

プレニールフラボノイドの化学と生合成

野村 太郎

東邦大学薬学部, 〒274-8510 船橋市三山 2-2-1

Chemistry and Biosynthesis of Prenylflavonoids

Taro NOMURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi 274-8510, Japan

(Received April 19, 2001)

Many isoprenylated flavonoids have been isolated from mulberry trees and related plants (Moraceae). Among them, kuwanons G (13) and H (14) were the first isolated active substances exhibiting a hypotensive effect from the Japanese *Morus* root bark. These compounds are considered to be formed through an enzymatic Diels-Alder reaction of a chalcone (15) and dehydro-kuwanon C (16) or its equivalent. Since that time, about forty kinds of Diels-Alder type adducts structurally similar to that of 13 have been isolated from the moraceous plants. Some strains of *Morus alba* as well as *M. bombycis* callus tissues have a high productivity of mulberry Diels-Alder type adducts, such as chalcomoracin (26) and kuwanon J (28). The biosynthesis of the mulberry Diels-Alder type adducts has been studied with the aid of the cell strain. Chalcomoracin (26) and kuwanon J (28) were proved to be enzymatic Diels-Alder type reaction products by the administration experiment with *O*-methylchalcone derivatives. Furthermore, for the isoprenoid biosynthesis of prenylflavonoids in *Morus alba* callus tissues, a novel way through the junction of glycolysis and pentose-phosphate cycle was proposed. The crude enzyme fraction catalyzing the *Morus* Diels-Alder type reaction could be isolated. Studies of phenolic constituents of licorice (*Glycyrrhiza* species) were carried out. On the course of the structure determination of the phenolic constituents of licorice, two new NMR structure determination methods for prenylflavonoids were found. Furthermore, the prenylphenols isolated from licorice were summarized according to the origin of the materials.

Key words—prenylflavonoid; biosynthesis; mulberry tree; Diels-Alder type adduct; licorice

1. はじめに

従来のフラボノイドの定義は3環性で4位がオキソ構造を持つフラボン、フラボノール、フラバノン、フラバノノール、イソフラボンなどを指す場合が多いが、最近ではアントシアニジン、プロアントシアニジン、フラバン、カテキンをはじめとする4位がオキソ構造を持たないタイプや2環性のカルコンやイソフラボン系化合物であるロテノイド、3-アリアルクマリル、さらに2-アリアルベンゾフラン骨格を有する化合物も含めてフラボノイドに分類されている。¹⁾我々はさらに拡大し、シンナモイルポリケチド経路で生合成されるスチルベン化合物²⁾もフラボノイドに分類されるものと考え取り扱っている。プレニールフラボノイドは上記のフラボノイド骨格にイソプレノイド側鎖の結合した化合物の総称である。我々のプレニールフラボノイドの研究は桑白皮 (*Mori Cortex*) エキス中の血圧下降成分の研

究よりスタートしたが、本総説では研究の経緯を概説する。

2. クワ科植物より得られる Diels-Alder 型付加化合物の構造研究

カイコの飼料として広く栽培されるクワの根皮は桑白皮又は桑根白皮と呼ばれ神農本草経の中品に収載されている漢方の要薬の1つである。その薬効としては消炎、利尿、鎮咳去痰などが知られ、用いられる漢方処方での適応症としては五虎湯等の呼吸器疾患及び疎風利水湯等の腎疾患の2つのグループに大別できる。しかし、薬理学的な研究は我々が研究を開始する以前においては血圧下降作用との関連においてなされた研究が多い。すなわち、1938年福留により桑樹の抽出エキスが家兎に対し血圧下降作用を示すとの報告に始まり、大石、鈴木、片柳らの報告により、活性成分はエーテル等で抽出される比較的不安定なフェノール性成分であろうと推定され

た.³⁾ 筆者らは桑根皮（生葉のみでなく広く根皮を意味する）のフェノール性成分の物理化学的諸性質を明らかにすることは活性成分検索への一方法と考え研究を開始した。

2-1. プレニールフラボノイドの研究 桑白皮のフェノール性成分としては Venkataraman などによるインド産 *Morus alba* より mulberrin (**1**), mulberrochromene (**2**) などの一連のプレニールフラボノイドの報告がある。それらの構造は tetrahydro-mulberrin (**1a**) への誘導により決定された。**1a** の構造は既に合成されている artocarpin (**3**) の還元体 (**3a**) のヨウ化水素酸による脱メチル化体 (**1a**) と一致することから、それらの構造は提出された (Fig. 1).⁴⁾

一方、筆者は morusin (**4**), kuwanon C (**5**) を始めイソプレノイド側鎖を有する多数のフラボノイドを分離した。代表的化合物を列挙する (Fig. 2).^{3,5)}

桑根皮より得られる一連のプレニールフラボノイドの特徴は B 環の置換様式は 2', 4' 位が酸素置換され、3 位にプレニール基の置換された化合物が多いことである。

Morusin (**4**), kuwanon C (**5**) が 8 位に置換基を有するのに対し、mulberrin (**1**) 及び mulberrochromene (**2**) は 6 位置換体である。**4, 5** は化学的に構造が確定している **5b** に関連付けられ、それらの構造は確定された (Fig. 2).⁶⁾ 一方、**1** と **5, 2** と **4** は同一物質であることが明らかとなり、mulberrin, mulberrochromene などの構造は訂正された。⁷⁾ これらの誤った構造が提出された理由は **3a** の脱メチル

化の際、Wessely-Moser (W.-M.) 転位が起こり **1a** より **5a** に一方的に誘導されたことによると推定された。⁸⁾ W.-M. 転位反応はフラボン（クロモン）誘導体に特有の反応であり、酸性条件下、フラビリウムカチオン、ジケトン体を経て進行し、6 位置換体より 8 位置換体が転位生成物として得られる (Fig. 3).⁹⁾ Artocarpin (**3**) の場合のように 8 位置換体への優先的な転位について速度論的な立場から検討を行い、立体的効果による 8 位置換体と 6 位置換体のフラビリウムカチオン中間体の安定性の相違により平衡の偏りが生じることを明らかにした。¹⁰⁾

Morusin (**4**) の構造研究の過程で興味ある光化学反応に遭遇した。すなわち、**4** のクロロホルム溶液を光照射すれば hydroperoxide (**12**) をほぼ定量的に生成する。さらに、**7** も副生する。この反応は溶媒依存性が高く、ベンゼン、クロロホルム中では進行するが、メタノール、アセトン中では進行しない。反応機構は基底状態で **4** と酸素とで弱い電荷移動錯体を形成し、光吸収後、励起複合体を経由して反応が進行する機構で実験結果の説明はできた (Fig. 4).¹¹⁾ 上記錯体の証明は最近マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI)-TOF-MS スペクトルにおいて対応するイオン ($[\text{MH} + \text{O}_2]^+$, m/z 453) が観測された。錯体の生成は **4** の X 線結晶構造解析により、B 環が γ -ピロン環に対しほぼ垂直にねじれていることから、3 位のプレニール基と B 環との間にオキシジェンポケットが生成することによると推定された。上記の光酸化反応の結果は、**4** の抗発がんプロモーター活性を見出すヒントと

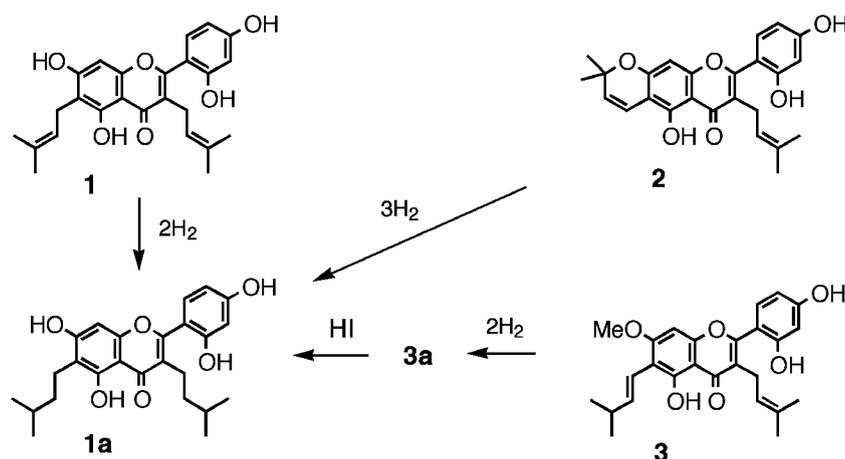


Fig. 1. Chemical Correlation between Prenylflavonoids (Venkataraman et al).

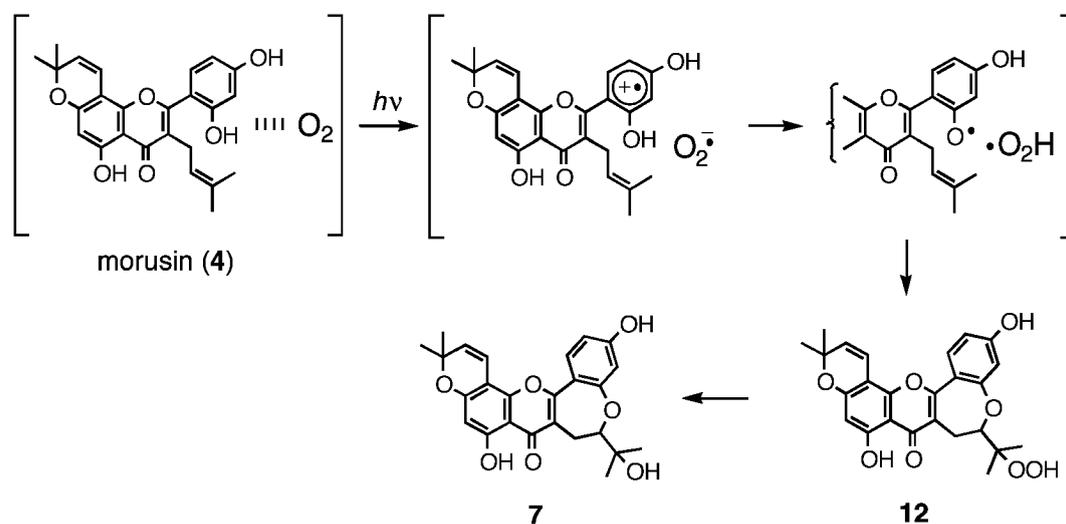


Fig. 4. A Photo-Reaction Mechanism of Morusin (4)

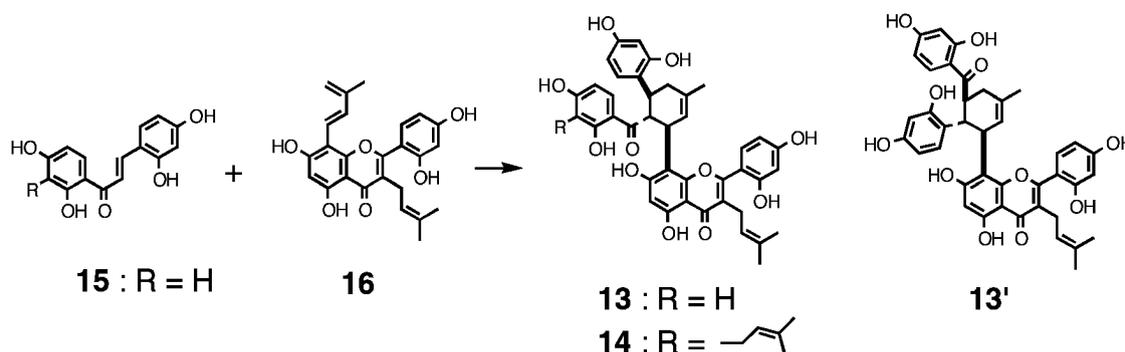


Fig. 5. A Hypothesis of the Biosynthesis of Kuwanon G (13)

された。特に大きな旋光度, $[\alpha]_{\text{D}}^{-543^\circ}$, を示す。各種スペクトルデータ及び熱分解反応より **13** 式が推定された。その構造式より, 2,2',4,4'-tetrahydrochalcone (**15**) の α , β -不飽和二重結合を dienophile とし, **5** の脱水素体 (**16**) を diene とする $[4\pi+2\pi]$ 付加反応により生成した分子間 Diels-Alder 型付加反応体と見なし得る化合物である。しかし, 付加の配向性は逆のタイプもあることより, **13'** の構造も否定できない。付加の配向性をより明確にするため, 以下のモデル反応を行った。すなわち, *trans*-chalcone (**17**) と 3-methyl-1-phenyl-1,3-butadiene (**18**) との $[4\pi+2\pi]$ 付加反応を行ったところ, 2 種の付加体, **19** と **20** のみが得られ, 構造は X 線結晶構造解析により決定した。両者の methylcyclohexene 環上の 3 置換基の相対配位は **19** では *all-trans* の関係にあり, **20** では *cis-trans* の関係にある (Fig. 6)。したがって, kuwanon G 及び

H は各々 **13**, **14** であることが相対配置を含めて支持された。この時点では生体内における Diels-Alder 反応の存在は推定されており, 同付加反応により生成したと推定される化合物は報告されていたが, それを実証した例は皆無であった。**13**, **14** は植物成分としては最初の光学活性分子間 Diels-Alder 型付加化合物と推定し, 以下の部分合成を含めた構造の確認を北海道大学正宗直教授らのグループとの共同研究で行った。¹⁷⁾

Kuwanon G octamethyl ether (**13a**) の熱分解により得られた chalcone (**15a**) と dehydrokuwanon C tetramethyl ether (**16a**) の構造を化学的に確認後, 両者の付加反応を 2,6-di-*tert*-butyl-*p*-cresol 存在下で行い, 2 種の付加体 (±)-**13a** と **21** が各々 35% と 32% の収率で得られた。前者は (±)-kuwanon G octamethyl ether (**13a**) であることが天然品との比較により確認された (Fig. 7)。Kuwanon H (**14**)

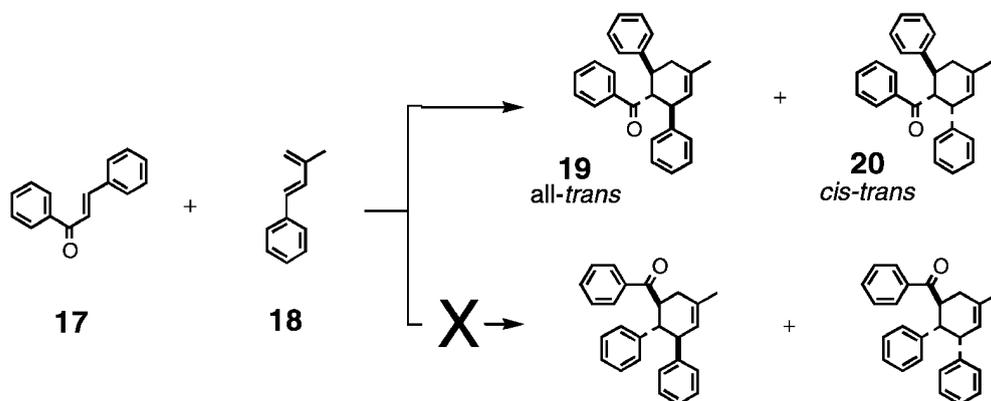
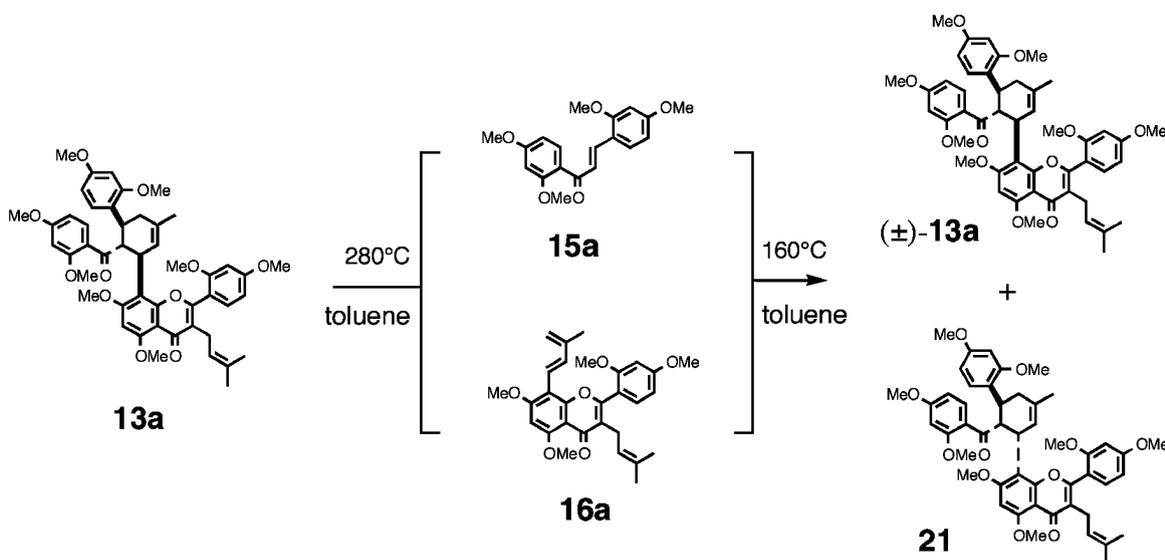


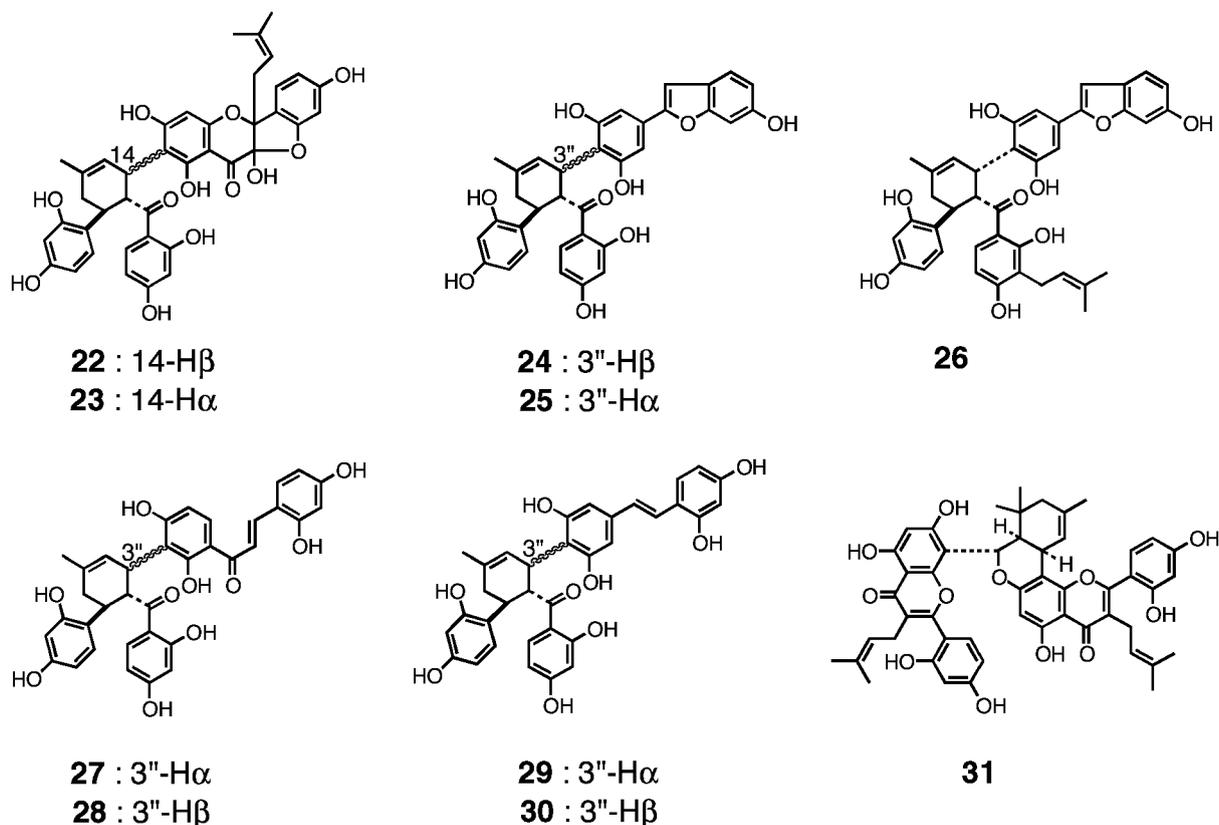
Fig. 6. Model Synthesis by Diels-Alder Reaction

Fig. 7. Pyrolysis of Kuwanon G Octamethyl Ether (**13a**) and Reconstruction of (±)-**13a** through Diels-Alder Reaction

についても octamethyl ether (**14a**) につき同様な反応を行い、同様な結果を得た。付加反応の regioselectivity については先のモデル実験の結果より明らかであり、kuwanon G, H の構造は絶対構造を除いて決定され、部分合成に成功した。

2-3. クワ科植物より得られる Diels-Alder 型付加化合物^{3,18-20} Kuwanon G (**13**) の構造決定後、*Morus* 属などのクワ科植物から多数の同付加体と考えられる化合物が得られ、約 50 種に達している。これらの付加体は dehydroprenyl-phenol と chalcone との付加体と見なし得る構造を有するが、次の 5 種のグループに大別される。1) dehydroprenyl-flavonoid と chalcone, 2) dehydroprenyl-2-arylbenzofuran と chalcone, 3) dehydroprenylchalcone と

chalcone, 4) dehydroprenylstilbene と chalcone, 5) 2 モルの dehydroprenylflavone である。代表的な化合物としては 1) のタイプの化合物では kuwanon G (**13**), H (**14**) をはじめ sanggenon C (**22**), D (**23**) などがある。²¹ 2) のタイプとしては mulberofuran C (**24**), J (**25**), chalomoracin (**26**)²² が、3) のタイプとしては kuwanon I (**27**), J (**28**) が、4) のタイプとしては kuwanon X (**29**), Y (**30**) が、また 5) のタイプとしては kuwanon M (**31**) が報告されている (Fig. 8)。興味ある点は、**22** と **23**, **24** と **25**, **27** と **28**, **29** と **30** に見られるように all-trans タイプと cis-trans タイプの一对の化合物が得られたことである。この結果は前述の Diels-Alder 反応のモデル反応における 2 種の付加体生成の例に一致する。以上

Fig. 8. Typical Diels-Alder Type Adducts from *Morus* Root Bark

の知見は、クワ科植物より得られる一連の Diels-Alder 型付加体は chalcone と dehydroprenylphenol との $[4\pi+2\pi]$ の付加環化反応を経て生合成されることを示唆する。これらの付加体は *Morus* 属植物の特徴的な成分と考えていたが、その後、約 10 種の同型付加体がクワ科の他の属の植物から報告されている。

2-4. Diels-Alder 型付加化合物の絶対構造³⁾

クワ科の Diels-Alder 型付加体は methylcyclohexene 環上の 3 種の置換基の相対配置が *all-trans* 型と *cis-trans* 型 2 種に分けられ、前者は *exo*-付加反応で、後者は *endo*-付加反応で生成すると考えられる。まず、絶対構造の決定を 3 種の異なる方法により行い、同一の結論に到達したが、本総説では 2 種の方法を記述する。円二色性 (CD) スペクトルの励起子カイラリティ法を用いた。^{23,24)} Mulberrofuran C (24) と J (25) は methylcyclohexene 環上の置換基が *cis-trans* 型と *all-trans* 型の関係にある。両者の CD スペクトルは benzoyl 発色団と 2-arylbenzofuran 発色団の励起子相互作用により生じた Cotton 効果と考えられる (Fig. 9)。この点を証明するた

め、24, 25 の還元体, dihydromulberrofuran C (24a), J (25a) に誘導した。各々の CD スペクトルの Cotton 効果は消失し、2-arylbenzofuran の結合位 (C-3'') のカイラリティの相違による対称のスペクトルを示した (Fig. 9)。以上より、Fig. 9 で見られた Cotton 効果は benzoyl と 2-arylbenzofuran の 2 つの発色団の相互作用に因るとともに、C-3'' 位の絶対構造が 24 と 25 とでは反転していることが明らかとなった。また、24, 25 両者ともに CD スペクトルは正の Cotton 効果を示すことより、励起子カイラリティ則を適用すれば、methylcyclohexene 環の絶対構造は各々 3''S, 4''R, 5''S と 3''R, 4''R, 5''S であることが示された。第 2 の方法は mulberrofuran C (24) を酸で処理し、ケタール体 mulberrofuran G (32) に誘導後、pentamethyl ether (32a) の X 線結晶構造解析で相対構造を決定した。32a のブロム化、DDQ 処理を経て 33 に誘導した。同化合物の X 線結晶構造解析により C-8'' 位は R と決定した (Fig. 10)。したがって、24 の methylcyclohexene 環の絶対構造は先の CD スペクトル結果と同一の 3''S, 4''R, 5''S と決定された。クワ科植物から得られる

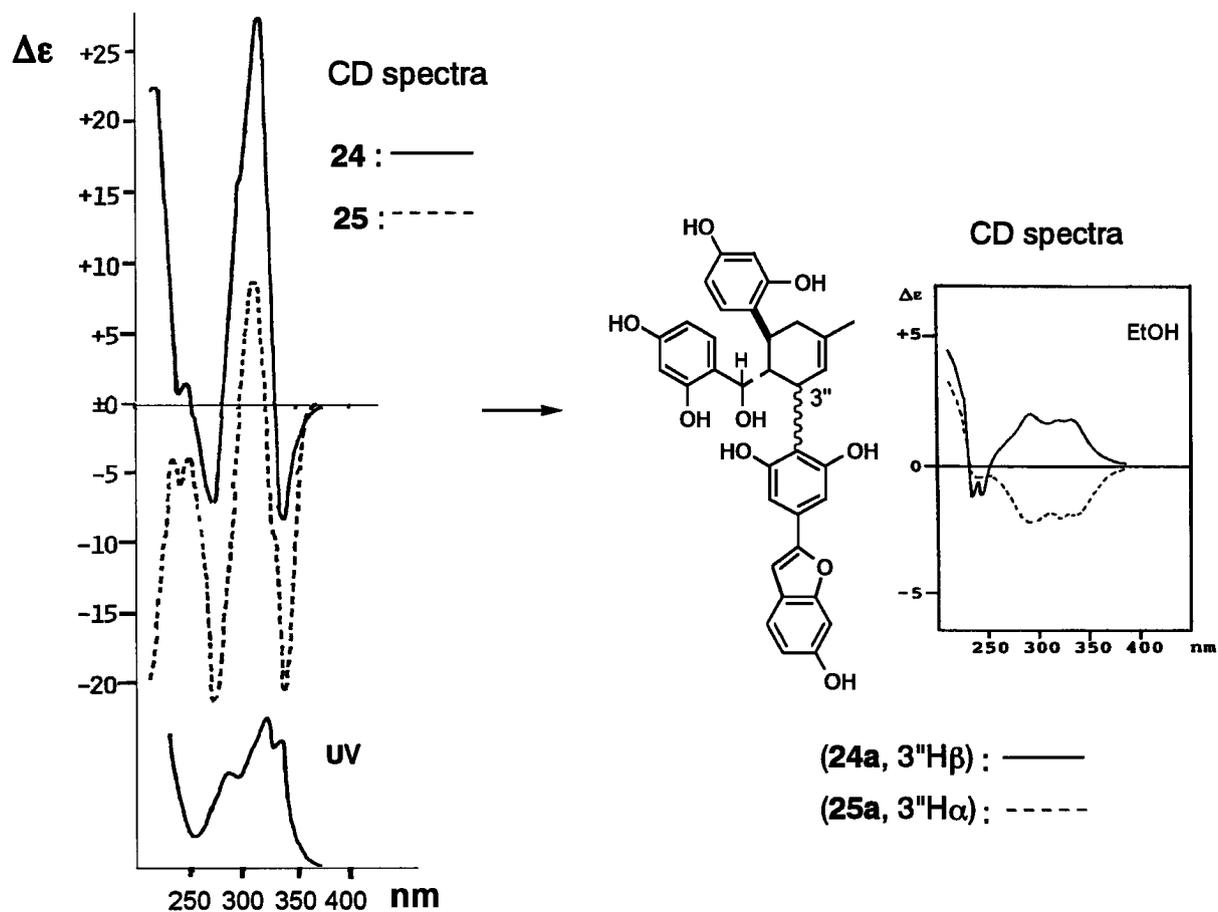


Fig. 9. CD Spectra of Mulberrofurans C (24), J (25), Dihydromulberrofurans C (24a) and J (25a)

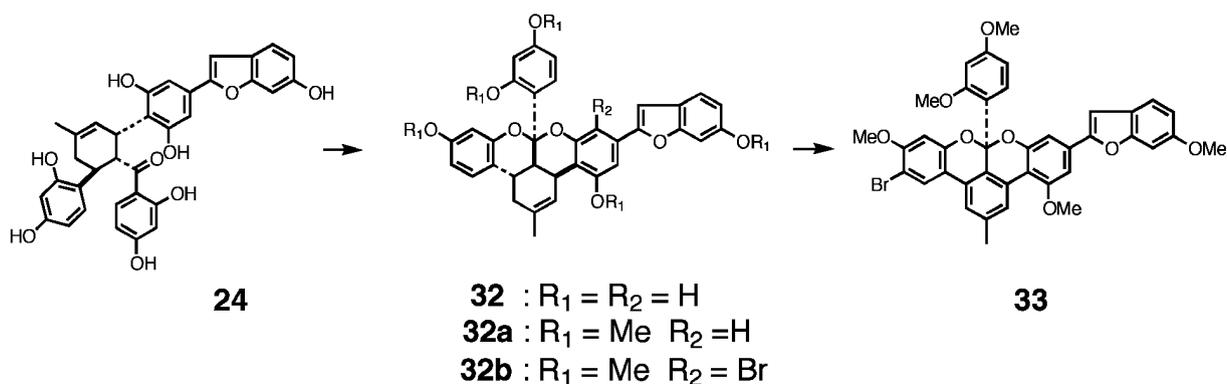


Fig. 10. Preparation of Aromatized Compound (33) from Mulberrofuran C (24) by Way of Mulberrofuran G (32)

Diels-Alder 型付加化合物の methylcyclohexene 環上の各置換基は *all-trans* 型と *cis-trans* 型の 2 種類に分けられるが、各々の旋光度は、前者は負の、後者は正の値を示す。したがって、*all-trans* 型、*cis-trans* 型の各々の methylcyclohexene 環上の各置換基の絶対構造は **25**, **24** と同じく表記され、前者は chalcone と dehydroprenylphenol との *exo*- 付加に

より、後者は *endo*- 付加により生成したと推定される (Fig. 11)。すなわち、クワ科植物より得られる一連の Diels-Alder 型付加体は立体化学的にも理論的な反応と一致する化合物であることが立証された。

3. Diels-Alder 型付加化合物の生合成研究^{18,20,25,26)}

天然の Diels-Alder 型付加化合物として報告されている例は多数あるが、証明された例は市原らによ

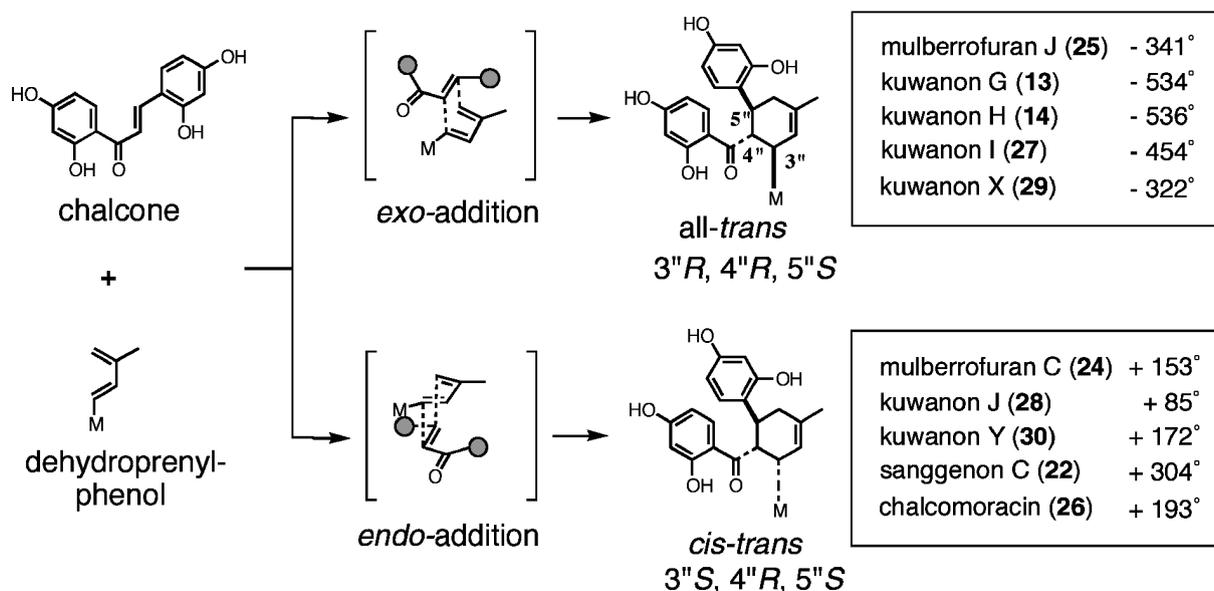


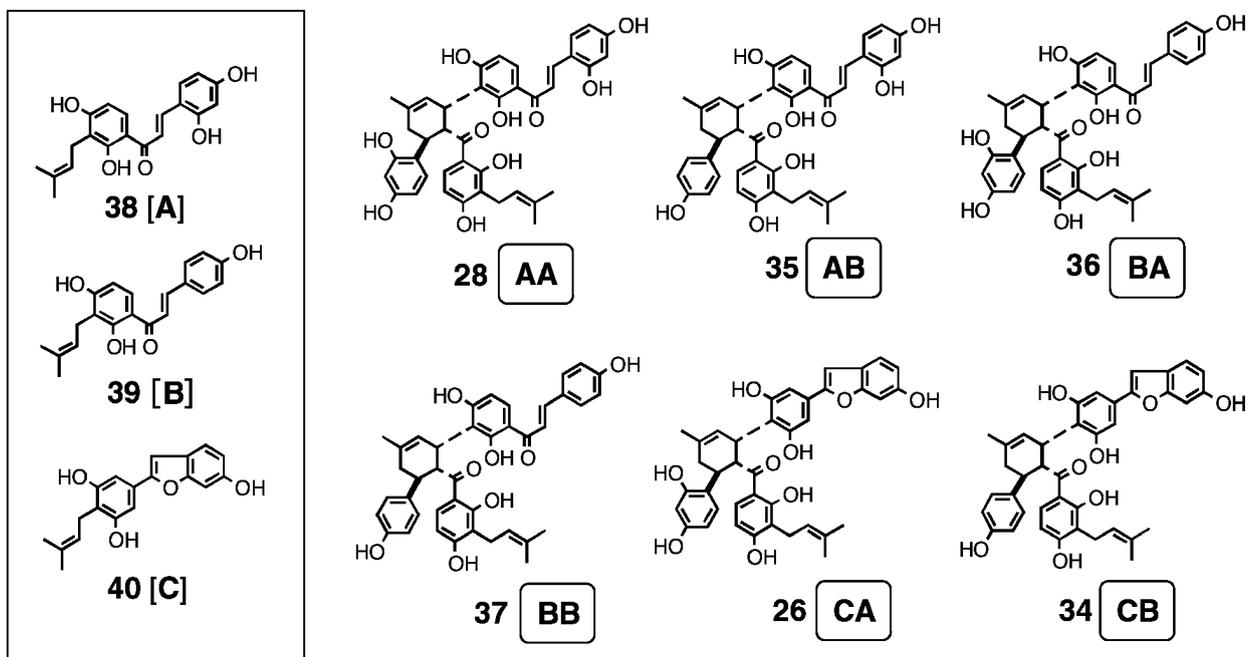
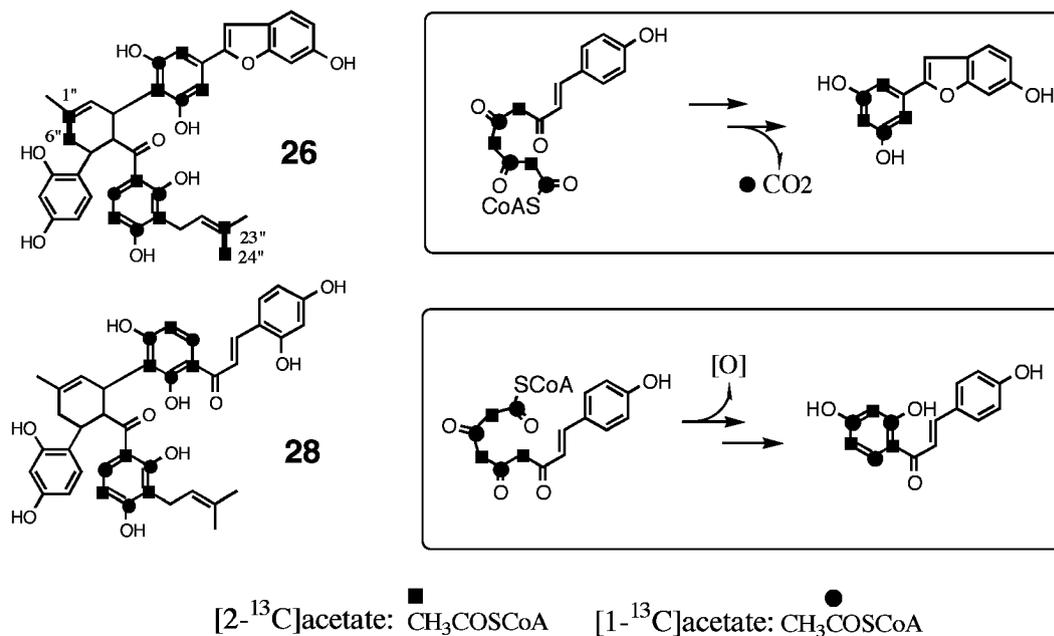
Fig. 11. Absolute Stereochemistry of *Morus* Diels-Alder Type Adducts

る分子内 Diels-Alder 型付加化合物, soranapyrone の他は見当たらない.²⁶⁾ 特に分子間 Diels-Alder 型付加体についての生合成研究例はなく, クワ科植物より得られる同付加体の生合成研究に着手した.

3-1. *Morus alba* L. カルスの産生する Diels-Alder 型付加化合物 上記の生合成研究は京都大学上田伸一博士との共同研究によりスタートした. カラヤマグワ (*Morus alba* L.) の実生あるいは葉よりカルスを誘導し, 培養, 成分検索による選抜を繰り返し, chacomoracin (26), mulberrofuran E (34), kuwanon J (28), Q (35), R (36), V (37) の各付加体をほぼ安定に産生する細胞を得ることができた. 同時に, morachalcone A (38), isobavachalcone (39), moracin C (40) が分離された.^{27,28)} これらの化合物の構造を比較すると, 38, 39, 40 を各々 A, B, C と仮称すれば, 28 は A と A との付加体, 35 は A と B, 36 は B と A, 37 は B と B の付加体, 同様に 26, 34 は各々, C と A, C と B の付加体と見なし得る. 反応は *endo*-付加と考えられ, A, B, C の総ての組合せの付加体を得られた. この結果は 26 を始めとする化合物は酵素の関与した天然の Diels-Alder 型付加化合物であることを支持する (Fig. 12).

3-2. ¹³C 同位体標識酢酸の投与実験 [1-¹³C] 及び [2-¹³C] 標識酢酸の投与実験で得られた 26 及び 28 の ¹³C 標識位置はいずれも 2 分子のシンナモイルポリケチドより構成されていることを支持し,

2-arylbenzofuran 骨格は aldol 型, chalcone 骨格は Claisen 型の縮合反応により生合成されることを支持した (Fig. 13).²⁹⁾ この投与実験においてポリケチド部への取込み率は約 17% であるが, イソプレノイド部への取込み率は [2-¹³C] 標識酢酸のみ取り込まれ約 0.5% であった. 興味ある点は 26 の ¹³C-NMR スペクトルのイソプレレン部の C-6'', C-24'' のシグナルの両脇に小さいが ¹³C-¹³C スピンカップリングに由来するサテライトピークが出現し, それらの隣接する炭素 (C-1'', C-23'') のシグナルにも同様なサテライトピークが観測された. この結果は [2-¹³C] 標識酢酸が細胞内で [1,2-¹³C₂] 標識酢酸に変化し, イソプレノイドに取り込まれることを意味する. その解釈として TCA 回路の関与を推定した. [2-¹³C] 標識酢酸が同回路に取り込まれ, 2 サイクルを経れば [1,2-¹³C₂] 標識酢酸が供給可能なオキザロ酢酸に到達する (Fig. 14). [2-¹³C] 標識酢酸の投与実験でイソプレノイド部に取り込まれた酢酸は投与した酢酸ではなく, 再構成された [1,2-¹³C₂] 標識酢酸と考えられた. しかも, メバロン酸経路においてスターターとなる第 1 番目の酢酸ユニットにのみ取り込まれた.²⁹⁾ さらに, [2-¹³C] 標識酢酸のパルス投与実験において, 26 のイソプレレン部の *trans*-メチル (C-7'', C-25'') にも ¹³C-¹³C スピンカップリングに基づくサテライトピークが見られた. この事実は 26 のイソプレレン部がジエンを經由

Fig. 12. Optically Active Diels-Alder Type Adducts in *Morus Alba* Callus TissuesFig. 13. ^{13}C -Labeling Patterns of **26** and **28** from $[1-^{13}\text{C}]$ and $[2-^{13}\text{C}]$ Acetate

した平衡反応を考えることにより説明できる。すなわち、イソプレン部がジエン構造に変化していたことの証拠を得た。興味あることに、この異性化反応はジエノフィルとして反応した chalcone 誘導体のイソプレン部にも起こっている。これは、プレニール基を持つ基質であればどのような分子も反応種と

して認識され、ジエンへの変化に取り込まれると推察される (Fig. 15).³⁰⁾

3-3. メトキシカルコン誘導体の投与実験³¹⁾
Morus alba カルスにおいて chalcone (26) や kuwanon J (28) が Diels-Alder 型の付加反応を経て生成することをより直接的に証明するため、前駆

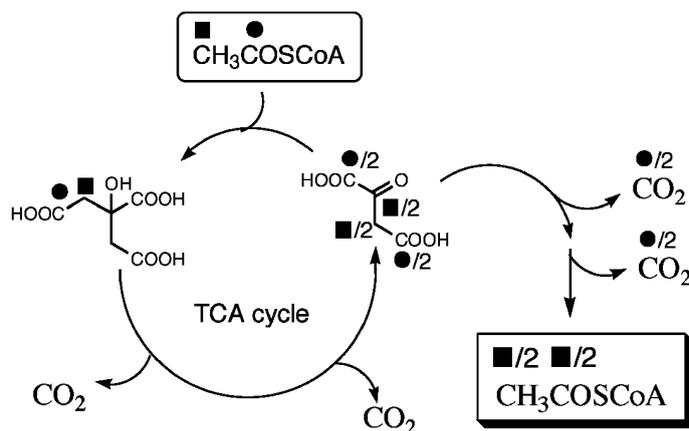


Fig. 14. Formation of [1,2-¹³C₂] Acetate from [2-¹³C] Acetate by Way of TCA Cycle

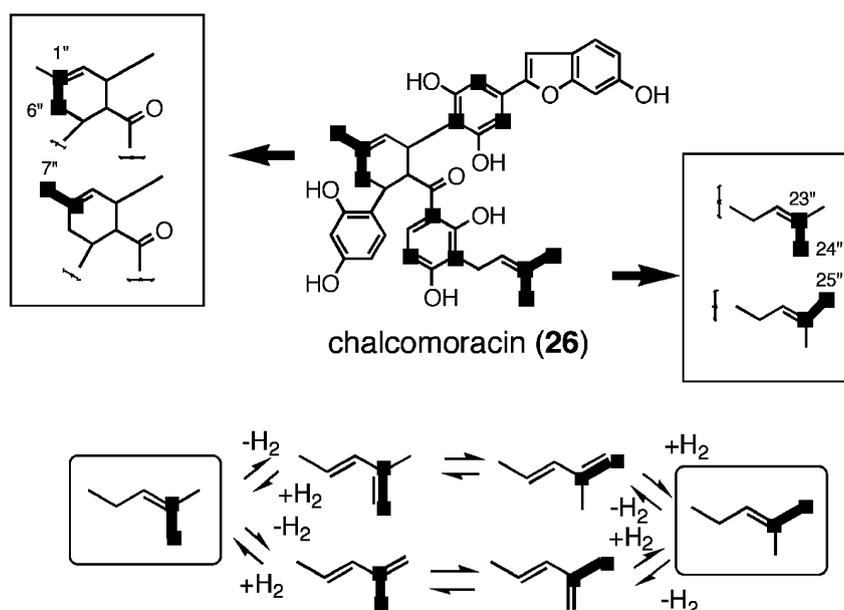


Fig. 15. ¹³C-Labeling Pattern of Chalcemoracin (26) in the Administration Experiment with [2-¹³C] Acetate in a Pulsed Manner

体としてメトキシカルコン (41) の投与実験を行った。代謝産物(42, 43, 44, 45, 46) を分離した (Fig. 16)。42 は投与した 41 の 3'位がプレニール化を受けた構造であり、プレニール化の時期が骨格形成後に行われることを示唆する。代謝物 43—46 はカルスから分離されている付加体のメトキシシル体に相当する。以上より 41 はプレニール化後、ジエンあるいはジエノフィルとして各付加体にそのままの形で取り込まれたことを示す。さらに、42 を用いて投与実験を行い、予想通り 43—46 を得た。これらの付加体の CD スペクトルの波形は対応する 26, 28 のそれに一致し、上記投与実験で得られた付加体の立体化学は 26, 28 のそれと一致することが明らか

となった。上記の結果は *Morus alba* カルスにおいて、プレニール部分をジエン、カルコン誘導体の α, β 二重結合部分をジエノフィルとした酵素の関与する分子間 Diels-Alder 型の付加環化反応の経路があることを実証した (Fig. 17)。^{31,32)}

3-4. *Morus alba* カルス中における Diels-Alder 型付加反応の段階³³⁾ *Morus alba* カルスから 6 種の Diels-Alder 型付加体が分離されているが、これらの化合物はそれぞれを構成するモノマー同士の付加反応を経て生合成されることが示唆される。その手掛かりを得るために、[2-¹³C] 標識酢酸の投与実験のカルスより 26, 28 と共に 34, 36, 37 を分離し、その標識様式と共にその取込み率を検討したと

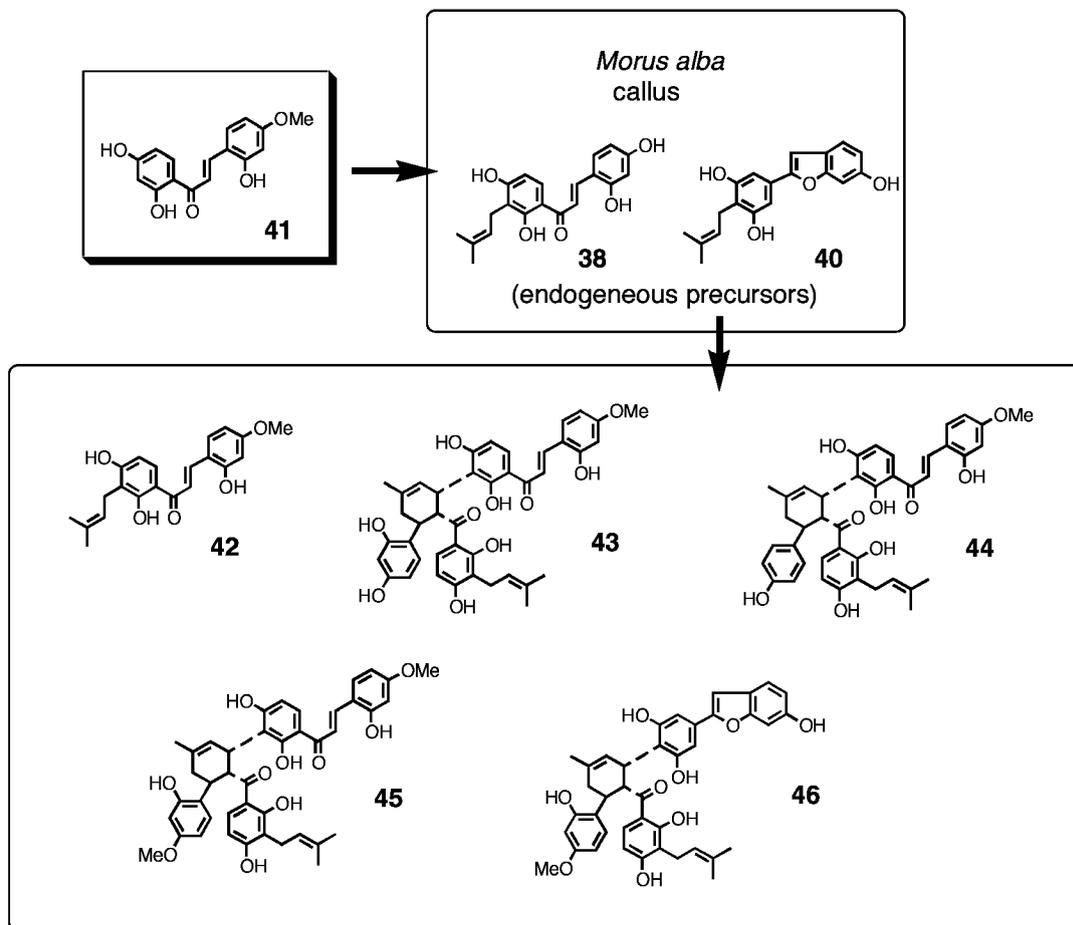


Fig. 16. Administration of Precursory *O*-Methylchalcone (41) to the *M. alba* Callus Tissues

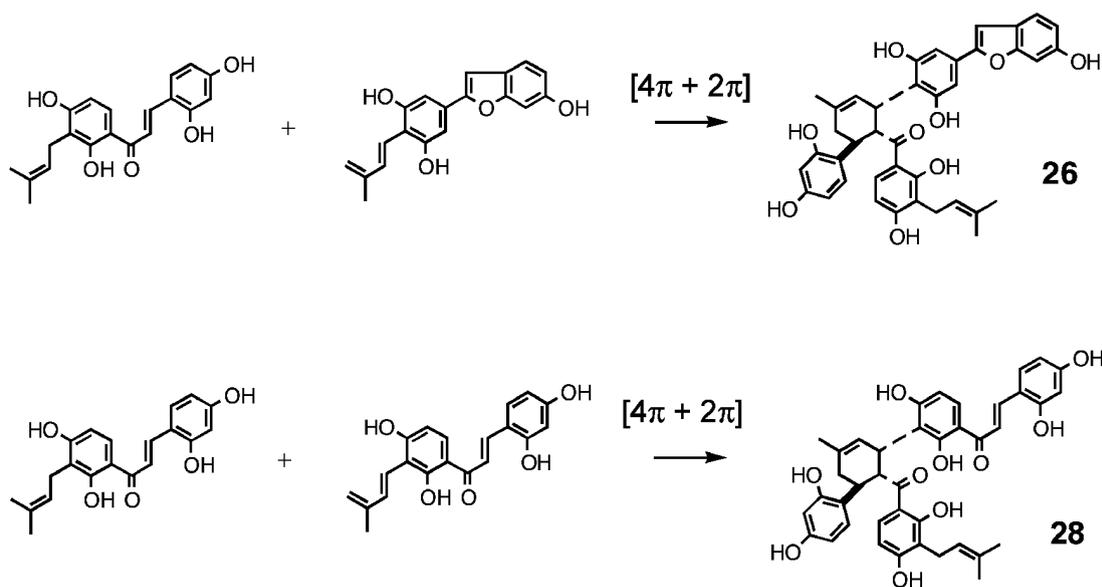


Fig. 17. Formation of Chalcomoracin (26) and Kuwanon J (28) through Diels-Alder Reaction

ころ、標識様式は同一であるが、その取込み率に差が認められ、水酸基が減少するにつれ取込み率が増加している傾向が認められた。一方、各付加体が分

子を構成するモノマー間のそれぞれ独立した Diels-Alder 型反応を経て生合成されることを考えると、36 の取込み率に矛盾を生じる。以上より、各付加

体はそれぞれ独立した付加反応によって生成されるのではなく、水酸化の程度の低い **37** が最初に生成され、次いで順次水酸化反応を受けて **36** さらに **28** が生成すると考えれば、上記の取込み率は矛盾なく説明できる (Fig. 18).

3-5. *Morus alba* カルスにおけるイソプレン生合成 ^{13}C 標識酢酸の投与実験で、**26** のイソプレン部における異常な標識様式を詳細に検討した。同投与実験の *Morus alba* カルスから β -sitosterol (**47**) を分離し、その標識様式を検討したところ、メバロン酸生合成経路から期待される位置に標識化が認められ、**26** のイソプレン生合成が異常であることが明らかとなった。³⁴⁾ イソプレン生合成前駆体の1つと考えられている L-ロイシンの投与実験を行ったが、イソプレン部には取り込まれずポリケチド由来の芳香環に標識化が起こることから、通常のアミノ酸代謝を受けアセチル CoA を経て取り込まれたこ

とを示す。³⁰⁾ 次に、 $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -D-グルコースの投与を試みた。このグルコースによる **26** のイソプレン部での標識化はすべての炭素に起こり、その標識様式は3分子の酢酸から構成されていることを示唆した。しかし、その生合成に TCA 回路が関与しているかどうかは $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -D-グルコースでは判断できない。この点を確認するため、 $[\text{2-}^{13}\text{C}]$ -及び $[\text{1,3-}^{13}\text{C}_2]$ -グリセロールの投与を試みた。³⁵⁾ その結果、イソプレン部を構成している各酢酸ユニットについて標識の連続化は起こらず、TCA 回路の関与は否定される (Fig. 19)。グリセロールから解糖経路を経た酢酸がメバロン酸経路を経てイソプレン部に取り込まれるとすれば、Fig. 20 で示す標識様式が期待される。Figures 19, 20 におけるイソプレン部での標識位置を比較すれば、**26** のイソプレン部での標識位置はメバロン酸経路を考慮した第1番目の酢酸ユニットに関しては予想通りであるが、第2番目、

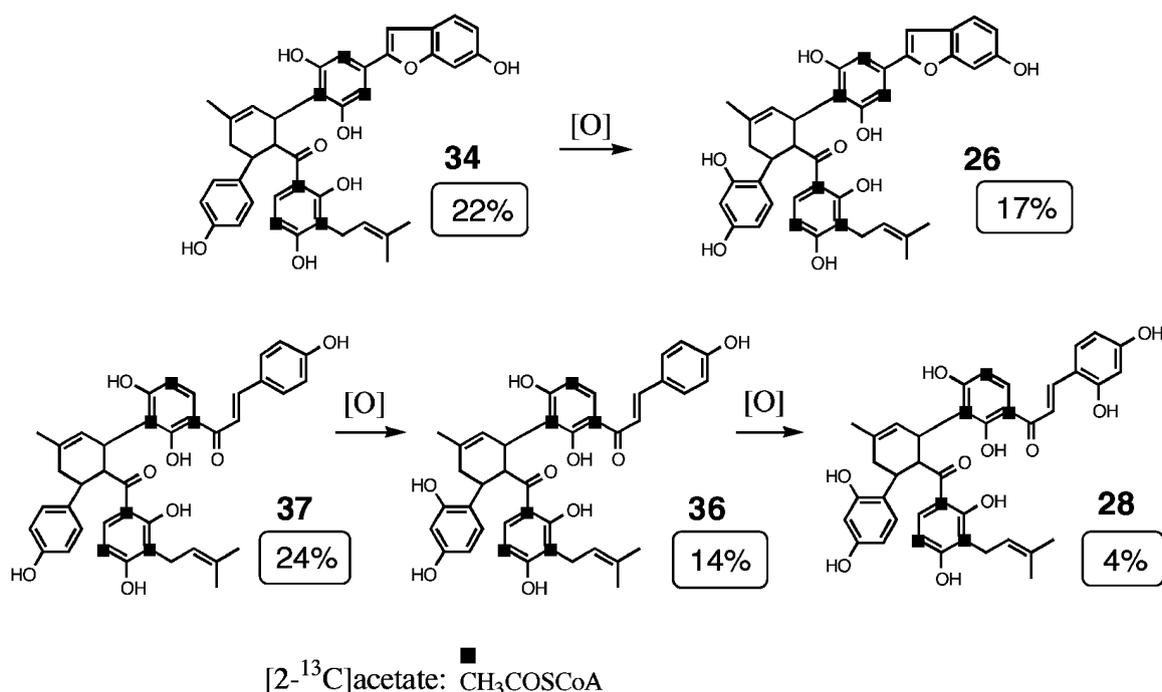


Fig. 18. Late Stage of the Biosynthesis of Diels-Alder Type Adducts in the *M. alba* Callus Tissues through Sequential Hydroxylation

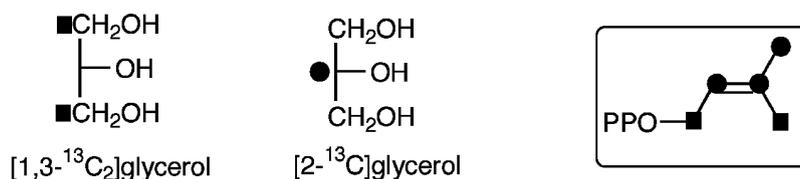


Fig. 19. ^{13}C -Labeling Pattern of the IPP Unit of Chalcomoracin (**26**) from ^{13}C -Labeled Glycerol

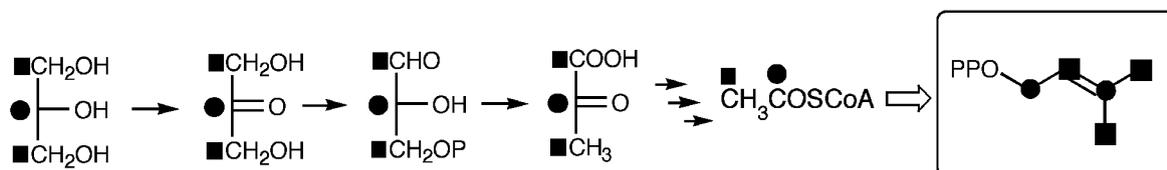


Fig. 20. Expected ^{13}C -Labeling Pattern of the IPP Unit from ^{13}C -Labeled Glycerol

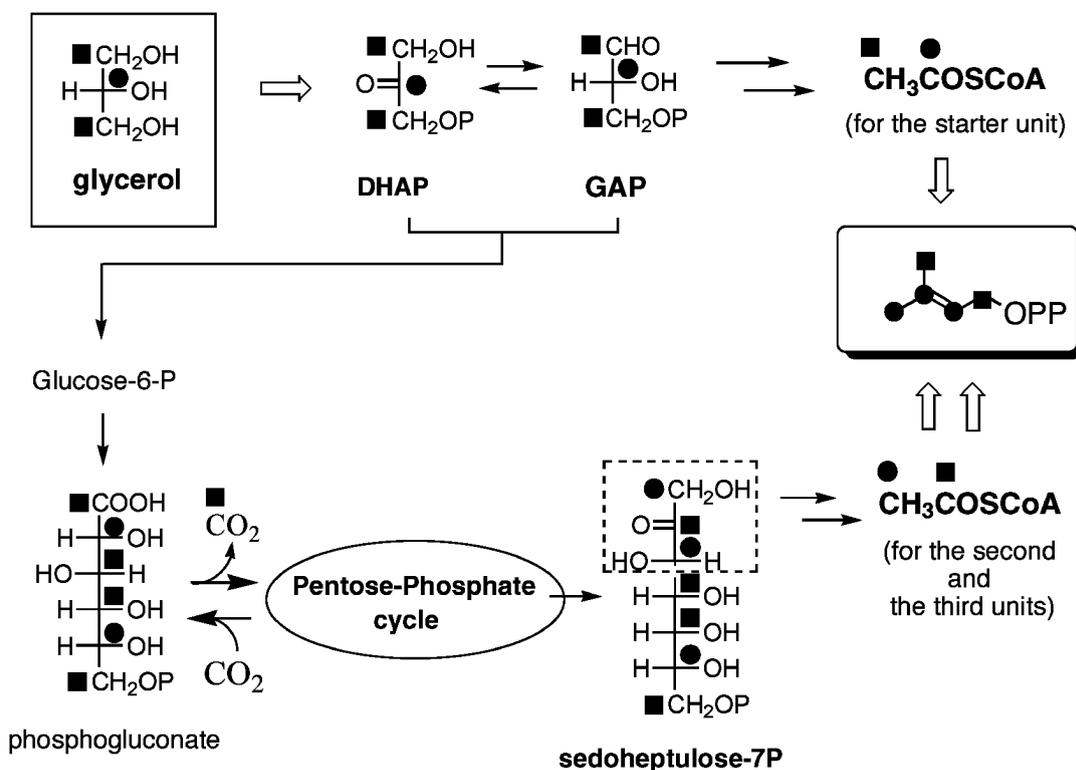


Fig. 21. IPP Biosynthesis for Isoprenylphenols in the *M. alba* Callus

3 番目の酢酸ユニットに関しては予想とは互いに逆の標識位置を示した。標識の逆転したアセチル CoA が生じる経路がペントースリン酸回路であると推察した。投与したグリセロールが糖新生の経路を経てペントースリン酸回路に入り、Fig. 21 で示す経路で供給されるアセチル CoA は解糖経路で得られるアセチル CoA とは標識位置が逆転する (Fig. 21)。26 に置換するイソプレン部には解糖経路から生成したアセチル CoA を 1 番目の酢酸ユニットとし、ペントースリン酸回路より供給されるアセチル CoA を 2 番目、3 番目の酢酸ユニットとして生合成されていると解釈することで酢酸投与におけるイソプレン部での不可解な標識様式も説明することができた (Fig. 21)。³⁵⁾

一方、Rohmer らによって高等植物、緑藻、多く

の真性細菌において、メバロン酸とは全く異なる新規な経路、非メバロン酸経路の存在が明らかにされた。³⁶⁾ “C3 ユニット + C2 ユニット” によるそのイソプレン生合成経路は *Morus alba* カルスのイソプレン生合成と共通点を持つが標識様式に若干の違いがある。以上より、*Morus alba* カルスには少なくとも 2 つのイソプレン生合成経路が共存していることを示す。この 2 つの生合成経路に対する 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤である compactin (ML-236B) の影響を検討した。³⁷⁾ Compactin の共存下、 $[2-^{13}\text{C}]$ 標識酢酸の投与実験により得られた 26 及び 47 の ^{13}C -NMR スペクトルを検討したところ、26 においては先の投与実験と同様の結果が得られたのに対し、47 では標識の取り込みは全く認められなかった。この結果は

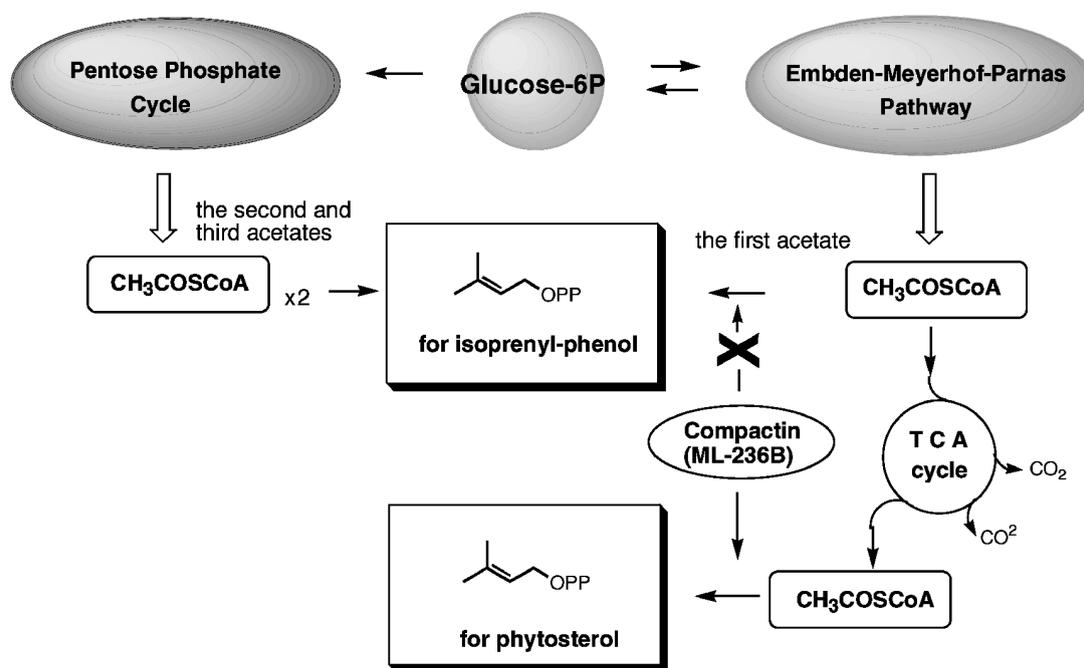


Fig. 22. Two Independent IPP Synthesis in the *M. alba* Callus Tissues

compactin がクワカルのステロール系化合物に対応するメバロン酸生合成経路のみを阻害したことを示し、クワカルスにおいて compactin に感受性のイソプレン生合成経路と非感受性の経路が共存していることを示した (Fig. 22).

3-6. クワカルスにおけるイソプレン生合成と脂肪酸及びアミノ酸代謝³⁸⁾ クワカルスにおけるイソプレン生合成の特色は [2-¹³C] 標識酢酸投与実験において chalconoracin (26) のイソプレン部の標識パターンは投与した酢酸がそのまま取り込まれるのではなく、TCA 回路を経由して再構成された標識の連続した [1,2-¹³C₂] 酢酸が取り込まれることを示唆している。しかし、ポリケチド由来の芳香環部分への取込み率(17%)は異常に高いのに対し、イソプレン部分へのそれは極端に低い(0.5%)。このことは、クワカルスにおいて酢酸-マロン酸経路の活性が高いことを示すと共に投与した酢酸は迂回した経路を通してイソプレン部に取り込まれることを示唆している。1つの可能性として、脂肪酸のβ-酸化経路が推定された。[2-¹³C] 標識酢酸の投与実験を行い、パルミチン酸をメチルエステルとして分離し、その ¹³C-NMR は予想通りの取込みが行われていることを示した。この脂肪酸のβ-酸化体がTCA 回路に入るとすれば実験結果の説明は可能で

ある (Fig. 23)。つぎに、¹³C 標識パルミチン酸の投与実験を試みたが、取込みは認められなかったため、β-酸化の関与を間接的に証明することとした。未分化の植物細胞においてβ-酸化はグリオキシソームで行われ、生成したアセチル CoA はTCA 回路の垂系であるグリオキシル酸回路で代謝されることが知られている。同回路を占める基質はTCA 回路のものとはほぼ同一であるが、この回路の特徴的な中間体であるグリオキシル酸に着目し、グリオキシル酸より誘導されるグリシンの関与について検討した。Morus alba カルスと同一な二次代謝経路を有する *Morus bombycis* カルス³⁹⁾に [2-¹³C] 標識グリシンを投与し、振盪培養後、常法通り処理し chalconoracin (26)、β-sitosterol (47) を分離し、各々の ¹³C-NMR スペクトルを検討した。その結果、26 のシナモイルポリケチド部分及びプレニール部分への取込みが認められたが、特に標識の連続した C2 ユニットが取り込まれており、[2-¹³C] 標識酢酸の結果と一致する。このことは2分子のグリシンがセリンに変換された後、生成した C2 ユニットが取り込まれることを示唆した。また、グリシンのセリンへの変換過程は 47 のメチオニン由来の炭素 (C-28, C-29) に取込みが認められたことから強く示唆された。この結果を確認する目的で [3-¹³C]

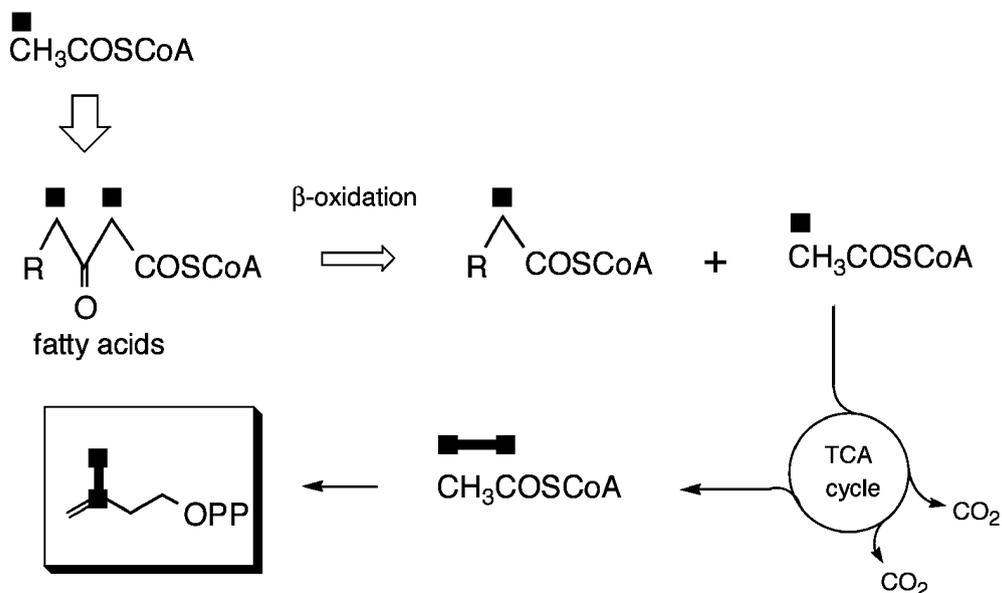


Fig. 23. Participation of Fatty Acid in IPP Biosynthesis in the *M. alba* Callus Tissues

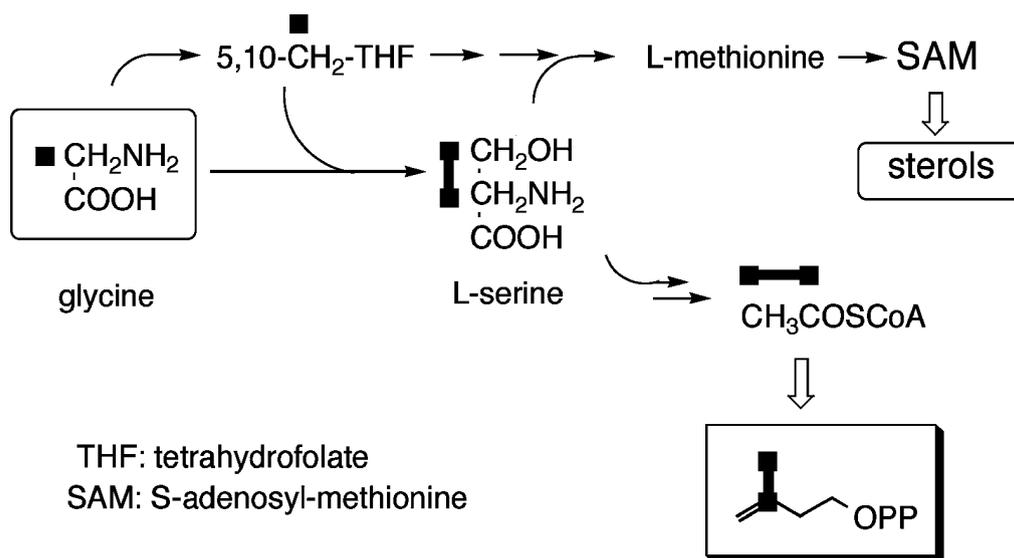


Fig. 24. Participation of Amino Acids in IPP Biosynthesis in the *M. bombycis* Callus Tissues

標識 DL-セリンの投与実験を行ったところ、その結果はグリシンの投与実験の結果を支持するものだった。以上の結果はグリオキシル酸回路の関与を示唆するものであり、 β -酸化も含めた脂肪酸代謝が *M. bombycis* カルスの二次代謝産物の生合成に関与していることを示す。すなわち、イソプレン生合成については β -酸化を想定した場合には酢酸投与時に見られた標識の連続した C2 ユニットはグリシン、セリンの経路を通して生成する可能性が高いことが示される (Fig. 24)。

3-7. シンナモイル部分の生合成 Chalconoracine (26) や kuwanon J (28) などのシンナモイル部分の生合成については、 ^{13}C 標識グルコース並びに ^{13}C 標識グリセロールの投与実験によりシキミ酸経路由来であることが示されている。シキミ酸経路での前駆体を明らかにする目的で ^{13}C 標識 L-フェニルアラニン (L-Phe) 及び ^{13}C 標識 L-チロシン (L-Tyr) の投与実験を行ったが、予想に反して同一のシンナモイル部分に両者共に取り込まれた。^{40,41)} その結果、(a) L-Phe \rightarrow シンナモイル CoA

→*p*-クマロイル CoA 及び (b) L-Tyr→*p*-クマロイル CoA の2つの経路が同時に働いていると推定される。しかし、これら2つの経路以外に高等植物では例のない L-Phe から L-Tyr への水酸化反応が存在している可能性も示唆された。そこで (a) の経路を完全に確立する目的で中間体のシンナモイル CoA に相当する [2-¹³C] 標識ケイヒ酸のチオエステル誘導体 (48) を調製し、*M. alba* カルスへの投与実験により期待された位置に標識化が認められ、[2-¹³C] 標識ケイヒ酸が取り込まれたことを示した (Fig. 25)。このことから、シンナモイル CoA から *p*-クマロイル CoA を経由していることが確認された。¹³C 標識 L-Phe 及び L-Tyr の同時投与実験も併せることにより、*M. alba* カルスでは *p*-クマロイル CoA 合成に関して (a) 及び (b) の2種類の経路が同時に働いている可能性が高いことが示された。⁴²⁾ これは高等植物の *p*-クマロイル CoA 合成に2つの経路が同時に関わっていることを示した最初の例である。一方、C₆-C₃ 骨格の生合成経路上、L-Phe の脱アミン酵素 PAL 及び L-Tyr の脱アミン酵素 TAL の2つの酵素の関わりにより、各シンナモイル CoA 及び *p*-クマロイル CoA が生成する。しかし、TAL は高等植物の中でもイネ科植物にのみ存在する酵素であることが知られ、また、トウモロ

コシから同定された PAL は L-Phe と同時に L-Tyr も基質とすることが知られている。したがって、上記クワカルスにおける (a), (b) 2つの経路はカルスに存在する PAL がトウモロコシと同様に2つのアミノ酸を基質として認識する可能性のあることを示唆する。⁴³⁾

3-8. 分子間 Diels-Alder 反応を触媒する酵素について³⁸⁾ Chalcomoracin (26) や kuwanon J (28) は酵素の介在する Diels-Alder 型反応により生合成される。現在まで分子内 Diels-Alder 型反応を触媒する酵素については分離精製の報告例はあるが、分子間 Diels-Alder 型反応を触媒する酵素の報告例はないことから、セルフリーでの検討を行うこととした。*M. bombycis* カルスから得られた粗酵素液を用いて酵素反応を行った。基質は *in vivo* の検討で用いたメトキシカルコン (42) を用いて、粗酵素液とインキュベートした。また、熱処理した粗酵素液に対しても同様に反応を行いコントロールとした。反応液を酢酸エチル抽出し、順相 HPLC で分析、42 由来の代謝産物 45 を分離し、構造を明らかにした。さらに、45 は 28 と同一の立体化学を有することがその CD スペクトルより示された。このことは粗酵素液中に分子間 Diels-Alder 型反応を介する酵素の存在を示す最初の例となった (Fig. 26)。

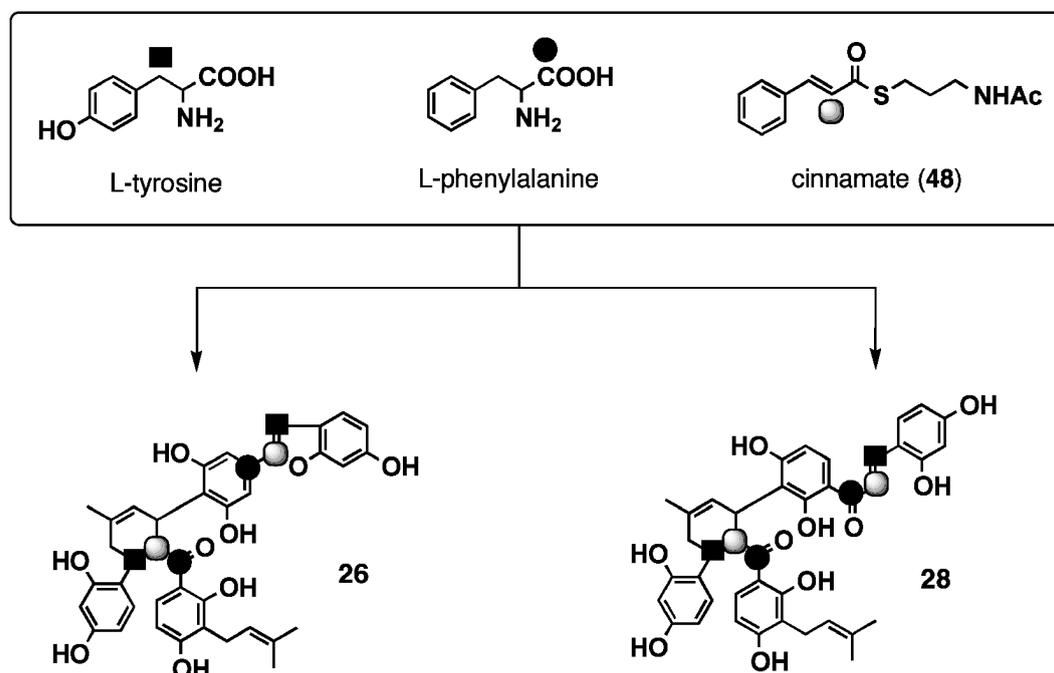


Fig. 25. Parallel Contribution of L-Phenylalanine and L-Tyrosine to the Biosynthesis of 26 and 28

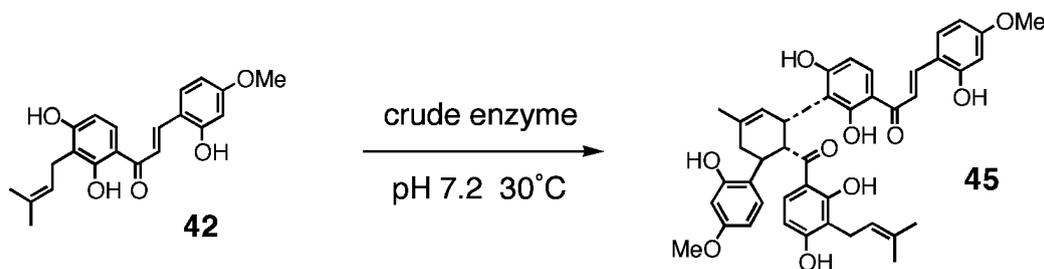


Fig. 26. Formation of Optically Active **45** from a Precursory Chalcone (**42**) by the Action of Crude Enzyme from *M. bombycis* Callus Tissues

4. カンゾウのプレニールフラボノイド

カンゾウは神農本草経の上品に「甘草」の名で収載されている漢方の要薬の1つであり、漢方処方に繁用される。一方、医薬用のみならず甘味料や調味料として繁用される天然食品でもある。その成分研究は多くの研究者により行われ、代表される化合物は glycyrrhizic acid (glycyrrhizin) である。サポニン以外の成分としては、柴田らによりイソプレノイドの置換したフラボノイド類が多数報告されている。⁴⁴⁾ 我々はクワ科植物より得られるプレニールフラボノイド研究の発展としてカンゾウのプレニールフラボノイドに興味を持ち、1986年より研究を開始した。研究の姿勢としてはできる限り基原植物の明らかなカンゾウを用いることとし、約80種の新規フェノール性化合物の構造を明らかにすると共にその研究途上でNMRを用いたプレニールフラボノイドの新しい構造決定法を見出した。同法を用いて構造訂正を行うと共に、1997年までに報告されているフェノール性成分に関する化学的研究論文を網羅した総説として纏めることができた。⁴⁵⁾ 以下、若干の知見を概説する。

4-1. プレニールフェノール類のベンジル炭素(C-1)の化学シフト⁴⁵⁻⁴⁷⁾ フラボノイドにおけるイソプレノイド基の置換位置は¹³C-NMRスペクトルにおける芳香環炭素のケミカルシフトから推定が可能である。しかし、イソプレノイド基の数が多い場合やイソプレノイド基がプレニール基1種類でなく、他のイソプレノイド基も存在する場合、各々の位置かを決定するのは困難である。プレニール基やゲラニール基のベンジル炭素(C-1)は δ 20-30に観測される。このC-1の化学シフトと構造との関係を約200種のプレニールフェノールにつき調べたところ、プレニール基の両オルト位の置換基の

種類(水素、酸素官能基、カルボニル基など)によって6種のタイプに分類され、各グループのC-1の化学シフト値はある範囲に限定される。この方法を利用することにより、構造決定の際、可能な構造をある程度しぼり込むことができる(Fig. 27)。⁴⁶⁾ 我々は *Broussonetia papyrifera* (クワ科) より broussoflavonol C, D を分離し、NOEなどの知見より、各々**49'**、**50'**の構造を提出した。しかし、broussoflavonol CのC-1の化学シフト値は δ 26.2及び29.2(CDCl₃)であり、提出した構造では先の規則性と一致しない。各々の化学シフト値よりタイプ3及びタイプ5のプレニール基と考え、各々**49**及び**50**式を推定し、LSPDなどの手法を用いて決定した。誤った原因はC-8位に置換する1,1-dimethylallyl基のメチル基とC-6'-Hとの間隔が約1.4Åであり、この間にNOEが観測されたことによる(Fig. 28)。⁴⁶⁾ 現在はHMBCなどのNMRにおける新手法の開発により、上記の手法の利用価値は低下したと見られるが、HMBCのノイズに由来するクロスピークの誤認を考えると、その利用価値は存在すると考える。現時点において例外は報告されていない。

4-2. プレニールフラボノイドの5位の水酸基プロトンの化学シフト^{45,48)} フラボノイドの5位の水酸基のプロトンは4位のカルボニルと水素結合を形成し、¹H-NMRスペクトル(in acetone-d₆)において、 δ 12.1-12.5に観測される。1998年迄に報告されているフラボノイドについて、この化学シフトと構造との関係を調べたところ、次のような規則性を見出した。すなわち、6位にイソプレノイドが存在すると、ない場合に比べ約0.3 ppm低磁場に観測され、8位に存在すると約0.05 ppm高磁場に観測される。この関係をフラボノイドの骨格と関連

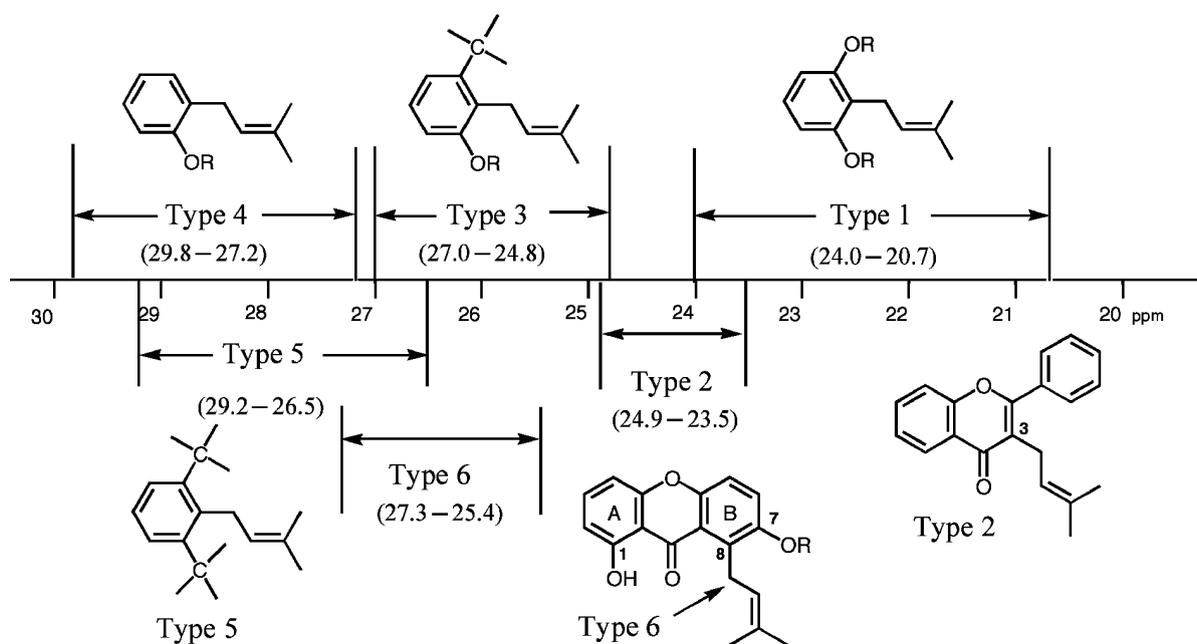
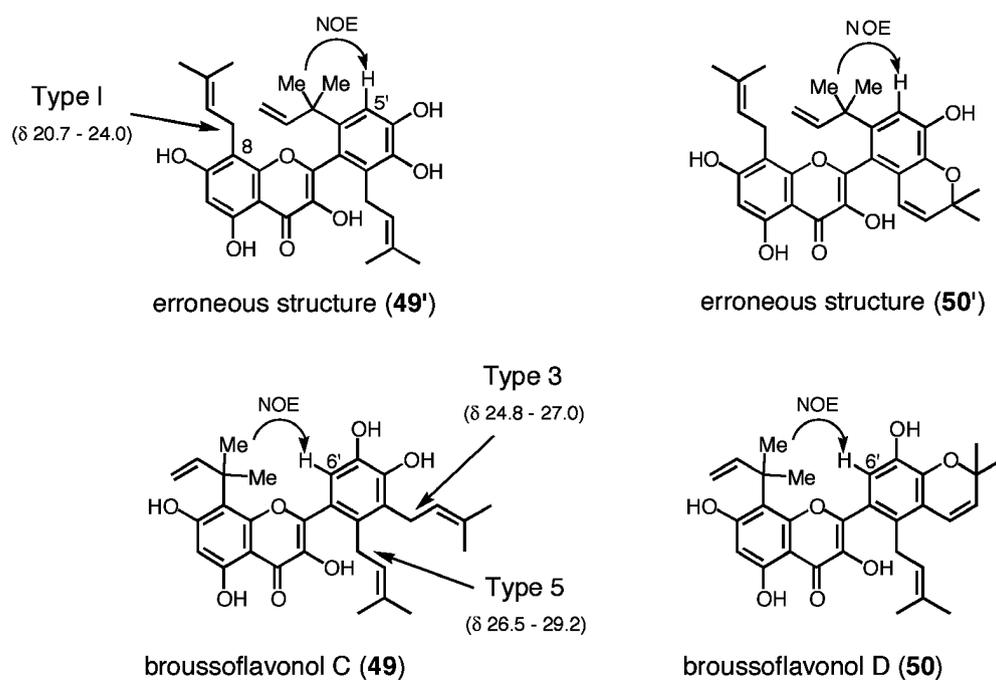
Fig. 27. Chemical Shift of CH₂ Carbon of Isoprenyl Group

Fig. 28. Structures of Brousoflavonols C (49) and D (50), and Their Erroneous Structures

付けて検討した結果、Fig. 29 に示す規則性が存在することが明らかとなった。1993 年までに水素結合している 5 位の水酸基が報告されている 57 例中、12 例が上記の規則性に合わないことが明らかとなり、うち 8 例については化学的及び分光学的手法を用いて訂正構造を提出し、本法の有用性を示した。

現在までに例外は報告されていない。フラボノイドの 6 位及び 8 位置換基の決定法は色々であるが、本法の特徴は微量サンプル (約 0.2 mg) で測定可能であり、濃度変化による化学シフトの変化が認められない点である。6 位置換体の場合、5 位水酸基がより低磁場にシフトすることについては、立体障害

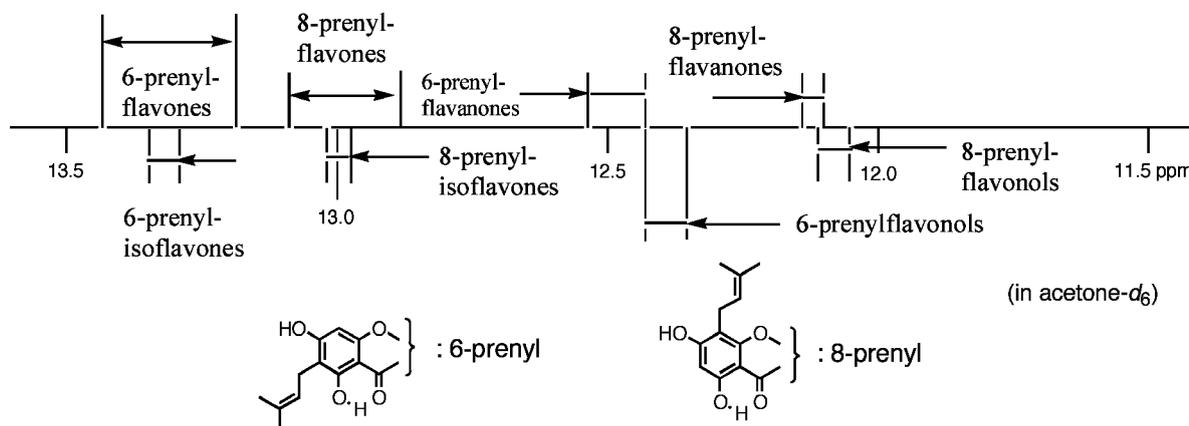


Fig. 29. Chemical Shift of Hydrogen-Bonding Hydroxyl Proton (C-5-OH) of Flavonoids

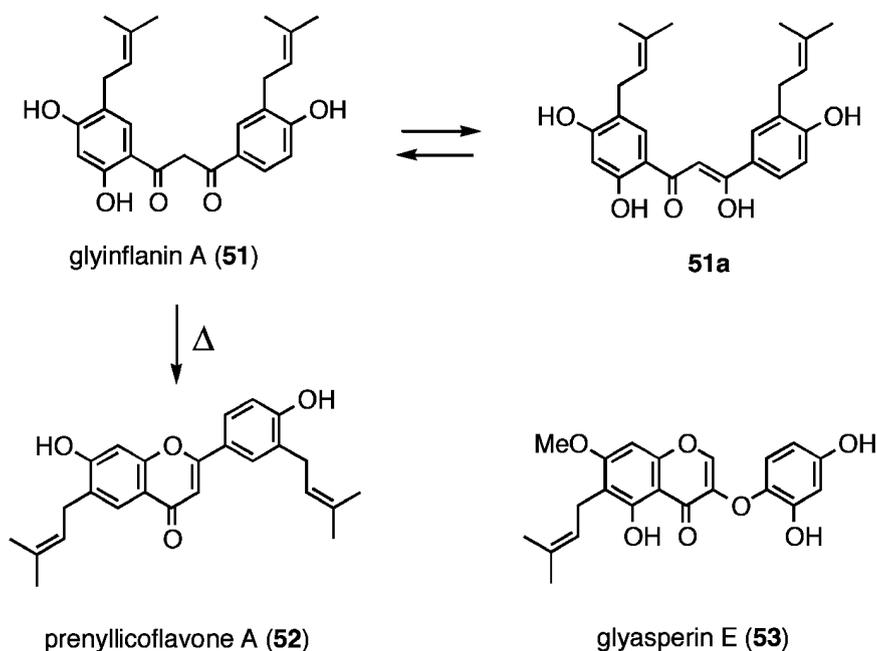


Fig. 30. Unique Phenolic Constituents from *Glycyrrhiza* spp.

により水酸基の回転障害に由来し、水酸基が4位のカルボニル基の方向に配向し、より固定化されていることによると推定される (Fig. 29).⁴⁵⁾

4-3. カンゾウのプレニールフラボノイドと基原植物 カンゾウより多数の新規化合物を得たが2例のみ示す。 *Glycyrrhiza inflata* より glyinflanin A (51) に代表される dibenzoylmethane 誘導体を得られた。⁴⁹⁾ 51 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (in acetone- d_6) はケト型 (51) とエノール型 (51a) の平衡混合物であることを示し、濃度の増加と共にケト型が増加する。したがって、固体状態ではケト型 (51) で存在していると推定している。また、同化合物はフラ

ボン合成の中間体であり、加熱により prenyllicoflavone A (52) に誘導される。⁴⁹⁾ *Glycyrrhiza aspera* より分離した glyasperin E (53) は 3-phenoxychromone 骨格を有する化合物で、この骨格の化合物として天然の最初の例であり、全合成により構造を確定した。生合成的には同植物より関連するフラボノールが分離されており、フラボノールより誘導されたと推定される (Fig. 30).⁵⁰⁾

我々の研究のみならず、先人の報告を調査し、プレニールフラボノイドと基原植物との関連につき検討したところ、興味ある知見が得られた。すなわち、*G. inflata* の主プレニールフラボノイドは licochal-

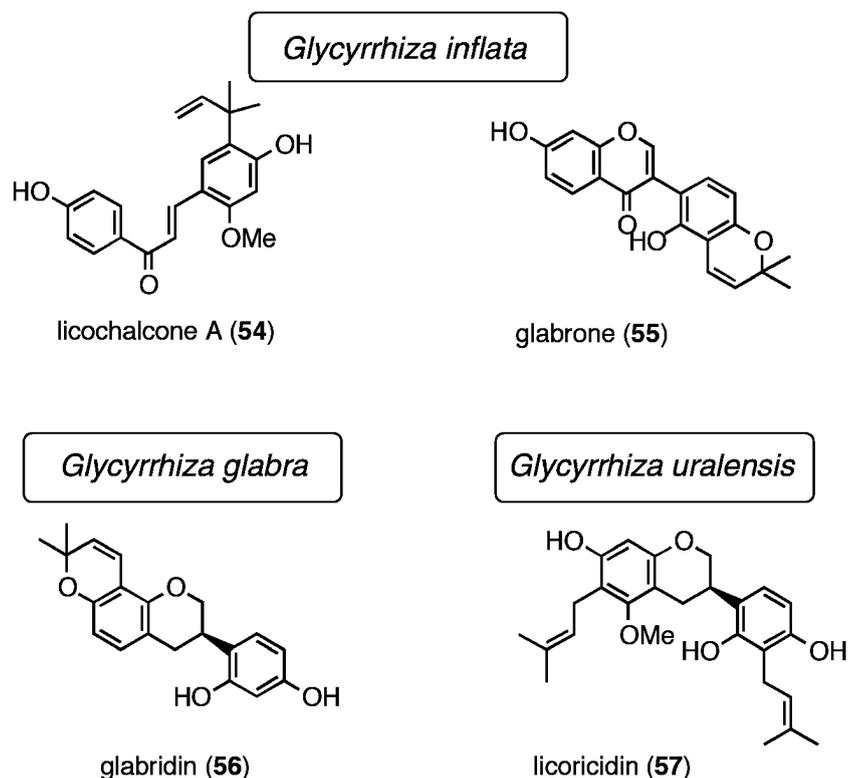


Fig. 31. Typical Components of *Glycyrrhiza* spp.

cone A (54) 及び glabrone (55) であり, *G. glabra* では glabridin (56), *G. uralensis* では licoricidin (57) であった. *G. inflata* 及び *G. glabra* の主プレニールフラボノイドは 5 位に酸素官能基がないのに対し, *G. uralensis* では 5 位に酸素官能基を有する. この結果は市販のカンゾウの基原植物を考える場合に有用と考える (Fig. 31).

謝辞 本研究は東邦大学薬学部薬品物理分析学教室深井俊夫, 羽野芳生両助教授を中心とした大学院生, 卒業研究生, 海外からの訪問研究員など多数の方々の御協力によりなされたものであり, 心より御礼申し上げます. また, 生合成に関する研究は京都大学薬学部 (故) 上田伸一助教授との協同研究で行われました. 上田先生の御冥福を心からお祈りいたします. また, 北海道大学名誉教授 (故) 三橋博先生をはじめ多数の先生方のお力添えにより本研究を続行することができました. 合わせて御礼申し上げます.

REFERENCES

- 1) Harbone J. B., Baxter H. (eds.), "The Handbook of the Natural Flavonoids, Vols. 1 and 2," John Wiley & Sons, New York, 1999, p. 1.
- 2) Hano Y., Goi K., Nomura T., Ueda S., *Cell. Mol. Life Sci.*, **53**, 237-235 (1997).
- 3) Nomura T., "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 53," ed. by Herz W., Grisebach H., Kirby G. W., Tamm Ch., Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 87-201 (1988) and references cited therein.
- 4) Deshpande V. H., Parthasarathy P. C., Venkataraman K., *Tetrahedron Lett.*, **1968**, 1715-1718.
- 5) Nomura T., Fukai T., Yamada S., Katayanagi M., *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1394-1402 (1978).
- 6) Nomura T., Sawaura Y., Fukai T., Yamada S., Tamura S., *Heterocycles*, **9**, 1355-1366 (1978).
- 7) Nomura T., Fukai T., *Heterocycles*, **12**, 1289-1295 (1979).
- 8) Chari V. M., Ahmad S., Osterdahl B. G., *Z. Naturforsch.*, **33b**, 1457-1459 (1978).
- 9) Wessely F., Moser G. H., *Monatsch.*, **56**, 97 (1930).
- 10) Shinomiya K., Hano Y., Nomura T., *Heter-*

- ocycles*, **53**, 877–886 (2000).
- 11) Nomura T., Fukai T., *Heterocycles*, **9**, 635–646 (1978).
 - 12) Fukai T., Nomura T., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 458–463 (2000).
 - 13) Nomura T., Fukai T., *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 2548–2552 (1980).
 - 14) Nomura T., Fukai T., Narita T., *Heterocycles*, **14**, 1493–1951 (1980).
 - 15) Oshima Y., Konno C., Hikino H., Matsushita K., *Tetrahedron Lett.*, **21**, 3381–3384 (1980).
 - 16) Takasugi M., Ishikawa S., Nagao S., Masamune T., Shirata A., Takahashi K., *Chem. Lett.*, **1980**, 1577–1580.
 - 17) Nomura T., Fukai T., Narita T., Terada S., Uzawa J., Iitaka Y., Takasugi M., Ishikawa S., Nagao S., Masamune T., *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2195–2198 (1981).
 - 18) Nomura T., Hano Y., *Nat. Prod. Rep.*, **11**, 1179–1218 (1994) and references cited therein.
 - 19) Nomura T., *Kagaku no Ryoiki*, **36**, 596–605 (1982).
 - 20) Nomura T., *Pure Appl. Chem.*, **71**, 1115–1118 (1999).
 - 21) Hano Y., Kanzaki R., Fukai T., Nomura T., *Heterocycles*, **45**, 867–874 (1997).
 - 22) Takasugi M., Nagao S., Masamune T., Shirata A., Takahashi K., *Chem. Lett.*, **1980**, 1573–1576.
 - 23) Hano Y., Suzuki S., Kohno H., Nomura T., *Heterocycles*, **27**, 75–81 (1988).
 - 24) Hano Y., Suzuki S., Nomura T., Iitaka Y., *Heterocycles*, **27**, 2315–2325 (1988).
 - 25) Nomura T., Hano Y., Ueda S., “Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 17, Structure and Chemistry (Part D),” ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, 1995, pp. 451–478.
 - 26) Oikawa H., Suzuki Y., Naya A., Katayama K., Ichihara A., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1995**, 1321–1322.
 - 27) Ueda S., Nomura T., Fukai T., Matsumoto J., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 3042–3045 (1982).
 - 28) a) Ueda S., Matsumoto J., Nomura T., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 350–353 (1984); b) Ikuta (nee Matsumoto) J., Fukai T., Nomura T., Ueda S., *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2471–2478 (1986).
 - 29) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 554–556 (1989).
 - 30) Hano Y., Ayukawa A., Nomura T., Ueda S., *Naturwissenschaften*, **79**, 180–182 (1992).
 - 31) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1990**, 610–613.
 - 32) Hano Y., Aida M., Nomura T., Ueda S., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **1992**, 1177–1178.
 - 33) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *Heterocycles*, **51**, 231–235 (1999).
 - 34) Seo S., Uomori A., Yoshimura Y., Takeda K., Seto H., Ebizuka Y., Noguchi H., Sankawa U., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1988**, 2407–2411.
 - 35) Hano Y., Ayukawa A., Nomura T., Ueda S., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 4189–4193 (1994).
 - 36) a) Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H., *Biochem. J.*, **295**, 517–524 (1993); b) Rohmer M., Seeman M., Horbach S., Bringer-Meyer S., Sahm H., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2564–2566 (1996).
 - 37) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *Naturwissenschaften*, **82**, 376–378 (1995).
 - 38) Shimazaki M., Doctoral thesis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Toho University, March 2001.
 - 39) Shimazaki M., Hano Y., Nomura T., *Natural Medicines*, **54**, 346–349 (2000).
 - 40) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *Can. J. Chem.*, **72**, 12–14 (1994).
 - 41) Hano Y., Nomura T., Ueda S., *Naturwissenschaften*, **81**, 507–509 (1994).
 - 42) Hano Y., Shimazaki M., Nomura T., Ueda S., *Heterocycles*, **50**, 989–994 (1999).
 - 43) Shimazaki M., Hano Y., Nomura T., *Naturwissenschaften*, **87**, 546–548 (2000).
 - 44) Shibata S., Saitoh T., *J. Indian Chem. Soc.*, **55**, 1184–1191 (1978).
 - 45) Nomura T., Fukai T., “Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, Vol. 73,” ed. by Herz W., Kirby G. W., Moore R. E., Steglich W., Tamm Ch., Springer-Verlag, Wien, New York, 1998, pp. 1–140.
 - 46) Fukai T., Nomura T., *Heterocycles*, **29**, 2379–2390 (1989).
 - 47) Fukai T., Nomura T., *Heterocycles*, **42**, 911–941 (1996).
 - 48) Fukai T., Nomura T., “Basic Life Sciences Vol. 66, Plant Polyphenols 2, Chemistry, Biol-

- ogy, Pharmacology, Ecology," ed. by Gross G. G., Hemingway R. W., Yoshida T., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, pp. 259–277.
- 49) Zeng L., Fukai T., Kaneki T., Nomura T., Zhang R. -Y., Lou Z. -C., *Heterocycles*, **34**, 85–97 (1992).
- 50) Zeng L., Fukai T., Nomura T., Zhang R. -Y., Lou Z. -C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, **1993**, 1153–1159.