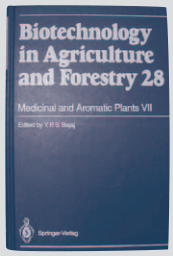




# Biotechnology in Agriculture and Forestry 28

## Medicinal and Aromatic Plant VII

バイオテクノロジー イン アグリカルチャー アンド フォレストリー


# Tabebuia avellanedae Lorentz ex Griseb.(Taheebo): In Vitro Culture and the Production of Naphthoquinones


*S.UEDA*[1]


## 1 General Account

### 1.1 Distribution and Importance of the Plant

Bignoniaceous plants of the genus *Tabebuia* grow throughout southern North America to South America. *Tabebuia avellanedae* Lorentz and Griseb. [synonym *T. heptaphylla* Vellosoi Toledo, *T. impetiginosa* Mart. ex DC. (Standl.), and *T. ipê* (Mart. ex Schum.) Standl.] is native to South America from Brazil to northern Argentina (Williams 1936; Hashimoto 1962; da Silva et al. 1977). The bark of the plant has been used as a diuretic and astringent. This plant has many colloquial names: Ipê, Ipê roxo, Ipê cavatan, Ipê comum, Ipê de São Paulo, Ipeuva, Aipê, Cavatan, Guiraiba, Lapacho, Pau d'Arco Roxo, Pau d'ArcoVelmelho, Peuva, Peuva roxa, Piuva, Queraiba, or Upeuva in Brazil; Lapacho or Lapacho negro in Argentina; Lapacho in Paraguay; Tayihú in Guarani; and Taheebo in ancient Inca (Hashimoto 1962; da Silva et al. 1977; Accorsi 1988). In an ancient language of the Incas, Quechua, which is still retained by the inhabitants of the sierras, *Tabebuia* species are called Tahuari (Williams 1936). *T. avellanedae* grows well in the semitropical regions of Brazil. The erect trunk of the tree with its spreading branches reaches a height of 30–50 m. The palmate compound leaves are composed of five to seven microphylls. The leaves are opposite, sharply toothed, and long pointed. The five-lobed rosy or purple showy blossoms, similar in shape to those of the genus *Catalpa*, open in mid- July to September (Fig. 1). The plants bear long suspended pods containing numerous seeds in September to October. The seeds are broadly winged. The timber is valuable for general construction and cabinetwork. The recent rediscovery of *Tabebuia* plants as effective drugs for cancer has made *T. avellanedae* an important medicinal resource (Hartwell 1968; Gottlieb and Mors 1980; M.M. Rao and Kingston 1982; Accorsi 1988; Ueda and Tokuda 1990; Zani et al. 1991; Saizarbitoria et al. 1992).


[1] Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-01, Japan



Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 28
Medicinal and Aromatic Plants VII (ed. by Y P S Bajaj)


© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1994

**Fig. 1.** Herbarium specimen of *Tabebuia avellanedae* flowers. (Donated by Professor W.R. Accorsi)

### 1.2 Secondary Metabolites

From the heartwood of *T. avellanedae*, a group of naphthoquinones and the derivatives, lapachol (**1**), lapachol methyl ether (**2**), deoxylapachol (**3**), menaquinone-1 (**4**), β-lapachone (**5**), α-lapachone (**6**), dehydro-α-lapachone (**7**), and lapachenole (**8**); a group of anthraquinones, 2-methylanthraquinone (**10**), 2-hydroxymethylanthraquinone (**11**), 2-acetoxymethylanthraquinone (**12**), anthraquinone-2-aldehyde (**13**), anthraquinone-2-carboxylic acid (**14**), 1-hydroxyanthraquinone (**15**), 1-methoxyanthraquinoe (**16**), and 2-hydroxy-3-methylanthraquinone (**17**); as well as a new dimeric quinone, tabebuin (**9**) were isolated together with quercetin, and *o*- and *p*-hydroxybenzoic acids (Burnett and Thomson 1967a, b; Figs. 2 and 3). Recently, from the inner bark of Argentine *T. avellanedae*, which was obtained from Kenneth Corwin (Dr. Meyer's Lapacho Co., Santa Monica, California), 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione (**18**), 8-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,-3-*b*]-furan-4,9-dione (**19**), 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-b]furan-4,9-dione (**20**), 2-acetyl-8-hydroxynaphtho [2,3-*b*]

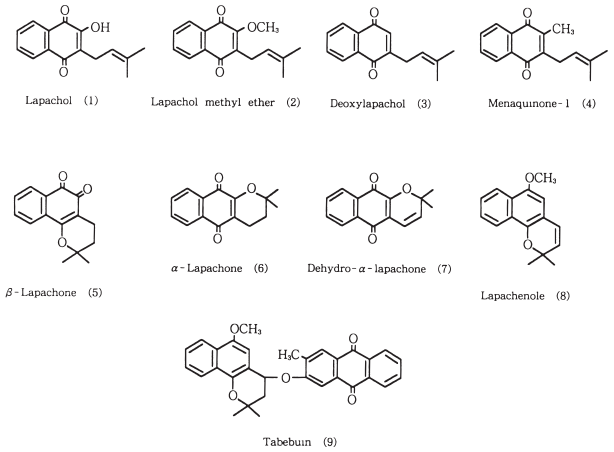



**Fig. 2.** Naphthoquinones (**1**)–(**9**) in *Tabebuia avellanedae* heartwood. (Burnett and Thomson 1967b)

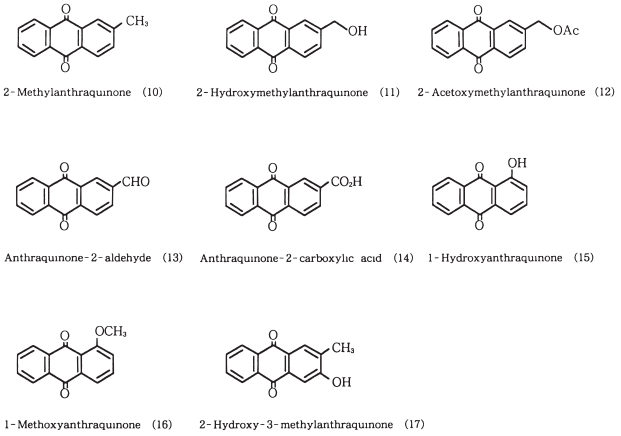



**Fig. 3.** Anthraquinones (**10**)–(**17**) in *Tabebuia avellanedae* heartwood. (Burnett and Thomson 1967b)

furan-4,9-dione (**21**), and 2,3-dihydro-5-hydroxy-2-(1-methylethenyl) naphtho-[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**24**) were isolated along with lapachol (**1**), dehydro-α-lapachone (**7**), and benzo-[*b*]furan-6-carboxaldehyde (**26**) (Wagner et al. 1989; Fig. 4).

From the bark of *Tabebuia avellanedae* ( = *T. impetiginosa*), obtained from Peru in 1983, *T. chrysantha* (Jacq.) Nichols (Tahuari) collected in Peru in March 1987, and *T. rosea* (Bertol.) DC. collected at Cartagena, Colombia, 2-(1-hydroxyethyl) naphtho[2,3-*b*] furan-4,9-dione (**22**) and 2-acetylnaphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione (**23**) were isolated. (5 or 8)-Hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho-[2,3-b]furan-4,9-dione was obtained from the bark of *T. rosea*, while from the wood, lapachol (**1**) and dehydro-α-lapachone (**7**) were obtained (Girald et al. 1988). From the methanolic extract of the bark of *T. avellanedae*, three new iridoid glucosides, 6-*O*-(*p*-hydroxybenzoyl)-ajugol, 6-*O*-(3′,4′-dimethoxy-benzoyl)-ajugol and 6-*O*-(*p*-hydroxybenzoyl)-ajugol were isolated (Nakano et al. 1993).

2-Ethylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione was obtained along with 2-iso-propylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and 2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4, 9-dione (**25**) (dehydro-iso-α-lapachone) from the heart-wood of *Paratecoma peroba* Kuhlm. (Sandermann et al. 1968).

Naphthoquinone (**18**) was first obtained from the wood of *Kigelia pinnata* DC. collected at Heng Chun Tropical Botanic Garden, Taiwan. This compound was designated as "kigelinone", to which structure (**19**) was assigned (Inoue et al. 1981). The same compound was also obtained from the stem bark of *Tabebuia*

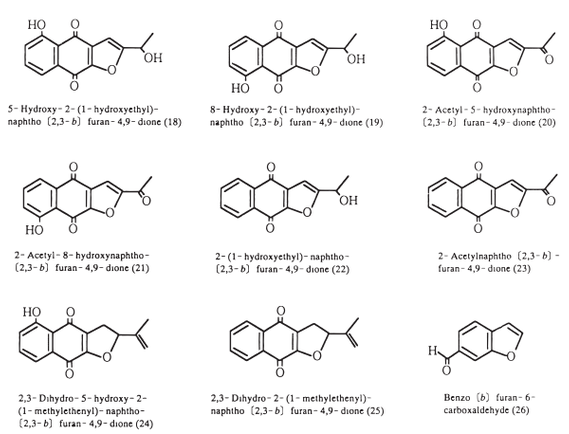



**Fig. 4.** Constituents (**18**)–(**26**) of *Tabebuia avellanedae* bark. (Wagner et al. 1989)

*cassinoides* (Lam.) DC. An alcoholic extract of the stem bark was found to be cytotoxic in the P-388 assay and the KB cell culture assay (M.M. Rao and Kingston 1982). Almost concurrently, quinones (**18**) and (**20**) were obtained from callus cultures of *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur. ( = *T. argentea* Britton) (Inouye et al. 1982). Recently, the 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 antitumor quinones such as (**19**), which showed potent cytotoxicity to human solid tumors in vitro (A-549, MCF-7, HT-29). The *T. barbata* plant is indigenous to the upper Orinoco and Amazonia rivers (Saizarbitoria et al. 1992). Quite recently, the application of a yeast-based assay, using a genetically engineered yeast strain that lacks the recombination pathway associated with repair of double-stranded breaks and meiotic recombination, known as rad 52, to an extract of a bignoniaceous plant *Crescentia cujete* resulted in the isolation of (**18**), (**22**), (**24**), and (**25**) along with five related naphthoquinones (Heltzel et al. 1993).

### 1.3 Conventional Practices for Propagation, Production of Naphthoquinones, and Their Clinical Applications

Among the Brazilian plants investigated as medicinal resources, *T. avellanedae* is note worthy due to its highly promising therapeutic effects. However, artificial propagation of this plant is very difficult. Wild *T. avellanedae* plants have thus been used for medicinal purpose (Accorsi 1988). Recent findings of the anti-tumor activity of the extract or the constituent naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione congener of this plant support their clinical use (M.M. Rao and Kingston 1982; Ueda and Tokuda 1990; Saizarbitoria et al. 1992).

In an effort to find a clinically acceptable antitumor-active compound, lapachol (**1**), a known uncoupler of oxidative phosphorylation (Howland 1963), and its derivatives have been extensively investigated. Lapachol (**1**), obtained from the methanol extract of the powdered wood of *T. avellanedae*, yield 3.18% (Linardi et al. 1975), shows highly significant activity against Walker 256 carcinosarcoma when given intraperitoneally, subcutaneously, intramuscularly, and orally. The best activity and therapeutic index were shown when the drug was given orally twice daily on days 3–6. This treatment regimen resulted in a maximum tolerated dose of 750 mg/kg and a minimum effective dose of 90 mg/kg to yield a therapeutic index of 8.33 and a maximum effectiveness of 0.11 (K.V. Rao et al. 1968; K.V. Rao 1974). Lapachol (1) indicated a significant inhibitory activity against 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced Epstein-Barr virus (EBV) activation. Furthermore, this compound inhibited the skin carcinogenesis initiated by 7,12-dimethylbenz(*a*) anthracene (DMBA)-and 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin carcinogenesis in mice (Ueda et al. 1992). Among almost a 100 synthesized analogs, 2-(3-methyl-2-butenyl)-3-(tetraacetyl-β- D-glucopyranosyl)-1,4-naphthoquinone (2-β-O-glucosyllapachol tetraacetate) extended lapachol activity, becoming effective against mouse lymphocytic leukemia P-388 (Linardi et al. 1975). Recent investigations on the influence of a broad concentration range of naturally occurring naphthoquinones and other cytotoxic or cytostatic agents on human granulocytes and lymphocytes revealed that nearly all substances show the known cytotoxic or immunosuppressive effects at high concentrations (10 μg ~ 10 ng/ml), whereas most of the same compounds, except cytostatic vincristine etc., display immunostimulating activities at very low concentrations (10 ng ~ 10 fg/ml). This observation might be relevant to the antitumoral effects of the naphthoquinone-containing *T. avellanedae* plant (Wagner et al. 1988).

Peroxidation of lapachol (**1**) with 3-chloroperbenzoic acid in the presence of sodium hydrogen carbonate, the epoxide (**27**) was formed, but it rapidly rearranged to ( ± )-2,3-dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)naphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione (**28**), yield 49% (Fig. 5). This compound showed enhanced activity against human epidermoid carcinoma of the neopharynx (KB) in comparison with lapachol (**1**) and related compounds (Adams and Lewis 1978).

Lapachol (**1**) occurs in the wood of several species of Bignoniaceae including *T. avellanedae* (Burnett and Thomson 1967a, b), termite-resistant *Tectona grandis* L. fil. (Berbenaceae) (Sandermann and Dietrichs 1957; Sandermann and Simatupang 1966), *Diphysa robinoides* Bent. (Leguminosae) (Sagrero-Nieves 1986), Fijian *Hibiscus tiliaceus* (Malvaceae) (Ali et al. 1980), and in the roots of *Conospermum teretifolium* R. Br. (Proteaceae) (Cannon et al. 1975).

A phase I clinical trial of lapachol (**1**) was carried out at the National Cancer Institute, Baltimore, Maryland, in 1967. The doses ranged from 250 to 3750 mg/day for 5 days. The largest total dose received was 3000 mg/day for 21 days. No toxicity was seen at doses below 1.5 g. Above this level, nausea and vomitting were usual. No hematologic or renal activity was seen at any dosage. At doses above 2 g/day, the prothrombin time was often markedly prolonged and required correction with parenteral vitamin K. This phenomenon was considered to be related to its structural similarity to vitamin K (Block et al. 1974).

2-Acetylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and ( ± )-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione were synthesized in 36% overall yield starting from furan and phthalic anhydride (Lopes et al. 1984). 7, 8-Dimethoxy-2-acetylnaphtho [2,3-*b*]furan-4,9-dione (**29**) was synthesized in 90% overall yield by a route involving directed ortho metalation. Chromium-pyridine complex oxidation of naturally occurring quinone (**30**) gave compound (**29**) (Fig. 6; de Silva et al. 1979; Zani et al. 1987).

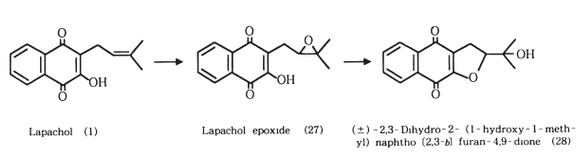



**Fig. 5.** Chemical conversion of lapachol into a dihydronaphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione derivative. (Adams and Lewis 1978)

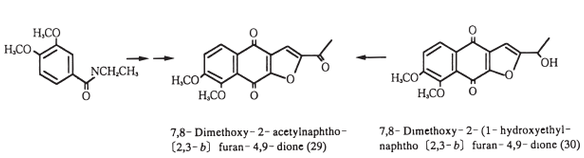



**Fig. 6.** Synthesis of natural naphtho[2,3-*b*]-furan-4,9-dione. (Zani et al. 1987)

Lapachol (**1**) was commercialized in Brazil as an antitumor drug (Linardi et al. 1975). The inner bark of *T. avellanedae* produced in Brazil is distributed in Asia as a herb tea by TAHEEBO JAPAN Co. Ltd., Osaka, Japan.

## 2 In Vitro Culture Studies

### 2.1 Review of the Tissue Culture/Biotechnology Studies on *Tabebuia avellanedae*

*T. avellanedae* callus tissues (Ueda 1993; Ueda et al. 1994) were induced according to the method applied to *Catalpa ovata* (Ueda et al. 1980). The callus and the cell suspension cultures produce 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho-[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**18**) in high yields along with a trace of 2-acetyl-5-hydroxynaphtho-[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**20**) (Fig. 7). Both naphthoquinones showed an inhibitory effect in Raji cells on tumor promotion by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) combined with n-butyric acid (Table 1; Ueda and Tokuda 1993; Ueda et al. 1994).

The author established a cell line of *Tabebuia caraiba* (Mart.) Bur. (*T. argentea* Britton) on MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with IAA and kinetin either in a solid or liquid state and produced four naphthoquinones, 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**18**), 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**20**), 2-acetylnaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**23**), and 5-hydroxy-2-(1-methylethenyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione. Pulse administration of precursory 4-(2-carboxyphenyl)-4-oxobutanoic acid (2-succinylbenzoic acid) to the suspension cultures at intervals of 10 days over

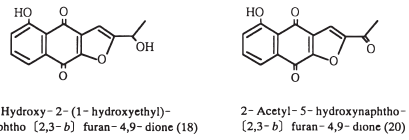



**Fig. 7.** Naphthoquinones of *Tabebuia avellanedae* cell cultures. (Ueda 1993)

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

| Compound | Concentrations: molar ratio (test compound/TPA) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 500 | 100 | 10 | 1 | 0.1 | 0.01 | |
| 5-Hydroxy-2-(1-hydroxy-ethyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**1**) | 0[a](0)[b] | 0(0) | 0(0) | 9.2(20) | 18.9(50) | 65.2(80) | 90.3 |
| 2-Acetyl-5-hydroxynaphtho-[2,3-*b*]-furan-4,9-dione (**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 | | |

[a] Values are EBV-EA activation (%) ± standard deviation $\sigma$ (± 5%) in the presence of test compound relative to the positive control (100). The activation was caused by TPA (32 pmol).
[b] Values in parentheses represent the viability (%) of Raji cells measured through Trypan Blue staining followed by counting of the surviving cells 48 h after the concomitant treatment of the cells with TPA, n-butyrate, and test substances in a 0.25% phosphate buffer solution (pH 7.2).

a period of 1 month resulted in the production of 2,3-dihydro-2-(1-methylethenyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**25**) in addition to the four quinones described above. *T. caraiba* cell cultures, which are incapable of producing these quinones in the MS or LS medium (Linsmaier and Skoog 1965) supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, (2,4-D) metabolized exogenous 2-succinylbenzoic acid to produce quinones (**18**), (**23**), (**25**), and 5-hydroxy-2-(1-methylethenyl)naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (Inouye et al. 1982).

On the basis of the structures of the naphthoquinones found in the *Tabebuia avellanedae* and *T. caraiba* cell cultures, the biogenesis of naphthoquinones could be proposed as shown in Fig. 8.

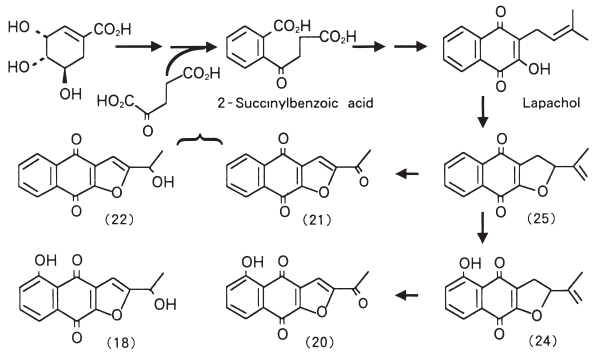



**Fig. 8.** Biogenesis of naphthoquinones in *Tabebuia avellanedae* and *T. caraiba*

### 2.2 Establishment of Tissue Culture/Cell Suspensions

Seeds of *T. avellanedae* were sterilized by soaking them successively in 70% ethanol for 30 s and in sodium hypochlorite solution (1% active chlorine) for 30 min. The seeds, washed five times with sterile water, were placed on 2% agar plates and incubated at 25 °C in the dark. Within 30 days, most of the seeds had germinated. The seedlings of about 5 mm in length were transferred to LS basal agar medium supplemented with $10^{-5}$ mol 2, 4-D and incubated at 25 °C in the dark. Callus tissues induced from the seedlings over 1–3 weeks of incubation were transferred to MS basal agar medium supplemented with $2 \times 10^{-5}$ mol indoleacetic acid (IAA) and $10^{-5}$ mol kinetin, pH 5.8, before autoclaving, at 25 °C in the dark and subcultured every 4–5 weeks. After three to five transfers the agar medium under the callus tissues turned yellow, indicating naphthoquinone production in the callus tissues. The callus tissues were then transferred to a 500-ml flask containing 200 ml of the above described MS medium from which agar was deleted. The liquid culture was stirred at 25 °C in the dark on a reciprocating shaker, 85 strokes/min, 8 cm in amplitude. The cells were subcultured every 4 to 5 weeks.

### 2.3 Extraction and Structure of Naphthoquinones

Lyophilized *Tabebuia avellanedae* callus tissues (10 g) were extracted four times with methanol under reflux for 30 min. The combined methanol extracts were concentrated in vacuo to give a brownish residue which was triturated repeatedly with chloroform. The chloroform extract was washed with water, dried over $MgSO_4$, and concentrated in vacuo to yield a yellowish residue. The residue was applied to thin layer chromatography on silica gel 60 $F_{254}$ plates (0.5 mm in thickness) with toluene–ethylacetate (4:1) as the developing solvent to give two main yellow bands. Extraction of a yellow band (Rf 0.3) with a mixture of chloroform and methanol (9:1) gave 5-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**18**) (Wagner et al. 1989), yield 5 mg. In the same way, another yellow band (Rf 0.8) gave 2-acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**20**) (Wagner et al. 1989), yield 0.5 mg (Fig. 7). The quinone (**18**) content of this *T. avellanedae* cell line is more than 100 times that of the bark of this plant. 5-Hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**18**), yellow needles (from EtOH), melting point 181 °C; high resolution mass spectrum found molecular ion $[M]^+$ 258.0541 ($C_{14}H_{10}O_5$ requires 258.0525); $[\alpha]_D^{28}$ − 25.0° (MeOH); ultraviolet absorption spectrum, absorption maximum, $\lambda$ (MeOH) nm (log$\varepsilon$); 204 (4.26), 233 (shoulder, 3.74), 247 (4.05), 300 (3.88), 396 (3.83); (KBr) infrared absorption maximum, $\nu$ max $cm^{-1}$ 1670, 1640, 1580, 1460, 1370, 1190, 1170, 970 $^1$H-NMR (220 MHz, $CDCl_3$) $\delta$: 1.65 (3H, doublet coupling constant, J = 6.6Hz), 2.25 (1H, broad singlet disappeared on addition of $D_2O$), 5.05 (1H, multiplet), 6.85 (1H, doublet, J = 0.7), 7.27 (1H, doublets of doublet, J = 8.3, 1.5 Hz), 7.62 (1H, triplet, J = 8.3), 7.82 (1H, doublets of doublet, J = 8.3, 1.5 Hz), 12.18 (1H, singlet, disappeared on addition of $D_2O$).

2-Acetyl-5-hydroxynaphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione (**20**), yellow needles from EtOH, melting point 218–220 °C; UV $\lambda_{max.}$ (MeOH) nm (log $\varepsilon$): 200 (4.36), 240 (4.07), 255 (4.30), 275 (4.12), 414 (3.50); ir (KBr) $\nu_{max}$: 2950, 2860, 1700, 1670, 1640, 1580, 1460, 1370, 1250, 1200, 1170, 1110, 970; $^1$H-NMR (220 MHz, $CDCl_3$) $\delta$: 2.67 (3H, singlet), 7.33 (1H, doublets of doublet, J = 8.4, 1.5 Hz), 7.60 (1H, singlet), 7.67 (1H, triplet, J = 7.8 Hz), 7.82 (doublets of doublet J = 7.4, 1.5 Hz), 12.13 (1H, singlet, disappeared on addition of $D_2O$).

## 3 Summary and Conclusions

Callus tissues induced from the sterilized seedlings of *Tabebuia avellanedae* and their cell suspension cultures produced 2-(1-hydroxyethyl)naphtho[2,3-*b*] furan-4,9-dione (**18**) and 2-acetyl-5-hydroxynaphtho [2,3-*b*]furan-4,9-dione (**20**) in high yield. The present success of the induction of callus tissues which produce medicinally promising naphthoquinones at high levels will contribute to the development of effective medicinal substances, including anticancer drugs.

## References


Accorsi WR (1988) Taheebo. Zero Planning, Kobe

Adams JC, Lewis JR (1978) ( ± )-2,3-Dihydro-2-(1-hydroxy-1-methylethyl) naphtho [2,3-*b*] furan-4,9-quinone; an anti-tumour active peroxidation product of lapachol. J Chem Res (S): 3

Ali S, Singh P, Thomson RH (1980) Naturally occurring quinones. Part 28. Sesquiterpenoid quinones and related compounds from *Hibiscus tiliaceus*. J Chem Soc Perkin I: 257–259

Block JB, Serpick AA, Miller W, Wiernik PH (1974) Early clinical studies with lapachol. Cancer Chemother Rep 2 (4): 27–28

Burnett AR, Thomson RH (1967a) Quinones, Part VIII. Dehydro-α- and -β-lapachone. J Chem Soc (C): 1261–1264

Burnett AR, Thomson RH (1967b) Naturally occurring quinones. Part X. The quinonoid constituents of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae). J Chem Soc (C): 2100–2104

Cannon JR, Joshi KR, McDonald IA, Retallack RW, Sierakowski AF, Wong LCH (1975) Structures of nine quinones isolated from two *Conospermum* species. Tetrahedron Lett 2795–2798

da Silva MF, Lisbôa PLB, Lisbôa RCL (1977) Nomes vulgares de plantas amazônicas. Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e tecnológico, Inst Nac Pesquisas Amazonia, Manaus, 163 pp

de Silva SO, Watanabe M, Snieckus V (1979) General route to anthraquinone natural products via directed metalation of *N,N*-diethylbenzamides. J Org Chem 26: 4802–4808

Dominguez XA, Franco R, Cano G, Garcia F MC, Dominguez S Jr XA, de la Peña M L (1983) Isolation of a new furano-1,4-naphthaquinone, diodantunezone from *Lanthana achyranthifolia*. Planta Med 49: 63

Girald M, Kindack D, Dawson BA, Ethier J-C, Awang DVC (1988) Naphthoquinone constituents of *Tabebuia* spp. J. Nat Pro 51: 1023–1024

Gosálvez M, Garcia-Cañero R, Blanco M, Gurucharri-Lloyd C (1976) Effects and specificity of anticancer agents on the respiration and energy metabolism of tumor cells. Cancer Treat Rep 60: 1–8

Gottlieb OR, Mors WB (1980) Potential utilization of Brazilian wood extractives. J Agric Food Chem 28: 196–215

Hartwell JL (1968) Plants used against cancer. A survey. Lloydia 31: 71–170

Hashimoto G (1962) Brazil Shokubutu-ki. Teikoku Shoin, Tokyo, 193 pp

Heltzel CE, Gunatilaka AAL, Glass TE, Kingston DGI (1993) Mechanism-based search for anticancer drugs: selective DNA-damaging naphthoquinones from *Crescentia cujete*. Abstr Pap 34th Annu Meet Amer Soc Pharmacognosy, San Diego, CA, 0–8

Howland JL (1963) Uncoupling and inhibition of oxidative phosphorylation by 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones. Biochim Biophys Acta 77: 659–662

Inoue K, Inouye H, Chen C-C (1981) A naphthoquinone and a lignan from the wood of *Kigelia pinnata*. Phytochemistry 20: 2271–2276

Inouye H, Ueda S, Inoue K, Nayeshiro H, Moritome N (1982) Biosynthesis of prenylnaphthoquinone congeners in cultured cells of *Streptocarpus dunnii* and *Tabebuia argentea*. In: Fujiwara A (ed), Plant Tissue Culture 1982, Maruzen, Tokyo, p 375–376

Joshi KC, Prakash L, Singh P (1973) Quinones and other constituents from *Tabebuia rosea*. Phytochemistry 12: 942–943

Joshi KC, Singh P, Sharma MC (1985) Quinones and other constituents of *Markhamia platycalyx* and *Bignonia unguiscati*. J Nat Prod 48: 145

Jurd L, Manners GD (1980) Wood extractives as models for the development of new types of pest control agents. J Agric Food Chem 28: 183–188

Linardi MCF, Oliveira MM, Sampaio MRP (1975) A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. J Med Chem 18: 1159–1161

Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol Plant 18: 100–127

Lopes CC, Lopes RSC, Pinto AV, Costa PRR (1984) Efficient synthesis of cytotoxic quinones: 2-acetyl-4*H*,9*H*-naphtho[2,3-*b*]furan-4,9-dione and ( ± )-2-(1-hydroxyethyl)-4*H*,9*H*-naphtho-[2,3-*b*] furan-4,9-dione. J Heterocycl Chem 21: 621–622

Mock J, Murphy ST, Ritchie E, Taylor WC (1973) Chemical studies of the Proteaceae VI. Two naphthoquinones from *Stenocarpus salignus*. Aust J Chem 26: 1121–1130

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473–497

Nakano K, Maruyama K, Murakami K, Takaishi Y, Tomimatsu T (1993) Iridoids from *Tabebuia avellanedae*. Phytochemistry 32: 371–373

Rao KV (1974) Quinone natural products: streptonigrin (NSC-45383) and lapachol (NSC-11905) structure-activity relationships. Cancer Chemother Rep 2(4) : 11–17

Rao KV, McBride TJ, Oleson JJ (1968) Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. Cancer Res 28: 1952–1954

Rao MM, Kingston DGI (1982) Plant anticancer agents, XII. Isolation and structure elucidation of new cytotoxic quinones from *Tabebuia cassinoides*. J Nat Prod 45: 600–604

Sagrero-Nieves L (1986) Isolation of lapachol from *Diphysa robinoides*. J Nat Prod 49: 547

Saizarbitoria TC, Anderson JE, McLaughlin JL (1992) Cytotoxic furonaphthaquinones from *Tabebuia barbata* (Bignoniaceae). Abstr Pap 33rd Annu Meet Am Soc Pharmacognosy, Williamsburg, VA, P-22

Sandermann W, Dietrichs HH (1957) Investigations on termiteproof wood species. Holz als Roh- und Werkstoff 15: 281–297

Sandermann W, Simatupang MH (1966) On the chemistry and biochemistry of teakwood (*Tectona grandis* L. fil). Holz als Roh- und Werkstoff 24: 190–204

Sandermann W, Simatupang MH, Wendeborn W (1968) Neue Chinone aus dem Kernholz von *Paratecoma peroba* Kuhlm. Naturwissenschaften 55: 38

Scogin R (1980) Anthocyanins of the Bignoniaceae. Biochem Syst Ecol 8: 273–276

Ueda S (1993) Production of furanonaphthoquinones in cell cultures of a South American plant *Tabebuia avellanedae*. Abstr Pap 113th Annu Meet Pharmaceutical Soc Japan, Osaka, No. 2, p181

Ueda S, Tokuda H (1990) Inhibitory effect of *Tabebuia avellanedae* constituents on tumor promotion. Planta Med 56: 669–670

Ueda S, Tokuda H (1993) Cancer preventive activity of *Tabebuia avellanedae* extracts and its constituents. Abstr Pap 34th Annu Meet Am Soc Pharmacognosy, San Diego, CA, P-51

Ueda S, Inoue K, Shiobara Y, Kimura I, Inouye H (1980) Quinones and related compounds in higher plants, X. Naphthoquinone derivatives of the callus culture of *Catalpa ovata*. Planta Med 40: 168–178

Ueda S, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A (1992) Anti-tumor promoting activity of lapachol. Abstr Pap 33rd Annu Meet Am Soc Pharmacognosy, Williamsburg, VA, P-70

Ueda S, Umemura T, Dohguchi K, Matsuzaki T, Tokuda H, Nishino H, Iwashima A (1994) Production of anti-tumor-promoting furanonaphthoquinones in *Tabebuia avellanedae* cell cultures. Phytochemistry 36: 323–325

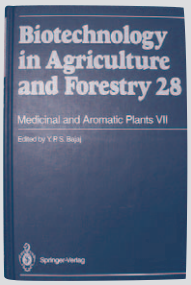
Wagner H, Kreher B, Jurcic K (1988) In vitro stimulation of human granulocytes and lymphocytes by pico- and femtogram quantities of cytostatic agents. Arzneim Forsch 38: 273–275

Wagner H, Kreher B, Lotter H, Hamburger MO, Cordell GA (1989) Structure determination of new isomeric naphtho [2,3-*b*] furan-4,9-diones from *Tabebuia avellanedae* by the selective-INEPT technique. Helv Chim Acta 72: 659–667

Williams L (1936) Woods of northeastern Peru. In: Dahlgren BE (ed) Field museum of natural history. Botanical Series, vol XV. Field Museum of Natural History, Chicago, pp 22, 444–447, 563

Zani CL, Oliveila AB, Snieckus V (1987) Efficient directed ortho metalation-based route to cytotoxic furanonaphthoquinone natural products. Tetrahedron Lett 28: 6561–6564

Zani CL, Oliveira AB, Oliveira GG (1991) Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea*. Phytochemistry 30: 2379–2381




# バイオテクノロジー イン アグリカルチャー アンド フォレストリー

## 薬効性芳香植物Ⅶ

# タベブイア・アベラネダエ（タヒボ）：インビトロ培養とナフトキノンの生産

上田　伸一[1]

## 1．概要

### 1.1　植物の分類と重要性

タベブイア属のノウゼンカズラ科植物は、北米南部から南米にかけて生育している。タベブイア・アベラネダエ（タベブイア・ヘプタフィラ、タベブイア・インペティギノサ並びにタベブイア・イペ）は、南米のブラジルから北アルゼンチンまでが自生地である（ウィリアムス1936年；橋本1962年；ダシルバ等1977年）。その樹皮は利尿剤並びに収斂剤として用いられてきた。この植物は、多くの俗名を持っている。即ち、ブラジルではIpe、Ipe roxo,Ipe cavatan,Ipe comum, Ipe de Sao Paulo,Ipeuva,Aipe,Gavatan,Guiraiba,Lapacho,Pau d' Arco Roxo,Roxo,Paud' Arco Velmelho,Peuva,Peuva roxa, Piuva,Queraiba、或いは、Upeuvaと呼ばれている。アルゼンチンでは、Lapacho、または,Lapacho negro、パラグアイではLapacho、ガラニではTayihu、と呼ばれ、古代インカではTaheeboと呼ばれていたとのことであり（橋本1962年；ダシルバ等1977年；アコーシ1988年）、インカの古代言語で、山地の住民が今でも使っているケチュア語では、タベブイア属植物は、Tahuariと呼ばれている（ウィリアムス1936年）。タベブイア・アベラネダエは、ブラジルの亜熱帯地域に良く生育している。枝を広げまっすぐに伸びた木の幹は、30メートルから50メートルに達する。掌状の複合葉は、5枚から7枚の小葉からなっている。その葉は対生で鋭い鋸歯状になっており長くとがっている。キササゲ属に似た5弁のバラ色か紫色のはでは花を7月中旬から9月にかけてつける（図1）。9月から10月にかけて、この植物には沢山の種子を含んだ長いさやが垂れ下がる。種子は広い羽根を付けている。材は建築用や家具用に価値がある。タベブイア属植物が制癌効果のある薬として最近再発見されたことにより、タベブイア・アベラネダエが重要な医薬資源となってきた（ハートウェル1968年；ゴットリーブ及びモルス1980年；M.Mラオ及びキングストン1982年；アコーシ1988年；上田及び徳田1990年；サニ等1991年；サイザルビトリア等1992年）

（注）1　日本国京都市左京区京都大学薬学部

図1　W.R.アコーシ教授より恵与されたタベブイア・アベラネダエの花の標本

### 1.2　二次代謝産物

タベブイア・アベラネダエの心材から一連のナフトキノンと、その誘導体ラパコール（1）ラパコール・メチルエテール（2）、デオキシラパコール（3）、メナキノン-1（4）β-ラパコン（5）、α-ラパコン（6）、デヒドロ・α・ラパコン（7）、ラパケノール（8）、一連のアントラキノン、2-メチルアントラキノン（10）、2-ヒドロキシ、メチルアントラキノン（11）、2-アセトキシメチルアントラキノン（12）、アントラキノン-2-アルデヒド（13）、アントラキノン-2-カルボン酸（14）、1-ヒドロキシアンドラキノン（15）、1-メトキシアントラキノン（16）、2-ヒドロキシ-3メチルアントラキノン（17）並びに新規の二量体のキノン、タベブイン（9）が、ケルセチンやオルト並びにパラヒドロキシ安息香酸と共に単離された（バーネット及びトムソン1967年、b:図2&3）。

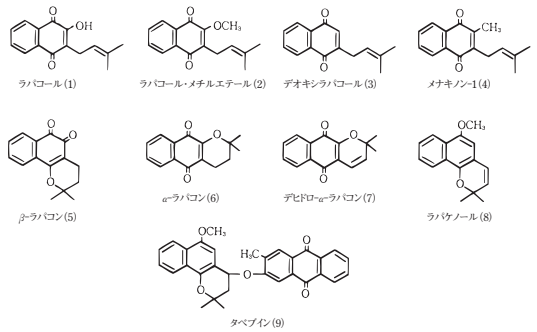



図2　タベブイア・アベラネダエの心材から一連のナフトキノン（1）-（9）
（バーネット及びトムソン1967年）

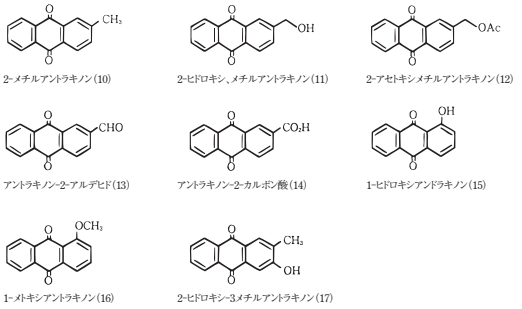



図3　タベブイア・アベラネダエの心材から一連のナフトキノン（10）-（17）
（バーネット及びトムソン1967年）

最近、ケネス・コルウィン氏（カリフォルニア州サンタモニカ市ドクター・マイヤーズ・ラパチョ社）から入手したアルゼンチン産のタベブイア・アベラネダエの内部樹皮から、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（18）、8-ヒドオキシ-2-（1-ヒドロキシエチル）ナフト[2,3-b]-フラン4,9-ジオン（19）、2-アセチル-5-ヒドロキシナフト[2,31-b]フラン4,9-ジオン（20）、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（21）、並びに2,3-ジヒドロ-5-ヒドロキシ-2-（1-メチルエテニル）ナフト-[2,3-b]フラン-4,9-ジオン（24）が、ラパコール（1）、ジヒドロ-α-ラパコン（7）、ベンゾ-[b]フラン-6-アルデヒド（26）と共に単離された（ワグナー等1989年；図。4）。

1983年ペルーから入手したタベブイア・アベラネダエ（=タベブイア・インペチギノサ）、1987年3月ペルーで採取したタベブイア・クリサンタ（タフアリ）並びにコロンビアのカルタゲナで採取したタベブイア・ロゼアの樹皮から、2-（1-ヒドロキシエチル）ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオン（22）と2-アセチルナフト[2,3-b]フラン-4,

9-ジオン（23）が単離された。タベブイア・ロゼアの樹皮から（5あるいは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、一方、その材からは、ラパコール（1）とデヒドロ-α-ラパコン（7）が得られた。タベブイア・アベラネダエの樹皮のメタノール・エキスからは、3種の新しいイリドイド・グルコシド、6-O-（パラヒドキシベンゾイル）-アジュゴール、6-O-（3、4-ジメトキシベンゾイル）-アジュゴールと6-O-（パラヒドキシベンゾイル）-アジュゴールが単離された（中野等1993年）。パラテコマ・ペロバの心材からは、2-エチルナフト［2,3-b］フラン4,9-ジオンが2-イソプロピルナフト［2,3-b］フラン-4、9-ジオンと2,3-ジヒドロ-2-（1-メチルエテニル）-ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（25）（ジヒドロ-イソ-α-ラパコン）と共に得られた（サンダーマン等1968年）。ナフトキノン（18）は、台湾の墾丁熱帯植物園で採取したキゲリア・ピンナータの材から最初に得られた。この物質は“キゲリノン”と命名され、構造式（19）が帰属された（井上等1981年）。同じ物質が、タベブイア・カッシノイデスの樹皮からも得られた。その樹皮のアルコールエキスは、P-388検定並び

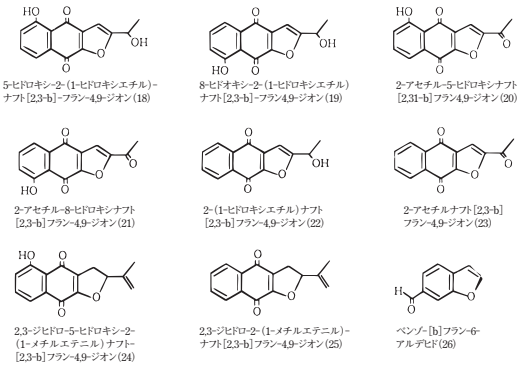



**図4　タベブイア・アベラネダエの樹皮の要素（18）-（26）**（ワグナー等1989年）

にKB細胞培養検定で細胞毒性をもつことが見い出された（ラオ及びキングストン1982年）。ほとんど同時にタベブイア・カライバ（=タベブイア・アルゼンティア）（井上等1982年）のカルス培養により、キノン（18）と（20）が得られた。最近、タベブイア・バルバタの95％エタノールエキスのブラインシュリンプ（アルテミア属の甲殻類）致死活性に基づいた分画によって、（19）のような抗癌活性キノンの分離された。この物質はインビトロでヒトの固型癌（A-549,MCF-7,HT-29）に対して強力な細胞毒性を示した。タベブイア・バルバタは、オリノコ河とアマゾン河の上流に固有するものである（サイザルビトリア等1992年）。ごく最近、ラド52として知られている二重鎖切断の往復や減数分裂での再結合に関連する再結合経路を欠くように遺伝子操作した酵母を使う検定法をノウゼンカズラ科植物クレセンチア・クジェテのエキスに適用したところ（18）、（22）、（24）、（25）並びに5種の関連するナフトキノンを分離できた（ヘルツェル等1993年）。

### 1.3　通常の植物の増殖とナフトキノンの生産並びに臨床応用薬用

資源として調査したブラジルの植物のうち、タベブイア・アベラネダエは治療的効果が非常に有望なことから、洋目に値する。しかし、この植物の人為的増殖は非常に難しい。それゆえ野生のタベブイア・アベラネダエが薬用の目的で使われてきている（アコーシ1988年）。この植物エキス或いはナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン類縁物質の抗腫瘍活性が最近発見されたことは、臨床的応用を支持することになろう（ラオ及びキングストン1982年；上田及び徳田1990年；サイザルビトリア等1992年）。臨床的に受け入れられる抗腫瘍活性物質を発見する為に、酸化的リン酸化のアンカプラー（ホウランド1963年）であるラパコール（1）とその誘導体が広範にわたり調査された。タベブイア・アベラネダエの材の粉末のエタノールエキスから3.18％の収率で得られたパラコール（1）（リナルディ等1975年）は、ウォーカー256癌肉腫に対し、腹腔内、皮下、筋肉内又は経口投与されると高い活性を示す。3日から6日間毎毎日2回経口投与すると、最高の活性と最高の治療係数が得られた。この療法では最大許容量は750mg/kgであり、治療係数は8.33、最大有効値は0.11であった（ラオ等1968年；ラオ1974年）。ラパコール（1）は、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）でひきおこされるエプスタインバール・ウィルス（EBV）の活性化に対して強い抑制活性を示した。さらにこの物質は、ハツカネズミで7,12-ジメチルベンツ（a）アントラセン（DMBA）とTPAでひきおこされる皮膚発癌を抑制した（上田等1992年）。ほぼ100種の合成類縁物質のうち、2-（3-メチル-2-ブテニル）-3-（テトラアセチル-β-D-グルコピラノシル）-1,4-ナフトキノン（2-β-O-グルコシルラパコール・テトラアセテート）がラパコールの活性を増大させ、ハツカネズミのリンパ性白血病P-388に対し有効であった（リナルディ等1975年）。

最近、ヒト顆粒球並びにリンパ球に対する天然のナフトキノンやその他の細胞毒性或いは細胞増殖抑制物質の広範な濃度範囲での影響を調べた結果、ほとんどすべての物質が高濃度（10μg～10ng/ml）では細胞毒性或いは免疫抑制効果を示し、一方、これらのうちで細胞増殖抑制活性をもつビンクリスチン等を除くほとんどの物質が、非常に低い濃度（10ng～10fg/ml）で免疫増強活性を示した。このことは、ナフトキノンを含有するタベブイア・アベラネダエの抗腫瘍効果に関係があるかもしれない。（ワグナー等1988年）。ラパコール（1）を酸性炭酸ナトリウムの存在下3-クロロ過安息香酸で酸化するとエポキシド（27）が得られたが、すぐに転移して（±）-2,3-ジヒドロ-2-（1-ヒドロキシ-1-メチルエチル）ナフト［2,3-b］-フラン-4,9-ジオン（28）となった。収率49％（図5）。この化合物は、ラパコール（1）や関連化合物として、ヒトの咽頭上皮癌（KB）に対し活性の増大がみられた（アダムス及びルイス1978年）。ラパコール（1）は、タベブイア・アベラネダエを含む数種のノウゼンカズラ科植物（バーネット及びトムソン1967年a,b）、シロアリに抵抗性のチーク（クマツヅラ科）（サンダーマン及びディートリッヒス1957年；サンダーマン及びシマトパング1966年）、デイフイサ・ロビノイデス（豆科）（サグレローニーベス1968年）、フィジー産のハイビスカス・テイリアセウス（アオイ科）（アリ等1980年）の材やコノスペルマム・テレチホリウム（ヤマモガシ科）の根（カノン等1975年）に含まれている。ラパコール（1）の第一相の臨床試験は1967年メリーランド州ボルチモア市の国立癌センターで行われた。服用量は5日間で1日250から3750mgであった。一番多い服用量は21日間で3000mgであった。1.5g以下の服用量では毒性は見られなかった。これ以上の場合、吐き気と嘔吐が起こった。どのような服用量でも血液や腎機能に対する活性は見られなかった。1日に2g以上服用をした場合、凝血時間がしばしば著しく長くなり、非経口のビタミンKで直す必要があった。この現象は、その構造がビタミンKに類似していることに関連があると考えられた（ブロック等1974年）。

2-アセチルナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオンと、（±）-2-（1-ヒドロキシエチル）ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオンは、フランと無水フタル酸から出発して全体で36％の収率で合成された（ロペス等1984年）。7,8-ジメトキシ-2-アセチルナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（29）は全体で90％の収率でオルト・メタル化を含む経路で合成された。天然のキノン（30）のクロム酸・ピリジン・借体・酸化によって化合物（29）が得られた（図6;ドシルバ等1979年；ザニ等1987年）。ラパコール（1）は、ブラジルで抗腫瘍薬として商品化された（リナルディ等1975年）。ブラジルで生産されたタベブイア・アベラネダエの内部樹皮は、アジアで樹木茶として、日本国大阪のタヒボジャパン株式会社によって販売されている。

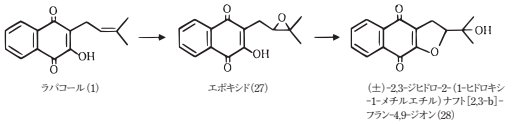



**図5　ジヒドロナフト［2、3-b］-フラン-4、9-ジオンへのラパコールの化学の転換**（アダムス及びルイス1978年）

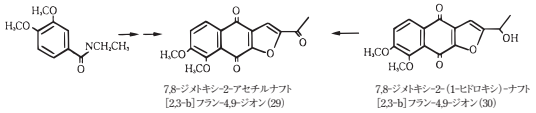



**図6　ナフト［2、3-b］-フラン-4、9-ジオンの合成**（ザニ等1987年）

## 2. インビトロ培養の研究

### 2.1 タベブイア・アベラネダエの組織培養／バイオテクノロジーの研究の概要

タベブイア・アベラネダエのカルス組織（上田1993;上田等1994年）は、キササゲに適用された方法（上田等1980年）に従って誘導された。カルスと細胞懸濁培養により、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（20）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（18）が高収率で得られる（図7）。両ナフトキノンは、n-酪酸と12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）によるラジ細胞の腫瘍促進に対する抑制効果を示した（表1;上田及び徳田1993年;上田等1994年）。著者はIAAとキネチンを添加したムラシゲ・スクーグ培地（ムラシゲ及びスクーグ1962年）で、固形あるいは液体培地でタベブイア・カライバ（タベブイア・アルゼンティア）の細胞系を確立し、4種のナフトキノン、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（18）、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（20）、2-アセチルナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（23）、と5-ヒドロキシ-2-（メチル

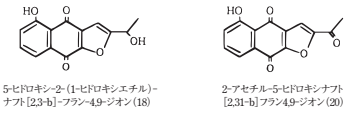



**図7 タベブイア・アベラネダエの細胞培養で得られるナフトキノン（上田 1993年）**

**表1.** 12-0-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート（TPA）（引き起こされたエプスタイン）Barrウィルスに対するタベブイア・アベラネダエ ナフトキノンの抑制する影響と初期の抗原（EBV-EA）活性化

| 合成物 | Concenrtation：臼歯の比率（テスト合成物/TPA） | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100 | 10 | 1 | 1 | 0.1 | 0.01 | |
| 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） | 0* (0)[b] | 0 (0) | 0 (0) | 9.2 (20) | 18.9 (50) | 65.2 (80) | 90.3 |
| 2-アセチル-5-ヒドロキシナフト［2,31-b］フラン4,9-ジオン（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（臼歯の定量 1:1） | 0 (20) | 0 (30) | 36.6 (80) | 56.0 | 83.6 | | |

*値はEBV-EA活性化（%）±s.dです。肯定的なコントロール（100）に関連のあるテスト合成物がある状態でのσ（±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%のリン酸塩緩衝液（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concomittant処理の後に残存するセル48hrを数えることを後に続けて、Trypanによって青を汚すことを測定したと言います。

エテニル）-ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオンを生産した。1ヶ月にわたり10日間の間隔で懸濁培養に前駆物質の4-（2-カルボキシフェニール）-4-オキソ酪酸のパルス投与を行った結果、上記4種のキノンのほかに2,3-ジヒドロ-2-（1-メチルエテニル）ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（25）が生産された。2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（2,4D）を添加したMS或いはLS培地（リンスマイア及びスクーグ1965年）でタベブイア・カライバ細胞培養は、これらキノンの生産ができないが、投与した2-サクシニル安息香酸を代謝し、キノン（18）、（23）、（25）と5-ヒドロキシ-2-（1-メチルエテニル）ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（井上等1982年）を生産した。タベブイア・アベラネダエと、タベブイア・カライバの細胞培養で見られたナフトキノンの構造に基づいて、これらのナフトキノンの想定生合成経路を図8のように考えることができる。

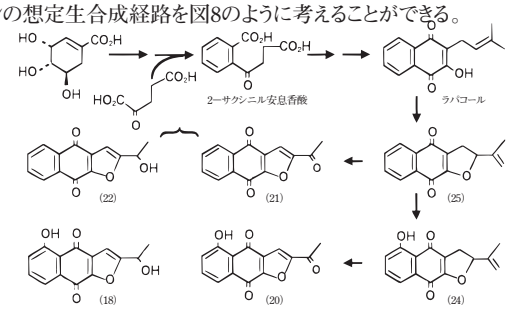



**図8 タベブイア・アベラネダエと、タベブイア・カライバの細胞培養で見られたナフトキノンの構造**

### 2.2 組織培養／細胞懸濁培養の確立

タベブイア・アベラネダエの種子を70%エタノール中に30秒、ついで次亜塩素酸ナトリウム溶液（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%寒天板上に置き、暗所25℃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5㎜の幼芽を$10^{-5}$モル2,4-Dを添加したLS寒天培地上に移し25℃暗所で培養した。1～3週間の培養で幼芽から誘導されたカルス組織は2×$10^{-5}$モル・インドル酢酸（IAA）と$10^{-5}$モル・キネチンを添加したMS基礎寒天培地（オートクレーブ前のpH5.8）に移し25℃の暗所で培養、4～5週間毎に継代した。3回から5回の移植後、カルス組織の寒天培地は黄色になり、カルス組織にナフトキノンができていることを示した。次いで寒天を除いた上記MS培地200mlを入れた500mlフラスコにカルス組織を移した。液体培養は、振幅8㎝、1分間85ストロークの往復運動振とう機で暗所25℃で撹拌した。細胞は、4～5週間毎に継代した。

### 2.3 ナフトキノンの抽出と構造

凍結乾燥したタベブイア・アベラネダエのカルス組織（10g）を還流下にメタノールで30分間4回抽出した。メタノールエキスを配合し減圧下で濃縮して褐色の残渣を得た。これをクロロホルムで繰り返し溶出させた。このクロロホルムエキスを水洗いし、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧で濃縮すると黄色残渣が得られた。この残渣をトルエン酢酸エチルエステル（4:1）を展開溶媒として、シリカゲル・60$F_{254}$プレート（厚さ0.5㎜）で薄層クロマトグラフィーに付すと、2つの黄色のバンドが得られた。クロロホルムとメタノール（9:1）の混液で黄色バンド（Rf0.3）を溶出し、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（18）（ワグナー等1989年）が得られた。収量5㎎（図7）。このタベブイア・アベラネダエ培養細胞系のキノン（18）の含量は、母植物の樹皮の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（18）、黄色針状結晶（エタノールから再結晶）融点181℃;高分解能マス・スペクトルで分子イオン［M］$^{+}$実験値 258.0541（C14H10O5、計算値258.0525）;［$\alpha$］$^{28}_{D}$-25°（メタノール）;紫外部吸収スペクトル$\lambda$max（メタノール）nm（log$\varepsilon$）;204（4.26）、233（ショルダー、3.74）247（4.05）、300（3.88）、396（3.83）;赤外吸収スペクトル（KBr）、$\varepsilon$max、㎝$^{-1}$ 1670,1640,1580,1460,1370,1190,1170,970,1H-NMR（220MHz,CDC13）$\delta$:1.6（3H、ダブレット、結合定数J=6.6Hz）,2.25（1H、プロード・シングレット、$D_2O$添加で消失）,（1H、マルチプレット）,6.85（1H、ダブレット、J=0.7）,7.27（1H、ダブレットのダブレット、J=8.3,1.5Hz）,7.62（1H、トリプレット、J=8.3）,7.82（1H、ダブレットのダブレット、J=8.3,1.5Hz）12.18（1H、シングレット、D2O添加で消失）。

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（20）、エタノールから再結晶、黄色針状結晶,融点218-220℃;紫外部吸収スペクトル$\lambda$max。（メタノニル）nm（log$\varepsilon$）:200（4.36）、240（4.07）、255（4.30）、275（4.12）、414（3.50）;赤外吸収スペクトル（KBr）$\varepsilon$max:2950.2860.1700.1670.1640、1580.1460、1370、1250、1200、1170、1100、97O;H-NMR（220MHz,CDC13）$\delta$:2.67（3H、シングレット）、7.33（1H、ダブレットのダブレット、J=8.4,1.5Hz）7.60（1H、シングレット）、7.67（1H、トリプレット、j=7.8Hz）、7.82（ダブレットのダブレットJ=7.4,1.5Hz）、12.13（1H、シングレット、D20添加で消失）。

## 3. 概要と結論

タベブイア・アベラネダエの滅菌幼芽からカルス組織と、その細胞懸濁培養は2-（1-ヒドロキシエチル）ナフト［2,3-b］フラン-4,9-ジオン（18）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（20）を高収率で生産するカルス組織の誘導に成功したことは、抗癌剤を含め効果的な医薬品の開発に寄与するであろう。

**（参考文献）**

W.R.Accorsi（1988年）Taheebo ゼロ・プランニング、神戸

J.C.Adams, J.R. Lewis（1978年）（±）-2,3-Dihydro-2-（1-hydroxyl）naphtho［2,3-b］furan-4,9-quinone;抗腫瘍活性のラパコール過酸化物 J.Chem. Res（S）:3

S.Alo, P.Singh, R.H. Thomson（1980年）天然キノン。Part28.ハイビスカス・ティリアセウスからのセスキテルペノイド・キノンとの関連物質,J.Chem.

Soc. Perkin. I:257-259
J.B.Block, A.A.Serpick, W.Miller, P.H.Wiernik（1974年）、ラパコールの初期臨床研究. Cancer Chemother Rep.2（4）:27-28
A.R.Burnerr, R.H.Thomson（1967年）キノン、PartⅧ.ジヒドロ-α-並びにβ-ラパコン.J.Chem. Son.（C）:1261-1264
A.R.Burnerr, R.H.Thomson（1967年 b）天然キノン、PartⅩ.タベブイア・アベラネダエ（ノウゼンカズラ科）のキノノイド成分J。Chem. Soc:（C）2100-2104
J·R·Connon, K, R, Joshi, I.A.Mcdonald, R.W.Retallack, A.F.Sierakowski, L.C.F. Sierakowski, L.C.H.Wong（1975年）。2種のコノスペルマム種から分離された9種のキノンの構造。Tetrahedron Lett2795-2798
M.F.da Silva, P.L.B.Lisboa, R.C.L.Lisboa（1977年）Nomes vulgarares de plantas amazo-nicas, Conselho Nacional de Desenvolvimento cientifico e tecnologico, Inst NacPesqisas Amazonia, 'Manaus、（アマゾンの植物の俗称）163pp
S.O. de Silva、M.Watanabe、V.Snieckus（1979年）N, N-ジェチルベンツアマイド直接のメタル化を経由するアントラキノン系天然物の一般合成法J.Org. Chem26:
4802-4808
X.A.Dominguez, R.Franco, G.Cano, F.MC.Garcia, X.A. Dominguez S.Jr.ML. de. la pena。（1983年）ランタナ・アキランチフォリアからの新規フラノ-1,4-ナフトキノン、ダイオダンツネゾンの分離。Planta Med49:63
H.Girald, D.Kindack, B.A.Dawson、J-CEthier, D.V.C.Awang（1988年）タベブイア種のナフトキノン成分。J.Nat, Prod.51:1023-1024
M.Gosalvez、R.Garcia-Canero, M.Blanco, C.Gurusharri-Lloyd（1967年）腫瘍細胞の呼吸とエネルギー代謝における抗癌物質の効果と特異性。Cancer Treat。Rep.60:1-8
O.R.Gottlieb, W.B.Mors（1980年）フラジルの木材の抽出物の可能性のある利用法。JAgric.Food Chem.28:196-215
J.L.Hartwell（1968年）抗癌用に用いられる植物、概説。Lloydia 31:170
橋本梧郎（1962年）ブラジル植物記。帝国書院、東京193pp
C.E.Heltzel.A.A.L. Gunatilaka, T.E.Glass, D.G.I.Kingston（1993年）メカニズムに基づいた抗癌剤の探索:クレセンチア・クジェテから得られた選択的DNA破壊ナフトキノン第34回アメリカ生薬学会年会（カリフォルニア州サンディエゴ）、講演要旨集0-8
J.L.Howland（1963年）2-ヒドロキシ-3-アルキル-14-ナフトキノンによるアンカップリングと酸化的リン酸化の阻害Biochim Biophys Acta77:659-662
K.Inouye, H.Inouye, C-C.Chen（1981年）キゲリア・ピンナータの材からのナフトキノンとリグナン。Phytochmistry20:2271-2276
H.Inouye, S.Ueda, K.Inoue, H.Nayashiro, N.Moritome（1982年）ストレプトカルプス・デュニーとタベブイア・アルゼンテアの培養細胞のプレニルナフトキノンの生合成。A.Fujiwara, Plant Tissue Culture 1982年。丸善、東京 p375-376
K.C.Joshi, L.Prakash, P.Singh（1973年）。タベブイア・ロゼアからのキノン及びその他の成分。Phytochmistr 12:942-943
K.C.Joshi, P.Singh, M.C.Sharma（1985年）マークハミア・プラティカリックスとビグノニア・アンギスカチのキノン並びにその他の成分。J.Nat.Prod.48:145
L.Jurd, G.D.Manners（1980年）新しいタイプの殺虫剤開発とモデルとなる木材抽出物。J Agric.Food Chem.28:183-188
M.C.F.Linardi, M.M.Oliveira, M.R.P.Sampaio（1975年）ハツカネズミのリンパ球白血病P-388に対して活性なラパコール誘導体。J Med.Chem. 18:1159-1161
E.M.Linsmaier, F.Skoog（1965年）タバコ組織培養における有機成長要素の要求性Physiol.Plant. 18:100-127
C.C.Lopes, R.S.C.Lopes, A.V.Pinto, P.R.R.Costa（1984年）細胞毒性キノン:2-アセチル-4H.9H-ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンと、（±）-2-（1-ヒドロキシエチル）-4H,9H-ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンの効率的合成。J.Heterocycl.Chem.21:621-622
J.Mock, S.T.Murphy、E.Ritchie、W.C.Taylor（1973年）ヤマモガシ科の化学的研究Ⅵ。ステノカルパス・サリグヌスからの2種のナフトキノン。Aust.J.Chem.26:1121-1130
T.Murashige, F.Skoog（1962年）タバコ組織培養の急速成長と生物検定のための改良培地。Physiol。Plant.15:473-497
K.Nakano, K.Maruyama, K.Murakami, Y,Takaishi, T.Tomimatsu（1993年）タベブイア・アベラネダエからのイリドイド。Phytochemistry32:371-373
K.V.Rao,（1974年）キノン天然:ストレプトニグリン（NSC-45383）とラパコール（NSC-11905）構造活性相関。Cancer Chemother.Rep.2（4）:11-17
K.V.Rao, T.J.McBride, J.J.Oleson（1968年）抗腫瘍剤としてのラパコールの認定と評価。Cancer Res. 28:1952-1954
M.M.Rao, D.G.I.Kingston（1982年）植物抗癌剤ⅩⅡ.タベブイア・カッシノイデスからの新しい細胞毒性キノンの単離と構造決定。J.Nat.Prod.45:600-604
L.Sagrero-Nieves（1986年）ディフィサ・ロビノイデスからのラパコールの単離。J.Nat.Prod.49:547
T.C.Saizarbitoria, J.E.Anderson, J.L.McLaughlin（1992年）タベブイア・バルバタ（ノウゼンカズラ科）からの細胞毒性フラノナフトキノン。第33回アメリカ生薬学会講演要旨集バージニア州ウイリアムスバーグP-22
W.Sandermann, H.HDietrichs（1957年）抗シロアリ材植物種の調査。Holz Als Roh-und Werkstoff 15:281-297
W.Sandermann, M.H.Simatupang,（1966年）チーク材（テクトナ・グランディス）の化学並びに生化学について、Holz als Rohund Werkstoff24:190-204
W.Sandermann,M.H.Simatupang, W.Wendeborn（1968年）パラテコマ・ペロバの心材からの新規キノンNaturwissens-chaften 55:38
R.Scoogin（1980年）ノウゼンカズラ科のアントシアニン Syst. Biochem Ecol, 8:273-276
S.ueda（1993年）南米産植物タベブイア・アベラネダエの細胞培養におけるフラノナフトキノンの生産。日本薬学会第113年会（大阪）講演要旨集№2,p181
S.Ueda, H.Tokuda（1990年）発癌促進に対するタベブイア・アベラネダエ成分の抑制効果。Planta Med.56:669-670
S.Ueda, H.Tokuda（1993年）タベブイア・アベラネダエエキス並びにその成分の癌予防活性。第34回アメリカ生薬学会年会（カリフォルニア州サンディエゴ）講演要旨集、P-51
S.Ueda, K.Inoue, Y.Shiobara, I.Kimura, H.Inouye（1980年）高等植物のキノンとその関連物質Ⅹ。キササゲのカルス培養のナフトキノン誘導体Planta Med. 40:168-178
S.Ueda, H.Tokuda, H.Nishino, A.Iwashima（1992年）ラパコールの抗腫瘍促進活性。第33回アメリカ生薬学会年会（バージニア州ウィリアムスバーグ）講演要旨集 P-70
S.Ueda, T.Umenur, K.Dohguchi, H,Tokuda, H.nishino, A.Iwashima（1994年）タベブイア・アベラネダエ細胞培養における抗腫瘍促進フラノナフトキノンの生産。Phytochemistry25:323-325
H.Wagner, B.Kreher, K.Jurcic（1988年）ピコー及びフェムトグラム量の細胞増殖抑制剤によるヒト顆粒球とリンパ球のインビトロ刺激。Arzneim.Forsch.38:273-275H-Wagner, B.Kreher, H
Lotter, M.O.Hamburger, G, A.Cordell（1989年）選択的INEPT技術によるタベブイア・アベラネダエからの新規イソメリック・ナフト[2,3-b]フラン-4,9-ジオンの構造決定。Helv.Chim.Acta 72:659-667
L.Willliams（1936年）ペルー北東部の木材:B.E.Dahlgren編　博物学の野外博物館　植物編15巻、Field Museum of Natural Historyシカゴ、pp22, 444-447, 563
C,L、Zani, A.B.Oliveila, V.Snieckus（1987年）細胞毒性フラノナフトキノン天然物への効果的なオルトメタル化反応に基づくルート。Tetrahedron Lett.28:6561-6564
C.L.Zani, A.B.Oliveira, G.G.Oliveira（1991年）タベブイア・オクラセアからのフラノナフトキノン。Phytochemistry30:2379—2381