

Cladosporium 属菌および未同定土壤分離真菌が
産生する抗 *Aspergillus fumigatus* 物質

細江 智夫

目 次

略語表

序 論 1-7

本 論 8-25

第 1 章 *Cladosporium* sp. IFM 49189 由来の抗真菌活性物質

第 1 節 *Cladosporium* sp. IFM 49189 の培養および成分分離

第 2 節 Cladosporide A の構造

第 3 節 Cladosporide A の抗真菌作用

第 4 節 Cladosporide B-D の構造

第 5 節 Pentanorlanostane 誘導体の抗真菌活性

第 2 章 未同定真菌 IFM 52672 由来の抗真菌活性物質 26-42

第 1 節 未同定真菌 IFM 52672 の培養および成分分離

第 2 節 Dihydroepiheveadride および関連化合物の構造

第 3 節 Dihydroepiheveadride および関連化合物の抗真菌活性

結 論 43-48

実験の部 49-61

第 1 章に関する実験

第 2 章に関する実験

謝 辞 62

引用文献 63-66

論文リスト 67

略号表

本論文においては、以下の略号を使用する。

ABPM	Allergenic bronchopulmonary aspergillosis
CD	Circular dichroism
CI-MS	Chemical ionization mass spectrometry
^{13}C -NMR	^{13}C - Nuclear magnetic resonance
^1H - ^1H COSY	^1H - ^1H Correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
^1H -NMR	^1H -Nuclear magnetic resonance
HPLC	High performance liquid chromatography
HREI-MS	High resolution electron ionization mass spectrometry
IR	Infrared
LPLC	Low pressure liquid chromatography
MIC	Minimum inhibitory concentration
NCCLS	The national committee for clinical laboratory standard
NOE	Nuclear Overhauser effect
NOESY	Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
PCC	Pyridinium chlorochromate
PDC	Pyridinium dichromate
TLC	Thin-layer chromatography
TsOH	<i>p</i> -Toluenesulfonic acid
UV	Ultraviolet

序 論

深在性真菌症は、別名内臓真菌症ともいわれるように身体内部の臓器や組織が真菌で侵される感染症のことである。

我が国にみられる深在性真菌症は、1960年頃より日和見感染として増加傾向がみられていたが、それほど致死的ではなく、あまり重要視されていなかった。

しかし、医学の進歩に伴い悪性腫瘍、造血系疾患、臓器移植などにより抵抗力の低下した患者が長期間生存可能になったことや広域抗生物質、抗腫瘍剤、副腎皮質ホルモン剤や免疫抑制剤の汎用、また各種留置カテーテルの使用が医療現場で日常的に行なわれるようになったことなどから、真菌感染症の増加と重篤化がみられるようになり、結果として直接死因に結びつくことも多くなってきた。また、深在性真菌症は診断が難しく熟練を要することや、副作用の少なく使いやすい抗真菌薬がなかったことなどから患者の増加とともに徐々に注目されるようになった^{1,2,3)}。さらに、1980年代には後天性免疫不全症候群（AIDS : acquired immunodeficiency syndrome）の新たな出現とその患者の著しい増加により、エイズに伴う真菌症の報告も注目されるようになった^{4,5)}。

この間、感染症治療薬として抗生物質が次から次へと新しい薬剤として臨床的に使われるようになったのに対し、真菌症に対する新しい予防・診断・治療の方法や新規抗真菌薬の開発はかなり遅れているのが現状である。

従来、日本国内で使用されている深在性真菌症の治療薬は細胞膜障害作用を有するアムホテリシン B (1)、核酸合成阻害薬であるフルシトシン (2)、細胞膜エルゴステロール合成阻害活性を有するアゾール系抗真菌剤ミコナゾール (3)、フルコナゾール (4) およびイトラコナゾール (5) の 5 薬剤であったが、2002年に 1,3- β -D-グルカン合成酵素阻害という新しい作用機序のキャンディン系抗真菌薬ミカファンギン (6) が承認され、深在性真菌症に対する新しい治療が期待されている (Fig. 1)。しかしながら、近年の医療技術の発達に伴い免疫力が低下した患者の増加や薬剤耐性菌の出現等といった現状からも、これまでの薬剤だけでは不十分であり、深在性真菌症の治療には新規抗真菌薬の開発がなお必要である。

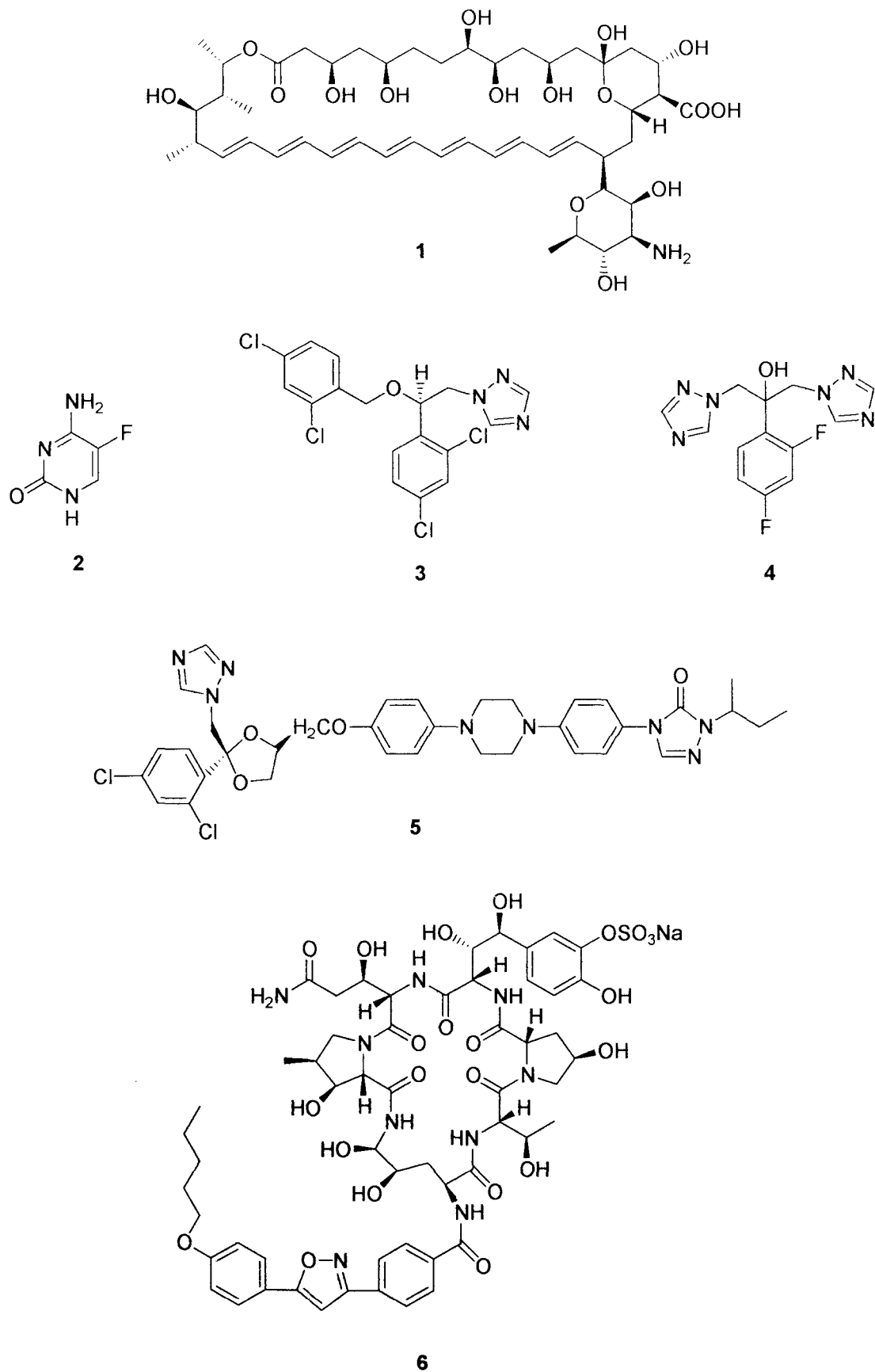


Fig. 1. Drugs for Deep Mycosis Used in Japan

特に最近の深在性真菌症の傾向として、主に *Aspergillus fumigatus* FRESENIUS var. *fumigatus* (以下、*A. fumigatus*) を原因菌としたアスペルギルス症の増加が認められている⁶⁾。現在、深在性真菌症の治療薬として最も汎用されているフルコナゾールは *Aspergillus* 属に対する抗真菌活性は弱いため、抗 *A. fumigatus* 作用を示す新規薬剤は医療現場において要求の高い薬剤と考えられる。

著者は、これまでに真菌類の第二次代謝産物の成分研究を行っており、*Oidiodendron* cf. *truncatum* UAMH 9473 から化合物 **12-17** を分離するとともに、抗真菌作用を有する化合物として LL-Z1271 α ^{7,8)} (**7**)、PR1388⁸⁾ (**8**) と新規 tetranorditerpenoid 化合物 oidiodendrolide A (**9**)、B (**10**) および C (**11**) を分離している⁹⁾ (Fig. 2)。

これらの tetranorditerpenoid 関連化合物は、カンジダ症の原因菌である *Candida albicans* (ROBIN) BERKHOUT (以下、*C. albicans*) およびクリプトコッカス症の原因菌 *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN var. *neoformans* (以下、*Cry. neoformans*) に対して抗真菌活性を示した。また、non-*albicans* *Candida* 症の原因菌となる *C. parapsilosis* や *C. dubliniensis* などの *C. albicans* 以外の病原性酵母に対しても抗真菌活性を示した (Table 1)。化合物 **8** は、輸入真菌症の1つであるヒストプラズマ症の原因菌 *Histoplasma capsulatum* に対しても抗真菌作用を示した。一連の tetranorditerpenoid 化合物の抗真菌活性は、C環がアセタール構造であることが必要であり、また B, C環内に不飽和結合が存在するほど、つまり B, C環の平面性が増すほど、強い活性を示すという結果が得られた (Chart 1)。

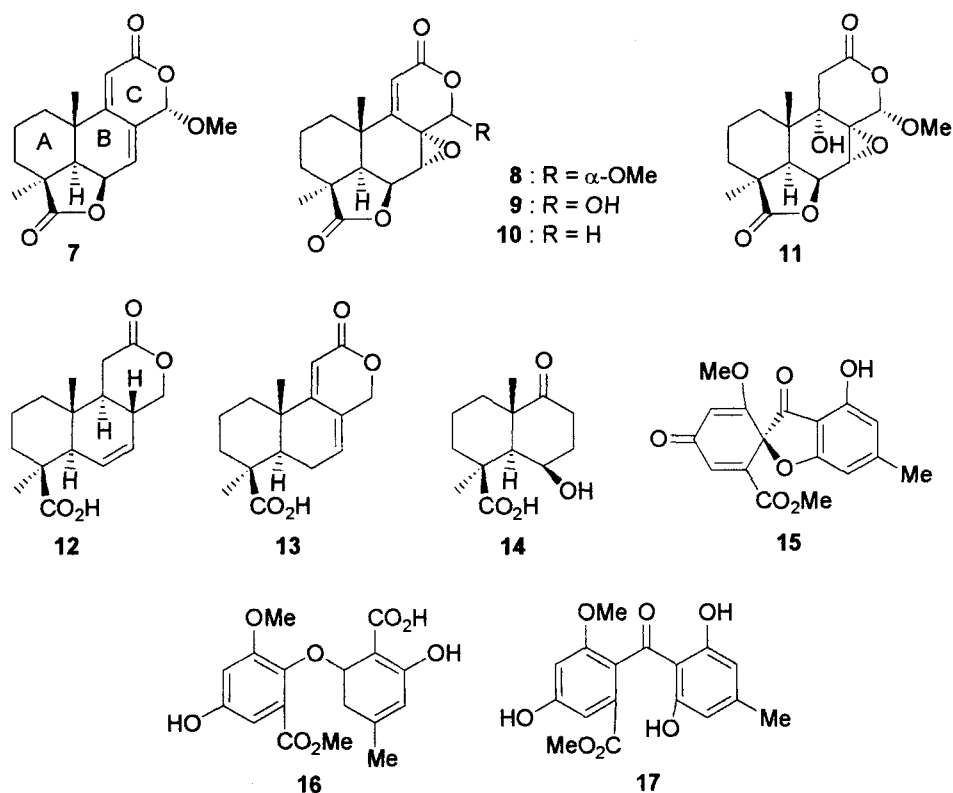


Fig. 2. Chemical Structures of Compounds Isolated from *Oidiodendron cf. truncatum* UAMH 9473

Table 1. *In vitro* antifungal activity (MIC) of 7 ~ 11

Test organism	Strain	MIC (μ g/ml)				
		7	8	9	10	11
<i>Candida albicans</i>	ATCC90028	8	16	>64	>64	32
<i>Candida albicans</i>	ATCC90029	8	16	>64	>64	32
<i>Candida albicans</i>	1463D	8	16	>64	>64	32
<i>Candida tropicalis</i>	IFM46816	32	64	>64	>64	64
<i>Candida parapsilosis</i>	IFM46863	8	16	>64	>64	32
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS7987	8	8	>64	>64	32
<i>Candida kefyr</i>	IFM46921	2	2	>64	>64	16
<i>Candida guilliermondii</i>	IFM46823	8	32	>64	>64	32
<i>Pichia anomala</i>	IFM47182	2	4	>64	>64	16
<i>Cryptococcus neoformans</i>	ATCC90112	4	8	>64	>64	16
<i>Exophiala dermatitidis</i>	yeast type	16	32	>64	>64	>64
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	KCH-1155	32	64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM41243	>64	>64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM41934	64	64	>64	>64	>64
<i>Aspergillus niger</i>	IFM41398	64	64	>64	>64	>64

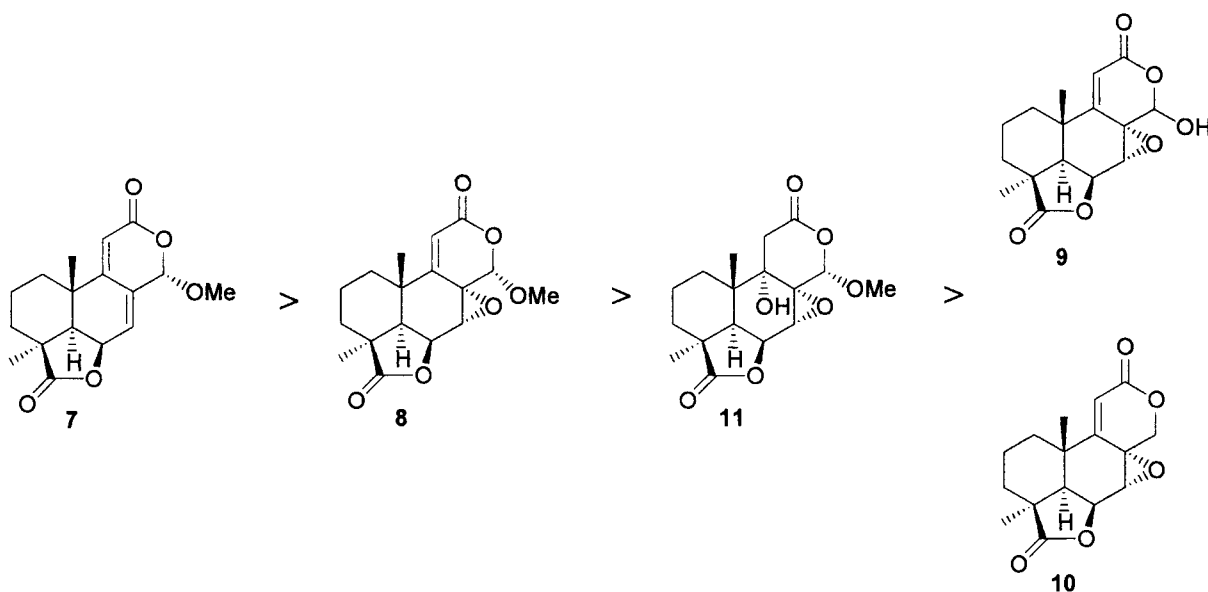


Chart 1.

近年、Sakai らにより *Aspergillus* sp. の培養菌体および培養ろ液から *A. fumigatus* に対して特異的な抗真菌作用を有する新規ステロイド Mer-NF8054A (18) および Mer-NF8054X (19) の単離が報告された¹⁰⁾。さらに水野らにより、*Emericella heterothallica* (KWON, FENNEL & RAPER) MALLOCH & CAIN, ATCC 16847 (mating type A) および ATCC 16824 (mating type a) からの Mer-NF8054X (19) の単離および絶対構造についての報告があった¹¹⁾。著者は、新たな抗 *A. fumigatus* 作用を有する化合物を求めて、上記 2 菌株について、成分検索を行なったところ、Mer-NF8054A および Mer-NF8054X と同じ 18,22-cycloergostane 骨格を有する新規化合物 emesterone A (20) および emesterone B (21) を単離したが、これらの化合物の *A. fumigatus* に対する抗真菌作用はいずれも Mer-NF8054A (18) より弱かった¹²⁾ (Fig. 3 および Table 2)。この結果から、11 位のカルボニル基の有無と 3 位の OH 基が抗真菌活性の強度に関与すると考えられた (Chart 2)。

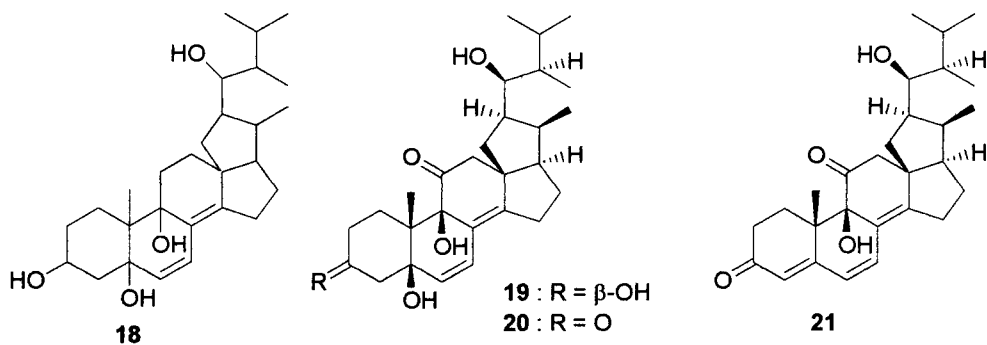


Fig. 3. Chemical Structures of 18, 22-Cycloergosterol Derivatives

Table 2. *In vitro* antifungal activity (MIC) of 18 - 21

Test organism	Strain	MIC (μ g/ml)			
		18*	19	20	21
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM4942	0.16	10	>80	20
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM41088	0.63	20	>80	80
<i>Candida albicans</i>	IFM40009	>50	>80	>80	>80

* The values were revised from the literature.¹⁰⁾

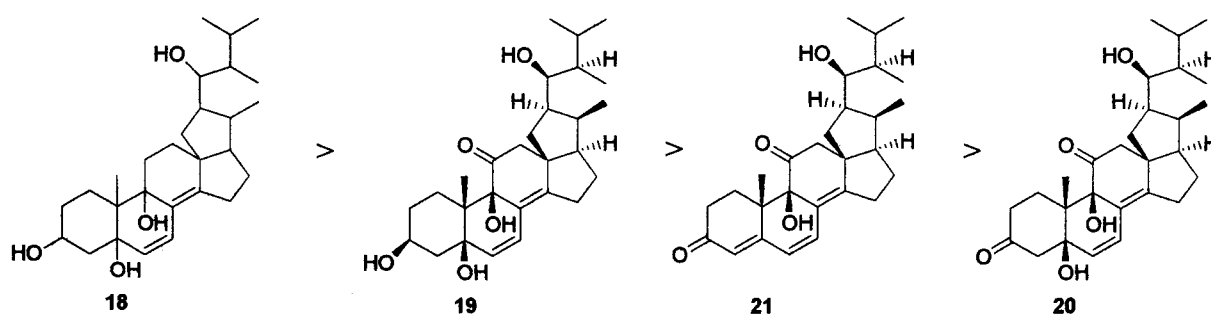


Chart 2.

そこで、著者は抗 *A. fumigatus* 作用を有する新規化合物を求めて、菌株保有機関（千葉大学真菌医学研究センター等）の保存菌株や新規分離菌株について

抗菌スクリーニングを行なった。その結果、抗 *A. fumigatus* 活性を有する化合物として、*Cladosporium* sp. IFM 49189 から新規 pentanorlanostane 誘導体 cladosporide A・D を、また未同定真菌 IFM52672 から新規 nonadrine である dihydroepiheveadrine およびその関連化合物を単離し、構造決定を行なった。さらに各化合物の構造の一部を化学変換することで、これらの化学構造と抗真菌活性との関連を示す知見が得られたので、本論にて報告する。

本 論

第 1 章 *Cladosporium* sp. IFM 49189 由来の抗真菌活性物質

新規抗真菌物質を得るために、1997年に南米土壌から分離した菌株約160種について、試験菌に *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans* および *Cry. neoformans* を用いて抗真菌活性スクリーニングを行なった結果、19菌株に抗真菌活性が認められた (Table 3)。これらの菌株のうち、*A. fumigatus* に対してのみ抗真菌活性を示した *Cladosporium* sp. IFM 49189 株から抗真菌活性物質の分離を試みた。

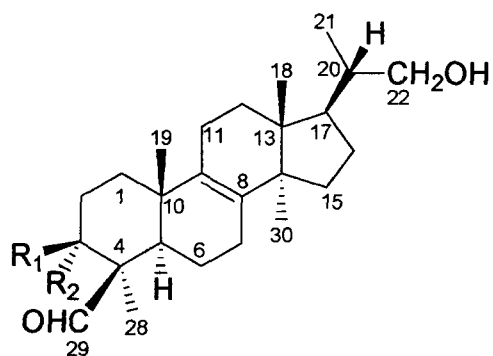
Table 3. Antifungal Activity of Fungal Extracts

Strain of fungus	Test organism			
	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>Cry. neoformans</i>
<i>Paecilomyces lilacinus</i> (Jo-1Ab)	16	22	18	(11)
<i>Fusarium</i> sp. (101)	11	(12)	10	-
Unidentified fungus (Mo-15A)	(13)	27	-	-
Unidentified fungus (133C)	17	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (Na-9②) = IFM 49189)	(15)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (150B)	(15)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (145B)	(12.5)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (165A)	(12)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (142A)	(11.5)	-	-	-
Unidentified fungus (133A)	(11)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (159A)	(11)	-	-	-
<i>Cladosporium</i> sp. (165B)	(11)	-	-	-
Unidentified fungus (168)	(10)	-	-	-
<i>Trichoderma</i> sp. (75B)	-	12	11	-
Unidentified fungus (Fo-1a)	-	-	(11)	(10)
<i>Aspergillus japonicus</i> (80A)	-	-	11	-
Unidentified fungus (152B)	-	-	-	(11)
<i>Penicillium</i> sp. (133D)	-	-	-	(10)
<i>Penicillium</i> sp. (138A)	-	-	-	(10)

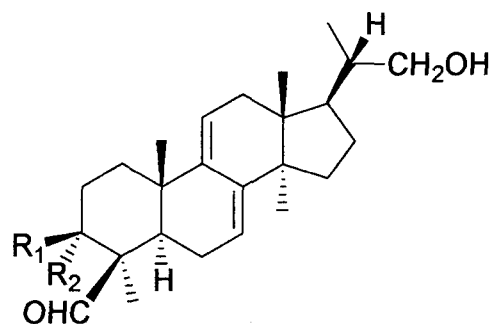
The diameter of inhibitory zone was measured in mm. The parenthesis means slightly growing in the inhibition circle. The minus (-) means no inhibition.

第 1 節 *Cladosporium* sp. IFM 49189 の培養および成分分離

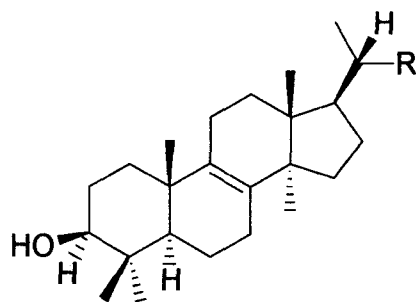
Cladosporium sp. IFM 49189 を 米培地 1500 g (米 150 g を 10 本の 1L 用 Roux flask に分注) で 21 日間、25 °C で培養した後、CH₂Cl₂-EtOH (1 : 1) で抽出・濃縮を行ない抽出物 24 g を得た。抽出物は、精製水で懸濁した後、CHCl₃ で液液分配を行なうと抗真菌活性は有機層のみに存在したので、それを濃縮し抽出エキス 14.5 g を得た。次に、抽出エキス 14.5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃, CHCl₃-EtOH (50 : 1), CHCl₃-EtOH (5 : 1), CHCl₃-EtOH (1 : 1) および acetone で順次溶出した。CHCl₃ および CHCl₃-EtOH (50 : 1) 分画の主成分は、ergosterol (22) であった。抗真菌活性は CHCl₃-EtOH (50 : 1) 分画に認められた。そこで、本分画を溶離液 CH₂Cl₂-acetone (20 : 1) で、シリカゲル LPLC によって分離を行なったところ、抗真菌活性は ergosterol peroxide (23) を主成分とした分画に認められた。この分画を濃縮乾固した後、MeOH を添加して溶解し遠心分離を行ない、沈殿物として ergosterol peroxide (23) と脂肪酸を除去した。上清液は溶離液 90% MeOH を用いて ODS 逆相 LPLC で繰返し精製した後、HPLC (CHCl₃ : MeOH = 200:1) で精製することで、lanosterol (24) の側鎖から炭素 5 個が欠損した pentanorlanostane 誘導体である 23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol (25)¹³⁾ 3 mg とともに新規化合物である cladosporide A (26) 13 mg、cladosporide B (27) 2 mg、cladosporide C (28) 2.5 mg および cladosporide D (29) 1 mg を得た (Chart 3 および Fig. 4)。



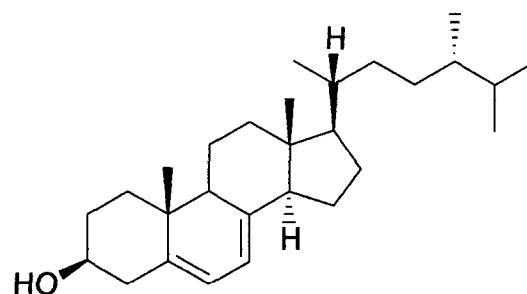
Cladosporide A (**26**) : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$
 Cladosporide C (**28**) : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$



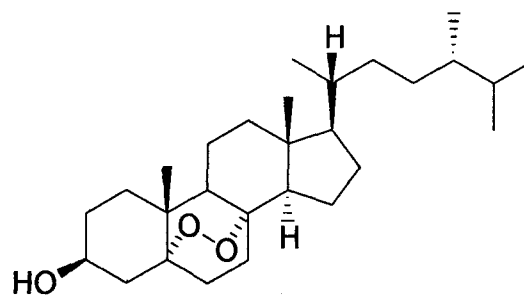
Cladosporide B (**27**) : $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$
 Cladosporide D (**29**) : $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$



25 : $R = \text{CH}_2\text{OH}$
 Lanosterol (**24**) : $R =$



Ergosterol (**22**)



Ergosterol peroxide (**23**)

Fig. 4. Chemical Structures of Cladosporides A - D
 and Their Related Compounds

Cladosporium sp. IFM 49189

cultured at 25 °C for 21d (1500 g of moistured rice)
extracted with CH₂Cl₂-EtOH (1:1)

Extract (24 g)

partitioned with H₂O-CHCl₃

H₂O layer

CHCl₃ layer (Residue : 14.5 g)

chromatographed on silica gel

CHCl₃

CHCl₃-EtOH (50:1)

CHCl₃-EtOH (5:1)

CHCl₃-EtOH (1:1)

acetone

Ergosterol (22)

LPLC on silica gel using CH₂Cl₂-acetone (20:1)
dissolved in MeOH

ppt

Supernatant

Ergosterol peroxide (23)

LPLC on ODS (90% MeOH)
HPLC on silica gel [CHCl₃-MeOH (200:1)]

Cladosporide A (26) 13 mg

Cladosporide C (28) 2.5 mg

23,24,25,26,27-Pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol (25) 3 mg

Cladosporide B (27) 2 mg

Cladosporide D (29) 1 mg

Chart 3. Isolation of Cladosporides A (26)-D (29) from *Cladosporium* sp. IFM 49189

第 2 節 Cladosporide A の構造

Cladosporide A (**26**) の分子式は、HREI-MS から $C_{25}H_{40}O_3$ と決定した。 1H -NMR スペクトルから、 δ 0.72 (s), 0.90 (d, $J=1$ Hz), 0.93 (s), 1.03 (d, $J=6$ Hz) および 1.31 (s) に 5 つのメチル基の存在が確認された。また、 δ 3.36 (dd) および 3.66 (dd) に観測されるメチレンプロトンのシグナルから第一級アルコールの存在と δ 3.18 (brdd) に観測されるメチンプロトンから第二級アルコールの存在および δ 9.78 (d) のシグナルからホルミル基の存在が確認された。 ^{13}C -NMR スペクトルから、5 つのメチル炭素シグナルと酸素原子に隣接した δ 67.9 のシグナルを含む 9 つの sp^3 メチレン炭素シグナル、酸素原子に隣接した δ 77.0 のシグナルを含む 4 つの sp^3 メチン炭素シグナル、4 つの sp^3 四級炭素シグナル、 δ 133.2 および δ 134.4 の sp^2 四級炭素シグナルおよび δ 208.1 のアルデヒド由来炭素シグナルの計 25 個の炭素シグナルが観測された (Table 4)。Cladosporide A (**26**) は、UV スペクトルで 284 nm に $n \rightarrow \pi^*$ 遷移による極大吸収 ($\log \epsilon = 2.12$) が認められることから、ホルミル基由来の孤立したカルボニル基の存在が示唆された。Cladosporide A (**26**) は、分子式から不飽和度が 6 であり、分子内に 4 置換の二重結合とホルミル基が存在することから、四員環の pentanortriterpenoid あるいは sesterterpenoid 誘導体であると推定した。そこで、pentanorlanostane 骨格を有する **25** と cladosporide A (**26**) の 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルデータの比較検討を行なったところ、**25** に存在するメチル基由来のシグナルの 1 本 [δ_H 1.00 (3H, d, $J=1.2$ Hz), δ_C 28.0] が消失し、**26** で新たにホルミル基由来のシグナル [δ_H 9.78 (1H, d, $J=2$ Hz), δ_C 208.1] が観測された。さらに ^{13}C -NMR スペクトルについて詳細な検討を行なうと、A 環およびこれに近接した炭素シグナルすなわち、C-3 (**25**: δ 79.0, **26**: δ 77.0), C-4 (**25**: δ 38.9, **26**: δ 52.4), C-5 (**25**: δ 50.4, **26**: δ 52.0) および C-28 (**25**: δ 15.4, **26**: δ 18.7) に比較的大きな変化が観察されたことから、cladosporide A (**26**) は **25** の 4 位に結合したメチル基の 1 つがアルデヒドに酸化された構造であると推定した。 1H - 1H COSY および HMBC スペクトルの結果もこの構造を支持していた (Fig. 6)。

Table 4. ^1H - and ^{13}C -NMR Chemical Shifts of **25** and Cladosporide A (**26**) in CDCl_3

Carbon No.	25		26	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	35.6	1.22 m 1.74 m	35.3	1.25 ddd (13, 13, 5) 1.83 m
2	27.9*	1.57 m 1.68 m	28.4	1.83 m 1.93
3	79.0	3.23 dd (12, 5)	77.0	3.18 brdd (10, 4)
4	38.9		52.4	
5	50.4	1.05 m	52.0	1.32 dd (15, 2)
6	18.3	1.48 m 1.68 m	18.1	1.69 m 2.01 m
7	26.5*	1.90 m 2.03 m	26.4	2.12 m 2.12 m
8	134.5*		134.4	
9	134.3*		133.2	
10	37.0		37.0	
11	21.0	2.03 m 2.03 m	21.1	2.02 m 2.10 m
12	30.9*	1.68 m 1.77 m	30.5	1.71 m 1.78 m
13	44.7		44.3	
14	49.6		49.3	
15	31.0*	1.22 m 1.57 m	30.7	1.23 ddd (12, 12, 2) 1.60 m
16	27.7*	1.37 m 1.68 m	27.3	1.40 m 1.93 m
17	46.8	1.57 m	46.4	1.58 m
18	15.9	0.72 s	15.7	0.72 s
19	19.2	0.99 s	18.3	0.93 s
20	39.4	1.57 m	39.2	1.58 m
21	16.8	1.03 d (6)	16.5	1.03 d (6)
22	68.2	3.36 dd (11, 5) 3.65 brd (11)	67.9	3.36 dd (10, 6) 3.66 dd (10, 2)
28	15.4*	0.81 d (2)	18.7	1.31 s
29	28.0	1.00 d (1)	208.1	9.78 d (2)
30	24.3*	0.88 s	24.1	0.90 d (1)

* The assignments were revised from the literature¹¹⁾.

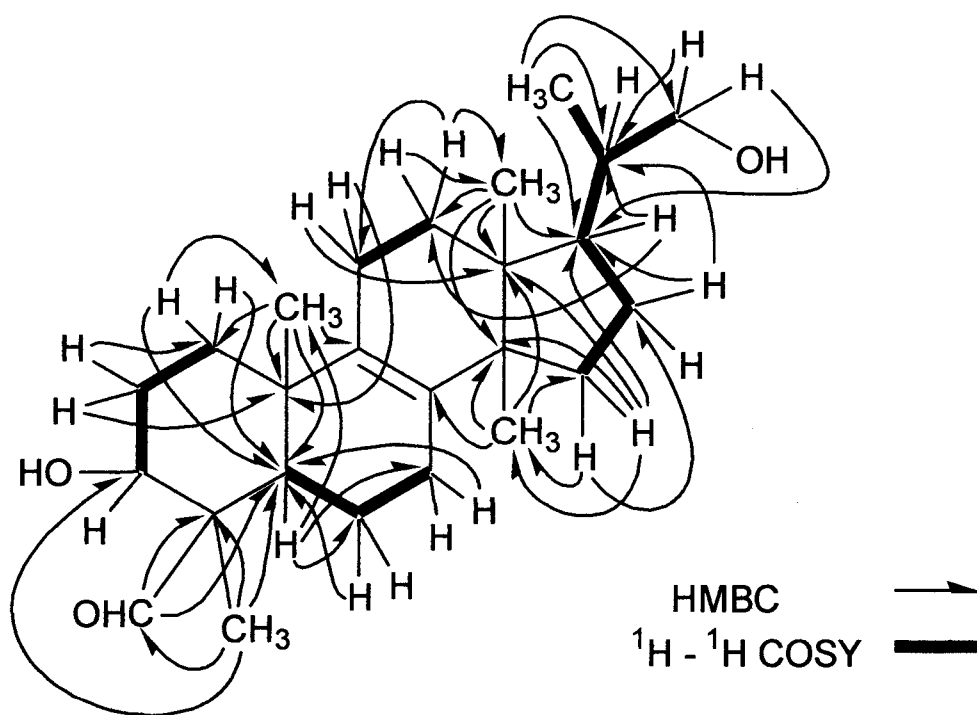


Fig. 6. HMBC and $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -COSY Correlations of Cladosporide A (26)

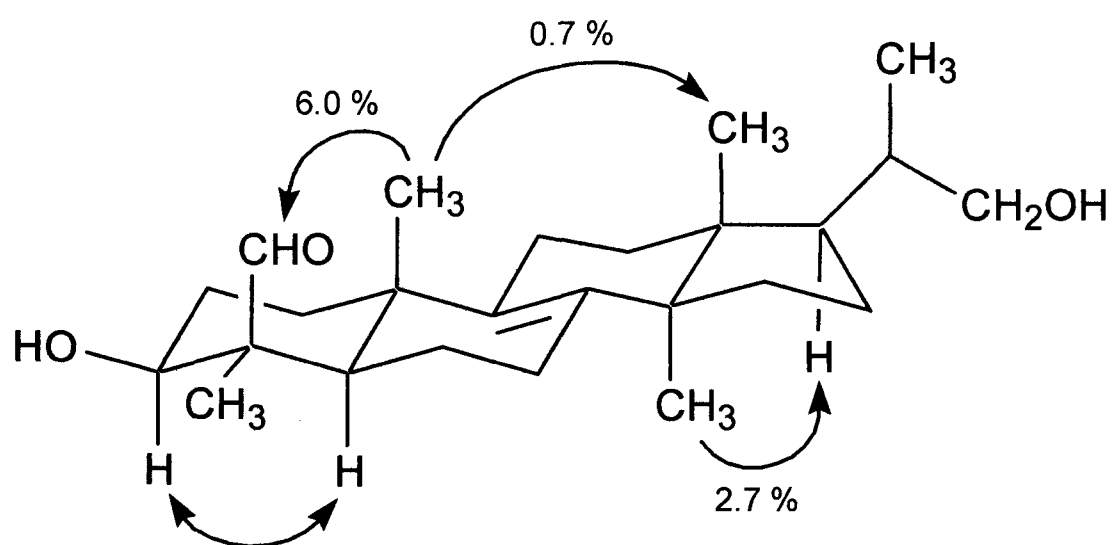


Fig. 7. NOE Correlations of Cladosporide A (26)

Cladosporide A (26) の NOE 実験において、19 位のメチル基のプロトン $\delta 0.93$ を照射したとき、ホルミル基のプロトン ($\delta 9.78$) と 18 位のメチル基のプロトン ($\delta 0.72$) の間にそれぞれ 6.0 % および 0.7 % の NOE が観測された。NOESY スペクトルにおける相関ピークは、3 位のプロトン ($\delta 3.18$) と 5 位のプロトン ($\delta 1.32$) の間にも観測された。これらの結果は、ホルミル基と 3 位の水酸基が同じ側に存在していることを示した。また、30 位のメチル基のプロトン ($\delta 0.90$) を照射した時、17 位のプロトン ($\delta 1.58$) に 2.7 % の NOE が観測された (Fig. 7)。このことから、17 位の側鎖の立体化学は β -位であると決定した。

Cladosporide A (26) の相対構造を確定するために、X線結晶解析を行なった。X線結晶解析に適した cladosporide A の結晶は、メタノール中から無色板状晶として得られた。結晶構造は、MITHRIL90¹⁴⁾ を用いた直接法によって解析を行ない、最終的な信頼度因子は $R = 0.073$ に収束した。結晶構造は、Fig. 8 に示すような cladosporide A·MeOH 一溶媒和物であった。Cladosporide A (26) 分子の結合距離や結合角度について、予想値との顕著なずれは認められなかった。また、cladosporide A (26) とメタノール分子は主に $22\text{-OH}\cdots 3\beta\text{-OH}\cdots\text{H}_2\text{O}\cdots 3\beta\text{-OH}$ [O2-H \cdots O1 (2.672 Å)、O1-H \cdots O4 (2.732 Å)、O4-H \cdots O1 (2.732 Å)] の水素結合により格子を形成していた。以上の結果から、cladosporide A (26) の相対構造は、Fig. 4 に示す通りであると決定した。

Cladosporide A (26) は、lanosterol 誘導体であることから、その絶対構造は Fig. 4 に示すような $3\beta, 22\text{-dihydroxy-}23, 24, 25, 26, 27\text{-pentanorlanostan-}29\text{-al}$ であると考えた。なお、X線結晶解析から得られた結晶構造について、29 位アルデヒドのカルボニル基にオクタント則を適用してみたところ符号は(-) となり、cladosporide A の絶対構造を支持する結果となった (Fig. 9)。

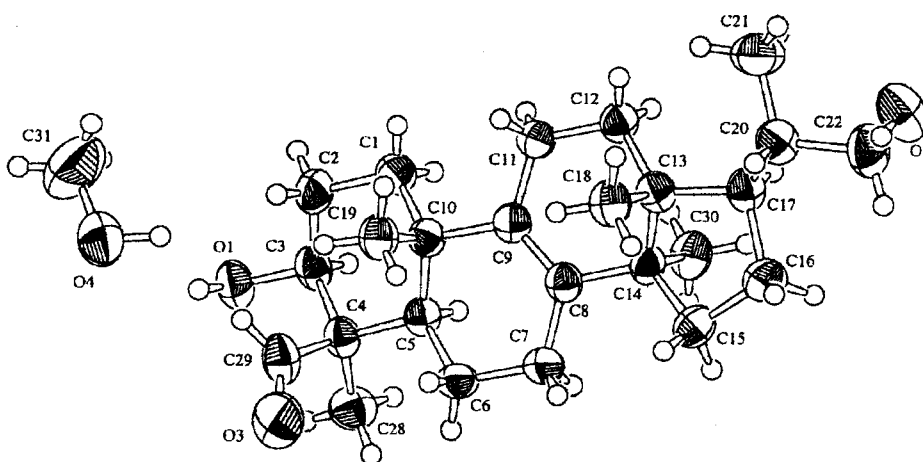


Fig. 8. Perspective View of the Crystal Structure of Cladosporide A (26) Methanol Solvate with Thermal Ellipsoids at 30 % Possibility

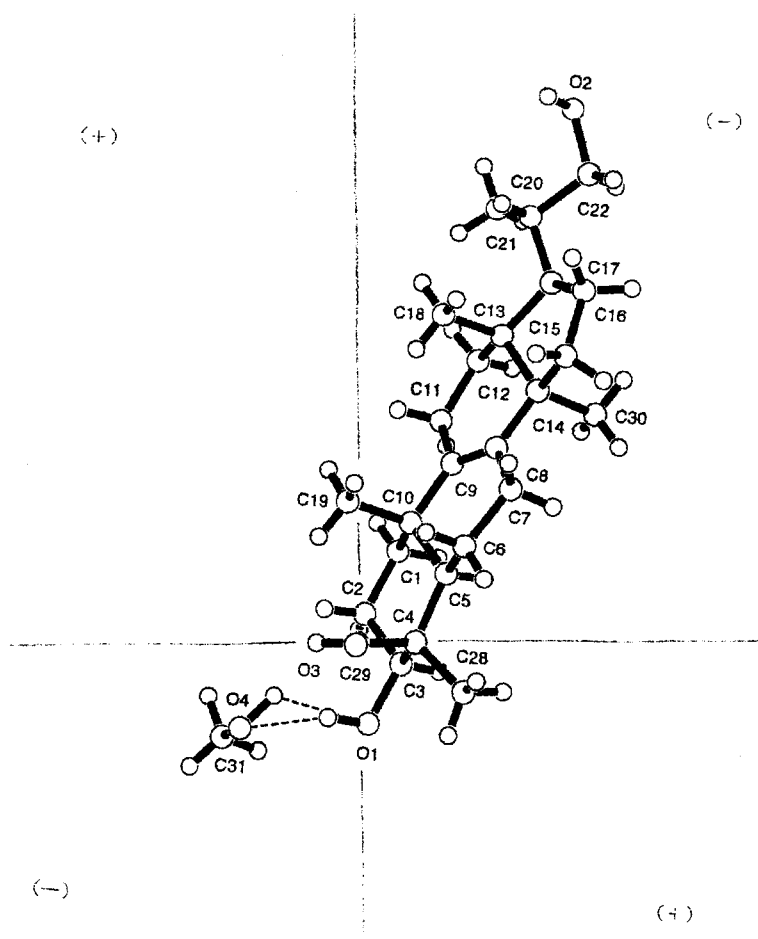


Fig. 9. The C=O Projection at Crystal Structure of Cladosporide A (26) Methanol Solvate

第 3 節 Cladosporide A の抗真菌作用

ヒトに対する病原真菌を含む糸状菌 10 株 および酵母 8 株に対する cladosporide A (26) の抗真菌スペクトルについて検討した。抗真菌活性試験は、NCCLS 法¹⁵⁾に準じた MIC 測定を行なったが、cladosporide A (26) は各試験菌に対して明瞭な MIC を示さなかった。そこで、cladosporide A (26) の各試験菌に対する 80 % 発育阻害濃度 (IC₈₀) を測定した (Table 5)。

ABPM 等の患者からの分離 5 菌株 (IFM 4942, IFM 40819, IFM 46075, IFM 47064 および IFM 47078) を含む 7 菌株の *A. fumigatus* に対して cladosporide A (26) は、IC₈₀ 0.5 - 4.0 µg/ml の抗真菌作用を示したが、同属の *A. flavus* や *A. niger* および病原性酵母 *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* および *Cry. neoformans* に対しては、128 µg/ml で抗真菌活性を示さなかった。

一方、cladosporide A (26) のホルミル基がメチル基にかわった 25 はすべての試験菌に対して、128 µg/ml で抗真菌活性を示さなかった。このことから、pentanorlanostane 誘導体の *A. fumigatus* に対する抗真菌作用には 4β-aldehyde が必要であると考えられた。

A. fumigatus は、ABPM 等のアスペルギルス症の主要な病原真菌であるので、cladosporide A (26) が静菌的作用ではあるが、*A. fumigatus* に対してのみ抗真菌作用を示すことは興味深い。

Table 5. Antifungal Activity of Cladsporide A (26)

Test organism	Strain	IC ₈₀ (μg/ml)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 4942	1.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 40819	4.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 41375	0.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 41382	1.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 46075	4.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 47064	4.0
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IFM 47078	0.5
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM 47031	>128
<i>Aspergillus flavus</i>	IFM 47032	>128
<i>Aspergillus niger</i>	IFM 41398	>128
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90028	>128
<i>Candida albicans</i>	ATCC 90029	>128
<i>Candida dubliniensis</i>	CBS 7988	>128
<i>Candida guilliermondii</i>	IFM 46823	>128
<i>Candida kefyr</i>	IFM 46921	>128
<i>Candida stellatoidea</i>	CBS 1905	>128
<i>Candida tropicalis</i>	IFM 46816	>128
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IFM 40215	>128

第 4 節 Cladosporide B-D の構造

Cladosporide B (27)、C (28) および D (29) の分子式は、HREI-MS からそれぞれ C₂₅H₃₈O₃、C₂₅H₄₀O₃ および C₂₅H₃₈O₃ と決定した。Cladosporide B・D の物理化学的性状は Table 6 に、¹H-NMR および ¹³C-NMR 解析データは Table 7 にまとめた。

Cladosporide C (28) は、cladosporide A (26)と同じ分子式 C₂₅H₄₀O₃ を示しており、両化合物の ¹³C-NMR スペクトルは、A 環およびこれに近接した炭素シグナルすなわち、C-1 (28 : δ 30.2, 26 : δ 35.3)、C-2 (28 : δ 26.5, 26 : δ 28.4)、C-3 (28 : δ 69.1, 26 : δ 77.0) および C-5 (28 : δ 45.2, 26 : δ 52.0) 以外はよく一致していた。¹H-NMR スペクトルにおいて、cladosporide C (28) と cladosporide A (26) は、C-3 のプロトン [28 : δ 4.14 (t, *J* = 3 Hz), 26 : δ 3.18 (brdd, *J* = 10, 4 Hz)] の化学シフトおよびカップリング様式に大きな違いが観測された。この結果から、cladosporide C (28) は、cladosporide A (26) の 3 位

のエピマー体であると推定した。そこで、各種二次元 NMR スペクトルによる詳細な検討を行なった結果 (Fig. 10 および Fig. 11)、 cladosporide C (**28**) の構造は cladosporide A (**26**) の 3 位の水酸基が α -OH となったエピマー体、すなわち 3 α , 22-dihydroxy-23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-en-29-al であると決定した。

Cladosporide B (**27**) および D (**29**) は、それぞれ cladosporide A (**26**) および C (**28**) より水素原子が 2 個少ない同じ分子式を有しており、また **27** および **29** は、どちらも 236, 243 および 251 nm に UV 極大吸収を示すことから、共役した二重結合の存在が示唆された。¹³C-NMR スペクトルで、cladosporide B (**27**) および D (**29**) は、 cladosporide A (**26**) および C (**28**) の 2 つの sp^2 炭素 (**26** : δ 134.4 および 133.2, **28** : δ 134.5 および 133.7) の代わりに、 4 つの sp^2 炭素 (**27** : δ 143.4, 143.0, 119.4 および 118.1, **29** : δ 143.6, 142.9, 119.4 および 117.7) が観測され、また **27** および **29** の ¹H-NMR スペクトルでは、それぞれ 2 つの二重結合上のプロトン、すなわち **27** では δ 5.43 (brd, $J = 6$ Hz) および 5.55 (brd, $J = 6$ Hz)、**29** では δ 5.43 (d, $J = 6$ Hz) および 5.52 (d, $J = 6$ Hz) が新たに観測された。これらの結果および各種二次元 NMR スペクトルの検討結果 (Fig. 12 および Fig. 13) から、 cladosporide B (**27**) および D (**29**) は 7,9(11) に共役二重結合をもつことが明らかとなった。また、¹H-NMR スペクトルで C-3 のプロトンの化学シフト値およびカップリング係数から、 cladosporide B (**27**) の C-3 の立体化学は、 cladosporide A (**26**) と同じ 3 β -OH [**27** : δ 3.23 (brdd, $J = 9, 5$ Hz), **26** : 3.18 (brdd, $J = 10, 4$ Hz)] であり、 cladosporide D (**29**) の 3 位の立体化学は cladosporide C (**28**) と同じ 3 α -OH [**29** : δ 4.12 (t, $J = 3$ Hz), **28** : 4.14 (t, $J = 3$ Hz)] であることがわかり、 NOESY の結果もそれを支持した。

以上の結果から、 cladosporide B (**27**) および D (**29**) の構造は、それぞれ cladosporide A (**26**) および C (**28**) の共役二重結合誘導体、すなわち 3 β , 22-dihydroxy-23,24,25,26,27-pentanorlanosta-7,9(11)-dien-29-al および 3 α , 22-dihydroxy-23,24,25,26,27-pentanorlanosta-7,9(11)-dien-29-al であると決定した。

Table 6. Physico-Chemical Properties of Cladosporide A (26), B (27), C (28) and D (29)

	26	27	28	29
Appearance	colorless plates (from MeOH)	colorless crystals (from CH ₂ Cl ₂ -MeOH)	colorless crystals (from CH ₂ Cl ₂ -MeOH)	colorless crystals (from CH ₂ Cl ₂ -MeOH)
Melting point (°C)	206-209	212-215	219-221	209-211
Molecular formula	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	C ₂₅ H ₃₈ O ₃	C ₂₅ H ₄₀ O ₃	C ₂₅ H ₃₈ O ₃
HREI-MS(M ⁺)	388.2962 (Calcd. 388.2977)	386.2832 (Calcd. 386.2821)	388.2975 (Calcd. 388.2977)	386.2806 (Calcd. 386.2821)
IR _v ^{KBr} cm ⁻¹	3400 (OH) 1715 (CO)	3370 (OH) 1710 (CO)	3385 (OH) 1720 (CO)	3380 (OH) 1715 (CO)
UV ^{MeOH} nm(log ε)	284 (2.12)	236 (4.15) 243 (4.03) 251 (4.03)	—	236 (4.22) 243 (4.28) 251 (4.03)
CD Δε(nm)	-0.55 (300)	-1.23 (304)	-0.57 (296)	-1.63 (301)

Table 7. ^1H - and ^{13}C -NMR Chemical Shifts of Cladosporide A (26), B (27), C (28) and D (29) in CDCl_3

No.	26		27		28		29	
	dC	dH (J in Hz)	dC	dH (J in Hz)	dC	dH (J in Hz)	dC	dH (J in Hz)
1	35.3	1.25 ddd (13, 13, 5) 1.83 m	35.7	1.55 m 2.05 m	30.2	1.52 m 1.52 m	29.9	1.68 m 1.76 m
2	28.4	1.83 m 1.93 m	28.6	1.92 m 1.94 m	26.5	1.65 m 2.08 m	26.4	1.76 m 1.76 m
3	77.0	3.18 brdd (10, 4)	77.0	3.23 brdd (9, 5)	69.1	4.14 t (3)	69.3	4.12 t (3)
4	52.4		52.4		52.4		51.9	
5	52.0	1.32 dd (15, 2)	50.6	1.40 dd (12.5, 4)	45.2	1.83 m	43.8	1.85 dd (13, 4)
6	18.1	1.69 m 2.01 m	22.6	2.27 brd (13, 12.5) 2.40 ddd (13, 6, 4)	17.8	1.83 m 1.92 m	21.9	2.29 ddd (17, 6, 4) 2.40 dd (17,13)
7	26.4	2.12 m 2.12 m	119.4	5.55 brd (6)	26.4	2.10 m 2.10 m	119.4	5.52 d (6)
8	134.4		143.4		134.5		143.6	
9	133.2		143.0		133.7		142.9	
10	37.0		37.3		37.3		37.3	
11	21.1	2.02 m 2.10 m	118.1	5.43 brd (6)	21.2	1.95 m 2.13 m	117.7	5.43 d (6)
12	30.5	1.71 m 1.78 m	37.7	2.10 dd (13, 6) 2.24 brd (13)	30.8	1.68 m 1.78 m	37.7	2.10 dd (18, 6) 2.26 brd (18)
13	44.3		43.8		44.6		43.9	
14	49.3		50.0		49.7		50.1	
15	30.7	1.23 ddd (12, 12, 2) 1.60 m	31.6	1.42 m 1.60 m	31.0	1.23 m 1.65 m	31.6	1.42 m 1.62 m
16	27.3	1.40 m 1.93 m	27.3	1.38 m 1.98 m	27.6	1.38 m 1.94 m	27.3	1.38 m 2.00 m
17	46.4	1.58 m	47.2	1.65 m	46.7	1.58 m	47.2	1.62 m
18	15.7	0.72 s	15.8	0.59 s	15.9	0.72 s	15.8	0.59 s
19	18.3	0.93 s	22.4	0.91 s	18.1	0.88 s	21.8	0.87 s
20	39.2	1.58 m	39.2	1.58 m	39.5	1.58 m	39.2	1.58 m
21	16.5	1.03 d (6)	16.6	1.02 d (6)	16.8	1.03 d (6)	16.6	1.02 d (6)
22	67.9	3.36 dd (10, 6) 3.66 dd (10, 2)	68.1	3.38 dd (10, 6) 3.67 dd (10, 2)	68.2	3.37 dd (10, 5) 3.66 brd (10)	68.1	3.38 dd (10, 7) 3.67 dd (10, 3)
28	18.7	1.31 s	19.4	1.30 d (2)	19.6	1.14 s	19.8	1.15 s
29	208.1	9.78 d (2)	208.1	9.91 d (2)	204.9	9.76 s	205.0	9.88 s
30	24.1	0.90 d (1)	25.4	0.89 s	24.3	0.90 s	25.4	0.91 s

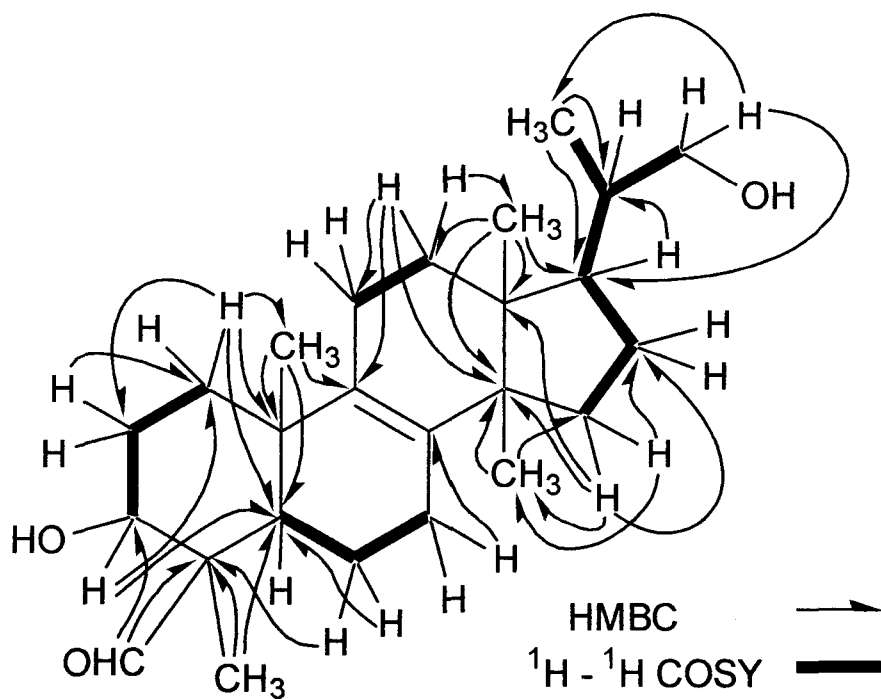


Fig. 10. HMBC and $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -COSY Correlations of Cladosporide C (**28**)

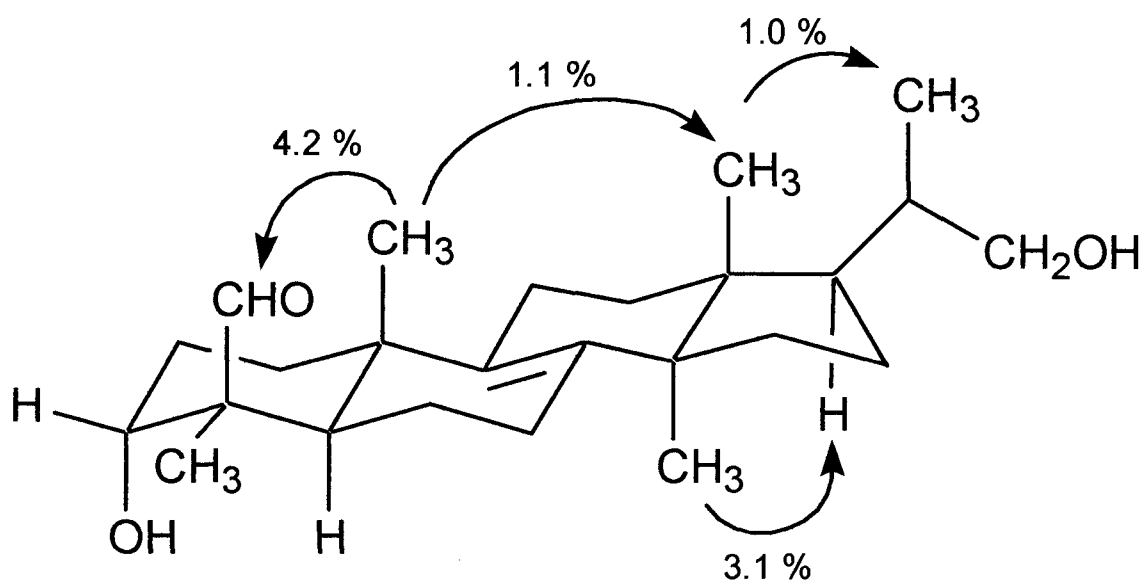


Fig. 11. NOE Correlations of Cladosporide C (**28**)

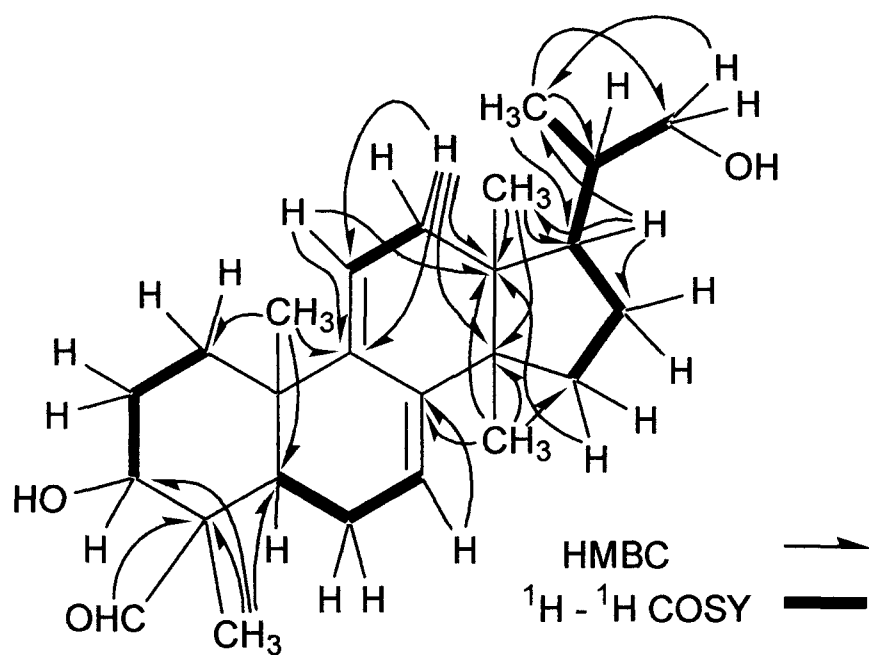


Fig. 12. HMBC and $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -COSY Correlations of Cladosporide B (**27**)

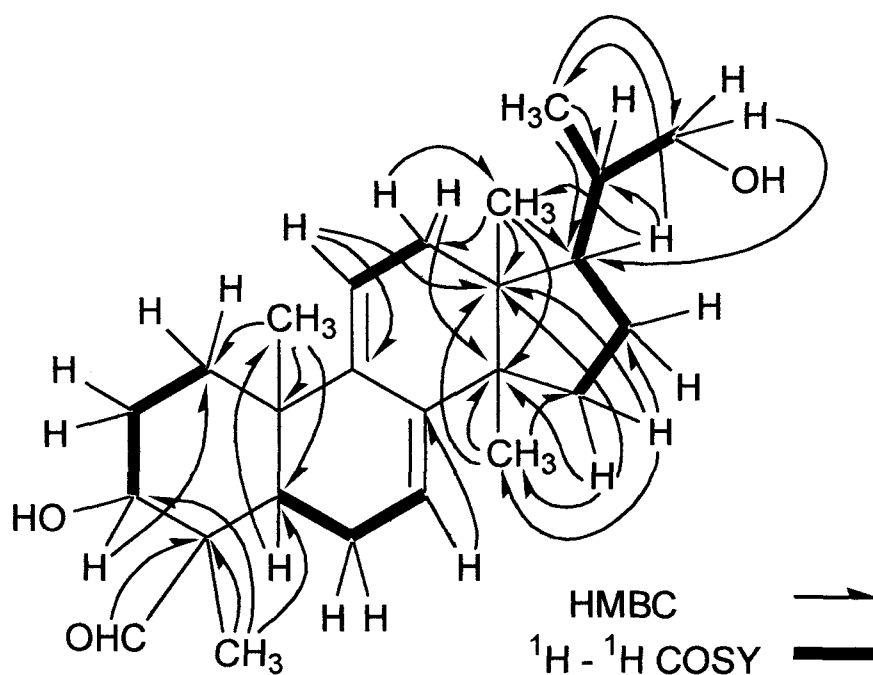


Fig. 13. HMBC and $^1\text{H} - ^1\text{H}$ -COSY Correlations of Cladosporide D (**29**)

第 5 節 Pentanorlanostane 誘導体の抗真菌活性

Cladosporium sp. IFM 49189 から得られた pentanorlanostane 化合物 **25**, cladosporide A (**26**), B (**27**), C (**28**), D (**29**) および cladosporide A (**26**) から誘導した PDC 酸化体 **30** および NaBH₄ 還元体 **31** について (Chart 4)、抗真菌活性試験を行なった。スクリーニングには、ペーパーディスク法を用い、試験菌として *A. fumigatus* IFM 41243, *A. niger* IFM 41398, *C. albicans* IFM 40009 および *Cry. neoformans* ATCC 90112 を使用した。

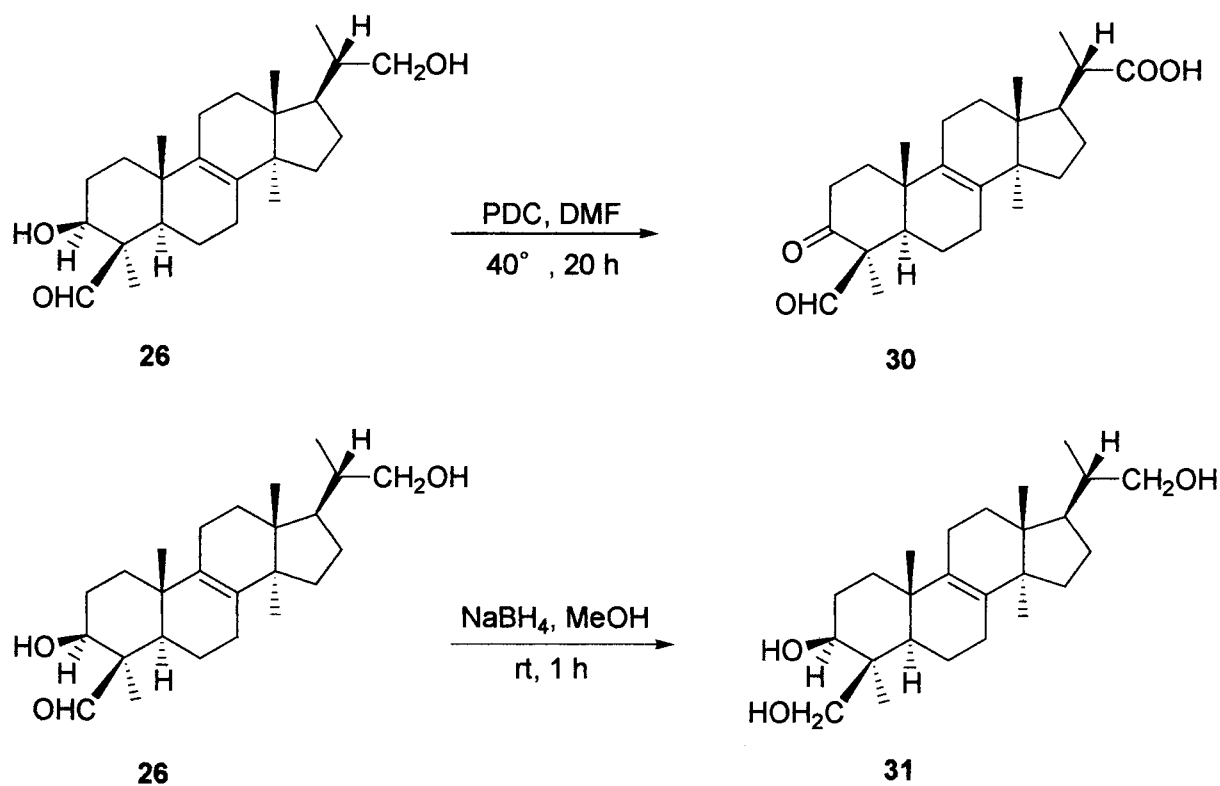


Chart 4.

化合物 25 - 31 は、いずれも *A. niger*, *C. albicans* および *Cry. neoformans* に対して抗真菌活性を示さなかった。Cladosporide A (26) および B (27) は、*A. fumigatus* に対して 3.0 $\mu\text{g}/\text{disc}$ および 1.5 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で発育阻害を示したが、cladosporide C (28) および D (29) は、発育阻害を示さなかった。また、cladosporide A (26) の酸化体 30 および還元体 31 は、*A. fumigatus* に対して弱い抗真菌活性を示した。これらの結果は、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性の発現には、3 位に $\beta\text{-OH}$ 基もしくはカルボニル基を有することと 4 β -メチル基に酸素官能基を有することが必要であり、また抗真菌活性については、3-keto より 3 $\beta\text{-OH}$ 、4 $\beta\text{-CH}_2\text{OH}$ より 4 $\beta\text{-CHO}$ 、8-ene より 7, 9(11)- diene のほうが強いという結論を得た (Table 8 および Chart 5)。

Table 8. Antifungal Activity of Compounds 25-31

Compound ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	25	26	27	28	29	30	31
100	—	15	17	—	—	±	10
50	—	15	16	—	—	—	9
25	—	15	14	—	—	—	±
12.5	—	13	13	—	—	—	—
6	—	13	13	—	—	—	—
3	—	11	12	—	—	—	—
1.5	—	—	11	—	—	—	—

The diameter of inhibition circle was indicated on mm.

All of Compounds showed no activity for *A. niger*, *C. albicans* and *Cry. neoformans*.

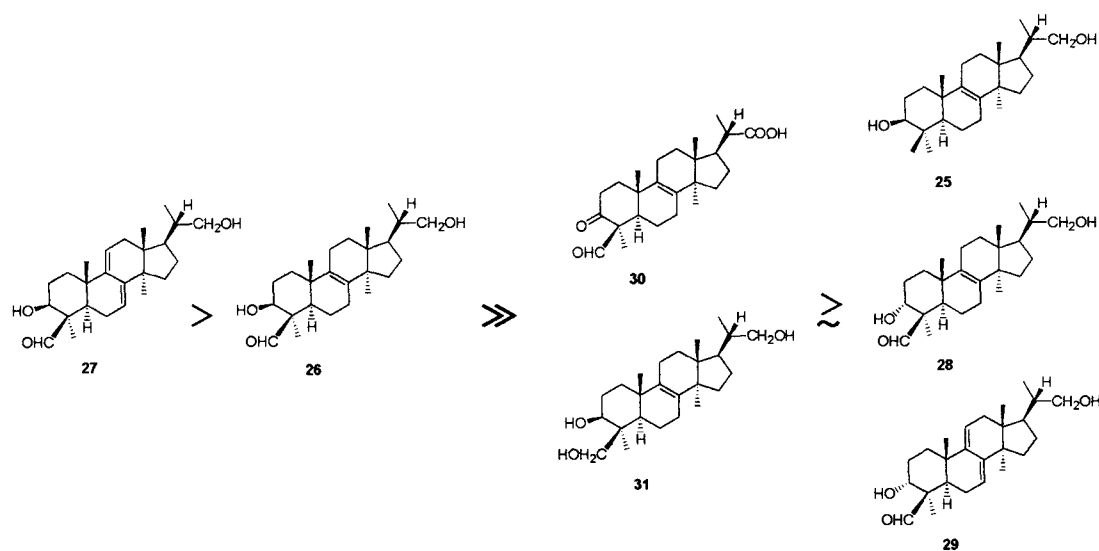


Chart 5.

第2章 未同定真菌 IFM52672 由来の抗真菌活性物質

新規抗真菌物質を得るために、2000年に南米土壌から分離した真菌約220種について、試験菌として *A. fumigatus*, *A. niger*, *C. albicans* および *Cry. neoformans* を用いて抗真菌活性スクリーニングを行ない、糸状菌である *A. fumigatus* および *A. niger* に対して抗真菌活性が認められた未同定真菌 IFM52672 株について成分検索を行なった。

第1節 未同定真菌 IFM 52672 の培養および成分分離

未同定真菌 IFM 52672 株を米培地 500 g (米 100 g ずつ 1L 用 Roux flask に分注) で 25 °C、28 日間培養した後、CHCl₃-MeOH (1:1) の混合溶媒で抽出し、粗抽出物 18 g を得た。粗抽出物をそれぞれ約 350mL の n-ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトンおよびメタノールの順に固液抽出を行なった。各抽出液について *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べた結果、活性は主に n-ヘキサンおよびベンゼン抽出液に認められた。そこで、両抽出液を合わせ、濃縮した後、*A. fumigatus* に対する抗菌活性を指標にして、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離精製を繰り返し、無色針状晶 (mp 157-8°C) として新規化合物 **32** を 315 mg (ジエチルエーテルより再結晶)、**32** の前分画から化合物 **33** 12 mg (アセトンより再結晶) を得た。化合物 **32** および **33** はベンゼン、塩化メチレン、アセトン、メタノールなどの有機溶媒には易溶であるが、水には不溶であった (Chart 6 および Fig. 14) 。

Unidentified fungus IFM 52672

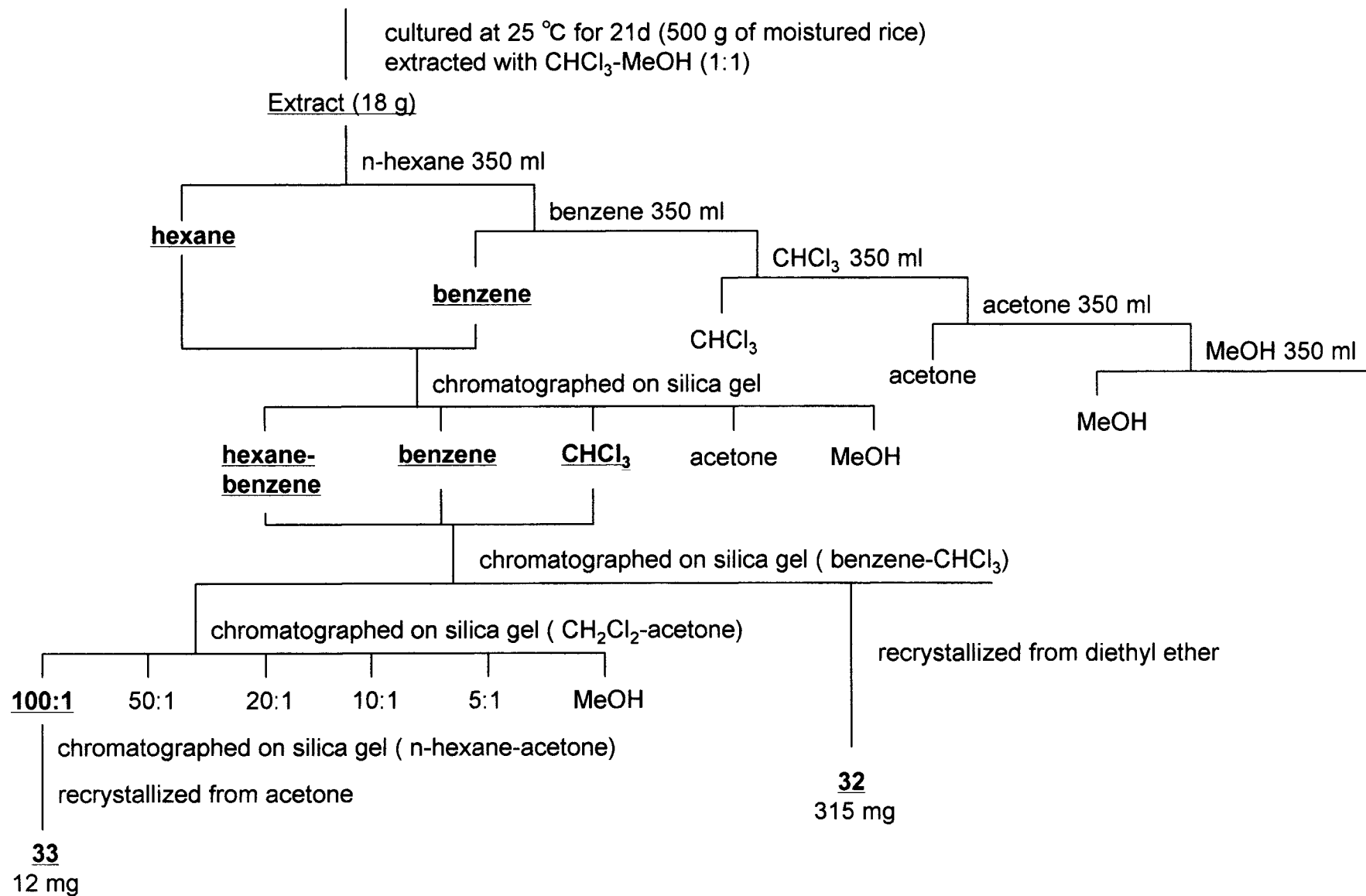


Chart 6. Isolation of Compounds **32** and **33** from Fungus IFM 52672

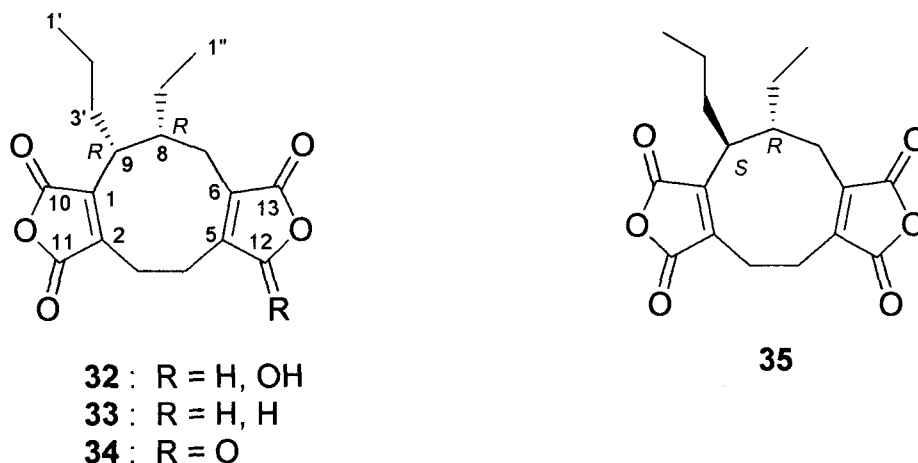


Fig. 14. Chemical Structures of Compounds **32** - **35**

第 2 節 Dihydroepiheveadride および関連化合物の構造

化合物 **32** の分子式は CI-MS および HREI-MS から分子式 $C_{18}H_{22}O_6$ と決定した。化合物 **32** の物理化学的性状を Table 9 に、 1H - および ^{13}C -NMR スペクトルデータを Table 10 に示した。化合物 **32** は、IR スペクトルで、 1770 cm^{-1} および 1840 cm^{-1} に無水カルボン酸に特徴的な吸収が認められ、さらに 3450 cm^{-1} に OH 基による吸収が認められた。 ^{13}C -NMR スペクトルから 3 つのカルボニル炭素 (δ 164.5, 165.8 および 171.8) の存在が観測されたことと 1H -NMR スペクトルでヘミアセタールあるいはアセタール炭素 (δ 98.7) に結合したプロトン δ 6.04 (1H, s) が確認されたことからマレイン酸無水物構造およびその一つのカルボニルが還元された構造の存在が示唆された。さらに 1H - 1H COSY および HMBC 等の各種二次元スペクトルの解析から、**32** をエチル基とプロピル基を側鎖に有する九員環を基本骨格とする nonadride 誘導体であると推定した (Fig. 15)。

化合物 **32** を PCC で処理すると、酸化体 **34** が得られた (Chart 7)。化合物 **34** は、*Helminthosporium heveae* PETCH (*Bipolaris heveae* CBS 241.93)

Table 9. Physico-Chemical Properties of Compounds **32-35**

	32	33	34	35
Appearance	colorless crystalline powder (from diethyl ether)	colorless crystal (from acetone)	colorless crystalline powder (from diethyl ether)	colorless crystalline powder (from diethyl ether)
Melting point (°C)	157-158	202-203	146-149	159.5-162
Molecular formula	C ₁₈ H ₂₂ O ₆	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	C ₁₈ H ₂₀ O ₆	C ₁₈ H ₂₀ O ₆
HREI-MS(M ⁺)	334.1428 (Calcd. 334.1416)	318.1480 (Calcd. 318.1467)	332.1270 (Calcd. 332.1260)	332.1273 (Calcd. 332.1260)
CI-MS (isobutane)	335 (M+1)	319 (M+1)	333 (M+1)	333 (M+1)
IRν ^{KBr} cm ⁻¹	3450 (OH) 1840, 1770 (anhydride)	1840, 1770 (anhydride)	1830, 1763 (anhydride)	1834, 1761 (anhydride)
UV ^{MeOH} nm(log ε)	251 (3.56), 204 (4.18)	247 (3.56), 216 (4.11)	246 (3.94), 204 (4.29)	246 (3.30), 204 (3.67)
CD Δε(nm)	-5.76 (247)	-5.21 (261), -3.77 (224)	-13.16 (250)	+1.05 (220)
[α] _D	-91.3° (c=1.04, CHCl ₃)	-83.0° (c=1.04, CHCl ₃)	-170.9° (c=1.11, CHCl ₃)	+59.3° (c=1.12, CHCl ₃)
Solubility (Soluble) (Insoluble)	CH ₂ Cl ₂ , EtOAc, Me ₂ CO, EtOH, MeOH <i>n</i> -Hexane, H ₂ O	CH ₂ Cl ₂ , EtOAc, Me ₂ CO, EtOH, MeOH <i>n</i> -Hexane, H ₂ O	CH ₂ Cl ₂ , EtOAc, Me ₂ CO, EtOH <i>n</i> -Hexane, H ₂ O	CH ₂ Cl ₂ , EtOAc, Me ₂ CO, EtOH <i>n</i> -Hexane, H ₂ O

Table 10. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectral Data of Compounds 32-35

No.	32		33		34		35	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
1	146.5		146.9		146.0		148.3	
2	146.5		145.6		146.2		145.1	
3	21.8	2.49 m 3.08 ddd (13.7, 10.0, 1.2)	22.2	2.20 m 3.11 ddd (13.7, 9.0, 1.4)	21.5	2.20 m 3.16 m	21.2	2.34 brt (12.8) 3.08 brt (12.8)
4	24.3	2.36 m 2.73 dd (13.8, 9.0)	24.6	2.48 brt (14.3, 10.7) 2.58 ddd (14.3, 9.0, 1.1)	22.1	2.20 m 3.16 m	22.5	2.20 m 3.23 dd (13.2, 8.6)
5	158.8		159.7		144.1		144.0	
6	130.6		127.8		145.0		144.5	
7	26.7	1.51m 2.64 brd (13.7)	26.9	1.55 m 2.68 brd (13.5)	28.0	1.76 brt (12.8, 12.5) 2.90 dd (12.8, 3.0)	26.1	2.12 brd (12.5) 2.88 brd (12.5)
8	46.5	2.04 m	46.4	2.10 m	47.9	2.10 m	40.7	2.22 m
9	40.1	2.64 m	40.5	2.50 m	40.8	2.44 m	46.2	2.24 m
10	164.5		164.3		164.1		163.5	
11	165.8		165.6		165.2		164.8	
12	98.7	6.04 s	71.2	4.70 dd (17.4, 2.5) 4.81 brd (17.4)	165.2		165.7	
13	171.8		173.7		164.8		165.7	
1'	13.9	0.86 t (7.1)	13.9	0.86 t (7.3)	13.9	0.87 t (7.3)	14.0	0.86 t (7.0)
2'	21.7	1.14 m 1.14 m	21.8	1.12 m 1.12 m	21.8	1.15 m 1.15 m	21.8	1.04 m 1.15 m
3'	31.5	1.51 m 2.14 m	31.5	1.50 m 2.10 m	31.6	1.56 m 2.15 m	30.8	1.62 m 1.94 m
1''	12.9	1.06 t (7.1)	12.9	1.07 t (7.3)	12.9	1.08 t (7.3)	12.8	1.18 brs
2''	23.2	0.95 m 2.04 m	23.2	0.98 m 2.00 m	23.5	0.98 m 2.10 m	22.5	1.20 m 1.82 m

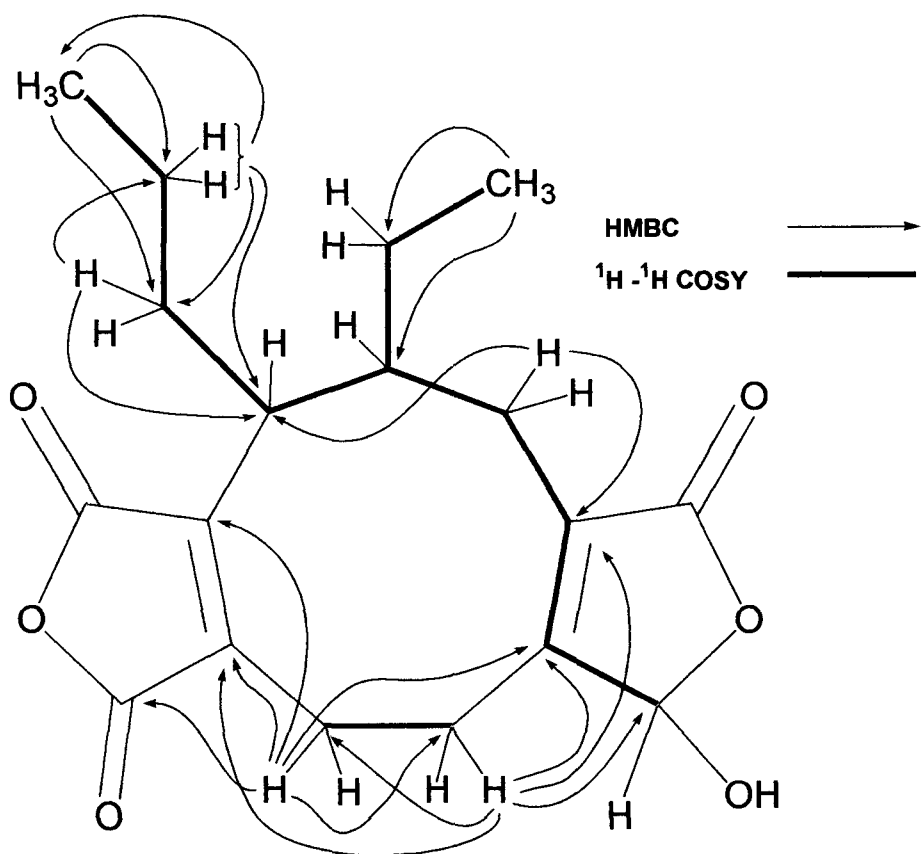


Fig. 15. HMBC and $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY Correlations in **32**

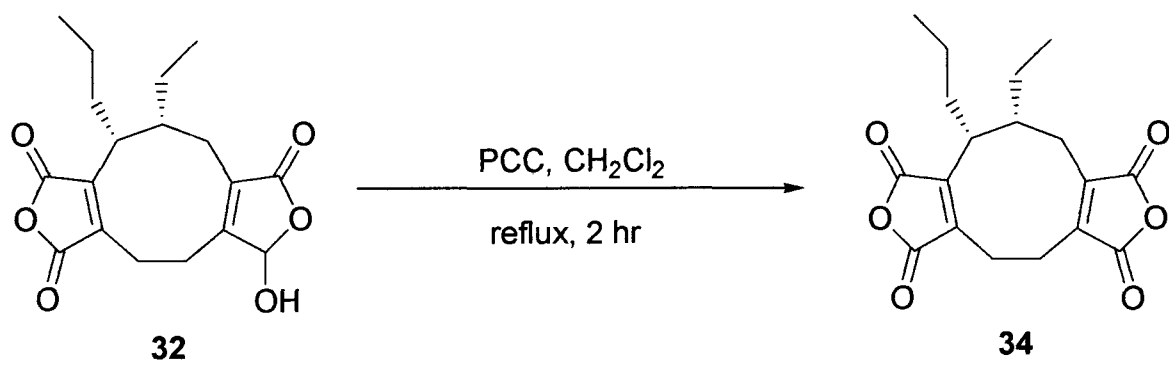


Chart 7.

から既に単離され、平面構造のみが決定している heveadride (**35**)^{16,17)} であると考えられたが、文献からは **35** の詳細な機器分析データ値が得られなかった。そこで、上記の菌株を the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) から入手し、本菌株について Chart 8 に示した培養・抽出・分離精製を行ない、heveadride (**35**) を得た。Heveadride (**35**) と **34** の各種機器データを比較すると、¹H- および ¹³C-NMR スペクトルデータが若干異なることと旋光度および CD スペクトルが明らかに異なることから、**34** は **35** の 8 位あるいは 9 位のエピマー体であると決定し、epiheveadride と命名した (Table 9 および Table 10)。したがって、今回分離した活性本体 **32** は **34** のジヒドロ体であることから、本化合物を dihydroepiheveadride と命名した。

化合物 **33** は、CI-MS および HREI-MS から分子式 C₁₈H₂₂O₅ と決定した (Table 9)。化合物 **33** と **32** の ¹H-NMR スペクトルを比較すると、**32** で存在した δ 6.04 (1H, s) のメチンシグナルが **33** では消失し、新たに δ 4.70 (1H, dd, *J* = 17.4, 2.5 Hz) および δ 4.81 (1H, d, *J* = 17.4 Hz) のメチレンシグナルが出現したこと以外は **32** とよく一致していた。また、¹³C-NMR スペクトルは、**32** のヘミアセタール炭素 (δ 98.7) が消失し、**33** では δ 71.2 に -CH₂-O- に相当するシグナルとして現れていること以外はよく一致していた (Table 10)。さらに、¹H-¹H COSY および HMBC 等の二次元スペクトルの解析から、**33** は **32** の 12-dehydroxy 誘導体であると推定した (Fig. 16)。そこで、化合物 **32** を NaBH₄ で還元後、PCC 酸化を行なったところ (Chart 9)、得られた生成物は CD スペクトルを含めた各種機器データが **33** と完全に一致したことから、**33** の絶対配置を含めた立体化学は **32** と同一であることが明らかとなった。

Biopolaris heveae CBS 241.93

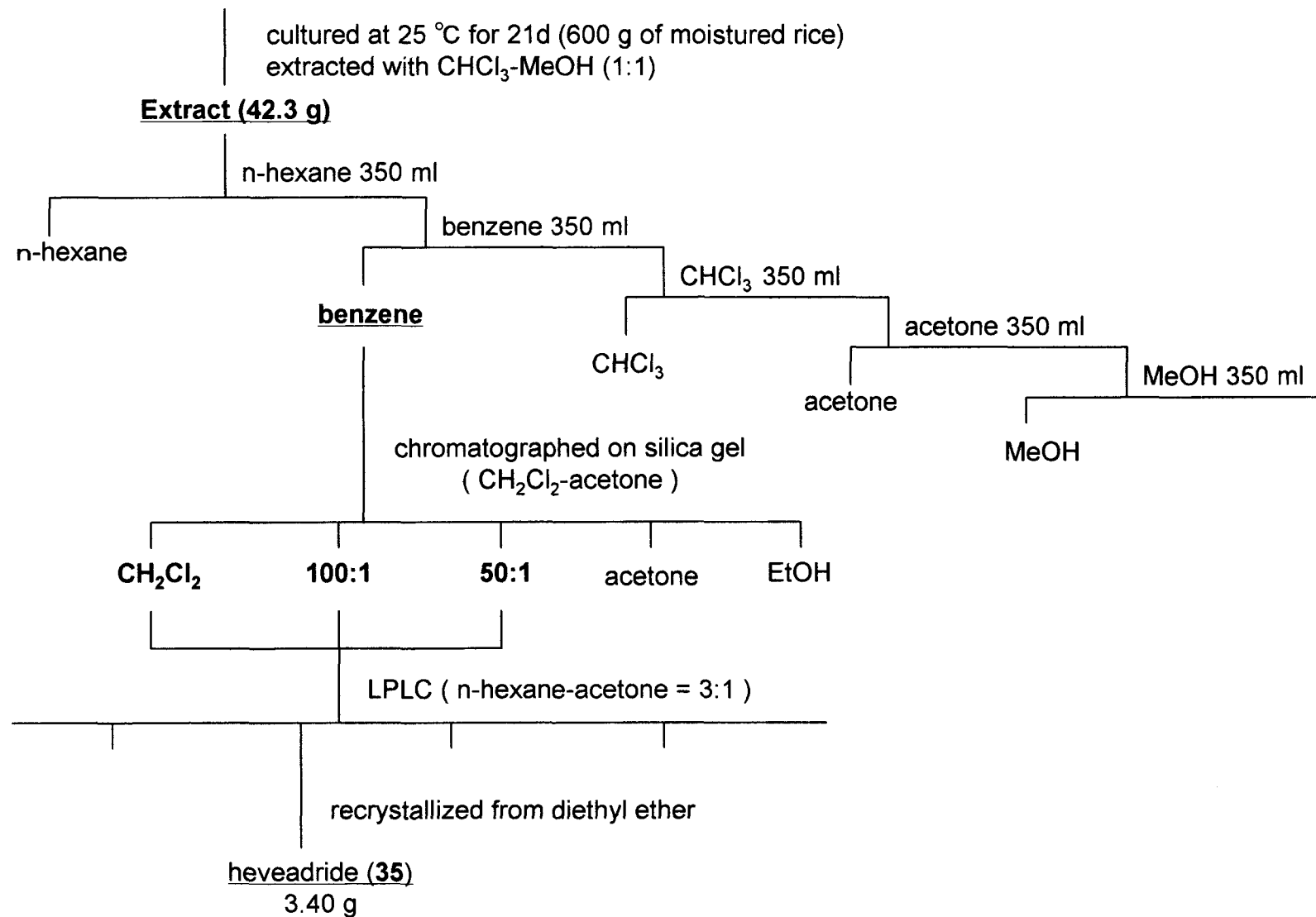


Chart 8. Isolation of Heveadride (35) from *Biopolaris heveae* CBS 241.93

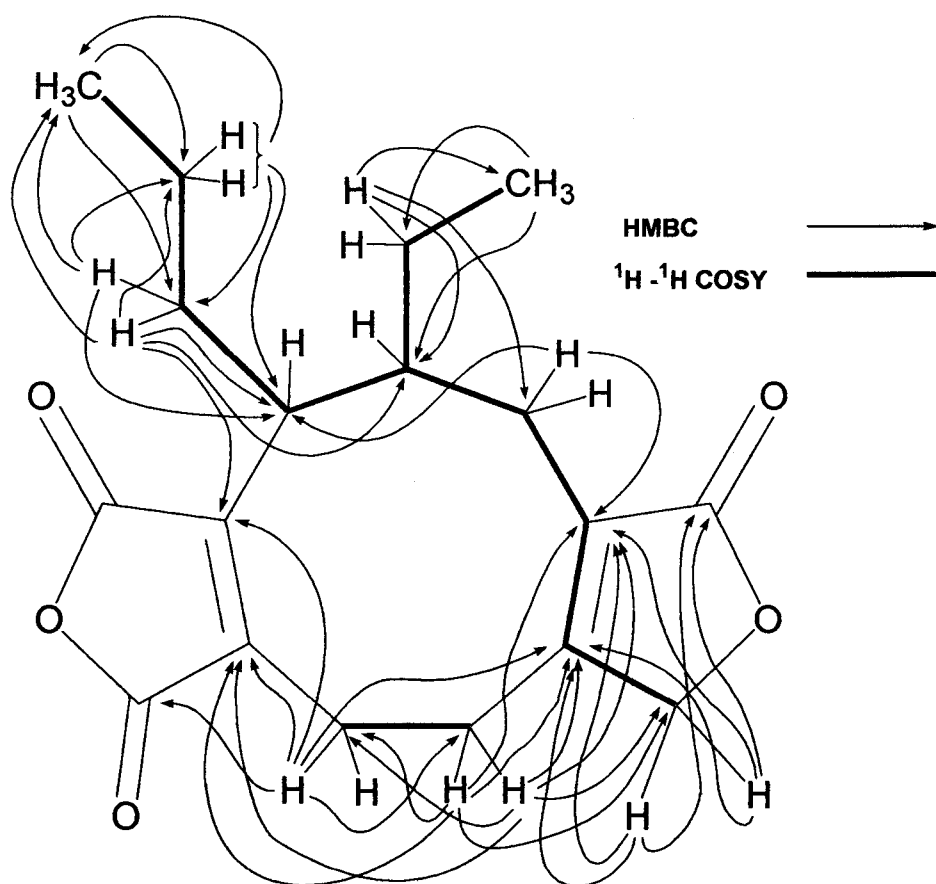


Fig. 16. HMBC and $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY Correlations in **33**

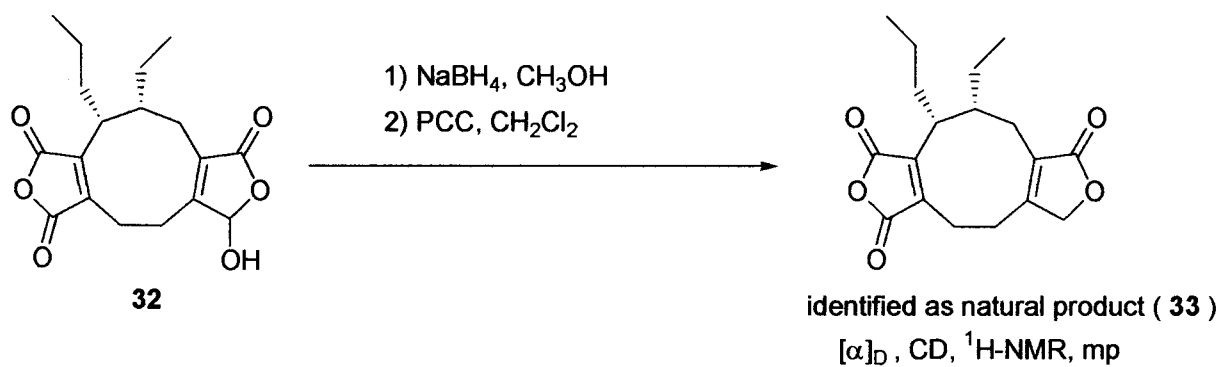
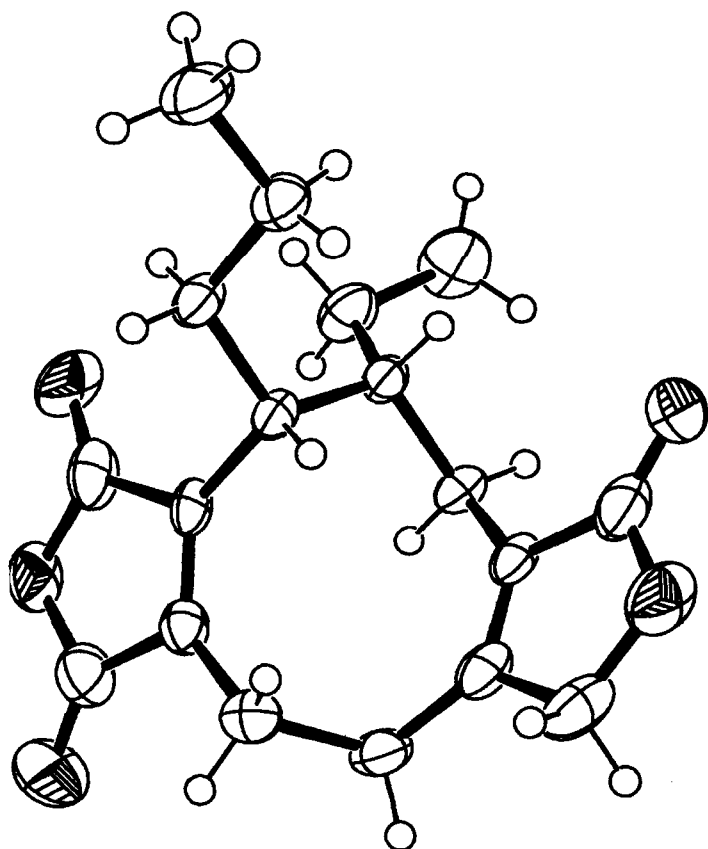


Chart 9.

化合物 **33** をアセトンから再結晶したところ、X 線結晶解析に適したプリズム晶として成長したので、これを用いて X 線結晶解析を行なったところ、**Fig. 17** に示した結晶構造が得られた。X 線結晶解析により得られた分子構造の結合距離や結合角は、予想していた化学構造とよく一致していた。その結果、**33** の相対配置が決定され、8 位および 9 位のアルキル側鎖は *cis* 配置であることが明らかとなった。また、前述した化学変換の結果 (**Chart 7** および **Chart 9**) から、dihydroepiheveadride (**32**) および epiheveadride (**34**) のアルキル側鎖どうしの立体化学も *cis* 配置であると決定した。したがって、heveadride (**35**) は、8 位および 9 位のアルキル側鎖どうしの立体化学は *trans* 配置であることが明らかとなった。



**Fig. 17. Perspective View of the Crystal Structure of 33
with Thermal Ellipsoids at 50 % Possibility**

化合物 **32** から誘導された **33** および **34** の 8 位および 9 位の立体化学は **32** と同じであり、epiheveadride (**34**) と heveadride (**35**) は 8 位あるいは 9 位の立体化学が異なる立体異性体ということになる。したがって、**34** および **35** の絶対構造を明らかにすれば、**32** および **33** の絶対構造を決定することができる。そこで、はじめに **34** と **35** の関係が 8-エピマー体であるか 9-エピマー体であるかを明らかにするために、**35** について 9 位の異性化反応を行ない、8 位および 9 位のアルキル側鎖が *cis* 配置になった生成物の旋光性を観測する実験を試みた。生成物が (-) の旋光性を示した場合、生成物は天然品 **32** 由来の **34** ($[\alpha]_{\text{D}} = -170.9^{\circ}$) と同一化合物、すなわち **35** の 9-エピマー体となり、(+) の旋光性を示した場合、生成物は **34** のエナンチオマー、すなわち **35** の 8-エピマー体のエナンチオマーとなる。

化合物 **35** をトルエン-ベンゼン混液中で過剰の TsOH とともに加熱処理を行なったところ、少量の epiheveadride (**34**) の生成が HPLC で確認され、生成した epiheveadride (**34**) は旋光度検出器で **32** の PCC 酸化体である **34** と同じ (-) の旋光性を示した (Fig. 18)。この化学反応の結果から、**34** は **35** の 9-エピマー体であること、すなわち **34** と **35** の 8 位の絶対配置が同一であることが明らかとなった。

次に epiheveadride (**34**) および heveadride (**35**) 等の絶対構造を明らかにするため、**34** および **35** について臭素原子を有する数種のイミド誘導体を作成し重原子を用いた X 線結晶解析による絶対構造の決定を試みた (Chart 10)。化合物 **34** については、X 線結晶解析に適した結晶を得ることはできなかったが、**35** については、Table 11 に示した生成物の中で、4-bromoaniline 誘導体 (**36c**) をアセトン中から再結晶することで、X 線結晶解析に適した板状晶が得られた。そこで、直接法による X 線結晶解析を行なった結果、R 因子が $R = 0.093$, $R_w = 0.101$ で解析が完了した。化合物 **36c** の絶対構造は、臭素原子の異常分散を利用して決定した結果、8 位が *R* 配置、9 位が *S* 配置であることが確認された (Fig. 19)。したがって、heveadride (**35**) の絶対構造も 8 位が *R* 配置、9 位が *S* 配置と決定した。

Heveadride (**35**) の 9 位が *S* 配置であることから、9-エピマー体である epiheveadride (**34**) は **32** および **33** も含めて 9 位が *R* 配置であり、これら

の絶対構造は Fig. 14 の通りに決定した。また、それぞれの化合物の化学的な関連性については、Chart 11 にまとめた。

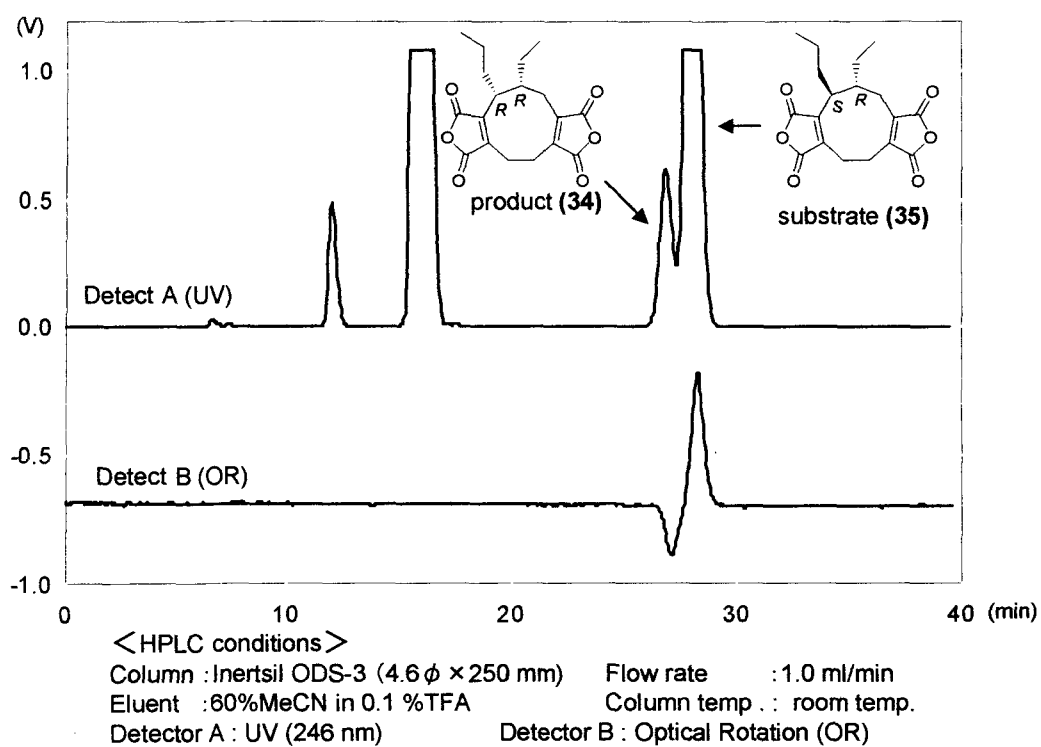


Fig. 18. HPLC Chromatogram for Epimerization of Heveadride (35)

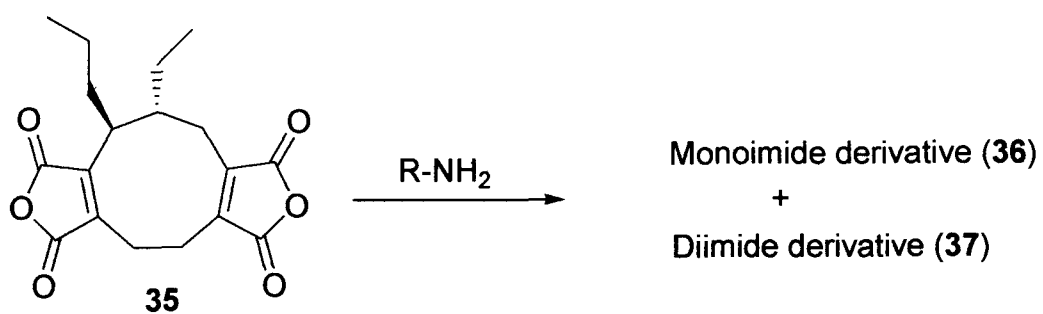


Chart 10.

Table 11. Imide Derivatives of Heveadride (35)

R	Solvent	Temp. (°C)	Time (h)	Product (%)	35 (%)
4-BrPhNH-	CHCl ₃	4	48	- 81.7 (37a)	-
4-BrBz-	toluene	reflux	16	25.0 (36b) 15.7 (37b)	-
4-BrPh-	toluene	reflux	6	27.5 (36c) 1.6 (37c)	30.0

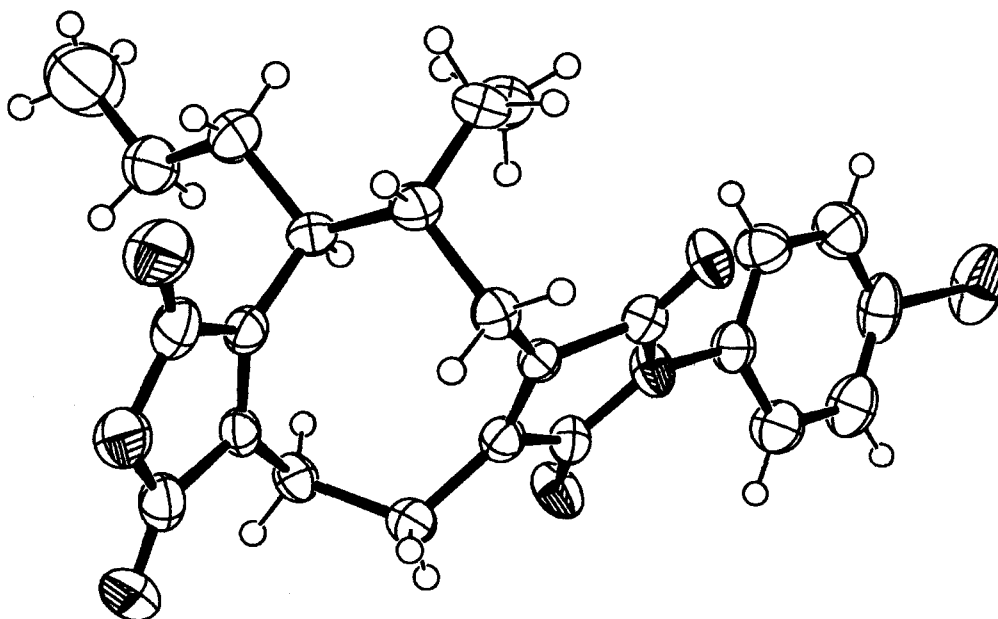


Fig. 19. Perspective View of the Crystal Structure of 36c with Thermal Ellipsoids at 50 % Possibility

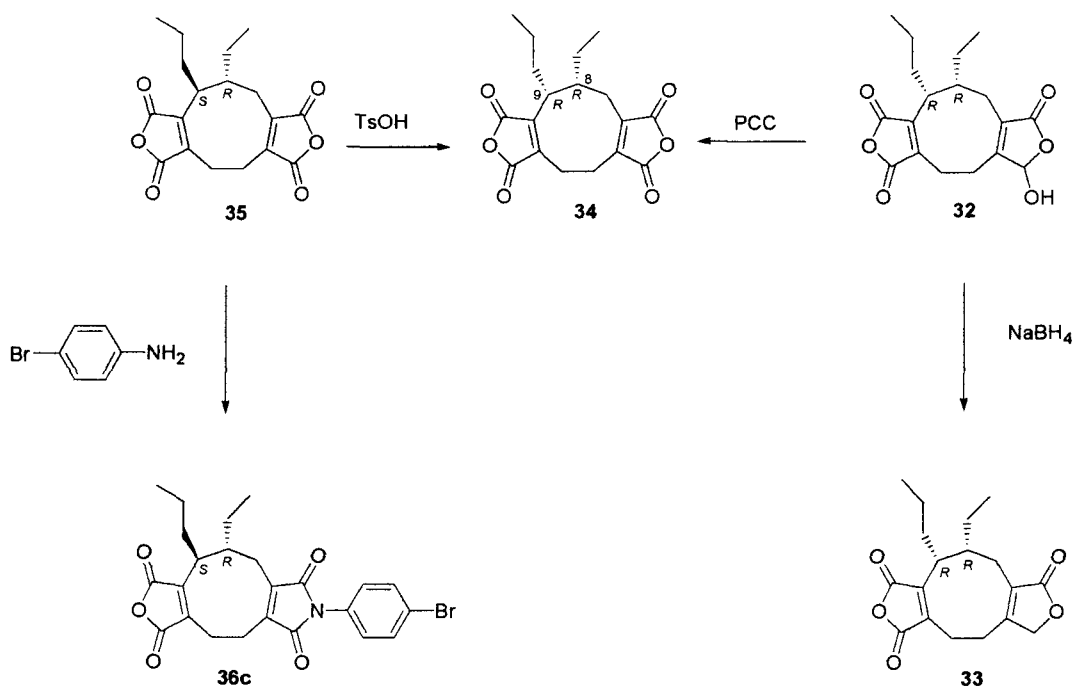


Chart 11.

第3節 Dihydroepiweadride および関連化合物の抗真菌活性について

化合物 **32**・**35** および **32** のメチル化体 **38** について、抗真菌活性試験を行った。各化合物は水に不溶性であったため、NCCLS¹⁵⁾ 法を適用することが出来なかったため、抗真菌活性試験はペーパーディスク法で行ない、その結果を Table 12 にまとめた。Dihydroepiweadride (**32**) は、深在性真菌症の原因菌である *A. fumigatus*, *Penicillium marneffeii* や皮膚糸状菌である *Trichophyton rubrum* および *Trichophyton mentagrophytes* のような病原性真菌を含むさまざまな糸状菌に対して、濃度 5 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で抗真菌作用を示した。化合物 **32** の抗酵母作用は濃度 5 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で *Trichosporon asahii* および *Trichosporon asteroides* の2菌株に認められたが、それ以外の *C. albicans* や *Cry. neoformans* のような病原性酵母には認められなかった。一方、**32** は濃度 100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で、数種の *Candida* 属 (*C. albicans*, *C. krusei*) および *Cry. neoformans* の発育を阻害した。しかしながら、**32** はいくつかの *Candida* 属 (*C. glabrata* および *C. tropicalis*) および黒色糸状菌 (*Fonsecaea pedrosoi* お

よび *Phialophora verrucosa*) には発育阻害活性を示さなかった。化合物 **34** および **35** の濃度 5 $\mu\text{g}/\text{disc}$ での糸状菌に対する抗菌スペクトルは、**32** と似ているが、その活性は弱かった。また、酵母に対して、いずれの化合物も濃度 5 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で抗酵母作用は認められなかった。化合物 **32** および **34** は、100 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で同様の抗菌スペクトルを示したが、**34** の抗真菌活性は **32** に比べて相対的に弱かった。一方、**35** は *Cry. neoformans* を除く酵母に抗菌性が認められなかった。グラム陽性菌 *Bacillus subtilis* およびグラム陰性菌 *Escherichia coli* に対する抗菌性は、いずれの化合物にも認められなかった。

これらの結果から、nonadrinide 構造における抗真菌活性は 8 位および 9 位の側鎖の立体化学の違いよりも 12 位のカルボニル基の還元によるヘミアセタール構造のほうに関与していると考えられた。次に **32** の 12 位の水酸基をメチル化した **38** (Chart 12) の抗真菌活性は **32** と比べて著しく低下した。このことから、強い抗真菌性の発現には、水酸基が遊離の状態である必要が考えられた。

Dihydroepihevadride (**32**) の糸状菌に対する抗菌活性は、阻止円の観察から静菌的であった。また、顕微鏡による観察から、**32** を処理した *A. fumigatus* は、通常の菌糸の状態と比べて、菌糸表面に凹凸が生じたり、菌糸の先端や途中が丸く膨張した状態が観察された (Fig. 20)。

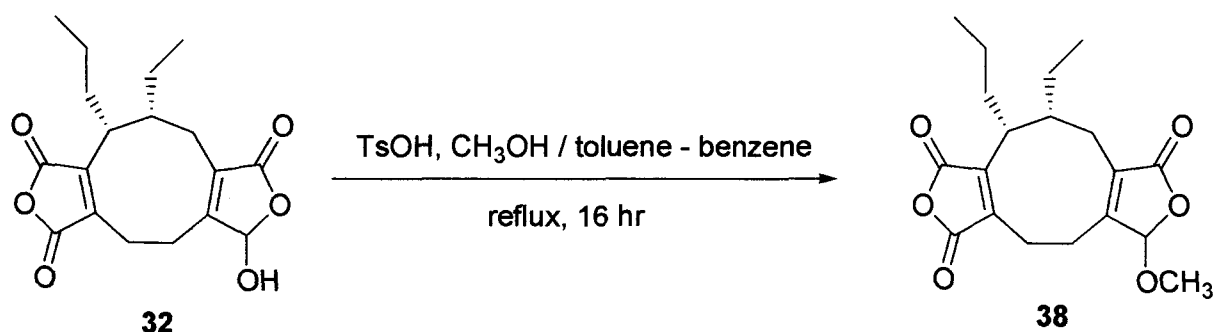


Chart 12.

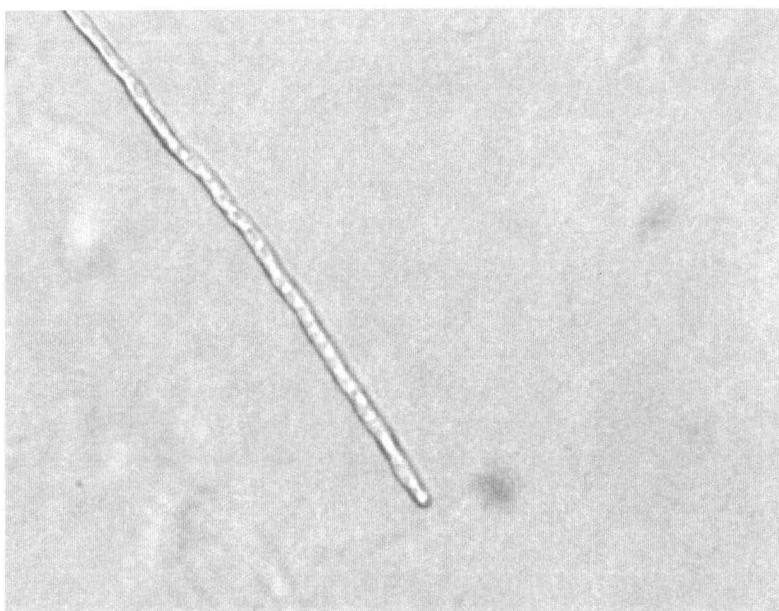
Table 12. Antimicrobial Activities of Compounds 32-35 and 38

Microorganisms	Diameter of Inhibition Zone (mm)					
	32		34		35	
	5 μ g	100 μ g	5 μ g	100 μ g	5 μ g	100 μ g
<Filamentous fungi>						
<i>Arthroderma benhamiae</i> IFM 41160	20		10		9	
<i>Aspergillus flavus</i> IFM 41935	26		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41243	20		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 41362	20		—		—	
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFM 47078	23		—		—	
<i>Aspergillus niger</i> IFM 41398	21		—		—	
<i>Cladophialophora carrionii</i> IFM 4808	—	26	—	—	—	—
<i>Emericella nidulans</i> IFM 46997	24		—		—	
<i>Epidermophyton floccosum</i> IFM 46637	13		9		8	
<i>Fonsecaea pedrosoi</i> IFM 4887		—		—		—
<i>Fusarium oxysporum</i> IFM 53787	10		—		—	
<i>Fusarium solani</i> IFM 52712	12		9		9	
<i>Microsporium canis</i> IFM 45108	25		10		9	
<i>Penicillium marneffeii</i> IFM 52703	21		—		—	
<i>Penicillium marneffeii</i> IFM 52697	11		—		—	
<i>Phialophora verrucosa</i> IFM 4928		—		—		—
<i>Scedosporium apiospermum</i> IFM 52028	17		11		11	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFM 40951	30		12		12	
<i>Trichophyton raubitschekii</i> IFM 45579	20		12		8	
<i>Trichophyton rubrum</i> IFM 45802	17		13		11	
<i>Trichophyton tonsurans</i> IFM 5275	28		12		9	
<i>Trichophyton verrucosum</i> IFM 46798	10		—		—	
<i>Trichophyton violaceum</i> IFM 46913	25		16		13	
< Yeasts >						
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	—	16	—	15	—	—
<i>Candida albicans</i> ATCC 90029	—	19	—	19	—	—
<i>Candida glabrata</i> IFM 40217	—	—	—	—	—	—
<i>Candida guilliermondii</i> IFM 46823	—	8	—	—	—	—
<i>Candida kefyr</i> IFM 46921	—	12	—	8	—	—
<i>Candida krusei</i> IFM 46834	—	15	—	—	—	—
<i>Candida parapsilosis</i> IFM 46863	—	—	—	—	—	—
<i>Candida tropicalis</i> IFM 46816	—	—	—	—	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i> ATCC 90112	—	14	—	11	—	9
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFM 40210	—	20	—	—	—	—
<i>Pichia anomala</i> IFM 53788	—	—	—	—	—	—
<i>Trichosporon asahii</i> IFM 48429	15		10		—	
<i>Trichosporon asteroides</i> IFM 48608	10		—		—	
< Bacteria >						
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i> B	—	—	—	—	—	—

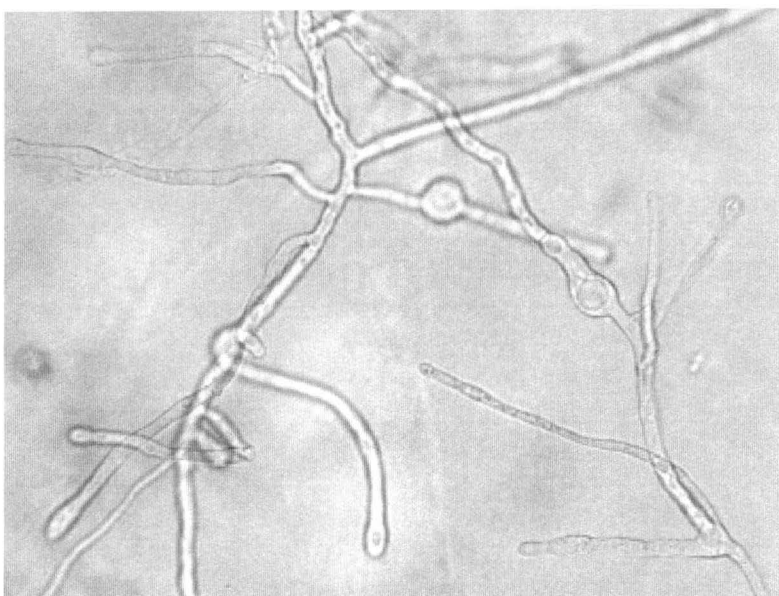
Paper disc (i. d. 6 mm) was used.

The minus (—) means no inhibition.

Compounds 33 and 38 were shown no antimicrobial activities.



Control



Treatment of Dihydroepihevadride (32)

Fig. 20. The Inhibitory Effect for the Hypha Elongation of *A. fumigatus* by Dihydroepihevadride (32)

結 論

著者は、深在性真菌症の中でも近年特に増加傾向にあるアスペルギルス症の主な原因菌である *A. fumigatus* に対して抗真菌作用を有する新規化合物を求めて、菌株保有機関の保存菌株や新規分離菌株について抗菌スクリーニングを行なった。その結果、抗 *A. fumigatus* 活性を有する化合物として、*Cladosporium* sp. IFM 49189 から新規 pentanorlanostane 誘導体 cladosporide A(26)・D(29) を、また未同定真菌 IFM52672 から新規 nonadride である dihydroepihevedride (32) およびその関連化合物を単離し、構造決定を行なった。さらに各化合物の構造の一部を化学変換することで、これらの化学構造と抗真菌活性との関連を示す知見を得た。

1997年に南米土壌から分離した *Cladosporium* sp. IFM 49189 株の米培養エキスから pentanorlanostane 誘導体である 23,24,25,26,27-pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol (25) 3 mg とともに新規化合物である cladosporide A (26) 13 mg、cladosporide B (27) 2 mg、cladosporide C (28) 2.5 mg および cladosporide D (29) 1 mg を分離した。

Cladosporide A (26) の化学構造は、NMR を中心とした各種スペクトルの検討と cladosporide A-MeOH 一溶媒和物の X 線結晶解析の結果から、4 β -ホルミル基を持つ pentanorlanostane 誘導体であると決定した。

Cladosporide B (27)、C (28) および D (29) の化学構造は、cladosporide A (26) と各種機器データを詳細に比較検討することにより決定した。

次にこれらの pentanorlanostane 誘導体について、cladosporide A (26) の酸化体 (30) および還元体 (31) も含めて、抗真菌活性試験を行なった。その結果、cladosporide A (26)、cladosporide B (27)、cladosporide A の酸化体 (30) および還元体 (31) は、本実験で試験菌として使用した糸状菌や酵母の中で、*A. fumigatus* に対して特異的に抗真菌活性を示し、化合物 25、cladosporide C (28) および cladosporide D (29) には抗真菌活性は認められなかった。また、これらの化合物の *A. fumigatus* に対する抗真菌活性の発現には、3 位に β -OH 基もしくはカルボニル基を有することと 4 β -メチル基に酸素官能基を有することが必要であり、また抗真菌活性の強さについては、3-keto 体より 3 β -OH、

4 β -CH₂OH よりも 4 β -CHO、8-ene より 7,9(11)-diene のほうが強い抗真菌活性を示すという結論を得た (Table 8 および Chart 5)。

今回得られた cladosporide 類のように側鎖が酸化的に開裂したラノステロール誘導体の真菌からの分離例はほとんどなく、hexanorlanostane 誘導体としては *Fomes officinalis* (VILLARS *et* FRIES) FAULL (POLYPORACEAE) から分離された **39** および **40** がはじめての単離例である¹⁸⁾。

Pentanorlanostane 誘導体における最初の例は、昆虫寄生菌 *Verticillium lecanii* (ZIMMERMANN) VIEGAS から分離された **25** である¹³⁾。また、Claydon らは、上述の菌から 3 β -hydroxy-4,4,14 α -trimethyl-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20 S -carboxylic acid (**41**), 3 β ,12 β -dihydroxy-4,4,14 α -trimethyl-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20 S -carboxylic acid (**42**) および 4,4,14 α -trimethyl-3-oxo-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20 S -carboxylic acid (**43**) 等の pentanorlanostane carboxylic acid 誘導体を分離している^{19, 20)} (Fig. 21)。

Cladosporide A (**26**) は 4 β -メチル基がホルミル基に酸化された pentanorlanostane 誘導体の初めての例であり、*A. fumigatus* に対して特異的な抗真菌活性を示す Mer-NF8054A (**18**)¹⁰⁾ と同じステロイド様化合物であることは興味深い。

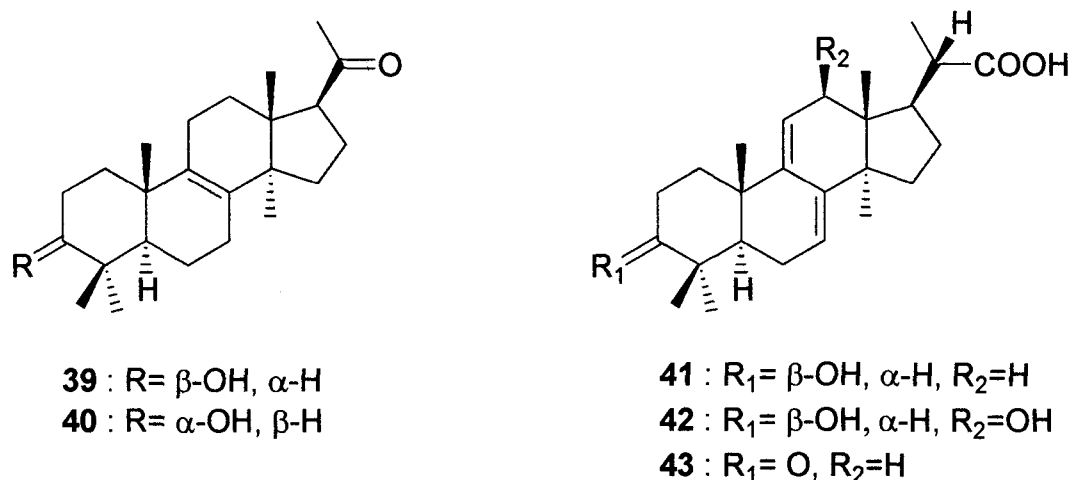


Fig. 21. The Compounds Degraded on Side Chain of Lanosterol

一方、2000年に南米土壌から分離した未同定真菌 IFM 52672 株の米培養エキスから新規抗真菌化合物 dihydroepiheveadride (**32**) とその 12-dehydroxy 体である **33** を単離した。

化合物 **32** は、CI-MS および HREI-MS から分子式 $C_{18}H_{22}O_6$ と決定した。化合物 **32** は、IR スペクトルで、 1770 cm^{-1} および 1840 cm^{-1} に無水カルボン酸に特徴的な吸収が認められ、さらに 3450 cm^{-1} に OH 基による吸収が認められたことから、マレイン酸無水物構造およびその一つのカルボニル基が還元された構造の存在が示唆された。さらに $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY および HMBC 等の各種二次元スペクトルの解析から、**32** はエチル基とプロピル基を側鎖に有する九員環を基本骨格とする新規 nonadride であると推定した。化合物 **33** は、CI-MS および HREI-MS から分子式 $C_{18}H_{22}O_5$ と決定した。化合物 **33** は、 ^1H 、 ^{13}C -NMR スペクトル、 $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$ COSY および HMBC 等の二次元スペクトルの解析と X線結晶解析の結果から、**32** の 12-dehydroxy 誘導体であると決定した。さらに化合物 **32** を NaBH_4 で還元後、PCC 酸化を行ったところ、得られた生成物は CD スペクトルを含めた各種機器データが **33** と完全に一致したことから、**33** の絶対配置を含めた立体化学は **32** と同一であることが明らかとなった。

化合物 **32** を PCC で処理した酸化体 **34** は、各種機器データの詳細な検討から *Helminthosporium heveae* PETCH (*Bipolaris heveae* CBS 241.93) から既に単離され、平面構造のみが決定している heveadride (**35**) の 8 位あるいは 9 位の立体化学が異なるエピマー体であると推定した。そこで、**35** について、9 位の異性化反応を行なったところ、天然品 **34** と同じ(-)の符号をもつ **34** が生成した。この結果から、**34** は **35** の 9-エピマー体であると決定し、epiheveadride と命名した。したがって、今回分離した活性本体である **32** は **34** のジヒドロ体であることから、本化合物を dihydroepiheveadride と命名した。

次に heveadride (**35**) の 4-bromoaniline 誘導体 (**36c**) について、X線結晶解析を行なった結果、化合物 **36c** の絶対構造は 8 位が *R* 配置、9 位が *S* 配置であることが確認された。したがって、heveadride (**35**) の絶対構造は 8 位が

R配置、9位がS配置と決定した。さらに heveadride (35) の9位がS配置であることから、9-エピマー体である epiheveadride (34) は 32 および 33 も含めて9位がR配置であり、これらの絶対構造は Fig. 14 の示したように決定した。また、それぞれの化合物の化学的な関連性については、Chart 11 にまとめられた。

これまでに2つのアルキル側鎖を隣接炭素上に持つ nonadride は、*H. heveae* (*B. heveae*) から分離されている heveadride (35) のほか、地衣類 *Cladonia polycarpoides* から homoheveadride (44)²¹⁾ が単離されているが、その側鎖の立体化学はいずれも未定のままであった。今回、heveadride (35) も含めてこれら一連の化合物の絶対配置および立体化学を明らかにすることができた。また、抗真菌作用については、32 がアスペルギルス症の原因菌である *Aspergillus* 属や *Trichophyton mentagrophytes* などの皮膚糸状菌を含む糸状菌類に対して特異的に抗菌性を示すことが明らかとなり、その抗菌活性は静菌的であることが阻止円の観察から示唆された。また、32 およびその関連化合物の抗菌性の比較から、その抗菌性の発現にはヘミアセタール構造が強く関与していることが示唆された。Dihydroepiheveadride (32) のように部分的に還元された nonadride については *Penicillium rubrum*²²⁾ から主成分 rubratoxin B (45) とともに分離された rubratoxin A (46) の1例のみであり、dihydroepiheveadride (32) は2番目の例である。

Nonadride²¹⁻³⁵⁾類 (Fig. 22) は、1965年に担子菌 *Byssochlamys fulva*^{23,24)} から (+)-byssochlamic acid (47) が単離・構造決定されたのが最初の例である。以降、十数種の nonadride 類が自然界から分離されているが、homononadride (44) が *Cladonia polycarpoides* (地衣類) から単離されている以外は、全て真菌類からの代謝産物として報告されている。Nonadride 類の生理活性については、古くはマイコトキシンとして (+)-byssochlamic acid (47)、rubratoxin A (46) および B (45) が知られており、ファイトトキシンとして castaneiolide²⁵⁾ (48)、cornexistin²⁶⁾ (49) および hydroxycornexistin²⁷⁾ (50) の報告がある。化合物 49 および 50 は、選択性の高い植物毒性を示すため、除草剤として農薬への応用が考えられている。また、抗真菌作用を有する化合物として scytalidin^{28,29)} (51) や deoxyscytalidin³⁰⁾ (52) が知られているが、その抗真菌活性の作用機序

についての報告はない。その他に、2つのエチル基が *cis* 配置で存在する (+)-glaucanic acid (**53**) および (+)-glauconic acid (**54**) などの報告がある^{31,32,33}。また、最近になって *ras* farnesyl transferase および squalene synthase に対して顕著な阻害活性を示す CP-263,917 (**55**) および CP-263,114 (**56**) が単離された^{34,35}。この報告は、nonadrine 類の生理活性作用が医薬品開発のリード化合物になりうる可能性を示しており、今回得られた dihydroepiheveadride (**32**) についても詳細な作用機序の解明により新規深在性真菌症治療薬の開発に寄与できると考える。

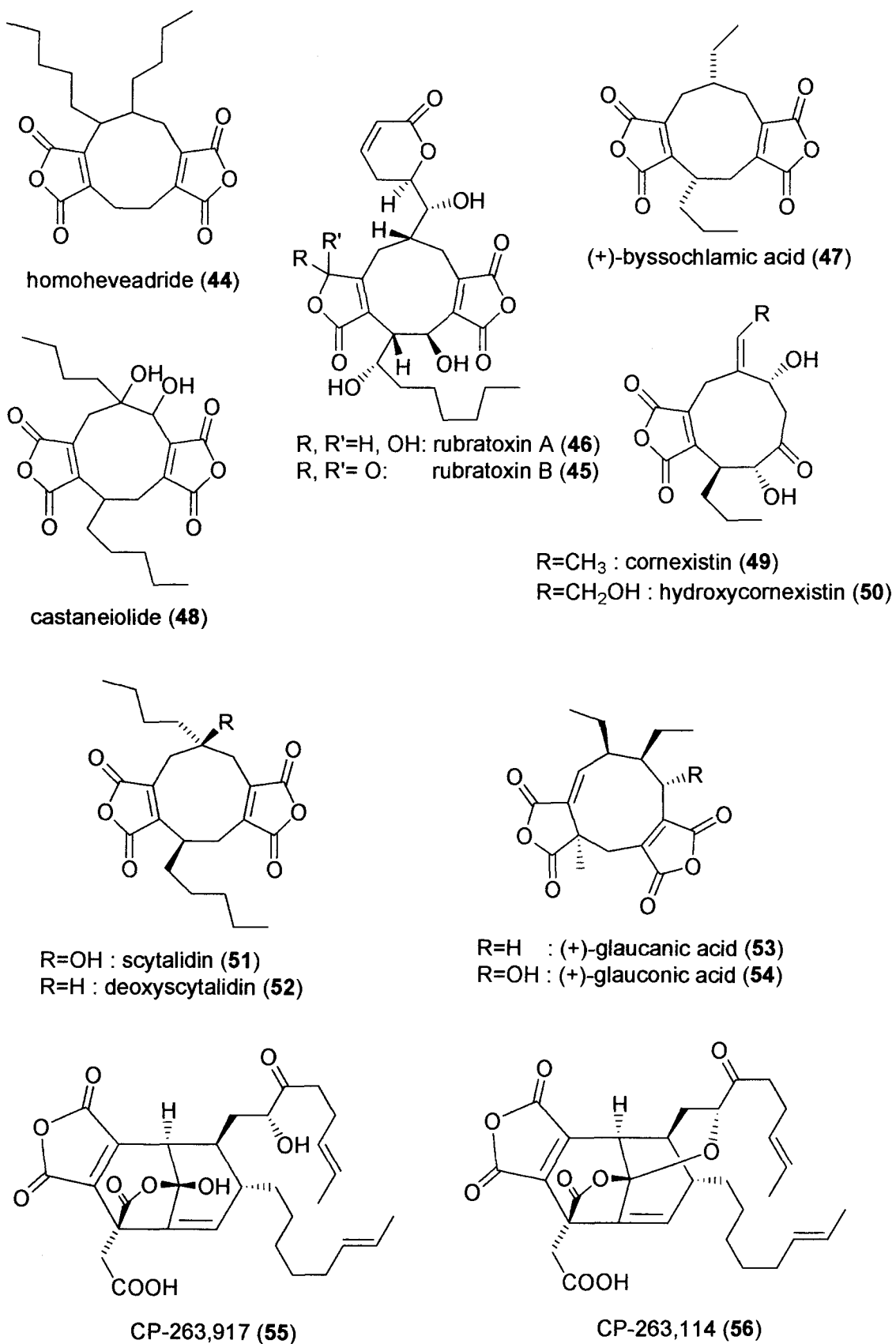


Fig. 22. Nonadrides

実験の部

装 置

融点は柳本微量融点測定装置で測定し、未補正である。EI 及び CI-MS は日本電子 JMS-MS600W 質量分析装置を用いた。IR スペクトルは日本分光 IR-810 型、UV スペクトルは日立 U-3210 型分光光度計で測定した。¹H-NMR 及び ¹³C-NMR スペクトルは、日本電子 Lambda-500 (¹H, 500.00 MHz ; ¹³C, 125.43 MHz) あるいは、日本電子 Lambda-270 (¹H, 270.0 MHz) 核磁気共鳴装置で測定し、全ての化学シフトは tetramethylsilane (TMS) を内部標準とした δ (ppm) 値で表示し、結合定数は Hz で表示した。旋光度は日本分光 DIP-1000 型デジタル旋光計で測定し、円二色性 (CD) スペクトルは日本分光 J-600 自記旋光分散計で測定した。カラムクロマトグラフィーは Kieselgel 60 (Art. 7734, Merck) を用いた。低圧液体クロマトグラフィー (LPLC) はケムコ Low-Prep 81-M-2 ポンプ及び、シリカゲル CQ-3 (30-50 μ m, Wako) を充填したガラスカラム (200 \times 10 mm) を用いた。分取用 HPLC は日本分光 RI-930 検出器を装着した日本分光 PU-980 ポンプあるいは、島村 YAD-883 RI 検出器を装着したセンシュウ SSC-3160 ポンプを用いた。分析用 HPLC は、日本分光 875-UV 検出器および日本分光 OR-1590 検出器を装着した島津 LC-9A ポンプを用いた。TLC は Kieselgel 60 F₂₅₄ (Art. 5715, Merck) を用い、紫外線 (254 nm) 存在下における吸収また 5 %, 10 % H₂SO₄, phosphomolybdate 等の噴霧・加熱による呈色で検出した。

第 1 章に関する実験

土壌分離菌株の抗真菌活性スクリーニング

1997 年南米土壌より分離された約 160 種の真菌は、滅菌済の米培地 10 g を入れた試験管で 25℃、21 日間培養した後、CH₂Cl₂・MeOH (1:1) で抽出した。抽出液は、減圧ろ過により培地とろ液にろ別した後、ろ液を減圧濃縮し各抽出エキスを得た。抗真菌活性のスクリーニングは、試験菌として *A. fumigatus* IFM 41362, *A. niger* IFM 41398, *C. albicans* IFM 40009 および *Cry. neoformans* ATCC 90112 を用いて、ペーパーディスク法で行なった。活性試験用培地の作成は、スクリーニング開始の 1・2 週間前に培養した試験菌を滅菌水に懸濁し、温時のポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に混釈後、10 mL ずつ滅菌済みシャーレ (90 mm×20 mm) に分注して作成した。各抽出エキスは、8 mm のペーパーディスク上に 2.5 mg/disc の濃度に調整した後、活性試験用培地上に置き、25 °C で培養した。24・72 時間培養後、阻止円の直径を測定した。判定は、病原糸状菌では 48・72 時間後、病原性酵母では 24・48 時間後に阻止円の直径 (mm) を測定する方法で行った。スクリーニングの結果は、Table 3 に示す通りである。

Cladosporium sp. IFM 49189 の培養および成分分離

Cladosporium sp. IFM 49189 を米培地 1500 g (米 150 g を 10 本の 1 L 用 Roux flask に分注) で 21 日間、25 °C で培養した後、CH₂Cl₂・EtOH (1:1) で抽出・濃縮を行ない、抽出物 24 g を得た。抽出物は、精製水で懸濁した後、CHCl₃ で液液分配を行ない、抽出エキス 14.5 g を得た。次に、抽出エキス 14.5 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに負荷し、CHCl₃, CHCl₃・EtOH (50:1), CHCl₃・EtOH (5:1), CHCl₃・EtOH (1:1) および acetone で順次溶出した。CHCl₃ および CHCl₃・EtOH (50:1) 分画の主成分は、ergosterol (**22**) であった。CHCl₃・EtOH (50:1) 分画について、溶離液 CH₂Cl₂・acetone (20:1) を用いて、シリカゲル LPLC で分離したところ、ergosterol (**22**) に続いて ergosterol peroxide (**23**) を主とした分画が得られた。この分画を濃縮した後、MeOH に溶解し遠心分離を行ない、沈殿物として ergosterol

peroxide (23) と脂肪酸を除去した。上清液は溶離液 90 % MeOH を用いて ODS 逆相 LPLC で分離した後、HPLC (CHCl₃: MeOH = 200 : 1) で精製することで、23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-ene-3 β , 22-diol (25) 3 mg、cladosporide A (26) 13 mg、cladosporide B (27) 2 mg、cladosporide C (28) 2.5 mg および cladosporide D (29) 1 mg を得た。

Cladosporide A (26) : 無色板状晶. mp 206 – 209°C (MeOH より再結晶). EI-MS m/z (%) : 388.2962 (M⁺, 388.2977 for C₂₅H₄₀O₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 284 (2.12) . IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3400 (OH), 1715 (C=O). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) : -0.55 (300). ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルデータは、本論中 Table 4 に示した。

Cladosporide B (27) : 無色結晶性粉末. mp 212 – 215°C (CH₂Cl₂·MeOH より再結晶). EI-MS m/z (%) : 386.2832 (M⁺, 386.2821 for C₂₅H₃₈O₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 236 (4.15), 243 (4.20), 251 (4.03). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3370 (OH), 1710 (C=O). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) : -1.23 (304). ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルデータは、本論中 Table 6 に示した。

Cladosporide C (28) : 無色針状晶. mp 219 – 221°C (CH₂Cl₂·MeOH より再結晶). EI-MS m/z (%) : 388.2975 (M⁺, 388.2977 for C₂₅H₄₀O₃). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3385 (OH), 1720 (C=O). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) : -0.57 (296). ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルデータは、本論中 Table 6 に示した。

Cladosporide D (29) : 無色針状晶. mp 209 – 211°C (CH₂Cl₂·MeOH より再結晶). EI-MS m/z (%) : 386.2806 (M⁺, 386.2821 for C₂₅H₃₈O₃). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 236 (4.22), 243 (4.28), 251 (4.03). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹ : 3380 (OH), 1715 (C=O). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) : -1.63 (301). ¹H-および ¹³C-NMR スペクトルデータは、本論中 Table 6 に示した。

Cladosporide A · MeOH 一溶媒和物の X 線結晶解析

X 線結晶解析に用いた cladosporide A (26) の結晶は、メタノール中から

cladosporide A·MeOH 一溶媒和物の無色板状結晶として得られた。X線回折強度データは、0.80 × 0.20 × 0.05 mm の結晶から RIGAKU AFC-7 FOS 自動4軸回折計を用いて収集した。総計 1686 の反射 ($2\theta < 120.1^\circ$) のうち、1514 の反射が $F > 3\sigma(F)$ の基準を満たしており、これらの反射を用いて構造解析を行なった。なお、結晶学的データは下記の通りである。

$C_{25}H_{40}O_3 \cdot CH_4O$, $M = 420.63$, triclinic, space group $P1$, $a = 7.141(1)$, $b = 15.186(2)$, $c = 6.192(1)$ Å, $\alpha = 90.51(1)$, $\beta = 111.08(1)$, $\gamma = 93.21(1)^\circ$, $V = 625.3(1)$ Å³, $Z = 1$, $D_c = 1.117$ g·cm⁻³, $F(000) = 232$, Cu-K α X-radiation (graphite monochromator), $\lambda = 1.54178$ Å.

構造解析と精密化 : 結晶構造は MITHRIL 90¹⁴⁾ を用いた直接法によって解析を行ない、最終的に完全マトリックス最小二乗法により精密化した。その際、全ての非水素原子に対して異方性温度因子を用い、水素原子の座標および等方性温度因子を固定した。最終的な信頼度因子 (R 因子) は、1514 の反射に対して $R = 0.073$, $R_w = 0.073$ に収束した。

Cladosporide A (26) の抗真菌活性試験

Cladosporide A (26) の抗真菌活性は、NCCLS 法¹⁵⁾ に準じて、3-morpholinopropane-sulfonic acid (MOPS) buffer 添加 RPMI-1640 寒天培地で糸状菌は 30 °C、72 時間、酵母は 35 °C、48 時間培養した後、微量液体希釈法によって行なった。試験菌として糸状菌は *A. fumigatus* FRESENIUS var. *fumigatus* (IFM 4942, IFM 40819, IFM 46075, IFM 47064 および IFM 47078), *A. flavus* LINK : FRIES (IFM 47031, IFM 47032) および *A. niger* VAN TIEGHEM IFM 41398 を用い、酵母は *C. albicans* (ROBIN) BERKHOUT (ATCC 90028, ATCC 90029), *C. dubliniensis* D. J. SULLIVAN CBS 7988, *C. guilliermondii* (CASTELLANI) LANGERON et GUERRA IFM 46823, *C. kefyri* (BEIJERINCK) VAN UDEN et BUCKLEY IFM 46921, *C. stellatoidea* (JONES et al.) LANGERON & GUERRA CBS 1905, *C. tropicalis* (CASTELLANI) BERKHOUT IFM 46816 および *Cryptococcus neoformans* (SANFELICE) VUILLEMIN var. *neoformans* IFM 40215 を用いた。

Cladosporide A (26) はポジティブコントロールである amphotericin B の

ような明瞭な MIC を示さなかったので、各試験菌に対する 80 % 発育阻害濃度 (IC₈₀) を測定した。Cladosporide A (26) の各試験菌に対する IC₈₀ の結果は、本論中 Table 5 に示した。

PDC による cladosporide A (26) の酸化反応

Cladosporide A (26) 2.0 mg (5.9 μmol) を溶解したジメチルホルムアミド溶液 1.5 mL 中に PDC 40 mg を加えて、40 °C で 20 時間攪拌した。反応終了後、反応混合物を氷水中に注ぎジエチルエーテルで抽出した。抽出物は、LPLC (n-hexane : acetone = 4 : 1) で分離精製することで、3, 29-dioxo-23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-ene-22-oic acid (30) 1.4 mg (収率 59.2 %) を得た。

3, 29-Dioxo-23, 24, 25, 26, 27-pentanorlanost-8-ene-22-oic acid (30) : 無色非晶形. EI-MS *m/z* (%) : 400 (M⁺, 38), 385 (M-CH₃, 20). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.75 (3H, s, 18-H₃), 0.94 (3H, s, 30-H₃), 1.15 (3H, s, 19-H₃), 1.23 (3H, d, *J* = 6.8 Hz, 21-H₃), 1.29 (3H, s, 28-H₃), 2.49 (2H, m, 2-H, 20-H), 2.67 (1H, ddd, *J* = 15.1, 13.3, 6.9 Hz, 2-H), 9.72 (1H, s, 29-H). CD (MeOH) Δε (nm) : -0.84 (291).

NaBH₄ による cladosporide A (26) の還元反応

Cladosporide A (26) 1.5 mg (3.9 μmol) を溶解したメタノール溶液 1.0 mL 中に NaBH₄ 20 mg (0.53 mmol) を加えて、室温で還元した。反応終了後、CHCl₃ で抽出・濃縮し、LPLC (CHCl₃ : MeOH = 40 : 1) で分離精製することで dihydrocladosporide A (31) 1.2 mg (収率 78.9 %) を得た。

Dihydrocladosporide A (31) : 無色非晶形. EI-MS *m/z* (%) : 390 (M⁺, 61), 375 (M-CH₃, 100). ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.70 (3H, s, 18-H₃), 0.88 (3H, s, 28-H₃), 0.94 (3H, s, 19-H₃), 1.02 (3H, d, *J* = 5.8 Hz, 21-H₃), 1.25 (3H, s, 28-H₃), 3.36 (2H, m, 3-H, 29-H), 3.47 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, 22-H), 3.66 (1H, dd, *J* = 11.0, 2.5 Hz, 22-H), 4.25 (1H, d, *J* = 11.0 Hz, 29-H).

Pentanorlanostane 誘導体の抗菌活性試験

抗真菌活性のスクリーニングは、試験菌として *A. fumigatus* IFM 41362, *A. niger* IFM 41398, *C. albicans* IFM 40009 および *Cry. neoformans* ATCC 90112 を用いて、ペーパーディスク法で行なった。活性試験用培地の作成は、スクリーニング開始の 1・2 週間前に培養した試験菌を滅菌水に懸濁し、温時のポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に混釈後、10 mL ずつ滅菌済みシャーレ (90 mm × 20 mm) に分注して作成した。各化合物は、8 mm のペーパーディスク上に 100, 50, 25, 12.5, 6.0, 3.0 および 1.5 µg/disc の濃度に調整した後、活性試験用培地上に置き、25 °C で培養した。24・72 時間培養後、阻止円の直径を測定した。試験の判定は、病原糸状菌では 48・72 時間後、病原性酵母では 24・48 時間後に阻止円の直径 (mm) を測定する方法で行なった。

第 2 章に関する実験

土壌分離菌株の抗真菌活性スクリーニング

南米土壌より分離された約 220 種の真菌は、滅菌済の米培地 10 g を入れた試験管で 25 °C、21 日間培養した後、CH₂Cl₂:MeOH (1:1) で抽出した。抽出液は、減圧ろ過により培地とろ液にろ別した後、ろ液を減圧濃縮し各抽出エキスを得た。抗真菌活性のスクリーニングは、試験菌として *A. fumigatus* IFM 41362, *A. niger* IFM 41398, *C. albicans* IFM 40009 および *Cry. neoformans* ATCC 90112 を用いて、ペーパーディスク法で行なった。活性試験用培地の作成は、スクリーニング開始の 1・2 週間前に培養した試験菌を滅菌水に懸濁し、温時のポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に混釈後、10 mL ずつ滅菌済みシャーレ (90 mm × 20 mm) に分注して作成した。各抽出エキスは、8 mm のペーパーディスク上に 2.5 mg/disc の濃度に調整した後、各試験菌入りの活性試験用培地上に置かれ、25 °C で培養した。24・72 時間培養後、阻止円の直径を測定した。判定は、病原糸状菌では 48・72 時間後、病原性酵母では 24・48 時間後に阻止円の直径 (mm) を測定する方法で行なった。

未同定真菌 IFM 52672 の培養および成分分離

未同定真菌 IFM 52672 を米培地 500 g (米 100 g を1 L 用 Roux flask 5 本に分注) で25 °C、28 日間培養した後、CHCl₃:MeOH (1:1) の混合溶媒で抽出し、粗抽出物 18 g を得た。粗抽出物をそれぞれ約 350 mL の n-ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトンおよびメタノールの順に固液抽出を行なった。各抽出液について *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べた結果、活性は主に n-ヘキサンおよびベンゼン抽出液に認められた。そこで、両抽出液を合わせ、濃縮した後、*A. fumigatus* に対する抗菌活性を指標にして、シリカゲルクロマトグラフィー (benzene-CHCl₃) による分離を繰り返し行ない、主画分をジエチルエーテルで再結晶をし、**32** 315 mg を得た。また、**32** の前分画をシリカゲルクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:acetone = 100:1 → 50:1 → 20:1 → 10:1 → 5:1, MeOH) による分離を行ない、得られた 100:1 の画分をさらにシリカゲルクロマトグラフィー (n-hexane:acetone = 4:1) で精製を行なった後、活性画分をアセトンで再結晶することで **33** 12 mg を得た。

Dihydroepiheveadride (32): 無色針状晶. mp 157-158°C (diethyl etherより再結晶). $[\alpha]_D = -91.3^\circ$ (c = 1.04, CHCl₃). EI-MS *m/z* (%): 334.1428 (M⁺, 334.1416 for C₁₈H₂₂O₆). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 251 (3.56), 204 (4.18). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 3450 (OH), 1840, 1770 (anhydride). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -5.76 (247). ¹H-および ¹³C-NMRスペクトルデータは、本論中 Table 10 に示した。

Deoxoepiheveadride (33): 無色プリズム晶. mp 202 – 203°C (acetone より再結晶). $[\alpha]_D = -83.0^\circ$ (c = 1.04, CHCl₃). EI-MS *m/z* (%): 318.1480 (M⁺, 318.1467 for C₁₈H₂₂O₅). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 247 (3.56), 216 (4.11). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 1840, 1770 (anhydride). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): 261 (-5.21), 224 (-3.77). ¹H- および ¹³C-NMR スペクトルデータは、本論中 Table 10 に示した。

Dihydroepiheveadride (32) の PCC 酸化反応

塩化メチレン 12 mL に PCC 350 mg を加えた後、3 mL の塩化メチレンに溶解した dihydroepiheveadride (**32**) 53 mg を滴下し、2 時間還流を行なった。反応後、減圧ろ過を行ない、得られたろ液を濃縮した後、シリカゲルカラムク

ロマトグラフィー (CH₂Cl₂) による精製を行ない、ジエチルエーテル中から **epiheveadride (34)** 41 mg を得た。

Epiheveadride (34): 無色結晶性粉末. mp 146-149°C (diethyl ether より再結晶). $[\alpha]_D = -170.9^\circ$ ($c = 1.11$, CHCl₃). EI-MS m/z (%): 332.1270 (M⁺, 332.1260 for C₁₈H₂₀O₆). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 246 (3.94), 204 (4.29). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 1830, 1763 (anhydride). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -13.16 (250). ¹H-および ¹³C-NMRスペクトルデータは、本論中 Table 10 に示した。

***Biolaris heveae* CBS 241.93 からの heveadride (35) の分離**

B. heveae CBS 241.93 を米培地 600 g (米 150 g を 1 L 用 Roux flask 4 本に分注) で 25 °C、21日間培養した後、CHCl₃:MeOH (1:1) の混合溶媒で抽出し、粗抽出物 42.3 g を得た。粗抽出物をそれぞれ約 350 ml の *n*-ヘキサン、ベンゼン、クロロホルム、アセトンおよびメタノールの順に固液抽出を行なった。TLC 分析によりベンゼン抽出エキス中に、**heveadride (35)** の UV 吸収スポット (254 nm) が観察されたので、シリカゲルクロマトグラフィー (CH₂Cl₂, CH₂Cl₂: acetone = 100:1 → 50:1, acetone, EtOH) で分離した。**Heveadride (35)** は、CH₂Cl₂, CH₂Cl₂: acetone = 100:1 および 50:1 の画分に存在したので、これらの分画を合わせて、LPLC (*n*-hexane: acetone = 3:1) による精製を行なった後、ジエチルエーテルによる再結晶により **heveadride (35)** 3.40 g を得た。

Heveadride (35): 無色結晶性粉末. mp 159.5 – 162°C (diethyl ether より再結晶). $[\alpha]_D = +59.3^\circ$ ($c = 1.12$, CHCl₃). EI-MS m/z (%): 332.1273 (M⁺, 332.1260 for C₁₈H₂₀O₆). UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 246 (3.30), 204 (3.67). IR ν_{\max}^{KBr} cm⁻¹: 1834, 1761 (anhydride). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): +1.05 (220). ¹H-および ¹³C-NMRスペクトルデータは、本論中 Table 10 に示した。

Dihydroepiheveadride (32) から deoxoepiheveadride (33) の合成

Dihydroepiheveadride (**32**) 300 mg (1.1 mmol) を MeOH 10 mL に溶解し、

NaBH₄ 150 mg (4.0 mmol) を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応後、4N-HCl で酸性にした後、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層は無水 Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣 274 mg を CH₂Cl₂ 10 mL に溶解した後、PCC 450 mg を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、ジエチルエーテルと無水 MgSO₄ を加えて 10 分間攪拌した。攪拌後、減圧ろ過により不溶物を除去した後、ろ液を減圧下溶媒留去した。得られた残渣は LPLC (CH₂Cl₂ : MeOH = 100 : 1) による精製を行ない、deoxoepiheveadride (**33**) 167 mg (収率 47.7 %) を得た。得られた合成品 **33** は、¹H-NMR, HREI-MS, mp, UV, CD スペクトル、TLC および HPLC の挙動について、天然品 **33** と完全に一致した。

Deoxoepiheveadride (**33**) のX線結晶解析

X線結晶解析に用いた **33** の結晶は、アセトンから再結晶することにより無色プリズム晶として得られた。回折強度データは、0.60 × 0.50 × 0.25 mm の結晶から Cu-Kα 線を用い、RIGAKU AFC-7 FOS 自動4軸回折計により収集した。測定した総計 1762 個の反射 (2θ < 135.9°) のうち、 $F > 3\sigma(F)$ の条件を満たす 1708 の反射を構造解析および精密化に用いた。なお、結晶学的データは次の通りである。

C₁₈H₂₂O₅, M = 318.37, orthorhombic, space group *P*2₁2₁2₁, *a* = 11.311 (4), *b* = 17.941 (5), *c* = 8.127 (2) Å, *V* = 1649.2 (9) Å³, *Z* = 4, *D_c* = 1.282 g·cm⁻³, *F*(000) = 680, μ (Cu-Kα) = 7.67 cm⁻¹, Cu-Kα X-radiation (filtered), λ = 1.54178 Å

構造解析と精密化：結晶構造は、SIR92³⁶⁾ を用いた直接法によって解き、DIRDIF99³⁷⁾ によるフーリエ合成により拡張した後、完全マトリックス最小二乗法によって精密化した。差フーリエ合成からほとんどの水素原子が見つけたが、すべての水素原子は計算によって得られた座標を以後の精密化に使用した。最終精密化ではすべての非水素原子に異方性温度因子を用い、水素原子の座標および等方性温度因子を固定して行なった。最終的なR因子は、1708 個の反射に対して *R* = 0.066, *R_w* = 0.076 となった。

Heveadride (**35**) からイミド誘導体の合成

Heveadride (**35**) から *p*-bromophenylhydrazine 誘導体 (**37a**) の合成¹⁶⁾

p-Bromophenylhydrazine hydrochloride 3.2 g (14.3 mmol) を 0.1N · NaOH 水溶液 150 mL に溶解し、diethyl ether で抽出した後、減圧濃縮を行なった。得られた乾固物を CHCl₃ 30 mL に溶解した後、heveadride (35) 1.2 g (3.6 mmol) を溶解した CHCl₃ 30 mL を加えて 4 °C で 2 日間攪拌した。反応終了後、減圧ろ過で過剰の試薬や塩を除いた後、ろ液を HCl 酸性にし、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層は無水 Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n · hexane : acetone = 2 : 1) による精製を行ない、37a 1.97 g (収率 81.7 %) を得た。

化合物 37a : 黄色非晶形. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.88 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.18 (3H, brs), 1.08 - 1.26 (3H, m), 1.43 - 1.97 (3H, m), 2.06 - 2.40 (5H, m), 2.85 (1H, brd, *J* = 12.9 Hz), 3.09 (1H, dd, *J* = 13.9, 8.7 Hz), 3.25 (1H, dd, *J* = 13.9, 8.5 Hz), 5.95 (2H, brs), 6.62 (4H, dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz), 7.35 (4H, dd, *J* = 8.9, 2.0 Hz).

Heveadride (35) から *p*-bromobenzylamine 誘導体 (36b および 37b) の合成

p-Bromobenzylamine hydrochloride 40 mg (0.18 mmol) を 0.1N · NaOH 水溶液 4 mL に溶解し、diethyl ether で抽出した後、減圧濃縮を行なった。得られた乾固物を toluene 4 mL に溶解した後、heveadride (35) 20 mg (0.06 mmol) を溶解した toluene 4 mL を加えて 16 時間加熱還流した。

反応終了後、減圧ろ過で過剰の試薬や塩を除いた後、ろ液を HCl 酸性にし、CH₂Cl₂ で抽出した。有機層は無水 Na₂SO₄ で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n · hexane : acetone = 2 : 1) による精製を行なった後、LPLC (n · hexane : acetone = 4 : 1) による精製を行い、モノイミド誘導体 36b 7.5 mg (収率 25.0 %) およびジイミド誘導体 37b 6.3 mg (収率 15.7 %) を得た。

化合物 36b : 淡黄色非晶形. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.82 (3H, t, *J* = 7.0 Hz), 1.16 (3H, brs), 0.92 - 1.26 (5H, m), 1.79 - 2.36 (6H, m), 2.80 (1H, brd, *J* = 13.0 Hz), 3.05 (1H, brdd, *J* = 14.0, 8.5 Hz), 3.14 (1H, brdd, *J* = 14.0, 8.5 Hz), 4.61 (2H,

brs), 7.21 (2H, brt, $J = 9.0$ Hz), 7.44 (2H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz).

化合物 **37b**: 淡黄色非晶形. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.78 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.14 (3H, brs), 0.98 - 1.34 (5H, m), 1.60 - 2.02 (3H, m), 2.09 - 2.26 (3H, m), 2.73 (1H, brd, $J = 13.0$ Hz), 2.99 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz), 3.13 (1H, dd, $J = 14.0, 8.5$ Hz), 4.59 (4H, s), 7.23 (4H, brt, $J = 9.0$ Hz), 7.44 (4H, dd, $J = 9.0, 2.0$ Hz).

Heveadride (35) から *p*-bromoaniline 誘導体 (36c) の合成

Heveadride (**35**) 200 mg (0.6 mmol) をトルエンに溶解し、*p*-bromoaniline 400 mg (2.3 mmol) を加えて 6 時間還流した。反応終了後、4N-HCl で酸性にした後、 CH_2Cl_2 で抽出した。有機層は無水 Na_2SO_4 で乾燥し、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣は、LPLC (n-hexane : acetone = 4 : 1) による精製を行ない、モノイミド誘導体 **36c** 80 mg (収率 27.5 %) およびジイミド誘導体 **37c** 10 mg (収率 1.6 %) を得た。なお、原料 **35** が 60 mg 回収された。

化合物 **36c**: 無色板状晶. mp 178 - 189°C (acetone から再結晶). HREI-MS m/z (%): 485.0837 (M^+ , 485.0813 for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{NO}_5\text{Br}$). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm ($\log \epsilon$): 246 (4.49). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1840, 1770 (anhydride). CD (EtOH) nm ($\Delta\epsilon$): 249 (+1.77). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.86 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.18 (3H, brs), 0.95 - 1.25 (4H, m), 1.40 - 1.75 (2H, m), 1.80 - 2.50 (5H, m), 2.87 (1H, brd, $J = 13.0$ Hz), 3.13 (1H, m), 3.27 (1H, m), 7.28 (2H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.59 (2H, d, $J = 8.7$ Hz).

化合物 **37c**: 淡黄色非晶形. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87 (3H, t, $J = 6.5$ Hz), 1.19 (3H, brs), 1.08 - 1.25 (4H, m), 1.50 - 1.83 (2H, m), 1.94 - 2.40 (5H, m), 2.90 (1H, brd, $J = 13.3$ Hz), 3.13 (1H, dd, $J = 13.2, 8.6$ Hz), 3.31 (1H, dd, $J = 13.8, 8.1$ Hz), 7.31 (4H, brt, $J = 8.9$ Hz), 7.60 (4H, brd, $J = 8.9$ Hz).

化合物 **36c** の X 線結晶解析

X 線結晶解析に用いた **36c** の結晶は、アセトン溶媒中から無色板状晶として得られた。回折強度データは、 $0.60 \times 0.30 \times 0.05$ mm の結晶から Cu-K α 線を

用い、RIGAKU AFC-7 FOS 自動 4 軸回折計により、収集した。Friedel 対を含む総計 4349 の反射 (型 $2\theta < 135.9^\circ$) のうち、 $F > 3\sigma(F)$ の条件を満たす 4068 の反射が構造解析および精密化に用いた。なお、結晶学的データは下記の通りである。

$C_{24}H_{24}O_5NBr$, $M = 486.36$, monoclinic, space group $C2$, $a = 18.506(5)$, $b = 11.563(2)$, $c = 10.706(2)$ Å, $\beta = 103.96(2)^\circ$, $V = 2223.3(8)$ Å³, $Z = 4$, $D_c = 1.453$ g·cm⁻³, $F(000) = 1000$, $\mu(\text{Cu-K}\alpha) = 28.22$ cm⁻¹, Cu-K α X-radiation (filtered), $\lambda = 1.54178$ Å.

構造解析と精密化：結晶構造は、SIR92³⁶⁾ を用いた直接法によって解き、DIRDIF99³⁷⁾ によるフーリエ合成により拡張した後、完全マトリックス最小二乗法によって精密化した。差フーリエ合成からほとんどの水素原子が見つめられたが、以後の精密化にはすべての水素原子について計算によって得られた座標を用いた。最終精密化はすべての非水素原子に異方性温度因子を用い、水素原子の座標および等方性温度因子を固定して行なった。最終的な R 因子は、4068 個の反射に対して $R = 0.093$, $R_w = 0.101$ となった。

Friedel 対同志の反射強度比を測定値と計算値で比較したところ、おおむね逆の値を得たので、結晶構造の座標系がもとのもの (右手系) ではなく、左手系が正しいことがわかった。したがって、**36c** の絶対構造は Fig. 18 となった。

Heveadride (35) の異性化

Heveadride (35) 6 mg をトルエン-ベンゼン混合液 2 mL に溶解し、TsOH·H₂O 60 mg を加えて 40 時間加熱還流した。反応終了後、精製水で希釈しジエチルエーテルで抽出した。有機層は無水 Na₂SO₄ で乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をアセトニトリル 400 μL に溶解することで試料溶液とし、HPLC 分析を行なった。HPLC 分析条件および HPLC クロマトグラムは Fig. 18 に示した。

Dihydroepiheveadride (32) のメチル化

Dihydroepiheveadride (32) 47 mg をトルエン-ベンゼン混合液 10 mL に溶解し、少量の MeOH と TsOH·H₂O 30 mg を加えて 16 時間加熱還流した。

反応終了後、精製水で希釈し CH₂Cl₂ で抽出した。有機層は無水 Na₂SO₄ で乾燥した後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣は、HPLC (n-hexane : acetone = 1 : 1) による分離を行ない、**32** の 12 α - および 12 β - メチル化体の混合物 **38** 27 mg と 3 mg の原料回収を得た。メチル化体の混合比率は、¹H-NMR スペクトルの積分比から約 2 : 1 であると確認した。

32 のメチル化体 (**38**) : 無色非晶形。 ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0.86 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.06 (3H, t, J = 7.1 Hz), 3.02* (1H, dd, J = 13.5, 8.1 Hz) / 3.10 (1H, dd, J = 13.5, 10.0 Hz), 3.67* (3H, s, 12-OMe) / 3.57 (3H, s, 12-OMe), 5.56* (1H, d, J = 1.7 Hz, 12-H) / 5.71 (1H, s, 12-H). * ¹H-NMR スペクトルデータは、major / minor で表現した。

Dihydroepihevedride (**38**) および関連化合物の抗真菌活性試験

各化合物は水に不溶性であるため、NCCLS¹⁵⁾ 法が適用出来ず、抗菌性試験はペーパーディスク法で行なった。試験に使用した菌株を Table 12 に示した。病原性糸状菌および病原性酵母については 1・2 週間前培養したものを、また細菌については 24 時間前培養したものをを用いた。活性試験用培地の作成は、前述の前培養試験菌を滅菌水に懸濁し、温時のポテトデキストロース寒天 (PDA) 培地に混釈後、10 mL ずつ滅菌済みシャーレ (90 mm × 20 mm) に分注して作成した。なお酵母では最終細胞数を 2 × 10⁴ CFU/mL に調製した。各化合物は、6 mm のペーパーディスク上に 100 および 5 μ g/disc の濃度に調整した後、各活性試験用培地上に置かれ、25 °C で培養した。各化合物の各濃度溶液の調製には DMSO を用いた。試験の判定は、病原糸状菌では 48・72 時間後、病原性酵母では 24・48 時間後、細菌については 16・24 時間後に阻止円の直径 (mm) を測定する方法で行なった。

謝 辞

本研究を行なうにあたり、終始変わらぬ懇切なるご指導を賜りました星薬科大学薬化学教室 河合賢一教授、野沢幸平助教授に深く感謝致します。本論文作成に際し、有益な御助言を賜りました千葉大学 宮治誠名誉教授、千葉大学真菌医学研究センター 福島和貴教授に深謝致します。また、抗菌試験を行なうにあたりご協力頂きました千葉大学真菌医学研究センター 滝澤香代子博士、MS および NMR を測定して下さった星薬科大学機器センター 笠井博子助手および小林直助手に深く感謝致します。

最後に、本実験に協力され適切なる助言と御討論を頂き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諸氏に心からお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 伊藤章：“真菌症のすべて ～最新知見からの現状と展望～”，医薬ジャーナル社、1997，東京。
- 2) 奥平雅彦：Opportunistic Fungus Infection の病理、日病会誌、**74**, 61-91 (1985).
- 3) 奥平雅彦、久米 光：深在性真菌症の最近の諸問題、病理と臨床、**9**, 1270-1273 (1991).
- 4) D. Edouard and D. Bertrand : Mycoses in AIDS Patients: An Overview. In. Mycoses in AIDS Patients., 27-63, Plenum Press, 1990, New York
- 5) N. H. Georgopapadakou and T. J. Walsh : Antifungal Agents : Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies., *J. Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**, 279-291 (1996).
- 6) T. Yamazaki, H. Kume, S. Murase, E. Yamashita, and M. Arisawa : Epidemiology of Visceral Mycoses: Analysis of Data in *Annual of the Pathological Autopsy Cases in Japan*, **37**, 1732-1738 (1999).
- 7) G. A. Ellestad, R. H. Evans, M. P. Kunstmann, J. E. Lancaster and G. O. Morton : Structure and Chemistry of Antibiotic LL-Z1271 α , an Antifungal Carbon-17 Terpene., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5483-5489 (1970).
- 8) N. R. Andersen and P. R. Rasmussen : The Constitution of Clerocidin, A New Antibiotic Isolated from *Oidiodendron truncatum.*, *Tetrahedron Lett.*, 469-472 (1984).
- 9) T. Hosoe, K. Nozawa, T. C. Lumley, R. S. Currah, K. Fukushima, K. Takizawa, M. Miyaji, and K. Kawai : Tetranorditerpene Lactones, Potent Antifungal Antibiotics for Human Pathogenic Yeasts, from a Unique Species of *Oidiodendron.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **47**, 1591-1597 (1999).
- 10) K. Sakai, H. Chiba, R. Kaneto, M. Sakamoto, K. Okamura and H. Tone : Mer-NF8054A and X, Novel Antifungal Steroids, Isolated from *Aspergillus* sp., *J. Antibiotics*, **47**, 591-594 (1994).
- 11) R. Mizuno, N. Kawahara, K. Nozawa, M. Yamazaki, S. Nakajima and K. Kawai : Stereochemistry of an 18, 22-Cyclosterol, Mer-NF8054X, from *Emericella*

- heterothallica* and *Aspergillus ustus.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 9–11 (1995).
- 12) T. Hosoe, T. Sameshima, K. Dobashi, and K. Kawai : Structures of Two New 18, 22-Cyclosterols, Emesterones A and B, from *Emericella heterothallica.*, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 850–852 (1998).
 - 13) J. F. Grove : New Metabolic Products of *Verticillium lecanii*. Part 3. 23,24,25,26,27-Pentanorlanost-8-en-3 β ,22-diol from *Verticillium lecanii.*, *Phytochemistry*, **23**, 1721–1723 (1984).
 - 14) C. J. Gilmore : “MITHRIL. An Integrated Direct Methods Computer Program”, University of Nijmegen, The Netherlands, 1994.
 - 15) The National Committee for Clinical Laboratory Standard Publication M-27A, “Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing Yeasts ; Approved Standard”, Wayne, 1997.
 - 16) R. I. Crane, P. Hedden, J. MacMillan and W. B. Turner : Fungal Products. Part IV. The Structure of Heveadride, A New Nonadride from *Helminthosporium heveae.*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 194–200 (1973).
 - 17) S. Nieminen and C. Tamm : ¹H- and ¹³C-NMR. Spectroscopy of the Nonadrides., *Helv. Chim. Acta*, **64**, 2791–2801 (1981).
 - 18) W. W. Epstein and G. van Lear : Metabolites of *Fomes officinalis.*, *J. Org. Chem.*, **31**, 3434–3435 (1966).
 - 19) N. Claydon, J. F. Grove, M. Pople and M. J. Begley : New Metabolic Products of *Verticillium lecanii*. Part 1. 3 β -Hydroxy-4,4,14 α -trimethyl-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20*S*-carboxylic acid and the Isolation and Characterization of Some Minor Metabolites., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 497–502 (1984).
 - 20) J. F. Grove : New Metabolic Products of *Verticillium lecanii*. Part 2. 3 β ,12 β -Dihydroxy-4,4,14 α -trimethyl-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20*S*-carboxylic acid and 4,4,14 α -trimethyl-3-oxo-5 α -pregna-7,9(11)-diene-20*S*-carboxylic acid., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1219–1221 (1984).
 - 21) A. W. Archer and W. C. Taylor : Homoheveadride, a Cyclononadiene Bis-Anhydride from *Gladonia polycarpoides.*, *Phytochemistry*, **26**, 2117–2119 (1987).

- 22) G. Buechi, K. M. Snader, J. D. White, J. Z. Gougoutas and S. Singh : Structures of Rubratoxins A and B., *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 6638–6641 (1970).
- 23) H. Raistrick and G. Smith : Studies in the Biochemistry of Micro-Organisms. XXXV. The Metabolic Products of *Byssoclamys fulva* Olliver and Smith., *Biochem. J.*, **27**, 1814–1819 (1933).
- 24) L. Escoula and G. Henry : Toxinogenic Molds in Silage. II. In Vitro Kinetics of Patulin and Byssochlamic Acid Biosynthesis by *Byssoclamys nivea* WESTLING in Liquid Medium., *Ann. Rech. Vet.*, **6**, 155–163 (1975).
- 25) K. Arai, S. Shimizu, H. Miyajima and Y. Yamamoto, Castaneiolide, Abscisic Acid and Monorden, Phytotoxic Compounds Isolated from Fungi (*Macrophoma castaneicola* and *Didymosporium radicumicola*) cause “Black Root Rot Disease” in Chestnut Trees., *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2870–2872 (1989).
- 26) M. Nakajima, K. Itoi, Y. Takamatsu, S. Sato, Y. Furukawa, K. Furuya, T. Honma, J. Kadotani, M. Kozasa and T. Haneishi : Cornexistin : A New Fungal Metabolite with Herbicidal Activity., *J. Antibiotics*, **44**, 1065–1071 (1991).
- 27) S. C. Fields, L. Mireles-Lo and B. C. Gerwick : Hydroxycornexistin : A New Phytotoxin from *Paecilomyces variotti*., *J. Nat. Prod.*, **59**, 698–700 (1996).
- 28) G. M. Strunz, M. Kakushima and M. A. Stillwell : Scytalidin : A New Fungitoxic Metabolite Produced by a *Scytalidium* Species., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.*, 2280–2283 (1972).
- 29) M. A. Stillwell, R. E. Wall and G. M. Strunz : Production, Isolation, and Antifungal Activity of Scytalidin, a Metabolite of *Scytalidium* Species., *Can. J. Microbiol.*, **19**, 597–602 (1973).
- 30) W. A. Ayer, P. Lu, H. Orszanska and L. Sigler : Deoxyscytalidin and Lignicol : New Metabolites from *Scytalidium* Species., *J. Nat. Prod.*, **56**, 1835–1838 (1993).
- 31) D. H. R. Barton, L. M. Jackman, L. R.-Hahn and J. K. Sutherland : The Nonadrides. Part II. The Constitutions of Glauconic and Glaucanic Acids., *J. Chem. Soc.*, 1772–1778 (1965).

- 32) D. H. R. Barton, L. D. S. Godinho and J. K. Sutherland : The Nonadrides. Part III. The Absolute Configuration of Glauconic and Glaucanic Acids., *J. Chem. Soc.*, 1779–1786 (1965).
- 33) D. H. R. Barton, J. L. Bloomer, L. M. Jackman, L. R-Hahn and J. K. Sutherland : The Constitutions of Glauconic, Glaucanic and Byssochlamic Acids., *Experientia*, **18**, 345–388 (1962).
- 34) T. T. Dabrah, H. J. Harwood Jr., L. H. Huang, N. D. Jankovich, T. Kaneko, J.-C. Li, S. Lindsey, P. M. Moshier, T. A. Subashi, M. Therrien and P. C. Watts. : CP-225,917 and CP-263,114, Novel Ras Farnesylation Inhibitors from an Unidentified Fungus I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biochemical Properties., *J. Antibiotics*, **50**, 1–7 (1997).
- 35) T. T. Dabrah, T. Kaneko, W. Masefski Jr. and E. B. Whipple : CP-225,917 and CP-263,114, Novel Ras Farnesylation Inhibitors from an Unidentified Fungus 2. Structure Elucidation., *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 1594–1598 (1997).
- 36) A. Altomare , G. Cascarano, C. Giacobazzo and A. Guagliardi : Early Finding of Preferred Orientation : A New Method., *J. Appl. Cryst.*, **27**, 1045–1050 (1994).
- 37) P.T. Beurskens, G. Admiraal, G. Beurskens, W. P. Bosman, R. de Gelder, R. Israel, and J.M.M. Smits, The DIRDIF-99 Program System, Technical Report of the Crystallographic Laboratory, University of Nijmegen, 1999, The Netherlands.

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。

第一章

A New Pentanorlanostane Derivative, Cladosporide A, as a Characteristic Antifungal Agent against *Aspergillus fumigatus*, Isolated from *Cladosporium* sp. : T. Hosoe, H. Okada, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Okada, G. M. C. Takaki, K. Fukushima, M. Miyaji, and K. Kawai, *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1422-1426 (2000).

New Pentanorlanostane Derivatives, Cladosporide B~D, as Characteristic Antifungal Agents Against *Aspergillus fumigatus*, Isolated from *Cladosporium* sp. : T. Hosoe, S. Okamoto, K. Nozawa, K. Okada, G. M.C. Takaki, K. Fukushima, M. Miyaji and K. Kawai, *J. Antibiot.*, **54**, 747-750 (2001).

第二章

A New Nonadrive Derivative, Dihydroepiheveadride, as Characteristic Antifungal Agent against Filamentous Fungi, Isolated from Unidentified Fungus IFM 52672. : T. Hosoe, K. Fukushima, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Takizawa, K. Okada, G. M. C. Takaki and K. Kawai, *J. Antibiot.*, **57**, 573-578 (2004).

The Absolute Structures of Dihydroepiheveadride, as Characteristic Antifungal Agent against Filamentous Fungi, and Its Related Compounds from Unidentified Fungus IFM 52672. : T. Hosoe, K. Fukushima, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Takizawa, and K. Kawai, *Heterocycles*, **63**, 2581-2589 (2004).