

変形菌からの天然物探索：

Tubifera dimorphotheca 等の成分に関する研究

2006 年

鎌田 和明

目次

序論	4
第1章 変形菌の培養可能株の探索	8
第1節 変形菌について	8
第2節 野外採取変形菌株からの分離, 培養	11
第3節 小括	24
第2章 培養変形体の成分研究 (1) : <i>Physarum melleum</i> (01-19)	25
第1節 培養変形体の化学成分について	25
第2節 <i>Physarum melleum</i> について	27
第3節 melleumin A (1), B (2)の単離・構造解析について	28
第4節 melleumin A (1), B (2)の立体配置の検討	30
第5節 小括	35
第3章 培養変形体の成分研究 (2) : <i>Physarum bethelii</i> (03-138)	36
第1節 <i>Physarum bethelii</i> について	36
第2節 <i>Physarum bethelii</i> 培養変形体の成分研究	37
第3節 小括	42
第4章 野外採取子実体の成分研究 (1) : <i>Tubifera dimorphotheca</i> (01-88)	43
第1節 <i>Tubifera dimorphotheca</i> について	43
第2節 <i>Tubifera dimorphotheca</i> の成分探索	44
第3節 tubiferal A および B の構造解析	49
第4節 tubiferal A の生合成について	66
第5節 tubiferal A および B の生物活性	67
第6節 小括	68
第5章 野外採取子実体の成分研究 (2) : <i>Arcyria cinerea</i> (03-105)	69
第1節 <i>Arcyria cinerea</i> について	69
第2節 <i>Arcyria cinerea</i> の成分探索	71
第3節 単離した化合物の構造解析	73
第4節 小括	

第 6 章 野外採取子実体の成分研究 (3) : <i>Arcyria obvelata</i> (04-76)	86
第 1 節 <i>Arcyria obvelata</i> について	86
第 2 節 <i>Arcyria obvelata</i> の成分探索	87
第 3 節 単離した化合物の構造解析	89
第 4 節 単離したビスインドール化合物の生物活性	98
第 5 節 小括	104
第 7 章 野外採取子実体の成分研究 (4) : <i>Lindbradia cribrarioides</i> (01-86)	105
第 1 節 <i>Lindbradia cribrarioides</i> について	105
第 2 節 <i>Lindbradia cribrarioides</i> (01-86)の成分探索 (水層について)	106
第 3 節 赤色色素成分の構造解析	107
第 4 節 <i>Lindbradia cribrarioides</i> (01-86)の成分探索 (EtOAc 層について)	109
第 5 節 小括	111
第 8 章 野外採取子実体の成分研究 (5) : <i>Stemonitis axifera</i> (04-33)	112
第 1 節 <i>Stemonitis axifera</i> について	112
第 2 節 <i>Stemonitis axifera</i> の成分探索	113
第 3 節 小括	116
第 9 章 野外採取子実体の成分研究 (6) : <i>Stemonitis fusca</i> var. <i>rufescence</i> (04-79)	117
第 1 節 <i>Stemonitis fusca</i> var. <i>rufescence</i> について	117
第 2 節 <i>Stemonitis fusca</i> var. <i>rufescence</i> の成分探索	118
第 3 節 小括	123
第 10 章 野外採取子実体の成分研究 (7) :	
<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>flexosa</i> (03-22)	124
第 1 節 <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>flexosa</i> について	124
第 2 節 <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>flexosa</i> の成分探索	125
第 3 節 小括	128
第 11 章 野外採取子実体の成分研究 (8) : <i>Fuligo aurea</i> (01-93)	129
第 1 節 <i>Fuligo aurea</i> について	129
第 2 節 <i>Fuligo aurea</i> の成分探索	130
第 3 節 小括	131

第 12 章 野外採取子実体の成分研究 (9) : <i>Tubifera ferruginosa</i> (05-146)	132
第 1 節 <i>Tubifera ferruginosa</i> について	132
第 2 節 <i>Tubifera ferruginosa</i> の成分探索	133
第 3 節 小括	137
総括	138
実験の部	141
参考文献	180
謝辞	183
主論文目録	184
学位論文審査	185

序論

天然に存在する植物，微生物，海洋生物などは，代謝によって多種多様な有機化合物を産生しており，中には人智の及ばない特異な構造や生物活性を有するものがある．たとえば，ヨーロッパイチイ (*Taxus brevifolia*) などから得られ，チューブリンの解重合を阻害して抗腫瘍活性を発現するタキソール (taxol) や，放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* から分離され，移植時の拒絶反応抑制やアトピー性皮膚炎に用いられているタクロリムス (FK-506) がその代表的なものとして挙げられる (Fig.1)¹⁾．それ故に天然物は，我々の生命を守る医薬品の素材として重要な地位を占め続けてきた．

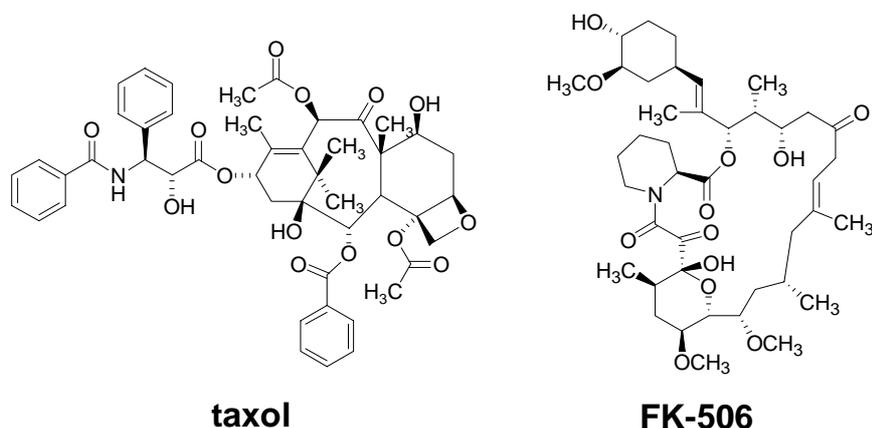


Fig.1 Structures of taxol and FK-506

しかしながら，天然物探索素材として手がけられたものは地球上の全生物種のうち 10 % にも満たないとも言われている²⁾．すなわち，人類がこれまでもつ地球上の各種生物の二次代謝産物に関する情報の割合はごく少ないものであると考えられ，未利用資源には未知の有用な生理活性を持つ成分や，新規な構造の化合物を生産している可能性が十分に残されている．

天然物の化学的研究の歴史を振り返ってみると，1929 年にイギリスの Fleming が *Penicillium notatum* から penicillin を発見し，次いでアメリカの Waksman が *Streptomyces griseus* から streptomycin を発見して以来，カビや放線菌のようなそれまで未利用であった微生物はたちまち脚光を浴び，抗生物質などの医薬品の供給源として盛んに研究されたのは周知の通りである．

近年でも，微生物から単離された天然物由来の抗真菌剤であるMicafungin³⁾の使用が承認されたことから，微生物からの天然物由来の薬剤を開発することが，今なお必要であることを表している (Fig.2)．また，興味深い構造を有するepoxyquinol A⁴⁾が糸状菌由来の血管新生阻害剤として単離報告されている．

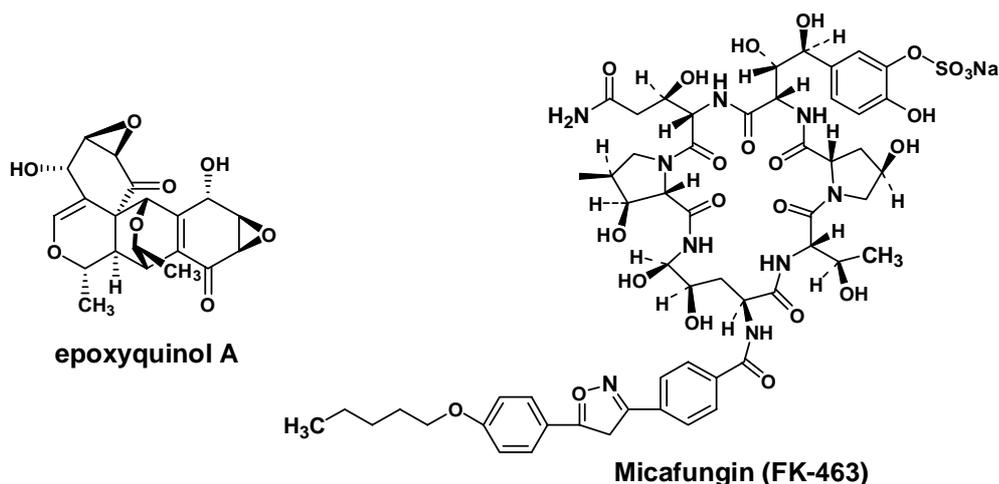


Fig.2 Structures of epoxyquinol A and Micafungin

海洋に目を向けてみると，そこに棲む多くの生物は，陸上とは大きく異なる生活環境に置かれており，陸棲生物には見られないような新規化学構造を有する成分が含まれていることが現在では明らかになっている．しかし，スキューバダイビングなどが普及する 1980 年代以前は，海洋生物は一般に入手困難であったため，それらの化学的研究はあまり進展していなかった．海洋生物の研究材料としては，海綿動物や腔腸動物のようなほとんど未利用の生物種が主として研究されてきたが，海洋生物の化学的研究が始まった当初は，医薬品開発のリード化合物として期待されるものが現在知られているように数多く見出されるとは，予想もつかなかったのではないだろうか．近年でも，八丈島産海綿 *Penares schulzei* から α -グルコシダーゼ阻害剤である *schulzeine A*⁵⁾ や，沖縄産海綿 *Terpios hoshinota* から P388 細胞に対して細胞毒性を示す *nakiterpiosin*⁶⁾ などが知られており (Fig.3)，海洋生物資源の有用性はいまだ計り知れないと考えられる．

このように天然物は，ふとした発見から予想もつかないような多大な恩

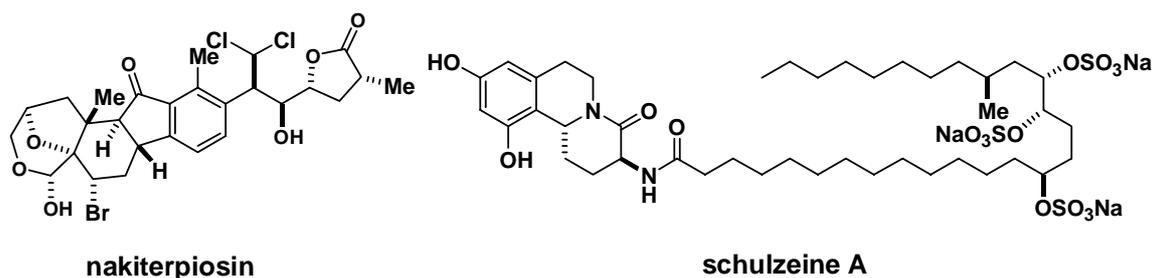


Fig.3 Structures of marine natural products

恵を我々に与えてくれる場合がある．近年では，陸上あるいは海洋に生息する難培養微生物や共生微生物などの生物種にアプローチした天然物探索研究が行われている．培養が困難であるなどの理由から，化学的研究があまり進展していない未利用の微生物資源として粘液細菌や細胞性粘菌が挙げられる．粘液細菌 *Sorangium cellulosum* からは，現在米国で抗がん剤として臨床試験が行われている epothilone A,B⁷⁾ が，細胞性粘菌 *Dictyostelium brefeldianum* からは，神経上皮細胞の腫瘍細胞に対して増殖抑制を示す brefelamide⁸⁾ のような興味深い二次代謝産物が得られている (Fig.4) ．

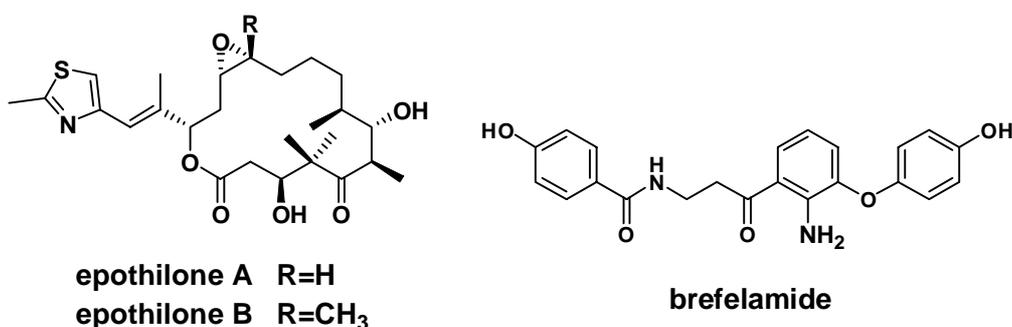


Fig.4 Structures of epothilone A,B and brefelamide

同様に培養が困難であり，あまり化学的研究が進展していない微生物資源として変形菌が挙げられる．当研究室では，未利用生物資源の一つであるこの変形菌に着目し，研究を行っている．

変形菌は，原生動物と菌類の特徴を併せ持ち，その生活環の中で孢子・アメーバ体・変形体・子実体の形態をとる大変ユニークな生物である．落

ち葉や倒木などの身近な場所に生育しており、決して珍しい生物ではない。変形菌を材料とした天然物の探索に関しては数例の先駆的な研究があり⁹⁾、変形菌には興味深い二次代謝産物が含まれることが期待された。しかしながら、野外採取で化学的研究を行うに十分な量を得ることが困難なこと、培養によって十分量の菌体を確保することも容易でないことなどの理由から、変形菌の二次代謝産物に関する研究はその後ほとんど進められていない。そこで、当研究室では変形菌を天然物探索素材として位置づけ、培養可能株の探索と成分研究を行っている。

本研究では、創薬につながる新規天然シーズの探索の一環として、野外採取した変形菌を用いて培養可能株の探索ならびに培養法の検討を行うとともに、培養に成功した変形体 2 種の成分研究を行った。また、*Tubifera dimorphotheca* を始めとする、野外採取で十分な量が得られた子実体 9 種の成分研究を行った。

第1章 変形菌の培養可能株の探索

第1節 変形菌について

変形菌（真性粘菌）は最も下等な真核生物として位置づけられ、生物五界説ではプロチスタ界に分類されている。しかし、細胞性粘菌や粘液細菌とも異なり、他に近縁な生物は見当たらない。Fig.1-1 に変形菌のライフサイクルを示した¹⁰⁾。

変形体 多核単細胞で細胞分裂を行わない。細胞壁をもたず、形を自由に変えることができ、秒速 1 mm 以上の速さで移動する。多くは先端が扇状の網目構造をしている。主として微生物を餌とする。ちぎっても死なずに、各々が独立した個体として成長でき、反対に同種の変形体同士はぶつかると融合し、1 個体となる。

菌核 変形体が暑さや寒さ、乾燥などの生育に適さない条件におかれたときになる休眠体。10 個前後の核を含むように分裂し、厚い膜で仕切られた菌核となる。生育に適した環境に戻ると元の変形体に戻る。

子実体 変形体は湿度・温度変化などをきっかけに、ほぼ同じ大きさの原形質の小塊に分割され、子実体を形成する。子実体は無数の胞子を袋(子嚢)につめた形をとり、変形体のすべての核が胞子となる。胞子形成の過程において減数分裂が行われる。

アメーバ状細胞 胞子が水分を吸収してふくらみ、胞子壁を裂開させるとアメーバ状細胞が這い出る。バクテリアを餌とし、単核単細胞で 2 分裂して増殖する。水分の多い条件では鞭毛を生じる。

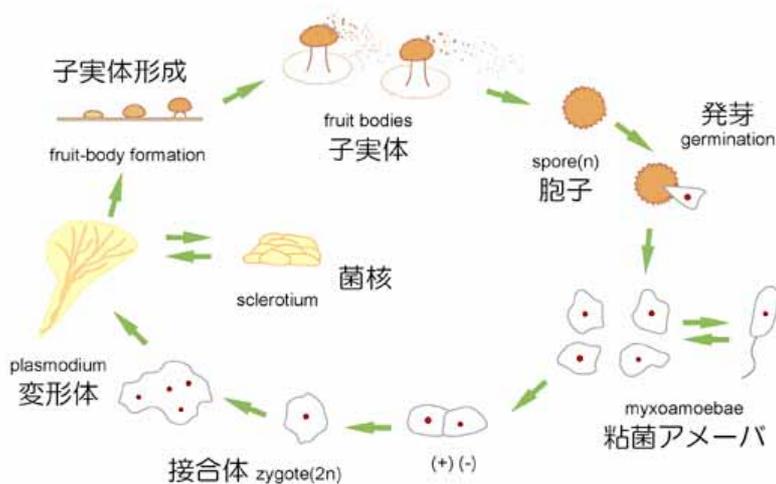


Fig.1-1 Lifecycle of a Myxomycete

以上のような興味深い生態を示す生物ではあるが、変形菌を素材とした天然物探索研究の報告例は決して多くはない。野外採取した変形菌からの報告例としては、子実体が比較的大きく、比較的容易に集められる種について数例の報告がある^{9) 11)}。これらの報告は、色素成分についてのものが多く、ナフトキノン化合物やビスインドール化合物が主に得られている。培養変形菌については、唯一簡単に人工培養できる *Physarum polycephalum* (モジホコリ) から、生理活性リン脂質や色素成分に関する報告がある¹²⁾。変形菌から得られた化学成分の一例を以下に示す。

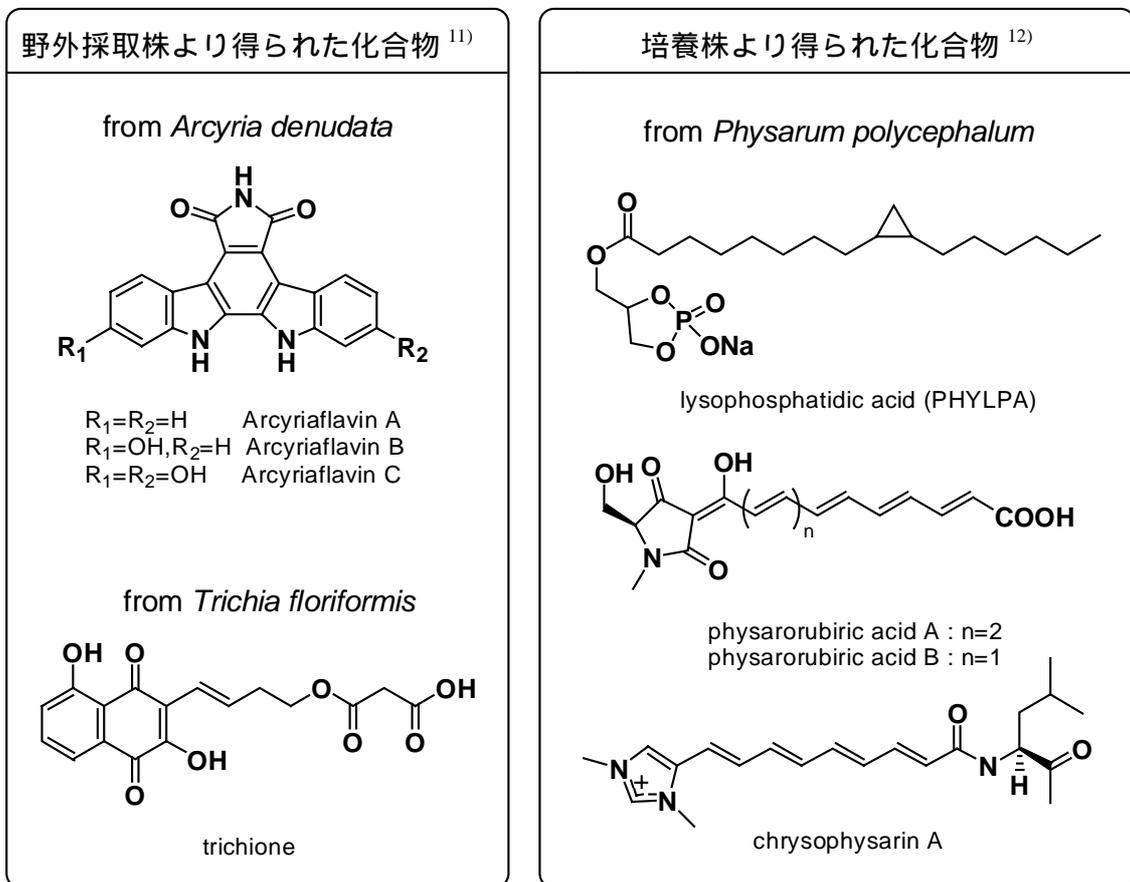


Fig. 1-2 変形菌の成分研究報告例

第2節 野外採取変形菌株からの分離，培養

変形菌の大きさは小さいため，野外採取によって成分研究を行うのに十分な量を得ることができる種は限られている．また，野外で採取されるものの大部分は子実体であり，変形体は発生の時期が限られているうえ，土中や樹皮の内部などに存在することが多いため，変形体を採取することは困難である．よって，変形菌を天然新分子探索素材として利用するには，まず，培養法の確立が必要である．当研究室では，1998年より変形菌の培養実験を開始し，野外採取変形菌の培養可能株の探索および培養の条件検討を行ってきた．2003年に全国各地で野外採取した変形菌の子実体135株，菌核9株，変形体9株の発芽実験を行った．手順は以下のとおりである．

【実験手順】

- 1) 野外子実体に含まれる孢子または菌核の一部を，濃縮大腸菌液を塗布した寒天平板培地に接種する．
- 2) 孢子が発芽しアメーバ体になると，大腸菌が透けて見える溶菌斑（Fig.1-4）が観察される．
- 3) 変形体に成長した株は，平板培地上にオートミールを添加あるいは大腸菌を塗布した培地で培養する（Fig.1-4）．
- 4) 変形体の培養を続けると，いくつかの菌株は適当な条件下で子実体を形成する（Fig.1-4）．

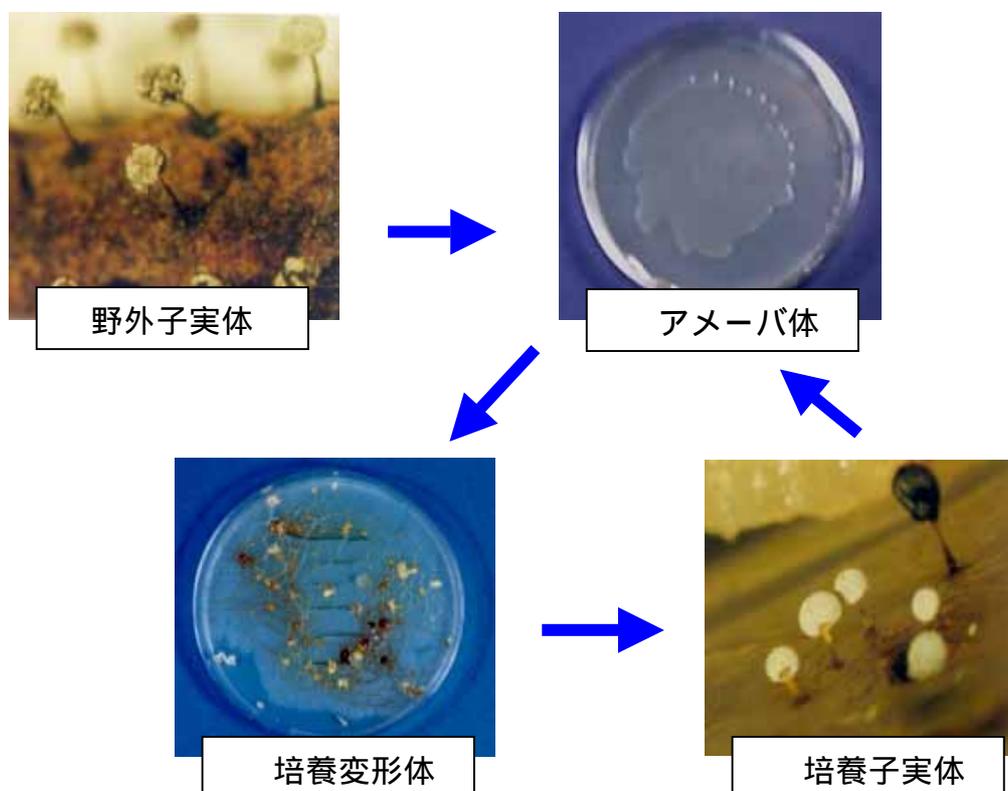


Fig. 1-4 *Didymium bahiense* (99-27 株)の培養生活環

発芽実験条件

各年度における発芽実験条件^{13), 15), 17), 20)} および発芽率をTable 1-1 に示す。

Table 1-1 発芽実験条件

年度	条件			結果		
	培地	温度	光条件	実験株数	発芽株数	発芽率
1998	無栄養/濃縮 <i>E. coli</i>	25	暗所	33 種 57 株	2 種 2 株	3.5%
1999	無栄養/濃縮 <i>E. coli</i> CM/2	25	明所 or 暗所	36 種 68 株	4 種 4 株	6%
2000	無栄養/濃縮 <i>E. coli</i> CM/2 LP/ <i>E. coli</i>	22	明所 or 暗所	42 種 65 株	13 種 13 株	20%
2001	無栄養/濃縮 <i>E. coli</i> LP/濃縮 <i>E. coli</i> 寒天/濃縮 <i>E. coli</i> A/濃縮 <i>E. coli</i>	22	明所 or 暗所	65 種 102 株 (うち菌核 2 株)	37 種 62 株 (うち菌核 2 株)	61%
2002	LP/濃縮 <i>E. coli</i> 寒天/濃縮 <i>E. coli</i>	22	暗所	49 種 67 株	20 種 24 株	36%
2003	LP/濃縮 <i>E. coli</i> 寒天/濃縮 <i>E. coli</i>	22	暗所	69 種 144 株 (うち菌核 9 株)	38 種 48 株 (うち菌核 7 株)	33%

* 2003 年の発芽実験に使用した株および培地組成は実験の部に示した。

* 変形体で採取したものは含まない。

* 種数は、未同定株を含まない。

発芽は、培地に塗布した大腸菌が孢子から発芽したアメーバ状細胞に食べられ、透けて見える溶菌斑として確認するか、変形体の存在により確認した。

・条件

- ・ 1999年度からは明所(16 h/day)での発芽実験も行った^{13), 17), 20)}が,明所でも暗所でも発芽率にあまり変化がないことと,効率化を測るために2001年度の途中から暗所のみで実験を行った.
- ・ 胞子が発芽し,溶菌斑が観測された株は,25℃暗所でLP/E培地に植え継いで培養した.

・培地^{13), 15), 17), 20)}

無栄養培地

糸状菌等のコンタミネーションを抑える目的で用いられたが,発芽率および変形体形成率が低かった.2001年度から用いた寒天培地がある程度のコンタミネーションを押さえることができ,発芽率や変形体形成率がより高いことから,2002年度以降は無栄養培地の使用を中止した.

CM/2 培地

以前に胞子接種からの変形体出現の報告²⁵⁾があったため,1999年度,2000年度に用いられたが,発芽率が低く,また,CM/2培地で生育するものはLP培地でも生育するため,2001年度以降では発芽実験に用いなかった.

LP 培地

2000年度から用いた.発芽率および変形体形成率が高く,変形体の生育もよい.

A 培地

yeast extractを含むため,菌食とされている菌に対して2001年度に用いた.発芽率が低く,A培地で発芽した株は他の培地でも発芽したため使用を中止した.

寒天培地

2001年度から用いた.LP培地よりは生育する株が少ないものの,糸状菌などのコンタミネーションを押さえることができる.また,子実体の形成に適している.

アメーバ状細胞は、バクテリアをえさとするため、各培地には大腸菌を塗布して用いたが、変形体へと成長した株のうち、平板培地上にオートミールを添加した培地で生育するものについては、このオートミールを添加した培地を使用した。

以下、

- ・ LP/E・・・LP 培地に *E.coli* 菌液を塗布したもの
- ・ LP/O・・・LP 培地にオートミールを添加したもの
- ・ Agar/O・・・寒天培地にオートミールを添加したもの と略する。

2003 年度 発芽実験結果

2003 年度は孢子では 135 株中、48 株が発芽し、29 株の変形体形成、3 株の子実体形成に成功した (Table 1-2)。菌核の状態で採取されたもの 9 株では、変形体を形成したもの(発芽)が 7 株、子実体を形成したものは 1 株であった (Table 1-3)。変形体の状態で採取されたものも 9 株あったため、LP/E 培地に接種したが、いずれも生育しなかった。

Table 1-2 2003 年度発芽菌株 (孢子)

No.	学名	発芽	変形体(色)	子実体(培地/餌/光)
03-07	<i>Physarum bogoriense</i>		(黄)	
03-08	<i>Didymium minus</i>		(白)	
03-09	<i>Craterium aureum</i>			
03-10	<i>Physarum bivalve</i>			
03-12	<i>Stemonitopsis typhina</i>			
03-14	<i>Hemitrichia clavata</i> var. <i>calyculata</i>			
03-15	<i>Diderma effusum</i>			
03-16	<i>Physarum cinereum</i>		(オレンジ)	
03-21	<i>Didymium squamulosum</i>		(白)	
03-32	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>			
03-34	<i>Didymium nigripes</i>		(白)	
03-38	不明 (<i>Craterium?</i>)		(黄)	
03-39	<i>Didymium minus</i>			
03-46	<i>Didymium squamulosum</i>		(白)	
03-48	<i>Collaria arcyronema</i>		(黄)	
03-51	<i>Craterium</i> <i>leucocephalum</i>		(白)	
03-53	<i>Physarum bivalve</i>		(白)	
03-57	<i>Tubifera</i> sp.		(白)	
03-61	<i>Didymium minus</i>			
03-62	<i>Craterium</i> <i>leucocephalum</i>		(黄)	
03-64	<i>Didymium iridis</i>		(白)	
03-67	<i>Didymium megalosporum</i>			
03-69	<i>Physarum bivalve</i>		(白)	
03-71	<i>Physarum pusillum</i>			
03-74	<i>Fuligo cinerea</i>		(白)	(LP/O, Agar/O L or D)
03-75	<i>Arcyria cinerea</i>			
03-76	<i>Didymium megalosporum</i>		(白)	
03-77	<i>Physarum leucopus</i>		(白)	
03-79	<i>Didymium iridis</i>			
03-80	<i>Diachea leucopodia</i>			
03-87	<i>Craterium</i> <i>leucocephalum</i>		(黄)	
03-89	<i>Hemitrichia serpula</i>			
03-90	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>porioides</i>			
03-94	<i>Didymium nigripes</i>			
03-116	<i>Diderma effusum</i>			
03-118	<i>Physarum bethelii</i>		(黄)	(LP/O L or D)
03-120	<i>Physarum nutans</i>		(黄)	
03-123	<i>Diderma platycarpum</i> var. <i>berkeleyanum</i>		(白)	
03-124	<i>Diderma hemisphaericum</i>		(白)	
03-126	<i>Cribraria cancellata</i>			

2003 年度発芽菌株（胞子） 続き

03-129	<i>Physarum viride</i>		
03-130	<i>Physarum globuliferum</i>	(白)	
03-136	<i>Stemonitis fusca</i>	(白)	
03-137	<i>Stemonitopsis typhina</i> var. <i>similis</i>	(白)	
03-139	<i>Physarum nucleatum</i>	(白)	
03-140	<i>Stemonitis axifera</i>	(白)	
03-141	<i>Physarum flavicomum</i>	(黄)	
03-151	<i>Physarella oblonga</i>	(黄)	

Table 1-3 2003 年度発芽菌株（菌核）

No.	学名	変形体(色)	子実体(培地/餌/光)
03-25	不明	(黄)	
03-28	<i>Physarum rigidum</i>	(黄)	(Agar/O L)
03-40	不明	(黄)	
03-41	不明	(黄)	
03-42	不明	(黄)	
03-43	不明	(黄)	
03-44	不明	(黄)	

変形体を形成した株のうち，生育が良いなど特徴的な株について以下に述べる³²⁾。

03-07 *Physarum bogoriense*

黄色変形体。

LP/E で生育するが，オートミール添加培地では生育しなかった。

03-28 *Physarum rigidum*

黄色変形体。子実体形成。

Agar/O 培地で良く生育する。菌核の状態で採取され，形成した子実体を鑑定していただいたところ，*P. rigidum* であると判明した。変形体および子実体の形状は，同種の 01-36 株と類似していた。

03-48 *Collaria arcyronema*

黄緑色変形体 .

LP/E で生育するがあまり広がらず , 平板培地上にオートミールを添加した培地では生育しなかった . 当研究室の発芽実験で *Collaria* 属の変形菌が変形体を形成したのは , 今回が初めてである .

03-57 *Tubifera* sp. (未同定)

薄茶色変形体 .

野外の未熟な子実体より発芽実験を行った .

LP/E で生育するがあまり広がらず , また , 平板培地上にオートミールを添加した培地では生育しなかった . 当研究室の発芽実験で *Tubifera* 属の変形菌が変形体を形成したのは , 今回が初めてである .



03-74 *Tubifera* sp.
wild immature fruit bodies

03-140 *Stemonitis axifera*

白色変形体 .

生育が遅い . アメーバ体を植え継いで約 3 週間後とかなり時間が経過してから , 変形体を形成した .

03-141 *Physarum flavicomum*

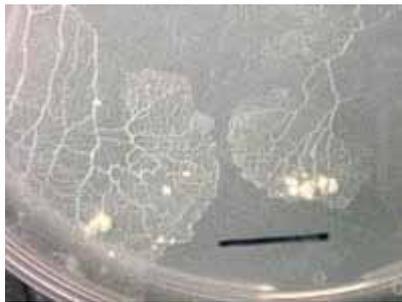
黄色変形体 .

LP/E で生育するが , 平板培地上にオートミールを添加した培地では生育しなかった . 子実体を形成せず , 容易に菌核を形成した .

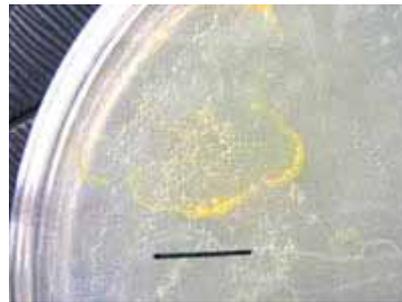
03-74 *Fuligo cinerea*

白色～黄色変形体．子実体形成．

LP/O 培地で良く成長するが寒天培地での生育は良くなかった．変形体は通常白色だが，シャーレ面に広がると次第に黄色味を帯び，子実体を形成した．野外子実体では，孢子嚢が石灰質で覆われているが，培養子実体では石灰が少ないため色が異なって見えた．



03-74 *F. cinerea*
cultured plasmodium (白)



03-74 *F. cinerea*
cultured plasmodium (黄)



03-74 *F. cinerea*
cultured fruit bodies



03-74 *F. cinerea*
wild fruit bodies

03-118 *Physarum bethelii*

黄色変形体．子実体形成．

Agar/O 培地でも生育するが LP/O 培地のほうが生育がよい．変形体は植え継ぎ後 3-4 日でシャーレー面に広がり，約 1 週間後には子実体を形成した．光照射により子実体を形成しやすく，クリーンベンチ内で電気をつけて植え継ぎを行うと広がらずに子実体となってしまった．



03-118 *P. bethelii*
cultured plasmodium



03-118 *P. bethelii*
cultured fruit bodies

03-151 *Physarella oblonga*

黄色変形体．子実体形成．

生育が遅い．LP/E 培地での生育は比較的良好である．野外株によく似た子実体を形成した．



03-151 *P. oblonga*
cultured plasmodium



03-151 *P. oblonga*
cultured fruit bodies (X60)

Table 1-4 年度別 発芽実験結果 (孢子)

	実験株		発芽				変形体形成				子実体形成			
	種数	株数	種数	%	株数	%	種数	%	株数	%	種数	%	株数	%
1998	33	57	2	6	2	4	1	3	1	2	0	0	0	0
1999	36	67	4	11	4	6	4	11	4	6	3	8	3	4
2000	42	66	13	31	13	20	8	19	8	12	3	7	3	5
2001	65	100	37	57	58	58	14	22	17	17	7	11	8	8
2002	49	69	21	43	24	35	8	16	8	12	4	8	4	6
2003	69	135	36	52	48	36	24	35	29	21	3	4	3	2

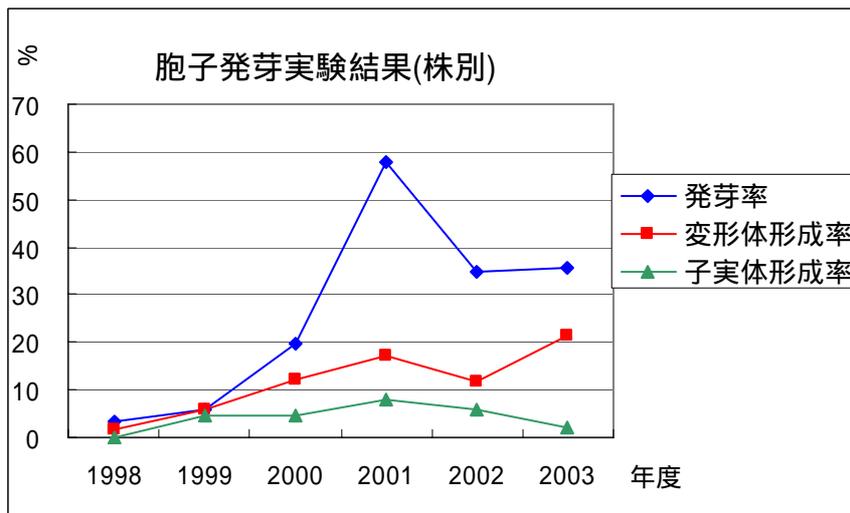
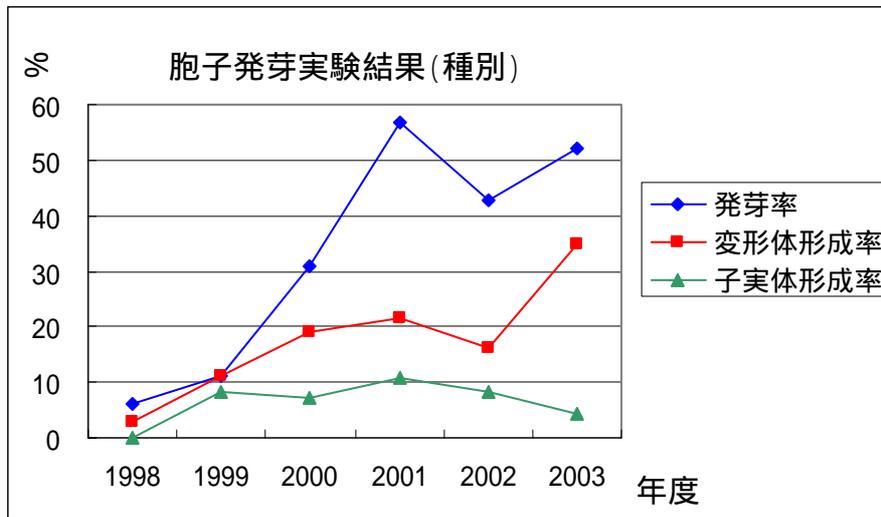


Fig. 1-5 年度別 発芽実験結果 (孢子)

発芽株と属との関係

2003 年度に発芽が観測された株を属ごとにまとめた(Table1-7, 1-8) .現在の培養条件に適している属とそうでない属がある . 以下に特徴をまとめた .

Didymium 属 : 発芽率 , 変形体形成率が共に高く , 現在の培養条件に適している . 形成した変形体も生育の早いものが多くほとんどが平板培地にオートミールを添加した培地で生育した . 子実体も比較的形成しやすかった .

Craterium 属 : LP 培地で発芽することが多く , 変形体も LP 培地で生育するが Agar 培地では生育しないことから , LP 培地が培養に適していると思われる . 変形体の生育は遅いものが多く , 成分研究を目標とした大量培養を行うためには更なる培養条件の検討が必要である . 変形体の形成率は比較的高いものの , 子実体は 2001 年度に 1 株が形成したのみである .

Physarum 属 : 発芽率 , 変形体形成率が共に高い . 生育が早い株は黄色の変形体で有柄の子実体を形成する種に多いように感じられた .

Diderma 属 : 発芽率は比較的高く , 変形体も数株で形成した . 変形体の生育はいずれも遅かった .

Ceratiomyxa 属 : 発芽が観察されると溶菌斑の状態では安定に培養できた . しかし , 何度植え継ぎを行っても変形体になることはなかった .

Fuligo 属 : 2002 年にはじめて発芽が観察され , 2003 年度に初めて変形体形成が観察された . 変形体を形成した 03-74 株の生育は早く , 子実体も形成したが , 全体の発芽率は低い .

上記以外では , 2002 年度は , *Arcyria* 属で , 2003 年度は *Tubifera* 属と *Collaria* 属ではじめて変形体の形成に成功した . また , *Arcyria* 属では子実体の形成にも成功した . また , *Physarella* 属は 2003 年度にはじめて 1 株が採取されたが , 発芽し , 変形体および子実体を形成した . しかし , *Arcyria* 属 , *Tubifera* 属 , *Collaria*

属の変形体は生育が遅く，安定に培養することはできなかった。

Table 1-5 2003 年度発芽株

2003年採取株発芽率			株数に対する形成率						
目	科	属	実験株 株数	発芽 (溶菌斑形成)		変形体形成		子実体形成	
				株	率(%)	株	率(%)	株	率(%)
Ceratiomyxales	Ceratiomyxaceae	<i>Ceratiomyxa</i>	10	2	20	0	0		
Liceales	Cribrariaceae	<i>Cribraria</i>	4	1	25	0	0		
		<i>Lycogala</i>	2	0	0	0	0		
	Enteridiaceae	<i>Tubifera</i>	3	1	33	1	33	0	0
Trichiales	Arcyriaceae	<i>Arcyria</i>	13	1	8	0	0		
	Trichiaceae	<i>Hemitrichia</i>	8	2	25	0	0		
Physarales	Physaraceae	<i>Badhamia</i>	1	0	0	0	0		
		<i>Craterium</i>	8	4	50	3	38	0	0
		<i>Fuligo</i>	8	1	13	1	13	1	13
		<i>Physarum</i>	21	13	62	10	48	1	5
		<i>Physarella</i>	1	1	100	1	100	1	100
	Didymiaceae	<i>Diachea</i>	2	1	50	0	0		
		<i>Diderma</i>	8	4	50	2	25	0	0
		<i>Didymium</i>	12	11	92	6	50	0	0
Stemonitales	Stemonitaceae	<i>Collaria</i>	3	1	33	1	33	0	0
		<i>Lamproderma</i>	4	0	0				
		<i>Stemonaria</i>	1	0	0				
		<i>Stemonitis</i>	14	2	14	2	14	0	0
		<i>Stemonitopsis</i>	7	2	29	1	14	0	0
		未同定	5	1	20	1	20	0	0
合計(8科21属)			135	48	36	29	21	3	2
菌核			9			7	78	1	11
変形体			9			0	0	0	0
合計(8科21属+菌核+変形体)			153	48	31	36	24	4	3

第3節 小括

- ・ 2003 年度に全国各地で採取された変形菌の発芽実験を行い，培養可能株を探索した子実体は 135 株中 48 株が発芽し，29 株で変形体の形成，3 株で子実体の形成に成功した．菌核の状態で作取されたもの 9 株では，7 株で変形体を形成し，1 株が子実体を形成した，変形体の状態で作取された 9 株は，LP/E 培地に接種したが，いずれも生育しなかった．
- ・ 2003 年度には *Fuligo* 属で変形体および子実体の形成に成功した．また，*Tubifera* 属，*Collaria* 属の変形体形成も本年度が初めてである．
- ・ 発芽実験の結果を考察したところ，前年までと同じく，新鮮な株を用いると発芽率が上昇することと，*Didymium* 属，*Physarum* 属，*Craterium* 属の発芽率が高いことが明らかとなった．

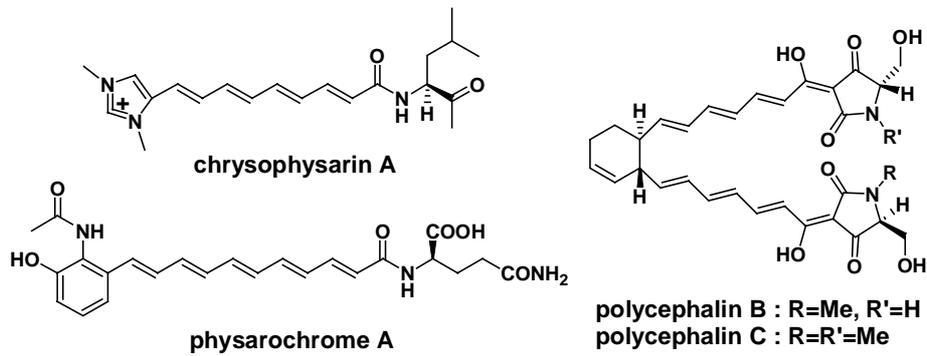
第 2 章 培養変形体の成分研究 (1) : *Physarum melleum* (01-19)

第 1 節 培養変形体の化学成分について

*Physarum*属に属する*physarum polycephalum* (モジホコリ) は, 液体培地やオートミールを添加した寒天平板培地による大量培養法が確立されている。そのため, 培養変形体からの化学成分に関する研究報告が数例あり, ステロールや黄色色素成分の報告がなされている^{9),11),12),33),34)}。さらに, *Physarum*属では, 2002 年度に当研究室において*Physarum rigidum*の成分研究が行われ, 黄色色素成分であるphysarigin A-Cが単離されている^{14),15)} (Fig.2-1)。

また, *Didymium*属の変形菌の化学成分に関する研究報告は 3 例あり, そのいずれもが当研究室で行われたものである。*Didymium minus*の培養変形体からは, 数種のステロール類が単離され^{19, 20)}, *Didymium squamulosum*の培養変形体からは, シクロプロパン環を有する脂肪酸¹⁷⁾およびclionasterol¹³⁾が単離されている。また, *Didymium bahiense*の培養変形体からは, 赤色色素であるmakaluvamine A, B¹⁷⁾およびbahiensol^{15, 35)}が単離され, *Didymium iridis*からはmakaluvamine Iおよびdamirone C^{26), 36)}が単離されている (Fig.2-2)。

from *Physarum polycephalum*^{11),33),34)}



from *Physarum rigidum*^{14),15)}

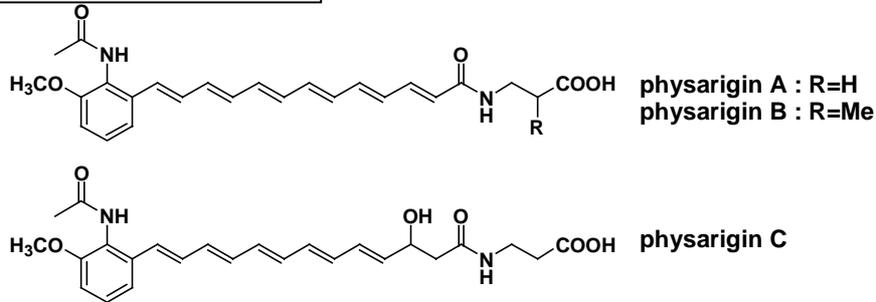
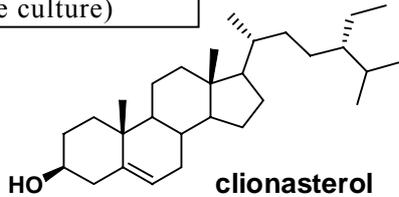
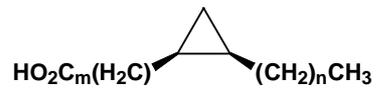


Fig.2-1 *Physarum* 属から単離報告のある化合物例

from *Didymium minus*
D. squamulosum
(plate culture)

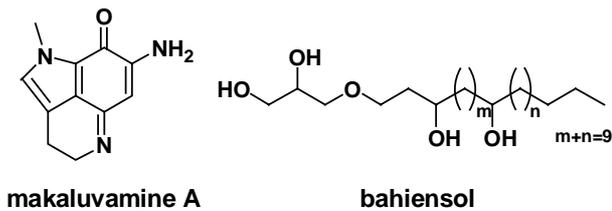


from *D. squamulosum*
(liquid culture)



m+n=12: 17-cyclopropane fatty acid
m+n=14: 19-cyclopropane fatty acid

from *D. bahiense* (plate culture)



from *D. iridis* (plate culture)

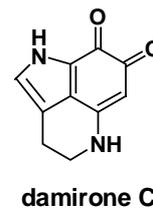


Fig.2-2 *Didymium* 属から単離報告のある化合物例

第2節 *Physarum melleum* について

Physarum melleum(シロジクキモジホコリ)は,モジホコリ目モジホコリ科に属する変形菌であり,暖地で春から秋によく見られる.野外の変形体は黄色あるいはうぐいす色を帯びた緑色であり,子実体は有柄で群生し,高さは0.6-1.2 mmである^{10), 43)}.

Physarum melleum 01-19 株は,2001年に埼玉県所沢市さいたま緑の森博物館で子実体が採取され他.2001年度の当研究室における野外採取変形菌の発芽実験により発芽が観察され,さらには変形体および子実体の形成にも成功し,生活環の1サイクルが観察可能な株である.培養子実体の胞子はスキムミルク・グルコース液中で凍結保存し,その胞子からの発芽にも成功している.

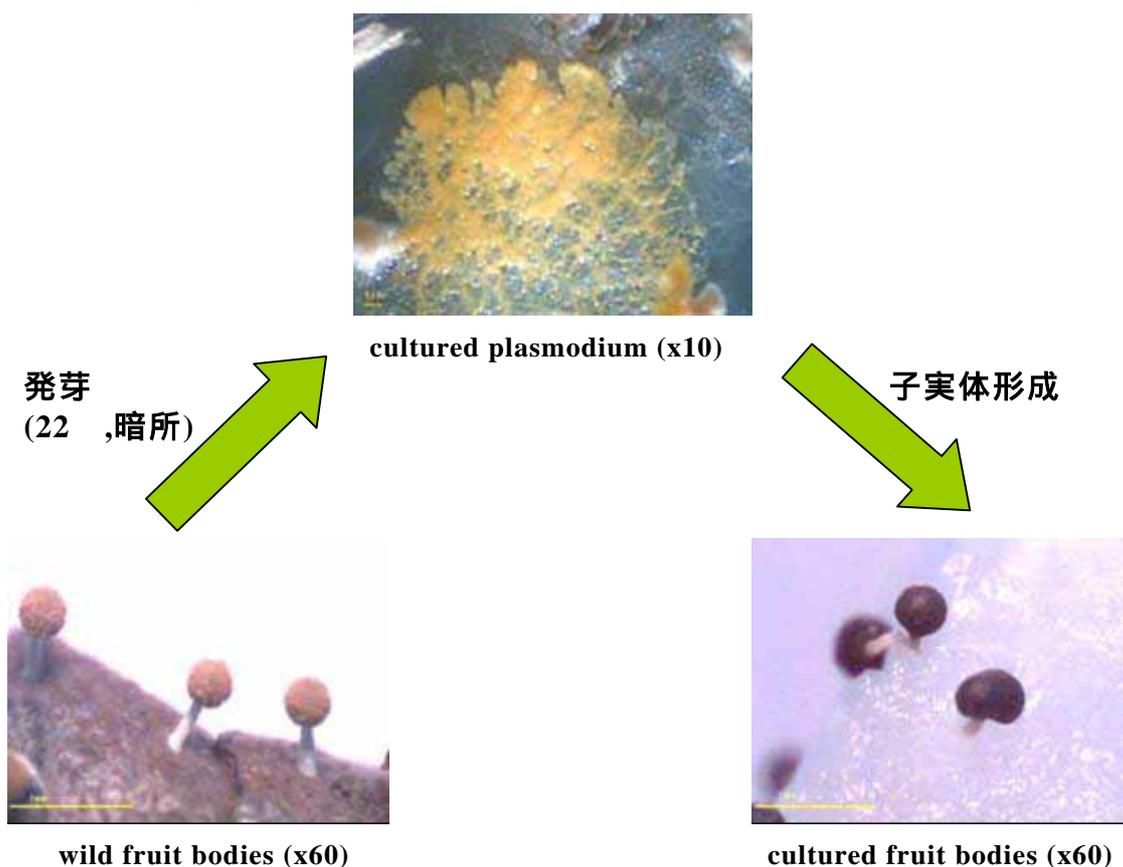


Fig.2-3 *Physarum melleum* (01-19)

* 野外子実体では,胞子嚢が色素を含んだ石灰質で覆われているが,培養子実体では石灰質が少ないため色が異なって見える.

第 3 節 melleumin A (1) , B (2)の単離・構造解析について

Physarum melleum (01-19)培養変形体の化学成分に関する研究は, 2003 年度に当研究室の中谷さと美氏により行われ, melleumin A, Bと命名した 2 種の新規ペプチド化合物が単離された. *Physarum melleum*の変形体を, *E. coli*を塗布したLP平板培地上で培養を行い, 平板培地の合計 3110 枚分の大量培養を行った. この菌体の 90 %メタノールおよび 90 %アセトンの抽出エキス 3.37 gを酢酸エチルと水で分配し, 220.7 mgの酢酸エチル層を各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行い, melleumin A (1)を 1.9 mg, melleumin B (2)を 6.5 mg単離している. ^1H , ^{13}C NMRスペクトルおよび ^1H - ^1H COSY, HMQC, HMBCスペクトルの解析により, melleumin A (1)およびmelleumin B (2) は

-メトキシ安息香酸, グリシン残基, スレオニン残基, およびチロシニル酢酸からなることが明らかとなった. また, 2 は 1 の 1 位と 16 位間のラクトン環が開裂した構造であることが判明した²⁶⁾. 以上melleumin A (1), B (2)の平面構造の決定までは中谷氏が行ったが, 立体化学については不明であった. そこで, 本研究では, melleumin A (1)およびB (2)の 3, 10 ならびに 11 位の絶対立体配置について検討を行った.

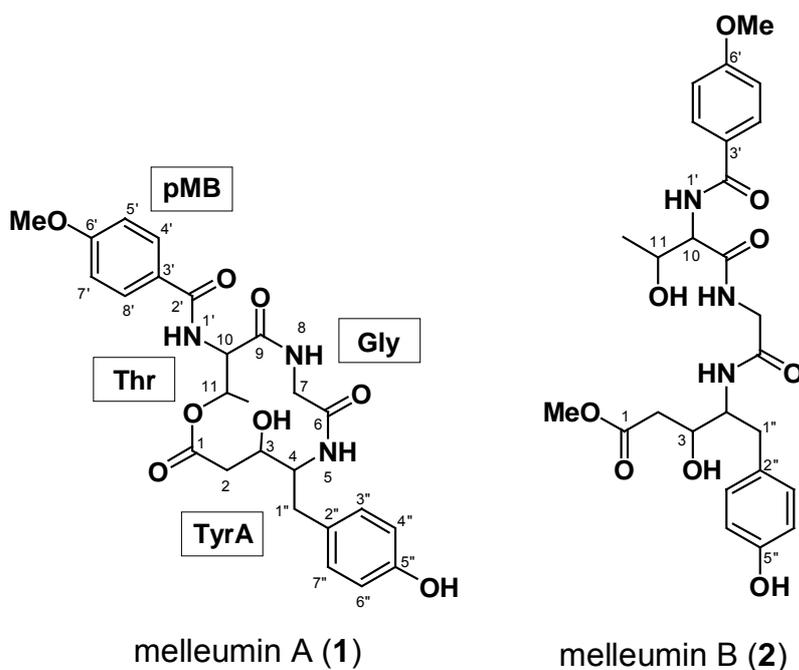


Fig.2-4 Structures of melleumin A (1) and B (2)

Table 2-1 Physico-chemical properties of melleumin A (1) and B (2)

	melleumin A (1)	melleumin B (2)
Appearance	Colorless amorphous solid	Colorless amorphous solid
FABMS (<i>m/z</i>)	500 [M+H] ⁺ 522 [M+Na] ⁺	532 [M+H] ⁺ 554 [M+Na] ⁺
Molecular formula	C ₂₅ H ₂₉ O ₈ N ₃	C ₂₆ H ₃₃ O ₉ N ₃
HRFABMS	calcd for C ₂₅ H ₃₀ O ₈ N ₃ 500.2034 (M+H) ⁺ found : 500.1995	calcd for C ₂₆ H ₃₄ O ₉ N ₃ 532.2295 (M+H) ⁺ found : 532.2338
[α] _D	[α] _D ²⁶ +27 (c 0.15, MeOH)	[α] _D ²⁶ ca. 0 (c 0.32, MeOH)
CD (MeOH) λ _{ext}	208 (Δε -3.3) and 244 nm (+4.7)	212 (Δε -6.1), 224 (-1.9), and 252 nm (+2.7)
UV (MeOH) λ _{max}	254 (ε 15000) and 225 nm (13000)	254 (ε 13000) and 226 nm (10000)
IR (film) ν _{max} cm ⁻¹	3420, 2930, 1720, 1640, 1610, 1510, and 1250	3410, 2925, 1730, 1660, 1640, 1630, 1610, 1510, 1500, 1440, and 1260
HPLC retention time ^a	19.9 min	14.8 min

^aColumn: Develosil ODS HG-5; 10 x 250 mm; eluent: 50% MeOH; flow rate: 1.8 mL/min; detection: UV at 254 nm

Table 2-2 NMR data for melleumin A (1) and B (2)

position	melleumin A (1)			melleumin B (2)		
	δ _H	<i>J</i> in Hz	δ _C	δ _H	<i>J</i> in Hz	δ _C
1			170.7			171.8
2	2.36	m	38.7	2.29	dd 15.6, 9.5	38.3
	2.55	m		2.38	dd 15.6, 3.7	
3	3.75	m	69.6	3.91	m	67.5
4	4.1	m	54.9 ^a	3.84	m	54.7
5	6.21	d 10.4		7.53	d 9.2	
6			169.2 ^b			168.5
7	3.49	m	44.4	3.57	dd 5.2, 16.7	42.2
	3.52	m		3.74	dd 6.3, 16.7	
8	8.54	br t		8.31	br t	
9			169.1 ^b			170.8
10	5	dd 8.9, 3.4	54.8 ^a	4.3	dd 7.6, 4.9	60.1
11	5.63	dq 3.4, 6.4	71.7	4.08	m	66.7
12	1.20 (3H)	d 6.4	16.1	1.11 (3H)	d 6.4	20.0
1'	8.07	d 8.9		8.02	d 7.6	
2'			166.6			166.3
3'			126.0			126.1
4',8'	7.91 (2H)	d 8.9	129.4 ^c	7.89 (2H)	d 8.9	129.4
5',7'	7.01 (2H)	d 8.9	113.4	7.01 (2H)	d 8.9	113.5
6'			161.8			161.8
1''	2.86	dd 14.7, 2.4	30.8	2.73	dd 13.7, 5.8	35.0
	2.57	m		2.47	dd 13.7, 8.6	
2''			129.3			129.1
3'',7''	6.95	d 8.5	129.6 ^c	6.93	d 8.6	129.9
4'',6''	6.63	d 8.5	115.0	6.59	d 8.6	114.9
5''			155.5			155.4
1-OMe				3.55 (3H)	s	51.2
6'-OMe	3.81 (3H)	s	55.4	3.81 (3H)	s	55.4
3-OH	5.43	d 3.9		5.13	d 5.5	
11-OH				5.09	d 6.1	
5''-OH	9.15	br s		9.12	br s	

^{a,b,c} Signals may be reversed.

第 4 節 melleumin A (1) , B (2)の立体配置の検討

始めに, melleumin A (1)の ROESY スペクトル (Fig. 2-12)の解析により, 5 位と 7 位に相関が観測されたことから, チロシニル酢酸とグリシン残基のつながりが確認され, 8 位と 10 位に相関が観測されたことから, グリシン残基とスレオニン残基のつながりが確認された. また, 1' 位と 8' 位に相関が観測されたことから, スレオニン残基と *p*-メトキシ安息香酸とのつながりが確認された.

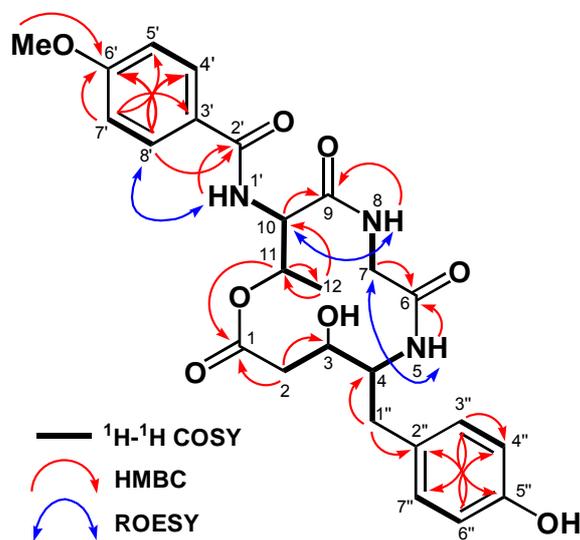


Fig.2-5 2D NMR and ROESY correlations of 1

次に, 0.1 mg の melleumin A (1)をドライメタノール 500 μL に溶解し, 28 % MeONa メタノール溶液 10 μL を加えて 5 分間反応させた. 反応後, TLC 分析を行い, melleumin B (2)が生成されたことを確認した.

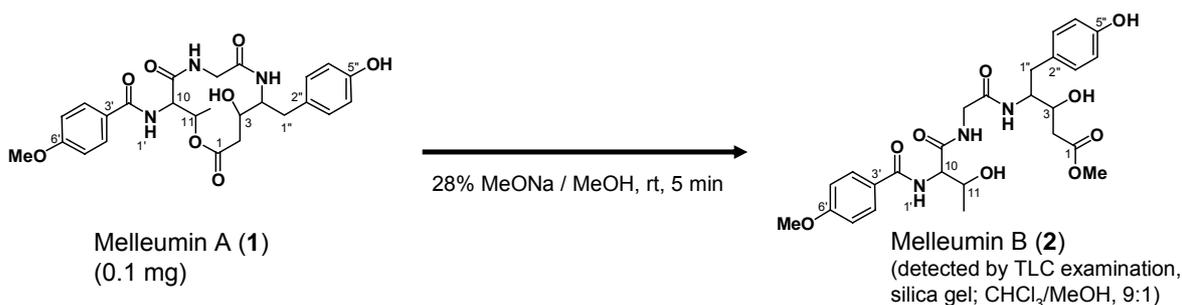


Fig.2-6 Conversion of melleumin A (1) into melleumin B (2)

そして, melleumin のスレオニン残基部分である 10, 11 位の絶対立体配置を決定するため, melleumin B (2)の加水分解を行い, 加水分解物のスレオニンが, D-Thr (10R,11S), D-allo-Thr (10R,11R), L-Thr (10S,11R), L-allo-Thr (10S,11S)の 4 通りの標品のうちどのスレオニンと一致するのかを, キラル

3*S*, 10*S*, 11*R*と決定した。

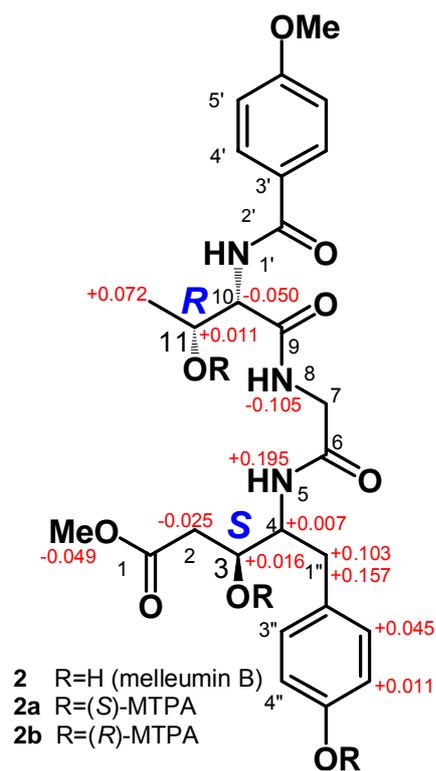


Fig.2-8 $\Delta\delta$ values [$\Delta\delta(\text{in ppm})=\delta_S-\delta_R$] obtained for (*S*) and (*R*)-MTPA esters

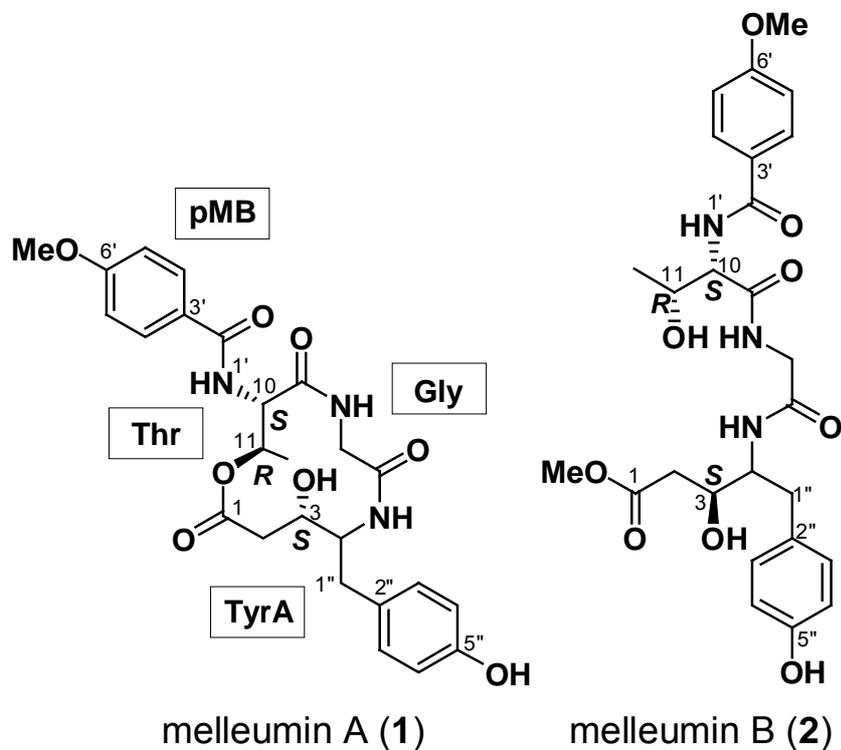


Fig.2-9 Structures of melleumin A (1) and B (2)

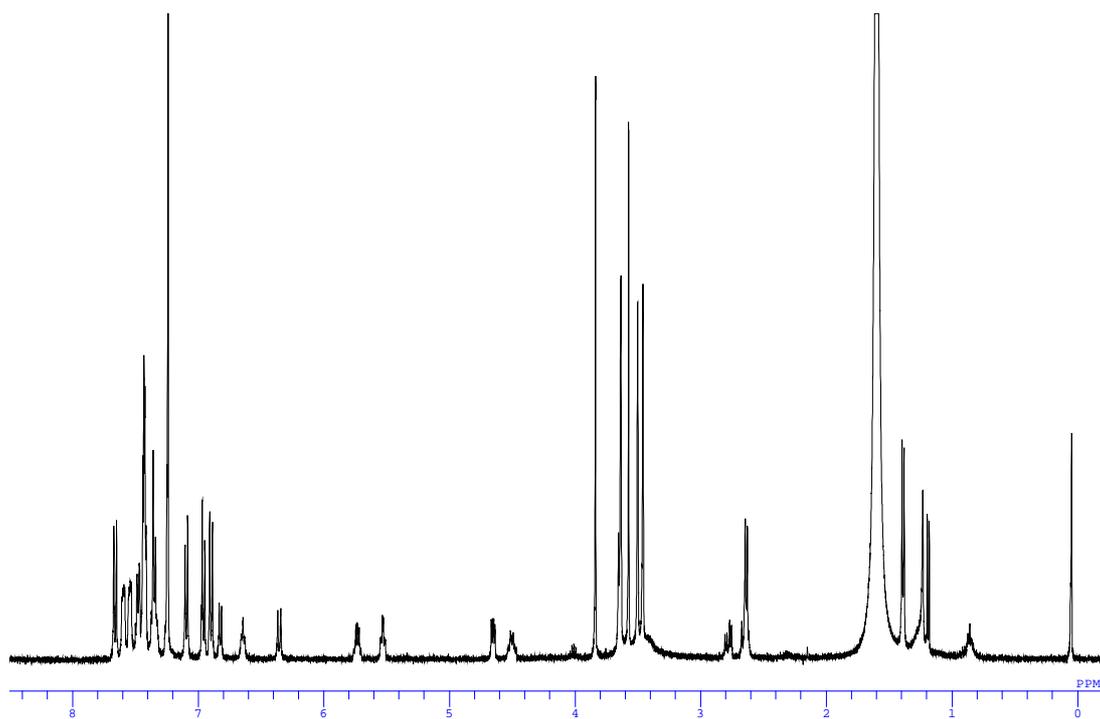


Fig.2-10 ^1H NMR spectrum of melleumin B (*S*)-MTPA ester (2a) in CDCl_3

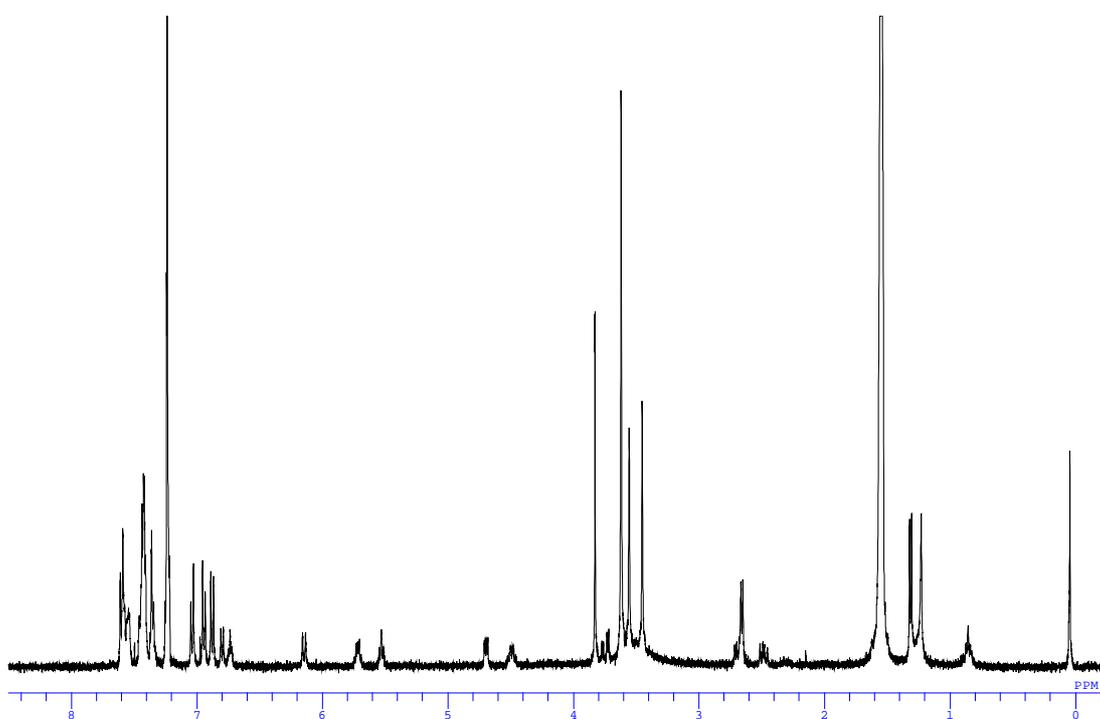


Fig.2-11 ^1H NMR spectrum of melleumin B (*R*)-MTPA ester (2b) in CDCl_3

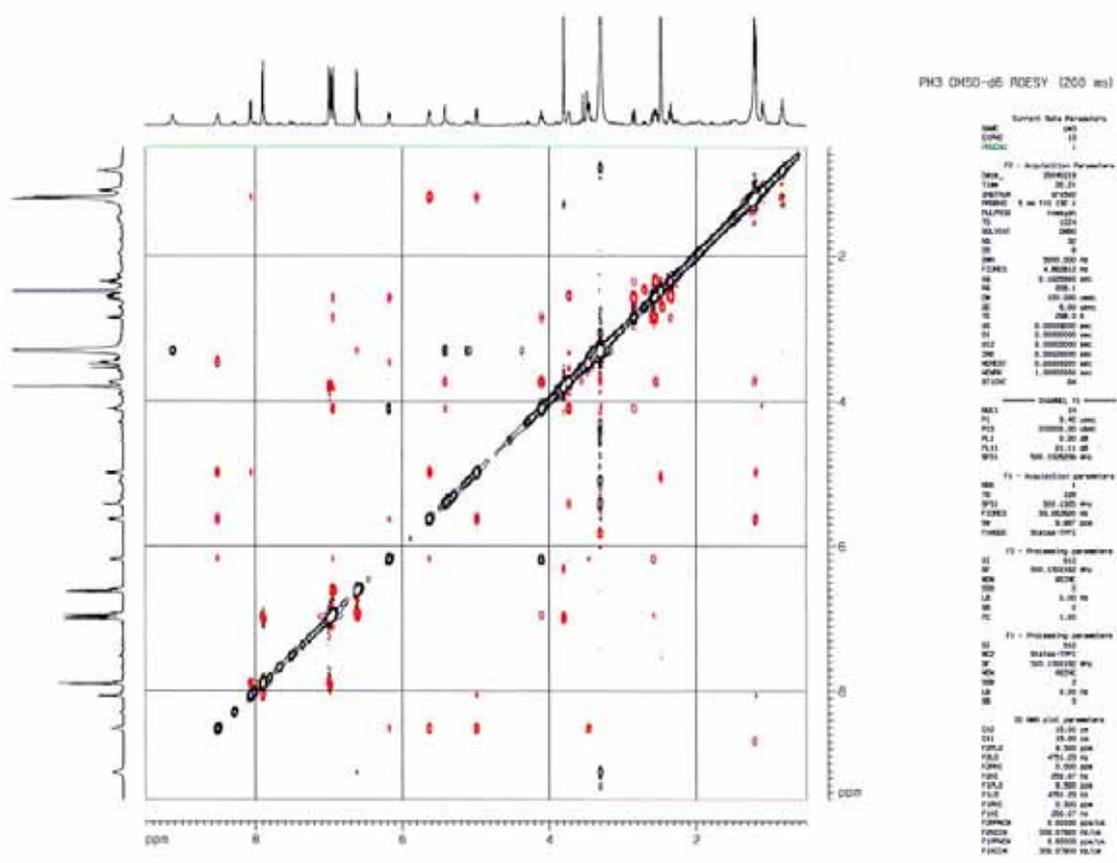


Fig. 2-12 ROESY spectrum of melleumin A (1)

第 5 節 小括

本章では、*Physarum melleum* 培養変形体から単離された新規ペプチド化合物 melleumin A (1), B(2) の立体配置の検討を行った。その結果、melleumin A (1), B(2) の 3 位、10 位および 11 位の絶対立体配置は、それぞれ *S*, *S*, *R* 配置であることを明らかにした。

第3章 培養変形体の成分研究 (2) : *Physarum bethelii* (03-138)

第1節 *Physarum bethelii* について

Physarum bethelii (ベテルモジホコリ)は,モジホコリ目モジホコリ科に属する変形菌で,主に夏に腐木上に発生する.変形体は黄色であり,子実体は有柄で群生し,高さは1-1.5 mmである.子嚢は平たい球形,底部はややへそ状,直径0.6-0.8 mmである.本菌の成分研究に関する報告例はない.しかし,第2章で述べたように,本菌の属する *Physarum* 属では数例の報告がなされている.

本研究に用いた *Physarum bethelii* (03-118 株)は,2003 年度に千葉県千葉市若葉区いずみの森で採取され,当研究室で行った発芽実験により培養に成功し,子実体形成にも成功した株である.

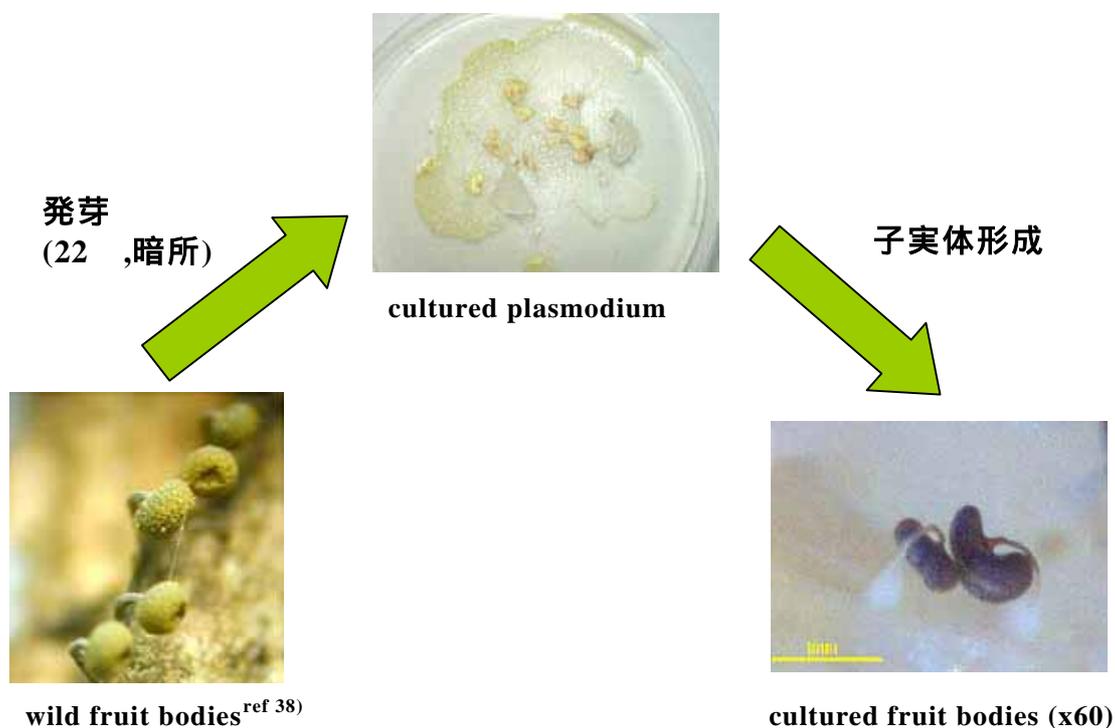


Fig.3-1 *Physarum bethelii* (03-118)

* 野外子実体では,孢子嚢が色素を含んだ石灰質で覆われているが,培養子実体では石灰質が少ないため色が異なって見える.

第 2 節 *Physarum bethelii* 培養変形体の成分研究

2003 年から 2004 年にかけて、本株変形体の大量培養を行った。オートミールを添加した LP 培地に変形体を接種し、 $\phi 9$ cm シャーレー面に変形体が広がるまで 25 日間、暗所で約 4 日間培養した後、スパーテルで菌体を培地からはがし取った。予備培養した本株変形体の抽出物について *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性試験を行ったが、活性を示さなかった。集めたシャーレ ($\phi 9$ cm) 1004 枚分の変形体を凍結乾燥後、得られた 43.3 g の凍結乾燥菌体を 90 % MeOH で 2 回、90 % Acetone で 1 回抽出し、抽出物 4.4 g を得た。TLC 分析を行ったところ、目標とした本株に特徴的な黄色色素は 85 % MeOH 層に複数存在し、 $\text{CHCl}_3/n\text{-BuOH/AcOH/H}_2\text{O}=1.5/6/1/1$ を展開溶媒に用いたシリカゲル TLC および ODS TLC で展開された (Fig.3-3)。85 % MeOH 層を、MeOH/H₂O 溶媒を用いた ODS カラムクロマトグラフィーにより分画した結果、黄色色素は主に Fr.1C から 1F および 1H に、くすんだ黄緑色の色素が Fr.1G に見られた (Fig.3-4)。色素成分は、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}=8/5/1$ を展開溶媒に用いた TLC 分析においてスポットとして確認された。しかし、黄色色素について、本展開溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、¹H NMR で確認を行ったところ、シグナルが確認できず、化合物が分解されてしまったと思われた。シリカゲルでは吸着力が強すぎると考えられたため、主に Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより色素成分の分離を行った。しかし、黄色色素等の成分は不安定であると考えられ、精製後の TLC 分析および ¹H NMR においても、複数のスポットならびにシグナルが確認された。単離に成功したと思われる Fr.4E、Fr.9C (Fig.3-5) について NMR スペクトルの解析を行ったが、微量であり、かつ数日後にはシグナル強度が弱くなり、化合物が分解、あるいは変化していくものと思われた。色素成分の単離は困難と思われたため、続いて色素成分以外の成分探索を行ったが、TLC 分析により順相系では分離できず、逆相 HPLC でも分離困難であったため、二次代謝産物と思われる化合物の単離には至らなかった。

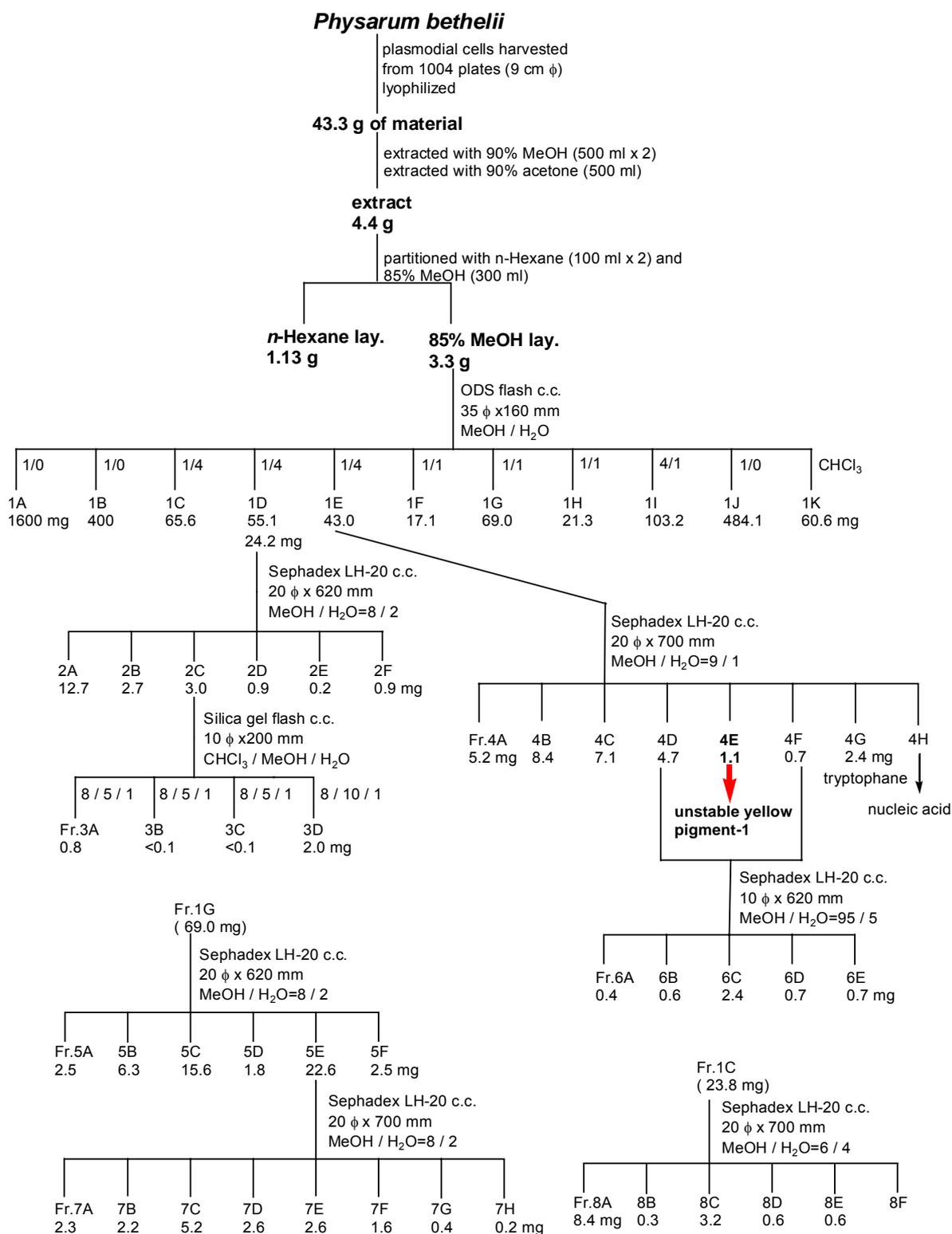


Fig.3-2 Separation of 85 %MeOH layer of *P. bethelii*

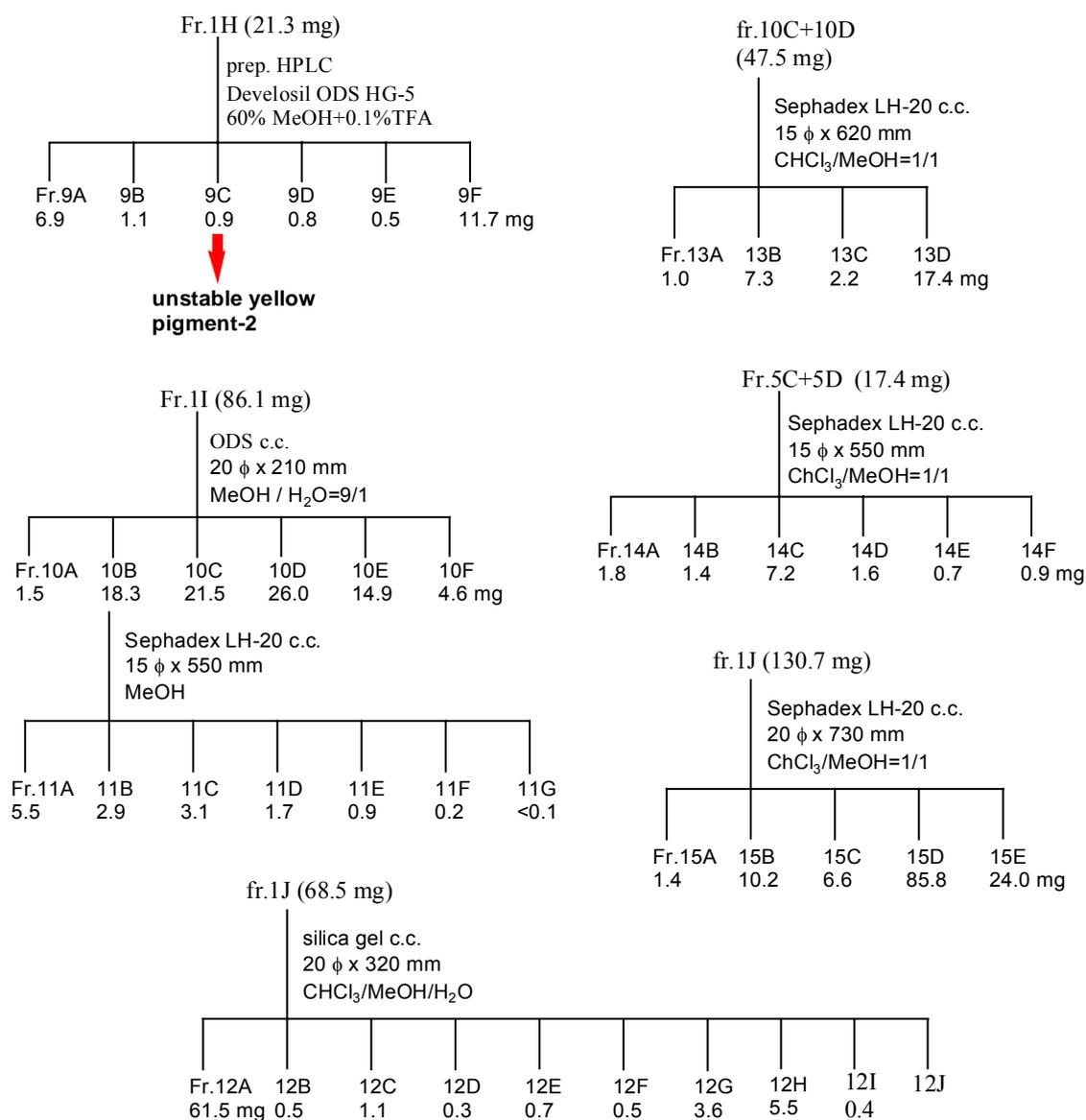


Fig.3-2 (continued)

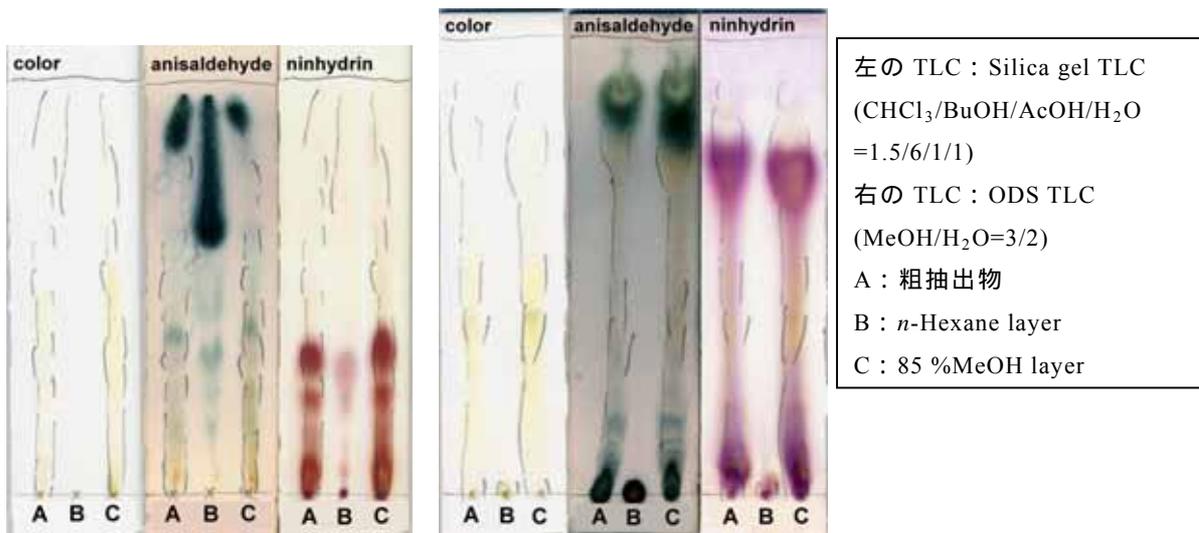


Fig.3-3 TLC analysis of *n*-Hexane and 85 %MeOH layer

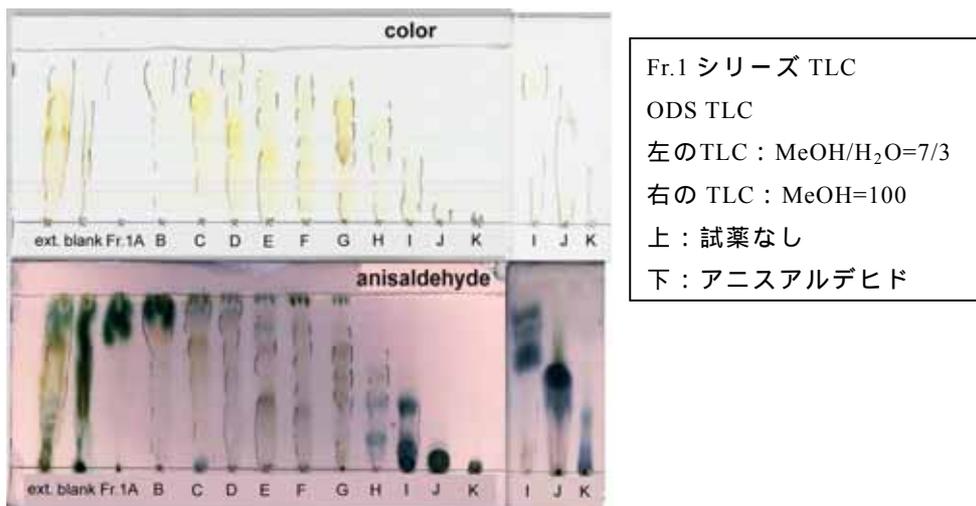


Fig.3-4 TLC analysis of Fr.1A-1K

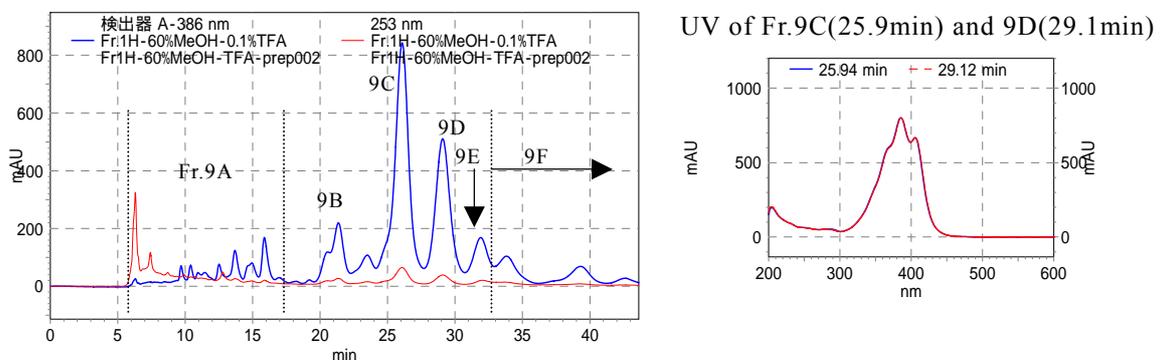
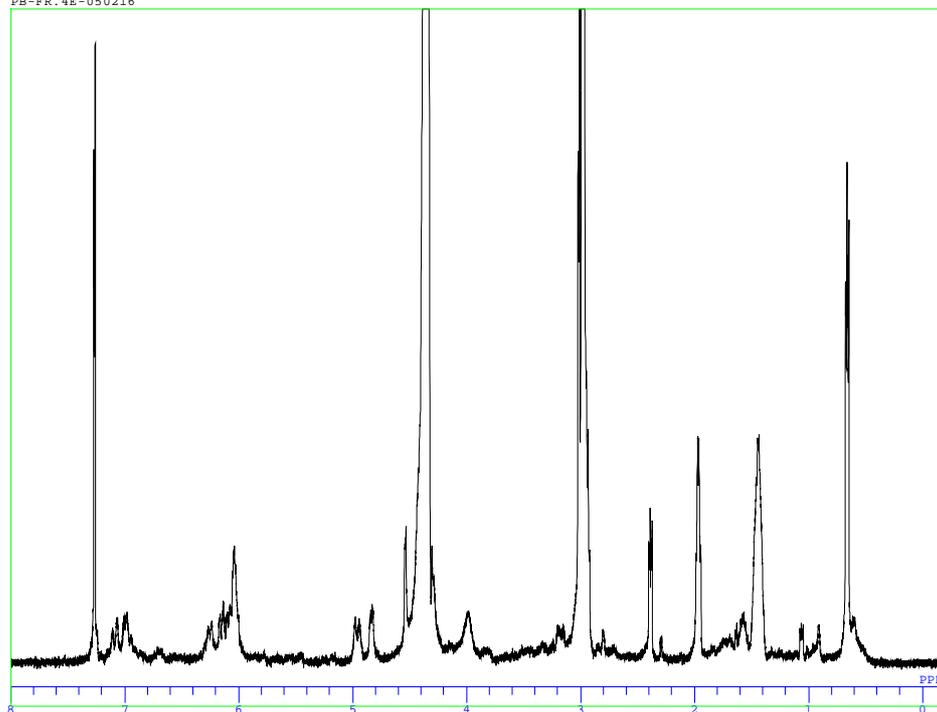


Fig.3-5 Preparation HPLC of Fr.1H

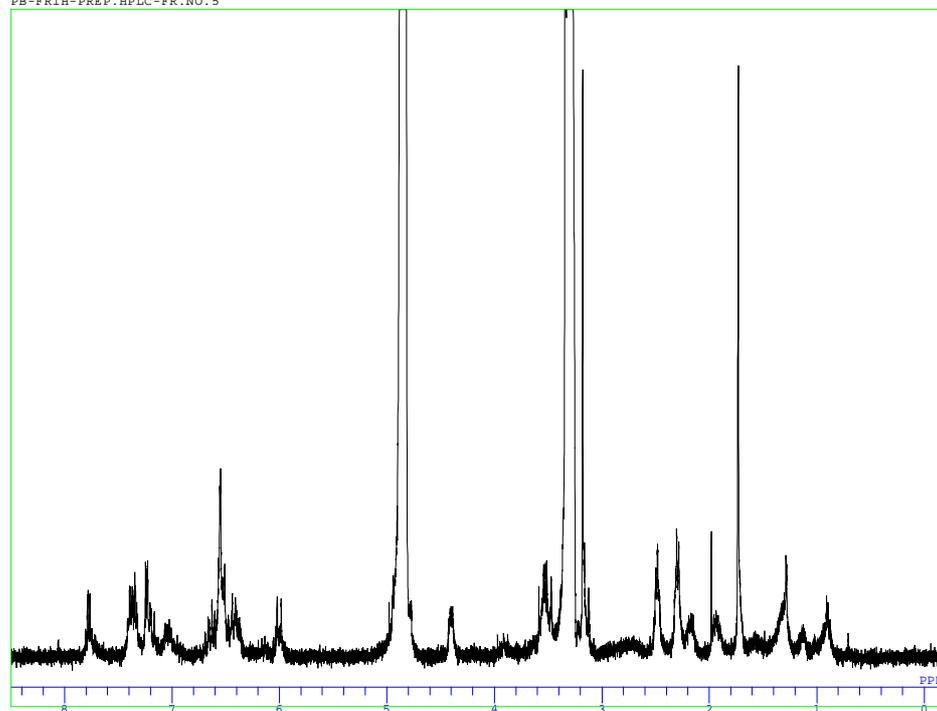
G:\ALICE95\DATA\A400\§""c\Physarum bethelii·IG''I\Fr.4%0%P\Fr.4E-050216.als
PB-FR.4E-050216



DFILEG:\ALICE95\DATA\A400\§""c\Physarum bethelii
COMNTPB-FR.4E-050216
DATIM
OBNUC1H
EXMODSINGL-NON
OBFRQ 399.65 MHz
OBSET 130.00 KHz
OBFIN 4500.0 Hz
POINT 32768
FREQU 7993.6 Hz
SCANS 64
ACQTM 4.099 sec
PD 2.500 sec
PWL 4.0 us
IRNUC1H
CTEMP 21.6 c
SLVNTCDCL3
EXREF 7.26 ppm
BF 0.01 Hz
RGAIN 22

Fig.3-6 ¹H NMR spectrum of unstable yellow pigment-1 (Fr.4E)

G:\ALICE95\DATA\A400\§""c\Physarum bethelii·IG''I\Fr.9%0%P\Fr.1H-Prep.HPLC-Fr.No.5.als
PB-FR1H-PREP.HPLC-FR.NO.5



DFILEG:\ALICE95\DATA\A400\§""c\Physarum bethelii
COMNTPB-FR1H-PREP.HPLC-FR.NO.5
DATIM
OBNUC1H
EXMODSINGL-NON
OBFRQ 399.65 MHz
OBSET 130.00 KHz
OBFIN 4500.0 Hz
POINT 32768
FREQU 7993.6 Hz
SCANS 64
ACQTM 4.099 sec
PD 2.500 sec
PWL 4.0 us
IRNUC1H
CTEMP 22.7 c
SLVNTCD3OD
EXREF 3.30 ppm
BF 0.01 Hz
RGAIN 22

Fig.3-7 ¹H NMR spectrum of unstable yellow pigment-2 (Fr.9C)

第3節 小括

本章では *Physarum bethelii* (03-118)の培養変形体の大量培養を行い,抽出エキスの分画を行った。黄色色素成分の単離を目指し,分画を進めたが,黄色色素は不安定であると考えられ,単離は困難であった。単離に成功したと思われた2種の黄色色素は微量であり,かつ化合物が変化あるいは分解していくものと思われ,化学構造の解明には至らなかった。また,色素以外の成分も分離困難であり,単離には至らなかった。

第4章 野外採取子実体の成分研究 (1) : *Tubifera dimorphotheca* (01-88)

第1節 *Tubifera dimorphotheca* について

Tubifera dimorphotheca (コモチクダホコリ)は、コホコリ目ドロホコリ科クダホコリ属に属する変形菌であり、春から秋、特に梅雨明け頃に腐木上に発生する^{10), 43)}。子実体は全高約1 cm、直径約3 cmまでで、群生または散生する。個々の単子嚢体は、淡褐色から赤褐色を帯びる。本研究に用いた株は、2001年8月に高知県高知市大津高で山本幸憲先生により採取され同定して頂いたものである。

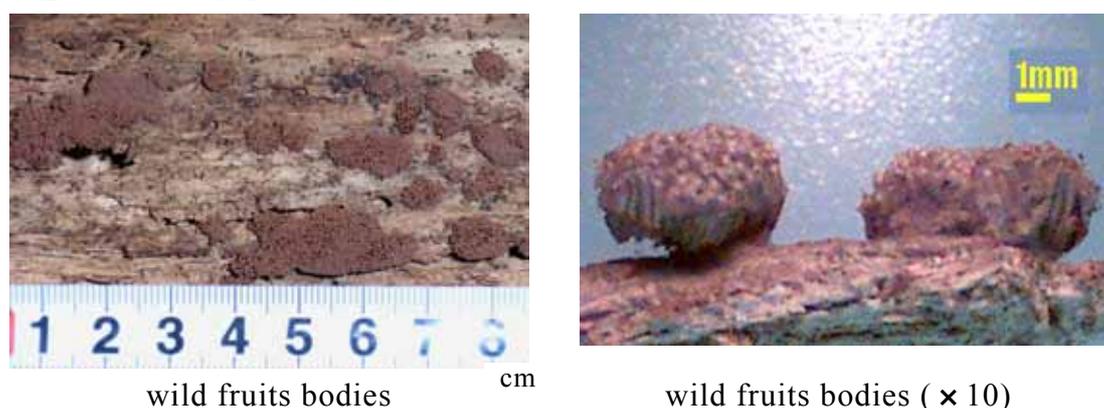


Fig.4-1 *Tubifera dimorphotheca*

本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにないが、本菌の属する *Tubifera* 属では、2002年度に当研究室で研究が行われた *Tubifera casparyi* 野外採取子実体についてのみ、成分研究例がある。この際、細胞周期阻害性成分の探索を目的として化学成分の研究が行われ、arcyriaflavin 類 3 種が単離されている (Fig.4-2)。また、単離されたarcyriaflavin C は、100 ng/mLの濃度でG₂/M期において細胞周期の進行を阻害することが示された。

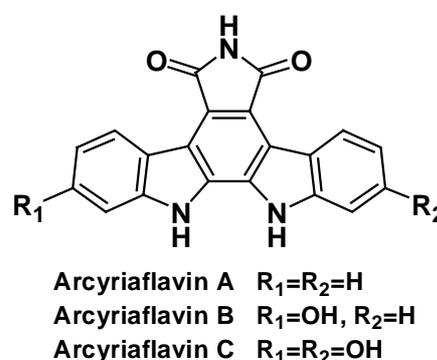


Fig.4-2 Arcyriaflavins from *Tubifera casparyi*

第 2 節 *Tubifera dimorphotheca* の成分探索

Tubifera dimorphotheca 野外採取子実体 (3.7 g) を 90 %メタノールおよび 90 %アセトンで抽出し, 305.0 mg の粗抽出物を得た。この粗抽出物をメタノール/水系溶媒を用いた ODS カラムクロマトグラフィーで粗分けを行ない, Fr.1A-1F を得た。比較的量的ある Fr.1D をシリカゲルカラムに負荷し, *n*-Hexane/EtOAc で溶出させ, Fr.2A-2I を得た。¹H NMR を測定したところ, Fr.2H, 2I は脂肪酸と思われ, 他のフラクションはステロイドまたはテルペン類と思われるシグナルが観測されたが, 量が少ないためさらなる精製は行わなかった。次に, Fr.1C について¹H NMR を測定してみたところ, ステロールと思われるシグナルが確認されたが, 9 ppm 付近にアルデヒド基と思われるシグナルが観測された。Fr.1C の分取条件を検討したところ, 直径 10 mm の Develosil ODS HG-5 カラムでは, 濃度を 10 mg/mL に調製したサンプル 5 μL を注入した時はピークの分離が良好であったが (Fig.4-3), 5 μL 以上注入するとブロードなピークになってしまうことがわかった。直径 10 mm のカラムで精製すると時間がかかり過ぎてしまうため, 直径 20 mm の Develosil ODS HG-5 カラムを用いて, 注入量を増やすことにより分取した。移動層に 75 %メタノールを用いた ODS HPLC で分取し (Fig.4-4) , tubiferal A (3) と命名した新規化合物を単離した。また, 複数のピークが重なった Fr.3A を, Develosil C₃₀ UG-5, YMC Pack ODS-AM, Inertsil ODS-3, Develosil ODS HG-5 の 4 種のカラム (いずれも 10φ × 250 mm) で分離条件を検討したところ, Develosil ODS HG-5 (10φ × 250 mm) を用いた時に最も良い分離が見られた。移動層に 65 %メタノールを用いた分取 HPLC で精製を行ったが, 20 mg/mL のサンプル濃度で 5 μL 以上インジェクトを行うとピークが重なってしまうため, サンプルを 5 μL ずつインジェクトし, 繰り返し分取 HPLC を行うことにより, tubiferal B (4) と命名した新規化合物を単離した。なお, ODS TLC 分析により, 展開溶媒にメタノール/水=9/1 を用いたときの tubiferal A および B の R_f 値はそれぞれ 0.39, 0.64 であった。

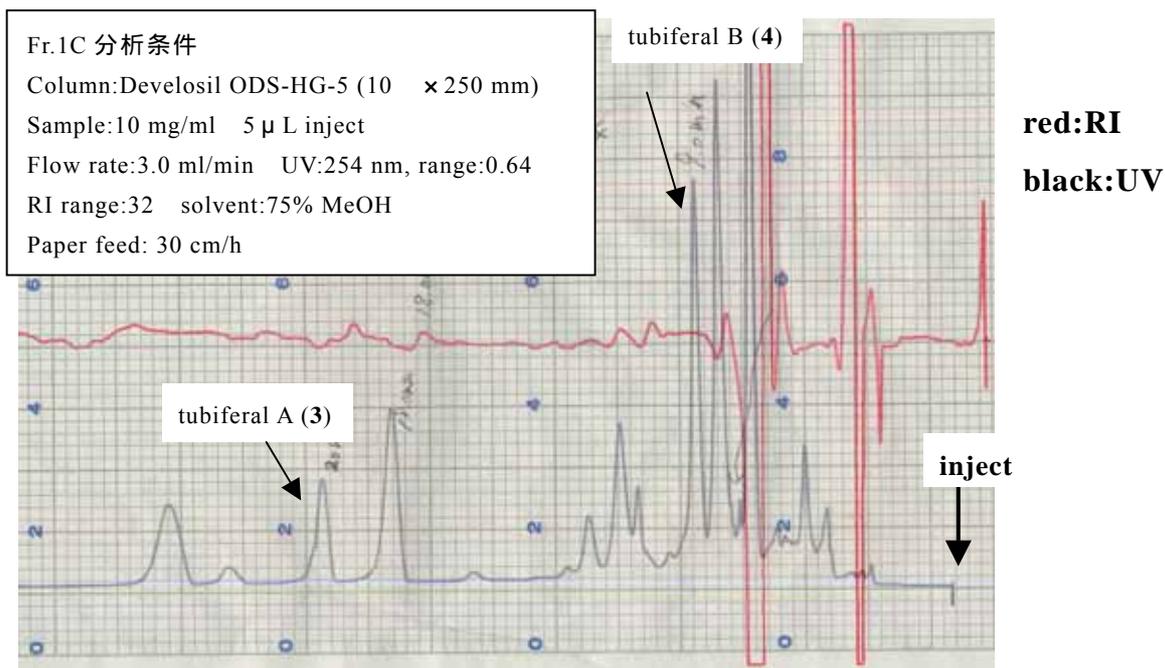


Fig.4-3 HPLC analysis of Fr.1C

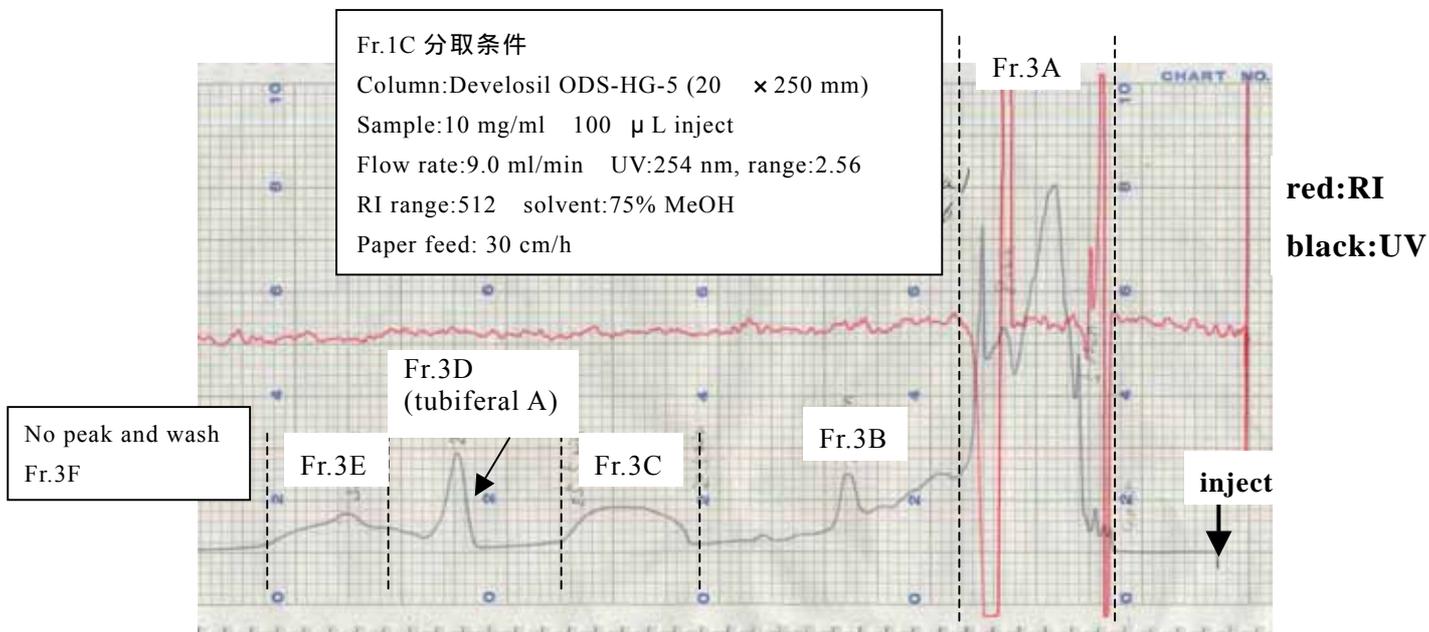


Fig.4-4 Preparative HPLC chart of Fr.1C

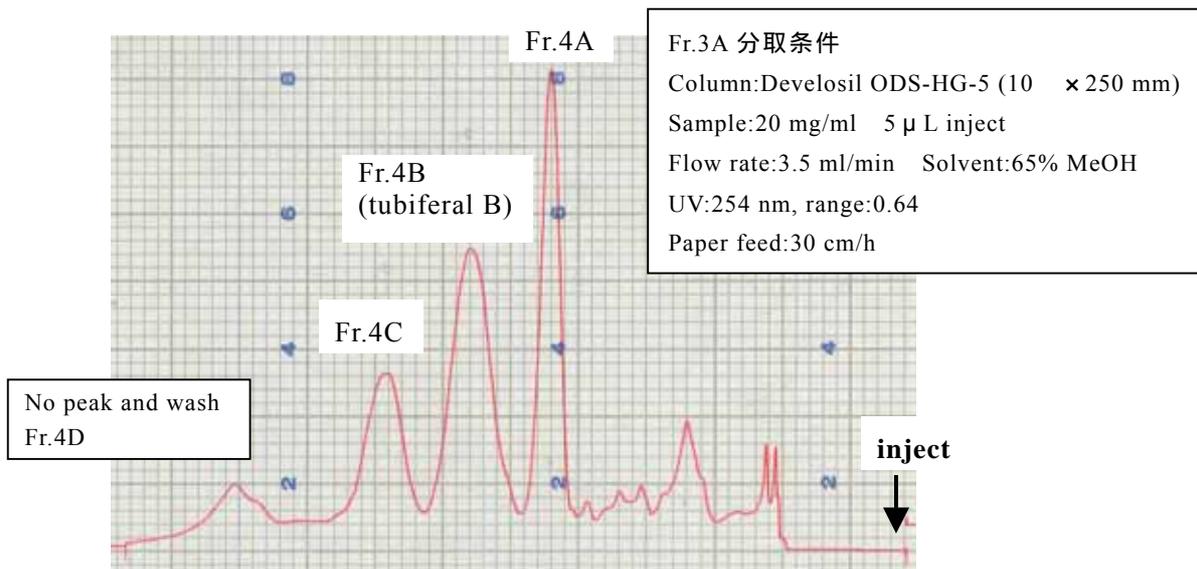


Fig.4-5 Preparative HPLC chart of Fr.3A

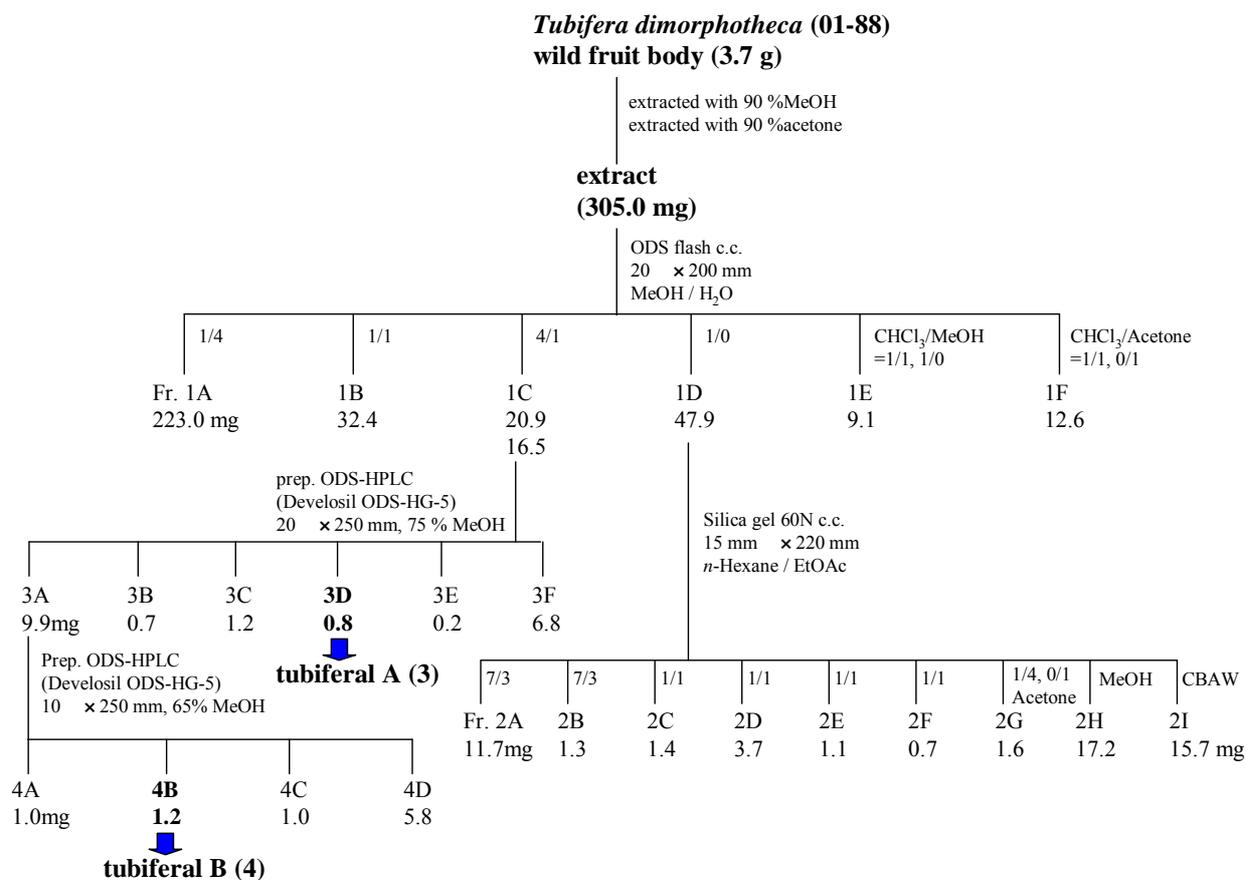


Fig.4-6 Isolation procedure of tubiferal A (3) and B (4)

tubiferal A ,B の増量ならびに tubiferal と類似した他の化合物の単離を目的として、新たに頂いた *Tubifera dimorphotheca* 野外採取子実体 (02-71 , 03-138 株)の溶媒抽出ならびに粗抽出物の分離 ,精製を行った .前回と同様に ODS カラムクロマトグラフィーにより粗抽出物の分離を行い , 80 %メタノール画分を分取 HPLC により精製を行い , tubiferal B (1.0 mg)の増量に成功した(Fig.4-7) .なお ,今回は直径 20 mm の分取用カラム (Develosil ODS HG-5 20φ・250 mm)で tubiferal Bを単離することができた (Fig.4-8) .tubiferal A のピークは分析時にわずかししか観測されず ,今回 tubiferal A の増量には至らなかった .

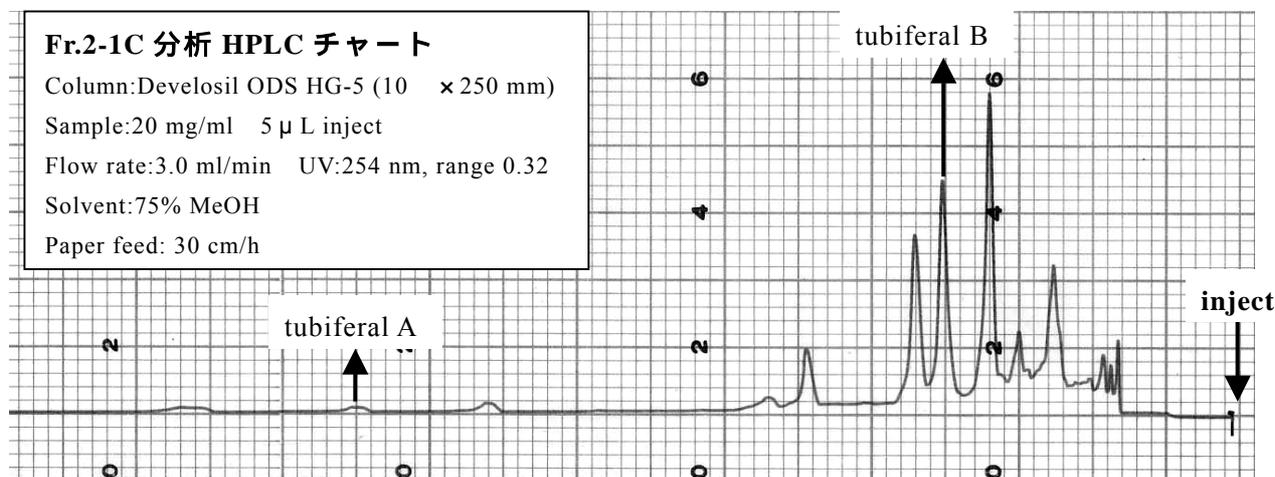


Fig.4-7 HPLC analysis of Fr.2-1C

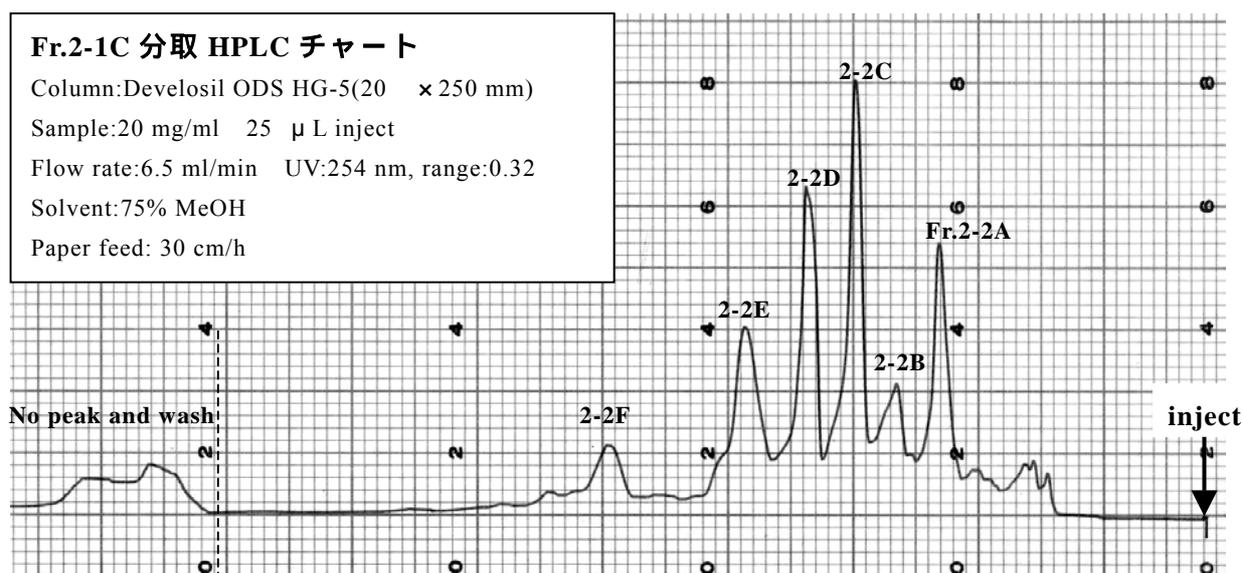


Fig.4-8 Preparative HPLC chart of Fr.2-1C

***Tubifera dimorphotheca* (02-71, 03-138)
extract
(225.6 mg)**

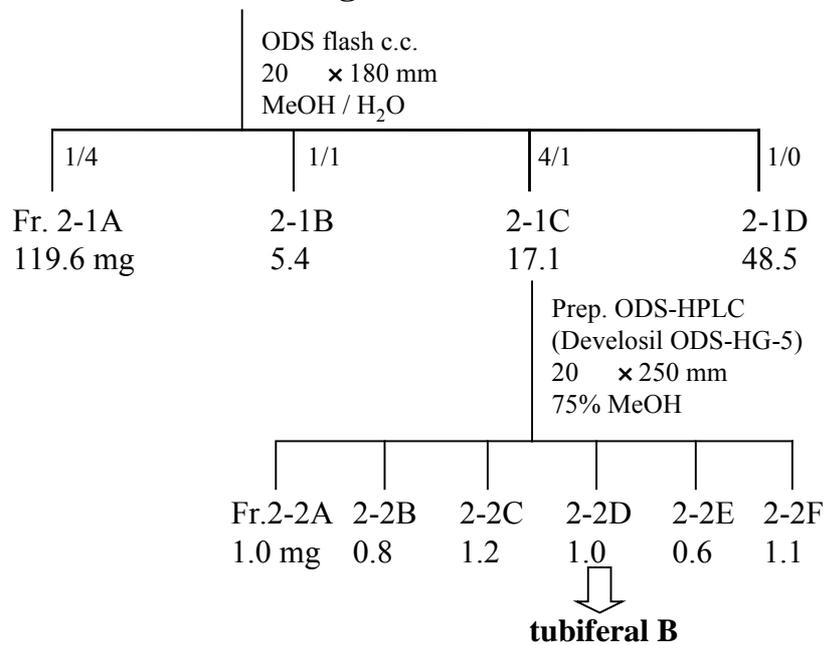


Fig.4-9 Isolation procedure of tubiferal B (4)

第3節 tubiferal A および B の構造解析

(1) tubiferal A (3)の構造解析

tubiferal A (3)は無色非結晶固体として単離された。FABMSスペクトルにおいて m/z 483 に $[M+H]^+$ とと思われるシグナルが観測され、高分解能FAB MS スペクトル (m/z 483.3101 $[M+H]^+$, Δ -0.9 mmu)の測定により、分子式 $C_{30}H_{42}O_5$ であることが明らかとなった。UVスペクトルから 239 および 246 nmに極大吸収が観測されたことから共役系が存在し、IRスペクトルからはヒドロキシ基に基づく吸収 (3390 cm^{-1})および2つのカルボニル基の吸収 ($1770, 1715\text{ cm}^{-1}$) が観測された。

重クロロホルムを測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトル(Fig.4-12, Table 4-1)では δ 9.65 にアルデヒド基と思われるシングレットのシグナル δ 6.10 (s), δ 5.78 (br t, $J=2.4\text{ Hz}$), δ 5.07 (br t, $J=7.2\text{ Hz}$)に3つのオレフィン水素由来のシグナル, δ 4.85 (ddd, $J=7.9, 6.3, 3.5\text{ Hz}$), δ 3.59 (m), δ 3.13 (d, $J=9.2\text{ Hz}$)に酸素が隣接していると思われる3つの sp^3 メチン水素のシグナル, 7つの sp^3 メチレン水素, 4つの sp^3 メチン水素, 5本全てシングレットのメチル基のシグナル (δ 1.70, δ 1.60, δ 1.07, δ 1.04, δ 0.77) が観測された。 ^{13}C NMR(Fig.4-13, Table 4-1)およびDEPTスペクトルの解析により, 1つのアルデヒド基のシグナル (δ 208.1), 1つのエステルカルボニル炭素のシグナル (δ 178.4), 3つのオレフィン4級炭素のシグナル (δ 137.7, δ 134.8, δ 133.5), 3つのオレフィンメチン炭素のシグナル (δ 130.2, δ 129.1, δ 123.0), 酸素が隣接していると思われる3つの sp^3 メチン炭素のシグナル (δ 82.5, δ 82.1, δ 71.3), 7つの sp^3 メチレン炭素のシグナル (δ 47.2, δ 37.8, δ 34.0, δ 29.8, δ 27.1, δ 25.9, δ 25.6), 4つの sp^3 メチン炭素のシグナル (δ 51.0, δ 50.1, δ 45.6, δ 43.0), 2つの sp^3 4級炭素 (δ 65.7, δ 45.0), 5つのメチル基の炭素のシグナル (δ 25.8, δ 24.7, δ 18.9, δ 17.9, δ 14.9) が観測された。

^1H - ^1H COSYスペクトルの解析 (Fig.4-10, 4-14)により, H2-1/H-2/H-3, H-5/H₂-6/H₂-7/H-8, H-11/H₂-12, H2-15/H-16/H-17/H-20/H-22, H-23/H-24 の

5 箇所の水素のつながりが明らかとなった。HMBCスペクトル (Fig.4-10, 4-16)の解析により、メチル基であるH₃-29 (δ 1.04)およびH₃-30 (δ 0.77)から δ_c 40.8 (C-4)に、H-3 (δ 3.13)から δ_c 24.7 (C-29)および δ_c 14.9 (C-30)に、H-5 (δ 2.04)からC-29 に相関が観測されたことから、H₃-29 およびH₃-30 のメチル基は四級炭素である δ_c 40.8 (C-4)に結合していることが考えられた。H₂-1 (δ 2.21, 2.52)およびH-3 からオキシメチン炭素である δ_c 71.3 (C-2)に、H₂-1 およびH₃-30 からオキシメチン炭素である δ_c 82.5 (C-3)に、H-3 から δ_c 40.8 (C-4)に、H₂-1 およびH₃-30 から δ_c 50.1 (C-5)に、H₂-1 およびH-5 (δ 2.04)からオレフィン四級炭素である δ_c 134.8 (C-10)にHMBC相関が観測されたことから、A環部分は2位および3位に1,2ジオール部分を有する六員環構造であることが明らかになった。次に、オレフィン水素であるH-19 (δ 6.10)から δ_c 47.2 (C-1), δ_c 50.1 (C-5), δ_c 134.8 (C-10), δ_c 129.1 (C-11)に、H₂-7 (1.25, 1.45)からC-5, δ_c 45.6 (C-8), δ_c 137.7 (C-9)にHMBC相関が観測され、H₂-1 からも δ_c 130.2 (C-19)にHMBC相関が観測されたことと、¹H-¹H COSYスペクトルによりH-5/H₂-6/H₂-7/H-8 のつながりが明らかになったことから、B環部分は7員環を形成することが考えられた。また、10位と19位ならびに9位と11位に、三置換二重結合が互いに共役したジエン部分が存在することが明らかとなった。H₂-7 およびメチル基であるH₃-18 (δ 1.07)からC-14 (δ 65.7)に、H₃-18 およびH-17 (δ 2.31)からC-12 (δ 37.8)に、H₃-18 およびH₂-15 (δ 2.68, δ 1.65)からC-13 (45.0)に、H₃-18 およびH-20 (δ 2.68)からC-17 (51.0)にHMBC相関が観測されたことと、¹H-¹H COSYスペクトルによりH-11/H₂-12 およびH₂-15/H-16/H-17 のつながりが明らかとなったことから、C環は六員環、D環は五員環構造であることが考えられた。また、メチル基であるH₃-18 (δ 1.07)は四級炭素であるC-13(δ 45.0)に結合していることが明らかになった。E環部分においては、H-17 (δ 2.31)から δ_c 43.0 (C-20)に、H-20 (δ 2.68)およびH-17 からエステルカルボニル炭素である δ_c 178.4 (C-21)にHMBC相関が観測されたことと、H-16 (δ 4.85)のシグナルが比較的 low field に観測されたことから、16位と21位の炭素は酸素を介して結合し、五員環ラク톤を形成していることが明らかとなった。以上のことから、tubiferal AはE環に五員環ラク톤を有する 6-7-6-5-5 員環からなる構

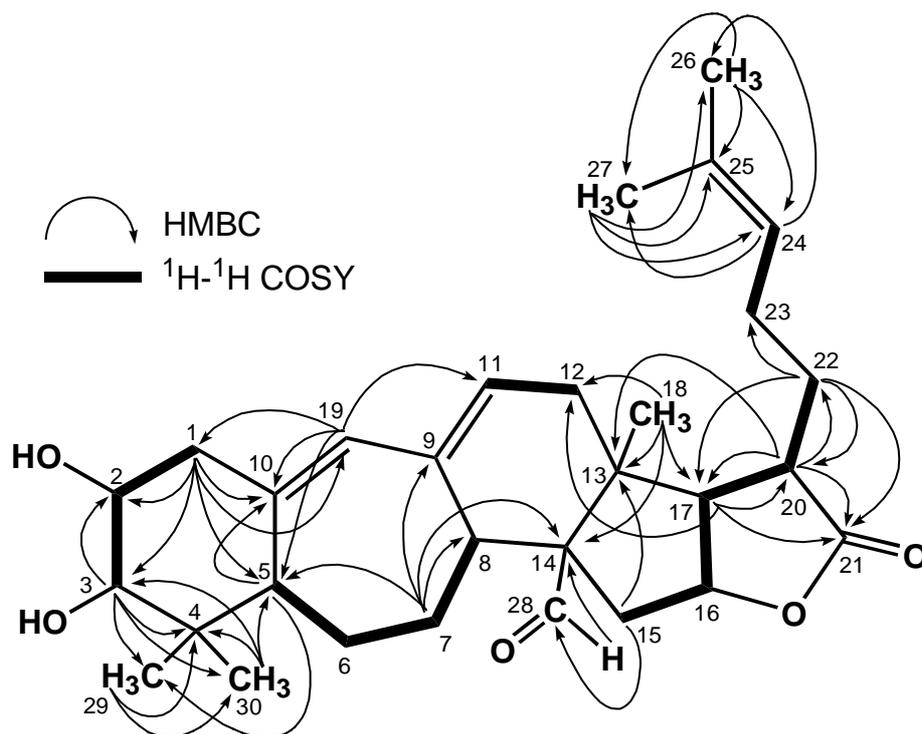


Fig.4-10 HMBC and $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY correlations of tubiferal A (3)

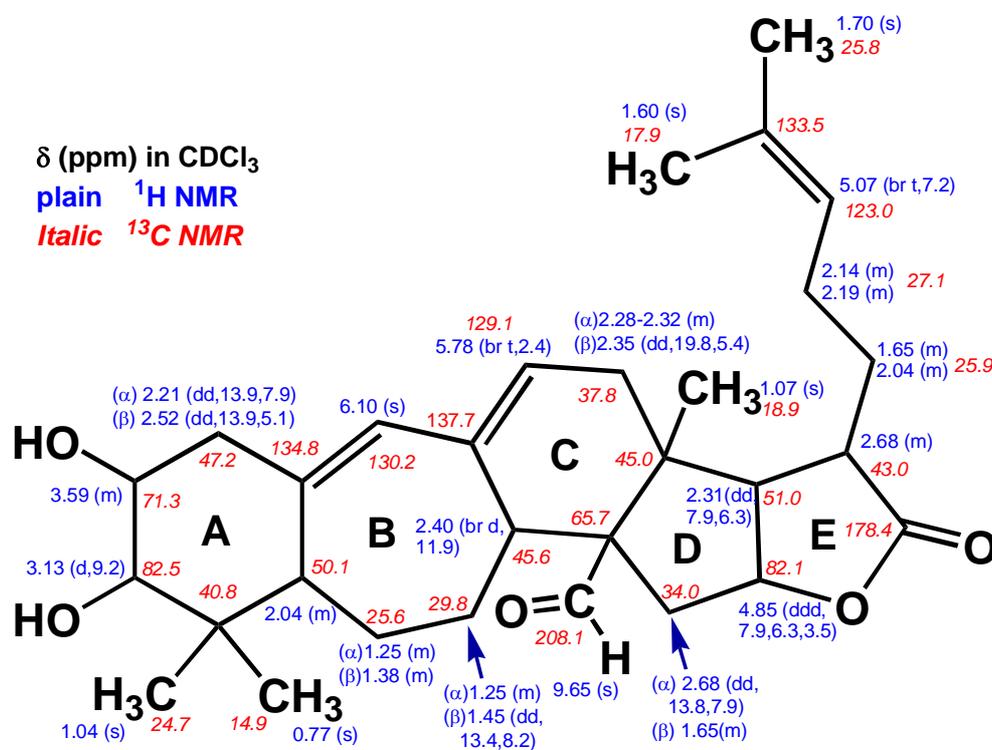


Fig.4-11 Structure of tubiferal A (3)

造であることが判明した。メチル基であるH₃-26 (δ 1.70)およびH₃-27 (δ 1.60)からお互いの炭素にHMBC相関が観測され、オレフィン四級炭素であるC-25 (δ_C 133.5)ならびにオレフィンメチン炭素であるC-24 (δ 123.0)にHMBC相関が観測された。また、H-24 (δ 5.07)からメチル基のδ_C 25.8 (C-26)ならびにδ_C 17.9 (C-27)に、H₂-22 (δ 1.65, 2.04)からδ_C 27.1 (C-23)にHMBC相関が観測され、¹H-¹H COSYスペクトルによりH₂-23/H-24 つながりが明らかになったことから、側鎖として4-メチル-3-ペンテニル基が存在することが考えられた。この側鎖のH₂-22 からδ_C 51.0 (C-17)、δ_C 43.0 (C-20)、δ_C 178.4 (C-21)にHMBC相関が観測され、H-20 (δ 2.68)からもδ_C 25.9 (C-22)にHMBC相関が観測された。このことから、4-メチル-3-ペンテニル基は20位の炭素 (δ 43.0)に結合していることが明らかになった。アルデヒド基であるH-28 (δ 9.65)から四級炭素であるδ_C 65.7 (C-14)にHMBC相関が観測され、H₂-15 (δ 2.68, δ 1.65)からもアルデヒド基の炭素であるδ_C 208.1 (C-28)に相関が観測されたことから、アルデヒド基は14位の炭素(δ 65.7)に結合していることが判明した。以上の解析結果から、Fig.4-11 に示したように、tubiferal Aは9,10-セコシクロアルタン骨格を有する新規トリテルペンアルデヒドラクトンであることが明らかになった。

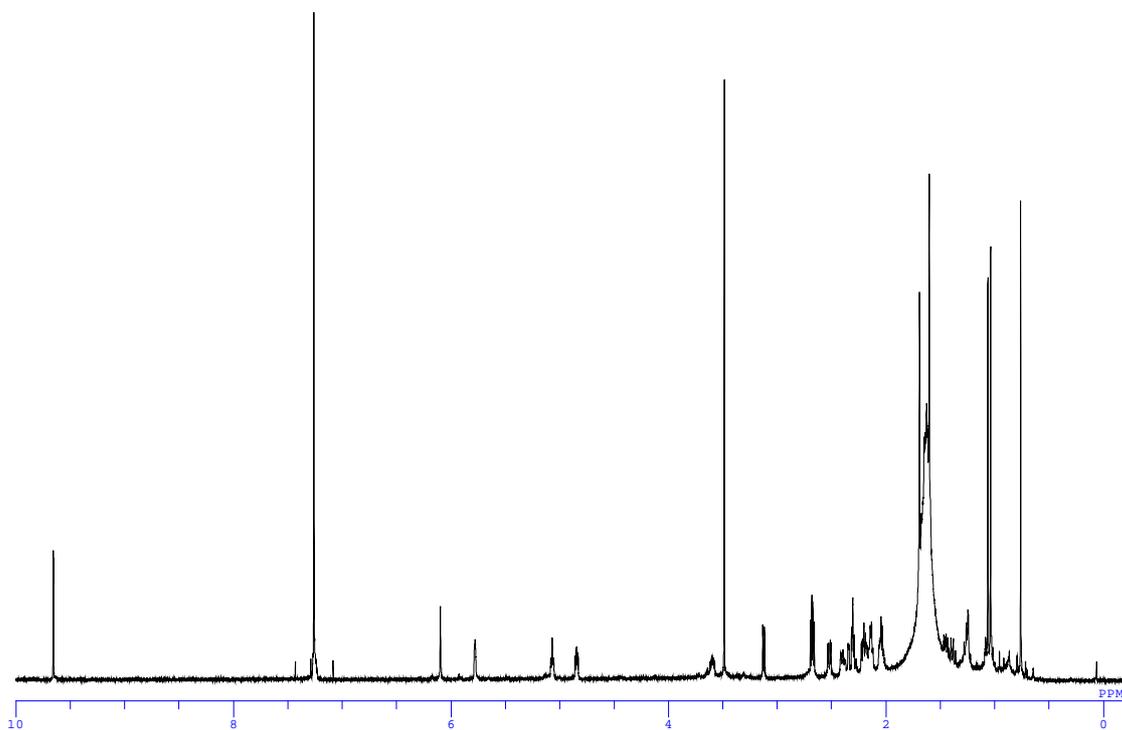


Fig.4-12 ^1H NMR spectrum of tubiferal A (3) in CDCl_3

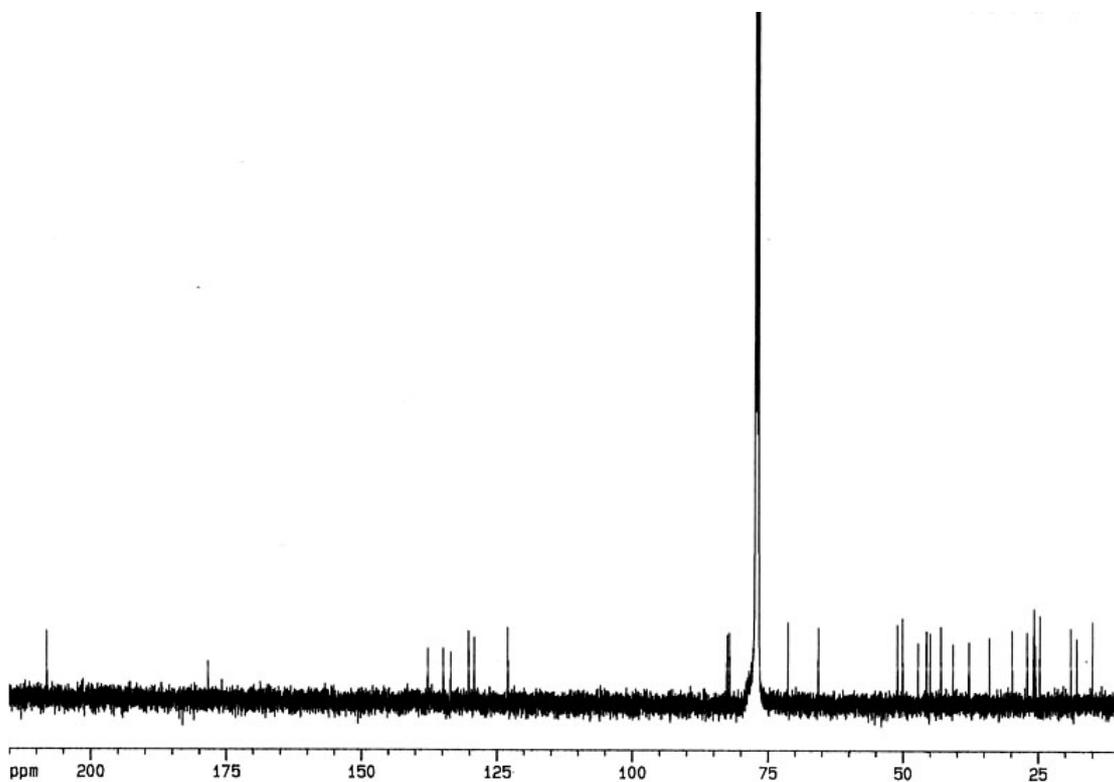


Fig.4-13 ^{13}C NMR spectrum of tubiferal A (3) in CDCl_3

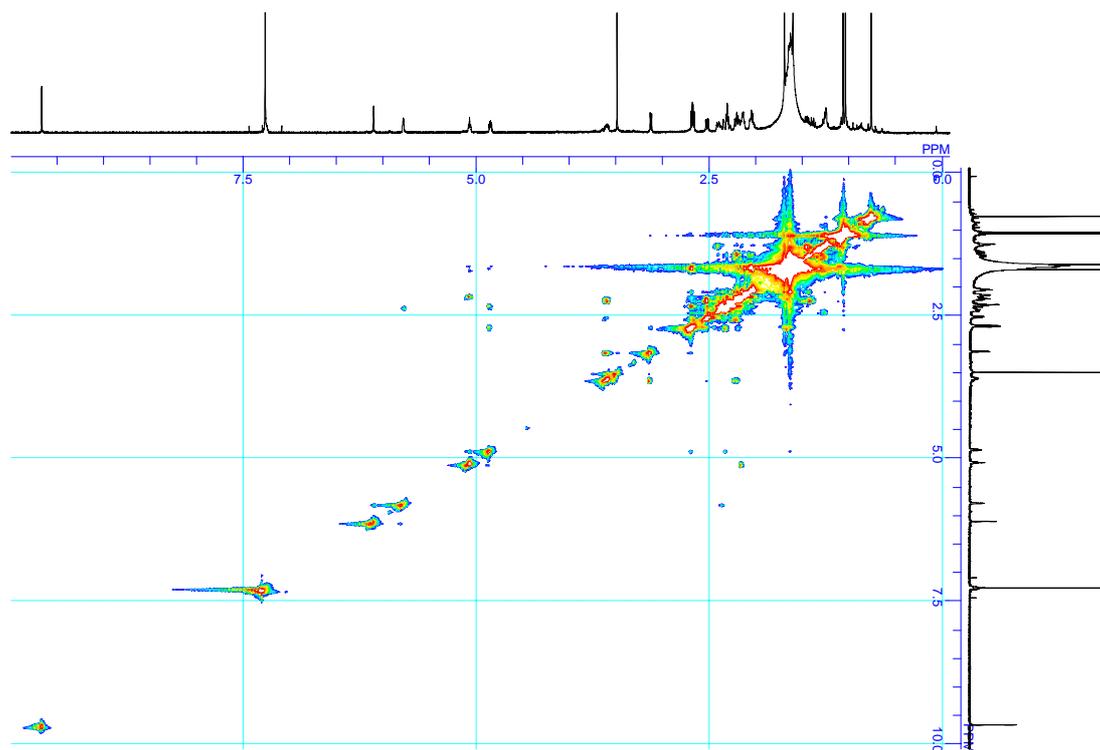


Fig.4-14 ^1H - ^1H COSY spectrum of tubiferal A (3) in CDCl_3

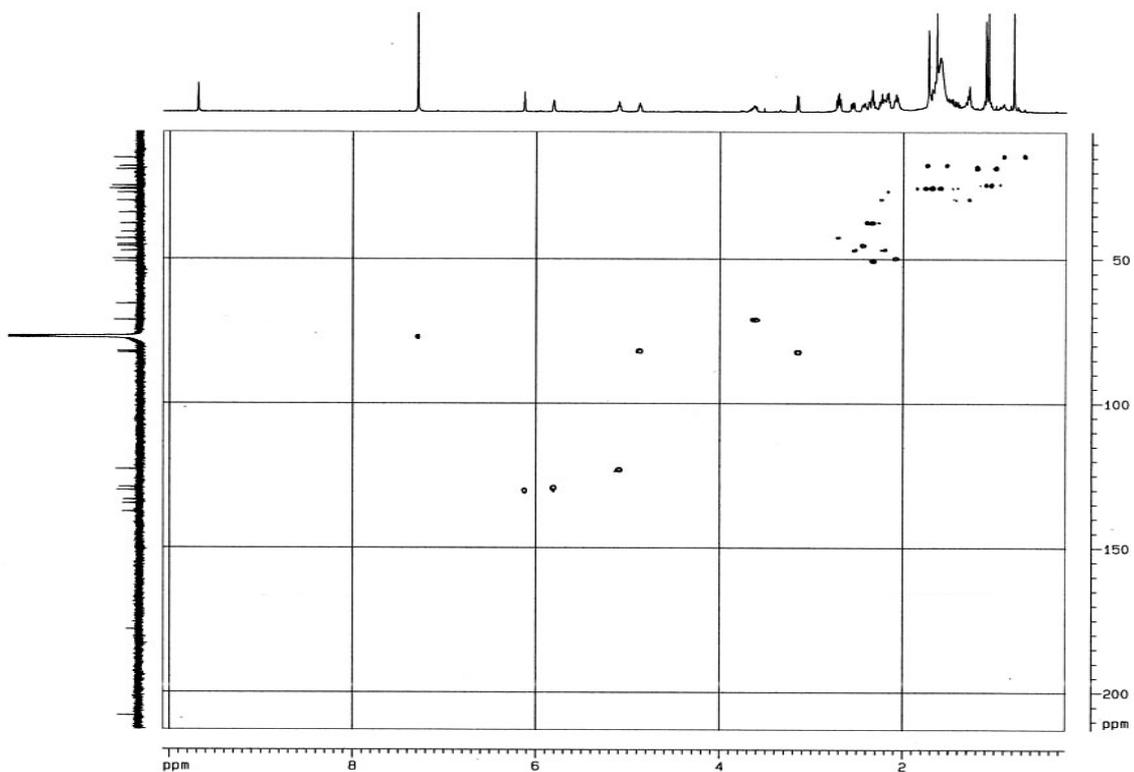


Fig.4-15 HMQC spectrum of tubiferal A (3) in CDCl_3

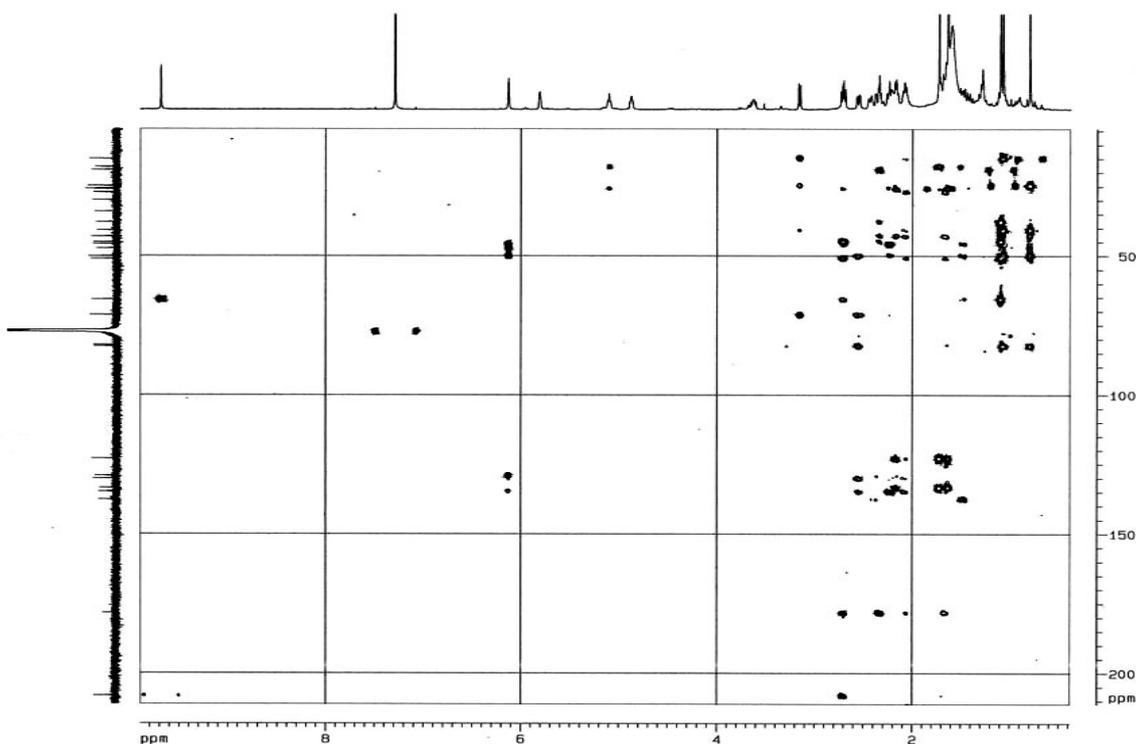


Fig.4-16 HMBC spectrum of tubiferal A (3) in CDCl_3

(3) tubiferal A の相対立体配置の検討

tubiferal A (3)の相対立体配置については、NOESYスペクトル(Fig.4-19)の解析ならびに ^1H NMRスペクトルの J 値により推定を行った。2位および3位の水素の J 値が9.2 Hzであることから、これらの水素は*trans*-ジアキシャル配置であることが明らかになった。また、2位の水素を上側、3位の水素を下側に配置させてNOESYスペクトルを解析したところ、H-2/H-1 β 、H-2/H₃-30、H₃-30/H-6 β 、H-6 β /H-8、H-8/H-15 β 、H-8/H₃-18、H₃-18/H-12 β 、H₃-18/H₂-22 にそれぞれ相関が観測されたことから、これらの水素は上側(β 配置)であることが推測された(Fig.4-23, 4-24)。また、H-3/H-1 α 、H-3/H₃-29、H-3/H-5、H-1 α /H-5、H-15 α /H-16、H-16/H-17、H-17/H-20、H-12 α /H-28、H-28/H-7 α にそれぞれNOESY相関が観測されたことから、これらの水素は下側(α 配置)であることが推測された。Fig.4-17ならびに4-18で、上側の水素を赤の矢印、下側の水素を青の矢印で示した。NOESY相関の観測されたH-2とH-1 β の J 値は5.1 Hzであることから、これらの水素はアキシャル

エカトリアル配置であることが明らかとなった。また，NOESY相関の観測されたH-15 α ，H-16，H-17，H-20 は互いに *cis* 配置の関係にあり，H-15 α とH-16の *J*値が 7.9 Hz，H-16とH-17の *J*値が 6.3 Hz，H-17とH-20の *J*値が 7.9 HzであることからNOESYスペクトルの相関は正しいことが確認された。

Fig.4-17 Relative configuration of tubiferal A (3)

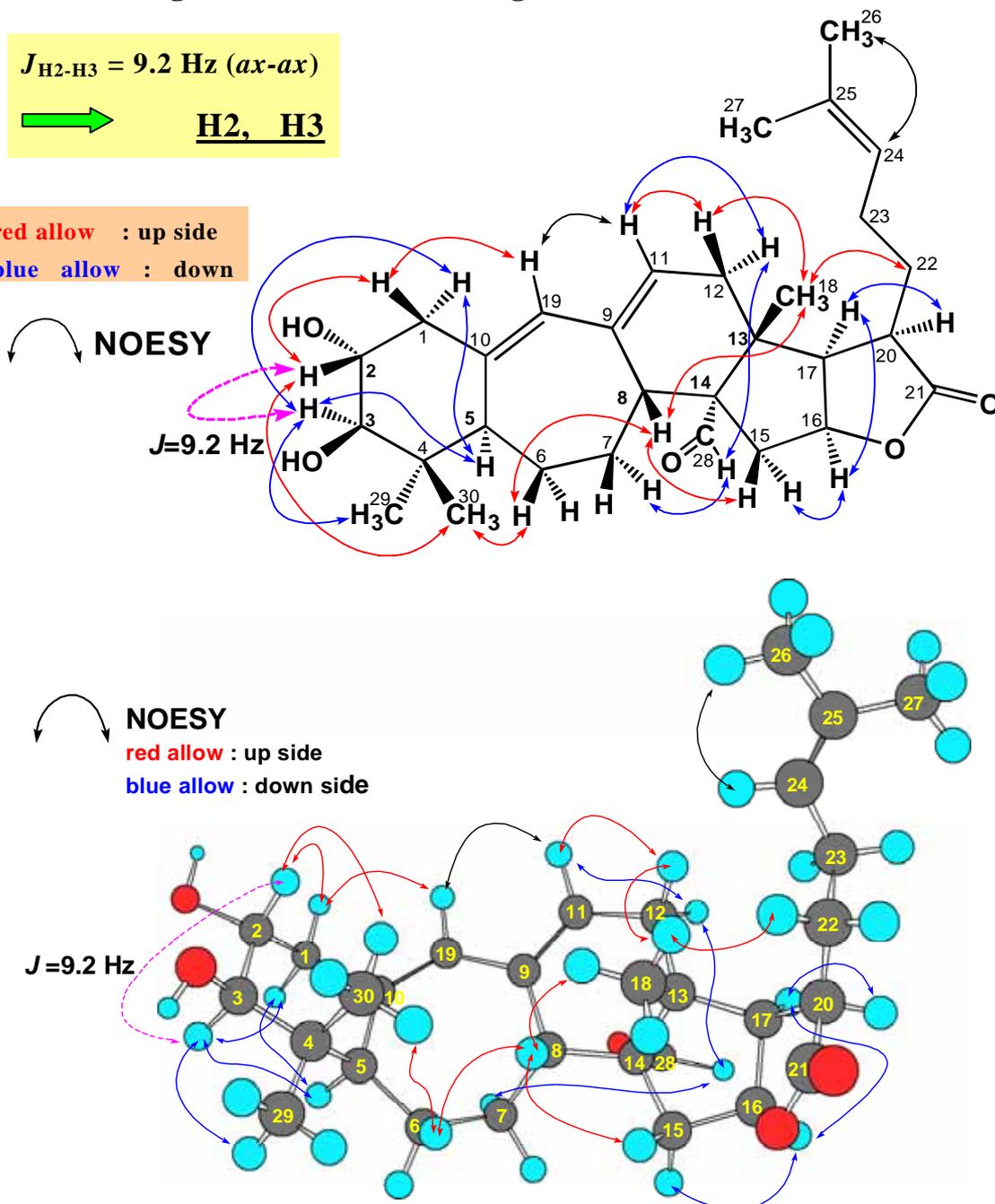


Fig.4-18 Relative configuration (Chem 3D) of tubiferal A (3)

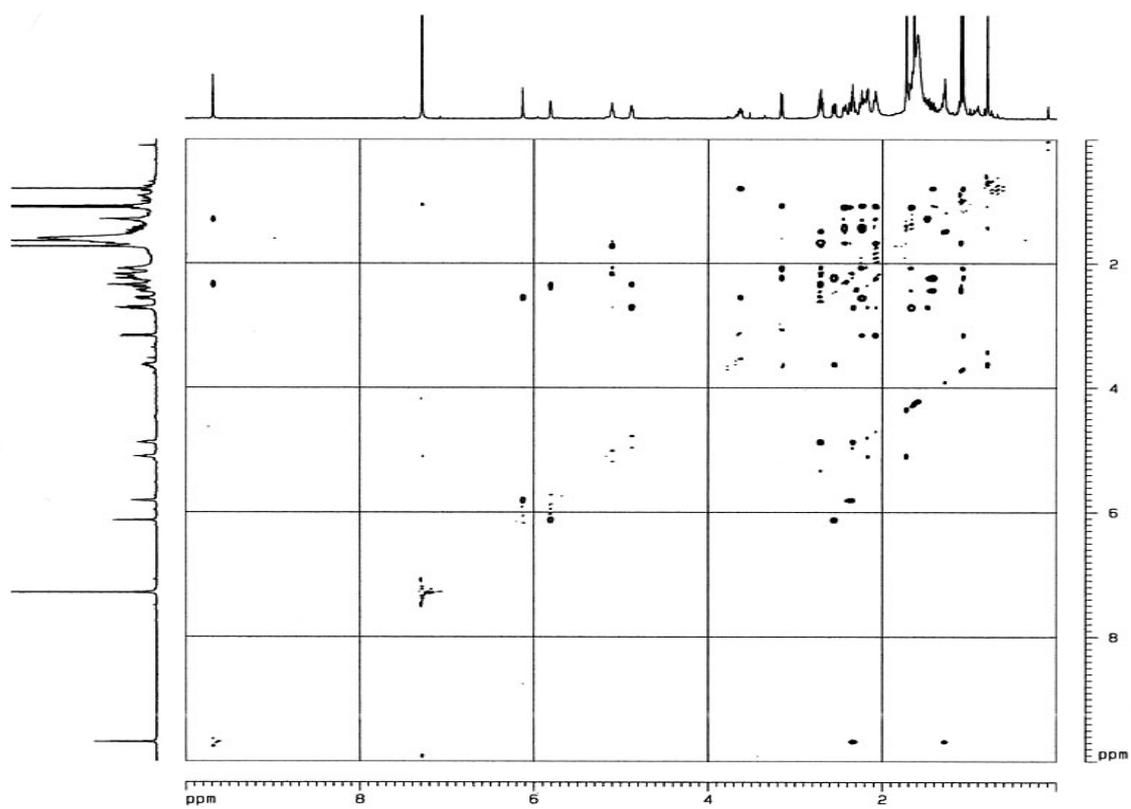


Fig.4-19 NOESY spectrum of tubiferal A (3) in CDCl₃

(3) tubiferal B (4)の構造解析

tubiferal B (4)は無色非結晶固体として単離された。FABMSスペクトルにおいて m/z 501 に $[M+H]^+$ とと思われるシグナルならびに m/z 523 に $[M+Na]^+$ とと思われるシグナルが観測された。高分解能FABMSスペクトル (m/z 501.3179 $[M+H]^+$, Δ -3.7 mmu)の測定により, 分子式 $C_{30}H_{44}O_6$ であることが明らかとなった。UVスペクトルから 240 および 246 nmに極大吸収が観測されたことから共役系が存在し, IRスペクトルからはヒドロキシ基に基づく吸収 (3420 cm^{-1})およびカルボニル基の吸収 (1710 cm^{-1}) が観測された。重メタノールを測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトル(Fig.4-22, Table 4-1)では, δ 9.58 にアルデヒド基と思われるシングレットのシグナル, δ 6.07 (s), δ 5.77 (s), δ 5.13 (br t, $J=5.7\text{ Hz}$)に 3 つのオレフィン水素由来のシグナル, δ 4.28 (ddd, $J=8.6, 6.6, 4.5\text{ Hz}$), δ 3.47 (ddd, $J=12.0, 9.3, 5.4\text{ Hz}$), δ 3.00 (d, $J=9.3\text{ Hz}$)に酸素が隣接していると思われる 3 つの sp^3 メチン水素のシグナル, 7 つの sp^3 メチレン水素, 4 つの sp^3 メチン水素, 5 本全てシングレットのメチル基のシグナル (δ 1.64, δ 1.58, δ 1.15, δ 1.00, δ 0.72)が観測された。 ^{13}C NMR(Fig.4-23, Table 4-1)およびDEPTスペクトルの解析により, 1 つのアルデヒド基のシグナル (δ 210.3), 3 つのオレフィン 4 級炭素のシグナル (δ 138.6, δ 135.1, δ 131.6), 3 つのオレフィンメチン炭素のシグナル (δ 131.8, δ 131.1, δ 125.9), 酸素が隣接していると思われる 3 つの sp^3 メチン炭素のシグナル (δ 83.0, δ 72.2, δ 71.8), 7 つの sp^3 メチレン炭素のシグナル (δ 49.2, δ 38.5, δ 37.9, δ 33.1, δ 31.1, δ 27.4, δ 26.8), 3 つの sp^3 メチン炭素のシグナル (δ 55.1, δ 51.1, δ 47.7), 2 つの sp^3 四級炭素のシグナル (δ 46.1, δ 41.9), 5 つのメチル基の炭素のシグナル (δ 25.7, δ 25.1, δ 18.7, δ 17.7, δ 15.0)が観測された。

tubiferal Bの 1D NMRスペクトルはtubiferal Aと類似しており, 分子式からもtubiferal Bはアルデヒド基を有したトリテルペンであることが推測された。 ^1H - ^1H COSYスペクトル(Fig.4-24)の解析により, H_2 -1/ H -2/ H -3, H -5/ H_2 -6/ H_2 -7/ H -8, H -11/ H -12 および H_2 -15/ H -16/ H -17/ H -20 の各水素のつながりが明らかとなった。HMQC(Fig.4-25)およびHMBCスペクトル(Fig.4-26)

の解析により，メチル基であるH₃-29 (δ 1.00)およびH₃-30 (δ 0.72)からお互いの炭素(δ 15.0, 25.1)ならびに4級炭素である δ_C 41.9 (C-4)にHMBC相関が観測されたことから，これらのメチル基は δ_C 41.9 (C-4)に結合していることが考えられた．また，H₃-29 およびH₃-30 から δ_C 83.0 (C-3)，H-30 から δ_C 51.1 (C-5)，H-3 (δ 3.00)から δ_C 72.2 (C-2)，H₂-1 (δ 2.13, 2.44)から δ_C 72.2 (C-2) および δ_C 135.1 (C-10)にHMBC相関が観測されたことから，A環部分の6員環構造が考えられた．さらにHMBCスペクトルの解析により，オレフィン水素であるH-19 (δ 6.07)からC-5，C-10 ならびに δ_C 131.8 (C-11)に相関が観測され，H-5/H₂-6/H₂-7/H-8，H-11/H-12 のつながりが明らかとなったことから，B環部分の7員環構造が考えられた．メチル基であるH₃-18 (δ 1.15)から δ_C 37.9 (C-12)， δ_C 46.1 (C-13)， δ_C 64.0 (C-14)および δ_C 55.1 (C-17)に，H₂-15 (δ 2.67, δ 1.21)からC-13 および δ_C 71.8 (C-16)に，メチル基であるH₃-26 (δ 1.64)およびH₃-27 (δ 1.58)からお互いの炭素 (δ_C 17.7, δ_C 25.7)，オレフィン四級炭素である δ_C 131.6 (C-25)ならびにオレフィンメチン炭素である δ_C 125.9 (C-24)に，アルデヒド基であるH-28 (δ 9.58)から δ_C 64.0 (C-14)にHMBC相関が観測されたことから，tubiferal B (4)はtubiferal A (3)と共通の部分構造を有することが考えられた．ここで，tubiferal Bをtubiferal Aと比較してみると，ODS TLCによる分析ではtubiferal Bの方がR_f値が高く，また，tubiferal Bの分子式がtubiferal Aよりも水1分子分増えていることから，tubiferal Bはtubiferal Aよりも極性が高い物質であることが推測された．さらに，¹Hおよび¹³C NMRのスペクトルデータを比較してみると，特に16位の化学シフト値がtubiferal Aの δ_H 4.85， δ_C 82.1 からtubiferal Bの δ_H 4.28， δ_C 71.8 に高磁場シフトしていることから，tubiferal Bの構造は，tubiferal Aの16位と21位間のラクトン環が開裂したセコ酸構造であることが推定された(Fig.4-21)．tubiferal A をアルカリ加水分解したところ，tubiferal Bが生成されたことをTLC分析により確認した．以上のことから，tubiferal Bも9,10-セコシクロアルタン型の新規トリテルペンアルデヒドであることが明らかとなった．

Table 4-1 ¹H and ¹³C NMR data of tubiferal A (3) and B (4)

positions	3 (CDCl ₃)		4 (CD ₃ OD)	
	δ _H (J in Hz)	δ _C	δ _H (J in Hz)	δ _C
1	(α) 2.21 dd (13.9, 7.9) (β) 2.52 dd (13.9, 5.1)	47.2	(α) 2.13 dd (12.7, 12.0) (β) 2.44 dd (12.7, 5.4)	49.2
2	3.59 m	71.3	3.47 ddd (12.0, 9.3, 5.4)	72.2
3	3.13 d (9.2)	82.5	3.00 d (9.3)	83.0
4		40.8		41.9
5	2.04 m	50.1	2.04 m	51.1
6	(α) 1.25 m (β) 1.38 m	25.6	(α) 1.39 m (β) 1.73 m	26.8
7	(α) 1.25 m (β) 1.45 dd (13.4, 8.2)	29.8	(α) 1.13 dd (8.4, 3.8) (β) 2.17 m	31.1
8	2.40 br d (11.9)	45.6	2.36 m	47.7
9		137.7		138.6
10		134.8		135.1
11	5.78 br t (2.4)	129.1	5.77 s	131.8
12	(α) 2.28-2.32 m (β) 2.35 dd (19.8, 5.4)	37.8	(α) 2.28 m (β) 2.36 m	37.9
13		45.0		46.1
14		65.7		64.0
15	(α) 2.68 dd (13.8, 7.9) (β) 1.65 m	34.0	(α) 2.67 dd (13.2, 4.5) (β) 1.21 dd (13.2, 8.6)	38.5
16	4.85 ddd (7.9, 6.3, 3.5)	82.1	4.28 ddd (8.6, 6.6, 4.5)	71.8
17	2.31 dd (7.9, 6.3)	51.0	1.50 dd (8.6, 6.6)	55.1
18	1.07 s (3H)	18.9	1.15 s (3H)	18.7
19	6.10 s	130.2	6.07 s	131.1
20	2.68 m	43.0	2.57 m	n.o.
21		178.4		n.o.
22	1.65 m and 2.04 m	25.9	1.42 m and 1.90 m ^a	33.1 ^b
23	2.14 m and 2.19 m	27.1	1.95 m and 2.04 m ^a	27.4 ^b
24	5.07 br t (7.2)	123.0	5.13 br t (5.7)	125.9
25		133.5		131.6
26	1.70 s (3H)	25.8	1.64 s (3H)	25.7
27	1.60 s (3H)	17.9	1.58 s (3H)	17.7
28	9.65 s	208.1	9.58 s	210.3
29	1.04 s (3H)	24.7	1.00 s (3H)	25.1
30	0.77 s (3H)	14.9	0.72 s (3H)	15.0

^{a,b}: Signals may be reversed. n.o.: not observed (probably due to small quantity)

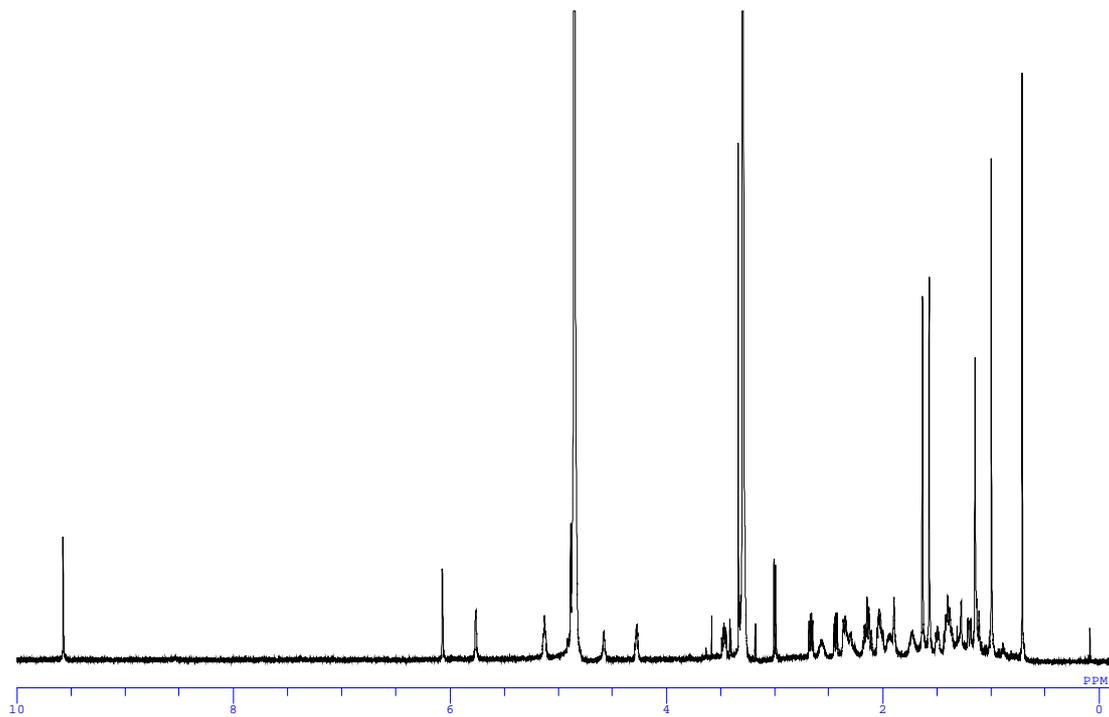


Fig.4-22 ^1H NMR spectrum of tubiferal B (4) in CD_3OD

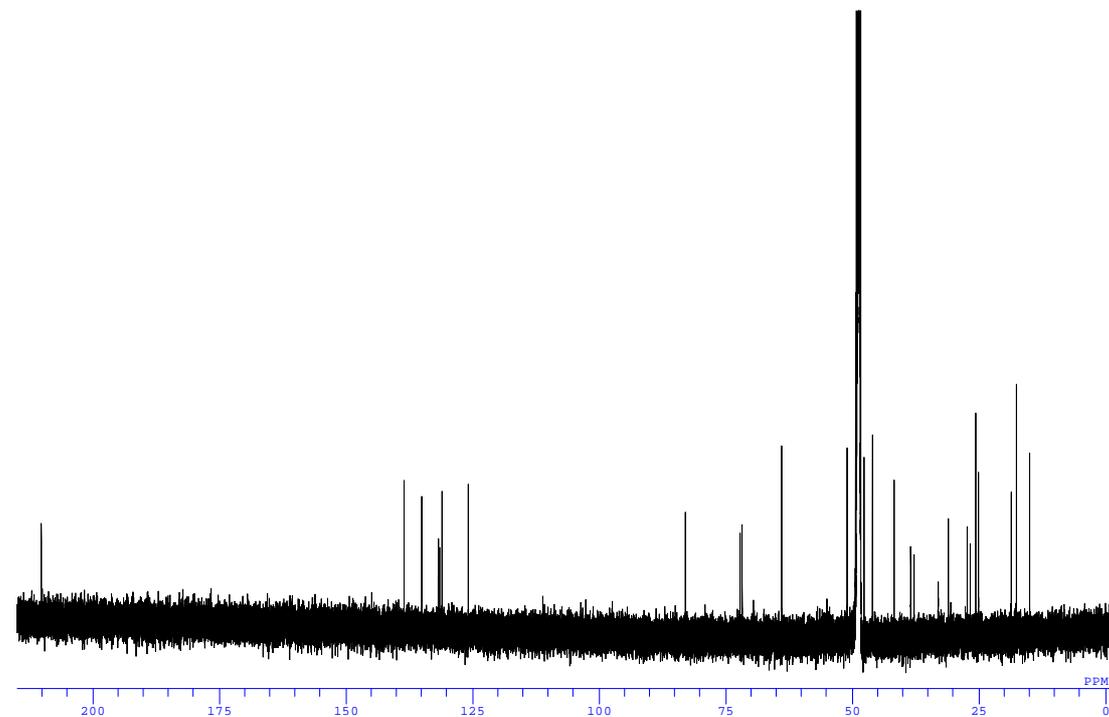


Fig.4-23 ^{13}C NMR spectrum of tubiferal B (4) in CD_3OD

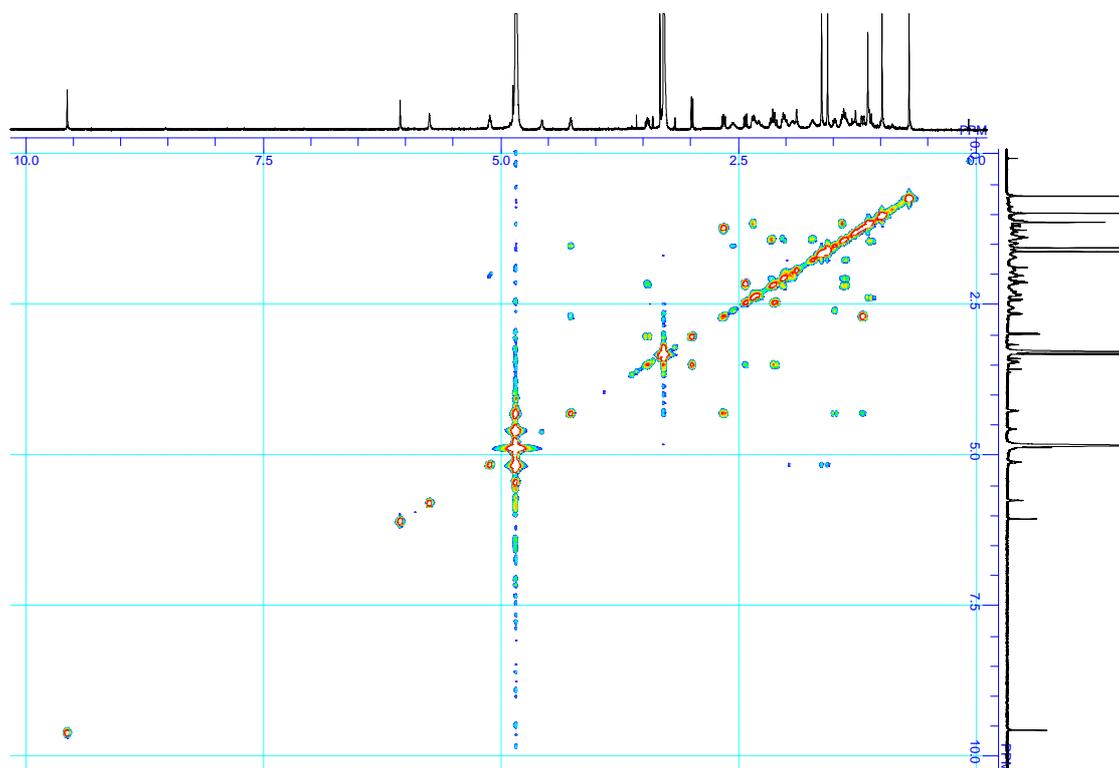


Fig.4-24 ^1H - ^1H COSY spectrum of tubiferal B (4) in CD_3OD

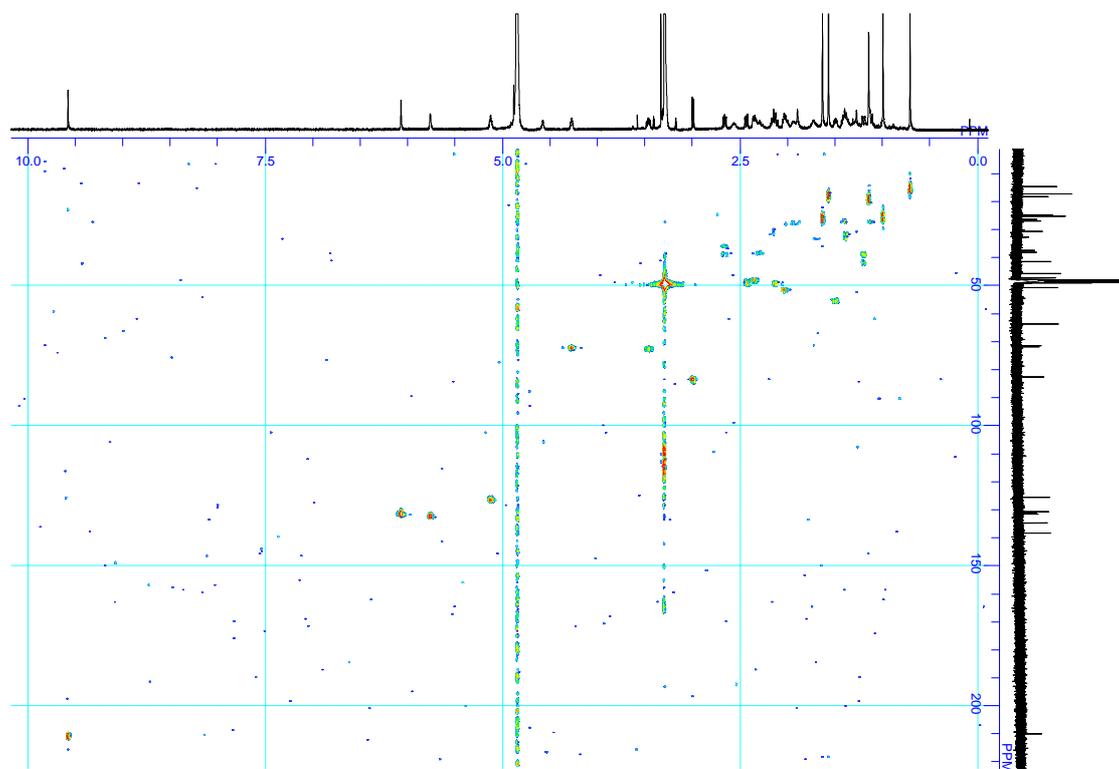


Fig.4-25 HMQC spectrum of tubiferal B (4) in CD_3OD

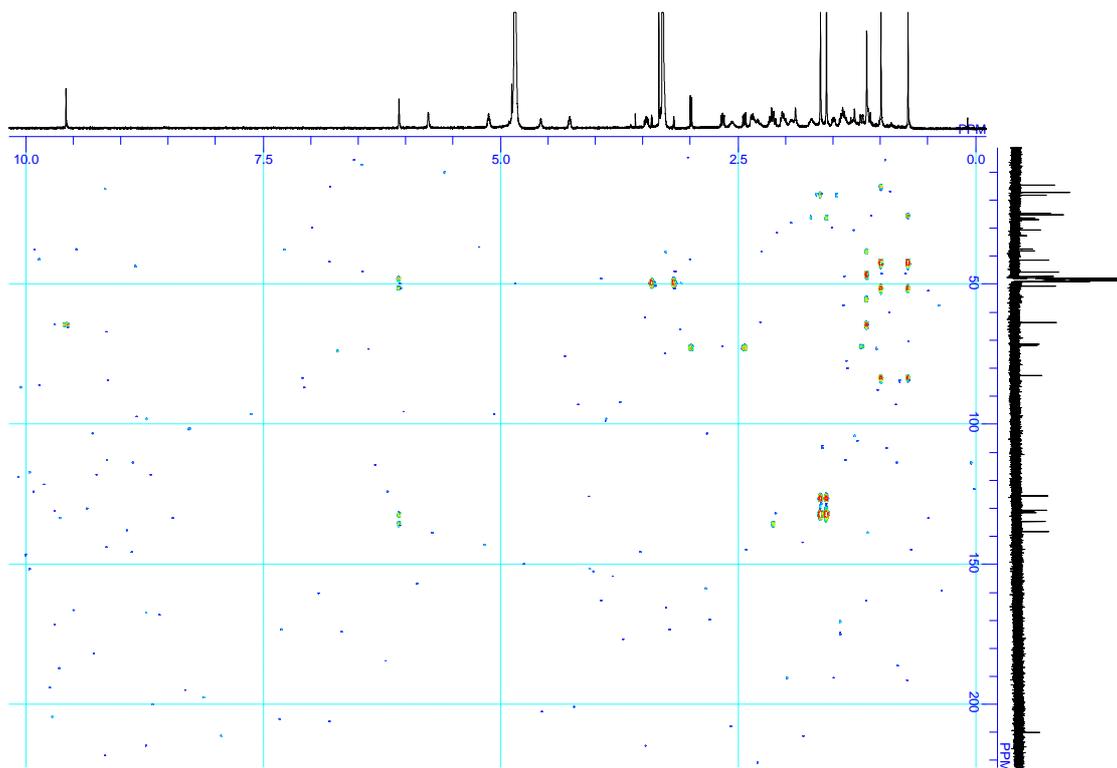
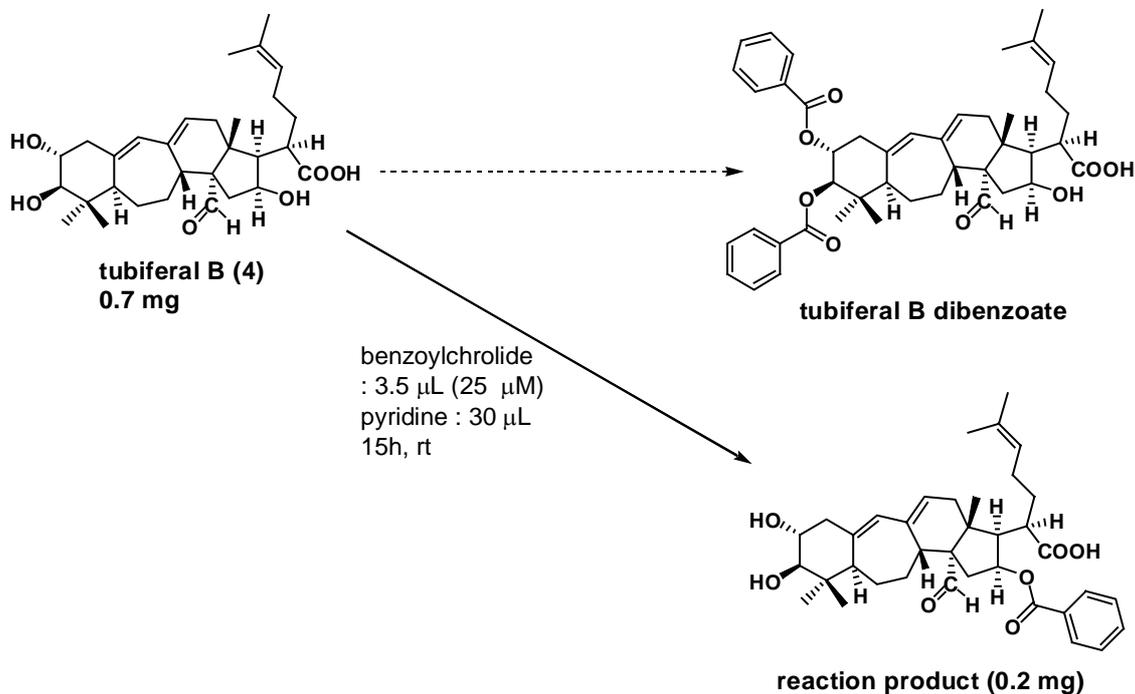


Fig.4-26 HMBC spectrum of tubiferal B (4) in CD₃OD

(3) tubiferal A および B の絶対立体配置の検討

tubiferal A (3)の絶対立体配置については，2，3位のジオールをベンゾイ



ル化し，CDスペクトルの測定によりジベンゾエート則を適用することにより決定することを試みた．最初に，300 nm付近にUV吸収を持つ*p*-ジメチルアミノベンゾイルクロリドでジベンゾイル化を行うことを考えたが，練習の時点でコレステロールとの反応性が悪かった．このため，ベンゾイルクロリドを用いて，tubiferal A (3)からの変換が確認されたtubiferal B (4)のジベンゾイル化を行った．その結果，0.2 mgの反応生成物を得られたが， ^1H NMRの測定により，16位の水素のシグナルが低磁場にシフトしたことから，ベンゾイル基が2,3位のヒドロキシ基ではなく，16位のヒドロキシ基に入ったと推測され，望みの化合物は得られなかった (Scheme 4-1, Fig.4-26)．2,3位のヒドロキシ基はどちらもエクソトリアル配置であり，立体障害が大きいためベンゾイル基が入らなかったのではないかと考えられた．tubiferal A, Bの絶対立体配置の決定には至っていない．

Scheme 4-1 Benzoylation reaction of tubiferal B (4)

G:\ALICE95\DATA\A400\5***c\TD-***\TD-2(0.66mg)-benzoate-CDCl3.als
TD-2-BENZOATE-CDCL3

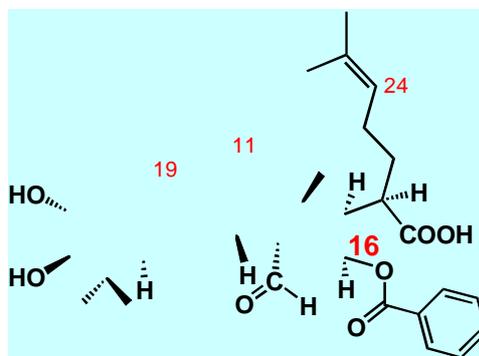
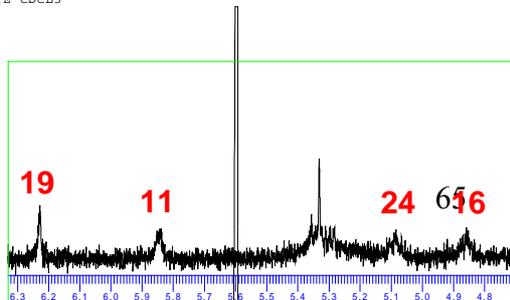
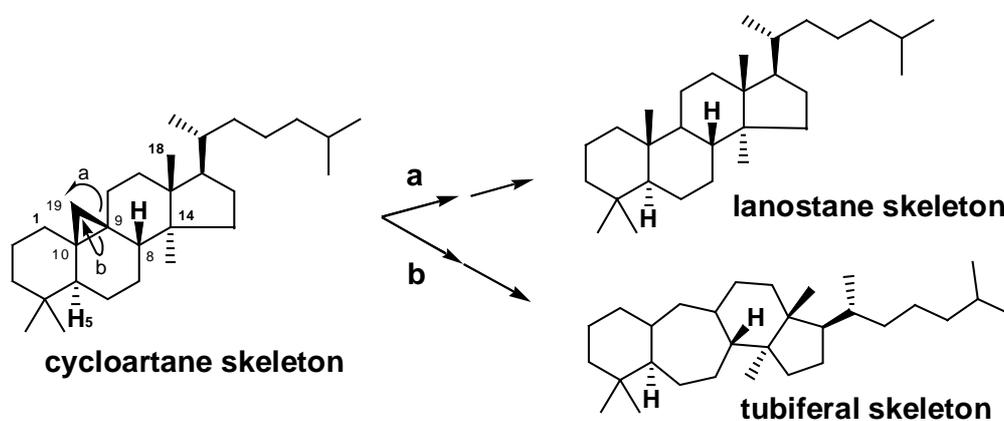


Fig.4-27 ^1H NMR spectrum of reaction product of tubiferal B (4) in CDCl_3

第 4 節 tubiferal A の生合成について

tubiferal A (3)は,シクロアルタン骨格の 9 位ならびに 10 位の三員環が開環した転位型トリテルペンであると推定された. tubiferal A の立体化学の検討により,その核間に存在する 5 位と 8 位の水素,ならびに 14 位の炭素に結合したアルデヒド基と 18 位のメチル基の立体化学は,シクロアルタン骨格のものと矛盾しなかった. このことから, tubiferal A がシクロアルタン骨格の化合物と生合成的な関連性があるものと考えられる.



Scheme 4-2 Conceivable backbone rearrangements from the cycloartane skeleton

第 5 節 tubiferal A および B の生物活性

tubiferal A (3), B (4)について, KB/VJ300 細胞 (ビンクリスチン(VCR)耐性ヒト舌がん細胞), LNCaP細胞 (ヒト前立がん細胞), KOB細胞 (TRAIL抵抗性ヒト白血病細胞)に対して細胞毒性に関する試験を行った. その結果, tubiferal A (3)はVCR耐性ヒト舌がん細胞に対して, tubiferal Aのみでは細胞毒性は示さなかった (IC_{50} 値 $>12.5 \mu\text{g/mL}$)ものの, tubiferal AおよびVCR共在下では単剤のみと比較して 4 倍以上の細胞毒性を示した(IC_{50} 値 $2.7 \mu\text{g/mL}$). したがってtubiferal A (3)にはビンクリスチン耐性克服作用を有することが判明した. tubiferal B (4)には活性は見られなかった.

Table 4-2 cytotoxicity of tubiferal A (3) and B (4)

	KB/VJ-300		LNCaP	KOB	
	VCR(+)	VCR(-)		TRAIL(+)	TRAIL(-)
tubiferal A (3)	2.7	>12.5	13.2	>6.3	>6.3
tubiferal B (4)	>12.5	>12.5	>12.5	>6.3	>6.3
Verapamil ^a	1.1	>25			
Curcumin ^a				20	>25
Cisplatin ^a			1.5		

Tests toward each cell line were carried out in the absence (-) and presence (+) of 100 ng/mL of VCR and 500 ng/mL of TRAIL, respectively, which did not affect the growth of the cells.

^a: positive controls

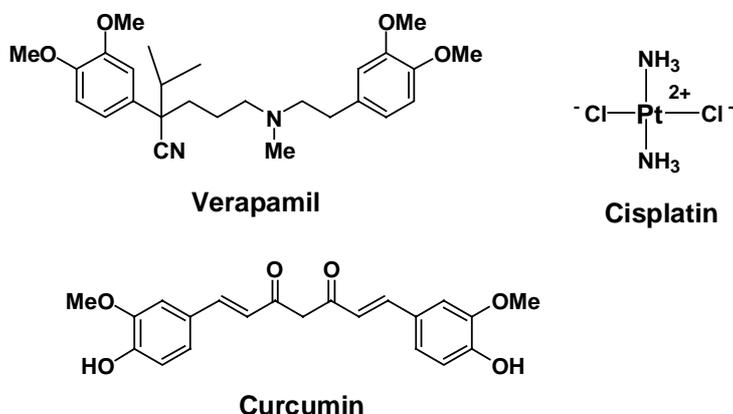


Fig.4-28 Structures of positive controls

第 6 節 小括

・ *Tubifera dimorphotheca* 野外採取子実体の成分研究を行い， tubiferal A , B と命名した新規化合物を単離した．各種スペクトルデータに基づいて構造解析を行い， tubiferal A は，6-7-6-5-5 員環構造を有する 9,10-セコシクロアルタン型の新規トリテルペンアルデヒドラクトンであり， tubiferal B はそのセコ酸構造であることを明らかにした．また， tubiferal A , B の相対立体配置を推定した．

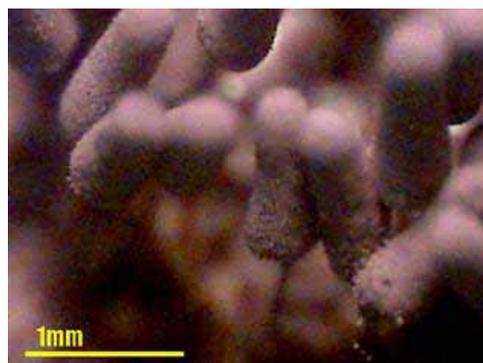
・ tubiferal A , B は，シクロアルタン骨格の 9 , 10 位が開裂した転位型トリテルペンであると推定された．

・ tubiferal A は， KB/VJ300 細胞に対して薬剤耐性克服作用が認められた．

第5章 野外採取子実体の成分研究 (2) : *Arcyria cinerea* (03-105)

第1節 *Arcyria cinerea* について

Arcyria cinerea (シロウツボホコリ) は, ケホコリ目 (Trichiales) ウツボホコリ科 (Arcyriaceae) に属する変形菌であり, 春から秋にかけて見られ, 特に夏に, 腐木や生木樹皮上に発生する^{10), 43)}. 子実体は, 高さ 1-5 mm であり, 単子嚢体型で, 群生まれに散生し, 有柄である. 子嚢は直径 0.1-0.9 mm で, 灰白色から淡黄色である. 変形体は白色



Wild fruit bodies (x60)

Fig.5-1 *Arcyria cinerea*

で, ときに灰色あるいは黄色である. 本研究に用いた株は, 2003年8月に高知県長岡郡本山町で山本幸憲先生により採取され同定して頂いたものである.

本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにないが, 本菌の属する *Arcyria* 属では, *Arcyria denudate* (ウツボホコリ) 野外子実体の成分に関する報告がなされており, arcyriarubin A-C や arcyriaflavin A-C, arcyriacyanin A などのビスインドール化合物が単離されている^{9a), 11a)}. また, 当研究室においても, 2002年度に中谷さと美氏により *Arcyria ferruginea* (トビゲウツボホコリ) の成分研究が行われ, dihydroarcyriarubin C などが単離されている^{26), 29)} (Fig.5-2).

また, *Arcyria* 属から単離されているビスインドール化合物と類似した構造を有する Staurosporine や UCN-01, Rebeccamycin のような化合物が放線菌から単離されている (Fig.5-3). これらの化合物は, 細胞周期制御に働く各種キナーゼを阻害することが知られている^{39), 40)} ことから, 成分研究を行われていない他の *Arcyria* 属の野外子実体からも, 生物活性を有するビスインドール類が得られるのではないかと興味を持たれた. そこで, 2003年度に

当研究室の直江綾乃氏によって本株子実体抽出物についてスクリーニングが行われた。その結果、細胞毒性および抗菌活性は示されなかったものの、TLCにおいてFast red B試薬に発色する複数の特徴的なスポットが確認されたため、これを指標にして化合物の分離、精製を行った。

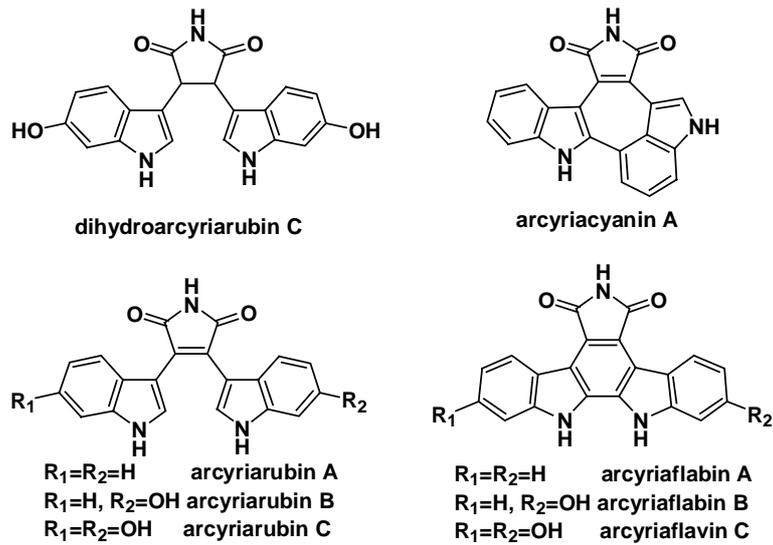


Fig.5-2 Bisindoles from *Arcyria* sp.

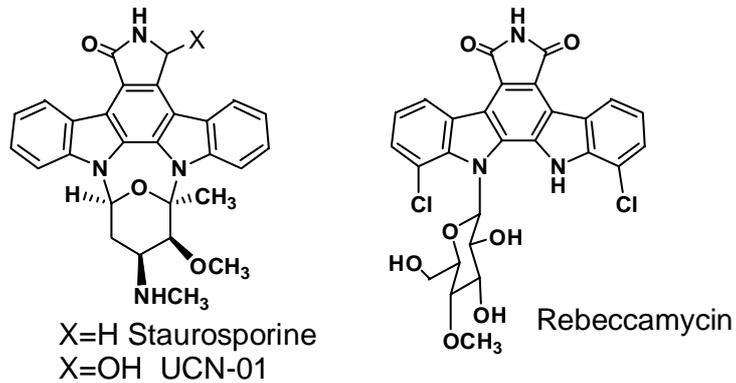


Fig.5-3 Bisindole derivatives from *Streptomyces* sp.

第 2 節 *Arcyria cinerea* の成分探索

Arcyria cinerea 野外採取子実体を 90% MeOH および 90% Acetone で抽出を行い，抽出物 200.4 mg を得た．得られた抽出物について，細胞毒性ならびに抗菌活性についてのスクリーニングを行ったが，いずれも活性は見られなかった．

始めに，TLCを用いて抽出物のケミカルスクリーニングを行ったところ，Fast Red B 試薬に発色する複数のスポットが確認され (Fig.5-4)，これを指標にして精製を進めた．粗抽出物 190.7 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに負荷し，*n*-Hexane/EtOAc の溶媒系を用いて EtOAc の割合を段階的に上げて溶出し，引き続き Acetone，MeOH で順次溶出させ，Fr1A-1G を得た．精製後の TLC 分析により，Fr.1D，1E，1G 画分に Fast Red B 試薬に陽性のスポットが確認された．Fr.1D を，CHCl₃/MeOH の溶媒系を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い，化合物 7 を単離した．Fr.1G を，CHCl₃/Acetone 混合溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製を行い，得られた Fr.4G を，メタノールを溶出溶媒に用いた Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーでさらに精製を行い，化合物 8 を単離した．Fr.1E を，メタノール/水系溶媒を用いた ODS カラムクロマトグラフィーで精製を行い，Fr2A-2D を得た．Fr.2B を，メタノールを用いた Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーで精製を行い，新規化合物 5 を単離した．また，混合物として化合物 5 を含むフラクション Fr6D および Fr.6E を併せて，60% MeOH を移動相に用いた ODS HPLC により精製を行い，化合物 5 の増量を行った．Fr.2C を，メタノールを用いた Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーで精製を行い，新規化合物 6 を単離した．

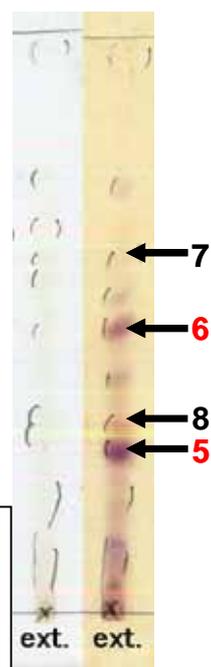


Fig.5-4 TLC analysis of ex

Silica gel TLC
右の TLC:Fast Red B 試薬
左の TLC:試薬無し
CHCl₃ / MeOH=85 / 15

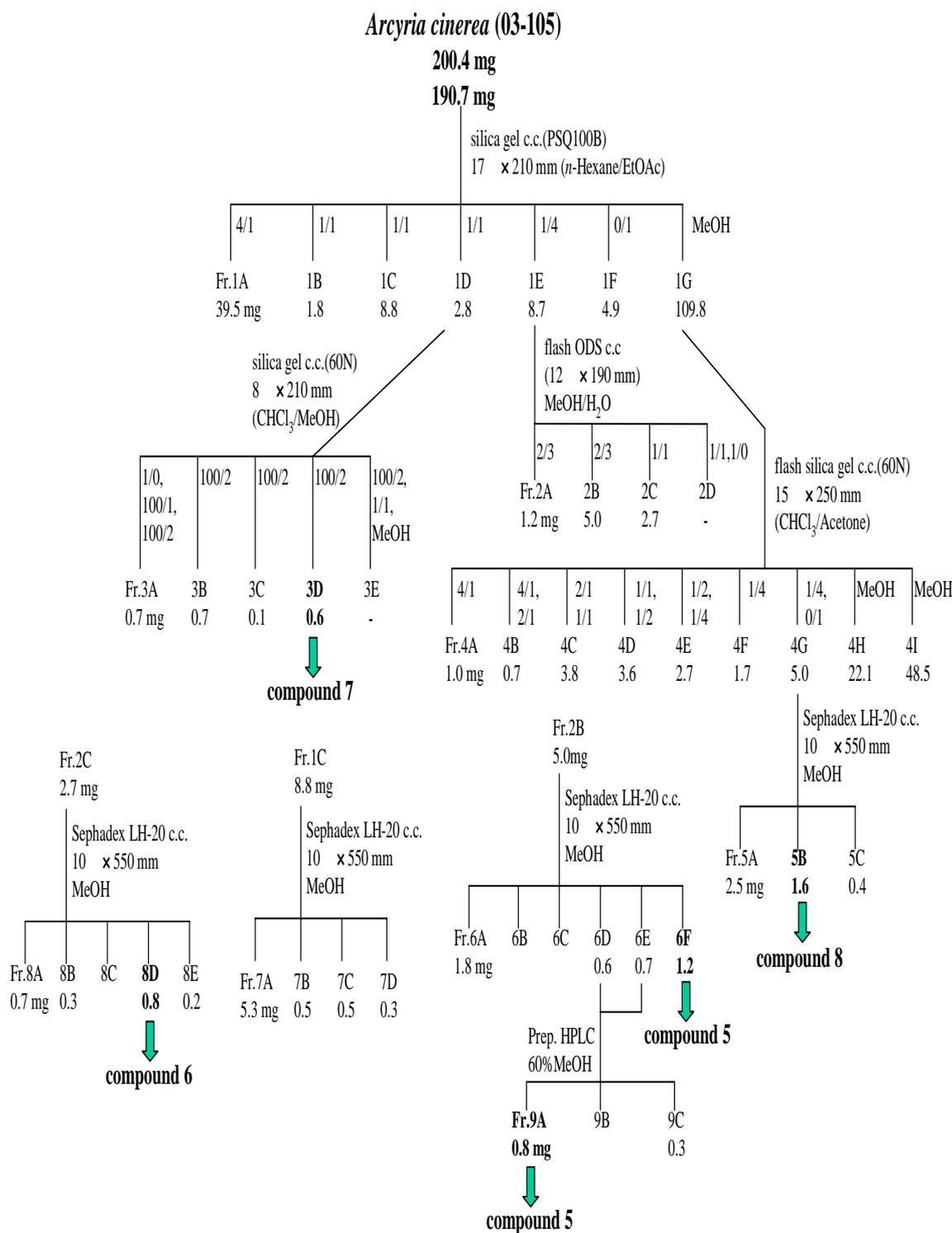


Fig.5-5 Isolation procedure of compound 5-8

第 3 節 単離した化合物の構造解析

(1) 化合物 5 の構造解析

化合物 5 は濃い茶色の非結晶粉末として単離され, FABMS スペクトルにおいて m/z 387 に $[M^+]$ とと思われるシグナルが観測され, 高分解能 FABMS スペクトル (m/z 387.1208 $[M^+]$, Δ -1.1 mmu) の測定により, 分子式 $C_{22}H_{17}N_3O_4$ であることが明らかとなった. UV スペクトルは 283 nm に極大吸収を示し, IR スペクトルからはヒドロキシ基に基づく吸収 (3396 cm^{-1}) およびカルボニル基の吸収 (1695 cm^{-1}) が観測された. 重メタノールを測定溶媒に用いた ^1H NMR スペクトル (Fig.5-8, Table 5-1) では, δ_H 3.65 に 1 つのメトキシ基由来のシグナルが観測され, 低磁場領域に 9H 分の芳香族シグナル δ_H 7.29 (s), δ_H 7.16 (dd, $J=8.4, 0.6\text{ Hz}$), δ_H 7.08 (d, $J=8.7\text{ Hz}$), δ_H 7.01 (d, $J=1.9\text{ Hz}$), δ_H 7.01 (s), δ_H 6.61 (dd, $J=8.7, 2.6\text{ Hz}$), δ_H 6.60 (dd, $J=8.4, 1.9$), δ_H 6.56 (dd, $J=2.6, 0.6$), δ_H 6.54 (s) が観測された. ^{13}C NMR (Fig.5-9, Table 5-1) および HMQC スペクトル (Fig.5-11) の解析により, δ_C 51.3 に 1 個のメトキシ基由来の炭素のシグナル, 9 個の芳香族メチン炭素のシグナル (δ_C 126.5, δ_C 124.8, δ_C 121.9, δ_C 112.3, δ_C 112.0, δ_C 111.9, δ_C 112.5, δ_C 105.5, δ_C 104.7), 9 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_C 132.8, δ_C 132.6, δ_C 129.9, δ_C 128.7, δ_C 124.8, δ_C 122.3, δ_C 120.7, δ_C 110.2, δ_C 110.1), 酸素が隣接していると思われる 2 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_C 151.4, δ_C 151.0), δ_C 163.6 に 1 個のエステルカルボニル炭素のシグナルが観測された. 分子式および ^1H , ^{13}C NMR スペクトルの解析により, 化合物 5 は非対称ビスインドール化合物であることが推測された.

^1H - ^1H COSY スペクトル (Fig.5-6, 5-10) の解析により, H-6 (δ_H 6.60)/H-7 (δ_H 7.16) および H-6' (δ_H 6.61)/H-7' (δ_H 7.08) のつながりが明らかとなった. HMBC スペクトル (Fig.5-6, 5-12) の解析により, H-2 (δ_H 7.01), H-4 (δ_H 7.04) および H-6 (δ_H 6.60) から δ_C 132.8 (C-7a), H-7 (δ_H 7.16) および H-2 から δ_C 129.9 (C-3a), H-4 および H-2 から δ_C 110.2 (C-3) に相関が観測され, さらに H-4 および H-7 から δ_C 151.0 (C-5) に相関が観測されたことから, 5-ヒドロキ

シインドールが存在することが明らかとなった。また, H-2' (δ_H 6.54), H-4' (δ_H 6.56)およびH-6' (δ_H 6.61)から δ_C 132.6 (C-7a'), H-7' (δ_H 7.08)およびH-2' (δ_H 6.54)から δ_C 128.7 (C-3a'), H-4'およびH-2'から δ_C 110.1 (C-3')に相関が観測され, さらにH-7'から δ_C 151.4 (C-5')に相関が観測されたことから, もう一つの5-ヒドロキシシインドールの存在が明らかとなった。メトキシ基の水素から δ_C 163.6にHMBCによる相関が観測されたことから, 1つのカルボン酸メチルエステル基の存在が明らかとなった。残りの芳香族メチン水素である δ_H 7.29 (H-9)から δ_C 124.8 (C-8), δ_C 122.3 (C-8'), δ_C 120.7 (C-9')にNMBC相関が観測されたことから, 化合物 5 はピロール部分を有するビスインドール化合物であることが判明した。NOE実験により, 9 位の水素から 4 位の水素にNOE相関が観測されたことから, ^1H および ^{13}C NMRの化学シフト値の帰属が明らかとなった (Fig.5-6, 5-7)。化合物 5 は新規物質であったため, cinereapyrrole Aと命名した。

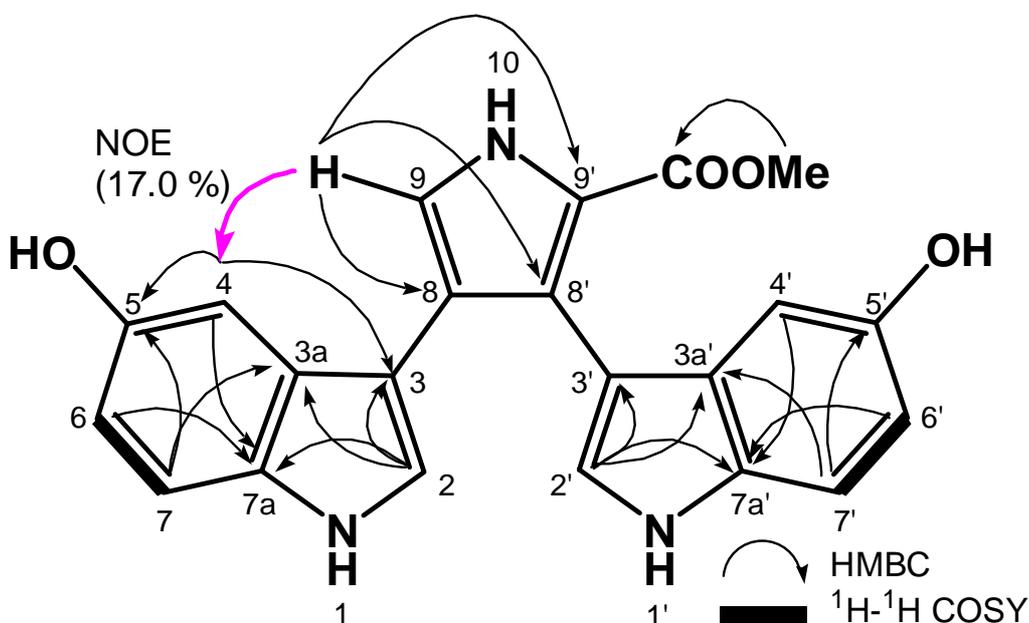


Fig.5-6 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 5

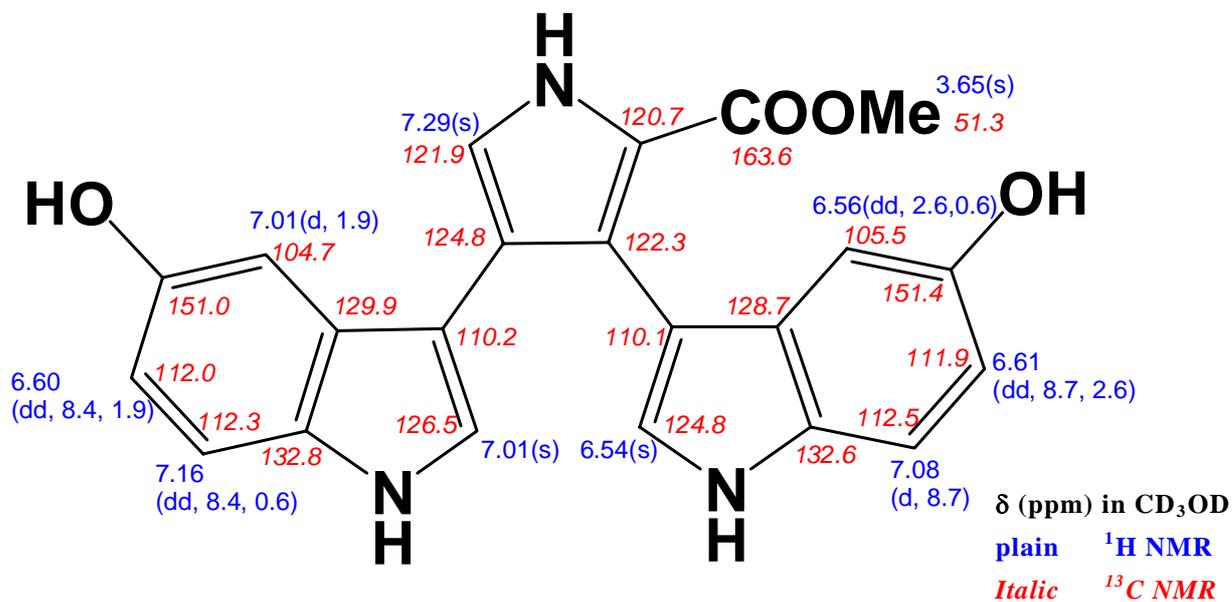


Fig. 5-7 Structure of compound 5

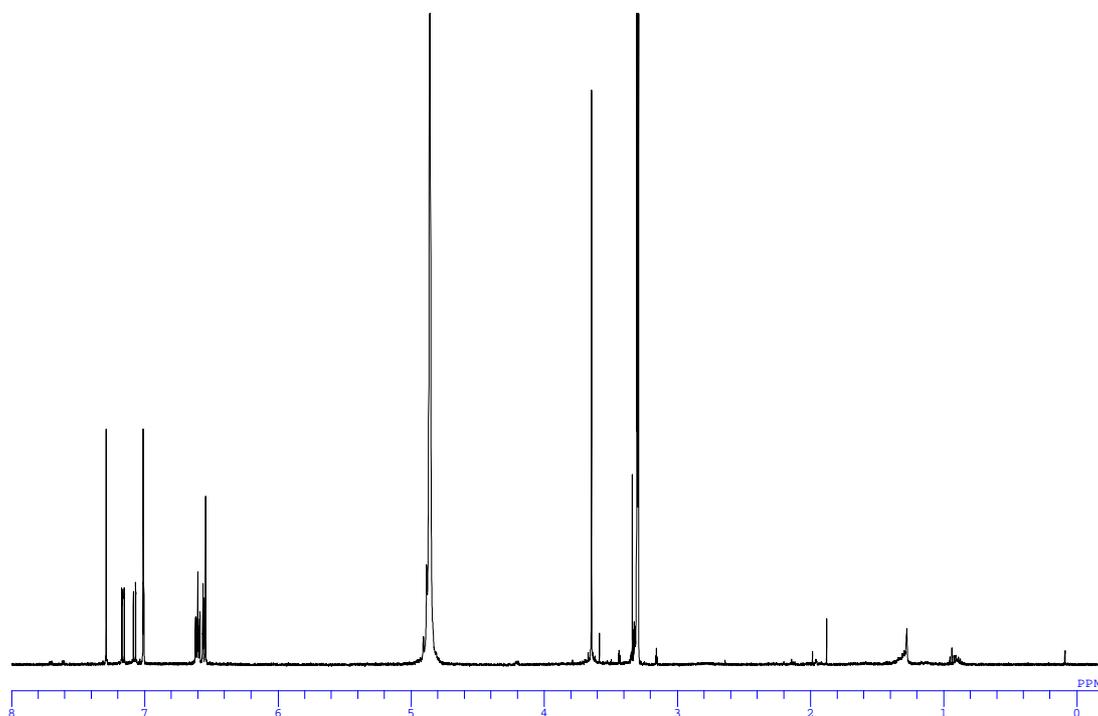


Fig.5-8 $^1\text{H NMR}$ spectrum of compound 5 in CD_3OD

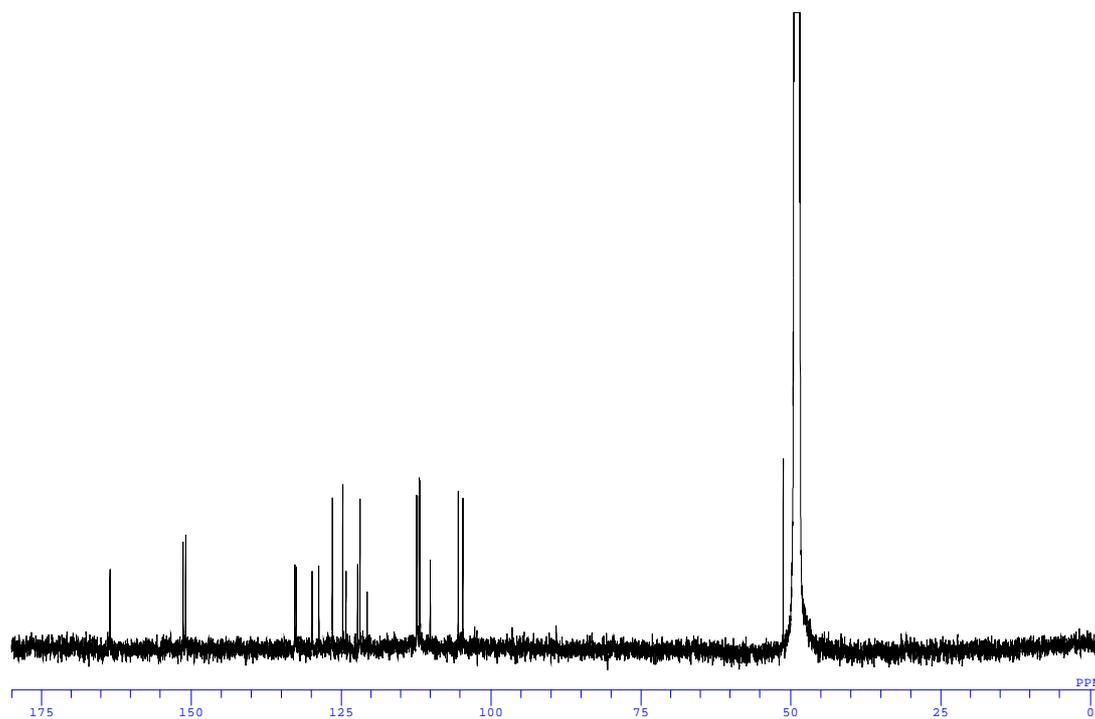


Fig.5-9 ^{13}C NMR spectrum of compound 5 in CD_3OD

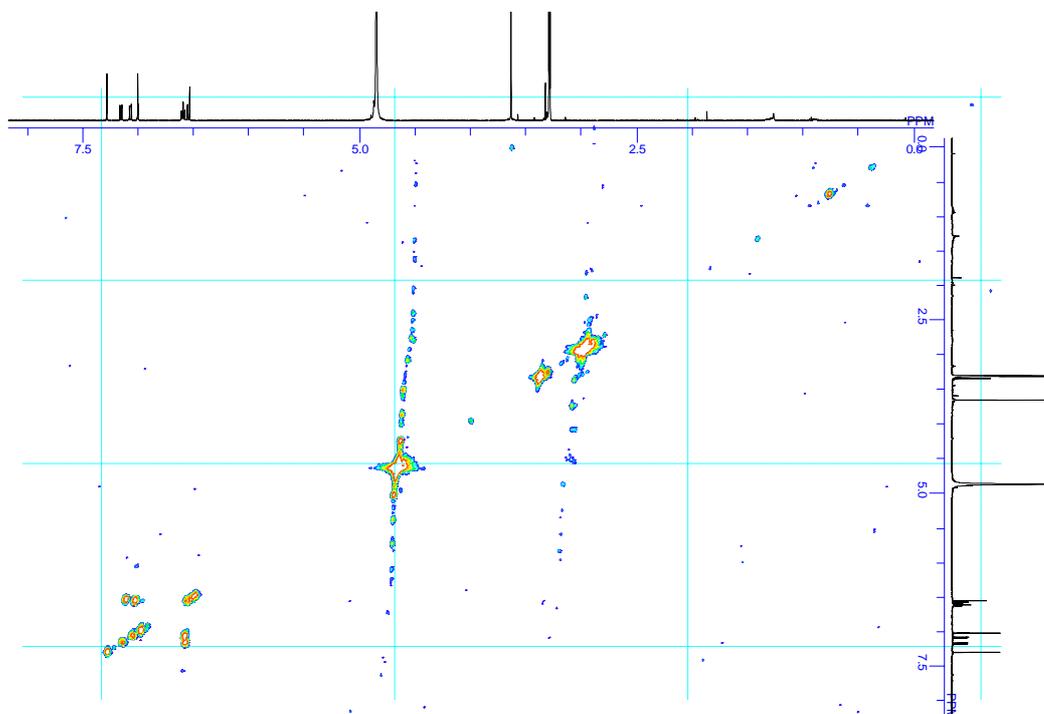


Fig.5-10 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 5 in CD_3OD

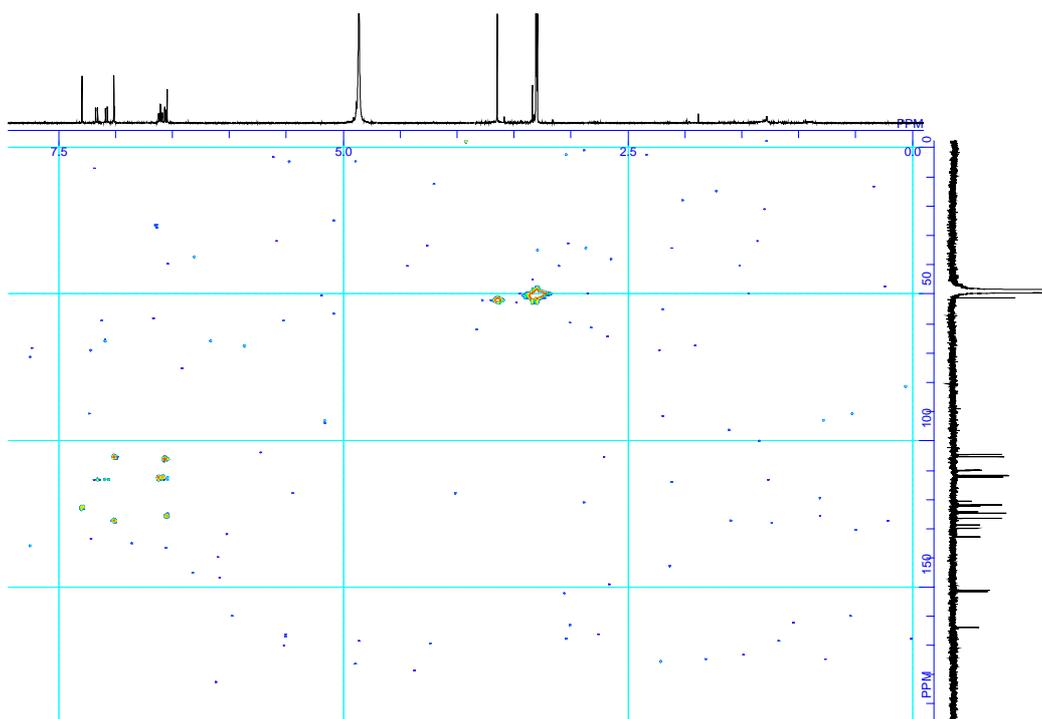


Fig.5-11 HMQC NMR spectrum of compound 5 in CD₃OD

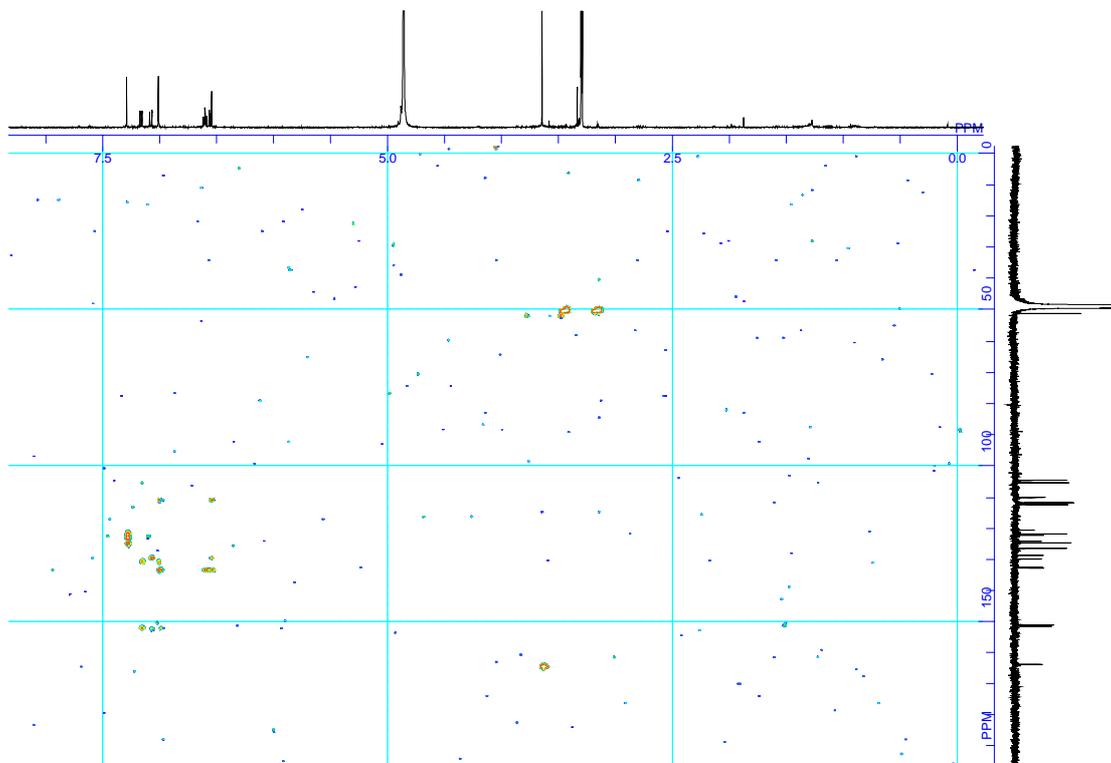


Fig.5-12 HMBC spectrum of compound 5 in CD₃OD

(2) 化合物 6 の構造解析

化合物 6 は濃い茶色の非結晶粉末として単離され, FABMSスペクトルにおいて m/z 371 に $[M^+]$ と思われるシグナルが観測され, 高分解能FABMSスペクトル (m/z 371.1278 $[M^+]$, $\Delta+0.8$ mmu) の測定により, 分子式 $C_{22}H_{17}N_3O_3$ であることが明らかとなった. UVスペクトルは 286 nm および 230 nm に極大吸収を示し, IRスペクトルからはヒドロキシ基に基づく吸収 (3400 cm^{-1}) およびカルボニル基の吸収 (1696 cm^{-1}) が観測された. 重アセトン を測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトル (Fig.5-15, Table 5-1) では, δ_{H} 3.57 に 1 つのメトキシ基由来のシグナルが観測され, 低磁場領域に, δ_{H} 7.64 (d, $J=8.1$ Hz), δ_{H} 7.44 (d, $J=3.6$ Hz), δ_{H} 7.31 (dt, $J=8.1, 1.2$ Hz), δ_{H} 7.19 (d, $J=8.2$ Hz), δ_{H} 7.10 (d, $J=2.6$ Hz), δ_{H} 7.04 (ddd, $J=8.1, 7.0, 1.2$ Hz), δ_{H} 6.95 (ddd, 8.1, 7.0, 1.2 Hz), δ_{H} 6.76 (d, $J=2.6$ Hz), δ_{H} 6.63 (dd, $J=8.2, 2.3$ Hz), δ_{H} 6.62 (s) の 10H 分の芳香族シグナルが観測された. また, NH由来と思われる 3 つのブロードなシグナル (δ_{H} 10.91, δ_{H} 9.89, δ_{H} 9.86) が観測された. ^{13}C NMR (Fig.5-16, Table 5-1) および HMQC スペクトルの解析により, δ_{C} 50.8 に 1 個のメトキシ基由来の炭素のシグナル, 10 個の芳香族メチン炭素のシグナル (δ_{C} 126.5, δ_{C} 123.5, δ_{C} 121.3, δ_{C} 121.8, δ_{C} 120.4, δ_{C} 119.7, δ_{C} 112.2, δ_{C} 112.0, δ_{C} 111.8, δ_{C} 105.1), 9 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_{C} 137.1, δ_{C} 132.0, δ_{C} 129.9, δ_{C} 129.8, δ_{C} 123.1, δ_{C} 121.6, δ_{C} 121.0, δ_{C} 110.8, δ_{C} 109.9), 酸素が隣接していると思われる 1 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_{C} 151.5), 1 個のエステルカルボニル炭素のシグナル (δ_{C} 162.0) が観測された. 分子式および ^1H , ^{13}C NMR スペクトルの解析により, 化合物 6 は非対称ビスインドール化合物であることが推測され, 化合物 5 の 1 つのヒドロキシ基が芳香族水素に置き換わった構造であることが推測された.

^1H - ^1H COSY スペクトル (Fig.5-13) の解析ならびに ^1H NMR の結合様式により, H-1 (δ_{H} 9.86)/H-2 (δ_{H} 6.76), H-4 (δ_{H} 7.64)/H-5 (δ_{H} 6.95)/H-6 (δ_{H} 7.04)/H-7 (δ_{H} 7.31), H-9 (δ_{H} 7.44)/H-10 (δ_{H} 10.91), H-1' (δ_{H} 9.89)/H-2' (δ_{H} 7.10) および H-6' (δ_{H} 6.63)/H-7' (δ_{H} 7.19) のつながりが明らかとなった. HMBC スペクトル (Fig.5-13) の解析により, H-2 (δ_{H} 6.76), H-4 (δ_{H} 7.64) お

よびH-6 (δ_H 7.04)から δ_C 137.1 (C-7a), H-2 およびH-5 (δ_H 6.95)から δ_C 129.9 (C-3a), H-4 から δ_C 121.8 (C-6), H-6 (7.04)から δ_C 120.4 (C-4)に相関が観測され, さらにH-4 およびH-2 から δ_C 110.8 (C-3)に相関が観測されたことから, 1つのインドールが存在することが明らかとなった. また, H-2' (δ_H 7.10)およびH-6' (δ_H 6.63)から δ_C 132.0 (C-7a'), H-7' (δ_H 7.19)およびH-2' (δ_H 7.10)から δ_C 129.8 (C-3a'), H-4' (δ_H 6.62)から δ_C 109.9 (C-3'), H-4'から δ_C 112.0 (C-6'), H-6'から δ_C 105.1 (C-4')に相関が観測され, さらにH-7'から δ_C 151.5 (C-5')およびヒドロキシ基の水素 (δ_H 7.35)からC-4', C-5', C-6'にHMBC相関が観測されたことから, 1つの5-ヒドロキシインドールの存在が明らかとなった. メトキシ基の水素から δ_C 162.0 にHMBCによる相関が観測されたことから, 1つのカルボン酸メチルエステル基の存在が明らかとなった. 残り1つの芳香族メチン水素である δ_H 7.44 (H-8)から δ_C 123.1 (C-8), δ_C 121.6 (C-8')にNMBC相関が観測されたことから, 化合物 6 はピロール部分を有するビスインドール化合物であることが判明した. NOE実験により, 9 位の水素から 4 位の水素にNOE相関が観測されたことから, 9 位の水素はヒドロキシ基のないインドール側に, カルボン酸メチルエステル基はヒドロキシ基のあるインドール側に存在することが判明した (Fig.5-13, 5-14). 化合物 6 は新規物質であったため, cinereapyrrole Bと命名した

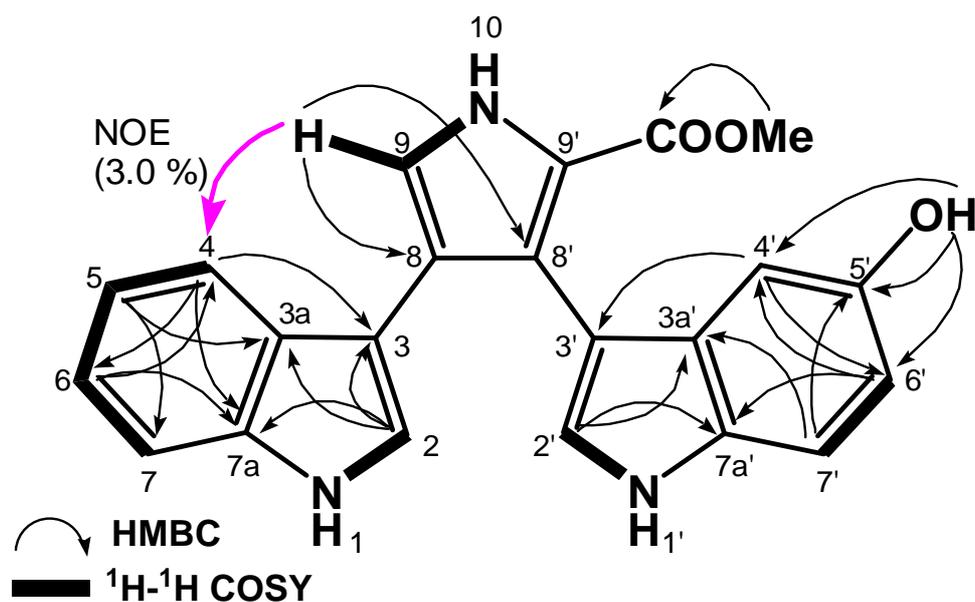


Fig.5-13 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 6

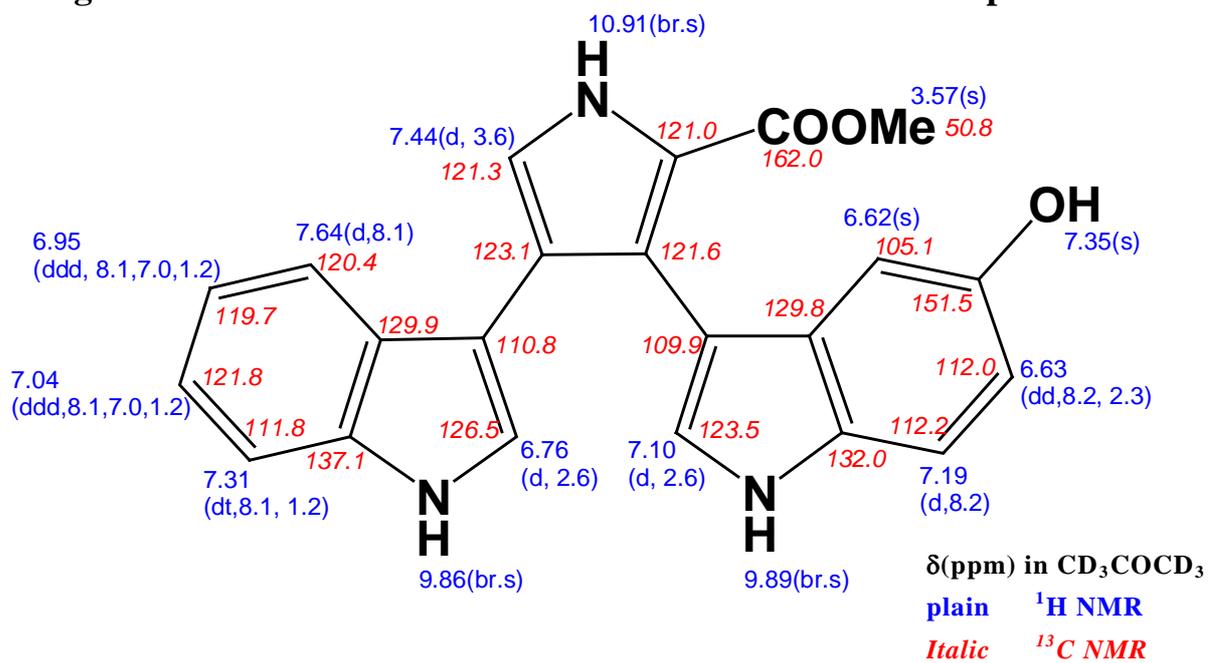


Fig. 5-14 Structure of compound 6

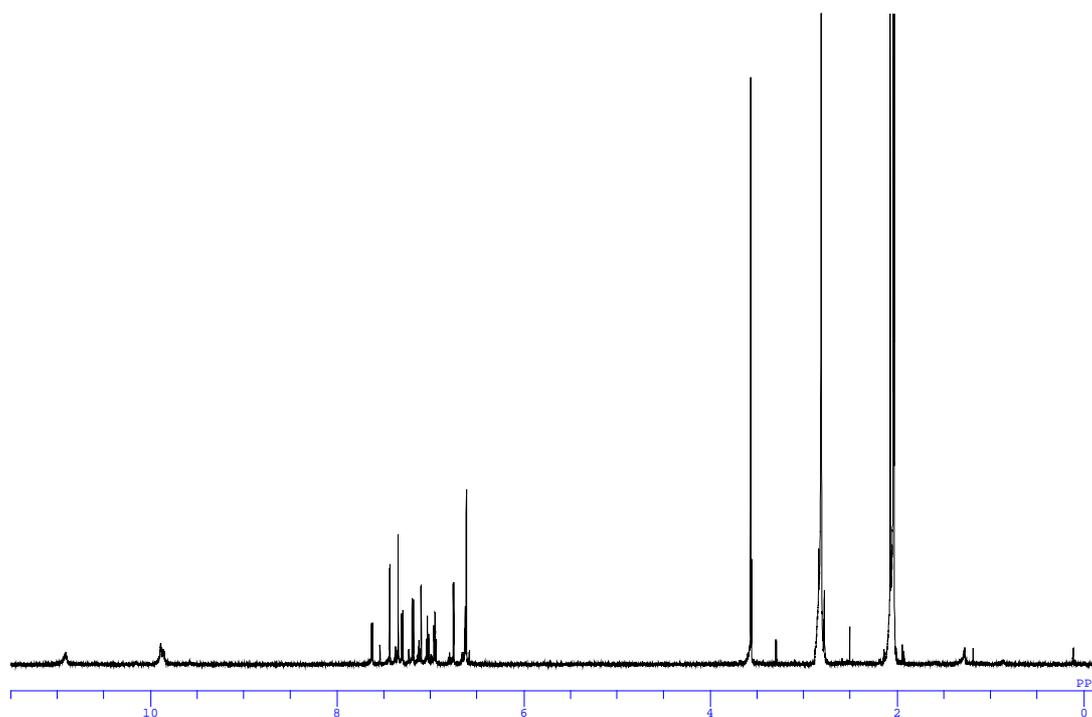


Fig.5-15 ^1H NMR spectrum of compound 6 in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

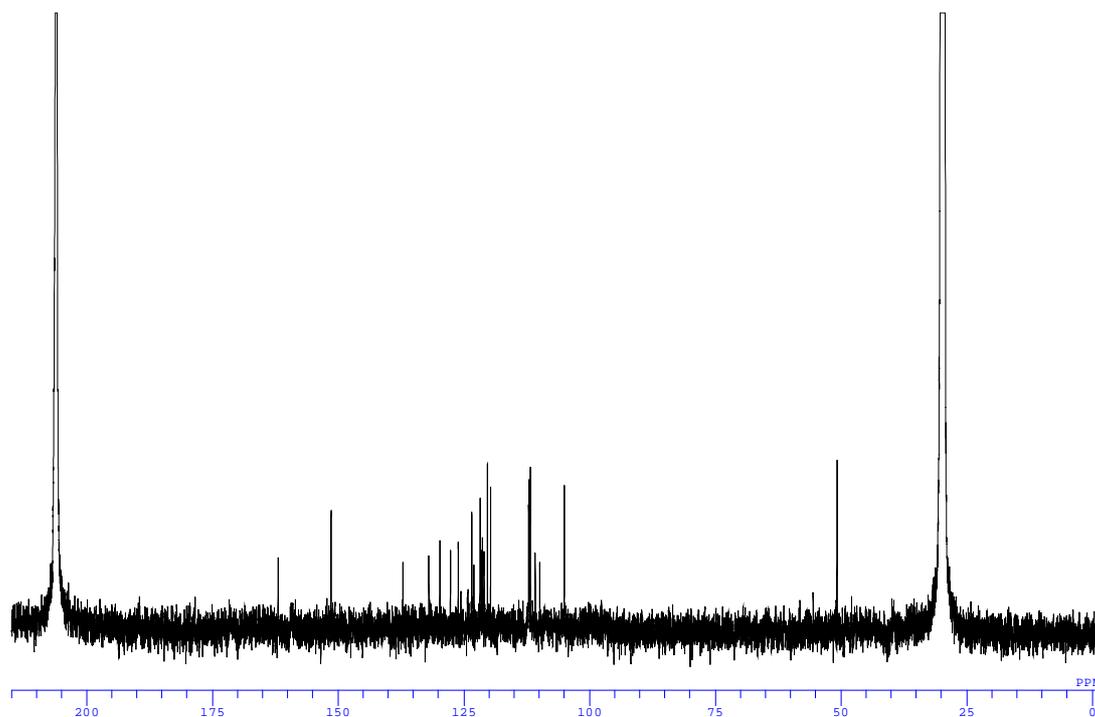


Fig.5-16 ^{13}C NMR spectrum of compound 6 in $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$

Table 5-1 NMR data of compound 5 and 6

positions	5 (CD ₃ OD)		6 (CD ₃ COCD ₃)	
	H (<i>J</i> in Hz)	c	H (<i>J</i> in Hz)	c
1			9.86 br s	
2	7.01 s	126.5	6.76 d 2.6	126.5
3		110.2		110.8
3a		129.9		129.9
4	7.01 d 1.9	104.7	7.64 d 8.1	120.4
5		151.0	6.95 ddd 8.1, 7.0, 1.2	119.7
6	6.60 dd 8.4, 1.9	112.0	7.04 ddd 8.1, 7.0, 1.2	121.8
7	7.16 dd 8.4, 0.6	112.3	7.31 dt 8.1, 1.2	111.8
7a		132.8		137.1
8		124.8 ^a		123.1 ^b
9	7.29 s	121.9	7.44 d 3.6	121.3
10			10.9 br s	
1'			9.89 br s	
2'	6.54 s	124.8	7.10 d 2.6	123.5
3'		110.1		109.9
3a'		128.7		129.8
4'	6.56 dd 2.6, 0.6	105.5	6.62 s	105.1
5'		151.4		151.5
6'	6.61 dd 8.7, 2.6	111.9	6.63 dd 8.2, 2.3	112.0
7'	7.08 d 8.7	112.5	7.19 d 8.2	112.2
7a'		132.6		132.0
8'		122.3 ^a		121.6 ^b
9'		120.7 ^a		121.0 ^b
COOMe		163.6		162.0
OMe	3.65	51.3	3.57 s	50.8
5'-OH			7.35 br s	

^{a,b,c} Signals may be reversed.

(3) 化合物 7 の構造解析

化合物 7 は、橙色の非結晶粉末として得られ、EIMSスペクトルの測定により m/z 327 に $[M^+]$ とされる分子イオンピークが観測された。重DMSOを測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトルでは、低磁場領域に 10H分の芳香族シグナル δ_{H} 7.72 (s), δ_{H} 7.35 (d, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 6.96 (t, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 6.79 (d, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 6.61 (t, $J=7.9$ Hz) が観測された。また、NH由来と思われる 2 つのシングレットのブロードなシグナル (δ_{H} 11.64, δ_{H} 8.30) が観測された。これらのことから、本化合物は対称型ビスインドール化合物であることが予想された。 ^1H NMRスペクトルを文献値⁴¹⁾と比較したところ、良い一致を示したため、化合物 7 を arcyriarubin A と同定した。arcyriarubin A は、これまでに変形菌 *Lycogala epidendrum*, *Arcyria denudata* の野外採取子実体から単離されている^{9b, 11a)}。

Table 5-2 ^1H NMR data of compound 7

position	compound 7 (400 MHz, DMSO- d_6)	Ref ⁴¹⁾ . (300 MHz, DMSO- d_6)
	^1H -NMR	^1H -NMR
1, 1'	11.64 (s, 2H)	11.6 (s, 2H)
2, 2'	7.72 (s, 1H)	7.70 (s, 1H)
		7.69 (s, 1H)
4, 4'	6.79 (d, 2H, $J=7.9$ Hz)	6.77 (d, 2H, $J=8.00$ Hz)
5, 5'	6.96 (t, 2H, $J=7.9$ Hz)	6.94 (t, 2H, $J=7.34$ Hz)
6, 6'	6.61 (t, 2H, $J=7.9$ Hz)	6.59 (t, 2H, $J=7.72$ Hz)
7, 7'	7.35 (d, 2H, $J=7.9$ Hz)	7.33 (d, 2H, $J=8.07$ Hz)

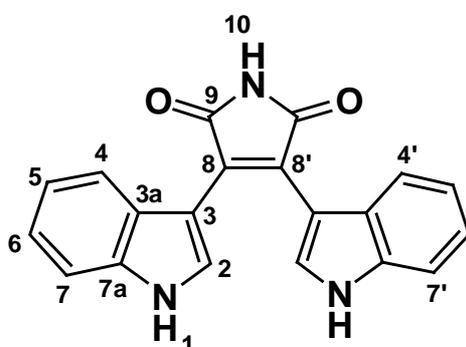


Fig.5-17 Structure of compound 7 (arcyriarubin A)

(4) 化合物 8 の構造解析

化合物 8 は茶色の粉末状物質として単離され ,FABMSスペクトルにおいて m/z 399 に $[M^+]$ と思われるシグナルが観測された .重メタノールを測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトルでは , δ_{H} 3.64 に 1 つのメトキシ基由来のシグナルが観測され , 低磁場領域に , δ_{H} 7.21 (dt, $J=8.4, 1.0$ Hz) , δ_{H} 7.16 (d, $J=8.0$ Hz) , δ_{H} 7.14 (d, $J=8.5$ Hz) , δ_{H} 7.12 (d, $J=8.3$ Hz) , δ_{H} 6.95 (ddd, $J=8.4, 7.1, 1.0$ Hz) , δ_{H} 6.89 (s) , δ_{H} 6.88 (ddd, 8.3, 7.0, 1.2 Hz) , δ_{H} 6.80 (ddd, $J=8.5, 7.1, 1.0$ Hz) , δ_{H} 6.79 (s) , δ_{H} 6.69 (ddd, $J=8.3, 7.0, 1.2$ Hz) , の 10H分の芳香族シグナルが観測された . ^{13}C NMRスペクトルの解析により , δ_{C} 51.5 に 1 個のメトキシ基由来の炭素のシグナル , 10 個の芳香族メチン炭素のシグナル (δ_{C} 125.9 , δ_{C} 125.7 , δ_{C} 121.5 , δ_{C} 121.3 , δ_{C} 121.3 , δ_{C} 121.1 , δ_{C} 119.4 , δ_{C} 119.1 , δ_{C} 111.7 , δ_{C} 111.5) , 10 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_{C} 137.4 , δ_{C} 137.4 , δ_{C} 132.1 , δ_{C} 129.6 , δ_{C} 129.3 , δ_{C} 127.0 , δ_{C} 122.9 , δ_{C} 119.9 , δ_{C} 110.7 , δ_{C} 110.5) , 2 個のカルボン酸あるいはエステルカルボニル炭素のシグナル (δ_{C} 163.3 , δ_{C} 162.2)が観測された .以上の解析結果から , 化合物 8 は分子式 $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ であることが予想され , HMQCおよびHMBCスペクトルの解析結果も踏まえて , 化合物 8 を lycogarubin C のモノメチルエステル体と同定した . 本化合物は , *Lycogala epidendrum* より単離されている³²⁾ .

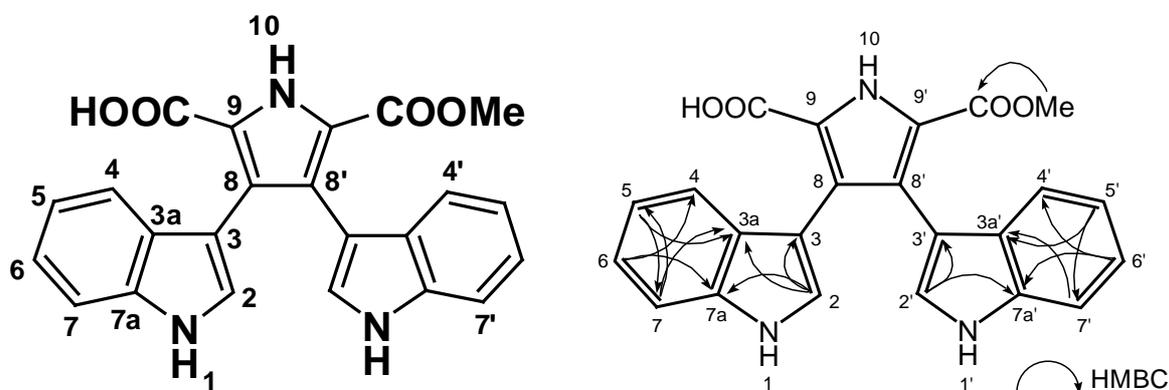


Fig.5-18 Structure of compound 8

第 5 節 小括

Arcyria cinerea 野外採取子実体の成分研究を行い, 2 種の新規化合物を含む 4 種の化合物を単離した. 各種スペクトル解析の結果, 化合物 5, 6 はピロール部分を有する新規ビスインドール化合物であることが明らかとなり, それぞれ cinereapyrrole A, B と命名した. また, 化合物 7 は arcryiarubin A, 8 は lycogarubin C のモノメチルエステル体であることを明らかにした.

第 6 章 野外採取子実体の成分研究 (3)

: *Arcyria obvelata* (04-76)

第 1 節 *Arcyria obvelata* について

Arcyria obvelata (キウツボホコリ)は、ケホコリ目 (Trichiales)ウツボホコリ科 (Arcyriaceae)に属する変形菌であり、春から秋、特に梅雨明け頃に腐木上に発生する^{10), 43)}。子実体は単子嚢体型であり、密生または群生し、有柄である。子嚢は円筒形あるいは卵形、色は黄色や黄土色であり、高さ 1.5 ~ 2 mm, 伸張して高さ 15 mm またはそれ以上になり、下垂することが多い。変形体は白色である。

本菌は別名を *Arcyria nutans* と言い、以前にドイツの Steglich らにより化学成分についての研究が行われていた。しかし、詳細な実験データに関しては記載されておらず、化学構造式のみが報告されていた^{9a)}。今回、化学構造式のみ報告されている化合物について、実験データに関する新たな知見を得ることも視野に入れ、化学成分の探索を行った。2004 年に高知県夜須町で山本幸憲先生に採取、同定して頂いた株を本研究に用いた。



Fig.6-1 Wild fruit bodies of *Arcyria obvelata*

第 2 節 *Arcyria obvelata* の成分探索

Arcyria obvelata 野外採取子実体 (0.33 g) を 90 %MeOH および 90 %Acetone で抽出を行い，抽出物 54.7 mg を得た．

TLC 分析を行ったところ，試薬を吹きかけない状態で主要色素と思われる 1 つの黄色色素のスポットが確認された．また，TLC を用いて抽出物のケミカルスクリーニングを行ったところ，Fast red B 試薬およびリンモリブデン酸に発色する複数のスポットが確認され (Fig.6-2)，これらを指標にして精製を進めた．抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに負荷し，クロロホルム/メタノール溶媒系を用い，メタノールの割合を段階的に上げて溶出させ，Fr.1A-1I を得た．TLC 分析の結果，Fr.1E は単一スポットであることが確認され，主要黄色色素成分と思われる化合物 (6.1 mg) を単離した．続いて，TLC 分析により同一の成分が含まれていることが確認された Fr.1B および 1C を一緒にし，移動相に 70 %メタノールを用いた ODS HPLC により精製を行い，化合物 10 (1.4 mg) を単離した．

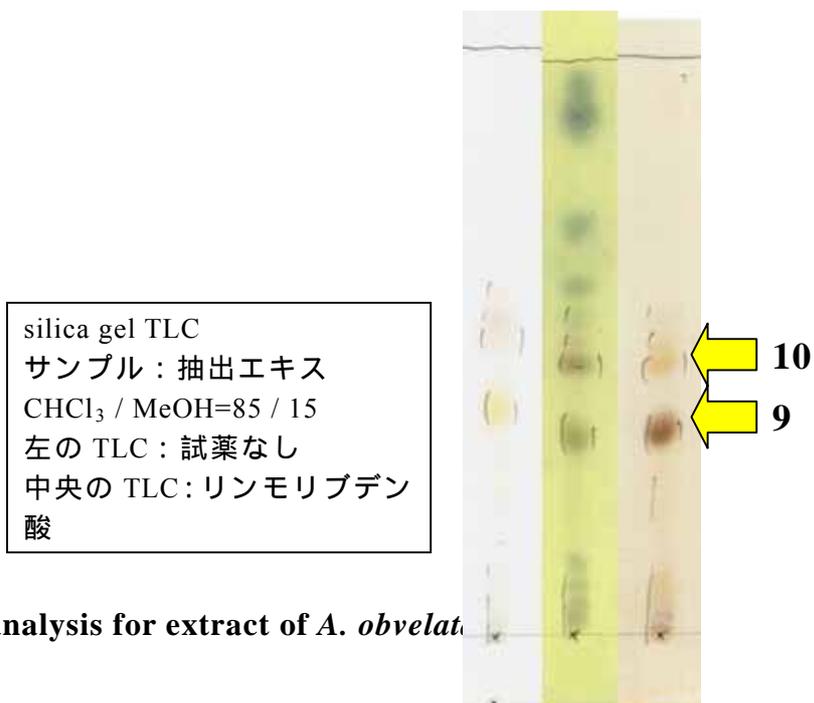


Fig. 6-2 TLC analysis for extract of *A. obvelata*

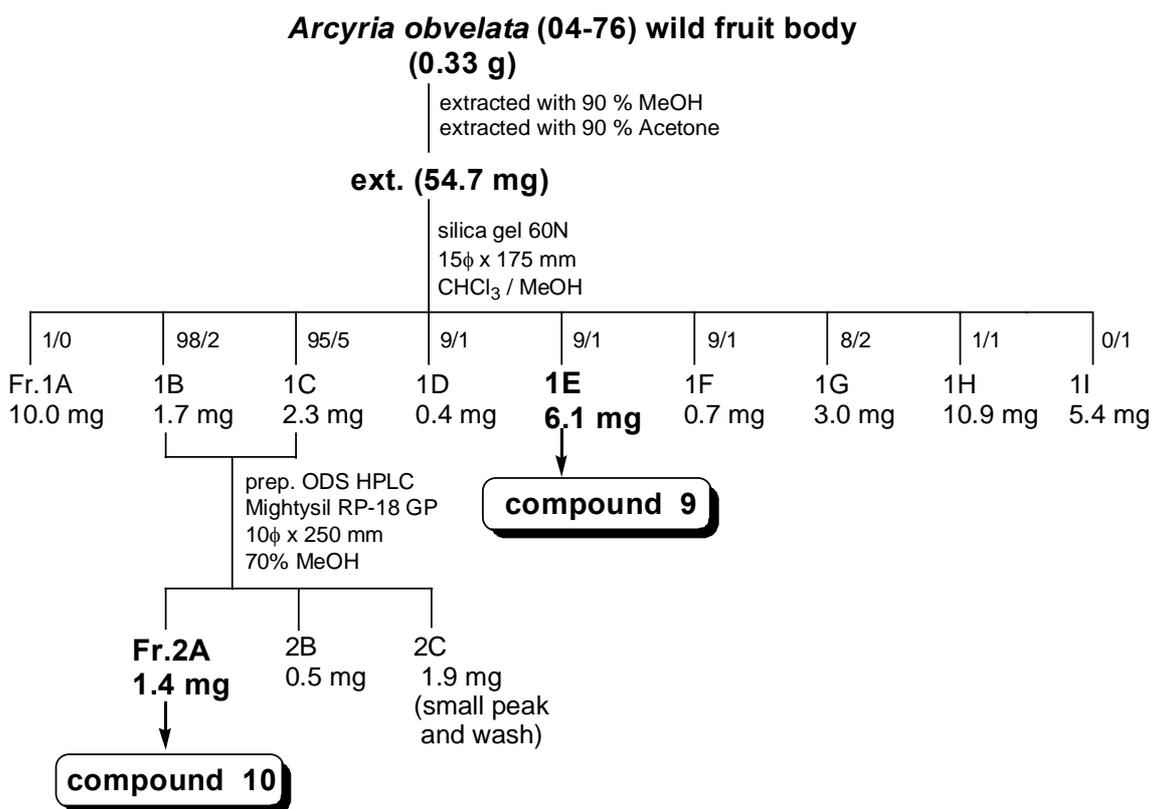


Fig. 6-3 Isolation procedure of compound 9 and 10

第 3 節 単離した化合物の構造解析

化合物 9 の構造解析

化合物 9 は橙色の非結晶粉末として得られ, EIMS スペクトルの測定により m/z 341 に分子イオンピークが観測された. 重アセトンを用いた ^1H NMR スペクトル (Fig.6-5, Table 6-1) では, 低磁場領域に, δ_{H} 9.11 (d, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 8.92 (d, $J=8.8$ Hz), δ_{H} 7.65 (d, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 7.49 (td, $J=7.9$, 0.9 Hz), δ_{H} 7.31 (t, $J=7.9$ Hz), δ_{H} 7.10 (d, $J=2.2$ Hz), δ_{H} 6.91 (dd, $J=8.8$, 2.2 Hz) の 7H 分の芳香族シグナルが観測された. また, NH 由来と思われる 3 つのシングレットのブロードなシグナル (δ_{H} 11.07, δ_{H} 10.98, δ_{H} 9.69) が観測された. 以上のことから, 化合物 9 は非対称ビスインドール化合物であることが推測され, 結合様式から, $J=2.2$ Hz でメタカップリングしていると思われるシグナル (δ_{H} 7.10) が 1 つ存在し, トリプレットの結合様式のシグナル (δ_{H} 7.49, δ_{H} 7.31) が 2 つ存在することから, 5 位あるいは 6 位が置換したインドールと無置換のインドールが 1 つずつ存在することが考えられた. 本化合物を arcyriaflavin B の ^1H NMR スペクトルと比較したところ, 良い一致を示したため, 化合物 9 を arcyriaflavin B と同定した. arcyriaflavin B は, これまでに変形菌 *Arcyria denudata*^{9a), 11a)}, *Tubifera casparyi*^{28), 29)}, *Lycogala epidendrum*³²⁾, の野外採取子実体から単離されている.

Table 6-1 ^1H NMR data of compound 9

position	compound 9 (400 MHz, Acetone- d_6)	Reference-1 ^{11a)} (90 MHz, Acetone- d_6)	Reference-2 ²⁸⁾ (400 MHz, Acetone- d_6)
1,1'-NH	10.98 (br s) 11.07 (br s)	11.65 (br s)	11.25 (br s)
4	8.92 (d, 8.8)	8.96 (d, 8.6 Hz)	8.92 (d, 8.4)
5	6.91 (dd, 8.8, 2.2)	6.93 (dd, 8.6, 2.1 Hz)	6.91 (dd, 8.4, 2.1)
7	7.10 (d, 2.2)	7.16 (d, 2.1 Hz)	7.10 (d, 2.4)
4'	9.11 (d, 7.9)	9.15 (br.d, 7.9 Hz)	9.11 (d, 7.6)
5'	7.49 (td, 7.9, 0.9)	7.24-7.80 (m)	7.50 (t like)
6'	7.31 (t, 7.9)		7.32 (t like)
7'	7.65 (d, 7.9)		7.67 (br d, 8.0)
10-NH	9.69 (br s)	9.64 (br s)	9.69 (br s)

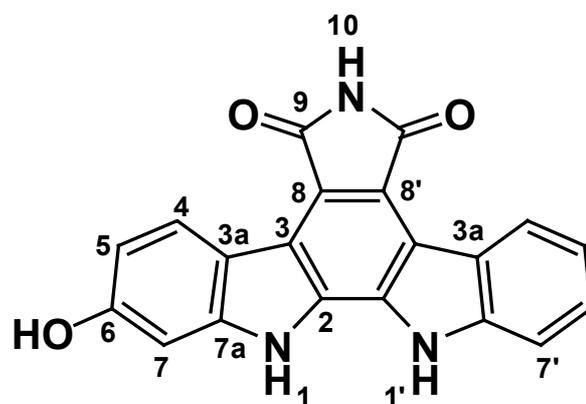


Fig. 6-4 Structure of compound 9 (arcyriaflavin B)

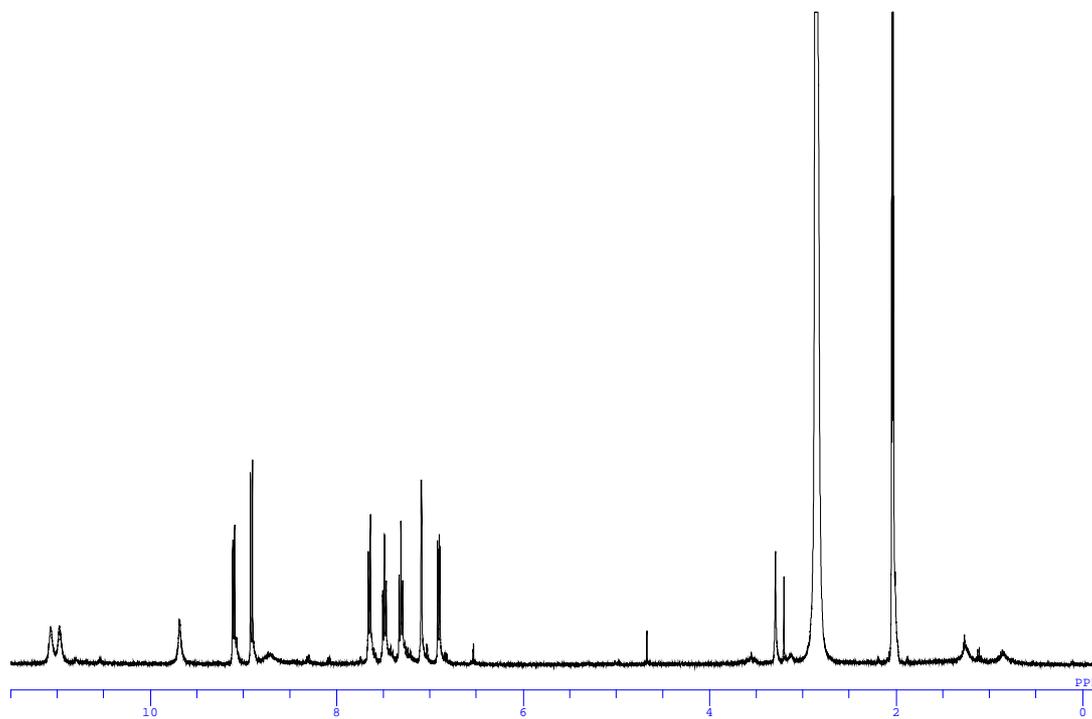


Fig. 6-5 ¹H NMR spectrum of compound 9 in Acetone-*d*₆

化合物 10 の構造解析

化合物 10 は薄黄色の非結晶粉末として単離され，FABMSスペクトルにおいて m/z 327 に $[M^+]$ のシグナルが観測された．高分解能FABMSスペクトル (m/z 327.1003 $[M^+]$, Δ -0.5 mmu) の測定により，分子式 $C_{20}H_{13}N_3O_2$ であることが明らかとなった．UVスペクトルは 363 , 344 , 228 , 203 nm に極大吸収を示し，IRスペクトルからはNHに基づく吸収 (3390 cm^{-1}) およびカルボニル基の吸収 (1710 cm^{-1}) が観測された．重アセトン測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトル (Fig.6-8 , Table 6-2) では，低磁場領域に δ 7.68 (d , $J=8.0$ Hz) , δ 7.65 (dd , $J=7.7$, 0.8 Hz) , δ 7.63 (dd , $J=2.7$, 1.5 Hz) , δ 7.42 (d , $J=8.0$ Hz) , δ 7.40 (dd , $J=7.7$, 0.8 Hz) , δ 7.21 (t , $J=7.7$ Hz) , δ 7.14 (ddd , $J=8.0$, 6.9 , 1.1 Hz) , δ 7.05 (ddd , $J=8.0$, 6.9 , 0.9 Hz) の 8H 分の芳香族シグナルが観測され， δ 5.32 ($J=7.5$ Hz) および δ 4.58 ($J=7.5$, 1.5 Hz) にそれぞれ 1H 分のシグナルが観測された．また，NH由来と思われる 3 つのシングレットのブロードなシグナル (δ 10.76 , δ 10.67 , δ 9.88) が観測された． ^{13}C NMR (Fig.6-9 , Table 6-2) および HMQC スペクトル (Fig.6-11) の解析により，2 個の sp^3 メチン炭素のシグナル (δ_{C} 45.6 , δ_{C} 44.7) , 8 個の芳香族メチン炭素のシグナル (δ_{C} 125.7 , δ_{C} 123.1 , δ_{C} 122.7 , δ_{C} 120.1 , δ_{C} 119.4 , δ_{C} 115.8 , δ_{C} 112.0 , δ_{C} 111.6) , 8 個の芳香族四級炭素のシグナル (δ_{C} 137.3 , δ_{C} 132.4 , δ_{C} 134.7 , δ_{C} 137.9 , δ_{C} 124.6 , δ_{C} 123.0 , δ_{C} 110.6 , δ_{C} 106.5) , 2 個のカルボニル炭素のシグナル (δ_{C} 178.7 , δ_{C} 178.3) が存在することが明らかとなった．以上のスペクトルの解析により，化合物 10 は非対称ビスインドール化合物であることが推測された．

^1H NMR スペクトルの結合様式ならびに ^1H - ^1H COSY スペクトル (Fig.6-10) の解析により， δ 7.68 (d , $J=8.0$ Hz , H-4) / δ 7.05 (ddd , $J=8.0$, 6.9 , 0.9 Hz , H-5) / δ 7.14 (ddd , $J=8.0$, 6.9 , 1.1 Hz , H-6) / δ 7.42 (d , $J=8.0$ Hz , H-7) の 4 個の水素と δ 7.65 (dd , $J=7.7$, 0.8 Hz , H-5') / δ 7.21 (t , $J=7.7$ Hz , H-6') / δ 7.40 (dd , $J=7.7$ Hz , H-7') の 3 個の水素， δ 5.32 (d , $J=7.5$ Hz , H-8) / δ 4.58 (d , $J=7.5$ Hz , H-8') の 2 個の水素のつながりがそれぞれ明らかとなった (Fig.6-6)．HMBC スペクトル (Fig.6-12) の解析により，H-4 (δ 7.68) から δ_{C}

123.1 (C-6), H-5 (δ 7.05)から δ_C 111.6 (C-7), H-6 (δ 7.14)から δ_C 119.4 (C-4), H-7 (δ 7.42)から δ_C 120.1 (C-5), H-4 およびH-6 から δ_C 137.3, H-5 およびH-7 から δ_C 132.4 に相関が観測され, さらにH-4 (δ 7.68)から δ_C 106.5 (C-3)に相関が観測されたことから, 1 つのインドール部分が存在することが考えられた (Fig.6-6). また, H-5' (δ 7.65)から δ_C 112.0 (C-7'), H-6' (δ 7.21)から δ_C 124.6 (C-4')ならびに δ_C 137.9 (C-7a'), H-5'およびH-7' (δ 7.40)から δ_C 123.0 (C-3a')にHMBCスペクトルの相関が観測され, さらにH-2' (δ 7.63)から δ_C 110.6 (C-3'), δ_C 123.0 (C-3a'), δ_C 137.9 (C-7a')にHMBCによる相関が観測されたことから, もう1つインドール部分が存在することが考えられた. 芳香族以外のシグナルでは, δ_H 5.32 から δ_C 45.6 およびカルボニル炭素の δ_C 178.3 のシグナルに相関が観測され, δ_H 4.58 からH-8'から δ_C 44.7 およびカルボニル炭素の δ_C 178.7 のシグナルに相関が観測されたことから, 3,4-ジヒドロマレイミド環が存在することが考えられた. また, 分子式の不飽和度より, 2 つのインドールおよび 3,4-ジヒドロマレイミド環の他に, もう1つ環状部分が存在することが示唆された. HMBCスペクトルにより, δ_H 5.32 から δ_C 134.7 に相関が観測されたことから, δ_H 5.32 は8位の水素, δ_H 4.58 は8'位の水素であることが明らかとなり, H-5'から δ_C 134.7 (C-2)にHMBC相関が観測されたことから, 本化合物は2位と4'位が炭素で結合したビスインドール化合物であり, dihydroarcyriacyanin Aであることが明らかとなった. H-8 およびH-8'の結合定数は7.5 Hzであり, また, 差NOE実験により, これらの水素に相関が観測されたことから, H-8 とH-8'は*cis*配置であると推定した(Fig.6-7). 本化合物は, SciFinder®検索では新規化合物であったが, 化学構造式のみが学会要旨集に記載されていた^{9a)}. 本化合物の詳細な実験データに関する報告はこれが初めてであり, 本研究により新たな知見を得ることができた. なお, 本化合物は, HeLa細胞に対してIC₅₀値は50 μ M以上であった.

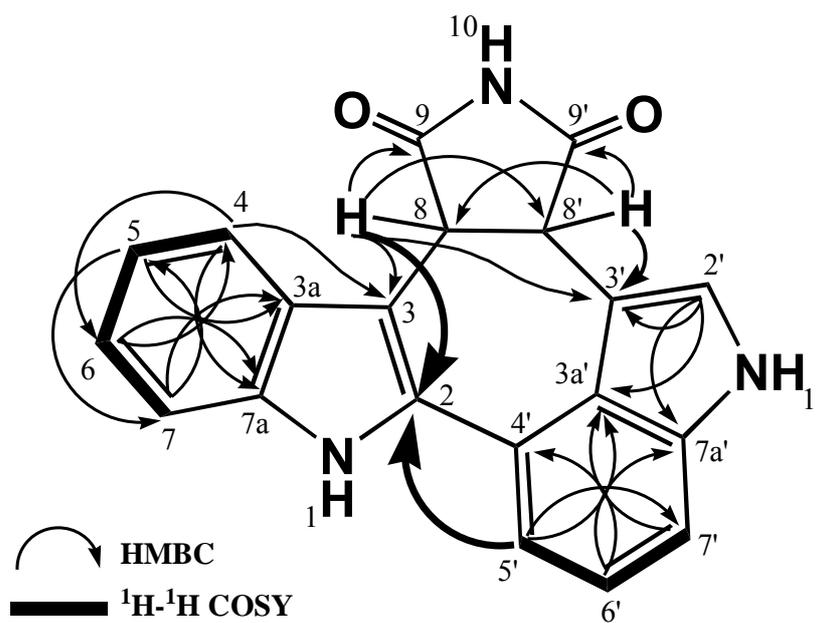


Fig.6-6 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compound 10

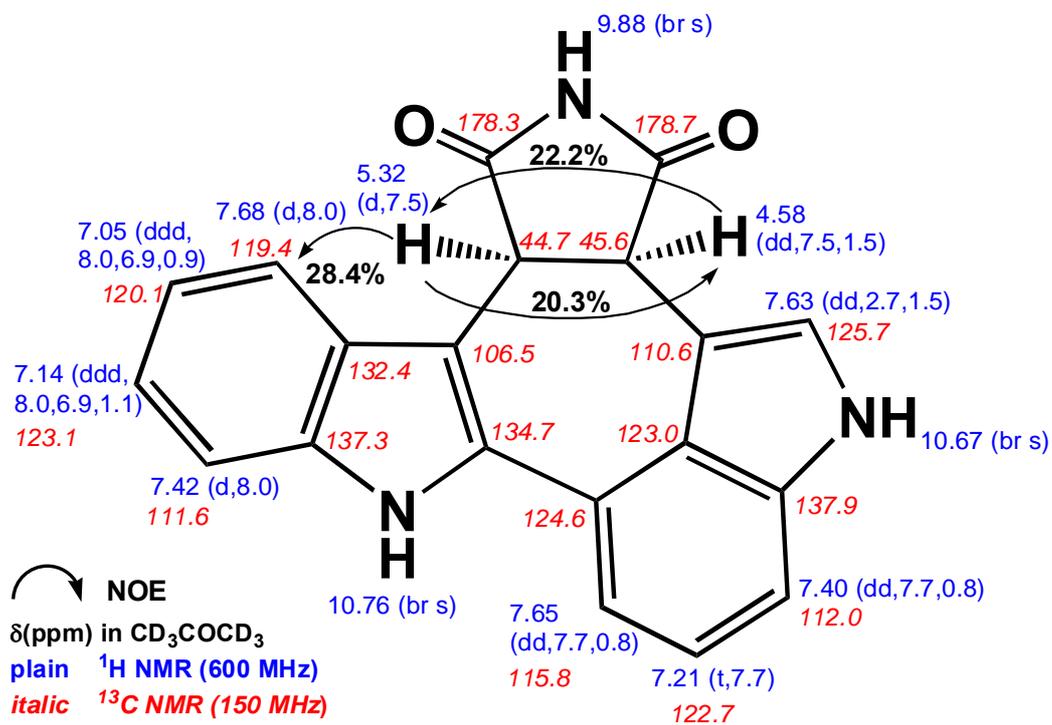


Fig. 6-7 Structure of compound 10

Table 6-2 ¹H and ¹³C NMR spectral data of compound 10

Position	compound 10 (CD ₃ COCD ₃)		
	δ _H (600 MHz)	<i>J</i> in Hz	δ _C (150 MHz)
1	10.76	(br s)	
2			134.7
3			106.5
3a			132.4
4	7.68	(d, 8.0)	119.4
5	7.05	(ddd, 8.0, 6.9, 0.9)	120.1
6	7.14	(ddd, 8.0, 6.9, 1.1)	123.1
7	7.42	(d, 8.0)	111.6
7a			137.3
8	5.32	(d, 7.5)	44.7
9			178.3
10	9.88	(br s)	
1'	10.67	(br s)	
2'	7.63	(dd, 2.7, 1.5)	125.7
3'			110.6
3a'			123.0
4'			124.6
5'	7.65	(dd, 7.7, 0.8)	115.8
6'	7.21	(t, 7.7)	122.7
7'	7.40	(dd, 7.7, 0.8)	112.0
7a'			137.9
8'	4.58	(dd, 7.5, 1.5)	45.6
9'			178.7

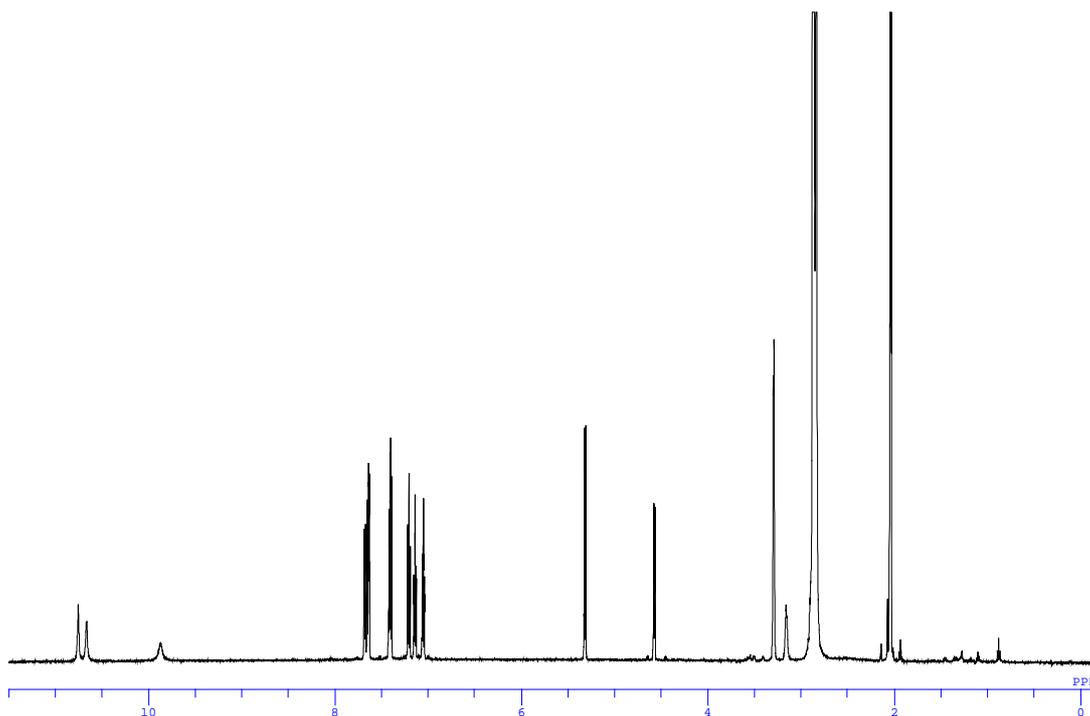


Fig.6-8 ^1H NMR spectrum of compound 10 in Acetone- d_6

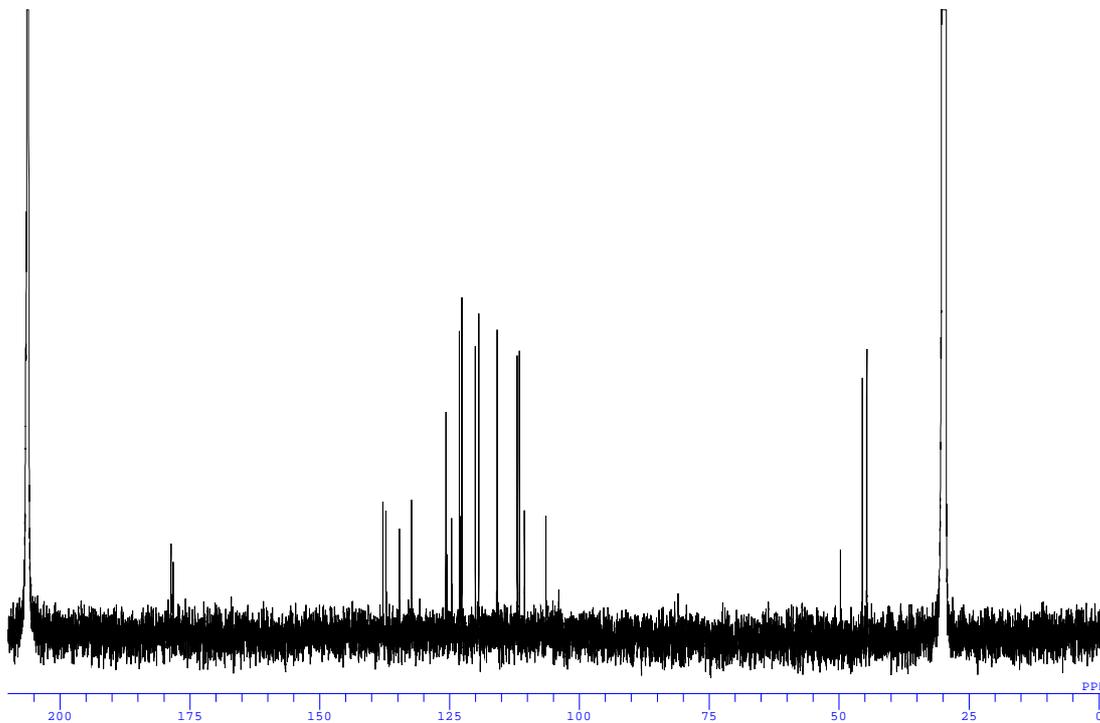


Fig.6-9 ^{13}C NMR spectrum of compound 10 in Acetone- d_6

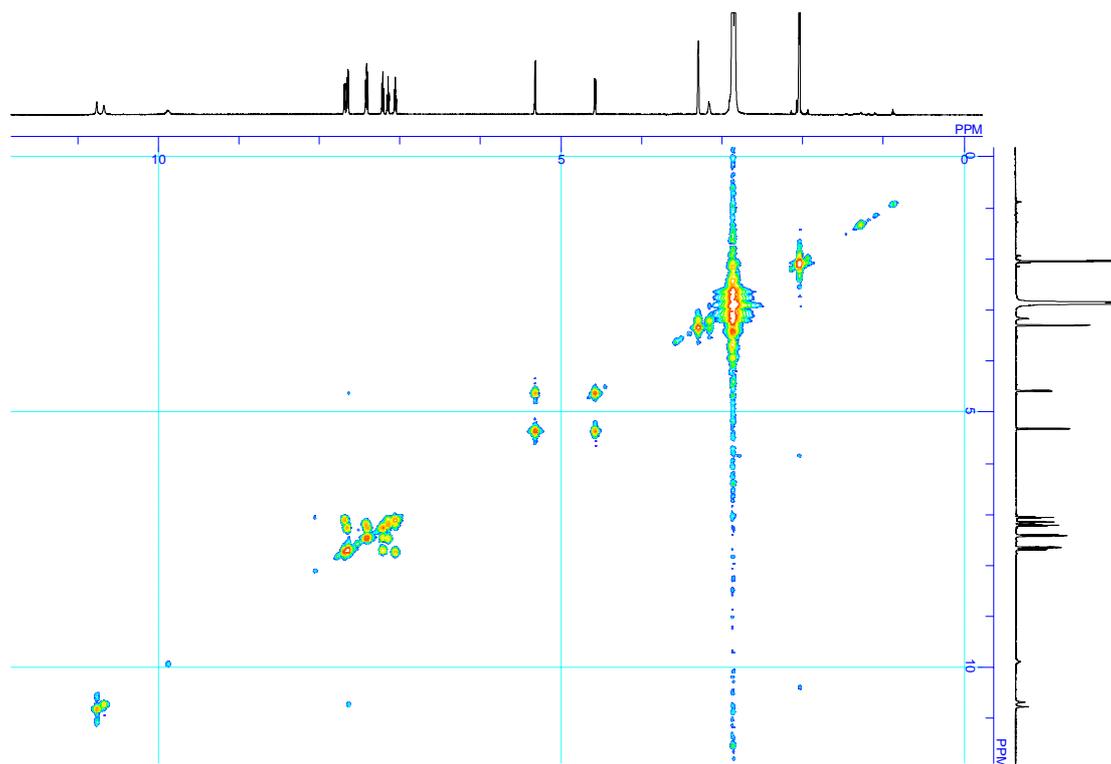


Fig.6-10 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 10 in Acetone- d_6

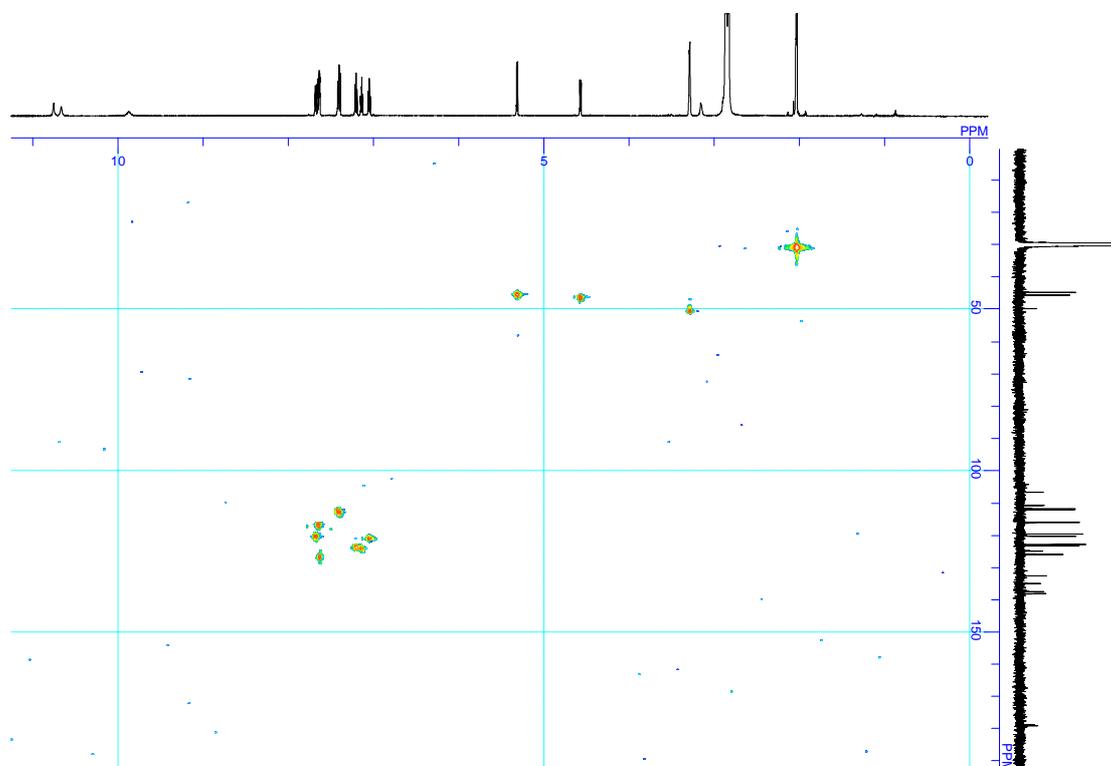


Fig.6-11 HMQC NMR spectrum of compound 10 in Acetone- d_6

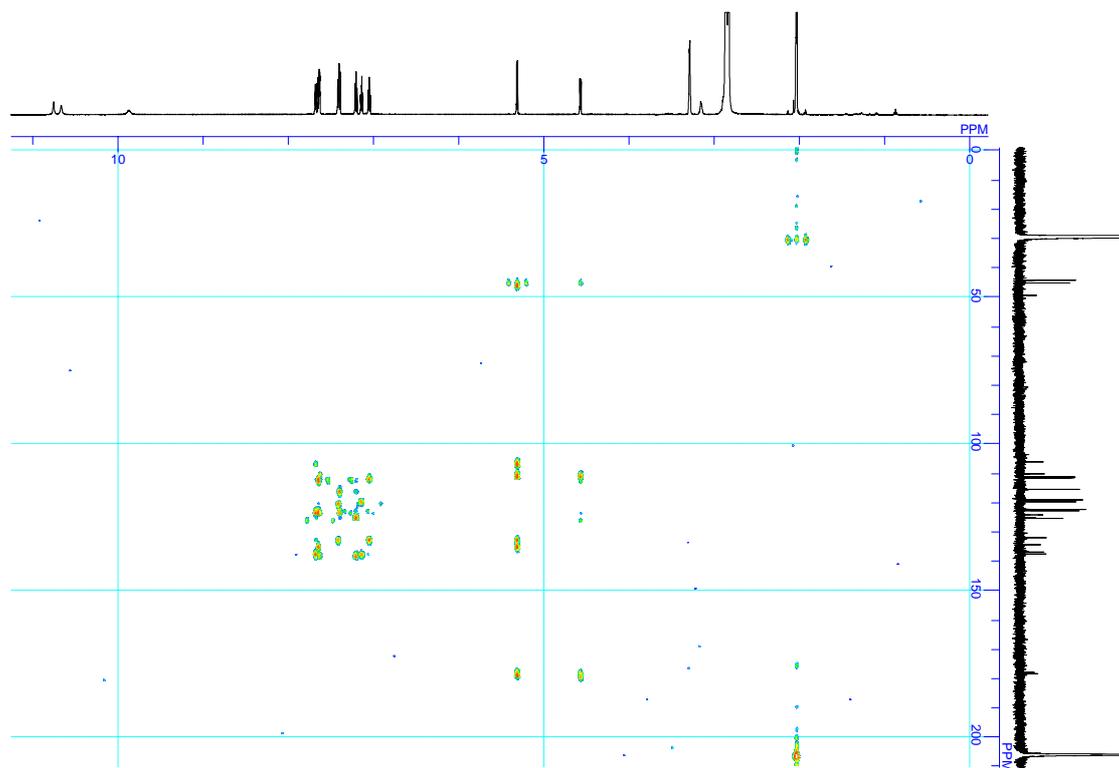


Fig.6-12 HMBC spectrum of compound 10 in Acetone- d_6

第4節 単離したビスインドール化合物の生物活性

(1) 細胞毒性に関する試験

cinereapyrrole A (5), B (6)ならびに arcyriaflavin B (9)について, KB/VJ-300 細胞 (ピンクリスチン耐性ヒト舌がん細胞) に対する細胞毒性試験を行った。その結果, cinereapyrrole A (5), B (6)は活性を示さなかった。arcyriaflavin B (9)は, KB/VJ-300 細胞に対して薬剤耐性克服作用は示さなかったものの, 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と顕著な細胞毒性を示した。

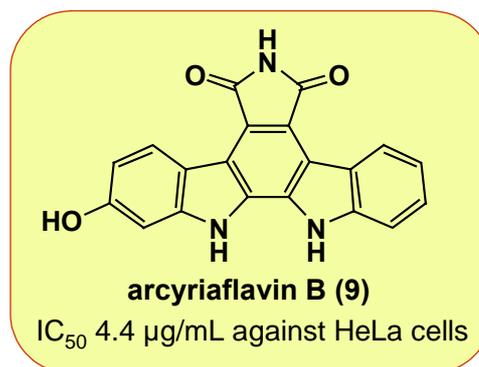
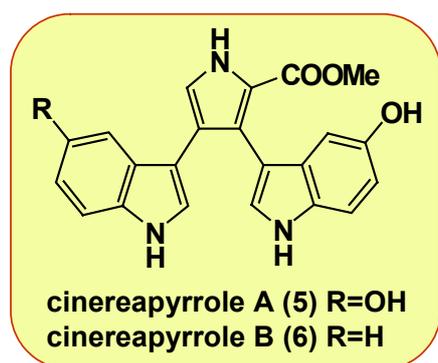
Table 6-3 Cytotoxicity of compounds 5, 6 and 9

Compounds	KB/VJ-300 (VCR耐性ヒト舌がん細胞)	
	VCR (+)	VCR (-)
cinereapyrrole A (5)	>12.5 ($\mu\text{g}/\text{mL}$, IC_{50})	>12.5
cinereapyrrole B (6)	>12.5	>12.5
arcyriaflavin B (9)	2.3	2.3
Verapamil ^a	>25.0	1.1

Tests toward each cell line were carried out in the absence (-) and presence (+) of 100 ng/mL of VCR, which did not affect the growth of the cells.

^a Positive control.

[Determined by K. Komiyama and M. Hayashi (Kitasato Institute)]



(2) ヒト培養がん細胞パネルによる抗がん剤スクリーニング試験

arcyriaflavin B (9)ならびに *Tubifera casparii* より単離された arcyriaflavin C について、ヒト培養がん細胞パネルによる抗がん剤スクリーニング試験を行った。本試験は、文部科学省がん特定 総合がんスクリーニング委員会の 矢守隆夫 博士の研究グループによる。

本試験では、39 種のヒトがん細胞株（肺がん 7 種、胃がん 6 種、大腸がん 5 種、卵巣がん 5 種、脳腫瘍 6 種、乳がん 5 種、腎がん 2 種、前立腺がん 2 種、およびメラノーマ 1 種）を用いた試験法である。

表の見方としては、

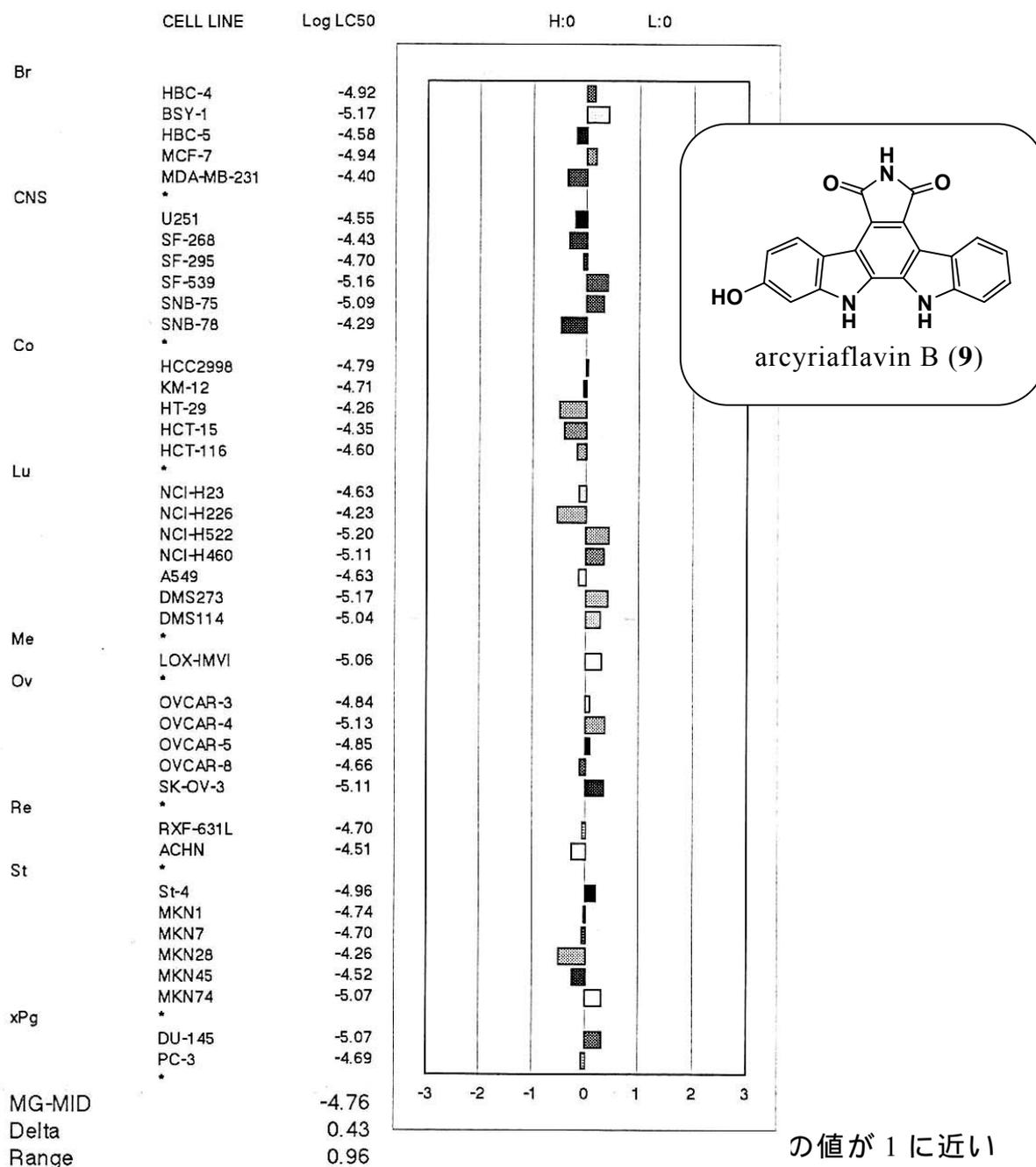
Delta：最も感受性の高い株と平均値との差を示す

Range：最も感受性の高い株と最も感受性の低い株のLog LC₅₀の差を示す

MG-MID：平均値を表す

有効濃度が十分低く(MG-MID が-5 より小さい)、Delta 値が 0.5 以上であり、かつ Range の値が 1 以上であると細胞株選択性が認められ、興味深い化合物であるといえる。

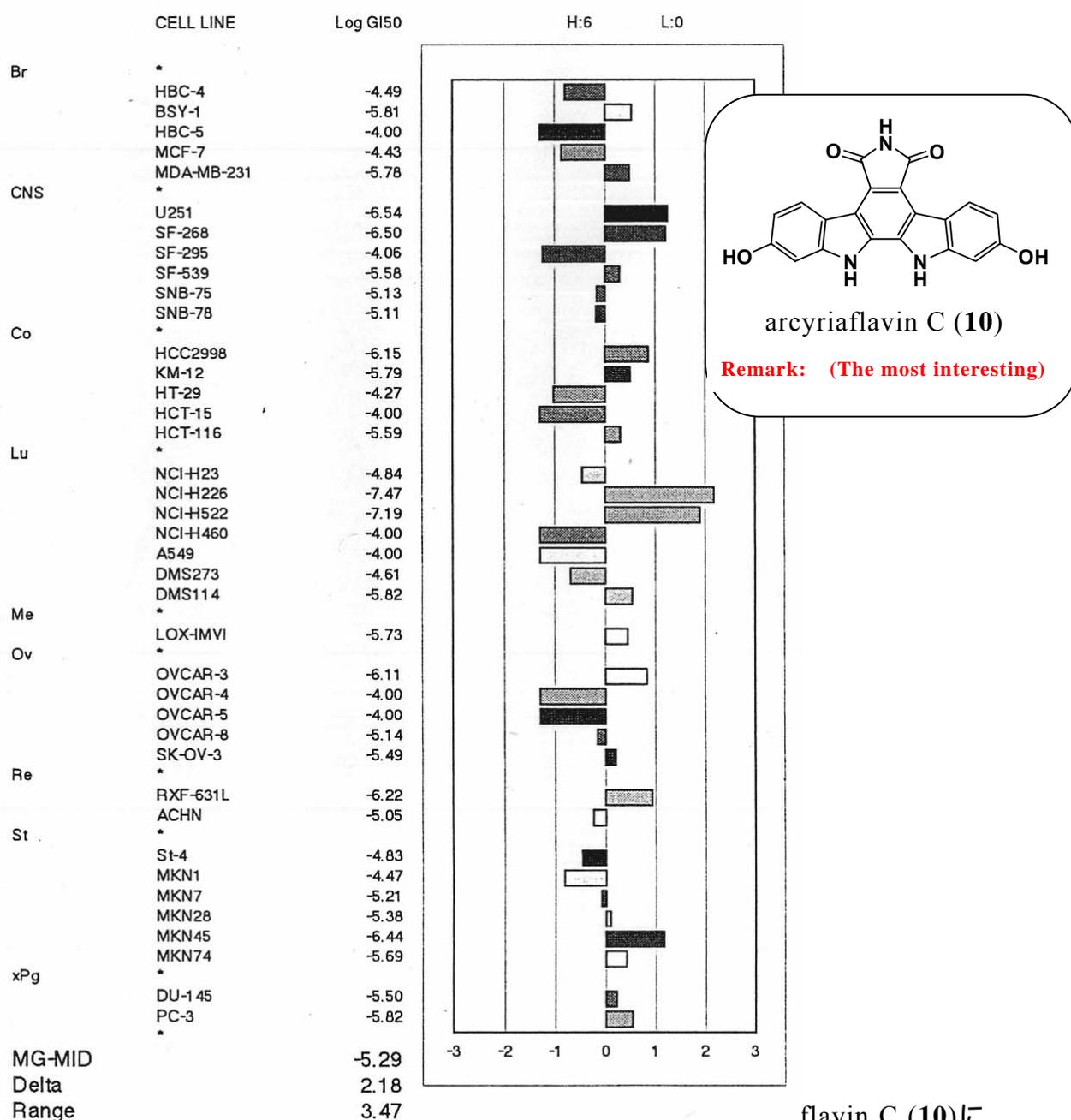
Table 6-4 Sensitivity against a panel of 39 human cancer cell lines of arcyriaflavin B (9)



の値が 1 に近いことから，ある程度の細胞株選択性が認められた．arcyriaflavin B (9)のグラフのパターン (Table 6-4)は標準薬剤に対して類似度が低く，作用機作に関する情報は未知であったことから，今後 *in vivo* での試験結果が期待される．

Table 6-5 Sensitivity against a panel of 39 human cancer cell lines

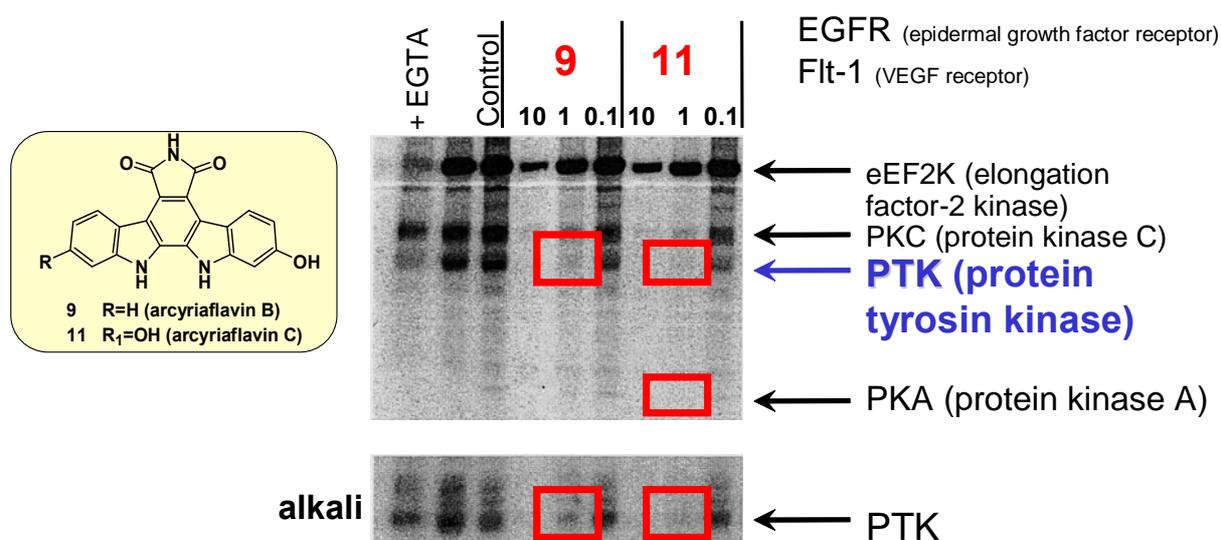
of arcyriaflavin C (10)



flavin C (10)についても試験を行った。その結果、arcyriaflavin C (10)は十分低濃度 (MG-MID<-5)で増殖抑制を示し、なおかつ脳腫瘍細胞株2種 (U251株:288 nM, SF-268株:316 nM)、肺がん細胞株2種 (NCI-H226株:34 nM, NCI-H522株:65 nM)に高い細胞株選択性が認められた。この結果から、arcyriaflavin CはThe most interestingという評価を得た。arcyriaflavin C (10)のグラフのパターン (Table 6-5)は標準薬剤に対して類似度が低く、作用機作に関する

情報は未知であった。今後 *in vivo* での試験結果が期待される。また、arcyriaflavin C (10)の構造は、arcyriaflavin B (9)よりもヒドロキシ基が1つ多くなっており、その違いだけで細胞増殖抑制および細胞株の選択性に大きな差が見られたことは、大変興味深い。

(3) プロテインキナーゼ阻害活性試験



Effects of compounds **9** and **11** on the activities of various protein kinases in a postnuclear supernatant of v-Src expressing NIH3T3 cells. Phosphorylation in the presence of [γ -³²P]ATP was allowed to proceed with the indicated additions to reaction mixtures. Phosphorylated proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography.

Fig. 6-13 Protein kinase inhibition of arcyriaflavin B (9) and C (10)

arcyriaflavin B (9),C (10)に対して、さらにプロテインキナーゼ阻害活性試験を行った。その結果、arcyriaflavin Cは1 μ g/mLの濃度で、PTK(プロテインチロシンキナーゼ)に対して80%以上の阻害活性を示した(Fig.6-13, Table 6-6)。また、arcyriaflavin BもPTKに対して1 μ g/mLの濃度で阻害活性を示した。これらの化合物は、PTKのような細胞質型プロテインキナーゼに対して活性が見られ、EGFRやFlt-1のような膜受容体型チロシンキナーゼには活性が見られなかったことから、これらの細胞質型プロテインキナーゼにある程度の選択性が見られた。以上の結果から、arcyriaflavin B

(9),C (10) の作用メカニズムは , PTK のような細胞質型プロテインキナーゼを阻害することにより細胞増殖抑制を引き起こすのではないかと考えられた .

Table 6-6 Inhibition selectivity of bisindole alkaloids^a

compounds	μg/mL	eEF2K	PKC	PTK	PKA	EGFR	Flt-1
9	10	—	++	++	++	—	—
	1	—	+	+	+	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—
11	10	—	++	++	++	—	++
	1	—	+	++	++	—	—
	0.1	—	—	—	—	—	—

^aThe indications “++”, “+”, and “—” mean >80%, 50-80%, and <50% kinase inhibition in each kinase assay, respectively.

第 5 節 小括

Arcyria obvelata 野外採取子実体の成分研究を行い、2 種の化合物を単離した。各種スペクトルの解析により、化合物 9 は arcyriaflavin B であることが明らかとなり、本変形菌の主要黄色色素成分であることが推測された。また、化合物 10 は dihydroarcyriacyanin A であることが明らかとなった。本化合物は以前に単離報告があったが、詳細な実験データは未報告であった。本化合物の詳細な実験データを今回得ることができた。

arcyriaflavin B (9) は、KB/VJ-300 細胞に対して薬剤耐性克服作用は示さなかったものの、 $2.3 \mu\text{g} / \text{mL}$ と顕著な細胞毒性を示した。arcyriaflavin B (9)、C (10) について、ヒト培養がん細胞パネルによる抗がん剤スクリーニング試験を行ったところ、arcyriaflavin C (10) は低濃度で増殖抑制を示し、なおかつ高い細胞株選択性が認められた。arcyriaflavin B (9)、C (10) は標準薬剤に対して類似度が低く、作用機作に関する情報は未知であった。さらに、arcyriaflavin B (9)、C (10) はプロテインチロシンキナーゼを阻害し、細胞質型プロテインキナーゼにある程度の選択性が見られた。arcyriaflavin B、C の、今後の *in vivo* での試験結果が期待される。

第7章 野外採取子実体の成分研究 (4) : *Lindbradia cribrarioides* (01-86)

第1節 *Lindbradia cribrarioides* について

Lindbradia cribrarioides [和名 タチフンホコリ(アミホコリ科, フンホコリ属)]の子実体は, 単子嚢体が密着した擬着合子嚢体型であり, 有柄である^{10), 43)}. 個々の子嚢は直径約 0.5 mm, 高さ約 1.5 mmの円筒形をしており, うぐいす色を帯びた褐色である. 春から秋に, スギなどの針葉樹の腐木上に発生する. 本研究に用いた 01-87 株は, 山本幸憲先生により 2001 年に高知県で採取され, 同定して頂いたものである.

本菌の化学成分に関する報告例はない. 本菌が属する *Lindbladia* 属では, *Lindbladia tubulina* の変形体から lindbladione と lindbladiapyrone が単離され^{9a)}, 子実体からは lindbladione とその類縁体が単離報告されている^{20), 24)}.

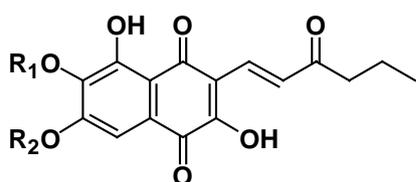


(cm)



x60

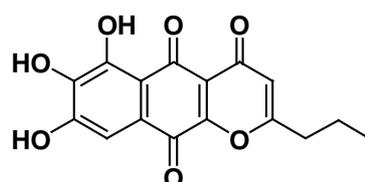
Fig.7-1 wild fruit bodies of *Lindbradia cribrarioides*



$R_1=R_2=H$ lindbladione

$R_1=H, R_2=Me$

$R_1=R_2=Me$



lindbladiapyrone

Fig.7-2 Chemical constituents from *Lindbladia tubulina*

第 2 節 *Lindbradia cribrarioides* (01-86)の成分探索 (水層について)

野外採取子実体 4.5 g を 90 %メタノールおよび 90 %アセトンで抽出を行い, 848.5 mg の抽出物を得た. これを 100 mL の蒸留水に懸濁させ、100 mL の EtOAc で 3 回分配を行った. この結果, EtOAc 層を 274.2 mg 得られ, 各分配層の TLC 分析の結果, 主要な色素成分であると思われる赤色のスポットが水層に確認された. 水層をエバポレーターでおよそ 30 mL に濃縮し, メタノール/水系の ODS カラムクロマトグラフィーにより精製を行った. 水 100 %からメタノールの割合を段階的に上げて溶出させ, Fr.1A から Fr.1J を得た. Fr.1 シリーズの TLC 分析を行ったところ, Fr.1G に赤色色素成分が確認された. このフラクションをメタノール/水=4/1 を溶出溶媒に用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製を行い, Fr.2A から Fr.2J を得た. この時に赤褐色の 4 つのバンドが確認され, これらを Fr.2D, 2F, 2H, 2I として構造解析を行った.

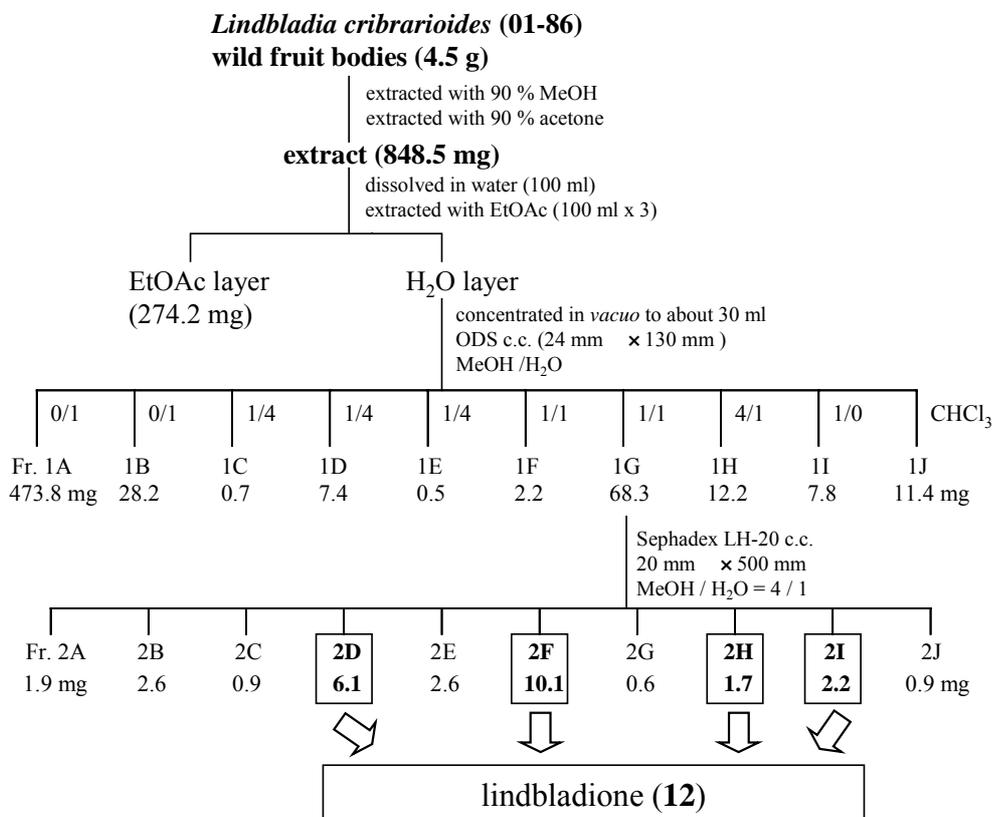


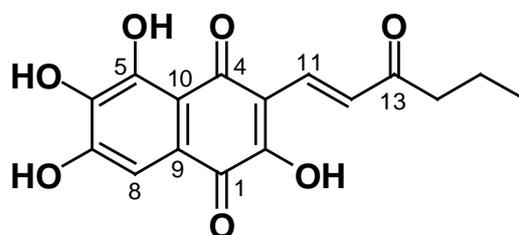
Fig.7-3 Isolation procedure of lindbladione (12)

第3節 赤色色素成分の構造解析

Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーを用いて精製を行った際に赤褐色のバンドとなって分離されたFr.2D, 2F, 2H, 2I は, ^1H NMRスペクトルの測定により, Fr.2Dを除いていずれも同様のスペクトルが得られた. スペクトル解析により最も純度が高かったFr.2Iについて, 重メタノールを測定溶媒に用いた ^1H NMRスペクトルの解析を行った. 低磁場領域において, 2つのダブルットのシグナル (δ 8.09 (1H, $J=16.0$ Hz), (δ 7.51 (1H, $J=16.0$ Hz))および1つのシングレットのシグナル (δ 7.08 (1H))が観測された. また, 高磁場領域において, それぞれ 2H分の 2つの脂肪属水素のシグナル (δ 2.56 (2H, t, $J=7.2$ Hz), δ 1.64 (2H, sextet, $J=7.2$ Hz)ならびにトリプレットのメチル基のシグナル (δ 0.95 (3H, $J=7.2$ Hz))が観測された (Table 7-1). これを *Lindbladia tubulina* から単離された lindbladione^{20), 24a)} と比較したところ, シグナルの結合様式および化学シフト値がほぼ一致し, TLC分析を行ったところ R_f 値も一致したことから, Fr.2Iを lindbladione (12) と同定した (Fig.7-4). Fr.2F, 2Hも ^1H NMRおよび TLC分析 (Fig.7-5)により lindbladione (12) と同定した. ^1H NMRスペクトルから, Fr.2F, 2H, 2Iとは異なる化合物と思われたFr.2Dについては, ^{13}C NMRを測定したところ lindbladioneと一致するシグナルが観測され, FAB MSスペクトルにより m/z 319 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ のシグナルが観測された. このことから, Fr.2Dは lindbladione と不純物の混合物であることが明らかとなった. 同じ化合物であるのに Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーで分離されたのは, lindbladione に Na が結合して塩になったためではないかと推測された.

Table 7- 1 ^1H NMR data for lindbladione (12) in CD_3OD

position	Fr. 2I	lindbladione
	δ_{H} (400 MHz)	δ_{H} (400 MHz)
8	7.08 (1H, s)	6.97 (1H, s)
11	8.09 (1H, d, $J=16.0$ Hz)	8.07 (1H, d, $J=16.0$ Hz)
12	7.51 (1H, d, $J=16.0$ Hz)	7.45 (1H, d, $J=16.0$ Hz)
14	2.56 (2H, t, $J=7.2$ Hz)	2.53 (2H, t, $J=7.6$ Hz)
15	1.64 (2H, sextet, $J=7.2$ Hz)	1.60 (2H, m)
16	0.95 (3H, t, $J=7.2$ Hz)	0.90 (3H, t, $J=7.6$ Hz)



lindbladione (12)

Fig.7-4 Structure of lindbladione

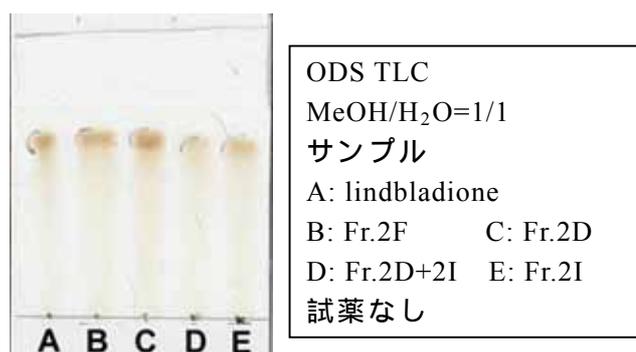


Fig.7-5 TLC analysis of lindbladione and Fr.2D, F, I

第4節 *Lindbradia cribrarioides* (01-86)の成分探索 (EtOAc層について)

TLC分析の結果，黄色色素成分などが確認されたEtOAc層について成分研究を行った．EtOAc層 (274.2 mg)を*n*-Hexane/EtOAc系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行った．EtOAcの割合を段階的に上げて溶出させ，Fr.1A-1Jを得た．また，アセトン，メタノール，CBAW (CHCl₃/*n*-BuOH/酢酸/水=1.5/6/1/1)で溶出させたフラクションをFr.1K，BAW (*n*-BuOH/酢酸/水=2/2/1)で溶出させたフラクションをFr.1Lとした．TLC分析により同一と思われる黄色色素のスポットが確認されたFr.1Eおよび1Fを統合し，CHCl₃/MeOH=99/1の溶出溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い，Fr.2A-2Iを得た．TLC分析により黄色色素の確認されたFr.2FをさらにSephadex LH-20で精製し，黄色色素のフラクションFr.5Cを得た．このフラクションの¹H NMRを測定したところ，オレフィン領域に多数のシグナルが確認され，ポリエン系の化合物ではないかと予想された (Fig.7-6)．このフラクションを，フォトダイオードアレイ検出器を用いたHPLCで分析を行ったところ，混合物であることが確認され，量が少ないことから単離には至っていない．また，Fr.1CならびにFr.1Hの精製を行ったが，化合物の単離には至らなかった．

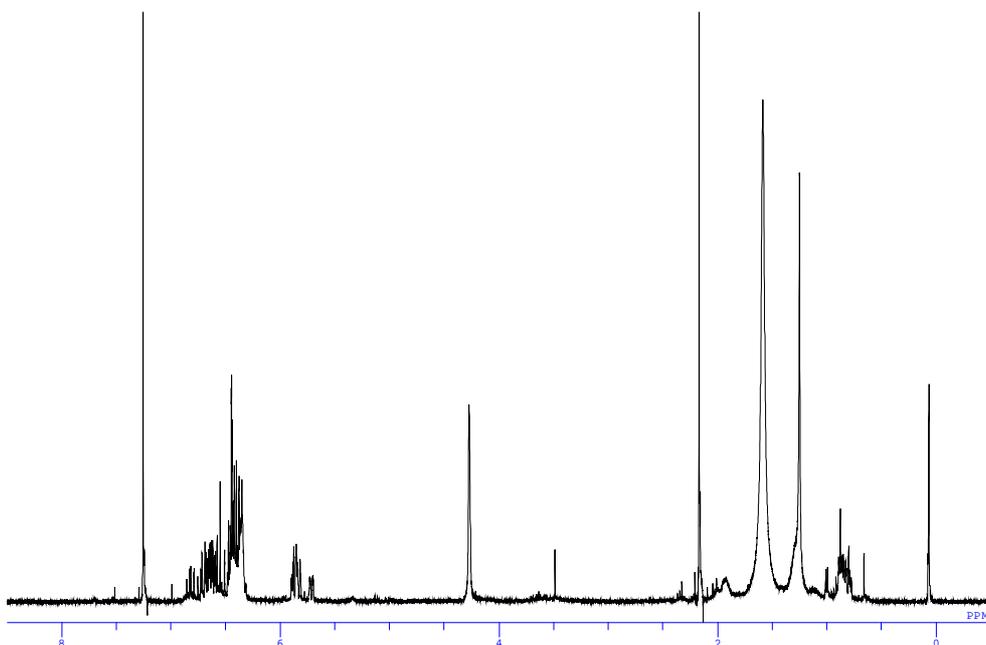


Fig.7-6 ¹H NMR spectrum of Fr.5C in CDCl₃

***Lindbladia cribrarioides* (01-86)**

EtOAc layer

(274.2 mg)

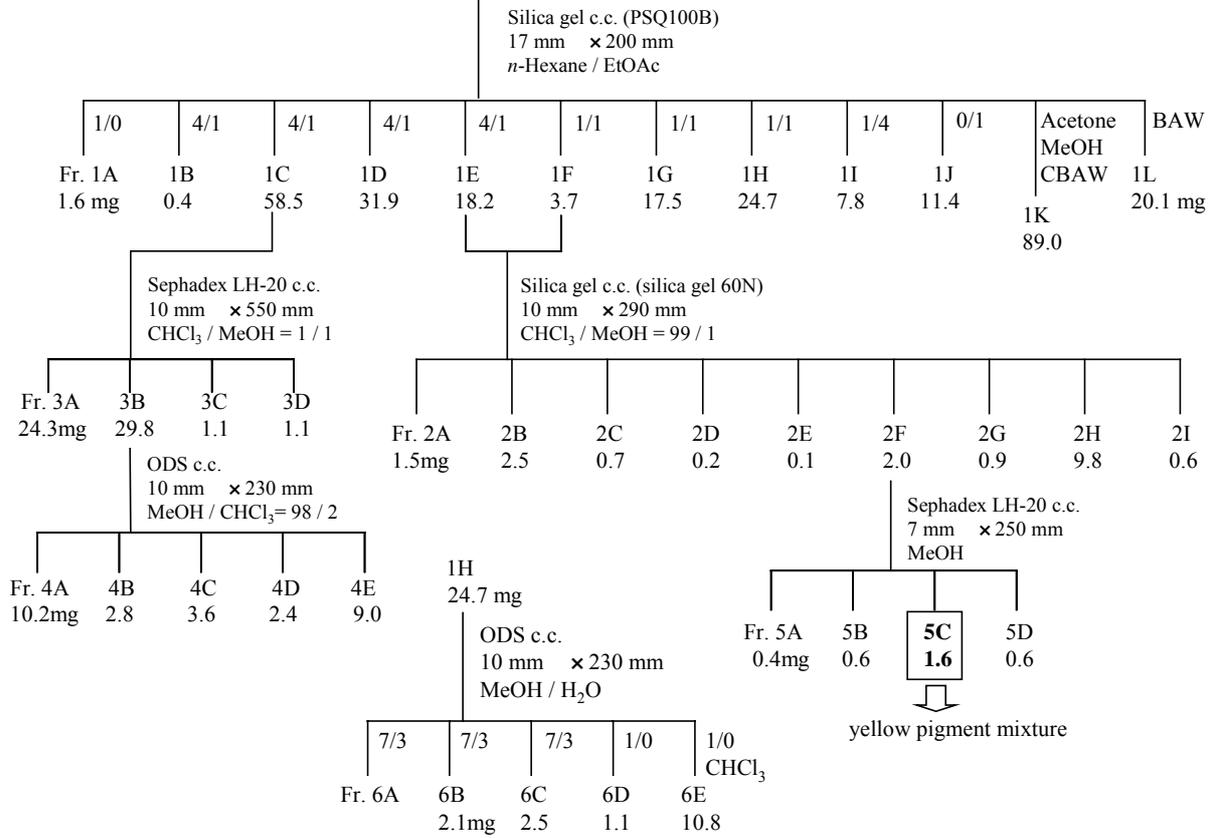


Fig.7-7 Separation of EtOAc extract of *L. cribrarioides*

第 5 節 小括

Lindbradia cribrarioides 野外採取子実体の水溶性画分から , 主要赤色色素成分と思われる lindbladione (12) を単離した . Lindbladione (12) は , 以前に *Lindbladia tublina* および *Cribraria intricata* から単離されていることから , *Lindbladia* 属ならびに *Cribraria* 属に共通の赤色色素成分であることが示唆された .

第 8 章 野外採取子実体の成分研究 (5) : *Stemonitis axifera* (04-33)

第 1 節 *Stemonitis axifera* について

Stemonitis axifera (サビムラサキホコリ)は、ムラサキホコリ目 (Stemonitales)ムラサキホコリ科 (Stemonitaceae)ムラサキホコリ属に属する変形菌で、高さは 7-20 mm、春から秋にかけて腐木上に発生する^{10), 43)}。子実体は単子嚢体型で、束生し、有柄である。子嚢は円筒形で、鉄さび色から赤褐色である。柄は黒色で光沢があり、子嚢体の高さの半分くらいまである。変形体は白色から黄色である。

本研究に用いた株は、2004 年 6 月に、高知県佐川町で山本幸憲先生により採取され同定して頂いたものである。



Fig.8-1 Wild fruit bodies of *Stemonitis axifera*

第 2 節 *Stemonitis axifera* の成分探索

Stemonitis 属の成分研究については，2003 年度に当研究室において *Stemonitis axifera*，*Stemonitis axifera* var. *smithii*，*Stemonitis splendens* の 3 種類が行われたが，色素成分等の変形菌の二次代謝産物と思われる化合物は得られなかった²⁸⁾。*Stemonitis* 属の成分に関する報告は依然として成されていないことから，未知の天然資源として興味深い化合物が得られる可能性も大いに在りうる．そこで，今回は抽出法を変え，野外採取子実体から DMSO エキス，アルカリエキス，酸性エキスを作成し，成分研究を行った．DMSO エキスに主に色素が抽出され，溶液の状態では黒色，減圧乾固した状態で灰色がかった紫色をしていた．

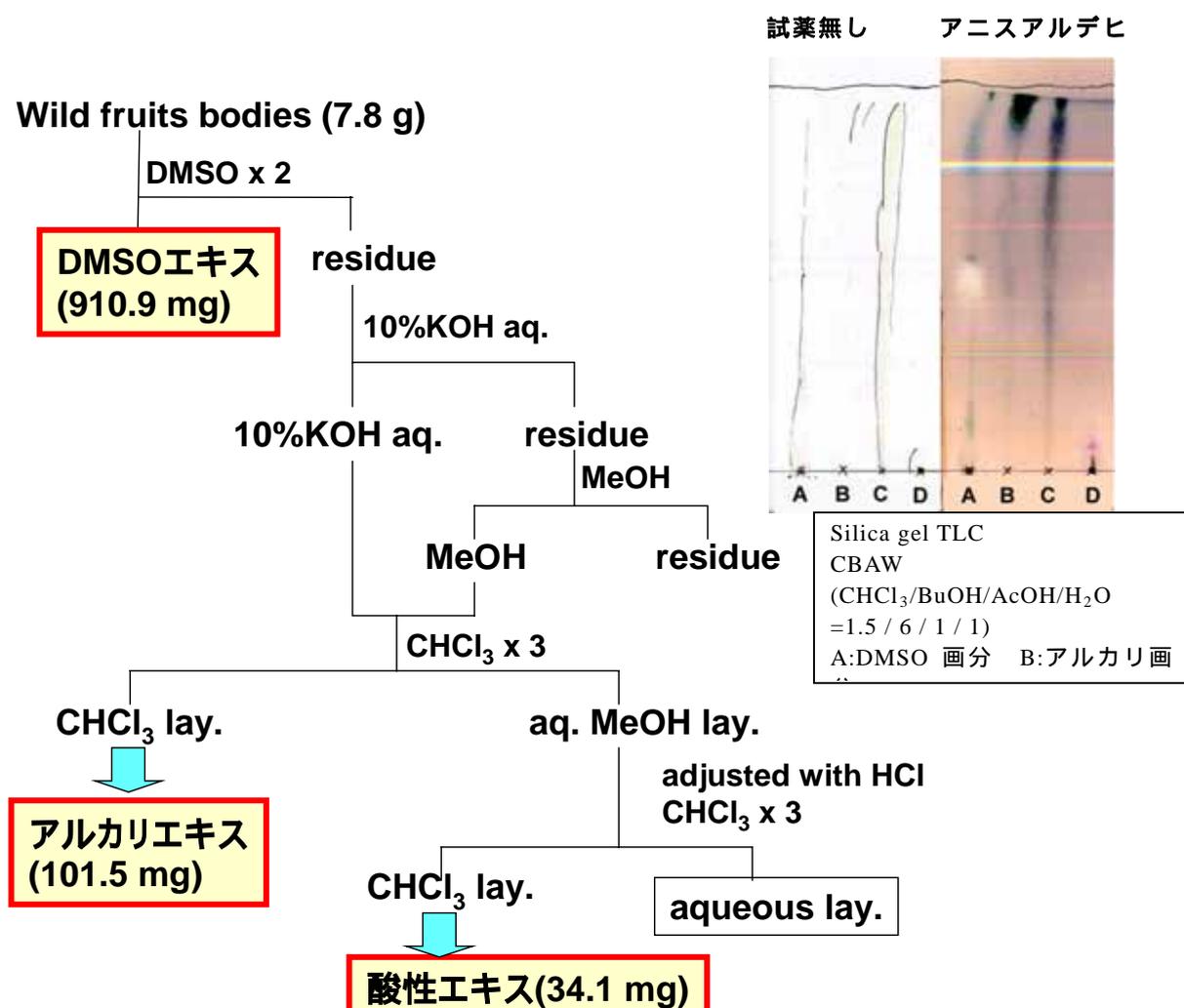


Fig. 8-2 Extraction scheme from *S. axifera*

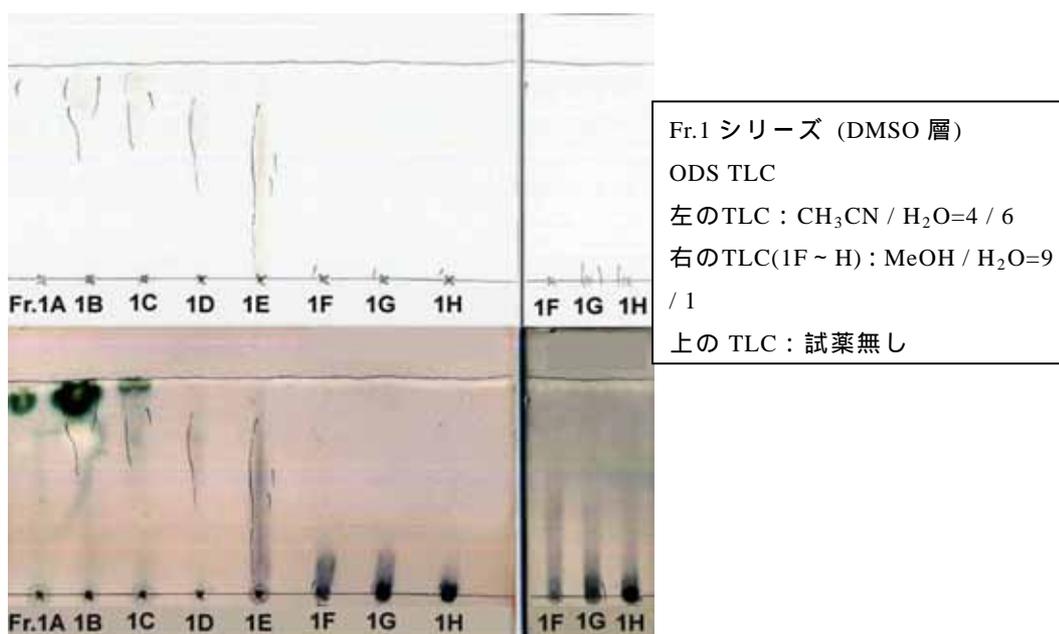


Fig. 8-3 TLC analysis of Fr.1A-1H (DMSO lay.)

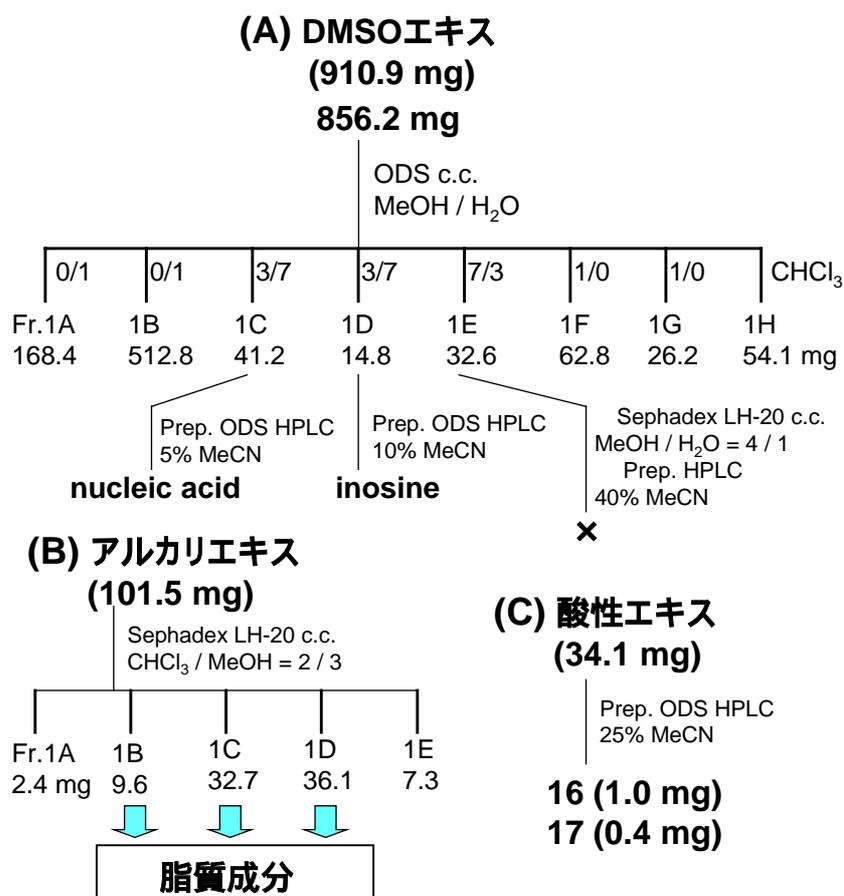


Fig.8-4 Separation charts of extract from *S. axifera*

作成した各エキスについて分離精製を行ったところ，アルカリエキスには脂質成分が多く含まれていることがわかった．また，DMSO エクスには糖ならびに核酸関連物質が含まれていることがわかった．酸性エキスからは，2 種の芳香族化合物を単離し，構造を推定した．しかし，どのエキスからも変形菌の二次代謝産物と思われる色素成分は得られなかった．

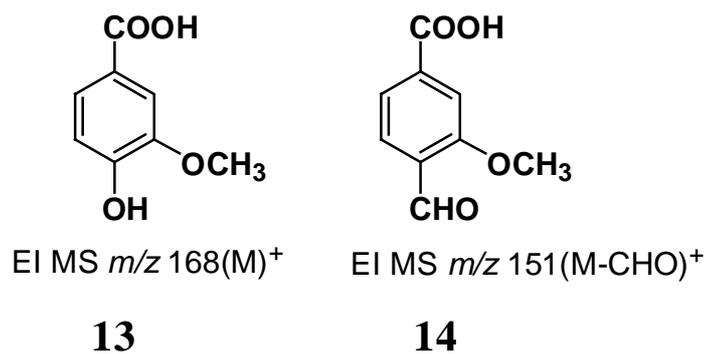


Fig.8-4 Structures of compounds 16 and 17

第 3 節 小括

Stemonitis axifera 野外採取子実体の DMSO エキス，アルカリエキス，酸性エキスを作成した．DMSO エキスに主に色素が抽出され，溶液の中で色素成分成分研究を行ったが，変形菌の二次代謝産物と思われる色素成分は得られなかった．

第9章 野外採取子実体の成分研究 (6)

: *Stemonitis fusca* var. *rufescens* (04-79)

第1節 *Stemonitis fusca* var. *rufescens* について

Stemonitis fusca var. *rufescens* (ホソミムラサキホコリ)は、ムラサキホコリ目 (Stemonitales)ムラサキホコリ科 (Stemonitaceae)ムラサキホコリ属に属する変形菌で、おもに夏に、腐木上に発生する^{10), 43)}。子実体の高さはおよそ 5-10 mmで、単子嚢体型であり、束生で、有柄である。本研究に用いた株は、2004年7月に高知県池川町で山本幸憲先生により採取され同定して頂いたものである。本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにない。

前章にて成分研究を行った *S. axifera* は、DMSO抽出により色素が抽出されることが明らかとなったが、DMSO抽出時に化合物が壊れてしまった可能性も考えられた。そこで本章では、*Stemonitis fusca* var. *rufescence* 野外採取子実体を用い、抽出条件について検討を行い、その後本菌の成分研究を行うことにした。



Fig.9-1 Wild fruit bodies of *Stemonitis fusca* var. *rufescence*

第 2 節 *Stemonitis fusca* var. *rufescens* の成分研究

(1) 抽出条件の検討

主に色素成分の抽出を目的として，*Stemonitis fusca* var. *rufescens* 野外採取子実体を少量ずつ用い，抽出条件の検討を行った．Table 9-1 に抽出条件を示し，以下に説明を加えた．

Table 9-1 *Stemonitis fusca* var. *rufescens* 野外採取子実体の抽出条件の検討

No.	菌体量	抽出溶媒	溶媒量	ミキサー	超音波	加温	ろ過	ろ液の色
-1	313.4 mg	50% EtOH	50 mL	10 min	30 min		ろ紙	わずかに黄色
-2		50% EtOH	50 mL			60 (30 min)	ろ紙	わずかに黄色
-1	558.5 mg	distilled water	50 mL					菌体が水をはじいてしまう。ろ過はせず。
-2		distilled water	50 mL	10 min	30 min	60 (30 min)	綿栓	濁った紫色，時間が経つと紫色の沈殿物が見られた。
-3		-2のろ液に2 <i>N</i> KOHを加えた						赤褐色
-1	323.8 mg	Hexane/EtOAc=1/1	50 mL	10 min	30 min		ろ紙	無色透明
-2		50%MeOH(pH 11,2 <i>N</i> KOH)	50 mL		30 min		ろ紙	赤褐色
-1	323.8 mg	Acetone	50 mL	10 min	30 min		ろ紙	無色透明
-2		10%酢酸にした50%MeOH	50 mL		30 min			上澄液は無色透明
-3		10%酢酸にした50%MeOH				60 (30 min)		上澄液は無色透明
	279.2 mg	50%EtOH(pH 11,2 <i>N</i> KOH)	50 mL	10 min	30 min		ろ紙	赤褐色

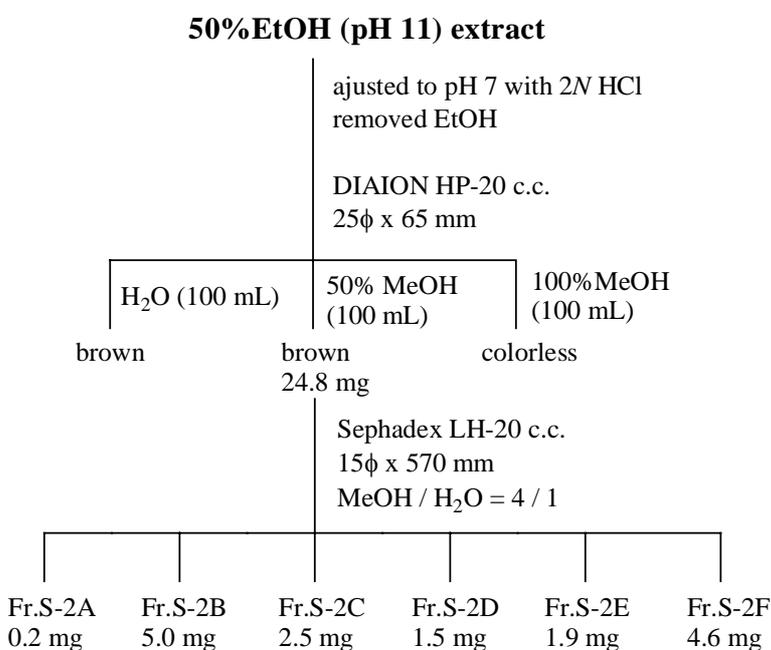
Table 9-1 の説明

- 1 50%EtOH 抽出、ろ液はわずかに黄色であった．
- 2 -1 の上澄をろ過後の菌体に 50%EtOH を加え、加温して抽出した．ろ液はわずかに黄色であった．
- 1 蒸留水で抽出しようとしたが、菌体が水をはじいてしまい抽出できなかった．
- 2 60 で加温してからミキサー、超音波にかけ、再び 60 で加温した．綿栓ろ過で濁った紫色であった．静置すると紫色の沈殿と無色の上澄液ができた．胞子も落ちてしまったのかもしれないと思われた．
- 3 -2 に 2*N* KOH を加え、pH 11 にしたところ、**赤褐色の上澄液**ができた．
- 1 色素成分は極性がかなり低い可能性も考えて、*n*-Hexane/EtOAc=1/1

- で抽出した。ろ液は無色透明だった。
- 2 ろ過した後の -1 の菌体に、2N KOH で pH 11 に調整した 50% MeOH を加えて抽出した。ろ液は赤褐色であった。
 - 1 100% Acetone で抽出したが、ろ液は無色透明だった。
 - 2 10% 酢酸にした 50% MeOH で抽出した。上澄液は無色透明だった。
 - 3 -2 をそのまま 60 で加温してみた。上澄液は無色透明だった。
- 2N KOH で pH 11 に調整した 50% EtOH を加えて抽出した。ろ液は赤褐色であった。

抽出条件検討の結果，2N KOHでpH 11 に調整した 50% MeOH および 50% EtOH で赤褐色の色素を抽出できることがわかった。上記の の抽出液の EtOH をエバポレーターで除去し、約 30 mL の H₂O に溶けた状態まで濃縮し、DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーを用いて H₂O、50% MeOH、100% MeOH の順で溶出させた (Fig.9-2)。

H₂O および 50% MeOH 画分に茶色色素が見られた。この 50% MeOH 画分を Sephadex LH-20 カラムで精製を行った。



Fr.S-2Bは、色素成分ではなかったが、¹H NMRを測定してみたところ、ブロードなシグナルが観測された (Fig.9-3)。他のフラクションは核酸や糖のシグナルが見られた。

Fig.9-2 Separation of small scale extract of *Stemonitis fusca* var. *rufescens*

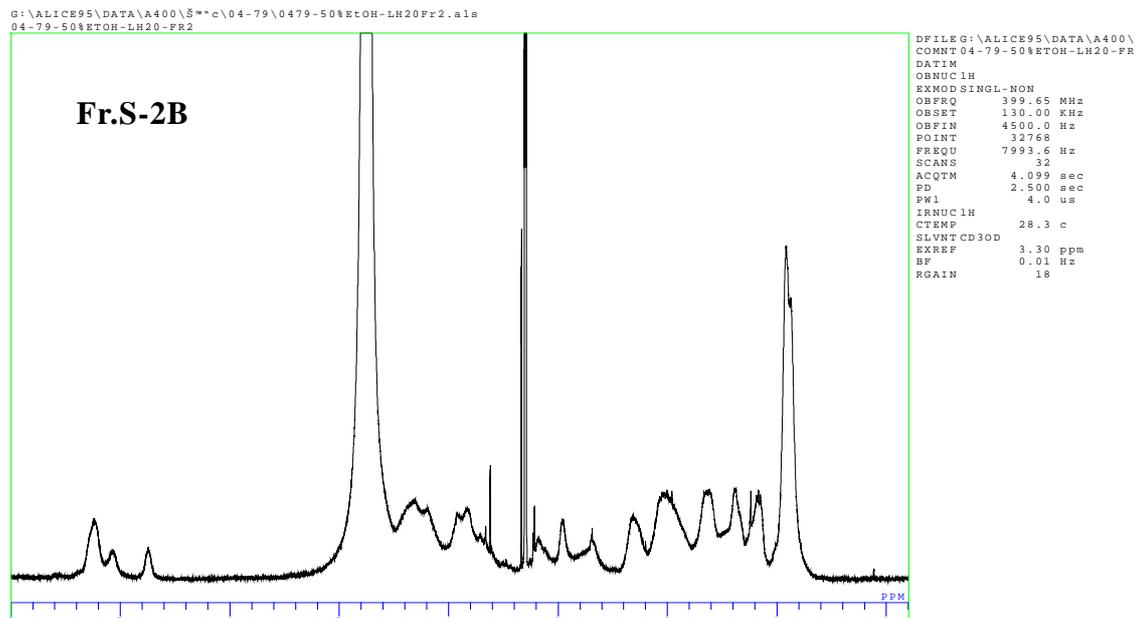


Fig.9-3 ^1H NMR spectrum of Fr.S-2B in $\text{CD}_3\text{OD}+\text{D}_2\text{O}$

抽出条件の結果を受けて, *Stemonitis fusca* var. *rufescence*の菌体 5.3 gの抽出を行った. 0.2N KOHでpH 11 に調整した 50% MeOH (200 mL)で 3 回抽出を行った. 抽出液を 2N HClで中和し, MeOHをエバポレーターで除去して H_2O 約 150mLまで濃縮した. これをDIAION HP-20 カラムに負荷し, H_2O , 50%MeOH, 100%MeOHの順に溶出させた.

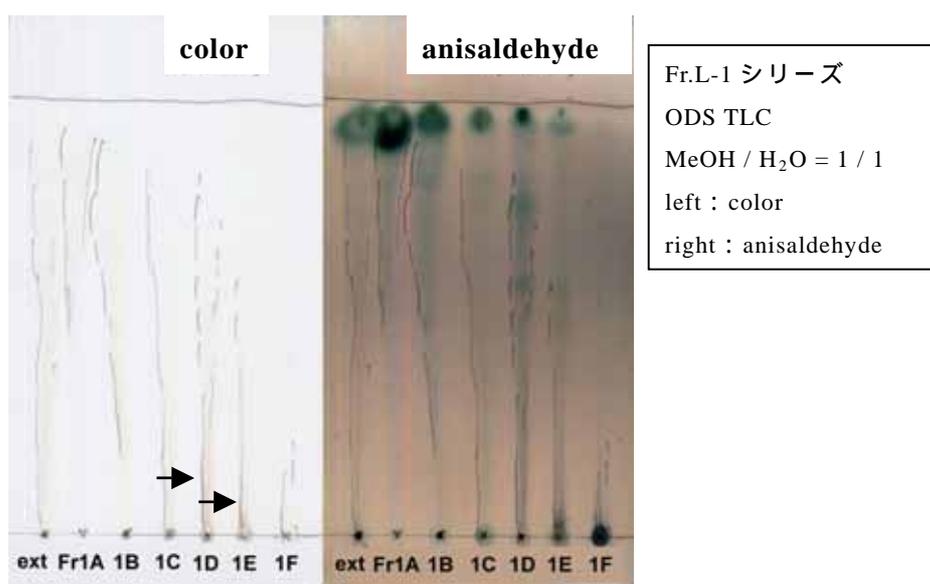
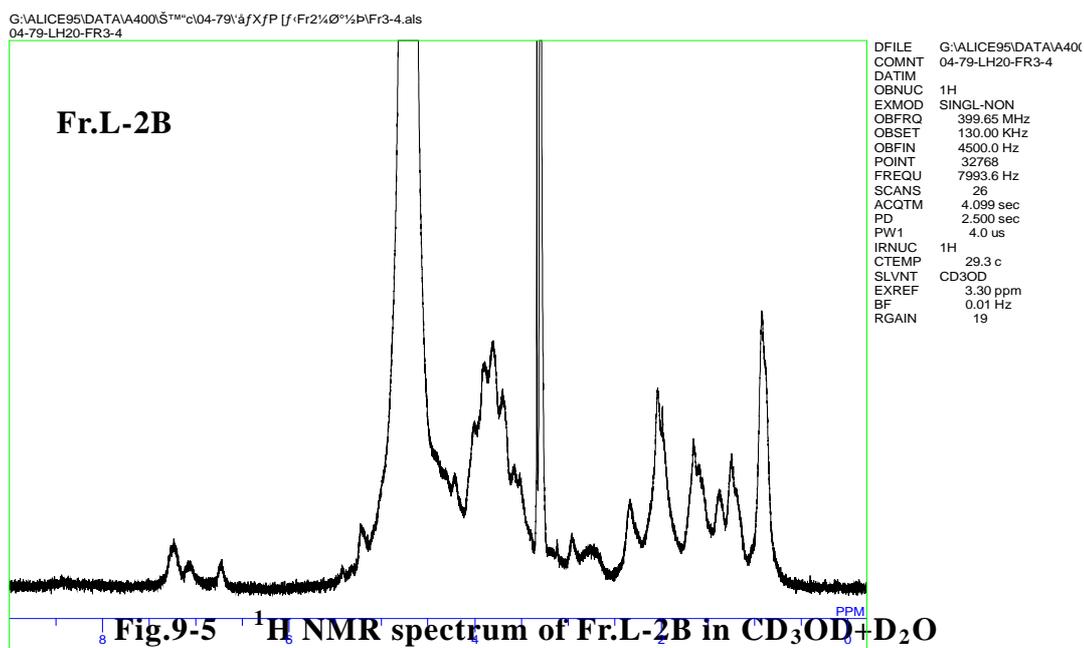


Fig.9-4 TLC analysis of Fr.L-1A-1F

Fr.L-1D, 1Eの矢印の部分にテーリングして色素成分が見られた。最も色素の濃かったFr.L-1Dを精製し, Fr.L-2Bおよび 2Cの一部をそれぞれ用いて¹H NMRを測定したが, ブロードなシグナルが見られた (Fig.9-5)。他のフラクションは核酸化合物であると推測され, 色素成分の単離には至っていない。



***Stemonitis fusca* var. *rufescence* wild fruit body
(5.3 g)**

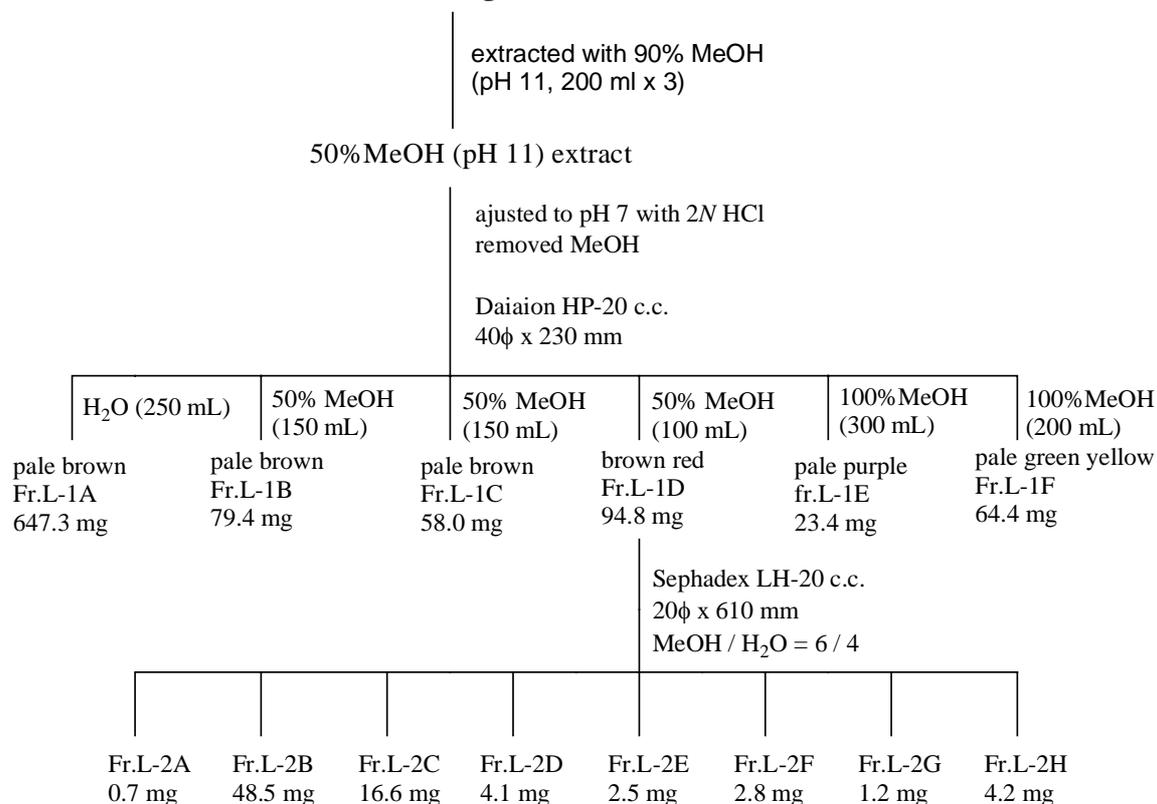


Fig.9-6 Separation of large scale extract of *Stemonitis fusca* var. *rufescens*

第 3 節 小括

Stemonitis fusca var. *rufescens* 野外採取子実体について抽出条件の検討を行った。その結果，塩基性に調整した 50% MeOH および 50% EtOH で赤褐色の色素を抽出できることが明らかとなった。色素成分の単離を目指して分画を行ったが，単離には至らなかった。

第 10 章 野外採取子実体の成分研究 (7)

: *Ceratiomyxa fruticulosa* var. *flexuosa* (03-22)

第 1 節 *Ceratiomyxa fruticulosa* var. *flexuosa* について

Ceratiomyxa fruticulosa var. *flexuosa* (ナミウチツノホコリ)は、ツノホコリ目 (Ceratiomyxales) ツノホコリ科 (Ceratiomyxales) ツノホコリ属に属する変形菌であり、おもに夏、腐木上に発生する^{10), 43)}。担子体は高さ 2-10 mm で群生、大きな集団になり、細長く白色である。本研究に用いた株は、2003 年 7 月に高知県高知市で山本幸憲先生により採取され同定して頂いたものである。



Fig.10-1 Wild fruit bodies of
C. fruticulosa var. *flexuosa*

本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにないが、本菌の属する *Ceratiomyxa* 属では、*Ceratiomyxa fruticulosa* (ツノホコリ) の野外採取変形体の成分として ceratiopyron A などが単離報告されている^{9a), 42)}。

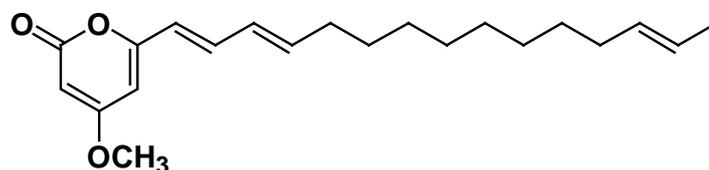


Fig.10-2 Ceratiopyron A from *Ceratiomyxa fruticulosa*

第 2 節 *Ceratiomyxa fruticulosa* var. *flexosa* の成分探索

Ceratiomyxa fruticulosa var. *flexosa* 野外採取子実体(4.5 g)を 90% MeOH および 90% Acetone で抽出を行い，抽出物 172.8mg を得た．この抽出物を，シリカゲルカラムクロマトグラフィーに負荷し，*n*-Hexane/EtOAc の溶媒系を用いて EtOAc の割合を段階的に上げて溶出し，引き続き Acetone，MeOH で順次溶出させ，Fr.1A-1J を得た．Fr.1C を Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーでさらに精製を行い，化合物 15 を得た．また，Fr.1E-1I について ¹H NMR の測定を行ったところ，Fr.1I は糖であったが，他のフラクションには特徴的な成分と思われるシグナルが見られた．そこで，Fr.1E および Fr.1H について精製を行ったが，いずれも化合物の単離には至らなかった．¹H NMR 測定時に，測定した重量よりも実際の量は少ないようであったので，他のフラクションの精製は断念した．

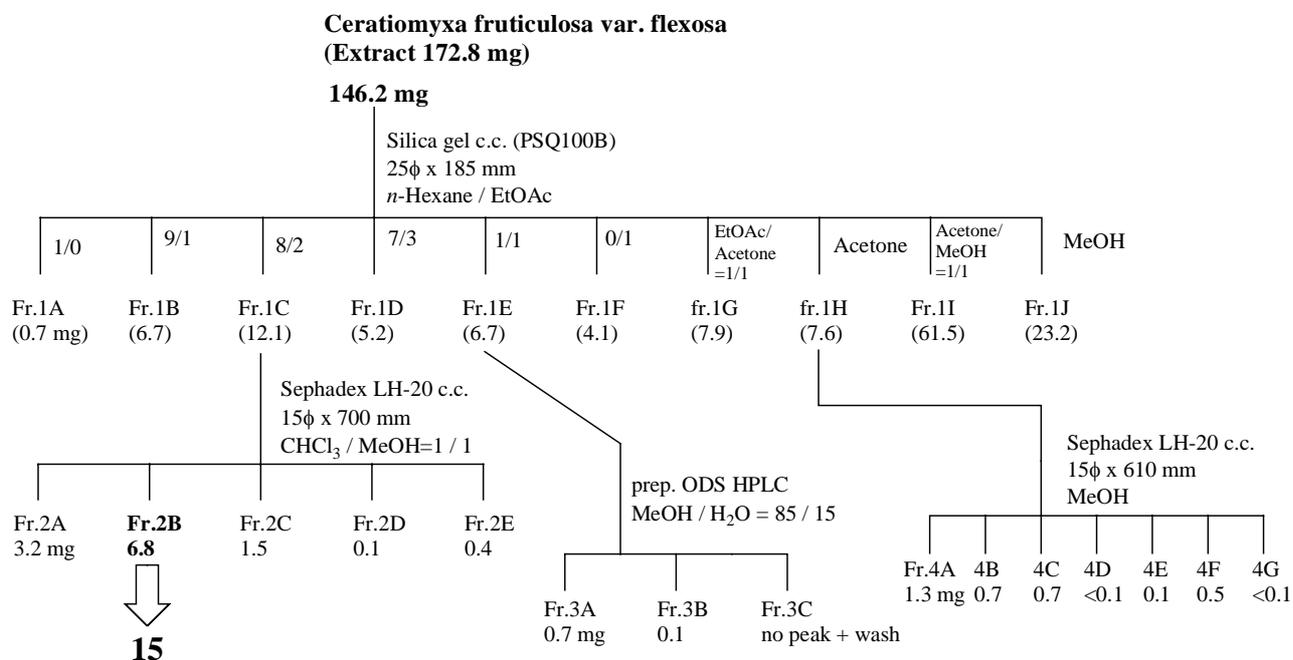
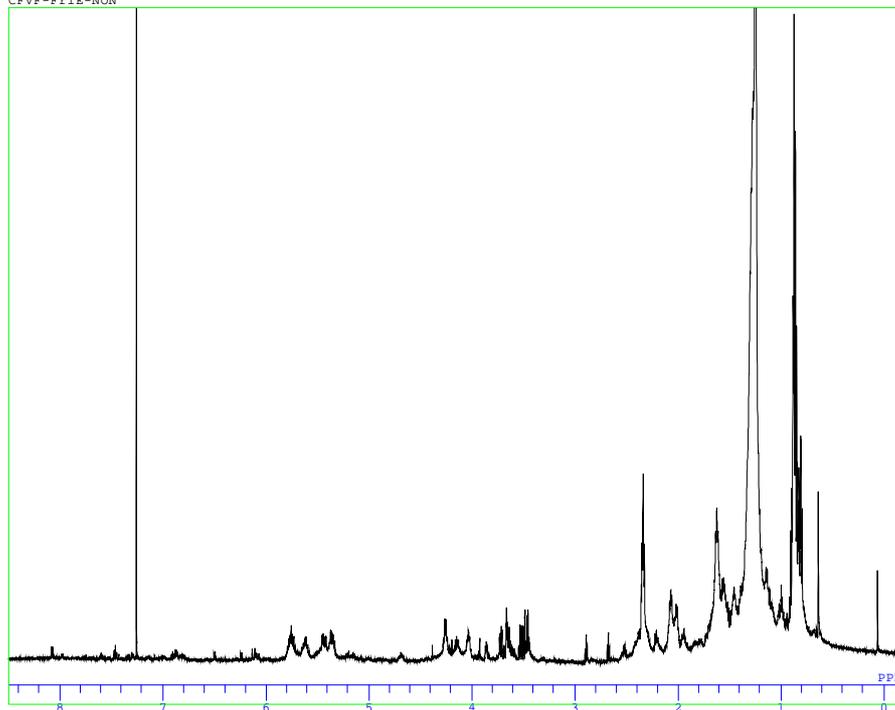


Fig. 10-3 Separation of extract of *C. fruticulosa* var. *flexosa*

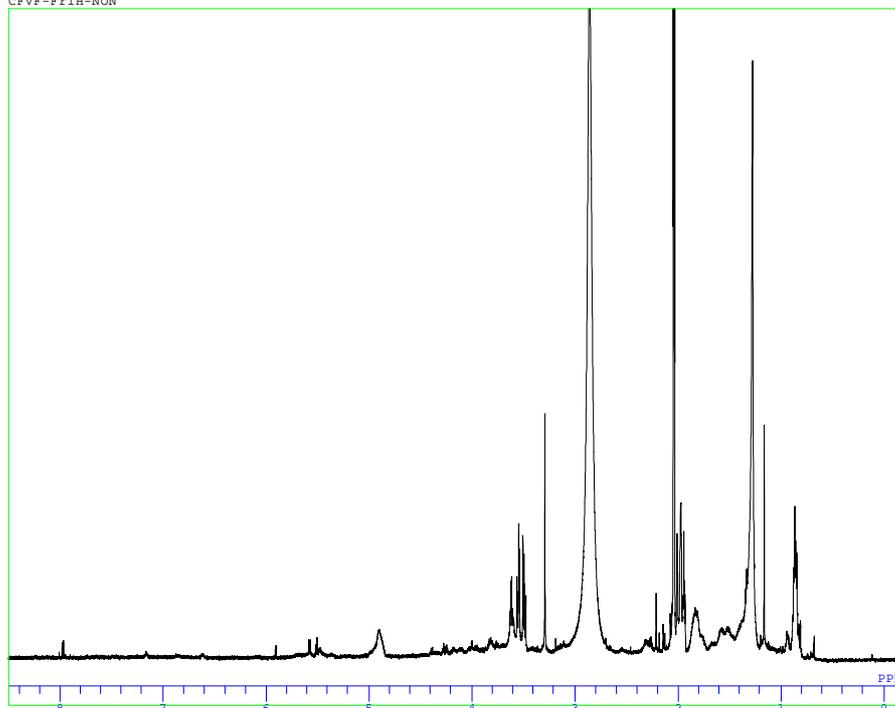
G:\ALICE95\DATA\E600\kamata\CFVF\•0 WGA\CFVF-Fr1E-NON.als
CFVF-Fr1E-NON



DFILEG:\ALICE95\DATA\E600\
COMNT CFVF-Fr1E-NON
DATIM 23-JUN-2005 20:20:12
OBNUC1H
EXMOD single_pulse.exp
OBFRQ 600.00 MHz
OBSET 175.00 KHz
OBFIN 905.7 Hz
POINT 32768
FREQU 9009.0 Hz
SCANS 16
ACQTM 3.637 sec
PD 4.000 sec
PW1 9.1 us
IRNUC1H
CTEMP 22.3 c
SLVNT CDCL3
EXREF 7.26 ppm
BF 0.01 Hz
RGAIN 17

Fig.10-4 ^1H NMR spectrum of Fr.1E in CDCl_3

G:\ALICE95\DATA\E600\kamata\CFVF\•0 WGA\CFVF-Fr1H-NON.als
CFVF-Fr1H-NON



DFILEG:\ALICE95\DATA\E600\
COMNT CFVF-Fr1H-NON
DATIM 28-JUN-2005 10:50:21
OBNUC1H
EXMOD single_pulse.exp
OBFRQ 600.00 MHz
OBSET 175.00 KHz
OBFIN 905.7 Hz
POINT 32768
FREQU 9009.0 Hz
SCANS 16
ACQTM 3.637 sec
PD 4.000 sec
PW1 9.1 us
IRNUC1H
CTEMP 21.7 c
SLVNT C3D6O
EXREF 2.04 ppm
BF 0.01 Hz
RGAIN 18

Fig.10-5 ^1H NMR spectrum of Fr.1H in Acetone- d_6

化合物 15 の構造解析

化合物 15 は白色粉末として得られ，EIMSスペクトルにより m/z 416 に $[M^+]$ とと思われるシグナルが観測された． ^1H および ^{13}C NMR スペクトルの解析により，化合物 15 はステロールと推測され，Scifinder[®] 検索により Stigmastan-3-ol のようなステロールではないかと予想された．しかし，予想されたステロールの NMR データを明確に記述した文献がないため，5，6 位の炭素が二重結合である clionasterol^{13), 18)} の ^{13}C NMR スペクトルのデータと比較することにより，化合物 15 の構造を推定することにした (Table 10-1)．化合物 15 の 24 位の炭素のケミカルシフト値が clionasterol のものと一致したことから，化合物 15 の 24 位の立体は clionasterol と同じであると推測され，化合物 15 の構造を stigmastan-3-ol, (3 β , 24 S) であると推定した．

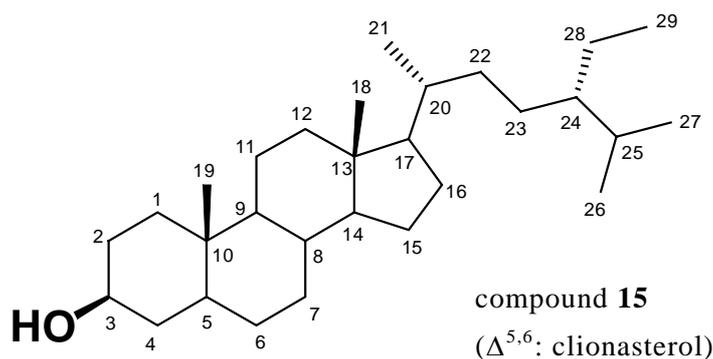


Fig.10-6 Structure of compound 15

Table 10-1 ^{13}C NMR data of compound 15 and clionasterol (125 MHz)

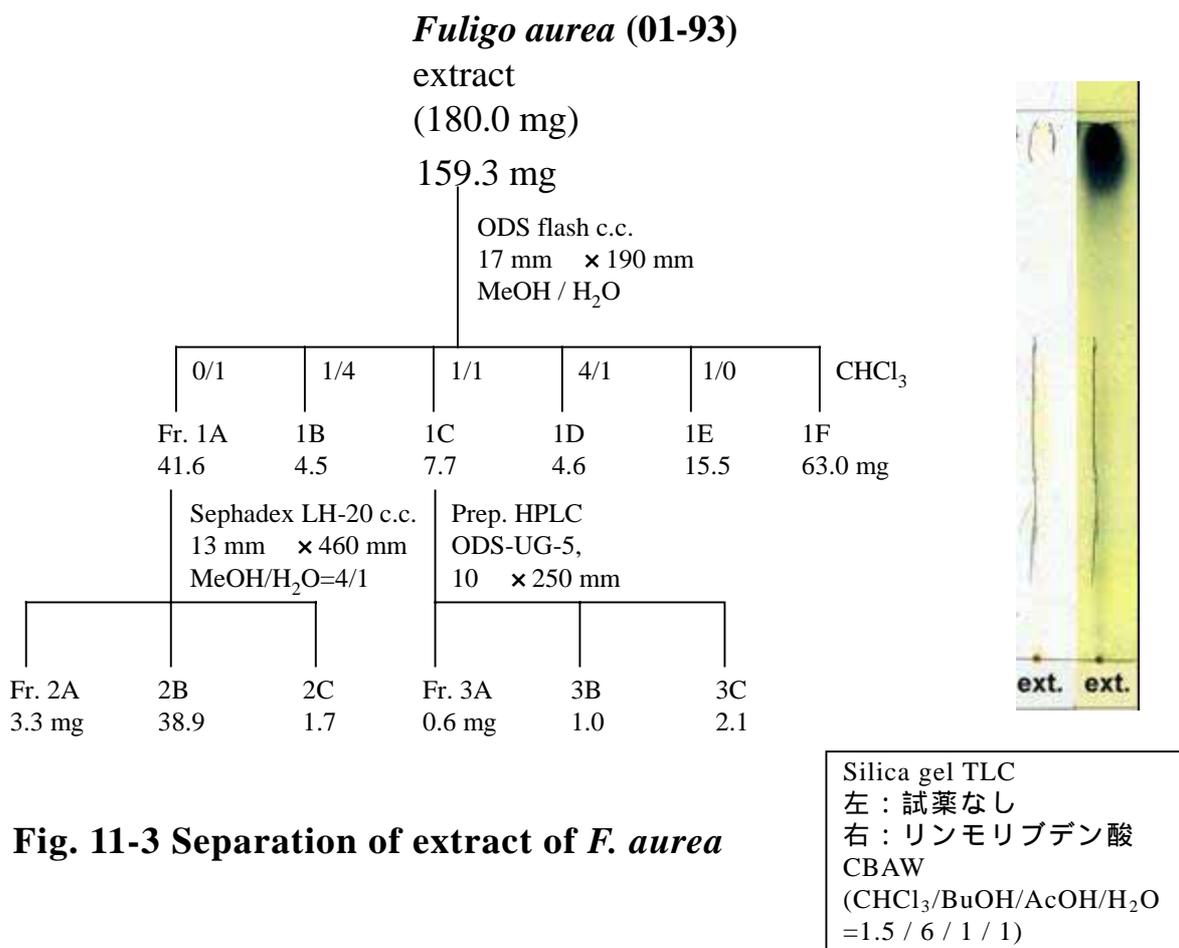
position	clionasterol	compound 15	position	clionasterol	compound 15
1	37.2	37.0	16	28.2	28.2
2	31.9	32.1	17	56.0	56.1
3	71.8	71.4	18	11.8	12.1
4	42.3	44.8	19	19.4	19.6
5	140.7	35.5	20	36.3	36.3
6	121.7	35.5	21	18.8	18.8
7	31.7	31.5	22	33.9	33.9
8	31.7	31.5	23	26.3	26.3
9	50.1	54.3	24	46.0	46.0
10	36.5	36.3	25	28.9	28.9
11	21.1	21.2	26	18.9	19.0
12	39.8	40.0	27	19.6	19.6
13	42.3	42.6	28	23.0	23.0
14	56.7	56.5	29	12.3	12.3
15	24.3	24.2			

第3節 小括

Ceratiomyxa fruticulosa var. *flexosa* 野外採取子実体の成分研究を行い，本菌に特徴的と思われた成分の単離には至らなかったが，一種のステロールを単離し，その構造を推定した．

第 2 節 *Fuligo aurea* の成分探索

Fuligo aurea (01-93 株) の子実体抽出物を成分探索に用いた。*Fuligo aurea* 野外採取子実体 (0.62 g) を 90 % MeOH および 90 % Acetone で抽出を行い, 抽出物 180.0 mg を得た。TLC 分析を行ったところ, 黄色の色素が確認され, これの単離を目指した。抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーで精製を行い, 黄色色素が Fr.1A と Fr.1C に主に確認された。¹H NMR を測定したところ, Fr.1A は主に糖であったが, 低磁場領域に黄色色素のものと思われるシグナルが観測されたため, 精製を行ったが, 色素成分の単離には至らなかった。また, Fr.1C についても, 黄色色素成分は微量であり, 構造解析には至らなかった。



第3節 小括

Fuligo aurea の野外採取子実体の成分研究を行い、黄色色素の単離を目指したが、色素成分の単離には至らなかった。

第 12 章 野外採取子実体の成分研究 (9) : *Tubifera ferruginosa* (05-146)

第 1 節 *Tubifera ferruginosa* について

Tubifera ferruginosa (クダホコリ)は,コホコリ目ドロホコリ科クダホコリ属に属する変形菌であり,春から秋に,腐木上に発生する.子実体は擬着合子嚢体型であり,孤生または群生し,無柄で高さ 5 mm,大きいものだと直径 15 cm くらいまでになる^{10), 43)}.個々の単子嚢体は円筒形や卵形をしており,直径は 0.2-0.4 mm で,色は土色から赤褐色である.変形体は無色から白色,後に桃色から褐色に変化する.本研究に用いた株は,2005 年 7 月に高知県香北町において,山本幸憲先生のご指導の下,石橋教授,蟹和氏とともに筆者も採取を行い,山本幸憲先生に同定して頂いたものである.

本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにないが,本株の属する *Tubifera* 属の成分研究については,第 4 章で述べた通りである.



wild fruits bodies

Fig.12-1 *Tubifera ferruginosa*



Fig.12-2 TLC analysis of extract of *T. ferruginosa*

第 2 節 *Tubifera ferruginosa* の成分探索

Tubifera dimorphotheca 野外採取子実体 (24.7 g) を 90 % メタノールおよび 90 % アセトンで抽出し, 3.88 g の粗抽出物を得た。粗抽出物についてシリカゲル TLC 分析を行ったところ, 赤色色素のスポットが観察されたが, 展開後しばらく放置したところ, 30 分程して退色が確認された。ODS TLC 分析においても同じく退色が確認されたため, 本抽出物に含まれる赤色色素はシリカゲルおよび ODS TLC に不安定であると考えられた。そのため, 本抽出物を, 吸着力が ODS よりも弱い DIAION HP-20 を担体に用いたカラムクロマトグラフィーにより分画を行った。分画を進めていったが, まだ赤色色素の単離には至っていない。

DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィーにより分画後の Fr.1G, 1H および 1I を統合し, ODS カラムクロマトグラフィーおよび分取 HPLC で精製を行い, 化合物 16 (1.0 mg) を単離した。化合物 16 は, EIMS の測定により分子量 370 であることが明らかとなり, ^1H および ^{13}C NMR スペクトル (Fig.12-4, 12-5) から分子式を $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_2$ と予想した。 ^1H および ^{13}C NMR スペクトルの解析により, 2 つのオレフィンメチン, 酸素が隣接した 3 つの sp^3 メチン, 5 つのメチル基のシグナルが観測された。予想分子式および炭素数から, 本化合物は 5 環性のテルペノイド化合物と考えられ, 現在構造解析を行っている。

また, Fr.1J を, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}=1/1$ を溶出溶媒に用いた Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーで分画を行い, *n*-Hexane/ CHCl_3 の溶媒系を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し, 化合物 17 (5.8 mg) および 18 (2.0 mg) を得た。 ^1D NMR および部分的な ^2D NMR スペクトルの解析により, 化合物 17 は, ステロールにリノール酸がエステル結合した Stigmasta-7,22-dien-3-ol,9,12-octadecadienoate, [$3\beta(9Z,12Z),5\alpha,22E,24R$] であると推定した⁴⁵⁾ (Fig.12-3)。また, 化合物 18 は, FABMS より m/z 677 に $[\text{M}+\text{H}]^+$ とと思われるシグナルが観測され, ^1H , ^{13}C NMR より化合物 17 のステロール部分のオレフィン炭素が 2 つ少なく, 他のシグナルは 17 と類似していた。このことから, 化合物 18 の構造を, 17 の 7, 8 位の二重結合が

無いStigmasta-22-en-3-ol,9,12-octadecadienoate, [$3\beta(9Z,12Z),5\alpha,22E,24R$]であると推定した (Fig.12-3) .

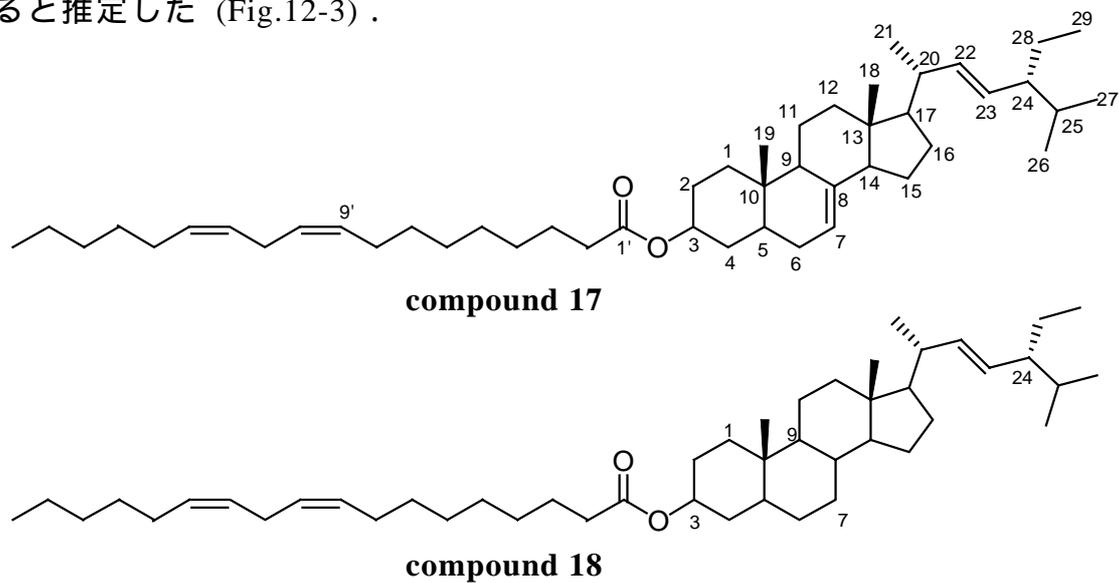


Fig.12-3 Structures of compounds 17 and 18

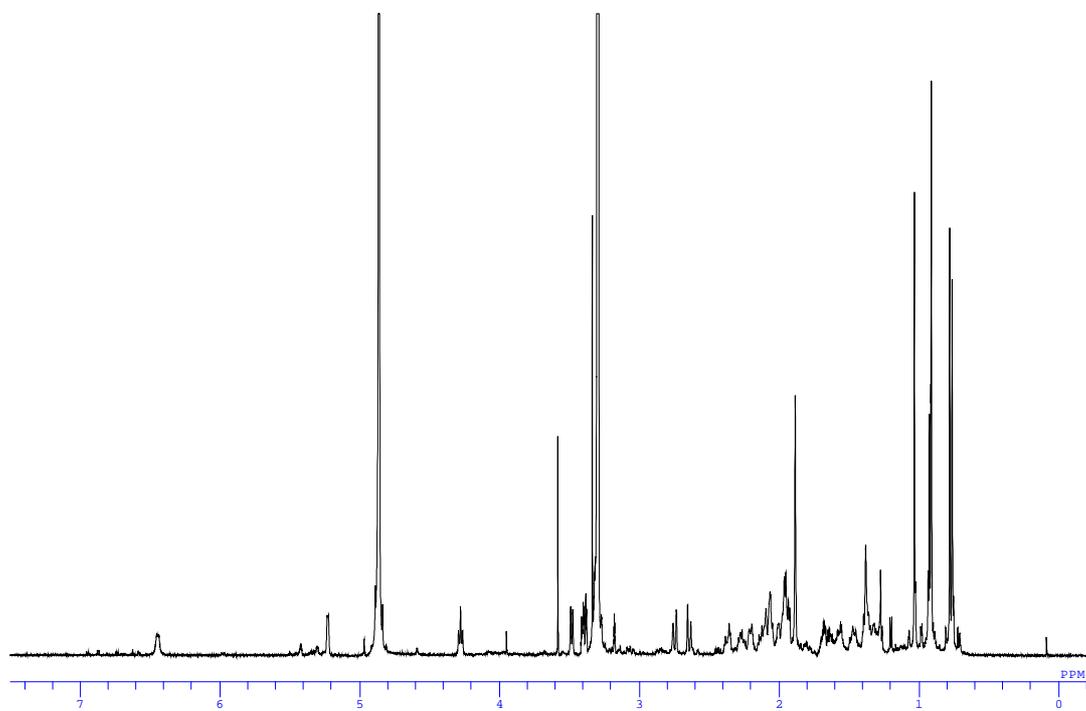


Fig.12-4 ^1H NMR spectrum of compound 16

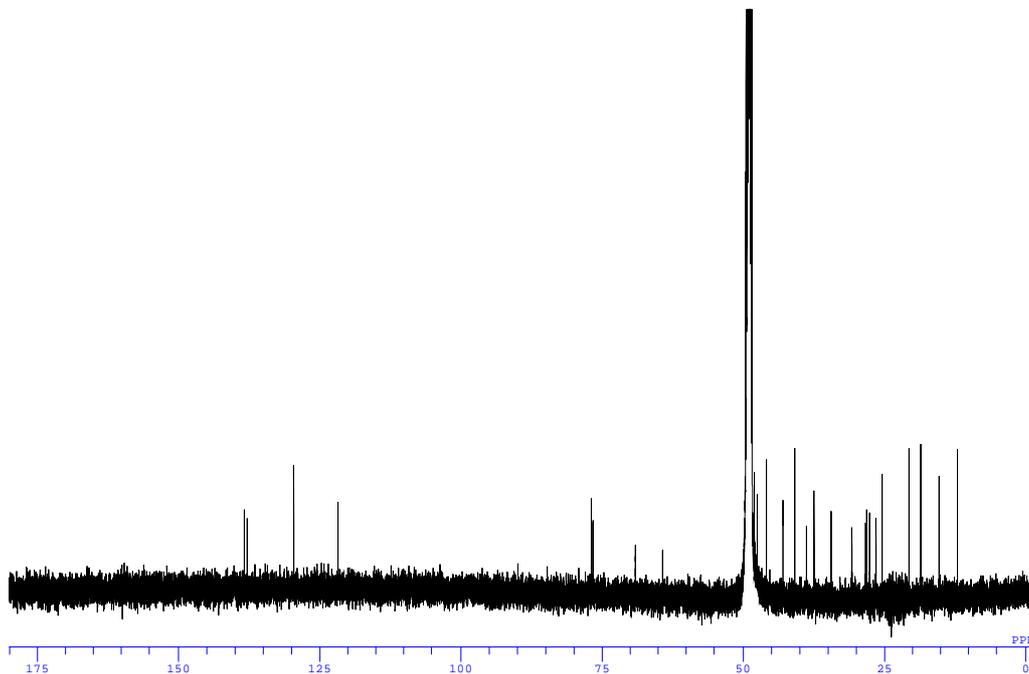


Fig.12-5 ^{13}C NMR spectrum of compound 16

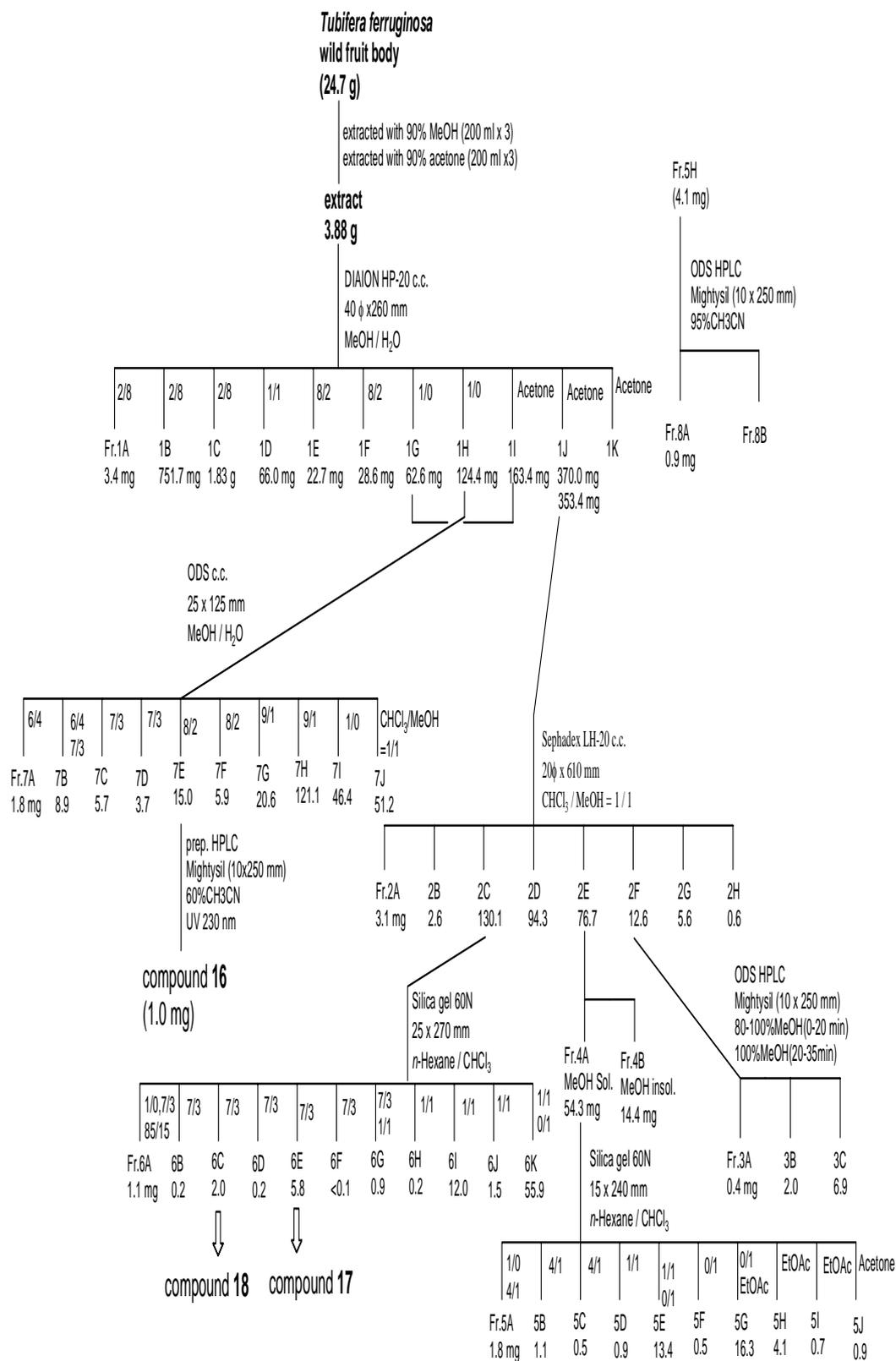


Fig.12-6 Separation of extract of *T. ferruginosa*

第 3 節 小括

Tubifera ferruginosa 野外採取子実体の成分研究を行い，ステロールにリノール酸がエステル結合した化合物 2 種を単離し，その構造を推定した．また，化合物 16 は，分子量および各種 NMR スペクトルから炭素数 25 のテルペンと予想され，現在構造解析を行っている．

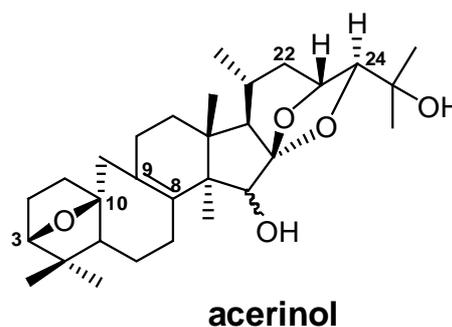
総括

筆者は、創薬につながる新規天然シーズの探索の一環として未利用資源である変形菌に着目し、野外採取変形菌の培養可能株の探索を行い、培養変形体 2 種および野外採取子実体 9 種についての成分研究を行った。

2003 年度に全国各地で採取された変形菌の発芽実験を行い、培養可能株を探索した。子実体は 135 株中 48 株が発芽し、29 株で変形体の形成、3 株で子実体の形成に成功した。また、*Fuligo* 属で変形体および子実体の形成に成功し、また、*Tubifera* 属、*Collaria* 属の変形体形成にも成功した。*Physarum bethelii* については安定して培養が可能となった。

Physarum melleum 培養変形体から単離された新規ペプチド化合物 melleumin A (1), B(2)の立体配置の検討を行った。その結果、melleumin A (1), B(2)の 3 位、10 位および 11 位の絶対立体配置は、それぞれ *S*, *S*, *R* 配置であることを明らかにした。4 位の絶対立体配置については、チロシニル酢酸部分の合成を行うことにより決定する予定である。

Tubifera dimorphotheca 野外採取子実体の成分研究を行い、tubiferal A (3), B (4)と命名した新規化合物を単離した。各種スペクトルデータに基づいて構造解析を行い、tubiferal Aは、6-7-6-5-5 員環構造を有する 9,10-セコシクロアルタン型の新規トリテルペンアルデヒドラクトンであり、tubiferal Bはそのセコ酸構造であることを明らかにした。また、tubiferal A, Bの相対立体配置を推定した。tubiferal A, Bは、シクロアルタン骨格の 9, 10 位が開裂した転位型トリテルペンであると推定された。tubiferal Aは、KB/VJ300 細胞に対して薬剤耐性克服作用が認められた。9,10-セコシクロアルタン型の天然由来の化合物は、ショウマ属植物より鉍酸処理することによりアーティファクトとして得られた



acerinol⁴⁶⁾およびその類縁体などが知られているが、その数は極めて少ない。本研究において、変形菌から稀な炭素骨格を有した天然物を単離し、構造決定を行うことができた。

Arcyria cinerea 野外採取子実体の成分研究を行い、2種の新規化合物を含む4種の化合物を単離した。各種スペクトル解析の結果、化合物5,6はピロール部分を有する新規ビスインドール化合物であることが明らかとなり、それぞれ cinereapyrrole A, B と命名した。また、化合物7は arcyrriarubin A, 8は lycogarubin C のモノメチルエステル体であることを明らかにした。

Arcyria obvelata 野外採取子実体の成分研究を行い、2種の化合物を単離した。各種スペクトルの解析により、化合物9は arcyrriaflavin B であることが明らかとなり、本変形菌の主要黄色色素成分であることが推測された。また、化合物10は dihydroarcyriacyanin A であることが明らかとなった。本化合物は以前に単離報告があったが、詳細な実験データは未報告であった。本化合物の詳細な実験データを今回得ることができた。

arcyrriaflavin B (9)は、KB/VJ-300細胞に対して薬剤耐性克服作用は示さなかったものの、2.3 µg / mL と顕著な細胞毒性を示した。arcyrriaflavin B (9), C (10)について、ヒト培養がん細胞パネルによる抗がん剤スクリーニング試験を行ったところ、arcyrriaflavin C (10)は低濃度で増殖抑制を示し、なおかつ高い細胞株選択性が認められた。arcyrriaflavin B (9), C (10)は標準薬剤に対して類似度が低く、作用機作に関する情報は未知であった。さらに、arcyrriaflavin B (9), C (10)はプロテインチロシンキナーゼを阻害し、細胞質型プロテインキナーゼにある程度の選択性が見られた。arcyrriaflavin B, C の今後の *in vivo* 試験の結果に大変興味を持たれる。

Lindbradia cribrarioides 野外採取子実体の水溶性画分から、主要赤色色素成分と思われる lindbladione を単離した。lindbladione は、以前に *Lindbradia tublina* および *Cribraria intricata* から単離されていることから *Lindbradia* 属ならびに *Cribraria* 属に共通の赤色色素成分であることが示唆された。

*Stemonitis axifera*および*Stemonitis fusca* var. *rufescence* 野外採取子実体について、溶媒抽出条件の検討も含めた成分研究を行った。DMSO抽出ならびに、塩基性に調整した50%メタノールおよび50%エタノール溶液で色素成分を抽出することができたが、色素成分等の変形菌に特徴的な二次代謝産物と思われる化合物は得られなかった。DMSOでの抽出や、塩基性に調整する場合にKOHを使用すると反応性が高く、化合物が分解されてしまうのではないかと考えられた。今後、*Stemonitis*属の成分研究を行うに当たり、 Na_2CO_3 で塩基性に調整した溶液で抽出を行うなど、さらなる抽出条件の検討が必要と考えられる。

Physarum bethelii 培養変形体ならびに*Fuligo aurea* 野外採取子実体の黄色色素成分等の成分研究を行った。これらの黄色色素は単離に成功しても微量であり、かつ不安定で徐々に変化していつてしまうため、さらに量を増やして成分研究を行うことが必要と思われる。また、化合物の精製時に遮光を行い、さらには低温条件下で精製を行うなど極力化合物の反応を抑える必要があると考えられる。

Ceratiomyxa fruticulosa var. *flexosa* 野外採取子実体から1種のステロールを単離した。特徴的な成分と思われた化合物は微量であり、単離には至らなかった。

Tubifera ferruginosa 野外採取子実体からステロールにリノール酸がエステル結合した2種の化合物を単離した。また、炭素数25のテルペンと思われる化合物を単離し、現在構造解析を行っている。混合物の状態でアルデヒド基と思われるシグナルを有した化合物を観測した。そのため、アルデヒド基を有する化合物が*Tubifera*属に共通した成分であるのかということに興味を持たれる。

実験の部

使用機器

核磁気共鳴装置 (NMR)

JEOL ecp600 spectrometer

JEOL α 500 spectrometer

JEOL α 400 spectrometer

内部標準として以下の残留溶媒周波数を用いた .

CDCl_3 (δ_{H} 7.26 , δ_{C} 77.0) , Acetone- d_6 (δ_{H} 2.04 , δ_{C} 29.8)

CD_3OD (δ_{H} 3.30 , δ_{C} 49.0) , DMSO- d_6 (δ_{H} 2.49 , δ_{C} 39.5)

Pyridine- d_5 (δ_{H} 8.71 , 7.55 , 7.19 , δ_{C} 149.9 , 135.5 , 123.5)

重水素化溶媒は Merck 社製を用いた .

化学シフト値は δ 値で表し δ の単位は ppm である . スピン結合定数は J 値 (Hz) で表し , 開裂様式は s(singlet) , d(doublet) , t(triplet) , m(multiplet) および br(broad) とそれぞれ略して表記した .

質量分析計 (MS)

EIMS : JMS GC-Mate mass spectrometer (JEOL)

HRFABMS : JMS-HX 110A mass spectrometer (JEOL)

LRFABMS : JMS-AX 500 , JMS-AX 505 mass spectrometer (JEOL)

FABMS の測定には NBA(3-nitrobenzylalcohol) をマトリックスとして用いた . また , 高分解能測定 (HR) には NBA をマトリックスとし , PEG (polyethylenglycol) を標準物質として用いた .

旋光計 ($[\alpha]_{\text{D}}$) : P-1020 Polarimeter(JASCO)

旋光分散計 (CD & ORD) : J-720WI spectropolarimeter (JASCO)

紫外・可視分光光度計 (UV-VIS) :

V-560 spectrophotometer (JASCO)

U-3200 spectrophotometer (Hitachi)

Uvmini-1240 spectrophotometer (Shimadzu)

赤外吸収分光光度計 (IR) : FT-IR230 spectrophotometer (JASCO)

サンプリング

(KBr) : KBr と試料を混和し , 打錠成型したものを測定に使用した .

(film) : NaCl 板に試料溶液を塗布し , 溶媒を蒸発させ測定に使用した .

(ATR) : DuraScope™ (ScensIR Technologies) 装置を用い , 全反射法にて測定を行った . (ATR ; Attenuate Total Reflectance)

HPLC 装置

カラム : Develosil ODS-UG-5 (10×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Develosil ODS-HG-5 (10×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Develosil ODS-HG-5 (20×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Develosil C-30-UG-5 (10×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Develosil RPAQUEOUS-AR-5 (10×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Develosil ODS-SR-5 (10×250 mm) (NOMURA CHEMICAL)
Capcell Pak NH₂ UG80 (4.6×250 mm) (SHISEIDO)
Capcell Pak C18 MG (10×250 mm) (SHISEIDO)
Mightysil RP-18 GP 250-10 (φ10×250 mm) (関東化学)
Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (φ4.6×250 mm) (関東化学)
YMC-Pack SIL-06 (φ6×250 mm) (YMC)
YMC-Pack ODS-AM (10×250 mm) (YMC)
Innertsil ODS-3 (10×250 mm) (GL Sciences)
Innertsil C8-3 (4.6×250 mm) (GL Sciences)

装置は以下の組み合わせでいずれかを用いた .

System 1. (JASCO A)

ポンプ : PU-980 Intelligent HPLC Pump (JASCO)

検出器 : UV-970 Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

RI-1530 Intelligent RI Detector (JASCO)

System 2. (JASCO A)

ポンプ : PU-2080 plus Intelligent HPLC Pump (JASCO)

検出器 : UV-2075 plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)

RI-2031 plus Intelligent RI Detector (JASCO)

System 3. (Shimadzu)

システムコントローラー : SCL-10A VP (Shimadzu)

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器 : SPD-M10A VP (Shimadzu)

送液ユニット : LC-10AD vp (Shimadzu)

低圧グラジエントユニット：FCV-10AL *vp* (Shimadzu)

オンラインテガッサ：DGU-12A (Shimadzu)

LC ワークステーション：CLASS-VP <ver.5.032> (Shimadzu)

System 4. (Waters)

システムコントローラー：Waters 600 controller

フォトダイオードアレイ紫外可視検出器：Waters 2996 Photodiode Array
Detector

送液ユニット：Waters 600 pump

オンラインテガッサ：Waters Inlinedegasser AF

LC ワークステーション：Empower Software

カラム担体

PSQ100B (FUJI SILYSIA CHEMICAL LTD.)

Silica gel 60N (nacalai tesque Inc.)

Sephadex LH-20 (Pharmacia)

Sep Pak ODS：Sep Pak C18 Cartridges (Waters)

薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート：

Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck)

RP-18 F₂₅₄ (Merck)

TLC を展開後、UV ランプにより 254 nm、360 nm の波長でスポットを検出した。

TLC発色試薬

リンモリブデン酸試薬

リンモリブデン酸 25 g / MeOH 250 mL

アニスアルデヒド試薬

p-アニスアルデヒド 9.1 mL / 濃硫酸 12.3 mL / 酢酸 3.7 mL / EtOH 370 mL

Fast Red B 試薬

Fast Red B 25 mg / H₂O 5.0 mL

ニンヒドリン試薬

ニンヒドリン 0.3 g / 酢酸 3.0 mL / *n*-BuOH 100 mL

Ehlich 試薬

p-ジメチルアミノベンズアルデヒド 5.0 g / 濃塩酸 50 mL / H₂O 50 mL

ドラーゲンドルフ試薬

(a) Bismuth Nitrate 0.11 g / Tartaric Acid 1.25 g / H₂O 5.0 mL

(b) KI 2.0 g / H₂O 5.0 mL

(c) Tartaric Acid 10 g / H₂O 50 mL

(a) , (b) , (c)を混合し使用した .

冷却遠心機 : himac CR21F (HITACHI)

ミキサー : 30BL23 , 31BL91 (WARING)

ホモジナイザー : Model. K (KINEMATICA)

[試薬]

溶媒

ブタノール , 2-プロパノール及びDMSOは和光純薬製の試薬特級品を用い , その他の溶媒は関東化学製の試薬一級品を蒸留して用いた . 核磁気共鳴(NMR)スペクトル用溶媒は , Merck社製重水素化溶媒 (CDCl₃ , Acetone-*d*₆ , CD₃OD , DMSO-*d*₆) を用いた .

MTPA エステル化試薬 :

(S)-(-)- α -Methoxy-trifluoromethyl phenyl acetyl chloride (MTPACl) (ALDRICH)

(R)-(+)- α -MTPACl (ALDRICH)

L-Threonine Minimum 98% (TLC) (SIGMA)

D-Threonine Minimum 98% (TLC) (SIGMA)

L-*allo*-Threonine (東京化成)

D-*allo*-Threonine (東京化成)

Trifluoro acetic Acid (TFA) 和光特級 (和光純薬)

28% Sodium Methoxide Methanol Solution (和光純薬)

Benzoyl Chloride (東京化成)

4-(Dimethylamino) benzoyl Chloride (Aldrich)

4-Dimethylaminopyridine (nacalai tesque)

Triethylamine (nacalai tesque)

Dichloromethane , Dehydrated 有機合成用 (和光純薬)

第1章に関する実験

第2節に関する実験

培地組成

LP培地	
Lactose	0.1%
Peptone	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.2%
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.1%
Agar	1.5%

寒天培地	
Agar	1.5%

CM/2培地	
cornmeal agar (DIFCO)	0.9%
Agar	1.0%

A培地	
Glucose	0.5%
Peptone	0.5%
Yeast extract	0.1%
KH ₂ PO ₄	0.2%
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.1%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1%
Agar	1.5%

Skim milk-Glucose液 (孢子の保存)	
Skim milk (DIFCO)	3.0%
Glucose	5.0%

試薬

Heart Infusion Broth (DIFCO)

Heart Infusion Agar (DIFCO)

Nutrient Broth (DIFCO)

Nutrient Agar (DIFCO)

オートミール (DIFCO)

使用細菌株

Escherichia coli NIHJ-JC2

培養器具

滅菌シャーレ (岩城硝子)

セラムチューブ (住友ベークライト)

使用機器

インキュベーター : EYELA LTI601SD (東京理化)

プレートの作成

培地を高圧蒸気滅菌し，滅菌済みのプラスチックシャーレに分注する（通常培養時:約 30 mL ,大量培養時:約 25 mL）. 孵卵器 (37)内に一晩放置し，表面を乾燥させる．

E.coli 菌液、濃縮 *E.coli* 菌液の作成

E.coli 菌液

E.coli を HI Broth に接種し，37 で一晩培養する．継代培養及び凍結保存孢子接種において LP 培地や寒天培地に塗布して使用する．

濃縮 *E.coli* 菌液

HI plate (2~3 枚分)にて 37 で一晩培養した *E.coli* をニクロム線耳で集め，生理食塩水約 5 mL に懸濁しボルテックスでよく攪拌する．野外採集株からの孢子・菌核接種において，LP 培地や寒天培地に塗布して使用する．

大腸菌の保存

低温室(5)で保存してある *E.coli* (N-slant)をニクロム線耳でとり，HI broth に接種する．37 で一晩培養する．

E.coli 液を N-plate に塗抹し，37 で一晩培養する．

きれいなコロニーをニクロム線耳で釣菌し，HI-broth に接種する．37 で一晩培養する．

E.coli 液をニクロム線耳でとり，N-slant に塗抹する．37 で一晩培養後，低温室で保存する．

野外孢子からの分離、継代培養

パスツールピペットを用いて，濃縮 *E.coli* 液約 5，6 滴を LP 培地，寒天培地に滴下し，そのまま放置してしみこませる．

爪楊枝の先を培地で湿らせた後，実体顕微鏡下で子実体をつついて孢子を取り，LP/濃縮 *E.coli*，寒天/濃縮 *E.coli* 培地に傷をつけるようにして接種する．

各種プレート を 22 暗所にて培養し，溶菌斑が生じたら発芽したものと考え，溶菌部分を爪楊枝で新しい寒天平板培地に継代し，培養する．変形体が生じたら，その一部を寒天ごと切り取り *E. coli* を滴下またはオートミールを添加した新しい培地に植え継ぎ，培養する．継代したプレートは原則として，培養室 25 暗所で培養する．

の操作を繰り返すことにより他の生物から分離する．

孢子の保存

孢子が形成されたら，セラムチューブに分注した Skim milk-Glucose 液（約

0.5 mL)に懸濁し， - 40 ℃ にて凍結保存する．

立ち上げる場合はなるべく速やかに解凍し，胞子を LP/ *E.coli* 培地(LP/E)に滴下して培養を開始する．

抗真菌剤添加培地の作成

カビなどの混在菌が除けないときに行う．ただし，生育の遅い変形菌では通常培地よりも生育が悪くなる傾向がある．

amphotericin B を DMSO に溶かす．DMSO の濃度は培地に対して 1%とする．amphotericin B は培地に対して 10 µg/mL とする．ただし滅菌フィルターを通す時に量が減るため，作る量は多めにした方がよい．

クリーンベンチ内で，ガラスシリンジを使って滅菌フィルターを通し，滅菌済みのふた付き試験管に入れる．

培地が手で触れることができるくらいまで冷めてから，マイクロピペッターを用いて LP 培地あるいは寒天培地に加える．

分注し，孵卵器（37 ℃）内に一晩放置する．

<使用器具>

滅菌フィルター:Millex-HV Filter Unit (MILLIPORE)

マイクロピペッター:P-1000 (GILSON)

< 野外変形菌株リスト 2003 年度採取分 >

子実体		
No.	学名	和名
03-01	<i>Lamproderma sauteri</i>	ザウタールリホコリ
03-02	<i>Lamproderma ovoideum</i>	タマゴルリホコリ
03-03,21,46	<i>Didymium squamulosum</i>	シロエノカタホコリ
03-04,15,29,78,116	<i>Diderma effusum</i>	ホネホコリ
03-05,51,62	<i>Craterium leucocephalum</i> var. <i>cylindricum</i>	ツツサカズキホコリ
03-06,30	<i>Craterium leucocephalum</i>	シロサカズキホコリ
03-07	<i>Physarum bogoriense</i>	ボゴールフクロホコリ
03-08,61	<i>Didymium minus</i>	コカタホコリ
03-09,86	<i>Craterium aureum</i>	キサカズキホコリ
03-10,69	<i>Physarum bivalve</i>	ガマグチフクロホコリ
03-11	<i>Lycogala exiguum</i>	コマメホコリ
03-12,49	<i>Stemonitopsis typhina</i>	ダテコムラサキホコリ
03-13,73	<i>Lamproderma scintillans</i>	キンルリホコリ
03-14,37,47,65,70 142,156	<i>Hyporhamma calyculata</i> (= <i>Hemitrichia clavata</i> var. <i>calyculata</i>)	ホソエノヌカホコリ
03-16	<i>Physarum cinereum</i>	ハイイロフクロホコリ
03-17	<i>Arcyria</i> sp.	アルキリア属
03-18,80	<i>Diachea leucopodia</i>	ジクホコリ
03-19,32,110	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>	ツノホコリ
03-20,75,104-108,145,152	<i>Arcyria cinerea</i>	シロウツボホコリ
03-22,121,146	<i>Famintzinia fruticulosa</i> var. <i>flexuosa</i> (= <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>flexuosa</i>)	ナミウチツノホコリ
03-31	<i>Physarum melleum</i>	シロジクキモジホコリ
03-33	<i>Famintzinia fruticulosa</i> var. <i>descendens</i> (= <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>descendens</i>)	エダナシツノホコリ
03-34,94	<i>Didymium nigripes</i>	ヒメカタホコリ
03-35,126	<i>Cribraria cancellata</i>	クモノスホコリ
03-36,96,136	<i>Stemonitis fusca</i>	ムラサキホコリ
03-39	<i>Didymium minus</i>	コカタホコリ
03-45,127	<i>Stemonitopsis hyperopta</i>	コムラサキホコリ
03-48,128,135	<i>Collaria arcyrionema</i>	ツヤエリホコリ
03-50	<i>Badhamia macrocarpa</i>	オオフウセンホコリ
03-52,112	<i>Arcyria affinis</i>	クロエウツボホコリ
03-55	<i>Arcyria insignis</i>	コウツボホコリ
03-56	<i>Fuligo candida</i>	シロススホコリ
03-57	<i>Tubifera</i> sp. (未熟)	クダホコリ属
03-58,95,140	<i>Stemoinitis axifera</i>	サビムラサキホコリ
03-63,120,161	<i>Physarum nutans</i>	シロモジホコリ
03-64,79	<i>Didymium iridis</i>	ゴマシオカタホコリ
03-66	<i>Cribraria microcarpa</i>	アシナガアミホコリ
03-67,76	<i>Didymium megalosporum</i>	クラカタホコリ
03-68	<i>Physarum melleum</i> f. <i>luteum</i>	コシロジクキモジホコリ
03-71	<i>Physarum pusillum</i>	コシアカモジホコリ
03-72,166-170	<i>Lycogala epidendrum</i>	マメホコリ

野外変形菌株リスト 2003 年度採取分 続き(1)

03-74,122	<i>Fuligo cinerea</i>	ネズミススホコリ
03-77	<i>Physarum leucopus</i>	シロアシモジホコリ
03-87	<i>Craterium leucocephalum</i> var. <i>scyphoides</i>	マルサカズキホコリ
03-88,103	<i>Fuligo septica</i> var. <i>flava</i>	キフシススホコリ
03-89,153	<i>Hyporhamma serpula</i> (= <i>Hemitrichia serpula</i>)	ヘビヌカホコリ
03-90,144	<i>Famintzinia porioides</i> (= <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>porioides</i>)	タマツノホコリ
03-91	<i>Physarum rigidum</i>	イタモジホコリ
03-92,129	<i>Physarum viride</i>	アオモジホコリ
03-93,102	<i>Stemonitis axifera</i> var. <i>smithii</i>	スミスムラサキホコリ
03-97,125,171	<i>Stemonitis pallida</i>	イリマムラサキホコリ
03-98	<i>Diderma spumarioides</i>	アワホネホコリ
03-99,150	<i>Fuligo candida</i>	シロススホコリ
03-100,141	<i>Physarum flavicomum</i>	キカミモジホコリ
03-101,149	<i>Stemonitis fusca</i> var. <i>rufescens</i>	ホソミムラサキホコリ
03-109,147	<i>Stemonitopsis gracilis</i>	チャコムラサキホコリ
03-111	<i>Fuligo aurea</i>	ムシホコリ
03-113	<i>Physarum viride</i> f. <i>incanum</i>	シラガアオモジホコリ
03-114	<i>Cribraria intricata</i>	フシアミホコリ
03-115,138	<i>Tubifera dimorphotheca</i>	コモチクダホコリ
03-117	<i>Stemonaria longa</i>	ヤリミダレホコリ
03-118	<i>Physarum bethelii</i>	ベテルモジホコリ
03-119	<i>Physarum florigerum</i>	ハナタマモチモジホコリ
03-123	<i>Diderma</i> aff. <i>Saundersii</i> (Masse) Lado	パークレイホネホコリ
03-124	<i>Diderma hemisphaericum</i>	ナバホネホコリ
03-130	<i>Physarum globuliferum</i>	シロジクモジホコリ
03-137	<i>Stemonitopsis typhina</i> var. <i>similis</i>	ハダカコムラサキホコリ
03-139	<i>Physarum nucleatum</i>	タマモチモジホコリ
03-143,148	<i>Stemonitis splendens</i>	オオムラサキホコリ
03-151	<i>Physarella oblonga</i>	チョウチンホコリ
03-154	<i>Licea</i> sp.	コホコリ属
03-155	<i>Trichia scabra</i>	キンチャケホコリ
03-157	<i>Trichia verrucosa</i>	ナカヨシケホコリ
03-158	<i>Trichia favoginea</i> var. <i>persimilis</i>	トゲケホコリ
03-159	<i>Trichia favoginea</i>	ヒョウタンケホコリ
03-160	<i>Metatrichia floriformis</i>	ハナハチノスケホコリ
03-162	<i>Lamproderma columbinum</i>	ルリホコリ
03-163	<i>Badhamia utricularis</i>	ブドウフウセンホコリ
03-164	<i>Cribraria dictyospora</i>	カクミアミホコリ
03-165	<i>Lepidoderma tigrinum</i>	キララホコリ
03-131-134	未同定	

野外変形菌株リスト 2003 年度採取分 続き(2)

菌核		
No.	学名	和名
03-28	<i>Physarum rigidum</i>	イタモジホコリ
03-24,25,27,40-44	未同定	

変形体		
No.	学名	和名
03-23,59	<i>Ceratiomyxa</i> sp.	ツノホコリ属
03-81	<i>Diachea leucopodia</i>	ジクホコリ
03-26,60,82-85	未同定	

* 2003 年度は 03-01 から 03-153 株のみの発芽実験を行った。

< 野外変形菌株リスト 2004 年度採取分 >

子実体		
No.	学名	和名
04-01,05,07,70	<i>Lycogala epidendrum</i>	マメホコリ
04-02,04,06,67	<i>Trichia favoginea</i> var. <i>persimilis</i>	トゲケホコリ
04-03,72,95	<i>Hemitrichia serpula</i>	ヘビヌカホコリ
04-08,20	<i>Lamproderma sauteri</i>	ザウターリホコリ
04-09	<i>Didymium dubium</i>	ハイカタホコリ
04-10,24	<i>Craterium aureum</i>	キサカズキホコリ
04-11,19	<i>Craterium leucocephalum</i> var. <i>scyphoides</i>	マルサカズキホコリ
04-12,18,25	<i>Physarium melleum</i>	シロジクキモジホコリ
04-13,15	<i>Physarium superbum</i>	キミミズフクロホコリ
04-14,28	<i>Physarium bogoriense</i>	ボゴールフクロホコリ
04-16,29	<i>Craterium reticulatum</i>	アミサカズキホコリ
04-17	<i>Diderma effusum</i>	ホネホコリ
04-21	<i>Didymium dubium</i>	ハイカタホコリ
04-22,34,55,63,77	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>	ツノホコリ
04-23,45,50,58,87	<i>Arcyria denudata</i>	ウツボホコリ
04-26	<i>Didymium nigripes</i>	ヒメカタホコリ
04-27	<i>Didymium minus</i>	コカタホコリ
04-30,52	<i>Stemonitopsis gracilis</i>	チャコムラサキホコリ
04-31	<i>Stemonitopsis typhina</i>	ダテコムラサキホコリ
04-32,59,78,102	<i>Arcyria cinerea</i>	シロウツボホコリ
04-33,71,104	<i>Stemonitis axifera</i>	サビムラサキホコリ
04-35	<i>Tubifera ferruginosa</i>	クダホコリ
04-36	<i>Cribraria piriformis</i> var. <i>notabilis</i>	マルナシアミホコリ
04-37,82	<i>Stemonitis splendens</i>	オオムラサキホコリ
04-38,40,60,80,99	<i>Stemonitis fusca</i>	ムラサキホコリ
04-39	<i>Cribraria cancellata</i>	クモノスホコリ
04-41,68,83,100	<i>Collaria arcyrionema</i>	ツヤエリホコリ
04-42	<i>Physarium melleum</i>	シロジクキモジホコリ
04-43	<i>Enteridium splendens</i> var. <i>juratum</i>	ジュラドロホコリ

野外変形菌株リスト 2004 年度採取分 続き

04-44	<i>Physarium viride f. incanum</i>	シラガアオモジホコリ
04-46,56,96	<i>Hemitrichia clavata var. calyculata</i>	ホソエノヌカホコリ
04-47	<i>Cribraria cancellata var. fusca</i>	サラクモノスホコリ
04-48	<i>Lindbladia tubulina</i>	フンホコリ
04-49,66,103	<i>Physarium rigidum</i>	イタモジホコリ
04-51	<i>Cribraria argillacea</i>	ツチアミホコリ
04-53	<i>Cribraria tenella var. tenella</i>	アミホコリ
04-54,84	<i>Ceratiomyxa fruticulosa var. porioides</i>	タマツノホコリ
04-57	<i>Arcyria major</i>	ナガハウツボホコリ
04-61	<i>Craterium leucocephalum var. cyrindricum</i>	ツツサカズキホコリ
04-62	<i>Ceratiomyxa fruticulosa var. flexuosa</i>	ナミウチツノホコリ
04-64	<i>Ceratiomyxa fruticulosa var. fruticulosa f. aurea</i>	キイロツノホコリ
04-65	<i>Pysarum globuliferum</i>	シロジクモジホコリ
04-69	<i>Stemonitopsis typhiue var. similis</i>	ハダカコムラサキホコリ
04-73	<i>Cribraria confusa</i>	コビトアミホコリ
04-74	<i>Cribraria violacea</i>	スミレアミホコリ
04-75,101	<i>Stemonitis pallida</i>	イリマメムラサキホコリ
04-76	<i>Arcyria obvelata</i>	キウツボホコリ
04-79	<i>Stemonitis fusca var. rufescens</i>	ホソミムラサキホコリ
04-81,85,105	<i>Tubifera dimorphotheca</i>	コモチクダホコリ
04-86	<i>Didymium squamulosum</i>	シロエノカタホコリ
04-88	<i>Diderma spumarioides</i>	アワホネホコリ
04-89	<i>Trichia decipiens</i>	エツキケホコリ
04-90,94	<i>Trichia favoginea</i>	ヒョウタンケホコリ
04-91	<i>Comatrichia pulchella var. fusca</i>	アミモチカミノケホコリ
04-92	<i>Cribraria meylanii</i>	メイランアミホコリ
04-93	<i>Metatrichia floriformis</i>	ハナハチノスケホコリ
04-97	<i>Metatrichia vesparium</i>	ハチノスケホコリ
04-98	<i>Cribraria dictyospora</i>	カクミアミホコリ
04-106	<i>Physarium stellatum</i>	ホシモジホコリ
04-107	<i>Physarium flavicomum</i>	キカミモジホコリ

2004 年度は , 子実体 60 種 107 株の野外変形菌を採取した .

< 野外変形菌株リスト 2005 年度採取分 >

子実体		
No.	学名	和名
05-01	<i>Fuligo septica</i> f. <i>flava</i>	キフシススホコリ
05-02,59,65,73,82,83,111, 124,133,136,143,158	<i>Stemonitis axifera</i>	サビムラサキホコリ
05-03	<i>Trichia scabra</i>	キンチャケホコリ
05-04	<i>Lamproderma sauteri</i>	ザウタールリホコリ
05-05,75,125,129,150	<i>Fuligo aurea</i> (= <i>Erionema aureum</i>)	ムシホコリ
05-06	<i>Diachea leucopodia</i>	ジクホコリ
05-07,30,88,127	<i>Lycogala epidendrum</i>	マメホコリ
05-08	<i>Physarum viride</i> f. <i>incanum</i>	シラガアオモジホコリ
05-09,23,31,45,63,74,103,146	<i>Tubifera ferruginosa</i> (= <i>Tubilifera arachnoidea</i>)	クダホコリ
05-10	<i>Arcyria insignis</i>	コウツボホコリ
05-11,18,21,27,29,36,37, 40,57,89,104	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>	ツノホコリ
05-12,13,26,44	<i>Cribraria intricata</i>	フシアミホコリ
05-14	<i>Physarum melleum</i>	シロジクキモジホコリ
05-15	<i>Cribraria tenella</i> var. <i>concinna</i>	コアミホコリ
05-16	<i>Tubifera ferruginosa</i> (= <i>Tubilifera arachnoidea</i>) <i>Licea minima</i>	クダホコリ コホコリ
05-17,42	<i>Craterium aureum</i>	キサカズキホコリ
05-19	<i>Stemonitopsis typhina</i> var. <i>similis</i>	ハダカコムラサキホコリ
05-20	<i>Lycogala epidendrum</i> <i>Lycogala epidendrum</i> var. <i>terrestre</i>	マメホコリ ナメラマメホコリ
05-22,54,95,96,97,98,102,128	<i>Arcyria cinerea</i>	シロウツボホコリ
05-24,79,120	<i>Stemonitopsis hyperopta</i>	コムラサキホコリ
05-25,58,166,169	<i>Trichia favoginea</i> var. <i>persimilis</i>	トゲケホコリ
05-32,41,53	<i>Diderma</i> aff. <i>saundersii</i> (Masse) Lado	パークレイホネホコリ
05-33	<i>Hemitrichia clavata</i>	ヌカホコリ
05-34,39,77	<i>Didymium squamulosum</i>	シロエノカタホコリ
05-35,67	<i>Physarum viride</i>	アオモジホコリ
05-38	<i>Diderma</i> aff. <i>saundersii</i> (Masse) Lado <i>Craterium aureum</i>	パークレイホネホコリ キサカズキホコリ
05-43	<i>Didymium minus</i>	コカタホコリ
05-46,50,151	<i>Diderma spumarioides</i>	アワホネホコリ
05-47	<i>Physarum cinereum</i>	ハイイロフクロホコリ
05-48	<i>Diderma testaceum</i>	マンジュウホネホコリ
05-49	<i>Arcyria obvelata</i> <i>Ceratiomyxa fruticulosa</i>	キウツボホコリ ツノホコリ
05-51	<i>Physarum superbum</i>	キミズフクロホコリ
05-52	<i>Physarum plicatum</i>	エリタテフクロホコリ
05-55	<i>Diderma effusum</i>	ホネホコリ
05-56	<i>Physarum melleum</i>	シロジクキモジホコリ
05-60	<i>Stemonitopsis gracilis</i>	チャコムラサキホコリ
05-61,70,94,106	<i>Hyporhamma calyculata</i> (= <i>Hemitrichia clavata</i> var. <i>calyculata</i>)	ホソエノヌカホコリ
05-62,142	<i>Arcyria obvelata</i>	キウツボホコリ
05-66,76,91,121,139,161	<i>Arcyria denudata</i>	ウツボホコリ
05-68,99,108	<i>Physarum nutans</i> (= <i>Physarum album</i>)	シロモジホコリ
05-69,140,165	<i>Stemonitis splendens</i>	オオムラサキホコリ

野外変形菌株リスト 2005 年度採取分 続き

05-71,81,147,155	<i>Stemonitis fusca</i>	ムラサキホコリ
05-72,92,123,148	<i>Stemonitis axifera</i> var. <i>smithii</i>	スミスムラサキホコリ
05-78,109	<i>Physarum umbiliciferum</i>	ヘソモジホコリ
05-80	<i>Cribraria purpurea</i>	ムラサキアミホコリ
05-84	<i>Cribraria cancellata</i> var. <i>fusca</i>	サラクモノスホコリ
05-85,112,113,114,115,117,122	<i>Cribraria tenella</i>	アミホコリ
05-86	<i>Lamproderma arcyronema</i>	ツヤエリホコリ
05-87	<i>Physarum penetrale</i>	ツキヌキモジホコリ
05-90,138	<i>Fuligo septica</i> f. <i>flava</i>	キフシスホコリ
05-93,101	<i>Cribraria cancellata</i>	クモノスホコリ
05-100,107	<i>Fuligo septica</i>	ススホコリ
05-105	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>porioides</i>	タマツノホコリ
05-110,118,119	<i>Physarum subnutans</i>	ニタリシロモジホコリ
05-116,132	<i>Cribraria dictyospora</i>	カクミアミホコリ
05-126,134	<i>Stemonitis virginensis</i>	バージニアムラサキホコリ
05-130,135	<i>Stemonitis flavogenita</i>	サラノセムラサキホコリ
05-131	<i>Lindbladia cribrarioides</i>	タチフンホコリ
05-141	<i>Stemonitis pallida</i>	イリマメムラサキホコリ
05-144,154	<i>Stemonaria longa</i>	ヤリミダレホコリ
05-145,160	<i>Stemonitis fusca</i> var. <i>rufescens</i>	ホソミムラサキホコリ
05-149	<i>Tubifera dimorphotheca</i>	コモチクダホコリ
05-152	<i>Physarum nucleatum</i>	タマモチモジホコリ
05-153	<i>Didymium comatum</i>	エダゲカタホコリ
05-156	<i>Didymium bahiense</i>	バイアカタホコリ
05-157	<i>Trichia scabra</i>	キンチャケホコリ
05-157	<i>Diachea leucopodia</i>	ジクホコリ
05-159	<i>Ceratiomyxa fruticulosa</i> var. <i>flexuosa</i>	ナミウチツノホコリ
05-162	<i>Physarum rigidum</i>	イタモジホコリ
05-163	<i>Physarum globuliferum</i>	シロジクモジホコリ
05-164	<i>Tubifera casparyi</i>	オオクダホコリ
05-167	<i>Physarum flavicomum</i>	キカミモジホコリ
05-168	<i>Trichia varia</i>	フタナワケホコリ
05-28	未熟	
05-137	<i>Stemonitis</i> sp.	ムラサキホコリ属

変形体

No.	学名	和名
05-170	<i>Diderma</i> aff. <i>saundersii</i> (Masse) Lado	パークレイホネホコリ

2005 年度は、子実体 71 種 167 株、変形体 1 種 1 株、不明 2 株の野外変形菌を採取した。なお、採取した変形体は研究室に持ち帰った後で子実体になり、同定して頂いた。

第2章に関する実験

melleumin A (1)の開環反応

MeONa と melleumin A (1)を反応させて開環することにより、melleumin A (1)から melleumin B (2)になることを TLC で確かめた。

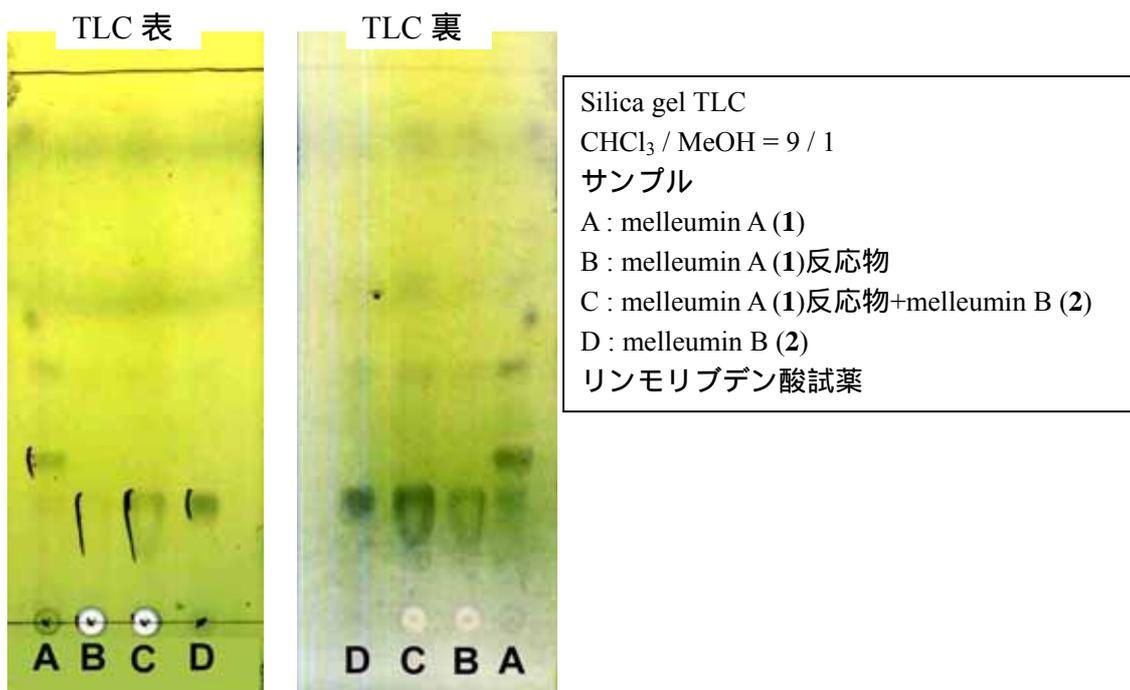
melleumin A (0.1 mg)を真空ポンプで1時間乾燥後、モレキュラーシーブス(3A)で脱水した MeOH (500 μ L)を加えて溶解し、28% MeONa メタノール溶液 (Wako)10 μ L を加えて5分間反応後、TLC 分析を行い、melleumin A (1)から melleumin B (2)が生成されることを確認した。

シリカゲルTLC分析(R_f 値) 展開溶媒: $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 9 / 1$

melleumin B (2) : 0.19

melleumin A (1) : 0.30

反応生成物 : 0.19 反応生成物+melleumin B (2点打ち) : 0.19



melleumin B (2)の加水分解反応

melleumin B (2)0.9 mg を 6 N HCl (1.5 mL)に溶解し、110 $^{\circ}\text{C}$ で加熱還流して12時間反応を行った。

melleumin B加水分解物のキラルTLC分析

melleumin B (2)加水分解物を、D-Thr (10R,11S), D-allo-Thr (10R,11R), L-Thr

(10*S*,11*R*) , L-*allo*-Thr (10*S*,11*S*)の 4 種類のスレオニン標品とともにキラル TLC で展開した .

展開溶媒 : MeOH / H₂O / CH₃CN = 1 / 1 / 4 ⁴⁷⁾

D-スレオニン : ca. 0.55 (R_f値)

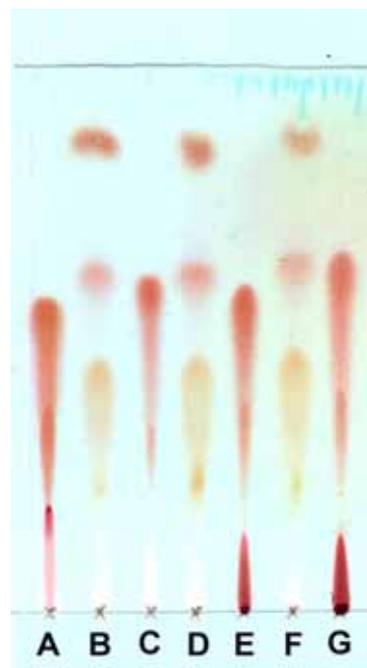
D-*allo*-スレオニン : ca. 0.55

L-スレオニン : ca. 0.60

L-*allo*-スレオニン : ca. 0.60

melleumin B 加水分解物 : ca. 0.60

キラル TLC 分析
(TLC:Merck HPTLC plate CHIR Art. 14101)
MeOH / H₂O / CH₃CN = 1 / 1 / 4
サンプル
A : D-スレオニン
B : melleumin B (2)加水分解物
C : L-スレオニン
D : melleumin B (2)加水分解物
E : D-*allo*-スレオニン
F : melleumin B (2)加水分解物
G : L-*allo*-スレオニン
ニンヒドリン試薬



melleumin B加水分解物のODS TLC分析

ODS TLC 分析 (展開溶媒 : 100 %MeOH)

L-スレオニン : R_f 値 0.56

L-*allo*-スレオニン : 0.61

PM-2 加水分解物 : 0.54

ODS TLC
(TLC:RP-18 F254s,Merck 1.15423)
MeOH=100%
サンプル
A : L-スレオニン
B : melleumin B (2)加水分解物
C : L-*allo*-スレオニン
ニンヒドリン試薬



melleumin B (2)の(S)-MTPAエステル化

melleumin B (2)0.9mg に 20 μ L のピリジンと 5.6 μ L の(R)-MTPACl (30 μ M)

を加えて 3 時間反応を行った。その後，MeOH を加えて反応を停止させ，エバポレーターでピリジンを除去後，順相 HPLC により精製を行った。

分取 HPLC 条件

カラム：YMC-Pack SIL-06 (6φ × 250 mm)

Flow rate：2.0 mL / min

Solvent：*n*-Hexane / *iso*-propanol = 85 / 15

UV 検出：254 nm

分取 HPLC の結果、melleumin B の(*S*)-MTPA エステル体 (2a) を 1.0 mg 得た。

melleumin B の(*S*)-MTPA エステル体 (2a) の物理化学的性質

colorless amorphous powder

FABMS (NBA)： m/z 1180 [M+H]⁺

melleumin B の(*S*)-MTPA エステル体 (2a) の¹H NMR データ

¹H NMR (CDCl₃) δ：2.638 (1H, d, *J*=6.4 Hz, H-2), 5.529 (1H, td, *J*=6.4, 2.2 Hz, H-3), 4.501 (1H, m, H-4), 6.339 (1H, d, *J*=9.1 Hz, H-5), 3.649 (1H, d, *J*=5.8 Hz, H-7), 6.636 (1H, br. t, *J*=5.8 Hz, H-8), 4.647 (1H, dd, *J*=8.0, 4.5 Hz, H-10), 5.732 (1H, qd, *J*=6.2, 4.5 Hz, H-11), 1.390 (1H, d, *J*=6.2 Hz, H-12), 6.812 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1'), 7.658 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-4', 8'), 6.897 (2H, d, *J*=8.8 Hz, H-5', 7'), 2.795 (1H, dd, *J*=14.0, 6.3 Hz, H-1''), 2.648 (over lap, H-1''), 7.094 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-3'', 7''), 6.961 (2H, d, *J*=8.4 Hz, H-4'', 6''), 3.573 (3H, s, 1-OMe), 3.838 (3H, s, 6'-OMe), 3.459 (3H, s, MTPA-OCH₃), 3.501 (3H, s, MTPA-OCH₃), 3.635 (3H, s, MTPA-OCH₃), 7.342-7.592 (15H, m, MTPA-Ph)

なお 2a の帰属については，¹H-¹H COSY スペクトルの解析により確認を行った。

melleumin B (2) の(*R*)-MTPA エステル化

melleumin B (2) 0.8 mg に 20 μL のピリジンと 5.6 μL の(*S*)-MTPACl (30 μM) を加えて 3 時間反応を行った。その後，MeOH を加えて反応を停止させ，エバポレーターでピリジンを除去後，順相 HPLC により分取を行った，

分取 HPLC 条件

カラム：YMC-Pack SIL-06 (6φ × 250 mm)

Flow rate：2.0 mL / min

Solvent：*n*-Hexane / *iso*-propanol = 85 / 15

UV : 254 nm

分取 HPLC の結果、melleumin B の(R)-MTPA エステル体 (2b) を 0.7 mg 得た .

melleumin B の(R)-MTPA エステル体 (2b) の物理化学的性質

colorless amorphous powder

FABMS (NBA) : m/z 1180 [M+H]⁺

melleumin B の(R)-MTPA エステル体 (2b) の¹H NMR データ

¹H NMR (CDCl₃) δ : 2.663 (1H, dd, $J=6.1, 2.6$ Hz, H-2), 5.513 (1H, td, $J=6.1, 1.9$ Hz, H-3), 4.494 (1H, m, H-4), 6.144 (1H, d, $J=9.4$ Hz, H-5), 3.749 (1H, dd, $J=16.8, 5.7$ Hz, H-7), 3.603 (1H, dd, $J=16.8, 5.7$ Hz, H-7), 6.741 (1H, t, $J=5.7$ Hz, H-8), 4.697 (1H, dd, $J=7.9, 3.5$ Hz, H-10), 5.721 (1H, qd, $J=6.6, 3.5$ Hz, H-11), 1.318 (1H, d, $J=6.6$ Hz, H-12), 6.795 (1H, d, $J=7.9$ Hz, H-1'), 7.603 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-4', 8'), 6.882 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-5', 7'), 2.692 (1H, dd, $J=14.2, 6.3$ Hz, H-1''), 2.491 (1H, dd, $J=14.2, 9.1$, H-1''), 7.049 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3'', 7''), 6.950 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-4'', 6''), 3.622 (3H, s, 1-OMe), 3.831 (3H, s, 6'-OMe), 3.456 (3H, s, MTPA-OCH₃), 3.559 (3H, s, MTPA-OCH₃), 3.624 (3H, s, MTPA-OCH₃), 7.334-7.595 (15H, m, MTPA-Ph)

第 3 章に関する実験

大量培養

オートミールを添加した LP 培地 (LP/O) 上に乾熱滅菌した爪楊枝を用いて 03-118 株の変形体の一部を接種し、ある程度広がったら新しいシャーレに継代した。変形体は、約 3 日から 4 日でシャーレ一面に広がり、一週間ほど経つとほぼ必ず子実体が形成された。

収穫、抽出

シャーレ一面に広がった変形体を、スパーテルを用いて培地からはがして収穫した。収穫した菌体は凍結保存した。φ9 cm のシャーレ 1004 枚分の変形体から得られた凍結乾燥菌体 43.3 g を 90 %MeOH (500 mL) で 2 回、90 %Acetone (500 mL) で 1 回抽出し、エキス 4.4 g を得た。

溶媒分配

エキス 4.4 g を 85 %MeOH 300 mL に懸濁させ，*n*-Hexane 100mL で 2 回分配し，*n*-Hexane 可溶部 1.13 g，85 %可溶部 3.3 g を得た。

85 %MeOH可溶画分の分画

85 %MeOH可溶画分 3.3 g をメタノール/水系溶媒を用いたODSカラムクロマトグラフィー (35φ×160 mm)で分画を行い，MeOH/H₂O=0/1 溶出画分Fr.1A (1.6 g)，Fr.1B (400 mg)，MeOH/H₂O=1/4 溶出画分Fr.1C (65.6 mg)，Fr.1D (55.1 mg)，MeOH/H₂O=1/1 溶出画分Fr.1E (43.0 mg)，Fr.1G (69.0 mg)，Fr.1H (21.3 mg) MeOH/H₂O=4/1 溶出画分Fr.1I (103.2 mg)，MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.1J (484.1 mg)，100 %CHCl₃溶出画分Fr.1K (60.6 mg)を得た。黄色色素は主にFr.1C-1Hに見られた。

・黄色色素の精製

Fr.1Dの精製

Fr.1D (55.1 mg)のうち 24.2 mg を，溶出液にメタノール/水=8/2 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×620 mm)により精製を行い，Fr.2A (12.7 mg)，Fr.2B (2.7 mg)，Fr.2C (3.0 mg)，Fr.2D (0.9 mg)，Fr.2E (0.2 mg)，Fr.2F (0.9 mg)を得た。なお，精製は第 3 培養室内で，25℃ 暗所の条件下で行った。

Fr.2Cの精製

Fr.2Cをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10φ×200 mm，Silica gel 60N) に負荷し，CHCl₃/MeOH/H₂O の溶媒を用いて精製を行い，CHCl₃/MeOH/H₂O=8/5/1 溶出画分Fr.3A (0.8 mg)，Fr.3B (<0.1 mg)，Fr.3C (<0.1 mg)，CHCl₃/MeOH/H₂O=8/10/1 溶出画分Fr.3D (2.0 mg)を得た。なお，精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.1Eの精製

Fr.1E を，溶出液にメタノール/水=9/1 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×700 mm)により精製を行い，Fr.4A (5.2 mg)，Fr.4B (8.4 mg)，Fr.4C (7.1 mg)，Fr.4D (4.7 mg)，Fr.4E (1.1 mg)，Fr.4F (0.7 mg)，Fr.4G (2.4 mg)を得た。この結果，不安定黄色色素として Fr.4E を得た。なお，精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.1Gの精製

Fr.1G を、溶出液にメタノール/水=8/2 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×620 mm)により精製を行い、Fr.5A (2.5 mg), Fr.5B (6.3 mg), Fr.5C (15.6 mg), Fr.5D (1.8 mg), Fr.5E (22.6 mg), Fr.5F (2.5 mg)を得た。サンプルをアプライ時につまってしまう、全て溶出されるのに約一週間かかった。なお、精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.4DおよびFr.4Fの精製

Fr.4D および Fr.4F を統合し、溶出液にメタノール/水=95/5 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×620 mm)により精製を行い、Fr.6A (0.4 mg), Fr.6B (0.6 mg), Fr.6C (2.4 mg), Fr.6D (0.7 mg), Fr.6E (0.7 mg), を得た。なお、精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.5Eの精製

Fr.5E を、溶出液にメタノール/水=8/2 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×700 mm)により精製を行い、Fr.7A (2.3 mg), Fr.7B (2.2 mg), Fr.7C (5.2 mg), Fr.7D (2.6 mg), Fr.7E (2.6 mg), Fr.7F (1.6 mg), Fr.7G (0.4 mg), Fr.7H (0.2 mg)を得た。なお、精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.1Cの精製

Fr.1C を、溶出液にメタノール/水=6/4 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×700 mm)により精製を行い、Fr.8A (8.4 mg), Fr.8B (0.3 mg), Fr.8C (3.2 mg), Fr.8D (0.6 mg), Fr.8E (0.6 mg), Fr.8F を得た。なお、精製の際にカラムをアルミホイルで遮光した。

Fr.1Hの精製

Fr.1H を ODS HPLC (カラム：Develosil ODS-HG-5, 10φ×250 mm, 溶離液：60%MeOH+0.1%TFA, Photodiode array 検出)により精製を行い、Fr.9A (6.9 mg), Fr.9B (1.1 mg), Fr.9C (0.9 mg), Fr.9D (0.8 mg), Fr.9E (0.5 mg), Fr.9F (11.7 mg)を得た。この結果、不安定黄色色素として Fr.9C を単離した。

Fr.5CおよびFr.5Dの精製

Fr.5CおよびFr.5Dを統合し、溶出液にCHCl₃/MeOH=1/1 を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×730 mm)により精製を行い、Fr.14A (1.8 mg), Fr.14B (1.4 mg), Fr.14C (7.2 mg), Fr.14D (1.6 mg), Fr.14E (0.7 mg), Fr.14F

(0.9 mg)を得た .

・黄色色素以外の精製

Fr.1Iの精製

Fr.1I を 90 %メタノールを用いた ODS カラムクロマトグラフィー (20φ×210 mm)で精製を行い , Fr.10A (1.5 mg) , Fr.10B (18.3 mg) , Fr.10C (21.5 mg) , Fr.10D (26.0 mg) , Fr.10E (14.9 mg) , Fr.10F (4.6 mg)を得た .

Fr.10Bの精製

Fr.10B を ,溶出液にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (15φ×550 mm)により精製を行い , Fr.11A (5.5 mg) , Fr.11B (2.9 mg) , Fr.11C (3.1 mg) ,Fr.11D (1.7 mg) ,Fr.11E (0.9 mg) ,Fr.11F (0.2 mg) ,Fr.11G (<0.1 mg)を得た .

Fr.1Jの精製-1

Fr.1J (484.1 mg)のうち 68.5 mgを , CHCl₃/MeOH/H₂O=8/5/1 の溶媒を用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (20φ×320 mm , Silica gel 60N)で精製を行い , Fr.12A (61.5 mg) , Fr.12B (0.5 mg) , Fr.12C (1.1 mg) , Fr.12D (0.3 mg) , Fr.12E (0.7 mg) ,Fr.12F (0.5 mg) ,Fr.12G (3.6 mg) ,Fr.12H (5.5 mg) ,Fr.12I (0.4 mg) ,Fr.12Jを得た .

Fr.10CおよびFr.10Dの精製

Fr.10CおよびFr.10Dを統合し , 溶出液にCHCl₃/MeOH=1/1 を用いたSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (15φ×620 mm)で精製を行い ,Fr.13A (1.0 mg) , Fr.13B (7.3 mg) , Fr.13C (2.2 mg) , Fr.13D (17.4 mg)を得た .

Fr.1Jの精製-2

Fr.1J (484.1 mg)のうち 130.7 mgを , 溶出液にCHCl₃/MeOH=1/1 を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×730 mm)により精製を行い , Fr.15A (1.4 mg) ,Fr.15B (10.2 mg) ,Fr.15C (6.6 mg) ,Fr.15D (85.8 mg) ,Fr.15E (24.0 mg)を得た .

第4章に関する実験

01-88 株のエキスの作製

Tubifera dimorphotheca (01-88 株, 山本先生番号 21625) 野外採取子実体 3.7 g を 90%メタノールに浸し, 10 分間ホモジナイズを行い, その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 菌体の残渣が沈むまで静置し, 上澄をろ紙でろ過した. 2 回目はホモジナイズを行わず, 30 分間超音波にかけて抽出を行った. 次に, 90%アセトンに浸し, 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 305 mg の粗抽出物を得た.

01-88 株粗抽出物の分画

01-88 株の粗抽出物 305 mg を ODS カラムクロマトグラフィー (Chromatorex ODS, 20 × 200 mm) により分画を行った. そして, 20%MeOH 溶出画分 Fr.1A (223.0 mg), 50%MeOH 溶出画分 Fr.1B (32.4 mg), 80%MeOH 溶出画分 Fr.1C (20.9 mg), 100%MeOH 溶出画分 Fr.1D (47.9 mg), CHCl₃ / MeOH = 1 / 1 溶出画分 Fr.1E (9.1 mg), CHCl₃ / Acetone = 1 / 1 溶出画分 Fr.1F (12.6 mg) を得た.

Fr.1D の分画

Fr.1D (47.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silicagel 60N, 15 × 220 mm) により分画を行った. そして, *n*-Hexane / EtOAc = 7 / 3 溶出画分 Fr.2A (11.7 mg), Fr.2B (1.3 mg), *n*-Hexane / EtOAc = 1 / 1 溶出画分 Fr.2C (1.4 mg), Fr.2D (3.7 mg), Fr.2E (1.1 mg), Fr.2F (0.7 mg), *n*-Hexane / EtOAc = 1 / 4, 0 / 1 および 100%Acetone 溶出画分 Fr.2G (1.6 mg), 100%MeOH 溶出画分 Fr.2H (17.2 mg), CBAW 溶出画分 Fr.2I (15.7 mg) を得た.

Fr.1C の分画

Fr.1C (20.9 mg) のうち 16.5 mg を HPLC (カラム: Develosil ODS-HG5, 20 × 250 mm, 溶離液: 75%MeOH, 流速: 9.0 mL / min, UV 検出: 254 nm) による精製を行い, Fr.3A (9.9 mg), Fr.3B (0.7 mg), Fr.3C (1.2 mg), Fr.3D (0.8 mg), Fr.3E (0.2 mg), Fr.3F (6.8 mg) を得た.

Fr.3A の分画

Fr.3A を, Develosil C₃₀ UG-5, YMC Pack ODS-AM, Inertsil ODS-3, Develosil ODS HG-5, Develosil ODS SR-5 の 5 種のカラム (いずれも 10φ × 250 mm) で分離条件を検討したところ, Develosil ODS HG-5 (10φ × 250 mm) を用いた時に最も良い分

離が見られた .Fr.3A (9.9 mg)を ,HPLC (カラム:Develosil ODS-HG5 ,10 × 250 mm ,
溶離液 : 65%MeOH , 流速 : 3.5 mL / min , UV検出 : 254 nm)による精製を繰り返
し行い ,Fr.4A (1.0 mg) ,Fr.4B (1.2 mg) ,Fr.4C (1.0 mg) ,Fr.4D (5.8 mg)を得た .

tubiferal A (3) , B (4)のODS TLC分析

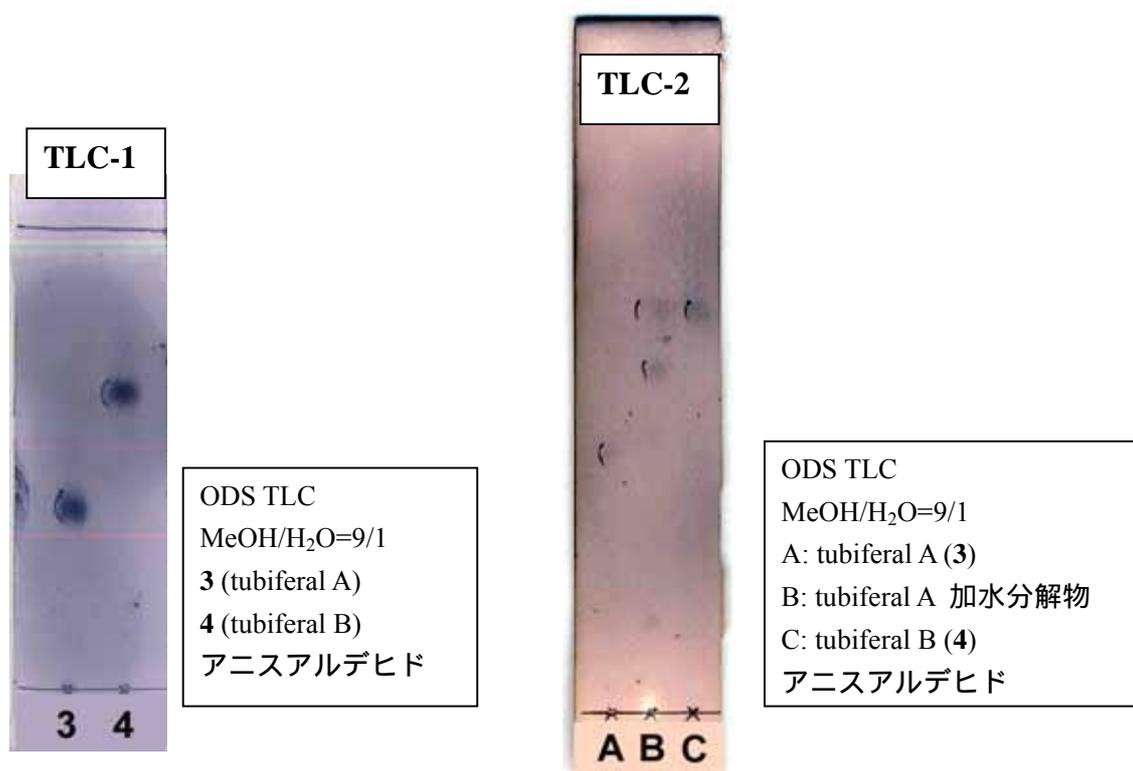
tubiferal A (3) , B (4)の ODS TLC 分析を行った(TLC は下図の TLC-1) .

R_f値 : tubiferal A (3) . . . 0.39

tubiferal B (4) . . . 0.64

tubiferal A (3)からtubiferal B (4)への変換

tubiferal A (0.1 mg)を 50 μLのMeOHで溶解し ,2N KOH (10 μL)を加えて室温で
24 時間反応を行った . その後 , tubiferal Bが生成されたことを , MeOH/H₂O=9/1
を展開溶媒に用いたODS TLC分析により確認した(TLCは下図のTLC-2) .



・ tubiferal 類の増量

02-71 および 03-138 株のエキスの作製

Tubifera dimorphotheca(02-71 , 03-138 株)野外採取子実体 2.5 g を 90 %メタノールに浸し , 10 分間ホモジナイズを行い , その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い , 菌体の残渣が沈むまで静置し , 上澄をろ紙でろ過した . 2 回目はホモ

ジナイズを行わず，30 分間超音波にかけて抽出を行った．次に，90 %アセトンに浸し，30 分間超音波にかけて 2 回抽出を行い，225.6 mg の粗抽出物を得た

02-71 および 03-138 株粗抽出物の分画

02-71 および 03-138 株の粗抽出物 225.6 mg を ODS カラムクロマトグラフィー(Chromatorex ODS , 20 × 200 mm)により分画を行った．そして，20%MeOH 溶出画分 Fr.2-1A (119.6 mg) , 50%MeOH 溶出画分 Fr.2-1B (5.4 mg) , 80%MeOH 溶出画分 Fr.2-1C (17.1 mg) , 100%MeOH 溶出画分 Fr.2-1D (48.5 mg)を得た．

Fr.2-1Cの分画

Fr.2-1C (17.1 mg)を HPLC (カラム : Develosil ODS-HG5 , 20 × 250 mm , 溶離液 : 75%MeOH , 流速 : 6.5 mL/min , UV 検出 : 254 nm)による精製を行い , Fr.2-2A (1.0 mg) , Fr.3B (0.8 mg) , Fr.2-2C (1.2 mg) , Fr.2-2D (1.0 mg) , Fr.2-2E (0.6 mg) , Fr.2-2F (1.1 mg)を得た．20 mg/mL の濃度のサンプルを , 1 回目の分取 HPLC よりも低量にしてインジェクトを行い , 精製を繰り返すことにより , 今回直径 2 cm のカラムで tubiferal B (4)の単離を行うことができた．

単離した化合物の物理化学的性状

tubiferal A (3)

colorless amorphous solid

FABMS m/z 483 $[M+H]^+$

HRFABMS m/z 483.3101 (calcd for $C_{30}H_{43}O_5$, $[M+H]^+$ 483.3110)

$[\alpha]_D^{22}$ -87 (c 0.12, MeOH)

UV λ_{max} (MeOH) 239 (18,000) and 246 nm (18,000)

IR(film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 3390 (-OH), 2930, 2860, 1770 (-C=O), 1715 (-C=O), 1560, 1455, 1390

1H , ^{13}C NMR スペクトルデータは第 4 章 , 第 3 節 Table 1 を参照のこと

General Procedures. 1H and ^{13}C NMR spectra of **3** were recorded on a 500 MHz spectrometer (Bruker DRX-500). Standard pulse sequences were employed for 2D NMR experiments. HMBC spectra were recorded using a 65 ms delay time for long-range C-H coupling with Z-axis PFG. NOESY spectra in the phase-sensitive mode were recorded using the TPPI method with spectral widths of both dimensions of 5252 Hz, and 128 scans with 16 dummy scans were accumulated into 1K data points for each of 256 t_1 increments. The mixing time was set to 500 ms.

tubiferal B (4)

colorless amorphous solid

FABMS m/z 501 $[M+H]^+$, m/z 523 $[M+Na]^+$

HRFABMS m/z 501.3179 (calcd for $C_{30}H_{45}O_6$, $[M+H]^+$ 501.3216)

$[\alpha]_D^{23}$ -46 (c 0.20, MeOH)

UV λ_{max} (MeOH) 240 (20,000) and 246 nm (20,000)

IR(film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 3420 (-OH), 2925, 2850, 1710 (-C=O), 1560, 1450, 1360

1H , ^{13}C NMRスペクトルデータは第4章, 第3節Table 1を参照のこと

tubiferal B (4)のジベンゾイル化反応

0.7 mg(1.3 μM)のtubiferal B (4)をpyridine (30 μL)で溶解し, 3.5 μL (25 μM)のbenzoylchlorideを加えて室温で15時間反応を行った(tubiferal Bは CH_2Cl_2 に対して溶解性が悪かった). 反応後, エバポレーターでpyridineを除去し, HPLCで精製を行い, 反応生成物 (0.2 mg)を得た.

反応生成物の精製条件

カラム: YMC-Pack SIL-06 (6 ϕ \times 250 mm)

流速: 1.5 ml/min

溶媒: *n*-Hexane / *iso*-propylalcohol = 99 / 1

UV 検出: 254 nm (range: 1.28)

第5章に関する実験

抽出操作

菌体のかきとりおよび抽出は, 当研究室の直江綾乃氏により行われた. *Arcyria cinerea* 野外採取子実体 (03-105 株, 山本先生番号 24861) 2.9 g を 90%メタノール (150 mL)に浸し, 10 分間ホモジナイズを行い, その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 菌体の残渣が沈むまで静置し, 上澄をろ紙でろ過した. 次からはホモジナイズの操作を省き, 90%メタノール (150 mL)でもう 1 回抽出し, 続いて 90%アセトン (150 mL)に浸し, 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 200.4 mg の粗抽出物を得た.

粗抽出物の分画

粗抽出物 200.4 mg のうち 190.7 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (17φ×210 mm, PSQ100B)に負荷し, *n*-Hexane/EtOAc の溶媒系を用い, EtOAc の割合を段階的に上げて溶出させ *n*-Hexane/EtOAc=4/1 溶出画分 Fr.1A (39.5 mg), *n*-Hexane/EtOAc=4/1 溶出画分 Fr.1B (1.8 mg), Fr.1C (8.8 mg), Fr.1D (2.8 mg), *n*-Hexane/EtOAc=1/4 溶出画分 Fr.1E (8.7 mg) *n*-Hexane/EtOAc=0/1 溶出画分 Fr.1F (4.9 mg), MeOH 溶出画分 Fr.1G (109.8 mg)を得た. Fr.1D, 1E, 1G に Fast Red B 試薬で発色するスポットが確認された.

Fr.1Eの分画

Fr.1Eをメタノール/水系溶媒を用いたODSカラムクロマトグラフィー (12φ×190 mm)で精製を行い, MeOH/H₂O=2/3 溶出画分Fr.2A (1.2 mg), Fr.2B (5.0 mg), MeOH/H₂O=1/1 溶出画分Fr.2C (2.7 mg), MeOH/H₂O=1/1, 1/0 溶出画分Fr.2D (<0.1 mg)を得た.

Fr.1Dの分画

Fr.1Dをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (8φ×210 mm, Silica gel 60N)に負荷し, クロロホルム/メタノールの溶媒系を用いて精製を行い, CHCl₃/MeOH=1/0, 100/1 および 100/2 溶出画分Fr.3A (0.7 mg), CHCl₃/MeOH=100/2 溶出画分Fr.3B (0.7 mg), Fr.3C (0.1 mg), Fr.3D (0.6 mg), CHCl₃/MeOH=100/2, 1/1 および 0/1 溶出画分Fr.3E (<0.1 mg)を得た. Fr.3Dを化合物 7 とした.

Fr.1Gの分画

Fr.1Gをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (15φ×250 mm, Silica gel 60N)に負荷し, クロロホルム/アセトンの溶媒系を用いて精製を行い, CHCl₃/Acetone=4/1 溶出画分Fr.4A (1.0 mg), CHCl₃/Acetone=4/1, 2/1 溶出画分Fr.4B (0.7 mg), CHCl₃/Acetone=2/1, 1/1 溶出画分Fr.4C (3.8 mg), CHCl₃/Acetone=1/1, 1/2 溶出画分Fr.4D (3.6 mg), CHCl₃/Acetone=1/2, 1/4 溶出画分Fr.4E (2.7 mg), CHCl₃/Acetone=1/4 溶出画分Fr.4F (1.7 mg), CHCl₃/Acetone=1/4, 0/1 溶出画分Fr.4G (5.0 mg), MeOH溶出画分Fr.4H (22.1 mg), Fr.4I (48.5 mg)を得た.

Fr.4Gの分画

Fr.4G を, 溶出溶媒にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×550 mm)により精製を行い, Fr.5A (2.5 mg), Fr.5B (1.6 mg), Fr.5C (0.4 mg)を得た. Fr.5B を化合物 8 とした.

Fr.2Bの分画

Fr.2B を , 溶出溶媒にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×550 mm)により精製を行い , Fr.6A (1.8 mg) , Fr.6B (<0.1 mg) , Fr.6C (<0.1 mg) , Fr.6D (0.6 mg) , Fr.6E (0.7 mg) , Fr.6F (1.2 mg)を得た . Fr.6F を化合物 5 (cinereapyrrole A)とした .

Fr.1Cの分画

Fr.1C を , 溶出溶媒にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×550 mm)により精製を行い ,Fr.7A (5.3 mg) ,Fr.7B (0.5 mg) ,Fr.7C (0.5 mg) , Fr.7D (0.3 mg)を得た .

Fr.2Cの分画

Fr.2C を , 溶出溶媒にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×550 mm)により精製を行い ,Fr.8A (0.7 mg) ,Fr.8B (0.3 mg) ,Fr.8C (<0.1 mg) , Fr.8D (0.8 mg) , Fr.8E (0.2 mg)を得た . Fr.6F を化合物 6 (cinereapyrrole B)とした .

Fr.6Dおよび 6Eの精製

Fr.6D および 6E を統合し , ODS HPLC (カラム : Develosil ODS-UG-5 , 10×250 mm , 溶離液 : 60%MeOH , UV 検出 : 254 nm)により精製を行い , Fr.9A (0.8 mg) , Fr.9B (<0.1 mg) , Fr.9C (no peak and wash , 0.3 mg)を得た .

単離した化合物の物理化学的性状

化合物 5 (cinereapyrrole A)

dark blown amorphous powder

FABMS m/z 387 [M^+]

HRFABMS m/z 387.1208 (calcd for $C_{22}H_{17}N_3O_4$, [$M+H$] $^+$ 387.1219)

UV λ_{max} (MeOH) 283 nm (11,000)

IR(film) $\nu_{max}cm^{-1}$ 3396 (-OH) , 1695 (-C=O) , 1583 , 1377

1H (500 MHz), ^{13}C NMR (125 MHz)スペクトルデータは本論Table 5-1 を参照

化合物 6 (cinereapyrrole B)

dark blown amorphous powder

FABMS m/z 371 [M^+]

HRFABMS m/z 371.1278 (calcd for $C_{22}H_{17}N_3O_3$, [$M+H$] $^+$ 371.1270)

UV λ_{max} (MeOH) 286 nm (ϵ 14,000) and 230 (ϵ 36,000)

IR(film) ν_{\max} cm⁻¹ 3400 (-OH) , 1696 (-C=O) , 1454 , 1377

¹H (600 MHz), ¹³C NMR (125 MHz)スペクトルデータは本論Table 5-1 を参照

化合物 7 (arcyriarubin A)

orange powder

EIMS m/z 327 [M⁺]

¹H NMRスペクトルデータ (400 MHz)は本論Table 5-2 を参照のこと

化合物 8 (lycogarubin C monomethylester)

brown powder

FABMS m/z 399 [M⁺]

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 6.89 (s, H-2) ,7.12 (d, *J*=8.3 Hz, H-4) ,6.69 (ddd, *J*=8.3, 7.0, 1.2, Hz, H-5) , 6.88 (ddd, *J*=8.3, 7.0, 1.2 Hz, H-6) , 7.16 (d, *J*=8.0 Hz, H-7) , 6.79 (s, H-2') , 7.14 (d, *J*=8.5 Hz, H-4') , 6.80 (ddd, *J*=8.5, 7.1, 1.0 Hz, H-5') , 6.95 (ddd, *J*=8.4, 7.1, 1.0 Hz, H-6') , 7.21 (dt, *J*=8.4, 1.0 Hz, H-7') , 3.64 (s, OMe)

¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz): 125.9 (C-2) ,110.7 (C-3) ,129.6 (C-3a) ,121.3 (C-4) , 119.1 (C-5) ,121.3 (C-6) ,111.5 (C-7) ,137.4 (C-7a) ,127.0 (C-8) ,119.9 (C-9) ,125.7 (C-2') , 110.5 (C-3') , 129.3 (C-3a') , 121.1 (C-4) , 119.4 (C-5) , 121.5 (C-6) , 111.7 (C-7) ,137.4 (C-7a') ,132.1 (C-8') ,122.9 (C-9') ,162.2 (COOH) ,163.3 (COOMe) , 51.5 (OMe)

第 6 章に関する実験

抽出操作

菌体のかきとりならびに各エキスの作成は、当研究室の研究補助員である大須賀淳美氏に行って頂いた *Arcyria obvelata* 野外採取子実体 (04-76 株山本先生番号 26359)330 mg を 90 %メタノール (50 mL)に浸し、10 分間ホモジナイズを行い、その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い、菌体の残渣が沈むまで静置し、上澄をろ紙でろ過した。次に、90 %アセトン(50 mL)に浸し、30 分間超音波にかけて抽出を行い、54.7 mg の粗抽出物を得た。

粗抽出物の分画

粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに負荷し、クロロホルム/メタノールの溶媒系を用い、メタノールの割合を段階的に上げて溶出させ、

CHCl₃/MeOH=1/0 溶出画分Fr.1A (10.0 mg) ,CHCl₃/MeOH=98/2 溶出画分Fr.1B (1.7 mg) ,CHCl₃/MeOH=95/5 溶出画分Fr.1C (2.3 mg) ,CHCl₃/MeOH=9/1 溶出画分Fr.1D (0.4 mg) ,Fr.1E (6.1 mg) ,Fr.1F (0.7 mg) ,CHCl₃/MeOH=8/2 溶出画分Fr.1G (3.0 mg) , CHCl₃/MeOH=1/1 溶出画分Fr.1H (10.9 mg) , CHCl₃/MeOH=0/1 溶出画分Fr.1I (5.4 mg)を得た . Fr.1Eが化合物 9 である .

化合物 10 の精製 , 単離

TLC 分析により , 化合物 10 が含まれていることが確認された Fr.1B (1.7 mg) と Fr.1C (2.3 mg)を統合し ,分取 HPLC (カラム :Mightysil RP-18 GP ,10 × 250 mm , 溶離液 : 70%MeOH , 流速 : 1.8 mL/min , UV 検出 : 254 nm)による精製を行い , Fr.2A (1.4 mg) , Fr.2B (0.5 mg) , Fr.2C (no peak and wash , 1.9 mg)を得た . Fr.2A が化合物 10 である .

単離した化合物の物理化学的性状

化合物 9 (arcyriaflavin B)

orange amorphous powder

EIMS *m/z* 341

¹H NMRスペクトルデータ (400 MHz)は本論Table 6-1 を参照のこと

化合物 10 (dihydroarcyriacyanin A)

pale yellow amorphous powder

FABMS *m/z* 327 [M⁺]

HRFABMS *m/z* 327.1003 [M⁺] (calcd for C₂₀H₁₃N₃O₂ , [M⁺] 327.1008)

UV(MeOH) _{max} 363(32000), 344(38000)

IR(film) _{max} cm⁻¹ 3390, 1710 and 1340

[α]_D^{25.0} -945.0 (c 0.1, MeOH)

¹H (600 MHz) , ¹³C NMR (150 MHz)スペクトルデータは本論Table 6-2 を参照

第7章に関する実験

抽出操作

菌体のかきとりおよび抽出は、当研究室の直江綾乃氏により行われた。*Lindbladia cribrarioides* 野外採取子実体 (01-86 株)4.5 g を 90 %メタノール (150 mL)に浸し、10 分間ホモジナイズを行い、その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い、4000rpm で 10 分間遠心を行った。続いて 90 %メタノール (100 mL) および 90 %アセトン (100 mL)で同じ操作を繰り返し行うことにより抽出を行い、848.5 mg の粗抽出物を得た。

溶媒分配

得られた粗抽出物を 100 mL の蒸留水に懸濁させ、100 mL の酢酸エチルで 3 回分配を行い、酢酸エチル層を 274.2 mg 得た。水層については、濃縮乾固せず精製を行った。

水溶性画分の分画

水層をエバポレーターでおよそ 30 mLに濃縮し、メタノール/水系のODSカラムクロマトグラフィーにより精製を行った。水 100 %からメタノールの割合を段階的に上げるステップワイズ法により溶出させ、MeOH/H₂O=0/1 溶出画分 Fr.1A (473.8 mg) ,Fr.1B (28.2 mg) ,MeOH/H₂O=1/4 溶出画分Fr.1C (0.7 mg) ,Fr.1D (7.4 mg) ,Fr.1E (0.5 mg) ,MeOH/H₂O=1/1 溶出画分Fr.1F (2.2 mg) ,Fr.1G (68.3 mg) ,MeOH/H₂O=4/1 溶出画分Fr.1H (12.2 mg) ,MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.1I (7.8 mg) ,100 %CHCl₃溶出画分Fr.1J (11.4 mg)を得た。

Fr.1Gの分画

赤色色素成分の確認された Fr.1G を、メタノール/水=4/1 を溶出溶媒に用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製を行い、4 つの赤褐色のバンドが確認され、これらを Fr.2D ,Fr.2F ,Fr.2H ,Fr.2I とした。Fr.2A (1.9 mg) ,Fr.2B (2.6 mg) ,Fr.2C (0.9 mg) ,Fr.2D(6.1 mg) ,Fr.2E (2.6 mg) ,Fr.2F (10.1 mg) ,Fr.2G (0.6 mg) ,Fr.2H (1.7 mg) ,Fr.2I (2.2 mg) ,Fr.2J (0.9 mg)

lindbladione (12)の物理化学的性状

C₁₆H₁₄O₇ (Mw:318)

Brown-red solid

FABMS m/z 319 [M+H]⁺

¹H NMRスペクトルデータ (400 MHz)は本論Table 7-1 を参照のこと

酢酸エチル可溶部の分画

酢酸エチル可溶部 274.2 mgを, *n*-Hexane/EtOAc系の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (PSQ100B)により精製を行った。EtOAcの割合を段階的に上げるステップワイズ法により溶出させ, *n*-Hexane/EtOAc=1/0 溶出画分Fr.1A (1.6 mg), *n*-Hexane/EtOAc=4/1 溶出画分Fr.1B (0.4 mg), Fr.1C (58.5 mg), Fr.1D (31.9 mg), Fr.1E (18.2 mg), *n*-Hexane/EtOAc=1/1 溶出画分Fr.1F (3.7 mg), Fr.1G (17.5 mg), Fr.1H (24.7 mg), *n*-Hexane/EtOAc=1/4 溶出画分Fr.1I (7.8 mg), *n*-Hexane/EtOAc=0/1 溶出画分Fr.1J (11.4 mg), 100 %アセトン, 100 %MeOHおよびCBAW (CHCl₃/*n*-BuOH/酢酸/水=1.5/6/1/1)溶出画分Fr.1K (89.0 mg), BAW (*n*-BuOH/酢酸/水=2/2/1)溶出画分Fr.1L (20.1 mg)を得た。

Fr.1Eおよび1Fの分画

黄色色素の確認されたFr.1EおよびFr.1Fを統合し, CHCl₃/MeOH=99/1 の溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N)により精製を行い, Fr.2A (1.5 mg), 2B (2.5 mg), 2C (0.7 mg), 2D (0.2 mg), 2E (0.1 mg), 2F (2.0 mg), 2G (0.9 mg), 2H (9.8 mg), 2I (0.6 mg)を得た。

Fr.1Cの精製

MeOH/CHCl₃=1/1 を溶出溶媒に用いたSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (10φ×550 mm)により精製を行い, Fr.3A (24.3 mg), 3B (29.8 mg), 3C (1.1 mg), 3D (1.1 mg)を得た。

Fr.3Bの精製

MeOH/CHCl₃=98/2 を溶出溶媒に用いたODS カラムクロマトグラフィー (10φ×230 mm)により精製を行い, Fr.4A (10.2 mg), 4B (2.8 mg), 4C (3.6 mg), 4D (2.4 mg), 4E (9.0 mg)を得た。

Fr.2Fの精製

メタノールを溶出溶媒に用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (7φ×290 mm)により精製を行い, Fr.5A (0.4 mg), 5B (0.6 mg), 5C (1.6 mg), 5D (0.6 mg)を得た。

Fr.1Hの精製

Fr.1HをMeOH/H₂Oを溶出溶媒に用いたODS カラムクロマトグラフィー (10φ × 230 mm)により精製を行い,Fr.6A (<0.1 mg),6B (2.1 mg),6C (2.5 mg),6D (1.1 mg),6E (10.8 mg)を得た.

第 8 章に関する実験

菌体のかきとりならびに各エキスの作成は,当研究室の研究補助員である大須賀淳美氏に行って頂いた.

DMSOエキスの作成

Stemonitis axifera (04-33, 山本先生番号 26353-26355)の菌体 (7.8 g)を DMSO 150 mL につけて終夜暗所にて室温静置を行った.その後,10 分間ホモジナイズを行い,静置し,上澄をろ紙でろ過した.残渣に DMSO 150 mL を加え,10 分間ホモジナイズを行いもう 1 回抽出を行った(終夜静置は省略).静置し,上澄をろ紙でろ過した.DMSO 上澄液を併せ,凍結乾燥を行い,DMSO エクス 910.9 mg を得た.

アルカリエキスの作成

DMSO エキスの作成に引き続き,残渣に 10 %KOH 水溶液 150 mL を加え,10 分間ホモジナイズを行った.その後静置し,上澄をろ過し,残渣に MeOH 150 mL を加えて 10 分間ホモジナイズを行い,静置後,上澄みをろ過した.上記の上澄液(10%KOH および MeOH)を併せ,この KOH-MeOH 溶液を CHCl₃ 150 mL で 3 回抽出し,アルカリエキス (101.5 mg)を得た.

酸性エキスの作成

アルカリエキスの作成に引き続き,水層をHClで中和し,pHを酸性側にした.この酸性溶液をCHCl₃ 150 mLで 3 回抽出し,酸性エキス 34.1 mgを得た.

アルカリエキスの分画

アルカリエキス 101.5 mgを,溶出溶媒にCHCl₃/MeOH=2/3 を用いたSephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ × 570 mm)により精製を行い,Fr.1A (2.4 mg),Fr.1B (9.6 mg),Fr.1C (32.7 mg),Fr.1D (36.1 mg),Fr.1E (7.3 mg)を得た.

アルカリエキスFr.1Bの精製

Fr.1BをCHCl₃/MeOHで再結晶を行い，母液 4.8 mgと結晶 3.2 mgを得た．本結晶はMeOHに不溶であった．

DMSOエキスの分画

DMSOエキス 910.9 mgのうち 856.2 mgを，DMSO 10mLで溶解し，メタノール/水系溶媒を用いたODSカラムクロマトグラフィー (25φ×180 mm)で分画を行い，MeOH/H₂O=0/1 溶出画分Fr.1A (168.4 mg)，Fr.1B (512.8 mg)，MeOH/H₂O=3/7 溶出画分Fr.1C (41.2 mg)，Fr.1D (14.8 mg)，MeOH/H₂O=7/3 溶出画分Fr.1E (32.6 mg)，MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.1F (62.8 mg)，Fr.1G (26.2 mg)，CHCl₃溶出画分Fr.1H (54.1 mg)を得た．Fr.1B，1D，1Eに主に茶色色素が見られた．エバポレーターで溶媒がとばないものは，凍結乾燥を一晩行った．

Fr.1Eの分画

Fr.1Eを，溶出液にメタノール/水=4/1の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×570 mm)により精製を行い，Fr.2A (<0.1 mg)，Fr.2B (2.1 mg)，Fr.2C (2.2 mg)，Fr.2D (1.4 mg)，Fr.2E (1.9 mg)，Fr.2F (5.8 mg)，Fr.2G (2.9 mg) Fr.2H (4.1 mg)，Fr.2I (2.0 mg)を得た．

Fr.2Hの分画

Fr.2Hを，分取HPLC (カラム：Develosil C30-UG-5，8φ×250 mm，溶離液：40 %CH₃CN，UV検出：230 nm)により精製を行い，Fr.3AおよびFr.3B (0.2 mg)を得た．

Fr.1Dの分画

Fr.1D 14.8 mgのうち 6.9mgを，分取HPLC (カラム：RPAQUEOUS AR-5，10φ×250 mm，溶離液：10%CH₃CN，UV検出：254 nm)により精製を行い，Fr.4A (0.3 mg)，4B (0.6 mg)を得た．なお，Fr.4Bは¹H NMRからinosineであった．

Fr.1Cの分画

Fr.1Cを分取HPLC (カラム：RPAQUEOUS AR-5，10φ×250 mm，溶離液：5%CH₃CN，UV検出：254 nm)により精製を行い，Fr.5A (0.6 mg)，5B (0.6 mg)を得た．これらは，¹H NMRより核酸化合物であると推定した．

酸性エキスの分画

酸性画分 34.1 mgを,分取HPLC (カラム: Develosil C₃₀-UG-5, 10φ × 250 mm, 溶離液: 25%CH₃CN, UV検出: 280 nm)により精製を行い, Fr.1A (1.0 mg), 1B (0.4 mg)を得た. Fr.1Aを化合物 16, Fr.1Bを化合物 17 とした.

単離した化合物の物理化学的性状

化合物 14

colorless amorphous powder

EIMS m/z 168 [M⁺]

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 7.55 (br.s, 1H), 7.53 (dd, $J=8.2, 1.2$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=8.2$ Hz, 1H), 3.88 (OMe, 3H)

化合物 15

colorless amorphous powder

EIMS m/z 151 [M-CHO]⁺

¹H NMR (CD₃OD, 400 MHz): 9.74 (s, 1H), 7.44 (br.s, 1H), 7.42 (dd, $J=8.6, 2.0$ Hz, 1H), 6.82 (d, $J=8.6$ Hz, 1H), 3.91 (OMe, 3H)

第 9 章に関する実験

Stemonitis fusca var. *rufescence* 野外採取子実体の抽出条件検討

菌体のかきとりは, 当研究室の研究補助員である大須賀淳美氏に行って頂いた. 抽出条件の検討については, 本論を参照のこと.

エキスの作成および粗分け (小スケール)

本論Table 9-1 の 示したように, *Stemonitis fusca* var. *rufescence* 野外採取子実体 (279.2 mg)を, 2N KOHでpH11 に調整した 50 %EtOH (50 mL)で抽出を行った. その後, この抽出液に 2N HClを加えpHを 7 に調整し, エバポレーターでEtOHを除去した. その際, 溶液が泡立ってくるので, 大きめのナス型フラスコを使い, 少量ずつ濃縮を行った. 濃縮した溶液を, メタノール/水系溶媒を用いたDIAION HP-20 カラムクロマトグラフィー (25φ × 65 mm)で精製を行い, MeOH/H₂O=0/1 溶出画分Fr.S-1A (brown, 100 mL分取), MeOH/H₂O=1/1 溶出画分Fr.S-1B (24.8 mg, 100 mL分取), Fr.S-1C (colorless, 100 mL分取)を得た. 色素が見られたFr.S-1Bについてさらに精製を行った.

Fr.S-1Bの分画

Fr.S-1B を、溶出液にメタノール/水=4/1 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (15φ×570 mm)により精製を行い、Fr.S-2A (0.2 mg)、Fr.L-2B (48.5 mg)、Fr.S-2C (2.5 mg)、Fr.S-2D (1.5 mg)、Fr.S-2E (1.9 mg)、Fr.S-2F (4.6 mg)を得た。

エキスの作成および粗分け (大スケール)

Stemonitis fusca var. *rufescence* 野外採取子実体の菌体 (5.3 g)を、2N KOHで pH11 に調整した 50 %MeOH (200 mL)で 3 回抽出を行った。その後、この抽出液に 2N HClを加えpHを 7 に調整し、エバポレーターでMeOHを除去し、溶液がおよそ 150 mLになるまで濃縮した。濃縮した溶液を、メタノール/水系溶媒を用いたDIAION HP-20 カラムクロマトグラフィー (40φ×230 mm)で精製を行い、MeOH/H₂O=0/1 溶出画分Fr.L-1A (647.3 mg、250 mL分取)、MeOH/H₂O=1/1 溶出画分Fr.L-1B (79.4 mg、150 mL分取)、Fr.L-1C (58.0 mg、150 mL分取)、Fr.L-1D (94.8 mg、100 mL分取)、MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.L-1E (94.8 mg、300 mL分取)、Fr.L-1F (64.4 mg、200 mL分取)を得た。各フラクションの色は、Fr.L-1A (pale brown)、Fr.L-1B (pale brown)、Fr.L-1C (pale brown)、Fr.L-1D (brown red)、Fr.L-1E (pale purple)、Fr.L-1F (pale green yellow)であった。最も色が濃く見られたFr.L-1D についてさらに精製を行った。

Fr.L-1Dの分画

Fr.L-1D を、溶出液にメタノール/水=6/4 の溶媒を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ×610 mm)により精製を行い、Fr.L-2A (0.7 mg)、Fr.L-2B (48.5 mg)、Fr.L-2C (16.6 mg)、Fr.L-2D (4.1 mg)、Fr.L-2E (2.5 mg)、Fr.L-2F (2.8 mg)、Fr.L-2G (1.2 mg) Fr.L-2H (4.2 mg)を得た。

第 10 章に関する実験

抽出操作

菌体のかきとりおよび抽出は，当研究室の中谷さと美氏により行われた．*Ceratiomyxa fruticulosa* var. *flexuosa* 野外採取子実体 (03-22 株，山本先生番号 24656-24657) を 90 %メタノールおよび 90 %アセトンで抽出を行い，172.8 mg の粗抽出物を得た．

粗抽出物の分画

粗抽出物 172.8 mg のうち 146.2 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25φ × 185 mm，PSQ100B) に負荷し，*n*-Hexane/EtOAc の溶媒系を用い，EtOAc の割合を段階的に上げて溶出させ *n*-Hexane/EtOAc=1/0 溶出画分 Fr.1A (0.7 mg)，*n*-Hexane/EtOAc=9/1 溶出画分 Fr.1B (6.7 mg) *n*-Hexane/EtOAc=8/2 溶出画分 Fr.1C (12.1 mg)，*n*-Hexane/EtOAc=7/3 溶出画分 Fr.1D (5.2 mg)，*n*-Hexane/EtOAc=1/1 溶出画分 Fr.1E (6.7 mg)，*n*-Hexane/EtOAc=0/1 溶出画分 Fr.1F (4.1 mg)，EtOAc/Acetone=1/1 溶出画分 Fr.1G (7.9 mg)，Acetone 溶出画分 Fr.1H (7.6 mg)，Acetone/MeOH=1/1 溶出画分 Fr.1I (61.5 mg)，MeOH 溶出画分 Fr.1J (23.2 mg) を得た．

Fr.1Cの精製

Fr.1C を，溶出溶媒に CHCl₃/MeOH=1/1 を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (15φ × 700 mm) により精製を行い，Fr.2A (3.2 mg)，Fr.2B (6.8 mg)，Fr.2C (1.5 mg)，Fr.2D (0.1 mg)，Fr.2E (0.4 mg) を得た．Fr.2B を化合物 15 とした．

Fr.1Eの精製

Fr.1E を ODS HPLC (カラム：Develosil C-30 UG-5，10 × 250 mm，溶離液：85%MeOH，UV 検出：254 nm，流速 2.0 ml/min) により精製を行い，Fr.3A (0.7 mg)，Fr.3B (0.1 mg)，Fr.3C (no peak and wash) を得た．

Fr.1Hの精製

Fr.1H を，溶出溶媒にメタノールを用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (15φ × 610 mm) により精製を行い，Fr.4A (1.3 mg)，Fr.4B (0.7 mg)，Fr.4C (0.7 mg)，Fr.4D (<0.1 mg)，Fr.4E (0.1 mg)，Fr.4F (0.5 mg)，Fr.4G (<0.1 mg) を得た．

化合物 16

White powder

EIMS m/z 416 [M^+], 401, 398, 383, 290, 257, 248, 233, and 215

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) : δ_{H} 3.59 (1H, m), δ_{H} 2.33 (2H, t, $J=7.5$ Hz), δ_{H} 0.91 (3H, d, $J=6.5$ Hz), δ_{H} 0.86 (3H, t, $J=7.3$ Hz), δ_{H} 0.82 (3H, d, $J=7.0$ Hz), δ_{H} 0.81 (3H, d, $J=6.5$ Hz), δ_{H} 0.80 (3H, s), δ_{H} 0.64 (3H, s)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) : 本論Table 10-1 参照

第 11 章に関する実験

抽出操作

菌体のかきとりおよび抽出は,当研究室の直江綾乃氏により行われた *Fuligo aurea* 野外採取子実体 (01-93 株, 山本先生番号 36748) 0.62 g を 90 %メタノール (100 mL)に浸し, 10 分間ホモジナイズを行い, その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 4 , 4000rpm で 10 分間遠心を行った. 続いて 90 %メタノール (100 mL)および 90 %アセトン (100 mL)で同じ操作を繰り返し行うことにより抽出を行い, 180.0 mg の粗抽出物を得た.

粗抽出物の分画

粗抽出物 180.0 mgのうち 159.3 mgをメタノール/水系溶媒を用いたODSカラムクロマトグラフィー (17φ×190 mm)で精製を行い, MeOH/H₂O=0/1 溶出画分 Fr.1A (41.6 mg), MeOH/H₂O=4/1 溶出画分Fr.1D (4.6 mg), MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.1E (15.5 mg), 100 %CHCl₃溶出画分Fr.1F (63.0 mg)を得た.

Fr.1Aの分画

黄色色素の確認された Fr.1A をメタノール/水=4/1 を溶出溶媒に用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより精製を行い, Fr.2A (3.3 mg), Fr.2B (38.9 mg), Fr.2C (1.7 mg)を得た.

Fr.1Aの分画

黄色色素の確認された Fr.1C を ODS HPLC (カラム : Develosil ODS-UG-5 , 10φ × 250 mm , 溶離液 : 35 %MeOH , UV 検出 : 300 nm)により繰り返し精製を行い, Fr.3A (0.6 mg), Fr.3B (1.0 mg), Fr.3C (2.1 mg)を得た.

第 12 章に関する実験

抽出

Tubifera ferruginosa 野外採取子実体 (05-146 株, 山本先生番号 28254-28255) 24.7 g を 90 %メタノール (200 mL) に浸し, 10 分間ホモジナイズを行い, その後 30 分間超音波にかけて抽出を行い, 菌体の残渣が沈むまで静置し, 上澄をろ紙でろ過した. 次からはホモジナイズの操作は省いて抽出をさらに 2 回行った. 続いて, 90 %アセトンに浸し, 30 分間超音波にかけて抽出を行いこれを 3 回繰り返し, 3.88 g の粗抽出物を得た.

粗抽出物の分画

粗抽出物を, DIAION HP-20 カラムクロマトグラフィー (40φ × 260 mm) で分画を行い, MeOH/H₂O=2/8 溶出画分 Fr.1A (3.4 g), Fr.1B (751.7 mg), Fr.1C (1.83 g), MeOH/H₂O=1/1 溶出画分 Fr.1D (66.0 mg), MeOH/H₂O=8/2 溶出画分 Fr.1E (22.7 mg), Fr.1F (28.6 mg), MeOH/H₂O=1/0 溶出画分 Fr.1G (62.6 mg), Fr.1H (124.4 mg), 100 %Acetone 溶出画分 Fr.1I (163.4 mg), Fr.1J (370.0 mg), Fr.1K を得た.

Fr.1J の精製

Fr.1J (370.0 mg) のうち 353.4 mg を, 溶出液に CHCl₃/MeOH=1/1 を用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (20φ × 610 mm) により精製を行い, Fr.2A (3.1 mg), Fr.2B (2.6 mg), Fr.2C (130.1 mg), Fr.2D (94.3 mg), Fr.2E (76.7 mg), Fr.2F (12.6 mg), Fr.2G (5.6 mg), Fr.2H (0.6 mg) を得た.

Fr.2F の精製

Fr.2F を, ODS HPLC (カラム: Mightysil, 10φ × 250 mm, 溶離液: 80-100% MeOH (0-20min), 100 % MeOH (20-35 min), Photodiode array 検出) により精製を行い, Fr.3A (0.4 mg), Fr.3B (2.0 mg), Fr.3C (6.9 mg) を得た.

Fr.2E の精製

Fr.2E の MeOH 可溶部を Fr.4A (54.3 mg), MeOH 不溶部を Fr.4B (14.4 mg) とした.

Fr.4A の精製

n-Hexane/CHCl₃ を溶媒に用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (15φ × 240 mm, Silica gel 60N) で精製を行い, *n*-Hexane/CHCl₃=1/0, 4/1 溶出画分 Fr.5A

(1.8 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=4/1 溶出画分Fr.5B (1.1 mg), Fr.5C (0.5 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=1/1 溶出画分Fr.5D (0.9 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=1/1, 0/1 溶出画分Fr.5E (13.4 mg) *n*-Hexane/CHCl₃=0/1 溶出画分Fr.5F (0.5 mg) *n*-Hexane/CHCl₃= 0/1, EtOAc溶出画分Fr.5G (16.3 mg), EtOAc溶出画分Fr.5H (4.1 mg), Fr.5I (0.7 mg), Acetone溶出画分Fr.5J (0.9 mg)を得た.

Fr.2Cの精製

Fr.2Cを*n*-Hexane/CHCl₃を溶媒に用いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (25φ×270 mm, Silica gel 60N)で精製を行い, *n*-Hexane/CHCl₃=1/0, 7/3, 85/15 溶出画分Fr.6A (1.1 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=7/3 溶出画分Fr.6B (0.2 mg), Fr.6C (2.0 mg), Fr.6D (0.2 mg), Fr.6E (5.8 mg), Fr.6F (<0.1 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=7/3, 1/1 溶出画分Fr.6G (0.9 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=1/1 溶出画分Fr.6H (0.2 mg), Fr.6I (12.0 mg), Fr.6J (1.5 mg), *n*-Hexane/CHCl₃=1/1, 0/1 溶出画分Fr.6K (55.9 mg)得た. Fr.6Cを化合物 17, Fr.6Cを化合物 18 とした.

Fr.1G, 1Hおよび 1Iの精製

Fr.1G, 1Hおよび 1Iをメタノール/水系溶媒を用いたODSカラムクロマトグラフィー (25φ×125 mm)で精製を行い, MeOH/H₂O=6/4 溶出画分Fr.7A (1.8 mg), MeOH/H₂O=6/4, 7/3 溶出画分Fr.7B (8.9 mg), MeOH/H₂O=7/3 溶出画分Fr.7C (5.7 mg), Fr.7D (3.7 mg), MeOH/H₂O=8/2 溶出画分Fr.7E (15.0 mg), Fr.7F (5.9 mg), MeOH/H₂O=9/1 溶出画分Fr.7G (20.6 mg), Fr.7H (121.1 mg), MeOH/H₂O=1/0 溶出画分Fr.7I (46.4 mg), CHCl₃/MeOH=1/1 溶出画分Fr.7J (51.2 mg)を得た.

Fr.5Hの精製

Fr.5HをODS HPLC (カラム: Mightysil, 10φ×250 mm, 溶離液: 95 %CH₃CN, Photodiode array検出)により精製を行い, Fr.9A (0.9 mg), Fr.9B (no peak and wash)を得た.

Fr.8Eの精製

Fr.7EをODS HPLC (カラム: Mightysil, 10φ×250 mm, 溶離液: 60 %CH₃CN, UV検出: 230 nm)により精製を行い, 化合物 16 (1.0 mg)を得た.

単離した化合物の物理化学的性状

化合物 17

colorless amorphous powder

FABMS m/z 674 [M^+]

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) : (リノール酸部分) δ_{H} 5.30-5.40 (4H, m), δ_{H} 2.77 (2H, t, $J=6.6$ Hz), δ_{H} 2.26 (2H, t, $J=7.5$ Hz), δ_{H} 0.89 (3H, t, $J=6.9$ Hz)

(ステロール部分) δ_{H} 5.16 (1H, dd, $J=15.0, 8.4$ Hz), δ_{H} 5.14 (1H, t, $J=3.9$ Hz), δ_{H} 5.03 (1H, dd, $J=15.0, 8.4$ Hz), δ_{H} 4.70 (1H, m), δ_{H} 1.03 (3H, d, $J=6.6$ Hz), δ_{H} 0.84 (3H, d, $J=6.0$ Hz), δ_{H} 0.81 (3H, t, $J=7.5$ Hz), δ_{H} 0.81 (3H, s), δ_{H} 0.79 (3H, d, $J=6.0$ Hz), δ_{H} 0.66 (3H, s)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) : (リノール酸部分) δ_{C} 173.5 , 130.2 , 130.1 , 128.0 , 127.9 , 34.2 , 31.5 , 29.6 , 29.5 , 29.3 , 29.2 , 29.10 , 29.08 , 27.2 , 25.6 , 25.1 , 22.6 , 14.1 (ステロール部分) δ_{C} 139.5 , 138.1 , 129.5 , 117.3 , 73.2 , 55.8 , 55.1 , 51.2 , 49.3 , 43.2 , 40.8 , 40.1 , 39.4 , 36.8 , 34.7 , 34.2 , 33.8 , 31.8 , 28.4 , 27.5 , 25.4 , 23.0 , 21.5 , 21.3 , 20.9 , 18.9 , 12.9 , 12.4 , 12.1

化合物 18

colorless amorphous powder

FABMS m/z 677 [$M+H$] $^+$

^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) : (リノール酸部分) δ_{H} 5.32-5.39 (4H, m), δ_{H} 2.76 (2H, t, $J=6.8$ Hz), δ_{H} 2.25 (2H, t, $J=7.6$ Hz), δ_{H} 0.89 (3H, t, $J=6.6$ Hz)

(ステロール部分) δ_{H} 5.15 (1H, dd, $J=15.2, 9.0$ Hz), δ_{H} 5.01 (1H, dd, $J=15.2, 8.7$ Hz), δ_{H} 4.70 (1H, m), δ_{H} 1.01 (3H, d, $J=6.6$ Hz), δ_{H} 0.84 (3H, d, $J=6.6$ Hz), δ_{H} 0.82 (3H, t, $J=6.0$ Hz), δ_{H} 0.82 (3H, s), δ_{H} 0.79 (3H, d, $J=6.6$ Hz), δ_{H} 0.66 (3H, s)

^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz) : (リノール酸部分) δ_{C} 173.5 , 130.2 , 130.1 , 128.0 , 127.9 , 34.1 , 31.5 , 29.7 , 29.6 , 29.3 , 29.2 , 29.10 , 29.08 , 27.2 , 25.6 , 25.1 , 22.6 , 14.1 (ステロール部分) δ_{C} 138.3 , 129.2 , 73.5 , 56.5 , 56.0 , 54.2 , 51.2 , 44.7 , 42.5 , 40.5 , 39.9 , 36.8 , 35.5 , 34.8 , 34.1 , 32.0 , 31.8 , 28.8 , 28.6 , 27.5 , 25.4 , 24.3 , 21.2 , 21.1 , 20.9 , 18.9 , 12.4 , 12.25 , 12.22

リノール酸部分の ^1H , ^{13}C NMRスペクトルの化学シフト値はRef.48 を参考にした .

参考文献

- 1) 田中治, 野副重男, 相見則郎, 永井正博 編 天然物化学 改定第 6 版; 南江堂, **2003**; 124-125, 390-392.
- 2) Harvey A. *Drug Discovery Today* **2003**, *5*, 294-300 .
- 3) 日本農芸化学会 2003 年度大会講演要旨集, **2003**; 401.
- 4) Kakeya H.; Onose R.; Koshino H.; Yoshida A.; Kobayashi K.; Kageyama S. I.; Osada H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 3496.
- 5) Takeda K.; Uehara T.; Nakao Y.; Matsunaga S.; Van Soest, R. W. M.; Fusetani N. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 187-193.
- 6) Teruya T.; Nakagawa S.; Koyama T.; Suenaga K.; Kita M.; Uemura D. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, *44*, 5171-5173.
- 7) Gerth K.; Bedorf N.; Höfle G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. *Journal of Antibiotics*, **1996**, *49*, 560-563.
- 8) Kikuchi H.; Saito Y.; Sekiya J.; Okano Y.; Saito M.; Nakahata N.; Kubohara Y.; Oshima Y. *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 8854-8858.
- 9) (a) Steglich W. *Pure Appl. Chem.*, **1989**, *61*, 281-288. (b) Hashimoto T.; Yasuda A.; Akazawa K.; Takaoka, S.; Tori, M.; Asakawa, Y. *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 2559-2560.
- 10) 萩原博光・山本幸徳、日本变形菌類図鑑、平凡社 **1995**
- 11) (a) Steglich, W.; Steffan, B.; Kopanski, L.; Eclhardt, G. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1980**, *19*, 459-460. (b) L. Kopanski, G.-R. Li, H. Besl and W. Steglich, *Liebigs Ann. Chem.*, **1982**, 1722-1729.
- 12) (a) Murakami-Murofushi, K.; Shioda, M.; Kaji, K.; Yoshida S.; Murofushi, H. *J. Bio. Chem.*, **1992**, *267*, 21512-21517. (b) Eisenbarth, S.; Steffan, B. *Tetrahedron*, **2000**, *56*, 363-365. (c) A. Nowak and B. Steffan, *Liebigs Ann./Recueil*, **1997**, 1817-1821.
- 13) 三田村真奈 平成 10 年度卒業論文
- 14) Misono, Y.; Ito, A.; Matsumoto, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Ishibashi, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4479-4481
- 15) 御園夕佳 平成 14 年度修士論文
- 16) Ishibashi, M.; Iwasaki, T.; Imai, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Ito, A. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 108-110.
- 17) 岩崎知子 平成 12 年度修士論文
- 18) Ishibashi, M.; Mitamura, M.; Ito, A. *Nat. Med.*, **1999**, *53*, 316-318.

- 19) Ishikawa, Y.; Kono, Y.; Iwasaki, T.; Misono, Y.; Nakatani, S.; Ishibashi, M.; Ito, A.;
Matsumoto J. *Nat. Med.*, **2001**, *55*, 312.
- 20) 石川八重 平成 13 年度修士論文
- 21) Erdman, T. R. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 5163-5173.
- 22) Patterson, G. W. *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 3481-3483.
- 23) Bullock, E.; Dawson, G. J. *J. Lipid Res.*, **1976**, *17*, 565-571.
- 24) (a) Ishikawa, Y.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama K. *Chem. Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1126-1127. (b) Misono, Y.; Ishikawa, Y.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 999-1001.
- 25) Nakatani, S.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 368-370.
- 26) 中谷さと美 平成 15 年度修士論文
- 27) Naoe, A.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3433-3435.
- 28) 直江綾乃 平成 15 年度修士論文
- 29) Nakatani, S.; Naoe, A.; Yamamoto, Y.; Yamauchi, T.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2879-2881.
- 30) Iwata, D.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1611-1612.
- 31) 岩田大 平成 14 年度卒業論文
- 32) 清田真樹子 平成 15 年度卒業論文
- 33) Nowak, A.; Steffan, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1998**, *37*, 3139-3141.
- 34) Steffan, B.; Praemassing, M.; Steglich, W. *Tetrahedron Lett.*, **1987**, *28*, 3667-3670.
- 35) Misono, Y.; Ishibashi, M.; Ito, A. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 612-613.
- 36) Nakatani, S.; Kiyota M.; Matsumoto, J.; Ishibashi, M. *Biochem. Sys. Ecol.* **2005**, *33*, 323-325.
- 37) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 4902-4906.
- 38) <http://www.nivicol.de/physarum.htm>
- 39) Fabre, S.; Prudhomme, M. *Bioorg. Med. Chem.* **1993**, *1*, 197-207.
- 40) Pereira, R. E.; Belin, L.; Sancelme, M.; Prudhomme, M.; Ollier, M.; Rapp, M.; Sevère, D.; Riou, J.; Fabbro, D.; Meyer, T. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4471-4477.
- 41) Faul, M. M.; Winneroski, L. L.; Krumrich, C. A. *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6053-6058.
- 42) Velten, R.; Josten, I.; Steglich, W. *Liebigs Ann.* **1995**, 81-85.
- 43) 山本幸憲 図説 日本の変形菌 , **1998**
- 44) Casser, I.; Steffan, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, *26*,

- 586-587.
- 45) Řezanka, T. *J. Chromatogr.*, **1992**, 598, 219-226.
 - 46) Kusano, G.; Uchida, H.; Murakami, Y.; Sakurai, N.; Takemoto, T. *Yakugaku Zasshi*, **1976**, 96, 321-325.
 - 47) Jiang, Z.; Barret, M-O.; Boyd, K. G.; Adams, D. R.; Boyd, A. S. F.; Burgess, J. G. *Phytochemistry* **2002**, 60, 33-38.
 - 48) Pouchert, J.; Behnke, J. *The Aldrich library of ¹³C and ¹H FT NMR spectra Edition Volume* , 785.

謝辞

本研究を行うにあたり、始終変わらぬ御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院 薬学研究科 活性構造化学研究室 石橋正己教授に心より感謝の意を表します。

本研究を進めるに際し、多くの有益な御助言を頂きました藤本治宏助教授(現帝京平成大学教授)、奥山恵美助教授(現城西国際大学教授)に深く感謝申し上げます。

また、終始有益な御助言、御指導頂きました佐藤昌昭博士、大槻 崇博士に心より感謝申し上げます。

変形菌株の採取、同定に協力して頂き、数多くの変形菌株を提供して下さい、さらに、多くの御助言を頂きました 高知北高等学校 山本幸憲先生、福井総合植物園 松本 淳博士に深く感謝申し上げます。また、変形菌採取に際し、ご指導ご協力頂きました変形菌研究会の皆様にも深く感謝申し上げます。

多くの有益な御助言、御指導をいただき、変形菌株を提供してくださいました杏林製薬 伊藤 明博士に深く感謝申し上げます。

melleumin A (1)および tubiferal A (3)のNMRスペクトルを測定して下さいました理研 GSC 廣田 洋博士、大貫裕之博士に深く感謝申し上げます。

細胞毒性試験を行って頂きました北里研究所 小宮山寛機博士 林 正彦博士に深く感謝申し上げます。

ヒトがん細胞パネルによる抗がんスクリーニングを行なって頂いた文部科学省がん特定 総合スクリーニング委員会 矢守隆夫博士(癌研究会)に深謝いたします。

プロテインキナーゼ阻害活性試験を行なって頂いた国立感染症研究所 上原至雅博士に深く感謝申し上げます。

質量分析にあたりご指導賜りました千葉大学分析センター 原 律子氏に深く感謝申し上げます。

変形菌関連の実験において多大なるご協力を頂いた中谷さと美氏、直江綾乃氏、清田真樹子氏、細谷孝博氏、園田朋美氏、杉光則子氏、蟹和宏顕氏、加藤由衣氏、末次智子氏に深く感謝申し上げます。

FABMS及び高分解能FABMS測定を行なって頂いた當銘一文氏、浅井健士氏、大崎尚人氏、花澤修和氏に深く感謝申し上げますとともに、多大なるご協力を頂き、苦楽を共にした活性構造化学研究室の皆様にも感謝いたします。

最後に、9年間に及ぶ長い学生生活の中、いつも陰で支えてくださいました私の家族に深く感謝申し上げます。

主論文目録

本学位論文は内容は、下記の発表論文による。

1. Kamata, K.; Onuki, H.; Hirota, H.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Sato, M.; Ishibashi, M.
“Tubiferal A, a Backbone-Rearranged Triterpenoid Lactone Isolated from the Myxomycete *Tubifera dimorphotheca*, Possessing Reversal of Drug Resistance Activity.”
Tetrahedron, **60**, 9835-9839, 2004
2. Nakatani, S.; Kamata, K.; Sato, M.; Onuki, H.; Hirota, H.; Matsumoto, J.; Ishibashi, M. “Melleumin A, a Novel Peptide Lactone Isolated from the Cultured Myxomycete *Physarum melleum*”
Tetrahedron Letters, **46**, 267-271, 2005
3. Kamata, K.; Kiyota, M.; Naoe, A.; Nakatani, S.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Yamori, T.; Ishibashi, M.
“New Bisindole Alkaloids Isolated from Myxomycetes *Arcyria cinerea* and *Lycogala epidendrum*”
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **53**, 594-597, 2005

学位論文審査

本学論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授（薬学研究院） 薬学博士 高山 廣光

副査 千葉大学教授（薬学研究院） 薬学博士 石川 勉

副査 千葉大学教授（薬学研究院） 薬学博士 西田 篤司

審査をして頂き，貴重な御助言を賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。