

氏名（本籍）	若菜大悟	（千葉県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第128号	
学位授与年月日	平成20年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	<i>Malbranchea filamentosa</i> から得られるフラノンおよびトリテルペン配糖体の構造	
論文審査委員	主査	教授 河合賢一
	副査	教授 本多利雄
	副査	教授 森田博史

## 論文内容の要旨

著者は本研究を遂行するにあたり、真菌の中でも実際に病原性を示す菌、もしくはその近縁の菌種が産生する物質の化学構造には興味深いものがあるのではないかと考え、コクシジオイデス症やヒストプラズマ症など深在性真菌症の原因菌のほとんどが含まれるホネタケ科に着目し、今回、本科に含まれる *Malbranchea* 属、その中でもまだ成分研究のされていない *Malbranchea filamentosa* IFM41300 株に着目し、その成分探索を行った。

本菌を米培地で 21 日間培養後、アセトンで抽出したエキスを各種クロマトグラフィーで分離し、数種の既知化合物とともに新規フラノン誘導体 34、36、および 37 と新規トリテルペン配糖体 38-41 を単離し、これらの構造解析を行った。

4-Benzyl-3-phenyl-5*H*-furan-2-one (34) は高分解能 EI-MS より分子式  $C_{17}H_{14}O_2$  と決定し、NMR スペクトルを中心とした各種機器データの解析から化学構造を 3 位にフェニル基を 4 位にベンジル基を有する  $\alpha,\beta$ -不飽和 5 員環ラクトン構造と決定した。(Fig.1)

Malfilamentoside A (36) は高分解能 CI-MS より分子式  $C_{26}H_{29}NO_8$  と決定し、NMR スペクトルを中心とした各種機器データの解析から 36 のゲニンは 34 と同様の構造であると決定した。糖部は酸加水分解により 6-*O*-methyl-D-glucosamine が得られたこと、36 の二次元 NMR スペクトル相関、および  $^1H$ -NMR スペクトルでのスピン結合定数の詳細な解析から、6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine であり、ゲニンの 5 位に糖が結合してい

る構造であると決定した。(Fig.1)

Malfilamentoside B (37) は ESI-TOF-MS より分子式  $C_{26}H_{29}NO_9$  と決定した。化合物 37 と 36 の  $^1H$  および  $^{13}C$ -NMR スペクトルを比較したところ、36 で観測された 6 位のシグナル  $\delta_c$  32.6 が消失し、新たに  $\delta_c$  70.0 のシグナルが観測されたこと以外、ほぼ一致していたことから、37 は 36 の 6-OH 体であると推定した。各種二次元 NMR スペクトルの解析結果は、37 が 36 の 6-OH 体である事を支持した。化合物 37 の構造は 36 と同様に酸加水分解より得られた糖の構造と、各種二次元 NMR スペクトル、および  $^1H$ -NMR スペクトルでのスピン結合定数の詳細な検討から Fig.1 のように決定した。

Malbrancheoside A (38) は無色結晶性粉末(mp.185℃)であり、その分子式は  $C_{48}H_{80}N_2O_{15}$  (不飽和度:10) と決定した。また、TLC 上でアニスアルデヒド・硫酸試薬噴霧後加熱することで緑褐色に呈色すること、 $^1H$ -、 $^{13}C$ -NMR および dept スペクトルより糖の存在を示唆する 14H 分のメチンもしくはメチレン水素、およびそれに相当する炭素が確認できたことから、2 個の糖を有する配糖体であると推定した。化合物 38 の酸加水分解を行った結果、2 つのゲニン 43 および 44 を得た。

Pseudomalbrancheogenin (43) は無色結晶性粉末(mp.227℃)で、高分解能 EI-MS より分子式  $C_{30}H_{50}O_5$  (不飽和度:6) と決定した。 $^1H$ -、 $^{13}C$ -NMR および dept スペクトルからオレフィンを 1 つ有する 5 環性化合物であると結論づけた。各種二次元 NMR スペクトルの解析から、43 は 3 位に 2-propanol 基を持つ 3 環性の部分構造 A と 23 位に 2-propanol 基を持つ 2 環性の部分構造 B が 13 位と 14 位で炭素 - 炭素単結合した 5 環性化合物であると決定した。化合物 43 の相対配置は NOESY 相関から決定した。化合物 43 の絶対配置を決定するため、6 位の第二級アルコールを利用した改良 mosher 法を試み、43 の ABC 環の 6 位の絶対配置を *R* と決定した。以上のことから pseudomalbrancheogenin (43) の絶対構造を DE 環を除き Fig.1 のように決定した。

Malbrancheogenin (44) は無色結晶性粉末(mp.183℃)で高分解能 EI-MS より 43 と同じ分子式  $C_{30}H_{50}O_5$  と決定した。44 と 43 の  $^1H$  および  $^{13}C$ -NMR スペクトルの比較から、オレフィンシグナル[44:  $\delta_c$  132.7/ $\delta_H$  5.16 (s),  $\delta_c$  133.7, 43:  $\delta_c$  119.9/ $\delta_H$  5.32(brdd, 2, 2),  $\delta_c$  134.9] が変化していた。この結果から 44 は 43 の D 環にあるオレフィンの位置が異なる構造と推定し、各種二次元 NMR スペクトルの解析を行った結果、44 は 14 位・19 位間に二重結合が形成された 43 の異性体であると決定した。化合物 44 の立体化学については、44 が酸性条件

下で容易に 43 へ変化することから同様の立体化学を持つことがわかった。以上の結果から malbrancheogenin (44) の構造を Fig.1 に示すように決定した。

Malbrancheoside A (38) の糖部は 38 の分子式とその 2 つのゲニンの分子式から、分子式  $C_{18}H_{32}N_2O_{10}$  で構成されていると考えた。 $^1H$  および  $^{13}C$ -NMR スペクトルで 2 つのアノマー水素 [ $\delta_H$  5.16(d, 4),  $\delta_H$  5.24(d, 4)] が観測されたことから、38 の糖は何らかの官能基を有する 2 つの糖であると考えた。

化合物 38 の酸加水分解より 39、40 とともに 6-*O*-methyl-D-glucosamine を得たこと、および 38 の HMBC スペクトルの相関から 2 つの糖は 6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine であると考えた。さらに、2 つの糖の結合位置は HMBC 相関から 4 位と 23 位であり、 $^1H$ -NMR のスピン結合定数から  $\alpha$ -アノマー体であると考えた。以上の結果および各種 NMR スペクトルの解析から、malbrancheogenin (44) の 4 位および 23 位に 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-glucosamine がエーテル結合した構造と決定した。(Fig.1)

Malbrancheoside B (39) は結晶性粉末(mp.152°C)で高分解能 CI-MS より分子式  $C_{36}H_{60}O_{10}$  と決定した。化合物 39 は  $^1H$ 、 $^{13}C$ -NMR および dept スペクトルを 38 と比較した結果、38 の 2 つのアノマー水素 [ $\delta_H$  5.16(d, 4),  $\delta_H$  5.24(d, 4)] が消失し、新たに  $\delta$  4.84 (bs) のピークが観測されたことと、4 位の炭素シグナルが高磁場側に移動していることが観察された。また、39 にはアノマー水素を含め酸素原子に隣接した 5 つのメチン基および酸素原子に隣接したメチレン基が 1 つ観測された。この結果から、39 は 1 つの糖を有し、38 と同じゲニン構造と推定した。化合物 39 の酸加水分解の結果から 39 のゲニンは 38 と同じであり、糖は  $\beta$ -mannose と決定した。以上の結果から malbrancheogenin (39) の構造を Fig.1 のように決定した。

Malbrancheoside C (40) は無色結晶性粉末(mp.168°C)で、FT-ESI-MS より分子式  $C_{47}H_{78}N_2O_{15}$  と決定した。化合物 40 の  $^1H$ 、 $^{13}C$ -NMR および dept スペクトルを 38 と比較し、メトキシ基が 1 つ消失している構造であると推定した。また、40 の酸加水分解の結果から、40 のゲニンは 44 と決定した。糖部については各種二次元 NMR スペクトルの解析結果から A 環の 4 位に *N*-acetyl- $\alpha$ -glucosamine が、E 環の 23 位 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- $\alpha$ -glucosamine が結合していると決定し、malbrancheoside c (40) の構造を Fig.1 に示すように決定した。

Malbrancheoside D (41) は無色結晶性粉末(mp.157°C)であり、高分解能

FT-ESI-MS より分子式  $C_{45}H_{75}NO_{15}$  と決定した。化合物 41 は  $^{13}C$ -NMR スペクトルから 39 の  $\beta$ -D-mannose 類似したシグナルが観察された。このことから 41 は 38 の 2 つの糖のどちらかが  $\beta$ -D-mannose に置換された構造と推定した。また、化合物 41 は酸加水分解の結果から、ゲニンは 44 であると決定した。二次元 NMR の詳細な解析から 4 位に  $\beta$ -mannose が、また、23 位に 6-O-methyl-N-acetyl- $\alpha$ -glucosamine が結合した構造であると決定した。

Malbrancheoside 類のゲニン、malbrancheogenin (44) は  $C_{30}$  化合物であることからトリテルペノイドであると考え、その生合成経路を明らかにするために  $^{13}CH_3COONa$  の取り込み実験を行った。その結果、pseudomalbrancheogenin (43) の炭素骨格内にメバロン酸経路での生成を示唆する  $^{13}C$  の取り込みが確認できた。(Fig.2, 3)

単離した各化合物の中で、34 にラットの血管平滑筋弛緩作用が認められた。また、水層は *C. neoformans* に対して抗真菌活性を示したが、今回単離した物質は活性を示さなかった。

## 論文審査の結果の要旨

申請者は、真菌の中で重篤な深在性真菌症（コクシジオイデス症、ヒストプラズマ症等）の原因菌のほとんどが含まれるホネタケ科に興味を持ち、これまで成分研究がほとんどなされてこなかったホネタケ科に属する *Malbranchea* 属菌類に着目し、その中の1種 *Malbranchea filamentosa* IFM41300株の成分探索を行った。

*M. filamentosa* IFM41300 株を米培地で21日間培養した後、そのアセトン抽出したエキスを各種クロマトグラフィーで分離・精製し、数種の既知化合物とともに新規フラノン誘導体34その配糖体2種 malfilamentoside A (36)、B (37) 及び新規トリテルペン配糖体4種 malbrancheoside A (38) - D (41) を単離し、これらの構造解析を行った。

化合物34は高分解能EI-MSより分子式を  $C_{17}H_{14}O_2$  と決定し、NMRスペクトルを中心とした各種機器データの解析からその構造4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one と決定した。Malfilamentoside A (36) 及び B (37) は高分解能MSより分子式をそれぞれ  $C_{26}H_{29}NO_8$ 、 $C_{26}H_{29}NO_9$  と決定した。酸加水分解によって得られた糖6-O-methyl-D-glucosamine、各種NMRスペクトルを中心とした機器データの解析及び $^1H$ および $^{13}C$ -NMRスペクトルの比較からそれらの構造をフラノン誘導体に6-O-methyl-N-acetyl-D-glucosamine が結合した構造であると決定した。

Malbrancheoside A (38) は無色結晶性粉末 (mp.185℃) であり、その分子式を  $C_{48}H_{80}N_2O_{15}$  (不飽和度:10) と決定した。化合物38は $^1H$ -及び $^{13}C$ -NMRの解析から2個の糖を有する配糖体であると推定した。化合物38の酸加水分解を行った結果、2つのゲニン43および44を得た。Pseudomalbrancheogenin (43) は無色結晶性粉末 (mp.227℃) で、EI-MSより分子式  $C_{30}H_{50}O_5$  (不飽和度:6) と決定した。 $^1H$ -及び $^{13}C$ -NMRの解析からオレフィンをもつ5環性化合物であると結論づけた。各種二次元NMRスペクトルの解析を行った結果、43の平面構造を3環性の部分構造と2環性の部分構造Bが炭素-炭素単結合した5環性トリテルペン様化合物であると決定した。化合物43の相対配置はNOESY相関から決定した。また、化合物43に改良Moscher法を適用し、6位の第二級アルコールの絶対配置を決定Rと決定した。以上のことから、43の絶対構造をDE環の部分を除き決定した。Malbrancheogenin (44) は無色結晶性粉末 (mp.183℃) で、分子式を43と同じと決定した。化合物44の構造は各種二次元NMRスペクトルの解析、43の $^1H$ -及び $^{13}C$ -NMRスペクトルの比較から、44の構造を43の二重結合の位置異

性体と決定した。さらに、malbrancheoside A (38) の糖部を加水分解反応や H および  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル等の解析から決定し、最終的に 38 の構造を決定した。

Malbrancheoside B (39)、malbrancheoside C (40)、malbrancheoside D (41) はそれぞれ無色結晶性粉末(mp.152°C、mp.168°C、mp.157°C)で、分子式は  $\text{C}_{36}\text{H}_{60}\text{O}_{10}$ 、 $\text{C}_{47}\text{H}_{78}\text{N}_2\text{O}_{15}$ 、 $\text{C}_{45}\text{H}_{75}\text{NO}_{15}$  と決定した。化合物 39 - 41 の構造は 38 と同様に  $^1\text{H}$ - 及び  $^{13}\text{C}$ -NMR および各種二次元 NMR スペクトルの解析結果と加水分解反応の結果からそれぞれの構造を決定した。

Malbrancheoside A (38) - D (41) は malbrancheogenin (44) をゲニンとする配糖体だり、構成糖として 6-*O*-methyl-*N*-acetyl- $\beta$ -glucosamine、*N*-acetyl- $\alpha$ -glucosamine、 $\beta$ -D-mannose がついているトリテルペン配糖体と考えられる。

Malbrancheoside 類のゲニン、malbrancheogenin (44) あるいは pseudomalbrancheogenin (43) は  $\text{C}_{30}$  化合物であることからトリテルペノイドであると考え、その生合成経路を明らかにするために  $^{13}\text{CH}_3\text{COONa}$  の取り込み実験を行った。その結果、の炭素骨格内にメバロン酸経路での生成を示唆する位置への  $^{13}\text{C}$  の取り込みが確認できた。また、今回単離した各化合物の中で、フラノン誘導体 34 にのみラットの血管平滑筋弛緩作用が認められた。また、水層は *C. neoformans* に対して抗真菌活性を示したが、今回単離した物質は活性を示さなかった。

以上の研究内容から、本論文は学位論文として充分評価しうるものであり、申請者に博士（薬学）の学位を授与するに値するものであると認める。