

氏名	アブドゥ チョウコウア Abdou Tchoukoua
本籍（国籍）	カメルーン
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連論第177号
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当論文博士
研究科及び専攻	連合農学研究科
学位論文題目	Studies on bioactive compounds from Cameroonian medicinal plants, <i>Acacia albida</i> and <i>Albizia chevalieri</i>, and Japanese endophytes <i>Xylaria</i> sp.（カメルーン産薬用植物 <i>Acacia albida</i> と <i>Albizia chevalieri</i>, と日本で分離された植物内生菌類 <i>Xylaria</i> sp. の生理活性物質に関する研究）
学位審査委員	主査 山形大学 教授 塩野 義人 副査 小関 卓也（山形 教授）, 橋本 勝（弘前 教授）, 木村 賢一（岩手 教授）, 得字 圭彦（帯広 准教授）

論文の内容の要旨

The isolation and characterization of bioactive substances from medicinal plants and endophytes is done using chromatographic and spectroscopic methods. The polar extracts of *Acacia albida* and *Albizia chevalieri* species (Mimosaceae), and culture filtrates of endophytic fungi of *Xylaria* sp. are investigated. The dissertation consists of the following three parts:

1. Triterpene saponins from *Acacia albida* (Mimosaceae)

The proposed species, *Acacia albida* (Mimosaceae) is a plant highly known for its medicinal value but on which no study on the specialised metabolites has been reported so far. In folk medicine, the decoction of the bark of *A. albida* is used for diarrhoea, colds, haemorrhage, leprosy, ophthalmic, and in cleansing fresh wounds. As there are no studies on its chemical constituents and since the plants of the genus *Acacia* are known as a rich source of triterpene saponins, we carried out phytochemical study of *Acacia albida* for its saponin content.

Chemical investigation of the roots of *A. albida* resulted in the isolation of seven new bidesmosidic triterpenoid saponins named albidosides A – G. Their structures were elucidated using 1D and 2D NMR spectroscopy and mass spectrometry and determined to be bidesmosides of oleanolic acid and 16 α -hydroxyoleanolic acid (echinocystic acid). Several

saponins with cytotoxic, antitumor, and apoptosis properties have been isolated from *Acacia* species. Therefore, the isolated compounds were assayed for their cytotoxicity against HeLa and HL60 cells using MTT method and microscopic observation. Albidosides E and F showed cytotoxicity against the cell lines studied and induced cytolytic phenotype immediately through membrane damaging effects. Although some saponins showed apoptotic cell death, albidosides E and F did not form apoptotic bodies.

A further detailed investigation of the barks of *Acacia albida* resulted in the isolation of the two additional triterpene saponins named albidosides H and I. These compounds were evaluated for their cytotoxicity against two human cancer cells, HeLa and HL60. Albidoside H exhibited strong cytotoxic effect (IC₅₀ 12.7 μ M on HL60 and 20.8 μ M on HeLa) while albidoside I exhibited weak cytotoxicity. These results are in accordance with the previous findings which speculate that in albidosides A – G, the cytotoxicity is greater when the aglycone is echinocystic acid and the sugar linked to aglycone C-3 is GlcNAc unsubstituted at C-6.

2. Two new 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides from the roots of *Albizia chevalieri* (Mimosaceae)

The proposed species, *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) is a tree of the dry savannah. In folk medicine, the leaf extract is used for the treatment of diabetes mellitus and cancer. In prior studies on the genus *Albizia*, saponins and flavonoids were found as the main constituents.

In our continuing search for bioactive compounds from Cameroonian medicinal plants, we investigated *Albizia chevalieri* from a phytopharmacological point of view. Phytochemical investigation of the roots of the plant led to the isolation of two new 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides, chevalieriflavanosides A and B. Their structures were established by 2D NMR techniques, UV, IR, CD, and mass spectrometry. These compounds were screened for their cytotoxicity against HL60 cells. The antibacterial activities of the new compounds also were evaluated against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* using the agar diffusion test. However, the tested compounds displayed no significant cytotoxic activity towards HL60 cells at the concentration of 100 μ M, but they exhibited weak antibacterial activity at 100 μ g/disk.

3. Metabolites from endophytic fungi of *Xylaria* sp. (Xylariaceae)

The fungal strain *Xylaria* sp. V-27 was isolated from a dead branch collected in Yamagata, Japan. This strain was then cultured on the steamed unpolished rice medium for four weeks. After cultivation the organic

extract was subjected to silica gel and octadecyl silica gel (ODS) column chromatography to afford a new eremophilane sesquiterpene 13,13-dimethoxyintegric acid, together with known compound integric acid as the most abundant constituent of the mycelial extract. The structure of the new compound was established by means of spectroscopic analyses. The isolated compounds indicated growth restoring activity against the mutant yeast strain [*Saccharomyces cerevisiae* (*zds1Δ erg3Δ pdr1Δ pdr3Δ*)] and inhibited degranulation of rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells stimulated by IgE+DNP-BSA, Thapsigargin and A23187, respectively. These cytotoxicity and the inhibition activity of degranulation against RBL-2H3 cells showed that the propenal unit on the structure plays an important role for the activities. Previous evidence has revealed that the propenal moiety is involved in HIV-1 integrase inhibitory activity.

From endophytic fungus *Xylaria curta*, a new bicyclic lactone was isolated along with two known metabolites, myrotheciumone A and 4-oxo-4H-pyron-3-acetic acid from the ethyl acetate extract. The structures of these compounds were elucidated on the basis of spectroscopic methods (UV, IR, HRESITOFMS, 1D and 2D NMR). The novel lactone isolated from *X. curta* was found to be another rare 5/5 rings-fusion system in a naturally occurring compound. This compound showed moderate antibacterial activity. Even though there have been a few reports showing the effects of *Xylaria* sp. derived compounds on plant growth, the novel compound showed phytotoxic activity against seed germination and lettuce radicle development. This observation suggests that the new compound may protect the host plant from competition by neighbouring plants since some endophytes are able to enhance the allelopathic effects of the hosts in order to prevent the invasion of exotic plant species.

(日本語)

本論文は、カメルーン産薬用植物の *Acacia albida* と *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) の抽出物と *Xylaria* sp. の培養抽出物に含まれる生理活性物質の単離精製および得られた物質の化学構造解析、生理活性試験について行った成果の要約である。

1. *Acacia albida* (Mimosaceae)に含まれるトリテルペンサポニン類について

Acacia albida はカメルーンにおいて、薬用植物の一つとして用いられてきたネムノキ科の植物である。例えば、民間療法として、この樹皮を煎じて、下痢および風邪、消化器官の出血、ハンセン病の予防、眼に関する疾患などに用いられている。また、切り傷の消毒にも樹皮の抽出物が用いられてきた。このような生理作用が知られておりながら、有機化学的な見地からの成分研究に関する報告例は多くない。一方、他の *Acacia* 属に関する研究においては、生理活性物質として、トリテルペンサポニン類を多く含むことがわかっている。そこで、本研究で *Acacia albida* の抽出物より、高極性画分に含まれるトリ

テルペンサポニン類を中心に精製を行い、化学構造を明らかにし、生理活性に関する情報を調べることにした。

A. albida の根のメタノール抽出物により、各種カラムクロマトグラフィーにより、7種の化合物を単離した。それらの化学構造は一次元および二次元 NMR スペクトルデータ、高分解能マスマスペクトルデータを用いて解析した。その結果、7種の化合物は、オレアナン型トリテルペノイドとエキノシスト酸に複数の糖が結合した新規サポニン類であったことから、これらをアルビドシド A~G とそれぞれ命名した。次にそれらの化合物について、HeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞株および HL60 (ヒト白血病) 細胞株に対する毒性試験を実施したところ、アルビドシド E および F は、細胞毒性を示した。アルビドシド E および F を加えた細胞の顕微鏡観察の結果、これらの物質は、細胞膜に作用して、細胞毒性活性を示していることが分かった。

Acacia albida の樹皮の抽出物について、さらに詳細な成分研究を行った。その結果、先と同様に、トリテルペンサポニン類が単離され、構造解析の結果、アルビドシド類の類縁体と判明したことにより、それぞれをアルビドシド H および I と名付けた。次に得られた物質について、細胞毒性試験を行った。その結果、アルビドシド H は HL60 と HeLa 細胞株に対して、それぞれ、 $12.7 \mu\text{M}$ (IC_{50})、 $20.8 \mu\text{M}$ (IC_{50}) の細胞毒性作用を示した。一方、アルビドシド I は弱い細胞毒性を示した。これらの結果は、アルビドシド A~G において、アグリコンがエキノシスト酸であり、アグリコンの 3 位に糖 (GlcNAc) が結合していることが必要であるということを示す結果と一致した。

2. *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) の根の抽出物より、単離された新しい 2 種の 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides について

ここで取り上げた *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) は、カメルーン北部の乾燥地域に生息する樹木の一つである。また、民間薬として、糖尿病や癌の治療に使用されている。一方、他の *Albizia* 属についてのこれまでの研究では、サポニンおよびフラボノイドが主成分として見出されている。今回は、あまり研究が進んでいない *A. chevalieri* の根の成分に着目し、含有する物質を明らかにすることにした。常法に従い、根の抽出物を溶媒分画ならびに各種カラムクロマトグラフィーにより精製した結果、2つのフラバン配糖体を単離した。それらの化学構造は各種 NMR スペクトルデータ、さらに、UV、IR、CD および質量分析により明らかにした。その結果、二種は、5-デオキシフラバン-3,4-ジオールグルコシド構造を有する新しい物質であったことから、Chevalieriflavanosides A および B と命名した。これらの HL60 細胞に対しては不活性 ($100 \mu\text{M}$) であったが、抗菌活性試験においては、*Staphylococcus aureus* と *Pseudomonas aeruginosa* に対して、 $100 \mu\text{g/disk}$ で弱い抗菌活性を示した。

3. 植物内生糸状菌 *Xylaria* sp V-27 と *X. curta* の代謝産物について

Xylaria sp. V-27 株は山形県の月山の麓で枯れ枝より分離された菌類である。本菌株を玄米を用いた培地に植菌し、4週間培養した。培養後、得られた有機抽出物をシリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーに付して、最も多く含まれる成分の一つとして、セスキテルペンのエレモフィラン骨格を有する既知のインテグリック酸を、さらに、その類縁物質を単離した。類縁物質は、NMR 等を用いた構造解析の結果、インテグリック酸の

新類縁物質で、13,13-ジメトキシインテグリック酸であることが分かった。インテグリック酸は、HIV インテグラーゼ阻害剤として報告されており、他の同様なエレモフィラン骨格を有する既知物質にも様々な生理活性が知られている。そこで、今回単離した二種の生理活性物質に対する情報を得るために、遺伝子変異酵母 [*Saccharomyces cerevisiae* (*zds1* Δ *erg3* Δ *pdr1* Δ *pdr3* Δ)] に対する増殖回復活性試験を行ったところ、有効な活性が見られたことから、この変異酵母に存在するいずれかの Ca^{2+} シグナル伝達経路を阻害していることが示唆された。さらに、両物質の作用を詳細に調べた結果、カルシニューリンを阻害していることが判明した。続いて、RBL-2H3 細胞株を用い、IgE+DNP-BSA や thapsigargin、A23187 などの刺激による β -ヘキソサミニダーゼ (β -HEX) 遊離阻害率を脱顆粒反応を指標として抗アレルギー活性試験を行った。その結果、インテグリック酸は 13,13-ジメトキシインテグリック酸より、 β -HEX の遊離を強く阻害した。おそらく、カルシニューリンを阻害することにより、脱顆粒抑制活性を示したと考えられた。また、活性発現には、インテグリック酸のプロペナル部分が活性に必要であるということをサポートする結果であり、これまでの HIV インテグラーゼ阻害活性と同様にプロペナル部分が重要であることを示すデータであった。

エンドファイト *Xylaria curta* の培養抽出物より、三種の化合物を単離した。これらの化合物について、化学構造を解析したところ、新物質の (3a*S*, 6a*R*)-4,5-dimethyl-3,3a,6,6a-tetrahydro-2H-cyclopenta[b]furan-2-one と既知物質の myrotheciumone A、4-oxo-4H-pyron-3-acetic acid であった。新規化合物は、レタスの種を用いた発芽試験において、レタス幼根に生長抑制活性を示した。宿主植物の有するアレパシー活性を増強する可能性があるかと推測した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、カメルーン産薬用植物の *Acacia albida* と *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) の抽出物と *Xylaria* sp. の培養抽出物に含まれる生理活性物質の単離精製および得られた物質の化学構造解析、生理活性試験について行った研究である。

1. *Acacia albida* (Mimosaceae) に含まれるトリテルペンサポニン類について

A. albida の根のメタノール抽出物により、各種カラムクロマトグラフィーにより、7種の化合物を単離した。それらの化合物は、オレアナン型トリテルペノイドとエキノシスト酸に複数の糖が結合した新規サポニン類であったことから、これらをアルビドシド A~G とそれぞれ命名した。次にそれらの化合物について、HeLa (ヒト子宮頸癌) 細胞株および HL60 (ヒト白血病) 細胞株に対する毒性試験を実施したところ、アルビドシド E および F は、細胞毒性を示した。アルビドシド E および F を加えた細胞の顕微鏡観察の結果、これらの物質は、細胞膜に作用して、細胞毒性活性を示していることが分かった。

Acacia albida の樹皮の抽出物からは、新しいアルビドシド類縁体 H および I が単離された。また、アルビドシド H は HL60 と HeLa 細胞株に対して、それぞれ、12.7 μ M (IC_{50})、20.8 μ M (IC_{50}) の細胞毒性作用を示した。

2. *Albizia chevalieri* (Mimosaceae) の根の抽出物より、単離された新しい2種の 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides について

A. chevalieri の根の成分に着目し、chevalieriflavanosides A および B と命名した 5-デオキシフラバン-3,4-ジオールグルコシド構造を有する新物質を明らかにした。これらの HL60 細胞に対しては不活性 (100 μ M) であったが、抗菌活性試験においては、

Staphylococcus aureus と *Pseudomonas aeruginosa* に対して、100 µg/disk で弱い抗菌活性を示した。

3. 植物内生糸状菌 *Xylaria* sp. V-27 と *X. curta* の代謝産物について

山形県の月山の麓の枯れ枝より分離した *Xylaria* sp. V-27 株の培養物より、セスキテルペンのエレモフィラン骨格を有する既知のインテグリック酸とその新しい類縁物質 13,13-ジメトキシインテグリック酸を明らかにした。これらの両物質は、遺伝子変異酵母に対する増殖回復活性試験より、有効な活性が見られたことから、この変異酵母に存在するいずれかの Ca²⁺ シグナル伝達経路を阻害していることが示唆された。続いて、それぞれの物質の詳細な作用を調査したところ、カルシニューリンを直接阻害していることが判明した。さらに RBL-2H3 細胞株を用いた抗アレルギー活性試験を行った結果、インテグリック酸は 13,13-ジメトキシインテグリック酸より、β-HEX の遊離を強く阻害した。

Xylaria curta の培養抽出物からは、生長抑制活性を有する新規物質を含む、計三種の化合物を単離した。

以上のように、植物および微生物資源より、新規な生理活性物質を単離し、それぞれの化学構造を明らかにした。このような天然有機化合物の取り扱い技術を駆使することにより、申請者の自国においても、十分に新しい研究を展開できるものと期待される。

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（農学）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. **Tchoukoua, A.**, Tabopda, T. K., Uesugi, S., Kimura, K.-I., Kwon, E., Momma, H., Ngadjui, B. T., Koseki, T., Shiono, Y., 2016. Two new 5-deoxyflavan-3,4-diol glucosides from roots of *Albizia chevalieri*. *Magn. Reson. Chem.*, 54, 893–896.
2. **Tchoukoua, A.**, Tabopda, T. K., Uesugi, S., Ohno, M., Kimura, K.-I., Kwon, E., Momma, H., Horo, I., Çalişkan, O. A., Shiono, Y., Ngadjui, B. T., 2017. Triterpene saponins from the roots of *Acacia albida* Del. (Mimosaceae). *Phytochemistry*, 136, 31–38.
3. **Tchoukoua, A.**, Ota, T., Akanuma, R., Ju, Y.-M., Supratman, U., Murayama, T., Koseki, T., Shiono, Y., 2017. A phytotoxic bicyclic lactone and other compounds from endphyte *Xylaria curta*. *Nat. Prod. Res.*, 31, 2113–2118.
4. **Tchoukoua, A.**, Tabopda, T. K., Simo, I. K., Uesugi, S., Ohno, M., Kimura, K.-I., Kwon, E., Momma, H., Shiono, Y., Ngadjui, B. T., 2017. Two new triterpene saponins from the barks of *Acacia albida* Del. (Mimosaceae). *Nat. Prod. Res.*, doi.org/10.1080/14786419.2017.1371156.
5. **Tchoukoua, A.**, Suzuki, T., Ariefita, N. R., Koseki, T., Okawa, Y., Kimura, K.-I., Shiono, Y., 2017. A new eremophilane sesquiterpene from the fungus *Xylaria* sp. V-27 and inhibition activity against degranulation in RBL-2H3 cells. *J. Antibiotics* (Accepted). Publication issue: December 2017, 70, 1129–1132.