

現生する化石針葉樹 *Taxodium distichum* Rich. 球果の
化学的防御に関する研究

2011. 3

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物資源科学専攻
(山形大学)

楠 本 倫 久

目次

第 1 章	緒論	1
第 1 節	スギ科 (Taxodiaceae) の化石針葉樹	1
第 2 節	化石針葉樹の化学成分に関する研究	2
第 3 節	針葉樹球果成分と生物活性に関する研究	4
第 4 節	本論文の目的	5
第 2 章	<i>Taxodium distichum</i> 球果抽出物の生物活性	10
第 1 節	緒言	10
第 2 節	実験方法	11
2. 1	試料	11
2. 2	抽出	11
2. 2. 1	逐次抽出	11
2. 3	抗蟻活性試験	11
2. 3. 1	供試生物	11
2. 3. 2	試験方法	11
2. 4	抗菌活性試験	12
2. 4. 1	供試生物	12
2. 4. 2	試験方法	13
第 3 節	結果および考察	14
3. 1	逐次抽出物	14
3. 2	抗蟻活性	14
3. 2. 1	殺蟻活性	14
3. 2. 2	摂食阻害活性	14
3. 3	抗菌活性	15

3. 3. 1	白色腐朽菌	15
3. 3. 2	褐色腐朽菌	15
3. 3. 3	軟腐朽菌	15
3. 3. 4	カビ菌	16
3. 4	<i>T. distichum</i> 球果の防御機構	16
3. 4. 1	ヤマトシロアリに対する防御	16
3. 4. 2	菌に対する防御	17
第4節	小括	18
第3章	<i>Taxodium distichum</i> 球果へキササン抽出成分の単離	27
第1節	緒言	27
第2節	実験方法	27
2. 1	試料	27
2. 2	ガスクロマトグラフィーによるへキササン抽出物の定量	27
2. 2. 1	GC-FID	27
2. 2. 2	GC-MS	28
2. 3	分画	28
2. 3. 1	分配抽出	28
2. 3. 2	カラムクロマトグラフィーによる化合物の単離	29
2. 3. 2. 1	弱酸性部からの単離	29
2. 3. 2. 2	中性部からの単離	30
2. 3. 2. 3	Ferruginol の単離	30
2. 3. 2. 4	6,7-Dehydroferruginol の合成	30
2. 4	単離成分の構造解析	31
2. 4. 1	GC-MS	31

2. 4. 2	NMR	31
2. 4. 3	X線結晶構造解析	31
2. 4. 4	IR・融点・旋光度	31
2. 4. 5	解析値	32
第3節	結果および考察	40
3. 1	ヘキサン抽出物の成分構成	40
3. 1. 1	ヘキサン抽出物の分画	40
3. 1. 2	ヘキサン抽出物のGC分析	40
3. 1. 3	弱酸性部のGC分析	40
3. 1. 4	中性部のGC分析	41
3. 2	ヘキサン抽出物構成成分の単離と同定	41
3. 2. 1	弱酸性部からの単離化合物	41
3. 2. 2	中性部からの単離化合物	42
3. 2. 3	Ferruginol (2), 6,7-dehydroferruginol (1) の確認	42
3. 2. 4	単離成分の同定	42
3. 2. 4. 1	6,7-Dehydroferruginol (1)	43
3. 2. 4. 2	Ferruginol (2)	43
3. 2. 4. 3	6,7-Dehydroroyleanone (3)	44
3. 2. 4. 4	Sandaracopimaric acid (4)	45
3. 2. 4. 5	Taxodione (5)	46
3. 2. 4. 6	Taxodal (6)	46
3. 2. 4. 7	Taxodone (7)	47
3. 2. 4. 8	Sugiol (8)	47
3. 2. 4. 9	Xanthoperol (9)	48
3. 2. 4. 10	Salvinolone (10)	49

3. 2. 4. 1 1	5,6-Dehydrosugiol (11)	50
3. 2. 4. 1 2	14-Deoxycoleon U (12)	51
3. 3	新規化合物 taxodal (6) の構造決定	52
3. 3. 1	GC-MS および IR 分析	52
3. 3. 2	NMR 分析	53
3. 3. 3	X 線結晶構造解析	54
3. 4	単離成分のヘキササン抽出物中の構成	54
第 4 節	小括	55
第 4 章	<i>Taxodium distichum</i> 球果成分の抗蟻活性	103
第 1 節	緒言	103
第 2 節	実験方法	103
2. 1	抗蟻活性試験	103
2. 1. 1	供試生物	103
2. 1. 2	試験方法	103
第 3 節	結果および考察	104
3. 1	単離成分の殺蟻活性	104
3. 2	単離成分の摂食阻害活性	105
3. 3	<i>T. distichum</i> 球果成分の抗蟻活性	106
3. 4	抗蟻活性とアビエタン型化合物の酸化	106
第 4 節	小括	108

第5章	<i>Taxodium distichum</i> 球果成分の抗菌活性	116
第1節	緒言	116
第2節	実験方法	116
2.1	抗菌活性試験	116
2.1.1	供試生物	116
2.1.2	試験方法	116
第3節	結果および考察	117
3.1	単離成分の抗菌活性	117
3.2	<i>T. distichum</i> 球果成分の抗菌活性	118
3.3	抗菌活性とアビエタン型化合物の酸化	119
第4節	小括	120
第6章	総括	127
引用文献		131
謝辞		140
Summary		141
本研究に関する報告一覧		145

第 1 章 緒論

第 1 節 スギ科 (Taxodiaceae) の化石針葉樹

太古から今日まで生存し続ける生物が存在し、それらは遺存種 (Relic species) と呼ばれる (Fujiyama, 1983)。遺存種は植物にも存在し、木本類ではイチョウ科 (Ginkgoaceae), マツ科 (Pinaceae), カエデ科 (Aceraceae), ソテツ科 (Cycadaceae) などが知られている。現存する多くの針葉樹はこの遺存種に該当し, “生きた化石 (Living fossil)” と呼ばれている。特にスギ科 (Taxodiaceae) に多く存在し, 例えば, メタセコイア (*Metasequoia glyptostoroboides*, 別名: アケボノスギ) やラクウショウ (*Taxodium distichum*, 別名: ヌマスギ) がその代表で, 一般に化石針葉樹 (Fossil conifers) と呼ばれている。メタセコイアは, 白亜紀後期 (約 8000 万年前) の化石として発見されており, またラクウショウやその近縁種は, 新生代第三紀の中新世 (約 2300 万年前から 530 万年前) の地層から化石として多く見つかっている (Lockheart et al. 2000)。さらに, コウヨウザン属 (*Cunninghamia*), セコイアメスギ属 (*Sequoia*), スイショウ属 (*Glyptostrobus*) などのスギ科樹木の化石は, ジュラ紀 (1 億 9500 万年前から 1 億 3500 万年前) まで遡ることができる (高相ら 1997)。

このように, 多くの化石針葉樹を含むスギ科樹木には 10 属 15 種が知られており (高橋 2002), そのうち 9 属約 13 種が北半球の日本, 台湾, 中国などのアジアや北アメリカに分布し, 1 属だけが南半球のタスマニア島に生育している (高相ら 1997)。

第2節 化石針葉樹の化学成分に関する研究

化石針葉樹からは、これまでに多くの特異的な化学成分が報告されている。

ヌマスギ属 (*Taxodium*) から報告されている化合物を Figure 1.1, Figure 1.2 に示す。ラクウショウ (*T. distichum*) の心材からは nezukol, ferruginol, manool (Scheffrahn et al. 1988) などのジテルペンが、枝や心材からは hinokiresinol, agatharesinol などのノルリグナンが単離されている (高橋ら 1996)。球果からは 1969 年に Kupchan らによって royleanone, taxodione, taxoquinone, taxodone, sugiol, 5,6-dehydrosugiol といった数種のアビエタン型ジテルペンが単離され (Kupchan et al. 1969), その後も数種類のジテルペンが単離されている (Yamamoto et al. 2003)。近年では, taxodistine A (別名: 7 β -methoxy-8,11,13-trien-6 α ,11,12-triol, Yamamoto et al. 2003) や taxodistine B (Hirasawa et al. 2007), 4 種の 6,7-dioxyabietane (Hirao et al. 2008) などの新規化合物が発見されている。

また, 同属のタチラクウショウ (*T. ascendens*) の葉からは, トリテルペンの cyclobalanone や cycloneolitsol が単離されている (Ying et al. 2005)。

メタセコイア (*M. glyptostoroboides*) から報告されている化合物を Figure 1.3 に示す。1977 年に榎らによって心材から athrotaxin, hydroxyathrotaxin, agatharesinol, metasequirin-A, metasequirin-B, hydroxymetasequirin-A などを中心とした数種類のノルリグナンが単離されている (Enoki et al. 1977a, 1977b)。心材のモノテルペン類については, 佐藤らによって報告されている (Sato et al. 1966)。また, 新鮮な葉からは quercitrin をはじめとした 9 種類のフラボノイドが確認され (加藤ら 1996), 新鮮な球果および枝葉, 小枝, 幹等から得られた精油成分の研究も報告されている (Fujita et al. 1974; Bajpai et al. 2007)。

コウヨウザン属, セコイアメスギ属, スイショウ属から報告されている化合物を Figure 1.4 に示す。コウヨウザン (*C. lanceolata*) 材油からはセスキテル

ペンの cedrol (Shieh and Sumimoto 1992) が, セコイアメスギ (*S. sempervirens*) 球果からは新規化合物の 20-hydroxyferruginol および 4 種類のアビエタン型ジテルペンである ferruginol, 18-hydroxyferruginol, sugiol, 6 α -hydroxysugiol が報告されている (Son et al. 2005)。また, スイショウ (*G. pensilis*) の枝葉からもアビエタン型新規化合物の glypensin A の単離が報告されている (Zhang et al. 2010)。

このように, スギ科の化石針葉樹からはテルペノイド, ノルリグナン, フラボノイドといった様々な種類の二次代謝物が報告されている。特に, 心材からはノルリグナン, 枝葉からはモノテルペン, セスキテルペン, フラボノイド, 球果からはアビエタン型を中心としたジテルペンが多く単離されている。なお, ラクウショウやメタセコイアの球果や種子が化石として多く発見されていることから, 球果化石由来の抽出物と現存する近縁種との化学成分の比較がおこなわれている。これらの研究は, 地質解析や化学分類学の分野に応用されている (Otto et al. 1997)。

第3節 針葉樹球果の生物活性成分に関する研究

針葉樹球果成分と生物活性との関係について検討した論文としては、ヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) の球果について、福島らはジテルペンおよびトリテルペンが、広食性の害虫であるハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) に対して強い摂食阻害を示すことを報告している (Fukushima et al. 2002)。また、Eberhardtらはカナダトウヒ (*Picea glauca*, 別名: white spruce) およびマツ科の球果に含まれるタンニン類が、樹木の青変病の原因菌である *Ceratocystis coerulescens* および代表的な白色腐朽菌の一種であるスエヒロタケ (*Schizophyllum commune*) に対して抗菌活性を示すことを報告している (Eberhardt and Young, 1994)。さらに、化石針葉樹であるラクウショウ (*T. distichum*) 球果に含まれる ferruginol は、木材腐朽菌や植物病原菌に対して強い抗菌活性を示すことが報告 (中島ら 1980; 河内ら 1991; 松井ら 2001; 小藤田ら 2001) されており、ヤマトシロアリおよびイエシロアリに対しても抗蟻活性を示すことが報告されている (Scheffrahn et al. 1988; 狩野ら 2004)。このように、針葉樹球果に含まれる化学成分に関する報告はこれまでのところ多くないが、球果に存在する様々な成分に多様な生物活性が存在することが知られている。

元来、球果は種子散布などの自己繁殖に必要な不可欠な部位であり、他の生物の攻撃から身を守るために特異的な防御成分を生産すると考えられている (Yano and Huruno 1994; Theis and Lerdau 2003)。よって、化石針葉樹の球果成分とその生物活性を研究することは、森林資源学および森林生態学において非常に重要である。

第4節 本論文の目的

これまで述べたように、スギ科化石針葉樹には特異的な化学成分が多く含まれていることがよく知られている。特にメタセコイアやラクウショウといった代表的なスギ科の化石針葉樹はよく研究され、葉、枝や心材の抽出物から多数の特徴的な成分が報告されている。球果については、生殖や繁殖にとって重要な部位であり、外敵から身を守るために様々な化学成分を生産し、生態防御をおこなっている器官であるが、これまで十分な検討がなされていない。そこで、ラクウショウの球果に含まれる生物活性成分を明らかにし、球果の自己防御作用を化学生態学的な視点から明らかにすることを研究の目的とした。

第2章では、ラクウショウ球果抽出物の構成を明らかにし、それら抽出物のヤマトシロアリおよび8種の菌に対する抽出物の生物活性を検討した。

第3章では、ラクウショウ球果からの活性成分の単離・同定を行うと共にそれら単離成分の構成を明らかにした。

第4章では、第3章で単離された化合物のヤマトシロアリに対する抗蟻活性、単離化合物の化学構造と抗蟻活性との関係、さらには単離化合物の量と活性の関係を検討した。

第5章では、第4章と同様に単離された化合物の抗菌活性、単離化合物の化学構造と抗菌活性との関係、さらには単離化合物の量と活性の関係を検討した。

以上の結果をもとに、ラクウショウ球果の生物活性を明らかにし、化石針葉樹の球果における化学的防御機構について考察した。

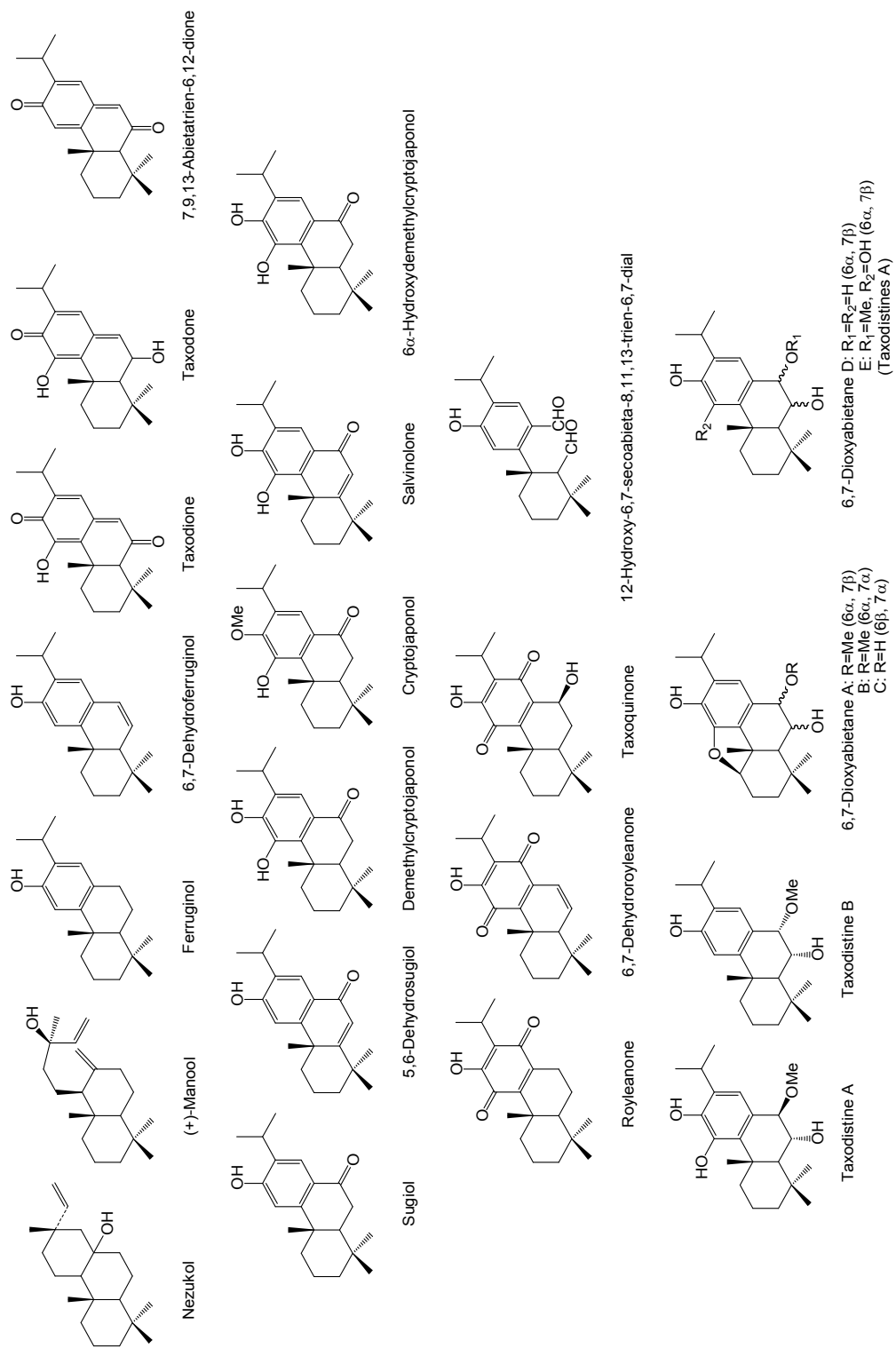
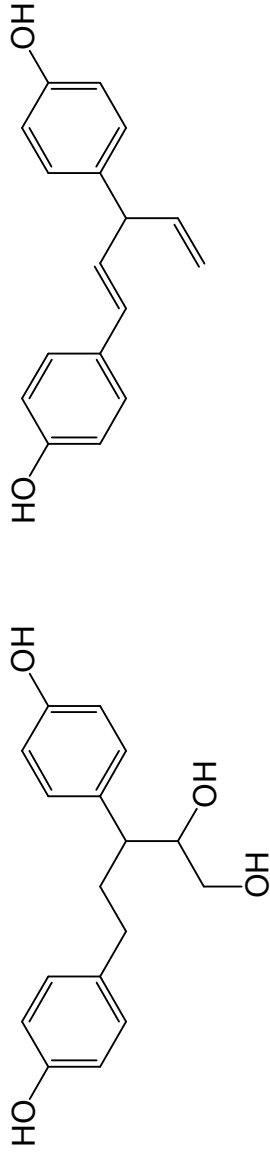


Figure 1.1. Chemical components (diterpenoids) in *Taxodium* species.

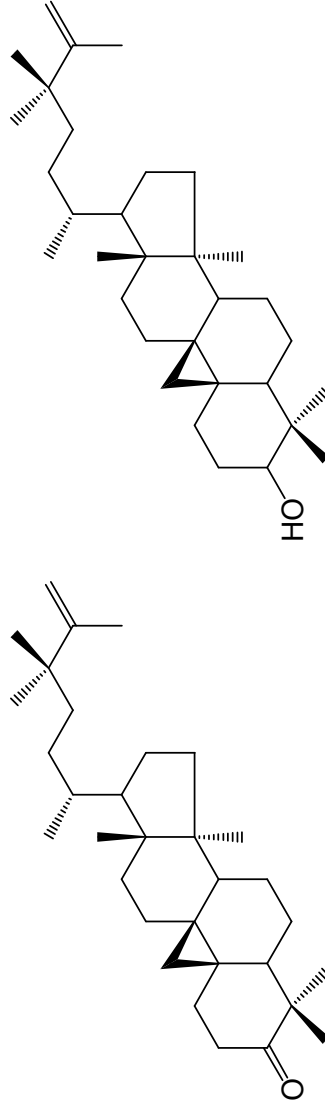
Norlignans



Agatharesinol

Hinokiresinol

Triterpenoids

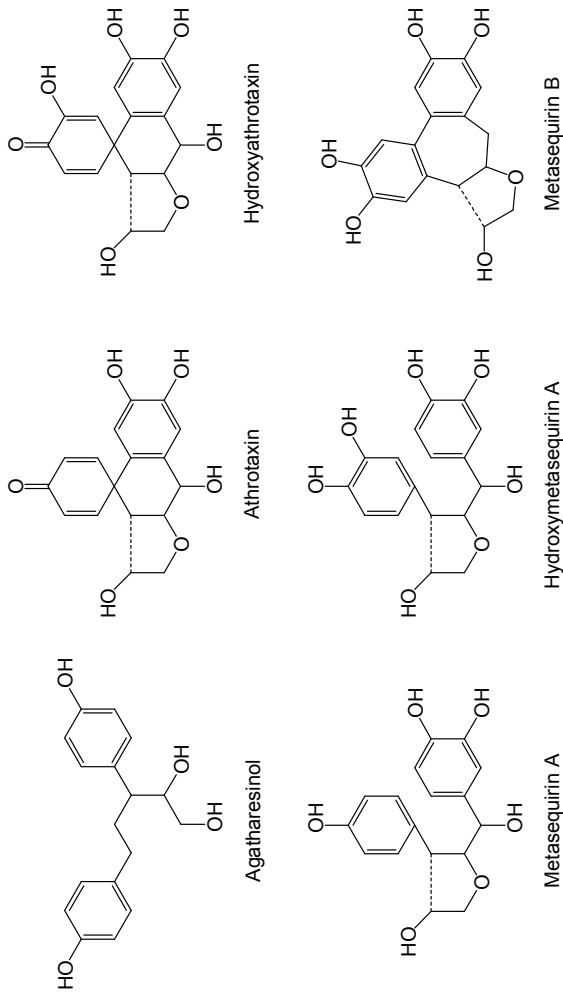


Cyclobalanone

Cycloneolitsol

Figure 1.2. Chemical components (norlignans and triterpenoids) in *Taxodium* species.

Norlignans



Flavonoids

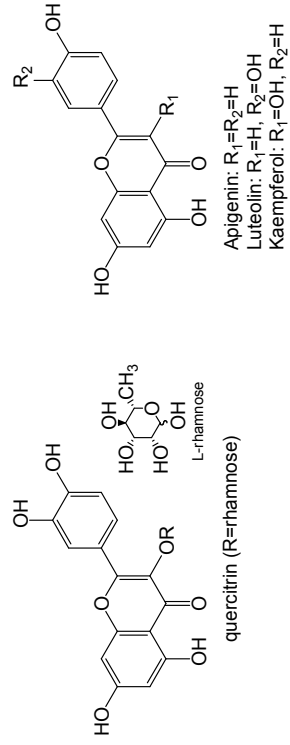
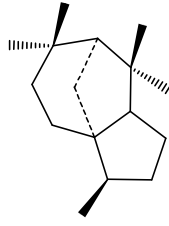


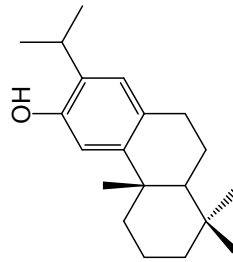
Figure 1.3. Chemical components (norlignans and Flavonoids) in *Metasequoia glyptostroboides*.

Sesquiterpenoid

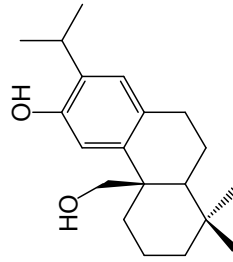


Cedrol

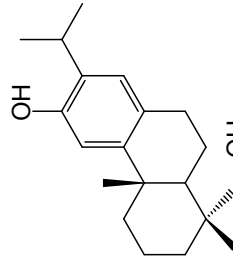
Diterpenoids



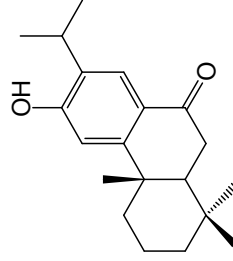
Ferruginol



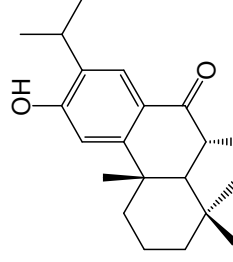
20-Hydroxyferruginol



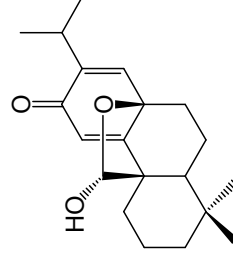
18-Hydroxyferruginol



Sugiol



6 α -Hydroxysugiol



Glypensin A

Figure 1.4. Chemical components (sesqui- and diterpenoids) in *Cunninghamia*, *Sequoia*, and *Glyptostrobooides* species.

第2章 *Taxodium distichum* 球果抽出物の生物活性

第1節 緒言

ラクウショウなどの針葉樹は様々な生物の攻撃から身を守るために特異的な化学成分を生産している。これらの化学成分は主に二次代謝産物であり、フラボノイド、テルペノイド、アルカロイドといった多種多様な成分から成り立っている。このように、多様な化学成分を生産する理由として、樹木の主要な分解者である木材腐朽菌やシロアリの攻撃から身を守るためと考えられる。よって、これまでに木材腐朽菌やシロアリに対する木材成分の生物活性については多数の報告がある (Rudman 1965; Bultman et al. 1979; Cornelius et al. 1997; Chang et al. 1999, 2000; Bläske and Hertel 2001; Cheng et al. 2005, 2008)。

針葉樹の化学的防御は葉や幹に留まらず、生殖器官の一つである球果も特有な化学成分を生産し、他生物に対する化学的防御をおこなっていると考えられている。しかし、針葉樹の球果抽出物を対象にした抗蟻・抗菌活性はほとんど報告されていない。

そこで、ラクウショウ球果の化学的防御を明らかにするため、逐次抽出物（ヘキサン、酢酸エチル、メタノール）を用いて生物活性試験をおこなった。対象生物には、北海道から沖縄まで日本全土に広く分布する (Figure 2.1) ヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* Kolbe), 白色腐朽菌のカワラタケ (*Trametes versicolor*) およびカイガラタケ (*Lenzites betulina*), 褐色腐朽菌のオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) およびキチリメンタケ (*Gloeophyllum trabeum*), 軟腐朽菌であるトリコデルマ (*Trichoderma virens*) およびミロテシウム (*Myrothecium verrucaria*), 代表的なカビ菌の中から不完全菌のペニシリウム (*Penicillium citrinum*) および接合菌のリゾープス (*Rhizopus oryzae*) を用いた。

第2節 実験方法

2.1 試料

山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センター生物多様性保全研究園 (Field Science Center, Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan) にて、落下したラクウショウ球果約 20 g を採集した。球果は、腐朽や風化が進行していないものに限定した。

2.2 抽出

2.2.1 逐次抽出

生重 17.6 g の球果を、フリーズドライ後、ウィリーミルで粉末状にしたサンプルを室温でヘキサン ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$) に浸漬し、7日後に抽出液をろ過、濃縮し、この操作を2度おこないヘキサン抽出物を得た。同様の操作を酢酸エチル (EtOAc)、メタノール (MeOH) でおこない、酢酸エチル抽出物、メタノール抽出物を得た。

2.3 抗蟻活性試験

2.3.1 供試生物

ヤマトシロアリは、山形県鶴岡市内で採集したコロニーを用いた。丸太ごと採集したコロニーは 27 ± 1 °C に保持し、定期的にスプレーで水を与えて常時湿潤に保ち、恒温室内で保存した。

2.3.2 試験方法

抗蟻活性試験では、殺蟻活性および摂食阻害活性を同時におこない、既報のペーパーディスク (Advantec, 8 mm diameter, 1.5 mm thickness, ca. 30 mg disk weight) (以下 PD とする) 法を用いた (Tellez et al. 2002; Ganapaty et al. 2004)。殺蟻活性は死亡数から、摂食阻害活性は PD 減少量から求めた。

試験区の見取り図を Figure 2.2 に示す。サンプルは、それぞれメタノールを用いて 5 mg/ml に調製し、PD に 60 μ l ずつ塗布した。溶媒を 24 時間減圧デシケータ内で気化させ、全てのサンプルがペーパーディスク重に対して 1%濃度

となるよう調整した。乾燥後、それぞれの PD 重を計量し、直径 45 mm のガラスシャーレ内に敷いた海砂 (3 g) 上の中央に設置した。スプレーで砂上を湿潤にし、試験区にヤマトシロアリの職蟻を 10 匹ずつ配置した。溶媒のみを PD に含浸させたものをブランク、PD を与えないものを無給試験 (No feed) として、毎試験ごとに準備した。シャーレは 27 ± 1 °C の暗所に設置し、24 時間ごと、21 日間にわたって死蟻数を計測し、7 日目および 14 日目の平均致死率および標準偏差 (\pm SD) を算出し殺蟻活性の評価とした。試験期間終了後に PD を取り出し、吸引デシケータ内で 24 時間乾燥させ摂食量を計量した。PD 減少量を、24 時間毎にカウントしたシロアリ生存数を全て合計した延べ数で割り、シロアリ 1 匹が 1 日に摂食した PD 量 {Mass (μ g)} を算出した。試験はそれぞれ 5 反復ずつおこなった。摂食阻害活性試験については、ブランクの PD 減少量に対する相対値 {Relative Rate (%)} を算出し活性の評価とした。

2. 4 抗菌活性試験

2. 4. 1 供試生物

木材腐朽菌は JIS (Japan Industrial Standard) 規格 K1571 における「木材防腐剤の性能基準及び試験方法」、かび菌は JIS 規格 Z2119 における「木材の耐朽性試験方法」で定められている以下に示す代表的な菌をそれぞれ用いた。

白色腐朽菌はカワラタケ (*Trametes versicolor*, NBRC:30340) およびカイガラタケ (*Lenzites betulina*, MAFF:420199) を、褐色腐朽菌はオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*, NBRC:30339) およびキチリメンタケ (*Gloeophyllum trabeum*, MAFF:420223) を、それぞれ木材腐朽菌として用いた。軟腐朽菌はトリコデルマ (*Trichoderma virens*, MAFF:645007) およびミロテシウム (*Myrothecium verrucaria*, MAFF:840074) を、不完全菌はペニシリウム (*Penicillium citrinum*, NBRC:6352) を、接合菌はリゾープス (*Rhizopus oryzae*, NBRC:31005) を、それぞれかび菌として用いた。カワラタケ、オオウズラタケ、ペニシリウム、リゾープスは NBRC (Natural Institute of

Technology and Evaluation Biological Resource Center, Tokyo, Japan) より, カイガラタケ, キチリメンタケ, トリコデルマ, ミロテシウムは NIAS (National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, Japan) より購入した。

なお, 購入した菌株は PDA (Potato Dextrose Agar) 培地 (Eiken Chemical Co., Japan) 上で培養し, 4 ± 1 °C の暗所で保存した。活性試験の際には, この保存菌株を PDA 培地上で 26 ± 1 °C 暗所下で培養し, これを試験に用いた。

2. 4. 2 試験方法

抗菌活性試験は, 過去の報告 (Kofujita et al. 2006; Sekine et al. 2009) に基づいておこなった。

まず, 1 mg/ml 濃度となるようにそれぞれの抽出物のアセトンもしくはメタノール溶液を調製した。試験培地には, 直径 88 mm のプラスチックシャーレに 15 ml の PDA を流し込み, 固化し常温となったものを用いた。600 μ l の調製されたサンプルを, クリーンベンチ内でコンラージ棒を用いて培地表面全体に塗布した。十分に溶媒を揮発させ (30 分から 1 時間), 培地表面に対して 10 μ g/cm² となるような試験区を調製した。600 μ l の有機溶媒のみを用いたものをコントロールとした。直径 5.5 mm のコルクボーラーを用いて前培養した菌糸外縁部から菌糸を削り貫き, 調製した培地中央に設置した。それぞれ作成した試験区は 26 ± 1 °C 暗所下, 湿度 70% のインキュベーター内で培養した。カワラタケは約 7 日間, カイガラタケは約 10 日間, オオウズラタケは約 14 日間, キチリメンタケは約 20 日間, トリコデルマは約 2 日間, ミロセシウムは約 20 日間, ペニシリウムは約 5 日間, リゾープスは約 24 時間培養した。それぞれコントロールの菌糸最外縁部がシャーレの淵に届いた時点で試験を終了とした。平均菌糸生長は, それぞれ中央から 4 方向の菌糸直径を計測し算出した。それぞれの試験は 3 反復おこない, 全ての結果において標準誤差 (\pm SE) を算出した。下記に示した式を用いてコントロールに対する平均生長率 (%) を算出し, 菌糸生長阻害から抗菌活性を評価とした。

Average growth rate (%) = $100 \times Da/Db$

Da: Total average of the mycelium diameter of each sample

Db: Average diameter of control mycelium

第3節 結果および考察

3.1 逐次抽出物

ラクウショウ球果の逐次抽出をおこなった結果を (Table 2.1)に示す。ヘキサン抽出物が 10.8%，酢酸エチル抽出物が 3.53%，メタノール抽出物が 1.56%となり，全抽出物は 15.9%となった。また，その構成はそれぞれ 68.0%，22.2%，9.80%となり，ヘキサン抽出物が最も多く，全体の約7割を占めていた。

3.2 抗蟻活性

3.2.1 殺蟻活性試験

逐次抽出物を用いたヤマトシロアリ (*R. speratus*) に対する殺蟻活性試験の結果を Figure 2.3 に示す。また，Table 2.2 に7日目と14日目の結果をまとめた。ヘキサン抽出物は7日目で $12.0 \pm 2.00\%$ ，14日目で $40.3 \pm 4.47\%$ と強い活性が，酢酸エチル抽出物は14日目で $28.0 \pm 4.90\%$ の活性が認められた。これに対してメタノール抽出物は弱い活性を示した。このように，ヘキサン抽出物に強い活性が認められたことから，ラクウショウ球果の低極性成分が殺蟻活性に強く関係していることが示唆された。

3.2.2 摂食阻害活性

逐次抽出物を用いた摂食阻害活性の結果を Table 2.3 に示す。すべての画分に，摂食阻害活性が確認された。中でも，ヘキサン抽出物 (12.3%) および酢酸エチル抽出物 (16.3%) に，非常に強い摂食阻害活性が認められた。このように，ヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物に非常に強い活性が認められたことから，これらを構成する低極性および中極性成分が摂食阻害活性に関係していることが示された。

3. 3 抗菌活性

3. 3. 1 白色腐朽菌

白色腐朽菌のカワラタケ (*T. versicolor*) およびカイガラタケ (*L. betulina*) に対する抗菌活性試験の結果を Figure 2.4 に示す。カワラタケに対しては、ヘキサン抽出物 ($87.0 \pm 2.53\%$) および酢酸エチル抽出物 ($90.6 \pm 4.82\%$) に若干の活性が認められた。カイガラタケに対しても同様に、ヘキサン抽出物 ($86.9 \pm 2.40\%$) および酢酸エチル抽出物 ($88.4 \pm 3.20\%$) に活性が認められた。メタノール抽出物は、カイガラタケに対して $96.4 \pm 2.81\%$ と弱い活性が見られた。このように、いずれの抽出物も白色腐朽菌に対する生長抑制効果は低いものであった。

3. 3. 2 褐色腐朽菌

褐色腐朽菌のオオウズラタケ (*F. palustris*) およびキチリメンタケ (*G. trabeum*) に対する抗菌活性試験の結果を Figure 2.5 に示す。両菌に対して、逐次抽出物すべてに強い抗菌活性が認められた。オオウズラタケに対しては、酢酸エチル抽出物 ($46.3 \pm 2.88\%$) およびヘキサン抽出物 ($47.9 \pm 6.24\%$) が非常に強い抗菌活性を示し、メタノール抽出物 ($70.1 \pm 3.54\%$) においても活性が確認された。キチリメンタケに対しては、ヘキサン抽出物 ($47.2 \pm 7.47\%$) が最も強い抗菌活性を示し、酢酸エチル抽出物 ($58.7 \pm 2.56\%$) およびメタノール抽出物 ($67.2 \pm 6.09\%$) においても活性が認められた。

これらの結果から、逐次抽出物の褐色腐朽菌に対する抗菌活性は、白色腐朽菌を上回る強い活性を示した。特に、ヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が強い活性を示したことから、低極性、中極性成分が活性に関与していることが示唆された。

3. 3. 3 軟腐朽菌

軟腐朽菌のトリコデルマ (*T. virens*) およびミロテシウム (*M. verrucaria*) に対する抗菌活性試験の結果を Figure 2.6 に示す。トリコデルマに対して、ヘ

キサン抽出物 ($63.8 \pm 3.20\%$) および酢酸エチル抽出物 ($66.0 \pm 3.60\%$) に強い抗菌活性が認められた。メタノール抽出物にも $97.2 \pm 2.14\%$ と弱い活性が見られた。ミロテシウムに対しても、ヘキサン抽出物 ($88.1 \pm 9.26\%$) および酢酸エチル抽出物 ($94.7 \pm 2.53\%$) に活性が認められた。

これらの結果から、逐次抽出物の軟腐朽菌に対する抗菌活性は、菌の種類により活性に差が認められ、トリコデルマに対してはヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物の低極性成分に強い活性が認められた。

3. 3. 4 カビ菌

一般的な2種のカビ菌であるペニシリウム (*P. citrinum*) およびリゾープス (*R. oryzae*) に対する抗菌活性試験の結果を Figure 2.7 に示す。両カビ菌に対して全ての逐次抽出物が活性を示した。ペニシリウムに対しては、メタノール抽出物 ($79.1 \pm 4.27\%$) に最も活性が認められ、酢酸エチル抽出物 ($83.2 \pm 3.70\%$) およびヘキサン抽出物 ($87.1 \pm 2.80\%$) にも活性が見られた。リゾープスに対しては、ヘキサン抽出物 ($82.1 \pm 2.13\%$) に最も活性が認められ、メタノール抽出物 ($85.1 \pm 1.42\%$)、酢酸エチル抽出物 ($87.4 \pm 1.54\%$) においても若干の活性が見られた。

これらの結果から、2種のカビ菌に対しては逐次抽出物すべてに活性が認められたが、その活性は強いものではなく、極性による差は認められなかった。

3. 4 *T. distichum* 球果の防御機構

3. 4. 1 ヤマトシロアリに対する防御

球果の防御機構を明らかにするために、抽出物量、殺蟻活性、摂食阻害活性の関係を Figure 2.8 に示した。これによれば、ヘキサン抽出物は抽出物量 (10.8%) が非常に多く、また殺蟻活性 ($40.3 \pm 4.47\%$)、摂食阻害活性 (12.3%) とともに強いことから、量的・質的に最も強い抗蟻活性を有していた。酢酸エチル抽出物は抽出物量 (3.53%) と少なく、殺蟻活性 ($28.0 \pm 4.90\%$)、摂食阻害活性 (16.3%) となり、ヘキサン抽出物に次ぐ活性を示し、量的には影響は少な

いが、質的な面で抗蟻活性に影響していた。これに対して、メタノール抽出物は抽出物量（1.56%）で、殺蟻活性（ $14.0 \pm 2.45\%$ ）、摂食阻害活性（70.8%）と、非常に弱い抗蟻活性画分であった。

以上のことから、ラクウショウ球果のシロアリに対する防御機構は低極性成分を多く含むヘキサン抽出物に寄与することが大きいものと考えられた。

3. 4. 2 菌に対する防御

菌に対するラクウショウ球果の防御機構を理解するために、抗菌活性試験に供した菌について評価した（Table 2.4）。ラクウショウ球果逐次抽出物は、いずれの画分においても褐色腐朽菌に対して最も強い抗菌活性を示した。次に強い活性を示した菌は軟腐朽菌のトリコデルマに対してであり、ヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物で抗菌活性を示した。その他の白色腐朽菌、カビ菌に対しては弱い活性を持つものであった。

抗菌活性と抽出物量についてみると、褐色腐朽菌に対し強い活性を示したヘキサン抽出物が最も多い（10.8%）ことから、ヘキサン抽出物中に含まれると考えられる低極性成分が大きく関与するものと考えられた。

以上のことからラクウショウ球果は、特にセルロース分解菌である褐色腐朽菌に対する強い防御機構を有しているものと考えられた。この他にも、量的な防御機構を考察すれば、ラクウショウ球果の全抽出物量が15%以上であることから、今回弱い活性に留まった他の菌に対しても量的には十分な抗菌活性を有していると考えられた。

第4節 小括

ラクウショウ球果の生物活性を明らかにするため、抽出物の構成、抗蟻活性、抗菌活性について検討した。

落下したラクウショウ球果の逐次抽出をおこなった結果、ヘキサン抽出物が10.8%、酢酸エチル抽出物が3.53%、メタノール抽出物が1.56%で、合計15.9%の収量が得られた。球果抽出物の構成は約70%がヘキサン抽出物であり、テルペノイドなどの低極性の化合物を多く含むことが考えられた。

逐次抽出物を用いたヤマトシロアリに対する抗蟻活性試験（殺蟻および摂食阻害活性）をおこなった。殺蟻活性はいずれの抽出物にも認められたが、ヘキサン抽出物（40%/14日目）で強い活性が認められ、酢酸エチル抽出物の約1.5倍、メタノール抽出物の約3倍であった。摂食阻害活性は、殺蟻活性より強い活性が認められ、特にヘキサン抽出物（12.3%）と酢酸エチル抽出物（16.3%）に強い活性が認められた。抗蟻活性を殺蟻活性と摂食阻害活性の両面から考察すると、ラクウショウ球果の活性は主に摂食阻害活性によるところが大きいと考えられた。

白色腐朽菌（カワラタケおよびカイガラタケ）に対して抗菌活性試験をおこなった結果、両菌に対してヘキサン抽出物が活性を示した。褐色腐朽菌（オオウズラタケおよびキチリメンタケ）に対しては、全ての抽出物に白色腐朽菌を上回る抗菌活性が見られ、ヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が非常に強い抗菌活性を示した。軟腐朽菌（トリコデルマおよびミロテシウム）に対しては、種間で活性に差が見られ、トリコデルマに対してヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が強い活性を示した。一般的なカビ菌（ペニシリウムおよびリゾプス）に対しては、すべての抽出物に活性が認められたがその活性は強いものではなく、極性による差は認められなかった。

抗蟻活性試験および抗菌活性試験の結果より、抽出物全体の約7割を占めるヘキサン抽出物に非常に顕著な生物活性が認められた。このことから、ラクウ

シヨウ球果はヘキサンに溶出する低極性成分を多く含有し、また、それら構成成分が分解者であるシロアリや腐朽菌に対して強い活性を示すことで、自身の化学的防御をおこなっていると考えられた。次章では、強い活性が認められたヘキサン抽出物のテルペノイドの単離同定並びに、これらの構成について述べる。

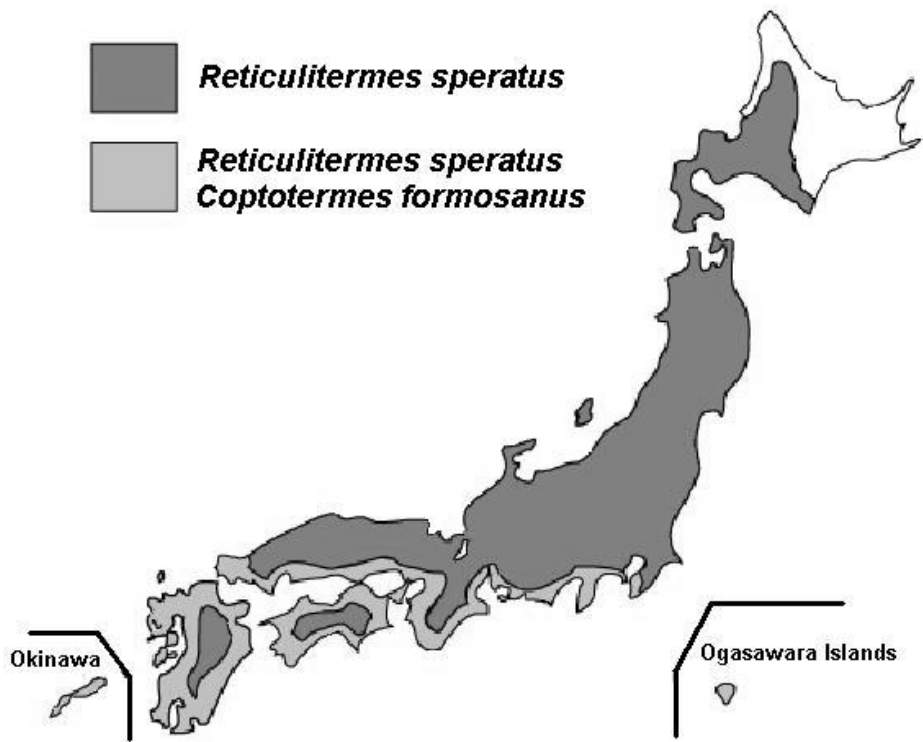


Figure 2.1. Habitat distribution of subterranean termites in Japan (2004).
 Figure was excerpted from The Japan Termite Control Association web page
 (<http://www.hakutaikyo.or.jp/faq.html>).

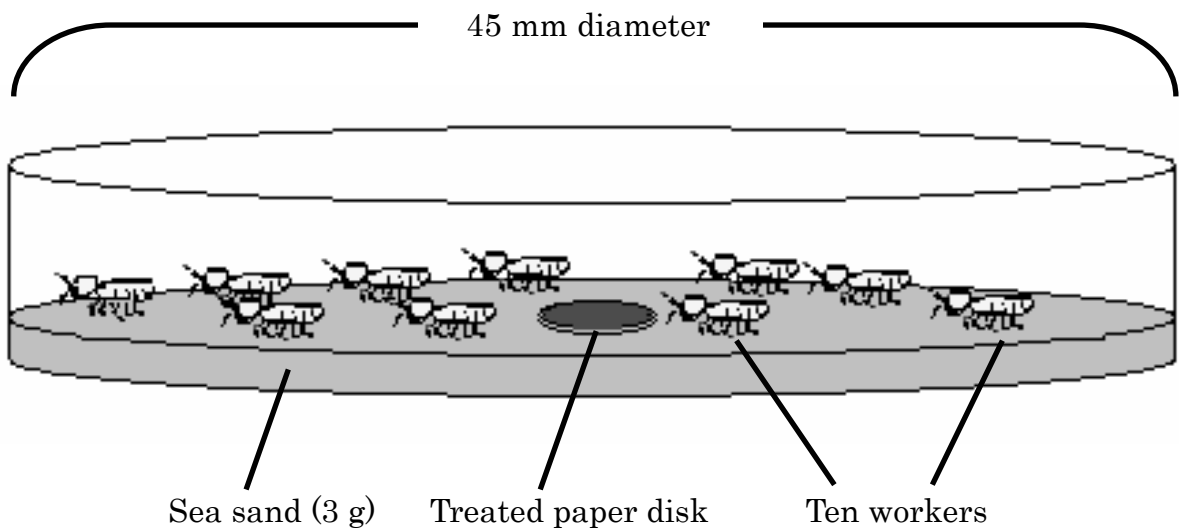


Figure 2.2. Sketch of antitermite activity test.

Table 2.1. The extractive yields of *T. distichum* cones.

Extracts	Yields (%) *	Relative yields (%) **
<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	10.8	68.0
EtOAc	3.53	22.2
MeOH	1.56	9.80
Total	15.9	100

* Yields (%) = 100 x Each extract weight / Dry weight

** Relative yields (%) = 100 x Each extract yield / Total yield of extracts

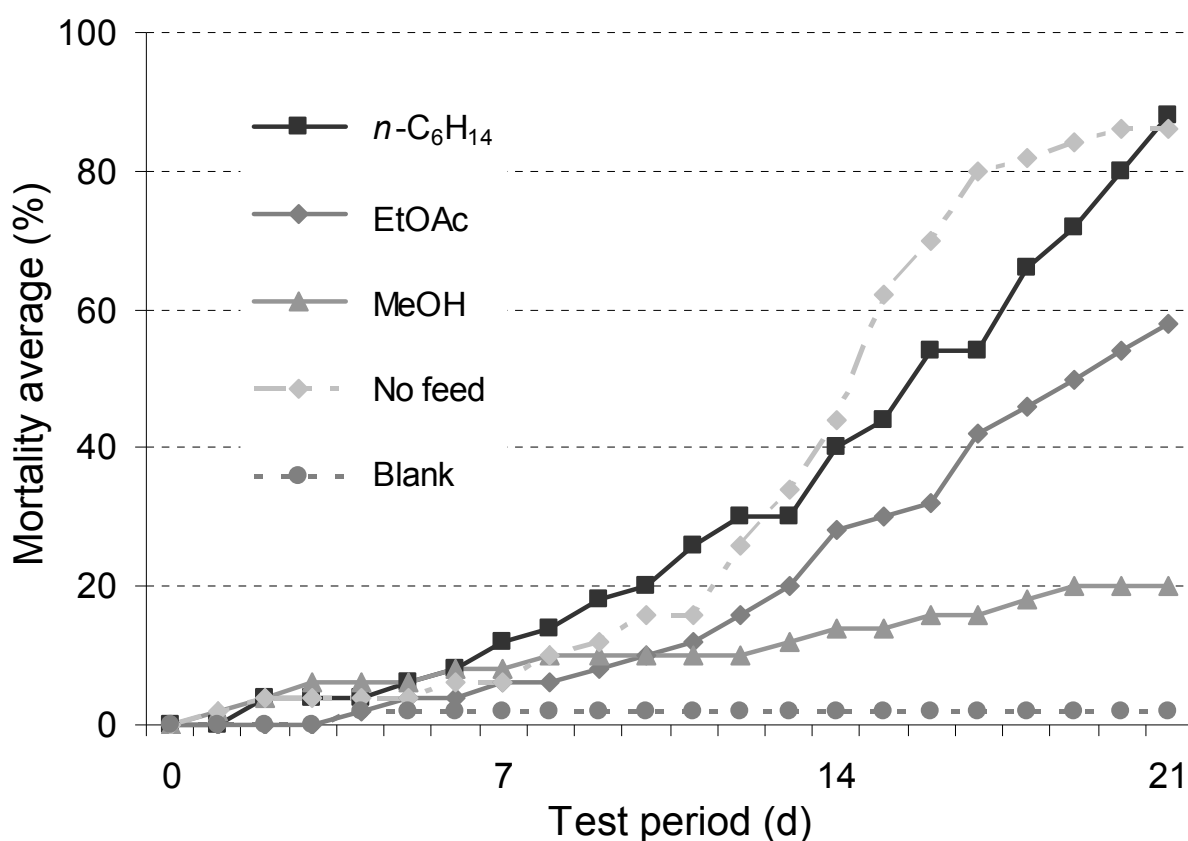


Figure 2.3. Termicidal progress of successive extracts against *R. speratus*.

Table 2.2. Termicidal activities of successive extracts against *R. speratus*.

Extracts	Mortality of termites ^a	
	7 days (%)	14 days (%)
<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	12.0 ± 2.00	40.3 ± 4.47
EtOAc	6.00 ± 4.00	28.0 ± 4.90
MeOH	8.00 ± 3.74	14.0 ± 2.45
No feed	6.00 ± 2.45	44.0 ± 4.00
Blank	2.00 ± 2.00	2.00 ± 2.00

^a Concentration of paper discs (100 x compound weight / paper disk weight) were 1.0%.

Table 2.3. Antifeedant activities of successive extracts against *R. speratus*.

Isolated compounds	Mass of paper fed by termites ^a	
	Mass (µg) ^a	Relative rate (%) ^b
<i>n</i> -C ₆ H ₁₄	3.74 ± 0.66	12.3
EtOAc	4.94 ± 0.51	16.3
MeOH	21.5 ± 2.14	70.8
Blank	30.3 ± 0.92	100

^a The mass of one termite fed per 24 hours (mass loss of paper disc in test period / total number of termites).

^b Relative rates was calculated from blank reading (100 x mass of each sample / mass of blank).

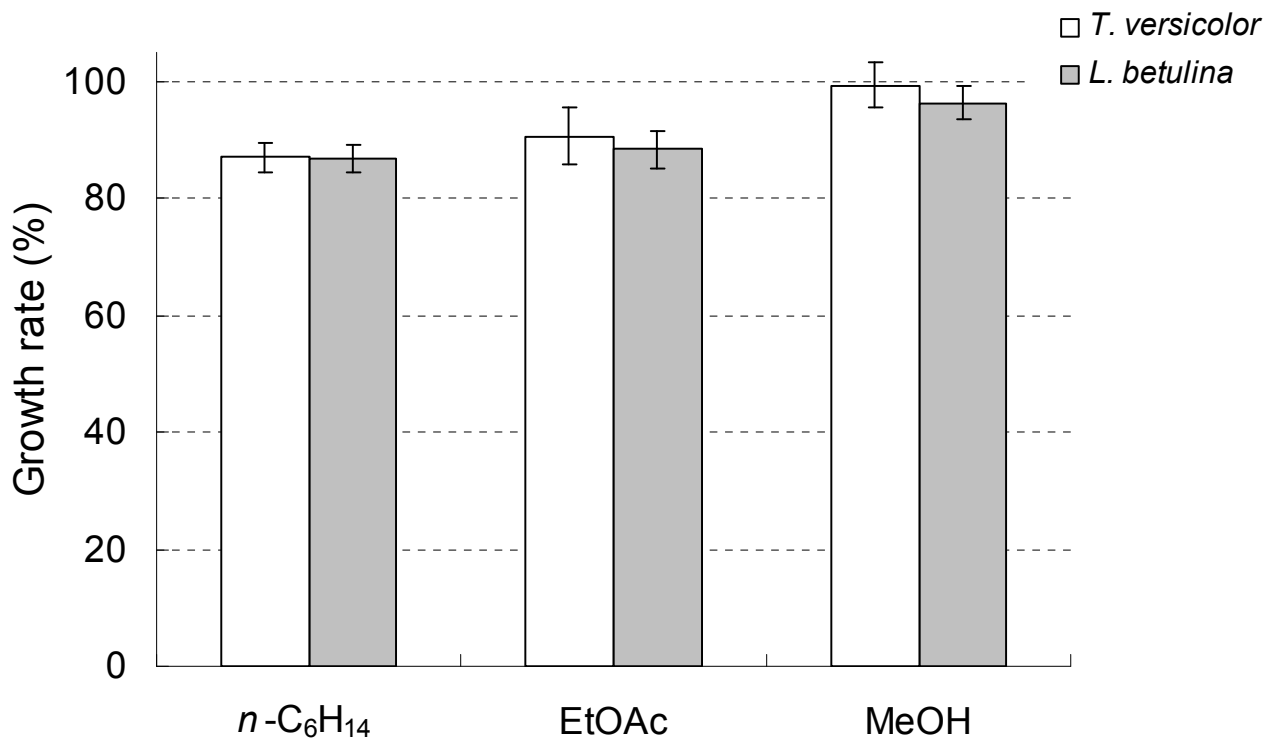


Figure 2.4. Antifungal activities of successive extracts against two white-rot fungi.

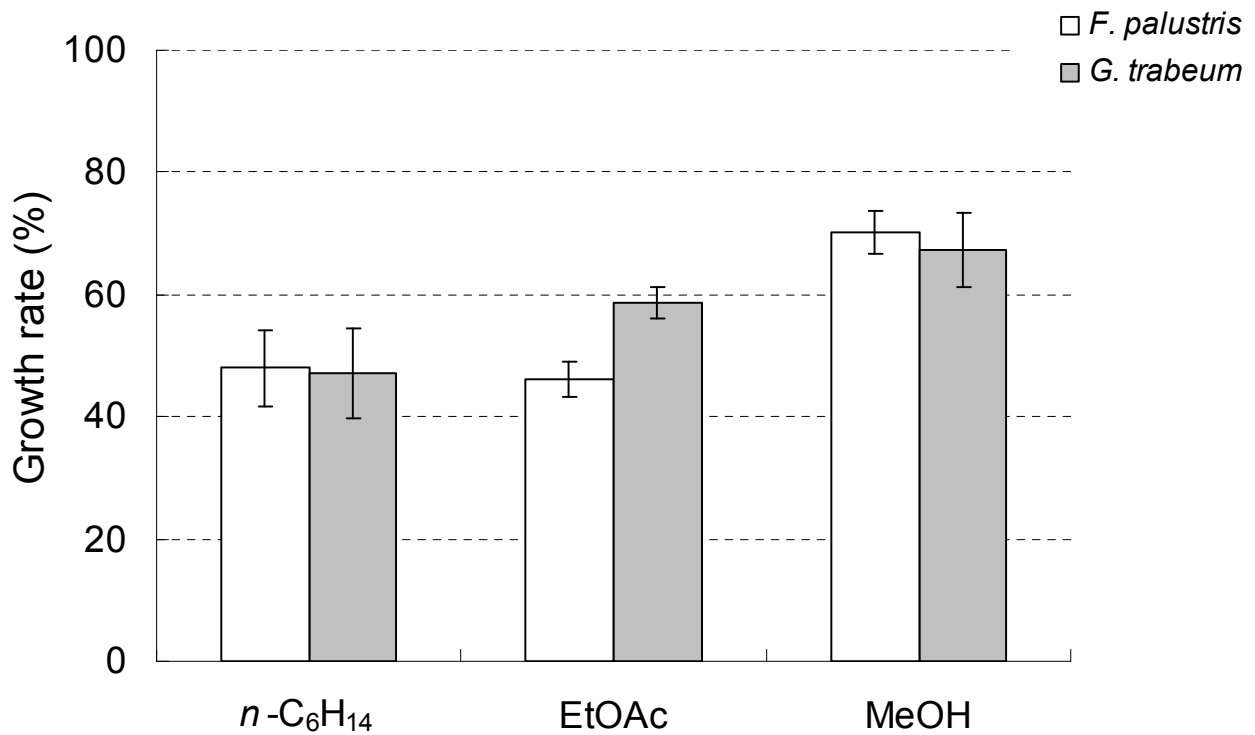


Figure 2.5. Antifungal activities of successive extracts against two brown-rot fungi.

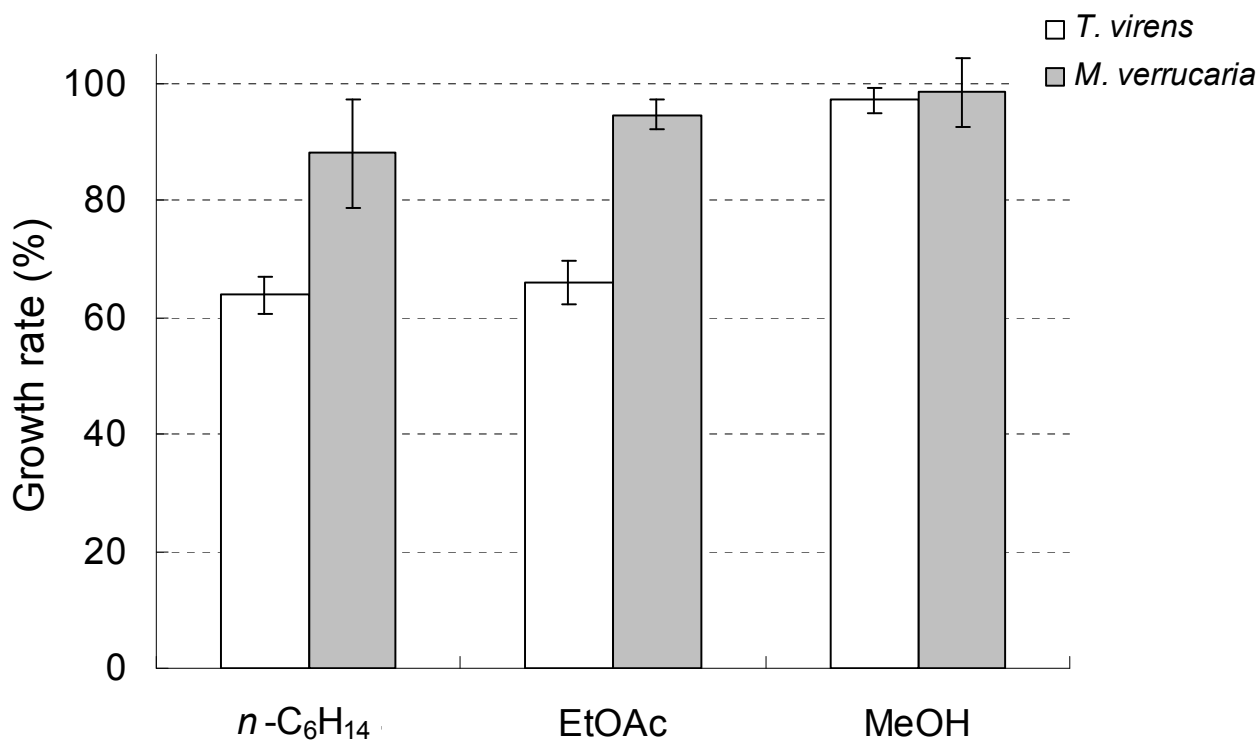


Figure 2.6. Antifungal activities of successive extracts against two soft-rot fungi.

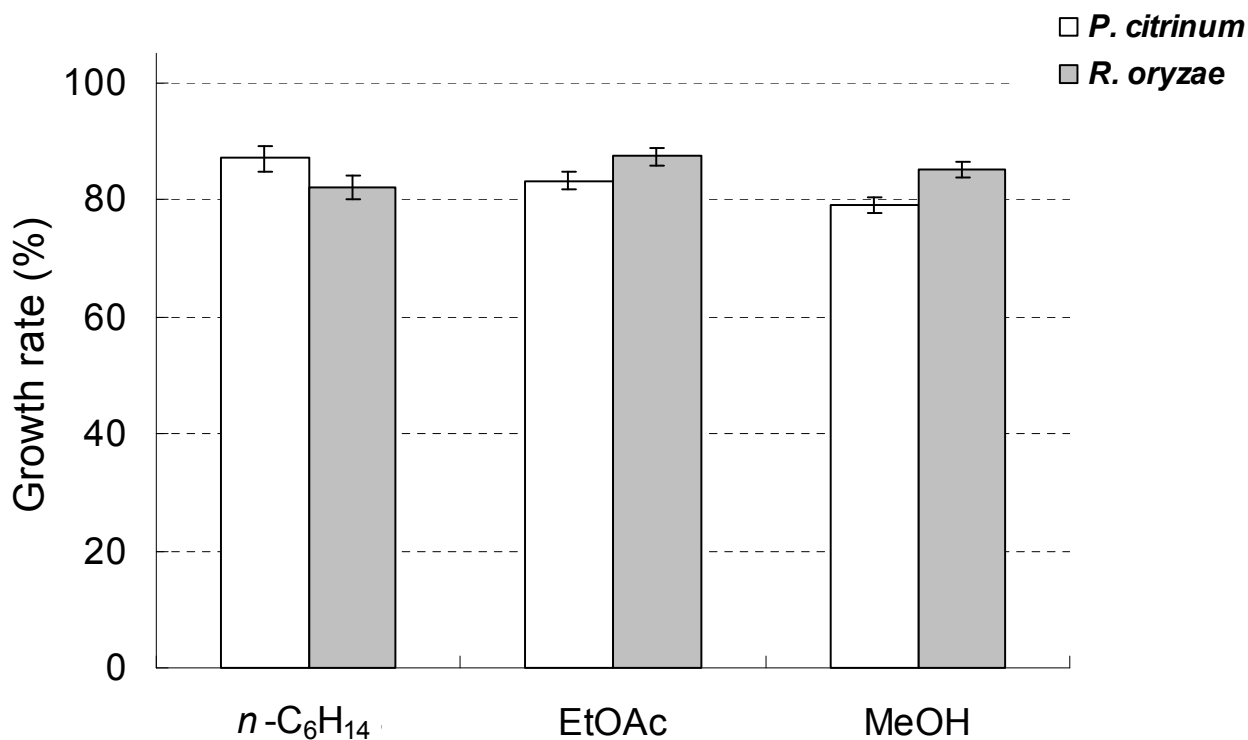


Figure 2.7. Antifungal activities of successive extracts against two non-wood-rot fungi.

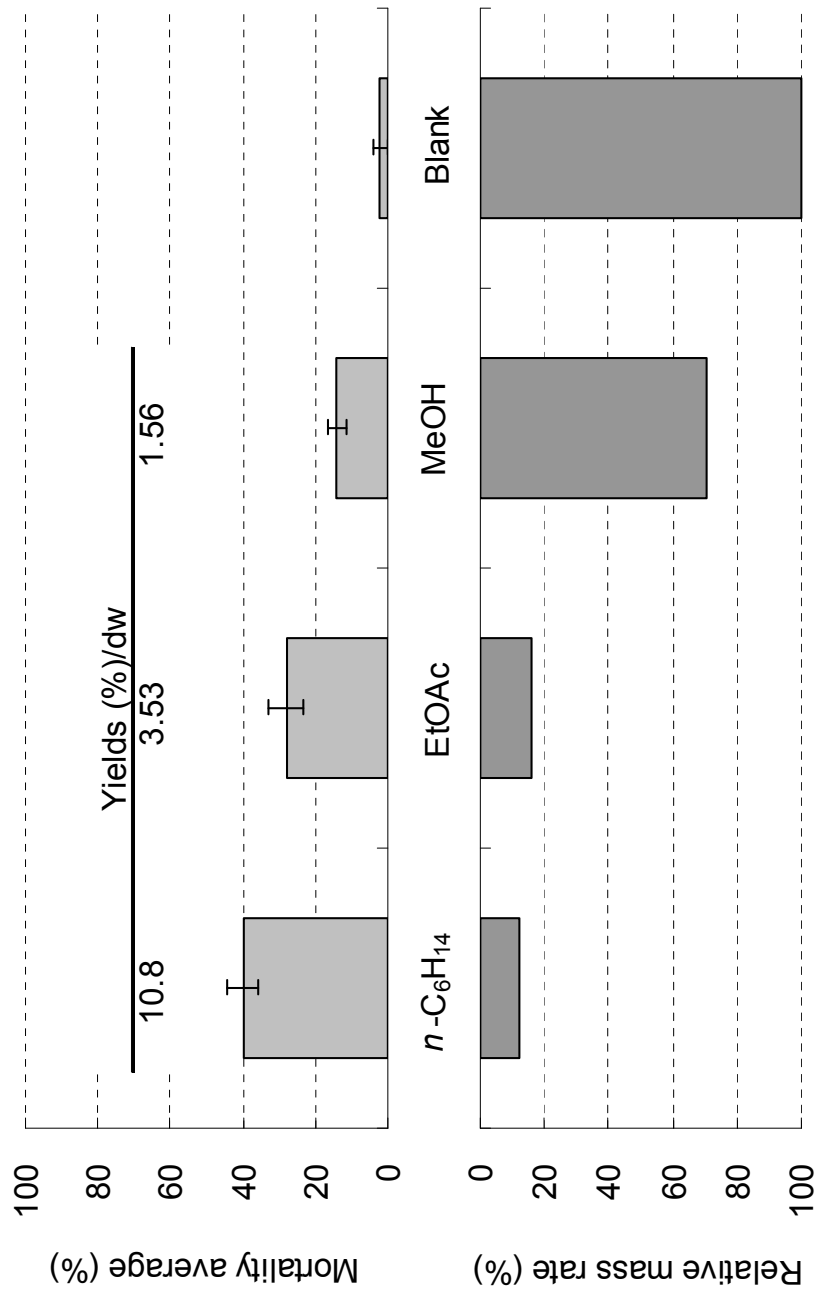


Figure 2.8. Relationship between termicidal activities at 14 day test period and antifeedant activities against *Reticulitermes*

Table 2.4. Evaluation of antifungal activities of successive extracts.

Class	Fungi	Strains	Extracts (15.9%/dw)		
			<i>n</i> -C ₆ H ₁₄ (10.8)	EtOAc (3.53)	MeOH (1.56)
White-rot	<i>Trametes versicolor</i>	NBRC: 30340	*	–	–
	<i>Lenzites betulina</i>	MAFF: 420199	*	*	–
Brown-rot	<i>Fomitopsis palustris</i>	NBRC: 30339	****	****	**
	<i>Gloeophyllum trabeum</i>	MAFF: 420223	****	***	**
Soft-rot	<i>Trichoderma virens</i>	MAFF: 645007	**	**	–
	<i>Myrothecium verrucaria</i>	MAFF: 840074	*	–	–
non-Wood-rot	<i>Penicillium citrinum</i>	NBRC: 6352	*	*	**
	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC: 31005	*	*	*

Each antifungal activity was evaluated from Growth rate (%) as follows:

**** ≤ 50%, *** ≤ 60%, ** ≤ 80%, * ≤ 90%, 80% < ** ≤ 80%, 80% < * ≤ 90%, 90% < –.

第3章 *Taxodium distichum* 球果へキサン抽出成分の単離

第1節 緒言

前章において、ラクウショウ球果へキサン抽出物は最も抽出率が高く(10.8%)、ヤマトシロアリに対する抗蟻活性、木材腐朽菌の褐色腐朽菌および軟腐朽菌のトリコデルマに対して非常に強い抗菌活性を示した。このことから、ラクウショウ球果のへキサンによって抽出される低極性成分が化学的防御に寄与していると考えられた。

よって本章では、ラクウショウ球果へキサン抽出物のGC分析による成分構成の確認、カラムクロマトグラフィーによる活性成分の単離、単離成分の同定およびそれらのへキサン抽出物中の構成を明らかにすることとした。

第2節 実験方法

2.1 試料

球果は、山形県西部に位置する鶴岡市の山形大学農学部附属やまがたフィールド科学センター生物多様性保全研究園のラクウショウ (*T. distichum*) 1個体(第1章と同一の個体)から採集した。風乾されたラクウショウ球果(800 g/dw)より得られたへキサン抽出物(88.6 g)を分画および化合物の単離に用いた。

2.2 ガスクロマトグラフィーによるへキサン抽出物の定量

2.2.1 GC-FID

GC-FID分析はHITACHI G-3000 gas chromatographを用い、以下の条件で分析をおこなった。

定量分析は、NB-1キャピラリーカラム(30 m × 0.32 mm i.d.; 0.4 μm film thickness; GL Sciences, JAPAN)、カラム温度100 °C(1 min 保持)から320 °C(2 min 保持)、10 °C/min 昇温で25分間おこなった。

定性分析(ジテルペンの構成)は、DB-1キャピラリーカラム(30 m × 0.32 mm i.d.; 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)、カラム

温度 100 °C (1 min 保持) から 320 °C (10 min 保持), 5 °C/min 昇温で 55 分間おこなった。

なお, 定量・定性分析の 気化室温度は 230 °C, 検出器温度は 250 °C とした。

定量のための検量には, モノテルペンおよびセスキテルペンは三点検量 (β -caryophyllene : heneicosane = 0.1 : 1.0, 0.5 : 1.0, 1.0 : 1.0) により算出された式 ($y = 0.9415 x - 0.0009$, $R^2 = 0.9987$) を用い, ジテルペンは七点検量 (ferruginol : heneicosane = 0.05 : 1.0, 0.1 : 1.0, 0.5 : 1.0, 1.0 : 1.0, 2.0 : 1.0, 1.0 : 0.3, 1.0 : 0.1) により算出された式 ($y = 2.3889 x + 0.0712$, $R^2 = 0.9982$) を用いた。全テルペノイド量 (%) は個々のテルペン量の和から算出した。

2. 2. 2 GC-MS

GC-MS 分析は SHIMADZU QP-5000 GC-MS を用い, 以下の条件で定性分析をおこなった。

DB-1 キャピラリーカラム (30 m \times 0.32 mm i.d.; 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), カラム温度は GC-FID 分析と同じ条件でおこなった。検出する分子量の幅は 450-50 amu とし, キャリアーガスにはヘリウムを用いた (3.6 ml/min)。化合物の分子量 (MW) は分子イオンピークにより決定し, 分子イオンピークが確認されない場合には NIST12 および NIST62 によるシミュラリティー検索をおこなった。

2. 3 分画

2. 3. 1 分配抽出

ヘキサン抽出物 (88.6 g) はベンゼンに溶解し, 飽和炭酸水素ナトリウム, 10%炭酸ナトリウム, 1%水酸化ナトリウムの順に分液漏斗内で分配抽出をおこない, 順次得られたアルカリ層は塩酸 (pH 2) で酸性化した後, ベンゼンで回収し無水硫酸ナトリウムで脱水した。得られた画分を順番に強酸性部, 中酸性部, 弱酸性部とし, 最後まで残った有機層を中性部とした。

2. 3. 2 カラムクロマトグラフィーによる化合物の単離

2. 3. 2. 1 弱酸性部からの単離

弱酸性部の一部 (11.0 g) を, 展開液にヘキサン・酢酸エチル (100:1-EtOAc only) を用いたシリカゲル (silica gel 60N, spherical 63-210 μm , neutral, Kanto Chemical Co., Japan) カラムクロマトグラフィー (CC) で分画し, 8 画分 (A-H) を得た。C, D および E (566.3 mg, *n*-hexane:EtOAc=100:1) を, ベンゼンを用いて再結晶を繰り返した結果, 赤色針状晶の 6,7-dehydroroyleanone (**3**, 306 mg) を単離した。続いて, G (542 mg, *n*-hexane:EtOAc=100:3) をヘキサンを用いて再結晶を繰り返した結果, 無色針状晶の taxodal (**6**, 44.6 mg) を単離した。F (305 mg, *n*-hexane:EtOAc=100:1-50:1) を, ヘキサン・クロロホルム (3:1-chloroform only) を用いた CC で分画し, 40 画分 (F1-F40) を得た。F9, F10, F11 および F12 (110 mg, *n*-hexane:chloroform=3:1) を, 再度 CC (*n*-hexane:chloroform=3:1) で精製した結果, 濃黄色板状晶の taxodione (**5**, 29.0 mg) を単離した。F (10.2 g) は混合物であったため, 酢酸エチル可溶画分 (H1, 9.84 g) および不溶画分 (H2, 334 mg) に分画した。6 g の H1 を, クロロホルムを展開溶媒に用いた CC に供して 48 画分 (H1-1-H1-48) に分画した。H1-9 から H1-11 (233 mg) をベンゼンを用いて再結晶を繰り返した結果, 淡黄色針状晶の salvinolone (**10**, 123 mg) および白色針状晶の sugiol (**8**, 40.7 mg) を単離した。同様に, H1-16 から H1-19 (461 mg) をベンゼンを用いて再結晶を繰り返した結果, 淡黄色粒状晶の 14-deoxycoleone U (**12**, 183 mg) を単離した。H1-23 から H1-27 (922 mg) を再度 CC (benzene:acetone=9:1) で精製した結果, 淡黄色針状晶の 5,6-dehydrosugiol (**11**, 21.3 mg), 濃褐色針状晶の sandaracopimaric acid (**4**, 11.6 mg) および黄色針状晶の xanthoperol (**9**, 37.6 mg) をそれぞれ単離した。

2. 3. 2. 2 中性部からの単離

中性部の一部 (4.89 g) をヘキサン可溶部 (N1, 3.84 g), 不溶部 (N2, 976 mg) に分画した。N1 にはワックスおよび重合物が含まれていたため, アセトン可溶部(N1-1, 3.76 g), 不溶部 (N1-2, 83.4 mg) に再度分画した。N1-1 を CC (*n*-hexane:EtOAc=9:1) で 18 画分 (N1-1-1–N1-1-18) に分画した。N1-1-6 (1.62 g) には 28.1%の 6,7-dehydroferruginol (**1**), 44.0%の ferruginol (**2**)が含まれていたが, 展開距離が非常に近く, 個々の純粋な化合物の単離は困難と判断した。N1-1-13 および N1-1-14 (231 mg) を再度 CC (*n*-hexane:EtOAc=9:1) で分画した結果, 淡黄色板状晶の taxodone (**7**, 7.8 mg) を単離した。また, アセトン不溶部である N2 を, ステップワイズ (*n*-hexane:EtOAc=4:1 – EtOAc:MeOH=1:1) で CC で分画した結果, ヘキサン:酢酸エチル=1:1 を展開溶媒に用いた際に taxodione (**5**, 109 mg) を得た。

2. 3. 2. 3 Ferruginol (**2**) の単離

中性部フラクションに含まれる ferruginol (**2**) に関しては, 過去の報告 (長濱ら 2000; 芦谷ら 2001) を参考にして, スギ (*C. japonica*) 樹皮から得られたヘキサン抽出物を CC (*n*-hexane:EtOAc=9:1) で分画し単離した。

2. 3. 2. 4 6,7-dehydroferruginol (**1**) の合成

6,7-Dehydroferruginol (**1**) に関しては過去の報告 (松井ら 2004) を参考にして sugiol (**8**) から合成した。65.4 mg の sugiol (**8**) をピリジンと無水酢酸混合溶媒 (1:1) に溶解し定法どおりにアセチル化をおこなった。収率 100%で得られた sugiol acetate をエタノールに溶解し, 冷却しながら水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) を大過剰に投与して 7-hydroxyferruginol acetate を収率 96%で得た。エーテルで分液後, ベンゼンに溶解し, *p*-トルエンスルホン酸 (PTSA) を少量加えて冷却管で還流し, 6,7-dehydroferruginol acetate を収率 36%で得た。分液漏斗を用いて水とベンゼン層を分離し, ベンゼン層を濃縮後に 10 倍濃度の 1%水酸化ナトリウム・メタノール溶液で脱アセチル化をおこな

って 12.1 mg の 6,7-dehydroferruginol (**1**) を収率 18% で得た。

2. 4 単離成分の構造解析

2. 4. 1 GC

単離した化合物の純度は GC-FID および GC-MS で確認した。分析には、上記の HITACHI G-3000 gas chromatograph および SHIMADZU QP-5000 GC-MS を用いた。キャピラリーカラムの種類および測定温度等については 2.3.1 に示した条件でおこなった。なお、分子式の決定には HR-MS (JEOL JMS-SX102A) を用い、電子衝撃イオン化法 (EI+), 加速電圧 10 kV, 質量分解能 3000 で測定した。試料導入には HP-1 キャピラリーカラムを用いた。

2. 4. 2 NMR

化合物の平面構造を推定するために $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DQF-COSY, HMBC, HMQC 等をおこなった。1D および 2D NMR 分析には JEOL JNM-EX400 (^1H 400 MHz/ ^{13}C 100 MHz) spectrometer を用いた。

2. 4. 3 X線結晶構造解析

Taxodal (**6**) の立体構造を決定するために、X線結晶構造解析をおこなった。分析機器および測定結果については以下の通りである。

Rigaku RAXIS RAPID diffractometer, Mo-K α radiation ($\lambda = 0.71075 \text{ \AA}$), graphite monochromator, $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$, F. W. = 302.41, orthorhombic, space group $\text{P}2_12_12_1$ (#19), cell dimensions $a = 6.810(4)$, $b = 11.268(6)$, $c = 21.796(10) \text{ \AA}$, $V = 1672.5(15) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_{\text{calc}} = 1.201 \text{ g/cm}^3$, $\mu(\text{MoK}\alpha) = 0.793 \text{ cm}^{-1}$, 16405 reflections collected, 3815 unique reflections ($R_{\text{int}} = 0.151$), final R indices ($I > 2.0 \sigma(I)$): $R_1 = 0.0464$, $wR_2 = 0.1243$ for 304 variable parameters.

2. 4. 4 IR・UV・融点・旋光度

IR スペクトルの分析には HORIBA FT-710 IR spectrometer を使用した。試料調製には KBr ペレットを用いた。UV 吸光度の測定には SHIMADZU

UV-1600PC spectrometer を用いた。融点の測定には YANAGIMOTO SEISAKUSHO Micro Melting Point apparatus を用いた。旋光度の測定には HORIBA SEPA-300 polarimeter を用いた。

2. 4. 5 解析値

6,7-Dehydroferruginol (**1**) の同定には GC-MS 分析を用い、下記にフラグメントパターンを示した。その他、単離化合物の各種構造解析値は以下の通りである。なお、Taxodal (**6**) の X 線結晶構造解析については 3. 3. 3 に示す。

6,7-Dehydroferruginol (1). Colorless amorphous solid. EI-MS m/z : 284 (M^+ , 50%), 269 (14), 227 (18), 214 (12), 213 (45), 203 (16), 202 (100), 201 (13), 200 (26), 199 (47), 185 (29), 171 (19), 165 (14), 159 (43), 157 (33), 152 (13), 141 (10), 83 (12), (31). HR-MS found 284.2131, $C_{20}H_{28}O$ required 284.2141.

Ferruginol (2). Light brown amorphous solid. IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3413.4, 2960.2, 2927.4, 2867.6, 1706.7, 1646.9, 1508.1, 1457.9, 1419.4, 1234.2, 1166.7, 1002.8, 891.0, 854.3, 769.5; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 0.90 (3H, *s*, 19- CH_3), 0.92 (3H, *s*, 18- CH_3), 1.16 (3H, *s*, 20- CH_3), 1.21 (3H, *d*, $J=6.7$ Hz, 16- CH_3), 1.22 (3H, *d*, $J=6.7$ Hz, 17- CH_3), 1.25 (2H, *m*, 3- CH_2), 1.31 (1H, *d*, $J=2.3$ Hz, 5-CH), 1.37 (2H, *m*, 1- CH_2), 1.46 (2H, *m*, 3- CH_2), 1.58 (2H, *d*, $J=3.4$ Hz, 2- CH_2), 1.66 (2H, *m*, 6- CH_2), 1.73 (2H, *t*, $J=3.4$ Hz, 2- CH_2), 1.84 (2H, *m*, 6- CH_2), 2.16 (2H, *brs*, 2- CH_2), 2.77 (2H, *m*, 7- CH_2), 2.85 (2H, *m*, 7- CH_2), 3.11 (1H, *hept*, $J=7.0$ Hz, 15-CH), 4.61 (1H, *brs*, 12-OH), 6.62 (1H, *s*, 11-CH), 6.82 (1H, *s*, 14-CH); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$): δ 19.2 (6- CH_2), 19.3 (2- CH_2), 21.6 (19- CH_3), 22.5 (16- CH_3), 22.7 (17- CH_3), 24.8 (20- CH_3), 26.8 (15-CH), 29.7 (7- CH_2), 33.3 (18- CH_3), 33.4 (4-C), 37.5 (10-C), 38.9 (1- CH_2), 41.7 (3- CH_2), 50.3 (5-CH), 111.0 (11-CH), 126.6 (14-CH), 127.2 (8-C), 131.4 (13-C), 148.6 (9-C), 150.7 (12-C); EI-MS m/z : 286 (M^+ , 83%), 272 (20), 271 (87), 229 (17), 215 (17), 201 (47), 189 (100), 175 (90), 173 (19), 163 (20), 159 (22), 149 (35),

147 (29), 145 (19), 133 (19), 115 (16), 91 (13), 69 (74), 55 (30); HR-MS found 286.2303, C₂₀H₃₀O required 286.2298.

6,7-Dehydrororoleanone (3). 306 mg. Red needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3360.4, 2961.2, 2925.5, 2910.1, 2869.6, 1663.3, 1642.1, 1625.7, 1551.5, 1457.9, 1377.9, 1329.7, 1298.8, 1272.8, 1253.5, 1164.8, 1106.0, 913.1, 769.5, 756.0, 714.5, 651.8; UV (C=0.05 mg/ml, *n*-hexane) nm: 451.0, 327.0, 255.5; mp: 170-171 °C (from benzene); $[\alpha]^{24.3}_{\text{D}} = -364.8$ ° (C=0.003 g/ml, MeOH); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.98 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.01 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.03 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.21 (3H, *d*, *J*=7.1 Hz, 16-CH₃), 1.22 (3H, *d*, *J*=7.2 Hz, 17-CH₃), 1.25 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.43 (2H, *td*, *J*=13.3 Hz, 3.9 Hz, 1-CH₂), 1.51 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.62 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.71 (2H, *m*, 2-CH₂), 2.14 (1H, *t*, *J*=3.1 Hz, 5-CH), 2.89 (2H, *d*, *J*=3.4 Hz, 1-CH₂), 3.17 (1H, *hept*, *J*=7.1 Hz, 15-CH), 6.46 (1H, *dd*, *J*=9.7 Hz, 3.0 Hz, 6-CH), 6.81 (1H, *dd*, *J*=9.8 Hz, 3.1 Hz, 7-CH), 7.34 (1H, *s*, 12-OH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 15.2 (20-CH₃), 18.7 (2-CH₂), 19.8 (16-CH₃), 20.0 (17-CH₃), 22.8 (19-CH₃), 24.1 (15-CH), 32.6 (18-CH₃), 33.3 (4-C), 35.2 (1-CH₂), 39.3 (10-C), 40.5 (3-CH₂), 52.1 (5-CH), 121.1 (7-CH), 122.6 (13-C), 138.5 (8-C), 139.6 (6-CH), 140.5 (9-C), 151.2 (12-C), 183.5 (11-C), 186.1 (14-C); EI-MS: *m/z* 314 (M⁺, 79%), 299 (27), 281 (6), 271 (21), 258 (16), 253 (16), 246 (15), 245 (68), 244 (74), 243 (23), 232 (100), 231 (45), 229 (22), 217 (23), 213 (25), 201 (15), 187 (25), 185 (19), 129 (18), 128 (21), 115 (32), 91 (24), 83 (41), 69 (30), 55 (75); HR-MS found 314.1906, C₂₀H₂₆O₃ required 314.1883.

Sandaracopimaric acid (4). 11.6 mg. Dark brown needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3401.8, 2929.3, 2850.3, 1695.1, 1465.6, 1382.7, 1276.7, 1176.4, 997.0, 906.4, 860.1; mp: 157-163 °C (from benzene); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.84 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.04 (3H, *s*, 17-CH₃), 1.14 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.21 (3H, *s*, 19-CH₃),

1.26 (2H, *m*, 6-CH₂), 1.36 (2H, *m*, 12-CH₂), 1.54 (2H, *m*, 11-CH₂), 1.60 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.62 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.66 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.77 (1H, *m*, 9-CH), 1.93 (1H, *dd*, *J*=12.4 Hz, 2.5 Hz, 5-CH), 2.21 (2H, *d*, *J*=7.0 Hz, 7-CH₂), 4.89 (2H, *dd*, *J*=10.4 Hz, 1.5 Hz, 16-CH₂), 4.91 (2H, *dd*, *J*=17.6 Hz, 1.5 Hz, 16-CH₂), 5.22 (1H, *s*, 14-CH), 5.77 (1H, *dd*, *J*=17.4 Hz, 10.5 Hz, 15-CH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 15.5 (20-CH₃), 17.0 (19-CH₃), 18.4 (2-CH₂), 18.8 (11-CH₂), 24.9 (6-CH₂), 26.3 (17-CH₃), 34.7 (12-CH₂), 35.7 (7-CH₂), 37.3 (3-CH₂), 37.7 (10-C), 38.0 (13-C), 38.6 (1-CH₂), 47.6 (4-C), 49.1 (5-CH), 50.8 (9-CH), 110.4 (16-CH₂), 129.4 (14-CH), 136.9 (8-C), 149.2 (15-CH), 185.2 (18-COOH); EI-MS *m/z*: 302 (M⁺, 17%), 287 (30), 257 (8), 241 (8), 167 (15), 159 (9), 148 (12), 139 (22), 135 (21), 134 (18), 133 (28), 123 (25), 121 (100), 119 (28), 107 (34), 105 (33), 93 (42), 91 (51), 81 (30), 79 (43), 77 (24), 67 (27), 55 (45); HR-MS found 302.2352, C₂₀H₃₀O₂ required 302.2247.

Taxodione (5). 138 mg. Dark yellow plate. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3322.8, 2935.1, 2361.4, 1669.1, 1612.2, 1594.84, 1354.8, 639.3; mp: 104-109 °C (from chloroform); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.12 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.16 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 17-CH₃), 1.18 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.22 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.27 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.27 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.40 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.61 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.73 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.75 (2H, *m*, 2-CH₂), 2.60 (1H, *s*, 5-CH), 2.93 (2H, *m*, 1-CH₂), 3.07 (1H, *hept*, *J*=7.0 Hz, 15-CH), 6.21 (1H, *s*, 7-CH), 6.88 (1H, *s*, 14-CH), 7.58 (1H, *s*, 11-OH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.5 (2-CH₂), 21.2 (16-CH), 21.6 (17-CH₃), 21.8 (20-CH₃), 22.1 (19-CH₃), 27.1 (15-CH), 32.8 (4-C), 33.3 (18-CH₃), 37.0 (1-CH₂), 42.9 (10-C), 63.0 (5-CH), 125.6 (9-C), 134.0 (7-CH), 136.1 (14-CH), 139.9 (8-C), 145.0 (11-C), 145.3 (13-C), 181.7 (12-C), 201.0 (6-C); EI-MS *m/z*: 314 (M⁺, 100%), 299 (17), 286 (58), 272 (19), 271 (83), 253 (13), 245 (69), 244 (25), 243 (25), 232 (38), 231 (44), 229 (25), 217 (33), 215

(26), 206 (22), 203 (25), 189 (22), 187 (22), 175 (14), 173 (15), 165 (12), 157 (11), 141 (17), 129 (20), 128 (24), 115 (30), 109 (41), 91 (26), 77 (24), 69 (31), 55 (51); HR-MS found 314.1941, C₂₀H₂₆O₃ required 314.1883.

Taxodal (6). 44.6 mg. Colorless needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3230.2, 3012.3, 2969.8, 2948.6, 2861.8, 2775.1, 2751.9, 2503.2, 1689.3, 1666.2, 1614.1, 1581.3, 1469.5, 1461.8, 1425.1, 1400.1, 1346.1, 1276.7, 1253.5, 1211.1, 1172.5, 979.7, 898.7, 763.7; UV (C=0.05 mg/ml, EtOAc) nm: 285.5; mp: 233-234 °C; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -131.4$ ° (C=0.005 g/ml, MeOH); ¹H-NMR (acetone-d₆): δ 1.17 (3H, *s*, 17-CH₃), 1.22 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.26 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.27 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 15-CH₃), 1.55 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.62 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.67 (2H, *m*, 2-CH₂), 2.43 (2H, *ddd*, *J*=13.3 Hz, 13.3 Hz, 4.0 Hz, 3-CH₂), 3.31 (1H, *hept*, *J*=7.0 Hz, 14-CH), 7.16 (1H, *s*, 10-CH), 7.73 (1H, *s*, 13-CH), 9.20 (1H, *s*, 11-OH), 9.68 (1H, *s*, 6-CH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 17.6 (2-CH₂), 20.8 (15-CH₃), 20.8 (16-CH₃), 24.0 (19-CH₃), 25.5 (14-CH), 25.6 (17-CH₃), 28.4 (18-CH₃), 36.9 (3-CH₂), 38.9 (1-CH₂), 43.1 (4-C), 51.4 (9-C), 114.3 (10-CH), 124.8 (7-C), 131.4 (12-C), 136.5 (13-CH), 146.9 (8-C), 158.7 (11-C), 190.2 (6-CHO), 213.2 (5-C); EI-MS: *m/z* 302 (M⁺, 26%), 287 (3), 274 (8), 269 (2), 259 (9), 256 (3), 241 (5), 232 (9), 231 (51), 220 (55), 219 (36), 205 (14), 204 (18), 203 (100), 191 (29), 190 (22), 189 (15), 187 (16), 177 (17), 175 (16), 161 (22), 159 (10), 147 (12), 128 (14), 115 (15), 91 (16), 77 (11), 69 (11), 55 (27); HR-MS found 302.1865, C₁₉H₂₆O₃ required 302.1883.

Taxodone (7). 7.8 mg. Pale yellow plate. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3432.7, 2960.2, 2929.3, 2869.6, 1612.2, 1560.1, 1457.9, 1432.9, 1363.4, 1305.6, 1255.4, 1160.9, 1093.4, 1052.9, 977.7, 908.3, 810.0; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.11 (3H, *d*, *J*=6.8 Hz, 17-CH₃), 1.13 (3H, *d*, *J*=6.8 Hz, 16-CH₃), 1.13 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.19 (3H, *s*, 18-CH), 1.19 (3H, *s*, 19-CH), 1.40 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.43 (2H, *m*, 3-CH₂),

1.54 (1H, *m*, 5-CH), 1.55 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.63 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.65 (2H, *m*, 2-CH₂), 2.89 (2H, *m*, 1-CH₂), 3.04 (1H, *hept*, *J*=6.8 Hz, 15-CH), 4.67 (1H, *brd*, *J*=8.4 Hz, 6β-axial-CH), 6.52 (1H, *d*, *J*=2.7 Hz, 7-CH), 6.79 (1H, *s*, 14-CH), 7.46 (1H, *s*, 11-OH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.8 (2-CH₂), 20.8 (16-CH₃), 21.4 (17-CH₃), 21.7 (20-CH₃), 22.8 (19-CH₃), 26.7 (15-CH), 34.1 (4-C), 36.7 (18-CH₃), 37.6 (1-CH₂), 40.7 (10-C), 43.2 (3-CH₂), 58.0 (5-CH), 70.0 (6-CH), 126.2 (9-C), 130.4 (13-CH), 135.7 (14-CH), 142.0 (11-C), 143.4 (8-C), 149.1 (7-CH), 181.7 (12-C); EI-MS *m/z*: 316 (M⁺, 26%), 301 (7), 298 (8), 283 (9), 273 (12), 255 (9), 245 (13), 242 (12), 233 (19), 231 (21), 229 (24), 220 (43), 219 (37), 217 (24), 215 (30), 205 (33), 203 (27), 191 (25), 177 (28), 173 (21), 128 (27), 115 (33), 95 (21), 91 (35), 83 (31), 77 (28), 69 (50), 55 (100), 53 (26); HR-MS found 316.1957, C₂₀H₂₈O₃ required 316.2039.

Sugiol (8). 40.7 mg. White needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3399.9, 3118.3, 2929.3, 2865.7, 1643.1, 1569.8, 1508.1, 1457.9, 1375.0, 1311.4, 1267.0, 1180.2, 1089.6, 869.7, 775.2, 661.5, 584.3; ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 0.87 (3H, *s*, 18-CH₃), 0.93 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.12 (3H, *d*, *J*=7.1 Hz, 17-CH₃), 1.14 (3H, *d*, *J*=6.9 Hz, 16-CH₃), 1.14 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.17-2.15 (7H, *m*), 2.41-2.57 (2H, *m*), 3.12 (1H, *hept*, *J*=6.9 Hz, 15-CH), 6.78 (1H, *s*, 11-CH), 7.64 (1H, *s*, 14-CH), 10.23 (1H, *s*, 12-OH); ¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ 18.5 (2-CH₂), 21.1 (19-CH₃), 22.2 (16-CH₃), 22.4 (17-CH₃), 23.0 (20-CH₃), 26.0 (15-CH), 32.3 (18-CH₃), 32.8 (4-C), 35.5 (6-CH₂), 37.4 (1-CH₂), 38.9-40.1 (10-C signal was overlapped with DMSO-d₆ signal), 40.8 (3-CH₂), 49.1 (5-CH), 109.3 (11-CH), 122.6 (8-C), 125.0 (14-CH), 132.5 (13-C), 155.8 (9-C), 160.1 (12-C), 196.5 (7-C); EI-MS *m/z*: 300 (M⁺, 69%), 285 (100), 243 (34), 218 (10), 217 (45), 215 (40), 203 (45), 201 (18), 189 (14), 175 (13), 173 (16), 163 (32), 161 (16), 147 (11), 145 (11), 128 (11), 115 (14), 91 (11), 69 (29), 55 (27); HR-MS found

300.2073, C₂₀H₂₈O₂ required 300.2090.

Xanthoperol (9). 37.6 mg. Yellow needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3371.0, 2961.2, 2938.0, 2903.3, 2871.5, 2361.4, 1715.4, 1655.6, 1592.0, 1566.9, 1466.6, 1328.7, 1290.1, 1263.2; mp: 246-249 °C (from benzene); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0.46 (3H, *s*, 19-CH₃), 0.97 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.22 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.28 (2H, *s*, 1-CH₂), 1.28 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 17-CH₃), 1.30 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.31 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.45 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.57 (2H, *m*, 2-CH₂), 2.47 (2H, *d*, *J*=14.8 Hz, 1-CH₂), 2.64 (1H, *s*, 5-CH), 3.22 (1H, *hept*, *J*=7.0 Hz, 15-CH), 6.86 (1H, *s*, 11-CH), 8.04 (1H, *s*, 14-CH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 18.9 (2-CH₂), 22.3 (16-CH₃), 22.3 (17-CH₃), 24.1 (19-CH₃), 27.0 (15-CH), 31.4 (18-CH₃), 35.4 (4-C), 36.3 (1-CH₂), 38.5 (20-CH₃), 39.4 (10-C), 42.0 (3-CH₂), 68.9 (5-CH), 111.2 (11-CH), 127.2 (8-C), 129.8 (14-CH), 134.7 (13-C), 150.6 (9-C), 160.5 (12-C), 179.9 (7-C), 200.1 (6-C); EI-MS *m/z*: 314 (M⁺, 28%), 286 (7), 272 (9), 271 (43), 229 (11), 217 (25), 205 (22), 204 (100), 203 (33), 187 (12), 173 (7), 161 (33), 128 (8), 115 (14), 91 (10), 77 (8), 69 (11), 55 (22); HR-MS found 314.1865, C₂₀H₂₆O₃ required 314.1883.

Salvinolone (10). 123 mg. Pale yellow needle. IR γ_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3373.9, 3250.4, 2960.2, 2869.6, 2361.4, 2341.2, 1625.7, 1583.3, 1506.1, 1456.0, 1371.1, 1314.3, 1260.3, 1178.3, 1048.1; mp: 204-206 °C (from benzene); ¹H-NMR (CDCl₃): δ 1.27 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.30 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 17-CH₃), 1.43 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.43 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.44 (2H, *m*, 3-CH₂), 1.50 (3H, *s*, 20-CH₃), 1.75 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.78 (2H, *m*, 1-CH₂), 1.90 (2H, *m*, 2-CH₂), 1.93 (2H, *m*, 3-CH₂), 2.28 (2H, *m*, 1-CH₂), 3.19 (1H, *hept*, *J*=7.0 Hz, 15-CH), 5.78 (1H, *s*, 11-OH), 6.86 (1H, *s*, 6-CH), 7.15 (1H, *s*, 12-OH), 8.01 (1H, *s*, 14-CH); ¹³C-NMR (CDCl₃): δ 17.6 (2-CH₂), 22.3 (16-CH₃), 22.5 (17-CH₃), 26.9 (15-CH), 27.6 (18-CH₃), 28.2 (19-CH₃), 33.6 (1-CH₂), 35.9

(4-C), 37.9 (3-CH₂), 40.3 (10-C), 111.4 (6-CH), 120.9 (8-C), 125.6 (14-CH), 133.8 (13-C), 141.0 (11-C), 143.8 (9-C), 154.9 (12-C), 157.7 (5-C), 179.7 (7-C); EI-MS *m/z*: 314 (M⁺, 99%), 299 (11), 286 (5), 272 (11), 271 (44), 258 (10), 255 (5), 245 (89), 244 (100), 229 (34), 215 (29), 203 (20), 175 (14), 128 (10), 115 (12), 83 (18), 55 (24); HR-MS found 314.1934, C₂₀H₂₆O₃ required 314.1883.

5,6-Dehydrosugiol (11). 21.3 mg. Pale yellow needle. IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3056.6, 3004.6, 2962.1, 2933.2, 2867.6, 1637.3, 1560.1, 1506.1, 1459.9, 1386.6, 1324.9, 1263.2, 1182.2, 1095.4, 879.4, 651.8; mp: 256 °C (from benzene and acetone); ¹H-NMR (acetone-d₆:MeOH-d₄=9:1): δ 1.18 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.20 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 17-CH₃), 1.21 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.32 (3H, *s*, 19-CH₃), 1.47 (3H, *s*, 20-CH₃), 2.40 (2H, *m*, 1-CH₂), 3.23 (1H, *t*, *J*=1.7 Hz, 15-CH), 6.30 (1H, *s*, 6-CH), 6.95 (1H, *s*, 11-CH), 7.84 (1H, *s*, 14-CH); ¹³C-NMR (acetone-d₆:MeOH-d₄=9:1): δ 19.2 (2-CH₂), 22.6 (16-CH₃), 22.7 (17-CH₃), 27.5 (15-CH), 29.7 (20-CH₃), 32.8 (18-CH₃), 32.8 (19-CH₃), 38.0 (4-C), 38.5 (1-CH₂), 41.0 (3-CH₂), 41.9 (10-C), 111.4 (11-CH), 123.2 (8-C), 124.6 (6-CH), 124.9 (14-CH), 135.0 (13-C), 155.3 (9-C), 160.5 (12-C), 174.5 (5-C), 185.7 (7-C); EI-MS *m/z*: 298 (M⁺, 61%), 283 (25), 255 (32), 242 (14), 241 (16), 230 (35), 229 (84), 228 (42), 214 (18), 213 (100), 199 (34), 187 (30), 185 (10), 171 (11), 170 (12), 165 (15), 157 (13), 152 (11), 128 (11), 115 (12), 83 (10), 55 (23); HR-MS found 298.2021, C₂₀H₂₆O₂ required 298.1934.

14-Deoxycoleon U (12). 183 mg. Pale yellow crystal. IR ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3523.3, 3382.5, 3257.2, 2960.2, 2929.3, 1637.3, 1583.3, 1558.2, 1473.4, 1342.2, 1270.9, 1187.9, 1135.9, 1060.7, 997.0, 908.3, 784.9, 574.7, 462.8; mp: 210-212 °C (from benzene); ¹H-NMR (pyridine-d₅): δ 1.30 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 16-CH₃), 1.30 (3H, *d*, *J*=7.0 Hz, 17-CH₃), 1.64 (3H, *s*, 18-CH₃), 1.68 (3H, *s*,

19-CH₃), 1.95 (3H, *s*, 20-CH₃), 3.64 (1H, *hept*, *J*=7.0 Hz, 15-CH), 7.10 (1H, *s*, -OH), 8.24 (1H, *s*, 14-CH), 8.39 (1H, *s*, -OH); ¹³C-NMR (pyridine-d₅): δ 18.3 (2-CH₂), 22.8 (16-CH₃), 23.1 (17-CH₃), 27.5 (19-CH₃), 27.6 (15-CH), 28.3 (18-CH₃), 28.4 (20-CH₃), 30.6 (1-CH₂), 36.7 (4-C), 36.9 (3-CH₂), 41.4 (10-C), 116.4 (14-CH), 121.6 (8-C), 135.6 (13-C), 140.3 (11-C), 142.4 (9-C), 144.2 (5-C), 144.3 (6-C), 150.2 (12-C), 180.7 (7-C); EI-MS *m/z*: 330 (M⁺, 35%), 315 (6), 287 (12), 274 (9), 262 (16), 261 (94), 260 (100), 248 (19), 247 (12), 245 (28), 233 (15), 232 (12), 231 (15), 219 (14), 217 (14), 191 (8), 128 (8), 115 (9), 82 (15), 77 (8), 69 (8), 55 (17); HR-MS found 330.1818, C₂₀H₂₆O₄ required 330.1834.

第3節 結果および考察

3.1 ヘキサン抽出物の成分構成

3.1.1 ヘキサン抽出物の分画

ラクウショウ落下球果 800 g をヘキサンで抽出し、ヘキサン抽出物 88.6 g (約 11%) を得た。この抽出物を強酸性部、中酸性部、弱酸性部および中性部フラクションに分画し、それぞれ 1.41 g, 1.23 g, 11.2 g, 74.8 g を得た (Figure 3.1)。これらの収率は順に 1.59%, 1.39%, 12.6%, 84.4% であった。つまり、酸性部は 25.6%、中性部は 84.4% であり、酸性部中の 81% を弱酸性部が占めていた。

3.1.2 ヘキサン抽出物の GC 分析

ラクウショウ球果ヘキサン抽出物の GC-FID クロマトグラムを Figure 3.2 に示す。保持時間 3 分から 20 分にかけて 20 のピークが認められ、16 分以降のピークが主体となっていた。GC-MS 分析により各ピークの分子量 (MW) を確認し、それらのピークの構成を Table 3.1 に示す。これに示すように、ピーク 1 (MW 150) はモノテルペンのアルコールと推定され、ピーク 2-4 (MW 220, 202, 220) はセスキテルペンおよびそのアルコールと推定された。さらに、5-20 のピーク (MW 270-330) はジテルペンと推定された。各ピークの相対量を算出すると、モノテルペンが 0.3%、セスキテルペンが 4.0%、ジテルペンが 95.7% となり、95% 以上がジテルペンであることが明らかとなった。また、GC-FID で検出されない成分 (ワックス成分および化合物の重合体等) を算出すると約 30% となり、GC 分析で検出された成分は全体の約 70% であった。

なお、GC-MS 分析でピーク 9 が 6,7-dehydroferruginolo (1)、ピーク 10 が ferruginol (2) と確認され、両者は球果ヘキサン抽出物の 50% を構成していた。

3.1.3 弱酸性部の GC 分析

酸性部中の 81% を占めていた弱酸性部の GC-FID クロマトグラムを Figure 3.3 に示す。保持時間 3 分から 20 分にかけて 30 のピークを確認することができ、16 分以降のピークが組成の主体となっていた。GC-MS で各ピークの分子

量を確認し、その構成を Table 3.2 に示す。ピーク 1 および 2 (MW 154) はモノテルペンのアルコールと推定され、ピーク 3 - 30 (MW 270 - 330) はジテルペンと推定された。ヘキサン抽出物で確認されたセスキテルペン類は確認されず、モノテルペンが 1.6%、それ以外の 98.4%がジテルペンであることが明らかとなった。

また、ヘキサン抽出物中の主要構成成分であった 6,7-dehydroferruginol (1) および ferruginol (2) は 2.2%、6.2%とほとんど認められず、弱酸性部にはラクウショウ球果に特徴的なジテルペンが多く含まれていることが明らかとなった。

3. 1. 4 中性部の GC 分析

中性部の GC-FID クロマトグラムを Figure 3.4 に示す。保持時間 3 分から 20 分にかけて 22 のピークを確認することができ、16 分以降のピークが組成の主体となっていた。ピーク 1 (MW 150) がモノテルペンのアルコール、ピーク 2 - 5 (MW 220, 220, 202, 220) がセスキテルペンおよびそのアルコールと推定され、ピーク 6 - 22 (MW 270 - 330) がジテルペンと推定された。モノ、セスキ、ジテルペンの相対量はそれぞれ 0.1%、3.9%、95.9%であり、テルペノイド全体の約 60%を 6,7-dehydroferruginol (1) および ferruginol (2) が占めていた (Table 3.3)。このように、テルペノイドの構成はヘキサン抽出物とほぼ同じであった。

3. 2 ヘキサン抽出物構成成分の単離と同定

3. 2. 1 弱酸性部からの単離化合物

特徴的なジテルペンが弱酸性部に多く確認されたため、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CC) を用いて分画した。分画スキームを Figure 3.5 に示す。分画の結果、6,7-Dehydroroyleanone (3) が赤色針状晶として 306 mg, taxodal (6) が無色針状晶として 44.6 mg, taxodione (5) が濃黄色板状晶として 29.0 mg, salvinolone (10) が淡黄色針状晶として 123 mg, sugiol (8) が白色針状

晶として 40.7 mg, 14-deoxycoleone U (**12**) が淡黄色粒状晶として 183 mg, 5,6-dehydrosugiol (**11**) が淡黄色針状晶として 21.3 mg, sandaracopimaric acid (**4**) が濃褐色針状晶として 11.6 mg, xanthoperol (**9**) が黄色針状晶として 37.6 mg, それぞれ単離された。

3. 2. 2 中性部からの単離化合物

6,7-Dehydroferruginol (**1**) および ferruginol (**2**) が多く含まれる中性部をカラムクロマトグラフィーで分画した (Figure 3.6)。分画の結果, 6,7-dehydroferruginol (**1**) および ferruginol (**2**) の混合フラクションを得たが, 分離が困難であった。この中性部からは, taxodone (**7**) が淡黄色板状晶として 7.8 mg, 弱酸性部よりすでに単離された taxodione (**5**) が 109 mg 単離された。

3. 2. 3 Ferruginol (**2**) および 6,7-dehydroferruginol (**1**) の確認

Ferruginol (**2**) に関しては, 過去の報告 (長濱ら 2000; 芦谷ら 2001) を参考にして, スギ (*C. japonica*) 樹皮へキササン抽出物を CC (*n*-hexane:EtOAc=9:1) で分画し単離し, 各種機器分析の結果から確認した。6,7-Dehydroferruginol (**1**) に関しては, 既存の報告 (松井ら 2004) に基づいて sugiol (**8**) から合成した。合成経路を Figure 3.7 に示す。6,7-Dehydroferruginol (**1**) の確認は, 先に示した文献 (長濱ら 2000; 芦谷ら 2001) 中の GC-MS スペクトルのフラグメントイオンおよび保持時間との比較によりおこなった。

3. 2. 4 単離成分の同定

CC による弱酸性部および中性部の単離をおこなった結果, 6,7-dehydroroyleanone (**3**), sandaracopimaric acid (**4**), taxodione (**5**), taxodal (**6**), taxodone (**7**), sugiol (**8**), xanthoperol (**9**), salvinolone (**10**), 5,6-dehydrosugiol (**11**), 14-deoxycoleon U (**12**) を単離した。スギ樹皮からの単離および合成で確認した 6,7-dehydroferruginol (**1**), ferruginol (**2**) を加え, 単離および確認された化合物の構造を Figure 3.8 に示す。以下に, それぞれの

化合物の同定について述べる。なお、新規化合物である taxodal (6) の平面構造および X 線結晶構造解析による立体構造の決定に関しては 3.3 で述べることにした。

3.2.4.1 6,7-Dehydroferruginol (1)

6,7-Dehydroferruginol (1) の MS スペクトルを Figure 3.9 に示す。分子イオンピークは 284 (M⁺) を示し、分裂ピークも文献値と一致していた。既存の報告 (松井ら 2004) に基づいて sugiol (8) から 6,7-dehydroferruginol を合成し、確認した。化合物の同定は、先に示した文献 (長濱ら 2000; 芦谷ら 2001) に示された GC-MS スペクトルのフラグメントイオンおよび保持時間との対比により 6,7-dehydroferruginol {IUPAC 名: (4bS)-4b,5,6,7,8,8a-hexahydro-2-isopropyl-4b,8,8-trimethylphenanthren-3-ol} と同定した。

3.2.4.2 Ferruginol (2)

Ferruginol (2) の MS スペクトルを Figure 3.10 に示す。分子イオンピークは 286 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.11) は、3400 cm⁻¹ 付近に水酸基の吸収が、3000 cm⁻¹ 付近に C-H 結合を有するアルカンやアルケンの吸収が確認された。

¹H-NMR (Figure 3.12) では、 δ 0.90 (3H), δ 0.92 (3H), δ 1.16 (3H) にメチル基のシグナル、 δ 3.11 (1H) に芳香環に結合するイソプロピル基のメチル基、 δ 6.62 (1H) および δ 6.82 (1H) にアルケンのプロトンのシグナルが確認された。¹³C-NMR (Figure 3.13) では 20 個の炭素が認められ、低磁場に出現するカルボニル基は確認されなかった。NMR 分析による実測値を、CDCl₃ を用いた文献値 (Tezuka et al. 1998) と比較した結果、すべての測定値が ferruginol の文献値と一致した (Table 3.4)。これらの結果より、アビエタン骨格を有する ferruginol {IUPAC 名: (4bS)-4b,5,6,7,8,8a,9,10-octahydro-2-isopropyl-4b,8,8-trimethylphenanthren-3-ol} と同定した。

3. 2. 4. 3 6,7-Dehydroroyleanone (3)

6,7-Dehydroroyleanone (3) の MS スペクトルを Figure 3.14 に示す。分子イオンピークは 314 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.15) は、3300 cm⁻¹ 付近に水酸基の吸収が、3000 cm⁻¹ 付近に C-H 結合を有するアルカンやアルケンの吸収が確認された。2950 cm⁻¹ および 1400 cm⁻¹ 付近の吸収帯からプロピル基の存在が、1650 cm⁻¹ 付近および 1150 cm⁻¹ の強い吸収からケトン構造の存在が示唆された。融点は 170-171 °C (from benzene) で、文献値 (Tezuka et al. 1998) は 148-153 °C (from MeOH) であった。

¹H-NMR (Figure 3.16) では、 δ 0.98 (3H), δ 1.01 (3H), δ 1.03 (3H) にメチル基のシグナル、 δ 3.17 (1H) に芳香環に結合するイソプロピル基のメチル基、 δ 6.46 (1H) および δ 6.81 (1H) にアルケンのプロトンのシグナルが確認された。¹³C-NMR (Figure 3.17) では 20 個の炭素が認められ、 δ 183.5 および δ 186.0 に 2 個のカルボニル基が確認され、キノン骨格を有する化合物と推定された。DEPT, H-H COSY, C-H COSY により水素と炭素を帰属させ、ロングレンジカップリングを調べた (Figure 3.18)。NMR 分析による実測値を、CDCl₃ を用いた文献値 (Tezuka et al. 1998) と比較した結果、すべての測定値が 6,7-dehydroroyleanone の文献値と一致した (Table 3.5)。これらの結果より、アビエタン骨格を有する 6,7-dehydroroyleanone {IUPAC 名: (4bS)-4b,5,6,7,8,8a-hexahydro-3-hydroxy-2-isopropyl-4b,8,8-trimethylhenthrene-1,4-dione, 別名: 12-hydroxy-abieta-6,8,12-triene-11,14-dione} と同定した。

この化合物はこれまでに、Hensch らによってシソ科 (*Labiatae*) プレクトランサス (*Plectranthus grandidentatus*) からの抽出物として単離 (Hensch et al. 1975) され、近年でもシソ科アリギリ属のサルビア (*Salvia deserta*) の根および茎の抽出物から単離 (Teixeira et al. 1997; Tezuka et al. 1998; Nagy et al. 1999) されている。

3. 2. 4. 4 Sandaracopimaric acid (4)

Sandaracopimaric acid (4) の MS スペクトルを Figure 3.19 に示す。分子イオンピークは 302 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.20) は、2900 cm⁻¹ および 1400 cm⁻¹ 付近にビニル基の吸収が、1700 cm⁻¹ および 1250 cm⁻¹ 付近にカルボキシル基の強い吸収が認められた。融点は 157-163 °C (from benzene) で、文献値 (Yang et al. 1998) は 167-169 °C (from EtOH) であった。

¹H-NMR (Figure 3.21) では、 δ 0.84 (3H) および δ 1.21 (3H) にメチル基のシグナル、 δ 4.89 (2H) および δ 5.77 (1H) にビニル基のシグナルが確認された。¹³C-NMR (Figure 3.22) では 20 個の炭素が認められた。 δ 185.3 にカルボニル基のシグナルが確認され、アルデヒドもしくはカルボキシル基を有する化合物と推定された。DEPT, H-H COSY, C-H COSY により水素と炭素を帰属させた結果、アビエタトリエン骨格とは異なる基本骨格を有する化合物である可能性が示唆された。実測値と合致する化合物を検索した結果、ピマレン骨格を有するジテルペンである可能性が強く示唆されたため、分子量から sandaracopimaric acid と推定し、HMBC 相関を確認した (Figure 3.23)。続いて、実測値を CCl₄ を用いた sandaracopimaric acid の文献値 (Wenkert and Buckwalter 1972) と比較した結果 (Table 3.6)、全ての ¹³C-NMR の実測値を合致でき、18 位のメチル基にカルボキシル基を有する sandaracopimaric acid {IUPAC 名 : (1R,4aR,7R)-1,2,3,4,4a,4b,5,6,7,9,10,10a-dodecahydro-1,4a,7-trimethyl-7-vinylphenanthrene-1-carboxylic acid} であると同定した。

この化合物は、13 位の炭素にビニル基を有し 18 位のメチル基にカルボキシル基が結合した構造を有している。これまでに、ヒノキ科ネズミサシ属のハイビャクシン (*Juniperus chinensis*) の葉 (Fang et al. 1993) や、イチイ属 (*Taxus*) の *Taxus MAIREI* (別名: 紅豆杉) から単離同定されている (Yang et al. 1998)。

3. 2. 4. 5 Taxodione (5)

Taxodione (5) の MS スペクトルを Figure 3.24 に示す。分子イオンピークは 314 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.25) は, 3300 cm⁻¹ 付近に水酸基の吸収, 3000 cm⁻¹ 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm⁻¹ および 1400 cm⁻¹ 付近にプロピル基, 1600 cm⁻¹ 付近にカルボニル基の強い吸収が見られた。融点は 104-109 °C (from chloroform) で, 文献値 (Kupchan et al. 1968) は 115-116 °C (from benzene) であった。

¹H-NMR (Figure 3.26) では, δ 1.12 (3H), δ 1.27 (6H) にメチル基のシグナル, δ 3.07 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 7.57 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のプロトンシグナルが確認された。¹³C-NMR (Figure 3.27) では 20 個の炭素が認められ, δ 181.7 および δ 201.0 にカルボニル基のシグナルが認められ, カルボニル基もしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。DEPT, H-H COSY, C-H COSY により水素と炭素を帰属させ, CDCl₃ を用いた文献値 (Tezuka et al. 1998) と比較した結果, すべての測定値が文献値と一致した (Table 3.7)。よって, 分子量および NMR のスペクトルデータから taxodione {IUPAC 名 : {4bS}-4b,5,6,7,8,8a-hexahydro-4-hydroxy-2-isopropyl-4b,8,8-trimethyl-phenanthrene-3,9-dione, 別名 : 11-hydroxy-7,9-(11),13-abietatriene-6,12-dione} と同定した。

この化合物はアビエタン型のジテルペンであり, 6 位と 12 位にキノン骨格を, 11 位に水酸基を有する構造である。Kupchan らによってラクウショウ球果から新規化合物として単離報告 (Kupchan et al. 1968) され, 近年では 6,7-dehydroroyleanone (3) と同じく, シソ科の植物から多く報告されている (Simões et al. 1986; Tezuka et al. 1998)。

3. 2. 2. 6 Taxodal (6)

単離した化合物 (6) は新規化合物であると推定されたため, 各種構造解析により平面構造を推定し, X 線結晶構造解析により立体構造を決定した。Taxodal

(6) の分析結果, 構造解析の詳細については 3. 3 に記す。

3. 2. 4. 7 Taxodone (7)

Taxodone (7) の MS スペクトルを Figure 3.28 に示す。分子イオンピークは 316 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.29) は, 3400 cm⁻¹ 付近に水酸基の吸収, 3000 cm⁻¹ 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm⁻¹ および 1400 cm⁻¹ 付近にプロピル基, 1600 cm⁻¹ 付近にカルボニル基の強い吸収が見られた。

¹H-NMR (Figure 3.30) では, δ 1.13 (3H), δ 1.19 (6H) にメチル基のシグナル, δ 3.17 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 7.46 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のプロトンシグナルが確認された。¹³C-NMR (Figure 3.31) では 20 個の炭素が確認され, δ 181.7 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから, カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。DEPT, DQFCOSY, HMQC により水素と炭素を帰属させ, HMBC 相関を確認した (Figure 3.32)。実測値を, CDCl₃ を用いた文献値 (Kupchan et al. 1969) と比較した結果, すべての測定値が taxodone の文献値と一致した (Table 3.8)。よって, taxodone {IUPAC 名: (4bS,9S)-5,6,7,8,8a,9-hexahydro-4,9-dihydroxy-2-isopropyl-4b,8,8-trimethylphenanthren-3(4bH)-one} であると同定した。

この化合物は, taxodione (5) の 6 位のカルボニル基が還元され水酸基が結合した構造を有しており, ラクウショウ球果から新規化合物として単離されている (Kupchan et al. 1968)。

3. 2. 4. 8 Sugiol (8)

Sugiol (8) の MS スペクトルを Figure 3.33 に示す。分子イオンピークは 300 (M⁺) であった。IR スペクトル (Figure 3.34) は, 3400 cm⁻¹ 付近に水酸基の吸収, 3000 cm⁻¹ 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm⁻¹ および 1400 cm⁻¹ 付近にプロピル基, 1600 cm⁻¹ 付近にカルボニル基の強い吸収が見られた。

¹H-NMR (Figure 3.35) では, δ 0.87 (3H), δ 0.93 (3H), δ 1.12 (3H), δ 1.14 (6H) にメチル基のシグナル, δ 3.12 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル

基, δ 6.78 (1H) および δ 7.64 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のプロトンシグナル, δ 10.23 (1H) に水酸基のシグナルが確認された。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Figure 3.36) では 19 個の炭素が確認され, δ 196.5 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから, カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。実測値を, DMSO-d_6 を用いた文献値 (Li et al. 2003, Li et al. 2008) と比較した結果, ほぼすべての測定値が sugiol の文献値と一致した (Table 3.9)。C-10 の文献値 δ 39.9 をスペクトルで確認することができなかったが, 他のシグナルが全て一致していることから, DMSO-d_6 の溶媒シグナルと完全に重複しているものと判断した (Figure 3.37)。これらの結果より, sugiol {IUPAC 名: (4aS)-2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethylphenanthren-9(1H)-one} であると同定した。

この化合物はアビエタン型のジテルペンであり, 7 位にカルボニル基を有する構造である。スギ科の針葉樹から多く報告されている (Li et al. 2008)。

3. 2. 4. 9 Xanthoperol (9)

Xanthoperol (9) の MS スペクトルを Figure 3.38 に示す。分子イオンピークは 314 (M^+) であった。IR スペクトル (Figure 3.39) は, 3300 cm^{-1} 付近に水酸基の吸収, 3000 cm^{-1} 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm^{-1} および 1400 cm^{-1} 付近にプロピル基の吸収, 1600 cm^{-1} 付近にカルボニル基の強い吸収, 1250 cm^{-1} 付近にフェノールの強い吸収が見られた。融点は $246\text{-}249\text{ }^\circ\text{C}$ (from benzene) で, 文献値 (Li et al. 2003) は $257\text{-}258\text{ }^\circ\text{C}$ (from EtOAc) であった。

$^1\text{H-NMR}$ (Figure 3.40) では, δ 0.46 (3H), δ 0.97 (3H), δ 1.22 (3H) にメチル基のシグナル, δ 3.22 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 6.86 (1H) および δ 8.04 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のプロトンシグナルが確認された。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Figure 3.41) では 20 個の炭素が認められ, δ 179.9 および δ 200.1 にカルボニル基のシグナルが確認され, カルボニル基もしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。DEPT, C-H COSY により水素と炭

素を帰属させ、HMBC 相関を確認した (Figure 3.42)。実測値を、DMSO- d_6 を用いた xanthoperol の文献値 (Li et al. 2003) で ^{13}C -NMR を中心に比較した結果 (Table 3.10), シグナル全てを対比させることができ、xanthoperol {IUPAC 名: (4a*S*)-1,2,3,4,4a,10a-hexahydro-6-hydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethylphenanthrene-9,10-dione} と同定した。

この化合物は、6 位と 7 位にカルボニル基を有し 12 位に水酸基を有するアビエタトリエン型のジテルペンである。これまでに、スギ (*C. japonica*) 樹皮や (Kondo et al. 1963), ヒノキ科ネズミサシ属のハイネズ (別名: 這杜松 *Juniperus conferta*) の心材 (Doi and Shibuya 1972), マキ属 (*Podocarpus*) の *Podocarpus ferrugineus* の樹皮 (Wenkert et al. 1974) からの単離報告がなされている。

3. 2. 4. 10 Salvinolone (10)

Salvinolone (10) の MS スペクトルを Figure 3.43 に示す。分子イオンピークは 314 (M^+) であった。IR スペクトル (Figure 3.44) は、3300 cm^{-1} 付近にブロードの水酸基の吸収、3000 cm^{-1} 付近にアルカンやアルケンの吸収、2950 cm^{-1} および 1400 cm^{-1} 付近にプロピル基の吸収、1600 cm^{-1} 付近に強いカルボニル基の吸収、1250 cm^{-1} 付近にフェノールの強い吸収が認められた。融点は 204-206 °C (from benzene) で、文献値 (Lin et al. 1989) は 253-254 °C (from MeOH) であった。

^1H -NMR (Figure 3.45) では、 δ 1.43 (6H), δ 1.49 (3H) にメチル基のシグナル、 δ 3.19 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基、 δ 5.78 (1H) に水酸基もしくはアルカン、 δ 6.86 (1H), δ 7.15 (1H), δ 8.01 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のプロトンシグナルが確認された。 ^{13}C -NMR (Figure 3.46) では 20 個の炭素が認められ、 δ 179.7 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから、カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。DEPT, H-H COSY, C-H COSY により水素と炭素を帰属させ、HMBC 相関を確認した

(Figure 3.47)。測定値を CDCl_3 を用いた測定の文献値 (Yamamoto et al., 2003) と比較した結果, ^{13}C -NMR における C-6 および C-14 以外のシグナルを一致させることができた (Table 3.11)。C-H COSY スペクトルの結果 (Figure 3.48) および HMBC 相関より, δ 6.86 のシグナルは δ 111.4 の炭素に, δ 8.01 のシグナルは δ 125.6 の炭素に帰属できることから, 文献値が誤っていると判断し, salvinolone {IUPAC 名: (S)-2,3,4,4a-tetrahydro-5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethylphenanthren-9(1H)-one} であると同定した。

この化合物は, 7 位にカルボニル基を一つ有し, 11 位と 12 位の炭素に水酸基を持つ 5 位-6 位が脱水素されたアビエタトリエン型のジテルペンである。Lin らによってシソ科の *Salvia prionitis* から単離・同定され (Lin et al. 1989), ラクウショウ球果からも確認されている (Yamamoto et al. 2003)。サルビア属からの単離報告が多数ある (Kawazoe et al. 1999; Ulubelen et al. 1999)。

3. 2. 4. 1 1 5,6-dehydrosugiol (11)

5,6-dehydrosugiol (11) の MS スペクトルを Figure 3.49 に示す。分子イオンピークは 298 (M^+) であった。IR スペクトル (Figure 3.50) は, 3000 cm^{-1} 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm^{-1} および 1400 cm^{-1} 付近にプロピル基の吸収, 1600 cm^{-1} 付近に強いカルボニル基の吸収, 1300 cm^{-1} 付近にフェノールの吸収が認められた。融点は $256\text{ }^\circ\text{C}$ (from benzene and acetone) で, 文献値 (Li et al. 2003) は $281\text{-}282\text{ }^\circ\text{C}$ (from EtOAc) であった。

^1H -NMR (Figure 3.51) では, δ 1.21 (3H), δ 1.32 (3H), δ 1.47 (3H) にメチル基由来のシグナル, δ 3.23 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 6.30 (1H) に水酸基もしくはアルカンのシグナル, δ 6.95 (1H) および δ 7.84 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のシグナルが確認された。 ^{13}C -NMR (Figure 3.52) では 20 個の炭素が認められ, δ 185.7 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから, カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。実測値を DMSO-d_6 を用いた文献値 (Li et al. 2003) と比較した結果

(Table 3.12), $^1\text{H-NMR}$ で δ 0.1-0.7, $^{13}\text{C-NMR}$ で δ 0.2-2.4 の誤差が確認されたが, 全てのシグナルを対比させることができたため, GC-MS スペクトルおよび NMR 分析の結果から 5,6-dehydrosugiol {IUPAC 名: (S)-2,3,4,4a-tetrahydro-6-hydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethylphenanthrene-9(1H)-one, 別表記: Δ^5 -dehydrosugiol} と同定した。

この化合物は, salvinolone (**10**) の 11 位の水酸基が脱水された構造で, 7 位の炭素にカルボニル基を有し, 12 位の炭素に水酸基を持つアビエタトリエン型のジテルペンである。Taxodione (**5**) と共に Kupchan らによってラクウショウ (*T. distichum*) の球果から新規化合物として単離報告 (Kupchan et al. 1968) された。近年では, ネズミサシ属 (*Juniperus*) のタイワンビャクシン (*Juniperus formosana* HAYATA) の心材部から単離報告がある (Kuo et al. 1990)。

3. 2. 4. 12 14-deoxycoleon U (**12**)

14-Deoxycoleon U (**12**) の MS スペクトルを Figure 3.53 に示す。分子イオンピークは 330 (M^+) であった。IR スペクトル (Figure 3.54) は, 3500 cm^{-1} 付近, 3300 cm^{-1} 付近に水酸基の吸収, 3000 cm^{-1} 付近にアルカンやアルケンの吸収, 2950 cm^{-1} および 1400 cm^{-1} 付近にプロピル基の吸収, 1600 cm^{-1} 付近にカルボニル基の強い吸収, 1200 cm^{-1} 付近にフェノールの強い吸収が認められた。融点は $210\text{-}212\text{ }^\circ\text{C}$ (from benzene) で, 文献値 (Hueso-Rodriguez et al. 1983) は $205\text{-}207\text{ }^\circ\text{C}$ (from EtOAc and *n*-hexane) であった。

$^1\text{H-NMR}$ (Figure 3.55) では, δ 1.64 (3H), δ 1.68 (3H), δ 1.95 (3H) にメチル基のシグナル, δ 3.64 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 7.10 (1H), δ 8.24 (1H), δ 8.39 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のシグナルが確認された。 $^{13}\text{C-NMR}$ (Figure 3.56) では 20 個の炭素が認められ, δ 180.7 にカルボニル基のシグナルが確認されたことから, カルボニルもしくはアルデヒド基を有する化合物と推定された。実測値を pyridine-d_6 を用いた文献値

(Hueso-Rodríguez et al. 1983) で ^{13}C -NMR を中心に比較した結果、14-deoxycoleon U の文献値と一致した (Table 3.13)。GC-MS スペクトルおよび NMR の分析結果より、14-deoxycoleon U {IUPAC 名: (R)-2,3,4,4a-tetrahydro-5,6,10-trihydroxy-7-isopropyl-1,1,4a-trimethylphenanthren-9(1H)-one, 別名: 6,11,12-trihydroxy-5,8,11,13-abieta tetraen-7-one} であると同定した。

この化合物は、7位の炭素にカルボニル基を有し、6位、11位、12位にそれぞれ水酸基を有するアビエタトリエン型のジテルペンである。Hueso-Rodríguez らによって *Salvia phlomoides* から単離・同定された (Hueso-Rodríguez et al. 1983)。これまでに単離報告は少なく、ラクウショウの球果 (Yamamoto et al. 2003) をはじめ、シソ科の *Salvia phlomoides* や *Salvia broussonetii* の根から数例報告されている (Hueso-Rodríguez et al. 1983; Fraga et al. 2005)。

3. 3 新規化合物 taxodal (6) の構造決定

3. 3. 1 GC-MS 分析および IR 分析

GC-MS のフラグメントイオンのピークを Figure 3.57 に示す。分子イオンピークは 302 (M^+) であった。官能基および基本骨格を推定するために、IR 分析をおこなった。

IR 分析の結果を Figure 3.58 に示す。3230 cm^{-1} 付近に水酸基の吸収、3012 cm^{-1} 、2970 cm^{-1} など 3000 cm^{-1} 付近にアルカンやアルケンなどの C-H 結合の吸収、2861 cm^{-1} および 1400 cm^{-1} にプロピル基の吸収、1689 cm^{-1} に芳香環に結合するカルボニル基の強い吸収、1277 cm^{-1} にフェノールの強い吸収が認められた。なお、2752 cm^{-1} 、1173 cm^{-1} 、980 cm^{-1} の吸収は、芳香環に結合するアルデヒド基のものと推測した。

3. 3. 2 NMR 分析

$^1\text{H-NMR}$ (Figure 3.59) では、 δ 1.17 (3H), δ 1.22 (3H), δ 1.55 (3H) にメチル基のシグナル, δ 3.31 (1H) に芳香環のイソプロピル基のメチル基, δ 7.16 (1H), δ 7.73 (1H), δ 9.68 (1H) に水酸基もしくはベンゼン環のシグナルが認められた。 $^{13}\text{C-NMR}$ の結果を DEPT90 および 135 と共に Figure 3.60 に示す。 δ 190.2 に α - β 不飽和アルデヒド基もしくはカルボニル基のシグナル, δ 213.2 にアルデヒド基と考えられるシグナルが認められた。DEPT から, 7 個の不飽和炭素, 4 個のメチン, 3 個のメチレン, 5 個のメチルが確認された。水酸基, アルデヒド基, カルボニル基を一つずつ有する化合物と考えられたため, これらの結果および分子量より $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$ と分子式を推定し, ジテルペンの類縁化合物であると考えた。 H-H COSY および C-H COSY 分析を用いて水素および炭素の帰属をおこなった結果を Table 3.14 に示し, HMBC 相関を Figure 3.61 に示す。その結果, δ 9.68 (1H, s, H-6) にベンゼン環に結合するアルデヒド基のシグナル, δ 3.31 (1H, hept, $J=7.0$ Hz, H-14), δ 1.27 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-15), δ 1.26 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-16) がイソプロピル基のシグナルであることが確認された。 $^{13}\text{C-NMR}$ で 6 個のアルケン由来のシグナル (δ 158.7, δ 146.9, δ 136.5, δ 131.4, δ 124.8, δ 114.3) が認められ, ベンゼン環を一つ有する化合物と推定された。また, 6 位の水素から 7 位, 8 位, 13 位の炭素に, 13 位の水素から 6 位, 8 位, 11 位, 14 位の炭素に HMBC 相関が示されたことから, アルデヒド基がベンゼン環に結合することが確認された。さらに, 10 位の水素 (1H) が 7 位, 9 位, 11 位の炭素に, 19 位の水素 (3H) が 1 位, 5 位, 8 位, 9 位, 10 位の炭素に, 13 位の水素 (1H) が 6 位, 8 位, 11 位, 14 位の炭素にそれぞれ相関を示したことから, トリメチルーオキシシクロヘキシル環, ベンゼン環およびイソプロピル基の結合が示された。これら構造解析の結果より, Figure 3.8 に示した立体構造 {IUPAC 名: 4-hydroxy-5-isopropyl-2-(1',3',3'-trimethyl-2'-oxocyclohexyl)benzaldehyde} と推定した。

類似化合物を検索したところ、*Cupressus goveniana* 樹皮より単離 (Jolad et al. 1984) された cupresol (5 β -hydroxy-6-oxasugiol) のメチル化による誘導体である B 環が開環した Methyl(R)-2-(1,3,3-trimethyl-2-oxocyclohexyl)-4-hydroxyl-5-isopropylbenzoate (Figure 3.62) と非常に近い $^1\text{H-NMR}$ の測定値を示したが、この誘導体は 7 位の炭素に結合するホルミル基がメトキシカルボニル基に置換された構造を有していた。これらの結果から、X 線結晶構造解析による立体構造の決定をおこなった。

3. 3. 3 X 線結晶構造解析

分析の詳細および測定条件については 2. 4. 3 に示した。X 線結晶構造解析により得られた三次元分子構造図 (ORTEP) を Figure 3.63 に示す。19 位のメチル基の立体配置を R (β) 配置と仮定し ORTEP に反映したが、X 線解析および旋光度測定では R (β) および S (α) の判別をおこなうことができなかった。そのため、Figure 3.61 に示した類似化合物の 19 位のメチル基が R 配置を有していたことから、一般的なアビエタン型ジテルペンと同様に 20 位のメチル基の立体配座を R (β) 配置として示した。

X 線結晶構造解析および 1D, 2D NMR 分析の結果から、taxodal (**6**) を新規化合物として立体構造を決定した。X 線解析の測定結果については、Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) に CCDC 685499 として登録した。

なお、6,7-dehydroferruginol を除いた 11 成分の $^1\text{H-NMR}$ (Table 3.15) および $^{13}\text{C-NMR}$ (Table 3.16) の実測値については一覧に記載した。

3. 4 単離成分のヘキサン抽出物中の構成

単離 12 成分の、ヘキサン抽出物中の構成を GC-FID および GC-MS で確認した (Figure 3.64)。ヘキサン抽出物中の単離 12 成分の構成を Table 3.17 に示す。最も多い成分である ferruginol (**2**) が 39.4%、次いで 6,7-dehydroferruginol (**1**) が 20.4%であり、ジテルペン全体の約 60%を構成

していた。Taxodione (5) は 12.3%, taxodone (7) は 6.19%, salvinolone (10) は 4.80%, 14-deoxycoleon U (12) は 2.08%で, sandaracopimaric acid (4), taxodal (6), 5,6-dehydrosugiol (11) は少量確認された。

なお, 単離された成分は, ラクウショウ球果ヘキサン抽出物に含まれるジテルペンの 87.6%を占めていた。

第4節 小括

第二章において, 収量も多く, 強い生物活性 (木材腐朽菌, 軟腐朽菌, かび菌, ヤマトシロアリ) を示したラクウショウ球果ヘキサン抽出物から化学成分の単離をおこなった。

まず, GC-FID, GC-MS を用いてヘキサン抽出物中のテルペノイド類の構成を調べた。その結果, モノテルペンアルコールが 0.3%, セスキテルペンアルコールが 4.0%, ジテルペンが 95.7%の構成であった。また, ヘキサン抽出物のテルペノイドは約 70%で, 残りの約 30%はワックス成分など GC 分析で検出されない化合物から構成されていると考えられた。

ヘキサン抽出物を分配抽出法により分画すると, 強酸性部 (1.59%), 中酸性部 (1.39%), 弱酸性部 (12.6%), 中性部 (84.4%) に分画された。酸性部では, 弱酸性部が約 80%を占め最も多かった。弱酸性部のテルペノイドの構成は, モノテルペンアルコールが 1.6%, ジテルペンが 98.4%で, 多様なジテルペンから構成されていた。これに対し, 中性部のテルペノイドの構成は, モノテルペンアルコールが 0.1%, セスキテルペンアルコールが 3.9%, ferruginol (36.9%) および 6,7-dehydroferruginol (21.8%) を主要としたジテルペンが 95.9%の構成となっていた。このように, 弱酸性部が多様なジテルペン構成となっていたことから, 弱酸性部の構成成分の単離を試みた。

弱酸性部の分画の結果, 弱酸性部より 6,7-dehydroroyleanone (3), sandaracopimaric acid (4), taxodione (5), taxodal (6), sugiol (8), xanthoperol (9), salvinolone (10), 5,6-dehydrosugiol (11), 14-deoxycoleon U (12) の 9

種類のジテルペンが単離され、この他にも中性部から taxodone (7) が単離された。これらの単離成分はアビエタン骨格の化合物であった。単離された 10 化合物は、1D および 2D NMR 分析を用いた構造解析、既報の文献値と実測値との比較などにより化学構造を決定した。

ヘキサン抽出物の主要なジテルペンである 6,7-dehydroferruginol (1) および ferruginol (2) は、純粋に単離することが困難であったことからスギ樹皮から単離し、6,7-dehydroferruginol (1) は sugiol (8) から合成し確認した。

Taxodal (6) は新規化合物であることから、IR 分析、NMR 分析、X 線結晶構造解析をおこない、また、cupresol メチル化誘導体との比較などから最終的に立体構造を決定した。

最後に、単離 12 化合物のヘキサン抽出物中の構成を確認した。主要構成成分である 6,7-Dehydroferruginol (1) が 20.4%, ferruginol (2) が 39.4% で全ジテルペンの約 60% を占め、taxodione (5) が 12.3%, taxodone (7) が 6.19%, salvinolone (10) が 4.80% , 14-deoxycoleon U (12) が 2.08% , 6,7-dehydroroyleanone (3) が 0.88%, xanthoperol (9) が 0.79%, sugiol (8) が 0.74% となり、sandaracopimaric acid (4), taxodal (6), 5,6-dehydrosugiol (11) については少量確認された。また、これら単離成分はヘキサン抽出物中のジテルペンの約 90% を構成していた。

以上のように、生物活性が認められたラクウショウ球果ヘキサン抽出物は、ferruginol (2) および 6,7-dehydroferruginol (1) を主要ジテルペンとする多様なアビエタン型ジテルペン成分から構成されていることが明らかになった。なお、次章では、これら単離成分の抗蟻活性について明らかにする。

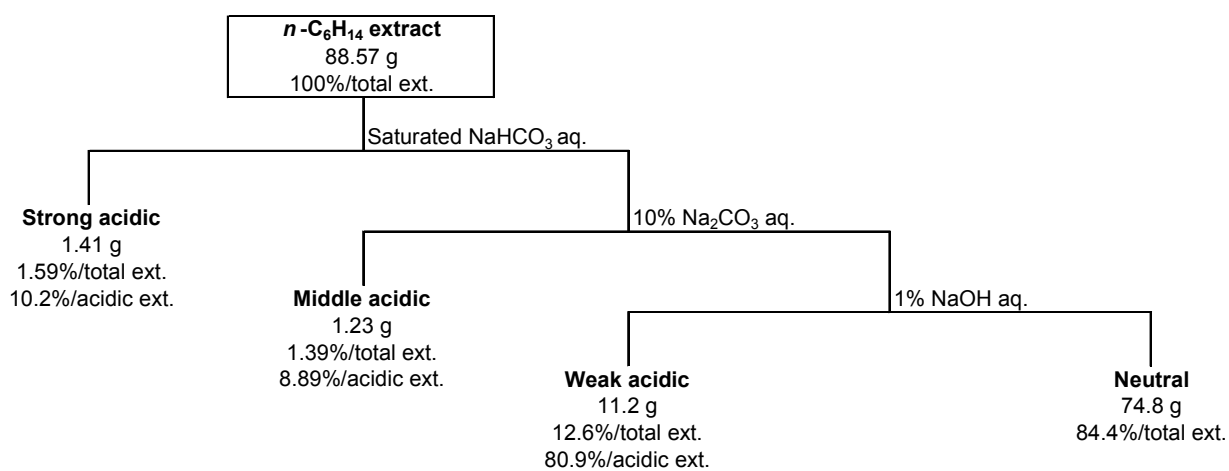


Figure 3.1. Separation scheme of $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ extract of *T. distichum*.

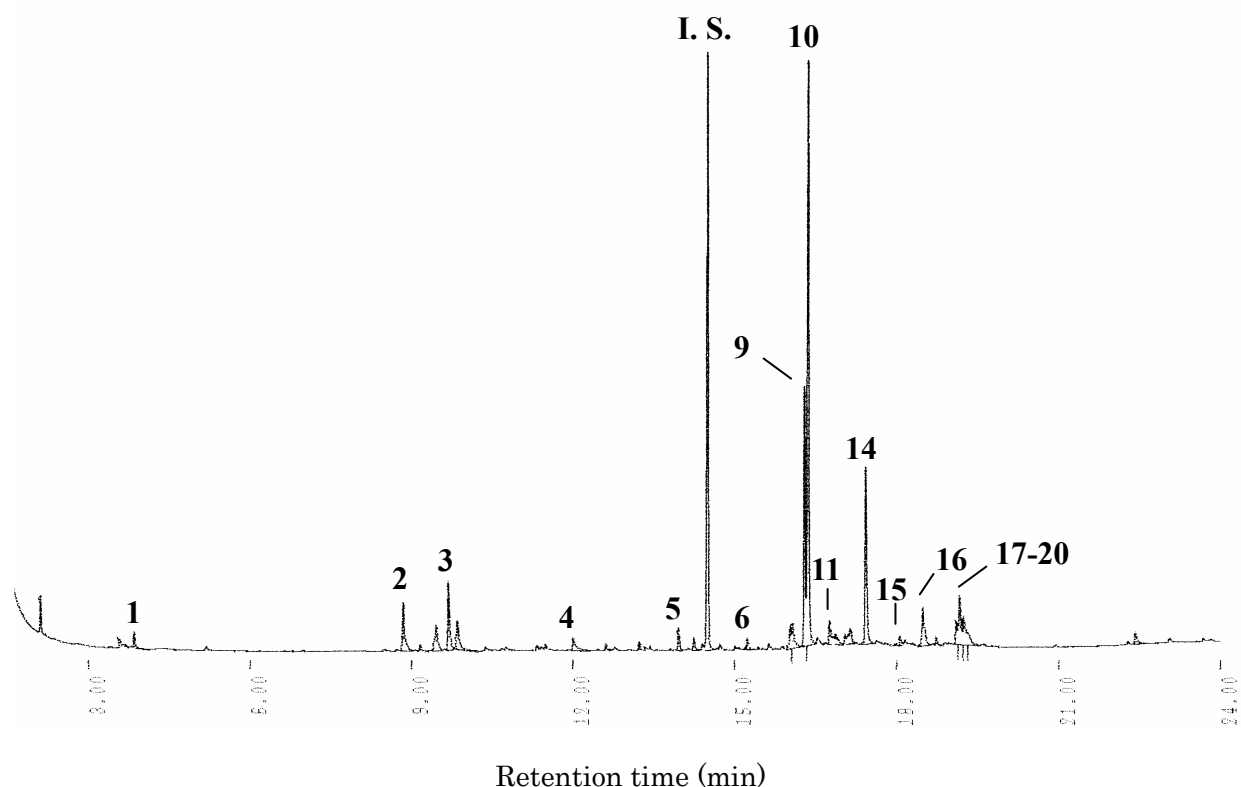


Figure 3.2. GC-FID chromatogram of *n*-C₆H₁₄ extract of *T. distichum* cones.

I.s.: Internal standard (heneicosane). Peak No. refer to **Table 3.1**.

Table 3.1. Terpenoid constituents of *n*-C₆H₁₄ extract of *T. distichum* cones.

	Peak No.	R. t. (min)	Contents (%) *	MW **	Identified compounds
Monoterpene	1	3.9	0.3	150	
Total			0.3		
Sesquiterpene	2	8.9	1.5	220	
	3	9.7	1.9	202	
	4	12.0	0.6	220	
Total			4.0		
Diterpene	5	14.0	2.2	270	
	6	15.2	1.8	286	
	7-8	16.1	4.7	298	
	9	16.3	14.8	284	6,7-dehydroferruginol (1)
	10	16.4	35.2	286	ferruginol (2)
	11	16.8	2.8	314	
	12	16.9	2.1	282	
	13	17.2	2.7	300	
	14	17.4	12.3	314	
	15	18.1	1.6	316	
	16	18.5	4.7	314	
	17-20	19.2	10.9	330	
Total			95.7		
Total terpene			100.0		

* Contents were calculated according to substitute each AREA ratio of GC-FID for calibration curve mentioned below. Mono- and Sesquiterpene: AREA ratio between β -caryophyllene and heneicosane (x-axis); $y = 0.9415x - 0.0009$ ($R^2 = 0.9987$). Diterpene: AREA ratio between ferruginol and heneicosane (x-axis); $y = 2.3889x + 0.0712$ ($R^2 = 9982$). ** Molecular weights (MW) were determined by molecular ion peak according to GC-MS analysis. When molecular ion peak could not find because of its lower concentration, MW were supposed by similarity retrieval using NIST12 and NIST62.

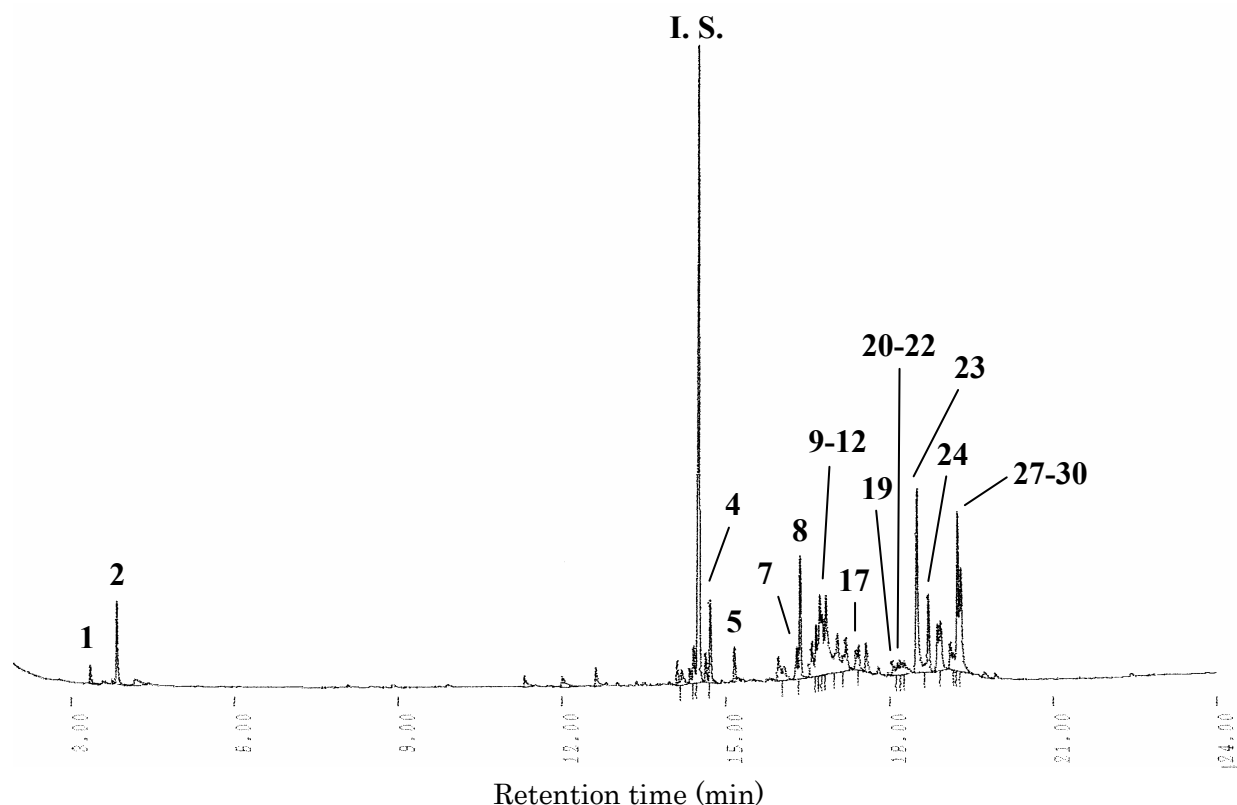


Figure 3.3. GC-FID chromatogram of weak acidic fraction from *n*-C₆H₁₄ extract of *T. distichum* cones. I.s.; Internal standard (heneicosane). Peak No. refer to **Table 3.2**.

Table 3.2. Terpenoid constituents of weak acidic fraction from *n*-C₆H₁₄ extract of *T. distichum* cones.

	Peak No.	R. t. (min)	Contents (%) *	MW **	Identified compounds
Monoterpene	1	3.4	0.3	154	
	2	3.8	1.3	154	
Total			1.6		
Diterpene	3	14.6	2.0	288	
	4	14.7	4.5	270	
	5	15.2	2.2	286	
	6	16.1	2.0	286	
	7	16.3	2.2	284	6,7-dehydroferruginol (1) ferruginol (2)
	8	16.4	6.2	286	
	9-12	16.7	12.9	314	
	13	16.8	8.3	316	
	14	17.0	4.3	302	
	15	17.2	3.4	298	
	16	17.4	1.6	314	
	17	17.4	2.1	300	
	18	17.6	2.4	312	
	19	18.1	1.6	316	
	20-22	18.2	3.3	314	
	23	18.5	11.6	314	
	24	18.7	5.0	298	
	25	18.9	3.2	316	
	26	18.9	4.0	316	
27-30	19.2	15.5	330		
Total			98.4		
Total terpene			100.0		

* Contents were calculated according to substitute each AREA ratio of GC-FID for calibration curve mentioned below. Mono- and Sesquiterpene: AREA ratio between β -caryophyllene and heneicosane (x-axis); $y = 0.9415x - 0.0009$ ($R^2 = 0.9987$). Diterpene: AREA ratio between ferruginol and heneicosane (x-axis); $y = 2.3889x + 0.0712$ ($R^2 = 9982$). ** Molecular weights (MW) were determined by molecular ion peak according to GC-MS analysis. When molecular ion peak could not find because of its lower concentration, MW were supposed by similarity retrieval using NIST12 and NIST62.

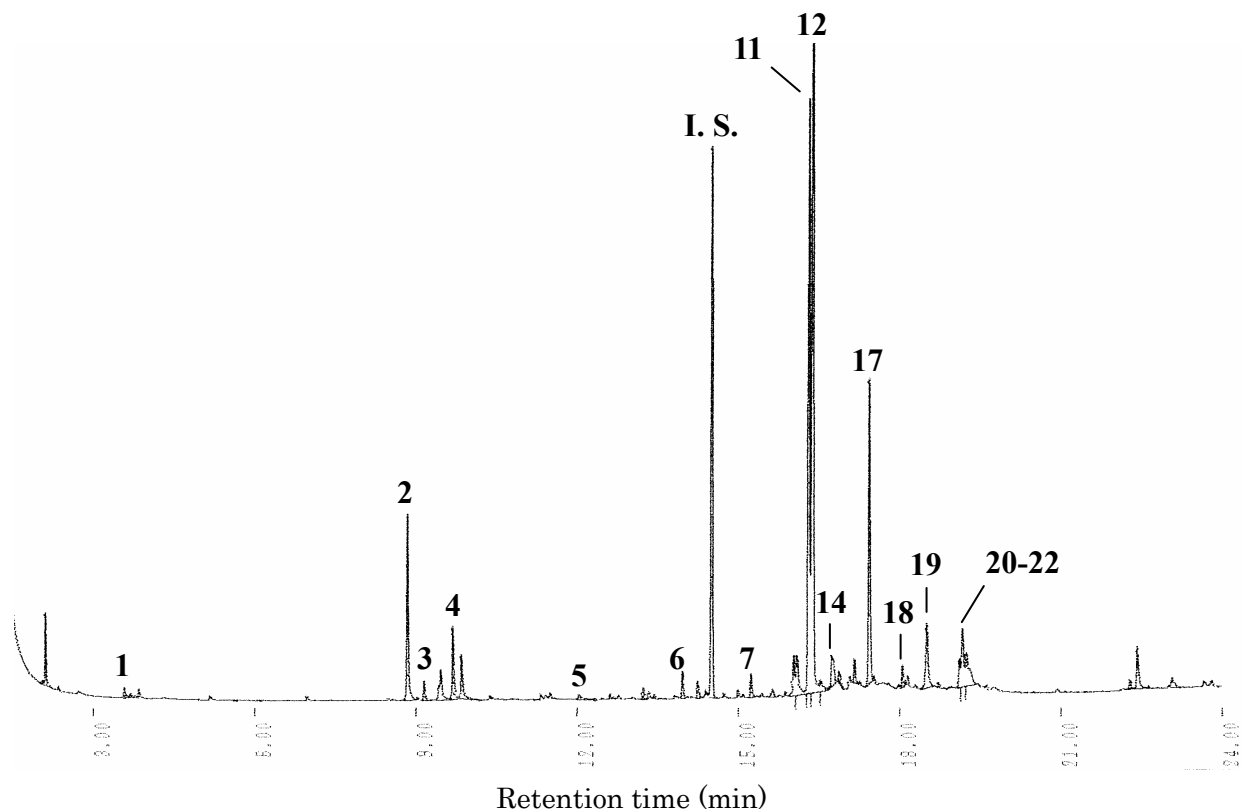


Figure 3.4. GC-FID chromatogram of neutral fraction from $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ extract of *T. distichum* cones. I.s.: Internal standard (heneicosane). Peak No. refer to **Table 3.3**.

Table 3.3. Terpenoid constituents of neutral fraction from $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ extract of *T. distichum* cones.

	Peak No.	R. t. (min)	Contents (%) *	MW **	Identified compounds
Monoterpene	1	3.6	0.1	150	
Total			0.1		
Sesquiterpene	2	8.8	2.4	220	
	3	9.2	0.3	220	
	4	9.7	1.1	202	
	5	12.0	0.1	220	
Total			3.9		
Diterpene	6	14.0	1.4	270	
	7	15.2	1.4	286	
	8	15.6	0.9	282	
	9-10	16.1	4.4	298	
	11	16.3	21.8	284	6,7-dehydroferruginol (1)
	12	16.4	36.9	286	ferruginol (2)
	13	16.5	1.2	298	
	14	16.7	2.5	314	
	15	16.9	1.0	302	
	16	17.2	1.4	302	
	17	17.4	10.7	314	
	18	18.1	1.2	316	
	19	18.5	4.0	314	
	20-22	19.2	7.3	330	
Total			95.9		
Total terpene			100.0		

* Contents were calculated according to substitute each AREA ratio of GC-FID for calibration curve mentioned below. Mono- and Sesquiterpene: AREA ratio between β -caryophyllene and heneicosane (x-axis); $y = 0.9415x - 0.0009$ ($R^2 = 0.9987$). Diterpene: AREA ratio between ferruginol and heneicosane (x-axis); $y = 2.3889x + 0.0712$ ($R^2 = 9982$). ** Molecular weights (MW) were determined by molecular ion peak according to GC-MS analysis. When molecular ion peak could not find because of its lower concentration, MW were supposed by similarity retrieval using NIST12 and NIST62.

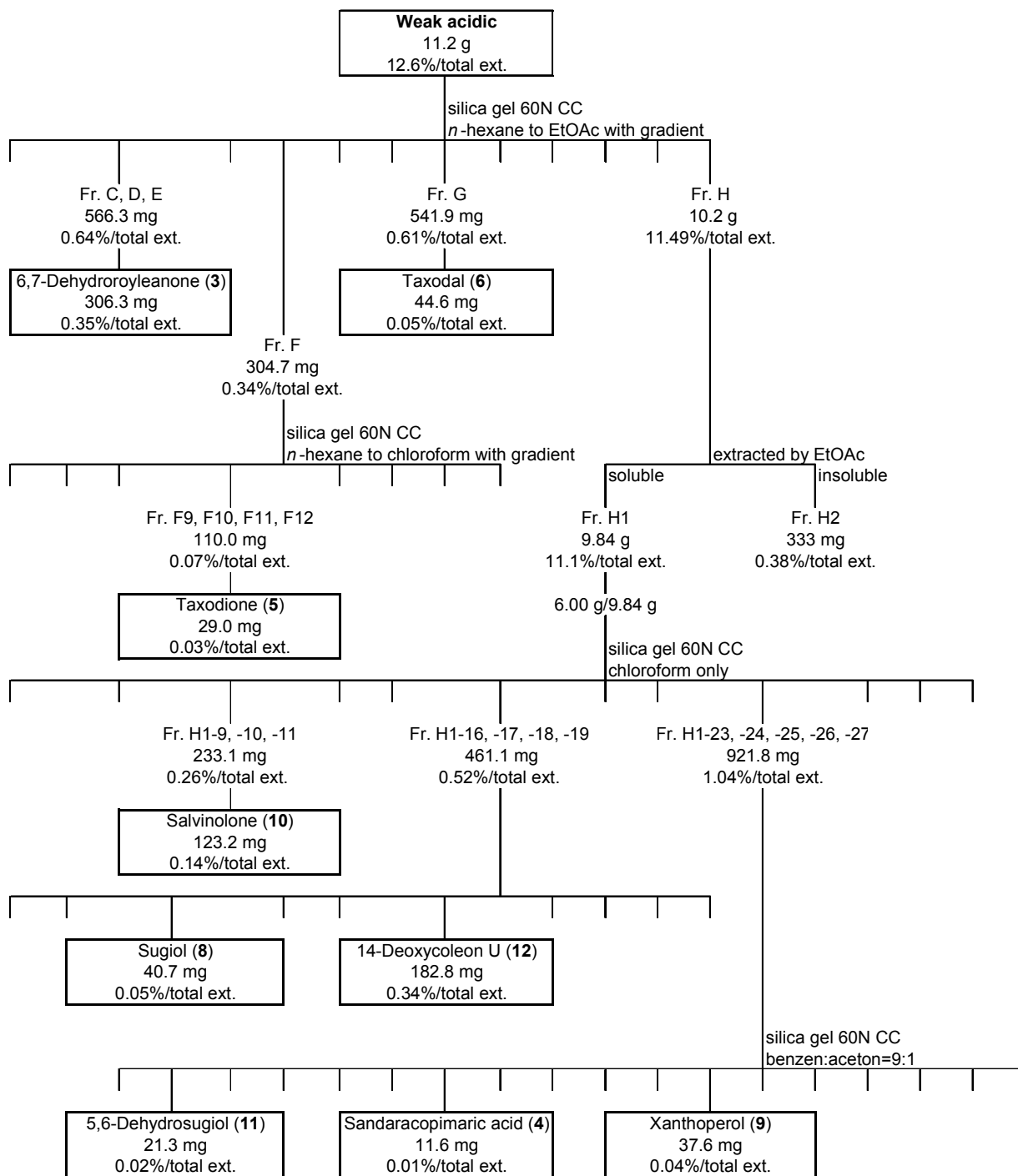


Figure 3.5. Isolation scheme of weak acidic fraction from *T. distichum* cones.

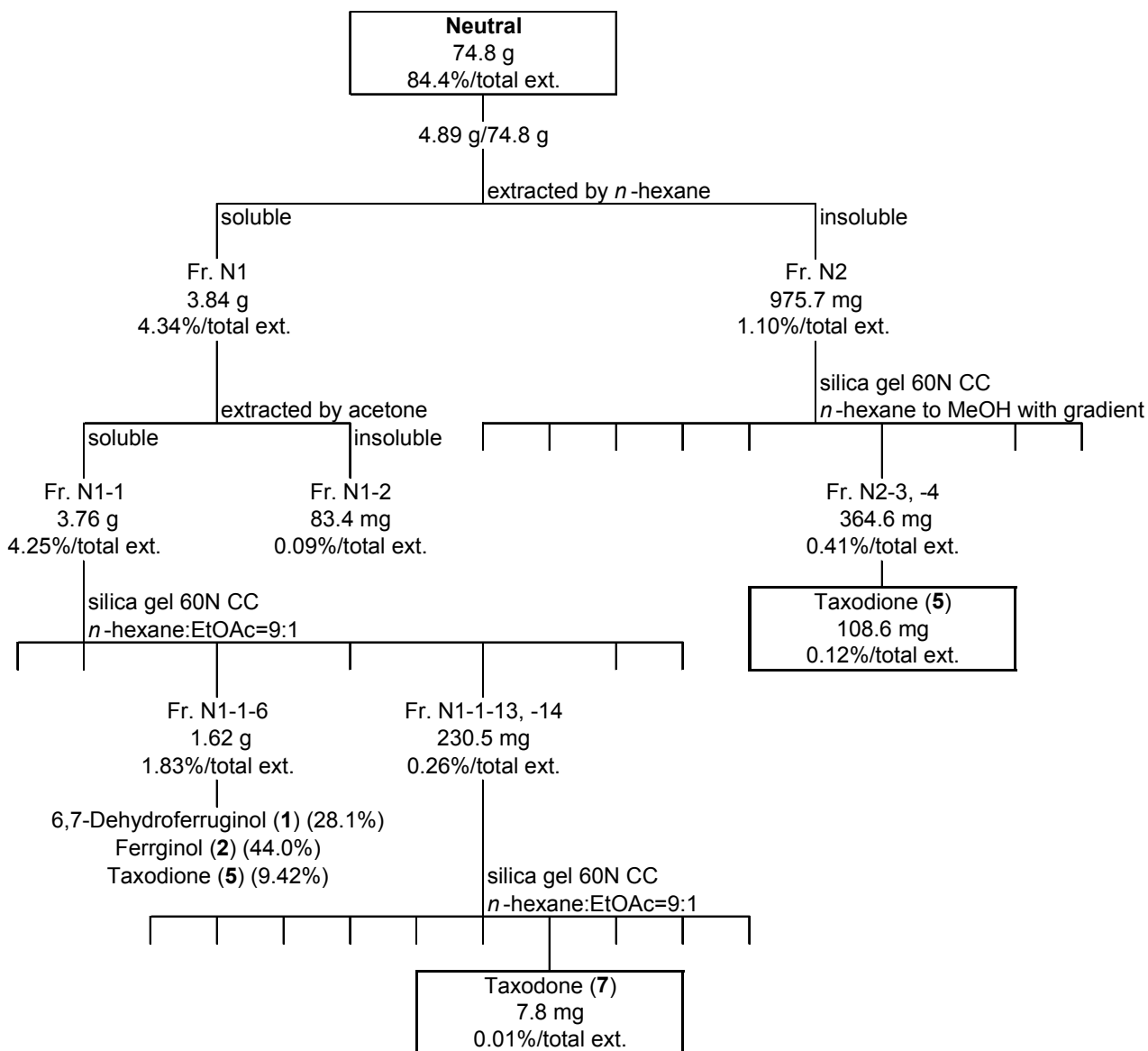


Figure 3.6. Isolation scheme of neutral fraction fraction from *T. distichum* cones.

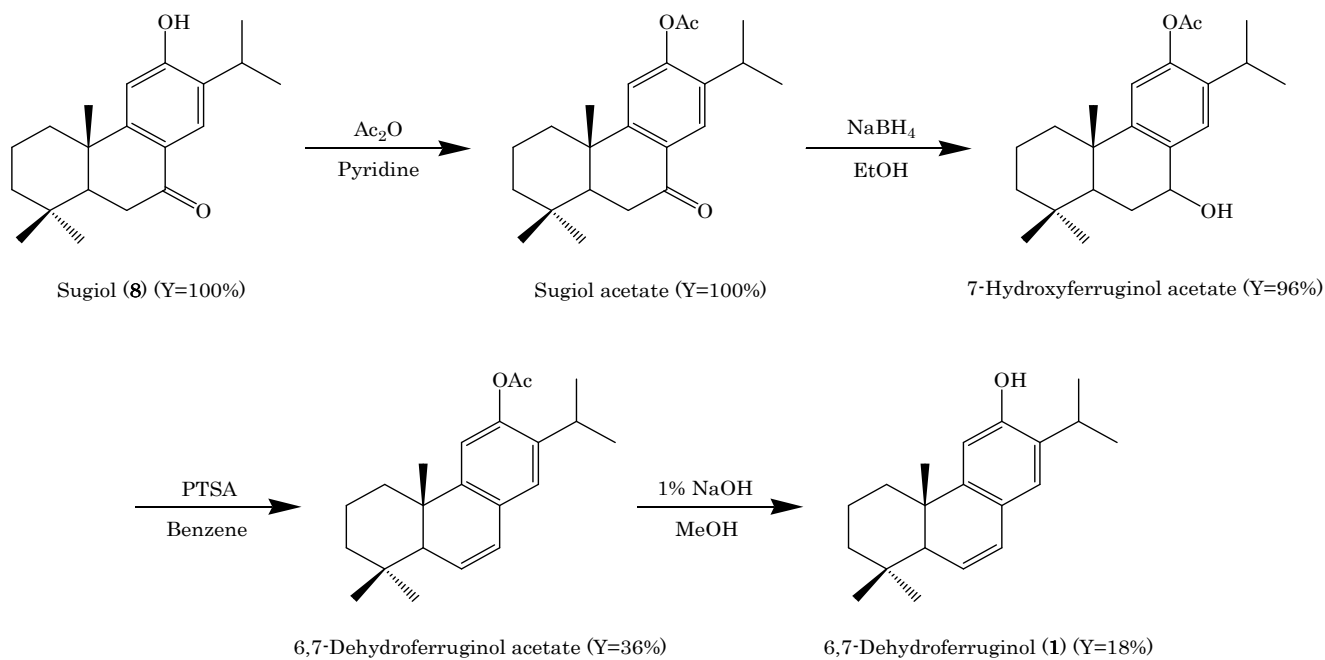


Figure 3.7. Scheme of 6,7-dehydroferruginol (**1**) synthesis.

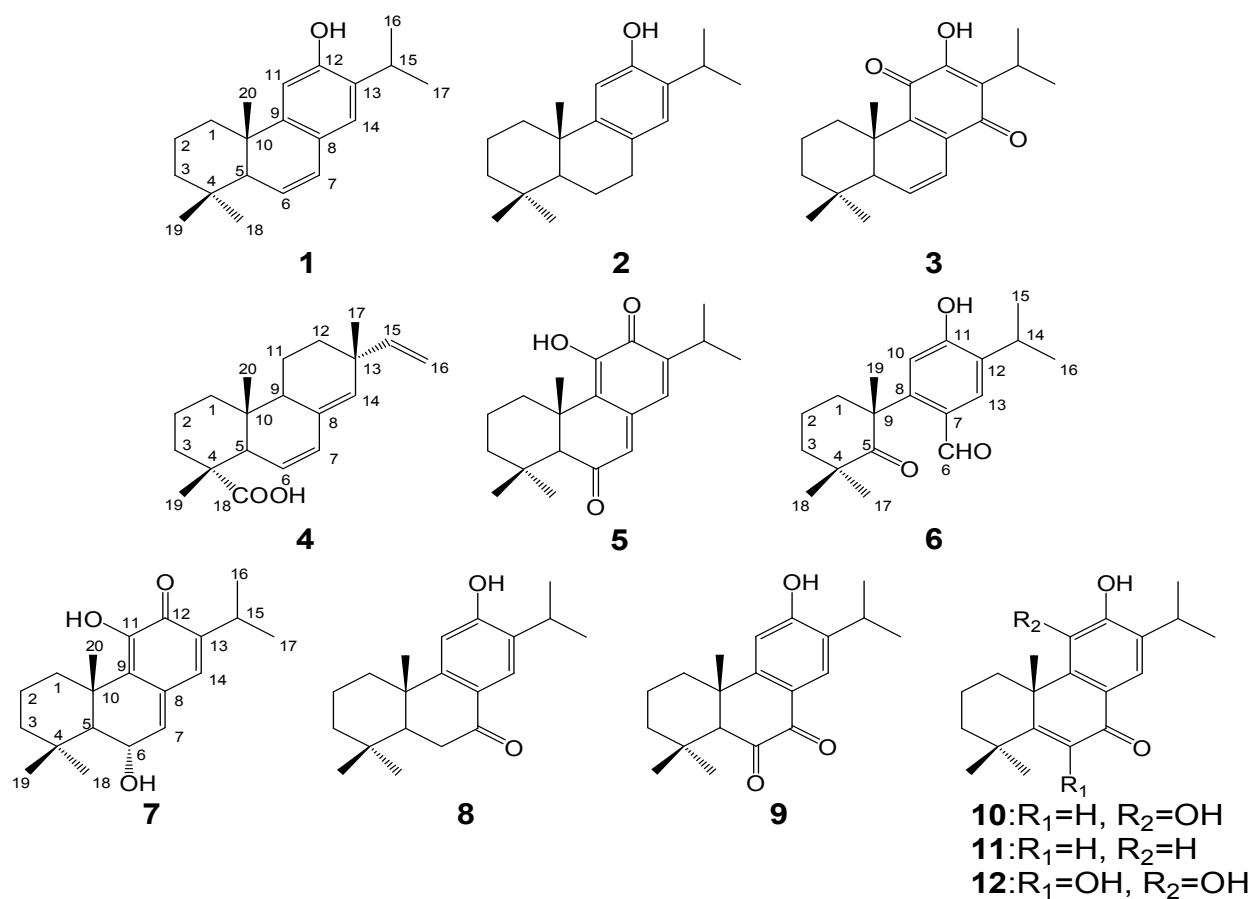


Figure 3.8. Chemical structures of isolated diterpenes from *n*-C₆H₁₄ extract of *T. distichum* cones.

6,7-dehydroferruginol (**1**), ferruginol (**2**), 6,7-dehydroroyleanone (**3**), sandaracopimaric acid (**4**), taxodione (**5**), taxodal (**6**), taxodone (**7**), sugiol (**8**), xanthoperol (**9**), salvinolone (**10**), 5,6-dehydrosugiol (**11**), and 14-deoxycoleon U (**12**).

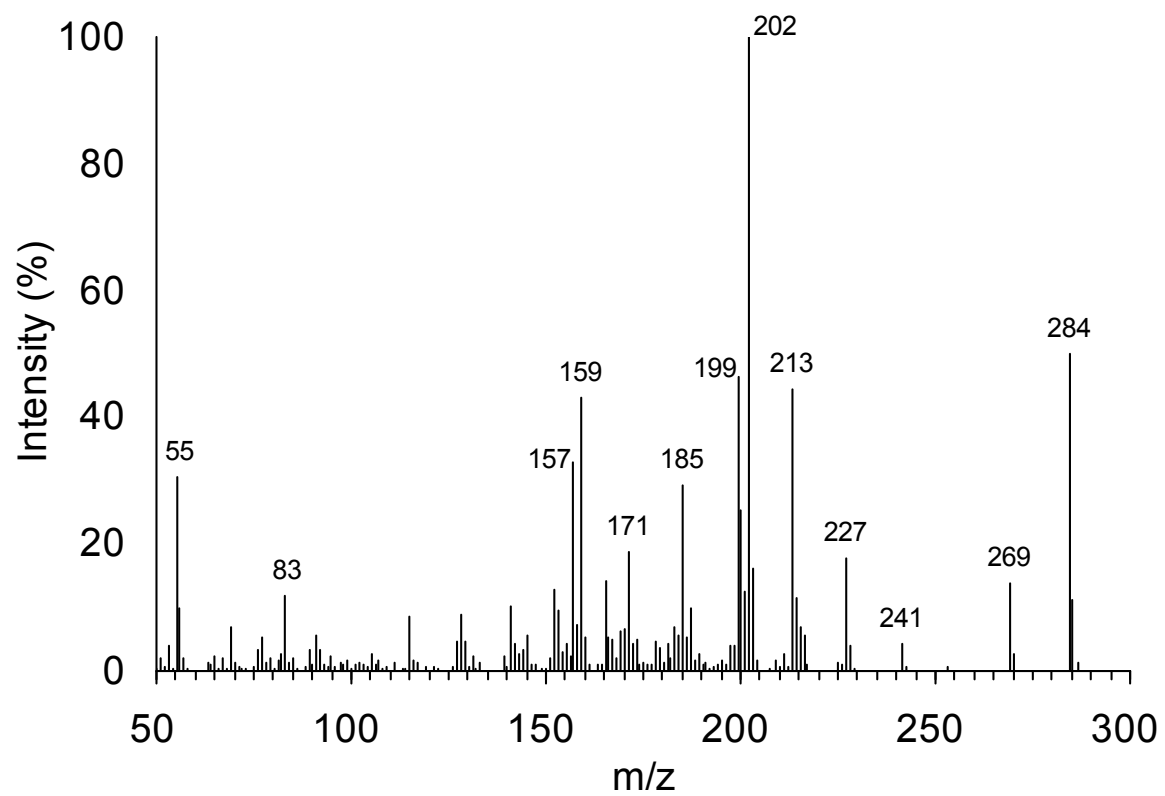


Figure 3.9. MS spectrum of 6,7-dehydroferruginol (1).

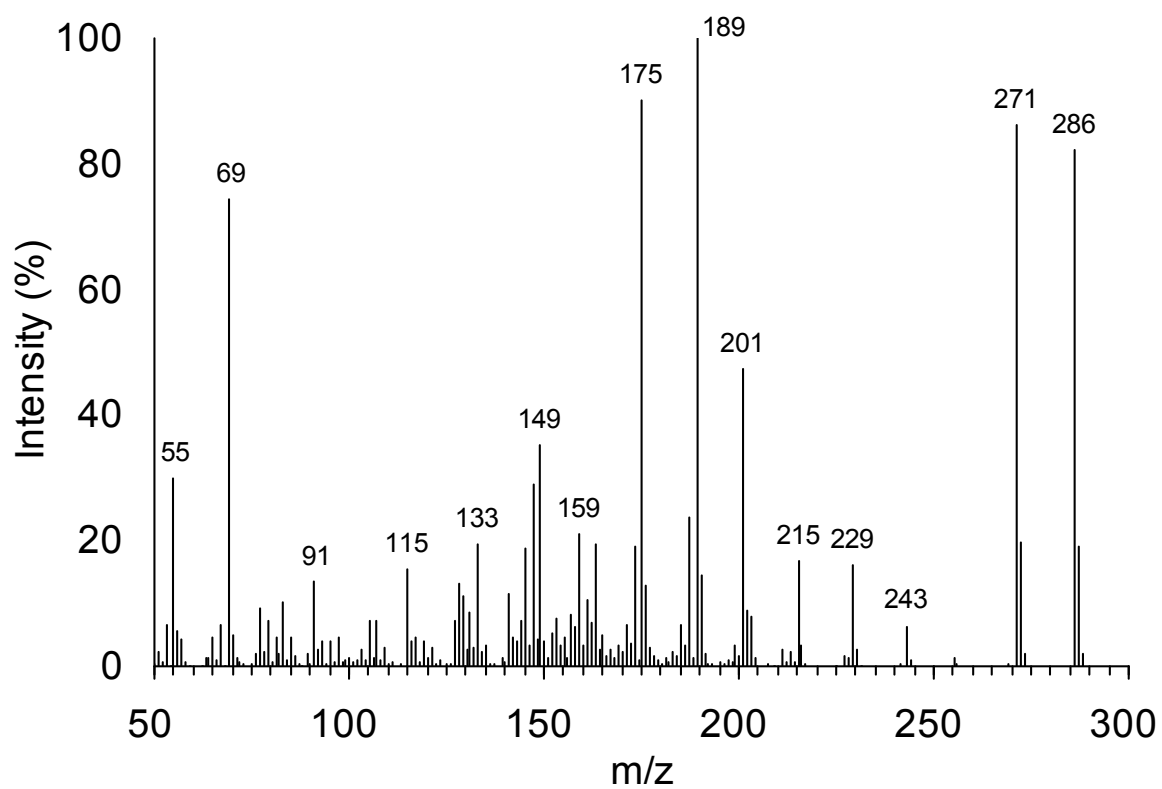


Figure 3.10. MS spectrum of ferruginol (2).

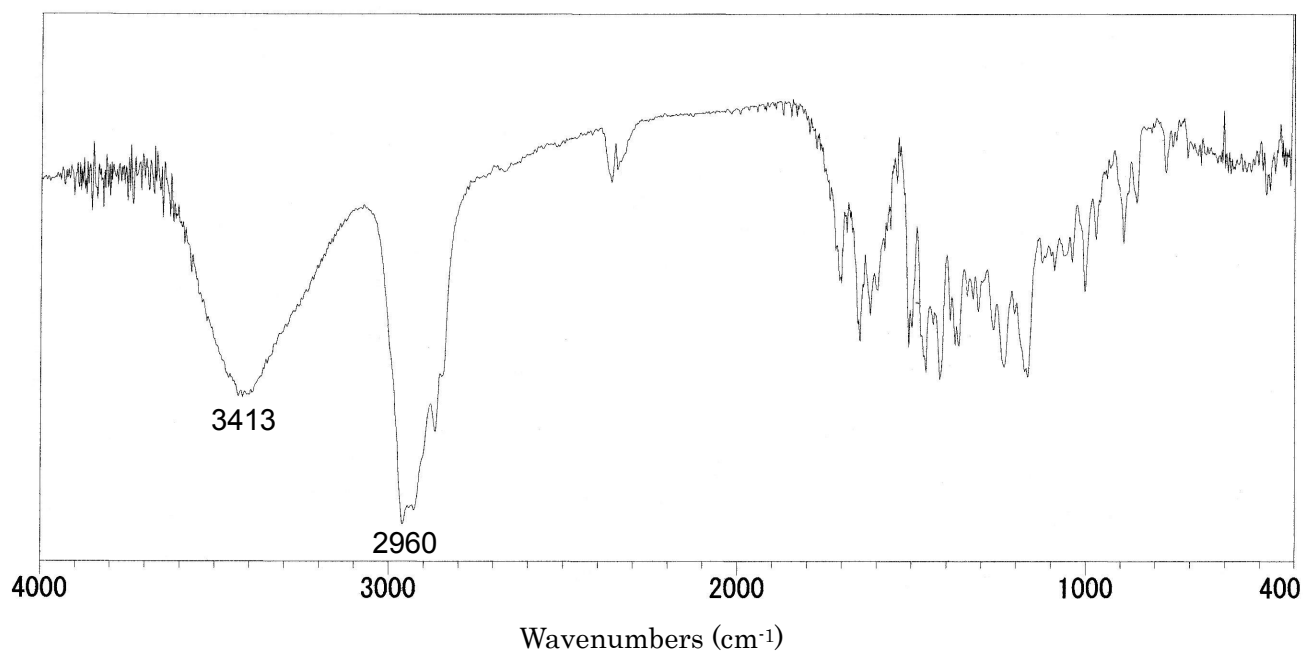


Figure 3.11. IR spectrum of ferruginol (2).

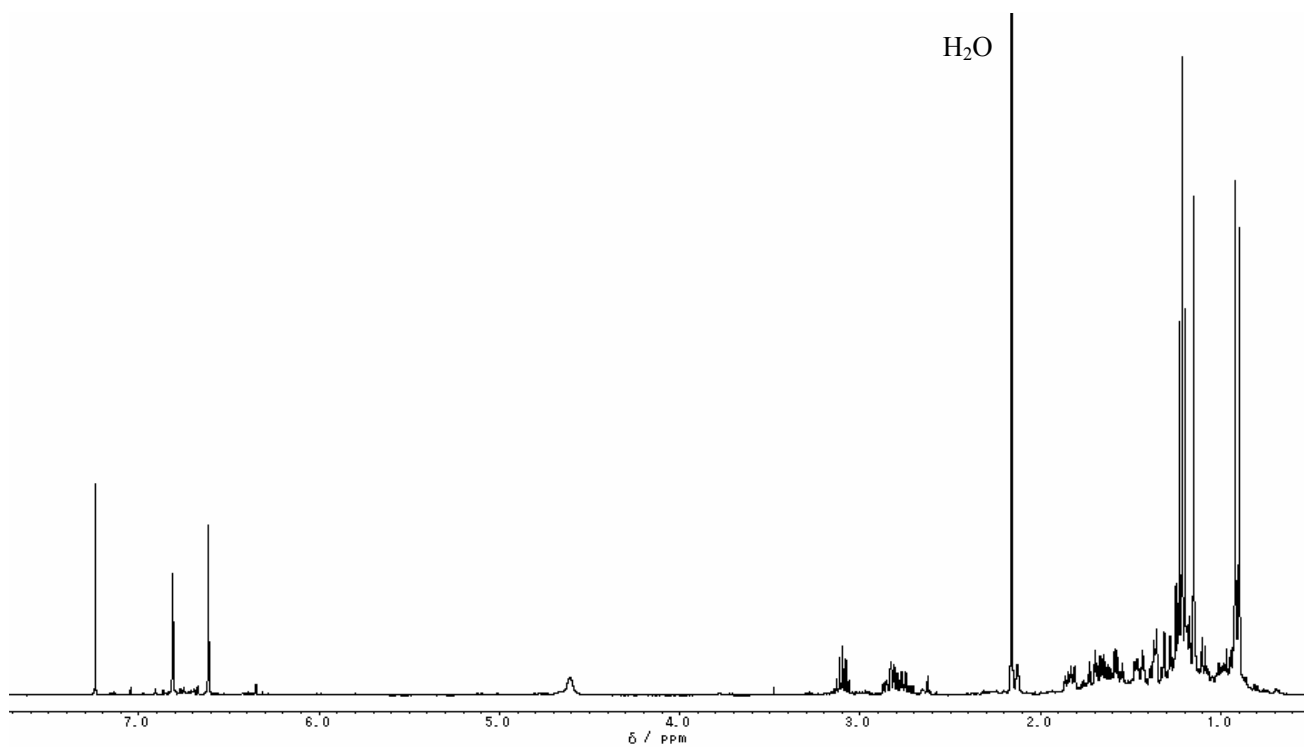


Figure 3.12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (CDCl_3) of ferruginol (**2**).

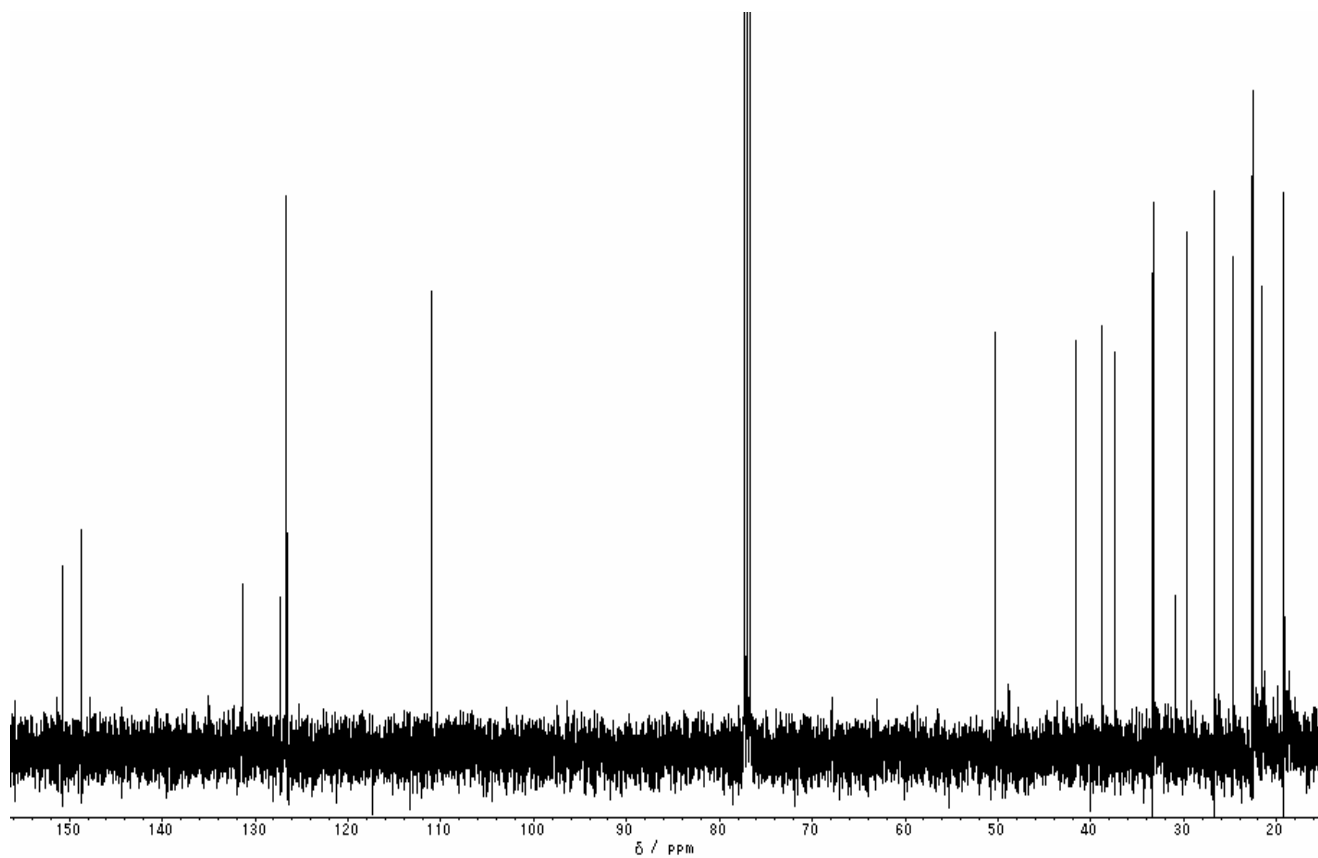


Figure 3.13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum (CDCl_3) of ferruginol (**2**).

Table 3.4. 1D NMR data for comparison of ferruginol (**2**) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1	1.37	td (13.5,3.5)	1.37	m	38.9	CH ₂	38.85	CH ₂
	2.15	dtd (13.5,3.5,1.5)	2.16	brs				
2	1.58	dq (13.5,3.5)	1.58	d (3.4)	19.4	CH ₂	19.30	CH ₂
	1.72	qt (13.5,3.5)	1.73	t (3.4)				
3	1.23	td (13.5,3.5)	1.25	m	41.8	CH ₂	41.68	CH ₂
	1.46	dtd (13.5,3.5,1.5)	1.46	m				
4					33.5	C	33.42	C
5	1.31	dd (12.5,2.0)	1.31	d (2.3)	50.4	CH	50.33	CH
6	1.66	dddd (13.5,12.5,11.0,7.0)	1.66	m	19.3	CH ₂	19.22	CH ₂
	1.85	ddt (13.5,7.5,2.0)	1.84	m				
7	2.76	ddd (16.5,11.0,7.5)	2.77	m	29.8	CH ₂	29.74	CH ₂
	2.85	ddd (16.5,7.0,2.0)	2.85	m				
8					127.3	C	127.24	C
9					148.7	C	148.64	C
10					37.5	C	37.48	C
11	6.61	s	6.62	s	111.0	CH	110.96	CH
12	4.60	brs-OH	4.61	brs-OH	150.7	C	150.69	C
13					131.4	C	131.39	C
14	6.81	s	6.82	s	126.6	CH	126.59	CH
15	3.11	heptet (7.0)	3.11	heptet (7.0)	26.8	CH	26.79	CH
16	1.22	d (7.0)	1.21	d (6.7)	22.6	CH ₃	22.54	CH ₃
17	1.24	d (7.0)	1.22	d (6.7)	22.8	CH ₃	22.72	CH ₃
18	0.93	s	0.92	s	33.3	CH ₃	33.28	CH ₃
19	0.91	s	0.90	s	21.7	CH ₃	21.59	CH ₃
20	1.16	s	1.16	s	24.8	CH ₃	24.76	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Tezuka et al. 1998.

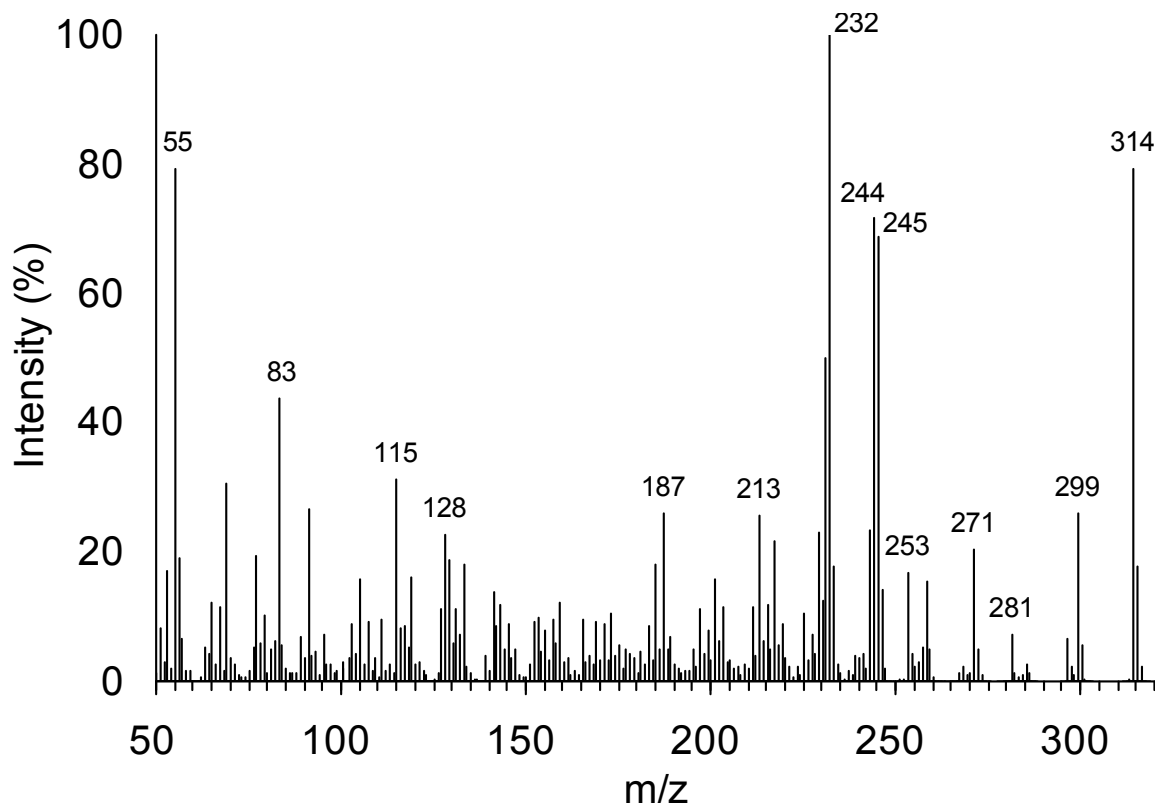


Figure 3.14. MS spectrum of 6,7-dehydroroyleanone (3).

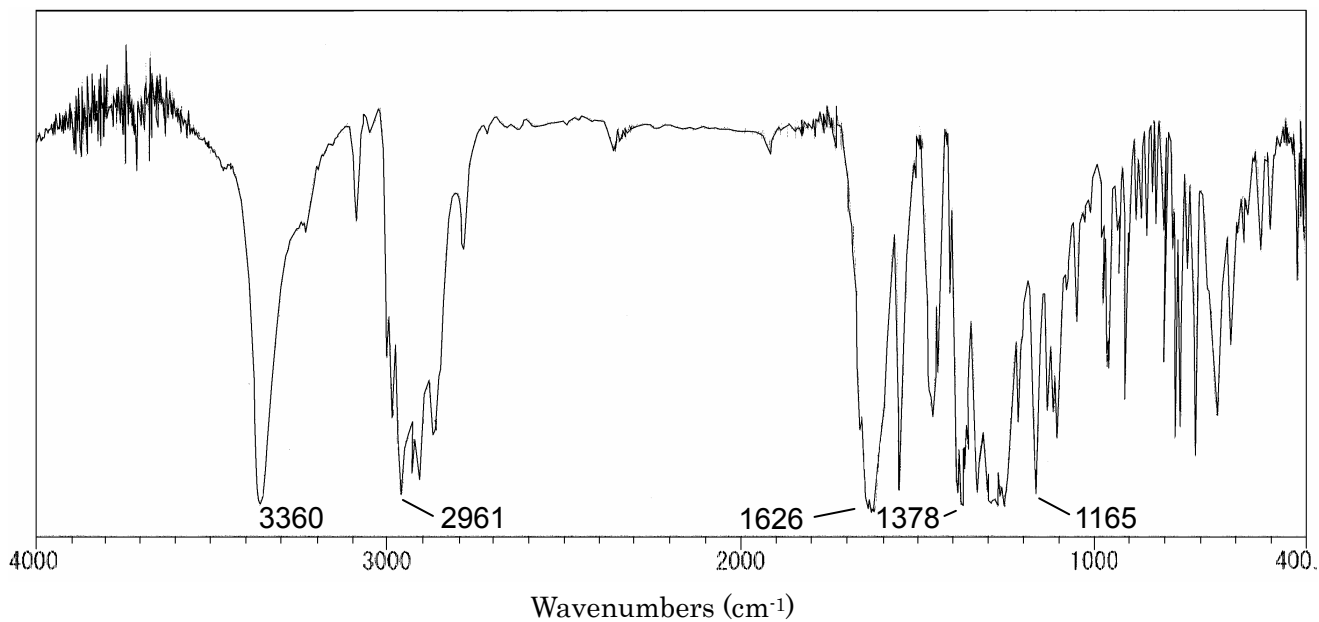


Figure 3.15. IR spectrum of 6,7-dehydroroyleanone (3).

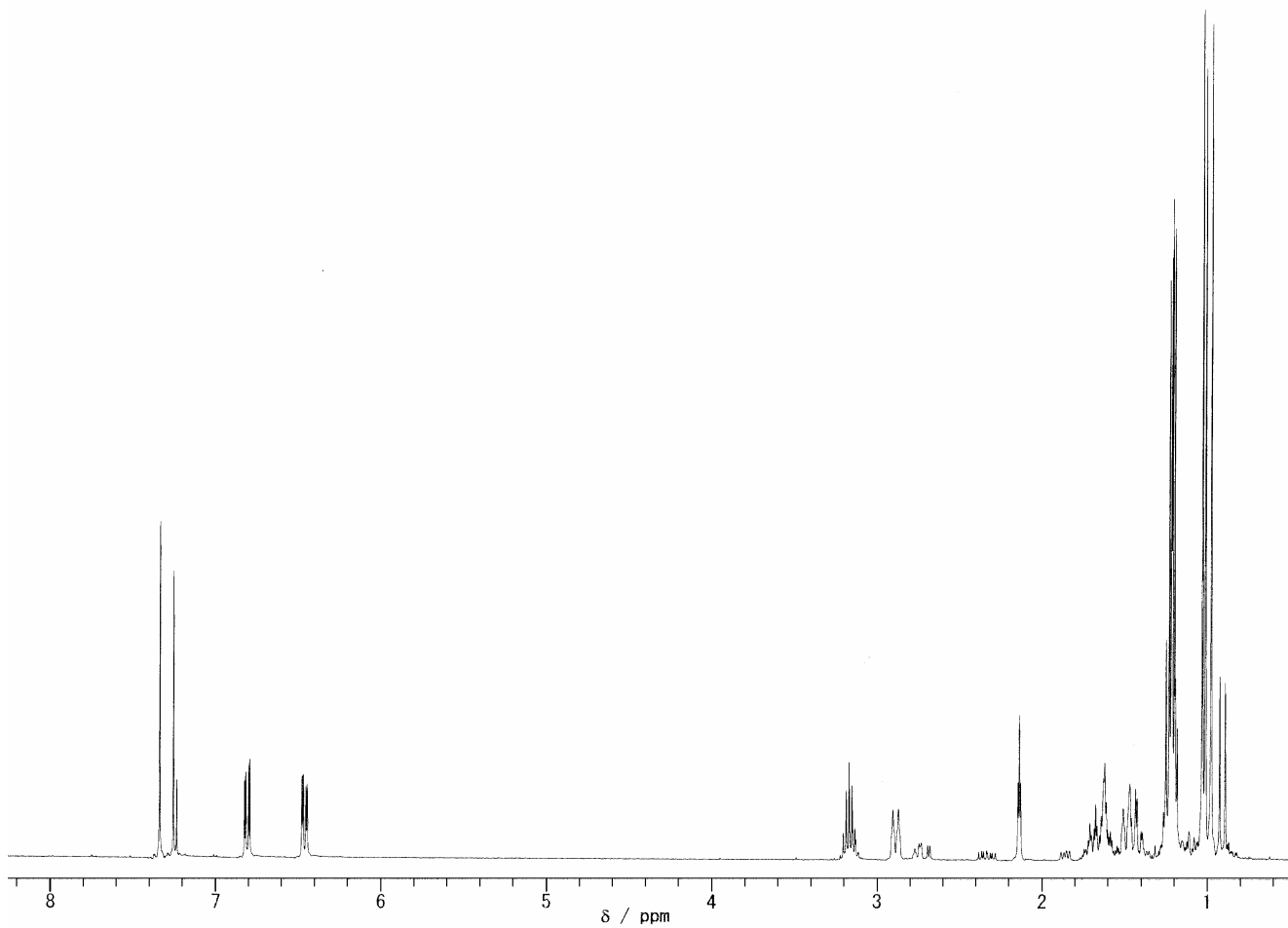


Figure 3.16. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of 6,7-dehydroroyleanone (**3**).

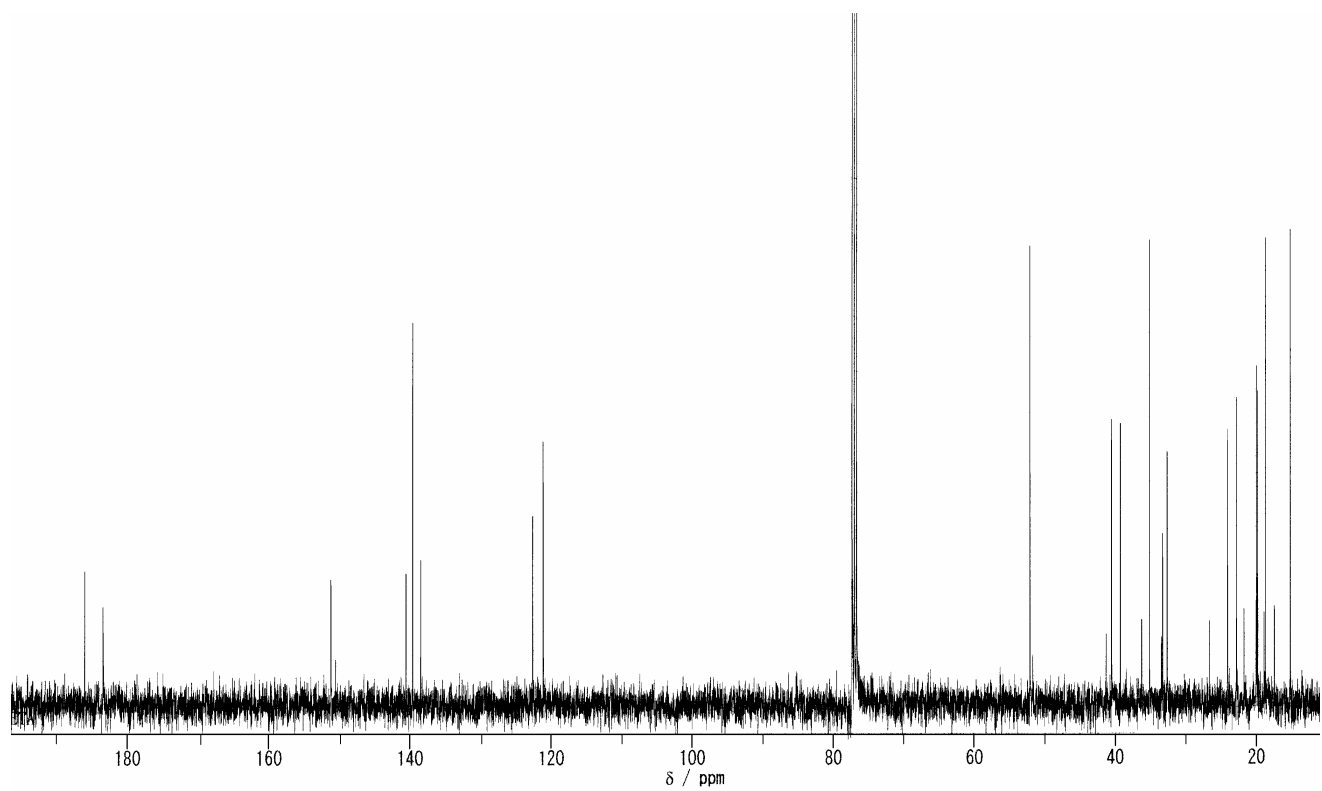


Figure 3.17. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of 6,7-dehydroroyleanone (**3**).

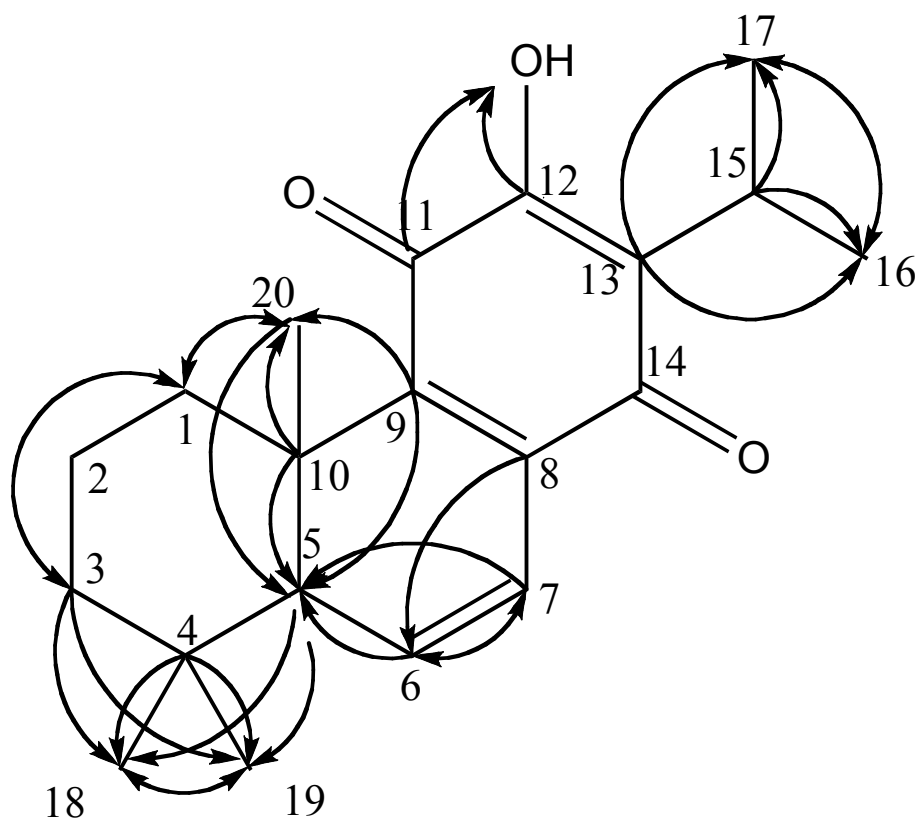


Figure 3.18. Long range coupling of 6,7-dehydroroyleanone (**3**).

Table 3.5. 1D NMR data for comparison of 6,7-dehydroroyleanone (**3**) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1	1.43	td (13.5,4.0)	1.43	td (13.3,3.9)	35.2	CH ₂	35.17	CH ₂
	2.89	dt (13.5,4.0)	2.89	d (3.4)				
2	1.61	dq (13.5,4.0)	1.62	m	18.7	CH ₂	18.69	CH ₂
	1.70	qt (13.5,4.0)	1.71	m				
3	1.24	m	1.25	m	40.5	CH ₂	40.54	CH ₂
	1.49	dt (13.5,4.0)	1.51	m				
4					33.3	C	33.28	C
5	2.14	t (3.0)	2.14	t (3.1)	52.1	CH	52.12	CH
6	6.47	dd (10.0,3.0)	6.46	dd (3.0,9.7)	139.6	CH	139.62	CH
7	6.81	dd (10.0,3.0)	6.81	dd (3.1,9.8)	121.1	CH	121.12	CH
8					138.5	C	138.47	C
9					140.5	C	140.52	C
10					39.3	C	39.26	C
11					183.5	C	183.46	C
12	7.36	s-OH	7.34	s-OH	151.2	C	151.20	C
13					122.6	C	122.60	C
14					186.0	C	186.06	C
15	3.17	heptet (7.0)	3.17	heptet (7.1)	24.1	CH	24.09	CH
16	1.22	d (7.0)	1.21	d (7.1)	19.8	CH ₃	19.82	CH ₃
17	1.23	d (7.0)	1.22	d (7.2)	20.0	CH ₃	20.01	CH ₃
18	0.98	s	0.98	s	32.6	CH ₃	32.61	CH ₃
19	1.02	s	1.01	s	22.8	CH ₃	22.81	CH ₃
20	1.04	s	1.03	s	15.2	CH ₃	15.18	CH ₃

* J value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Tezuka et al. 1998.

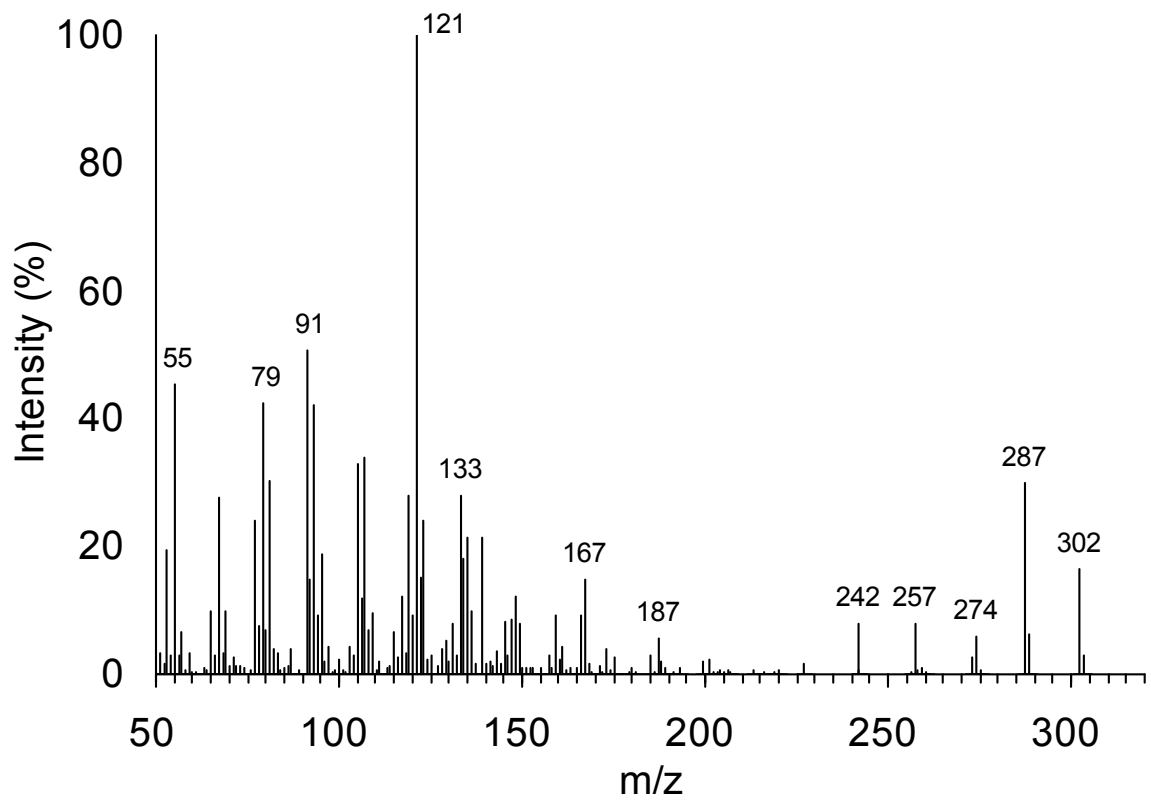


Figure 3.19. MS spectrum of sandaracopimaric acid (4).

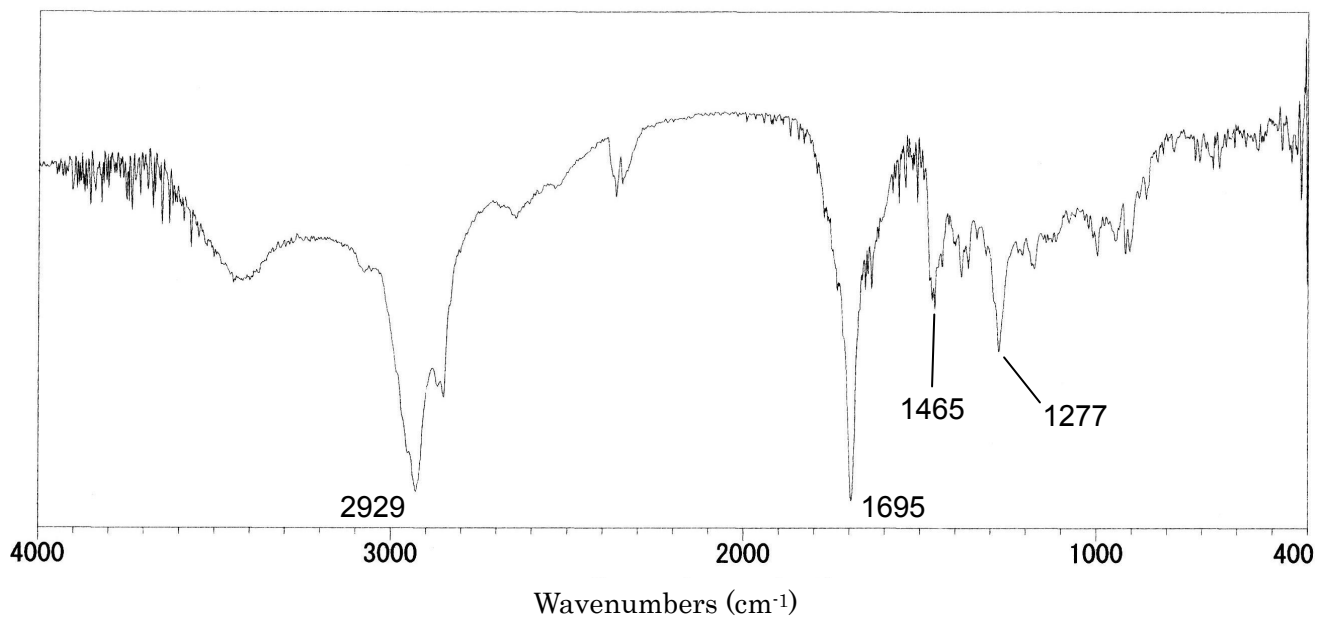


Figure 3.20. IR spectrum of sandaracopimaric acid (4).

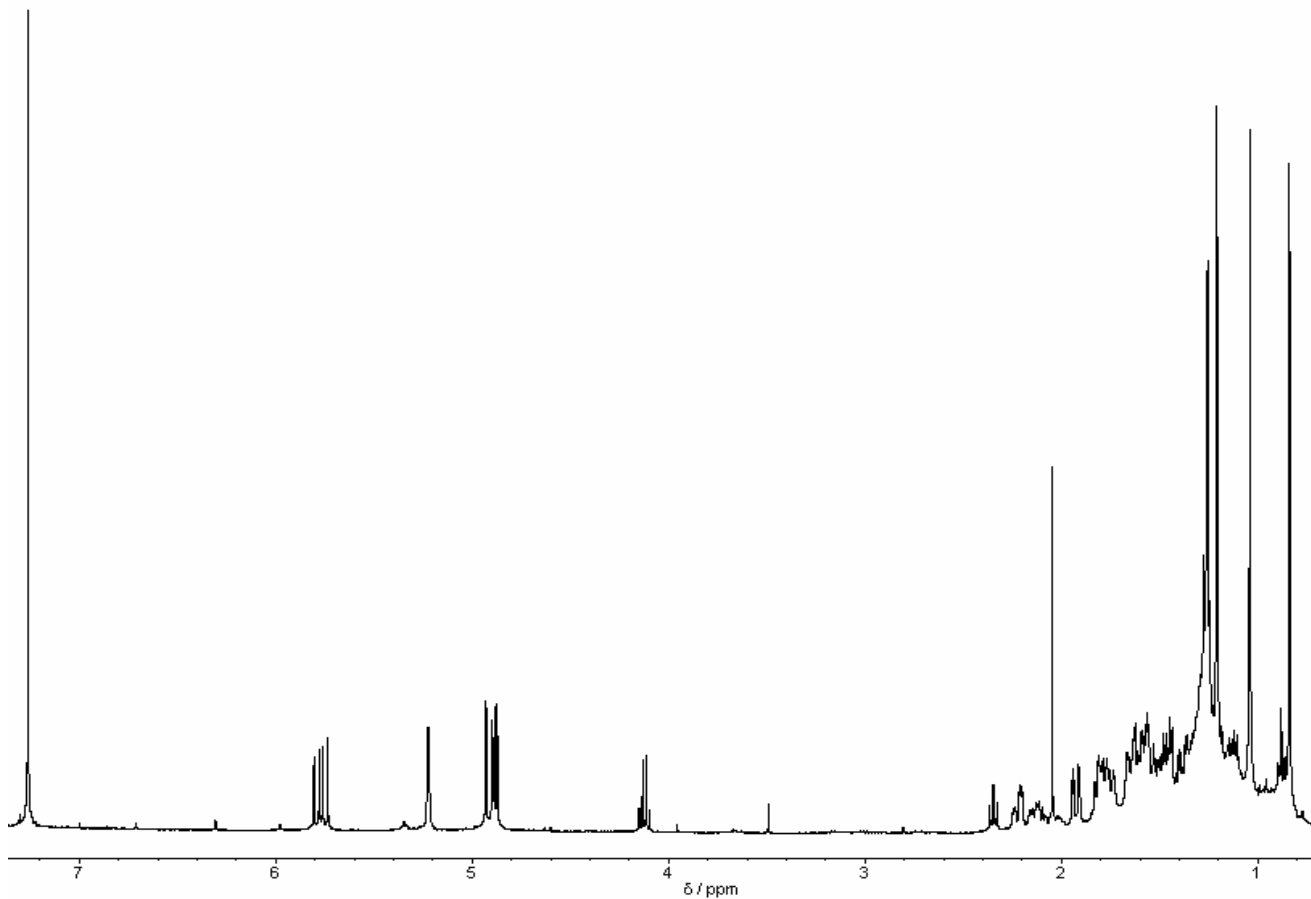


Figure 3.21. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of sandaracopimaric acid (**4**).

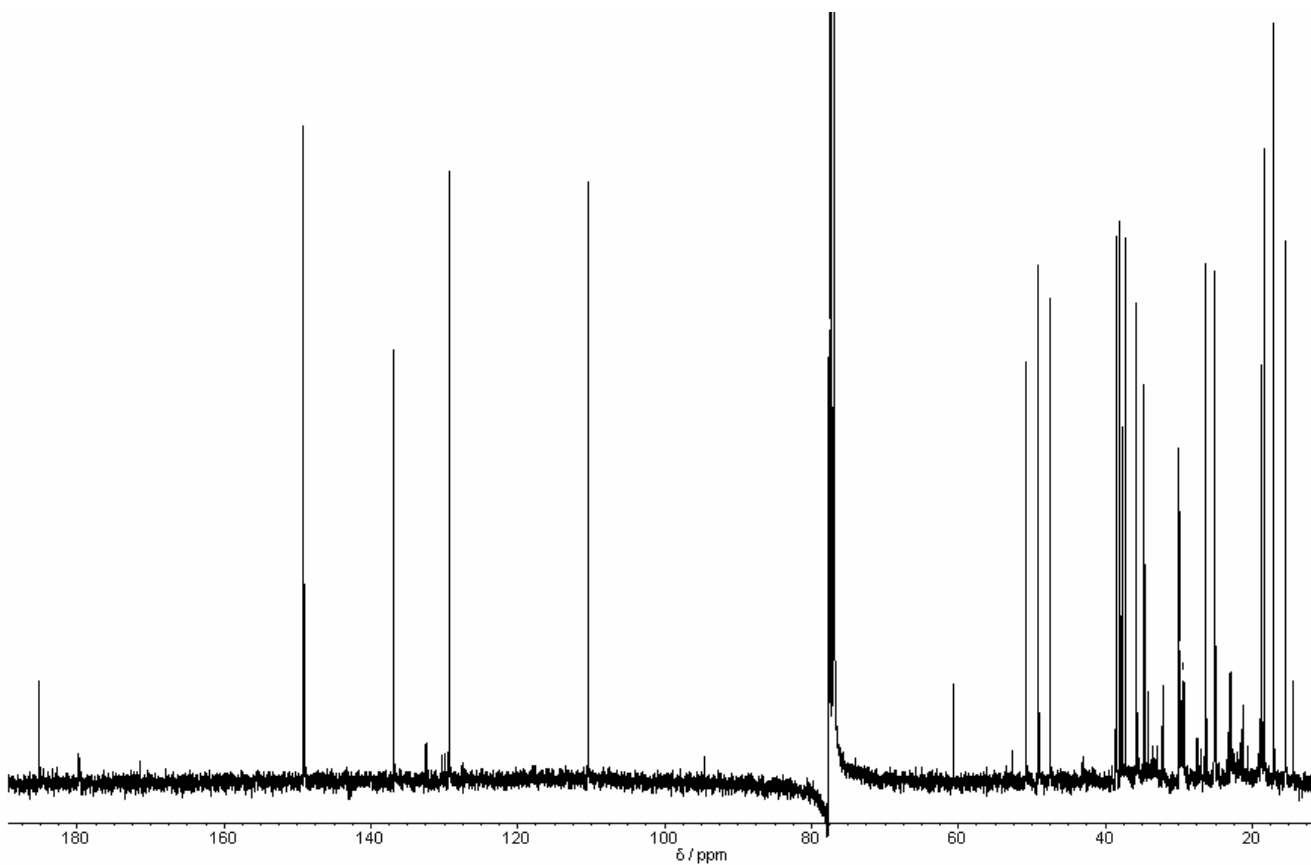


Figure 3.22. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of sandaracopimaric acid (**4**).

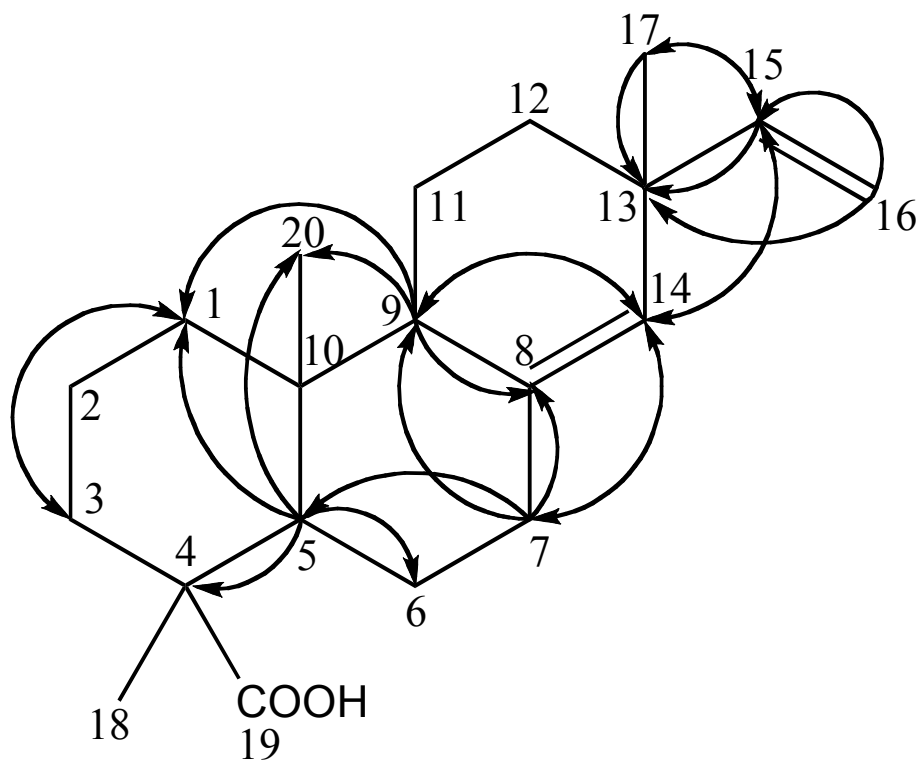


Figure 3.23. HMBC correlations of sandaracopimaric acid (**4**).

Table 3.6. 1D NMR data for comparison of sandaracopimaric acid (**4**) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *		¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **	Observed value	Literature value **		Observed value	
1		1.14 m	38.4	CH ₂	38.55	CH ₂
2		1.66 m	18.3	CH ₂	18.42	CH ₂
		1.60 m				
3		1.62 m	37.1	CH ₂	37.29	CH ₂
4			47.2	C	47.55	C
5		1.93 dd (12.4, 2.5)	48.7	CH	49.10	CH
6		1.26 m	24.9	CH ₂	24.94	CH ₂
7		2.21 d (7.0)	35.5	CH ₂	35.73	CH ₂
8			136.2	C	136.89	C
9	None	1.77 m	50.7	CH	50.83	CH
10			37.8	C	37.67	C
11		1.54 m	18.8	CH ₂	18.83	CH ₂
12		1.36 m	34.6	CH ₂	34.70	CH ₂
13			37.4	C	37.98	C
14		5.22 s	129.3	CH	129.39	CH
15		5.77 dd (17.4, 10.5)	149.0	CH	149.16	CH
16		4.89 dd (10.4, 1.5)	110.5	CH ₂	110.42	CH ₂
17		4.91 dd (17.6, 1.5)	26.2	CH ₃	26.28	CH ₃
18		1.04 s	185.3	COOH	185.21	COOH
19		1.21 s	16.8	CH ₃	17.04	CH ₃
20		0.84 s	15.3	CH ₃	15.47	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Wenkert and Buckwalter 1972.

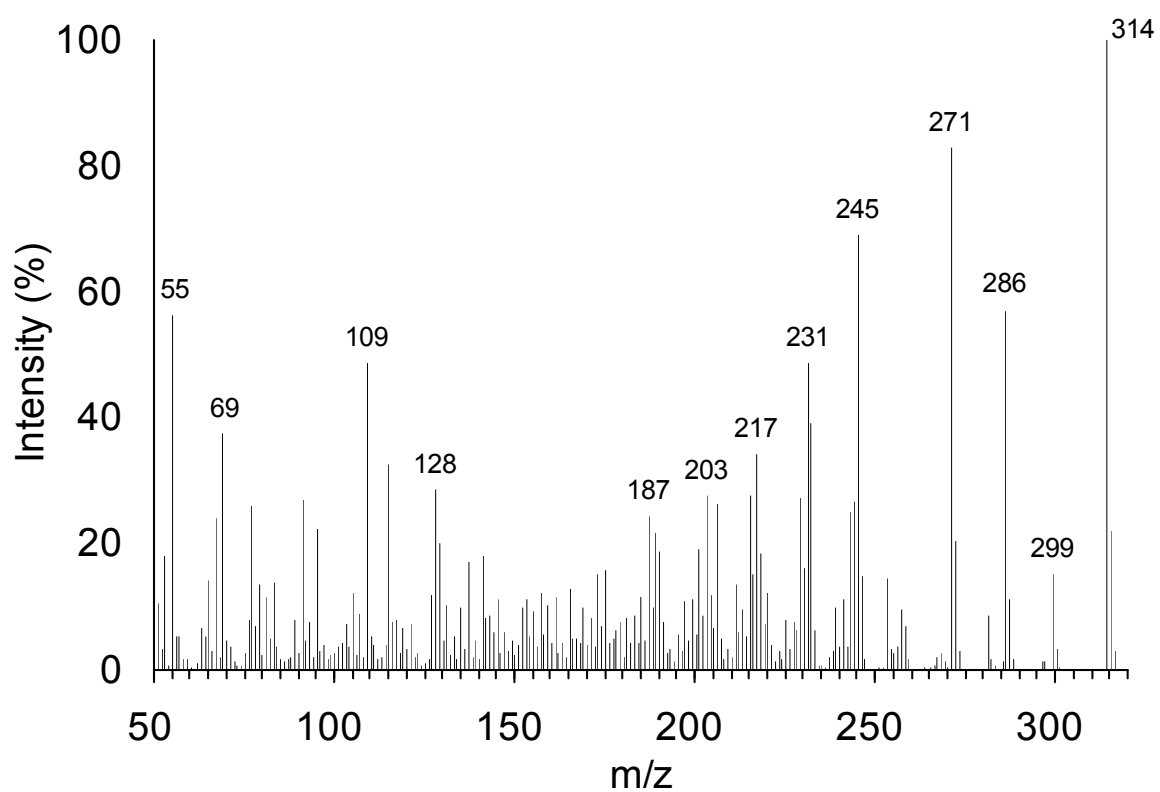


Figure 3.24. MS spectrum of taxodione (5).

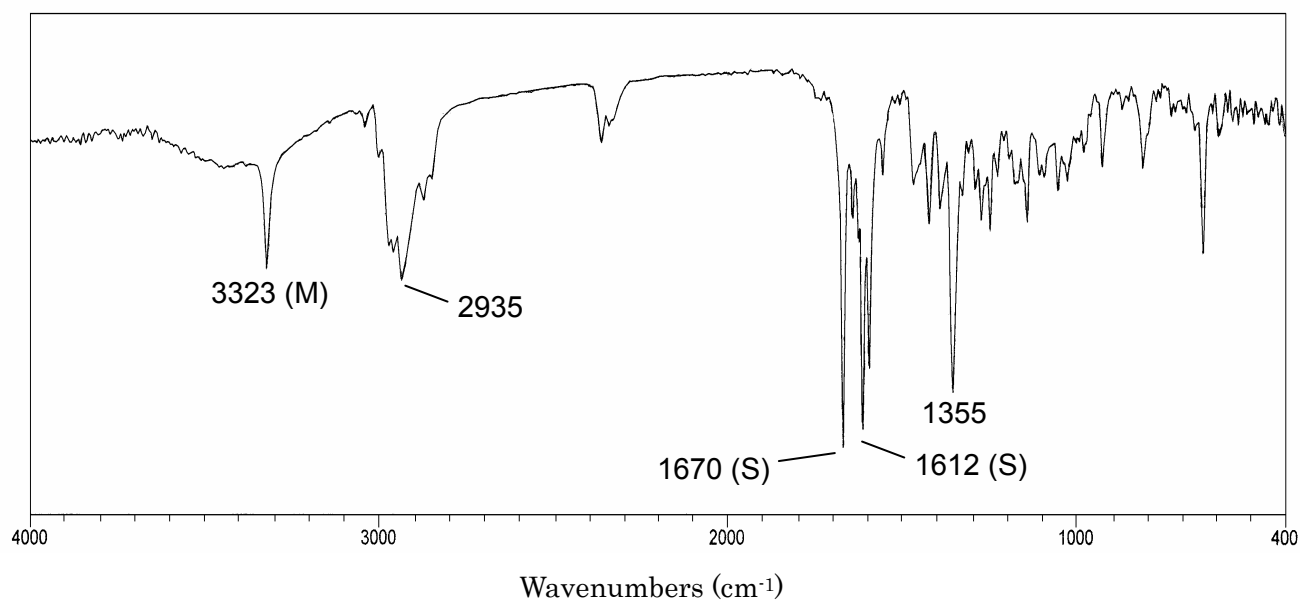


Figure 3.25. IR spectrum of taxodione (5).

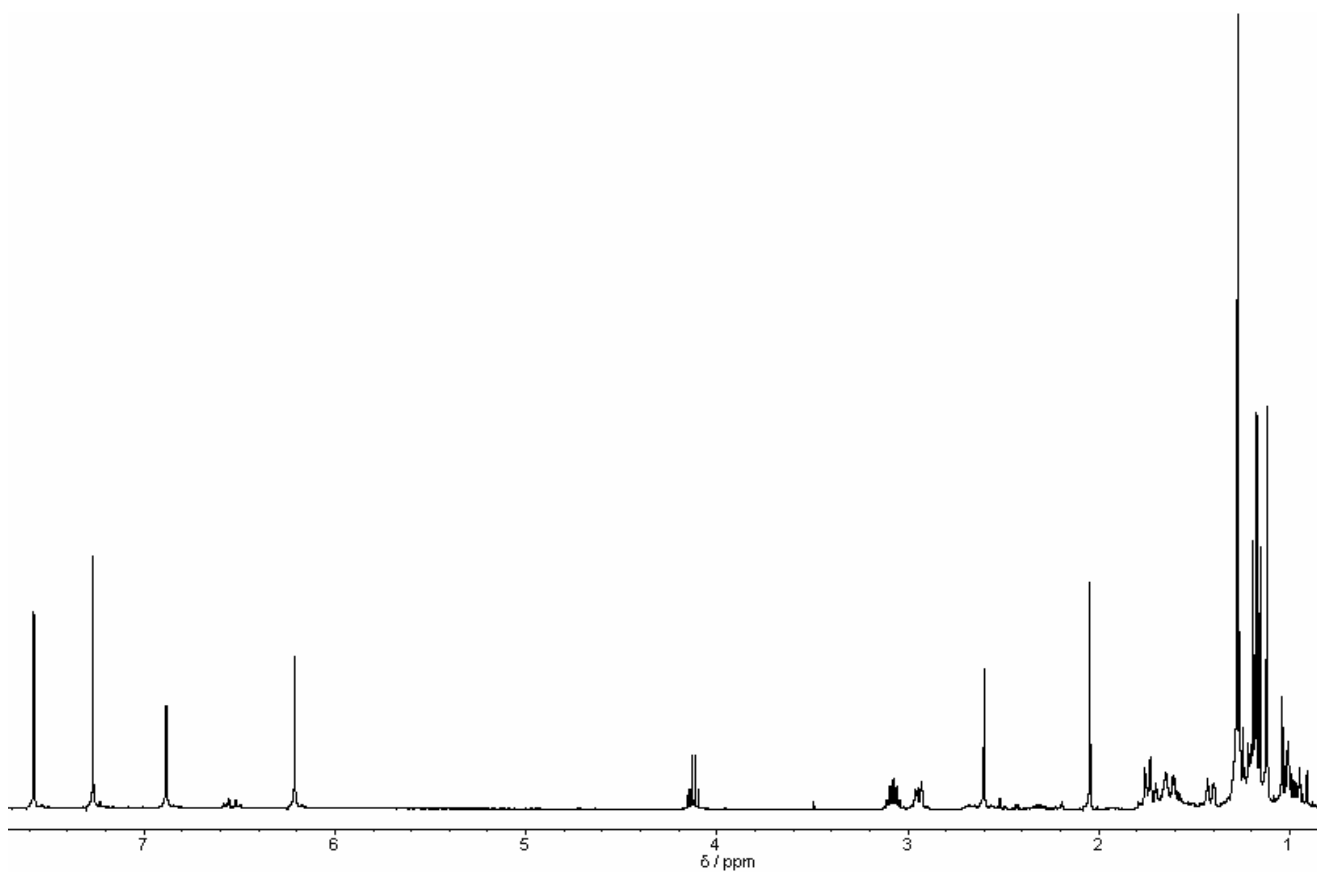


Figure 3.26. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of taxodione (**5**).

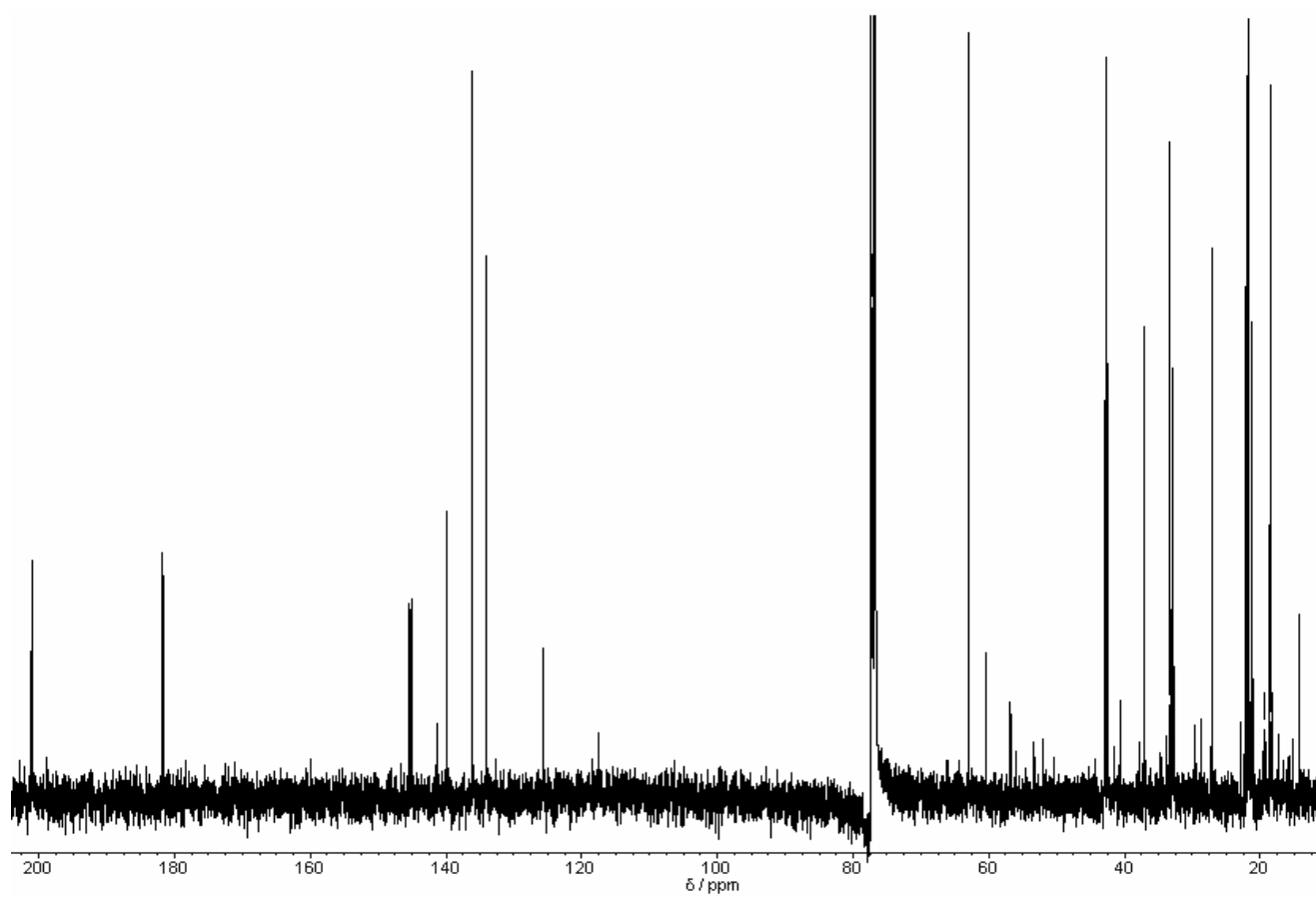


Figure 3.27. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of taxodione (**5**).

Table 3.7. 1D NMR data for comparison of taxodione (**5**) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1	1.75	m	1.73	m	37.1	CH ₂	37.01	CH ₂
	2.94	m	2.93	m				
2	1.59	dq (13.5,3.5)	1.61	m	18.6	CH ₂	18.53	CH ₂
	1.71	qt (13.5,3.5)	1.75	m				
3	1.20	m	1.22	m	42.6	CH ₂	42.56	CH ₂
	1.41	dtd (13.5,3.5,1.5)	1.40	m				
4					32.9	C	32.83	C
5	2.60	s	2.60	s	63.1	CH	62.97	CH
6					201.0	C	201.03	C
7	6.21	s	6.21	s	134.0	CH	133.97	CH
8					140.0	C	139.91	C
9					125.7	C	125.63	C
10					42.9	C	42.87	C
11	7.57	s-OH	7.58	s-OH	145.0	C	144.98	C
12					181.7	C	181.70	C
13					145.4	C	145.34	C
14	6.88	s	6.88	s	136.2	CH	136.14	CH
15	3.07	heptet (7.0)	3.07	heptet (7.0)	27.2	CH	27.13	CH
16	1.18	d (7.0)	1.18	d (7.0)	21.3	CH	21.21	CH
17	1.16	d (7.0)	1.16	d (7.0)	21.6	CH ₃	21.62	CH ₃
18	1.12	s	1.12	s	33.3	CH ₃	33.26	CH ₃
19	1.27	s	1.27	s	22.1	CH ₃	22.10	CH ₃
20	1.27	s	1.27	s	21.9	CH ₃	21.83	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Tezuka et al. 1998.

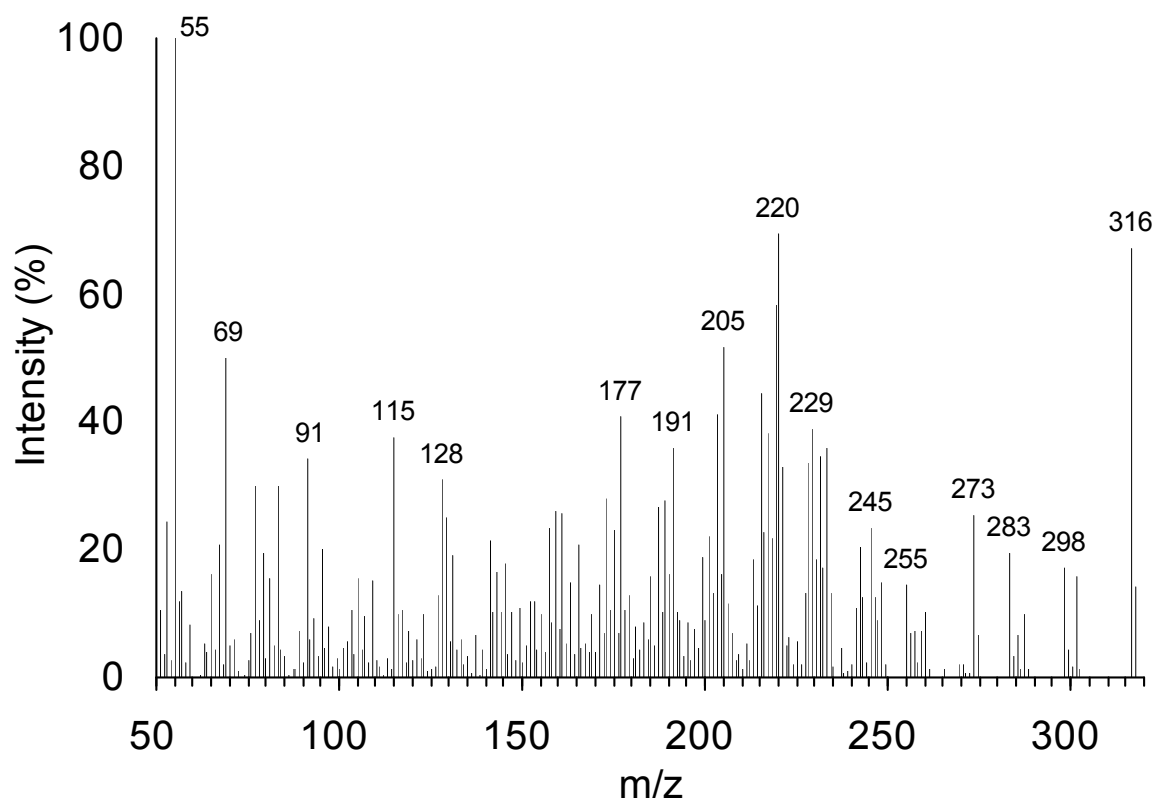


Figure 3.28. MS spectrum of taxodone (7).

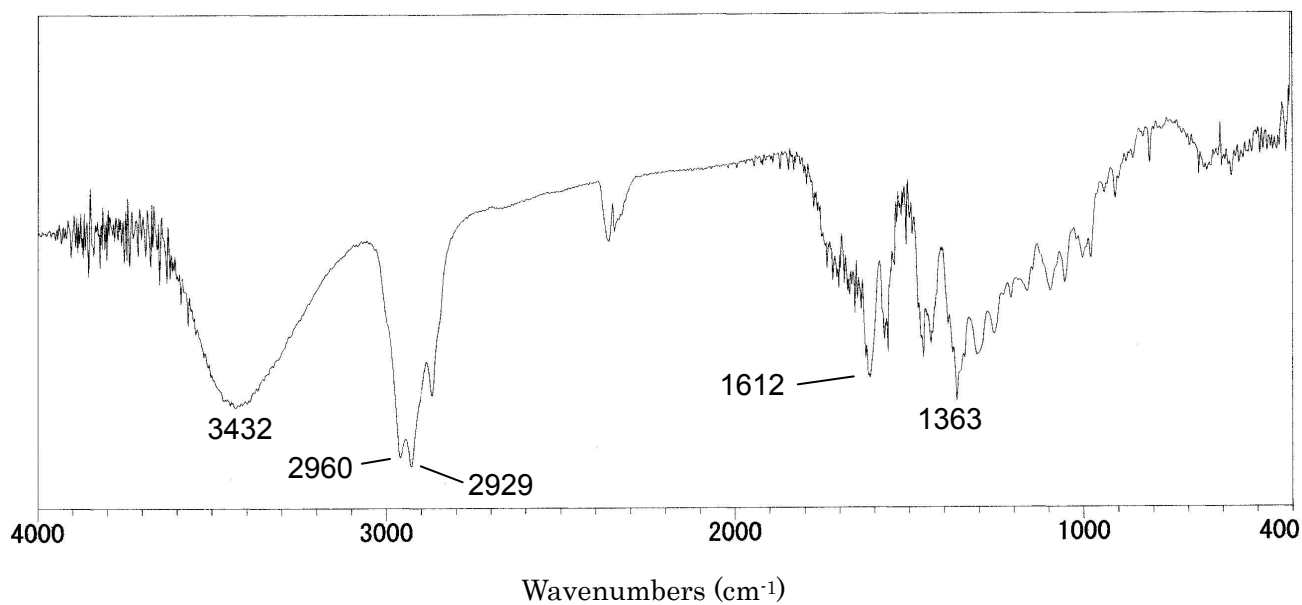


Figure 3.29. IR spectrum of taxodone (7).

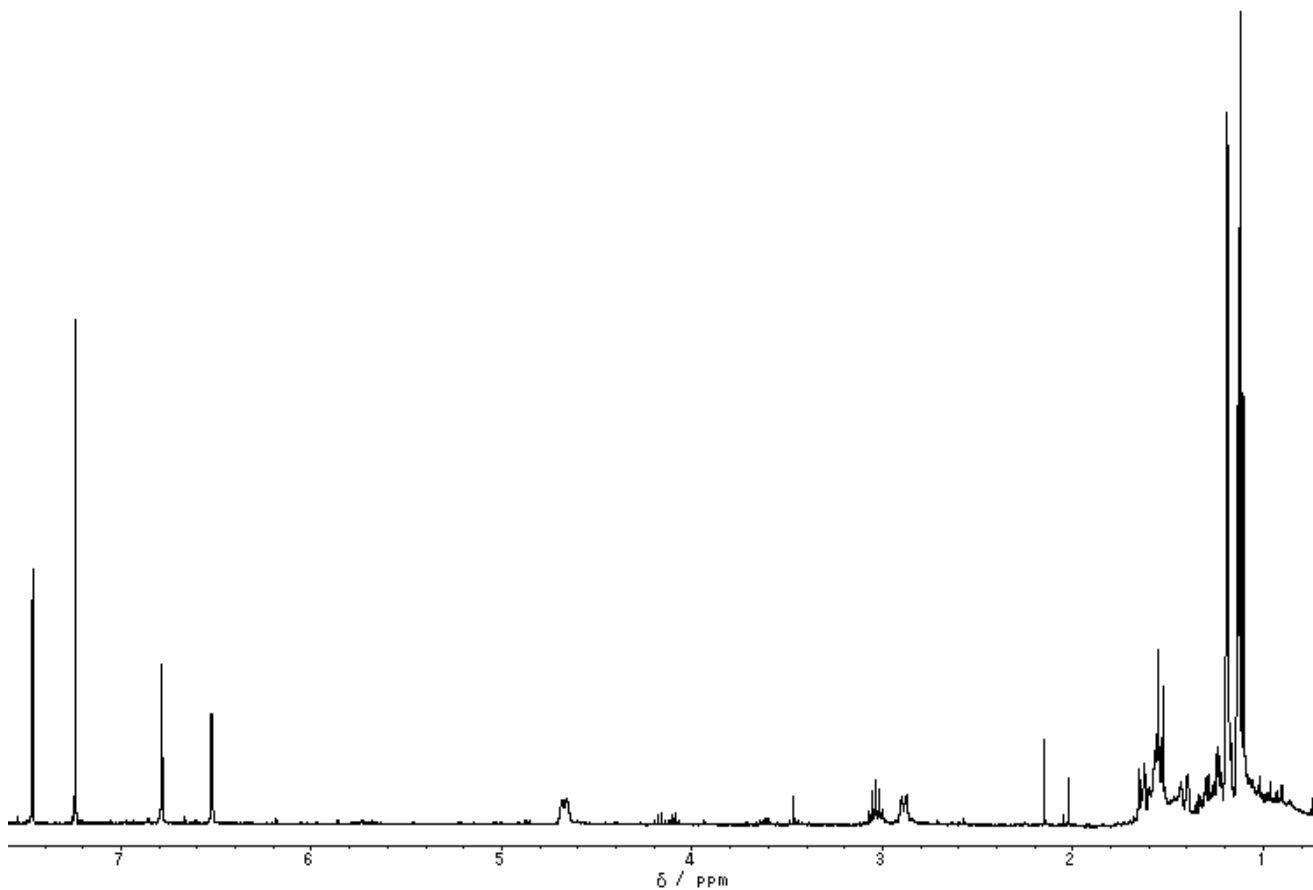


Figure 3.30. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of taxodone (**7**).

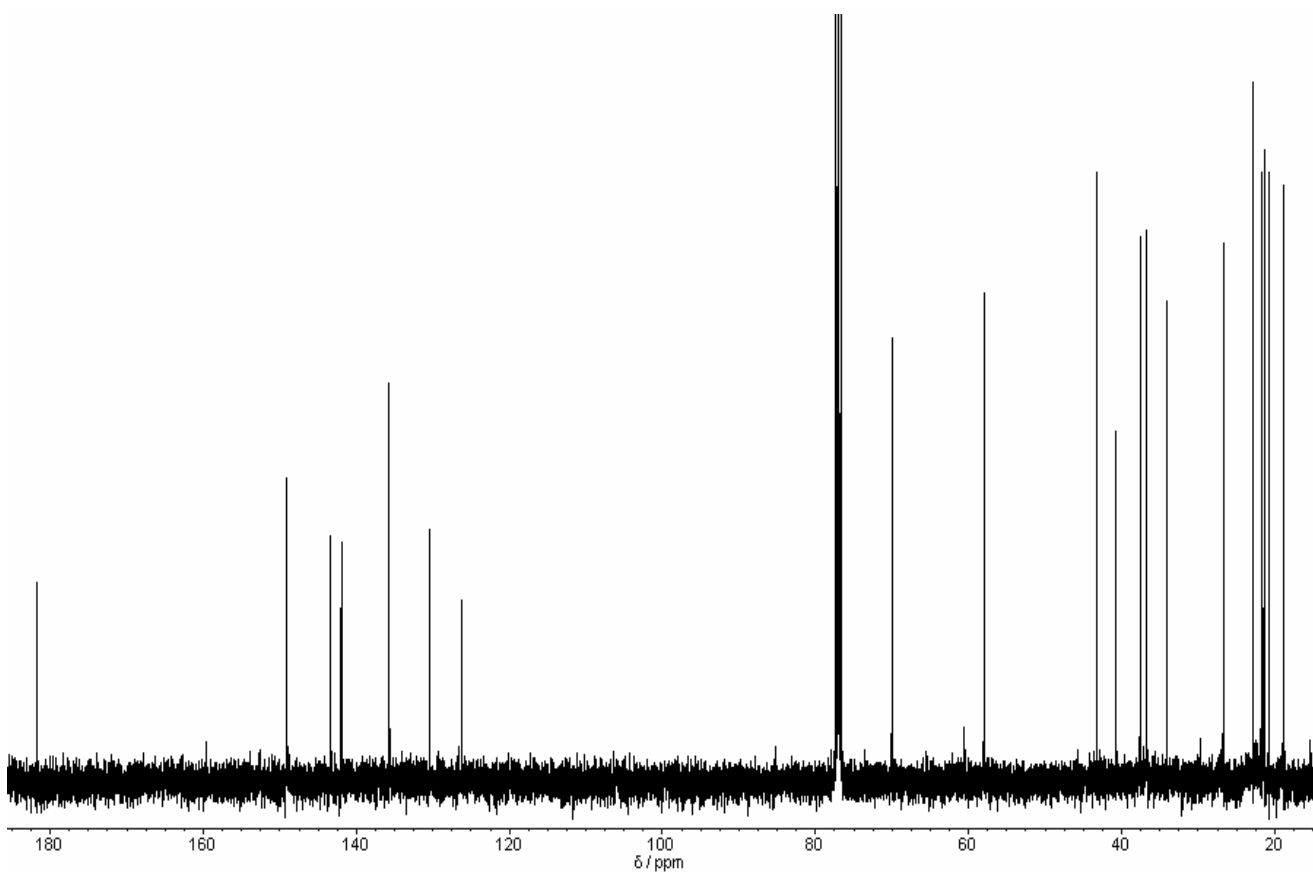


Figure 3.31. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of taxodone (**7**).

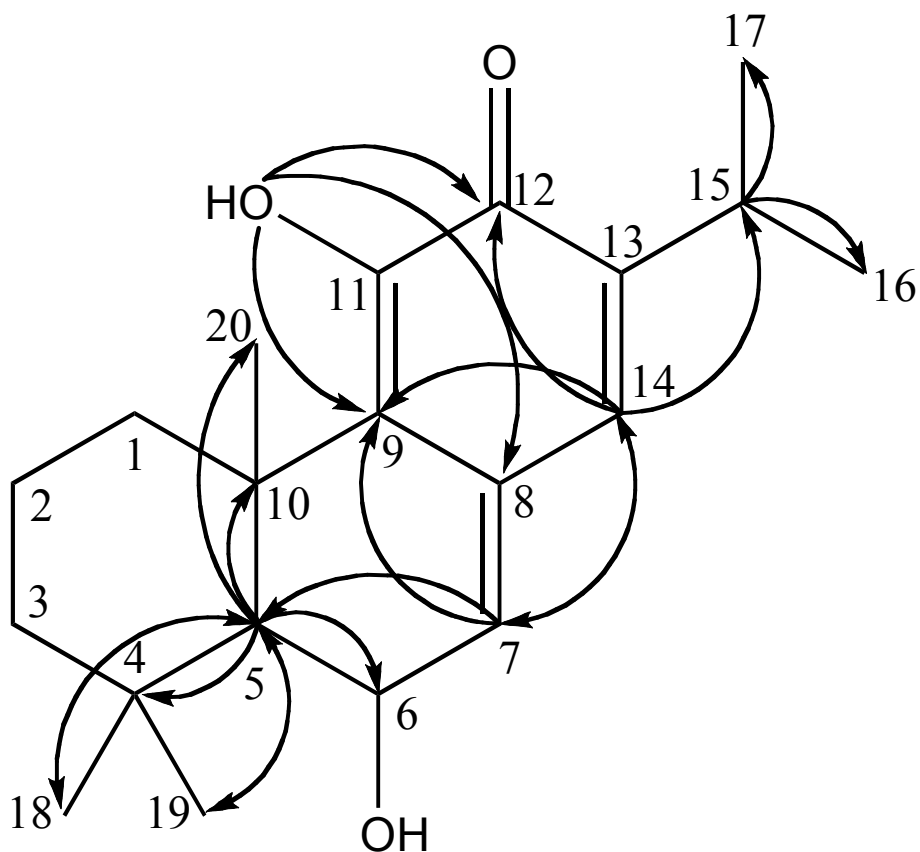


Figure 3.32. HMBC correlations of taxodone (7).

Table 3.8. 1D NMR data for comparison of taxodone (7) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *		¹³ C-NMR Data (δ)	
	Literature value **	Observed value	Literature value **	Observed value
1		1.63 m		37.6 CH ₂
2		2.89 m		
		1.55 m		18.8 CH ₂
3		1.65 m		
		1.40 m		43.2 CH ₂
4		1.43 m		
				34.1 C
5		1.54 s		58.0 CH
6	4.70 m	4.67 d (8.4)		70.0 CH
7	6.55 d (2.5)	6.52 d (2.7)		149.1 CH
8				143.4 C
9				126.2 C
10			None	40.7 C
11	7.49 s-OH	7.46 s-OH		142.0 C
12				181.7 C
13				130.4 C
14	6.81 s	6.79 s		135.7 CH
15	3.00 heptet (7.0)	3.17 heptet (6.8)		26.7 CH
16	↑ ↑	1.13 d (6.8)		20.8 CH ₃
17	1.10	1.11 d (6.8)		21.4 CH ₃
18	1.17 five CH ₃	1.19 s		36.7 CH ₃
19	1.22	1.19 s		22.8 CH ₃
20	↓ ↓	1.13 s		21.7 CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Kupchan et al. 1969.

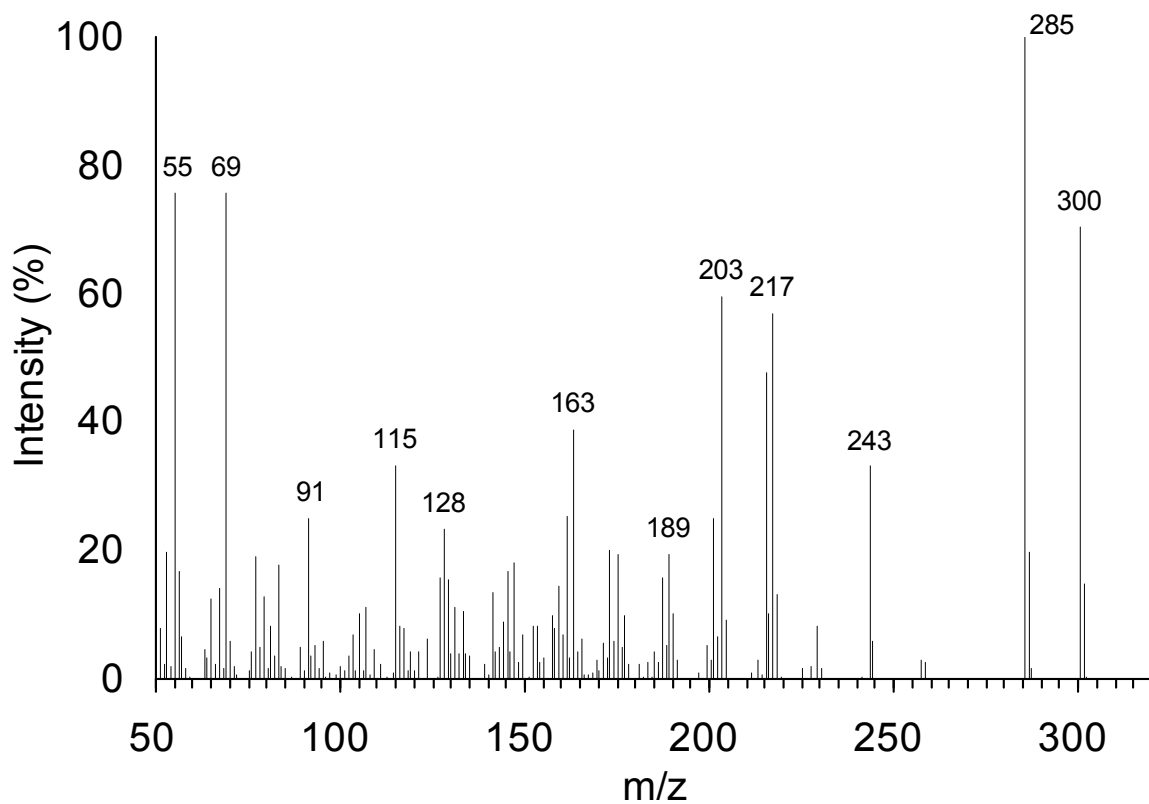


Figure 3.33. MS spectrum of sugiol (8).

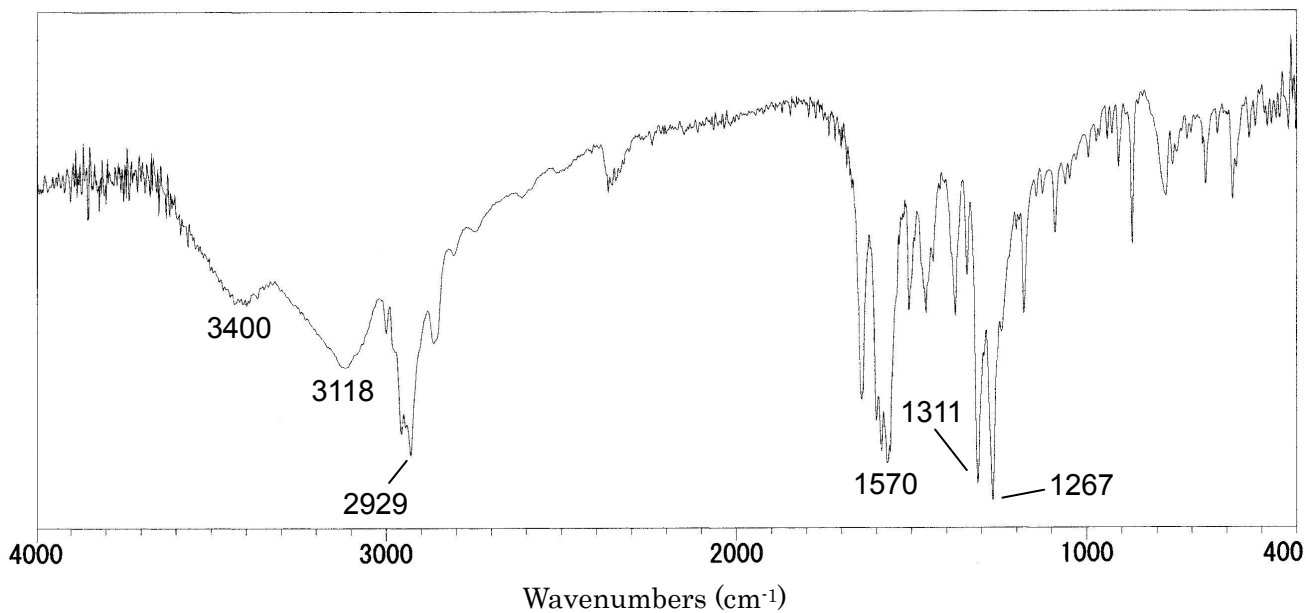


Figure 3.34. IR spectrum of sugiol (8).

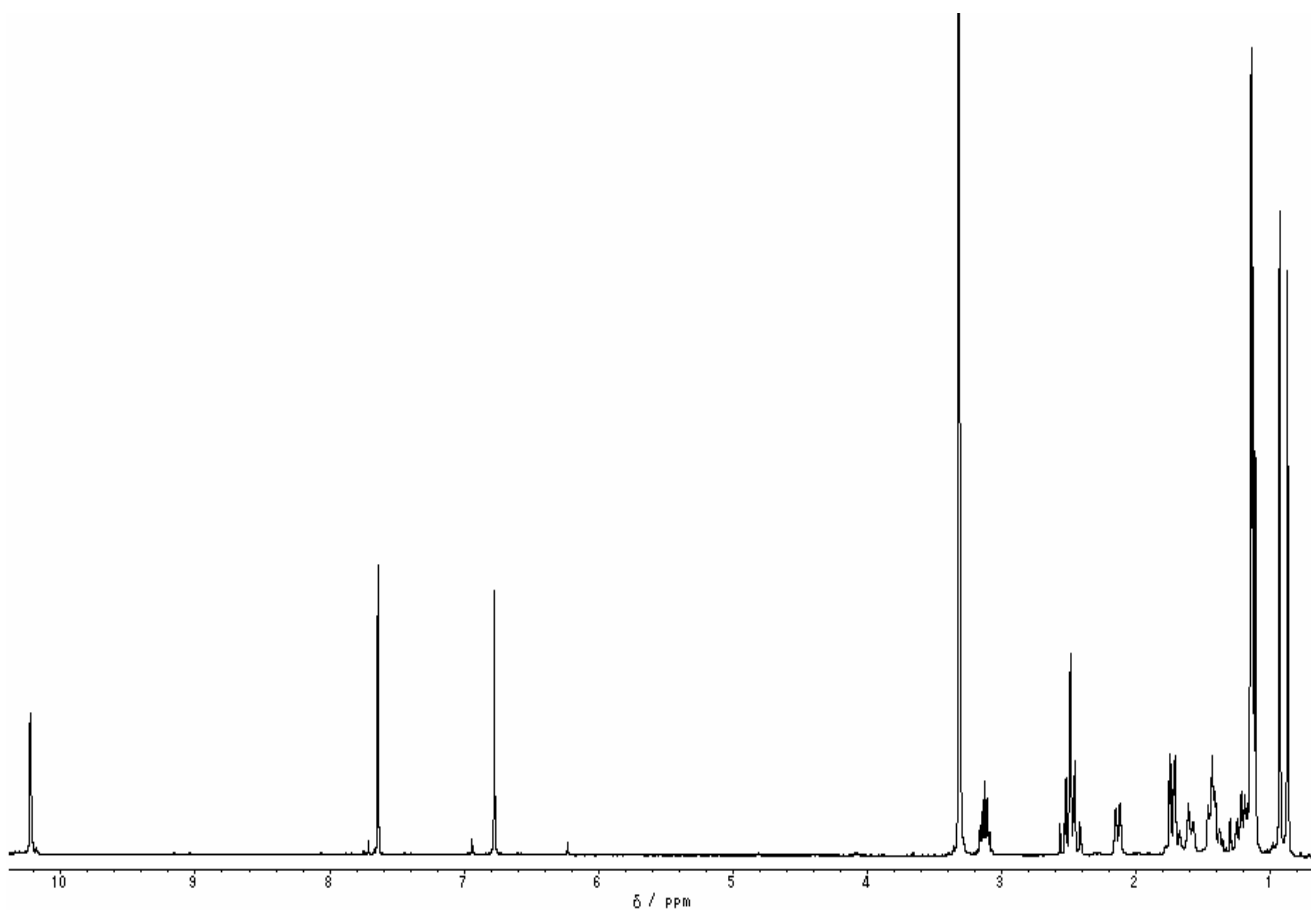


Figure 3.35. ^1H -NMR spectrum (DMSO- d_6) of sugiol (**8**).

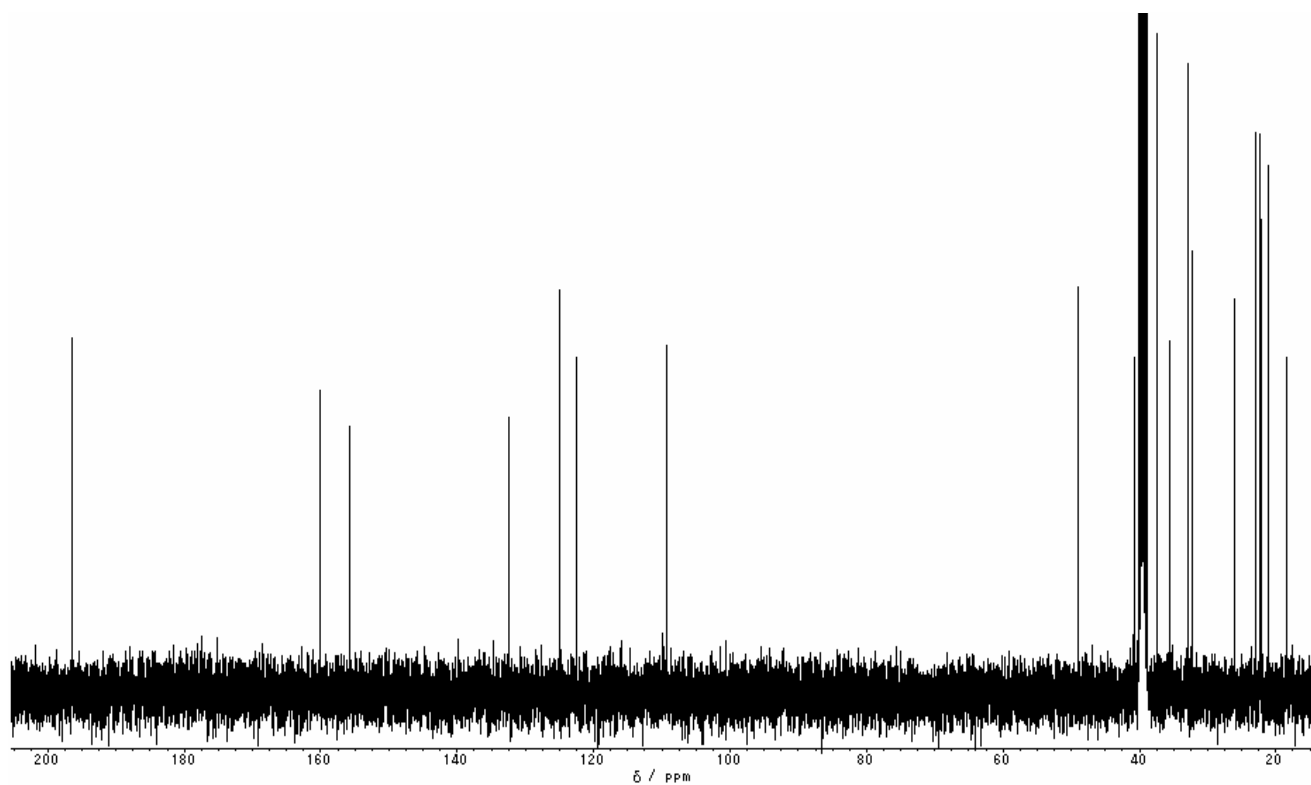


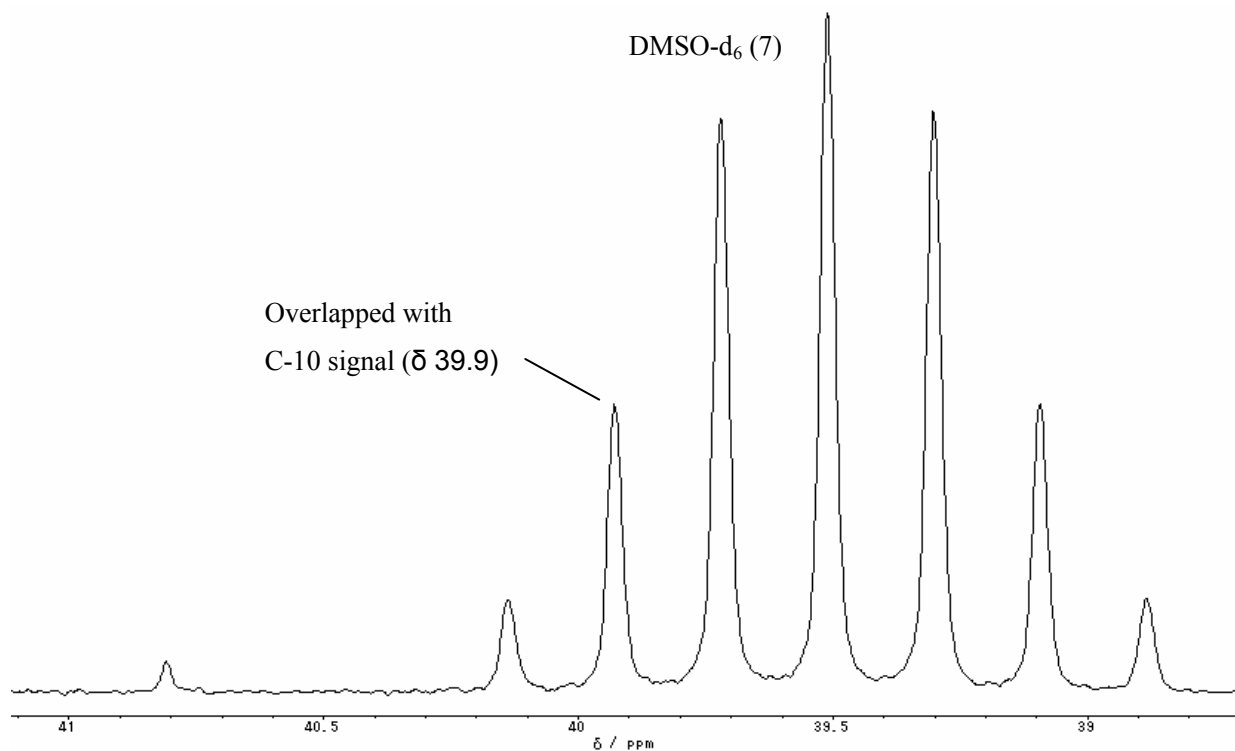
Figure 3.36. ^{13}C -NMR spectrum (DMSO- d_6) of sugiol (**8**).

Table 3.9. 1D NMR data for comparison of sugiol (**8**) (DMSO-d₆, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1					37.41	CH ₂	37.44	CH ₂
2					18.43	CH ₂	18.45	CH ₂
3	1.20-2.15 and 2.41-2.56 m		1.17-2.15 and 2.41-2.57 m		40.80	CH ₂	40.81	CH ₂
4					32.81	C	32.84	C
5					49.04	CH	49.06	CH
6					35.46	CH ₂	35.49	CH ₂
7				196.40	C	196.48	C	
8				122.53	C	122.55	C	
9				155.75	C	155.81	C	
10				39.92	C	Overlapped with DMSO-d ₆ C signal		
11	6.78	s	6.78	s	109.26	CH	109.30	CH
12	10.23	s-OH	10.23	s-OH	160.05	C	160.05	C
13					132.44	C	132.48	C
14	7.64	s	7.64	s	124.94	CH	124.97	CH
15	3.13	heptet (6.8)	3.12	heptet (6.9)	26.02	CH	26.02	CH
16	1.15	d (6.8)	1.14	d (6.9)	22.15	CH ₃	22.18	CH ₃
17	1.11	d (6.8)	1.12	d (7.1)	22.32	CH ₃	22.35	CH ₃
18	0.86	s	0.87	s	32.24	CH ₃	32.27	CH ₃
19	0.92	s	0.93	s	21.08	CH ₃	21.11	CH ₃
20	1.13	s	1.14	s	22.98	CH ₃	23.01	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Li et al. 2003 and Li et al. 2008.

**Figure 3.37.** ¹³C-NMR spectrum of DMSO-d₆ and sugiol (**8**).

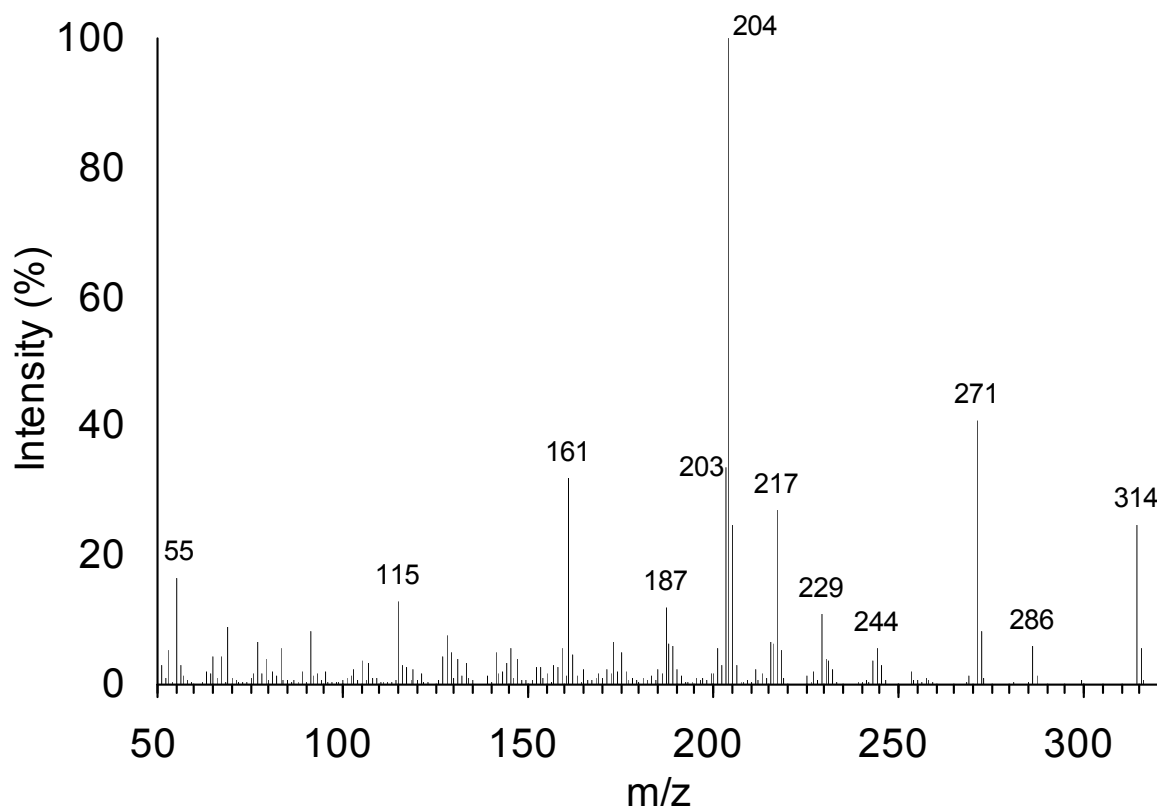


Figure 3.38. MS spectrum of xanthoperol (9).

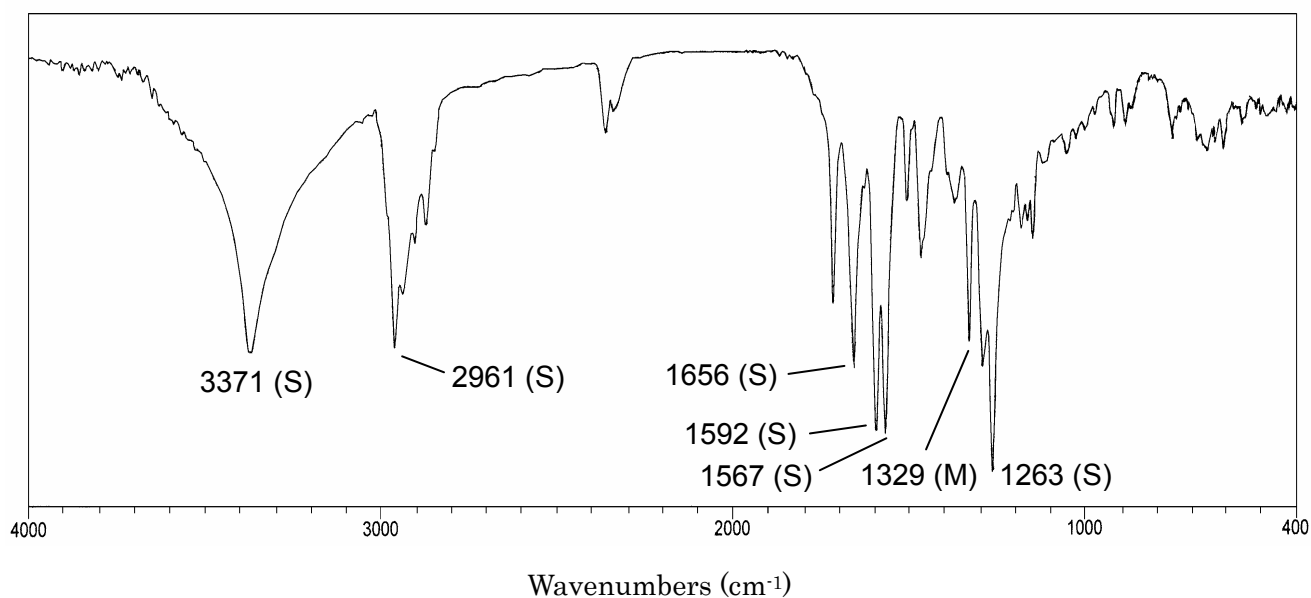


Figure 3.39. IR spectrum of xanthoperol (9).

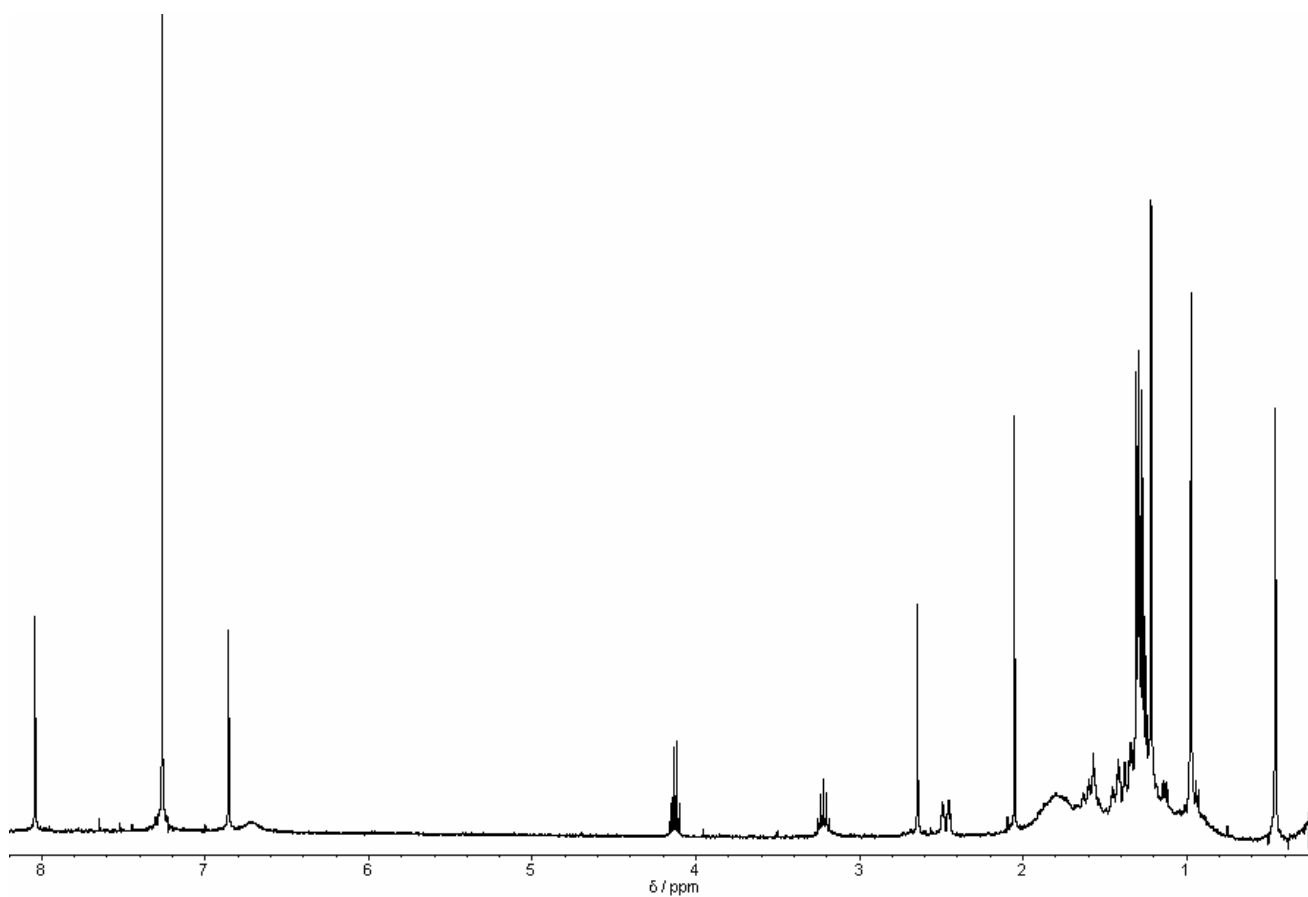


Figure 3.40. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of xanthoperol (**9**).

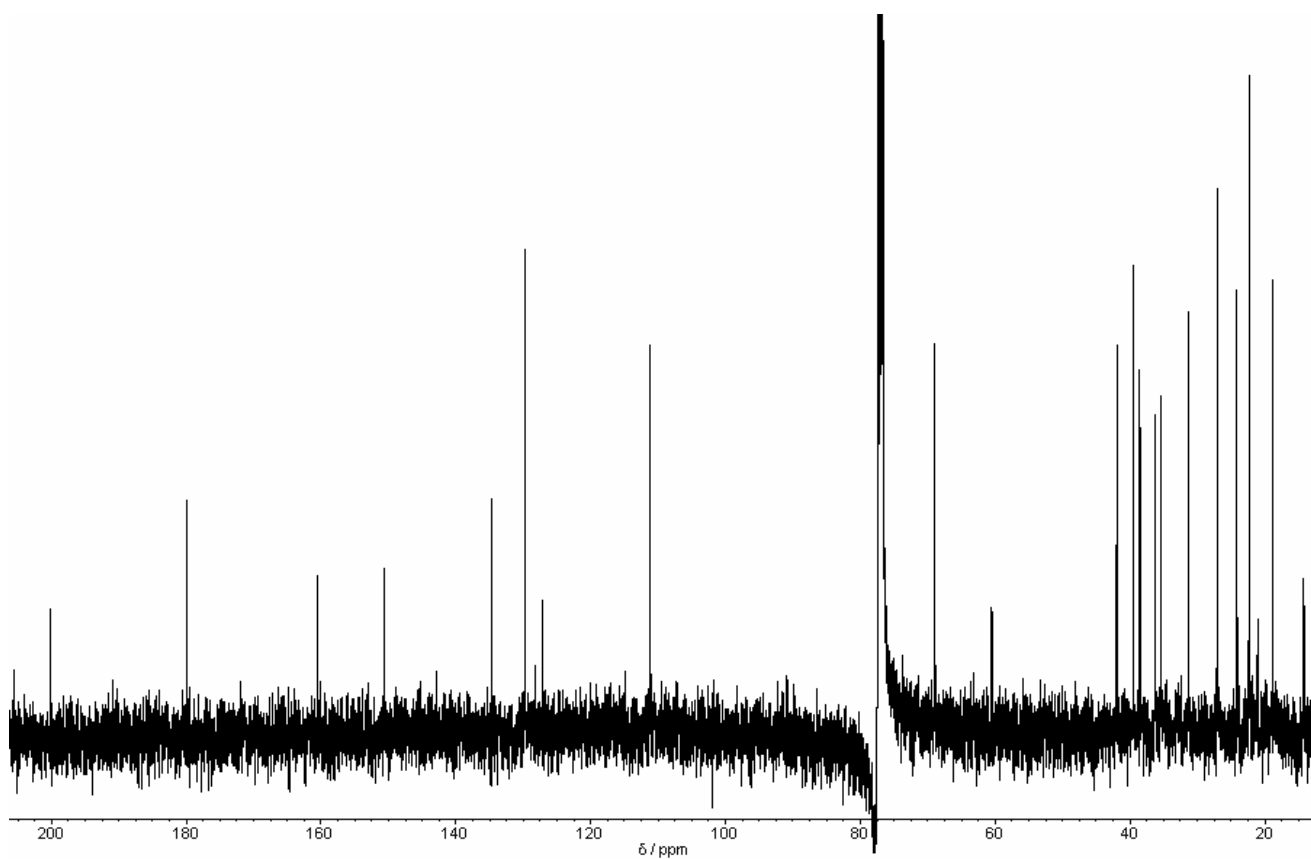


Figure 3.41. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of xanthoperol (**9**).

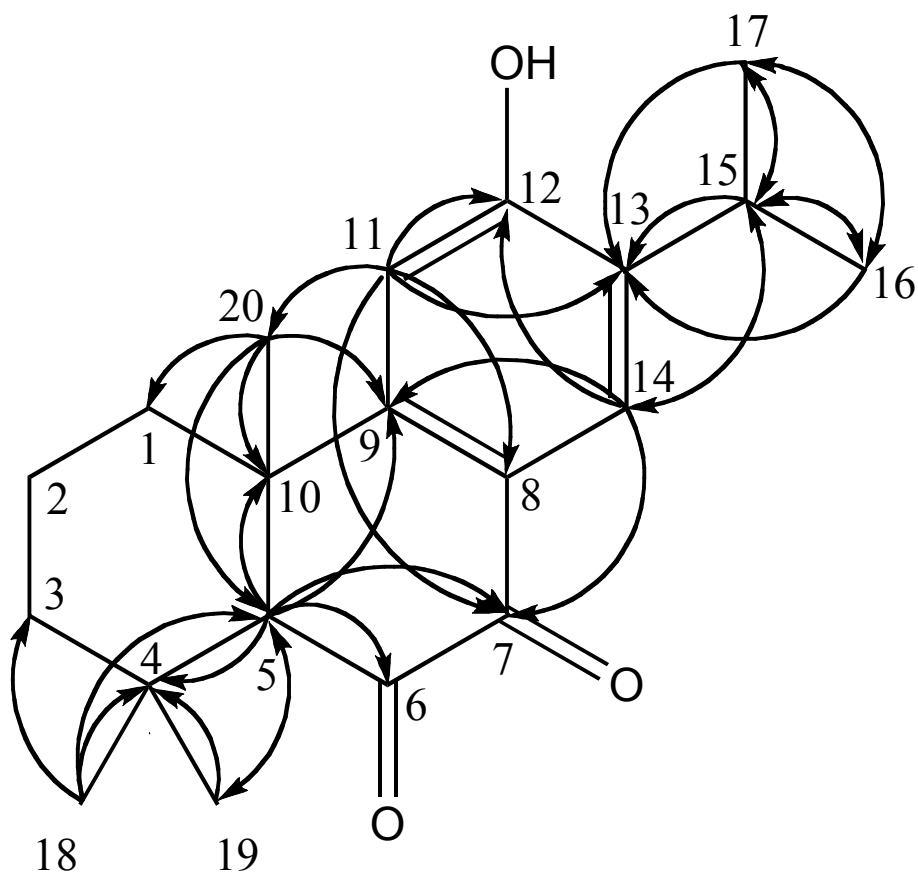


Figure 3.42. HMBC correlations of xanthoperol (**9**).

Table 3.10. 1D NMR data for comparison of xanthoperol (**9**) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *		¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **	Observed value	Literature value **		Observed value	
1	1.32-2.37 m	1.28 s	35.22	CH ₂	36.27	CH ₂
2		2.47 d (14.8)	18.40	CH ₂	18.85	CH ₂
3		1.57 m	40.98	CH ₂	41.95	CH ₂
4		1.31 m	34.71	C	35.44	C
5	2.60 s	1.45 m	68.07	CH	68.94	CH
6		2.64 s	199.70	C	200.10	C
7			179.04	C	179.93	C
8			125.42	C	127.22	C
9			150.18	C	150.62	C
10			38.98	C	39.44	C
11	6.91 s	6.86 s	110.59	CH	111.17	CH
12			162.25	C	160.49	C
13			134.44	C	134.72	C
14	7.77 s	8.04 s	127.95	CH	129.75	CH
15	3.16 heptet (6.4)	3.22 heptet (7.0)	26.32	CH	26.95	CH
16		1.30 d (7.0)	21.94	CH ₃	22.25	CH ₃
17		1.28 d (7.0)	22.09	CH ₃	22.34	CH ₃
18	0.82 s	0.97 s	30.96	CH ₃	31.36	CH ₃
19	0.31 s	0.46 s	23.61	CH ₃	24.12	CH ₃
20	1.11 s	1.22 s	37.94	CH ₃	38.53	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Li et al. 2003.

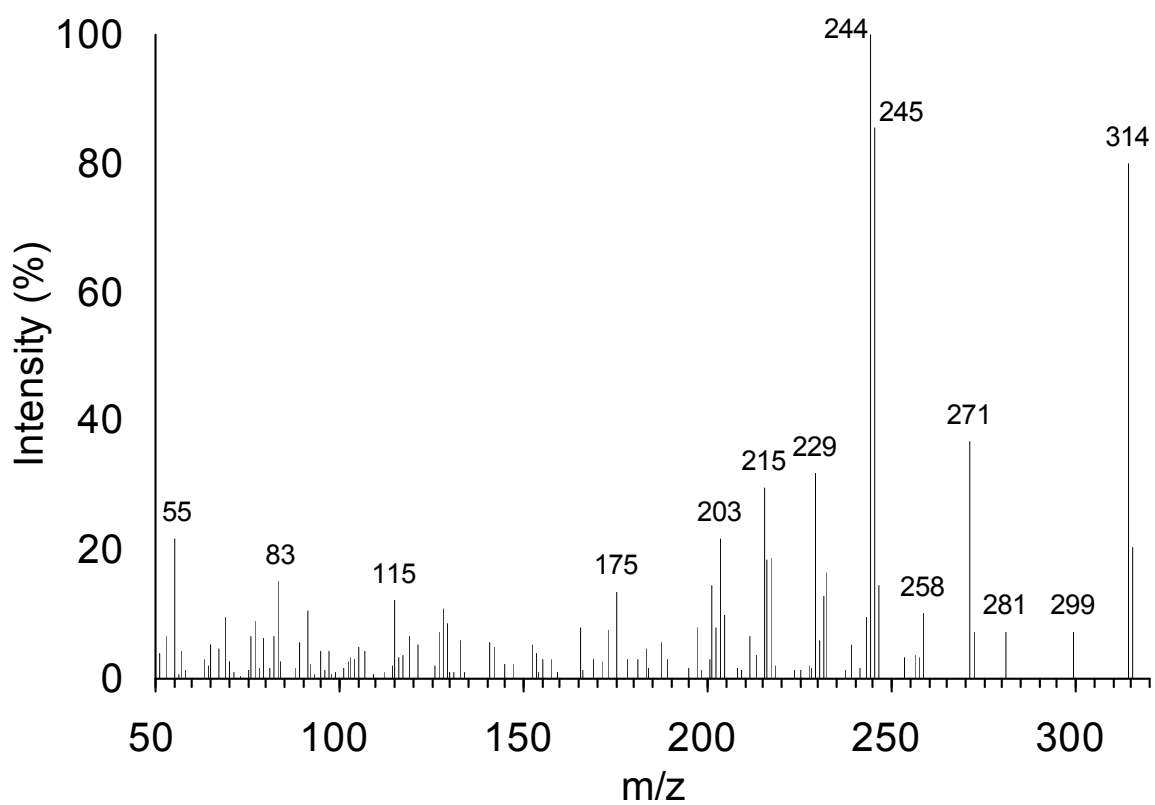


Figure 3.43. MS spectrum of salvinolone (10).

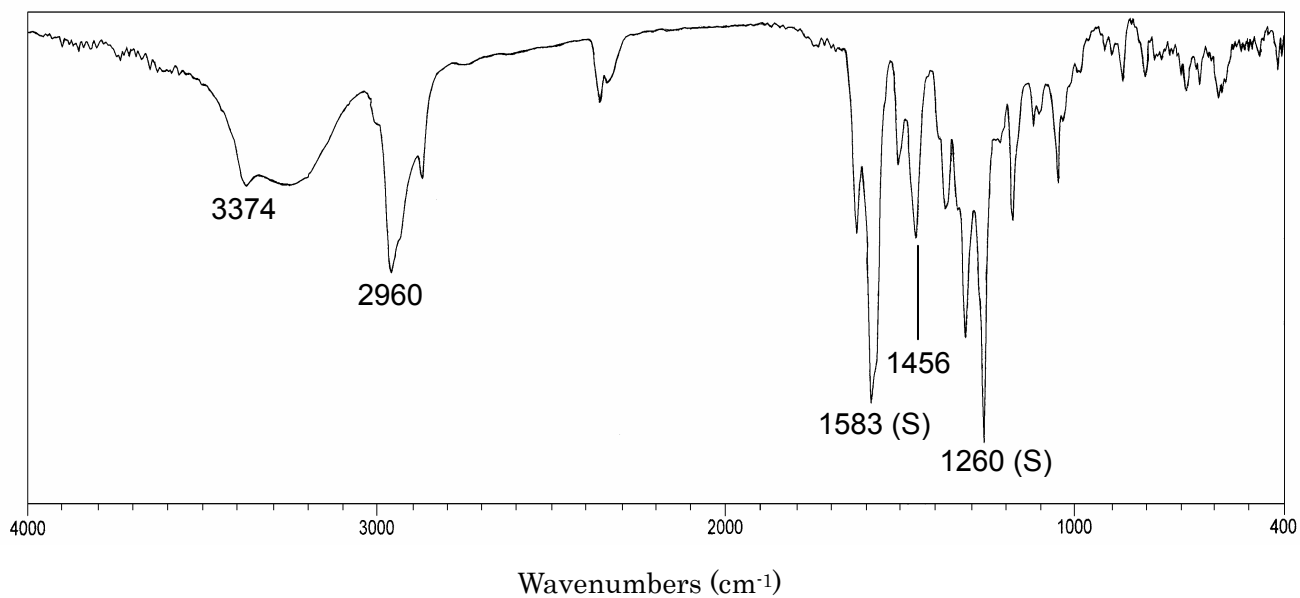


Figure 3.44. IR spectrum of salvinolone (10).

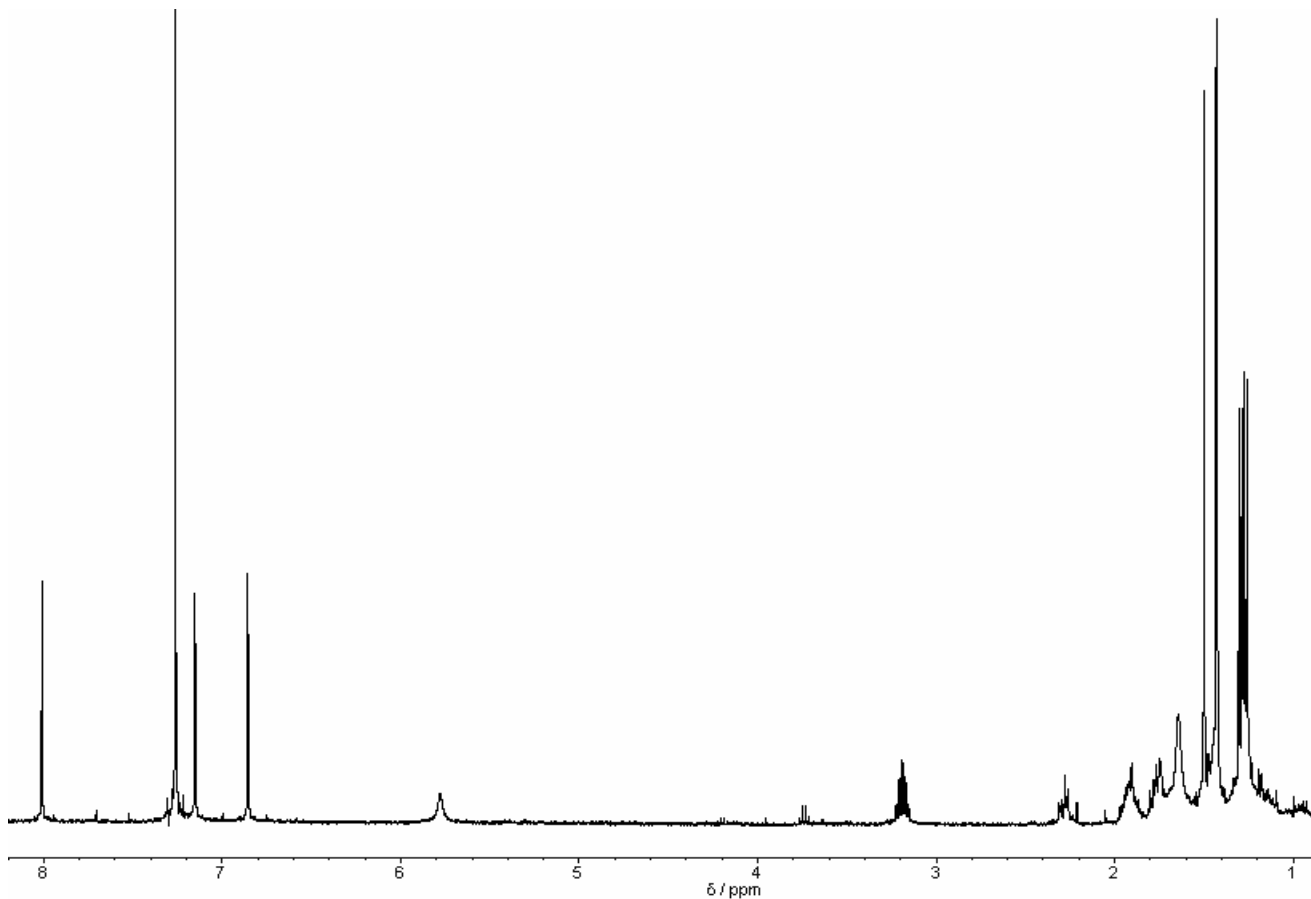


Figure 3.45. ^1H -NMR spectrum (CDCl_3) of salvinolone (**10**).

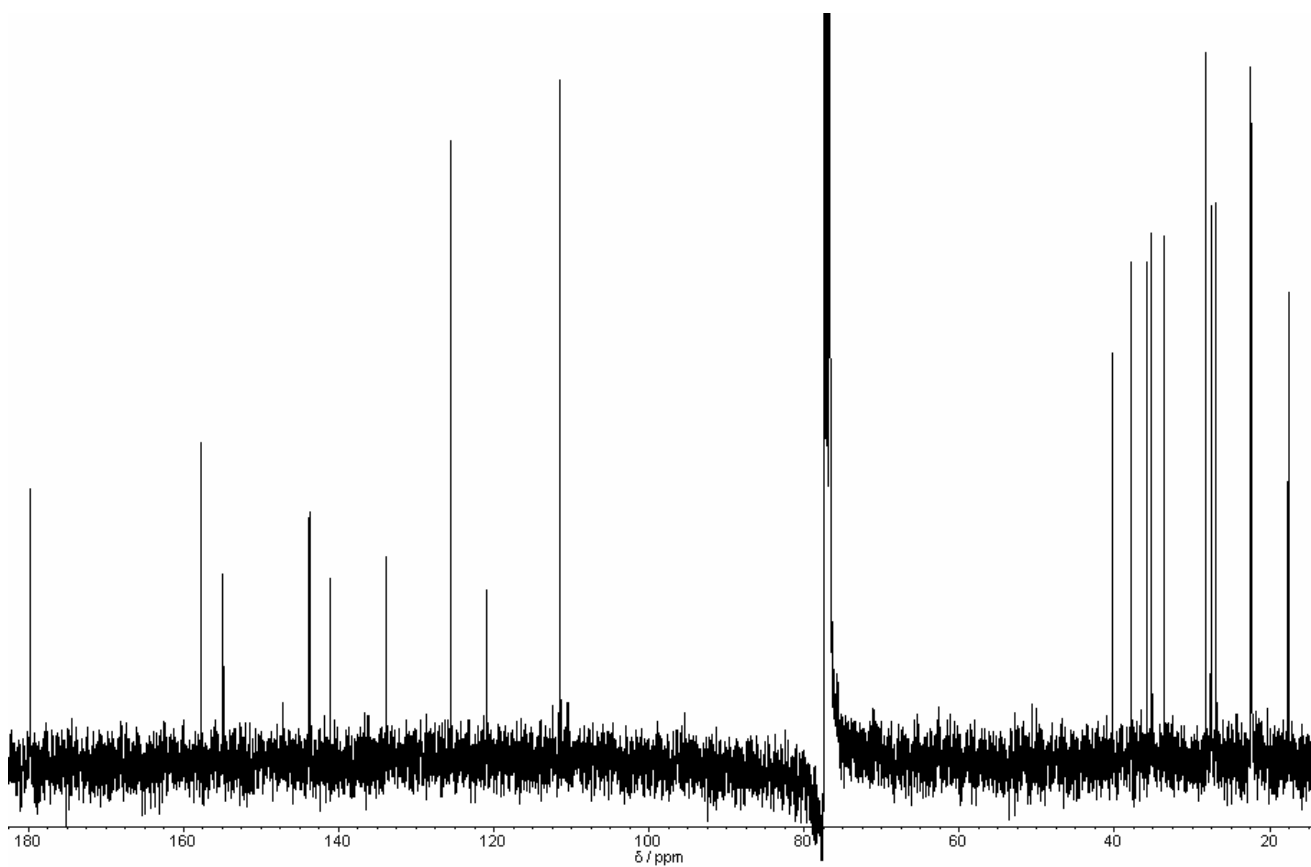


Figure 3.46. ^{13}C -NMR spectrum (CDCl_3) of salvinolone (**10**).

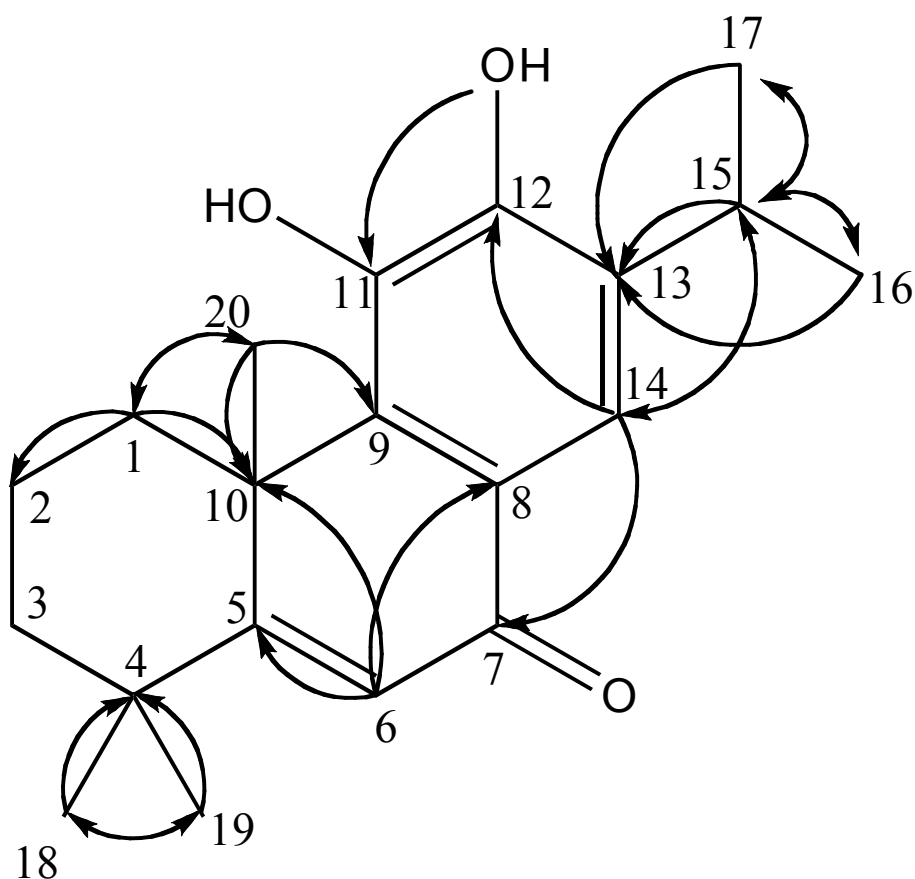


Figure 3.47. HMBC correlations of salvinolone (10).

Table 3.11. 1D NMR data for comparison of salvinolone (10) (CDCl₃, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1			1.78	m	33.55	CH ₂	33.60	CH ₂
2	2.27	m	2.28	m				
			1.75	m	17.55	CH ₂	17.59	CH ₂
			1.90	m				
3			1.44	m	37.83	CH ₂	37.88	CH ₂
			1.93	m				
4					35.87	C	35.90	C
5					157.76	C	157.72	C
6	6.85	s	6.86	s	125.54	CH	111.43	CH
7					179.72	C	179.72	C
8					120.80	C	120.90	C
9					143.73	C	143.78	C
10					40.30	C	40.31	C
11	5.87	s-OH	5.78	s-OH	141.14	C	141.04	C
	7.15	s-OH	7.15	s-OH	154.89	C	154.90	C
12					133.84	C	133.81	C
13					111.40	CH	125.58	CH
14	8.01	s	8.01	s	26.84	CH	26.90	CH
15	3.12	heptet (7.0)	3.19	heptet (7.0)	22.25	CH ₃	22.29	CH ₃
16	1.26	d (7.0)	1.27	d (7.0)	22.45	CH ₃	22.49	CH ₃
17	1.28	d (7.0)	1.30	d (7.0)	27.53	CH ₃	27.56	CH ₃
18	1.43	s	1.43	s	28.17	CH ₃	28.22	CH ₃
19	1.43	s	1.43	s	35.16	CH ₃	35.20	CH ₃
20	1.49	s	1.50	s				

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Yamamoto et al. 2003.

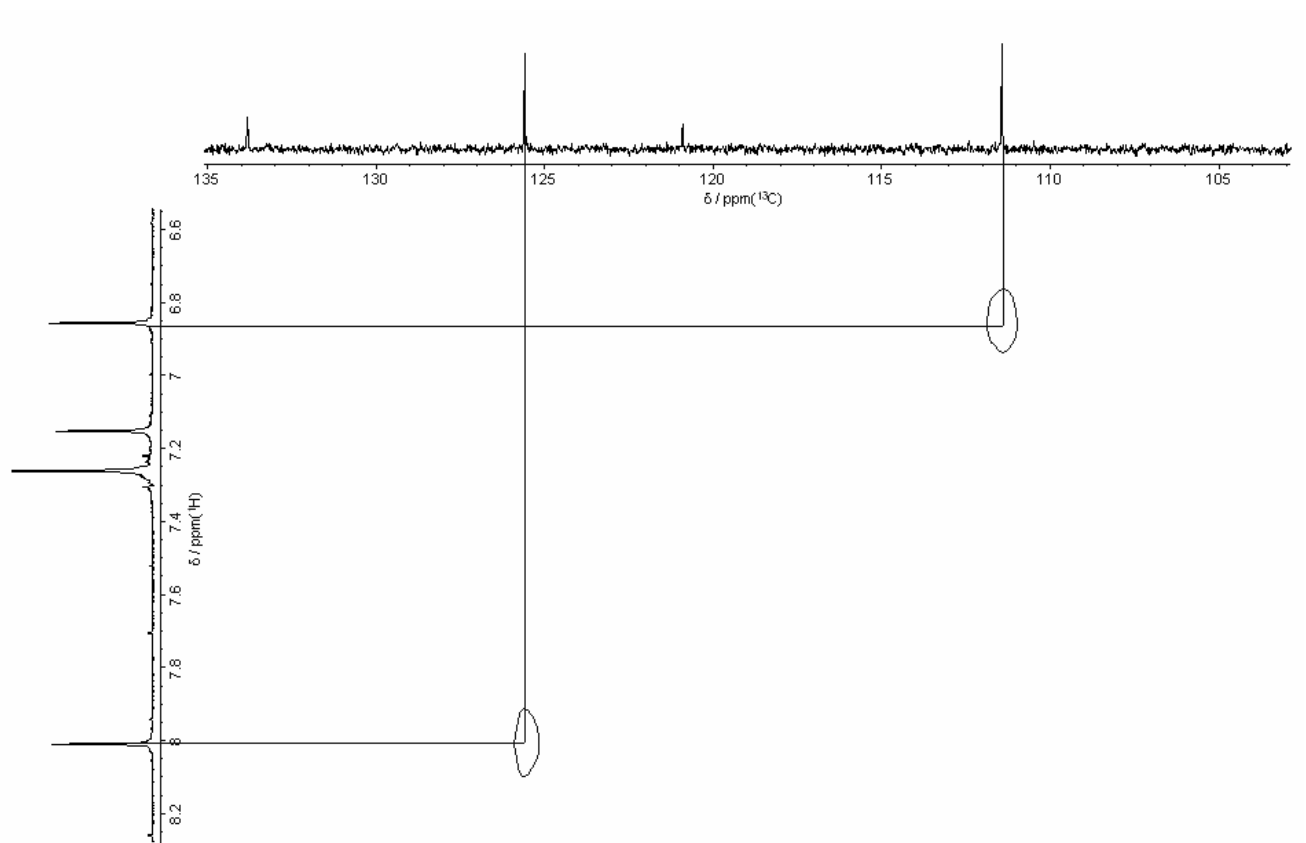


Figure 3.48. C-H COSY correlations of salvinolone (10).

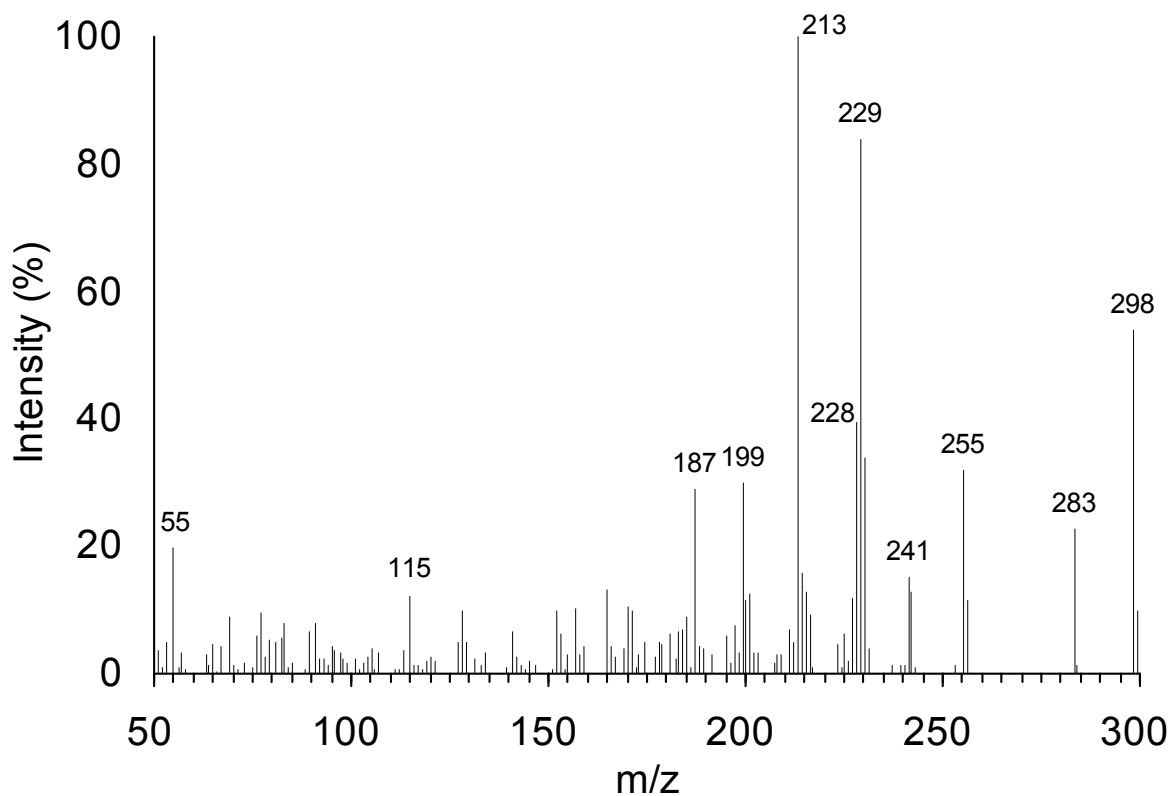


Figure 3.49. MS spectrum of 5,6-dehydrosugiol (11).

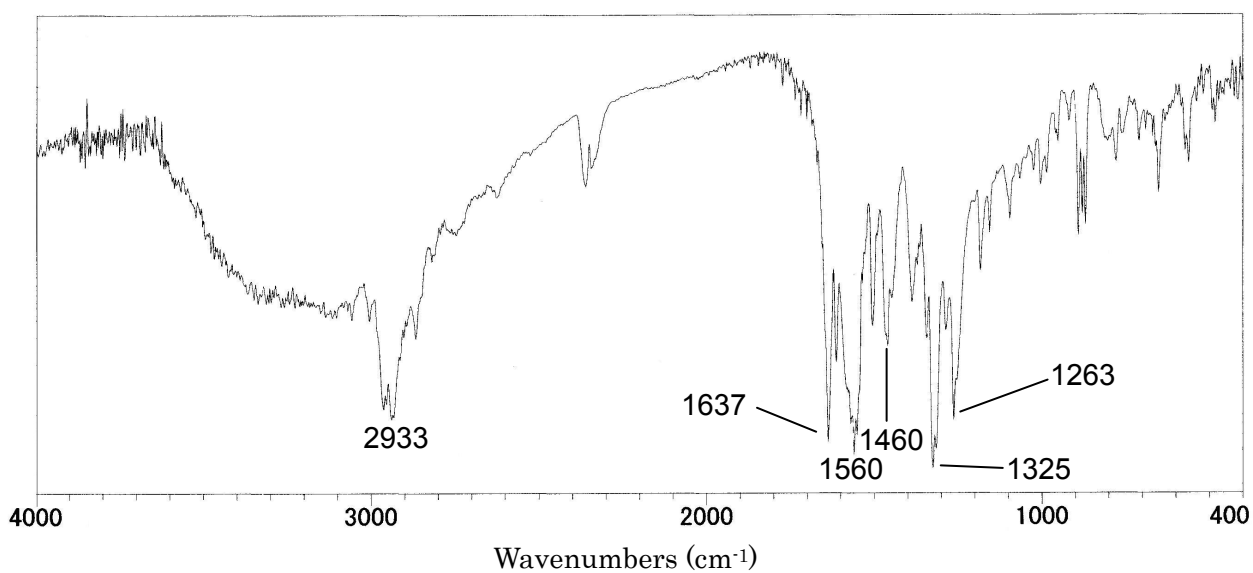


Figure 3.50. IR spectrum of 5,6-dehydrosugiol (11).

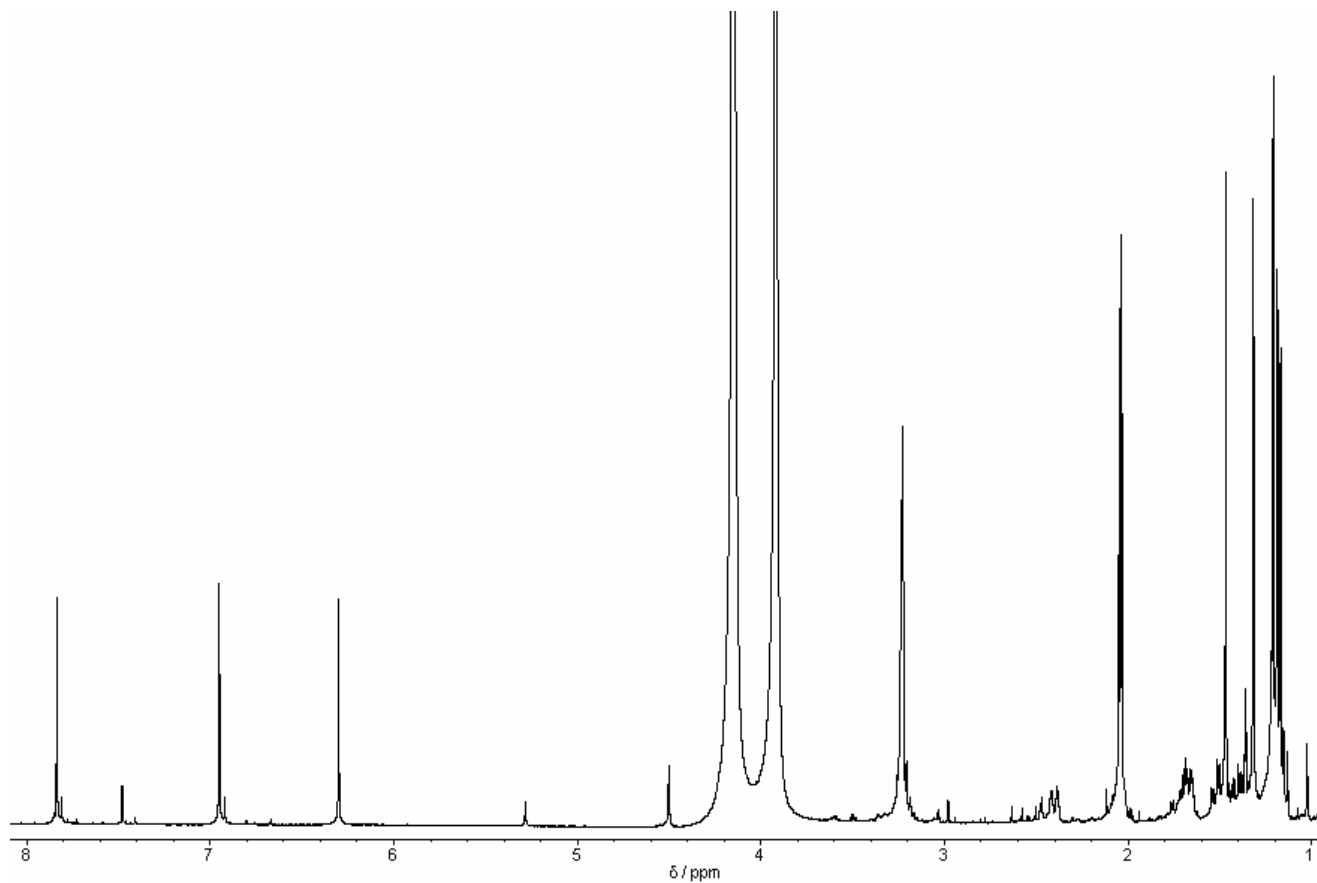


Figure 3.51. ^1H -NMR spectrum (acetone- d_6 :MeOH- d_4 =9:1) of 5,6-dehydrosugiol (**11**).

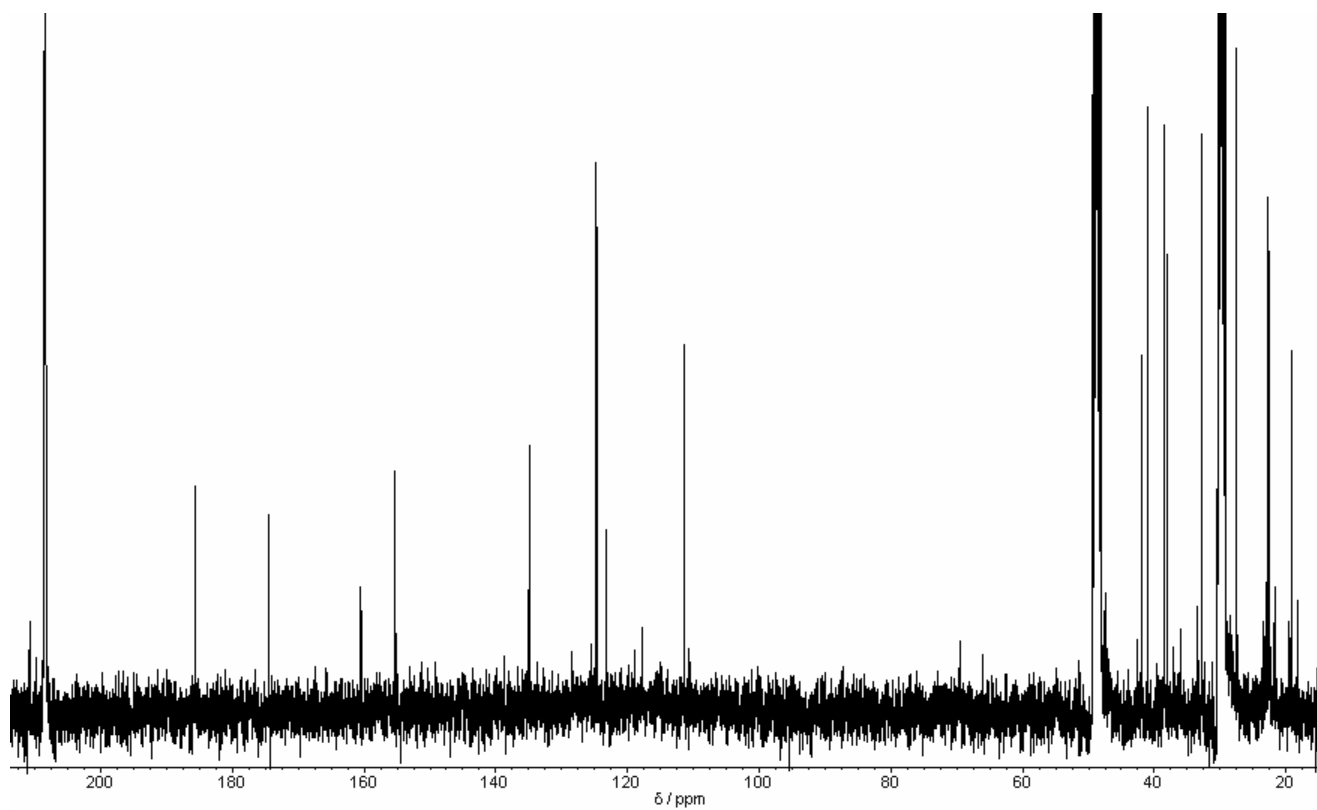


Figure 3.52. ^{13}C -NMR spectrum (acetone- d_6 :MeOH- d_4 =9:1) of 5,6-dehydrosugiol (**11**).

Table 3.12. 1D NMR data for comparison of 5,6-dehydrosugiol (**11**) (acetone-d₆:MeOH-d₄=9:1, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *		¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **	Observed value	Literature value **		Observed value	
1	1.31-2.30 m	2.40 m	37.29	CH ₂	38.48	CH ₂
2			18.00	CH ₂	19.22	CH ₂
3			39.78	CH ₂	41.04	CH ₂
4			36.92	C	38.01	C
5			172.21	C	174.46	C
6	6.23 s	6.30 s	123.76	CH	124.64	CH
7			183.25	C	185.68	C
8			121.62	C	123.18	C
9			153.44	C	155.25	C
10			40.44	C	41.92	C
11	6.94 s	6.95 s	110.51	CH	111.40	CH
12			159.18	C	160.49	C
13			133.43	C	134.95	C
14	7.71 s	7.84 s	123.59	CH	124.86	CH
15	3.16 heptet (6.8)	3.23 t (1.7)	26.15	CH	27.49	CH
16	1.16 d (6.8)	1.18 d (7.0)	22.17	CH ₃	22.57	CH ₃
17	1.18 d (6.8)	1.20 d (7.0)	22.35	CH ₃	22.68	CH ₃
18	1.19 s	1.21 s	32.24	CH ₃	32.78	CH ₃
19	1.29 s	1.32 s	32.51	CH ₃	32.83	CH ₃
20	1.42 s	1.47 s	28.85	CH ₃	29.36	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Li et al. 2003.

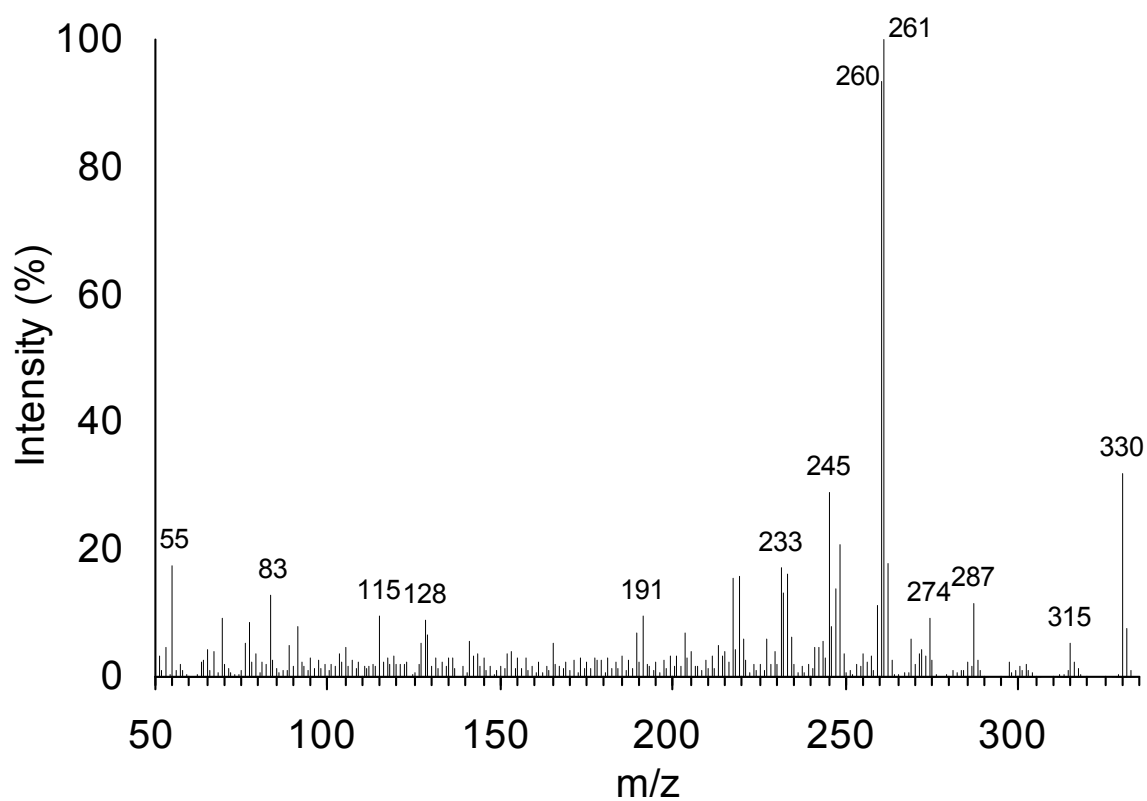


Figure 3.53. MS spectrum of 14-deoxycoleon U (**12**).

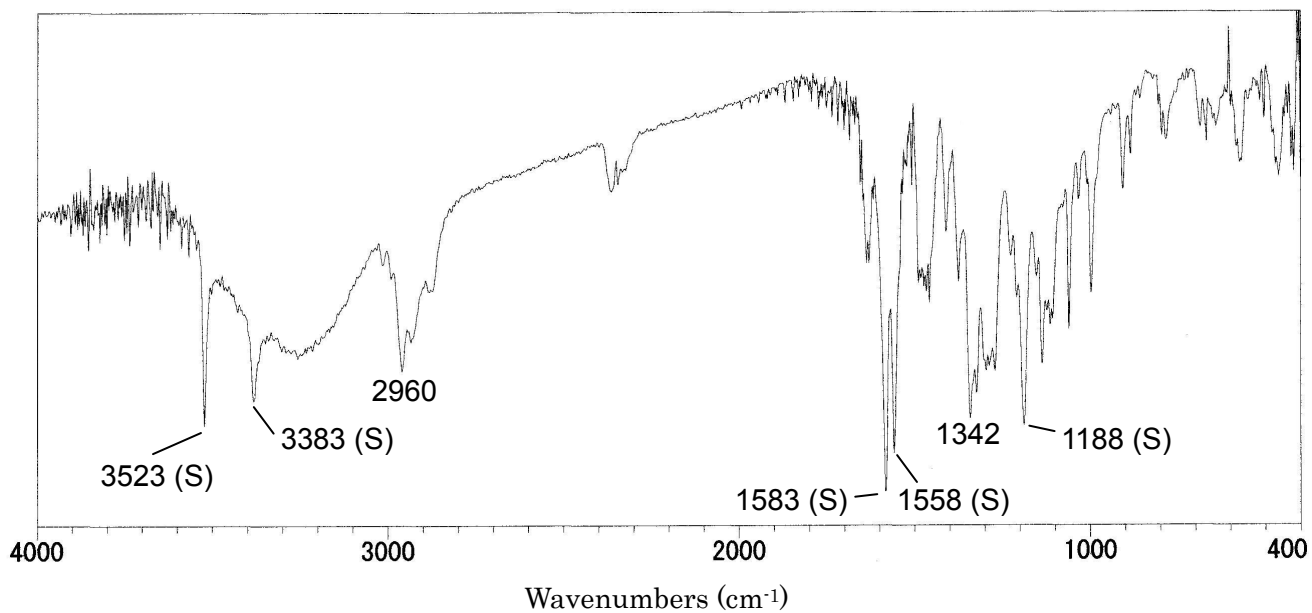


Figure 3.54. IR spectrum of 14-deoxycoleon U (**12**).

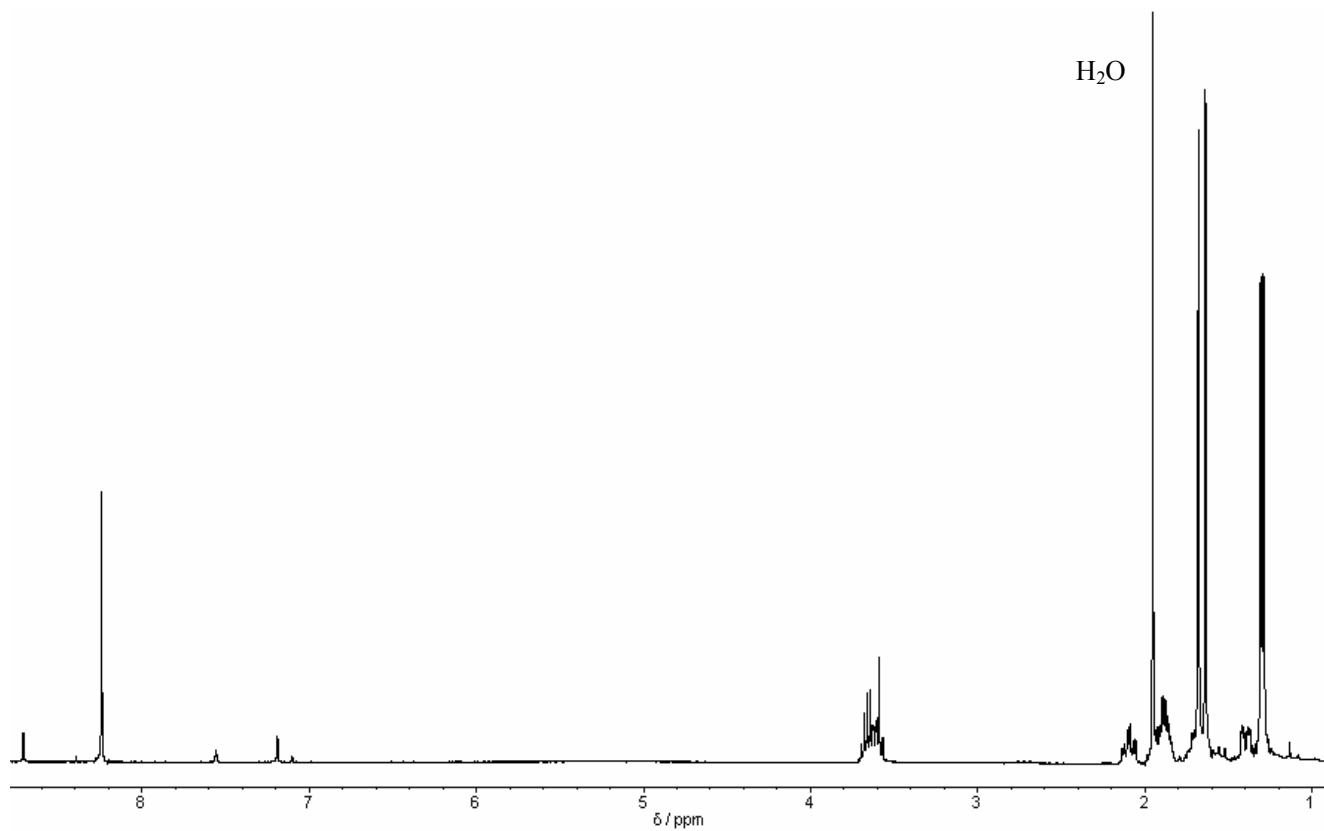


Figure 3.55. ^1H -NMR spectrum (pyridine- d_5) of 14-deoxycoleon U (**12**).

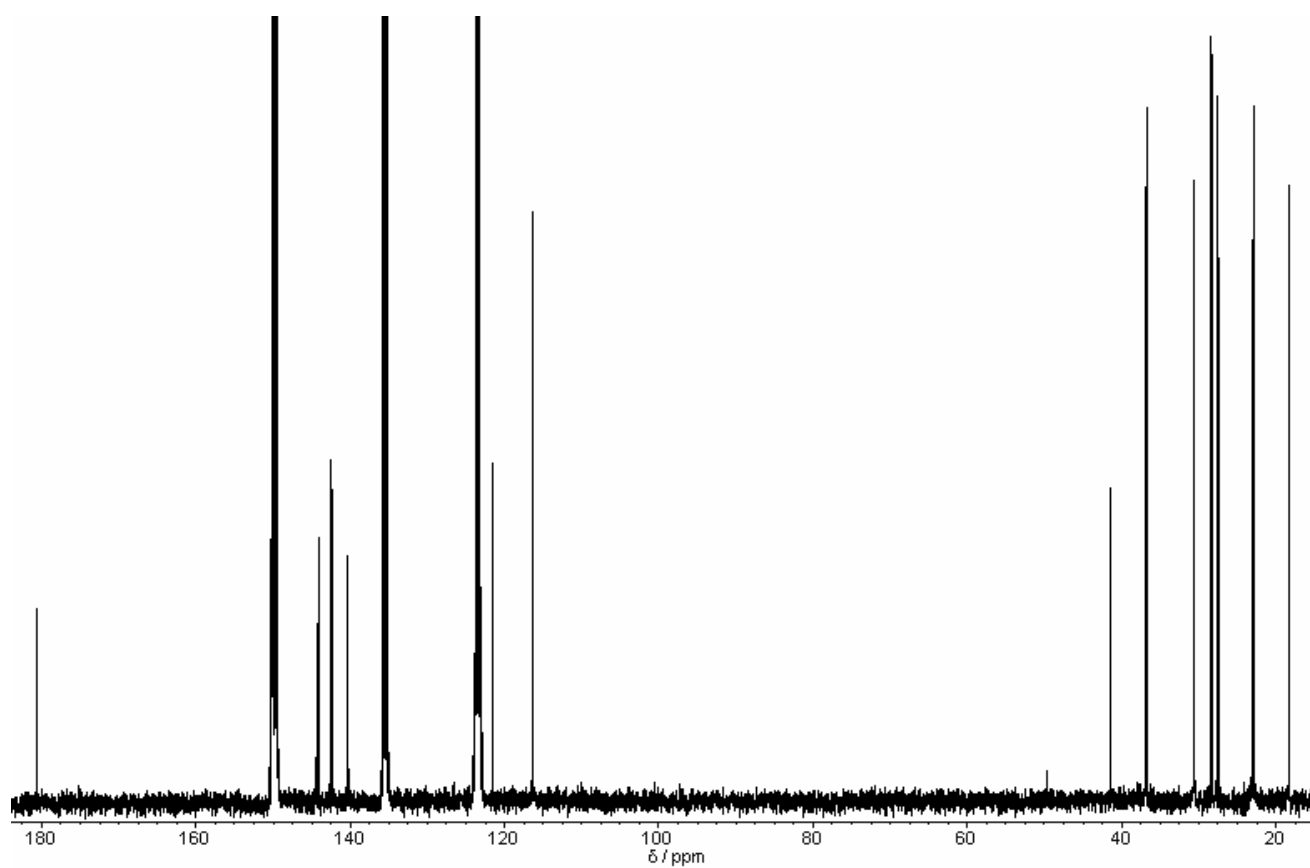


Figure 3.56. ^{13}C -NMR spectrum (pyridine- d_5) of 14-deoxycoleon U (**12**).

Table 3.13. 1D NMR data for comparison of 14-deoxycoleon U (**12**) (pyridine-d₅, δ in ppm).

Carbon No.	¹ H-NMR Data (δ) *				¹³ C-NMR Data (δ)			
	Literature value **		Observed value		Literature value **		Observed value	
1					30.4	CH ₂	30.59	CH ₂
2	-3.50	Overlapped with H-15 signal			18.2	CH ₂	18.28	CH ₂
3					37.0	CH ₂	36.86	CH ₂
4					36.6	C	36.70	C
5					143.8	C	144.15	C
6			8.39	s-OH	143.9	C	144.34	C
7					180.5	C	180.68	C
8					121.3	C	121.55	C
9					142.3	C	142.44	C
10					41.3	C	41.39	C
11					139.9	C	140.30	C
12			7.10	s-OH	149.7	C	150.23	C
13					135.4	C	135.60	C
14	8.12	s	8.24	s	116.4	CH	116.40	CH
15	3.53	heptet (7.2)	3.64	heptet (7.0)	27.6	CH	27.59	CH
16	1.28	d	1.30	d (7.0)	22.8	CH ₃	22.82	CH ₃
17	1.28	d	1.30	d (7.0)	23.0	CH ₃	23.09	CH ₃
18	1.59	s	1.64	s	28.1	CH ₃	28.29	CH ₃
19	1.63	s	1.68	s	27.6	CH ₃	27.50	CH ₃
20	1.89	s	1.95	s	28.4	CH ₃	28.36	CH ₃

* *J* value were shown in parenthesis.

** Literature value were refer to Hueso-Rodríguez et al. 1983.

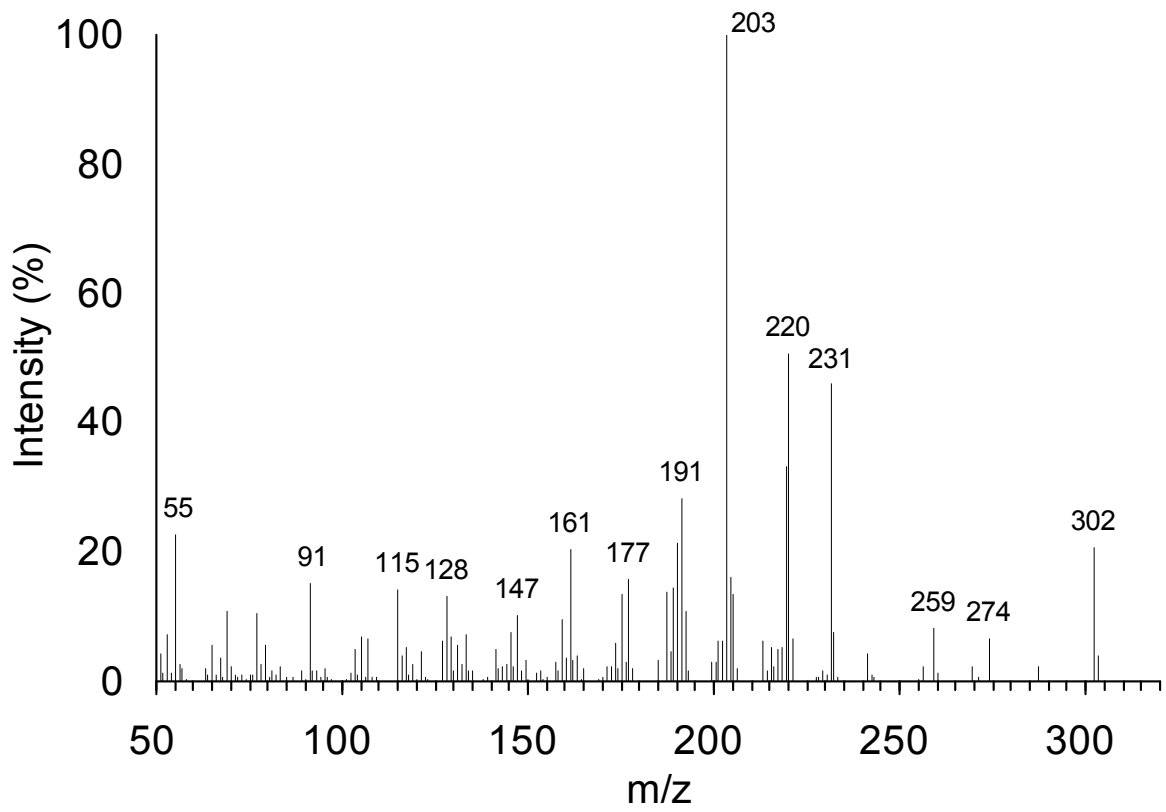


Figure 3.57. MS spectrum of taxodal (6).

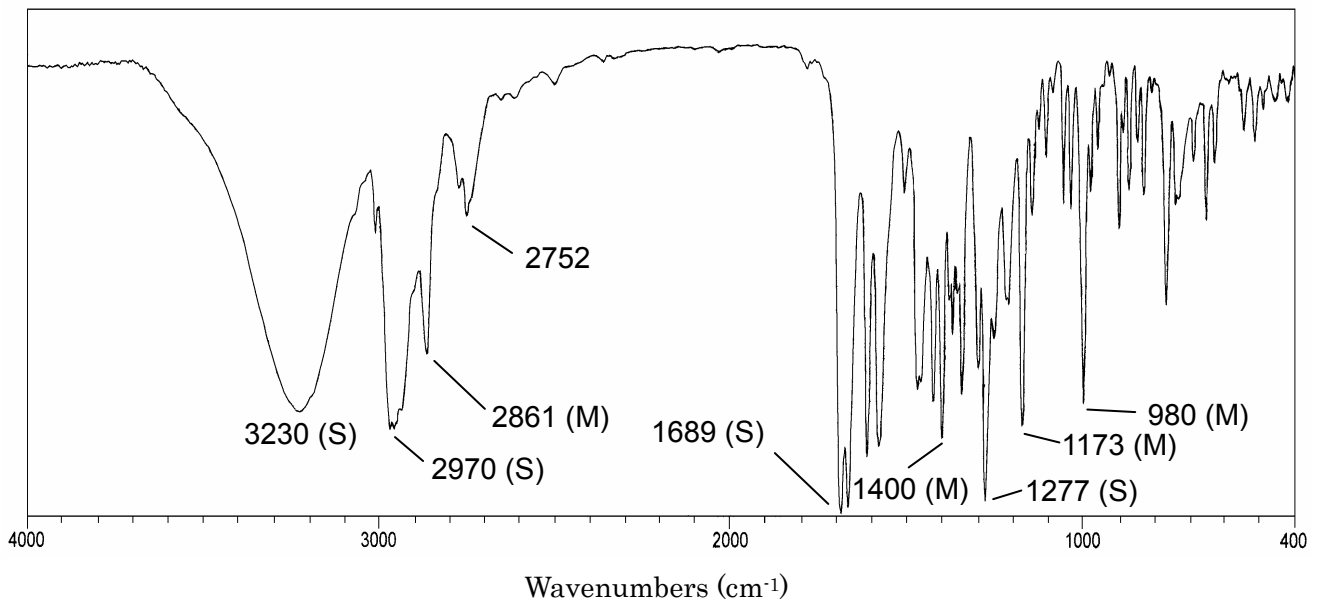


Figure 3.58. IR spectrum of taxodal (6).

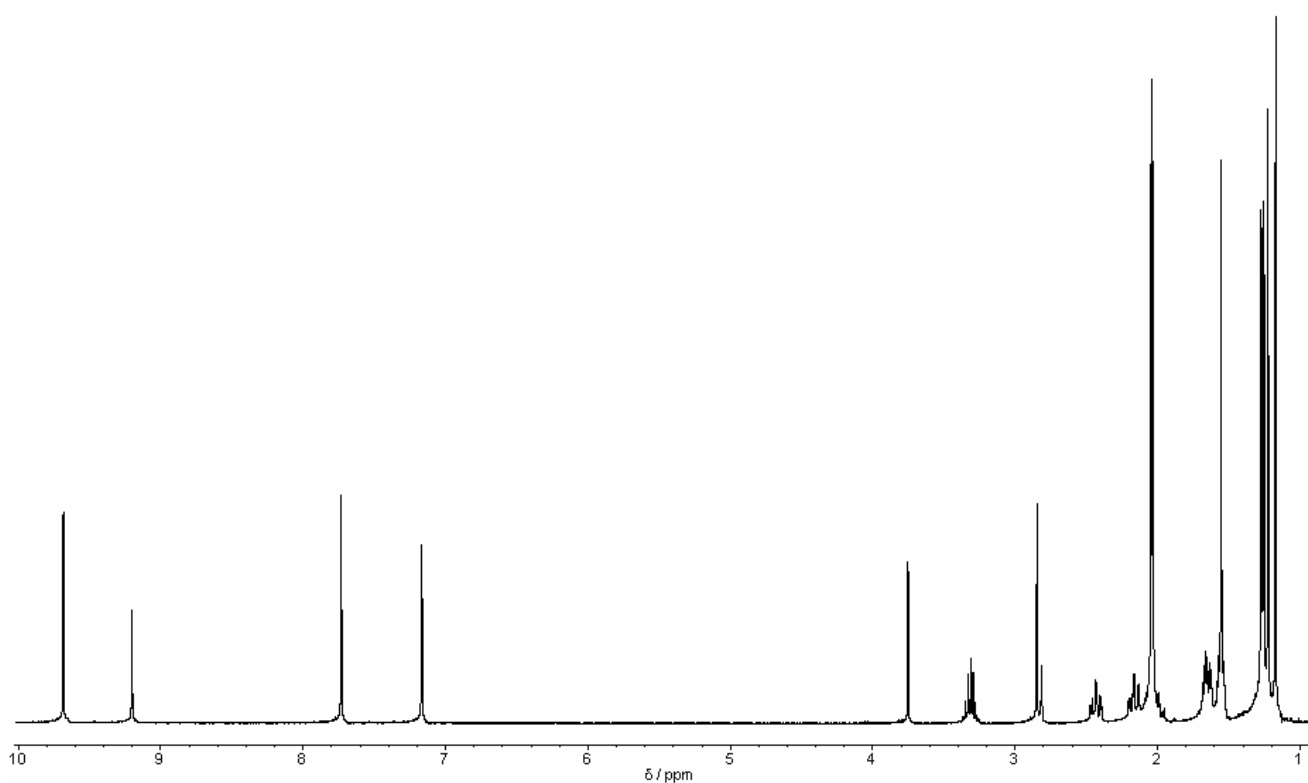


Figure 3.59. ^1H -NMR spectrum (acetone- d_6) of taxodal (**6**).

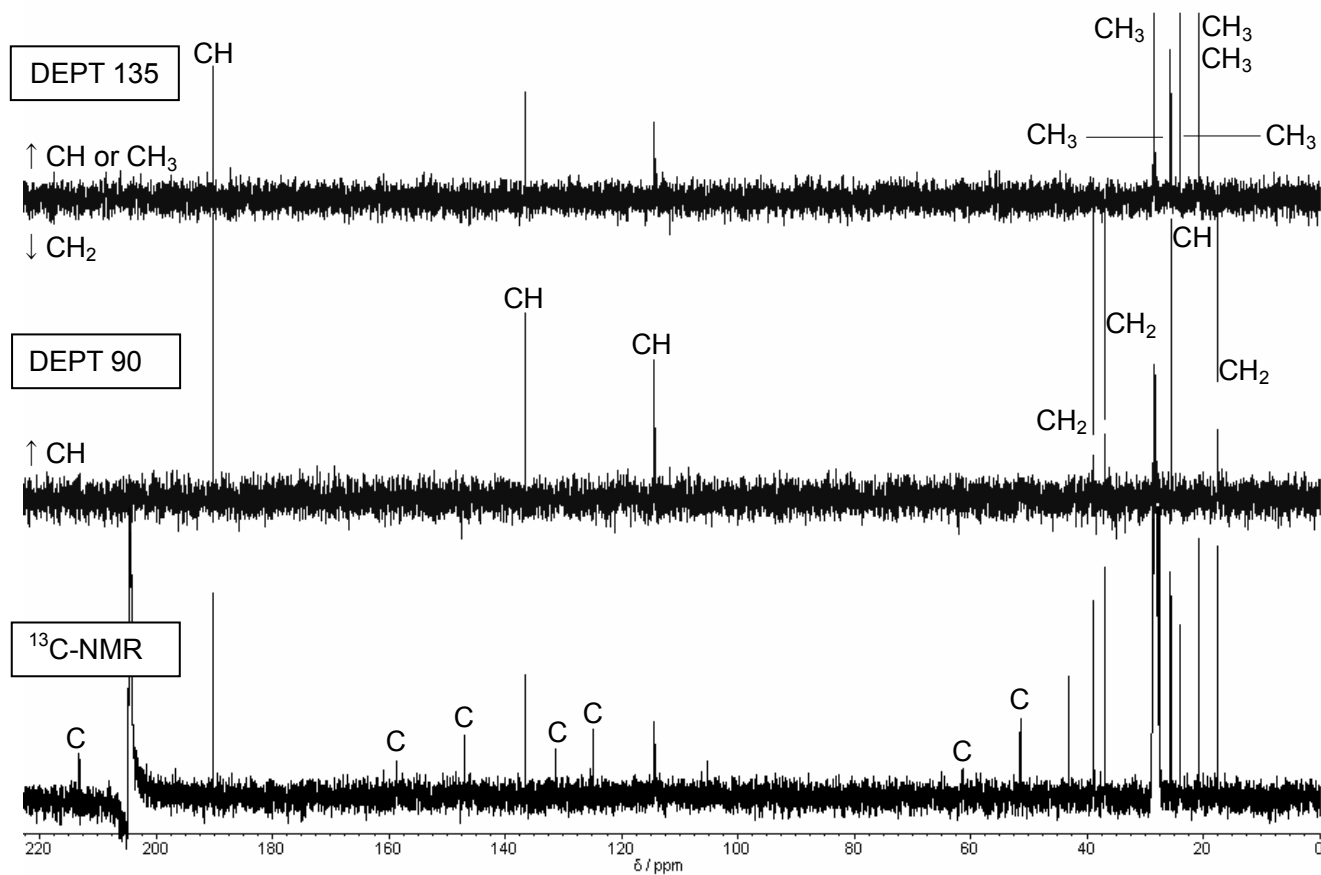


Figure 3.60. DEPT 90 and 135 spectrum (acetone- d_6) of taxodal (**6**).

Table 3.14. NMR data for taxodal **6** (acetone- d_6 , δ in ppm).

C#	δ C ^a , mult ^c	δ H ^b , mult (<i>J</i> in Hz)
1	38.9 CH ₂	1.62, m 2.17, ddd (12.9, 13.0, 3.5)
2	17.6 CH ₂	1.67, m 2.04, m
3	36.9 CH ₂	1.64, m 2.43, ddd (13.3, 13.3, 4.0)
4	43.1 C	—
5	213.2 C	—
6	190.2 CH	9.68, s
7	124.8 C	—
8	146.9 C	—
9	51.4 C	—
10	114.3 CH	7.16, s
11	158.7 C	—
12	131.4 C	—
13	136.5 CH	7.73, s
14	25.5 CH	3.31, hept (7.0)
15	20.8 CH ₃	1.27, d (7.0)
16	20.8 CH ₃	1.26, d (7.0)
17	25.6 CH ₃	1.17, s
18	28.4 CH ₃	1.22, s
19	24 CH ₃	1.55, s

^a Spectra were recorded at 100 MHz.

^b Spectra were recorded at 400 MHz.

^c ¹³C-NMR multiplicities were obtained from DEPT-90 and -135 .

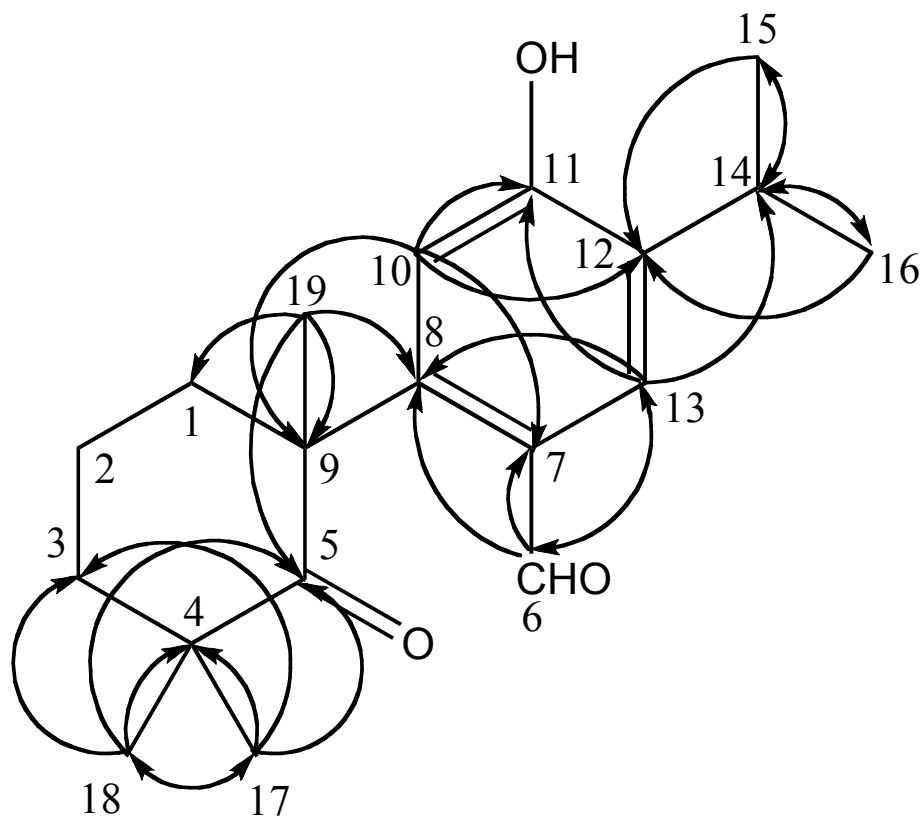


Figure 3.61. HMBC correlations of taxodal (**6**).

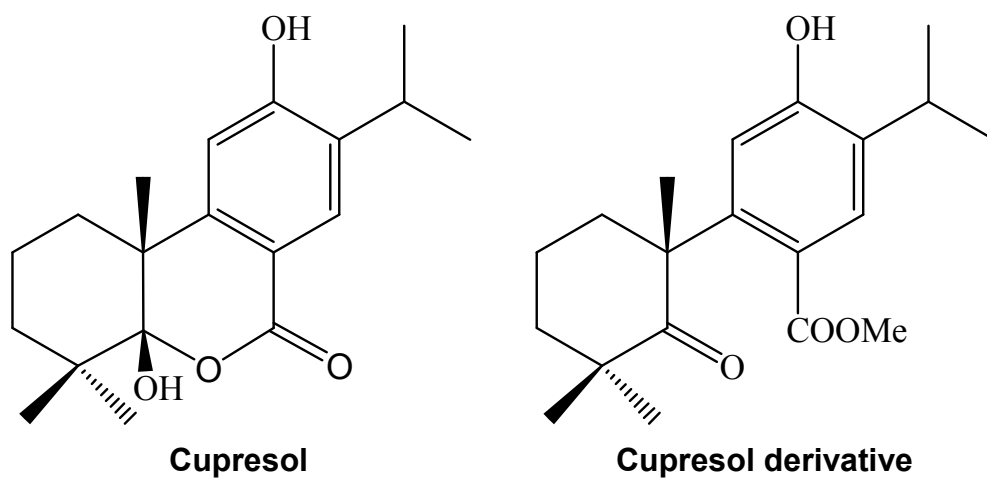


Figure 3.62. Structure of cupresol and the derivative.

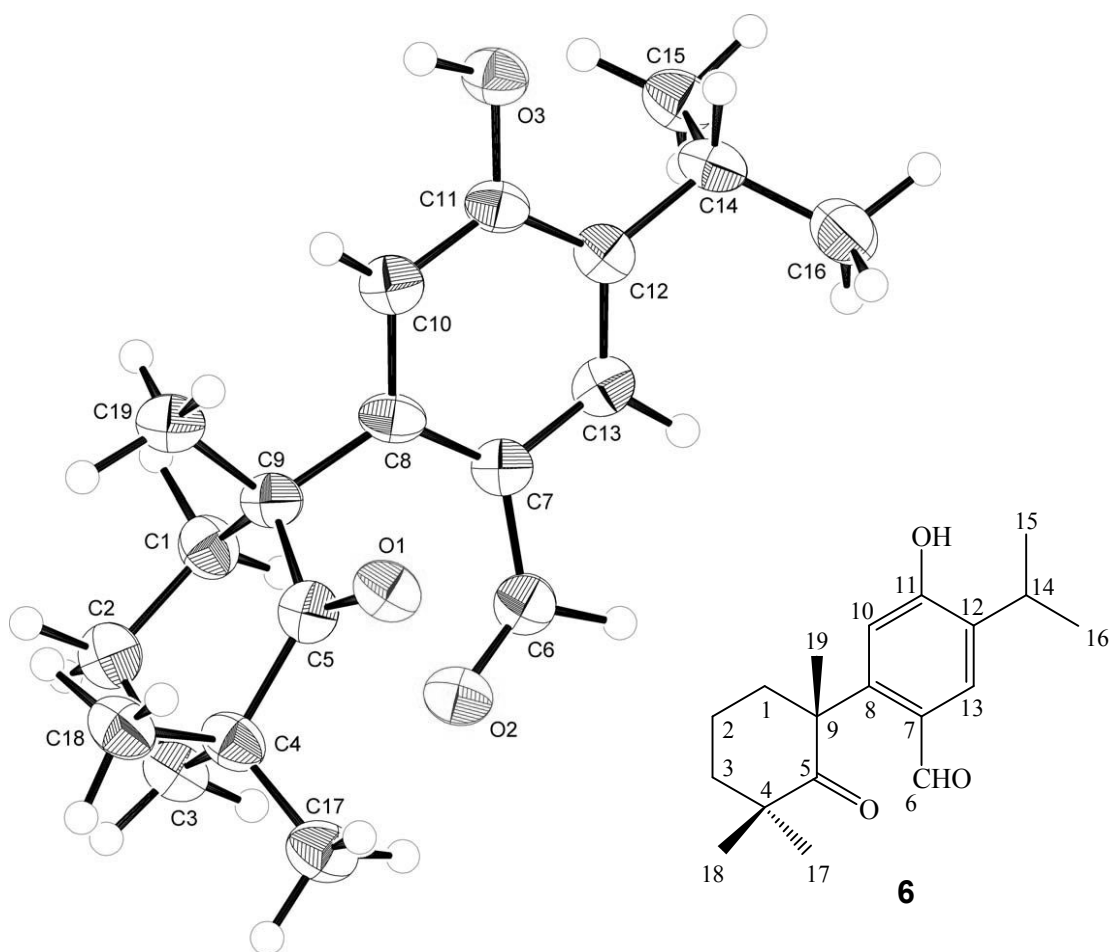


Figure 3.63. ORTEP view of taxodal **6**.

Table 3.15. ¹H-NMR data for isolated compounds **2-12**.

C No.	2 (CDCl ₃)	3 (CDCl ₃)	4 (CDCl ₃)	5 (CDCl ₃)	6 (acetone-d ₆)	7 (CDCl ₃)	8 (DMSO-d ₆)	9 (CDCl ₃)	10 (CDCl ₃)	11 (acetone-d ₆ , MeOH-d ₄ =9:1)	12 (pyridine-d ₅)
1	1.37 m	1.43 td (13.3,3.9)	1.14 m	1.73 m	1.62 m	1.63 m		1.28 s	1.78 m		
2	2.16 brs	2.89 d (3.4)	1.66 m	2.93 m	2.17 ddd (12.9, 13.0, 3.5)	2.89 m		2.47 d (14.8)	2.28 m	2.40 m	
2	1.58 d (3.4)	1.62 m	1.60 m	1.61 m	1.67 m	1.55 m		1.57 m	1.75 m		
3	1.73 t (3.4)	1.71 m		1.75 m	2.04 m	1.65 m	1.17-2.15 and m	1.31 m	1.90 m		
3	1.25 m	1.25 m	1.62 m	1.22 m	1.64	1.40 m		1.45 m	1.44 m		
3	1.46 m	1.51 m		1.40 m	2.43 ddd (13.3, 13.3, 4.0)	1.43 m	2.41-2.57		1.93 m		
4											
5	1.31 d (2.3)	2.14 t (3.1)	1.93 dd (12.4, 2.5)	2.60 s		1.54 s		2.64 s	6.86 s	6.30 s	8.39 s-OH
6	1.66 m	6.46 dd (3.0,9.7)	1.26 m			4.67 d (8.4)					
7	2.77 m	6.81 dd (3.1,9.8)	2.21 d (7.0)	6.21 s	9.68 s (C-6)*	6.52 d (2.7)					
7	2.85 m										
8											
9			1.77 m								
10											
11	6.62 s		1.54 m	7.58 s-OH	7.16 s (C-10)*	7.46 s-OH	6.78 s	6.86 s	5.78 s-OH	6.95 s	
12	4.61 brs-OH	7.34 s-OH	1.36 m				10.2 s-OH		7.15 s-OH		7.10 s-OH
13											
14	6.82 s		5.22 s	6.88 s	7.73 s (C-13)*	6.79 s	7.64 s	8.04 s	8.01 s	7.84 s	8.24 s
15	3.11 heptet (7.0)	3.17 heptet (7.1)	5.77 dd (17.4, 10.5)	3.07 heptet (7.0)	3.31 heptet (7.0) (C-14)*	3.17 heptet (6.8)	3.12 heptet (6.8)	3.22 heptet (7.0)	3.19 heptet (7.0)	3.23 t (1.7)	3.64 heptet (7.0)
16	1.21 d (6.7)	1.21 d (7.1)	4.89 dd (10.4, 1.5)	1.18 d (7.0)	1.27 d (7.0) (C-15)*	1.13 d (6.8)	1.14 d (6.9)	1.30 d (7.0)	1.27 d (7.0)	1.18 d (7.0)	1.30 d (7.0)
17	1.22 d (6.7)	1.22 d (7.2)	4.91 dd (17.6, 1.5)	1.16 d (7.0)	1.26 d (7.0) (C-16)*	1.11 d (6.8)	1.12 d (7.1)	1.28 d (7.0)	1.30 d (7.0)	1.20 d (7.0)	1.30 d (7.0)
18	0.92 s	0.98 s	1.04 s	1.12 s	1.17 s (C-17)*	1.19 s	0.87 s	0.97 s	1.43 s	1.21 s	1.64 s
19	0.90 s	1.01 s	1.21 s	1.27 s	1.22 s (C-18)*	1.19 s	0.93 s	0.46 s	1.43 s	1.32 s	1.68 s
20	1.16 s	1.03 s	0.84 s	1.27 s	1.55 s (C-19)*	1.13 s	1.14 s	1.22 s	1.50 s	1.47 s	1.95 s

* Carbon numbers of taxodal (**6**) were corresponded with other compounds (true carbon number).

Table 3.16. ¹³C-NMR data for isolated compounds **2-12**.

C No.	2 (CDCl ₃)	3 (CDCl ₃)	4 (CDCl ₃)	5 (CDCl ₃)	6 (acetone-d ₆)	7 (CDCl ₃)	8 (DMSO-d ₆)	9 (CDCl ₃)	10 (CDCl ₃)	11 (acetone-d ₆ /MeOH-d ₄)	12 (pyridine-d ₅)
1	38.9	35.2	38.6	37.0	38.9	37.6	37.4	36.3	33.6	38.5	30.6
2	19.3	18.7	18.4	18.5	17.6	18.8	18.5	18.9	17.6	19.2	18.3
3	41.7	40.5	37.3	42.6	36.9	43.2	40.8	42.0	37.9	41.0	36.9
4	33.4	33.3	47.6	32.8	43.1	34.1	32.8	35.4	35.9	38.0	36.7
5	50.3	52.1	49.1	63.0	213.2	58.0	49.1	68.9	157.7	174.5	144.2
6	19.2	139.6	24.9	201.0	-	70.0	35.5	200.1	111.4	124.6	144.3
7	29.7	121.1	35.7	134.0	190.2 (C-6) *	149.1	196.5	179.9	179.7	185.7	180.7
8	127.2	138.5	136.9	139.9	124.8 (C-7) *	143.4	122.6	127.2	120.9	123.2	121.6
9	148.6	140.5	50.8	125.6	146.9 (C-8) *	126.2	155.8	150.6	143.8	155.3	142.4
10	37.5	39.3	37.7	42.9	51.4 (C-9) *	40.7	Overlapped	39.4	40.3	41.9	41.4
11	111.0	183.5	18.8	145.0	114.3 (C-10) *	142.0	109.3	111.2	141.0	111.4	140.3
12	150.7	151.2	34.7	181.7	158.7 (C-11) *	181.7	160.1	160.5	154.9	160.5	150.2
13	131.4	122.6	38.0	145.3	131.4 (C-12) *	130.4	132.5	134.7	133.8	135.0	135.6
14	126.6	186.1	129.4	136.1	136.5 (C-13) *	135.7	125.0	129.8	125.6	124.9	116.4
15	26.8	24.1	149.2	27.1	25.5 (C-14) *	26.7	26.0	27.0	26.9	27.5	27.6
16	22.5	19.8	110.4	21.2	20.8 (C-15) *	20.8	22.2	22.3	22.3	22.6	22.8
17	22.7	20.0	26.3	21.6	20.8 (C-16) *	21.4	22.4	22.3	22.5	22.7	23.1
18	33.3	32.6	185.2	33.3	25.6 (C-17) *	36.7	32.3	31.4	27.6	32.8	28.3
19	21.6	22.8	17.0	22.1	28.4 (C-18) *	22.8	21.1	24.1	28.2	32.8	27.5
20	24.8	15.2	15.5	21.8	24.0 (C-19) *	21.7	23.0	38.5	35.2	29.4	28.4

* Carbon numbers of taxodal (**6**) were corresponded with other compounds (true carbon number).

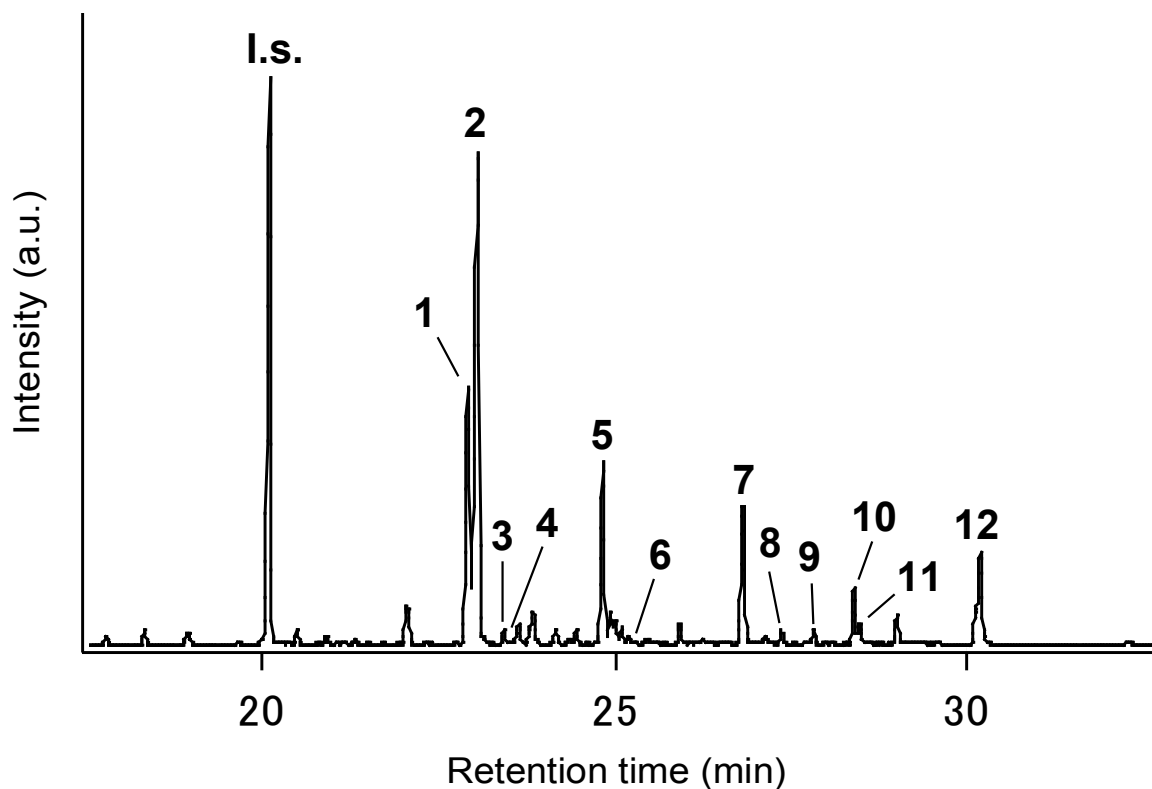


Figure 3.64. GC-MS chromatogram of diterpene composition in $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ extract of *Taxodium distichum* cones. I.s.; Internal standard (heneicosane). 6,7-dehydroferruginol (1), ferruginol (2), 6,7-dehydroroyleanone (3), sandaracopimaric acid (4), taxodione (5), taxodal (6), taxodone (7), sugiol (8), xanthoperol (9), salvinolone (10), 5,6-dehydrosugiol (11), and 14-deoxycoleon U (12).

Table 3.17. Constituents of diterpenes in $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ extract of *Taxodium distichum* cones.

Compound	Retention time (min)	Contents (%) ^a
6,7-dehydroferruginol (1)	22.9	20.4
ferruginol (2)	23.0	39.4
6,7-dehydroroyleanone (3)	23.4	0.88
sandaracopimaric acid (4)	23.5	t ^b
taxodione (5)	24.8	12.3
taxodal (6)	25.5	t ^b
taxodone (7)	26.8	6.19
sugiol (8)	27.4	0.74
xanthoperol (9)	27.8	0.79
salvinolone (10)	28.4	4.80
5,6-dehydrosugiol (11)	28.5	t ^b
14-deoxycoleon U (12)	30.1	2.08
Total		87.6

^a Contents (%) = $100 \times \text{Each component peak area} / \text{Total diterpenoids peak area}$ (GC-FID).

^b Trace.

第4章 *Taxodium distichum* 球果成分の抗蟻活性

第1節 緒言

前章において、ラクウショウ球果へキササン抽出物のテルペノイドは90%以上がジテルペンであることが確認され、その構成は、6,7-dehydroferruginol (1) および ferruginol (2) が約6割を、約4割がラクウショウ球果に特徴的なジテルペンから構成されていることが明らかになった。また、カラムクロマトグラフィにより分離を行い、新規化合物を含むアビエタン型を中心とした12化合物を単離・同定した。

この章では、これら単離成分の生物活性を明らかにすることでラクウショウ球果の化学的防御機構を化学成分の量的・質的な面から明らかにすることとした。

なお、対象とする生物として、森林生態系における木質資源の重要な分解者の一つであるヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus* Kolbe.) を用い、摂食阻害活性および殺蟻活性を検討した。

第2節 実験方法

2.1 抗蟻活性試験

2.1.1 供試生物

生物試料として、第2章2.3と同様に山形県鶴岡市内で採集したヤマトシロアリ (*R. speratus* Kolbe) のコロニーを用いた。コロニーは、 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ に保持した恒温室内で保存し、定期的にスプレーで水を与えて常時湿潤に保った。

2.1.2 試験方法

試験方法および活性の評価方法は、第2章2.3.2と同様の方法でおこなった。濃度はペーパーディスク (PD) あたり1%、殺蟻活性および摂食阻害活性試験はそれぞれ3反復ずつ同時におこなうものとした。24時間ごと、14日間にわたって死亡数を計測し、5日目および10日目の平均致死率および標準偏差 (\pm SD) を算出した。

第3節 結果および考察

3.1 単離成分の殺蟻活性

ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離した12化合物の中から、量的に確保できた11化合物 (sandaracopimaric acid (4)を除く) の殺蟻活性試験の結果を Figure 4.1 に、5日目および14日目の致死率を Table 4.1 に示す。6,7-Dehydroroyleanone (3) が5日目で $46.7 \pm 3.33\%$ 、10日目で $70.0 \pm 10.0\%$ と非常に強い活性を示した。次いで、taxodone (7), ferruginol (2), taxodione (5) が10日目でそれぞれ $24.0 \pm 6.00\%$ 、 $20.0 \pm 11.6\%$ 、 $20.0 \pm 11.6\%$ と活性を示した。Salvinolone (10) にも $16.7 \pm 6.67\%$ と若干の活性が認められた。6,7-dehydroferruginol (1), sugiol (8), 5,6-dehydrosugiol (11), 14-deoxycoleon U (12) には殺蟻活性は認められなかった。このように、単離化合物間で活性に大きな差が認められた。

これまでの報告 (狩野ら 2004) では、ferruginol (2) が抗蟻活性を有することが知られている。今回の結果では、6,7-dehydroroyleanone (3) に ferruginol (2) の3.5倍の強い殺蟻活性が認められた。特に、6,7-dehydroroyleanone (3) は短い試験期間 (5日間) で4.5倍以上の非常に強い殺蟻性を示したことから、アビエタン型ジテルペンの中では強い活性を有することが明らかとなった。この化合物の構造は、C環にヒドロキシキノン構造を有する化合物であった。これに対して、C環からB環にかけてキノンメチドを構成する taxodione (5) および taxodone (7) には強い活性が認められなかったことから、アビエタン骨格のC環にキノン構造を有する特徴的な化学構造が活性に寄与していると考えられた。

6,7-Dehydroroyleanone (3) と類似した構造 (Figure 4.2) の royleanone, taxoquinone, cryptoquinone, 7 α -hydroxy-11,14-dioxo-8,12-abietadiene, 7 α -acetoxy-6 β -hydroxy-royleanone, horminone といったキノン骨格を有するアビエタン型ジテルペンは、抗菌活性および細胞毒性といった特異的な活性を

有することが報告されており (Kupchan et al. 1968; Kofujita et al. 2002, 2006; Gaspar-Marques et al. 2006), C 環のキノン骨格が様々な活性の発現に有効であることを支持している。

3. 2 単離成分の摂食阻害活性

11 化合物の摂食阻害活性試験の結果を Table 4.2 に示す。全ての化合物に摂食阻害活性が認められた。中でも, xanthoperol (9) の PD 摂食量 (Mass) が 0.0 μg (0.0%) で, 試験期間中に全く摂食されなかった。このことから, この化合物は非常に強い摂食阻害活性を有していることが確認された。Ferruginol (2) および 14-deoxycoleon U (12) の PD 摂食量 (Mass) は, それぞれ $0.44 \pm 0.19 \mu\text{g}$ (0.99%), $0.83 \pm 0.55 \mu\text{g}$ (1.87%) となり, xanthoperol (9) に次いで強い摂食阻害活性を有する化合物であることが明らかとなった。Taxodione (5), taxodone (7) においては, それぞれ $2.97 \pm 0.729 \mu\text{g}$ (6.70%), $3.44 \pm 0.30 \mu\text{g}$ (7.77%) と 10% 以下の強い活性が認められた。また, 6,7-dehydroferruginol (1), 6,7-dehydroroyleanone (3), salvinolone (10), taxodal (6) においても, それぞれ $7.35 \pm 2.56 \mu\text{g}$ (16.6%), $9.87 \pm 1.91 \mu\text{g}$ (20.3%), $9.33 \pm 0.86 \mu\text{g}$ (21.1%), $16.7 \pm 2.21 \mu\text{g}$ (37.7%) と強い活性が確認された。従って, 活性の強弱はあるものの単離されたすべてのジテルペンに摂食阻害活性が認められた。

顕著な摂食阻害活性が認められた xanthoperol (9) は, アビエタン骨格 B 環の 6 位と 7 位の炭素にカルボニル基を有する化合物であり, 7 位にのみカルボニル基を有する sugiol (8) がほとんど活性を示さないことから, 6 位のカルボニル基が摂食阻害活性に強く寄与していることが示唆された。水酸基の数から考察すると, 7 位にカルボニル基を有する sugiol (8) では活性を示さなかったが, C 環の 11 位に水酸基が結合した salvinolone (10) では活性を示し, さらに, C 環の 6 位に水酸基が加わった 14-deoxycoleon U (12) では非常に強い活性を示した。これらのことから, 12 位に水酸基を有する化合物では, 11 位, 6 位と結合する水酸基の数が増えることによってより強い摂食阻害活性を示した。

ジテルペンの摂食阻害については、これまでにアビエタトリエン型では ferruginol (2) で確認されている (Kano et al., 2004) だけである。本研究は、様々なアビエタン型のジテルペンについて検討された初めての報告である。

3. 3 *T. distichum* 球果の抗蟻活性

殺蟻および摂食阻害活性の関係から抗蟻活性を明らかにするために、10日目の平均致死率およびシロアリ1匹の平均PD摂食量を Figure 4.3 に示した。殺蟻および摂食阻害の両方にほとんど活性が見られない sugiol (8) は、単離されたジテルペンの中では唯一抗蟻活性を示さない化合物であると言えた。その他のすべての単離成分には摂食阻害活性が見られ、特に 6,7-dehydroroyleanone (3) は強い殺蟻活性も見られた。この結果から、ferruginol (2) および 6,7-dehydroferruginol (1) を中心としたラクウショウ球果ヘキサン抽出物を構成するジテルペンの大半は主に摂食阻害活性に寄与していると考えられた。6,7-dehydroroyleanone (3) のように微量 (0.88%/total diterpene) にしか存在しないが、強い殺蟻活性を示す化合物もあり、これらも抗蟻活性に影響を与えているものと考えられた。なお、今回は 2,3 の単離ジテルペンを混合した相乗効果を見る試験は行わなかったが、ヘキサン抽出物中のジテルペンが複合的に作用することで殺蟻活性に寄与していることも考えられた。

3. 4 抗蟻活性とアビエタン型化合物の酸化

ラクウショウ球果ヘキサン抽出物より単離・同定された化合物の大半が ferruginol (2) の酸化物であった。山本らは ferruginol (2) を出発点とした酸化経路を示している (Yamamoto et al. 2003)。そこで、ferruginol (2) の酸化経路と単離化合物の活性値とを比較した図を Figure 4.4 に示す。“a”には殺蟻活性値，“b”にはPDの摂食量をそれぞれ ferruginol (2) の値を 100, 1 とし計算した。“a”は値が増すごとに活性が強くなったことを示し，“b”は値が増すごとに活性が弱くなったことを示す。

殺蟻活性は、6位と7位が脱水素された 6,7-dehydroferruginol (1) では活性

が大きく減少するが、6,7-dehydroroyleanone (3), taxodione (5), taxodone (7) のようにキノン構造を有する化合物に酸化されると ferruginol (2) と同等もしくはそれ以上の強い活性成分となる。また、7位にカルボニル基を有する sugiol (8) に酸化されると活性を失うが、11位に水酸基が結合した salvinolone (10) になると再び活性を示すようになる。

続いて摂食阻害活性は、6,7-dehydroferruginol (1) では殺蟻活性同様に活性を示さないが、酸化の進行した taxodione (5) および taxodone (7) では活性を示した。同様に、sugiol (8) では全く活性を示さなかったが、xanthoperol (9), 14-deoxycoleon U (12), salvinolone (10) など酸化により水酸基もしくはカルボニル基が結合した化合物では、非常に強い活性を示した。

これらの結果から、酸化に伴うアビエタン構造の変化によって活性が減少する場合もあるが、多くの場合は更なる酸化によって再び活性が増加することが明らかとなった。つまり、ラクウショウ球果の主要ジテルペンである ferruginol (2) の酸化は一時的に活性を減少させるが、様々な酸化形態をとることにより活性を維持もしくは多様なものに増大させ、様々な生物に対する化学的防御を行っているものと考えられた。

第4節 小括

ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離・同定した12化合物中の11化合物を用いて、ヤマトシロアリに対する殺蟻活性および摂食阻害活性試験をおこなった。

殺蟻活性は、11化合物中5つの化合物に無給試験を上回る活性が認められた。特に、6,7-dehydroroyleanone (3) は10日で70%以上の致死率を示した。それ以外の化合物は、殺蟻活性が報告されている ferruginol (2) ($20.0 \pm 11.6\%$) と同程度の活性を示した。非常に強い活性を示した 6,7-dehydroroyleanone (3) は、アビエタン骨格のC環にキノン構造を有し12位に水酸基を有する化学構造であり、ferruginol (2) と同程度の活性が認められる taxodione (5) および taxodone (7) はC環にキノンメチドを有する構造であった。このことから、C環の特異的なキノン骨格が殺蟻活性を示したと考えられた。

摂食阻害活性については、sugiol (8) を除く全ての化合物に活性が認められた。特に、xanthoperol (9), ferruginol (2), 14-deoxycoleon U (12) の活性は非常に強く、2%以下の相対摂食量を示した。この他にも、taxodione (5), taxodone (7), 6,7-dehydroferruginol (1), 6,7-dehydroroyleanone (3), salvinolone (10), taxodal (6) がそれぞれ6.70%, 7.77%, 16.6%, 20.3%, 21.1%, 37.7%と活性を示した。非常に強い摂食阻害活性を示した xanthoperol (9) の化学構造は、アビエタン骨格B環の6位と7位のオルト位にカルボニル基を有する化合物で、6位のカルボニル基が摂食阻害活性に強く寄与していることが示唆された。摂食阻害活性を水酸基の数から考察すると、B環の7位にカルボニル基を有する sugiol (8) ではほとんど活性を示さないが、同様の構造でC環の11位に水酸基が結合した salvinolone (10) では活性を示す化合物となり、C環の6位にさらに水酸基が加わった 14-deoxycoleon U (12) では更に強い活性を示す化合物へと変化した。これらのことより、上記の構造においては水酸基の増加によって摂食阻害活性が強まると考えられた。

単離成分の抗蟻活性試験の結果を、ferruginol (2) を出発点とした酸化経路から考察した。Ferruginol (2) の酸化初期段階の化合物である 6,7-dehydroferruginol (1) や sugiol (8) は、活性が格段に減少するものの、さらに酸化が進行した 6,7-dehydroroyleanone (3) (C 環のキノン構造), xanthoperol (9) (B 環のオルトキノン), 14-deoxycoleon U (12) (水酸基の増加) といった構造に変化すると再び活性が強まり、ferruginol (2) を上回る活性を示した。このことより、アビエタン型ジテルペンは酸化が進行し B 環および C 環が多様な構造を取ることによって、活性を維持もしくは増加させていると考えられた。

以上のように、ラクウショウ球果に確認されたアビエタン型ジテルペンは、多様な抗蟻活性を示し、特に摂食阻害の点で強い活性を示した。このことから、ラクウショウ球果のシロアリに対する防御機構は、主に摂食阻害活性によるものと考えられた。また、アビエタン型ジテルペンは酸化段階における構造の多様化により、殺蟻および摂食阻害といった様々な活性に寄与すると考えられた。

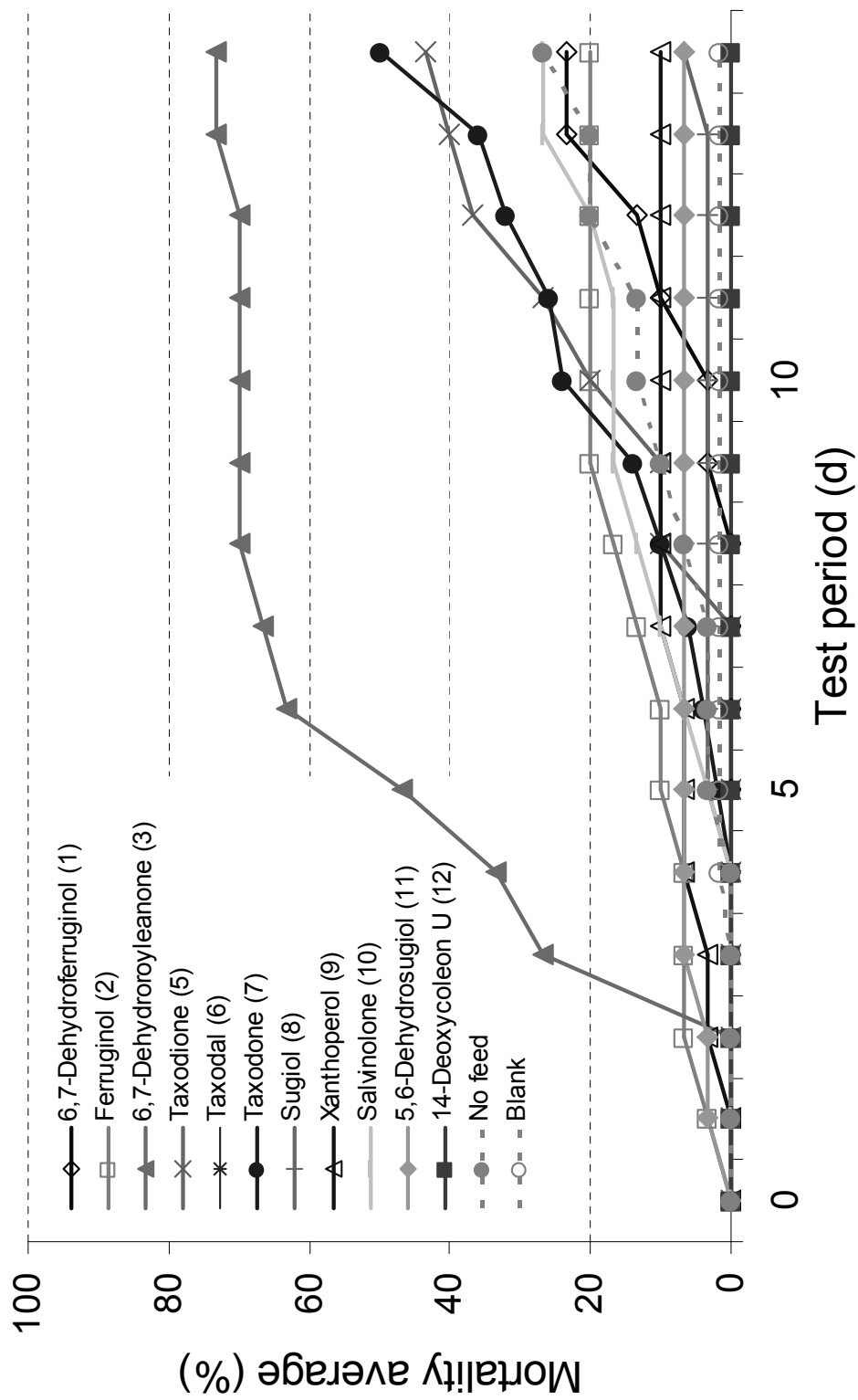


Figure 4.1. Termiticidal progress of isolated compounds against *R. speratus*.

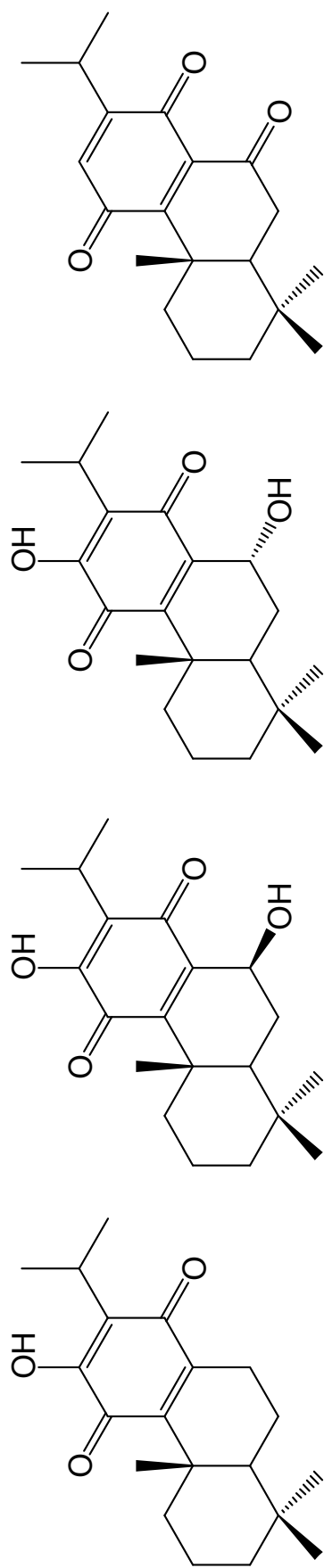
Table 4.1. Termicidal activities of isolated compounds against *R. speratus*.

Isolated compounds	Mortality of termites ^a		
	5 days (%)	10 days (%)	10 days (%)
6,7-dehydroferruginol (1)	n.m. ^b	3.33 ± 3.33	3.33 ± 3.33
ferruginol (2)	10.0 ± 5.77	20.0 ± 11.6	20.0 ± 11.6
6,7-dehydroroyleanone (3)	46.7 ± 3.33	70.0 ± 10.0	70.0 ± 10.0
sandaracopimaric acid (4)	n.t. ^b	n.t. ^b	n.t. ^b
taxodione (5)	n.m. ^c	20.0 ± 11.6	20.0 ± 11.6
taxodal (6)	n.m. ^c	n.m. ^c	n.m. ^c
taxodone (7)	2.00 ± 2.00	24.0 ± 6.00	24.0 ± 6.00
sugiol (8)	3.33 ± 3.33	3.33 ± 3.33	3.33 ± 3.33
xanthoperol (9)	6.67 ± 3.33	10.0 ± 5.77	10.0 ± 5.77
salviolone (10)	3.33 ± 3.33	16.7 ± 6.67	16.7 ± 6.67
5,6-dehydrosugiol (11)	6.67 ± 6.67	6.67 ± 6.67	6.67 ± 6.67
14-deoxycoleon U (12)	n.m. ^c	n.m. ^c	n.m. ^c
No feed	3.33 ± 3.33	13.3 ± 3.33	13.3 ± 3.33
Blank	1.67 ± 1.67	1.67 ± 1.67	1.67 ± 1.67

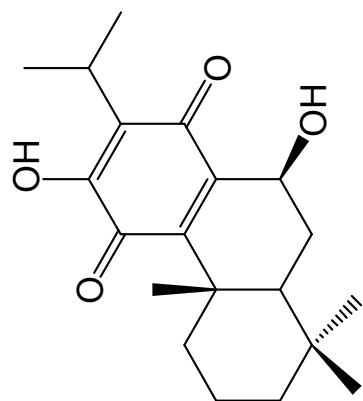
^a Concentration of paper discs (100 x compound weight / paper disk weight) were 1.0%.

^b Not tested.

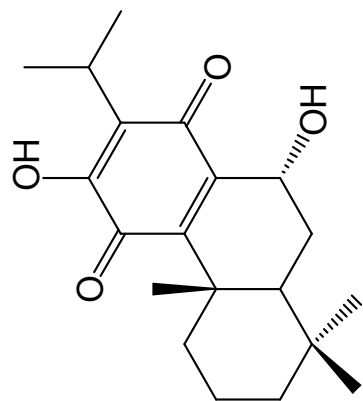
^c No mortality observed.



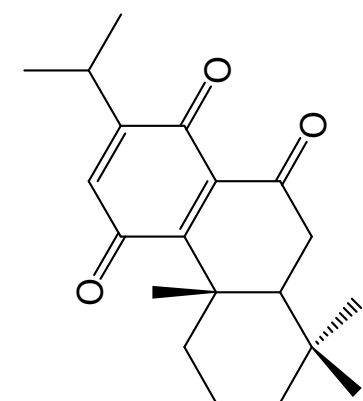
Royleanone



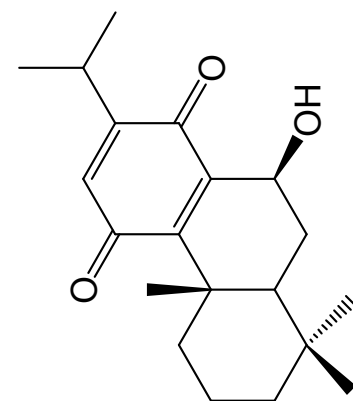
Taxoquinone



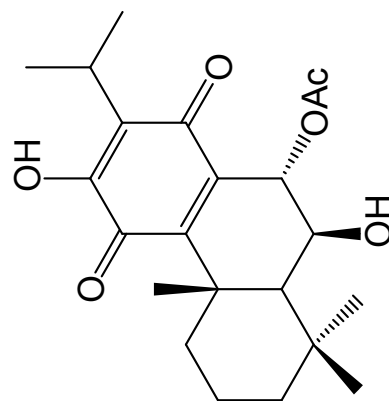
Horminone



Cryptoquinone



7 β -Hydroxy-11,14-dioxo-8,12-abietadiene



7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone

Figure 4.2. Chemical structures of bioactive abietan-type quinones.

Table 4.2. Antifeedant activities of isolated compounds against *R. speratus*.

Isolated compounds	Mass of paper fed by termites ^a	
	Mass (μg) ^a	Relative rate (%) ^b
6,7-dehydroferruginol (1)	7.35 \pm 2.56	16.6
ferruginol (2)	0.44 \pm 0.19	0.99
6,7-dehydroroyleanone (3)	8.97 \pm 1.91	20.3
sandaracopimaric acid (4)	n.t. ^c	n.t. ^c
taxodione (5)	2.97 \pm 0.72	6.70
taxodal (6)	16.7 \pm 2.21	37.7
taxodone (7)	3.44 \pm 0.30	7.77
sugiol (8)	41.9 \pm 2.33	94.7
xanthoperol (9)	0.0	0.00
salvinolone (10)	9.33 \pm 0.86	21.1
5,6-dehydrosugiol (11)	27.9 \pm 2.64	63.0
14-deoxycoleon U (12)	0.83 \pm 0.55	1.87
Blank	44.3 \pm 1.54	100

^a The mass of one termite fed per 24 hours (mass loss of paper disc in test period / total number of termites).

^b Relative rates was calculated from blank reading (100 x mass of each sample / mass of blank).

^c Not tested.

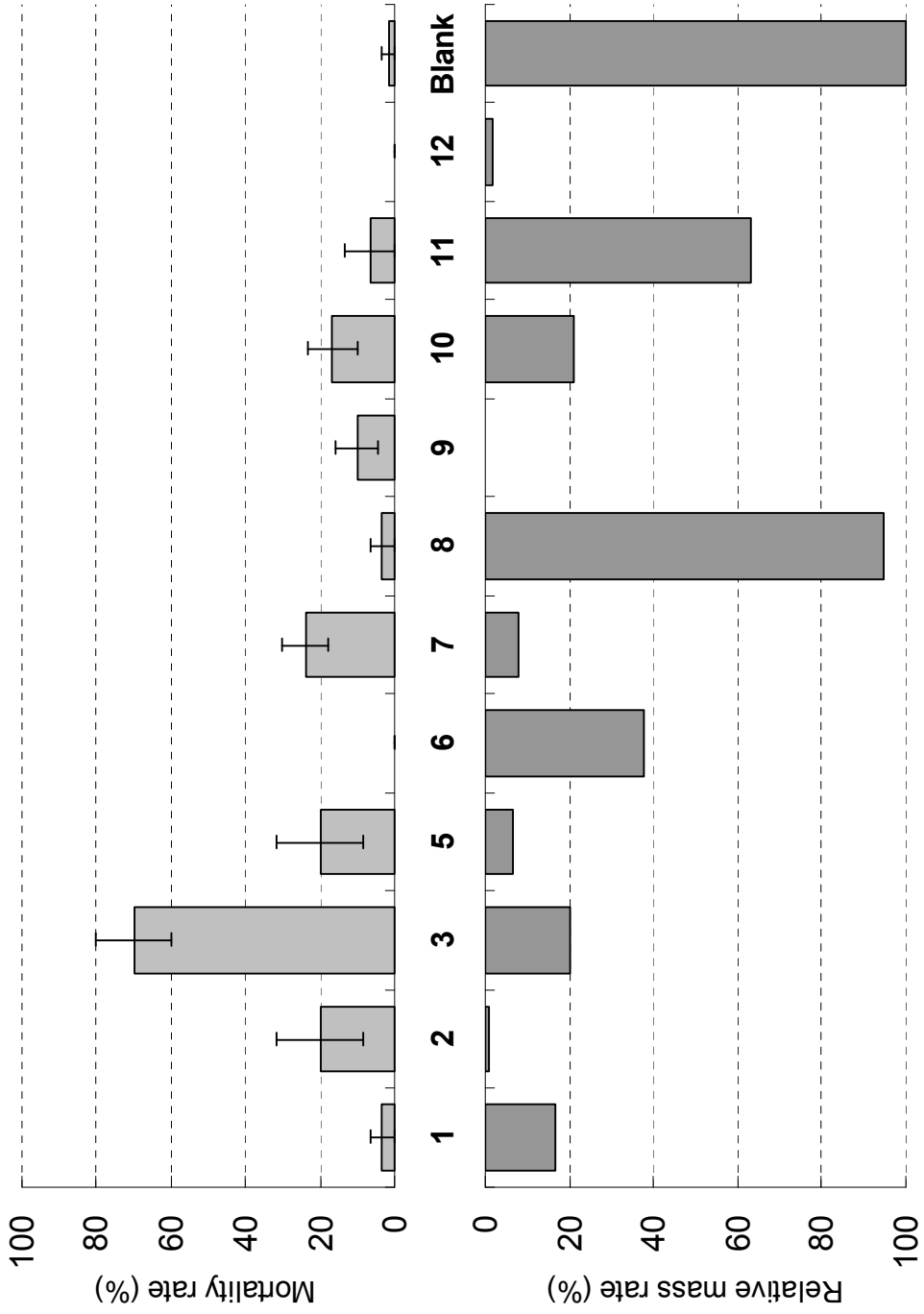


Figure 4.3. Relationship between termicidal activities at 10 d test period and antifedant activities against *R. speratus*.

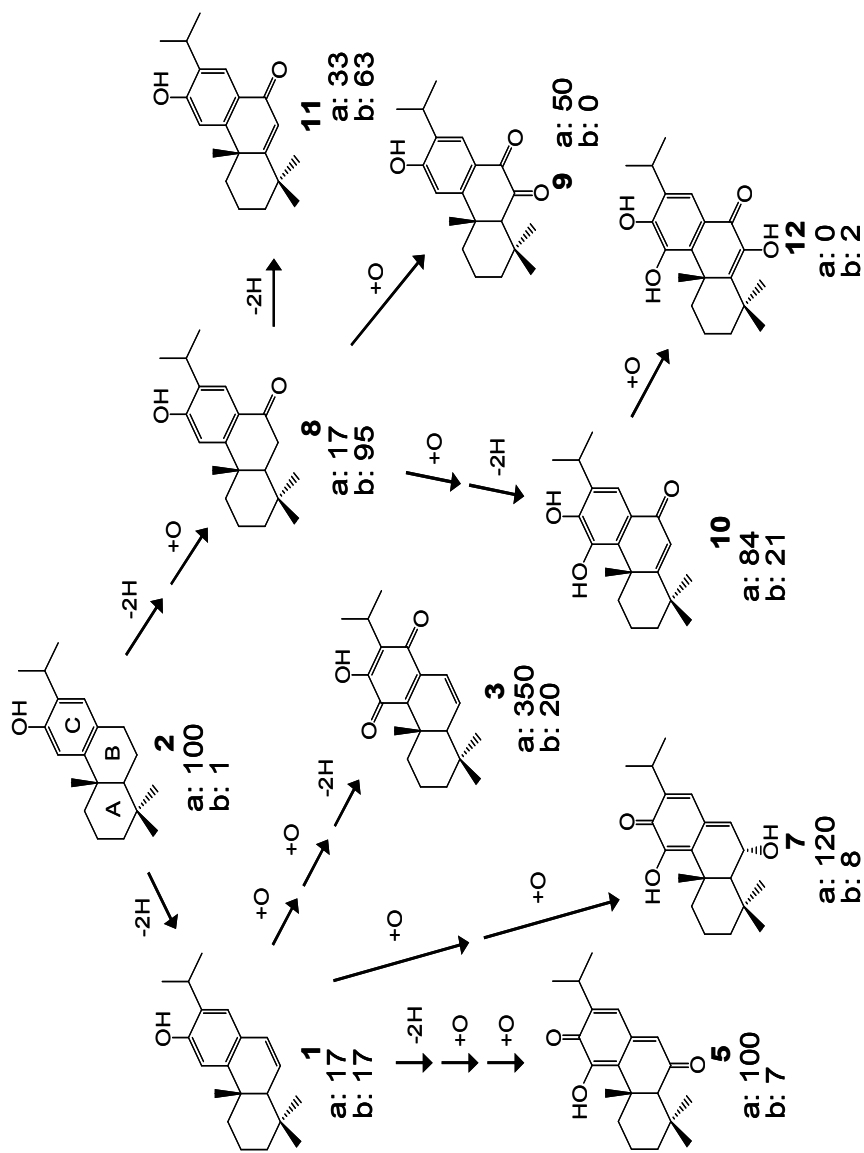


Figure 4.4. Route of ferruginol (1) and sugiol (8), and antitermite activities of each compound.

“**a**” means relative mortality (%) of *R. speratus* caused by the compounds; mortality caused by compound **2** in 10 d set 100 (A higher rate means a higher termiticidal activity). “**b**” means relative mass of paper disc that one termite fed in 24 h; mass of disc treated with **2** set 1 (A lower rate means a higher antifeedant activity).

第5章 *Taxodium distichum* 球果成分の抗菌活性

第1節 緒言

第4章では、ラクウショウ球果へキサン抽出物に含まれる12化合物を用いて、ヤマトシロアリに対する殺蟻および摂食阻害活性試験をおこない、6,7-dehydroroleanone (**3**) に強い殺蟻活性が、xanthoperol (**9**), ferruginol (**2**), 14-deoxycoleon U (**12**) に強い摂食阻害活性が認められ、sugiolを除く化合物に多様な抗蟻活性が確認された。

木材腐朽菌は、木材の耐久性を著しく低下させることから、これまでに木材成分と抗菌活性に関する様々な研究が報告されている (Rudman 1965; Chang et al. 1999, 2000; Cheng et al. 2005, 2008)。しかしながら、抗蟻活性同様、針葉樹球果に含まれる成分と抗菌活性については、これまでにほとんど報告されていない。よって本章では、へキサン抽出物から単離された化合物について、代表的な2種の木材腐朽菌に対する抗菌活性を検討し、抗蟻活性の評価と同様に ferruginol (**2**) の酸化過程における活性の変化についても考察した。

第2節 実験方法

2.1 抗菌活性試験

2.1.1 供試生物

本試験では、代表的な木材腐朽菌から白色腐朽菌のカワラタケ (*Trametes versicolor*, NBRC:30340) および褐色腐朽菌のオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*, NBRC:30339) を活性試験に用いた。これら供試菌は第2章2.4.1に示したようにNBRCから購入した。両菌株はPDA (Potato Dextrose Agar) 培地 (Eiken Chemical Co., Japan) 上で培養し、 4 ± 1 °C で保存した。活性試験は、PDA培地を敷いたプラスチックシャーレ (88 mm) 上で 26 ± 1 °C 暗所下で数回に渡って継体培養をおこない、試験に用いた。

2.1.2 試験方法

抗菌活性試験は、第2章2.4.2と同様の方法でおこなった。濃度は、培

地表面に対して 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, それぞれ 3 反復とした。全ての結果において標準誤差 ($\pm \text{SE}$) を算出し, コントロールに対する平均生長率 (%) を算出して, 菌糸生長阻害から抗菌活性を評価した。

第 3 節 結果および考察

3. 1 単離成分の抗菌活性

ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離した 12 化合物の木材腐朽菌に対する抗菌活性試験の結果を Figure 5.1 に示す。生長率を比較すると, 白色腐朽菌のカワラタケに対して 12 化合物中 9 化合物に抗菌活性がみられた。中でも, 14-deoxycoleon U (**12**) が $38.7 \pm 2.05\%$ と特に強い活性を示し, 次いで taxodione (**5**) が $51.3 \pm 0.88\%$, salvinolone (**10**) が $69.6 \pm 1.63\%$ と強い活性を示した。褐色腐朽菌のオオウズラタケに対しては, 12 化合物すべてに抗菌活性がみられた。このうち, taxodione (**5**) が $21.6 \pm 1.50\%$, 14-deoxycoleon U (**12**) が $22.6 \pm 0.84\%$ と特に強い活性を示した。次いで salvinolone (**10**) が $46.0 \pm 2.31\%$, taxodone (**7**) が $50.3 \pm 0.65\%$, ferruginol (**2**) が $62.0 \pm 0.50\%$ と他の化合物より強い活性を示した。

白色腐朽菌と褐色腐朽菌に対する 12 化合物の活性の相違を見ると, 6,7-dehydroroyleanone (**3**) および sandaracopimaric acid (**4**) を除いて, 褐色腐朽菌に対して非常に強い活性を示すことが明らかとなった。試験に用いた 12 化合物中では, 特に 14-deoxycoleon U (**12**), taxodione (**5**), salvinolone (**10**) に両菌に対する強い活性が認められた。

アビエタン型ジテルペンの構造の違いによる抗菌活性の変化を考察した。まず, 5,6-dehydrosugiol (**11**) を基本構造として, 水酸基の数と抗菌活性との関係を考察した (Figure 5.2)。5,6-Dehydrosugiol (**11**), salvinolone (**10**), 14-deoxycoleon U (**12**) は, それぞれ 5 位と 6 位が脱水素され, 7 位にカルボニル基を有するヒドロキシアビエタトリエン構造を有しており, カワラタケに対してそれぞれ $91.1 \pm 1.05\%$, $69.6 \pm 1.63\%$, $38.7 \pm 2.05\%$, オオウズラタ

ケに対してそれぞれ $79.8 \pm 1.43\%$, $46.0 \pm 2.31\%$, $22.6 \pm 0.84\%$ と、12位, 11位, 6位に結合する水酸基が増加するに従い強い抗菌活性を示した。このように、5,6-dehydrosugiol (11) を基本構造として見た場合、水酸基の数およびその位置が木材腐朽菌に対する抗菌活性に強く関係している可能性が考えられた。続いて、非常に強い活性を示した taxodione (5) は taxodone (7) と類似した構造を持ち (Figure 5.3), taxodione (5) は6位にカルボニル基を、taxodone (7) は水酸基を有している。そのため、キノンメチドを有するこれらの化合物では、水酸基よりカルボニル基を有する構造が強い活性に寄与すると考えられる。また、強い抗菌活性を示した taxodione (5), taxodone (7), salvinolone (10), 14-deoxycoleon U (12) は、いずれも11位に水酸基を有していた。

キノン骨格を有するアビエタン型ジテルペンは強い抗菌活性を有することが過去の報告 (Kofujita et al. 2002) から知られている。しかし、今回試験に用いた 12 化合物のうち、C 環にヒドロキシベンゾキノン構造を有する 6,7-dehydroroyleanone (3) は両菌に対して活性を示さず、木材腐朽菌に対してはキノン構造のみで活性を論じることができないと考えられた。

3. 2 *T. distichum* 球果成分の抗菌活性

木材腐朽菌 (カワラタケおよびオオウズラタケ) に対するラクウショウ球果の防御機構を理解するために、単離した 12 化合物の抗菌活性を評価した (Table 5.1)。単離成分の大半が、白色腐朽菌以上に褐色腐朽菌に対して強い活性を示した。これは、ヘキササン抽出物でおこなった試験結果と一致しており、今回活性のみられた化合物が抗菌活性に強く関係していると考えられた。ヘキササン抽出物中の主要なジテルペンである ferruginol (2) および 6,7-dehydroferruginol (1) にも抗菌活性が認められたが、ジテルペン中の構成比が 12.3%の taxodione (5), 6.19%の taxodone (7), 4.80%の salvinolone (10), 2.08%の 14-deoxycoleon U (12) に、主要構成成分以上の強い活性が認められた。

以上のことから、ラクウショウ球果の化学的防御は、球果を構成するジテルペンの約 60%を占める ferruginol (2) および 6,7-dehydroferruginol (1) が量的な面で抗菌活性に寄与し、それ以外の約 25%を占める taxodione (5) など多様なジテルペンが質的な面で抗菌活性に関与していると考えられた。この傾向は、特に褐色腐朽菌に対し強く現れ、ラクウショウ球果の化学的防御機構の特徴が明らかとなった。

3. 3 抗菌活性とアビエタン型化合物の酸化

第4章3. 3で前述したように、ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離された 12 化合物の大半が ferruginol (2) の酸化物と考えられることから、Figure 4.1 と同様に山本らの報告に基づいて ferruginol (2) を出発点とする酸化経路および ferruginol (2) に対する活性の相対値を Figure 5.4 に示す。Ferruginol (2) の活性値を 100 とし、それに対するカワラタケの活性値を“a”に、オオウズラタケの活性値を“b”に示した。これらの数値が減少するに従い、強い抗菌活性を示したこととなる。

白色腐朽菌（カワラタケ）と褐色腐朽菌（オオウズラタケ）による抗菌活性成分の大きな相違はみられず、両菌とも同様の傾向を示した。つまり ferruginol (2) が 6,7-dehydroferruginol (1) へ酸化されると活性が大きく減少するが、taxodione (5)、taxodone (7) のようにキノンメチドや 11 位に水酸基を有する構造へと酸化が進行すると ferruginol (2) 以上の強い活性成分となった。同様に、sugiol (8) に酸化されると大きく活性を失うが、酸化が進行し水酸基を多く有する salvinolone (10) および 14-deoxycoleon U (12) に変化すると、再び強い抗菌活性成分となった。

以上のことから、ラクウショウ球果に多量に含まれる ferruginol (2) を中心としたアビエタン型ジテルペンが、酸化段階に伴い多様な構造に変化することによって、抗蟻活性同様、木材腐朽菌に対する多様な活性に寄与するものと考えられた。

第4節 小括

ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離・同定された12化合物を用いて、木材腐朽菌のカワラタケ（白色腐朽菌）およびオオウズラタケ（褐色腐朽菌）に対する抗菌活性試験をおこなった。

白色腐朽菌（カワラタケ）に対して、12化合物中9化合物に抗菌活性がみられ、14-deoxycoleon U (**12**) が $38.7 \pm 2.05\%$ と特に強く、taxodione (**5**) が $51.3 \pm 0.88\%$ 、salvinolone (**10**) が $69.6 \pm 1.63\%$ と強い抗菌活性を示した。褐色腐朽菌（オオウズラタケ）に対しては、12化合物すべてに抗菌活性がみられ、taxodione (**5**) が $21.6 \pm 1.50\%$ 、14-deoxycoleon U (**12**) が $22.6 \pm 0.84\%$ と非常に強い活性を示し、次いで salvinolone (**10**) が $46.0 \pm 2.31\%$ 、taxodone (**7**) が $50.3 \pm 0.65\%$ 、ferruginol (**2**) が $62.0 \pm 0.50\%$ と強い活性を示した。特に、taxodione (**5**)、salvinolone (**10**)、14-deoxycoleon U (**12**) が両菌に対して非常に強い抗菌活性を示した。

それぞれの化学構造の点から抗菌活性を考察すると、5,6-dehydrosugiol (**11**) の11位,6位に順次水酸基が結合し salvinolone (**10**) および 14-deoxycoleon U (**12**) となることで強い抗菌活性を示すことから、水酸基の数およびその結合部位が木材腐朽菌に対する抗菌活性に強く関係していると考えられた。

木材腐朽菌（カワラタケおよびオオウズラタケ）に対するラクウショウ球果の防御機構を理解するため、単離した12化合物の抗菌活性を評価した。その結果、ラクウショウ球果の化学的防御は球果を構成するジテルペンの約60%を占める ferruginol (**2**) および 6,7-dehydroferruginol (**1**) が量的な面で抗菌活性に寄与し、それ以外の約25%を占める taxodione (**5**) など多様なジテルペンが質的な面で抗菌活性に関与していると考えられた。この傾向は、特に褐色腐朽菌に対し強く現れ、ラクウショウ球果の特徴的な化学的防御機構が明らかとなった。

アビエタン型化合物の酸化過程における抗菌活性の変化について、

ferruginol (2) を基準として考察した結果、白色腐朽菌および褐色腐朽菌の両菌に対し、ferruginol (2) の酸化物 taxodione (5)、salvinolone (10)、14-deoxycoleon U (12) が非常に強い抗菌活性を示したことから、多量に含まれる ferruginol (2) を中心としたアビエタン型ジテルペンが、酸化段階に伴い多様な構造に変化することによって、抗蟻活性同様、木材腐朽菌に対する多様な活性に寄与するものと考えられた。

以上のことから、ラクウショウ球果に含まれるアビエタン型ジテルペンが抗菌活性に大きく関与し、これらの化合物が酸化の進行に伴い多様に変化することによって、主要構成成分およびその酸化物が量的・質的に木材腐朽菌に対する化学的防御に寄与しているものと考えられた。

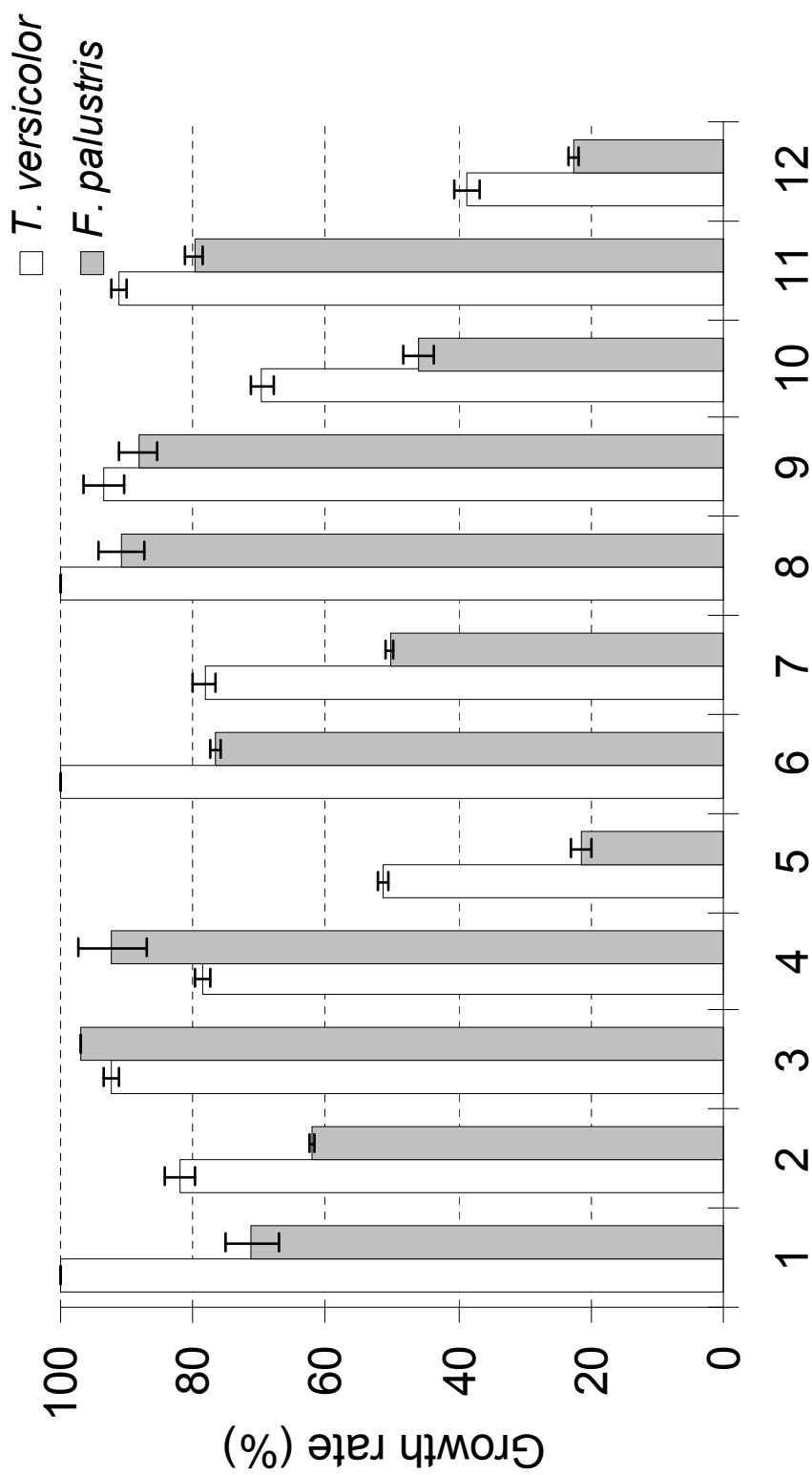


Figure 5.1. Antifungal activities of isolated compounds against two wood-rot fungi.

6,7-dehydroferruginol (**1**), ferruginol (**2**), 6,7-dehydroroyleanone (**3**), sandaracopimaric acid (**4**), taxodione (**5**), taxodal (**6**), taxodone (**7**), sugiol (**8**), xanthoperol (**9**), salvinolone (**10**), 5,6-dehydrojugiol (**11**), and 14-deoxycoleon U (**12**).

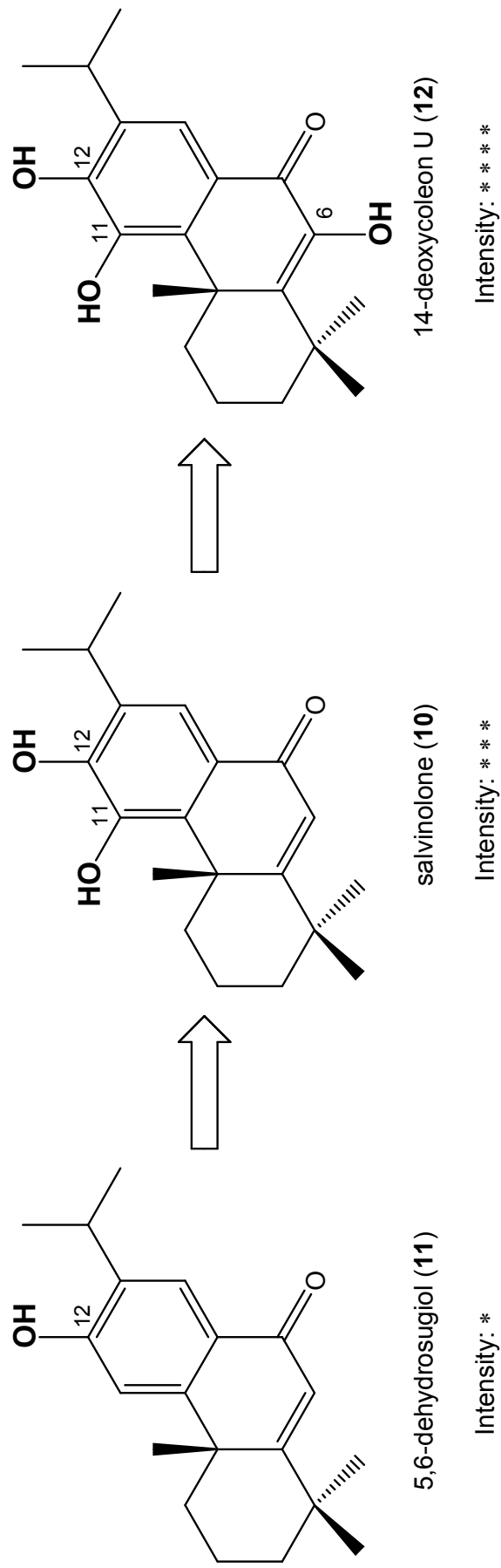


Figure 5.2. Antifungal intensities (*) according to the numbers of hydroxyl group bonded to 5,6-dehydroisovalenone (11).

Intensities were evaluated from relative growth rates of two wood-rot fungi, *T. versicolor* and *F. palustris*.

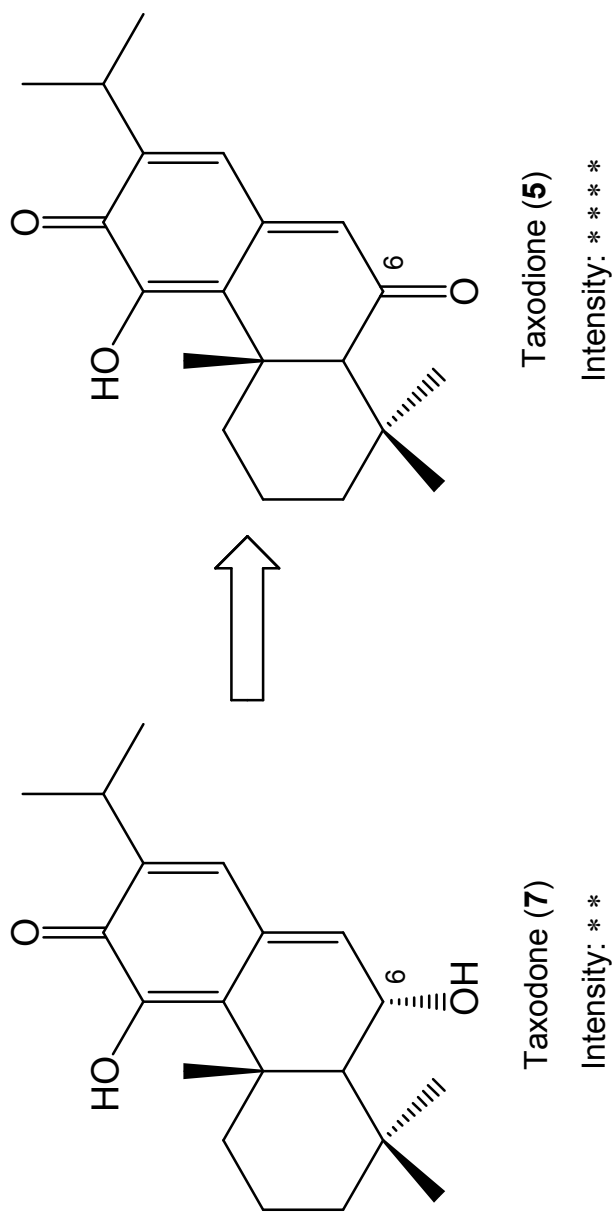


Figure 5.3. Antifungal intensities (*) according to the different functional groups at C-6. Intensities were evaluated from relative growth rates of two wood-rot fungi, *T. versicolor* and *F. palustris*.

Table 5.1. Evaluation of antifungal activities of isolated compounds.

Compounds	Contents (%)	Strains	
		<i>Trametes versicolor</i> (white-rot)	<i>Fomitopsis palustris</i> (brown-rot)
6,7-Dehydroferruginol (1)	20.4	–	**
Ferruginol (2)	39.4	*	**
6,7-Dehydroroleanone (3)	0.88	–	–
Sandaracopimaric acid (4)	trace	**	–
Taxodione (5)	12.3	***	****
Taxodal (6)	trace	–	**
Taxodone (7)	6.19	**	***
Sugiol (8)	0.74	–	–
Xanthoperol (9)	0.79	–	*
Salvinolone (10)	4.80	**	****
5,6-Dehydrosugiol (11)	trace	–	**
14-Deoxycoleon U (12)	2.08	****	****

Each antifungal activity was evaluated from Growth rate (%) as follows:

**** ≤ 50%, 50% < **** ≤ 60%, 60% < ** ≤ 80%, 80% < * ≤ 90%, 90% < –.

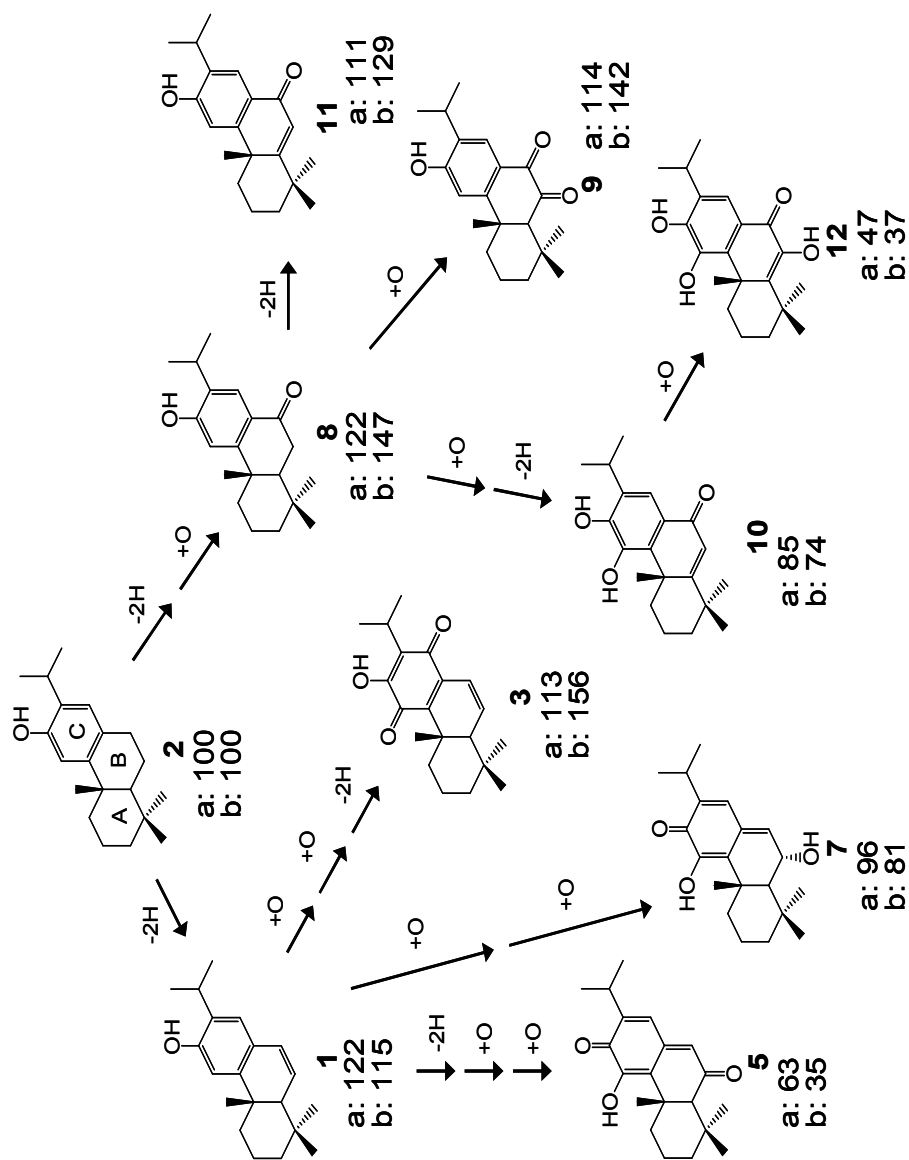


Figure 5.4. Route of ferruginol (2) oxidation via 6,7-dehydroferruginol (1) and sugiol (8), and antifungal activities of each compound.

“a” means relative growth rate (%) of *T. versicolor* and “b” means relative growth rate (%) of *F. palustris*; growth rate of compound 2 set 100 (A lower rate means a higher antifungal activity).

第6章 総括

ラクウショウ (*Taxodium distichum*) は現存する代表的な化石針葉樹である。その球果にはこれまでに特徴的なアビエタン型ジテルペンが多く存在することが報告されており、これらの化合物には、抗癌活性、細胞毒性、抗微生物活性、抗細菌活性、抗菌活性といった多様な生物活性が確認されている。しかし、これらの研究の大半は個別の活性評価に留まり、球果の化学的防御という視点からの研究は、ほとんどおこなわれていない。本研究は、ラクウショウ球果の化学的防御機構を解明するため、球果抽出物の構成とその生物活性を明らかにすると共に、球果構成成分の単離と同定、さらには単離化合物の生物活性を検討した。

第2章では、ラクウショウ球果の生物活性を明らかにするため、抽出物の構成、抗蟻活性、抗菌活性について検討した。ラクウショウ球果の逐次抽出ではヘキサン抽出物が 10.8%、酢酸エチル抽出物が 3.53%、メタノール抽出物が 1.56%の収率で得られた。また、全抽出物の約 70%がヘキサン抽出物から構成されていた。逐次抽出物のヤマトシロアリ (*Reticulitermes speratus*) に対する抗蟻活性(殺蟻, 摂食阻害)は、ヘキサン抽出物に殺蟻および強い摂食阻害活性、酢酸エチル抽出物に強い摂食阻害活性が認められた。ヘキサン抽出物および酢酸エチルに含まれる低極性成分は、主に摂食阻害活性に寄与すると考えられた。逐次抽出物の抗菌活性は、白色腐朽菌のカワラタケ (*Trametes versicolor*) およびカイガラタケ (*Lenzites betulina*) に対してはヘキサン抽出物が、褐色腐朽菌のオオウズラタケ (*Fomitopsis palustris*) およびキチリメンタケ (*Gloeophyllum trabeum*) に対してはヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が強い活性を示した。軟腐朽菌のトリコデルマ (*Trichoderma virens*) およびミロテシウム (*Myrothecium verrucaria*) に対してはトリコデルマのみにヘキサン抽出物および酢酸エチル抽出物が活性を示し、カビ菌のペニシリウム (*Penicillium citrinum*) および接合菌のリゾープス (*Rhizopus oryzae*) に

対しては強い活性は認められなかった。特に用いた菌の中では褐色腐朽菌に対してヘキサン抽出物に強い活性が示された。このように、抽出物全体の約7割を占めるヘキサン抽出物に非常に顕著な生物活性が認められ、ラクウショウ球果の低極性成分がシロアリおよび腐朽菌に対して強い活性を示すことを明らかにした。

第3章では、第2章で最も強い抗蟻活性および抗菌活性を示したヘキサン抽出物から活性成分の単離と同定をおこなった。ヘキサン抽出物中のテルペノイド類の構成はモノテルペンアルコールが0.3%、セスキテルペンが4.0%、ジテルペンが95.7%を占め、ジテルペンが主要構成成分であった。ヘキサン抽出物を分配抽出法により酸性部（弱酸性部・中酸性部・強酸性部）と中性部に分画し、中性部の主要成分として ferruginol および 6,7-dehydroferruginol を確認すると共に、多様なジテルペンの構成が確認された弱酸性部より9種類のジテルペン 6,7-dehydroroyleanone, sandaracopimaric acid, taxodione, taxodal, sugiol, xanthoperol, salvinolone, 5,6-dehydrosugiol, 14-deoxycoleon U を単離・同定した。この中で、taxodal は新規化合物であり、NMR 分析、X線結晶構造解析等をおこない立体配置を決定した。このように、強い活性が認められたラクウショウ球果ヘキサン抽出物は、ferruginol および 6,7-dehydroferruginol を主要構成成分とする多様なアビエタン型ジテルペンから構成されていることを明らかにした。

第4章では、ラクウショウ球果ヘキサン抽出物より単離・同定した12化合物中11化合物を用いてヤマトシロアリに対する抗蟻活性（殺蟻，摂食阻害）を検討した。11化合物中5化合物に殺蟻活性が認められ、特に 6,7-dehydroroyleanone は非常に高い致死率（70%）を示した。この化合物は、アビエタン骨格のC環にキノン構造，12位に水酸基を有し，C環の特徴的な構造が殺蟻活性を示したと考えられた。摂食阻害活性は，sugiol を除く全ての化合物に認められ，特に xanthoperol, 14-deoxycoleon U に相対摂食量2%以下

の非常に強い活性が確認された。Xanthoperol は、アビエタン骨格 B 環のオルト位にカルボニル基を有する化合物であり、他の化合物に見られない B 環の特徴的な構造が強い摂食阻害活性を示したと考えられた。また、B 環の 7 位にカルボニル基を有する sugiol には活性が認められないが、同じ構造で C 環の 11 位に水酸基が結合した salvinolone では摂食阻害活性を示し、さらに B 環の 6 位に水酸基を付加した 14-deoxycoleon U では非常に強い摂食阻害活性を示したことから、水酸基の増加が摂食阻害活性に寄与すると考えられた。アビエタン型ジテルペンの抗蟻活性を ferruginol からの酸化経路で考察すると、酸化段階初期の 6,7-dehydroferruginol や sugiol では活性が著しく減少するが、酸化が進行した 6,7-dehydroroyleanone, xanthoperol, 14-deoxycoleon U では再び強い活性成分となった。これらの結果より、ラクウショウ球果のシロアリに対する防御機構は、主に摂食阻害活性によるものであり、アビエタン型ジテルペンの酸化による構造の多様化によって、殺蟻および摂食阻害といった特異的な活性を示すものと考えられた。

第 5 章では、ラクウショウ球果ヘキササン抽出物より単離・同定された 12 化合物の抗菌活性を、木材腐朽菌のカワラタケ（白色腐朽菌）およびオオウズラタケ（褐色腐朽菌）を用いて検討した。カワラタケに対しては、12 化合物中 9 化合物に活性が認められ、14-deoxycoleon U, taxodione, salvinolone に強い活性が認められた。オオウズラタケに対しては、12 化合物すべてに活性が認められ、taxodione, 14-deoxycoleon U に特に強い活性が、salvinolone, taxodone, ferruginol に強い活性が認められた。その強さは、用いた白色腐朽菌の活性を大きく上回るものであった。また、両菌に対して強い抗菌活性を示した taxodione, salvinolone, 14-deoxycoleon U の化学構造から活性を考察すると、5,6-dehydrosugiol の 11 位, 6 位に順次水酸基が結合し salvinolone および 14-deoxycoleon U となることで強い活性成分となることから、水酸基の数およびその結合部位が木材腐朽菌に対する抗菌活性に強く関係していると考えられ

た。2種の木材腐朽菌に対するラクウショウ球果の防御機構を理解するために、12化合物の抗菌活性を評価すると、ラクウショウ球果の化学的防御は球果を構成するジテルペンの約60%を占める ferruginol および 6,7-dehydroferruginol が量的な面で抗菌活性に寄与し、それ以外の約25%を占める taxodione など多様なジテルペンが質的な面で抗菌活性に関与していると考えられた。この傾向は、特に褐色腐朽菌に対し強く現れ、ラクウショウ球果の化学的防御機構の特徴が明らかとなった。アビエタン型ジテルペンの抗菌活性を ferruginol からの酸化経路で考察すると、白色および褐色両腐朽菌に対し ferruginol の酸化物 taxodione, salvinolone, 14-deoxycoleon U が非常に強い抗菌活性を示したことから、多量に含まれる ferruginol を主体としたアビエタン型ジテルペンが、酸化段階に伴い多様な構造に変化することで、抗蟻活性同様、木材腐朽菌に対する多様な活性に寄与するものと考えられた。以上のことから、ラクウショウ球果に含まれるアビエタン型ジテルペンが抗菌活性に大きく関与し、これらの化合物が酸化の進行に伴い多様に変化することで、主要構成成分およびその酸化物が量的・質的に木材腐朽菌に対する化学的防御に寄与しているものと考えられた。

以上の結果より、化石針葉樹であるラクウショウの球果に含まれる特徴的なアビエタン型ジテルペンが、球果の化学的防御に強く関係していることが明らかとなった。ラクウショウ球果の自己防御は、多量に含まれる ferruginol が酸化され特異的な活性成分に変わることによって、多様な生物に対する防御機構を発現していると考えられた。

引用文献

- 芦谷竜矢, 氏家正嗣, 長濱静男, 上野智子, 坂井克己 2001. スギ樹皮抽出成分の特徴. 木材学会誌 47:276-281.
- Bajpai, V. K., Rahman, A., and Kang, S. C. 2007. Chemical composition and anti-fungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Industrial Crops and Products* 26:28-35.
- Bläske, V. U. and Hertel, H. 2001. Repellent and toxic effects of plant extracts on subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology* 94:1200-1208.
- Bultman, J. D., Beal, R. H., and Ampong, F. F. K. 1979. Natural resistance of some tropical African woods to *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Forest Products Journal* 29:46-51.
- Chang, S. T., Wang, S. Y., Wu, C. L., Chen, P. F., and Kuo, Y. H. 2000. Comparison of the antifungal activity of cadinane skeletal sesquiterpenoids from *Taiwania (Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* 54:241-245.
- Chang, S. T., Wang, S. Y., Wu, C. L., Su, Y. C., and Kuo, Y. H. 1999. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of *Taiwania (Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. *Holzforschung* 53:487-490.
- Cheng, S. S., Liu, J. Y., Chang, E. H., and Chang, S. T. 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Bioresource Technology* 99:5145-5149.

- Cheng, S. S., Lin, H. Y., and Chang, S. T. 2005. Chemical composition and antifungal activity of essential oils from different tissues of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:614-619.
- Cornelius, M. L., Grace, J. K., and Yates, J. R. III 1997. Toxicity of monoterpenoids and other natural products to the formosan subterranean termite (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Economic Entomology* 90:320-325.
- Doi, K., and Shibuya, T. 1972. Diterpenes of *Juniperus conferta*. *Phytochemistry* 11:1175.
- Eberhardt, T. L., and Young, R. A. 1994. Conifer seed cone proanthocyanidin polymers: characterization by ¹³C NMR spectroscopy and determination of antifungal activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 42:1704-1708.
- Enoki, A., Takahama, S., and Kitao, K. 1977a. The extractives of Metasekoia, *Metasequoia glyptostoroboides* Hu et CHENG. I. The isolation of Metasequirin-A, Athrotaxin and Agatharesinol from the heartwood. *Mokuzai Gakkaishi* 23:579-586. 1997b. The Extractives of Metasekoia, *Metasequoia glyptostoroboides* Hu et CHENG. II. The isolation of Hydroxyathrotaxin, Metasequirin-B and Hydroxymetasequirin-A. *Mokuzai Gakkaishi* 23:587-593.
- Fang, J. M., Lee, C. K., and Cheng, Y. S. 1993. Diterpenes from Leaves of *Juniperus chinensis*: *Phytochemistry* 33:1169-1172.
- Fujiyama, I. 1983. Neogene termites from northeastern districts of Japan, with references to the occurrence of fossil insects in the districts. *Memoirs of the National Science Museum (Tokyo)*, 16:83-98.

- Fukushima, J., Yatagai, M., and Ohira, T. 2002. Abietane-type and labdane-type diterpenoids from the cones of *Chamaecyparis obtusa*. *Journal of Wood Science* 48:326-330.
- Fraga, B. M., Díaz, C. E., Guadaño, A., and González-Coloma, A. 2005. Diterpenes from *Salvia broussonetii* transformed roots and their insecticidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:5200-5206.
- Ganapaty, S., Thomas, P. S., Fotso, S., and Laatsch, H. 2004. Antitermitic quinones from *Diospyros sylvatica*. *Phytochemistry* 65:1265-1271.
- Gao, J., and Han, G. 1997. Cytotoxic abietane diterpenoids from *Caryopteris incana*. *Phytochemistry* 44:759-761.
- Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. A., and Rodriguez, B. 2006. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. Hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 13:267-271.
- Hensch, M., Rüedi, P., and Eugster, C. H. 1975. Horminon, Taxochinon und weitere Royleanone aus 2 abessinischen *Plectranthus*-Spezies (*Labiatae*). *Helvetica Chimica Acta* 58:1921-1934.
- Hirao, T., Nakano, Y., and Yamamoto, H. 2008. Four new 6,7-dioxyabietane diterpenes from cones of *Taxodium distichum* Rich. *Bulletin of the Faculty of Education, Ibaraki University* 57:71-76.
- Hirasawa, Y., Izawa, E., Matsuno, Y., Kawahara, N., Goda, Y., and Morita, H. 2007. Taxodistines A and B, abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17:5868-5871.

- Hueso-Rodriguez, J. A., Jimeno, M. L., Rodriguez, B., Savona, G., and Bruno, M. 1983. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry* 22:2005-2009.
- 藤田安二, 藤田真一, 岩村淳一, 西田節夫 1975. 各地産植物精油に関する研究 (第 38 報) メタセコイアの精油成分 その 1. 薬学雑誌 95:349-351.
- Jolad, S. D., Hoffmann, J. J., Schram, K. H., Cole, J. R., Bates, R. B., and Tempesta, M. S. J. 1984. A new diterpene from *Cupressus goveniana* var. ABRAMASIANA: 5β-Hydroxy-6-oxasugiol (cupresol). *Journal of Natural Products* 47:983-987.
- 狩野仁美, 澁谷栄, 林和男, 飯島泰男, 土居修一 2004. スギ心材の抗蟻性におよぼす高温乾燥の影響. 木材学会誌 50:91-98.
- 加藤鉄二, 本間隆夫 1996. メタセコイアの新鮮な葉に含まれるフラボノイド類の単離と化学構造. 東海大学スポーツ医科学雑誌, 8:78-81.
- 河内進策, 目黒貞利, 稲田聡子 1991. スギ木粉によるシイタケの栽培 フェルギノールによるシイタケ菌糸成長阻害. 木材学会誌 37:971-975.
- Kawazoe, K., Yamoto, M., Takaishi, Y., Honda, G., Fujita, T., Sezik, E., and Yesilada, E. 1999. Rearranged abietane-type diterpenes from *Salvia dichroantha*. *Phytochemistry* 50:493-497.
- 小藤田久義, 藤野陽治, 佐々木達也, 長谷部真, 太田路一, 鈴木幸一 2001. スギ樹皮の抗菌活性とその関連成分. 木材学会誌 47:479-486.
- Kofujita, H., Fujino, Y., Ota, M., and Takahashi, K. 2006. Antifungal diterpenes from the bark of *Cryptomeria japonica* D. Don. *Holzforschung* 60:20-23.
- Kofujita, H., Ota, M., Takahashi, K., Kawai, Y., and Hayashi, Y. 2002. A diterpene quinone from the bark of *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* 61:895-898.

- Kondo, Y., Ikenoue, T., and Takemoto, T. 1963. Structure of xanthoperol. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 11:678-680.
- Kuo, Y. H., Wu, T. R., Cheng, M. C., and Wang, Y. 1990. Five new compound from the heartwood of *Juniperus formosana* HAYATA. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 38:3195-3201.
- Kupchan, S. M., Karim, A., and Marcks, C. 1968. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *Journal of the American Chemical Society* 90:5923-5924.
- Kupchan, S. M., Karim, A., and Marcks, C. 1969. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *The Journal of Organic Chemistry* 34:3912-3919.
- Li, A., She, X., Zhang, J., Wu, T., and Pan, X. 2003. Synthesis of C-7 oxidized abietane diterpenes from racemic ferruginyl methyl ether. *Tetrahedron* 59:5737-5741.
- Li, W. H., Chang, S. T., Chang, S. C., and Chang, H. T. 2008. Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark. *Natural Product Research* 22:1085-1093.
- Lin, L. Z., Blaskó, G., and Cordell, G. A. 1989. Diterpenes of *Salvia prionitis*. *Phytochemistry* 28:177-181.
- Lockheart, M. J., van Bergen, P. F., and Evershed, R. P. 2000. Chemotaxonomic classification of fossil leaves from the Miocene Clarkia lake deposit, Idaho, USA based on n-alkyl lipid distributions and principal component analyses. *Organic Geochemistry* 31:1223-1246.
- 松井隆尚, 松下洋一, 菅本和寛, 小川喜八郎, 小宮山晶子, 牟田信次 2001. スギ材テルペノイドのシイタケ菌糸生長阻害作用. 木材学会誌 47:58-62.

- 松井隆尚, 松下洋一, 菅本和寛, 矢野弘道 2004. スギ (*Cryptomeria japonica*) 材のテルペノイドの単離およびフェルギノールの化学変換. 宮崎大学工学部紀要 33:63-73.
- 中島健, 善本知孝, 福住俊郎 1980. スギ材中のシイタケ菌阻害成分. 木材学会誌 26:698-702.
- 長濱静男, 岩岡達矢, 芦谷竜矢 2000. スギ材油のテルペノイド成分 (第 6 報) 精英樹球 3号, 県児湯 3号, 県始良 14号の成分. 木材学会誌 46:225-230.
- Nagy, G., Günther, G., Máthé, I., Blunden, G., Yang, M. H., and Crabb, T. A. 1999. Diterpenoids from *Salvia glutinosa*, *S. austriaca*, *S. tomentosa* and *S. verticillata* roots. *Phytochemistry* 52:1105-1109.
- Otto, A., Simoneit, B. R. T., and Rember, W. C. 2003. Resin compounds from the seed cones of three fossil conifer species from the Miocene Clarkia flora, Emerald Creek, Idaho, USA, and from related extant species. *Review of Palaeobotany and Palynology* 126:225-241.
- Otto, A., Walther, H., and Püttmann, W. 1997. Sesqui- and diterpenoid biomarkers preserved in *Taxodium*-rich Oligocene oxbow lake clays, Weissenster basin, Germany. *Organic Geochemistry* 26:105-115.
- Rudman, P. 1965. The causes of natural durability in timber XVIII. Further notes on the fungi toxicity of wood extractives. *Holzforschung* 19:57-58.
- Sato, A., Senda, M., Kakutani, T., Watanabe, Y., and Kitao, K. 1966. Studies on wood phenolics (II) extractives from heart wood of *Metasequoia glyptostoroboides* Hu et CHENG (Part 1). *Bulletin of the Wood Research Institute, Kyoto University* 39:13-21.

- Scheffrahn, R. H., Hsu, R. C., Su, N. Y., Huffman, J. B., Midland, S. L., and Sims, J. J. 1988. Allelochemical resistance of Bald Cypress, *Taxodium distichum*, heartwood to the subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *Journal of Chemical Ecology* 14:765-776.
- Sekine, N., Ashitani, T., Murayama, T., Shibutani, S., Hattori, S., and Takahashi, K. 2009. Bioactivity of latifolin and its derivatives against termites and fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:5707-5712.
- Shieh, J. C., and Sumimoto, M. 1992. Antifungal wood component of *Cunninghamia lanceolata*. *Mokuzai Gakkaishi* 38:482-489.
- Simões, S., Michavila, A., Rodríguez, B., Maria, C., and Hasan, G. A. M. 1986. A quinone methide diterpenoid from the root of *Salvia moorciuftiana*. *Phytochemistry* 25:755-756.
- Son, K. H., Oh, H. M., Choi, S. K., Han, D. C., and Kwon, B. M. 2005. Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15:2019-2021.
- 高橋孝悦, 上仲恭子, 坂井克己 1996. メタセコイア及びラクウショウのフェノール性成分. 第46回 日本木材学会大会発表要旨集 p.402.
- 高橋孝悦 2002. “樹木の顔 -樹木抽出成分の効用と利用-”. 中坪文明 編, 海青社 p.124.
- 高相徳志郎, 鈴木三男 1997. “朝日百科, 植物の世界, 11 巻, 種子植物”. 八尋洲東 編, 朝日新聞社 pp.204-207.
- Teixeira, A. P., Batista, O., Simões, M. F., Nascimento, J., Duarte, A., Torre, M. C. D. L., and Rodríguez, B. 1997. Abietane diterpenoids from *Plectranthus Grandidentatus*. *Phytochemistry* 44:325-327.

- Tellez, M. R., Khan, I. A., Kobaisy, M., Schrader, K. K., Dayan, F. E., and Osbrink, W. 2002. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). *Phytochemistry* 61:149-155.
- Tezuka, Y., Kasimu, R., Li, J. X., Basnet, P., Tanaka, K., Namba, T., and Kadota, S. 1998. Constituents of roots of *Salvia deserta* Schang. (Xinjiang-Danshen). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 46:107-112.
- Theis, N., and Lerchau, M. 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *Plant Science* 164:93-102.
- Wenkert, E., and Buckwalter, B. L. 1972. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy of naturally occurring substances. X. Pimaradienes. *Journal of the American Chemical Society* 94:4367-4369.
- Wenkert, E., Campello, J. D. P., McChesney, J. D., and Watts, D. J. 1974. Diterpenes of *Podocarpus ferrugineus* bark. *Phytochemistry* 13:2545-2549.
- Yamamoto, H., Hirao, T., Wakayama, K., and Chida, T. 2003. Abietane diterpenes from cones of *Taxodium distichum* Rich. *Bulletin of the Faculty of Education, Ibaraki University* 52:31-39.
- Yang, S. J., Fang, J. M., and Cheng, Y. S. 1998. Diterpenes from *Taxus MAIREI*. *Phytochemistry* 49:2037-2043.
- Yano, S., and Furuno, T. 1994. Resin acids from extracts of pine cones of Kuromatsu (*Pinus thunbergii*). *Mokuzai Gakkaishi* 40:72-77.
- Ying, S., Xi-hua, Y., Can-Kui, Z., and Zhi-Ben, T. 2005. C-32 triterpenes from *Taxodium ascendens*. *Biochemical Systematics and Ecology* 33:211-214.

Zhang, Y. M., Yin, R. T., Jia, R. R., Yang, E. H., Xu, H. M., and Tan, N. H.
2010. A new abietane diterpene from *Glyptostrobus pensilis*. *Fitoterapia*
81:1202-1204.

謝辞

本研究を遂行するにあたって、終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました山形大学農学部生物環境学科の高橋孝悦教授、芦谷竜矢准教授、荻山紘一名誉教授、生物資源学科の村山哲也教授、岩手大学農学部共生環境課程の小藤田久義准教授、弘前大学農学生命科学部応用生命工学科の橋本勝教授に心より感謝、御礼申し上げます。

また、長浜バイオ大学バイオサイエンス学科の河合靖教授には X 線結晶構造解析の分析、並びに立体構造の決定に関して多大なるご指導を賜りました。更に、九州大学大学院環境農学部門の藤田弘毅助教には新規化合物の検索にあたってご助言を賜りました。更に、秋田県立大学木材高度加工研究所の関根伸浩研究員には抗蟻活性および抗菌活性試験の遂行にあたって多くのご助言を賜りました。重ねて御礼申し上げます。

最後に、NMR 分析にあたり多大な協力をしてくださった山形大学大学院農学研究科の早坂優一氏、並びに論文執筆にあたり多大な協力と御手を戴いた山形大学農学部生物環境学科森林資源学講座森林資源利用学研究室の諸子に心より感謝いたします。

Summary

Chemical defenses of living fossil conifer,

Taxodium distichum Rich. cones.

Taxodium distichum Rich. (Taxodiaceae), commonly known as “bald” or “swamp” cypress, is well known as an extant deciduous, living fossil conifer. Abietane-type diterpenes are widely distributed in the plant kingdom as natural compounds. They reveal characteristic bioactivities (e. g. cytotoxic, antimicrobial, and antibacterial effects). Cones of *T. distichum* have been known to contain characteristic abietane-type diterpenes, however, only a few reports have considered self-defensive compounds in living fossil conifer cones. These compounds might have been important for the persistence, and thus, evolutionary success of *T. distichum*. The aim of this study was to investigate the bioactivities of components from *T. distichum* cones, and to evaluate their chemical self-defense mechanism.

In the second chapter, antitermitic and antifungal activities of successive extracts from *T. distichum* cones were examined. The fallen cones of *T. distichum* were extracted successively using *n*-C₆H₁₄, EtOAc, and MeOH solvents and these yields were 10.8%, 3.53%, and 1.56% per dry weight, respectively. In the antitermite tests, the *n*-C₆H₁₄ extract showed 40% of potent mortality in 7 days against subterranean termite, *Reticulitermes speratus*. The *n*-C₆H₁₄ and EtOAc extracts showed potent antifeedant activities. All extracts showed antifungal activities against brown-rot fungi, *Fomitopsis palustris* and *Gloeophyllum trabeum*, much stronger than white-rot fungi, *Trametes versicolor* and *Lenzites betulina*. The *n*-C₆H₁₄ and EtOAc extracts especially showed potent activities against *F. palustris*.

These two extracts also showed antifungal activities against soft-rot fungi, *Trichoderma virens*. From these results, the *n*-C₆H₁₄ and EtOAc extracts had higher antitermitic and antifungal activities than MeOH extract. In addition, the yield of *n*-C₆H₁₄ extract was three times higher than that of EtOAc extract. Thus, it was suggested the low polar components in *T. distichum* cones mainly related to their chemical defense.

In the third chapter, chemical components of the *n*-C₆H₁₄ extract were investigated. The *n*-C₆H₁₄ extract was analyzed by GC-FID and GC-MS. It was consisted of 70% terpenoids and 30% waxes and/or polymerized components. These terpenoids were mainly diterpenes (95.7%), with few sesqui- (4.0%) and monoterpene alcohols (0.3%). The extract was separated by partition extractions to the strong, medium, and weak acidic fractions with a neutral fraction, and these yields were 1.59%, 1.39%, 12.61%, and 84.41% per *n*-C₆H₁₄ extract, respectively. Weak acidic fractions were mainly several types of diterpenes (98.4%) with few monoterpene alcohols (1.6%). Neutral fraction had similar chemical composition to *n*-C₆H₁₄ extract, and it was consisted of ferruginol and 6,7-dehydroferruginol. These two compounds were determined from the comparison with standard and synthesized samples by GC analyses. The weak acidic and neutral fractions were separated by silica gel column chromatography. Structures of isolated compounds were determined by GC-MS, IR, and NMR analyses. Nine diterpenes, 6,7-dehydroroleanone, sandaracopimaric acid, taxodione, taxodal, sugiol, xanthoperol, salvinolone, 5,6-dehydrosugiol, and 14-deoxycoleon U were isolated from the weak acidic fraction, and taxodone from the neutral fraction. Isolated diterpenes, excluding sandaracopimaric acid and taxodal, had abietane-type structure. Taxodal was a novel

diterpenes, therefore, the configuration was determined by X-ray crystallographic analysis. These identified compounds consist 90% of diterpenes in the *n*-C₆H₁₄ extract. Thus, most of abietane-type diterpenes in *T. distichum* cones were identified.

In the fourth chapter, termicidal and antifeedant activities of the twelve identified compounds against *R. speratus* were examined. The 6,7-dehydroroyleanone showed strongest mortalities (47% in 5 days and 70% in 10 days) in the components. All of twelve compounds showed antifeedant activities. Xanthoperol, ferruginol, 14-deoxycoleon U, taxodione, and taxodone especially showed potent antifeedant activities. 6,7-Dehydroroyleanone has a hydroxyquinone structure; xanthoperol, taxodione, and taxodone have carbonyl groups; and 14-deoxycoleon U has three hydroxyl groups. These results suggested that the characteristic forms of the abietane-type structure due to the degree of ferruginol oxidation reflect their various activities.

In the fifth chapter, antifungal activities of the twelve identified compounds against white-rot fungi, *T. versicolor*, and brown-rot fungi, *F. palustris* were revealed. Most of the identified compounds showed antifungal activities against *F. palustris* much stronger than *T. versicolor*. This tendency was the same property as *n*-C₆H₁₄ extract. Taxodione and 14-deoxycoleon U especially showed potent antifungal activities against *F. palustris* and *T. versicolor*; and salvinolone, taxodone, and ferruginol also showed antifungal activities against *F. palustris*. Hence, the quantity of abietane-type compounds is not the only factor influencing the antifungal activities of *T. distichum* cones, but that there is also an effect of oxidized abietane-type compounds. This illustrates that it is important to

investigate the antifungal properties of both major and minor oxidized compounds when evaluating potentially active compounds.

As consequences, chemical self-defenses of *T. distichum* cones were strongly related to the activities of characteristic abietane-type diterpenes. *T. distichum* cones utilize these compounds for self-defense by oxidizing ferruginol to the various active compounds.

本研究に関する報告一覧

掲載論文

1. Norihisa Kusumoto, Tetsuya Murayama, Yasushi Kawai, Tatsuya Ashitani, Koichi Ogiyama, and Koetsu Takahashi 2008. Taxodal, a novel irregular abietane-type diterpene from the cones of *Taxodium distichum*. *Tetrahedron Letters* 49:4845-4847.
2. Norihisa Kusumoto, Tatsuya Ashitani, Yuichi Hayasaka, Tetsuya Murayama, Koichi Ogiyama, and Koetsu Takahashi 2009. Antitermitic Activities of Abietane-type Diterpenes from *Taxodium distichum* Cones. *Journal of Chemical Ecology* 35:635-642.
3. Norihisa Kusumoto, Tatsuya Ashitani, Tetsuya Murayama, Koichi Ogiyama, and Koetsu Takahashi 2010. Antifungal Abietane-Type Diterpenes from the Cones of *Taxodium distichum* Rich. *Journal of Chemical Ecology* 36:1381-1386.

学会発表

1. 楠本倫久, 村山哲也, 荻山紘一, 高橋孝悦 2007. ラクウショウ球果 *n*-hexane 抽出物に含まれる生物活性物質. 第 57 回日本木材学会大会, ポスター発表 PM007.
2. 楠本倫久, 芦谷竜矢, 村山哲也, 荻山紘一, 高橋孝悦 2008. ラクウショウ球果 *n*-hexane 抽出物に含まれる生物活性物質(II). 第 58 回日本木材学会大会, ポスター発表 PM008.
3. 楠本倫久, 芦谷竜矢, 村山哲也, 荻山紘一, 高橋孝悦 2009. ラクウショウ球果に含まれるアビエタン型化合物の抗菌活性. 第 59 回日本木材学会大会, ポスター発表 PM009.

4. Norihisa Kusumoto, Tatsuya Ashitani, Tetsuya Murayama, Koichi Ogiyama, and Koetsu Takahashi 2009. Bioactivities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones. *25th annual meeting of the International Society fo Chemical Ecology*, Oral presentation Session 3.6.
5. Norihisa Kusumoto, Tatsuya Ashitani, and Koetsu Takahashi 2010. The chemical defenses in living fossil conifer cones. *26th annual meeting of the International Society of Chemical Ecology*, Poster presentation P03-007.

以上