

氏名	フェリー フェルディアンサー ソフィアン FERRY FERDIANSYAH SOFIAN
本籍（国籍）	インドネシア共和国
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	連研第 831 号
学位授与年月日	令和 4 年 9 月 2 6 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
学位論文題目	Study on cytotoxic phenolic sesquiterpenes isolated from <i>Dysoxylum parasiticum</i> (Osbeck) Kosterm [Meliaceae] (センダン科 <i>Dysoxylum parasiticum</i> (Osbeck)Kosterm に含まれる細胞毒性活性を有するフェノール性セスキテルペン類に関する研究)
学位審査委員	主査 山形大学教授 塩野 義人 副査 山形大学教授 小関 卓也 副査 弘前大学教授 橋本 勝 副査 岩手大学教授 木村 賢一

論文の内容の要旨

Plants and other natural sources can provide a vast range of complex and structurally diverse compounds. Drug discovery from plants has played an important role in the treatment of human diseases, and indeed, most current anticancer agents used in clinical practices are derived from plants. For this reason, the discovery of new drugs from plants is an exclusively important objective. Moreover, the screening method for selecting the material resources is also essential by considering the number of materials, limited cost, and limited time. One of the methods is by using primates as screening source for plant candidates. That is rare natural resources and a unique screening method conducted by some of researchers.

Based on previous research, 42 Indonesian primate-consumed plants had been utilized as anticancer. Those plants grow in the Pangandaran Nature Reserve of West Java Province, Indonesia. Several compounds were isolated from these plants, including kaempferol-3-*O*-rhamnoside isolated from *Schima wallichii*, 2',4'-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone isolated from *Eugenia aquea*, and catechin isolated from *Garcinia celebica* with significant anticancer and antiplasmodial activities. Previously, it was discovered that some of these plants, including *Disoxylum parasiticum* (synonym of *Dysoxylum caulostachyum*), showed potential anticancer, antibacterial, and antiplasmodial activities. Therefore, the studies were focused on searching for specialized metabolites in primate-consumed plants that exhibit cytotoxic activity against cancer cells.

This thesis describes the investigation of chemical components and their cytotoxic activity from *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm. belonging to Meliaceae family. *D. parasiticum*, with a synonym of *Dysoxylum caulostachyum* Miq., is a species of a rainforest tree. This plant grows up to 36 m tall, has a trunk with a diameter of up to 60 cm, and buttress roots

measuring up to 1.5 m in diameter. It has potential as a feature tree in parks or gardens in areas with subtropical or tropical climates. I collected the leaves of this plant as material research from the exact location, Pangandaran Nature Reserve area of West Java Province, Indonesia. Based on this study, the chemical investigation from *D. parasiticum* leaves led to the isolation of six undescribed specialized metabolites, namely, bidysoxyphenols A–C (**3–5**), tridysoxyphenols A and B (**6** and **7**), and bidysoxyletine (**8**), together with four known compounds, namely dysoxyphenol (**1**), 7*R*,10*S*-3-hydroxycalamenene (**2**), 4-hydroxy-4,7-dimethyl- α -tetralone (**9**), and 3*R*,6*S*-3-hydroxy- α -ionone (**10**). The isolation of specialized metabolites from this plant has been executed utilizing several steps of the chromatography method.

The structures of **3–7**, including their absolute stereochemistry, were elucidated by analysis of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, high-resolution electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry (HRESITOFMS), and electronic circular dichroism (ECD) data, which were supported by their biosynthetic pathway. The proposed biosynthetic pathway of **1–7** is presented in this thesis. I describe that compound **3** was proposed to be originated from **1** via a biosynthetic pathway, and it was suggested that **3** was produced by the coupling of two phenolic systems of **1** in a process readily rationalized using radical reactions. Meanwhile, compounds **4** and **5** were produced by coupling two phenolic systems of **1/2** and **1/chiloscyphenol A**, respectively. Moreover, I proposed that compounds **6** and **7** were thought to arise via the radical addition of **3** by **1** and **2**, respectively. Interestingly, compound **1** and chiloscyphenol A have the basic skeleton isomeric to those hydroxycalamenenes, in which the Me-15 were located at C-5 for **1** and C-3 for chiloscyphenol A, instead of at C-4. Compound **1** and chiloscyphenol A have been isolated for the first time from *Dysoxylum densiflorum* and *Chiloscyphus polyanthus*, respectively. Both compounds' formations were thought to arise from an irregular farnesane. This irregular farnesane, namely tanacetene, has been isolated for the first time from *Tanacetum longifolium*. Tanacetene is an irregular non-head-to-tail sesquiterpene from a natural product that does not follow the biogenetic isoprene rule and is of rare occurrence.

The structure of **8** was determined using 1-dimensional (1D) and 2-dimensional (2D) NMR spectroscopy, ultraviolet (UV) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy, and HRESITOFMS data confirmed by quantum chemical calculations in the TDDFT approach using the B3LYP exchange-correlation function for ¹³C NMR and UV spectroscopic data. According to the 1D and 2D NMR data, four possibilities of compound **8** were revealed. The discrimination between these four possibilities (**8a–8d**) was achieved using theoretical NMR calculations. To reduce a vast number of conformations and make this analysis feasible, the structures were set to replace the two geranyl fragments with methyls. The experimental carbon resonances of **8** matched with the calculated data for **8b** with the most significant correlation coefficient, R²= 0.9896. These results indicated that 3,3'-dihydroxyl-5,5'-dimethyldibenzonaphthyrone-type (**8b**) could be excluded. In support of these theoretical NMR calculation data, the experimental UV spectrum of **8** in MeOH and the spectrum calculated for **8a–8d** at the TD-DFT B3LYP/6-311G(d)//B3LYP/6-31G(d) and the TD-DFT mPW1PW91/6-311G(d)//B3LYP/6-31G(d) levels,

including the PCM solvent model for MeOH, were compared and confirmed that the structure of **8** was the same as **8b**. In conclusion, the structure of **8** was identified as a bicoumarin derivative.

Compounds **1–7**, **9**, and **10** were tested for their cytotoxic activity against HL60 cells using the MTT assay with camptothecin as a positive control. Compound **8** was excluded from the test because its red color was incompatible with this method, and it was also slightly soluble with the media. The results showed that compounds **1–4** exhibited inhibitory activities with IC₅₀ values of 18.25 ± 1.52, 119.85 ± 10.03, 39.04 ± 3.12, and 137.41 ± 24.18 μM, respectively, implying that the activity of sesquiterpene phenol derivatives reduced as their molecular weights increased. As compounds **5–7**, **9**, and **10** had IC₅₀ values higher than 150 μM, these compounds were considered less active or inactive. Referring to their IC₅₀ values, compound **1** showed higher cytotoxicity than compound **2**. This might be due to the –OH group position at C-4 and the methyl position at C-5 in the benzene ring affecting the cytotoxic properties. Compounds **3** and **4** were dimeric structures of **1** and **2**, respectively, and the cytotoxicity of compound **3** was more potent than that of compound **4**. These findings indicate that the monomeric structure **1** has an essential role in the cytotoxicity against the HL60 cell line and suggest that compounds **1** and **3**, as sesquiterpene phenol derivatives, are potential candidates for developing new anticancer drugs. However, further studies are required to prove this preliminary conclusion by analyzing more analogs of monomeric and oligomeric compounds with those hydroxyl and methyl substituent groups. In addition, the previous report showed that chiloscycphenols A and B, which are analog compounds of **1**, exhibited significant cytotoxicity against the human tumor cell line MCF-7, with IC₅₀ values of 14.8 and 5.6 μM, respectively. Furthermore, understanding these compounds' molecular mechanisms of target cytotoxicity may provide valuable information for their possible applications in cancer management.

(日本語訳)

植物より分離される生理活性物質には、複雑で多様な化学構造を有するものが多い。医薬品の開発において、植物抽出物を対象にする研究は非常に重要であり、実際に、抗がん剤の半数は、植物由来の生産物である。一方で、有用物質を探索するスクリーニング研究を実際に行うことは、多くの困難が伴う。そこで、一つの方法として、霊長類の摂取している植物をスクリーニング源とする考えに基づく研究例がある。例えば、インドネシア（パンガンダラン国立保護区）の霊長類が摂取する 42 種の植物のうち、ツバキ科 *Schima wallichii*（ヒメツバキ）より kaempferol-3-O-rhamnoside、フトモモ科 *Eugenia aquea*（ミズレンブ）より 2',4'-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone、フクギ科 *Garcinia celebica*（セレベスマンゴスチン）より、catechin が抗腫瘍活性物質として報告されている。このように、霊長類の摂取する植物には抗癌活性や抗菌活性、抗マラリア活性など生理活性を示す物質が多く含まれることから、この博士論文では、インドネシアの熱帯雨林に自生し、霊長類が摂取する植物の一種のセンダン科 *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm (シノニム *Dysoxylum caulostachyum*) に含まれている生理活性物質について、化学構造と生理活性について明らかにすることにした。

D. parasiticum の樹高は 36 m にも達し、幹周は 60 cm で、1.5 m の板根を形成する。この植物は、公園や庭において、モデル植物として取り扱われている。今回の研究を始めるにあたり、

インドネシアの西ジャワに位置するパンガンダラン国立保護区より採取し、葉の抽出物に含まれる成分を調査した。その結果、6種の新規物質と4種の既知物質を単離した。それぞれの構造解析の結果、新規物質は、bidysoxyphenols A (3), B (4), and C (5), tridysoxyphenols A (6) and B (7), bidysoxyetine (8) と名付けた。一方、既知物質は、dysoxyphenol (1), 7*R*,10*S*-3-hydroxycalamenene (2), 4-hydroxy-4,7-dimethyl- α -tetralone (9), 3*R*,6*S*-3-hydroxy- α -ionone (10) と判明した。

化合物 3 ~ 7 の化学構造については、NMR や質量分析を中心に構造解析を進め、絶対立体配置は、ECD スペクトルを利用した。これらの化合物から、推定される生合成経路も提出した。化合物 3 は、1 のラジカル反応により、また、化合物 4 と 5 は、それぞれ、1 / 2 と 1 / chiloscyphenol A から生合成されたと考えられた。

さらに、化合物 6 と 7 は、3 と 1 または 2 とのラジカル反応により生合成される。興味深いことに、1 と chiloscyphenol A は、hydroxycalamenene の異性体であり、1 は 5 位に、chiloscyphenol A は 3 位にメチル基を有している。化合物 1 と chiloscyphenol A は *D. densiflorum* と *Chiloscyphus polyanthus* より、初めて単離された物質であり、farnesane から誘導された tanacetene から生合成されたと考えられる。Tanacetene は、*Tanacetum longifolium* より発見されており、セスキテルペンとしては、珍しいイレギュラーな head to tail 反応による生合成経路が推定されている。

化合物 8 の構造解析については、NMR, UV, IR, HRESITOFMS のデータ並びに計算化学で導き出された ¹³C-NMR と UV データとの比較により決定した。すなわち、NMR データより推定された 8 の異性体 (8a–8d) を計算より求めた ¹³C-NMR データと比較後、さらに UV データを計算値と比較し、8 の構造を bicoumarin の新しい誘導体と決定した。

化合物 1 ~ 7, 9, 10 はヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60) 株を用い、毒性試験を行なった。化合物 8 については、赤色を示し、溶解性が低いことから、試験は実施できなかった。化合物 1 ~ 4 は生育阻害活性を示した [IC₅₀ (μ M); 1: 18.25 \pm 1.52, 2: 119.85 \pm 10.03, 3: 39.04 \pm 3.12, 4: 137.41 \pm 24.18]。その結果、分子量が大きくなるにつれて、活性が低下する傾向を示した。一方、化合物 5 ~ 7, 9, 10 については、150 μ M でも活性を示さなかった。化合物 1 と 2 の細胞毒性試験の結果より、ベンゼン環の C-4 位の水酸基と C-5 位のメチル基が細胞毒性活性に関与していることが示された。化合物 3 と 4 は、1 と 2 のそれぞれの二量体であり、3 の細胞毒性は、4 より弱いことから、1 の構造が細胞毒性に必須であることを支持した。今後、1 と 3 は、細胞毒性を有するフェノール性セスキテルペンとして開発が期待できる。今後、水酸基やメチル基の結合位置が異なるモノマーやダイマーの活性試験データを調べる必要性が残されているものの、1 の誘導体である chiloscyphenols A と B は、乳がん細胞株に対して毒性を示す既知の報告 [IC₅₀ (μ M); 1: 14.8, 2: 5.6] を考慮すると、これらの化合物の細胞毒性のメカニズムを理解することは、今後、抗癌剤の開発に向けて重要な情報である。

論文審査の結果の要旨

本学位論文では、インドネシアの熱帯雨林に自生し、霊長類が摂食する植物の一種のセンダン科 *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm (シノニム *Dysoxylum caulostachyum*) に含まれている生理活性物質について、化学構造と生理活性について明らかにした。その結果、6種の新規物質と4種の既知物質を単離し、それぞれの構造解析により、新規物質は、bidysoxyphenols A (3), B (4), and C (5), tridysoxyphenols A (6) and B (7), bidysoxyetine (8) と

名付け、既知物質は、dysoxyphenol (1), 7*R*,10*S*-3-hydroxycalamenene (2), 4-hydroxy-4,7-dimethyl- α -tetralone (9), 3*R*,6*S*-3-hydroxy- α -ionone (10) と判明した。

化合物 3 ~ 7 の化学構造については、NMR や質量分析を中心に構造解析を進め、絶対立体配置は、ECD スペクトルを利用した。これらの化合物から、推定される生合成経路も提出した。化合物 3 は、1 のラジカル反応により、また、化合物 4 と 5 は、それぞれ、1 / 2 と 1 / chiloscyphenol A から生合成されると考えられた。

さらに、化合物 6 と 7 は、3 と 1 または 2 とのラジカル反応により生合成される。興味深いことに、1 と chiloscyphenol A は、hydroxycalamenene の異性体であり、1 は 5 位に、chiloscyphenol A は 3 位にメチル基を有している。化合物 1 と chiloscyphenol A は *D. densiflorum* と *Chiloscyphus polyanthus* より、初めて単離された物質であり、farnesane から誘導された tanacetene から生合成されると考えられる。Tanacetene は、*Tanacetum longifolium* より発見されており、セスキテルペンとしては、イレギュラーな head to tail 反応による生合成経路が推定されている。

化合物 8 の構造解析については、NMR, UV, IR, HRESITOFMS のデータ並びに計算化学で導き出された ¹³C-NMR と UV データとの比較により決定した。

化合物 1 ~ 7, 9, 10 はヒト前骨髄性白血病細胞 (HL60) 株を用い、毒性試験を行なった。化合物 1 ~ 4 は阻害活性を示した。その結果、分子量が大きくなるにつれて、活性が低下する傾向を示した。一方、化合物 5 ~ 7, 9, 10 については、150 μ M でも活性を示さなかった。化合物 1 と 2 の細胞毒性試験の結果より、ベンゼン環の C-4 位の水酸基と C-5 位のメチル基が細胞毒性活性に関与していることが示された。化合物 3 と 4 は、1 と 2 のそれぞれの二量体であり、3 の細胞毒性は、4 より弱いことより、1 の構造が細胞毒性に必須であることを支持した。今後、1 と 3 は、細胞毒性を有するフェノール性セスキテルペンとして開発が期待できる。また、水酸基やメチル基の結合位置が異なるモノマーやダイマーの活性試験データを調べる必要性が残されているものの、1 の誘導體である chiloscyphenols A と B は、乳がん細胞株に対して毒性を示す既知の報告を考慮すると、これらの化合物の細胞毒性のメカニズムを理解することは、今後、抗癌剤の開発に向けて重要な情報である。

以上の結果から、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (学術) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Ferry Ferdiansyah Sofian, Anas Subarnas, Mayuka Hakozaki, Shota Uesugi, Takuya Koseki, Yoshihito Shiono (2022) Bidysoxyphenols A–C, dimeric sesquiterpene phenols from the leaves of *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm. *Fitoterapia* 158:105157. 出版社：エルゼビア
2. Ferry Ferdiansyah Sofian, Anas Subarnas, Takuya Koseki, Yoshihito Shiono (2022). Structure elucidation of a new bicoumarin derivative from the leaves of *Dysoxylum parasiticum* (Osbeck) Kosterm. *Magnetic Resonance in Chemistry* 18 March 2022:1–7. 出版社：JOHN WILEY & SONS LTD