

Eupenicillium javanicum の
代謝産物の研究

中楯 奨

目次

略語表	1
序論	2
本論	5
第一章 <i>Eupenicillium javanicum</i> の代謝産物の化学スクリーニング	5
第一節 <i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 54704 株の代謝産物の分離	6
第二節 Eujavanicol 類の構造	8
第三節 Javanicumine 類の構造	18
第四節 <i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 59075 株の代謝産物の分離	24
第五節 Eujindole 類の構造	26
第二章 <i>Eupenicillium javanicum</i> の代謝産物の生物活性スクリーニング	38
第一節 <i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 58214 株の抗真菌活性物質 [2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride]	39
第二節 2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride の抗真菌活性	42
第三節 <i>Eupenicillium javanicum</i> IFM 54704 株の抗真菌活性物質 [Eujavanicin A]	43
第四節 Eujavanicin A の抗真菌活性	53
結論	54
実験の部	62
第一章に関する実験	63
第二章に関する実験	70
謝辞	79
引用文献	80
論文リスト	85

略語表

本論文においては、以下の略語を使用する。

<i>ax</i>	Axial
CD	Circular dichroism
¹³ C NMR	¹³ C Nuclear magnetic resonance
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
EI-MS	Electron ionization mass spectrometry
<i>eq</i>	Equatorial
FAB-MS	Fast atom bombardment mass spectrometry
FDAA	1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide
¹ H- ¹ H COSY	¹ H- ¹ H Correlation spectroscopy
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
¹ H NMR	¹ H Nuclear magnetic resonance
HPLC	High performance liquid chromatography
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
IR	Infrared spectroscopy
LPLC	Low pressure liquid chromatography
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser and exchange spectroscopy
PDA	Potato dextrose agar
ROE	Rotating frame overhauser effect
TLC	Thin-layer chromatography
TOCSY	Total correlation spectroscopy
UV	Ultraviolet

序論

生物は、長い進化の過程でそれぞれが様々な化合物の生産能力を獲得してきた。生物の生産する天然有機化合物は、構造上極めて多様である。天然有機化合物は、構造の多様性によりもたらされる多彩な生物活性から医薬品などの供給源として古くから人類に多大な恩恵を与え、その探索源として世界中の様々な生物種が用いられてきた。

真菌を利用した創薬は、1929年に Fleming による *Penicillium notatum* からのペニシリン (1)¹⁾の発見に始まる。今日までに、*P. griseofulvum* から抗真菌抗生物質グリセオフルビン (2)²⁾、*Eupenicillium brefeldianum* から免疫抑制剤ミゾリビン (3)³⁾、*Trichoderma polysporum* から免疫抑制剤シクロスポリン (4)⁴⁾がそれぞれ単離され、その後医薬品として利用されている。また、複数の *Penicillium sp.*より報告された mycophenolic acid (5)⁵⁾、*P. brevicompactum* から発見された compactin (6)⁶⁾は、リード化合物として活用され、前者からはミコフェノール酸モフェチル (7)、後者からはスタチン類 (8)が開発され、世界中で使用される医薬品となっている。これらを始め、世界中の菌類から生理活性を示す物質、様々な構造の代謝産物が報告されている。菌類は確認されているものでおよそ六千五百属、八万種弱にのぼるとされ、さらに毎年のように新種が記録されているが、代謝産物の研究が行われた菌類は全体のほんの一部に限られている。そのため、真菌の産生する第二次代謝物中には、多くの未知の天然有機化合物が含まれていると予想される。今日の医薬品開発においても菌類は魅力的な研究対象であり、特殊な環境で生活する海洋真菌や昆虫寄生菌なども未知の代謝産物の生産を期待し研究対象になっている⁷⁾。

今回私は、地球上の広範囲に生息し、頻繁に分離される菌類に注目した。このような菌類が、様々な生育環境に適応し、生活する力を獲得しているものと考えた。そのため、多様な第二次代謝産物の生産が期待でき、リード化合物開発研究に適した生物資源の一つになりうると考えた。

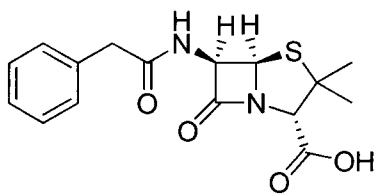
一方、現代社会において生物多様性の保全は人類共通の課題となっている。2010年10月、生物多様性条約締結国会議 COP10 が名古屋で開催され、生物多様性を保全するための愛知目標と、遺伝資源を利用する際の利益配分の国際ルー

ルを定めた名古屋議定書が採択された。資源取得にあたり資源国の法を順守し、証明書の発行を受け、利用国側で不正取得を監視することなどが法的拘束力のあるものとなった。その結果、国外の生物種からの医薬品開発やそのシードの探索には、情報公開・コスト・時間の負担が増し、一段と厳しい段階となった。

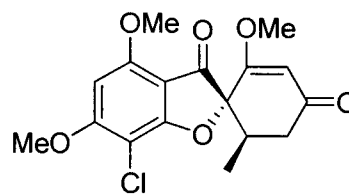
国内資源の活用を考える際、日本は狭い国土から天然資源に乏しいと思われがちである。しかし、菌類の生息環境を考えると、日本は平地が全国土の四分の一、標高差が約 3,800m と変化に富む地形を有し、約三分の二が森林と豊かな自然環境を有する。また、気候は高温多湿かつ四季の変化があり、北海道の冷帯から南西諸島の亜熱帯と幅広い気候帯に属する。すなわち、菌類にとって日本は多彩な生育環境を有し、菌類は生息地に適応した結果生み出される遺伝子の多様性を獲得することが予想される。

このようなことを考え、私は、日本を含め地球上の広い地域に分布する菌種に注目し、その代謝産物の研究を行うこととした。本研究に適した菌種の一つとして、日本で頻繁に分離される菌種である *Eupenicillium* 属 *Series javanica* に分類される子囊菌、*Eupenicillium javanicum* を選択した。*E. javanicum* の代謝産物について、化学スクリーニングにより菌株間における代謝産物の生産の特徴を調べ、新規化合物の探索を行い、多様な骨格の化合物を生産する能力の獲得を検証した。また、生物活性スクリーニングを行い、生理活性物質を生産する能力の獲得を検討した。生物活性スクリーニングは、近年高リスク患者が年々増加傾向を示し、重篤な続発性感染症として問題となっている深在性真菌症の起因菌の一つ *Aspergillus fumigatus* に対する抗真菌活性試験を行った。

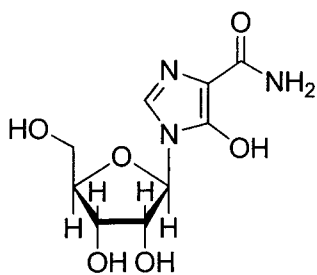
以上、国内由来 *E. javanicum* の代謝産物の研究により、潜在的国内資源である真菌類のリード化合物探索源としての可能性を検討した。



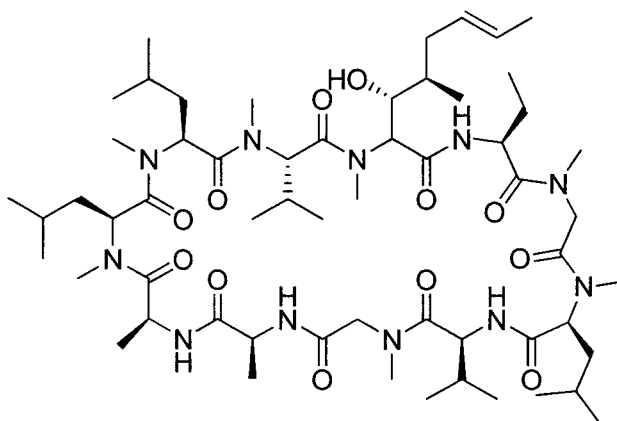
Penicillin G (1)



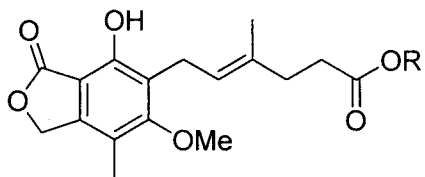
2



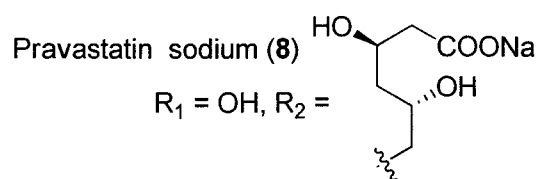
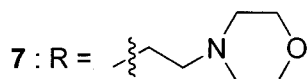
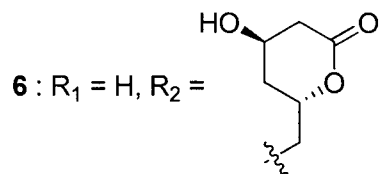
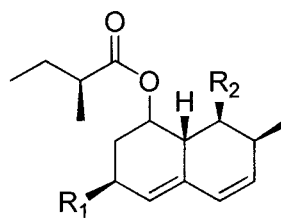
3



4



5 : R = H



本論

第一章 *Eupenicillium javanicum* の代謝産物の化学スクリーニング

日本国内土壌から得られた *Eupenicillium javanicum* 22 菌株について、それぞれ米を用いた固形培地(米培地)で培養した後、培養抽出エキスを作製し、TLC 分析を用い、第二次代謝産物の生産性を調べた。

リン・モリブデン酸試薬を用いた際、*E. javanicum* IFM 54704 株の代謝産物中にのみ、加熱時に徐々に青く呈色する特徴的な化合物が認められ、*E. javanicum* IFM 54704 株および IFM 60196 株には同試薬によりオレンジ色を呈する化合物が認められた。IFM 59075 株、IFM 60196 株および IFM 60197 株には、van Urk 試薬^{8,9)}に陽性(青色又は黄色)を示す化合物の存在が確認された。これらのことから *E. javanicum* は多様な骨格の代謝産物を生産し、また菌株により異なる生産性を有していることが予想された。そこで、TLC 分析時に、これらの化合物がより多く存在すると予想された *E. javanicum* IFM 54704 株および IFM 59075 株の成分探索を行った。

第一節では *E. javanicum* IFM 54704 株の代謝産物の分離について、第二節では新規デカリン誘導体 eujavanicol 類の構造決定について、第三節では新規ジオキソモルフォリン誘導体 javanicunine 類の構造決定について、第四節では *E. javanicum* IFM 59075 株の代謝産物の分離について、第五節では新規インドールジテルペン eujindole 類の構造決定について述べる。

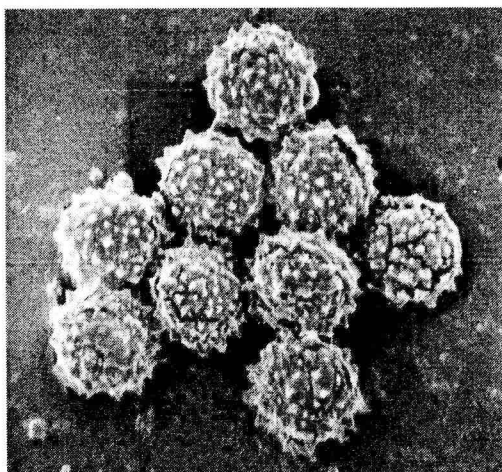
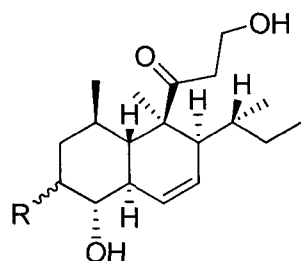
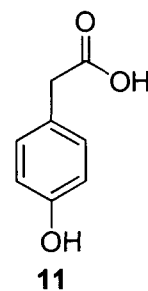
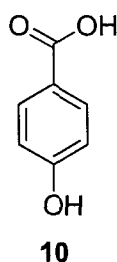
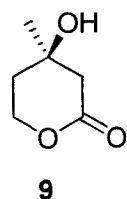


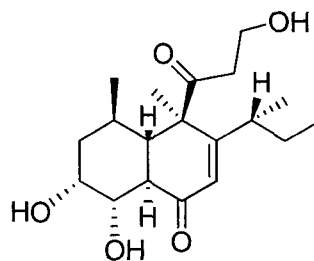
Fig. 1. Ascospore of *E. javanicum* IFM 54704

第一節 *Eupenicillium javanicum* IFM 54704 株の代謝産物の分離

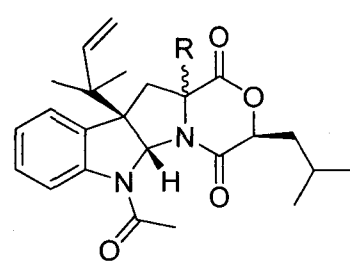
千葉県土壌より分離された *E. javanicum* IFM 54704 株を、米培地で 25°C、21 日間培養した。培養後、CHCl₃・MeOH (1:1) で抽出し、溶媒を留去した残渣に水、AcOEt を加えて、液液分配を行い、水可溶部分を除いて AcOEt 抽出エキスを得た。得られた抽出エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃・EtOH の混合比を徐々に変化させ、Chart 1 に示すように分画した。CHCl₃ : MeOH = 10:1 で溶出した分画を LPLC および HPLC で分離・精製を繰り返し行い、mevalonolactone (9)¹⁰⁾、*p*-hydroxybenzoic acid (10) および *p*-hydroxyphenylacetic acid (11) とともに弱い UV 吸収を示し、リン・モリブデン酸試液に対して加熱時に徐々に青色に呈色する新規化合物 eujavanicol A (12)、eujavanicol B (13) および eujavanicol C (14)、同試薬によりオレンジ色の呈色を示す新規化合物 javanicunine A (15) および javanicunine B (16) を得た。



Eujavanicol A (12) : R = α -OH
Eujavanicol B (13) : R = β -OH



Eujavanicol C (14)



Javanicunine A (15) : R = α -H
Javanicunine B (16) : R = β -OH

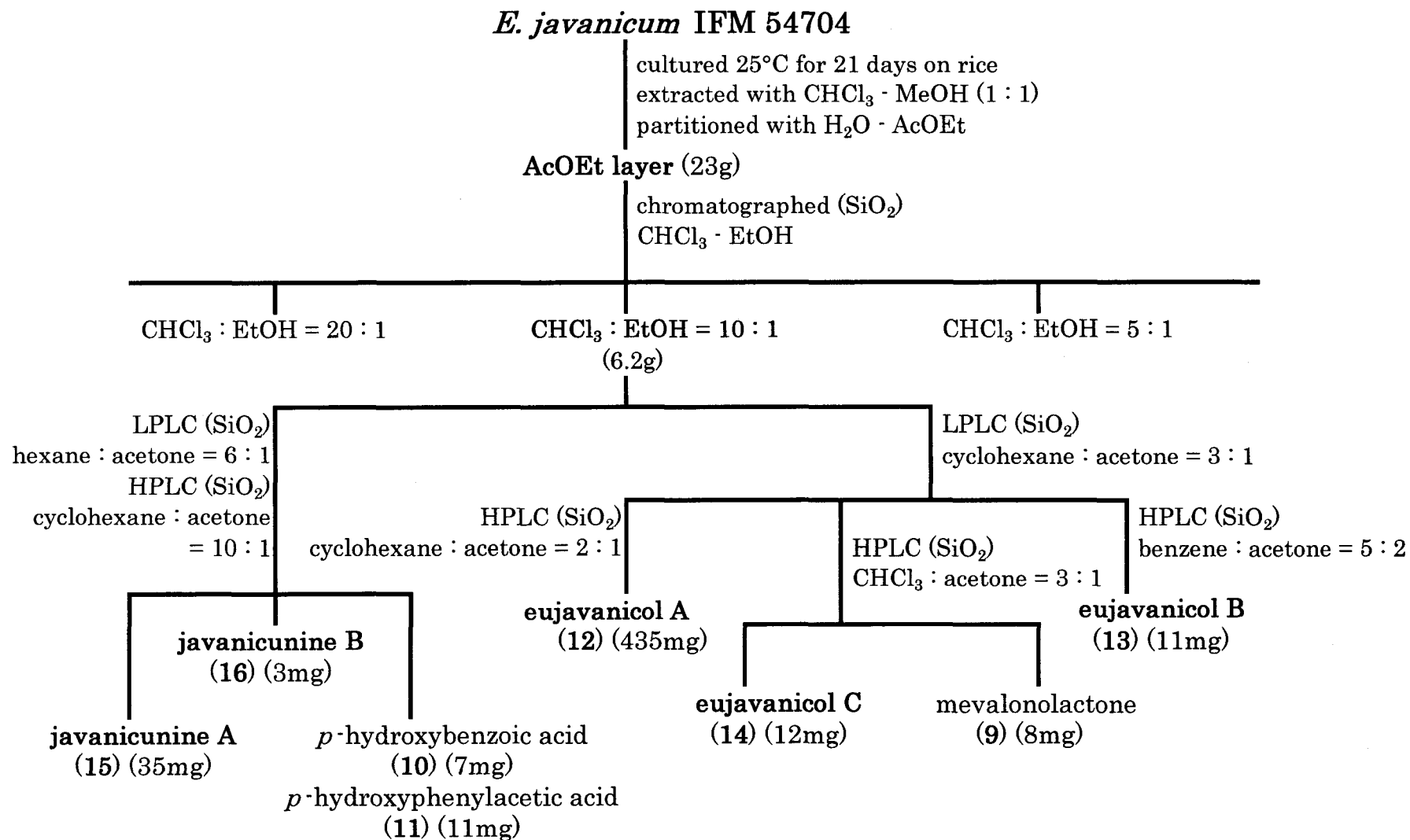


Chart 1.

第二節 Eujavanicol 類の構造

Eujavanicol A (12)、B (13)および C (14)は、いずれも無色の非晶性固体として得られ、類似した ^1H および ^{13}C NMR シグナルが観測された (Table 1)。

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of eujavanicol A (12), eujavanicol B (13), and eujavanicol C (14) in CDCl_3

No	Eujavanicol A (12)		Eujavanicol B (13)		Eujavanicol C (14)	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	52.6		52.5		59.4	
1-Me	19.4	1.25 s	19.3	1.22 s	14.6	1.37 m
2	52.4	1.94 m	52.4	1.94 m	173.6	
3	124.0	5.71 ddd (10.7, 4.6, 2.7)	124.0	5.71 ddd (10.7, 4.8, 2.7)	126.0	6.08 br s
4	126.1	6.00 ddd (10.7, 2.7, 2.4)	125.2	6.03 dt (10.7, 2.7)	203.2	
4a	39.1	2.14 tq (10.7, 2.4)	42.7	1.74 m	44.7	2.57 m
5	75.3	3.44 br d (10.7)	78.7	3.22 dd (10.7, 8.5)	72.3	3.88 dd (9.4, 2.0)
6	69.7	4.04 ddd (3.1, 2.9, 2.6)	75.7	3.55 m	67.8	4.00 m
7 _{ax}	41.3	1.52 ddd (14.6, 12.1, 2.6)	42.3	1.40 m	38.8	1.30 ddd (14.3, 12.0, 2.6)
7 _{eq}		1.85 dt (14.6, 2.9)		1.94 m		1.91 dt (14.3, 3.2)
8	30.6	1.73 m	35.1	1.43 m	27.6	2.17 m
8-Me	22.4	0.60 d (7.0)	22.5	0.65 d (6.4)	18.9	0.77 br s
8a	43.1	1.93 t (10.4)	42.7	2.05 t (9.9)	45.9	2.16 m
9	215.7		215.4		213.4	
10	41.2	2.66 ddd (18.9, 6.1, 3.7)	41.2	2.67 ddd (18.9, 6.1, 3.5)	41.7	2.57 m
		2.86 ddd (18.9, 7.3, 3.9)		2.85 ddd (18.9, 7.4, 3.9)		2.88 m
11	58.1	3.84 m	58.0	3.84 m	57.9	3.83 br s
		3.90 m		3.91 m		
1'	37.2	1.13 m	37.2	1.12 m	37.0	1.74 m
1'-Me	19.3	0.93 d (6.7)	19.2	0.93 d (7.0)	22.8	1.08 d (6.3)
2'	24.5	0.76 m	24.4	0.76 m	30.3	1.37 m
		1.47 m		1.46 m		
3'	12.6	0.76 m	12.5	0.76 m	12.2	0.89 br s

Eujavanicol A (12)は、FAB-MS スペクトルから分子式が $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{O}_4$ と決定され、不飽和度 4 の化合物であった。IR スペクトルにおける 1697cm^{-1} の吸収と ^{13}C NMR スペクトルに 215.7ppm のシグナルが観測されたことから、ケトンの存在が明らかになった。また、 ^{13}C NMR スペクトルに二つの sp^2 炭素 (δ_{C} 124.0, 126.1)が認められたことから、一つの二重結合の存在が明らかとなり、不飽和度から二環性の化合物であると予想された。さらに、IR スペクトルにおいて 3355cm^{-1} に吸収が認められたことから、水酸基の存在が予想された。アセチル化を行った結果、triacetylejavanicol A (17)が得られたことから三つの水酸基を有することが明らかになった (Chart 2)。

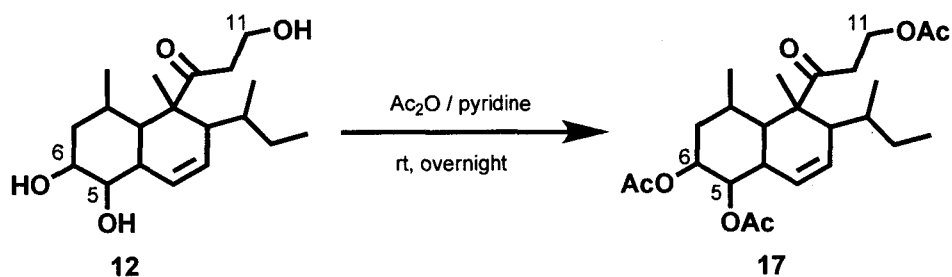


Chart 2.

HMQC スペクトルから、プロトンと炭素の直接の結合を Table 1 のように決定した。 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析を行い、3 位のプロトン (δ_{H} 5.71)、4 位のプロトン (δ_{H} 6.00)、4a 位のプロトン (δ_{H} 2.14)、5 位のプロトン (δ_{H} 3.44)、6 位のプロトン (δ_{H} 4.04)、7 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.52, 1.85)、8 位のプロトン (δ_{H} 1.73) および 8 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.60) におけるスピン系を明らかにし、同様に 1' 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.93)、1' 位のメチンプロトン (δ_{H} 1.12) および 2' 位のメチレンプロトン (δ_{H} 0.76, 1.47)、3' 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.76) の 1-methylpropyl 基におけるスピン系および 10 位 (δ_{H} 2.66, 2.86) と 11 位 (δ_{H} 3.84, 3.90) のメチレンプロトン間のスピン系が明らかになった (Fig. 2)。HMBC スペクトルの解析を行った結果、4 位のプロトン、7 位のプロトンおよび 8 位のメチルプロトンから 8a 位のメチン炭素 (δ_{C} 43.1) への相関が観測され、シクロヘキサン環(A 環)の結合を決定した。また、1' 位のメチルプロトンと 2' 位のメチレンプロトン、4 位のプロトンから 2 位のメチン炭素 (δ_{C} 52.4) への相関が認められたことから、1-methylpropyl 基が 2 位に結合することが明らかになった (Fig. 2)。さらに、1 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.25) から 1 位の四級炭素 (δ_{C} 52.6)、2 位の炭素、8a 位の炭素および 9 位のカルボニル炭素 (δ_{C} 215.7) への相関が観測されたことから、12 は二重結合をもつデカリン環を基本骨格に有することが明らかになった。また、10 位のプロトンから 9 位のカルボニル炭素への相関が認められたことから、1 位に 3-hydroxypropanoyl 基が結合していることが分かった。以上のことより、eujavanicol A (12) の平面構造を決定した (Fig. 2)。

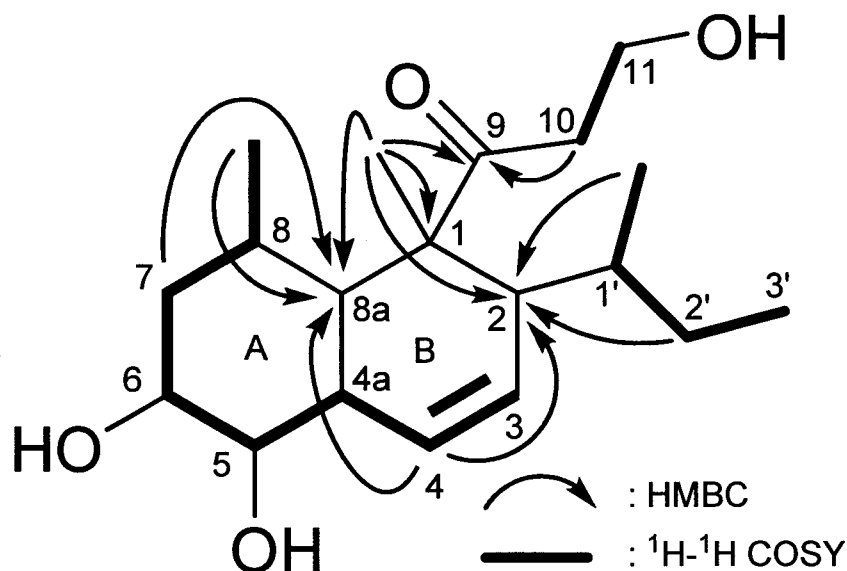


Fig. 2. Key HMBC and ¹H-¹H COSY correlations of eujavanicol A (12)

Eujavanicol A (12)の立体化学を決定するために、NOE 実験を行った (Fig. 3)。その結果、5位のプロトンの照射により7位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.52) と 8a 位のプロトン (δ_{H} 1.93)に、4a 位のプロトン (δ_{H} 2.14)の照射により8位のプロトンに NOE が観測された。これらのことから、12 の A 環がイス型配座をとる *trans*-デカリン環であることが明らかになった。1'位の立体構造については、1位の大きな置換基の存在により、重なり形配座を取る際の回転障壁から2位と1'位の結合の回転が抑制されると考え、NOE スペクトルの解析から検討した。1'位のプロトンの照射により2位のプロトン、10位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 2.66)および11位のプロトンに、1'位のメチルプロトンの照射により2位のプロトンと3位のプロトンに、また、3'位のメチルプロトンの照射により3位のプロトンに NOE が観測された。これらのことから、1'位のプロトンと1'位のメチル基はともに2位のプロトンの近くに位置し、かつ1'位のプロトンは1位の側鎖により近い位置に存在し、また3'位のメチルプロトンは3位側に位置する Fig. 3 に示す構造と決定した。6位の立体化学は、5位との ¹H NMR の結合定数から検討した。5位のプロトンの結合定数は、10.7Hz (br d)であった。この結合定数の大部分が4a位のプロトンとの *diaxial* 結合によるものであり、6位のプロトンとの結合定数は小さいものと考えられた。さらに、6位のプロトンは ddd を示し、結合定数はいずれも 3Hz 程度であることから、6位のプロトンを *equatorial* 結合

であると決定し、すなわち、6位の水酸基を axial 結合であることを決定した。以上により、eujavanicol A (12)の相対構造を決定した。

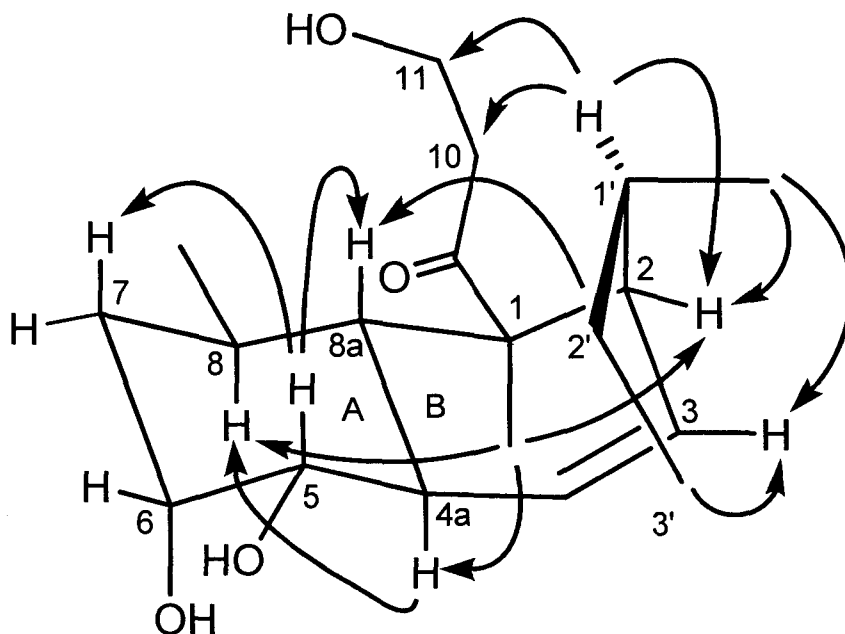


Fig. 3. Key NOE correlations of of eujavanicol A (12)

Eujavanicol B (13)の分子式は、FAB-MS スペクトルにより、12と同じ分子式の $C_{19}H_{32}O_4$ と決定され、13は12の異性体であることが明らかになった。化合物13の 1H および ^{13}C NMR スペクトルは、4a位 (δ_C 39.1, δ_H 2.14 : 12, δ_C 42.7, δ_H 1.74 : 13)、5位 (δ_C 73.5, δ_H 3.44 : 12, δ_C 78.7, δ_H 3.22 : 13)、6位 (δ_C 69.7, δ_H 4.04 : 12, δ_C 75.7, δ_H 3.55 : 13)および8位 (δ_C 30.6, δ_H 1.73 : 12, δ_C 35.1, δ_H 1.43 : 13)を除いては12と極めて酷似していた。HMQC、 1H - 1H COSYおよびHMBC スペクトルの詳細な解析からも分かるとおり、eujavanicol B (13)は12と同じ平面構造であることが明らかになった (Fig. 4)。

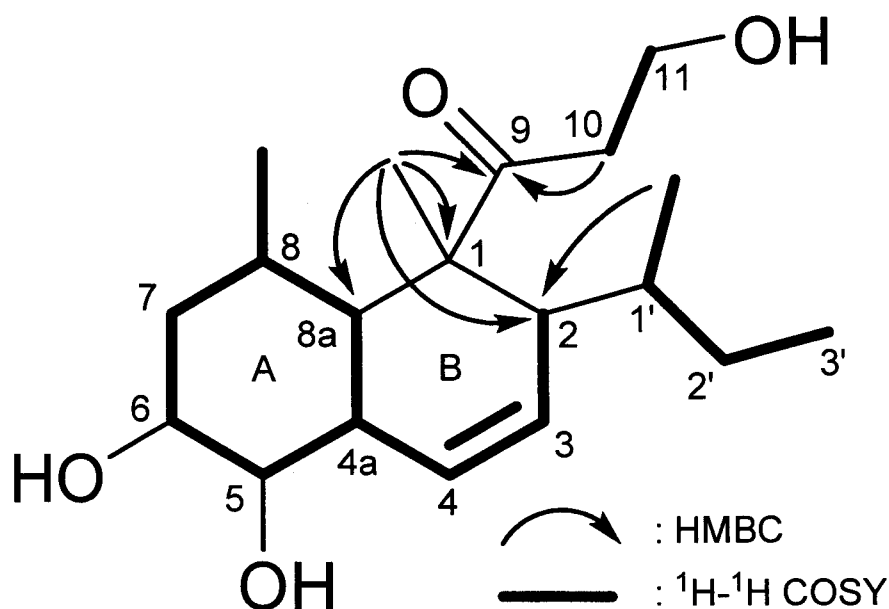


Fig. 4. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of eujavanicol B (13)

化合物 12 の比旋光度が $+49.9^\circ$ であるのに対し、13 は $+28.0^\circ$ であったことから、13 は 12 のジアステレオマーであると考えられた。Eujavanicol B (13) の立体化学を決定するために、NOE 実験と 12 と 13 の結合定数の比較を行った (Fig. 5)。NOE 実験の結果、4a 位のプロトンの照射により 6 位のプロトンと 1 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.22) に、5 位のプロトンの照射により、7 位の一つのプロトン (δ_{H} 1.40) と 8a 位のプロトン (δ_{H} 2.05) に NOE が観測されたことから、13 は 12 と同じく A 環のシクロヘキサン環がイス型配座をとる *trans*-デカリン環を有することが明らかになった。また、13 の 1' 位の立体化学を 12 と同様に検討し、12 の 1' 位と同じ相対構造であると決定した。5 位と 6 位の間での結合定数を比較したところ、5 位のプロトンが axial 結合、6 位のプロトンが equatorial 結合である 12 では 3Hz 程度であるのに対して、13 では 8.5Hz とより大きな値であった。このことから、13 は 5 位と 6 位のプロトンがともに axial 結合であると決定された。以上のことから、eujavanicol B (13) の相対構造を 12 の 6-エピマーであると決定した。

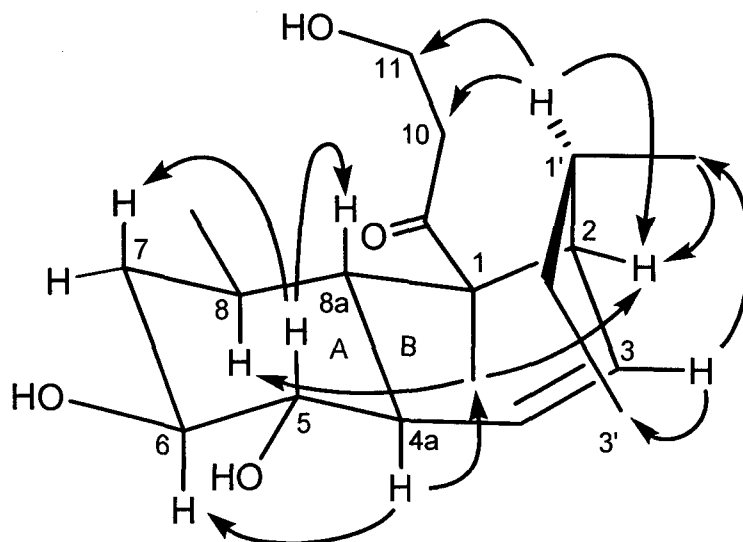


Fig. 5. Key NOE correlations of of eujavanicol B (13)

Eujavanicol A (12)および B (13)の絶対構造を決定するために、5位と6位の隣接する水酸基に着目し、励起子カイラリティー法を適用することとした¹¹⁾。化合物 13 に *p*-bromobenzoyl chloride を作用させ、tri-*p*-bromobenzoate (18) とし、CD スペクトル ($\Delta\epsilon$: モル円二色性)を測定した (Chart 3, Fig. 6)。その結果、18 は、第一コットン効果が 253nm に $\Delta\epsilon = -49.0$ 、第二コットン効果が 234nm に $\Delta\epsilon = +15.6$ と観測され、負のキラリティーを示した。化合物 13 についても同様に、tri-*p*- bromobenzoate (19)を得て、CD スペクトルを測定した (Chart 3, Fig. 6)。その結果、19 は、第一コットン効果が 254nm に $\Delta\epsilon = +20.5$ 、第二コットン効果が 238nm に $\Delta\epsilon = -15.4$ と観測され、正のキラリティーを示した。これらの結果より、18 は 5位と6位の *p*-bromobenzoyl 基が反時計回りに位置し、19 は 5位と6位の *p*-bromobenzoyl 基が時計回りに位置することが明らかになった (Fig. 7)。以上より、eujavanicol A (12)の絶対構造を 5*S*, 6*R*、eujavanicol B (13)の絶対構造を 5*S*, 6*S*の図に示す構造と決定した。

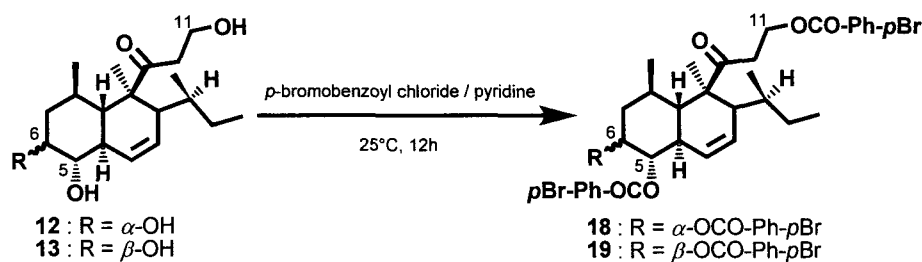


Chart 3.

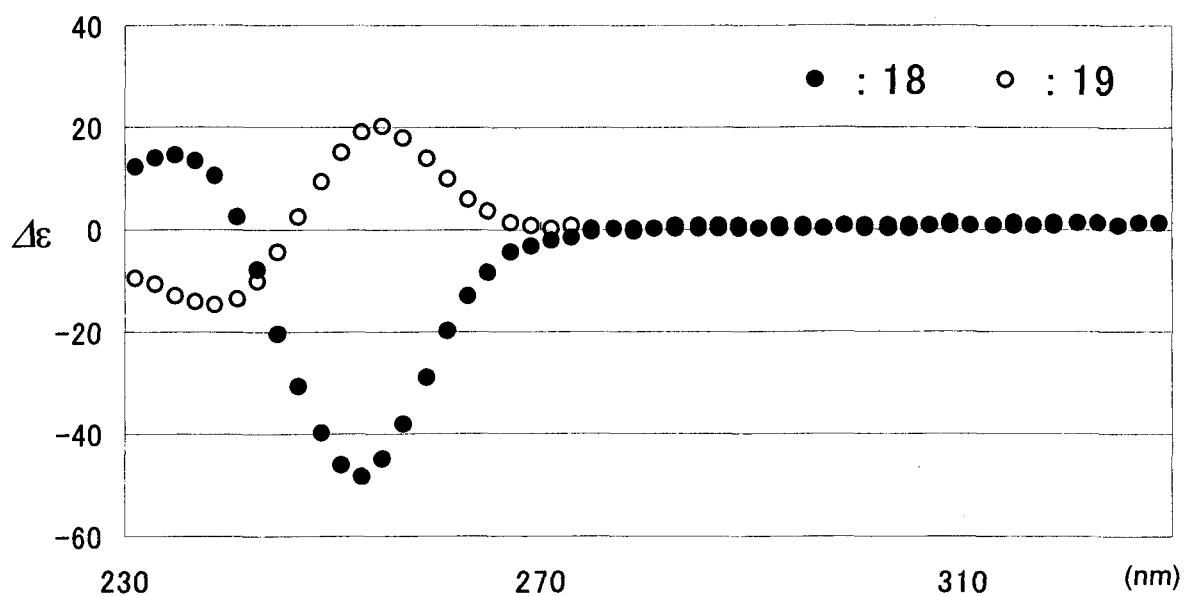


Fig. 6. CD spectra of 18 and 19

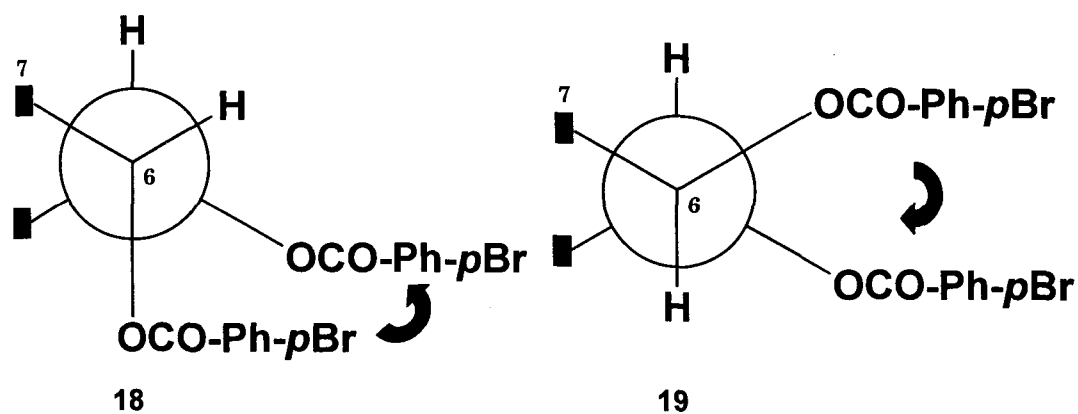
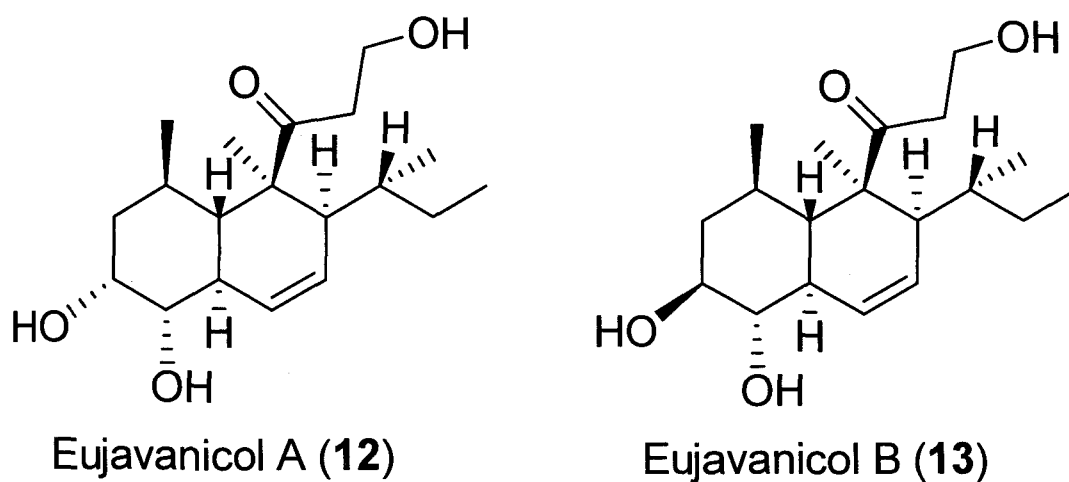


Fig. 7. Newman projection formulas of 18 and 19



Eujavanicol C (14)は、FAB-MS スペクトルから 12 および 13 に比べて酸素一原子が増加し、水素二原子が減少した分子式の $C_{19}H_{30}O_5$ であると決定された。化合物 14 は、IR スペクトルの 1703 および 1646cm^{-1} に二種類のカルボニル基による吸収が認められ、 ^{13}C NMR スペクトルで 213.4ppm に脂肪族ケトンのシグナルおよび 203.2ppm に共役ケトンのシグナルが観測された (Table 1)。HMQC スペクトルの解析により、プロトンと炭素の直接の結合を決定した (Table 1)。 ^1H - ^1H COSY スペクトルから、4a 位のプロトン (δ_{H} 2.57)、5 位のプロトン (δ_{H} 3.88)、6 位のプロトン (δ_{H} 4.00)、7 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.30, 1.91)、8 位のプロトン (δ_{H} 2.16)、8 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.77)のスピンス系と、1'位のメチルプロトン (δ_{H} 1.08)、1'位のプロトン (δ_{H} 1.74)、2'位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.37)、3'位のメチルプロトン (δ_{H} 0.89)の 1-methylpropyl 基におけるスピンス系、10 位 (δ_{H} 2.57, 2.88)と 11 位のメチレンプロトン (δ_{H} 3.83)間の結合を明らかにした (Fig. 9)。HMBC スペクトルにおいて、8 位のメチルプロトンから 8a 位の炭素 (δ_{C} 45.9)へ、1 位のメチルプロトン (δ_{C} 1.37)から 1 位の四級炭素 (δ_{C} 59.4)と 2 位の sp^2 炭素 (δ_{C} 173.6)と 8a 位の炭素へ相関が認められ、8 位から 8a、1、2 位と順に結合することが明らかになった。5 位のプロトンから 4 位のカルボニル炭素 (δ_{C} 203.2)へ、4a 位のプロトンから 3 位の炭素 (δ_{C} 126.0)へ、1'位のメチルプロトンから 2 位の炭素へ、3 位のプロトンから 1'位の炭素 (δ_{C} 37.0)への相関が観測された。以上のことから、4a 位からカルボニル基(4 位)、二重結合(3 位、2 位)の順で結合し、2 位に 1-methylpropyl 基が結合していることが明らかになり、4a 位のプロトンから 8a 位の炭素へ相関が観測され、デカリン環の構築を完成した。さらに、8a 位のプロトン (δ_{H} 2.16)と 10 位のプロトンから 9 位のカルボニル炭素 (δ_{C} 213.4)への相関が認められたことから 1 位の側鎖の結合を決定し、eujavanicol C (14)の平面構造を 12 の 2 位、3 位間が二重結合、4 位がケトンとなった構造と決定した (Fig. 9)。

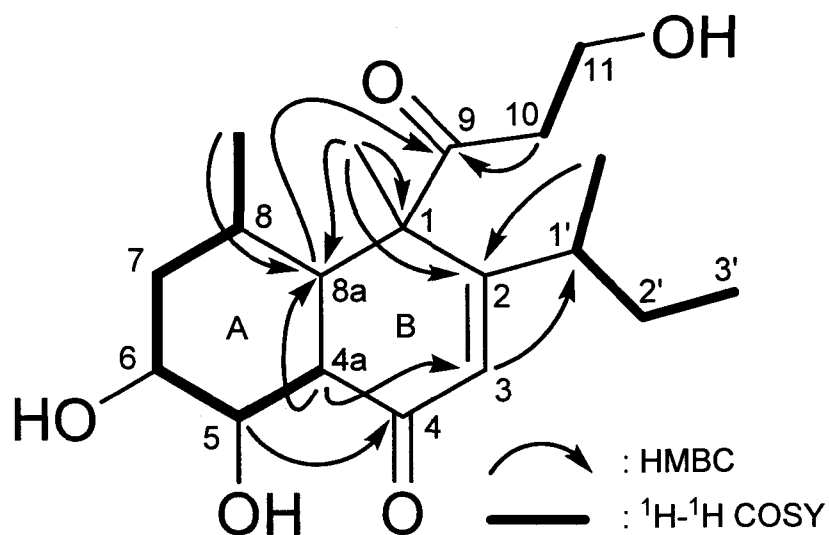


Fig. 9. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of eujavanicol C (14)

Eujavanicol C (14)の相対構造を決定するために NOE 実験を行った。4a 位のプロトンの照射により 8 位のプロトンと 1 位のメチルプロトンに NOE が観測され、7 位のメチレンプロトンのうちのひとつ (δ_{H} 1.30)の照射および 8a 位のプロトンの照射により、いずれも 5 位のプロトンに NOE が観測された。これらのことから、14 は 12 と同様なシクロヘキサン環がイス型配座をとる *trans*-デカリン環であることが明らかになった (Fig. 10)。化合物 14 の ^1H NMR における 5 位のプロトンの結合定数が 9.4, 2.0Hz (dd)であることから、12 と同様に 14 は 5 位のプロトンが axial 結合、6 位のプロトンが equatorial 結合であると決定した。以上より、eujavanicol C (14)の相対構造を決定した。

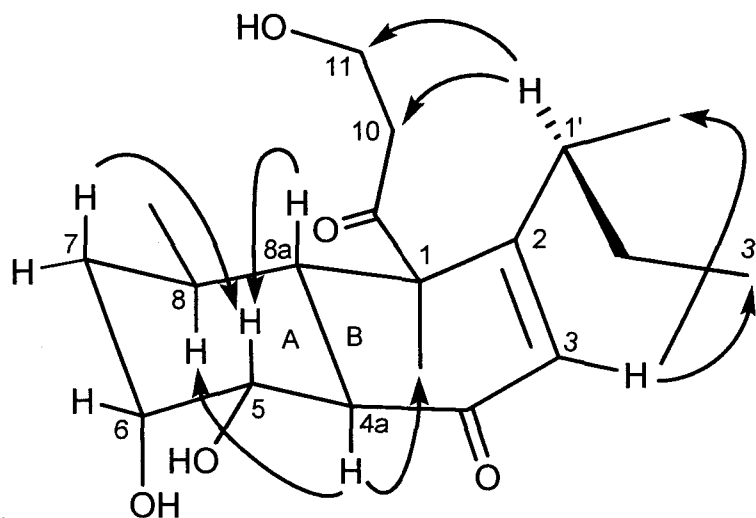


Fig. 10. Key NOE correlations of of eujavanicol C (14)

Eujavanicole C (14)の絶対構造の決定は、12 や 13 と同様に *p*-bromobenzoate 誘導体を合成し、励起子カイラリティー法の適用により行うこととした¹¹⁾。化合物 14 に *p*-bromobenzoyl chloride を作用させ、tri-*p*-bromobenzoate (20) を合成した。CD スペクトルにおける共役ケトン部分の影響を考慮し、20 に NaBH₄ を作用させ、還元体 (21) へ導き、21 の CD スペクトルを測定した (Chart 4, Fig. 11)。化合物 21 の CD スペクトルは、負のカイラリティーを示したことから、21 は 5 位と 6 位の *p*-bromobenzoyl 基が反時計回りに位置することが明らかになった (Fig. 12)。以上のことより、eujavanicol C (14) の絶対構造を 12 と同様の 5*S*, 6*R* である図に示した構造と決定した。

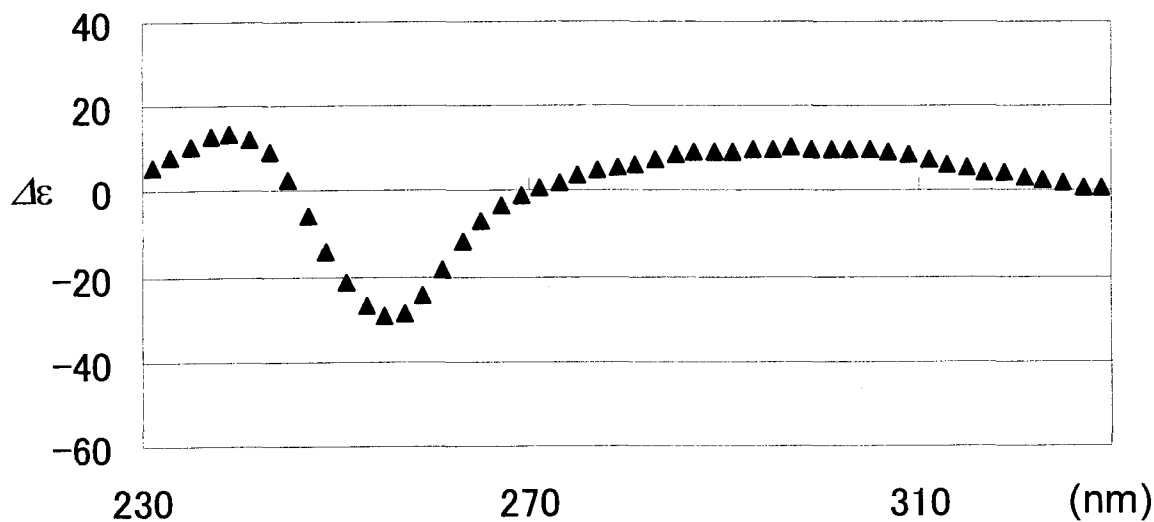
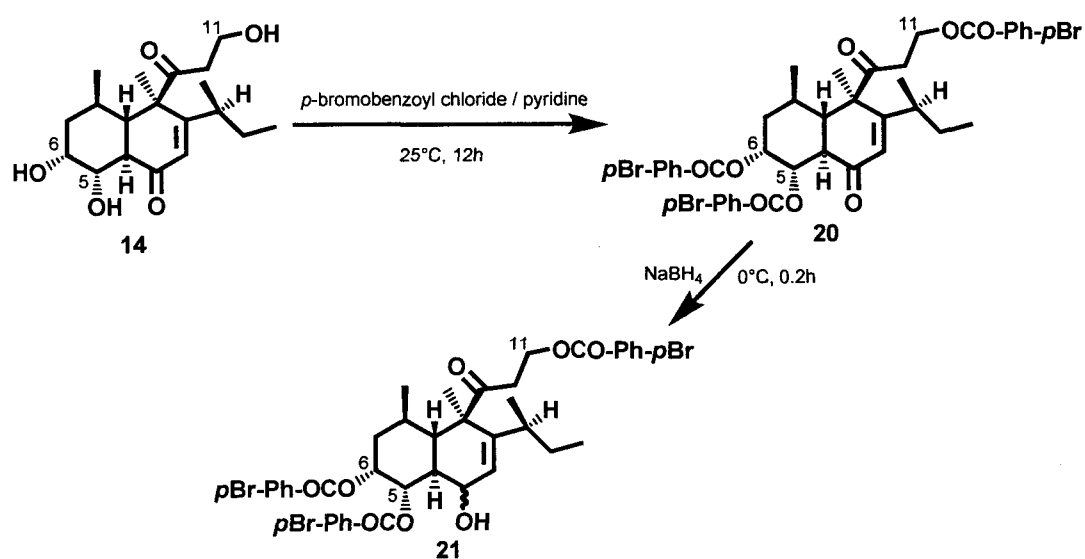


Fig. 11. CD spectrum of 21

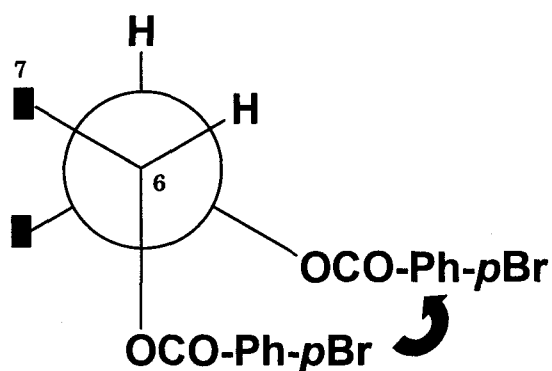
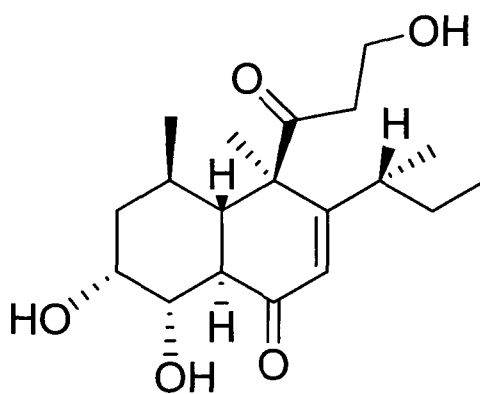


Fig. 12. Newman projection formula of 21



Eujavanicol C (14)

第三節 Javanicunine 類の構造

Javanicunine A (15)の分子式は、EI-MS スペクトルから $C_{24}H_{30}N_2O_4$ と決定された。化合物 15 の 1H および ^{13}C NMR スペクトルは、*Penicillium fructigenum* より分離された fructigenine B (22)¹²⁾ に類似していた (Table 2)。 ^{13}C NMR スペクトルで、15 は 3 位の炭素が 77.2ppm に現れ、22 のそれより 24ppm 程度低磁場にシフトしており、さらに IR スペクトルで $1760cm^{-1}$ にエステルに相当する吸収が認められたことから、15 は 1,4-ジオキソモルフォリン誘導体であると予測された (Table 2)。

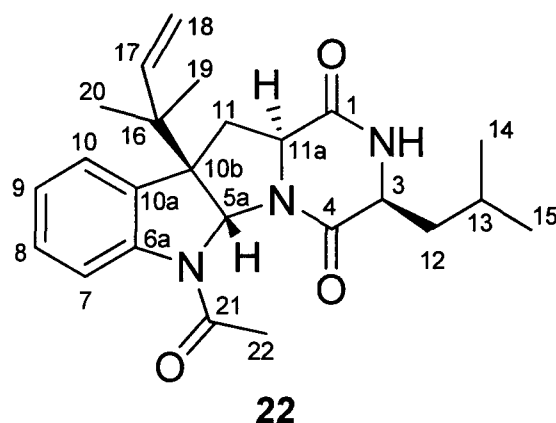


Table 2. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of javanicunine A (15), B (16), and fructigenine B (22) in CDCl_3

No	Javanicunine A (15)		Javanicunine B (16)		22
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}
1	168.5		167.3		165.9
3	77.2	4.66 dd (9.6, 2.8)	77.0	5.00 dd (10.4, 3.1)	53.2
4	165.1		165.3		169.0
5a	79.4	5.92 br s	80.5	5.92 br s	79.4
6a	142.82		142.1		143.2
7	119.6	7.99 br d	120.7	8.06 br d	124.4*
8	129.3	7.34 td (7.2, 1.5)	130.0	7.42 td (7.7, 1.2)	128.9
9	124.6	7.16 td (7.5, 1.0)	125.0	7.22 td (7.4, 1.1)	119.1
10	124.3	7.28 d (7.7)	124.4	7.37 d (7.5)	128.9
10a	132.0		130.0		119.1*
10b	60.9		59.2		60.8
11 β	35.2	2.53 dd (13.0, 6.4)	42.0	2.94 d (14.5)	38.9
α		2.70 dd (13.0, 10.8)		2.69 d (14.5)	
11a	57.7	4.00 dd (10.8, 6.4)	87.4		59.0
12	37.7	1.82 m	37.6	1.76 m	35.8
		1.89 m		1.87 m	
13	23.8	1.90 m	23.9	1.91 m	24.4
14	21.1	0.89 d (6.3)	21.2	0.89 d (6.0)	21.1
15	23.2	0.96 d (6.3)	23.3	0.97 d (6.0)	21.2
16	40.4		40.4		40.3
17	142.77	5.79 dd (17.4, 10.8)	142.5	5.75 dd (17.2, 10.8)	143.0
18	114.8	5.12 d (17.4)	115.3	5.12 d (17.2)	114.5
		5.15 d (10.8)		5.16 d (10.8)	
19	22.4	1.16 s	22.3	1.13 s	22.3
20	23.0	0.97 s	22.9	0.96 s	22.5
21	169.8		169.8		170.0
22	23.5	2.63 br s	23.5	2.61 br s	23.2

* Assignment should be reversed.

化合物 **15** は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルにおいて、7位のプロトン (δ_{H} 7.99)、8位のプロトン (δ_{H} 7.34)、9位のプロトン (δ_{H} 7.16)および10位のプロトン (δ_{H} 7.28)のスピンの系、3位のプロトン (δ_{H} 4.66)、12位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.82, 1.89)、13位のプロトン (δ_{H} 1.90)および14位のメチルプロトン (δ_{H} 0.89)のスピンの系が明らかになり、さらに13位のプロトンと15位のメチルプロトン (δ_{H} 0.96)間、11位のメチレンプロトン (δ_{H} 2.53, 2.70)と11a位のプロトン (δ_{H} 4.00)間、17位のプロトン (δ_{H} 5.79)と18位のエキソメチレンプロトン (δ_{H} 5.12, 5.15)間の結合を決定した (Fig. 13)。次に HMBC スペクトルの解析を行い、各部分構造の接続を決定した。8位のプロトンから6a位の炭素 (δ_{C} 142.8)へ、9位のプロトンから10a位の炭素 (δ_{C} 132.0)への相関が確認されることから、1,2-置換ベンゼンの存在が明らかになり、17位のプロトンから16位の炭素 (δ_{C} 40.4)、10b位の炭素 (δ_{C} 60.9)、19位の炭素 (δ_{C} 22.4)および20位の炭素 (δ_{C} 23.0)へ、10位のプロトンから10b位の炭素への相関が認められることから dimethylallyl 基の存在とその結合位置を決定した。また、11位のプロトンから5a位の炭素 (δ_{C} 79.4)と10a位の炭素への相関が、5a位のプロトン (δ_{H} 5.92)から6a位の炭素と10b位の炭素へ相関が認められ、二つのピロリジン環の存在を決定した。さらに、11位のプロトンと11a位のプロトンから1位のカルボニル炭素 (δ_{C} 168.5)への相関と12位のプロトンから4位のカルボニル炭素 (δ_{C} 165.1)への相関から、ジオキソモルフォリン環との結合を決定した。22位のメチルプロトン (δ_{H} 2.63)からもう一つのカルボニル炭素 (δ_{C} 169.8)へ相関が認められ、6位に結合するアミンプロトンが観測されないことから、6位にアセチル基が結合していると確定した (Fig. 13)。以上のことから、javanicunine A (**15**)の平面構造を決定した。

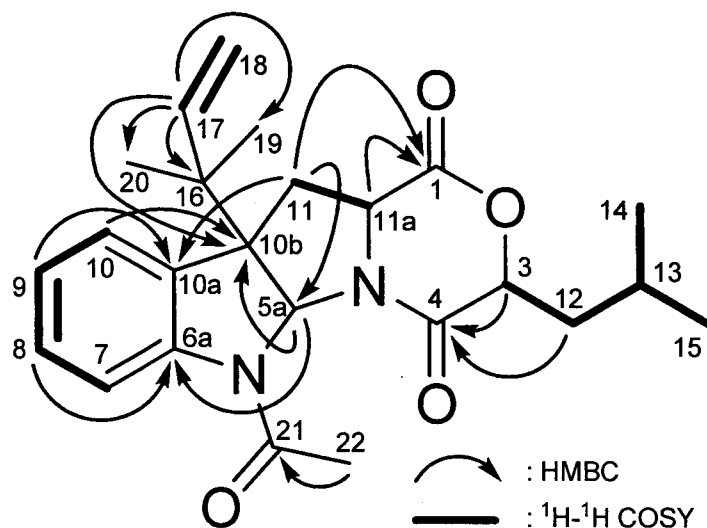


Fig. 13. Key HMBC and ^1H - ^1H cosy correlations of javanicunine A (15)

NOE 実験から 15 の相対構造の決定を行った。11a 位のプロトンの照射により 3 位のプロトンと 11 位の低磁場プロトン (δ_{H} 2.70, α 位)へ NOE が観測されたことから、3 位と 11a 位のプロトンがともに同一面方向に位置することが明らかになった。また、19 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.16)の照射により 11 位の高磁場プロトン (δ_{H} 2.53, β 位)と 5a 位のプロトンに NOE が観測され、dimethylallyl 基と 5a 位のプロトンおよび 2-methylpropyl 基が同一面方向に位置することが分かり、javanicunine A (15)の相対構造を決定した (Fig. 14)。

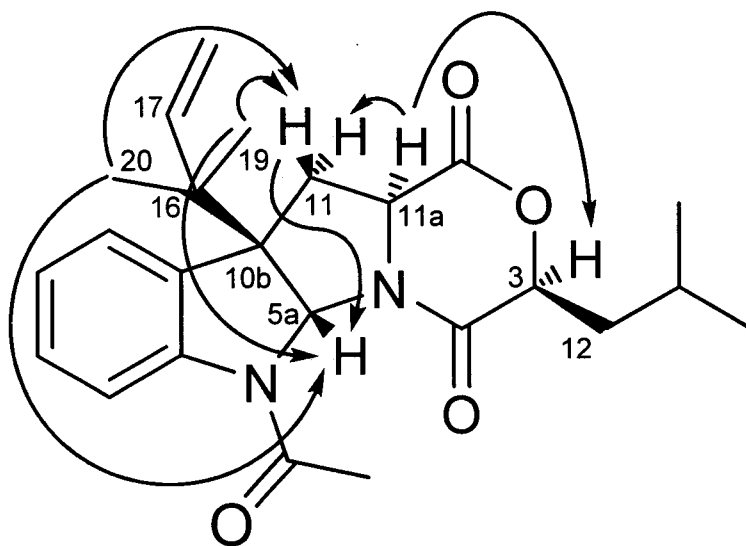


Fig. 14. Key NOE correlations of javanicunine A (15)

Javanicunine A (15)の絶対構造の決定は、Yamaguchiらの方法にしたがった¹³⁾。化合物 15 を加水分解し、tryptophan に導き、キラルプレートを用いた TLC 分析により、D-および L-tryptophan との比較を行った (Chart 5)¹⁴⁾。その結果、15 の加水分解物中の tryptophan は L 体であることが明らかになった。よって、javanicunine A (15)の絶対構造を図のように決定した。

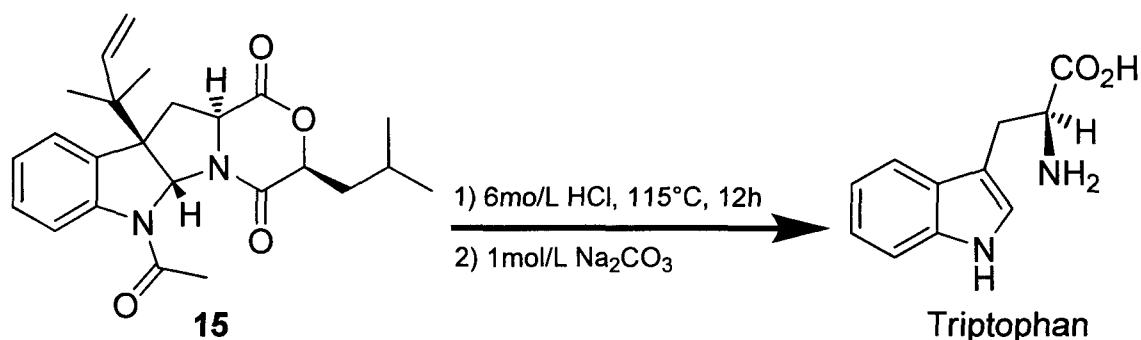


Chart 5.

Javanicunine B (16)は、FAB-MS スペクトルから分子式を C₂₄H₃₀N₂O₅ と決定され、15 の分子式と比較して酸素一原子が増加しているのみであった。化合物 16 の ¹H および ¹³C NMR スペクトルは 15 のそれらと類似していた (Table 2)。化合物 16 の 11a 位の炭素は 87.4ppm に観測され、15 のそれ (δ_c 57.7) に対して大きく低磁場シフトしていた。11a 位の炭素は DEPT スペクトルにより、15 ではメチン炭素 (δ_H 4.00) であったのに対し、16 では水素を持たない炭素であることが明らかになった。各種 NMR スペクトルの詳細な解析により、16 は 15 の 11a 位に水酸基が結合した構造と決定した。化合物 16 の NOE 実験において、19 位のメチルプロトン (δ_H 1.13) の照射により 5a 位のプロトン (δ_H 5.92) と 11 位の低磁場プロトン (δ_H 2.94) に NOE が観測された (Fig. 15)。これにより、16 の構造は、dimethylallyl 基、5a 位のプロトンおよび 11 位の低磁場プロトンが同一面方向に位置することが明らかとなった (Fig. 15)。化合物 16 の 11a 位の水酸基の立体を決定するために、11 位のプロトンの化学シフトを 15 (δ_H 2.70 : α位, δ_H 2.53 : β位) と比較した。化合物 16 の 11 位のプロトンの化学シフトは、α位が 2.69ppm、β位が 2.94ppm と観測され、β位のプロトンに大きな低磁場シフトが認められた。この低磁場シフトは、11 位のβプロトンと 11a 位の水酸基が同一面

方向に存在し、近接することより立体(圧縮)効果が起きたと考えられ、**16** の水酸基を β 位に位置すると決定した¹⁵⁾。以上より、javanicunine B (**16**)の相対構造を決定した。

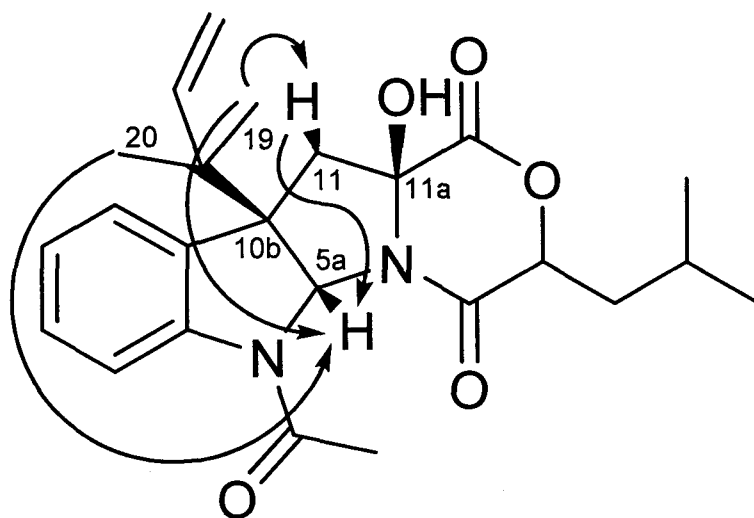
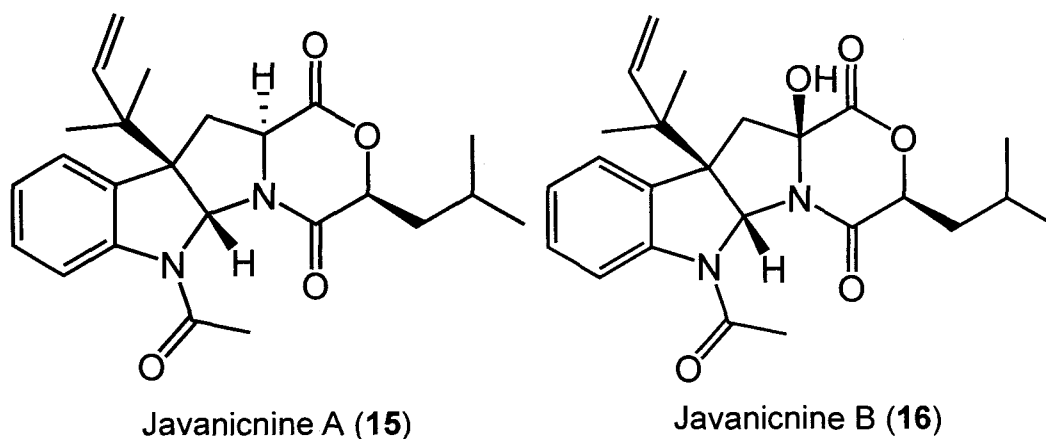


Fig. 15. Key NOE correlations of javanicunine B (**16**)

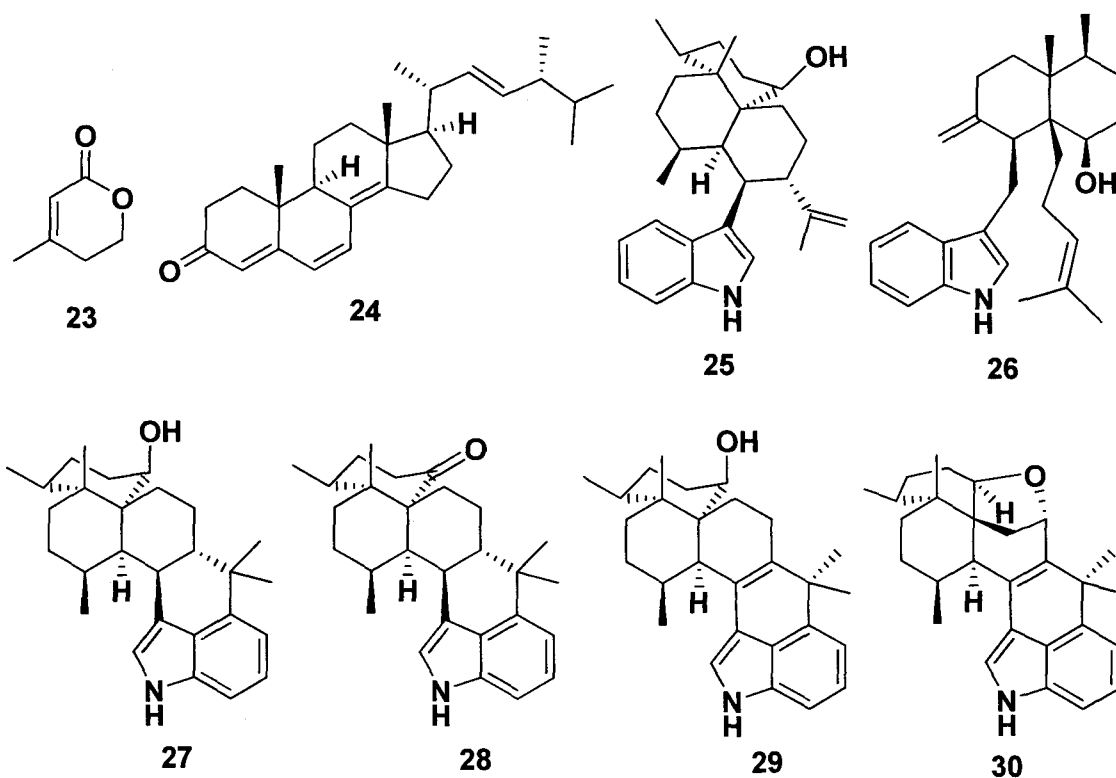
化合物 **16** と **15** が同一生物体より得られた代謝産物であることから、生合成を考慮し、javanicunine B (**16**)の絶対構造を **15** と同様の立体化学であると推定した。

また、TLC 分析時に javanicunine 類に特徴的な発色が認められた *E. javanicum* IFM 60196 株の代謝産物について詳細な検討を行った結果、**15** の存在は認められたが、**16** は確認されず、javanicunine 類の生産性は産生する菌株間にも違いが存在することが明らかになった。



第四節 *Eupenicillium javanicum* IFM 59075 株の代謝産物の分離

千葉県土壌より分離した *E. javanicum* IFM 59075 株を米培地で 25°C、21 日間培養した。培養後、CHCl₃ - MeOH (1:1) で抽出し、溶媒を留去した残渣に水および AcOEt を加え、液液分配を行い、水可溶部分を除き AcOEt 抽出エキスを得た。得られた抽出エキスを MeCN - hexane でさらに液液分配を行ったところ、MeCN 可溶部中に van Urk 試薬^{8,9)}に青又は黄色に呈色するスポットが認められた。得られた MeCN 可溶部をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃ - acetone の混合比を変化させて分画した。Chart 6 に示すように LPLC、HPLC で繰り返し分離・精製し、2,3-anhydromevalonic acid δ -lactone (23)¹⁶⁾、ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (24)¹⁷⁾ とともに六種のインドールジテルペン 10,23-dihydro-24,25-dehydroaflavinine (25)¹⁸⁾、nominine (26)¹⁹⁾、17-hydroxyeujindole (27)、17-oxoeujindole (28)、8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (29) および 8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30) を得た。新規化合物である eujindole 類 (27~30) の構造決定について第五節で述べる。



E. javanicum IFM 59075

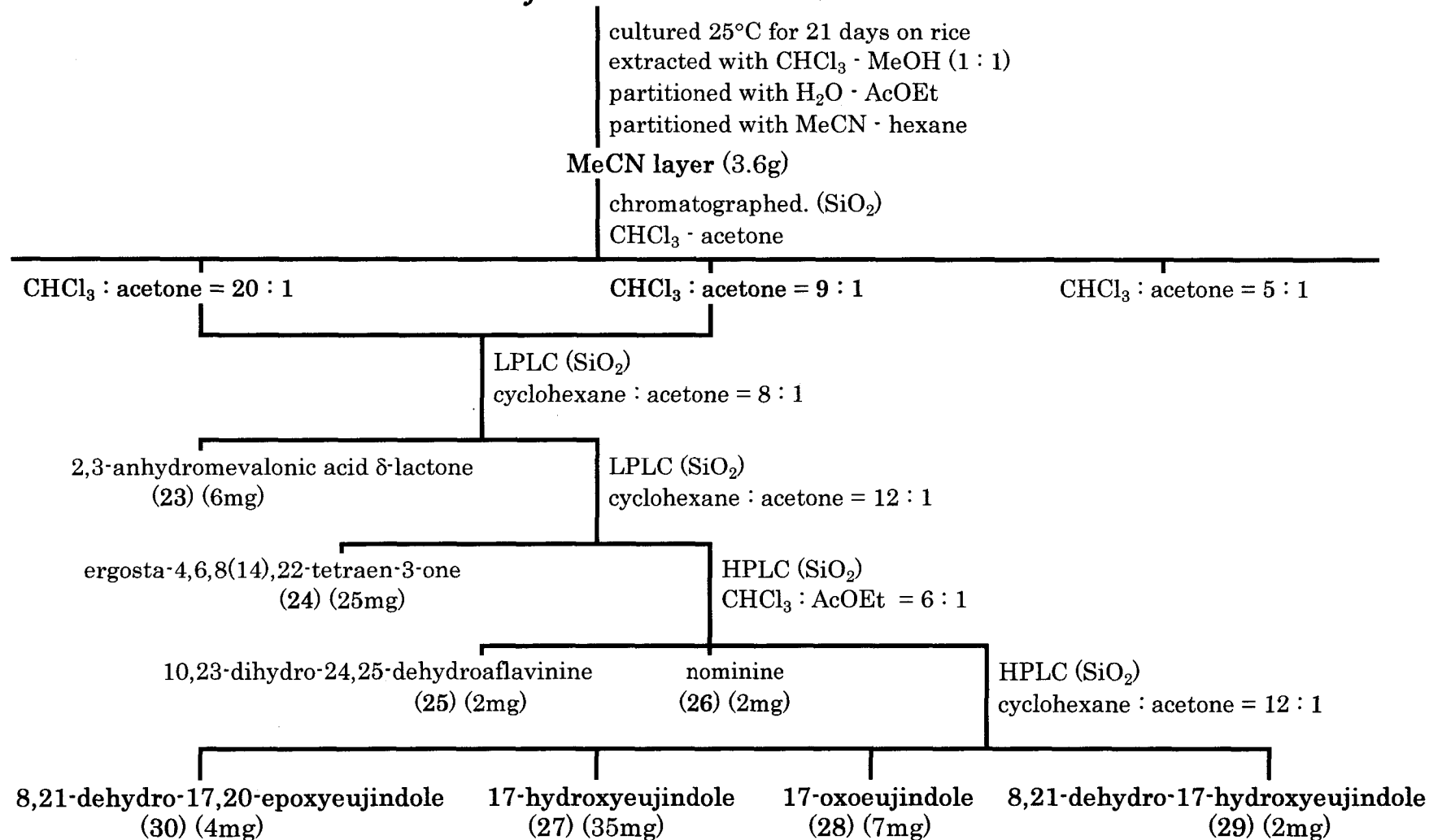


Chart 6.

第五節 Eujindole 類の構造

17-Hydroxyeujindole (27)は、融点 129.3 – 130.2°C の無色針状晶として得られ、FAB-MS測定により分子式が $C_{28}H_{39}NO$ (不飽和度 10)と決定された。Van Urk 試薬陽性(青色)および UV スペクトル (283, 293nm)からインドール骨格の存在が予想された。化合物 27 の 1H および ^{13}C NMR スペクトルは aflavinine (31)²⁰⁾ のそれらと類似していたが、31 がもつ二つのオレフィン炭素およびイソプロピル基の代わりに、一つの四級炭素、二つのメチン、二つのメチル基が観測された (Table 3)。 ^{13}C NMR スペクトルから、 sp^2 炭素が八個、 sp^3 炭素が二十個存在し、HMQC スペクトルから、 sp^2 炭素に結合したプロトンが四個、NH プロトンが一個存在することが明らかになった。これらのことから、27 は二置換インドールを有するインドールジテルペンであることが予想された。

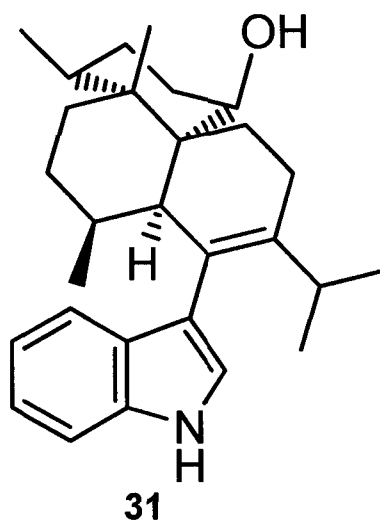


Table 3. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of 17-hydroxyeujindole (27) and 17-oxoeujindole (28) in CDCl_3

No	17-Hydroxyeujindole (27)		17-Oxoeujindole (28)	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1(NH)		7.88 br s		7.91 br s
2	116.5	6.81 br t (1.7)	116.3	6.90 br t (1.7)
3	115.6		115.0	
3a	125.8		125.6	
4	142.3		142.7	
5	112.4	7.01 br t (4.0)	112.5	6.99 dd (4.6, 3.4)
6	122.6	7.16 m	122.8	7.16 m
7	107.8	7.16 m	107.7	7.15 m
7a	134.0		134.0	
8	33.0	3.43 br dd (12.0, 4.0)	36.5	2.64 ddd (12.6, 5.1, 1.7)
9	36.7	2.79 br td (8.0, 4.0)	38.5	3.43 m
10	29.0	2.72 m	28.0	2.77 m
11	28.6	1.99 _{ax} m	28.8	2.18 _{ax} m
		1.11 _{eq} br d (14.3)		1.26 _{eq} m
12	27.8	1.57 _{ax} ddd (14.3, 13.3, 2.7)	26.9	1.57 _{ax} m
		1.22 _{eq} dt (13.3, 2.9)		1.35 _{eq} dt (14.3, 3.4)
13	39.1		44.8	
14	31.3	2.31 m	30.4	2.83 m
15	25.3	1.75 _{ax} dq (13.2, 3.4)	33.2	1.92 _{eq} m
		1.33 _{eq} br d (13.2)		1.64 _{ax} dd (13.7, 4.6)
16	29.5	2.00 _{ax} m	38.9	2.97 _{ax} ddd (13.7, 11.5, 6.3)
		1.69 _{eq} m		2.17 _{eq} m
17	69.1	4.61 br s	217.0	
18	43.5		58.0	
19	25.2	2.14 _{eq} br d (13.2)	24.0	2.14 _{eq} m
		1.84 _{ax} td (13.2, 4.0)		1.70 _{ax} dt (13.2, 5.2)
20	20.9	1.91 _{eq} m	21.5	2.01 _{ax} dq (13.2, 5.2)
		1.67 _{ax} m		1.80 _{eq} m
21	43.5	2.31 m	42.6	2.31 dt (12.6, 5.1)
22	37.8		37.8	
23	24.2	1.04 s	23.8	0.93 s
24	24.8	1.46 s	24.4	1.40 s
25	15.8	0.85 d (8.6)	14.9	0.86 d (6.9)
26	18.4	1.01 s	16.0	0.65 s
27	22.7	0.86 d (8.0)	22.9	0.94 d (6.9)

^1H - ^1H COSY スペクトルの解析により、1位のNHのプロトン (δ_{H} 7.88)と2位のプロトン (δ_{H} 6.81)のスピンス系および5位のプロトン (δ_{H} 7.01)、6位のプロトン (δ_{H} 7.16)および7位のプロトン (δ_{H} 7.16)のスピンス系が明らかになった。また、HMBCスペクトルにおいて、1位のNHのプロトンから7位の炭素 (δ_{C} 107.8)への相関が観測されたことにより、3位と4位が置換されたインドール環の存在が明らかになった。 ^1H - ^1H COSY スペクトルにより、8位のプロトン (δ_{H} 3.43)、9位のプロトン (δ_{H} 2.79)、10位のプロトン (δ_{H} 2.72)、11位 (δ_{H} 1.99, 1.11)お

よび 12 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.57, 1.22)のスピンス系と、15 位 (δ_{H} 1.75, 1.33)、16 位のメチレンプロトン (δ_{H} 2.00, 1.69)および 17 位のプロトン (δ_{H} 4.61)のスピンス系、10 位のプロトンと 27 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.86)の結合、14 位のプロトン (δ_{H} 2.31)と 25 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.85)の結合、19 位 (δ_{H} 2.14, 1.84)および 20 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.91, 1.67)間の結合が明らかになった。HMBC スペクトルにおいて、26 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.01)から 12 位の炭素 (δ_{C} 27.8)、13 位の四級炭素 (δ_{C} 39.1)、14 位の炭素 (δ_{C} 31.3)および 18 位の四級炭素 (δ_{C} 43.5)への相関が観測され、また 10 位のプロトンから 18 位の炭素への相関が観測されたことより、C 環および 13 位と 14 位間の結合が明らかになった。25 位のメチルプロトンから 13 位の炭素、14 位の炭素および 15 位の炭素 (δ_{C} 25.3)へ、9 位のプロトンから 17 位の炭素 (δ_{C} 69.1)へそれぞれ相関が認められ、D 環の結合を決定した。17 位のプロトンから 19 位の炭素 (δ_{C} 25.2)へ、19 位のプロトンと 9 位のプロトンから 21 位の炭素 (δ_{C} 43.5)への相関がそれぞれ認められたことより、B 環の結合を決定した。23 位 (δ_{H} 1.04)と 24 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.46)からともに 21 位の炭素、22 位の炭素 (δ_{C} 37.8)および 4 位の炭素 (δ_{C} 142.3)へ、2 位のプロトンから 8 位の炭素 (δ_{C} 33.0)への相関が観測されたことから、A 環の結合を決定し、17-hydroxyeujiindole (27)の平面構造を決定した (Fig. 16)。

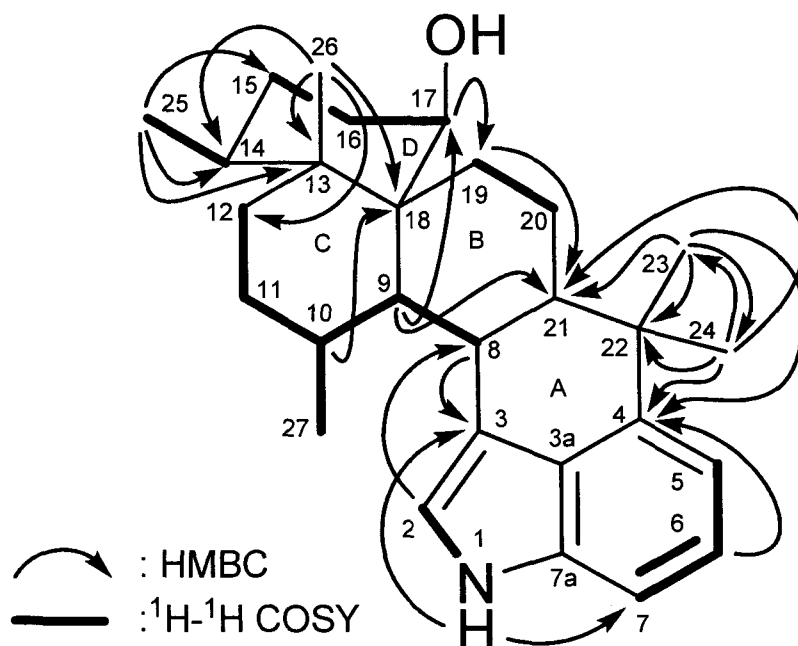


Fig. 16. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of 17-hydroxyeujiindole (27)

17-Hydroxyeujiindole (27)の相対構造を NOESY スペクトルの解析から検討した。測定溶媒を CDCl_3 とした測定により、23 位のメチルプロトンと 8 位のプロトンおよび 20 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 3.43)の間、8 位のプロトンと 17 位のプロトン間と、12 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.57)と 27 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.86)間、11 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.99)と 9 位のプロトン (δ_{H} 2.79)間および、15 位のメチレンプロトン一つ (δ_{H} 1.75)と 26 位のメチルプロトン間に NOESY 相関が認められた (Fig. 17)。また、測定溶媒を CDCl_3 とした測定時に分離が困難であった 14 位と 21 位のプロトンについては測定溶媒を $\text{acetone-}d_6$ とすることで分離し、NOESY 測定を行った。27 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.81)と 21 位のプロトン (δ_{H} 2.24)間、14 位のプロトン (δ_{H} 2.27)と 16 位のプロトンの一つ (δ_{H} 1.94)および 9 位のプロトン (δ_{H} 2.85)間に相関が認められた (Fig. 17a)。以上の NOESY スペクトルの解析結果より、17-hydroxyeujiindole (27)の相対構造を、B 環、C 環および D 環がいずれもイス型配座をとり、A 環と B 環は *trans* 結合、B 環と C 環は *cis* 結合、C 環と D 環は *cis* 結合する構造と決定した (Fig. 17b)。

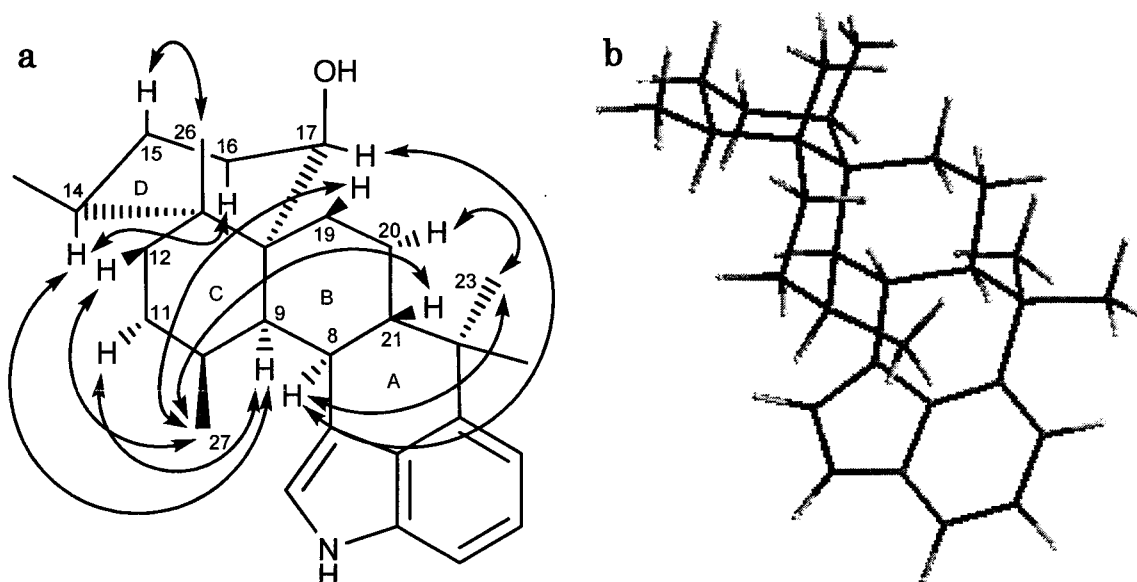


Fig. 17. (a) NOESY correlations of 17-hydroxyeujiindole (27)
 (b) Molecular structure of 27 obtained by MM2 calculation

17-Oxoeujindole (28)は、van Urk 試薬に対し陽性(青色)を示し、FAB-MS 測定により分子式が 27 に比べ水素二原子減少した $C_{28}H_{37}NO$ と決定された。化合物 28 は、27 と類似した 1H および ^{13}C NMR スペクトルを示したが、27 の 17 位のシグナル (δ_C 69.1, δ_H 4.61)が消失し、代わりに δ_C 217.0 のカルボニル由来の炭素シグナルが認められた。また、17 位周辺の 16 位、18 位および 26 位の 1H NMR スペクトルの化学シフトに大きな移動が認められた (Table 3)。以上のことから、28 は 27 の 17 位がケトンとなった化合物であると推定された。化合物 27 と同様に、各種二次元 NMR スペクトルの解析から、17-oxoeujindole (28)の平面構造を決定した (Fig. 18)。

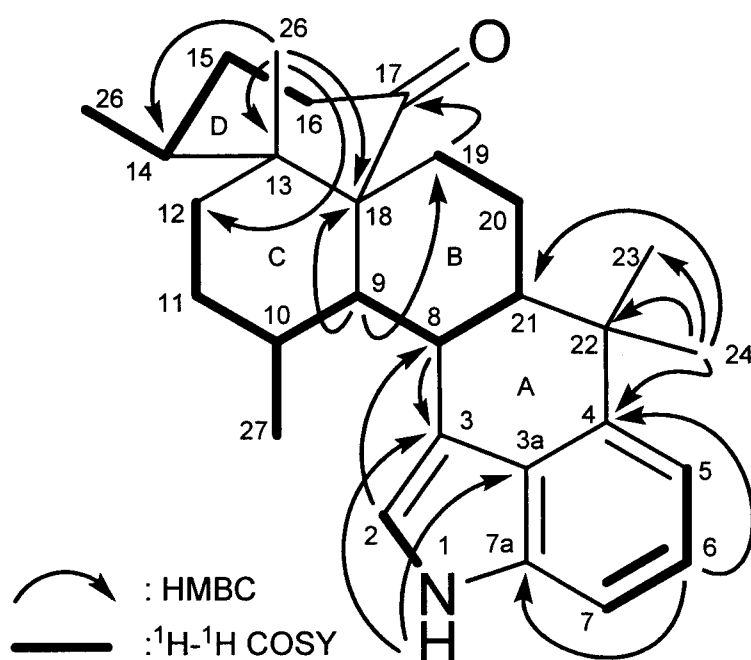


Fig. 18. Key HMBC and 1H - 1H COSY correlations of 17-oxoeujindole (28)

NOESY スペクトルの解析から、28 の相対構造の決定を行った。23 位のメチルプロトン (δ_H 0.93)と 20 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 2.01)および 8 位のプロトン (δ_H 2.64)間、19 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 1.70)と 21 位のプロトン (δ_H 2.31)間、27 位のメチルプロトンと 12 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 1.57)および 19 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 1.70)の間、9 位のプロトン (δ_H 3.43)と 11 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 2.18)の間、14 位のプロトン (δ_H 2.83)と 9 位のプロトンおよび 16 位のメチレンプロトンの一つ (δ_H 2.97)の間、

26 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.65)と 15 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.64)の間に NOESY 相関が認められた (Fig. 19a)。以上の結果から、17-oxoeujindole (28)の相対構造を決定した (Fig. 19b)。

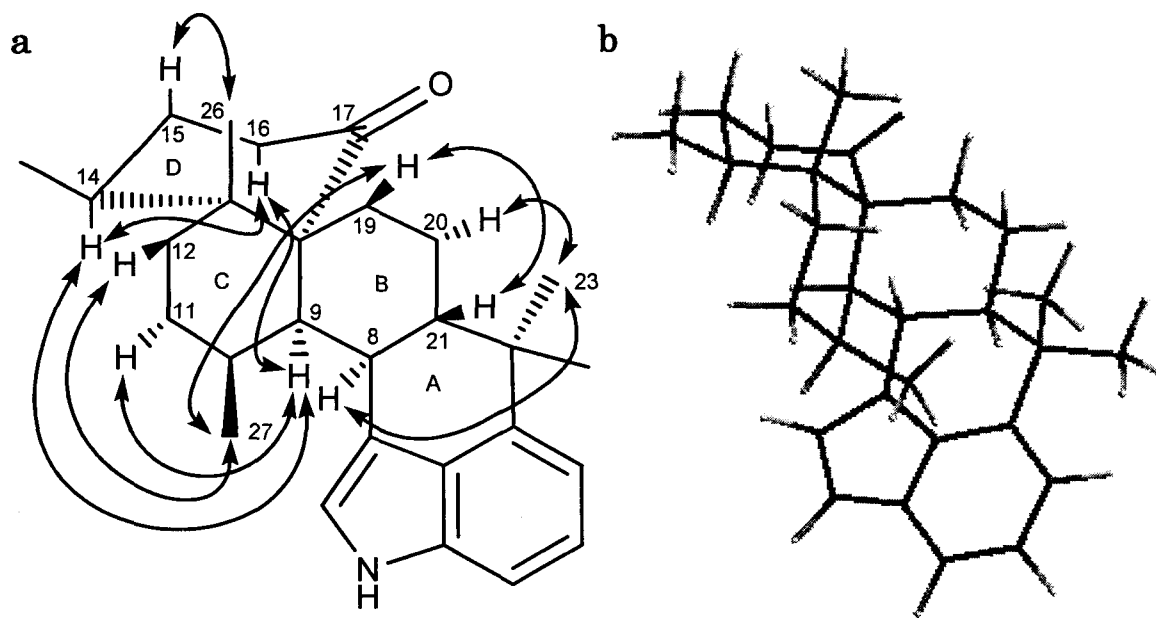


Fig. 19. (a) NOESY correlations of 17-oxoeujindole (28)
(b) Molecular structure of 28 obtained by MM2 calculation

8,21-Dehydro-17-hydroxyeujindole (29)は、van Urk 試薬に対し陽性(黄色)を示し、FAB-MS 測定により分子式が 28 と同一の $\text{C}_{28}\text{H}_{37}\text{NO}$ と決定された。化合物 29 の ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは、27 のそれらと類似していたが、29 の ^{13}C NMR スペクトルに sp^2 炭素が 27 より二つ多く観測され、ジテルペン部分に二重結合一つを有する化合物と考えられた (Table 4)。

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of 8,21-dehydro-17-hydroxyeujiindole(29) and 8,21-dehydro-17,20-epoxyeujiindole (30) in CDCl_3

No	8,21-Dehydro-17-hydroxyeujiindole (29)		8,21-Dehydro-17,20-epoxyeujiindole (30)	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1(NH)		7.91 br s		7.82 br s
2	114.5	6.83 d (1.8)	119.4	6.98 d (1.8)
3	115.5		113.5	
3a	124.9		125.5	
4	140.7		140.2	
5	114.3	7.00 d (7.4)	114.7	7.02 d (7.5)
6	124.2	7.20 t (7.4)	124.2	7.23 t (7.5)
7	107.3	7.08 d (7.4)	107.3	7.11 d (7.5)
7a	134.0		133.7	
8	124.2		124.2	
9	39.3	2.93 dd (6.2, 1.5)	49.3	2.83 d (5.1)
10	30.6	2.53 m	30.7	2.70 m
11	26.0	1.98 _{ax} m	30.5	1.50 m
		1.29 _{eq} m		
12	27.5	1.61 _{ax} m	26.6	1.41 m
		1.26 _{eq} m		1.79 m
13	38.3		38.3	
14	31.3	2.30 m	27.9	2.05 m
15	25.4	1.69 _{ax} m	26.0	1.28 dq (10.6, 3.9)
		1.28 _{eq} m		1.70 m
16	30.4	1.83 _{ax} tdd (13.8, 4.1, 3.1)	25.9	1.61 m
		1.50 _{eq} m		1.83 m
17	70.9	4.03 br s	84.5	3.57 dd (12.6, 6.9)
18	41.3		48.1	
19	22.4	2.14 _{eq} ddt (13.5, 6.6, 1.5)	32.9	1.95 dd (10.9, 4.6)
		1.92 _{ax} ddd (13.5, 10.7, 7.5)		1.99 d (10.9)
20	22.8	2.49 m	73.6	4.80 d (4.6)
		2.43 m		
21	135.6		139.5	
22	40.6		39.8	
23	28.9	1.49 s	29.0	1.54 s
24	32.3	1.46 s	31.8	1.46 s
25	15.8	0.86 d (6.9)	15.1	0.87 d (6.9)
26	18.0	1.00 s	21.2	0.92 s
27	18.3	0.92 d (7.4)	15.1	0.90 d (7.4)

化合物 29 の HMBC スペクトルにおいて、9 位のプロトン (δ_{H} 2.93) から新たに形成された二重結合の二つの sp^2 炭素 (δ_{C} 124.2, 135.6) と 3 位の炭素 (δ_{C} 115.5) へ、また 23 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.49) と 24 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.46) から sp^2 炭素 (δ_{C} 135.6) およびインドール環の 4 位の炭素 (δ_{C} 140.7) への相関が観測された (Fig. 20)。これらの結果から、8,21-dehydro-17-hydroxyeujiindole (29) の平面構造を Fig. 20 に示す構造と決定した。

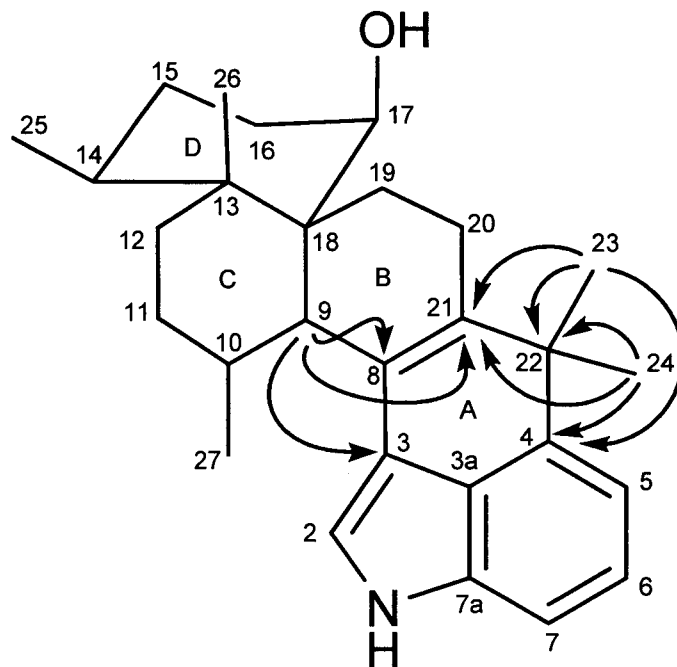


Fig. 20. Key HMBC correlations of 8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (**29**)

化合物 **29** の相対構造を NOESY 相関の解析から決定することとした。27 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.92) と 12 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.61) および 19 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.92) の間、9 位のプロトンと 11 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.98) および 14 位のプロトン (δ_{H} 2.30) 間、11 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.98) と 14 位のプロトン間、16 位のプロトンの一つ (δ_{H} 1.83) と 14 位のプロトンおよび 9 位のプロトン間、26 位のメチルプロトン (δ_{H} 1.00) と 15 位のメチレンプロトンの一つ (δ_{H} 1.69) の間に NOESY 相関が認められた (Fig. 21a)。これらの結果より、C 環および D 環は、ともにイス型配座をとり、B 環と C 環、C 環と D 環との結合は、いずれも *cis* で結合していると明らかになった。以上のことより、8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (**29**) の相対構造を決定した (Fig 21b)。

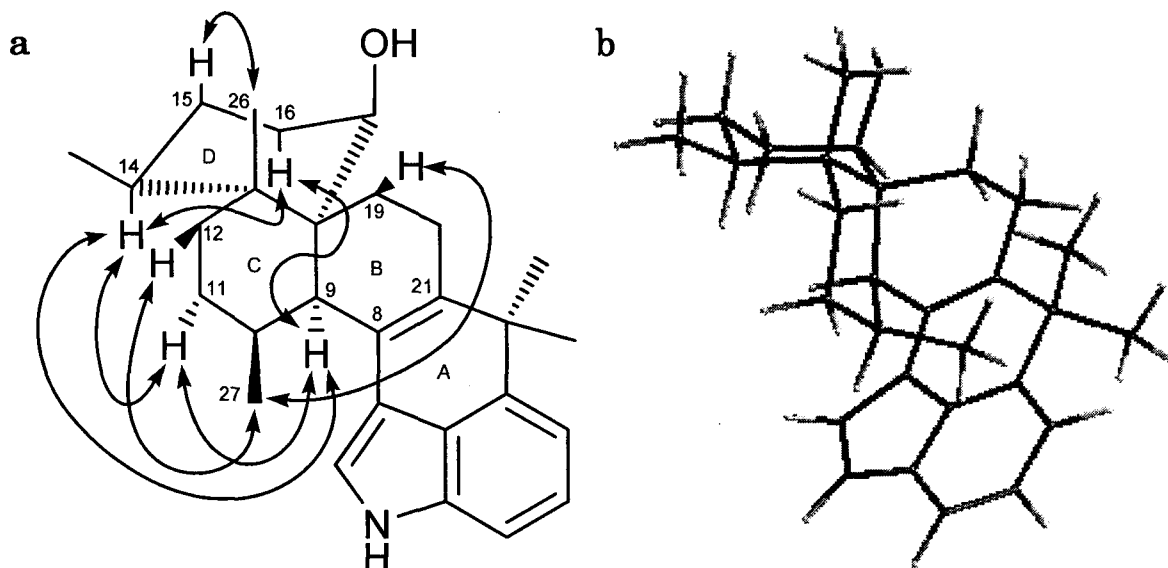


Fig. 21. (a) NOESY correlations of 8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (29)
 (b) Molecular structure of 29 obtained by MM2 calculation

8,21-Dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)は、van Urk 試薬に対し陽性(黄色)を示し、FAB-MS 測定により分子式を $C_{28}H_{35}NO$ と決定された。化合物 30 は、29 より水素二原子が減少し、その結果、不飽和度は一つ多いが、 sp^2 炭素の数は 29 と同一であった。したがって、30 の構造は、29 に環が一つ加わった七環性化合物であることが予想された。化合物 30 の 1H および ^{13}C NMR スペクトルは、29 と類似していたが、29 にあった一つのメチレン炭素 (δ_c 22.8)が消失し、新たに酸素官能基を有する炭素 (δ_c 73.6)が観測された (Table 4)。DEPT スペクトルから本炭素はメチンであり、HMQC スペクトルから結合するプロトン (δ_H 4.80)を決定した。 1H - 1H COSY スペクトルで、この 4.80ppm のプロトンと 19 位のプロトン (δ_H 1.95, 1.99)間の相関が観測されたことから、20 位に酸素と結合するメチンの存在が予想された。さらに、HMBC スペクトルの解析により、9 位のプロトン (δ_H 2.83)から 17 位の炭素 (δ_c 84.5)、18 位の炭素 (δ_c 48.1)および 19 位の炭素 (δ_c 32.9)への相関、また 20 位のプロトン (δ_H 4.80)から 17 位の炭素と 18 位の炭素への相関が認められた (Fig. 22)。これらのことより、17 位と 20 位がエーテル結合する七環性の構造が明らかになり、8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)の平面構造を決定した。

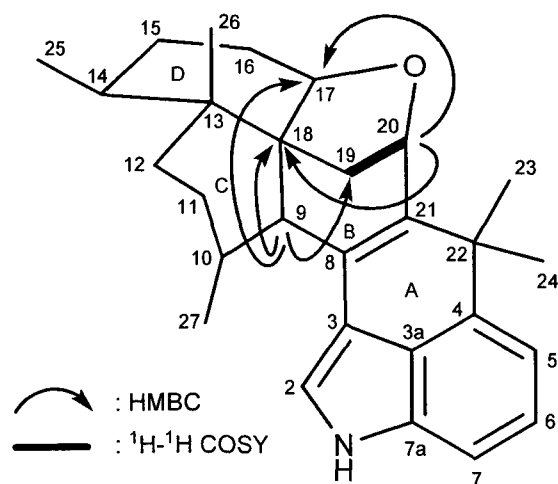


Fig. 22. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of
8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)

化合物 30 は、NOESY スペクトルに 9 位のプロトンと 14 位のプロトン (δ_{H} 2.05) および 17 位のプロトン (δ_{H} 3.57) 間、26 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.92) と 11 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.50)、16 位の低磁場プロトン (δ_{H} 1.61) および 19 位の高磁場プロトン (δ_{H} 1.95) 間、12 位の低磁場プロトン (δ_{H} 1.79) と 9 位のプロトン および 10 位のプロトン (δ_{H} 2.70) 間、14 位のプロトンと 17 位のプロトン 間に相関が認められた (Fig. 23a)。これらのことより、C 環および D 環は、ともに舟型配座を取り、B 環と C 環の結合は、*cis* で結合することが明らかになり、8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30) の相対構造を決定した (Fig. 23b)。

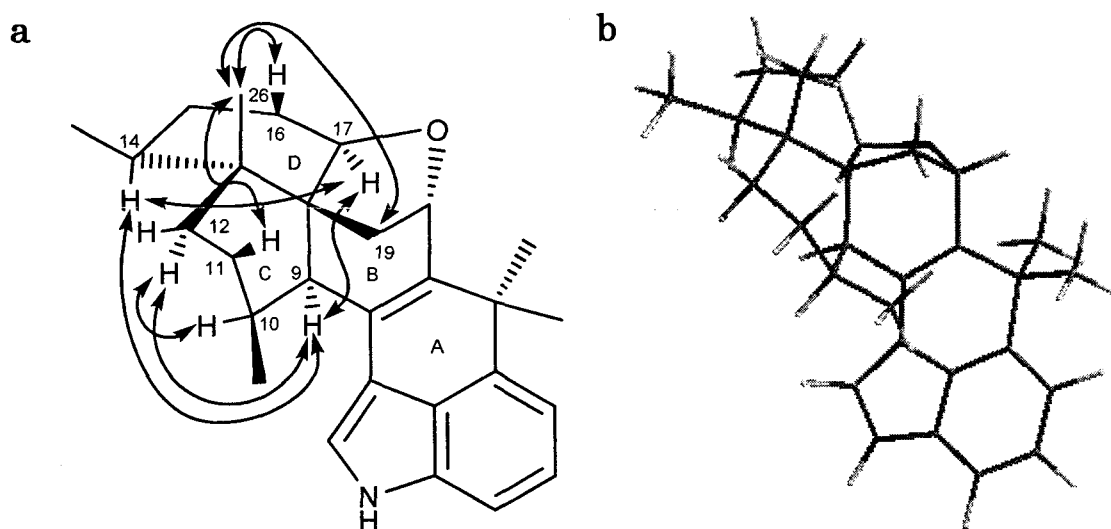


Fig. 23. (a) NOESY correlations of 8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)
(b) Molecular structure of 30 obtained by MM2 calculation

Eujindole 類の絶対構造は、17-oxoeujindole (28)の decalone 環 (C/D 環)に着目して、オクタント則に基づいて決定することとした。化合物 28 は、その C 環と D 環の結合様式 (*cis*)から、Fig. 24 に示す *c2ax* 又は *c2'ax* の二通りの絶対構造が考えられた。Kirk らの方法²¹⁾に従い、28 のモル円二色性 ($\Delta\epsilon$)を算出した。類似した 10-methyl-*cis*-1-decalone (32)の *c2'ax* の $\Delta\epsilon$ は +2.1 であり、28 においては、32 の $\Delta\epsilon$ に加えて γ_{eq} 位のメチル基による 0.1、 β'_{-ax} 位の前方オクタントによる 0.2 の寄与が考えられた。そのため、*c2'ax* であれば +1.8 程度と算出され、鏡像体の *c2ax* であれば -1.8 程度と予想された。化合物 28 の CD スペクトルの結果は、 $\Delta\epsilon = -1.4$ (292nm)となり、17-oxoeujindole (28)を C/D 環が *c2ax* 構造をとる絶対構造と決定した。

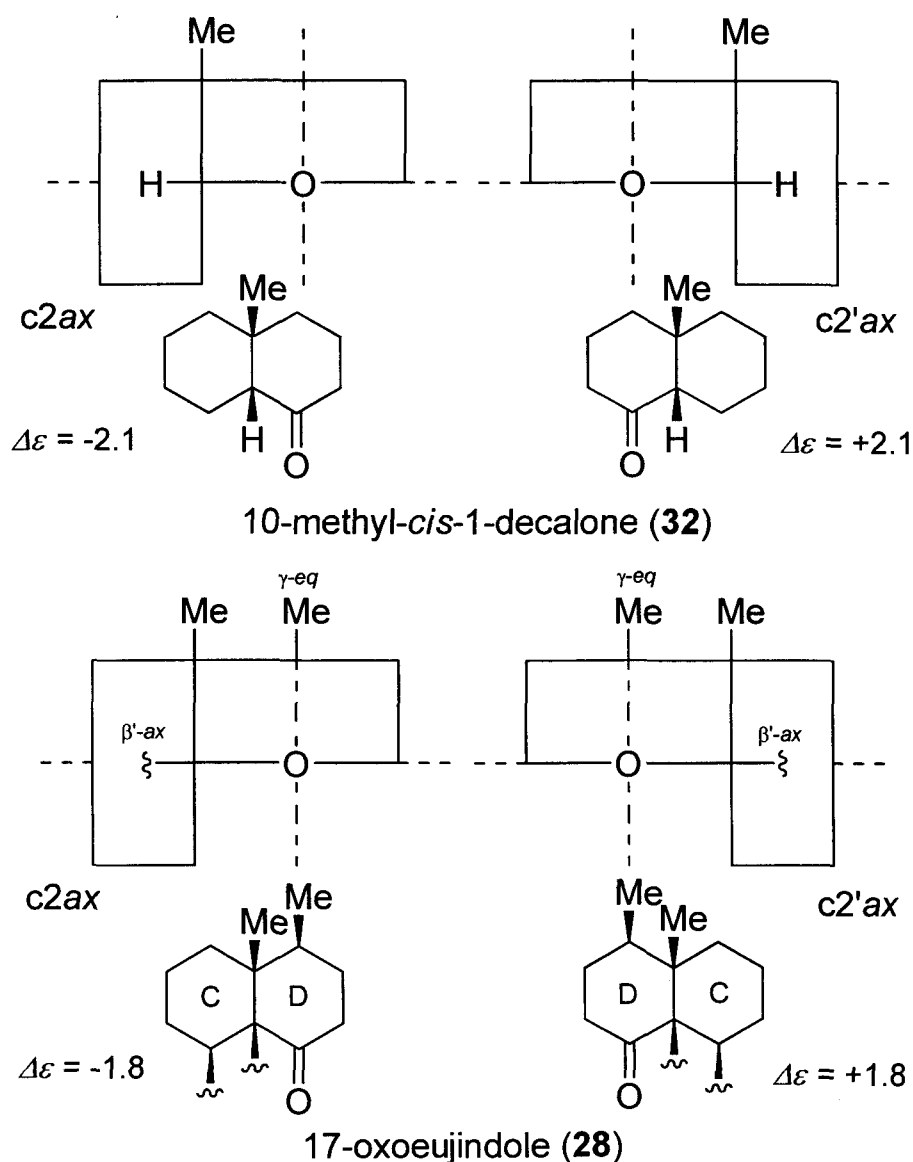
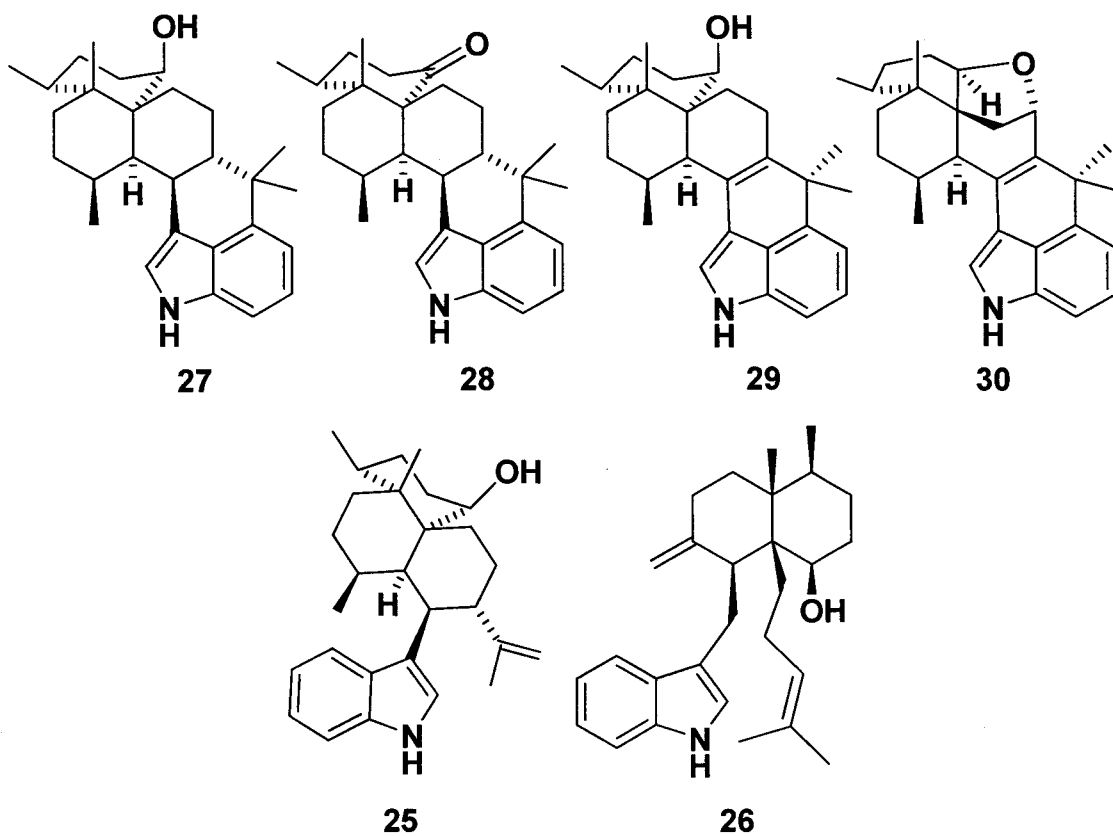


Fig. 24. The *c2ax* and *c2'ax* forms and calculated $\Delta\epsilon$ of 32 and 28

今回単離されたその他の eujindole 類 (27, 29, 30) については、28 と同一生物体より得られた代謝産物であることを考え、生合成上、27、29 および 30 のいずれもが 28 と同様の絶対構造であると推定した。また、10,23-dihydro-24,25-dehydroflavinine (25)、nominie (26) の絶対構造は、未決定であった。これらの予想される生合成²²⁾を考慮すると、本研究で eujindole 類と同一菌株から得られたことから、25 と 26 も eujindole 類と同様の絶対構造であると推定された。

さらに、TLC 分析時に本菌株と同様の特徴的な発色が認められた *E. javanicum* IFM 60196 株および IFM 60197 株の代謝産物について詳細な検討を行った。その結果、*E. javanicum* IFM 60196 株の抽出エキス中に 25、27、28 および 30 の存在を、IFM 60197 株の抽出エキス中に 25、27 および 28 の存在を確認した。これらいずれの菌株においても eujindole 類や 10,23-dihydro-24,25-dehydroflavinine (25) の産生が確認されたが、インドールジテルペンを産生する菌株間においてもその生産性が異なることが明らかになった。

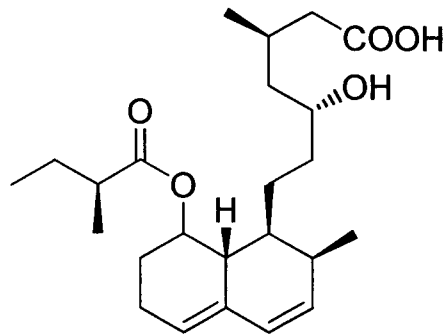


第二章 *Eupenicillium javanicum* の代謝産物の生物活性スクリーニング

第一章で用いた *E. javanicum* に分類される 22 菌株について、米培地を用いて 25°C、21 日間培養した。CHCl₃ - MeOH (1:1) で抽出、濃縮を行った後、水と AcOEt で液液分配を行った。AcOEt 層を分離後、濃縮して AcOEt エキスを作製した。得られた各エキスについて、*Aspergillus fumigatus* に対する抗真菌活性スクリーニングを行った (Table 5)。

その結果、*E. javanicum* IFM 54704 株、IFM 52259 株、IFM 58214 株および IFM 60197 株の培養エキスに活性が認められた。これら 4 菌株の培養エキス中に、これまでに *E. javanicum* から得られている抗真菌活性物質 compactin ラクトン開環体 (33)²³⁾ の存在を検討した。活性を示した 4 菌株中に、33 の存在は確認されなかったため、新たな活性物質の発見が期待された。そこで、活性を示すエキスを生産した 4 菌株について、それらの活性本体の分離を試みた。しかし、IFM 60197 株と IFM 52259 株の 2 菌株については、活性本体の分離の過程で活性の大きな低下が起こるとともに、菌株の培養の繰り返しの中で活性本体の生産能の消失の結果、活性物質の分離に至らなかった。IMF 58214 株も分離の過程で活性の失活が起こるが、後述する方法により活性本体の特定を行うことが出来た。また、前章で新規化合物の生産を明らかにした IFM 54704 株も抗真菌活性を示したことから、その活性本体の検討を行った。さらに、得られた活性物質は、分離時に得られた誘導体と共に抗真菌活性について詳細な検討を行った。

第一節では、*E. javanicum* IMF 58214 株の生産する抗真菌活性物質の探索について、第二節では、*E. javanicum* IMF 58214 株の活性本体 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride の抗真菌活性について、第三節では、*E. javanicum* IMF 54704 株の活性本体の新規環状デプシペプチド eujavanicin A の分離およびその構造について、第四節では、eujavanicin A の抗真菌活性について述べる。



33

Table 5. Antifungal activity of *E. javanicum* extracts against *A. fumigatus*

strain	activity	strain	activity
86-1 (IFM 54704)	+	TM-419	-
BS-13-4 (IFM 52259)	+	TM-420	-
NRRL707 (IFM 42082)	-	TM-810	-
T-154 (IFM 58214)	+	TM-425	-
T-155	-	TM-700	-
T-156	-	TM-701 (IFM 60197)	+
TM-124	-	TM-712	-
TM-130	-	TM-810	-
TM-135 (IFM 60196)	-	UC61	-
TM-136	-	UC62 (IFM 59075)	-
TM-417	-	UC63	-

+ : inhibition. - : no inhibition.

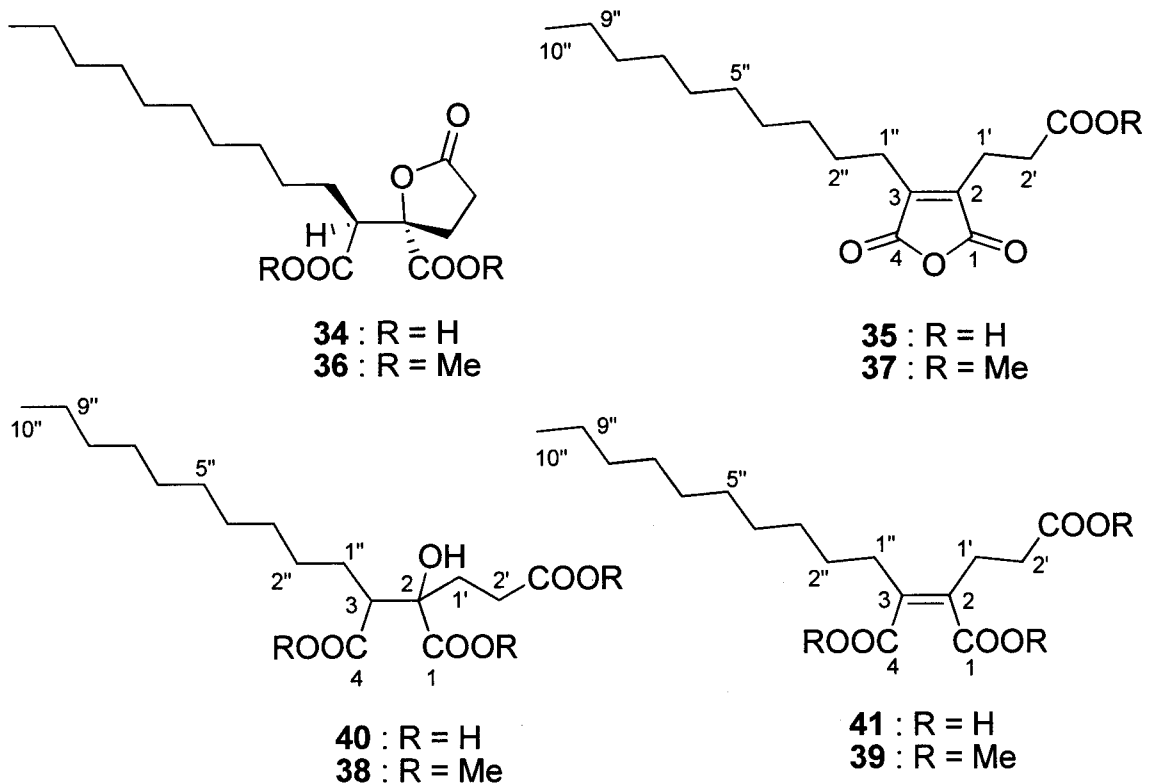
第一節 *Eupenicillium javanicum* IFM 58214 株の抗真菌活性物質

[2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride]

E. javanicum IMF 58214 株を米培地で 25°C、21 日間培養した後、CHCl₃ - MeOH (1:1)を加え一晩静置し、抽出したところ、液が二層に分離していた。それぞれを別々に濃縮後、*Aspergillus fumigatus* に対する抗真菌活性を調べたところ、上層にのみ活性が認められた。上層を分離して溶媒を留去し、残渣に水と AcOEt を加えて、液液分配を行った。抗真菌活性は AcOEt 可溶部分に認められ、水可溶部は活性を示さなかった。そこで、AcOEt 可溶部分を濃縮して、エキス

を作製し、ポリスチレン樹脂(ダイヤイオン HP21)を担体としたカラムクロマトグラフィーに付し、MeOH・H₂Oの濃度比を変化させ、溶出させた。得られた分画の中で、MeOH:H₂O = 8:2で溶出した分画に活性が認められた。種々の担体を用いたクロマトグラフィーによる活性成分の単離・精製を試みたが、行った全ての方法において、活性の大きな減弱が認められた。Compactin (6)は、塩基性条件化でそのラクトンが開環した 33 が、強い抗菌活性を示すということが既に知られている²³⁾。本活性本体も溶出時に構造の変化が起こり、活性の減弱につながっている可能性を考え、分離後の各分画について酸性、塩基性条件下および加熱後の活性を調べた。その結果、抗真菌試験時に少量の希塩酸をディスクに添加すること、または加熱することにより活性が増強する特性が明らかになった。また、AcOEtと水による分配を水層の液性を変化させて行い、それぞれ活性を調べたところ、中性・酸性(塩酸)の水溶液では有機層、塩基性(炭酸水素ナトリウム)の水溶液を用いた場合は水層に活性物質が移行することが明らかになり、活性成分はカルボン酸を有する酸性物質であると推定された。本活性成分の特徴は判明したが、HPLCでの分離・精製の過程で生じる活性の大きな減弱は、酸および加熱による活性の回復では補えなかった。活性を示す MeOH:H₂O = 8:2で溶出した分画には、spiculisporic acid (34)^{24,25)}が多量に存在することが¹H NMR スペクトルにより確認された。しかし、精製した 34 には抗真菌活性は無く、その再結晶母液のみが活性を示した。そこで活性物質を単離するため、34 を再結晶で出来る限り除き、66μg/discで活性を示す分画を得た。本分画の¹H NMR スペクトルを測定したところ、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)²⁵⁾の存在が予想された。化合物 35 の単離が現時点で不可能であったので、本活性分画を用いて CH₂N₂で処理してメチルエステル化を行った。この反応生成物を LPLC により分離した結果、反応生成物の大部分が spiculisporic acid dimethyl ester (36)²⁴⁾であった。その他に 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride monomethyl ester (37)²⁶⁾および 2-(2-carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid trimethyl ester (38)²⁷⁾が少量得られた。また、同じ活性分画について加熱後、CH₂N₂を用いてメチルエステル化を行ったところ、36、37 および 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic acid trimethyl ester (39)が得られた。これらのメチルエステル体のうち、37 のみが抗真菌活性を示したが、活性

分画の活性に対し著しく弱いものであった。そのため、本菌の活性本体は、加熱を行った活性分画のメチルエステル化の際に、含量の増加した **37** あるいは新たに認められた **39** の脱メチルエステル体であると考えられた。活性本体を特定するために、メチルエステル化で得られた **37**、**38** および **39** について酸加水分解を行い、それぞれ **35**、2-(2-carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid (**40**)²⁸⁾ および 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic acid (**41**)を得た。これらについて、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べることにした。化合物 **35** は、少量しか得られなかったため、**34** を減圧下で加熱することにより合成した²⁵⁾。活性試験の結果、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を示した **35** を活性本体と推定した。活性試験の結果と ¹H NMR スペクトルから予測される **35** の含量の検討から、**35** が本菌株の活性本体であると決定した。化合物 **35** および本菌株より **35** の分離過程で得られた化合物の抗真菌活性について次節で述べる。



第二節 2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride の抗真菌活性

E. javanicum IFM 58214 株より 35 の分離過程で得られた 34~41 について、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性をペーパーディスク法²³⁾により測定した。その結果、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)が 6.25 μ g/disc で直径 13mm の阻止円を示し、抗真菌薬である amphotericin B に匹敵する強い活性が認められた。また、35 のメチルエステル体である 37 が 50 μ g/disc で阻止円の形成が認められ、弱い活性を示した (Table 6)。この結果から、無水マレイン酸の部分構造が活性発現に重要であり、遊離カルボン酸の存在が活性の強度に影響することが考えられた。また本研究により、初めて spiculisporic acid 関連化合物の抗真菌活性を明らかにした。

Table 6. Antifungal activity of compounds (34 - 41) against *A. fumigatus*

compound (μ g/disc)	34	35	36	37	38
100	-	17	-	15	-
50	-	17	-	10	-
25	-	16	-	-	-
12.5	-	14	-	-	-
6.25	-	13	-	-	-
3.1	-	+	-	-	-
compound (μ g/disc)	39	40	41	Amphotericin B	
100	-	-	-	ND	
50	-	-	-	ND	
25	-	-	-	13	
12.5	-	-	-	12	
6.25	-	-	-	12	
3.1	-	-	-	10	

- : no inhibition. + : slight inhibition. ND : no data.

第三節 *Eupenicillium javanicum* IFM 54704 株の抗真菌活性物質

[Eujavanicin A]

前章で述べた *E. javanicum* IFM 54704 株から単離された化合物は、いずれも抗真菌活性を示さなかった。そこで改めて、培養を行い、抗真菌活性を指標として活性物質の分離を行うこととした。

E. javanicum IFM 54704 株を米培地で 25℃、21 日間培養し、CHCl₃・MeOH (3:2)で抽出し、抽出液を水と AcOEt で液液分配を行った。得られた AcOEt エキスは、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を示し、水可溶部は活性を示さなかった。本 AcOEt エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃・EtOH の混合比を変化させ順次溶出した。CHCl₃ : EtOH = 10:1 および 5:1 で溶出した分画に *A. fumigatus* に対する抗真菌活性が認められ、これらの分画は LPLC (SiO₂, CHCl₃ : acetone = 3:1, cyclohexane : acetone = 3:1)によって、活性物質が濃縮されたが、TLC において種々の発色試薬を用いても検出が困難であった。検討の結果、展開した TLC プレートに塩酸に浸した後、ホットプレート上で加熱し、ニンヒドリン試薬を噴霧することにより検出が可能となった。また、RI 検出器を用いた HPLC (SiO₂, cyclohexane : acetone = 3:2)を用い精製を行った際、二つのピークが現れた。それらを分離し、再び HPLC を行うといずれの分画も同様な二つのピークを示した。したがって、これらのピークは同一化合物の二つのコンフォメーションと考えられた。そこで、本分画を hexane・AcOEt により再結晶を行い、eujavanicin A (42)を単離した。

Eujavanicin A (42)は、FAB-MS 測定により分子式が C₅₅H₉₃N₉O₁₅ と決定された。¹H および ¹³C NMR スペクトルから C-メチルが十一個、N-メチルが五個、NH が三個、カルボニル炭素が十二個存在することが確認された (Table 7)。IR スペクトルに、1734 および 1639cm⁻¹の吸収が認められ、加水分解後にニンヒドリン試薬陽性となる特徴から、エステル結合およびアミド結合を有する環状デプシペプチドであると予想された。各種 NMR スペクトルの解析において、プロトン数の多さから近接したシグナルの結合等の判別が困難であった。そこで、次元および二次元 TOCSY 測定によりシグナルを分離し、十個の成分 (A - J)に分類した (Table 7, Fig. 25)。

Table 7. ¹H and ¹³C NMR spectral data for eujavanicin A (42) in CDCl₃

amino acid residue no.	<i>d</i> _C , multiplicity	<i>d</i> _H (<i>J</i> in Hz)	amino acid residue no.	<i>d</i> _C , multiplicity	<i>d</i> _H (<i>J</i> in Hz)
Lactic acid (A)	1 173.2, qC		L- <i>N</i> -Melle (F)	1 171.4 ^a , qC	
	2 67.0, CH	5.47 d (7.0)		2 57.1, CH	5.26 d (10.9)
	3 18.1, CH ₃	1.39 d (7.0)		3 32.6, CH	2.18 m
L-Pip (B)	1 172.0, qC			4 24.5, CH ₂	1.07 m
	2 46.7, CH	5.59 d (6.0)			1.31 m
	3 27.6, CH ₂	1.76 m		5 15.1, CH ₃	0.92 ov
		1.88 m		6 10.0, CH ₃	0.91 ov
	4 18.8, CH ₂	1.66 m	NCH ₃	29.72, CH ₃	2.91 s
		2.18 m	L- <i>N</i> -Melle (G)	1 171.43 ^a , qC	
	5 25.0, CH ₂	1.48 m		2 75.0, CH	3.12 d (10.0)
		1.91 m		3 33.8, CH	2.71 m
	6 43.4, CH ₂	3.64 d (13.4)		4 25.8, CH ₂	1.03 m
		4.23 dt (13.4, 3.0)			1.51 m
L- <i>N</i> -MeVal (C)	1 168.0, qC			5 17.0, CH ₃	0.99 d (6.5)
	2 66.9, CH	4.34 d (10.4)		6 10.8, CH ₃	0.89 ov
	3 26.0, CH	2.44 m	NCH ₃	41.4, CH ₃	3.39 s
	4 19.2, CH ₃	0.87 d (7.0)	L-Asp (H)	1 171.0, qC	
	5 19.6, CH ₃	1.04 d (6.5)		2 47.6, CH	4.92 m
	NCH ₃ 28.8, CH ₃	2.77 s		3 37.8, CH ₂	2.44 dd (16.3, 3.0)
L-Val (D)	1 170.4, qC				2.56 dd (16.3, 8.0)
	2 54.6, CH	4.51 t (10.4)		4 171.38 ^a , qC	
	3 29.1, CH	1.98 m		NH	7.88 d (6.9)
	4 20.0, CH ₃	0.78 d (7.0)	L- <i>N</i> -MeVal (I)	1 169.3, qC	
	5 18.1, CH ₃	0.79 d (6.5)		2 62.5, CH	4.84 d (11.4)
	NH	6.90 d (10.4)		3 26.0, CH	2.33 m
L- <i>N</i> -MeAsp (E)	1 169.7, qC			4 18.6, CH ₃	0.81 ov
	2 52.0, CH	6.40 dd (11.9, 5.5)		5 18.6, CH ₃	0.96 d (6.5)
	3 35.5, CH ₂	2.75 m	NCH ₃	29.69, CH ₃	3.07 s
		3.09 m	L-Leu (J)	1 171.34 ^a , qC	
	4 171.49 ^a , qC			2 49.3, CH	4.93 m
	NCH ₃ 30.5, CH ₃	2.87 s		3 37.5, CH ₂	1.63 m
					2.15 m
				4 25.1, CH	1.51 m
				5 21.1, CH ₃	0.86 d (6.5)
				6 23.1, CH ₃	0.83 d (6.9)
				NH	7.46 d (9.9)

qC : quaternary carbon. ^a Assignments for these carbon atoms may be interchanged.

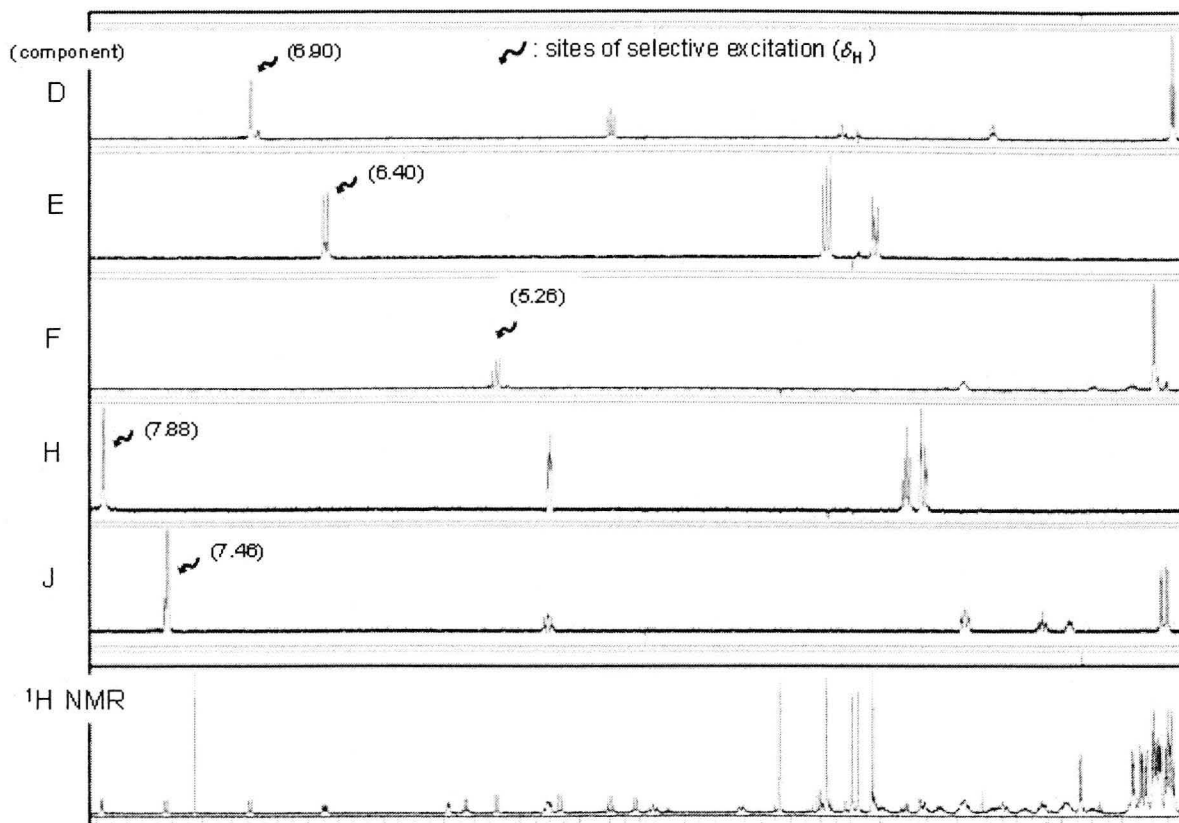


Fig. 25. ^1H NMR and 1D TOCSY spectra of eujavanicin A (42)

HSQC スペクトルからプロトンと炭素間の結合を決定し、 ^1H - ^1H COSY および HMBC スペクトルの解析から各成分の構造を決定することとした (Fig. 26)。

成分 A は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から、2 位のメチン (δ_{H} 5.47) と 3 位のメチル (δ_{H} 1.39) との結合が決定された。HMBC スペクトルに 2 位のプロトンからカルボニル炭素 (δ_{C} 173.2) への相関が認められたことから、成分 A を lactic acid (Lac) 残基と決定した。

成分 B は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から、2 位のメチン (δ_{H} 5.59) と 3 位のメチレン (δ_{H} 1.76, 1.88) 間、5 位 (δ_{H} 1.48, 1.91) と 6 位のメチレン (δ_{H} 3.64, 4.23) 間の結合が決定された。HMBC スペクトルに 2 位のプロトンから 6 位の炭素 (δ_{C} 43.4) へ、4 位のプロトン (δ_{H} 2.18, 1.66) から 2 位の炭素 (δ_{C} 46.7) と 6 位の炭素へ相関が認められたことから、成分 B は pipercolic acid (Pip) 残基であると予想された。

成分 C は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から 2 位 (δ_{H} 4.34) と 3 位のメチン (δ_{H} 2.44)、3 位のメチンと 4 位 (δ_{H} 0.87) および 5 位のメチル (δ_{H} 1.04) 間の

結合が決定された。HMBC スペクトルに *N*-メチルプロトン (δ_{H} 2.77)から 2 位の炭素 (δ_{C} 66.9)へ、2 位のプロトンからカルボニル炭素 (δ_{C} 168.0)への相関が認められたことから、成分 C を *N*-methylvaline (*N*-MeVal)残基と決定した。

成分 D は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から NH (δ_{H} 6.90)、2 位 (δ_{H} 4.51)、3 位のメチンプロトン (δ_{H} 1.98)および 4 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.78)のスピ系および 3 位と 5 位のメチル (δ_{H} 0.79)間の結合が決定された。HMBC スペクトルにおいて 2 位のプロトンからカルボニル炭素 (δ_{C} 170.4)への相関が認められたことから、成分 D を valine (Val)残基と決定した。

成分 E は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から 2 位のメチン (δ_{H} 6.40)と 3 位のメチレン (δ_{H} 2.75, 3.09)の結合が決定された。HMBC スペクトルに *N*-メチルプロトン (δ_{H} 2.87)から 2 位の炭素 (δ_{C} 52.0)への相関、2 位のプロトンからカルボニル炭素 (δ_{C} 169.7)へ、3 位のプロトンからもう一つのカルボニル炭素 (δ_{C} 172.49)に相関が認められたことから、成分 E は *N*-methyloaspartic acid 残基 (*N*-MeAsp)であると予想された。

成分 F は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析で 2 位 (δ_{H} 5.26)と 3 位のメチン (δ_{H} 2.18)間の結合が決定された。HMBC スペクトルに *N*-メチルプロトン (δ_{H} 2.91)から 2 位の炭素 (δ_{C} 57.1)への相関、2 位のプロトンから 4 位の炭素 (δ_{C} 24.5)へ、6 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.91)から 2 位の炭素および 4 位の炭素へ、4 位のメチレンプロトン (δ_{H} 1.07, 1.31)から 5 位のメチル炭素 (δ_{C} 15.1)へ相関が認められたことから、成分 F は *N*-methylisoleucine または *N*-methyl-*allo*-isoleucine (*N*-MeIle)残基と予想された。

成分 G は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から、2 位 (δ_{H} 3.12)、3 位のメチン (δ_{H} 2.71)、5 位のメチル (δ_{H} 0.99)間の結合を決定した。HMBC スペクトルに *N*-メチルプロトン (δ_{H} 3.39)から 2 位の炭素 (δ_{C} 75.0)への相関、6 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.89)から 3 位の炭素 (δ_{C} 33.8)と 4 位の炭素 (δ_{C} 25.8)へ相関が認められたことから、成分 G は *N*-methylisoleucine または *N*-methyl-*allo*-isoleucine (*N*-MeIle)残基であると予想された。

成分 H は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から NH (δ_{H} 7.88)と 2 位のメチン (δ_{H} 4.92)間の結合が決定された。HMBC スペクトルに NH のプロトンから 3 位の炭素 (δ_{C} 37.8)へ、2 位のプロトン (δ_{H} 4.92)からカルボニル炭素 (δ_{C} 171.0)へ、

3 位のメチレンプロトン (δ_{H} 2.44, 2.56)からもう一つのカルボニル炭素 (δ_{C} 171.38)へ相関が認められたことから、成分 H は、aspartic acid (Asp)残基であると予想された。

成分 I は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から 2 位 (δ_{H} 4.84)と 3 位のメチン (δ_{H} 2.33)の結合を決定した。HMBC スペクトルにおいて、*N*-メチルプロトン (δ_{H} 3.07)、4 位 (δ_{H} 0.81)および 5 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.96)から 2 位の炭素 (δ_{C} 62.5)へ、2 位のプロトンからカルボニル炭素 (δ_{C} 169.3)への相関が認められたことから、成分 I を *N*-methylvaline (*N*-MeVal)残基と決定した。

成分 J は、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から NH (δ_{H} 7.46)、2 位のプロトン (δ_{H} 4.93)、3 位にメチレンプロトン (δ_{H} 1.63, 2.15)、4 位のプロトン (δ_{H} 1.51)および 5 位のメチルプロトン (δ_{H} 0.86)のスピンの系、4 位のメチンと 6 位のメチル (δ_{H} 0.83)の結合が決定され、成分 J は leucine (Leu)残基であると予想された。

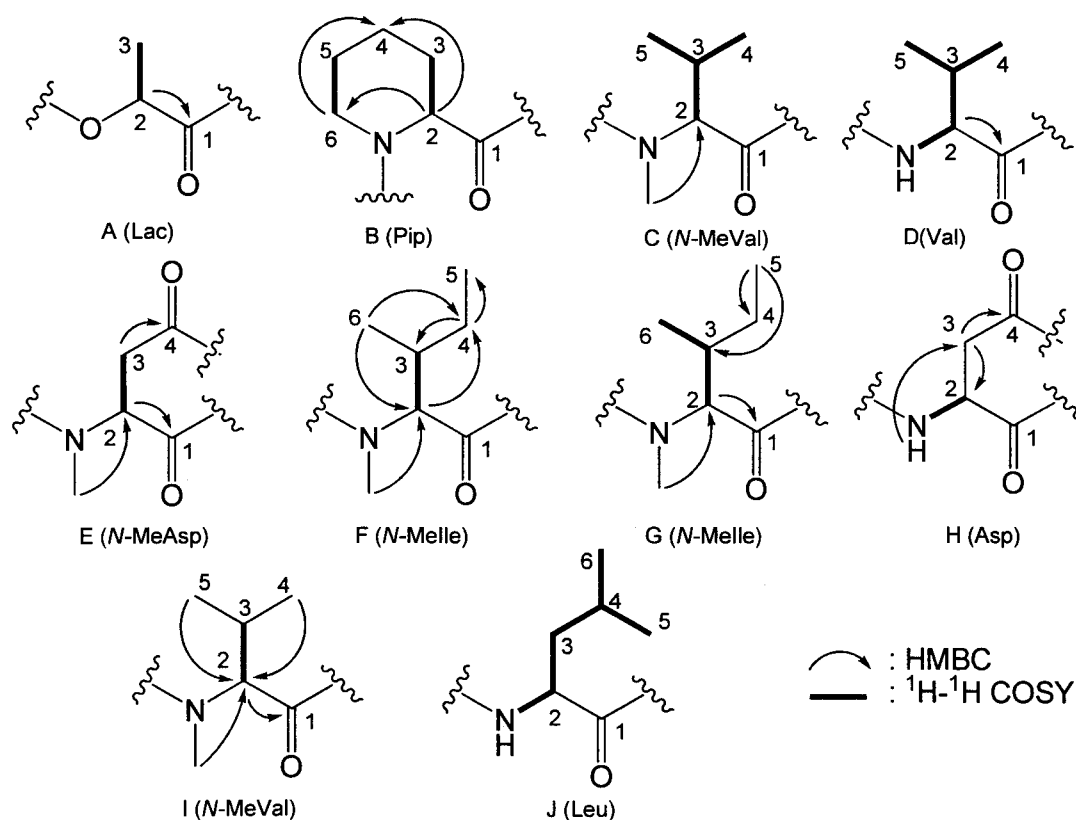


Fig. 26. ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations for components of eujavanicin A (42)

成分 E (*N*-MeAsp)、成分 H (Asp)の側鎖がカルボキシル基であることの確認するため、**42**に CH₂N₂を反応させエステル化を行った。得られた methyl ester (**43**)の ¹H NMR スペクトルに二つのメトキシ基 (δ_{H} 3.48, 3.69)が確認されたことから、**42**にカルボキシル基が二つ存在することが明らかになり、成分 E を *N*-methylasspartic acid 残基、成分 H を aspartic acid 残基と決定した。

各成分間の結合は、HMBC スペクトルの解析から検討した (Fig. 27)。成分 B (Pip)の 2 位のプロトンから成分 A (Lac)のカルボニル炭素への相関が認められたことから lactic acid のカルボン酸が pipecolic acid にアミド結合していることが明らかになり、さらに、成分 C (*N*-MeVal)の *N*-メチルプロトンから成分 B (Pip)のカルボニル炭素への相関、成分 D (Val)の NH のプロトンから成分 C (*N*-MeVal)のカルボニル炭素への相関、成分 E (*N*-MeAsp)の *N*-メチルプロトンから成分 D (Val)のカルボニル炭素への相関および成分 F (*N*-MeIle)の *N*-メチルプロトンから成分 E (*N*-MeAsp)の 1 位のカルボニル炭素への相関がそれぞれ確認されたことからフラグメント I (Lac-Pip-*N*-MeVal-Val-*N*-MeAsp-*N*-MeIle)の結合が明らかになった。さらに、成分 I (*N*-MeVal)の *N*-メチルプロトンから成分 H (Asp)の 1 位のカルボニル炭素への相関および成分 J (Leu)の NH から成分 I (*N*-MeVal)のカルボニル基への相関が認められたことからフラグメント II (Asp-*N*-MeVal-Leu)の結合が明らかになった。

成分 F、G および J の 1 位のカルボニル基は、化学シフトが近く、それらの特定が困難であった。そこで、これらの成分の結合を決定するために ROE スペクトルの解析を行った (Fig. 27)。成分 F の 2 位のプロトンの照射により成分 G (*N*-MeIle)の *N*-メチルプロトンに ROE が観測され、二つの *N*-methyloisoleucine が互いに結合していることが確認された。さらに、成分 H (Asp)の NH のプロトンの照射により G (*N*-MeIle)の 2 位のプロトンに ROE が観測されたことから、本化合物はフラグメント I と II が成分 G (*N*-MeIle)を介して結合することが明らかになった。以上のこと並びに IR データ、分子式を考慮し、eujavanicin A (**42**)の平面構造を、C 末端の成分 J (Leu)が成分 A (Lac)とエステル結合した Fig. 27 に示す構造と決定した。

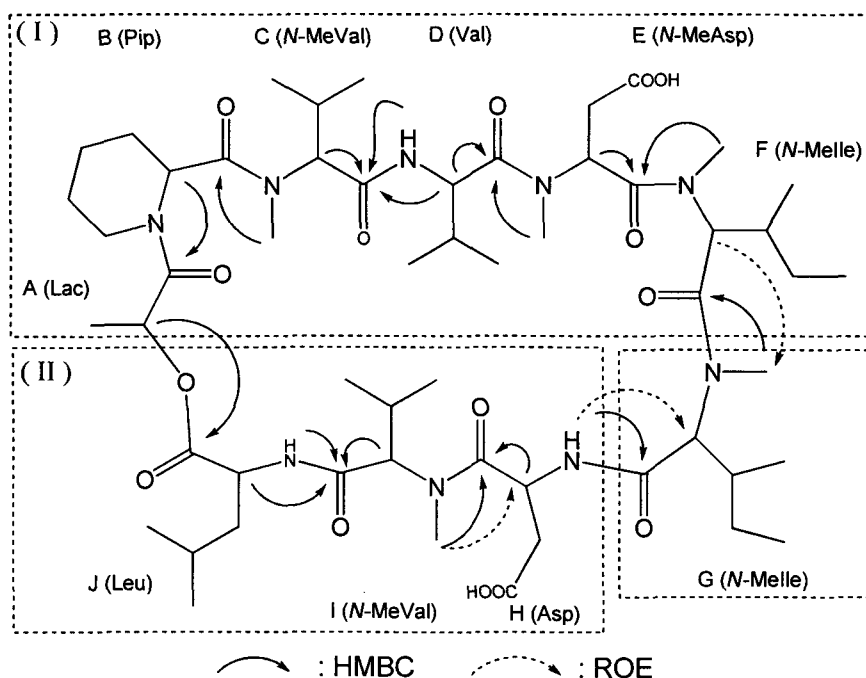


Fig. 27. Key HMBC and ROE correlations for eujavanicin A (42)

MS スペクトルのフラグメンテーションの解析から、**42** のアミノ酸配列の確認を行った。先に得られた **43** を NaOMe/MeOH でメタノリシスを行い、環状エステル部分を開環させた eujavanicin A trimethyl ester (**44**) に導いた。化合物 **44** について、FAB-MS 測定を行い、フラグメントの解析を行った (Fig. 28)。その結果、擬分子イオンピーク $1203[M+Na]^+$ と $1181[M+H]^+$ が観測され、**44** の分子式 $C_{58}H_{101}N_9O_{16}$ と一致した。擬分子イオンピーク $1181[M+H]^+$ から 144 マスユニット (m.u.) 少ないフラグメントの m/z 1036 が観測され、144m.u. に相当する $[LeuOMe-H_2O]$ の開裂が考えられた。同様に、 m/z 923 のフラグメントピークが観測されたことから 113m.u. に相当する $[N-MeVal-H_2O]$ が開裂し、 m/z 794 のフラグメントピークが観測されたことから 129m.u. に相当する $[AspOMe-H_2O]$ 、 m/z 666 のフラグメントピークが観測されたことから 128m.u. に相当する $[N-MeIle-H_2O]$ 、 m/z 539 のフラグメントピークが観測されたことから 127m.u. に相当する $[N-MeIle-H_2O]$ 、 m/z 396 のフラグメントピークが観測されたことから 143m.u. に相当する $[N-MeAspOMe-H_2O]$ 、 m/z 297 のフラグメントピークが観測されたことから 99m.u. に相当する $[Val-H_2O]$ 、 m/z 184 のフラグメントピークが観測されたことから 113m.u. に相当する $[N-MeVal-H_2O]$ が順に開裂し、Pip-Lac フラグメントに相当する m/z 184 のフラグメントピークが観測されたも

のと考えられた。この結果は、各種 NMR 実験により決定した 42 の構造を支持するものであった。しかし、成分 F および G については、isoleucine 骨格か *allo*-isoleucine 骨格であるかは未だ不明であった。

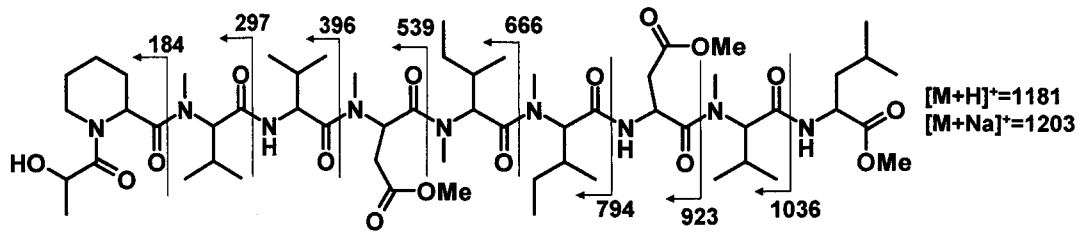


Fig. 28. FAM-MS fragmentation (m/z values) of eujavanicin A trimethyl ester (44)

未決定であった成分 F と G の骨格および eujavanicin A (42) の絶対構造は、42 の酸加水分解を行い、得られた各成分の絶対配置から決定することとした。

Lactic acid の絶対構造の決定は、キラルカラムを用いた HPLC 分析により行った。化合物 42 の酸加水分解物中の lactic acid の保持時間と D-および L-lactic acid の標準品の保持時間を比較した結果、42 を構成する lactic acid を D 体であると決定した (Fig. 29)。

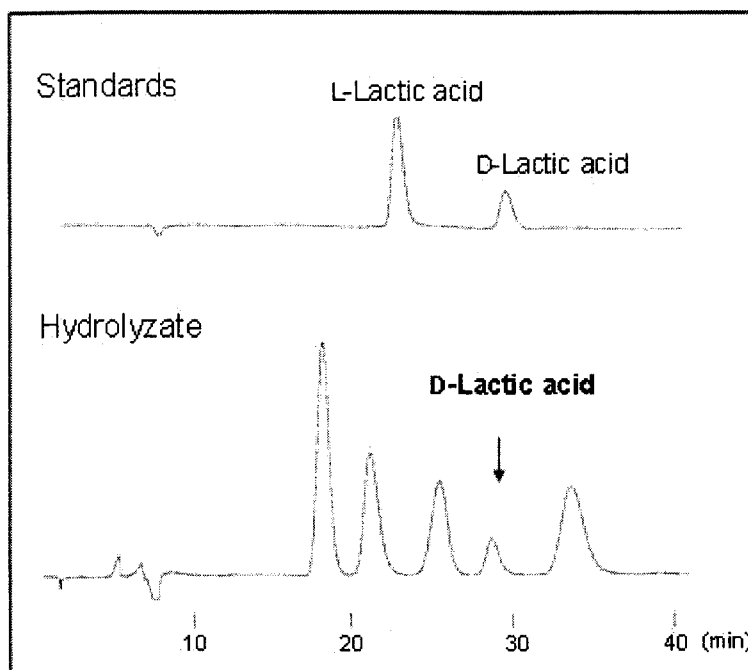


Fig. 29. HPLC chromatograms for lactic acid

構成アミノ酸の絶対構造は、Marfey法を適用して決定した²⁹⁾。すなわち、42の加水分解物とアミノ酸の標準品について、それぞれ Marfy 試薬 (FDAA) を作用させ、FDAA 誘導体を合成した。*N*-Me-D-Ile、*N*-Me-L-Ile、*N*-Me-D-*allo*-Ile および *N*-Me-L-*allo*-Ile は、文献の方法に従い合成した^{30,31)}。FDAA 誘導体についての HPLC 分析を行った結果、*N*-methylisoleucine または *N*-methyl-*allo*-isoleucine と予想された成分 F と G はいずれも *N*-methyl-L-isoleucine であることが明らかになった。その他の構成アミノ酸の絶対構造についても、全て L 体であることが明らかになった (Fig. 30, 31)。以上の結果から、eujavanicin A (42) の構造を絶対配置を含めて決定した。

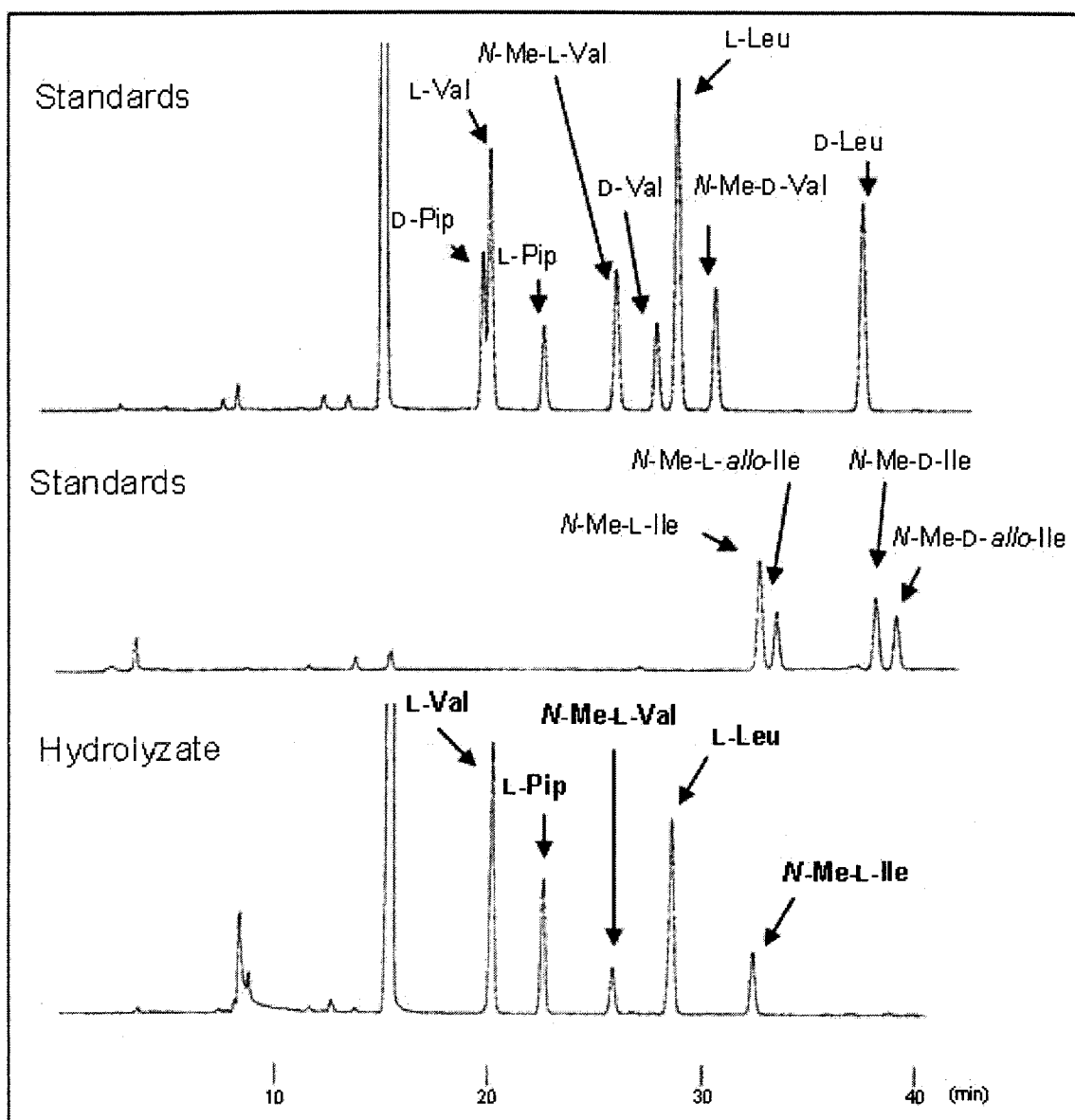


Fig. 30. HPLC chromatograms for FDAA derivatives

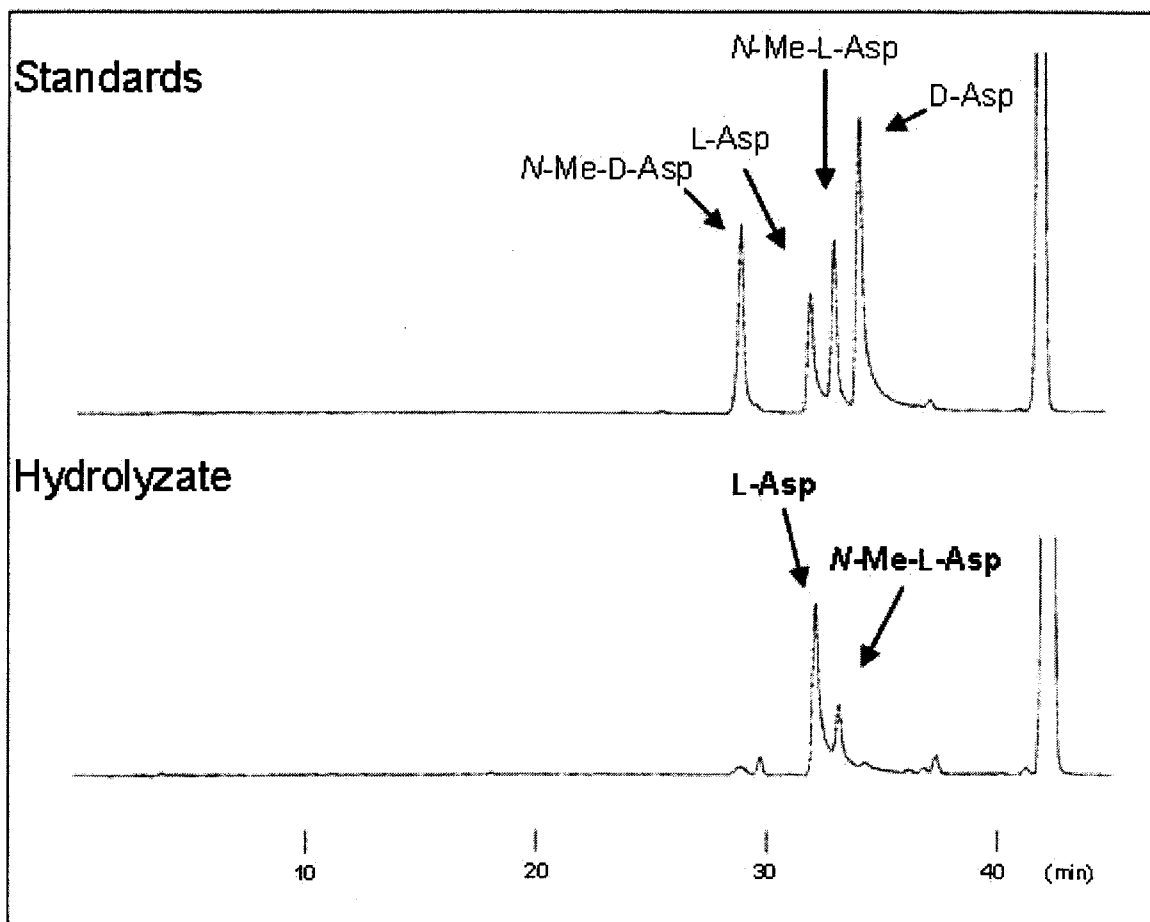
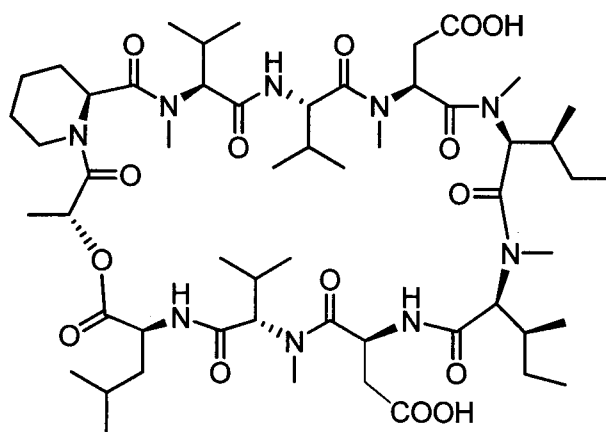


Fig. 31. HPLC chromatograms for FDAA derivatives of Asp and *N*-MeAsp



Eujavanicin A (42)

第四節 Eujavanicin A の抗真菌活性

E. javanicum IFM 54704 株から得られた 42 と、そのメチルエステル体である 43 について、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を測定した。その結果、42 は 6.25 μ g/disc で直径 23mm の阻止円を形成し、強い抗菌活性を示した。一方、43 は抗真菌活性を示さず、*A. fumigatus* 活性にはカルボン酸の存在が必須であると考えられた。化合物 42 の抗菌スペクトルについて、*A. niger*、*Candida albicans*、*Cryptococcus neoformans*、*Staphylococcus aureus*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Salmonella enteritidis* に対する活性を検討した。その結果、42 は活性試験を行ったいずれの病原微生物に対して活性を示さず、42 は *A. fumigatus* に対する特異的な抗真菌活性を有することが明らかになった (Table 8)。

Table 8. Antimicrobial activities of eujavanicin A (42)

microorganisms	Eujavanicin A (42)	
	50 μ g/disc	6.25 μ g/disc
[filamentous fungi]		
<i>Aspergillus fumigatus</i>	28	23
<i>Aspergillus niger</i>	—	—
[yeasts]		
<i>Candida albicans</i>	—	—
<i>Cryptococcus neoformans</i>	—	—
[bacteria]		
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—
<i>Salmonella enteritidis</i>	—	—

The diameter of inhibition circle is indicated in mm.

— : no inhibition.

結論

化学スクリーニングおよび生物活性スクリーニングの二つの観点から、*Eupenicillium javanicum* の代謝産物に関する研究を行った。広域に分布し、日本で頻繁に分離される真菌類について、医薬品リード化合物開発を目指した生理活性物質探索源としての有用性を検討した。

日本国内土壌から分離された *E. javanicum* の 22 菌株の代謝産物について、TLC 分析に種々の発色試薬を用いて、化学スクリーニングを行った。その結果、*E. javanicum* IFM 54704 株において、特徴的なスポットが認められた。すなわち、弱い UV 吸収を有し、リン・モリブデン酸試薬を噴霧後、加熱するとゆっくりと青く呈色するものであり、このスポットは本菌株のみに認められた。また、IFM 54704 株、IFM 60196 株にはリン・モリブデン酸試薬によって、オレンジ色を呈するスポットが認められた。また、IFM 59075 株、IFM 60196 株、IFM 60197 株には、van Urk 試薬に陽性(青色又は黄色)を示す代謝産物の存在が確認された。これらのことから、*E. javanicum* は菌株により多様な骨格の代謝産物を生産する菌であることが予想され、特徴的な化合物がより多く存在すると予想された *E. javanicum* IFM 54704 株および IFM 59075 株を用いて代謝産物の分離・構造決定を行った。

TLC 分析を指標に *E. javanicum* IFM 54704 株の代謝産物の分離を行い、mevalonolactone (9)、*p*-hydroxybenzoic acid (10)、*p*-hydroxyphenylacetic acid (11)とともに、三種の新規デカリン誘導体 eujavanicol A (12)、eujavanicol B (13) および eujavanicol C (14)、二種の新規ジオキソモルフォリン関連化合物 javanicunine A (15) および javanicunine B (16) を単離した。

Eujavanicol A (12) および B (13) は、FAB-MS スペクトルから分子式をいずれも同じ $C_{19}H_{32}O_4$ と決定された。各種機器データの解析から 12 と 13 は、ともに *trans*-デカリン環を有し、それらは 6 位のエピマーであることが明らかとなった。絶対構造を決定するために、12 と 13 それぞれに *p*-bromobenzoyl chloride を作用させ、tri-*p*-bromobenzoate (18) および (19) を得た。励起子カイラリティー法を適用することにより、18 の絶対構造を 5*S*, 6*R*、19 の絶対構造を 5*S*, 6*S* と決定し、eujavanicol A (12) および eujavanicol B (13) を図に示す絶対構造と決定し

た。Eujavanicol C (14)は、FAB-MS スペクトルから分子式を $C_{19}H_{30}O_5$ と決定され、各種機器データの解析から、12 の 2 位と 3 位に二重結合、4 位がケトンとなった構造であることが明らかになった。その絶対構造決定には、12 および 13 と同様に励起子カイラリティー法を適用した。すなわち、14 を tri-*p*-bromobenzoate (20)に導き、CD スペクトルにおける共役ケトンの影響を除くために 20 の共役ケトン還元して 21 とし、CD スペクトルを測定した。その結果から、eujavanicol C (14)の絶対構造を図に示す構造と決定した。これら 12~14 は、今回用いた 22 菌株において本菌株にのみ存在が確認された。

Javanicunine A (15)および B (16)は、TLC 分析時、リン・モリブデン酸試薬によってオレンジ色を呈した。化合物 15 および 16 は、FAB-MS 測定により分子式をそれぞれ $C_{24}H_{30}N_2O_4$ 、 $C_{24}H_{30}N_2O_5$ と決定された。各種機器データの解析から、15 は 11a 位にプロトン、16 は 11a 位に水酸基を有するジオキソモルフォリン誘導体と決定され、NOE 実験をもとにこれらの相対構造を決定した。化合物 15 を酸性条件下でトリプトファンに導き、キラル TLC を用いて、そのトリプトファンが L 体であることを明らかにし、javanicunine A (15)の絶対構造を決定した。また、15 と 16 は同一菌株から単離されたことから、生合成を考慮し、16 を 15 と同様の絶対構造であると推定した。新規モルフォリン誘導体 15 および 16 は、化学スクリーニングを行った 22 菌株のエキスのうち、2 菌株に存在するのみであり、javanicunine 類の存在したもう 1 菌株である IFM 60196 株の代謝産物中には、15 の存在が確認されたが、16 の存在は確認されなかった。これまでに、*Penicillium brevicompactum* から分離された植物の成長調節に関与する brevicompanine A (45)³²⁾、*P. roqueforti* や *P. crustosum* から分離された痙攣性毒の生理活性を持つ roquefortine C (46)^{13,33)} など様々なトリプトファン由来のジケトピペラジン類が報告されている。しかし、天然から得られたジオキソモルフォリン誘導体は、*E. molle* から分離された mollenine A (47)、mollenine B (48)³⁴⁾、*Aspergillus niveus* から単離された電位依存性ナトリウムチャネル阻害活性物質 PF1233A (49)、PF1233B (50)³⁵⁾ の四例のみであり、15 および 16 は希少な骨格の化合物であった。

E. javanicum IFM 59075 株の代謝産物について、van Urk 試薬を用いた TLC 分析を指標に分離を行った結果、2,3-anhydromevalonic acid δ -lactone (23)、

ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (24)とともに、インドールジテルペン 10,23-dihydro-24,25-dehydroaflavinine (25)、nominine (26)、さらに四種の新規インドールジテルペン 17-hydroxyeujindole (27)、17-oxoeujindole (28)、8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (29)および 8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)を得た。化合物 27、28、29 および 30 は、それぞれの分子式を FAB-MS スペクトルから $C_{28}H_{39}NO$ 、 $C_{28}H_{37}NO$ 、 $C_{28}H_{37}NO$ および $C_{28}H_{35}NO$ と決定された。各種機器データの解析によりそれらの平面構造を決定し、NOE 実験によりこれらの相対構造を決定した。化合物 27 と 29 は 17 位に水酸基、28 は 17 位にケトンをも有し、かつ 29 は A/B 環の橋が二重結合となった六環性のインドールジテルペンであり、30 は 29 と同様に A/B 環の橋が二重結合であり、さらに 17 位と 20 位でエーテル結合を形成した五員環をも有する七環性のインドールジテルペンであった。化合物 28 の C/D 環 (*cis*-decalone 環)に着目し、Kirk らの方法に従い CD スペクトルの解析を行い、17-oxoeujindole (28)の絶対構造を決定した。*E. javanicum* IFM 59075 株から今回得られたインドールジテルペン 25~30 は、いずれも 26 から生合成されてくるものと考えられる²²⁾。10,23-Dihydro-24,25-dehydroaflavinine (25)、nominine (26)の絶対構造は、未決定であった。25~30 は本研究で同一菌株から得られたことから、生合成を考慮し、いずれも 28 と同様の絶対構造であると推定した。また、TLC 分析時、eujindole 類に特徴的なスポットが認められた *E. javanicum* IFM 60196 株の抽出エキス中に 25、27、28 および 30、IFM 60197 株の抽出エキス中に 25、27 および 28 の存在を確認した。これまでに天然から単離されたインドールジテルペンは、*A. flavus* から分離された aflatrem (51)^{20,36)}、*P. crustosum* から分離された penitrem A (52)³⁷⁾、*P. paxilli* から分離された paxiline (53)³⁸⁾などの生理活性物質をはじめとして、数多くの報告がなされている。しかし、eujindole 類のようにジテルペン部がインドール環の 3 位、4 位と結合し、環化したインドールジテルペンは、*Petromyces muricatus* から分離された petromindole (54)³⁹⁾の一例のみであり、希少な骨格の化合物であった。

生物活性スクリーニングとして、真在性真菌症の起因菌の一つ *A. fumigatus* に対する抗真菌活性を行った。化学スクリーニングに用いた 22 菌株のうち 4 菌株 (IFM 52259, IFM 54704, IFM 58214, IFM 60197)に抗真菌活性が認められ

た。これまでに *E. javanicum* から単離された抗真菌活性物質として compactin ラクトン開環体 (33) が報告されている。今回、抗真菌活性の認められた 4 菌株の代謝産物中には、33 が確認されず、生理活性物質の多様な生産性が期待された。そこで、活性を示すエキスを生産した 4 菌株について、それらの活性本体の分離を試みた。しかし、IFM 60197 株と IFM 52259 株の 2 菌株については、活性本体の分離の過程で活性の大きな低下が起こるとともに、菌株の培養を繰り返した際に活性本体の生産能が消失し、活性物質の分離に至らなかった。

E. javanicum IFM 58214 株の抗真菌活性は、本体分離の際に spiculisporic acid (34) と挙動を共にしていたが、再結晶で精製された 34 は活性を示さなかった。活性本体は、炭酸水素ナトリウム水溶液で水層へ転溶し、酸性水溶液でエーテル層に転溶することからカルボキシル基を有する酸性化合物であると推定された。そこで、活性を示す分画について CH_2N_2 で処理し、カルボン酸を有する化合物をメチルエステル化し、得られたメチルエステルを分離後、加水分解して活性本体を特定することとした。 CH_2N_2 処理で得られたメチルエステル誘導体混合物の分離・精製を行い、メチルエステル体を単離した。得られた各エステルを加水分解し、活性分画中に 34、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35) および 2-(2-carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid (40) の存在が明らかになった。これらをそれぞれ *A. fumigatus* に対する抗真菌活性試験を行った結果、35 が 6.25 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で直径 13mm の阻止円を形成したことから、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35) が本菌 IFM 58214 株の活性本体であると決定した。活性本体探索の過程で得られた化合物について同様に抗真菌活性を調べたところ、35 のメチルエステル体である 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride monomethyl ester (37) が 50 $\mu\text{g}/\text{disc}$ と弱いながら抗真菌活性を示した。これらのことから、活性発現に無水マレイン酸の部分構造が関与し、遊離カルボン酸の存在が活性の強度に影響することが考えられた。Spiculisporic acid (34) はマイコトキシンとして知られている²⁴⁾。また、その関連化合物とともに微生物由来の界面活性剤であるバイオ・サーファクタントとしても知られており、界面化学的特性の研究や、安定剤、分散剤、化粧品添加剤などへの応用の研究がなされている⁴⁰⁾。今回の研究により、spiculisporic acid 関連化合物の抗真菌活性が初めて明らかになった。これまでに、無水マレイン酸の

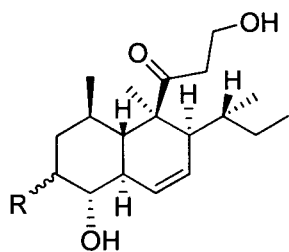
部分構造を有する抗真菌活性物質として、nonadride 類の scytalidin (55)⁴¹⁾、deoxyscytalidin (56)⁴²⁾および dihydroepihevadride (57)⁴³⁾が天然から得られ、報告されている。これらと合わせて作用機序の詳細な解析を進めることにより、真在性真菌症治療薬のリード化合物開発に寄与できると考えられた。

E. javanicum IFM 54704 株の代謝産物中から化学スクリーニング時に単離された化合物は、抗真菌活性を示さなかった。改めて培養を行い、活性本体の分離を試みた際、活性本体に UV 吸収が無いことから挙動の確認を行う簡便な方法を検討した。活性本体は、ニンヒドリン試薬に対し陰性であったが、TLC 上で酸を噴霧して加熱後、ニンヒドリン試薬を噴霧・加熱することで陽性となることが明らかになった。この検出方法を指標に、本菌株の活性本体である新規化合物 eujavanicin A (42)を単離した。化合物 42 は、FAB-MS 測定により分子式を $C_{55}H_{93}N_9O_{15}$ と決定された。IR スペクトルからエステルが存在が明らかになり、ニンヒドリン試薬に対する反応性から環状デプシペプチドと予想された。化合物 42 を CH_2N_2 で処理すると dimethyl ester (43)が得られることから、42 は二つのカルボン酸を有することが明らかとなった。各種 NMR データの解析から、42 の平面構造を九つのアミノ酸残基と一つの乳酸残基で構成された構造と決定した。また、43 に対しメタノリシスを行い、環状エステル部分を開環させた trimethyl ester (44)に導き、FAB-MS 測定を行った。得られた 44 の MS フラグメンテーションは、決定した 42 のアミノ酸配列を支持する結果を示した。化合物 42 の絶対構造を決定するために、42 について 6mol/L 塩酸を用いたアミノ酸分解を行い、構成する各残基の絶対配置を検討した。化合物 42 の加水分解物について、キラルカラムを用いた HPLC 分析により乳酸を D 体であると決定し、また Marfey 法により全てのアミノ酸が L 体であることを明らかにした。これらのことから、eujavanicin A (42)の絶対構造を決定した。*A. fumigatus* に対する抗真菌活性試験を行ったところ、42 は 6.25 μ g/disc で強い抗真菌活性を示したが、43 では活性が消失し、42 の *A. fumigatus* に対する抗真菌活性の発現には遊離のカルボン酸の存在が必須であることが分かった。さらに、42 は他の病原微生物 (*A. niger*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* および *Salmonella enteritidis*) に対する活性を示さず、*A. fumigatus* に対して特異的に抗真菌活性を示す化合物

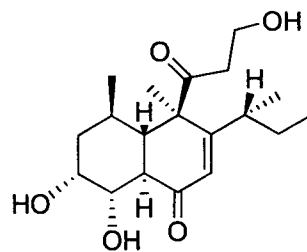
であると明らかになった。既存の薬剤に対する薬剤耐性菌の出現に備え、多様な抗菌スペクトルを有する抗真菌薬の開発が必要である。今後、化合物 42 の選択的な活性発現の機構を解明することによりリード化合物の開発に有益な知見となるものと考えられた。

化学スクリーニングにより、*E. javanicum* から類似構造の化合物が様々な生物活性を有する新規化合物 eujavanicol 類 (12 - 14)、javanicunine 類 (15, 16) および eujindole 類 (27 - 30) が得られ、それらの生産性は菌株により違いが認められた。生物活性スクリーニングの結果、*E. javanicum* からこれまでに報告されている 33 とは異なる抗真菌活性物質、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35) および eujavanicin A (42) をそれぞれ別の *E. javanicum* 菌株から単離した。また、今回 *A. fumigatus* に対する抗真菌活性の認められた *E. javanicum* IFM 52259 株、IFM 60196 株のいずれの菌株の代謝産物中においても抗真菌活性物質 33、35 および 42 は確認されず、さらに異なる抗真菌活性物質の生産が予想された。*Emericella sp.* から単離された emestrin (58)⁴⁴⁾ や、*Eupenicillium brefeldianum* から単離された brefeldin A (59)⁴⁵⁾ のように、同一菌種の複数の菌株から同じ生理活性物質が確認されるものが存在する。一方、日本で頻繁に分離される *E. javanicum* は、菌株によって、同じ生理活性を示す構造の大きく異なる化合物を産生していることが明らかになった。このことは、リード化合物探索源として有益な特徴と考えられた。

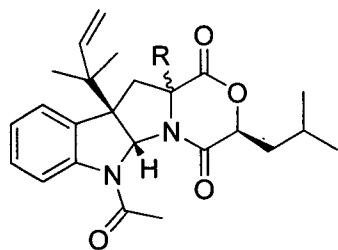
以上のことから、日本で頻繁に分離される菌類がリード化合物探索源としての可能性を秘めた有用な潜在的国内資源であると考えられた。



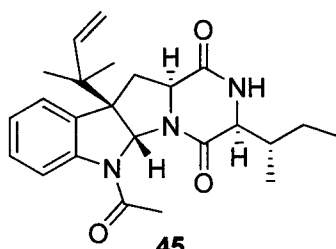
12 : R = α -OH
 13 : R = β -OH



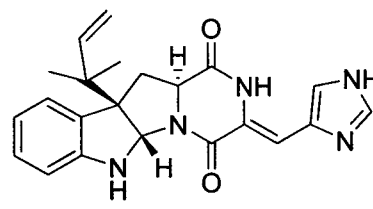
14



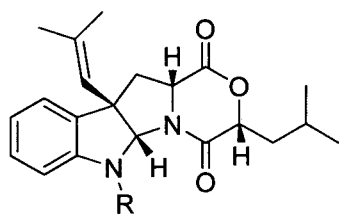
15 : R = α -H
 16 : R = β -OH



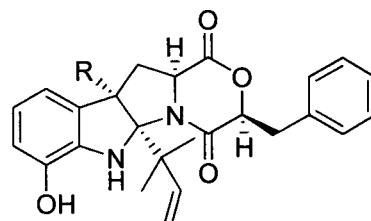
45



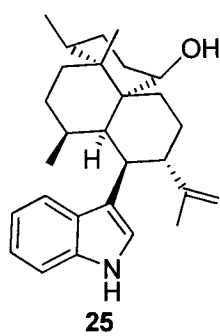
46



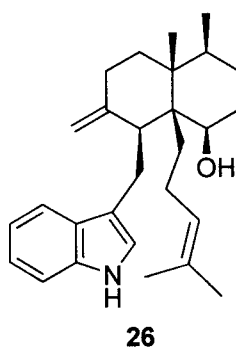
47 : R = H
 48 : R = CHO



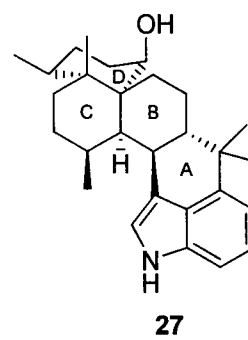
49 : R = OH
 50 : R = OAc



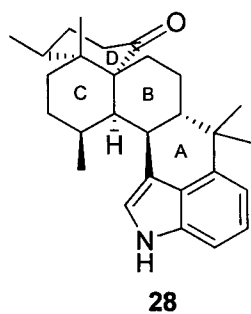
25



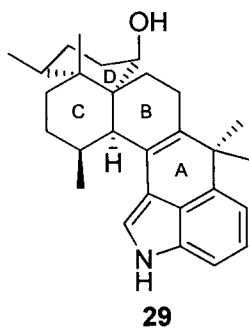
26



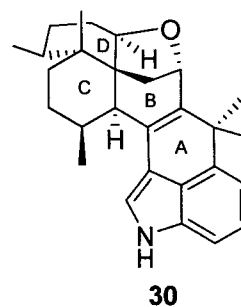
27



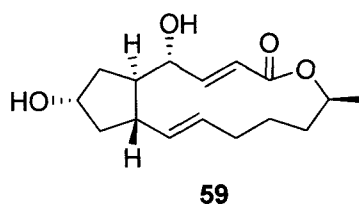
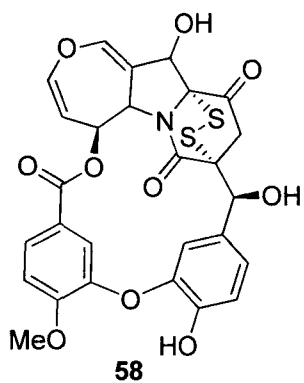
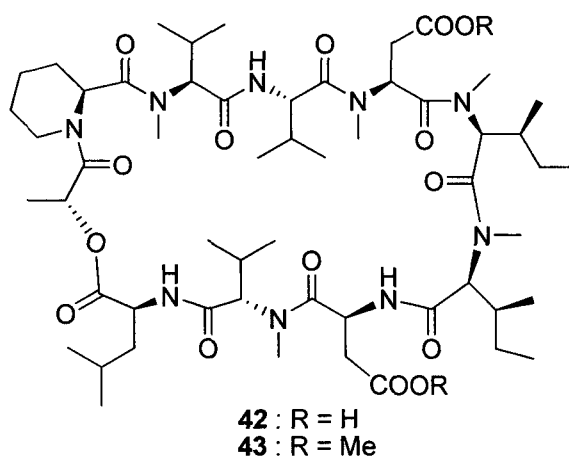
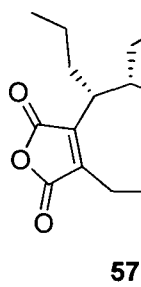
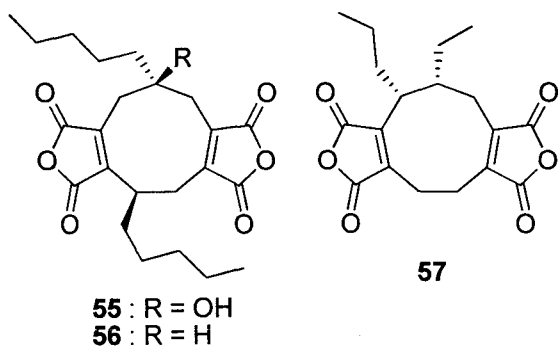
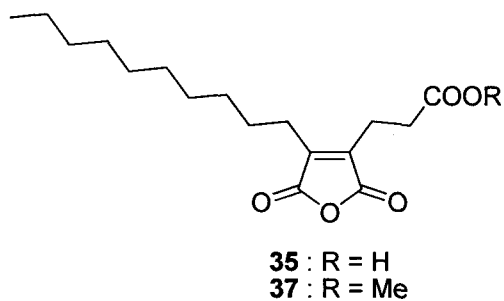
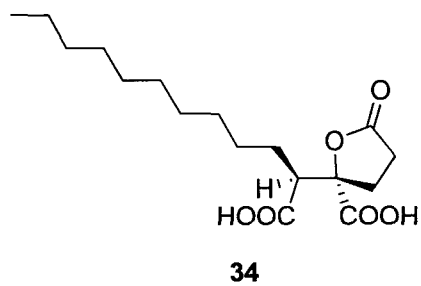
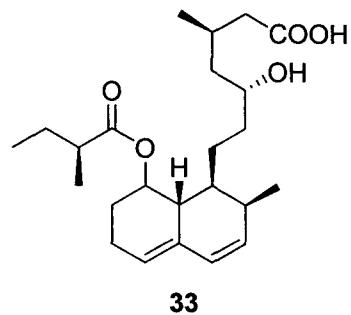
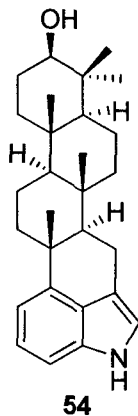
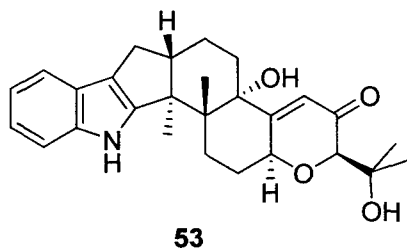
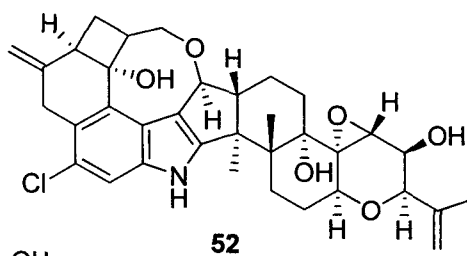
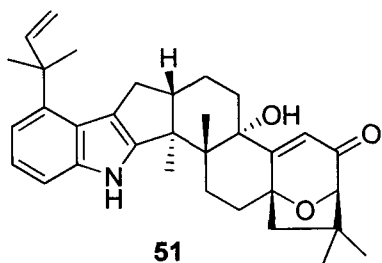
28



29



30



実験の部

融点は柳本微量融点測定装置で測定し、値は全て未補正である。旋光度は日本分光 P-1020 旋光光度計で測定し、円二色性スペクトルは日本分光 J-820 円二色性分散計で測定した。IR スペクトルは日本分光 FT/IR-4100 フーリエ変換赤外分光光度計で、また UV スペクトルは日本分光 V-560 分光光度計で測定した。EI-MS および FAB-MS スペクトルは日本電子 JMS-MS700V 質量分析計で測定した。¹H および ¹³C NMR スペクトルは日本電子 JNM-ECA500 あるいは JNM-AL300 核磁気共鳴装置で測定し、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。また、シグナルは、一重線 (singlet) を s、二重線 (doublet) を d、三重線 (triplet) を t、四重線 (quartet) を q、多重線 (multiplet) を m、幅の広いシグナル (broad signal) を br、他のシグナルと重なり合ったもの (overlapping signal) を ov と表記した。

カラムクロマトグラフィーは、固定相に Merck Silica gel 60 あるいはダイヤイオン HP21 を用いた。LPLC は、東京理化機器 SP-12 ポンプ、シリカゲル充填カラム (ULTRAPACK SI-40A YAMAZEN) を用いた。HPLC は、日本分光 PU-980 ポンプと検出器として島村 YRD-883 示差屈折率検出器を接続したもの、島津 LC-10AD ポンプと島村 YRU-883 示差屈折率検出器を接続したもの又は日本分光 PU-2089 ポンプと日本分光 UV-2075UV 検出器を接続したものに、日本分光 CO-2067 カラムオープンを組み合わせて用いた。

TLC は、Merck Silica gel 60 F254 あるいは MACHEREY-NAGEL chiralplate を用い、紫外線 (254, 365nm) 照射下における吸収および蛍光、またはニンヒドリン試薬、リン・モリブデン酸試薬あるいは van Urk 試薬の噴霧・加熱による呈色により検出した。Depsipeptide は、6mol/L HCl に浸した後、ホットプレートで加熱し、1mol/L KH₂PO₄ 溶液で処理後にニンヒドリン試薬を噴霧による呈色で検出した。

反応に用いた CH₂N₂ は、ジアゾメタン調製用試薬の *p*-toluenesulfonyl-*N*-methyl-*N*-nitrosoamide から調製し、CH₂N₂ のエーテル溶液として用いた。

Eupenicillium javanicum の各菌株の培養

E. javanicum の各菌株の培養は、PDA 平板培地にて 25°C、21 日間培養した種菌を作製した後に行った。米培地は、Roux flask 1 本あたり米 (約 160g) を一時間水に浸したものの 250g を分注し、120°C で 30 分間滅菌したものをを用いた。

第一章に関する実験

Eupenicillium javanicum IFM 54704 株の代謝産物の分離

千葉県土壌より分離された *E. javanicum* IFM 54704 株を米培地 (5kg) で 25°C、21 日間培養した。CHCl₃-MeOH (1:1) で抽出、濃縮を行った後、水と AcOEt で液液分配を行った。AcOEt 層を分離後、濃縮して AcOEt エキス (23g) を得た。AcOEt エキスをシリカゲル (400 g) を用いたカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃ : EtOH = 1:0, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:1 の順に溶出した。それぞれの画分を濃縮し、六つの分画 CHCl₃ (10.5g)、CHCl₃ - EtOH (20:1) (3.8g)、CHCl₃ - EtOH (10:1) (6.2g)、CHCl₃ - EtOH (5:1) (0.5 g)、CHCl₃ - EtOH (1:1) (0.8 g)、EtOH (0.5 g) を得た。三番目の分画 (CHCl₃ : EtOH = 10:1) を、シリカゲルを担体とした順相の LPLC に付し、cyclohexane : acetone = 3:1 により溶出して、粗精製三分画を得た。粗精製第一分画について HPLC (SiO₂) を用いて、cyclohexane : acetone = 2:1 を移動相に使用し、eujavanicol A (12) (435mg) を単離した。また、第二分画 CHCl₃ : acetone = 3:1 の移動相にした HPLC で精製し、eujavanicol C (14) (11.6mg) および mevalonolactone (9) (7.7mg) を得た。さらに、その第三分画を HPLC (SiO₂, benzene : acetone = 5:2) で精製し、eujavanicol B (13) (11mg) を分離した。また、上記カラムクロマトグラフィーの CHCl₃ - EtOH = 10:1 溶出分画の低極性部分に、TLC においてリン・モリブデン酸試液によりオレンジ色に呈色する化合物が認められたので、本分画を順相の LPLC (benzene : acetone = 6:1) の後に、移動相に cyclohexane : acetone = 10:1 を用いた HPLC (SiO₂) に付すことにより、*p*-hydroxybenzoic acid (10) (7mg) および *p*-hydroxyphenylacetic acid (11) (11 mg) とともに javanicunine A (15) (35mg) および javanicunine B (16) (3 mg) を得た。

Eujavanicol A (12)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = +49.9^{\circ}$ ($c = 1.33$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 325.2375 ($\text{M}+\text{H}^+$, 325.2379 for $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_4$). IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3355 (OH), 1697 (C=O). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 1 に示した。

Eujavanicol B (13)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +28.0^{\circ}$ ($c = 0.33$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 325.2345 ($\text{M}+\text{H}^+$, 325.2379 for $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_4$). IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3356 (OH), 1698 (CO). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 1 に示した。

Eujavanicol C (14)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +52.3^{\circ}$ ($c = 0.37$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 339.2176 ($\text{M}+\text{H}^+$, 339.2171 for $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_5$). UV (MeOH) $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$ ($\log \epsilon$): 244 (4.01). IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3427, 1703, 1646. ^1H NMR (acetone- d_6) δ : 5.94 (1H, br s, H-3), 3.73 (1H, m, H-6), 3.68 (1H, m, H-5), 3.64 (2H, m, H-11), 2.85 (1H, m, H-10), 2.56 (1H, m, H-10), 2.45 (1H, dd, $J = 12.9, 9.5\text{Hz}$, H-4a), 2.29 (1H, m, H-8a), 1.99 (1H, m, H-8), 1.62 (1H, dt, $J = 13.8, 3.4\text{Hz}$, H-7eq), 1.57 (1H, m, H-1'), 1.36 (2H, m, H-2'), 1.30 (1H, m, H-7ax), 1.22 (3H, br s, 1-Me), 0.97 (3H, d, $J = 6.3\text{Hz}$, 1'-Me), 0.75 (3H, m, H-3'), 0.63 (3H, br d, $J = 4.6\text{Hz}$, 8-Me). ^{13}C NMR (acetone- d_6) δ : 212.0 (C-9), 204.1 (C-4), 174.1 (C-2), 126.3 (C-3), 73.2 (C-6), 68.5 (C-5), 60.1 (C-1), 57.7 (C-11), 45.7 (C-8a or C-4a), 45.6 (C-4a or C-8a), 43.2 (C-10), 40.1 (C-7), 37.6 (C-1'), 30.7 (C-2'), 28.5 (C-8), 22.9 (1'-Me), 19.1 (8-Me), 14.8 (1-Me), 12.5 (C-3'). CDCl_3 で測定した ^1H および ^{13}C NMR データは、本論中 Table 1 に示した。

Javanicunine A (15)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -152.3^{\circ}$ ($c = 1.0$, CH_2Cl_2). EI-MS m/z (%): 410 (M^+ , 18), 368 (29), 299 (base peak), 157 (27), 130 (19). HREI-MS m/z : 410.1094 (M^+ , 410.1103 for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4$). UV (CH_2Cl_2) $\lambda_{\text{max}} \text{ nm}$ ($\log \epsilon$): 247 (3.95), 278 (3.14), 285 (3.09). IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 1760(COO), 1670 (CO). ^1H お

よび ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 2 に示した。

Javanicunine B (16)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -118.5^\circ$ ($c = 0.20$, CH_2Cl_2). HRFAB-MS m/z : 427.2260 ($\text{M}+\text{H}^+$, 427.2233 for $\text{C}_{24}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_5$). UV (MeOH) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 246 (3.87), 278 (3.13), 285 (3.09). IR ν_{max} cm^{-1} : 1760(COO), 1700 (CO). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 2 に示した。

Eujavanicol A (12)のアセチル化

Eujavanicol A (12) (88mg)をピリジン (1mL)、無水酢酸 (1mL)の混液に溶解し、室温で一晩反応させた。反応混合物に氷水を加え、エーテルで抽出した。シリカゲルを担体とした順相の LPLC で benzene : acetone = 20:1 を移動相に用いて、精製し、triacetylejavanicol A (17) (40mg)を得た。

Triacetylejavanicol A (17)の性状

HRFAB-MS m/z : 451.2688 ($\text{M}+\text{H}^+$, 451.2696 for $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{O}_7$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 5.70 (1H, ddd, $J = 10.6, 4.0, 2.9\text{Hz}$, H-3), 5.65 (1H, br d, $J = 10.6\text{Hz}$, H-4), 5.39 (1H, ddd, $J = 2.9, 2.9, 2.9\text{Hz}$, H-6), 4.70 (1H, dd, $J = 11.7, 2.9\text{Hz}$, H-5), 4.37 (2H, m, H-11), 2.91 (1H, dt, $J = 18.9, 5.7\text{Hz}$, H-10), 2.82 (1H, dt, $J = 18.9, 6.3\text{Hz}$, H-10), 2.36 (1H, br t, $J = 11.7\text{Hz}$, H-4a), 2.10 (3H, s, Me), 2.09 (1H, m, H-8a), 2.04 (3H, s, Me), 2.02 (3H, s, Me), 1.96 (1H, m, H-2), 1.75 (1H, dt, $J = 13.7, 2.9\text{Hz}$, H-7 $_{eq}$), 1.70 (1H, m, H-8), 1.60 (1H, ddd, $J = 13.7, 11.5, 2.9\text{Hz}$, H-7 $_{ax}$), 1.46 (1H, m, H-2'), 1.28 (3H, br s, 1-Me), 1.15 (1H, m, H-1'), 0.92 (3H, d, $J = 6.9\text{Hz}$, 1'-Me), 0.75 (3H, m, H-3'), 0.72 (1H, m, H-2'), 0.59 (3H, d, $J = 6.9\text{Hz}$, 8-Me). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 209.9 (C-9), 170.8 (OCO), 170.3 (OCO), 170.3 (OCO), 124.6 (C-3 or C-4), 124.41 (C-4 or C-3), 75.3 (C-5), 69.0 (C-6), 59.0 (C-11), 52.1 (C-1), 52.0 (C-2), 43.3 (C-8a), 38.9 (C-7), 38.0 (C-10), 37.0 (C-4a), 36.7 (C-1'), 31.3 (C-8), 24.3 (C-2'), 21.9 (8-Me), 21.1 (OCOMe), 20.8 (OCOMe), 20.7 (OCOMe), 19.1 (1'-Me or 1-Me), 19.0 (1-Me or 1'-Me), 12.3 (C-3').

Eujavanicol A (12)の *p*-ブロモベンゾイル化

Eujavanicol A (12) (3mg)をピリジン (0.3mL)に溶解し、*p*-bromobenzoyl chloride (50mg)を加え、室温で 12 時間攪拌した。氷水を加えた後、AcOEt と 0.5mol/L HCl を加えて液液分配をした。有機層を分離後、NaHCO₃で洗浄して得られた有機層を Na₂SO₄で乾燥した後に濃縮し、シリカゲルを担体とした順相の HPLC で cyclohexane : acetone = 5:1 の移動相を使用して精製を行い、tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol A (18) (2.5mg)を得た。

Tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol A (18)の性状

¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.89 - 7.47 (12H, m), 5.74 - 5.68 (3H, m, H-4, H-5, H-6), 5.07 (1H, dd, J = 11.5, 3.5Hz, H-3), 4.74 - 4.59 (2H, m, H-11), 3.14 - 2.92 (2H, m, H-10), 2.63 (1H, t, J = 9.3Hz, H-4a), 2.27 (1H, t, J = 9.3Hz, H-8a), 1.99 (2H, m, H-2, H-7_{eq}), 1.81 (2H, m, H-7_{ax}, H-8), 1.52 (1H, m, H-2'), 1.38 (3H, s, 1-Me), 1.19 (1H, m, H-1'), 0.86 (3H, d, J = 6.8Hz, 1'-Me), 0.72 (4H, m, H-2', H-3'), 0.68 (3H, d, J = 6.3Hz, 8-Me). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm): -49.0 (253), +15.6 (234).

Eujavanicol B (13)の *p*-ブロモベンゾイル化

Eujavanicol B (13) (3mg)をピリジン (0.3mL)に溶解し、*p*-bromobenzoyl chloride (50mg)を加え、室温で 12 時間攪拌した。氷水を加えた後、AcOEt と 0.5 mol/L HCl を加えて液液分配をした。有機層を分離後、NaHCO₃で洗浄して得られた有機層を Na₂SO₄で乾燥した後に濃縮し、シリカゲルを担体とした順相の HPLC で cyclohexane : acetone = 5:1 の移動相を使用して精製を行い、tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol B (19) (3.4mg)を得た。

Tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol B (19)の性状

¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.88 - 7.48 (12H, m), 5.69 (1H, ddd, J = 10.3, 4.6, 2.9Hz, H-3), 5.59 (1H, br d, J = 10.3Hz, H-4), 5.32 - 5.23 (2H, m, H-5, H-6), 4.71 - 4.59 (2H, m, H-11), 3.08 - 2.95 (2H, m, H-10), 2.36 - 1.63 (7H, m, H-2, H-2', H-4a, H-7, H-8, H-8a), 1.30 (3H, s, 1-Me), 1.22 (1H, m, H-1'), 0.86 (3H, d, J =

6.3Hz, 1'-Me), 0.73 (3H, d, $J = 6.3\text{Hz}$, H-3'), 0.72 (1H, m, H-2'), 0.71 (3H, br d, $J = 5.2\text{Hz}$, 8-Me). CD (CH_2Cl_2) $\Delta\epsilon$ (nm) : +20.5 (254), -15.4 (238).

Eujavanicol C (14)の *p*-プロモベンゾイル化

Eujavanicol C (14) (3mg)をピリジン (0.3mL)で溶解し、*p*-bromobenzoyl chloride (50mg)を加え、室温で12時間攪拌した。氷水を加えた後、AcOEtと0.5 mol/L HClを加えて液液分配をした。有機層を分離後、 NaHCO_3 で洗浄して得られた有機層を Na_2SO_4 で乾燥した後に濃縮し、シリカゲルを担体とした順相のHPLCでcyclohexane : acetone = 5:1の移動相を使用して精製を行い、tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol C (20) (3.1mg)を得た。

Tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol C (20)の性状

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.87 - 7.48 (12H, m), 6.08 (1H, br s, H-3), 5.68 (1H, br s, H-6), 5.54 (1H, dd, $J = 10.4, 3.5\text{Hz}$, H-5), 4.65 (1H, dt, $J = 11.5, 7.2\text{Hz}$, H-11), 4.46 (1H, m, H-11), 3.17 (1H, dt, $J = 18.3, 7.2\text{Hz}$, H-10), 3.05 (1H, m, H-10), 2.91 (1H, m, H-4a), 2.42 (1H, m, H-8 or H-8a), 2.23 (1H, m, H-8a or H-8), 2.08 (1H, dt, $J = 14.3, 3.5\text{Hz}$, H-7 $_{eq}$), 1.78 (1H, m, H-1'), 1.63 (1H, br d, $J = 14.3\text{Hz}$, H-7 $_{ax}$), 1.43 (3H, s, 1-Me), 1.38 (1H, m, H-2'), 1.12 (3H, d, $J = 6.9\text{Hz}$, 1'-Me), 0.87 (7H, m, 8-Me, H-3', H-2').

Tri-*p*-bromobenzoyleujavanicol C (20)の還元

化合物 20 (2mg)をEtOH (3mL)に溶解し、冷やしながら NaBH_4 (10mg)を加え、5分間室温で攪拌した。少量のacetoneを加えた後、2mol/L HClを加えて残存する NaBH_4 を分解した後、水と CH_2Cl_2 を加えた。有機層を抽出し、 Na_2SO_4 で乾燥後に濃縮し、HPLC (SiO_2)でcyclohexane : acetone = 4:1の移動相を使用し、精製を行い、20の還元体 (21) (0.8mg)を得た。

化合物 20 の還元体(21)の性状

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.93 - 7.45 (12H, m), 5.93 (1H, d, $J = 9.9\text{Hz}$, H-3), 5.66 (1H, m, H-6), 5.43 (1H, dd, $J = 10.9, 2.9\text{Hz}$, H-5), 4.65 (1H, m, H-11), 4.44 (1H,

m, H-11), 3.98 (1H, m, H-4), 3.25 (1H, m, H-10), 3.08 (1H, m, H-10), 2.45 (1H, br t, $J = 11.5\text{Hz}$, H-8a), 2.18 (1H, m, H-7 eq), 2.16 - 2.04 (3H, m, H-4a, H-7 ax , H-8), 1.64 - 1.59 (2H, m, H-1', H-2'), 1.43 (3H, s, 1-Me), 1.32 (1H, m, H-2'), 1.00 (3H, d, $J = 6.3\text{Hz}$, 1'-Me), 0.86 (6H, m, H-3', 8-Me). CD (CH_2Cl_2) $\Delta\epsilon$ (nm) : -30.0 (256), +14.2 (239).

Javanicunine A (15)の酸加水分解および tryptophan の同定

Javanicunine (A) (15) (3mg)に、6 mol/L HCl (0.5mL)を加え、減圧下アルゴン置換をし、115°Cで22時間反応させた。0.5mol/L Na_2CO_3 で中和し、乾燥、濃縮した。得られた加水分解物について、キラルプレート用いて、MeOH:H₂O:MeCN = 1:1:4により展開し、D-およびL-tryptophanの標準品と共にTLC分析を行った。

Eupenicillium javanicum IFM 59075 株の代謝産物の分離

千葉県土壌より分離された *E. javanicum* IFM 59075 株を米培地 (2.5kg)で、25°C、21日間培養した。CHCl₃ - MeOH (1:1)で抽出後に濃縮し、水と AcOEt で液液分配を行い、水可溶部を除き、有機層を濃縮して AcOEt エキス (13.4g)を得た。さらに、MeCN と hexane を加え、液液分配を行い、脂肪酸等の低極性化合物を多く含む hexane 可溶部分を除いた。MeCN 可溶部を濃縮して得たエキス (3.6g)について、シリカゲル (80g)を用いてカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃ - acetone の混合比を変化させ順次溶出した。それらを TLC に付し、van Urk 試薬を噴霧したところ CHCl₃ : acetone = 20:1 および 9:1 で溶出した分画中に青又は黄色に呈色するスポットが認められた。固定相にシリカゲルを用いた LPLC に cyclohexane : AcOEt = 8:1 を移動相に使用し、van Urk 試薬陽性化合物の精製を行ったところ、2,3-anhydromevalonic acid δ -lactone (23) (6 mg)が得られ、LPLC で cyclohexane : acetone = 12:1 を移動相として精製を行った際に、ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one (24) (25mg)が得られた。さらに、シリカゲルカラムを用いた HPLC で cyclohexane : AcOEt = 6:1 の移動相を用いて分離を行い、10,23-dihydro-24,25-dehydroaflavinine (25) (2mg)および nominine (26) (2mg)を得た。さらに、cyclohexane : acetone = 12:1 の移動相を用いて

HPLC (SiO₂)に付すことにより、8,21-dehydro-17,20-epoxyeujindole (30) (4mg)、17-hydroxyeujindole (27) (35mg)、17-oxoeujindole (28) (7mg)および 8,21-dehydro-17-hydroxyeujindole (29) (2mg)を得た。

17-Hydroxyeujindole (27)の性状

Colorless needles. mp 129.3 - 130.2°C (from hexane-acetone). $[\alpha]_D^{22} = -43.7^\circ$ ($c = 0.40$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 404.2925 ($M-H^+$, 404.2953 for C₂₈H₃₈NO). UV (MeOH) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 226 (4.51), 283 (3.73), 293 (3.66). IR ν_{max} cm⁻¹: 3480 (NH), 3287 (OH). ¹H NMR (acetone-*d*₆) δ : 9.75 (NH), 7.08 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7), 6.99 (1H, m, H-2), 6.98 (1H, m, H-6), 6.87 (1H, d, $J = 6.9$ Hz, H-5), 4.59 (1H, br s, H-17), 3.42 (1H, dd, $J = 12.0, 5.2$ Hz, H-8), 2.85 (1H, m, H-9), 2.78 (1H, m, H-10), 2.29 (1H, m, H-19*eq*), 2.27 (1H, m, H-14), 2.24 (1H, m, H-21), 2.02 (1H, m, H-11*ax*), 1.94 (1H, m, H-16*ax*), 1.81 (1H, ddd, $J = 15.1, 12.6, 3.2$ Hz, H-15*ax*), 1.8 - 1.7 (2H, m, H-20), 1.67 (1H, m, H-19*ax*), 1.59 (1H, m, H-16*eq*), 1.55 (1H, td, $J = 14.3, 2.8$ Hz, H-12*ax*), 1.39 (3H, s, H-24), 1.20 (1H, m, H-15*eq*), 1.16 (1H, dt, $J = 14.3, 3.4$ Hz, H-12*eq*), 1.04 (1H, br d, $J = 13.1$ Hz, H-11*eq*), 1.00 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-23), 0.81 (3H, d, $J = 7.4$ Hz, H-27), 0.79 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, H-25). ¹³C NMR (acetone-*d*₆) δ : 142.5(C-4), 135.3(C-7a), 126.8 (C-3a), 122.7 (C-6), 118.1 (C-2), 115.3 (C-3), 112.3 (C-5), 108.8 (C-7), 68.3 (C-17), 44.6 (C-21), 44.3 (C-18), 39.9 (C-13), 38.3 (C-22), 37.2 (C-9), 33.8 (C-8), 32.0 (C-14), 30.6 (C-16), 30.0 (C-10), 29.4 (C-11), 28.7 (C-12), 26.4 (C-15), 26.1 (C-19), 25.2 (C-24), 24.5 (C-23), 23.1 (C-27), 21.6 (C-20), 18.8 (C-26), 16.2 (C-25). NOESY data (H \leftrightarrow H#) H-14 \leftrightarrow H-9, H-16*ax*; H-21 \leftrightarrow H-19*ax*, H-24, H-27. その他の NOESY スペクトルデータは CDCl₃で測定したものと同様であった。CDCl₃で測定した ¹H および ¹³C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 3 に示した。

17-Oxoeujindole (28)の性状

Colorless amorphous solid. $[\alpha]_D^{22} = -28.7^\circ$ ($c = 0.40$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 404.2930 ($M+H^+$, 404.2953 for C₂₈H₃₈NO). UV (MeOH) λ_{max} nm ($\log \epsilon$):

225 (4.51), 282 (3.83), 292 (3.76). IR ν_{\max} cm^{-1} : 3406 (NH), 1683 (CO). CD (MeOH) $\Delta\epsilon$ (nm) = -1.4 (292). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 3 に示した。

8,21-Dehydro-17-hydroxyeujindole (29)の性状

Colorless microcrystal. mp 211.0 - 211.8°C (from cyclohexane). $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -81^\circ$ ($c = 0.07$, CH_2Cl_2). UV (MeOH) λ_{\max} nm ($\log \epsilon$): 239 (4.19), 276 (3.86), 297 (3.81), 314 (sh 3.73). IR ν_{\max} cm^{-1} : 3499 (NH), 3239 (OH), 1444, 749. HRFAB-MS m/z : 404.2918 ($\text{M}+\text{H}^+$, 404.2953 for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{NO}$). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 4 に示した。

8,21-Dehydro-17,20-epoxyeujindole (30)の性状

Colorless leaves. mp (dec.) 257.3 - 258.3°C (from acetone). $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -332^\circ$ ($c = 0.15$, CH_2Cl_2). HRFAB-MS m/z : 402.2809 ($\text{M}+\text{H}^+$, 402.2797 for $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{NO}$). UV (MeOH) λ_{\max} nm ($\log \epsilon$): 234 (4.32), 278 (3.99), 298 (4.02), 308 (3.95), 317 (sh 3.84). IR ν_{\max} cm^{-1} : 3228 (NH). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 4 に示した。

第二章に関する実験

抗菌活性試験

抗菌活性はペーパーディスク法を用いて測定した。試験菌は、*Aspergillus fumigatus* IFM 41362 株、*A. niger* IFM 41398 株、*Candida albicans* ATCC 40009 株、*Cryptococcus neoformans* ATCC 90122 株、*Staphylococcus aureus* MBRC 12732 株、*Bacillus subtilis* NBRC 3134 株、*Escherichia coli* NBRC 14237 株、*Salmonella enteritidis* NBRC 3313 株を用いた。活性試験用培地は、試験菌を滅菌水に懸濁し、温時の PDA 培地に混釈後、約 10mL ずつ滅菌済みシャーレ (90mm x 20mm) に分注して作製した。国内土壌より分離された *E. javanicum* 22 菌株は、それぞれ米培地 (40g) で 25°C、21 日間培養した。 CHCl_3 - MeOH (1:1) で抽出、濃縮を行った後、水と AcOEt で液液分配を行った。AcOEt

層を分離後、濃縮して AcOEt エキスを作製した。各エキスは 5mg/disc、各化合物は適当な濃度に調整し、ペーパーディスク(直径 8mm)に染み込ませ、乾燥させた。乾燥させたペーパーディスクを活性試験用培地上に置き、25°C で培養した。試験の判定は、糸状菌では 48・72 時間後、酵母では 24・48 時間後、細菌については 16・24 時間後に阻止円の形成の有無および阻止円の直径 (mm)を測定した。酸性条件下の活性試験は乾燥させたペーパーディスクに 0.1mol/L HCl 15 μ L を添加して行い、塩基性条件下の活性試験は乾燥させたペーパーディスクに 0.1mol/L NaOH 15 μ L を添加したものを用いて行った。

***Eupenicillium javanicum* IFM 58214 株の活性成分の分離**

E. javanicum IFM 58214 株を米培地 (2.5kg)で 25°C、21 日間培養した。Roux flask 1 本あたり、CHCl₃・MeOH (1:1) (400mL)を加え、一晩静置し、抽出したところ液が二層に分離した。それぞれ別々に濃縮後、*A. fumigatus* に対する抗真菌活性を調べたところ、上層に活性が認められた。上層の溶媒を留去し、残渣に水と AcOEt を加えて、液液分配を行った。抗真菌活性は AcOEt 可溶部分に認められ、水可溶部は活性を示さなかった。AcOEt 可溶部分を濃縮して、エキスを作製し、ポリスチレン樹脂(ダイヤイオン HP21)を担体としたカラムクロマトグラフィーに付した。ポリスチレン樹脂は一晩 MeOH:H₂O = 6:4 に浸たものを用いて、MeOH:H₂O = 7:3, 8:2, 9:1, 10:0 の順に溶出させた。抗真菌活性は、MeOH:H₂O = 8:2 で溶出した分画に認められた。本分画を、シリカゲルを担体とした LPLC および HPLC を用いて行ったが、分離時に活性の大きな減弱が認められた。さらに ODS、HILIC カラムを用いた HPLC、移動相にギ酸やトリフルオロ酢酸 (TFA)の添加、リン酸緩衝液、イオンペア試薬を用いた分離を行ったが、いずれも抗真菌活性に大きな減弱が認められた。また、得られる活性の低下した分画から spiculisporic acid (34)の存在を確認した。MeOH:H₂O = 8:2 で溶出した分画から AcOEt により再結晶を行い、精製された 34 を得た。その再結晶母液から 34 を再結晶で出来る限り除き、66 μ g/disc で活性を示す活性分画を得た。酸性、塩基性条件下での活性を調べた結果、抗菌試験時に少量の希塩酸をディスクに添加することにより活性が増強した。また、AcOEt と中性・酸性 (HCl)・塩基性 (NaHCO₃)の水溶液による分配を行い、活性を調べたところ、

炭酸水素ナトリウム水溶液で水層へ転溶し、塩酸酸性水溶液でエーテルに転溶することから酸性化合物であると明らかとなったため、 CH_2N_2 によりメチルエステル化を行った。66 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で活性を示した活性分画の ^1H NMRスペクトルを測定し、分画中に2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)の特徴的なシグナルを確認した。

E. javanicum IFM 58214 株の活性分画の CH_2N_2 を用いたメチルエステル化

66 $\mu\text{g}/\text{disc}$ で活性を示した活性分画(220mg)に、 CH_2N_2 エーテル溶液を加え、25 $^\circ\text{C}$ で5分間反応させた。反応生成物について、シリカゲルカラムを用いたLPLCでtoluene : acetone = 18:1の移動相を使用して分離を行い、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride monomethyl ester (37) (10.1mg)、spiculisporic acid dimethyl ester (36) (154mg)および2-(2-carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid trimethyl ester (38) (55mg)を得た。同じ活性分画(45mg)について加熱後に CH_2N_2 エーテル溶液を用いてメチルエステル化を行い、同様にLPLCを用いて分離を行い、37 (7.9mg)、36 (10.2mg)および2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic acid trimethyl ester (39) (2.2mg)を得た。

2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride monomethyl ester (37)の性状

HRFAB-MS m/z : 325.2028 ($\text{M}+\text{H}^+$, 325.2015 for $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{O}_5$). IR ν_{max} cm^{-1} : 1841, 1766, 1739. UV (CH_2Cl_2) λ_{max} nm (log ϵ) : 256(3.89). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 3.69 (3H, s, 3'-COOMe), 2.77 (2H, dt, $J = 6.9, 1.5\text{Hz}$, H-1'), 2.69 (2H, dt, $J = 6.9, 1.5\text{Hz}$, H-2'), 2.50 (2H, t, $J = 7.8\text{Hz}$, H-1''), 1.57 (2H, m, H-2''), 1.32 (2H, m, H-3''), 1.30 (2H, m, H-9''), 1.26 (10H, br s, H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8''), 0.88 (3H, t, $J = 7.2\text{Hz}$, H-10''). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 172.0 (C-3'), 165.6 (C-4 or C-1), 165.5 (C-1 or C-4), 146.1 (C-3), 141.9 (C-2), 52.0 (3'-COOMe), 31.8 (C-8''), 31.1 (C-2'), 29.6 (C-7'' or C-5'' or C-6''), 29.5 (C-6'' or C-5'' or C-7''), 29.4 (C-5'' or C-6'' or C-7''), 29.3 (C-4'' or C-5''), 29.2 (C-3'' or C-4''), 27.9 (C-2''), 24.5 (C-1''), 22.7 (C-9''), 19.8 (C-1'), 14.1 (C-10'').

2-(2-Carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid trimethyl ester (38)の性状

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.82 (3H, s, 1-COOMe), 3.73 (3H, s, 4-COOMe), 3.67 (3H, s, 3'-COOMe), 3.63 (1H, s, 2-OH), 2.78 (1H, dd, $J = 3.4, 11.5\text{Hz}$, H-3), 2.48 (1H, m, H-2'), 2.19 (1H, m, H-1'), 2.15 (1H, m, H-2'), 1.97 (1H, m, H-1''), 1.85 (1H, m, H-1''), 1.37 (1H, m, H-1''), 1.30 (2H, m, H-9''), 1.29 (12H, br s, H-3'', H-4'', H-5'', H-6'', H-7'', H-8''), 1.22 (2H, m, H-2''), 0.88 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$, H-10''). $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3) δ : 174.5 (C-1), 174.2 (C-4), 173.5 (C-3'), 77.8 (C-2), 53.8 (C-3), 53.2 (1-COOMe), 52.0 (4-COOMe), 51.9 (3'-COOMe), 32.4 (C-1'), 32.0 (C-8''), 29.65 (C-7'' or C-5'' or C-6''), 29.62 (C-6'' or C-5'' or C-7''), 29.5 (C-5'' or C-6'' or C-7''), 29.4 (C-4'' or C-3''), 29.4 (C-3'' or C-4''), 28.7 (C-2''), 28.0 (C-1''), 27.9 (C-2''), 22.8 (C-9''), 14.2 (C-10'').

2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic acid trimethyl ester (39)の性状

HRFAB-MS m/z : 371.2445 ($\text{M}+\text{H}^+$, 371.2434 for $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{O}_6$). UV (CH_2Cl_2) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 226 (3.97). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.76 (3H, s), 3.75 (3H, s), 3.69 (3H, s), 2.67 (2H, brt, $J = 7.4\text{Hz}$, H-1'), 2.46 (2H, br t, $J = 7.4\text{Hz}$, H-2'), 2.37 (2H, br t, $J = 7.4\text{Hz}$, H-1''), 1.42 (2H, m), 1.31 (4H, m), 1.26 (10H, br s), 0.88 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$, H-10''). NOESY data (H \leftrightarrow H#) H-1' \leftrightarrow H-1''.

化合物 37、38、39 のアルカリ加水分解

活性分画のメチルエステル化により得られた 37、38 および 39 について、それぞれ 10% NaOH 水溶液中、60°C で 2 時間加熱した。反応後、2 mol/L HCl で中和し、水とエーテルを加え、液液分配を行い、エーテル層を濃縮した。それぞれ、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)、2-(2-carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid (40) および 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic acid (41) を得た。

2-(2-Carboxyethyl)-3-decyl-2-hydroxysuccinic acid (40)の性状

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD) δ : 2.74 (1H, dd, $J = 2.9, 10.9\text{Hz}$), 2.46 (1H, m), 2.15 (2H, m), 1.98 (1H, m), 1.87 (1H, m), 1.28 - 1.39 (17H, m), 0.89 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$).

^{13}C NMR (CD_3OD) δ : 176.9, 176.8, 176.7, 78.7, 54.6, 33.9, 33.1, 30.71, 30.66, 30.5, 30.5, 30.4, 29.8, 28.81, 28.79, 23.7, 14.5.

2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic acid (43)の性状

^1H NMR (CD_3OD) δ : 2.64 (2H, t, $J = 8.0\text{Hz}$), 2.50 (2H, t, $J = 8.0\text{Hz}$), 2.40 (2H, t, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.45 (1H, m), 1.28 - 1.38 (15H, m), 0.90 (3H, t, $J = 6.9\text{Hz}$).

化合物 34 から 2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)への誘導

化合物 34 (45mg)をナス型フラスコに入れ、266Pa で減圧下、オイルバス上で攪拌しながら 170°C で 2 時間加熱した。ヘキサンとエーテルの混合液から再結晶し、2-(2-carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35) (23mg)を得た。

2-(2-Carboxyethyl)-3-decylmaleic anhydride (35)の性状

FAB-MS m/z : 311 ($\text{M}+\text{H}^+$). UV (CH_2Cl_2) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 256 (3.79). IR ν_{max} cm^{-1} : 3441 - 2487, 1843, 1763, 1711. ^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.77 (4H, br s, H-1', H-2'), 2.50 (2H, t, $J = 7.5\text{Hz}$, H-1"), 1.57 (2H, quintet, $J = 7.5\text{Hz}$, H-2"), 1.32 (2H, m, H-3"), 1.31 (2H, m, H-9"), 1.26 (10H, br s, H-4", H-5", H-6", H-7", H-8"), 0.88 (3H, t, $J = 7.2\text{Hz}$, H-10"). ^{13}C NMR (CDCl_3) δ : 177.2 (C-3'), 165.6 (C-1), 165.4 (C-4), 146.3 (C-2), 141.4 (C-3), 31.8 (C-8"), 30.9 (C-2'), 29.6 (C-7" or C-5" or C-6"), 29.5 (C-6" or C-5" or C-7"), 29.4 (C-5" or C-6" or C-7"), 29.24 (C-4" or C-3"), 29.17 (C-3" or C-4"), 27.9 (C-1"), 24.6 (C-2"), 22.6 (C-9"), 19.5 (C-1'), 14.1 (C-10").

Eupenicillium javanicum IFM 54704 株の活性成分の分離

E. javanicum IFM 54704 株を米培地 (5.5kg)で 25°C、21 日間培養した。 CHCl_3 - MeOH (3:2)で抽出し濃縮後、水と AcOEt を加えて分配した。有機層を濃縮し、AcOEt エキス (53g)を得て、シリカゲル (800g)を用いたカラムクロマトグラフィーに付し、 CHCl_3 : EtOH = 1:0, 20:1, 10:1, 5:1, 1:1, 0:1 の混合比で順次溶出させ、それぞれを濃縮し、六分画した。得られた三番目の溶出分画 (CHCl_3 : EtOH = 10:1) (6.2g)と四番目に溶出した分画 (CHCl_3 : EtOH = 5:1) (0.5g)の

みに活性が濃縮されていた。両分画について、シリカゲルを用いた LPLC で CHCl_3 : acetone = 3:1 あるいは cyclohexane : acetone = 3:1 の移動相を使用して活性画分 (107mg) を得た。さらに、RI 検出器を用いた HPLC (SiO_2 , cyclohexane : acetone = 3:2) を用い精製を行ったが、二つのピークが認められた。これらを hexane - AcOEt (5:1) により再結晶を行い、無色結晶として eujavanicin A (42) を単離した。

Eujavanicin A (42) の性状

Colorless cubes. mp 243.2 - 243.5°C (from hexane - AcOEt). $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -194.9^\circ$ ($c = 0.8$, MeOH). HRFAB-MS m/z : 1120.6855 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1120.6869 for $\text{C}_{55}\text{H}_{94}\text{N}_9\text{O}_{15}$. IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 1734 (COO), 1683 (CO), 1639 (CON). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルデータは、本論中 Table 7 に示した。

Eujavanicin A (42) のメチルエステル化

化合物 42 (10.2mg) を MeOH (1mL) に溶解し、 CH_2N_2 エーテル溶液を加えて、25°C で 5 分間反応させた。濃縮した後、HPLC (SiO_2) に cyclohexane : acetone = 2:1 の移動相を用いて精製し、eujavanicin A dimethyl ester (43) (9.3mg) を得た。

Eujavanicin A dimethyl ester (43) の性状

Colorless amorphous solid. FABMS m/z : 1149 ($\text{M}+\text{H}^+$), 1171 ($\text{M}+\text{Na}^+$). ^1H NMR (CDCl_3) δ : 8.36 (NH, d, $J = 10.3\text{Hz}$, Leu) [7.95 (d, $J = 9.8\text{Hz}$)], 8.00 (NH, d, $J = 10.4\text{Hz}$, Val) [8.12 (d, $J = 9.7\text{Hz}$)], 6.61 (NH, d, $J = 7.4\text{Hz}$, Asp) [8.09 (d, $J = 8.6\text{Hz}$)], 6.58 (1H, dd, $J = 10.6, 4.9\text{Hz}$, *N*-MeAsp-2) [6.19 (dd, $J = 9.2, 5.7\text{Hz}$)], 5.52 (1H, d, $J = 6.9\text{Hz}$, Lac-2) [5.38 (ov)], 5.35 (1H, m, Pip-2), 5.13 (1H, m, Asp-2) [5.19 (m)], 5.12 (1H, d, $J = 10.8\text{Hz}$, *N*-MeIle-2 [I]) [5.24 (d, $J = 11.5\text{Hz}$)], 4.85 (1H, m, Leu-2) [4.91 (m)], 4.60 (1H, m, Val-2) [4.62 (m)], 4.39 (1H, d, $J = 11.5\text{Hz}$, *N*-MeVal-2 [II]) [4.70 (d, $J = 10.9\text{Hz}$)], 4.27 (1H, d, $J = 10.9\text{Hz}$, *N*-MeVal-2 [I]) [4.23 (d, $J = 10.3\text{Hz}$)], 4.11 (1H, m, Pip-6), 3.73 (1H, d, $J = 10.3\text{Hz}$, *N*-MeIle-2 [II]) [3.08 (d, $J = 11.7\text{Hz}$)], 3.69 (3H, s, COOMe) [3.70

(s)], 3.59 (1H, m, Pip-6), 3.48 (3H, s, COOMe) [3.52 (s)], 3.18 (3H, s, *N*-MeVal [II]) [3.20 (s)], 3.05 (3H, s, *N*-MeIle [I]) [3.05 (s)], 3.01 (3H, s, *N*-MeAsp) [2.98 (s)], 2.88 (1H, m, *N*-MeAsp-3) [2.86 (m)], 2.76 (3H, s, *N*-MeVal [I]), 2.74 (3H, s, *N*-MeIle [III]) [3.15 (s)], 2.62 (1H, dd, $J = 13.6, 3.2\text{Hz}$, Asp-3) [2.53 (1H, dd, $J = 15.8, 3.2\text{Hz}$)], 2.45 (1H, m, *N*-MeVal-3 [I]), 2.29 (1H, m, *N*-MeVal-3 [II]), 2.29 (1H, m, *N*-MeIle-3 [II]) [2.20 (m)], 2.26 (1H, m, Asp-3) [2.36 (m)], 2.20 (1H, m, *N*-MeAsp-3) [2.43 (m)], 2.12 (1H, m, Pip-4), 2.03 (1H, m, *N*-MeIle-3 [II]) [2.86 (m)], 1.96 (1H, m, Val-3) [1.97 (m)], 1.85 (2H, m, Pip-3 and 5), 1.70 (1H, m, Pip-3), 1.62 (1H, m, Pip-4), 1.61 (1H, m, Leu-3) [1.67 (m)], 1.53 (1H, m, Leu-3) [1.57 (m)], 1.48 (1H, m, Pip-5), 1.44 (1H, m, Leu-4) [1.42 (m)], 1.41 (1H, d, $J = 6.9\text{Hz}$, Lac-3) [1.38 (d, $J = 6.9\text{Hz}$)], 1.34 (1H, m, *N*-MeIle-4 [II]) [1.48 (m)], 1.20 (1H, m, *N*-MeIle-4 [I]) [1.29 (m)], 1.05 (Me, d, $J = 6.3\text{Hz}$, *N*-MeVal [II]) [1.1 (d, $J = 6.9\text{Hz}$)], 1.03 (1H, m, *N*-MeIle-4 [II]) [1.01 (m)], 1.01 (1H, m, *N*-MeIle-4 [I]) [1.07 (m)], 0.96 (Me, ov, *N*-MeVal [I]), 0.93 (2Me, ov, *N*-MeIle [II]) [0.90 (ov)], 0.89 (Me, ov, *N*-MeVal [I]) [0.88 (ov)], 0.87 (2Me, ov, *N*-MeIle [I]) [0.90 (ov)], 0.84 (Me, ov, Val) [0.82 (ov)], 0.81 (2Me, ov, Leu) [0.82 (ov)], 0.74 (Me, d, $J = 6.9\text{Hz}$, *N*-MeVal [III]) [0.88 (ov)], 0.74 (Me, d, $J = 6.9\text{Hz}$, Val) [0.75 (d, 6.3)]. minor conformation のデータを []内に示した。

Eujavanicin A dimethyl ester (43)のメタノリシス

化合物 43 (9.3mg)と NaOMe (10mg)を MeOH (2mL)で溶解し、室温で 3 時間反応させた。氷水を加えた後、AcOEt で液液分配を行った。AcOEt 層を濃縮させた後、HPLC (SiO₂)で cyclohexane : acetone = 2:1 の移動相を用いて精製し、eujavanicin A trimethyl ester (44) (3.3mg)を得た。

Eujavanicin A trimethyl ester (44)の性状

FAB-MS m/z (%) : 1203 (M+Na⁺, 1.8), 1181 (M+H⁺, 1.6), 1036 (M - Leu(OMe)⁺, 2.5), 923 (M - (*N*-MeVal-Leu(OMe))⁺, 1), 794 (M - (Asp(OMe)-*N*-MeVal-Leu(OMe))⁺, 32), 666 (M - (*N*-MeIle-Asp(OMe)-*N*-MeVal-Leu(OMe))⁺, 18), 539 (M - (*N*-MeIle-*N*-MeIle-Asp(OMe)-*N*-MeVal-Leu(OMe))⁺, 24), 396

((Lac-Pip-*N*-MeVal-Val) - OH⁺, 5), 297 ((Lac-Pip-*N*-MeVal) - OH⁺, 89), 184 ((Lac-Pip) - OH⁺, 100).

Eujavanicin A (42)の酸加水分解

化合物 42 (1.2mg)に 6mol/L HCl (1mL)を加え、アルゴン気流下、110°C で 21 時間反応させた。溶液を乾燥させ、42 の加水分解物を得た。

Lactic acid の絶対構造決定

化合物 42 の酸加水分解物を水 (1mL)で溶かし、その 16 μ L を用いて HPLC 分析を行い、L-および D-lactic acid の標準品と比較した。

カラム : Sumichiral OA-5000, 5 μ m, 4.6 x 150mm (ligand exchange type chiral column). 検出 : UV 254nm. 移動相 : 1mmol/L CuSO₄ 水溶液. カラム温度 : 25°C. 流速 : 1.0mL/min. 保持時間 (min) : L-lactic acid (21.8), D-lactic acid (28.4).

Marfey 法によるアミノ酸の絶対構造決定

化合物 42 の加水分解物およびアミノ酸標準品に FDAA のアセトン溶液を加えた後、1mol/L NaHCO₃ 水溶液を加え、40°C で 1 時間反応させた。室温に戻した後、2mol/L HCl を加えて中和させ、濃縮し、MeOH : H₂O = 1:1 の混合液 (1mL) で溶解し、その 10 μ L について HPLC 分析を行い、標準品と保持時間の比較を行った。*N*-MeAsp、Asp については分離条件 B、その他は分離条件 A で行った。

カラム : YMC-Pack ODS, 5 μ m, 250 x 4.6mm. 流速 : 1.0mL/min

分離条件 A

移動相 : linear gradient of 30 - 60% CH₃CN - H₂O containing 0.05% TFA in 80min. カラム温度 : 25°C. 保持時間 (min) : D-Pip (19.9), L-Val (20.3), L-Pip (22.7), L-*N*-MeVal (25.9), D-Val (27.7), L-Leu (28.7), D-*N*-MeVal (30.4), L-*N*-MeIle (32.6), L-*N*-Me-*allo*-Ile (33.4), D-Leu (37.0), D-*N*-MeIle (38.0), D-*N*-Me-*allo*-Ile (38.9).

分離条件 B

移動相 : linear gradient of 15 - 45% CH₃CN-H₂O containing 0.05% TFA in

80min. カラム温度 : 30°C. 保持時間 (min) : D-*N*-MeAsp (29.1), L-Asp (32.1),
L-*N*-MeAsp (33.1), D-Asp (34.2).

謝辞

本研究遂行に際し、終始ご指導、ご助言を賜りました星薬科大学薬化学教室 河合賢一教授、同 細江智夫准教授、奥羽大学薬学部 野沢幸平教授に深謝の意を表します。

菌株の供与ならびに同定をしていただきました福島和貴博士、千葉大学真菌医学研究センター 矢口貴志准教授に深く感謝申し上げます。

種々の反応を行う際、様々なご助言、ご協力いただきました佐藤博泰博士に心から感謝申し上げます。

抗菌活性試験を行うにあたり、ご指導、ご協力いただきました星薬科大学薬化学教室 板橋武史助手、奥羽大学薬学部 堀江均教授に心から感謝申し上げます。

代謝産物の分離に際し、ご支援、ご協力いただきました永井正博博士、星薬科大学薬品物理化学教室 上田晴久教授、奥羽大学薬学部 藤井祐一教授に心より感謝申し上げます。

本論文作成に際し、ご助言、ご協力いただきました星薬科大学放射線応用科学研究室 遠藤朋宏准教授に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究を開始する際に有用な資料の提供、数多くのご助言をいただきました駒井信一郎博士に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) A. Fleming, The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*, *British J. Experimental Pathology*, **10**, 226-236 (1929).
- 2) A. E. Oxford, H. Raistrick, P. Simonart, The biochemistry of micro. Ovrddot. Organism. LX. Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx, *Biochem. J.*, **33**, 240-248 (1939).
- 3) K. Mizuno, M. Tsujino, M. Takada, M. Hayashi, K. Atsumi, K. Asano, T. Matsuda, Studies on bredinin. I. Isolation, characterization, and biological properties, *J. Antibiot.*, **27**, 775-782 (1974).
- 4) A. Rügger, M. Kuhn, H. Lichti, H. R. Loosli, R. Huguenin, C. Quiquerez, A. Wartburg, Cyclosporin A, a peptide metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, with immunosuppressive activity, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1075-1092 (1976).
- 5) L. C. Alsberg, F. O. Black, Maize Deterioration. *Bull.*, **270**, 7-48 (1913).
- 6) A. G. Brown, T. C. Smale, T. J. King, R. Hasenkamp, R. H. Thompson, Crystal and molecular structure of compactin, a new fungal metabolite from *Penicillium brevicompactum*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1976**, 1165-1170 (1976).
- 7) T. Fujita, K. Inoue, S. Yamamoto, T. Ikumoto, S. Sasaki, R. Toyama, K. Chiba, Y. Hoshino, T. Okumoto, Fungal metabolites. Part 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite, *J. Antibiot.*, **47**, 208-215 (1994).
- 8) E. Stahl, H. Kaldewey, Spurenanalyse physiologisch aktiver, einfacher indolderivate, *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.*, **323**, 182-192 (1961).
- 9) D. T. Wicklow, P. F. Dowd, J. B. Gloer, The genus *Aspergillus* antiinsectan effects *Aspergillus* metabolites ed. by K. A. Powell *at al.*, Plenum Press, New York, 93-114 (1994).

- 10) K. Mori, K. Okada, Synthetic microbial chemistry. VI. Synthesis of mevalonolactone (hiochic acid lactone) employing asymmetric epoxidation as the key step, *Tetrahedron*, **41**, 557-559 (1985).
- 11) N. K. Harada, K. Nakanishi, Circular Dichroic Spectroscopy. Exciton Coupling in Organic Stereochemistry, Tokyo Kagaku Doujin, Tokyo, 117-123 (1982).
- 12) K. Arai, K. Kimura, T. Mushiroda, Y. Yamamoto, Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from *Penicillium fructigenium* takeuch, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2937-2939 (1989).
- 13) T. Yamaguchi, K. Nozawa, K. Kawai, S. Nakajima, S. Udagawa, Absolute configuration of roquefortine C, a tremorgenic mycotoxin, *Mycotoxins*, **34**, 29-32 (1991).
- 14) K. Günter, Thin-layer chromatographic enantiomeric resolution via ligand exchange, *J. Chromatogr.*, **448**, 11-30 (1988).
- 15) F. Song, X. Xu, S. Li, S. Wang, J. Zhao, P. Cao, Y. Yang, X. Fan, Norsesquiterpenes from the brown alga *Dictyopteris divaricate*, *J. Nat. Prod.*, **68**, 1309-1313 (2005).
- 16) I. Louis, N. L. Hungerford, E. J. Humphries, M. D. McLeod, Enantioselective total synthesis of (-)-dactylolide, *Org. Lett.*, **8**, 1117-1120 (2006).
- 17) K. E. Schulte, G. Rucker, H. Fachmann, Components of medicinal plants. XX. Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one as a component of larch fungus [*Fomes officinalis*], *Tetrahedron Lett.*, 4763-4764 (1968).
- 18) M. R. TePaske, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, P. F. Dowd, Three new aflavinines from the sclerotia of *Aspergillus tubingensis*, *Tetrahedron*, **45**, 4961-4968 (1989).
- 19) J. B. Gloer, B. L. Rinderknecht, D. T. Wicklow, P. F. Dowd, Nominine: A new insecticidal indole diterpene from the sclerotia of *Aspergillus nomius*, *J. Org. Chem.*, **54**, 2530-2532 (1989).

- 20) R. T. Gallagher, J. Clardy, B. J. Wilson, Aflavinine, a novel indole-mevalonate metabolite from tremorgen-producing *Aspergillus flavus* species, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 243-246 (1980).
- 21) D. N. Kirk, W. Klyne, Optical rotatory dispersion and circular dichroism. PartLXXXII. An empirical analysis of the circular dichroism of decalones and their analogues, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1076-1102 (1974).
- 22) 野沢幸平, インドロジテルペン骨格を有する振せん性マイコトキシン, マイコトキシン, **37**, 17-21 (1993).
- 23) S. Okamoto, T. Hosoe, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Kawai, K. Okada, G. M. C. Takaki, M. Chikamori, T. Yaguchi, K. Fukushima, M. Miyaji, New decaline derivatives, eujavanoic acid A and B, from *Eupenicillium javanicum* A587-2, *J. Nat. Prod.*, **67**, 1580-1583 (2004).
- 24) 藤本治宏, 持斎康弘, 堀江義一, 山崎幹夫, *Talaromyces panasenkoi* からの毒性代謝産物としての spiculisporic acid の分離について, マイコトキシン, **27**, 15-19 (1988).
- 25) 蒲康夫, 安本昌彦, 鈴木洋, 石上祐, スピクリスポール酸よりエステル、アミド及びイミド誘導体の選択的合成, 油化学, **38**, 292-296 (1989).
- 26) L. Brault, M. Denance, E. Banaszak, S. E. Maadidi, E. Battaglia, D. Bagrel, M. Samadi, Synthesis and biological evaluation of dialkylsubstituted maleic anhydrides as novel inhibitors of Cdc25 dual specificity phosphatases, *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 243-247 (2007).
- 27) S. Brandange, O. Dahlman, B. Lindqvist, A. Mahlen, L. Morch, Absolute configuration and enantioselective synthesis of spiculisporic acid, *Acta Chem. Scand. B*, **38**, 837-844 (1984).
- 28) T. Tabuchi, I. Nakamura, T. Kobayashi, Accumulation of the open-ring acid of spiculisporic acid by *Penicillium spiculisporum* in shake culture, *J. Ferment. Technol.*, **55**, 37-42 (1977).
- 29) P. Marfey, Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene, *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 591-596 (1984).

- 30) Y. Suzuki, M. Ojika, Y. Sakagami, K. Kaida, R. Fudou, T. Kameyama, New cyclic depsipeptide antibiotics, clavariopsins A and B, produced by an aquatic hyphomycetes, *Clavariopsis aquatica*. 2. Structure analysis, *J. Antibiot.*, **54**, 22-28 (2001).
- 31) S. Ray, M. G. B. Drew, A. K. Das, A. Banerjee, The role of terminal tyrosine residues in the formation of tripeptide nanotubes: a crystallographic insight, *Tetrahedron*, **62**, 7274-7283 (2006).
- 32) M. Kusano, G. Sotoma, H. Koshino, J. Uzawa, M. Chijimatsu, S. Fujioka, T. Kawano, Y. Kimura, Brevicompanines A and B: New plant growth regulators produced by the fungus, *Penicillium brevicompactum*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2823-2826 (1998).
- 33) 大桃定洋, 佐藤隆男, 歌川貞一, 阿部又三, *Penicillium roqueforti* の培養から festuclavine および 3 種のインドール・アルカロイド roquefortine A, B および C の分離, 日本農芸化学会誌, **49**, 615-623 (1975).
- 34) H. Wang, J. B. Gloer, D. T. Wicklow, P. F. Dowd, Mollenines A and B: New dioxomorpholines from the ascostromate of *Eupenicillium molle*, *J. Nat. Prod.*, **61**, 804-807 (1998).
- 35) N. Kushida, T. Yaguchi, N. Miike, JP P2003-96080A (2003).
- 36) B. J. Wilson, C. H. Wilson, Toxin from *Aspergillus flavus*: production on food materials of a substance causing tremors in mice, *Science*, **144**, 177-178 (1964).
- 37) A. E. De Jesus, P. S. Steyn, F. R. Van Heerden, R. Vlegaar, P. L. Wessels, W. E. Hull, Tremorgenic mycotoxins from *Penicillium crustosum*: Isolation of penitrems A-F and the structure elucidation and absolute configuration of penitrem A, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1847-1856 (1983).
- 38) J. P. Springer, J. Clardy, J. M. Wells, R. J. Cole, J. W. Kirksey, The structure of paxilline, a tremorgenic metabolite of *Penicillium paxilli*, *Tetrahedron Lett.*, **16**, 2531-2534 (1975).

- 39) M. Ooiike, K. Nozawa, S. Udagawa, K. Kawai, Structure of a new type of indoloditerpene, petromindole, and a new asterriquinone derivative, PM-53, from the ascostromata of *Petromyces muricatus*, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1694-1696 (1997).
- 40) Y. Ishigami, Y. Uji, K. Masui, Y. Shibayama, Japan Tokkyo Koho, H5-10696 (1993).
- 41) M. A. Stillwell, R. E. Wall, G. M. Strunz, Production, isolation, and antifungal activity of scytalidin, a metabolite of *Scytalidium* species, *Can. J. Microbiol.*, **19**, 597-602 (1973).
- 42) W. A. Ayer, P. Lu, H. Orszanska, L. Sigler, Deoxyscytalidin and lignicol : new metabolites from *Scytalidium* species, *J. Nat. Prod.*, **56**, 1835-1838 (1993).
- 43) T. Hosoe, K. Fukushima, T. Itabashi, K. Nozawa, K. Takizawa, K. Okada, G. M. C. Takaki, K. Kawai, A new nonadride derivative, dihydroepiheveadride, as characteristic antifungal agent against filamentous fungi, isolated from unidentified fungus IFM 52672, *J. Antibiot.*, **57**, 573-578 (2004).
- 44) H. Seya, S. Nakajima, K. Kawai, S. Udagawa, Structure and absolute configuration of emestrin, a new macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (10), 657-658 (1985).
- 45) E. Härrä, W. Loeffler, H. P. Sigg, H. Stähelin, Ch. Tamm, Über die Isolierung neuer stoffwechselprodukte aus *Penicillium brefeldianum* DODGE, *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1235-1243 (1963).

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

Eujavanicols A-C, decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. : S. Nakadate, K. Nozawa, H. Horie, Y. Fujii, M. Nagai, T. Hosoe, K. Kawai, T. Yaguchi and K. Fukushima, *J. Nat. Prod.*, 70(9), 1510-1512 (2007).

New dioxomorpholine derivatives, javanicunine A and B, from *Eupenicillium javanicum*. : S. Nakadate, K. Nozawa, H. Horie, Y. Fuji, M. Nagai, S. Komai, T. Hosoe, K. Kawai, T. Yaguchi and K. Fukushima, *Heterocycles*, 68(9), 1969-1972 (2006).

New type indole diterpene, eujindoles, from *Eupenicillium javanicum*. : S. Nakadate, K. Nozawa, H. Horie, Y. Fujii and T. Yaguchi, *Heterocycles*, 83(2), 351-356 (2011).

Two new eujindoles, from *Eupenicillium javanicum*. : S. Nakadate, K. Nozawa and T. Yaguchi, *Heterocycles*, 83(8), 1867-1871 (2011).

第二章

An antifungal substance isolated from *Eupenicillium javanicum* IFM 58214. : S. Nakadate, K. Nozawa and T. Yaguchi, *Mycotoxins*, 61(2), 41-45 (2011).

Antifungal cyclic depsipeptide, eujavanicin A, isolated from *Eupenicillium javanicum*. : S. Nakadate, K. Nozawa, H. Sato, H. Horie, Y. Fujii, M. Nagai, T. Hosoe, K. Kawai and T. Yaguchi, *J. Nat. Prod.*, 71(9), 1640-1642 (2008).