

博士学位論文

性ホルモン生合成酵素を標的とした
機能性成分の探索研究

—*Mammea siamensis* および *Coreopsis tinctoria*—

近畿大学大学院

薬学研究科薬科学専攻

羅 鳳琳

博士学位論文

性ホルモン合成酵素を標的とした
機能性成分の探索研究

—*Mammea siamensis* および *Coreopsis tinctoria*—

2023年1月12日

近畿大学大学院

薬学研究科薬科学専攻

羅鳳琳

目 次

緒 論	1
本 論	10
第一章 <i>Mammea siamensis</i> 花部の含有成分の探索	
第一節 <i>M. siamensis</i> 花部からの含有成分の抽出・単離	10
第二節 <i>M. siamensis</i> 花部より得られた既知化合物 kayeassamin I (25) の立体決定 および新規化合物 (1—13) の構造解析	14
第三節 抽出エキスおよび含有成分のアロマターゼ阻害活性	46
第四節 含有クマリン成分のアロマターゼ阻害様式	50
第五節 含有クマリン成分のエストロゲン様作用	54
第六節 含有クマリン成分の MCF7 細胞増殖抑制作用	57
第七節 含有クマリン成分の 5 α -リダクターゼ阻害活性	59
第八節 含有クマリン成分の LNCaP 細胞増殖抑制作用	62
第二章 <i>Coreopsis tinctoria</i> 花部の含有成分の探索	
第一節 <i>C. tinctoria</i> 花部からの含有成分の抽出・単離	65
第二節 抽出エキスおよび含有成分のアロマターゼ阻害活性	68
第三節 含有フラボノイド成分のアロマターゼ阻害様式	70
第四節 含有成分のエストロゲン様活性	73
第五節 含有成分の MCF7 細胞増殖抑制作用	75
第六節 含有成分の 5 α -リダクターゼ阻害活性	76
第七節 含有成分の LNCaP 細胞増殖抑制作用	77
結 論	79
実験の部	81
第一章の実験	
第一節の実験	82
第二節の実験	87
第三節の実験	93
第四節の実験	94

第五節および第六節の実験	95
第七節の実験	97
第八節の実験	99
第二章の実験	
第一節の実験	100
第二節の実験	105
第三節の実験	105
第四節の実験	105
第五節の実験	105
第六節の実験	105
第七節の実験	105
引用文献	105

緒 論

乳がんは女性が罹患するがんの中で発症数が最も多いがんである。2020年の全世界における新しく乳がんと診断された女性は約 226 万人であり、乳がんによる死亡者数は約 685,000 例と報告されている¹⁾。

乳がんの発症と進行には女性ホルモンのエストロゲンが重要な役割を果たしている。エストロゲン受容体陽性乳がんは乳がん全体の約 70% を占めており、その発症、増悪にエストロゲンが深く関わっており、エストロゲンの生涯曝露量の増加は、乳がんの発症の最も大きなリスクファクターとも言われている^{2,3)}。そのため、エストロゲンの受容体への結合を阻害する、もしくは、その供給を抑制するホルモン療法が、エストロゲン受容体陽性乳癌に対する治療法として広く認識されている³⁾。

アロマターゼはシトクロム P-450 スーパーファミリーに属し、アンドロゲン基質からのエストロゲンの生合成過程の最終段階を担う律速酵素である(Figure 1)。アロマターゼは胎盤および卵胞の顆粒膜細胞で高度に発現され、皮下脂肪、肝臓、筋肉、脳、正常乳房、乳がん組織などにも低レベルで存在している⁴⁾。閉経前の女性では、エストロゲンは主に卵巣より分泌されるが、閉経後の女性では、卵巣の機能が低下し、エストロゲンは主に副腎由来のアンドロゲンが脂肪組織や筋肉などの末梢組織でアロマターゼにより、ステロイド骨格の A 環が芳香化されることにより産生される (Figure 2)。アロマターゼは乳がん組織にも存在するため、閉経後エストロゲン受容体陽性乳がんにおいて、血中エストロゲン濃度が低くても、乳がん組織内ではエストロゲンの産生が行われている。したがって、アロマターゼを阻害することにより、閉経後乳がん患者体内のエストロゲン合成が抑制され、乳がんに対する治療効果が期待できることから、現在、閉経後エストロゲン受容体陽性乳がんの術後ホルモン療法の第一選択として、アロマターゼ阻害剤の 5 年投与が推奨されている。

アロマターゼ阻害剤は化学構造および作用機序から、ステロイド型および非ステロイド型に分類される (Figure 3 構造式)。ステロイド骨格を有するエキセメスタンは、アロマターゼの基質であるテストステロンおよびアンドロステンジオンと似た構造を持ち、偽基質として競争的にアロマターゼの活性部位に不可逆的に結合し、「自殺基質」としてアロマターゼを不活化する。一方、非ステロイド骨格を有するアミノグルテチミドやレトロゾー

ルなどのアロマトラーゼ阻害剤はアロマトラーゼ基質と異なる構造を持ち、可逆的にアロマトラーゼを阻害し、阻害剤が血中からの消失に伴う阻害活性を失う可能性がある⁵⁻⁸⁾。その長期の投与により耐性を獲得し、また副作用として関節痛や筋肉痛があるため、新たなアロマトラーゼ阻害剤の候補化合物が求められている。

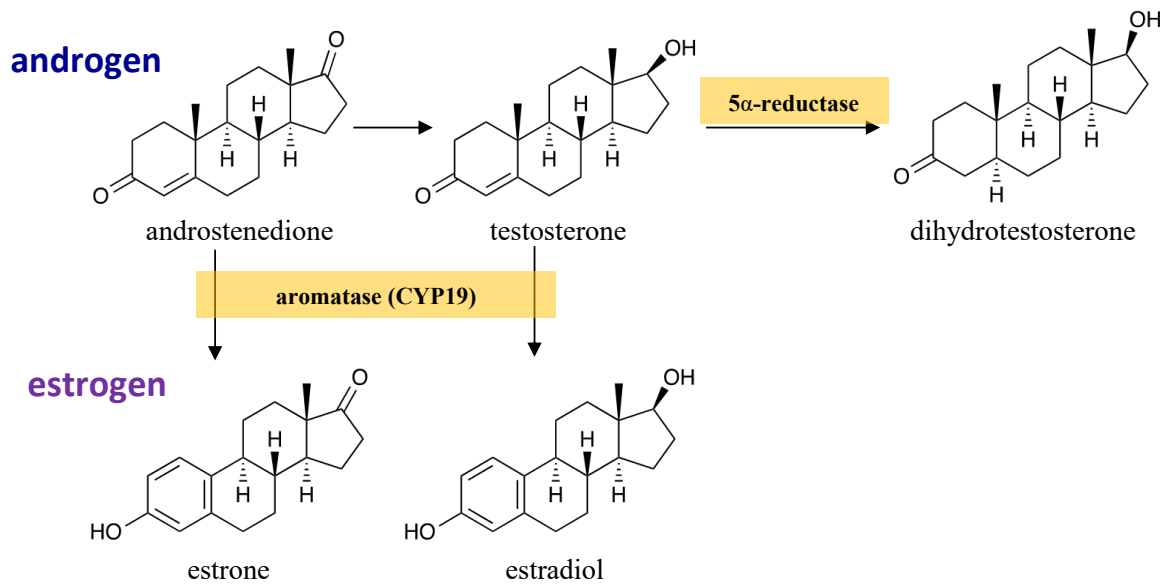


Figure 1. Biosynthetic pathway of estrogens and androgens

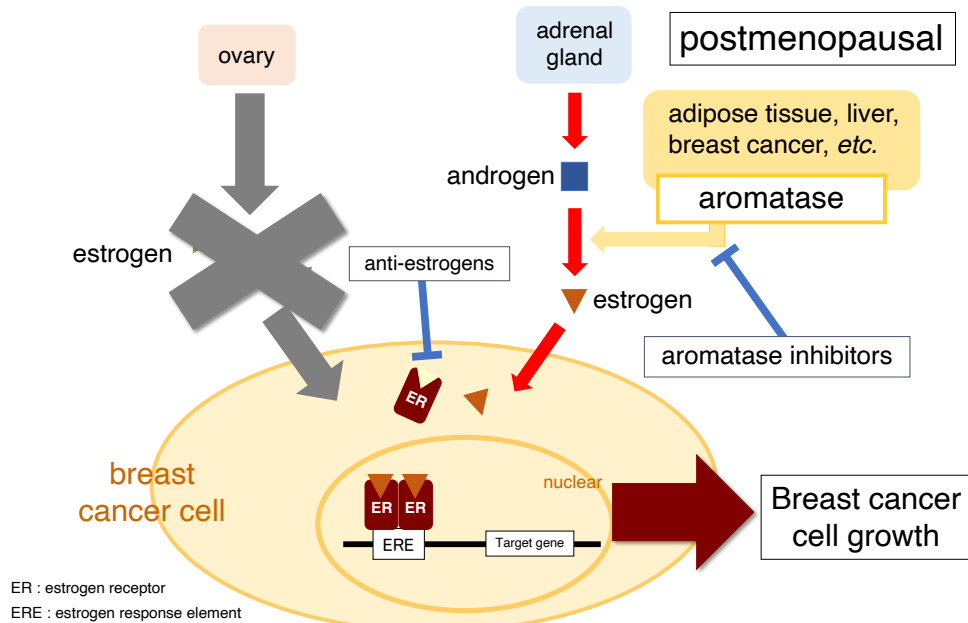
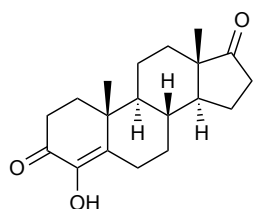
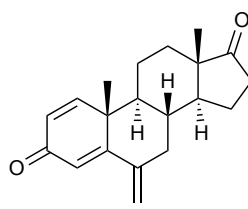


Figure 2. Diagrammatic representation of estrogen action.

Steroidal Aromatase Inhibitors

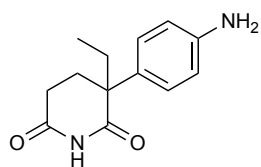


formestane

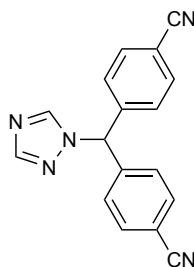


exemestane

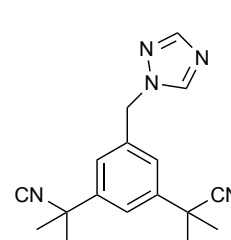
Non-steroidal Aromatase Inhibitors



aminoglutethimide



letrozole



anastrozole

Figure 3. Chemical structures of steroidal and non-steroidal aromatase inhibitors

Figure 1 に示すように、アロマトラーゼによりテストステロンはエストロゲンに合成される。また、同じステロイドホルモン生合成酵素のうち、 5α -リダクターゼはアロマトラーゼと同様にテストステロンを基質とし、ジヒドロテストステロン (DHT) に変換する。DHT はテストステロンと比較し、アンドロゲン受容体への親和力が 5 倍高い活性型のアンドロゲンである⁹⁾。DHT とテストステロンなどのアンドロゲンは、前立腺の発達と維持に必要である以外、アンドロゲン受容体 (AR) を介して前立腺がんや前立肥大症などの疾患の発症や進行に関与していることが知られている¹⁰⁾。

前立腺がんは、肺がんに次いで、世界中の男性で発症率が 2 番目に高い悪性腫瘍である。その発症率は地域、人種によって異なり、ヨーロッパや北アメリカ等における前立腺がんの発症率は日本を含む東アジア地域より 4–5 倍高く、特にアフリカ系アメリカ人の前立腺がん発症率世界中で最も高いことが報告されている¹¹⁾。その一因として、日本人男性より欧米の男性体内の 5α -リダクターゼ活性が高いことが示唆されている¹²⁾。前立腺がん現在の治療法として、がんが前立腺の中または周辺組織にとどまっている場合、ほとんどの患者で手術または放射線療法が効果的であるが、移転性または進行性前立腺がんに対してアンドロゲン低下療法 (androgen deprivation therapy, ADT) が標準療法とされている¹⁴⁾。しかし、前立腺がんの多くは長く ADT 治療を続けていると反応が弱くなり、抵抗性を獲得して再発し、アンドロゲン非依存性の去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) に進行し、ドセタキセルなどの化学療法剤が使用されるが、また耐性が生じ治療効果が弱くなる^{13,14)}。また近年、前立腺癌における 5α -リダクターゼ阻害に関する再評価研究が盛んに行われてる。すなわち、 5α -リダクターゼを阻害することにより DHT の生成量を減し、前立腺がんの発症を抑制することが期待できると考えられており、Ian M Thompson のグループが 2003 年に発表した前立腺がん予防試験 (PCPT) に関する研究では、 5α -リダクターゼ阻害薬である finasteride の投与により前立腺がんの長期的に発症率が抑制されるという結果が報告されている^{15–17)}。また、同グループが 2019 年に発表した同試験を約 20 年追跡した結果から、finasteride の使用は前立腺がんの死亡リスクも 25%低下させることが明らかになった。以上のことから、 5α -リダクターゼを標的とすることで、前立腺がん発症を抑制することに寄与できるものと考えられる。

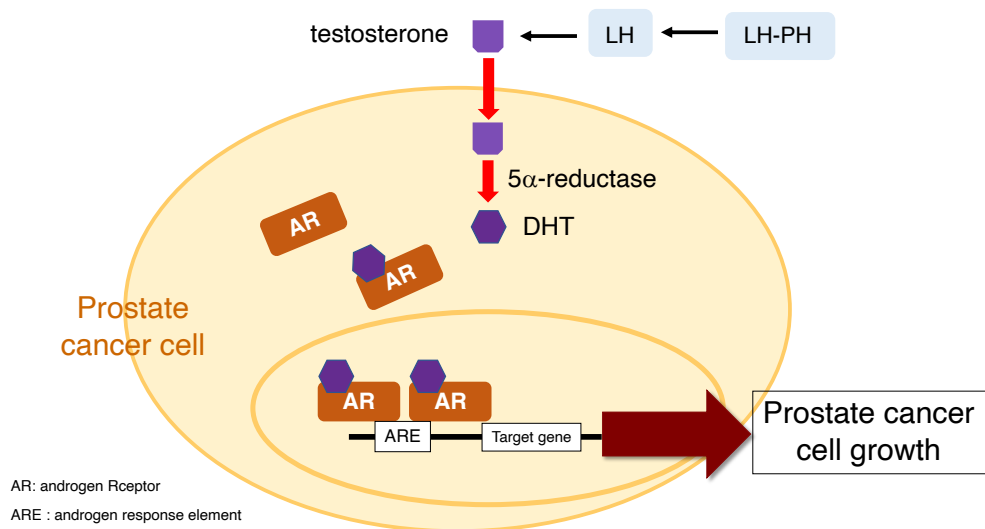


Figure 4. Diagrammatic representation of androgen action.

以上の背景から、著者の研究室にて保有している世界各地の天然資源の抽出エキスをライブラリーからこれら、性ホルモン合成酵素を標的とした阻害活性成分の探索研究を行った。その結果、タイ天然薬物 *Mammea siamensis* 花部の MeOH 抽出エキスと雪菊 *Coreopsis tinctoria* 花部の MeOH 抽出エキスにアロマターゼ阻害活性を見いだした。さらに、それらの含有成分を精査した結果、*M. siamensis* 花部より計 13 (1–13) 種の新規クマリン化合物を単離・構造決定するとともに、36 種の既知化合物を単離・同定した。また、*C. tinctoria* 花部より 24 種の既知化合物を単離・同定した。比較的に強いアロマターゼ阻害活性が認められた *M. siamensis* 花部より得られた化合物 **16, 17, 35**, および *C. tinctoria* 花部より得られた化合物 **50, 55** はヒト乳腺がん由来細胞株 MCF7 においてエストロゲン様作用を示さず、競合的にアロマターゼを阻害することが明らかになった。また、*M. siamensis* 花部より得られた化合物 **1, 14, 15, 38, 39** には 5α-リダクターゼ阻害活性が認められ、ヒト前立腺がん細胞 LNCaP における細胞増殖抑制活性も有することを明らかにした。

Mammea siamensis

テリハボク科 (Calophyllaceae) 植物 *Mammea siamensis* は、タイをはじめミャンマー、ラオス、ベトナムなどの東南アジア地域に広く分布する常緑樹である^{18,19}。 *M. siamensis* はタイにおいては Sarapee と称され、その花部は古くから民間薬として慢性心不全や解熱、食欲不振の改善などに用いられてきた^{18,20,21}。 *M. siamensis* の含有成分の研究に関して、これまでに花部、枝、樹皮および種子よりクマリン、キサントンおよびテルペン類化合物の単離が報告されている^{18,20,22-26}。 さらに、エキスおよび含有成分の薬理活性について、これまでに抗アレルギー作用²¹、がん細胞に対する抗増殖活性^{19,25} および抗マラリア活性¹⁸ などが報告されている。

今回、 *M. siamensis* 花部の MeOH 抽出エキス ($IC_{50} = 16.5 \mu\text{g/mL}$)、 およびその分画である EtOAc 移行部 ($IC_{50} = 2.9 \mu\text{g/mL}$) および MeOH 溶出部 ($IC_{50} = 8.5 \mu\text{g/mL}$) にアロマターゼ阻害活性が認められ、同活性の集約が認められた EtOAc 移行部について含有成分の精査を行った。 その結果、新規クマリン **1-13** (Figure 5) を単離・構造決定するとともに、計 36 種の既知化合物を単離・同定した²⁷⁻³¹。 *M. siamensis* 花部含有成分のアロマターゼ阻害活性を評価した結果、新規プレニルクマリンである mammeasins K (**7**, $IC_{50} = 7.6 \mu\text{M}$)、 および既知化合物である mammeasin B (**15**, $4.1 \mu\text{M}$)、 C (**16**, $2.8 \mu\text{M}$)、 D (**17**, $3.6 \mu\text{M}$)、 mammea B/AB cyclo D (**35**, $3.1 \mu\text{M}$) などの化合物に比較的強い活性が認められ、主活性成分として明らかにした。 また、これらの化合物は競合的にアロマターゼを阻害し、特に **35** ($K_i = 0.84 \mu\text{M}$) は第一世代アロマターゼ阻害剤である aminoglutethimide ($K_i = 0.84 \mu\text{M}$) と同程度の阻害活性を有することを明らかにした。 また、 **16**, **17** および **35** はヒト乳がん由来細胞株 MCF7 においてエストロゲン様作用も示さず、アロマターゼと共通基質を有する 5α -リダクターゼ阻害活性も認められなかったことから、 **16**, **17** および **35** は選択的アロマターゼ阻害剤シーズとしての可能性が示唆された。

また、化合物 **1**, **14**, **15**, **38**, **39** には 5α -リダクターゼ阻害活性が認められた。 得られた化合物についてヒト前立腺がん由来細胞株 LNCaP 細胞における細胞増殖抑制作用を評価し、その結果、 **14**, **15**, **38-40** などの化合物に強い LNCaP 細胞増殖抑制活性が認められた。

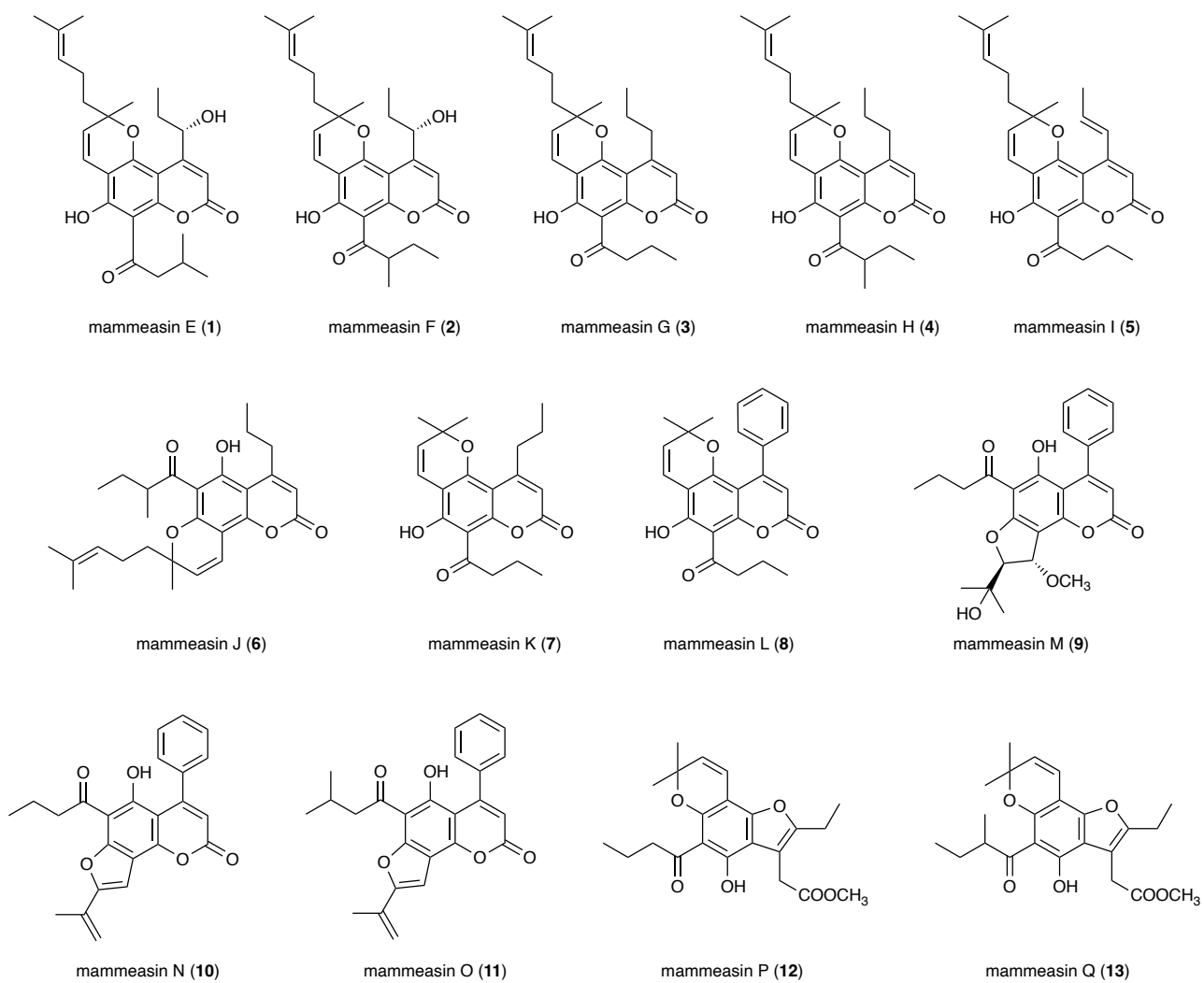


Figure 5. New compounds 1–13 from flowers of *M. siamensis*

Coreopsis tinctoria

Coreopsis tinctoria Nutt. は北アメリカ原産のキク (Asteraceae) 科ハルシヤギク属の一年草であり、現在は世界中に分布している。アメリカ先住民は *C. tinctoria* の根部のお茶を下痢、出血などの疾患の治療や催吐剤として利用されている^{32,33}。 *C. tinctoria* は 1900 年頃には、中国に伝来し、観葉植物として栽培されていた³⁴。現在中国においては主に新疆ウイグル自治区崑崙山周辺に栽培されており、崑崙山脈の標高 3,000 メートル以上の積雪地にも自生していることから、「雪菊」または「崑崙菊」と呼ばれている。また、新疆ウイグル自治区において、*C. tinctoria* の頭状花部は解熱、解毒、血液循環の促進、心血管疾患の予防および高血圧の治療などの目的で茶飲料として使用されており³⁵⁻³⁷、ポルトガルにおいてはその煎出液は伝統的に高血糖の改善を目的に用いられている (*C. tinctoria* はポルトガル語で「Estrelas do Egipto」と称される)^{33,38}。

C. tinctoria の含有成分に関する研究では、フラボノイド、ポリアセチレン、多糖類、脂肪酸や揮発性物質などの化合物が多く報告されている³⁹⁻⁴⁴。また、*C. tinctoria* のエキスおよび含有成分の薬理作用について、これまでにインスリン抵抗性改善効果^{45,46}、抗高血糖活性^{37,45,47}、抗酸化活性^{33,48}、抗高血圧^{35,43} および抗炎症活性^{37,49} などが報告されている。

C. tinctoria 乾燥花部の MeOH 抽出エキス ($IC_{50} = 36.9 \mu\text{g/mL}$) にアロマターゼ阻害活性を見いだしたことから、その活性を指標に含有成分を精査した。その結果、MeOH 抽出エキスより調製した EtOAc 移行部および MeOH 溶出部より、計 24 種 (**50-73**) の既知化合物を単離・同定した (Figure 6)。それらの含有成分についても同様に活性を検討した結果、okanin (**50**, $IC_{50} = 8.4 \mu\text{M}$)、(2*S*)-naringenin (**54**, $7.8 \mu\text{M}$)、isookanin (**55**, $4.9 \mu\text{M}$)、(2*S*)-7,3',5'-trihydroxyflavanone (**56**, $1.2 \mu\text{M}$) および (2*S*)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (**57**, $2.0 \mu\text{M}$) に強い阻害活性が認められ、いずれも競合阻害剤としてアロマターゼを阻害することが明らかになった。また、**50** および **55** はヒト乳腺がん由来細胞株 MCF7 においてエストロゲン様作用も示さず、アロマターゼと共通基質を有する 5 α -リダクターゼの活性への影響を与えなかったことから、**50** および **55** は選択的アロマターゼ阻害剤シーズとしての可能性が示唆された。

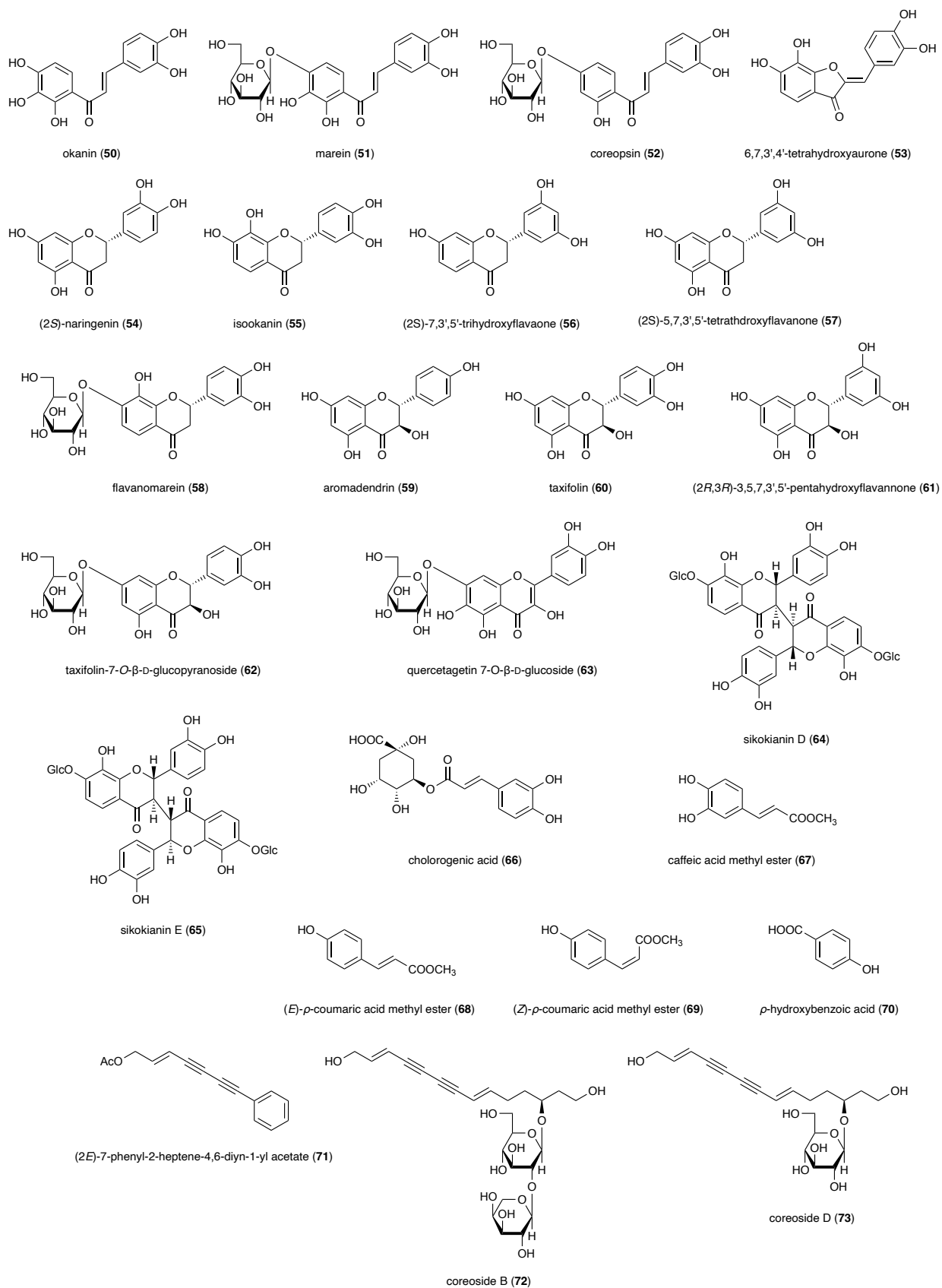


Figure 6. Chemical structures of isolated constituent from flowers of *C. tinctoria*

本 論

第一章 *Mammea siamensis* 花部の含有成分の探索

第一節 *M. siamensis* 花部からの含有成分の抽出・単離

タイ産 *M. siamensis* の乾燥花部 (1.8 kg) を粉碎し, MeOH にて熱時抽出 (80°C, 3 h, 3 回) した. 得られた MeOH 抽出液を減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (463.7 g, 生薬からの収率 25.66%) を得た. この MeOH 抽出エキス (413.7 g) を EtOAc/H₂O にて分配し, EtOAc 移行部 (110.34 g, 6.84%) および H₂O 移行部を得た. さらに H₂O 移行部を Diaion HP-20 column (2.4 kg, H₂O→MeOH) に付し, H₂O 溶出部 (217.70 g, 13.50%) および MeOH 溶出部 (68.10 g, 4.22%) を得た. 得られた EtOAc 移行部 (89.45 g) を順相シリカゲル, 逆相 ODS カラムクロマトグラフィー, 次いで逆相 HPLC により繰り返し分離精製し, 計 13 種の新規化合物 (**1—13**) を単離・構造決定する²⁷⁻²⁹) (Figure 8) とともに 34 種の既知クマリン (Figure 9) mammeasin A²⁷) (**14**), mammeasin B²⁷) (**15**), mammeasin C²⁷) (**16**), mammeasin D²⁷) (**17**), surangin B⁵⁰) (**18**), surangin C⁵¹) (**19**), surangin D²⁵) (**20**), kayeassamin A⁵²) (**21**), kayeassamin E⁵³) (**22**), kayeassamin F⁵³) (**23**), kayeassamin G⁵³) (**24**), kayeassamin I⁵³) (**25**), 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(2-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-*de*]chromen-2-one²⁰) (**26**), 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(3-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-*de*]chromen-2-one²⁰) (**27**), mammea A/AA^{51,54}) (**28**), mammea A/AB⁵¹) (**29**), mammea A/AC⁵⁴) (**30**), mammea A/AD⁵⁵⁻⁵⁷) (**31**), mammea A/AA cyclo D^{18,51,58}) (**32**), mammea A/AB cyclo D^{51,58}) (**33**), mammea A/AC cyclo D^{54,59}) (**34**), mammea B/AB cyclo D⁵⁵) (**35**), mammea B/AC cyclo D⁵⁹) (**36**), mammea B/AC cyclo F (**37**)^{55,58}), mammea E/BA^{60,61}) (**38**), mammea E/BB^{50,60,61}) (**39**), mammea E/BC⁶¹) (**40**), , mammea E/BC cyclo D²³) (**41**), mammea E/BD cyclo D²³) (**42**), mammea A/AA cyclo F^{18,55,58,62}) (**43**), mammea A/AC cyclo F⁵⁴) (**44**), deacetylmammea E/AA cyclo D⁶³) (**45**), deacetylmammea E/BB cyclo D⁶³) (**46**), deacetylmammea E/BC cyclo D⁶³) (**47**) に加え, β-amyrin⁶⁴) (**48**), benzoic acid (**49**) を単離・同定した (Figure 7).

既知化合物 **14—49** については, 旋光度や MS, IR, UV および NMR スペクトルなどの物理化学データを文献との比較により同定した.

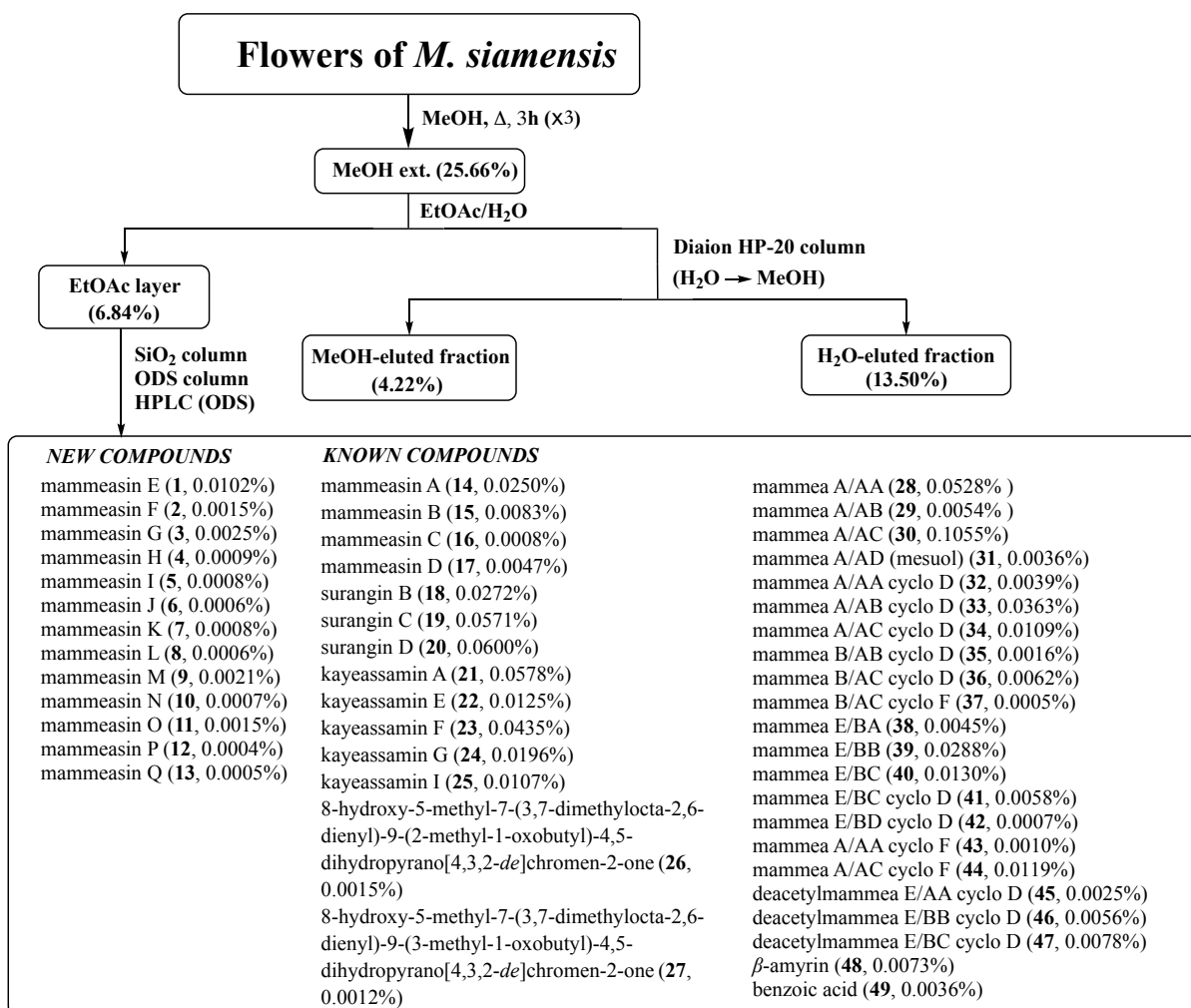


Figure 7. Isolation of chemical constituents from flowers of *M. siamensis*

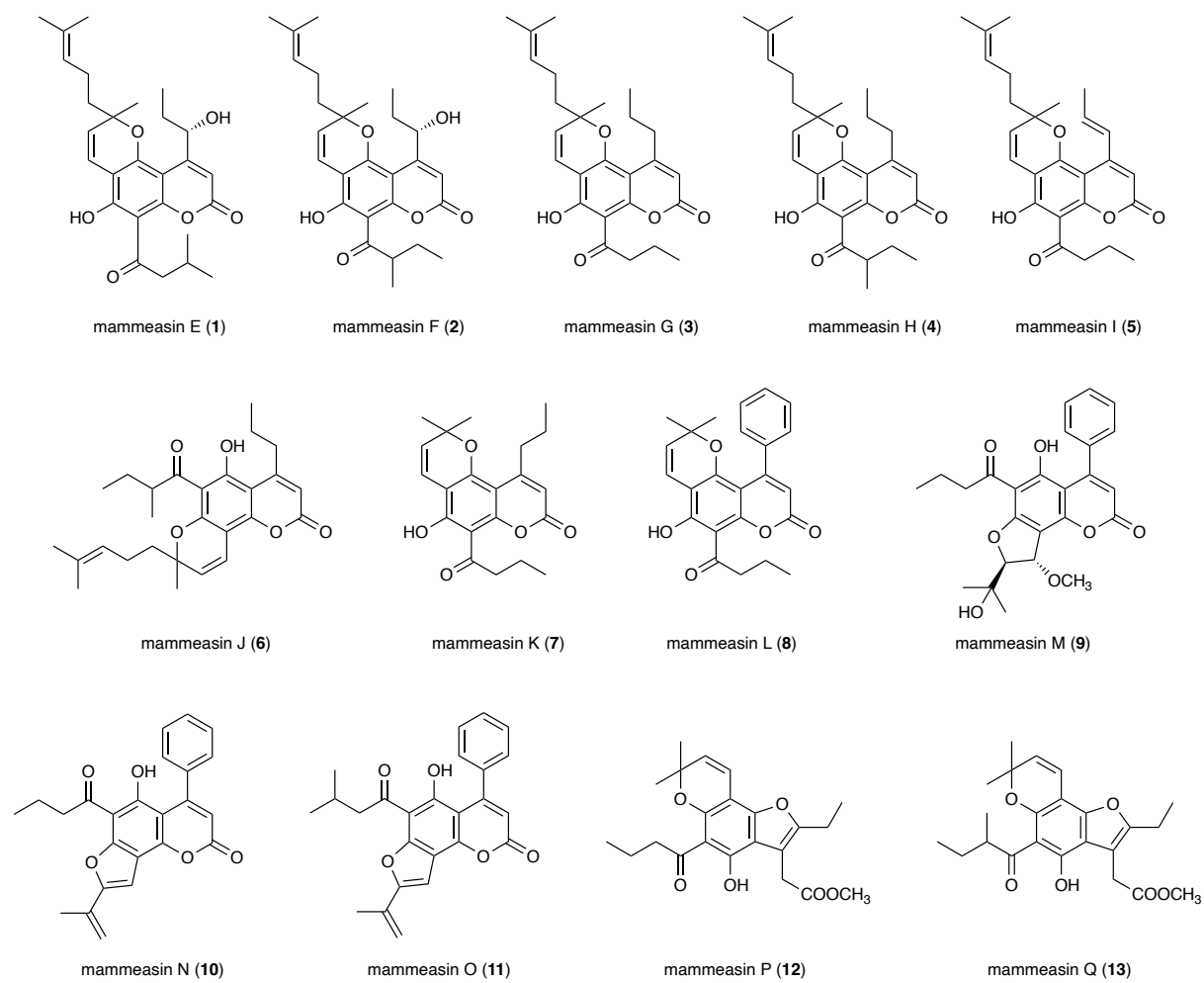


Figure 8. New compounds 1 – 13 from flowers of *M. siamensis*

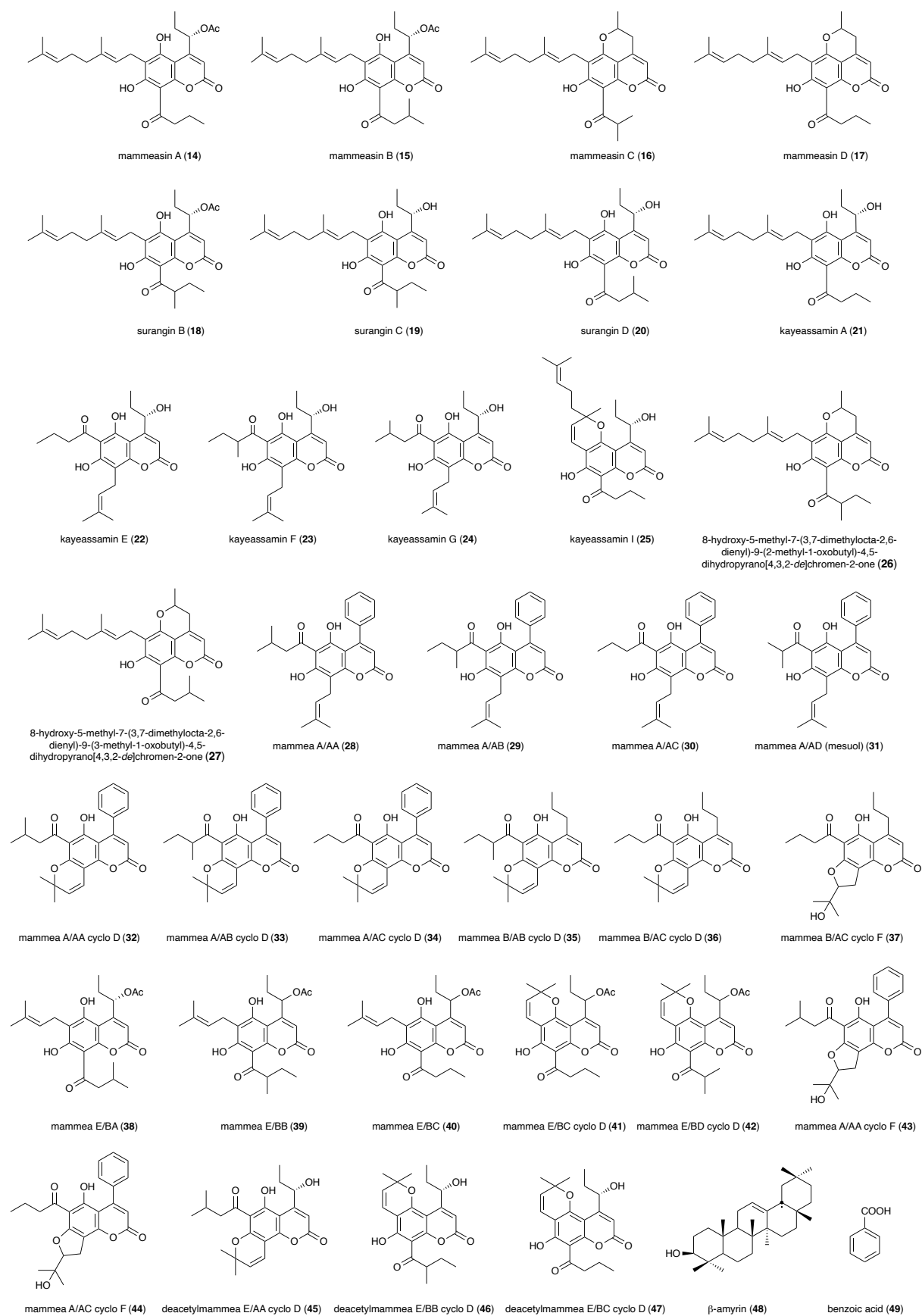


Figure 9. Chemical structures of isolated constituents from flowers of *M. siamensis*

第二節 *M. siamensis* 花部より得られた既知化合物 kayeassamin I (25) の立体決定および新規化合物 1—13 の構造解析

Kayeassamin I (25) は負の旋光性 $[\alpha]_D^{25} -50.4$ ($c = 0.63$, CHCl_3) を有する淡黄色油状物質として得られ, その electron ionization mass spectroscopy (以下, EI-MS) および高分解能 EI-MS から分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_6$ を有することが明らかになった. 25 の水素核磁気共鳴 (以下, $^1\text{H-NMR}$) および炭素 13 核磁気共鳴 (以下, $^{13}\text{C-NMR}$) スペクトルを既知化合物である kayeassamin I⁵³⁾ と比較したところ, 良好な一致が見られ, さらに高分解能 EI-MS の測定結果からも同一の分子式を与えた. Kayeassamin I (25) については報告されている化合物であるが⁵³⁾, その 1' 位および 2'' 位の 2 つの不斉中心のうち, 1' 位は *S* 配置であると決定されていたが, 2'' 位の絶対配置は決定されていなかった. そこで, 化合物 25 のさらなる構造解明を目的とし, 25a と 25b の NMR スペクトルを比較したところ, 大部分のシグナルが類似したが, 2''- CH_3 , 5'', 6'' 位における炭素, 2''- CH_3 , 9'', 10'' 位における水素にて, わずかに異なるシグナルが得られた (Table 1). また, 今回得られた化合物 25 について ODS カラム (COSMOSIL 5C₁₈-MS-II) を用いて HPLC にて分析したところ, 25a, 25b 二つのピークに分かれており, その存在比が 25a:25b = 1:1 であることが明らかになった (Figure 10). 1a, 1b それぞれのピークを分離すると, いずれも時間の経過とともに異性化が起こり, その存在比がまた 1:1 に収束した. 以上の結果から, 25 は 2'' 位に異性化が起こり, (*S*)-体 : (*R*)-体 = 1:1 のジアステレオ化合物であることが推察された.

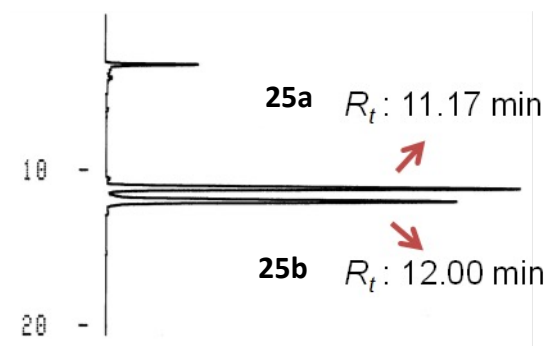


Figure 10 . HPLC analysis of 25

また、**25** の 1' 位の立体化学について、1' 位が *S* 配置と報告されている kayeassamin A (**21**) を 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (以下, DDQ) にて酸化誘導し、化合物 **25** が得られたことから、**25** の 1' 位の立体化学は **21** と同様に *S* 配置であることが確認された (Figure 11).

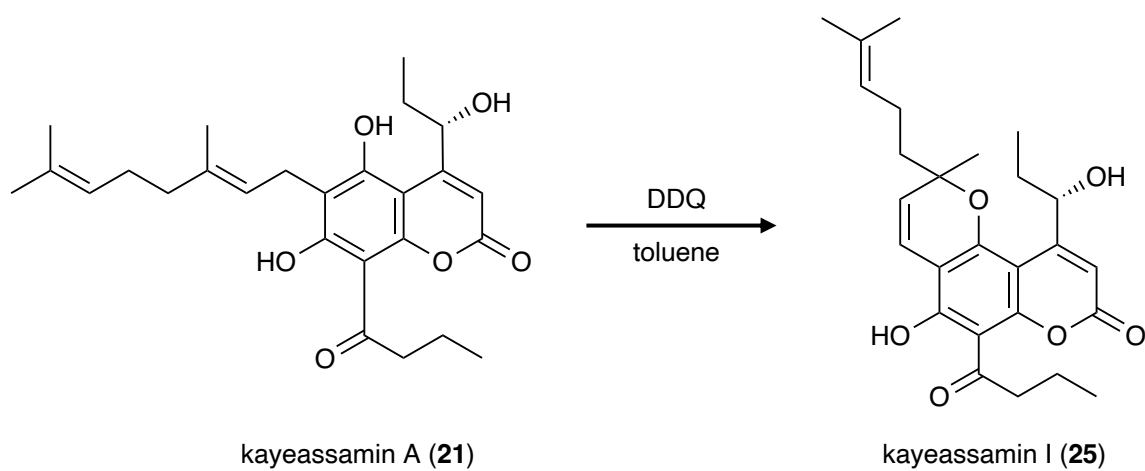


Figure 11 . Preparation of **25** from kayeassamin A (**21**)

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data (CDCl₃) for kayeassamin I (**25a**, **25b**)

position	25a^a		25b^a		25^b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.6		159.6		159.6
3	6.60 (br s)	107.0	6.61 (d, 0.9)	107.2	6.61 (s)	107.0
4		160.6		160.6		160.6
4a		101.0		101.1		101.0
5		155.9		155.9		155.9
6		105.8		106.0		105.8
7		162.9		162.9		162.9
8		104.5		104.6		104.5
8a		157.2		157.2		157.3
1'	5.43 (br t, <i>ca.</i> 8)	71.8	5.43 (br t, <i>ca.</i> 8)	71.7	5.43 (d, 8.1)	71.8
2'	1.51, 1.95 (each m)	30.7	1.53, 1.96 (each m)	30.5	1.50, 1.97 (each m)	30.7
3'	1.11 (3H, t, 7.4)	10.2	1.09 (3H, t, 7.4)	10.1	1.13 (3H, t, 7.4)	10.2
2''		83.0		83.1		83.0
3''	5.53 (d, 10.2)	125.0	5.55 (d, 10.2)	124.8	5.54 (d, 10.0)	124.9
4''	6.78 (d, 10.2)	116.5	6.79 (d, 10.2)	116.6	6.79 (d, 10.0)	116.5
5''	1.71, 1.91 (each m)	41.6	1.71, 1.91 (each m)	41.9	1.90 (2H,m)	41.6
6''	2.09 (2H, m)	23.0	2.09 (2H, m)	23.2	2.09 (2H, m)	23.0
7''	5.06 (qt, 0.9, 7.1)	123.1	5.06 (qt, 0.9, 7.1)	123.0	5.07 (t, 7.1)	123.1
8''		132.6		132.6		132.6
9''	1.64 (3H, d, 0.9)	25.6	1.67 (3H, d, 0.9)	25.6	1.64 (3H, s)	25.6
10''	1.55 (3H, s)	17.6	1.57 (3H, s)	17.7	1.55 (3H, s)	17.7
1'''		206.4		206.4		206.4
2'''	3.26 (2H, t, 7.1)	46.7	3.26 (2H, t, 7.1)	46.7	3.27 (2H, t, 7.1)	46.7
3'''	1.78 (2H, qt, 7.4, 7.1)	18.0	1.78 (2H, qt, 7.4, 7.1)	18.0	1.79 (2H, m)	18.1
4'''	1.04 (3H, t, 7.4)	13.8	1.03 (3H, t, 7.4)	13.8	1.05 (3H, m)	13.8
2''-CH ₃	1.52 (3H, s)	27.2	1.48 (3H, s)	27.5	1.51 (3H, s)	27.3
7-OH	14.47 (s)		14.47 (s)		14.48 (brs)	

^a Measured by 800 MHz for ¹H-NMR and 200 MHz for ¹³C-NMR.

^b Reported in ([53] Win et al., 2008a) by 400 MHz for ¹H-NMR and 100 MHz for ¹³C-NMR.

mammeasin E (**1**) は負の旋光性 $[\alpha]_D^{25}$ -58.9 ($c=0.12$, CHCl_3) を有する淡黄色油状物質として得られ、その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_6$ を有することが明らかになった。**1** について ODS カラム (COSMOSIL 5C₁₈-MS-II) を用い HPLC 分析したところ、**1** は **25** と同様に **1a**, **1b** 二つのピークに分かれており、その存在比が **1a:1b** = 1:1 であることが明らかになった (Figure 12)。**1a**, **1b** それぞれのピークを分離すると、いずれも時間の経過とともに異性化が起これり、その存在比がまた 1:1 に収束した。また、**1** の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルデータ (CDCl_3 , Table 2) は化合物 **25** と類似しており、**25** の 8 位の 1-oxobutyl 基の代わりに、**1** の 8 位に 3-methyl-1-oxobutyl 基 {**1a** [δ_{H} 1.03 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H_3 -4" and H_3 -5"), 2.27 (1H, m, H-3"), 3.14 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H_2 -2"); **1b** [δ_{H} 1.03 (6H, d, $J = 6.6$ Hz, H_3 - 4" and H_3 -5"), 2.27 (1H, m, H-3"), 3.14 (2H, d, $J = 6.7$ Hz, H_2 -2")] に由来するシグナルが観察された。また、**1** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、¹H-¹H COSY において、Figure 13 に太線で示した部分構造が明らかになった。さらに、HMBC スペクトルにおいて、Figure 13 に矢印で示したように、3 位プロトン [**1a**: δ_{H} 6.61 (1H, d, $J = 0.9$ Hz, H-3); **1b**: δ_{H} 6.59 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-3)] から C-2 (**1a**: δ_{C} 159.6; **1b**: δ_{C} 159.6), 4a (**1a**: δ_{C} 101.0; **1b**: δ_{C} 101.1), 1' (**1a**: δ_{C} 71.8; **1b**: δ_{C} 71.7); 7 位水素結合したヒドロキシプロトン [**1a**: δ_{H} 14.51 (1H, s, 7-OH); **1b**: δ_{H} 14.51 (1H, s, 7-OH)] から C-6 (**1a**: δ_{C} 105.8; **1b**: δ_{C} 106.0), 7 (**1a**: δ_{C} 163.0; **1b**: δ_{C} 163.0), 8 (**1a**: δ_{C} 104.5; **1b**: δ_{C} 104.6); 1' 位プロトン [**1a**: δ_{H} 5.40 (1H, br t, $J = ca.$ 8 Hz, H-1'); **1b**: δ_{H} 5.40 (1H, br t, $J = ca.$ 8 Hz, H-1')] から C-3 (**1a**: δ_{C} 107.0; **1b**: δ_{C} 107.1), 4a; 3" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 5.53 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3"); **1b**: δ_{H} 5.54 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3")] から C-6 (**1a**: δ_{C} 105.8; **1b**: δ_{C} 106.0), 2" (**1a**: δ_{C} 83.0; **1b**: δ_{C} 83.1), 2"-CH₃ (**1a**: δ_{C} 27.3; **1b**: δ_{C} 27.5); 4" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 6.79 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4"); **1b**: δ_{H} 6.78 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4")] から C-5 (**1a**: δ_{C} 156.0; **1b**: δ_{C} 156.0), 6; 5" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 1.71, 1.90 (each 1H, m, H_2 -5"); **1b**: δ_{H} 1.71, 1.90 (each 1H, m, H_2 -5")] から C-2", 2"-CH₃; 7" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 5.06 (1H, qt, $J = 1.0, 7.1$ Hz, H-7"); **1b**: δ_{H} 5.06 (1H, qt, $J = 1.0, 7.1$ Hz, H-7")] から C-9" (**1a**: δ_{C} 25.5; **1b**: δ_{C} 25.6), 10" (**1a**: δ_{C} 17.6; **1b**: δ_{C} 17.7); 9" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 1.64 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-9"); **1b**: δ_{H} 1.67 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H-9")] から C-7" (**1a**: δ_{C} 123.1; **1b**: δ_{C} 123.0), 8" (**1a**: δ_{C} 132.6; **1b**: δ_{C} 132.5), 10"; 10" 位プロトン [**1a**: δ_{H} 1.52 (3H, s, H-10"); **1b**: δ_{H} 1.54 (3H, s, H-10")] から C-7"-9"; 2" 位プロトンから C-1" (**1a**: δ_{C} 206.2; **1b**: δ_{C} 206.2) の間に HMBC スペクトルの相関が観測され

たことから, **1** の平面構造が明らかになった. 以上の結果から, **1** も **25** と同様に 2'' 位に異性化が起こり, (S)-体 : (R)-体 = 1:1 のジアステレオ化合物であることが推察された.

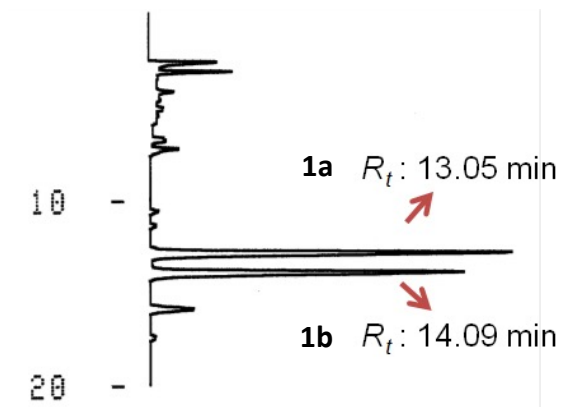


Figure 12 . HPLC analysis of **1**

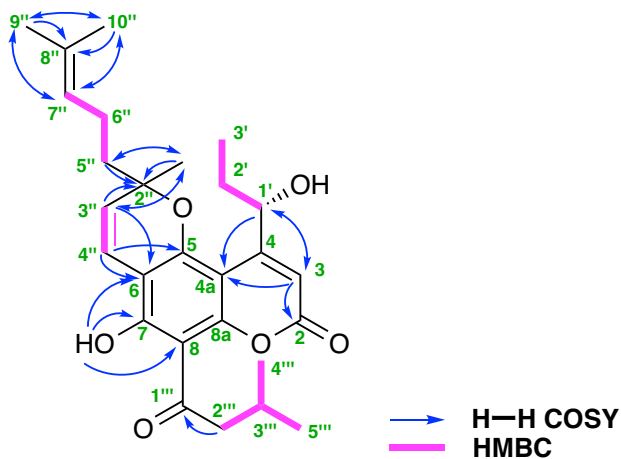


Figure 13. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **1**

さらに、**1** の 1' 位の絶対立体配置を決める目的で、1' 位が *S* 配置と報告されている surangin D (**20**) を DDQ にて酸化誘導し、化合物 **1** が得られたことから、**1** の 1' 位の立体化学は **20** と同様に *S* 配置であることを決定した (Figure 14).

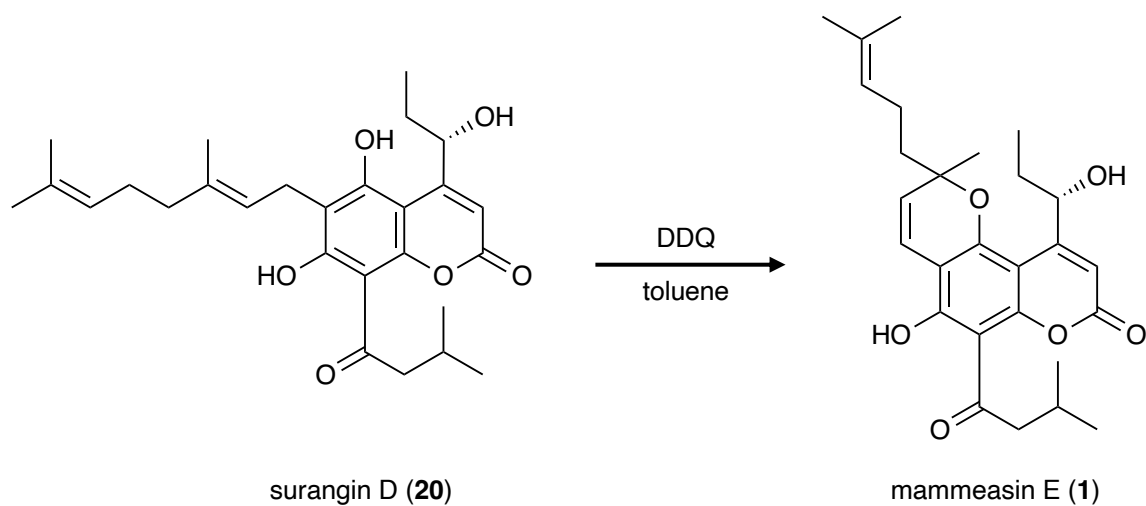


Figure 14. Preparation of **1** from surangin D (**20**)

以上の結果から、**1** の 1' 位の立体化学は *S* 配置であり、また、**1** は **25** と同様に 2'' 位に異性化が起きり、その存在比が (*S*)-体 : (*R*)-体 = 1:1 のジアステレオ化合物であることが推察された。

Table 2. ¹H-NMR (700 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (175 MHz, CDCl₃) spectroscopic data for mammeasin E (**1a**, **1b**)

position	1a		1b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.6		159.6
3	6.61 (d, 0.9)	107.0	6.59 (d, 1.0)	107.1
4		160.7		160.7
4a		101.0		101.1
5		156.0		156.0
6		105.8		106.0
7		163.0		163.0
8		104.5		104.6
8a		157.1		157.1
1'	5.40 (br t, <i>ca.</i> 8)	71.8	5.40 (br t, <i>ca.</i> 8)	71.7
2'	1.53, 1.96 (each m)	30.7	1.53, 1.96 (each m)	30.6
3'	1.12 (3H, t, 7.3)	10.2	1.09 (3H, t, 7.1)	10.1
2''		83.0		83.1
3''	5.53 (d, 10.2)	125.0	5.54 (d, 10.2)	124.9
4''	6.79 (d, 10.2)	116.5	6.78 (d, 10.2)	116.5
5''	1.71, 1.90 (each m)	41.6	1.71, 1.90 (each m)	41.8
6''	2.08 (2H, m)	23.0	2.08 (2H, m)	23.2
7''	5.06 (qt, 1.0, 7.1)	123.1	5.06 (qt, 1.0, 7.1)	123.0
8''		132.6		132.5
9''	1.64 (3H, d, 1.0)	25.5	1.67 (3H, d, 1.0)	25.6
10''	1.52 (3H, s)	17.6	1.54 (3H, s)	17.7
1'''		206.2		206.2
2'''	3.14 (2H, d, 6.7)	53.6	3.14 (2H, d, 6.7)	53.6
3'''	2.27 (m)	25.6	2.27 (m)	25.5
4'''	1.03 (3H, d, 6.6)	22.6	1.03 (3H, d, 6.6)	22.6
5'''	1.03 (3H, d, 6.6)	22.6	1.03 (3H, d, 6.6)	22.6
2''-CH ₃	1.51 (3H, s)	27.3	1.48 (3H, s)	27.5
7-OH	14.51 (s)		14.51 (s)	

mammeasin F (**2**) は負の旋光性 $[\alpha]_D^{25} -42.1$ ($c=0.45$, CHCl_3) を有する淡黄色油状物質として得られ, その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_6$ を有することが明らかになった. **2** について ODS カラム (COSMOSIL 5C₁₈-MS-II) を用い HPLC 分析したところ, **2** も存在比が **2a:2b** = 1:1 二つのピークに分かれていることが明らかになった (Figure 15). **2a, 2b** それぞれのピークを分離すると, いずれも時間の経過とともに異性化が起こり, その存在比がまた 1:1 に収束した. また, **2** の ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルデータ (CDCl_3 , Table 3) は化合物 **1** と類似しており, **2** の 8 位の 3-methyl-1-oxobutyl 基の代わりに, **2** の 8 位に 2-methyl-1-oxobutyl 基 {**2a** [δ_{H} 0.98 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-5''), 1.25 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-3''), 1.46, 1.89 (each 1H, m, H₂-4''), 3.89 (1H, m, H₂-2'')]; **2b** [δ_{H} 0.98 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H₃-5''), 1.26 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, H₃-3''), 1.46, 1.89 (each 1H, m, H₂-4''), 3.89 (1H, m, H₂-2'')]} に由来するシグナルが観察された. また, **2** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ, ¹H-¹H COSY において, Figure 16 に太線で示した部分構造が明らかになった. さらに, HMBC スペクトルにおいて, Figure 16 に矢印で示したように, 3 位プロトン [**2a**: δ_{H} 6.62 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-3); **2b**: δ_{H} 6.61 (1H, d, $J = 1.0$ Hz, H-3)] から C-2 (**2a**: δ_{C} 159.5; **2b**: δ_{C} 159.5), 4a (**2a**: δ_{C} 101.0; **2b**: δ_{C} 101.2), 1' (**2a**: δ_{C} 71.8; **2b**: δ_{C} 71.8); 7 位水素結合したヒドロキシプロトン [**2a**: δ_{H} 14.44 (1H, s, 7-OH); **2b**: δ_{H} 14.44 (1H, s, 7-OH)] から C-6 (**2a**: δ_{C} 105.9; **2b**: δ_{C} 106.1), 8 (**2a**: δ_{C} 104.3; **2b**: δ_{C} 104.3); 1' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 5.43 (1H, m, H-1'); **2b**: δ_{H} 5.43 (1H, m, H-1')] から C-3 (**2a**: δ_{C} 107.1; **2b**: δ_{C} 107.2), 4a; 3'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 5.54 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3''); **2b**: δ_{H} 5.54 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3'')] から C-6 (**2a**: δ_{C} 105.9; **3b**: δ_{C} 106.1), 2'' (**2a**: δ_{C} 83.0; **2b**: δ_{C} 83.1), 2''-CH₃ (**2a**: δ_{C} 27.3; **2b**: δ_{C} 27.5); 4'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 6.79 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4''); **2b**: δ_{H} 6.79 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4'')] から C-5 (**2a**: δ_{C} 155.8; **2b**: δ_{C} 155.8), 6; 5'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 1.71, 1.91 (each 1H, m, H₂-5''); **2b**: δ_{H} 1.71, 1.91 (each 1H, m, H₂-5'')] から C-2'', 2''-CH₃; 7'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 5.06 (1H, dt, $J = 1.3, 7.1$ Hz, H-7''); **2b**: δ_{H} 5.06 (1H, qt, $J = 1.3, 7.1$ Hz, H-7'')] から C-9'' (**2a**: δ_{C} 25.6; **2b**: δ_{C} 25.6), 10'' (**2a**: δ_{C} 17.6; **2b**: δ_{C} 17.7); 9'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 1.64 (3H, br s, H-9''); **2b**: δ_{H} 1.67 (3H, br s, H-9'')] から C-7'' (**2a**: δ_{C} 123.1; **2b**: δ_{C} 123.0), 8'' (**2a**: δ_{C} 132.6; **2b**: δ_{C} 132.6), 10''; 10'' 位プロトン [**2a**: δ_{H} 1.57 (3H, s, H-10''); **2b**: δ_{H} 1.57 (3H, s, H-10'')] から C-7''-9''; 2'' 位プロトンから C-1'' (**2a**: δ_{C} 210.7; **2b**: δ_{C} 210.7) の間に HMBC スペクトルの相関が観測されたことから, **2** の平面構造が明らかになった. 以上の結果から, **2**

も **25** と同様に 2'' 位に異性化が起こり, (*S*)-体 : (*R*)-体 = 1:1 のジアステレオ化合物であることが推察された。

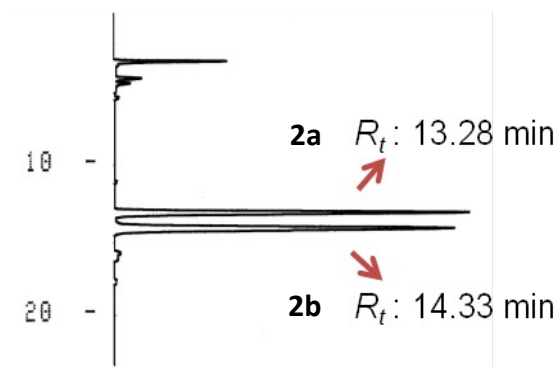


Figure 15. HPLC analysis of **2**

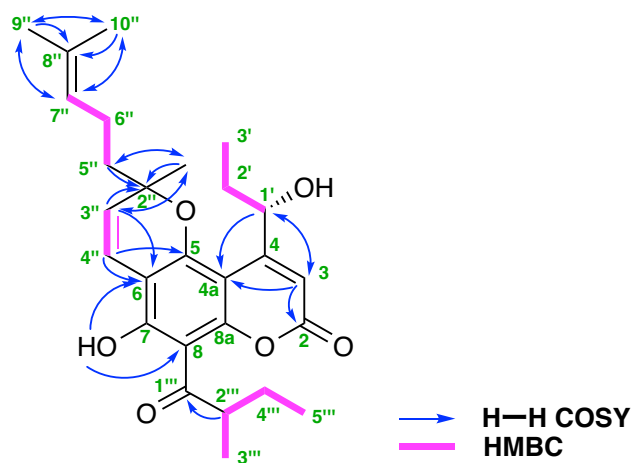


Figure 16. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **2**

さらに、**2** の 1' 位の絶対立体配置を決める目的で、1' 位が *S* 配置と報告されている surangiun C (**19**) を DDQ にて酸化誘導し、化合物 **2** が得られたことから、**2** の 1' 位の立体化学は **19** と同様に *S* 配置であることを決定した (Figure 17).

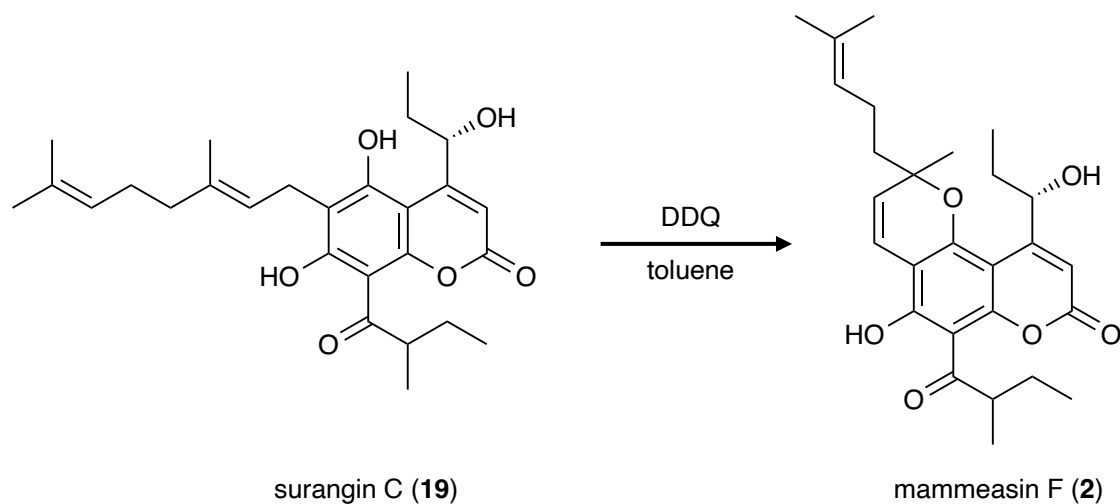


Figure 17. Preparation of **2** from surangiun C (**19**)

以上の結果から、**2** の 1' 位の立体化学は *S* 配置であり、また、**2** も 2'' 位に異性化が起きり、その存在比が (*S*)-体 : (*R*)-体 = 1:1 のジアステレオ化合物であることが推察された。

Table 3. ¹H-NMR (800 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (200 MHz, CDCl₃) spectroscopic data for mammeasin F (**2a**, **2b**)

position	2a		2b	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.5		159.5
3	6.62 (d, 1.0)	107.1	6.61 (d, 1.0)	107.2
4		160.6		1560.5
4a		101.0		101.2
5		155.8		155.8
6		105.9		106.1
7		163.1		163.1
8		104.3		104.3
8a		157.0		156.9
1'	5.43 (m)	71.8	5.43 (m)	71.8
2'	1.52, 1.96 (each m)	30.7	1.52, 1.96 (each m)	30.6
3'	1.12 (3H, t, 7.1)	10.2	1.10 (3H, t, 7.1)	10.1
2''		83.0		83.1
3''	5.54 (d, 10.2)	124.9	5.54 (d, 10.2)	124.8
4''	6.79 (d, 10.2)	116.6	6.79 (d, 10.2)	116.6
5''	1.71, 1.91 (each m)	41.7	1.71, 1.91 (each m)	41.9
6''	2.09 (2H, m)	23.0	2.09 (2H, m)	23.3
7''	5.06 (dt, 1.3, 7.1)	123.1	5.06 (qt, 1.3, 7.1)	123.0
8''		132.6		132.6
9''	1.64 (3H, br s)	25.6	1.67 (3H, br s)	25.6
10''	1.57 (3H, s)	17.6	1.57 (3H, s)	17.7
1'''		210.7		210.7
2'''	3.89 (m)	47.0	3.89 (m)	47.0
3'''	1.25 (3H, d, 6.7)	16.6	1.26 (3H, d, 6.7)	16.6
4'''	1.46, 1.89 (each m)	27.2	1.46, 1.89 (each m)	27.2
5'''	0.98 (3H, t, 7.5)	11.7	0.98 (3H, t, 7.5)	11.7
2''-CH ₃	1.52 (3H, br s)	27.3	1.47 (3H, br s)	27.5
7-OH	14.44 (s)		14.44 (s)	

Mammeasin G (**3**) は淡黄色油状物質として得られ, その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{26}H_{32}O_5$ を有することが明らかになった. 化合物 **3** の赤外吸収 (以下, IR) スペクトルから, α, β -不飽和 γ -ラクトン構造 (1747 cm^{-1}) および共役したラクトンカルボニル基 (1614 cm^{-1}) に由来する吸収が観察された. 次に, **3** の ^1H -および ^{13}C -NMR (CDCl_3 , Table 4) スペクトルから, 5つのメチル基 [δ_{H} 1.036 (3H, t, $J = 7.3\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-3}'$), 1.039 (3H, t, $J = 7.3\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-4}''$), 1.48 (3H, s, $2''\text{-CH}_3$), 1.56 (3H, s, $\text{H}_3\text{-10}''$), 1.65 (3H, br s, $\text{H}_3\text{-9}''$)], 6つのメチレン [δ_{H} 1.66 (2H, m, $\text{H}_2\text{-2}'$), [1.71, 1.89 (each 1H, m, $\text{H}_2\text{-5}''$)], 1.78 (2H, qt, $J = 7.3, 7.0\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-3}'''$), 2.11 (2H, m, $\text{H}_2\text{-6}''$), 2.85, 2.96 (each 1H, m, $\text{H}_2\text{-1}'$), 3.26 (2H, t, $J = 7.0\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-2}'''$)], 4つのオレフィンプロトン [δ_{H} (5.08 (1H, br t, $J = ca. 7\text{ Hz}$, $\text{H-7}''$), 5.53 and 6.78 (each 1H, d, $J = 10.4\text{ Hz}$, $\text{H-3}''$ and $4''$), 6.00 (1H, s, H-3)], および1つの水素結合したヒドロキシプロトン [δ_{H} 14.50 (1H, s, 7-OH)] に由来するシグナルが観察された. **3** の ^1H -NMR および ^{13}C -NMR スペクトルデータは 1' 位のヒドロキシ基を除いて kayeassamin I (**25**) と類似し, また, **3** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ, ^1H - ^1H COSY において, Figure 18 に太線で示した部分構造が明らかになった. また, HMBC スペクトルにおいて, Figure 18 に矢印で示したように, 3位プロトンから C-2 (δ_{C} 159.3), 4a (δ_{C} 102.6), 1' (δ_{C} 39.0); 3''位プロトンから C-6 (δ_{C} 105.7), 2'' (δ_{C} 82.8), 2''- CH_3 (δ_{C} 27.3); 4''位プロトンから C-5 (δ_{C} 157.5), 6; 5''位プロトンから C-2'', 2''- CH_3 ; 7''位プロトンから C-9'' (δ_{C} 25.7), 10'' (δ_{C} 17.1); 9''位プロトンから C-7'' (δ_{C} 123.3), 8'' (δ_{C} 132.5); 10''位プロトンから C-7'', 8''; 2'''位プロトンから C-1''' (δ_{C} 206.4); 7-OH から C-6, 7 (δ_{C} 163.0), 8 (δ_{C} 104.3); 2- CH_3 プロトンから C-2'', 3'' (δ_{C} 124.9), 5'' (δ_{C} 41.8) の間に相関が観測されたことから, 各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 18). 以上の結果から, 化合物 **3** を kayeassamin I (**25**) の 1'-dehydroxylated derivative として決定した.

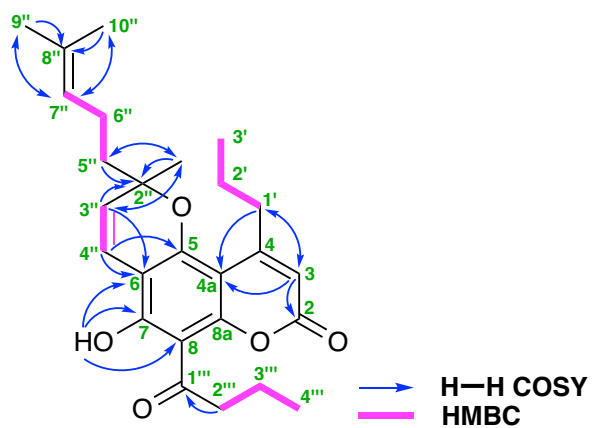


Figure 18. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **3**

Mammeasin H (**4**) は淡黄色油状物質として得られ, その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{27}H_{34}O_5$ を有することが明らかになった. **4** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 4) スペクトルデータは化合物 **3** と類似し, **3** の 8 位の 1-oxobutyl 基の代わりに, **4** の 8 位に 2-methyl-1-oxobutyl 基 [δ_H 0.98 (3H, t-like, $J = ca.$ 7 Hz, $H_{3-5''}$), 1.24 (3H, d, $J = 6.7$ Hz, $H_{3-2''}$), 1.47, 1.90 (each 1H, m, $H_{2-4''}$), 3.90 (1H, m, $H_{2''}$)] に由来するシグナルが観察された. また, **4** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ, 1H - 1H COSY において, Figure 19 に太線で示した部分構造が明らかになった. さらに, HMBC スペクトルにおいて, Figure 19 に矢印で示したように, 3 位プロトン [δ_H 6.00 (1H, s)] から C-2 (δ_C 159.2), 4a (δ_C 102.6), 1' (δ_C 39.0); 1' 位プロトン [δ_H 2.86, 2.96 (each 1H, m)] から C-3 (δ_C 110.4), 4a; 3'' 位プロトン [δ_H 5.53 (1H, d, $J = 10.3$ Hz)] から C-6 (δ_C 105.8), 2'' (δ_C 82.5), 2''-CH₃ (δ_C 27.3); 4'' 位プロトン [δ_H 6.79 (1H, d, $J = 10.3$ Hz)] から C-5 (δ_C 157.1), 6; 5'' 位プロトン [δ_H 1.70, 1.90 (each 1H, m)] から C-2'', 2''-CH₃; 7'' 位プロトン [δ_H 5.07 (1H, qt, $J = 1.0, 7.3$ Hz)] から C-9'' (δ_C 25.6), 10'' (δ_C 17.6); 9'' 位プロトン [δ_H 1.66 (3H, br s)] から C-7'' (δ_C 123.4), 8'' (δ_C 132.4); 10'' 位プロトン [δ_H 1.56 (3H, s)] から C-7'', 8''; 2'' 位プロトン [δ_H 3.90 (1H, m)] から C-1''' (δ_C 210.7); 7-OH [δ_H 14.50 (1H, s)] から C-6, 7 (δ_C 163.1), 8 (δ_C 104.0); 2-CH₃ プロトンから C-2'', 3'' (δ_C 124.9), 5'' (δ_C 41.8) の間に相関が観測されたことから, 各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 19).

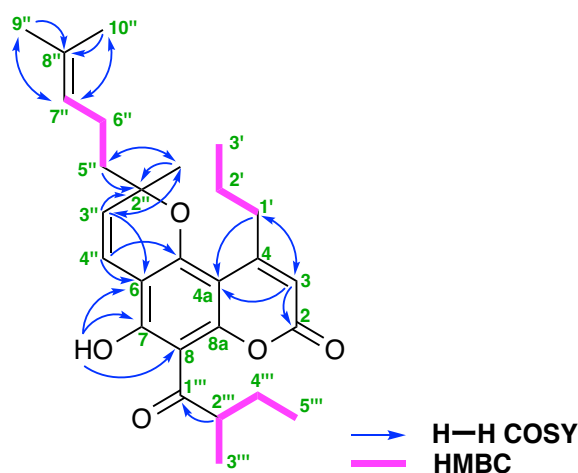


Figure 19. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **4**

Mammeasin I (**5**) は淡黄色油状物質として得られ、その electrospray ionization-mass spectroscopy (以下、ESI-MS) において擬似分子ピークが m/z 445 $[M + Na]^+$ に認められ、高分解能 ESI-MS により分子式 $C_{26}H_{30}O_5$ を有することが明らかになった。**5** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 4) スペクトルデータは 4 位の側鎖構造部分に由来するシグナルを除いて化合物 **3** と類似した。**5** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 4) スペクトルから、5 つのメチル基 [δ_H 1.04 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H_3-4''), 1.47 (3H, s, $2''-CH_3$), 1.55 (3H, s, H_3-10''), and 1.65 (3H, br s, H_3-9''), 1.91 (3H, dd, $J = 1.6, 6.8$ Hz, H_3-3'')], 4 つのメチレン { δ_H [1.70, 1.88 (each 1H, m, H_2-5'')], 1.78 (2H, qt, $J = 7.4, 7.1$ Hz, H_2-3'')}, 2.10 (2H, m, H_2-6''), 3.26 (2H, t, $J = 7.1$ Hz, H_2-2'')}, 6 つのオレフィンプロトン [δ_H 5.07 (1H, br t, $J = ca. 7$ Hz, $H-7''$), 5.52 and 6.75 (each 1H, d, $J = 10.1$ Hz, $H-3''$ and $4''$), 6.08 (1H, br s, $H-3$), 6.08 (1H, dq, $J = 15.6, 6.8$ Hz, $H-2'$), 7.05 (1H, br d, $J = ca. 15.6$ Hz, $H-1'$)] および 1 つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_H 14.53 (1H, s, 7-OH)] に由来するシグナルが観察された。また、**6** の *trans*-2-propenyl side chain の結合位置は、Figure 20 に太線および矢印で示したように、 1H - 1H COSY および HMBC スペクトルの解析より明らかになった。

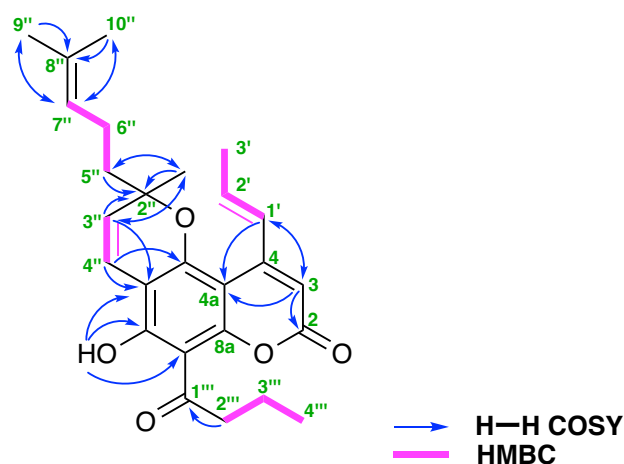


Figure 20. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **5**

Table 4. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) spectroscopic data for mammeasins G (**3**), H (**4**) and I (**5**)

position	3		4		5	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.3		159.2		159.6
3	6.00 (s)	110.4	6.00 (s)	110.4	6.08 (br s)	107.5
4		158.4		158.4		156.9
4a		102.6		102.6		102.0
5		157.5		157.1		157.0
6		105.7		105.8		105.8
7		163.0		163.1		163.2
8		104.3		104.0		104.1
8a		156.9		156.9		153.5
1'	2.85, 2.96 (each m)	39.0	2.86, 2.96 (each m)	39.0	7.05 (br d, <i>ca.</i> 15.6)	130.8
2'	1.65 (2H, m)	23.2	1.68 (m)	23.2	6.08 (dq, 15.6, 6.8)	130.8
3'	1.03 (3H, t, 7.1)	13.8	1.04 (3H, t, 7.4)	14.0	1.91(3H, dd, 1.6, 6.8)	18.7
2''		82.8		82.5		82.3
3''	5.53 (d, 10.4)	124.9	5.53 (d, 10.3)	124.9	5.52 (d, 10.1)	125.4
4''	6.78 (d, 10.4)	116.6	6.79 (d, 10.3)	116.6	6.75 (d, 10.1)	116.3
5''	1.71, 1.89 (each m)	41.8	1.70, 1.90 (each m)	41.8	1.70, 1.88 (each m)	41.6
6''	2.11 (2H, m)	23.2	2.09 (2H, m)	23.1	2.10 (2H, m)	22.7
7''	5.08 (br t, <i>ca.</i> 7)	123.3	5.07 (qt, 1.0, 7.1)	123.4	5.07 (br t, <i>ca.</i> 7)	123.4
8''		132.5		132.4		132.3
9''	1.65 (3H, br s)	25.7	1.66 (3H, br s)	25.6	1.65 (3H, br s)	25.6
10''	1.56 (3H, s)	17.1	1.56 (3H, s)	17.6	1.55 (3H, s)	17.6
2''-CH ₃	1.48 (3H, s)	27.3	1.49 (3H, s)	27.3	1.47 (3H, s)	27.0
1'''		206.4		210.7		206.3
2'''	3.26 (2H, t, 7.0)	46.7	3.90 (m)	46.9	3.26 (2H, t, 7.1)	46.6
3'''	1.78 (2H, qt, 7.3, 7.0)	18.1	1.24 (3H, d, 6.7)	16.5	1.78 (2H, qt, 7.4, 7.1)	18.1
4'''	1.03 (3H, t, 7.3)	13.8	1.47, 1.90 (each m)	27.1	1.04 (3H, t, 7.4)	13.8
5'''			0.98 (3H, t-like, <i>ca.</i> 7)	11.7		
7-OH	14.50 (s)		14.50 (s)		14.53 (s)	

Mammeasin J (**6**) は淡黄色油状物質として得られ、高分解能 ESI-MS により分子式が $C_{27}H_{34}O_5$ を有することが明らかになった。6 の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 5) スペクトルから、6つのメチル基 [δ_H 0.85/0.86 (3H, t-like, $J = ca.$ 7 Hz, H_3-5''), 0.94 (3H, t, $J = 7.1$ Hz, H_3-3'), 1.13/1.14 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H_3-3''), 1.42/1.43 (3H, s, $2'''-CH_3$), 1.49/1.50 (3H, s, H_3-10'''), and 1.59/1.60 (3H, br s, H_3-9''')]; 5つのメチレン { δ_H [1.39, 1.81 (each 1H, m, H_2-4'')], 1.58 (2H, m, H_2-2'), [1.65, 1.83 (each 1H, m, H_2-5''')], 2.04 (1H, m, H_2-6'''), 2.89 (2H, br t, $J = ca.$ 7 Hz, H_2-1')}, 1つのメチン [δ_H 3.69 (2H, ddq, $J = 6.6, 6.9, 6.9$ Hz, H_2-2'')], 4つのオレフィンプロトン [δ_H 5.01 (1H, br t, $J = ca.$ 7 Hz, $H-7'''$), 5.48 and 6.83 (each 1H, d, $J = 10.2$ Hz, $H-3'''$ and $4'''$), 5.89 (1H, s, $H-3$)], および1つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_H 15.24/15.26 (1H, s, 5-OH)] に由来するシグナルが観察された。6 と mammea B/AB cyclo D (**35**) の 1H -NMR および ^{13}C -NMR spectroscopic properties は類似し、6 は 35 より1つのプレニル部分構造に由来するシグナルが観察された。また、6 の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 1H - 1H COSY において、Figure 21 に太線で示した部分構造が明らかになった。また、HMBC スペクトルにおいて、Figure 21 に矢印で示したように、3位プロトンから C-2 (δ_C 160.1), 4a (δ_C 103.3), 1' (δ_C 38.5); 1'位プロトンから C-3 (δ_C 110.2), 4a; 2''位プロトンから C-1'' (δ_C 211.9); 3'''位プロトンから C-8 (δ_C 101.27/101.34), 2''' (δ_C 82.5), 2'''- CH_3 (δ_C 27.11/27.19); 4'''位プロトンから C-7 (δ_C 157.65/157.69), 8; 5'''位プロトンから C-2''', 2'''- CH_3 ; 7'''位プロトンから C-9''' (δ_C 25.6), 10''' (δ_C 17.62/17.63); 9'''位プロトンから C-7''' (δ_C 123.17/123.22), 8''' (δ_C 132.4); 10'位プロトンから C-7'', 8''; 5-OH から C-4a, 5 (δ_C 165.2), 6 (δ_C 106.7); 2'''- CH_3 から C-2''', 3''' (δ_C 124.74/124.79), 5''' (δ_C 41.67/41.79) の間に相関が観測されたことから、6 の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 21)。

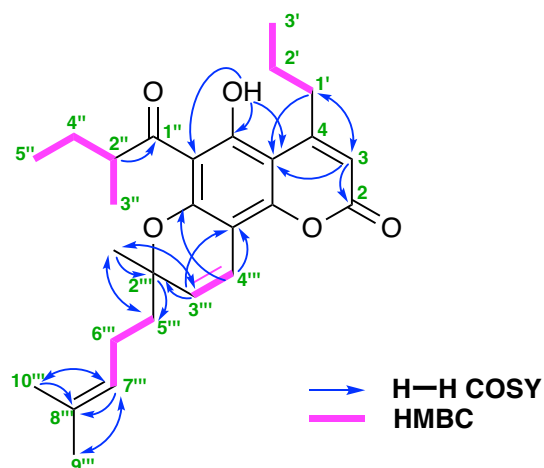


Figure 21. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **6**

Table 5. ^1H -NMR (800 MHz, CDCl_3) and ^{13}C -NMR (200 MHz, CDCl_3) spectroscopic data for mammeasin J (**6**)

6		
position	δ_{H}	δ_{C}
2		160.1
3	5.89 (s)	110.2
4		159.5
4a		103.3
5		165.2
6		106.7
7		157.65 / 157.69
8		101.27 / 101.34
8a		155.0
1'	2.89 (2H, br t, <i>ca.</i> 7)	38.5
2'	1.58 (2H, m)	22.7
3'	0.94 (3H, t, 7.1)	14.0
1''		211.89
2''	3.69 (ddq, 6.6, 6.9, 6.9)	46.6 / 46.7
3''	1.13 / 1.14 (3H, d, 6.9)	16.7 / 17.2
4''	1.39, 1.81 (each m)	26.6 / 26.9
5''	0.85 / 0.86 (3H, t-like, <i>ca.</i> 7)	11.85 / 11.87
2'''		82.5
3'''	5.48 (d, 10.2)	124.74 / 124.79
4'''	6.83 (d, 10.2)	116.3
5'''	1.65, 1.83 (each m)	41.67 / 41.79
6'''	2.04 (2H, m)	23.08 / 23.15
7'''	5.01 (br t, <i>ca.</i> 7)	123.17 / 123.22
8'''		132.4
9'''	1.59 / 1.60 (3H, br s)	25.6
10'''	1.49 / 1.50 (3H, s)	17.62 / 17.63
2'''-CH ₃	1.42 / 1.43 (3H, s)	27.11 / 27.19
5-OH	15.24 / 15.26 (s)	

Mammeasin K (**7**) は淡黄色アモルファス様物質として得られ、その高分解能 ESI-MS から分子式 $C_{21}H_{24}O_5$ を有することが明らかになった。化合物 **7** の IR スペクトルから、 α, β -不飽和 γ -ラクトン構造 (1748 cm^{-1}) および共役したラクトンカルボニル基 (1653 cm^{-1}) に由来する吸収が観察された。次に、**7** の ^1H - および ^{13}C -NMR (CDCl_3 , Table 6) スペクトルから、4つのメチル基 [δ_{H} 1.03 (3H, t, $J = 7.6\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-4}''$), 1.04 (3H, t, $J = 7.6\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-3}''$), and 1.53 (6H, s, $\text{H}_3\text{-5}''$, $\text{H}_3\text{-6}''$)], 4つのメチレン [δ_{H} 1.66, (2H, qt, $J = 7.6, 7.6\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-2}''$), 1.78 (2H, qt, $J = 7.6, 7.3\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-3}''$), 2.90 (2H, t, $J = 7.6\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-1}''$), 3.26 (2H, t, $J = 7.1\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-2}''$)], 3つのオレフィンプロトン [δ_{H} 5.57 (1H, d, $J = 10.1\text{ Hz}$, $\text{H-3}''$), 6.00 (1H, s, H-3), 6.73 (1H, d, $J = 10.1\text{ Hz}$, $\text{H-4}''$)], および1つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_{H} 14.50 (1H, s, 7-OH)] に由来するシグナルが観察された。**7** の ^1H - および ^{13}C -NMR spectroscopic properties は deacetylmammea E/BC cyclo D (**47**) の 1' 位のヒドロキシ基を除いて **47** と類似し、また、**7** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 ^1H - ^1H COSY において、Figure 22 に太線で示した部分構造が明らかになった。また、HMBC スペクトルにおいて、Figure 22 に矢印で示したように、3位プロトンから C-2 (δ_{C} 159.2), 4a (δ_{C} 102.7), 1' (δ_{C} 39.0); 1'位プロトンから C-3 (δ_{C} 110.5), 4 (δ_{C} 158.2), 4a; 3''位プロトンから C-6 (δ_{C} 105.9), 2'' (δ_{C} 79.6); 4''位プロトンから C-5 (δ_{C} 156.5), 7 (δ_{C} 163.0), 2''; 5'' and 6''位プロトンから C-2'', 3'' (δ_{C} 126.3); 2'''位プロトンから C-1''' (δ_{C} 206.4); 7-OH位プロトンから C-6, 7, 8 (δ_{C} 104.3) の間に相関が観測されたことから、**7** の各部分構造の結合位置が明らかになり (Figure 22), さらに、**7** の ^1H - および ^{13}C -NMR スペクトルデータを同じ 2,2-dimethyl-2*H*-pyran および butyryl 基の部分構造を持つ mammea B/AC cyclo D⁶⁰) (**36**) との比較により (Table 6), **7** のクマリン骨格に結合している 2,2-dimethyl-2*H*-pyran および butyryl 基の部分の結合位置が **36** と逆になっていることが確認された。以上の結果から、mammeasin K (**7**) の化学構造が明らかになった。

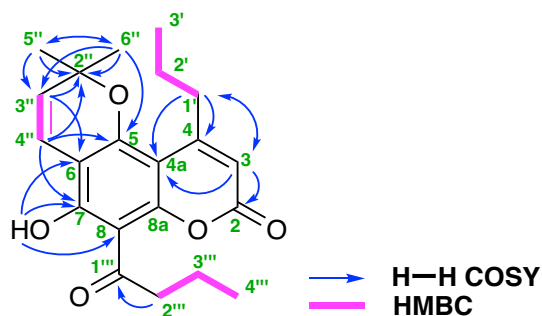


Figure 22. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **7**

Table 6. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic data (CDCl_3) for mammeasin K (**7**) and mammea B/AC cyclo D (**36**).

Position	7^a		Position	mammea B/AC cyclo D (36) [60] ^b	
	δ_{H}	δ_{C}		δ_{H}	δ_{C}
2		159.2	2		160.06
3	6.00 (1H, s)	110.5	3	5.93 (1H, s)	110.32
4		158.4	4		159.49
4a		102.7	4a		103.22
5		156.5	5		165.11
6		105.9	6		106.99
7		163.0	7		157.67
8		104.3	8		101.50
8a		157.4	8a		155.09
7-OH	14.50 (1H, s)		5-OH	15.34 (1H, s)	
1'	2.90 (2H, t, 7.6)	39.0	1'	2.92 (2H, dd, 7.5, 7.6)	38.45
2'	1.66 (2H, qt, 7.6, 7.6)	23.3	2'	1.63 (2H, br sext)	22.74
3'	1.04 (3H, t, 7.6)	13.9	3'	0.99 (3H, t, 7.3)	13.98
2''		79.6	1''		207.47
3''	5.57 (1H, d, 10.1)	126.3	2''	3.06 (2H, t, 7.4)	46.88
4''	6.73 (1H, d, 10.1)	115.9	3''	1.72 (2H, sext, 7.4)	18.28
5''	1.53 (3H, s)	28.2	4''	1.00 (3H, t, 7.4)	13.90
6''	1.53 (3H, s)	28.2	2'''		79.65
1'''		206.4	3'''	5.57 (1H, d, 10.0)	126.20
2'''	3.26 (2H, t, 7.1)	46.7	4'''	6.81 (1H, d, 10.0)	115.67
3'''	1.78 (2H, qt, 7.6, 7.1)	18.0	5'''	1.52 (3H, s)	28.69
4'''	1.03 (3H, t, 7.6)	13.8	6'''	1.52 (3H, s)	29.69

Measured by ^a800 MHz and ^b400 MHz.

Mammeasin L (**8**) は淡黄色アモルファス様物質として得られ、その高分解能 ESI-MS から分子式 $C_{24}H_{22}O_5$ を有することが明らかになった。化合物 **8** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 7) スペクトルデータは化合物 **7** と類似し、**7** の 4 位の propyl 基の代わりに、**8** の 4 位に 1 つの一置換ベンゼン環 [δ_H 7.23 (2H, dd, $J=1.6, 7.8$ Hz, H-2', 6') and 7.39 (3H, m, H-3', 4', 5')] に由来するシグナルが観察された。また、**8** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 1H - 1H COSY において、Figure 23 に太線で示した部分構造が明らかになった。さらに、HMBC スペクトルにおいて、Figure 23 に矢印で示したように、3 位プロトン [δ_H 6.01 (1H, s, H-3)] から C-2 (δ_C 158.9), 4a (δ_C 102.2), 1' (δ_C 140.0); 2', 6' 位プロトンから C-4 (δ_C 156.0); 3'' 位プロトン [δ_H 5.39 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-3'')] から C-6 (δ_C 105.8), 2'' (δ_C 79.0); 4'' 位プロトン [δ_H 6.63 (1H, d, $J=10.1$ Hz, H-4'')] から C-5 (δ_C 166.3), 7 (δ_C 165.2), 2''; 5'', 6'' 位プロトン [δ_H 0.95 (each 3H, s, H₃-5'' and H₃-6'')] から C-2'', 3'' (δ_C 126.8); 2''' 位プロトン [δ_H 3.31 (2H, t, $J=7.3$ Hz, H₂-2''')] から C-1''' (δ_C 206.4); 7-OH [δ_H 14.50 (1H, s, 7-OH)] から C-6, 7, 8 (δ_C 104.3) の間に相関が観測されたことから、**8** の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 23)。さらに、 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、**8** の 2,2-dimethyl-2*H*-pyran および butyryl 基部分に由来するシグナルを同じ構造を持つ mammea A/AC cyclo D (**34**) との比較 (Table 7) により、**8** のクマリン骨格に結合している 2,2-dimethyl-2*H*-pyran および butyryl 基部分の結合位置が **34** と逆になっていることが確認された。以上の結果から、mammeasin L (**8**) の化学構造が明らかになった。

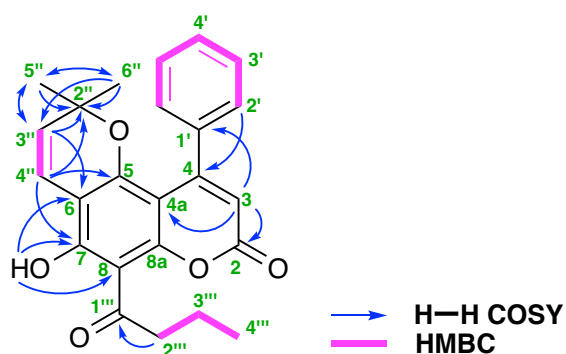


Figure 23. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **8**

Table 7. ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopic data (CDCl₃) of mammeasin L (**8**) and mammea A/AC cyclo D (**34**).

8^a			mammea A/AC cyclo D (34) [52] ^b		
Position	δ_{H}	δ_{C}	Position	δ_{H}	δ_{C}
2		158.9	2		159.63
3	6.01 (1H, s)	111.9	3	5.96 (1H, s)	112.66
4		156.0	4		156.38
4a		102.2	4a		102.15
5		156.2	5		164.37
6		105.8	6		106.97
7		163.6	7		158.20
8		104.0	8		101.48
8a		157.0	8a		154.79
7-OH	14.59 (1H, s)		5-OH	14.73 (1H, s)	
1'		140.0	1'		139.21
2',5'	7.23 (2H, dd, 1.6, 7.8)	127.1	2',5'	7.29 (2H, m)	127.15
3',6'	7.39 (2H, m)	127.6	3',6'	7.38 (2H, m)	127.60
4'	7.39 (1H, m)	127.8	4'	7.38 (1H, m)	128.21
2''		79.0	1''		207.20
3''	5.39 (1H, d, 10.1)	126.8	2''	3.02 (2H, t, 7.3)	46.79
4''	6.63 (1H, d, 10.1)	115.3	3''	1.67 (2H, sext, 7.3)	18.19
5''	0.95 (3H, s)	27.4	4''	0.97 (3H, t, 7.3)	13.07
6''	0.95 (3H, s)	27.4	2'''		79.84
1'''		206.2	3'''	5.60 (1H, d, 10.0)	126.31
2'''	3.31 (2H, t, 7.3)	46.6	4'''	6.86 (1H, d, 10.0)	115.51
3'''	1.82 (2H, qt, 7.6, 7.3)	18.1	5'''	1.55 (3H, s)	28.26
4'''	1.07 (3H, t, 7.6)	13.8	6'''	1.55 (3H, s)	28.26

Measured by ^a800 MHz and ^b400 MHz.

Mammeasin M (**9**) は淡黄色油状物質として得られ、その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{25}H_{26}O_7$ を有することが明らかになった。化合物 **9** の IR スペクトルから、 α , β -不飽和 γ -ラクトン構造 (1748 cm^{-1}) および 共役したラクトンカルボニル基 (1615 cm^{-1}) に由来する吸収が観察された。次に、**9** の ^1H - および ^{13}C -NMR (CDCl_3 , Table 8) スペクトルから、3つのメチル基 [δ_{H} 0.98 (3H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-4}''$), 1.35 and 1.39 (each 3H, s, $\text{H}_3\text{-4}''$ and $\text{H}_3\text{-5}''$)], 2つのメチレン [δ_{H} 1.70 (2H, qt, $J = 7.5, 7.2\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-3}''$), 3.00 (2H, t, $J = 7.2\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-2}''$)]; 1つのメトキシメチル基 [δ_{H} 3.64 (3H, s)]; 2つのメチン [δ_{H} 4.65 and 5.23 (each 1H, d, $J = 2.9\text{ Hz}$, $\text{H-2}''$ and $\text{H-1}''$)]; 1つのオレフィンプロトン [δ_{H} 5.98 (1H, s, H-3)]; 1つの一置換ベンゼン環 [δ_{H} 7.30 (2H, dd, $J = 1.7, 8.1\text{ Hz}$, $\text{H-2}'$ and $\text{H-6}'$), 7.34 (1H, m, $\text{H-4}'$), 7.40 (2H, dd, $J = 7.2, 8.1\text{ Hz}$, $\text{H-3}'$ and $\text{H-5}'$)]; および1つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_{H} 14.65 (1H, s, 5-OH)] に由来するシグナルが観察された。また、**9** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 ^1H - ^1H COSY において、Figure 24 に太線で示した部分構造が明らかになった。さらに、HMBC スペクトルにおいて、Figure 24 に矢印で示したように、3位プロトンから C-2 ($\delta_{\text{C}} 159.2$), 4a ($\delta_{\text{C}} 102.8$), 1' ($\delta_{\text{C}} 1390.0$); 2', 6' 位プロトンから C-4 ($\delta_{\text{C}} 156.5$); 2'' 位プロトンから C-1'' ($\delta_{\text{C}} 205.3$); 1''' 位プロトンから C-7 ($\delta_{\text{C}} 165.2$), 8 ($\delta_{\text{C}} 106.0$), 3''' ($\delta_{\text{C}} 71.2$); 2''' 位プロトンから C-7, 3''', 4''' ($\delta_{\text{C}} 25.9$), 5''' ($\delta_{\text{C}} 25.6$); 4''' 位プロトンから C-2''' ($\delta_{\text{C}} 97.8$), 3''', 5'''; 5''' 位プロトンから C-2''', 3''', 4'''; 5-OH から C-4a, 5 ($\delta_{\text{C}} 166.3$), 6 ($\delta_{\text{C}} 103.0$); 1'''-OCH₃ から C-1''' ($\delta_{\text{C}} 78.7$) の間に相関が観測されたことから、**9** の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 24)。以上の ^1H - ^1H COSY および HMBC スペクトルの解析結果により、**9** の平面構造が明らかになった。

次に、Figure 25 に示すように、**9** の D 環部分の 1''' 位および 2''' 位の立体配置の決定については、絶対配置既知の類縁化合物との ^1H - ^1H カップリング定数の比較および nuclear Overhauser effect (以下、NOE) difference Spectroscopy の相関を用いて決定した。Figure 25 に示したように、 ^1H -NMR スペクトルにおいて、**9** の $^3J_{1''', 2'''} = 2.9\text{ Hz}$ であり、また、絶対配置既知の類縁化合物 mammea A/AA methoxycyclo F (**9a**) の $^3J_{1''', 2'''} = 3.0\text{ Hz}$ であり⁶²⁾、相似の J 値が観察された。加えて、化合物 **9** の $\text{H-2}'''$ と $\text{H-3}'''$ の間に NOE 相関が観察されたため (Figure 25)、**9** の $\text{H-2}'''$ と $\text{H-3}'''$ の相対立体配置が *trans* であることを決定した。以上の結果から、**9** の化学構造を決定した。

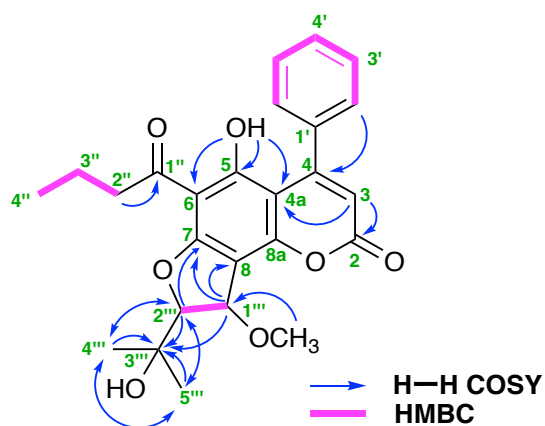


Figure 24. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **9**

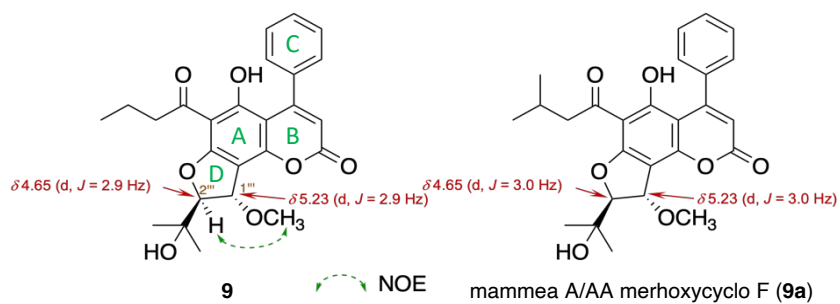


Figure 25. Coupling constant $^3J_{1''',2''''}$ value and difference NOE correlation of **9**.
 Reported value (CDCl_3) of mammea A/AA methoxycyclo F (**9a**) [62]

Table 8. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) and ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) spectroscopic data of mammeasin M (**9**) and mammeaA/AA methoxycyclo F⁶² (**9a**)

Position	9		mammea A/AA methoxycyclo F (9a) [62]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.2		159.8
3	5.98 (1H, s)	112.6	5.99 (1H, s)	112.5
4		156.5		156.5
4a		102.8		102.8
5		166.3		166.5
6		103.0		103.3
7		165.2		164.4
8		106.0		105.9
8a		156.5		156.8
5-OH	14.65 (1H, s)		14.75 (1H, s)	
1'		139.0		139.0
2',5'	7.30 (2H, dd, 1.7, 8.1)	127.2	7.31 (2H, m)	127.2
3',6'	7.40 (2H, dd, 7.2, 8.1)	127.7	7.40 (2H, m)	127.7
4'	7.34 (1H, m)	128.3	7.40 (1H, m)	128.3
1''		205.3		205.1
2''	3.00 (2H, t, 7.2)	45.2	2.81 (1H, dd, 7.0, 15.0) 3.00 (1H, dd, 7.0, 15.0)	52.0
3''	1.70 (2H, qt, 7.5, 7.2)	17.8	2.21 (1H, m)	25.0
4''	0.98 (3H, t, 7.2)	13.8	0.96 (3H, d, 7.0)	22.6
5''			0.96 (3H, d, 7.0)	22.6
1'''	5.23 (1H, d, 2.9)	78.7	5.23 (1H, d, 3.0)	78.6
2'''	4.65 (1H, d, 2.9)	97.8	4.65 (1H, d, 3.0)	97.7
3'''		71.2		71.2
4'''	1.35 (3H, s)	25.6	1.35 (3H, s)	25.5
5'''	1.39 (3H, s)	25.9	1.39 (3H, s)	25.9
1'''-OCH ₃	3.64 (3H, s)	57.7	3.64 (3H, s)	57.7

Mammeasin N (**10**) は淡黄色油状物質として得られ, その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{24}H_{20}O_5$ を有することが明らかになった. **10** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 9) スペクトルから, 1つの butane-1-one 基 [δ_H 1.06 (3H, t, $J=7.4$ Hz, H_3-4''), 3.16 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H_2-2''), 1.81 (2H, qt, $J=7.4, 7.4$ Hz, H_2-3'')], 1つのメチル基 [δ_H 2.16 (3H, s, H_3-4''')], 1つの exo-メチレン [δ_H 5.52, 5.71 (each 1H, s, H_2-4''')], 2つのオレフィンプロトン [δ_H 6.14 (1H, s, $H-3$), 6.98 (1H, s, $H-1'''$)], 1つの一置換ベンゼン環 [δ_H 7.35 (2H, dd, $J=1.7, 7.7$ Hz, $H-2'$ and $H-6'$), 7.34 (3H, m, $H-3'-5'$)], および1つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_H 14.58 (1H, s, 5-OH)] に由来するシグナルが観察された. また, **10** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ, 1H - 1H COSY において, Figure 26 に太線で示した部分構造が明らかになった. さらに, HMBC スペクトルにおいて, Figure 26 に矢印で示したように, 3位プロトンから C-2 (δ_C 159.3), 4a (δ_C 103.3), 1' (δ_C 138.9); 2'位プロトンから C-4 (δ_C 156.7); 2''位プロトンから C-1'' (δ_C 204.5); 1'''位プロトンから C-7 (δ_C 155.7), 8 (δ_C 111.2), 3''' (δ_C 132.0); 4'''位プロトンから C-2''' (δ_C 156.5), 5''' (δ_C 19.1); 5'''位プロトンから C-2''', 3''', 4''' (δ_C 113.4); 5-OH から C-4a, 5 (δ_C 162.8), 6 (δ_C 104.6) の間に相関が観測されたことから, **10** の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 26). さらに, 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルにおいて, **10** の置換基を含む D 環部分に由来するシグナルは, 同じ部分構造を持つ化合物⁶⁵⁾ oroselone (**10a**) (Figure 28) のシグナルと類似したことから (Table 9), その部分構造についても確認された. 以上の結果から, mammeasin N (**10**) の化学構造が明らかになった.

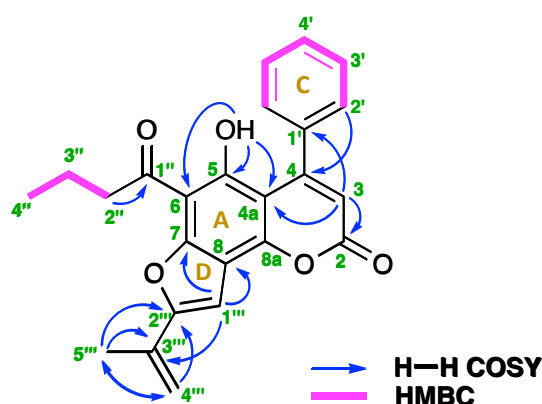


Figure 26. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **10**

Mammeasin O (**11**) は淡黄色油状物質として得られ、その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{25}H_{22}O_5$ を有することが明らかになった。 **11** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 9) スペクトルデータは化合物 **10** と類似し、 **10** の 6 位の butane-1-one 基の代わりに、 **11** の 6 位に1つの 3-methylbutane-1-one 基 [δ_H 1.03 (each 3H, d, $J = 6.8$ Hz, $H_{3-4''}$ and $H_{3-5''}$), 2.32 (1H, m, $H_{3'''}$), 3.16 (2H, d, $J = 6.9$ Hz, $H_{2-2''}$)] に由来するシグナルが観察された。 また、 **11** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 1H - 1H COSY において、 Figure 27 に太線で示した部分構造が明らかになった。 さらに、 HMBC スペクトルにおいて、 Figure 27 に矢印で示したように、 3 位プロトン [δ_H 6.14 (1H, s, H_{-3})] から C-2 (δ_C 159.3), 4a (δ_C 103.6), 1' (δ_C 138.9); 2', 6' 位プロトン [δ_H 7.36 (each 1H, dd, $J = 1.7, 7.8$ Hz, $H_{-2'}$ and $H_{-6'}$)] から C-4 (δ_C 156.5); 2'' 位プロトンから C-1'' (δ_C 204.3); 1''' 位プロトン [δ_H 6.98 (1H, s, $H_{-1'''}$)] から C-7 (δ_C 156.4), 8 (δ_C 111.3), 3''' (δ_C 132.0); 4''' 位プロトン [δ_H 5.25, 5.71 (each 1H, br s, $H_{2-4'''}$)] から C-2''' (δ_C 156.7), 5''' (δ_C 19.1); 5''' 位プロトン [δ_H 2.16 (3H, s, $H_{3-5'''}$)] から C-2''', 3''', 4''' (δ_C 113.3); 5-OH [δ_H 14.58 (1H, s, 5-OH)] から C-4a, 5 (δ_C 162.8), 6 (δ_C 104.6) の間に相関が観測されたことから、 **11** の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 27)。 さらに、 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、 **11** の置換基を含む D 環部分に由来するシグナルも同じ部分構造を持つ化合物 oroselone⁶⁵ (**10a**) (Figure 28) のシグナルと類似したことから (Table 9), その部分構造についても確認された。 以上の結果から、 mammeasin O (**11**) の化学構造が明らかになった。

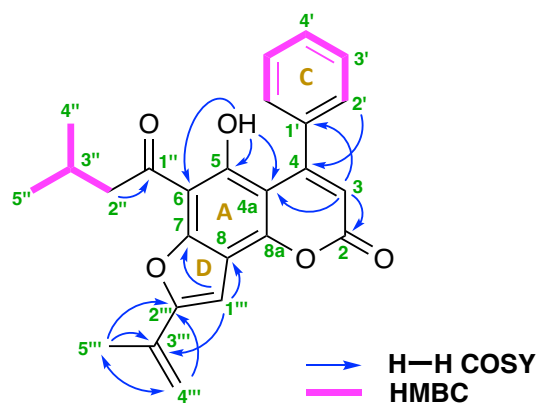
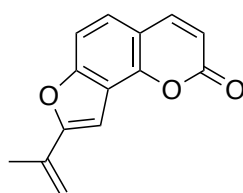


Figure 27. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **11**

Table 9. ^1H - and ^{13}C -NMR spectroscopic data (CDCl_3) of mammeasins N (**10**) and O (**11**) and oroselone⁶⁵ (**10a**).

Position	10^{a)}		11^{b)}		Oroselone (10a) [65]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		159.3		159.3		160.62
3	6.14 (1H, s)	114.2	6.14 (1H, s)	114.2	6.36 (1H, d, 9.6)	113.88
4		156.7		156.5	7.77 (1H, d, 9.6)	144.32
4a		103.3		103.6		113.40
5		162.8		163.0	7.30 (1H, d, 8.5)	123.79
6		104.6		104.7	7.34 (1H, d, 8.5)	108.21
7		155.7		156.4		156.90
8		111.2		111.3		118.29
8a		153.1		153.1		148.08
5-OH	14.58 (s)		14.58 (s)			
1'		138.9		138.9		
2',5'	7.35 (2H, dd, 1.7, 7.7)	127.2	7.36 (2H, dd, 1.7, 7.8)	127.2		
3',6'	7.43 (2H, m)	127.7	7.43 (2H, m)	127.7		
4'	7.43 (1H, m)	128.4	7.43 (1H, m)	128.4		
1''		204.5		204.3		
2''	3.26 (2H, t, 7.4)	45.1	3.16 (2H, d, 6.9)	51.8		
3''	1.81 (2H, qt, 7.4, 7.4)	17.7	2.32 (1H, m)	25.0		
4''	1.06 (3H, t, 7.4)	13.8	1.03 (3H, d, 6.8)	22.7		
5''			1.03 (3H, d, 6.8)	22.7		
1'''	6.98 (1H, s)	100.2	6.98 (1H, s)	100.3	6.96 (1H, s)	99.59
2'''		156.5		156.7		157.94
3'''		132.0		132.0		132.18
4'''	5.25 (1H, br s)	113.4	5.25 (1H, br s)	113.3	5.24 (1H, s)	118.29
	5.71 (1H, br s)		5.71 (1H, br s)		5.82 (1H, s)	
5'''	2.16 (3H, s)	19.1	2.16 (3H, s)	19.1	2.13 (3H, s)	19.06

Measured by ^{a)}800 MHz or ^{b)}500 MHz.



oroselone (**10a**)

Figure 28. Structure of oroselone (**10a**).

Mammeasin P (**12**) は淡黄色油状物質として得られ、その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{22}H_{26}O_6$ を有することが明らかになった。 **12** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 10) スペクトルから、5つのメチル基 [δ_H 1.01 (3H, t, $J=7.4$ Hz, H_3-4''), 1.27 (3H, t, $J=7.6$ Hz, H_3-3'), 1.52 (each 3H, s, $2''-CH_3 \times 2$), 3.71 (3H, s, $2-COOCH_3$)], 4つのメチレン [δ_H 1.73 (2H, qt, $J=7.4, 7.4$ Hz, H_2-3''), 2.67 (2H, q, $J=7.6$ Hz, H_2-2'), 3.07 (2H, t, $J=7.4$ Hz, H_2-2''), 3.75 (2H, s, H_2-3)], 2つのシス置換オレフィンプロトン [δ_H 5.51 and 6.65 (each 1H, d, $J=9.7$ Hz, $H-3''$ and $H-4''$)], および1つの水素結合したヒドロキシ基 [δ_H 14.12 (1H, s, 8a-OH)] に由来するシグナルが観察された。また、 **12** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、 1H - 1H COSY において、 Figure 29 に太線で示した部分構造が明らかになった。さらに、 HMBC スペクトルにおいて、 Figure 29 に矢印で示したように、3位プロトンから C-2 (δ_C 171.9), 4 (δ_C 107.7), 4a (δ_C 111.1), 1' (δ_C 155.5); 2'位プロトンから C-4, 1'; 3''位プロトンから C-6 (δ_C 99.1), 2'' (δ_C 78.1), $2''-CH_3$ (δ_C 27.6); $2''-CH_3$ から C-2'' (δ_C 78.1), 3'' (δ_C 125.7), 4'' (δ_C 116.1); 2''', 3'''位プロトンから C-1''' (δ_C 207.5); 8-OH から C-8 (δ_C 107.0), 4a, 8a (δ_C 159.8) の間に相関が観測された (Figure 29)。以上のことから、 **12** の polysubstituted benzofuran 骨格が明らかになり、 **12** の n-butyryl および 2,2-dimethyl-2H-pyran groups 部分構造の結合位置も明らかになった。また、 **12** の benzofuran 骨格は、 *M. siamensis* に多く含まれているクマリン化合物の共通構造部分である 4-(1'-acetoxypropyl)coumarin に由来すると推測されている^{66,67}。すなわち、 Figure 31 に示すように、4-(1'-acetoxypropyl)coumarin の分子内置換により furocoumarin が形成され、また酸触媒により二重結合が移動し、さらにラクトンが開環し、 **12** の benzofuran 骨格が形成される。

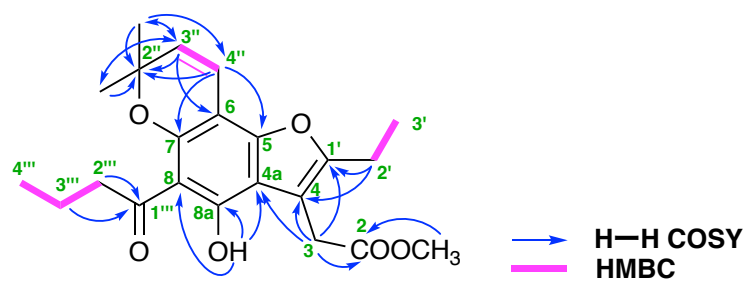


Figure 29. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of **12**

Mammeasin Q (**13**) は淡黄色油状物質として得られ, その EI-MS および高分解能 EI-MS から分子式 $C_{23}H_{28}O_6$ を有することが明らかになった. **13** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 10) スペクトルから, **13** の 1H - および ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, Table 10) スペクトルデータは化合物 **12** と類似し, **12** の 8 位の n-butyryl 基の代わりに, **13** の 8 位に 1 つの 2-methyl-butyryl 基 [δ_H 0.92 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, $H_{3-4''}$), 1.17 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $H_{3-5''}$), 1.42, 1.87 (each 1H, m, $H_{2-3''}$), and 3.81 (1H, m, $H_{2''}$)] に由来するシグナルが観察された. また, **13** の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ, 1H - 1H COSY において, Figure 30 に太線で示した部分構造が明らかになった. さらに, HMBC スペクトルにおいて, Figure 30 に矢印で示したように, 3 位プロトン [δ_H 3.75 (2H, s, H_{2-3})] から C-2 (δ_C 171.9), 4 (δ_C 107.7), 4a (δ_C 111.2), 1' (δ_C 155.5); 2' 位プロトン [δ_H 2.67 (2H, q, $J = 7.5$ Hz, $H_{2-2'}$)] から C-4, 1'; 3'' 位プロトン [δ_H 5.51 (1H, d, $J = 9.8$ Hz)] から C-6 (δ_C 99.1), 2'' (δ_C 78.1), 2''- CH_3 (δ_C 27.6); 4'' 位プロトン [δ_H 6.65 (1H, d, $J = 9.8$ Hz, $H_{4''}$)] から C-5 (δ_C 151.9), 7 (δ_C 154.5), 2''; 2''- CH_3 [δ_H 1.52 (each 3H, s, 2''- CH_3)] から C-2'', 3'' (δ_C 125.7), 4'' (δ_C 116.1); 2''', 3''', 5''' 位プロトン [δ_H 3.81 (1H, m, $H_{2''}$), 1.42, 1.87 (each 1H, m, $H_{2-3''}$), 1.17 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, $H_{3-5''}$)] から C-1''' (δ_C 211.8); 8a-OH [δ_H 14.09 (1H, s, 8a-OH)] から C-8 (δ_C 107.0), 4a, 8a (δ_C 159.8) の間に相関が観測されたことから, **13** の各部分構造の結合位置が明らかになった (Figure 30).

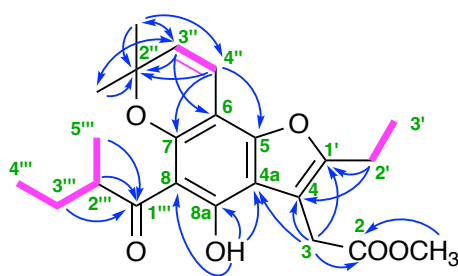


Figure 30. 1H - 1H COSY and HMBC correlations of **13**

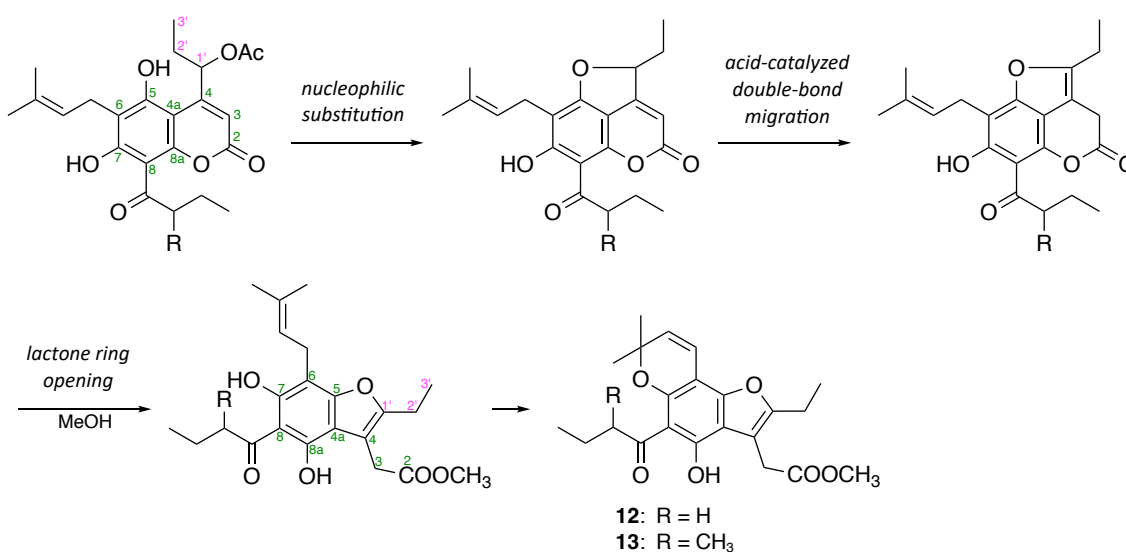


Figure 31. Plausible generative pathway of **12** and **13**^{66,67)}

Table 10. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) and ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) spectroscopic data of mammeasins P (**12**) and Q (**13**)

Position	12		13	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
2		171.9		171.9
3	3.75 (2H, s)	29.8	3.75 (2H, s)	29.7
4		107.7		107.7
4a		111.1		111.2
5		*152.2		*151.9
6		99.1		99.1
7		*154.6		*154.5
8		107.0		107.0
8a		159.8		159.8
2-COOCH ₃	3.71 (3H, s)	52.1	3.71 (3H, s)	52.1
8a-OH	14.12 (1H, s)		14.09 (1H, s)	
1'		155.5		155.5
2'	2.67 (2H, q, 7.6)	19.4	2.67 (2H, q, 7.5)	19.5
3'	1.27 (3H, t, 7.6)	12.8	1.27 (3H, t, 7.5)	12.8
2''		78.1		78.1
3''	5.51 (1H, d, 9.7)	125.7	5.51 (1H, d, 9.8)	125.7
4''	6.65 (1H, d, 9.7)	116.1	6.65 (1H, d, 9.8)	116.1
2''-CH ₃ × 2	1.52 (6H, s)	27.6	1.52 (6H, s)	27.6
1'''		207.5		211.8
2'''	3.07 (2H, t, 7.4)	128.4	3.81 (1H, m)	46.2
3'''	1.73 (2H, qt, 7.4, 7.4)	18.5	1.42, 1.87 (each 1H, m)	26.8
4'''	1.01 (3H, t, 7.4)	14.0	0.92 (3H, t, 7.5)	11.9
5'''			1.17 (3H, d, 6.9)	16.9

第三節 抽出エキスおよび含有成分のアロマターゼ阻害活性

第一節において抽出した *M. siamensis* 花部の MeOH 抽出エキスおよび MeOH 抽出エキスより調製した各分画のアロマターゼ阻害活性を検討した。

その結果は Table 11 に示すように、*M. siamensis* 花部の MeOH 抽出エキス (IC₅₀ = 16.5 μg/mL), EtOAc 移行部 (2.9 μg/mL) および MeOH 溶出部 (8.5 μg/mL) にアロマターゼ阻害活性を見いすとともに、EtOAc 移行部に活性の集約が認められた。

Table 11. Inhibitory activity of methanol extract and fractions from flowers of *M. siamensis* against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μg/mL)
	0 μg/mL	3 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	100 μg/mL	
MeOH ext.	0.0±5.5	-13.2±3.2	41.8±1.6**	80.0±3.1**	97.5±0.6**	16.5
EtOAc-soluble fraction	0.0±4.0	46.3±4.4**	89.0±1.2**	100.1±0.6**	99.9±0.5**	2.9
MeOH-eluted fraction	0.0±5.8	2.0±3.9	70.7±1.2**	93.0±1.0**	96.9±0.9**	8.5
H ₂ O-eluted fraction	0.0±7.7	-4.7±4.8	1.2±2.2	-1.7±2.1	-0.1±4.0	>100

Each value represents the mean±S.E.M. (N=3).

Asterisks denote significant differences from control at **p*<0.05, ***p*<0.01.

次に、*M. siamensis* 花部に含まれるアロマターゼ阻害活性成分を明らかにするため、活性の集約が認められた EtOAc 移行部より単離・構造決定または同定した含有成分 (Figure 8, Figure 9) について同様に検討した。その結果は Table 12 に示すように、mammeasin M 以外いずれのクマリン化合物もアロマターゼに対して阻害活性を示し、なかでも新規化合物 mammeasins K (**7**, 7.6 μM), O (**11**, 9.1 μM) および 既知化合物 mammeasins A (**14**, 10.1 μM), B (**15**, 4.1 μM), C (**16**, 2.7 μM), D (**17**, 3.9 μM); surangin B (**19**, 9.8 μM), surangin C (**20**, 8.8 μM), surangin D (**21**, 9.8 μM); kayeassamin I (**25**, IC₅₀ = 9.3 μM), **26** (7.5 μM), **27** (8.8 μM), mammea A/AA (**28**, 6.9 μM), mammea A/AB (**29**, 8.6 μM), mammea A/AA cyclo D (**32**, 7.2 μM), mammea B/AB cyclo D (**35**, 3.1 μM), および mammea A/AA cyclo F (**43**, 9.2 μM) などの化合物に比較的強いアロマターゼ阻害活性が認められ、活性寄与成分として明らかになった。

Table 12. Inhibitory activity of constituents from flowers of *M. siamensis* against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Mammeasin E (1)	0.0 \pm 4.6	-0.6 \pm 7.1	39.5 \pm 3.8**	97.9 \pm 1.8**	113.1 \pm 1.5**	11.1
Mammeasin F (2)	0.0 \pm 1.0	3.1 \pm 2.6	37.1 \pm 0.7**	91.2 \pm 0.1**	111.7 \pm 0.8**	12.4
Mammeasin G (3)	0.0 \pm 5.2	13.4 \pm 9.7	25.8 \pm 4.4*	62.7 \pm 4.6**	96.0 \pm 2.3**	21.3
Mammeasin H (4)	0.0 \pm 4.7	5.7 \pm 2.9	19.9 \pm 4.9**	67.6 \pm 1.1**	102.9 \pm 0.9**	17.9
Mammeasin I (5)	0.0 \pm 12.8	-2.1 \pm 14.7	20.8 \pm 6.8	57.7 \pm 6.8**	99.4 \pm 0.8**	21.3
Mammeasin J (6)	0.0 \pm 4.7	2.4 \pm 4.4	16.9 \pm 3.6*	53.5 \pm 1.6**	94.8 \pm 0.4**	23.4
Mammeasin K (7)	0.0 \pm 7.7	59.5 \pm 7.2**	54.4 \pm 2.0**	69.3 \pm 2.2**	88.3 \pm 1.2**	7.6
Mammeasin L (8)	0.0 \pm 3.0	1.6 \pm 7.8	22.6 \pm 3.8*	64.7 \pm 3.2**	94.6 \pm 0.9**	20.7
Mammeasin M (9)	0.0 \pm 3.3	-3.0 \pm 1.7	-7.8 \pm 4.3	12.9 \pm 4.3	43.4 \pm 1.4**	>100
Mammeasin N (10)	0.0 \pm 3.4	2.8 \pm 5.0	41.4 \pm 4.7**	83.2 \pm 0.9**	98.9 \pm 0.6**	12.0
Mammeasin O (11)	0.0 \pm 4.4	8.8 \pm 8.1	55.8 \pm 3.0**	91.6 \pm 1.5**	99.8 \pm 0.1**	9.1
Mammeasin A (14)	0.0 \pm 3.0	-5.5 \pm 5.3	57.0 \pm 3.4**	92.8 \pm 1.2**	97.0 \pm 0.8**	10.1
Mammeasin B (15)	0.0 \pm 0.8	35.4 \pm 1.7**	86.7 \pm 1.6**	100.4 \pm 0.6**	104.8 \pm 0.4**	4.1
Mammeasin C (16)	0.0 \pm 6.3	54.1 \pm 5.0**	84.3 \pm 2.8**	94.9 \pm 0.3**	99.3 \pm 2.2**	< 3.0
Mammeasin D (17)	0.0 \pm 2.6	49.3 \pm 2.2**	63.9 \pm 2.6**	87.8 \pm 1.0**	110.7 \pm 1.1**	3.6
Surangin B (18)	0.0 \pm 2.9	-12.1 \pm 6.1	65.0 \pm 3.3**	95.6 \pm 0.4**	100.1 \pm 0.7**	9.8
Surangin C (19)	0.0 \pm 4.7	-4.2 \pm 4.4	68.5 \pm 1.2**	99.1 \pm 0.4**	110.8 \pm 0.5**	8.8
Surangin D (20)	0.0 \pm 3.7	-19.6 \pm 5.0**	27.9 \pm 3.1**	85.9 \pm 2.3**	99.4 \pm 0.7**	18.1
Kayeassamin A (21)	0.0 \pm 4.4	-11.3 \pm 6.6	58.4 \pm 0.2**	98.1 \pm 0.2**	98.9 \pm 0.2**	10.0
Kayeassamin E (22)	0.0 \pm 1.5	7.8 \pm 5.6	32.3 \pm 4.7**	78.3 \pm 0.3**	97.8 \pm 0.4**	14.9
Kayeassamin F (23)	0.0 \pm 1.5	3.4 \pm 3.2	23.7 \pm 3.8**	61.7 \pm 1.3**	97.1 \pm 0.9**	19.7
Kayeassamin G (24)	0.0 \pm 2.0	-17.0 \pm 3.9**	1.7 \pm 3.0	50.3 \pm 0.9**	100.1 \pm 1.0**	27.8
Kayeassamin I (25)	0.0 \pm 1.3	5.5 \pm 1.7*	49.7 \pm 0.7**	99.7 \pm 0.1**	112.2 \pm 0.7**	9.3
26	0.0 \pm 4.8	25.0 \pm 0.7**	59.8 \pm 1.5**	88.0 \pm 0.3**	98.9 \pm 0.4**	7.5
27	0.0 \pm 2.6	15.7 \pm 1.1**	58.9 \pm 0.4**	91.5 \pm 0.6**	100.4 \pm 0.3**	8.8
Mammea A/AA (28)	0.0 \pm 7.3	11.6 \pm 6.5	73.9 \pm 4.4**	104.7 \pm 0.9**	111.9 \pm 1.9**	6.9
Mammea A/AB (29)	0.0 \pm 1.8	3.8 \pm 5.5	65.0 \pm 2.4**	94.3 \pm 1.0**	95.9 \pm 1.2**	8.6
Mammea A/AC (30)	0.0 \pm 2.6	-4.4 \pm 0.9	42.8 \pm 2.3**	89.7 \pm 0.6**	101.5 \pm 0.5**	13.7
Mammea A/AD (31)	0.0 \pm 1.5	13.8 \pm 3.0**	51.5 \pm 0.9**	78.8 \pm 1.0**	95.7 \pm 0.4**	11.3
Mammea A/AA cyclo D (32)	0.0 \pm 4.8	30.6 \pm 0.7**	56.5 \pm 4.3**	84.2 \pm 1.2**	98.8 \pm 0.0	7.2
Mammea A/AB cyclo D (33)	0.0 \pm 0.6	5.5 \pm 1.3	28.6 \pm 4.5**	54.9 \pm 1.1**	82.0 \pm 1.2**	24.1
Mammea A/AC cyclo D (34)	0.0 \pm 2.8	-28.5 \pm 8.8**	11.7 \pm 1.8	47.6 \pm 1.0**	81.0 \pm 2.3**	35.0
Mammea B/AB cyclo D (35)	0.0 \pm 4.3	48.5 \pm 0.9**	66.6 \pm 1.7**	85.9 \pm 1.5**	98.4 \pm 1.0**	3.1
Mammea B/AC cyclo D (36)	0.0 \pm 9.7	-4.2 \pm 6.4	36.1 \pm 5.7**	56.0 \pm 2.8**	79.5 \pm 1.7**	24.6
Mammea E/BA (38)	0.0 \pm 10.1	-0.5 \pm 4.9	37.7 \pm 4.0**	72.0 \pm 4.1**	95.6 \pm 0.8**	16.6
Mammea E/BB (39)	0.0 \pm 1.3	-12.0 \pm 3.4**	33.6 \pm 2.1**	73.8 \pm 0.6**	95.9 \pm 1.1**	18.6
Mammea E/BC (40)	0.0 \pm 5.8	3.9 \pm 6.7	24.5 \pm 4.2*	52.4 \pm 4.3**	90.3 \pm 1.1**	23.2
Mammea E/BC cyclo D (41)	0.0 \pm 7.7	7.2 \pm 4.8	51.1 \pm 1.7**	87.2 \pm 0.6**	97.7 \pm 0.6**	11.5
Mammea E/BD cyclo D (42)	0.0 \pm 2.3	7.1 \pm 2.0	38.7 \pm 2.2**	82.5 \pm 0.9**	98.6 \pm 0.3**	12.1
Mammea A/AC cyclo F (44)	0.0 \pm 2.4	-6.7 \pm 0.4*	18.0 \pm 2.1**	79.8 \pm 1.0**	99.1 \pm 0.2**	19.9
Deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	0.0 \pm 0.7	0.6 \pm 3.3	23.3 \pm 1.3**	75.2 \pm 1.1**	97.0 \pm 0.4**	19.3
Deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	0.0 \pm 14.5	-8.0 \pm 7.9	44.1 \pm 5.2**	85.9 \pm 1.8**	98.2 \pm 0.4**	12.1
Deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	0.0 \pm 3.9	1.0 \pm 10.0	27.0 \pm 6.6**	73.9 \pm 3.0**	103.5 \pm 1.6**	16.6
β -amyryn (48)	0.0 \pm 3.6	-3.5 \pm 1.8	-14.3 \pm 1.6	-21.2 \pm 4.3**	24.4 \pm 5.1**	>100
Benzoic acid (49)	0.0 \pm 6.0	-4.0 \pm 6.4	-7.5 \pm 7.8	-4.4 \pm 4.1	-3.4 \pm 6.2	>100

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	
Mammea A/AA cyclo F (43)	0.0 \pm 6.1	-1.5 \pm 3.3	2.9 \pm 5.2	57.5 \pm 2.4**	95.3 \pm 1.6**	9.2

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	
Mammeasin C (16)	0.0 \pm 2.2	4.0 \pm 3.1	21.6 \pm 3.2**	51.0 \pm 4.2**	82.5 \pm 2.1**	2.7
Mammeasin D (17)	0.0 \pm 3.8	21.9 \pm 0.8**	32.9 \pm 3.0**	41.6 \pm 2.2**	65.3 \pm 0.4**	3.9

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

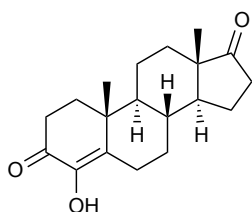
26: 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(2-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-de]chromen-2-one

27: 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(3-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-de]chromen-2-one

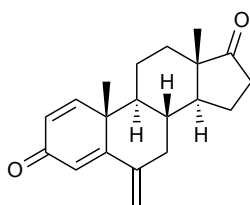
現在までに臨床応用されたアロマトラーゼ阻害剤は、その化学構造および作用機序から、ステロイド系および非ステロイド系に分類される^{5,68)} (Figure 32). 第一世代のアロマトラーゼ阻害剤 aminoglutethimide, 第二世代の formestane, および第三世代の letrozole, anastrozole および exemestane の活性を同様にアロマトラーゼ阻害活性評価を行い、その結果を Table 13 および Table 14 に示す.

また、*M. siamensis* 由来クマリン化合物の阻害活性強度について、それらのアロマトラーゼ阻害剤と比較した。その結果、**15**, **16**, **17** および **35** が第一世代のアロマトラーゼ阻害剤 aminoglutethimide と同程度のアロマトラーゼ阻害活性を示した。

Steroid Aromatase Inhibitors

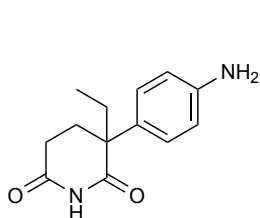


formestane

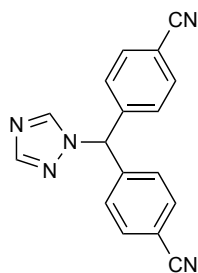


exemestane

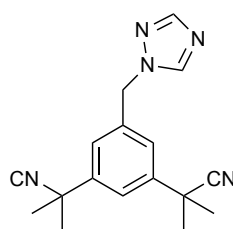
Non-steroidal Aromatase Inhibitors



aminoglutethimide



letrozole



anastrozole

Figure 32. Chemical structures of aromatase inhibitors

Table 13. Inhibitory activity of aminoglutethimide against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	
aminoglutethimide	0.0 \pm 1.4	10.0 \pm 2.1**	31.9 \pm 2.7**	61.4 \pm 1.3**	82.6 \pm 0.9**	2.0

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=3).

Asterisks denote significant differences from control at * p <0.05, ** p <0.01.

Table 14. Inhibitory activity of letrozole, anastrozole and exemestane against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)								IC ₅₀ (nM)
	0 nM	0.3 nM	1 nM	3 nM	10 nM	30 nM	100 nM	300 nM	
letrozole	0.0 \pm 4.2	5.1 \pm 2.8	34.8 \pm 2.3**	76.4 \pm 2.1**	92.0 \pm 1.4**				1.6
anastrozole	0.0 \pm 4.4			27.1 \pm 6.0**	45.0 \pm 3.3**	73.3 \pm 1.8**	86.4 \pm 0.9**		11.1
exemestane	0.0 \pm 3.3				16.4 \pm 1.9**	36.5 \pm 2.1**	80.3 \pm 2.2**	91.3 \pm 3.1**	42.3

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=3).

Asterisks denote significant differences from control at * p <0.05, ** p <0.01.

第四節 含有クマリン成分のアロマターゼ阻害様式

酵素阻害剤は、大きく分けて可逆的阻害剤および不可逆的阻害剤の二つのタイプがある。可逆的阻害は酵素反応速度論的に競合阻害、不競合阻害および混合阻害に分類される。阻害剤濃度 [I] を固定した条件下、基質テストステロン濃度 [S] を変化させ、反応速度 v の逆数 $1/v$ を $1/[S]$ に対してプロットし（二重逆数プロット、Lineweaver-Burk プロットとも呼ぶ）、阻害様式を判断する。

第三節において比較的強いアロマターゼ阻害活性を示した *M. siamensis* 花部由来クマリン化合物、および陽性対照として用アロマターゼ阻害剤である aminoglutethimide について、Lineweaver-Burk プロットを用いてアロマターゼに対する阻害様式の評価を行った (Figure 33–35)。また、Lineweaver-Burk プロットより、これらのクマリン化合物のアロマターゼへの結合親和性を示す阻害定数 K_i を算出した (Table 15)。

陽性対照剤として使用した aminoglutethimide はアロマターゼの競合阻害剤として報告されており⁶⁹⁾、その阻害定数 K_i は $0.84 \mu\text{M}$ と算出した (Table 15)。

Table 15. K_i values of coumarin constituents from the flowers of *M. siamensis* against human recombinant aromatase.

Treatment	K_i (μM)	Treatment	K_i (μM)
Mammeasin E (2)	7.1	Surangin B (18)	1.3
Mammeasin F (3)	12.3	Surangin C (19)	2.6
Mammeasin K (7)	3.4	Kayaessamin I (25)	14.7
Mammeasin N (10)	2.6	Mammea A/AA (28)	13.7
Mammeasin O (11)	2.3	Mammea A/AB (29)	8.1
Mammeasin A (14)	5.1	Mammea A/AA cyclo D (32)	1.2
Mammeasin B (15)	1.3	Mammea B/AB cyclo D (35)	0.84
Mammeasin C (16)	2.8	Mammea E/BC (40)	11.3
Mammeasin D (17)	4.3	Mammea E/BC cyclo D (41)	2.3
		Mammea A/AA cyclo F (43)	4.3
		Aminoglutethimide	0.84

Each values represents the mean \pm S.E.M. ($N=3$).

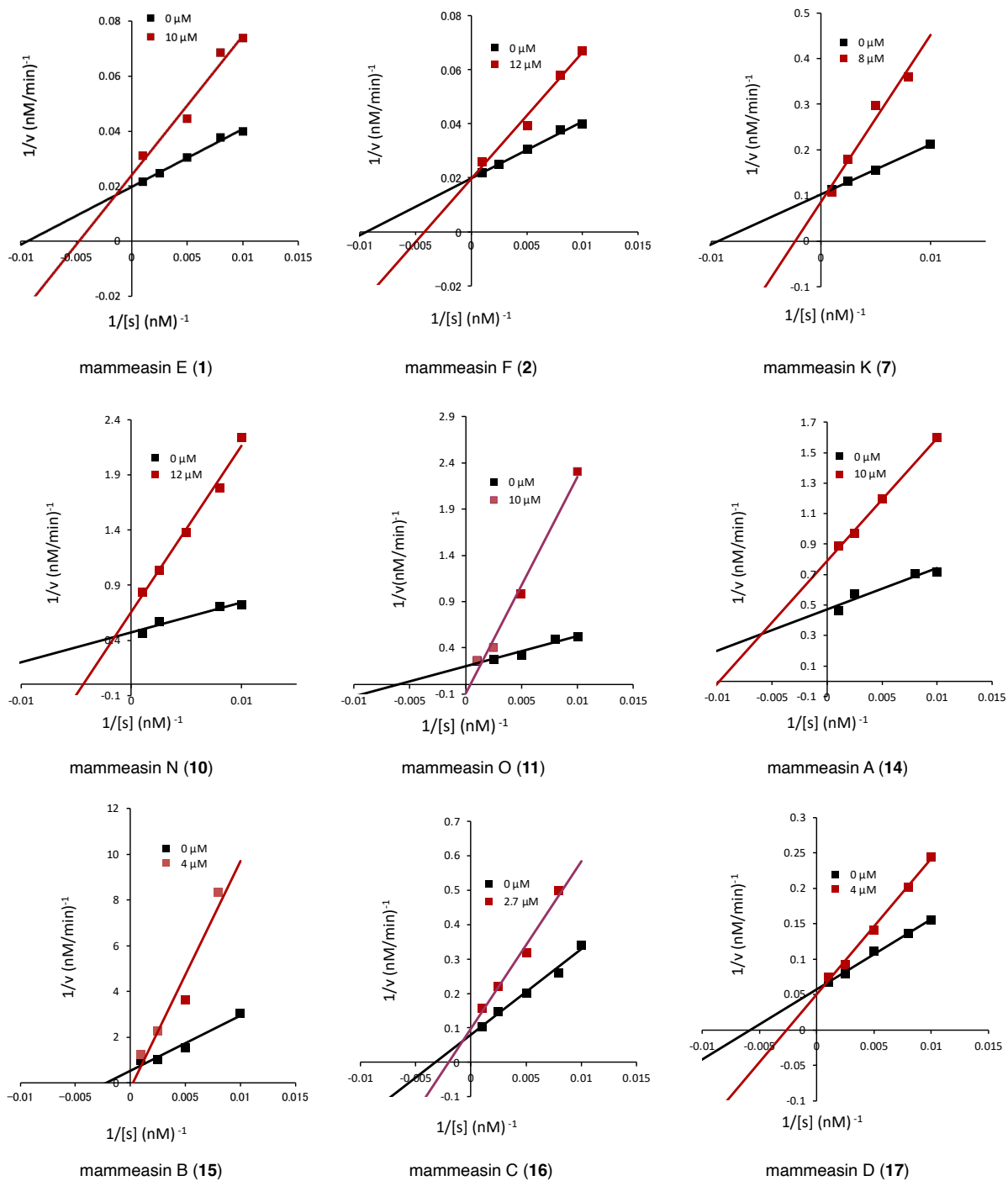


Figure 33. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of human recombinant aromatase activity by coumarin constituents from the flowers of *M. siamensis*

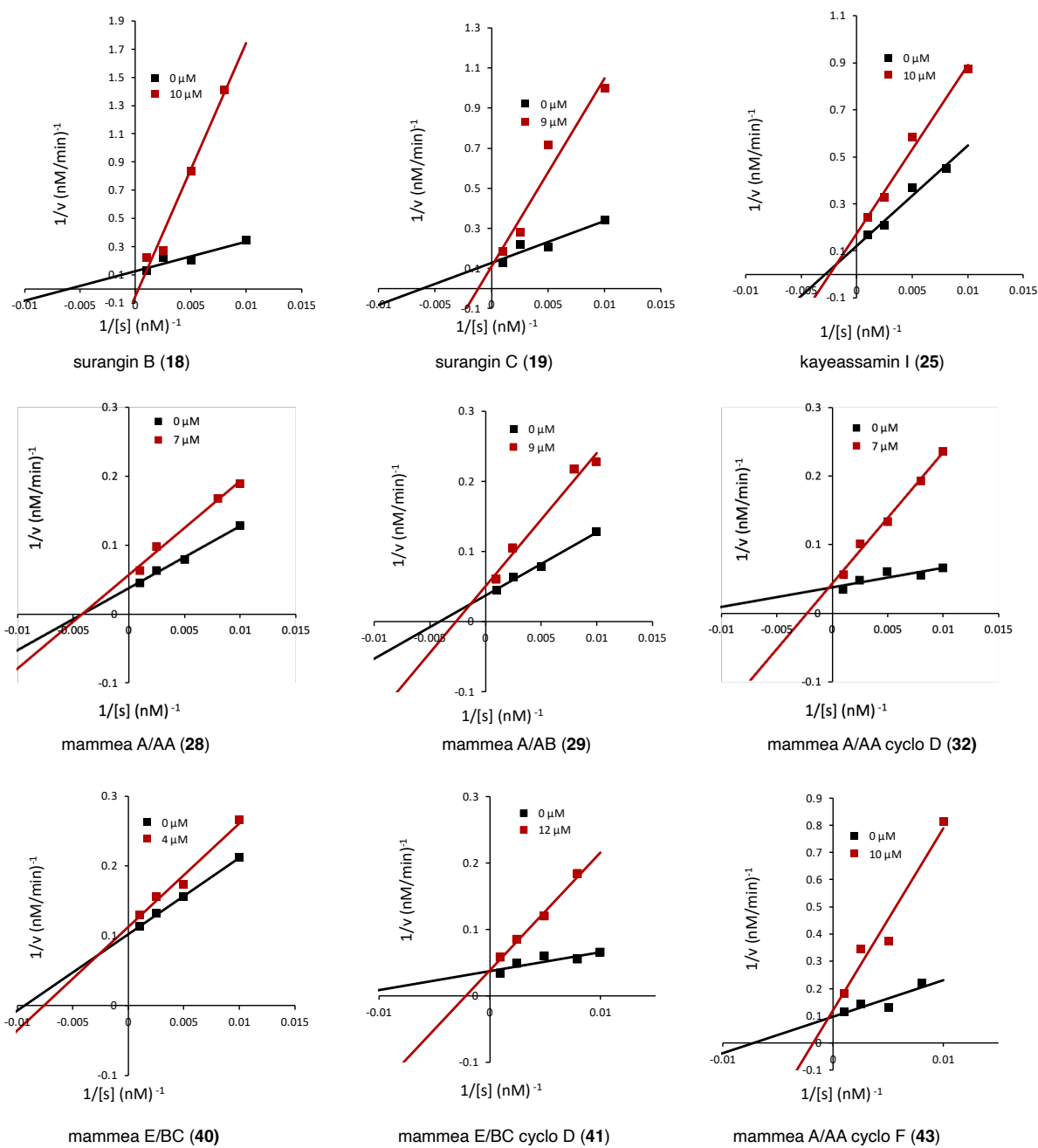


Figure 34. Lineweaver-Burk plots of the inhibition of human recombinant aromatase activity by coumarin constituents from the flowers of *M. siamensis*

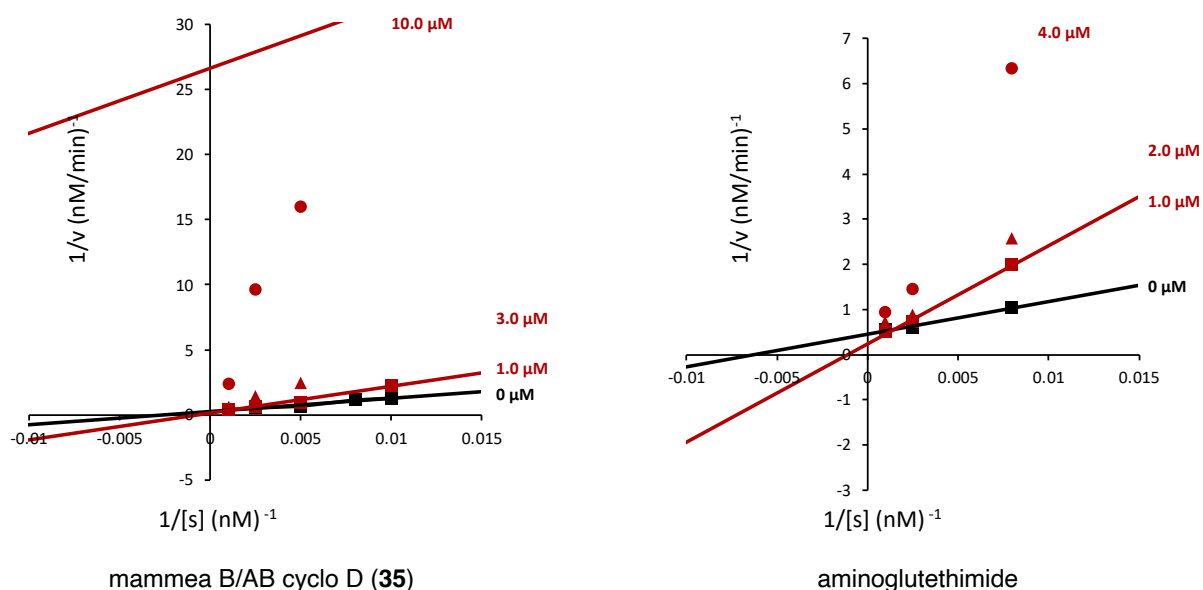


Figure 35. Lineweaver-Bark plots of the inhibition of human recombinant aromatase activities by mammea B/AB cyclo D (**35**) and aminoglutethimide.

Figure 33–35 の結果より， mammeasins F (**2**), K (**7**), B (**15**), C (**16**), D (**17**), surangin B (**18**), surangin C (**19**), mammea A/AA cyclo D (**32**), mammea B/AB cyclo D (**35**), mammea E/BC cyclo D (**41**) および mammea A/AA cyclo F (**43**) は競合的にアロマターゼを阻害することが明らかになった．また， Table 15 の結果より， **15**, **18**, **32** および **35** はアロマターゼに対し高い結合親和性を示し，強いアロマターゼ阻害活性を有していることが明らかになった．なかでも，化合物 **35** についてその阻害定数 K_i が $0.84 \mu\text{M}$ と算出し， aminogluterhimide ($K_i = 0.84 \mu\text{M}$) と同程度であり，最も強い阻害活性を示した．

第五節 含有クマリン成分のエストロゲン様作用

エストロゲン受容体陽性の閉経後乳癌では、エストロゲンががん細胞の増殖に関与している。植物中にもエストロゲンと同様の活性を示す化合物が存在し、大豆に含まれるイソフラボンなどが知られている。アロマターゼ阻害剤においては、非臨床試験の段階で阻害剤のエストロゲン様作用の評価が行われている。

したがって、第三節でアロマターゼ阻害活性が認められたクマリン化合物について、ヒト乳腺癌由来細胞株 MCF7 細胞におけるエストロゲン様作用を評価し、その結果を Table 16 に示す。アロマターゼ阻害剤についても同様に評価した (Table 17)。また、陽性対照剤として、エストロゲン依存性乳がん細胞の増殖を促進するイソフラボンである daidzein および genistein を使用し⁷⁰⁾ (Figure 36)、同様に MCF7 細胞におけるエストロゲン様作用について評価した (Table 18)。

細胞培養に用いた培地に含まれる pH 指示薬である phenol red は弱いエストロゲン様作用を有していることが知られており⁷¹⁾、また fetal bovine serum (FBS) のなかにもホルモンが含まれており、それらの影響を排除するために、phenol red free Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) および charcoal stripped FBS を用いて本実験を行った。

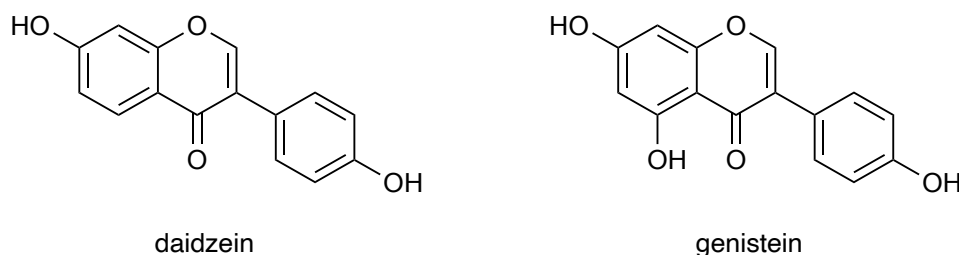


Figure 36. Chemical structures of daidzein and genistein

Table 16. Estrogenic effects of coumarins isolated from flowers of *M. siamensis* on cell proliferation in MCF7 cells.

Treatment	Cell proliferation (% of control)				
	0 μ M	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
Mammeasin E (1)	100.0 \pm 0.7	102.8 \pm 2.3	102.0 \pm 1.4	104.8 \pm 1.5	82.0 \pm 1.6**
Mammeasin F (2)	100.0 \pm 4.9	88.8 \pm 6.1	85.3 \pm 3.9	89.5 \pm 8.3	50.3 \pm 2.0**
Mammeasin G (3)	100.0 \pm 6.6	109.8 \pm 5.3	98.5 \pm 2.4	93.1 \pm 5.7	96.7 \pm 7.1
Mammeasin H (4)	100.0 \pm 8.5	88.0 \pm 3.8	99.2 \pm 6.5	99.5 \pm 7.0	88.1 \pm 6.9
Mammeasin I (5)	100.0 \pm 5.6	106.0 \pm 4.0	96.9 \pm 5.3	102.5 \pm 7.2	98.2 \pm 4.2
Mammeasin J (6)	100.0 \pm 3.5	90.5 \pm 4.3	89.2 \pm 4.4	98.1 \pm 7.1	93.0 \pm 3.7
Mammeasin K (7)	100.0 \pm 2.5	85.8 \pm 7.9	87.4 \pm 4.0	86.3 \pm 6.0	72.5 \pm 3.1**
Mammeasin L (8)	100.0 \pm 5.6	100.7 \pm 1.7	97.9 \pm 2.1	107.9 \pm 3.5	98.8 \pm 1.5
Mammeasin M (9)	100.0 \pm 5.1	103.7 \pm 6.4	99.5 \pm 3.0	97.3 \pm 3.3	97.7 \pm 5.6
Mammeasin N (10)	100.0 \pm 5.3	110.1 \pm 3.2	110.7 \pm 5.8	106.4 \pm 8.2	104.7 \pm 6.7
Mammeasin O (11)	100.0 \pm 7.1	101.0 \pm 6.3	96.6 \pm 9.7	102.5 \pm 8.7	80.1 \pm 4.9
Mammeasin A (14)	100.0 \pm 4.9	100.5 \pm 6.3	93.3 \pm 3.8	35.5 \pm 0.5**	14.0 \pm 0.7**
Mammeasin B (15)	100.0 \pm 2.9	98.7 \pm 4.9	69.5 \pm 2.4**	44.6 \pm 2.0**	7.5 \pm 0.6**
Mammeasin C (16)	100.0 \pm 4.9	96.0 \pm 3.8	92.4 \pm 1.6	88.8 \pm 1.8	69.4 \pm 3.2**
Mammeasin D (17)	100.0 \pm 4.1	97.5 \pm 2.3	94.1 \pm 5.3	101.0 \pm 5.3	92.6 \pm 7.1
Surangin B (18)	100.0 \pm 3.6	98.1 \pm 4.4	81.6 \pm 2.0*	30.8 \pm 1.1**	11.3 \pm 0.3**
Surangin C (19)	100.0 \pm 3.6	100.3 \pm 5.7	108.7 \pm 3.7	108.2 \pm 2.1	11.8 \pm 2.0**
Surangin D (20)	100.0 \pm 2.3	84.9 \pm 1.9**	89.1 \pm 1.7**	91.6 \pm 0.8**	11.4 \pm 0.7**
Kayeassamin A (21)	100.0 \pm 3.3	97.8 \pm 4.0	109.6 \pm 4.1	92.7 \pm 8.2	20.0 \pm 2.6**
Kayeassamin E (22)	100.0 \pm 5.0	96.9 \pm 5.5	99.6 \pm 4.0	92.6 \pm 2.7	10.8 \pm 0.8**
Kayeassamin F (23)	100.0 \pm 3.9	100.5 \pm 4.4	105.0 \pm 3.7	70.3 \pm 2.7**	8.5 \pm 0.5**
Kayeassamin G (24)	100.0 \pm 15.1	111.4 \pm 4.7	115.0 \pm 3.6	122.6 \pm 3.2	7.8 \pm 0.4**
Kayeassamin I (25)	100.0 \pm 4.6	111.7 \pm 1.4*	124.1 \pm 2.1**	131.2 \pm 1.9**	65.2 \pm 1.5**
26	100.0 \pm 3.5	96.6 \pm 1.5	92.5 \pm 1.4	86.9 \pm 2.3**	78.9 \pm 1.3**
27	100.0 \pm 4.0	97.9 \pm 2.6	100.4 \pm 4.7	100.8 \pm 4.5	84.1 \pm 0.8*
Mammea A/AA (28)	100.0 \pm 2.7	97.9 \pm 3.0	98.7 \pm 2.8	95.9 \pm 1.8	87.1 \pm 1.6**
Mammea A/AB (29)	100.0 \pm 2.9	100.8 \pm 3.5	101.7 \pm 2.2	98.1 \pm 2.0	102.5 \pm 1.1
Mammea A/AC (30)	100.0 \pm 5.7	98.2 \pm 2.5	96.5 \pm 5.2	93.6 \pm 3.4	25.5 \pm 1.2**
Mammea A/AD (31)	100.0 \pm 1.2	93.7 \pm 2.8	93.7 \pm 0.6	89.0 \pm 2.7**	17.7 \pm 1.2**
Mammea A/AA cyclo D (32)	100.0 \pm 1.1	96.5 \pm 2.8	96.5 \pm 4.2	90.3 \pm 6.2	95.2 \pm 7.3
Mammea A/AB cyclo D (33)	100.0 \pm 5.5	95.6 \pm 3.3	101.0 \pm 6.2	102.1 \pm 8.3	95.0 \pm 5.4
Mammea A/AC cyclo D (34)	100.0 \pm 3.1	100.2 \pm 3.2	102.9 \pm 2.7	105.0 \pm 4.0	100.0 \pm 2.5
Mammea B/AB cyclo D (35)	100.0 \pm 4.7	95.7 \pm 2.1	90.0 \pm 6.2	82.5 \pm 3.0*	68.4 \pm 1.8**
Mammea B/AC cyclo D (36)	100.0 \pm 8.4	100.9 \pm 3.5	102.3 \pm 4.0	104.1 \pm 3.3	92.5 \pm 2.4
Mammea E/BA (38)	100.0 \pm 2.1	100.3 \pm 2.2	85.1 \pm 1.1**	69.0 \pm 2.2**	20.2 \pm 0.4**
Mammea E/BB (39)	100.0 \pm 3.5	99.6 \pm 3.6	57.2 \pm 1.3**	46.0 \pm 0.2**	13.9 \pm 1.3**
Mammea E/BC (40)	100.0 \pm 5.0	100.5 \pm 3.0	82.2 \pm 6.7	70.7 \pm 2.7**	16.5 \pm 0.4**
mammea E/BC cyclo D (41)	100.0 \pm 10.1	105.4 \pm 8.1	91.3 \pm 1.7	82.3 \pm 1.2	60.3 \pm 4.1**
mammea E/BD cyclo D (42)	100.0 \pm 1.4	83.4 \pm 2.7**	92.8 \pm 1.0	98.2 \pm 3.5	85.2 \pm 2.3**
mammea A/AA cyclo F (43)	100.0 \pm 3.2	110.9 \pm 2.1*	102.7 \pm 2.0	98.4 \pm 2.1	87.2 \pm 1.6**
mammea A/AC cyclo F (44)	100.0 \pm 6.8	76.6 \pm 4.0**	89.12.7	89.3 \pm 3.5	100.8 \pm 3.2
deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	100.0 \pm 2.6	108.3 \pm 5.9	106.8 \pm 2.0	88.8 \pm 2.6	72.0 \pm 1.1**
deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	100.0 \pm 2.0	102.2 \pm 7.8	105.3 \pm 3.8	114.4 \pm 1.8	88.4 \pm 5.3
deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	100.0 \pm 3.6	95.3 \pm 2.1	98.9 \pm 4.3	96.2 \pm 3.8	77.7 \pm 0.7**

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

26: 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(2-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-de]chromen-2-one

27: 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(3-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-de]chromen-2-one

Table 17. Estrogen-like effects of aminoglutethimide, letrozole, anastrozole and exemestane on cell proliferation in MCF7 cells

Treatment	Cell proliferation (% of control)				
	0 μ M	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
Aminoglutethimide	100.0 \pm 2.5	101.7 \pm 2.3	110.7 \pm 5.1	107.0 \pm 6.6	111.6 \pm 1.5
Letrozole	100.0 \pm 4.2	99.9 \pm 5.6	96.2 \pm 4.3	99.9 \pm 4.0	85.0 \pm 1.1
Anastrozole	100.0 \pm 1.0	95.5 \pm 1.4	96.4 \pm 1.9	97.4 \pm 1.1	97.0 \pm 2.4
Exemestane	100.0 \pm 2.0	96.6 \pm 2.3	94.2 \pm 2.4	93.8 \pm 1.7	96.3 \pm 2.1

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 18. Estrogenic effect of daizein and genistein on cell proliferation in MCF7 cells

Treatment	Cell proliferation (% of control)				
	0 μ M	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
Daidzein	100.0 \pm 4.5	93.2 \pm 4.7	101.6 \pm 4.3	124.2 \pm 4.0**	132.6 \pm 2.5**
Genistein	100.0 \pm 3.5	99.6 \pm 6.8	125.5 \pm 4.7*	146.5 \pm 5.5**	156.8 \pm 6.9**

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 16 に示した結果より、第三節において比較的強いアロマターゼ阻害活性が認められた新規クマリン mammeasins K (7), O (11) および既知化合物である 14–19, 25–29, 32, 35, 43 などの化合物において、いずれも MCF7 細胞におけるエストロゲン様作用より細胞の増殖が観察されなかった。

また、mammeasin F (2), A (14), B (15); surangin B (18), C (19), D (20), kayeassamin A (21), E (22), F (23); mammea A/AC (30), A/AD (31), E/BA (38), E/BB (39) および E/BC (40) などの化合物には 10 μ M の濃度においてホルモン非存在下における細胞の増殖抑制が観察された。

第六節 含有クマリン成分の MCF7 細胞増殖抑制作用

前節において mammeasin F (2), A (14), B (15); surangin B (18), C (19), D (20); kayeassamin A (21), E (22), F (23); mammea A/AC (30), A/AD (31), E/BA (38), E/BB (39) および E/BC (40) などの化合物には 10 μM の濃度において、ホルモン非存在下における細胞の増殖抑制が観察されたことから、これらクマリン化合物が乳がん細胞の増殖抑制活性を有する可能性が見いだされた。そこで *M. siamensis* 花部由来クマリン化合物について MCF7 細胞の通常培養条件における細胞増殖抑制作用について検討した。陽性対照剤として、乳がんの化学療法で用いられる doxorubicin および camptothecin を使用した。

その結果、Table 19 に示すように、化合物 16 ($\text{IC}_{50} = 64.5 \mu\text{M}$), 17 ($\text{IC}_{50} = \mu\text{M}$), 19 (32.5 μM), 20 (18.3 μM), 23 (83.0 μM) および 24 (7.4 μM) には、通常培養条件においても MCF7 細胞の増殖抑制が観察された。

Table 19. Anti-proliferative effects of coumarin constituents from flowers of *M. siamensis* against MCF7 cells.

Treatment	Cell proliferation (% of control)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Mammeasin E (1)	100.0±0.5	81.2±0.6**	44.9±1.2**	43.6±2.2**	60.1±3.2**	
Mammeasin F (2)	100.0±2.3	103.8±0.9	101.1±3.3	72.4±1.0**	60.6±1.8**	>100
Mammeasin G (3)	100.0±0.7	100.5±1.3	101.9±1.7	103.5±2.3	94.7±1.0	>100
Mammeasin H (4)	100.0±0.9	95.4±1.9	94.4±1.8**	98.3±1.4	74.4±0.2*	>100
Mammeasin I (5)	100.0±1.8	93.1±1.9	92.9±2.8*	106.2±1.1	96.7±0.6	>100
Mammeasin J (6)	100.0±5.1	106.1±4.2	98.4±5.8	100.9±2.9	93.9±5.1	>100
Mammeasin K (7)	100.0±1.1	107.1±2.6	120.3±2.9**	106.3±2.6	125.7±1.9**	
Mammeasin L (8)	110.0±2.5	94.0±0.9	93.8±1.5	96.2±1.6	94.2±2.1	
Mammeasin M (9)	100.0±0.8	92.7±0.6**	95.1±0.4	92.1±1.1**	89.0±2.6**	>100
Mammeasin N (10)	100.0±1.6	98.2±0.8	97.9±1.7	101.2±2.9	61.2±1.2**	>100
Mammeasin A (14)	100.0±1.7	46.7±0.9**	44.1±0.3**	36.3±3.0**	2.2±0.2**	
Mammeasin B (15)	100.0±3.5	42.1±0.5**	50.7±0.7**	68.6±1.6**	3.0±0.3**	
Mammeasin C (16)	100.0±1.3	95.0±1.1	93.3±0.9	75.0±2.2**	23.3±4.6**	64.5
Mammeasin D (17)	100.0±1.3	97.8±1.9	98.5±1.3	81.7±1.8**	36.7±5.1**	79.5
Surangin B (18)	100.0±1.8	37.5±0.9**	40.0±1.2**	48.6±0.8**	2.1±0.1**	
Surangin C (19)	100.0±3.3	108.5±3.7	96.0±2.3	67.3±2.4**	3.1±0.4**	32.5
Surangin D (20)	100.0±3.0	112.3±5.0	85.6±2.2*	33.9±3.6**	3.8±0.6**	18.3
Kayeassamin A (21)	100.0±1.5	93.6±0.5**	78.0±1.7**	41.8±0.4**	60.7±0.7**	
Kayeassamin F (23)	100.0±2.8	70.7±3.1**	62.6±2.1**	61.1±1.1**	49.0±1.7**	83.0
Kayeassamin G (24)	100.0±2.5	63.5±0.6**	41.0±1.7**	36.1±1.2**	38.4±1.3**	7.4
Kayeassamin I (25)	100.0±1.1	106.6±1.6*	110.3±2.1**	85.3±1.9**	63.0±0.4**	>100
Mammea A/AA (28)	100.0±3.6	101.5±3.0	88.9±2.8*	90.3±1.0	90.1±1.7	
Mammea A/AB (29)	100.0±1.4	100.2±3.8	86.5±1.7**	85.4±2.2**	78.2±0.5**	>100
Mammea A/AC (30)	100.0±6.9	70.7±3.3**	49.1±0.6**	70.2±2.7**	83.8±2.8*	
Mammea A/AD (31)	100.0±1.9	61.5±1.8**	40.8±0.9**	55.2±1.0**	76.2±1.7**	
Mammea A/AA cyclo D (32)	100.0±1.6	92.1±3.2	89.2±3.6	91.9±3.2	82.3±3.4**	
Mammea A/AB cyclo D (33)	100.0±1.0	102.7±3.8	104.7±3.3	106.1±2.1	98.6±1.4	>100
Mammea A/AC cyclo D (34)	100.0±3.2	101.6±1.7	94.7±2.0	94.8±2.0	93.8±1.7	
Mammea B/AB cyclo D (35)	100.0±2.5	107.5±1.7	103.8±2.5	102.8±3.2	85.3±1.6**	
Mammea B/AC cyclo D (36)	100.0±3.7	92.9±2.4	93.6±1.7	91.7±3.4	91.4±1.7	
Mammea E/BA (38)	100.0±3.2	41.7±1.1**	48.1±1.0**	76.9±1.2**	51.3±2.5**	
Mammea E/BB (39)	100.0±1.0	41.6±1.6**	45.8±1.7**	63.6±2.6**	50.3±2.0**	
Mammea E/BC (40)	100.0±1.7	32.1±1.0**	39.7±0.5**	53.8±1.1**	83.7±1.0**	
Mammea E/BC cyclo D (41)	100.0±4.6	90.9±1.6	91.1±1.8	68.6±2.6**	69.3±2.5**	
Mammea E/BD cyclo D (42)	100.0±1.6	102.5±2.6	102.6±0.5	82.1±1.8**	84.2±1.2**	>100
Mammea A/AA cyclo F (43)	100.0±3.6	95.2±2.0	98.0±3.3	94.6±2.9	80.2±4.3**	
Mammea A/AC cyclo F (44)	100.0±1.4	83.6±1.0**	79.1±2.0**	82.5±3.8**	80.6±1.0**	
deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	100.0±3.0	94.3±1.0	93.1±1.5	79.8±2.9**	50.0±3.1**	>100
deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	100.0±2.0	112.8±3.2**	113.5±3.7*	108.3±1.2	95.3±2.1	>100
deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	100.0±4.4	100.9±3.4	107.1±3.8	95.4±1.6	58.9±4.4**	>100
	Cell proliferation (% of control)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	
Mammeasin A (14)	100.0±2.1	42.0±0.4**	43.7±0.9**	51.4±0.8**	2.3±0.9**	
Mammeasin B (15)	100.0±1.4	43.4±0.6**	46.6±0.7**	58.1±1.0**	41.4±4.7**	
Camptothecin	100.0±2.8	57.0±1.8**	49.6±1.7**	12.5±0.4**	17.7±0.2**	0.26
	Cell proliferation (% of control)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	0.03 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	
Doxorubicin	100.0±3.3	84.5±3.4**	72.8±2.6**	57.5±2.2**	42.1±2.4**	0.55

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

第七節 含有クマリン成分の 5 α -リダクターゼ阻害活性

5 α -リダクターゼはアロマターゼと同様に性ホルモン生合成経路の酵素のひとつであり、生体内においてはアロマターゼと共通の基質テストステロンを有し、テストステロンを dihydrotestosterone (DHT) に変換する (Figure 37). アロマターゼ阻害活性が認められた化合物について、アロマターゼへの特異的な阻害活性を評価するために、その一環としてアロマターゼと共通基質をもつ 5 α -リダクターゼに対する阻害活性を評価した. 本実験にはラット肝ホモジネートを用いて 5 α -リダクターゼ阻害活性を検討し、陽性対照薬として 5 α -リダクターゼ阻害薬である finasteride を使用し同様に評価した (Figure 38).

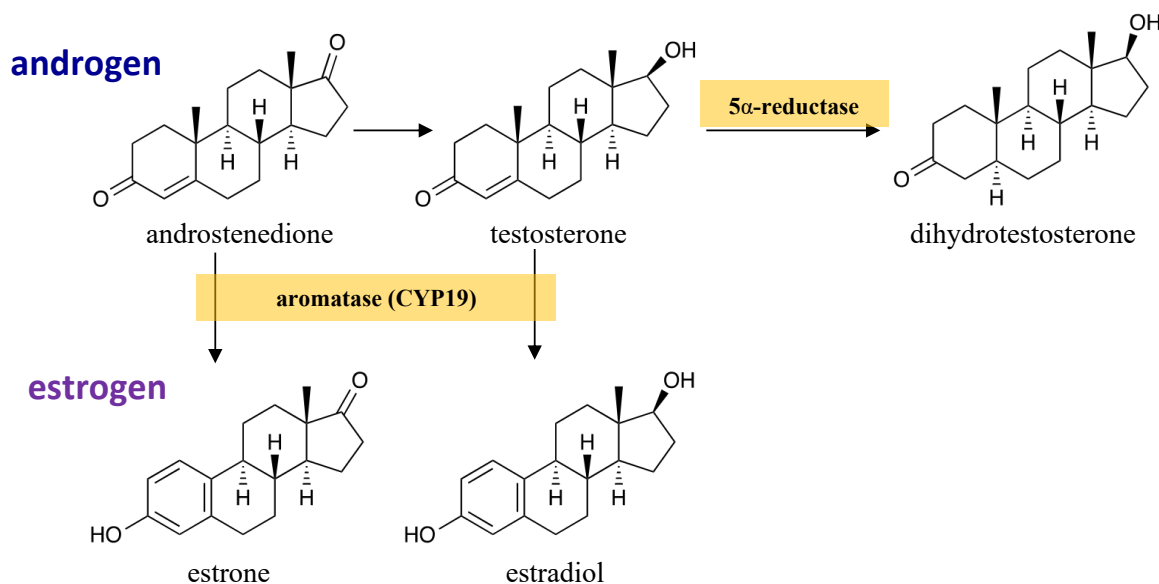


Figure 37. Biosynthetic pathway of estrogens and androgens

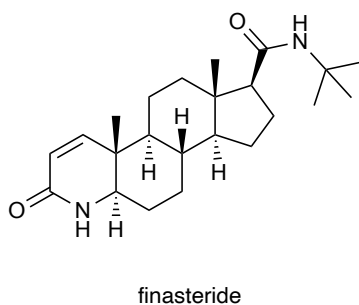


Figure 38. Chemical structures of finasteride

Table 20 には *M. siamensis* 花部由来クマリン化合物および finasteride の 5 α -リダクターゼに対する阻害活性の IC₅₀ を示し, Table 21 には 5 α -リダクターゼ阻害活性が認められた化合物の各濃度における阻害率を示している.

Table 20. IC₅₀ values of coumarin constituents from flowers of *M. siamensis* on testosterone 5 α -reductase

	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (μ M)
Mammeasin E (1)	22.6	Mammea A/AA (28)	19.5
Mammeasin F (2)	>100 (14.9) ^a	Mammea A/AB (29)	>100 (23.3) ^a
Mammeasin G (3)	>100(31.3) ^a	Mammea A/AC (30)	>100 (41.5) ^a
Mammeasin H (4)	>100 (37.2) ^a	Mammea A/AD (31)	>100 (30.3) ^a
Mammeasin I (5)	>100 (29.6) ^a	Mammea A/AA cyclo D (32)	>100 (38.8) ^a
Mammeasin J (6)	>100 (31.5) ^a	Mammea A/AB cyclo D (33)	>100 (6.7) ^a
Mammeasin M (9)	>100 (18.8) ^a	Mammea A/AC cyclo D (34)	>100 (32.0) ^a
Mammeasin N (10)	>100 (39.6) ^a	Mammea B/AB cyclo D (35)	>100 (40.7) ^a
Mammeasin A (14)	19.0	Mammea B/AC cyclo D (36)	>100 (27.3) ^a
Mammeasin B (15)	24.0	Mammea E/BA (38)	16.2
Mammeasin C (16)	91.9	Mammea E/BB (39)	16.8
Mammeasin D (17)	>100 (16.4) ^a	Mammea E/BC (40)	>100 (19.1) ^a
Surangin B (18)	>100 (38.5) ^a	Mammea E/BC cyclo D (41)	>100 (31.9) ^a
Surangin C (19)	5.9	Mammea E/BD cyclo D (42)	>100 (31.7) ^a
Surangin D (20)	>100 (16.4) ^a	mammea A/AA cyclo F (43)	23.6
Kayeassamin A (21)	>100 (20.2) ^a	mammea A/AC cyclo F (44)	83.8
Kayeassamin E (22)	33.8	Deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	>100 (37.1) ^a
Kayeassamin F (23)	15.9	Deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	>100 (31.9) ^a
Kayeassamin G (24)	17.7	Deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	>100 (40.8) ^a
Kayeassamin I (25)	>100 (29.6) ^a		
		Finasteride ^b	0.12

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

^a Values in parentheses present of control of cell viability at 100 μ M.

^b Commercial finasteride was purchased from Sigma-Aldrich Co. LLC (St. Louis, USA).

その結果を陽性対照剤である finasteride (IC₅₀ = 0.12 μ M) と比較し, 比較的強いアロマトラーゼ阻害活性が認められた新規化合物 mammeasins C (16), D (17) および 既知化合物 surangin B (18), surangin D (20), kayeassamin I (25), mammea A/AB (29), A/AA cyclo D (32), B/AB cyclo D (35) などの化合物は 5 α -リダクターゼ阻害活性を示さなかったことから, アロマトラーゼ阻害剤シーズとしての可能性が示唆された.

Table 21. Inhibitory activity of coumarin constituents from *M.siamensis* against 5 α -reductase from S9 rat liver fractions.

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Mammeasin E (1)	0.0 \pm 6.0	20.0 \pm 9.2	30.9 \pm 9.3	53.9 \pm 12.7	89.5 \pm 15.8	22.6
Mammeasin F (2)	0.0 \pm 5.2	-	-	-	14.9 \pm 5.4	>100
Mammeasin G (3)	0.0 \pm 5.1	-	-	-	31.3 \pm 2.4	>100
Mammeasin H (4)	0.0 \pm 5.1	-	-	-	37.2 \pm 4.7*	>100
Mammeasin I (5)	0.0 \pm 5.1	-	-	-	29.6 \pm 3.4*	>100
Mammeasin J (6)	0.0 \pm 5.1	-	-	-	31.5 \pm 4.3*	>100
Mammeasin M (9)	0.0 \pm 5.1	-	-	-	18.8 \pm 3.3	>100
Mammeasin N (10)	0.0 \pm 4.7	9.6 \pm 5.0	14.5 \pm 7.9	23.2 \pm 8.7	39.6 \pm 6.3**	>100
Mammeasin O (11)	0.0 \pm 2.2	1.7 \pm 2.2	4.3 \pm 5.4	18.5 \pm 5.6	42.4 \pm 5.8**	>100
Mammeasin A (14)	0.0 \pm 7.2	12.6 \pm 10.5	40.8 \pm 12.8	53.1 \pm 5.2	129.0 \pm 20.9	19.0
Mammeasin B (15)	0.0 \pm 11.8	35.3 \pm 6.1	39.9 \pm 4.2	58.8 \pm 9.6	83.7 \pm 4.3	24.0
Mammeasin C (16)	0.0 \pm 15.3	3.4 \pm 13.1	8.8 \pm 10.0	17.9 \pm 10.6	52.9 \pm 22.5	91.9
Mammeasin D (17)	0.0 \pm 15.6	-	-	-	16.4 \pm 5.8	>100
Surangin B (18)	0.0 \pm 3.2	-	-	-	38.5 \pm 5.0	>100
Surangin C (19)	0.0 \pm 1.8	28.2 \pm 7.7	63.6 \pm 8.3	113.6 \pm 6.7	123.7 \pm 9.6	5.9
Surangin D (20)	0.0 \pm 15.6	-	-	-	16.4 \pm 5.8	>100
Kayeassamin A (21)	0.0 \pm 2.9	-	-	-	20.2 \pm 7.9	>100
Kayeassamin E (22)	0.0 \pm 4.9	2.6 \pm 7.1	11.5 \pm 12.7	51.1 \pm 12.4	79.9 \pm 12.7	33.8
Kayeassamin F (23)	0.0 \pm 6.0	4.6 \pm 1.1	41.0 \pm 6.4	68.6 \pm 3.9	94.6 \pm 1.3	15.9
Kayeassamin G (24)	0.0 \pm 4.6	14.4 \pm 9.7	37.5 \pm 6.9	61.3 \pm 3.0	62.3 \pm 3.2	17.7
Kayeassamin I (25)	0.0 \pm 6.5	-	-	-	37.5 \pm 11.1	>100
Mammea A/AA (28)	0.0 \pm 4.0	18.9 \pm 7.0	32.0 \pm 3.9	62.0 \pm 2.8	92.9 \pm 5.3	19.5
Mammea A/AB (29)	0.0 \pm 3.2	-	-	-	23.3 \pm 7.2	>100
Mammea A/AC (30)	0.0 \pm 3.2	-	-	-	41.5 \pm 11.4	>100
Mammea A/AD (31)	0.0 \pm 3.2	-	-	-	30.3 \pm 2.1	>100
Mammea A/AA cyclo D (32)	0.0 \pm 2.9	-	-	-	38.8 \pm 3.8	>100
Mammea A/AB cyclo D (33)	0.0 \pm 6.0	-	-	-	6.7 \pm 4.5	>100
Mammea A/AC cyclo D (34)	0.0 \pm 1.7	-	-	-	32.0 \pm 1.9	>100
Mammea B/AB cyclo D (35)	0.0 \pm 4.6	-	-	-	40.7 \pm 18.1	>100
Mammea B/AC cyclo D (36)	0.0 \pm 1.7	-	-	-	27.3 \pm 2.0	>100
Mammea E/BA (38)	0.0 \pm 5.1	16.2 \pm 4.0	31.3 \pm 3.8*	48.5 \pm 1.1**	62.9 \pm 2.6**	16.2
Mammea E/BB (39)	0.0 \pm 6.0	8.4 \pm 6.1	43.3 \pm 3.8	58.0 \pm 4.5	93.4 \pm 4.8	16.8
Mammea E/BC (40)	0.0 \pm 3.2	-	-	-	19.1 \pm 1.3	>100
mammea E/BC cyclo D (41)	0.0 \pm 2.9	-	-	-	31.9 \pm 3.9	>100
mammea E/BD cyclo D (42)	0.0 \pm 2.4	8.2 \pm 3.1	10.8 \pm 5.5	22.5 \pm 5.9	31.7 \pm 5.0	>100
mammea A/AA cyclo F (43)	0.0 \pm 8.6	13.76 \pm 6.67	21.62 \pm 10.29	62.79 \pm 18.09**	56.96 \pm 15.7**	23.6
mammea A/AC cyclo F (44)	0.0 \pm 5.29	4.16 \pm 6.11	18.43 \pm 6.88*	32.52 \pm 6.04**	54.77 \pm 23.17**	83.8
deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	0.0 \pm 2.9	-	-	-	37.1 \pm 4.0	>100
deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	0.0 \pm 2.9	-	-	-	31.9 \pm 8.8	>100
deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	0.0 \pm 1.7	-	-	-	40.8 \pm 4.1	>100
	0 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	IC ₅₀ (μ M)
Finasteride	0.0 \pm 6.4	48.5 \pm 10.9	61.8 \pm 11.4	76.0 \pm 9.8	91.3 \pm 13.1	0.12

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

また, mammeasin E (1, IC₅₀ = 22.6 μ M), mammeasin A (14, 19.0 μ M), B (15, 24.0 μ M); kayeassamins E (22, 33.8 μ M), F (23, 15.9 μ M), G (24, 17.7 μ M); mammea A/AA (28, 19.5 μ M), E/BA (38, 16.2 μ M), E/BB (39, 16.8 μ M) および mammea A/AA cyclo F (43, 23.6 μ M) には弱い 5 α -リダクターゼ阻害活性が認められ, surangin C (19, 5.9 μ M) には比較的強い 5 α -リダクターゼ阻害活性が認められた。

第八節 含有クマリン成分の LNCaP 増殖抑制作用

5 α -リダクターゼは血中循環テストステロンを基質して DHT に変換する。DHT はテストステロンに比較し、アンドロゲン受容体への親和性が高く、活性型アンドロゲンとして知られている。DHT とテストステロンはアンドロゲン受容体 (AR) を介して前立腺がんの発症や進行に関与していることから、5 α -リダクターゼを阻害することにより DHT の生成量が下がり、前立腺がんの発症を抑制することが期待できると考えられる。また、5 α -リダクターゼ阻害薬である finasteride の投与により前立腺がんの長期的に発症率が抑制され、前立腺がんの死亡リスクも 25%低下させることが報告されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

前節においていくつかの *M. siamensis* 花部由来のクマリン化合物には 5 α -リダクターゼ阻害活性が認められたことから、前立腺がん細胞への影響について検討すべく、*M. siamensis* 花部エキスおよびその含有クマリン成分について、ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP 細胞における増殖抑制作用を評価した。その結果は Table 22 および Table 23 に示す。陽性対照剤として、前立腺がんの化学療法で用いられる paclitaxel を使用した。

Table 22. Anti-proliferative effects of methanol extract and fractions from flowers of *M. siamensis* against LNCaP cells.

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	0 $\mu\text{g/mL}$	0.3 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	
MeOH ext.	100.0 \pm 1.7	96.2 \pm 2.3	87.8 \pm 2.0**	24.5 \pm 1.7**	7.3 \pm 0.1**	2.1
EtOAc-soluble fraction	100.0 \pm 1.3	97.7 \pm 2.0	97.0 \pm 2.3	42.7 \pm 1.5**	7.6 \pm 0.2**	2.7
	Inhibition (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	
MeOH-eluted fraction	100.0 \pm 2.0	99.4 \pm 4.6	95.8 \pm 2.2	38.1 \pm 1.5**	11.9 \pm 0.0**	23.8
H ₂ O-eluted fraction	100.0 \pm 6.1	99.7 \pm 6.3	94.8 \pm 4.1	86.1 \pm 3.1	72.4 \pm 2.5**	>100

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=5).

Asterisks denote significant differences from control at * p <0.05, ** p <0.01.

Table 22 に示したように、*M. siamensis* 花部 MeOH 抽出エキスより強い LNCaP 細胞増殖抑制活性 (IC₅₀ = 2.0 $\mu\text{g/mL}$) を見だし、その分画である EtOAc 移行部に活性の集約 (IC₅₀ = 2.7 $\mu\text{g/mL}$) が認められた。

Table 23. Anti-proliferative effects of coumarin constituents from flowers of *M. siamensis* against LNCaP cells.

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Mammeasin E (1)	100.0 \pm 2.7	94.8 \pm 3.9	24.8 \pm 1.4**	8.9 \pm 0.0**	8.2 \pm 0.3**	5.9
Mammeasin F (2)	100.0 \pm 1.6	90.4 \pm 4.8*	79.8 \pm 2.3**	15.5 \pm 0.5**	7.3 \pm 0.0**	16.7
Mammeasin G (3)	100.0 \pm 4.3	115.2 \pm 6.9	102.6 \pm 3.6	80.6 \pm 2.2*	38.4 \pm 0.9**	83.5
Mammeasin H (4)	100.0 \pm 2.1	97.1 \pm 1.4	95.4 \pm 1.3	90.8 \pm 1.2*	31.5 \pm 1.1**	69.4
Mammeasin I (5)	100.0 \pm 2.7	107.9 \pm 1.4	110.1 \pm 5.0	100.7 \pm 2.7	47.9 \pm 0.8**	>100
Mammeasin J (6)	100.0 \pm 3.4	97.1 \pm 2.9	99.1 \pm 1.8	91.4 \pm 2.4	86.9 \pm 3.8**	>100
Mammeasin K (7)	100.0 \pm 1.7	95.8 \pm 2.3	95.6 \pm 1.5	94.4 \pm 1.8	79.9 \pm 1.6	>100
Mammeasin L (8)	100.0 \pm 1.8	92.7 \pm 1.6*	88.9 \pm 2.2**	83.9 \pm 1.7**	19.6 \pm 0.6**	49.4
Mammeasin M (9)	100.0 \pm 6.2	95.0 \pm 4.8	95.5 \pm 2.2	87.0 \pm 5.5	91.3 \pm 0.8	>100
Mammeasin N (10)	100.0 \pm 1.6	97.2 \pm 4.6	92.3 \pm 2.2	80.3 \pm 3.1**	49.4 \pm 1.7**	49.4
Mammeasin O (11)	100.0 \pm 1.1	93.2 \pm 2.3	91.0 \pm 4.4*	61.3 \pm 1.4**	15.1 \pm 0.3**	35.2
Mammeasin A (14)	100.0 \pm 4.1	18.9 \pm 1.0**	11.0 \pm 0.3**	8.0 \pm 0.0**	10.8 \pm 0.0**	<3
Mammeasin B (15)	100.0 \pm 1.4	16.0 \pm 0.8**	11.2 \pm 0.2**	8.3 \pm 0.1**	9.1 \pm 0.1**	<3
Mammeasin C (16)	100.0 \pm 1.7	111.7 \pm 3.4*	96.5 \pm 3.5	54.1 \pm 2.2**	8.4 \pm 0.1**	30.5
Mammeasin D (17)	100.0 \pm 3.1	92.1 \pm 3.1	76.0 \pm 3.0*	58.1 \pm 3.2**	8.0 \pm 0.1**	25.0
Surangin B (18)	100.0 \pm 1.8	23.8 \pm 1.5**	13.4 \pm 0.5**	9.3 \pm 0.2**	8.8 \pm 0.1**	<3
Surangin C (19)	100.0 \pm 4.2	105.3 \pm 7.4	54.4 \pm 4.7**	14.2 \pm 1.0**	7.9 \pm 0.0**	11.8
Surangin D (20)	100.0 \pm 2.2	110.4 \pm 4.2	79.9 \pm 3.3*	20.4 \pm 0.4**	7.5 \pm 0.1**	24.7
Kayeassamin E (22)	100.0 \pm 3.1	57.5 \pm 3.1**	11.1 \pm 0.4**	8.8 \pm 0.1**	7.6 \pm 0.1**	<3
Kayeassamin F (23)	100.0 \pm 2.8	78.8 \pm 1.0**	21.9 \pm 0.7**	8.6 \pm 0.2**	7.4 \pm 0.1**	6.2
Kayeassamin G (24)	100.0 \pm 1.5	58.6 \pm 2.7**	11.9 \pm 0.4**	7.9 \pm 0.1**	7.0 \pm 0.1**	3~10
Mammea A/AA (28)	100.0 \pm 1.6	97.6 \pm 2.9	98.8 \pm 0.5	87.9 \pm 2.0**	17.9 \pm 0.5**	51.9
Mammea A/AC (30)	100.0 \pm 1.2	105.2 \pm 2.6	75.9 \pm 3.6**	13.8 \pm 0.3**	15.1 \pm 0.3**	26.2
Mammea A/AD (31)	100.0 \pm 2.6	90.3 \pm 3.2*	78.2 \pm 2.7**	8.4 \pm 0.1**	9.9 \pm 0.1**	12.9
Mammea A/AB cyclo D (33)	100.0 \pm 3.0	90.8 \pm 3.0*	91.5 \pm 2.9	87.7 \pm 1.8**	82.7 \pm 0.4**	>100
Mammea A/AC cyclo D (34)	100.0 \pm 0.8	95.2 \pm 1.2	95.7 \pm 1.9	92.6 \pm 2.5*	90.0 \pm 1.0**	>100
Mammea B/AB cyclo D (35)	100.0 \pm 2.9	102.7 \pm 3.5	97.6 \pm 2.7	87.0 \pm 3.4*	28.3 \pm 0.6**	61.9
Mammea B/AC cyclo D (36)	100.0 \pm 1.7	86.9 \pm 1.5**	85.8 \pm 4.3**	82.6 \pm 1.1**	78.4 \pm 1.4**	>100
Mammea E/BB (39)	100.0 \pm 2.4	11.8 \pm 0.4**	9.0 \pm 0.1**	9.7 \pm 0.2**	9.1 \pm 0.1**	<3
Mammea E/BC (40)	100.0 \pm 3.6	11.1 \pm 0.4**	8.8 \pm 0.1**	10.5 \pm 0.2**	8.6 \pm 0.1**	<3
mammea E/BC cyclo D (41)	100.0 \pm 2.0	99.8 \pm 3.2	94.2 \pm 4.7	34.8 \pm 1.2**	7.6 \pm 0.0**	23.1
mammea A/AA cyclo F (43)	100.0 \pm 1.4	94.8 \pm 3.4	77.6 \pm 2.2**	34.9 \pm 1.8**	6.6 \pm 0.1**	21.3
mammea A/AC cyclo F (44)	100.0 \pm 2.8	88.2 \pm 4.2*	69.5 \pm 2.9**	44.1 \pm 1.2**	14.1 \pm 0.2**	39.7
deacetylmammea E/AA cyclo D (45)	100.0 \pm 1.3	90.8 \pm 3.5**	85.0 \pm 0.4**	39.3 \pm 0.7**	6.7 \pm 0.1**	25.9
deacetylmammea E/BB cyclo D (46)	100.0 \pm 1.0	91.8 \pm 1.9*	86.0 \pm 3.0**	51.7 \pm 1.6**	7.0 \pm 0.0**	34.0
deacetylmammea E/BC cyclo D (47)	100.0 \pm 2.0	94.5 \pm 1.3*	85.7 \pm 0.9**	24.7 \pm 0.7**	6.9 \pm 0.0**	19.7
			Inhibition (%)			IC ₅₀
Kayeassamin I (25)	0 μ M	10 μ M	20 μ M	30 μ M	50 μ M	(μ M)
	100.0 \pm 1.7	79.8 \pm 2.1**	36.4 \pm 1.1**	16.6 \pm 0.6**	6.5 \pm 0.1**	16.1
			Inhibition (%)			IC ₅₀
Mammea E/BD cyclo D (42)	0 μ M	30 μ M	50 μ M	60 μ M	100 μ M	(μ M)
	100.0 \pm 2.1	92.4 \pm 4.7	69.9 \pm 4.2**	36.2 \pm 1.1**	18.8 \pm 0.7**	53.9
			Inhibition (%)			IC ₅₀
Kayeassamin E (22)	0 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	(μ M)
	100.0 \pm 1.1	99.5 \pm 2.1	91.0 \pm 2.3**	51.2 \pm 1.1**	9.2 \pm 0.1**	3.0
Kayeassamin G (24)	100.0 \pm 0.7	96.5 \pm 2.7	93.4 \pm 3.9	60.0 \pm 2.7**	8.9 \pm 0.2**	3.5
			Inhibition (%)			IC ₅₀
Mammeasin A (14)	0 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	(μ M)s
	100.0 \pm 1.1	95.3 \pm 2.9	97.4 \pm 1.9	60.0 \pm 2.6**	12.9 \pm 0.1**	1.2
Mammeasin B (15)	100.0 \pm 1.3	93.1 \pm 3.2	86.3 \pm 2.1**	28.0 \pm 1.7**	13.2 \pm 0.3**	0.63
Surangin B (18)	100.0 \pm 2.3	94.8 \pm 1.7	94.1 \pm 2.2	88.7 \pm 0.6**	15.3 \pm 0.3**	1.5
Mammea E/BA (38)	100.0 \pm 2.9	113.1 \pm 5.5	109.4 \pm 4.8	51.6 \pm 1.6**	12.6 \pm 0.4**	0.88
Mammea E/BB (39)	100.0 \pm 1.9	92.1 \pm 1.9*	82.8 \pm 2.7**	16.1 \pm 0.7**	9.6 \pm 0.1**	0.52
Mammea E/BC (40)	100.0 \pm 2.1	88.5 \pm 1.5**	30.2 \pm 1.1**	11.1 \pm 0.1**	8.6 \pm 0.1**	0.12
			Inhibition (%)			IC ₅₀
Paclitaxel ^{72,73)}	0 nM	0.3 nM	1 nM	3 nM	10 nM	(nM)
	100.0 \pm 4.0	85.5 \pm 2.8*	73.4 \pm 3.0**	57.1 \pm 4.3**	16.8 \pm 1.0**	3.7

Each value represents the mean \pm S.E.M. ($N = 5$). Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

含有クマリン化合物を評価した結果は Table 23 に示したように, mammeasin E (**1**, $IC_{50} = 5.9 \mu\text{M}$), mammeasins A (**14**, $1.2 \mu\text{M}$), B (**15**, $0.63 \mu\text{M}$); surangins B (**18**, $1.5 \mu\text{M}$), C (**19**, $11.8 \mu\text{M}$), kayeassamins E (**22**, $3.0 \mu\text{M}$), F (**23**, $6.2 \mu\text{M}$), G (**24**, $3.5 \mu\text{M}$); および mammea E/BA (**38**, $0.88 \mu\text{M}$), E/BB (**39**, $0.52 \mu\text{M}$), E/BC (**40**, $0.12 \mu\text{M}$) などの化合物は LNCaP 細胞増殖抑制活性を示し, なかでも特に **14**, **15** および **38**–**40** には強い活性が認められた.

第二章 *Coreopsis tinctoria* 花部の含有成分の探索

第一節 *Coreopsis tinctoria* 花部の含有成分の抽出・単離

中国新疆省産 *C. tinctoria* の乾燥花部 (2 kg) を MeOH にて熱時抽出 (3 h, 4 回) した. 得られた MeOH 抽出液を減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (969.74 g, 生薬からの収率 48.49%) を得た. この MeOH 抽出エキス (895.86 g) を EtOAc/H₂O にて分配し, EtOAc 移行部 (144.07 g, 7.80%) および H₂O 移行部を得た. さらに H₂O 移行部を Diaion HP-20 column (3.0 kg, H₂O→MeOH) に付し, H₂O 溶出部 (391.74 g, 21.20%) および MeOH 溶出部 (264.14 g, 14.30%) を得た. 得られた EtOAc 移行部 (120.02 g) および MeOH 溶出部 (150.05 g) を順相シリカゲル, 逆相 ODS カラムクロマトグラフィー, 次いで逆相 HPLC により繰り返し分離精製し, 計 24 種の既知化合物 okanin⁴³⁾ (**50**), marein⁴³⁾ (**51**), coreopsin⁷⁴⁾ (**52**), 6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone^{43,75)} (**53**), (2*S*)-naringenin⁷⁶⁾ (**54**), isookanin^{43,77)} (**55**), (2*S*)-7,3',5'-trihydroxyflavanone⁷⁸⁾ (**56**), (2*S*)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone⁷⁹⁾ (**57**), flavanomarein⁸⁰⁾ (**58**), aromadendrin⁸¹⁾ (**59**), taxifolin^{43,82)} (**60**), (2*R*,3*R*)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone⁸³⁾ (**61**), taxifolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside⁸⁴⁾ (**62**), quercetagenin 7-*O*-β-D-glucoside⁸⁵⁾ (**63**), sikokianin D⁸⁶⁾ (**64**), sikokianin E⁸⁶⁾ (**65**), chlorogenic acid⁸⁷⁾ (**66**), caffeic acid methyl ester⁸⁸⁾ (**67**), (*E*)-*p*-coumaric acid methyl ester⁸⁹⁾ (**68**), (*Z*)-*p*-coumaric acid methyl ester⁸⁹⁾ (**69**), *p*-hydroxybenzoic acid⁹⁰⁾ (**70**), (2*E*)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate⁷⁸⁾ (**71**), coreoside B⁴⁹⁾ (**72**), coreoside D⁴⁹⁾ (**73**) を単離・同定した (Figure 40).

既知化合物 **50**–**73** については, 旋光度や MS, IR, UV および NMR スペクトルなどの物理化学データを文献との比較により同定した.

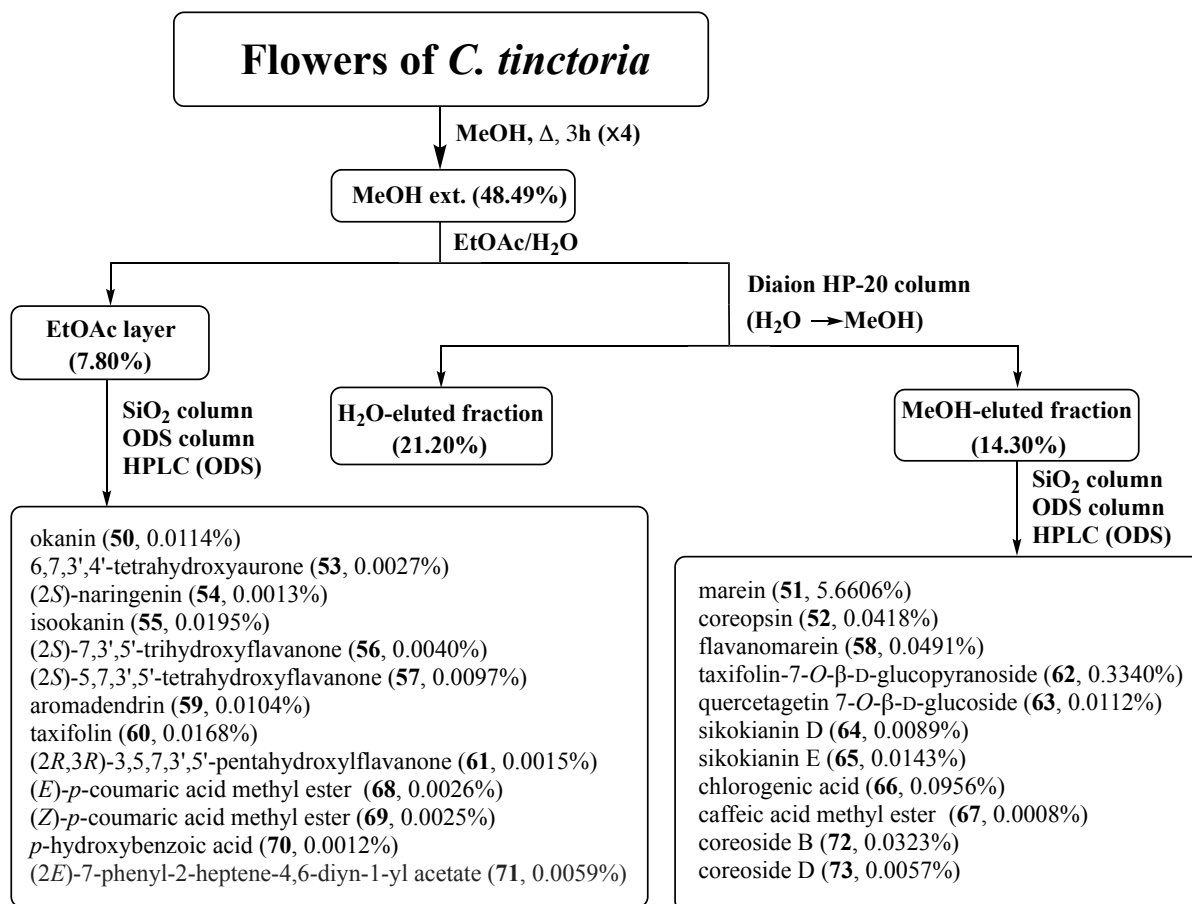


Figure 39. Isolation of chemical constituents from flowers of *C. tinctoria*

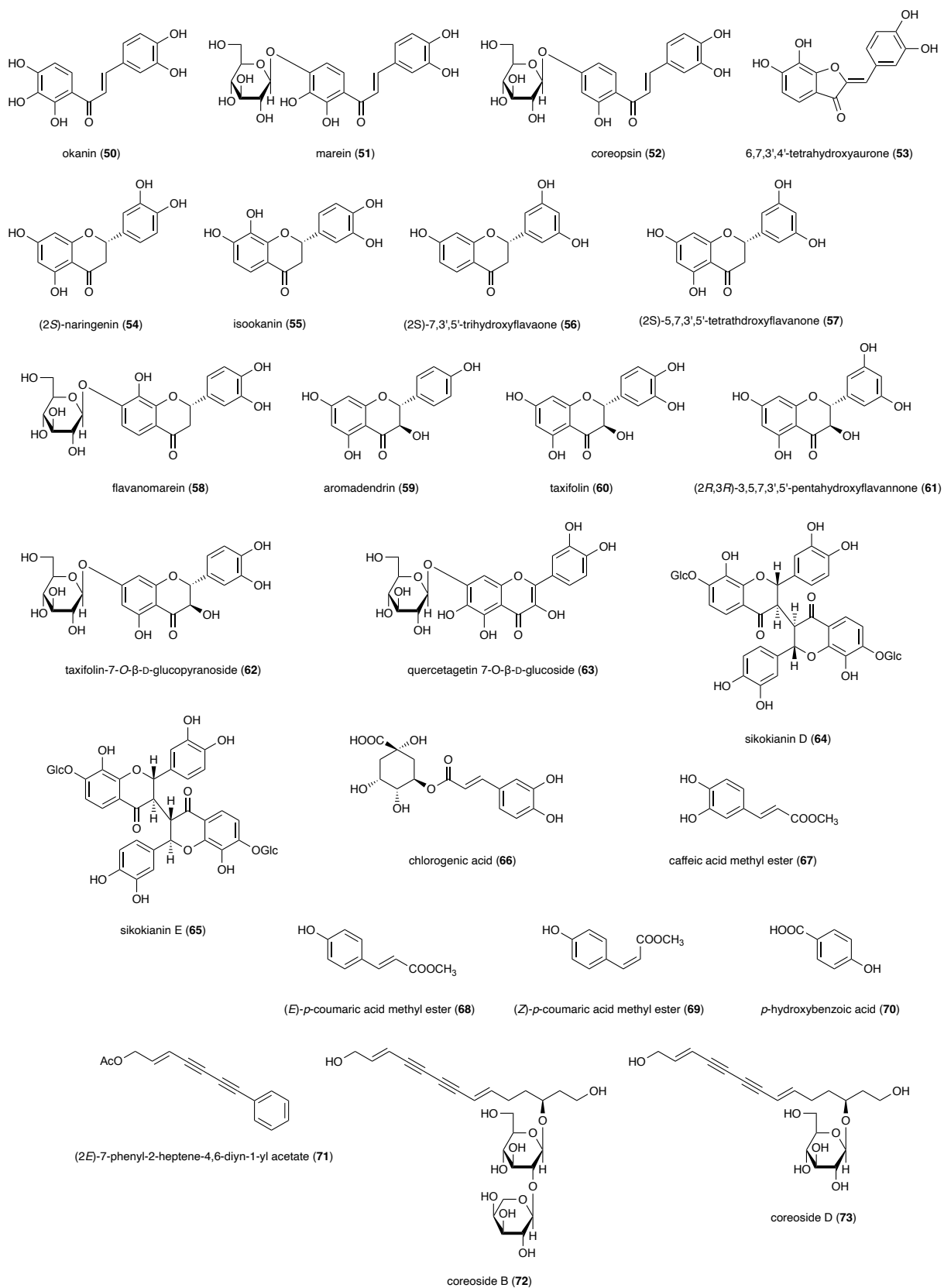


Figure 40. Chemical structures of isolated constituent from flowers of *C. tinctoria*

第二節 抽出エキスおよび含有成分のアロマトラーゼ阻害活性

第一節において抽出した *C. tinctoria* 花部の MeOH 抽出エキスおよび MeOH 抽出エキスより調製した各分画のアロマトラーゼ阻害活性を第一章第三節と同様に検討した。その結果は Table 24 に示すように、*C. tinctoria* 花部 MeOH 抽出エキスにアロマトラーゼ阻害活性を見だし、EtOAc 移行部に活性の集約 ($IC_{50} = 15.0 \mu\text{g/mL}$) が認められた。

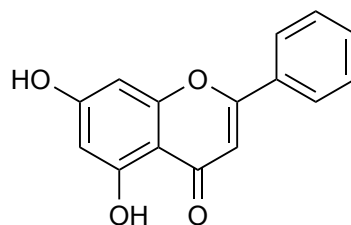
Table 24. Inhibitory activity of methanol extract and fractions from flowers of *C. tinctoria* against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
	0 $\mu\text{g/mL}$	3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	
MeOH ext.	0.0 \pm 7.2	7.1 \pm 8.0	15.7 \pm 5.2	49.1 \pm 1.2**	74.5 \pm 1.6**	24.9
EtOAc-soluble fraction	0.0 \pm 7.8	34.1 \pm 1.2**	53.1 \pm 0.6**	86.6 \pm 0.6**	99.2 \pm 0.6**	15.0
MeOH-eluted fraction	0.0 \pm 7.4	-1.8 \pm 7.3	13.1 \pm 7.7	47.9 \pm 4.1**	79.0 \pm 2.1**	25.5
H ₂ O-eluted fraction	0.0 \pm 4.6	5.2 \pm 12.3	-1.2 \pm 1.3	1.2 \pm 5.4	4.5 \pm 9.4	>100

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=3).

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

次に、*C. tinctoria* 花部に含まれるアロマトラーゼ阻害活性成分を明らかにするため、これまでに EtOAc 移行部より単離・同定されている含有成分 (Figure 40) についても同様にアロマトラーゼ阻害活性を評価した。また、天然フラボノイドの中で、果実の果皮などに含まれる chrysin (Figure 41) は強い非ステロイドアロマトラーゼ阻害剤として知られており、アロマトラーゼを競合的に阻害することが報告されている^{91,92)}。陽性対照剤として chrysin についても同様にアロマトラーゼ阻害活性を検討し、 IC_{50} として $0.32 \mu\text{M}$ であった (Table 25)。



chrysin

Figure 41. Chemical structure of chrysin

Table 25. Inhibitory activity of constituents from flowers of *C. tinctoria* against human recombinant aromatase (CYP19)

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Okanin (50)	0.0 \pm 7.4	30.6 \pm 2.9**	50.0 \pm 1.9**	80.0 \pm 3.0**	96.0 \pm 0.3**	8.4
Marein (51)	0.0 \pm 4.8	3.8 \pm 4.9	-1.6 \pm 4.0	7.3 \pm 4.4	31.7 \pm 0.9**	-
Coreopsin (52)	0.0 \pm 5.2	6.5 \pm 6.3	2.2 \pm 2.4	25.8 \pm 3.3**	46.9 \pm 3.7**	-
6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53)	0.0 \pm 0.7	7.0 \pm 10.9	17.7 \pm 5.4	53.8 \pm 3.2**	91.3 \pm 0.9**	27.2
(2S)-Naringenin (54)	0.0 \pm 5.3	33.1 \pm 4.2**	55.1 \pm 1.1**	74.9 \pm 1.6**	85.5 \pm 1.1**	7.8
Isookanin (55)	0.0 \pm 8.0	27.2 \pm 8.5*	58.4 \pm 5.3**	79.1 \pm 3.3**	91.5 \pm 0.6**	4.9
(2S)-7,3',5',-Trihydroxyflavaone (56)	0.0 \pm 4.9	75.1 \pm 1.0**	81.5 \pm 0.3**	90.7 \pm 0.9**	93.5 \pm 0.5**	0.08
(2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	0.0 \pm 6.7	46.8 \pm 2.4**	64.2 \pm 3.7**	81.2 \pm 2.3**	92.9 \pm 1.0**	3.5
Flavanomarein (58)	0.0 \pm 5.0	4.9 \pm 5.8	3.6 \pm 6.4	19.3 \pm 3.4	30.3 \pm 3.2**	-
Aromadendrin (59)	0.0 \pm 4.6	13.7 \pm 3.2	28.6 \pm 2.4**	39.3 \pm 5.5**	65.7 \pm 0.4**	36.7
Taxfolin (60)	0.0 \pm 4.9	16.1 \pm 9.0	28.3 \pm 1.9**	57.9 \pm 3.2**	85.6 \pm 0.5**	23.2
(2R,3R)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (61)	0.0 \pm 4.8	-14.2 \pm 3.3	0.8 \pm 6.4	25.3 \pm 3.6**	62.8 \pm 0.2**	66.1
Taxfolin-7-O-Glc (62)	0.0 \pm 9.5	1.8 \pm 8.1	2.5 \pm 12.4	11.8 \pm 4.6	21.5 \pm 5.1	-
Quercetagenin-7-O-Glc (63)	0.0 \pm 14.3	30.5 \pm 5.2	39.6 \pm 7.0*	54.9 \pm 1.5**	68.9 \pm 3.6**	24.1
Sikokianin D (64)	0.0 \pm 7.4	-0.4 \pm 8.4	13.7 \pm 5.6	47.2 \pm 2.6**	74.4 \pm 1.3**	23.8
Sikokianin E (65)	0.0 \pm 15.3	-6.8 \pm 12.7	1.8 \pm 10.8	31.4 \pm 4.6	58.6 \pm 4.8**	27.4
Chlorogenic acid (66)	0.0 \pm 23.3	-3.2 \pm 16.4	-10.3 \pm 11.4	-8.3 \pm 13.1	5.6 \pm 15.1	-
Caffeic acid methyl ester (67)						
(E)-p-Coumaric acid methyl ester (68)	0.0 \pm 12.6	-13.3 \pm 10.0	-7.0 \pm 6.0	1.0 \pm 12.1	25.6 \pm 7.8	-
(Z)-p-Coumaric acid methyl ester (69)	0.0 \pm 11.0	-12.9 \pm 14.4	-10.3 \pm 6.8	10.1 \pm 7.9	36.7 \pm 12.5	-
p-Hydroxybenzoic acid (70)	0.0 \pm 5.1	4.6 \pm 6.8	4.7 \pm 6.5	5.4 \pm 7.7	3.9 \pm 4.4	-
(2E)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (71)						
Coreoside B (72)	0.0 \pm 1.6	-7.9 \pm 3.7	3.8 \pm 4.7	27.7 \pm 3.5**	42.7 \pm 2.8**	-

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	
Okanin (50)	0.0 \pm 2.7	11.8 \pm 3.8	27.9 \pm 4.3**	57.5 \pm 0.3**	78.6 \pm 1.2**	7.4
(2S)-Naringenin (54)	0.0 \pm 8.2	12.2 \pm 2.3	28.6 \pm 3.1**	68.2 \pm 1.8**	76.4 \pm 0.5**	6.6
Isookanin (55)	0.0 \pm 4.9	16.7 \pm 3.1*	35.9 \pm 1.9**	62.7 \pm 2.9**	79.9 \pm 2.5**	5.9
(2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	0.0 \pm 8.8	39.1 \pm 3.0**	57.2 \pm 2.5**	72.3 \pm 1.9**	82.1 \pm 1.5	2.0

	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	0.1 μ M	0.3 μ M	1 μ M	3 μ M	
(2S)-7,3',5',-trihydroxyflavaone (56)	0.0 \pm 5.2	0.4 \pm 2.7	21.8 \pm 3.8**	44.5 \pm 4.6**	70.7 \pm 2.9**	1.2
Chrysin	0.0 \pm 1.9	21.3 \pm 4.0**	52.9 \pm 4.3**	68.7 \pm 0.4**	86.2 \pm 0.4**	0.32

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=3).

Asterisks denote significant differences from control at * p <0.05, ** p <0.01.

C. tinctoria 花部由来フラボノイド化合物についてアロマターゼ阻害活性を評価した結果は Table 25 に示すように、化合物 okanin (**50**, IC₅₀ = 7.4 μ M), (2S)-naringenin (**54**, 6.6 μ M), isookanin (**55**, 4.9 μ M), (2S)-7,3',5',-trihydroxyflavaone (**56**, 1.2 μ M) および (2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (**57**, 2.0 μ M) を主活性成分として明らかにした。これらの化合物の阻害活性の強度についても、**57** は陽性対照剤として使用した aminoglutethimide (IC₅₀ = 2.0 μ M) と同程度の活性を示し、**56** は aminoglutethimide よりも強いアロマターゼ阻害活性を示すことが明らかになった。

第三節 含有フラボノイド成分のアロマターゼ阻害様式

第二章第二節において比較的強いアロマターゼ阻害活性を示した *C. tinctoria* 花部由来フラボノイド化合物について、第一章第四節と同様に、Lineweaver-Burk プロットを用いてアロマターゼに対する阻害様式の評価を行った (Figure 42). また、Lineweaver-Burk プロットより、これらの化合物のアロマターゼへの結合親和性を示す阻害定数 K_i を算出し、その結果を Table 26 に示す. また、第二章第二節において陽性対照剤として使用した chrysin についても同様に、Lineweaver-Burk プロットを用いて阻害様式の評価を行い (Figure 42), その阻害定数 K_i を $0.23 \mu\text{M}$ と算出した (Table 26).

Table 26. K_i values of constituents from *Coreopsis tinctoria* flower (**50**, **54-58**) and chrysin against human recombinant aromatase

Treatment	K_i (μM)	Treatment	K_i (μM)
Okanin (50)	1.6	(2S)-7,3',5'-Trihydroxyflavaone (56)	0.13
(2S)-Naringenin (54)	0.90	(2S)-5,7,3',5'-Tetrahydroxyflavanone (57)	0.32
Isookanin (55)	0.81		
Aminoglutethimide	0.84	Chrysin	0.23

Each values represents the mean \pm S.E.M. ($N=3$).

Figure 42 の結果より、アロマターゼ阻害活性が認められた *C. tinctoria* 花部由来フラボノイド化合物について、いずれの化合物も chrysin と同様にアロマターゼを競合的に阻害することが明らかになった. また、阻害定数 K_i の結果について、Table 26 に示したように、**56** ($K_i = 0.13 \mu\text{M}$), **57** ($K_i = 0.32 \mu\text{M}$) は aminoglutethimide ($K_i = 0.84 \mu\text{M}$) よりも高いアロマターゼに対す結合親和性を示し、強い阻害活性を有していることが明らかになった. さらに chrysin と比較し、**56** は chrysin よりも強い活性を示し、競合的にアロマターゼを阻害することが明らかになった.

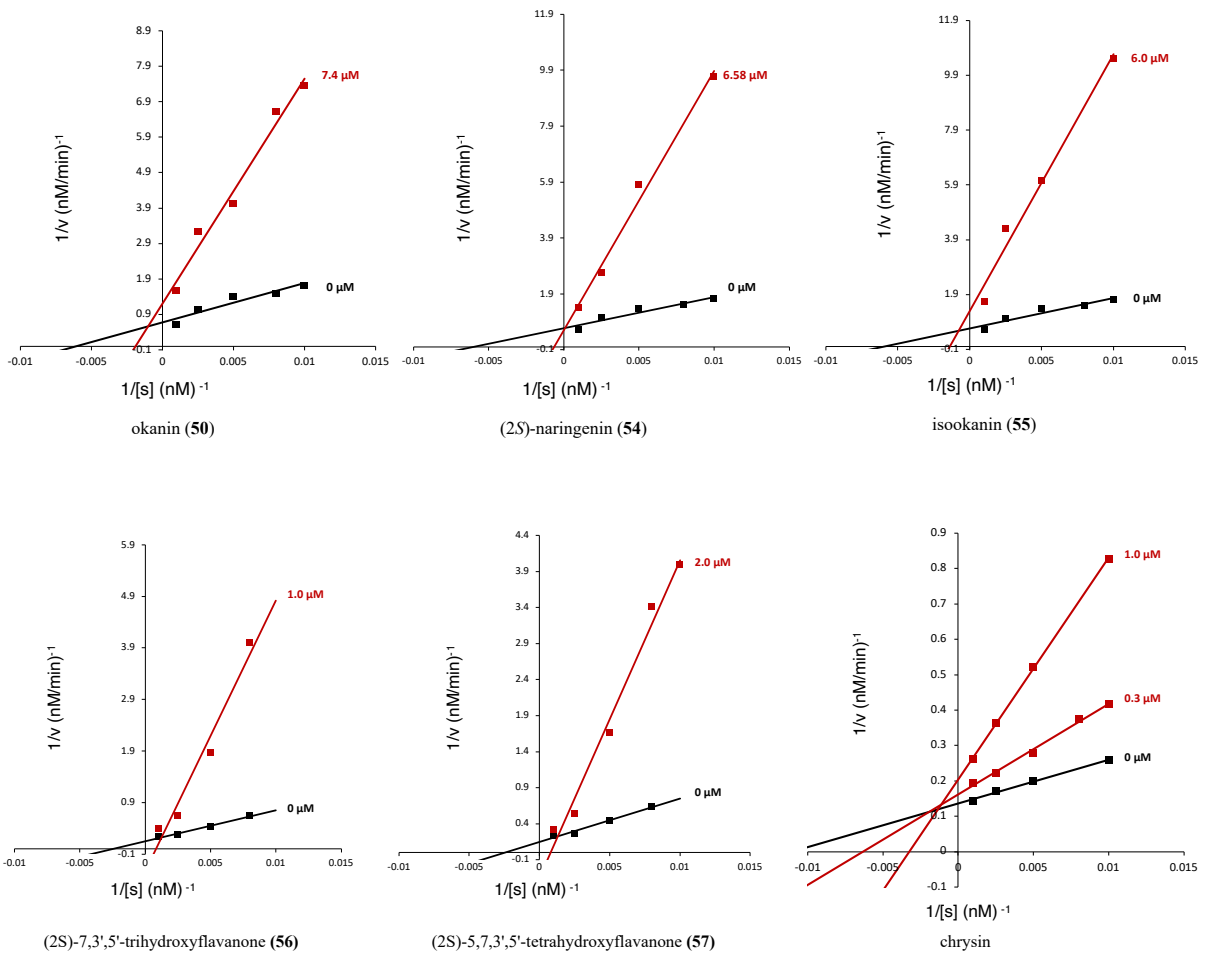


Figure 42. Lineweaver-Burk Plots of the Inhibition against Human Recombinant Aromatase Activities by **50**, **54–57** and Chrysin

また、前節の結果より、*C. tinctoria* 花部由来フラボノイド化合物の構造とアロマトラーゼ阻害活性相関について、最も強い活性が認められた **56** および **57** は、同じ flavanone 骨格を有し、その B 環に 3',5'-resorcinol moiety の共通構造を持っていることが明らかとなった。同様に B 環に 3',5'-resorcinol moiety の部分構造を持ち、flavanol 骨格である化合物 (2*R*,3*R*)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (**61**, IC₅₀ = 66.1 μM) において活性の減弱が認められたことから、flavanone 骨格および B 環の 3',5'-resorcinol moiety 構造を持つことが活性に必要であると考えられた。

第四節 含有成分のエストロゲン様作用

アロマターゼ阻害活性が認められた *C. tinctoria* 花部由来化合物について、第一章第五節と同様に MCF7 細胞におけるエストロゲン様作用を検討した。陽性対照剤として、エストロゲン依存性乳がん細胞の増殖を促進するイソフラボンである daidzein および genistein を使用した (Table 28)。その結果は Table 27 に示すように、比較的強いアロマターゼ阻害活性が認められた化合物 **50**, **54–57** について、10 μM の濃度において、**50**, **55** にはエストロゲン様活性より MCF7 細胞の増殖は観察されなかった。

Table 27. Estrogen-like effects of constituents isolated from *C. tinctoria* on cell proliferation in MCF7 cells

Treatment	Cell proliferation (% of control)				
	0 μM	0.01 μM	0.1 μM	1 μM	10 μM
Okanin (50)	100.0 \pm 3.1	101.6 \pm 3.5	91.4 \pm 3.4	91.0 \pm 3.1	110.2 \pm 5.8
Marein (51)	100.0 \pm 8.7	91.7 \pm 4.3	92.3 \pm 7.2	91.1 \pm 5.4	94.7 \pm 3.1
Coreopsin (52)	100.0 \pm 5.7	100.7 \pm 2.9	101.0 \pm 4.0	106.9 \pm 3.3	117.3 \pm 2.0*
6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53)	100.0 \pm 3.5	94.5 \pm 1.4	96.9 \pm 3.0	94.1 \pm 1.8	84.2 \pm 2.2**
(2S)-Naringenin (54)	100.0 \pm 4.5	93.5 \pm 4.3	102.8 \pm 5.9	201.2 \pm 6.2**	215.7 \pm 2.9**
Isookanin (55)	100.0 \pm 6.9	85.4 \pm 1.1	90.7 \pm 4.5	89.2 \pm 2.9	93.6 \pm 2.9
(2S)-7,3',5',-Trihydroxyflavaone (56)	100.0 \pm 4.6	94.4 \pm 1.9	99.9 \pm 4.3	106.5 \pm 5.8	124.9 \pm 5.5**
(2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	100.0 \pm 3.3	103.8 \pm 2.5	96.9 \pm 2.4	102.1 \pm 0.7	144.3 \pm 6.3**
Flavanomarein (58)	100.0 \pm 8.6	105.5 \pm 9.7	91.4 \pm 6.2	92.1 \pm 6.1	99.1 \pm 7.1
Aromadendrin (59)	100.0 \pm 2.8	93.4 \pm 2.2	94.9 \pm 2.6	105.8 \pm 2.2	202.3 \pm 7.8**
Taxfolin (60)	100.0 \pm 4.9	96.7 \pm 5.8	94.1 \pm 2.2	94.0 \pm 3.4	94.7 \pm 2.4
(2R,3R)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (61)	100.0 \pm 5.3	92.7 \pm 5.8	89.9 \pm 4.1	93.6 \pm 4.0	93.4 \pm 2.4
Taxfolin-7-O-Glc (62)	100.0 \pm 5.7	94.9 \pm 4.6	92.3 \pm 1.4	95.7 \pm 5.4	95.7 \pm 3.0
Quercetagetin-7-O-Glc (63)	100.0 \pm 9.5	100.4 \pm 5.1	103.2 \pm 3.3	98.1 \pm 2.3	106.5 \pm 3.2
Sikokianin D (64)	100.0 \pm 6.3	110.0 \pm 4.5	105.6 \pm 5.1	103.4 \pm 4.9	118.6 \pm 7.3
Sikokianin E (65)	100.0 \pm 3.4	102.7 \pm 4.5	100.5 \pm 7.5	99.1 \pm 4.4	109.6 \pm 2.0
Chlorogenic acid (66)	100.0 \pm 3.5	82.3 \pm 2.6*	84.7 \pm 6.1*	82.3 \pm 3.6*	81.9 \pm 2.9*
Caffeic acid methyl ester (67)	100.0 \pm 4.8	101.5 \pm 2.6	98.3 \pm 9.5	96.8 \pm 9.4	102.7 \pm 5.5
(E)-p-Coumaric acid methyl ester (68)	100.0 \pm 5.9	95.0 \pm 7.8	94.8 \pm 4.9	96.4 \pm 4.9	151.4 \pm 6.0**
(Z)-p-Coumaric acid methyl ester (69)	100.0 \pm 3.3	99.6 \pm 3.6	97.9 \pm 4.5	108.3 \pm 5.4	167.5 \pm 7.5**
p-Hydroxybenzoic acid (70)	100.0 \pm 7.9	96.0 \pm 7.6	95.2 \pm 5.0	102.9 \pm 8.5	97.2 \pm 8.0
(2E)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (71)	100.0 \pm 4.1	99.7 \pm 4.3	103.1 \pm 8.7	107.5 \pm 6.1	107.5 \pm 5.8
Coreoside B (72)	100.0 \pm 6.6	89.4 \pm 4.3	92.6 \pm 1.3	95.6 \pm 5.6	94.3 \pm 5.1

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N=4).

Asterisks denote significant differences from control at * p <0.05, ** p <0.01.

Table 28. Estrogenic effect of daizein and genistein on cell proliferation in MCF7 cells

Treatment	Cell proliferation (% of control)				
	0 μ M	0.01 μ M	0.1 μ M	1 μ M	10 μ M
Daidzein	100.0 \pm 4.5	93.2 \pm 4.7	101.6 \pm 4.3	124.2 \pm 4.0**	132.6 \pm 2.5**
Genistein	100.0 \pm 3.5	99.6 \pm 6.8	125.5 \pm 4.7*	146.5 \pm 5.5**	156.8 \pm 6.9**

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

第五節 含有成分の MCF7 増殖抑制作用

第一章第六節と同様に、*C. tinctoria* 花部由来化合物についても、MCF7 細胞の通常培養条件における細胞増殖抑制作用について検討した。その結果は Table 29 に示す。

Table 29. Proliferative Effects of Constituents Isolated from the Flowers of *C. tinctoria* on MCF7

Treatment	Cell proliferation (% of control)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Okanin (50)	100.0 \pm 1.9	99.7 \pm 1.4	98.1 \pm 1.6	71.3 \pm 1.6**	49.5 \pm 0.7**	28.0
Marein (51)	100.0 \pm 0.9	102.7 \pm 6.0	97.6 \pm 3.9	53.7 \pm 1.9**	47.6 \pm 1.1**	17.8
Coreopsin (52)	100.0 \pm 2.6	103.3 \pm 4.9	99.2 \pm 3.5	63.9 \pm 1.8**	65.7 \pm 2.6**	
6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53)	100.0 \pm 2.4	88.2 \pm 3.4**	89.7 \pm 1.1*	56.1 \pm 2.6**	37.2 \pm 0.7**	42.0
(2S)-Naringenin (54)	100.0 \pm 1.2	118.2 \pm 1.1**	122.5 \pm 2.4**	131.4 \pm 2.9**	149.2 \pm 1.6**	
Isookanin (55)	100.0 \pm 2.0	95.6 \pm 1.6	96.8 \pm 1.0	91.7 \pm 1.1*	62.8 \pm 1.1**	
(2S)-7,3',5',-Trihydroxyflavaone (56)	100.0 \pm 1.6	102.4 \pm 0.8	111.2 \pm 3.4	108.3 \pm 0.8*	92.6 \pm 1.1*	
(2S)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	100.0 \pm 1.3	104.5 \pm 2.0	106.1 \pm 1.6	112.8 \pm 2.3**	111.0 \pm 1.1**	
flavanomarein (58)	100.0 \pm 2.8	99.8 \pm 0.7	98.3 \pm 1.7	74.9 \pm 0.7**	56.9 \pm 0.7**	27.5
aromadendrin (59)	100.0 \pm 1.1	106.9 \pm 0.9**	111.6 \pm 1.8**	135.0 \pm 2.8**	158.9 \pm 2.6**	
taxfolin (60)	100.0 \pm 2.5	104.8 \pm 4.2	97.1 \pm 2.5	109.7 \pm 2.8	90.1 \pm 1.0*	
(2R,3R)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (61)	100.0 \pm 2.5	102.6 \pm 4.6	87.6 \pm 0.6*	103.5 \pm 3.2	107.4 \pm 0.8	
Taxfolin-7-O-Glc (62)	100.0 \pm 0.4	100.2 \pm 2.0	105.8 \pm 1.9	105.0 \pm 2.6	70.4 \pm 1.1**	
Quercetagenin-7-O-Glc (63)	100.0 \pm 0.7	100.1 \pm 1.8	102.4 \pm 3.8	97.5 \pm 0.2	95.7 \pm 1.7	
Sikokianin D (64)	100.0 \pm 2.8	99.3 \pm 2.8	96.2 \pm 3.5	99.7 \pm 1.7	98.7 \pm 4.0	
Sikokianin E (65)	100.0 \pm 3.2	104.3 \pm 0.7	103.8 \pm 4.0	107.7 \pm 4.2	107.1 \pm 2.2	
Chlorogenic acid (66)	100.0 \pm 2.6	83.9 \pm 2.0****	86.1 \pm 1.8****	87.6 \pm 1.5**	92.6 \pm 1.3*	
Caffeic acid methyl ester (67)	100.0 \pm 3.2	101.6 \pm 3.1	102.1 \pm 5.5	103.5 \pm 3.2	92.0 \pm 3.5	
(E)-p-Coumaric acid methyl ester (68)	100.0 \pm 2.4	100.6 \pm 3.1	104.6 \pm 3.3	105.5 \pm 3.6	105.5 \pm 2.2	
(Z)-p-Coumaric acid methyl ester (69)	100.0 \pm 3.3	92.8 \pm 1.8	93.8 \pm 1.9	97.7 \pm 2.4	98.3 \pm 2.8	
p-Hydroxybenzoic acid (70)	100.0 \pm 0.3	87.9 \pm 3.0*	98.0 \pm 2.5	92.7 \pm 5.0	98.3 \pm 1.6	
(2E)-7-phenyl-2-heptene-4,6-dien-1-yl acetate (71)	100.0 \pm 0.2	91.5 \pm 1.0*	95.5 \pm 3.2	87.4 \pm 1.3**	85.9 \pm 2.8**	
Coreoside B (72)	100.0 \pm 2.4	103.2 \pm 1.3	107.0 \pm 3.5	99.0 \pm 1.5	99.0 \pm 1.8	

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

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 29 に示したように、*C. tinctoria* 花部の主成分である marein (51, IC₅₀ = 28.0 μ M) および okanin (50, 17.8 μ M), 6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53, 42.0 μ M), flavanomarein (58, 27.5 μ M) には通常培養条件において弱い MCF7 細胞増殖抑制作用が認められた。

第六節 含有成分の 5 α -リダクターゼ阻害活性

C. tinctoria 花部由来化合物について、第一章第五節と同様に 5 α -リダクターゼ阻害活性を検討し、その IC₅₀ を Table 30 に示す。陽性対照薬に 5 α -リダクターゼ阻害薬である finasteride を使用した。

その結果は Table 30 に示すように、finasteride と比較して、アロマトラーゼ阻害活性が認められなかった化合物 6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone (**53**) 以外、いずれの化合物も 100 μ M で 5 α -リダクターゼ阻害活性を示さなかったことが明らかとなった。

Table 30. IC₅₀ values of constituents from flowers of *C. tinctoria* on testosterone 5 α -reductase

	IC ₅₀ (μ M)		IC ₅₀ (μ M)
Okanin (50)	> 100 (17.7) ^{a)}	aromadendrin (59)	> 100 (15.8) ^{a)}
Marein (51)	>100 (1.2) ^{a)}	taxfolin (60)	> 100 (38.2) ^{a)}
Coreopsin (52)	> 100 (19.5) ^{a)}	(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (61)	> 100 (43.4) ^{a)}
6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53)	31.1	Taxfolin-7- <i>O</i> -Glc (62)	>100 (-5.7) ^{a)}
(2 <i>S</i>)-Naringenin (54)	> 100 (27.0) ^{a)}	(<i>E</i>)- <i>p</i> -Coumaric acid methyl ester (68)	>100 (24.5) ^{a)}
Isookanin (55)	> 100 (46.7) ^{a)}	(<i>Z</i>)- <i>p</i> -Coumaric acid methyl ester (69)	>100 (20.1) ^{a)}
(2 <i>S</i>)-7,3',5',-Trihydroxyflavaone (56)	> 100 (25.8) ^{a)}	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (70)	>100 (1.9) ^{a)}
(2 <i>S</i>)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	> 100 (32.7) ^{a)}		
flavanomarein (58)	>100 (8.8) ^{a)}	Finasteride	0.12

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

a) Values in parentheses present inhibition % at 100 μ M.

第七節 含有成分の LNCaP 細胞増殖抑制作用

C. tinctoria 花部 MeOH 抽出エキスおよびその MeOH 抽出エキスより調製した各分画について、第一章第八節と同様に、ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP 細胞における増殖抑制作用を評価した。陽性対照剤として、前立腺がんの化学療法で用いられる paclitaxel を使用した。その結果は Table 30 に示す。

Table 30 Proliferative Effects of Extract and Fractions of the Flowers of *C. tinctoria* on LNCaP

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μg/mL)
	0 μg/mL	3 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	100 μg/mL	
MeOH ext.	100.0±4.4	97.3±2.8	102.8±4.0	99.9±1.4	76.8±1.1	-
MeOH-eluted fraction	100.0±2.1	111.3±5.2	115.0±3.6	94.4±1.6	52.2±1.1**	-
H ₂ O-eluted fraction	100.0±4.1	102.0±6.5	97.5±3.5	90.5±2.5	84.6±1.4*	-

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μg/mL)
	0 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	60 μg/mL	100 μg/mL	
EtOAc-soluble fraction	100.0±2.6	106.8±4.9	102.5±4.9	56.4±3.1**	21.5±0.2**	62.0

Each value represents the mean±S.E.M. (N=5).

Asterisks denote significant differences from control at * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 30 に示したように、*C. tinctoria* 花部 MeOH 抽出エキスより調製した EtOAc 移行部 (IC₅₀ = 62.0 μg/mL) に弱い LNCaP 細胞増殖抑制活性が認められた。*C. tinctoria* 花部由来化合物についても同様に評価した (Table 31)。

その結果、化合物 (2*E*)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (**71**) は IC₅₀ = 11.9 μM であり、LNCaP 細胞増殖抑制活性が認められた。また、okanin (**50**), marein (**51**), coreopsin (**52**), isookanin (**55**), flavanomarein (**58**) および coreoside B (**72**) についても、100 μM 濃度において LNCaP 細胞増殖の抑制が観察された。

Table 31. Proliferative Effects of Extract and Fractions of the Flowers of *C. tinctoria* on LNCaP

Treatment	Inhibition (%)					IC ₅₀ (μ M)
	0 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	100 μ M	
Okanin (50)	100.0 \pm 2.4	89.9 \pm 2.3	96.0 \pm 7.3	82.1 \pm 2.4*	30.7 \pm 0.2**	
Marein (51)	100.0 \pm 1.1	104.6 \pm 1.8	108.9 \pm 1.3**	105.0 \pm 1.4*	28.5 \pm 0.5**	
Coreopsin (52)	100.0 \pm 2.9	98.3 \pm 2.5	101.1 \pm 3.8	90.6 \pm 1.7	40.4 \pm 0.6**	
6,7,3',4'-Tetrahydroxyaurone (53)	100.0 \pm 2.1	94.1 \pm 2.6	96.8 \pm 3.1	98.3 \pm 3.8	45.7 \pm 2.5**	
(2 <i>S</i>)-Naringenin (54)	100.0 \pm 5.9	97.0 \pm 9.3	112.6 \pm 6.8	109.7 \pm 8.1	108.0 \pm 3.0	
Isookanin (55)	100.0 \pm 2.9	96.6 \pm 1.7	96.1 \pm 3.5	99.0 \pm 2.8	36.0 \pm 1.4**	
(2 <i>S</i>)-7,3',5',-Trihydroxyflavaone (56)	100.0 \pm 4.2	121.0 \pm 4.4*	113.8 \pm 5.6	105.9 \pm 5.6	57.2 \pm 1.8**	
(2 <i>S</i>)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (57)	100.0 \pm 3.4	115.6 \pm 6.1	106.3 \pm 4.6	96.5 \pm 4.0	64.9 \pm 2.1**	
Flavanomarein (58)	100.0 \pm 1.4	99.6 \pm 2.5	103.6 \pm 1.7	106.9 \pm 1.3*	33.4 \pm 0.7**	
Aromadendrin (59)	100.0 \pm 1.3	100.2 \pm 2.3	108.4 \pm 1.7*	98.1 \pm 3.3	120.0 \pm 0.5**	
Taxfolin (60)	100.0 \pm 8.2	96.6 \pm 5.4	88.4 \pm 7.1	103.1 \pm 8.2	99.0 \pm 2.4	
(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (61)	100.0 \pm 3.4	102.9 \pm 3.6	104.9 \pm 2.0	105.7 \pm 2.4	73.6 \pm 1.4**	
Taxfolin-7- <i>O</i> -Glc (62)	100.0 \pm 2.0	97.9 \pm 3.6	101.6 \pm 2.4	84.9 \pm 1.7**	20.2 \pm 0.4**	
Quercetagetin-7- <i>O</i> -Glc (63)	100.0 \pm 4.4	97.1 \pm 8.1	95.1 \pm 5.3	97.1 \pm 5.7	82.4 \pm 2.7*	
Sikokianin D (64)	100.0 \pm 1.8	96.5 \pm 1.7	95.1 \pm 3.1	101.1 \pm 3.4	92.0 \pm 1.6	
Sikokianin E (65)	100.0 \pm 1.8	103.5 \pm 3.6	100.9 \pm 4.0	99.6 \pm 2.4	89.2 \pm 1.3*	
Chlorogenic acid (66)	100.0 \pm 3.7	98.4 \pm 2.7	98.9 \pm 1.8	100.9 \pm 1.8	105.7 \pm 0.7	
Caffeic acid methyl ester (67)	100.0 \pm 3.5	103.8 \pm 2.4	110.5 \pm 4.4	107.5 \pm 3.7	88.5 \pm 3.6	
(<i>E</i>)- <i>p</i> -Coumaric acid methyl ester (68)	100.0 \pm 1.6	109.1 \pm 1.3*	114.7 \pm 3.1**	117.6 \pm 2.0**	116.2 \pm 2.0**	
(<i>Z</i>)- <i>p</i> -Coumaric acid methyl ester (69)	100.0 \pm 1.9	107.3 \pm 2.4	109.0 \pm 1.9*	103.8 \pm 2.4	102.4 \pm 1.6	
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid (70)	100.0 \pm 2.7	98.5 \pm 0.5	95.5 \pm 1.5	99.1 \pm 3.4	104.0 \pm 7.3	
(2 <i>E</i>)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (71)	100.0 \pm 4.3	96.7 \pm 6.3	67.5 \pm 4.5**	35.9 \pm 0.4**	19.0 \pm 0.5**	11.9
Coreoside B (72)	100.0 \pm 1.1	104.6 \pm 1.8	108.9 \pm 1.3**	105.0 \pm 1.4*	28.5 \pm 0.5**	

Each value represents the mean \pm S.E.M. (N = 5).

Significantly different from the control, *p < 0.05, ** p < 0.01.

結 論

Mamemma siamensis

タイ天然薬物 *M. siamensis* 花部の MeOH 抽出エキス, その分画である EtOAc 移行部および MeOH 溶出部にアロマターゼ阻害活性を見いだした. EtOAc 移行部 ($IC_{50}=2.9$ mg/mL) に活性の集約が認められ, EtOAc 移行部から計 18 種の新規クマリン化合物 **1–13** を単離・構造決定するとともに, 36 種の既知化合物を単離・同定した. アロマターゼ阻害活性寄与成分について検討した結果, mammeasin C (**16**), mammeasin D (**17**) および mammea B/AB cyclo D (**35**) はヒト乳がん由来細胞株 MCF7 においてエストロゲン様作用を示さず, 競合阻害剤として強いアロマターゼ阻害活性を示すことを明らかにした. その活性の選択性について, **16**, **17** および **35** はアロマターゼと共通基質を有する 5 α -リダクターゼの活性への影響を与えなかったことから, アロマターゼ阻害剤シリーズとしての可能性が示唆される.

また, *M. siamensis* 花部由来クマリン **14**, **15**, **38**, **39** には 5 α -リダクターゼ阻害活性も認められ, ヒト前立腺がん細胞株 LNCaP における増殖抑制作用を検討した結果, mammeasins A (**14**), B (**15**) および mammea E/BA (**38**), E/BB (**39**), E/BC (**40**) には強い LNCaP 細胞増殖抑制活性が認められた.

Coreopsis tinctoria

中国新疆産 *C. tinctoria* 花部の MeOH 抽出エキスにアロマターゼ阻害活性を見いだした. その活性寄与成分を精査する目的で, *C. tinctoria* 花部から計 24 種の既知化合物を単離・同定し, その含有成分のアロマターゼ阻害活性および阻害様式を検討した. その結果, 化合物 okanin (**50**), (2*S*)-naringenin (**54**), isookanin (**55**), (2*S*)-7,3',5',-trihydroxyflavaone (**56**) および (2*S*)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (**57**) は競合阻害剤としてアロマターゼ阻害活性を示すことが明らかになった. なかでも, **50** および **55** について, ヒト乳がん由来細胞株 MCF7 細胞における

エストロゲン様作用も示さず，またアロマトラーゼと共通基質を有する 5 α -リダクターゼ阻害活性も認められなかったことから，**50** および **55** のアロマトラーゼ阻害剤シーズとしての可能性が示唆された．

実験の部

旋光度は, Horiba high sensitive SEPA-300 digital polarimeter を用いて測定した.

高分解能質量分析 (High resolution FAB-MS, EI-MS) および質量分析 (FAB-MS, EI-MS) は, JEOL JMS-700 および JMS-SX 102 型質量分析装置を用いて測定した.

赤外吸収スペクトル (IR) は, Shimadzu FT-IR DR-8100 spectrometer を用いて測定した.

紫外吸収スペクトル (UV) は, Shimadzu UV-1600 spectrometer を用いて測定した.

水素および炭素核磁気共鳴 (^1H - および ^{13}C -NMR) スペクトルは, JEOL JNM ECA-800, 700, 500 および JNM-GSX 400 型を用いて測定し, tetramethylsilane (TMS) を内部標準として用いた.

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, ポンプは Shimadzu LC-6AD を, 示差屈折計検知器 (RI) は, Shimadzu RID-6A を, 紫外分光光度計検出器 (UV) は, Shimadzu SPD-10A, および 20A を用いた. また, カラムは, COSMOSIL 5C₁₈-MS-II (ナカライテスク, 250×4.6 mm, i.d.), (250×20 mm, i.d.) および Wakopak Navi C30-5 (富士フイルム和光純薬, 250×4.6 mm, i.d.), (250×20 mm, i.d.) を分析用および分取用として用いた.

カラムクロマトグラフィーの吸着剤は, 順相系はシリカゲル 60 N (球状, 中性, Merck), 逆相系はクロマトレックス ODS DM1020T (富士シリシア) および Diaion HP-20 (日本練水) を用いた.

薄相クロマトグラフィー (TLC) には, silica gel 60F₂₅₄ (Merck, 順相), RP-18 F_{254S} および RP-18 WF_{254S} (Merck, 逆相) を使用し, スポットの検出は UV (254 nm) および 1% Ce(SO₄)₂-10% H₂SO₄ 水溶液を噴霧し, 加熱時の呈色によりおこなった.

第一章の実験

第一節の実験

タイ産 *Mammea siamensis* の乾燥花部 (1.8 kg) を細かく粉碎し, MeOH にて加熱還流下, 3 時間抽出し, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の操作を計 3 回行った. 得られた MeOH 抽出エキスを減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (463.7 g, 生薬からの収率 25.66%) を得た. 得られた MeOH 抽出エキス (413.7 g) を EtOAc と H₂O (1:1, v/v) で分配抽出し, EtOAc 移行部 (110.3 g, 6.84%) および水移行部を得た. 水移行部を, Diaion HP-20 カラム [2.4 kg, H₂O→MeOH] で分画し, H₂O 溶出部 (217.7 g, 13.50%) および MeOH 溶出部 (68.10 g, 3.77%) を得た.

EtOAc 移行部 (110.3 g のうち 89.45 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [2.7 kg, hexane-EtOAc (10:1→7:1→5:1, v/v)→EtOAc→MeOH] で分画し, Fr. E1 (3.05 g), Fr. E2 (2.86 g), Fr. E3 (11.71 g), Fr. E4 (1.62 g), Fr. E5 (4.15 g), Fr. E6 (6.29 g), Fr. E7 (2.21 g), Fr. E8 (2.94 g), Fr. E9 (10.23 g), Fr. E10 (11.17 g) および Fr. E11 (21.35 g) を得た.

Fr. E1 (3.05 g) を逆相 ODS カラム [91.5 g, MeOH-H₂O (90:10→95:5, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E1-1 (167.9 mg), Fr. E1-2 (121.8 mg), Fr. E1-3 (226.7 mg), Fr. E1-4 (251.2 mg), Fr. E1-5 (292.9 mg), Fr. E1-6 (107.8 mg), Fr. E1-7 (400.6 mg), Fr. E1-8 (364.9 mg) および Fr. E1-9 (444.1 mg) を得た. Fr. E1-3 (226.7 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製した.

Fr. E2 (2.86 g) を逆相 ODS カラム [74.0 g, MeOH-H₂O (70:30→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E2-1 (21.0 mg), Fr. E2-2 (26.2 mg), Fr. E2-3 (114.1 mg), Fr. E2-4 (425.0 mg), Fr. E2-5 (199.3 mg), Fr. E2-6 (79.6 mg), Fr. E2-7 (94.8 mg), Fr. E2-8 (1211.4 mg) および Fr. E2-9 (328.8 mg) を得た.

Fr. E2-3 (114.1 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製し, mammeasin P (**12**, 4.8 mg, 0.0004%) および mammeasin Q (**13**, 6.7 mg, 0.0005%) を得た. Fr. E2-4 (425.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v) および CH₃CN-1% aqueous AcOH (75:25, v/v)] で分離精製し, mammeasin G (**3**, 32.7 mg, 0.0025%), mammeasin H (**4**, 12.1 mg, 0.0009%), mammeasin I (**5**, 10.5, 0.0008%), mammeasin K (**7**, 10.6 mg, 0.0008%) および mammeasin L (**8**, 8.2 mg, 0.0006%) を得た.

Fr. E2-5 (199.3 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1%

aqueous AcOH (90:10, v/v)]で分離精製し, mammeasin J (**6**, 8.4 mg, 0.0006%) を得た.

Fr. E3 (11.71 g) を逆相 ODS カラム [337.1 g, MeOH-H₂O (90:10→95:5, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E3-1 (49.3 mg), Fr. E3-2 (3109.8 mg), Fr. E3-3 (4679.3 mg), Fr. E3-4 (1089.1 mg), Fr. E3-5 (1034.0 mg), Fr. E3-6 (280.8 mg) および Fr. E3-7 (85.6 mg) を得た.

Fr. E3-2 (532.8 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammea A/AB cyclo D (**33**, 59.7 mg, 0.0266%)を得た. Fr. E3-4 (497.9 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammea A/AB cyclo D (**33**, 27.8 mg, 0.0047%), mammea A/AC cyclo D (**34**, 46.0 mg, 0.0077%), mammea B/AB cyclo D (**35**, 9.8 mg, 0.0016%) および mammea B/AC cyclo D (**36**, 32.9 mg, 0.0055%) を得た.

Fr. E3-5 (502.8mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, surangin C (**19**, 8.2 mg, 0.0013%), surangin D (**20**, 24.9 mg, 0.0039%) および β -amyrin (**48**, 46.0 mg, 0.0073%) を得た.

Fr. E4 (1.62 g) を逆相 ODS カラム [136.8 g, MeOH-H₂O (80:20→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E4-1 (34.9 mg), Fr. E4-2 (22.8 mg), Fr. E4-3 (61.3 mg), Fr. E4-4 (1916.0 mg), Fr. E4-5 (1397.0 mg), Fr. E4-6 (166.5 mg), Fr. E4-7 (80.7 mg), Fr. E4-8 (212.6 mg), Fr. E4-9 (68.7 mg) および Fr. E4-10 (100.6 mg) を得た.

Fr. E5 (4.15 g) を逆相 ODS カラム [120 g, MeOH-H₂O (80:20→85:15, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E5-1 (115.7 mg), Fr. E5-2 (2789.8 mg), Fr. E5-3 (515.4 mg), Fr. E5-4 (430.0 mg), Fr. E5-5 (119.2 g) および Fr. E5-6 (1110.0 mg) を得た.

Fr. E5-1 (115.7 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製した.

Fr. E5-2 (517.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, mammeasin M (**9**, 5.0 mg, 0.0021%), mammeasin O (**11**, 3.7 mg, 0.0015%), mammea A/AA (**28**, 101.2 mg, 0.0418%), mammea A/AC (**30**, 112.9 mg, 0.0466%), mammea A/AA cyclo D (**32**, 3.7 mg, 0.0015%), mammea B/AC cyclo F (**37**, 1.2 mg, 0.0005%), mammea E/BC cyclo D (**41**, 14.0 mg, 0.0058%), mammea E/BD cyclo D (**42**, 1.8 mg, 0.0007%) および mammea A/AC cyclo F (**44**, 4.6 mg, 0.0019%)を得た.

Fr. E5-3 (515.4 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1%

aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, mammea A/AC (**30**, 45.6 mg, 0.0035%), mammea A/AA cyclo D (**32**, 14.9 mg, 0.0011%), mammea A/AB cyclo D (**33**, 46.4 mg, 0.0035%), mammea A/AC cyclo D (**34**, 30.1 mg, 0.0023%) および mammea A/AA cyclo F (**43**, 13.2 mg, 0.0010%)を得た.

Fr. E5-4 (430.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammea A/AA cyclo D (**32**, 17.4 mg, 0.0013%), mammea A/AB cyclo D (**33**, 19.1 mg, 0.0015%), mammea A/AC cyclo D (**34**, 11.5 mg, 0.0009%) および mammea B/AC cyclo D (**36**, 9.5 mg, 0.0007%) を得た.

Fr. E6 (6.29 g) を逆相 ODS カラム [201.4 g, MeOH-H₂O (80:20→90:10→95:5, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E6-1 (44.7 mg), Fr. E6-2 (157.2 mg), Fr. E6-3 (928.8 mg), Fr. E6-4 (3117.0 mg), Fr. E6-5 (128.8 mg), Fr. E6-6 (487.1 mg), Fr. E6-7 (230.8 mg), Fr. E6-8 (280.5 mg), Fr. E6-9 (102.9 mg) および Fr. E6-10 (96.5 mg) を得た.

Fr. E6-2 (157.2 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, surangin D (**20**, 10.9 mg, 0.0008%) を得た.

Fr. E6-3 (413.4 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製し, mammeasin N (**10**, 5.1 mg, 0.0007%), mammea A/AD (**31**, 8.0 mg, 0.0014%) および mammea E/BB (**39**, 57.1 mg, 0.0098%) を得た.

Fr. E6-3 (514.6 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製し, mammea A/AD (**31**, 15.8 mg, 0.0022%), mammea A/AC (**30**, 35.6 mg, 0.0049%), mammea E/BA (**38**, 32.7 mg, 0.0045%), mammea E/BB (**39**, 140.1 mg, 0.0190%)

Fr. E6-4 (497.4 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammeasin A (**14**, 53.1 mg, 0.0250%), mammeasin B (**15**, 13.6 mg, 0.0065%), mammeasin E (**1**, 8.0 mg, 0.0038%), kayeassamin I (**25**, 14.2 mg, 0.0068%), mammea A/AA (**28**, 23.6 mg, 0.0110%), mammea A/AB (**29**, 11.3 mg, 0.0054%), mammea A/AC (**30**, 95.6 mg, 0.0458%), surangin B (**18**, 55.1 mg, 0.0260%) および mammea A/AC cyclo F (**44**, 21.8 mg, 0.010%) を得た.

Fr. E6-5 (128.8 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammeasin B (**15**, 24.1 mg, 0.0018%) および surangin B (**18**, 15.1 mg, 0.0012%) を得た.

Fr. E6-6 (487.1 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, mammeasin C (**16**, 10.4 mg, 0.0008%), mammeasin

D (**17**, 60.9 mg, 0.0047%), 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(2-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-*de*]chromen-2-one (**26**, 19.8 mg, 0.0015%), 8-hydroxy-5-methyl-7-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-9-(3-methyl-1-oxobutyl)-4,5-dihydropyrano[4,3,2-*de*]chromen-2-one (**27**, 16.3 mg, 0.0012%) および *mammea* A/AC (**30**, 35.6 mg, 0.0047%) を得た。

Fr.E7 (2.21 g) を逆相 ODS カラム [47.0 g, MeOH-H₂O (60:40→80:20→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E7-1 (187.3 mg), Fr. E7-2 (912.0 mg), Fr. E7-3 (275.2 mg), Fr. E7-4 (185.6 mg), Fr. E7-5 (30.0) および Fr. E7-6 (44.0 mg) を得た。

Fr. E7-1 (187.3 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] で分離精製した。

Fr. E7-2 (912.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, *mammea* E/BC (**40**, 99.0 mg, 0.013%) を得た。

Fr. E7-3 (275.2 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, *kayeassamin* I (**25**, 52.1 mg, 0.0039%), *mammeasin* E (**1**, 34.1 mg, 0.0026%) および *mammeasin* F (**2**, 19.5 mg, 0.0015%) を得た。

Fr. E8 (2.94 g) を逆相 ODS カラム [47.0 g, MeOH-H₂O (80:20→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E8-1 (11.4 mg), Fr. E8-2 (31.8 mg), Fr. E8-3 (23.2mg), Fr. E8-4 (111.3 mg), Fr. E8-5 (1127.5 mg), Fr. E8-6 (107.5 mg), および Fr. E8-7 (117.6 mg) を得た。

Fr. E8-5 (648.8 mg) 逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (80:20, v/v)] で分離精製し, *deacetylmammea* E/AA cyclo D (**45**, 10.1 mg, 0.0025%) を得た。

Fr. E9 (10.23 g) を逆相 ODS カラム [300.0 g, MeOH-H₂O (80:20→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E9-1 (2809.0 mg), Fr. E9-2 (5678.0 mg), Fr. E9-3 (385.9 mg), Fr. E9-4 (422.0 mg) および Fr. E9-5 (51.9 g) を得た。

Fr. E9-1 (1008.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, *kayeassamin* E (**22**, 58.6 mg, 0.0125 %), *kayeassamin* F (**23**, 203.9 mg, 0.0435%), *kayeassamin* G (**24**, 92.1 mg, 0.0196%), *deacetylmammea* E/BB cyclo D (**46**, 12.0 mg, 0.0056%), *deacetylmammea* E/BC cyclo D (**47**, 36.8 mg, 0.0078%) および *benzoic acid* (**49**, 16.9 mg, 0.0036%) を得た。

Fr. E9-2 (526.2 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1%

aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, surangin C (**19**, 63.6 mg, 0.0525%), surangin D (**20**, 66.7 mg, 0.0550%) および kayeassamin A (**21**, 68.1 mg, 0.0562%) を得た.

Fr. E9-3 (385.9 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (254 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (90:10, v/v)] で分離精製し, surangin C (**19**, 43.1 mg, 0.0033%), surangin D (**20**, 54.3 mg, 0.0042%) および kayeassamin A (**21**, 20.5 mg, 0.0016%) を得た.

既知化合物 (**14**–**49**) は, $[\alpha]_D$, MS, RI, UV, IR, ¹H- および ¹³C-NMR データを文献値あるいは標品と比較し同定した.

第二節の実験

kayeassamin I (**25**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25}$ -50.4 ($c=0.63$, CHCl_3)

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{O}_6$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 439.2115

Found : 439.2116

UV [MeOH , nm, ($\log \epsilon$): 220 (4.10), 272 (4.33), 306 (4.26)

IR (film, cm^{-1}): 3464, 1740, 1605, 1408, 1126

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) δ : Table 1 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : Table 1 に記載

mammeasin E (**1**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25}$ -58.9 ($c=0.12$, CHCl_3)

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_6$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 453.2272

Found : 453.2272

UV [MeOH , nm, ($\log \epsilon$): 223 (4.01), 273 (4.12), 302 (4.12)

IR (film, cm^{-1}): 1740, 1713, 1613, 1454, 1408, 1284, 1126, 1049

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) δ : Table 2 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : Table 2 に記載

mammeasin F (**2**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25}$ -42.1 ($c=0.45$, CHCl_3)

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{O}_6$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 453.2272

Found : 453.2287

UV [MeOH , nm, ($\log \epsilon$): 224.0 (3.89), 297.5 (3.82)

IR (film, cm^{-1}): 1732, 1713, 1605, 1454, 1381, 1261, 1126, 1049

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) δ : Table 3 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : Table 3 に記載

mammeasin G (**3**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25} 0$ ($c = 0.75$, CHCl_3)

High resolution EI-MS

Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{O}_5$ $[\text{M}]^+$: 424.2250

Found : 424.2254

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 272 (4.25), 302 (4.17)

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 1747, 1614, 1584, 1465, 1385, 1284, 1165, 1120, 1075

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

mammeasin H (**4**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25} 0$ ($c = 0.66$, CHCl_3)

High resolution EI-MS

Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{O}_5$ $[\text{M}]^+$: 438.2406

Found : 438.2400

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 273 (3.90), 307 (3.81)

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 1743, 1614, 1584, 1454, 1385, 1284, 1165, 1120, 1075

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

mammeasin I (**5**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{25} 0$ ($c = 0.35$, CHCl_3)

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{O}_5\text{Na}$ $[\text{M} + \text{Na}]^+$: 445.1985

Found : 445.1975

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 274 (3.95), 317 (3.71)

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 1747, 1616, 1584, 1456, 1385, 286, 1183, 1119, 1100, 1076

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : Table 4 に記載

mammeasin J (6) : Pale yellow oil

High resolution ESI-MS

Calcd for $C_{27}H_{34}O_5Na$ $[M + Na]^+$: 461.2298

Found : 461.2288

$[\alpha]_D^{25}$ 0 ($c=0.43$, $CHCl_3$)

UV [MeOH, λ_{max} nm, (log ϵ): 229 (4.28), 288 (4.23)

IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 1743, 1614, 1582, 1462, 1379, 1264, 1186, 1111, 1084

1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 5 に記載

^{13}C -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 5 に記載

mammeasin K (7): Pale yellow amorphous solid

High resolution ESI-MS

Calcd for $C_{21}H_{24}O_5Na$ $[M + Na]^+$: 379.1516

Found : 379.1512

Calcd for $C_{21}H_{23}O_5$ $[M - H]^-$: 355.1540

Found : 355.1552

UV [MeOH, λ_{max} nm, (log ϵ): 219 (4.14), 270 (4.46), 305 (4.39)

IR (film, cm^{-1}): 1748, 1734, 1653, 1609, 1558, 1506, 1456, 1387, 1194, 1150, 1125

1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 6 に記載

^{13}C -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 6 に記載

mammeasin L (8) : Pale yellow amorphous solid

High resolution ESI-MS

Calcd for $C_{24}H_{22}O_5Na$ $[M + Na]^+$: 413.1359

Found : 413.1353

Calcd for $C_{24}H_{21}O_5Na$ $[M - H]^-$: 389.1384

Found : 389.1384

UV [MeOH, λ_{max} nm, (log ϵ): 263 (4.41), 309 (4.35)

IR (film, cm^{-1}): 1748, 1734, 1683, 1653, 1610, 1558, 1506, 1456, 1387, 1190, 1153, 1138

1H -NMR (800 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 7 に記載

^{13}C -NMR (200 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 7 に記載

mammeasin M (**9**) : Pale yellow oil

$[\alpha]_D^{23}$ 0 ($c=0.15$, CHCl_3)

High resolution EI-MS

Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_7$ $[\text{M}]^+$: 438.1679

Found : 438.1676

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 281 (4.35)

IR (film, cm^{-1}): 3450, 1748, 1717, 1615, 1558, 1456, 1381, 1235, 1190, 1154

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : Table 8 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : Table 8 に記載

mammeasin N (**10**) : Pale yellow oil

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{O}_5$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 387.1227

Found : 387.1238

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 287 (4.25)

IR (film, cm^{-1}): 1748, 1609, 1559, 1458, 1373, 1230, 1150, 1126

$^1\text{H-NMR}$ (800 MHz, CDCl_3) δ : Table 9 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3) δ : Table 9 に記載

mammeasin O (**11**) : Pale yellow oil

High resolution ESI-MS

Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{O}_5$ $[\text{M} - \text{H}]^-$: 401.1394

Found : 401.1393

UV [MeOH , λ_{max} nm, ($\log \epsilon$): 287 (4.26)

IR (film, cm^{-1}): 1748, 1614, 1460, 1392, 1262, 1217, 1156, 1127

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : Table 9 に記載

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ : Table 9 に記載

mammeasin P (**12**) : Pale yellow oil

High resolution EI-MS

Calcd for $C_{22}H_{26}O_6$ $[M]^+$: 386.1729

Found : 386.1724

UV [MeOH, λ_{\max} nm, (log ϵ): 247 (4.23), 267 (4.03), 354 (3.29)

IR (film, cm^{-1}): 1743, 1622, 1456, 1167, 1120

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 10 に記載

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 10 に記載

mammeasin Q (**13**) : Pale yellow oil

$[\alpha]^{22}_D 0$ ($c = 0.34$, $CHCl_3$)

High resolution EI-MS

Calcd for $C_{23}H_{28}O_6$ $[M]^+$: 400.1886

Found : 400.1880

UV [MeOH, λ_{\max} nm, (log ϵ): 247 (4.23), 268 (4.04), 352 (3.36)

IR (film, cm^{-1}): 1743, 1622, 1456, 1169, 1123

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 10 に記載

^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ : Table 10 に記載

Surangin C (**19**), surangin D (**20**) および kayeassamin A (**21**) の酸化

Kayeassamin A (**21**, 9.0 mg) の dry-toluene (2.0 mL) 溶液に, DDQ (10.0 mg) を加え, 室温で 4 時間攪拌した. 反応液を aq. sat. NaHCO₃ で希釈し, EtOAc で抽出した. EtOAc 層を aq. sat. NaCl で洗浄後, 無水 MgSO₄ で乾燥した. 乾燥剤を濾過後, 溶媒を減圧下留去し得られた粗生成物を HPLC [Cosmosil 5C18-MS-II, MeOH-1% aqueous AcOH (85:15, v/v)] で分離精製し, kayeassamin I (**25**, 3.8 mg, 46%) を得た.

同様に, surangin D (**20**, 9.6 mg) および surangin C (**19**, 12.7 mg) についても酸化し, mammeasin E (**1**, 3.3 mg, 38%) および mammeasin F (**2**, 2.0 mg, 17%) を得た.

第三節の実験

アロマトラーゼ阻害活性⁹³⁾

96 穴ハーフエリア黒色マイクロプレート (greiner bio-one) を用いて酵素阻害実験を行った。基質および酵素は、pH 7.4 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ buffer (富士フイルム和光純薬) に溶解し、被験物質は buffer と DMSO を用いて希釈した。

遮光条件下で、1.6 μM dibenzylfluorescein (DBF : BD Biosciences Discovery Labware) を用いて、酵素である 8 nM アロマトラーゼ (Human CYP19 + P450 Reductase SUPERSOMES™: BD Biosciences Discovery Labware) との混合溶液を各ウェルに 20 μL ずつ添加し、被験物質を 20 μL ずつ添加した後、37°C で 10 分間加温した (アロマトラーゼはバイオマッシャーII 電動攪拌機によりホモジナイズした)。各ウェルに補酵素として 500 μM NADPH (富士フイルム和光純薬) 40 μL ずつ添加した後、37°C で 30 分間加温して反応させた (DMSO 終濃度 : 0.5%, DBF : 0.4 μM , アロマトラーゼ : 2 nM, NADPH : 250 μM)。反応後、各ウェルに 2 mM NaOH を 30 μL ずつ添加した。37°C で 2 時間加温した後、蛍光強度をマイクロプレートリーダーで測定し (ex: 485 nm, em: 535 nm), 阻害率 (%) と 50% 阻害濃度を算出した。

第四節の実験

アロマターゼ阻害様式

第三節の実験と同様に 96 穴ハーフエリア黒色マイクロプレート (greiner bio-one) を用いてアロマターゼ酵素反応を行なった。第三節の実験で使用された DBF のかわりに、異なる濃度のテストステロン (final concentration: 0.4, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μM) を基質として使用し、37°C で 15 分酵素反応が終わった後、プレートを沸騰水浴で 2 分間加熱し、酵素を失活させた。エストラジオール EIA kit (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA) を用いてエストラジオール検量線を作成し、酵素反応で生成したエストラジオールを定量した。定量後、Lineweaver-Burk 二重逆数プロットを作成し、阻害様式を判断し、阻害定数 (K_i) を算出した。

第五節および第六節の実験

ヒト乳腺癌由来細胞株 MCF7 細胞の培養

理化学研究所より購入したヒト乳腺癌由来細胞株 MCF7 (RCB1904) 細胞を培養して実験に供した。培地は minimum essential medium eagle (MEM, Sigma-Aldrich) に 10% (v/v) FBS (Fetal bovine serum, Gibco by Life Technologies), 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 0.1 mM 非必須アミノ酸 (Gibco by Life Technologies) および 1 mM ピルビン酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬) を添加して使用した。細胞の培養は, 75 cm² 培養フラスコ中, 5% CO₂ 下 37°Cにて行った。継代操作は, 培養した細胞を PBS (-) (Phosphate buffered saline, 日水製薬) で洗浄した後, 0.02% (w/v) trypsin および 0.05% (w/v) EDTA · 2Na (同仁化学) を含む PBS (-) により剥離して, 定法に従って行った。

MCF7 細胞に対するエストロゲン様作用⁹⁴⁾

培地は phenol red-free Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco by Life Technologies) に 5% (v/v) charcoal stripped FBS (Sigma-Aldrich), 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin を添加して使用した。

MCF7 細胞を 5×10³ cells/well (100 μ L/well) の細胞密度で 96 ウェルプレート (住友ベークライト) に播種して実験を行った。培養 1 日後 (5% CO₂, 37°C), 培地を抜き取り, 新しい培地 (90 μ L/well) を添加し, さらに被験物質 (1% DMSO) を含む培地 (10 μ L/well) を添加して 4 日間培養した。培養後 MTT assay を行った。

被験物質は DMSO に溶解し, DMSO 終濃度 (v/v) が 0.1% になるように添加した。Proliferation (% of control) は下記の式より求めた:

$$\text{Cell proliferation (\% of control)} = (A-B) / A \times 100$$

A:O.D. (control)

B:O.D. (sample)

MCF7 細胞増殖抑制活性⁹⁵⁾

96 ウェルプレート (住友ベークライト) に MCF7 細胞を 7.5×10^3 cells/well (100 μ L/well) の細胞密度で播種し, 37°C, 5% CO₂ 環境下で 24 時間培養した. その後, 被験物質を含有する培地を各 well に 100 μ L ずつ添加して, さらに 48 時間培養した. 培養後に, MTT assay により評価した. 陽性対象として, doxorubicin および camptothecin を使用した.

被験物質は DMSO に溶解し, DMSO 終濃度 (v/v) が 0.5% になるように添加した. Cell viability (%) は下記の式より求めた:

$$\text{Cell viability (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A:O.D. (control)

B:O.D. (sample)

MTT assay

5 mg/mL に調製した 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, PBS (-) 溶液) 溶液を 10 μ L/well 添加し, 37 °Cにて 4 時間インキュベートした. インキュベート後, 培地を除去し, 0.04 N HCl 含有 2-propanol (IPA) を 80 μ L/well 添加し, 産生した formazan 色素を溶解させた後, マイクロプレートリーダーにて O.D. 値を測定した (測定波長 560 nm, 参照波長 670 nm).

第七節の実験

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、ポンプは Shimadzu LC-20AD を、フォトダイオードアレイ検出器は Shimadzu SPD-M20A を用いた。また、カラムは、COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-MS-II(ナカライテスク, 2.0×150 mm, i.d.) を用いた。

5 α -reductase 阻害活性⁹⁶⁻⁹⁸⁾

48 穴マイクロプレートを使用し、緩衝液には 40 mM KH₂PO₄-K₂HPO₄ buffer pH 6.5 (富士フィルム和光純薬) を用いて実験を行った。

0.35 nmol testosterone (東京化成) と 10 nmol NADPH (富士フィルム和光純薬) の混合溶液を各ウェルに 490 μ L ずつ添加し、被験物質 (DMSO で希釈) を 5 μ L ずつ添加した。室温で 20 分間インキュベートした後、10 倍希釈した S9 Rat Liver Fractions (オリエンタル酵母) を 10 μ L ずつ添加し、37°C で 30 分間加温して反応させた。反応後、プレートを沸騰水浴で 2 分間加熱し、酵素を失活させた。酵素失活後の溶液 500 μ L/well を抜き取り、酢酸エチル 500 μ L と混ぜ、遠心分離 (10000 rpm, 5min) した。上層の酢酸エチル層 300 μ L を取りだしマイクロチューブに入れ、一晩放置し、酢酸エチルを除去し、テストステロンを得た。得られたテストステロンを内部標準物質 (fludrocortisone acetate 20 μ g/mL, Sigma-Aldrich) 含有のアセトニトリル 30 μ L で溶かし、HPLC にてテストステロン濃度を定量した。

Column : COSMOSIL Packed Column 5C₁₈-MS-II 2.0 I.D.×150 mm

Column temperature : 40°C

Mobile phase : MeOH : H₂O = 60 : 40

Flow rate : 0.2 mL/min

Detection : UV at 254 nm

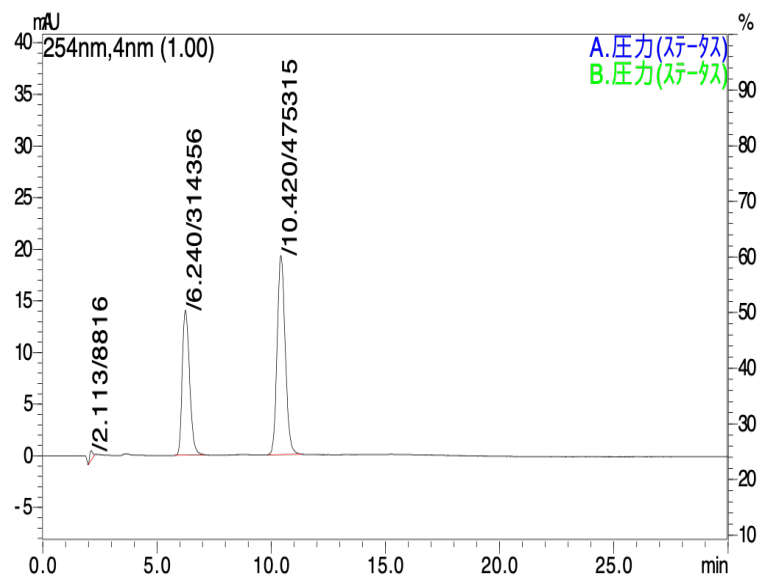


Figure 43. HPLC chromatogram of internal standard, substrate and reference compound

テストステロンのピーク面積と内部標準物質のピーク面積との比を縦軸に、テストステロンの濃度を横軸にして、検量線を作成した。検量線より求めたテストステロン定量値から、阻害率 (%) を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = (A - B) / (C - B) \times 100$$

A : 被験物質添加

B : 被験物質未添加 (コントロール)

C : 酵素未添加

第八節の実験

ヒト前立腺がん由来細胞株 LNCaP clone FGC 細胞の培養

KAC Co., Ltd.より購入したヒト前立腺がん由来細胞株 LNCaP clone FGC (89110211) 細胞を培養して実験に供した。培地は RPMI 1640 medium (FUJIFILM Wako) に 10% (v/v) FBS (Fetal bovine serum, Biosera), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin ,および 1 mM ビルビン酸ナトリウム (富士フイルム和光純薬) を添加して使用した。細胞の培養は, 75 cm² 培養フラスコ中, 5% CO₂ 下 37°C にて行った。継代操作は, 培養した細胞を PBS (-) (Phosphate buffered saline, 日水製薬) で洗浄した後, 0.02% (w/v) trypsin および 0.05% (w/v) EDTA・2Na (同仁化学) を含む PBS (-) により剥離して, 定法に従って行った。

LNCaP 細胞増殖抑制活性^{72,73)}

LNCaP 細胞を 96 ウェルプレート (住友ベークライト) に 5×10^3 cells/well (100 µL/well) の密度で播種し, 37°C, 5% CO₂ 環境下で 24 時間培養後, 試験サンプルを含む 100 µL/well 培地を加えた。さらに 96 時間培養した後, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) により細胞増殖アッセイを行った。陽性対象として, paclitaxel を使用した。

被験物質は DMSO に溶解し, DMSO 終濃度が (v/v) が 0.1% になるように添加した。

CCK-8 assay

Dojindo Molecular Technologies, Inc. (Kumamoto, Japan)より購入した CCK-8 溶液を 20 µL/well 添加し, 37 °C にて 2 時間インキュベートした。インキュベート後, マイクロプレートリーダーにて O.D. 値を測定した (測定波長 450 nm, 参照波長 650 nm)。Cell viability (%) は下記の式より求めた:

$$\text{Cell viability (\%)} = (A-B) / A \times 100$$

A:O.D. (control)

B:O.D. (sample)

第二章の実験

第一節の実験

中国新疆省産 *C. tinctoria* の乾燥花部 (2.0 kg) を粉碎し, MeOH にて加熱還流下, 3 時間抽出し, 抽出液を濾取した. 残渣に MeOH を加え, 同様の操作を計 4 回行った. 得られた MeOH 抽出エキスを減圧下溶媒留去し, MeOH 抽出エキス (969.74 g, 生薬からの収率 48.49%) を得た. この MeOH 抽出エキス (895.86 g) を EtOAc と H₂O (1:1, v/v) にて分配抽出し, EtOAc 移行部 (144.07 g, 7.80%) および H₂O 移行部を得た. さらに H₂O 移行部を Diaion HP-20 column (3.0 kg, H₂O→MeOH→acetone) に付し, H₂O 溶出部 (391.74 g, 21.20%), MeOH 溶出部 (264.14 g, 14.30%) および acetone 溶出部 (14.47 g, 0.78%) を得た.

EtOAc 移行部 (144.07 g のうち 120.02 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [3.0 kg, hexane→hexane-EtOAc (100:1→50:1→10:1→5:1→3:1→1:1, v/v)→EtOAc→MeOH] で分画し, Fr. E1 (2.0563 g), Fr. E2 (0.2522 g), Fr. E3 (0.1464 g), Fr. E4 (7.8701 g), Fr. E5 (1.9407 g), Fr. E6 (12.8325 g), Fr. E7 (19.8945 g), Fr. E8 (7.3712 g), Fr. E9 (4.1026 g) および Fr. E10 (56.2400 g) を得た.

Fr. E6 (12.83 g) を逆相 ODS カラム [408 g, MeOH-H₂O (70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH→acetone] で分画し, Fr. E6-1 (35.7 mg), Fr. E6-2 (32.8 mg), Fr. E6-3 (13.5 mg), Fr. E6-4 (90.6 mg), Fr. E6-5 (85.0 mg), Fr. E6-6 (69.4 mg), Fr. E6-7 (1014.4 mg), Fr. E6-8 (115.5 mg), Fr. E6-9 (213.7 mg), Fr. E6-10 (520.2 mg), Fr. E6-11 (722.4 mg) および Fr. E6-12 (5776.4 mg) を得た. このうち, Fr. E6-4 を (2*E*)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyne-1-yl acetate (**71**, 90.6 mg, 0.0059%) と同定した.

Fr. E6-5 (85.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (75:25, v/v)] で分離精製した.

Fr. E6-7 (309.5 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (55:45, v/v) および CH₃CN-1% aqueous AcOH (70:30, v/v)] で分離精製した.

Fr. E7 (19.90 g) を逆相 ODS カラム [600 g, MeOH-H₂O (40:60→50:50→60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で分画し, Fr. E7-1 (141.4 mg), Fr. E7-2 (219.8 mg), Fr. E7-3 (465.7 mg), Fr. E7-4 (155.1 mg), Fr. E7-5 (504.9 mg), Fr. E7-6 (1059.1 mg), Fr. E7-7 (417.4

mg), Fr. E7-8 (4606.8 mg), Fr. E7-9 (4529.3 mg), Fr. E7-10 (1555.7 mg), Fr. E7-11 (4925.6 mg), Fr. E7-12 (133.6 mg) および Fr. E7-13 (349.6 mg) を得た.

Fr. E7-1 (141.7 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (10:90, v/v)] で分離精製し, *p*-hydroxybenzoic acid (**70**, 19.1mg, 0.0012%) を得た.

Fr. E7-3 (465.7 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (25:75, v/v)] で分離精製し, (*E*, *Z*)-*p*-coumaric acid methyl ester (**68**, **69**, 31.6 mg, 0.0021%) を得た.

Fr. E7-4 (155.1 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] で分離精製し, (*E*)-*p*-coumaric acid methyl ester (**68**, 7.3 mg, 0.0005%), (*E*)-*p*-coumaric acid methyl ester (**69**, 6.3 mg, 0.0004%) および (2*S*)-naringenin (**54**, 20.0 mg, 0.0015%) を得た.

Fr. E7-5 (504.9 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (45:55, v/v)] で分離精製した.

Fr. E8 (7.37 g) を逆相 ODS カラム [250 g, MeOH-H₂O (30:70→40:60→50:50→60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で分画し, Fr. E8-1 (243.7 mg), Fr. E8-2 (1343.0 mg), Fr. E8-3 (105.3 mg), Fr. E8-4 (437.4 mg), Fr. E8-5 (1207.0 mg), Fr. E8-6 (1218.9 mg), Fr. E8-7 (507.8 mg), Fr. E8-8 (523.6 mg), Fr. E8-9 (1033.9 mg) および Fr. E8-10 (395.4 mg) を得た.

Fr. E8-2 (1343.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (20:80, v/v)] で分離精製し, isookanin (**55**, 35.0 mg, 0.0152%) および taxifolin (**60**, 38.7 mg, 0.0169%) を得た.

Fr. E8-3 (105.3 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (20:80, v/v)] で分離精製し, (2*R*,3*R*)-3,5,7,3',5'-pentahydroxyflavanone (**61**, 22.7 mg, 0.0002%) を得た.

Fr. E8-4 (231.2 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (20:80, v/v)] で分離精製し, (2*S*)-7,3',5'-trihydroxyflavanone (**56**, 32.9 mg, 0.0040%) および aromadendrin (**59**, 84.4 mg, 0.0104%) を得た.

Fr. E8-5 (254.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] で分離精製し, isookanin (**55**, 8.0 mg, 0.0025%), okanin (**51**, 36.8 mg, 0.0114%) および (2*S*)-5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone (**57**, 31.4 mg, 0.0097%) を得

た.

Fr. E9 (4.10 g) を逆相 ODS カラム[140 g, MeOH-H₂O (30:70→40:60→50:50→60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH]で分画し, Fr. E9-1 (219.4 mg), Fr. E9-2 (69.1 mg), Fr. E9-3 (120.3 mg), Fr. E9-4 (91.9 mg), Fr. E9-5 (273.4 mg), Fr. E9-6 (254.0 mg), Fr. E9-7 (939.4 mg), Fr. E9-8 (376.8 mg), Fr. E9-9 (849.4 mg) および Fr. E9-10 (448.9 mg) を得た.

Fr. E9-3 (120.3 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (15:85, v/v)]で分離精製し, isookanin (**55**, 22.9 mg, 0.0002%) を得た.

Fr. E9-6 (254.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (20:80, v/v)]で分離精製し, isookanin (**55**, 4.1 mg, 0.00003%) および 6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone (**53**, 41.3 mg, 0.0003%) を得た.

MeOH 溶出部 (264.14 g のうち 150.05 g) を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー [4.95 kg, CHCl₃:MeOH:H₂O (10:3:0.3→7:3:0.4→6:4:1, v/v)→MeOH] で分画し, Fr. M1 (2.8891 g), Fr. M2 (1.2907 g), Fr. M3 (4.0455 g), Fr. M4 (2.1694 g), Fr. M5 (2.9740 g), Fr. M6 (12.5883 g), Fr. M7 (93.6732 g), Fr. M8 (3.6817 g), Fr. M9 (9.2266 g), Fr. M10 (11.7265 g) および Fr. M11 (4.0224 g) を得た.

Fr. M7 (35.1 g) を逆相 ODS カラム [1160 g, MeOH-H₂O (30:70→40:60→80:20, v/v)→MeOH] で分画し, Fr. M7-1 (830.7 mg), Fr. M7-2 (6705 mg), Fr. M7-3 (2388.6 mg), Fr. M7-4 (20343.5 mg), Fr. M7-5 (3247.7 mg), Fr. M7-6 (493.8 mg), Fr. M7-7 (484.0 mg) および Fr. M7-8 (446.5 mg) を得た. このうち, Fr. M7-4 を marein (**51**, 20343.5 mg, 5.1793%) と同定した.

Fr. M7-1 (291.7 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (15:85, v/v)] で分離精製し, taxifolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (**62**, 15.3 mg, 0.0111%) を得た.

Fr. M7-2 (289.2 mg) を逆相 HPLC [Wakopak Navi C30-5, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (25:75, v/v)] で分離精製し, taxifolin-7-*O*-β-D-glucopyranoside (**62**, 54.7 mg, 0.3229%) および flavanomarein (**58**, 44.0 mg, 0.2597%) を得た.

Fr. M7-5 (304.2 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (40:60, v/v)] で分離精製し, marein (**51**, 177.1 mg, 0.4813%) を得た.

Fr. M7-5-3 (48.4 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (40:60, v/v)] で分離精製し, coreopsin (**52**, 15.4 mg, 0.0418%), coreoside

B (**72**, 11.9 mg, 0.0323%) および coreoside D (**73**, 2.1mg, 0.0057%) を得た.

Fr. M10 (11.4242 g) を逆相 ODS カラム [330.0 g, MeOH-H₂O(30:70→40:60→45:55→50:50→60:40→70:30→80:20→90:10, v/v)→MeOH] で分画し, Fr. M10-1 (111.8 mg), Fr. M10-2 (2585.6 mg), Fr. M10-3 (2502.1 mg), Fr. M10-4 (1723.6 mg), Fr. M10-5 (981.9mg), Fr. M10-6 (491.2 mg), Fr. M10-7 (420.8 mg), Fr. M10-8 (268.4mg), Fr. M10-9 (402.8 mg), Fr. M10-10 (548.0 mg), Fr. M10-11 (410.0 mg), Fr. M10-12 (309.0 mg), Fr. M10-13 (280.0 mg), Fr. M10-14 (21.0 mg) および Fr. M10-15 (2020.0 mg) を得た. このうち, Fr. M10-6 を marein (**51**, 491.2 mg, 0.0481%) と同定した.

Fr. M10-1 (98.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (7:93, v/v)] で分離精製した.

Fr. M10-2 (376.3 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (15:85, v/v)] で分離精製し, chlorogenic acid (**66**, 142.3 mg, 0.0956%) を得た.

Fr. M10-3 (335.1 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (25:75, v/v)] で分離精製し, sikokianin D (**64**, 12.2 mg, 0.0089%) および sikokianin E (**65**, 19.6 mg, 0.0143%) を得た.

Fr. M10-4 (338.5 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), MeOH-1% aqueous AcOH (30:70, v/v)] で分離精製した.

Fr. M10-5 (315.0 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (20:80, v/v) および CH₃CN-1% aqueous AcOH (15:85, v/v)] で分離精製し, marein (**51**, 15.7 mg, 0.0048%), quercetagenin 7-*O*-β-D-glucopyranoside (**63**, 36.7 mg, 0.0112%) および caffeic acid methyl ester (**67**, 2.6 mg, 0.0008%) を得た.

Fr. M10-15 (125.1 mg) を逆相 HPLC [Cosmosil 5C₁₈-MS-II, detection: UV (230 nm), CH₃CN-1% aqueous AcOH (15:85, v/v)] で分離精製した.

既知化合物 (**50**–**70**, **72**, **73**) は, MS, UV, ¹H- および ¹³C-NMR データを文献値あるいは標品と比較し同定した.

既知化合物 (2*E*)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (**71**) の ¹H- および ¹³C-NMR データは報告されていないため, 以下に記載する.

(*E*)-7-phenyl-2-heptene-4,6-diyn-1-yl acetate (**71**)

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 2.07 (3H, s, -OAc), 4.65 (2H, dd, $J = 1.6, 6.9$ Hz, H₂₋₇), 5.92 (1H, dt, $J = 16.0, 1.6$ Hz, H-5), 6.36 (1H, dt, $J = 16.0, 6.9$ Hz, H-6), 7.36 (3H, m, H-3'-5'), 7.47 (2H, dd, $J = 2.2, 8.2$ Hz, H-2',6'); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.6 (q, -OCOCH₃), 64.7 (t, C-7), 74.3 (s, C-2), 75.4 (s, C-3), 80.1 (s, C-1), 82.2 (s, C-4), 112.2 (d, C-5), 122.8 (s, C-1'), 129.7 (d, C-3',5'), 130.6 (d, C-4'), 133.4 (d, C-2',6'), 141.9 (d, C-6), 172.1 (s, -OCOCH₃); positive-ion ESIMS m/z : 247 [M + Na]⁺; HRESIMS m/z : 247.0724 [M + Na]⁺ (calcd for C₁₅H₁₂O₂Na, 247.0730).

第二節の実験

第一章第三節の実験と同様に行なった。

第三節の実験

第一章第四節の実験と同様に行なった。

第四節の実験

第一章第五節の実験と同様に行なった

第五節の実験

第一章第六節の実験と同様に行なった

第六節の実験

第一章第七節の実験と同様に行なった

第七節の実験

第一章第八節の実験と同様に行なった

引用文献

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer J. Clin.*, **71** (3), 209–249 (2021).
2. Sikora, M. J.; Cordero, K. E.; Larios, J. M.; Johnson, M. D.; Lippman, M. E.; Rae, J. M. The Androgen Metabolite 5 α -Androstane-3 β ,17 β -Diol (3 β Adiol) Induces Breast Cancer Growth via Estrogen Receptor: Implications for Aromatase Inhibitor Resistance. *Breast Cancer Res. Treat.*, **115** (2), 289–296 (2009).
3. Lumachi, F.; Brunello, A.; Maruzzo, M.; Basso, U.; Basso, S. Treatment of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *CMC*, **20** (5), 596–604 (2013).
4. Smith, I. E.; Dowsett, M. Aromatase Inhibitors in Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **348** (24), 2431–2442 (2003).
5. Wada T. Academic Detailing from the Viewpoint of Chemical Structural Formulas. *YAKUGAKU ZASSHI*, **139** (8), 1101–1105 (2019).
6. Buzdar, A. U.; Robertson, J. F. R.; Eiermann, W.; Nabholz, J.-M. An Overview of the Pharmacology and Pharmacokinetics of the Newer Generation Aromatase Inhibitors Anastrozole, Letrozole, and Exemestane. *Cancer*, **95** (9), 2006–2016 (2002).
7. Ahmad, I.; Shagufta. Recent Developments in Steroidal and Nonsteroidal Aromatase Inhibitors for the Chemoprevention of Estrogen-Dependent Breast Cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **102**, 375–386 (2015).
8. Tahara, M., Nomura, S., Hashimoto, M., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **122**, 345–354 (2003).
9. Feldman, B. J.; Feldman, D. The Development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **1** (1), 34–45 (2001).
10. Heinlein, C. A.; Chang, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, **25** (2), 276–308 (2004).
11. Rebbeck, T. R.; Devesa, S. S.; Chang, B.-L.; Bunker, C. H.; Cheng, I.; Cooney, K.; Eeles, R.; Fernandez, P.; Giri, V. N.; Gueye, S. M.; Haiman, C. A.; Henderson, B. E.; Heyns, C. F.; Hu, J. J.; Ingles, S. A.; Isaacs, W.; Jalloh, M.; John, E. M.; Kibel, A. S.; Kidd, L. R.; Layne, P.; Leach, R. J.; Neslund-Dudas, C.; Okobia, M. N.; Ostrander, E. A.; Park, J. Y.; Patrick, A. L.; Phelan, C. M.; Ragin, C.; Roberts, R. A.; Rybicki, B. A.; Stanford, J. L.; Strom, S.; Thompson, I. M.; Witte, J.; Xu, J.; Yeboah, E.; Hsing, A. W.; Zeigler-Johnson, C. M. Global Patterns of Prostate Cancer Incidence, Aggressiveness, and Mortality in

- Men of African Descent. *Prostate Cancer*, **2013**, 1–12 (2013).
12. Ross, R. K.; Bernstein, L.; Pike, M. C.; Henderson, B. E.; Lobo, R. A.; Stanczyk, F. Z.; Shimizu, H. 5-Alpha-Reductase Activity and Risk of Prostate Cancer among Japanese and US White and Black Males. *The Lancet*, **339** (8798), 887–889 (1992).
 13. Kallifatidis, G.; Hoy, J. J.; Lokeshwar, B. L. Bioactive Natural Products for Chemoprevention and Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Seminars in Cancer Biology*, **40–41**, 160–169 (2016).
 14. 松井 久典, ホルモンを基盤とした前立腺がん治療薬研究開発. *Folia Pharmacol. Jpn.*, **142**, 150-155 (2013).
 15. Thompson, I. M.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Parnes, H. L.; Minasian, L. M.; Godley, P. A.; Lucia, M. S.; Ford, L. G. Long-Term Survival of Participants in the Prostate Cancer Prevention Trial. *N. Engl. J. Med.*, **369** (7), 603–610 (2013).
 16. Thompson, I. M.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Lucia, M. S.; Miller, G. J.; Ford, L. G.; Lieber, M. M.; Cespedes, R. D.; Atkins, J. N.; Lippman, S. M.; Carlin, S. M.; Ryan, A.; Szczepanek, C. M.; Crowley, J. J.; Coltman, C. A. The Influence of Finasteride on the Development of Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.*, **349** (3), 215–224 (2003).
 17. Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Darke, A. K.; Lucia, M. S.; Ford, L. G.; Minasian, L. M.; Parnes, H. L.; LeBlanc, M. L.; Thompson, I. M. Long-Term Effects of Finasteride on Prostate Cancer Mortality. *N. Engl. J. Med.*, **380** (4), 393–394 (2019).
 18. Chaniad, P.; Chukaew, A.; Payaka, A.; Phuwajaroanpong, A.; Techarang, T.; Plirat, W.; Punsawad, C. Antimalarial Potential of Compounds Isolated from *Mammea Siamensis* T. Anders. Flowers: In Vitro and Molecular Docking Studies. *BMC Complement Med. Ther.*, **22** (1), 266 (2022).
 19. Tung, N. H.; Uto, T.; Sakamoto, A.; Hayashida, Y.; Hidaka, Y.; Morinaga, O.; Lhieochaiphant, S.; Shoyama, Y. Antiproliferative and Apoptotic Effects of Compounds from the Flower of *Mammea Siamensis* (Miq.) T. Anders. on Human Cancer Cell Lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **23** (1), 158–162 (2013).
 20. Prachyawarakorn, V.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S. Pyranocoumarins from the Twigs of *Mammea Siamensis*. *Phytochemistry*, **67** (9), 924–928 (2006).
 21. Makchuchit, S.; Itharat, A.; Tewtrakul, S. Anti-Allergic Activity of Thai Medicinal Plants. *Planta Med*, **75** (09), s-0029-1234527 (2009).
 22. Poobrasert, O.; Constant, H. L.; Beecher, C. W. W.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D.; Pezzuto, J. M.; Cordell, G. A.; Santisuk, T.; Reutrakul, V. Xanthenes from the Twigs of

- Mammea Siamensis. *Phytochemistry*, **47** (8), 1661–1663 (1998).
23. Mahidol, C.; Kaweetripob, W.; Prawat, H.; Ruchirawat, S. Mammea Coumarins from the Flowers of *Mammea siamensis*. *J. Nat. Prod.*, **65** (5), 757–760 (2002).
 24. Subhadhirasakul, S.; Pechpongs, P. A Terpenoid and Two Steroids from the Flowers Of *Mammea siamensis*. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, **27** (2), 555–561(2005).
 25. Ngo, N. T. N.; Nguyen, V. T.; Vo, H. V.; Vang, O.; Duus, F.; Ho, T.-D. H.; Pham, H. D.; Nguyen, L.-H. D. Cytotoxic Coumarins from the Bark of *Mammea Siamensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **58** (11), 1487–1491 (2010).
 26. Laphookhieo, S.; Promnart, P.; Syers, J. K.; Kanjana-Opas, A.; Ponglimanont, C.; Karalai, C. Coumarins and Xanthones from the Seeds of *Mammea Siamensis*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **18** (5), 1077–1080 (2007).
 27. Morikawa, T.; Sueyoshi, M.; Chaipech, S.; Matsuda, H.; Nomura, Y.; Yabe, M.; Matsumoto, T.; Ninomiya, K.; Yoshikawa, M.; Pongpiriyadacha, Y.; Hayakawa, T.; Muraoka, O. Suppressive Effects of Coumarins from *Mammea Siamensis* on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression in RAW264.7 Cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **20** (16), 4968–4977 (2012).
 28. Ninomiya, K.; Shibatani, K.; Sueyoshi, M.; Chaipech, S.; Pongpiriyadacha, Y.; Hayakawa, T.; Muraoka, O.; Morikawa, T. Aromatase Inhibitory Activity of Geranylated Coumarins, Mammeasins C and D, Isolated from the Flowers of *Mammea Siamensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **64** (7), 880–885 (2016).
 29. Morikawa, T.; Luo, F.; Manse, Y.; Sugita, H.; Saeki, S.; Chaipech, S.; Pongpiriyadacha, Y.; Muraoka, O.; Ninomiya, K. Geranylated Coumarins From Thai Medicinal Plant *Mammea Siamensis* With Testosterone 5 α -Reductase Inhibitory Activity. *Front. Chem.*, **8**, 199 (2020).
 30. Luo, F.; Sugita, H.; Muraki, K.; Saeki, S.; Chaipech, S.; Pongpiriyadacha, Y.; Muraoka, O.; Morikawa, T. Anti-Proliferative Activities of Coumarins from the Thai Medicinal Plant *Mammea Siamensis* (Miq.) T. Anders. against Human Digestive Tract Carcinoma Cell Lines. *Fitoterapia*, **148**, 104780 (2021).
 31. Luo, F.; Manse, Y.; Chaipech, S.; Pongpiriyadacha, Y.; Muraoka, O.; Morikawa, T. Phytochemicals with Chemopreventive Activity Obtained from the Thai Medicinal Plant *Mammea Siamensis* (Miq.) T. Anders.: Isolation and Structure Determination of New Prenylcoumarins with Inhibitory Activity against Aromatase. *IJMS*, **23** (19), 11233

- (2022).
32. Foster, S.; Duke, JA. A Field Guide to Medicinal Plants and Herbs of Eastern and Central North America. *Houghton Mifflin Harcourt*, p.141(2000).
 33. Dias, T.; Bronze, M. R.; Houghton, P. J.; Mota-Filipe, H.; Paulo, A. The Flavonoid-Rich Fraction of *Coreopsis Tinctoria* Promotes Glucose Tolerance Regain through Pancreatic Function Recovery in Streptozotocin-Induced Glucose-Intolerant Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **132** (2), 483–490 (2010).
 34. Chen, C.; Wang, Q.-H.; Wu, J.-Y.; Huang, D.; Zhang, W.-H.; Zhao, N.; Li, X.-F.; Wang, L.-X. Historical Introduction, Geographical Distribution, and Biological Characteristics of Alien Plants in China. *Biodiversity and Conservation*, **26** (2), 353–381 (2017).
 35. Sun, Y.-H.; Zhao, J.; Jin, H.-T.; Cao, Y.; Ming, T.; Zhang, L.-L.; Hu, M.-Y.; Hamlati, H.; Pang, S.-B.; Ma, X.-P. Vasorelaxant Effects of the Extracts and Some Flavonoids from the Buds of *Coreopsis Tinctoria*. *Pharmaceutical Biology*, **51** (9), 1158–1164 (2013).
 36. Shen, J.; Hu, M.; Tan, W.; Ding, J.; Jiang, B.; Xu, L.; Hamulati, H.; He, C.; Sun, Y.; Xiao, P. Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Coreopsis Tinctoria* Nutt.: A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, **269**, 113690 (2021).
 37. Zhang, H.; Zhong, J.; Zhang, Q.; Qing, D.; Yan, C. Structural Elucidation and Bioactivities of a Novel Arabinogalactan from *Coreopsis Tinctoria*. *Carbohydrate Polymers*, **219**, 219–228 (2019).
 38. Dias, T.; Liu, B.; Jones, P.; Houghton, P. J.; Mota-Filipe, H.; Paulo, A. Cytoprotective Effect of *Coreopsis Tinctoria* Extracts and Flavonoids on TBHP and Cytokine-Induced Cell Injury in Pancreatic MIN6 Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, **139** (2), 485–492 (2012).
 39. Shen, J.; Hu, M.; Tan, W.; Ding, J.; Jiang, B.; Xu, L.; Hamulati, H.; He, C.; Sun, Y.; Xiao, P. Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of *Coreopsis Tinctoria* Nutt.: A Review. *Journal of Ethnopharmacology*, **269**, 113690 (2021).
 40. Guo, J.; Wang, A.; Yang, K.; Ding, H.; Hu, Y.; Yang, Y.; Huang, S.; Xu, J.; Liu, T.; Yang, H.; Xin, Z. Isolation, Characterization and Antimicrobial Activities of Polyacetylene Glycosides from *Coreopsis Tinctoria* Nutt. *Phytochemistry*, **136**, 65–69 (2017).
 41. Liu, Y.; Du, D.; Liang, Y.; Xin, G.; Huang, B.-Z.; Huang, W. Novel Polyacetylenes from *Coreopsis Tinctoria* Nutt. *Journal of Asian Natural Products Research*, **17** (7), 744–749 (2015).

42. Yu, Q.; Chen, W.; Zhong, J.; Huang, D.; Shi, W.; Chen, H.; Yan, C. Purification, Structural Characterization, and Bioactivities of a Polysaccharide from *Coreopsis Tinctoria*. *Food Frontiers*, **fft2.145** (2022).
43. Wang, W.; Chen, W.; Yang, Y.; Liu, T.; Yang, H.; Xin, Z. New Phenolic Compounds from *Coreopsis Tinctoria* Nutt. and Their Antioxidant and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activities. *J. Agric. Food Chem.*, **63** (1), 200–207 (2015).
44. Zhang, W.-S.; Sun, Q.-L.; Zheng, W.; Zhang, Y.; Du, J.; Dong, C.-X.; Tao, N. Structural Characterization of a Polysaccharide from *Coreopsis Tinctoria* Nutt. and Its Function to Modify Myeloid Derived Suppressor Cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, **126**, 926–933 (2019).
45. Cai, W.; Yu, L.; Zhang, Y.; Feng, L.; Kong, S.; Tan, H.; Xu, H.; Huang, C. Extracts of *Coreopsis Tinctoria* Nutt. Flower Exhibit Antidiabetic Effects via the Inhibition of α - Glucosidase Activity. *Journal of Diabetes Research*, **2016**, 1–9 (2016).
46. Jiang, B.; Le, L.; Wan, W.; Zhai, W.; Hu, K.; Xu, L.; Xiao, P. The Flower Tea *Coreopsis Tinctoria* Increases Insulin Sensitivity and Regulates Hepatic Metabolism in Rats Fed a High-Fat Diet. *Endocrinology*, **156** (6), 2006–2018 (2015).
47. Zhang, F.; Yang, M.; Xu, J.; Hu, Y.; Gao, R.; Huang, K.; He, X. *Coreopsis Tinctoria* and Its Flavonoids Ameliorate Hyperglycemia in Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Nutrients*, **14** (6), 1160 (2022).
48. Du, D.; Yao, L.; Zhang, R.; Shi, N.; Shen, Y.; Yang, X.; Zhang, X.; Jin, T.; Liu, T.; Hu, L.; Xing, Z.; Criddle, D. N.; Xia, Q.; Huang, W.; Sutton, R. Protective Effects of Flavonoids from *Coreopsis Tinctoria* Nutt. on Experimental Acute Pancreatitis via Nrf-2/ARE-Mediated Antioxidant Pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, **224**, 261–272 (2018).
49. Zhang, Y.; Shi, S.; Zhao, M.; Chai, X.; Tu, P. Coreosides A–D, C14-Polyacetylene Glycosides from the Capitula of *Coreopsis Tinctoria* and Its Anti-Inflammatory Activity against COX-2. *Fitoterapia*, **87**, 93–97 (2013).
50. Laphookhieo, S.; Maneerat, W.; Kiattansakul, R. Phenolic Compounds from *Mammea Siamensis* Seeds. *Can. J. Chem.*, **84** (11), 1546–1549 (2006).
51. Verotta, L.; Lovaglio, E.; Vidari, G.; Finzi, P. V.; Neri, M. G.; Raimondi, A.; Parapini, S.; Taramelli, D.; Riva, A.; Bombardelli, E. 4-Alkyl- and 4-Phenylcoumarins from *Mesua Ferrea* as Promising Multidrug Resistant Antibacterials. *Phytochemistry*, **65** (21), 2867–2879 (2004).

52. Win, N. N.; Awale, S.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Novel Anticancer Agents, Kayeassamins A and B from the Flower of *Kayea Assamica* of Myanmar. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **18** (16), 4688–4691 (2008).
53. Win, N. N.; Awale, S.; Esumi, H.; Tezuka, Y.; Kadota, S. Novel Anticancer Agents, Kayeassamins C–I from the Flower of *Kayea Assamica* of Myanmar. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16** (18), 8653–8660 (2008).
54. Morel, C.; Guilet, D.; Oger, J.-M.; Séraphin, D.; Sévenet, T.; Wiart, C.; Hadi, A. H. A.; Richomme, P.; Bruneton, J. 6-Acylcoumarins from *Mesua Racemosa*. *Phytochemistry*, **50** (7), 1243–1247 (1999).
55. Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J. Synthesis of the *Mammea* Coumarins. Part 1. The Coumarins of the *Mammea* A, B, and C Series. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 317 (1987).
56. Bandaranayake, W. M.; Selliah, S. S.; Sultanbawa, M. U. S.; Games, D. E. Xanthones and 4-Phenylcoumarins of *Mesua Thwaitesii*. *Phytochemistry*, **14** (1), 265–269 (1975).
57. Chakraborty, D. P.; Das, B. C. The Structure of Mesuol. *Tetrahedron Letters*, **7** (46), 5727–5730 (1966).
58. Prachyawarakorn, V.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S. NMR Study Of Seven Coumarins From *Mammea Siamensis*. *Pharmaceutical Biology*, **38** (sup1), 58–62 (2000).
59. Kaweetripob, W.; Mahidol, C.; Prawat, H.; Ruchirawat, S. Chemical Investigation Of *Mammea Siamensis*. *Pharmaceutical Biology*, **38** (sup1), 55–57 (2000).
60. Crombie, L.; Games, D. E.; Haskins, N. J.; Reed, G. F. Extractives of *Mammea Americana* L. Part V. The Insecticidal Compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 2255 (1972).
61. Yang, H.; Protiva, P.; Gil, R. R.; Jiang, B.; Baggett, S.; Basile, M. J.; Reynertson, K. A.; Weinstein, I. B.; Kennelly, E. J. Antioxidant and Cytotoxic Isoprenylated Coumarins from *Mammea americana*. *Planta med.*, **71** (9), 852–860 (2005).
62. Guilet, D.; Hélesbeux, J.-J.; Séraphin, D.; Sévenet, T.; Richomme, P.; Bruneton, J. Novel Cytotoxic 4-Phenylfuranocoumarins from *Calophyllum d Ispar*. *J. Nat. Prod.*, **64** (5), 563–568 (2001).
63. Mahidol, C.; Prawat, H.; Kaweetripob, W.; Ruchirawat, S. Regioisomers of Acylcoumarins from the Flowers of *Mammea Siamensis*. *Natural Product Communications*, **2** (5), 1934578X0700200 (2007).
64. Bhattacharyya, J.; Barros, C. B. Triterpenoids of *Cnidoscopus Urens*. *Phytochemistry*, **25**

- (1), 274–276 (1985).
65. Shul'ts, E. E.; Ganbaatar, Zh.; Petrova, T. N.; Shakirov, M. M.; Bagryanskaya, I. Yu.; Taraskin, V. V.; Radnaeva, L. D.; Otgonsuren, D.; Pokrovskii, A. G.; Tolstikov, G. A. Plant Coumarins. IX.* Phenolic Compounds of *Ferulopsis Hystrix* Growing in Mongolia. Cytotoxic Activity of 8,9-Dihydrofurocoumarins. *Chem Nat Compd*, **48** (2), 211–217 (2012).
66. Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J. Synthesis of the Insecticidal 1'-Acetoxy-Mammeins and Surangin b. *Tetrahedron Letters*, **26** (24), 2933–2936 (1985).
67. Crombie, L.; Jones, R. C. F.; Palmer, C. J. Synthesis of the Mamea Coumarins. Part 2. Experiments in the Mamea E Series and Synthesis of Mamea E/AC. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 333 (1987).
68. Kitawaki J., *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, **118**, 3–12 (2009).
69. Kellis, J. T.; Vickery, L. E. Inhibition of Estrogen Synthetase (Aromatase) by 4-Cyclohexylaniline*. *Endocrinology*, **114** (6), 2128–2137 (1984).
70. de Lemos, M. L. Effects of Soy Phytoestrogens Genistein and Daidzein on Breast Cancer Growth. *Ann Pharmacother*, **35** (9), 1118–1121 (2001).
71. Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A.; Katzenellenbogen, B. S. Phenol Red in Tissue Culture Media Is a Weak Estrogen: Implications Concerning the Study of Estrogen-Responsive Cells in Culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83** (8), 2496–2500 (1986).
72. Liew, S. Y.; Looi, C. Y.; Paydar, M.; Cheah, F. K.; Leong, K. H.; Wong, W. F.; Mustafa, M. R.; Litaudon, M.; Awang, K. Subditine, a New Monoterpenoid Indole Alkaloid from Bark of *Nauclea Subdita* (Korth.) Steud. Induces Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, **9** (2), e87286 (2014).
73. Pandey, S.; Walpole, C.; Shaw, P. N.; Cabot, P. J.; Hewavitharana, A. K.; Batra, J. Bio-Guided Fractionation of Papaya Leaf Juice for Delineating the Components Responsible for the Selective Anti-Proliferative Effects on Prostate Cancer Cells. *Front. Pharmacol.*, **9**, 1319 (2018).
74. Lima, T. C.; Souza, R. J.; Santos, A. D. C.; Moraes, M. H.; Biondo, N. E.; Barison, A.; Steindel, M.; Biavatti, M. W. Evaluation of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Phenolic Compounds from *Calea Uniflora* Less. *Natural Product Research*, **30** (5), 551–557 (2016).
75. Sashida, Y.; Ogawa, K.; Kitada, M.; Karikome, H.; Mimaki, Y.; Shimomura, H. New Aurone Glucosides and New Phenylpropanoid Glucosides from *Bidens Pilosa*. *Chem.*

- Pharm. Bull.*, **39** (3), 709–711 (1991).
76. Guimarães, A. G.; Gomes, S. V. F.; Moraes, V. R. S.; Nogueira, P. C. L.; Ferreira, A. G.; Blank, A. F.; Santos, A. D. C.; Viana, M. D.; Silva, G. H.; Quintans Júnior, L. J. Phytochemical Characterization and Antinociceptive Effect of *Lippia Gracilis* Schauer. *J. Nat. Med.*, **66** (3), 428–434 (2012).
 77. Jung, M. J.; Kang, S. S.; Jung, H. A.; Kim, G. J.; Choi, J. S. Isolation of Flavonoids and a Cerebroside from the Stem Bark Of *Albizzia Julibrissin*. *Arch. Pharm. Res.*, **27** (6), 593 (2004).
 78. Lee Hyun-Jung; Lee Oh-Kyu; Kwon Yeong-Han; Choi Don-Ha; Kang Ha-Young; Lee Hyeon-Yong; Paik Ki-Hyon; Lee Hak-Ju. A New Flavanone from the Wood of *Amorpha Fruticosa* L. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, **27** (3), 426–428 (2006).
 79. Nessa, F.; Ismail, Z.; Mohamed, N.; Haris, M. R. H. M. Free Radical-Scavenging Activity of Organic Extracts and of Pure Flavonoids of *Blumea Balsamifera* DC Leaves. *Food Chemistry*, **88** (2), 243–252 (2004).
 80. Olejniczak, S.; Ganicz, K.; Tomczykowa, M.; Gudej, J.; Potrzebowski, M. J. Structural Studies of 2-(3',4'-Dihydroxyphenyl)-7- β -D-Glucopyranos-1-O-Yl-8-Hydroxychroman-4-One in the Liquid and Solid States by Means of 2D NMR Spectroscopy and DFT Calculations. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, No. 6, 1059–1065 (2002).
 81. Kim, J. W.; Kim, T. B.; Yang, H.; Sung, S. H. Phenolic Compounds Isolated from *Opuntia Ficus-Indica* Fruits. *Nat. Prod. Sci.*, **22** (2), 117 (2016).
 82. Agrawal, P.; Agarwal, S.; Rastogi, R.; Österdahal, B.-G. Dihydroflavanonols from *Cedrus Deodara*, A ^{13}C NMR Study. *Planta Med.*, **43** (09), 82–85 (1981).
 83. Elwekeel, A.; Elfishway, A.; AbouZid, S. Enhanced Accumulation of Flavonolignans in *Silybum Marianum* Cultured Roots by Methyl Jasmonate. *Phytochemistry Letters*, **5** (2), 393–396 (2012).
 84. Pan, H.; Lundgren, L. N. Phenolics from Inner Bark of *Pinus Sylvestris*. *Phytochemistry*, **42** (4), 1185–1189 (1996).
 85. Ràmachandran Nair, A. G.; Gunasegaran, R.; Krishnan, S.; Bayet, C.; Voirin, B. Flavonol Glycosides from Leaves of *Eupatorium Glandulosum*. *Phytochemistry*, **40** (1), 283–285 (1995).
 86. Yan, R.-J.; Li, M.-Y.; Zhou, H.-F.; Kong, D.-Y.; Wu, T. Two New Biflavonones from *Coreopsis Tinctoria*. *Journal of Asian Natural Products Research*, **19** (10), 960–965 (2017).

87. Jin, U.-H.; Lee, J.-Y.; Kang, S.-K.; Kim, J.-K.; Park, W.-H.; Kim, J.-G.; Moon, S.-K.; Kim, C.-H. A Phenolic Compound, 5-Caffeoylquinic Acid (Chlorogenic Acid), Is a New Type and Strong Matrix Metalloproteinase-9 Inhibitor: Isolation and Identification from Methanol Extract of *Euonymus Alatus*. *Life Sciences*, **77** (22), 2760–2769 (2005).
88. Balachandran, C.; Duraipandiyan, V.; Al-Dhabi, N. A.; Balakrishna, K.; Kalia, N. P.; Rajput, V. S.; Khan, I. A.; Ignacimuthu, S. Antimicrobial and Antimycobacterial Activities of Methyl Caffeate Isolated from *Solanum Torvum* Swartz. Fruit. *Indian Journal of Microbiology*, **52** (4), 676–681 (2012).
89. Wang, G.; Zhu, L.; Zhao, Y.; Gao, S.; Sun, D.; Yuan, J.; Huang, Y.; Zhang, X.; Yao, X. A Natural Product from *Cannabis Sativa* Subsp. *Sativa* Inhibits Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2 (HIPK2), Attenuating MPP + -Induced Apoptosis in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Bioorganic Chemistry*, **72**, 64–73 (2017).
90. Kim, D. H.; Lee, T. H.; Subedi, L.; Kim, S. Y.; Lee, K. R. Chemical Constituents of *Impatiens Balsamina* Stems and Their Biological Activities. *Nat Prod Sci*, **25** (2), 130 (2019).
91. Balam, F. H.; Ahmadi, Z. S.; Ghorbani, A. Inhibitory Effect of Chrysin on Estrogen Biosynthesis by Suppression of Enzyme Aromatase (CYP19): A Systematic Review. *Heliyon*, **6** (3), e03557 (2020).
92. Campbell, D. R.; Kurzer, M. S. Flavonoid Inhibition of Aromatase Enzyme Activity in Human Preadipocytes. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **46** (3), 381–388 (1993).
93. Jacobsen, N. W.; Halling-Sørensen, B.; Birkved, F. K. Inhibition of Human Aromatase Complex (CYP19) by Antiepileptic Drugs. *Toxicology in Vitro*, **22** (1), 146–153 (2008).
94. Yoshikawa, M.; Uemura, T.; Shimoda, H.; Kishi, A.; Kawahara, Y.; Matsuda, H. Medicinal Foodstuffs. XVIII. Phytoestrogens from the Aerial Part of *Petroselinum Crispum* MILL. (PARSLEY) and Structures of 6"-Acetylapiin and a New Monoterpene Glycoside, Petroside. *Chem. Pharm. Bull.*, **48** (7), 1039–1044 (2000).
95. Razak, N. A.; Abu, N.; Ho, W. Y.; Zamberi, N. R.; Tan, S. W.; Alitheen, N. B.; Long, K.; Yeap, S. K. Cytotoxicity of Eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 Human Breast Cancer Cells via Cell Cycle Arrest, Anti-Angiogenesis and Induction of Apoptosis. *Sci. Rep.*, **9** (1), 1514 (2019).
96. Koseki, J.; Matsumoto, T.; Matsubara, Y.; Tsuchiya, K.; Mizuhara, Y.; Sekiguchi, K.; Nishimura, H.; Watanabe, J.; Kaneko, A.; Hattori, T.; Maemura, K.; Kase, Y. Inhibition

- of Rat 5 α -Reductase Activity and Testosterone-Induced Sebum Synthesis in Hamster Sebocytes by an Extract of *Quercus Acutissima* Cortex. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2015**, 1–9 (2015).
97. Lee, S. H.; Lee, D. H.; Lee, J.; Lee, W. Y.; Chuang, B. C.; Choi, M. H. Comparative GC-MS Based In Vitro Assays of 5 α -Reductase Activity Using Rat Liver S9 Fraction. *Mass Spectrometry Letters*, **3** (1), 21–24 (2012).
98. Matsuda, H.; Sato, N.; Yamazaki, M.; Naruto, S.; Kubo, M. Testosterone 5.ALPHA.-Reductase Inhibitory Active Constituents from *Anemarrhenae Rhizoma*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **24** (5), 586–587 (2001).

謝 辞

本研究に際し、終始御指導を賜りました近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室 森川敏生 教授に衷心より感謝致します。

また、実験に際し、御助言、御討論下さいました近畿大学薬学総合研究所食品薬学研究室 萬瀬 貴昭 講師に心から感謝致します。

論文作成に際し、御助言下さいました村岡 修 薬学総合研究所前所長および松田 久司 京都薬科大学名誉教授に心から感謝致します。

また、NMR を測定していただきました、近畿大学 共同利用センター丸本 真輔 講師に深謝致します。

また、本研究に多大なる御協力を賜りました、長友 暁史研究員、奥川 修平修士、柴谷 華苗修士、宮坂 賢知修士、井上 尚樹修士、山本 紗也修士、徐 尹修士、シュレスタ サリタ修士、杉田 秀美学士、石川 聡史学士、佐伯 竣介学士、西 さくらさんならびに研究室員の皆様に感謝の意を表します。