

変形菌キフシススホコリ等の化学成分
に関する研究

2010年

新谷 彰教

目次

序論	3
第1章 成分研究の素材としての変形菌	6
第1節 変形菌について	6
第2章 野外採取子実体の成分研究 (1) : <i>Fuligo septica</i> f. <i>flava</i> (06-30)	9
第1節 <i>Fuligo septica</i> f. <i>flava</i> について	9
第2節 <i>Fuligo septica</i> f. <i>flava</i> の成分探索	10
第3節 Fuligoic acid (1)の構造解析	11
第4節 Dehydrofuligoic acid(2)の構造解析	24
第5節 小括	31
第3章 野外採取子実体の成分研究 (2) : <i>Cribraria meylanii</i> (07-76)	32
第1節 <i>Cribraria meylanii</i> について	32
第2節 <i>Cribraria meylanii</i> の成分探索	33
第3節 Cribrarione C の構造解析	33
第4節 Cribrarione C の生物活性	42
第5節 小括	43
第4章 野外採取子実体の成分研究 (3) : <i>Arcyria cinerea</i> (05-22)	44
第1節 <i>Arcyria cinerea</i> について	44
第2節 <i>Arcyria cinerea</i> の成分探索	45
第3節 化合物 6 の構造解析	46
第4節 小括	54
第5章 他の変形菌からの既知化合物の単離	55
第1節 既知化合物の単離	55
総括	57

実験の部	58
参考文献	65
謝辞	67
主論文目録	68
学位論文審査	69

序論

現在我々人間は、病気になると薬を使用して健康を取り戻そうとする。このような状況を我々は当然のように享受している。しかし我々がこの状況を享受できるようになったのは人類の歴史から見たらごく最近のことにすぎず、その意味で薬は人類が生み出した恩恵の一つであると言える。

その薬にはもともと天然に存在する植物、微生物、動物などに含まれる化学成分を基につくられたものが多く見られる。これらの化学成分と好ましい薬理効果を基にして、分子構造に改良を加えもとの化合物よりも有効で安全な合成化合物が数多く開発されてきた。例えば現在、わが国の臨床現場で使用されているインフルエンザ治療薬オセルタミビル(商品名タミフル)は、中国原産のシキミ科の常緑高木であるトウシキミの果実である八角から採取されるシキミ酸から合成される(Fig. 1)。

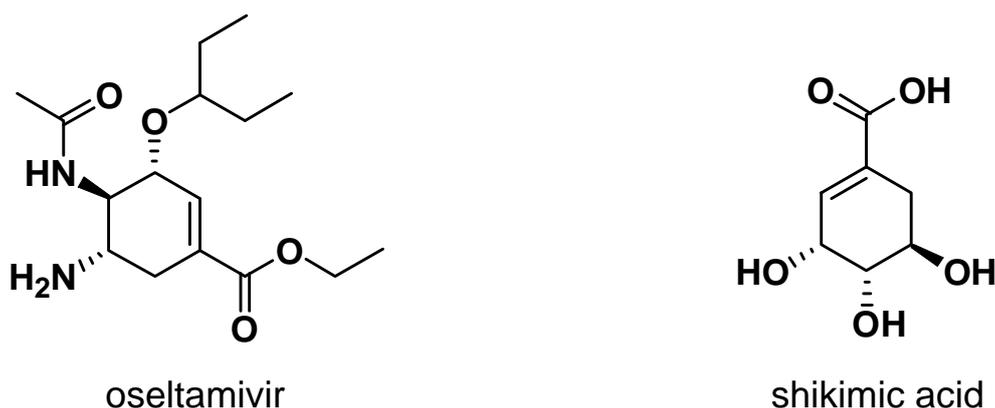
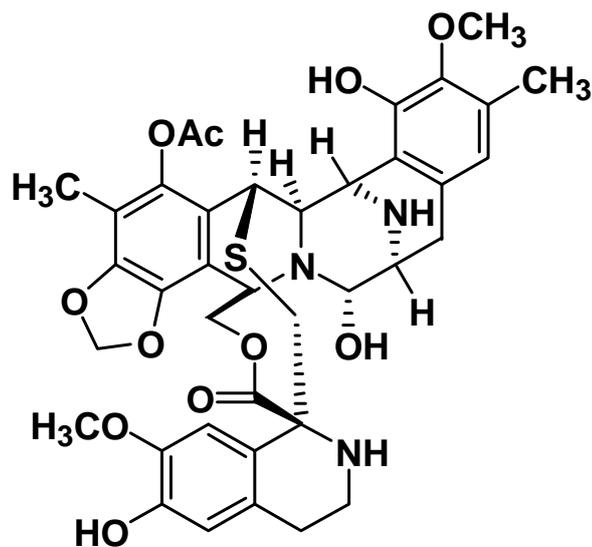


Fig.1 Structures of oseltamivir and shikimic acid

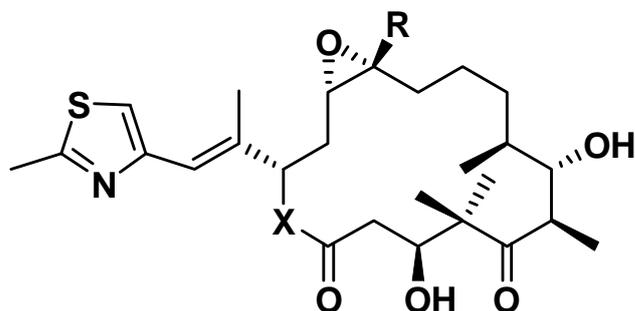
また海洋生物からはカリブ海産ホヤ *Ecteinascidia turbinata* よりテトラヒドロイソキノリンアルカロイドである、ecteinascidin (ET-743)が分離された(Fig.2)。本化合物は P388 白血病担癌マウスに対して延命効果が認められ、有望な抗腫瘍薬として期待されていた化合物である¹⁾。そして本化合物は 2007 年 9 月に欧州委員会から進行又は転移性軟部組織肉腫の治療薬として、スペインのファーママー社より商品名『ヨンデリス』として販売承認を受けた。2009 年 3 月 29 日大鵬薬品工業株式会社がファーママー社と『ヨンデリス』の開発販売のライセンス契約を締結し、日本での開発販売のライセンスを受けた。軟部肉腫は国内での発生頻度が 10 万に 2 人とされる稀な疾患で、既存の抗がん剤では予後不良で新しい薬剤の開発が待たれていた。



ecteinacidin (ET-743)

Fig. 2 Structure of ecteinacidin

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生物資源として粘液細菌や細胞性粘菌が挙げられる。しかし培養条件が徐々に確立されるに伴い、これらの生物から興味深い二次代謝産物が得られている。例えば、粘液細菌の一つであるセルロース分解性の土壌生息菌 *Sorangium cellulosum* から 16 員環マクロライド epothilone A,B が発見された²⁾。この化合物は微小管安定化作用機構と顕著な抗がん活性が見い出されていた。Epothilone B のラクトン構造をラクタムに変換して得られた ixabepilone が FDA により転移性乳がんに対する単剤治療薬として 2007 年 10 月に認可を受けた(Fig.3)。



epothilone A R = H, X = O
 epothilone B R = CH₃, X = O
 ixabepilone R = CH₃, X = NH

Fig. 3 Structures of epothilone A,B and ixabepilone

同様に培養が困難であり、化学的研究があまり進展していない生物資源として変形菌 (myxomycete) が挙げられる。変形菌は真性粘菌とも呼ばれ、最も下等な真核生物の一つとして位置付けられている。この生物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³⁾、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、その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探索の一環として、*Fuligo septica* f. *flava* (キフシススホコリ) を始めとする子実体の成分研究を行った。

第1章 成分研究の素材としての変形菌

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⁴⁾。

- 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、形を自由に變えることができ、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。

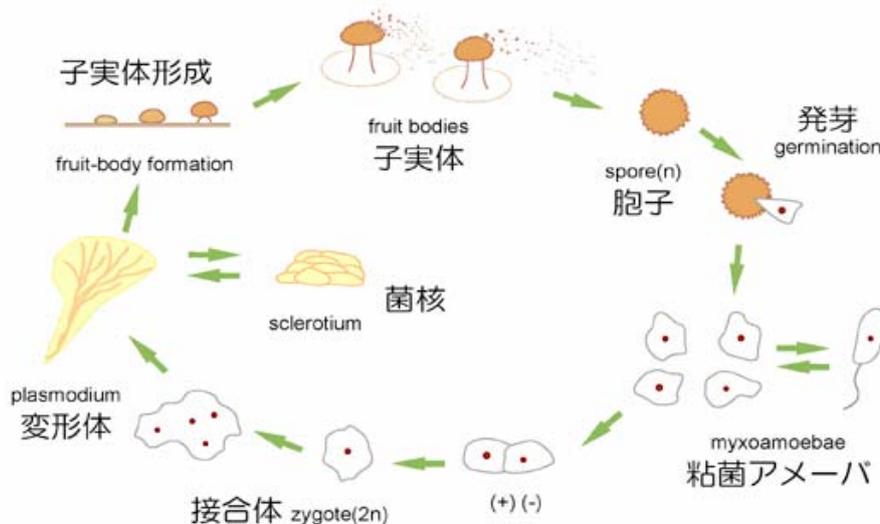


Fig.1-1 Lifecycle of a Myxomycete

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³⁾⁵⁾。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⁶⁾。変形菌から得られた化学成分の一例を以下に示す。

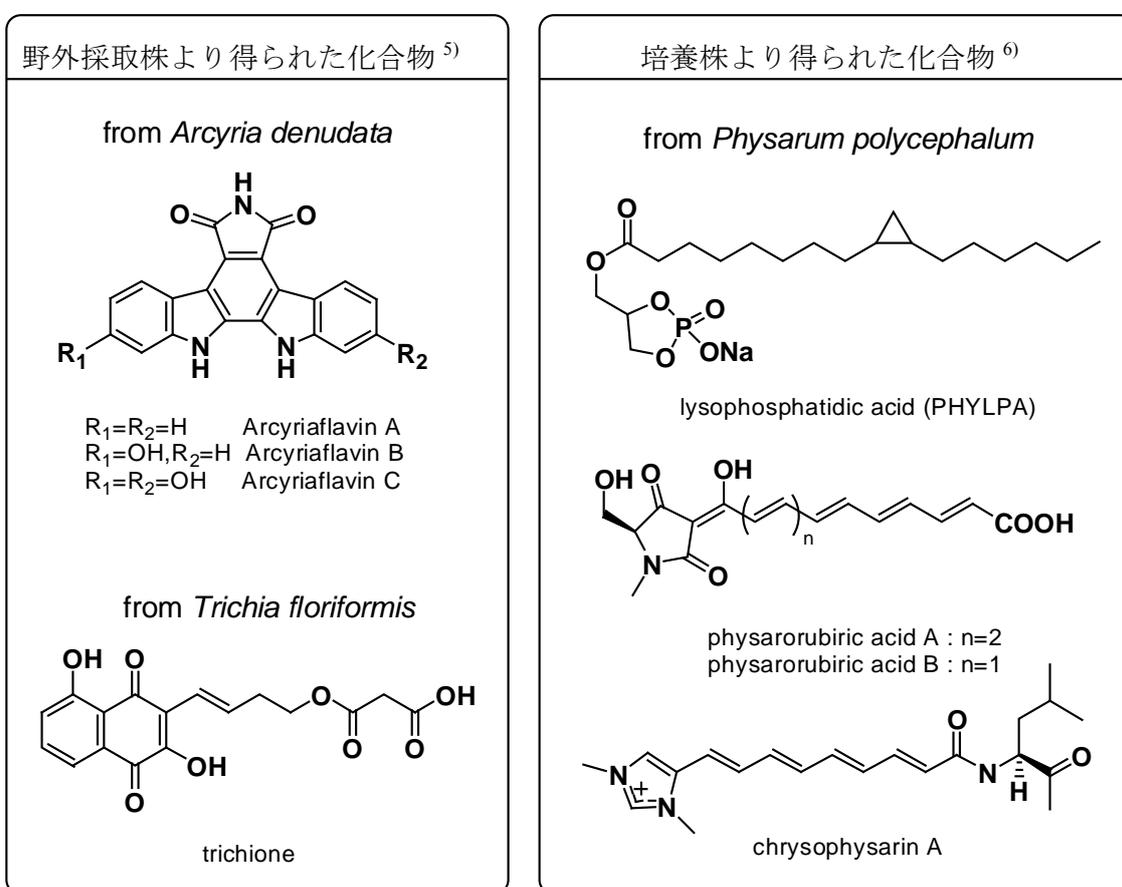


Fig. 1-2 Chemical components from myxomycetes

当研究室における変形菌の研究は1998年から開始され⁷⁾, 培養実験とともに、変形菌の化学成分の研究が進められてきた。寒天平板培養変形体の成分については、まず、色素成分として *Physarum rigidum* から黄色色素である physarigin A-C が単離され⁸⁾, また, *Didymium bahiense* から赤色色素である makaluvamine A,B がそれぞれ単離されている⁹⁾。色素以外の成分では, *Didymium squamulosum* の寒天平板上培養変形体から clionasterol が単離され^{7), 10)}, また, *Didymium minus* の寒天平板上培養変形体から clionasterol など, 数種のステロイドが単離された¹¹⁾。Clionasterol は以前に海綿¹²⁾ あるいは微細藻¹³⁾, また, 変形菌 *Physarum polycephalum*¹⁴⁾からの単離報告がある。

2001 年からは、野外採集株についても成分研究が行われ、*Lindbladia tublina* の子実体から数種の赤色色素が単離された¹⁵⁾。その他 *Fuligo candida*¹⁶⁾, *Cribraria purpurea*¹⁷⁾, *Arcyria ferruginea*¹⁸⁾, *Tubifera casparyi*¹⁸⁾, *Cribraria cancellata*¹⁹⁾, *Lycogala epidendrum*^{20), 21)}からもいくつかの化合物が単離されている。

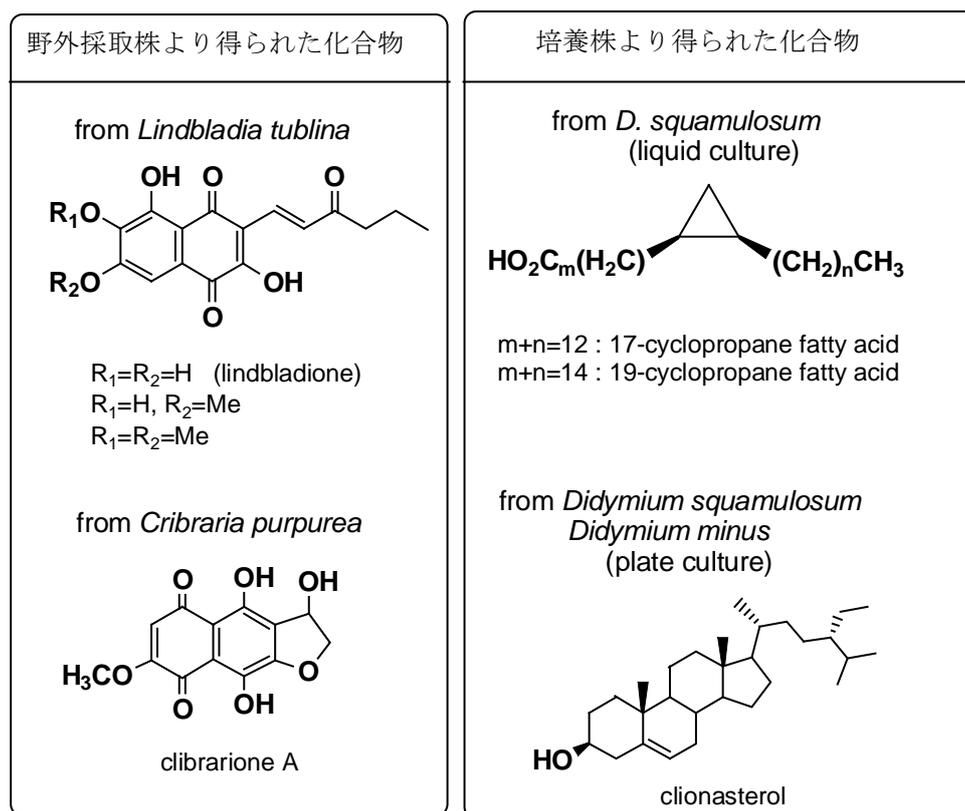


Fig.1-3 Bioactive natural products isolated from myxomycetes in our group

第2章 野外採取子実体の成分研究 (1)

Fuligo septica f. *flava* (06-30)

第1節 *Fuligo septica* f. *flava* について

Fuligo septica f. *flava* (キフシスホコリ)は、モジホコリ目モジホコリ科ススホコリ亜属に属する変形菌であり、春から秋、特に夏に腐木上に発生する。本種は *Fuligo septica* (ススホコリ)の変種である。石灰節は黄色で子嚢は基本種より濃い黄色を帯びる。本研究に用いた株は、2004年から2006年にかけて高知県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. 2-1 Wild fruit bodies of *Fuligo septica* f. *flava*

本菌の化学成分に関する報告例はこれまでにないが、本菌の類縁種である *Fuligo septica* について成分研究例があり、変形体から黄色色素である fuligorubin A が単離されている²²⁾。

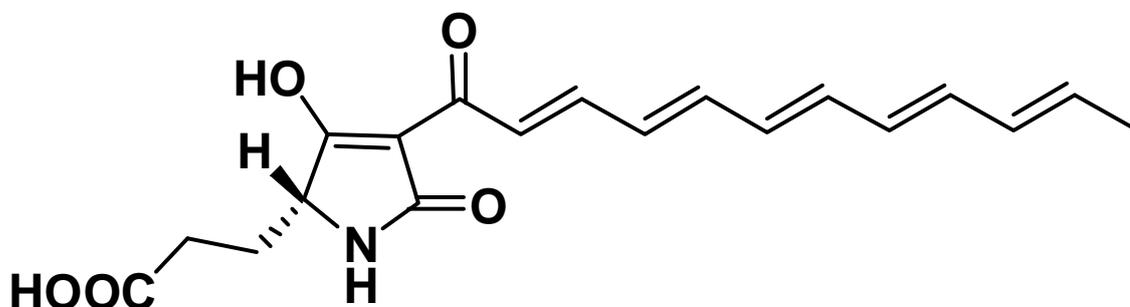


Fig. 2-2 Fuligorubin A from *Fuligo septica*

第2節 *Fuligo septica* f. *flava* の成分探索

Fuligo septica f. *flava* 野外採取子実体 (17.4 g) を MeOH およびアセトンで抽出し, 742.5 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い, フラクション(fr)1A-1L を得た. フラクション(fr)1B からフラクション(fr)1D に黄色のスポットが見られた. fr1B には ODS TLC (MeOH / H₂O = 2 : 1) で黄色のスポットの上にアニスアルデヒド試薬に陽性のスポットが確認された. このスポットを指標にして fr1B を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で精製を行い, fr4A-4E を得た. アニスアルデヒド試薬に陽性であった fr4A について, 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, **Fuligoic acid (1)** と命名した新規化合物を単離した. また黄色スポットの単離を目指して fr1C を LH 20 カラムにより精製を行い, fr2A-2D を得た. Fr2C を LH 20 カラムにより精製を行い, 黄色色素**(2)**を単離した.

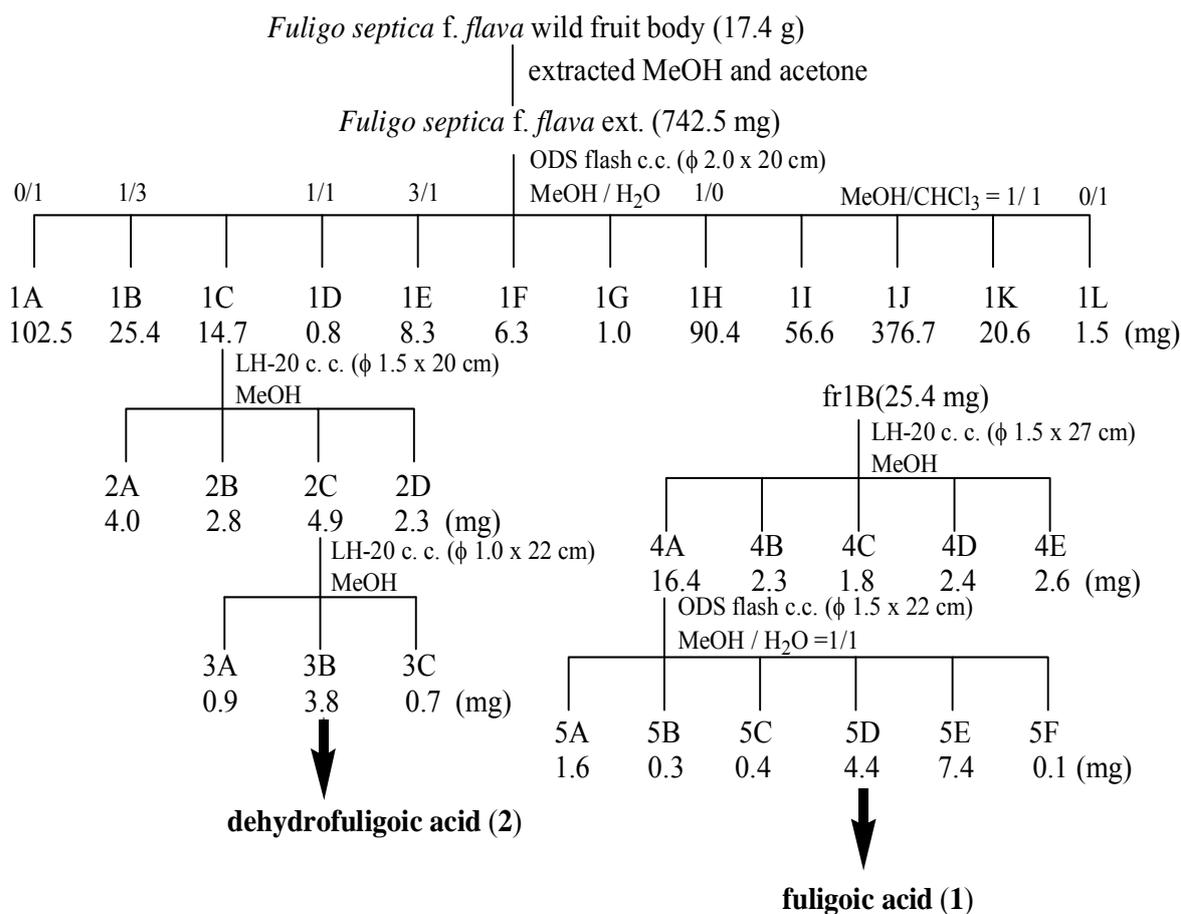


Fig.2-3 Isolation chart of *Fuligo septica* f. *flava*

第3節 Fuligoic acid (1)の構造解析

(1) Fuligoic acid (1) の構造解析

Fuligoic acid (1)は黄色固体として単離された。正イオン ESIMS スペクトルにおいて m/z 333 と同位体イオンピークである m/z 335 に $[M+Na]^+$ と推測されるシグナルが約 3 : 1 の比で観測された。また負イオン ESIMS スペクトルにおいて m/z 309 と同位体イオンピークである m/z 311 に $[M-H]^-$ と推測されるシグナルが約 3 : 1 の比で観測されたことから, fuligoic acid (1)は塩素原子を 1 つ含むことが示唆された。負イオン高分解能 ESI-MS スペクトルにおいて m/z 309.0556 $[M-H]^-$ (計算値 $C_{15}H_{15}O_5^{35}Cl$ 309.0530) に分子イオンピークが観測され, m/z 311.0521 $[M-H]^-$ (計算値 $C_{15}H_{15}O_5^{37}Cl$ 311.0500) に同位体イオンピークが観測されたので, その分子式を $C_{15}H_{15}O_5Cl$ と推定した。UV スペクトル(Fig. 2-16)において 340, 325, 233 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(Fig. 2-15)における 3385, 1680, 1620 cm^{-1} の吸収よりカルボキシ基及び共役カルボニル基の存在が示唆された。

また m/z 309 $[M-H]^- C_{15}H_{14}O_5^{35}Cl$ をプリカーサイオンとする MS/MS 測定を行った結果, m/z 273.0758 $[M-H-HCl]^-$ (計算値 $C_{15}H_{13}O_5^{35}Cl$ 273.0768), m/z 265.0634 $[M-H-CO_2]^-$ (計算値 $C_{14}H_{14}O_3^{35}Cl$ 265.0631), m/z 229.0878 $[M-H-CO_2-HCl]^-$ (計算値 $C_{14}H_{13}O_3$ 229.0865) に娘イオンが観測されたことから, カルボキシ基および塩素の存在が示唆された(Fig. 2-4)。同位体 ^{35}Cl を含む m/z 309 をプリカーサイオンとしたため, m/z 265 の娘イオン $[M-H-CO_2]^-$ イオンでは ^{37}Cl を含む m/z 267 は観測されなかった。また TMS ジアゾメタンを用いたメチル化によりメチルエステル (EIMS m/z 324 M^+) が生成したことからカルボキシ基の存在が示唆された。

重 DMSO を測定溶媒に用いた 1H NMR スペクトル (Fig. 2-10, Table 1) では δ_H 3.73 に一つのメトキシ基, δ_H 5.01 に一つの sp^3 メチン水素, δ_H 2.56, 2.60 に一つの sp^3 メチレン水素, 多数の sp^2 水素が観測された。 ^{13}C NMR (Fig. 2-11, Table 1) および DEPT スペクトルの解析により, 一つのエステルあるいはラクトンカルボニル炭素 (δ_C 166.1), 一つのカルボン酸部 (δ_C 163.4) を含む 12 個の sp^2 炭素, 一つのメトキシ基 (δ_C 56.5), 一つの sp^3 メチレン炭素 (δ_C 32.4), 一つの sp^3 メチン炭素 (δ_C 75.2) が観測された。

MS/MS: プリカーサ m/z 309.06 /- ベースピーク 265.06(227242)

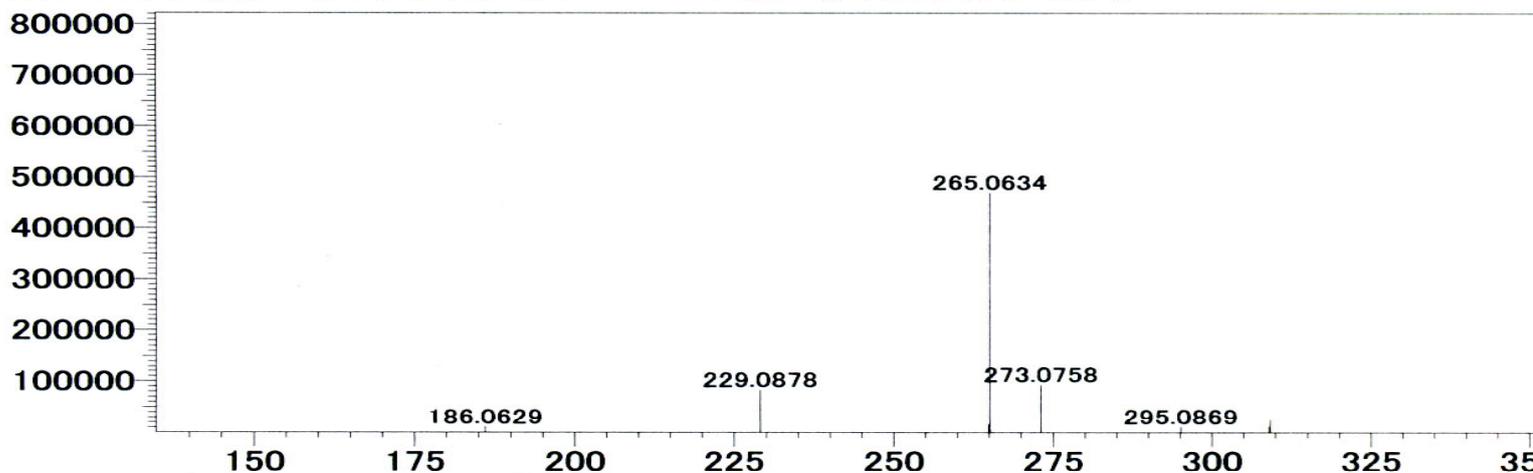


Fig. 2-4 ESI-MS/MS spectrum of fuligoic acid

^1H - ^1H COSY スペクトルの解析 (Fig. 2-8, 2-12) により, $\text{H}_2\text{-4}$ / H-5 / H-6 / H-7 , H-11 / H-12 の二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.2-8, 2-14) において H-2 / C-1 , H-2 / C-3 , H-2 / C-4 , $\text{H}_2\text{-4}$ / C-2 , $\text{H}_2\text{-4}$ / C-3 , H-5 / C-3 , H-5 / C-4 に相関が観測された. δ_{H} 2.56, 2.60 ppm のメチレンプロトン ($\text{H}_2\text{-4}$) と δ_{H} 5.01 ppm のメチン水素 (H-5) に COSY スペクトルの相関が観測され, δ_{H} 5.01, 5.19 ppm のメチンプロトンから δ_{C} 32.4, 172.9 ppm の炭素に HMBC 相関が観測され, メトキシプロトンから δ_{C} 172.9 ppm の炭素に HMBC 相関が観測されたことから, 部分構造 **A** (Fig. 2-5) を導いた. C-2 , C-3 のケミカルシフト値が 90.2, 172.9 ppm であることから両炭素は二重結合を形成していることが推測された.

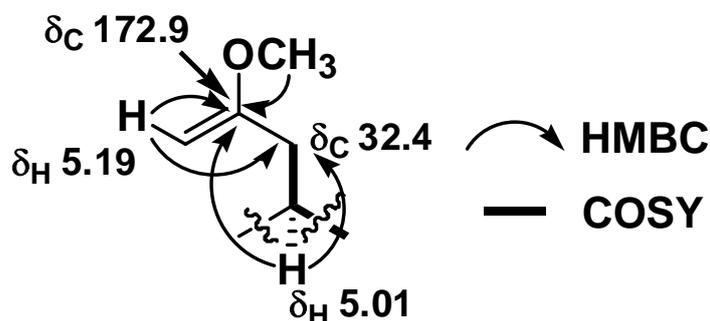


Fig. 2-5 Partial structure **A**

本化合物の分子式より, 不飽和度は 8 でありそれを考慮すると, ケミカルシフト値よりテトラエンの 4 つ, カルボニル 2 つ, 部分構造 **A** 中の 1 つの二重結合

の存在より、環が 1 つ存在することがわかった。また 5 つの酸素原子のうち、 OCH_3 、 COOH の存在がわかっているので残された酸素は 2 つとなる。 δ_c 172.9 ppm の炭素が低磁場シフトしていること、IR スペクトルにおいて二つのカルボニル基の存在が示唆されたので、 δ_c 172.9 ppm の炭素はカルボニル基の β 炭素であることが推測された。一方カルボニル炭素のケミカルシフト値は 166.1 ppm であることから、この炭素はエステルまたはラク톤のカルボニル炭素と推定した。ラクトン環を持つことは、隣接する炭素原子のケミカルシフト値が 75.2 ppm、および水素原子のケミカルシフト値が 5.01 ppm に低磁場シフトしていることからその存在が支持される。以上の考察より、本化合物の部分構造にはラクトン環の存在がわかった(Fig. 2-6)。

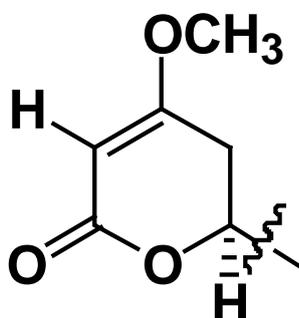


Fig. 2-6 Partial structure of fuligoic acid

類似した化合物として変形菌 *Ceratiomyca fruticulosa* より Ceratiopyron A が報告されており²³⁾、Ceratiopyron A でも同様に β 位炭素のシグナルは δ_c 171.2 ppm の低磁場領域に観測されている。

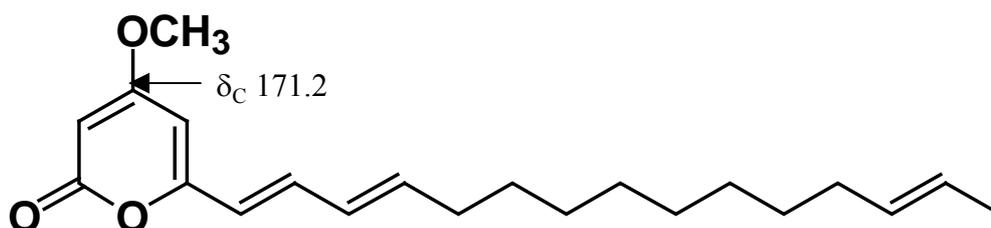


Fig. 2-7 Structure of Ceratiopyron A

以上の部分構造が存在することから、ジヒドロピロン環の存在が明らかとなった。ジヒドロピロン環とテトラエン部は $\text{H}_2\text{-4} / \text{H-5} / \text{H-6} / \text{H-7}$ の COSY 相関および 5 位水素から 6 位, 7 位炭素に HMBC 相関が観測されたことから (Fig. 2-8), ジヒドロピロン環とテトラエン部は 5 位で結合していることが判明した。また 13 位炭素が四級炭素であることから塩素はこの位置に結合していると考え、

fuligoic acid の構造を Fig. 2-9 に示す新規ポリエン型ピロン化合物であると推定した。また DMSO 溶媒中、H-6 および H-7 の結合定数が 14.3Hz であり、H-6 から H-8 に NOE 相関が観測されたことから 6 *E* 配置であると推定した。

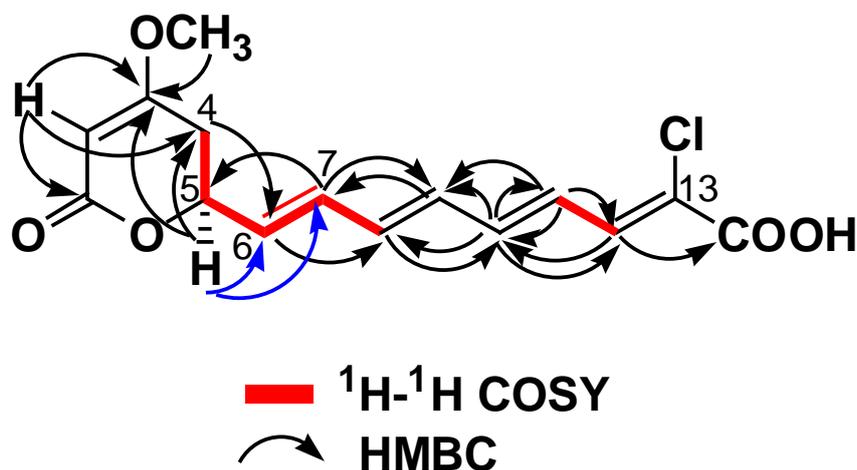


Fig. 2-8 $^1\text{H}-^1\text{H}$ COSY and HMBC correlations fuligoic acid

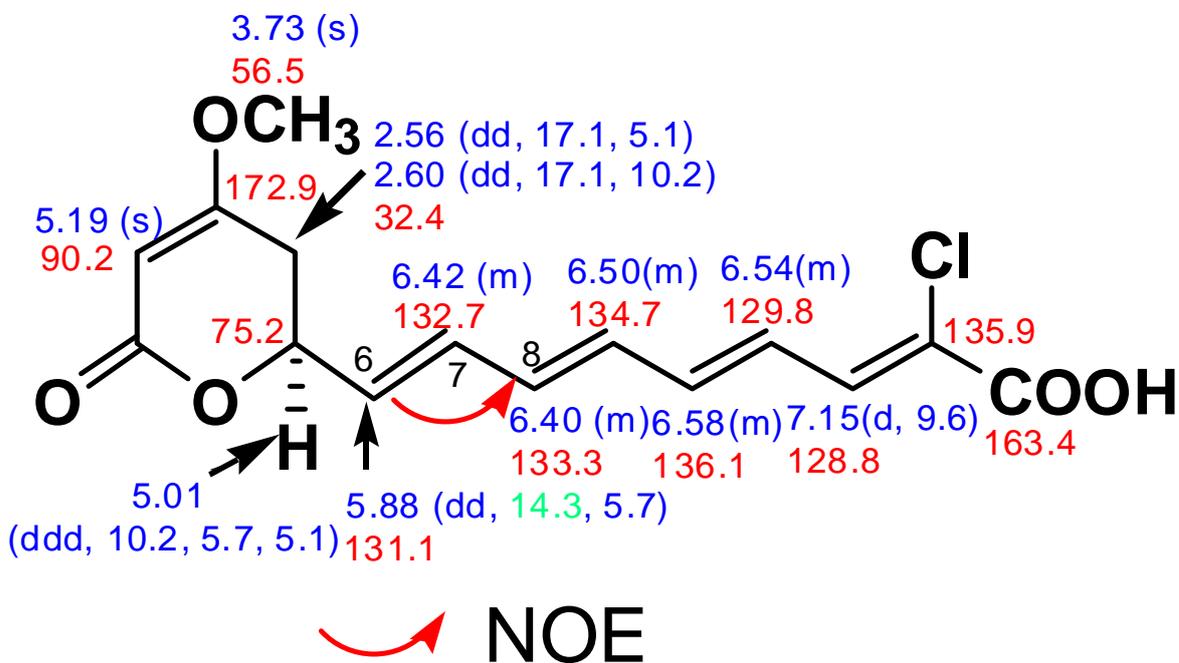


Fig. 2-9 Structure of fuligoic acid

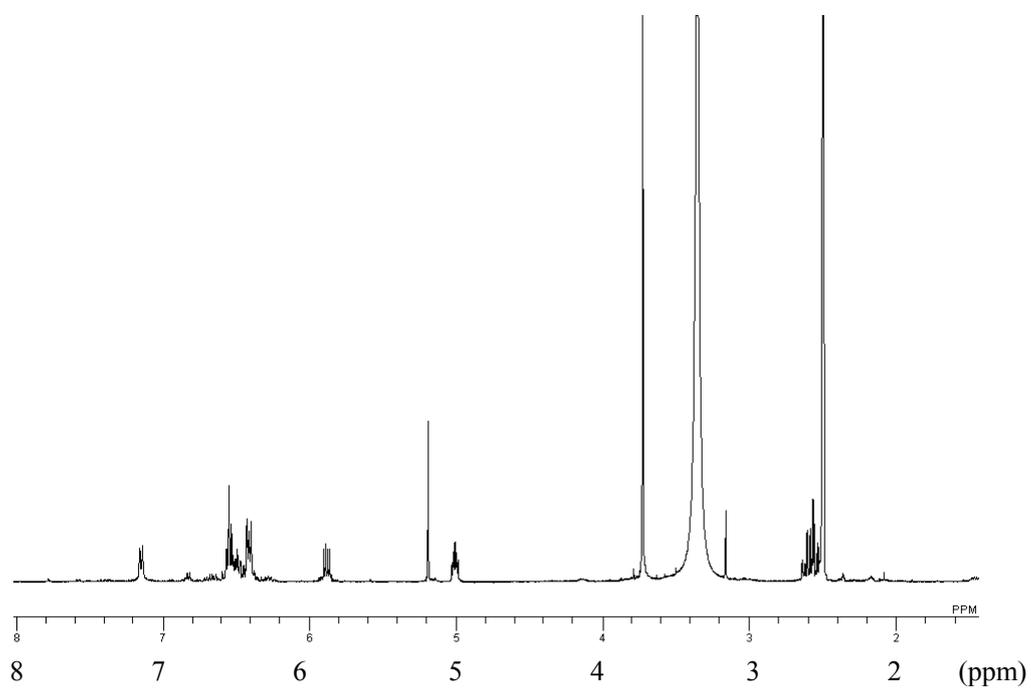


Fig. 2-10 ^1H NMR spectrum of fulgic acid in $\text{DMSO-}d_6$

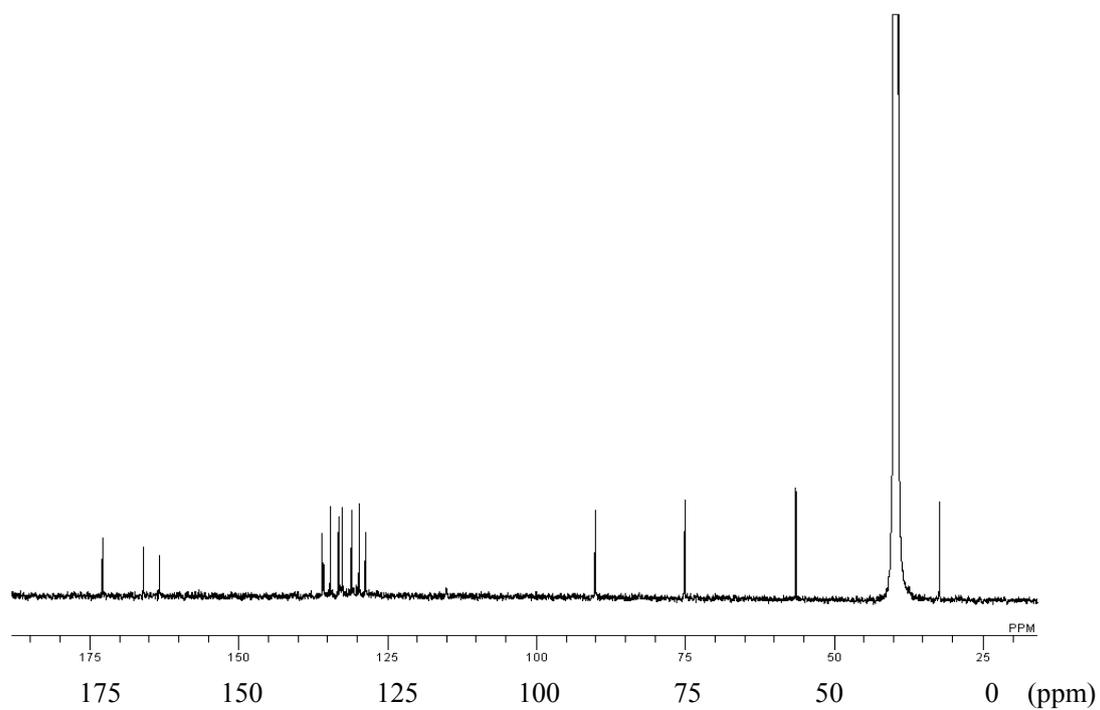


Fig. 2-11 ^{13}C NMR spectrum of fulgic acid in $\text{DMSO-}d_6$

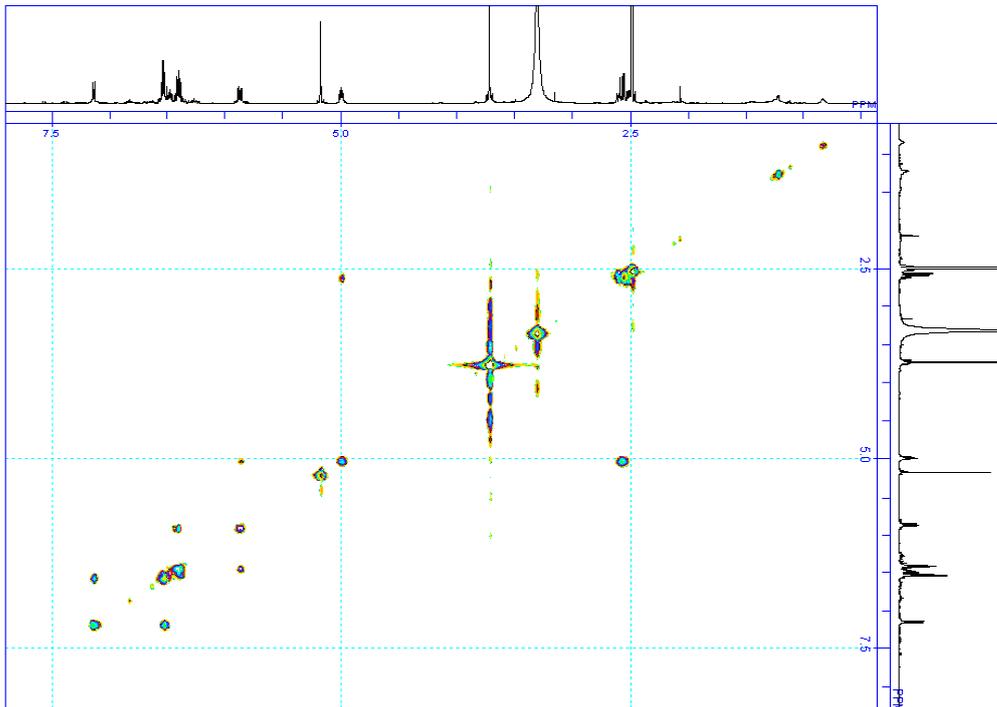


Fig. 2-12 ^1H - ^1H COSY spectrum of fuligoic acid in $\text{DMSO-}d_6$

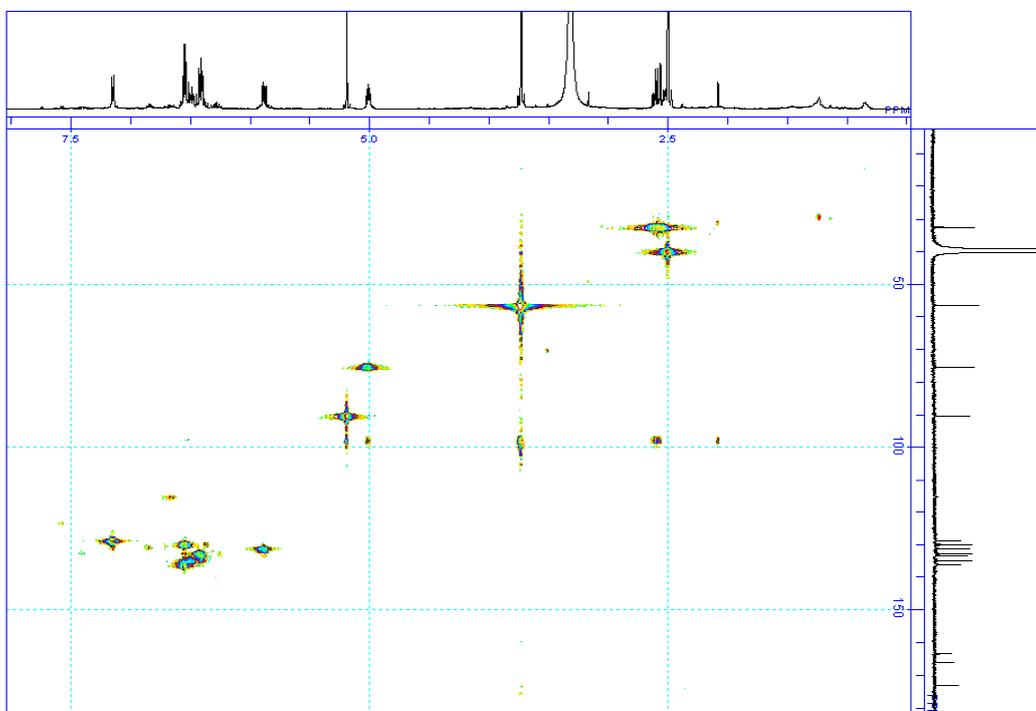


Fig. 2-13 HMQC spectrum of fuligoic acid in $\text{DMSO-}d_6$

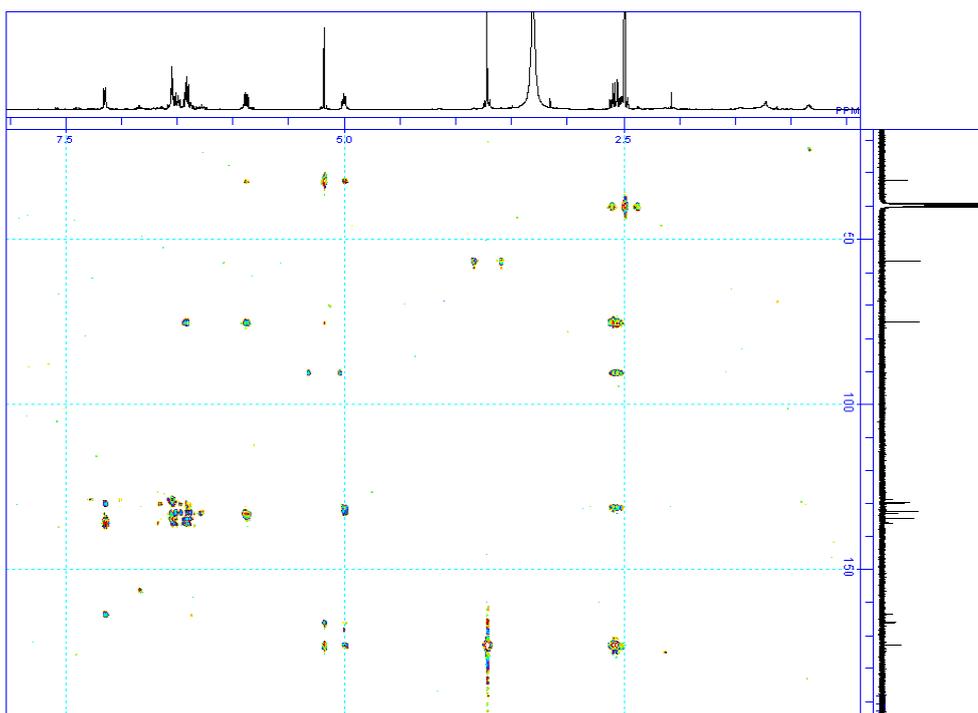


Fig. 2-14 HMBC spectrum of fuligoic acid in DMSO- d_6

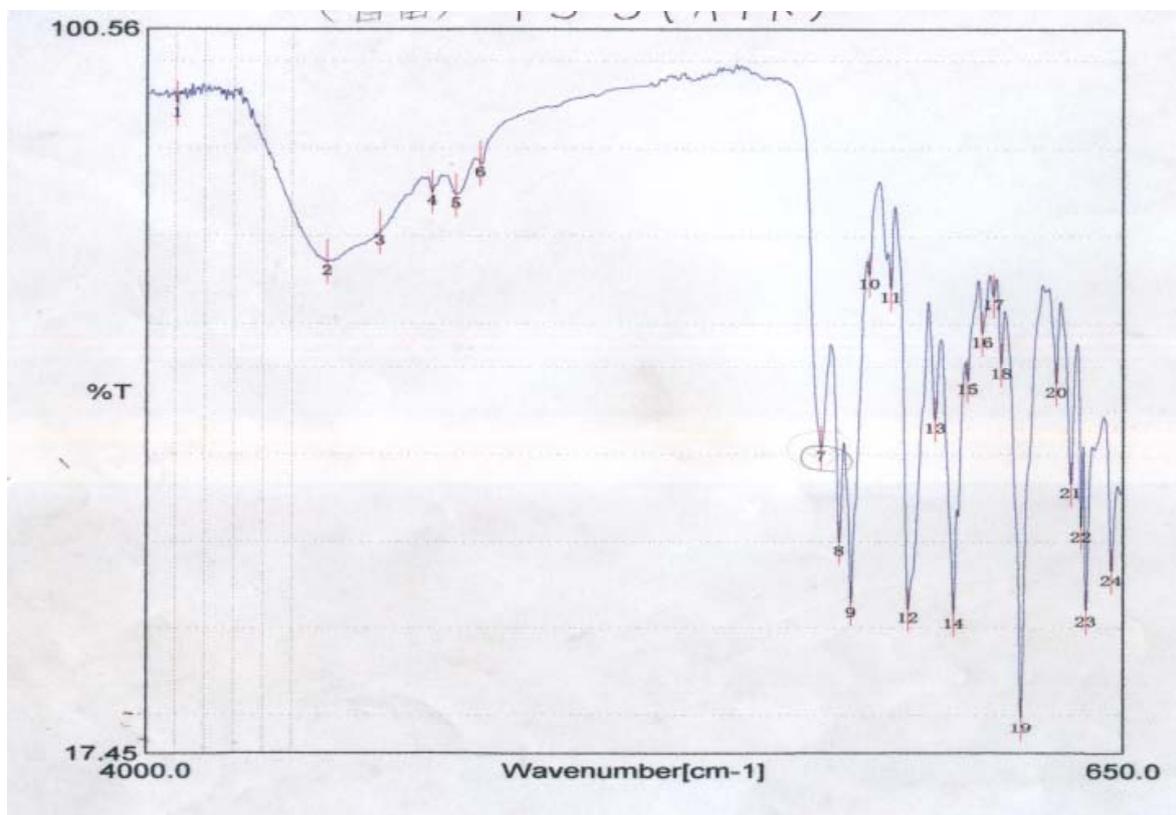


Fig. 2-15 IR spectrum of fuligoic acid

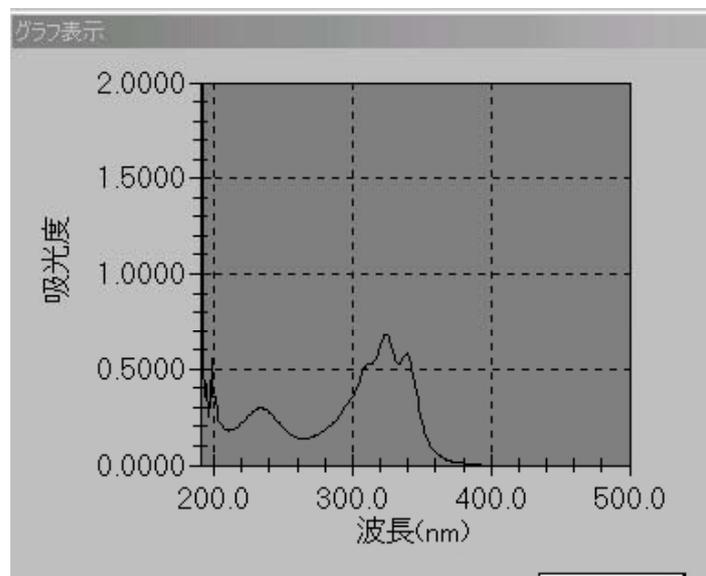


Fig. 2-16 UV spectrum of fuligoic acid

(2) Fuligoic acid のテトラエン部の幾何異性の決定

テトラエン部の幾何異性の決定を行うにあたり、6位炭素から11位炭素の幾何異性についてはオレフィンプロトンの J 値により決定した。重メタノール溶媒で 800 MHz NMR 測定を行った結果 (Fig.2-17) , $J_{6,7} = 15.6$ Hz, $J_{8,9} = 14.7$ Hz, $J_{10,11} = 14.7$ Hz を示したので、6位から11位のトリエン部は全て *E* 体であることを確認した。DMSO- d_6 中では $J_{6,7} = 14.3$ Hz と既に読んでいた。

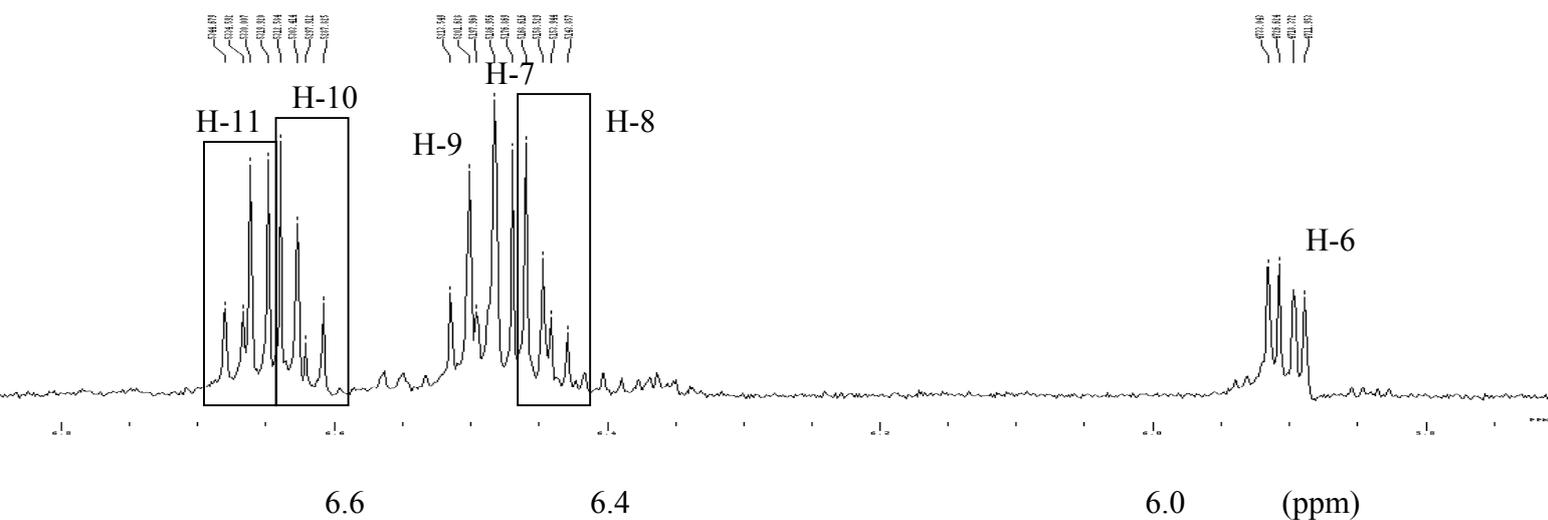


Fig. 2-17 NMR spectrum of fuligoic acid in CD_3OD

12, 13 位オレフィンの幾何異性については, カルボキシ基炭素とβ位水素との相関つまり $^3J_{CH}$ の値に着目した論文を参考にした²⁴⁾. この論文では methyl 2-butenate においてカルボニル炭素とβ位水素が *trans* の関係にある時は $^3J_{CH}$ の値が 14.5 Hz, *cis* の関係にある時にはその値が 6.8 Hz であることが報告されている. またこの論文では, Fuligoic acid と同様オレフィンの置換基にクロル基とカルボキシ基が結合している, α -chlorocinnamic acid ではカルボキシ基炭素とβ位水素が *cis* の関係にある時には, $^3J_{CH}$ の値が 5.0 Hz であることも報告されていた.

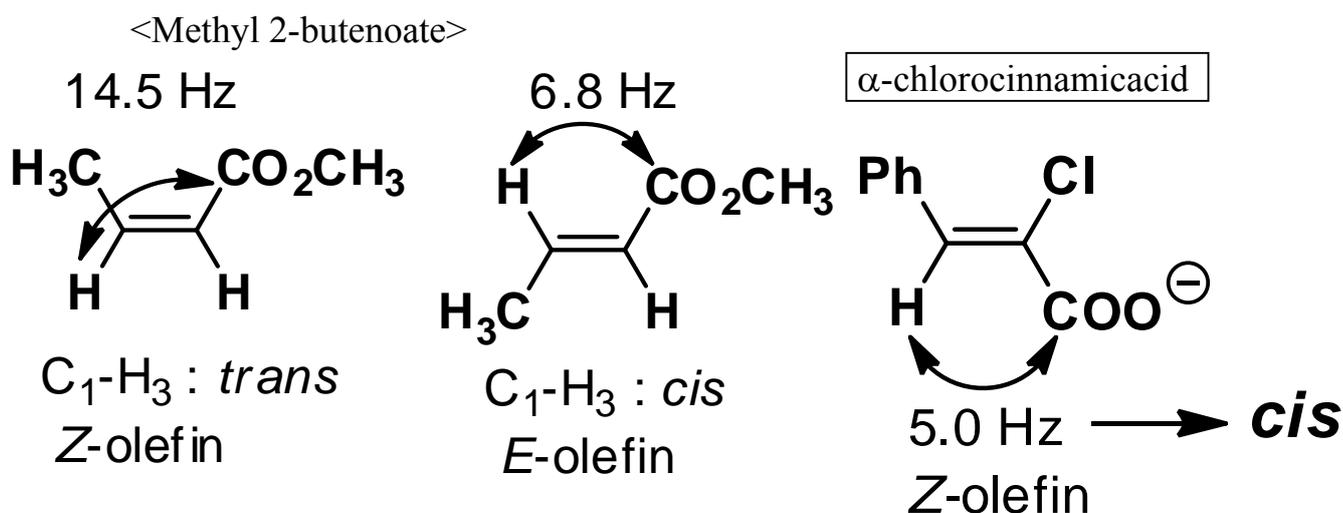
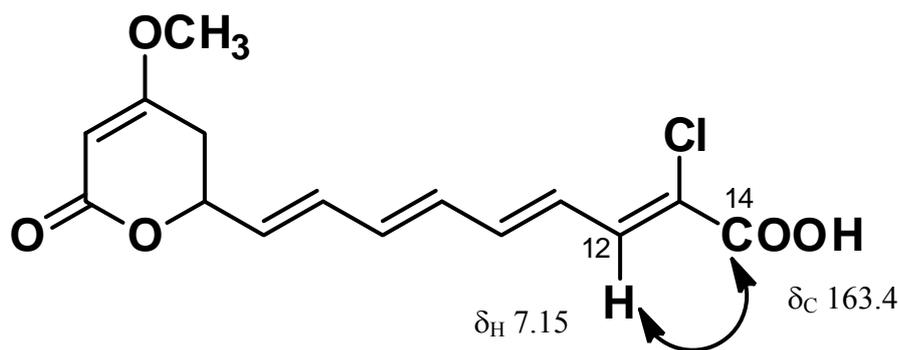


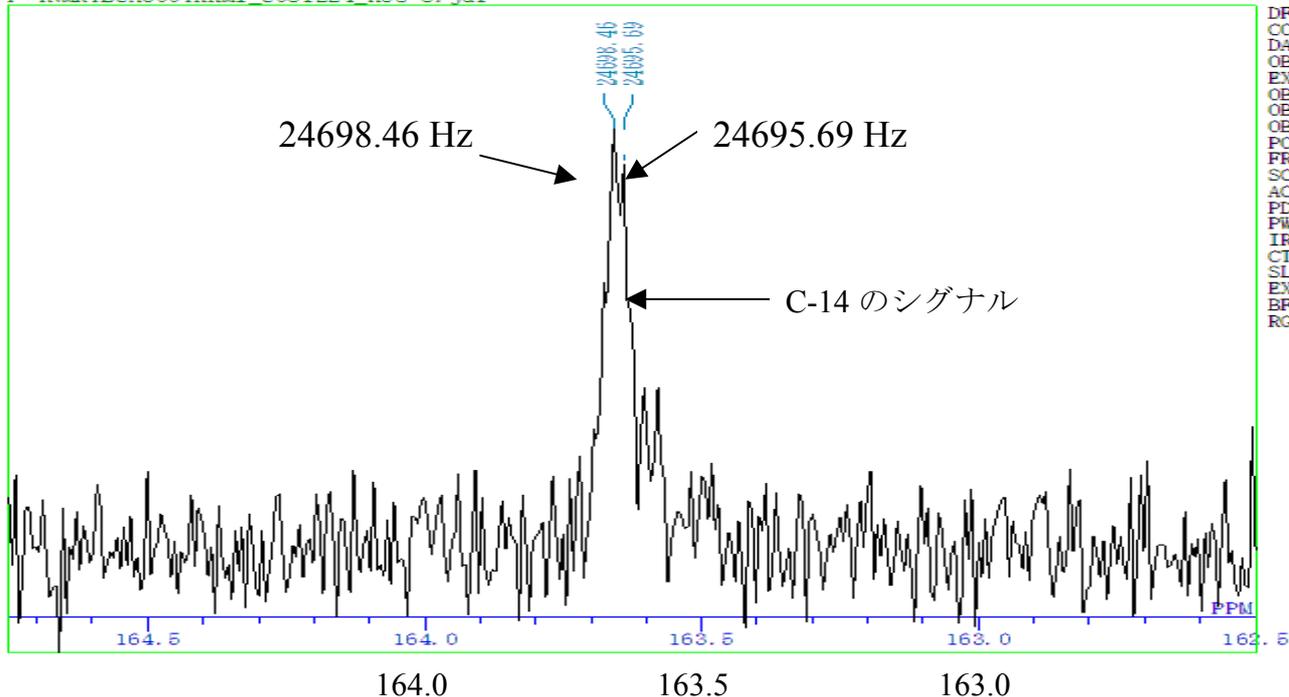
Fig. 2-18 $^3J_{C,H}$ -values of methyl 2-buteoate and α -chlorocinnamic acid

そこで fuligoic acid のカルボキシ基炭素とβ位水素との相関 $^3J_{CH}$ の値を測定することにした。 $^3J_{CH}$ の測定のため, 以下の2通りの方法を試みた.



- ^{13}C NMR の 1H nondecoupling 測定を行った. この測定の結果, 14 位炭素と 12 位水素との $^3J_{CH}$ の値は 2.8Hz であることがわかった. この値を先の文献で報告された $^3J_{CH}$ の値と比較すると, 14 位炭素と 12 位水素は *cis* の関係にあることがわかった. 従って 12, 13 位オレフィンの幾何異性は Z 配置であると決定した.

KKMI/dmso 25dC sgm sgnoc th5atfg 600
 F:\NMR\ECA600\KKMI_C081224_noe-8.jdf



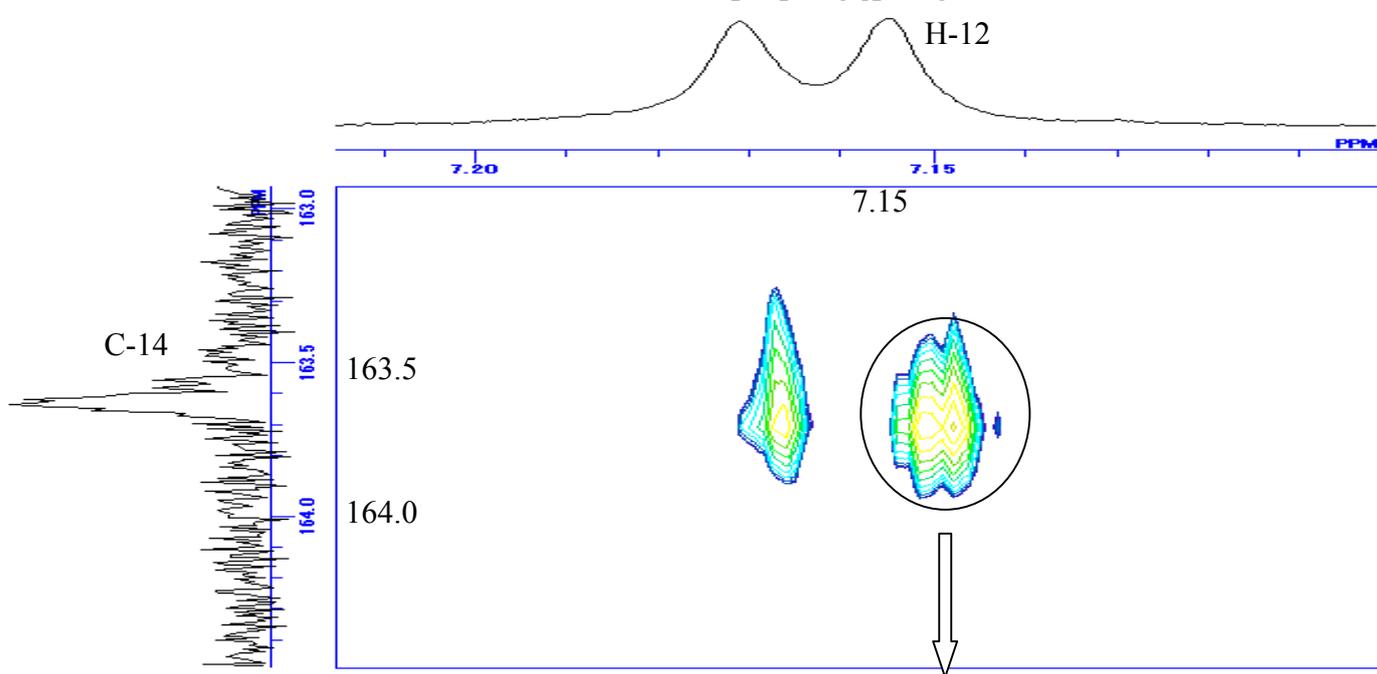
DFILE KKMI_C
 COMNT KKMI/7
 DATIM 25-12
 OBNUC 13C
 EXMOD singl
 OBFREQ
 OBSET
 OBFIN
 POINT
 FREQU
 SCANS
 ACQTM
 PD
 PW1
 IRNUC 1H
 CTEMP
 SLVNT DMSO
 EXREF
 BF
 RGAIN

使用機器 : JEOL ECA-600, 溶媒: DMSO- d_6

Fig. 2-19 ^1H nondecoupling ^{13}C NMR of fuligoic acid

2. X 軸のデータポイント数を 8K にして HMBC 測定を行い炭素-水素によるカップリングを読むことにより $^3J_{\text{CH}}$ の値を求め、その値を α -クロロ桂皮酸の $^3J_{\text{CH}}$ の値と比較することにより、12, 13 位オレフィンの幾何異性を決めることにした。重 DMSO を測定溶媒に用い、Fuligoic acid の 8KHMBC 測定を行なった。使用機器は JEOL ECA-600 を用いた。この測定の結果、より高磁場側のプロトンに見られた等高線の中にはさらに二つの等高線が観測された (Fig.2-20)。この二つの等高線は炭素-水素のカップリングによるものであると考えられ、 ^1H NMR のケミカルシフト値より $^3J_{\text{CH}}$ の値を 2.4Hz であると算出した。この値を α -chlorocinnamic acid の $^3J_{\text{CH}}$ の値と比較することにより、カルボキシ基炭素と β 位水素とは *cis* の関係にあることがわかった。このことにより fuligoic acid は 12Z 配置を有すると推定した。

Fuligoic-acid/dmsco sgm12 25dC hmhc_pfg nhx5fg 600
 F:\NMR\ECA600\090107\FULIGOIC_acid_hmhc_pfg_8k-1.jdf



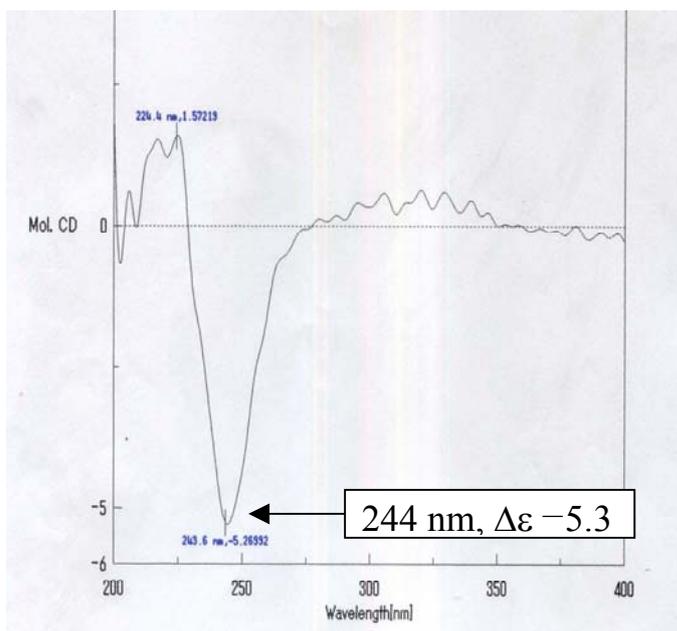
DFILE
 COMNT
 DATIM
 EXMOD
 OBNUC
 OBFRQ
 OBSET
 OBFIN
 POINT
 FREQU
 CLPNT
 TODAT
 CLFRQ
 SCANS
 ACQTM
 PD
 PW1
 PW2
 PW3
 P11
 P12
 P13
 IRNUC
 CTEMP
 SLVNT
 EXREF
 GLEXR
 RGAIN

炭素-水素による分裂 : $J = 2.4 \text{ Hz}$
 C-14 / H-12 : cis

Fig. 2-20 8K HMBC spectrum of fuligoic acid

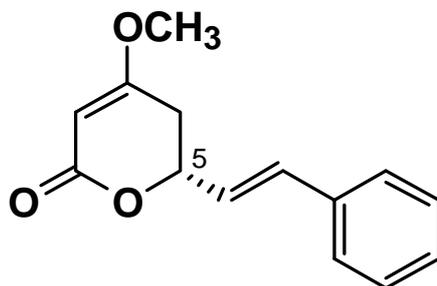
(3) Fuligoic acid の絶対配置の決定

Fuligoic acid の5位の絶対配置については、類似天然物とのCDスペクトルの比較により決定した。Fuligoic acid のCDスペクトルを測定したところ、244 nmにおいて $\Delta\epsilon - 5.3$ という負のcotton効果を示した。一方5R配置を有する類似天然物であるkawainは250 nmで正のcotton効果を示すと文献で報告されていることから²⁵⁾、fuligoic acid の5位は5S配置であると推定した。



$c = 0.47 \text{ mM}$
solvent : MeOH

Fig. 2-21 CD spectrum of fuligoic acid



$\lambda_{\text{ext}} \quad \Delta \epsilon$
250 nm +10.5
in dioxane

Fig. 2-22 Structure of kawain

(4) Fuligoic acid の生物活性の検討

Fuligoic acid について現在当研究室で行っているアッセイ系による検討を行った。AGS 細胞(ヒト胃がん細胞)を用いて TRAIL 耐性克服作用²⁶⁾と細胞毒性試験²⁷⁾を行ったところ、活性は見られなかった。(Fig.2-23) Wnt シグナル阻害作用²⁸⁾, Hedgehod シグナル阻害作用²⁹⁾についても検討したところ、活性は見られなかった。また *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性を paper disc を用いて行ったが、活性は見られなかった。

TRAIL 耐性克服作用並びに細胞毒性試験

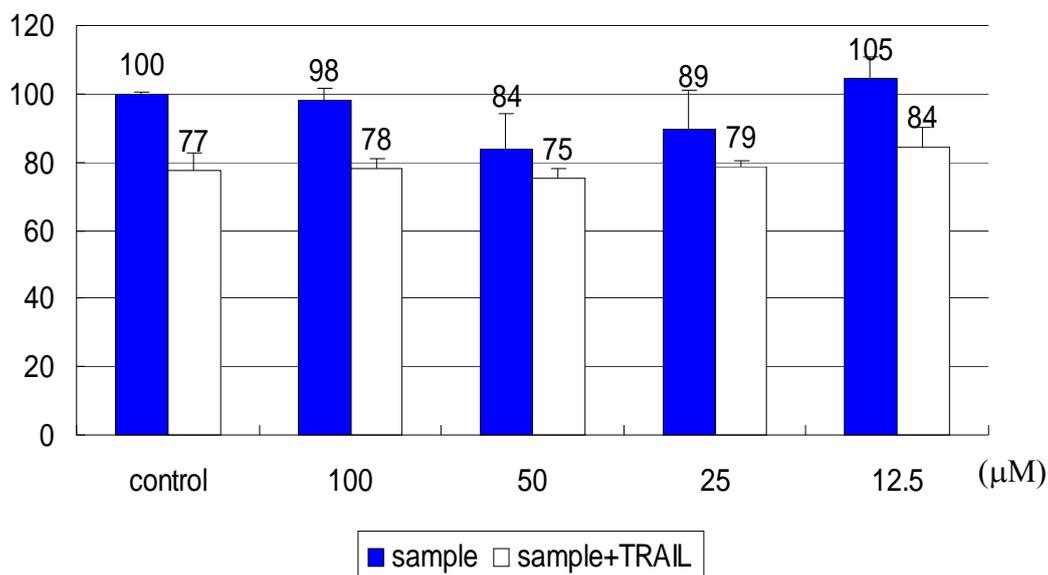


Fig. 2-23 TRAIL resistance overcoming activity and cytotoxicity of fulgic acid

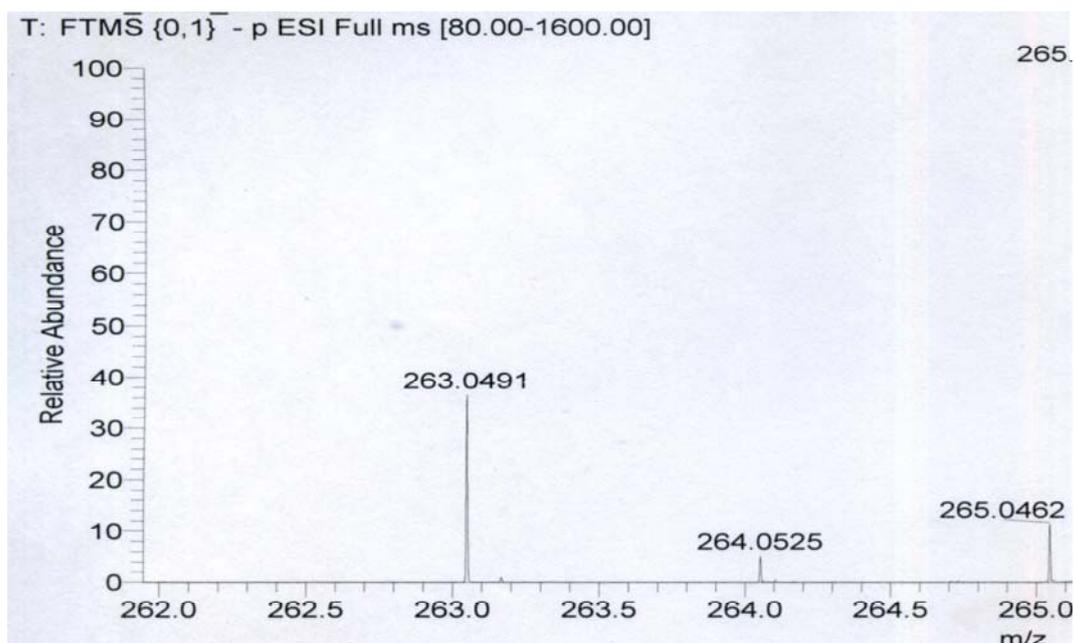
Table 1. ^1H , ^{13}C NMR data of fulgic acid (**1**) in $\text{DMSO-}d_6$

position	δ_{H} (600 MHz, J in Hz)	δ_{C}	HMBC
1		166.1	
2	5.19 s	90.2	172.9, 166.1, 32.4
3		172.9	
4	2.56 (dd, $J = 17.1, 5.1$) 2.60 (dd, $J = 17.1, 10.2$)	32.4	172.9, 131.1, 90.2, 75.2 172.9, 131.1, 90.2, 75.2
5	5.01 (ddd, 10.2, 5.7, 5.1)	75.2	172.9, 132.7, 131.1, 32.4
6	5.88 (dd, 14.3, 5.7)	131.1	133.3, 75.2, 32.4
7	6.42 m	132.7	134.7, 131.1, 75.2
8	6.40 m	133.3	136.1, 134.7, 131.1
9	6.50 m	134.7	132.7
10	6.58 m	136.1	134.7, 133.3, 129.8, 128.8
11	6.54 m	129.8	136.1, 134.7, 128.8
12	7.15 (1H, d, $J = 9.6$)	128.8	163.4, 136.1, 129.8
13		135.9	
14		163.4	
15	3.73 (3H, s)	56.5	172.9

第4節 Dehydrofuligoic acid(2)の構造解析

本化合物は黄色固体として得られ、負イオン ESIMS スペクトルにおいて m/z 307 と 309 に約 3 : 1 の強度比で(M-H)イオンのピークを与えたことから塩素を 1 個含むと推定した. また高分解能 ESIMS スペクトルにおいて m/z 307.0388 と 309.0360 に(M-H)イオンのピークを与えた. これらは ^{35}Cl と ^{37}Cl の同位体とした計算値 ($\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5^{35}\text{Cl}$, 307.0373, $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5^{37}\text{Cl}$, 309.0344.) と良く一致したことから, その分子式を $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_5\text{Cl}$ と推定した. UV スペクトル (Fig.2-35) の 406, 386, 303 nm の吸収極大から fuligoic acid より長い共役系の存在が示唆され, IR スペクトル (Fig.2-34) の $3420, 1680, 1600\text{cm}^{-1}$ の吸収よりカルボキシ基およびカルボニル基の存在が示唆された. ^1H , ^{13}C -NMR スペクトル測定 (Fig. 2-29, 2-30, Table 2) により, 1 つのメトキシ基およびオレフィンのシグナルが観測された. また ^1H -NMR スペクトルの 6 ppm から 7 ppm 付近のシグナルおよび ^{13}C -NMR スペクトルの 120 ppm から 140 ppm 付近のシグナルの存在から, 本化合物はポリエン化合物であることが推測された.

カルボキシ基および塩素の存在について, ESIMS スペクトルのフラグメントイオンの検討を行った (Fig. 2-24). その結果 m/z 263.0491, 265.0462, 227.0719 にフラグメントイオンが観測された. m/z 263.0491, 265.0462 の両イオンは(M-H-CO₂)⁻に由来するものと考えられ, 約 3:1 の強度比でフラグメントイオンが観測された. m/z 227.0719 のイオンはさらに HCl が脱離したイオンに由来するものと考えた. これら三つのフラグメントイオンから, カルボキシ基およびクロル基の存在が示唆された.



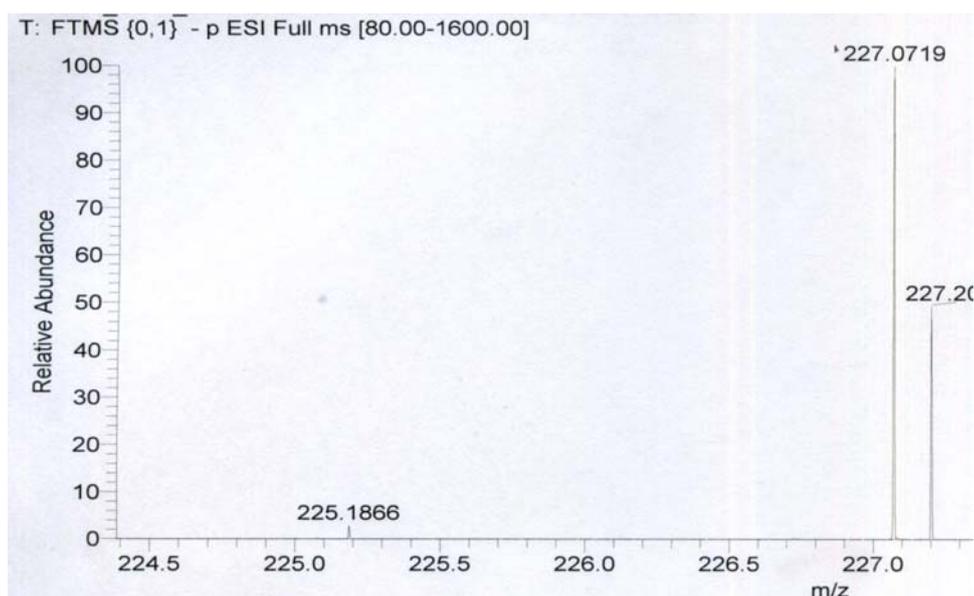


Fig. 2-24 ESI spectrum of dehydrofuligoic acid

この黄色色素の NMR スペクトルの積分値を検討したところ、本化合物は二つの異性体の 2:1 の混合物であると推定した。両化合物の 6 位水素は Fig. 2-25 に示した位置にシグナルが観測された。また Fig. 2-26 に示した COSY, HMBC 相関 (Fig. 2-31, 2-33) が観測されたことから、 α -ピロン環とテトラエン部は 5 位で結合していることが明らかとなった。また 13 位炭素が四級炭素であることから塩素はこの位置に結合していると考え、本化合物の構造を Fig.2-27 に示すポリエン型ピロン化合物であると推定した。これは新規化合物であったので dehydrofuligoic acid と命名した。また主異性体の 6 位水素は 6.37ppm にシグナルが観測され J 値が 15.7 Hz であったことから、6E 体であると推定した。副異性体の 6 位水素は 5.98 ppm にシグナルが観測され J 値が 11.5 Hz であったことから、6Z 体であると推定した。Fuligoic acid に比べ、本化合物は長い共役系を有し TLC の発色に違いが見られた (Fig. 2-28)。

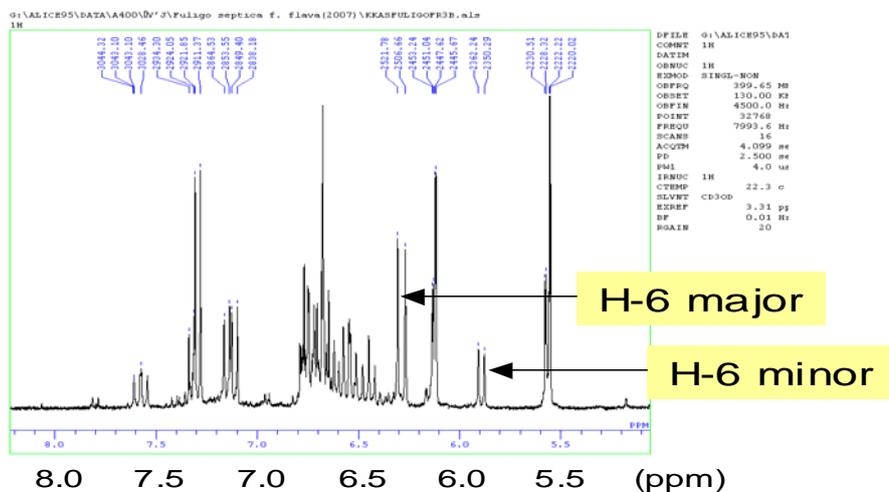


Fig. 2-25 NMR spectrum of dehydrofuligoic acid

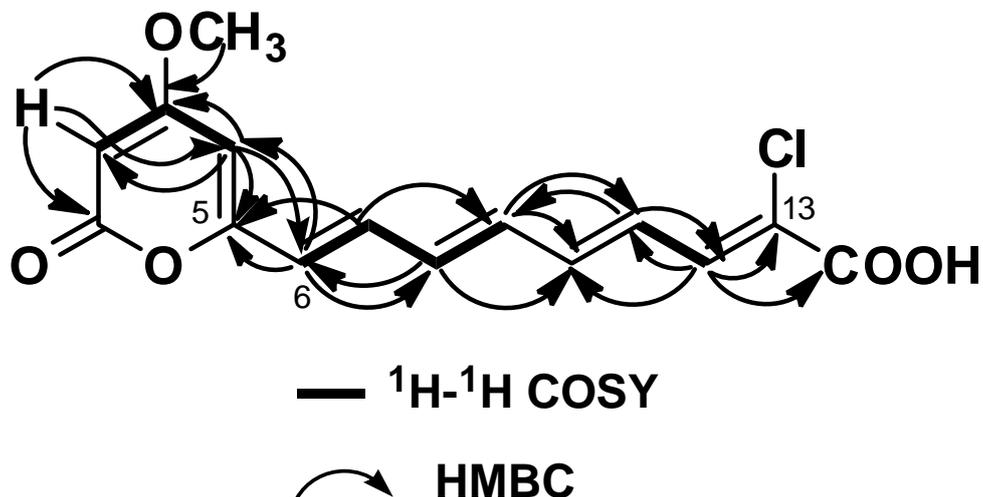


Fig. 2-26 ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations dehydrofuligoic acid

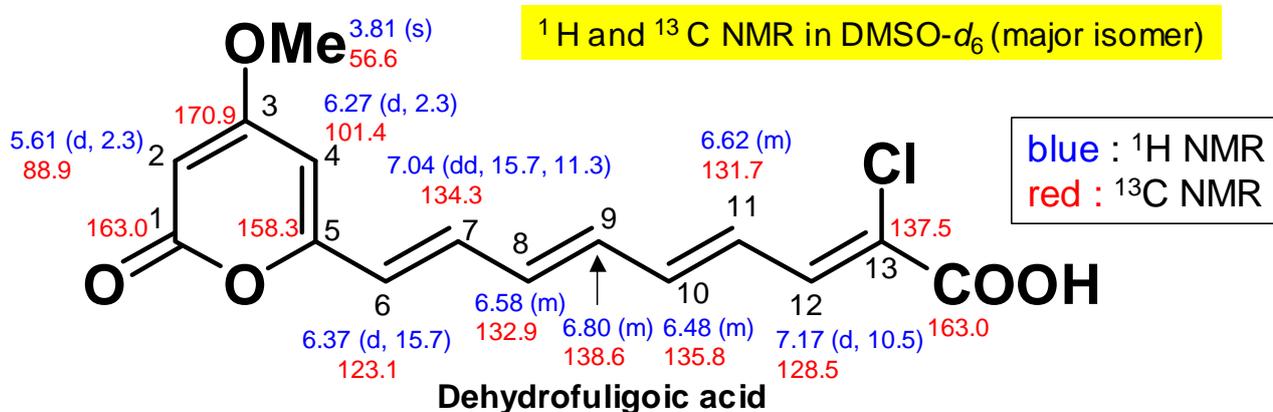


Fig. 2-27 Structure of dehydrofuligoic acid

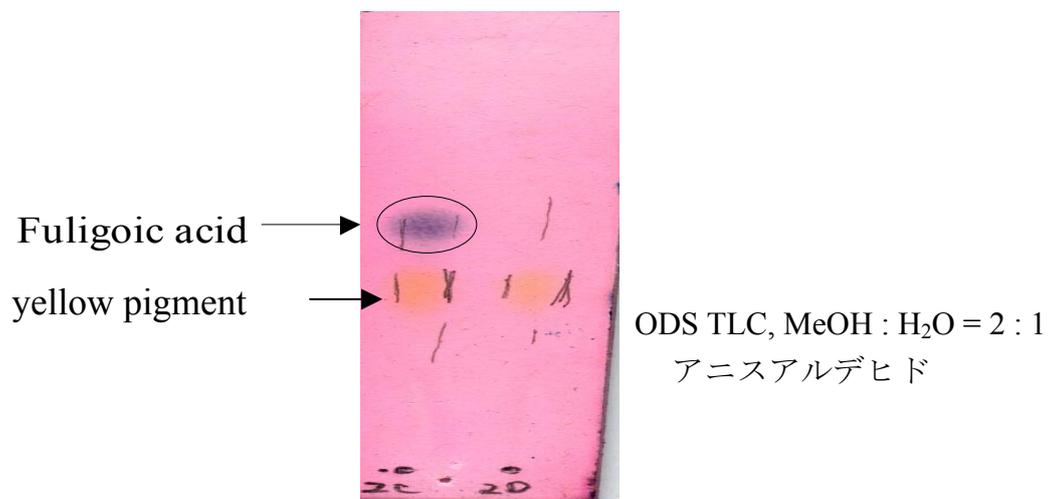


Fig. 2-28 ODS TLC of fuligoic acid and dehydrofuligoic acid

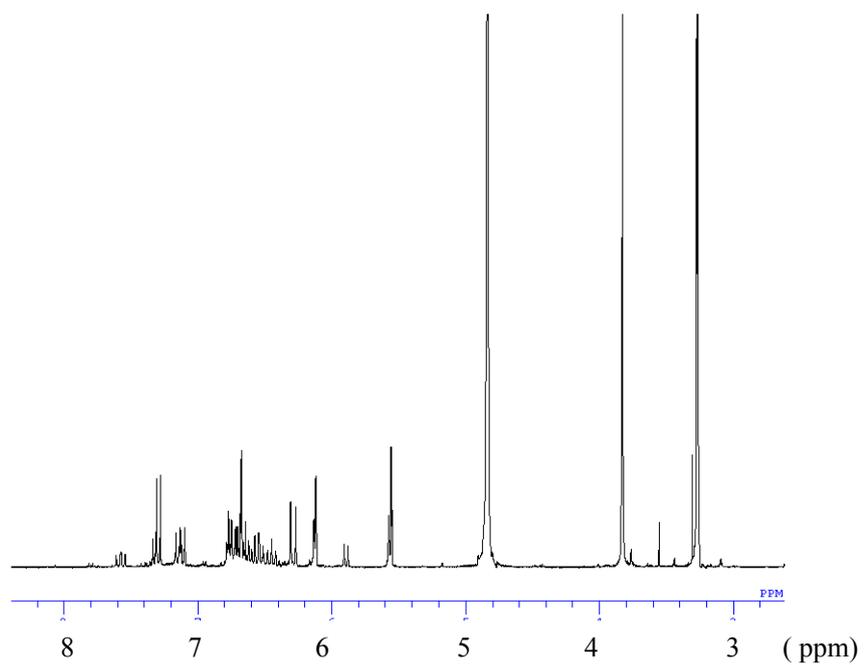


Fig. 2-29 ¹H NMR spectrum of dehydrofuligoic acid in CD₃OD

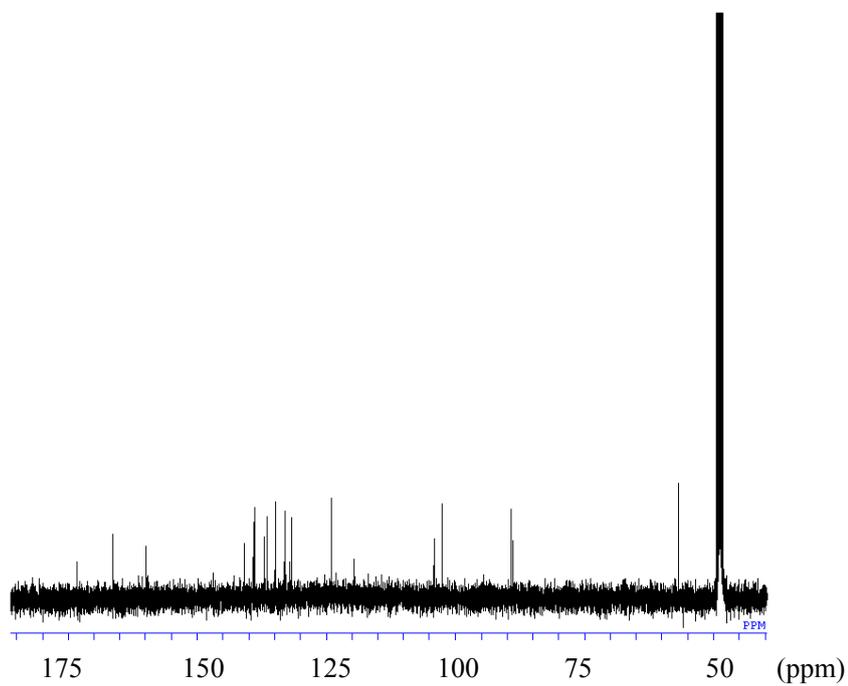


Fig. 2-30 ^{13}C NMR spectrum of dehydrofuligoic acid in CD_3OD

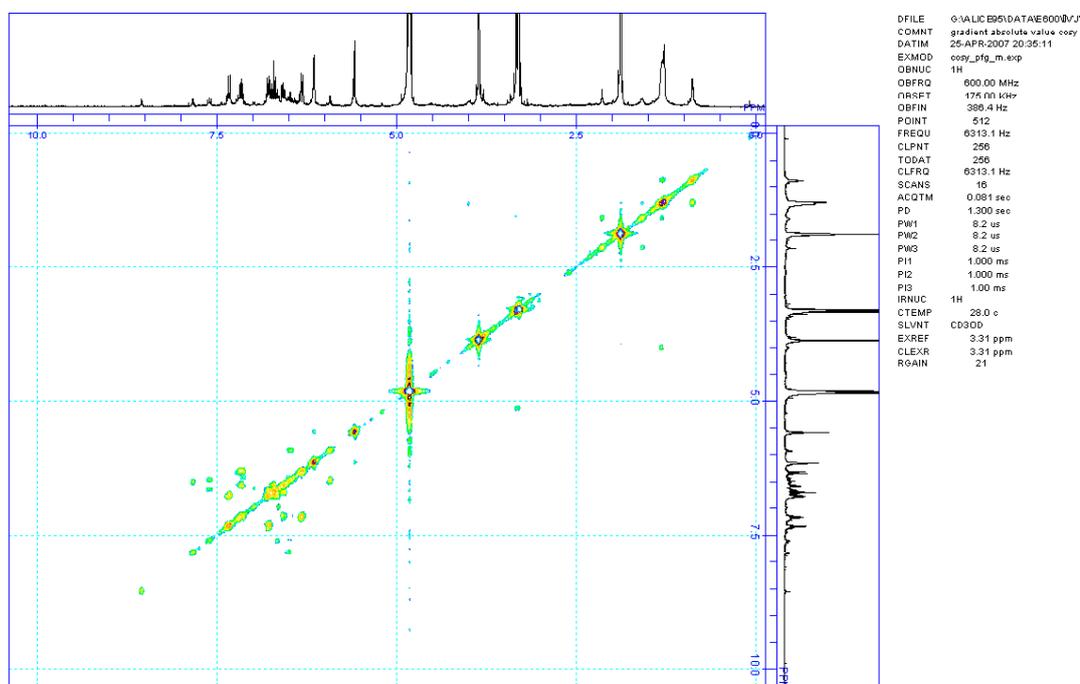


Fig. 2-31 ^1H - ^1H COSY spectrum of dehydrofuligoic acid in CD_3OD

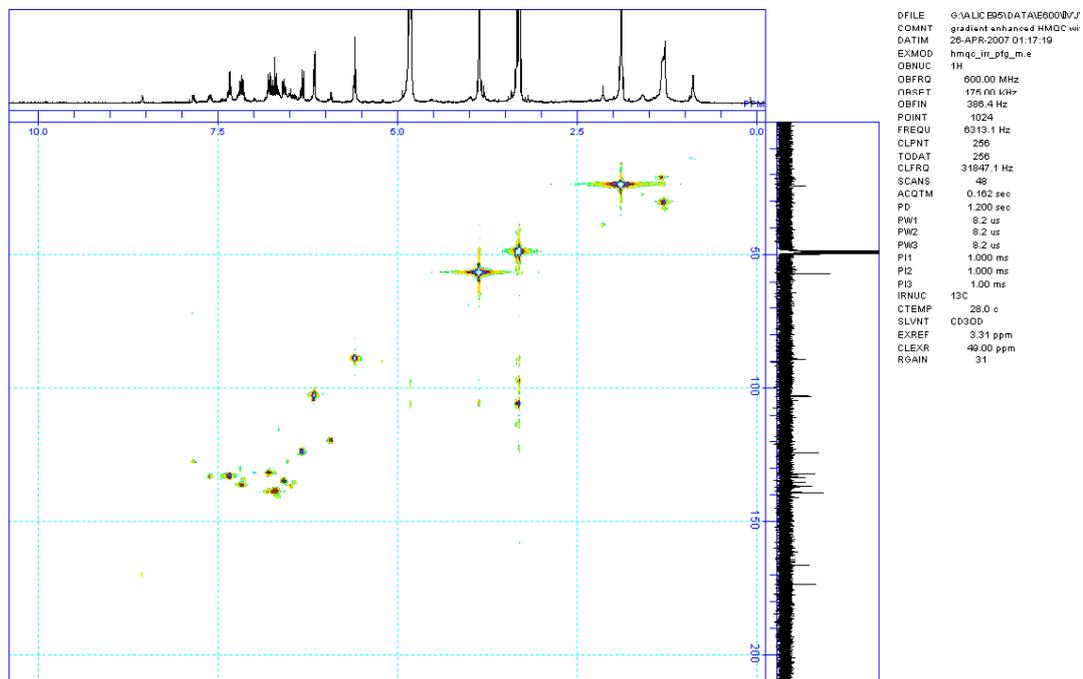


Fig. 2-32 HMQC spectrum of dehydrofuligoic acid in CD₃OD

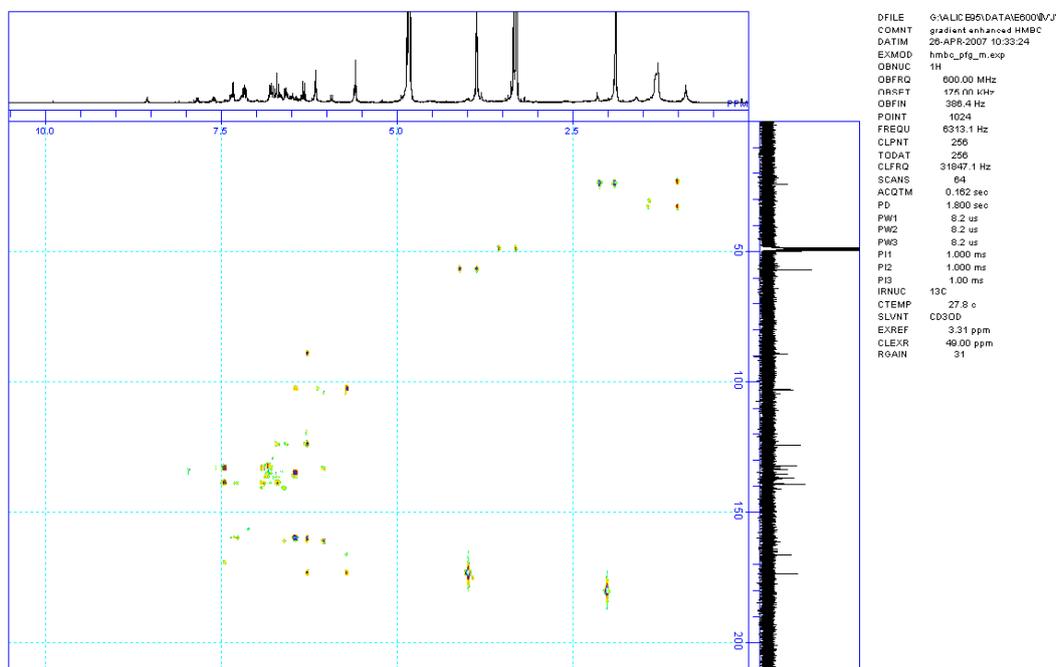


Fig. 2-33 HMBC spectrum of dehydrofuligoic acid in CD₃OD

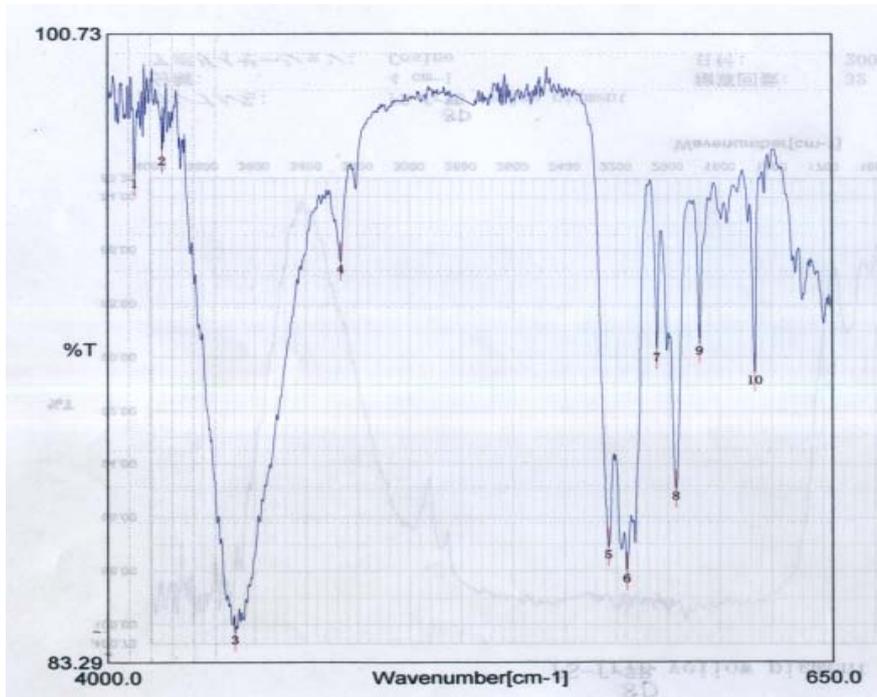


Fig. 2-34 IR spectrum of dehydrofuligoic acid

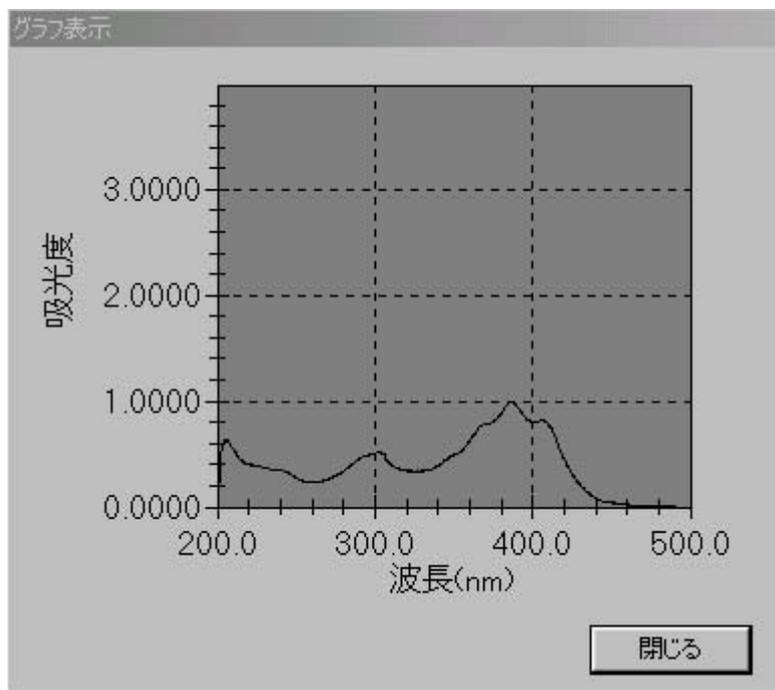


Fig. 2-35 UV spectrum of dehydrofuligoic acid

Table.2 ^1H , ^{13}C NMR data of dehydrofuligoic acid (**2**) in $\text{DMSO-}d_6$

Position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	HMBC (^1H to ^{13}C)
1		163.0	
2	5.61 d (2.3)	88.9	170.9, 163.0, 101.4
3		170.9	
4	6.27 d (2.3)	101.4	170.9, 158.3, 123.1, 88.9
5		158.3	
6	6.37 d (15.7)	123.1	158.3, 132.9, 101.4
7	7.04 dd (15.7, 11.3)	134.3	158.3, 138.6
8	6.58 m	132.9	135.8, 123.1
9	6.80 m	138.6	135.8, 131.7
10	6.48 m	135.8	
11	6.62 m	131.7	138.6, 128.5
12	7.17 d (10.5)	128.5	163.0, 137.5, 135.8, 131.7
13		137.5	
14		163.0	
OMe	3.81 s	56.6	170.9

第5節 小括

Fuligo septica f. *flava* (キフシススホコリ) の子実体抽出物について、TLC の発色スポットを指標に分離精製を行い、fuligoic acid (**1**)および dehydrofuligoic acid (**2**)と命名した2種の新規ポリエン型ピロン化合物を単離した。

第3章 野外採取子実体の成分研究 (2)

Cribraria meylanii (07-76)

第1節 *Cribraria meylanii* について

Cribraria meylanii (メイランアミホコリ)はアミホコリ科アミホコリ亜属に属する変形菌であり、秋から冬に山地の針葉樹の腐木上に発生する。子実体は単子嚢体型であり、密生し有蔽である。子嚢は亜球形または楕円形、色は赤褐色から紫褐色を帯び金属光沢がある。本研究に用いた株は、2007年12月に高知県物部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 *Cribraria* 属では、*Cribraria purpurea* (ムラサキアミホコリ)と *Cribraria cancellata* (クモノスホコリ) 野外採取子実体の成分に関する報告があり^{17), 19)}, cribrarione A-B のナフトキノン化合物が単離されている。

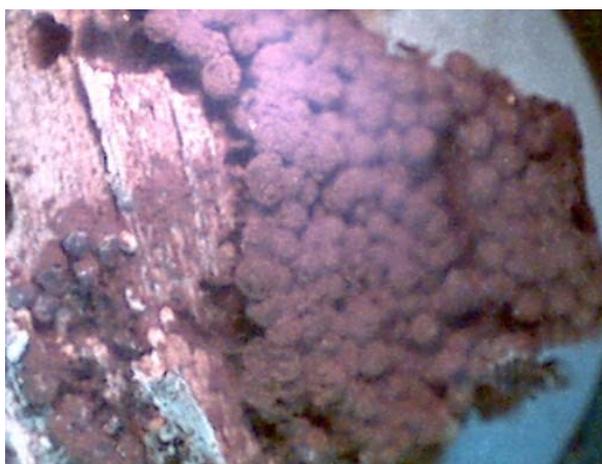


Fig. 3-1 Wild fruit bodies of *Cribraria meylanii*

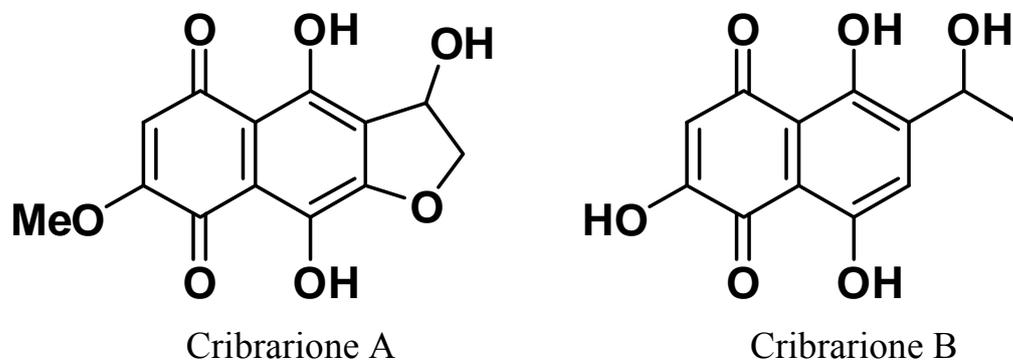
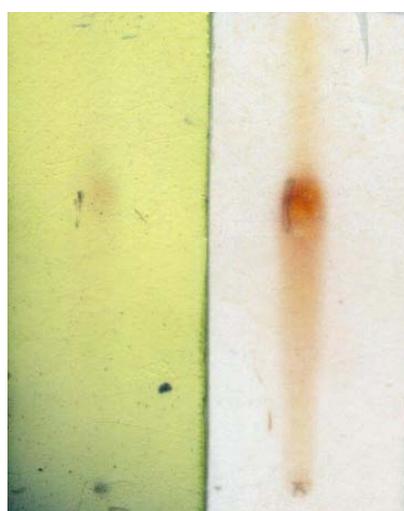


Fig. 3-2 Structure of cribrarione A, B

第2節 *Cribraria meylanii* の成分探索

2007年に高知県で採取された *Cribraria meylanii* 野外採取子実体(2.2 g)を 90%メタノールおよび 90%Acetone で抽出し, 907.7 mg の子実体抽出物を得た.

得られた抽出物をクロロホルム/メタノール系のシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, Fr1A から 1H を得た. Fast Red 試薬に陽性のスポットが確認された Fr1F について, ODS カラムクロマトグラフィー(溶媒系: 50%MeOH + 0.1%TFA)で分離・精製し, fr2A-2C を得た. Fr2A をメタノールを溶媒に用いた Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィーにより分離・精製を行い, 赤褐色色素 cribrarione C (3) を 3.8 mg 得た(Fig. 3-3, 3-4).



ODS TLC, 50%MeOH

左:リンモリブデン酸

右: Fast Red B

Fig. 3-3 TLC of cribrarione C

第3節 Cribrarione C の構造解析

Cribrarione C は赤褐色固体として得られ, HREIMS において m/z 222.0161 ($\Delta -0.3$ mmu)に分子イオンピークが観測されたことから, 分子式 $C_{10}H_6O_6$ をもつことが判明した. UV スペクトル (Fig. 3-16) において 273, 323, 414 nm に極大吸収が見られたことから共役系の存在が示唆され, また IR スペクトル (Fig. 3-15) では $3320, 1630\text{ cm}^{-1}$ に吸収が認められたのでヒドロキシ基およびカルボニル基の存在が示唆された.

DMSO 溶媒を用いた $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (Fig. 3-10, Table 3) において, 2つのオレフィンプロトン [δ_{H} 5.72 (1H, s), 6.98 (1H, s)], 3つのヒドロキシ基 [δ_{H} 9.67 (1H, brs), 10.11 (1H, brs), 13.52 (1H, brs)] に由来するシグナルが観測された. $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (Fig. 3-11, Table 3) では, 2つのカルボニル炭素 (δ_{C} 189.6, 181.2), 2つの sp^2 メチン炭素 (δ_{C} 108.3, 108.0) および 5つの sp^2 四級炭素 (δ_{C} 150.6, 149.1, 140.0, 122.3, 109.3) に由来するシグナルが観測された. $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ NMR スペ

クトルのケミカルシフト値より、芳香環の存在が示唆された。本化合物の不飽和度は8であり、芳香環・二つのカルボニル炭素・一つのオレフィンの存在より、本化合物はもう一つ環を持つことが示唆された。さらに本化合物の炭素数が10個であることから、ナフトキノン骨格の存在が示唆された。またその分子式を考慮すると四つのヒドロキシ基を有することが明らかとなった。二つのオレフィンプロトンがシングレットで観測されたことから、両プロトンはそれぞれキノン部と芳香環上に存在することが示唆された。本化合物のNMRのケミカルシフト値を变形菌から単離された lindbladione (4)の値と比較することにより、2,5,6,7位にヒドロキシ基を有するテトラヒドロキシナフトキノン骨格を有することが予想された (Fig. 3-5)。

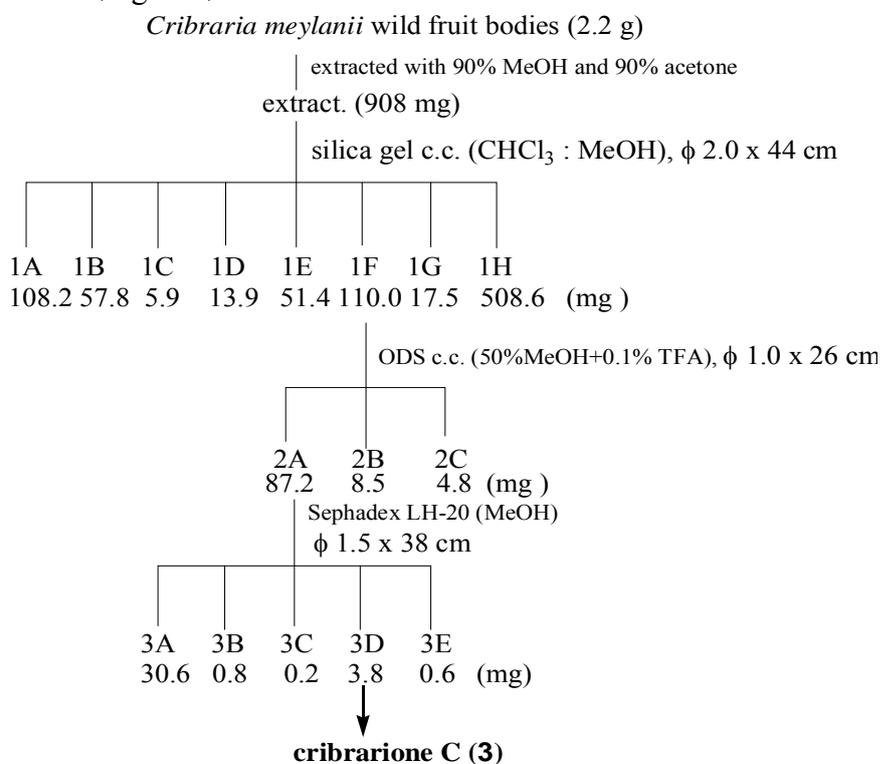


Fig. 3-4 Isolation chart of cribrarione C

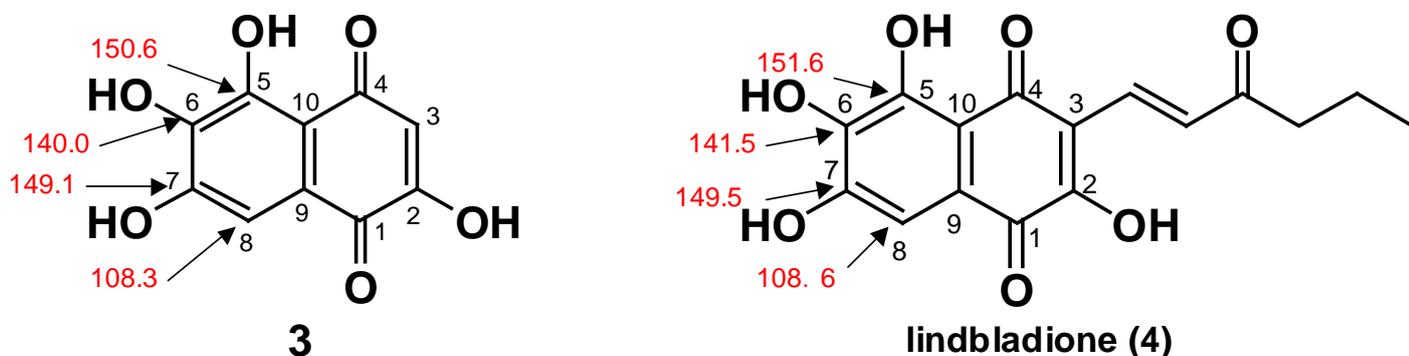


Fig. 3-5 Structure of cribrarione C(3) and lindbladione (4)

しかし水素原子を5位ではなく8位に有する **3a** の構造の可能性も考えられた (Fig. 3-6). 本化合物の HMBC 相関 (Fig. 3-13) で3位の水素原子から 109.3 ppm の炭素原子に相関が観測されたので, この炭素原子は10位に帰属されることがわかった. また 122.3 ppm の炭素原子は化学シフトから, 酸素が結合していない四級炭素として残された核間の9位の炭素と帰属されることが明らかとなった. 6.98 ppm の水素原子から10位の炭素原子には HMBC 相関が明瞭に観測されたのに対し, 9位の炭素原子には弱い相関しか観測されなかった (Fig. 3-7). そこで HMBC の展開時間を変更して測定を行なった (Fig. 3-14). その結果, 以下に示すスペクトルが得られた (Fig. 3-8). これを見ると J_{CH} の値が 8 Hz に相当する, 展開時間 62.5 ms の時では, 6.98 ppm の水素原子から10位の炭素原子には明瞭に, 9位の炭素原子 122.3 ppm に対し弱い相関しか観測されなかった. 一方 J_{CH} の値が 4 Hz に相当する, 展開時間 125 ms の時では, 6.98 ppm の水素原子から9位の炭素原子への相関が比較的是っきりと観測された.

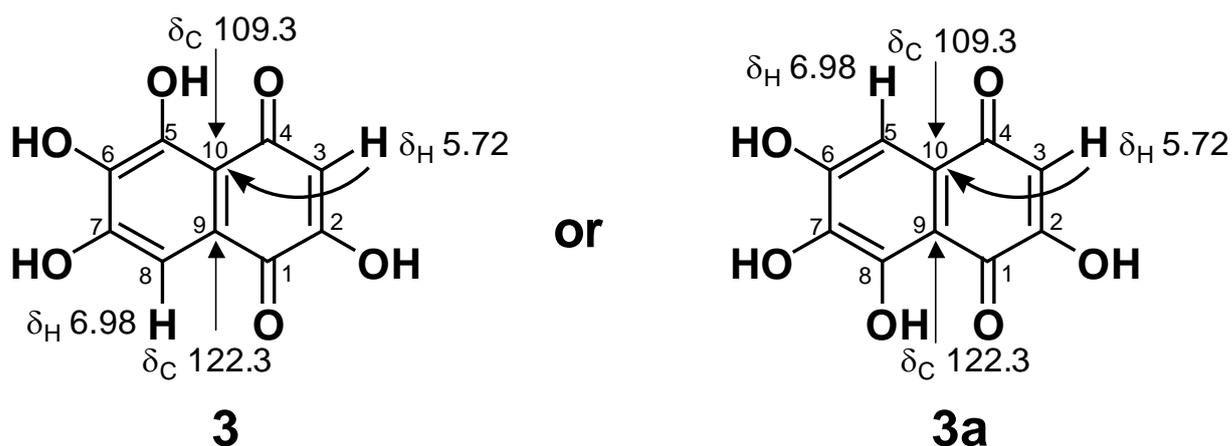


Fig. 3-6 Structure of **3** and **3a**

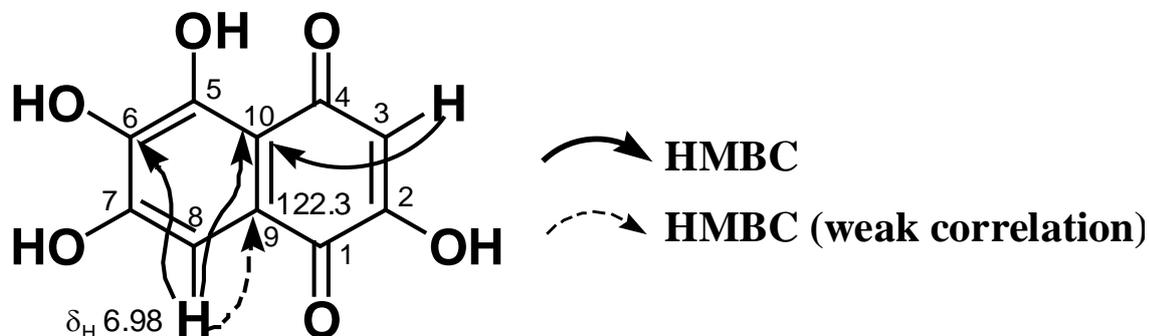
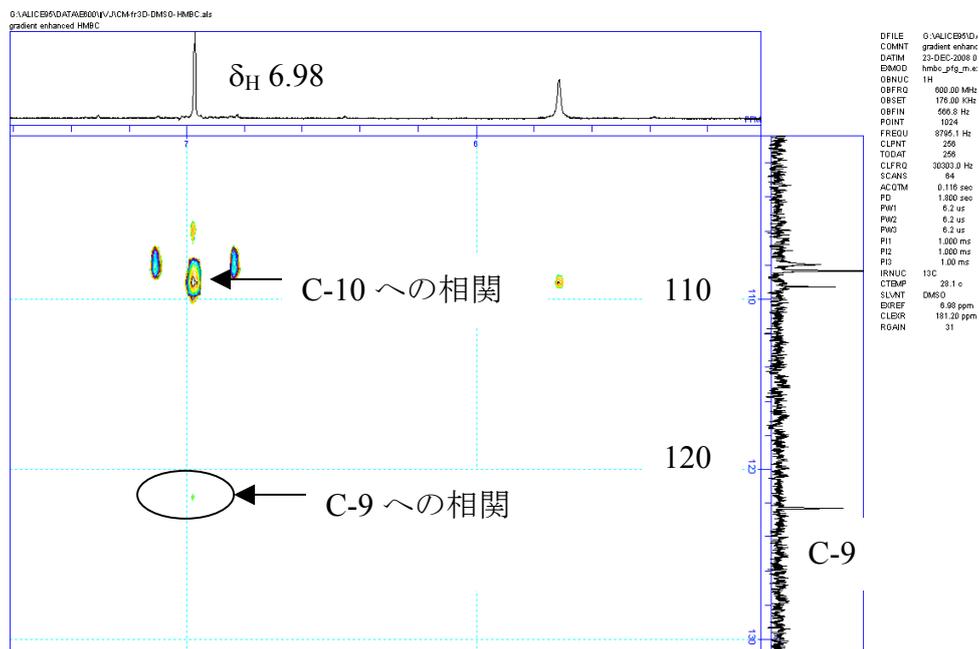


Fig. 3-7 HMBC spectrum of **3**

展開時間 62.5 ms ($^1J_{CH} = 8$ Hz)の HMBC スペクトル



展開時間 125 ms ($^1J_{CH} = 4$ Hz)の HMBC スペクトル

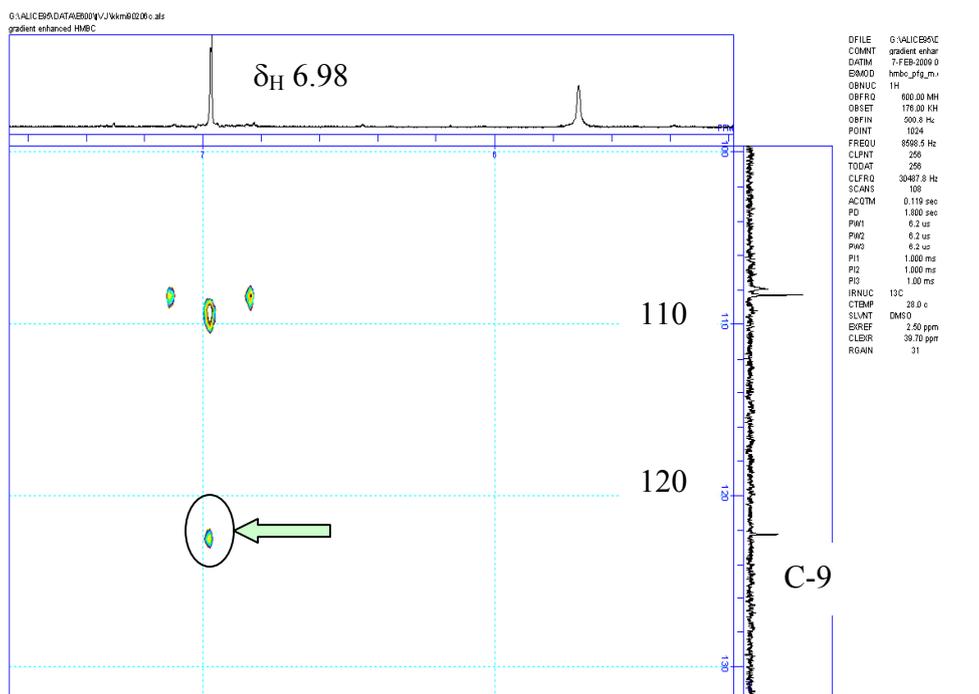


Fig. 3-8 HMBC correlation of **3** with a Long-Range Delay of 62.5 and 125 ms between δ_H 6.98 and C-9

一方、芳香環では2結合を介した J_{CH} の値は3結合を介した J_{CH} の値に比べて小さいことが知られている³⁰⁾。例えばベンゼンでは2結合を介した J_{CH} の値は1.0 Hzであり、3結合を介した J_{CH} の値は7.4 Hzである。このことと先のHMBC相関の結果を合わせると、6.98 ppmの水素原子から9位炭素原子への相関は2結合を介した J_{CH} に由来することが示唆され、6.98 ppmの水素原子は5位ではなく8位に帰属されることが明らかとなった。以上の結果より、cribrarione Cの構造はFig. 3-9に示した2,5,6,7テトラヒドロキシ-1,4ナフトキノン**3**であることが明らかとなった。本化合物は没食子酸からの合成報告例(Fig. 3-17)があるが³¹⁾、天然物からの単離は今回が初めての例である。また本化合物のNMR, MSのデータも文献に記載されていなかったため、今回が初めての報告である。またscheme 3-1に文献に記載された合成経路を示した。酸化反応により1位がケトンに酸化されている。3位が酸化されない理由は記載されていなかった。

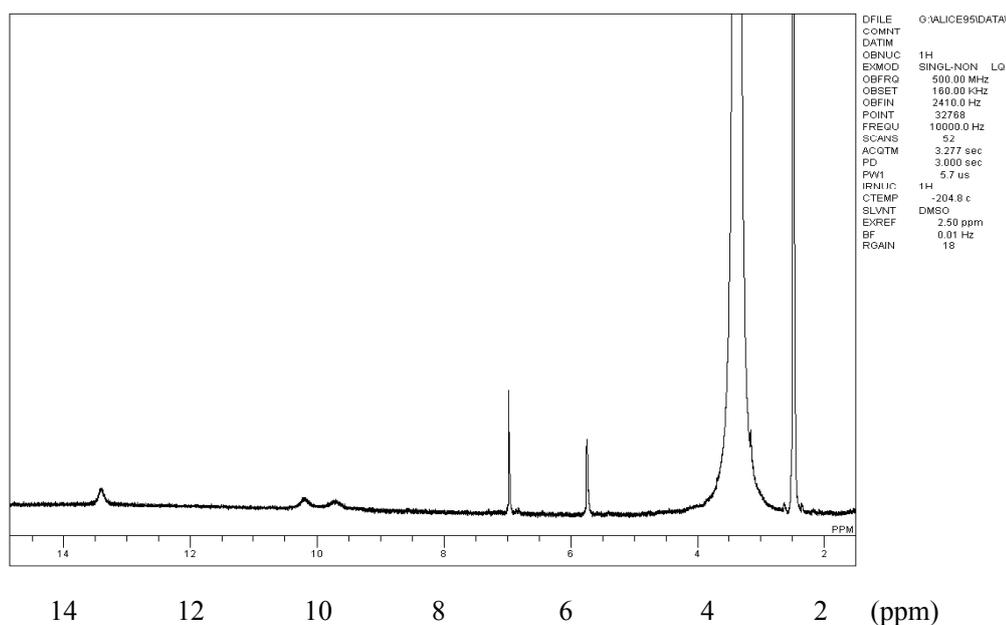
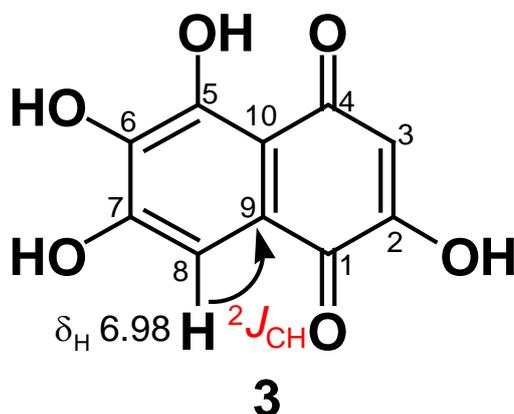


Fig. 3-10 ^1H NMR spectrum of cribrarione C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$

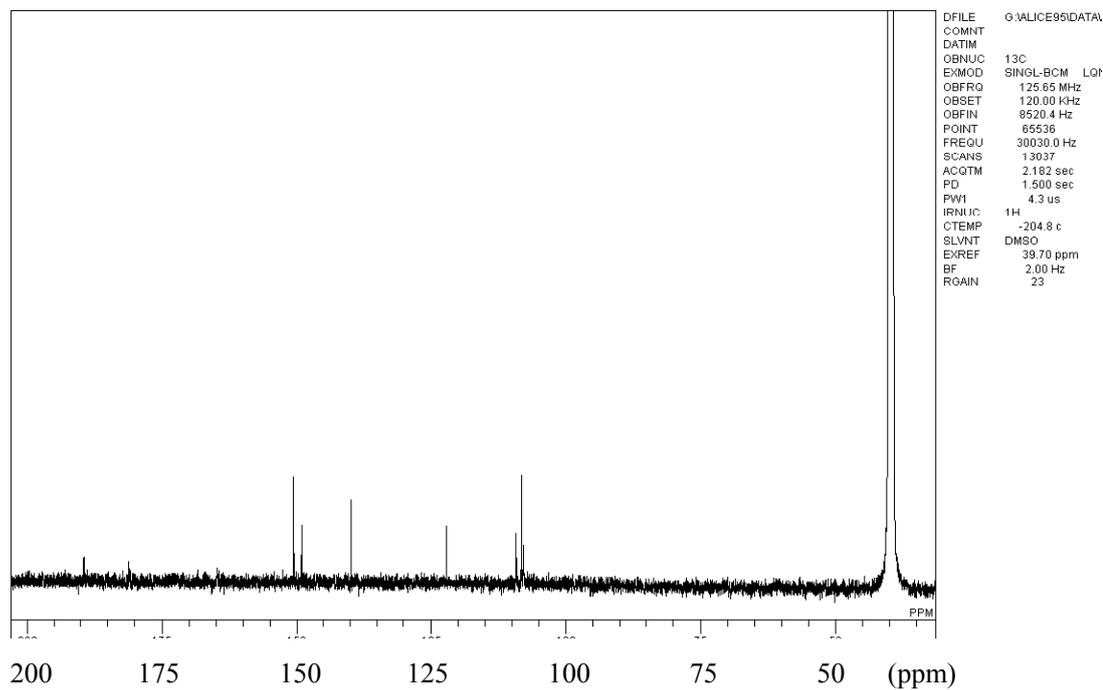


Fig. 3-11 ^{13}C NMR spectrum of cribrarione C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$

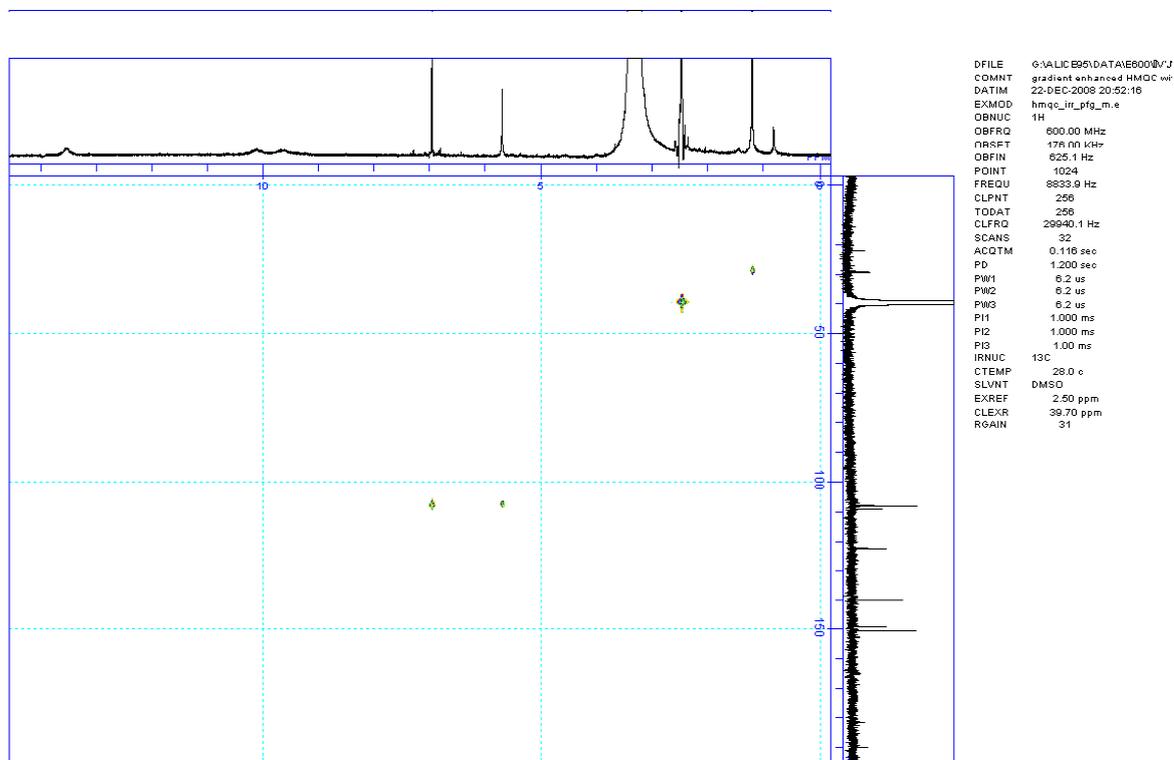


Fig. 3-12 HMQC spectrum of cribrarione C (**3**) in $\text{DMSO-}d_6$

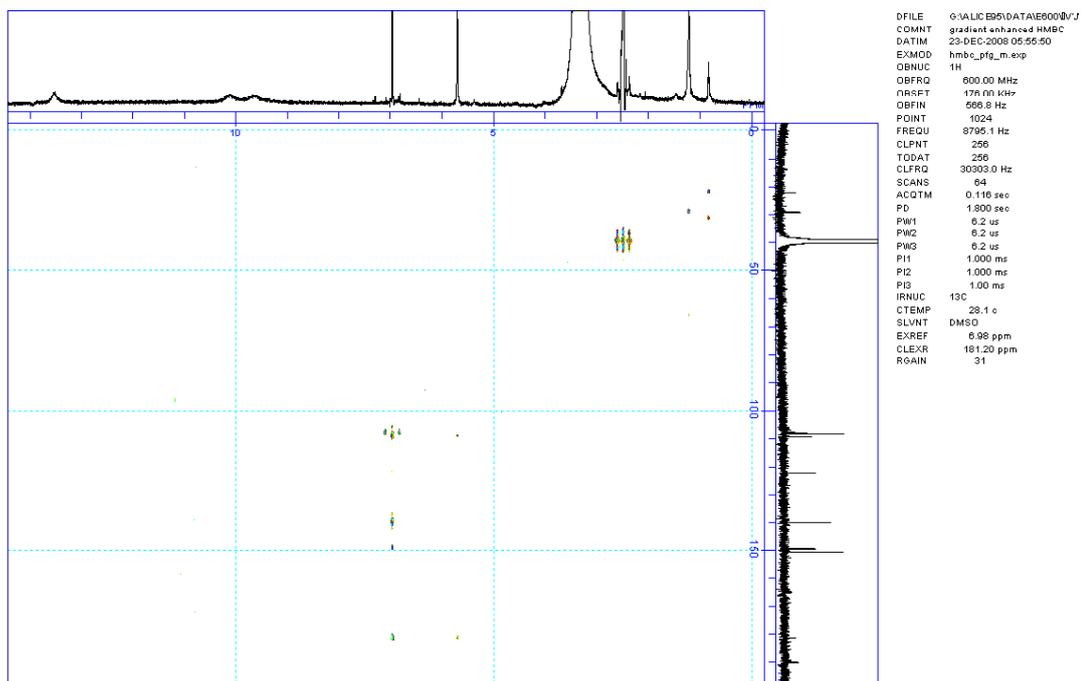


Fig. 3-13 HMBC spectrum of cribrarione C (**3**) in DMSO- d_6 ($^nJ_{CH} = 8$ Hz)

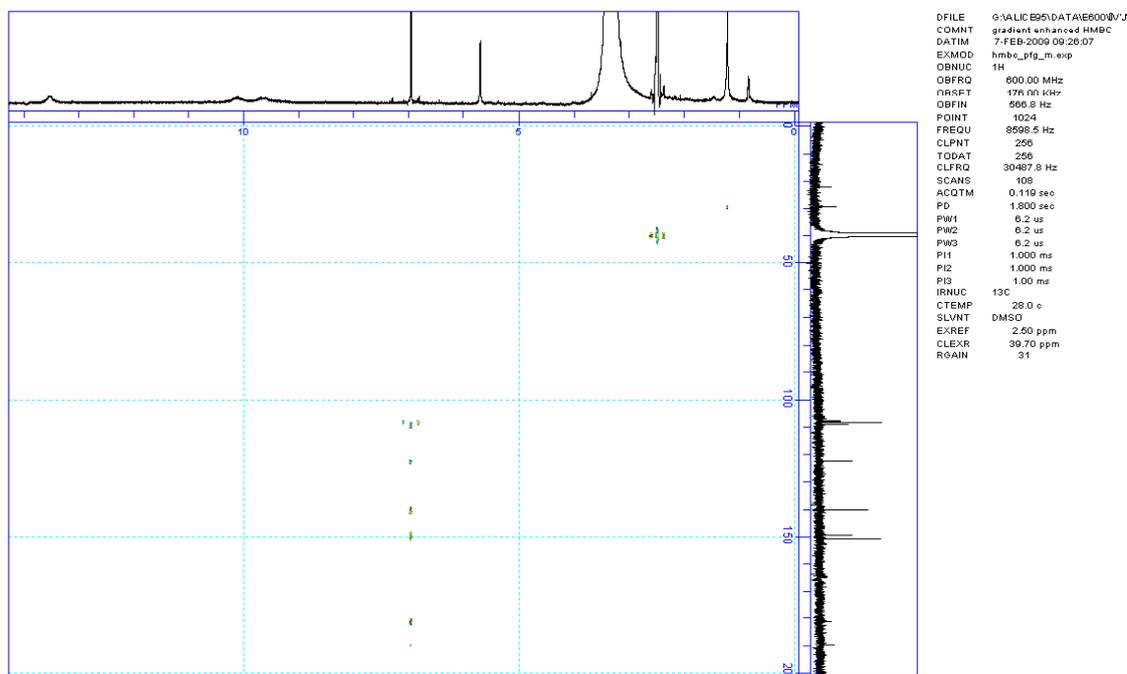


Fig. 3-14 HMBC spectrum of cribrarione C (**3**) in DMSO- d_6 ($^nJ_{CH} = 4$ Hz)

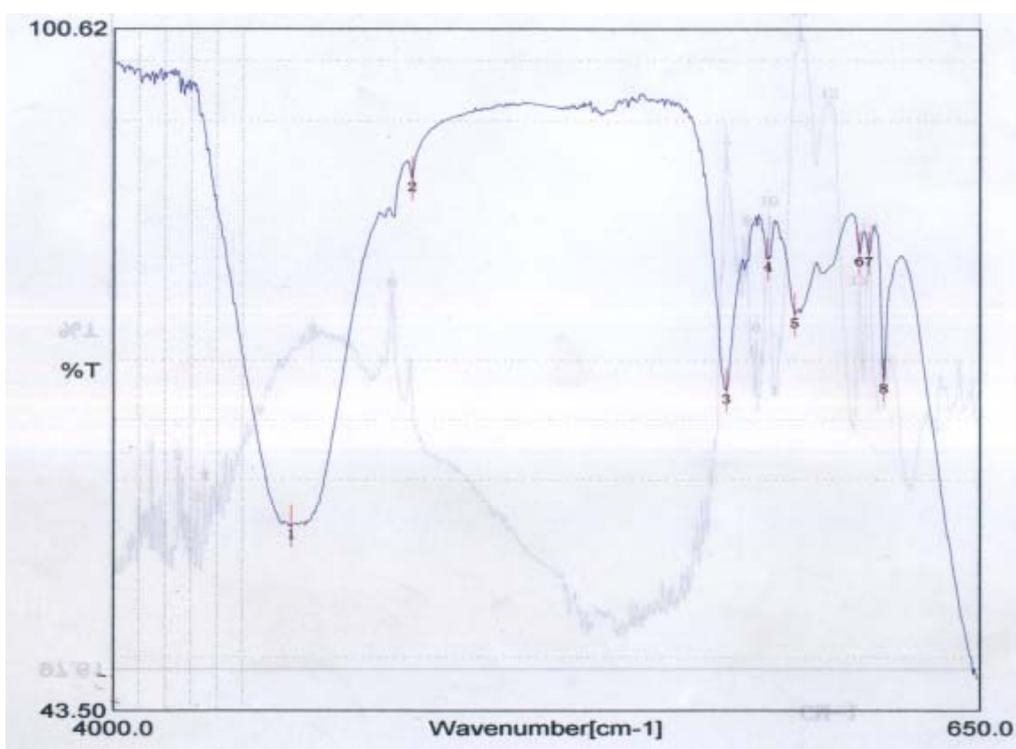


Fig. 3-15 IR spectrum of cribrarione C (3)

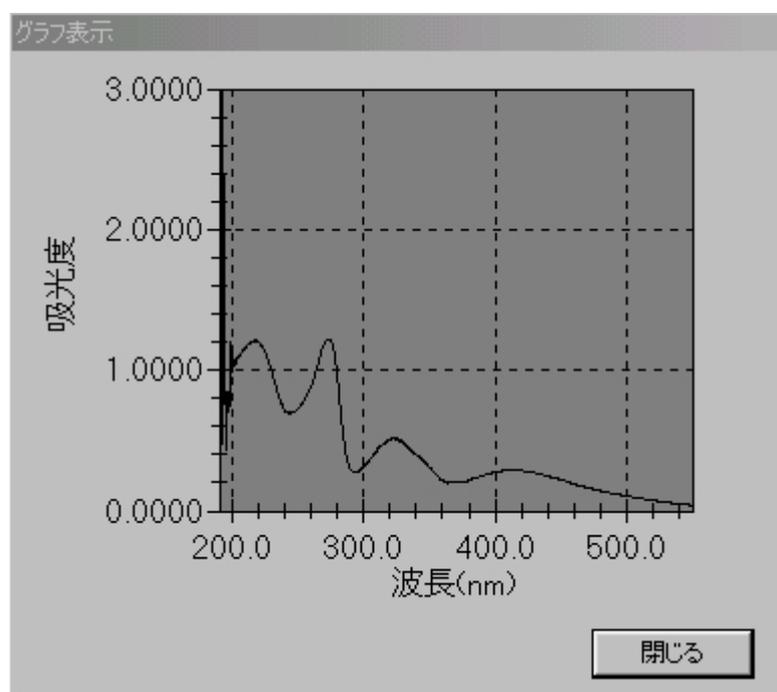


Fig. 3-16 UV spectrum of cribrarione C (3)

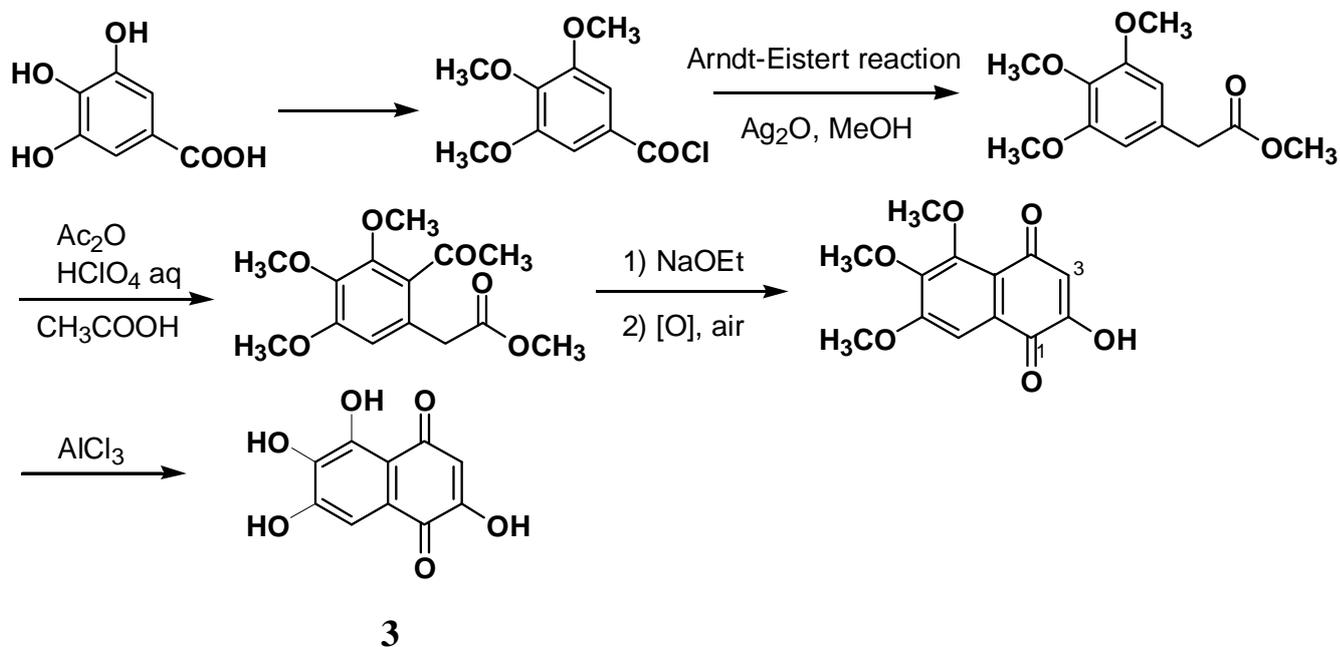
Table 3. ^1H - and ^{13}C -NMR Spectral Data of **3** in $\text{DMSO-}d_6$

position	δ_{H}	δ_{C}	HMBC	δ_{C} of 4 ^c
1		181.2		184.1
2		a		176.4
3	5.72 (s)	108.0	181.2, 109.3	113.3
4		189.6		189.6
5		150.6		151.6
6		140.0		141.5
7		149.1		149.5
8	6.98 (s)	108.3	181.2, 149.1 , ^b 140.0 122.3 , ^b 109.3	108.6
9		122.3		125.0
10		109.3		112.2
OH	9.67 (brs) 10.11 (brs) 13.52 (s)			

a) not observed in both experiments with a long-range delay of 62.5 ms and 125 ms.

b) observed weakly with a long-range delay of **62.5 ms**,
but observed clearly with a long-range delay of **125 ms**.

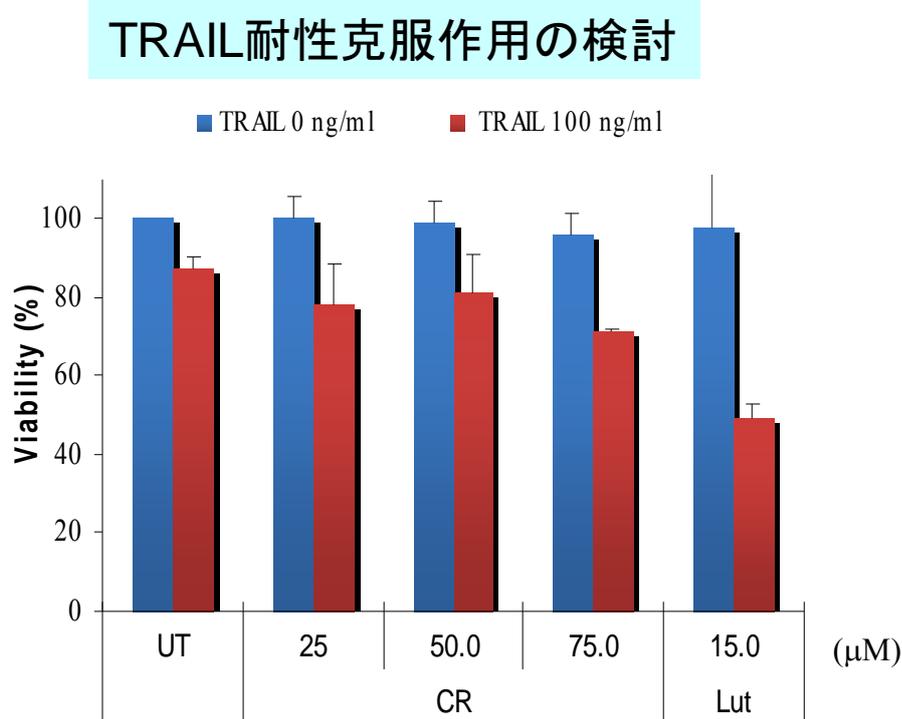
c) for naphthoquinone moiety (in CD_3OD)



Scheme. 3-1 Synthesis pathway of compound **3** in the literature³¹⁾

第 4 節 Cribrarione C の生物活性

Cribrarione C の生物活性について、現在当研究室で行っているアッセイ系による検討を行った。AGS 細胞を用いて TRAIL 耐性克服作用²⁶⁾を検討したところ、75 μM の濃度で TRAIL との併用により細胞生存率の減少が若干見られた (Fig. 3-17)。HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験²⁷⁾では活性は見られなかった。また paper disc を用いた抗菌試験を行ったところ、*Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性は見られなかった。



細胞生存率: TRAIL (100 ng/ mL) 単独 87%
cribrarione C (75 μM) 単独 96%
TRAIL (100 ng/ mL) + cribrarione C (75 μM) 71%

Fig. 3-17 TRAIL-resistant overcoming activity of cribrarione C

HeLa 細胞を用いた細胞毒性試験では化合物 **3** に細胞毒性は認められなかった。また AGS 細胞を用いた TRAIL 耐性克服作用を検討したところ、TRAIL 併用により細胞生存率が 25%減少したので中程度の活性が見られたと判定した。*Staphylococcus aureus* に対しての抗菌活性は見られなかった。

第5節 小括

Cribraria meylanii (メイラナミホコリ)子実体抽出物について、TLCの発色スポットを指標に分離精製を行い、*cribrarione C*と命名したナフトキノン型色素を単離し、その構造を明らかにした。本化合物はAGS細胞を用いたTRAIL耐性克服作用に中程度の活性が見られた。

第4章 野外採取子実体の成分研究 (3)

Arcyria cinerea (05-22)

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。子実体は、高さ 1-5 mm であり、単子嚢型で、群生または散生し、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。変形体は白色で、ときに灰色あるいは黄色である。本研究に用いた株は 2005 年に高知県と千葉県で採取され同定して頂いたものである。

本菌の化学成分については、当研究室の鎌田和明氏により報告がなされており cinereapyrrole A, B が単離されている²⁰⁾。

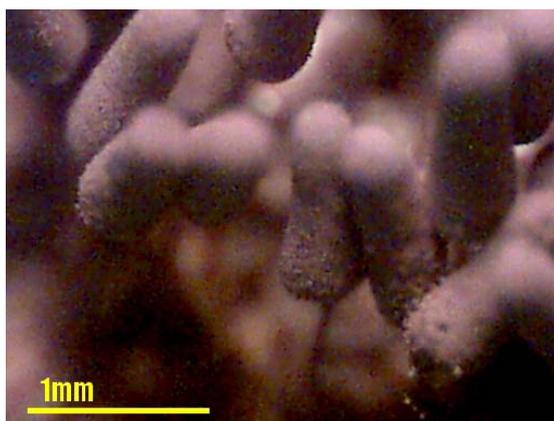
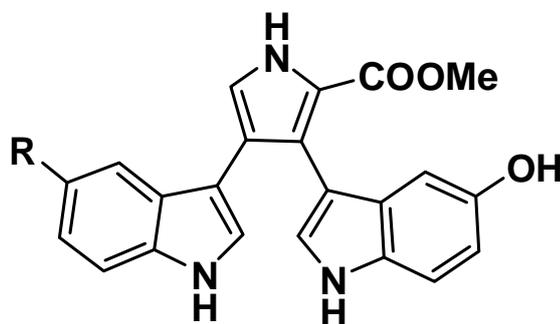


Fig.4-1 A wild fruit body of *Arcyria cinerea*



R = OH cinereapyrrole A

R = H cinereapyrrole B

Fig. 4-2 Structures of cinereapyrrole A, B

第2節 *Arcyria cinerea* の成分探索

2005年に高知県と千葉県で採取された *Arcyria cinerea* の野外採取子実体 (1.0 g) を90%メタノールおよび90%アセトンで抽出し、127.9 mgの子実体抽出物を得た。得られた抽出物についてTLCによる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、これを指標にして精製を進めた。抽出物の一部をシリカゲルカラム、ODS HPLCにより分離精製を行い、既知ビスインドール化合物 arcyriaflavin B (5)^{5a)} とともに新規化合物 6 を単離した。

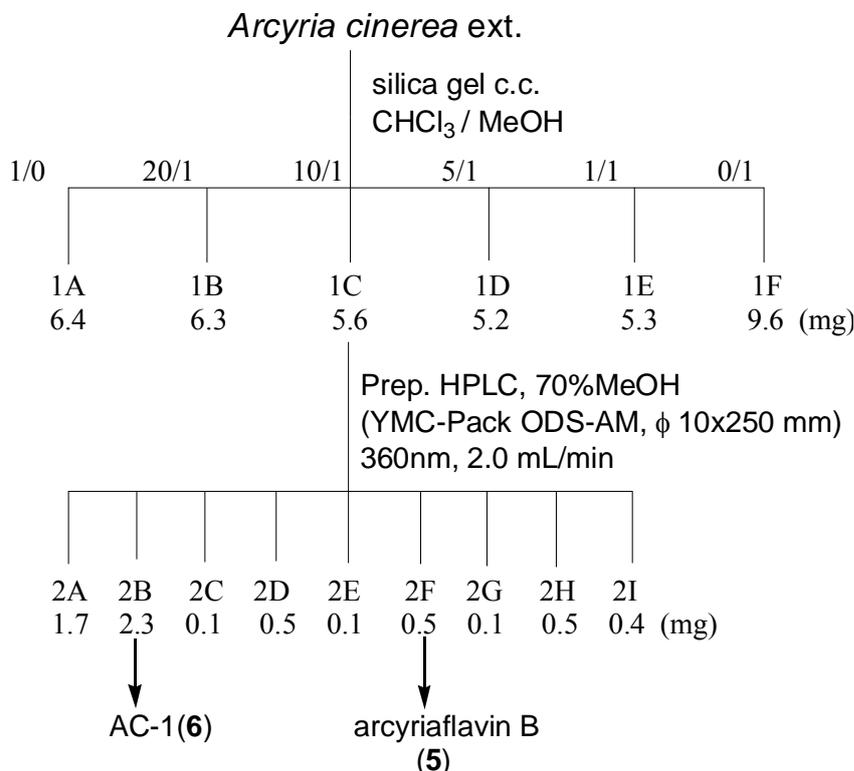


Fig. 4-3 Isolation chart of *Arcyria cinerea*

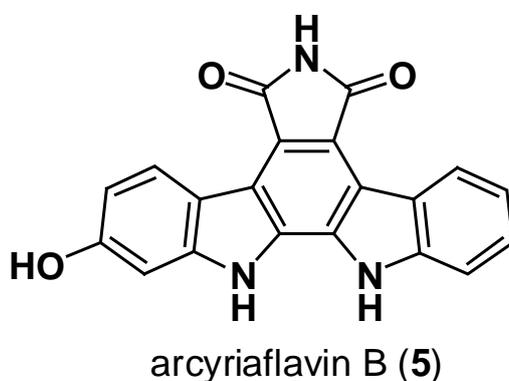


Fig. 4-4 Structure of arcyriaflavin B

第3節 化合物 **6** の構造解析

新規化合物 **6** は arcyriaflavin B と NMR チャートが類似しており、化合物 **6** では 6.55 ppm にシングレットのシグナルが観測された (Fig. 4-5). COSY スペクトル (Fig. 4-8), HMBC スペクトル (Fig. 4-10) の解析により2つの芳香環の存在が示唆された (Fig. 4-6). そこで、arcyriaflavin B と構造が似ている 6-hydroxystaurosporinone²¹⁾ とケミカルシフト値の比較を行った.

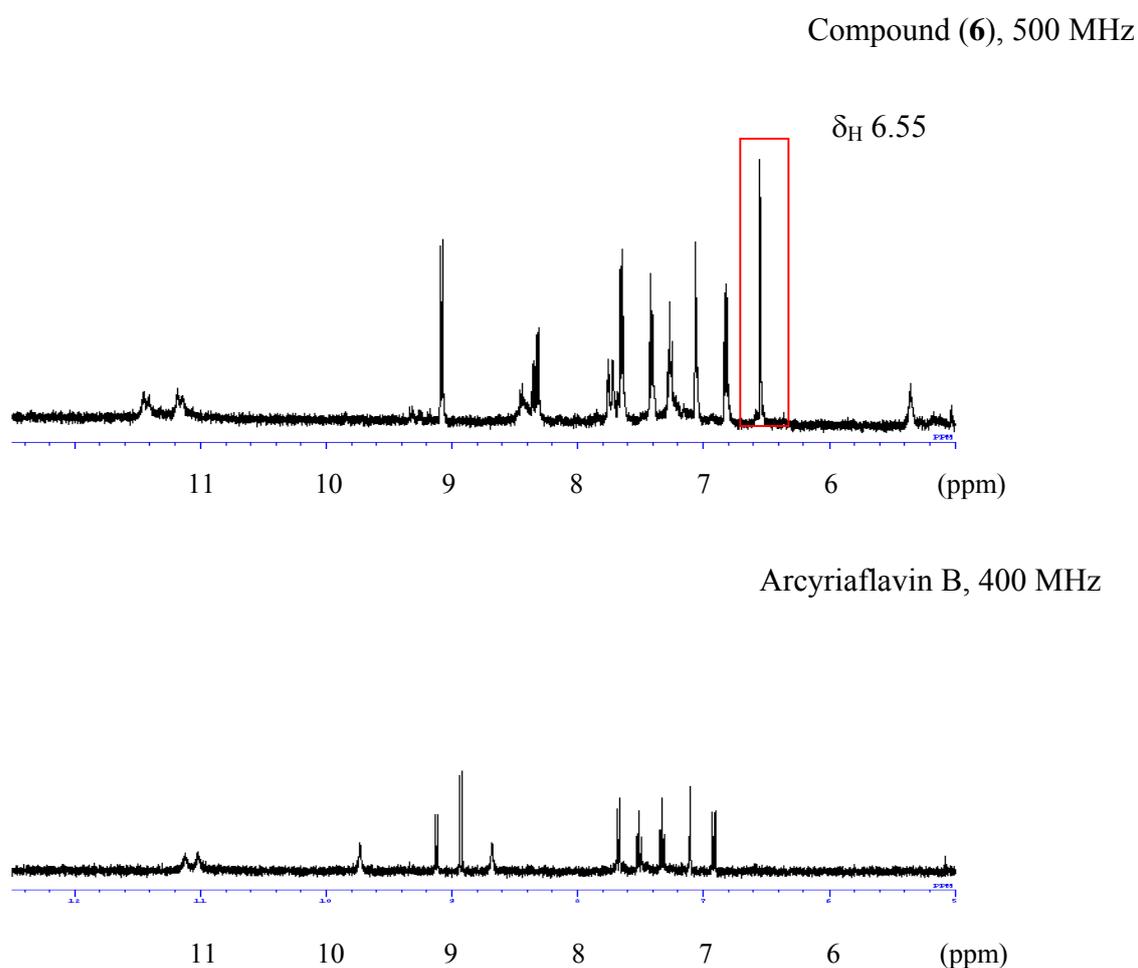


Fig. 4-5 ^1H NMR spectrum of compound **6** and arcyriaflavin B in acetone- d_6

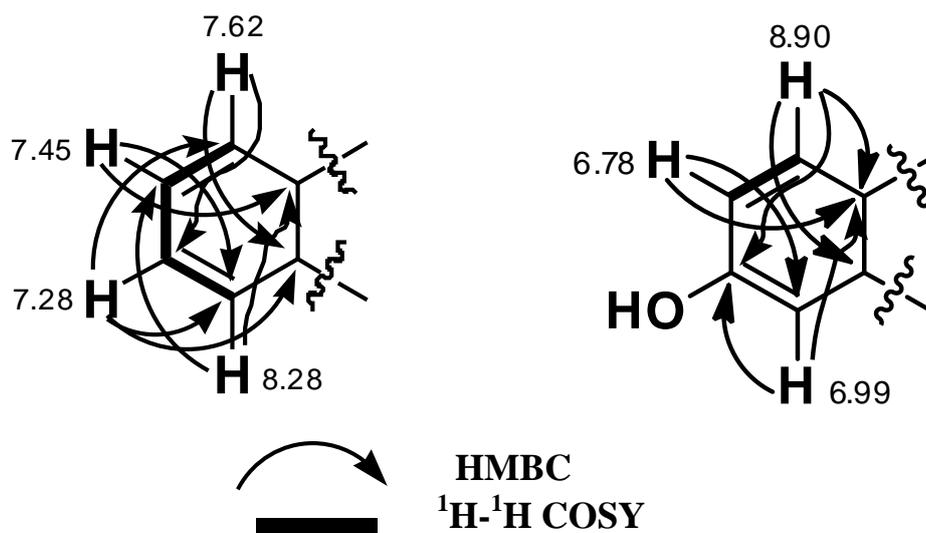


Fig. 4-6 ¹H-¹H COSY and HMBC correlations of compound **6**

その結果化合物 **6** は、6-hydroxystaurosporinone (**7**) とケミカルシフト値が類似しており、9'位プロトンのシフト値に違いが見られた。重アセトンを用いた ¹H NMR スペクトルでは、化合物 **6** の 9'位プロトンのシフト値は 6.55 ppm でありシングレットのシグナルが観測された。一方化合物 **7** では 5.02 ppm に 2H 分のプロトンのシグナルが観測された。化合物 **7** の 4 位と 4'位水素のケミカルシフト値において、9 位のカルボニル基に近い 4 位水素は 9.17 ppm に、カルボニル基が存在しない 9'位に近い 4'位の水素は 8.00 ppm に観測された。すなわち、カルボニル基が存在する側の 4 位水素は、カルボニル基が存在しない側の 4'位水素より低磁場側に観測された (Table. 4-1, Fig. 4-7)。これに基づき化合物 **6** の 4 位と 4'位水素について、低磁場側の 9.09 ppm のシグナルをカルボニル基が存在する 9 位側の 4 位に、高磁場側の 8.38 ppm のシグナルをカルボニル基が存在しない 9'位側の 4'位水素に帰属した。以上により本化合物の構造を 6 位にヒドロキシ基、9 位にカルボニル炭素、9'位にアミナル構造を有する新規ビスインドール化合物であると推定した。

Table 4-1 NMR data of compound **6** and 6-hydroxystaurosporinone (**7**)

	AC-1(CD ₃ OD)		AC-1(acetone- <i>d</i> ₆)	6-hydroxystaurosporinone	
	6		6	(acetone- <i>d</i> ₆) 7	
position	δ_H (J in Hz)	δ_C	δ_H (J in Hz)	δ_H (J in Hz)	δ_C
3					118.2
4	8.90 (1H, d, 8.7)	127.2	9.09 (1H, d, 8.6)	9.17 (1H, d, 8.4)	127.5
6		157.9			157.3
9		176.3			173.6
3'		132.4			133.6
4'	8.28 (1H, d, 7.9)	125.0	8.38 (1H, d, 7.2)	8.00 (1H, d, 7.8)	121.7
9'	6.48 (1H, s)	86.2	6.55 (1H, s)	5.02 (2H, s)	46.2
1-NH			11.44 (1H, s)	11.08 (1H, s)	
10-NH					
1'-NH			11.17 (1H, s)	10.76 (1H, s)	

in acetone-*d*₆

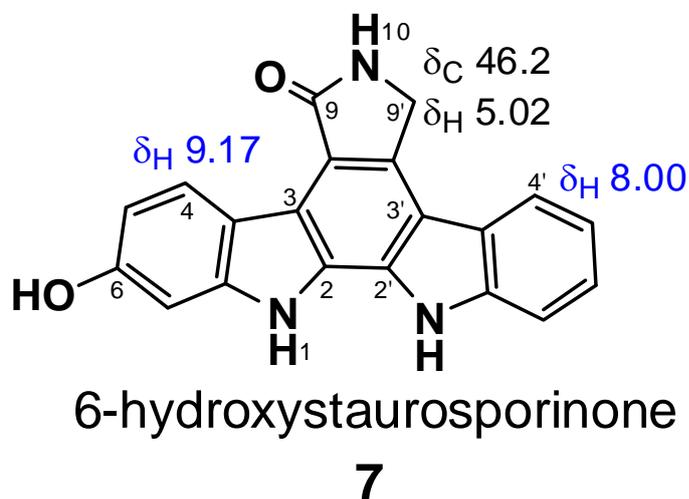
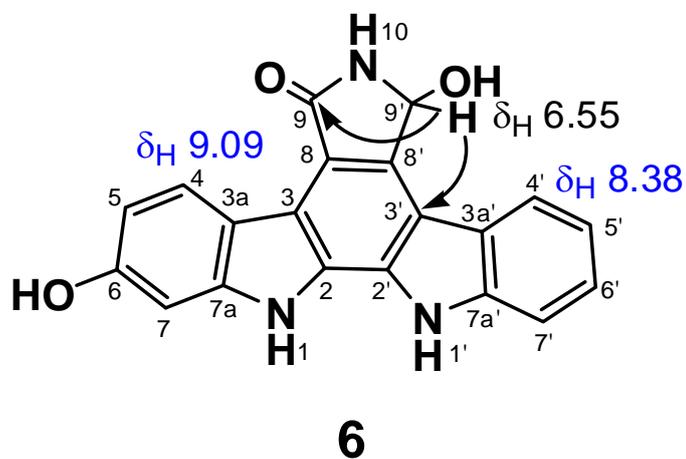


Fig. 4-7 NMR chemical shifts of **6** and **7**

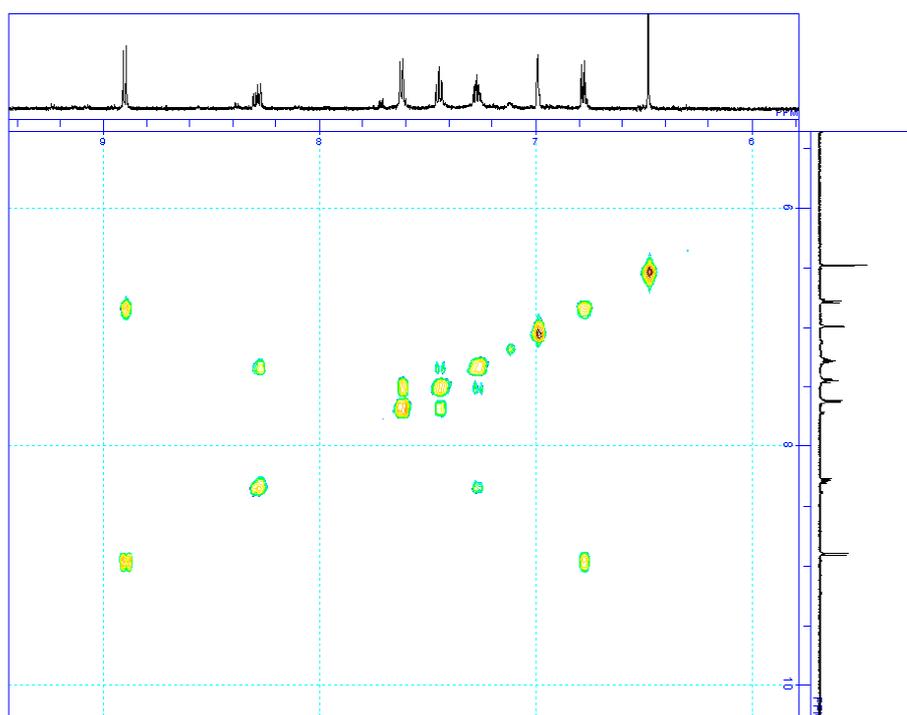


Fig. 4-8 ^1H - ^1H COSY spectrum of compound 6

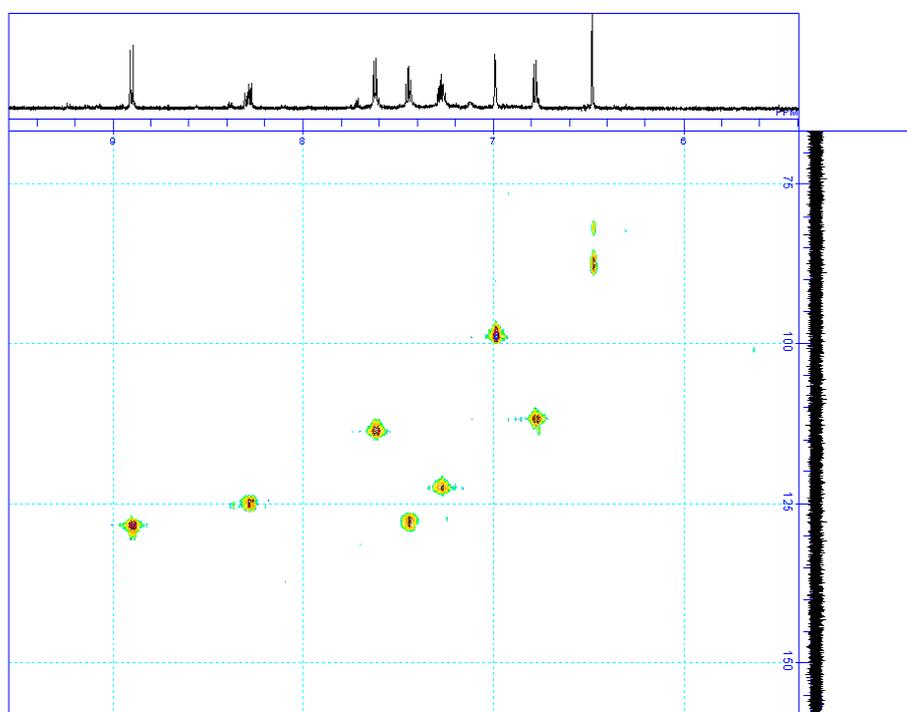
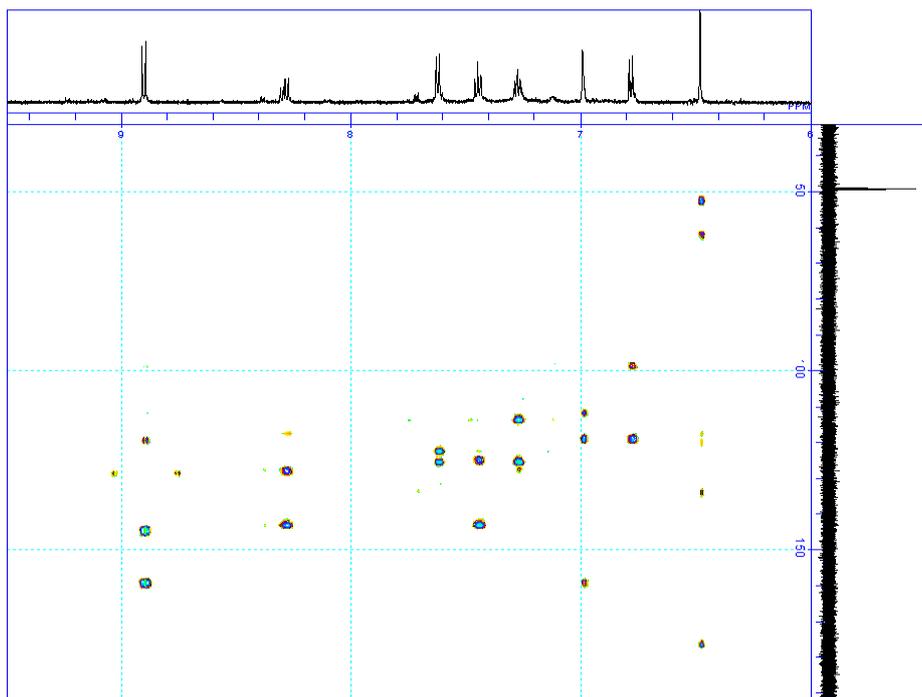
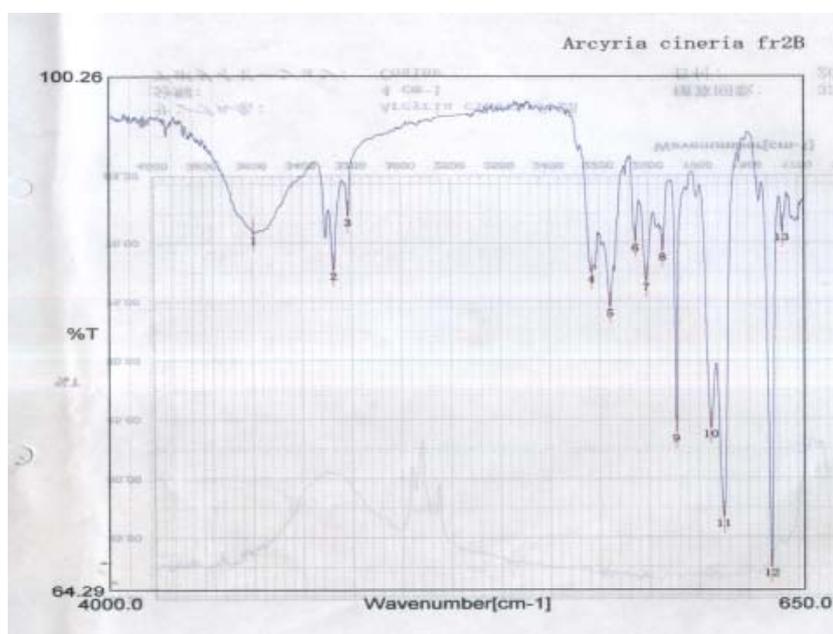


Fig. 4-9 HMQC spectrum of compound 6



Fig, 4-10 HMBC spectrum of compound **6**



Fig, 4-11 IR spectrum of compound **6**

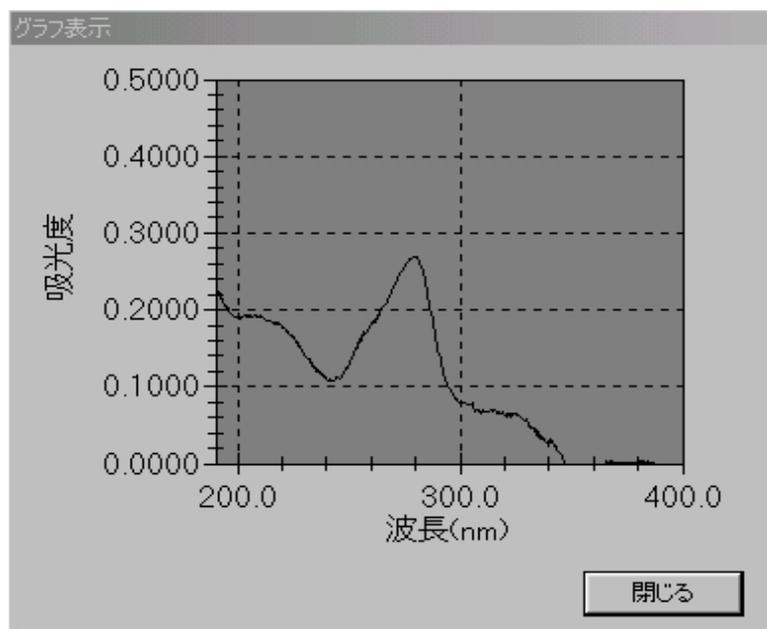


Fig. 4-12 UV spectrum of compound **6**

Table. 4-2 ^1H , ^{13}C NMR data of compound **6**

Compound 6 (CD_3OD)		6 (acetone- d_6)	
position	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
2			
3			
3a		119.9	
4	8.90 (1H, d, 8.7)	127.2	9.09 (1H, d, 8.6)
5	6.78 (1H, d, 8.7)	112.2	6.83 (1H, d, 8.6)
6		157.9	
7	6.99 (1H, s)	97.3	7.06 (1H, s)
7a		143.2	
8			
9		176.3	
2'			
3'		132.4	
3a'		126.0	
4'	8.28 (1H, d, 7.9)	125.0	8.38 (1H, d, 7.2)
5'	7.28 (1H, d, 7.9)	123.5	7.27 (1H, d, 7.2)
6'	7.45 (1H, d, 7.9)	126.5	7.42 (1H, d, 7.2)
7'	7.62 (1H, d, 7.9)	114.8	7.65 (1H, d, 7.2)
7a'		141.6	
8'			
9'	6.48 (1H, s)	86.2	6.55 (1H, s)
1-NH			11.44(1H, s)
10-NH			
1'-NH			11.17 (1H, s)

次に fig. 4-13 に示した反応を参考にして³²⁾, arcyriaflavin B (5)を用いた還元反応を行なった (Fig. 4-14) . Arcyriaflavin B (5)を DIBALH 還元することにより, 9'位還元体 6 と 9 位還元体 8 の生成を予想した. 反応生成物を精製後, 天然品と TLC 比較を行ったところよい一致を示した.

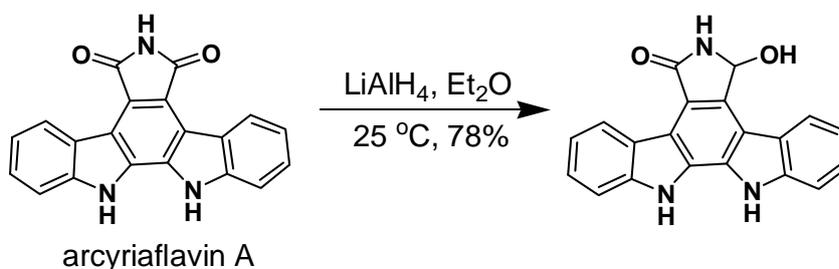


Fig. 4-13 Reduction of arcyriaflavin A

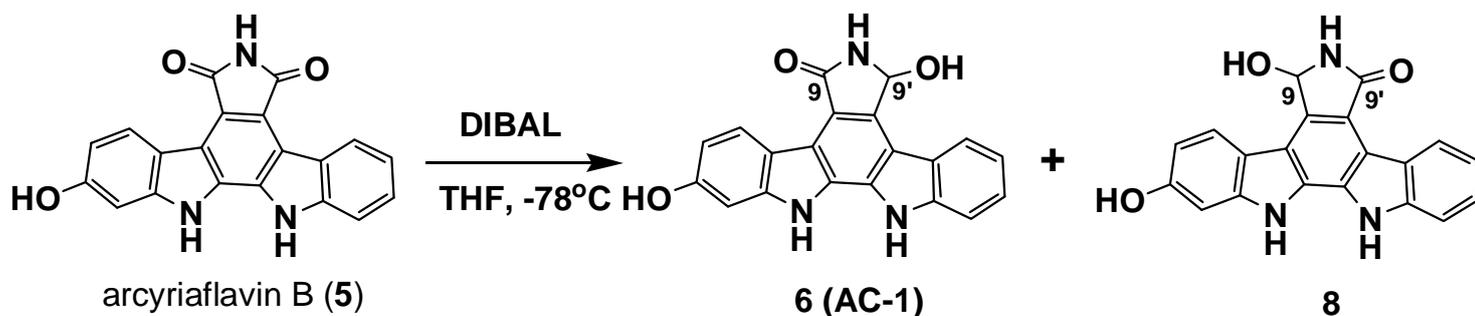


Fig. 4-14 Reduction of arcyriaflavin B

次に天然品と反応生成物の HPLC 分析を行なった. 以下に示す条件で分析を行なった. その結果天然品は保持時間 40 分にピークを示し (Fig. 4-15), Fig. 4-16 に示す UV スペクトルが観察された. 一方反応生成物も保持時間 40 分にピークを示し (Fig. 4-15). Fig. 4-17 に示す UV スペクトルが観察され天然品と一致した. 従って保持時間 40 分のピークを 9'位還元体 6 と推定した. また保持時間 38 分のピークは UV 吸収が 40 分のピークと類似しているため, 9 位還元体 8 と推定した.

<分析条件>

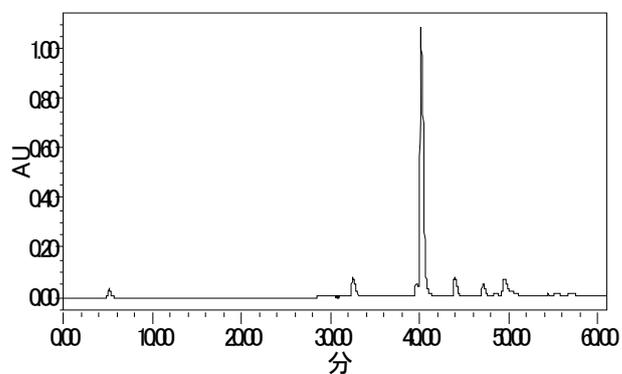
Solvent : 40%MeOH-100%MeOH gradient

Column : CAPCELL PAK C18 ACR s-3mm, (φ 4.6 x 250 mm)

Flow rate : 0.5 mL/ min, Detector : Photodiode array

Concentration : 5 mg/ mL, 5 μL inject, UV detection : 300 nm

AC-1(天然物)



t_R 40 min

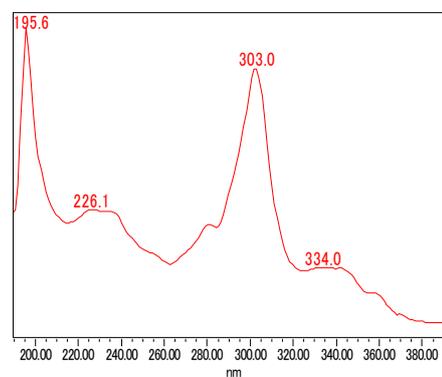


Fig.4-16 UV spectrum of AC-1 (6)

(反应生成物)

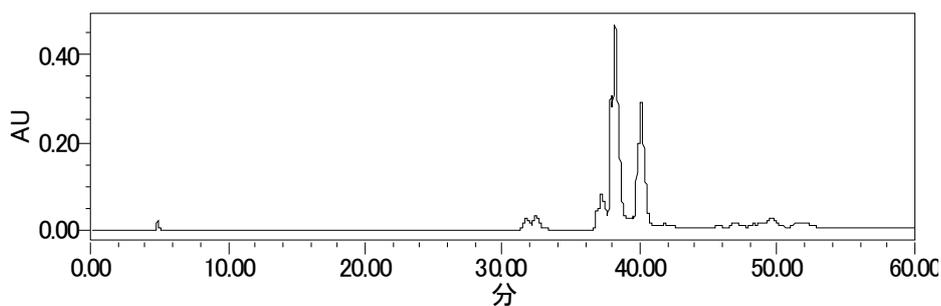
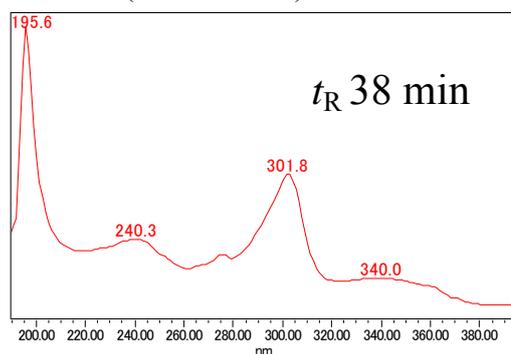


Fig. 4-15 HPLC analysis of AC-1 (6) and reaction products

(反应生成物) 8



(反应生成物) 6

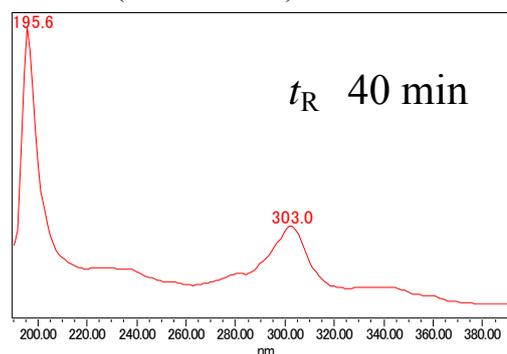


Fig. 4-17 UV spectrum of reaction products

第4節 小括

Arcyria cinerea (シロウツボホコリ)より、既知ビスインドール化合物とともに新規ビスインドール化合物を単離し、その構造をアミナール構造を含む 6, 9'-dihydroxystaurosporinone と推定した.

第5章 他の変形菌からの既知化合物の単離

第1節 既知化合物の単離

この他, *Metatrichia vesparium* (ハチノスケホコリ) (07-01)より既知ビスインドール化合物 arcyriaflavin B, Cを単離した. また *Arcyria denudata* (ウツボホコリ) (05-161)より arcyriarubin Cを単離した (Fig. 5-1) .

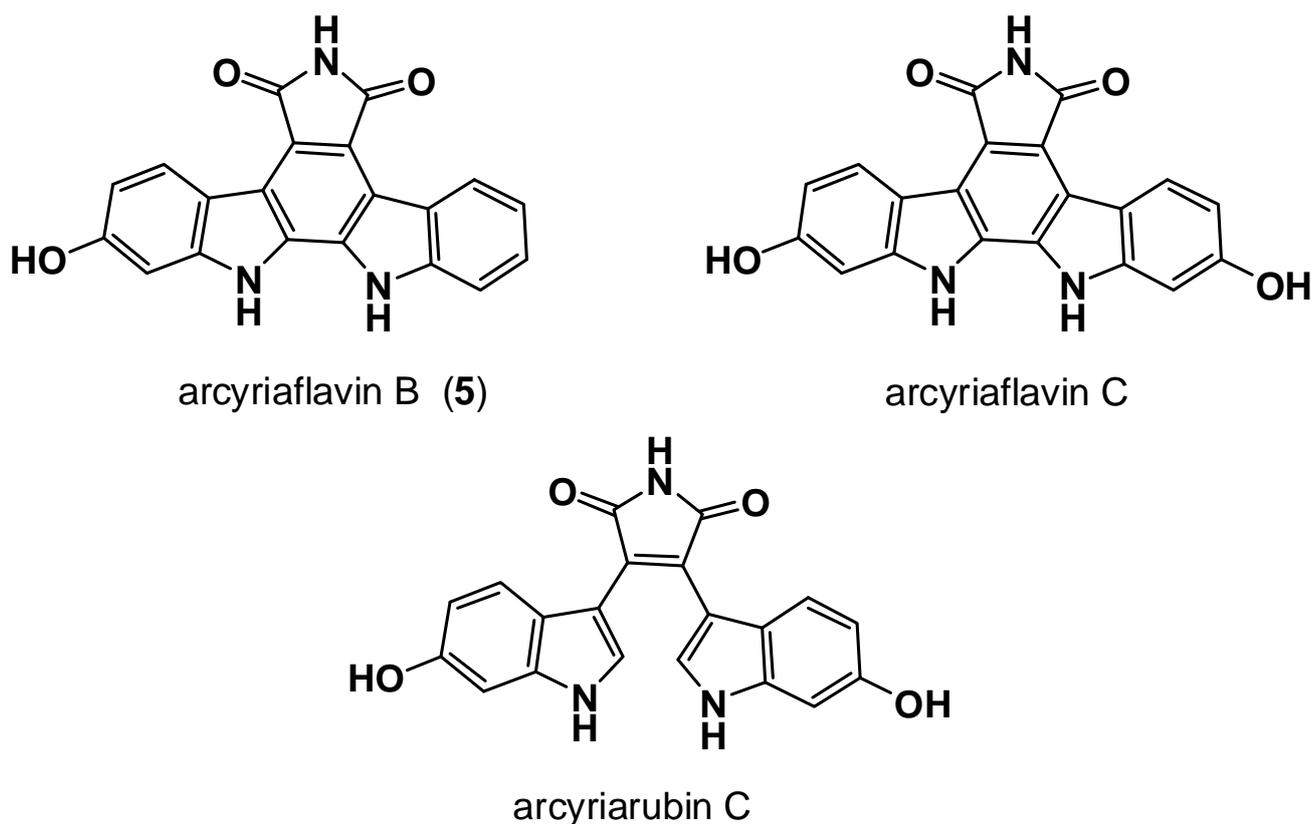
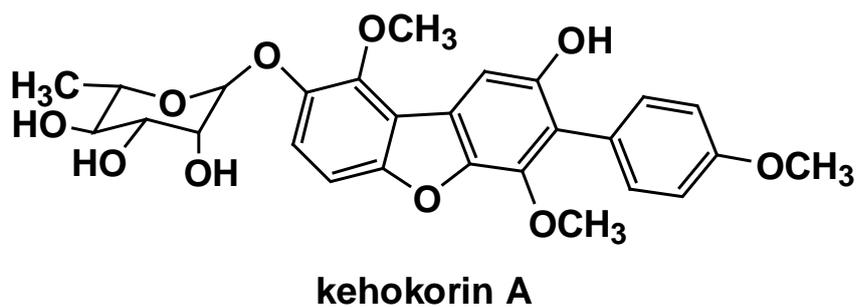
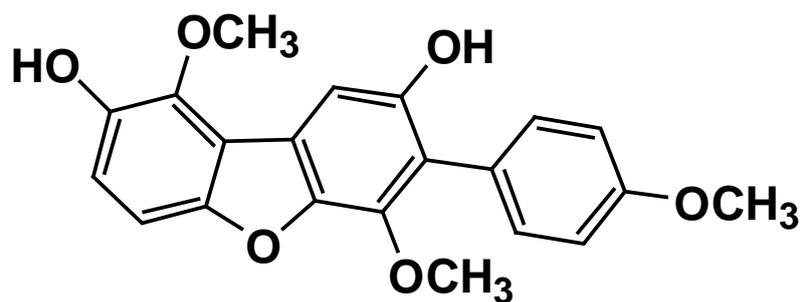


Fig. 5-1 Bisindoles from *Metatrichia vesparium* and *Arcyria denudata*

Trichia favoginea var. *persimilis* (トゲケホコリ) (05-169)からは既知 *p*-ter-phenyl 化合物 kehokorin A, Bを単離した (Fig. 5-2) .

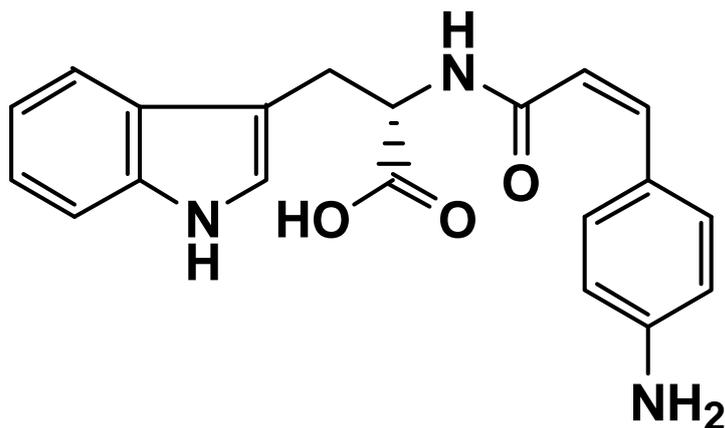




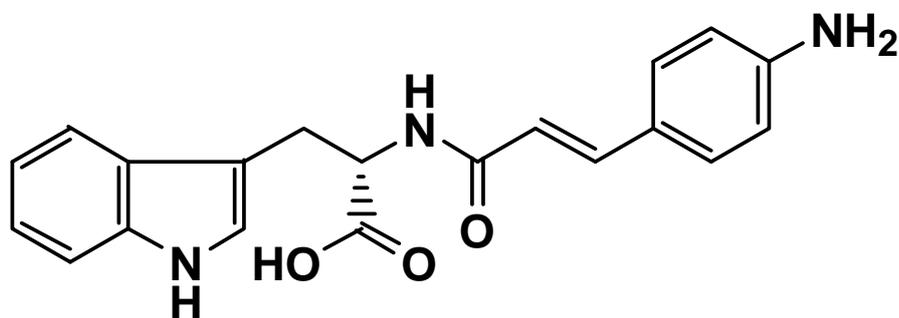
kehokorin B

Fig. 5-2 Structures of kehokorin A, B

Fuligo aurea (ムシホコリ) (06-32) および *Fuligo septica* f. *flava* (キフシスホコリ) (08-09)より, tryptophan *cis* および *trans*-4-aminocinnamamide を単離した (Fig. 5-3) .



tryptophan *cis*-4-aminocinnamamide



tryptophan *trans*-4-aminocinnamamide

Fig. 5-3 Structures of tryptophan *cis* and *trans*-4-aminocinnamamide

総括

筆者は、創薬につながる新規天然シーズ探索の一環として未利用資源である変形菌に着目し、野外採取子実体の成分研究を行った。

Fuligo septica f. *flava* (キフシスホコリ) 野外採取子実体の成分研究を行い、fuligoic acid (**1**), dehydrofuligoic acid (**2**)と命名した二種の新規ポリエン型ピロン化合物を単離した。二次元 NMR, ESIMS, MS/MS などの各種スペクトルデータに基づいて構造解析を行い、fuligoic acid はジヒドロピロン環が、dehydrofuligoic acid は α -ピロン環がテトラエンと結合している構造であることを明らかにした。また両化合物は、テトラエンの末端にカルボキシ基と塩素を有する構造であった。

Cribraria meylanii (メイランアミホコリ) 野外採取子実体の成分研究を行い、cribrarione C と命名したナフトキノ型色素を単離した。各種スペクトル解析に基づき、本化合物は 2,5,6,7-テトラヒドロキシナフトキノ化合物であることを明らかにした。本化合物は没食子酸からの合成報告例があったが、天然物から単離されたのは今回が初めてである。本化合物について AGS 胃がん細胞を用いた TRAIL 耐性克服作用を検討したところ、TRAIL 併用により細胞生存率が 25% 減少したので中程度の活性が見られたと判定した。

Arcyria cinerea (シロウツボホコリ) 野外採取子実体の成分研究を行い、既知ビスインドール化合物 arcyriaflavin B とともに新規ビスインドール化合物 AC-1 を単離し、その構造をアミナール構造を含む 6,9'-dihydroxystaurosporinone と推定した。Arcyriaflavin B の DIBAL 還元により AC-1 が得られることを HPLC 分析により確認した。

その他数種の変形菌より、ビスインドール化合物を始めとする数種の既知化合物を単離した。

実験の部

使用機器

核磁気共鳴装置 (NMR)

JEOL JNM-A400 spectrometer (400MHz), JEOL JNM-A500 spectrometer (500MHz), JEOL ecp400 spectrometer (400MHz), JEOL ECA600, ecp600 spectrometer (600MHz), または JEOL ECA 800 spectrometer (800MHz)を使用した。

また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} 2.05, δ_{C} 29.8), CD_3OD (δ_{H} 3.31, δ_{C} 49.0), DMSO- d_6 (δ_{H} 2.50, δ_{C} 39.7)

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), q (quartet), m (multiplet) および br (broad) とそれぞれ略して表記した.

質量分析装置 (MS)

EIMS : JMS GC-Mate mass spectrometer (JEOL)

HREIMS : JMS GC-Mate mass spectrometer (JEOL)

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

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

ESIMS : Waters ZQ 2000,

HRESIMS : Shimadzu LCMS-IT-TOF spectrometer, Exactive (Thermo fisher scientific)

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 (HRFABMS) には NBA をマトリックスとし, PEG (polyethyleneglycol) を標準物質として用い, HREIMS には PFK (perfluorokerosene) 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) : J-720WI spectropolarimeter (JASCO)

紫外・可視分光光度計 (UV-VIS)

Uvmini-1240 spectrophotometer (Shimadzu)

赤外吸収分光光度計 (IR)

FT-IR230 spectrometer (JASCO) を使用し, 試料は DuraSample/ IR II (smiths) を用いた全反射法 (ATR 法) により測定した.

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 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 370mL

《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 0.5 g / *n*-BuOH 100 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 2.0g / H₂O 5.0 mL

(c) Tartaric Acid 10 g / H₂O 50 mL

(a), (b), (c)を混合して使用した。

カラム担体

PSQ 100B (富士シリシア化学)

Silica gel 60 N (spherical, neutral) (関東化学)

Sephadex LH-20 (Pharmacia)

Chromatorex ODS (富士シリシア化学)

HPLC 装置

カラム : Capcell Pak ATR (4.6×250 mm) (SHISEIDO)

YMC-Pack ODS AM (10×250 mm) (YMC)

装置は以下の組み合わせで用いた。

・分取 HPLC

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

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

・分析 HPLC (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)
・ 分析 HPLC (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

第 2 章に関する実験

抽出操作

Fuligoic septica f. *flava* 野外採取子実体(17.4 g)を MeOH (200 mL)に浸し, 10 分間ホモジナイズを行った後, 4000 rpm で 10 分間遠心分離を行い, 上澄をろ紙でろ過した. 続いてメタノール(200 mL)およびアセトン(100 mL)でそれぞれ二回同じ操作を繰り返し行うことにより, 742.5 mg の粗抽出物を得た.

単離

粗抽出物 742.5 mg を水 100%からメタノールの割合を段階的に上げて ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 20 x 200 mm) により精製を行い, Fr1A-L を得た. 25 %MeOH 溶出画分の Fr1B (25.4 mg) を Sephadex LH-20 (φ 15 x 270 mm, MeOH)さらに ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー(φ 15 x 220 mm, 50% MeOH)により精製を行い, fr5D から fuligoic acid **1** を 4.4 mg 得た. また, 25 %MeOH 溶出画分の fr1C(14.7 mg)を Sephadex LH-20 (φ 10 x 220 mm, MeOH)により精製を行い, fr2A-D を得た. Fr2C (4.9 mg)を Sephadex LH-20 (φ 10 x 220 mm, MeOH)により精製を行い, fr3A-C を得た. Fr3B から dehydrofuligoic acid **2** を 3.8 mg 得た.

Fuligoic acid 1

Yellow powder; $[\alpha]_D^{17}$ -31 (c 0.33, MeOH); UV (MeOH) λ_{\max} 340 (ϵ 12820), 325 (ϵ 15100), and 233 nm (6600); IR (ATR) ν_{\max} 3390, 1680, 1620, 1580, and 1380 cm^{-1} ; ^1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (150 MHz) in DMSO- d_6 (Table 1); ^1H NMR (800 MHz, CD₃OD) δ_{H} 2.56 (1H, dd, $J = 17.0, 4.6$ Hz; H-4 α), 2.63 (1H, dd, $J = 17.0, 10.0$ Hz; H-4 β), 3.79 (3H, s; H₃-15), 5.03 (1H, ddd, $J = 10.0, 6.0, 4.6$ Hz; H-5), 5.20 (1H, s; H-2), 5.90 (1H, dd, $J = 15.1, 6.0$ Hz; H-6), 6.44 (1H, dd, $J = 14.7, 10.1$ Hz; H-8), 6.47 (1H, dd,

$J = 15.1, 10.1$ Hz; H-7), 6.50 (1H, dd, $J = 14.7, 10.1$; H-9), 6.62 (1H, dd, $J = 14.7, 10.1$ Hz; H-10), 6.66 (1H, dd, $J = 14.7, 10.6$ Hz; H-11), and 7.30 (1H, d, $J = 10.6$ Hz; H-12); (+)-ESIMS m/z 333 and 335 ($M+Na$)⁺; (–)-ESIMS m/z 309 and 311 ($M-H$)[–]; (–)-HRESIMS m/z 309.0556 [calcd for $C_{15}H_{14}O_5^{35}Cl$, ($M-H$)[–] 309.0530], m/z 311.0521 [calcd for $C_{15}H_{14}O_5^{37}Cl$, ($M-H$)[–] 311.0500], m/z 265.0634 [calcd for $C_{14}H_{14}O_3^{35}Cl$, ($M-H-CO_2$)[–] 265.0631], m/z 229.0878 [calcd for $C_{14}H_{13}O_3$, ($M-H-CO_2-HCl$)[–] 229.0865]; CD (MeOH, 0.47 mM) λ_{max} ($\Delta\epsilon$) 224 (+1.6) 244 (–5.3) nm. ¹H (600 MHz) and ¹³C (125 MHz) in DMSO-*d*₆ (Table 1)

Dehydrofuligoic acid 2

Yellow powder; UV (MeOH) λ_{max} 406 (ϵ 10490), λ_{max} 386 (ϵ 12720), and 303 nm (6620); IR (ATR) ν_{max} 3420, 1680, 1600, 1460, and 1370 cm^{-1} ; ¹H (600 MHz) and ¹³C NMR (125 MHz) in DMSO-*d*₆ (Table 1); (–)-ESIMS m/z 307 and 309 ($M-H$)[–]; (–)-HRESIMS m/z 307.0338 [calcd for $C_{15}H_{12}O_5^{35}Cl$, ($M-H$)[–] 307.0373], m/z 309.0360 [calcd for $C_{15}H_{12}O_5^{37}Cl$, ($M-H$)[–] 309.0344], m/z 265.0462 [calcd for $C_{14}H_{12}O_3^{37}Cl$, ($M-H-CO_2$)[–] 265.0445], m/z 263.0491 [calcd for $C_{14}H_{12}O_3^{35}Cl$, ($M-H-CO_2$)[–] 263.0475], m/z 227.0719 [calcd for $C_{14}H_{11}O_3$, ($M-H-CO_2-HCl$)[–] 227.0708]. ¹H (600 MHz) and ¹³C (125 MHz) in DMSO-*d*₆ (Table 2)

Fuligoic acid 1 のメチル化

Fuligoic acid (0.2 mg, 0.65 μ mol)を Ar 気流下室温で脱水メタノール(0.1 mL)に溶解し, TMSCHN₂ の 10% *n*-hexane 溶液 (140 μ L) を加えて室温で 10 時間反応を行った. 反応溶液を減圧下溶媒を留去した. 得られた粗生成物を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー (ϕ 10 x 175 mm, 展開溶媒: クロロホルム/メタノール= 49 : 1) で精製したところ, メチルエステルが 0.2 mg 得られた.

FS-3 methyl ester : EIMS m/z 324 M⁺

Fuligoic acid 1 の ¹H nondecoupling ¹³C NMR 測定

重 DMSO 溶媒中, fuligoic acid の ¹H nondecoupling ¹³C NMR 測定を行った. パルス繰り返し時間 (PD) の間だけ ¹H を照射し NOE を生じさせて感度を上げた. 14 位炭素 (δ_c 163.4) と 12 位水素 (δ_H 7.15) とのカップリングを読み, 2.8 Hz であると算出した.

Fuligoic acid 1 の 8KHMBC 測定

重 DMSO 溶媒中, fuligoic acid の X 軸のポイント数を 8K にして HMBC 測定を 22.5 時間行った. 14 位炭素と 12 位水素とのカップリングの値を ¹H NMR のケミ

カルシフト値から読み, 2.4 Hz であると算出した.

第 3 章に関する実験

抽出操作

Cribraria meylanii 野外採取子実体(2.17 g)を 90% MeOH (100 mL)に浸し, 10 分間ホモジナイズを行った後, 4000 rpm で 10 分間遠心分離を行い, 上澄をろ紙でろ過した. 続いて 90%メタノール(50 mL)および 90%アセトン(50 mL)で二回同じ操作を繰り返し行うことにより抽出を行い, 907.7mg の粗抽出物を得た.

単離

粗抽出物 907.7 mg をクロロホルム/メタノール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(ϕ 20 x 440 mm)により精製を行い, Fr1A-H を得た. 100%メタノールで溶出し, Fast Red B 試薬で発色した fr1F (110.0 mg)を ODS シリカゲルカラム(ϕ 10 x 260 mm, 50%MeOH+0.1% TFA) により精製を行い, fr2A-2C を得た. さらに fr2A (87.2 mg)を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー(ϕ 15 x 380 mm, MeOH)により精製を行い, fr3A-E を得た. Fr3B から cribrarione C (**3**)を 3.8 mg 得た.

Cribrarione C (3)

Red brown solid

EIMS m/z 222 [M^+]

HREIMS m/z 222.0161 [M^+] [calcd for $C_{10}H_6O_6$]

UV (EtOH) λ_{max} 414 (ϵ 2100), 323 (ϵ 3800), and 273 nm (ϵ 9000); IR (ATR) ν_{max} 3320, 1630 cm^{-1} ; 1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) in DMSO- d_6 (Table 3);

第 4 章に関する実験

抽出操作

Arcyria cinerea 野外採取子実体(1.0 g)を 90% MeOH (35 mL)に浸し, 10 分間ホモジナイズを行った後, 4000 rpm で 10 分間遠心分離を行い, 上澄をろ紙でろ過した. 続いて 90%メタノール(35 mL)および 90%アセトン(20 mL)で二回同じ操作を繰り返し行うことにより抽出を行い, 127.9mg の粗抽出物を得た.

単離

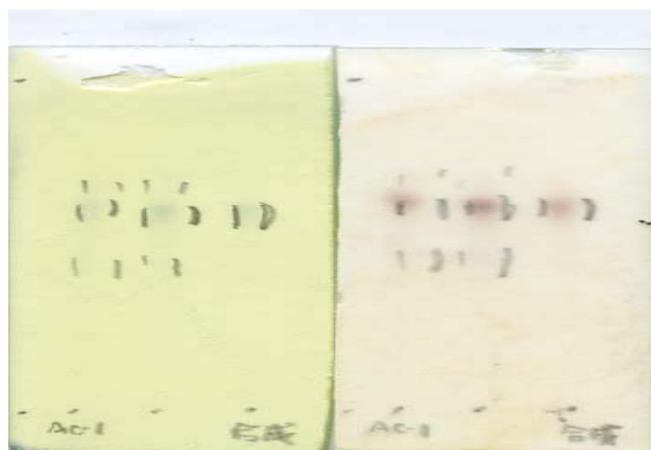
粗抽出物 127.9 mg をクロロホルム/メタノール系の溶媒を用い、メタノールの割合を段階的に上げてシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製を行い、Fr1A-Fを得た。クロロホルム/メタノール = 9/1 溶出面分で Fast Red B 試薬で発色した fr1C (5.6 mg) を ODS HPLC (YMC-Pack ODS-AM, ϕ 10 x 250 mm, 溶離液: 70% MeOH) により精製を行い、fr2A-2I を得た。Fr. 2B (2.3 mg) を AC-1(6) とし、fr2F (0.5 mg) を arcyriaflavin B (5) とした。

AC-1 (6)

UV (MeOH) λ_{\max} 314, 282 nm, IR (ATR) ν_{\max} 3310, 2920, 1670, 1580 cm^{-1} ; ^1H (600 MHz) and ^{13}C NMR (125 MHz) in acetone- d_6 (Table 4-2);

AC-1 (6) の還元反応

Arcyriaflavin B (2.1 mg, 6.2 μmol) を Ar 気流下脱水 THF (60 μL) に溶解させ、DIBAH の 0.99 M トルエン溶液 (50 μL , 49.5 μmol) を滴下し、室温で 3 時間反応させた。反応溶液に水を加えさらに 2N 塩酸を加えて、酢酸エチルで抽出し無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下溶媒を留去した。得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 10 x 220 mm, 展開溶媒: クロロホルム/メタノール = 4 : 1) で精製し、原料とともに還元生成物を 0.3 mg 得た。



↑ 天然品 ↑ 反応生成物 ↑ 天然品 ↑ 反応生成物
silica gel plate,
 $\text{CHCl}_3 / \text{MeOH} = 3 : 1$, Fast Red B 試薬

AC-1 (6)と反応生成物の HPLC 分析

AC-1 の天然物と DIBAH 還元反応生成物の HPLC を行った.

<分析条件>

Solvent : 40%MeOH-100%MeOH gradient

Column : CAPCELL PAK C18 ACR s-3mm, (ϕ 4.6 x 250 mm)

Flow rate : 0.5 mL/ min, Detector : Photodiode array

Concentration : 5 mg/ mL, 5 μ L inject, UV detection : 300 nm

その結果, AC-1 の天然物は保持時間 40 分にピークを示した. また UV スペクトルで 303 nm に吸収極大を示した. 一方, 反応生成物は保持時間 38 分と 40 分にピークを示した. UV スペクトルで, 保持時間 40 分のピークは 303 nm に吸収極大を示し, 9'位還元体と推定した. また保持時間 38 分のピークは 302 nm に吸収極大を示し 9 位還元体と推定した.

参考文献

- 1) 海老塚豊, 森田博史 編 パートナー天然物化学; 南江堂, 2007, 268.
- 2) Gerth K.; Bedorf N.; Höfle G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. *Journal of Antibiotics*, **1996**, *49*, 560-563.
- 3) Steglich W. *Pure Appl. Chem.*, **1989**, *61*, 281-288.
- 4) 萩原博光, 山本幸憲 日本変形菌類図鑑, 平凡社, **1995**
- 5) (a) Steglich, W.; Steffan, B.; Kopanski, L.; Eclhardt, G.. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1980**, *19*, 459-460. (b) Kopanski, L.; Li, G.-R.; Besl, H.; Steglich, W. *Liebigs Ann. Chem.*, **1982**, 1722-1729.
- 6) (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.
- 7) 三田村真奈 平成 10 年度卒業論文
- 8) Misono, Y.; Ito, A.; Matsumoto, J.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Ishibashi, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 4479-4481.
- 9) Ishibashi, M.; Iwasaki, T.; Imai, S.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Ito, A. *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 108-110.
- 10) Ishibashi, M.; Mitamura, M.; Ito, A. *Nat. Med.*, **1999**, *53*, 316-318.
- 11) Ishikawa, Y.; Kono, Y.; Iwasaki, T.; Misono, Y.; Nakatani, S.; Ishibashi, M.; Ito, A.; Matsumoto J. *Nat. Med.*, **2001**, *55*, 312.
- 12) Erdman, T. R. *Tetrahedron*, **1972**, *28*, 5163-5173.
- 13) Patterson, G. W. *Phytochemistry*, **1972**, *11*, 3481-3483.
- 14) Bullock, E.; Dawon, G. J. *J. Lipid Res.*, **1976**, *17*, 565-571.
- 15) (a) Ishikawa, Y.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K. *Chem Pharm. Bull.* **2002**, *50*, 1126-1128. (b) Misono, Y.; Ishikawa, Y.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 999-1001.
- 16) Nakatani, S.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *Chem Pharm. Bull.* **2004**, *52*, 368-370.
- 17) Naoe, A.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 3433-3435.
- 18) Nakatani, S.; Naoe, A.; Yamamoto, Y.; Yamauchi, T.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 2879-2881.
- 19) Iwata, D.; Ishibashi, M.; Yamamoto, Y. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1611-1612.

- 20) Kamata, K.; Kiyota, M.; Naoe, A.; Nakatani, S.; Yamamoto, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Yamori, T.; Ishibashi, M. *Chem Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 594-597.
- 21) Hosoya, T.; Yamamoto, Y.; Uehara, Y.; Hayashi, M.; Komiyama, K.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 2776-2780.
- 22) Casser, I.; Steffan, B.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1987**, *26*, 586-587.
- 23) Velten, R.; Josten, I.; Steglich, W. *Liebigs Ann.* **1995**, 81-85.
- 24) Kingsbury, C. A.; Draney, D.; Sopchik, A.; Risser, W.; Durham, D. *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 3863-3868.
- 25) Snatzke, G.; Hänsel, R. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 1797-1799.
- 26) Ahmed, F.; Ohtsuki, T.; Aida, W.; Ishibashi, M. *J. Nat.Prod.* **2008**, *71*, 1963-1966.
- 27) Ohtsuki, T.; Miyagawa, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Ishibashi, M. *J. Nat.Prod.* **2008**, *71*, 918-921.
- 28) Li, X.; Ohtsuki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. *Chem. Asian J.* **2009**, *4*, 540-547.
- 29) Hosoya, T.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1082-1092.
- 30) Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle, D. J., "Spectrometric Identification of Organic Compounds," 7th ed., Wiley, Hoboken, NJ, **2005**, p.215.
- 31) Natori S.; Kumada Y. *Chem Pharm. Bull.* **1965**, *13*, 1472-1475.
- 32) Harris, W.; Hill, C. H.; Keech, E.; Malsher, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 8361-8364.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました千葉大学大学院 薬学研究院 活性構造化学研究室 石橋正己教授に心よりお礼申し上げます。

本研究を進めるに際し、ご指導、ご助言頂きました千葉大学大学院薬学研究院 活性構造化学研究室 荒井緑准教授に厚く御礼申し上げます。

また、終始有益な御助言、御指導頂きました當銘一文助教に心より感謝申し上げます。

NMR 測定ならびに MS/MS 測定を行って頂き、終始有益なご助言、ご指導頂きました大槻崇前助教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ました、高知市大津甲 山本幸憲先生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深く感謝申し上げます。

Fuligoic acid の ESIMS スペクトルを測定して下さいました理研 GSC 廣田 洋博士、星薬科大学 森田 博史教授、細谷 孝博博士に深く感謝申し上げます。

Fuligoic acid の NMR 測定にあたり、有益なご助言、ご指導を頂きました理研 鶴澤 洵博士、千葉大学分析センター関 宏子准教授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、吉田 清香氏に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、御協力を頂きました当研究室の大須賀淳美氏に心より感謝申し上げます。

在学中、ご指導、ご討論を頂きました活性構造化学研究室の皆様に感謝いたします。

本研究の一部は、千葉大学研究支援プログラム(若手助成 A)の支援を頂きました。関係者の方々に感謝申し上げます。

主論文目録

本学位論文の内容は、下記の発表論文による。

1. Shintani, A.; Ohtsuki, T.; Yamamoto, Y.; Hakamatsuka, T.; Kawahara, N.; Goda Y
Ishibashi, M.
“Fuligoic acid, a new yellow pigment with a chlorinated polyene-pyrone acid
structure isolated from the myxomycete *Fuligo septica* f. *flava*.”
Tetrahedron Letters, **2009**, *50*, 3189-3190.
2. Shintani, A.; Yamazaki, H.; Yamamoto, Y.; Ahmed, F.; Ishibashi, M.
“Cribrarione C, a Naphthoquinone Pigment from the Myxomycete *Cribraria*
meylanii”
Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **2009**, *57*, 894-895.

学位論文審査

本学位論文の審査は、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 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 石川 勉

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 高山 廣光

副査 千葉大学大学院教授 (薬学研究院) 薬学博士 西田 篤司

審査をして頂き、貴重なご助言を賜りました諸先生方に深く感謝申し上げます。