

短報

## Ginkgetin の glucose 配糖体の合成と $\beta$ -secretase 阻害活性

佐々木寛朗<sup>1)\*</sup>, 梅澤佑介<sup>2)</sup>, 三木和彦<sup>2)</sup>,

木下 薫<sup>2)</sup>, 小山清隆<sup>2)</sup>, 金田 幸<sup>1)</sup>, 高橋邦夫<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学薬学部医薬資源化学研究室, <sup>2)</sup> 明治薬科大学生薬学教室

## Synthesis and $\beta$ -secretase inhibitory activity of ginkgetin glucoside

Hiroaki Sasaki<sup>1)\*</sup>, Yusuke Umezawa<sup>2)</sup>, Miki Kazuhiko<sup>2)</sup>,

Kaoru Kinoshita<sup>2)</sup>, Kiyotaka Koyama<sup>2)</sup>, Miyuki Kaneda<sup>1)</sup>, Kunio Takahashi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Medicinal Resources Chemistry, School of Pharmacy, Shujitsu University

<sup>2)</sup> Department of Pharmacognosy and Phytochemistry, Meiji Pharmaceutical University

(Received 27 December 2013; accepted 10 January 2014)

### Abstract

A  $\beta$ -secretase (BACE1) inhibitor could be used for the development of an effective and a safe therapy for Alzheimer's disease. This study describes the synthesis and the  $\beta$ -secretase inhibitory activity of a glucoside of ginkgetin (**1**) that inhibits the  $\beta$ -secretase with an  $IC_{50}$  value of 3.9  $\mu$ M. The material **1** was isolated from *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch. var. *harringtonia*. The ginkgetin glucoside atropisomers **4R** and **4S** were produced by glucosidation of **1**. The atropisomers **4R** and **4S** inhibited the  $\beta$ -secretase with  $IC_{50}$  values of 17  $\mu$ M and 3.1  $\mu$ M, respectively. Therefore, glycosidation of biflavonoids could be one of the effective methods for drug development.

Keyword:  $\beta$ -secretase, ginkgetin, biflavonoids, glucoside, atropisomer

### 緒言

$\beta$ -secretase の阻害薬は副作用の少ない根本的なアルツハイマー病の治療薬の標的として、大きな期待が寄せられている。これまでにフラボンが C3'-C8"結合した amentoflavone 型ビフラボノイドに  $\beta$ -secretase 阻害活性があることを報告している<sup>1,2)</sup>。三木らはビフラボノイドに抗インフルエンザウイルス活性があり、さらにシアル酸配糖化

することで活性が増強することを報告した。このことは配糖化が活性増強に有用であることを示している<sup>3)</sup>。今回我々は ginkgetin (**1**) の glucose 配糖体を合成し、 $\beta$ -secretase 阻害活性を検討した。

### 方法

Ginkgetin (**1**) は *Cephalotaxus harringtonia* K. Koch. var. *harringtonia* (イヌガヤ) から単離した

ものを用いた<sup>4)</sup>。糖供与体には 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- $\alpha$ -D-glucopyranosyl bromide (**2**) (Tokyo Chemical Industry) を用いた。

$\beta$ -Secretase 阻害活性試験は, BACE1 FRET Assay Kit, Red (Pan Vera) を用いて試験した<sup>1)</sup>。Positive control として,  $\beta$ -Secretase Inhibitor (Wako Pure Chemical Industries) を用いた。サンプルの最終濃度 0.1, 0.5, 1, 10  $\mu$ g/mL における試験結果 (n=3) から, IC<sub>50</sub> ( $\beta$ -secretase の酵素活性を 50% 阻害するのに要する阻害物質の濃度) を Graph Pad Prism<sup>®</sup> Ver. 5 (Graph Pad Software) を用いて算出した。2 群間の比較には, F 検定を行い, 等分散の場合は Student の t 検定, 不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定を用いた。

## 結果・考察

### **3R, 3S** の合成 (図 1)。

**1** (350.5 mg, 0.62 mmol) を DMF (dry) 5.0 ml に室温, 遮光, Ar 雰囲気下で溶解させ, NaH (60%, 29.6 mg, 0.74 mmol) を加え 1 時間攪拌した。次に **2** (215.8 mg, 0.53 mmol) を加え, 18 時間攪拌しながら反応させた。反応終了後, CHCl<sub>3</sub> で希釈し,

水を加えて分液処理を行なった。有機層を無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で乾燥した後, 溶媒を減圧留去した。残渣を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (MeOH), HPLC (toluene-acetone) で分離, 精製し, **3R** (5.3 mg, 収率 2%), **3S** (8.3 mg, 収率 3%) を得た。

**1** のような amentoflavone 型ビフラボノイドでは 7"位が配糖化されると, C3'-C8"で結合したビフェニル構造で回転障害が生じることにより, **3R** および **3S** のように 2 種のアトロプ異性体が生成する<sup>3)</sup>。 **3R** および **3S** は HRFABMS より, C<sub>46</sub>H<sub>41</sub>O<sub>19</sub> であることから, **1** にアセチル基で保護された glucose 1 分子が結合した化合物であると決定した (表 1)。 **1** の H-6"位は  $\delta_H$  6.40 と帰属されるが, **3R** では  $\delta_H$  6.86, **3S** では  $\delta_H$  6.82 と低磁場にシフトしていた。また, **3R** における  $\delta_H$  5.71 (H-1"') からの  $\delta_C$  158.6 (C-7") への HMBC 相関, および **3S** における  $\delta_H$  5.63 (H-1"') から  $\delta_C$  158.9 (C-7") への HMBC の相関より **3R, 3S** では glucose が 7"位に結合していると決定した。 **3R, 3S** は 2D-NMR など詳細に検討し, 完全帰属を行った (表 2, 3)。

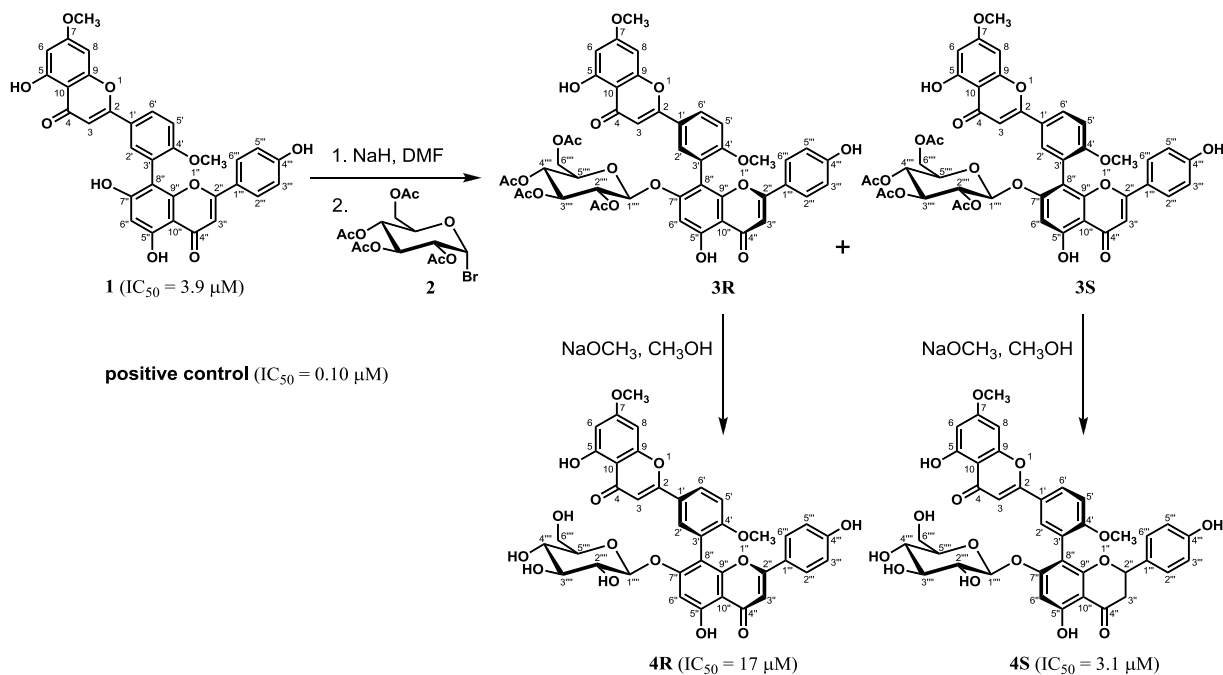


図 1 Ginkgetin (**1**) の glucose 配糖体 **4R, 4S** の合成と  $\beta$ -secretase 阻害活性

**4R** の合成 (図 1)

**3R** (6.7 mg, 7.5 μmol) を MeOH 4.0 ml に室温、遮光, Ar 雰囲気下で溶解させ, NaOMe (28% in MeOH) 3.0 ml を加えて4時間攪拌した. 次に H<sub>2</sub>O 7.0 ml を加え, 更に 18 時間攪拌した. 反応終了後, 2 mol/L HCl で中和し, 溶媒を減圧留去し, H<sub>2</sub>O 不溶部から **4R** (3.0 mg, 収率 55%) を得た.

**4S** の合成 (図 1)

**3S** (10.0 mg, 11 μmol) を MeOH 5.0 ml に室温、

遮光, Ar 雰囲気下で溶解させ, NaOMe (28% in MeOH) 4.0 ml を加えて4時間攪拌した. 次に H<sub>2</sub>O 7.0 ml を加え, 更に 18 時間攪拌した. 反応終了後, 2 mol/L HCl で中和し, 溶媒を減圧留去し, H<sub>2</sub>O 不溶部から **4S** (5.1 mg, 収率 63%) を得た.

**4R** は **3R** におけるシグナル δ<sub>H</sub> 1.59, 1.86, 1.98, 2.06 の消失より, **4S** は **3S** におけるシグナル δ<sub>H</sub> 1.70, 1.87, 1.98, 2.06 の消失より, アセチルの除去を確認した (表 2).

表 1 機器スペクトルデータ

<i>(R)</i> -7,4'-Di- <i>O</i> -methyl-7''- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-glucopyranosyl)amentoflavone ( <b>3R</b> )	
Yellow powder; mp 150-152°C; [α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> -222.8 (c 0.20, MeOH); IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> : 2920, 1750, 1650, 1600, 1440, 1365, 1260, 1220, 1040, 800; UV λ <sub>max</sub> (MeOH) nm (log ε): 331 (4.46), 270 (4.48), 207 (4.48); CD λ <sub>max</sub> (MeOH) nm ([θ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> ): 337 (-75350), 306 (34351), 284 (7401), 263 (31167), 238 (-12300), 225 (-1132); FABMS (positive) <i>m/z</i> 897([M+H] <sup>+</sup> ), 567; HRFABMS (positive) <i>m/z</i> 897.2236 (Calcd for 897.2242, C <sub>46</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub> ); <sup>1</sup> H-NMR (表 2); <sup>13</sup> C-NMR (表 3).	
<i>(S)</i> -7,4'-Di- <i>O</i> -methyl-7''- <i>O</i> -(2,3,4,6-tetra- <i>O</i> -acetyl-D-glucopyranosyl)amentoflavone ( <b>3S</b> )	
Yellow powder; mp 153-156°C; [α] <sub>D</sub> <sup>24</sup> -145.9 (c 0.40, MeOH); IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> : 2920, 2850, 1755, 1650, 1600, 1500, 1440, 1365, 1260, 1220, 1040, 840, 820, 800; UV λ <sub>max</sub> (MeOH) nm (log ε): 334 (4.59), 270 (4.60), 206 (4.73); CD λ <sub>max</sub> (MeOH) nm ([θ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> ): 334 (69560), 307 (-47349), 282 (-5458), 264 (-30055), 239 (2788), 224 (-26695); FABMS (positive) <i>m/z</i> 897([M+H] <sup>+</sup> ), 567; HRFABMS (positive) <i>m/z</i> 897.2249 (Calcd for 897.2242, C <sub>46</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub> ); <sup>1</sup> H-NMR (表 2); <sup>13</sup> C-NMR (表 3).	
<i>(R)</i> -7,4'-Di- <i>O</i> -methyl-7''- <i>O</i> -(D-glucopyranosyl)amentoflavone ( <b>4R</b> )	
Yellow powder; mp 195-197°C; [α] <sub>D</sub> <sup>23</sup> -164.8 (c 0.20, MeOH); IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> : 2925, 2850, 1730, 1650, 1600, 1440, 1260, 1100, 1030, 800; λ <sub>max</sub> (MeOH) nm (log ε): 331 (4.23), 270 (4.26), 205 (4.44); CD λ <sub>max</sub> (MeOH) nm ([θ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> ): 336 (-50602), 307 (40028), 282 (1365), 266 (18860), 240 (-10760); FABMS (positive) <i>m/z</i> 729 ([M+H] <sup>+</sup> ), 567; HRFABMS (positive) <i>m/z</i> 729.1827 (Calcd for 729.1819, C <sub>38</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> ); <sup>1</sup> H-NMR (表 2); <sup>13</sup> C-NMR (表 3).	
<i>(S)</i> -7,4'-Di- <i>O</i> -methyl-7''- <i>O</i> -(D-glucopyranosyl)amentoflavone ( <b>4S</b> )	
Yellow powder; mp (dec.) 198°C; [α] <sub>D</sub> <sup>23</sup> -17.9 (c 0.30, MeOH); IR ν <sub>max</sub> (KBr) cm <sup>-1</sup> : 2925, 1650, 1600, 1495, 1440, 1280, 1260, 1160, 1100, 1070, 835; UV λ <sub>max</sub> (MeOH) nm (log ε): 329 (4.45), 270 (4.46), 207 (4.61); CD λ <sub>max</sub> (MeOH) nm ([θ] <sub>D</sub> <sup>25</sup> ): 336 (70792), 307 (-39012), 284 (-2197), 265 (-29896), 241 (5081); FABMS (positive) <i>m/z</i> 729 ([M+H] <sup>+</sup> ), 567; HRFABMS (positive) <i>m/z</i> 729.1826 (Calcd for 729.1819, C <sub>38</sub> H <sub>33</sub> O <sub>15</sub> ); <sup>1</sup> H-NMR (表 2); <sup>13</sup> C-NMR (表 3).	

表 2 <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) スペクトルデータ

position	<b>3R</b>	<b>3S</b>	<b>4R</b>	<b>4S</b>
3	6.97 (s)	6.98 (s)	6.96 (s)	6.98 (s)
6	6.36 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	6.37 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz)	6.37 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.37 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz)
8	6.81 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	6.83 (d, <i>J</i> = 2.2 Hz)	6.88 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz)	6.79 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz)
2'	8.01 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	8.01 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz)	8.12 (d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	8.11 (d, <i>J</i> = 1.2 Hz)
5'	7.35 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	7.35 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	7.39 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	7.35 (d, <i>J</i> = 8.7 Hz)
6'	8.22 (d, <i>J</i> = 2.4, 8.9 Hz)	8.24 (dd, <i>J</i> = 2.4, 8.8 Hz)	8.21 (d, <i>J</i> = 2.1, 8.9 Hz)	8.22 (d, <i>J</i> = 1.2, 8.7 Hz)
3''	6.89 (s)	6.90 (s)	6.87 (s)	6.88 (s)
6''	6.74 (s)	6.77 (s)	6.75 (s)	6.78 (s)
2''', 6'''	7.48 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	7.47 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	7.52 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	7.52 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz)
3''', 5'''	6.69 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.71 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz)	6.75 (d, <i>J</i> = 8.9 Hz)	6.73 (d, <i>J</i> = 7.7 Hz)
1''''	5.71 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	5.63 (d, <i>J</i> = 8.1 Hz)	5.16 (d, <i>J</i> = 7.9 Hz)	5.17 (d, <i>J</i> = 7.3 Hz)
2''''	4.84 (dd, <i>J</i> = 8.1, 9.6 Hz)	4.84 (d, <i>J</i> = 8.1, 9.6 Hz)	3.02 (broad t, <i>J</i> = 8.5 Hz)	3.02 (m)
3''''	5.30 (t, <i>J</i> = 9.6 Hz)	5.30 (t, <i>J</i> = 9.6 Hz)	3.29 (m)	3.27 (m)
4''''	4.92 (t, <i>J</i> = 9.6 Hz)	4.92 (t, <i>J</i> = 9.6 Hz)	3.08 (broad t, <i>J</i> = 3.5 Hz)	3.10 (broad t, <i>J</i> = 8.8 Hz)
5''''	4.35 (m)	4.32 (ddd, <i>J</i> = 2.3, 6.8, 9.6 Hz)	3.72 (m)	3.39 (m)
6''''	4.08 (dd, <i>J</i> = 1.9, 12.2 Hz)	4.08 (dd, <i>J</i> = 2.2, 12.2 Hz)	3.45 (m)	3.48 (m)
	4.18 (dd, <i>J</i> = 6.5, 12.2 Hz)	4.21 (dd, <i>J</i> = 6.8, 12.2 Hz)	3.69 (m)	3.65 (broad d, <i>J</i> = 11.2 Hz)
5-OH	12.88 (s)	12.91 (s)	12.96 (s)	12.91 (s)
4''-OH	13.22 (s)	13.20 (s)	13.21 (s)	13.16 (s)
7-OCH <sub>3</sub>	3.82 (s)	3.83 (s)	3.85 (s)	3.84 (s)
4'-OCH <sub>3</sub>	3.78 (s)	3.72 (s)	3.77 (s)	3.78 (s)
OCOCH <sub>3</sub>	1.59, 1.86, 1.98, 2.06 (s)	1.70, 1.87, 1.98, 2.05 (s)		

表3 <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) スペクトルデータ

position	3R	3S	4R	4R	position	3R	3S	4R	4R
2	163.6	163.5	163.9	163.9	9"	153.5	153.4	153.4	153.4
3	103.9	103.9	103.8	103.6	10"	105.3	105.9	104.7	104.9
4	181.7	181.8	181.9	181.7	1"	120.3	120.5	120.6	120.9
5	160.9	160.9	161.0	160.9	2"', 6"'	128.1	128.0	128.0	128.0
6	98.1	98.1	97.8	98.1	3"', 5"'	115.8	115.8	115.9	115.8
7	165.0	165.0	164.9	165.0	4"	161.5	161.4	161.7	161.8
8	92.7	92.7	92.7	92.5	1''''	96.1	97.1	99.6	99.6
9	157.2	157.2	157.3	157.2	2''''	70.0	70.0	73.2	72.9
10	104.6	104.7	104.5	104.7	3''''	71.8	71.7	76.7	76.6
1'	122.4	122.5	122.4	122.0	4''''	67.9	68.0	69.5	69.6
2'	130.4	130.8	131.5	130.8	5''''	71.0	71.1	77.0	77.1
3'	120.3	120.2	120.3	120.8	6''''	61.7	61.8	60.5	60.6
4'	160.2	159.8	160.1	160.4	7-OCH <sub>3</sub>	56.0	56.0	56.0	56.0
5'	111.8	111.5	111.4	111.6	4'-OCH <sub>3</sub>	55.9	56.0	55.8	55.9
6'	128.5	128.0	128.1	128.2	OCOCH <sub>3</sub>	19.8	19.9		
2"	164.1	164.1	163.7	163.6		20.2	20.2		
3"	102.6	102.6	102.3	102.5		20.4	20.4		
4"	182.1	182.1	182.0	182.0		20.4	20.4		
5"	160.8	160.7	160.8	160.7	OCOCH <sub>3</sub>	168.0			
6"	97.7	98.6	97.8	97.4		169.1	169.1		
7"	158.6	158.9	159.9	159.9		169.3	169.5		
8"	105.5	105.5	105.0	105.8		169.8	169		

*Ginkgo biloba* L. (イチョウ) から **1** の配糖体 ginkgetin 7"-O-β-D-glucopyranoside が報告されているが、立体配置に関する報告はなかった<sup>5)</sup>、アトロプ異性体を含め、それらの立体配置を詳細に解析した (表 1)。CD スペクトルにおいて、**4R** は負の第一 (336 nm)、負の第二 (307 nm) の Cotton 効果、**4S** は正の第一 (336 nm)、負の第二 (307 nm) の Cotton 効果を示した。CD 励起キラルリティー法を適用し、負のキラルリティーを示している **4R** を *R* 体、正のキラルリティーを示している **4S** を *S* 体と決定した。

β-Secretase 阻害活性試験において、**1** の IC<sub>50</sub> = 3.9 μM、および positive control である β-Secretase Inhibitor の IC<sub>50</sub> = 0.10 μM から試験の再現性を確認した<sup>1)</sup>。配糖体 **4R** では IC<sub>50</sub> = 17 μM であったが、配糖体 **4S** では IC<sub>50</sub> = 3.1 μM であった。**4S** は **4R** と比較して阻害活性が高く、有意傾向にある (*p* = 0.0596, Aspin-Welch の *t* 検定)。

**4S** は **1** に比べ水への溶解性が高いことから、配糖体化することにより、活性を減弱させることなく、溶解性の改善できることを明らかにした。

以上のことから、ビフラボノイドの配糖化が新たな創薬研究への可能性があることを示した。

#### 引用文献

- 1) Sasaki H., Miki K., Kinoshita K., Koyama K., Juliawaty L. D., Achmad S. A., Hakim E. H., Kaneda M., Takahashi K.: β-Secretase (BACE-1) inhibitory effect of biflavonoids., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20, 4558-4560 (2010).
- 2) Sasaki H., Kitoh Y., Miki K., Kinoshita K., Koyama K., Kaneda M., Takahashi K.: Structure-activity relationships of biflavonoids for β-secretase (BACE-1) inhibitory activity., *Heterocycles*, 85, 2749-2756 (2012).
- 3) Miki K., Nagai T., Suzuki K., Tsujimura R., Koyama K., Kinoshita K., Furuhata K., Yamada H., Takahashi K.: Anti-influenza virus activity of biflavonoids., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 772-775 (2007).
- 4) Yook C. S., Jung J. H., Jeong J. H., Nohara T., Chang S. Y.; Biflavonoids from the leaves of *Cephalotaxus koreana* nakai., *Nat. Prod. Sci.*, 6, 1-4 (2000).
- 5) Hyun S.K., Kang S.S., Son K.H., Chung H.Y., Choi J.S.: Biflavone glucosides from *Ginkgo biloba* yellow leaves., *Chem. Pharm. Bull.*, 53, 1200-1201 (2005).