

1-4-27. 鹿児島産植物および海洋生物からの有用二次代謝産物の探索研究

濱田 季之

**Study on secondary metabolites from plants and marine organisms
in Kagoshima area**

HAMADA Toshiyuki

鹿児島大学 大学院理工学研究科

*Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University***要旨**

薩南諸島を中心として鹿児島県内に生息する植物や海洋生物は多様性に富んでいる。本研究室で行っている鹿児島産の植物や海洋生物由来の二次代謝産物からの有用物質探索研究の一環として、喜界島産希少柑橘シークーの葉に含まれる香気成分を分析し、特徴的な香気組成を明らかにした。また、南九州市番所鼻産紅藻ハナヤナギから2種の新規生物活性トリテルペノイド類を単離し、化学構造を決定した。2種のトリテルペノイドは、成人T細胞白血病患者由来のがん細胞株に対する増殖阻害活性を示した。

はじめに

当研究室では、生物多様性に富む薩南諸島を中心として鹿児島県内に生息する植物や海洋生物に含まれる二次代謝産物を探索し、その中から医薬品などの有用物質を見つけ出し、その化学構造や生物学的な性質を解明することを目的に研究を行っている。

今回、①喜界島の固有希少柑橘であるシークー (*Citrus* sp.) の葉に含まれる香気成分の分析、および、②南九州市番所鼻海岸の“海の池”に群生する紅藻ハナヤナギ (*Chondria armata*) に含まれる生物活性トリテルペノイド類の単離・構造決定・生物活性に関する研究について報告する。以下、①と②に分けて示す。

①喜界島産シークーの葉由来の香気成分分析

香酸柑橘は広い地域で栽培されており、食用や飲料、化粧品の香料など世界中で幅広く利用されている。世界的にはレモン (*Citrus limon*)、ライム (特にメキシカンライム (*Citrus aurantifolia* Swingle), タヒチライム (*Citrus aurantifolia* Tanaka)), 日本国内においてはユズ (*Citrus junos* Siebold. ex Tanaka), カボス (*Citrus sphaerocarpa* Hort. ex Tanaka), スダチ (*Citrus sudachi* Hort. ex Shirai) が香酸柑橘としてよく知られている。一方、長年限られた地域のみで自生し、地域振興を担う希少種の柑橘も存在する。

「シークー (*Citrus* sp.)」は、喜界島のみで自生する地域固有の希少種である。一般的な柑橘と比べるとやや晩生な柑橘で、1月以降に完熟する。また、果実は小さくてアルベドが厚く、酸味が強いので食用には不向きである。ベルガモット (*C. bergamia* Risso) によく似た特徴的な芳香をもつものの2種の成分別の含有率は異なっており (Hamada *et al.*, 2017)、遺伝的なつながりもなく各々独立して発生したものであることが明らかとなった (Teramoto *et al.*, 2017)。この結果を踏まえ、ベルガモットがアールグレイの香りづけに利用されていることに倣い、シークーを使った紅茶が開発されるなど特産化が推進されている。しかし、葉の香気成分についてはまだ調べられていない。ハーブの一種として料理に利用されるなど、柑橘の

葉も果皮と同様に利用できる可能性を秘めている。果皮で特徴的な香り組成が見られたことから、葉も特有の香気を有する可能性が高く、その特徴を明らかにできれば地域の在来柑橘の利用拡大、高付加価値化につながると考え、葉の香り成分の GC-MS 分析を試みた。

②番所鼻産ハナヤナギ由来トリテルペノイド類に関する研究

フジマツモ科 (Rhodomelaceae) に属するハナヤナギ (*Chondria armata*) は熱帯および亜熱帯地域に生息し、日本においては本州南部の太平洋岸から鹿児島沿岸地域などの南西の島々に分布している。温暖な海域に生息するハナヤナギは、様々な二次代謝産物を有する紅藻として知られている。これまでに報告されている化合物として、奄美群島の徳之島において駆虫薬として用いられていたドウモイ酸 (domoic acid) が挙げられる。ドウモイ酸はグルタミン酸受容体のアゴニストとして作用し、脳内海馬の特定の領域の神経細胞を選択的に破壊することで記憶障害を引き起こす (Grimmelt *et al.*, 1990)。また、イワスナギンチャク (*Palythoa* sp.) の毒成分であるパリトキシン (palytoxin) も過去にハナヤナギから単離されており、マウスにおける LD₅₀ が 0.15 µg/kg の強い致死活性を有している (Moore *et al.*, 1971)。上記の化合物以外からも国内産のハナヤナギから生物活性を有する二次代謝産物の単離報告がいくつかなされている (Hamada *et al.*, 2020)。

また、インド産およびオーストラリア産からのハナヤナギからは構造内に Br 基や Cl 基を有するトリテルペン系化合物の単離報告がされており、生物活性の報告は無いものの独特な二次代謝産物として知られている (Ciavatta *et al.*, 2001; Ola *et al.*, 2010; Ola *et al.*, 2017)。

一方、九州南部で主に発症している成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia : ATL) は、HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type I) によりリンパ球の一種である T 細胞が感染することでがん化する病気で、その HTLV-1 キャリアは日本で 100 万人を超えるといわれている。現段階での主な治療法として CHOP 療法、LSG15 療法など多剤併用化学療法が挙げられる。しかし、副作用として骨髄への影響が深刻であることや、患者の 5 年生存率が 20%未満と低い医療成績であることなど様々な問題があるため、より有用な治療薬の開発が求められている。

本研究では、鹿児島県南九州市番所鼻にて採取されたハナヤナギから ATL 患者由来のがん細胞株である SIT 細胞に対する細胞傷害活性 (抗 ATL 活性) および核磁気共鳴 (NMR) スペクトルから得られる化学構造情報を指標に二次代謝産物の探索を行った。

方法

①喜界島産シークラーの葉由来の香り成分分析

Materials

シークラーの葉は 2019 年 11 月に鹿児島県喜界島で採取されたものを用いた。

Extraction of essential oils

エッセンシャルオイルは、葉 (250~300g) から水蒸気蒸留法を用いて抽出した。分離したオイルは分析を行うまで、-30°C で保管した。

Gas chromatography – Mass spectrometry method (GC-MS)

エッセンシャルオイルの GC-MS 分析は、Agilent Technologies 7890A/5975C GC/MSD システムを使用し、カラムには DB-WAX キャピラリーカラム (J&W Scientific Inc., CA, USA; 30 m × 0.25 mm (i.d.), 膜厚 0.25 µm) を用いた。注入口は 250°C で加熱し、スプリット注入法 (ス

プリット比: 1/50) を用いた。カラムは初期温度 50°C で 5 分間維持し、次いで最終温度 240°C まで 10°C/min で加熱して 10 分間保持した。キャリアガスはヘリウムを使用し、流速は 1 mL/min とした。質量検出器の条件は、イオン化電圧 70 eV, 放出電流 40 mA, 質量範囲 50-800 amu, スキャン速度 1.0 scan/sec とした。各分析は 3 回実行した。

Identification of the chemical components in the leaves of the Citrus

香気成分は、同様の分析条件下で分析した *n*-アルカンの保持時間によって算出されたリテンションインデックス (RI) をもとに同定した。化合物の識別は、検出されたマスペクトルと National Institute of Standards and Technology (NIST) のライブラリによる既知の純粋な物質のマスペクトルとの比較、および RI 値を用いた文献値との比較によって確認した。

②番所鼻産ハナヤナギ由来トリテルペノイド類に関する研究

Materials

紅藻ハナヤナギ (*Chondria armata*) [TH14-3-1] (9 kg, 湿重量) は鹿児島県南九州市番所鼻海岸の“海の池”にて採取した。

Extraction and Isolation

鹿児島県産の紅藻ハナヤナギ [TH14-3-1] (9 kg, 湿重量) を MeOH で抽出し、得られた抽出液を減圧下で濃縮を行うことで 680 g の抽出物を得た。このうち 346 g を CH₂Cl₂ と 50% MeOH aq. で二層分配を行った。得られた CH₂Cl₂ 抽出物 (15 g) のうち 5.6 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60, 40×300 mm, mobile phase: 10% AcOEt / *n*-Hexane – 20% AcOEt / *n*-Hexane – 40% AcOEt / *n*-Hexane – 100% AcOEt – 50% MeOH / CH₂Cl₂) にて分離を行い、8 個の画分を得た。fr.3 (175 mg のうち 156 mg) を recycle HPLC (column: JAIGEL-SIL, 20×500 mm, 3.5 mL / min, 5 cycles, 100% CHCl₃) にて分離を行い、8 個の画分を得た。さらに、fr.3-5 (17.8 mg) を順相 HPLC (column: Cosmosil 5SL-II, 4.6×250 mm, 1.0 mL / min, 90 μL inject, 10% AcOEt / *n*-Hexane) にて分離を行い 14 個の画分を得た。得られた 7 番目と 8 番目のフラクションをまとめて、逆相 HPLC (column: Cosmosil 5C₁₈-MS-II, 4.6×250 mm, 1.0 mL / min, 90 μL inject, 80% MeOH / H₂O) にて分離を行い、fr.3-5-7-7 (compound 1; 1.5 mg)、fr.3-5-7-8 (compound 2; 0.8 mg) を単離した。

結果と考察

①喜界島産シークラーの葉由来の香気成分分析

シークラーの葉の精油からは 33 成分 (98.1%) を同定した。具体的なデータについては、投稿論文作成中のため、非公開とさせていただいた。

最も含有率が高かったのはエステル・オキシド類 (7 成分; 72.5%) で、それらのうち linalyl acetate (68.8%) が最も主要な成分であった。その他含有率が 1% 以上の主要成分としては geranyl acetate (1.92%), neryl acetate (1.65%), モノテルペンアルコール (4 成分; 19.4%) の linalool (16.9%), α-terpineol (1.09%), セスキテルペン炭化水素 (10 成分; 3.15%) の β-caryophyllene (1.33%) が挙げられる。また、モノテルペン炭化水素 (6 成分; 1.69%), その他アルコール類 (1.37%) が各成分微量に存在していた。

次に、同柑橘の果皮香気成分と比較を行った。果皮の香気成分からはベルガモットの香りを形成する主成分である limonene (40.4%), linalool (23.9%), linalyl acetate (3.04%) が検出

されている。これらのうち、limonene は葉の香り成分にはほとんど含まれていなかった。Linalool については葉ではやや少なく、linalyl acetate については果皮では 3.04% に対し、葉では約 70% と大きな違いが見られた。その他果皮の含有率 1% 以上の主要成分も葉では低いという結果であった。

さらに、主要な香酸柑橘（ベルガモット、ダイダイ、レモン、ライム、ユズ）の葉の香り成分と比較した (Huang *et al.*, 2020)。柑橘の果皮の主成分である limonene についてはシークーではかなり微量で、ベルガモットおよびダイダイと同程度であった。また、 β -caryophyllene はベルガモット、ライム、ユズと同程度の含有率であった。炭化水素類の含有率が少ないという点においては、ベルガモットおよびダイダイと共通していた。含酸素成分の主要成分である linalool はシークーでは 16.91%、ベルガモットでは 29.19% と比較的近い値を示したが、linalyl acetate はベルガモットやダイダイで 30% 弱なのに対し、シークーでは約 70% と非常に特異な含有率であることが分かる。その他 1% 以上の含酸素成分についてもシークーの組成と一致するような柑橘はなかった。同柑橘の果皮や他柑橘の葉とは組成が大きく異なっており、とりわけ linalool, linalyl acetate の含有率が高いことから鎮静作用が見込め、アロマセラピーなどへの利用が期待できると考える。

②番所鼻産ハナヤナギ由来トリテルペノイド類に関する研究

鹿児島県南九州市番所鼻産ハナヤナギ [TH14-3-1] (9 kg, 湿重量) を MeOH で抽出し、その抽出物を CH_2Cl_2 と 50% MeOH aq. で二層分配した。得られた CH_2Cl_2 抽出物から各種カラムクロマトグラフィー法を駆使し、compound 1 (1.5 mg)、および compound 2 (0.8 mg) を単離した。

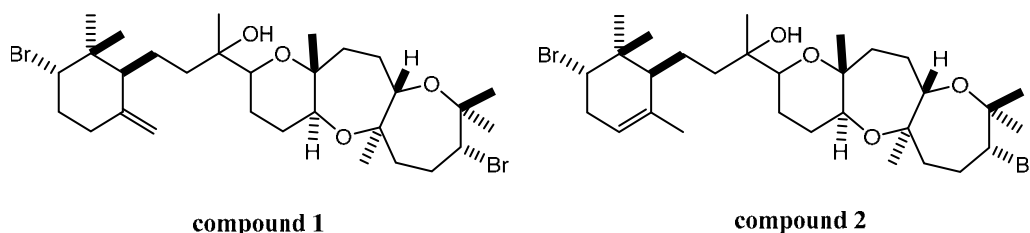


Figure 1. 番所鼻産ハナヤナギから単離した compound 1 および 2 の化学構造

Compound 1 は淡黄色無定形として得られた。Compound 1 の FAB-MS の 3 本の分子イオンピーク m/z 633, 635 および 637 (ピーク強度比 1:2:1)、ならびに HR-FAB-MS の m/z 633.2153 $[\text{M}+\text{H}]^+$ より、その分子式は $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Br}_2$ と決定した。 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY スペクトルより 5 つの部分構造が得られ、さらに、HMBC スペクトルより、H-1 および H-25 から C-2、C-3 および C-7 への相関、H-26 から C-5、C-6 および C-7 への相関、H-27 から C-9、C-10 および C-11 への相関、H-28 から C-14、C-15 および C-16 への相関、H-29 から C-18、C-19 および C-20 への相関、そして H-24 および H-30 から C-22 および C-23 への相関が確認できたことにより、六員環 2 個と七員環 2 個の 4 つの環構造を持つ平面構造が推定できた。BCD 環部分はオーストラリア産ハナヤナギから単離された armatol B (Ciavatta *et al.*, 2001) と同じ構造であったが、A 環が六員環の化合物は今回が初めてである。

さらに NOESY スペクトルより、H-3/H-7 の NOE 相関と H-11/H-28、H-28/H-16 δ 、H-

16B/H-18、および H-18/H-22 の NOE 相関が見られたことから、これらのプロトンが同一方向に配向していることが分かった。また、H-14/H-29 の NOE 相関より、これらが先程のプロトンとは、逆方向に配向していることが分かった。それにより、A 環と BCD 環のそれぞれの相対配置を決定した。A 環と BCD 環との相対配置については未定である。

Compound 2 は **compound 1** と同様の FAB-MS および HR-FAB-MS (m/z 633.2154 [M+H]⁺) が得られたことから、分子式は C₃₀H₅₀O₄Br₂ と決定した。NMR データも **compound 1** のものとよく似ていたが、**compound 1** の A 環上のエキソメチレンプロトンのシグナルが消失し、代わりに、新たなオレフィンプロトンとメチルプロトンのシグナルが現れたこと、および HMBC スペクトルより、そのメチルプロトン Me-26 より C-5 と C-6 のオレフィン炭素ならびに C-7 に相関を示すことにより、**Figure 1** に示す平面構造と決定した。

また、相対配置についても **compound 1** と同様であった。一部の相対配置ならびに絶対配置については未決定であるが、過去に単離された *armatol* 類と同様と考える。

単離した 2 つの化合物の SIT 細胞に対する細胞増殖阻害活性試験を行ったところ、**compound 1** において 6.3 μM、**compound 2** において 4.6 μM とやや強い細胞傷害活性を有した。なお、本試験は Cell Counting Kit-8 を用いており、生細胞数に比例したホルマザン色素の蛍光強度で評価している。

謝辞

本研究を遂行してくれた当研究室の原野 加奈子さん、鶴丸 広樹君、および有機化学研究室の皆さんのご協力に感謝します。試料や情報の提供等にご尽力賜りました鹿児島大学農学部の本山 雅史教授、伊地知 告さんに深謝します。

引用文献

- Ciavattaa ML, Wahidulla S, D'Souza L, Scognamiglio G, Cimino G (2001) New bromotriterpene polyethers from the Indian alga *Chondria armata*. *Tetrahedron* 57 (3): 617–623.
- Grimmelt B, Nijjar M, Brown J, Macnair S, Wagner S, Johnson G, Amend J (1990) Relationship between domoic acid levels in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and toxicity in mice. *Toxicon* 28: 501–508.
- Hamada T, Hayasaki M, Kitahara H, Yamashita K, Kariyazaki A, Tani F, Onitsuka S, Okamura H (2017) Essential oil composition of citrus peels in Kikai-jima Island, Japan. *Amer. J. Essen. Oils. Nat. Prod.* 5 (3): 12–15.
- Hamada T, Kobayashi K, Arima N, Tani F, Vairappan CS, Onitsuka S, Okamura H (2020) Two cytotoxic squalene-derived polyethers from the Japanese red alga *Chondria armata*. *Natural Product Research* 35 (23): 1–6.
- Huang Y, Pu Z (2000) The Chemical Composition of the Leaf Essential Oils from 110 Citrus Species, Cultivars, Hybrids and Varieties of Chinese Origin. *Perfumer & Flavorist* 25: 53–66.
- Moore RE, Scheuer PJ (1971) Palytoxin: A New Marine Toxin from a Coelenterate. *Science* 172 (3982): 495–498.
- Ola ARB, Babey AM, Motti C, Bowden BF (2010) Aplysiols C–E, brominated triterpene polyethers from the marine alga *Chondria armata* and a revision of the structure of aplysiol B. *Aust. J. Chem.* 63 (6): 907–914.
- Ola ARB, Babey AM, Bowden BF (2017) Anticancer Triterpene from the Marine Red Algae *Chondria armata*. *Journal of Applied Chemical Science* 4: 318–321.
- Teramoto S, Ninomiya T, Yamamoto M (2017) The Bergamot aroma of local citrus ‘Shiikuu’ (*Citrus* sp.) originating from Kikai Island of Kagoshima Prefecture, Japan: Analysis of its essential oil characteristics and genetic background. *Hort. Res. (Japan)* 16 (3): 239–248.