



Pergamon

PHYTOCHEMISTRY

The international Journal of Plant Biochemistry

ファイトケミストリー

PRODUCTION OF ANTI-TUMOUR-PROMOTING FURANO-NAPHTHOQUINONES IN *TABEBUIA AVELLANEDAE* CELL CULTURES.

S.UEDA¹

SHINICHI UEDA, TAKASHI UMEMURA, KOHJI DOHGUCHI, TOHRU MATSUZAKI, HARUNKUNI TOKUDA,* HOYOKU NISHINO* and AKIO IWASHIMA*

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan; *Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kamigyo-ku, Kyoto 602, Japan

(Received in revised form 2 November 1993)

Key Word Index—*Tabebuia avellanedae*; Bignoniaceae; naphthoquinone; 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione; anti-tumour-promoting activity.

Abstract—Callus and cell suspension cultures of *Tabebuia avellanedae* produce promising antitumour-promoting furanonaphthoquinones, 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and 2-acetyl-5-hydroxy-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione in high yields.

INTRODUCTION

Tabebuia avellanedae Lorentz and Griseb. is native to South America from Brazil to northern Argentina. Colloquial names for this plant include Ipê, Ipê roxo, Lapacho, Pau d'Arco Roxo, Peuva, Peuva roxa, Piuva, Queraiba, or Upeuva in Brazil, Lapacho and Lapacho negro in Argentina, Lapacho in Paraguay, Tayihú in Guarani, and Taheebo in ancient Inca. The bark of this plant has been used as a diuretic and as an astringent [1–3].

Recently, from the inner bark of Argentine *T. avellanedae*, 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**1**), 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione, 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**2**), 2-acetyl-8-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(1-methylethenyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione were isolated [4], besides other naphthoquinones and anthraquinones [5].

From the bark of *T. avellanedae* (= *T. impetiginosa*) obtained from Peru, *T. chrysantha* (Jacq.) Nichols ('Tahuari') collected in Peru and *T. rosea* (Bertol.) DC. collected in Cartagena, Colombia, 2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and 2-acetylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione were isolated. From the bark of *T. rosea*, also (5 or 8)-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione was obtained and from the wood, only lapachol and dehydro- α -lapachone [6].

Quinone **1** was first obtained from the wood of *Kigelia pinnata* DC. and designated as kigelinone. The structure of this compound was erroneously assigned to 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione [7]. The same compound was also isolated from the stem bark of *T. cassinoides* (Lam.) DC. An alcoholic extract from the stem bark was cytotoxic in the P-388 assay and the KB cell culture assay [8]. Recently, brine

shrimp lethality-directed fractionation of the 95% ethanol extract of the bark of *T. barbata* (E. Mey.) Sandwith has led to the isolation of antitumour quinones, e.g. 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione. These quinones have demonstrated potent cytotoxicity to human solid tumours *in vitro* (A-549, MCF-7, HT-29) [9].

Among the South American plants so far investigated as medicinal resources, *T. avellanedae* is worthy of more attention because of its highly promising therapeutic effects and its rich variety of naphthoquinones. However, artificial propagation of this plant is very difficult. Thus far, only wild *T. avellanedae* plants of over 20 years old have been used for medicinal purpose [1]. These facts prompted us to develop a high naphthoquinone-producing cell line of *T. avellanedae*. *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur. (= *T. argentea* Britton) cell cultures produced four naphthoquinones, **1**, **2**, 2-acetylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and 5-hydroxy-2-(1-methyl-ethenyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione [10].

RESULTS AND DISCUSSION

Callus tissues of *T. avellanedae* were induced according to the method applied to *Catalpa ovata* [11]. Callus and the cell suspension cultures grown on Murashige–Skoog medium [12] supplemented with indole acetic acid (IAA)

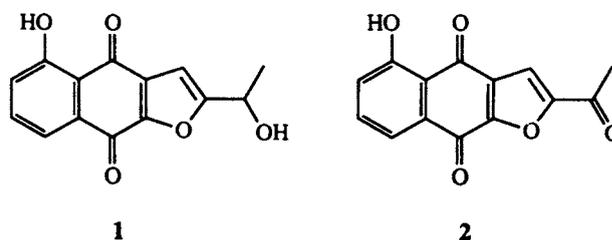


Table 1. Inhibitory effects of *T. avellanedae* naphthoquinones against 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)-induced Epstein-Barr virus early antigen (EBV-EA) activation

| Compound | Concentration: molar ratio (test compound/TPA) | | | | | | |
|--------------------------------|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| | 1000 | 500 | 100 | 10 | 1 | 0.1 | 0.01 |
| 1 | 0*(0)† | 0 (0) | 0 (0) | 9.2 (20) | 18.9 (50) | 65.2 (80) | 90.3 |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 53.7 (70) | 90.4 | 100 | 100 |
| Lapachol | 19.7 (80) | 46.2 (80) | 68.4 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1 + lapachol (molar ratio 1:1) | 0 (20) | 0 (30) | 36.6 (80) | 56.0 | 83.6 | | |

*Values are EBV-EA activation (%) \pm s.d. σ (\pm 5.0%) in the presence of test compound relative to the positive control (100). The activation was caused by TPA (32 pmol).

†Values in parentheses represent the viability per cent of Raji cells measured through Trypan Blue staining, followed by counting of the surviving cells 48 hr after the concomitant treatment of the cells with TPA, *n*-butyrate and test substances in a 0.25% phosphate buffer solution (pH 7.2).

and kinetin produced 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (1) in high yield (0.05%, dry weight base) along with a trace of 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (2). The physical and spectral data for these two quinones were consistent with the literature values [5]. The yield of 1 from cell cultures was more than 100 \times higher than that of 1 from the bark of the tree.

A short-term *in vitro* assay utilizing the activation of Epstein-Barr virus (EBV) expression in EBV genome-carrying human lymphoblastoid cells has been used to detect tumour promoters, e.g. 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) and anti-tumour promoters [13–15]. This assay system is composed of EBV-non-producer cells as the indicator, *n*-butyrate as the trigger, TPA as the EBV-activator and the test substance.

Following addition of *n*-butyrate, TPA and either naphthoquinone 1 or naphthoquinone 2 to the culture medium, the cells were cultivated for 48 hr at 37° and the ratio of EBV early antigen (EA)-expressing cells estimated using immunofluorescence. Both quinones 1 and 2 showed significant dose-dependent inhibitory effects in this *in vitro* assay (Table 1). In particular, the activity of 1 was *ca* 100 \times greater than that of 2. It is also noteworthy that the cancer preventive activity of 1 shown by the short-term *in vitro* assay was 10⁴ \times greater than that of lapachol (Table 1).

EXPERIMENTAL

Mps: uncorr.; UV: MeOH; IR: KBr discs; ¹H NMR: 220 MHz, CDCl₃ (TMS as int. standard); high resolution MS: positive ion mode; analytical TLC: Merck silica gel 60 F₂₅₄ plates (0.25 mm layer for analytical purpose and 0.5 mm layer for prep. mode) developed with toluene-EtOAc (4:1). TLC plates were examined under UV light at 254 and 360 nm.

Plant material. The fruits, bark and herbarium specimens were provided by Professor Emeritus W.R. Accorsi, Universidade de São Paulo. The bark was also obtained from Tahebo Japan, Osaka, Japan.

Establishment of tissue culture/cell suspensions. Seeds of *T. avellanedae* were sterilized by soaking successively in 70% EtOH for 30 sec and in sodium hypochlorite soln (1% active Cl) for 30 min. The seeds were washed (\times 5) with sterile H₂O and placed on 2% agar plates and incubated at 25° in the dark. Within a period of 30 days, most of the seeds had germinated. The seedlings of *ca* 5 mm in length were transferred to Linsmaier-Skoog (LS) basal agar medium [16] supplemented with 10⁻⁵ mol 2,4-D and incubated at 25° in the dark. Callus tissues induced from the seedlings over an incubation period of 1–3 weeks were transferred to Murashige-Skoog (MS) basal agar medium supplemented with 2 \times 10⁻⁵ mol IAA and 10⁻⁵ mol kinetin, pH 5.8, before autoclaving at 25° in the dark and subcultured every 4–5 weeks. After 3–5 transfers, the agar medium under the callus tissues was coloured yellow indicating naphthoquinone production in the callus tissues. The callus tissues were then transferred to a 500-ml flask containing 200 ml agar-free MS medium (composition as above). The liquid culture was kept at 25° in the dark on a reciprocating shaker (85 strokes min⁻¹, 8 cm in amplitude). The cells were subcultured every 4–5 weeks.

Extraction and isolation of naphthoquinones 1 and 2. Lyophilized *T. avellanedae* callus tissue (10 g) was extracted 4 \times with MeOH under reflux for 30 min. The combined MeOH extracts were concd *in vacuo* to give a brownish residue which was triturated repeatedly with CHCl₃. The CHCl₃ extract was washed with H₂O, dried over MgSO₄ and concd *in vacuo* to yield a yellowish residue. The residue was applied to TLC to give 2 yellow bands. Extraction of a yellow band at *R_f* 0.3 with a mixt. of CHCl₃ and MeOH (9:1) gave 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (1), yield 5 mg. In the same way, another yellow band (*R_f* 0.8) gave 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (2), yield 0.5 mg. The content of quinone 1 in this cell line is more than 100 \times higher than that of the bark collected in Brazil.

5-Hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (1). Yellow needles (from EtOH), mp 181°; HR-MS,

m/z : 258.0541 $[M]^+$ ($C_{14}H_{10}O_5$ requires 258.0525); $[\alpha]_D^{28} -25.0^\circ$ (MeOH); UV λ_{max} nm (log ϵ): 204 (4.26), 233 (sh 3.74), 247 (4.05), 300 (3.88), 396 (3.83); IR ν_{max} cm^{-1} : 2950, 2860, 1670, 1640, 1580, 1460, 1370, 1190, 1170, 970; 1H NMR: δ 1.65 (3H, *d*, $J=6.6$ Hz), 2.25 (1H, *br s*, disappeared on addition of D_2O), 5.05 (1H, *m*), 6.85 (1H, *d*, $J=0.7$ Hz), 7.27 (1H, *dd*, $J=8.3, 1.5$ Hz), 7.62 (1H, *t*, $J=8.3$ Hz), 7.82 (1H, *dd*, $J=8.3, 1.5$ Hz), 12.18 (1H, disappeared on addition of D_2O).

2-Acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (2). Yellow needles from EtOH, mp 218–220°; UV λ_{max} nm (log ϵ): 200 (4.36), 240 (4.07), 255 (4.30), 275 (4.12), 414 (3.50); IR ν_{max} cm^{-1} : 2950, 2860, 1700, 1670, 1650, 1580, 1460, 1370, 1250, 1200, 1170, 1110, 970; 1H NMR: δ 2.67 (3H, *s*), 7.33 (1H, *dd*, $J=8.4, 1.5$ Hz), 7.60 (1H, *s*), 7.67 (1H, *t*, $J=7.8$ Hz), 7.82 (*dd*, $J=7.4, 1.5$ Hz), 12.13 (1H, *s*, disappeared on addition of D_2O).

Acknowledgements—The authors are grateful for the encouragement of the late Professor E. Leete, University of Minnesota, and Professor T. Fujita, Kyoto University. Thanks are also due to Professor Emeritus W. R. Accorsi, Universidade de São Paulo, for his generous gift of the plant materials and kind advice, and Dr T. Motoyoshi for introducing the authors to the *T. avellanadae* plant.

REFERENCES

1. Accorsi, W. R. (1988) in *Taheebo*, p. 28. Zero Planning, Kobe.
2. Hashimoto, G. (1962) in *Brazil Shokubutu-ki (A Note of Brazilian Plants)*, p. 193. Teikoku Shoin, Tokyo.
3. da Silva, M. F., Lisbõa, P. L. B. and Lisbõa, R. C. L. (1977) in *Names Vulgares de Plantas Amazônicas*, p. 163. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.
4. Wagner, H., Kreher, B. and Lotter, H. (1989) *Helv. Chim. Acta* **72**, 659.
5. Burnett, A. R. and Thomson, R. H. (1967) *J. Chem. Soc. (C)* 2100.
6. Giral, M., Kindack, D., Dawson, B. A., Ethier, J.-C. and Awang, D. V. C. (1988) *J. Nat. Prod.* **51**, 1023.
7. Inoue, K., Inouye, H. and Chen, C.-C. (1981) *Phytochemistry* **20**, 2271.
8. Rao, M. M. and Kingston, D. G. I. (1982) *J. Nat. Prod.* **45**, 600.
9. Saizarbitoria, T. C., Anderson, J. E. and McLaughlin, J. L. (1992) *Abstract Papers of the 23rd Annual Meeting of American Society of Pharmacognosy*, P-22. Williamsburg, Virginia.
10. Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., Nayeshiro, H. and Moritome, N. (1982) in *Plant Tissue Culture 1982* (Fujiwara, A., ed.), pp. 375–376. Maruzen, Tokyo.
11. Ueda, S., Inoue, K., Shiobara, Y., Kimura, I. and Inouye, H. (1980) *Planta Med.* **40**, 168.
12. Murashige, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant.* **15**, 473.
13. Ito, Y., Yanase, S., Fujita, J., Harayama, T., Takeshima, M. and Imanaka, H. (1981) *Cancer Letters* **13**, 29.
14. Okamoto, H., Yoshida, D. and Mizusaki, S. (1983) *Cancer Letters* **19**, 47.
15. Ueda, S., Iwahashi, Y. and Tokuda, H. (1991) *J. Nat. Prod.* **54**, 1677.
16. Linsmaier, E. M. and Skoog, F. (1965) *Physiol. Plant.* **18**, 100.



タバブイア・アベラネダエ細胞培養による抗腫瘍促進 フラノ・ナフトキノンの生産

上田 伸一

上田 伸一、梅村 俊、道口 浩二、松崎 徹、徳田 春邦
西野 輔翼、岩島 昭夫

日本国 京都市左京区京都大学薬学部、同京都市上京区京都府立医科大学(1993年11月3日原稿受理)

キーワードインデックス:

タバブイア・アベラネダエ / ノウゼンカズラ科 / ナフトキノ / 5-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン / 抗発癌促進活性

(要旨)

タバブイア・アベラネダエのカルス並びに細胞懸濁培養は、有望な抗発癌促進活性を持つフラノナフトキノ、5-ヒドロキシ2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン4,9-ジオンと2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンを高収率で生産する。

(説明)

タバブイア・アベラネダエは、ブラジルからアルゼンチン北部に至る南米の原産である。この植物の俗称は、ブラジルではIpe、Ipe roxo、Lapacho、Paud' Arco Roxo、Peuva、Peuva roxa、Piuva、Queraiba、或いはUpeuva、Upeuva、アルゼンチンではLapacho、Lapacho negro、パラグアイではLapacho、ガラニではTayihuと呼ばれており、古代インカではTaheeboと呼ばれていたとのことである。この植物の樹皮は利尿剤や収斂剤として使用されている[1-3]。

最近、アルゼンチンのタバブイア・アベラネダエの樹皮から、他のナフトキノやアントラキノ[5]の外に、5-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)-ナフト[2,3b]フラン-4,9-ジオン(1)、8-ヒドロキシエチル-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン、2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(2)、2-アセチル-8-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン及び2,3-ジヒドロ-5-ヒドロキシ-2-(1-メチルエセニル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンが単離された[4]。

ペルーで入手したタバブイア・アベラネダエ(=タバブイア・インペチギノーサ)の樹皮、ペルーで採集したタバブイア・クリサンタ(“タフアリ”)ならびにコロンビアのカルタゲナで採集したタバブイア・ロゼアの樹皮からも、(5または8)-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)-ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンが得られたが、材からはラパコールとジヒドロ- α -ラパコンが得られただけである[6]。

キノ(1)は、キゲリア・ピンナータの材から最初に得られたのでキゲリノンと名付けられた。この化合物の構造は誤って8-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンとされた[7]。

同じ化合物がタバブイア・カッシノイデスの樹皮からも単離された。樹皮のアルコール抽出物は、P-388(マウス移行性リンパ肉腫細胞)並びにKB(ヒト上皮様細胞がん)細胞に対し

て細胞毒性があった[8]。最近、タバブイア・バルバータの樹皮の95%エタノールエキスをブラインシュリンブ(アルテミア属の甲殻類)致死活性を指標として分画し、抗腫瘍キノ類、例えば8-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンが単離されている。これらのキノは、インビトロでヒトの固型がん(A-549, MCF-7, HT-29)に対して強い細胞毒性を示した[9]。

これまで調査した南米植物の中では、タバブイア・アベラネダエがその有望な治療効果と豊富にナフトキノを含むことから、薬用資源として極めて注目に値する。しかし、この樹木の人工栽培は非常に難しい。薬用に供されているのは、20年以上の野生のタバブイア・アベラネダエだけである[1]。

この事実から、タバブイア・アベラネダエの高ナフトキノ生産細胞系を得る必要が生じたのである。タバブイア・カライバ細胞培養は、4種のナフトキノ、化合物(1)(2)、2-アセチルナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン及び5-ヒドロキシ-2-(1-メチルエセニル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンを生産した[10]。

(結果と結論)

タバブイア・アベラネダエのカルス組織をキササゲで用いた方法[11]で誘導した。インドール酢酸とカイネチンを添加したムランゲ・スクーグ培地[12]で培養したカルスと細胞懸濁培養は、

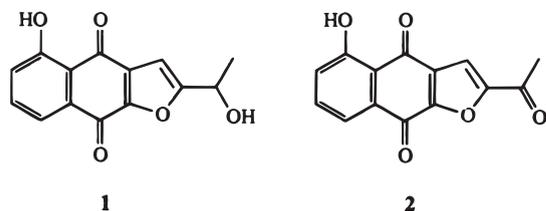


表1. 12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセテート(TPA)に対するタバブイア・アベラネダエの抑制する影響
引き起こされたエプスタイン・バーウイルスの初期の抗原(EBV-EA)活性化

| 化合物 | 濃度：モル比(テスト化合物/TPA) | | | | | | |
|------------------------|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| | 1000 | 500 | 100 | 10 | 1 | 0.1 | 0.01 |
| 1 | 0* (0)† | 0 (0) | 0 (0) | 9.2 (20) | 18.9 (50) | 65.2 (80) | 90.3 |
| 2 | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 53.7 (70) | 90.4 | 100 | 100 |
| ラパコール | 19.7 (80) | 46.2 (80) | 68.4 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 1+ラパコール (白濁の定量 1:1) | 0 (20) | 0 (30) | 36.6 (80) | 56.0 | 83.6 | | |

*値はEBV-EA活性化(%) \pm s.dです。肯定的なコントロール(100)に関連のあるテスト化合物がある状態での σ (\pm 5.0%)。その活性化はTPA(32pmpl)によって引き起こされました。

括弧中の†値は、Rajiセルの実行可能性パーセントが、0.25%のリン酸緩衝液(pH 7.2)中のTPA、n-ブチレートおよびテスト物質を備えたセルのconcomitant処理の後に残存するセル48hrを数えることを後に続けて、Trypaniによって青を汚すことを測定したと言います。

微量の2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(2)と共に5-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)-ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(1)を高収率(乾燥重量当たりで0.05%)で生産した。この2種のキノンに関する物理的並びにスペクトルデータは、文献値[5]と一致した。細胞培養からの化合物(1)の収率は、樹皮からの収率の100倍以上であった。EBVゲノムを保持したヒトリンパ芽球細胞におけるエプスタイン・バーウイルス(EBV)発現活性化を利用する短期インビトロアッセイは、腫瘍促進因子、例えば12-O-テトラデカノイルホルポール-13-アセテート(TPA)並びに抗腫瘍促進因子を検出するのに用いられている[13-15]。このアッセイシステムは、インジケータとしてのEBV-非生産細胞株、誘発剤としてのn-ブチレート、TPA並びに試料からなっている。培地に、n-ブチレート、TPA及びナフトキノン(1)又はナフトキノン(2)を加えてから、細胞を37度で48時間培養し、EBV初期抗原発現細胞の比率を蛍光抗体法で測走した。このインビトロアッセイでキノン(1)とキノン(2)は、用量依存的な強い抑制効果を示した。特に(1)の活性は(2)の約100倍以上であった。又、短期インビトロアッセイで(1)の発がん予防活性はラパコールの1000倍以上であった。(表1)

(実験の部)

融点:未補正;IR:KBrディスク;プロトンNMR:220MHz, CDCl₃(TMS標準):高分解能質量分析:陽イオン;TLC分析:Merckシリカゲル60F₂₅₄プレート(分析目的では0.25mm、分取目的では0.5mm)、トルエン・酢酸エチル(4:1)で展開。TLCプレートは、UV光下254と360nmで観察した。

植物材料:果実、樹皮、植物標本は、サンパウロ大学名誉教授W.R.アコーシ博士より提供された。樹皮は日本国大阪のタヒボジャパン株式会社から入手した。

組織培養/細胞懸濁培養の確率

タバペイア・アベラネダエの種子を70%のエタノール中に30秒、ついで次亜塩素酸ナトリウム(1%活性塩素)に30分浸して殺菌した。さらに、滅菌水で5回洗浄し2%寒天板上、暗所25度で培養した。30日以内にほとんどの種子が発芽した。長さ約5mmの幼芽を10⁻⁵モル2,4-Dを添加したリンスマイヤー・スクーグ(LS)基礎培地(オートクレーブ前のpH5.6)に移し、暗所25度で培養した。1-3週間カルス組織が誘導された。このカルスを2×10⁻⁵モルのIAAと10⁻⁵モルのカイネチンを添加したムラシゲ・スクーグ(MS)基礎培地(オートクレーブ前のpH5.8)に移植し、暗所25度で培養し4-5週間毎に継代した。3-5回の移植で、カルス組織下の寒天層が黄色となった。これはナフトキノンの生産を示すものである。カルス組織は寒天を入れないMS液体培地(200ml)に移植した。液体培地は暗所25度で往復振とう機(85ストローク/分、振幅8cm)で振とうした。細胞は4-5週間毎に移植した。

ナフトキノン(1)と(2)の抽出分離

凍結乾燥したタバペイア・アベラネダエのカルス組織(10g)を還流下、メタノールで30分宛4回抽出した。メタノールエキスは合併し、減圧濃縮すると褐色の残渣を与えた。

これをクロロホルムで繰り返し抽出した。クロロホルムエキスは水で洗浄後MgSO₄で乾燥し、黄色残渣を得た。この残渣をTLCに付して2本の黄色バンドが得られた。

CHCl₃とMeOH(9:1)の混合溶媒で溶出し、Rf0.3の黄色バンドからは、5-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]

フラン-4,9-ジオン(1)を5mg得た。同様にもうひとつの黄色バンド(Rf0.8)からは2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(2)を0.5mg得た。この細胞系のキノンの含量は、ブラジルで収集した樹皮のキノン含量の100倍以上である。

5-ヒドロキシ-2-(1-ヒドロキシエチル)ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(1)黄色針状晶(EtOHで再結晶)、融点181°;HR-MS, m/z:258.0541[M]⁺(C₁₄H₁₀O₅計算値258.0525);[α]_D²⁵:20°(MeOH);UV_{λmax}nm(logε):204(4.26)、233(sh3.74)、247(4.05)、300(3.88)、396(3.83);IR_{λmax}cm⁻¹:2950、2860、1670、1640、1580、1460、1370、1190、1170、970;¹HNMR;δ1.65(3H,d,J=6.6Hz)、2.25(1H,brs,D₂Oを加えると消失)、5.05(1H,m)、6.85(1H,d,J=0.7Hz)、7.27(1H,dd,J=8,3,1.5Hz)、7.62(1H,tj_o@tahebo.com,J=8.3Hz)、7.82(1H,dd,8,3,,1.5Hz)、12.18(1H,D₂Oを加えると消失)。

2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン(2)エタノールで再結晶、黄色針状晶、融点218-220°;UV_{λmax}nm(logε):200(4.36)、240(4.07)、255(4.30)、275(4.12)、414(3.50);IR_{λmax}cm⁻¹:2950、2860、1780、1670、1650、1580、1460、1370、1250、1200、1170、1110、970;¹HNMR;δS2.67(3H,s)、7.33(1H,dd,J=8.4,1.5Hz)、7.60(1H,s)7.67(1H,t,J=7.8Hz)、7.82(dd,J=7.4,1.5Hz)、12.13(1H,8,D₂Oを加えると消失)。

(謝辞)

著者等は、ミネソタ大学の故E.Leete教授、並びに京都大学のT.藤多教授に感謝する。同時にサンパウロ大学の名誉教授W.R.Accorsi博士に対し、植物材料の提供、並びに親切な助言に感謝する。著者にタバペイア・アベラネダエ植物を紹介された本吉博士に感謝する。

(参考文献)

1. W.R.Accorsi(1998) "TAHEEBO", p28 セロ・ブランニング(神戸)
2. 橋本G(1962) "ブラジル植物記", p193 帝国書院(東京)
3. da Silva, M.F., Lisboa, P.L.B., Lisboa, R.C.L.(1977) "Names Vulgares de Plantas Amazonicas" p.163. Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnologico. Instituto nacional de Pesquisas da Amazonia, Manaus.
4. Wagner, H, Kreher, B., Lotter, H. (1989) Helv, Chim. Acta 72巻659
5. Burnett, A.R., Thomsom, R.H. (1967) J.Chem. Soc. (C) 2100.
6. Girald, M., Kindack, D., Dawson, B.A., Ethier, J.-C., Awang, D.V.C (1988) J. Nat. Prod. 51巻, 1023
7. 井上, K.井上, H.Chen C.-C. (1981) "Phytochemistry" 20巻, 2271
8. Rao, M. M., Kingston, D.G.I. (1982) J. Nat. Prod. 45巻, 600
9. Saizarbitoria, T. C., Andersson, J. E., McLaughlin, J.I. (1992) アメリカ生薬学会第23年会要旨集P-22(バージニア州ウリアムスバーク)
10. 井上, H., 上田, S., 井上, K., 苗代, H., 漏留, N. (1982) "Plant Tissue Culture 1982" (藤原・A.編集) p375-376
11. 上田, S., 井上, K., 塩原, Y., 木村, I.井上, H. (1980) Planta Medica 40巻, 168
12. ムラシゲ, T., SKOOG, H (1962) "Physiol. Plant." 15巻, 473
13. 伊藤, Y., 柳瀬, S., 藤田, J., 原山, T., 竹島, M., 今中, H. (1981) "Cancer Letters" 13巻, 29
14. 岡本, H., 吉田, D., 水崎, S. (1983) "Cancer Letters" 19巻, 47
15. 上田, S., 岩橋, Y., 徳田, H. (1991) J. Nat. Prod. 54巻, 1677
16. Linsmier, E.M. Skoog, F (1965) Physiol. Plant. 18巻, 100