

# 精密構造認識に基づくアントシアニンの分子会合

名古屋大学大学院農学研究科

博士論文 主論文

1992年4月

吉田 久美



## 目 次

	頁
緒言	1
第1章 アントシアニンの高速液体クロマトグラフィーによる分析	11
1. 1 序	11
1. 2 逆相カラムと3次元検出器を用いたアントシアニンの分析	13
1. 3 まとめ	24
第2章 ツユクサ青色花卉色素コンメリニンの構造	25
2. 1 序	25
2. 2 フラボンの自己会合	29
2. 2. 1 フラボコンメリニンの単離精製	31
2. 2. 2 フラボコンメリニンの自己会合	32
2. 3 コンメリニンの構造	45
2. 3. 1 コンメリニン及びコンメリニン様色素の再合成	45
2. 3. 2 コンメリニンにおけるコピグメンテーション	56
2. 3. 3 コンメリニンのX線結晶構造解析	71
2. 3. 4 コンメリニンにおける分子会合	80
2. 4 ツユクサ花卉の発色機構	88
2. 4. 1 ツユクサ紫色変種花卉の成分	89
2. 4. 2 ツユクサ花卉における青色と紫色の発現機構	91
2. 5 まとめ	103

第3章 アシル化アントシアニンの分子会合	105
3. 1 序	105
3. 2 リンドウ青色花弁色素ゲンチオデルフィンの分子内会合と安定化	108
3. 2. 1 ゲンチオデルフィンの溶液中のコンフォーメーション	110
3. 2. 2 コンピュータモデリングによるゲンチオデルフィンのコンフォーメーション解析	120
3. 3 紫ヤム色素アラタニンの分子会合	124
3. 3. 1 アラタニンの単離精製	125
3. 3. 2 アラタニンの構造	125
3. 3. 3 アラタニンの分子会合と安定性	131
3. 4 まとめ	144
結語	146
実験の部	148
文献	188
謝辞	

## 緒言

植物と色の呼び方には、洋の東西を問わず深いつながりがある。牡丹色、橙色、萌黄色、茄子紺、朽葉色、ヴァイオレット、ローズピンク、エヴァーグリーン……。しかし、微妙な色合いを区別して色を表現する語彙の多彩さにかけては、西欧人は遠く日本人に及ばないという。虹彩の色の違いによるもので、日本人の黒目は、西洋人の薄いブルーやグリーンが目よりも、僅かな色の差をより繊細に識別できるためだそう。ともあれ、自然に溢れる美しい色を、何とかして自分のものにし、永遠にとどめたいという望みから、染色技術もうまれたのであろう。植物の色の中でも、高等植物の花色は、白色、黄色から赤、紫、青まで多種類で、いずれも鮮やかで澄んだ色を示す。「なぜ、あれほどの様々な色が存在し得るのか。」、「何の違いによるのだろうか。」あるいは、「何のために花は色をもつのか。」と誰もが一度は疑問に考えたことと思う。

天然物化学の原点は自然にあり、この研究は人が自然に向かったときに沸き起こる素朴な「なぜ？」に対する答えを見つけだすことだと考える。ただし、その研究の標的は物質関与の生命現象であり、有機化学の言葉を使い、関与する物質の構造を明らかにすることにより、その機構の解明をしようとするものである。この領域で最も古くから行なわれてきたのは、自然からの物質の抽出、構造決定である。その初期には、毒、薬、色、匂いなどの生体への際だった活性を有する物質の単離、構造決定に関する研究が行なわれた。その後、天然からは微量しか得られないために、構造があいまいな化合物の構造決定のため、その物質の物性、生理作用をさらに詳しく知るため、そして、その活性を越える作用をもつ化合物を得るために有機合成化学も巻き込んで発展してきた。

自然現象のうち、色はもっとも直接的に人の感覚器に訴える現象の一つで、19世紀後半以降、色素に関する研究は、有機化学の発展とほとんど歩調を同じくしてきたといってもよい。カロチノイド、クロロフィルなどの植物色素の研究は、19世紀後半から20世紀前半にかけての有機化学の花形であったし、これらを研究した化学者は、いずれもノーベル賞を授賞している。また、インジゴやアリザリンの化学合成は、有機合成化学の最初の成果として現在でも語り継がれている。しかし、天然物化学としての植物色素の研究は、20世紀前半にほとんど完成したものともみなされ、1960年以降興味の対象からはずれていった。

花色素、アントシアニンも同様である。この色素は、高等植物の花、果実、葉などの赤から紫、青といった鮮やかな色を発現する色素で、特に紫、青色系統の色はほとんどがアントシアニンによる。有機化学的な構造研究は、1910年代にWillstätterらにより始められ、彼の一派によりほとんどのアントシアニンの構造が明らかになった。1930年代になるとRobinsonらによって合成がなされ、その構造が確定した。それ以降1960年頃までに、主だった色素の構造が解明され、有機化学的研究としては完成したものと見なされた。

アントシアニンは天然には配糖体として存在し、発色団はアグリコンのアントシアニンジンである<sup>1-8</sup>。アントシアニジンは天然には、Fig. 1に示す数種しか知られておらず、僅かな構造の差しかないのに、なぜあれほどの多彩な色が生じるのかが古くから疑問であった。また、天然の花の美しい色を身に付けようと、花卉を絞って色素液を得ても、それはほとんどがすぐに退色してしまうため、なぜ植物中では安定に存在し得るのかも大きな疑問であった。この2つの大きな疑問、「花色変異」と「安定性」に対してこれまで様々な説が提出されてきた。最も古くはWillstätterによるpH説でアントシアニンがpHによりリトマスのように色が変わることから、

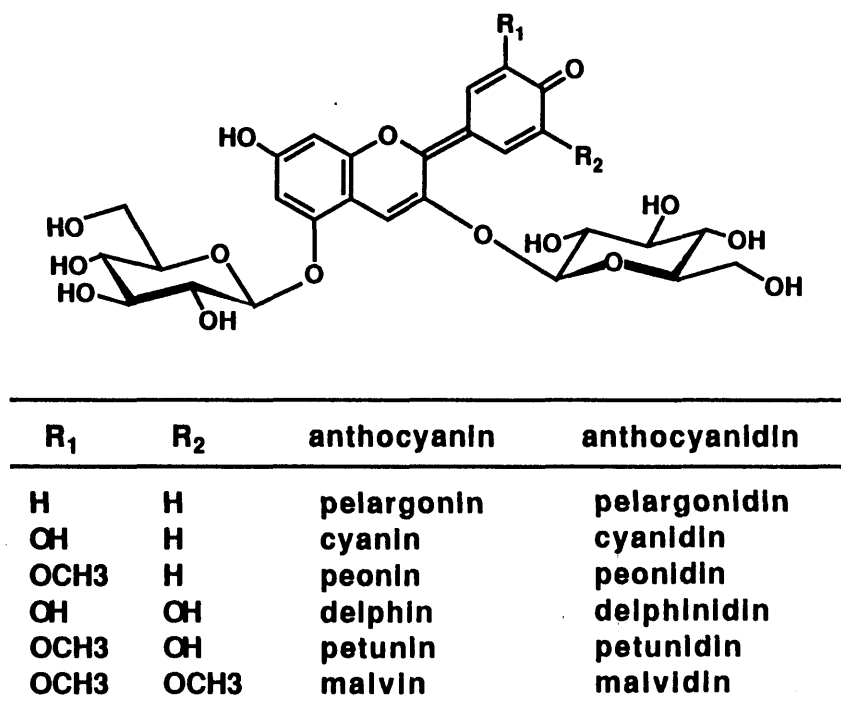


Fig. 1 Structure of common anthocyanins.

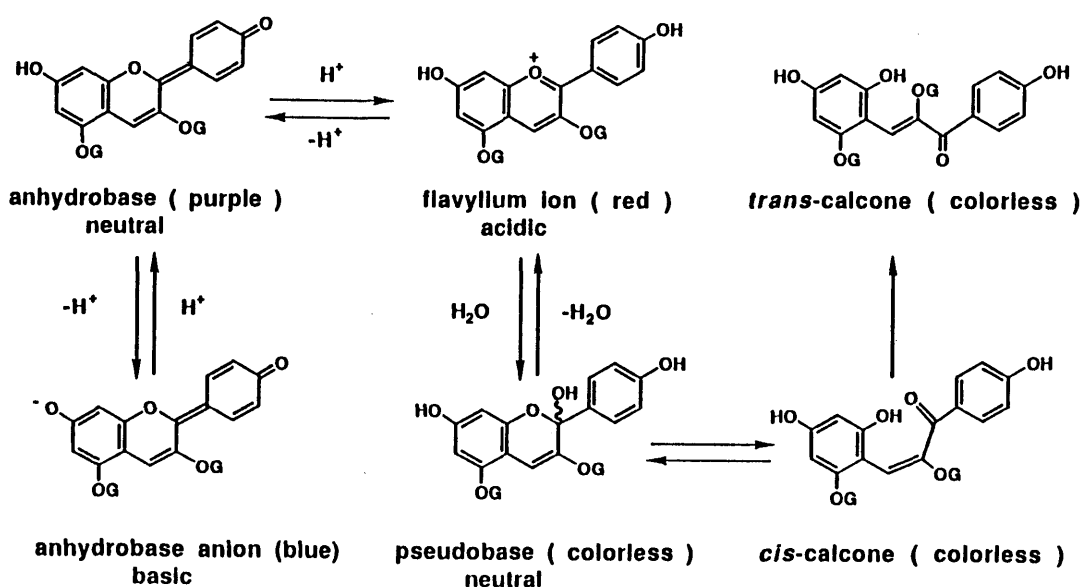


Fig. 2 Change in structures of an anthocyanin in aqueous solutions as a function of pH (G = sugar residue).

花の色の違いは花卉の液性、pHによるものとした説である<sup>9</sup>。このpHによる色の変化は、Fig. 2に示した構造変化によるもので、中性域におけるフラビリウムイオンの2位への水和がアントシアニンの退色の原因であることは、1977年にBrouillardらにより明かにされた<sup>6,10</sup>。一方、日本の柴田桂太、柴田雄次兄弟らは、植物生理学的に細胞のpHは弱酸性にコントロールされているとして、この説に疑問を抱き、青色花の発現に対して異論を唱えた<sup>11</sup>。そして、花の青色はアントシアニンの金属錯体によるとした金属錯体説を提出した<sup>11</sup>。しかし、この説は、実験的証拠が不十分だとして、Willstätterの弟子のEverest等により反論され、取り上げられなかった<sup>12</sup>。1930年代になり、Robinson夫妻は、アントシアニンの合成研究、植物の分析研究を通じて、アントシアニンが植物においては、フラボノイドや、芳香族酸、タンニン、多糖類などの、無色の物質と共存し、これらの共存物質（コピグメント）との分子間相互作用によって色の深色化、安定化が起きるとして、コピグメント説を提出した<sup>13</sup>。柴田の弟子の林孝三らは、金属錯体説の復権をめざし青色の花の研究を続け、1958年にツクサ青色花卉からコンメリニンを取り出すことに成功し、これが、マグネシウムを含む金属錯体アントシアニンであると報告した<sup>14</sup>。しかしBayerは、ヤグルマギク青色花卉色素の研究から、鉄、アルミニウムなどの金属は、アントシアニンと青色錯体を作るが、マグネシウムでは青色にならないとして、これを否定した<sup>15</sup>。1970年代になるとAsenらが、アントシアニンの濃度を100倍にするとモル吸光係数は300倍になることを見だし、アントシアニンの自己会合による安定化を提唱した<sup>16</sup>。また、日本の斉藤らは、中性の希薄水溶液で異常に安定な色素をキキョウ<sup>17</sup>、シネラリア<sup>18</sup>などから見だし、これが、分子内の芳香族酸によるコピグメント効果によるとした<sup>19</sup>。しかし、1960年以降、研究の主流は生物学者であった (Fig. 3)。

pH		Willstätter	1913
Intermolecular	selfassociation	Asen	1972
	copigmentation	Robinson	1931
	metal complex	Shibata, Hayashi	1919
Intramolecular	Intramolecular copigmentation	Salto, Yoshitama	1971

Fig. 3 History of chemical study on flower color variation and stability.

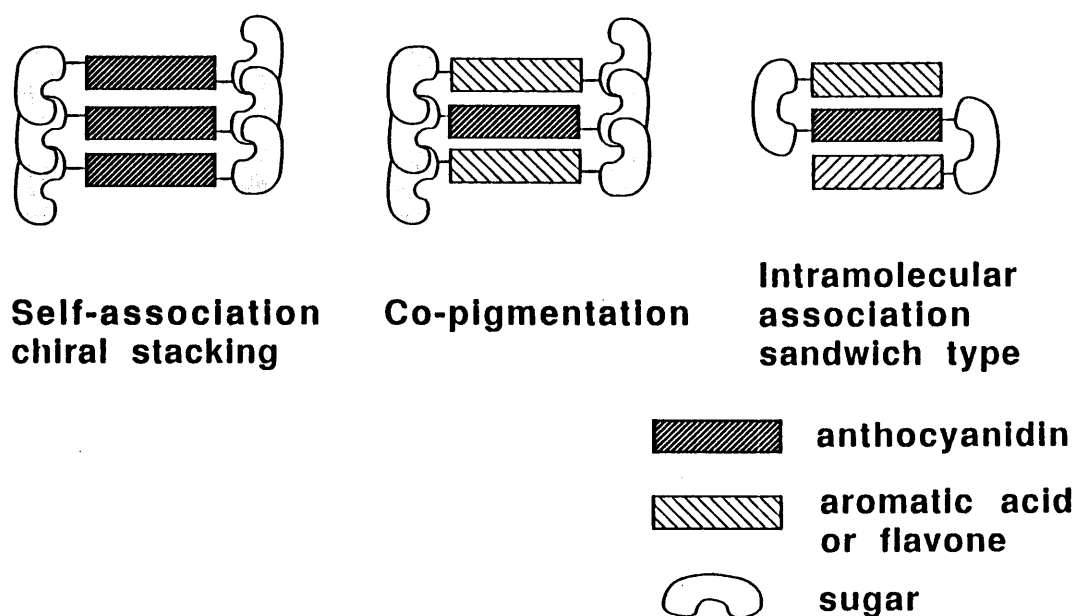


Fig. 4 Schematic representation of hydrophobic stacking structure of anthocyanins.



天然物化学が、1960年代以降、各種クロマトグラフィーの開発による化合物の分離手段の飛躍的進歩と、赤外吸収スペクトル、核磁気共鳴スペクトル、質量分析、X線回折などの機器分析法の発達による構造解析の一大変革に非常にうまく乗り、より微量の物質の単離、より複雑な構造をもつ物質の構造決定へと走ったとき、研究者の目はアントシアニンには向けられなかった。なぜなら、生体にごく微量しか含まれない物質を目標にすることが研究の進歩として考えられ、複雑な構造とは、不斉炭素を多く含み、分子量の大きな化合物のことであったからである。アントシアニンは、花卉に1%近く含まれ、決して微量成分とは見なされなかったし、構造は単純で、不斉炭素と言っても糖部分しかないからである。とうの昔に研究し尽くされ、解決すべき問題はほとんど残っていないと考えられていたのである。

これに疑義を唱え、アントシアニンを天然物化学の研究の中心に位置づけ、1970年に研究を開始したのは後藤俊夫である。後藤は、日本における天然物化学研究の揺籃期に自身の研究を開始し、まさに、その発展の中心的存在として、常に世界をリードし続けた。天然物化学に多用されつつあった物質の単離法、構造決定法をアントシアニン研究に適用し、高速液体クロマトグラフィー、 $^1\text{H}$  NMR、FABMSを駆使して、それ以前のアントシアニンの構造を訂正し、また、分子量が1500を越える複雑なアントシアニンの構造も立体を含め初めて明らかにした<sup>1,5,20</sup>。さらに、この研究の過程で、これまで提出されてきたアントシアニンの安定化機構は、すべて、芳香環同士の疎水結合に基づく分子会合に帰することができると発想するに至った (Fig. 4)<sup>1,5,20</sup>。しかし、その実証は難航した。これまでの構造研究は、いずれも強酸性下のフラビリウムイオン型の解析であり、アンヒドロ塩基型の色素、すなわち、花卉中で美しい色を発現しているときの真の色素の構造を明らかにしたものではなかったし、疎水相互作用に基づく芳香環同士のスタッキングも、多くの

それを支持するデータはあるものの、直接的に、3次元的に会合分子の構造を解明し、また、原子の配置を証明してはいなかった。

1980年代以降今日まで、天然物化学は、その手段としての単離、構造決定、合成の技術がほとんど最高に達した。しかし、研究の根本にあるべき何を解明しなくてはならないかの発想の転換のないままに手段に依存しすぎたツケがまわり、急速に失速しつつある。後藤はこのような事態に至るであろうことを予想し、先見性をもって「動的天然物化学」の概念を起し、活性物質の構造と活性発現の間にあるブラックボックスに目を向ける必要を説いた<sup>21</sup>。

アントシアニンの化学的研究は、ちょうど、いわゆる静的天然物化学の範疇にある花卉からの色素の単離と人為的産物である強酸性下のフラビリウムイオンの構造決定から、脱却しなくてはならない時期にあったといえる。著者は、花色という活性発現とフラビリウムイオン構造との間にあるブラックボックスを開ける鍵が、分子会合の機構の解明であると考えた。アントシアニンの分子会合は、その存在が予想はされていたが、有機化学の精密さという意味ではほとんど解明されていなかったに等しい。この分子会合では、ツユクサ青色花卉色素コンメリニンで代表されるように、極めて厳密に構造認識がなされる。分子が規則的に会合することによって、新しい機能を獲得するということは、有機化合物の集合体である生体系について、その個々の成分だけに注目したのでは、真に化学的な理解とは程遠いという事を示唆する。さらに、低分子だけが集合してできる点で、従来型の酵素-基質モデル、包接化合物におけるはまり込みなどで代表される、高分子-低分子型とは全く異なる。従って、天然物化学が今後進むべき新たな道を探るのに、打ってつけの素材といえ、全く新しい概念を創造できる可能性がある。そこで、精密構造認識に基づくアントシアニンの分子会合の研究を行なった。会合状態にある分子の構造を解明し、

なぜ会合により色、安定性といった機能を獲得するのか、なぜ、分子が会合するのかを明かにすることにより初めて、美しい花の色に対する「なぜ？」という素朴な疑問に答えることができると思う。



Photo 1 Flower of *Commelina communis*, Tuyukusa in Japanese.



Photo 2 Flower of *Commelina communis* and its purple variant, Type I and Type II.

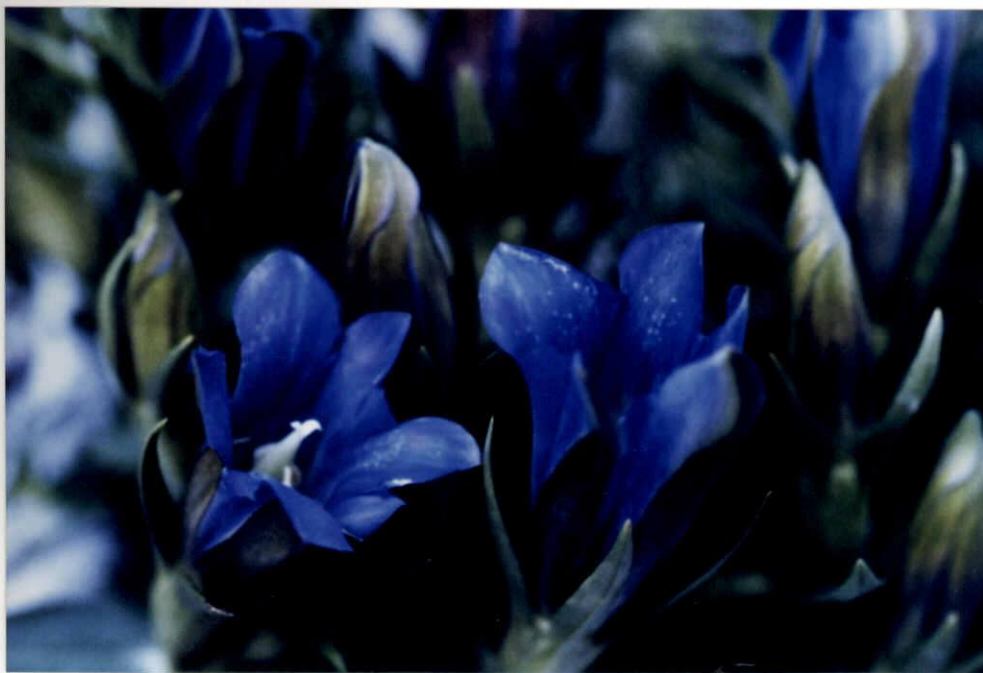


Photo 3 Flower of *Gentiana makinoi*, Ooyamarindou in Japanese.

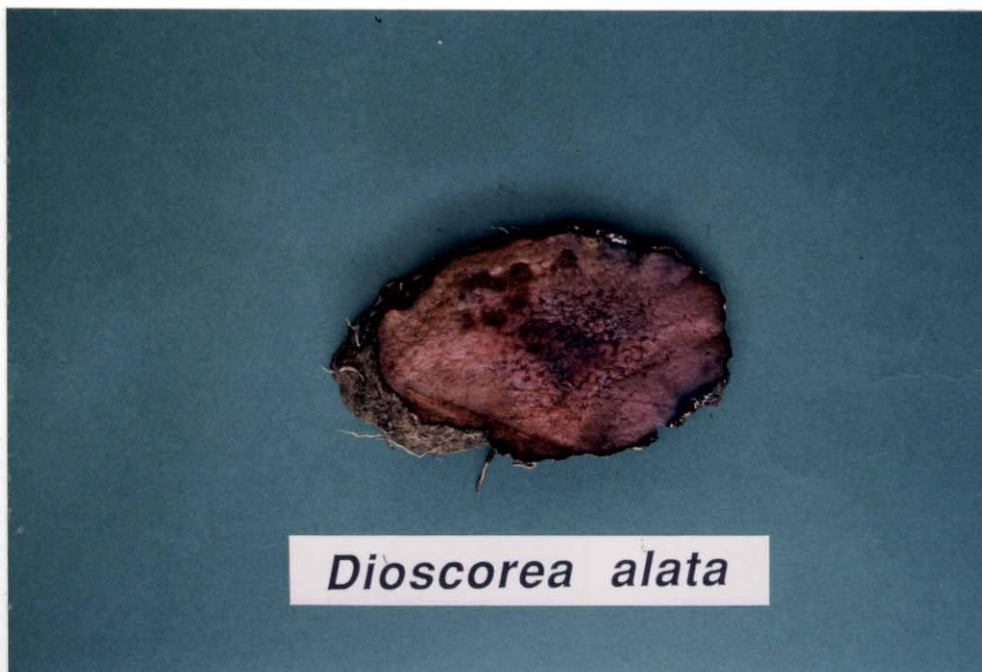


Photo 4 Tuber of purple yam, *Dioscorea alata*.

## 第1章 アントシアニンの高速液体クロマトグラフィーによる分析

### 1. 1 序

アントシアニンの分析法は、ここ15年ほどの間にペーパークロマトグラフィーから高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法へと移り、高速化と高分離能が達成された<sup>2</sup>。その最も初期には、Adamovics<sup>22</sup>、Iacobucci<sup>23</sup>、Hrazdina<sup>24</sup>、Akavia<sup>25</sup>の研究があり、C-18の逆相カラムを用いて、酢酸、りん酸、ギ酸等の酸を含む移動相を流すことにより、アントシアニンやそのモノグルコシド等の単純な色素の分離がなされている。その後、後藤、近藤らにより分析法の改良がなされ、数%のりん酸または、0.5%程度のトリフルオロ酢酸（TFA）を含む酢酸－アセトニトリル－水溶液の移動相を用いて、40°Cで分析する方法が開発された<sup>26</sup>。10%以上の酢酸を含み強酸性のため、担体のシラノール基によるアントシアニンの吸着を防ぐことができた。この方法を用いて、多数のアントシアニンの分析や単離精製が行われた<sup>1,5,20</sup>。

しかし、アントシアニンのHPLCによる分析については、未だ様々な問題が残されていた。アントシアニンはその液性により構造が変化し、中性や弱酸性では平衡混合物を与えるため、移動相をpH1以下の強酸性にして、安定なフラビリウムイオン型に固定して分析しなければ満足なクロマトグラムを与えない。このため、従来のシリカゲルを担体にした逆層カラムでは、耐久限界に近い、あるいは限界を越えた低いpHで分析を行わなければならない、カラムの寿命がたいへん短かく、再現性の良いクロマトグラムを得ることが困難であった。また、アントシアニンの花色変異や安定化の研究を行う場合、花卉に含まれるアントシアニンばかりでなく、他のフラボンなどの成分や、芳香族酸等も同時に分析する必要がある。これらの成

分の極性は多岐にわたるため、グラジエント分析は非常に有利であるが、移動相に10%以上の酢酸を含むため、紫外吸収で検出した場合はベースラインの上昇が避けられなかった。最近、フォトダイオードアレイ検出器が開発され、アントシアニンの分析に極めて有効であることが明らかになっている<sup>27-31</sup>。保持時間ばかりでなく、各ピークの電子スペクトルを比較することにより、より正確なピークの同定をする事ができ、同時に、化合物の構造に関する情報も得られる。アントシアニンの多くは分子内に芳香族酸を有し、3章で記すように、複数の芳香族酸を持つアントシアニンは希薄水溶液中でも極めて安定で、安全な食用着色料として産業上も利用価値が高い<sup>6</sup>。分子内の芳香族酸の数を推定するのに、古くから、310-335 nm 付近の芳香族有機酸の吸収極大と可視部のアントシアニン環由来のピークの吸収極大の吸光度の比を指標にできることが知られている<sup>32-34</sup>。3次元クロマトグラムは、色素を単離せずに分子内の有機酸の個数を推定できることから、アントシアニンの探索にもおおいに威力を発揮する。しかし、これも、クロマトグラムのベースラインが上昇するために、正確な判断が困難であった。

著者は、この問題を解決するために、数年前から市販になったポリマーを担体とした逆層カラムが適当と考えた。そこで、ポリマー担体のC-18逆層カラムと、3次元検出基を用いた、アントシアニンのHPLC分析条件の検討を行った。

## 1. 2 逆相カラムと3次元検出器を用いたアントシアニンの分析

シリカゲルの代わりにポリマーを担体としてオクタデシル基を結合した数種の逆層カラムが数年前から実用化されている。これらのカラムの利点として、使用可能な pH 幅が広いことが挙げられる。ODS シリカと異なりアルカリ性域でも使用可能で、耐酸性も ODS シリカよりも高い。シラノール基の影響がないので、担体への化合物の吸着が比較的少なく、回収率がよい。従って、アントシアニンの分析において問題であった、カラムの劣化が抑えられ、再現性の良いクロマトグラムが得られると考えた。さらに、移動相から、酢酸を除去することが可能と考えられ、グラジエント分析を行った場合、紫外部のベースライン上昇が抑えられ、3次元検出に適すと考えた。そこで、ポリマー担体の C-18 逆層カラムである Asahipak ODP-50 を用いてアントシアニンの HPLC 分析条件の検討を行った。

アントシアニンをフラビリウムイオン型に固定するための酸として、分析だけでなく、単離する場合の利点も考えて、揮発性のトリフルオロ酢酸を選んだ。HPLC に良く用いられる溶媒のアセトニトリルとメタノールを用いて分析条件の検討を行った結果、このカラムの場合、アセトニトリルの方が分離が良くピークがシャープであることがわかった。そこで、アセトニトリル-水系でグラジエント分析の条件を検討した。分析温度を 40°C とし、0.5% TFA 含有10% アセトニトリル水溶液から0.5% TFA 含有30% アセトニトリル水溶液へ30分間のリニアグラジエントを行うと短時間で分離の良いクロマトグラムが得られることがわかった (Fig. 1-1)。

まず、構造既知の多アシル化アントシアニンを分析して、芳香族酸の数の推定を検討した。サンプルとして、分子内にコーヒー酸を3個含む HBA (1)<sup>35</sup> とシネリン (2)<sup>36</sup>、コーヒー酸を2個含むゲンチオデルフィン (3)<sup>37</sup> とプラチコニン (4)<sup>38</sup>、



Pump: JASCO 880-PU  
Detector: JASCO MULTI-330S  
Column: Asahipak ODP-50  
Temp: 40°C  
Flow: 1.0 ml/min  
Solvent: 10% to 30% CH<sub>3</sub>CN  
containing 0.5% TFA  
30 min linear gradient

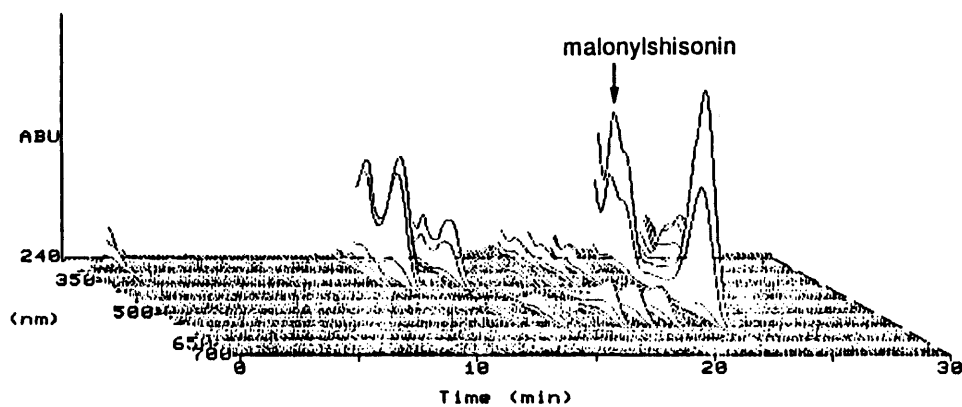


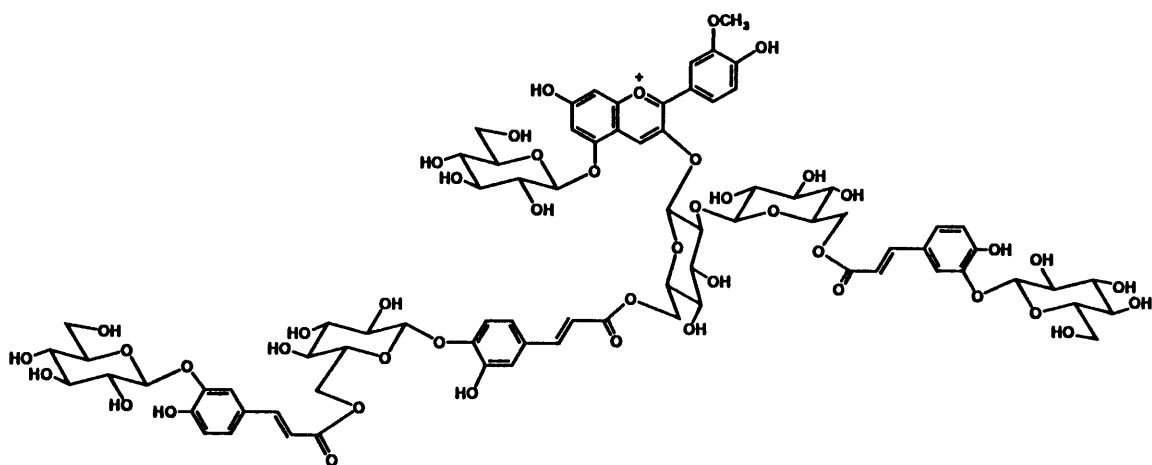
Fig. 1-1 3D-chromatogram of the extract of red leaves of *Perilla ocimoides*.

*p*-クマル酸を1個含むマロニルアオブニン (5, M)<sup>39</sup> とマロニルシソニン (6, M)<sup>40,41</sup>、有機酸を含まない、デルフィン (7) とシアニン (8) を用いて、この条件で分析した (Fig. 1-2)。3次元クロマトグラムから得た各色素ピークの電子スペクトル (Fig. 1-3) の、芳香族有機酸由来の吸収である、紫外部の 280 nm から 350 nm の吸収における吸収極大の値とアントシアニン母核に由来する可視部の吸収極大における吸光度の比を計算すると (Table 1-1) 分子内芳香族有機酸が1個の色素は約 0.5、2個のものは約 1.0、3個有すると約 1.5 となることがわかった。有機酸を含まない色素では、280 nm から 350 nm の間に吸収は認められず、芳香族有機酸の有無がはっきりわかった。この分析法では、紫外部のベースラインが上昇しないため、可視部と紫外部の吸収極大の比が正確に得られたと考えている。

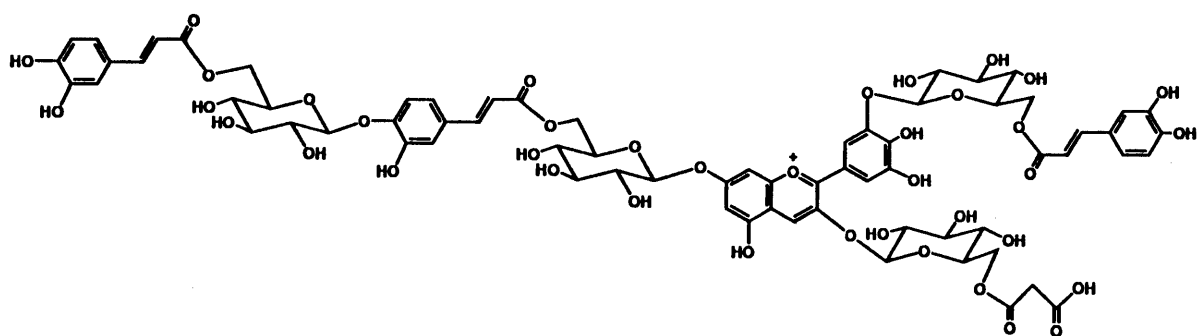
この分析法を、実際の花弁に含まれるアントシアニンの分析に適用した。分析手順としては、1. 花弁からのアントシアニンの抽出、2. 3次元検出器を用いた HPLC 分析、3. ピークの電子スペクトルからの色素の構造推定 (芳香族有機酸の個数の推定) の3ステップにわかれる。

色素の含量にもよるが、約 1 cm 四方程度の花弁を液体窒素で凍結し、直ちに、スパーテルなどで粉碎した。分子内にマロニル基を有する色素の分解を防ぐため、抽出は、3% TFA 含有 50% アセトニトリル水溶液で行った。室温で 30 分～1 時間抽出後、フィルター (ポアサイズ 0.45-0.50  $\mu\text{m}$ ) でろ過し、5-20  $\mu\text{l}$  を注入して HPLC 分析を行った。

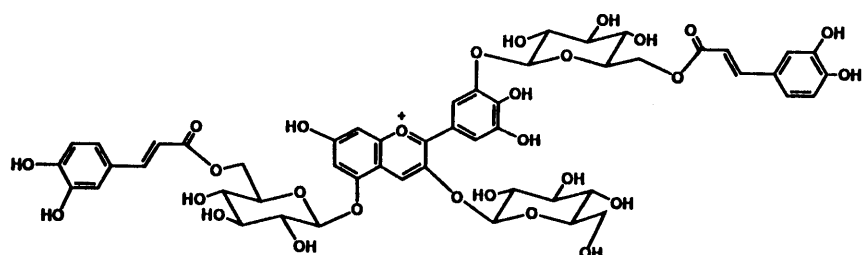
青、紫、ピンク色<sup>42</sup>のヤグルマギク花弁を分析した結果を Fig. 1-4 に示した。青色花弁の色素はスクシニルシアニン (9) であることが田村らにより明らかにされている<sup>43</sup>。紫色花弁には、スクシニルシアニンのほかに、ほぼ同量の別の色素が含まれることが明らかになった。電子スペクトルをスクシニルシアニンと比較すると全く



**HBA (1) from *Ipomoea tricolor***



**clnerarin (2) from *Seneclo cruentus***



**gentiodelphin (3) from *Gentiana makinoi***

**Fig. 1-2 Structures of anthocyanins analyzed by 3D-HPLC.**

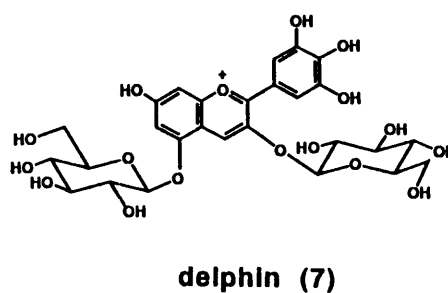
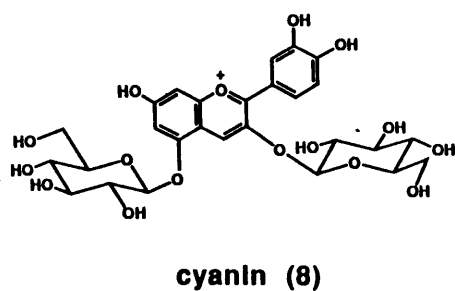
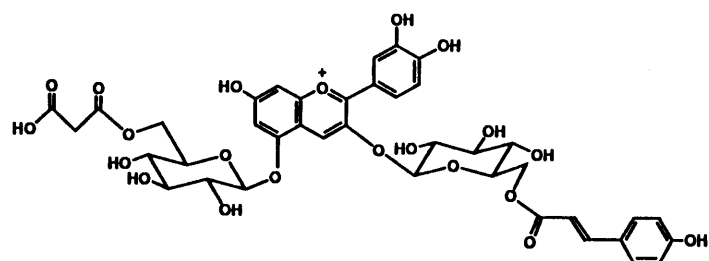
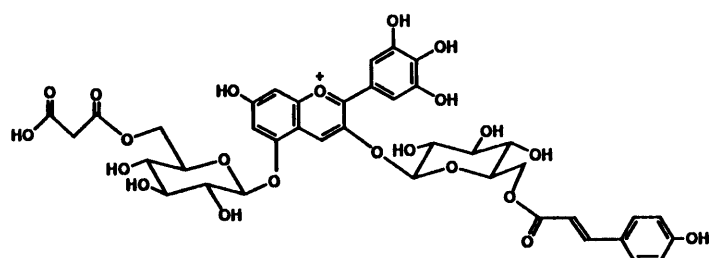
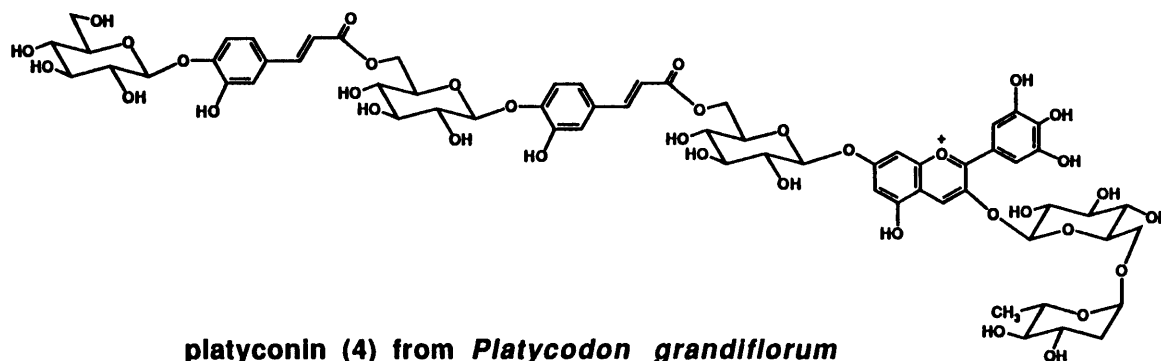
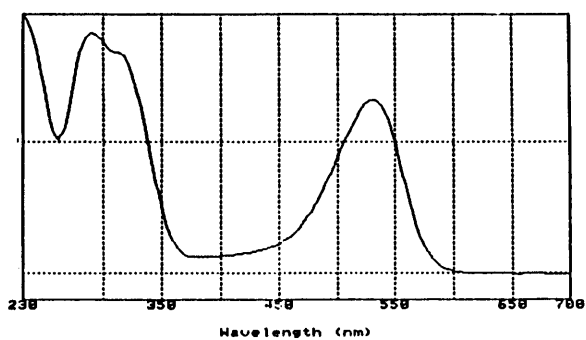


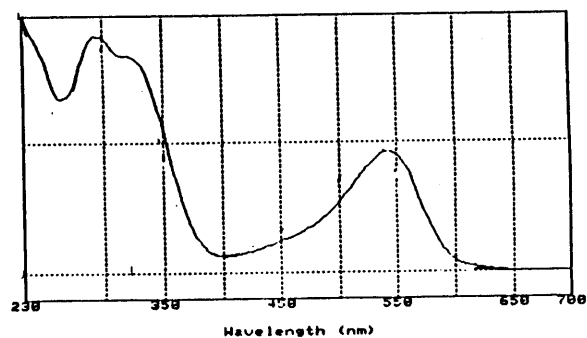
Fig. 1-2 (Continued).

Table 1-1. Ratio of  $\lambda_{\text{uvmax}} / \lambda_{\text{vismax}}$  calculated from the electronic spectra obtained by 3D-HPLC.

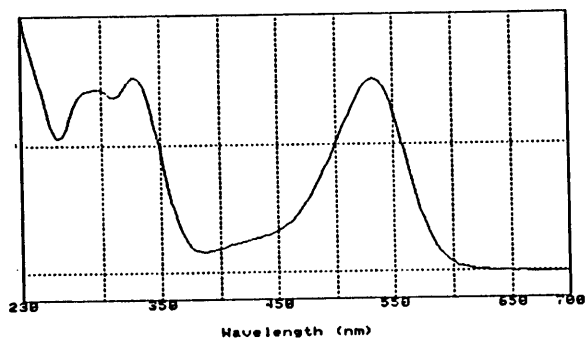
anthocyanin	acyl moiety	number	$\lambda_{\text{acidmax}}$ (nm)	$\lambda_{\text{vismax}}$ (nm)	Ratio (uvmax/ vismax)
HBA (1)	caffeic acid	3	320	530	1.3
cinerarin (2)	caffeic acid	3	325	544	1.7
gentiodelphin (3)	caffeic acid	2	328	530	1.0
platyconin (4)	caffeic acid	2	320	533	0.9
malonylawobanin (5)	<i>p</i> -coumaric acid	1	317	533	0.6
malonylshisonin (6)	<i>p</i> -coumaric acid	1	317	518	0.6
delphin (7)	-	0	(276)	519	-
cyanin (8)	-	0	(276)	510	-



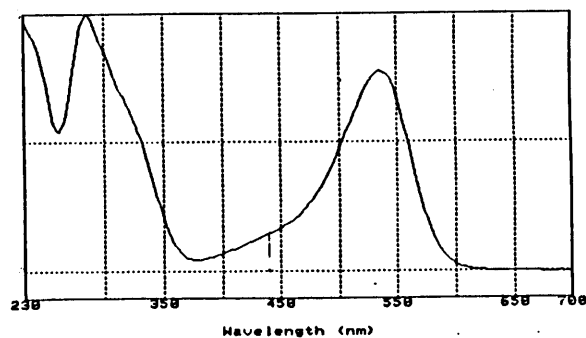
**HBA (1)**



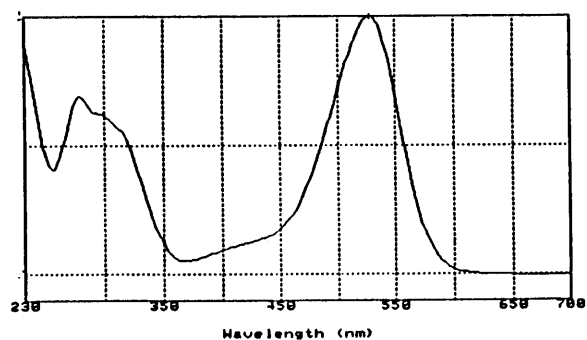
**cinerarin (2)**



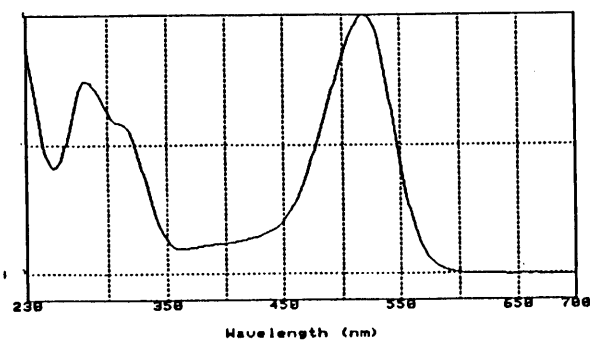
**gentiodelphin (3)**



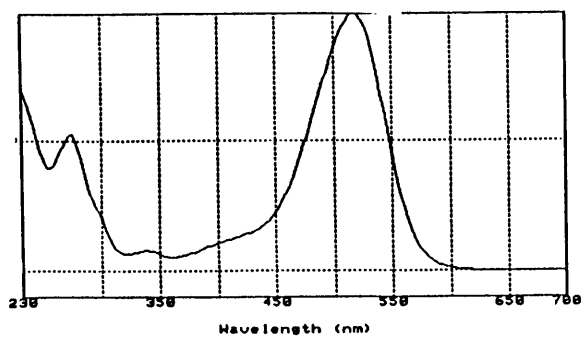
**platyconin (4)**



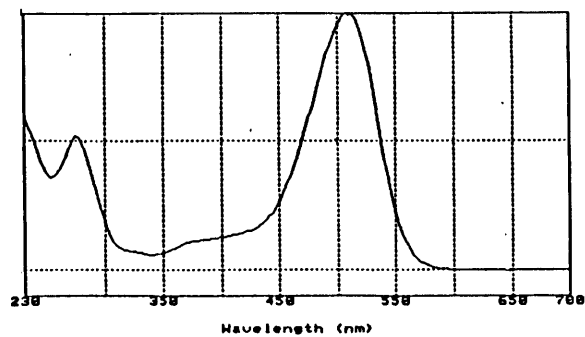
**malonylawobanin (5)**



**malonylshisonin (6)**

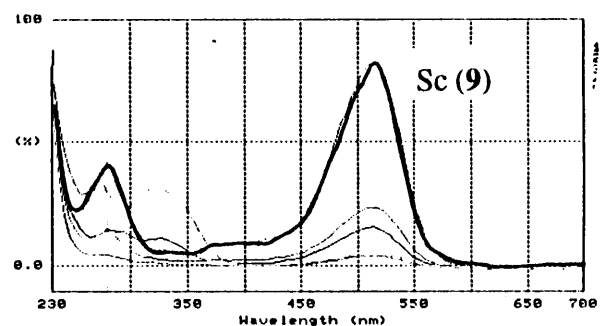
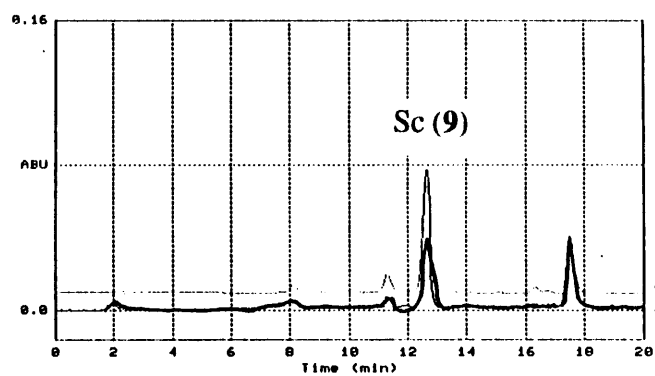


**delphin (7)**

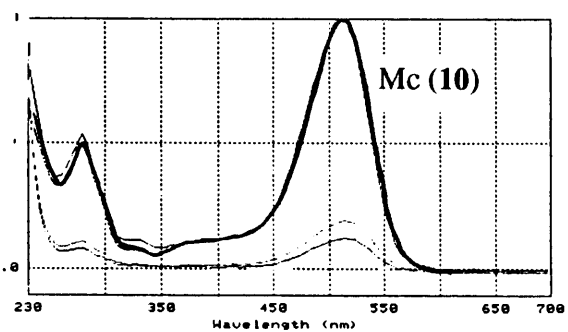
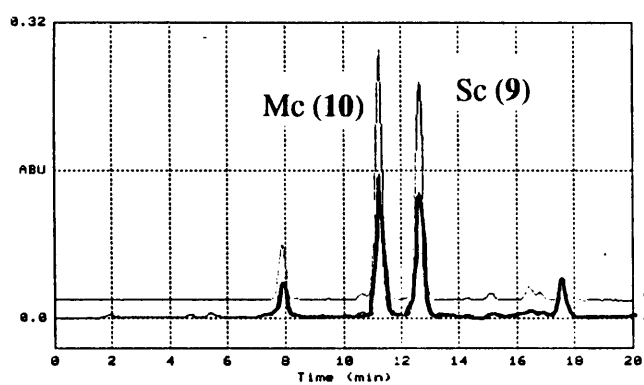


**cyanin (8)**

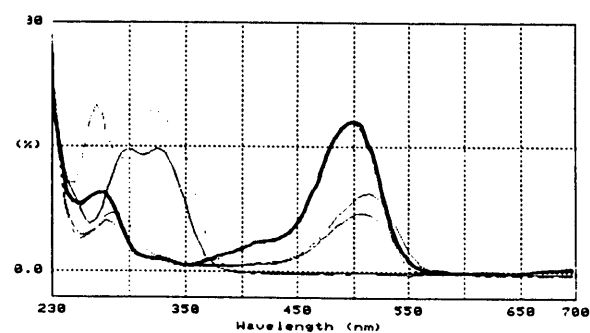
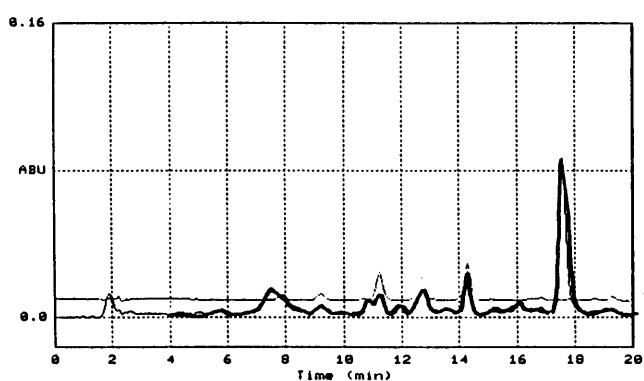
**Fig. 1-3 Electronic spectra of anthocyanins obtained 3D-HPLC.**



blue petals



purple petals



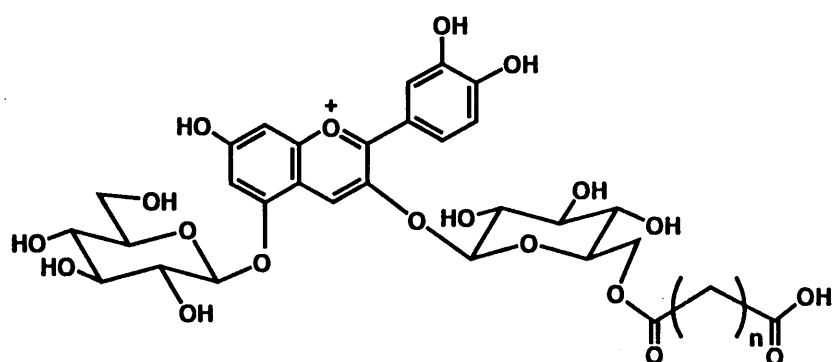
pink petals

Fig. 1-4 Chromatograms and electronic spectra of the extracts of blue, violet and pink petals of *Centaurea cyanus*.

一致することから、母核の構造、母核への糖の結合位置も全く同じであることが推定できた。スクシニル基の代わりに何らかの紫外吸収のない残基が置換している可能性が考えられた。実際に色素を単離したところ、スクシニル基の代わりにマロニル基の入ったマロニルシアニン (10) であることが分かった (Fig. 1-5)。

Fig. 1-6 には、デルフィニウム花卉の分析結果を示した。デルフィニウムには、花卉が紫色の品種と青色の品種とがある。それぞれ含まれる色素の違うことがわかった。さらに、この色素は、240 nm 付近に極大を示し、可視部の極大との比が、紫色花卉では約 1.0、青色花卉では 2.0 であった。含まれる有機酸がこれまで知られていたケイヒ酸誘導体ではないことが示唆された。1915年にWillstätterはデルフィニウム花卉色素には *p*-ヒドロキシ安息香酸が含まれると報告している<sup>44</sup>。その後 *p*-ヒドロキシ安息香酸の存在は Harborne により否定された<sup>45</sup>。この分析結果から、240 nm の吸収は安息香酸由来と考えられ、青色花卉には 4 分子、紫色花卉には 2 分子の安息香酸誘導体が結合していると推定できる。これはその後の単離構造研究によって確認された (シアノデルフィン: 11, Fig. 1-7)<sup>46</sup>。さらに、トリカブトの紫色花卉色素の本法による分析から、この色素がデルフィニウム紫色花卉色素バイオルデルフィン (12)<sup>47</sup> と同定できた。





**n=2 succinylcyanin (9)**  
**n=1 malonylcyanin (10)**

**Fig. 1-5 Structures of succinylcyanin (9) and malonylcyanin (10).**

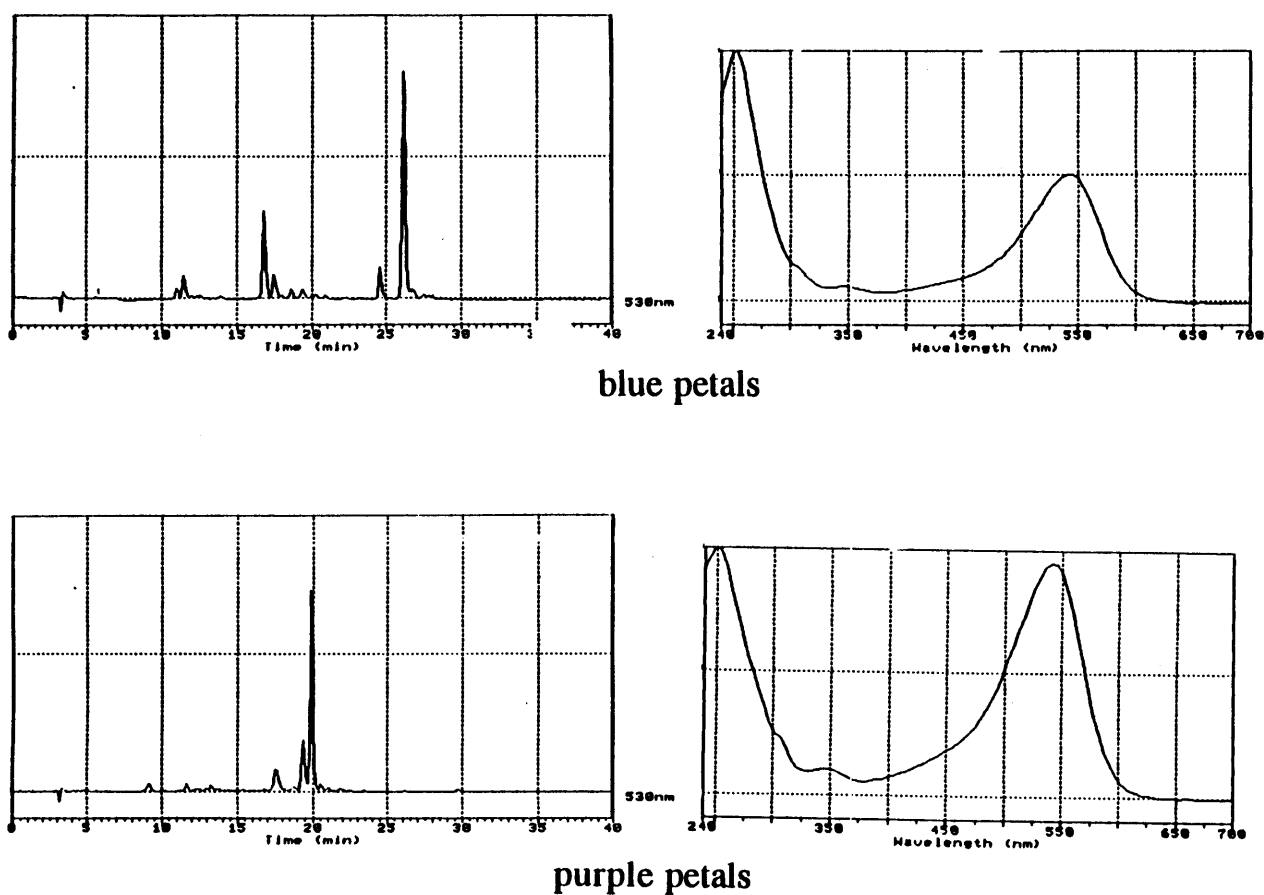


Fig. 1-6 Chromatograms and electronic spectra of extract of blue and purple petals of *Delphinium hybridum*.

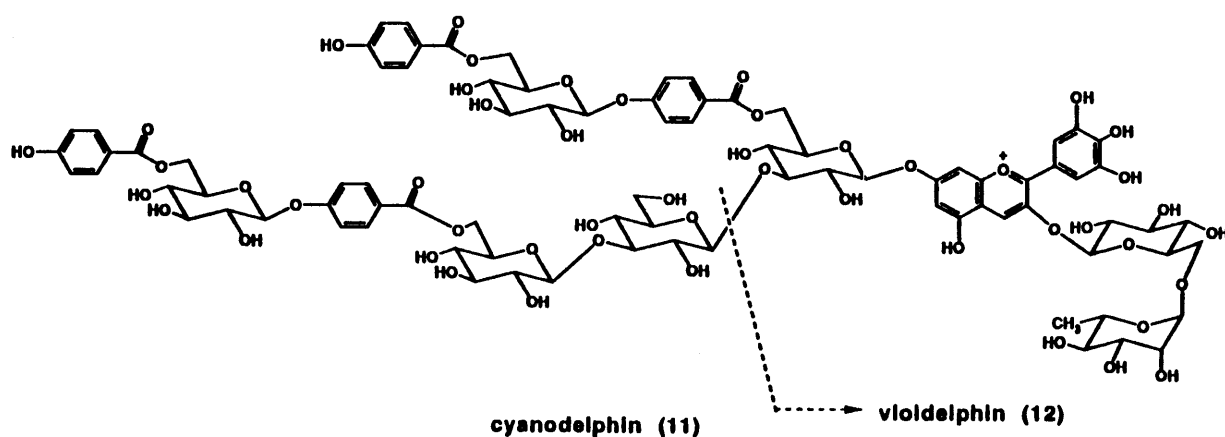


Fig. 1-7 Structures of cyanodelphin (11) and viodelphin (12).

### 1. 3 まとめ

ポリマー担体の C-18 逆層カラムである Asahipak ODP-50 を用いてアントシアニンの H P L C 分析条件の検討を行い、従来のシリカ ODS カラムよりも耐久性に勝り、特に、3 次元検出器と組み合わせるとアントシアニンの同定、構造推定に極めて強力であることを明らかにした。本法により、約 1 cm<sup>2</sup> 程度の花卉から効率よく色素や他の植物成分を抽出し、多岐にわたる極性を有する成分を 3 0 分～4 0 分の短時間に分離能よく同時分析することができた。植物試料の探索、成分の同定、構造推定、品質管理などの経時的な色素の分析にも有効な手段と考える。

## 第2章 ツユクサ青色花卉色素コンメリニンの構造

### 2. 1 序

ひとくちに青色の花といっても、純粹に青い花卉は数えるほどで、実際には紫色がかったものが多い。ツユクサは、その数少ない花のひとつである (Photo 1)。花卉の青色発現の機構解明はアントシアニンの化学の中で最も重要な課題で、これまで様々な説が提出されてきた。1913年に Willstätter は花色変異に対して、pH説を提出し、花の色の違いは花卉の液性によるとした<sup>9</sup>。これに対し、日本の柴田桂太らは、pH説で青色の花を説明するには、花卉は pH 8 以上の強アルカリ性にならなくてはならないが、一般的に植物の細胞液は弱酸性であることからこの説に疑問を持った。そして、錯体化学者の柴田雄次と共同で、花の青色はアントシアニンの金属錯体により発現するという金属錯体説を 1919 年に提出した<sup>11</sup>。柴田らの説は Everest に強行に反対され立ち消えとなったが<sup>12</sup>、その後、林孝三らは、金属錯体説の復権を目指して青色の花の研究を続け、1958年にツユクサ青色花卉色素を中性のままで単離結晶化に成功した<sup>14</sup>。林らはこのツユクサ青色花卉色素をコンメリニンと命名し、マグネシウムを含むメタロアントシアニンであると報告し<sup>48,49</sup>、金属の分析値からコンメリニンの組成をアオブニン (13, Aw)<sup>51,52</sup> 2 分子、フラボコンメリン (14, F)<sup>52</sup> 2 分子にマグネシウム 1 原子を含むとし、Fig. 2-1 に示す推定構造式を提出した<sup>53</sup>。

その後、後藤らは、コンメリニンの構造研究が進まないのは、植物から単離したコンメリニンを用いると常に不純物の混入が避けられないためであると考え、成分からのコンメリニンの再構成による、組成の確定と構造の解明を開始した。



その結果、コンメリニンに含まれるアントシアニン成分は林らの報告したアオブニンではなくマロニルアオブニンであること<sup>39</sup>、マグネシウムが必須成分であることが明らかになった。田村らはマロニルアオブニンとアオブニンと混ぜて再構成し、電気泳動を行うという巧妙な手法と、超速心分析による分子量測定、金属の分析値を組み合わせ、コンメリニン (15) の組成をマロニルアオブニン 6 分子、フラボコンメリン 6 分子にマグネシウム 2 原子であると決定した<sup>54</sup>。これらの構造に関する知見をもとに河合らは、武田、斎藤らによって収集された C d -コンメリニン (16) の X 線回折データ<sup>55</sup>を用いて解析を行い、R 因子 33% の解を得た<sup>1,5,56</sup>。分子は 3 回軸を持ち、軸上に金属が配置されていること、その金属に 3 分子ずつマロニルアオブニンが配位していることが推定された。

この一連の研究成果により、コンメリニンの不思議な性質が解きあかされた。分子量は 9 0 0 0 を越えるため透析膜を通過しない。濃厚溶液では会合が強固で安定に青色を示すが、希釈すると会合が解けて単分子になり、速やかに水和され無色になる。マロニルアオブニンのマロニル基により電気泳動で陽極へ移動する。アントシアニンの母核同士が左旋的に自己会合しているために、可視部に強い負の励起子型のコットンを示す。

しかし、これらの結果を合わせてもコンメリニンの真の構造を解明するには至らなかった。アントシアニンの青色発現機構を有機化学レベルで解明するには、なんとしても分子の完全な構造を明らかにしなければならない。金属の配位位置、分子内での各成分の会合状態を精密に解析すれば、アントシアニンの色の違いが何によるのかを構造レベルで解明できると考えた。そこで、従来の 4 軸型 X 線回折装置よりも光源が格段に明るい、シンクロトロン放射光・巨大分子用ワイセンベルグカメラを用いて X 線結晶構造解析によるコンメリニンの構造解析を行った。分子量 9 0

00を越える化合物を低分子有機化合物と同程度の分解能で解析するためには、タンパク質に通常用いる方法のみでは不可能である。そこで、NMR、CDなどの機器分析手段でアントシアニン、フラボンの会合状態を明らかにして、それらのデータも加味した解析が必要であると考えた。

本章で著者は最初に、コンメリニンの構成フラボンであるフラボコンメリンの水溶液中での自己会合の解明を試みた。次に、アントシアニンや、金属を代えたコンメリニン様錯体を再構成し、これらの錯体の中性水溶液におけるNMRを詳細に比較、解析することにより、コンメリニンにおけるアントシアニンとフラボンの会合状態（コピグメンテーション）を調べた。この知見をもとに、コンメリニンのX線結晶構造解析を行なった。さらに、ツユクサにおける花色変異の化学的解明を目的に、紫色の花を付けるツユクサ変種における色の発現機構の研究を行なった。

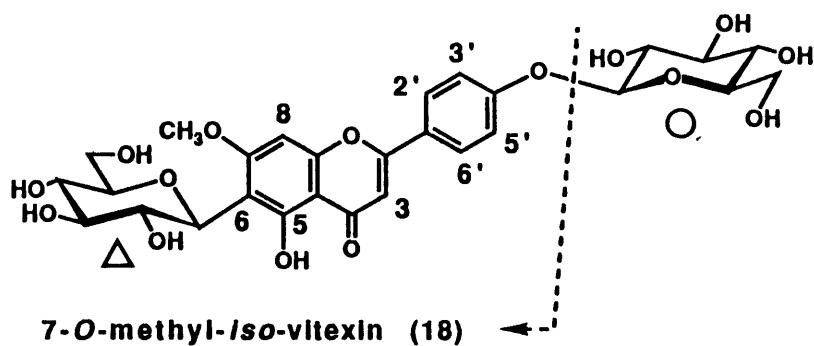
## 2. 2 フラボコンメリンの自己会合

単純なアントシアニンは中性の希薄溶液中では不安定で速やかに退色する。しかし、濃厚な水溶液中では会合して安定化されることを、1972年に Asen らは示し、この機構を自己会合と呼んだ<sup>16</sup>。星野らは、<sup>1</sup>H NMR、および、CDを用いて、シアニン、マルビンなどのアントシアニンジグルコシドの自己会合の研究を行ない、これがアントシアニン環同士のキラルな左旋的なスタッキングであることを証明した<sup>57-59</sup>。

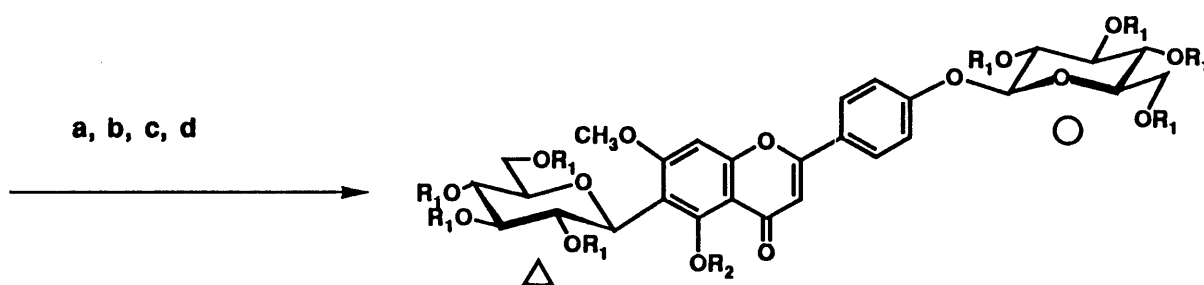
その後、吉兼は、ツユクサ青色花卉色素コンメリニンの成分であるフラボコンメリン (14, F, Fig. 2-2) が、濃厚水溶液中でアントシアニンと同様に左旋的に自己会合すると報告した<sup>60</sup>。フラボコンメリンを  $5 \times 10^{-3}$  M の濃度で水に溶かすと、強い励起子型の負のコットンを示し温度を上昇させると CD の大きさが小さくなること、<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて、芳香環上の水素が濃度依存的に高磁場シフトし、測定温度を上げると逆に低磁場へシフトする事を明らかにし、芳香環同士の疎水結合に基づく面対面のスタッキングの存在を支持するものであると推定した<sup>60</sup>。しかし、吉兼は、フラボコンメリンの H-3 と H-8 のシグナルの帰属をしないままに <sup>1</sup>H NMR における高磁場シフトを論じており、測定も水溶液に限っていた。

フラボコンメリンにおける自己会合の機構は、アントシアニンの自己会合と基本的には同じであろうと推定でき、フラボコンメリンは希薄溶液でも安定であるため、アントシアニンでは不可能な単分子状態での CD や <sup>1</sup>H NMR スペクトルの測定が可能で、自己会合の機構をより詳細に解析することができると考えた。さらに、フラボコンメリンは、コンメリニンの構成成分で、この分子中で極めて規則的に会合した状態にあると考えられる。従って、フラボコンメリンの自己会合を詳細に解析





flavoccommelin (14)



- a.  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$  rt, 6 h  
 b.  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{THF}$  rt, 5 h (62% from 14)  
 c.  $\text{CH}_3\text{I}/\text{CHCl}_3$  90°C, 2 h (84%)  
 d.  $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  25°C, 1 h (93%)

	$\text{R}_1$	$\text{R}_2$
17	H	CH3
19	Ac	Ac
20	Ac	H
21	Ac	CH3

Fig. 2-2 Structure of flavoccommelin (14) and its derivatives.

することは、コンメリニンの構造を解明するためにも非常に重要である。

田村<sup>61</sup>、吉兼<sup>60</sup>は、クロマトグラフィーを繰り返すことによりフラボコンメリンを単離し、林らの方法<sup>52</sup>を踏襲した二硫化炭素による結晶化法を用いていたため、大量化に難があった。そこで、まず、フラボコンメリンを大量に簡便に精製する方法について検討した。次に、フラボコンメリンの自己会合を、主に、CDと<sup>1</sup>H NMRを用いて、溶媒や測定温度を種々検討して詳細に解析した。さらに、フラボコンメリンを5-O-メチル化フラボコンメリン(17)<sup>62</sup>、7-O-メチル-*iso*-ビテキシン(18)へ誘導し、これらの誘導体についても水溶液中での自己会合現象を調べた (Fig. 2-2)。

## 2. 2. 1 フラボコンメリンの単離精製

これまでフラボコンメリンは、粗コンメリニンからクロマトグラフィーによってマロニルアオブアニンを得るときに同時に単離していたため、大量に得ることが困難であった。ツユクサ青色花卉の搾汁にエタノールを加えて粗コンメリニンを沈澱させた上清に、多量のフラボコンメリンが含まれていることが分かったので、この上清からのフラボコンメリンの単離を行った。

上清を減圧下濃縮してエタノールを除去後、得られた茶色の粘性液に水を加えて希釈し、XAD-7カラムへ吸着させた。カラムに大量の水を流し、糖、タンパク質と考えられる高極性物質を洗い出した後、順次メタノールの含量を上昇させてクロマトグラフィーを行った。50%メタノール水溶液の画分にほとんどのフラボコンメリンが溶出された。この画分を減圧下濃縮して得られた残渣に水を加えて加熱溶解し、熱時アセトニトリルを加え冷却すると、フラボコンメリンが淡黄色の不定形の析出物として得られた。

次に、高瀬の報告<sup>62</sup>を参考にして、フラボコンメリンを5-O-メチル化体(17)へと誘導した。フラボコンメリンに無水酢酸とピリジンを加え室温で6時間反応させた。得られた完全アセチル化物(19)と5位が水酸基のままのアセチル化物(20)との混合物を、テトラヒドロフラン中、濃アンモニア水で5時間反応させ、5位が水酸基のままのアセチル化物(20)だけを得た。このものをクロロホルム中ヨウ化メチルで5-O-メチル化し21とした後、アセチル基をメタノール中ナトリウムメトキシドを作用させて加水分解除去し、目的の5-O-メチルフラボコンメリン(17)を得た。

フラボコンメリンの4'位のグルコースは、メタノール中塩酸を作用させることにより加水分解し、7-O-メチル-*iso*-ビテキシン(18)を得た。

## 2. 2. 2 フラボコンメリンの自己会合

まず、フラボコンメリン(14)の規則的な会合が濃度に依存して起きるかどうかを調べた。14を0.05 Mの酢酸緩衝液(pH 5.7)に $5 \times 10^{-3}$  Mの濃度に溶解し、段階的に10倍希釈して、 $5 \times 10^{-4}$  M、 $5 \times 10^{-5}$  Mの溶液を調製した。それぞれの溶液を、光路長0.1 mm、1.0 mm、10 mmのセルに入れ、25°Cで電子スペクトルとCDを続けて測定した。Fig. 2-3に示したように、 $5 \times 10^{-3}$  Mのときだけに、励起子型の負のCDが認められた。電子スペクトルは、濃度が濃くなるに従って、1-2 nmの吸収極大波長の短波長シフトが観測され、同時に、モル吸光係数は小さくなりスペクトルがブロード化した。アントシアニンの吸収スペクトルは、自己会合によって可視の吸収極大波長が短波長シフトし、モル吸光係数も小さくなることが計算から明らかにされている<sup>1, 5, 20, 57, 59</sup>。14の濃度に依存した電子スペクトルの変化は、自己会合した

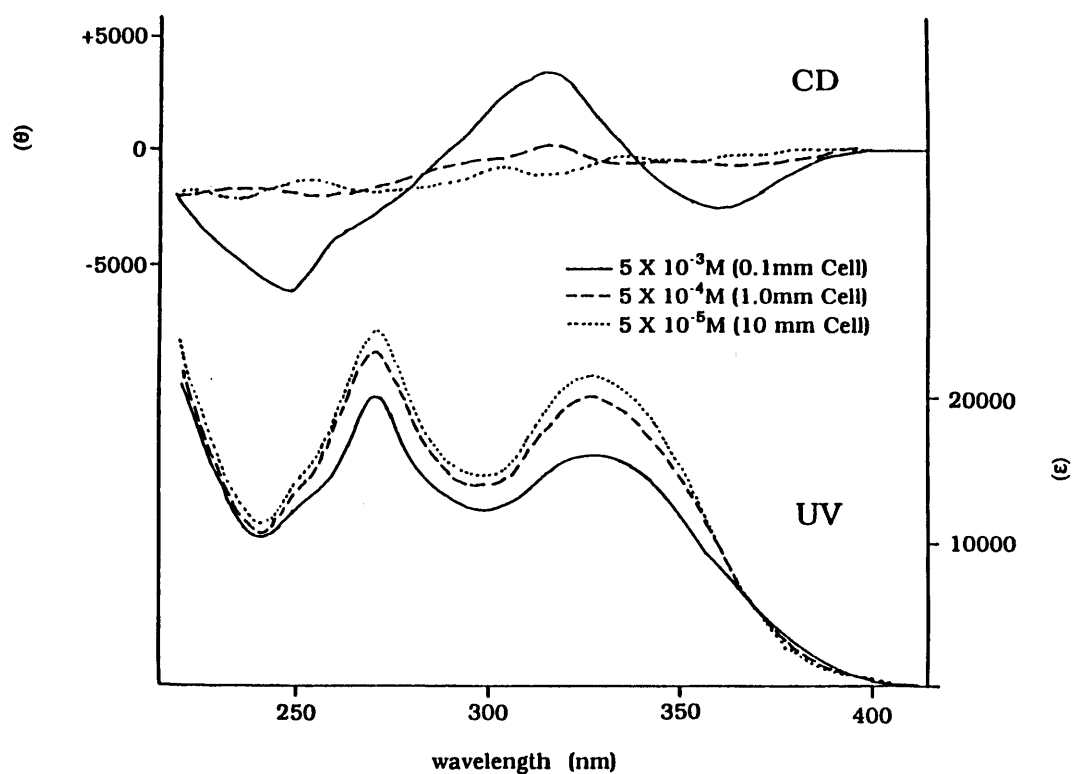


Fig. 2-3 Concentration dependence of UV and CD spectra of flavocommelin (14) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7.

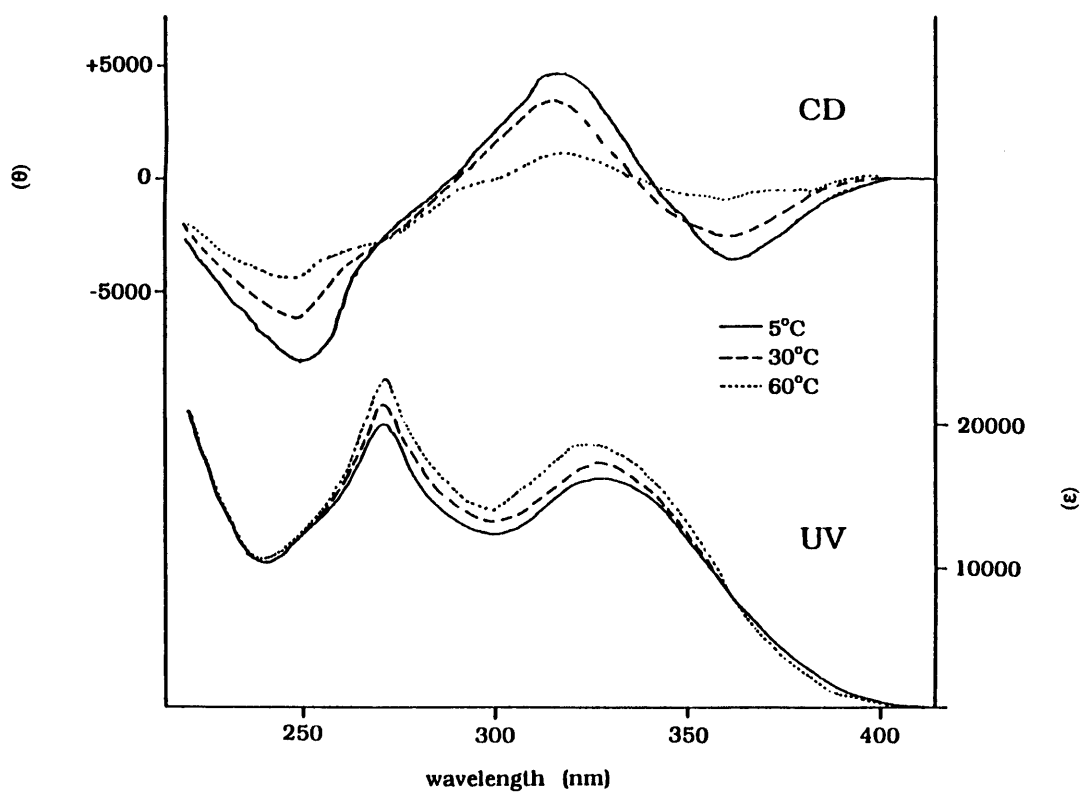


Fig. 2-5 Temperature dependence of UV and CD spectra of flavocommelin (14) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7.

アントシアニンの場合と同じであり、CDの挙動もアントシアニンのそれと同様であった。このCDから、14の会合が、母核の双極子モーメントが左旋的にねじれた方向での、面対面のスタッキングであることが支持された (Fig. 2-4)<sup>1, 5, 20, 57, 59</sup>。

フラボコンメリンの水溶液 ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) を、温度を変えてCDを測定すると、温度が高いほど励起子型のコットンは小さくなることが分かった (Fig. 2-5)。溶液の温度が上昇すると、分子運動が激しくなり分子会合は弱くなる。温度の上昇とともに励起子型の負のコットンが減少することは、分子間の規則的な左旋的会合が温度の上昇とともに減少したことを示す。

フラボコンメリンの会合が、芳香環同士の面対面のスタッキングであることは、 $^1\text{H}$  NMRの測定によっても明らかにできた (Fig. 2-6)。CDにおいて励起子型のコットンの出現する $5 \times 10^{-3} \text{M}$ の濃度と、それ以下の濃度で $^1\text{H}$  NMRスペクトルを測定すると、シグナルに著しい違いがあった。すなわち、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ 以下の濃度ではシグナルの化学シフトはほとんど変化しなかったが、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ になると、フラボコンメリンの母核上のシグナルが急激に高磁場シフトし、同時にシグナルのブロード化も見られた。各々のシグナルを、NOE差スペクトル、デカップリング実験によって帰属した。Fig. 2-5に示したように、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ではH-3とH-8のシグナルが2本に分裂していることが明らかになった。各シグナルの濃度依存的な高磁場シフトを比較すると、H-8が最も大きく、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ から $5 \times 10^{-3} \text{M}$ になると約0.6 ppm移動し、次いで、H-3、H-2' , 6'、H-3' , 5'の順であった (Table 2-1)。母核の水素の高磁場シフトは、スタッキングした芳香環のアニソトロピーによると考えられ、高磁場シフトの程度はスタッキングした芳香環との重なり度合いを反映しているものと考えられる。これから、フラボコンメリンの水溶液中の自己会合においては、C-8、C-3の辺りの重なりが大きいと推定できた。シグナ

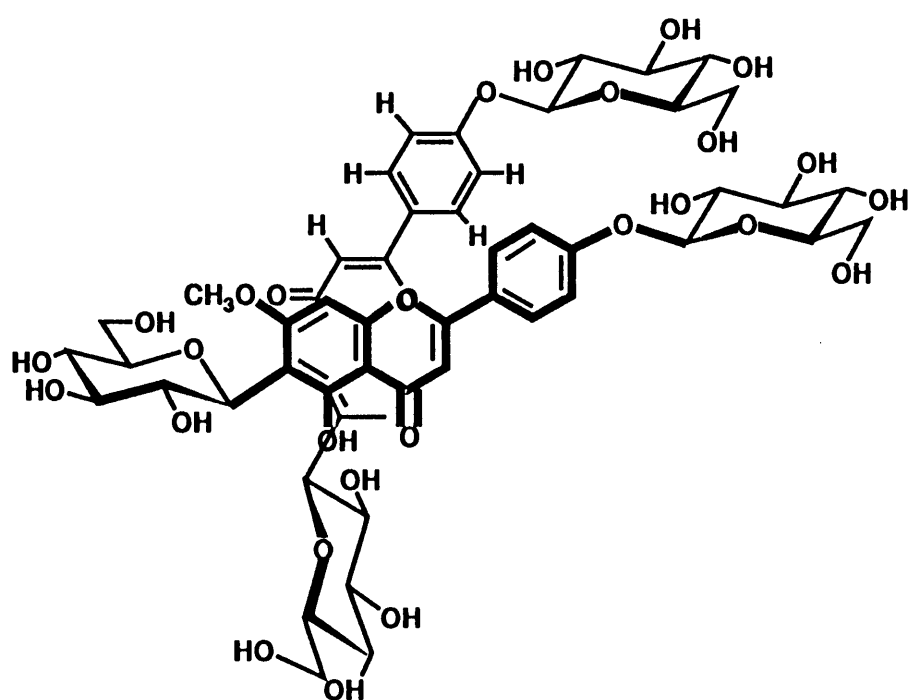


Fig. 2-4 Proposed stacking structure of flavocommelin (14).

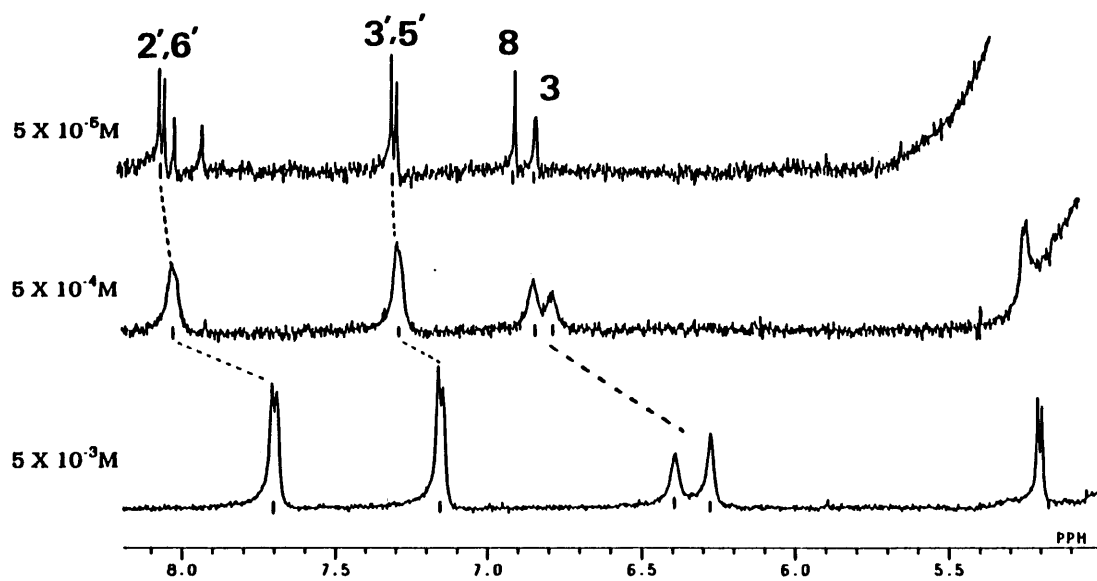


Fig. 2-6 Concentration dependence of <sup>1</sup>H NMR spectra of flavocommelin (14) in D<sub>2</sub>O at 30°C (500 MHz).

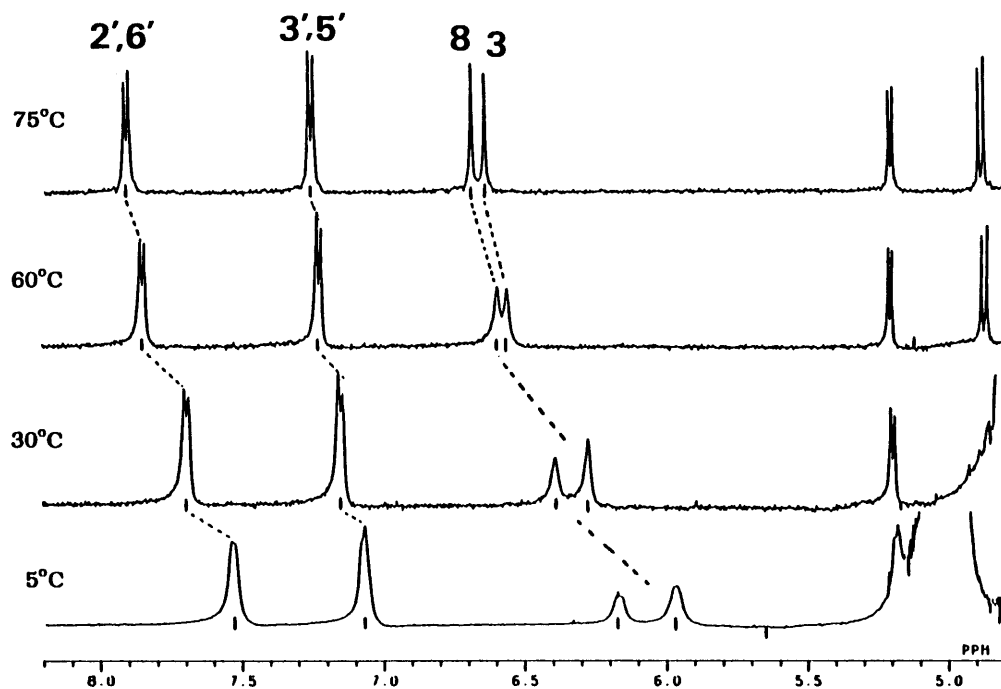


Fig. 2-7 Temperature dependence of <sup>1</sup>H NMR spectra of flavocommelin (14) in D<sub>2</sub>O (5 × 10<sup>-3</sup> M, 500 MHz).

Table 2-1 Concentration dependence of upfield shift of the signals of flavocommelin (14) from  $5 \times 10^{-5}\text{M}$  to  $5 \times 10^{-4}\text{M}$  and  $5 \times 10^{-3}\text{M}$  in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$ .

proton	$5 \times 10^{-4}\text{M}$ (ppm)	$5 \times 10^{-3}\text{M}$ (ppm)
H-3, H-8	0.05	0.54
H-2', 6'	0.03	0.36
H-3', 5'	0.02	0.15



ルの分裂は、母核同士が強固に会合しているため、C-グルコシド結合の自由回転が損なわれたためと考えている。

フラボコンメリンの $5 \times 10^{-3} \text{M}$ の濃度の水溶液について、温度を変えてスペクトルを測定した (Fig. 2-7)。低温ではブロードだったシグナルが、温度を上昇させるとシャープになり、同時に低磁場シフトした。75°Cまで温度を上げると $5 \times 10^{-5} \text{M}$ におけるスペクトルと非常によく似たスペクトルが得られた。この温度では、分子運動が激しく規則的な会合はほとんど消失し、単分子状態になっていると考えられる。そのため、高希釈で単分子状態の $5 \times 10^{-5} \text{M}$ と同じスペクトルを与えたものと推定できた。逆に温度を下げて、5°Cで測定したスペクトルは、糖のアノマー水素が2種類現れており、シグナルの分裂はグルコシド結合の回転障害によると考えた。

$5 \times 10^{-4} \text{M}$ のサンプルでは、5°Cから75°Cまで温度を変えて測定しても、シグナルの化学シフトの変化は0.1 ppm以下とわずかで、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ では、温度を変化させてもシグナルの化学シフトは全く変化しなかった。シグナルの半値幅は、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ では15°C以下で、ブロード化が認められ、H-3、H-8のシグナルが重なって観測されたが、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ では全く認められず、5°Cのスペクトルでもシャープであった。これから、シグナルの高磁場シフトは、明らかに、会合した相手の芳香環のアニソトロピーによるものであると結論できるが、ブロード化は、一概には自己会合によるものであるといえないことがわかった。すなわち、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ では、規則的な会合によって回転障害が生じたと考えられるが、 $5 \times 10^{-4} \text{M}$ では不規則な会合、(aggregation)、によって、分子運動がゆっくりになり、丁度NMRのサンプリング時間と同調したために、ブロードなシグナルを与えられと考えられる。さらに、 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ になると分子は単体で存在し、5°C程度では、回転障害が起これないため、シャープなシグナルを与えたものと考えられる。

上述したCD、 $^1\text{H}$  NMRを、メタノール、ジメチルスルホキシドあるいはピリジン中で測定すると、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$  から  $5 \times 10^{-3}\text{M}$  まで濃度を変化させても、CDではいずれも全く励起子型のコットンが観測されず、 $^1\text{H}$  NMRでもシグナルの高磁場シフトが認められなかった。有機溶媒中では、疎水相互作用が弱められ、また、ピリジンのような芳香環を持つ溶媒では、母核とピリジンの会合が生じるので、フラボコンメリン同士の規則的な自己会合が妨げられたためと考えた。これにより、フラボコンメリンの水溶液中での左旋的な自己会合は、フラボンの母核芳香環同士の疎水結合によるものであることが明らかにできた。

5-O-メチルフラボコンメリン (17, Fig 2-2) を用いて同様に水溶液中でCDを測定したところ、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$  でフラボコンメリンほど顕著ではないが、励起子型の負のコットンが認められ、温度を上昇させるとこのCDは小さくなった (Fig. 2-8)。しかし、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$  でも形は少し異なるもののCDが認められ (Fig. 2-9)、このCDが自己会合しているためかどうかは明確にできなかった。しかし、 $^1\text{H}$  NMRでは、濃度依存的な母核シグナルの高磁場シフトが認められ、ねじれ方向は別としても、何らかの自己会合が起きている可能性はある。17の $^1\text{H}$  NMRでは、H-3、H-8のシグナルが30°Cでも約2:1の比率で2本に分裂しており、糖のアノマー水素、フラボンの7位のメトキシ基も同じ比率で分裂していた。5位が水酸基のかわりにメトキシ基になり立体的にかさ高いため、C-グルコシドの回転障害がより大きくなったためであろうと考えられる。フラボコンメリンと比較して5-O-メチルフラボコンメリンでは、CDの大きさ、 $^1\text{H}$  NMRでの化学シフトの移動度ともに小さい。5位にメトキシ基が存在するために生まれるひずみが原因で、自己会合しにくくなっていると考えている。

4'位の糖を加水分解除去した7-O-メチル-*iso*-ビテキシン (18, Fig 2-2) を用いて、

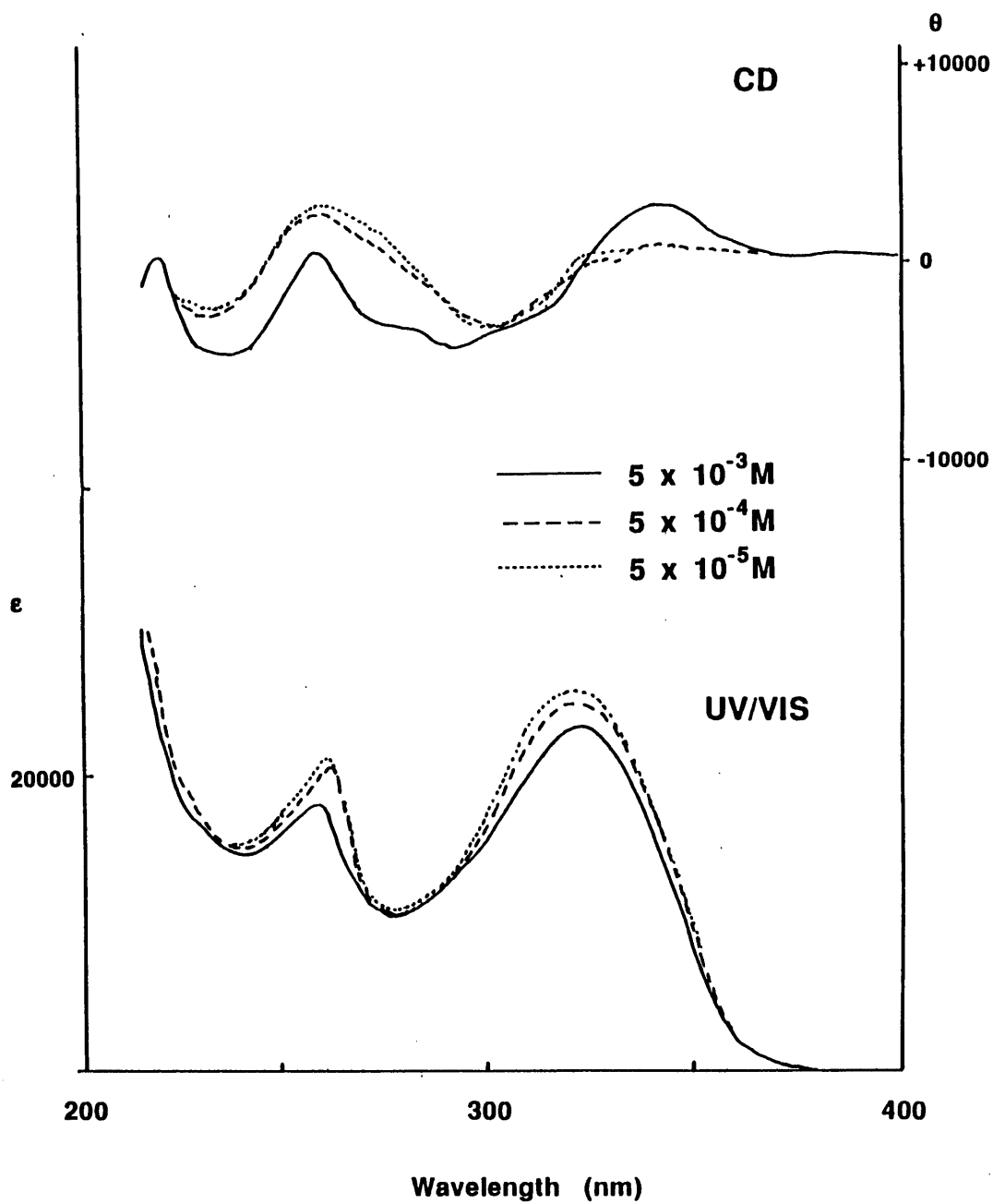


Fig. 2-8 Concentration dependence UV and CD spectra of 5-*O*-methylflavocommelin (17) in D<sub>2</sub>O at 30°C (500 MHz).

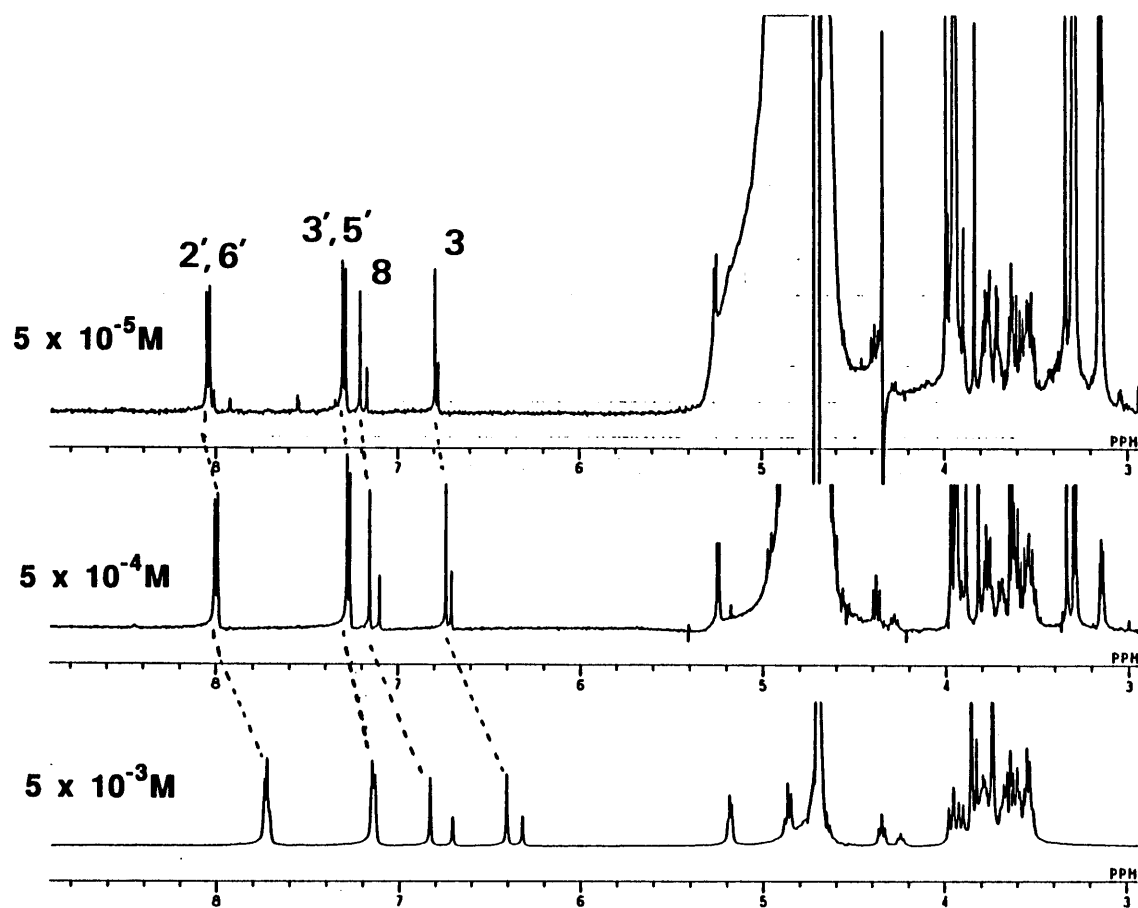


Fig. 2-9 Concentration dependence of  $^1\text{H}$  NMR spectra of 5-*O*-methylflavocommelin (17) in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$  (500 MHz).

同様のCDと $^1\text{H}$  NMRの測定を行った (Fig. 2-10, 2-11)。 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 以上の濃度で励起子型の負のCDが認められ、 $^1\text{H}$  NMRにおける芳香族水素の高磁場シフトも $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 以上で認められた。このフラボンも左旋的に自己会合することが明らかになり、フラボコンメリンよりも低濃度でも自己会合することから、かなり強い疎水相互作用を持つといえる。

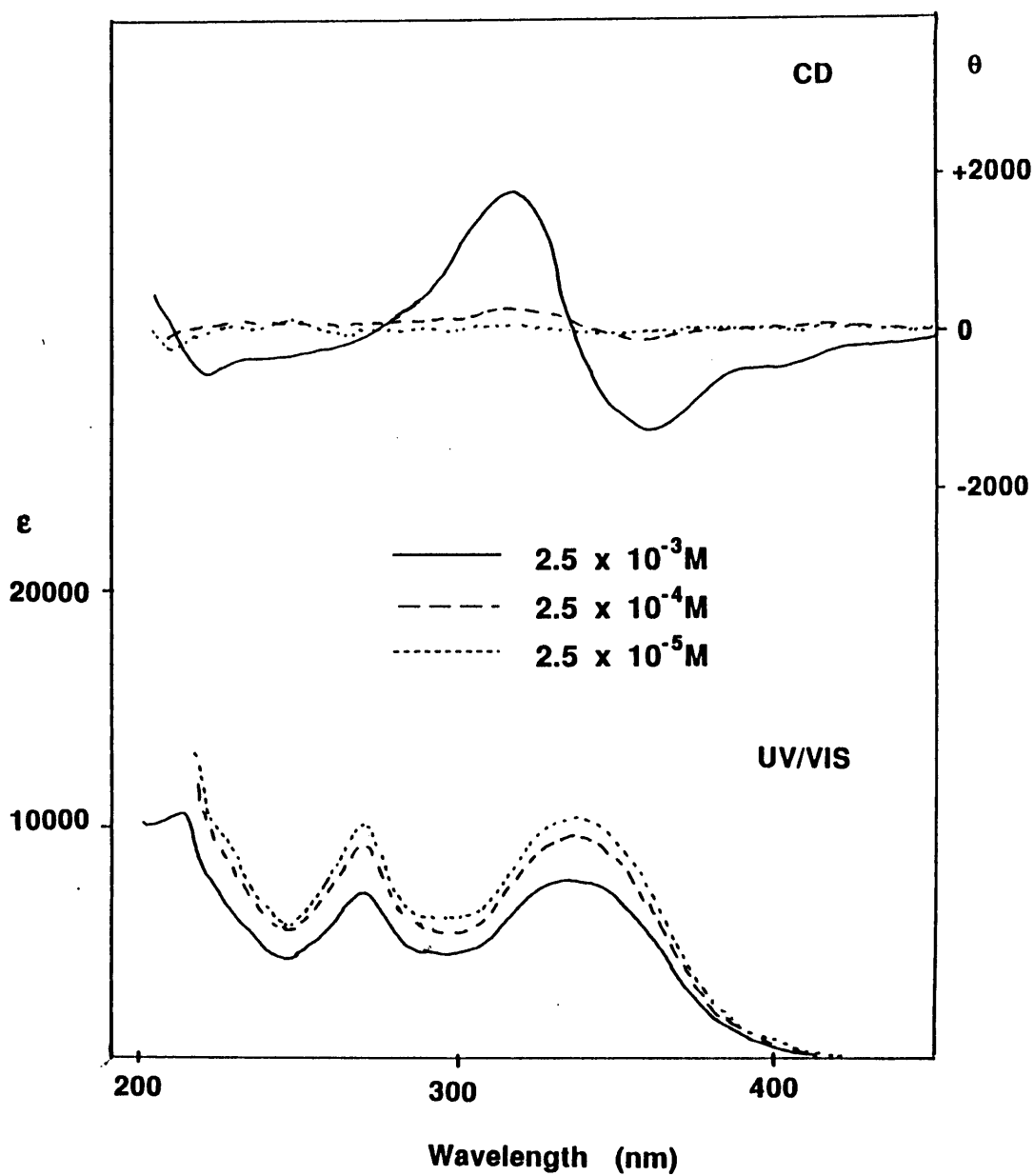


Fig. 2-10 Concentration dependence UV and CD spectra of 7-*O*-methyl-*iso*-vitexin (**18**) in D<sub>2</sub>O at 30° C.

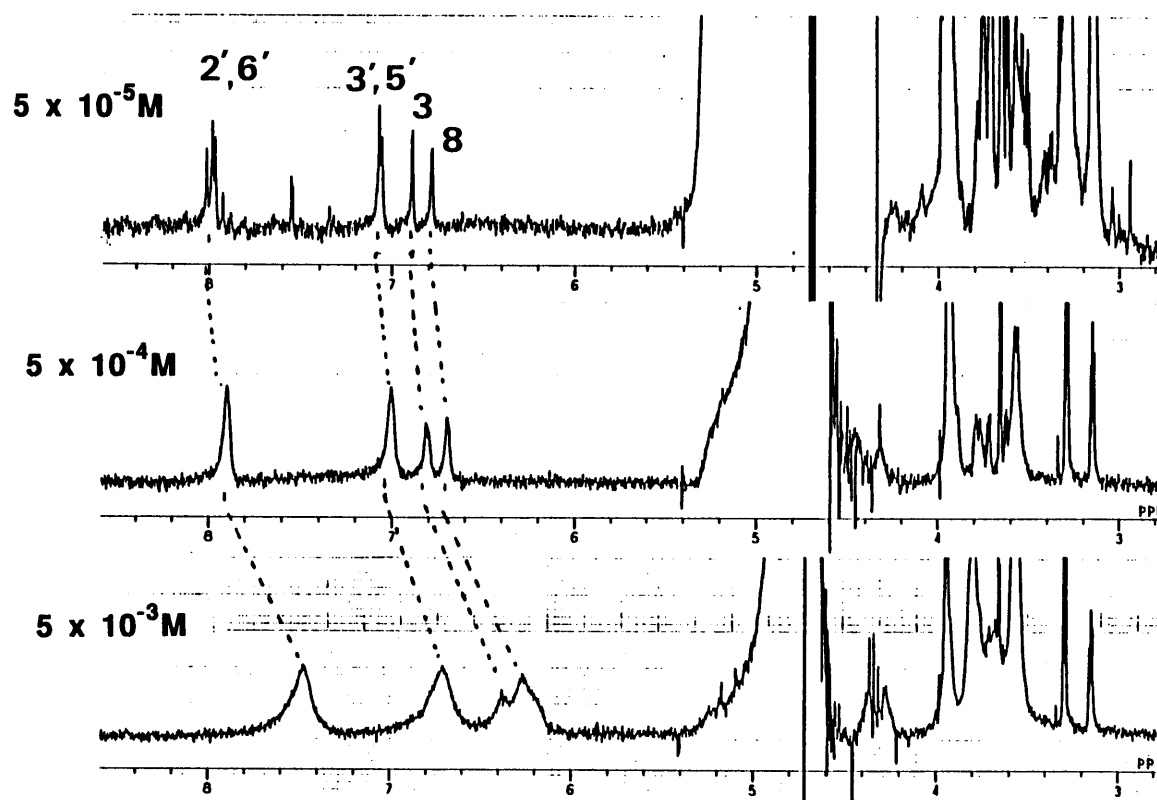


Fig. 2-11 Concentration dependence of  $^1\text{H}$  NMR spectra of 7-*O*-methyl-*iso*-vitexin (**18**) in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $30^\circ\text{C}$  (500 MHz).

## 2. 3 コンメリニンの構造

後藤、田村らは様々なコンメリニンの性質、再構成実験の結果、および機器分析のデータから、コンメリニン (15) の組成を  $[M_6F_6Mg_2]^6$  であるとし<sup>54</sup> Fig. 2-12 の構造模式を提出した<sup>1,5</sup>。可視部に非常に強い負の励起子型のコットンを示すことから、アントシアニンの母核同士が左旋的にスタッキングし、母核のB環に水酸基が2個以上ないとコンメリニン様錯体が生成しないことから、金属はB環の水酸基に配位しているであろうと推定した<sup>1,5</sup>。斉藤らによる結晶の回折データから分子内に3回軸が存在することがわかり<sup>55</sup>、さらに、後藤、河合らは、Cd-コンメリニン (16) のX線結晶構造解析により (R 因子 33%)、マロニルアオバニンの母核部分の座標決定に成功し (Fig. 2-13)、これが、コンメリニンの機器分析データを非常に良く説明することを明かにした<sup>1,5, 56</sup>。

コンメリニンの完全な構造決定はX線結晶構造解析に依るしかない。しかし、分子量約9000の高分子化合物を、数百の低分子有機化合物の分解能で解析するには、他の分析データからの構造推定が不可欠である。そこで、田村らの報告したコンメリニンの再構成法<sup>54</sup>を参考にして、コンメリニンおよびアントシアニンを代えたコンメリニン様錯体を構成し、その構造について、主としてNMRを用いて解析した。さらに、中心金属を変えたコンメリニン様錯体の結晶化を行い、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の装置を用いて、X線結晶構造解析を行った。

### 2. 3. 1 コンメリニンおよびコンメリニン様色素の再構成

コンメリニンは、マロニルアオバニン (5, M, TFA 塩) を中和後、1当量のフラ



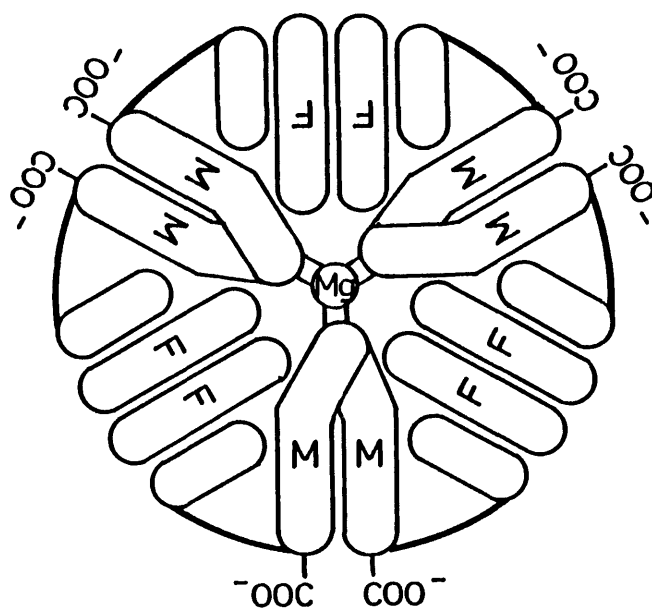


Fig. 2-12 A proposed gross structure of commelinin (another magnesium ion is under the magnesium ion shown). M: malonylawobanin (5); F: flavocommelin (14).

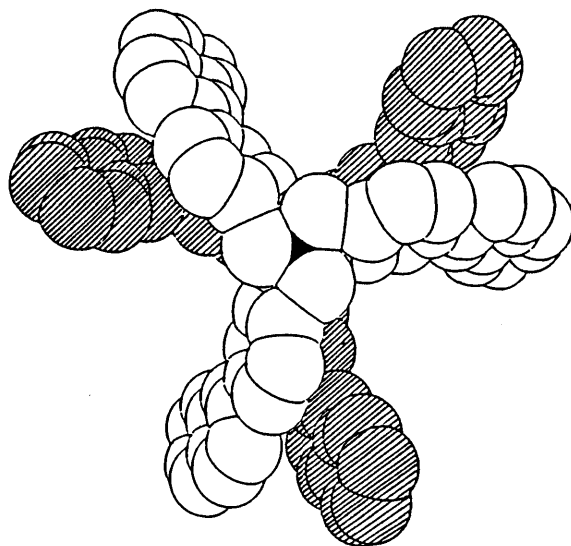
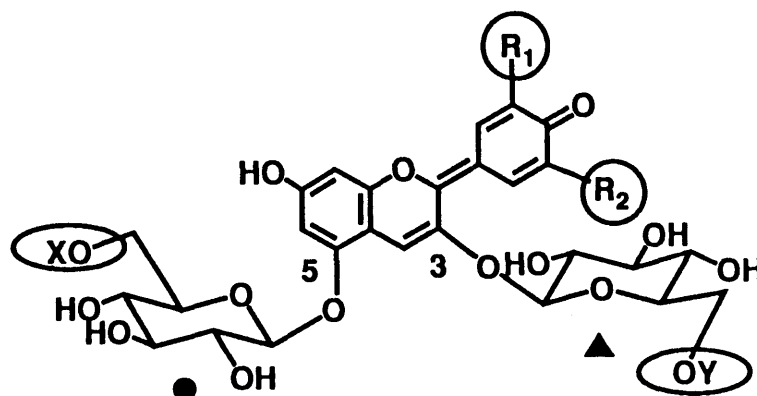


Fig. 2-13 Arrangement of six anthocyanidin skeletal frameworks in the commelinin molecule obtained from preliminary X-ray analysis by Goto *et al.*

ボコンメリン (14, F) と 1 / 3 当量のマグネシウムを加えることにより再構成することができる。さらに、田村は、B 環の水酸基の置換様式だけがマロニルアオブニンと異なるアントシアニンを用いてコンメリニン様錯体の再構成実験を行い、コンメリニン様錯体が生成するためには、B 環上に 2 個以上の水酸基が必要であることを明らかにした<sup>1,5, 20, 61</sup>。しかし、コンメリニン様錯体の色調や安定性などの性質について、詳細には明らかでなかった。そこで、効率よくコンメリニンを再構成する方法を検討し、同時に、アントシアニンばかりでなく、フラボンも代えたコンメリニン様錯体を再構成し、その性質について調べた。

マロニルアオブニンを薄いアンモニア水で中和後、減圧下濃縮乾固し、そこへ、1.2 当量のフラボコンメリンを粉末でなく濃厚水溶液として加え、次いで、1 当量の酢酸マグネシウム水溶液を加えた。得られた濃青色の溶液をセルロファイン GC-15 ゲルで精製した。濃い青色の画分を減圧下濃縮乾固すると、コンメリニンが濃紺の金属光沢を持つ固体として得られた。この方法で、部分的に構造がマロニルアオブニン、またはフラボコンメリンと異なるアントシアニンおよびフラボンを用いてコンメリニン様錯体の生成について調べた (Table 2-2)。コンメリニン様錯体の生成は、特徴的な電子スペクトルの形状、可視部の非常に強い励起子型の負のコットンと電気泳動における挙動で判断した。まず、B 環の置換様式だけが異なる 4 種のアントシアニンを用いて再構成実験を行った。マロニルシソニン (6, Ms)、モノデマロニルサルビアデルフィン (22)<sup>60</sup> でコンメリニン様錯体の生成が認められた。モノデマロニルサルビアニンと (23)<sup>60</sup>、サルビアマルビン (24)<sup>63</sup> では錯体の生成は全く認められなかった。コンメリニン様錯体の形成には B 環に 2 個以上の水酸基が必要であることが確認でき、金属は B 環の *O*-ジヒドロキシ基に配位していることが明らかになり、マグネシウムが酸素アニオンに配位する機構が考えられた<sup>1,5, 61</sup>。デ



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	X	Y	complexation	
malonylawobanin (5)	OH	OH	malonyl	<i>p</i> -coumaryl	O	(15)
awobanin (13)	OH	OH	H	<i>p</i> -coumaryl	O	(27)
malonylshisonin (6)	OH	H	malonyl	<i>p</i> -coumaryl	O	(28)
monodemalonylsalvadelphin (22)	OH	OH	malonyl	caffeyl	O	(29)
monodemalonylsalvianin (23)	H	H	malonyl	<i>p</i> -coumaryl	X	-
salviamalvin (24)	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	malonyl	caffeyl	X	-
succinylcyanin (9)	OH	H	H	succinyl	O	(30)
malonylcyanin (10)	OH	H	H	malonyl	O	(31)
delphin (7)	OH	OH	H	H	X	-

Table-2-2 Formation of commelinin-like pigment by changing of anthocyanin component in presence of magnesium ion.

ルフィン (7)、スクシニルシアニン (9)<sup>43</sup>、マロニルシアニン (10)、および、ツユクサ紫色変種タイプ I I の花卉色素 3-グルコシルデルフィニジン (25) と 3-p-クマリルグルコシルデルフィニジン (26)<sup>60, 64</sup> を用いた再構成実験から、母核 5 位の糖 (●) が必須であることと、▲の糖の 6 位には、芳香族酸である必要はないが、何らかのアシル基が必要であることが分かった。

これらのコンメリニン様錯体の電子スペクトル、CD スペクトルを Fig. 2-14, 2-15 に示した。母核がシアニジンであるアントシアニンから得た錯体は、可視の吸収極大波長がコンメリニンよりも 20-30 nm 短波長となり、色は紫色がかった青色となった。5 x 10<sup>-5</sup> M の濃度での安定性を比較すると (Fig. 2-16) マロニルシソニン-コンメリニン (28, Ms-コンメリニン) はコンメリニンとほとんど安定性が変わらなかったのに対し、▲の糖の 6 位が芳香族酸でない、スクシニルシアニン-コンメリニン (30, Sc-コンメリニン)、マロニルシアニン-コンメリニン (31, Mc-コンメリニン) は不安定であった。

次に、フラボンを代えて再構成実験を行った。フラボコンメリニンの 5 位の水酸基がメチル化された 5-O-メチル化フラボコンメリニン (17) と 4' 位のグルコースを加水分解除去した 7-O-メチル-iso-ビテキシン (18) をフラボンとして用い、再構成を試みた (Table 2-3)。5 位をメチル化したフラボンからはコンメリニン様錯体が生成したが、4' 位の糖がないものでは、生成しなかった。5-O-メチル化フラボコンメリニン-コンメリニン (32) の電子スペクトル、CD はコンメリニンとほとんど同じであったが (Fig. 2-17)、安定性が非常に劣り、コンメリニンの 1/10 程度の安定性しか示さなかった (Fig. 2-18)。

コンメリニンの中心金属を代えたコンメリニン様錯体が、武田らにより報告されている<sup>65-68</sup>。コンメリニンの X 線結晶構造解析を行うにあたり、中心金属の違う 2

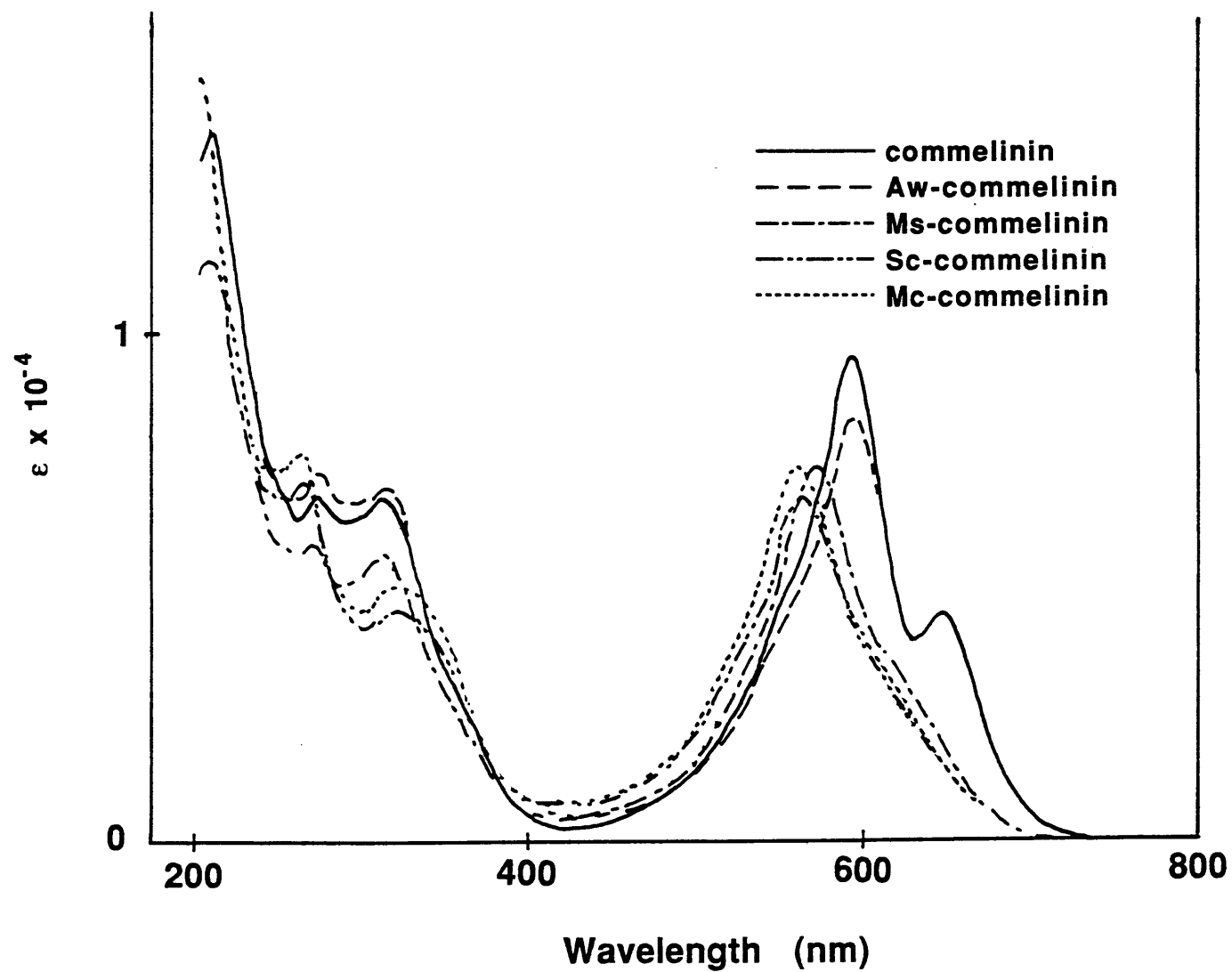


Fig. 2-14 Electronic spectra of commelinin (15) and commelinin-like pigments (27, 28, 30 and 31) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7 ( $5 \times 10^{-5}M$ ).

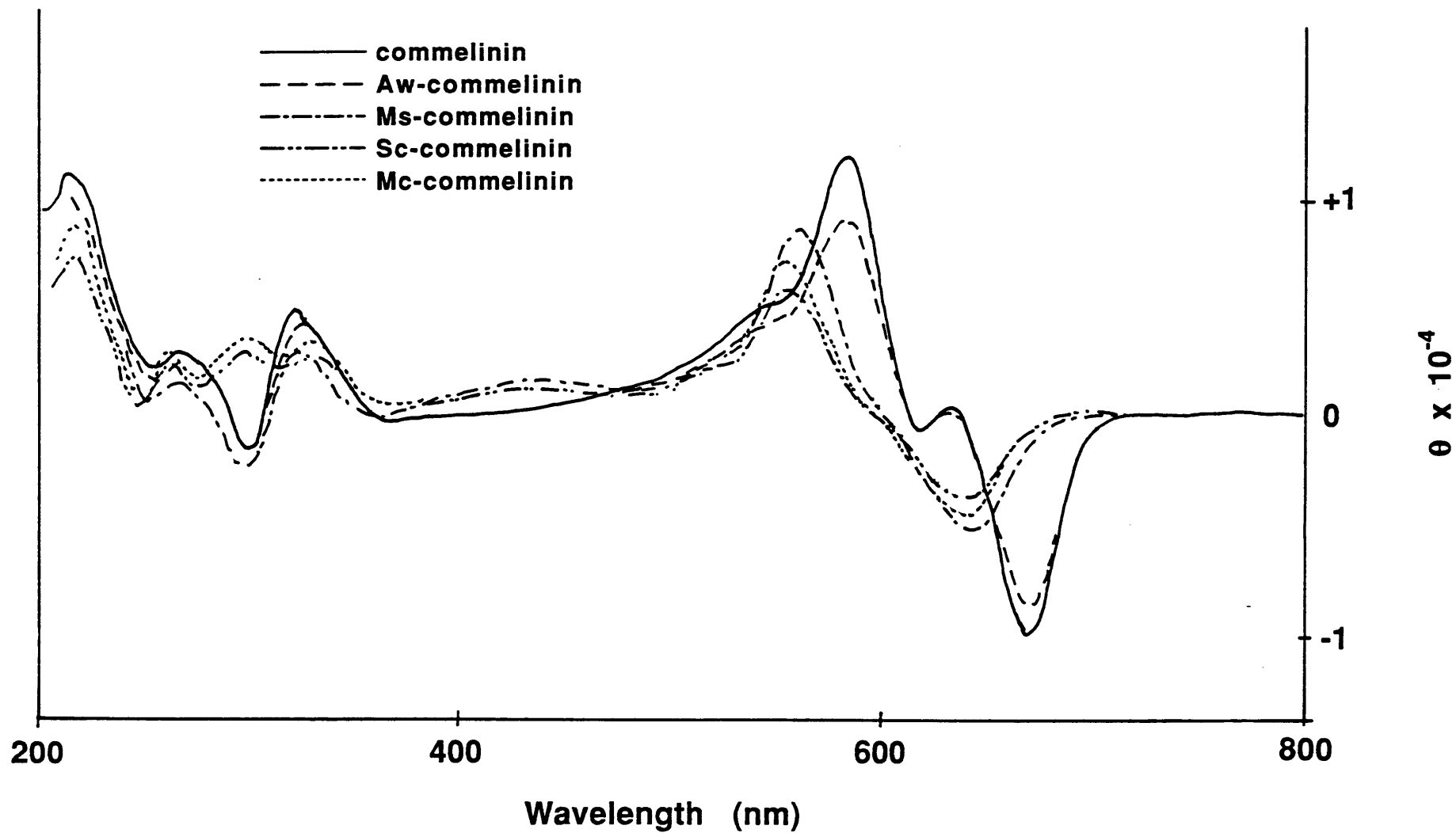


Fig. 2-15 CD of commelinin (15) and commelinin-like pigments (27, 28, 30 and 31) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7 ( $5 \times 10^{-5}$  M).

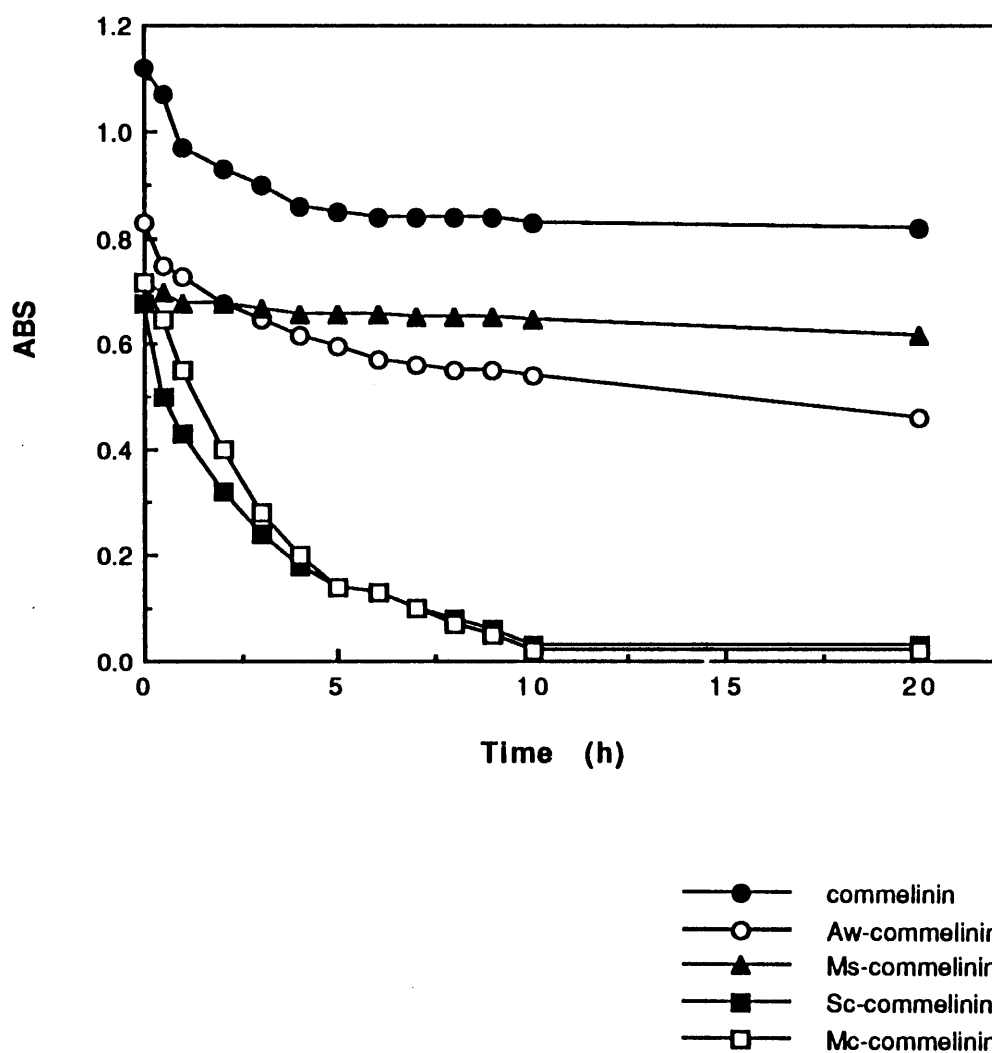
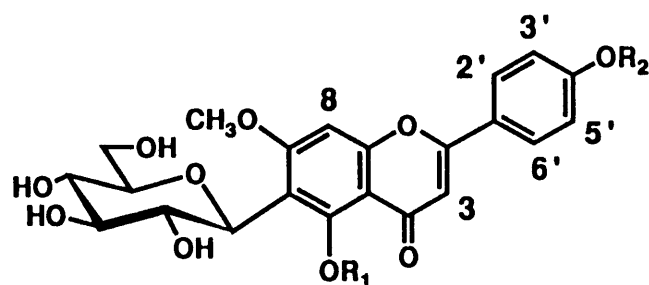


Fig. 2-16 Stability of commelinin (15) and commelinin-like pigments (27, 28, 30 and 31) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.7) at 25°C ( $5 \times 10^{-5}$ M).

Table 2-3 Formation of commelinin-like pigment by changing of flavone component in presence of magnesium ion.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	complexation	
flavocommellin (14)	H	glucosyl	○	(15)
5-O-methylflavocommellin (17)	CH <sub>3</sub>	glucosyl	○	(32)
7-O-methyl-/so-vitexin (18)	H	H	X	-

Table 2-4 Formation of commelinin-like pigment with changing complexation metal in presence of malonylawobanin (5, M) and flavocommellin (14, F).

metal ion	complexation	metal ion	complexation
Mg <sup>2+</sup>	○ (15)	Ni <sup>2+</sup>	○ (35)
Al <sup>3+</sup>	× -	Cu <sup>2+</sup>	× -
Cr <sup>2+</sup>	× -	Zn <sup>2+</sup>	○ (33)
Mn <sup>2+</sup>	○ (36)	Cd <sup>2+</sup>	○ (16)
Fe <sup>2+</sup>	× -	Sn <sup>2+</sup>	× -
Fe <sup>3+</sup>	× -	Ba <sup>2+</sup>	× -
Co <sup>2+</sup>	○ (34)	Pb <sup>2+</sup>	× -



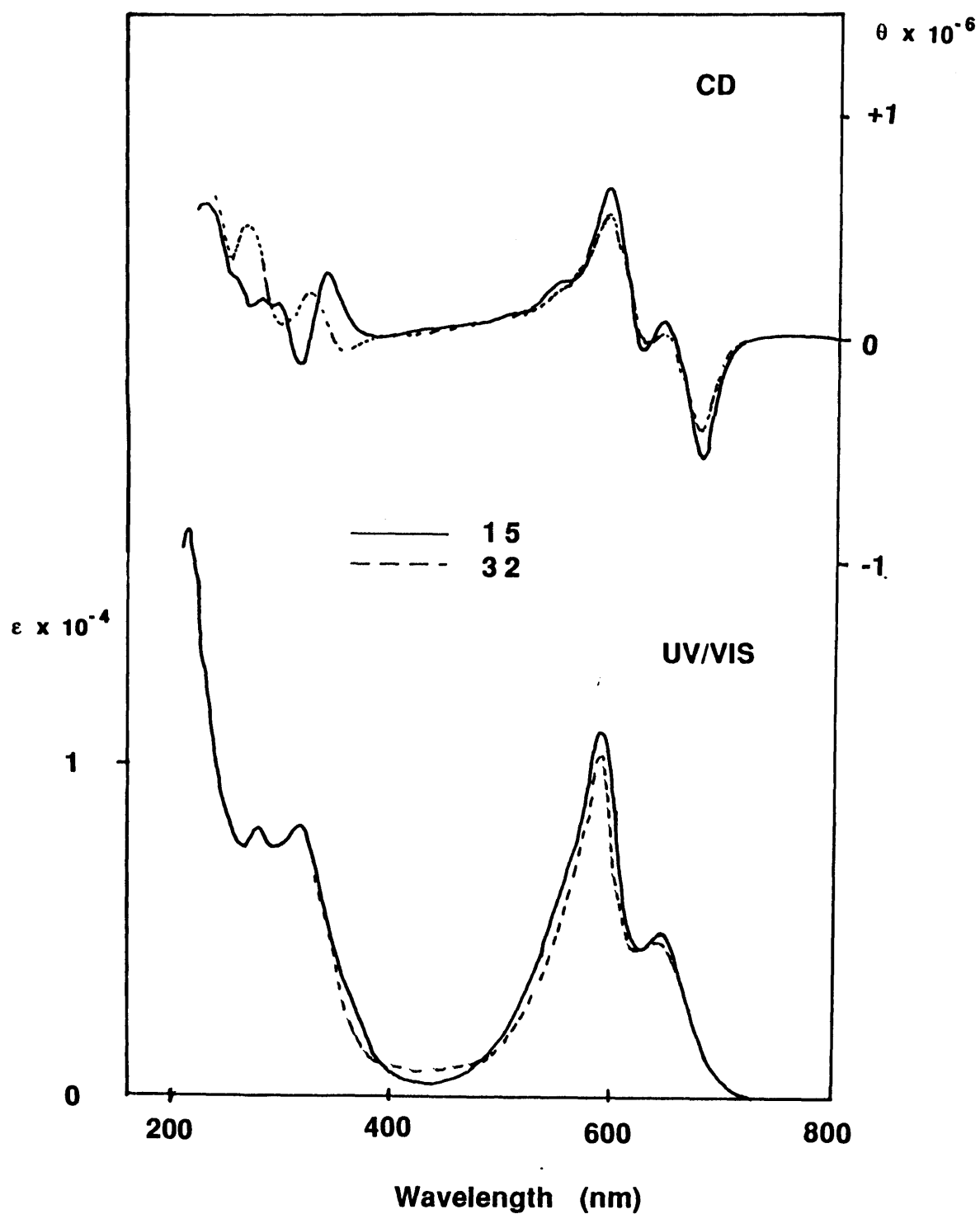


Fig. 2-17 Electronic spectra and CD of commelinin (15) and commelinin-like pigments (32) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7 ( $5 \times 10^{-5}M$ ).

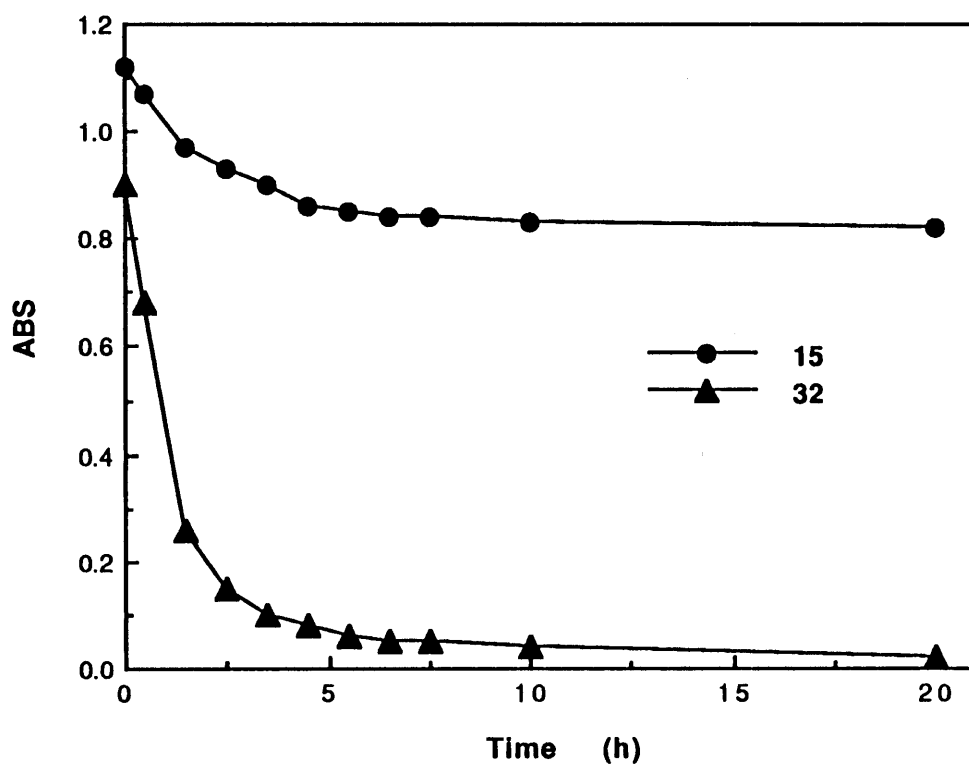


Fig. 2-18 Stability of commelinin (15) and commelinin-like pigments (32) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.7) at 25°C ( $5 \times 10^{-5}$ M).

種の結晶の回折データを用いた重原子法が有望であると考え、中心金属を代えた様々なコンメリニン様錯体の再構成を行った。天然のマグネシウムの他に、亜鉛 (Zn-コンメリニン, 33)、コバルト (Co-コンメリニン, 34)、ニッケル (Ni-コンメリニン, 35)、マンガン (Mn-コンメリニン, 36)、カドミウム (Cd-コンメリニン, 16) を用いるとコンメリニン様錯体が生成した。バリウム、アルミニウム、鉄、銅では溶液が青黒色となり、沈殿を生じたものもあったが、コンメリニン様錯体はできなかった (Table 2-4)。各錯体の電子スペクトルとCDを Fig. 2-19 に示した。金属によって、可視の吸収極大波長が異なり、CDのコットンの値も異なった。これは、配位する金属によって、アントシアニン核の電子密度が微妙に変化するためと考えられた。安定性についても、天然のマグネシウム錯体よりも、コバルト、ニッケル錯体の方が安定であることがわかった (Fig. 2-20)。

再構成したコンメリニンおよびコンメリニン様錯体の金属含量を、ICP発光分析により定量した (Table 2-5)。田村らにより提出されたコンメリニンの組成<sup>54</sup> (アントシアニン：フラボン：金属 = 3 : 3 : 1) から得られる理論値と比較すると何れも若干分析値が低かったが、林らにより提出された組成<sup>53</sup> (アントシアニン：フラボン：金属が 2 : 2 : 1) では分析値が全く一致しないことから、3 : 3 : 1 の組成が正しいことを支持するものと考えた。分析値が理論値より低いのは、水分子が強固に結合し、完全には除去できなかったためと考えている。

## 2. 3. 2 コンメリニンにおけるコピグメンテーション

コンメリニンは、マロニルアオバニン (M) とフラボコンメリン (F) が金属の回りを -MMFFMMFFMMFF- ととりまいた構造であることがこれまでに推定されてい

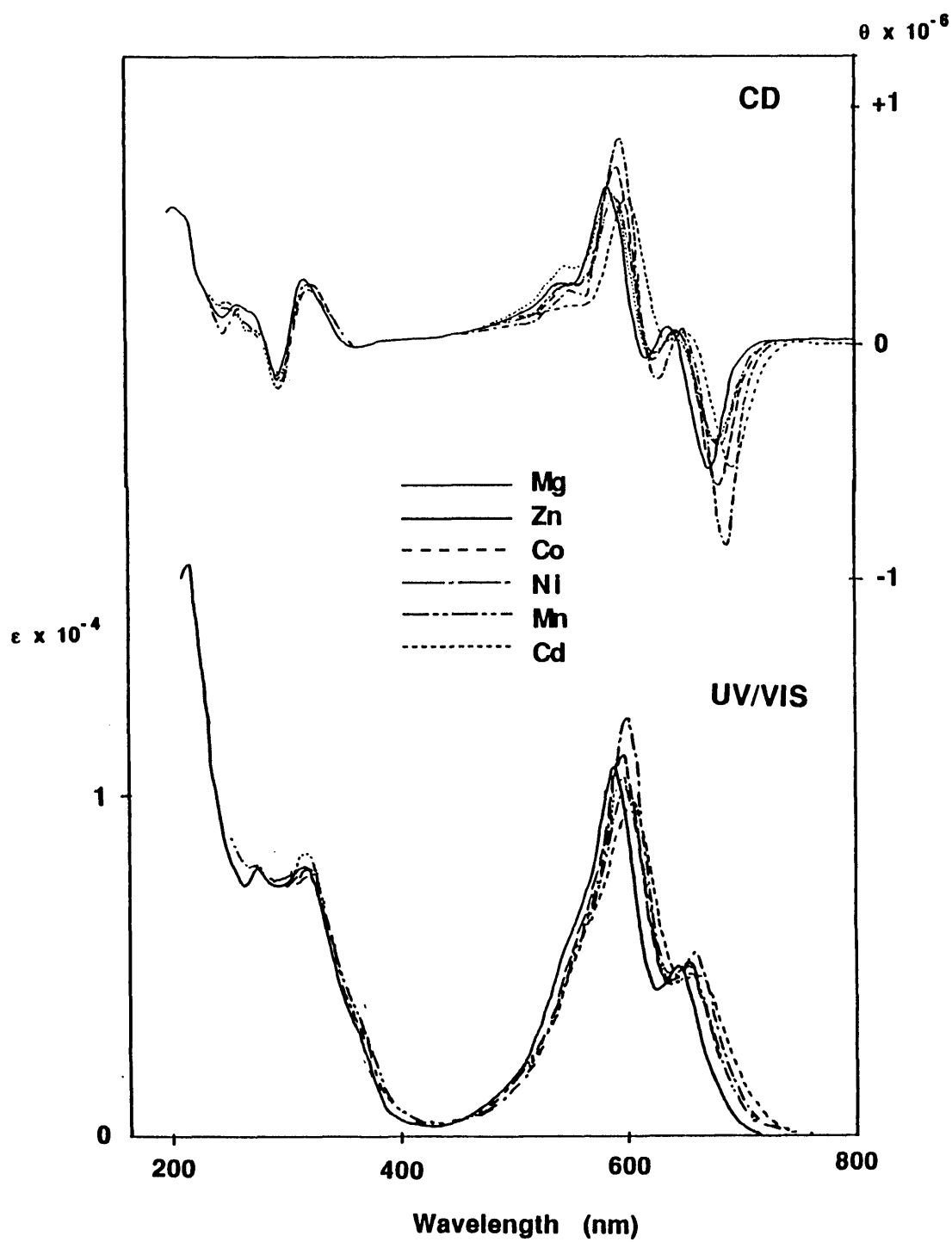


Fig. 2-19 Electronic spectra and CD of commelinin (15) and commelinin-like pigments (33, 34, 35, 36 and 16) in 0.05 M acetate buffer at pH 5.7 ( $5 \times 10^{-5}$  M).

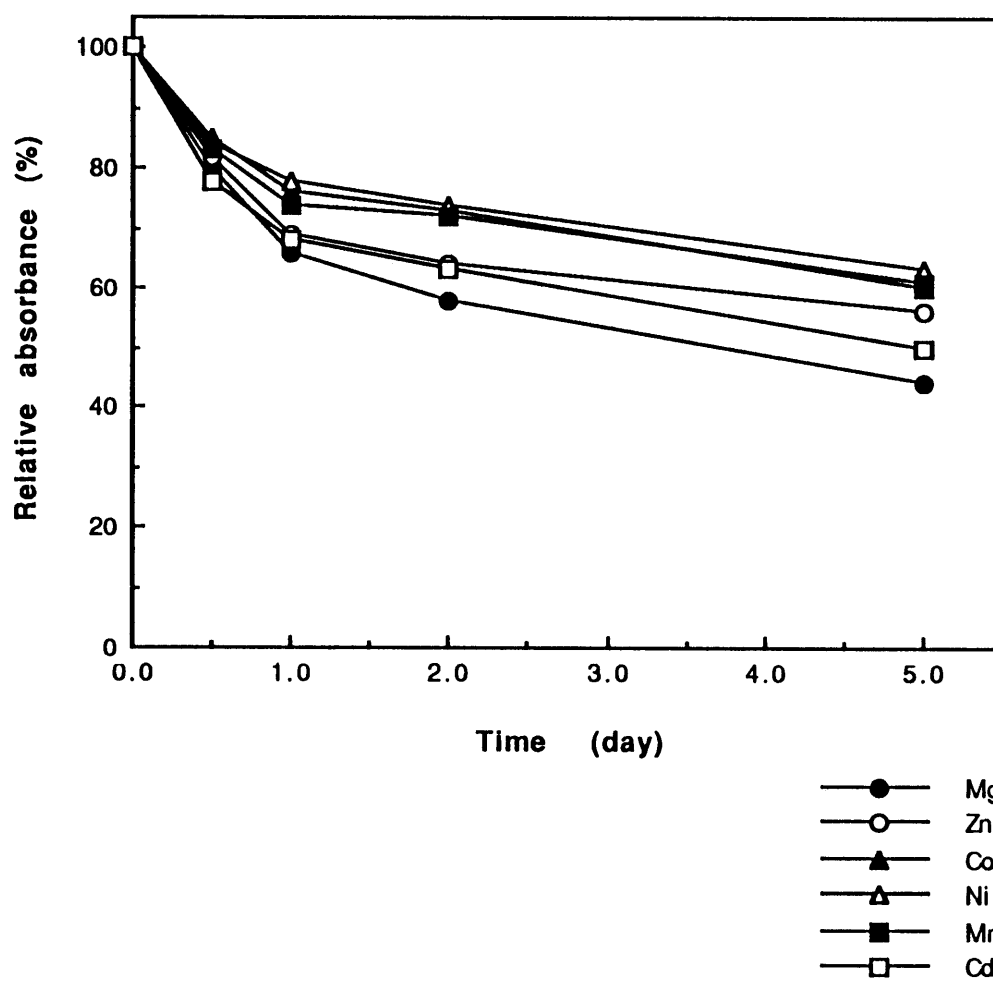


Fig. 2-20 Stability of commelinin (15) and commelinin-like pigments (33, 34, 35, 36 and 16) in 0.05 M acetate buffer (pH 5.0) at 25°C ( $5 \times 10^{-5}$ M).

Table 2-5 Analysis of metal content in commelinin (**15**) and commelinin-like pigments by ICP.

	found (%)	calcd. (%)
comelinin ( <b>15-n</b> )	0.42	0.54
comelinin ( <b>15-c</b> )	0.43	0.54
<b>Ms</b> -comelinin ( <b>28</b> )	0.37	0.55
<b>S c</b> -comelinin ( <b>30</b> )	0.10	0.58
<b>Zn</b> -comelinin ( <b>33</b> )	1.15	1.46
<b>Co</b> -comelinin ( <b>34</b> )	1.03	1.32
<b>Ni</b> -comelinin ( <b>35</b> )	1.17	1.32
<b>Mn</b> -comelinin ( <b>36</b> )	1.00	1.23
<b>Cd</b> -comelinin ( <b>16</b> )	1.90	2.48

る (Fig. 2-12)<sup>1,5</sup>。この分子における各成分の会合状態については、アントシアニンの母核同士の自己会合は、CDおよび予備的なX線結晶構造解析の結果などから明らかである (Fig. 2-13)。また、2. 2で述べたように、コンメリニンの構成フラボンであるフラボコンメリンが濃厚水溶液中で左旋的に自己会合することが分かり (Fig. 2-4)<sup>69</sup>、コンメリニン分子内でも、同様の自己会合の存在が示唆された。

コンメリニン分子中のアントシアニンとフラボンの会合状態、すなわち、コピグメンテーションの状態を機器分析的に明らかにするには、NMRスペクトルにおける分子内のNOEを解析するのがよい。コンメリニンの重水中の<sup>1</sup>H NMRスペクトルは、1986年に田村により報告された<sup>61</sup>。コンメリニンが、アントシアニンとフラボン各6分子ずつから構成された高分子であるにもかかわらず、そのスペクトルは単純で、各成分のシグナルは1分子ずつしか観測されていない。このことは、コンメリニン分子において、成分が対称性よく配置されていることを示唆する。さらに田村は、シグナルの一部を帰属し、マロニルアオブニン (5, M) とフラボコンメリン (14, F) 間の分子間NOEを解析し、コピグメンテーションについて示している<sup>61</sup>。しかし、コンメリニンのスペクトルは強い会合のため非常にブロードで、しかも大きなアニソトロピーを受けているため帰属を誤る恐れが大きく、測定条件を適切に選ばないとスピン拡散により全てのシグナルに負のNOEが観測されてしまう。そこで、コンメリニンの重水中のスペクトルの測定条件を検討しなおした。コンメリニンの安定性と、NOE実験を行ったときのスピン拡散との兼ね合いを検討して、<sup>1</sup>H NMRの測定条件を、コンメリニンの濃度を20-40 mg/mL (約3-7 × 10<sup>-3</sup>M) とし、測定温度を40°Cまたは50°Cに設定した。シグナルの帰属は、コンメリニンの他にアオブニン-コンメリニン (27, Aw-コンメリニン)、マロニルシソニン-コンメリニン (28, Ms-コンメリニン) のスペクトルを比較して行った。測定は、

1次元のHOMOSD、NOE差スペクトルだけでなく、2次元測定(DQF-COSY、NOESY、HOHAHA)を中心的に利用した。

コンメリニンにおけるアントシアニンの芳香族部分のシグナルを帰属するために、まず、マロニルシソニン-コンメリニン(28, Ms-コンメリニン)とコンメリニンのスペクトルを測定した(Fig. 2-21)。Ms-コンメリニンではアントシアニンの母核がシアニジンであるため、コンメリニンと比較するとB環5'位の水素のシグナルが新たに出現する。6.51 ppmにダブルットが観測されたので、これをB環の5'位水素と考え、これをもとにMs-コンメリニンのDQF-COSYよりB環2'、6'位のシグナルの帰属を行った(Fig. 2-22)。さらに5.90 ppmと7.30 ppmのブロードなダブルットが16 Hzの結合定数を持つことからp-クマル酸の $\alpha$ ,  $\beta$ 水素、6.70 ppmと7.20 ppmのダブルットが各々2 H分あることと結合定数が約8 Hzであったことからp-クマル酸の2, 6位水素、および3, 5位水素と推定した。コンメリニンのスペクトルは、これと化学シフトは多少移動したもののシグナルのパターンはよく似ていたことから、Ms-コンメリニンとの比較、類推によりFig. 2-21のように推定した。Aw-コンメリニンの芳香族領域のシグナルも同様に推定した(Fig. 2-21)。

次に、糖のアノマー水素の帰属のために、Aw-コンメリニンのスペクトルの解析を行った。Aw-コンメリニンのDQF-COSYスペクトルをアノマー水素と推定した5 ppm付近のブロードなダブルットから出発して解析し、(Fig. 2-23-1)の様に糖の水素のつながりを明らし、同様の解析をコンメリニンについても行なった。これから、5.2 ppmのシグナルと関係づけられた糖の6位メチレンシグナルはコンメリニン、Aw-コンメリニンの両分子とも低磁場に観測されたのに対し、5.3 ppmのシグナルから関係づけられた糖の6位メチレンシグナルはコンメリニンでは低磁場であったが、Aw-コンメリニンではより高磁場に移動していることが分かった。



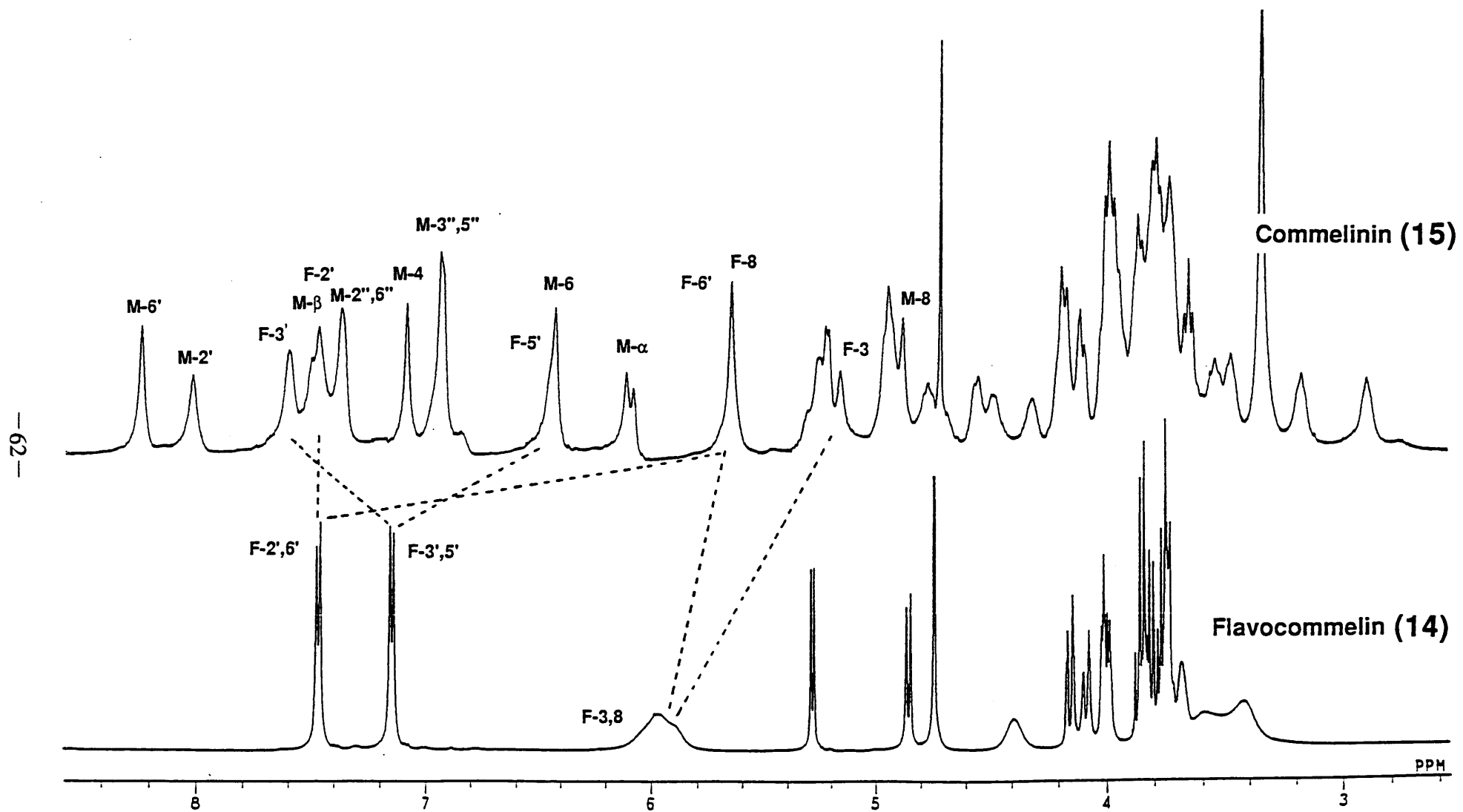


Fig. 2-21-1  $^1\text{H}$  NMR spectra of commelinin (15) and flavocommelin (14) in  $\text{D}_2\text{O}$  at  $40^\circ\text{C}$  (500 MHz).

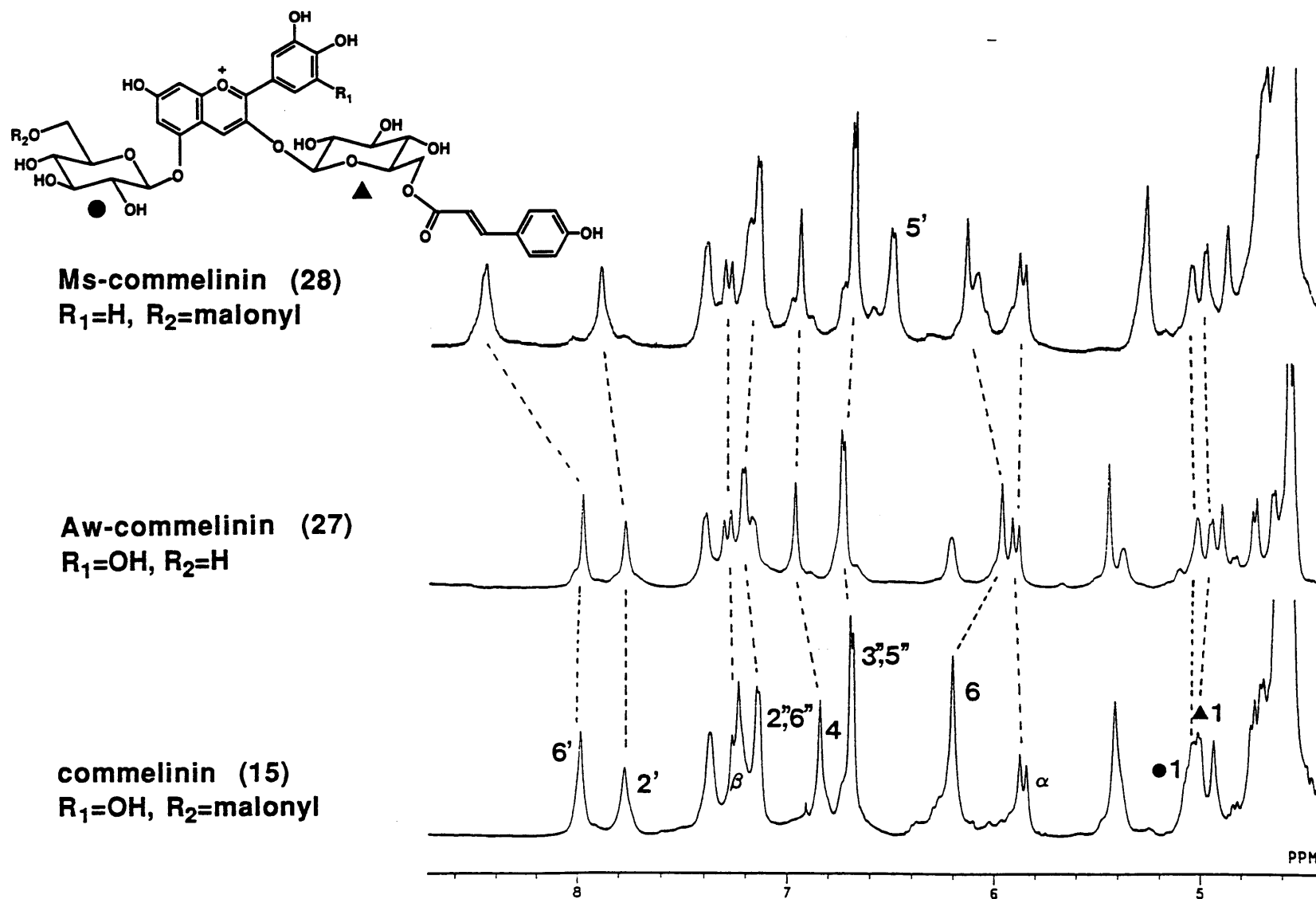


Fig. 2-21-2 <sup>1</sup>H NMR spectra of commelinin (15), Aw-commelinin (27) and Ms-commelinin (28) in D<sub>2</sub>O at 40° C (500 MHz).

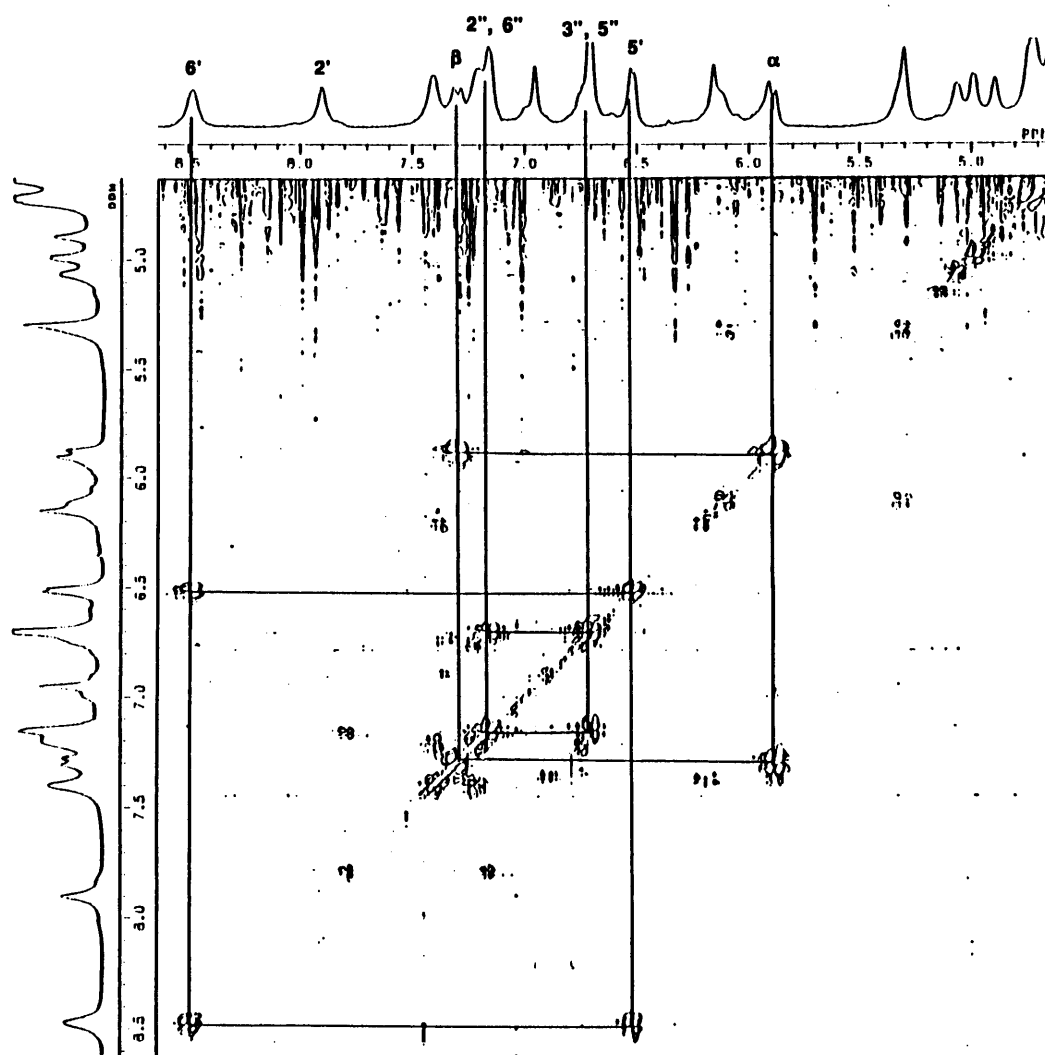


Fig. 2-22 Partial DQF-COSY of Ms-commelinin (**28**) in D<sub>2</sub>O at 40°C (500 MHz).

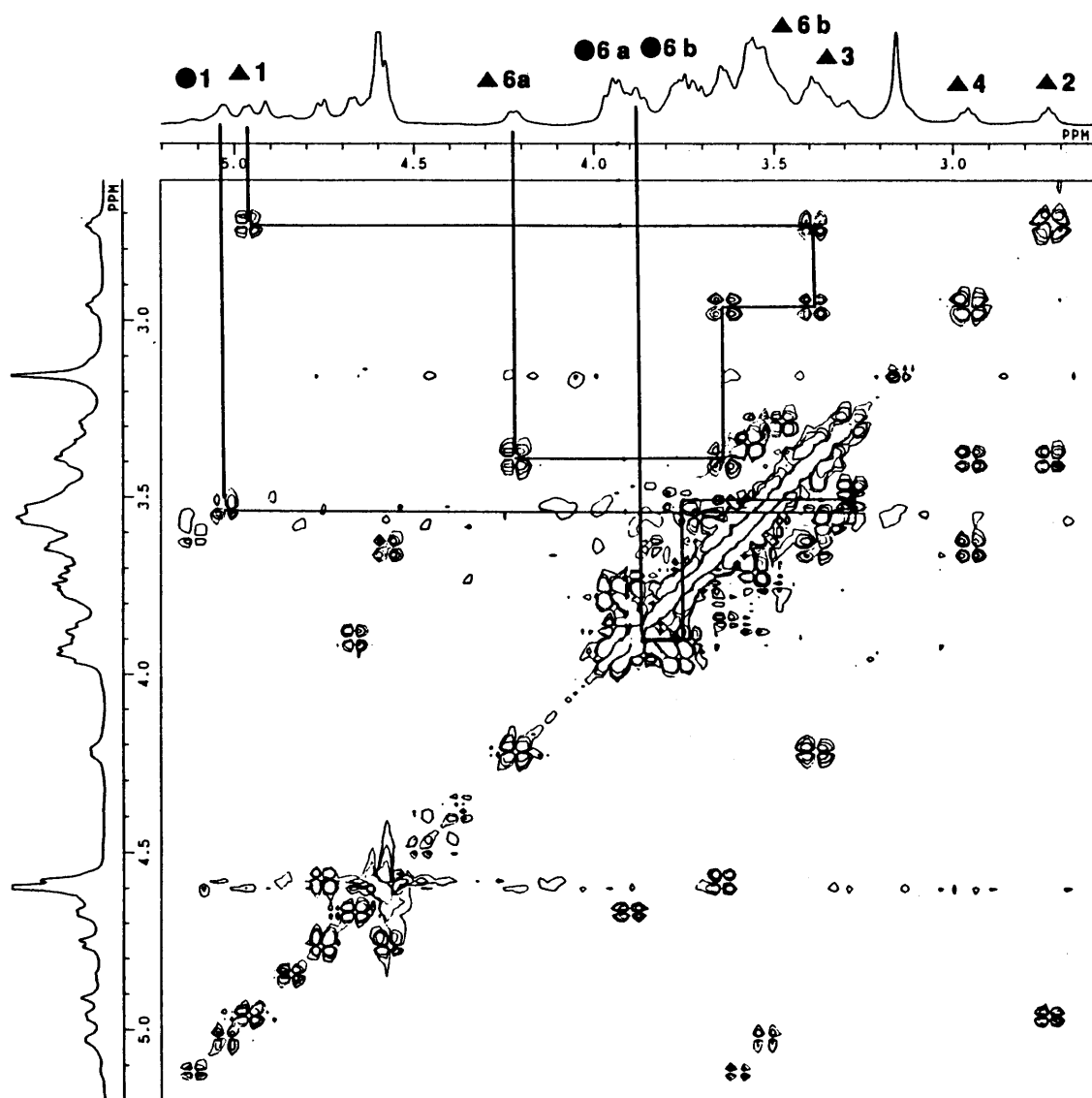


Fig. 2-23-1 Partial DQF-COSY of A w-commelinin (27) in D<sub>2</sub>O at 40°C (500 MHz).

これから、Aw-コンメリニン (27) において5.2 ppm のシグナルが▲-1、5.3 ppm のシグナルが●-1 と帰属し、これを基に、27 のNOESYを解析した。▲、および●の糖のアノマー水素から強いNOE交差ピークが観測されたシグナルをそれぞれ、4、6 位水素と帰属した。NOESYからは、*p*-クマル酸の2、6 位および3、5 位と推定したシグナルの間にNOE交差ピークが観測され、さらに、*p*-クマル酸の $\alpha$ 水素と2 位、6 位水素との間にもNOEが認められたことから、この帰属が確定した。アントシアニンの8 位水素は、アントシアニンB環2' 位の水素とNOEが観測された4.6 ppm のシグナルと帰属した。

同様にして、コンメリニンおよびMs-コンメリニンのグルコース1 位のシグナルを、高磁場側を▲-1、低磁場側を●-1 と推定してそれぞれNOESYの解析を行なった。推定した帰属は矛盾なく説明できたことから、アントシアニンの芳香環部分、および、糖部分の帰属が確定した。

残る芳香族領域のシグナルは、フラボコンメリン (14, F) 由来のものである。まず、Aw-コンメリニンを用いたDQF-COSYから、フラボコンメリンB環の4 水素を、オルトカップリングした2 水素ずつの2 組に分類した (Fig. 2-23-2)。次に特徴的な3.15 ppm の7 位メトキシ基シグナルからのNOEを解析して、フラボコンメリン8 位の水素が5.44 ppm と帰属できた。糖のアノマー水素のシグナルは、4.64 ppm と4.74 ppm に観測され、その内、4.74 ppm のダブルットシグナルが結合定数9 Hzであったため、これをC-グルコシドである△の糖の1 位、残りの4.64 ppm のシグナルを○の1 位と推定した。○-1 のシグナルからは、先のDQF-COSYでグループ化されたシグナルのうち6.2 ppm と7.40 ppm のシグナルにNOEが観測されたので、これをフラボコンメリンB環の3' および5' 位水素であると帰属した。残る未帰属のシグナル(4.88 ppm) はフラボコンメリン3 位水素と決定し、

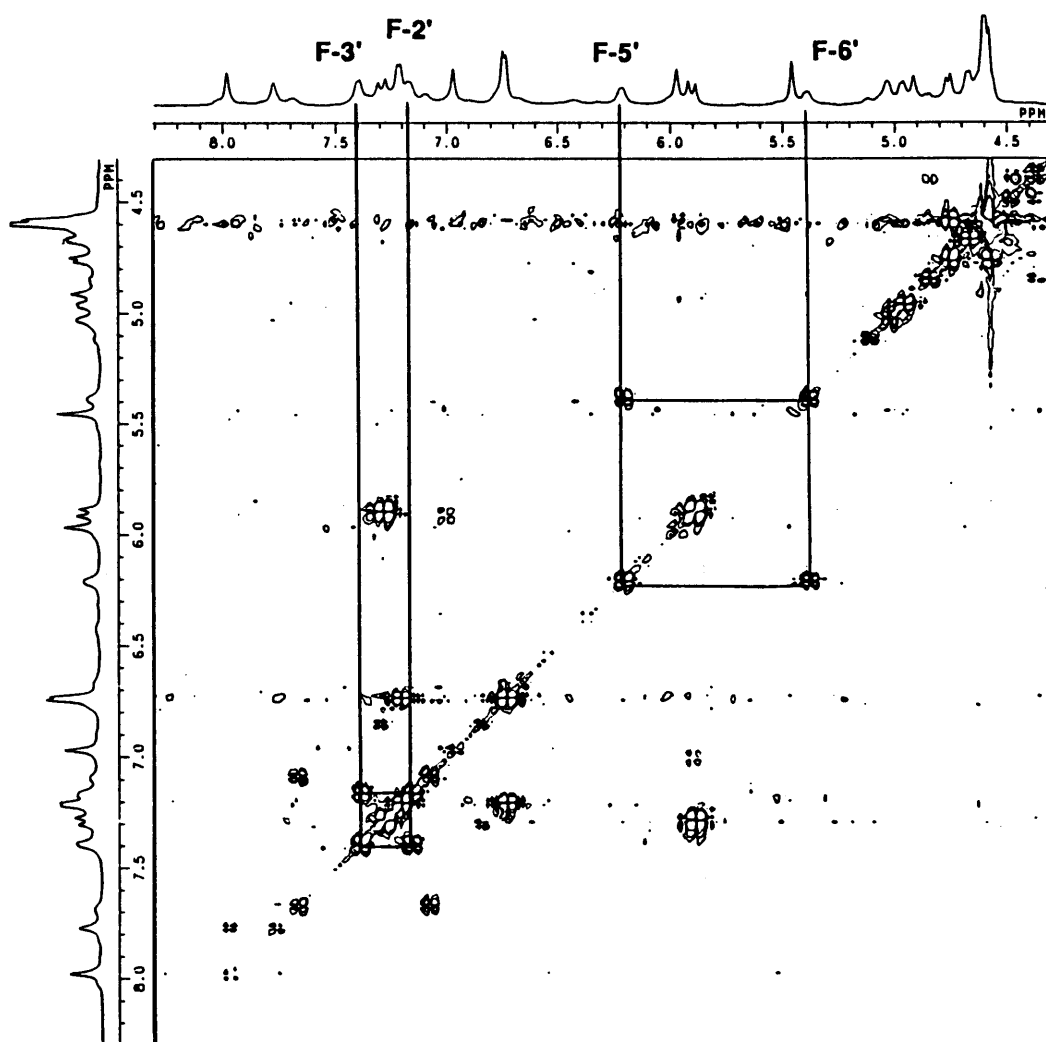


Fig. 2-23-2 Partial DQF-COSY of A w-commelinin (27) in D<sub>2</sub>O at 40°C (500 MHz).

この3位水素との間にNOEがある方を便宜上6'位水素とした。

以上により、Aw-コンメリニンの全てのシグナルの帰属が確定できた。同様にして、コンメリニン、Ms-コンメリニンのスペクトルも完全に解析した (Fig. 2-21)。

<sup>1</sup>H NMR スペクトルの完全な帰属を行った結果、コンメリニンにおいてマロニルアオバニンのB環、フラボコンメリンのB環の水素が、何れも非対称な環境にあり、それらのシグナルが別々に現れることが分かった。さらに、同条件下で測定したマロニルアオバニン、フラボコンメリンのスペクトルと比較すると、何れのシグナルもかなり高磁場にシフトしていることが明らかになった。コンメリニンにおけるマロニルアオバニン8位の水素は、4.63 ppm に観測され、かなり高磁場に移動している。それ以外のシグナルも、マロニルアオバニンを中性で測定することが不可能なため、定量的な比較はできなかったが、高磁場へ移動していた。フラボコンメリンの母核水素は、3、8、5'、6'位のシグナルが0.5 ppm から2 ppm も高磁場シフトしており、逆に、2'、3'位のシグナルは、0.5 ppm 程度の低磁場シフトが認められた。シグナルの高磁場シフトは、会合した相手分子の芳香環の環電流によると考えられることから、コンメリニンにおける各成分の強固な会合が示唆された。

この帰属を基に、コンメリニンにおけるマロニルアオバニン (M) とフラボコンメリン (F) との分子間のNOEを解析した (Fig. 2-24)。これらのNOEからマロニルアオバニンとフラボコンメリンの会合関係は、田村の報告したような2分子が同じ向きに平行に会合したのではなく、アントシアニンとフラボンの発色団同士がクロスして会合した Fig. 2-25 の様であることが明らかにできた。マロニルアオバニンは、4、6位水素および、▲-1 からp-クマル酸の水素への遠隔NOEも認められ、p-クマル酸残基がコンメリニン分子内で母核4、5、6位の方へ折り畳まれているこ

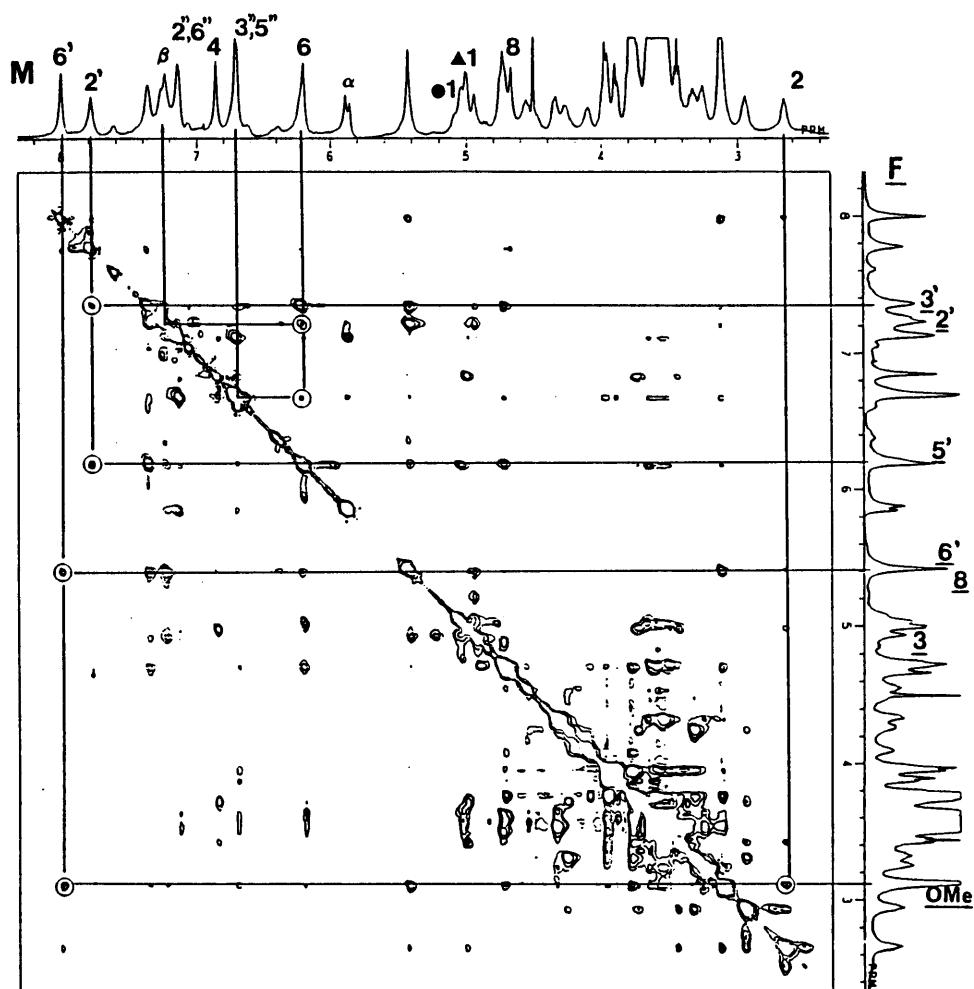
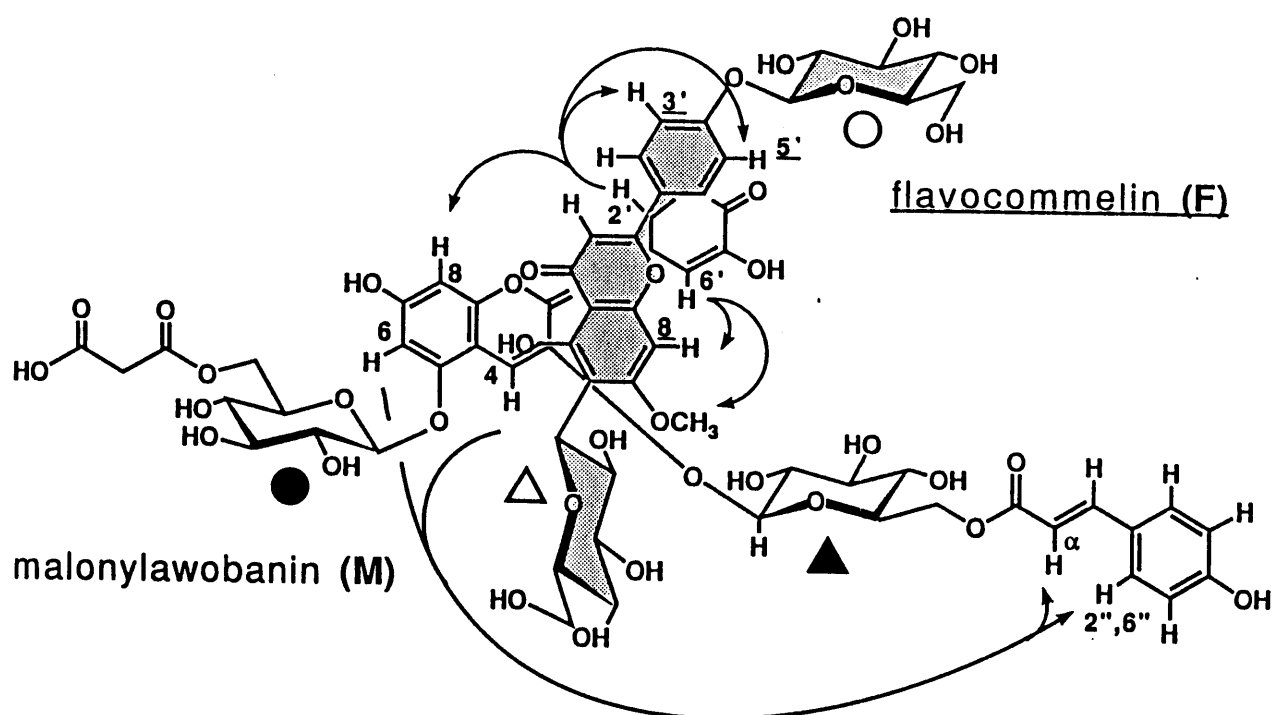


Fig. 2-24 NOESY of commelinin (15) in D<sub>2</sub>O at 40° C (500 MHz).





Arrows : long distance NOEs at 40°C

Fig. 2-25 Intermolecular NOEs and stacking pattern of malonylawobanin (5) and flavocommeline (14) in commelinin (15).

とが明らかになった。

コンメリニン分子内のマロニルアオバニンとフラボコンメリンの交差したコピグメンテーションにおけるねじれの向きは、アントニンとフラボンそれぞれの発色団の励起波長差が大きいため、CDから推定することはできない。しかし、これまでの研究により、各構成成分が中心金属の作る3回軸の廻りに環状に **-MMFFMMFFMMFF-** と配置され<sup>1,5</sup>、**M** 同士は左旋的に<sup>1,5, 20, 61</sup>、その間隙に挿入されている **F** 同士も左旋的に<sup>69</sup> 会合していることが明かである。**M** と **F** の会合が左旋的であるとする、会合分子はねじれが解消されることなく際限無く積み重なってしまう。従って、**MF**の会合様式は右旋的と考えられる。

### 2. 3. 3 コンメリニンのX線結晶構造解析

最初にコンメリニンのX線回折データを得たのは、伊藤、武田らで、1981年に中心金属をカドミウムに代えたコンメリニン様錯体を用いて、4軸型回折計によりデータを収集した<sup>55</sup>。結晶は3方晶系に属し、空間群は  $p321$  と報告されている<sup>55</sup>。その後1986年に斎藤（規夫）、武田らによって、前記の報告と独立に4軸型装置でデータの測定、解析がなされた<sup>70</sup>。斎藤らは、天然のコンメリニン (**15-n**)、再合成したコンメリニン (**15-c**)、Cd-コンメリニン (**16**) から、結晶を得ているが、全て空間群が異なり、さらに、伊藤らが得た空間群とも違っていた。しかし、両グループとも解を得るには至らなかった。1986年に河合、後藤らは伊藤らのデータを用いて部分的な解を得ることに成功した<sup>1,5, 56</sup>。しかし、R因子は33%でアントシアニンの母核部分しか明らかにできなかった<sup>1,5, 56</sup>。何れの研究も、最終的な解を得るに至らなかったのは、コンメリニンの分子量が、通常の有機化学的精度でX線

結晶構造解析を行い得る分子より大きく、得られた回折データの数が少なかったことも原因と考えられる。コンメリニンの結晶が不安定なため、長時間の測定に耐えないことも大きな要因である。現在、蛋白などの高分子で不安定な結晶のX線結晶構造解析には、シンクロトロン放射光から得られる強い白色X線を用いて、ワイセンベルグカメラで測定する方法が、最も強力な手段となっている。そこで、コンメリニンの回折データの測定を従来の4軸型でなく、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の巨大分子用ワイセンベルグカメラ・イメージングプレートのシステムを用いて<sup>71</sup>、高速、高精度にデータ収集し、解析を行った。

なお、本章に記したコンメリニンのX線結晶構造解析研究は高エネルギー物理学研究所の中川敦史博士と共同で行ったもので、結晶のX線回折データの収集、および解析は中川博士が行った。

2. 3. 1の方法で再構成した中心金属の異なる各種のコンメリニンを用いて、水-エタノールから結晶化を行った。Cd-コンメリニンが最も良好な単結晶（金属光沢を持つ濃紺のプリズム晶）を与えた。さらに、オオボウシバナの青色花卉搾汁から、水-エタノールによる沈澱、透析、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを繰り返すことにより天然のコンメリニンを精製し、同様に結晶化を行い、プリズム晶を得た。

コンメリニンの分子量の測定は、超遠心法により行った。田村は1986年に超遠心法でコンメリニンの分子量測定を行い、9300（文献61では9600）という値を得ている<sup>54,61</sup>。しかし、コンメリニンを0.1Nの塩化ナトリウム溶液に溶解してそのまま測定しており、等張液を対照に用いた測定ではないため、理論的には正しくなくその結果に問題があった。そこで、X線結晶構造解析を行うに当たり、分子量の再測定を行った。サンプルは、天然コンメリニンの他に、再構成したコン

メリニン、C d-コンメリニンを用い、何れも、水-エタノールから得た結晶を用いた。各々の試料を 0.1N の塩化ナトリウム水溶液に溶解し、5°C で 2 昼夜透析してから測定した。まずコンメリニンの比容を求めた。コンメリニンを 0.3-0.7% の濃度になるように 0.1N 塩化ナトリウム水溶液に溶解し、30 時間透析した後、振動密度計を用いて 10°C で溶液の密度を測定した。それぞれの溶液中のコンメリニンの量は吸光度法で定量した。天然コンメリニンの比容は 0.601、再構成したコンメリニンは 0.593、C d-コンメリニンは 0.556 であった (Table 2-6)。分析超遠心の測定は、濃度 2 mg/mL 程度のコンメリニン溶液を同様に 2 昼夜透析し、これを透析外液で約 10 倍に希釈して行った。対照には外液を用いた。温度は 10°C とし、25,000 rpm で 10 時間遠心して平衡状態にある時の濃度勾配データを用いて分子量を求めた (Fig. 2-26)。得られた分子量は、天然コンメリニン、再構成コンメリニン、C d-コンメリニンでそれぞれ 8400、8600、7900 であった。田村の得た 9600 の結果より若干小さい値となった。この差は、たぶん、今回の方法で得た比容が約 0.6 であったのに対し、田村の報告した比容が 0.65 と大きめであったためと考えられる。今回得られたコンメリニンの分子量は、後藤らが確定した、コンメリニンの組成  $[M_6F_6Mg_2]^{6-}$  から計算した分子量のコンメリニン：8814、C d-コンメリニン：8862 と良く一致し、さらに、後述の X 線結晶構造解析から確定した分子量ともよく一致した。

上記のデータを踏まえて、C d-コンメリニンのプリズム晶を用いて回折強度の測定を行った (Table 2-7)。自己パターン図上に現れたピークから、カドミウム原子の位置は結晶学的な 3 回軸上にあり、以前河合らにより報告された結果<sup>1,5,56</sup>と一致した。重原子置換による方法は、カドミウム以外を中心金属に含むコンメリニン様錯体の良好な単結晶が得られなかったため断念し、直接法による解析を試みた。

Table 2-6 Partial specific volume ( $v$ ) of natural commelinin (**15-c**), reconstructed commelinin (**15-c**) and Cd-commelinin (**16**) in 0.1 N NaCl.  
(all samples were dialysed for 2 days at 5° C)

sample	conc. (g/mL)	T (sec)	density ( $d_1$ )	$v$
dist. H <sub>2</sub> O	-	23.49707	[0.999713] ( $d_0$ )	
solvent	-	23.52116	1.004120	
<b>15-n</b> s1	$2.227 \times 10^{-3}$	23.52509	1.004932	0.632777
<b>15-n</b> s2	$3.085 \times 10^{-3}$	23.52767	1.005413	0.578492
<b>15-n</b> s3	$5.210 \times 10^{-3}$	23.53208	1.006235	0.591612
<b>15-c</b> s1	$1.579 \times 10^{-3}$	23.52442	1.004829	0.548721
<b>15-c</b> s2	$3.645 \times 10^{-3}$	23.52827	1.005547	0.606008
<b>15-c</b> s3	$4.768 \times 10^{-3}$	23.53016	1.005899	0.624315
<b>16</b> s1	$1.738 \times 10^{-3}$	23.52475	1.004891	0.554104
<b>16</b> s2	$3.068 \times 10^{-3}$	23.52786	1.005493	0.550210
<b>16</b> s3	$3.925 \times 10^{-3}$	23.52969	1.005834	0.561001
solvent	-	23.52111	1.004235	
dist. H <sub>2</sub> O	-	23.49683	[0.999713] ( $d_0$ )	

$$d_1 - d_0 = A - 1 (T_1^2 - T_2^2) \quad A: 252.4629$$

$$v_0 = \lim (1 - (d - C) / d_0) / C$$

$v_0$ natural commelinin	0.601
$v_0$ reconstructed commelinin	0.593
$v_0$ Cd-commelinin	0.556

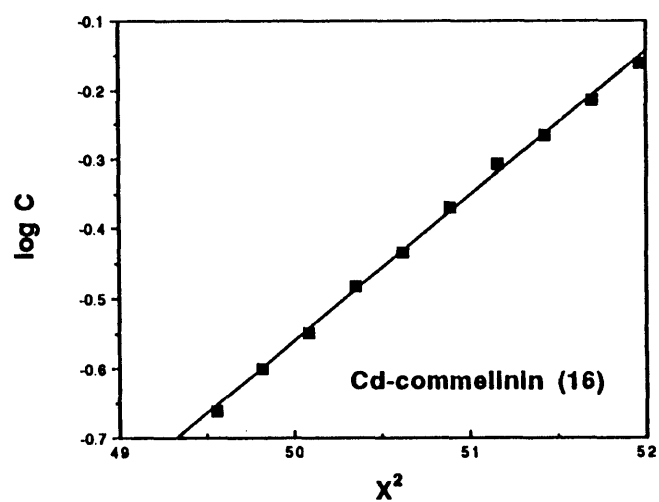
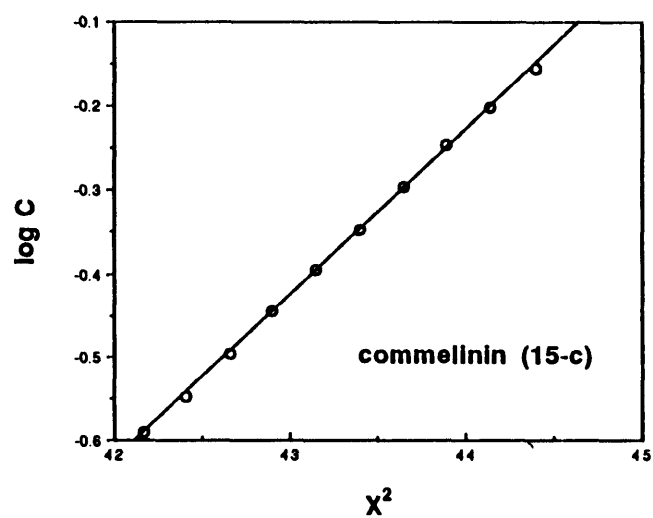
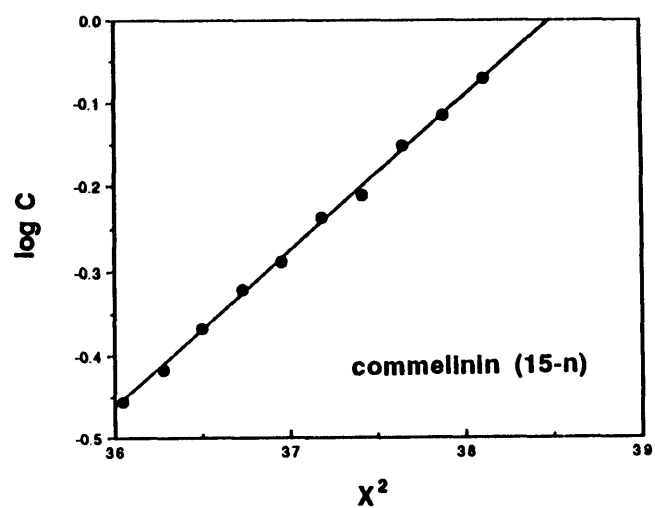


Fig. 2-26 Molecular weight of natural commelinin (15-n), reconstructed commelinin (15-c) and Cd-commelinin (16) obtained by ultracentrifugation. Plot of  $-\log C$  to  $\chi^2$  after 10h ultracentrifugation with 25,000 rpm.

Table 2-7 X-ray crystallographic data of natural commelinin (**15-n**) and Cd-commelinin (**37**).

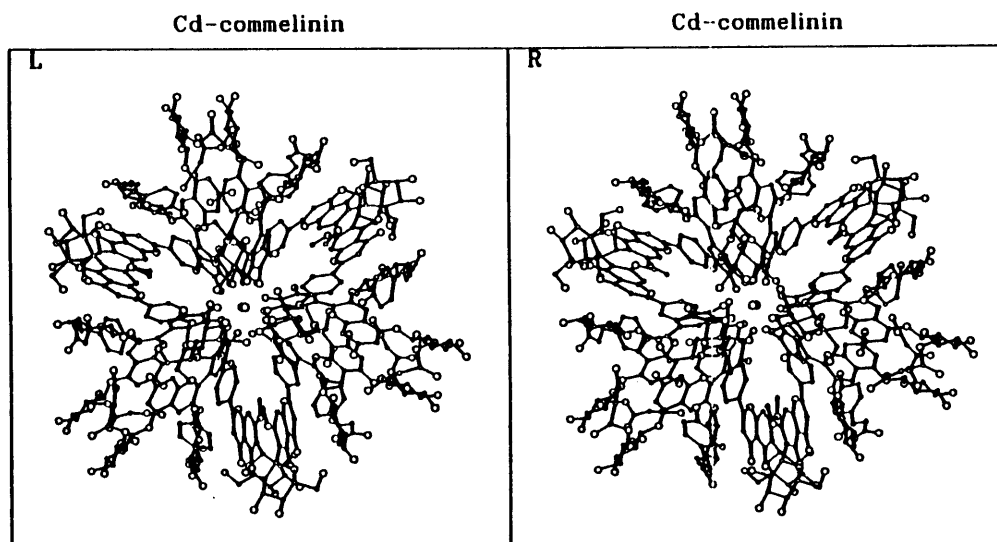
	comelinin ( <b>15-n</b> )	Cd-commelinin ( <b>37</b> )
crystal system	trigonal	trigonal
space group	<i>P</i> 321	<i>P</i> 321
cell dimensions	$a = b = 31.191\ (4)\ \text{\AA}$ $c = 33.623\ (8)\ \text{\AA}$	$a = b = 31.329\ (8)\ \text{\AA}$ $c = 33.590\ (14)\ \text{\AA}$
cell volume	$V = 2.833 \times 10^{-4}\ \text{\AA}^3$	$V = 2.856 \times 10^{-4}\ \text{\AA}^3$
number of molecules in an unit cell	$Z = 2$	$Z = 2$

SHELEX-86<sup>72</sup>を用いて解析を進めたところ、パターン図から得られていた金属原子の位置に相当した位置にピークが現れたので、この解を基に構造解析を進めた。これまでに得られたコンメリニンの構造に関する知見から、金属の回りには、マロニルアオバニン (5, M) のB環が配位していると考えられたので、3次元グラフィックス上で金属のピークの回りに母核の一部と見なせるピークを探した。選び出した63個のピークを用いて、逐次フーリエ法により原子モデルの作成を行うというサイクルを数回繰り返し、コンメリニンに含まれる水素以外の全ての原子の帰属を行った。原子パラメーターは、XTAL 2.6、XTAL 3.0<sup>73</sup>を用いて精密化し、分解能 1Åの 1 0 2 4 4 個の反射を構造因子の計算に含め（溶媒分子 3 0 個を含む）、R 因子 13.2% の結果を得た (Fig. 2-27)。

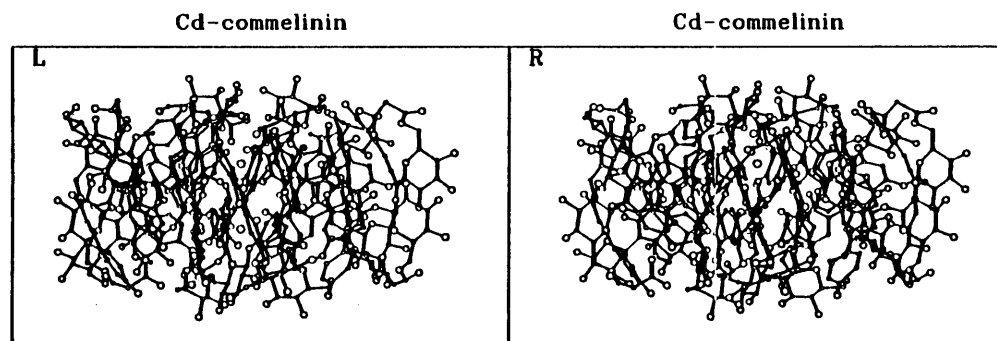
コンメリニンの結晶は非常に多くの結晶溶媒を含むため、結晶構造解析をさらに精密に行うためには、結晶溶媒を無視することはできない。そこで、コンメリニン結晶の熱分析を行い、含まれる溶媒の量を求めた。C d -コンメリニンのプリズム晶を 3 m g 程度秤量し熱天秤にのせ、室温から 500°C まで 2 0 分間で昇温して重量の減少を記録した (Fig. 2-28)。結晶の重量の約 30% が結晶溶媒で、これを全て水分子と考えると、コンメリニン1分子当たり約 1 8 0 分子の水を含むことがわかった。浮遊法により得られたC d -コンメリニンの比重 1.43 から溶媒分子の数を計算すると、結晶の非対称単位中に 6 0 個程度の水分子が含まれることになる。コンメリニン1分子当たりに換算すると 1 8 0 分子となり、熱分析の結果と良い一致を示した。

同様のシステムを用いて、天然コンメリニンのプリズム晶の回折データの測定も行った。解析は進行中だが、吸収強度のパターンは天然コンメリニン、C d -コンメリニンともほとんど同じで、結晶データもよく一致した。従って、天然コンメ



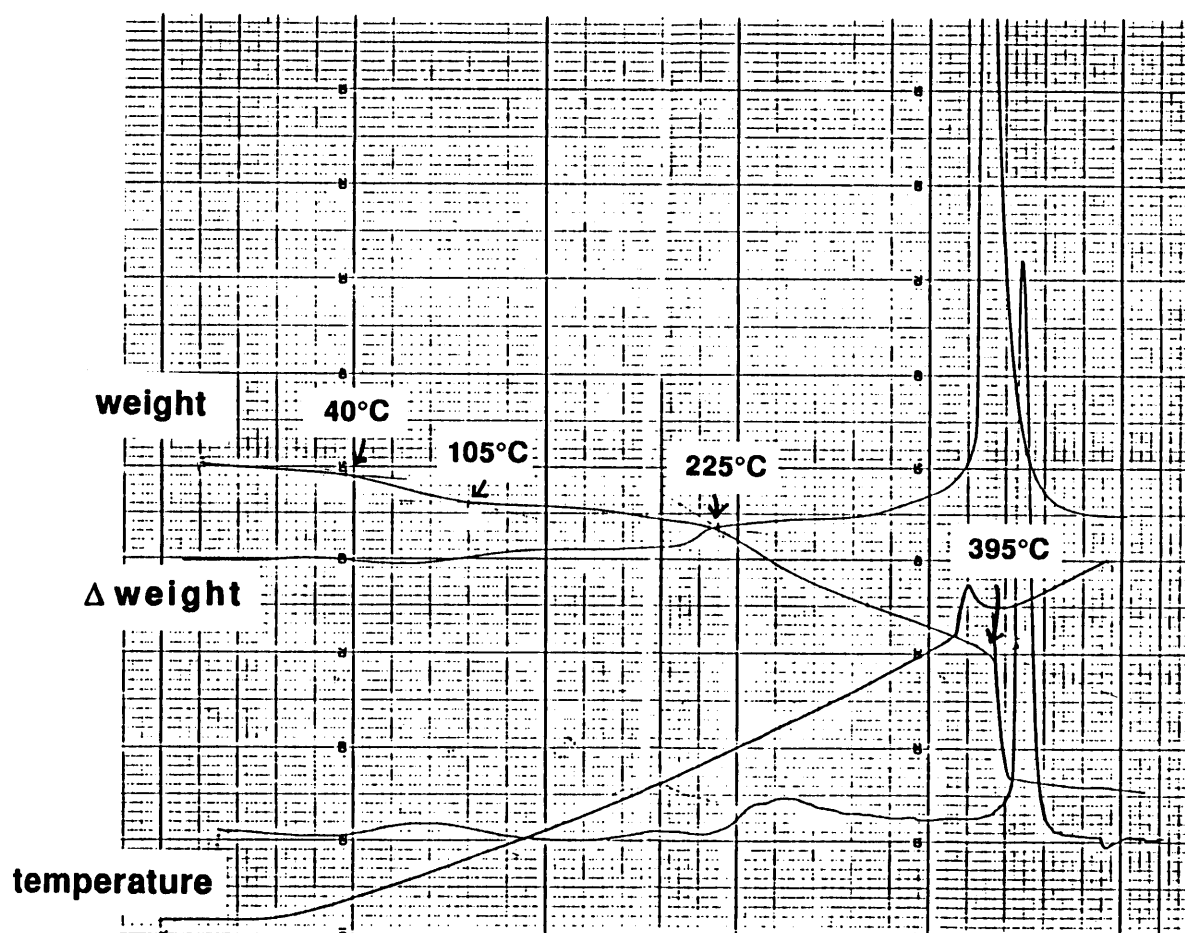


viewing along crystallographic *c*-axis.



viewing along crystallographic *z*-axis.

Fig. 2-27 Stereoscopic structure of Cd-commelinin (16) without solvent molecules.



sample weight : 4.23 mg

rt	→	105°C	8.3%	(0.35 mg)
105°C	→	225°C	5.6%	(0.24 mg)
225°C	→	395°C	27.4%	(1.16 mg)

Fig. 2-28 Thermogravimetric analysis of Cd-commelinin (16).

リニンの結晶構造はC d-コンメリニンの構造と同じであると結論でき、これにより、コンメリニンの構造が完全に決定できた。マロニルアオバニン6分子、フラボコンメリン6分子、金属2原子を含む複合型アントシアニンであり、それぞれが対称性よく会合した化学量論的超分子であることが明らかにできた。

#### 2. 3. 4 コンメリニンにおける分子会合

X線結晶構造解析によりコンメリニンの結晶状態における構造が完全に明らかになった。得られた座標データからコンメリニンにおける各成分分子の会合状態を明らかにし、青色発現機構について考察した。

C d-コンメリニンは結晶学的に等価な3回軸上に乗っており、その軸上に5.1 Å 離れて2個のカドミウムイオンが存在する。各々の金属原子に、3分子ずつのマロニルアオバニン (5, M) が配位し、M 同士は左旋的に自己会合していた。この間隙に、左旋的に自己会合した2分子のフラボコンメリン (14, F) が存在し、丁度金属を -MMFFMMFFMMFF- と2分子ずつ会合したユニットがぐるりと取り囲んだ形であった。3回軸方向から見ると分子の形はほぼ円形で、軸と直角方向から見ると長方形である。即ち、コンメリニン分子は球を上下から半分の厚さに潰したような形であった。

Fig. 2-29 に、会合したマロニルアオバニン (M) 2分子だけを示した。M はB環の2'、3' 位水酸基で金属に配位し、別々の金属に配位したM 同士が左旋的に自己会合していた。母核の長軸は約60度左旋的にねじれ、母核同士の距離は、最も近いところで約3.5 Å とほぼファンデルワールス半径に近い距離であった。M の

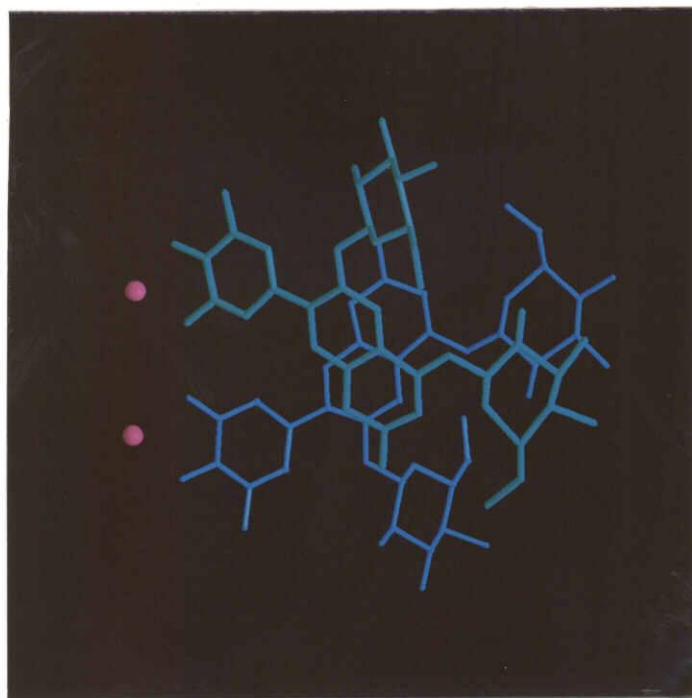


Fig. 2-29 Stacking pattern of self-association of malonylawobanin (5) in Cd-commelinin (16).

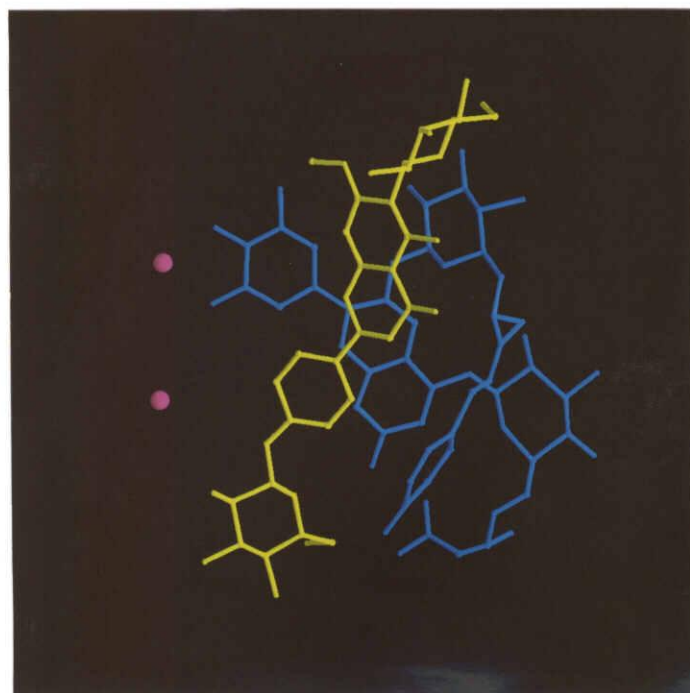


Fig. 2-32 Stacking pattern of co-pigmentation between malonylawobanin (5) and flavocommelin (14) in Cd-commelinin (16). Blue: malonylawobanin (5); yellow: flavocommelin (14); red: magnesium ion.

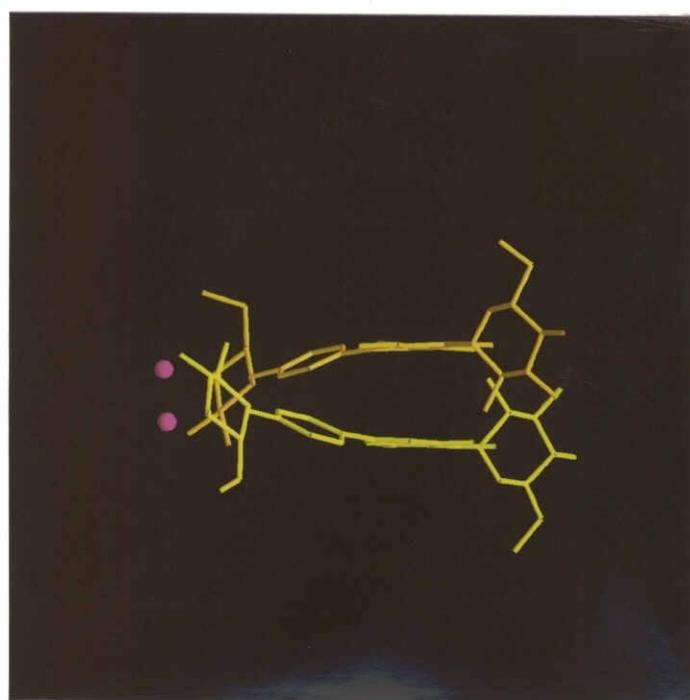
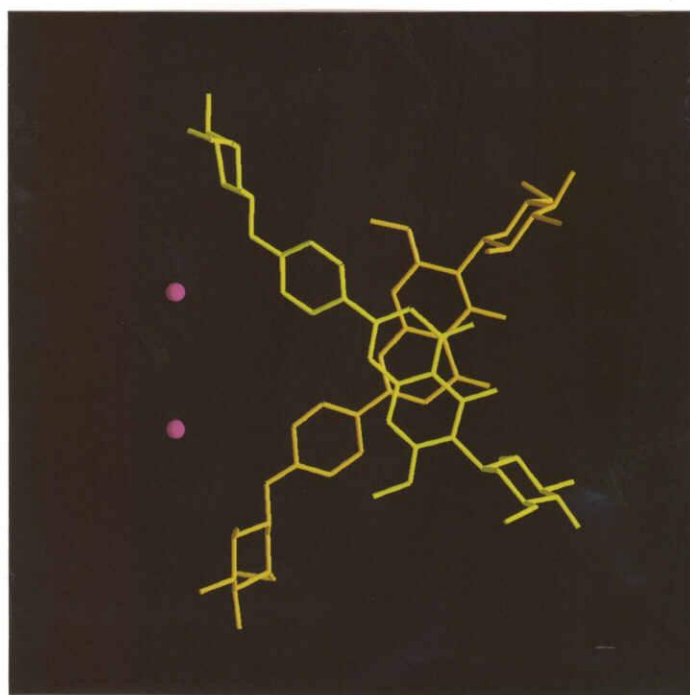
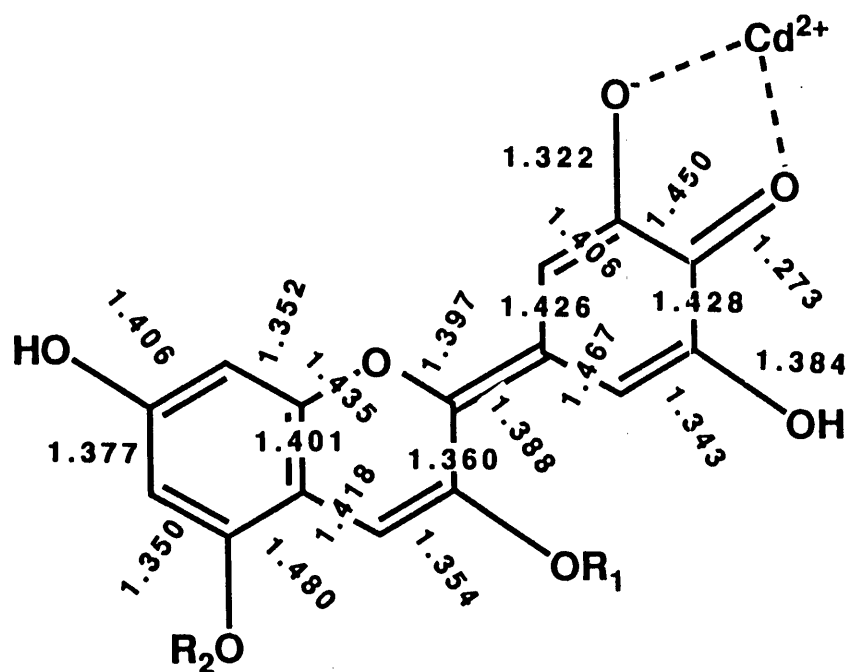


Fig. 2-31 Stacking pattern of self-association of flavocommelin (15) in Cd-commelinin (16).



**R factor=13.2%**

Fig. 2-30 Bond length (Å) of malonylawobanin (5) in Cd-commelinin (16).

母核の各原子間の結合距離を Fig. 2-30 に示した。B環のC 2' - C 3' 間とC 5' - C 6' 間の距離が約 1.3 Å でC 3' - C 4' 間およびC 4' - C 5' 間の距離の 1.4 Å より短いことがわかった。さらに、C 4' - O 4' 間の結合距離は 1.27 Å でC 3' - O 3' や、C 5' - O 5' 間の結合距離よりも 0.05 Å も短くカルボニル基のC - O間の結合距離 (1.23 Å) に近いことから、4' 位はケト型を取ることが明らかにできた。中性のアンヒドロ塩基型のアントシアニンの構造が、4' ケト型であるか7ケト型であるかは、これまで確実ではなく、星野らの研究から多分4' ケト型をとると推定されていた<sup>58</sup>。X線結晶構造解析により、4' ケト型であることが確かめられた。また、マロニルアオブアニンの *p*-クマル酸部分は、6位の方へ折れ曲がっていることが明らかになった。これは、<sup>1</sup>H NMRのNOEから推定された構造を支持するものである。さらに、アントシアニンの母核に結合した糖のグルコシド結合は、糖の6員環の平面がほぼアントシアニンの母核平面と直角の角度に近いコンフォメーションを取り、▲-1がH-4の方向を、●-1はH-6の側を向いていた。このグルコシド結合のコンフォメーションは、3章で述べるアントシアニンの強酸性下のそれとほとんど同じである。また、自己会合したアントシアニン同士の母核平面は全く平らなのではなく、若干、寄り添うように湾曲していることも明らかになった。

2分子で自己会合したマロニルアオブアニン (MM) の間には自己会合したフラボコンメリン (FF) が存在していた (Fig. 2-31)。この会合も左旋的で分子の長軸はほぼ直交し、母核平面の距離は、マロニルアオブアニンと同様に、3.5-4 Å と非常に近接していた。分子のほぼ両端にある2個のグルコースは、その環の作る平面が母核に対して垂直になり、これを真横から見ると Fig. 2-31 の様であった。

Fig. 2-32 には、マロニルアオブアニン (M) とフラボコンメリン (F) の会合、コピグ

メンテーションの状態について示した。両者の母核同士は右旋的に会合し、分子間の距離はマロニルアオブニンがフラボコンメリンの反対側へ少し反っているため、自己会合の場合よりも若干長く4-4.5 Åであった。この会合状態は、コンメリニンの重水中でのNOEから得た会合状態と非常によく一致するものであった。また、マロニルアオブニンの *p*-クマル酸のベンゼン環はフラボコンメリンのB環とはほぼ直交した位置関係にあった。フラボンB環の5' 6' 位水素のシグナルが2'、3' 位のそれよりもかなり高磁場に観測される理由は、この *p*-クマル酸のスタッキングによるアニソトロピーのためであることが明らかになった。

Cd-コンメリニンの錯体中心部分を Fig. 2-33 に示した。2原子のCdイオンの間は、5.1 Åであり、その間には溶媒分子などは何も存在しなかった。Cd-Cdの金属結合の距離は通常2.98 Å前後であり、金属同士は結合していないことがわかった。従って、金属同士をこの位置に固定する力は、M同士の疎水結合に基づく自己会合力であるといえる。それぞれの金属に対して、3分子のマロニルアオブニンのB環 *O*-ジフェノール部分がゆがんだ3角柱型を取り配位しており、B環は、3回軸に対して少し傾いたプロペラ状に金属を取り囲んでいた。

コンメリニン分子の内部は、芳香環同士が会合しており、非常に疎水的であった。分子の表面はグルコース、マロン酸残基など多数の水酸基、カルボキシル基などの親水基により覆われ、親水的であった。分子内部の疎水結合と分子表面の親水基と水分子との水素結合による親和力の両方が働き、コンメリニン分子を集合型の超分子として保っているものと考えられた。<sup>1</sup>H NMR、CDから推定されたコンメリニン分子の会合構造は、X線結晶構造解析により確定した構造と良い一致を示した。これにより、結晶状態と溶液中のいずれにおいてもコンメリニンは同じ構造を取っていることがわかった。コンメリニンは、非常にコンパクトに各成分が組み込まれ



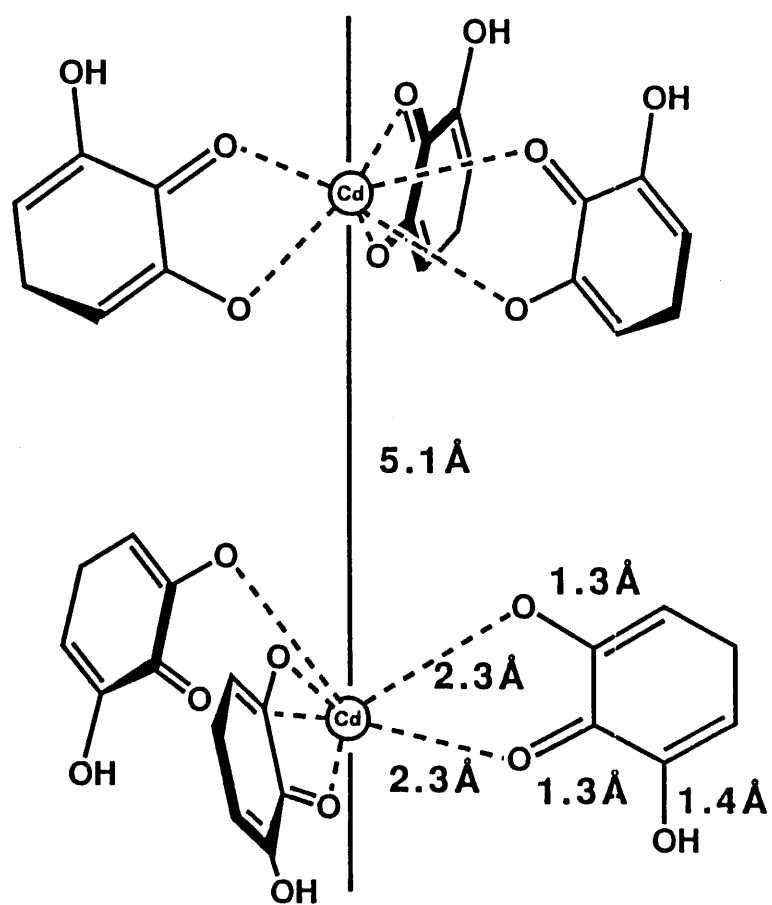


Fig. 2-33 Coordination of oxygens of B-ring of anthocyanins to cadmium ions.

た分子である。2 個の金属イオンのまわりにマロニルアオバニン、フラボコンメリンがその構造に含まれる構成残基全てを有効に使って、隙間なく会合し、対称性の良い超分子が作り上げられていた。例えば、*p*-クマル酸がスクシニル基、マロニル基に替わると、*p*-クマル酸残基が折り畳まれることによって埋めていた間隙が空く。コンメリニンB環との会合がなくなるために分子の形を保つ力が減ると同時に水分子がその隙間から侵入し不安定になったものと推定できる。また、●の糖のマロニル基も分子表面を覆う親水性基であり、これがないアオバニン-コンメリニンの場合分子表面に疎水性部分が出てしまう。さらに顕著であるのは●の糖のない場合で、アントシアニンの4、5、6位付近がむき出しになってしまう。一方、フラボコンメリン側の構造変化を考えると、5位水酸基をメチル化するとコンメリニン様錯体の安定性が極めて悪くなる。C-グルコシドのコンフォメーションに影響を与えるし、フラボンの自己会合も2.2で述べたように立体障害のため弱くなるからと考えられる。4'位の糖は金属イオンの作る3回軸の上下を覆っているため、これがなくなると発色に最も重要な錯体中心部分が、水の攻撃に対し無防備になる。アントシアニンがデルフィニジン骨格からシアニジン骨格へと変化すれば、電子密度が変化して色に影響を与える。これらの理由から、構成成分のいずれの部分が変わっても色調、安定性に影響を与え、その変化が大きければ、コンメリニン分子を保ちえなくなることがわかる。コンメリニンにおいて非常に精密な構造認識が働いていることが明かにできた。

## 2. 4 ツユクサ花卉の発色機構

ツユクサの花弁は通常青色であるが、中には、突然変異で紫色を示すものがある。吉兼はこの変異種に注目し、青色花弁色素コンメリニンとの成分の違いを解明し、発色の機構について報告した<sup>60</sup>。すなわち、紫色花弁のアントシアニン成分は青色花弁と異なり、5位のグルコースの欠損したアントシアニンだけから成ることを明らかにし、これらのアントシアニンからはコンメリニン様青色錯体が全く生成しないことと、花弁の紫色はフラボコンメリンとのコピグメンテーションによるものであることを報告した<sup>60</sup>。しかし、紫色花弁の搾汁がコンメリニン様の励起子型の負のコットンを示す理由が示す理由は解明されておらず、花弁中の各成分の濃度に基づいたコピグメンテーション実験を行っていないため、他の紫色発現の機構の存在も完全には否定できない。著者は、ツユクサ紫色花弁と青色花弁の色の違いの解明は未だ不十分であると考え、この変種における紫色発現機構の解明を行った。

後述の研究により、ツユクサ紫色変種は、その成分の違いにより2種類のタイプに分かれることが明らかになった<sup>64</sup>。ひとつは、Photo 2の1に示すように両花弁とも薄い紫色になるもの（タイプI）で構成成分は青色花弁と全く同じであった。もうひとつは、Photo 2の2に示すような片方の花弁の半分が青色で、のこり半分が紫色というようなキメラの花弁が現れる変種（タイプII）である。タイプIIの成分は5-デグルコシルアントシアニンで、吉兼が報告したのは、タイプIIの変種に関するものであることがわかった。ツユクサ青色花弁の色素は金属錯体アントシアニンのコンメリニンで、2. 3でその構造を明らかにしたように、化学量論的な超分子である。紫色変種花弁では、何らかの理由でコンメリニンが生成しないと考えられる。なぜ、コンメリニンができないのか、さらに、それぞれの花弁に含まれ

るアントシアニン、フラボン成分から、花卉の色が再現できるのか、という観点から、紫色発現機構の詳細な化学的解明を行った。超分子ができない理由を明らかにすることは、コンメリニンにおける精密構造認識に基づく錯体形成機構を解明するためにも非常に重要である。さらに、花卉の微妙な色合いの違いに対して、化学的なアプローチができれば、花色変異に関する極めて大きな示唆が得られる。

#### 2. 4. 1 ツユクサ紫色変種花卉の成分

通常のツユクサ青色花卉と紫色変種の花卉を採取し、それぞれの搾汁を1. 2で記した方法で分析した(Table 2-8)。紫色花卉は、その成分により2種類に分かれることが明らかになった。すなわち、構成成分は青色花卉と同じで、マロニルアオバニン(5, M)とフラボコンメリン(14, F)が含まれるがその含量が青色花卉と異なるタイプIと、マロニルアオバニンはほとんど含まれず別の2種のアントシアニンが含まれるタイプIIに区別できた。そして、ひとつの花卉に青色と紫色の2色が発現したり、ひとつの花の左右の花卉の色が異なるキメラ花卉は、全てタイプIIに属することがわかった。左右両花卉ともが紫色の変種には、タイプIとタイプIIの両方が認められた。

タイプIにはマロニルアオバニンの他に、微量の未知色素が含まれていた。クロマトグラムを比較した結果、青色花卉の搾汁にも同じ色素が含まれていることがわかり、まずこの色素を単離して構造解明を行なった。青色花卉から得た粗色素60gから常法に従い、XAD-7カラムクロマトグラフィー、逆層中圧分取カラムクロマトグラフィーを繰り返し、この色素を140mg単離した。色素の分子量は、FABMSによりマロニルアオバニンと同じ843であることが明らかにできた。<sup>1</sup>H

Table 2-8 Average content of flavonoid (mg) in 1 g of fresh petals (determined by HPLC comparing with authentic samples).

color of petals	concentration of flavonoids (mg/g of fresh petals)				
	5	14	37	25	26
blue	2.0	2.1	0.15	0	0
purple (I)	0.93	0.50	0.31	0	0
purple (II)	0	3.0	0	0.53	0.81

Table 2-9 Formation of commelinin (15) and commelinin-like pigment under various complexation conditions.  
(anthocyanin : flavocommelin = 1: 1)

anthocyanin (conc.)	pH	conc. of $Mg^{2+}$	complexation
1 ( $5 \times 10^{-3}M$ )	6.5	$3.3 \times 10^{-1}M$ (200 eq.)	×
37 ( $5 \times 10^{-3}M$ )	6.5	$3.3 \times 10^{-1}M$ (200 eq.)	×
1 ( $5 \times 10^{-3}M$ )	7.5	$3.3 \times 10^{-3}M$ (2 eq.)	○
37 ( $5 \times 10^{-3}M$ )	7.5	$3.3 \times 10^{-3}M$ (2 eq.)	○
1 ( $5 \times 10^{-5}M$ )	7.5	$5.0 \times 10^{-3}M$ (300 eq.)	×

NMRを10% TFA-CD<sub>3</sub>OD中で測定するとFig. 2-34に示したように、芳香族領域、糖部分、ともマロニルアオブニンと非常に良く似たスペクトルを示し、唯一異なっていたのは、*p*-クマル酸由来の $\alpha, \beta$ 水素の化学シフトがマロニルアオブニンより高磁場に検出されたことと、 $J_{\alpha, \beta}$ が13.0 Hzであったことである。これは、マロニルシスソニンの<sup>1</sup>H NMRスペクトルにおける*p*-クマル酸のシグナルの挙動と良く一致したことから、この色素の構造を、マロニルアオブニンの*p*-クマル酸が*Z*配置を取った、マロニルシスアオブニン (37) と決定した (Fig. 2-35)。なお、タイプ I I の紫色変種に含まれる色素の構造は吉兼により、3-グルコシルデルフィニジン (25) と 3-*p*-クマリルグルコシルデルフィニジン (26) であることが明らかにされている (Fig. 2-35)<sup>60</sup>。

花卉に含まれる色素の構造が明らかにできたので、次に、花色変異と色素含量の関係を明らかにするために、それぞれのタイプの花卉に含まれる色素とフラボンの量を分析した。花卉10mg 当たり0.1mLの1.5% TFA 含有50% CH<sub>3</sub>CN 水溶液を加え、室温で2時間抽出し、HPLCで分析した (Table 2-8)。タイプ I は、通常の青色花卉よりも色素、フラボンの含有量が少なく、生花卉 1g 当たりマロニルアオブニン (5) は青色花卉の約半量の0.93 mg、フラボコンメリン (14) は約1/4の0.50 mgしか含まれていなかった。タイプ I I は、フラボコンメリン (14) は3.0 mg とむしろ青色花卉よりも多く含まれていたが、色素は25と26を合わせても1.34 mg と少なかった。

#### 2. 4. 2 ツユクサ変種における青色と紫色の発現機構

2種の紫色変種花卉と通常の青色花卉の色を積分球装置で測定したスペクトルを

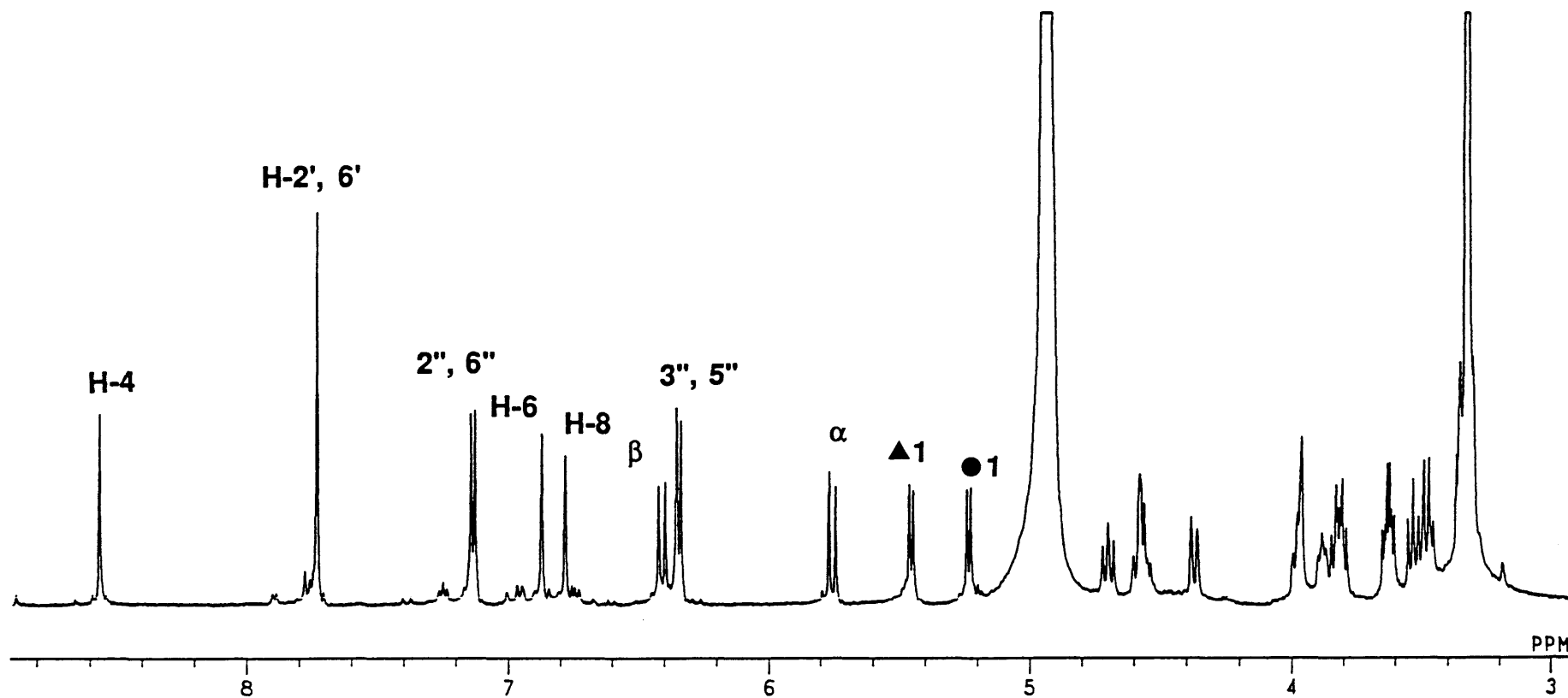
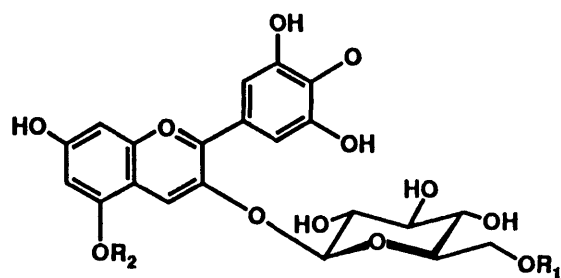


Fig. 2-34  $^1\text{H}$  NMR spectra of malonyl-*cis*-awobanin (38) in  $\text{TFA-d-CD}_3\text{OD}$  at  $25^\circ\text{C}$  (500 MHz).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
5	<i>p</i> -( <i>E</i> )-coumaryl	6- <i>O</i> -malonyl-β-D-glucopyranosyl
37	<i>p</i> -( <i>Z</i> )-coumaryl	6- <i>O</i> -malonyl-β-D-glucopyranosyl
25	H	H
26	<i>p</i> -( <i>E</i> )-coumaryl	H

Fig. 2-35 Structure of malonyl-*cis*-awobanin (37), 3-*O*-glucosyldelphinidin (25) and 3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaryl)glucosyldelphinidin (26).

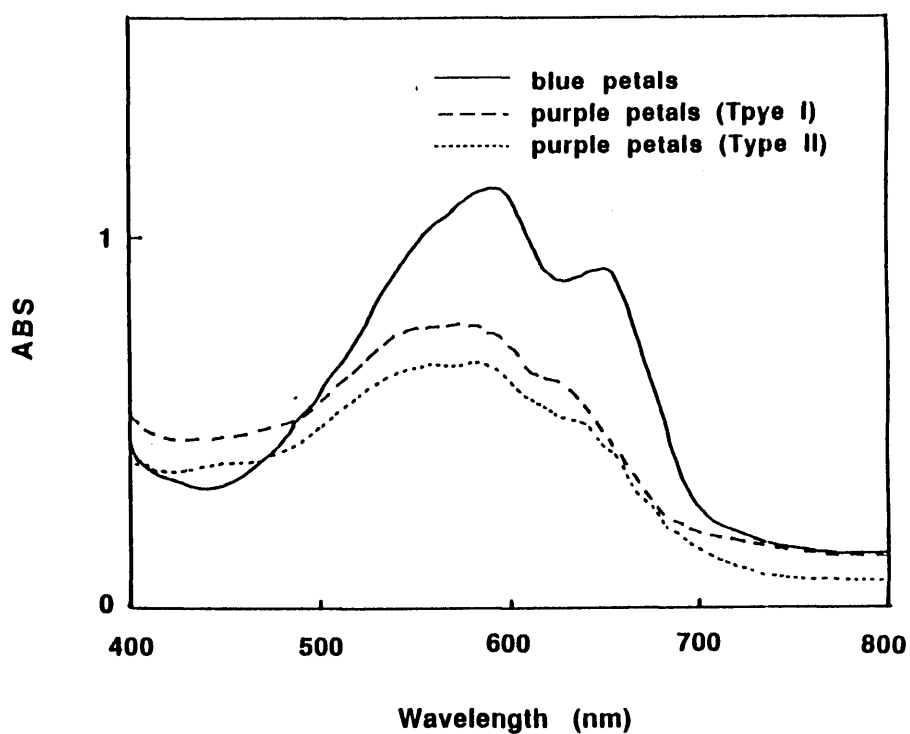
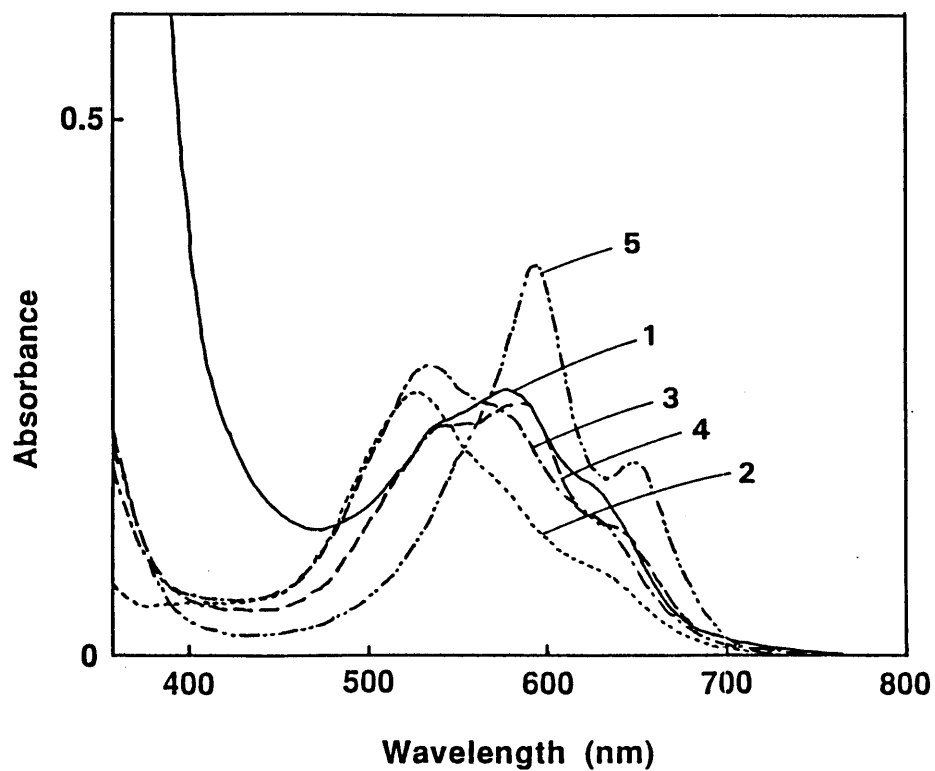


Fig. 2-36 Visible absorption spectra of purple petals of *Commelina communis* var Type I and II.



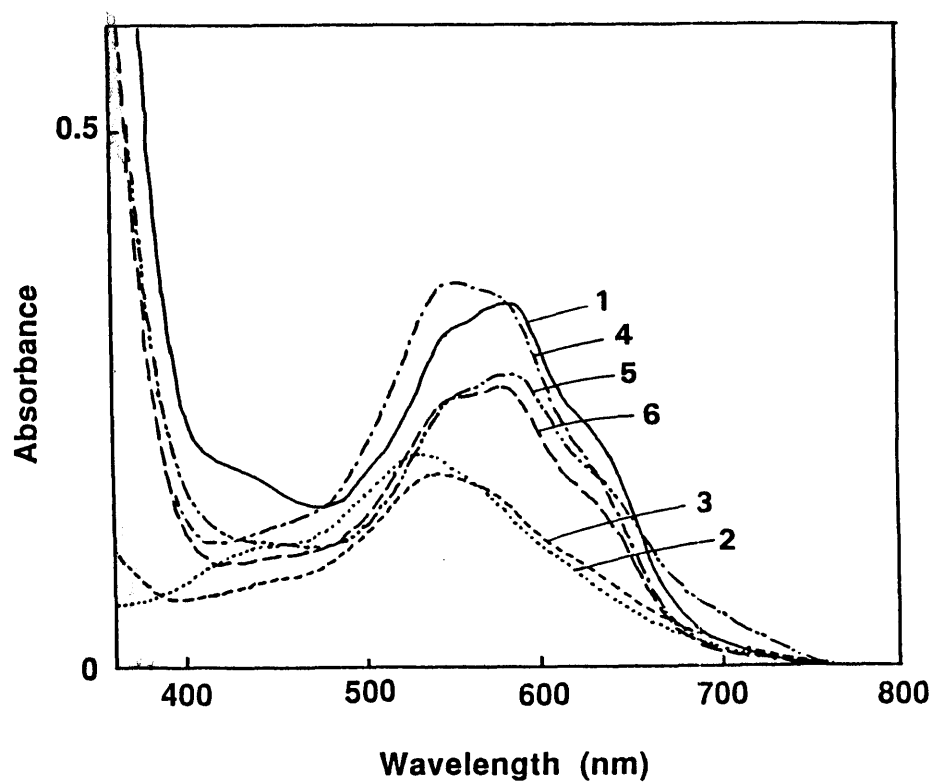
Fig. 2-36 に示した。青色花卉は、コンメリニンを pH 5.5 で測定したときのスペクトルと同じ吸収極大 (589 nmÅ644 nm) を示し、スペクトルの形状もコンメリニンほどシャープではなかったが良く似ていた。これに対し、タイプ I、および I I の花卉はそれぞれ、577 nm、574 nm に吸収極大を示し、スペクトルも青色花卉とは全く異なりブロードであった。Fig. 2-37, 2-38 には、それぞれの色の花卉の搾汁の電子スペクトルを示した。紫色花卉 I および、I I の搾汁の pH は 5.7 で、可視の吸収極大は、それぞれ、576 nm、581 nm と、花卉と若干異なったが、スペクトルはほぼ同様の形状を示した。この搾汁の CD を測定したところ、非常に小さかったものの、コンメリニンと同じ波長に負の励起子型のコットンを示し、これら紫色花卉にも、わずかにコンメリニンが存在するのではないかと考えた。

最初に、タイプ I の変種における紫色発色機構について検討した。この変種花卉には、(Table 2-8) に示したように、含有量の多少はあるものの、青色花卉と全く同じ成分、マロニルアオブニン (5, M)、マロニルシスアオブニン (37) およびフラボコンメリン (14, F) が含まれていた。2. 3 で述べたように、コンメリニンは M と F をマグネシウム存在下で混合するだけで再構成されるほど、強い錯体形成能を有する。なぜ、タイプ I の変種花卉では成分がそろっていながら錯体が形成されないのかは極めて不思議な現象といえる。花卉にコンメリニンに必須のマグネシウムが存在しないためと考えることもできるが、植物体においてマグネシウムはクロロフィルの中心金属で、ごく一般的に存在する元素である。さらに、2. 3. 1 で述べたように、マグネシウム以外にも、Zn、Co、Mn、等の 2 価の金属イオンにより、コンメリニン様の錯体は生じることが分かっており、金属が足りないためとは考えにくい。花卉の細胞中でアントシアニンとフラボンの存在する場所が分かれており、お互いに混ざり合うことができないためではないかと考えることもできる。



- 1 pressed juice
- 2 **5** ( $1.5 \times 10^{-3} M$ )
- 3 **5** ( $1.5 \times 10^{-3} M$ ), **14** ( $0.75 \times 10^{-3} M$ ) and  $Mg^{2+}$  ( $1 \times 10^{-2} M$ )
- 4 **5** ( $1.5 \times 10^{-3} M$ ), **14** ( $0.75 \times 10^{-3} M$ ) and commelinin (**15**,  $0.1 \times 10^{-3} M$ )
- 5 commelinin ( $0.25 \times 10^{-3} M$ )

Fig. 2-37 Visible absorption spectra of the pressed juice of type I petals and its reproduced purple color mixtures (in 0.05M acetate buffer at pH 5.7, 0.1 mm path length).



- 1      pressed juice
- 2      **25** ( $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ )
- 3      **26** ( $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ )
- 4      **25** ( $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) and **14** ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ )
- 5      **26** ( $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ ) and **14** ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ )
- 6      **25** ( $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ ), **26** ( $1.25 \times 10^{-3} \text{M}$ ) and **14** ( $5 \times 10^{-3} \text{M}$ )

Fig. 2-38    Visible absorption spectra of the pressed juice of type II petals and its reproduced purple color mixtures (in 0.05M acetate buffer at pH 5.7, 0.1 mm path length).

しかし、アントシアニン、フラボンはいずれも同じ中間体を経て生合成され、その経路のかなり最後のところで分岐することが明らかになっており、お互いに別々に存在するとは考え難い。これから、タイプ I の紫色花卉の発色機構はコンメリニン錯体形成時の何らかの不都合によるのではないかと考えた。

まず、花卉と同じ pH 5.7 で花卉成分の電子スペクトルを測定した (Fig. 2-37)。各成分の濃度は、ツユクサ花卉の重量全てを水分として換算した。マロニルシスアオブニン (37) は 2. 3. 1 で述べたようにマロニルアオブニン (5, M) と比較して錯体生成能に大きな差がなかったので、M に置き換えて実験を行った。マロニルアオブニン ( $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) の電子スペクトルを測定すると可視の吸収極大は 528 nm で、これにマグネシウムを加えても、スペクトルはほとんど変化しなかった。マロニルアオブニンを  $1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、フラボコンメリンを  $7.5 \times 10^{-4} \text{ M}$  (M に対して 0.5 当量)、マグネシウムを  $2 \times 10^{-2} \text{ M}$  (M に対して 20 当量) とすると、フラボコンメリンのコピグメント効果により、スペクトルは吸収極大が 7 nm 長波長シフトした。しかし、その形状はほとんど変化しなかった。すなわち、花卉の成分を花卉と同じ濃度、pH で溶解しても、花卉、花卉の搾汁と同じ電子スペクトルは再現できないことが明らかになった。花卉の搾汁の CD をコンメリニン由来と考え、計算量のコンメリニンを加えると、電子スペクトルは搾汁と非常によく一致した (Fig. 2-37)。これから、タイプ I の紫色花卉では、アントシアニンの一部しかコンメリニンを形成せず、大部分がフラボコンメリンとコピグメンテーションしていることが明らかになった。含まれるコンメリニンの量に応じて、花卉の色は青みを帯びていくと考えられ、微妙な花色の違いが、含まれるアントシアニンとフラボン、および、それらから形成される錯体 (コンメリニン) の量の変動により説明できると考える。

なぜ、紫色花卉タイプ I において、コンメリニンが形成されないかは、その精密

な構造認識による会合を解明する上で重要な問題である。しかし、錯体定数の測定はアントシアニンが中性水溶液中で不安定であることと、コンメリニンが3成分からなることから、かなり困難と考えられた。そこで、まず、定性的ではあるが、アントシアニンとフラボンの濃度を1 : 1に固定して、pHによるコンメリニン錯体形成の有無について調べた。マロニルアオブニン (5, M) の濃度を青色花卉に含まれる濃度とほぼ同等の  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  とし、フラボコンメリン (14, F) も同量とした。コンメリニンが形成されるかどうかは特徴的な電子スペクトルとCDから判定した (Table 2-9)。Mの濃度が  $5 \times 10^{-3} \text{ M}$  の場合、pH 6では、CDは全く認められず、コンメリニンが形成されないことが明らかになった。pH 6.5では、CDの大きさから、Mの量に対して、約30%のコンメリニンしか形成されないことが判明した。pHを7.5にするとほぼ計算量のコンメリニンが生成した。以上から、金属錯体形成には、液性がアルカリ性でなければいけないことがわかった。しかし、Mの濃度が  $5 \times 10^{-5} \text{ M}$  の場合は、当量のFに300当量のマグネシウムを加えてもpH 6.5はもちろんのこと、pH 7.5でもコンメリニンは全く形成されなかった。コンメリニンにおいて、金属はMのB環3'、4'位の酸素に配位し、3'位が水酸基、4'位がケトンであることを2. 3. 3で明らかにした。本実験により、金属が配位するためには、液性がアルカリ性になり3'位の水酸基が脱プロトン化しなくてはならないことが明らかになった。さらに、Mの濃度が低いとアルカリ性でもコンメリニンが形成されないことから、アントシアニンが会合状態にないと錯体形成が起きないものと考えた。すなわち、弱アルカリ性下、高濃度のマロニルアオブニンがフラボコンメリンとコピグメンテーションした状態にあるところへ金属が添加されると、マロニルアオブニンが金属の回りに規則的に配位し、その間隙にフラボコンメリンも規則的な配置を取るようになり、最終的にコンメリニン分子ができると考えてい

る。但し、この反応は瞬時に起こり、溶液は肉眼的には金属の添加と同時に真っ青になった。

コンメリニンは、いったん形成されると、他のアントシアニンとは異なり pH 4 から 8 まで青色を示す (Fig. 2-39)。しかし、青色花卉と同じ色合いは、pH 5-6 の弱酸性の時に生じる。従って、青色花卉では、開花直前の一時期、花卉の細胞液の液性がアルカリ性に傾くときがあり、その時にコンメリニンが形成され、その後液性は再び弱酸性へ下がるのではないかと考えられる。紫色変種タイプ I では、細胞液を一時的にアルカリ性にする機能がないためにコンメリニンが形成されず紫色を示すのではないかと推定している。

タイプ I I の変異種については、吉兼が単離した、2 種のデグルコシル化アントシアニン<sup>60</sup>、3-グルコシルデルフィニジン (25) と 3-*p*-クマリルグルコシルデルフィニジン (26) を用いて、花卉の色の再現を行った (Fig. 2-38)。pH 5.7 で、両色素の電子スペクトルを測定したところ、可視の吸収極大はそれぞれ、532 nm と 540 nm であった。この変種花卉中のフラボコンメリニンの含量は、色素に対して約 2 当量であったので、それぞれに、2 当量のフラボコンメリンを加え同じ pH で電子スペクトルを測定した。すると、25 では 18 nm の長波長シフト、26 では 41 nm の長波長シフトが観測された。これはフラボコンメリンのコピグメント効果によるものと考えられ、同量のフラボコンメリンを加えても、長波長シフトの大きさが異なるのは、アントシアニンの分子構造によって会合の強さが違うためではないかと考えられる。コピグメンテーションによる長波長シフトは、会合した分子間の電荷移動によるものと考えられている<sup>1, 3, 5, 6, 20, 74-76</sup>。モノアシル化アントシアニンの 26 の方が、電荷移動の度合いが大きいために、約 2 倍の長波長シフトとなって現れたのではないかと推定する。3-グルコシルデルフィニジン (25) と 3-*p*-クマリルグルコ

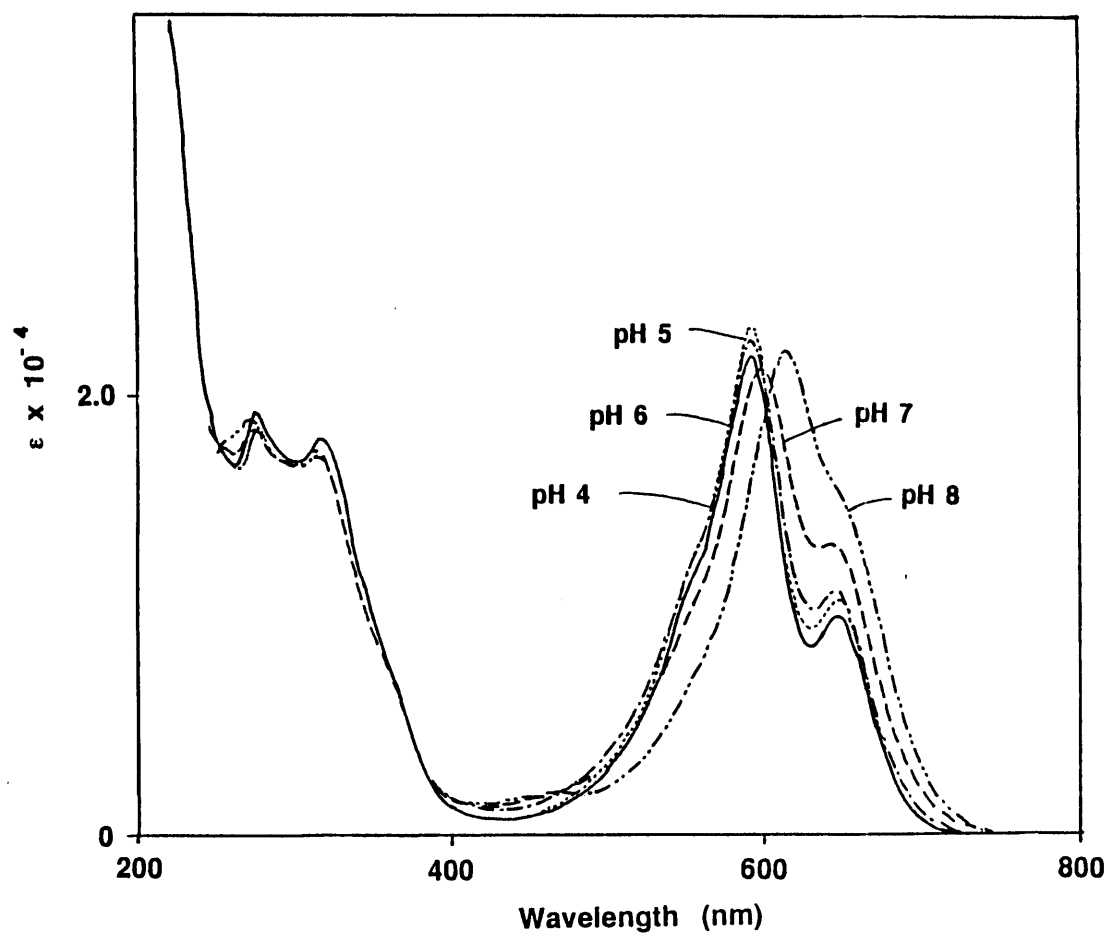


Fig. 2-39 Electronic spectra of commelinin (15) in various pH aqueous solutions.

シルデルフィニジン (26) を、Table 2-8 にしたがって計算した量比に混合し、フラボコンメリンを全アントシアニン量に対し 2 当量加えたところ、Fig. 2-38 に示すように、花卉の搾汁と良く一致したスペクトルを与えた。

なお、この 2 種の色素とも、pH を弱アルカリ性にして再構成実験を行っても、コンメリニン様錯体は全く形成されなかった。これから、タイプ I I の花卉では、何らかの酵素的な変異によりマロニルアオブアニンが生合成されず、5 位の糖が欠損したアントシアニンだけが蓄積するため、コンメリニンが形成されないことがわかった。青色花卉よりもむしろ多く含まれる、フラボコンメリンとのコピグメンテーションにより紫色が発現していることが明らかにできた。

このタイプ I I の変種では、タイプ I よりもさらに色合いのバリエーションが多く、ほとんど青に近いものから、紫、赤紫色と種々ある。これらの花卉の成分含量を H P L C で分析し、花卉の色と色素含有量との関係を調べた。花卉 1 枚に 1% TFA 水溶液を 0.1 mL 加え、室温で 30 分抽出してから、1. 2 の方法で分析し、色素の含量を各ピークの相対面積で示した (Table 2-10)。タイプ I I の花卉にはマロニルアオブアニンが検出され、その量は、肉眼的な判断ではあるが、花卉の青みが増すにつれて多くなることがわかった。また、青みがかった紫色の花の搾汁の CD を測定したところ、コンメリニン様の励起子型コットンが観測され、花卉が青みがかかるのは、コンメリニンのためであると推定できた。このタイプ I I の変種では、一時的に細胞液をアルカリ性にする機能については問題がなく、含有されたマロニルアオブアニンに応じた量のコンメリニンが形成され、その分だけ花卉が青色がかかるものと考えられる。



Table 2-10 Relative content of malonylawobanin (**5**, **M**), malonyl-cis-awobanin (**37**), 3-*O*-glucosyldelphinidin (**25**), and 3-*O*-(6-*O*-*p*-coumaryl)glucosyldelphinidin (**26**) in various color petals of *Commelina communis* var.

color of petals	relative concentration of anthocyanin (%)			
	<b>5</b>	<b>37</b>	<b>25</b>	<b>26</b>
blue	77.5	1.6	0.6	2.7
purplish blue	29.2	1.0	30.0	33.3
bluish purple	21.8	-	25.0	43.1
purple	11.6	-	42.6	40.9
light purple	0.6	-	50.1	40.8

## 2. 5 まとめ

本章でまず著者は、ツユクサ青色花弁色素コンメリニンの構成フラボンであるフラボコンメリンの水溶液中における自己会合の機構を明かにした。フラボコンメリンは、高濃度になると左旋的に自己会合することが、励起子型の負のコットンと $^1\text{H}$  NMRにおける母核のシグナルの高磁場シフトから明らかにできた。糖の6員環が作る面は、フラボコンメリンの母核平面とほぼ直交しており、分子の真上にそのままスタッキングすることは立体障害が大きく不可能である。芳香環同士のねじれが左旋的になるか右旋的になるかを規定するものは、フラボコンメリン分子の両端に結合したグルコースの立体配置であると考えている。

次に、アントシアニン、フラボン、金属を換えてコンメリニン様錯体を再構成し、 $^1\text{H}$  NMRの1次元、2次元測定により、コンメリニンのスペクトルの完全な帰属を達成した。分子間のNOEから、コンメリニンにおけるアントシアニンとフラボンの会合状態（コピグメンテーション）が、アントシアニンやフラボンの自己会合と同様交差したものであることを明かにした。これらの知見を基に、Cd-コンメリニンのX線結晶構造解析に成功し、コンメリニンの完全な構造を明かにすることができた。ジェニュインのアントシアニンとしては無論の事、糖を含むフラボノイド類のX線結晶構造解析としても初めての成功例である。コンメリニンでは、アントシアニンは4'-ケト型をとり、各金属に3分子ずつのアントシアニンがそのB環3'、4'位の水酸基でねじれた3角柱型をつくり配位していた。2個の金属原子のまわりに別の金属に配位したアントシアニン同士で左旋的に自己会合したユニットと2分子のフラボンが左旋的に自己会合したユニットが交互にプロペラ上に配置されていた。

さらに、紫色花卉を付ける変種のツユクサにおける色の発現機構の研究を行ない、2種類の異なる機構が存在することを明かにするとともに、コンメリニン形成における分子認識についての重要な示唆を得ることができた。変種の一つ（タイプI）は、フラボノイド成分が青色花卉と全く同じであり、この発色の違いを有機化学的解明することにより、コンメリニンの錯体形成には、アルカリ性下でアントシアニンのB環水酸基がアニオン型を取ることが必須であることが明かになった。もう一方の変種（タイプII）では、アントシアニン成分の構造が異なり、非常に厳密な構造認識がなされるためにコンメリニンが形成されないことが明かになった。いずれも、フラボコンメリンとのコピグメンテーションによる紫色発色であった。

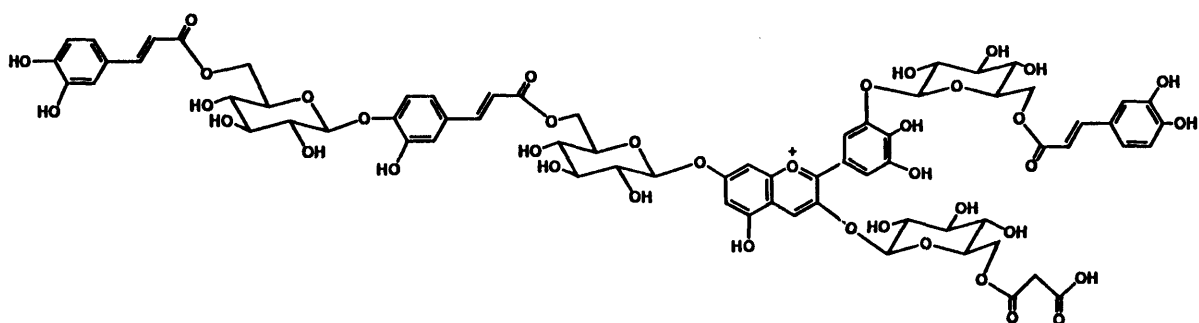
コンメリニンの青色は、アントシアニンの金属錯体の色、即ち、マロニルアオブアニンのアンヒドロ塩基アニオンによる発色であることを実証することができた。コンメリニン分子の内部は芳香環同士が会合して非常に疎水的である。さらに、分子の表面には親水性基が多数あり、会合をより強固に保つ働きをすると考えられる。糖、有機酸などの置換基は、青色発色や、疎水結合に基づく母核の会合に直接的に関与するものではないが、分子の隙間を埋めると同時に水分子の攻撃による退色を防ぐために重要であると考えられる。コンメリニンのような集合型超分子における分子認識は、ある条件が整うと、お互いが相手の構造を認識し合って、一つの大きな分子を作り上げていくという点で、ホスト-ゲストの様な超分子形成におけるようないわゆる穴の認識とは性格が全く異なる。この厳密な認識は、全てその分子の構造、立体配置に由来し、左右されることがもできる。花の色を作り上げる分子の構造をはじめて明らかにでき、微妙な花色変異の機構の1例を示すことができた。今後の研究により、この超分子形成における集合の原動力、精密な構造認識の機構解明が期待できるものとする。

### 第3章 アシル化アントシアニンの分子会合

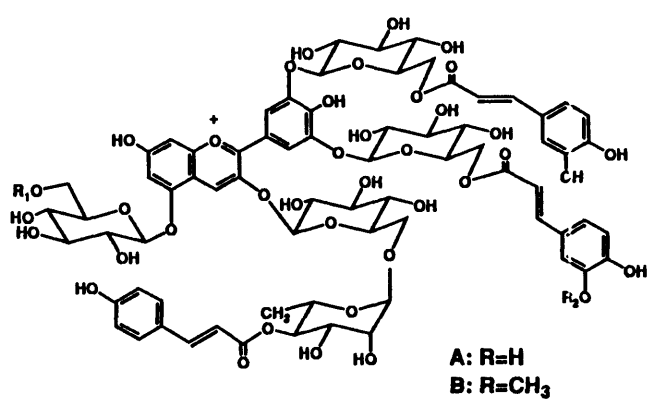
#### 3. 1 序

単純なアントシアニンは中性の希薄水溶液中では極めて不安定で、母核の2位への水和により容易に無色のプソイド塩基となる。1971年に斎藤らはキキョウの紫色花卉からプラチコニン<sup>17</sup>を単離して、このアントシアニンが希薄溶液中でも極めて安定であることを報告した。以来、いくつかの中性希薄溶液で安定な色素がシネリア<sup>18,36</sup>、ロベリア<sup>77,78</sup>、チョウマメ<sup>79-82</sup>などから見つかった (Fig. 3-1)。これらの一連のアントシアニンは何れも分子内に複数の芳香族有機酸（コーヒー酸、*p*-クマル酸等のケイヒ酸誘導体）を有することから、阿部らは、アントシアニジン母核のB環のオルト水酸基と芳香族酸の水酸基との水素結合による会合が安定化の要因であろうと報告している<sup>19</sup>。

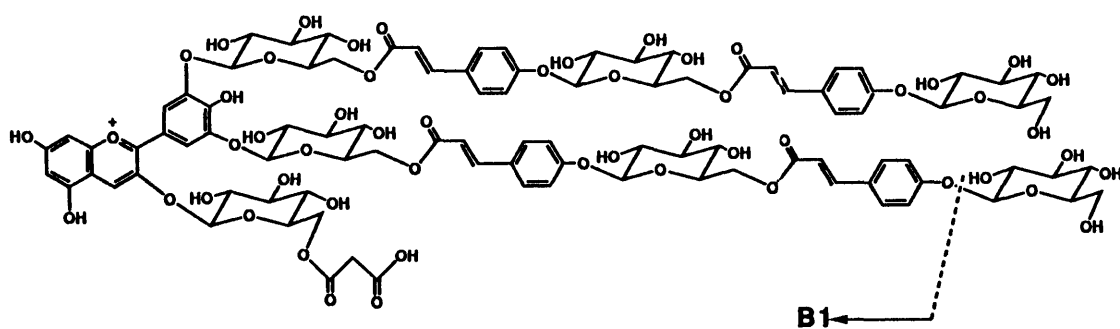
これに対し後藤らは、多数の青色あるいは青紫色の花卉から多アシル化アントシアニンを単離して構造決定した結果、色の安定化の要因は水素結合でなくアントシアニジン母核とケイヒ酸誘導体との疎水結合によるものでであろうと考えた<sup>1,5,20</sup>。2.2で述べたように、アントシアニンの自己会合による安定化機構は、母核同士の疎水結合による面对面の左旋的な会合によることが後藤、星野らによって明らかにされている<sup>1,5,20,57-59</sup>。後藤らは多アシル化アントシアニンの安定化機構もこれと同様にケイヒ酸誘導体が母核に対し面と面で会合したものでであろうと考え、Fig. 4に示したサンドイッチ型会合モデルを提唱した<sup>1,5,20</sup>。母核の上下両側が芳香族酸で覆われることによりアントシアニジン2位への水和が妨げられ、その結果として色が安定になると推定している。実際に西洋アサガオ青色花卉色素HBA (1)<sup>35</sup>の構造決



**cinerarin from *Senecio cruentus***



**loberinin A and B from *Loberia erinus***



**ternatin A1 from *Clitoria ternatea***

**Fig. 3-1** Structure of polyacylated anthocyanins, cinerarin from *Senecio cruentus*, loberinin A and B from *Loberia erinus* and ternatin A1 and B1 from *Clitoria ternatea*.

定を行った際、強酸性下のフラビリウムイオン型のNMRスペクトルではあるものの、糖のアノマー水素とコーヒー酸の水素との間に遠隔NOEが観測されたことから中性溶液におけるHBAの折り畳みモデルも提出している<sup>1, 5, 20</sup>。同時期にBrouillardらも多アシル化アントシアニンの安定化機構について、実験的証拠は全くないものの芳香族酸の疎水結合による会合を提唱している<sup>74, 83</sup>。

本章で著者は、様々なアントシアニンの中で特異な一群をなす多アシル化アントシアニンの会合構造を取り上げ、色素の溶液中における分子会合と安定化機構の解明を行なった。対象分子として、1982年に後藤らにより構造決定されたリンドウ青色花卉色素ゲンチオデルフィン<sup>37</sup>と紫ヤム色素アラタニンを選んだ。アラタニンは東南アジアで実際に食品に利用されている色素で<sup>84</sup>、中性水溶液で安定であるという報告がなされていたが<sup>85</sup>、含まれている色素の正確な構造は確かではなかった。そこで、単離構造決定も含めて報告する。

アントシアニンの会合構造解析はこれまで、強酸性下のフラビリウムイオン型色素の会合構造解析すら、精密には行われていなかった。そこで本章では、まず強酸性下の会合構造解析を行った。

### 3・2 リンドウ青色花卉色素ゲンチオデルフィンの分子内会合と安定性

リンドウ (*Gentiana makinoi*, Photo 3) の青色花卉色素ゲンチオデルフィン (3) は、1982年に後藤らにより、5,3'-di-*O*-(6-*O*-trans-caffeoyl- $\beta$ -D-glucosyl)-3-*O*-( $\beta$ -D-glucosyl) delphinidin と構造決定された (Fig. 3-2)<sup>37</sup>。安定な多アシル化アントシアニンの中で、母核デルフィニジンにグルコース3個、コーヒー酸2個の単純な構造で、HBA<sup>35</sup>などに比べ分子量も小さい。そのためスペクトル解析が容易と考え、分子内会合構造解析の対象に選んだ。さらに、分子内にマロニル基などの脱離し易い基がないため、長時間の測定中にも色素が分解しにくいという利点も考慮した。

色素の単離精製は、後藤らの方法を参考に一部改良して行い、2.4 Kg の生花卉から 260 mg の純粋な色素を単離した。次に、ゲンチオデルフィン (3) をアルカリ加水分解してビスデアシルゲンチオデルフィン (38)<sup>37</sup> を得た。ゲンチオデルフィンとビスデアシルゲンチオデルフィンの中性水溶液における安定性を Fig. 3-3 に示した。これから、ゲンチオデルフィンは後藤らが報告したとおり安定で、アシル基を除去すると不安定になることが確認できた。

ゲンチオデルフィンは、花卉と同じ pH の中性では溶解性が極めて低いため、NMRにおいて解析可能なスペクトルが得られなかった。しかし、酸性メタノール中のフラビリウムイオン型のスペクトルで、後述のように、母核とコーヒー酸の間に遠隔NOEが観測され、他のデータからも、分子内会合構造が示唆された。そこで、10% TFA 含有メタノール中における分子内会合構造の解析を行った。

溶液における分子の詳細な高次構造を知る手段として、現在NMR法は最も活用されている。主としてNMRから得られた距離情報、およびねじれ角の情報を束縛条件としてコンピュータ支援のコンフォメーション解析を行った。

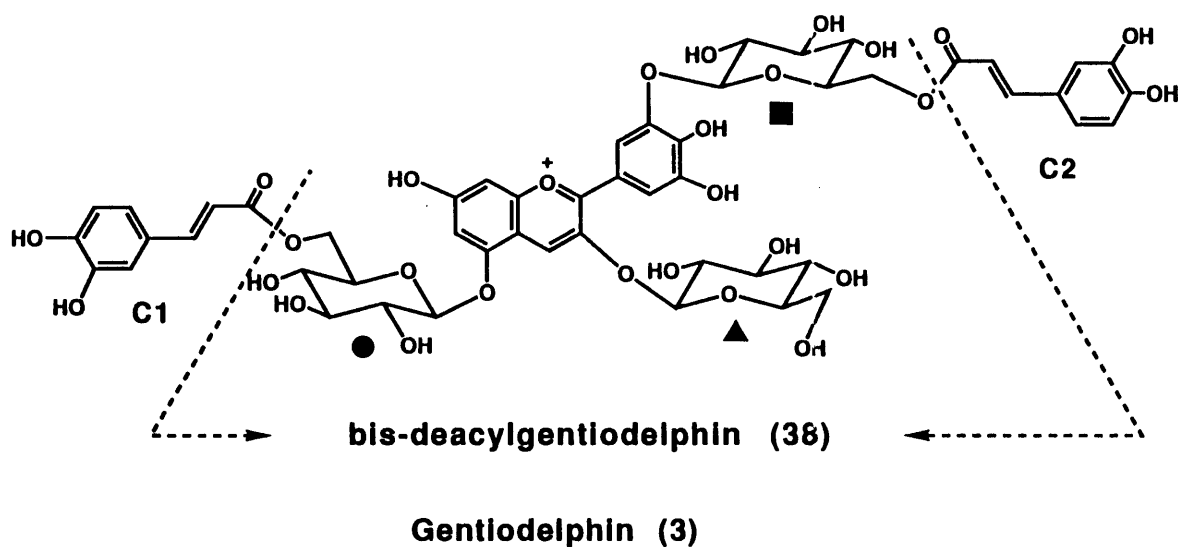


Fig. 3-2 Structure of gentiodelphin (3) from *Gentiana makinoi*.

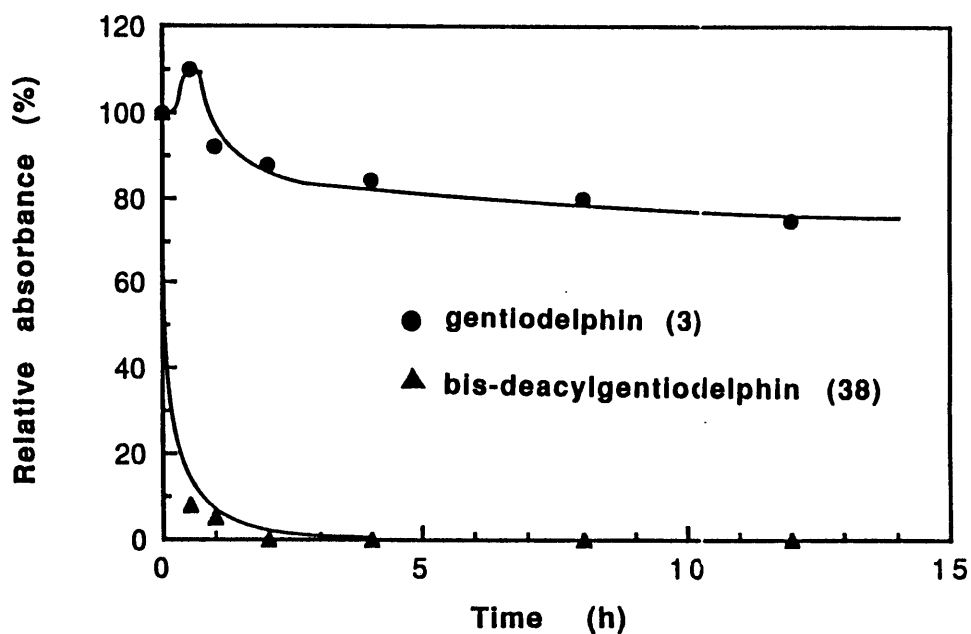


Fig. 3-3 Stability of gentiodelphin (3) and bisdeacylgentiodelphin (38) in aqueous solution (pH 6.5,  $5 \times 10^{-5}$ M, 25°C).



### 3. 2. 1 ゲンチオデルフィンの溶液中のコンフォーメーション

ゲンチオデルフィン (3) の発色団同士の相互作用は、電子スペクトルとCDの測定によって得られた。ゲンチオデルフィンとビスデアシルゲンチオデルフィン (38) の酸性メタノール中の電子スペクトルを測定すると、その吸収極大波長は3の方が11 nm 長波長であった。アントシアニン母核に紫外部に吸収極大を持つ芳香環がコピグメンテーションすると、可視部の吸収極大は長波長シフトする事が明らかにされ、アントシアニン同士が自己会合した場合は、可視の吸収極大はむしろ短波長へシフトすることが明らかになっている。従って、電子スペクトルからは母核は自己会合ではなく、コーヒー酸と会合していることが示唆された。これはCDで、可視部に励起子型のコットンが認められなかったことから支持され、母核同士の自己会合はないと考えられた (Fig. 3-4)。

より詳細な分子内の距離情報、ねじれ角情報の収集は各種のNMR実験によって得ることができた。その前提として、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルのシグナルが帰属されていなければならない。また、NOE実験の結果を解析する場合、それが、分子間でなく分子内のNOEであることを証明する必要がある。そのために、まずゲンチオデルフィンの $^1\text{H}$  NMRのシグナルの完全な帰属を行い、次に、測定条件（温度、濃度）の検討を行った。後藤らの報告では、コーヒー酸のC 1とC 2のシグナルは区別されていなかった。そこで、HMBC<sup>86</sup>スペクトルの測定を行い、C 1のシグナルとC 2のシグナルを区別した。コーヒー酸のカルボニル炭素を介して、グルコース6位のメチレン水素とコーヒー酸 $\alpha, \beta$ 水素との間に相関が認められたことから、Fig. 3-5のように帰属できた。

次にゲンチオデルフィンのスペクトルが濃度によって変化するかどうかを調べ

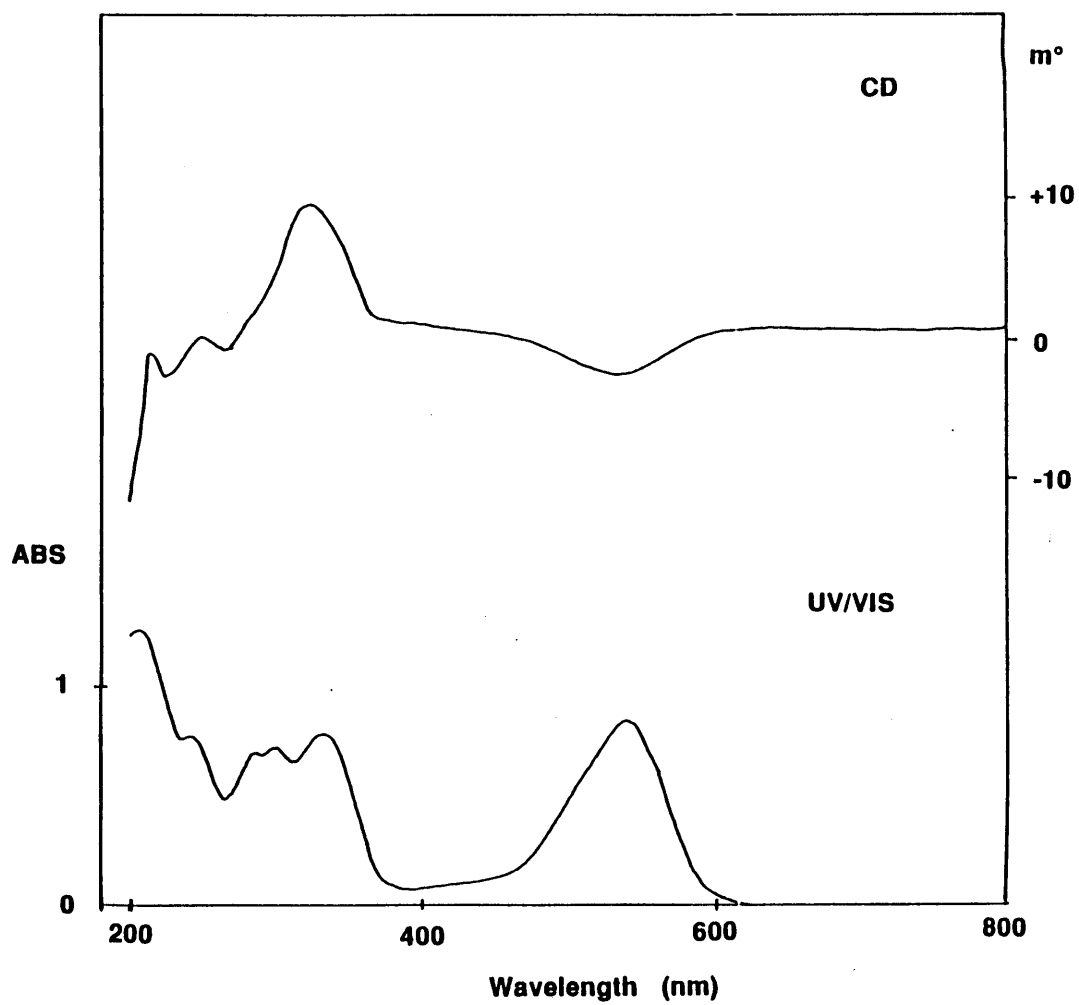


Fig. 3-4 Electronic spectra and CD of gentiodelphin (3) in 10% TFA-methanol ( $2.7 \times 10^{-3} \text{M}$ ,  $25^\circ \text{C}$ ).

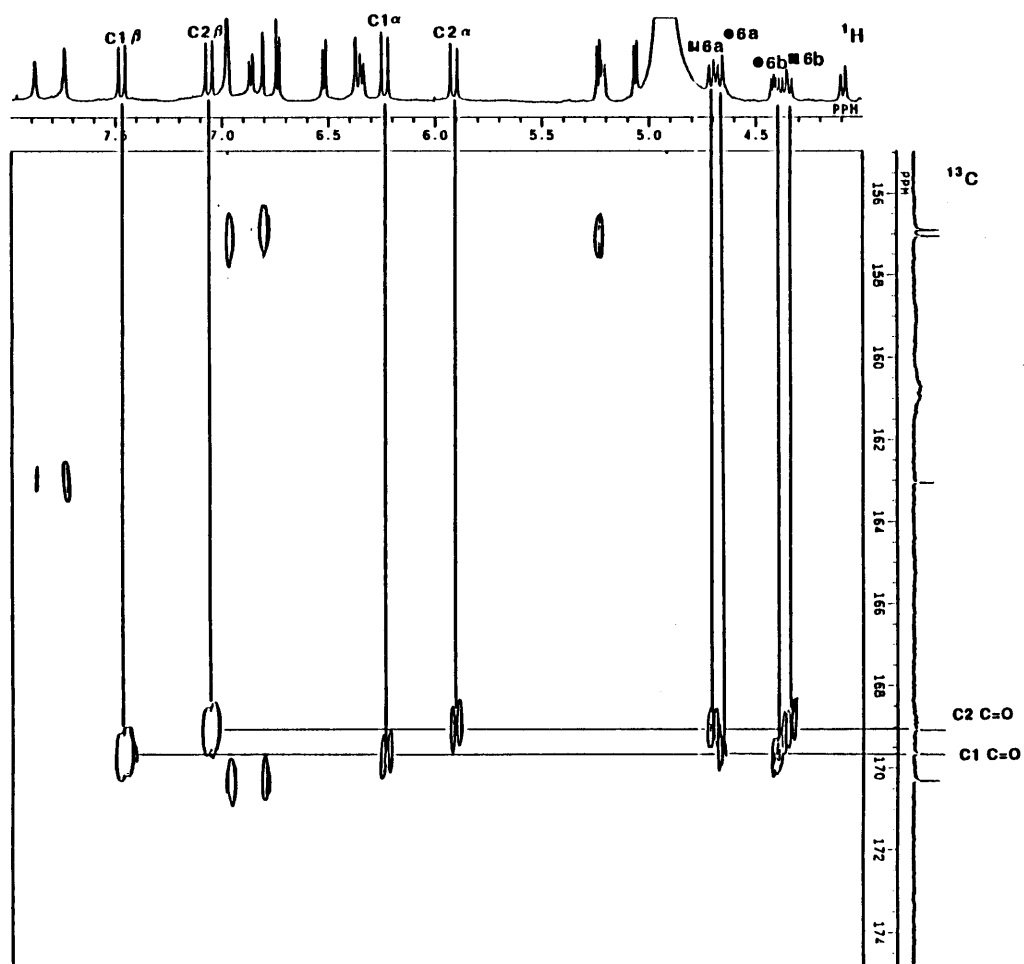


Fig. 3-5 HMBC spectrum of gentiodelphin (3) in 10%  $\text{TFA-d}_3\text{-CD}_3\text{OD}$  at  $25^\circ\text{C}$ . ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz).

た。3 を 10% TFA-メタノールに溶かし、濃度を  $2.7 \times 10^{-2}$  M (20 mg/0.6 mL) から  $5.4 \times 10^{-5}$  M まで変化させて  $^1\text{H}$  NMR を測定した (Fig. 3-6)。  $5.4 \times 10^{-5}$  M から  $2.7 \times 10^{-3}$  M の間では、化学シフトはほとんど変化しなかった。  $2.7 \times 10^{-2}$  M になると、母核、および C 2 のコーヒ酸のシグナルが 0.1-0.05 ppm とわずかに高磁場シフトした。 2. 2 で述べたように、フラボコンメリンでは  $10^{-3}$  M を越えると、キラルな面対面のスタッキングが生じ、  $^1\text{H}$  NMR において母核のシグナルが 0.5 ppm 以上高磁場シフトした。星野らも、アントシアニンの自己会合について同様の高磁場シフトを報告している<sup>59</sup>。ゲンチオデルフィンにおいて  $2.7 \times 10^{-2}$  M の高濃度でも顕著なシグナルの移動が認められないことから、母核の規則的な会合はないものと結論できた。

Fig. 3-7 に、  $2.7 \times 10^{-2}$  M の濃度のゲンチオデルフィンのスペクトルの温度による変化を示した。低温になるにつれての H-2'、H-6'、C 2-2、C 2-5 の水素のシグナルの高磁場シフトが認められたが、その移動は大きいものでも 0.1 ppm 程度で、他のシグナルの化学シフトはほとんど変化しなかった。低温になるにつれ分子運動が緩慢になり規則的な会合が強固になることは、2. 2 で明らかにした。従って、3 のスペクトルが温度による変化をほとんど示さなかったことも、分子間会合がないことを支持するものと考ええる。

そこで、ゲンチオデルフィンの濃度は  $2.7 \times 10^{-2}$  M として NOE 実験を行った。NOE の大きさは、化合物の分子量、溶媒の粘性、測定周波数により変化する。分子量が 1000 ~ 1500 のアントシアニンの場合、溶媒に酸性メタノールを用いると室温付近で負の NOE が観測されることが分かっている。温度を変えて NOE の測定を行ったところ、40°C では NOE はほとんど観測されなかったが、温度を下げていくにつれ、負の NOE が現れた。室温にすると、H-4 と ▲-1 との間などの

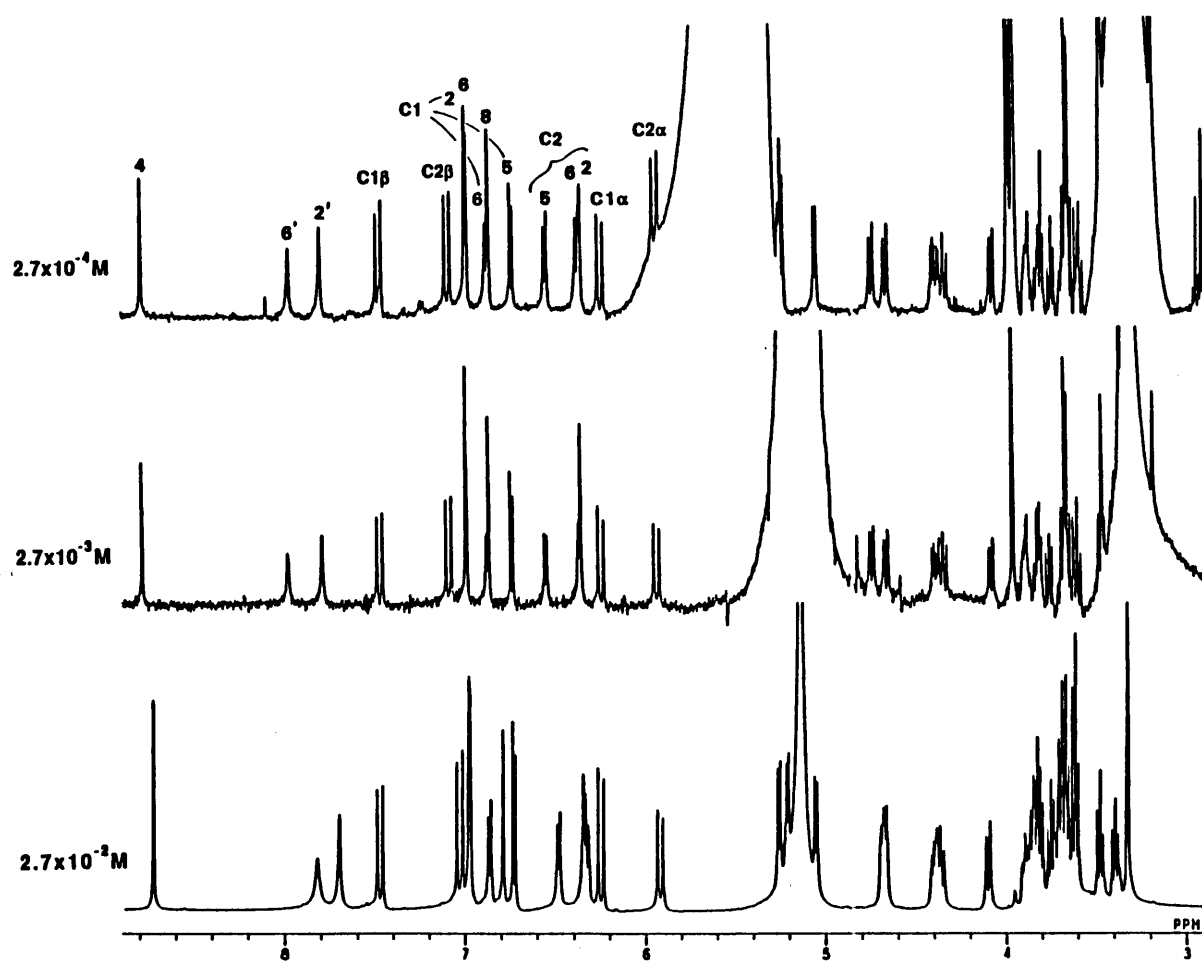


Fig. 3-6  $^1\text{H}$  NMR spectra of gentiodelphin (3) at various concentrations in 10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $25^\circ\text{C}$  (500 MHz).

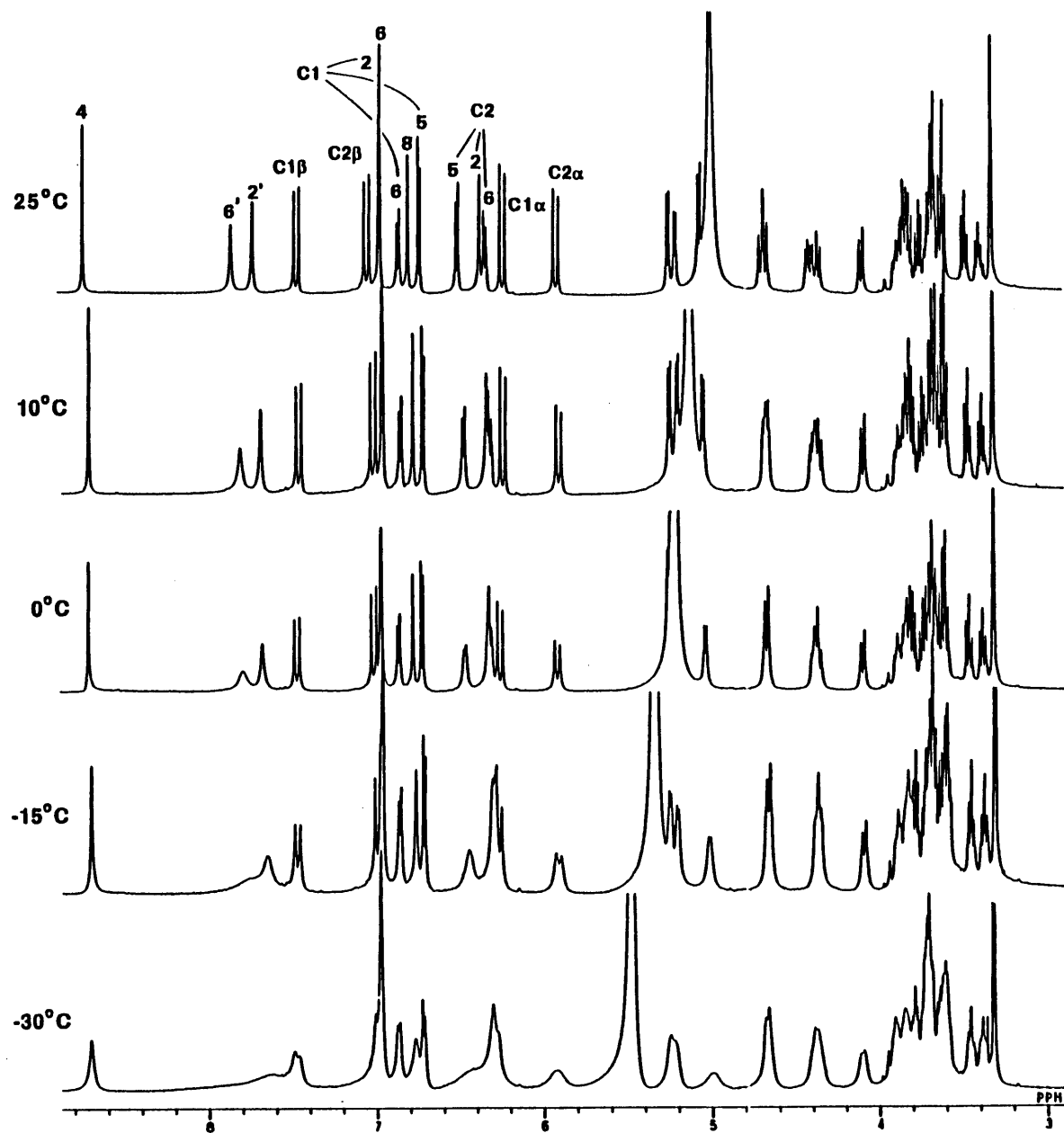


Fig. 3-7  $^1\text{H}$  NMR spectra of gentiodelphin (3,  $2.7 \times 10^{-2}\text{M}$ ) at various temperatures in 10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at 25°C (500 MHz).

強いNOEが認められた。さらに温度を下げて10°Cで測定すると、母核のシグナルとコーヒー酸の間というような遠隔NOEが観測され、それ以下の低温では、シグナルのプロード化が激しく、スピン拡散のため全てのシグナルにNOEが現れた。そこで、測定温度は10°Cに設定し得られたNOEを詳細に解析した (Fig. 3-8)。

アントシアニンの高次構造解析を行なう上で、母核に結合した糖のコンフォメーションはきわめて重要である。自由度の大きい結合としては、グルコシド結合の部分とC5-C6結合とが考えられる。グルコシド結合のコンフォメーションに関しては、NOE実験の結果から、C5-C6結合のコンフォメーションに関しては、<sup>1</sup>H NMRにおける結合定数から推定できた。

各グルコースのアノマー水素を照射すると結合した母核の片方の水素にだけ強いNOEが観測された。たとえば、▲-1を照射するとH-4にだけNOEがあり、H-2'やH-6'にはほとんど認められず、H-6'からは、●-2にNOEが観測された。また、●-1を照射したときには、H-6に強くNOEがありH-4には全く観測されなかった。これから、グルコシド結合は自由回転しているのではなく、固定されていることがわかった。すなわち、アノマー水素が一方を向いた形をとり、母核平面に対して、グルコピラノース環が直角に立ったようなコンフォメーションを取っているのではないかと推定できた。このコンフォメーションを取るとグルコシド結合の酸素の孤立電子対とベンゼン間の $\pi$ 軌道との相互作用が最大になって<sup>87-90</sup>、安定化されるものと考えられた。

糖のC5-C6結合はFig. 3-9に示す3種の回転異性体として混在する。6位の*pro R*、*pro S*水素と5位の水素との結合定数が明らかであれば、改良Karplus式<sup>91</sup>からその存在比を計算することができる<sup>92</sup>。大類らは経験則でなされていたこの6位の*pro R*、*pro S*水素の帰属を、キラル重水素化法により一義的に決定する方法を開

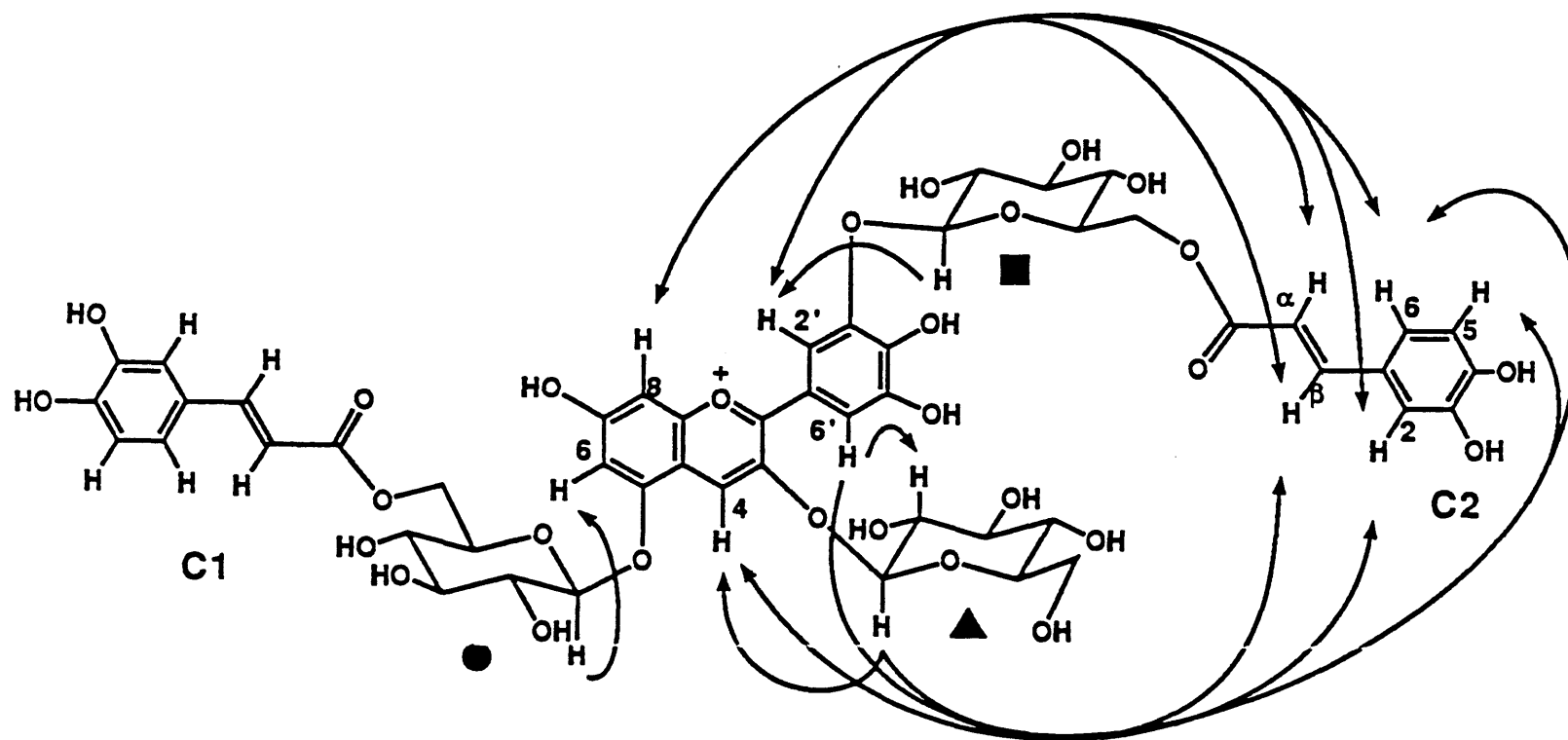
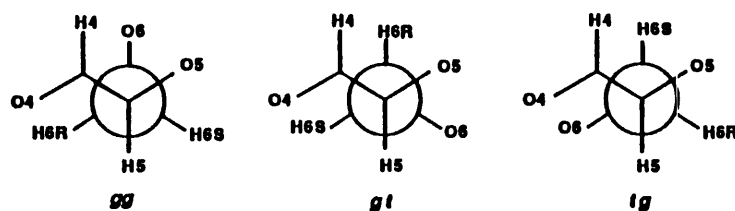


Fig. 3-8 NOE network of gentiodelphin (3,  $2.7 \times 10^{-2}$  M) in 10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $10^\circ\text{C}$  (500 MHz).





	Equation A			Equation B		
	% of each rotamer					
	<i>gg</i>	<i>gt</i>	<i>tg</i>	<i>gg</i>	<i>gt</i>	<i>tg</i>
▲	45	55	0	45	59	-4
●	49	51	0	49	54	-3
■	18	82	0	17	87	-4

Equation A :  $J_{5,6\text{proS}} = 1.3gg + 2.7gt + 11.7tg$   
 $J_{5,6\text{proR}} = 1.33gg + 11.5gt + 5.8tg$   
 $gg + gt + tg = 1$

Equation B :  $J_{5,6\text{proS}} = 2.2gg + 2.4gt + 11.1tg$   
 $J_{5,6\text{proR}} = 1.7gg + 10.8gt + 4.1tg$   
 $gg + gt + tg = 1$

Fig. 3-9 Ratio of *gg*, *gt* and *tg* rotamers of three glucoses of gentiodelphin (3) calculated by the modified Karplus equation.

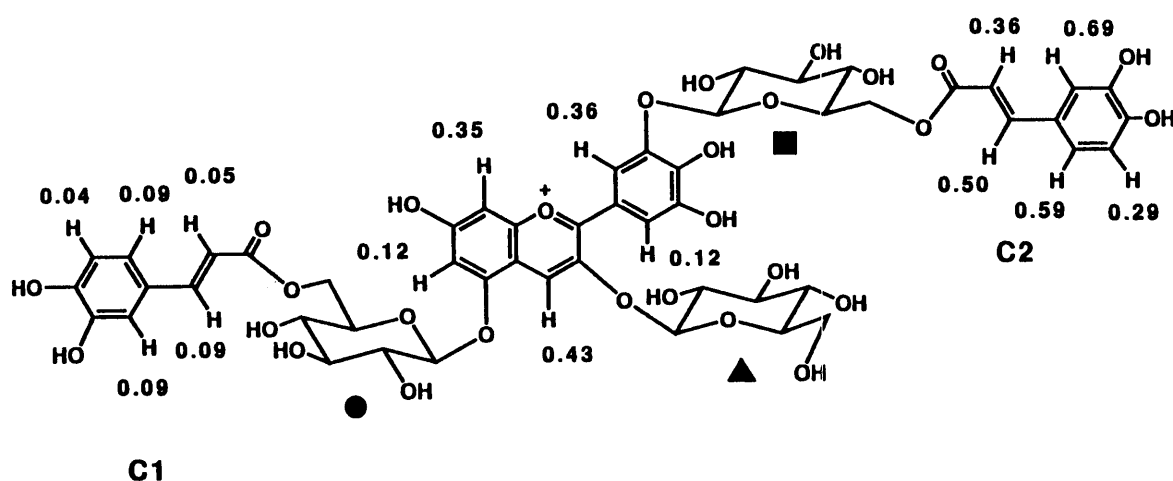


Fig. 3-10 Upfield shift (ppm) of protons of gentiodelphin (3) compared with methyl caffeate (C1 and C2) or bis-deacylgentiodelphin (anthocyanidin nucleus). ( $2.7 \times 10^{-2}\text{M}$  in 10% TFAd- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $30^\circ\text{C}$ , 500 MHz).

発した<sup>93</sup>。そして、D-グルコースでは、*gg* コンフォメーションが主要で 60%、残りが *gt* で 40%、*tg* は全く存在しないことを明らかにした<sup>94</sup>。大類らの結果からの類推で結合定数の小さい方 (6a 水素) を *proS*、大きい方 (6b 水素) を *proR* と帰属した。この帰属に基づき Fig. 3-9 の式を用いて各異性体の存在比を計算した結果、▲と●のグルコースは *gg* と *gt* の比が約 6 : 4、■の糖では *gt* が 80% 以上を占め主要コンフォメーションであることがわかった。なお、逆の帰属による計算では *tg* が主要となることから類推による帰属は正しいものと考えている。

次に、遠隔 NOE を解析し、コーヒー酸の分子内会合について明らかにした。母核の H-4、H-8、H-2'、H-6' と C 2 の水素との間に -1 ないし -2% の NOE が認められ、C 1 の水素との間には全く NOE は認められないことが分かり、C 2 のコーヒー酸だけが母核と会合していることが推定された。母核と C 2 水素の間の遠隔 NOE は  $2.7 \times 10^{-3}$  M の濃度のサンプルでも同様に観測された。先述のように  $5.4 \times 10^{-5}$  M からこの濃度までは、<sup>1</sup>H NMR スペクトルにほとんど変化が認められなかった。従って、これらの遠隔 NOE は分子間でなく分子内によるものである。さらに、40°C の 2 次元 ROE<sup>95</sup> 測定によっても、H-8 と C 2- $\alpha$ 、H-2' と C 2- $\beta$  の間に相関ピークが認められ、NOE がスピン拡散によるものではないことが確認できた。

C 2 の母核への会合は、C 2 残基の水素の化学シフトが C 1 よりも全体的に高磁場にあることから示唆された (Fig. 3-10)。母核のシグナルおよび C 1、C 2 の各シグナルを、それぞれ、ビスデアシルゲンチオデルフィン (38)、コーヒー酸メチルの化学シフトと比較すると、母核は 0.09-0.36 ppm、C 2 は 0.20-0.69 ppm 高磁場シフトしていたのに対し、C 1 は 0.1 ppm 以下のシフトしか認められなかった。この高磁場シフトは芳香環の環電流によるアニソトロピーによるもので、C 2 の芳香

環の面が母核の上に面平行に存在するためと考えられた。大坪らは、パラシクロフ  
ァンの $^1\text{H}$  NMRシグナルにおけるアニトロピーについて、4 Å 前後の距離に平  
行にあるベンゼン環の水素は約 0.69 ppm 高磁場シフトすると報告した<sup>96,97</sup>。この例  
から、C 2 のコーヒ酸はかなり近い距離で対面で会合しているのではないかと  
推定できた。

上述した以外にも、NMRからは興味深い事実が明らかになった。低温で測定し  
たスペクトルでは、線幅のブロード化が認められたが、各シグナルで均一ではなく、  
H-2'、H-6' のシグナルおよびC 2 のコーヒ酸のシグナル ( $\alpha$ 、6 位) が  
C 1 のシグナルと比較してブロード化が顕著であった (Fig. 3-7)。シグナルの線幅  
は、横緩和時間、 $T_2$ 、に依存するので、温度変化の実験でシグナルのブロード化  
が比較的高温で起こる水素の部分は、分子のセグメント運動がゆっくりであると推  
定できる。この理由は、C 2 が会合しているためではないかと考えられる。またコ  
ーヒ酸を加水分解により除去した、ビスデアシルゲンチオデルフィンでは、全て  
の糖のC 5-C 6 結合のコンフォメーションが *gg* であった。6 位のコンフォメ  
ーションはC 2 の分子内会合と密接に関係しているものと考えられた。

### 3. 2. 2 コンピュータモデリングによるゲンチオデルフィンのコンフォ メーション解析

3. 2. 1 で得られたゲンチオデルフィン (3) のコンフォメーションに関する  
データをもとに、計算機支援のコンフォメーション解析を行った。使用したプロ  
グラムは QUANTA-CHARMm<sup>98,99</sup> でコンピュータは IRIS-4D を用いた。3 は分子内  
に回転可能な結合が多数あり、全ての結合を一度に回転させて安定コンフォメー

ションを検索することは不可能である。そこで、まず、ビスデアシルゲンチオデルフィン (38) について 3 個のグルコシド結合を逐次回転させてコンフォメーション検索を行い、得られた安定コンフォメーションに対し、コーヒー酸をこれも 1 残基ずつ逐次結合させ、それぞれについてコンフォメーションを検索するという段階的方法をとった。比誘電率は 1 とし真空中の計算を行なった。NOE から得られた距離情報と C 5 - C 6 結合のねじれ角についての束縛条件を付けてコンフォメーション検索、エネルギー最適化を行った。そして、最終段階で全ての束縛条件をはずしたエネルギー最適化を行い安定コンフォメーションを得た。なお、AB 環の間の結合に関する回転については、H-8 と H-2' が近いコンフォメーションでないと、▲と■の糖が立体的に非常に近くなり不利であるので図のように固定した。

まず、ビスデアシルゲンチオデルフィンのグルコシド結合 $\phi$ 、および $\psi$ を各々 $30^\circ$ ずつ回転させて、コンフォメーション検索を行った (Fig. 3-11)。その間アノマー水素と H-4 との間に  $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$  の距離の束縛条件を付け、C 5 - C 6 結合については gg として束縛した。その結果、母核平面と糖の 6 員環の作る平面とがほぼ直角になったコンフォメーションが最適コンフォメーションとして得られた。同様の方法で、 $\phi'$ 、 $\psi'$ 、 $\phi''$  および  $\psi''$  を逐次回転させて安定コンフォメーションを探した。

次に、ビスデアシルゲンチオデルフィンの最適化コンフォメーションに C 1 のコーヒー酸を結合し、T1、T2、T3、T4の軸を T1 と T2 については  $30^\circ$  ずつ T3 と T4については  $180^\circ$  回転させて構造検索を行った。C 1 と母核との間にはなんらの NOE が観測されなかったので、この残基間には束縛条件は全く付けなかった。ただし、C 5 - C 6 結合についてのみ、gg として束縛した。ついで、C 2 のコーヒ

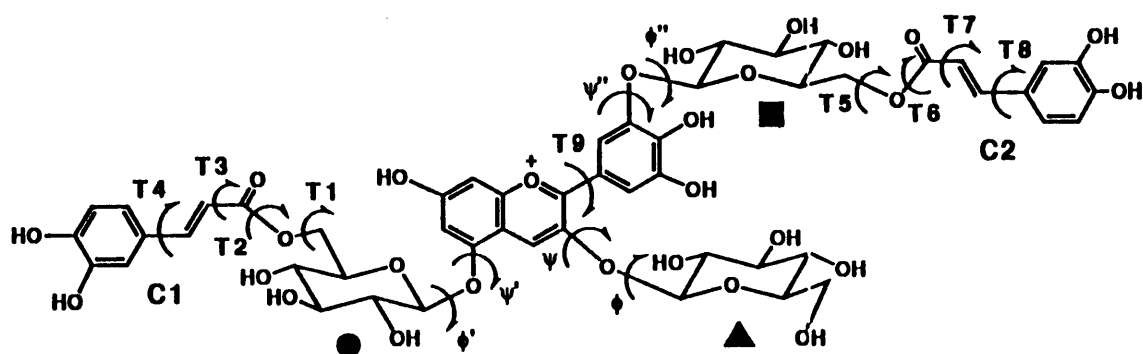


Fig. 3-11 Torsional bonds of gentiodelphin (3) rotated during conformational search.

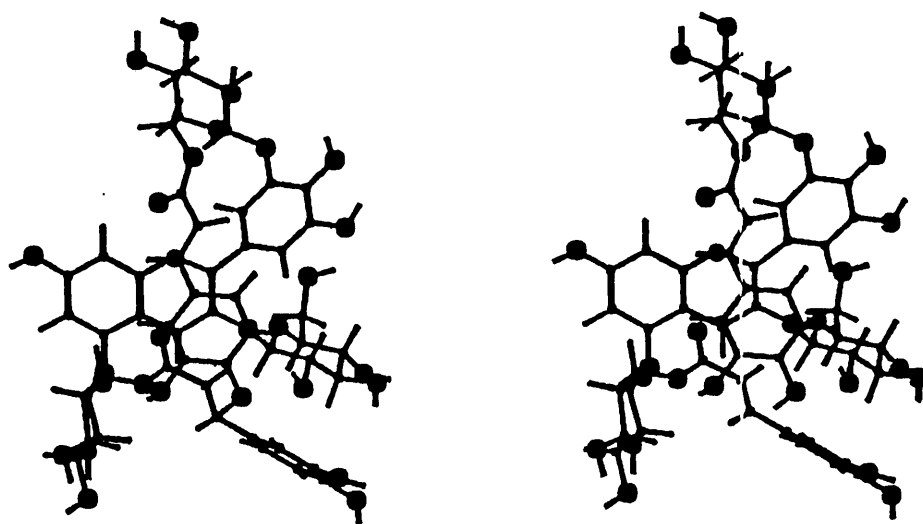


Fig. 3-12 Stereoscopic structure of the optimized conformation of gentiodelphin (3).

ー酸を *gt* コンフォメーションをとった■の糖の6位に結合させ、こんどは、糖のアノマー水素と母核間の強いNOEだけでなく、遠隔のNOEの観測された水素どうしにも  $4.0 \pm 1.0$  Å の距離束縛を付けた。初期座標として、C2のT7、T8結合の回転に関する4つのコンフォーマーを考え、それぞれについて、 $\phi$ 、 $\psi$ 、T5、T6の結合を360°の範囲のランダムサンプリング検索で回転させ、各コンフォメーションについてエネルギー最適化を行った。最終的に Fig. 3-12の最適化コンフォメーションが得られた。得られたコンフォメーションにおいて、C2はアントシアジンのAB環の裏側から約4 Åの距離で会合していた。A環とB環とは 90° の角度でねじれ、C1は全く母核とは相互作用のない位置に存在した。各アノマー水素と母核水素との距離はH-4と●-1、H-6と▲-1およびH-2'と■-1でそれぞれ2.94 Å、2.29 Å、2.09 Åであった。

### 3・3 紫ヤム色素アラタニンの分子会合

ヤムイモは主として熱帯、亜熱帯に分布するヤマノイモ科の植物で、塊茎を食用とする。食用作物としては世界で最も多量に栽培されており、非常に重要な植物である。塊茎の色は通常の白色の他に、黄色、紫色など多数あり、フィリピンでは紫ヤム (*Dioscorea alata*, Photo 4) の乾燥粉末 (UBE) がアイスクリーム等の食品の着色に用いられる。

1967年、1968年に Rasper<sup>100</sup>ら Imbert<sup>101</sup>らはそれぞれ紫ヤム (*Dioscorea alata*) より色素を抽出し、アントシアニンであることを報告した。両者ともシアニジンに1～2個の糖が結合した簡単な構造を提出している。その後1977年に津久井らはUBEの色素が中性溶液中でも安定であることとその構造がシアニジン、またはマルビジンにゲンチオビース、*p*-クマル酸が結合したものであると報告した。1990年になって、正山らは紫ヤム (*Dioscorea alata*) から3種の色素を単離してアラタニン1-3と命名し、シアニジン、またはペオニジンの3位にゲンチオビオースが結合し、さらにシナピル酸を1個含む構造を報告している<sup>102</sup>。しかし、正山らはさらに他の複雑なアントシアニンの存在も報告しているものの詳細は不明のままであった。

従って、これまでの紫ヤム色素の研究は、何れも、塊茎に含まれる全ての色素の完全な構造を明らかにしておらず、すでに報告された構造も、そのデータから考える限り、確かとは考えがたかった<sup>103-105</sup>。さらにこれらの単純な構造では色素の安定性を十分に説明できるものではないと考えた。そこで著者は、紫ヤムの色素の完全な構造を明らかにして、その安定化機構の解明を行なった。

### 3. 3. 1 アラタニンの単離精製

凍結保存した紫ヤマ (*Dioscorea alata*) を下ろし金ですりつぶしたのち、1章に記した常法に従って抽出し、HPLCで分析した (Fig. 3-13)。主に5種の色素が含まれることが分かり、中でも含量の多い色素3種について、溶出順にアラタニンA (39)、B (40)、C (41) とした。3次元検出器により得た各ピークの電子スペクトルから、アラタニンA、B、およびCはそれぞれ分子内にケイヒ酸誘導体を2個、2個、および1個含むことが明かになった。同時にUBEから同様の条件で抽出した抽出液も分析したところ、得られたクロマトグラムに差は認められなかった。これから、生イモの凍結乾燥による色素の分解は殆ど起きないことがわかった。また、1% 塩酸-メタノールで抽出後、抽出液を室温で数日間放置してもクロマトグラムに変化が認められなかったことから、紫ヤマのアントシアニンには、マロニル基は存在しないものと推定した。

色素を単離するために、凍結保存した紫ヤマ 283 g をすり下ろし、1% TFA 含有 50% アセトニトリル水溶液で抽出した。抽出液を減圧下濃縮し不溶物を濾別後、中圧逆相分取カラムに吸着させた。3% リン酸を含むA液の濃度を0% から30% まで段階的に上昇させて色素を溶出した。色素を含む画分はさらに逆相分取HPLCで精製した。アラタニンA、B、CをTFA塩としてそれぞれ10 mg、50 mg、25 mg 得た。

### 3. 3. 2 アラタニンの構造

アラタニンA (39) はFABMSで  $m/z$  1509 に分子イオンピークを与えた。



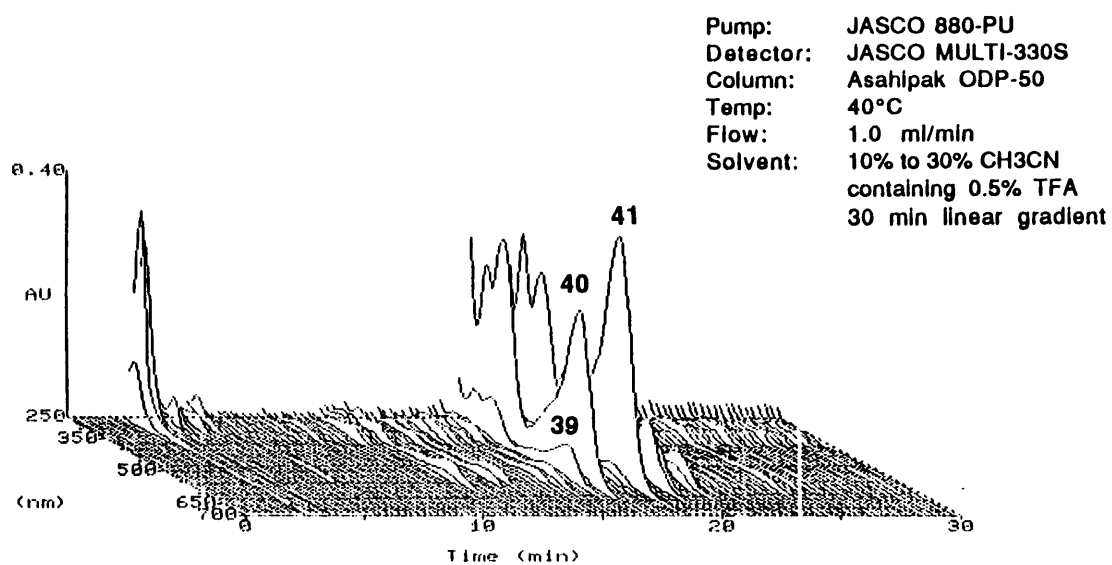
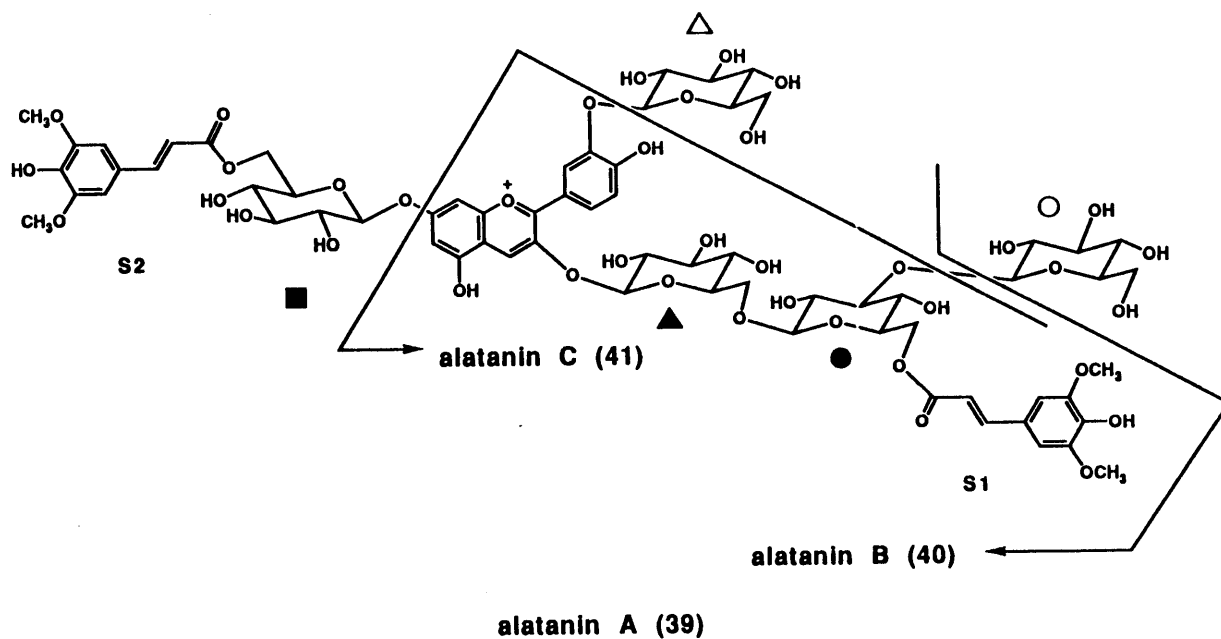


Fig. 3-13 3D-chromatogram of the extract of tuber of purple yam *Dioscorea alata*.

アラタニンAの10% TFA 含有重メタノール中の $^1\text{H}$  NMRスペクトル (Fig. 3-14) において最も低磁場に観測される 8.55 ppm のシグナルをH-4と帰属して<sup>106</sup>、デカップリング実験における遠隔カップリングから 6.89 ppm と 7.06 ppm のシグナルをそれぞれH-6とH-8と帰属できた。7.94 ppm のシグナルと 8.45 ppm のシグナルの間にメタカップリングが、8.45 ppm と7.01 ppm のシグナルの間にオルトカップリングが観測されたことから、各々、アントシアニンA環のH-2'、H-6'、H-5'と帰属でき母核はシアニンであることが明らかにできた。

芳香族領域にはさらにケイヒ酸誘導体の $\alpha$ ,  $\beta$ 水素に由来すると考えられる2組のダブレットが存在し、6.16 ppm、6.07 ppm に各々2 H分のシングレット、3.36 ppm、3.55 ppm に各々6 H分のメトキシ基由来と考えられるシングレットが観測された。アラタニンAをメタノール中でアルカリ加水分解するとシナピル酸メチルだけが得られたことから2個の芳香族酸はシナピル酸と決定し、 $J_{\alpha\beta}=16\text{ Hz}$  からいずもトランス配置を取ることが分かった。

5 ppm 近辺には糖のアノマー水素と考えられるダブレットが5個観測された。それぞれのアノマー水素を照射して1次元HOHAHAスペクトルを測定することにより、糖のシグナルを完全に帰属し、得られた結合定数から、糖は全て $\beta$ -グルコピラノシドであることが分かった。さらに●と■の糖の6位のメチレンシグナルが他の糖のシグナルと比較して低磁場に観測されることから、2個のシナピル酸は●と■の糖の6位に結合していることが明らかにできた。

糖の結合位置はNOE差スペクトルにより決定した。各糖のアノマー水素を照射することにより、Fig. 3-15 に示したNOEが観測されたことから、▲、●、■および△の結合位置をそれぞれ3位、▲の6位、7位、2'位と決定した。しかし、○の糖は、アノマー水素の照射により、●の2位と3位の両方に-10%のNOEが認

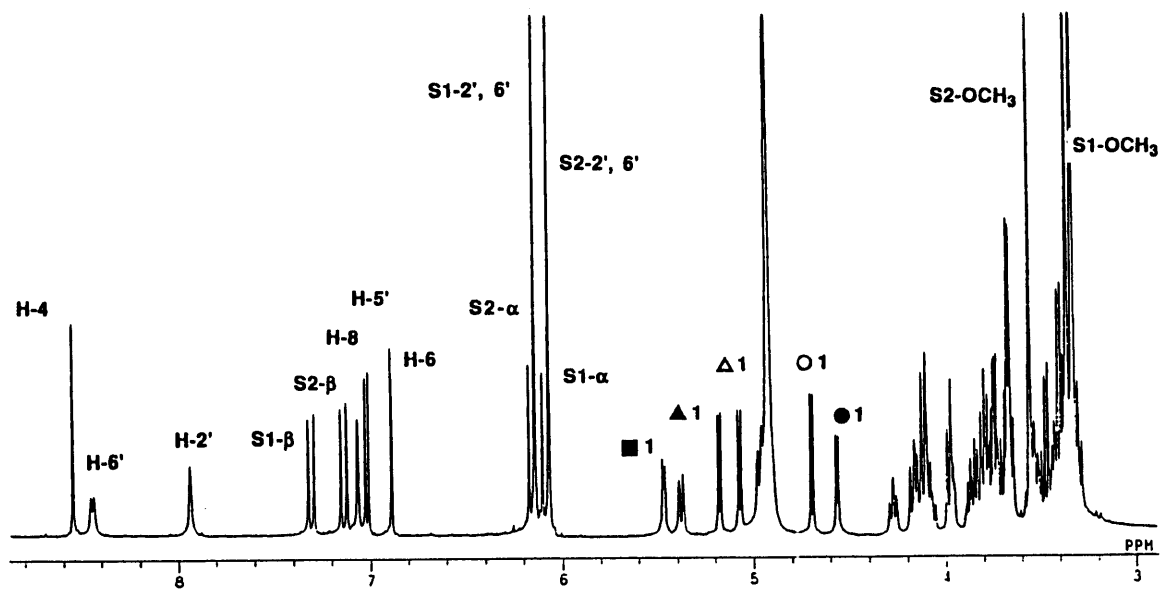


Fig. 3-14  $^1\text{H}$  NMR spectrum of alatanin A (39) in 10%  $\text{TFA-d-CD}_3\text{OD}$  at  $30^\circ\text{C}$ . (500 MHz).

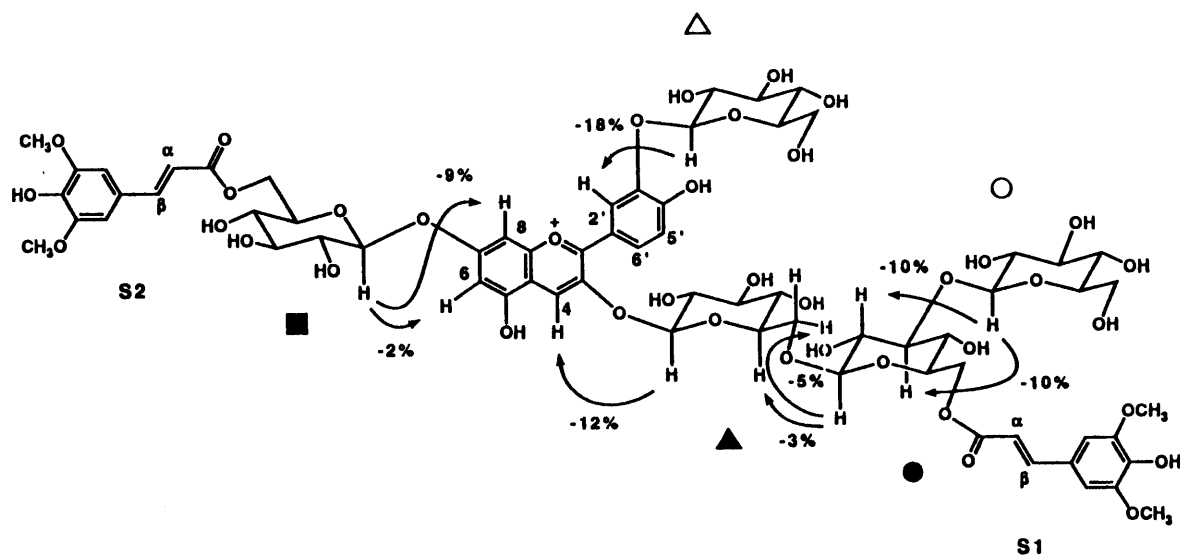


Fig. 3-15 NOE network of alatanin A (39) in 10%  $\text{TFA-d-CD}_3\text{OD}$  at  $10^\circ\text{C}$  (500 MHz).

められたため結合位置の特定ができなかった。そこで、アラタニンAを無水トリフルオロ酢酸でトリフルオロアセチル化して（アラタニンA完全トリフルオロアセチル化体, **42**）、糖の結合位置の決定を試みた<sup>107, 108</sup>。

糖のシグナルの帰属法および、糖の結合位置を決定するために、水酸基を完全アセチル化してシグナルを広げるのはきわめて有効である。アセチル化と比較してトリフルオロアセチル化法は、立体的に込んだ水酸基ですら温和な条件で定量的に反応が進み、さらに有用であった。実際には、色素を重クロロホルムと無水トリフルオロ酢酸の混合液に溶解するだけでなんらの後処理も必要とせずそのままNMR測定が可能であった。アラタニンAの完全トリフルオロアセチル体を用いて、先と同様に糖の1位シグナルを照射した1次元H O H A H A測定 (Fig. 3-16)、NOE差スペクトル測定を行った。**42**では、問題となっていた○の1位から●-2および3へ、やはり同程度のNOEが観測された。一方化学シフトを比較すると、●-2がアシル化シフトして 5.05 ppm へ移ったのに対し●-3は 4.28 ppm と高磁場に観測された。このことからアラタニンAにおいて●-2は水酸基で●-3に○の糖が結合していたと決定した。その他の糖の結合位置に関しては、アラタニンAにおけるNOEより得られた結果と一致した。

2個のシナビル酸の何れのシグナルがS 1、S 2にそれぞれ帰属されるかは、3. 2. 1で述べたと同様に、アラタニンAのHMB C測定により決定した。得られた構造は、F A B M Sによって得た分子量とも一致し、以上からアラタニンAの構造を3-*O*-(6-*O*-(3-*O*-(β-D-glucopyranosyl)-6-*O*-(*E*)-sinapyl-β-D-glucopyranosyl)-β-D-glucopyranosyl)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-sinapyl-β-D-glucopyranosyl)-2'-*O*-(β-D-glucopyranosyl) cyanidinと決定した<sup>109</sup>。

アラタニンB (**40**) はF A B M Sで *m/z* 1 3 4 7 に分子イオンピークを与えた。

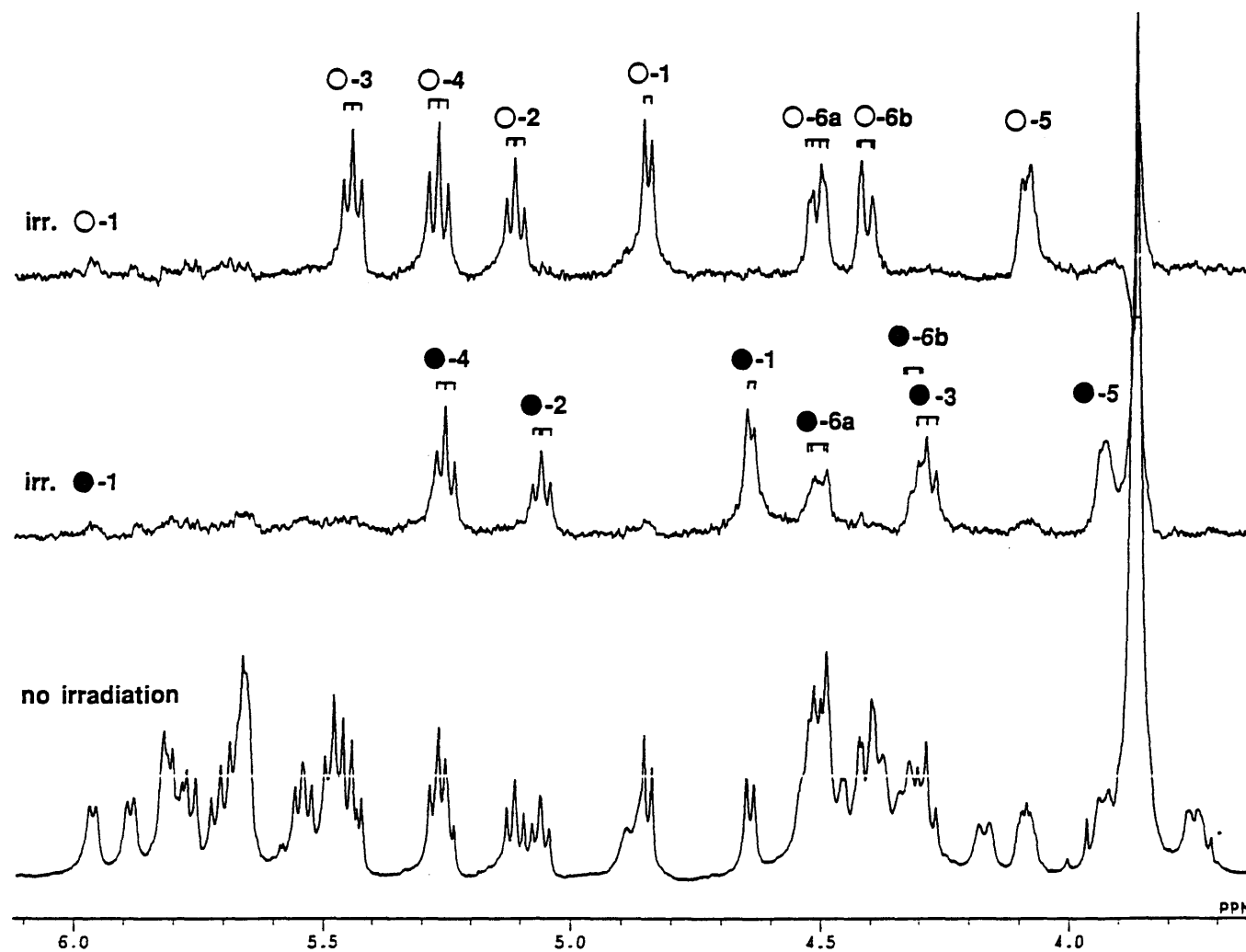


Fig. 3-16 1D HOHAHA and  $^1\text{H}$  NMR spectra of the sugar region of per-trifluoroacetyl alatanin A (4 2) (in TFA anhydride- $\text{CDCl}_3 = 1:1$ , at  $50^\circ\text{C}$  (500 MHz)).

$^1\text{H}$  NMRはアラタニンAのスペクトルとよく似通っており、芳香族領域のシグナルは、アラタニンAで述べたと同様の方法で、シアニジン環と2個のトランス型シナピル酸に由来すると決定できた (Fig. 3-17)。

糖のアノマー水素に帰属できる5 ppm 付近のダブレットは4個あり、アラタニンAの分子量との差が162であることから、アラタニンBはアラタニンAからグルコースが1個脱離したものであろうと推定した。糖の1位水素を照射した1次元H O H A H Aスペクトルにより、全ての糖のシグナルを帰属した結果、やはり4個の $\beta$ グルコピラノシドの存在が明らかになり、差NOEスペクトルから Fig. 3-18 の様に糖が結合していることを決定できた。シナピル酸の結合位置は、●と■の6位の水素の化学シフトが他の糖の6位のシグナルに較べ低磁場であることから●と■であると決定し、HMBCによって確認できた。

以上によりアラタニンBの構造はアラタニンAから○の糖が脱離した、3-*O*-(6-*O*-(6-*O*-(*E*)-sinapyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-7-*O*-(6-*O*-(*E*)-sinapyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-2'-*O*-( $\beta$ -D-glucopyranosyl)cyanidinと決定した<sup>109</sup>。

アラタニンC (41) はFABMSで $m/z$  817に分子イオンピークを与えた。

$^1\text{H}$  NMRからはシアニジンと1個のシナピル酸、2個の $\beta$ グルコシドの存在が示唆された (Fig. 3-19)。上述の方法で糖のシグナルの完全な帰属と結合位置の決定を行い (Fig. 3-20)、構造を、3-*O*-(6-*O*-(6-*O*-(*E*)-sinapyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosyl) cyanidinと決定した<sup>109</sup>。

### 3. 3. 3 アラタニンの分子会合と安定性

紫ヤムに含まれる色素はアラタニンA (39)、B (40)、C (41) の3種で全体の約

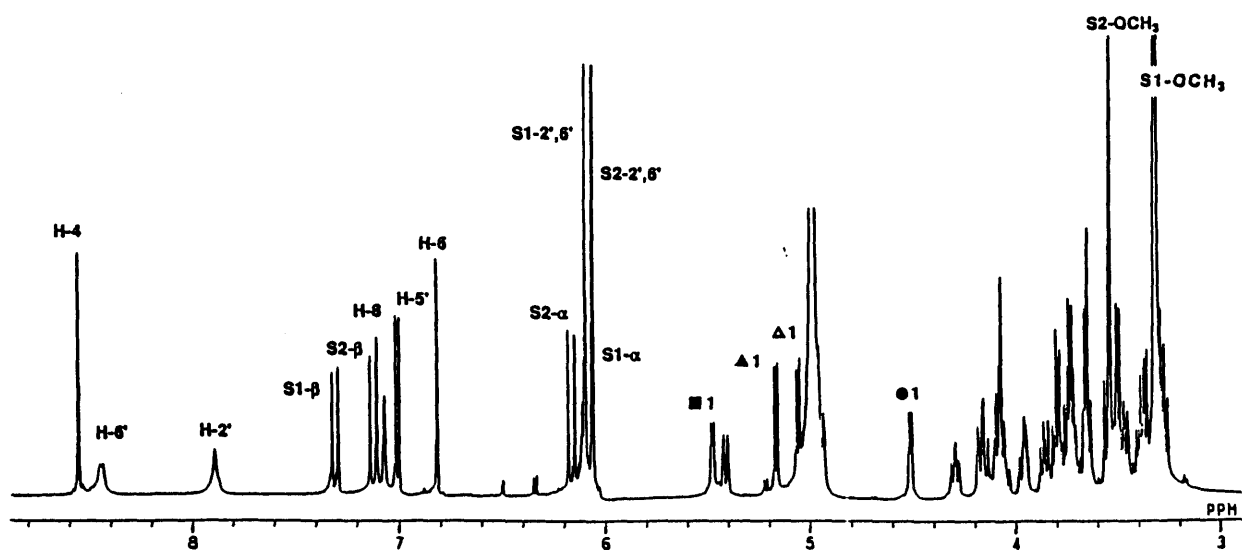


Fig. 3-17  $^1\text{H}$  NMR spectrum of alatanin B (40) in 10% TFAd- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $30^\circ\text{C}$ . (500 MHz).

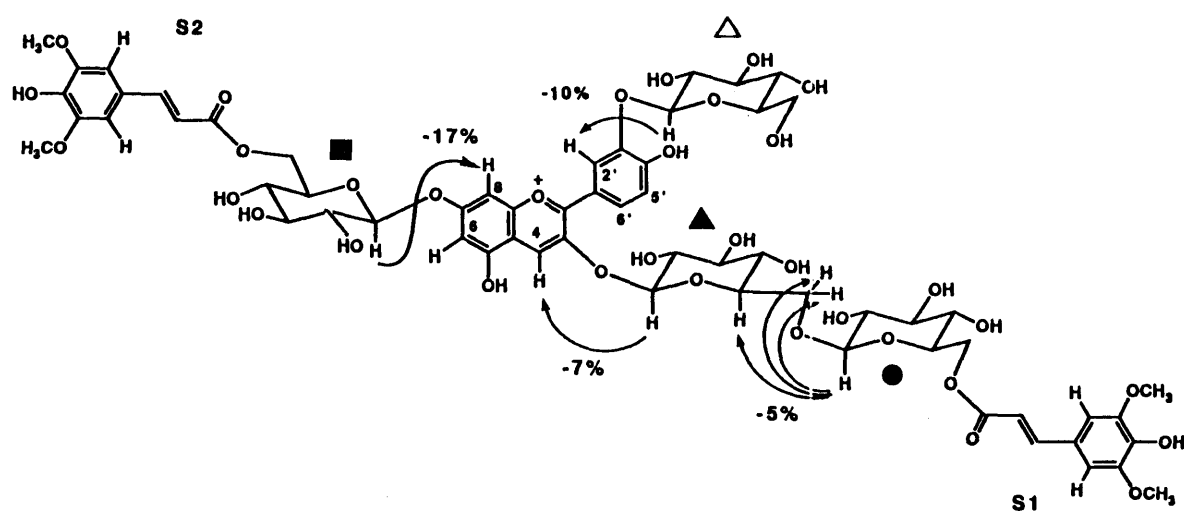


Fig. 3-18 NOE network of alatanin B (40) in 10% TFAd- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $10^\circ\text{C}$  (500 MHz).

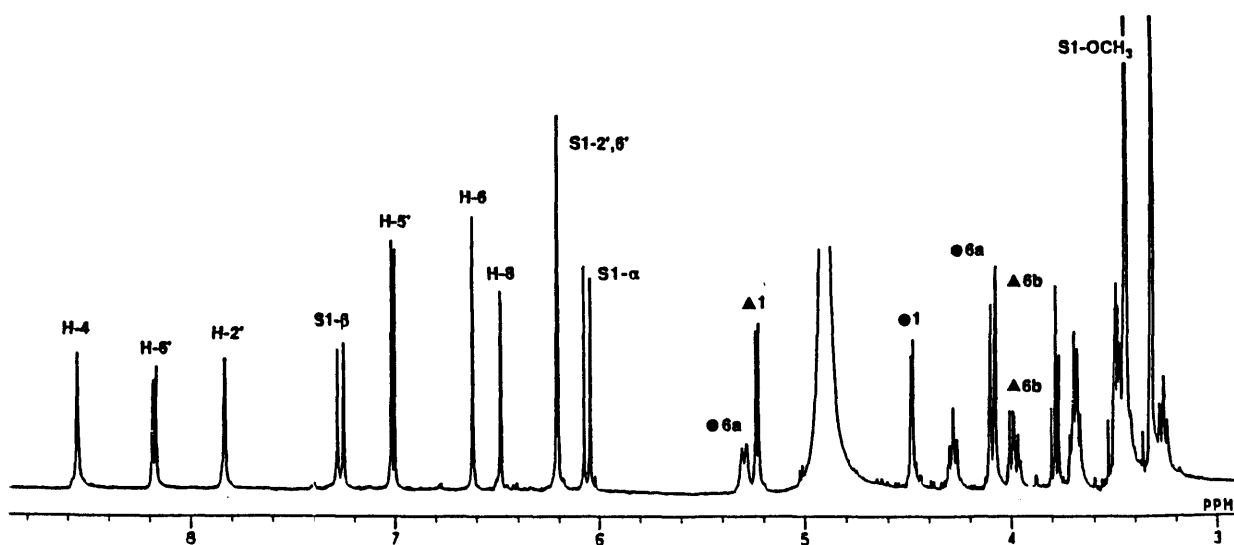


Fig. 3-19  $^1\text{H}$  NMR spectrum of alatanin C (**41**) in 10% TFAd- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $30^\circ\text{C}$ . (500 MHz).

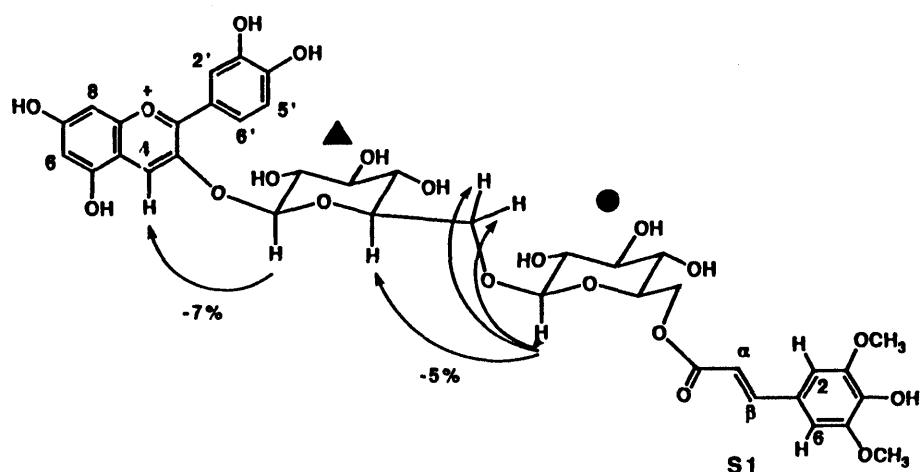


Fig. 3-20 NOE network of alatanin C (**41**) in 10% TFAd- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $10^\circ\text{C}$  (500 MHz).



90% を占める。そこでこれらの各色素の中性水溶液における安定性を調べた。単離した色素の pH 6 の緩衝液中における安定性を Fig. 3-21 に示した。分子内にアシル基を 2 個有するアラタニン A、B はこれまで知られている多アシル化アントシアニンと同様の高い安定性を示し、24 時間後もその色は 90% 以上残存した。驚くべきことに、アシル基が 1 個のアラタニン C も中性の希薄水溶液中で極めて高い安定性を示し、24 時間後も 70% 以上の安定性を示すことが分かった<sup>110</sup>。

アラタニン A、B ( $5 \times 10^5$  M) の CD を同じ溶液で測定したところ、可視部には励起子型のコトンは全く観測されなかったのに対し、紫外部には強い正の励起子型コトロンが認められ、シナピル酸が母核に会合しているものと考えられた (Fig. 3-22)<sup>1, 5, 20</sup>。中性水溶液における溶解性は、ゲンチオデルフィンと同様に低く、 $5 \times 10^4$  M 以上の濃度では、青紫色の沈澱を生じた。そのためまず、酸性メタノール中での NMR 測定を行いコンフォーメーションを推定した。Fig. 3-23 に示した遠隔 NOE が観測された。また、アラタニンの分子内シナピル酸残基の化学シフトをシナピル酸メチルのそれと比較すると、Fig. 3-23 に示すように、S 1、S 2 とも 0.25-0.85 ppm 高磁場シフトしていることが分かった。ゲンチオデルフィンと違い酸性溶液中で 2 個の有機酸が両方共、母核と会合していることを示唆するものと考えられた<sup>110</sup>。

これまで知られていた、希薄な中性水溶液中で安定なアントシアニンは全て、分子内に 2 個以上の芳香族有機酸を有する<sup>1, 3, 5, 20, 74</sup>。今回見つけたアラタニン C (41) は、モノアシル化アントシアニンでありながら安定な初めての例である。通常、モノアシル化アントシアニンは同様の条件下で極めて不安定であることから、アラタニン C には、分子内サンドイッチ型安定化機構とは異なる、何らかの分子会合の存在が推定できる。そこで、この異常な安定性の解明を試みた。

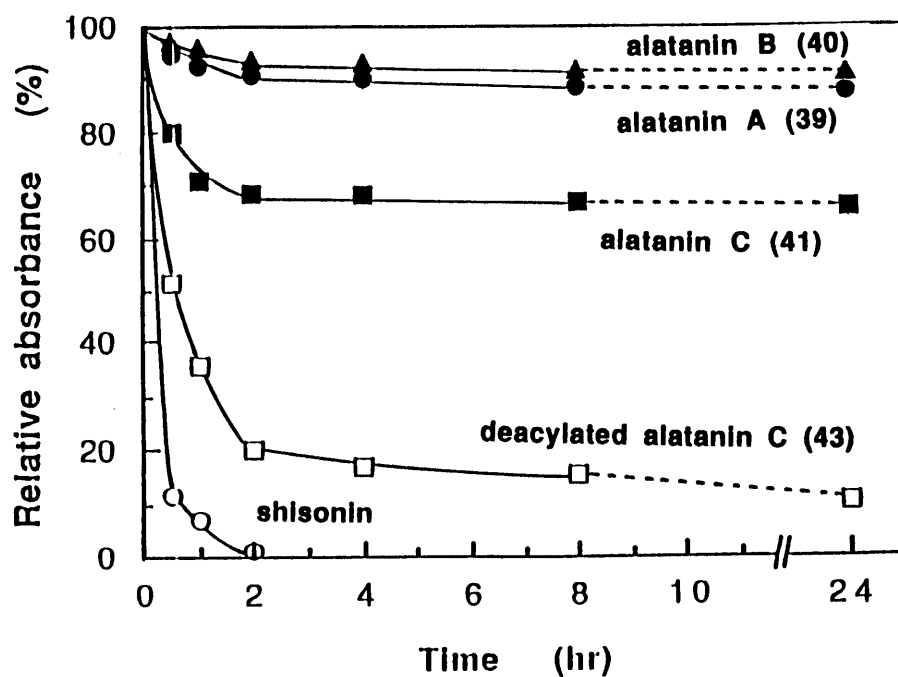


Fig. 3-21 Stability of alatanin A (39), alatanin B (40), alatanin C (41), deacylated alatanin C (43) and shisonin ( $5 \times 10^{-5} \text{M}$ ) in 0.05M phosphate buffer (pH 6.0) at 20°C.

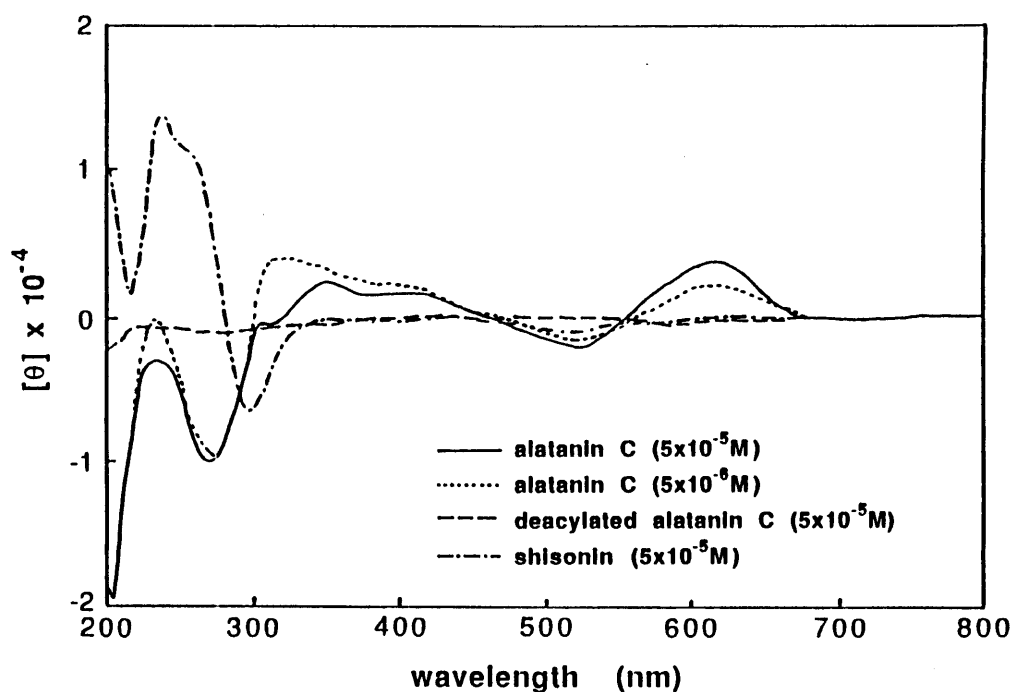


Fig. 3-22 CD of alatanin C (41), deacylated alatanin C (42) and shisonin in 0.05M phosphate buffer (pH 6.0) at 20°C.

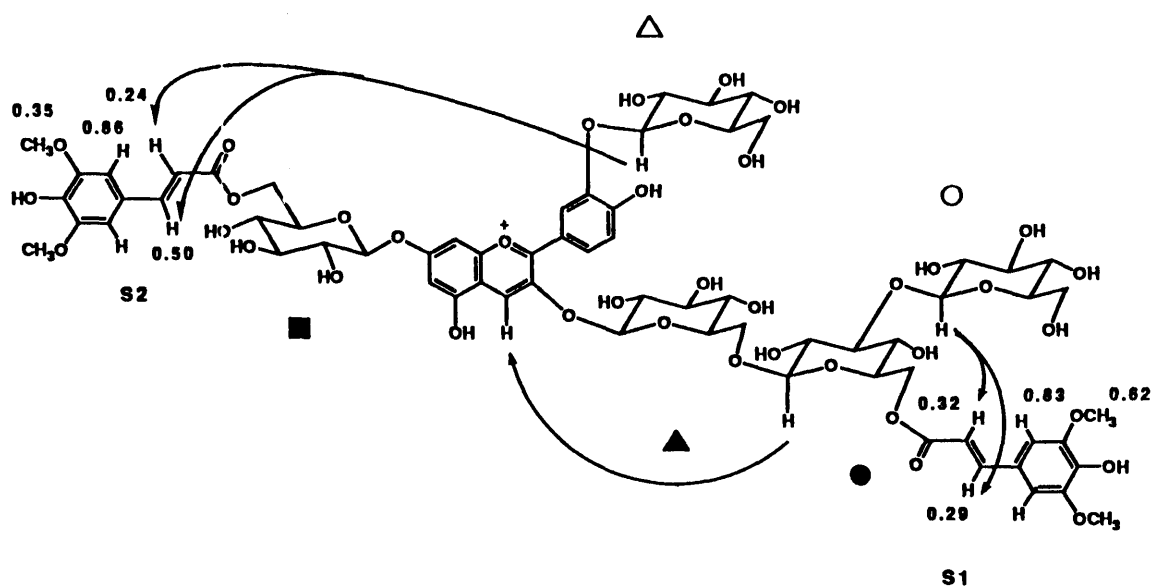


Fig. 3-23 Long distance NOEs and the upfield shift of protons of alatanin A (39) comparing with methyl sinapiate in 10% TFA- $d$ -CD<sub>3</sub>OD at 10°C (500 MHz).

アラタニンCの濃度を $5 \times 10^4$  M から  $5 \times 10^6$  M まで変えて安定性を調べたところ濃度が高い方が若干安定性も高いことが分かった (Fig.3-21)。しかし、自己会合する単純なアントシアニンは、 $10^4$  M 以下の希薄溶液になると急速に不安定になるので<sup>1,5,20,58</sup>、アラタニンC (41) の安定性の濃度依存性はこれらとは異なる。さらに、分子内のシナピル酸を除去すると、不安定になり速やかに退色することから、シナピル酸は安定化には重要であることが分かった。 $10^5$  M でCDを測定したところ、可視部に正の励起子型のコットンが観測され、右旋的な自己会合の存在が示唆された。さらに、このCDには濃度依存性も認められた。シアニン、デルフィンなどの単純なアントシアニンの自己会合は負の励起子型のコットンが現われることから、左旋的である。しかし、このCDは濃度 $10^4$  M 以下では観測されない。2. 2に記したフラボコンメリンの場合も $10^3$  M より薄い濃度では励起子型のコットンは現れない。従って、 $10^5$  M の希薄溶液において、アントシアニンは通常単分子で存在していると考えられる。これに対し、41で、 $10^6$  M の濃度においても自己会合が存在することは、きわめて特異的である。41からシナピル酸を除去したデアシル体(43)は、中性溶液中、 $10^5$  M の濃度では不安定であると同時に、可視部のコットンも消失した。このことからアラタニンCの右旋的自己会合は、シナピル酸の存在によるものと考えざるを得ない。この会合が分子間相互作用によるものであることは、極めて強いコピグメント効果を有するフラボコンメリンを41の希薄溶液に添加していくと、その量に応じて可視部のコットンが減小していくこと<sup>5,20</sup>からも確かめられた (Fig. 3-24)。さらに、41のCDを塩酸-メタノール中で測定すると、上述のコットンは全く消失した。有機溶媒中では疎水相互作用が弱められ、アントシアニン母核同士の自己会合が断ち切られるためと解釈できる。

アラタニンCもアラタニンA、Bと同様中性水溶液への溶解性が極めて悪いため、

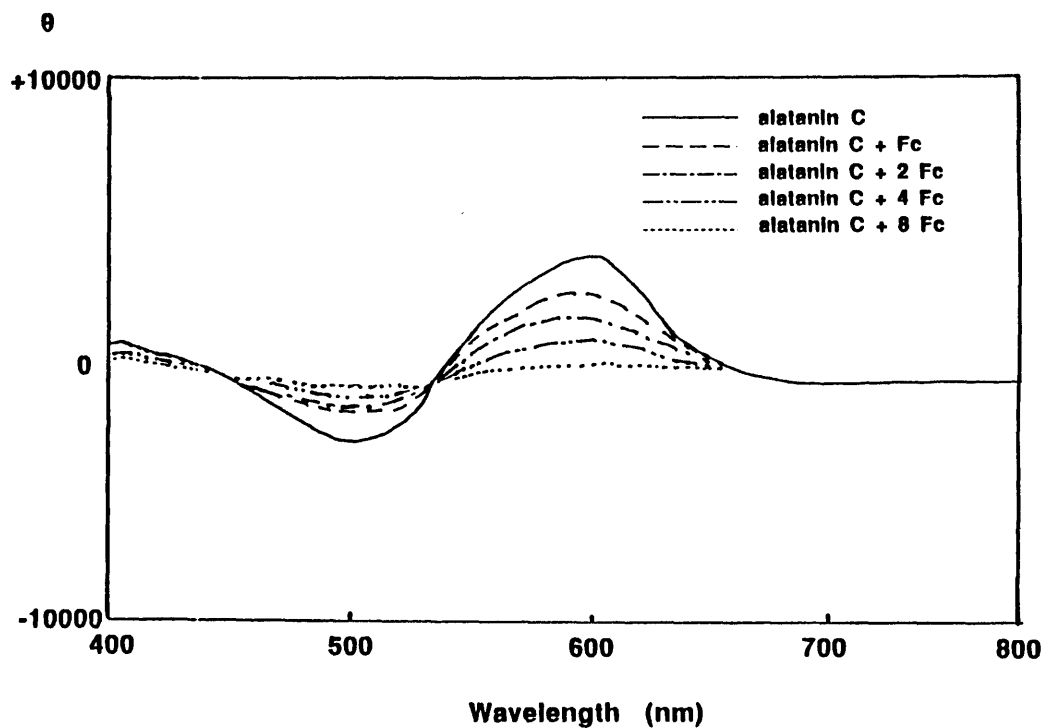


Fig. 3-24 CD of alatanin C (41) with flavocommelin (15) in 0.05M phosphate buffer (pH 6.0) at 20°C.

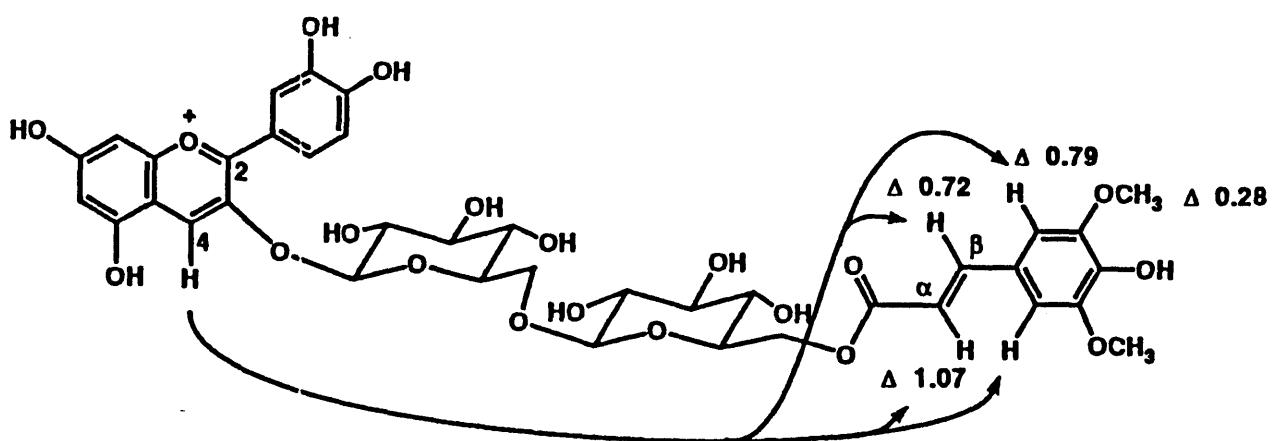


Fig. 3-25 Long distance NOEs and the upfield shift of protons of alatanin C (41) comparing with methyl sinapiate in 10% TFA- $d$ - $CD_3OD$  at 10°C (500 MHz).

まず酸性メタノール中における会合状態をNMR測定により推定した。Fig. 2-25に示すように母核H-4とシナビル酸の水素との間に遠隔NOEが観測された。シグナルの化学シフトをシナビル酸メチルと比較するとFig. 2-25に示す高磁場シフトが観測された。希薄水溶液中で不安定なシソニン<sup>10</sup>は、有機酸と母核との間の遠隔NOEは全く観測されず、高磁場シフトも認められなかった。従って、酸性溶液中でのシナビル酸残基の母核への分子内会合は中性における色素の安定性とも密接に関連しているものと考えられる。より極性の高い酸性水溶液中でアラタニンCのCDを測定したところ、酸性メタノール中よりさらに強い正の励起子型のコットンが認められた (Fig. 2-26)。重水中の<sup>1</sup>H NMRにおいてもメタノール中と同様の遠隔NOEと共にシナビル酸残基水素の高磁場シフトが観測された (Fig. 2-27)<sup>110</sup>。

以上から、中性水溶液中でもアラタニンCのシナビル酸残基は、強固に分子内会合し、同時に、母核の右旋的自己会合も起こっているものと推測できる。アラタニンCが他のモノアシル化アントシアニンと構造上異なるのは、アントシアニジン母核の5位がフリーであることと、アシル基が、ゲンチオビオースの外側の糖の6位に結合している点である。3. 2. 3で述べたようにアントシアニジン環に結合した糖の面は母核に対しほぼ直角に位置するため、3位と5位の両方に糖が結合した場合環の真上には自己会合できないと考えられる。糖に芳香族有機酸が結合すると立体的にはさらに込み合うため自己会合は殆ど不可能であろう。これに対し、アラタニンCでは5位が空いており、さらには、母核と芳香族酸を結ぶ連結部分にあたる糖が2糖と距離的にも長く、柔軟性もある。これらの理由で、モノアシル化アントシアニンでありながら自己会合できるのではないかと考えている。

アラタニンCの会合モデルとして現在のところFig. 2-28の構造を考えている<sup>110</sup>。ひとつは、2分子のアラタニンCがちょうど入れ子のようになって、母核の片側を

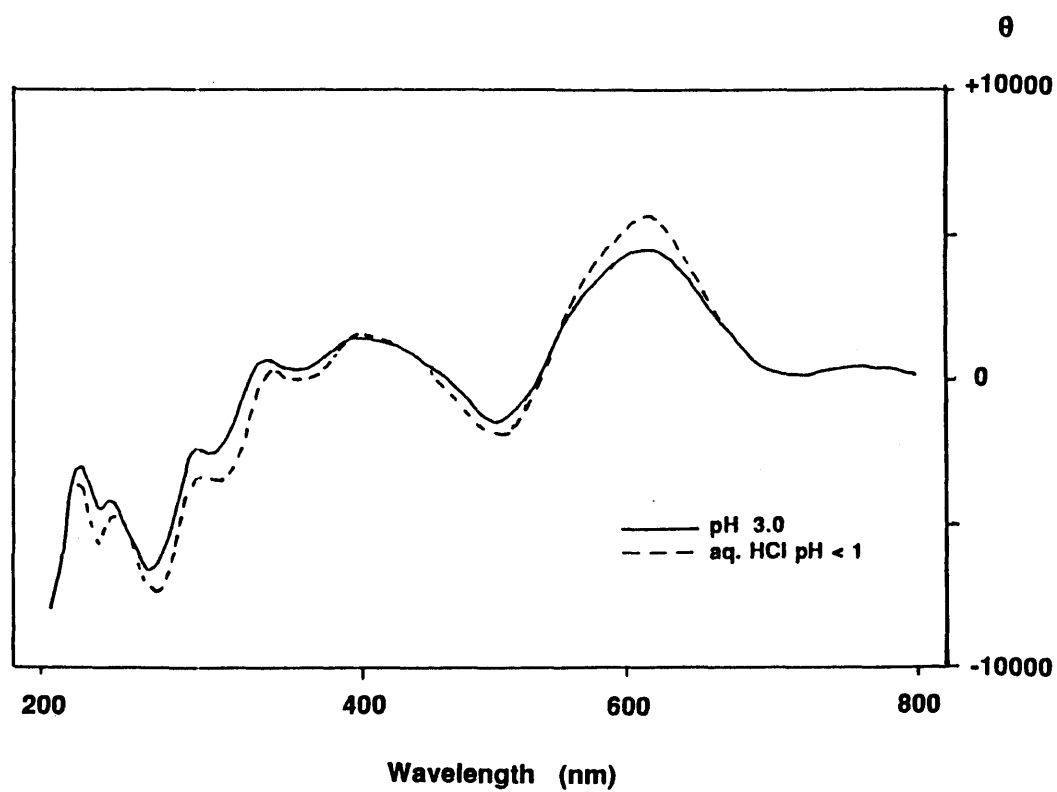


Fig. 3-26 CD of alatanin C (41) in various acidic solutions at 20°C.

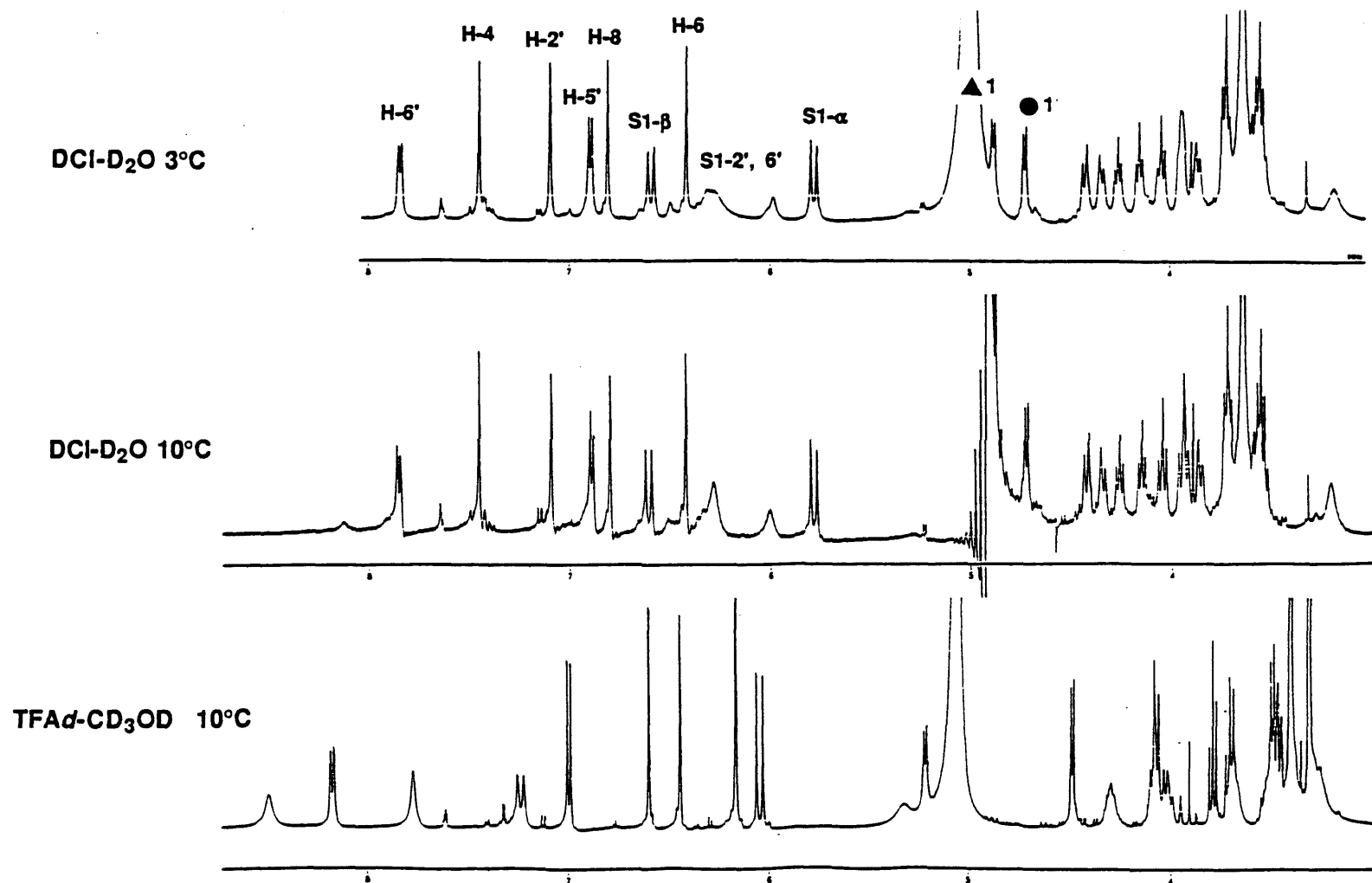


Fig. 3-27 <sup>1</sup>H NMR spectra of alatanin C (41) in DCI-CD<sub>3</sub>OD and TFAd-CD<sub>3</sub>OD (500 MHz).



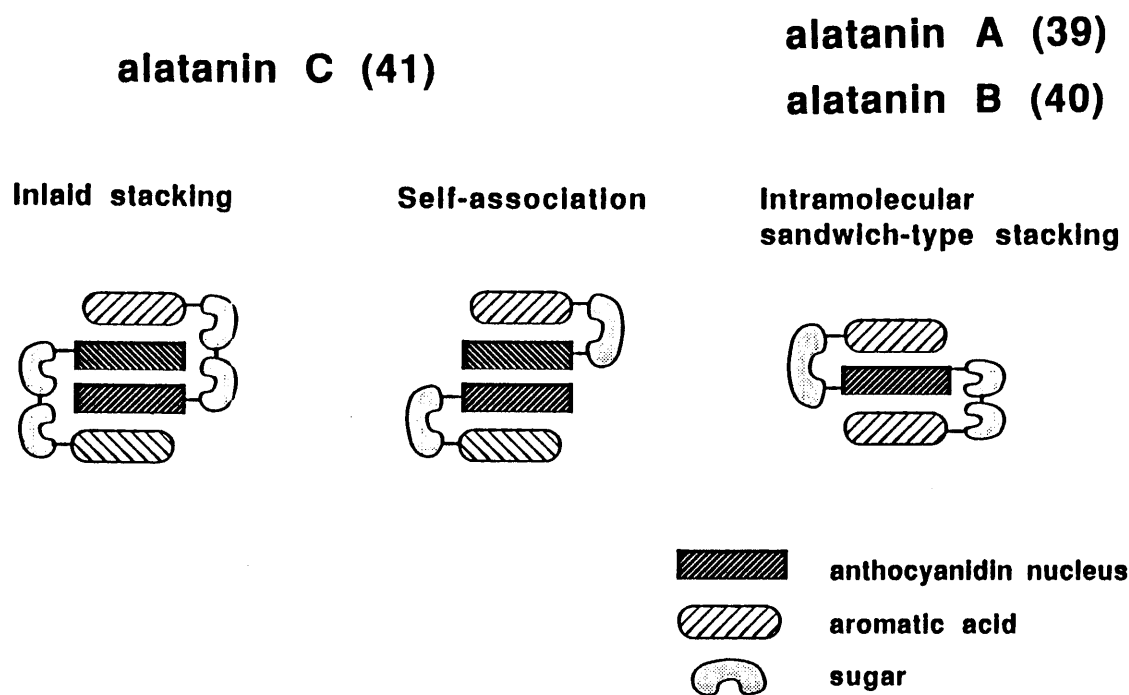


Fig. 3-28 Proposed stacking structure of alatanin C (41).

もう一方のアントシアニン分子の母核が覆い、他方を自己会合した相手の分子のシナピル酸と会合したような構造、もうひとつは、分子内のシナピル酸が会合したアラタニンC同士が、もう一方の空いた側で母核同士自己会合したものである。この何れの会合構造をとるかについては、今後さらに検討が必要である。

### 3. 4 まとめ

本章で著者は、NMRを中心とした機器分析手段により、リンドウ青色花卉色素ゲンチオデルフィンと紫ヤム色素アラタニン類の会合構造の研究を行った。これまで極めて定性的な証拠しかなかった、多アシル化アントシアニンの会合構造に対し、詳細な機器データの解析とそれらをもとにしたコンフォメーション解析を行い、芳香環同士の疎水結合によるスタッキングを実証した。

ゲンチオデルフィンにおいては、まず、酸性条件下の $^1\text{H}$  NMRスペクトルのシグナルを、HMBC測定により完全に帰属した。これにより分子内に複数存在する芳香族有機酸のシグナルの区別をすることができた。次に、温度、濃度などを変えて測定条件の検討を行い、分子内の遠隔NOEを検出できる条件を見いだした。得られたNOEを詳細に解析し、ゲンチオデルフィンに2個存在するコーヒー酸のうち、B環の糖に結合したC2だけが母核にスタッキングする事を明らかにした。さらに、糖のアノマー水素と母核水素との強いNOEから、アントシアニンのグルコシド結合が一方方向に固定されていることを明らかにし、グルコース6位水素の結合定数から、糖のC5-C6結合の回転異性体の存在比を求めることができた。これらの、溶液における高次構造に関する知見をもとに、ゲンチオデルフィンのコンピュータ支援コンフォメーション解析を行い、酸性メタノール中の安定コンフォメーションを推定した。3個の糖は何れも母核、アントシアニジン環に対して、ピラノース環の作る面がほぼ直角になるコンフォメーションを取り、C2はAB環の後ろ側から約4 Åの距離で対面の会合をすることを明らかにした。

紫ヤムイモ色素については、成分の正しい構造がこれまで全く出されていなかったもので、まず、色素の単離構造決定を行った。完全トリフルオロアセチル化法によ

る糖の結合位置の決定、HMB Cによる有機酸のシグナルの区別、などの手法により3種の新規色素、アラタニンA、B、Cの構造を明らかにした。中性希薄水溶液中での安定性を調べた結果、アラタニンCが、モノアシル化アントシアニンでありながら、多アシル化アントシアニンと同程度にも安定であることを見いだした。アラタニンCの特異な安定化機構を調べたところ、酸性溶液中でシナビル酸と母核が分子内会合していることがNMR測定によりわかった。さらに、中性希薄溶液中、母核が右旋的に自己会合する証拠が得られた。これらから、アラタニンCが、入れ子型会合とでもいうべき、母核同士の自己会合と芳香族酸の分子内会合とが組み合わさった高次構造を取っているのではないかという結論に達した。

本章で取り上げた色素は、残念なことにいずれも中性水溶液中での溶解度がきわめて低く、 $^1\text{H}$  NMRを用いた詳細なコンフォーメーション解析は酸性メタノール溶液中でしか行うことができなかった。そのため、ゲンチオデルフィンでは2個あるコーヒー酸のうち、片方しか分子内会合していないことが明らかになり、サンドイッチ型会合の証明はできなかった。しかし、アラタニンでも示したように、メタノールよりも極性の高い酸性水溶液中では会合がより強固になることから、中性では芳香酸が上下から会合したサンドイッチ型になるのであろうと推定している。今後は、水以外の溶解性の高い中性溶媒での会合構造解析の検討、中性で水溶性の高いアントシアニンの探索とそれを用いた詳細な会合構造の解明、ジェヌインの色素の結晶化によるX線結晶構造解析、などの方向で研究を進めることが課題と考えている。

## 結語

本論文で著者は、花色素アントシアニンの精密構造認識に基づく分子会合の研究を行った。まず、ツユクサ青色花卉色素コンメリニンの構造研究を行ない、天然のコンメリニンと全く同じ分子配列を持つC d-コンメリニンのX線結晶構造解析に成功した。植物体に存在する状態の、中性域におけるアントシアニン（アンヒドロ塩基やアンヒドロ塩基アニオン）の原子レベルでの構造解明は初めてであり、これにより、花の青色は、アントシアニンが金属イオンに配位し、4' ケト-アンヒドロ塩基アニオン型の分子種に固定されることにより発現することを明らかにした。同時に、一般的に希薄溶液中では不安定なこの化学種が、アントシアニン同士、あるいは、アントシアニンとフラボンとの芳香間同士の疎水結合に基づく強固な会合とによって安定化されることを明かにし、さらに、分子の表面を覆う親水性基と溶媒の水分子との親水性相互作用により会合が強められ、安定に色を保つことが分かった。次に著者は、中性希薄水溶液中で安定なアシル化アントシアニンである、リンドウ青色花卉色素、ゲンチオデルフィンと紫ヤム色素、アラタニンの会合構造の解明を行い、酸性溶液中ではあるものの、<sup>1</sup>H NMRおよびそれに基づくコンピュータ支援のコンフォメーション解析により、分子内の芳香族酸がアントシアニン母核と、芳香間同士の疎水結合により会合していることを明かにした。

コンメリニンの構造解明は、1919年に柴田らが提出し、その後否定されていた金属錯体説を実証しただけでなく、後藤らが提唱してきた、アントシアニンの安定化に普遍的に関わる原理である、「疎水相互作用に基づく会合」を有機化学的に精密な構造レベルで初めて明かにしたものである。アシル化アントシアニンの分子内会合構造の解明についても同様で、X線結晶構造解析ほどの精度ではないものの

会合した有機構造を3次元的に表し、残基同士の距離を数値化することができた。その結果、アントシアニンにおける分子会合が、分子の構造に厳密に規定される事が明かになった。コンメリニンにおいては、構造的に適合しないものは共存させても排除され、超分子の形成に加わらない事が分かった。アントシアニンやフラボンのキラルな会合では、ねじれ方向性が決まっており、また、アシル化アントシアニンの分子内会合では、母核に結合した糖のコンフォメーションにより大きく影響を受けることも、明らかにできた。

これらの会合は全て非共有結合によるものであり、可逆的である。このような弱い結合によって集合した分子、「超分子」の形成、および分解は、花色素ばかりでなく生命体における様々な生理機能の発現に深く関わる。酵素の基質認識、レセプターにおける薬物の認識、免疫応答反応、遺伝情報の伝達など、生体はこの非常に弱い分子間、あるいは分子内の残基間の相互作用を厳密に立体制御し、区別し得るがために生命を維持できる。この一つの典型的な例が花色素アントシアニンの分子会合である。他方、アントシアニンの分子会合は超分子における特異的な例でもある。なぜなら、他の大多数の超分子は高分子と低分子との相互作用であるのに対し、アントシアニンでは低分子だけによる集合型の会合であるから。

いずれにせよ、「いのち」の謎の解明を目指し、あるいは自然に向かった時の素朴な「なぜ」に対する答えを見つけるために、超分子の化学が鍵であることは間違いない。本研究により、植物においてアントシアニンが多様な花色とその色の安定性という生理機能を獲得する機構の一部が、精密に解明できた。この知見が、動的天然物化学の目指すブラックボックスを開くきっかけになることを期待してやまない。

## 実験の部

### 一般操作

電子スペクトルは日立製作所製 UV-228 型分光光度計または、日本分光工業製 Ubest-50 型分光光度計（積分球装置 JASCO TIS-417 型付き）を用いて測定した。 $10^{-3}$  M の濃度の試料は光路長 0.1 mm のセルを、 $10^{-4}$  M の濃度の試料は光路長 1.0 mm のセルを、 $10^{-5}$  M の濃度の試料は光路長 10 mm のセルを、 $10^{-6}$  M の濃度の試料は光路長 100 mm のセルにいて測定した。ただし、コンメリニンについては、 $10^{-4}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M の濃度の試料についてそれぞれ、0.1 mm、1.0 mm、10 mm のセルを用いた。必要に応じて、恒温セルホルダーを使用した。0.1 mm、1.0 mm の光路長のセルは、モノメトキシトリチルアルコール 2.5 mg を過塩素酸－エタノール 3:2 溶液 10 mL に溶解した液を用いて 10 mm のセルを基準として補正した。

CD は、日本分光工業製 J-500E 型円二色計を用いて測定した。試料濃度と光路長は電子スペクトルの測定と同様にした。必要に応じて、恒温セルを用いた。

核磁気共鳴スペクトルの測定は日本電子製 GX-500 型装置でおこなった ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)。化学シフトは ppm であらわし、内部標準には  $\text{CD}_2\text{HOD}$  または TMS を用いた。サンプルはポアサイズ 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過して 5 mm  $\phi$  のチューブに入れ、重水または、重メタノールを溶媒としたときは、試料を重水置換した。差 NOE 測定、1 次元 H O H A H A 測定、2 次元 NMR 測定の場合は、温度可変装置で一定温度に調節した。各測定のパルスシーケンスは、日本電子の供給したものを使用し、測定条件はそれぞれの項に記載した。NOE 差スペクトルの測定は、測定溶媒に限らず照射時間 5 sec で行ない、1 次元 H O H A H A はスピンロッキング時間を 100 ms とした。1 次元 H O H A H A の測定における

90° パルスと選択的 90° パルス、2 次元測定の際の 90° パルスは、サンプル毎にその都度測定した。

FABMS の測定は日本電子製 DX-304/DA5000 型装置または、HX-110/DA5000 型装置で行ない、1N 塩酸－グリセロールをマトリクスとして用いた。

pH は、堀場製 ガラス電極 pH メーター 4D 型で測定した。

緩衝液は、pH 4-6 は、酢酸緩衝液を、pH 5.5-7.5 はりん酸緩衝液を用いた。0.05 M または、0.1 M に調製した、酢酸水溶液、酢酸ナトリウム水溶液、りん酸 2 水素カリウム水溶液、りん酸水素 2 ナトリウム水溶液をそれぞれ適当量混合し、pH メーターで測定しながら微調整した。

分析高速液体クロマトグラフィーは、日本分光製 TRIROTAR III 型ポンプまたは、日本分光製 880-PU 型ポンプを用い、検出器は UVIDEC 100-III 型、870-UV 型を、3 次元検出器は MULTI-330S 型 または MULTI-340 型を用いた。定量分析には島津製インテグレーター CR3-A 型を用いた。カラムは、野村化学製 Develosil ODS-5 (4.6 mm  $\phi$  x 250 mm) または、旭化成製 Asahipak ODP-50 (4.6 mm  $\phi$  x 150 mm, 4.6 mm  $\phi$  x 250 mm) を用い、前者では、3% りん酸または TFA 含有 A 水溶液 (A 溶液; 酢酸：アセトニトリル：水 = 20: 25: 55) を溶媒にした単一溶媒分析、後者は 0.5% TFA 含有アセトニトリル水溶液を用いた単一溶媒分析または、グラジエント分析をおこなった。溶媒は、酸以外は全て単蒸留して用い、混合後ポアサイズ 0.5-1.0  $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過して使用した。試料はポアサイズ 0.5-1.0  $\mu$ m のメンブレンフィルターで濾過してから注入した。分析は全て 40° C で行ない送液量は 1 mL/min とした。

分取（高速）液体クロマトグラフィーは、野村化学製 Develosil ODS lop を充填したガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm)、金属カラム (20 mm  $\phi$  x 250 mm) または、



Develosil ODS-5 を充填した金属カラム (20 mm  $\phi$  x 250 mm)、Asahipak ODP-90 を充填した金属カラム (21.5 mm  $\phi$  x 300 mm) を用い、分析条件と同様の溶媒系を用いて流速 5-15 mL/min で行なった。ただし、酸は主としてりん酸を用いた。

コンメリニン以外のアントシアニンの分取は以下の方法で行なった。凍結した試料をそのままあるいはミキサーで微粉碎し数%の TFA を含む メタノール または、アセトニトリル 水溶液に浸漬し、室温で数回抽出した。得られた抽出液を TFA 水溶液で洗浄した Amberlite XAD-7 カラム (70 mm  $\phi$  x 500 mm) に吸着させた。カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的に アセトニトリル または、メタノールの割合を上昇させ色素を溶出した。これを減圧下濃縮し、得られた粗色素を分取（高速）液体クロマトグラフィーを用い精製した。色素画分を減圧下濃縮乾固し、アントシアニンを TFA 塩として得た。カウンターアニオンが不揮発性のりん酸の場合は、色素画分を水で 3 ないし 5 倍に希釈し、Develosil ODS-5 金属カラム (20 mm  $\phi$  x 50 mm) に吸着させ、TFA 水溶液でカラムを洗浄後、0.5% TFA 含有 A 溶液または、0.5% TFA 含有 50% アセトニトリル水溶液で溶出するという方法で揮発性のイオンに交換後同様に濃縮した。

## 第1章の実験

### 1. 2の実験

#### 花卉からのアントシアニンの抽出

分析に用いた花卉は、名古屋大学農学部附属農場で栽培したもの、または市場から購入したものをを用いた。生花卉を液体窒素に浸漬して凍結後乳鉢であるいは、スパーテルで粉碎し、3% TFA 含有 50% アセトニトリル水溶液を加え室温で30分ないし1時間抽出した。これをポアサイズ 0.5-1.0  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターで濾過してHPLC分析の試料とした。

#### 3次元検出高速液体クロマトグラフィー

ポンプとして880-PUを2台使い、ミキサー 880-30、カラムオープン 860-CO、カラム Asahipak ODP-50 (4.6 mm  $\phi$  x 150 mm, 4.6 mm  $\phi$  x 250 mm) を用いて、0.5% TFA 含有 10% アセトニトリル水溶液から0.5% TFA 含有 30% アセトニトリル水溶液への30分間のリニアグラジエントの後10分間0.5% TFA 含有 30% アセトニトリル水溶液を流した。試料の注入量は5-10  $\mu\text{L}$  とした。

検出器はMULTI-340を用い、240-700 nmの波長範囲をWavelength accumulation 4 nm、Time accumulation 0.4 または 0.8 sec でデータ取り込みを行なった。

#### HBA (1)、シネラリン (2)、プラチコニン (4)

分析した色素のうち、HBA (1)、シネラリン (2)、プラチコニン (4) は、後藤 (昭子)<sup>111</sup>、河合<sup>112</sup>の精製したものをを用い、一部の純度の悪いものについては、一般操作に記した方法で再度精製した。

マロニルアオブニン (5, M)、アオブニン (Aw, 13)

粗コンメリニン 2.02 g に1% TFA 水溶液を 100 mL 加え、室温で 15 分間超音波処理して溶解した後 3000 rpm で 15 分間遠心し赤紫色の上清を得た。残渣にさらに 100 mL の1% TFA 水溶液を加え、同様に遠心処理し上清を合わせて Develosil ODS lop 分取ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。1% TFA 水溶液を流した後、0.01% TFA 含有 A 水溶液の濃度を 25% から 50% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。アオブニンは 40% A 水溶液の画分に溶出し、マロニルアオブニンは 50% A 水溶液の画分に溶出した。それぞれの画分を減圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてアオブニン TFA 塩を 50 mg マロニルアオブニン TFA 塩を 545 mg 得た。

さらに、大量の分取の際は、粗コンメリニンの赤紫色上清を Amberlite XAD-7 カラム (70 mm  $\phi$  x 500 mm) に吸着させ一般操作に記した常法に従い単離後 Develosil ODS lop 分取ガラスカラムで同様に精製した。

デルフィン (7)

マロニルアオブニン TFA 塩 240 mg に 1% 塩酸含有メタノール 25 mL を加え、40°C で 20 時間反応させた。反応液を減圧下 1/4 量まで濃縮し、3% リン酸水溶液を 100 mL を加え希釈してから、分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸含有 A 水溶液の濃度を段階的に上げて溶出し、13% A 水溶液の画分からデルフィンを 35% A 水溶液の画分からアオブニンをそれぞれ濃赤色の TFA 塩として 48 mg、91 mg 得た。

Electronic Spectral Data of **5**, **7** and **2** in 0.01% HCl-MeOH at 20°C ( $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ )).

<b>5</b>	<b>7</b>	<b>13</b>
541 (34100)	539 (24600)	542 (30300)
308 (19400)	302 (8200)	309 (21500)
280 (18000)	278 (11700)	281 (21700)

FABMS **5**: 859 ( $M^+$ )    **7**: 627 ( $M^+$ )    **13**: 773 ( $M^+$ )

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **5**, **7** and **13** (10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at 25°C, 500MHz)

5				7			13		
4	8.87	s		9.10	s		8.90	s	
6	7.00	d	2.0	7.08	d	2.0	7.01	d	2.0
8	6.93	d	2.0	7.06	d	2.0	7.90	d	2.0
2', 6'	7.77	s		7.83	s		7.76	s	
▲1	5.19	d	7.5	5.31	d	7.5	5.45	d	7.5
2	3.78	dd	9.0, 7.5	3.74	dd	9.0, 7.5	3.81	dd	9.0, 7.5
3	3.57	t	9.0	3.56	t	9.0	3.64	t	9.0
4	3.45	t	9.0	3.46*	t	9.0	3.54	t	9.0
5	3.80	ddd	9.0, 6.0, 2.0	3.95*	dd	9.0, 7.0, 2.0	3.93	ddd	9.0, 6.5, 3.0
6a	4.54	dd	12.0, 2.0	3.98*	ddd	9.0, 7.0, 2.0	4.51	dd	12.0, 3.0
6b	4.22	dd	12.0, 6.0	3.73*	dd	12.0, 7.0	4.48	dd	12.0, 6.5
●1	5.45	d	7.5	5.15	d	7.5	5.16	d	7.5
2	3.79	t	9.0, 7.5	3.68	t	9.0, 7.5	3.86	t	9.0, 7.5
3	3.62	t	9.0	3.56	t	9.0	3.58	t	9.0
4	3.49	t	9.0	3.44	t	9.0	3.45	t	9.0
5	3.96	ddd	9.0, 8.0, 3.0	3.63	ddd	9.0, 6.0, 2.0	3.61	ddd	9.0, 6.0, 2.0
6a	4.52	dd	12.5, 3.0	3.96	dd	12.0, 2.0	3.99	dd	12.0, 2.0
6b	4.41	dd	12.5, 8.0	3.76	dd	12.0, 6.0	3.83	dd	12.0, 6.0
α	6.26	d	16.0				6.24	d	16.0
C β	7.38	d	16.0				7.39	d	16.0
2, 6	7.23	d	8.5				7.39	d	8.5
3, 5	6.72	d	8.5				6.77	d	8.5
NOE	5 (25°C)			7 (30°C)			13 (-10°C)		
▲ 1	↷	H-4		8%			-17%		
● 1	↷	H-6					-17%		
H-4	↷	▲ -1					-17%		

#### マロニルシソニン (6)、シアニン (8)

赤シソ葉 (*Perilla ocimoides*) の凍結粉碎物 2.1 Kg に 3% TFA 水溶液を 2.1 L 加え室温で数時間抽出した。これを 3 回繰り返して得られた抽出液を Amberlite XAD-7 カラム (70 mm  $\phi$  x 500 mm) に吸着させた。カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的にアセトニトリルの割合を上昇させ色素を溶出した。色素は主として 30% アセトニトリル画分に溶出した。これを減圧下濃縮しを分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸水溶液を 200 mL 流した後、3% リン酸含有 A 水溶液の濃度を 10% から 50% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。マロニルシソニンは 40% A 水溶液の画分に溶出した。この画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてマロニルシソニン TFA 塩を 270 mg 得た。

同時に、シアニン TFA 塩を 7.5 mg 得た。

Electronic Spectral Data of **6** and **8** in 0.01% HCl-MeOH at 25°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ))

<b>6</b>	<b>8</b>
529 (27300)	527 (26800)
314 (15500)	279 (11700)
295 (17500)	

FABMS: **6** 843 ( $M^+$ )      **8**: 611 ( $M^+$ )Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **6** and **8** (10% TFA- $d_3$ OD at 25°C, 500MHz)

<b>6</b>				<b>8</b>			
4	8.96	s		9.16	s		
6	7.01	d	1.5	7.09	d	2.0	
8	6.97	br.s		7.08	br.s		
2'	8.03	d	2.0	8.09	d	2.0	
5'	7.03	d	8.5	7.05	d	8.5	
6'	8.26	dd	8.5, 2.0	8.23	dd	8.5, 2.0	
▲ 1	5.44	d	7.5	5.29	d	7.5	
2	3.77	dd	9.0, 7.5	3.70	dd	9.0, 7.5	
3	3.62	t	9.0	3.54	t	9.0	
4	3.50	t	9.0	3.41	t	9.0	
5	3.95	ddd	9.0, 8.0, 3.0	3.63	ddd	9.0, 7.0, 2.5	
6a	4.53	dd	12.0, 3.0	3.98	dd	12.0, 2.5	
6b	4.45	dd	12.0, 8.0	3.72	dd	12.0, 7.0	
● 1	5.20	d	7.5	5.15	d	7.5	
2	3.79	dd	9.0, 7.5	3.68	dd	9.0, 7.5	
3	3.58	t	9.0	3.56	t	9.0	
4	3.47	t	9.0	3.46	t	9.0	
5	3.81	ddd	9.0, 6.5, 2.5	3.57	ddd	9.0, 5.5, 2.0	
6a	4.55	dd	12.0, 2.5	3.96	dd	12.0, 2.0	
6b	4.24	dd	12.0, 6.5	3.75	dd	12.0, 5.5	
α	6.25	d	16.0				
C β	7.38	d	16.0				
2, 6	7.24	d	2.0				
3, 5	6.73	d	8.0				
NOE				6 (0°C)			
▲ 1	↷	H-4		-16.3%		-14.2%	
● 1	↷	H-6		-13.0%		-13.1%	

#### スクシニルシアニン (9)

1986年から1988年にかけて名古屋大学付属農場で栽培したヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) 青色花卉の凍結粉碎物 9.9 Kg に 3.8L の水を加え、チーズプレス器で搾汁を絞り 8.6 L の青色ジュースを得た。ジュースを濾過後 30 L のエタノールを加え -20° C で一晩放置し、粗色素を沈殿させた。濾別または連続遠心操作により上清を除去後、減圧下塩化カルシウム上で乾燥し青色固形物として 87.8 g の粗プロトシアニンを得た。粗プロトシアニン 50 g に 1% TFA 水溶液を 1 L 加え、室温で 30 分間超音波処理して溶解した後、2500 rpm で 15 分間遠心し赤紫色の上清を得た。残渣にはさらに 400 mL の 1% TFA 水溶液を加え、同様に遠心処理し上清を合わせて Amberlite XAD-7 カラム (70 mm  $\phi$  x 500 mm) に吸着させた。カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的に アセトニトリルの割合を上昇させ色素を溶出した。スクシニルシアニンは主として 50% アセトニトリル画分に溶出した。これを減圧下濃縮しその 1 / 5 量を分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。1.5% リン酸水溶液を 200 mL 流した後、1.5% リン酸含有 A 水溶液の濃度を 10% から 50% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。スクシニルシアニンは 30% A 水溶液の画分に溶出した。この画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてスクシニルシアニン TFA 塩を 50 mg 得た。

同時に 40% A 水溶液の画分からマロニルフラボンを淡赤色の固体として 45 mg 得た。

#### マロニルシアニン (1.0)

1987年から1988年にかけて名古屋大学付属農場で栽培したヤグルマギク (*Centaurea cyanus*) 紫色花卉の凍結粉碎物 100 g に1% TFA 水溶液を 300 mL 加え室温で一晩抽出した。搾汁を得た後の残渣に1% TFA 水溶液を 200 mL 加え抽出する操作を計3回繰り返し、合計 900 mL の抽出液を得た。Amberlite XAD-7 カラム (40 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させ、カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的にアセトニトリルの割合を上昇させ色素を溶出した。マロニルシアニンは主として20% アセトニトリル画分に溶出した。これを減圧下濃縮しその 1/4 量を分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸水溶液を 200 mL 流した後、3% リン酸含有 A 水溶液の濃度を10% から40% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。シアニンは15% A 水溶液の画分に、マロニルシアニンは20% A 水溶液の画分に、スクシニルシアニンは23% A 水溶液の画分に溶出した。それぞれの画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてシアニン TFA 塩を 65 mg、マロニルシアニン TFA 塩を 220 mg、スクシニルシアニン TFA 塩を 220 mg 得た。

同時に40% A 水溶液の画分からマロニルフラボンを淡赤色の固体として 87 mg 得た。



Electronic Spectral Data of **9** and **10** in 0.01% HCl at 20°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

<b>9</b>	<b>10</b>
528 (27000)	527 (33000)
387 (3160)	387 (3440)
279 (12400)	279 (13300)

FABMS **9**: 711 ( $M^+$ )

**10**: 697 ( $M^+$ )

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **9** and **10**.

<b>9</b> (10% TFAd-DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> at 30°C, 400MHz)				<b>10</b> (10% TFAd-CD <sub>3</sub> OD at 30°C, 500MHz)		
4	7.09	s		8.95	s	
6	7.00	s		7.04	d	1.5
8	7.08	s		7.08	d	1.5
2'	8.14	br. s		8.06	d	2.0
5'	7.11	d	9.0	7.50	d	8.0
6'	8.19	br. d	9.0	8.29	dd	8.0, 2.0
▲ 1	5.16	d	7.5	5.45	d	7.5
2	3.67	br. t	9.0	3.74	dd	9.0, 7.5
3	3.57	t	9.0	3.60	t	9.0
4	3.43	t	9.0	3.47	t	9.0
5	3.58	m		3.90	ddd	9.0, 7.5, 2.0
6a	3.90	br. d	12.0	4.48	dd	12.0, 2.0
6b	3.70	dd	12.0, 4.0	4.36	dd	12.0, 7.5
● 1	5.65	d	8.0	5.21	d	7.5
2	3.76	br. t	9.0	3.72	dd	9.0, 7.5
3	3.64	t	9.0	3.58	t	9.0
4	3.40	t	9.0	3.49	t	9.0
5	4.03	m		3.61	ddd	9.0, 6.0, 2.0
6a	4.47	br. d	12.0	3.98	dd	12.0, 2.0
6b	4.21	dd	12.0, 9.0	3.78	dd	12.0, 6.0
CH <sub>2</sub> H <sub>2</sub>	2.50	m				
NOE						
▲ 1	↗	H-4	-20%	4%		
● 1	↗	H-6	-11%			
(200 MHz)						

## 第2章の実験

### 2. 2の実験

#### 各スペクトルの測定

濃度依存的なフラボンの電子スペクトル、CD、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルの測定は、各々の化合物の、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 溶液を作成し、段階的に10倍に希釈して $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ として試料とした。測定は温度制御して行なった。

#### フラボコンメリン (14)

3.5 Kg のツユクサ青色花卉の搾汁にエタノールを加え粗コンメリニンを沈殿させた上清を減圧下濃縮乾固してフラボコンメリンの多く含まれる青茶色の油状物を得た。これを水で希釈し濾過後、Amberlite XAD-7 カラムに吸着させた。水を4L流した後、20% MeOH水溶液を6L、30% メタノール 水溶液を4L、50% 水溶液を6L流した。フラボコンメリンは50% メタノール水溶液画分に溶出したので、この画分を減圧下濃縮後水溶液にし、熱時 アセトニトリルを加えることにより結晶化し、黄色の非常に細かい針状晶として5.69 gを得た。

#### フラボコンメリン-5-OH-アセチル化物 (20)

フラボコンメリン 250 mg (0.411 mmol) に10 mL のピリジンと2mL の無水酢酸を加え室温で6時間反応させた。反応液を減圧下濃縮してから塩化メチレンに溶解し飽和重曹水で洗浄し、フラボコンメリン完全アセチル化物 (19) フラボコンメリン-5-OH-アセチル化物 (20) の約1:7の混合物を399 mg 得た。このもの全量を20 mL のテトラヒドロフランに溶解し、2mL の濃アンモニア水を加え50°Cで3時間反応させた。

反応液を濃縮後常法により後処理し240 mg のフラボコンメリン- 5 - OH -アセチル化物を得た。(収率 62%)

#### 5-O-メチルフラボコンメリン アセチル化物 (21)

フラボコンメリン 5-OH-アセチル化物 (20) 240 mg (0.25 mmol) にクロロホルム 20 mL を加え、酸化銀 240 mg、ヨウ化メチル 0.24 mLを加え封管して 90°C で 1 時間加熱した。その後さらに 酸化銀 2 g、ヨウ化メチル 1 mL、トルエン 20 mLを追加して 90°C で 1 時間反応させた。酸化銀を濾別後減圧下濃縮乾固して 5-O-メチルフラボコンメリン アセチル化物を 205 mg 得た。(収率 84%)

#### 5-O-メチルフラボコンメリン (17)

5-O-メチルフラボコンメリン アセチル化物 (21) 200 mg (0.209 mmol) に無水メタノールを 20 mL とナトリウムメトキシド 18 mg を加え、室温で 1 時間反応させた。反応液を Dawex-80 で中和後樹脂を濾別し減圧下濃縮乾固した。残渣を水-メタノール-アセトニトリル から結晶化し 5-O-メチルフラボコンメリンを 121 mg 得た。(収率 93%)

#### 7-O-メチル-iso- ビテキシン (18)

フラボコンメリン 25 mg (0.042 mmol) に 5% 塩酸-メタノールを 25 mL 加え、60°C で 40 時間反応させたが、原料の溶解性が悪く反応が遅かったため、(HPLC 分析から原料と目的物が約 1 : 1) さらに、塩酸を 5 mL 加え 12 時間反応を続けた。原料が消失したので減圧下濃縮し、水-エタノールから結晶化させ、7-O-メチル-iso- ビテキシンを 7 mg 得た。(収率 38%)

Electronic spectral data of **14**, **17** and **18** at 25°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
DMSO	329 (22400) 297 (13,700)	315 (14,500) 265 (10000)	
H <sub>2</sub> O	327 (22000) 271 (25400)	321 (25800) 261 (20800)	335 (20700) 270 (20000)

CD of **14**, **17** and **18** at 25°C (nm ( $\theta$ )) (sample conc.;  $5 \times 10^{-3}$ M).

	<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
H <sub>2</sub> O	363 (-850) 321 (+7300)	340 (+2800) 290 (-4600) 254 (+600)	360 (-2800) 315 (+3600)

FABMS **14**: 608 ( $M^+$ ) **17**: 622 ( $M^+$ )

Assignment of the <sup>1</sup>H NMR Spectra of **14**, **17** and **18** (pyridine-d<sub>5</sub>, 500MHz)

<b>14</b> (80°C)				<b>17</b> (100°C)				<b>18</b> (80°C)			
3	6.75	s		6.71	s			6.76	s		
8	6.62	s		6.87	s			6.62	s		
2', 6'	7.81	d	9.0	7.80	d	8.5		7.85	d	8.5	
3', 5'	7.37	d	9.0	7.36	d	8.5		7.18	d	8.5	
▲ 1	5.53	br. d	9.0	5.46	d	9.5		5.54	dr. d	10.0	
2	5.08	br. s		4.93	br. s			5.04	br. s		
3	4.22	m		4.12	m			4.20	t	9.0	
4	4.22	m		4.12	m			4.23	t	9.0	
5	4.03	ddd	9.0, 6.0, 3.0	3.98	m			4.03	ddd	9.0, 6.0, 3.5	
6a	4.41	dd	12.0, 3.0	4.36	dd	12.0, 3.0		4.41	dd	12.0, 3.5	
6b	4.25	dd	12.0, 6.0	4.20	dd	12.0, 6.0		4.25	dd	12.0, 6.0	
● 1	5.59	d	7.5	5.35	d	7.5					
2	4.21	t	9.0, 7.5	4.15	m						
3	4.21	t	9.0	4.15	m						
4	4.16	t	9.0	4.10	m						
5	4.05	ddd	9.5, 6.0, 3.0	4.00	ddd	9.0, 6.0, 3.0					
6a	4.46	dd	12.0, 3.0	4.41	dd	12.0, 3.0					
6b	4.26	dd	12.0, 6.0	4.23	dd	12.0, 6.0					
5-CH <sub>3</sub>				4.20	s						
7-CH <sub>3</sub>	3.75	s		3.76	s						
NOE											
				<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>		<b>14</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	
				60°C	80°C	60°C		60°C	80°C	60°C	
H-3	↷	H-2', 6'	7.8%	15%	14%						
H-8	↷	H-7OCH <sub>3</sub>	10%	12%	21%						
7-OCH <sub>3</sub>	↷	H-8	16%	18%	21%						
H-2', 6"	↷	H-3	7%								

FABMS 19: 986 (M+), 20: 944 (M+)

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of 19, 20 and 21 (pyridine-*d*5, 500MHz)

20 (75°C)				21 (CDCl <sub>3</sub> , 40°C)		
3	6.79	br. s		6.58	s	
8	6.65	s		6.76	s	
2', 6'	7.90	d	9.0	7.81	d	9.0
3', 5'	7.32	d	9.0	7.10	d	9.0
▲ 1	5.76	br. d	9.0	5.11	d	10.0
2	6.42	br. s		6.00	br. t	9.5
3	5.78	t	9.5	5.33	t	9.0
4	5.57	br. t	9.5	5.18	t	9.0
5	4.14	dt	9.5, 4.0	3.84	t	9.0
6a	4.44	m		4.21	dd	12.5, 6.0
6b	4.44	m		4.15	dd	12.0, 2.5
● 1	5.76	d	7.5	5.19	d	7.5
2	5.66	dd	9.5, 7.5	5.29	t	9.0
3	5.76	t	9.5	5.31	t	9.0
4	4.16	t	9.5	5.19	t	9.0
5	4.33	ddd	9.5, 5.5, 3.0	3.92	ddd	9.0, 6.0, 2.5
6a	4.51	dd	12.0, 5.5	4.29	dd	12.5, 6.0
6b	4.43	dd	12.0, 3.0	4.20	dd	12.0, 2.5
5-CH <sub>3</sub>				4.00	s	
7-CH <sub>3</sub>	3.88	s		3.91	s	
COCH <sub>3</sub>	1.82, 1.93, 2.00, 2.02			1.76, 2.02, 2.04, 2.04,		
(s)	2.02, 2.03, 2.05, 2.06			2.05, 2.06, 2.07, 2.08		

## 2. 3の実験

### 一般操作

コンメリニンの再構成、結晶化、各種の分析試験には、すべて2回蒸留水（ヤマト製オートスチルWAU-12型で製造）を使用した。

### 安定性試験

コンメリニン、コンメリニン様錯体の安定性試験は pH 5.7 の 0.05 M 酢酸緩衝液に色素を  $5 \times 10^{-5}$  M の濃度に溶解し光路長 1 mm のセルで測定した電子スペクトルの可視の吸収極大波長における吸光度の変化で調べた。

### ICP 発光分析

ICP 発光分析は、セイコー電子工業製 SPS-100A 型装置でおこなった。金属の含量が 100 ppb ないし 10 ppm の範囲になるように試料を水に溶解し、試料とした。

### 分析超遠心

分析超遠心は、日立分析超遠心装置 282 型で行なった。約 5-10 mg のコンメリニンを 0.5 mL の 0.1 N 塩化ナトリウム水溶液に溶解し、5°C で 2 日間透析した。これを透析外液で約 10 倍に希釈し、440 nm の吸光度が 1mm の光路長のセルで 0.04 程度になるようにした。この試料を、3 試料マルチチャンネルセルに入れ、対照は透析外液とした。

10°C で 25,000 rpm の回転数で約 10 時間遠心し、平衡状態のデータを得てこれを解析した。

## 比溶測定

コンメリニンの比溶測定は、振動密度計 DMA 02C 型装置で行なった。試料を 0.3-0.7% の濃度になるよう 0.1N NaCl に溶解し、5° C で 2 日間透析後、10° C で密度を測定した。溶液の濃度は吸光分析により求めた。

## 熱分析

コンメリニンの熱分析は、第 2 精工社製熱天秤 TG/SSC 型で行なった。試料 2-4 mg を精密に秤量し、熱天秤に乗せ、25° C -500° C まで 20 分間かけて昇温させ重量の減少を測定した。

## 電気泳動

コンメリニンの電気泳動は、東洋濾紙製電気泳動器 C 型で行なった。セルローズアセテートシート (70 mm x 250 mm, Sartorius, Schulecher & Schell, Nagel 製) を 0.05 M の酢酸緩衝液 (pH 5.0) で均一に湿らせ、コンメリニンの水溶液 ( $1 \times 10^{-2}$  M 程度) をスポットした。0.5 mA/sheet の定電流で 2 時間泳動した (電圧は約 300-350 V)。

## 核磁気共鳴スペクトル

コンメリニン、コンメリニン様錯体の核磁気共鳴スペクトルは、20-40 mg の試料を 0.5-0.6 mL の重水に溶解し、1 度減圧下で濃縮乾固したものをアルゴン気流下で 5 mm  $\phi$  の試料管にサンプリングした。

測定は、温度制御して行ない、1 次元、2 次元の測定は、日本電子の供給したパルスシーケンスで行なった。NOE 差スペクトルにおける照射時間は 5 sec、1 次元

HOH AHA、2次元HOH AHAのスピンロック時間は 100 ms、NOE SYの展開時間は150 ms とした。

### X線結晶構造解析

X線結晶構造解析は高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の中川博士と共同で行なった。C d-コンメリニンの結晶の比重は浮遊法により測定し、 $1.43 \text{ g/cm}^3$ であった。X線回折データの収集は、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設のステーションBL-6 A<sub>2</sub>において、巨大分子用ワイセンベルグカメラ、イメージングプレートシステムを用いて行なった<sup>71</sup>。金のL<sub>III</sub>吸収端である $1.04 \text{ \AA}$ の波長を選び測定した。C d-コンメリニンのデータは、3個の結晶を用いて4セットの測定を行ない、27フレームのデータを得た。これらは、プログラムシステムWEIS<sup>113</sup>を用いて指数付けを行ない積分強度とした後、スケーリング・マーシングを行なって1つのデータセットとした。最終的に分解能 $0.75 \text{ \AA}$ の19389個の回折強度データを得、この時のR-mergeは6.66%であった。直接法のSHELEX-86<sup>72</sup>を用いて、得られた解を基にして、3次元グラフィクス上（グラフィクス：PS-340、コンピュータ：Vax Station 3100、モデルビルディングプログラム：FRODO）でアントシアニン、フラボンの母核炭素を選び出し、逐次フーリエ法を数サイクル繰り返すことにより水素以外の全ての原子の帰属を行なった。原子パラメータの精密化はXTALプログラム<sup>73</sup>で行ない、 $0.75 \text{ \AA}$ 分解能の10164反射を構造因子の計算に含めR因子13.2%の解が得られた。



## 天然コンメリニン (15-n) の単離精製

1986年および1988年に草津市農協から購入し現地で凍結して保存したオオボウシバナ (*Commelina communis*) の青色花卉の凍結物 8 Kg よりチーズプレス器で搾汁を絞り 7 L の青色ジュースを得た。ジュースを濾過後、これに 42 L のエタノールを加え -20°C で一晩放置し、粗色素を沈殿させた。濾別または連続遠心操作により上清をを除去後減圧下塩化カルシウム上で乾燥し青色固形物として 37.9 g の粗コンメリニンを得た。粗コンメリニン 19 g に 2M 酢酸マグネシウム水溶液を 100 mL を加え超音波処理により溶解させた後 3000 rpm で 10 分間遠心し青色上清を得た。ここにエタノール 800 mL を加え 5°C で一晩放置した。2500 rpm で 20 分間遠心して得た青色沈殿を減圧下塩化カルシウム上で乾燥し青色固形物として 5.9 g の粗コンメリニンを得た。（電子スペクトルからコンメリニンの純度約 25%）この粗コンメリニン 2.0 g に水 20 mL とエタノール 20 mL を加え -20°C で一晩放置し、遠心処理で上清を得た。この上清を 2 L の水を用いて透析処理し透析内液を減圧下濃縮した。この全量をセルロファイン GC-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (40 mm  $\phi$  x 300 mm) に吸着させ、水で溶出した。青色画分を減圧下濃縮乾固し、純度約 95% のコンメリニンを 719 mg 得た。

## コンメリニンの結晶化

コンメリニン、コンメリニン様錯体の結晶化は、水-エタノールの混合溶媒系で行なった。10 mg 程度のコンメリニンまたは、コンメリニン様錯体を約 0.2-0.4 mL の水に溶解し、そこへ、0.5-1 mL のエタノールを溶液が濁り加減になるまで少しづつ加え、5°C に冷蔵放置して結晶化させた。コンメリニン、C d -コンメリニンともに濃青色の金属光沢をもつプリズム晶として得た。

モノデマロニルサルビアデルフィン (22)、モノデマロニルサルビアニン (23)、  
3-グルコシルデルフィニジン (25)、3-*p*-クマリルグルコシルデルフィニジン  
(26)

上記色素は、吉兼が単離したものを用了。

#### サルビアマルビン (24)

1988年11月に名城公園で採取した青色サルビア (*Salvia farinacea*) の凍結花  
弁を粉碎し2% TFA 50% アセトニトリル水溶液を 3.8 L 加え室温で一晩抽出した。  
搾汁を得た後の残渣に2% TFA 50% アセトニトリル水溶液を 2.4 L、1.3 L 加え抽出  
する操作を計3回繰り返す、得られた抽出液を減圧下1 L まで濃縮した。濃縮液中  
の不溶物を遠心除去後、Amberlite XAD-7 カラム (70 mm  $\phi$  x 500 mm) に吸着させ、  
カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的に アセトニトリル の割合を上昇させ色素を  
溶出した。色素は主として 30-50% アセトニトリル画分に溶出した。これを減圧  
下濃縮しその 1/4 量を分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に  
吸着させた。3% りん酸水溶液を 200 mL 流した後、3% りん酸 含有 A 水溶液 の濃度  
を 10% から 60% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。マロニ  
ルアオバニン は45% A 水溶液の画分に、サルビアマルビンは 60% A 水溶液の画分  
に、に溶出した。それぞれの画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減  
圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてマロニルアオバニン TFA 塩を 160 mg、サル  
ビアマルビン TFA 塩を 94 mg 得た。

Electronic Spectral Data of **24** in 0.01% HCl-MeOH at 20°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

540nm (25300), 301 nm (19600), 280 nm (21200).

FABMS **24**: 888 (MH<sup>+</sup>)

Assignment of the <sup>1</sup>H NMR Spectra of **24** (10% TFA-d-CD<sub>3</sub>OD at 25°C, 500MHz)

<b>24</b>			
4	8.98	s	
6	7.02	d	2.0
8	7.02	d	2.0
2', 6'	7.97	s	
OCH <sub>3</sub>	4.00	s	
▲ 1	5.47	d	7.5
2	3.78	dd	9.0, 7.5
3	3.62	t	9.0
4	3.49	t	9.0
5	3.95	ddd	9.0, 8.0, 3.0
6a	4.48	m	
6b	4.48	m	
● 1	5.21	d	7.5
2	3.73	dd	9.0, 7.5
3	3.58	t	9.0
4	3.47	t	9.0
5	3.81	ddd	9.0, 6.0, 2.0
6a	4.55	dd	12.0, 2.0
6b	4.24	dd	12.0, 6.0
α	6.23	d	16.0
C β	7.37	d	16.0
2, 6	7.24	d	8.5
3, 5	6.73	d	8.5

### コンメリニン (15-c) の再構成

マロニルアオブニン (5) TFA 塩 300 mg (0.309 mmol) に水を 1.5 mL 加え 0.5 N アンモニア水 1.5 mL で中和後減圧下濃縮乾固した。ここへ水を 1.0 mL とフラボコンメリン (14) 300 mg (1.5 eq.) を 1.5 mL に水に溶解してを加え、さらに、0.5 N 酢酸マグネシウム水溶液 2.0 mL と 1.0 M 酢酸カリウム水溶液 1.0 mL を加えた。溶液は瞬時に青色となった。これを室温で一晩放置後、エタノールを 40 mL 加え 5°C で数時間放置した。全量を遠心処理 (3000 rpm 10 min) して析出した残渣を集め、減圧下塩化カルシウム上で乾固して濃青色の固体を 487 mg 得た。全量を 2.5 mL の水に溶かし、セルロファイン GC-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (40 mm  $\phi$  x 170 mm) に吸着させ、水で溶出した。青色画分を減圧下濃縮乾固し、コンメリニンを濃青色固体として 371 mg 得た。(収率、マロニルアオブニン TFA 塩から 80%)

実験スケールが少量の場合は、アントシアニンとフラボン、金属の各溶液を混合して得た青色溶液をそのままあるいは、約半量に減圧下濃縮しそのままセルロファイン GC-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。

### Aw-コンメリニン (27)

アオブニン (13) TFA 塩 288 mg (0.291 mmol) とフラボコンメリン (14) 258 mg (1.5 eq.)、0.1 N 酢酸マグネシウム水溶液 1.94 mL (2 eq.) と 1.0 M 酢酸カリウム水溶液 1.0 mL から同様に再構成し、セルロファイン GC-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。青色画分を減圧下濃縮乾固し、Aw-コンメリニンを濃青色固体として 138 mg 得た。(収率、アオブニン TFA 塩から 56%)

### Ms-コンメリニン (23)

マロニルシソニン (6) TFA 塩 300 mg (0.314 mmol) とフラボコンメリン (14) 286 mg (1.5 eq.), 0.5 N 酢酸マグネシウム水溶液 0.27 mL (1.3 eq.) と 1.0 M 酢酸カリウム水溶液 0.628 mL から同様に再構成し、セルロファイン GC-15 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製した。青色画分を減圧下濃縮乾固し、Ms-コンメリニンを濃青色固体として 309 mg 得た。(収率、マロニルシソニン TFA 塩から 66%)

Electronic spectra of 15, 27 and 28 in 0.05 M acetate buffer pH 5.7.

15 $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	27 $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	28 $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )
646 (10100) 590 (21900)	645 (9600) 591 (16600)	620 (sh) 569 (12400)

CD of 15, 27 and 28 in 0.05 M acetate buffer pH 5.7.

15 nm ( $\theta$ )	27 nm ( $\theta$ )	28 nm ( $\theta$ )
675 (-530000) 588 (+660000)	670 (-430000) 580 (+450000)	640 (-320000) 560 (+390000)

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **15**, **27** and **28** ( $\text{D}_2\text{O}$  at  $40^\circ\text{C}$ , 500MHz)

15				27 (50°C)				28			
anthocyanin											
4	6.85	br. s		6.96	br. s		6.93	br. s			
6	6.09	br. s		5.97	br. s		6.18	br. s			
8	4.66	br. s		4.59	br. s		4.64	br. s			
2'	7.77	br. s		7.67	br. s		7.89	br. s			
5'	—			—			6.52	br. d	7.0		
6'	7.99	br. s		7.97	br. s		8.49	br. s			
▲ 1	5.01	br. d	7.0	4.96	br. d	7.0	4.98	br. d	7.0		
2	2.65	br. s		2.73	br. t	9.0	2.58	br. s			
3	3.57	br. t	9.0	3.48			3.49	br. t	9.0		
4	2.93	br. t	9.0	2.95	br. t	9.0	2.89	br. s			
5	3.74			3.64			3.72				
6a	4.34			4.22	br. d	12.0	4.25	br. s			
6b	3.30			3.38			3.30	br. s			
● 1	5.04	br. d	7.0	5.03	br. s		5.06	br. d	7.0		
2	3.50			3.53			3.54				
3	3.75			3.28			3.68				
4				3.50							
5				3.78			3.57				
6a	4.34			3.96			4.32	br. s			
6b	3.75			3.70			3.75				
C α	6.56	br. d	16.0	5.89	br. d	16.0	5.87	br. d	16.0		
β	7.25	br. d	16.0	7.29	br. d	16.0	7.29	br. d	16.0		
2, 6	7.14	br. d	8.0	7.21	br. d	7.0	7.15	br. d	8.0		
3, 5	6.70	br. d	8.0	6.73	br. d	7.0	6.69	br. d	8.0		
flavone											
3	4.95	br. s		4.91	br. s		4.90	br. s			
8	5.42	br. s		5.44	br. s		5.29	br. s			
2'	7.24	br. s		7.16	br. d	8.0	7.20	br. s			
3'	7.28	br. d	8.0	7.38	br. d	8.0	7.38	br. s			
5'	6.21	br. s		6.21	br. s		6.09	br. s			
6'	5.42	br. s		5.38	br. d	8.0	5.33	br. s			
Δ 1	4.80	br. d	9.0	4.76	br. d	9.0	4.78	br. d	9.0		
2	4.55			4.59			4.58	br. s			
3	3.66			3.66			3.68				
4											
5											
6a											
6b											
O 1	4.77	br. d	7.0	4.66	br. d	7.0	4.72	br. d	7.0		
2	4.10	br. s		3.89			4.12				
3	3.80			3.55			2.72				
4	3.50			3.29			3.30				
5				3.48			3.55				
6a							3.98				
6b							3.80				

## コンメリニン様錯体の再構成－1

前記の再構成法に従い、アントシアニンまたはフラボンを代えてコンメリニン様錯体を再構成した。各色素の収率、データは下記のとおり。

### Re-construction of commelinin-like complex by changing flavonoids.

anthocyanin	flavone	obtained complex	yield
<b>9</b> (100 mg)	<b>14</b> (150 mg)	36 mg	22% ( <b>30</b> )
<b>10</b> (8 mg)	<b>14</b> (8 mg)	7.1 mg	47% ( <b>31</b> )
<b>5</b> (19 mg)	<b>17</b> (20 mg)	18.3 mg	62% ( <b>32</b> )

### Electronic spectra of commelinin-like complex in 0.05 M acetate buffer pH 5.7.

<b>30</b> $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	<b>31</b> $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )	<b>32</b> $\lambda_{\max}$ ( $\epsilon$ )
620 (sh) 565 (13300)	620 (sh) 665 (14400)	644 (12600) 590 (18000)

### CD of commelinin-like complex in 0.05 M acetate buffer pH 5.7.

<b>30</b> nm ( $\theta$ )	<b>31</b> nm ( $\theta$ )	<b>32</b> nm ( $\theta$ )
640 (-180000) 553 (+300000)	640 (-225000) 553 (+360000)	688 (-320000) 597 (+390000)

## コンメリニン様錯体の再構成－2

前記の再構成法に従い、金属を代えてコンメリニン用錯体を再構成した。各色素の収率、データは下記のとおり。

Re-construction of commelinin-like complex by changing metal ions.

metal ion	M (5)	F (14)	obtained complex	yield
Zn <sup>2+</sup>	40 mg	40 mg	22 mg	36% (33)
Co <sup>2+</sup>	40 mg	40 mg	38 mg	62% (34)
Ni <sup>2+</sup>	40 mg	40 mg	36 mg	59% (35)
Mn <sup>2+</sup>	40 mg	40 mg	26.5 mg	43% (36)
Cd <sup>2+</sup>	40 mg	40 mg	34 mg	55% (16)

Electronic spectra of commelinin-like complex in 0.05 M acetate buffer pH 5.0.

33 $\lambda_{\max}$ (ε)	34 $\lambda_{\max}$ (ε)	35 $\lambda_{\max}$ (ε)	36 $\lambda_{\max}$ (ε)	16 $\lambda_{\max}$ (ε)
649 (9460) 594 (20600)	658 (9500) 602 (19700)	654 (10800) 598 (24700)	652 (9550) 595 (20400)	648 (98701) 592 (21000)

CD of commelinin-like complex in 0.05 M acetate buffer pH 5.0.

33 nm (θ)	34 nm (θ)	35 nm (θ)	36 nm (θ)	16 nm (θ)
680 (-550000) 595 (+690000)	692 (-530000) 604 (+630000)	688 (-860000) 597 (+870000)	680 (-440000) 594 (+610000)	680 (-430000) 590 (+640000)



## 2. 4 の実験

### 生花卉の電子スペクトル

生花卉の電子スペクトルは、積分球装置にガラス板に挟んだ生花卉を取付け測定した。

### ツユクサ花卉色素の分析

生花卉 10 mg あたり 0.1 mL の 1.5% TFA 含有 50% アセトニトリルを加え、室温で 2 時間抽出し、1. 2 の実験の部に記載した Asahipak ODP-50 (4.6 mm  $\phi$  x 250 mm) を用いた高速液体クロマトグラフィー（リニアグラジエント条件）で分析した。検出は 870-UV 型を用い 280 nm で行ない、インテグレータで各ピーク面積を出力した。それぞれの色素について、単離した色素を用いて検量線を作成し、絶対検量線法で定量した。

### 花卉の紫色の再現実験

$7.5 \times 10^{-3}$  M に調製したフラボコンメリン水溶液に pH 5.7 の緩衝液を加えフラボコンメリンの濃度を設定濃度とした。そこへ  $7.5 \times 10^{-2}$  M に調製したアントシアニン水溶液を加え、ただちに混合し、そのままセルに入れて電子スペクトル、CD を測定した。必要に応じて、0.5 M に調製した酢酸マグネシウム溶液をアントシアニンの 2-200 当量 添加した。

### pH を変えた再構成実験

各々の pH の緩衝液に設定濃度の 30 倍の濃度に調製したアントシアニンのメタ

ノール溶液、フラボンの水溶液と0.5 M に調製した酢酸マグネシウム水 溶液をフラボン、金属、アントシアニンの順に加え混合し、そのままセルに入れて電子スペクトル、CDを測定した。

#### マロニルシシスアオバニン (37)

マロニルシアオバニンの単離と同様に、粗コンメリニン 60 g から Amberlite XAD-7 カラム、次いで、Develosil ODS lop 分取ガラスカラム で精製した。マロニルシスアオバニンはDevelosil ODS lop 分取ガラスカラムクロマトグラフィーで 30% A 水溶液の画分に溶出した。常法に従いカウンターオアニオンを置換後、減圧下濃縮乾固して濃赤色の固体としてマロニルシシスアオバニン TFA 塩を 140 mg 得た。

Electronic Spectral Data of **37** in 0.01% HCl-MeOH at 20 °C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

542 nm (28800), 308 nm (20200), 280 nm (21100).

FABMS **37**: 859 ( $\text{MH}^+$ )

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **37** (10% TFA- $d$ - $\text{CD}_3\text{OD}$  at 25 °C, 500MHz)

<b>37</b>				<i>cis-p</i> -coumaric acid ( <b>45</b> )			
4	8.56	s					
6	6.87	br. s					
8	6.78	br. s					
2', 6'	7.73	s					
▲ 1	5.45	d	7.5				
2	3.82	dd	9.0, 7.5				
3	3.63	t	9.0				
4	3.47	t	9.0				
5	3.97	ddd	10.0, 9.0, 2.0				
6a	4.70	dd	12.0, 10.0				
6b	4.37	dd	12.0, 2.0				
● 1	5.23	d	7.5				
2	3.80	dd	9.0, 7.5				
3	3.62	t	9.0				
4	3.53	t	9.0				
5	3.88	ddd	9.0, 6.5, 3.0				
6a	4.58	dd	12.0, 3.0				
6b	4.56	dd	12.0, 6.5				
C	$\alpha$	5.75	d	13.0	5.84	d	13.0
	$\beta$	6.41	d	13.0	6.87	d	13.0
	2, 6	7.14	d	8.5	7.62	d	9.0
	3, 5	6.34	d	8.5	6.81	d	9.0
					CH <sub>3</sub> 3.73	s	
NOE <b>37</b> (-10 °C)							
▲	1 $\curvearrowright$ H-4	18.3%					
●	1 $\curvearrowright$ H-6	13.6%					

### 3 章の実験

#### 3. 2 の実験

##### 安定性試験

ゲンチオデルフィン、ビスデアシルゲンチオデルフィンの中性水溶液中の安定性は pH 6.5 の 0.05M リン酸緩衝液に色素のメタノール溶液（濃度； $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ）を加え  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  とし、光路長 10 mm のセルで測定した電子スペクトルの可視の吸収極大波長における吸光度の変化で調べた。

##### 核磁気共鳴スペクトル

ゲンチオデルフィンの核磁気共鳴スペクトルの測定は、10% TFA<sub>d</sub> 含有重メタノールを溶媒として行なった。NOE 差スペクトルにおける照射時間は 5 sec、1 次元 HOHAHA、2 次元 HOHAHA のスピンロック時間は 100 ms、NOESY の展開時間は 1200 ms、ROESY は展開時間を 250 ms、HMBC は展開時間を 60 ms とした。

##### ゲンチオデルフィン (3)

1987 年に北伊那で購入し凍結保存してあったリンドウ (*Gentiana makinoi*) の青色花卉 2400 g を液体窒素で凍結後粉碎し、2% TFA 含有 20% メタノール水溶液を 6.5 L 加え室温で一晩抽出した。抽出液を連続遠心により得た後の残渣に 2% TFA 含有 メタノール 3 L を加え抽出する操作を 2 回繰り返した。得られた抽出液を減圧下

2 L まで濃縮した。濃縮液中の不溶物を遠心除去後、Amberlite XAD-7 カラム

(70 mm  $\phi$  x 600 mm) に吸着させ、カラムを TFA 水溶液で洗浄後、段階的に メタノールの割合を 80% まで上昇させ色素を溶出した。色素は主として 60-80% メタノール画分に溶出した。これを減圧下濃縮しその一部を分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸水溶液を 800 mL 流した後、3% リン酸含有 A 水溶液の濃度を 10% から 60% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。ゲンチオデルフィン は 45% A 水溶液の画分に溶出した。この画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固し、Develosil ODS-5 金属カラム (20 mm  $\phi$  x 250 mm) を用い、3% リン酸 含有 43% A 水溶液を溶媒として再度クロマトグラフィーにより精製した。濃赤色の固体としてゲンチオデルフィン TFA 塩を 260 mg 得た。

#### ビスデアシルゲンチオデルフィン (38)

60 mg のゲンチオデルフィン TFA 塩を 2.5 mL のメタノールに溶解し、アルゴンガスをバブリングしてから、0°C に冷却した。そこへ、同様にアルゴン置換した 1N 水酸化ナトリウム溶液を 2.5 mL 加え、0°C で 1 時間反応させた。反応液はアルカリを加えるとすぐに青緑色へ変化した。反応液に 6N 塩酸を加えて反応を止め、減圧下濃縮した。濃縮液を水で 5 倍に希釈してから、分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸 水溶液を流した後、3% リン酸 含有 A 水溶液 の濃度を 10% から 60% まで段階的に上げてクロマトグラフィーをおこなった。常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固し、濃赤色の固体としてビスデアシルゲンチオデルフィン TFA 塩を 46 mg 得た。(収率 69%)

#### コーヒー酸メチル (44)

コーヒー酸 200 mg (1.11 mmol) にメタノール 20 mL と塩酸 1 mL を加え、2 時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮後、飽和重曹水で洗い塩化メチレンで抽出し、コーヒー酸メチルを 100 mg 得た。(収率 46%)

Electronic Spectral Data of **3** and **38** in 0.01% HCl-MeOH at 20°C ( $\lambda_{\text{max}}$  (ε))

<b>3</b>	<b>38</b>
540 (22,100)	529 (20,100)
331 (20,600)	276 (10,100)
300 (19,100)	
284 (18,600)	

FABMS    **3**: 1113 (M+)    **38**: 789 (M+)Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **3** and **32** (10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at 30°C, 500MHz)

<b>3</b>				<b>38</b>				<b>44</b>			
<b>4</b>	8.74	s		<b>9.17</b>	s						
<b>6</b>	6.96	d	2.0	<b>7.08</b>	d	2.0					
<b>8</b>	6.81	d	2.0	<b>7.17</b>	br.d	2.0					
<b>2'</b>	7.73	d	1.5	<b>8.09</b>	d	2.0					
<b>6'</b>	7.88	d	1.5	<b>7.97</b>	d	2.0					
<b>▲ 1</b>	5.06	d	7.5	<b>5.31</b>	d	7.5					
<b>2</b>	3.75	dd	9.0, 7.5	<b>3.74</b>	dd	9.0, 7.5					
<b>3</b>	3.61	t	9.0	<b>3.58</b>	t	9.0					
<b>4</b>	3.48	t	9.0	<b>3.45</b>	t	9.0					
<b>5</b>	3.69	ddd	9.0, 7.0, 2.0	<b>3.66</b>	ddd	9.0, 7.0, 2.0					
<b>6a</b>	4.09	dd	12.0, 2.0	<b>3.90</b>	dd	12.0, 2.0					
<b>6b</b>	3.84	dd	12.0, 7.0	<b>3.75</b>	dd	12.0, 7.0					
<b>● 1</b>	5.23	d	7.5	<b>5.20</b>	d	7.5					
<b>2</b>	3.81	dd	9.0, 7.5	<b>3.71</b>	dd	9.0, 7.5					
<b>3</b>	3.68	t	9.0	<b>3.59</b>	t	9.0					
<b>4</b>	3.62	t	9.0	<b>3.49</b>	t	9.0					
<b>5</b>	3.88	ddd	9.0, 6.5, 2.0	<b>3.60</b>	ddd	9.0, 5.0, 2.0					
<b>6a</b>	4.66	dd	12.0, 2.0	<b>3.97</b>	dd	12.0, 2.0					
<b>6b</b>	4.41	dd	12.0, 6.5	<b>3.78</b>	dd	12.0, 5.0					
<b>■ 1</b>	5.21	d	7.0	<b>5.04</b>	d	7.5					
<b>2</b>	3.68	m		<b>3.60</b>	m						
<b>3</b>	3.68	m		<b>3.60</b>	m						
<b>4</b>	3.41	t	9.0	<b>3.45</b>	t	9.0					
<b>5</b>	3.85	ddd	9.5, 9.0, 2.0	<b>3.60</b>	ddd	9.0, 5.0, 2.0					
<b>6a</b>	4.71	dd	12.0, 2.0	<b>4.00</b>	dd	12.0, 2.0					
<b>6b</b>	4.35	dd	12.0, 9.5	<b>3.80</b>	dd	12.0, 5.0					
<b>α</b>	6.23	d	16.0					<b>6.28</b>	d	16.0	
<b>β</b>	7.47	d	16.0					<b>7.55</b>	d	16.0	
<b>C1 2</b>	6.98	d	2.0					<b>7.06</b>	d	2.5	
<b>5</b>	6.74	d	8.0					<b>6.79</b>	d	8.0	
<b>6</b>	6.86	dd	8.0, 2.0					<b>6.95</b>	dd	8.0, 2.0	
							(CH3)	<b>3.76</b>	s		
<b>α</b>	5.91	d	16.0								
<b>β</b>	7.05	d	16.0								
<b>C2 2</b>	6.37	d	2.0								
<b>5</b>	6.51	d	8.0								
<b>6</b>	6.34	dd	8.0, 2.0								
NOE				<b>3 (25°C)</b>				<b>38 (-25°C)</b>			
▲ 1 ↔ H-4				-14%				-43%			
● 1 ↔ H-6				-12%				-45%			
■ 1 ↔ H-2'				-14%				-63%			

## コンピュータモデリング

コンメリニンフォーメーション解析は、Silicon Graphics 製 IRIS 4D/25G ワークステーションを用い、分子モデリングは Polygen 製 QUANTA 3.2/CHARMm 21. プログラムを使用した。計算は真空中の設定で行ない、アントシアニンフラビリウムイオン型とし、母核1位に+1のチャージを固定した。まずビスデアシルゲンチオデルフィンについて、Fig. 3-11に示した  $\phi$  および  $\psi$  を各々  $30^\circ$  ずつ回転させるグリッドサーチを行ない、各コンフォーメーションについて、100ステップの steepest descent minimization を行なった。その間 H-4 と  $\blacktriangle$ -1 の間に  $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$  (重み 10) の距離の束縛条件を付け、C 5-C 6 結合については gg として束縛した (重み 50)。得られた最適コンフォーメーションについて  $\phi'$  および  $\psi'$  を各々  $30^\circ$  ずつ回転させるグリッドサーチを同様に行なった。H-6 と  $\bullet$ -1 の間に  $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$  (重み 10)、 $\bullet$  の C 5-C 6 結合については gg の束縛条件を付け加えた。得られた最適コンフォーメーションに  $\blacksquare$  の糖を加え、再度同様にコンフォーメーション検索、最適化を行なった。H-2' と  $\blacksquare$ -1 に  $2.5 \pm 0.5 \text{ \AA}$  (重み 10) の束縛、 $\blacksquare$  の C 5-C 6 結合についても gg の束縛条件を付け加えた。こうして得られたビスデアシルゲンチオデルフィンのコンフォーメーションの  $\bullet$  の糖の6位に C 1 のコーヒ酸を結合させた。母核水素と糖のアノマー水素との間の距離束縛と糖の C 5-C 6 結合についての gg の束縛を同様に加え、T1、T2、T3、T4の軸を T1 と T2 については  $30^\circ$  ずつ T3 と T4については  $180^\circ$  回転させてグリッドサーチを行った。各コンフォーメーションは100ステップの steepest descent minimization を行いその中からエネルギーの低いコンフォーメーションを1/6程度選び、束縛条件を付けた200ステップの steepest descent minimization、200ステップの conjugate gradient minimization を行なった。さらに、10個のコンフォーメーションを選び出



し、束縛条件をはずした10ステップの Newton Raphson minimization を行なった。最安定コンフォメーションを選び、■の糖の6位にC2のコーヒ酸を結合させた。母核水素と糖のアノマー水素との間の距離束縛、●のC5-C6結合についてgg、■のC5-C6結合についてgtと束縛し、さらに、 $^1\text{H}$  NMRスペクトルにおいて遠隔のNOEが観測された、H-4とC2- $\alpha$ , C2-2, C2-6、H-8とC2- $\alpha$ , C2-2、H-2'とC2- $\beta$ , C2-2, C2-6、H-6'とC2- $\beta$ , C2-2, C2-6、▲-1とC2- $\alpha$ , C2-5の間に、 $4.0 \pm 1.0$  Åの距離束縛を付けた。C2のT7、T8結合をそれぞれ0°または180°とした4個のコンフォメーションを作成し、それぞれから、 $\phi$ 、 $\psi$ 、T5、T6の結合を360°の範囲のランダムサンプリング検索で回転させて2000コンフォメーションづつ発生させた。各コンフォメーションについて100ステップの steepest descent minimization を行いエネルギー最適化を行った。先と同様に約1/6のコンフォメーションを選び200ステップの steepest descent minimization、200ステップの conjugate gradient minimization を束縛を付けて行なった後、C2のT7、T8結合のコンフォメーションが異なるグループからそれぞれ約10個のコンフォメーションを選び出した。最終的に全ての束縛条件をはずした10ステップの Newton Raphson minimization を行ない最安定コンフォメーションを得た。

### 3. 3 の実験

#### 核磁気共鳴スペクトル

アラタニンの核磁気共鳴スペクトルの測定は、ゲンチオデルフィンの項に記した方法と同様の条件で行なった。

#### アラタニンの安定性

ゲンチオデルフィンの項に記載したように、色素の濃厚メタノール溶液を pH 6.0 の 0.05 M リン酸緩衝液に加え  $5 \times 10^{-5}$  M、 $5 \times 10^{-6}$  M とし、光路長 10 mm 100 mm のセルで測定した。

#### アラタニン A (39)、アラタニン B (40)、アラタニン C (41)

1990 年にフィリピンから凍結して持ち帰った紫ヤマ (*Dioscorea alata*) 283 g を下ろし金ですりおろし、1% TFA アセトニトリル溶液を 300 mL 加え室温で一晩抽出した。遠心分離して搾汁を得た後の残渣に 1% TFA アセトニトリル溶液を 300 mL 加え抽出する操作を計 4 回繰り返し、得られた抽出液を減圧下 1/10 量まで濃縮した。濃縮液中の不溶物を濾別後、分取 Develosil ODS lop ガラスカラム (24 mm  $\phi$  x 250 mm) に吸着させた。3% リン酸水溶液を 300 mL 流した後、3% リン酸含有 A 水溶液の濃度を 20% から 30% まで段階的に上げて約 500 mL ずつ流し、色素を溶出した。アラタニン A は 30% A 水溶液の画分に、アラタニン B は 28% A 水溶液の画分に、アラタニン C は 20% A 水溶液の画分に溶出した。それぞれの画分を常法に従いカウンターアニオンを換えてから減圧下濃縮乾固し、さらに、Asahipak ODP-90 カラム (21.5 mm  $\phi$  x 300 mm) を用いて 0.5% TFA 含有 14% アセトニトリル水溶液を

流し精製した。濃赤色の固体としてアラタニンA TFA 塩を 10 mg、アラタニンB TFA 塩を 50 mg、アラタニンC TFA 塩を 25 mg 得た。

#### アラタニンA完全トリフルオロアセチル化体 (42)

アラタニンA (39) 5 mg (0.0033 mmol) に無水トリフルオロ酢酸 0.3 mL を加え、40°C で反応させた。溶液は黄色となり、反応が進むにつれて沈殿が減少した。1 時間後に重クロロホルムを0.3 mL 加え、メンブレンフィルターで濾過して NMR チューブにサンプリングし、核磁気共鳴スペクトルの測定を行なった。

#### デアシル化アラタニンC (43)

ゲンチオデルフィンのアルカリ加水分解と同様に行なった。5.8 mg のアラタニンC を 0.5 mL のメタノールに溶解してアルゴン置換後 0.5 mL の0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え 0°C で 40 分間反応させた。さらに溶液を室温にして1時間30分反応させた後、同様に酸処理し、Asahipak ODP-90 カラム で精製した。1.7 mg のデアシル化アラタニンC が得られた。(収率 38%)

#### アラタニンA、アラタニンB、アラタニンCのアルカリ加水分解

アラタニンA、アラタニンB、アラタニンCをそれぞれ約 100 µg 取り、先述と同様にアルゴン気流下でメタノール中 0.5 N 水酸化ナトリウム水溶液を作用させ、アルカリ加水分解した。0°C で1時間反応させた後、塩酸処理し、反応液をそのままAsahipak ODP-50 カラムを用いて3次元クロマト分析を行なった。標品のシナピル酸メチルと保持時間、ピークの電子スペクトルを比較することにより、アラタニンに含まれる有機酸がシナピル酸であると同定した。

#### シナビル酸メチル (45)

シナビル酸 500 mg (2.23 mmol) にメタノール 50 mL と硫酸 1 mL を加え、2 時間加熱還流した。反応液を減圧下濃縮後、飽和重曹水で洗い塩化メチレンで抽出し、シナビル酸メチルを 300 mg 得た。(収率 56%)

Electronic spectral data of **39**, **40** and **41** in 0.01% HCl-MeOH at 20°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

<b>39</b>		<b>40</b>		<b>41</b>	
534	(20,400)	533	(16,400)	539	(14,500)
334	(23,100)	334	(14,500)	334	(8,890)
297	(18,700)	296	(11,900)	286	(10,300)

FABMS   **39**: 1509 ( $M^+$ )    **40**: 1347 ( $M^+$ )    **41**: 817 ( $M^+$ )

Assignments of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **39**, **40**, **41** and **42**  
(10% TFA-d- $\text{CD}_3\text{OD}$  at  $30^\circ\text{C}$ , 500MHz).

	39	40	41	42 <sup>+</sup>		39	40	41	42 <sup>+</sup>
4	8.55	8.56	8.55	9.13	$\Delta$ 1	5.07	5.06		5.88
6	6.89	6.82	6.62	8.05	2	3.66	3.65		5.54
8	7.06	7.06	6.48	7.84	3	3.75	3.74		5.79
2'	7.94	7.91	7.84	8.13	4	3.39	3.38		5.47
5'	7.01	7.01	7.01	7.69	5	3.78	3.78		4.37
6'	8.45	8.44	8.18	8.17	6a	4.17	4.17		4.49
$\blacktriangle$ 1	5.17	5.16	5.23	5.81	6b	3.86	3.86		4.44
2	3.74	3.72	3.68	5.64 <sup>#</sup>	$\bigcirc$ 1	4.69			4.84
3	3.79	3.80	3.78	5.64 <sup>#</sup>	2	3.39			5.11
4	3.30	3.28	3.26	5.48	3	3.47			5.44
5	4.27	4.28	4.28	4.32	4	3.36			5.26
6a	4.10	4.09	4.09	4.16	5	3.44			4.08
6b	3.98	4.06	3.98	3.75	6a	3.98			4.51
$\bullet$ 1	4.56	4.51	4.48	4.64	6b	3.72			4.41
2	3.66	3.50 <sup>#</sup>	3.47 <sup>#</sup>	5.05	$\alpha$	6.08	6.07	6.06	6.38*
3	3.68	3.50 <sup>#</sup>	3.47 <sup>#</sup>	4.28	$\beta$	7.30	7.31	7.27	7.64**
4	3.83	3.72	3.69	5.25	2,6	6.14	6.11	6.21	6.78***
5	3.52	3.46	3.47	3.93	$\text{OCH}_3$	3.36	3.32	3.45	3.86
6a	5.38	5.39	5.29	4.50	$\alpha$	6.16	6.15		6.39*
6b	4.11	4.08	4.09	4.30	$\beta$	7.13	7.12		7.66**
$\blacksquare$ 1	5.47	5.47		5.98	2,6	6.07	6.06		6.79***
2	3.66 <sup>#</sup>	3.65		5.66	$\text{OCH}_3$	3.55	3.55		3.86
3	3.66 <sup>#</sup>	3.65		5.78					
4	3.41	3.38		5.70					
5	3.97	3.96		4.54					
6a	4.96	4.95		4.86					
6b	4.15	4.15		4.38					
NOE									
		39	40	41					
		10 $^\circ\text{C}$	20 $^\circ\text{C}$	10 $^\circ\text{C}$					
$\blacktriangle$ 1	$\curvearrowright$ H-4	-12%	-7%	-7%					
$\bullet$ 1	$\curvearrowright$ $\blacktriangle$ 5	-3%		-5.3%					
$\bullet$ 1	$\curvearrowright$ $\blacktriangle$ 6		-4.5%						
$\blacksquare$ 1	$\curvearrowright$ H-8	-9.1%	-17.2%						
$\Delta$ 1	$\curvearrowright$ H-2'	-18.5%	-10%						
$\bigcirc$ 1	$\curvearrowright$ $\bullet$ 2, 3	-10%							

$J_{4,8} \leq 0.5\text{Hz}$ ,  $J_{6,8} = J_{2',6'} = 2.0\text{Hz}$ ,  $J_{5',6'} = 8.5\text{Hz}$ ,  $J_{\alpha,\beta} = 16.0\text{Hz}$ ,  $J_{\text{sugar}1,2} = 7.5\text{Hz}$ ,

$J_{\text{sugar}2,3} = J_{3,4} = J_{4,5} = 9.0\text{Hz}$ .

+, measured in  $\text{CDCl}_3$  at  $50^\circ\text{C}$ .

#; higher order.

\*, \*\* and \*\*\*; These assignments may be reversed.

Electronic spectral data of **43** in 0.01% HCl-MeOH at 20°C ( $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )).

529 nm (12800), 283 nm (7750)

FABMS **43**: 611 ( $M^+$ )

Assignment of the  $^1\text{H}$  NMR Spectra of **43** and **45** (10% TFA- $d_3$ -CD $_3$ OD at 25°C, 500MHz)

<b>43</b>				<b>45</b>			
4	9.01	s		$\alpha$	6.39	d	16.0
6	6.70	d	2.0	$\beta$	7.61	d	16.0
8	6.91	br. d	2.0	2, 6	6.91	s	
2'	8.09	d	2.0	OCH $_3$	3.89	s	
5'	7.05	d	8.5	OCH $_3$	3.78	s	
6'	8.24	dd	8.5, 2.0	(ester)			
▲ 1	5.27	d	7.5				
2	3.72	dd	9.0, 7.5				
3	3.57	t	9.0				
4	3.50	t	9.0				
5	3.79	td	9.0, 9.0, 1.5				
6a	4.20	dd	12.0, 1.5				
6b	3.80	br. d	12.0, 9.0				
● 1	4.29	d	7.5				
2	3.25	dd	9.0, 7.5				
3	3.30	t	9.0				
4	3.32	t	9.0				
5	3.23	dd	9.0, 5.5, 2.5				
6a	3.85	dd	12.0, 2.5				
6b	3.65	dd	12.0, 5.5				
NOE				6 (0°C)      8 (-20°C)			
▲ 1	H-4			-16.3%			-14.2%
● 1	H-6			-13.0%			-13.1%

## 参考文献

1. T. Goto and T. Kondo, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **30**, 17 (1991).
2. J. B. Harborne and R. J. Grayer, in *The Flavonoids, Advances in Research since 1980*; J. B. Harborne ed., Chapman and Hall, London, 1988; p. 1.
3. R. Brouillard, in *The Flavonoids, Advances in Research since 1980*, J. B. Harborne ed., Chapman and Hall, London, 1988; p. 525.
4. 林孝三、増訂植物色素、林孝三編、養賢堂、1988.
5. T. Goto, *Prog. Chem. Nat. Prod.*, **52**, 113 (1987).
6. R. Brouillard, in *Anthocyanins as Food Colors*, P. Markakis ed., Academic Press, New York, 1982; p. 1.
7. G. Hrazdina, in *The Flavonoids, Advances in Research*, J. B. Harborne and T. J. Mabry eds., Chapman and Hall, London, 1982; p.135.
8. C. F. Timberlake and P. Bridle. in *The Flavonoids*, J. B. Harborne, T. J. Mabry and H. Mabry eds., Academic Press, New York, 1975; p. 214.
9. R. Willstätter and A. E. Everest, *Ann. Chem.* **401**, 189 (1913).
10. R. Brouillard and B. Delaporte, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 8461 (1919).
11. K. Shibata, Y. Shibata and K. Kashiwagi, *J. Amer. Chem. Soc.*, **41**, 208 (1919).
12. A. E. Everest, and A. J. Hall, *Proc. Roy. Soc. London*, **92B**, 150 (1921).
13. G. M. Robinson, R. Robinson, *Biochem. J.* **25**, 1687 (1931).
14. K. Hayashi, Y. Abe, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **34**, 373 (1958).
15. E. Bayer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **5**, 791 (1966).
16. S. Asen, R. N. Stewart, K. H. Norris, *Phytochemistry* **11**, 1139 (1972).

17. N. Saito, Y. Osawa, and K. Hayashi, *Phytochemistry*, **10**, 445 (1971).
18. K. Yoshitama and K. Hayashi, *Bot. Mag. Tokyo*, **87**, 33 (1974).
19. K. Abe, H. Kakisawa, K. Yoshitama, and N. Saito, 36th Annual Meet. Chem. Soc. Jpn. Preprint 1977; p. 1209.
20. T. Goto, H. Tamura T. Kawai, T. Hoshino, N. Harada and T. Kondo, *Annal. New York Acad. Sci.*, **471**, 155 (1986).
21. 後藤俊夫、動的天然物化学、後藤俊夫編著、講談社、1983.
22. J. Adamovics and F. R. Sterimitz, *J. Chromatography*, **129**, 464 (1976).
23. M. Wilkinson T. G. Sweeny and G. A. Iacobucci, , *J. Chromatography*, **132**, 349 (1977).
24. M. Williams and G. Hrazdina, *J. Chromatography*, **155**, 389 (1978).
25. D. Strack, N. Akavia and H. Reznik, *Z. Naturforsch.*, **35C**, 533 (1980).
26. 近藤忠雄、田村啓敏、高瀬茂弘、後藤俊夫、日本化学会誌、1571 (1986).
27. E. Idaka, T. Ogawa, T. Kondo and T. Goto. *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2215 (1987).
28. E. Hebrero, C. Santos-Bulega and J. C. Ri vas-Gonzalo, *Am. J. Enol. Vitic.*, **39**, 227 (1988).
29. V. Hong and R. E. Wrolstad, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 698 (1990).
30. V. Hong and R. E. Wrolstad, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 708 (1990).
31. Y. S. Velioglu and G. Mazza, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 463 (1991).
32. J. B. Harborne, *Biochem. J.*, **70**, 22 (1958).
33. J. B. Harborne, in *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London, 1967; p. 1.
34. 武田幸作、増訂植物色素、林孝三編、養賢堂、1988、p. 151.



35. T. Kondo, T. Kawai, H. Tamura and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2273 (1987).
36. T. Goto, T. Kondo, T. Kawai and H. Tamura, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 6021 (1984).
37. T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, H. Imagawa, A. Iino, and K. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3695 (1982).
38. T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, K. Kawahori and H. Hattori, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 2181 (1983).
39. T. Goto, T. Kondo, H. Tamura, S. Takase, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 4963 (1983).
40. T. Kondo, H. Tamura, K. Yoshida and T. Goto, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 797-800 (1989).
41. K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda and T. Goto, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1745 (1990).
42. K. Takeda, Ch. Kumegawa, J. B. Harborne and R. Self, *Phytochemistry*, **27**, 1228 (1988).
43. H. Tamura, T. Kondo, Y. Kato and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5749 (1983).
44. R. Willstätter and W. Mieg, *Ann. Chem.*, **408**, 61 (1915).
45. J. B. Harborne, *Phytochemistry*, **3**, 151 (1964).
46. T. Kondo, K. Suzuki, K. Yoshida, K. Oki, M. Ueda, M. Isobe and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6375 (1983).
47. T. Kondo, K. Oki, K. Yoshida and T. Goto, *Chem. Lett.*, 137 (1990).
48. K. Hayashi, Y. Abe, S. Mitsui, *Proc. Jpn. Acad.* **34**, 373 (1958).
49. 三井清司、林孝三、服部静夫、植物学雑誌、**72**、327 (1959).
50. C. Kuroda, *Proc. Imp. Acad.*, **9**, 94 (1933).
51. C. Kuroda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **11**, 265 (1936).

52. K. Takeda, S. Mitsui and K. Hayashi, *Bot. Mag. Tokyo*, **70**, 578 (1966).
53. K. Hayashi and K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad.* **46**, 535 (1970).
54. H. Tamura, T. Kondo and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1801 (1986).
55. 伊藤正時、大場茂、斎藤喜彦、武田幸作、「アントシアニンの化学と応用」予稿集 東京、1982 p. 10.
56. 河合隆利、名古屋大学大学院農学研究科修士論文、1986.
57. T. Hoshino, U. Matsumoto, T. Goto and N. Harada, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 3621 (1981).
58. T. Hoshino, U. Matsumoto and T. Goto, *Phytochemistry*, **20**, 1971 (1981).
59. T. Hoshino, U. Matsumoto, N. Harada and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 433 (1982).
60. 吉兼光雄、名古屋大学大学院農学研究科修士論文、1988.
61. 田村啓敏、名古屋大学大学院農学研究科博士論文、1986.
62. 高瀬茂弘、名古屋大学大学院農学研究科修士論文、1979.
63. T. Kondo, M. Yoshikane, K. Yoshida and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6729 (1989).
64. T. Kondo, K. Yoshida, M. Yoshikane and T. Goto, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 2919 (1991).
65. K. Hayashi and K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, **53**, 1 (1977).
66. K. Takeda, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B.*, **53**, 257 (1977).
67. K. Takeda, F. Narashima and S. Nonaka, *Phytochemistry*, **19**, 2175 (1980).
68. K. Takeda, T. Fujii and M. Iida, *Phytochemistry*, **23**, 879 (1984).
69. T. Goto, K. Yoshida, M. Yoshikane and T. Kondo, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 713

- (1990).
70. 斎藤規夫、上野勝彦、武田幸作、明治学院大学一般教育部附属研究所紀要、**10**、63  
(1986).
  71. N. Sakabe, *Nucl. Instr. and Meth.*, **A303**, 448 (1991).
  72. G. Sheldrick, *Acta Cryst.*, **A46**, 467 (1990).
  73. S. R. Hall, J. M. Stewart eds., *Xtal 3.0 Reference Manual*, University of Western  
Australia and Maryland (1990).
  74. R. Brouillard, *Phytochemistry*, **22**, 1311 (1983).
  75. Y. Osawa, in *Anthocyanins as Food Colors*, P. Markakis ed., Academic Press, New  
York, 1982; p. 41.
  76. R. Brouillard, G. Mazza, Z. Saad, A. M. Albrecht-Gary and A. J. Cheminat, *Amer.*  
*Chem. Soc.*, **111**, 2604 (1989).
  77. K. Yoshitama, *Phytochemistry*, **16**, 1857 (1977).
  78. T. Kondo, J. Yamashiki, K. Kawahori and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6055  
(1989).
  79. N, Saito, K. Abe, T. Honda, C. F. Timberlake and P. Bridle, *Phytochemistry*, **24**,  
1583 (1985).
  80. N, Terahara, N. Saito, T. Honda, K. Toki and Y. Osajima, *Tetrahedron Lett.*, **30**,  
5305 (1989).
  81. N, Terahara, N. Saito, T. Honda, K. Toki and Y. Osajima, *Tetrahedron Lett.*, **31**,  
2921 (1990).
  82. T. Kondo, M. Ueda and T. Goto, *Tetrahedron*, **46**, 4749 (1990).
  83. R. Brouillard, *Phytochemistry*, **20**, 143 (1981).

84. 津久井重紀夫、桑野和民、三田村敏男、谷村和八郎、農化誌、**51**、471、(1977).
85. 津久井重紀夫、家政誌、**39**、209 (1988).
86. A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2093 (1986).
87. J. D. Merish, and J. K. M. Sanders, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 4029 (1981).
88. P. Deslongchamps, and R. J. Taillefer, *Can. J. Chem.*, **53**, 3029 (1975).
89. P. Deslongchamps, *Stereoelectronic Effects in Organic Chemistry*, Pergamon, Oxford, 1983.
90. A. J. Kirby, *The Anomeric Effect and Related Stereoelectronic Effects at Oxygen*, Springer-Verlag, Berlin, 1983.
91. K. L. Williamson and S. J. William, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4623 (1961).
92. A. Bruyn and M. Anteunis, *Carbohydrate Res.*, **47**, 311 (1976).
93. H. Hori, T. Nakajima, Y. Nishida, H. Ohri and H. Meguro, *J. Carbohydrate Chem.*, **5**, 585 (1986).
94. N. Nishida, H. Hori, H. Ohri and H. Meguro, *J. Carbohydrate Chem.*, **7**, 239 (1988).
95. A. Bax, and D. J. Davis, *J. Mag. Reson.*, **63**, 207 (1985).
96. T. Otsubo, S. Mizogami, Y. Sakata, S. Misumi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 3831 (1973).
97. 坂田祥光、化学の領域、**28**、947 (1974).
98. QUANTA-CHARMm software (var. 3.2 for IRIS) is released by Polygen Co.
99. CHARMM; B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson D. J. States, S. Swaminathan and M. Karplus, *J. Computational Chem.*, **4**, 187 (1983).
100. V. Rasocher and D. G. Coursey, *Experientia*, **23**, 611 (1967).

101. M. P. Imbert, and C. Seaforth, *Experientia*, **24**, 445 (1968).
102. Y. Shoyama, I. Nishioka, W. Hearsh, S. Umemoto, K. Fujita, and H. Okubo, *Phytochemistry*, **29**, 2999 (1990).
103. F. W. Martin, L. Telek and R. M. Ruberte, *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 335 (1974).
104. R. Carreno-Diaz and N. J. Grau, *Food Sci.*, **42**, 615 (1977).
105. O. N. Ozo, J. C. Caygrill and D. G. Coursey, *Phytochemistry*, **23**, 329 (1984).
106. E. Nilsson, *Chemica Scripta*, **4**, 49 (1973).
107. M. Ranganathan and P. Balaram, *Org. Mag. Res.*, **13**, 220 (1980).
108. T. Goto, T. Kondo, H. Imagawa, S. Takase, M. Atobe and I. Miura, *Chem. Lett.*, 883 (1981).
109. K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda, S. Kawakishi, A. J. M. Lubag, E. M. T. Mendoza and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5575 (1991).
110. K. Yoshida, T. Kondo and T. Goto, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 5579 (1991).
111. 後藤昭子、名古屋大学農学部卒業論文、1986.
112. 河合隆利、名古屋大学農学部卒業論文、1984.
113. T. Higashi, *J. Appl. Cryst.*, **22**, 9 (1988).

## 謝辞

本研究を開始し、進めていく上で、適切なご指導、温かいご助言を賜り、コンメリニンのX線結晶構造解析成功の第一報を聞かれた直後に逝去された、名古屋大学農学部故後藤俊夫教授に深く感謝するとともに、心よりご冥福をお祈りします。後藤俊夫先生の奥様、後藤泉氏には、ご自身のご不幸にも関わらず花の栽培、写真提供を始め公私ともに、多大な御助力を頂きました。感謝の念にたえません。

一貫して熱気あふれる指導を賜り、また、研究に対する理想を語り激励くださいました、名古屋大学化学測定機器センター、近藤忠雄助手に心から感謝の意を表します。

コンメリニンのX線結晶構造解析は、高エネルギー物理学研究所、中川敦史助手との共同研究であり、氏の尽力なくしては完成し得ませんでした。深く感謝いたします。

本研究を完成させるために、名古屋大学農学部、磯部稔教授には一方ならぬお世話になりました。深謝いたします。

研究の遂行にあたっては、名古屋大学化学測定機器センター前センター長、野依良治教授、現センター長、山田静之教授、早川芳宏現教養部教授、鈴木正昭助教授を始めとした化学測定機器センターの皆様に、多大な便宜を図って頂きました。有難うございました。

名古屋大学農学部の丸茂晋吾教授、川岸舜朗教授には、研究を続けるうえで大層お世話になり、また示唆に富むご助言を頂きました。深くお礼申し上げます。

名古屋大学農学部生物有機化学研究室を卒業された、田村啓敏博士、河合隆利修士、吉兼光雄修士を始めとした共同研究者の方々、西川俊夫助手を始めとした職員

の皆様、上田実修士、青木秀樹修士を始めとした在学生の方々には、有形無形の様々な協力を頂きました。有難うございました。

東京学芸大学、武田幸作教授には、コンメリニンの結晶化について、慶応義塾大学、大場茂講師にはコンメリニンのX線結晶構造解析について、東北大学、原田宣之助教授にはアラタニンのCDの解釈についてそれぞれ有益なご助言を頂きました。名古屋大学農学部、月向邦彦助教授には比容測定装置を借用させていただきました。厚くお礼申し上げます。

紫色のツユクサ（タイプI）を供与していただきました、大西英爾名古屋大学名誉教授、ヤグルマギクの栽培をお願いした、名古屋大学農学部附属農場の吉田重方教授に厚くお礼申し上げます。

FABMSの測定をお願いした名古屋大学農学部の北村繁幸氏、名城大学分析センターの益田勝吉氏、ICPおよび分析超遠心の測定に便宜を図って下さいました、岡崎共同研究機構、基礎生物学研究所の服部宏之氏、梶浦弘子氏、熱分析の装置をお借りした、三和化学研究所、岐阜研究所の近藤所長に感謝します。

最後に、研究のできる環境作りに尽力下さり、終始励ましを頂いた、相山女学園大学、北野康学長、亀田清教授、相山正弘学園長に感謝します。

## 報文目録

1. Chiral Stacking of a Natural Flavone, Flavoccommelin, in Aqueous Solutions.  
Toshio GOTO, Kumi YOSHIDA, Mitsuo YOSHIKANE and Tadao KONDO,  
*Tetrahedron Letters*, **31**, 713-716 (1990).
2. Structures of Alatanin A, B and C Isolated from Edible Purple Yam *Dioscorea Alata*.  
Kumi YOSHIDA, Tadao KONDO, Kiyoshi KAMEDA, Shunro KAWAKISHI,  
Angelo Josue M. LUBAG, Evelyn M. T. MENDOZA and Toshio GOTO,  
*Tetrahedron Letters*, **32**, 5575-5578 (1991).
3. Unusually Stable Monoacylated Anthocyanin from Purple Yam *Dioscorea Alata*.  
Kumi YOSHIDA, Tadao KONDO and Toshio GOTO,  
*Tetrahedron Letters*, **32**, 5589-5580 (1991).
4. Mechanism for Color Development in Purple Flower of *Commelina Communis*.  
Tadao KONDO, Kumi YOSHIDA and Toshio GOTO,  
*Agricultural and Biological Chemistry*, **55**, 2919-2921, (1991).
5. Intarmolecular Stacking Conformation of Gentiodelphin, a Diacylated Anthocyanin from *Gentiana Makinoi*.  
Kumi YOSHIDA, Tadao KONDO and Toshio GOTO,  
*Tetrahedron* in press.
6. Structural Basis of Blue-Color Development in Flower Petals: Structure Determination of Commelinin from *Commelina Communis*.  
Tadao KONDO, Kumi YOSHIDA, Atsushi NAKAGAWA, Takatoshi KAWAI,  
Hirotoshi TAMURA and Toshio GOTO.  
submitted for publication to *Nature*.



## 正誤表

	正	誤
5 頁 Fig. 3	Willstätter 1915	Willstätter 1913
1 8 8 頁 文献 9	<b>408</b> , 147 (1915)	<b>401</b> , 189 (1913)