリ化が起こることが明らかとなり, 配糖体 **167** を 2''-epiframeroside と決定した.

2-2-3. ソケイ属 (*Jasminum*) 植物のセコイリドイド配糖体 イボタノキ属, トネリコ属植物では oleoside あるいは 10-hydroxyoleoside がフェニルエチルアルコール誘導体とエステル結合したセコイリドイド配糖体が多く含まれるが, ソケイ属植物の

配糖体では様相が少し異なっている. *J. officinale* var. *grandiflorum* から得られた **169** と **170** では, フェニルエチルアルコール部分のメチレン基が酸素化され, メトキシ基を有していた.⁵³⁾ *J. amplexicaule* の **171-173** は, **127** あるいは **128** の 10 位ヒドロキシ基に, さらに 10-hydroxyoleoside 11-methyl ester (**126**) がエステル結合した二量体や三量体である.⁵⁴⁾ 一方, *J. polyanthum* では, **174** とともに, **122** あるいは **121** のフェノール性ヒドロキシ基あるいはグルコースのヒドロキシ基に oleoside 11-

Fig. 22. New Secoiridoid Glucosides **169–187** from *Jasminum* spp.

methyl ester (**125**) がエステル結合した配糖体 **175–182, 184** や、10-hydroxyoleoside 11-methyl ester (**126**) と oleoside 11-methyl ester (**125**) がエステル結合を介して二量体や三量体となった **185–187** が得られた。配糖体 **183** では **125** ではなく、secologanositide が結合していた (Fig. 22).^{55–57)}

ソケイ属植物のイリドイド系配糖体で特徴的なことは、モノテルペン類とのエステル構造がみられる点である。*J. polyanthum* では、oleoside 11-methyl ester (**125**) と直鎖状モノテルペンのエステル **188–198** が得られた (Fig. 23).^{58,59)} それに対して *J.*

hemsleyi では、イリドイド配糖体 loganin とモノテルペン menthialofic acid のエステル **199–203** 及びクマル酸のエステル **204, 205** が得られた (Fig. 24).^{60,61)}

J. sambac, *J. nudiflorum*, *J. mesnyi* の配糖体では、モノテルペン部は環化してシクロペンタン環を形成している。*J. mesnyi* から単離された jasminin (**123**) がその代表的なもので、⁶²⁾ 同植物より類似の配糖体が多く単離されている。^{63–65)} さらに *J. sambac* の葉部から配糖体 **206–208**,⁶⁶⁾ *J. nudiflorum* から、シクロペンタン環を持つモノテルペンと 1–3 個

Fig. 23. New Secoiridoid Glucosides **188–198** from *Jasminum polyanthum* Fig. 24. New Iridoid Glucosides **199–205** from *Jasminum hemsleyi*

の oleoside (**124**) がエステル結合した配糖体 **209–224** を単離した。^{67–69} また *J. sambac* からは、リグナンと **125** が結合した sambacolignoside (**225**),⁷⁰ *J. nudiflorum* からは、isooleoacteoside (**226**) を単離した (Fig. 25).

J. sambac と *J. nudiflorum* から単離した **206–224** 及び *J. mesnyi* から単離した配糖体は環状テルペン部を持つが、このシクロペンタン環の立体配置には注目する必要がある。イリドイド炭素骨格の形成機構は、geraniol (**227**) が 10-hydroxygeraniol を経て、10-oxogeraniol に変換され、このジアルデヒド体の iridodial (**228**) への還元的閉環によるものである。Iridodial (**228**) は、さらに酸化反応、配糖体化の後、シクロペンタン環の開裂により oleoside が生成すると考えられる。一方、配糖体 **206–224** の環状モノテルペン部も鎖状モノテルペンの環化により生

成し、仮想前駆体 **229** のヒドロキシ化により多様なモノテルペン部が形成されると説明できる。しかし、iridodial のシクロペンタン環は 1,5-*cis* 配置で、絶対配置は 1*R*, 2*S*, 5*R* であるのに対して、環状モノテルペン **229** のシクロペンタン環では 1,5-*trans* 配置であり、立体配置は iridodial と異なっている。このことから、ソケイ属の植物では、閉環の立体化学の異なる閉環酵素の存在が想定される。また、**149** と **167** においても、シクロペンタン環の絶対配置はソケイ属の配糖体と異なっている。*F. americana* では **228** から酸化反応により生合成されると考えられ、また *S. afghanica* においても、**228** に閉環後に立体配置の変換が起こる可能性も想定されるが、異なる閉環酵素の存在も否定できない (Fig. 26).

Fig. 25. New Secoiridoid Glucosides **206–226** from *Jasminum sambac* and *Jasminum nudiflorum*

2-2-4. イボタノキ属 *Ligustrum vulgare* のセコイリドイドアグリコン *Ligustrum vulgare* L. からは **127**, **128** などの既知配糖体のほか、新規配糖体 **230**, **231** を得た。さらにアグリコン ligustrohemiacetal A (**232**) と B (**233**) を単離し、構造決定した (Fig. 27).⁷¹⁾

化合物 **232** は、スペクトルデータから、*J. multiflorum* から単離されている jasmolactone A と同一化合物と考えられた。⁷²⁾ しかし、jasmolactone 類のスペクトルデータの解析、及び加水分解後の生成機構に疑問点があった。一方、オリーブの葉部から、アグリコン **234** が得られ、oleoside 型配糖体から酵素加水分解による生成機構が報告されていた。⁷³⁾ そこで、10-hydroxyoleuropein (**127**) を β-glucosidase により加水分解を行ったところ、**232** や **233** と同様のヘミアセタール構造を持つ化合物 **235** が得られ、そのスペクトルデータは jasmolactone B と一致した。スペクトル解析と化学変換反応により、**235** の構造を決定し、jasmolactone 類の構造を訂正した (Fig. 28)。

2-2-5. Oleoside 型配糖体の生合成経路 モクセイ科に特徴的な oleoside 型配糖体は、他のセコイリドイド配糖体と同様、投与実験により secologanin (**2**) から生合成されと考えられていた。また、**2** からの経路は不明であったが、ligustalose 型化合物の存在と、エチリデン基の立体化学的考察に基づき、8*S*,10-epoxysecologanin (**236**) が生合成中間体として想定された。⁷⁴⁾ その後、投与実験において、⁷⁵⁾ **236** のトリチウム標識体が oleoside 型、10-hydroxyoleoside 型、ligustalose 型配糖体に取り込まれたことから、8*S*,10-epoxysecologanin (**236**) が生合成経路の中間体である可能性が示唆された (Fig. 29, Pathway A)。

しかし、Jensen らのグループは、oleoside 型配糖体が **2** から **236** を経て生合成されるとする説には取り込み率の低さから否定的で、モクセイ科植物の配糖体は deoxyloganic acid (**237**) を中間体とする種々の経路を経て生合成されることを投与実験の結果より示した (Fig. 29, Pathway B)。またイリドイド配糖体の構造にはモクセイ科の属毎に特徴があ

Fig. 26. Diversity of Iridane Skeletons of Oleoside-type Secoiridoid Glucosides in Oleaceous Plants

Fig. 27. New Secoiridoid Glucosides **230** and **231** and Unusual Recycled Secoiridoid Aglycones **232** and **233** Isolated from *Ligustrum vulgare*

Fig. 28. Possible Reaction Scheme from Oleoside-type and 10-Hydroxyoleoside-type Secoiridoid Glucosides to Recycled Aglycones

Fig. 29. Postulated Biosynthetic Pathways to Oleoside 11-Methyl Ester (**125**)

り、植物分類と生合成経路の関連について論じている。⁴⁴⁾ Deoxyloganic acid (**237**) の C-10 がヒドロキシ化されると **238** になり、ついで forsythide (**239**) が生成する経路はレンギョウ属 (*Forsythia*) にのみ認められる。**237** から loganic acid (**240**) を経て secologanic acid (**241**) に至る経路は、他科植物では一般的なセコイリドイドの生合成経路であるが、モクセイ科では *Fontanesia* でのみ存在する。モクセイ科のセコイリドイド配糖体の多くは、**240** ではなく 7-epiloganin (**242**) を経て生合成される。ハシドイ属 (*Syringa*) では、**242** は ketologanin (**243**) に酸化され、epikingisidic acid (**244**) に至る。**244** 又は epikingiside (**245**) からはラクトン環の開環をとまって、secologanoside (**246**) や secoxyloganin (**247**) が生成する可能性についても言及している。これらの経路では、カルボン酸誘導体として生合成されるが、トネリコ属 (*Fraxinus*) やハシドイ属の植物における oleoside 11-methyl ester (**125**) の生合成では、基質は 11-メチルエステルであり、7-epiloganin (**248**) が ketologanin (**249**) を経て oleoside 11-methyl ester (**125**) が生合成されると結論している。

筆者の研究室のモクセイ科植物の成分検索では、単離した配糖体の多くは、oleoside 型若しくは 10-hydroxyoleoside 型配糖体で、**236** 又は 8*S*,10-epoxy

環を持つ関連化合物は認められず、secologanin もモクセイ科植物に検出できなかった。それ以外の既知物質として、*F. formosana* から **245**、*J. hemsleyi* から **1** と **249**、*L. vulgare* から **246** が単離された。また *J. hemsleyi* には **1** と **249** が 10-hydroxyoleoside 型既知配糖体と共存しており、また、*J. polyanthum* から、分子中に oleoside と secologanoside 部分を持つ配糖体 **183** が得られた。Oleoside 型セコイリドイド配糖体は、secologanin 由来ではなく、7-epiloganin (**248**)、ketologanin (**249**) を経て生合成されることが明らかにされたが、oleoside 型配糖体と **1**、**245**、**246** が同一の植物に共存していることから、oleoside 型配糖体を含む植物内の生合成経路は単一ではなく、複数の経路が共存していると考えるのが妥当であろう。

Oleuropein の生合成経路において、ketologanin (**249**) から開環して oleoside 11-methyl ester (**125**) を生成する機構は、他科植物のセコイリドイド系化合物でみられる loganin (**1**) から secologanin (**2**) の生成機構と大きく異なっており、興味は尽きない。最近、オリーブの網羅的な遺伝子発現解析が進められ、olive iridoid synthase に関する報告がされている。⁷⁶⁾ 更なる研究の進展による oleuropein 生合成の全容解明に期待したい。

Fig. 30. Representative Benzophenanthridine Alkaloids

Fig. 31. Biosynthetic Sequence from Reticuline to Benzophenanthridine Alkaloids

3. イソキノリンアルカロイドの構造, 生合成, 生物活性

3-1. ベンゾフェナントリジンアルカロイドの生合成 イソキノリンアルカロイドは薬用植物に含まれる重要な生理活性物質で, 古くからその構造研究, 薬理活性の研究は活発に行われてきた. 生合成に関しても, 当初は標識化合物の投与実験を中心に, その経路の解明が行われてきた. 1980 年代になり, Zenk 教授らは植物の培養組織と酵素化学的手法を駆使して, morphine, berberine の生合成過程の全容を明らかにしていた. 従来より, 永倉教授がこれらの研究に協力していたことから, Zenk 教授の下で, ベンゾフェナントリジンアルカロイドの生合成研究に取り組むことになった.

ベンゾフェナントリジンアルカロイドはミカン科, ケシ科, ケマンソウ亜科に含まれ, 代表的なものとして chelidone (250), sanguinarine (251), chelirubine (252), macarpine (253) や chelethrine (254) が知られている (Fig. 30). ベンゾフェナントリジンアルカロイドの生合成については, 標識化合物の投与実験によって, (+)-reticuline (255), scoulerine (256), stylopine (258) が

250 の前駆物質であることが報告されていた. さらに *Macleaya cordata* の培養細胞を用いた投与実験により 251, 252, 253 が stylopine (258), *cis-N*-methylstylopine (259), protopine (260) を経て生合成されることが明らかにされていた.⁷⁷⁾ しかし, protopine (260) からベンゾフェナントリジンアルカロイドへの骨格変換の詳細な機構は不明であった (Fig. 31).

当時, Zenk 研究室では, (+)-reticuline (255) から scoulerine (256), cheilanthifoline (257), stylopine (258), *cis-N*-methylstylopine (259) を経て protopine (260) へと至る生合成経路において, 二個のメチレンジオキシ基の形成と 259 のヒドロキシ化の過程に, チトクローム P450 依存性のモノオキシナーゼが関与していることが解明されつつあった.⁷⁸⁾ そこで, チトクローム P450 酸化酵素による protopine (260) の 6 位ヒドロキシ化の可能性を検討した.^{79,80)} Protopine (260) の 6 位をヒドロキシ化する酵素反応を検出するためには, 6 位が ³H で標識された protopine が必要であったので, 次を示す方法で, [6-³H]-protopine ([6-³H]-260) を合成した (Fig. 32). すなわち, 260 をオキシ塩化リンで

Fig. 32. Chemical Synthesis of $[6-^3\text{H}]$ -Protopine ($[6-^3\text{H}]$ -260)

Reagents and conditions: (a) POCl_3 , CH_3CN , reflux, 1 h; (b) 1. 25% KOH - MeOH , reflux, 10 min; 2. NaBH_3CN , MeOH , pH 5–6, rt, 4 h; (c) BrCN , MgO , THF - H_2O , rt, 24 h; (d) TNN , MeOH , -10°C to 0°C , 40 min; (e) LiAlH_4 , THF , 0°C , 2 h; (f) 1. 10% HCl , THF , rt, 48 h; then NaHCO_3 , pH 6.5–7.0; 2. $\text{NaB}^3\text{H}_3\text{CN}$, MeOH - THF - H_2O , rt, 45 h; (g) PCC , NaOAc , CH_2Cl_2 , rt, 2 h.

処理し，得られた四級塩基 **261** をホフマン分解に付すことによりアルケン **262** を得た．これを THF - H_2O 中で BrCN - MgO で処理することにより開環と同時にヒドロキシ基を導入し，ついで **263** をメタノール中，硝酸タリウム (III) で酸化し，**264** と **265** の混合物が得られた．ヘミアセタール体 **264** を LAH により還元的にシアノ基を除去した．アミン **266** を 10% HCl で加水分解後， NaHCO_3 で pH を調整し，この条件下で生成物はイミニウム塩 **267** を形成すると考えられるので， $\text{NaB}^3\text{H}_3\text{CN}$ によって還元的にトリチウムを導入した．最終的に **268** のヒドロキシ基を PCC 酸化すると，目的とする $[6-^3\text{H}]$ -protopine ($[6-^3\text{H}]$ -**260**) が得られた． $\text{NaB}^3\text{H}_3\text{CN}$ の還元反応では立体選択的に標識化されるが，酸化して得られる $[6-^3\text{H}]$ -**260** はキラル中心が消失するため，6 位のメチレンの水素は均等に標識されており，酵素反応の検出に好都合である．ヒドロキシ化により標識されたトリチウムの半量は水として培地

中に放出され，酵素活性の測定が可能であり，トリチウムの半量は生成物に保持され同定に役立つからである．

植物の材料としては *Eschscholtzia californica* の培養細胞を用いた．この培養細胞は，ファイトアレキシンの macarpine (**253**) を産生し，⁸¹⁾ エリシターとして酵母の細胞壁の添加により macarpine 生合成が誘導されるため，生合成関連酵素の研究には最適の材料であった．

E. californica の培養細胞に $[6-^3\text{H}]$ -protopine ($[6-^3\text{H}]$ -**260**) を加えて培養すると，期待通り強い放射活性が培地中に検出されたことから，**260** の 6 位がヒドロキシ化されていることが強く示唆された．求める酵素をミクロソーム結合性の P450 モノオキシゲナーゼと予想し，*E. californica* の培養細胞のミクロソーム画分を調製し，この画分に $[6-^3\text{H}]$ -**260** を加えると酵素活性が認められた．エリシターで処理した培養細胞では未処理のものと比較して，

Fig. 33. Plausible Reaction Mechanism of Formation of Dihydrosanguinarine (270) from Protopine (260) Catalyzed by Protopine-6-hydroxylase

その酵素活性は大きく増大した。一方、ベンゾフェナントリジンアルカロイドを生産しない *Berberis stolonifera* などの培養細胞のミクロソーム画分では酵素活性が認められなかったことから、ベンゾフェナントリジンアルカロイド生合成に関与する酵素であると言える。この酵素は、補酵素として NADPH, また分子状酸素を要求し、この酵素反応は、暗黒下で一酸化炭素により阻害されるが、光照射で回復した。また、チトクローム P450 阻害剤によって活性は阻害された事実から、本酵素はチトクローム P450 酸化酵素であることを明らかにし、protopine-6-hydroxylase と命名した。しかし、生成物は 260 の 6 位ヒドロキシ化により生成した 6-hydroxyprotopine (269) ではなく、dihydrosanguinarine (270) であった。その生成は、260 の 6 位ヒドロキシ化により生成した 6-hydroxyprotopine が非酵素的に enamine-aldehyde 中間体となり、C-6 と C-13 間で分子内縮合、脱水反応が起こる機構で説明できる (Fig. 33)。

生成物の分析に際して、ラジオクロマトグラムで 270 に加えて、もう 1 つの生成物のピークが認められた。この事実から、260 から生成した 270 が、ミクロソーム画分にある他のチトクローム P450 酸化酵素によりさらに酸化を受けている可能性が考えられ、macarpine (253) の生合成中間体の存在が推

定された。そこで、エリシター処理により 253 の生合成が強く誘導された *E. californica* 培養細胞の成分検索を行った。⁸²⁾ 培養した液体培地より既知化合物 251, 252, 253 とともに 3 種の新規アルカロイド、10-hydroxysanguinarine (271), 12-hydroxychelirubine (272), 10-hydroxychelerythrine (273) が得られ、また培養細胞からは、培地から得られた化合物に加えて 4 種のジヒドロベンゾフェナントリジンアルカロイドを単離した。そのうち 10-hydroxydihydrosanguinarine (274) は新規化合物、他は既知化合物 dihydrosanguinarine (270), dihydrochelirubine (275), dihydromacarpine (276) であった。さらに培養細胞のミクロソーム画分のアルカロイドを HPLC 分析すると 270, 274, 275, 276 に加えて 12-hydroxydihydrochelirubine (277), 10-hydroxydihydrochelerythrine (278) のピークが検出され、また dihydrochelerythrine (279) と dihydrochelilutine (280) に相当するピークも認められた。274 と 277 については単離同定した。しかし、それらが酸化されたベンゾフェナントリジンアルカロイドはミクロソーム画分に全く検出されなかった。以上の事実から、260 より生成した 270 が、ミクロソームの膜結合性のチトクローム P450 酸化酵素により、10 位のヒドロキシ化を受けて 274 を生じ、その後メチル化を受けると 275 となり、さらに、12 位のヒド

Fig. 34. Biosynthetic Pathway Leading from Dihydrosanguinarine (270) to Macarpine (253)

ロキシ化, メチル化により **276** が生成すると説明される. その推定は, **270** をヒドロキシ化するチトクローム P450 酸化酵素 dihydrosanguinarine-10-hydroxylase 及び **274** をメチル化する 10-hydroxy-dihydrosanguinarine-10-O-methyltransferase を *E. californica* の培養細胞に見出すことによって証明された. このメチル化酵素は基質特異性が高く, **274** のみをメチル化し, **271**, **272**, **273**, **277** 及び **278** をメチル化しなかった.⁸³⁾ その後, Zenk らにより, エリシター処理をした *Thalictrum bulgaricum* 及び *E. californica* の培養細胞から **275** の 12 位をヒドロキシ化する dihydrochelirubine-12-hydroxylase 及び **277** のメチル化酵素が発見された.⁸⁴⁾ メチル化酵素の基質特異性から, メチル化はジヒドロ体で起こり, **271** や **272** が直接メチル化を受けて **252** や **253** を生成する可能性は否定される. ジヒドロ体 **270**, **274–277** は基質特異性の低い細胞質の酵素 dihydrobenzophenanthridine oxidase⁸⁵⁾ によりベンゾフェナントリジンアルカロイドへと酸化されると考えられる. このように, macarpine (**253**) へ至る生合成経路の全容が明らかとなった (Fig. 34). この過程で, ミクロソームの膜結合性のチトクローム P450 酵素が重要な役割を果たしており, またこれらの酵素はエリシター処理により強く誘導されるのに対して, 細胞質に存在するメチル化酵素は誘導を受けないことも明らかとなった.

また, chelerythrine (**254**), chelilutine (**281**) の生合成に関しては, *E. californica* の培養細胞から **273** を単離し, またミクロソーム画分に **278** を同定

したことから, marcarpine (**253**) の生合成の場合と同様に, allocryptopine (**282**) から, チトクローム P450 酸化酵素, メチル化酵素, oxidase によって生合成されると推定される (Fig. 35).

最近, Sato らは *E. californica* の培養細胞から protopine-6-hydroxylase の cDNA を単離し, 酵母で発現させたりコンビナントタンパク質が, protopine (**260**) と allocryptopine (**282**) を, それぞれ dihydrosanguinarine (**270**) と dihydrochelerythrine (**279**) に変換することを示している.⁸⁶⁾

3-2. ビスベンジルイソキノリンアルカロイドの生物活性 ビスベンジルイソキノリンアルカロイドは, 2 分子のベンジルイソキノリンアルカロイドが酸化的フェノールカップリングによって結合した構造を持ち, ツツラフジ科 (Menispermaceae), キンポウゲ科などの植物から多数単離されている.⁸⁷⁾ ビスベンジルイソキノリンアルカロイドには様々な生物活性を持つものがあることから, 生物活性に注目しながら, ビスベンジルイソキノリンアルカロイド含有植物の成分検索を行った.

3-2-1. 白薬子のセファランチンと関連化合物の毛組織細胞増殖促進効果 タマサキツツラフジ *Stephania cepharantha* HAYATA は中国の四川, 貴州や台湾などに分布する多年生つる性の植物で, 地下部に塊根を有している. この塊根を乾燥した生薬を白薬子と称する. 白薬子の成分研究の歴史は古く, 多数のビスベンジルイソキノリンアルカロイドが単離されている. 白薬子の生薬としての薬効は, ビスベンジルイソキノリンアルカロイドに起因して

Fig. 35. Proposed Biosynthetic Sequence from Allocryptopine (**282**) to Chelerythrine (**254**) and Chelilutine (**281**)

Fig. 36. Bisbenzylisoquinoline and Quarternary Alkaloids Isolated from *Stephania cepharantha* and Related Benzylisoquinoline Alkaloids

Asterisks indicate new compounds.

いると考えられる。主塩基の cepharanthine (283) は、脱毛、白血球減少抑制剤として、また多剤耐性克服剤として用いられている。いわゆる“セファランチン”製剤は育毛効果が報告されており、283 が活性物質であると考えられるが、他のピスベンジリソキノリンアルカロイドの活性については未知であった。そこで、白薬子のアルカロイド成分をさらに精査するとともに、その成分の育毛効果を評価した。

白堊子の三級アルカロイド画分からはベンジルイソキノリンアルカロイド **283-292** を含む 14 種の既

知アルカロイドを単離した。四級アルカロイド画分については、精製の困難さから精査されていなかったが、過塩素酸ナトリウムを用いたイオン対抽出とイオン対 HPLC 分取法により、新規アルカロイド stecepharine (**297**), tetradehydreticuline (**300**) を含む、9 種の四級アルカロイド **293–301** を単離した (Fig. 36).⁸⁸⁾

三級アルカロイド画分から得られた 9 種のピスベンジルイソキノリンアルカロイドと、四級アルカロイド画分から得られた 2'-*N*-methylisotetrandrine (301) の毛組織細胞増殖活性を評価した。

Fig. 37. Biogenetic Scheme from (*R*)-*N*-Methylcoclaurine (311) to Bisbenzylisoquinoline Alkaloids in *Nelumbo nucifera*

Cepharanthine (283) は 0.01 $\mu\text{g/mL}$ でマウスの毛組織から単離した培養細胞の増殖を促進し、cepharanoline (284), isotetrandrine (285), berbamine (286) も同様に、細胞増殖を亢進させた。その程度は、育毛剤として知られる 70 $\mu\text{g/mL}$ minoxidil よりも、わずかに効果が大きかった。他の 6 種のアルカロイドは効果を示さなかった。また、283 と 284 は 0.01–0.1 $\mu\text{g/mL}$ で最大の効果を示した。4 種のアルカロイドは、毛組織細胞に対して増殖を促進するのに対して、マウスの皮膚から得たケラチノサイトやフィibroblastに対しては効果を示さず、毛包に特異的に作用することが明らかとなった。⁸⁹⁾

Cepharanthine (283) などのビスベンジルイソキノリンアルカロイドが毛組織細胞に特異的に作用し、毛成長を促進することが明らかとなった。これらアルカロイドは (*S*)-及び (*R*)-ベンジルイソキノリンアルカロイドの二量体であることから、単量体も同様に活性を示すのか、また立体化学の影響について興味を持たれた。そこで、(*S*)-reticuline (255), (*S*)-norreticuline (302), (*R*)-reticuline (303), (*R*)-norreticuline (304) を合成し、それぞれの活性を評価した。その結果、255 と 302 は培養毛組織細胞の増殖を促進し、0.01 $\mu\text{g/mL}$ において最大の効果を示した。一方、303, 304 は顕著な効果

を示さず、明らかに立体特異性が認められた。また、255 と 302 は cepharanthine (283) と同様、ケラチノサイトやフィibroblastに対しては効果を示さなかった。さらに、*in vivo* での活性を見るために、マウスに 1% の (*S*)-norreticuline を塗布したところは 1% minoxidil とほぼ同程度の育毛効果を示した。⁹⁰⁾

3-2-2. 蓮子心の薬理作用とビスベンジルイソキノリンアルカロイド スイレン科植物ハス (*Nelumbo nucifera* GAERTNER) の成熟した種子の胚芽を蓮子心と呼ぶ。蓮子心には、ビスベンジルイソキノリンアルカロイドが含まれていることが知られており、精神を安定させる目的で使用されている。東洋医学では心を清める、熱を去る、止血する、精を鈍らせるなどの効能を持つ漢方薬として熱病、労心吐血の治療に用いられている。したがって蓮子心は中枢抑制作用を有することが予想される。そこで、薬理活性を評価しながら、含有成分の検索を行った。

まず蓮子心のメタノール抽出エキスを調べたところ、マウスに対して自発運動抑制作用を示した。ついで、メタノールエキスを水と *n*-ヘキサン、クロロホルム、*n*-ブタノールで順次分配し、各抽出物の活性を評価した。*n*-ヘキサン層、*n*-ブタノール層、水層は活性を示さなかったが、クロロホルム抽出物

Fig. 38. Synthesis of Nelumboferine (**308**)

Reagents and conditions: (a) *p*-TsOH, C₆H₆, reflux, 2.5 h; (b) *n*-BuLi, THF, -98 to 0°C, 2 h; (c) hydrazine, *p*-TsOH, EtOH, reflux, 2 h; (d) formalin, NaBH₄, MeOH, rt, 1 h; (e) H₂, Pd/C, MeOH, rt, 7 h; (f) CuBr·SMe₂, Cs₂CO₃, pyridine, reflux, 20 h; (g) BCl₃, CH₂Cl₂, -15°C, 1 h.

は明らかな自発運動抑制作用を示した。またクロロホルム抽出物にはビスベンジルイソキノリンアルカロイドが含まれていることから、主塩基の **neferine** (**305**) について精査すると、濃度依存的に自発運動抑制を引き起こし、鎮静作用を示すことが明らかになった。また、体温降下作用、チオペンタールによる睡眠持続時間の延長、抗不安作用を引き起こすことも明らかとなった。⁹¹⁾

主塩基 **neferine** が中枢抑制作用を示したことから、クロロホルム抽出物に含まれる他のアルカロイド成分にも同様の活性を期待し、蓮子心のアルカロイド成分の再検索を行った。既知のビスベンジルイソキノリンアルカロイド **neferine** (**305**), **liensinine** (**306**), **isoliensinine** (**307**) とともに、新たに 3 種のアルカロイド **nelumboferine** (**308**) と **nelumborine A** (**309**), **nelumborine B** (**310**) を単離し、その構造を決定した。⁹²⁾ **Nelumborine A** (**309**) と **nelumborine B** (**310**) は回転異性体であり、ゆるやかに相互に変換する。これらの新規アルカロイドの生合成経路は、いずれも (*R*)-*N*-methylcoclaurine (**311**) を共通の前駆体とし、2 分子が C-O 酸化的カップリングにより **308** を生じ、また一方、C-C

酸化的カップリングにより **309** と **310** が生成すると考えられる。生合成中間体 **nelumboferine** (**308**) はさらにメチル化され、蓮子心の主アルカロイド **305**, **306**, **307** が生合成されると考えられる (Fig. 37)。

蓮子心からは、主塩基 **neferine** (**305**) とともに **306**, **307**, **308** が得られたので、これらビスベンジルイソキノリンアルカロイドの置換基の違いが薬理活性に及ぼす影響を検討しようと考えた。**306**, **307** は比較的多量に得られたが、新規アルカロイド **nelumboferine** (**308**) は微量しか含まれてないため活性試験が困難であったので、全合成を行った。また、立体化学の薬理活性への影響を検討するために **neferine** (**305**) の立体異性体を全合成した。

新規化合物はベンジルイソキノリンの二量体であるため、まずベンジルイソキノリンの単量体を合成し、それらを Ullmann 反応によりカップリングさせて合成した。単量体の合成には、鍵反応として不斉アルキル化を用いた。バニリン (**312**) より調製したテトラヒドロイソキノリン **313** にキラル補助基 **314** を縮合させ、アルキル化の基質 **315** とした。THF 中、-98°C で **315** の不斉アルキル化を行った

Fig. 39. Structures of Neferine (**305**), 1-*epi*-Neferine (**324**), 1'-*epi*-Neferine (**325**), *ent*-Neferine (**326**) and *O*-Methylneferine (**327**)

ところ、99%以上の立体選択性で目的物 **316** が得られた。ヒドラジンによりキラル補助基を除去し、**317** の還元的 *N*-メチル化、**318** の接触水添によるベンジル基の脱保護を経て、目的の上部単量体 **319** へと誘導した。同様にして、**315** から **320**, **321** を経て、もう一方の下部単量体 **322** も合成した。臭化銅ジメチルスルフィド錯体と炭酸セシウムを用いて、**319** と **322** の Ullmann カップリングを行い、得られた二量体 **323** の脱保護によって目的のアルカロイド nelumboferine (**308**) が得られた (Fig. 38)。

蓮子心のビスベンジルイソキノリンアルカロイドには2つのキラル中心があるため、4つの立体異性体が存在可能である。そこで、neferine (**305**) の立体化学が薬理活性に及ぼす影響を調べるため、前述の新規アルカロイドと同じ合成法で、キラル補助基として *L*-及び *D*-バリン由来のオキサゾリンを使い分けることで、**305** の3種の非天然型立体異性体 1-*epi*-neferine (**324**), 1'-*epi*-neferine (**325**), *ent*-neferine (**326**) を合成した。また neferine (**305**) をメチル化することにより *O*-methylneferine (**327**) を得た (Fig. 39)。

化合物の置換基の相違が自発運動量に及ぼす影響は neferine (**305**), liensinine (**306**), isoliensinine (**307**), nelumboferine (**308**) と *O*-methylneferine (**327**) を用いて検討した。いずれの化合物も自発運動量を抑制し、その作用は **306**, **307**, **308** が **305**, **327** よりも強力であった。この結果から、ビスベンジルイソキノリンアルカロイドの C-12 及び/又は C-7' の置換基がメトキシ基からヒドロキシ基に置き換わると鎮静作用が高まると考えられた。また、*O*-methylneferine (**327**) は作用発現が早く、その作用は短時間で消失する傾向がみられた。

また、neferine (**305**), 1-*epi*-neferine (**324**), 1'-*epi*-neferine (**325**), *ent*-neferine (**326**) の作用を比

較し、立体化学の違いによる活性への影響を検討した。その結果、いずれの化合物も自発運動量の抑制を示した。その作用の強さは **325** > **324** > **326** > **305** の順に強いことが分かった。

以上、置換基の異なるビスベンジルイソキノリン型アルカロイドの自発運動量の測定結果を比較したところ、いずれの化合物も抑制作用を示し、またその強さには顕著な差がみられないことから自発運動量抑制作用の発現には置換基よりもビスベンジルイソキノリン骨格が重要であると考えられる。また、立体異性体の活性の比較検討の結果、作用の強弱は認められたが、明確な規則性はみられなかった。⁹³⁾

Neferine (**305**) や liensinine (**306**) の他の中枢作用についても検討し、抗うつ作用を示すこと、また抗うつ作用にセロトニン作動性神経が関連することを明らかにしている。^{94,95)}

4. 単離培養地衣菌の代謝物

地衣類は土壌、岩上、樹皮上などを覆うように生育する共生生物で、共生関係を利用して地球上に広く分布している。全世界で400属あまり、22000種以上が知られており、外部形態から痂状地衣、葉状地衣、樹状地衣の3種に大別される。地衣体の大部分は菌類の菌糸からつくられ、その中に微細な緑藻や藍藻が共生しており、分類学上は独立した生物群とみなされる。構成菌類は藻菌類、子囊菌類、担子菌類あるいは不完全菌類で、大部分の地衣類は子囊菌からなり、現存する既知の菌類種の5分の1は地衣化している。

地衣類は、食用地衣や色素、香料の原料として、また古来より世界各国で民間薬としても利用されている。地衣類は、化学的には地衣成分と呼ばれる地衣類特有の化合物群を含有することで知られている。地衣成分は既に19世紀には研究対象になり、1831年には vulpinic acid (**328**) が単離され、1883

Fig. 40. Representative Lichen Substances

年に構造決定されたが、ほとんどの地衣成分の構造は不明のままであった。1920年から1945年に、朝比奈らは多くの地衣成分の化学構造の解明に成功し、これは日本における薬学、天然物化学の歴史に大きな位置を占めてきた。⁹⁶⁾ 今日までにデブシド [lecanoric acid (329), barbatic acid (330) など], デブシドン [stictic acid (331) など], ジベンゾフラン [usnic acid (332) など], ジフェニルエーテル [congrayanic acid (333) など], キサントン [lichexanthone (334) など], クロモン [eugentiol (335) など], ラクトンカルボン酸 [lichesterinic acid (336) など]などを基本骨格とする800種類以上の地衣成分が構造決定されている (Fig. 40)。⁹⁷⁾ 芳香族化合物を中心とする地衣成分は、植物や菌類の代謝産物とは化学構造が異なり、共生生物である地衣類の特殊性を際立たせている。これら地衣成分の地衣体における生理的な役割の詳細は明らかにはされていないが、UV照射に対する防御物質、微生物や植物の成長抑制物質、また昆虫の忌避物質としての役割を担っていると考えられている。⁹⁸⁾ 地衣類由来の成分には、抗菌活性を始めとし、抗ウイルス、抗腫瘍、酵素阻害活性など幅広い生物活性が報告され、その意義が再認識されている。⁹⁹⁾

しかし、天然の地衣体は成長が極めて遅いこと、また自然環境の変化に伴い生育分布が狭くなりつつあることから、薬用資源としての活用には限りがあると考えられる。その解決法の1つとして地衣類の培養技術がある。地衣類の培養方法は種々検討されており、菌類と藻類が共存する状態で培養する方法 (組織培養) と、構成する菌類、藻類をそれぞれ分離し個別に培養する方法 (単離培養) が開発されている。地衣菌の培養法としては、生殖器官である子器から胞子を放出させ、無菌的に発芽させて純化培

養する方法が知られている。この方法は1886年以来長らく続けられたが、1960年代になって Ah-madjian らによって集大成され、多くの地衣菌胞子の放出発芽実験や地衣菌と地衣藻の再結合実験が種々試みられている。¹⁰⁰⁾

一方、地衣菌の培養による代謝物に関する研究は多くなく、1990年代半ばまでで20数例あるだけで、地衣類の特徴的な成分であるデブシド類、デブシドン類、クロモン類やアントラキノン類が培養地衣菌で生産する例が報告されている。このように地衣成分を単離地衣菌が生産している事実から、地衣成分の生合成関連遺伝子は地衣菌がすべて備えていると考えられ、地衣藻は出発物質やエネルギーの供給など間接的な関与に留まる可能性が指摘されるようになった。現在までに、地衣菌の培養条件について種々検討されているが、大阪市立環境研究所の濱田博士は、胞子由来の地衣菌を、寒天培地に高濃度の糖を添加して高浸透圧条件下で培養を行うと、地衣本来の代謝産物やときには地衣成分とは異なる新規化合物を大量に生産することを明らかにした。¹⁰¹⁾ そこで、地衣菌の高浸透圧培養法に興味を持ち、共同で日本国内及び海外で採集した痼状地衣類より胞子由来の地衣菌を単離培養し、その代謝物の構造研究を行った。

4-1. 地衣菌の単離培養による異常代謝物の生産

4-1-1. ダイダイゴケ科 *Xanthoria* 属地衣類の培養地衣菌の代謝物 *Xanthoria* 属地衣類には emodin (337), parietin (338) などアントラキノン類が含まれていることは広く知られている。*Xanthoria polycarpa* の地衣体の成分を分析すると 337-342 を、また *X. elegans* の地衣体からは 337, 338, 341, 342 を検出した。これら地衣より地衣菌を単離培養したところ、*X. polycarpa* の培養地衣菌は

Fig. 41. Anthraquinones from the Thalli and Cultured Mycobionts of *Xanthoria polycarpa* and *Xanthoria elegans*

338, 341, 342 を、また *X. elegans* の培養地衣菌は **338, 339, 340** を大量に生産した。¹⁰²⁾ この属の地衣では、地衣菌が地衣成分の生合成に関与する遺伝子をすべて備えており、地衣成分の生合成の主体は地衣菌で、共生藻は特別な役割を果たしていないと考えるのが妥当である (Fig. 41)。

4-1-2. モジゴケ科 *Graphis* 属地衣類の培養地衣菌の代謝物 モジゴケ科 *Graphis* 属地衣は世界で約 340 種が知られ、熱帯地域に多く、日本には 30 種以上が分布している。子器が鉛筆で文字を走り書きしたような模様からモジゴケと称されている。天然の地衣体からは、デプシド類、デプシドン類などの地衣成分が知られているが、*Graphis* 属地衣の地衣菌の単離培養についての報告はごくわずかであった。

Graphis scripta var. *pulverulenta* より地衣菌を単離培養したところ、新規代謝物 graphislactone A-D (**343–346**) が得られた。¹⁰³⁾ **343–345** は不完全糸状菌類 *Alternaria tenuis* のマイコトキシン arternariol (**347**) と同じ 6*H*-dibenzo [*b, d*] pyran-6-one 骨格を持ち、また **343** は *Botrytis allii* の代謝物 botrallin (**348**) の還元体に相当するものである。Graphislactone A-D は、通常的地衣成分とは異なり、菌代謝物と類似した骨格を持つ異常代謝産物であった。また *G. prunicola* (アメリカ産) の地衣菌からは **343–346** と graphislactone E (**349**)、graphislactone F (**350**) が、*G. cognata* (愛媛産) の地衣菌からは **343, 345** と **347** が、*G. scripta* (スロベニア産) の地衣菌からは **343, 345, 346** が得られた。¹⁰⁴⁾ さらに、和歌山、長野、カナダで採取した *G. scripta* や、長野、岩手、高知、長崎など各地で採取した *G. cognata* の地衣菌培養でも同様に graphislactone 類の生産が認められた。¹⁰⁵⁾ このように *Graphis* 属地

衣の地衣菌培養では、地理的に離れた採集地域の地衣でも、また異なる種のもでも graphislactone 類を共通に生産しているという結果が得られた。その後、海綿の内生菌 *Ulocladium botrytis* から **346** の 8-デメチル体 ulocladol (**351**) が単離され、¹⁰⁶⁾ また植物の内生菌 *Cephalosporium acremonium* IFB-E007 の培養物から、graphislactone A (**343**) の類似化合物 graphislactone G (**352**) と H (**353**) が単離されている。¹⁰⁷⁾ これらの事実は、菌類の系統発生学的な考察をする上で興味深い結果と考えている (Fig. 42)。

一方、同種の *Graphis scripta* であっても、採集地の異なる株によって、全く異なる代謝経路が発現する場合もあった。栃木県・日光で採取した *G. scripta* の培養地衣菌からは 3 種のクロモン類 **354–356** が得られた。¹⁰⁸⁾ また同じく日光で採取した *G. scripta* の別株からは **357** ($4R : 4S = 3 : 7$)、**358** ($2S, 3S, 4R : 2R, 3R, 4S = 10 : 9$)、**359** (enantiomeric mixture 73 : 27) が、いずれもエナンチオマーの混合物として得られた。¹⁰⁹⁾ この例のように培養地衣菌の代謝物は光学異性体の混合物であることが多い。またアメリカ・アラバマで採集した *G. scripta* の培養地衣菌からは **360** が得られた (Fig. 42)。¹¹⁰⁾

さらに 9 種の *Graphis* 属地衣から地衣菌を単離培養し、代謝物の検索を行った (Fig. 43)。フィリピン産の未同定の *Graphis* sp. からはイソクマリン **361** ($10R : 10S = 19 : 1$) と **362** ($10R : 10S = 18 : 7$) がエナンチオマーの混合物として得られた。¹¹¹⁾ また *G. scripta* var. *serpentina* からは 3,3'-dihydroxy-5,5'-dimethyldiphenyl ether (**363**)、*G. rikuzensis* からは violaceol-I (**364**)、violaceol-II (**365**) と新規三量体 rikuzenol (**366**) が得られた。ジフェニルエーテル類 **363, 364, 365** はこれまで真菌類より単離された例はあるが、これらを地衣類や地衣菌から単離したのは初めてである。¹¹²⁾ *G. apriens* からは新規化合物 **367** ($3R : 3S = 3 : 2$)、**368** ($3R, 4R : 3S, 4S = 49 : 1$) が、既知クロモン **354–356**、6-methoxymellein (**369**)、graphisquinone (**370**) 及び ergosterol (**371**) とともに得られた。*G. handelii* からは、チオフェン環を持つ thiographisquinone (**372**) を **354, 369, 370** とともに得た。また *G. awaensis* からも **372** とともに **354, 369, 370, 371** を単離した。¹¹³⁾ *G. proserpens* の培養地衣菌からは 6 種の新

Fig. 42. Metabolites **343–360** Isolated from Cultured Mycobionts of *Graphis* spp. and Related Fungal Metabolites
 Asterisks indicate new compounds.

Fig. 43. Metabolites **361–385** of Cultured Mycobionts of *Graphis* spp.
 Asterisks indicate new compounds.

規化合物 **373–378** を既知化合物 **379–381** とともに得た。Proserin A–C (**376–378**) は天然物として初めて単離された 7-oxo-5,7-dihydrooxepino [4,3,2-*de*] isochromene 誘導体である。¹¹⁴⁾

さらに、ベトナム産の *G. vestitoides* から、**374**, **379**, **380**, **381** とともに新規化合物 **382** と 14 員環マクロライド graphilide (**383**) を単離した。14 員環マクロライドは、海洋天然物や菌代謝物としての報

告はあるが、培養地衣菌から単離したのは初めての例である。¹¹⁵⁾ また未同定の *Graphis* sp. からは **376** と 2 種の新規化合物 **384** と graphisidin (**385**) を単離、構造決定した。両化合物と関連のある 3,4-dihydro-2*H*, 5*H*-pyrano [3,2-*c*] chromene 誘導体や benzophenone 誘導体は菌代謝物として報告はあるが、地衣菌代謝物には例はない。¹¹⁶⁾

Fig. 44. Metabolites **386–403** of Cultured Mycobionts of *Lecanora* spp.
Asterisks indicate new compounds.

4-1-3. チャシブゴケ科 *Lecanora* 属地衣類の培養地衣菌の代謝物 *Lecanora iseana* の培養地衣菌からは新規化合物 **386–389** とともに既知化合物 **390–396** が得られた.¹¹⁷⁾ *L. leprosa* (= *L. cinereocarenea*) の培養地衣菌からは **390** と新規ジベンゾフラン **397–400**,¹¹⁸⁾ 及び naphtho [1,8-*cd*] pyran-3-one 骨格を持つ lecanopyrone (**401**)¹¹⁹⁾ が得られた. *L. nipponica* の培養地衣菌からは 2 種の新規カルボン酸誘導体 **402** と **403** を単離した (Fig. 44).¹²⁰⁾

4-1-4. サネゴケ科 *Pyrenula* 属地衣類の培養地衣菌の代謝物 奈良で採取した *Pyrenula japonica* と北アメリカ産の *P. pseudobufonia* の培養地衣菌からは、既知キサントン **404** 及び新規化合物 **405** と **406** を得た.¹²¹⁾ また滋賀で採取した *P. japonica* の別株の培養地衣菌からは **404–406** とともに新規キサントン **407** 及び **408** と既知化合物 emodin (**337**) と sclerotiorin (**409**) を得た.¹²²⁾ 宮崎で採取した未同定の *Pyrenula* sp. の地衣菌培養からは toralactone (**410**) と naphtho [1,8-*cd*] pyran-3-one 骨格を有する新規化合物 pyrenulin (**411**) を得た.¹²³⁾ 徳島で採取した未同定の *Pyrenula* sp. の培養地衣菌からは、新規化合物 **412, 413, 414** (enantiomeric mixture 9 : 11), **415** を単離構造決定した.¹²⁴⁾ ベトナムで採取した未同定の *Pyrenula* sp. の培養地衣菌からは、既知化合物 **337, 405, 416** とともに新規化合

物 pyrenulic acid A–H (**417–424**) を得た (Fig. 45).¹²⁵⁾

キサントン **404–406** は、地衣体から得られる norlichexanthone (**391**) と異なり、3 位にメチル基あるいはヒドロキシメチル基を持つことから、生合成におけるポリケチド鎖の開環様式は、*Pyrenula* 属の培養地衣菌では地衣体と異なっていると考えられる。また、**409** (アザフィロン骨格), **411** (naphthalene 骨格), **412–414** (5,8-dihydroxyisocoumarin 誘導体), **417–424** (アルキル化デカリン型ポリケチド), **415** (ベンゾフラン) のような骨格を持つ化合物をこれまで培養地衣菌から単離した例はない。

また pyrenulic acid 類の生物活性を評価したところ、pyrenulic acid A (**416**) と pyrenulic acid G (**423**) の DNA polymerase α と β の阻害活性は IC₅₀ は 8.1–19.5 μ M, また、pyrenulic acid A の HCT116 ヒトがん細胞の増殖阻害活性は IC₅₀ 6.4 $\pm$ 0.7 μ M であった。

4-1-5. その他の地衣類の培養地衣菌の代謝物 *Haematomma* sp. の培養地衣菌より、(–)-usnic acid (**332**), **425** と新規化合物 8-methylascomycone A (**426**) を単離した.¹²⁶⁾ 未同定の *Trypethelium* sp. の培養地衣菌からは新規化合物 **427** と **428** を既知化合物 (+)-trypethelone methyl ether (**429**) と

Fig. 45. Metabolites **404–424** of Cultured Mycobionts of *Pyrenula* spp.
Asterisks indicate new compounds.

Fig. 46. Metabolites **332** and **425–430** of Cultured Mycobionts of *Haematomma* sp. and *Trypethelium* sp.
Asterisks indicate new compounds.

(+) -sclerodin (**430**) とともに得た。¹²⁷⁾ 1,2-Naphthoquinone-type の代謝物は培養地衣菌から単離された例はあるが、**428** や **430** のような phenalene 化合物が培養地衣菌から単離されたのは最初である (Fig. 46)。

Sarcographa tricola の培養地衣菌からは、新規セスキテルペン 3-*epi*-petasol (**431**), dihydropetasol (**432**), sarcographol (**433**) を既知セスキテルペン **434–439** と ergosterol peroxide (**440**) とともに得た。¹²⁸⁾ また未同定の *Dorygma* sp. の培養地衣菌からは新規セスキテルペン **441–446** と既知化合物 **447** を単離した (Fig. 47)。¹²⁹⁾ Eremophilane 型や angu-

lar triquinane 骨格のセスキテルペンを培養地衣菌から単離した最初の報告である。 *Pseudopyrenula subnudata* の培養地衣菌からは新規ポリケチド **448–453** を得た。これらは菌代謝物 versiol の関連化合物である。この型のヘプタケチドを培養地衣菌から得た最初の例である。¹³⁰⁾

4-2. 地衣菌代謝物の生合成における炭素骨格の起源 地衣類が生産する地衣成分の生合成経路は菌類の代謝物との比較から推定されているが、実際に投与実験や酵素実験により検討した例はごく限られている。これは地衣類の成長が極めて遅いこと、個体も小さく実験材料として十分な量を得ることが

Fig. 47. Metabolites **431–453** of Cultured Mycobionts of *Sarcographa tricos*, *Dorygma* sp. and *Pseudopyrenula subnudata*. Asterisks indicate new compounds.

Fig. 48. Biosynthetic Origin of Graphenone (**454**)

困難なことなどが、生成実験の障害となっているためである。しかし、地衣菌培養では長期間無菌条件下で培養が可能であり、比較的多くの細胞を扱えることから、生成実験には適した実験系であるといえる。そこで、地衣体の典型的な地衣成分ではなく異常な代謝物であるが、炭素骨格の特徴的な化合物を産生する地衣菌に関して、¹³C 標識化合物の投与実験を行い、それら代謝物の炭素骨格の起源を明らかにした。そのうち、2 例について簡単に述べる。

Graphenone の炭素骨格の起源

Graphenone (**454**) は、宮川らにより *Graphis scripta* の培養地衣菌から単離構造決定されており、¹⁰¹⁾ *Graphis handelii* の培養地衣菌も生産することが確認された。そこで、¹³C 標識体を *G. handelii*

の培養地衣菌に投与すると、graphenone の C-4–C-3, C-1'–C-8' の C₁₀ ユニットには酢酸が取り込まれ、C-9' は S-アデノシルメチオニンのメチル基由来であることが明らかとなった。しかし、pyruvate や glycerol は取り込まれず、succinate の標識が graphenone の C-1 に取り込まれたことから、C-1, C-2, C-10' の C₃ ユニットは C₃ の前駆体が直接取り込まれるのではなく、succinate など C₄ 体由来であることが明らかとなった (Fig. 48).¹³¹⁾

Lecanopyrone 合成におけるヘプタケチド鎖の閉環様式

Lecanopyrone (**401**) と類似した骨格を持つ simonyellin は、地衣 *Simonyella variegata* STEINER から単離された化合物で、ヘプタケチドの環化に

Fig. 49. Folding of Heptaketide Chain in the Biosynthesis of Lecanopyrone (401)

よって生成した phenalenone 中間体が、酸化を受け、ついで炭素原子 1 個を失い、最終的に脱水するという推定生合成経路が提出されている。¹³²⁾したがって、lecanopyrone も同様に、ヘプタケチドが **a**, **b**, **c** のいずれかの閉環様式により生じる phenalenone 骨格を経て生合成されと考えられる。そこで、¹³C 標識の酢酸を *Lecanora leprosa* の培養地衣菌への投与実験を行い、**401** は様式 **b** でヘプタケチド閉環後、酸化的な開環の過程を経て生合成されることが明らかとなった (Fig. 49)。¹¹⁹⁾

4.3. 培養地衣菌の代謝物の地衣藻成長阻害活性

地衣成分には抗酸化活性や微生物、高等植物、藻への成長阻害活性があることが報告されている。このような微生物に対するトキシン、あるいは光や酸素のストレスに対する紫外線吸収物質や抗酸化剤としての機能は、地衣の生存にとって重要な生理的意義、生体の化学防御の役割を果たしている可能性が考えられる。しかし、地衣菌は単離培養条件下では、天然の地衣体の地衣成分とは骨格の異なる新規化合物を生産する例が数多く見いだされた。このことから、これら培養地衣菌の代謝物の生理的な意義を検討することは、地衣菌の共生状態における役割及び共生が物質生産に及ぼす影響を考える上で重要である。

Ahmadjian は地衣成分の生合成における共生藻の役割について興味深い仮説を提出している。¹³³⁾一般的なデブシドやデブシドンなどの地衣成分は orsellinic acid を経由した経路で生合成されと考えられるのに対し、菌類では orsellinic acid から脱

炭酸した orcinol を前駆体として生合成されたと考えられる代謝物が多い。このことから地衣菌は本来菌類と同様の化合物を生合成する能力を持っているが、それらには毒性があるために地衣体では共生藻がデカルボキシラーゼ阻害物質を産生し、地衣菌の orsellinic acid のエステル化を優先しているため、デブシドやデブシドンが蓄積するとする説である。地衣菌培養から得たジフェニルエーテル類やジベンゾフラン類は脱炭酸し、カルボキシ基を持たないのであったという点では Ahmadjian の説に符合しており、非常に興味深い結果と言える。

地衣菌培養の代謝物が、地衣成分とは異なり菌代謝物に近いものであったことから、本来地衣菌は菌類と同様の代謝能を持つが、共生状態のときには藻類に不都合な化合物の生産が抑制されているとの考えに基づき、種々の地衣菌代謝物の共生藻の成長に対する影響を検討した。アントラキノン **337**, **338**, **340**, キサントン **391–396**, **404–406**, **408**, グラフィスラクトン類 **343**, **344**, **345**, クロモン **354**, **356**, イソクマリン **361**, **412**, ジベンゾフラン **332**, **390**, **397**, **400**, カルボン酸類 **357**, **359** 及び graphenone (**451**), graphisquinone (**370**) を含む BBM 培地で共生藻 *Trebouxia erici* を振とう培養した。培養地衣菌でのみ生産される異常な代謝物のうち **343**, **361**, **390**, **397**, **400**, **412** は共生藻の成長を約 40–60% に抑制した。この結果より、培養地衣菌の代謝物のうちあるものは共生藻の成長阻害物質であるため、共生体ではその生合成能の発現は抑制されている可能性が示唆された。しかし地衣菌の代謝物でも抑制

しないものもあり、また地衣成分 emodin (337) やキサントン 391-393 は成長を阻害した。地衣類は地衣菌が共生藻と共生しているが、その組み合わせは任意のものではなく、自然界においては特定の組み合わせでのみ共生する。地衣菌の代謝物が共生藻の種間の選別や、共生状態における共生藻の成長の制御に関与している可能性も考えられる。¹³⁴⁾

4-4. 地衣菌単離培養による物質生産の課題と可能性 地球上に広く分布している地衣類はデブシド等の地衣成分を産生することで知られている。地衣成分の構造研究は、わが国における薬学、天然物化学の歴史に大きな位置を占めてきたが、地衣成分は地衣類に特徴的であるゆえに構造上の多様性が乏しいと言える。しかし、地衣類から地衣菌を単離培養することにより種々の二次代謝物の生産が可能である。われわれが培養地衣菌から単離した代謝物の多くは新規化合物で、構造的には従来の地衣成分とは全く異なり、菌代謝物に類似した多様な化合物が得られた。この理由として、「菌の進化過程で共生という生活形態を獲得した地衣菌では、共生藻にとって好ましくない二次代謝物の生合成の発現は抑制されるようになった。しかし、単離培養条件では共生を脱したことにより、内在する休眠二次代謝関連遺伝子が発現してきた」ためと考えられる。したがって、地衣菌の単離培養により潜在的な二次代謝関連遺伝子を発現させることができれば、地衣類は新規生物活性物質の供給源となる可能性がある。しかし、二次代謝物を生産しない培養地衣菌株も多く、いかにしてこれら地衣菌の休眠遺伝子を高発現させて、有用な二次代謝物の生産を実現させるかが課題である。最近のゲノム解析により、糸状菌には、これまで単離同定された二次代謝物から予測される数より遥かに多くの生合成遺伝子が存在しており、その多くが休眠遺伝子と考えられている。そのため、エピジェネティック制御により休眠遺伝子の発現を活性化し、新規有用物質の探索につなげる研究が行われている。¹³⁵⁾ このエピジェネティック制御を地衣菌培養に効果的に応用できれば、新たな物質生産につながることを期待できる。しかし、現在までのところ、筆者らの実験から良好な結果は得られていない。地衣体と同様に地衣菌も生育が遅いことが障害で、今後は最適な培養条件の検討と、転写活性を適切に制御する添加薬物の選択が課題であ

る。有用な代謝物が発見できれば、分子生物学的手法による微生物異種発現系を用いた生合成系の構築への展開が望まれる。また最近、多くの地衣菌及び藻類の遺伝子の発現が地衣化により抑制されることが報告され、遺伝子の発現の抑制が地衣化のプロセスで重要な役割を果たす可能性が示唆されているが、どのような遺伝子が関与しているかは明らかにされていない。今後、地衣菌、共生藻のゲノムや遺伝子発現の情報の解明は、物質生産のみならず共生生物学にとって重要な課題であろう。

5. おわりに

天然薬用資源は、創薬の歴史において数多くの薬の種を供給し、天然物化学は薬学の中で重要な位置を占めてきた。しかし、近年、天然物化学分野の研究内容、方法論は大きく変化している。筆者が天然物化学の研究を開始した当時は、研究室に HPLC は 1 台もなく、NMR も 60 MHz が主流で、二次代謝物の生合成研究も放射性標識化合物を用いた投与実験を行っていた。その後、分離技術や機器分析の飛躍的な進歩により、構造解析技術も大きく変化し、また生合成研究も、酵素レベルの研究さらには網羅的な遺伝子解析により二次代謝の制御の原理を解明しようとする段階に移行している。筆者は、二次代謝物の生合成研究を意識しつつも、二次代謝物の構造解析を中心に研究を行ってきた。二次代謝物の多様性を知ることは、生合成研究において重要な情報、試料を提供し、また、新たな生物活性物質の発見にもつながると期待したからである。天然有機化合物は、人知を超えた構造の新規性、多様性があり、また生命活動と深く関わっている。今後も天然物化学の研究が、複数の異なる分野との緊密な連携をとりながら、新たな創薬研究へと展開し、また生命活動のダイナミズムに迫るために更なる発展をしていくことを期待している。

謝辞 神戸薬科大学在職中、終始多大なるご指導、ご支援を頂きました永倉直敬元学長に深く感謝申し上げます。また、これまで研究に携わってこられたのは、故井上博之教授、故 M. H. Zenk 教授の薫陶の賜物と心より感謝するとともに、ご冥福をお祈り致します。また在職中の研究成果は、薬化学研究室の竹仲由希子准教授、西村克己講師、旧研究室員の伊藤篤子元講師、島田厚子元助手、神前祥子元

助手及び多くの大学院生、学部学生の努力によるものであります。ここに厚く御礼を申し上げます。さらに、種々のご協力を頂きました国内外の大学や企業の多くの共同研究者に深甚の謝意を表します。また本研究の一部は、文部科学省科学研究費、神戸薬科大学共同研究費の支援により遂行したものです。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Inouye H., Uesato S., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **50**, 171–236 (1986).
- 2) Battersby A. R., *Pure Appl. Chem.*, **14**, 117–136 (1967).
- 3) Battersby A. R., Westcoltt N. D., Glüsenkamp K.-H., Tietze L.-F., *Chem. Ber.*, **114**, 3439–3447 (1981).
- 4) Inoue K., Takeda Y., Tanahashi T., Inouye H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 981–990 (1981).
- 5) Yamamoto H., Katano N., Ooi A., Inoue K., *Phytochemistry*, **53**, 7–12 (2000).
- 6) Battersby A. R., Burnett A. R., Parsons, P. G., *J. Chem. Soc. C*, 1187–1192 (1969).
- 7) Battersby A. R., Parry R. J., *Chem. Commun.*, 901–902 (1971).
- 8) Nagakura N., Höfle G., Zenk M. H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 896–898 (1978).
- 9) Nagakura N., Höfle G., Coggiola D., Zenk M. H., *Planta Med.*, **34**, 381–389 (1978).
- 10) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 1137–1139 (1989).
- 11) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **30**, 3117–3123 (1991).
- 12) Nagakura N., Itoh A., Tanahashi T., *Phytochemistry*, **32**, 761–765 (1993).
- 13) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., Nayeshiro H., *Phytochemistry*, **36**, 383–387 (1994).
- 14) Itoh A., Baba Y., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **59**, 91–97 (2002).
- 15) Itoh A., Ikuta Y., Baba Y., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **52**, 1169–1176 (1999).
- 16) Höfle G., Nagakura N., Zenk M. H., *Chem. Ber.*, **113**, 566–576 (1980).
- 17) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2208–2210 (1994).
- 18) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *J. Nat. Prod.*, **58**, 1228–1239 (1995).
- 19) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **41**, 651–656 (1996).
- 20) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **46**, 1225–1229 (1997).
- 21) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Heterocycles*, **48**, 499–505 (1998).
- 22) Itoh A., Tanahashi T., Tabata M., Shikata M., Kakite M., Nagai M., Nagakura N., *Phytochemistry*, **56**, 623–630 (2001).
- 23) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **31**, 1037–1040 (1992).
- 24) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **33**, 161–164 (1993).
- 25) Tanahashi T., Kobayashi C., Itoh A., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Wu H.-X., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 415–419 (2000).
- 26) Itoh A., Tanahashi T., Ikejima S. (née Sato), Inoue M., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Wu H.-X., *J. Nat. Prod.*, **63**, 95–98 (2000).
- 27) Wiegrebbe W., Kramer W. J., Shamma M., *J. Nat. Prod.*, **47**, 397–408 (1984).
- 28) Itoh A., Ikuta Y., Tanahashi T., Nagakura N., *J. Nat. Prod.*, **63**, 723–725 (2000).
- 29) De-Ekunamkul W., Ounaroorn A., Tanahashi T., Kutchan T. M., Zenk M. H., *Phytochemistry*, **45**, 477–484 (1997).
- 30) De-Ekunamkul W., Suttipanta N., Kutchan T. M., *Phytochemistry*, **55**, 177–181 (2000).
- 31) Nomura T., Quesada A. L., Kutchan T. M., *J. Biol. Chem.*, **283**, 34650–34659 (2008).
- 32) Nomura T., Kutchan T. M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 7722–7738 (2010).
- 33) De-Ekunamkul W., Zenk M. H., *Phytochemistry*, **31**, 813–821 (1992).
- 34) Jain S., Chaudhary P. N., Gawade V. B., *Scientific World*, **10**, 2304–2328 (2012).
- 35) Pakrashi S. C., Mukhopadhyay R., Sinha R. R., Ghosh Dastidar P. P., Achari B., Ali E., *Indian J. Chem.*, **24B**, 19–28 (1985).
- 36) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., *J. Nat. Prod.*, **59**, 535–538 (1996).
- 37) Itoh A., Tanahashi T., Nagakura N., Nishi T., *Phytochemistry*, **62**, 359–369 (2003).
- 38) Itoh A., Fujii K., Tomatsu S., Takao C.,

- Tanahashi T., Nagakura N., Chen C.-C., *J. Nat. Prod.*, **66**, 1212–1216 (2003).
- 39) Tanahashi T., Takenaka Y., Kobayashi C., Watsuji J., Nagakura N., Chen C.-C., *Natural Medicines*, **51**, 556 (1997).
- 40) Itoh A., Oya N., Kawaguchi E., Nishio S., Tanaka Y., Kawachi E., Nishi T., Tanahashi T., *J. Nat. Prod.*, **68**, 1434–1436 (2005).
- 41) Itoh A., Tanaka Y., Nagakura N., Akita T., Nishi T., Tanahashi T., *Phytochemistry*, **69**, 1208–1214 (2008).
- 42) Tietze L. F., Bärtels C., *Liebigs Ann. Chem.*, 155–160 (1991).
- 43) Itoh A., Kumashiro T., Yamaguchi M., Nagakura N., Mizushima Y., Nishi T., Tanahashi T., *J. Nat. Prod.*, **68**, 848–852 (2005).
- 44) Jensen S. R., Franzky H., Wallander E., *Phytochemistry*, **60**, 213–231 (2002).
- 45) Tanahashi T., Watanabe H., Itoh A., Nagakura N., Inoue K., Ono M., Fujita T., Chen C.-C., *Phytochemistry*, **31**, 2143–2145 (1992).
- 46) Tanahashi T., Watanabe H., Itoh A., Nagakura N., Inoue K., Ono M., Fujita T., Morita M., Chen C.-C., *Phytochemistry*, **32**, 133–136 (1993).
- 47) Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Takaishi K., Chen C.-C., *Phytochemistry*, **33**, 397–400 (1993).
- 48) Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Takaishi K., Chen C.-C., He Z.-D., Yang C.-R., *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1649–1651 (1993).
- 49) Tanahashi T., Parida, Takenaka Y., Nagakura N., Inoue K., Kuwajima H., Chen C.-C., *Phytochemistry*, **49**, 1333–1337 (1998).
- 50) Takenaka Y., Okamoto A., Hirose H., Tanahashi T., Abstracts of papers, the 136th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan, Yokohama, March 2016, No.2, p. 216.
- 51) Takenaka Y., Tanahashi T., Shintaku M., Sakai T., Nagakura N., Parida, *Phytochemistry*, **55**, 275–284 (2000).
- 52) Takenaka Y., Okazaki N., Tanahashi T., Nagakura N., Nishi T., *Phytochemistry*, **59**, 779–787 (2002).
- 53) Tanahashi T., Sakai T., Takenaka Y., Nagakura N., Chen C.-C., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1582–1586 (1999).
- 54) Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N., Noyeshiro H., *Planta Med.*, **58**, 552–555 (1992).
- 55) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., *Phytochemistry*, **41**, 1341–1345 (1996).
- 56) Tanahashi T., Takenaka Y., Akimoto M., Okuda A., Kusunoki Y., Suekawa C., Nagakura N., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 367–372 (1997).
- 57) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., *Phytochemistry*, **48**, 317–322 (1998).
- 58) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., *J. Nat. Prod.*, **60**, 514–518 (1997).
- 59) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1776–1780 (1998).
- 60) Tanahashi T., Shimada A., Nagakura N., Inoue K., Ono M., Fujita T., Chen C.-C., *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 729–733 (1995).
- 61) Tanahashi T., Shimada A., Kai M., Nagakura N., Inoue K., Chen C.-C., *J. Nat. Prod.*, **59**, 798–800 (1996).
- 62) Kamikawa T., Inoue K., Kubota T., Woods M. C., *Tetrahedron*, **26**, 4561–4587 (1970).
- 63) Inoue K., Tanahashi T., Inouye H., *Phytochemistry*, **24**, 1299–1303 (1985).
- 64) Tanahashi T., Nagakura N., Kuwajima H., Takaishi K., Inoue K., Inouye H., *Phytochemistry*, **28**, 1413–1415 (1989).
- 65) Inoue K., Fujita T., Inouye H., Kuwajima H., Takaishi K., Tanahashi T., Nagakura N., Asaka Y., Kamikawa T., Shingu T., *Phytochemistry*, **30**, 1191–1201 (1991).
- 66) Tanahashi T., Nagakura N., Inoue K., Inouye H., *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1793–1796 (1988).
- 67) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Nishi T., *J. Nat. Prod.*, **62**, 1311–1315 (1999).
- 68) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Nishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1200–1204 (2000).
- 69) Takenaka Y., Tanahashi T., Taguchi H., Nagakura N., Nishi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 384–389 (2002).
- 70) Tanahashi T., Nagakura N., Inoue K., Inouye H., Shingu T., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 5032–5035 (1987).
- 71) Tanahashi T., Takenaka Y., Okazaki N., Koge M., Nagakura N., Nishi T., *Phytochemistry*, **70**, 2072–2077 (2009).
- 72) Shen Y.-C., Chen C.-H., *J. Nat. Prod.*, **52**,

- 1060–1070 (1989).
- 73) Gariboldi P., Jommi G., Verotta L., *Phytochemistry*, **25**, 865–869 (1986).
- 74) Inoue K., Nishioka T., Tanahashi T., Inouye H., *Phytochemistry*, **21**, 2305–2311 (1982).
- 75) Kuwajima H., Tanahashi T., Inoue K., Inouye H., *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1634–1637 (1999).
- 76) Alagna F., Geu-Flores F., Kries H., Panara F., Baldoni L., O'Connor S. E., Osbourn A., *J. Biol. Chem.*, **291**, 5542–5554 (2016).
- 77) Takao N., Kamigauchi M., Okada M., *Helv. Chim. Acta*, **66**, 473–484 (1983).
- 78) Kutchan T. M., Dittrich H., Bracher D., Zenk M. H., *Tetrahedron*, **47**, 5945–5954 (1991).
- 79) Tanahashi T., Zenk M. H., *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5625–5628 (1988).
- 80) Tanahashi T., Zenk M. H., *Phytochemistry*, **29**, 1113–1122 (1990).
- 81) Schumacher H.-M., Gundlach H., Fiedler F., Zenk M. H., *Plant Cell Rep.*, **6**, 410–413 (1987).
- 82) Tanahashi T., Zenk M. H., *J. Nat. Prod.*, **53**, 579–586 (1990).
- 83) De-Eknamkul W., Tanahashi T., Zenk M. H., *Phytochemistry*, **31**, 2713–2717 (1992).
- 84) Kammerer L., De-Eknamkul W., Zenk M. H., *Phytochemistry*, **36**, 1409–1416 (1994).
- 85) Schumacher H.-M., Zenk M. H., *Plant Cell Rep.*, **7**, 43–46 (1988).
- 86) Takemura T., Ikezawa N., Iwasa K., Sato F., *Phytochemistry*, **91**, 100–108 (2013).
- 87) Buck K. T., “The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology,” Vol. 30, Chap. 1, ed. by Brossi A., Academic Press, San Diego, 1987, pp. 1–222.
- 88) Tanahashi T., Su Y., Nagakura N., Nayeshiro H., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 370–373 (2000).
- 89) Nakaoji K., Nayeshiro H., Tanahashi T., Su Y., Nagakura N., *Planta Med.*, **63**, 425–428 (1997).
- 90) Nakaoji K., Nayeshiro H., Tanahashi T., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 586–588 (1997).
- 91) Sugimoto Y., Furutani S., Itoh A., Tanahashi T., Nakajima H., Oshiro H., Sun S., Yamada J., *Phytomedicine*, **15**, 1117–1124 (2008).
- 92) Itoh A., Saitoh T., Tani K., Uchigaki M., Sugimoto Y., Yamada J., Nakajima H., Oshiro H., Sun S., Tanahashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **59**, 947–951 (2011).
- 93) Nishimura K., Horii S., Tanahashi T., Sugimoto Y., Yamada J., *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 59–68 (2013).
- 94) Sugimoto Y., Furutani S., Nishimura K., Itoh A., Tanahashi T., Nakajima H., Oshiro H., Sun S., Yamada J., *Eur. J. Pharmacol.*, **634**, 62–67 (2010).
- 95) Sugimoto Y., Nishimura K., Itoh A., Tanahashi T., Nakajima H., Oshiro H., Sun S., Toda T., Yamada J., *J. Pharm. Pharmacol.*, **67**, 1716–1722 (2015).
- 96) Asahina Y., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **8**, 207–244 (1951).
- 97) Huneck S., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **81**, 1–313 (2001).
- 98) Yamamoto Y., *Chemical Regulation of Plants*, **35**, 169–179 (2000).
- 99) Shukla V., Joshi G. P., Rawat M. S. M., *Phytochem. Rev.*, **9**, 303–314 (2010).
- 100) Ahmadian V., “The Lichen Symbiosis,” John Wiley and Sons, Inc., New York, 1993.
- 101) Miyagawa H., Hamada N., Sato M., Ueno T., *Phytochemistry*, **36**, 1319–1322 (1994).
- 102) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Hamada N., *Lichenology*, **1**, 7–10 (2002).
- 103) Tanahashi T., Kuroishi M., Kuwahara A., Nagakura N., Hamada N., *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1183–1185 (1997).
- 104) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N., *Phytochemistry*, **62**, 71–75 (2003).
- 105) Hamada N., Tanahashi T., Miyagawa H., Miyawaki H., *Symbiosis*, **31**, 23–33 (2001).
- 106) Höller U., König G. M., Wright A. D., *Eur. J. Org. Chem.*, 2949–2955 (1999).
- 107) Zhang H.-W., Huang W.-Y., Song Y.-C., Chen J.-R., Tan R.-X., *Helv. Chim. Acta*, **88**, 2861–2864 (2005).
- 108) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Hamada N., *Heterocycles*, **53**, 1589–1593 (2000).
- 109) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **89**, 2760–2770 (2014).
- 110) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Hamada N., *Natural Medicines*, **57**, 34 (2003).
- 111) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N., Miyawaki H., *Heterocycles*, **53**,

- 723–728 (2000).
- 112) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Hamada N., *Chem. Pharm. Bull.*, **51**, 794–797 (2003).
- 113) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **83**, 2157–2164 (2011).
- 114) Takenaka Y., Morimoto, N., Hamada N., Tanahashi T., *Phytochemistry*, **72**, 1431–1435 (2011).
- 115) Le D. H., Takenaka Y., Hamada N., Miyawaki H., Tanahashi T., *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 358–362 (2013).
- 116) Takenaka Y., Taguchi S., Le D. H., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **87**, 2651–2657 (2013).
- 117) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Phytochemistry*, **66**, 665–668 (2005).
- 118) Tanahashi T., Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N., *Phytochemistry*, **58**, 1129–1134 (2001).
- 119) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Z. Naturforsch.*, **65c**, 637–641 (2010).
- 120) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Z. Naturforsch.*, **60b**, 1324–1326 (2005).
- 121) Tanahashi T., Takenaka Y., Ikuta Y., Tani K., Nagakura N., Hamada N., *Phytochemistry*, **52**, 401–405 (1999).
- 122) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Hamada N., *Z. Naturforsch.*, **55c**, 910–914 (2000).
- 123) Takenaka Y., Nagakura N., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **81**, 1931–1935 (2010).
- 124) Takenaka Y., Tanahashi T., Nagakura N., Itoh A., Hamada N., *Phytochemistry*, **65**, 3119–3123 (2004).
- 125) Le D. H., Takenaka Y., Hamada N., Mizushima Y., Tanahashi T., *J. Nat. Prod.*, **77**, 1404–1412 (2014).
- 126) Takenaka Y., Mizushima Y., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **94**, 1728–1735 (2017).
- 127) Takenaka Y., Naito Y., Le D. H., Hamada N., Tanahashi T., *Heterocycles*, **87**, 1897–1902 (2013).
- 128) Le D. H., Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Phytochemistry*, **91**, 242–248 (2013).
- 129) Tanahashi T., Takenaka Y., Abstract Book, the 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Reserch, Budapest, August 2015, p. 147.
- 130) Takenaka Y., Tanahashi T., Abstract Book, the 63rd International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Reserch, Budapest, August 2015, p. 332.
- 131) Takenaka Y., Hamada N., Tanahashi T., *Z. Naturforsch.*, **63c**, 565–568 (2008).
- 132) Elix J. A., Feige G. B., Lumbsch H. T., Mies B., Wardlaw J. H., Willis A. C., *Aust. J. Chem.*, **48**, 2035–2039 (1995).
- 133) Curberson C. F., Ahmadjian V., *Mycologia*, **72**, 90–109 (1980).
- 134) Takenaka Y., Tanahashi T., Hamada N., *Lichenology*, **7**, 153–158 (2008).
- 135) Cichewiz R. H., *Nat. Prod. Rep.*, **27**, 11–22 (2010).