

琉球大学学術リポジトリ

マダラチョウのメスとモンパノキとの相関に関する研究

メタデータ	言語: 出版者: 荻原和仁 公開日: 2009-12-25 キーワード (Ja): マダラチョウ, モンパノキ, ムラサキ科, ピロリチジンアルカロイド キーワード (En): danaid butterflies, Messerschmidia argentea, Boraginaceae, pyrrolizidine alkaloids 作成者: 荻原, 和仁, Ogihara, Kazuhito メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/14313

マダラチョウのメスとモンパノキ との相関に関する研究

(課題番号 10660114)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金
[基盤研究(C)(2)]研究成果報告書

平成13年3月

琉球大学附属図書館



0020024037659

著者 荻原 和 仁
大学理学部助教授)

は し が き

一般に、マダラチョウのオスは食草とはまったく無関係なムラサキ科の植物に飛来し、その汁を好んで吸う。オスのこの行動は、この植物から求愛行動を引き起こさせる化学物質（フェロモン）の前駆体であるピロリチジンアルカロイドを摂取するためのものである。このようなマダラチョウのオスの行動はpharmacophagous behaviorとして定義づけられている。

沖縄には、マダラチョウとして、アサギマダラ、リュウキュウアサギマダラ、カバマダラ、スジグロカバマダラ、ツمامラサキマダラおよびオオゴマダラが定着・生息し、そのオスも、オオゴマダラを除いて、例に漏れずムラサキ科のモンパノキに飛来してその汁を吸う。ところごとく最近、アサギマダラ、リュウキュウアサギマダラ、スジグロカバマダラおよびツمامラサキマダラのメスにも、モンパノキの汁を吸う行動が観察された。そこで、これらマダラチョウのメスがモンパノキの汁の中のどのような化学成分を摂取・代謝しているかを明らかにする目的で**基盤研究 (C) (2)**をスタートさせた。

研 究 組 織

研究代表者：荻原和仁（琉球大学理学部助教授）

研 究 経 費

平成10年度	2, 100千円
平成11年度	600千円
平成12年度	500千円

計	3, 200千円
---	----------

研究発表

(ア) 学会誌等

発表者

テーマ名：学会誌名、巻、頁（年）。

- (1) Kazuhito Ogihara
Pyrrolizidine Alkaloids from *Messerschmidia argentea* : *Phytochemistry*, **44**, 545 (1997).
- (2) Kazuhito Ogihara
Studies on Constituents from the Twigs of *Messerschmidia argentea* II: *Bull. Sci. Univ. Ryukyus*, **64**, 53 (1997).
- (3) Kazuhito Ogihara
Triterpenoids and Phytosteroids from the Leaves of *Cynanchum liukuense* : *Bull. Sci. Univ. Ryukyus*, **70**, 83 (2000).

(イ) 口頭発表等

発表者

テーマ名：学会等名、場所、年月。

- (1) 荻原和仁、仲里梨沙、比嘉松武、与儀誠一
モンパノキに含まれるDP PHラジカルスカベンジャーの構造：第2回沖縄フリーラジカル研究会、沖縄、平成11年7月。
- (2) 荻原和仁、比嘉松武、与儀誠一
モンパノキの成分について：第248回日本農芸化学会西日本支部大会、沖縄、平成12年10月。
- (3) 新屋敷博人、荻原和仁、比嘉松武、与儀誠一
コウシュンウマノスズクサの成分について：第248回日本農芸化学会西日本支部大会、沖縄、平成12年10月。

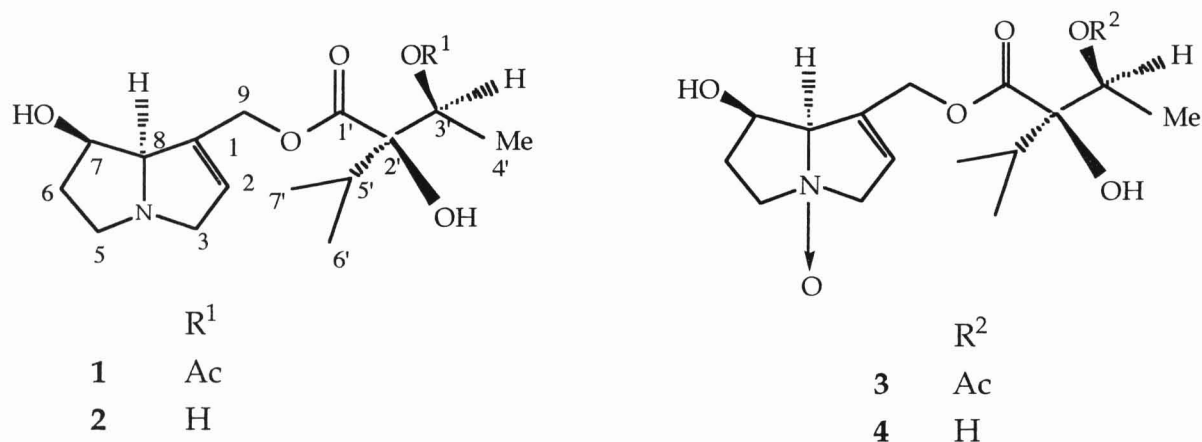
研究成果

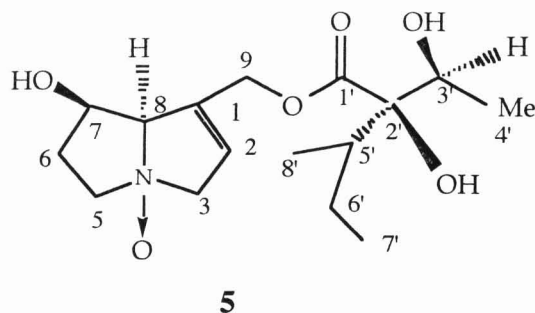
(1) マダラチョウ類のメスが摂食するモンパノキの汁の化学成分

モンパノキの小枝を水で抽出し、得られた水抽出物についてマダラチョウ類のメスに対する摂食刺激活性試験を行なった。その結果、水抽出物について摂食行動が観察された。そこで、摂食試験を併用しながら水抽出物を Sephadex G-25 でゲルろ過し、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフし、摂食刺激活性を示す塩基性画分を得た。以上の操作と試験結果から、マダラチョウ類のメスが摂食しているモンパノキの汁の化学成分は塩基性成分であることが明らかとなった。

(2) マダラチョウ類のメスが摂食しているモンパノキの汁の塩基性成分の構造

マダラチョウ類のメスが摂食しているモンパノキの汁の塩基性画分の成分組成を明らかにする目的で、塩基性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフし、化合物 1 ~ 6 を得た。化合物 1 ~ 4 の構造は各種スペクトルデータを標品のそれらと比較することにより pyrrolizidine alkaloid 誘導体 (PAs) である 3'-acetylindicine (1), indicine (2), 3'-acetylindicine-*N*-oxide (3), indicine-*N*-oxide (4) と同定した。

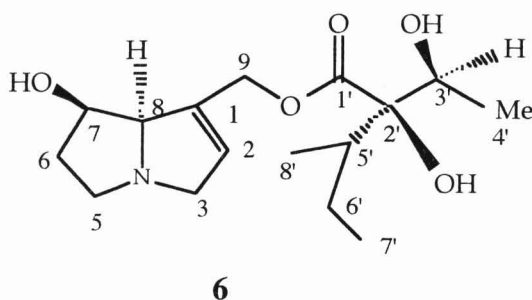




化合物 **5** は油状物で、その比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 9^\circ$ (c 0.2, CHCl_3) であった。分子式は高分解能質量分析 (HRMS : m/z 313.1847 $[\text{M}]^+$) の結果から、 $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ と決定された。化合物 **5** の ^1H および ^{13}C NMR スペクトルを indicine (**2**) のそれらと比較すると、ネシン酸部を除いて良く一致した。このことから、**5** もネシン部分を retronecine とした PA 誘導体と推定された。EIMS において化合物 **5** の分子イオンピークは indicine (**2**) のそれより 14 マスユニット大きい m/z 313 に観測された。また、 ^1H NMR スペクトルを **2** のそれと比較すると、**2** のネシン酸部分に由来するシグナルのうち、 δ_{H} 0.96 の H-15 に由来する doublet ($J=7$ Hz) が化合物 **5** のスペクトルでは消失し、新たに δ_{H} 0.92 および 1.25 に triplet ($J=7.5$ Hz) および multiplet がそれぞれ観測された。これらの観測事実は、化合物 **5** の構造が **2** のネシン酸部分のイソプロピル基の一方のメチル基がエチル基に置換した構造であることを示唆する。このことは、H-H COSY スペクトルにおいて、 δ_{H} 0.95 の H-17 による doublet と δ_{H} 1.87 の H-14 による quartet of doublet との間にクロスピークが、また、 δ_{H} 1.87 の H-14 による quartet of doublet と δ_{H} 1.25 の H-15 による multiplet との間にクロスピークが、さらに、 δ_{H} 1.25 の H-15 による multiplet と δ_{H} 0.92 の H-16 による triplet との間にクロスピークがそれぞれ観測されたことから支持される。また、HMBC スペクトルにおいて、 δ_{H} 0.92 の H-16 による triplet と δ_{C} 29.7 の C-15 によるシグナルとの間に ^2J 結合相関によるクロスピークが、また、 δ_{H} 0.92 の H-16 による triplet と δ_{C} 39.3 の C-14 によるシグナルとの間に ^3J 結合相関によるク

ロスピークが、さらに、 δ_{H} 0.95 のH-17 によるdoublet と δ_{C} 39.3 のC-14 によるシグナルとの間に²J結合相関によるクロスピークがそれぞれ観察されたことも、化合物 **5** の構造が **2** のネシン酸部分のイソプロピル基の一方のメチル基がエチル基に置換した構造であることをさらに支持する。

以上の結果から、化合物 **5** の構造を {1R-[1 α , 7 α β]}-2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-pentanoic acid (2, 3, 5, 7a-tetrahydro-1-hydroxy-1H-pyrrolozine-7-yl) methyl ester (**5**) と決定した。



化合物 **6** は無色オイル状として得られ、その比旋光度は $[\alpha]_{22}^{\text{D}} +50^{\circ}$ (c 0.2, CHCl_3) であった。化合物 **6** の分子式は、HRMS におけるm/z 313. 1847 のイオンピークから、 $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_5$ と推定された。IR スペクトルは 3400 cm^{-1} に水酸基、 1735 および 1220 cm^{-1} にエステルによる吸収を示した。化合物 **6** の MS が化合物 **5** のそれとよく類似していたことから **6** も pyrrolizidine alkaloid (PA) 誘導体と推定された。PA はネシン塩基と呼ばれる部位とネシン酸と呼ばれる部位から構成されている。そこで、各部位毎に構造を決定した。

ネシン塩基部については、¹H-NMR スペクトルにおいて δ 5.81 (1H, s) にオレフィンプロトンによるシグナル、¹³C-NMR スペクトルにおいて δ_{C} 123.57 および 133.48 にオレフィン炭素によるシグナルがそれぞれ観測されたこと、また、 δ_{H} 4.68 の 8 位のプロトンによるシグナルが、singlet で観測されたことから、ネシン塩基部は retronecine と推定された。また、**6** の¹H-NMRスペクトルを **5** のそれと比較すると、**5** のスペクトルにおい

て δ_{H} 3.45 (1H, br d, $J=16.0$ Hz) および 3.95 (1H, br d, $J=16.0$ Hz) の 3 位のプロトンに帰属されるシグナルが、化合物 **6** では δ_{H} 4.40 (1H, br d, $J=16.2$ Hz) および 4.53 (1H, d, $J=16.2$ Hz) で観測された。化合物 **5** において δ_{H} 2.75 (1H, ddd, $J=11.5, 9.0, 6.0$ Hz) および 3.28 (1H, t, $J=7.5$ Hz) の 5 位のプロトンに帰属されるシグナルが、化合物 **6** では δ 3.64 (1H, ddd, $J=11.8, 7.0, 2.7$ Hz) および 3.76 (1H, dt, $J=11.8, 5.6$ Hz) でと低磁場側で観測された。 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて両者を比較すると、**5** の δ_{C} 62.82 (C-3)、53.65 (C-5) ならびに 78.56 (C-8) の炭素シグナルは、**6** では δ_{C} 79.01 (C-3)、70.04 (C-5) ならびに 97.30 (C-8) と、16–19 ppm 低磁場側で観測された。これは化合物 **6** の窒素原子に電気陰性度の高い酸素が結合していることを示唆し、**6** が retoronesine ester *N*-oxide 骨格を有することを示す。従って、ネシン部は retronecine-*N*-oxide と決定され、**6** の分子式も推定分子式より酸素が 1 つ多い $\text{C}_{16}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ と決定された。

ネシン酸部については、**6** の ^1H -および ^{13}C -NMR スペクトルは、1 個のカルボニル炭素 (δ_{C} 175.75)、水酸基の結合した 4 級炭素 (δ_{C} 84.73)、Me-CH(OH) 部 [δ_{H} 4.08 (1H, q, $J=6.4$ Hz) および 1.15 (3H, d, $J=6.4$ Hz)、ならびに δ_{C} 70.24 および 17.33] および 1-methylpropyl 基 [δ_{H} 0.91 (3H, t, $J=7.5$ Hz)、0.93 (3H, d, $J=6.5$ Hz)、1.23 (1H, ddd, $J=13.5, 7.5, 7.0$ Hz)、1.40 (1H, ddd, $J=13.5, 7.5, 2.7$ Hz) および 1.77 (1H, ddq, $J=7.0, 6.5, 2.7$ Hz) ならびに δ_{C} 12.84、13.15、25.14 および 41.17] の存在を示唆し、すでに本植物から単離されている化合物 **5** のネシン酸部のそれらと比較するとよく一致した。従って、化合物 **6** のネシン酸部の構造は、2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl-pentanoic acid と決定された。COSY、HMQC および HMBC からネシン塩基部およびネシン酸部の構造が支持された。化合物 **6** を希硫酸中で亜鉛を用いて還元すると、化合物 **5**

を与えた。

以上の結果から、化合物 **6** を 2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl-pentanoic acid retronecine ester *N*-oxide (**6**)と決定した。

(3) モンパノキの塩基性画分から単離されたpyrrolizidine alkaloids(1 – 6) に対するマダラチョウ類の成虫の摂食刺激活性試験

(ア) スジグロカバマダラ (*Salatura genutia*)の成虫の摂食刺激活性物質

スジグロカバマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質およびオスの成虫に対するpharmacophagous behavior刺激活性物質を明らかにする目的で、6種類のpyrrolizidine alkaloids (PAs) **1 – 6** の個々についてメスとオスに対する摂食刺激活性試験を行った。Table 1 に、スジグロカバマダラのメス

Table 1. Consumption rate (%) * of pyrrolizidine alkaloids **1-6** from the twigs of *M. aregentea* by male and female butterflies of *Salatura genutia*.

sample	female		male	
	Consumption rate	<i>p</i>	Consumption rate	<i>p</i>
3'-acetylindicine (1)	0		93.2±0.5	< 0.0001
indicine (2)	0		93.7±1.0	< 0.0001
3'-acetylindicine- <i>N</i> -oxide (3)	0		98.3±0.5	< 0.0001
indicine- <i>N</i> -oxide (4)	98.2±0.4	< 0.0001	97.8±0.5	< 0.0001
alkaloid 5	0		0	
alkaloid 5 N -oxide (6)	0		0	
1+2+3+4+5+6	98.3±0.4	< 0.0001	98.0±0.9	< 0.0001

* Consumption rate (%) was determined by the following equation:

$$\text{Consumption rate (\%)} = [(A-R)/A] \times 100,$$

A: amount of a sample applied on the glass plate before testing,

R: amount of a sample remained on the glass plate after testing.

p: Sign test

とオスの6種類のPAs(1-6)の摂食率を示す。スジグロカバマダラのメスはindicine-*N*-oxide(4)のみを摂食し、一方、オスはPAs 1-4を摂食した。

以上の結果から、モンパノキに含まれる4がスジグロカバマダラのメスに対する摂食刺激活性物質であることが明らかとなった。また、PAs 1-4がオスに対するpharmacophagous behavior刺激活性物質であることも明らかとなった。また、スジグロカバマダラのメスは1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、メスはモンパノキから選択的に4のみを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。同様に、野外においても、オスはモンパノキから選択的に1-4だけを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。

(イ) リュウキュウアサギマダラ (*Ideopsis similis*)の成虫の摂食刺激活性物質

リュウキュウアサギマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質およびオスの成虫に対するpharmacophagous behavior刺激活性物質を明らかにする目的で、6種のPAs 1-6の個々についてメスとオスに対する摂食刺激活性試験を行った。Table 2に、リュウキュウアサギマダラのメスとオスのPAs 1-6の摂食率を示す。リュウキュウアサギマダラのメスは3'-acetylandicine-*N*-oxide(3)とindicine-*N*-oxide(4)を摂食した。一方、オスは3'-acetylandicine-*N*-oxide(3)のみを摂食した。

以上の結果から、モンパノキに含まれる3と4がリュウキュウアサギマダラのメスに対する摂食刺激活性物質であることが明らかとなった。また、4がオスに対するpharmacophagous behavior刺激活性物質であることが明らかとなった。また、リュウキュウアサギマダラのメスもオスも1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、メスはモンパノキから選択

Table 2. Consumption rate (%) * of pyrrolizidine alkaloids 1-6 from the twigs of *M. aregentea* by male and female butterflies of *Ideopsis similis*

sample	female		male	
	Consumption rate	<i>p</i>	Consumption rate	<i>p</i>
3'-acetyлиндicine (1)	0		0	
indicine (2)	0		0	
3'-acetyлиндicine- <i>N</i> -oxide (3)	98.1±0.2	< 0.0001	97.9±0.2	< 0.0001
indicine- <i>N</i> -oxide (4)	98.1±0.1	< 0.0001	0	
alkaloid 5	0		0	
alkaloid 5 <i>N</i> -oxide (6)	0		0	
1+2+3+4+5+6	98.3±0.4	< 0.0001	98.3±0.4	< 0.0001

* Consumption rate (%) was determined by the following equation:

$$\text{Consumption rate (\%)} = [(A-R)/A] \times 100,$$

A: amount of a sample applied on the glass plate before testing,

R: amount of a sample remained on the glass plate after testing.

p: Sign test

的に3と4のみを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。同様に、野外においても、オスはモンパノキから選択的に3のみを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。

(ウ) ツマムラサキマダラ (*Euploea mulciber*) の成虫の摂食刺激活性物質

ツマムラサキマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質およびオスの成虫に対するpharmacophagous behavior刺激活性物質を明らかにする目的で、6種のPAs 1-6の個々についてメスとオスに対する摂食刺激活性試験を行った。Table 3に、ツマムラサキマダラ成虫のメスとオスPAs 1-6の摂食率を示す。ツマムラサキマダラ成虫の雌雄とも1-4を摂食した。

Table 3. Consumption rate (%) * of pyrrolizidine alkaloids 1-6 from the twigs of *M. aregentea* by male and female butterflies of *IEuploea mulciber*

sample	female		male	
	Consumption rate	<i>p</i>	Consumption rate	<i>p</i>
3'-acetyлиндicine (1)	97.9±0.1	< 0.0001	93.7±0.1	< 0.0001
indicine (2)	97.9±0.1	< 0.0001	93.9±0.1	< 0.0001
3'-acetyлиндicine- <i>N</i> -oxide (3)	97.9±0.1	< 0.0001	97.9±0.1	< 0.0001
indicine- <i>N</i> -oxide (4)	98.1±0.1	< 0.0001	98.1±0.1	< 0.0001
alkaloid 5	0		0	
alkaloid 5 <i>N</i> -oxide (6)	0		0	
1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6	98.4±0.4	< 0.0001	98.3±0.4	< 0.0001

* Consumption rate (%) was determined by the following equation:

$$\text{Consumption rate (\%)} = [(A-R)/A] \times 100,$$

A: amount of a sample applied on the glass plate before testing,

R: amount of a sample remained on the glass plate after testing.

p: Sign test

以上の結果から、モンパノキに含まれる1-4がツマムラサキマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質およびオスの成虫に対する pharmacophagous behavior 刺激活性物質であることが明らかとなった。また、ツマムラサキマダラのメスもオスも1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、メスおよびオスはモンパノキから1-4だけを選択的に摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。

(I) アサギマダラ (*Parantica sita*) の成虫の摂食刺激活性物質

アサギマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質およびオス成虫に対する pharmacophagous behavior 刺激活性物質を明らかにする目的で、6種類の PAs 1-6 の個々についてメスとオスに対する摂食刺激活性試験を行った。

Table 4 に、アサギマダラ成虫のメスとオスの6種類のPAs 1-6 の摂食率を示す。アサギマダラの成虫のメスは3'-acetylindicine-*N*-oxide (3)およびindicine-*N*-oxide (4)を摂食し、一方、オスはPAs 1-4 を摂食した。

Table 4. Consumption rate (%) * of pyrrolizidine alkaloids 1-6 from the twigs of *M. aregentea* by male and female butterflies of *Parantica sita*

sample	female		male	
	Consumption rate	<i>p</i>	Consumption rate	<i>p</i>
3'-acetylindicine (1)	0		98.3±0.1	< 0.0001
indicine (2)	0		98.3±0.1	< 0.0001
3'-acetylindicine- <i>N</i> -oxide (3)	93.2±0.1		98.3±0.1	< 0.0001
indicine- <i>N</i> -oxide (4)	93.2±0.1	< 0.0001	98.3±0.1	< 0.0001
alkaloid 5	0		0	
alkaloid 5 <i>N</i> -oxide (6)	0		0	
1+2+3+4+5+6	93.3±0.1	< 0.0001	98.0±0.9	< 0.0001

* Consumption rate (%) was determined by the following equation:

$$\text{Consumption rate (\%)} = [(A-R)/A] \times 100,$$

A: amount of a sample applied on the glass plate before testing,

R: amount of a sample remained on the glass plate after testing.

p: Sign test

以上の結果から、モンパノキに含まれる3と4がアサギマダラのメスの成虫に対する摂食刺激活性物質であることが明らかとなった。また、PAs 1-4のどれもがオスに対するpharmacophagous behavior刺激活性物質であることが明らかとなった。また、アサギマダラのメスが1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、メスはモンパノキから選択的に3と4のみを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。同様に、オスもまた1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、オスはモンパノキから選択的に1-4だけを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食して

いることがそれぞれ示唆された。

(オ) カバマダラ (*Anosia chrysippus*) の成虫の摂食刺激活性

野外および研究室の飼育室でカバマダラのメスがモンパノキに飛来するところを著者は一度も観察したことがない。このことから、モンパノキにはカバマダラのメスに対する摂食刺激物質がないと考えられる。そこで、メスがモンパノキに含まれるalkaloidsを摂食しないことを確認する目的とオスに対する摂食刺激活性物質を明らかにする目的で、PAs 1-6 の個々についてメスとオスに対する摂食刺激活性試験を行った。Table 5に、カバマダラのメスとオスの PAs1-6 の摂食率を示す。カバマダラのメスは PAs1-6 のいずれも摂食しなかった。一方、オスはindicine-*N*-oxide (4) のみを摂食した。

Table 5. Consumption rate (%) * of pyrrolizidine alkaloids 1-4 from the twigs of *M. aregentea* by male and female butterflies of *Anosia chrysippus*

sample	female		male	
	Consumption rate	<i>p</i>	Consumption rate	<i>p</i>
3'-acetylindicine (1)	0		0	
indicine (2)	0		0	
3'-acetylindicine- <i>N</i> -oxide (3)	0		0	
indicine- <i>N</i> -oxide (4)	0		98.1±0.4	< 0.0001
alkaloid 5	0		0	
alkaloid 5 <i>N</i> -oxide (6)	0		0	
1+2+3+4+5+6	nt		98.1±0.2	< 0.0001

* Consumption rate (%) was determined by the following equation:

$$\text{Consumption rate (\%)} = [(A-R)/A] \times 100,$$

A: amount of a sample applied on the glass plate before testing,

R: amount of a sample remained on the glass plate after testing.

p: Sign test.

以上結果から、モンパノキに含まれる4がオスに対するpharmacophagous behavior刺激活性物質であることが明らかとなった。

また、カバマダラのオスも1-6の混合物も完全に摂食したことから、野外においても、オスはモンパノキから選択的に4のみを摂食するのではなく、モンパノキに含まれる全ての種類のPAsを摂食していることが示唆された。

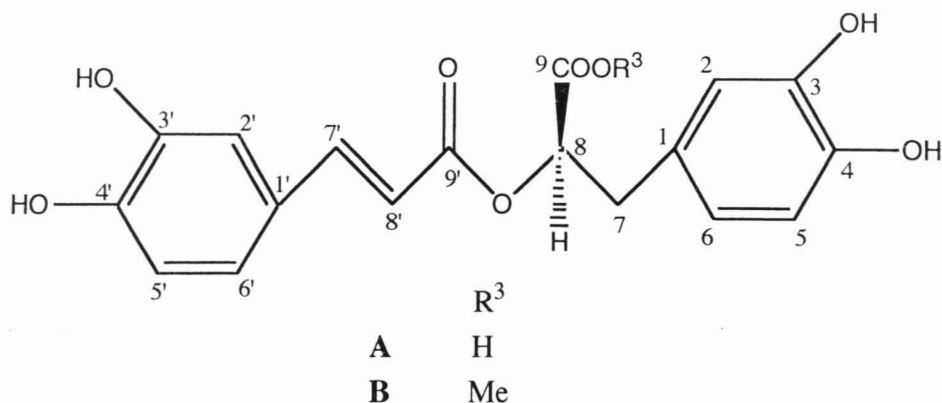
以上の5種類のマダラチョウに関する研究結果から、モンパノキに含まれるマダラチョウのメスの成虫に対する摂食刺激物質はチョウの種によって異なることが明らかとなった。また、モンパノキに含まれるオスの成虫に対するpharmacophagous behavior 刺激物質とメスの成虫に対する摂食刺激物質とは同種内でも異なることが明らかとなった。

(4) モンパノキに含まれるその他の成分

(ア) 抗酸化物質 (成分) の構造

モンパノキの葉および小枝の水抽出物にDPPHラジカルスカベンジャー作用が観察されたので、小枝および葉に含まれる抗酸化活性を有する成分の検索を行った。

モンパノキの新鮮小枝を水で抽出し、抽出液を濃縮後メタノールを加え、メタノール可溶部と不溶部とに分けた。DPPHラジカルスカベンジャー作用を指標にメタノール可溶部を各種カラムクロマトグラフィーで分画・精製し、抗酸化活性を有する4種の化合物A-Eを得た。これらの化合物の構造は、そのIR, MS, 1Dおよび2D NMRの解析ならびに化学誘導から同定した。



化合物 A は褐色無定形固体として得られ、比旋光度は $[\alpha]_D +86.3^\circ$ (c 0.4, MeOH) であった。IR スペクトルは、 3600 cm^{-1} の水酸基による吸収と 1715 cm^{-1} にカルボニル基による吸収を示し、カルボキシル基の存在を示唆した。また、IR スペクトルは 1680 cm^{-1} に共役カルボニルによる吸収と 1350 から 1100 cm^{-1} にエステルの特性吸収を示し、化合物 8 が共役エステルの誘導体であることも示唆した。さらに、IR スペクトルは 1600 および 1500 cm^{-1} に芳香環による吸収を示し、化合物 A が芳香族化合物であることも示唆した。

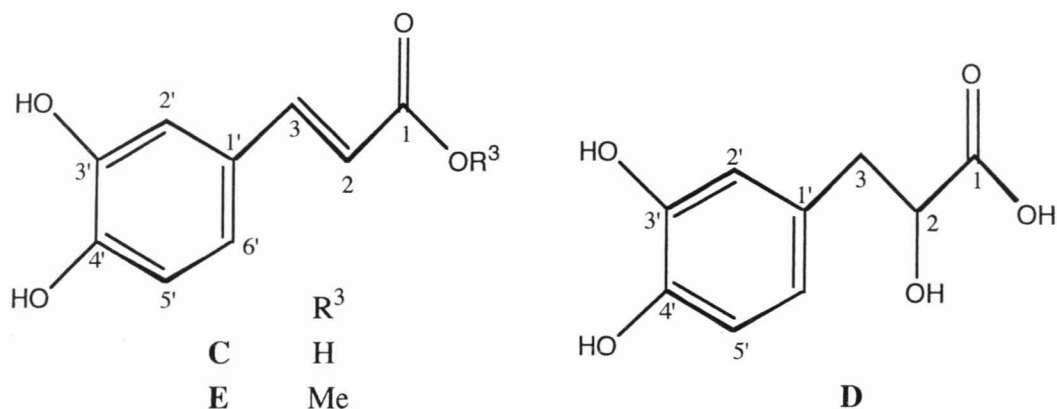
化合物 A の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、 $\delta_{\text{H}} 7.41$ (1H, d, $J=15.9\text{ Hz}$) および 6.17 (1H, d, $J=15.9\text{ Hz}$) に互いにトランス結合した共役オレフィンプロトンによるシグナル、 $\delta_{\text{H}} 6.67$ (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$)、 6.81 (1H, dd, $J=7.8, 2.2\text{ Hz}$)、 6.93 (1H, d, $J=2.2\text{ Hz}$) に AMX パターンの芳香環プロトンによるシグナルを示した。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルは $\delta_{\text{H}} 146.27$ と 149.81 に酸素原子が結合した芳香環炭素によるシグナルを示した。これらのことから、化合物 A が部分構造として 3',4'-dihydroxycinnamic acid 部位を有することが示唆された。

さらに、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは $\delta_{\text{H}} 6.53$ (1H, dd, $J=7.8, 2.2\text{ Hz}$)、 6.59 (1H, d, $J=7.8\text{ Hz}$)、 6.68 (1H, d, $J=2.2\text{ Hz}$) にもう 1 組の AMX パターンの芳香環プロトンによるシグナル、 $\delta_{\text{H}} 5.00$ (1H, dd, $J=9.5, 3.5\text{ Hz}$) に酸素原子に結合した不斉炭素に結合しているプロトンと、それに隣接したメチレ

ンプロトンの結合による ABX パターンのシグナルがそれぞれ観測された。¹³C-NMR スペクトルにおいても、 δ_c 147.14, 145.25 にさらにもう 1 組の酸素原子が結合した芳香環炭素によるシグナルが観測された。

これらのことは化合物 A が部分構造として 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-lactic acid 部位を有することを示唆する、これらの結果は COLOC スペクトルの解析結果および EI-MS スペクトルによる、3',4'-dihydroxycinnamic acid 部位に由来する m/z 180 およびに 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-lactic acid 部位に由来する m/z 198 のフラグメントピークイオンの存在からも示唆される。

以上の結果から、化合物 A は 3',4'-dihydroxycinnamic acid と 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-lactic acid とのエステルであることが推定された。次に、両者の結合位置を調べる目的で化合物 A をメタノール中でピリジンを触媒に無水酢酸と反応させ、水酸基のアセチル化と同時にカルボキシル基のメチル化を行った。この反応で得られた化合物 (Aa) の ¹H-NMR スペクトルは δ_H 2.31, 2.30, 2.28 および 2.27 に 4 本のアセチル基によるシグナルを示し、そのケミカルシフト値からフェノール性の水酸基のみがアセチル化されたことが確認された。このことは 3',4'-dihydroxycinnamic acid 部のカルボキシル基と 3-(3',4'-dihydroxyphenyl)-lactic acid 部の 2 位の水酸基とが縮合していることを示し、以上から化合物 A の構造を rosmarinic acid と推定した。化合物 A の物理定数および各種スペクトルデータを R-(+)-rosmarinic acid の文献値と比較した結果一致した。したがって化合物 A を R-(+)-rosmarinic acid (A) と同定した。

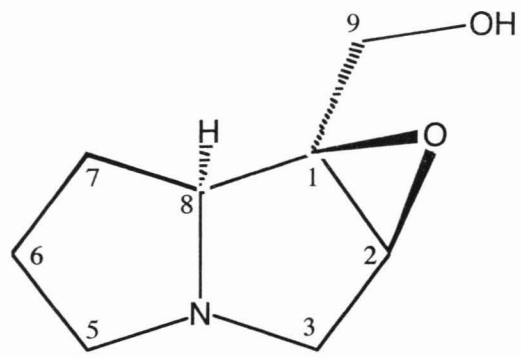


同様な方法によって化合物B-Eの構造を、*R*-(+)-rosmarinic acid methyl ester (B)、caffeic acid (C)、3-(3', 4'-dihydroxyphenyl)-lactic acid (D)、および caffeic acid methyl ester (E)とそれぞれ同定した。化合物A-Dならびに一般に知られている抗酸化物質であるアスコルビン酸のDPPHラジカル消去能を比較した。それぞれのED₅₀は、A (44 μ g/ml、122 μ M)、B (63 μ g/ml、169 μ M)、C (100 μ g/ml、500 μ M)、D (90 μ g/ml、455 μ M)、アスコルビン酸 (90 μ g/ml、511 μ M) であり、*R*-(+)-rosmarinic acid (A) およびそのメチルエステル (B) はアスコルビン酸より強い抗酸化力をもつことが示された。

(イ) モンパノキの葉に含まれるPAsの構造

モンパノキの小枝の抽出操作に従って、葉を水で抽出し、得られた水抽出物をSephadex G-25でゲルろ過し、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフし、塩基性画分を得た。さらに、塩基性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフし、既に小枝から単離されている化合物2の他に化合物7を得た。

化合物7の構造を分光分析学的手法を用いて推定し、その物理定数および各種スペクトルデータを文献値と比較することにより、PA誘導体である1 β ,2 β -epoxy-1 α -hydroxymethyl-8 α -pyrrolizidine (7) と同定した。



(7)

(別添様式3)

平成 12 年度科学研究費補助金研究成果報告書概要

琉球大学

1. 研究機関番号 1:8:0:0:1 2. 研究機関名

3. 研究種目名 基盤研究(C)(2) 4. 研究期間 平成10年度~平成12年度

5. 課題番号 1:0:6:6:0:1:1:4

6. 研究課題名 マダラチョウのメスとモンパノキとの相関に関する研究

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
00194481	刈册 オギハラカズヒト 萩原, 和仁	理学部	助教授

8. 研究分担者 (所属機関名は、研究代表者の所属機関と異なる場合に記入すること)

研究者番号	研究分担者名	所属機関名・所属部局名	職名
	刈册		
	刈册		
	刈册		
	刈册		
	刈册		

9. 研究成果の概要 (当該研究期間のまとめ 600字~800字 図 グラフ等は記載しないこと)

1. モンパノキからマダラチョウのメスの摂食刺激物質の単離—モンパノキの小枝を蒸留水で抽出後、得られた水抽出物をスジグロカバマダラのメスに対する摂食刺激活性を指標にゲルろ過およびシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、スジグロカバマダラのメスに対して強い摂食刺激活性を示す塩基性の画分を得た。この塩基性の画分をさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、6種のピロリチジンアルカロイド (1-6) を単離した。化合物1-6の構造を分光分析学的常法を用いて、それぞれ 3'-acetylindicine (1), indicine (2), 3'-acetylindicine N-oxide (3), indicine N-oxide (4), 6'-methylindicine (5)および6'-methylindicine N-oxide (6)と決定した。

2. マダラチョウのメスに対するピロリチジンアルカロイド (1-6) の摂食刺激活性試験結果—沖縄に棲息する5種のマダラチョウ (スジグロカバマダラ、リュウキュウアサギマダラ、カバマダラ、ツمامラサキマダラおよびアサギマダラ) のメスに対する1-6の摂食刺激活性試験を行った結果、スジグロカバマダラに対して4に、リュウキュウアサギマダラに対して3および4に、ツمامラサキマダラに対して1-4に、アサギマダラに対して3および4に、それぞれ摂食刺激活性が観測された。カバマダラのメスに対してはいずれの化合物でもその活性が観測されなかった。以上の結果から、モンパノキに含まれるマダラチョウのメスに対する摂食刺激物質はマダラチョウの種によって異なることが明らかとなった。また、マダラチョウのオスに対するモンパノキに含まれるpharmacophagous behavior 刺激物質を調べ比較した結果、モンパノキに含まれるオスのpharmacophagous behavior 刺激物質とメスの摂食刺激物質とは同種間でも異なることが明らかとなった。マダラチョウの雌によって摂取されたピロリチジンアルカロイドの行方については2種のチョウについて明らかになりつつあるが、マダラチョウ全体としての結論を得ることはまだできず、なお現在研究中である。

10. キーワード

- (1) マダラチョウ (2) モンパノキ (3) ムラサキ科
 (4) ピロリチジンアルカロイド (5) (6)
 (7) (8) (裏面に続く)

ABSTRACTS OF RESEARCH PROJECT, GRANT-in-AID FOR SCIENTIFIC RESEARCH (C)

1. RESEARCH INSTITUTION NUMBR: 18001
2. RESEARCH INSTITUTION:UNIVERSITY OF THE RYUKYUS
3. CATEGORY: Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (2)
4. TERM OF PROJECT (1998 ~ 2000)
5. PROJECTION NUMBER: 10660114
6. TITLE OF PROJECT: Studies on Relationship Between Females of Danaid Butterflies and *Messerschmidia argentea*
7. HEAD INVESTIGATOR

REGISTERED NUMBER	MANE	DEPARTMENT,TITLE OF POSITION
00194481	Ogihara, Kazuhito	Science, Associate Professor

8. INVESTIGATORS

REGISTERED NUMBER	MANE	INSTITUTION, DEPARTMENT,TITLE OF POSITION
-------------------	------	---

9. SUMMARY OF RESEARCH RESULTS

Male danaid butterfly of many species is well-known to visit Boraginaceae plants and sucks with its proboscis the pyrrolizidine alkaloids-containing exudation, which was defined as pharmacophagous behavior. The male stores the alkaloids as defensive substances and/or manufactures aphrodisiacal substances from the alkaloids and uses them in its courtship display to attract the female butterfly. The males of danaid butterflies such as *Salatura genutia* (CRAMER), *Ideopsis similis* (LINNAEUS), *Euploea mulciber* (CRAMER), *Parantica sita* (KOLLAR), and *Anosia chrysippus* (LINNAEUS) which inhabit in Okinawa also visited *Messerschmidia argentea* Johnst (Boraginaceae) and sucked dewdrops on the fresh twigs and their own saliva on the dead twigs of the plant. In some species, the same pharmacophagous behavior is observed for not only the male butterflies but also the female ones. I examined the differential effects of constituents from *M. argentea* on pharmacophagous behavior of the male and female danaid butterflies.

A water extract of the twigs of *M. argentea* was subjected to gel filtration chromatography on Sephadex G-25 and then column chromatography on silica gel to give a basic fraction which stimulated ingestion of it by the male and female butterflies. The fraction was, moreover, subjected to preparative TLC to give four pyrrolizidine alkaloids (PAs) such as 3'-acetylandicine (1), indicine (2), 3'-acetylandicine-*N*-oxide (3), indicine-*N*-oxide (4), 6'-methylandicine (5), and 6'-methylandicine-*N*-oxide (6).

Phagostimulant tests of PAs 1-6 against the adult males and females of danaid butterflies were done. The male butterflies of *S. genutia* ingested 1-4. The female ones ingested only 4, but did a sample mixed 4 such as 1 + 2 + 3 + 4 + 5 + 6. Thus, each of the alkaloid 1-4 was a stimulant of the pharmacophagous behavior into the males of *S. genutia* and 4 into the females. On the basis of phagostimulant test for other butterflies, the alkaloid 3 was found to be a stimulant of the pharmacophagous behavior into the males of *I. similis*, 3 and 4 into of the females of *I. similis*. Each of the alkaloid 1-4 was a stimulant of the pharmacophagous behavior into the males and females of *E. mulciber*. Each of the alkaloid 1-4 was a stimulant of the pharmacophagous behavior into the males of *P. sita* and 3 and 4 into females of *P. sita*. The alkaloid 4 was a stimulant of the pharmacophagous behavior into of the males of *A. chrysippus*. The female butterflies of *A. chrysippus* was not stimulated by the water extract and each pyrrolizidine alkaloid.

10. KEY WORDS

- (1) danaid butterflies (2) Messerschmidia argentea (3) Boraginaceae
(4) pyrrolizidine alkaloids