

イソプレノミクスを基盤としたホップ生合成中間体  
プレニル化アシルフロログルシノール類  
の合成と抗酸化活性の評価

2014年3月

徳島大学大学院先端技術科学教育部  
環境創生工学専攻生命テクノサイエンスコース  
田中涼

## 目次

第一章 .....	1
序論 .....	1
第二章 .....	5
2.1 acylphloroglucinol 類、プレニル化およびゲラニル化 acylphloroglucinol 類の 分子設計 .....	5
2.2 acylphloroglucinol 類、プレニル化およびゲラニル化 acylphloroglucinol 類の 逆合成解析 .....	5
2.3 acylphloroglucinol 類、プレニル化およびゲラニル化 acylphloroglucinol 類の 合成戦略 .....	6
第三章 .....	7
3.1 acylphloroglucinol 類、プレニル化およびゲラニル化 acylphloroglucinol 類 (UTX-52, UTX-53,UTX-54, UTX-71, UTX-75, UTX-76, UTX-77, UTX-70, UTX-78, UTX-79, UTX-80, UTX-72)合成の部 .....	7
3.2 抗酸化活性評価 .....	8
3.2.1 DPPH radical 消去活性評価 .....	8
3.2.2 リノール酸共役ジエン生成阻害活性および LDL 抗酸化活性 .....	8
3.3 考察 .....	12
第四章 .....	16
4.1 結論 .....	16
第五章 .....	16
試薬および使用器具一覧 .....	16

第六章 .....	18
実験方法 .....	18
第七章 .....	28
参考文献 .....	28
第八章 .....	30
謝辞 .....	30

## 第一章

### 序論

植物や微生物において生合成される二次代謝産物にはflavonoidやalkaloid、phenylpropanoidなど非常に多く存在しているがその役割は植物種における捕食者からの防御や他の植物の成長を阻害することがある。一方、人はこれらの二次代謝産物を農薬や医薬品といった様々な形で利用してきた。事実として、解熱鎮痛剤として知られているsallcinや白血病の治療薬として用いられているvincristinは植物由来の医薬品である。そのため、これまで様々な生物活性において有能と考えられた天然物をリードとした創薬開発も行われてきた。このように医薬品としても利用されている二次代謝産物における生合成中間体は人に対しても有用な物質が存在する可能性が示唆される。しかし、二次代謝産物の生合成中間体は天然物からはわずかしき分取できず、また生物活性の報告も少ない。その中でも特に、骨格合成後位置選択的にイソプレニル鎖の修飾を受けた化合物であるプレニル化芳香族化合物に着目している。プレニル化芳香族化合物はプレニル化を受けることにより活性が大きく変化し、さらにプレニル化により新たな生物活性が付与されることも種々報告されている。このことから、プレニル化は天然物の生物活性の発現に関与していることが考えられ非常に興味深い。さらに、一般的にプレニル化されることにより脂溶性が高まり細胞膜を透過しやすくなることで、細胞への取り込み量が増加すると考えられている<sup>1</sup>が、プレニル化芳香族化合物の生物活性や作用機構についてはあまり研究されていない。

そこで当研究室では“イソプレノミクス(植物および動物で生合成されるイソプレニル化合物を探索し、合成に関わる遺伝子やタンパク質の機能を解明して医薬品開発に応用する創薬研究)”を基盤とし、これまで様々な二次代謝産物およびその生合成中間体であるプレニル化芳香族化合物の合成および生物活性の評価を行ってきた。

一方、活性酸素、あるいはフリーラジカルは生体内のいたるところで生成され、生体内の脂質、蛋白質、核酸がその標的となり、種々の疾患の原因の一つと考えられている。これらは特に生体膜の脂質中に含まれる高度不飽和脂肪酸に障害を与える。フリ

ラジカルにより障害を受けた不飽和脂肪酸は膜脂質過酸化連鎖反応を介して過酸化脂質を生成する。生体膜脂質過酸化反応は膜構造の破壊、蛋白質の酵素作用や受容体の機能障害を起こす。そのため活性酸素あるいはフリーラジカルなどから生体を防御する手段としてラジカルスカベンジャーの研究が盛んに行われている。特に、LDL (low-density lipoprotein) は肝臓で生合成されたコレステロールを体中に運搬する役割を担っている。しかしながら LDL が活性酸素やフリーラジカルなどによって酸化を受けると変性 LDL となりマクロファージに貪食される。変性 LDL が大量に蓄積するとマクロファージは際限なく貪食し続けるために泡沫化し、血管内皮に沈着し、アテローム性動脈硬化を引き起こす。アテローム性動脈硬化は心筋梗塞や脳梗塞を誘発するため、LDL の変性を防ぐことが重要となる<sup>2</sup>。

今回研究対象であるホップの抽出物には主に humulone、lupulone が含まれている。さらに、アシル基の違いにより phlorisovalerophenone (PIVP)、phlorisobutyrophenone (PIBP)、phlormethylbutanophenone (PMBP) があり、これらの化合物はビールの苦みや香りを与え殺菌作用や泡立ちをよくし、また抗菌活性<sup>3</sup>や抗アレルギー活性<sup>4</sup>、抗炎症活性<sup>5</sup>といったさまざまな生理活性もある。また、acylphloroglucinol 自体は無味であることからプレニル化がビールの苦味において重要な役割があると考えられている。

humulone および lupulone の生合成経路としては、3つの malonyl-CoA および各 acyl-CoA である Isovaleryl-CoA、Isobutyryl-CoA、2-methylbutyryl-CoA を出発原料としてそれぞれ phlorisovalerophenone (PIVP)、phlorisobutyrophenone (PIBP)、phlormethylbutanophenone (PMBP) が生合成<sup>6</sup>される。その後、プレニル基転位酵素により、モノプレニル化およびジプレニル化される。各ジプレニル化 acylphloroglucinol は酸化され、humulone、cohumulone、adhumulone になり、さらにプレニル化されることで lupulone、colupulone、adlupulone が生合成されることが推定されている (fig.1)。またホップ抽出物に含まれる flavonoid 類であるプレニル化 xanthohumol<sup>7</sup>には抗癌活性があると報告されている。しかし、ホップ抽出物の生合成中間体は非常に少量であり生物活性の報告もほとんどない。さらに、ホップの生合成

経路を解明するためにも、生合成中間体を推測して合成することは非常に重要である。

そこで今回、ホップ抽出物生合成中間体であると考えられるモノプレニル PIVP、ジプレニル PIVP、モノプレニル PIBP、ジプレニル PIBP、モノプレニル PMBP、ジプレニル PMBP および、さらにホップ抽出物に存在する可能性があるモノグラニル PIVP、モノグラニル PIBP、モノグラニル PMBP の合成を行い、キリンホールディングスより供与頂いたホップ抽出物 International Calibration Extract2 (ICE-2) (fig.2) および ICE-2 から単離した cohumulone および colupulone とあわせて DPPH radical 消去活性、リノール酸およびヒト LDL における抗酸化活性の評価を行った。

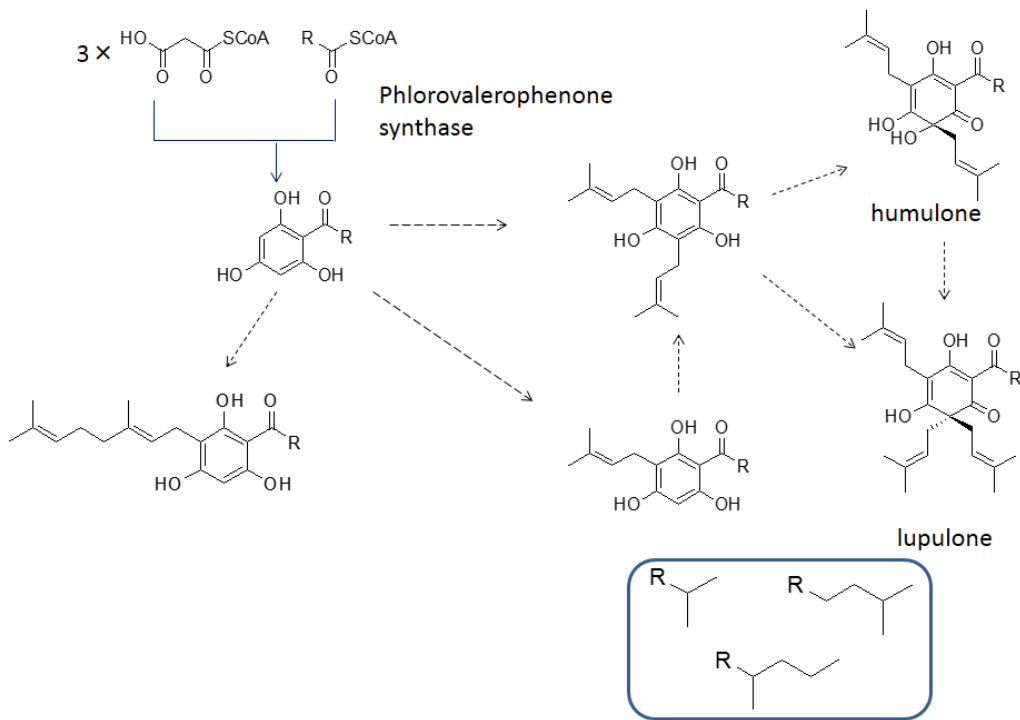


Fig.1: 予想されるhumulone類、lupulone類の生合成経路

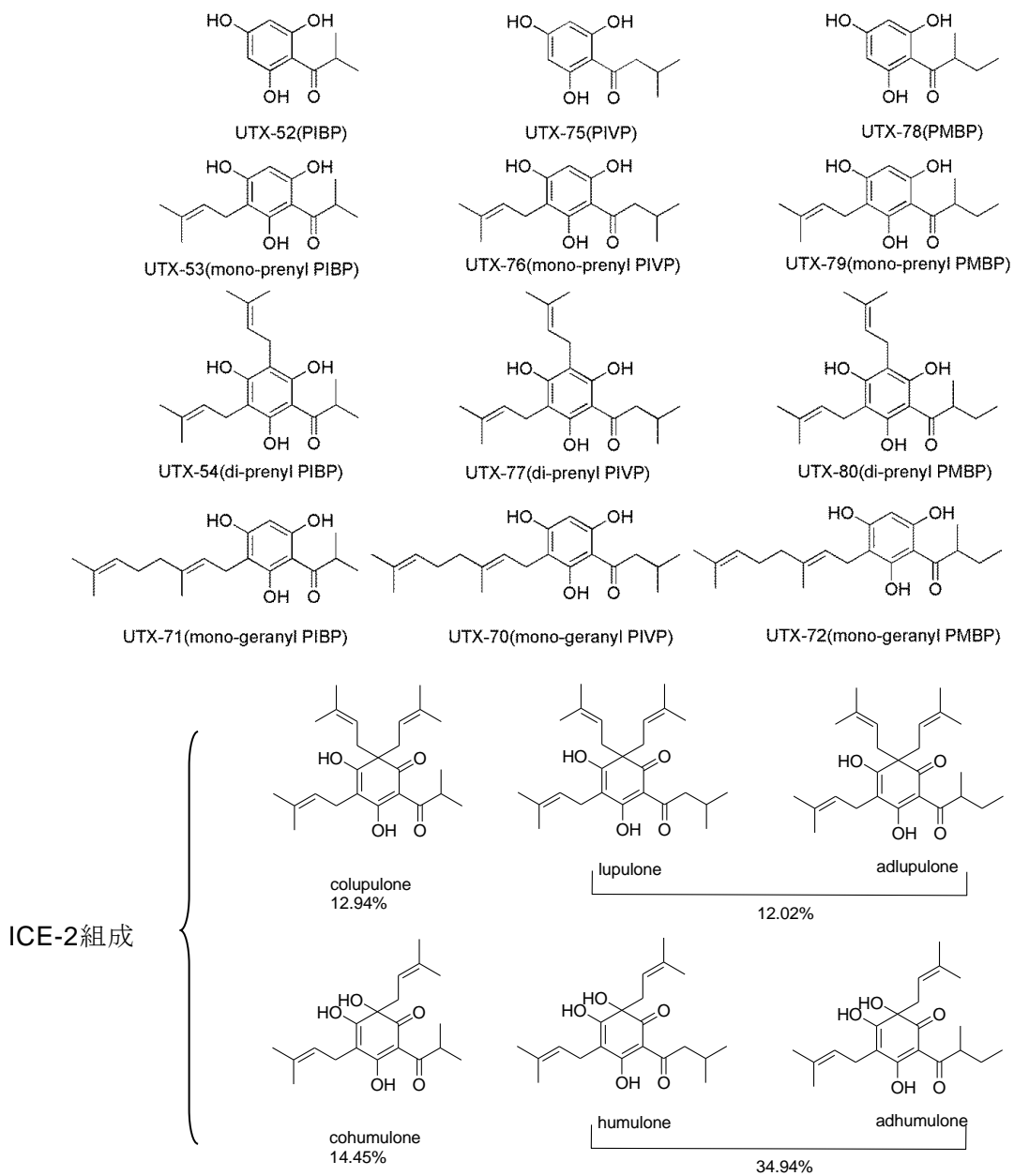


Fig.2: 合成したプレニルおよびゲラニル化acylphloroglucinolと  
ホップ抽出物International Calibration Extract2 (ICE-2)

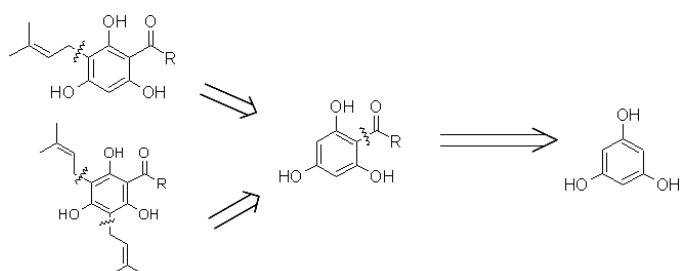
## 第二章 分子設計及び合成戦略

### 2.1 分子設計

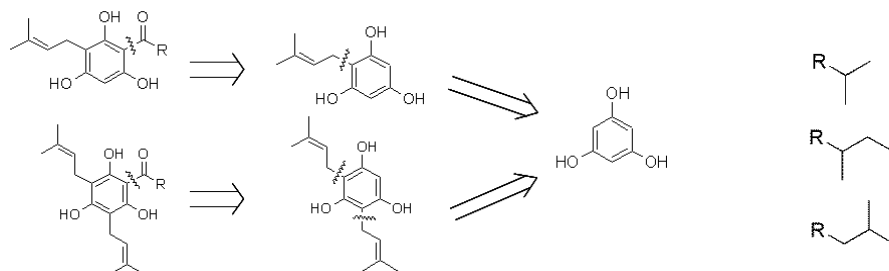
今回、イソプレノミクスに基づき、ホップ抽出物である humulone 類、lupulone 類の生合成中間体と推測される 3 位をプレニル化したモノプレニル体および 3 位、5 位をプレニル化したジプレニル体であるプレニル化 acylphloroglucinol 類およびホップ抽出物に含まれる可能性のある 3 位に C10 であるゲラニル基を導入したゲラニル化 acylphloroglucinol 類を分子設計した。

### 2.2 逆合成解析

A



B



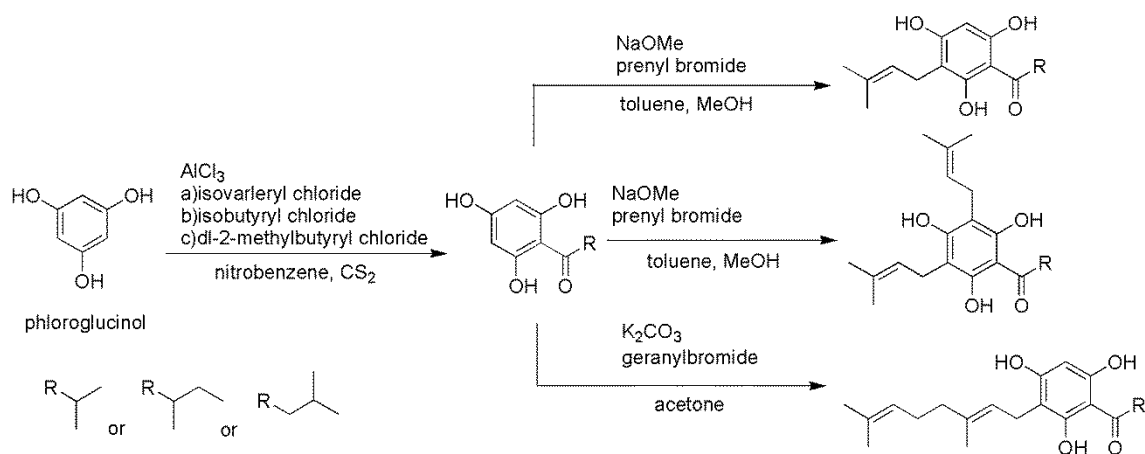
Scheme1: プレニル化 acylphloroglucinol 類の逆合成解析

A は先にアシル化を行った後にプレニル化を行う経路で、B は先にプレニル化を行った後にアシル化を行う経路を示している(Scheme1)。ここで、B の経路の場合、先にプレニル化を行うと、酸によりプレニル基が活性化され、近傍のフェノール性 OH 基とプレニル基が反応し、環化されることが以前に明らかになっている。したがって、A の経路に従い合成を行った。



### 2.3 合成戦略

Phloroglucinol を出発原料としてルイス酸存在下、carboxylic halide (isovaleryl chloride、isobutyryl chloride、DL-2-methyl butyryl chloride)との Friedel-Crafts acylation により、acylphloroglucinol 類を得、次いで得られた acylphloroglucinol 類を塩基性条件下で prenyl bromide および geranyl bromide と反応させ、モノプレニル化 acylphloroglucinol 類、さらにジプレニル化 acylphloroglucinol 類、モノゲラニル化 acylphloroglucinol 類を合成することを計画した (Scheme2)。

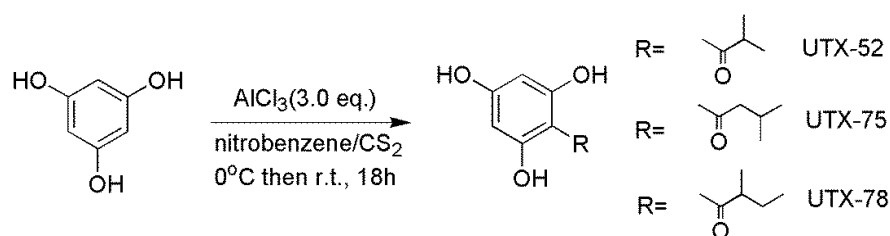


Scheme2: プレニル化 acylphloroglucinol 類の合成

### 第三章 結果および考察

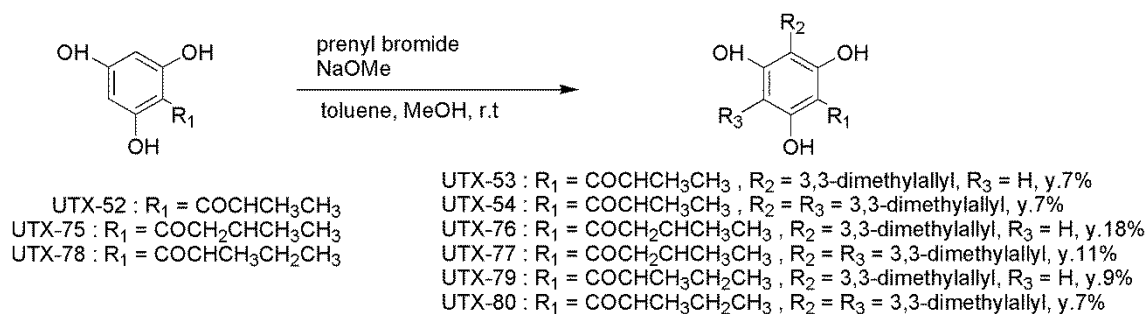
#### 3-1. 合成

Phloroglucinolを出発原料としてFriedel-Crafts acylationを行い、acylphloroglucinol類 (UTX-52,UTX-75,UTX-78)を収率86~90%で得た (Scheme3)。次に、各acylphloroglucinolをプレニル化し、モノプレニル化acylphloroglucinol類 (UTX-53, UTX-76,UTX-79)およびジプレニル化acylphloroglucinol類 (UTX-54,UTX-77, UTX-80)を収率7~18%で得た (Scheme4)。モノゲラニル化acylphloroglucinol類 (UTX-71, UTX-70,UTX-72)は、Potassium carbonate存在下でgeranyl bromideと反応させ収率11~18%で得た<sup>8</sup> (Scheme5)。

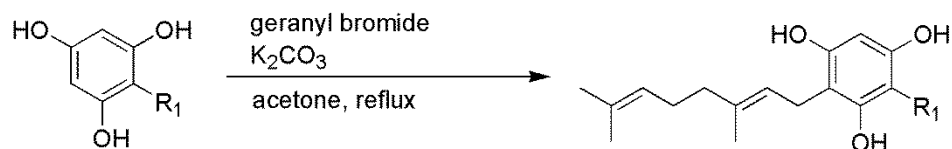


UTX-52	Isobutyryl chloride (1.0 eq.)	y. 90 %
UTX-75	Isovareryl chloride (1.0 eq.)	y. 90 %
UTX-78	DL-2-methyl butyryl chloride (1.0 eq.)	y. 86 %

Scheme3: Acylphloroglucinol類の合成



Scheme4: プレニル化acylphloroglucinols類の合成



UTX-52 :  $R_1 = \text{COCHCH}_3\text{CH}_3$   
 UTX-75 :  $R_1 = \text{COCH}_2\text{CHCH}_3\text{CH}_3$   
 UTX-78 :  $R_1 = \text{COCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$

UTX-71 :  $R_1 = \text{COCHCH}_3\text{CH}_3$ , y. 11%  
 UTX-70 :  $R_1 = \text{COCH}_2\text{CHCH}_3\text{CH}_3$ , y. 18%  
 UTX-72 :  $R_1 = \text{COCHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$ , y. 17%

Scheme5: ゲラニル化acylphloroglucinol類の合成

### 3.2.抗酸化活性

#### 3.2.1 DPPH radical消去活性

DPPH radical消去法によりfree radicalに対する各化合物の反応性を評価した (fig.3)。その結果、モノプレニル体>モノゲラニル体>ジプレニル体>acylphloroglucinolの順で高い活性を示した。DPPHとの反応における化学量論比は、モノプレニル体もしくはモノゲラニル体 : DPPH=1:2、ジプレニル体:DPPH=1:1であった。

#### 3.2.2 リノール酸共役ジエン生成阻害活性およびLDL抗酸化活性

共役ジエン生成阻害によりリノール酸に対する各化合物の抗酸化活性を評価した (fig.4,fig.5)。その結果、DPPH radical消去活性と同様の傾向が見られ、モノプレニル体およびモノゲラニル体においてICE-2よりも約1.5~4.0倍高い活性を示し、ジプレニル体およびacylphloroglucinolはほとんど活性を示さなかった。humuloneにおいてプレニル側鎖の伸長により活性が増加したのに対し、cohumulone、adhumuloneでは逆に活性が減少した。

次に、ヒトLDLに対する各化合物の抗酸化活性を共役ジエン生成阻害活性およびTBARS法により評価した (fig.6)。共役ジエン生成阻害活性については、リノール酸共役ジエン生成阻害活性とは異なりcohumuloneが最も高い活性を示した。TBARS法においてもcohumuloneが最も高い活性を示し、生合成中間体およびモノゲラニル化acylphloroglucinol類においてほぼ同等のヒトLDL酸化阻害活性が見られた。

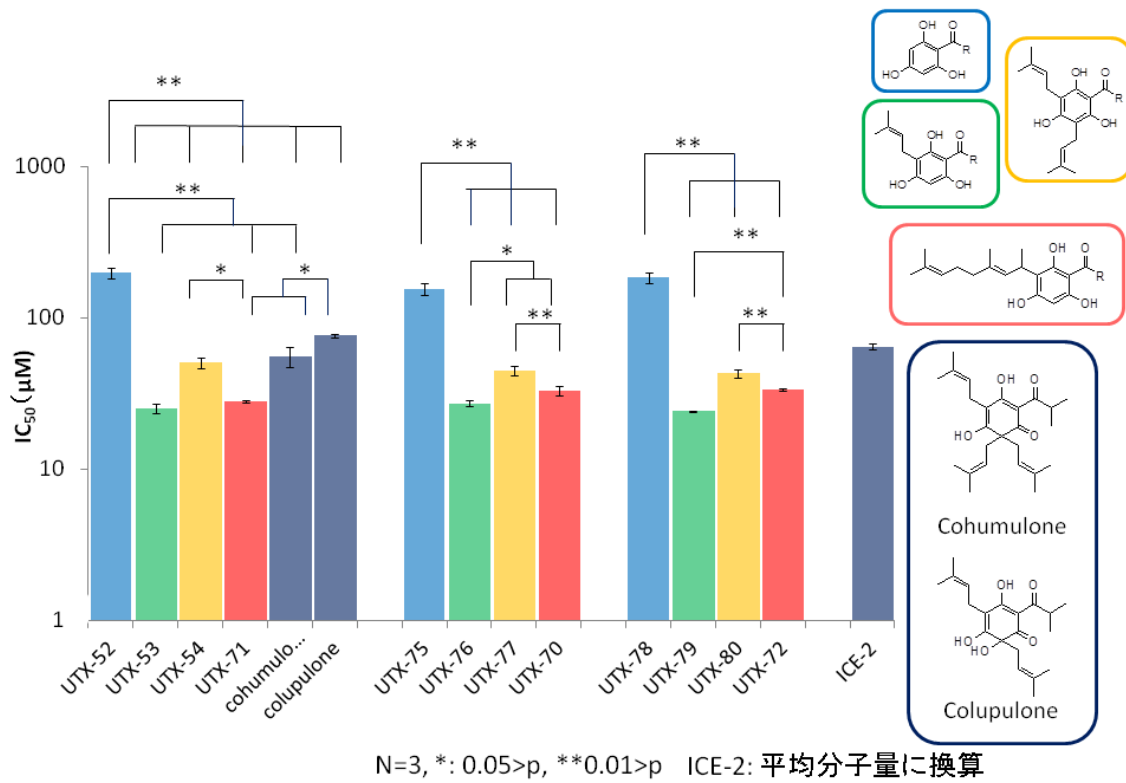


Fig.3: acylphloroglucinol類、プレニル化およびゲラニル化acylphloroglucinol類の DPPH radical 消去活性

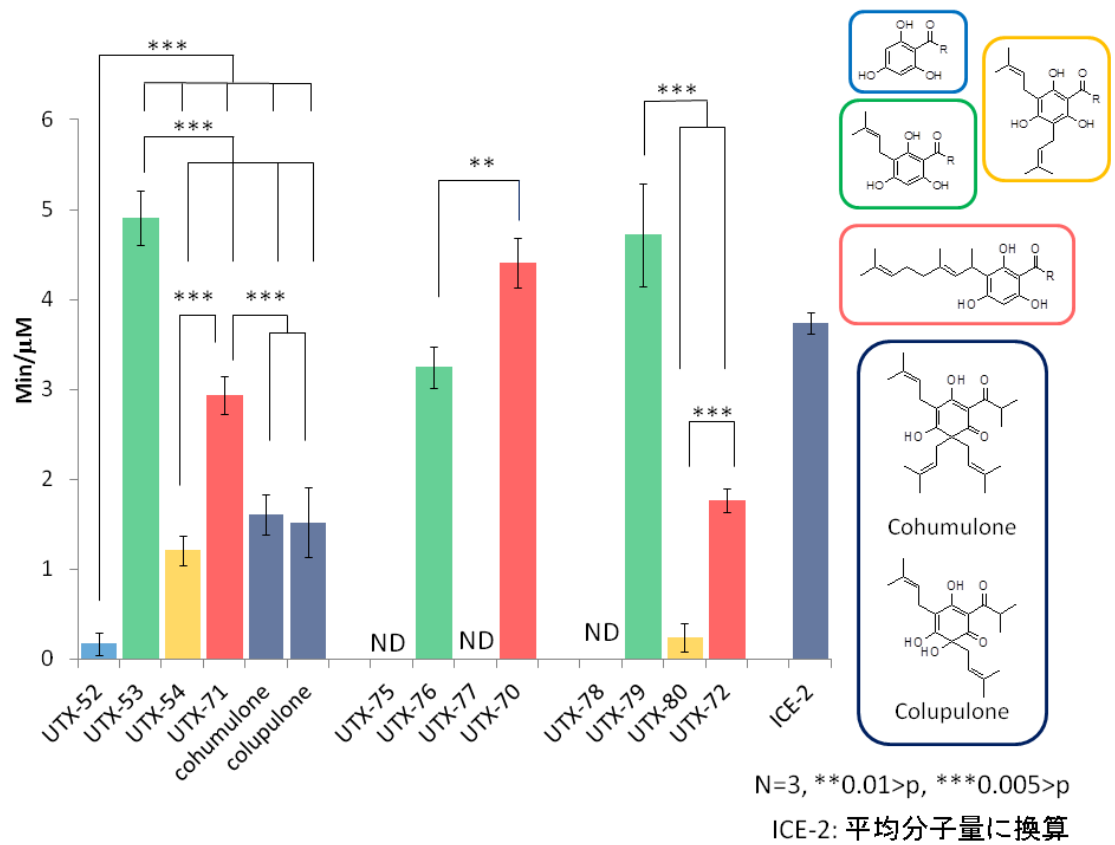


Fig.4: Acylphloroglucinol類、プレニル化およびゲラニル化acylphloroglucinol類のリノール酸に対する共役ジエン生成阻害活性

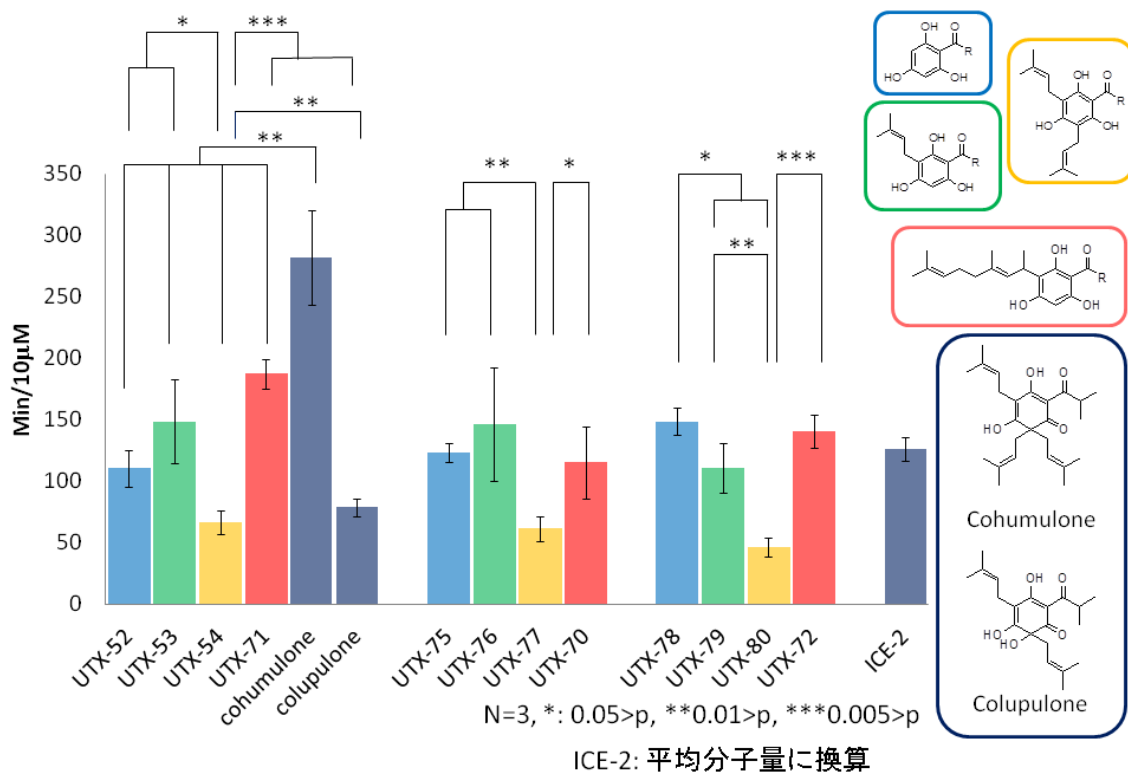
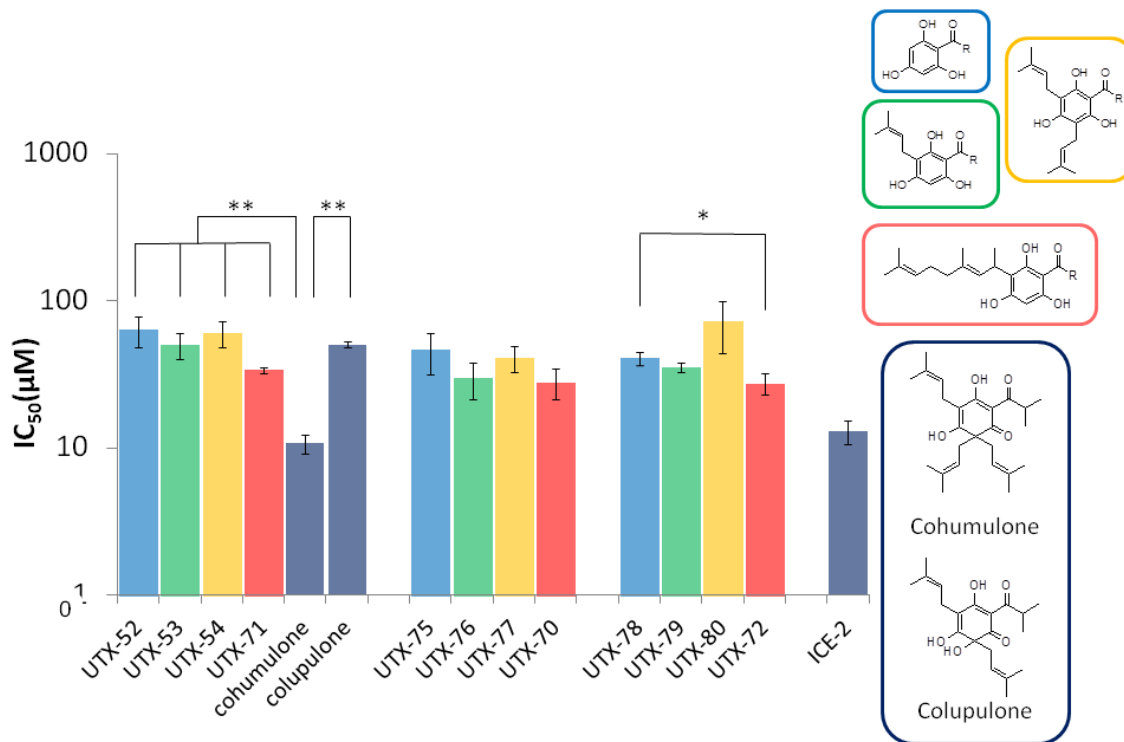


Fig.5: Acylphloroglucinol類、プレニル化およびゲラニル化acylphloroglucinol類のヒトLDLに対する共役ジエン生成阻害活性



N=3, \*: 0.05>p, \*\*0.01>p ICE-2: 平均分子量に換算

Fig.6: Acylphloroglucinol類、プレニル化およびゲラニル化acylphloroglucinol類のヒトLDLに対する抗酸化活性 (TBARS法)

### 3.3 考察

Acylphloroglucinol類およびプレニル化acylphloroglucinol類は、ホップ抽出物である humulone および lupulone の生合成における鍵中間体であるが、天然からほとんど単離できないため、その生物活性については未知であった。今回、phloroglucinol を出発原料として Friedel-Crafts acylation による各アシル側鎖を導入後、sodium methoxide または potassium carbonate 存在下で prenyl bromide および geranyl bromide によるプレニル化またはゲラニル化により生合成中間体の合成に成功した。

DPPH radical 消去活性においてモノプレニル体が高い活性を示し、活性の強さとイオン化ポテンシャル (IP 値) に負の相関がみられた (fig.7)。また、radical scavenging 活性とリノール酸酸化阻害活性との間に相関が見られることから、リノール酸の酸化

に対する抗酸化活性は脂溶性に依存せず、**radical**反応性に依存していることが示唆された。この理由として、モノプレニル体はジプレニル体に比べフェノール性OH基の周辺空間に余裕があるためDPPHが容易に接近しやすく、ジプレニル体に比べて活性が高くなったと考えられる (fig.8)。

ヒトLDLに対する抗酸化活性において、**artepillinC**イソプレノミクスの結果<sup>9,10</sup>とは異なりジプレニル体が相対的に低い活性を示した。これは、プレニル基が二つ以上存在することにより、分子の崇高さが増大することでLDL膜に対する親和性が低下したことが考えられる。二次代謝産物である**cohumulone**がもっとも高い活性を示した理由としては、隣接する2つのOH基による銅イオンに対するキレート作用が考えられる。

TBARS法による抗酸化活性においては、すべての生合成中間体において有意差はみられず、また、プレニル基の数や側鎖の長さにも相関がみられなかった。これは、TBARS法の特長により初期酸化を抑制する効果はあまり影響しないことが考えられる。また、TBARS法でも**cohumulone**が最も高い活性を示した理由としては、前述のキレート作用によると示唆される。

以上、本研究から得られた知見から、より強力な新規抗酸化剤として図9に示すような**humulone**類の1つのプレニル体をメチル基に置換した化合物が予想される (fig.9)。また、共同研究成果としてホップ生合成に係るプレニル転移酵素の遺伝子同定<sup>11</sup>にも成功しており (fig.10)、生合成中間体を分子設計・合成することは生合成経路の解明においても非常に有用であることが示された。



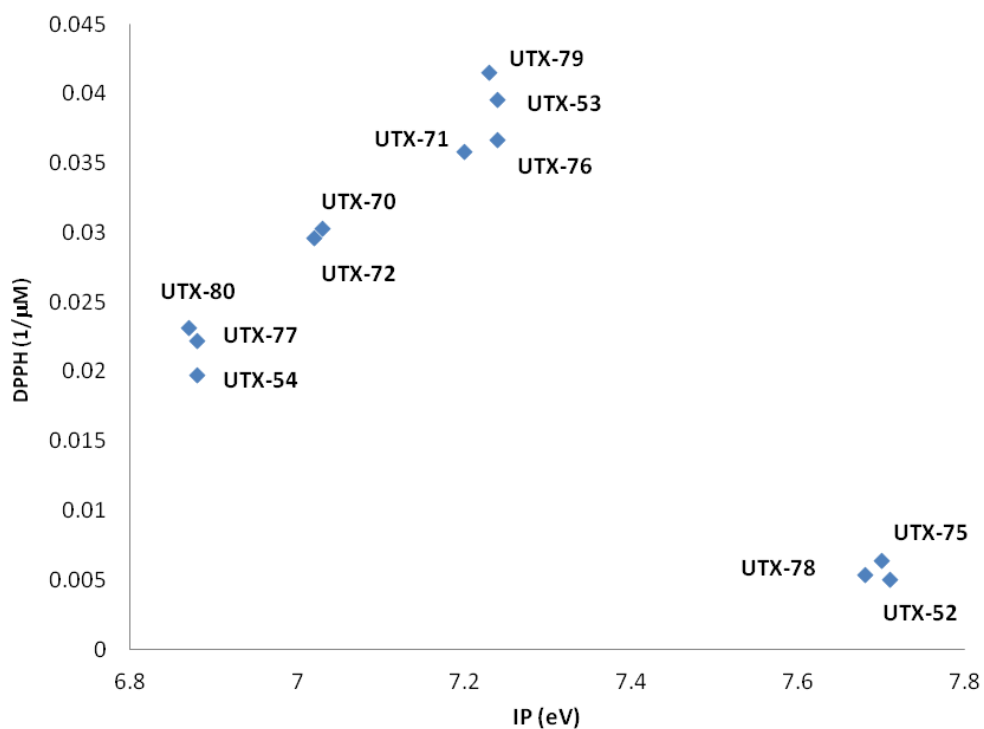


Fig.7: DFT計算におけるイオン化ポテンシャル (IP値)とDPPH radical消去活性との相関

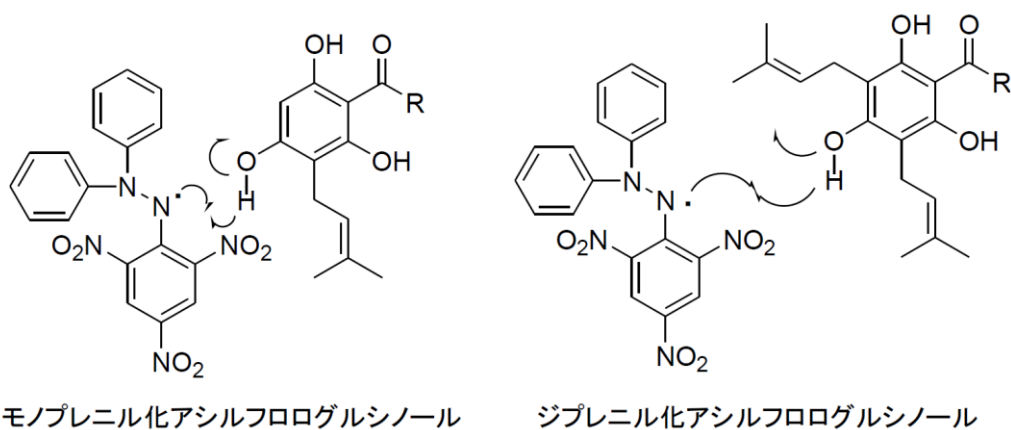


Fig.8: DPPHとモノプレニル化acylphloroglucinol類およびジプレニル化acylphloroglucinol類との反応性の違い

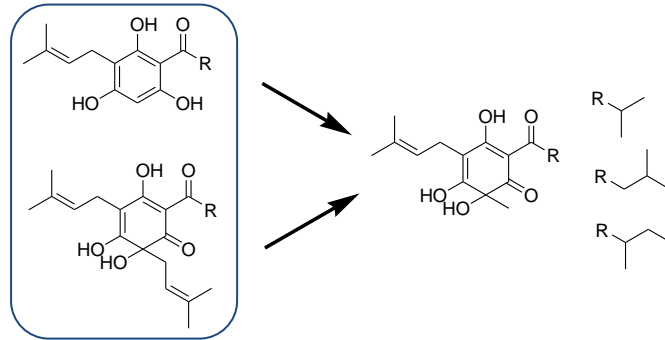


Fig.9: 今回得られた知見から予想される強力な新規抗酸化剤

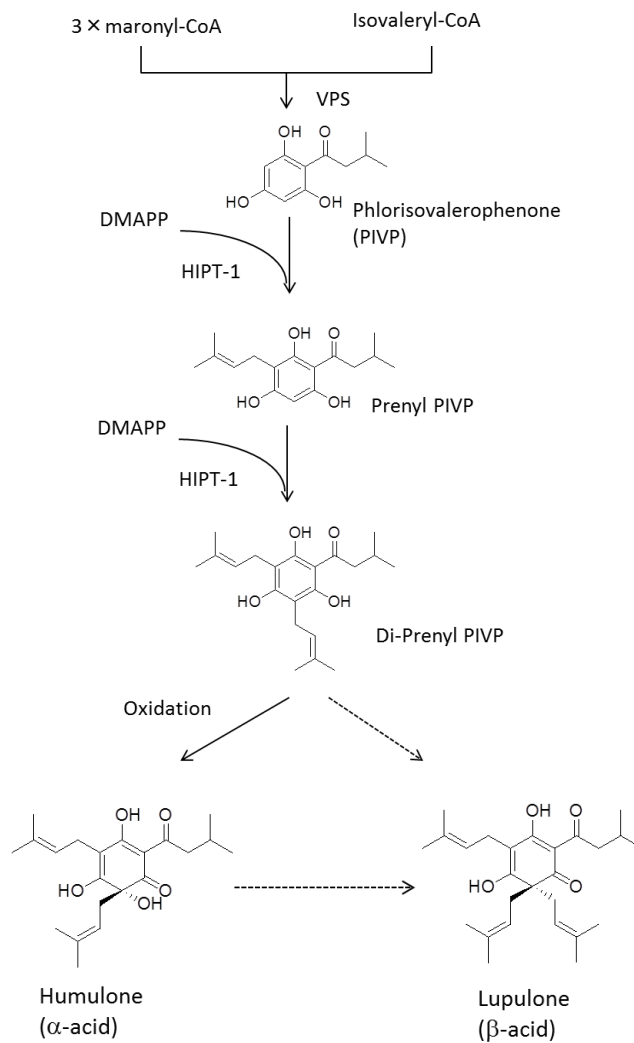


Fig.10: humuloneおよびlupuloneの生合成に係わる遺伝子の同定

## 第四章 結論

ホップ生合成中間体およびモノゲラニル化acylphloroglucinol類の合成に成功した。プレニル化acylphloroglucinolの抗酸化活性は、疎水性に依存しないことが示唆された。また、今回合成したホップ生合成中間体は、二次代謝産物であるICE-2と比較して同等かそれ以上の抗酸化活性を示したことや、ホップ生合成に係るプレニル転移酵素の遺伝子同定に成功したことから、生合成中間体を合成することの有用性が証明できた。

## 第五章 試薬、使用器具一覧

### 5.1 試薬

Acetone (関東化学株式会社)

phloroglucinol (シグマアルドリッチジャパン株式会社)

nitrobenzene (シグマアルドリッチジャパン株式会社)

ICE-2 (キリンホールディングス)

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (和光純薬工業株式会社)

CH<sub>3</sub>COOH (和光純薬工業株式会社)

CH<sub>3</sub>CN (関東化学株式会社)

Et<sub>2</sub>O (関東化学株式会社)

EtOH (関東化学株式会社)

HCl (シグマアルドリッチジャパン株式会社)

*n*-hexane (和光純薬工業株式会社)

MeOH (キシダ化学株式会社)

Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (和光純薬工業株式会社)

NaCl (鳴門塩業株式会社)

NaOH (和光純薬工業株式会社)

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (和光純薬工業株式会社)

Silica Gel 60N (関東化学株式会社)

Toluene (関東化学株式会社)  
Linoleic acid (東京化成工業株式会社)  
2-methylpropanoyl chloride (東京化成工業株式会社)  
3-methyl-butyryl chloride (東京化成工業株式会社)  
2-Methyl-butyryl chloride (東京化成工業株式会社)  
carbon disulfide (東京化成工業株式会社)  
Aluminium chloride (和光純薬工業株式会社)  
1-1 Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (和光純薬工業株式会社)  
Ethanol(99.5%)精密分析用 (シグマアルドリッチジャパン株式会社)  
2-[N-Morpholino] ethanonesulfonic acid (MES) (和光純薬工業株式会社)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O (和光純薬工業株式会社)  
NaCl (シグマアルドリッチジャパン株式会社)  
KCl (和光純薬工業株式会社)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (和光純薬工業株式会社)  
KBr (シグマアルドリッチジャパン株式会社)  
Albumin Bovine (BSA) (シグマアルドリッチジャパン株式会社)  
BCA Protein Assay Reagent (PIERCE)

## 5.2 使用器具

超遠心機 HITACHI CENTRIFUGE CS120 (ローター : RP80AT-141 80,000 RPM)、超遠心用遠心管 4PC TUBE ASSY(Hitachi Koki) 、HITACHI U-2000 Spectrophotometer、恒温装置 TAITEC (thermo minder SD)、吸光度計 MICROPLATE READER (Model 550)BIO-RAD、15 ml 遠心管チューブ、1.5 ml マイクロテストチューブ、マグネティックスターラー、ドライヤー、ピペットマン、石英セル、5 ml シリンジ、1 ml シリンジ、NIPRO 滅菌済みバキュテイナ採血管、NIPRO フローマックス注射針 25G、透析膜 Slide-A-Lyzer Dialxsos Cassette (Extra strengs) 10,000 MWCO 0.5-3 ml Capacity、パラフィルム、スターラーピース、メスシリンダー

## 第六章 実験方法

### 6.1 合成

#### ***2-methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-1-propanone (UTX-52)***

Phloroglucinol (3.0 g, 23.6 mmol) and aluminium chloride (3.0 eq.) were dissolved in nitrobenzene (4.4 ml) and carbon disulfide (7.0 ml), and then 2-methylpropanoyl chloride, (1.0 eq.) was added with stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 14 h. The mixture was poured into water and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O, and then washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> followed by saturated aqueous NaCl. The Et<sub>2</sub>O layer was dried (anhydrous MgSO<sub>4</sub>) and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-52: yield 90%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 5.92 (s, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.99-3.92 (m, 1H), 1.12 (d, 6H, *J* = 6.4 Hz); EIMS *m/z*: 196 (M<sup>+</sup>).

#### ***3-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)- 1- butanone (UTX-75)***

Phloroglucinol (3.0 g, 18.7 mmol) and aluminium chloride (3.0 eq.) were dissolved in nitrobenzene (5.0 ml) and carbon disulfide (2.0 ml), and then 3-methyl-butyryl chloride (1.0 eq.) was added with stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The mixture was poured into water and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O, and then washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> followed by saturated aqueous NaCl. The Et<sub>2</sub>O layer was dried (anhydrous MgSO<sub>4</sub>) and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-75: yield 90%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 5.93 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 2.95 (d, 2H, *J* = 6.84 Hz), 2.04-2.08 (m, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H); EI-MS *m/z* 210 (M<sup>+</sup>).

**2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxy-phenyl)-1-pentanone(UTX-78)**

Phloroglucinol (3.0 g, 18.5 mmol) and aluminium chloride (3.0 eq.) were dissolved in nitrobenzene (4.4 ml) and carbon disulfide (7.3 ml), and then 2-Methyl-butryl chloride (1.0 eq.), was added with stirring. The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 h. The mixture was poured into water and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O, and then washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> followed by saturated aqueous NaCl. The Et<sub>2</sub>O layer was dried (anhydrous MgSO<sub>4</sub>) and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-78: yield 86 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 5.93 (s, 1H), 5.1 (s, 1H), 3.87-3.84 (m, 1H), 3.105 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.61 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.00 (d, 3H, *J* = 6.3 Hz); EI-MS *m/z* 210 (M<sup>+</sup>).

**2-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-propanone (UTX-53)**

UTX-52 (406.6 mg, 2.1 mmol) was dissolved in toluene (10 ml) and methanol (1.0 ml). Sodium methoxide (2.1 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (2.1 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-53: Yield 7%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 5.93 (s, 1H), 5.23-5.19 (m, 1H), 3.87-3.84 (m, 1H), 3.11 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 1.61 (s, 3H), 1.49 (s, 3H), 1.00 (d, 6H, *J* = 6.3 Hz); EI-MS *m/z* 264 (M<sup>+</sup>).

**2-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3,5-di(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-propanone (UTX-54)**

UTX-52 (200.0 mg, 1.0 mmol) was dissolved in toluene (10 ml) and methanol (1.0 ml). Sodium methoxide (3.0 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (3.0 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-54: Yield 7%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 4.79-4.76 (m, 2H), 3.95-3.87 (m, 1H), 2.53 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 2.42 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz), 1.45 (s, 3H), 1.43 (s, 3H), 0.93 (d, 6H, *J* = 6.9 Hz); EI-MS *m/z* 332 (M<sup>+</sup>).

**3-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-butanone (UTX-76)**

UTX-75 (334.0 mg, 1.6 mmol) was dissolved in toluene (10 ml) and methanol (1.0 ml). Sodium methoxide (2.1 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (2.1 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-76: Yield 18%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ 6.06 (s, 1H), 5.20-5.24 (m, 1H), 3.24 (d, 2H, *J* = 7.1 Hz), 2.19-2.29 (m, 1H), 1.74 (s, 1H), 1.63 (s, 1H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H); EI-MS *m/z* 278 (M<sup>+</sup>).

**3-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3,5-di(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-butanone  
(UTX-77)**

UTX-75 (80.0 mg, 0.38 mmol) was dissolved in toluene (8.0 ml) and methanol (1.0 ml). Sodium methoxide (3.0 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (3.0 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-77: Yield 11%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 4.87-4.90 (m, 2H), 2.85-2.87 (m, 2H), 2.59-2.70 (m, 2H), 2.04-2.08 (m, 1H), 1.575 (d, 3H, *J* = 15.9 Hz), 0.92-0.98 (m, 3H), 0.92-0.98 (m, 3H); EI-MS *m/z* 346 (M<sup>+</sup>).

**2-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-pentanone  
(UTX-79)**

UTX-78 (308.2 mg, 2.0 mmol) was dissolved in toluene (3 ml) and methanol (0.5 ml). Sodium methoxide (2.1 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (2.1 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 30 min. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-79: Yield 9 %; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) 5.94 (s, 1H), 5.08-5.11 (m, 1H), 3.11 (d, 1H, *J* = 7.1 Hz), 1.16-1.26 (m, 1H), 0.99 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz), 0.74-0.80 (m, 3H); EI-MS *m/z* 278 (M<sup>+</sup>).



**2-methyl-1-[2,4,6-trihydroxy-3,5-di(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-1-pentanone  
(UTX-80)**

UTX-78 (408.5 mg, 1.9 mmol) was dissolved in toluene (10 ml) and methanol (1.0 ml). Sodium methoxide (3.0 eq.) was added with stirring on ice bath, and then 3,3-Dimethylallyl bromide (3.0 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1.5 h. The mixture was acidified with 2 N HCl and the mixture was extracted with Et<sub>2</sub>O. The Et<sub>2</sub>O layer was washed with saturated aqueous NaCl followed by Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The Et<sub>2</sub>O layer was evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-80: Yield 7%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ5.0-4.9 (m, 2H), 3.96-3.94 (m, 1H), 2.68-2.51 (m, 4H), 1.58 (s, 6H), 1.55 (s, 6H), 1.13-1.09 (m, 2H), 1.05 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); EI-MS *m/z* 364 (M<sup>+</sup>).

**2.4 1-[3-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyl)-2,4,6-trihydroxy-phenyl]-2-methyl-1-propanone (UTX-71)**

UTX-52 (250.0 mg, 1.3 mmol) was dissolved in acetone (6 ml). anhydrous potassium carbonate (2.0 eq.) was added with stirring on ice bath, and then geranyl bromide (1.0 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was refluxed for 24 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-71: Yield 11%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ6.08 (s, 1H), 5.24 (t, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.09-5.06 (m, 1H), 4.63 (d, 2H, *J* = 8.3 Hz), 4.03-3.95 (m, 1H), 3.25 (d, 4H, *J* = 7.3 Hz), 1.65 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.12 (s, 3H); EI-MS *m/z* 332 (M<sup>+</sup>).

**1-[3-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyl)-2,4,6-trihydroxy-phenyl]-2-methyl-1-butanone (UTX-70)**

UTX-75 (152.3 mg, 0.7 mmol) was dissolved in acetone (2 ml). anhydrous potassium carbonate (0.5 eq.) was added with stirring on ice bath, and then geranyl bromide (0.8 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was refluxed for 6 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-70: Yield 18%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ6.06 (s, 1H), 5.26-5.22 (m, 1H), 5.09-5.05 (m, 1H), 4.63 (d, H, J = 8.3 Hz), 3.31-3.25 (m, 4H), 2.95 (d, 2H, J = 6.8 Hz), 2.28-2.20 (m, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.94 (s, 3H); EI-MS *m/z* 346 (M<sup>+</sup>).

**1-[3-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyl)-2,4,6-trihydroxy-phenyl]-2-methyl-1-pentanone (UTX-72)**

UTX-78 (207.0 mg, 1.0 mmol) was dissolved in acetone (5 ml). anhydrous potassium carbonate (2.0eq.) was added with stirring on ice bath, and then geranyl bromide (1.1 eq.) was dropped slowly. The reaction mixture was refluxed for 6 h. The reaction mixture was filtered and evaporated under reduced pressure. Residues were purified by silica gel column chromatography with hexanes and ethyl acetate to give the product as yellow oil. UTX-72: Yield 17%; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO) δ6.06 (s, 1H), 5.26-5.23 (m, 1H), 5.08 (t, 3H, J = 7.1 Hz), 4.62 (d, 1H, J = 8.3 Hz), 3.91-3.84 (m, 1H), 3.26 (d, 2H, J = 4.4 Hz), 1.96-1.93 (m, 2H), 1.85-1.79 (m, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 1.12 (d, 3H, J = 6.8 Hz), 0.89 (t, 3H, J = 7.3 Hz); EI-MS *m/z* 346 (M<sup>+</sup>).

## 6.2 DPPH ラジカル消去活性の評価

水系におけるラジカル捕捉能を評価するため、DPPH ラジカル消去活性の測定を行った。DPPH は分解性が高いため用時調製した。分光光度計の波長を 517 nm、25°C に設定した。石英セル中に 40  $\mu$ M MES buffer となるように、エタノールを加え、ゼロ合わせを行った。コントロールとして終濃度がそれぞれ、100  $\mu$ M DPPH、40  $\mu$ M MES buffer となるようにエタノールで調製し、5 分毎に吸光度を測定し 30 分間の DPPH の吸光度変化を調べた。次に試薬を 30  $\mu$ l 入れて同様の測定を行い、30 分後の吸光度 (517 nm) が 50%減少した時の濃度として IC<sub>50</sub> を求めた (Fig.11)。

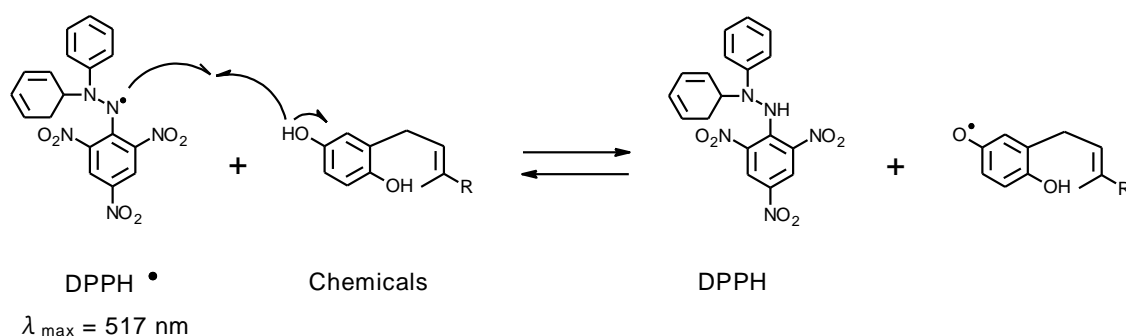


Fig.11: DPPH ラジカル消去活性の原理

以上の DPPH ラジカル消去活性は、Blois らの方法<sup>12</sup>を基本として行った。

## 6.3 Linoleic acid,LDL 抗酸化活性の評価

### 6.3.1 LDL の単離・精製<sup>13</sup>

まず、採取したてのヒトの血液を室温で約 30 分間静置してから、3,000 rpm、4°C の条件で 10 分間遠心分離を行った。遠心後、沈殿を吸わないように気をつけながら上清 (血清) をピペットマンで採取し、15 ml 遠心管に移した。

これ以後の実験操作は低温下で行った。まず、0.325 g/ml になるように KBr を血清に溶解させる。このとき泡立てないように気をつけた。完全に KBr が溶解したことを確認してから、ピペットマンを用いて血清を超遠心用遠心管に入れた。このとき、ピ

ペットマンを押し込まないようにすると泡立たずに済む。次に濃度 8.5 g/l の NaCl 水溶液 ( $d=1.006$ ) を体積比で、(NaCl 層) : (血清層) = 2 : 3 になるように静かに乗せるように注いだ。この際、層が混ざらないように気をつけ、きれいな 2 層にした。

超遠心器で 80,000 rpm、4°C の条件で 60 分間遠心分離を行った。遠心後は慎重かつ速やかに遠心管を取り出し、濃度勾配によって分画された LDL 層をピペットマンで採取、エッペンドルフチューブに移した。

針なしの 1 ml シリンジを用いて試料を採取した後、22  $\mu\text{m}$  のマイクロフィルタを装着させ、別の新しいエッペンドルフチューブに濾出させた。次に、針を装着させた 5 ml シリンジで試料を吸い取った後、針を透析膜に挿入し試料を注入する。針を挿入させる際に透析膜を傷つけないように注意。透析膜に浮きを装着させ、スターラーで攪拌させながら PBS バッファー中で遮光下、4°C で 30 分間透析後、バッファー交換し、さらに 30 分間透析した。最後にバッファー交換し、一晚透析した。3 回の透析はすべて低温室で行った。なお、透析用の PBS バッファーは十分に窒素を通気し、冷却してから用いた。透析後の精製 LDL は 5 ml シリンジで採取し、遮光下、4°C、窒素充填下でエッペンドルフチューブに保存した。

### 6.3.2 LDL の定量 (BCA 法)

BSA 検量線を作成するため、石英セル内の終濃度をそれぞれ 0、0.125、0.25、0.50、1.0 mg/ml になるように BSA std. を調整した。LDL のサンプルは 4 倍、6 倍、8 倍の希釈で 3 点とった。サンプルの希釈は PBS バッファーで行った。マイクロプレートリーダー用 96 穴プレートに希釈サンプル及び BSA std. を 25  $\mu\text{l}$  ずつアプライした。さらに (BCA・A 液 3000  $\mu\text{l}$ ) + (BCA・B 液 60  $\mu\text{l}$ ) の混合液を 200  $\mu\text{l}$  ずつアプライした。このとき泡立てないように気をつける。37°C、30 分間インキュベーションした後 ABS<sub>570</sub> 測定を行い、検量線から LDL 濃度及び単離した LDL 量を算出した。

### 6.3.3 リノール酸および LDL 共役ジエン生成阻害活性

リノール酸の抗酸化活性はリノール酸酸化における共役ジエン生成阻害活性で評価した<sup>14,15</sup>。

まず、石英セルに終濃度がそれぞれ LDL 50 µg/ml、化合物 10 µM、酸化開始剤として終濃度 5 µM 硫酸銅を加えた時間を 0 分として吸光度の計測を始めた。LDL 脂質過酸化の過程で生じる共役ジエンの吸光度 234 nm における吸光度の経時変化を 37°C、4 時間測定した。また、阻害時間の算出方法としては酸化を抑えている時間の近似直線と酸化されている時間の近似直線の交点を阻害時間とした (fig.12)。

### 6.3.4 TBARS assay

初期酸化で生じた共役ジエンがさらに酸化されることによって、マロンジアルデヒドが生成する。このマロンジアルデヒドとチオバルビツール酸 (TBA) を反応させることによってチオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) を形成させ、それを指標として実験を行った<sup>16</sup>。

まず、LDL (50 µg/100 µm)、硫酸銅の終濃度は 5 µM となるように PBS バッファー、化合物、LDL、硫酸銅の順に混合させた。37°C、4 時間インキュベーション後、試料全量を 15 ml 遠心管に移してから 1%リン酸水溶液 1 ml ずつ加えた。さらに 10 mM BHT を 50 µl 加えて酸化を停止させ、最後に 0.67% TBA を 1 ml 加えた。30 分間熱処理 (100°C) した。反応終了後、試料を氷中で冷やし常温に戻してからブタノールを 2 ml 加え、約 30 秒間ボルテックスした。十分に攪拌させることで、TBARS はブタノールに溶解込む。3,000 rpm、4°C の条件で 10 分間遠心分離を行い 2 層に分けた。遠心後、ブタノール層 (上層) を採取し、532 nm における吸光度を測定した。TBARS はセルに吸着しやすいので石英セルを用い、測定の度に十分に洗浄した (Fig.13)。

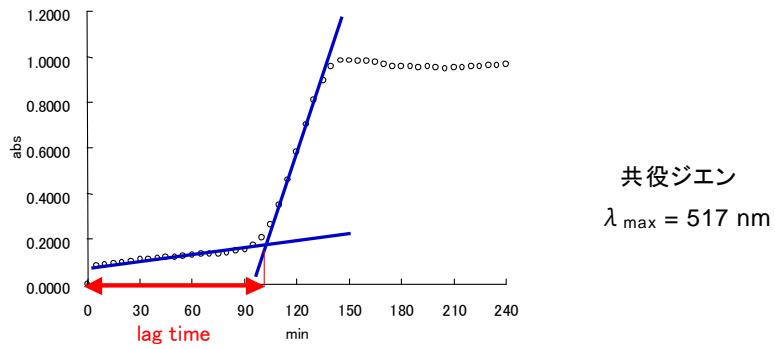
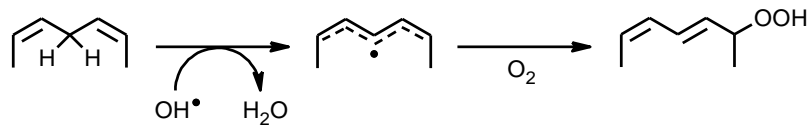


Fig.12: 共役ジエン形成阻害活性の原理と算出方法

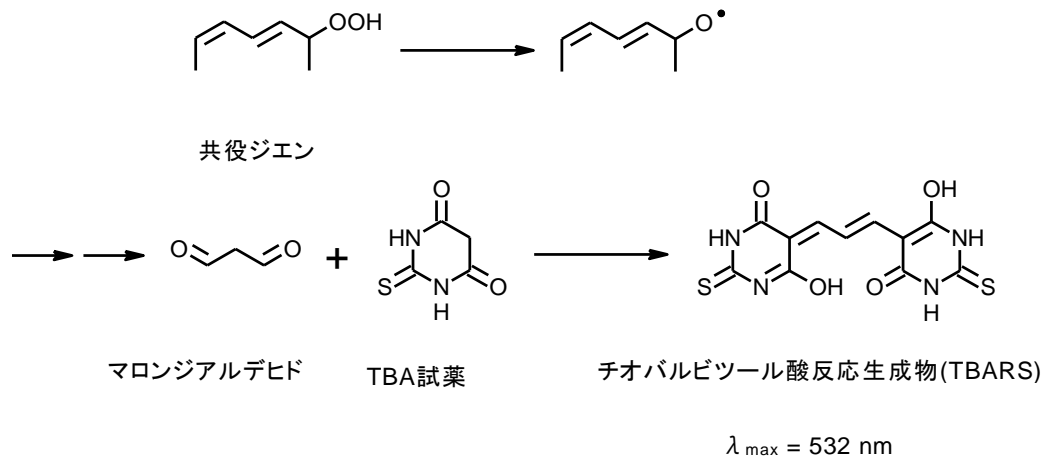


Fig.13: TBARS 法の原理

## 第七章 参考文献

1. Botta, B., *et al.*, Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol Sci.*, 26 (12), 606-608 2005.
2. Judith A., Berliner and Jay W. Heinecke., "The Role of Oxidation Lipoproteins in Atherogenesis." *Free Radic. Biol. Med.*, 20, 707-727 1996.
3. Ann E., *et al.*, Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 33, 195-207 1996.
4. Segawa S., *et al.*, Effects of a hop water extract on the compound 48/80-stimulated vascular permeability in ICR mice and histamine release from OVA-sensitized BALB/c mice. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71, 1577-1581 2007.
5. Hougee S., *et al.*, Selective inhibition of COX-2 by a standardized CO<sub>2</sub> extract of *Humulus lupulus* in vitro and its activity in a mouse model of zymosan-induced arthritis. *Planta. Med.*, 72, 228-233 2006.
6. Okada Y., *et al.*, Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 150–155 2001.
7. J.F. Stevens, *et al.*, Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health. *Phytochemistry*, 65, 1317–1330 2004.
8. Jin Hui Yang, *et al.*, First total synthesis of (±)-puyanin and (±)-4'-O-methylbonannione, *Chinese Chem. Letters*, 21, 1267–1269 2010.
9. Uto Y., *et al.*, Artepillin C isoprenomics: design and synthesis of artepillin C isoprene analogues as lipid peroxidation inhibitor having low mitochondrial toxicity. *Bioorg Med. Chem.*, 14, 5721-5728 2006.
10. Uto Y., *et al.*, Artepillin C isoprenomics: design and synthesis of artepillin C analogues as antiatherogenic antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 578, 113-118 2006.

11. Tsurumaru Y., *et al.*, HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. *Biochemical Biophysical Research Communication.*, 417, 393-398 2012.
12. Blois MS., *et al.*, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200 1958
13. R. J. Havel, *et al.*, THE DISTRIBUTION AND CHEMICAL COMPOSITION OF ULTRACENTRIFUGALLY SEPARATED LIPOPROTEINS IN HUMAN SERUM. *J. Clin. Invest.*, 34 (9), 1345-1353 1955.
14. Liégeois C., *et al.*, Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. *J. Agric. Food. Chem.*, 48, 1129-1134 2000.
15. Pryor W., *et al.*, Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol.*, 105, 293-299 1984.
16. Yagi K., *et al.*, Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods Mol. Biol.*, 108, 101-106 1998.



## 第八章 謝辞

本研究に際し御指導、御鞭撻を賜りました徳島大学工学部生物工学科 A-2 講座の堀均 教授、宇都義浩 准教授、共同研究の京都大学 矢崎一史 教授、DFT 計算を行ってくださった大阪大学 大久保敬 特任准教授、ならびに NMR スペクトルを測定していただきました徳島大学工学部生物工学科 中村真紀 技術職員、友成さゆり 技術職員、また元素分析を実施していただきました徳島大学工学部化学応用工学科 岡山恵美子 技術職員、質量分析を測定していただきました徳島大学工学部化学応用工学科 上田昭子 技術職員にあわせて心から感謝いたします。特に、本研究に際し御指導、御鞭撻いただきました宇都義浩 准教授に心から感謝いたします。

また両親をはじめ、様々な面で支えていただいた先輩方、同期、後輩のみなさまに深く感謝いたします。最後に、本研究に御協力して頂きましたすべての方々に心から感謝いたします。