

Malbranchea filamentosa から得られる
フラノンおよびトリテルペン配糖体の構造

若菜大悟

目次

略語表	1
序論	2
本論	
第1章 <i>Malbranchea filamentosa</i> IFM41300 株の培養および成分分離	6
第2章 フラノン誘導体の構造	9
第1節 4-Benzyl-3-phenyl-5 <i>H</i> furan-2-one (34) の構造	9
第2節 Malfilamentoside A (36) の構造	13
第3節 Malfilamentoside B (37) の構造	16
第3章 Malbrancheoside 類の構造	18
第1節 Malbrancheoside A (38) の構造	18
・ Pseudomalbrancheogenin (43) の構造	21
・ Malbrancheogenin (44) の構造	26
第2節 Malbrancheoside B (39)・D (41)の構造	29
・ Malbrancheoside B (39)の構造	29
・ Malbrancheoside C (40)の構造	36
・ Malbrancheoside D (41)の構造	39
第4章 Malbrancheoside 類の生合成経路の検討	42
結論	47
実験の部	51
謝辞	60
引用文献	61
論文リスト	64

略語表

本論文においては、以下の略号を使用する。

^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Correlation spectroscopy
CI-MS	Chemical ionization mass spectrometry
CPC	Centrifugal liquid - liquid partitioned chromatography
dept	Distortionless enhancement by polarization transfer
EI-MS	Electron ionization mass spectrometry
ESI-TOF-MS	Electrospray ionization time of flight mass spectrometry
FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectrometry
FT-MS	Fourier transform mass spectrometry
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
IR	Infrared
LPLC	Low pressure liquid chromatography
MTPA	α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid
NMR	Nuclear magnetic resonance
NOESY	Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
PDA	Potato dextrose agar
ROESY	Rotating frame nuclear Overhauser effect spectroscopy
UV	Ultraviolet

序論

人類はその長い歴史の中で真菌類を醸造や醗酵による食品の加工・製造に世界各地で利用してきた。ヨーロッパや中央アジアでは主食であるパン以外に動物性乳醗酵品としてチーズやヨーグルト等を、東および東南アジアでは主に魚類や大豆等の穀類を原料とした魚醤、テンペ、日本でも醤油、味噌、かつおぶしなどを製造している。

真菌類の医薬品開発における資源としての歴史は、東洋の漢方薬や西洋のハーブを利用した民間薬などで長い歴史を持つ植物と比べ、非常に浅く、1929年にフレミングが *Penicillium notatum* の培養液から発見した penicillin 類(1, 2)^{1), 2)} が真菌由来の医薬品として最初の例である。それ以降微生物が医薬品開発の天然物資源として注目されるようになった。財団法人 日本抗生物質学術協議会により発行されている微生物からの生理活性物質の探索・研究に関する専門学術誌 “Journal of Antibiotics” (1947年創刊) では1947年から2003年までに5430の化合物が報告され、それを調査すると1980年代までは放線菌から得られた化合物が多いが、1990年代以降、真菌から得られた化合物が著しく増加しており、真菌類が医薬品開発のための有用な天然物資源として広く認識されていることを示している。³⁾ 事実真菌由来の医薬品として春山らにより *Penicillium citrinum* から単離された ML-236B (= compactin : 3)⁴⁾ から HMG-CoA 還元酵素阻害作用を持つ高脂血症治療薬 pravastatin (4)²⁾ [商品名：メバロチン:第一三共(株)]、*Tblypocladium inflatum* 培養液中から発見された免疫抑制剤である cyclosporin (5)²⁾ [商品名：サンデュミン、ノバルティスファーマ(株)]、1974年、F, Benz らにより *Aspergillus nidulans* から単離された echinocandin B (6)⁵⁾ をリード化合物として開発されたβ-1,3 グルカン合成酵素阻害作用を持つ、リポペプチド系抗真菌剤 micafungin (7)²⁾ [商品名：ミカファンギン、アステラス製薬(株)] などが開発され、上市されている。さらに、1971年 Kluepfel らにより *Myriococcum albomyces* から単離された myriocin (8)⁶⁾ をリード化合物として開発された FTY720 (9) は多発性硬化症の治療薬として現在開発中 (phase II) であり、その他様々な生物活性を示す化合物が得られている。(Fig.1)

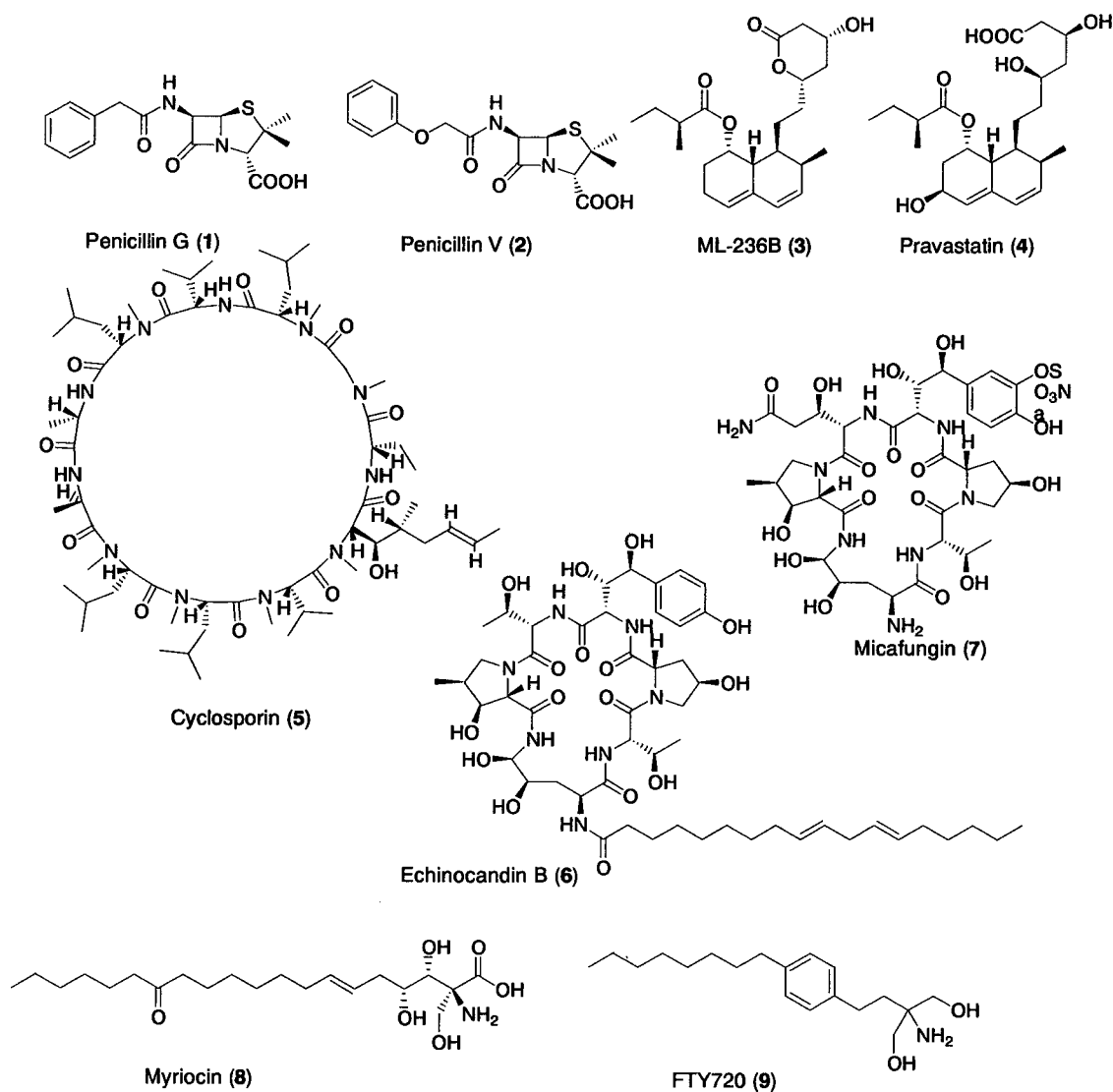


Fig.1 Drugs from fungi

また、1960 年代オーストラリアの養鶏場で 10 万羽以上の七面鳥が急性肝障害を起こし死亡した事件は aflatoxin 類 (10・13) の存在を (天然由来の最強の発ガン物質として) 世界中に知らしめる出来事であり、改めて真菌の生理活性物質の産生能力の高さを印象付けた。その後、相次いで、同じく肝障害を引き起こす sterigmatocystin (14)、*Aspergillus* 属菌が産生する ochratoxin A (15)、黄変米の原因である *Penicillium citrinum* などが産生する citrinin (16) などさまざまなマイコトキシン発見され、真菌の代謝産物の食品衛生や環境衛生の面における重要性が認識された。⁷⁾ (Fig.2)

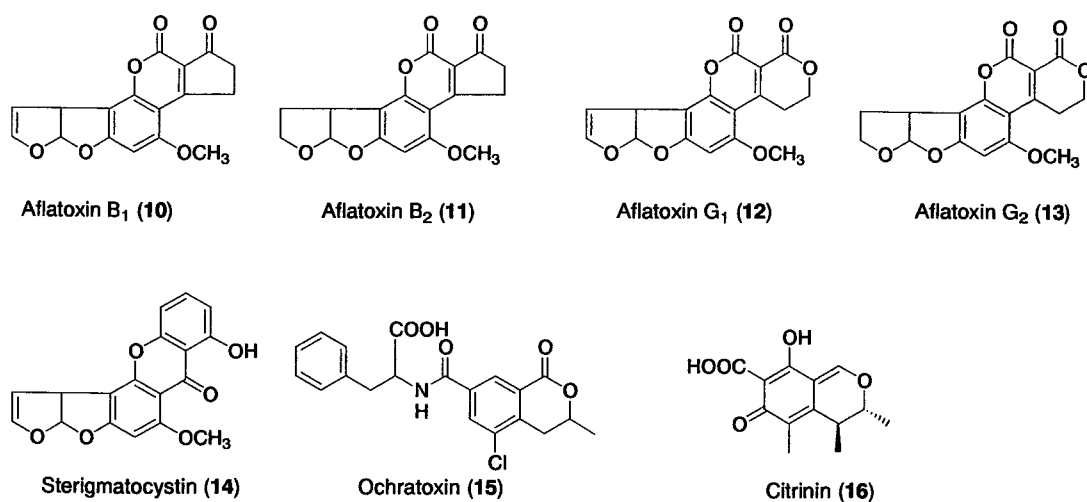


Fig.2 Mycotoxins

著者は真菌類からの新しい化合物の探索研究を行い、これまでに新規化合物として *Penicillium citrinum* IFM53298 株から citrinin (16) の 2 量体化合物 penicitrinone A (17)、B (18) および penicitrinol A (19)⁸⁾、*Neosartorya fischeri* IFM52672 株から terrein (20) の異性体である isoterrein (21)⁹⁾ を *Aspergillus fumigatus* IFM54246 株から 2,4-dihydroxy-3-methylacetophenone (22)¹⁰⁾ を単離し報告している。(Fig.3)

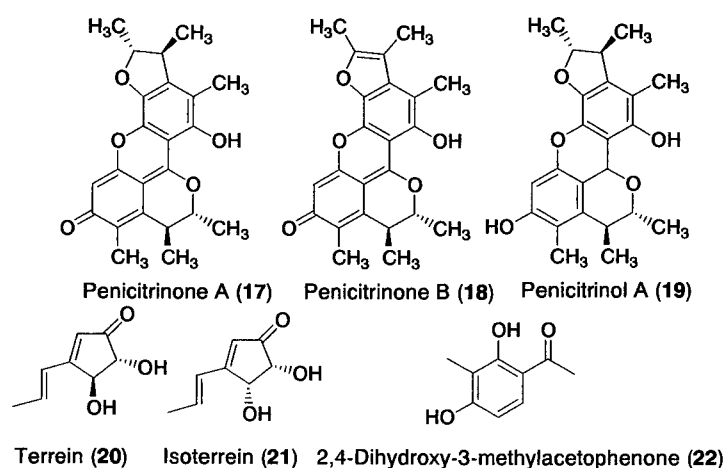


Fig.3 New compounds isolated by us

今回新たに真菌類の成分探索を行うにあたり、真菌類の中でも強い病原性を示す菌またはその類縁菌の代謝産物は化学組成的に興味深いのではないかと考えた。重篤な真菌症を

引き起こす菌として、コクシジオイデス症の原因菌である *Coccidioides immitis*、パラコクシジオイデス症の原因菌である *Paracoccidioides brasiliensis*、ブラストマイセス症の原因菌である *Blastomyces dermatitidis*、ヒストプラズマ症の原因菌である *Histoplasma capsulatum* があるが¹¹⁾、これらの完全世代はすべてホネタケ科に属している。*Malbranchea* 属菌もこれらの菌と同じくその完全世代はホネタケ科に属しているものが多く、上記の病原性真菌と分類上近縁の可能性があることから、¹²⁾ *Malbranchea* 属菌の成分探索を行うことにした。*Malbranchea* 属菌のこれまでの成分検索を調査したところ、*M. aurantiaca*、*M. cinnamomea* から 8 化合物が報告されているのみであった。(Fig.4)¹³⁾⁻¹⁷⁾ そこで、著者はこれまでに二次代謝産物の検索が実施されていない *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株の成分探索を行うことにした。

本報では第 1 章で *Malbranchea filamentosa* IFM 41300 の培養および成分分離、第 2 章ではフラノン誘導体の構造、第 3 章ではトリテルペン配糖体の構造、第 4 章ではトリテルペン配糖体の生合成に関して述べる。

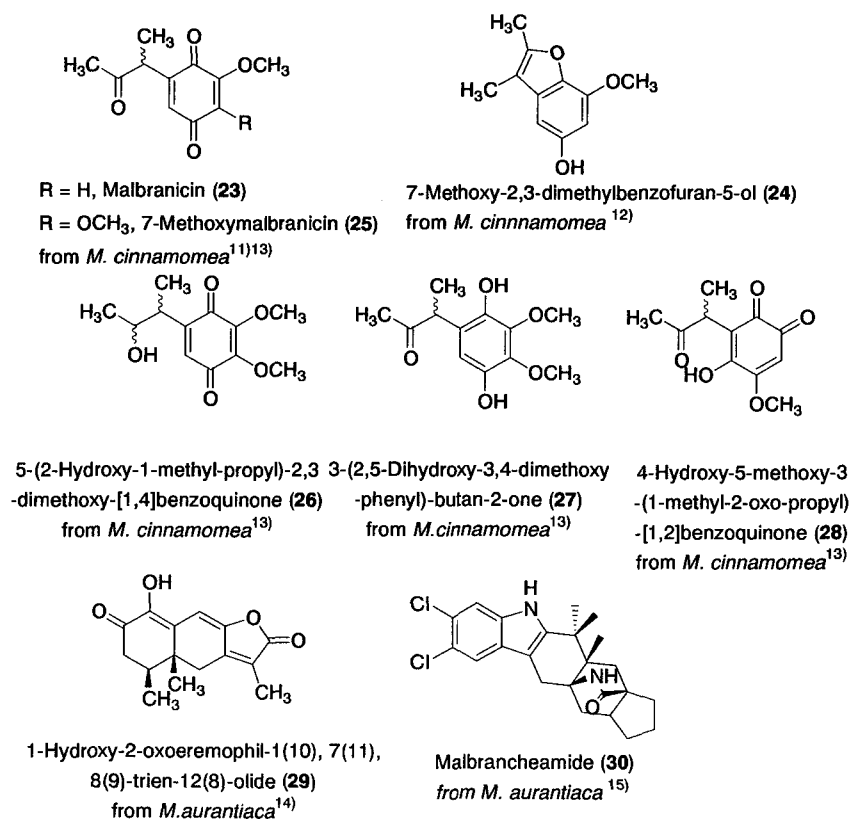


Fig.4 New compounds already isolated from *Malbranchea* sp.

本論

第1章 *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株の培養および成分分離

PDA 平板培地で培養した *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株を種菌とし、米培地で 25℃、21 日間静置培養した。培養後、acetone で抽出・溶媒留去し、acetone 抽出エキスを得た。次にこのエキスを水と AcOEt で分配し、得られた AcOEt 抽出エキスを hexane、benzene、CH₂Cl₂、MeOH で順次固液抽出した。Hexane 分画をカラムクロマトグラフィー [シリカゲル, CH₂Cl₂ - acetone (50 : 1 → acetone)] で分画後、fr.1 を LPLC [シリカゲル, hexane - acetone (5 : 2)]、HPLC [シリカゲル, hexane - acetone (5 : 1)] で分離し、bassianolide (31 : 80 mg) を得た¹⁸⁾ 化合物 31 は昆虫に広く発生する白きょう病の原因菌 *Beauveria bassiana* から単離され、カイコに対する殺虫作用を持つデプシペプチドとして報告されている。また、fr.3 を HPLC [シリカゲル, benzene - acetone (50 : 1)] で精製し、真菌 *Amauroascus* sp. より単離され、ラットの動脈に対する弛緩作用を持つ amauromine (32) を得た。¹⁹⁾ Benzene 分画をカラムクロマトグラフィー [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (50 : 1 → EtOH)] で分画後、HPLC [シリカゲル, benzene - EtOH (70 : 1)] で精製し、1939 年に *Aspergillus glaucus* から単離されたアントラキノン誘導体 erythroglaucine (33)²⁰⁾ とともに、新規フラノン誘導体 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (34) を得た。CH₂Cl₂ 抽出エキスを、LPLC [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (10 : 1)] で分画後、さらに LPLC [シリカゲル, CH₂Cl₂ - acetone (1 : 5)] を用いて精製し、シソ科植物 *Robdosia rubescens* から単離されている N-acetyl-γ-aminobutyric acid (35)²¹⁾ を、また、HPLC [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (10 : 1)、CH₂Cl₂ - acetone (1 : 2)] および HPLC (ODS, 70% MeOH) で繰り返し精製し、新規フラノン配糖体 malfilamentoside A (36) および B (37) を得た。MeOH 抽出エキスをカラムクロマトグラフィー (HP20, 溶出溶媒 : H₂O, 20% MeOH, 40% MeOH, 60% MeOH, 80% MeOH, MeOH, acetone) で分画し、得られた acetone 分画をさらに CPC で CH₂Cl₂ - MeOH - H₂O からなる二層系を用い上昇法で分画した。その後 fr.3 を、HPLC [ODS, 80% MeOH および MeCN-MeOH-H₂O (7:7:6)] を用いて精製し、malbrancheoside C (40) および malbrancheoside D (41) を単離した。また、fr.5 を HPLC (ODS 85% MeOH) で精製し、malbrancheoside A (38) および malbrancheoside B (39) を得た。

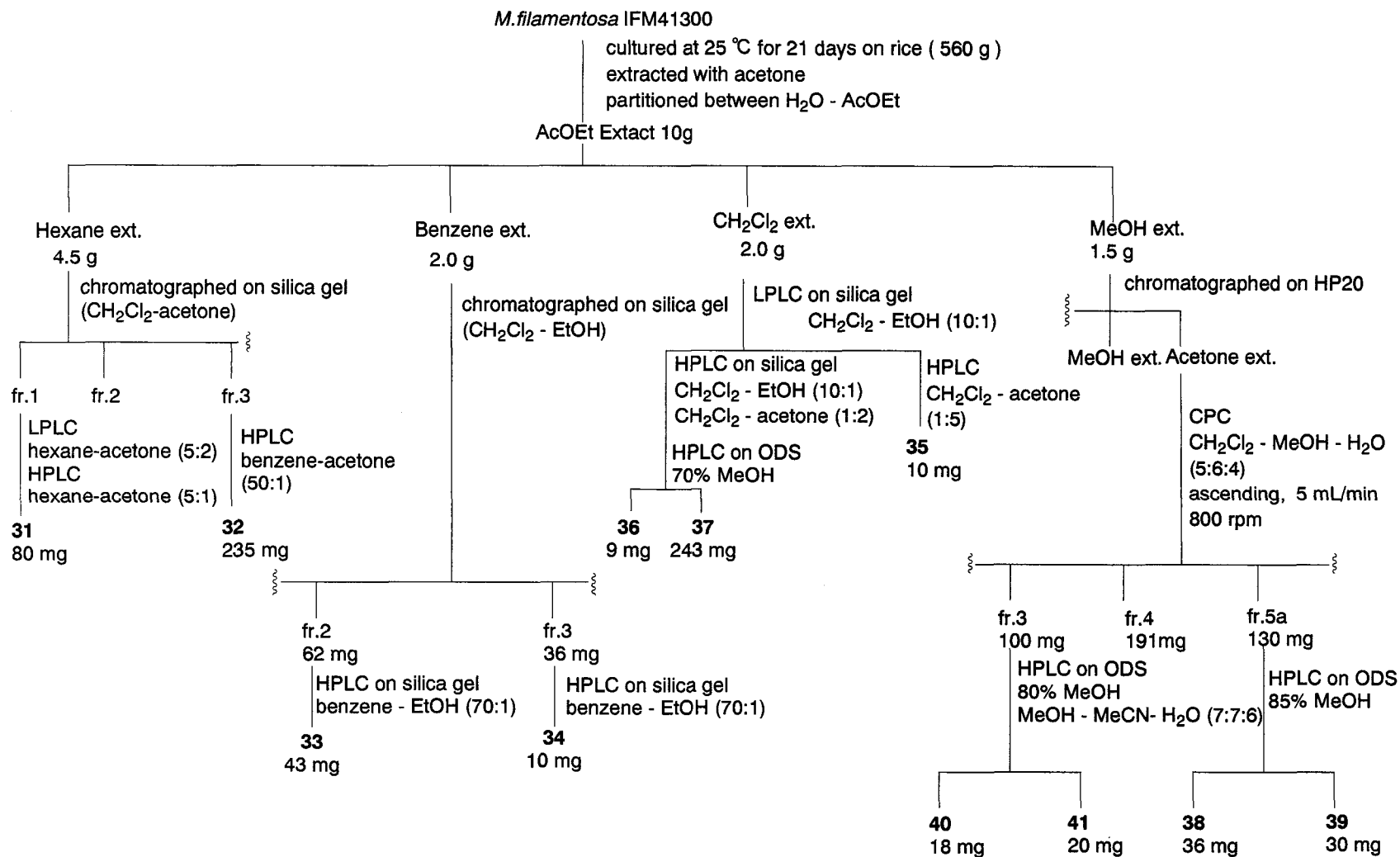
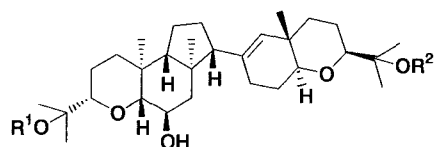
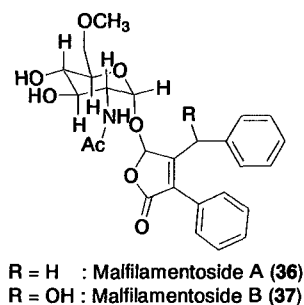
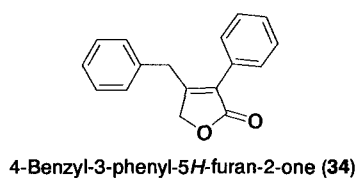
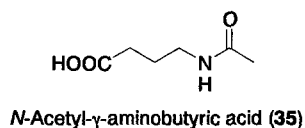
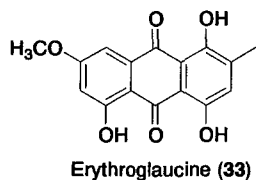
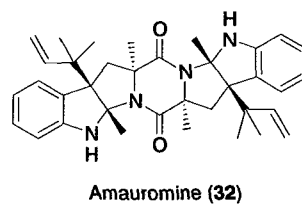
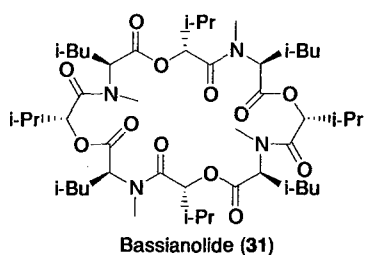


Chart.1 Isolation scheme from *Malbranchea filamentosa* IFM41300



- Malbrancheoside A (38): $R^1 = R^2 = 6\text{-}O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$
 B (39): $R^1 = H, R^2 = \beta\text{-D-mannose}$
 C (40): $R^1 = N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}, R^2 = 6\text{-}O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$
 D (41): $R^1 = \beta\text{-D-mannose}, R^2 = 6\text{-}O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$

Fig.5 Metabolites from *Malbranchea filamentosa* IFM41300

第2章 フラノン誘導体の構造

本章では、前章で述べた benzene 分画、および CH₂Cl₂ 分画から得られた新規フラノン誘導体 **34**、**36**、**37** の構造決定を行った。(Fig.6) 化合物 **34** の構造解析を第1節で、**36** の構造決定を第2節で、**37** の構造決定を第3節で述べる。

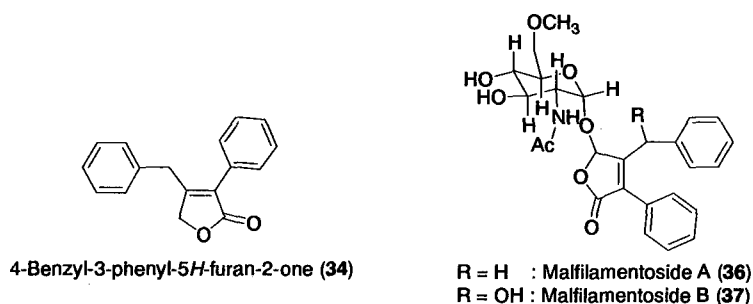


Fig.6 Chemical structures of 4-benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (**34**),
malfilamentoside A (**36**) and malfilamentoside B (**37**)

第1節 4-Benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (**34**)の構造

化合物 **34** は無色油状物質で、高分解能 EI-MS より分子式 C₁₇H₁₄O₂ (不飽和度 : 11) と決定した。¹H-NMR スペクトルからは δ 7.10 から δ 7.53 に 10 個の芳香族プロトンおよび、2 個の CH₂ の存在を示唆するシグナル δ 3.96 (2H, s) および δ 4.69 (2H, s) が観測された。(Fig.7, Table.1) **34** の ¹³C-NMR スペクトルを Fig.8, Table.1 に示す。¹³C-NMR スペクトルでは 13 本のシグナルが観察されたが、分子式より炭素数は 17 であり、δ 128.5、δ 129.2、δ 128.9、δ 128.7 の 4 本の sp² メチン炭素のシグナル強度が他の炭素シグナルと比べて約 2 倍の値を示していることから、これら 4 本の炭素シグナルはそれぞれ 2 つの炭素シグナルが重なり合っていると考えた。

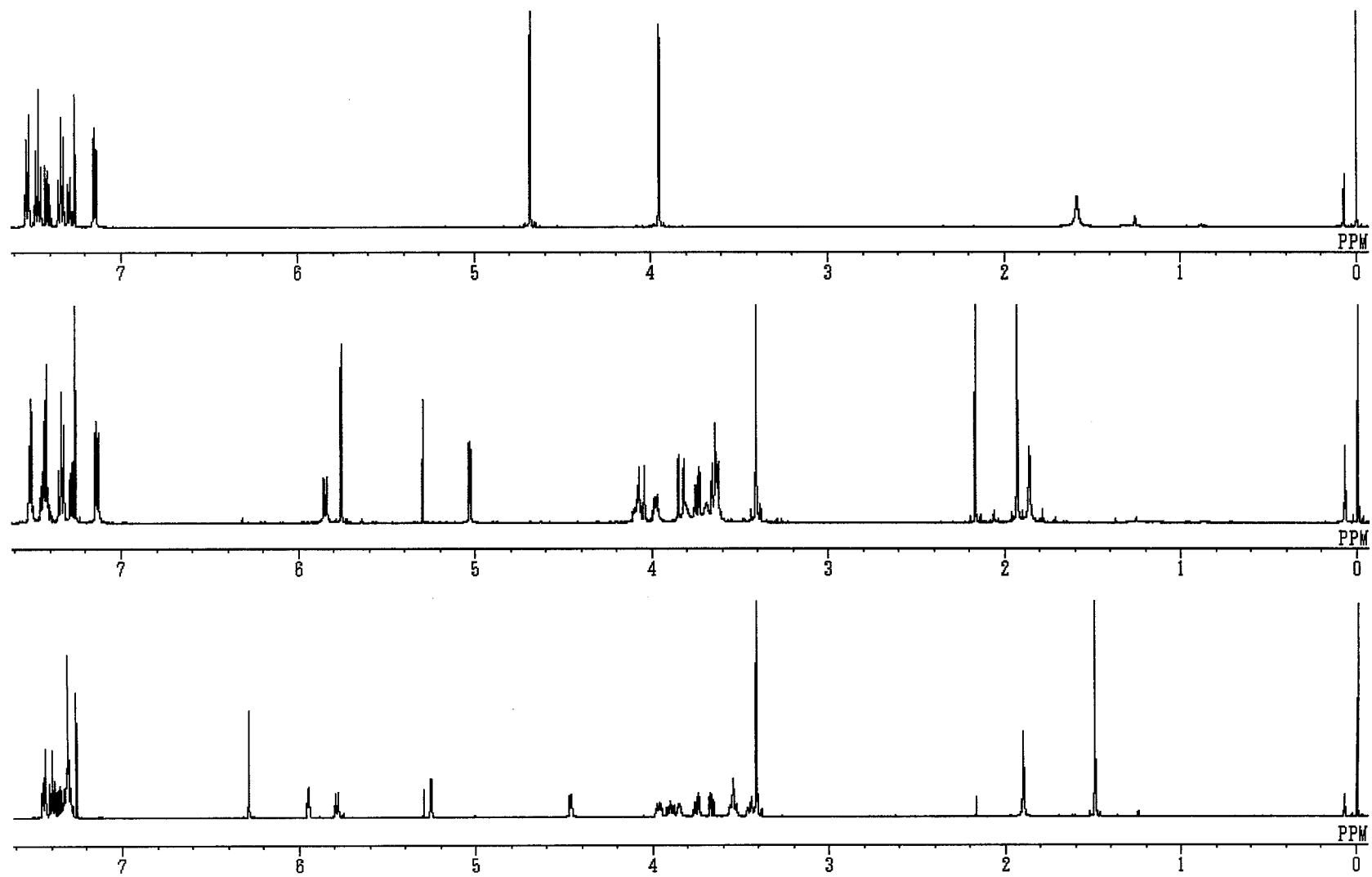


Fig.7 ^1H -NMR spectra of 4-benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34), malfilamentoside A (36) and malfilamentoside B (37)

^1H - ^1H COSYおよびHMBCスペクトルから δ_{C} 127.4 / δ_{H} 7.28 (1H, m) - δ_{C} 129.2 / δ_{H} 7.34 (2H, m) - δ_{C} 128.5 / δ_{H} 7.10 (2H, m) の相関および δ_{C} 128.8 / δ_{H} 7.40 (1H, m) - δ_{C} 128.7 / δ_{H} 7.47 (2H, m) - δ_{C} 128.9 / δ_{H} 7.53 (2H, m) の相関が観測された。これらの相関は一置換ベンゼンに特徴的であることから、**34**は2つの一置換ベンゼンを有すると推定した。また、 δ 173.3 にエステル基の存在を示す四級炭素のシグナルが、さらに、酸素原子に隣接したメチレン炭素 δ 71.1 と δ 34.0 のシグナルが観測された。続いてHMBCスペクトルで 5位のメチレン水素 (δ 4.69, 2H, s) からC-2 (δ 173.3)、C-3 (δ 127.6)、C-4 (δ 159.7) および、C-6 (δ 34.0) に相関が見られた。このことから α, β -不飽和ラクトンの存在が示唆された。また、6位のメチレン炭素 (δ 3.96, s) からC-3 (δ 127.6)、C-4 (δ 159.7)、C-5 (δ 71.1)、C-1' (δ 136.1) および、C-2' (δ 128.5) に相関が見られたことから γ -ラクトンの4位にベンジル基の存在が示唆され、2''位のベンゼン環水素 (δ 7.53, m) からC-3 (δ 127.6) への相関から、3位にフェニル基の存在が示唆された。以上のことから、本化合物は α, β -不飽和ラクトンの3位にフェニル基が、4位にベンジル基がついた 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (**34**) の構造を持つと決定した。(Fig.9)

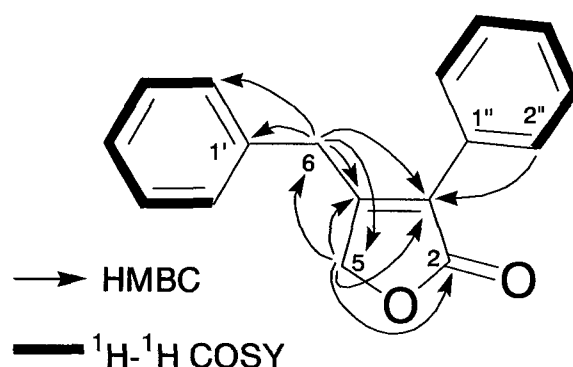


Fig.9 Chemical structure, ^1H - ^1H COSY and

important HMBC correlations of 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (**34**)

Table.1 ¹H- and ¹³C-NMR Chemical shifts of4-benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34) and malfilamentosides A (36), B (37)

Carbon No.	¹³ C δ _C	34 δ _H	36 δ _C	36 δ _H (<i>J</i> in Hz)	37 δ _C	37 δ _H (<i>J</i> in Hz)
2	173.3		169.9		169.8	
3	127.6		136.0		140.4	
4	159.7		155.7		156.8	
5	71.1	4.69 s	100.8	5.76 s	101.7	6.29 s
6	34.0	3.96 s	32.6	3.82 d (15.6) 4.05 d (15.6)	70.0	5.95 d (4.9)
6-OH						3.85 br
1'	136.1		131.1		130.7	
2' & 6'	128.5	7.10 m	128.5	7.14 m	127.6	7.45 m
3' & 5'	129.2	7.34 m	128.9	7.44 m	129.0	7.32 m
4'	127.4	7.28 m	127.5	7.28 m	129.5	7.32 m
1''	129.7		128.6		128.4	
2'' & 6''	128.9	7.53 m	129.3	7.34 m	128.9	7.40 m
3'' & 5''	128.7	7.47 m	128.8	7.52 m	128.5	7.32 m
4''	128.8	7.40 m	129.5	7.44 m	128.8	7.32 m
1'''			98.4	5.03 d (3.4)	100.0	5.25 d (3.4)
2'''			53.3	4.08 m	53.8	3.91, ddd (10.7, 7.6, 3.4)
2'''-NH				5.85 d (8.6)		5.79 d (7.6)
-COCH ₃			23.2	1.93 s	23.2	1.49 s
-COCH ₃			171.5		172.6	
3'''			72.5	3.64 brd (9.8)	73.2	3.45 m
4'''			71.7	3.64 brd (9.8)	71.8	3.54, brt (10.1)
5'''			71.2	3.98 m	70.8	3.97, ddd (10.1, 4.6, 3.4)
6'''			71.8	3.65 dd (10.7, 3.4) 3.75 dd (10.7, 4.3)	71.7	3.67 dd (10.7, 3.4) 3.75 dd (10.7, 4.6)
6'''-O-Me			59.5	3.41 s	59.3	3.41 s

第2節 Malfilamentoside A (36) の構造

Malfilamentoside A (36)は融点 188℃の無色針状晶であり、高分解能 CI-MS より偽分子イオンピーク $C_{26}H_{30}NO_8$ が得られたことから、36 の分子式を $C_{26}H_{29}NO_8$ (不飽和度: 13) と決定した。化合物 36 は IR スペクトルから、エステル基 (1780 cm^{-1}) および、アミド由来のケトン基 (1610 cm^{-1}) の存在が示唆された。 ^1H 、 ^{13}C -NMR および HMQC スペクトルから 34 と同様の 2 個の一置換ベンゼンの存在を示唆する相関 [$\delta_C\ 127.5 / \delta_H\ 7.28$ (1H, m) - $\delta_C\ 128.9 / \delta_H\ 7.44$ (2H, m) - $\delta_C\ 128.5 / \delta_H\ 7.14$ (2H, m) および $\delta_C\ 129.5 / \delta_H\ 7.44$ (1H, m), $\delta_C\ 128.8 / \delta_H\ 7.52$ (2H, m), $\delta_C\ 129.3 / \delta_H\ 7.34$ (2H, m)] が観測された。また、34 の $\delta_C\ 71.1 / \delta_H\ 4.69$ (2H, s) に観測された 5 位のメチレンシグナルが 36 では $\delta_C\ 100.8 / \delta_H\ 5.76$ (1H, s) のメチンシグナルへ、また、34 では 6 位のメチレンシグナル [$\delta_C\ 34.0 / \delta_H\ 3.96$ (2H, s)] が 36 では $\delta_C\ 32.6 / \delta_H\ 3.82$ (1H, d, $J = 15.6\text{ Hz}$), $\delta_H\ 4.05$ (1H, d, $J = 15.6\text{ Hz}$) に観測された。さらに 36 では糖の存在を示唆する 7H 分のシグナル [$\delta\ 5.03$ (1H, d, $J = 3.4\text{ Hz}$), $\delta\ 4.08$ (1H, m), $\delta\ 3.64$ (1H, m), $\delta\ 3.64$ (1H, m), $\delta\ 3.98$ (1H, m), $\delta\ 3.65$ (1H, dd, $J = 10.7\text{ Hz}$, $J = 3.4\text{ Hz}$), $\delta\ 3.75$ (1H, dd, $J = 10.7\text{ Hz}$, $J = 4.3\text{ Hz}$)] が観測されたことから、化合物 36 は 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (34) の配糖体ではないかと推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。(Fig.10)

HMBC スペクトルより、5 位のメチン水素のシグナル [$\delta\ 5.76$ (s)] から C-2 ($\delta\ 169.9$)、C-4 ($\delta\ 155.7$) および、C-1''' ($\delta\ 98.4$) へ、6 位のメチレン水素 [$\delta\ 3.82$, d, $J = 15.6\text{ Hz}$), ($\delta\ 4.05$, d, $J = 15.6\text{ Hz}$)] から C-3 ($\delta\ 136.0$)、C-4、C-5 ($\delta\ 100.8$)、C-1' ($\delta\ 131.1$) および C-2' ($\delta\ 128.5$) へ、また、2''位のベンゼン環水素 ($\delta\ 7.34$, m) から C-3 へ、それぞれ相関が見られた。このことから、化合物 36 は 34 と同様のゲニン構造を持ち、5 位に糖が結合している構造と決定した。

化合物 36 の糖については分子式 $C_{26}H_{29}NO_8$ (不飽和度: 13) と 36 のゲニンの分子式 $C_{17}H_{13}O_3$ を考慮すると、糖部分は分子式 $C_9H_{16}NO_5$ で構成されていると考えられた。この分子式から 36 の糖部は何らかの官能基で修飾された単糖であると考え、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて、 $\delta\ 5.03$ (d, $J = 3.4\text{ Hz}$) のメチン水素のシグナルから $\delta\ 4.08$ (m) のメチン水素へ、 $\delta\ 4.08$ (m) のメチン水素から δ

3.64 (brd, $J = 9.8$ Hz) のメチン水素へ、 δ 3.64 (brd, $J = 9.8$ Hz) の水素シグナルから δ 3.98 (m) のメチン水素へ、 δ 3.98 (m) のメチレン水素から [δ 3.65 (dd, $J = 10.7$ Hz, $J = 3.4$ Hz) および δ 3.75 (dd, $J = 10.7$ Hz, $J = 4.3$ Hz)] のメチレン水素へそれぞれ相関が見られたことおよび HMBC スペクトルで 1'' 位のメチン水素 (δ 5.03) から C-5''' (δ 71.2) への相関が観測されたことから、**36** の糖は pyranose であると考えた。また、6''' 位のメチレン水素 [δ 3.65 (dd, $J = 10.7$ Hz, $J = 3.4$ Hz) および δ 3.75 (dd, $J = 10.7$ Hz, $J = 4.3$ Hz)] から δ 59.5 のメチル炭素への相関から 6-OCH₃ の存在が示唆され、2''' 位のメチン水素 (δ 4.08, m) および、アセチル基のメチル水素 (δ 1.93, s) からアセチル基のカルボニル炭素 δ 171.5 (—COCH₃) への相関から 2''' 位にアセチルアミノ基の存在が示唆された。以上の結果から **36** の糖部は六炭糖であり、2''' 位にアセチルアミノ基を、6 位にメトキシ基を有すると決定した。

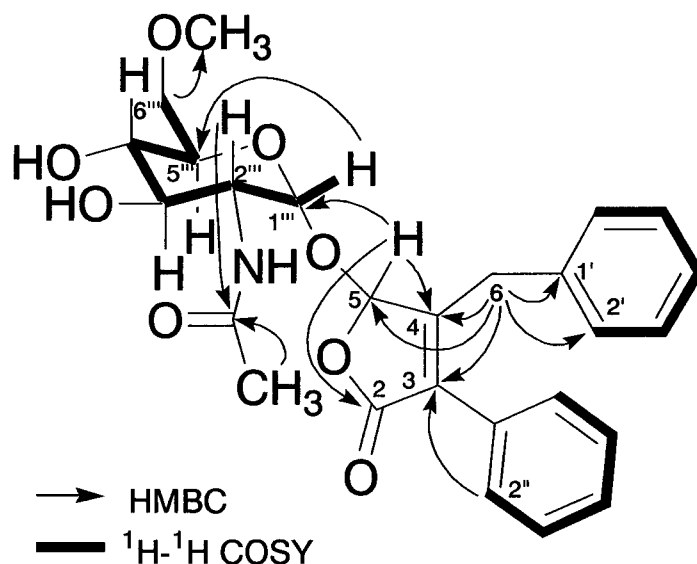


Fig.10 HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of malfilamentoside A (**36**)

続いて、糖部の各メチンのスピン結合定数より、 $J_{H2''-H3''}$ が 9.8 Hz、 $J_{H4''-H5''}$ が 9.8 Hz のスピン結合定数を示したので、6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine と決定した。

また、6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine が D 体であるか L 体であるか調べるために酸加水分解を行い、(Fig.11) 6-*O*-methyl-glucosamine (42) を得た。化合物 42 の旋光度は $[\alpha]_D = +62.9^\circ$ であり、文献値 $[\alpha]_D = +68^\circ$ ²²⁾ とほぼ一致していることから、36 の糖部は 6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine であると決定した。

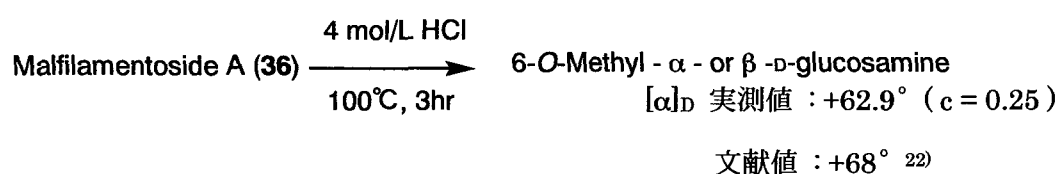


Fig.11 Acid hydrolysis of malfilamentoside A (36)

さらに、糖部の 1''位の水素と 2''位の水素間のスピン結合定数より(Fig.12)、 $J_{H1''-H2''}$ が 3.4 Hz であることから α -アノマーであると決定した。以上の結果から malfilamentoside A (36) の構造を Fig.6 のように決定した。しかしながら、6 位の水酸基の立体化学に関しては残念ながら決定には至らなかった。

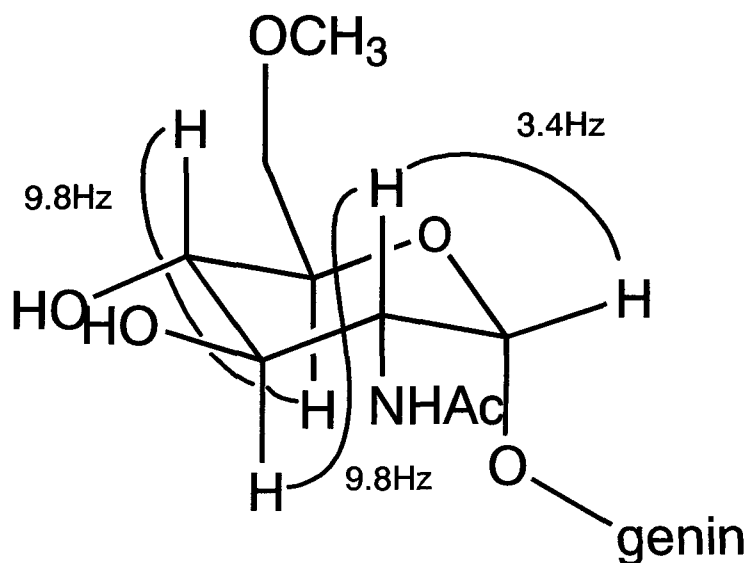


Fig.12 Coupling constants of Sugar part of malfilamentoside A (36)

第3節 Malfilamentoside B (37) の構造

Malfilamentoside B (37) は無色非晶形物質で、高分解能 ESI-TOF-MS より分子式 $C_{26}H_{29}NO_9$ と決定した。本化合物と malfilamentoside A (36) の 1H -および ^{13}C -NMR スペクトルをと比較したところ、36 で観測された 6 位のシグナル δ_C 32.6 / [δ_H 3.82 (d, $J = 15.6$ Hz), δ_H 4.05 (d, $J = 15.6$ Hz)] が消失し、新たに δ_C 70.0 / δ_H 5.95 (d, $J = 4.9$ Hz) が観測された以外、ほぼ一致していた。また、37 と 36 の分子式を比較すると 37 は 36 に対して酸素原子が 1 個増加していることから 6 位が酸化された化合物、すなわち 36 の 6-OH 体であると推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析結果から、37 のゲニン部の平面構造を Fig.13 のように、malfilamentoside A (36) の 6 位に水酸基のついた構造と決定した。

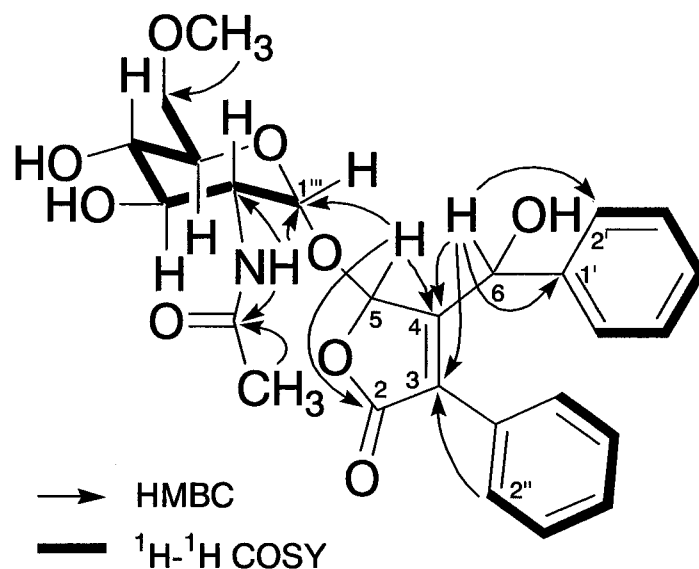


Fig.13 HMBC correlations of malfilamentoside B (37)

糖部の化学構造は malfilamentoside A (36)と同様に ^1H -NMR スペクトルでのスピン結合定数の詳細な検討 ($J_{\text{H}2'''\text{-H}3'''} = 10.7 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}3'''\text{-H}4'''} = 10.1 \text{ Hz}$, $J_{\text{H}4'''\text{-H}5'''} = 10.1 \text{ Hz}$) により 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine と決定し、(Fig.14) 酸加水分解により得られた 6-*O*-methyl-D-glucosamine (42) の旋光度が $+65.3^\circ$ であることから、文献値との比較により決定した。また、 $1'''$ 位と $2'''$ 位のスピン結合定数は $J_{\text{H}1'''\text{-H}2'''} = 3.4 \text{ Hz}$ の値を示したので、 α -アノマーと決定した。以上から malfilamentoside B (37)の化学構造を Fig.6 と決定した。

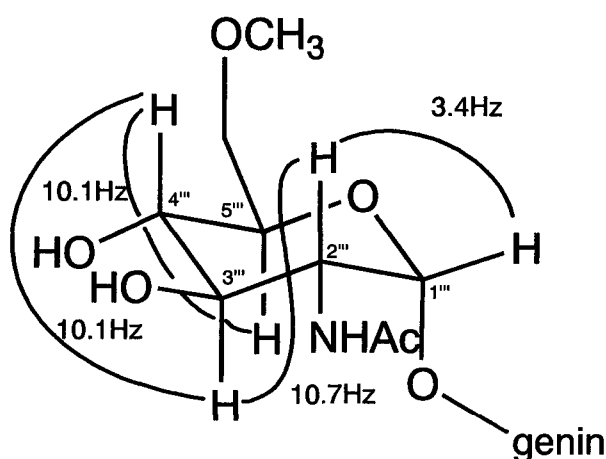


Fig.14 Coupling constants of Sugar part of malfilamentoside B (37)

第3章 Malbrancheoside 類の構造決定

本章では、第1章で述べた MeOH 画分から分離した malbrancheoside A (38) - D (41) の化学構造について述べる。第1節では Malbrancheoside A (38) の構造解析について、第2節では malbrancheoside B (39) - D (41) に関する構造解析について述べる。

第1節 Malbrancheoside A (38) の構造

Malbrancheoside A (38) は融点 185 °C の無色結晶性粉末 (AcOEt - CH₂Cl₂ より再結晶) であり、その分子式は FAB-MS および元素分析より C₄₈H₈₀N₂O₁₅ (不飽和度 : 10) と決定した。また、TLC 上でアニスアルデヒド-硫酸試薬噴霧後加熱することで緑褐色に呈色すること、¹H-、¹³C-NMR および dept スペクトルより (Fig.15, 16, Table.2) 糖の存在を示唆する 14H 分のシグナルが確認できた。[δ_C 91.9 / δ_H 5.16 (1H, d, J = 4 Hz), δ_C 56.3 / δ_H 3.76 (1H, m), δ_C 72.8 / δ_H 3.59 (1H, m), δ_C 71.9 / δ_H 3.28 (1H, m), δ_C 72.7 / δ_H 3.86 (1H, m), δ_C 73.6 / δ_H 3.55 (2H, m), δ_C 93.5 / δ_H 5.24 (1H, d, J = 4 Hz), δ_C 56.1a / δ_H 3.76 (1H, m), δ_C 72.8 / δ_H 3.59 (1H, m), δ_C 72.9 / δ_H 3.28 (1H, m), δ_C 72.6 / δ_H 3.87 (1H, m), δ_C 73.7 / δ_H 3.55 (2H, m)] このことから、2 個の糖を有する配糖体であると推定し、まず、38 の genin 部の化学構造を決定するために、酸加水分解を行い genin の分離・精製を試みた。その結果、同じ分子式 C₃₀H₅₀O₅ を持つ 2 個の化合物 43 および 44 が得られた。(Fig.17) また、化合物 44 は酸性条件下で 43 に変化した。そこで化学的に安定であると考えられる 43 の構造について検討した。

Table.2 ^1H - and ^{13}C -NMR Assignments for malbrancheoside A (38)

Carbon 38			Carbon 38		
No.	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	No.	δ_{C}	δ_{H} (Hz)
1	39.4	1.19(m), 1.60(m)	1'	91.9	5.16 (d, 4)
2	22.7	1.53(m), 1.69(m)	2'	56.3a	3.76 (m)
3	86.6	3.30(m)	3'	72.8	3.59 (m)
4	80.3		4'	71.9	3.28 (m)
5	92.7	2.78(d,10)	5'	72.7b	3.86 (m)
6	68.5	3.72(m)	6'	73.6c	3.55 (m), 3.55 (m)
7	48.3	1.20(m), 2.00(dd,11,4)	6'-OMe	59.9	3.33 (s)
8	45.7		<u>CO-CH₃</u>	173.9	
9	59.4	1.32(m)	CO- <u>CH₃</u>	23.0	1.93(s)
10	36.7		1''	93.5	5.24(d,4)
11	20.2	1.40(m), 1.54(m)	2''	56.1a	3.76(m)
12	26.0	1.63(m), 1.80(m)	3''	72.8	3.59(m)
13	59.0	1.96(m)	4''	72.9	3.28(m)
14	135.5		5''	72.6b	3.87(m)
15	32.4	1.98(m), 2.18(m)	6''	73.7c	3.55(m), 3.55(m)
16	25.9	1.63(m), 1.63(m)	6''-OMe	59.9	3.33(s)
17	83.7	3.18(dd,11,4)	<u>CO-CH₃</u>	173.6	
18	35.7		CO- <u>CH₃</u>	23.0	1.88(s)
19	134.1	5.16(s)			
20	38.5	1.36(m), 1.61(m)			
21	23.9	1.54(m), 1.60(m)			
22	86.6	3.41(d, 11,3)			
23	80.2				
24	23.4	1.15(s)			
25	23.4	1.20(s)			
26	20.8	0.94 (s)			
27	17.1	0.75(s)			
28	14.4	0.90(s)			
29	22.7	1.20(s)			
30	22.7	1.20(s)			

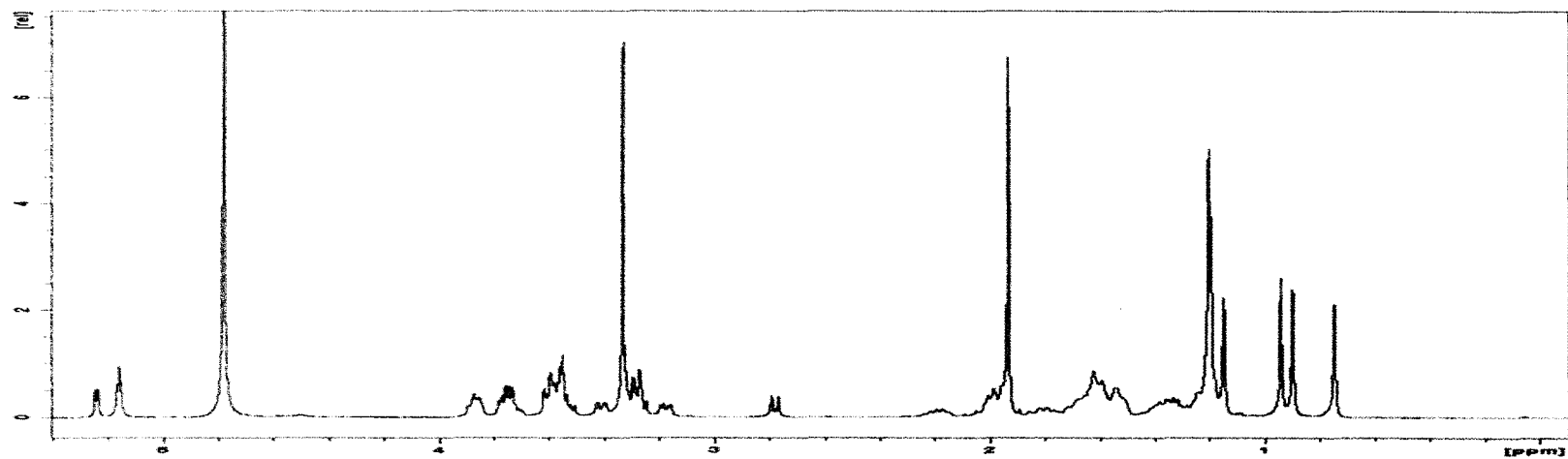


Fig.15 ^1H -NMR spectrum of malbrancheoside A (38)

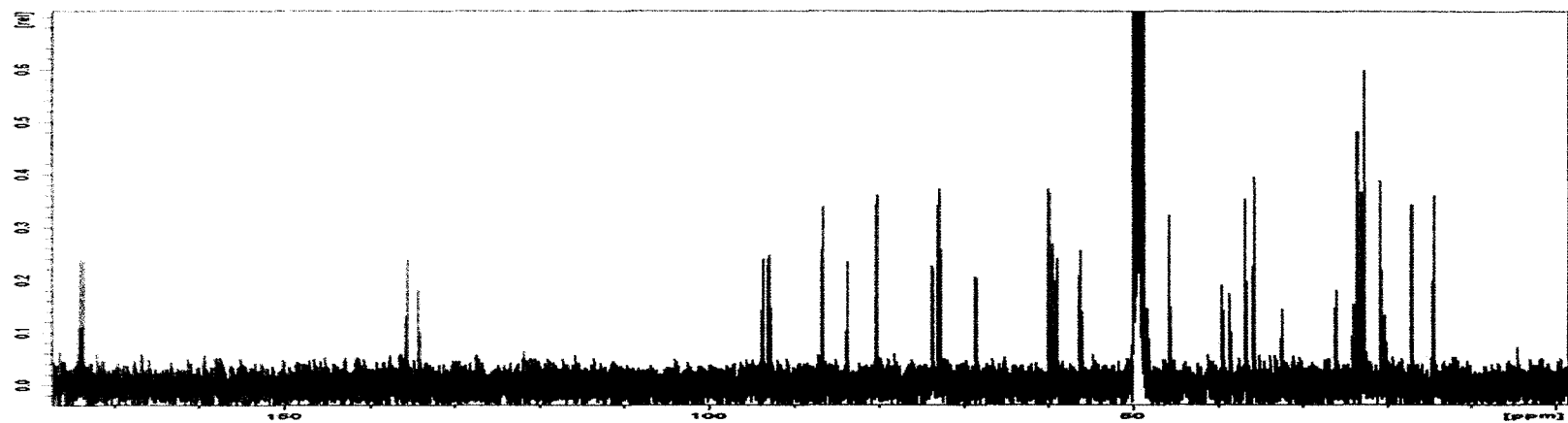


Fig.16 ^{13}C -NMR spectrum of malbrancheoside A (38)

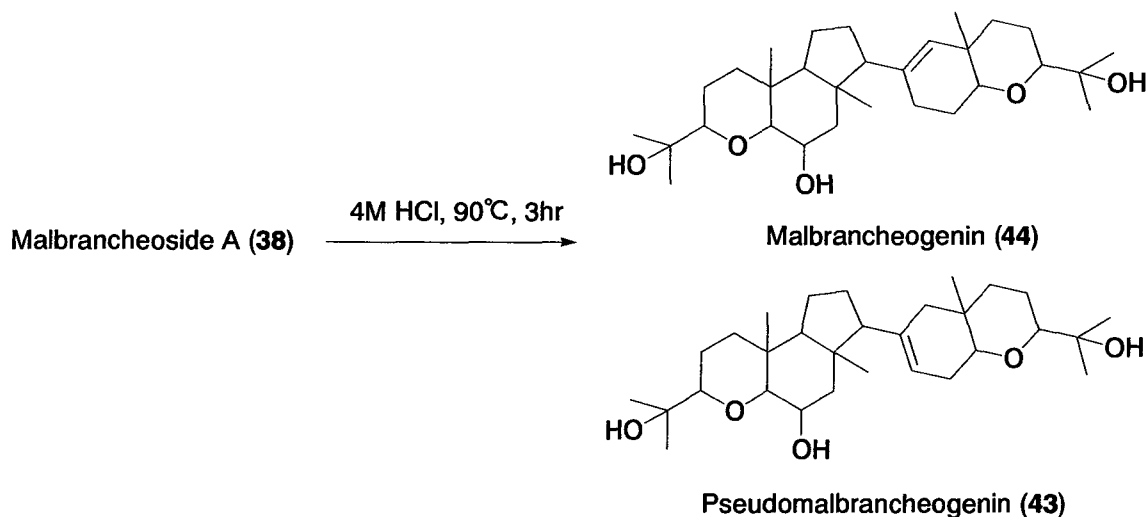


Fig.17 Hydrolysis and structures of pseudomalbrancheogenin (43) and malbrancheogenin (44)

・ Pseudomalbrancheogenin (43) の構造解析

Pseudomalbrancheogenin (43) は融点 227°C の無色結晶性粉末で、高分解能 EI-MS より分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ (不飽和度 : 6) と決定した。 ^1H -、 ^{13}C -NMR および dept スペクトルから、(Table.3) 7 個のメチル基 [$\delta_{\text{C}} 23.7 / \delta_{\text{H}} 1.17$ (s), $\delta_{\text{C}} 26.0 / \delta_{\text{H}} 1.17$ (s), $\delta_{\text{C}} 16.3 / \delta_{\text{H}} 0.88$ (s), $\delta_{\text{C}} 16.7 / \delta_{\text{H}} 0.80$ (s), $\delta_{\text{C}} 13.3 / \delta_{\text{H}} 0.91$ (s), $\delta_{\text{C}} 24.2 / \delta_{\text{H}} 1.19$ (s) および $\delta_{\text{C}} 26.6 / \delta_{\text{H}} 1.24$ (s)]、9 個のメチレン基 { $\delta_{\text{C}} 37.5 / [\delta_{\text{H}} 1.62$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.66$ (m)], $\delta_{\text{C}} 21.1 / [\delta_{\text{H}} 1.43$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.75$ (m)], $\delta_{\text{C}} 45.7 / [\delta_{\text{H}} 1.27$ (m), $\delta_{\text{H}} 2.08$ (dd, $J = 5$ Hz, $J = 12$ Hz)], $\delta_{\text{C}} 18.7 / [\delta_{\text{H}} 1.34$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.53$ (m)], $\delta_{\text{C}} 25.3 / [\delta_{\text{H}} 1.66$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.80$ (m)], $\delta_{\text{C}} 29.0 / [\delta_{\text{H}} 1.97$ (brdd, $J = 11$ Hz, $J = 13$ Hz), $\delta_{\text{H}} 2.21$ (dd, $J = 7$ Hz, $J = 13$ Hz)], $\delta_{\text{C}} 45.1 / [\delta_{\text{H}} 1.68$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.88$ (d, $J = 18$ Hz)], $\delta_{\text{C}} 38.0 / [\delta_{\text{H}} 1.23$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.60$ (m)] および $\delta_{\text{C}} 22.3 / [\delta_{\text{H}} 1.42$ (m), $\delta_{\text{H}} 1.60$ (m)] }、1 個の炭素-炭素二重結合の存在を示す sp^2 炭素 [$\delta_{\text{C}} 134.9$, $\delta_{\text{C}} 119.9 / \delta_{\text{H}} 5.32$ (brdd, $J = 2$ Hz, $J = 2$ Hz)]、酸素に隣接した 5 つのメチンシグナル [$\delta_{\text{C}} 85.1 / \delta_{\text{H}} 3.27$ (dd, $J = 11$ Hz, $J = 3$ Hz), $\delta_{\text{C}} 90.9 / \delta_{\text{H}} 2.86$ (d, $J = 10$ Hz), $\delta_{\text{C}} 67.3 / \delta_{\text{H}} 3.84$ (ddd, $J = 5$ Hz, $J = 10$ Hz, $J = 10$ Hz), $\delta_{\text{C}} 79.2 / \delta_{\text{H}} 3.30$ (dd, $J = 6$ Hz, $J = 11$ Hz), $\delta_{\text{C}} 84.4 / \delta_{\text{H}} 3.17$ (dd, $J = 2$ Hz, $J = 11$

Hz)] を含むメチンが8つ、および、2つの酸素原子に隣接した炭素2個 (δ 72.2, δ 71.9) を含む5つの4級炭素が観測された。化合物 43 は不飽和度6であることから、オレフィンを一つ有する5環性化合物であると結論づけた。以上をもとに各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。(Fig.18)

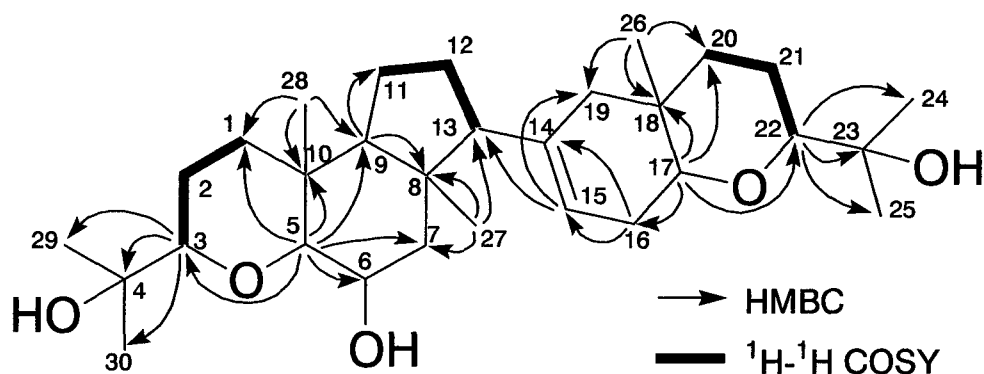


Fig.18 HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of pseudomalbrancheogenin (43)

^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて2位のメチレン水素 [δ 1.43 (m), δ 1.75 (m)] から1位のメチレン水素 [δ 1.62 (m), δ 1.66 (m)] および3位のメチレン水素 [δ 3.27 (dd, J = 11 Hz, J = 3 Hz)] へ、また、12位のメチレン水素 [δ 1.66 (m), δ 1.80 (m)] から11位のメチレン水素 [δ 1.34 (m), δ 1.53 (m)] および13位のメチン水素 [δ 1.92 (dd, J = 11 Hz, J = 10 Hz)] へ、それぞれ相関が観測された。HMBC スペクトルでは、 δ 0.91 (s, 28- H_3) のメチル水素のシグナルから C-1 (δ 37.5)、C-9 (δ 58.1) および C-10 (δ 35.0) へ、 δ 0.80 (s, 27- H_3) のメチル水素のシグナルから C-7 (δ 45.7)、C-8 (δ 43.8)、および、C-13 (δ 56.7) へ、 δ 2.86 (d, J = 10 Hz, 5-H) のメチン水素から C-1、C-6 (δ 67.3)、C-7、C-9 および C-10 へ、 δ 1.35 (m, 9-H) のメチン水素のシグナルから C-8 および C-11 (δ 18.7) へ相関が観測されたので、三環性の部分構造を持つことが示唆された。また、 δ 3.27 (dd, J = 11 Hz, 3 Hz, 3-H) のメチン水素のシグナルから観測される C-4、C-29 (δ 24.2)、C-30 (δ 26.6) への相関から 2-propanol 基の存在が示唆され、その結合位置は3位と決定した。以上のことから、化合物 43 は3位に 2-propanol 基を持つ3環性 (6/6/5) の部分構造 (部分構造 A) を有すると決定した。

次に、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて、20 位のメチレン水素 [δ 1.23 (m), δ 1.60 (m)] から 22 位のメチン水素 [δ 3.17 (dd, $J = 2$ Hz, $J = 11$ Hz)] までの相関が観測された。HMBC スペクトルで δ 0.88 (s, 26- H_3) のメチル基のシグナルから C-18 (δ 32.2)、C-19 (δ 45.1) および C-20 (δ 38.0) へ、 δ 3.30 (dd, $J = 11$ Hz, $J = 6$ Hz, 17-H) のメチン水素から C-16 (δ 29.0)、C-18、C-20 および、C-22 (δ 84.4) へ、 δ 5.32 (brdd, $J = 2$ Hz, $J = 2$ Hz, 15-H) のオレフィン水素のシグナルから C-13 および C-19 へ、 δ 1.97 (brdd, $J = 11$ Hz, $J = 13$ Hz, 15-H) および δ 2.21 (dd, $J = 7$ Hz, $J = 13$ Hz, 15-H) のメチレン水素から C-14 および C-15 (δ 119.9) への相関が観測されたことから 43 は 2 環性の部分構造 B を有し、また、 δ 3.17 (dd, $J = 11$ Hz, $J = 7$ Hz, 22-H) のメチン水素のシグナルから C-23 (δ 71.9)、C-24 (δ 23.7)、C-25 (δ 26.0) への相関が観測されたことから 22 位に 2-propanol 基の存在が示唆された。さらに、部分構造 B にある 15 位のオレフィン水素から、部分構造 A を構成する 13 位の炭素に対して HMBC の相関が観測されたことから 43 は部分構造 A と B が 13 位と 14 位で炭素 - 炭素単結合した 5 環性化合物であると決定した。

Table.3 ¹H- and ¹³C-NMR Assignments for

pseudomalbrancheogenin (43) and malbrancheogenin (44)

Carbon		Pseudomalbrancheogenin (43)		Malbrancheogenin (44)	
No.	δ _C	δ _H (Hz)	δ _C	δ _H (Hz)	
1	37.5	1.66(m), 1.62(m)	37.5	1.63(m), 1.19(m)	
2	21.1	1.75(m), 1.43(m)	21.1	1.75(m), 1.44(m)	
3	85.1	3.27(dd,11,3)	85.1	3.22(m)	
4	72.2		72.0 ^b		
5	90.9	2.86(d, 10)	90.9	2.87(d,10)	
6	67.3	3.84(ddd,10,10,5)	67.3	3.84(ddd,11,10,5)	
7	45.7	2.08(dd,12,5), 1.27(m)	45.4	2.11(dd,12, 5), 1.23(m)	
8	43.8		44.1		
9	58.1	1.35(m)	57.8	1.31(m)	
10	35.0		35.0		
11	18.7	1.53(m), 1.34(m)	18.9	1.56(m), 1.35(m)	
12	25.3	1.80(m), 1.66(m)	24.5 ^a	1.68 ^c (m), 1.68(m)	
13	56.7	1.92(dd,11,10)	57.2	1.97(m)	
14	134.9		133.7		
15	119.9	5.32(brdd,2,2)	30.6	2.23(ddd,10,9,9), 1.97(m)	
16	29.0	2.21(dd,13,7), 1.97(brdd,13,11)	24.4 ^a	1.80 ^c (m), 1.68(m)	
17	79.2	3.30(dd,11,6)	81.8	3.22(m)	
18	32.2		34.3		
19	45.1	1.88(d,18), 1.68(m)	132.7	5.16(s)	
20	38.0	1.60(m), 1.23(m)	36.8	1.63(m), 1.35(m)	
21	22.3	1.60(m), 1.42(m)	22.2	1.65(m), 1.44(m)	
22	84.4	3.17(dd,11,2)	85.1	3.22(m)	
23	71.9		72.0 ^b		
24	23.7	1.17(s)	23.8	1.18 ^d (s)	
25	26.0	1.17(s)	26.1	1.19 ^d (s)	
26	16.3	0.88(s)	20.0	0.96(s)	
27	16.7	0.80(s)	16.3	0.75(s)	
28	13.3	0.91(s)	13.3	0.90(s)	
29	24.2	1.19(s)	24.2	1.19 ^d (s)	
30	26.6	1.24(s)	26.6	1.24(s)	

^{a~f} The assignments may be reversed

Pseudomalbrancheogenin (43) の相対配置を決定するため、NOESY スペクトルの測定を行った。(Fig.19) その結果、ABC 環上にある 3 位のメチン水素 (δ 3.27, dd, $J = 11$ Hz, $J = 3$ Hz) と 5 位のメチン水素 (δ 2.86, d, $J = 10$ Hz)、5 位のメチン水素と 9 位のメチン水素 (δ 1.35, m)、9 位のメチン水素と 13 位のメチン水素 (δ 1.92) への相関が観察された。また、6 位のメチン水素と 27 位のメチル水素 (δ 0.80, s)、28 位のメチル水素と 27 位のメチル水素にそれぞれ相関が観測された。このことから A / B / C 環は trans - anti - trans 配置であると決定した。次に DE 環については、26 位のメチル水素 (δ 0.88, s) と 16 位の β -水素 δ 2.21 (dd, $J = 13$ Hz, $J = 7$ Hz)、16 位の α -水素 δ 1.97 (brdd, $J = 13$ Hz, $J = 11$ Hz) と 17 位のメチン水素 (δ 3.30, dd, $J = 11$ Hz, $J = 6$ Hz)、17 位のメチン水素と 22 位のメチン水素 (δ 3.17, dd, $J = 11$ Hz, $J = 2$ Hz) にそれぞれ相関が見られた。このことから D / E 環は trans 配置であると決定した。

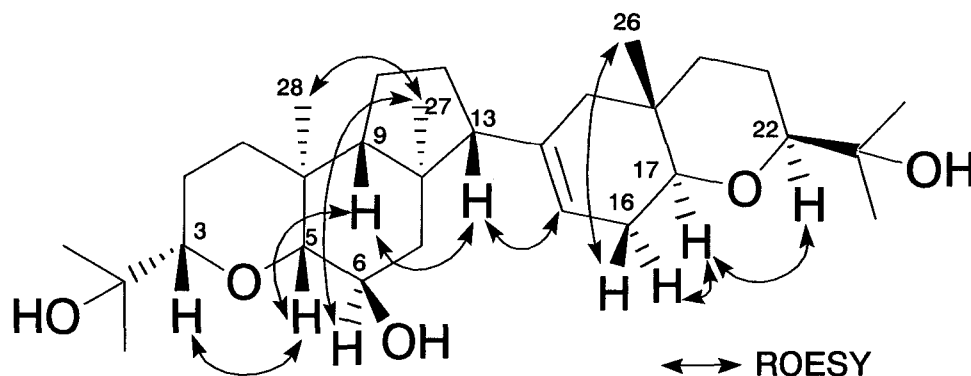


Fig.19 Important NOESY correlations of pseudomalbrancheogenin (43)

ABC 環の絶対配置を決定するため、6 位の第二級アルコールを利用した改良 Mosher 法²³⁾,²⁴⁾を試みた。Pseudomalbrancheogenin (43) に (*S*)-(+)-もしくは (*R*)-(-)-MTPA-Cl を加え、pyridine 中、室温で 24 時間反応した。(Fig.20) 得られた (*S*)-MTPA エステル体 (45) と (*R*)-MTPA エステル体 (46) の ^1H -NMR スペクトルの化学シフト値から 45 と 46 の化学シフト値の差 (Δ Hz) を計算したところ、Fig. 21 のようになった。この結果から 43 の ABC 間の立体化学は (3*S*), (5*R*), (6*R*), (8*S*), (9*R*), (10*R*), (13*S*) と決定した。

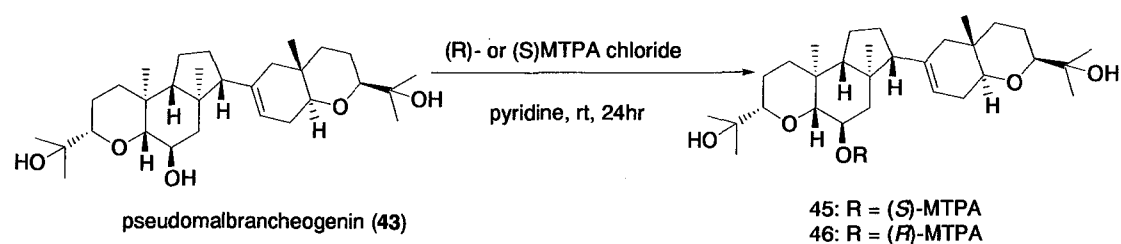


Fig.20 Reaction of pseudomalbrancheogenin (43)

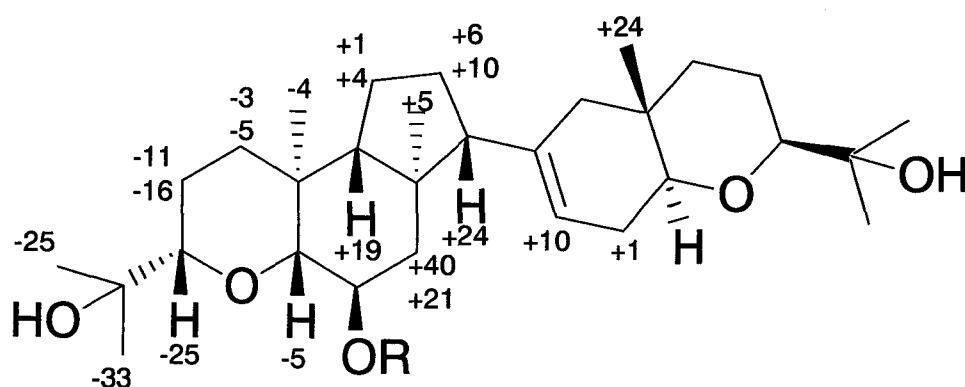


Fig.21 Differences of Chemical Shifts ($\Delta\delta$ in Hz) between
(S)- and (R)- MTPA esters of Pseudomalbrancheogenin

・ Malbrancheogenin (44) の構造解析

Malbrancheogenin (44) は融点 183 °C の無色結晶性粉末 (EtOH·H₂O から再結晶) で高分解能 EI-MS より C₃₀H₅₀O₅ と決定した。44 と 43 の ¹H および ¹³C-NMR スペクトルの比較から、(Table.3) オレフィン炭素の化学シフト値 (43 : δ 119.9, δ 134.9, 44 : δ 132.7, δ 133.7) が若干異なり、また、オレフィン水素が 43 : δ 5.32 (brdd, J = 2 Hz, J = 2 Hz) から 44 : δ 5.16 (s) へ変化した以外はほぼ一致していた。この結果から 44 は 43 の D 環にあるオレフィンの位置のみが異なる構造と推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。(Fig.22)

化合物 44 の HMBC スペクトルから 26 位のメチル水素 (δ 0.96, s) から C-17 (δ 81.8)、

C-18 (δ 34.3) C-19 (δ 132.7) および C-20 (δ 36.8) へ、17 位のメチン水素 (δ 3.22, m) からは C-16 (δ 24.4)、C-19 (δ 132.7)、C-20 および、C-22 (δ 85.1) へ相関が観察された。また、19 位のオレフィン水素 (δ 5.16, s) からは C-13 (δ 57.2) および C-15 (δ 30.6) へ相関が見られた。これらの結果から malbrancheogenin (44) は pseudomalbrancheogenin (43) の 14 位 - 15 位間の二重結合が消失し、14 位 - 19 位間に新たに二重結合が形成された 43 の異性体であると決定した。

化合物 44 の立体化学については、44 が 43 へ変化することから、同様の立体化学、すなわち (3*S*), (5*R*), (6*R*), (8*S*), (9*R*), (10*R*), (13*S*) であると推定した。

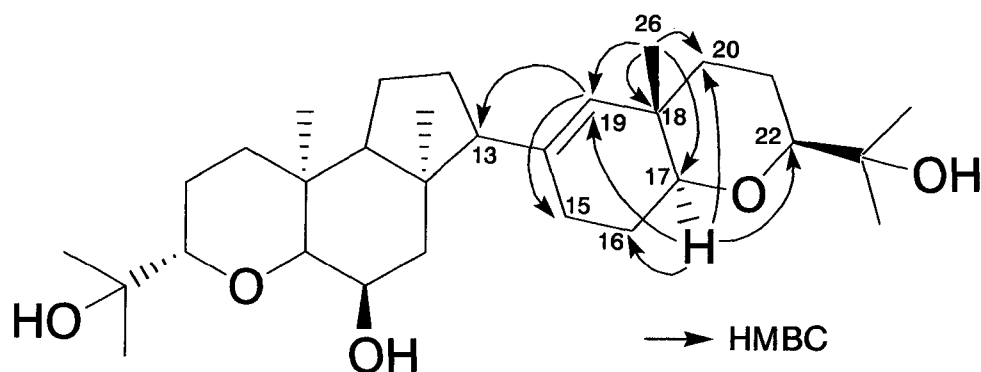


Fig.22 Important HMBC correlations of malbrancheogenin (44)

Malbrancheoside A (38) の糖部については 38 の分子式 $C_{48}H_{80}N_2O_{15}$ と 38 の 2 つのゲニン 43、44 の分子式 $C_{30}H_{50}O_5$ から糖部は分子式 $C_{18}H_{32}N_2O_{10}$ で構成されていると考えた。 1H 、 ^{13}C -NMR スペクトルでアノマーと考えられる 2 つのシグナル δ_H 5.24 (d, $J = 4$ Hz) / δ_C 93.5 および δ_H 5.16 (d, $J = 4$ Hz) / δ_C 91.9 が観測されたことから、38 は何らかの官能基を有する 2 つの糖を有していると考えた。(Table.2) そこで、化合物 38 酸加水分解反応を行ったところ 6-*O*-methyl-D-glucosamine のみ得られた。この結果から 38 の有する 2 つの糖はいずれも 6-*O*-methylglucosamine の誘導体であると考えた。化合物 38 の HMBC スペクトルの解析結果から、未だに帰属されていない 2 つのメチル基に相当するシグナル δ 3.33 (6H, s) から 6' 位および 6'' 位のメチレン炭素 (δ 73.6, δ 73.7) への相関があることから 6' 位および 6'' 位にそれぞれメトキシ基の存在が示唆され、また 2' 位および 2'' 位のメチン

水素に相当するシグナル δ 3.76 (2H, m) からアセチル基を形成する 2 つのカルボニル炭素 δ 173.9 および δ 173.6 への相関から 2' 位および 2'' 位のアミノ基がアセチル化されていると考えた。2 つの糖の結合位置は HMBC スペクトルで 1' 位および 1'' 位のメチン水素 [δ 5.16 (d, $J = 4$ Hz), δ 5.24 (d, $J = 4$ Hz)] から 4 位および 23 位の四級炭素 (δ 80.3 および δ 80.2) への相関が観測されたことから、2 つの糖の結合位置はそれぞれ 4 位および 23 位であると決定した。また、44 が酸性条件下 43 に変化することから真性ゲニンは 44 ではないかと推測していたが、38 の各種二次元 NMR スペクトルの結果からも、真性ゲニンは malbrancheogenin (43) と支持された。

次に、 ^1H -NMR スペクトルのスピン結合定数の詳細な解析結果の検討から 2 つの 6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine の 1' 位と 2' 位および 1'' 位と 2'' 位のメチン水素のスピン結合定数がそれぞれ $J_{\text{H}1'\text{-H}2'} = 4$ Hz、 $J_{\text{H}1''\text{-H}2''} = 4$ Hz であることから、どちらの糖も α -アノマー体であると考えた。以上の結果から、malbrancheogenin (38) は A/B/C 環を有する部分構造 A と D/E 環を有する部分構造 B とが 13 位と 14 位で単結合した 5 環性化合物であり、4 位および 23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- α -D-glucosamine がエーテル結合した構造と決定した。(Fig.23)

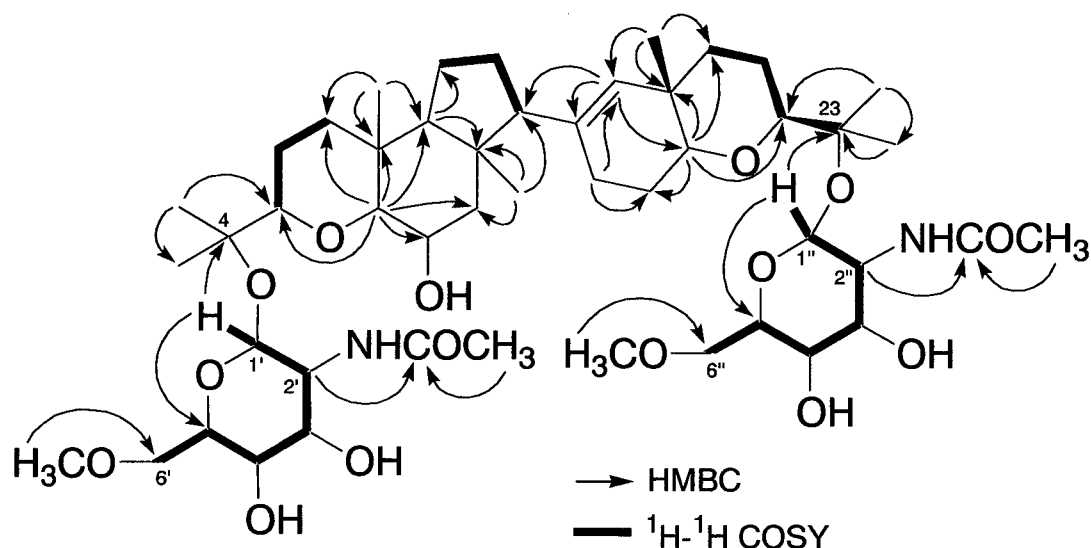


Fig.23 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of malfilamentoside A (38)

第 2 節 Malbrancheoside B (39) - D (41) の構造

・ Malbrancheoside B (39) 化学構造

Malbrancheoside B (39) は融点 152℃の結晶性粉末で高分解能 CI-MS より分子式 $C_{36}H_{60}O_{10}$ と決定した。化合物 39 は 1H 、 ^{13}C -NMR および dept スペクトルを 38 と比較した結果、(Fig.24,25,26, Table.4) 38 の 2 つのアノマー水素 [δ 5.16 (d, $J = 4$ Hz), δ 5.24 (d, $J = 4$ Hz)] が消失し、新たに δ 4.84 (brs) のピークが観測された。また、4 位の炭素シグナルが δ 80.3 (38) から δ 73.9 (39) へ、高磁場側に移動していることが観察された。また、39 にはアノマー水素を含め酸素原子に隣接した 5 つのメチン基 [δ_c 74.0 / δ_H 3.75 (m), δ_c 75.8 / δ_H 3.40 (dd, $J = 10$ Hz, $J = 4$ Hz), δ_c 68.9 / δ_H 3.51 (dd, $J = 10$ Hz, $J = 10$ Hz), δ_c 78.2 / δ_H 3.12 (dd, $J = 11$ Hz, $J = 2$ Hz)] および酸素原子に隣接したメチレン基が 1 つ [δ_c 63.3 / δ_H 3.65 (dd, $J = 11$ Hz, $J = 5$ Hz), δ_H 3.77 (dd, $J = 11$ Hz, $J = 2$ Hz)] 観測された。39 と 38 の 1H 、 ^{13}C -NMR スペクトルは上記した違い以外はほぼ同じパターンを示した。この結果から、malbrancheoside B (39) は malbrancheoside A (38) と同じゲニンを持ち、糖を 1 つ有する構造と推定した。そこで、酸加水分解を行い得られた 2 つのゲニンの旋光度が malbrancheoside A (38) から得られた pseudomalbrancheogenin (43) および malbrancheogenin (44) と一致したので、39 のゲニン部分は 38 と同一であると推定した。また、39 の各種二次元 NMR スペクトルの結果から、39 の真性ゲニンは 38 の場合と同様に malbrancheogenin (44) であると決定した。(Fig.27)

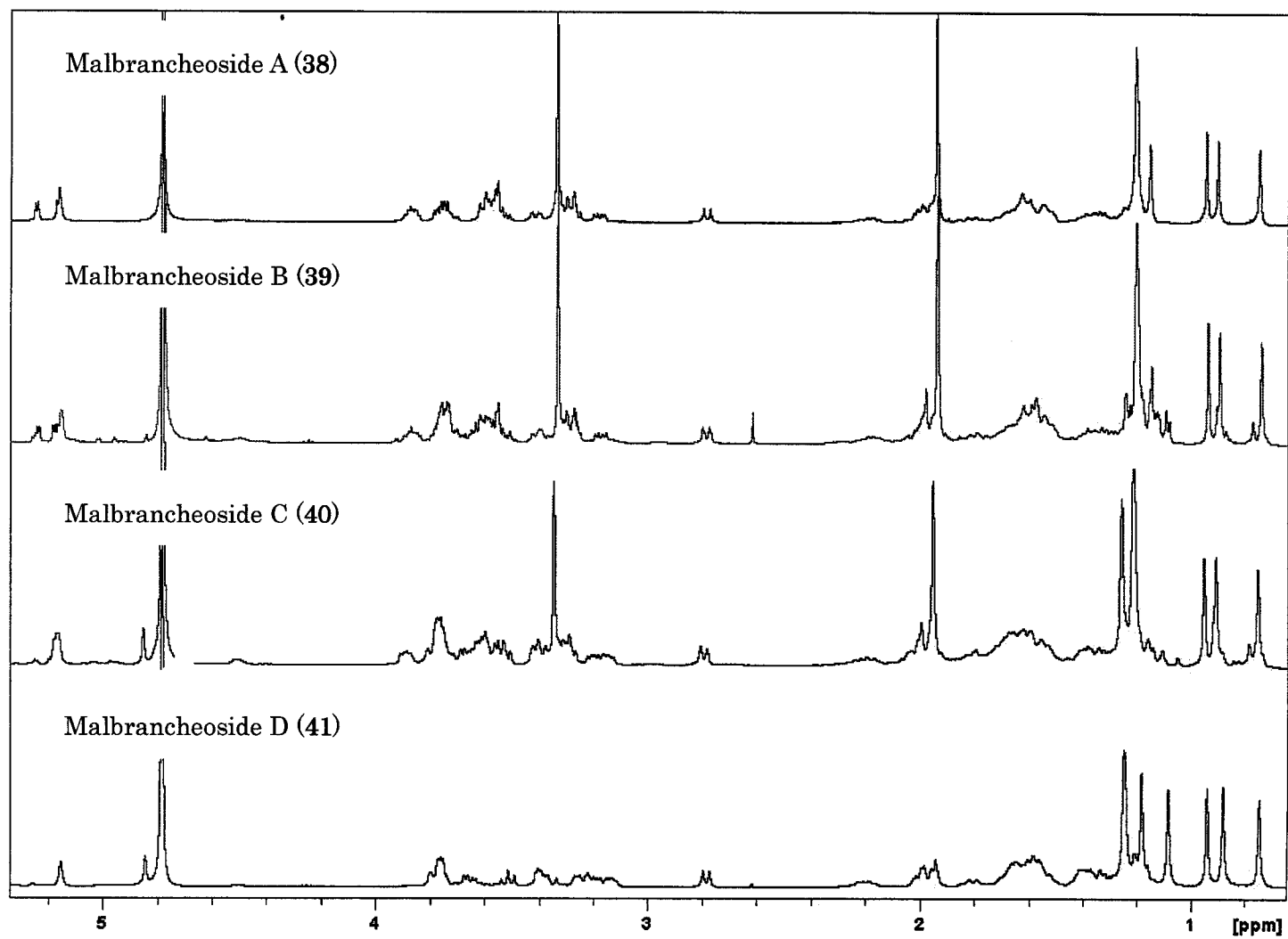


Fig.24 ^1H -NMR spectra of malbrancheoside A (38) - D (41)

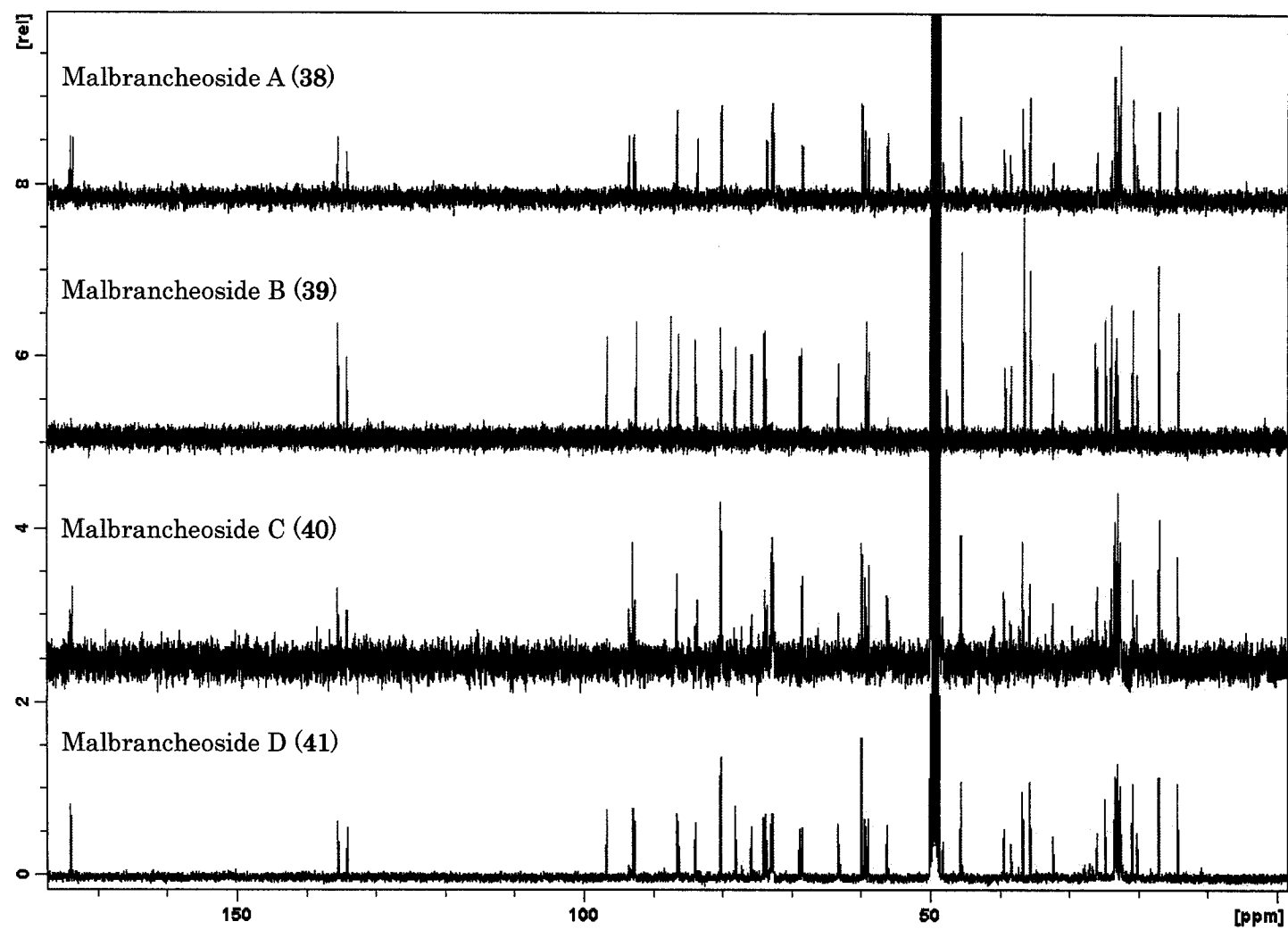


Fig.25 ^{13}C -NMR spectra of malbrancheoside A (38) - D (41)

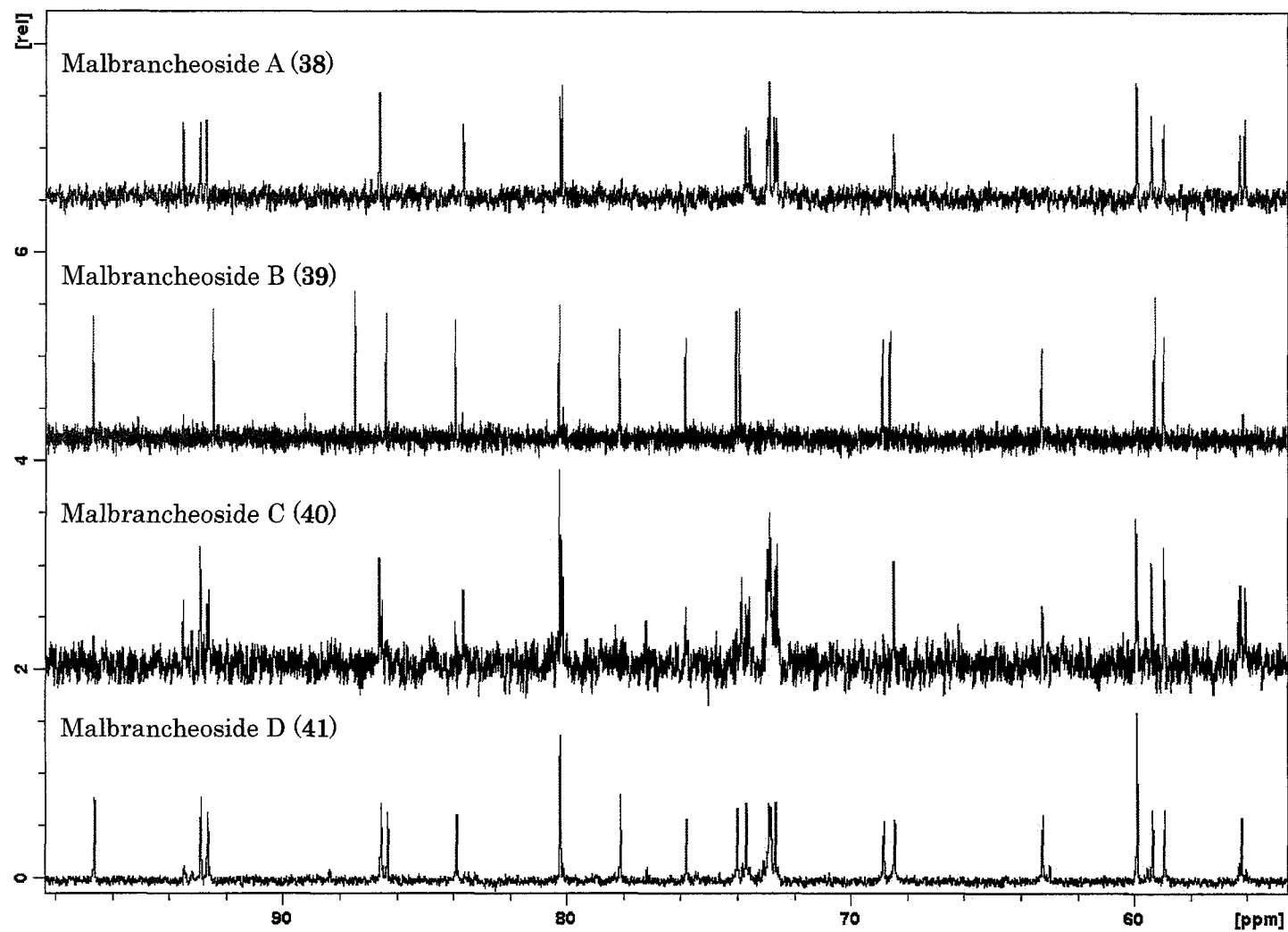


Fig.26 ^{13}C -NMR spectra (50- 100 ppm) of malbrancheoside A (38) · D (41)

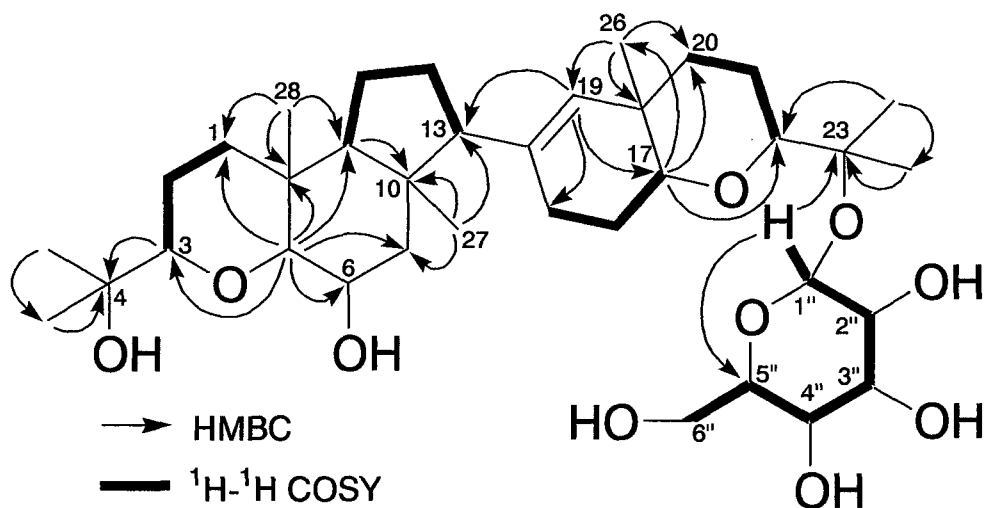


Fig.27 HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of malbrancheoside B (39)

化合物 **39** の糖部は **39** の分子式 $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$ と **39** のゲニンである **44** の分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ を考慮して、糖部は分子式 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_5$ で構成される単糖と推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った。 ^1H - ^1H COSY より 1''位のメチン水素 (δ 4.84, brs) から 2''位のメチン水素 (δ 3.75, m) へ、2''位のメチン水素から 3''位のメチン水素 (δ 3.40, m) へ、3''位のメチン水素から 4''位のメチン水素 (δ 3.51, dd, $J = 10$ Hz, $J = 10$ Hz) へ、4''位のメチン水素から 5''位のメチン水素 (δ 3.12, m) へ、5''位のメチン水素から 6''位のメチレン水素 [(δ 3.65, dd, $J = 11$ Hz, $J = 5$ Hz), (δ 3.77, m)] へそれぞれ相関が観察されたことと、HMBC スペクトルで 1''位のメチン水素から 5''位の炭素 (δ 78.2) への相関があることから、**39** の糖部は pyranose であると考えた。 ^1H -NMR スペクトルで 2''位のメチン水素と 3''位のメチン水素、3''位のメチン水素と 4''位のメチン水素、および 4''位のメチン水素と 5''位のメチン水素のスピンの結合定数 ($J_{\text{H}2''\cdot\text{H}3''} = 4$ Hz, $J_{\text{H}3''\cdot\text{H}4''} = 10$ Hz, $J_{\text{H}4''\cdot\text{H}5''} = 10$ Hz) および ROESY スペクトルで 1''位のメチン水素と 3''位のメチン水素、3''位のメチン水素と 5''位のメチン水素、5''位のメチン水素と 1''位のメチン水素の間に相関があること

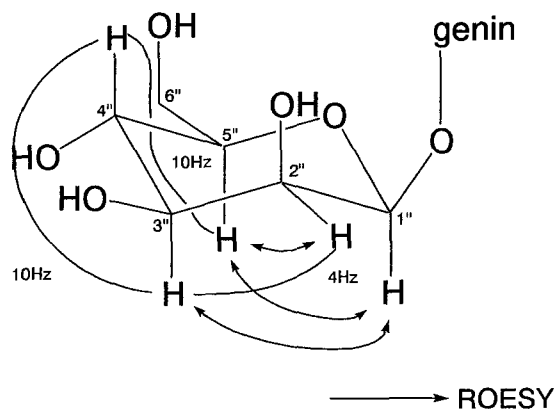


Fig.28 ROESY correlations and coupling cinstances of malbrancheoside B (35)

から、**39** の糖は mannose と決定した。(Fig.28) また、糖の結合位置は HMBC スペクトルで 1''位の水素から 23 位の四級炭素 (δ 80.2)への相関があることから E 環の 23 位の炭素とエーテル結合していると決定した。

通常、mannose や rhamnose では α -アノマー、 β -アノマーともにスピン結合定数が 1Hz 前後となり、スピン結合定数から配置を決めることが不可能である。そのため、アノマープロトンの化学シフト値および $J_{C1''-H1''}$ から決定することにした。²⁵⁾

α -アノマーなら化学シフト値は δ 5.10 - δ 5.56、 J_{C1-H1} は 164 - 166 Hz に、 β -アノマーなら化学シフト値は δ 4.67 - δ 5.00、 J_{C1-H1} は 153 - 156 Hz になるはずである。測定をした結果、本化合物の化学シフト値は δ 4.84、 J_{C1-H1} は 155.3 Hz だったので、この結果からも β -アノマーであると決定した。以上の結果から malbrancheoside B (**39**) は malbrancheoside A (**38**) と同じゲニンを有し、かつ、23 位に β -mannose が結合した構造と決定した。

Table.4 ^1H - and ^{13}C -NMR Assignment for malbrancheosides A (38) - D (41) in CD_3OD

Carbon No.	38		39		40		41	
	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Hz)	δ_{C}	δ_{H} (Hz)
1	39.4	1.19(m)	39.2	1.20(m)	39.4	1.19(m)	39.4	1.19(m)
		1.60(m)		1.58(m)		1.60(m)		1.60(m)
2	22.7	1.53(m)	23.3	1.39(m)	22.7	1.53(m)	22.5	1.54(m)
		1.69(m)		1.57(m)		1.68(m)		1.76(m)
3	86.6	3.30(m)	87.5	3.24(m)	86.6	3.31(m)	86.5	3.31(m)
4	80.3		73.9		80.2		80.2	
5	92.7	2.78(d,10)	92.5	2.78(d,10)	92.6	2.78(d,10)	92.6	2.79(d,10)
6	68.5	3.72(m)	68.6	3.76(m)	68.5	3.73(m)	68.5	3.74(m)
7	48.3	1.20(m)	47.6	1.20(m)	48.3	1.21(m)	48.2	1.21(m)
		2.00(dd,11,4)		2.00(dd,12,5)		2.01(m)		2.02(m)
8	45.7		45.5		45.6		45.6	
9	59.4	1.32(m)	59.3	1.32(dd,12,5)	59.4	1.32(m)	59.3	1.32(m)
10	36.7		36.5		36.7		36.7	
11	20.2	1.40(m)	20.1	1.40(m)	20.2	1.40(m)	20.2	1.41(m)
		1.54(m)		1.52(m)		1.54(m)		1.54(m)
12	26.0	1.63(m)	25.9	1.65(m)	25.7	1.64(m)	26.0	1.65(m)
		1.80(m)		1.80(m)		1.80(m)		1.80(m)
13	59.0	1.96(m)	59.0	1.95(m)	58.9	1.95(m)	58.9	1.96(m)
14	135.5		135.4		135.5		135.4	
15	32.4	1.98(m)	32.3	1.97(m)	32.4	1.99(m)	32.2	1.98(m)
		2.18(m)		2.20(m)		2.18(m)		2.20(m)
16	25.9	1.63(m)	26.0	1.65(m)	26.0	1.60(m)	25.9	1.60(m)
		1.63(m)		1.65(m)		1.60(m)		1.60(m)
17	83.7	3.18(dd,11,4)	83.9	3.13(m)	83.6	3.17(dd,12,4)	83.9	3.20(dd,11,5)
18	35.7		35.6		35.6		35.6	
19	134.1	5.16(s)	134.1	5.15(s)	134.1	5.15(s)	134.0	5.16(bs)
20	38.5	1.36(m)	38.4	1.36(m)	38.5	1.36(m)	38.4	1.37(m)
		1.61(m)		1.59(m)		1.59(m)		1.60(m)
21	23.9	1.54(m)	23.4	1.60(m)	23.8	1.54(m)	23.1	1.60(m)
		1.60(m)		1.70(m)		1.62(m)		1.70(m)
22	86.6	3.41(dd,11,3)	86.4	3.38(m)	86.6	3.41(m)	86.3	3.37(m)
23	80.2		80.3		80.1		80.2	
24	23.4	1.15(s)	23.2	1.24(s)	22.7	1.14(s)	22.7	1.21(s)
25	23.4	1.20(s)	24.8	1.24(s)	23.4	1.20(s)	23.4	1.21(s)
26	20.8	0.94 (s)	20.9	0.94(s)	20.8	0.94(s)	20.9	0.95(s)
27	17.1	0.75(s)	17.1	0.75(s)	17.0	0.74(s)	17.0	0.75(s)
28	14.4	0.90(s)	14.2	0.88(s)	14.4	0.89(s)	14.4	0.91(s)
29	22.7	1.20(s)	23.9	1.18(s)	22.6	1.20(s)	23.1	1.25(s)
30	22.7	1.20(s)	26.2	1.08(s)	23.4	1.20(s)	24.8	1.25(s)
1'	91.9	5.16 (d,4)			92.9	5.17(d,3)	96.6	4.85(brs)
2'	56.3a	3.76 (m)			56.2	3.77(m)	74.0	3.76(m)
3'	72.8	3.59 (m)			72.8	3.63(m)	75.8	3.41(m)
4'	71.9	3.28 (m)			72.9	3.29(m)	68.8	3.54(m)
5'	72.7	3.86 (m)			72.7	3.86(m)	78.1	3.15(m)
6'	73.6	3.55 (m)			73.7	3.56(m)	63.2	3.65(m)
		3.55 (m)				3.56(m)		3.78(m)
6'-O-Me	59.9	3.33 (s)						
CO-CH ₃	173.9				173.8			
CO-CH ₃	23.0	1.93(s)			23.0	1.93(s)		
1''	93.5	5.24(d,4)	96.7	4.84(brs)	93.5	5.24(d,4)	92.9	5.12(d,4)
2''	56.1	3.76(m)	74.0	3.75(m)	56.2	3.76(m)	56.2	3.76(m)
3''	72.8	3.59(m)	75.8	3.40(dd,10,4)	72.7	3.58(m)	72.8	3.61(m)
4''	72.9	3.28(m)	68.9	3.51(dd,10,10)	72.8	3.29(m)	72.9	3.29(m)
5''	72.6	3.87(m)	78.2	3.12(ddd,10,5)	72.6	3.87(m)	72.7	3.88(m)
6''	73.7	3.55(m)	63.3	3.65(dd,11,5)	73.6	3.54(m)	73.3	3.57(m)
		3.55(m)		3.77(dd,11,2)		3.54(m)		3.57(m)
6''-OMe	59.9	3.33(s)			59.9	3.33(s)	59.9	3.34(s)
CO-CH ₃	173.6				173.8		173.8	
CO-CH ₃	23.0	1.88(s)			22.9	1.93(s)	23.0	1.91(s)

・ Malbrancheoside C (40) の化学構造

Malbrancheoside C (40) は融点 168℃の無色結晶性粉末で、FT-ESI-MS より分子式 $C_{47}H_{78}N_2O_{15}$ と決定した。化合物 40 の 1H 、 ^{13}C -NMR および dept スペクトルを malbrancheoside A (38) と比較すると、(Fig.24,25,26, Table.4) 38 で δ_H 3.33 (s) / δ_C 59.9 に観測されるメチル基 2 つ分のシグナルが、積分値から 1 つ分消失している以外はほぼ同じスペクトルパターンを示したことから、38 の分子式 ($C_{48}H_{80}N_2O_{15}$) と 40 の分子式を比較すると CH_2 分少なかったことから、40 は 38 と同じゲニンを有し、かつ 2 つの糖のいずれかのメトキシ基が消失した構造であると考えた。

Malbrancheoside C (40) は酸加水分解により A (38) と同じく 2 つのゲニン pseudomalbrancheogenin (43) と malbrancheogenin (44) が生成したことから、40 の各種二次元 NMR スペクトルの解析結果から、40 の真性ゲニンは malbrancheogenin (44) と決定した。化合物 40 の糖部については、40 の分子式 ($C_{47}H_{78}N_2O_{15}$) と 40 のゲニンである malbrancheogenin (44) の分子式 $C_{30}H_{50}O_5$ から、糖を構成する分子式は $C_{17}H_{30}N_2O_{10}$ であると考えられた。Malbrancheoside A (38) の糖部を構成する分子式は $C_{18}H_{32}N_2O_{10}$ であり、38 の糖部の分子式と比較すると CH_2 分少ないことから、40 の糖は 38 と同じ glucosamine の誘導体である、6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine と 6 位のメチル基が水素に置換された *N*-acetylglucosamine であると考えた。 1H - 1H COSY スペクトルで 1'位のメチン水素 δ 5.17 (d, 3) から 2'位のメチン水素 δ 3.77 (m)、3'位のメチン水素 δ 3.63 (m)、4'位のメチン水素 δ 3.29 (m)、5'位のメチン水素 δ 3.86 (m) を経て、6'位のメチレン水素 δ 3.56 (2H, m) までの連続した相関と、HMBC スペクトルで 1'位の δ 5.17 (d, $J=3$ Hz) から 5'位のメチン炭素 δ 72.7 に相関があることから、pyranose の存在が示唆された。同様にして、1''位のメチン水素 δ 5.24 (d, $J=4$ Hz) から 2''位 δ 3.76 (m)、3''位 δ 3.58 (m)、4''位 δ 3.29 (m)、5''位 δ 3.87 (m) のメチン炭素を経、6''位のメチレン水素 δ 3.54 (2H, m) までの連続した相関と、HMBC スペクトルで 1''位の水素 から 5''位のメチン炭素 δ 72.6 への相関があることからもう 1 つの pyranose の存在が示唆された。また、ROESY スペクトルにおいて、1'位のメチン水素から 4'位のメチン水素、2'位のメチン水素から 6'位のメチン水素、3'位のメチン水素から 5'位のメチン水素、1''位のメチン水素から 4''位のメチン水素、2''位のメチ

ン水素から 4''位のメチン水素、3''位のメチン水素から 5''位のメチン水素への相関および HMBC スペクトルで 2'位と 2''位の水素からそれぞれアセチル基のカルボニル炭素 (δ 173.8, 2C) への相関があることと、 δ 3.33 (s) のメトキシ基のシグナルから 6''位のメチレン炭素 δ 73.6 への相関があることから 2 つの糖は *N*-acetylglucosamine と 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine であると決定した。(Fig.29) また、1'位と 2'位、1''位と 2''位のスピン結合定数がそれぞれ $J_{H1'-H2'} = 3\text{Hz}$ 、 $J_{H1''-H2''} = 4\text{Hz}$ の値を示したので α -アノマールと決定した。

Malbrancheoside C (40) の糖の結合位置は HMBC スペクトルで 1'位の水素から 4 位の四級炭素 δ 80.3 への相関があること、1''位の水素から 23 位の四級炭素 δ 80.2 への相関があること、さらに、ROESY スペクトルで 1''位の水素と 22 位の水素 δ 3.41 (dd, $J = 11\text{ Hz}$, $J = 3\text{ Hz}$) に相関があることから、malbrancheoside C (40) の 2 つ糖はそれぞれ A 環の 4 位に *N*-acetylglucosamine が、E 環の 23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine が結合していると決定した。以上の結果から malbrancheoside C (40) は malbrancheoside A (38) と同じゲニンを有し、かつ、4 位に *N*-acetyl- α -glucosamine、23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- α -glucosamine を有する構造であると決定した。

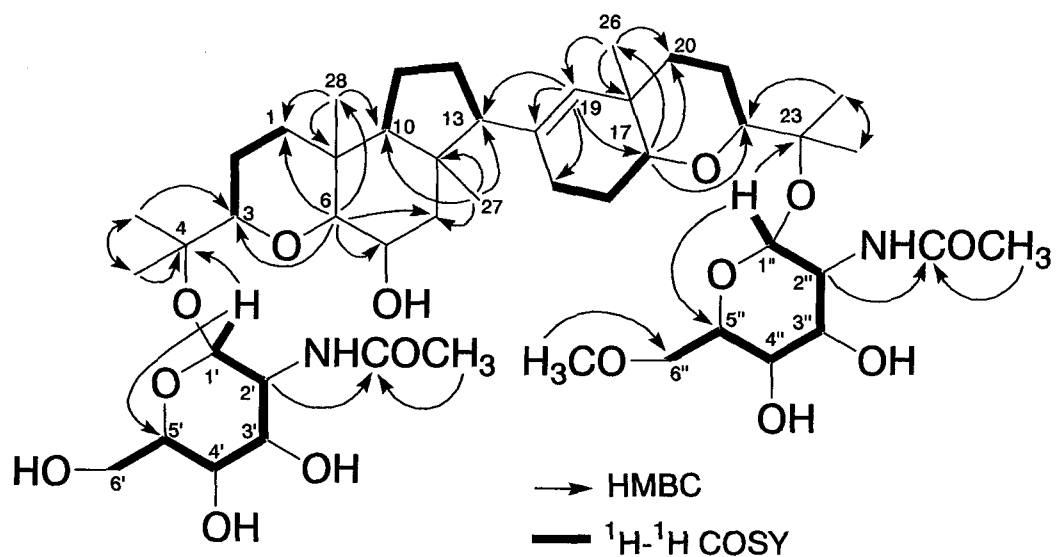


Fig.29 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of malbrancheoside C (40)

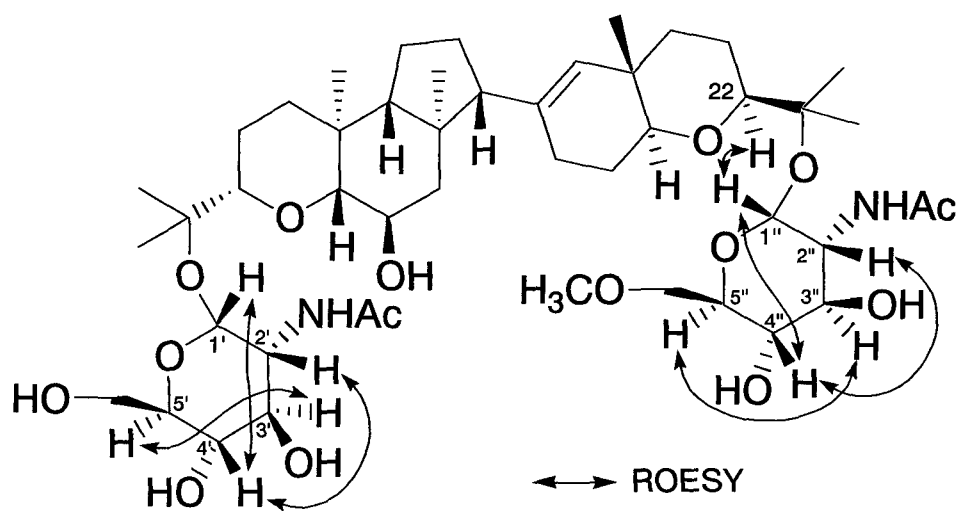


Fig.30 Important ROESY correlations of malbrancheoside C (40)

・ Malbrancheoside D (41) の化学構造

Malbrancheoside D (41)は融点 157℃の無色結晶性粉末であり、高分解能 FT-ESI-MS より分子式 $C_{45}H_{75}NO_{15}$ と決定した。化合物 41 はアニスアルデヒド硫酸試薬により茶緑色の呈色を示した。また、41 の 1H -NMR スペクトルは malbrancheoside A (38) と非常によく似たスペクトルを示した。また、41 は ^{13}C -NMR スペクトルで malbrancheoside B (39) で観察された β -D-mannose の 1 位の炭素シグナル (39 : δ 96.7) と同様のシグナル (40 : δ 96.6) が観察された。これらのことから 41 は malbrancheoside A (38) の 2 つの糖のうちどちらかが β -D-mannose に置換された構造ではないかと考えた。

Malbrancheoside D (41) は酸加水分解により A (38)・C (41) と同様に 2 つのゲニン pseudomalbrancheogenin (43) と malbrancheogenin (44) を与えた。化合物 41 の各種二次元 NMR スペクトルの解析を行ったところ、38-40 との NMR データの比較検討から、41 の真性ゲニンは A (38)・C (40) と同様に malbrancheogenin (44) であると決定した。化合物 41 の糖については 41 の分子式 $C_{45}H_{75}NO_{15}$ と 41 のゲニンである malbrancheogenin (44) の分子式 $C_{30}H_{50}O_5$ から考察すると糖を構成する分子式は $C_{15}H_{27}NO_{10}$ であると考えられた。この分子式は先に予想した 41 が有する 2 つの糖の存在、すなわち 6-O-methyl-N-acetylglucosamine ($C_9H_{16}NO_5$)、 β -D-mannose ($C_6H_{11}O_5$)を満たすことからさらに二次元 NMR の詳細な解析を行った。 1H - 1H COSY スペクトルから、6-O-methyl-N-acetylglucosamine に相当する 1''位の水素 [δ 5.12 (d, $J = 4$ Hz)] から δ 3.76 (m, 2''-H), δ 3.61 (m, 3''-H), δ 3.29 (m, 4''-H), δ 3.88 (m, 5''-H) および δ 3.57 (2H, m, 6''-H) への連続した相関があること、HMBC で 1''位の水素シグナルから 5''位のメチン炭素 δ 72.7 への相関があることから、この糖は pyranose と考えた。さらに、HMBC スペクトルで δ 3.34 (s) のメトキシ基のシグナルから 6''位のメチレン炭素 δ 73.3 への相関、2''位のメチン水素 δ 3.76 (m) からアセチル基のカルボニル炭素 δ 173.8 への相関があること、更に ROESY スペクトルで 2''位の水素 δ 3.76 (m) と 4''位の水素 δ 3.29 (m)、3''位の水素 δ 3.61 (m) と 5''位の水素 δ 3.88 (m) に相関があることから、malbrancheoside D (41) の糖の 1 つを 6-O-methyl-N-acetylglucosamine と決定した。また、 β -D-mannose の 1 位のアノマー水素に相当するシグナル δ 4.87 (brs) から δ 3.76 (m, 2'-H)、 δ 3.41 (m, 3'-H)、 δ

3.54 (m, 4'-H)、 δ 3.15 (m, 5'-H)および6'位のメチレン水素 [δ 3.65 (m) δ 3.78 (m)] への連続した相関があること、HMBC スペクトルで1'位の水素 δ 4.87 (brs) から5'位のメチン炭素 δ 78.1 への相関があることから、この糖はpyranoseであると考えた。さらにROESY スペクトルで1'位の水素と3'位の水素、3'位の水素と5'位の水素に相関があることから malbrancheoside D (41) のもう1つの糖は mannose であると決定した。次に2つの糖の結合位置と結合配置についてだが、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine の1''位と2''位のスピン結合定数が $J_{\text{H1-H2}} = 4 \text{ Hz}$ であることから α -アノマー体であると考え、更に HMBC スペクトルで1''位の水素 δ 5.12 (d, $J = 4 \text{ Hz}$)から23位の四級炭素 δ 80.2 への相関があることから、6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine の結合位置は23位であると決定した。次に mannose の結合位置と結合配置について、ROESY スペクトルから β -mannose であり、HMBC スペクトルで1'位の水素 δ 4.85 (brs) から4位の四級炭素 δ 80.2 への相関があることから、mannose の結合位置は4位であると決定した。

以上の結果から、malbrancheoside D (41) は malbrancheoside A (38) - D (41) と同じゲニンを有し、かつ、4位に β -mannose、23位に 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- α -glucosamine が結合した構造と決定した。

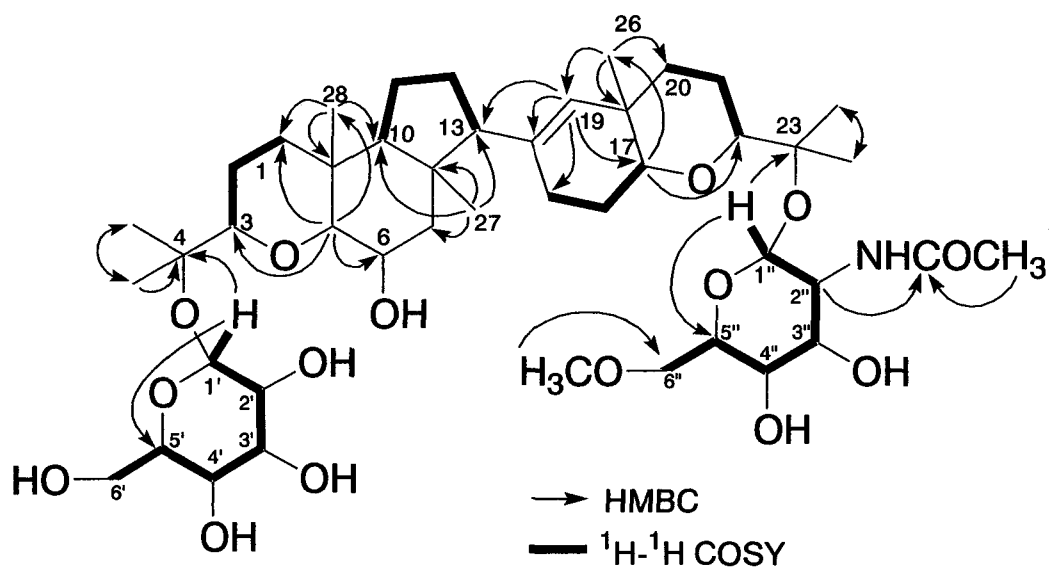


Fig.31 ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of malbrancheoside D (41)

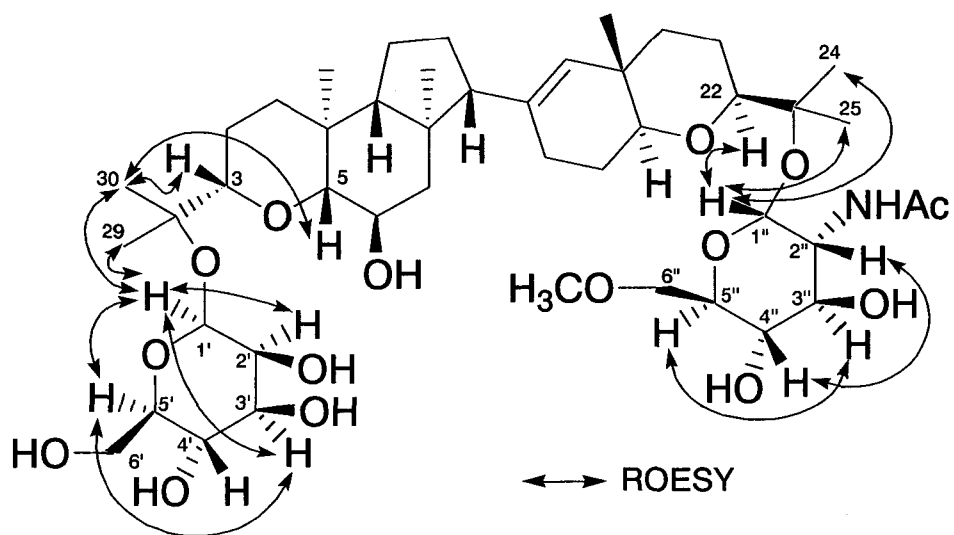


Fig.32 Important ROESY correlations of malbrancheoside D (41)

第4章 Malbrancheoside 類の生合成経路の検討

Malbrancheoside 類のゲニンは C_{30} 化合物であることからトリテルペノイドであると考えられる。同様の炭素骨格を持つ化合物として、Yoel Kashman らにより海綿 *Ptilocaulis spiculifer* から単離された abudinol A (47)、B (48) がすでに報告されているが、²⁶⁾²⁷⁾ abudinol A (47)、abudinol B (48) の生合成については検討されていなかった。そこで、同様の炭素骨格を持ち、同じ生合成経路で生成していると考えられる malbrancheoside 類の生合成経路を明らかにするために ^{13}C で標識化した CH_3COONa による ^{13}C の取り込み実験を行った。²⁸⁾

Malbranchea filamentosa の培養に使用していた米培地に 2 位の炭素を ^{13}C で標識化した一炭素標識体である $^{13}CH_3COONa$ を添加し培養を行った後 malbrancheoside 類の分離・精製を行ったが、 ^{13}C で標識化された化合物は得られなかった。そこで種々の培地について検討した結果、(Table.5) 米をフードプロセッサーで粉碎し、500 μm のふるいにかけ、得られた粉末を水 100 mL に対し 3 g 添加し、調製した培地 (以下、米粉末液体培地と略す) を用い培養を行ったところ、良好な結果が得られたので、この培地を用い $^{13}CH_3COONa$ の取り込み実験を行った。

Malbranchea filamentosa IFM41300 株の種菌を、米粉末液体培地 5 L に分注し、25 $^{\circ}C$ 、150 rpm で 200 時間培養した。その後、 $^{13}CH_3COONa$ を添加し、さらに 25 $^{\circ}C$ 、150 rpm で 100 時間培養後、培養液を凍結乾燥した。乾固後、MeOH で抽出後、溶媒留去し抽出エキス 500 mL を得た。このエキスを 4 mol/L 塩酸 30 mL を加え 90 $^{\circ}C$ 、5 時間反応後、 $CHCl_3$ を加えて分配し、得られた $CHCl_3$ 層を LPLC [$CHCl_3$ - acetone (3 : 1)]、HPLC [$CHCl_3$ - acetone (5 : 1)] で精製し、 ^{13}C で標識された pseudomalbrancheogenin (45 : 2 mg) を得た。(Chart.2)

Table.5 Examination of culture condition

	Condition	Time	Growth	Malbrancheoside	Uptake of ^{13}C
Rice culture	static	500hr	+	+	-
PDB ^{a)}	static	100hr	+	-	-
		200hr	-	-	-
		300hr	-	-	-
	shake	100hr	+	-	-
		200hr	+	-	-
		300hr	+	-	-
PYG ^{b)}	static	100hr	+	-	-
		200hr	-	-	-
		300hr	-	-	-
	shake	100hr	+	-	-
		200hr	+	-	-
		300hr	+	-	-
Rice powder culture	shake	100hr	+	-	-
		200hr	+	+	+
		300hr	+	+	+

a) PDB : Potate dextrose broth (Difco) 24 g / 1 L of purified water

b) PYG : Peptone yeast glucose broth,

polypeptone 6g, yeast extract 6g, glucose 40g / 1L of purified water

Malbranchea filamentosa IFM41300

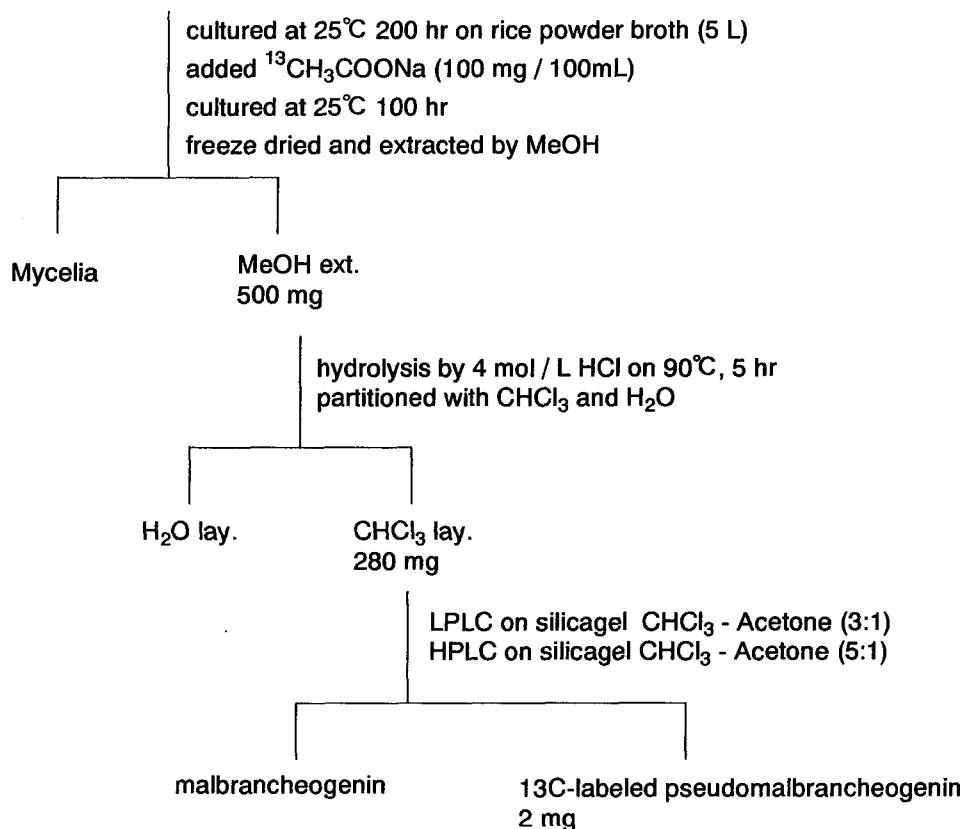


Chart.2 Isolation scheme of ¹³C-labeled pseudomalbrancheogenin (45)

化合物 **39** の ¹³C-NMR スペクトルを測定したところ 18 つの炭素 [δ 119.2 (C-15), δ 90.2 (C-5), δ 84.5 (C-3), δ 83.7 (C-22), δ 78.4 (C-17), δ 57.3 (C-9), δ 56.0 (C-13), δ 45.1 (C-7), δ 44.2 (C-19), δ 37.3 (C-20), δ 36.8 (C-1), δ 25.5 (C-24), δ 25.0 (C-29), δ 23.5 (C-25), δ 23.0 (C-30), δ 15.7 (C-27), δ 15.4 (C-26), δ 12.4 (C-28)] について ¹³C で標識化されていることが確認できた。(Fig.33) それを構造式に当てはめると ¹³C は pseudomalbrancheogenin (44) に Fig.34 で示したように取り込まれていることが分かった。このことから、malbrancheoside 類は CH₃COOH 3 分子からなるメバロン酸が 6 分子重合し生成される squalene が閉環し、さらに糖が付加すると考えられる。(Fig.35)

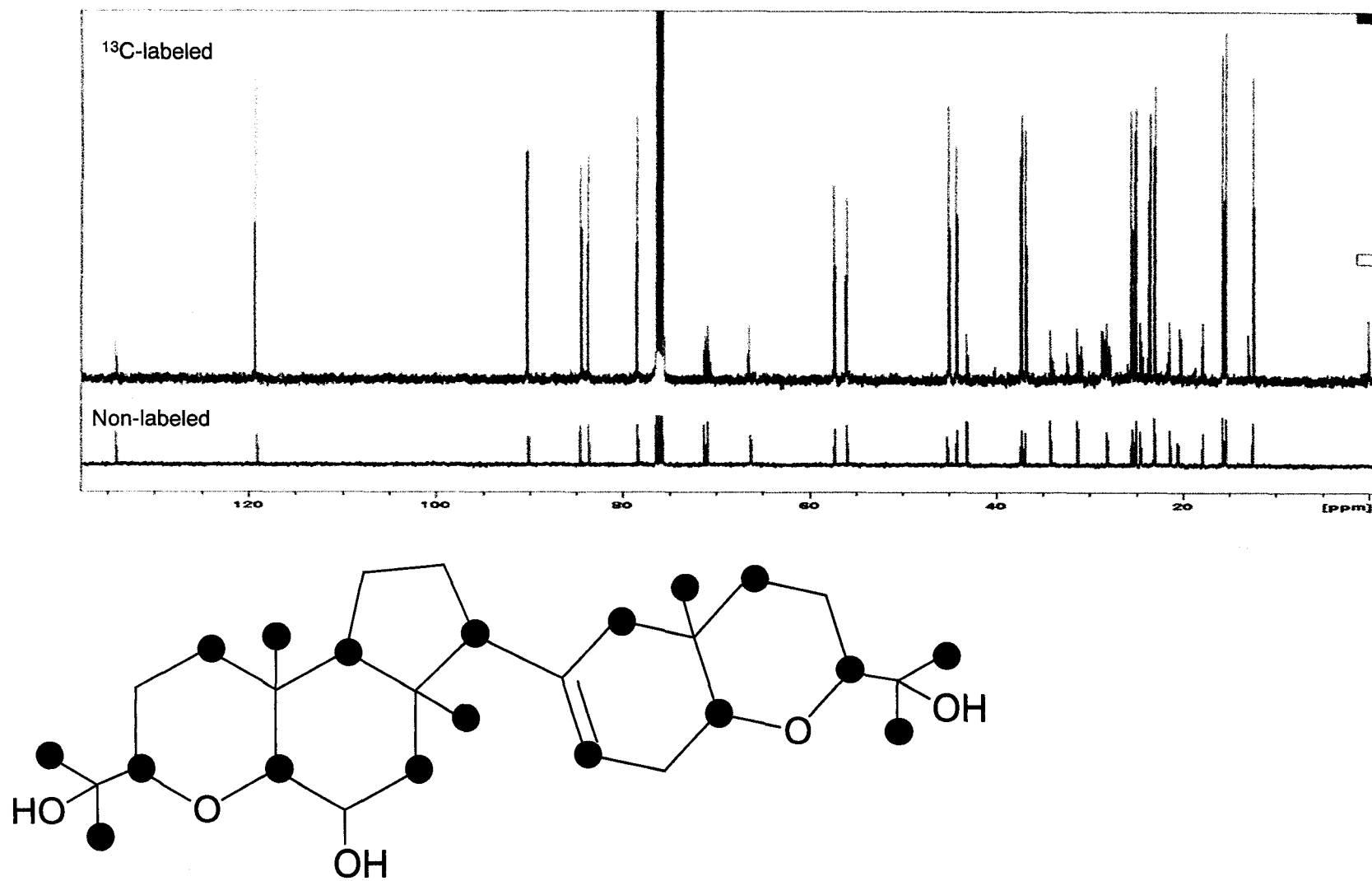


Fig.34 Uptaked positions of ^{13}C -labeled pseudomalbrancheogenin (45)

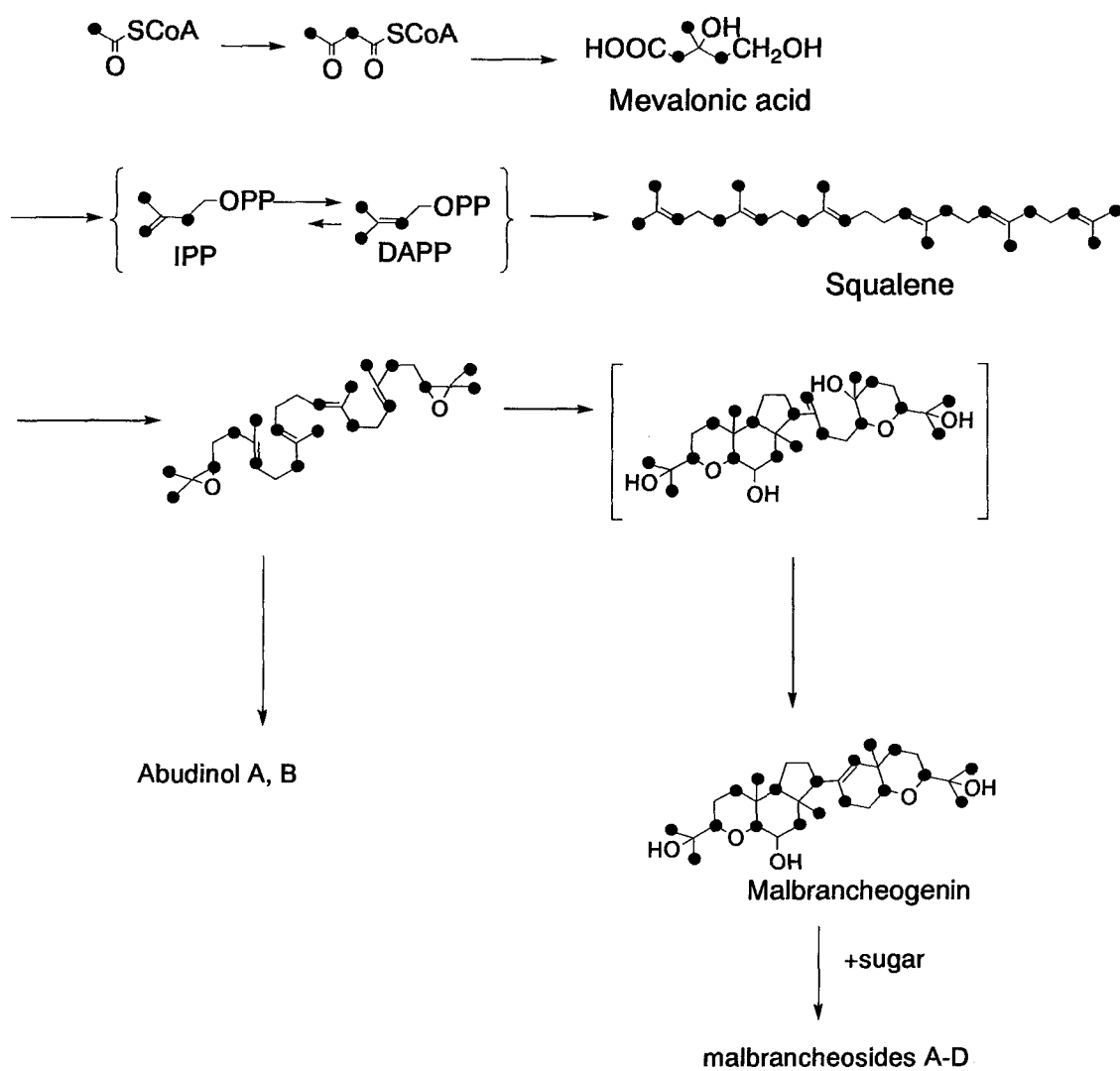


Fig.35 Proposed biosynthesis pathway

結論

著者は、生物資源として真菌類、中でも分類学的に病原真菌類を多く含むホネタケ科に属する *Malbranchea* 属に着目し、未だ成分研究の行われていない *M. filamentosa* IFM41300 株について成分探索を行った。その結果、新規フラノン誘導体 4-benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34)、malfilamentoside A (36)、B (37) および新規トリテルペン配糖体 malbrancheoside A (38)・D (41) を単離した。

4-Benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34) は高分解能 EI-MS より分子式 $C_{17}H_{14}O_2$ と決定し、NMR スペクトルを中心とした各種機器データの解析からその構造を決定した。Malfilamentoside A (36) および B (37) は高分解能 CI-MS または ESI-TOF-MS より分子式 $C_{26}H_{30}NO_8$ および $C_{26}H_{30}NO_9$ と決定し、NMR スペクトルを中心とした各種機器データの詳細な解析からそれらの平面構造を決定した。糖部は加水分解により得られた糖の旋光度の比較により 6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine と決定した。また、36 および 37 のスピン結合定数から、ゲニンと α -結合していることがわかった。以上の結果、malfilamentoside A (36) および B (37) の構造を一部の立体化学を除いて決定した。(Fig.36)

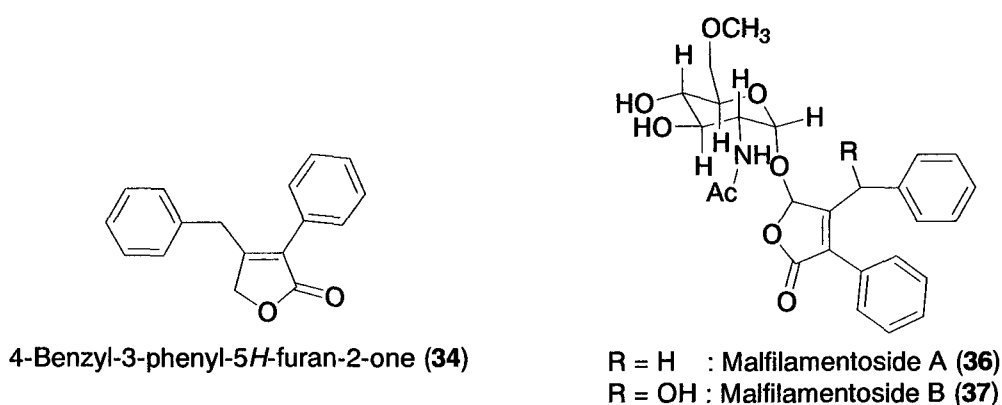


Fig.36 Chemical structures of 4-benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34),
malfilamentoside A (36) and B (37)

今回単離したフラノン誘導体 (34, 36, 37) と同一の炭素骨格を有する化合物としては、

近年オーストラリアの土壌真菌 *Gymnoascus reesii* から 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (34)とともに 5-OMe 体の gymnoascolide B (46), C (47) が単離されており、34 は小麦葉枯病の原因菌である *Septoria nodorum* に対する抗菌活性が報告されている。²⁹⁾ また、malfilamentoside A (36)のゲニン部分に相当する化合物としては *Anixiella micropertusa* から単離された microperfuranone (48) が報告されている。(Fig.37)³⁰⁾

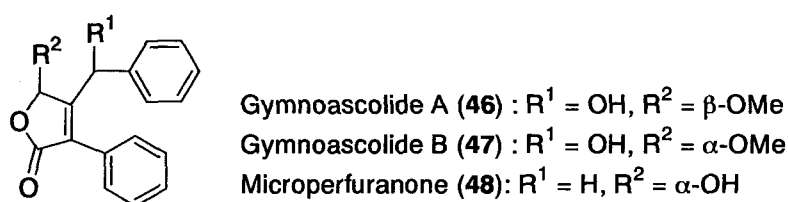


Fig.37 Related compounds for furanone derivative.

Malbrancheoside A (38)はFAB-MSおよび元素分析から分子式 $\text{C}_{48}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_{15}$ と決定した。まず、38 の加水分解を行い、2 種のゲニン pseudomalbrancheogenin (43) および malbrancheogenin (44) を得た。化合物 43 および 44 は高分解能 EI-MS より分子式 $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_5$ であり、各種二次元 NMR スペクトルの解析より 43 の平面構造を決定した。さらに、NOESY スペクトルの詳細な解析より ABC 環および DE 環の相対配置を決定し、改良 Mosher 法により ABC 環の 6 位の水酸基の絶対配置を決定した。以上の結果、pseudomalbrancheogenin (43) の絶対構造を DE 環の絶対配置を除いて決定した。(Fig.37) また、malbrancheogenin (44) の平面構造を、HMBC スペクトルを中心とした各種スペクトルの解析から決定し、さらに、44 が酸性条件下、比較的容易に 43 に変化すること等から 44 の絶対配置を含めた立体化学を決定した。(Fig.38) Malbrancheoside A (38) の加水分解により得られた糖は旋光度を含む各種 NMR スペクトルから 6-O-methyl-D-glucosamine と決定した。さらに、各種二次元 NMR スペクトルの解析および 44 が酸性条件で容易に 43 に変化することから、malbrancheoside A (38) の構造を malbrancheogenin 4,23-bis-O-(2-acetylamino-2-deoxy-6-O-methyl- α -D-glucopyranoside) と決定した。(Fig.39)

Malbrancheoside B (39) は高分解能 CI-MS より分子式 $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$ であり、また、

malbrancheoside C (40) および D (41) は FT-ESI-MS からそれぞれ $C_{47}H_{78}N_2O_{15}$ 、 $C_{45}H_{75}NO_{15}$ と決定した。Malbrancheoside B (39)・(41) を加水分解したところ、いずれも malbrancheoside A (38) と同一のゲニン pseudomalbrancheogenin (43) および malbrancheogenin (44) を与えた。化合物 35・37 の糖部については、配糖体の各種二次元 NMR スペクトルを中心としたスペクトルの解析から、それぞれ 23 位に mannose、4 位に *N*-acetylglucosamine および 23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine が、4 位に mannose および 23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetylglucosamine が結合していると決定した。以上の結果 およびアノマー水素の結合様式の解析から malbrancheoside B (39)・D (41) の構造を決定した。(Fig.39)

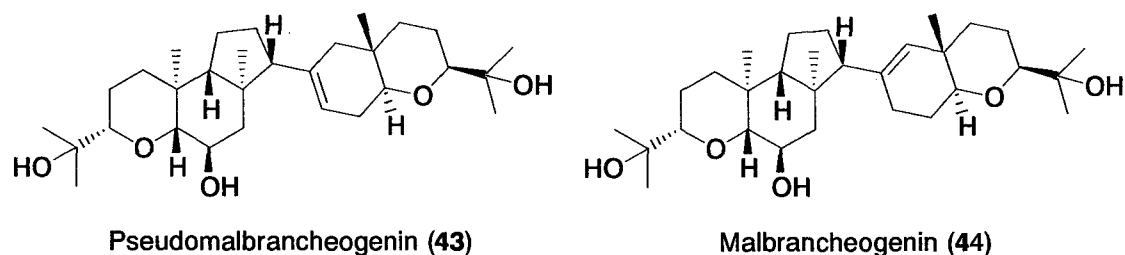
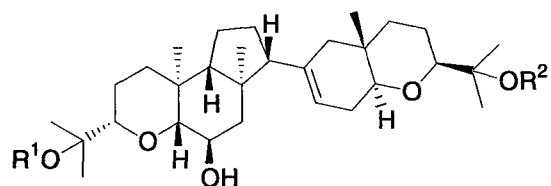


Fig.38 Chemical structures of pseudomalbrancheogenin (43) and malbrancheogenin (44)



- Malbrancheoside A (38): $R^1 = R^2 = 6-O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$
 B (39): $R^1 = H$, $R^2 = \beta\text{-D-mannose}$
 C (40): $R^1 = N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$, $R^2 = 6-O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$
 D (41): $R^1 = \beta\text{-D-mannose}$, $R^2 = 6-O\text{-methyl-}N\text{-acetyl-}\alpha\text{-D-glucosamine}$

Fig.39 Chemical structures of malbrancheoside A (38)・D (41)

今回得られた malbrancheoside 類 (38 - 41) を構成するゲニン malbrancheogenin (44)

は炭素数 30 の化合物であり、本化合物は新規トリテルペン様化合物と考えられたが、同一の炭素骨格を有する化合物として、近年、海洋性海綿 *Ptilocaulis spiculifer* から単離された abudinol A (47) および B (48) が報告されている。(Fig.40)²⁶⁾²⁷⁾ また、トリテルペン様物質の D-glucosamine および D-mannose の配糖体が菌類から単離されたのは最初の例であると考えられる。フラノン誘導体 malfilamentoside A (36) および B (37) にも malbrancheoside 類と同一の 6-O-methyl-N-acetyl-D-glucosamine が配糖体として結合していることは興味深い。

前述したように malbrancheoside 類のゲニン部、malbrancheogenin (44) はトリテルペンと考えられるが、その生合成実験は abudinol A (47) および B (48) を含めて全く行われていなかった。そこで、今回 2 位を ¹³C で標識した酢酸ナトリウムを用いた取り込み実験を行った結果、pseudomalbrancheogenin (43) は mevalonic acid から squalene を経て、閉環、糖の付加が起こり合成されるトリテルペンであると予想される。

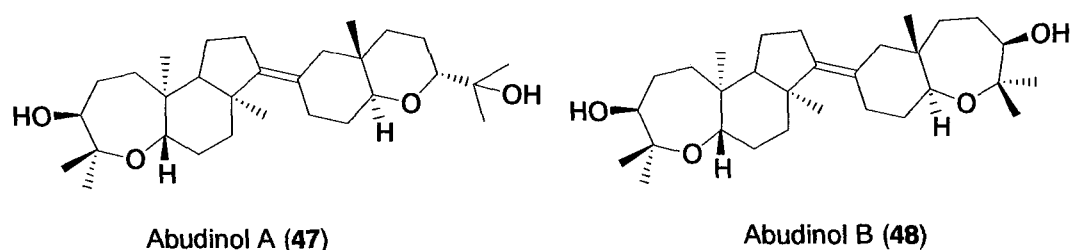


Fig.40 Structures of abudinol A (47) and B (48)

今回得られた新規化合物について、数種の生理活性試験を行ったところ、34 にラットの血管平滑筋弛緩作用($\text{Ca}^{2+} = 10^{-3}\text{M}$: 検体: 10^{-7}M 45%、 10^{-6}M 76%抑制)が認められた。また、*M. filamentosa* IFM41300 株の acetone 抽出エキスを AcOEt と水で分配した水相はクリプトコッカス症の原因菌である *Cryptococcus neoformans* に対して抗真菌活性を示したが、今回得られた化合物の中には残念ながら活性を示す化合物は認められなかった。*M. filamentosa* のエキ스는今回得られた Malbrancheoside 類より極性の高い分画に *C. neoformans* に対する強い抗菌活性を示しているの、今後これらの分画の分離・精製が望まれる。

実験の部

融点は柳本微量融点測定装置で測定し、未補正である。旋光度は日本分光 DIP-1000 型旋光光度計で測定し、CD スペクトルは J-600 型自記旋光分散計(JASCO)および、J-720 型自記旋光分散計 (JASCO)、IR スペクトルは IR-810 型自記分光光度計 (JASCO)、UV スペクトルは U-3210 自記分光光度計 (日立)または Ultrospec2100pro 分光光度計 (Amersham Bioscience)で測定した。EI および CI-MS は JMS-600W 型質量分析計 (日本分光)、ESI-MS は micromass ZQ 型質量分析計(Waters)、ESI-TOF-MS は microTOF 型質量分析計 (Bruker)、FAB-MS は JMS-SX 102 型質量分析計 (JEOL)、FT-ESI-MS は LTQ Orbitrap 型質量分析計 (Thermo Fisher Scientific)で測定した。 ^1H -NMR および ^{13}C -NMR は Lambda-500 型 (^1H : 500.00 MHz, ^{13}C : 125.43 MHz: 日本電子)、あるいは AV-400 型 (^1H : 400.13 MHz, ^{13}C : 100.61 MHz: Bruker) 核磁気共鳴装置で測定し、化学シフトは tetramethylsilane を内部標準とした δ (ppm) 値で表示し、スピン結合定数は Hz で表示した。なお、singlet、doublet、triplet、quartet、multiplet ならびに broad はそれぞれ s、d、t、q、m および br と略記した。LPLC は SS50-1296 型ポンプ (Superior Electric Company) を使い、カラムは CQ-3 (30-50 μm : 和光純薬) を充填したガラスカラム ($\phi 25 \times 300 \text{ mm}$) もしくは SI-40B ($\phi 26 \times 300 \text{ mm}$: 山善) を用いた。HPLC は分取用として、順相系では SSC-3160 型ポンプ (センシュウ科学) もしくは Intelligent 302 型ポンプ (バイオテック) を使い、カラムは PEGASIL silica60-5 ($\phi 10 \times 300 \text{ mm}$: センシュウ科学) もしくは Inertsil SIL100A ($\phi 10 \times 250 \text{ mm}$: GL Science Inc.) を使用し、流速を 4 mL/min に設定した。また、検出器は YRD-883 型示差屈折計 (島村) を用いた。逆相系では SSC-3160 型ポンプ (センシュウ科学) を使い、カラムは Inertsil ODS-P ($\phi 10 \times 250 \text{ mm}$: GL Science Inc.) もしくは PEGASIL ODS ($\phi 10 \times 250 \text{ mm}$: センシュウ科学) を使用し、流速を 4 mL/min に設定した。検出器は RI-UV monitor YRU-883 型検出器 (島村) を用いた。分析用としては、ポンプは PU-2080plus 型 (JASCO) を使い、カラムは Inertsil ODS-3 ($\phi 4.6 \times 250 \text{ mm}$: GL science Inc.) を使用した。検出器は MD-2010plus 型多波長検出器 (JASCO) を用いた。CPC は DS-4 型ポンプ (SHODEX) を使い、CPC model LLB-M (SANKI) を、上昇法 (800 rpm, 流速 5 mL/min) で使用し

た。TLC は TLC plate Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) を用い紫外線下における吸収および蛍光、またはリンモリブデン試薬、アニスアルデヒド硫酸試薬による呈色で検出した。膜滅菌は 8010 型遠心機 (KUBOTA) を用い、ULTRAFREE CL GV (0.22 μ m) 型遠心式フィルターユニット (MILLIPORE) を使用した。また、動物実験は星薬科大学動物実験指針に基づいて行った。

第 1 章に関する実験

Malbranchea filamentosa IFM41300 株からの成分分離 (8 ページ、Chart.1 参照)

Malbranchea filamentosa IFM41300 株を PDA 平板培地にて 25℃、21 日間培養し種菌とした。あらかじめ滅菌 (120℃、20 分) した米培地 560g (米乾燥重量 140g を 4 本の Roux flask に分注) に、本菌の種菌を滅菌済みスパーテルで 1cm² 角に切り、それぞれ 2 片ほど入れ、25℃、21 日間静置培養した。Acetone で抽出し、溶媒を留去後、残渣を水に懸濁し AcOEt で抽出し、エキスを (10 g) を得た。本エキスを hexane、benzene、CH₂Cl₂、MeOH で順次固液抽出し、各分画を溶媒留居した。得られた hexane 分画 (4.5 g) を、カラムクロマトグラフィー [シリカゲル, CH₂Cl₂ - acetone (50 : 1 → acetone)] で分画後、その fr.1 を LPLC [hexane - acetone (5 : 2)]、HPLC [hexane - acetone (5 : 1)] で順次精製し bassidinolide (31)(80 mg) を得た。また、fr.3 を HPLC [benzene - acetone (50 : 1)] で精製し、amauromine (32)(235 mg) を得た。Benzene 分画 (2.0 g) を、カラムクロマトグラフィー [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (50 : 1 → EtOH)] で分画後、HPLC [シリカゲル, benzene - EtOH (70 : 1)] で精製し、erythroglaucine (33)(43 mg) とともに 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (34)(10 mg) を得た。CH₂Cl₂ 抽出エキスを、LPLC [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (10 : 1)] で分画後、HPLC [シリカゲル, CH₂Cl₂ - EtOH (10 : 1), CH₂Cl₂ - Acetone (1 : 2)]、および HPLC (ODS : 70% MeOH) で精製し、N-acetyl-aminobutyric acid (35)(10 mg) と共に malfilamentoside A (36)(9 mg) および、B (37)(243 mg) を得た。MeOH 抽出エキス (1.5 g) を DIAION HP20 を担体としたオープンカラムを用い、H₂O、20% MeOH、40% MeOH、60% MeOH、80% MeOH、MeOH、acetone で順次溶出し、acetone 分画をさらに CPC で CH₂Cl₂ - MeOH - H₂O からなる二層系を用い上

昇法で精製し、7分画に分離した。その後、fr.3を、ODSを用いたHPLCで80% MeOH および、MeCN-MeOH-H₂O (7:7:6)からなる移動層を用い精製し、malbrancheoside C (40)(18 mg) および、malbrancheoside D (41)(20 mg)を単離した。また、CPC後のfr.5を、ODSを用いたHPLCで85% MeOHを移動層と用いて精製し、malbrancheoside A (38)(36 mg)、malbrancheoside B (39)(30 mg)を得た。

第2章に関する実験

4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (34)の性状

無色粘性油。EI-MS m/z, 250 [M⁺, 25], 205 (52), 115 (97), 91 (100). CI-MS m/z, 251 (M + H)⁺. HR-EI-MS, found: 250.0996 [(M⁺), 250.0994 for C₁₇H₁₄O₂]. UV(MeOH) λ_{max} nm (log ε): 249 (3.95), 208 (4.21). IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3030, 2920, 1750, 1500, 1450, 1110, 1040. ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table1 に示した。

Malfilamentoside A (36)の性状

無色針状晶。融点 188°C (from MeOH). [α]_D²⁰ + 206° (c 1.0, MeOH). EI-MS m/z (%) 483(M⁺, 18), 405 [(M-H₂O)⁺, 27], 248 (100). CI-MS m/z(%) 484.1955 [(M+H)⁺, 484.1971 for C₂₆H₃₀NO₈, 100]. UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 256 (3.98) nm. IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3400 (-OH), 1780 (-COO-), 1610 (-CONH-), 1520. CD Δε (nm) +9.8 (243). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table1 に示した。

Malfilamentoside B (37)の性状

無色結晶性粉末。mp 113 °C (from MeOH). [α]_D²⁰ + 24° (c 1.0, MeOH). EI-MS m/z (%) 264 (100). CI-MS m/z (%) 265 (100). ESI-TOF-MS m/z 500.1929 [(M+H)⁺, 500.1915 for C₂₆H₃₀NO₉]. UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 259 (3.88) nm. IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹ 3400 (-OH), 1650 (-CONH-), 1530. CD Δε (nm) -7.3 (260). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 table1 に示した。

Malfilamentoside A (36) および B (37) の酸加水分解

Malfilamentoside A (36)、B (37) (各 20 mg) に 4 mol/L 塩酸 (10 mL) を加え、100 °C で 3 時間加熱した。冷後、それぞれの反応液を AcOEt で抽出した。その水層を、ODS カラムを用いた HPLC (5 % CH₃CN) で精製し、6-*O*-methyl-D-glucosamine hydrochloride (A: 6 mg, B: 5 mg) を得た。

6-*O*-methyl-D-glucosamine hydrochloride (42) の性状

無色非晶形粉末。[α]_D²⁰ + 62.9° (c 0.83, H₂O)。¹H-NMR δ (CD₃OD): α -anomer, 2.87 (1H, dd, J = 10.7 Hz and 3.6 Hz, 2-H), 3.11 (1H, dd, J = 9.8 Hz and 8.9 Hz, 4-H), 3.25 (3H, s, 6-O-Me), 3.55 (1H, m, 6-H₂), 3.55 (1H, dd, J = 10.7 and 8.9 Hz, 3-H), 3.74 (1H, ddd, J = 9.8 Hz, 4.6 Hz and 4.6 Hz, 5-H), 5.18 (1H, d, J = 3.6 Hz, 1-H); β -anomer, 2.58 (1H, dd, J = 9.5 Hz and 8.2 Hz, 2-H), 3.11 (1H, m, 4-H), 3.2-3.6 (4H, m, 3-H, 5-H, 6-H₂), 3.26 (3H, s, 6-O-Me), 4.62 (1H, d, J = 8.2 Hz, 1-H)。

第 3 章に関する実験

Malbrancheoside A (38) の性状

無色結晶性粉末。融点 185°C (from AcOEt-CH₂Cl₂)。[α]_D²⁰ + 120.5° (c 1.02, MeOH)。Positive FAB-MS m/z: 947.5 [(M+Na)⁺]. Anal. Calcd. For C₄₈H₈₀N₂O₁₅: C, 61.26; H, 8.75; N, 2.95. Found: C, 61.10; H, 8.52; N, 3.07. UV (MeOH) end absorption. IR ν _{max}^{KBr} cm⁻¹ 3400 (-OH), 1660 (-CONH-). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table3 に示した。

Malbrancheoside A (38) の酸加水分解

Malbrancheoside A (38)(80 mg) に 4 mol/L 塩酸 5 mL を加え、90 °C で 3 時間反応させた。反応液を CHCl₃ で分配し、CHCl₃ 層を無水 Na₂SO₄ で乾燥し濃縮、乾固した。これを HPLC [シリカゲル, CHCl₃ - acetone (3 : 1)] で精製し、malbrancheogenin (44)(21 mg)

および pseudomalbrancheenin (43)(13 mg)を得た。また、水層を濃縮後、HPLC (ODS, 5 % CH₃CN) で精製し、6-*O*-methyl-D-glucosamine hydrochloride (42)(12 mg) を得た。

Pseudomalbrancheenin (43)の性状

無色結晶性粉末. 融点 227 °C (from EtOH · H₂O). $[\alpha]_D^{20} + 15.1^\circ$ (c 1.0, MeOH).
EI-MS m/z (%) 490.3677 (M⁺ 490.3658 for C₃₀H₅₀O₅). UV (MeOH) end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3420 (-OH). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table2 に示した。

Malbrancheenin (44)の性状

無色結晶性粉末. 融点 183 °C (from EtOH · H₂O). $[\alpha]_D^{20} + 49.5^\circ$ (c 1.0, MeOH).
EI-MS m/z (%) 490.3661 (M⁺ 490.3658 for C₃₀H₅₀O₅). UV (MeOH) end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3360 (-OH). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table2 に示した。

Malbrancheenin の MTPA エステル化

Malbrancheenin (8.7 あるいは 7.3 mg)に (*R*) · (-) · α · methoxy · α · trifluoromethyl-phenylacetyl chloride (27.3 mg) あるいは (*S*) · (+) · α · methoxy · α · trifluoromethyl-phenylacetyl chloride (21.7 mg) を加え、pyridine (1 mL) に溶解させた。室温で 24 時間反応させた後、空気噴霧で乾燥させ、CHCl₃ と 1M Na₂CO₃ 水溶液を加え分配し、得られた CHCl₃ 層に水を加えさらに分配した。得られた CHCl₃ 層を HPLC [hexane · acetone (3 : 1)] で精製し、(*S*) · および (*R*) · MTPA エステル体をそれぞれ 10 mg、9 mg 得た。

Pseudomalbrancheenin · (*S*) · MTPA エステル (45)の性状

無色非晶形物質. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 5.33 (m, 15-H), 5.32 (m, 6-H), 3.31 (dd, J = 5Hz and 10 Hz, 17-H), 3.18 (m, 3-H), 3.18 (m, 3-H), 3.16 (d, J = 10 Hz, 5-H), 2.21 (m, 16-H₂), 2.11 (dd, J = 5Hz and 11 Hz, 7-H₂), 1.96 (m, 16-H₂), 1.95 (m, 13-H), 1.79 (m, 12-H₂), 1.74 (m, 19-H₂), 1.74 (m, 19-H₂), 1.71 (m, 12-H₂), 1.66 (m, 2-H₂), 1.63 (m, 1-H₂), 1.59 (m, 21-H₂), 1.55 (m, 11-H₂), 1.55 (m, 20-H₂), 1.45 (m, 21-H₂), 1.41 (m, 11-H₂), 1.39 (m, 2-H₂), 1.38 (m, 9-H), 1.34 (m, 7-H₂), 1.28 (m, 20-H₂), 1.19 (m, 1-H₂),

1.18 (s, 24-H₃), 1.18 (s, 25-H₃), 1.10 (s, 29-H₃), 1.05 (s, 30-H₃), 0.98 (s, 28-H₃), 0.89 (s, 27-H₃), 0.84 (s, 26-H₃).

Pseudomalbrancheogenin - (*R*) - MTPA エステル (46) の性状

無色非晶形物質. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 5.31 (m, 6-H), 5.30 (m, 15-H), 3.30 (dd, J = 6 Hz and 10 Hz, 17-H), 3.24 (dd, J = 3 Hz and 12 Hz, 3-H), 3.18 (m, 22-H), 3.17 (d, J = 10 Hz, 5-H), 2.21 (m, 16-H₂), 2.01 (dd, J = 5 Hz and 12 Hz, 7-H₂), 1.96 (m, 16-H₂), 1.89 (m, 13-H), 1.77 (m, 12-H₂), 1.69 (m, 2-H₂), 1.69 (m, 12-H₂), 1.68 (m, 19-H₂), 1.68 (m, 19-H₂), 1.64 (m, 1-H₂), 1.59 (m, 21-H₂), 1.55 (m, 20-H₂), 1.54 (m, 11-H₂), 1.45 (m, 21-H₂), 1.42 (m, 2-H₂), 1.40 (m, 11-H₂), 1.33 (m, 9-H), 1.29 (m, 7-H₂), 1.28 (m, 20-H₂), 1.20 (m, 1-H₂), 1.18 (s, 24-H₃), 1.18 (s, 25-H₃), 1.16 (s, 29-H₃), 1.13 (s, 30-H₃), 0.99 (s, 28-H₃), 0.87 (s, 27-H₃), 0.84 (s, 26-H₃).

Malbrancheoside B (39) の性状

無色非晶形物質. 融点 152 °C (from MeOH). [α]_D²⁰ + 37.40 (c 0.5, MeOH). ESI-MS m/z (%) 653 [(M+H)⁺ 100]. CI-MS m/z (%) 653.4271 [(M+H)⁺, 653.4264 for C₃₆H₆₁O₁₀, 47]. UV (MeOH) end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3400 (-OH). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table4 に示した。

Malbrancheoside B (39) の酸加水分解

Malbrancheoside B (39)(20 mg) に 4 mol/L 塩酸 10 mL を加え、90 °C で 3 時間反応させた。反応液に CHCl₃ を加え分配し、有機層を濃縮後 HPLC [silicagel, CHCl₃ – acetone (5 : 1)] で精製し、malbrancheogenin (44)(5 mg) および pseudomalbrancheogenin (43)(2 mg) を得た。また、水層を濃縮後、HPLC (ODS, 5 % CH₃CN) で精製し、D-mannose (2 mg) を得た。

D-mannose の性状

無色非晶形物質. $[\alpha]_D^{20} + 15.20$ (c 0.21, H₂O). ¹H-NMR δ (CD₃OD) : anomer-1, 3.27 (1H, m, 5-H), 3.44 (1H, dd, J = 10 Hz and 10 Hz, 4-H), 3.48 (1H, m, 3-H), 3.50 (1H, m, 2-H), 3.54 (1H, m, 6-H₂), 3.62 (1H, m, 6-H₂), 4.87 (1H, brs, 1-H). anomer-2, 3.02 (1H, m, 5-H), 3.36 (1H, dd, J = 10 Hz and 9 Hz, 4-H), 3.48 (1H, m, 2-H), 3.52 (1H, m, 3-H), 3.55 (1H, m, 6-H₂), 3.66 (1H, m, 6-H₂), 4.68 (1H, brs, 1-H).

Malbrancheoside C (40)の性状

無色結晶性粉末. 融点 168 °C (from MeOH). $[\alpha]_D^{20} + 120.8^\circ$ (c 1.0, MeOH). ESI-MS m/z (%) 933 [(M + Na)⁺, 100]. FT-ESI-MS m/z (%) 933.5280 [(M+Na)⁺, 933.5300 for C₄₇H₇₈N₂O₁₅Na, 100]. UV (MeOH) end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3400 (-OH), 1650 (-NHCO-). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table4 に示した。

Malbrancheoside D (41)の性状

無色結晶性粉末. 融点 157 °C (from MeOH). $[\alpha]_D^{20} + 110.5^\circ$ (c 0.5, MeOH). ESI-MS m/z (%) 892 [(M + Na)⁺, 100], 870 [(M+H)⁺, 30]. FT-ESI-MS m/z (%) 892.5028 [(M+Na)⁺, 892.5034 for C₄₅H₇₅NO₁₅Na, 100], 870.5210 [870.5215 for C₄₅H₇₅NO₁₅, 29]. UV (MeOH) end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ 3400 (-OH), 1650 (-CONH-). ¹H および ¹³C-NMR スペクトルデータは本論中 Table 4 に示した。

第 4 章に関する実験

¹³C 取り込み実験に関する培養・成分分離

本実験では培地として米をフードプロセッサーで粉碎し、500 um のふるいにかけてられた粉末を水 100 mL に対し 3 g 添加したものを用いた。

Malbranchea filamentosa IFM41300 株を米粉末液体培地に植菌し 25 °C、150 rpm で 100 時間培養したものを種菌とした。あらかじめ滅菌 (120 °C、20 分) した米粉末液体培地 5 L (500 mL を 1 L 三角フラスコに分注) に種菌を 10 mL ずつ入れ、25 °C、150 rpm

で 8 日間培養した。その後、 $^{13}\text{CH}_3\text{COONa}$ を精製水 10 mL に溶かし膜滅菌した後、1 mL ずつ分注した。さらに 25 °C、150 rpm で 4 日間培養し、培養液を凍結乾燥した。乾固後、MeOH で抽出し、溶媒留去し抽出エキス 500 mL を得た。このエキスを 4 mol/L 塩酸 30 mL を加え 90 °C、5 時間攪拌後、 CHCl_3 を加えて分配を 3 回行い、得られた CHCl_3 層に水を加え分配を行った。得られた CHCl_3 層を無水 Na_2SO_4 で乾燥後、溶媒を留去し、LPLC [CHCl_3 - acetone (3 : 1)]、HPLC [CHCl_3 - acetone (5 : 1)] で精製し、 ^{13}C 標識 pseudomalbrancheoginine (45)(2 mg) を得た。

^{13}C 標識 pseudomalbrancheoside (45) の性状

無色非晶形物質。 ^1H -NMR (CDCl_3) δ : 5.34 (1H, brdd, $J = 2$ Hz and 2 Hz, 15-H), 3.84 (1H, m, 6-H), 3.29 (1H, m, 17-H), 3.27 (1H, m, 3-H), 3.17 (1H, bd, $J = 11$ Hz, 22-H), 2.82 (1H, d, $J = 10$ Hz, 3-H), 2.21 (1H, dd, $J = 13$ Hz and 7 Hz, 16-H₂), 2.08 (1H, dd, $J = 12$ Hz and 5 Hz, 7-H₂), 1.95 (1H, m, 16-H₂), 1.93 (1H, m, 13-H), 1.88 (1H, m, 19-H₂), 1.80 (1H, m, 12-H₂), 1.75 (1H, m, 2-H₂), 1.68 (1H, m, 19-H₂), 1.66 (2H, m, 1-H₂, 12-H₂), 1.62 (1H, m, 1-H₂), 1.60 (1H, m, 20-H₂, 21-H₂), 1.53 (1H, m, 11-H₂), 1.43 (1H, m, 2-H₂), 1.42 (1H, m, 21-H₂), 1.35 (1H, m, 9-H), 1.34 (1H, m, 11-H₂), 1.27 (1H, m, 11-H₂), 1.23 (1H, m, 20-H₂), 1.24 (3H, s, 30-H₃), 1.19 (3H, s, 29-H₃), 1.17 (6H, s, 24-H₃, 25-H₃), 0.91 (3H, s, 28-H₃), 0.88 (3H, s, 26-H₃), 0.80 (3H, s, 27-H₃). ^{13}C -NMR (CDCl_3) δ : 119.9 (T, C-15), 90.9 (T, C-5), 85.2 (T, C-3), 84.4 (T, C-22), 79.1 (T, C-17), 58.0 (Q, C-9), 56.7 (Q, C-13), 45.8 (D, C-7), 44.9 (D, C-19), 38.0 (D, C-20), 37.5 (D, C-1), 26.2 (S, C-29), 25.7 (S, C-24), 24.2 (S, C-30), 23.7 (S, C-25).

各種生物活性試験に関する実験

抗真菌活性試験の方法

抗真菌活性試験はペーパーディスク法で行い、試験菌として病原酵母 2 種(*Candida albicans* ATCC90028、*Cryptococcus neoformans* ATCC90112) および病原糸状菌

(*Aspergillus fumigatus* IFM41243 および *A. niger* IFM41398)を用いた。試験方法は、試料を適当な濃度に希釈し、滅菌済み 8mm ディスクに染み込ませ良く乾燥させた後、抗真菌試験用培地の上に置き、25℃で培養した。病原酵母は 24 時間後、病原糸状菌は 48 時間後の阻止円の大きさを測定した。なお、抗真菌試験用培地の作製は、前述の試験菌をあらかじめ PDA 斜面培地に培養しておき、前培養試験菌を滅菌水に懸濁させ、PDA 培地に混入後、滅菌済みシャーレに 10-15mL ずつ分注し、作製した。

ラット摘出大動脈を用いた血管弛緩作用³¹⁾

7-8 週齢の Wistar 系雄性ラットを用い、マグヌス法で測定した。ラットの胸部の動脈を摘出し、付着した脂肪等を除いた血管を長さ 3mm に切断し、測定装置に取り付け、EGTA 添加 Ca^{2+} 除去 Krebs-Henseleit 溶液を用いて洗い、 Ca^{2+} を取り除いた後、 Ca^{2+} 除去・高濃度 K^{+} Krebs-Henseleit 溶液に置換した。試料溶液 (10^{-6} M または 10^{-7} M: 0.1%DMSO 溶液)を投与し、1 時間プレインキュベート後、 CaCl_2 を Ca^{2+} 濃度が段階的に上昇するように添加し、血管の収縮を観察した。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始変わらぬ懇切なる御指導・御助言を賜りました、星薬科大学薬化学教室 河合賢一教授、細江智夫講師、ならびに奥羽大学薬学部 野沢幸平教授に心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、菌株の御供与ならびに研究の御助言をして下さいました千葉大学真菌医学研究センター 福島和貴教授、矢口貴志准教授、滝澤香代子博士に深謝いたします。また、MS および NMR スペクトルを測定して下さいました国立医薬品食品衛生研究所 川原信夫博士、ならびに星薬科大学機器センター 笠井博子博士、池上眞由美博士、元素分析をして下さいました斉藤節博士に深く感謝申し上げます。

最後に、本研究に御助言・御討論をして下さいました、板橋武史助手をはじめとする星薬科大学薬化学教室の皆様にも心より感謝申し上げます。

引用文献

- 1) Y. Chin, M. J. Balunas, H. B. Chai, A. D. Kinghorn, Drug discovery from natural sources, *The AAPS.*, **8**, E239-E253 (2006).
- 2) M. Misiek, D. Hoffmeister, Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical science, *Planta Med.*, **73**, 103-115 (2007).
- 3) <http://www.antibiotics.or.jp/>, 財団法人 日本抗生物質学術協議会
- 4) H. Haruyama, H. Kuwano, T. Kinoshita, A. Terahara, T. Nishigaki, C. Tamura, Structure elucidation of the bioactive metabolites of ML-236B (mevastatin) isolated from dog urine, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 1459-1467 (1986).
- 5) F. Benz, F. Knusel, J. Nuesch, H. Treichler, R. Nyfeler, W. K. Schierlein, Echinocandin B, a novel polypeptide-antibiotic from *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: isolation and structural components., *Helv. Chim. Acta*, **57**, 2459-2477 (1974).
- 6) D. Kluepfel, J. Bagli, H. Baker, M. Charest, A. Kudelski, S. N. Sehgal, C. Vezina, Myriocin, a new antifungal antibiotic from *Myriococcum albomyces*., *J. Antibiotics*, **25**, 109-115 (1971).
- 7) Richard J. Cole, Richard H. Cox, "Handbook of Toxic Fungal Metabolites" Academic press, New York.
- 8) D. Wakana, T. Hosoe, T. Itabashi, K. Okada, G. M. de Campos Takaki, T. Yaguchi, K. Fukushima, K. Kawai, New citrinin derivatives isolated from *Penicillium citrinum*, *J. Nat. Med.*, **60**, 279-284 (2006).
- 9) D. Wakana, T. Hosoe, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Okada, G. M. de Campos Takaki, T. Yaguchi, K. Fukushima, K. Kawai, Isolation of isoterrein from *Neosartorya fischeri*, *Mycotoxins*, **56**, 3-6 (2006).
- 10) T. Hosoe, D. Wakana, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Okada, G. M. de Campos Takaki, K. Takizawa, T. Yaguchi, K. Fukushima, K. kawai, Antifungal sunstances isolated from *Aspergillus fumigatus* IFN 54246, obtained from a Brazilian soil, *Mycotoxins*, **56**, 7-10 (2006).

- 11) 山口英世, 病原真菌と真菌症 改定 2 版, 南山堂, 東京, 2003 年.
- 12) S. Udagawa, Taxonomical outline of dermatophytes in the Ascomycetes, *Jpn. J. Med. Mycol.*, **38**, 1-4 (1997).
- 13) Y. Chiung, T. Fujita, M. Nakagawa, H. Nozawa, G. Chen, Z. Chen, M. Nakayama, A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54, *J. Antibiotics*, **46**, 1819-1826 (1993).
- 14) B. Schlegel, A. Hartl, F. A. Gollmick, U. Grafe, 7-Methoxy-2,3-dimethylbenzofuran-5-ol, a new antioxidant from *Malbranchea cinnamomea* HKI 0286, *J. Antibiotics*, **56**, 792-794 (2003).
- 15) B. Schlegel, F. Hanel, F. A. Gollmick, H. P. Saluz, U. Grafe, New quinones and hydroquinones from *Malbranchea cinnamomea* HKI 286 and HKI 296 and interaction with Tax/CREB expression system in yeast, *J. Antibiotics*, **56**, 917-922 (2003).
- 16) S. Martinez-Luis, M. C. Gonzalez, M. Ulloa, R. Mata, Phytotoxines from the fungus *Malbranchea aueantiaca*, *Phytochemistry*, **66**, 1012-1016 (2005).
- 17) S. Martinez-Luis, R. Rodriguez, L. Acevedo, M. C. Gonzalez, A. Lira-Rocha, R. Mata, Malbrancheamide, a new calmodulin inhibitor from the fungus *Malbranchea aurantiaca*, *Tetrahedron*, **62**, 1817-1822 (2006).
- 18) A. Suzuki, M. Kanaoka, A. Isogai, S. Murakoshi, M. Ichinoe, S. Tamura, Bassianolide, a new insecticidal cyclopeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*, *Tetrahedron Letters*, **25**, 2167-2170 (1977).
- 19) S. Takase, Y. Kawai, I. Uchida, H. Tanaka, H. Aoki, Structure of amauromine, a new hypotensive vasodilator produced by *amauroascus* sp, *Tetrahedron*, **45**, 3037-3048 (1985).
- 20) M. Braun, Regioselective synthesis of catenarin and erythroglaucin, *Tetrahedron Letters*, **20**, 2885-2888 (1979).
- 21) L. Jing, X. Tao, W. Xiu-Li, Y. Han, Y. Chun-Hua, L. Jing-Yu, Chemical studies on *Rabdosia*., *Chin. J. Nat. Med.*, **2**, 276-279 (2004).
- 22) R. W. Jeanloz, 6-*O*-Methyl-D-glucosamine hydrochloride, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**,

558-560 (1954).

23) I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, High-field FT NMR application of Mosher's Method. The absolute configurations of marine terpenoids, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991).

24) J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, The assignment of absolute configuration by NMR. *Chem. Rev.*, **104**, 17-117 (2004).

25) H. Mihashi, O. Tanaka, S. Nozoe, M. Nagai, 天然物化学 改訂第2版, 南江堂, 東京, 1986年, p70-71.

26) A. Rudi, Z. Stein, I. Goldberg, T. Yosief, Y. Kashman, Yardenone and abudinol two new triterpenes from the marine sponge *Ptilocaulis spiculifer*, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 1445-1448 (1998).

27) A. Rudi, T. Yoshief, M. Schleyer, Y. Kashman, Several new isoprenoids from two marine sponges of the family Axinellidae, *Tetrahedron*, **55**, 5555-5566 (1999).

28) E. R. Cruz, The biosynthesis of the new tremulane sesquiterpenes isolated from *Phellinus tremulae*, *Can. J. Chem.*, **75**, 834-839 (1997).

29) B. Clark, R. J. Capon, E. Lacey, S. Tennant, J. H. Gill, B. Bulheller, G. Bringmann, Gymnoascolides A-C: Aromatic butenolides from an Australian isolate of the soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*, *J. Nat. Prod.*, **68**, 1226-1230 (2005).

30) H. Fujimoto, Y. Satoh, K. Yamaguchi, M. Yamazaki, Monoamine oxidase inhibitory constituents from *Anixiella micropertusa*, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1506-1510 (1998).

31) M. Nagai, M. Noguchi, T. Iizuka, K. Otani, K. Kamata, Vasodilator effects of des (α -carboxy-3,4-dihydroxyphenethyl)lithospermic acid (8-epibleclmic acid), a derivative of lithospermic acids in *Salviae miltiorrhizae radix*, *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 228-232 (1996).

論文リスト

本論文は、以下の発表論文から構成されている。

第 2 章

T. Hosoe, T. Iizuka, S. Komai, D. Wakana, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Fukushima, K. Kawai, 4-Benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300, *Phytochemistry*, **66**, 2776-2779 (2005).

D. Wakana, T. Hosoe, T. Itabashi, K. Fukushima, K. Kawai, Two new furanone glycosides, malfilamentoside A and B, from *Malbranchea filamentosa*, *Mycotoxins*, **58**, accepted (2008).

第 3 章および第 4 章

D. Wakana, T. Hosoe, T. Itabashi, H. Okada, K. Fukushima, K. Kawai, Structures of new triterpene glycosides, malbrancheoside A-D, from *Malbranchea filamentosa*, *Heterocycles*, submitted.