

Aversion - 同種のカビの異系統間
拮抗現象 - に関する化学的研究

貫名 学

目次	(ページ)
緒論	— 1 —
本論	— 17 —
第 1 章 <u>Cochliobolus lunata</u> の aversion 現象	— 17 —
第 2 章 <u>Cochliobolus lunata</u> IFO 5997 菌の aversion factor - lunatoic acid A	— 25 —
第 1 節 <u>Cochliobolus lunata</u> IFO 5997 菌の培養と lunatoic acid A の抽出と単離	— 25 —
第 2 節 Lunatoic acid A の物理化学的性状	— 33 —
第 3 節 Lunatoic acid A の平面構造	— 37 —
第 4 節 Lunatoic acid A の絶対構造	— 52 —
第 5 節 Lunatoic acid A の生物活性	— 62 —
第 3 章 <u>Cochliobolus lunata</u> IFO 5997 菌の生産と 3 関連代謝産物 - lunatoic acid B	

— 68 —

第 1 節 *Lunatoic acid B* の単離

— 68 —

第 2 節 *Lunatoic acid B* の物理化学的性状

— 76 —

第 3 節 *Lunatoic acid B* の平面構造

— 78 —

第 4 節 *Lunatoic acid B* の絶対構造

— 85 —

第 5 節 *Lunatoic acid B* の生物活性

— 95 —

第 6 節 *Lunatoic acid A* および *B* とその他の
関連化合物についての比較
考察

— 97 —

第 4 章 *Cochliobolus lunata* の他の IFO 菌株の
生産する代謝産物

— 104 —

第 1 節 *Cochliobolus lunata* の他の IFO 菌株の
生産する代謝産物の予備的検
索

— 107 —

第 2 節 新代謝産物 *d*-acetylradicinol

— 121 —

第 3 節 Radicinin

— 126 —

第 4 節 新代謝産物 radicinol

— 131 —

第 5 節 Radicinin, radicinol の絶対構造

— 140 —

第 5 章 Cochliobolus lunata IFO 5997 菌の培地

を異にした場合の新代謝産物

P-C₁₉化合物

— 148 —

第 1 節 培養と抽出, 単離

— 151 —

第 2 節 P-C₁₉化合物の物理化学的性状

— 159 —

第 3 節 P-C₁₉化合物の化学構造

— 161 —

第 6 章 Cochliobolus lunata 菌の生産する代謝

産物の生合成的相関についての

考察

— 177 —

結論 — 187 —

(実験の部) — 191 —

謝辞 — 216 —

参考文献 — 218 —

結 論

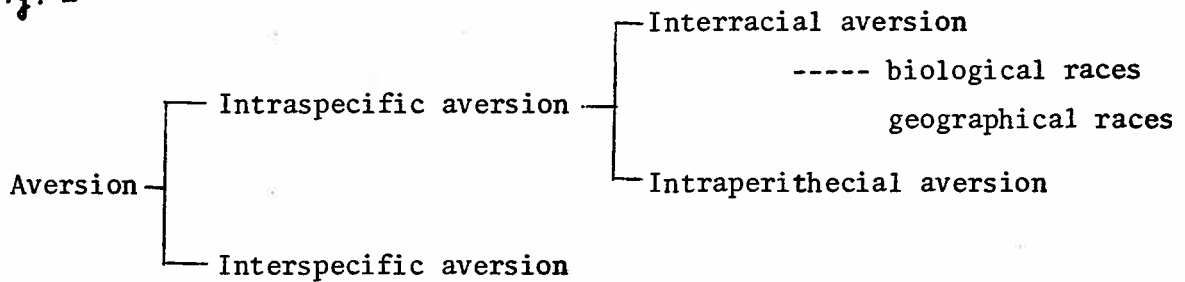
種々の微生物を同一の培地に同時に生育させると、そこには様々な相互作用が現われて来ることが古くから知られている。

Aversion (嫌触現象) は、1923年に、D. M. Cayleyが、子のう菌類のsex(性型)とheterothaliam (雌雄異株性)を研究する過程で、stone fruits (りんご, 毛玉等)の萎凋病を起す植物病原菌、Diaporthe perniciosa Machal (Valsaceae, Sphaeriales)の単胞子分離した菌系を、寒天培地上に同時に生育させると、両コロニーの生育境界面に互いに生育し合わない領域が形成される現象に対して名付けたものである⁽¹⁾。その際、Cayleyは、D. perniciosaの319株の単胞子分離した菌株を得て、対峙培養を行った結果、aversionは、異なる宿主(host)に由来する菌株間に多く出現することを観察した。また、B. O. Dodgeは、1920年に、Ascobolus magnificusの同じ

sex の strain (系統) を , 同一の培地中に生育させた所 , 2つのコロニー間に菌糸の生育が比較的少なく , 両菌株が拮抗現象を起したような狭い領域が形成されるのを観察した。(2)

更に , Cayley は , 1931年に , それまでに種々観察されてきた微生物間の生育境界面に起る現象に関する知見を整理して , Fig. 1 に示す如くに分類した。(3)

Fig. 1




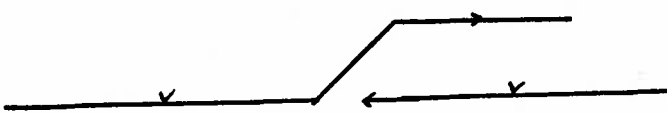
このうち , interracial aversion (品種間嫌触現象) は , 植物に対する病原性とか寄生性等を異にする生物学的品種 , なしは同一の種に属する菌でもその由来した地理的起源を異にする品種の間に見られる aversion をい , 同一の被子器に由来する異な , た胞子間に起る


aversion, intraperithecial aversion (同一被子器内嫌触現象) と區別した。後者には、極性に基づく性的和合性と裏腹に生起する生理的な自家不稔性 (self-incompatibility) の場合も含まれてゐると思われぬ。

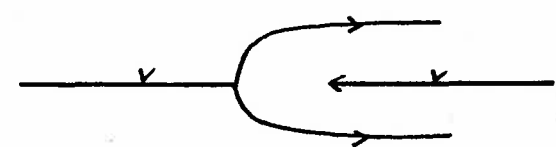
一方、Cayley が interspecific aversion として區別した aversion は、今日では抗生物質として知られるものの現象面での原型であつたと思われぬ。これは異種間の嫌触現象として分類されたもので、1924年、C. L. Porter は、132種の細菌、酵母、カビを収集して、各々の間の相互作用を研究し、Fig. 2 に示すような5つのタイプに分類し得ることを示した⁽⁴⁾。その際、Porter は、Cayley が分類した intraspecific aversion の例も記載してゐるが、大部分は interspecific aversion であつた。例えば、ある Helminthosporium 菌の生育は、対峙培養された Actinomyces nigrificans、Bacillus ramosus、あるいは Bacterium alkaligenes によつて完全に抑制されたと述べてゐる。


地理的起源を異にする品種間の interracial

A. 
(ex. Rhizopus nigricans : the same organism)

B. 
(ex. Sclerotium rolfsii : Helminthosporium)

C. 
(ex. Helminthosporium : Helminthosporium)

D. 
(ex. Helminthosporium : Pink yeast)

E. 
(ex. Helminthosporium : Bacterium)

aversion については、1926年に、九州大学の中田博士が、白絹病菌 Sclerotium rolfsii (Corticium rolfsii) について研究した。彼は、この菌の strain を類別するの に aversion を用いて、供試した 47 菌株の geographical races を 33 strains に區別した⁽⁵⁾。また、aversion の原因 について顕微鏡学的觀察を行ひ、形成された aversion zone は、通気することによつて消失してしまふことから、菌糸の生産する気体状物質がその原因であるうと推定した⁽⁶⁾。ついで、1928年には、大原農研の西門博士が Helminthosporium 属の 38 菌株を収集して、同種間、および異種間の対峙培養を行つた⁽⁷⁾。そのなかで、Helminthosporium setariae Sawada (Cochliobolus setariae) の各 strain は、この属の他の種のカビに対し、著しく aversion を起こしたが、同時に、同一種内の系統間 (interracial aversion) でも、また同一の宿主から分離した系統間でも aversion を起こすと報告した。

さて著者は本研究を開始するにあたりこの極めて興味深い報告に基づいて、種々の予備

的検討の後、西門博士の報告した Cochliobolus setariae を取り上げ、その aversion に関与する活性物質の解明を既に試みてゐるが、これについては後述する。



Cochliobolus setariae の IFO. 6387 菌と IFO. 6635 菌間の aversion 現象

次に、*aversion* は、同種に属する異なる系統間に生起する拮抗現象として、その現象の記載は極めて古いのであるが、その原因を解明しようとする試みは少ない。1926年に、中田博士が白絹病菌の *aversion* について揮発性物質が関与していることを示唆しているが、1934年には M. R. Vandendries が、*Lentipes betulina* の sex を異にする菌株間に観察される *barriage* (障壁性; *aversion* の別名) には、同じく揮発性の物質が関与していると報告した⁽⁸⁾。1952年には、G. H. Banbury が *Mucor mucedo* の sex を同じくする菌株間に観察される *aversion* に対しても、同様に揮発性の物質が関与していると述べている⁽⁹⁾。また、1961年には京大の岩本博士が担子菌である *Coprinus macrosporus* f. *microsporus* (*Coprinus cinereus* f. *microsporus*) に観察される *aversion* について研究した⁽¹⁰⁾。それによるところこの菌の *aversion* は、*A hetero B homo* の遺伝的なコントロール下に現われ、その原因物質は、培養口液から有機溶剤 (エーテル, ナイロアルコール) で抽出されること、菌体からは

水で抽出されるが、いづれも熱に不安定であることなど、興味ある報告をしてゐる。著者も、この報告に基づき、Coprinus cinereus f. microsporus の異系統間の aversion を観察してみたが、aversion zone の大小はそんなに著しいものではなかつた。

近年に至つて、Cayley が aversion として分類した現象に対して、種々の生化学的アプローチもなされ始め、この現象の細胞生理学的側面からの解析もなされるようになって来た。

Podospora anserina について、 δ と α と呼ばれる菌株を掛け合わせて得られる子孫のうちで、 δ と似た表現型を示すが、次に α と接合した結果 α の持つ性質を示すようになり、同時に δ に対して karage を示して来る⁽¹¹⁾。このような現象を解析することにより、banage を示す因子は、菌糸と菌糸の融合を通して他へ移行することのできるプラスミッド様の因子が関与することが明らかとなつて来た。また、この Podospora anserina については、別に、地理的起源を

異にする品種間の karyogamy を細胞学的レベルで解析しようとする試みもなされ始めている。(12)

Neurospora crassa に観察される heterokaryon (異核接合体) 形成についての研究では, heterokaryon が生存し得ない場合の不和合性因子 (incompatibility factor) を micro-injection technique を用いて分離しようと試みた例がある。(13) この場合には, その活性を示す因子は human Ig immunoglobulin と似たような電気泳動パターンを示し, ショ糖密度勾配遠心分離では, 約 8S の沈降定数を持つ分画中に存在し, DEAE-Sephadex および Sephadex G200 で分離を進めた結果, 未だ純粋に得ることはできなかつたものの, その分子量は約 20 万のおそらく RNA と結合した蛋白質であらうと報告している。

なお, バクテリアでも同様の生育阻害現象が既に見い出されており, その活性物質はバクテリオシンと総称され, 分子量数万の高分子糖蛋白質が関与し, 特に大腸菌のそれはコリニンとして現在遺伝生化学の分野で活発に研

究されており、その遺伝学的実体が細胞質性因子、プラスミドとして明らかにされてゐる。⁽¹⁴⁾

以上概説したような歴史を踏まえ、著者は *aversion* に関与する活性物質の化学的本体を明らかにすることを目的として研究を開始したのであるが、著者等が行つて来た研究の初期の成果については著者の修士論文としてまとめられているが以下にその概要を述べる。

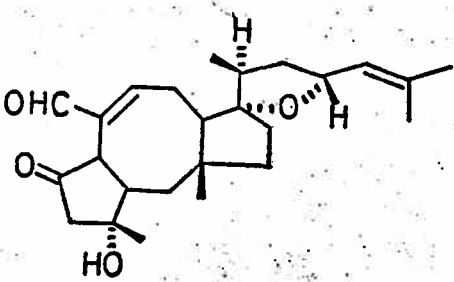
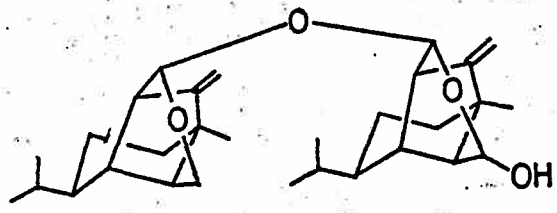
最初に実際に使用する菌を選別する目的で、文献的知見を参考にして Table 1 にまとめた菌種については *aversion* 現象の再現性を検討し、現象の著しい菌種として三種の菌、*Corticium rolfsii*、*Cochliobolus setariae*、*Cochliobolus lunata* を選んだ。次に本現象に低分子活性物質が関与しているか否かを調べる目的で、各菌の対峙培養物を有機溶剤で抽出し、その抽出物の生育阻害効果を、各々の対峙された異系統菌株に対してパーセント法で検定した結果、*Corticium rolfsii* についてはわずかに活性が観察されたが、*Cochlio-*

Table. /

Name of species	Nos. of strain	Nos. of paired culture
<i>Cochliobolus lunata</i>	10	45
<i>Cochliobolus setariae</i>	2	1
<i>Cochliobolus geniculata</i>	2	1
<i>Curvularia trifolii</i>	2	1
<i>Coprinus cinereus</i>	3	3
<i>Corticium rolfsii</i>	10	45
<i>Lentinus edodes</i>	5	10
<i>Neurospora crassa</i>	4	6
<i>Penicillium funiculosum</i>	6	15
<i>Pyricularia oryzae</i>	2	1
<i>Pyrenophora teres</i>	2	1

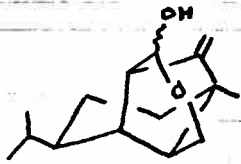
bolus setariae および *Cochliobolus lunata* については、
 各々相手菌に対してのみ強い生育阻害効果を示す物質の存在を認められた。この結果に基づき
 その活性物質の生産性を調べたところ、*Cochliobolus setariae* の場合には、IFO. 6387 菌および 6635 菌の各々の菌が単独で、それぞれ相手菌に対してのみ強い生育阻害効果を示す物質を、各々の培養汁液中に生産していることが判明し、
 aversion factor としてその物質の単離、構造決定を行、た⁽²⁰⁾。これらの構造と生物活性の結果を Table 2 に示した。即ち 6387 菌の aversion factor は ophiobolin A であり、本化合物は既に 1958 年、中村、石橋らにより類縁菌である *Ophiobolus miyabeanus* より、植物病原菌、白蘚菌、トリコモナスに対して生育阻止作用を示す抗生物質として単離され、1965 年野副らが X 線結晶構造解析より構造を決定したセスタテルペンであり、た⁽¹⁵⁾。6635 菌の aversion factor は、prehelminthosporol と prehelminthosporal の dimeric bisacetal 化合物であり、た。Prehelminthosporol は、1965 年、de Mayo らにより

Table. 2 The structures and inhibitory activities of
aversion factors in Cochliobolus setariae
IFO 6387 and 6635.

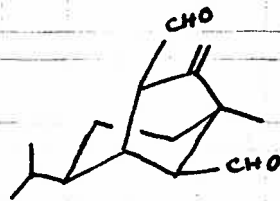
Aversion factors	Inhibitory activities*	
	IFO. 6387	IFO. 6635
IFO. 6387	500	3
		
IFO. 6635	25	100
		

* Min. inhibitory conc.(γ /ml) by dilution method

類縁菌の Helminthosporium sativum から単離，構造決定されたセスキテルペンであり，また，prehelminthosporal は artifact のジエチルエーテル体として同じく de Mayo らによつて単離，構造決定されたものである⁽¹⁶⁾。その dimeric な化合物の存在については，de Mayo らおよび Dorn らが指摘して⁽¹⁷⁾いるが構造は不明である。また，6635 菌の

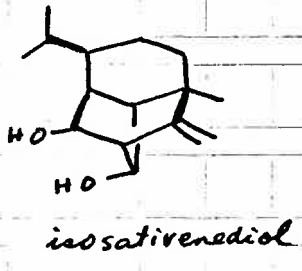
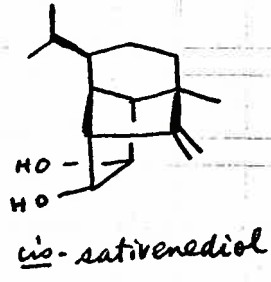


prehelminthosporol



prehelminthosporal

aversion factor の構造研究の過程で，同菌の培養汁液中に新代謝産物の存在を認め，スベクトルデータ，化学反応からその構造を cis-sativenediol と決定した⁽¹⁹⁾。一方，cis-sativenediol と同時に単離されたその構造異性体は，当初 trans-sativenediol とされたが，その後 Arigoni らの研究からその構造は isosativenediol と訂正された⁽¹⁸⁾。また，cis-sativenediol はジベレリン様活性を示す新植物生長調節物質であることが明らかにされたが



ジベレリンのC, D環との構造的類似性から注目される化合物である。

本研究の主目的である Cochliobolus lunata の aversion は, Cayley の分類に従えば, Cochliobolus setariae の aversion とは別のタイプに分類される, いわゆる half-aversion を示し, 本研究においてその原因物質である aversion factor の構造を明らかにすることである。結論を簡潔に述べれば, Cochliobolus setariae ではセスキテルペンとセステルペンであるが, Cochliobolus lunata では, lunatoic acid A と命名したヘキサケチドの誘導体である, たのである。テルペンとポリケチドは菌類の第2次代謝産物として極めて広範囲の菌類が生産しており, 今後更に別のカビの aversion factor を追求することによって, 生合成

的に別のタイプに属する代謝産物の存在にも
同様の活性を有するものが見いだされる可
能性を示していると言えよう。

本 論

第 1 章 Cochliobolus lunata の aversion 現象

Cochliobolus lunata は、イネのにせいもち病、すす紋病、アワの縁葉枯病、グラジオラスの赤斑病、ホフウ類のすす病などを起こす植物病原菌で、小房生子のう菌類に属し、不完全時代は Curvularia に属する。

本研究に使用した菌は、大阪の発酵研究所 (IFO) に保存のもので、Table 3 に示した 10 種類の菌株である。これら 10 種類の菌株間での aversion 現象を観察するため、可能な全ての組み合わせ、すなわち 45 組を対峙培養した。対峙培養は、モルト培地 (Table 4 の組成のもの) 20 ml を、9 cm のペトリ皿に入れ、固化後数 cm 離して菌糸片を接種した後、30°C で、暗所にて週間培養した。観察結果を Table 5 に示し、Fig. 3 に実際の結果を写真撮影したものを示した

Table. 3

<u>Cochliobolus lunata Nelson et Haasis</u>	
IFO No.	
5997	CMI,22812;S.K. Sen Gupta
6286	NHL(H. Kurata, FI-4)
6287	NHL(H. Kurata, FI-19)
6288	NHL(H. Kurata, FI-39)
6289	NHL(H. Kurata, FI-56)
6290	NHL(H. Kurata, FI-57)
6291	NHL(H. Kurata, FI-58)
6299	ATCC,12017; NRRL,2380
6382	Tottori Univ.(M. Nishimura)
6586	HAC(W. Yamamoto)

CMI;The Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.

NHL;National Institute of Hygienic Sciences, Tokyo, Japan.

ATCC; American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A.

NRRL; Northern Utilization Research Branch, U.S. Dept. of Agriculture,
Peoria, U.S.A.

HAC; Hyogo University of Agriculture, Sasayama, Japan.

Table. 4

Malt-dextrose agar(MDA)	
Malt extracts	20 g
Dextrose	20 g
Peptone	1 g
Agar	20 g
Water(dist.)	1 L.

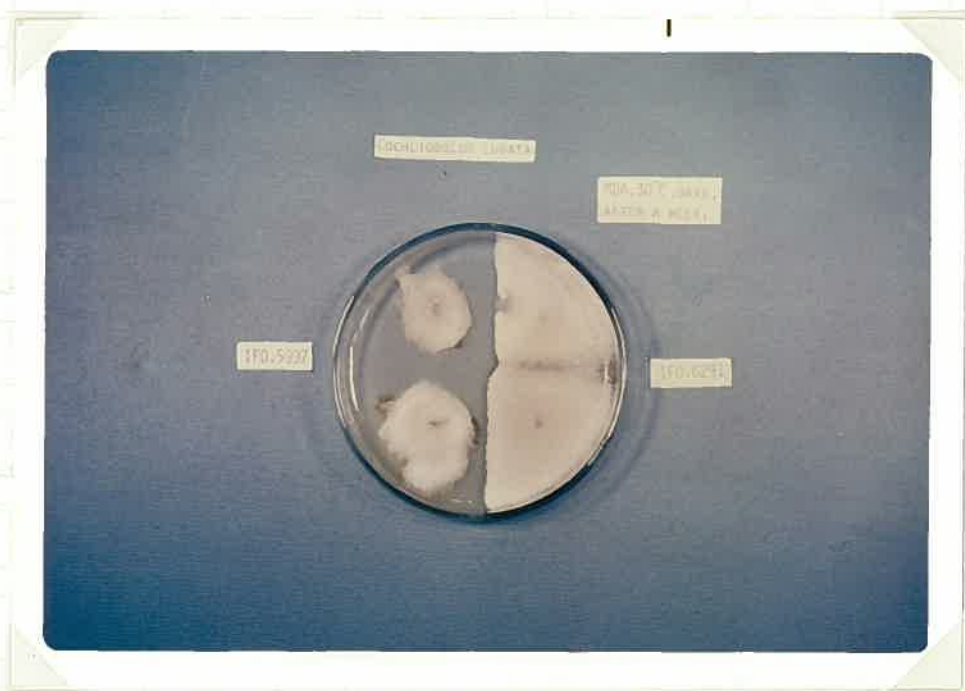


Cochliobolus lunata (不完全時代: Curvularia lunata)

の IFO 5997 菌と IFO 6299 菌と

aversion 現象

Fig. 36



Cochliobolus lunata IFO 5997 菌 (左のコード=) と
 IFO 6291 菌 (右のコード=) との aversion 現象

。本菌での aversion 現象の特徴は, Cayley の分類
 による half-aversion 型である点である。即ち, IFO
 5997 菌が他の 8 種の strain に対して著しい aver-
 sion を示し, 自らは同心円状のコロニーを保っ
 て他菌株からの生育阻害を受けていない。こ
 のことは, 既に述べた Cochliobolus setariae に観察さ
 れた aversion 現象と異なる点である。興味深い
 ことに, 他の strain のなかの IFO 6586 菌は 5997 菌
 と aversion を示さなかつたことである。このこ
 とは, 5997 菌の生産する aversion factor が全く作用
 しないう異菌株が含まれてゐることを示してゐ
 る。更に, 写真でわかるように 5997 菌は他の
 菌株に比べて著しく生育速度が遅く, 小さな
 コロニーを形成してゐることは, 生産された
 aversion factor が生産菌それ自体に対しても何等
 かの作用を有すると思われろ。これらの諸点
 に関しては後に述べる。

Cochliobolus setariae の aversion 現象は, 培地の量を
 多くしたり, 培地に 1% の charcoal を加えたもので
 対峙培養すると, 両コロニーは嫌触されず,

aversion が消失することから、両菌株が培地中に生育抑制物質を生産していると推定されたが、このことが Cochliotolus lunata についても当てはまるかどうかを検討した。内径 8.5 cm の殺菌シャーレに、各々 2 枚ずつモルト寒天培地 10 ml, 20 ml, 30 ml を流し込み固化後、2 cm および 5 cm の間隔をへだてて、5997 菌と 6299 菌を接種して、27-30℃、暗所で培養した。10 日間培養した後、得られた観察図を Fig. 4 に示した。

この結果は、培地の量を少なくすると嫌触域の大きさが大きくなり、逆に多くすると狭められ、また余り近接して接種すると、肉眼的に両コロニーは完全に接触することを示している。このことは、5997 菌が Cochliobolus setariae と同様に、培地中に相手菌の生育を阻害する物質を生産していると考えられることとで説明できる。

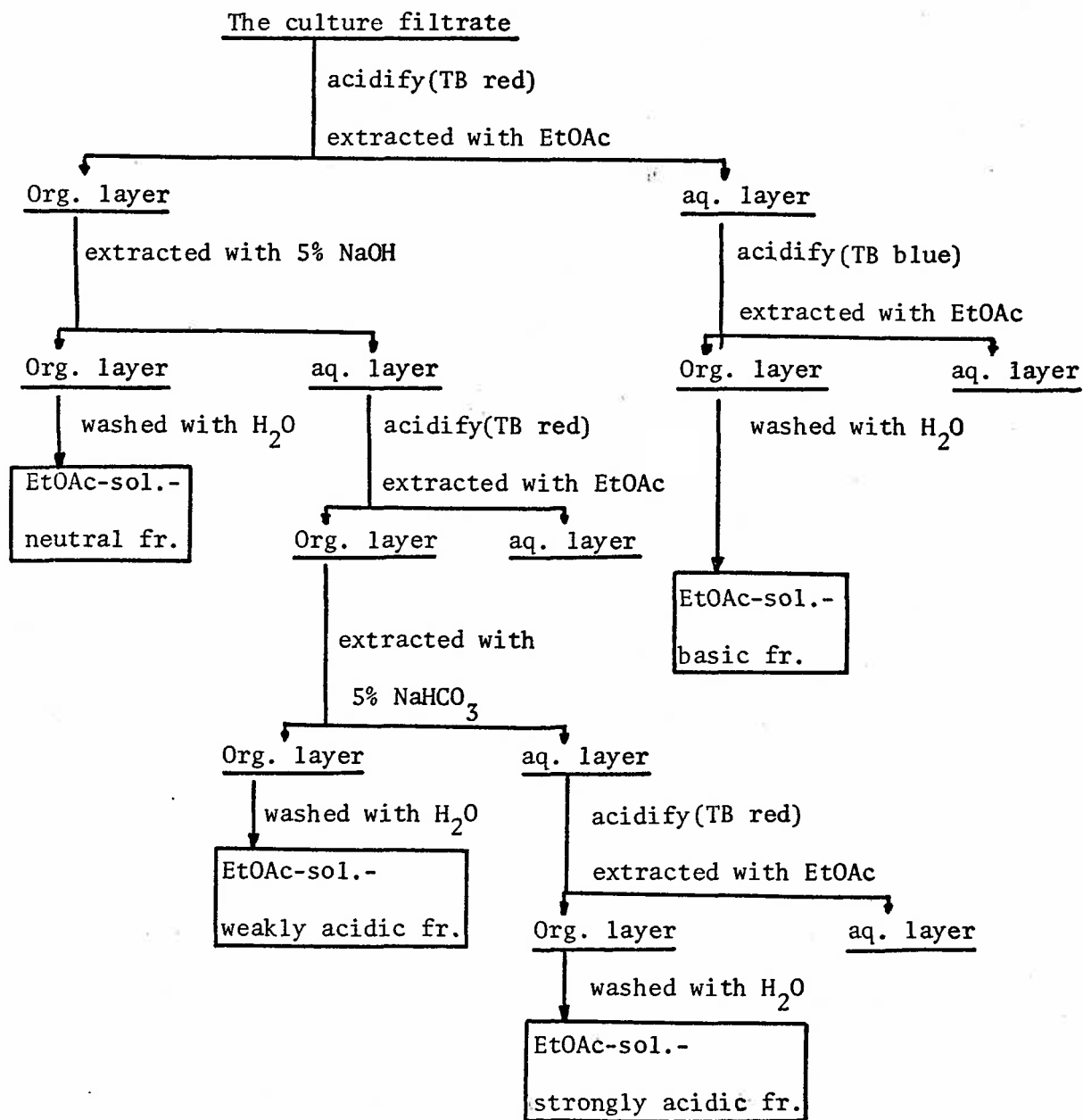
第 2 章 Cochliobolus lunata IFO 59 97 菌 の aversion factor — lunatoic acid A

第 1 節 Cochliobolus lunata IFO 59 97 菌 の 培 養 と , lunatoic acid A の 抽 出 と 単 離

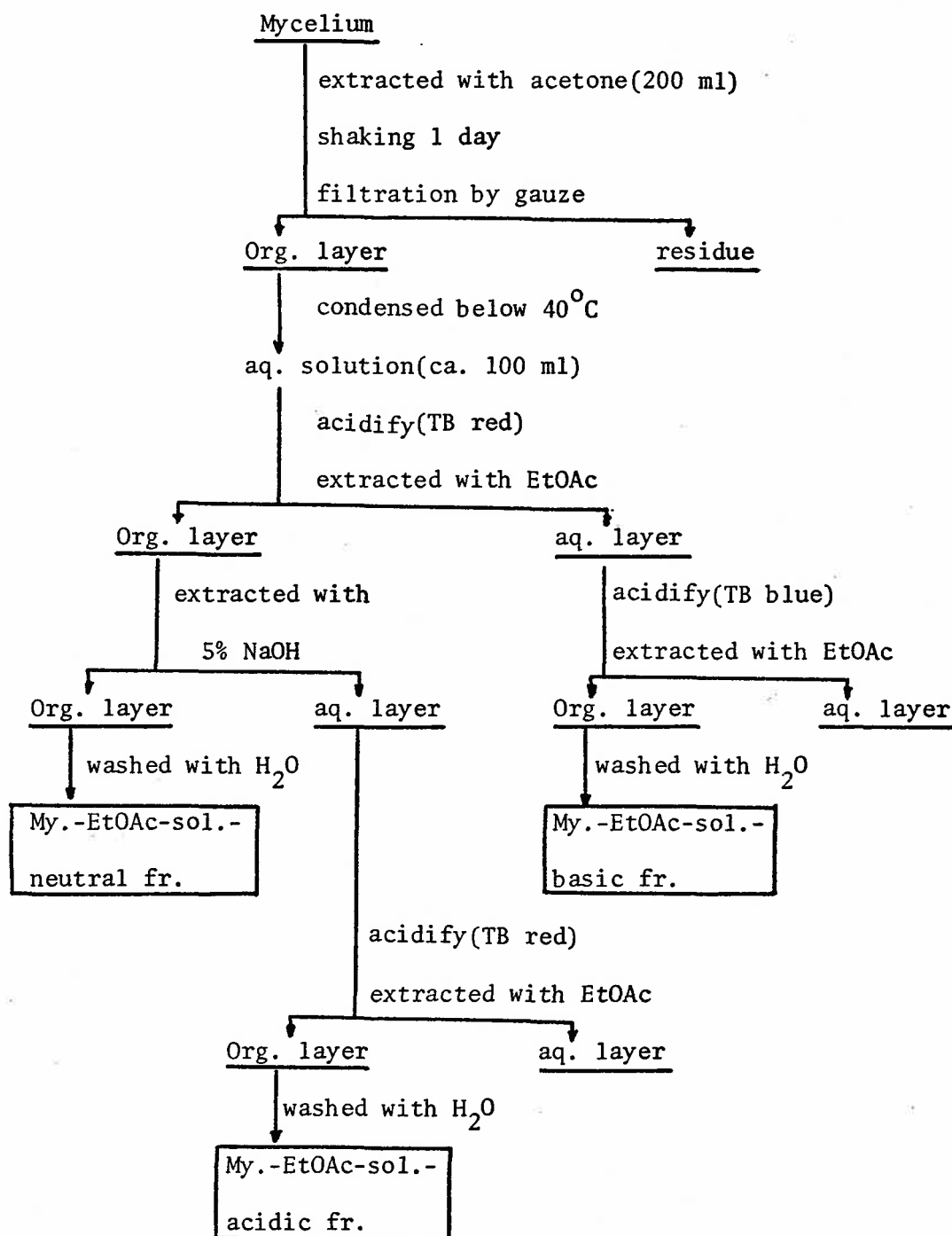
前章で述べた如く, 59 97 菌は培地中にある種の生育阻害物質を生産してゐることが十分考えられるが, 一応 62 99 菌も培養してどのような物質を生産してゐるかを知らぬ目的も含めて予備的に検討した。

エルト培地 120 ml を 500 ml の取口フラスコに入れ, オートクレーブ後, スラントに十分生育した各菌に殺菌水を入れて菌糸片をかき出して浮遊させた接種液を入れ, 27-30℃, 暗所で2日間振盪培養したそのから, 各々 5ml を新たな培地に入れて2日間同条件下に培養した。2日後には菌は十分に繁殖した。培養物をかきで菌体と培養口液に分けた後, Fig. 2-1 に示した操作で抽出した。得られた各分画を各々

Cochliobolus lunata IFO 5997



Cochliobolus lunata IFO 5997 and 6299



の菌に対してバルブ法で活性をテストした。結果を Table 2-1 に示した。この結果、5997 菌の培養口液の酢酸エチル可溶の強酸性分画に、相手菌 (6299 菌) に対して強い生育阻害活性を示す物質が存在することかわかった。また、このものは自己菌 (5997 菌) に弱く生育阻害活性を示した。強酸性分画は、Fig. 2-2 に示すような薄層クロマトを与えた。そこで、図示したような 5 つの分画に正確に分取薄層クロマトを行ない生物検定を行った。結果を Table 2-2 に示した。活性物質は Fr. III の黄色に着色した分画に存在する。このものはエーテル性ジアゾメタニと反応して、活性を消失することなく $R_f = 0.84$ (5% MeOH in $CHCl_3$) のスポットに変わる。活性物質は遊離のカルボニ酸としてでも単離することは出来るが、より容易な分離方法として、中性のメチルエステルに変えた方が有利であり、Fig. 2-3 に示した操作で黄色針状結晶状に単離した。本化合物は文献精査の結果新化合物であり、たので lunatic acid A と命名した。

Table 2-1

(29)

Fractions	Activities(diameter, cm)	
	IFO 5997	IFO 6299
IFO 5997		
culture filtrate		
neutral fr.	-	-
basic fr.	-	-
weakly acidic fr.	-	1.0
strongly acidic fr.	1.5	3.5
mycelium		
neutral fr.	-	-
basic fr.	-	-
acidic fr.	-	-
IFO 6299		
culture filtrate		
neutral fr.	-	-
basic fr.	-	-
acidic fr.	-	-
mycelium		
neutral fr.	-	-
basic fr.	-	-
acidic fr.	-	-

Fig. 2-2 TLC of the EtOAc-soluble strongly acidic fraction of the culture filtrate of Cochliobolus lunata IFO 5997

10% MeOH in CHCl_3
Kieselgel pF_{254}

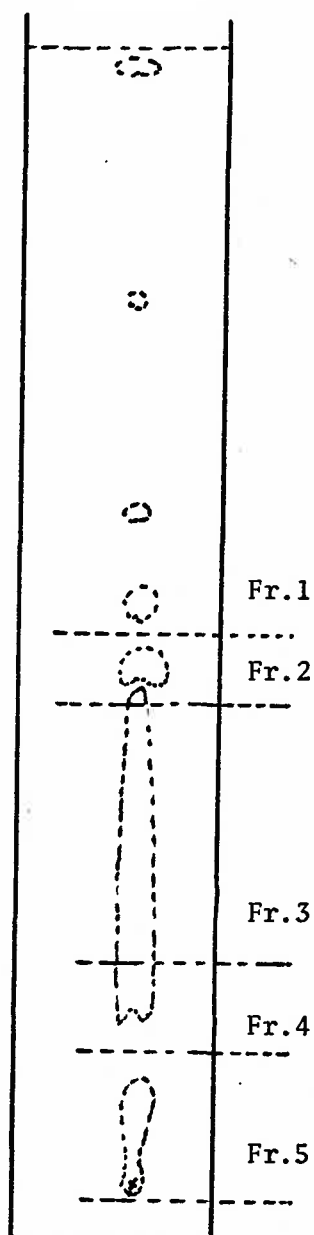
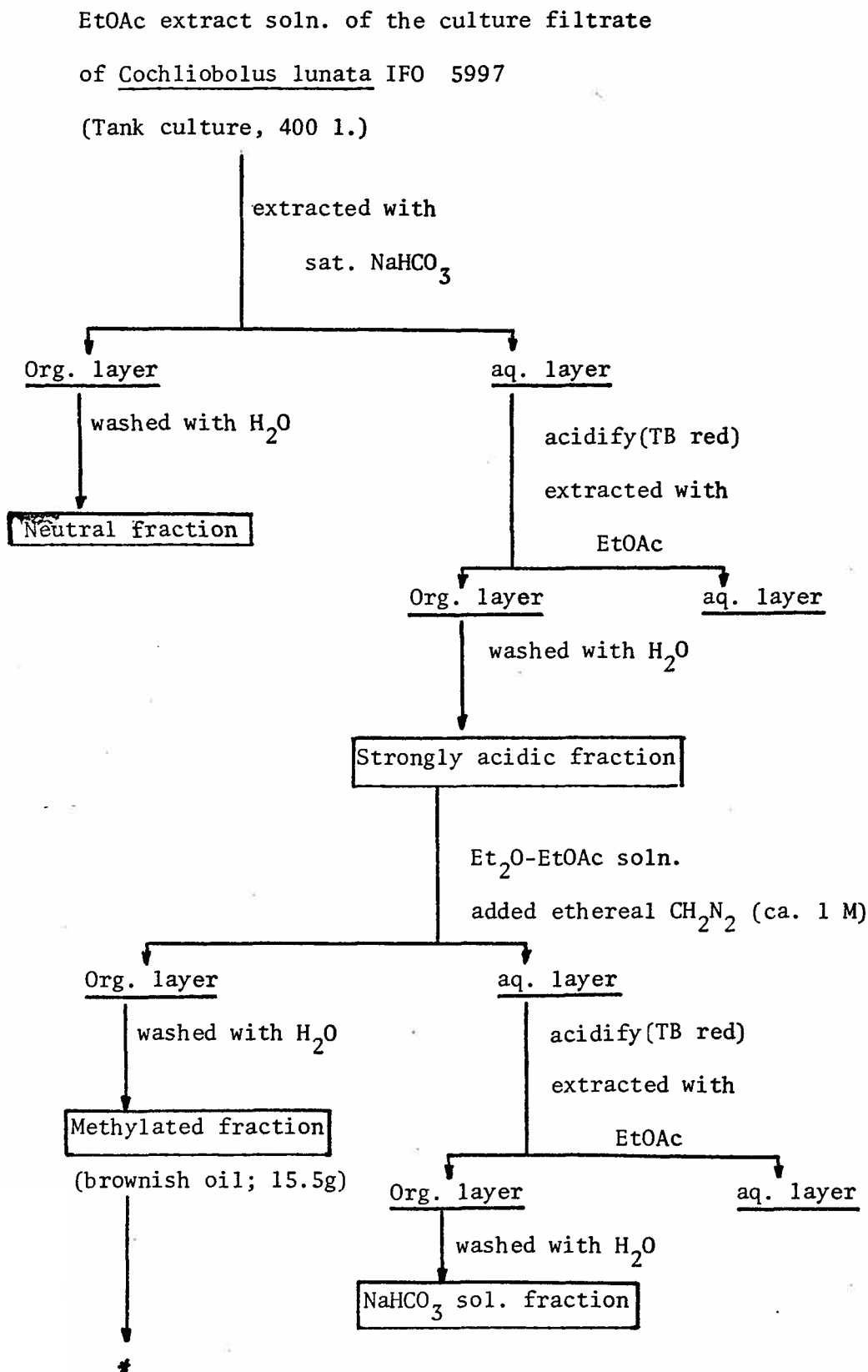
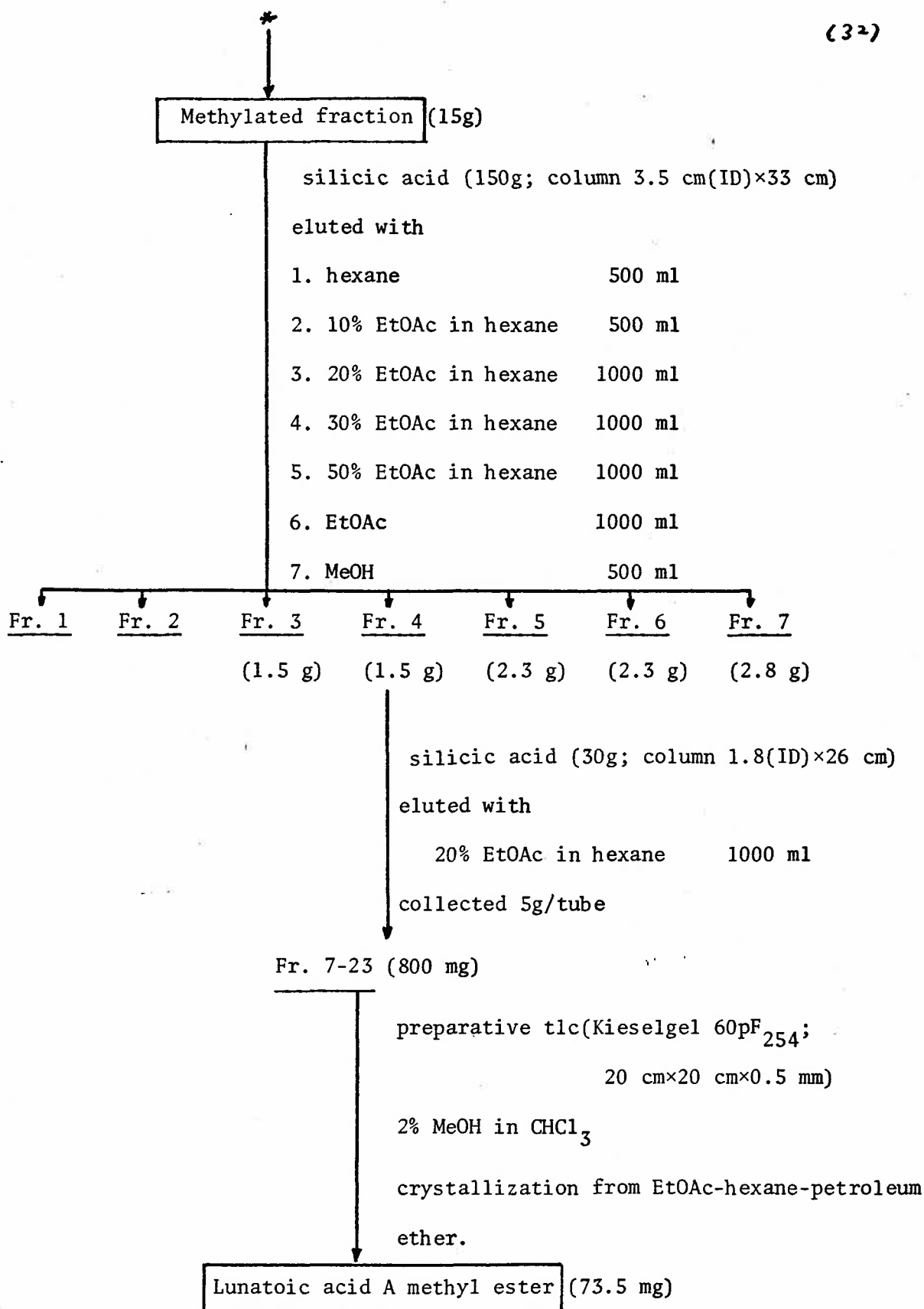


Table. 2-2

Fraction	Activities (diameter, cm)	
	IFO 5997	IFO 6299
1	-	-
2	-	1.0
3	1.6	3.4
4	-	-
5	-	-

Fig. 2-3





第 2 節 Lunatoic acid A の 物 理 化 学 的 性 状

Lunatoic acid A methyl ester (LA-AMe) は, Table 2-3 に 示 す 物 性 値 を 与 え た。

Table. 2-3

Yellow needles (from EtOAc-hexane-petroleum ether)

mp 109°C $[\alpha]_D^{26} -208^{\circ}$ (c 0.17, CHCl₃)

C₂₂H₂₆O₇ Found(%): C 65.73, H 6.61 (calcd: C 65.66, H 6.51)

M⁺ (m/e) 402.1691 (calcd. 402.1678)

UV $\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ nm(ϵ): 240(14100), 262(15500), 348(22000), 530(1600).

$\lambda_{\max}^{\text{MeOH-1N NaOH}}$ nm(ϵ): 253(17600), 355(33600), 520(6000).

$\lambda_{\max}^{\text{MeOH-1N HCl}}$ nm(ϵ): 240(15000), 270(19000), 344(19000).

IR $\nu_{\max}^{\text{CCl}_4}$ cm⁻¹: 1720, 1630, 970.

LA-AMe は, アセトニ, 酢酸エチル, クロロホルム, 四塩化炭素, シエチルエーテル, ベンゼン, メタノール, エタノールに可溶で, n-ヘキサニ, 石油エーテルに不溶である。酸には安定であるが, アルカリに長時間触れると分解し活性を消失する。また酢酸エチル溶液としてシリカゲルのプレートにスポットし, 暗黒下 UV ラニフ (λ_{max} 3650 Å) を照射すると, 黄色

の 螢 光 を 登 す る 。 ま た , ア ニ モ ニ ア 水 , カ セ
イ ソ ー ガ 水 溶 液 を 滴 下 す る と 赤 色 を 帯 び る 。

Fig. IR spectrum of lunatoic acid A methyl ester. (CHCl_3)

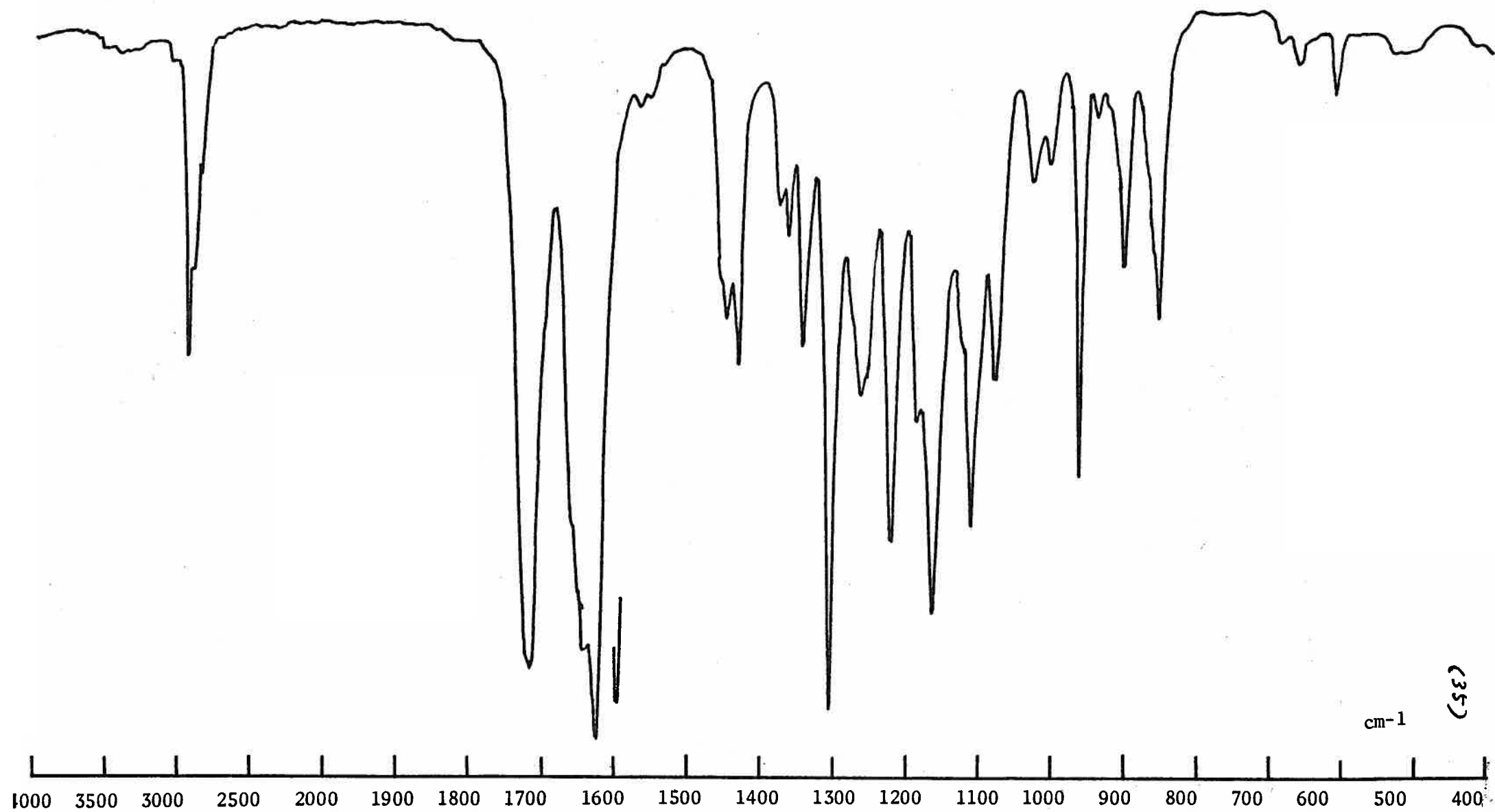
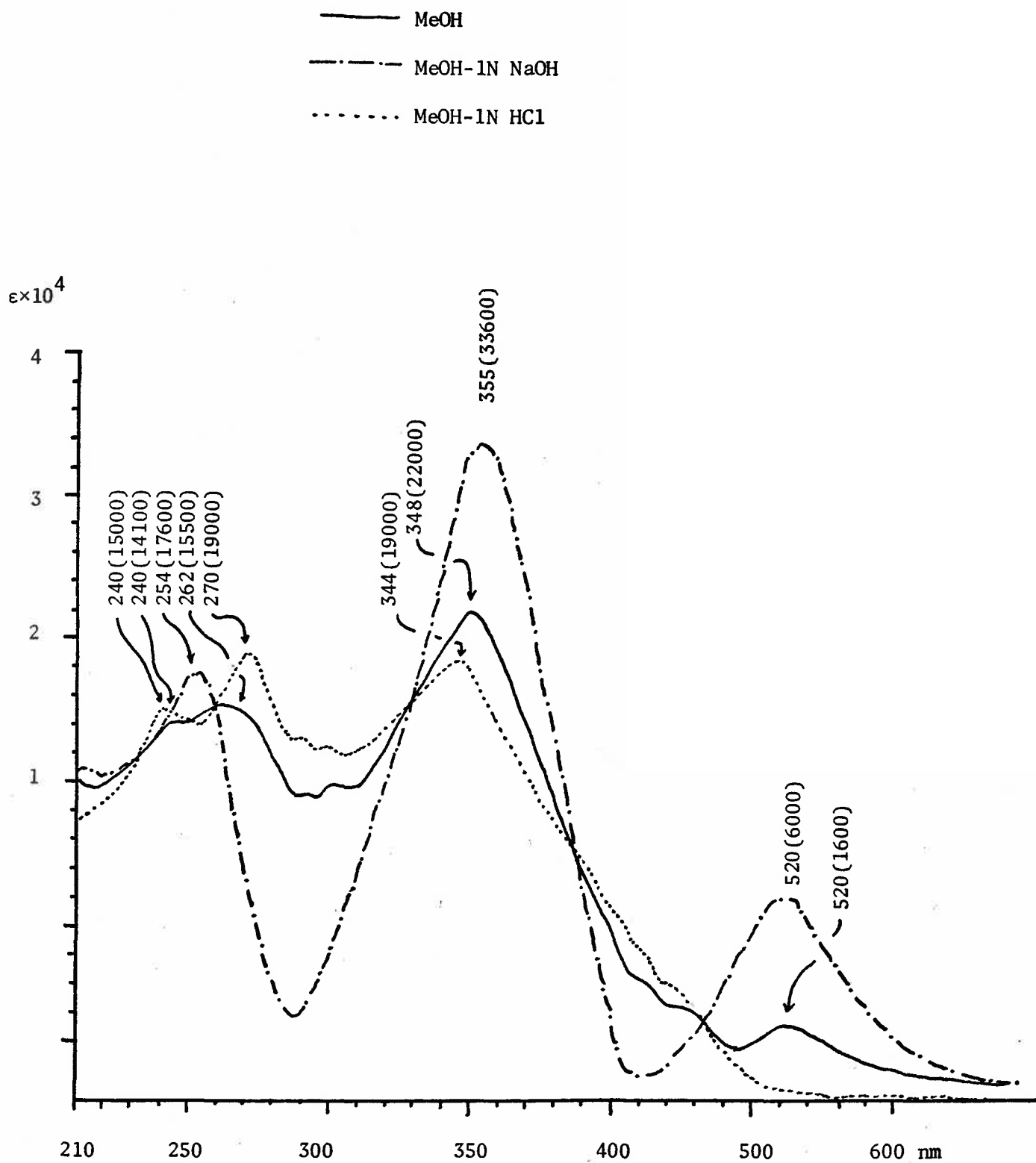
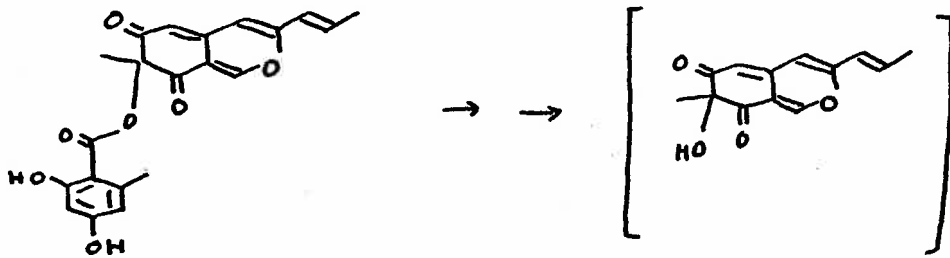


Fig. 2-4 UV spectrum of lunatoic acid A methyl ester.



第 3 節 Lunatic acid A の平面構造

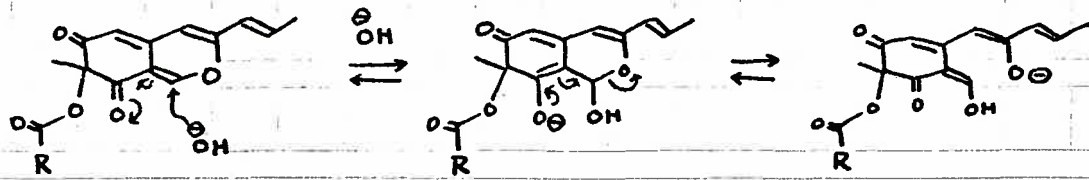
LA-AMe の構造に関する最初の知見は特徴的な UV スペクトルより得られた。本化合物の Fig. 2-4 に示した UV スペクトルは文献精査の結果既知の発色団のなかでは amphipyron 発色団に類似している。Büchi らは、mitorubrin の構造研究の過程で、その構造中に含まれる amphipyron 発色団の UV スペクトルの想定値として、mitorubrin の示した吸収値からオルセリニ酸のメチルエステルの吸収スペクトルを差し引いた値を算出した。(21)



$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm(ϵ): 216(18200), 266(18200),
 292(10100), 346(16100).
 $\lambda_{\max}^{\text{NaOH}}$ nm(ϵ): 246(20200), 320(23600),
 346(28600), 485(5600).

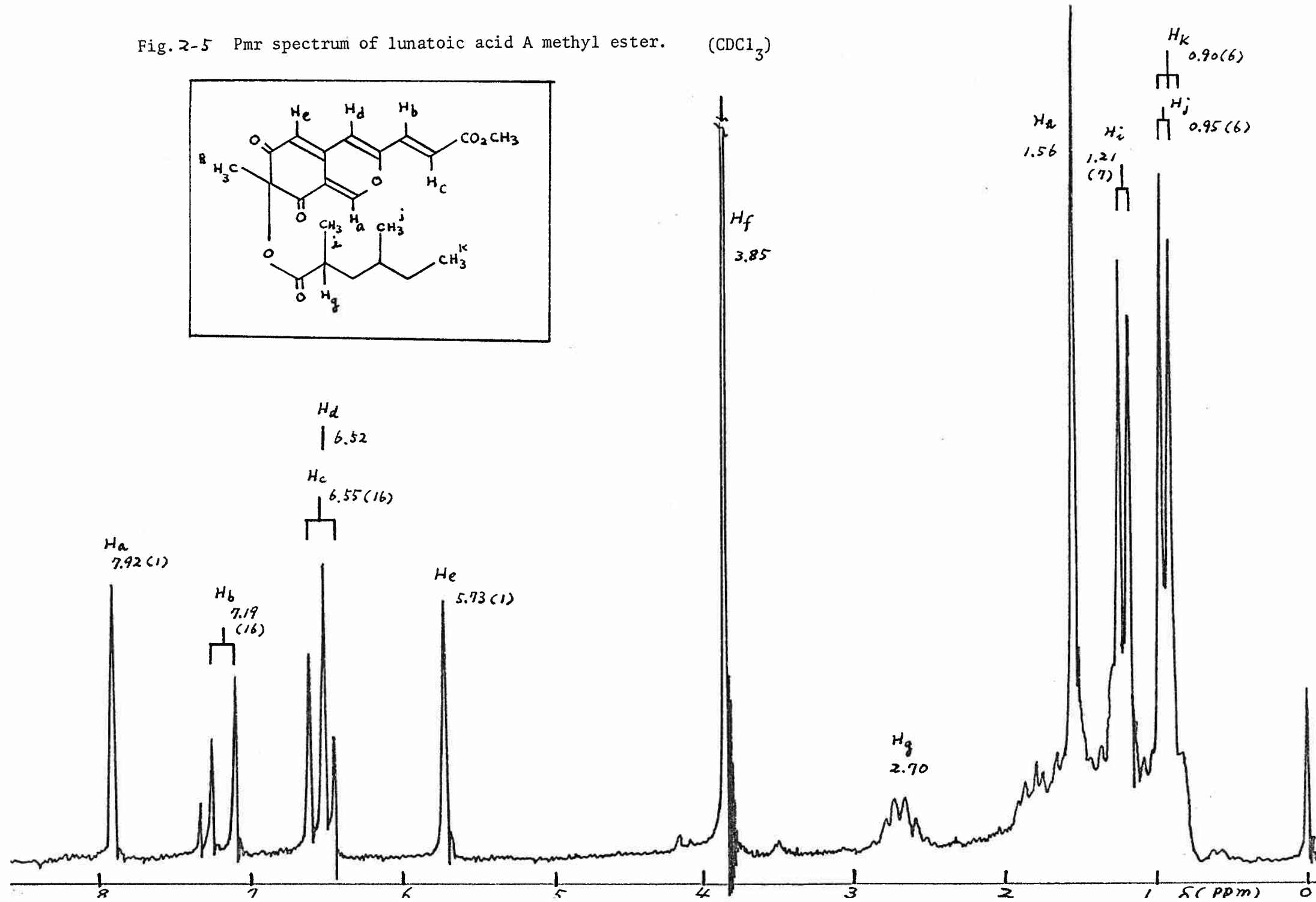
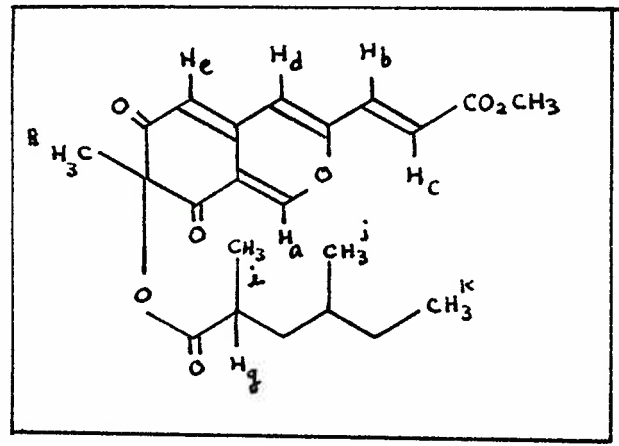
$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm(ϵ): 241(8200),
 278(9200),
 346(16000).
 $\lambda_{\max}^{\text{base}}$ nm(ϵ): 249(12000),
 346(27000),
 485(5600).

LA-AM₂ の中性のメタノール溶液の UV スペクトルには、酸性溶液中およびアルカリ溶液中のスペクトルの極大値付近の吸収を示しており、メタノール中において一部が酸性およびアルカリ側における発色団の構造を取っている可能性を示唆している。アルカリ側での長波長シフトに対応する発色団は、Büchiらによると、B 環の開裂を伴う下記の構造が考えられている。LA-AM₂ のメタノール溶液中では、水はメタノールの付加したものが考えられる。

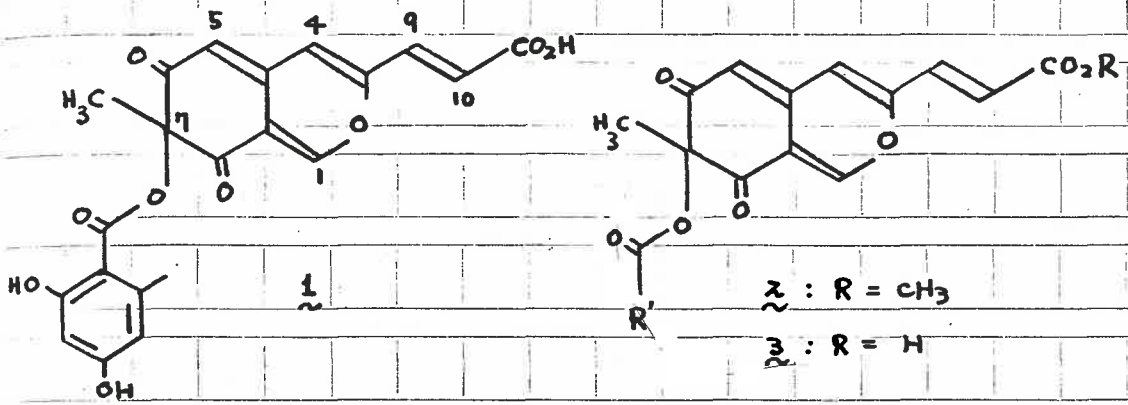


いづれにしても、このような特徴的な発色団の存在が UV スペクトルから示唆されたが、更に pmr スペクトルによってもこのことが強く支持された。Pmr スペクトルを Fig. 2-5 に示したが、amphipyronne 環上のプロトン間のケミカルシフトおよび結合定数を既知の mitorubrinic acid と比較

Fig. 2-5 Pmr spectrum of lunatoic acid A methyl ester. (CDC1₃)



すゝと次図の如くになる。



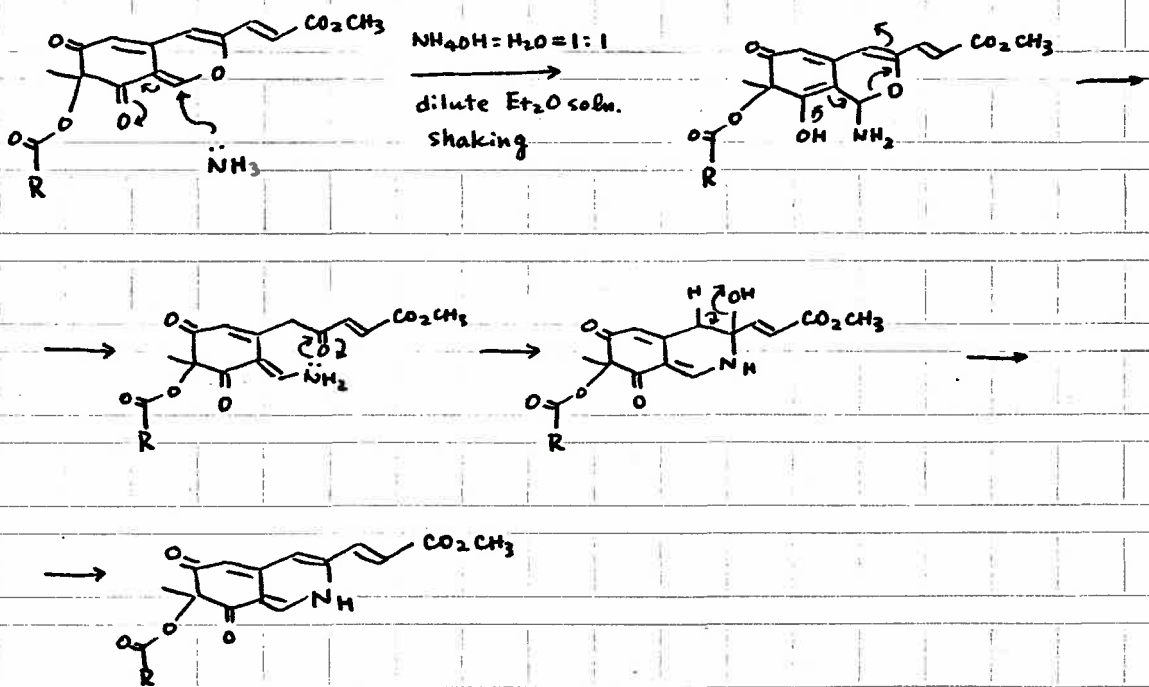
(in d₆-acetone)

compound	$\underline{1}$	$\underline{2}$	$\underline{3}$
proton	δ (J, Hz)	δ (J, Hz)	δ (J, Hz)
1-H	8.16(0.7)	8.05(1)	8.05(1)
4-H	-	6.98	6.96
5-H	5.82(0.7)	5.67(1)	5.66(1)
7-CH ₃	1.68	1.49	1.50
9-H	7.36(16)	7.32(15.6)	7.31(16)
10-H	6.53(16)	6.52(15.6)	6.50(16)

(in CDCl₃)

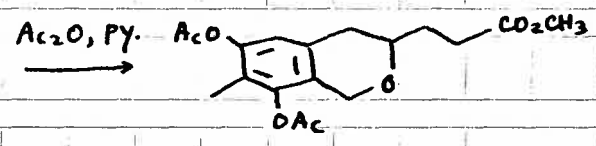
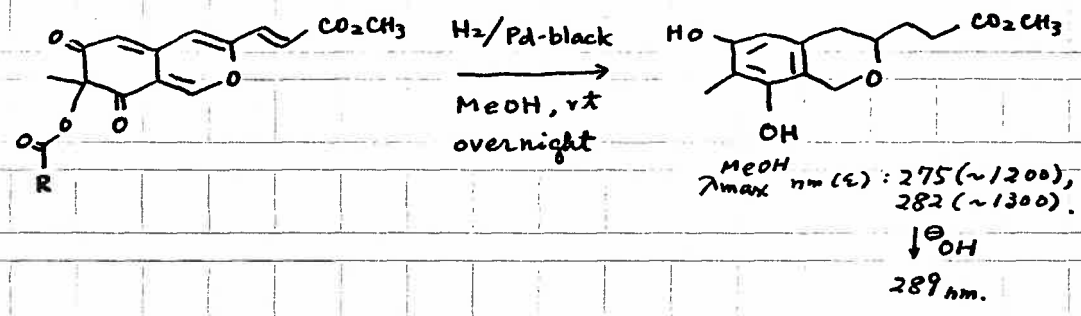
compound	$\underline{2}$	$\underline{3}$
proton	δ (J, Hz)	δ (J, Hz)
1-H	7.92(1)	7.90(1)
4-H	6.52	6.50
5-H	5.73(1)	5.73(1)
7-CH ₃	1.56	1.53
9-H	7.19(16)	7.21(16)
10-H	6.55(16)	6.52(16)

また、amphipyronne は極めて容易にアニモニアと反応して対応するアミノ誘導体となることが知られており、azaphilone mold metabolites としても分類されてゐる。LA-AMe を希エーテル溶液とし濃水酸化アニモニア - 水 = 1:1 を少量加えて数分間振盪した所、対応するアミノニと与えた。



このことは、LA-AMe が amphipyronne 核を有することを確認してゐる。また、LA-AMe をメタノール中パラジウム黒を用いて一夜接触還元すると、isochroman 誘導体を与えることでも確認された(次

図)。 Isochroman 誘導体の構造は、その UV 2 へ 7

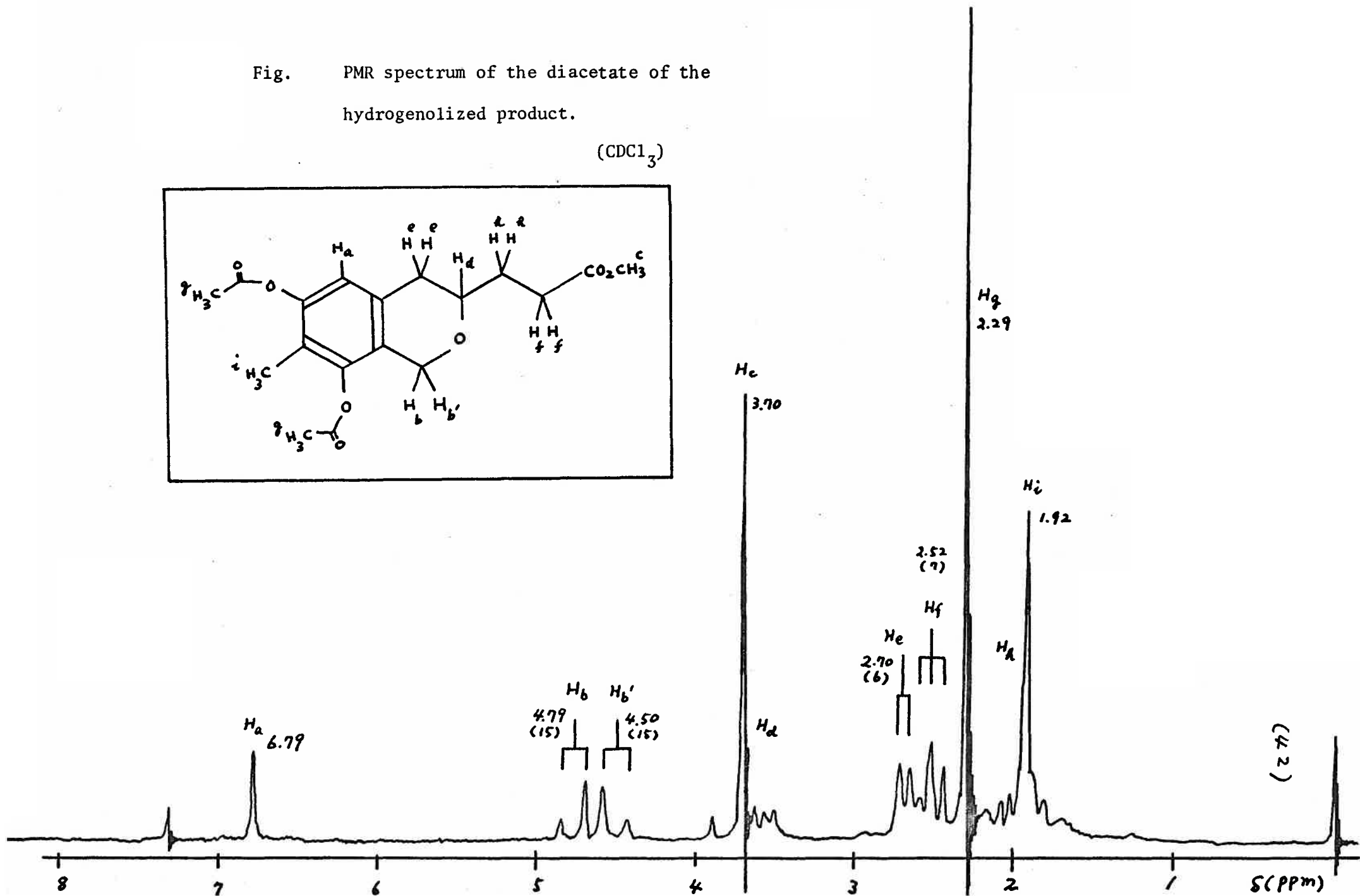
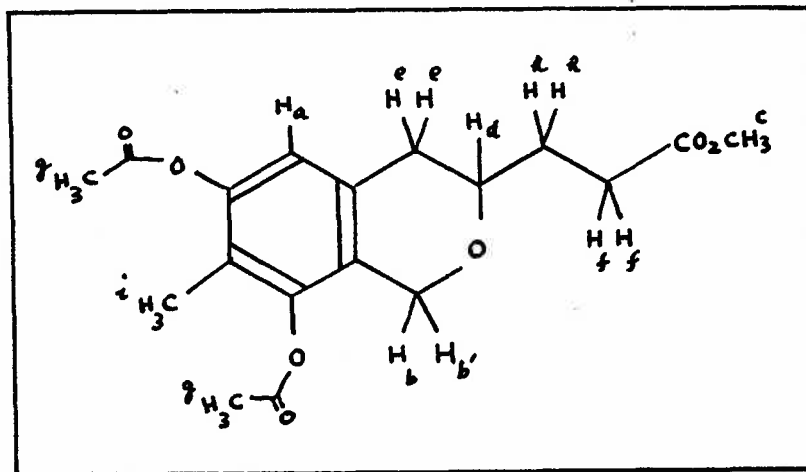


トルからシフトと予想され、そのシフト体との pmr スペクトルで確認された。

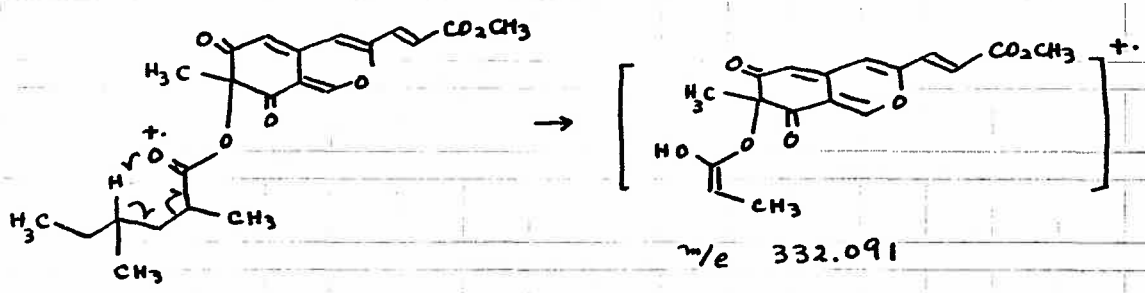
LA-AMe の分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{O}_7$ から母核の発色団部分を差し引くと、残りは $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_2$ であり不飽和度 1 であるが、母核の 7 位のアトロキニ基のエステルカルボニルに 1 個消費されるので、飽和カルボン酸と予想された。LA-AMe の pmr スペクトルから母核部分を除くと、1 級のメチル基が δ 0.88 ($J=6\text{Hz}$) の triplet, 2 級のメチル基が δ 0.91 ($J=6\text{Hz}$) および δ 1.19 ($J=7\text{Hz}$) にそれぞれ doublet に現われており、このことは、 $\text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_2$ 部分がジメチルヘキサン酸誘導体であること

Fig. PMR spectrum of the diacetate of the hydrogenolized product.

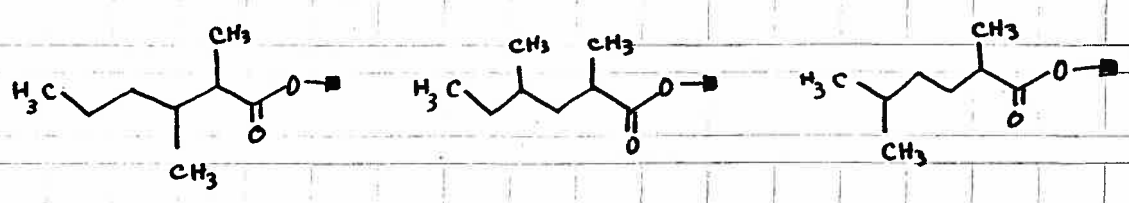
(CDCl₃)



を示唆している。また、 δ 1.19 ($J=7\text{Hz}$) の doublet のシグナルは、 δ 2.65 の multiplet と互いにデカップリングされること、および LA-AMe の MS スペクトル (Fig.2-5) において m/e 332.091 は $C_{17}H_{16}O_7$ のフラグメントイオンが現われていることは、エステル結合の McLafferty 転位によるものと考

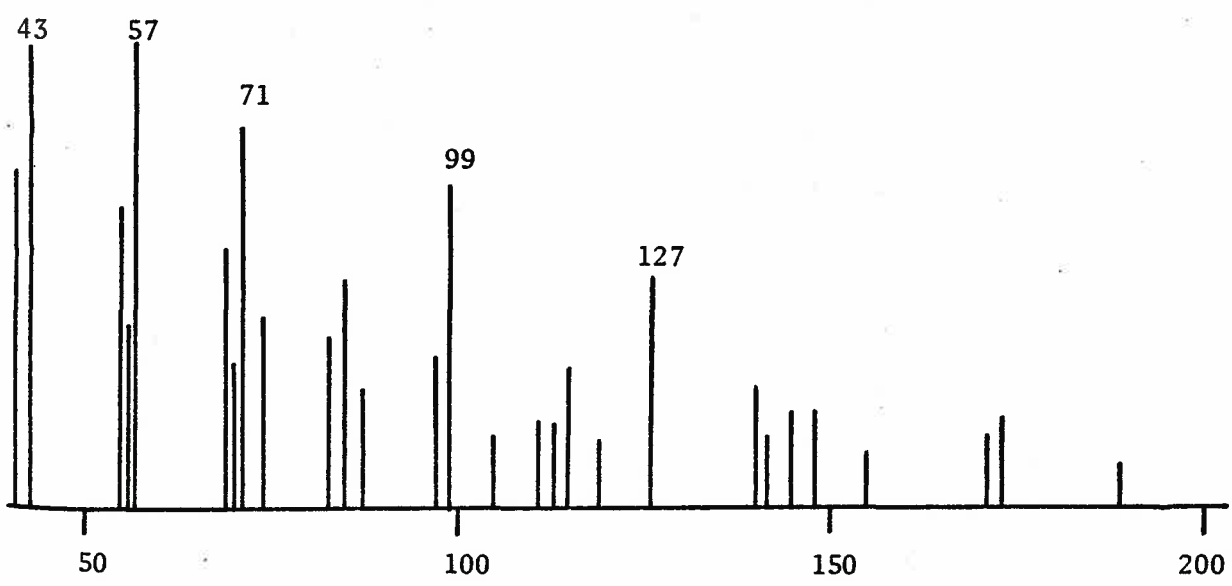
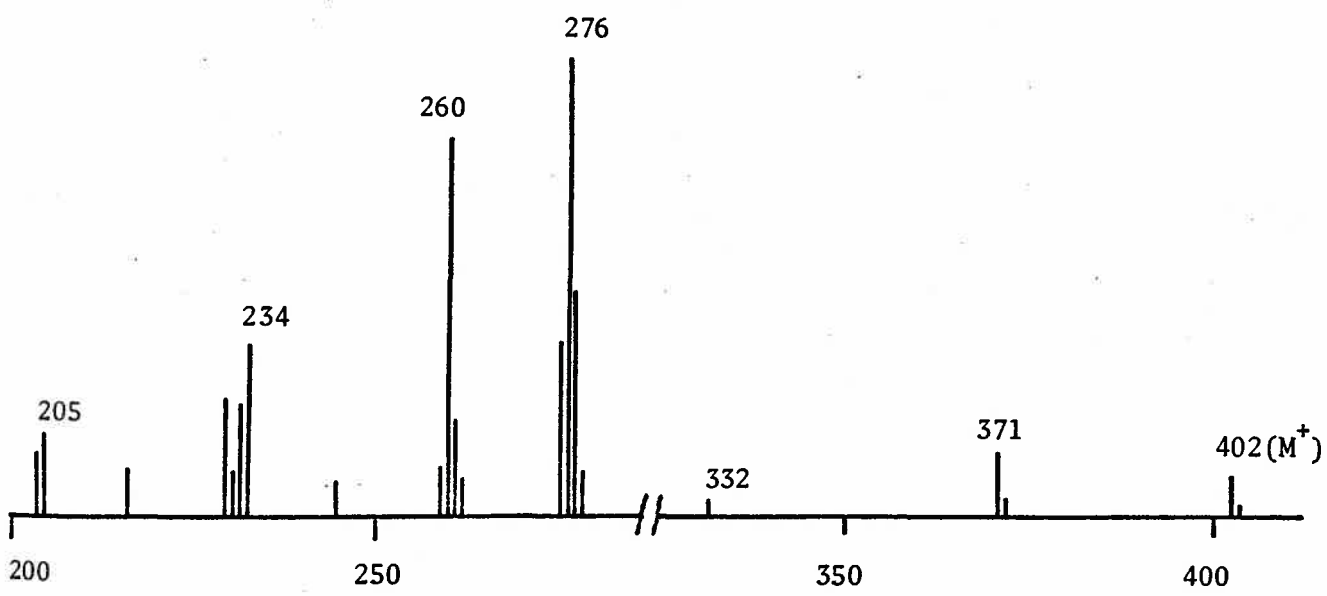


らぬ、1つのメチル基がエステルカルボニル基の α 位に存在することを示唆している。残る可能な構造は、2,3-, 2,4-, 2,5-dimethyl hexanoate の3つに限られる。



LA-AMe を無水メタノール中、トリリウムキトキシドと処理すると、 $C_8H_{15}O_2$ の部分がメタ

Fig.2-5 Mass spectrum of lunatoic acid A methyl ester.



ノリニスを受けてメチルエステル体 ($C_9H_{18}O_2$)
 を与えることが GC-MS で確認されたので、比
 較対照のための標品化合物を得るために、分
 枝位置の異なるジメチルヘキサ二酸の3種の
 異性体を Fig. 2-6 に示したルートで合成した。

合成した標品をガスクロマトグラフイーに
 かけたときは、Table 2-4 に示す結果を得た。天
 然より得たメチルエステルは、2,4-dimethyl hexanoate
 の2つのピークのうち前に溶出される $t_R = 9.1 \text{ min}$
 のピークと一致し、Co-GLC によ、ても確かめ
 られた。また、GC-MS で両者は完全に同一で
 あることが示された。従、て、 $C_9H_{15}O_2$ 部分は
 2,4-ジメチルヘキサ二酸であ、て、LA-AMe の
 平面構造は、下式のように表わされる。

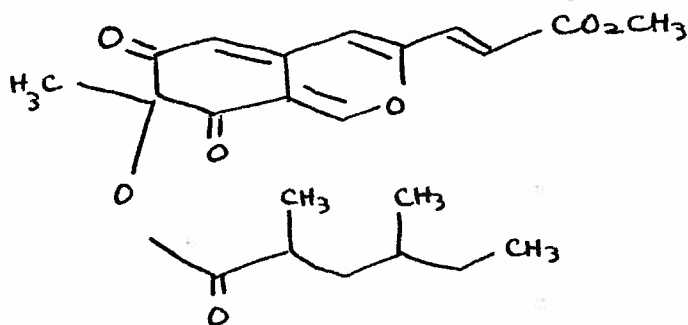


Fig.2-6 Synthesis of the three isomeric dimethylhexanoic acids

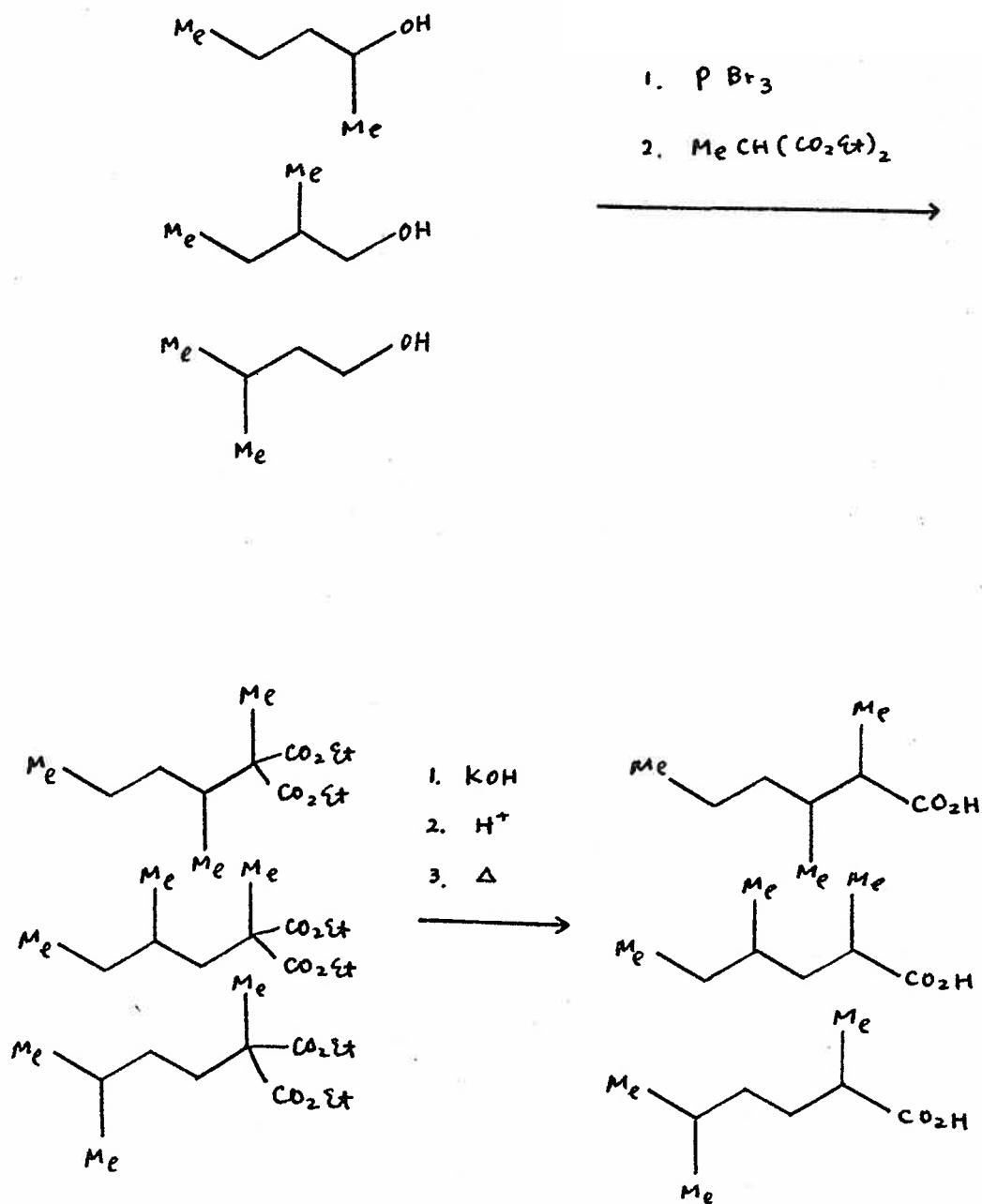


Table.2-4 GC analysis of the three isomeric dimethylhexanoic acids methyl ester and the degradation product.

5% OV-210 (1m, 46^oC)

	retention time(min)	Co-injection
2,3-dimethylhexanoate	10.8	9.1, 10.8
2,4-dimethylhexanoate	9.1, 10.1	9.1, 10.1
2,5-dimethylhexanoate	10.2	9.1, 10.2
The degradation product	9.1	

5% DEGS (1m, 45^oC)

	retention time(min)	CO-injection(46 ^o C)
2,3-dimethylhexanoate	8.4	6.6, 8.0
2,4-dimethylhexanoate	7.0, 7.8	6.6, 7.4
2,5-dimethylhexanoate	8.0	6.6, 7.6
The degradation product	7.0	

两部分構造がエステル結合を介して結ばれて
 いることは、高分解能マススペクトルの解
 析により、Fig. 2-7 に示す如く合理的に説明さ
 れる。MS スペクトルで特徴的に現われてい
 る m/e 276 および 260 のフラグメントイオン
 は、エステル酸素原子の両隣りが開裂して生
 成したものである。その他の特徴的な開裂も
 Büchi らが提出した母核の A 環に基づく開裂
 機構とよく合致している。また、LA-AMe をア
 ニモニウムで処理して得たアミン誘導体では、
 各フラグメントイオンが 1マス位く現われて
 おり、これらのフラグメントイオンが A 環の
 開裂に由来することとを支持している。最後に
 lunatic acid A の全体の炭素骨格を確認する目
 的では ^{13}C NMR スペクトルを取った。得られたスペ
 クトルを Fig. 2-8 に示した。全炭素が現われて
 おり、シグナルの帰属はオフレグナンスによ
 り得られる多重度およびケミカルシフトの比
 較により、Table 2-5 に示すようになると思われ
 る。

Fig. 2-7 Mass fragmentation of lunatic acid A methyl ester.

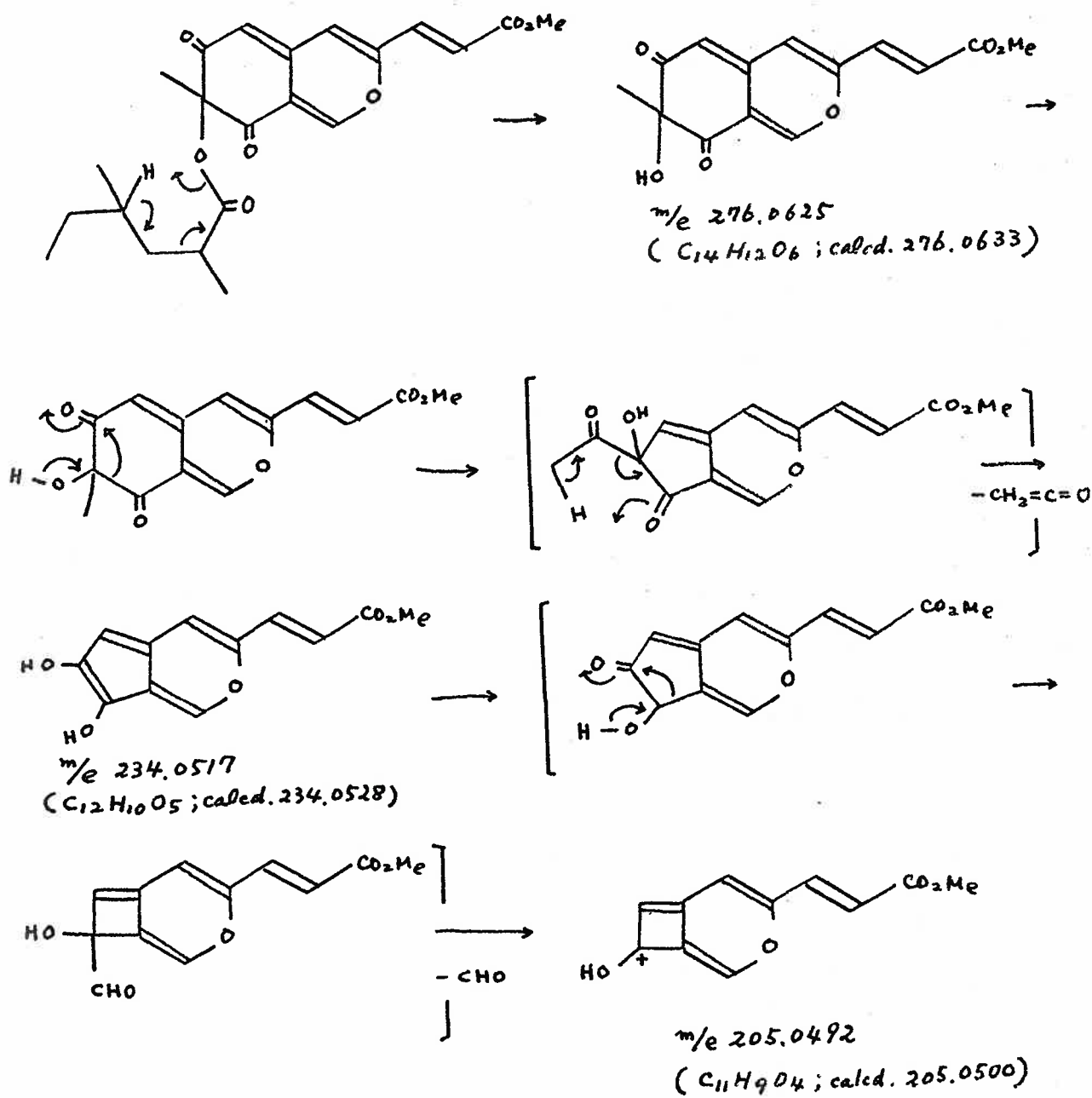


Fig. 2-8 Proton Noise Decoupled C^{13} -NMR spectrum of lunatoic acid A methyl ester.

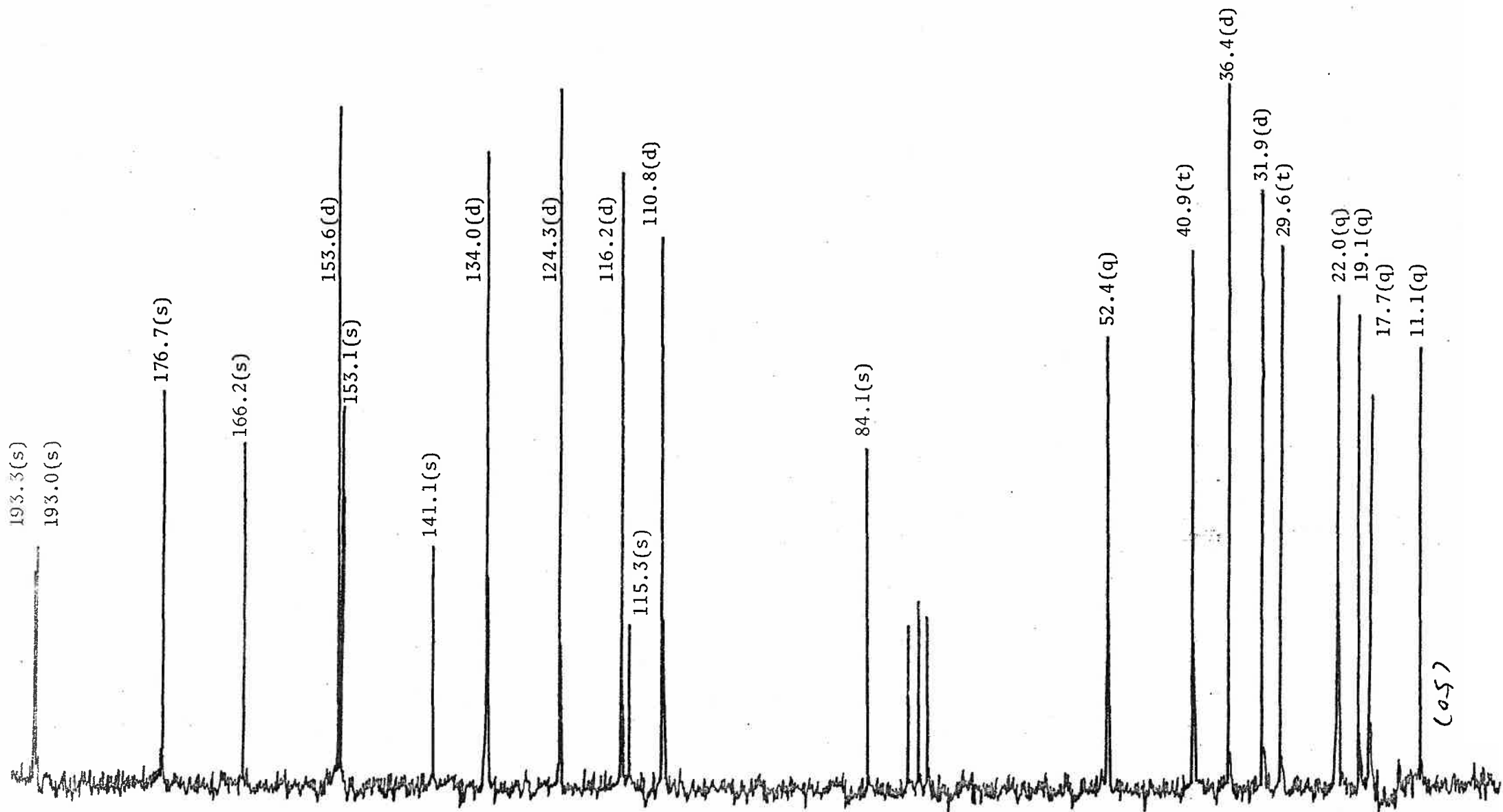
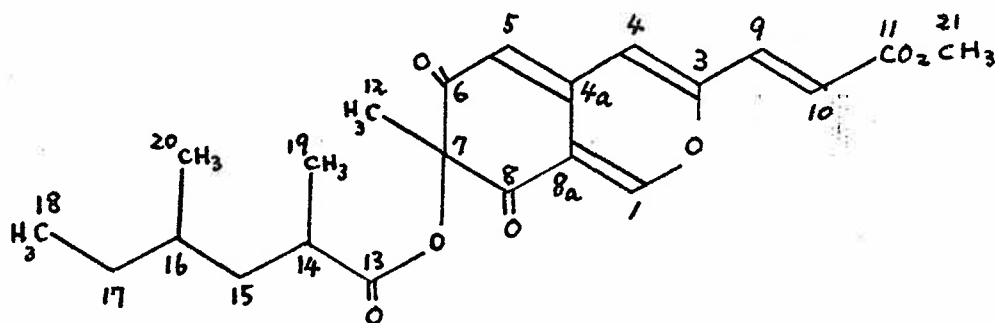


Table.2-5 Cmr chemical shifts and their assignments of lunatoic acid A methyl ester.

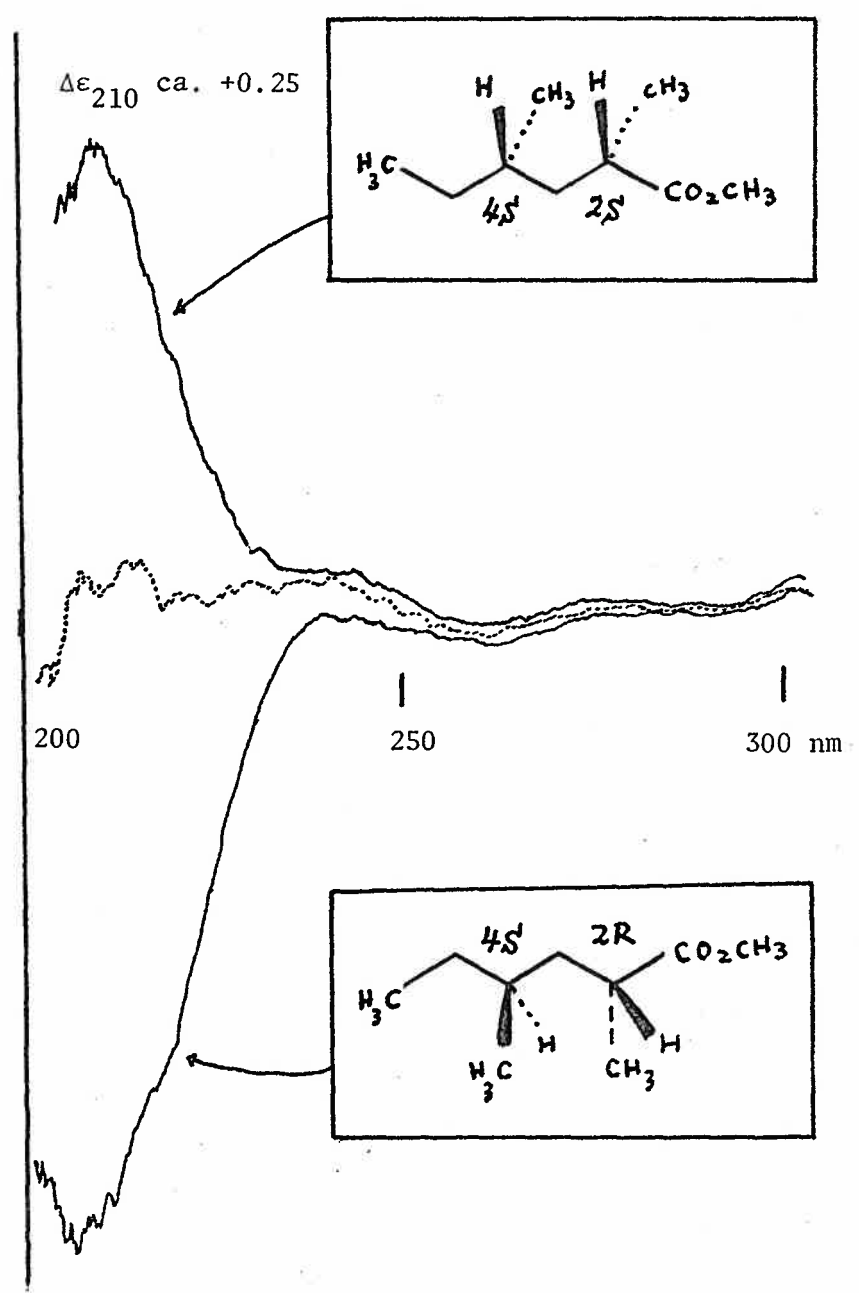


δ	multiplicity	assignment	δ	multiplicity	assignment
193.3	s	C-6 or C-8	110.8	d	C-10
193.0	s	C-6 or C-8	84.1	s	C-7
176.7	s	C-13	52.4	q	C-21
166.2	s	C-11	40.9	t	C-15
153.6	d	C-1	36.4	d	C-14
153.1	s	C-3	31.9	d	C-16
141.1	s	C-4a	29.6	t	C-17
134.0	d	C-4 or C-5	22.0	q	C-12
124.3	d	C-4 or C-5	19.1	q	C-19
116.2	d	C-9	17.7	q	C-20
115.3	s	C-8a	11.1	q	C-18

第4節 Lunatic acid Aの絶対構造

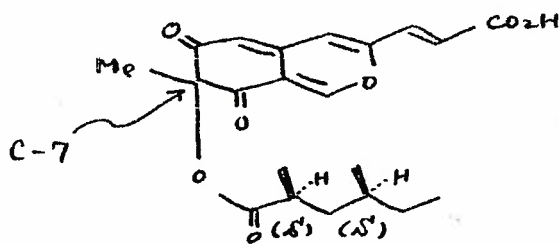
2,4-dimethylhexanoate部分の絶対構造については、天然のメチルエステル体はGCで、合成したエーアステレート²の2本のピークのうち前に溶出されるピークと一致すること述べたが、この酸は既に Odham によって光学活性アミルアルコールから合成され光学分割されており、その比旋光度と絶対構造との関係が明らかにされて⁽²³⁾いる。そこで、LA-AMe をナトリウムメチドで処理した後シリカゲルのカラムクロマトにかけ 2,4-dimethylhexanoate を分離した。その旋光度を測定すると $[\alpha]_D^{26} = +25 \pm 5^\circ$ (c 0.28, CHCl₃) であった。これは (2S, 4S)-異性体と一致する。また、光学活性アミルアルコールから合成した 2,4-dimethylhexanoate を GC 分取後、各々のピークの CD を測定した所 Fig. 2-9 に示すように天然物と一致するピークに相当するものは正の Cotton 効果を示したのに対して、後に溶出されるピークは負の Cotton 効果を示した。このことは、一般にカルボニル酸メチルエステルのα位にメチル

Fig.2-9 CD spectra of 2,4-dimethyl hexanoic acid methyl ester.



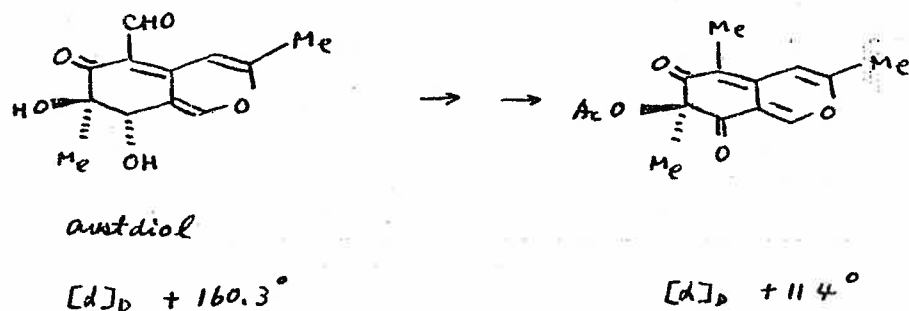
基が置換したものでは、正の Cotton 効果を与えるものは S 配位を有し、負の Cotton 効果を与えるものは R 配位を有することから⁽²⁴⁾、旋光度から結論された絶対配位と同一であって、天然のものは $(2S, 4S)$ -dimethylhexanoate であると結論した。

Lunatic acid A に残される不斉中心は C-7 位に関するものである。大変興味あることに、従



来菌類から見出しられて同様の母核を有する代謝産物の中には、C-7 位の配位を異にする (+) 体および (-) 体が異なり、たびたびから得られてくる (Table 2-6)。これらの代謝産物の C-7 位の絶対配置については長い間未解決のままであったが、最近 Steyn らが austdiol の誘導体 (ブロム原子を含む) の X 線解析から絶対構造を決定し、その旋光性との関連を明らかにした⁽²⁵⁾。

<p>(7R)</p>	<p>R=CH₃ (-)-mitorubrin <u>Penicillium rubrum</u> R=CH₂OH (-)-mitorubrinol <u>Pen. rubrum</u> R=CO₂H (-)-mitorurinic acid <u>Pen. funiculosum</u></p>
<p>(7S)</p>	<p>R=CH₃ (+)-mitorubrin <u>Hypoxyton fragiforme</u> R=CH₂OH (+)-mitorubrinol <u>Hyp. fragiforme</u> R=CO₂H (+)-mitorubrinic acid <u>Hyp. fragiforme</u></p>
<p>(7S)</p>	<p>(-)-sclerotiorin <u>Pen. sclerotiorum</u> <u>Pen. multicolor</u></p>
<p>(7R)</p>	<p>(+)-sclerotiorin <u>Pen. hirayamae</u></p>



LA-AMe は、(一)ニリ - ズに属し、かつ Whalleyらによると、これら一群の amphipyronc 核は一般に大きな旋光性を示し、しかもその旋光性は主として C-7 位の配位に依存することが報告されてお⁽²⁶⁾り、分枝脂肪酸部が大きくと旋光性に寄与しない、つまり旋光性を逆転させる程の寄与がないと仮定すれば、C-7 位は R 配位を有すると推定される。そこで、C-7 位の絶対配位を知るために、CD 曲線と絶対配位の関係が確立されておる austdiol 誘導体の CD と比較した。また、共役系による影響を考慮して 9, 10-位の二重結合を、酢酸エチル中パラジウム黒を触媒にして部分還元して飽和させたジヒドロ体の CD も測定した。9, 10-位が選択的に還元されておることは、還元生成物の分子イオニヒロ - フが

m/e 404 に現われ、 m/e を増加して 113 になると、
 および pmr スペクトル (Fig. 2-10) に見られるよう
 に、9, 10-位の *trans* のオレフィンプロトンのシ
 グナルが消失し、代りに δ 2.69 に 4H 分が AB
quartet 様に見われ、 m/e 113 ことで確認された。得
 られた各々の CD 曲線を Fig. 2-11 に示し、データを
 Table 2-7 に示した。

ジヒドロ体の CD 曲線は、*anustriol* 誘導体のそ
 のととの Cotton 効果の波長、および $\Delta\epsilon$ 値がほぼ
 同じであるが、その符号が全く逆である。こ
 のことは、C-7 位の絶対配置が *anustriol* 誘導体
 とは逆の配置にあることを示している。従
 て、*lunatic acid A* の絶対構造は C-7 位が R 配置
 のものであり、Whalley らが述べた旋光性の関
 係と一致したことになる。

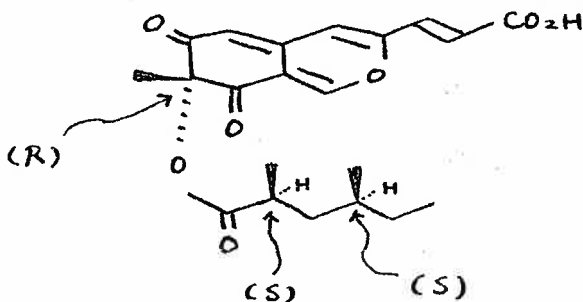
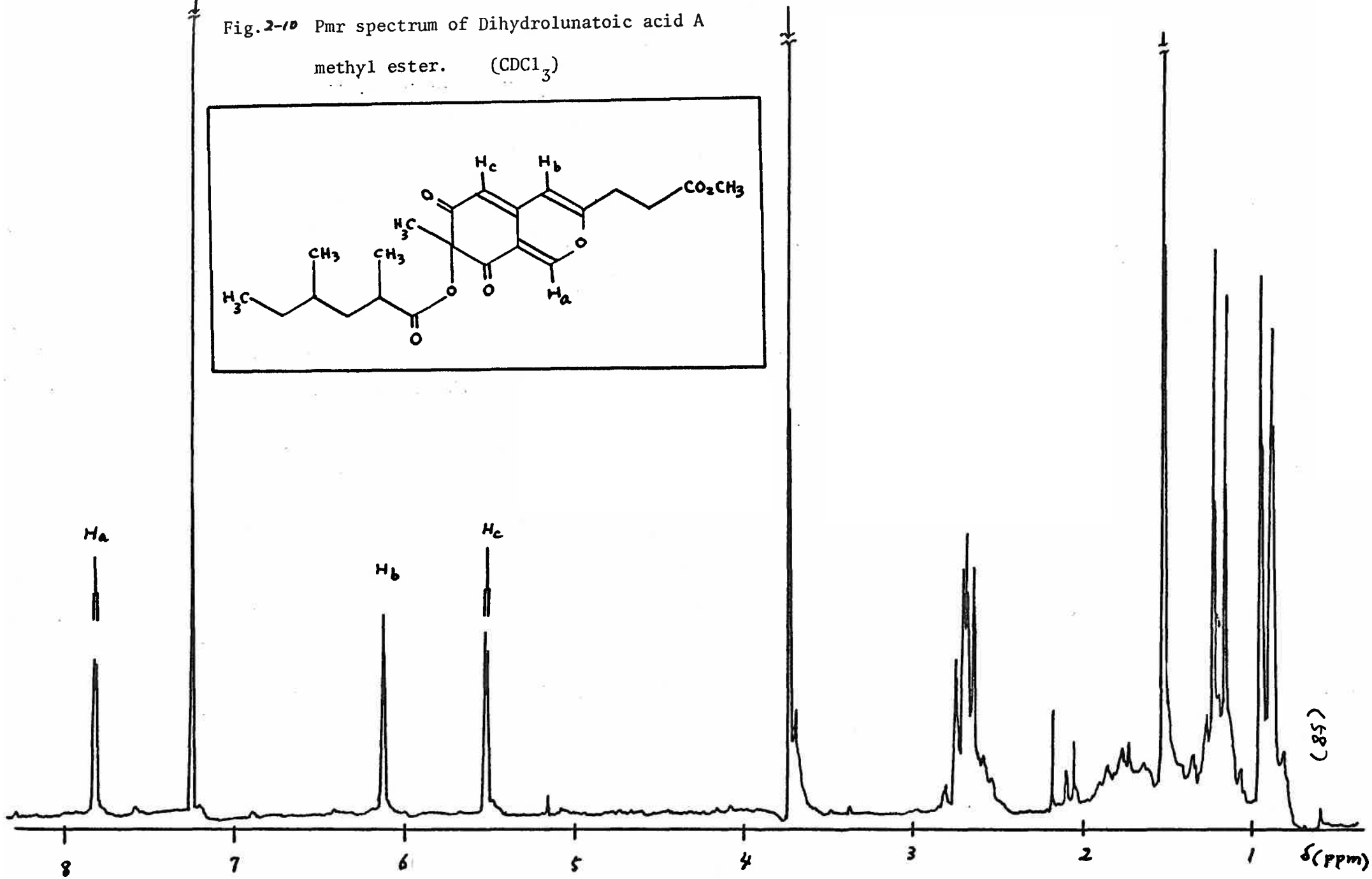
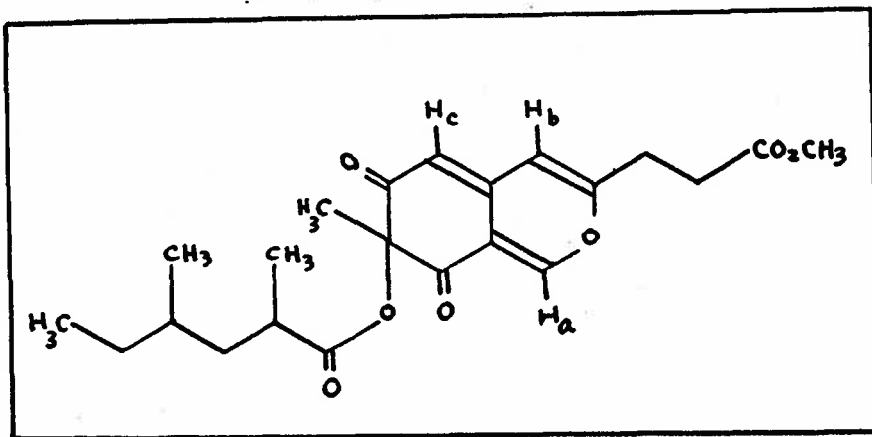


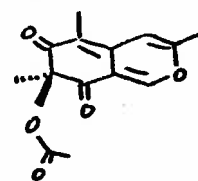
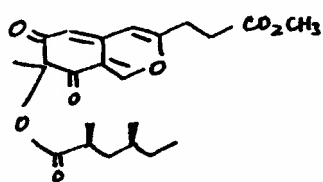
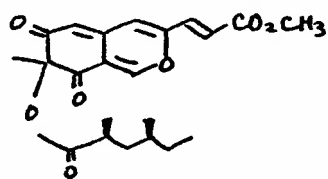
Fig. 2-10 Pmr spectrum of Dihydrolunatoic acid A
methyl ester. (CDCl_3)



(58)

δ (ppm)

Table. 2-7



nm	$\Delta\epsilon$
420	-2.55
355	-0.24
320	-2.28

nm	$\Delta\epsilon$
351	-4.15
274	+4.25
250	-0.48

nm	$\Delta\epsilon$
357	+5.6
270	-4.0
244	+0.9
225	+1.3
210	-3.7

Fig. 2-11_a CD spectrum of lunatoic acid A methyl ester.

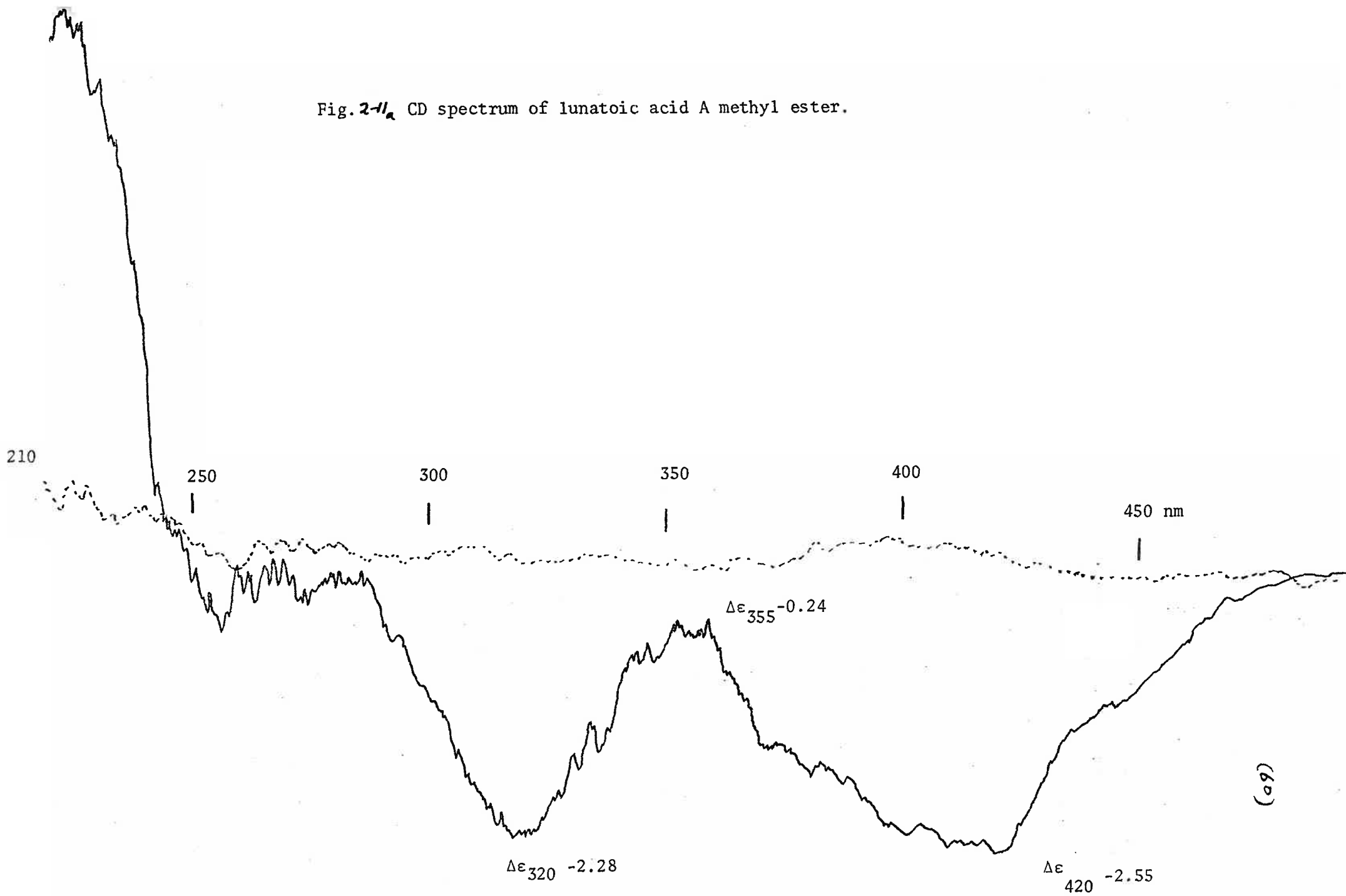
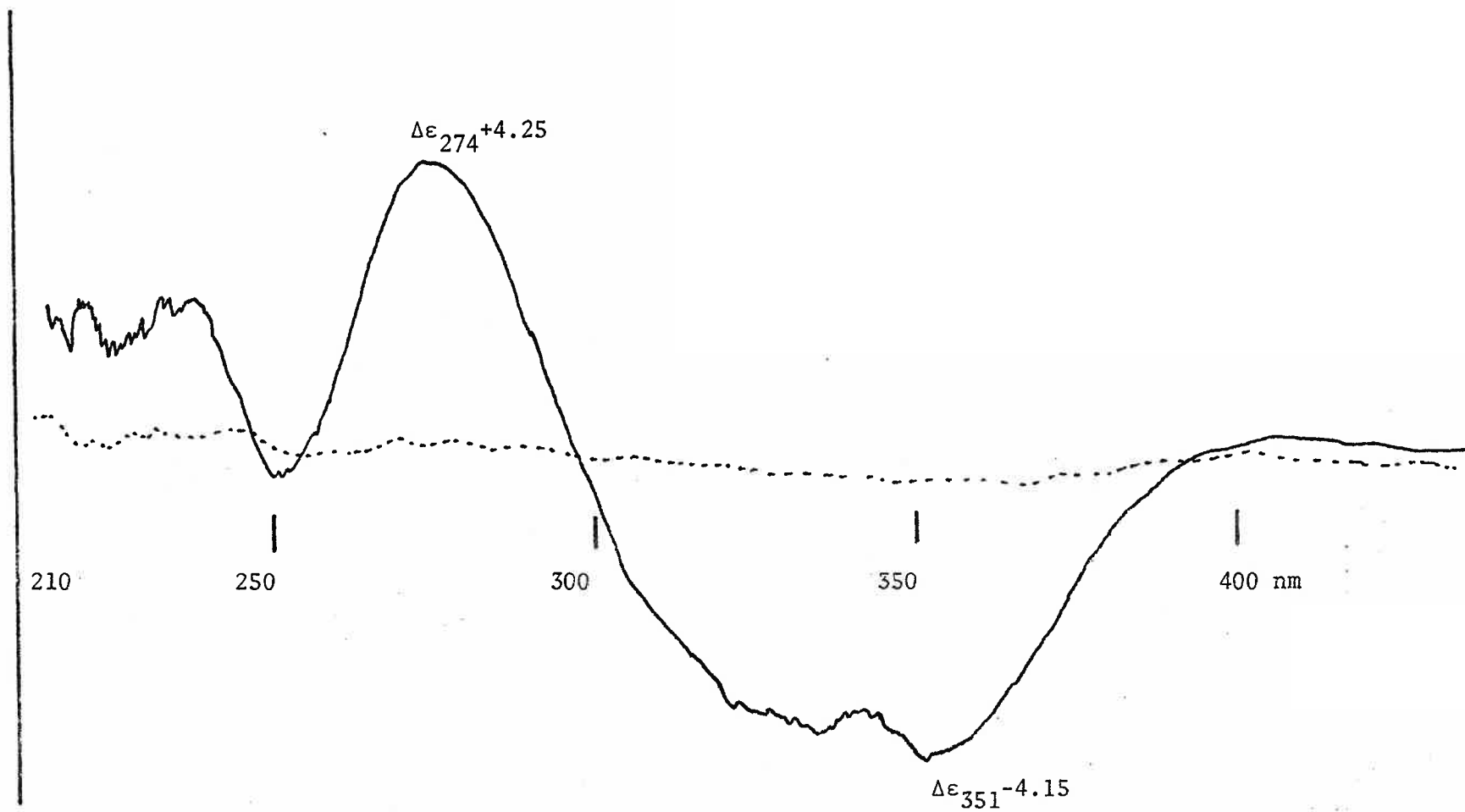


Fig. 2-11₆ CD spectrum of Dihydrolunatoic acid A methyl ester.



第 5 節 Lunatoic acid A の 生 物 活 性

Lunatoic acid A の 生 育 阻 止 濃 度 と 調 べ た 結 果 と

Table 2-8 に 示 し た。Lunatoic acid A は、5997 菌 が aversion 現 象 を 示 し た 他 の 8 種 類 の strain に 対 し て 3 ~ 12 μ /ml で 生 育 阻 害 を 示 し た が、5997 菌 自 身 お よ び 5997 菌 が aversion 現 象 を 示 さ ば か っ た 6586 菌 に 対 し て は 100 μ /ml が 必 要 で あ っ た。こ の こ と は、5997 菌 の 示 し た aversion 現 象 が ら 十 分 予 想 さ れ た こ と で あ る が、5997 菌 の 生 産 す る aversion factor が lunatoic acid A で あ る こ と を 示 す こ の で あ る。ま た、lunatoic acid A は 寒 天 希 釈 法 と 液 体 希 釈 法 と で は 他 の strain に 対 す る 最 少 阻 止 濃 度 が か な り 異 な っ て い る が、寒 天 希 釈 法 で の 生 育 可 能 の 濃 度 で コ ン ト ロ ー ル に 比 較 し 著 し く コ ロ ニ - の 大 き さ と 異 に し た。こ の こ と は lunatoic acid A の 作 用 機 構 と 何 等 か の 関 係 が あ る と 思 わ れ る。液 体 希 釈 法 で は 菌 糸 が 全 体 に 液 中 に 浸 漬 さ れ て い る の に 対 し て、寒 天 希 釈 法 で は 気 中 菌 糸 は さ ら さ れ て い る。

ま た、Table 2-8c に 見 ら れ る よ う に lunatoic acid A

Table. 2-8_a Inhibitory activities of the aversion factor, lunatoic acid A.
(malt-dextrose medium, shaking at 30°C, in darkness)

Tested Fungi	Concentration(γ/ml)					
	after 2 days			after 5 days		
	12	6	3	12	6	3
<u>Cochliobolus lunata</u>						
IFO						
5997	+	+	+	+	+	+
6286	-	-	-	-	-	-
6287	-	-	-	+	+	+
6288	-	-	-	-	-	-
6289	-	-	-	+	+	++
6290	-	-	-	-	-	-
6291	-	-	-	-	-	-
6299	-	+	+	-	+	+
6382	-	-	-	-	-	-
6586	+	+	+	+	+	+

Table. 2-8_b Inhibitory activities of the aversion factor, lunatoic acid A.
(malt-dextrose agar medium, after 2 days)

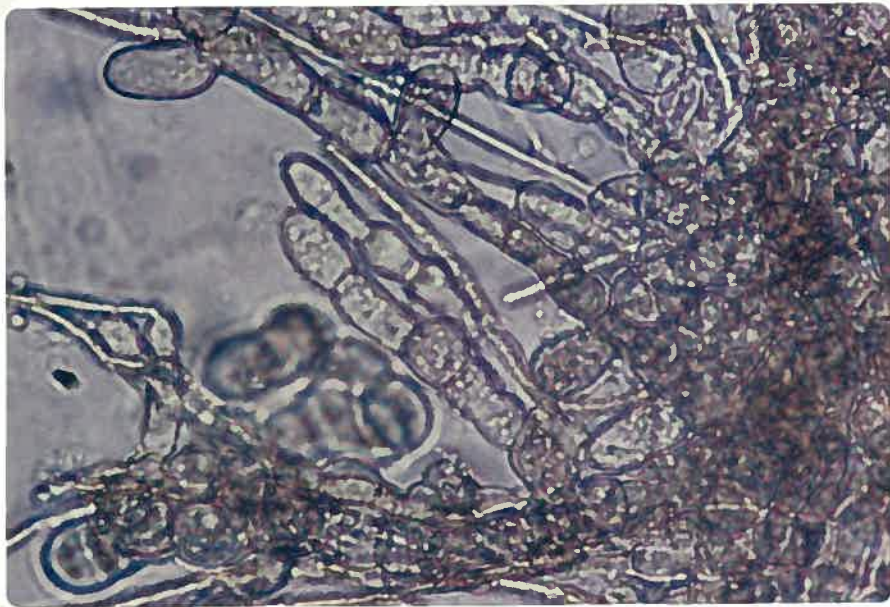
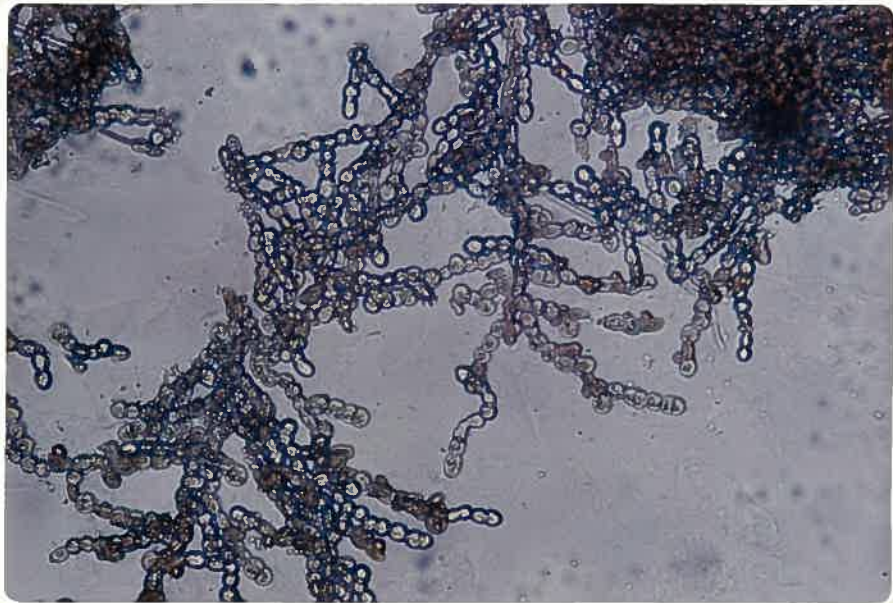
Tested Fungi	Concentration(γ/ml)			
	100	50	25	12
<u>Cochliobolus lunata</u>				
IFO.				
5997	+	+	+	++
6286	-	-	+	+
6287	-	+	+	+
6288	+	+	+	+
6289	+	+	+	+
6290	-	-	+	+
6291	-	+	+	++
6299	-	+	+	+
6382	-	+	+	+
6586	+	+	++	++

control: +++

Table.2-8. Inhibitory activities of the aversion factor, lunatoic acid A,
of Cochliobolus lunata IFO 5997 to other microorganisms

Bacteria	γ/ml	Fungi	γ/ml
Bacillus cereus	>100	Alternaria kikuchiana	100
Bacillus subtilis	>100	Cochliobolus miyabeanus	100
Escherichia coli	>100	Cladosporium fulvum	100
Escherichia coli	>100	Colletotrichum lindemuthianum	± 100
(SM,TC,CM,NM,MK)			
Pseudomonas aeruginosa	>100	Fusarium oxysporum	>100
Pseudomonas mirabilis	>100	Gibberella fujikuroi	>100
Sarcina lutea	>100	Glomerella cingulata	± 50
Serratia marcescens	>100	Glomerella lagenarium	100
Staphylococcus aureus	>100	Mortierella ramaniana	>100
Staphylococcus aureus	>100	Pyricularia oryzae	50
(PC,SM,EM,LM,OL)			
Mycobacterium smegmatis*	± 100		
(Nutrient-agar, 48 hrs)		(Potato-Sucrose-agar, 72 hrs)	
(*4% glycerol nutrient agar, 72 hrs)			

は、バクテリア類に對しては全く無効であり、
 またカビ類に對しては、イネの「もち病菌」として知られる Pyricularia oryzae に對して 50 %ml で生育阻害を示し、またブドウの晚腐病菌として知られる Glomerella cingulata に 50 %ml で土の状態になるが他の菌には 100 %ml、ないしそれ以上必要であり、かなり特異性を持つていた。この特異性は lunatic acid A の作用機構と何等かの関係があると思われる。Aversion zone の顕微鏡観察図を Fig. 2-12 に示した。驚いたことには、5997 菌は著しく分節した厚膜胞子様の菌糸になり、また、生育を止められた 6299 菌は、aversion zone においてのみ著しく分節した厚膜胞子様の菌糸を作った。このことは、lunatic acid A の作用機構と何等かの関係を示すものと思われ、今後に残された極めて興味深い点と言えよう。



Cochliobolus lunata IFO 5997 菌の顕微鏡観察写真

{ エルト培地, 30°C, 1週間培養 }

上: 10x15倍

下: 40x15倍



Cochliobolus lunata IFO 6299 菌の顕微鏡観察写真

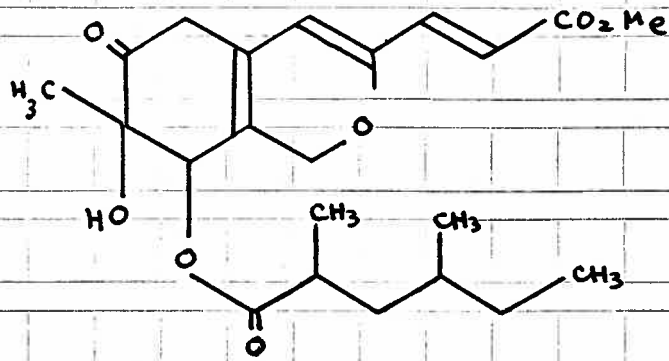
{ エルト培地, 30℃, 1週間培養 }
上: 10×15倍, 下: 40×15倍

第3章 Cochliobolus lunata IFO 5997 菌の生産する

関連代謝産物 - lunatoic acid B

第1節 Lunatoic acid B の単離

LA-AMe の分離・精製中、薄層クロマトグラフで LA-AMe の関連化合物と思われるスポットの存在を認め、Fig. 3-1 に示した操作でのメチルエステル体として単離した。本化合物は新代謝産物であり、たのて lunatoic acid B と命名した。また、本化合物の分離・精製中、薄層クロマトグラフで極めて近接した別の関連新代謝産物 (lunatoic acid C のメチルエステル体) の存在を認め、部分的に精製したところ、スペクトル的にテトラヒドロ体と予想される化合物であり、たが、比較的不安定なため最終的な構造の提出には至らなかったが、たが、pmr スペクトル (Fig. 3-2) から下記の構造と思われる。



or

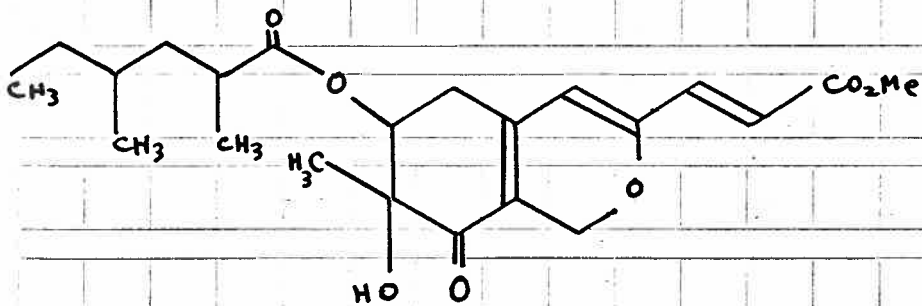


Fig.3-2 PMR spectrum of lunatoic acid C methyl ester.

(CDCl₃)

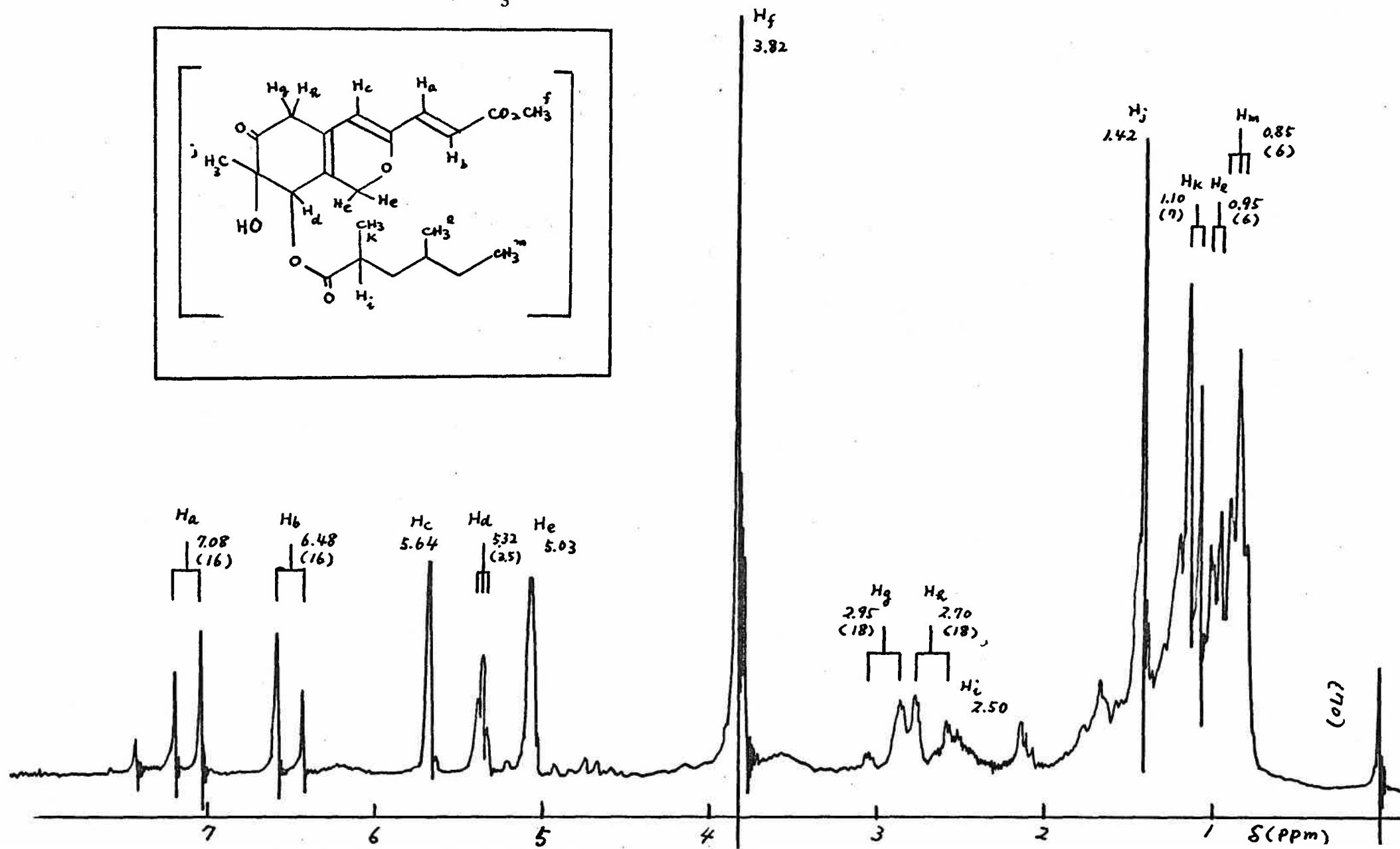
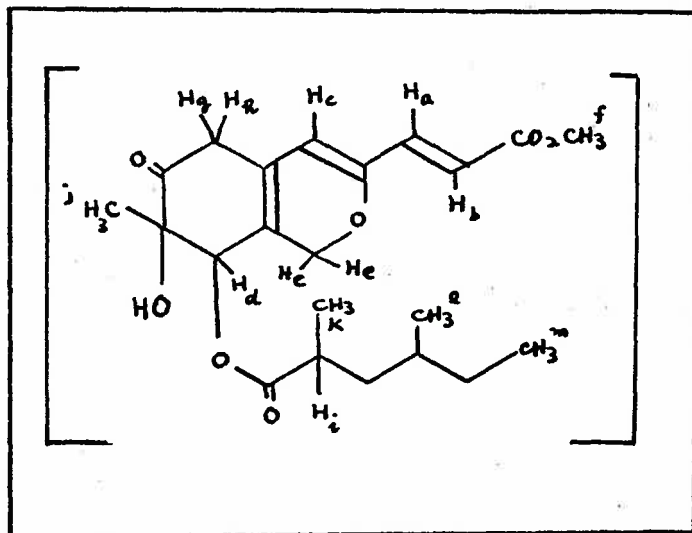
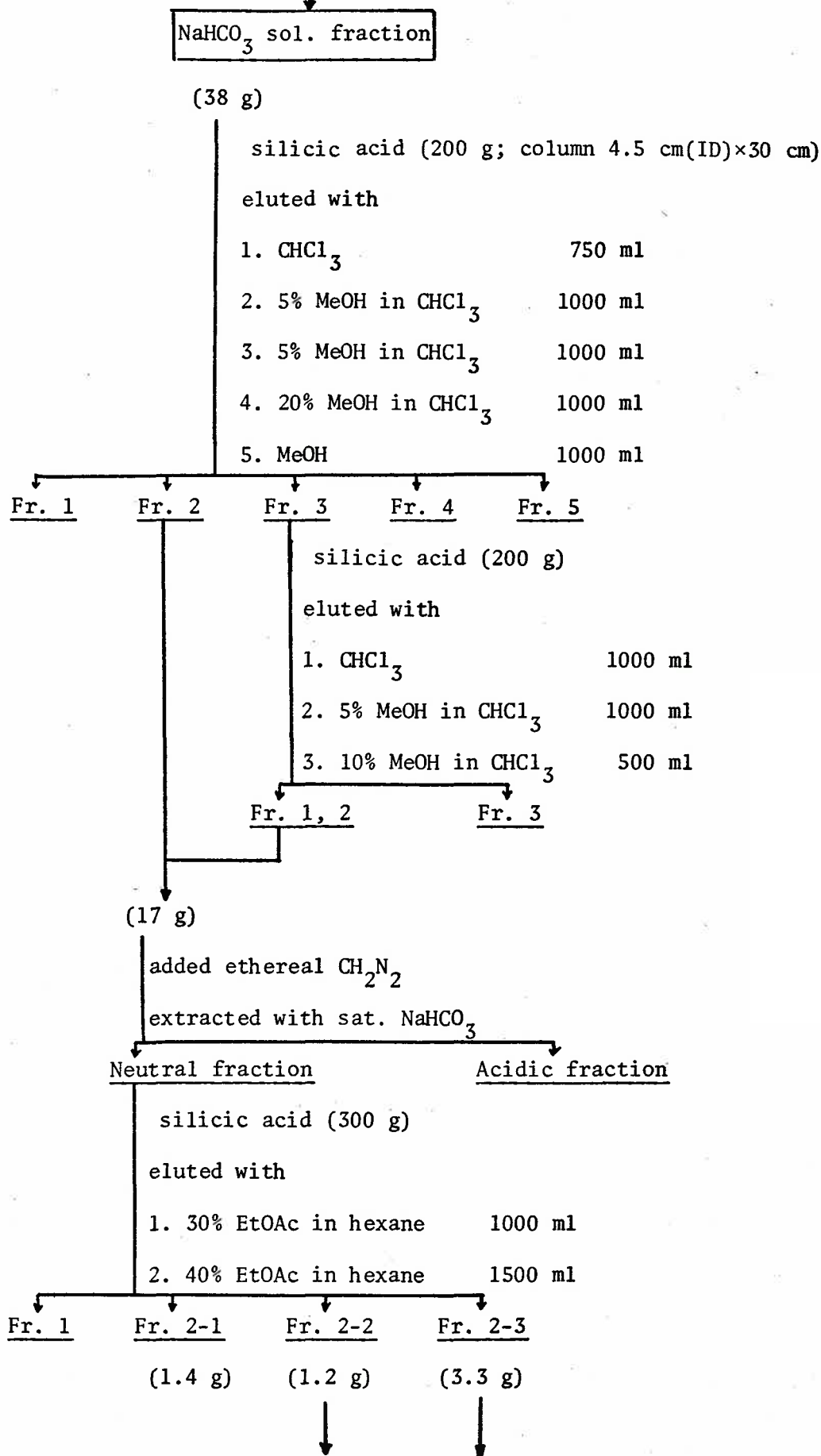
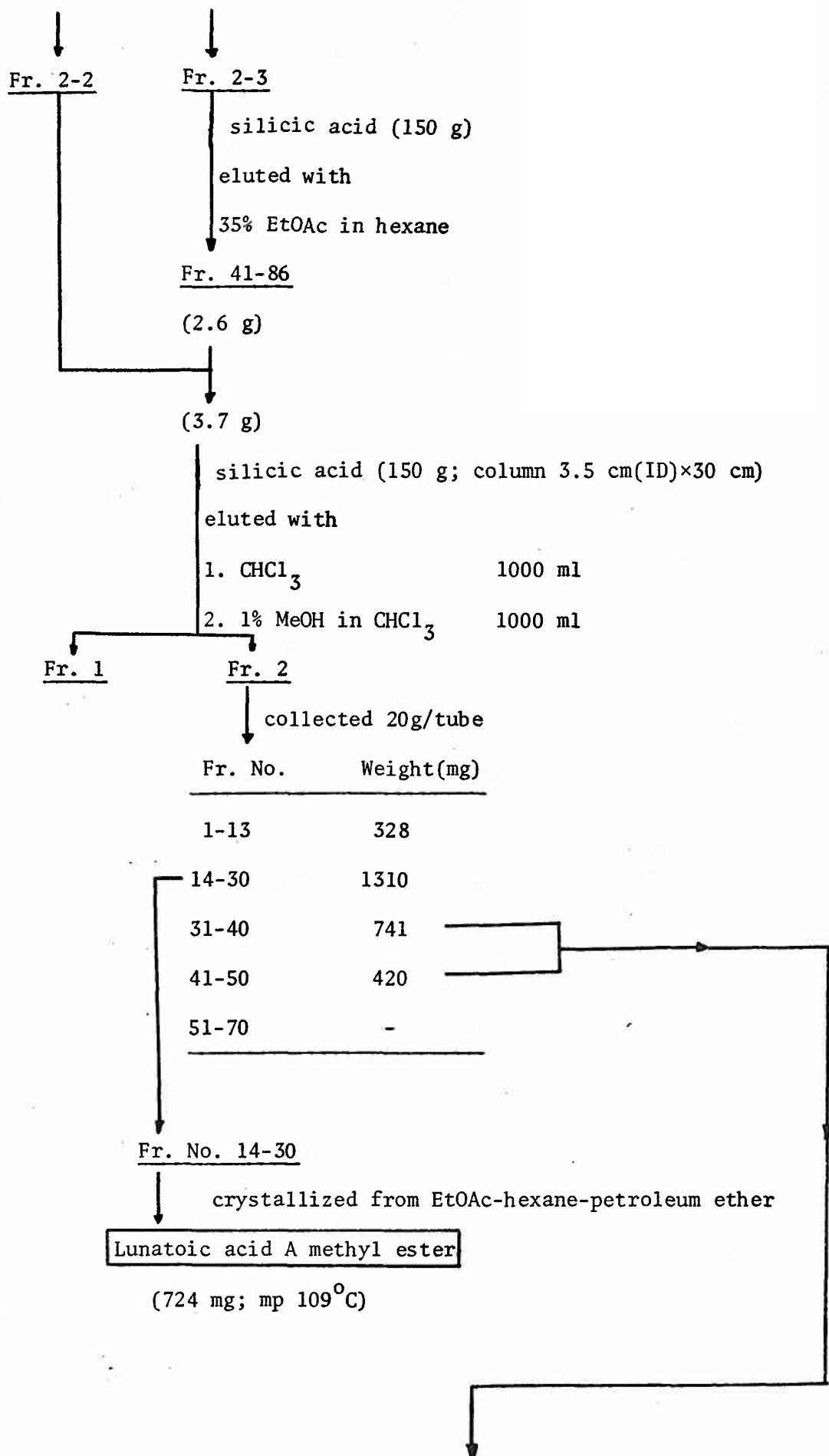


Fig. 3-1

Fig. 2-3

(717)





(74)



Fr. No. 47-53

(58 mg)

preparative tlc(Kieselgel 60pF₂₅₄; 20 cm×20 cm×0.75 mm)

developed 3 times with

15% EtOAc in benzene

eluted with EtOAc

Lunatoic acid B methyl ester

(27 mg)

$[\alpha]_D^{26} +201^{\circ}$ (c 0.71, CHCl₃)

**



(75)

Fr. No. 5-7

(174 mg)



Sephadex LH-20; column 1.2 cm(ID) ×48 cm

eluted with acetone

collected 3g/tube

Fr. No. 7,8

(113 mg)



silicic acid (25 g; column 1.5 cm(ID)×34 cm)

eluted with

1. 5% EtOAc in benzene 700 ml

2. 10% EtOAc in benzene 200 ml

collected 10g/tube

Fr. No. 103-135



Sephadex LH-20; column 1.2 cm(ID)×20 cm

eluted with acetone

(Lunatoic acid C methyl ester)

(38 mg)

第 2 節 Lunatoic acid B の物理化学的性状

Lunatoic acid B methyl ester (LA-BMe) は, Table 3-1 に示す物性値を示した。

Table. 3-1

Yellow amorphous powder

$[\alpha]_D^{26} +201^\circ (c\ 0.71, \text{CHCl}_3)$

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_7$ $M^+(m/e): 404.1848$ (calcd. 404.1835)

UV

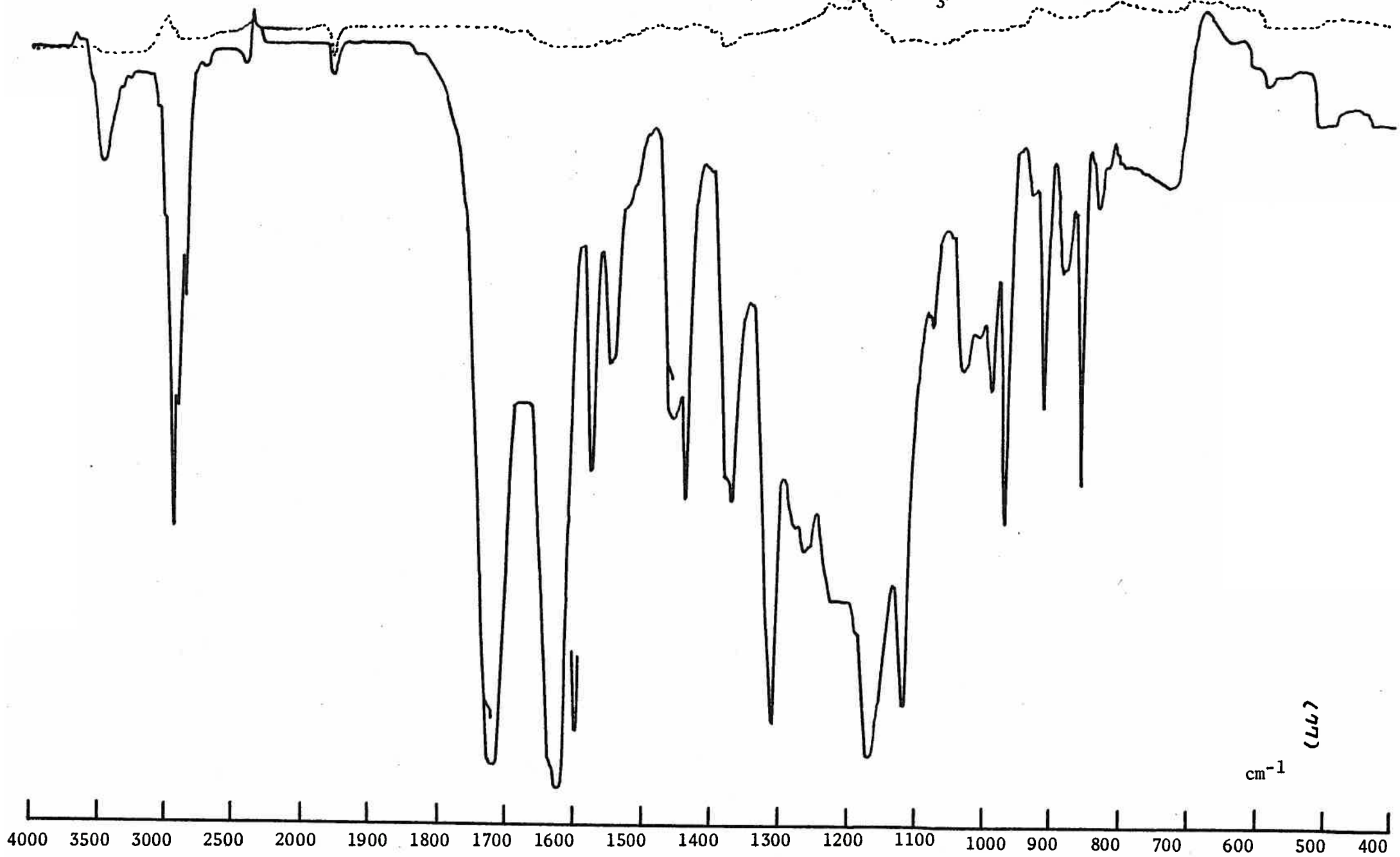
$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm(ϵ): 219(13500), 274(12400), 283(12300), 307(10400),
383(11500).

$\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH-1N NaOH}}$ nm(ϵ): 284(12300), 345(14800).

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3450, 1720, 1625.

LA-BMe は LA-AMe の示したようなアミドの反応性を示さなかった。このことは、本化合物の構造的特徴を示すもので、更に驚いたことに、LA-BMe は LA-AMe とは逆の正の旋光性を示した。このことは C-7 位の配位の逆転を予想させたか後に述べる。

Fig. IR spectrum of lunatoic acid B methyl ester. (CHCl_3)



第 3 節 Lunatoic acid B の平面構造

LA-BMe は分子式 $C_{22}H_{28}O_7$ を有し LA-AMe のジヒ
 ドロ体であると推定された。UV スペクトル
 は LA-AMe と同様の amphipyronone 発色団を持つことを
 示唆する。また pmr スペクトルの特徴的な母
 核上のプロトンも支持してゐる。LA-BMe に含ま
 れる 2H 分の余分のプロトンの 1 つは $\delta 5.62$ に
 singlet として現われ、もう 1 つは $\delta 3.88$ に重水置
 換され、IR スペクトルで $\nu_{max}^{CH_2}$ 3450 cm^{-1} に吸収を
 示す水酸基として現われたい。残りのプロ
 トンは各々 Fig. 3-3 に示す如く残存してゐること
 から、A 環に存在する 2 つのカルボニル基の
 どちらか一方が還元されて 2 級アルコールを
 生成してゐると考えられた。そこで LA-BMe の
 cmr スペクトル (Fig. 3-4) を測定した所予想通
 りカルボニル基の吸収は 1 つ ($\delta 198.2(5)$) であり
 、代わりに新しくシグナルが $\delta 73.0$, doublet として
 現われた。このことは、A 環のカルボニル基
 が 2 級アルコールに還元されてゐることを示
 してゐる。しかし、新たに出現したアルコ-

Fig.3-3 PMR spectrum of lunatoic acid B methyl ester

(CDCl₃)

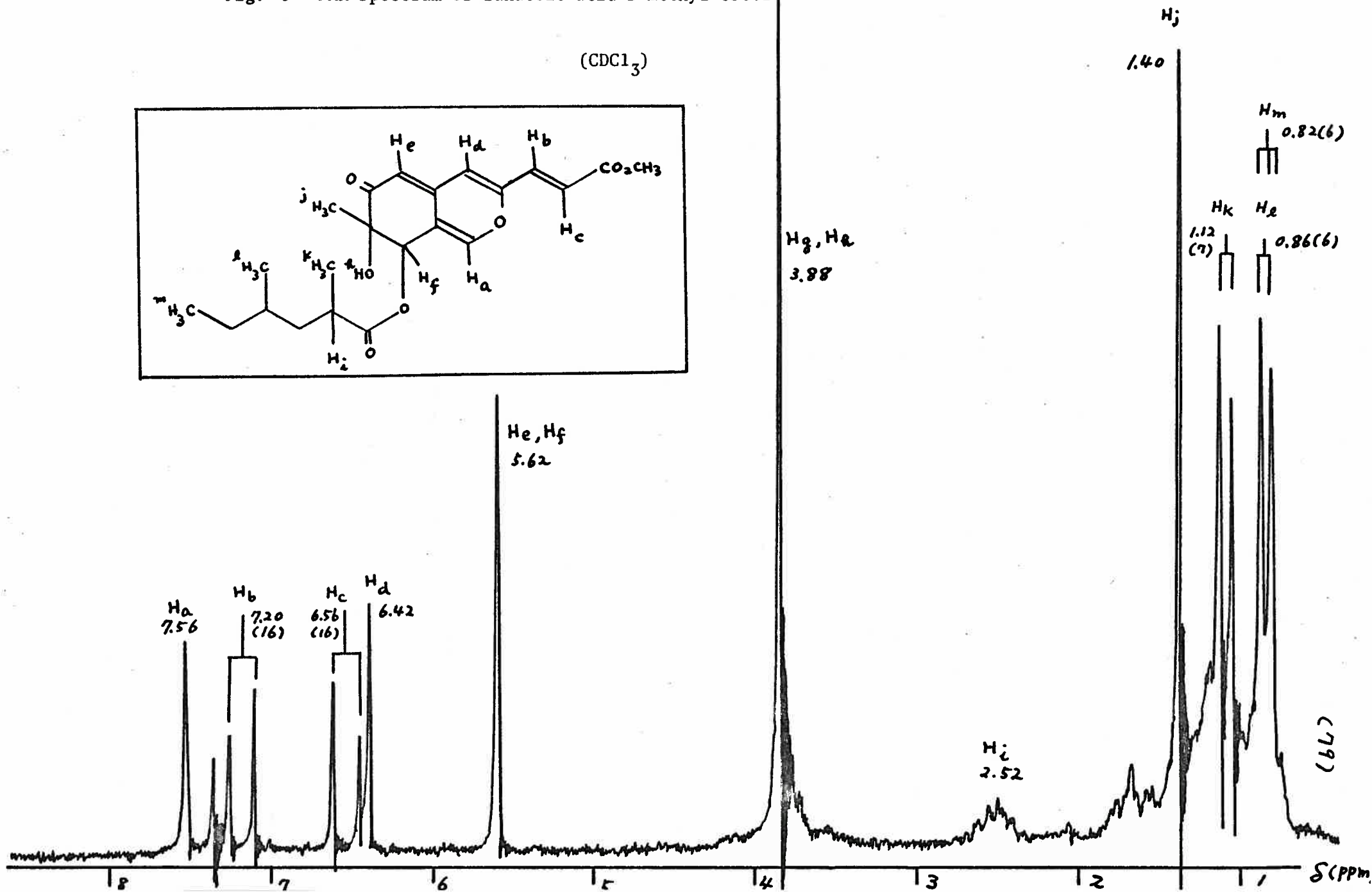
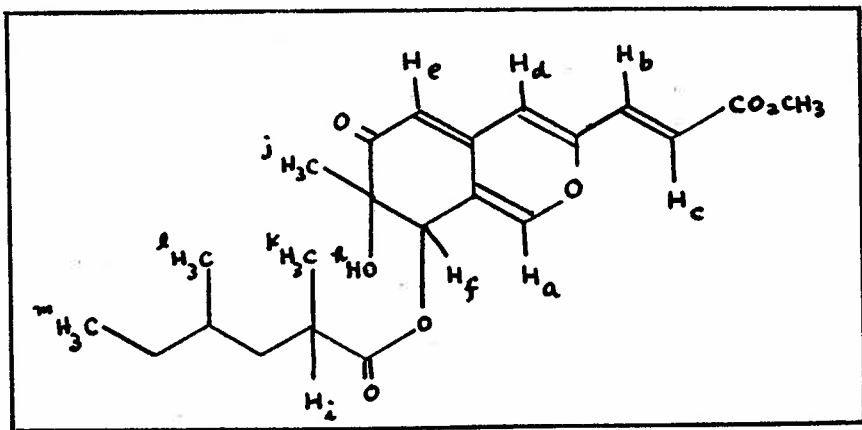
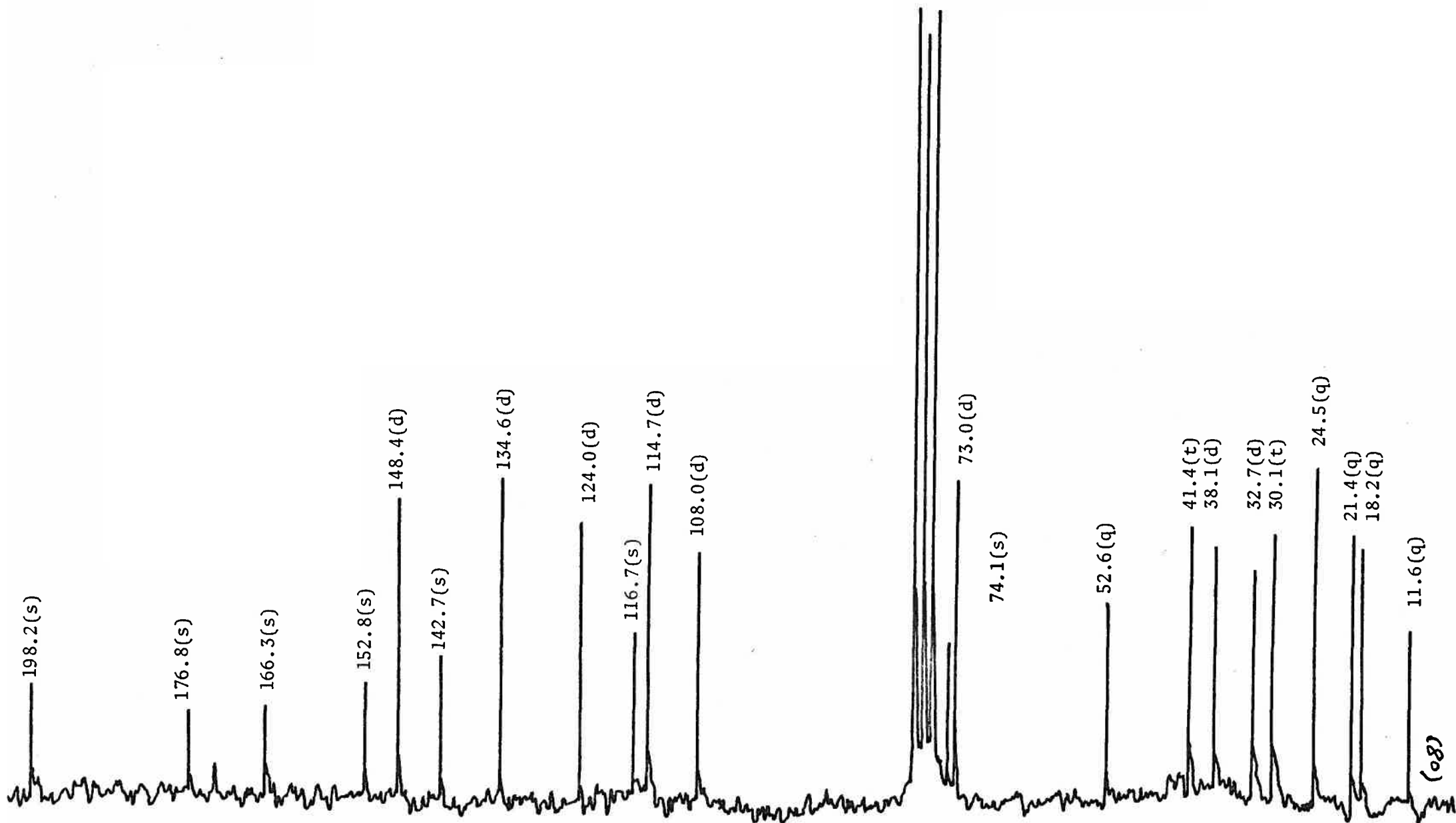


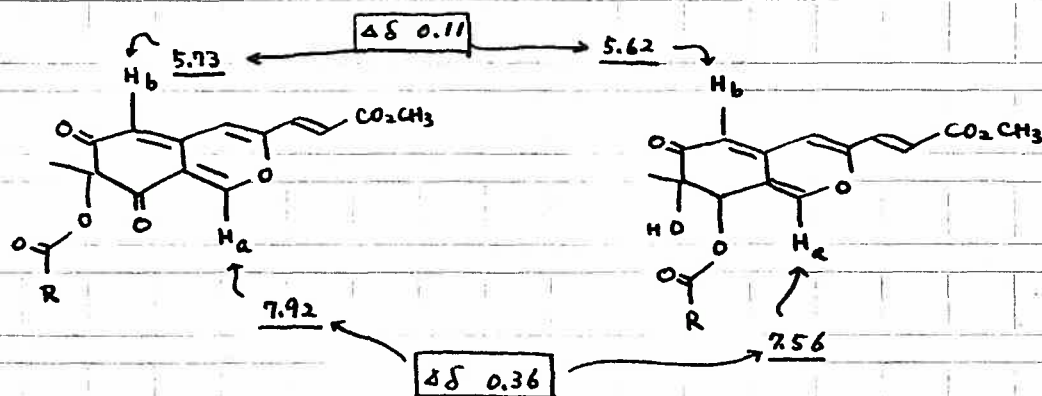
Fig. 3-4 Proton Noise Decoupled C^{13} -NMR spectrum of lunatoic acid B methyl ester.



ルの付け根のメチンプロトンのケミカルシフトが δ 5.62 とかなり低磁場にあることから、何等かの変化を更に受けてゐると思われた。

そこで、LA-BMe を Ac_2O , pyridine でアセチル化を試みた所、現物の回収に終わりをアセチル化されなかつた。また、クロム酸・ピリジン錯体で酸化を行つてみたが酸化を受けなかつた。更に DMSO 中での pmr スペクトル (Fig 3-5) で重水置換される水酸基のプロトンは singlet として現われており、これらのことから生成した遊離アールコ-ルは3級であることを示してゐる。

この場合どちらのカルボニル基が還元を受けたかについては、LA-AMe および LA-BMe の pmr スペクトルの比較から C-8 位のカルボニル基であると結論された。すなわち、B 環の H_a プロ



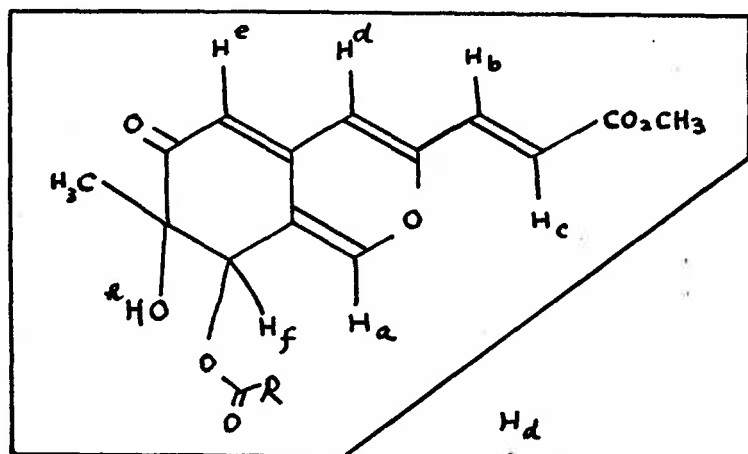
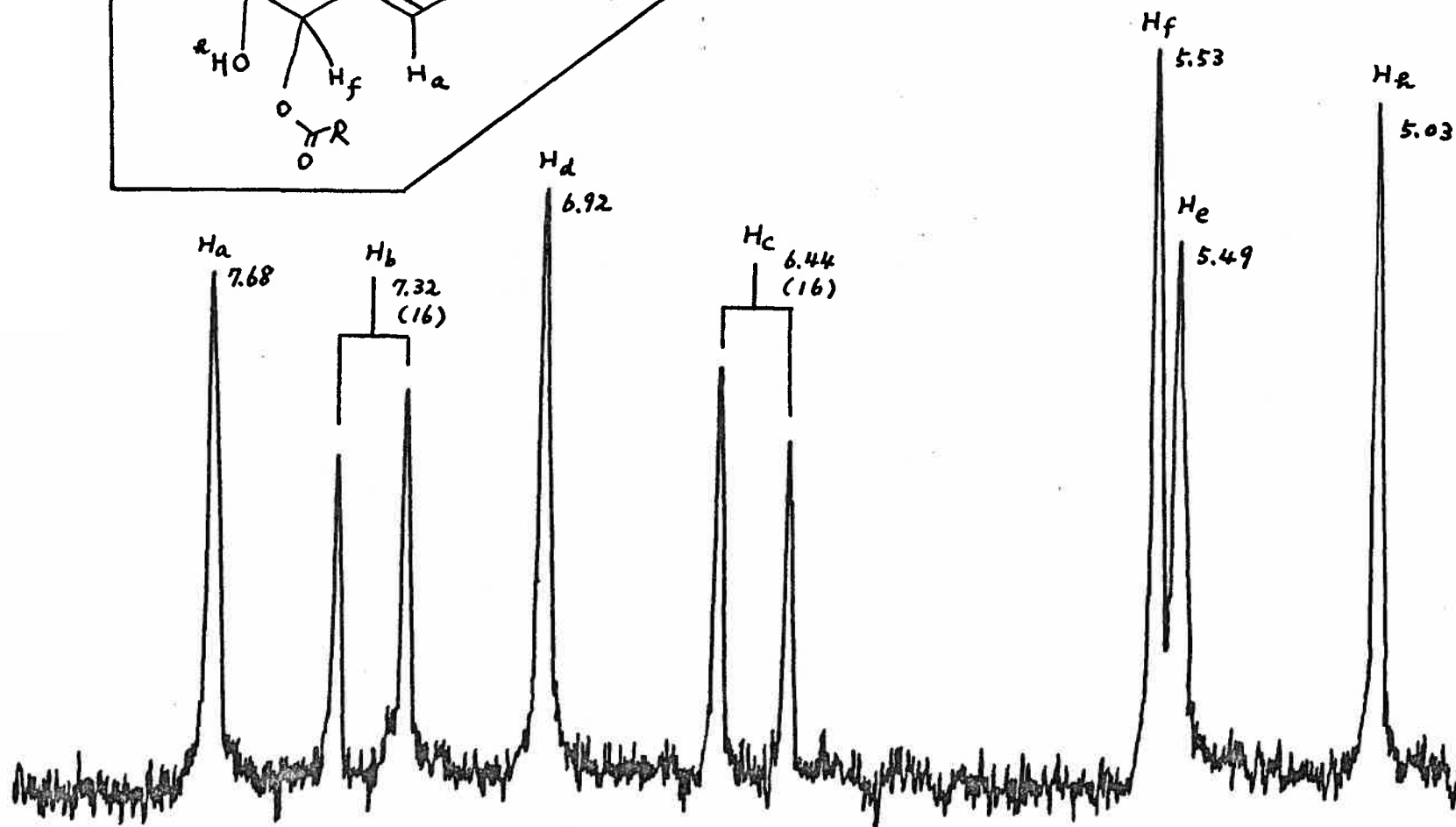


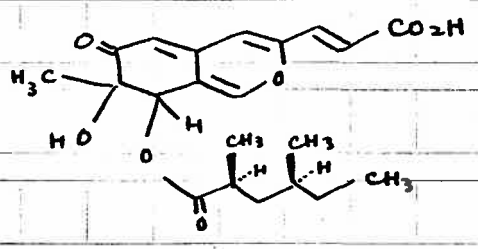
Fig. 3-5 PMR spectrum of lunatoic acid B methyl ester.
(d_6 -DMSO)



ロトンの両化合物間におけるケミカルシフト
 の差は, $\Delta\delta$ 0.36 ppm であるのに対し, A 環の H_b
 プロトンの差は 0.11 ppm である。このことは,
 LA-BMe にあつては H_a プロトンに対して peri-位に
 あつたカルボニル基が還元されたためにその
 磁気異方性を受け度合が著しく緩和された
 ためと考えることができよう。

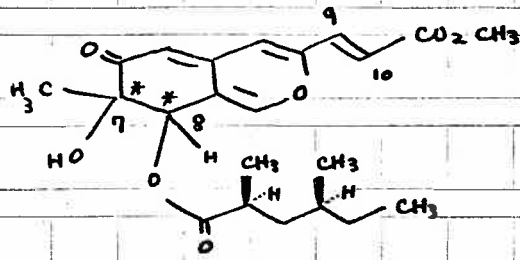
残る acyl 部分は pmr スペクトルおよび ms
 スペクトルから LA-AMe のそれと同様と考えら
 れた。LA-BMe をナトリウムメトキシドで分解
 後, GC にかけ合成した標品と比較した所,
 methyl 2,4-dimethylhexanoate と完全に一致し, GC-MS
 でも完全に一致した。また, methyl 2,4-dimethylhexanoate
 の $t_R = 8 \text{ min.}$ に溶出されるピークと一致するこ
 とが Co-GC で確認されたので, 天然物は (2S,4S)
 あるいは (2R,4R) のどちらかであることを示し
 ている。同一菌の生産する同一化合物が lunato-
 ic acid A および B の間で, 2つの不斉炭素共全
 く逆であるとは到底考えにくいのので, lunatoic
 acid A と同様の (2S,4S) の立体配置を有する

であらうと結論した。



第 4 節 Lunatic acid B の絶対構造

LA-BMe は分枝脂肪酸部のほかに chromophore 部分にさらに 2 つの不斉炭素を有している。ま



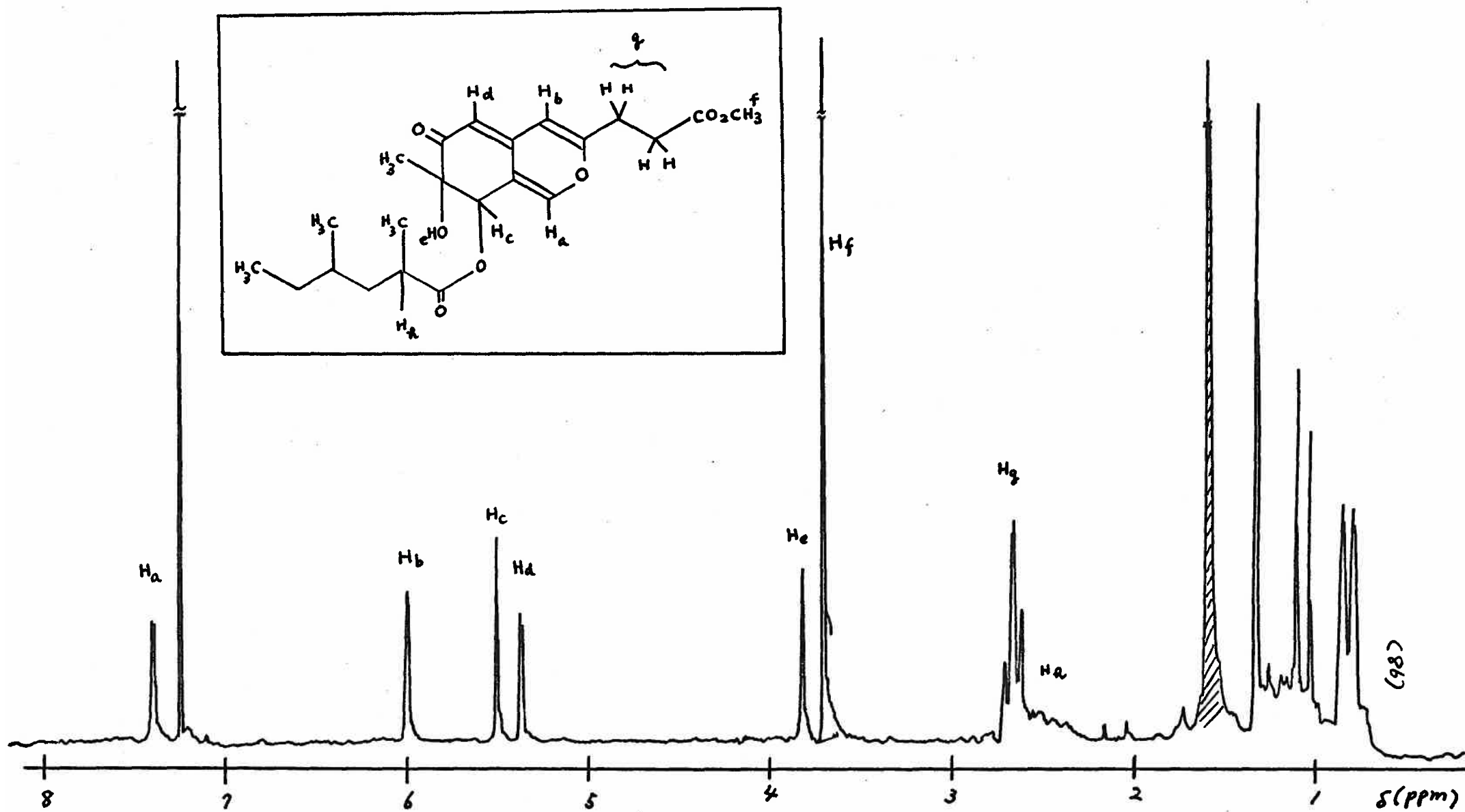
た本化合物は lunatic acid A とは逆の旋光性を示したことから、その絶対構造を解明することは興味あることと思われた。

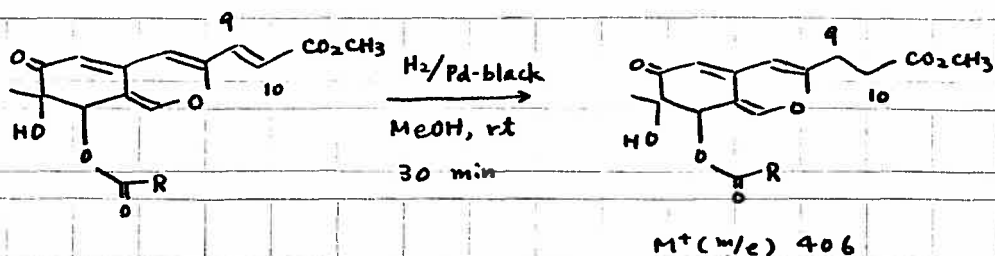
絶対構造の決定には lunatic acid A の場合と同様に CD 法を応用した。LA-BMe をメタノール中、パラジウム黒を触媒として、9,10-位の二重結合を選択的に還元してジヒドロ体を得た。9,10-位のジヒドロ体は、pmr スペクトル (Fig. 3-6) で、trans 二重結合の吸収が消失していること、および ¹³C NMR スペクトルで δ 40.6 に分子イオンピークを示すことで確認された。

まず 2 つの不斉中心のうち C-7 位の絶対構造を決定するためにモデル化合物として、

Fig. 3-6 PMR spectrum of Dihydrolunatoic acid B methyl ester.

(CDCl₃)





CD 曲線と絶対構造の関係がわか、て 113 D:hydro-
(25)
deoxy-8-epi-austriol を選んだ。LA-BMe およびそのエニ
トド体の CD 曲線を Fig.3-7 に示した。また Table 3-2
に測定値を示した。

Table 3-2 から明らかなるように エニトド体の CD
はモデル化合物と符号を含めてよく合致して
あり、C-7 位の絶対配置はモデル化合物と同
様の R 配置であることを示して 113。このこ
とは、Whalley らによる旋光性の相関と合致して
113 点興味深。次に、残る不斉炭素は C-8

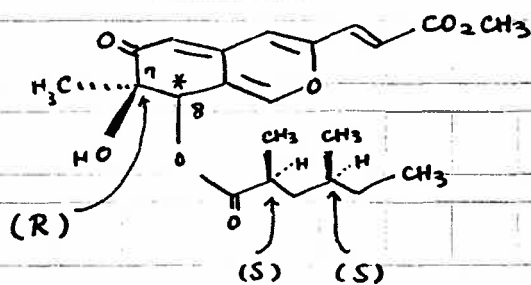
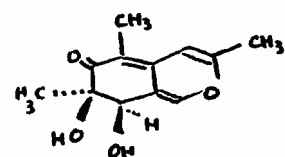
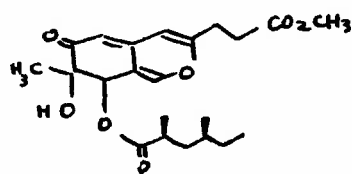
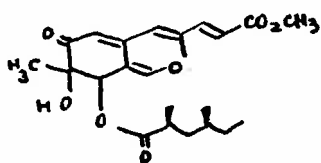


Table 3-2



Dihydrodeoxy-8-epi-austriol

nm	$\Delta\epsilon$	nm	$\Delta\epsilon$	nm	$\Delta\epsilon$
382	+5.70	352	+11.8	360	+7.8
310	-6.15	310	-6.36	313	-6.5
292	-4.79	265	+0.50	255	-0.2
281	-5.70	235	-3.43	235	-1.6
250	+1.94				

Fig. 3-7_a CD spectrum of Dihydrolunatoic acid B methyl ester.

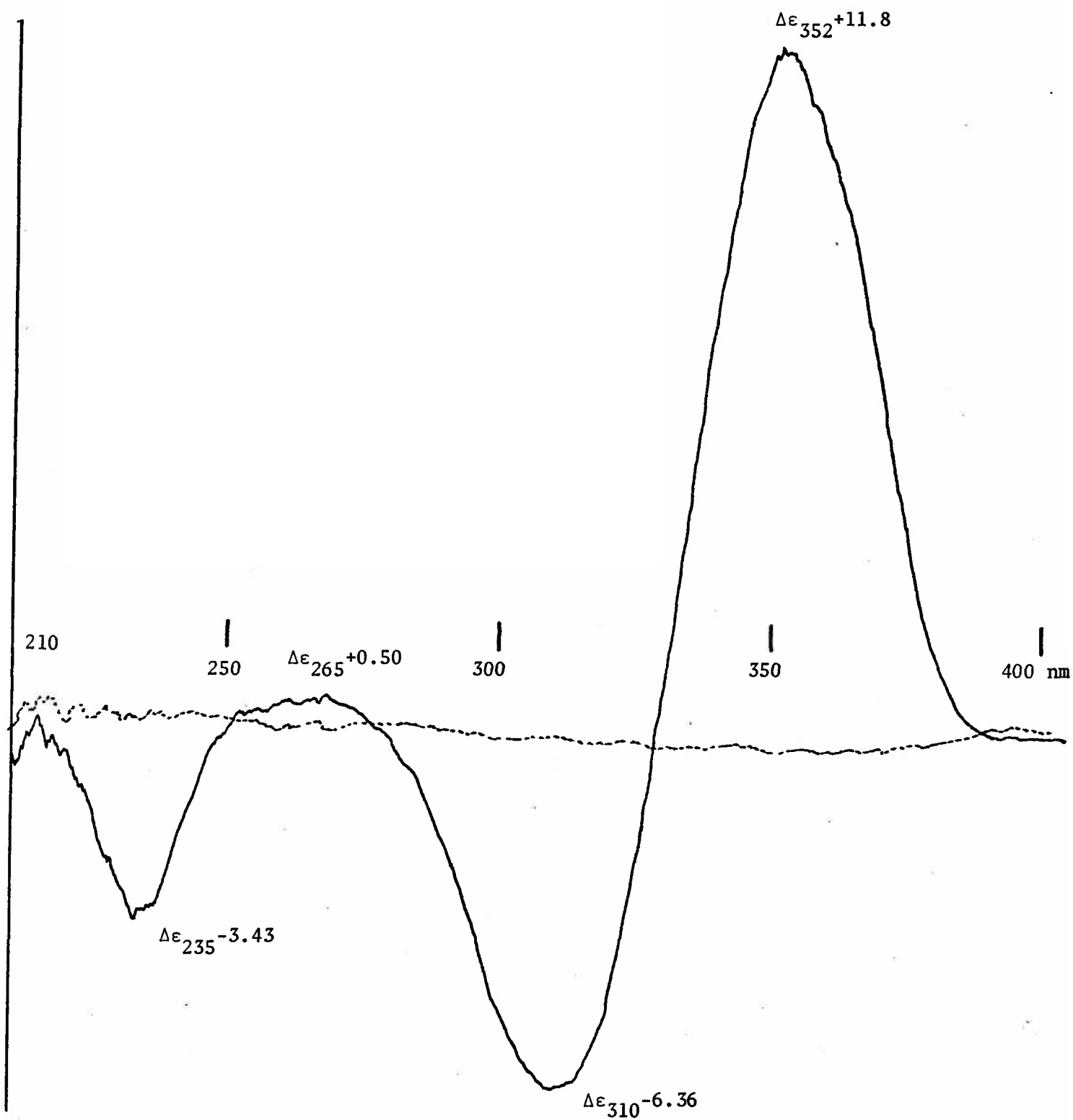
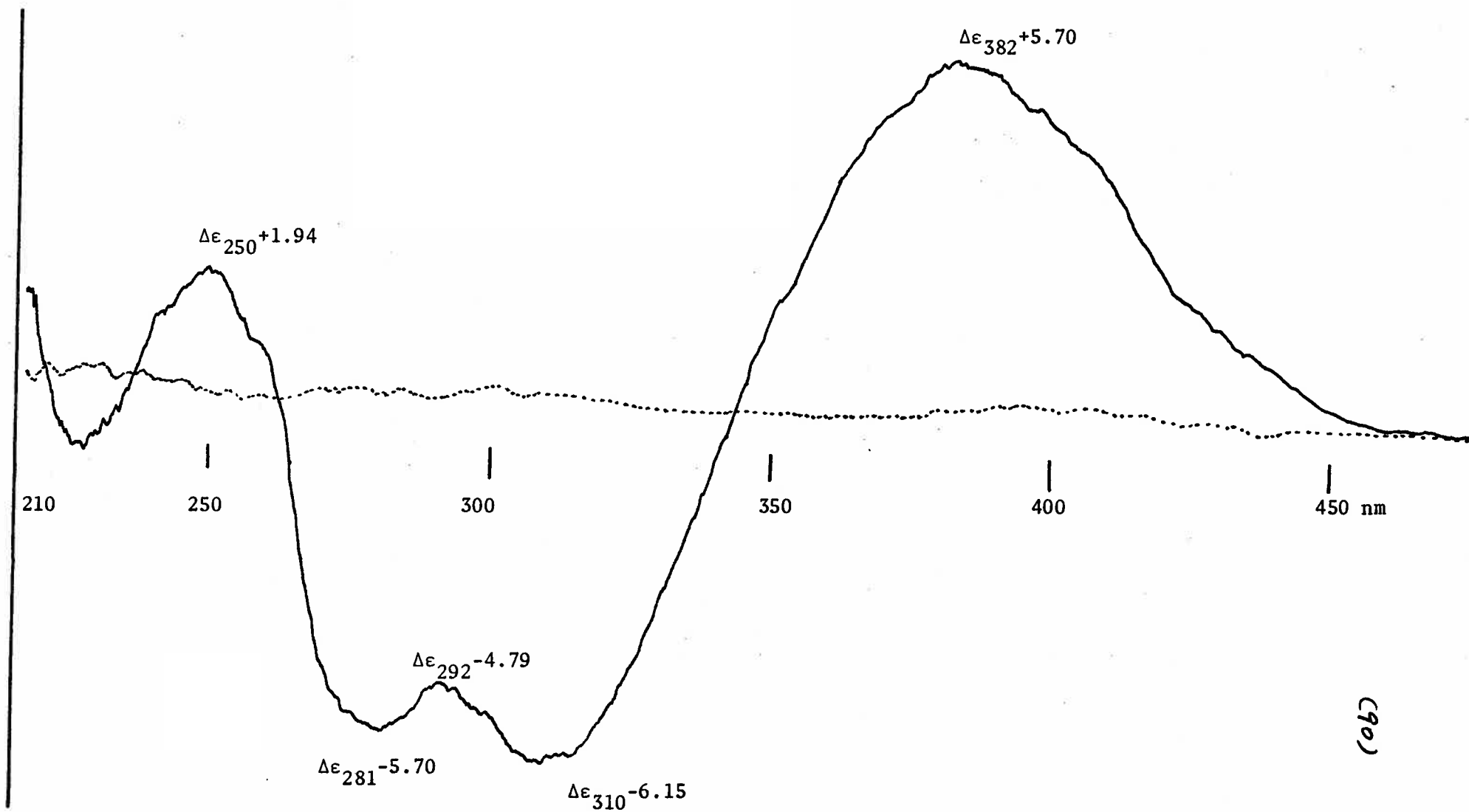
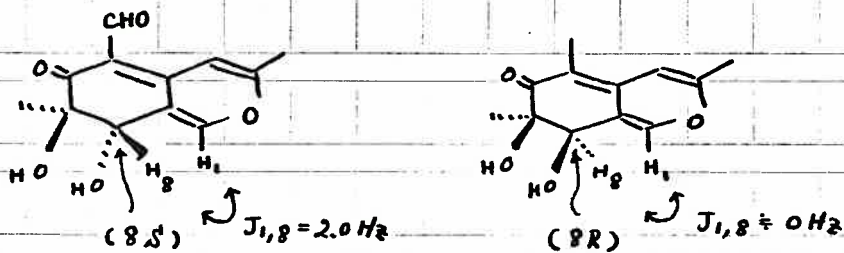


Fig. 3-7₆ CD spectrum of lunatoic acid B methyl ester.



(90)

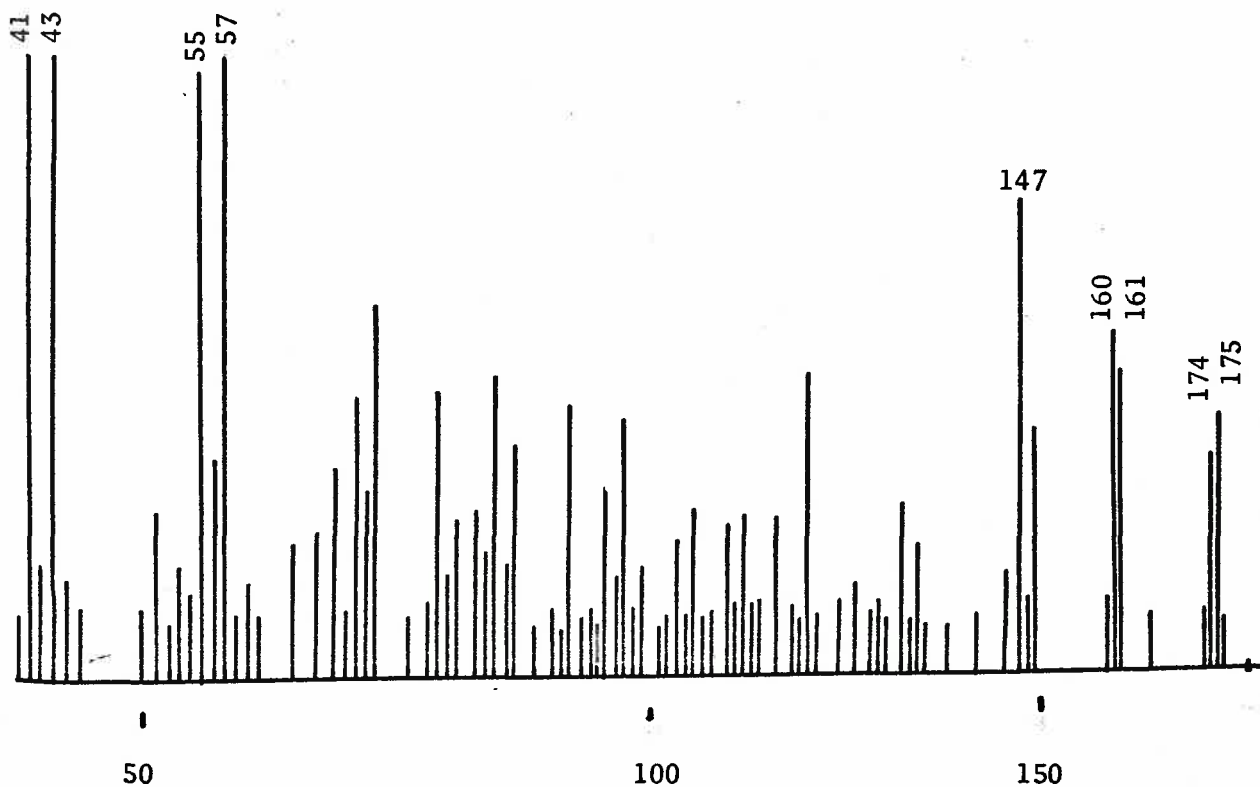
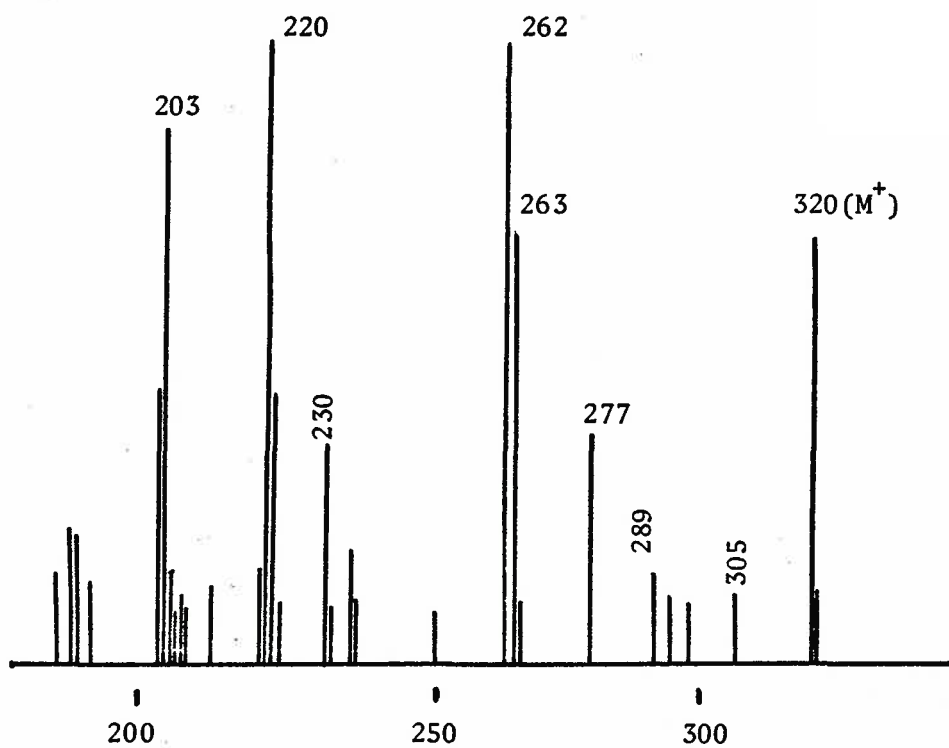
位であつて、この絶対配置に関する最初の手掛りは、pmrスペクトルより得られる。Steynらによると、既に絶対配置の明らかになつてゐる図示した二種の化合物のうち、(8*S*)の場合に



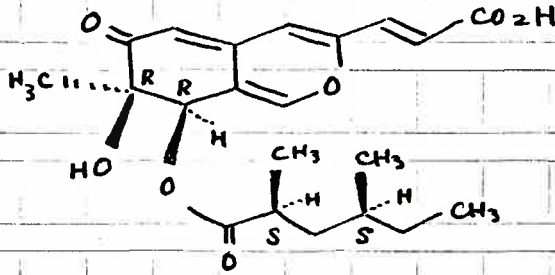
は H_1, H_8 間のアリルカップリングがあつて $J_{1,8} = 2.0 \text{ Hz}$ の doublet として現われるが、(8*R*)の場合にはアリル位との角度が 0° となつて $J_{1,8} \approx 0 \text{ Hz}$ で singlet として現われることがわかつてゐる。LA-BM₂ では、 $J_{1,8} = 0 \text{ Hz}$ の sharp な singlet として現われており (Fig. 3-5), このことは8位が*R*配置を有することを示唆してゐる。そこで既に絶対配置の明らかになつたC-7位との相対的關係を確立するため、ジヒドロ体を温和にアルカリ加水分解してジオール体とし、ついで2,2-ジメチルプロパノール、p-トルエンスルホン酸で処理

Fig. 3-8 Mass spectrum of the acetonide.

(93)



従って lunatoic acid B の絶対構造は下式のように現わされる。



Lunatoic acid B は lunatoic acid A とは全く逆の旋光性を示すことからその絶対構造の相関について興味を持たれたが、C-7 位についてこれまで別々の種に属するカビから (+) シリ－ズのもの、あるいは (-) シリ－ズのものが得られていたのに、今回同一のカビの培養口液から両者が同時に得られたのは最初の例である。この事実はこれらの代謝産物の生合成機構を考察する上で興味深い問題を提起しているといえよう。

第 5 節 Lunatoic acid B の生物活性

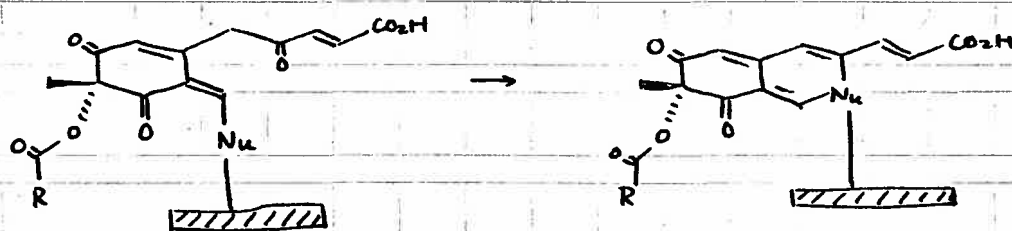
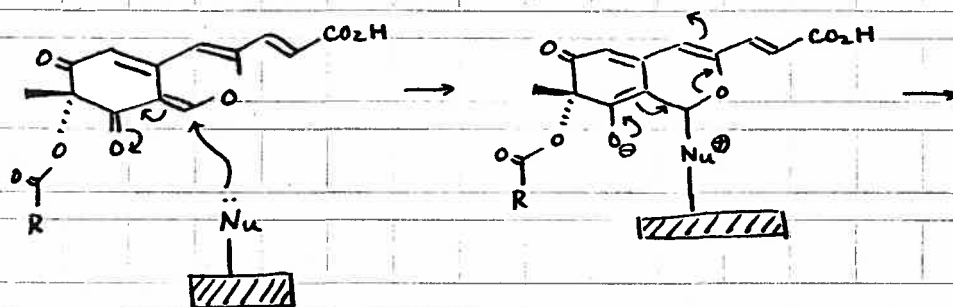
LA-BMe を 5997 菌 および *aversion* を受けた菌の代表として 6299 菌 を選り、液体希釈法で両菌に對する抗菌活性をテストした。結果を Table 3-3 に示した。

Table. 3-3

IFO No.	Concentration(γ /ml), Malt-dextrose medium, 2 days.						
	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5
5997	-	+	+	+	+	+	+
6299	-	+	+	+	+	+	+

LA-BMe は 5997 菌 および 6299 菌 の生育を阻害するのには 11 μ g/ml も 100% 必要であった。Lunatoic acid A と比較して活性は著しく減少してゐる。このことと関連した興味ある事実は、lunatoic acid A がアミノ酸の高反応性を有したのに反して、lunatoic acid B にはその反応性がほとんどなかったことである。Lunatoic acid A の高反応性を考慮すると、もしかしたら lunatoic acid A が生体のある種の求核性基を有する成分と不可逆的

に反応してその成分含量を減少せしめること
によ、生育阻害効果を現わしてゐるかも知
れな。今後更に検討を加えた興味ある点
の1つである。



第 5 節 Lunatoic acid A および B とその他の関連化合物についての比較考察

Cochliobolus lunata IFO. 5997 菌の aversion factor の構造が確立されたので、本節ではその構造的特徴と生物活性について、既知の関連代謝産物と比較考察する。

Lunatoic acid A は α - ϵ - α と非常に高い反応性を示す azaphilone 類に属することを既述した。

既知の azaphilone 類および関連代謝産物を一括して Table 3-4 に示した。⁽²⁷⁾ Table 3-4 で明らかにな如く azaphilone 類は多種類のカビで生産される。

Mitorubrinic acid は、lunatoic acid A と全く共通の母核を有し、 α ニル部分を異にするものである。この α ニル部分の相異は他の azaphilone 類でも見られ、rotiorin, rubropunctatin, monacorubrin は α ニル部分が β - γ ト酸でその炭素鎖長を異にしており、その活性 \times 4 \times 2 \times が母核のカルボニル炭素と縮合してなる。この構造的特徴はこれらの一群の azaphilone 類の生合成機構を考える上での1つのヒントを与えてなると思

構造	化合物名	生産菌	生物活性
	<p>R=CH₃ (-)-mitorubrin <u>P. rubrum</u> (+)-mitorubrin <u>H. fragiforme</u></p> <p>R=CH₂OH (-)-mitorubrinol <u>P. rubrum</u> (+)-mitorubrinol <u>H. fragiforme</u></p> <p>R=CO₂H (-)-mitorubrinic acid <u>P. funiculosum</u> (+)-mitorubrinic acid <u>H. fragiforme</u></p>		
	<p>(+)-sclerotiorin <u>P. sclerotiorum</u> antibacterial <u>P. multicolor</u> (Gram +) (-)-sclerotiorin <u>P. hirayamae</u></p>		
	rotiorin	<u>P. sclerotiorum</u>	
	7-epi-5-Cl-isorotiorin	<u>P. hirayamae</u>	
	ochrephilone	<u>P. multicolor</u>	
	rubropunctatin	<u>M. rubropunctatus</u>	

	monascorubrin	<u>M. purpureus</u>	
	monascin	<u>M. purpureus</u> <u>M. rubropunctatus</u> <u>M. rubiginosus</u>	
	citrinin	<u>P. (various species)</u> <u>Crotaria crispata</u>	antibiotic (Gram +) narrowing of hyphal tip
	ascochitine	<u>A. fabae</u>	phytotoxin antifungal
	pulvilloric acid	<u>P. pulvillorum</u>	antibacterial (Gram +) antifungal
	austdiol	<u>Aspergillus ustus</u>	mycotoxin

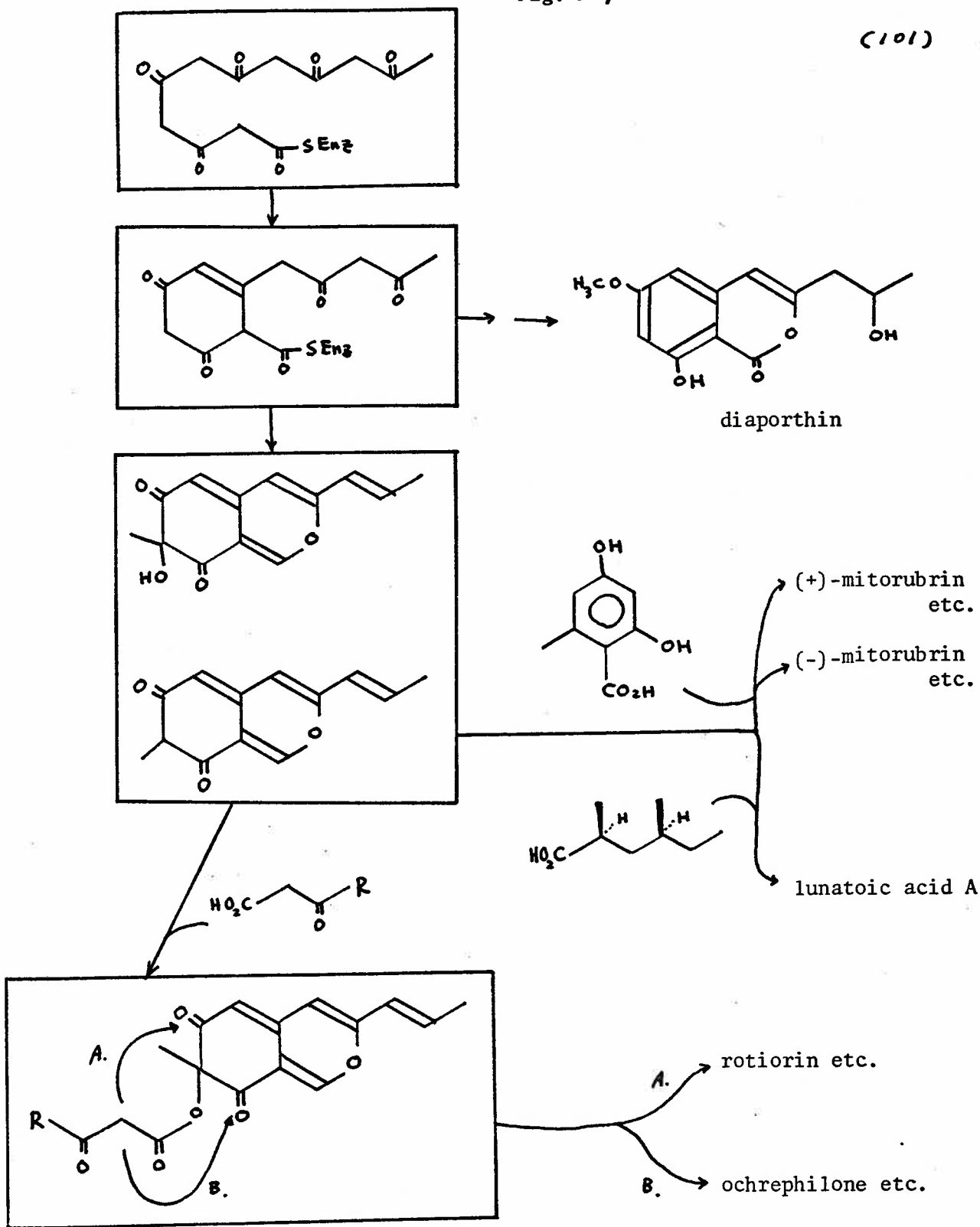
(P. = Penicillium, M. = Monascus, H. = Hypoxylon, A. = Ascochyta)

ゆれる。Fig. 3-9 に示したようなステロイドでの
 生合成ルートが考えられようが、仮想中間体
 と目されるヘキサケチドの縮合物は、まだ単
 離されてない。しかし構造的に極めて近い
 代謝産物であると思われ、diaporthin は既に単
 離されて⁽²⁸⁾いる。

また、この azaphilone 類に、このもう一つ
 の興味深い事実は、本研究で構造の確立され
 た二種の代謝産物 lunatic acid A および B に
 見られる C-7 位の絶対配置に関するものであ
 る。(+) または (-) へ至る不斉認識が C-7 位にあ
 ることは、同一化合物中にもう一つの不斉炭
 素を有する sclerotinin で側鎖の 2 級メチル基の
 絶対配置が同じ S 配位にあること、および
 lunatic acid A と B の分枝脂肪酸が同一であ
 ることから推定される。このことは、仮想中
 間体と目されるヘキサケチドの縮合物が介在
 する可能性を支持するように思われる。つま
 り、一旦形成された中間体に次のステロイド
 の水酸化反応があることはアシロキニ化反応にあ

Fig. 3-9

(101)



がかる酵素の立体特異性が各々のカビで異なる
 と考えられるからである。しかし、本研究
 で明らかになつたもう一つの点は、同一のカ
 ビのなかでもそれらが同時に起こつたとい
 うことであろう。このことは何か未知の特別の
 しくみがあることを予想させるが、今後に残
 された興味ある点と言えよう。

Lunatoic acid A の示した生物活性については、
 azaphilone 類のなかにも citrinin のように菌系の
 先端を狭くするものや、抗菌作用を有するも
 のは少なくないが、その作用機構の解明され
 てゐるものは未だ見当らな^い。もし lunatoic
 acid A が aversion zone に観察された菌系の形態
 的变化をもたらすものであれば、一つの可能
 性を示してゐると思われる。カビの菌系の形
 態異常に關して興味ある報告は、D-3-ニ1酸
 添加の Czapek 培地で Helminthosporium oryzae 菌に厚
 膜胞子状細胞 (CLC: chlamyospore-like cell) が形成
 されたこと⁽²⁹⁾や、polyoxin が Alternaria kikuchiana 菌の
 菌系に球状構造体を作らせたこと⁽³⁰⁾があげられ

る。 Polyoxin の作用点は細胞壁合成の前駆体である Uridine diphospho-N-acetyl-D-glucosamine との構造的類似性から、その代謝拮抗体として作用すると考えられており、また D-アミノ酸は細胞壁の構成成分の一つであることを考えると、lunatoic acid A が細胞壁合成に何等かの作用を及ぼしている可能性が考えられ、今後に残された別の興味ある点と思われる。

第4章 Cochliobolus lunata の他の IFO 菌株の 生産する代謝産物

既に緒論で述べたように Cochliobolus setariae IFO. 6387 および 6635 菌間の aversion の場合には、6387 菌がセスタテルペンである ophiotoxin A を生産し、6635 菌は dimeric bisacetal of prehelminthosporol and prehelminthosporol を生産し、これらの代謝産物が各々選択的に相手菌の生育を阻害することにより起こった。これらは生合成的に見ると Fig. 4-1 に示すように両 aversion factor とともに同じメバロン酸系列に由来するテルペンノイドであるが、6635 菌は C₁₅ のフアルネリールが環化するのに対し、6387 菌では C₂₅ のゲラニルフアルネリールが環化して生合成されると考えられ、このことは、同種に属するカビでも、異なった strain 間では、かなり生理的な分化が進んでいることを示していると考えられた。

よって、Cochliobolus lunata の aversion factor の構造が確立された時点での次の興味は、本菌の

異系統が果してどんな第2次代謝産物の生合成系を有するのか、特に異系統間の代謝産物の相異が同じポリメチド生合成系内に存在するのか、それと全く別の合成系路があるのか否かを明らかにすることにし、そのためにIFO 所屬の他の *strain* の生産する代謝産物の構造を明らかにすることにした。

第1節 *Cochliobolus lunata* の他のIFO菌株の 生産する代謝産物の予備的検索

他の菌株の培養に当っては、5997菌が *aver-sion factor* を生産したのと同様の条件下で行うこととした。一般に、微生物の代謝産物は培地のpHを変化させると生産物の生産量が変化したり、また栄養源として動物エキスをを用いるのと植物エキスをを用いるのでは全く異なる抗生物質を生産する例が知られて⁽³¹⁾いる。また同一の微生物を同一の培地で培養し、ただ温度のみを変化させると物質生産の速度ばかりでなく、摂氏20度と30度では生産される抗生物質が全く異なる例が知られて⁽³¹⁾いる。これら培養条件の微妙な変化によつて生合成される代謝産物が異なること自体興味深い問題があるが、本研究での問題は異系統間での代謝産物の相異ということであるので全く同一の条件下に培養した。

まず予備的に全ての *strains* をモルト培地

120 ml の入った 500 ml の坂口フラスコで一定期間
 (3 日 ~ 1 週間) 培養後、各々を培養口液と
 菌体とに分けそれぞれを酢酸エチルおよびア
 セトンで抽出し、薄層クロマトグラフィーで
 調べた。結果を Fig. 4-2 に示した。薄層クロマ
 トグラフィーの結果からは、各 strain が相互に
 類似した生産物を作っており、作っておりな
 かったりして、かなり多種類のものが存在し
 ているようにみえる。ただ特徴的、かつ興味
 深いことは、5997 菌とは aversion を示さなか
 った 6586 菌が lunatoic acid と同一の色調の黄色代謝
 産物を少量ながら生産していることであつた
 。そこで更に薄層クロマトグラフィーで確認
 した所、Fig. 4-3 に示す如く lunatoic acid A と同一の
 挙動を示した。ついで相当する黄色スポット
 を分取薄層クロマトグラフィーを行ひ、更に
 2 種類の溶媒系で薄層クロマトグラフィーを
 行つた所、Fig. 4-4 に示すような結果を与えた。
 即ち 6586 菌は lunatoic acid A を生産しており、こ
 のことは本物質の MS スペクトルが lunatoic

Fig. 4-2_a TLC of the extracts of Cochliobolus lunata

50% EtOAc in benzene

Kieselgel 60pF₂₅₄

detected by UV, I₂, and 0.5% vanillin-H₂SO₄

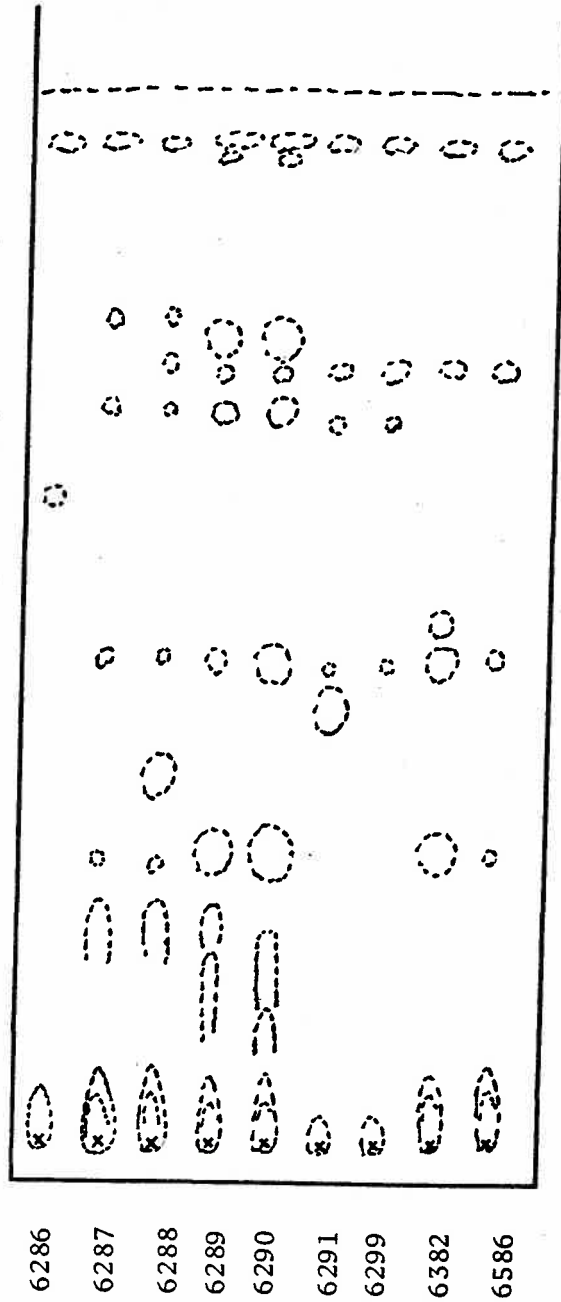


Fig. 4-2c TLC of the extracts of Cochliobolus lunata

50% acetone in benzene

Kieselgel 60pF₂₅₄

detected by UV, I₂, and 0.5% vanillin-H₂SO₄

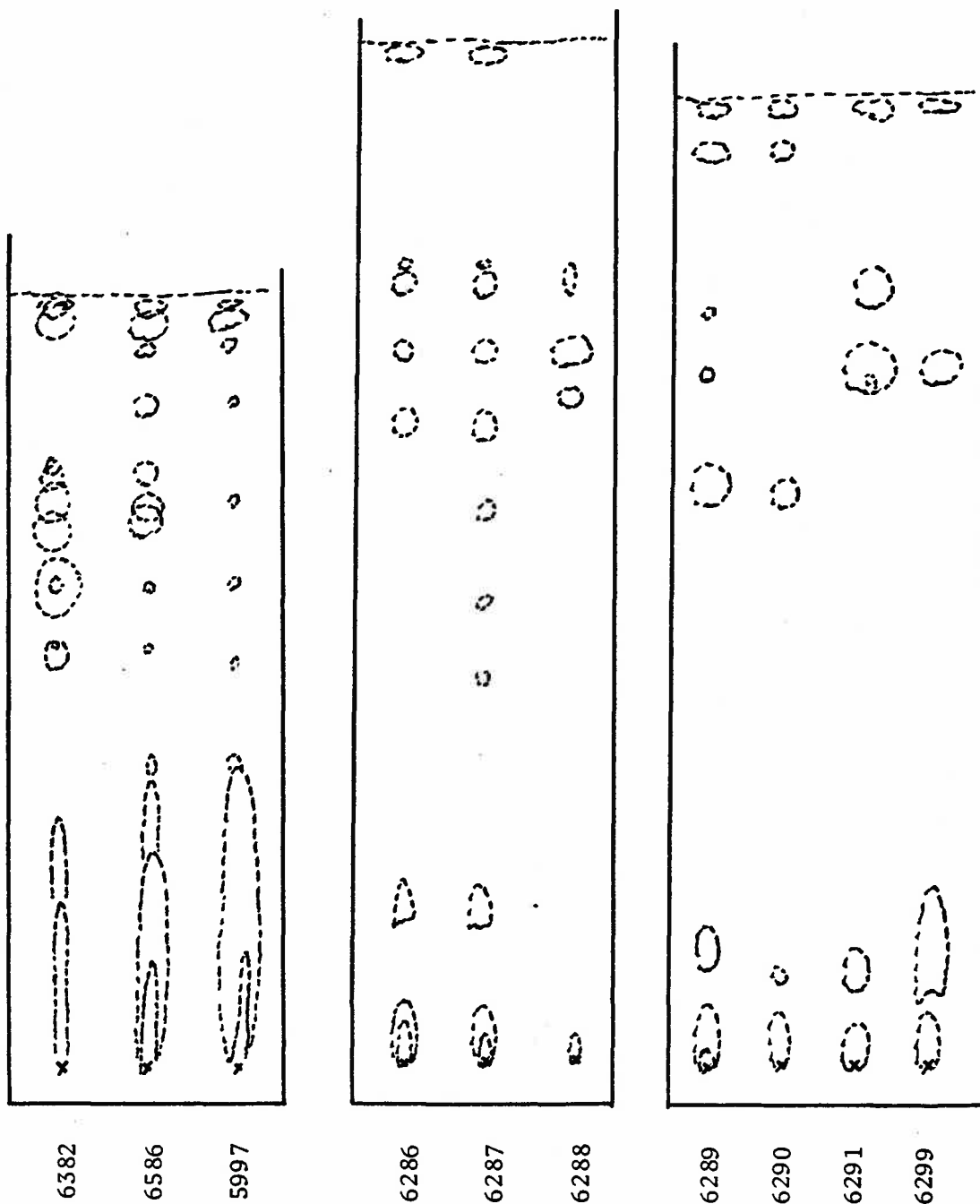


Fig.4-2_d TLC of the extracts of Cochliobolus lunata

Kieselgel 60pF₂₅₄

detected by UV, I₂, and 0.5% vanillin-H₂SO₄

CHCl₃

30% EtOAc in hexane

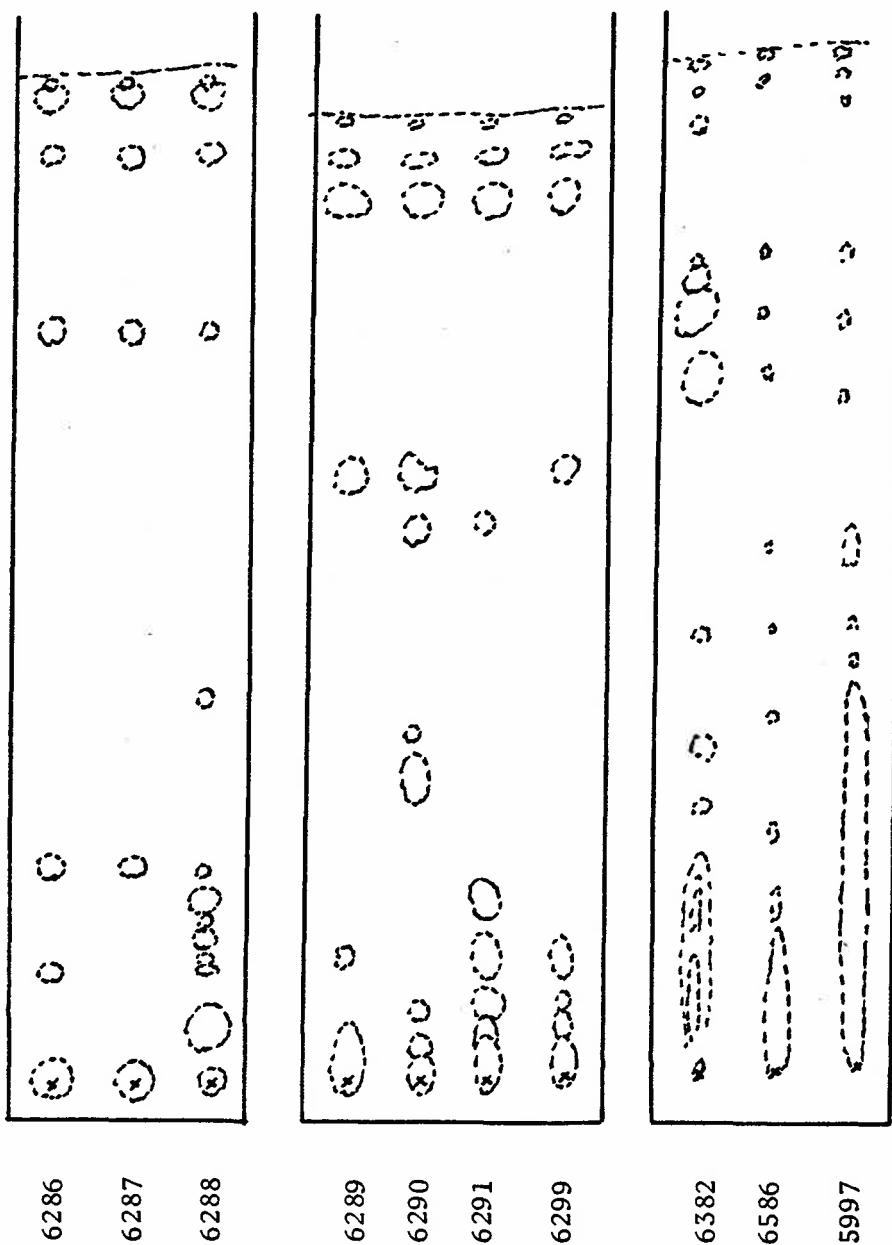
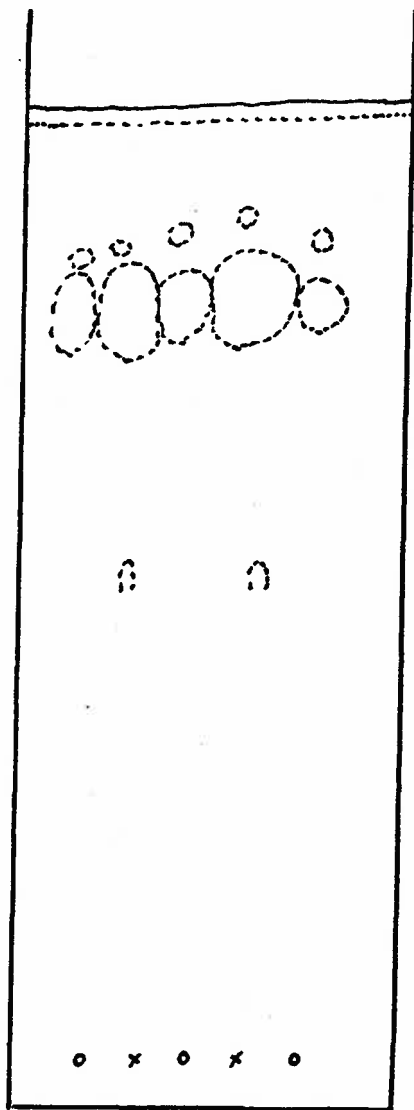


Fig.4-3 TLC of the extracts of Cochliobolus lunata
IFO. 5997 and IFO. 6586

$C_6H_6 : Et_2O : HCOOH = 25 : 75 : 2$

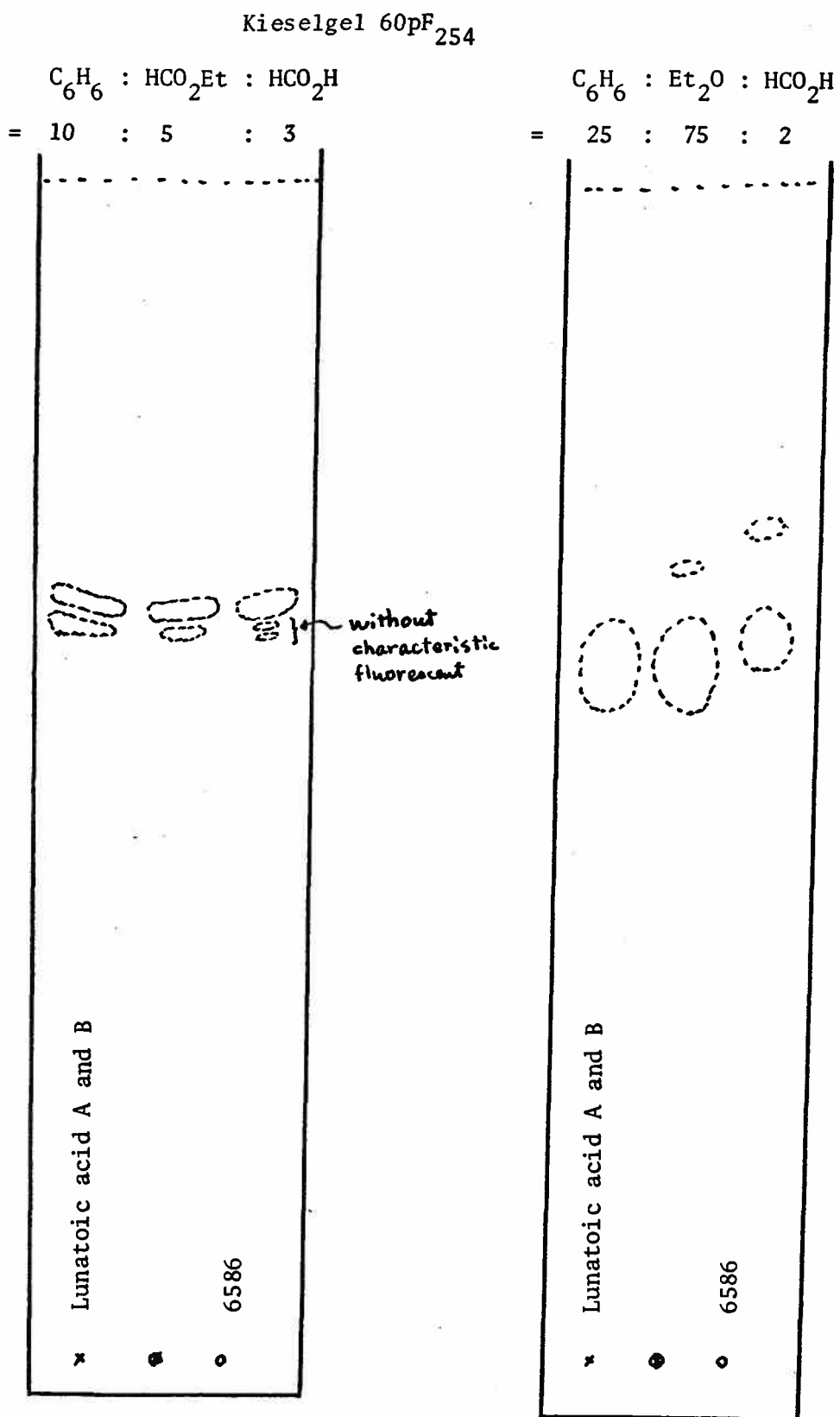
Kieselgel 60pF₂₅₄



6586
5997
6586
5997
6586

Fig.4-4 TLC of lunatoic acid A, B and the purified extracts
of Cochliobolus lunata IFO 6586

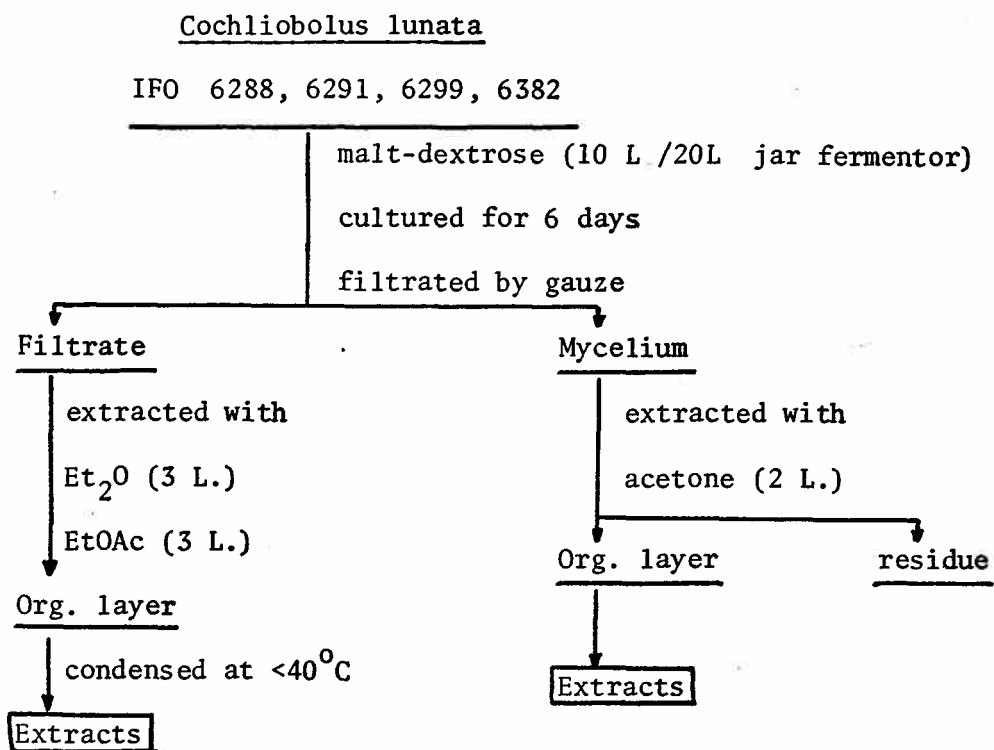
(116)



acid A と一致することから確認された。このことは、6586 菌が 5997 菌同様に *aversion factor* である *lumatoic acid A* を生産する能力を有するが、その生産量が 5997 菌に比して著しく少量のため、他の菌に対して 5997 菌の示したような *aversion* を示し得なから、たとえ考えられる。また、6586 菌が *lumatoic acid A* に抵抗性であり、たのは、生産能を有するために耐性となり、ていると考えられる。一般に、抗生物質生産菌は菌株特異的で、その抗生物質を生産することのできる菌株は、その抗生物質に耐性であることが知られてい⁽³²⁾る。6586 菌が少量ながら *lumatoic acid A* を生産してい⁽³²⁾ることは興味深いことと思われる。

次いで、他の *strain* の代謝産物を明らかにするため、この予備的検討の存かから、IFO 6288 菌、6291 菌、6299 菌、6382 菌の 4 菌株を選んで、各々を jar fermentor (10 l.) で同一の培地 (モルト培地) を用いて培養した。次いで、各々の培養液の抽出物を、各々 Fig. 4-5 に示す

Fig. 4-5



IFO No.	Weight(g)
6288	3.74
6291	0.45
6299	0.58
6382	0.44

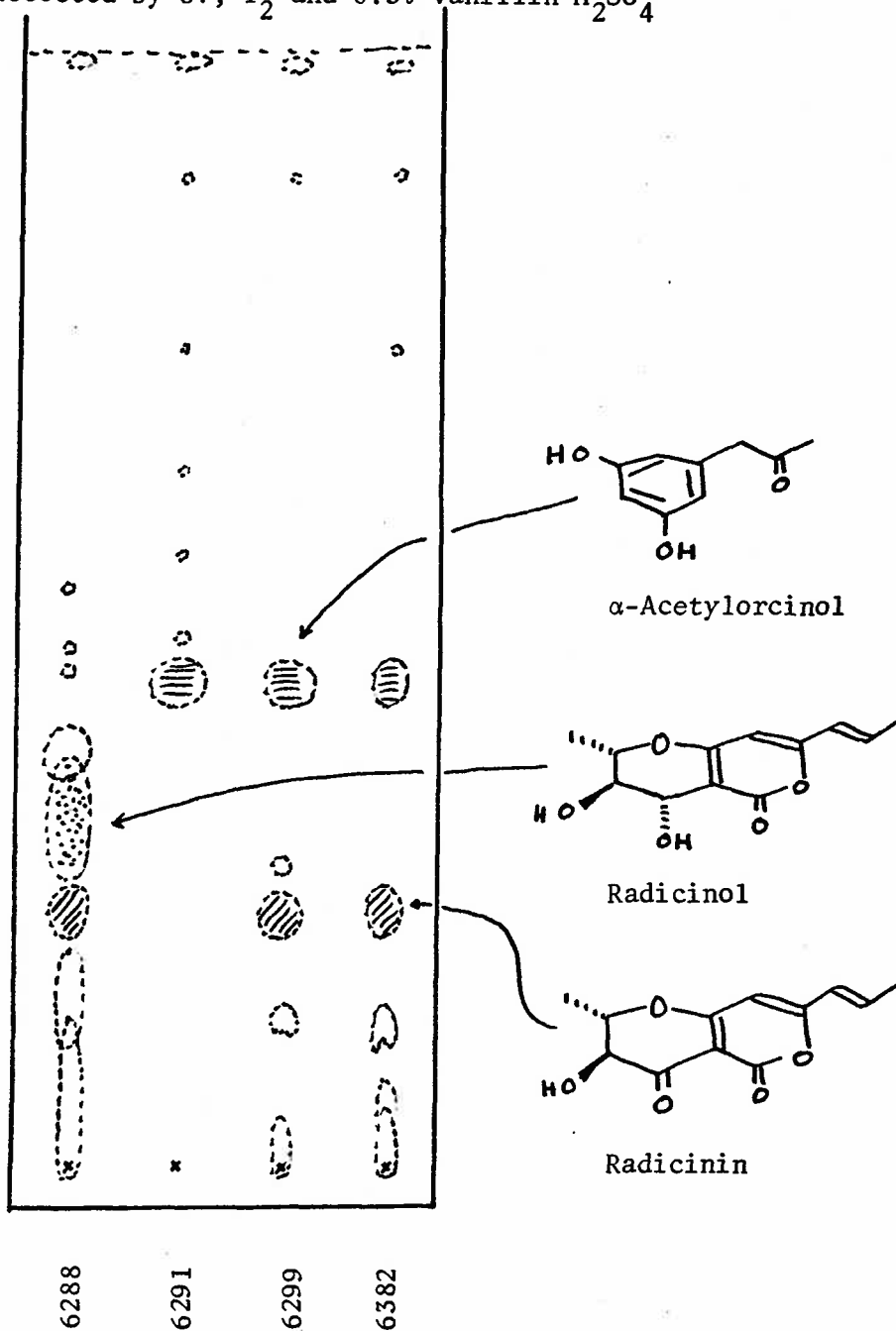
如くに分離した。各抽出物の薄層クロマトグラフィーを Fig. 4-6 に示し、最終的に構造の確立されたものを示した。次にこれらの代謝産物の分離と構造について述べる。

Fig.4-6 TLC of the extracts of Cochliobolus lunata

IFO 6288, 6291, 6299 and 6382

30% EtOAc in hexane; Kieselgel 60pF₂₅₄

detected by UV, I₂ and 0.5% vanillin-H₂SO₄



第 2 節 新代謝産物 *d*-acetylorsinol

本化合物は, I.F.O. 6291, 6299, 6382 菌によつて生産されることか, 薄層クロマトグラフィを用いた予備的検索から明らかにされたが, 本化合物の単離は 6291 菌の抽出物から Fig. 4-7 に示した操作で行った。

本化合物は, Table 4-1 に記載した物性値を示した。

Table. 4-1

colorless oil	
$C_9H_{10}O_3$	$M^+(m/e): 166.0630$ (calcd. 166.0630)
UV	λ_{max}^{EtOH} nm(ϵ): 280(2300), 285(2300).
IR	$\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 3560, 3300, 1700, 1600.

本化合物の構造は, pmr スパクトル, および MS スパクトルのフラグメンテーションから置換ベンゼン誘導体であると思われた。UV スパクトルは, 本化合物がジフェニールの発色団を有することを示唆した。また, *d*₆-アセトン中の pmr スパクトルで, 重水置換され

Cochliobolus lunata IFO 6291Extracts (0.45 g)

silicic acid (20 g)

eluted with

1. hexane	100 ml
2. 10% EtOAc in hexane	200 ml
3. 20% EtOAc in hexane	100 ml
4. 30% EtOAc in hexane	100 ml
5. 40% EtOAc in hexane	100 ml
6. 50% EtOAc in hexane	300 ml
7. 70% EtOAc in hexane	100 ml
8. EtOAc	100 ml
9. MeOH	100 ml

Fr. No.	Weight(mg)
1-10	297
11-20	29
21-30	4
31-40	4
41-50	13
51-60	18
61-70	23
71-80	6
81-90	5
91-100	-
101-116	-

preparative tlc

(Kieselgel 60pF₂₅₄;

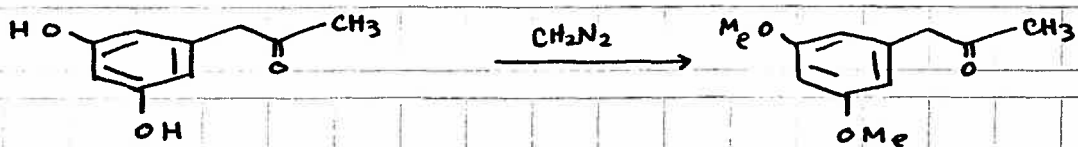
14cm×20cm×0.75mm)

developed twice with

50% EtOAc in hexane

Fr.	Weight(mg)
1.	6.80 α-acetylorscinol
2.	0.94
3.	2.75

3 H 分の吸収, および $\delta 5$ - ポリジーン中の
 pmr スペクトルで $\delta 6.85$ に 2 H 分の doublet, $J=$
 2Hz の吸収と $\delta 7.01$ に 1 H 分の triplet, $J=2\text{Hz}$ の
 吸収があることから, メタ位に置換された誘
 導体であることがわかった。また, $\delta 2.13$ の 3
 H 分の singlet の吸収, および MS スペクトル
 で $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}$ の脱離したフラグメントイオンが観
 察されることからメチルケトン基の存在が示
 唆され, 残るメチレンが $\delta 3.58$ に singlet とし
 て観察され, 二置換メチレンの Shoolery の加減
 定数から予想されるケミカルシフトとよく合
 致することから, 本化合物は α -アセチルオ
 ルニールと推定された。本化合物はエーテ
 ル性のジブタジメタンと反応してジメチル化物
 を与えた。



そこで標品と直接に比較する目的で、Fig. 4-8
 に示した文献記載のルートで標品を合成した
 (33)。合成したα-アセチルオルニールおよびその
 ジメチルエーテル体は、天然物のそれらと
 薄層クロマトグラフィ、MS スペクトル、
 pmr スペクトルが完全に一致した。

α-アセチルオルニールは、天然より得
 られたのは本研究が初めてであり、生合成的
 には、既に Penicillium brevi-compactum より得られて
 (34) いるα-アセチルオルセリニ酸から脱炭酸に
 より導かれると思われる。構造的に類似した
 オルニールは、既にオルセリニ酸から生合
 成されることが証明されている。(35)

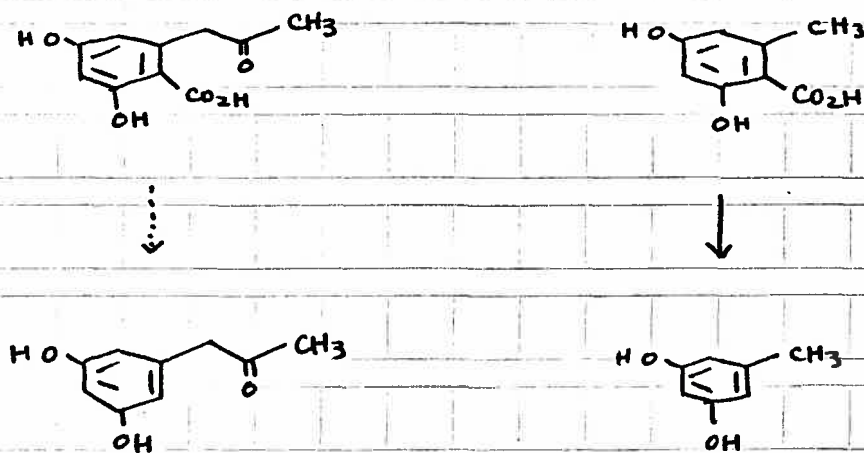
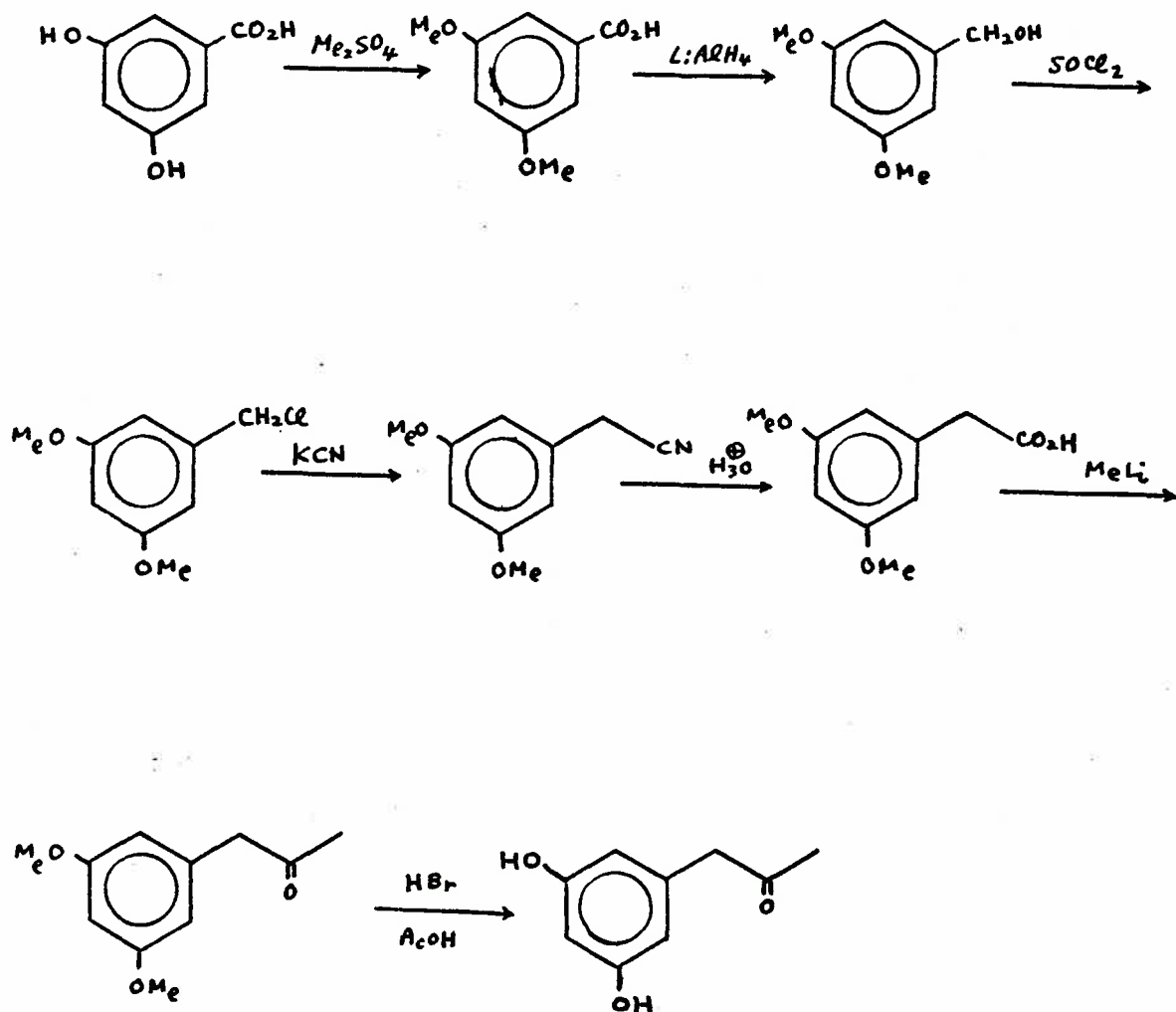


Fig. 4-8 Synthesis of α -acetylcorcinol

第 3 節 Radicinin

本化合物は, IR0 6288, 6299, 6382 菌によ, て生産されること加薄層クロマトグラフ, 一の予備的検索から明らかにな, したが, 分離精製は 6288 菌の抽出物から Fig. 4-9 に示した操作で行った。本化合物はメタノール, または, メタノールと酢酸エチルの混合溶媒から再結して微黄色の針状結晶として得られた。測定した物性値を Table 4-2 に示した。

Table. 4-2

pale yellow needles (from MeOH or MeOH-EtOAc)

mp 235-238°C

$[\alpha]_D^{24}$ $-190 \pm 4^\circ$ (c 0.24, CHCl_3)

$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$ M^+ (m/e): 236.0680 (calcd. 236.0684)

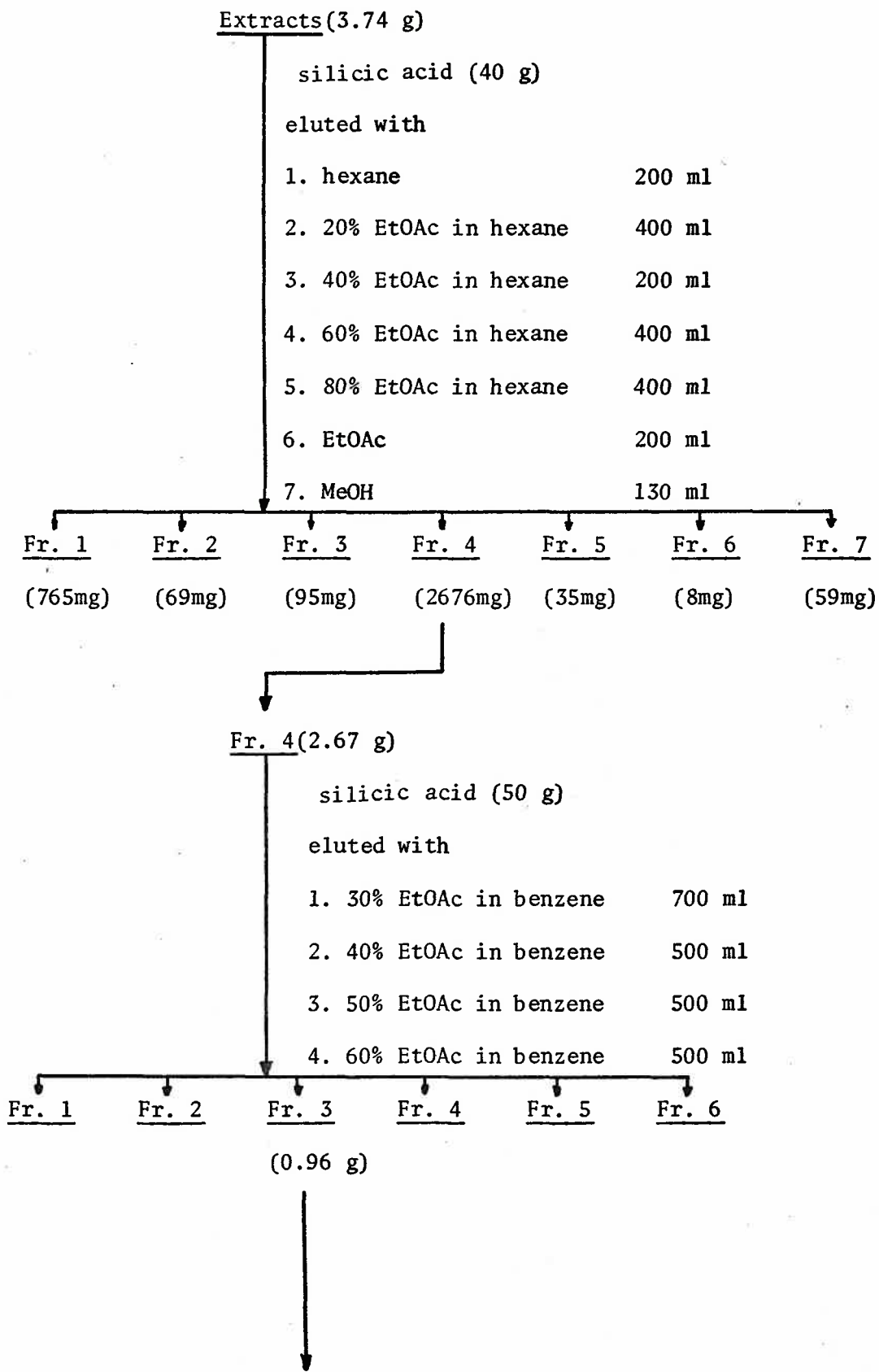
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH-MeOH(3:1)}}$ nm(ϵ): 221(20600), 270.5(6500),
280(5800), 342(18600).

addition of alkali: 216, 383.

addition of acid : 220, 270, 342.

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3450, 3080, 1750, 1650, 1595, 1510,
1430, 1375, 1310, 1218, 1160, 1100,
1040, 1030, 998, 975, 912.

Cochliobolus lunata IFO 6288



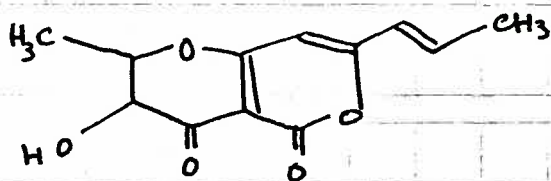
↓
Fr. 3

(0.96 g)

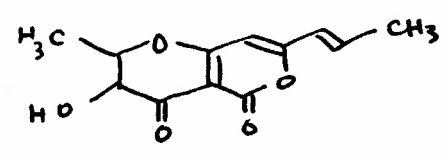
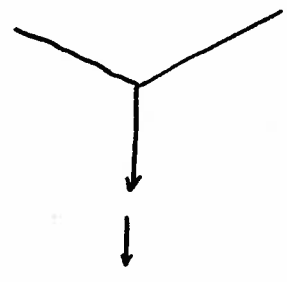
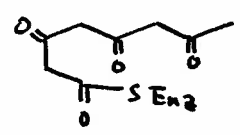
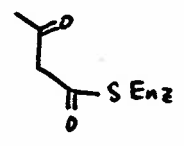
↓
Sephadex LH-20
eluted with acetone

Fr. No.	Weight(mg)
1-27	39.5
28	4.0
29	23.1
30	61.0 radicinin
31	43.0
32	8.1
33	0.9
34	0.8
35	0.8
36	26.5
37	175.9
38	238.2 radicinol
39	164.0
40	64.5
41-45	34.1
46-89	13.0

これらのスペクトルデータの解析、および
 pmr スペクトルの詳細なデカップリング実験
 の結果から、本化合物は、既に Grove によつて
Stemphyllum radicinum よりファイトトキシン活性を
 有する代謝産物として構造決定された radicinin
 と同定した⁽³⁶⁾。本化合物は無水酢酸、セリジン
 と処理するとモノアセレート体を与えた。



また、尾崎は radicinin が Cochliobolus lunata から得
 られ、除草性、殺虫性、抗菌作用を示すこと
 を報告した⁽³⁷⁾。また、Grove ら⁽³⁸⁾ および田辺ら⁽³⁹⁾ は
 radicinin の生合成研究をし、Grove らはアセラ
 ト-マロネートより導かれた2つのポリケ
 トル鎖が縮合して生成されると報告した。



radicinin

第4節 新代謝産物 *radicinol*

本化合物は、IFO 6288 菌によつて特異的に生産されることか薄層クロマトグラフィ - の予備的検索で明らかになつたので、6288 菌の抽出物から Fig. 4-9 に示した操作で無色粘稠性オイルとして単離した。本化合物は構造研究の結果、新代謝産物であつたので *radicinol* と命名した。本化合物は、Table 4-3 に示す物性値を示した。

Table. 4-3

colorless viscous oil

$[\alpha]_D^{31} -175^\circ$ (c 1.02, CHCl_3)

$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ M^+ (m/e): 238.0824 (calcd. 238.0841)

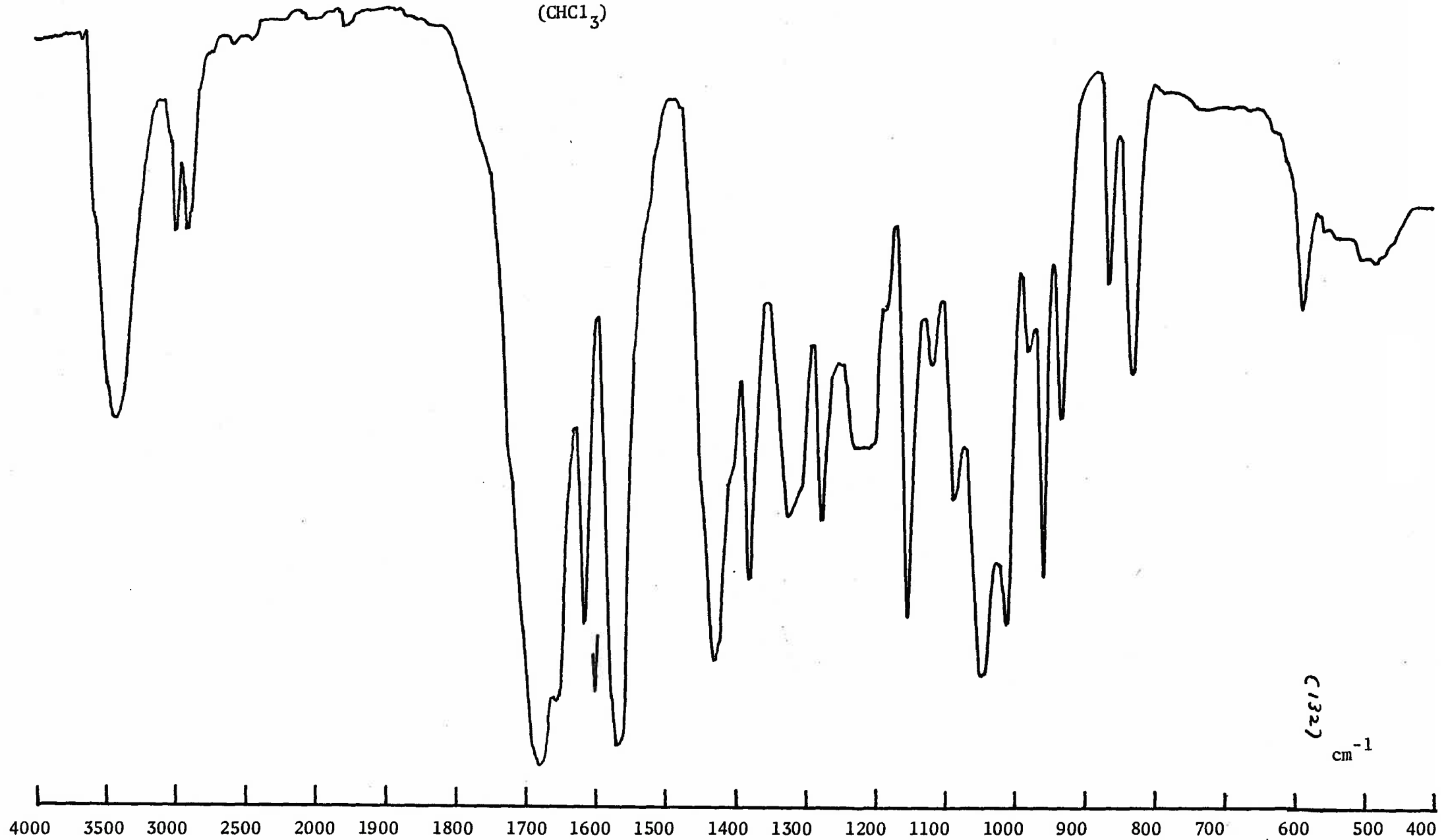
UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm(ϵ): 226(39300), 262(3100),
271(3200), 318(10800).

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3425, 1680, 1655, 1615, 1570,
1430, 865, 830.

本化合物は、*radicinin* と類似したスペクトルを示し、分子式からそのジヒドロ体であると思われた。余分の2H分は、pmr スペクト

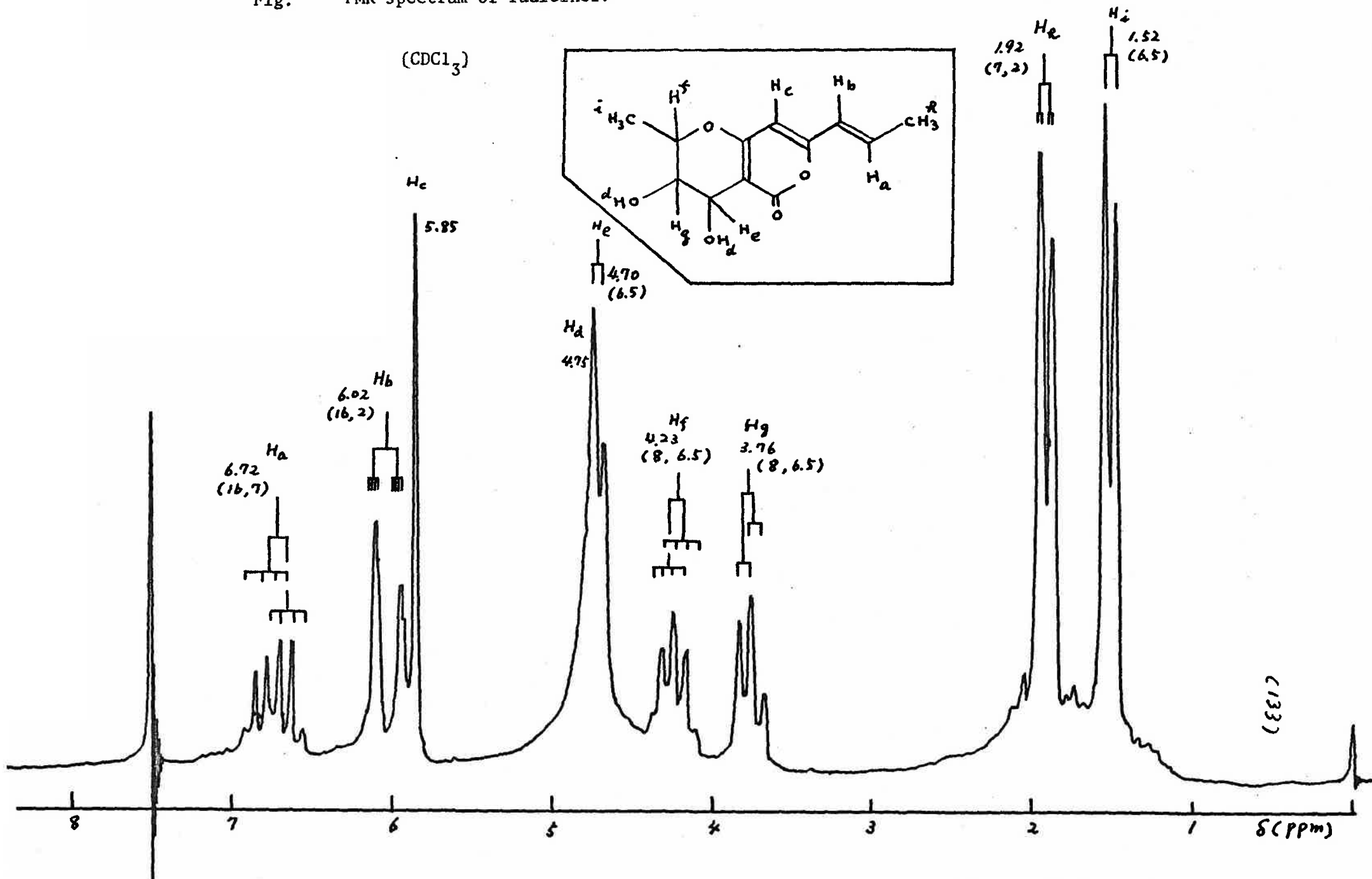
Fig. IR spectrum of radicicol.

(CHCl₃)



(1327)
cm⁻¹

Fig. PMR spectrum of radicicol.



ルでは, δ 4.70 (1H, d, $J=6.5$ Hz), および δ 4.75
 (2H, bs) のうちの 1H 分に重水置換されるプロ
 トンとして現われてゐる。残りのプロトン
 の吸収は, *radicinin* と同様の形で現われてい
 るが, δ 3.76 (1H, dd, $J=6.5, 8$ Hz) の Hg に帰属され
 るプロトンが新たに出現したプロトンとカッ
 プリングしてゐることから, *radicinin* の A 環の
 カルボニル基が 2 級アルコールに還元された
 ものと推定された。このことは, *radicinol* の
 pmr スペクトルで, *radicinin* にあつた δ 188 の
 カルボニル炭素と思われ吸収が消失し, 代
 わりに δ 76.8 (d.) (あるいは δ 72.5 (d.) または δ
 68.0 (d.) の二つれが) に 2 級アルコールの炭素
 の吸収を示したことから支持される。また,
radicinol を無水酢酸, ピリジンで処理すると
 ジアセテートを与え, ジアセテート体の pmr
 スペクトル (Fig. 4-10) では, δ 5.88 (1H, m) および
 δ 5.18 (1H, dd, $J=4, 4.5$ Hz) に各々 1 個磁場 triplet
 を受けた 2 本の吸収を示し, 2 級アルコール
 であることを示してゐる。 δ 5.88 の Hd に帰属

Fig. Proton Noise Decoupled C^{13} -NMR spectrum of radicinol.

($CDCl_3$)

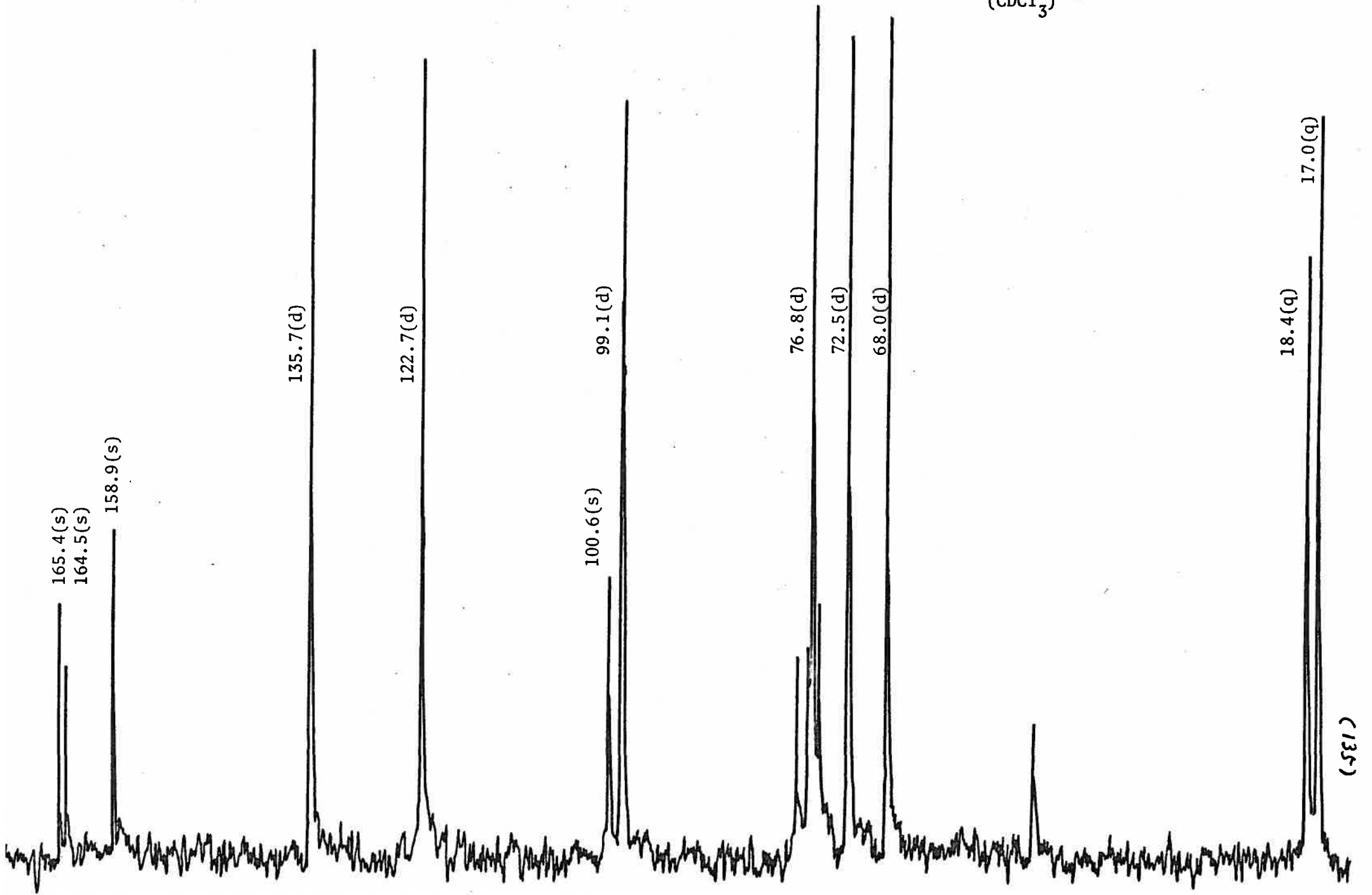
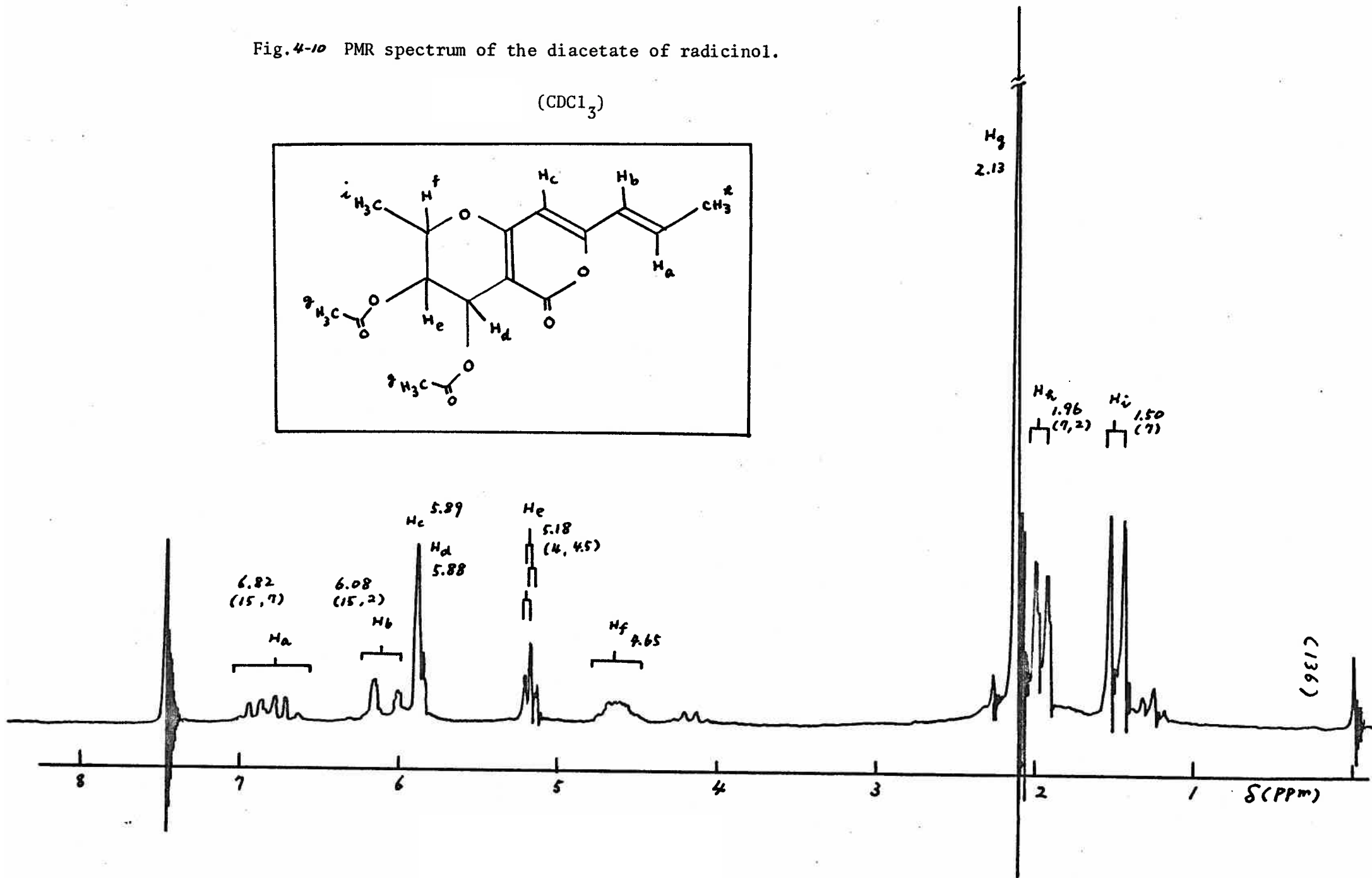
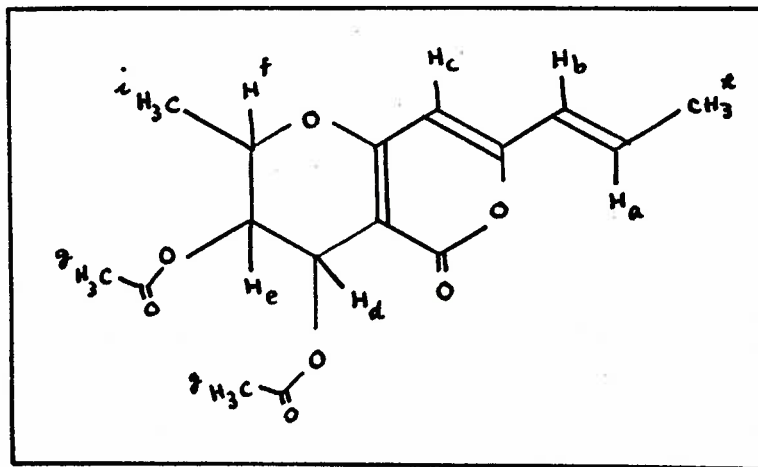


Fig. 4-10 PMR spectrum of the diacetate of radicicol.

(CDCl₃)



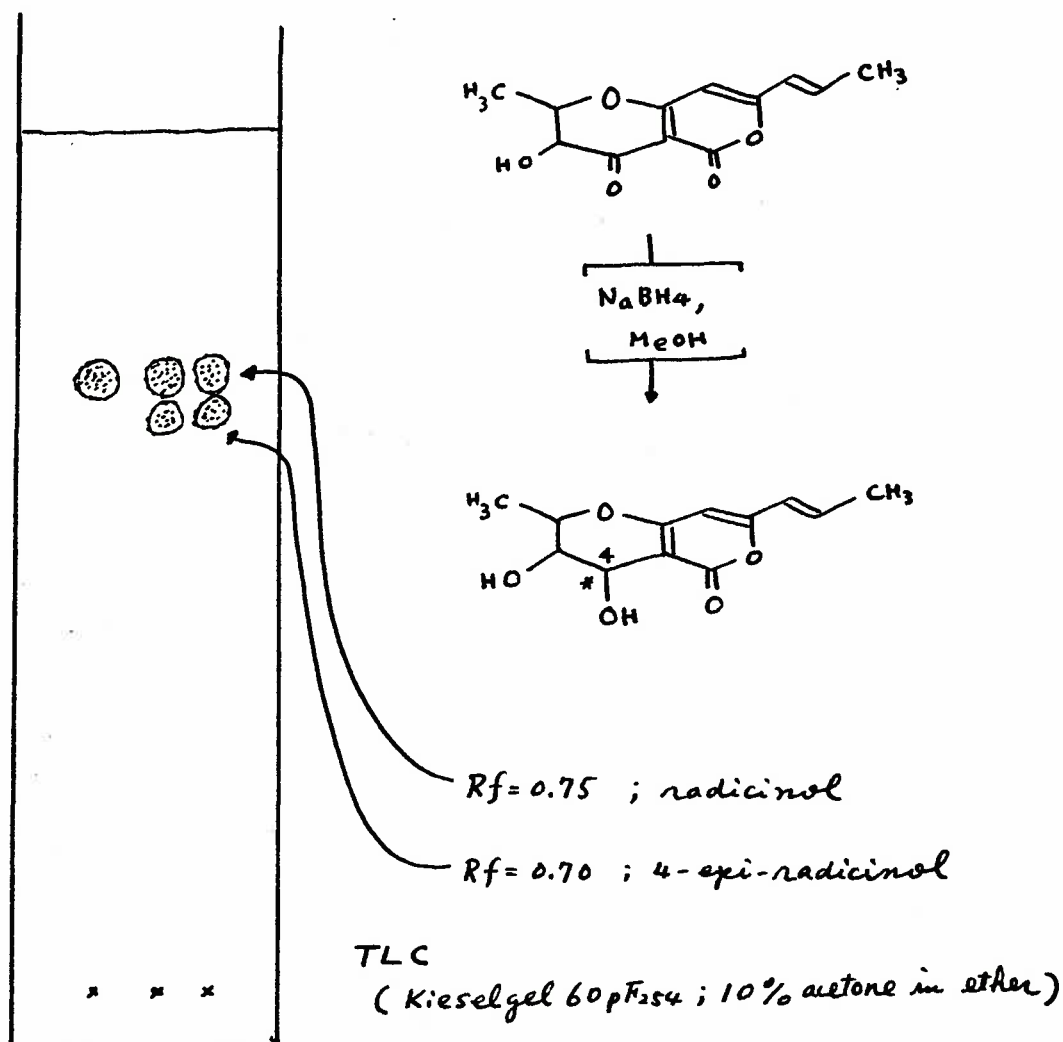
されるプロトンのシグナルが単純な doublet になった。このことは、A 環の C-10-Me-3-OH がジアセテート体では遊離のアルコール体と異ったために Hf との遠距離カップリングが出現したものと解釈される。

そこで、radicinin をメタノール中、水素化ホウ素ナトリウムで還元し、生じたジアステロマーの混合物を注意深く薄層クロマトグラフィーで分離した。より極性の低い $R_f = 0.75$ (10% アセトン-エーテル) の還元物は、 $[\alpha]_D^{28} -157^\circ$ (c 0.66, CHCl₃) を示し、MS スペクトル、PMR スペクトル、IR スペクトル、薄層クロマトグラフィーが完全に radicinol と一致した。また、より極性の高いエピマーは、 $R_f = 0.70$ (10% アセトン-エーテル) で Table (2) の物性値を示し、薄層クロマトグラフィーおよび MS スペクトルデータが天然物とは異なっており、radicinol の 4 位のエピマーであった。

Table. 4-epi-radicinol

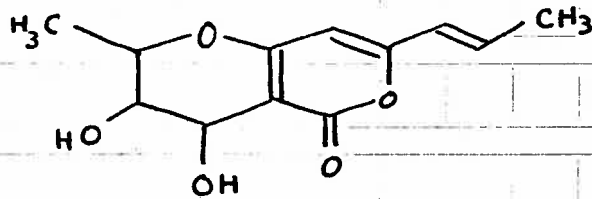
$$[\alpha]_D^{28} -92^{\circ} \text{ (c 0.475, CHCl}_3\text{)}$$

$$C_{12}H_{14}O_5 \quad M^+ \text{ (m/e) } 238.$$

$$\text{IR } \nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1} : 3425, 1685, 1655, 1615, 1570.$$


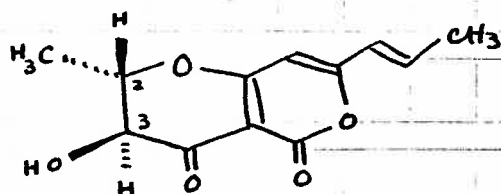
従、 γ -radicinol の平面構造は下式と結論され

3.

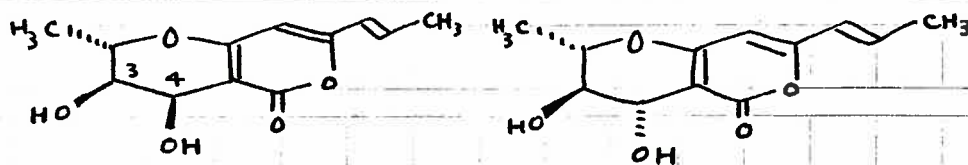


第5節 Radicinin, radicinol の絶対構造

Radicinin の相対的立体化学については, pmr スペクトルにおいて C-2, C-3 位のプロトン間の

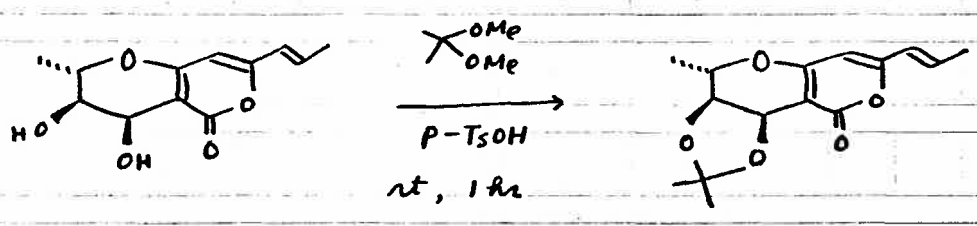


の結合定数 $J_{2,3} = 11 \text{ Hz}$ であることから A 環の立体化学はトランスの配置にあることが知られてくる⁽³⁶⁾。従って, radicinol および 4-*epi*-radicinol は 4 位のエピマーであるから互いに 3, 4 位に関してのミスまたはトランスの関係にあるはずである。このうちミスの関係を有するものが



4-*epi*-radicinol であり, トランスの関係にあるものが radicinol であることは, radicinol および 4-*epi*-radicinol の隣接グリコシルに對するアセトタイド形成の差違で区別できた。即ち, 4-*epi*-radicinol を 2, 2-ジメチルプロパン, p-ト

ルエンスルホニ酸で1時間、室温で反応させたところアセトナイド体を与えたが、radicinol

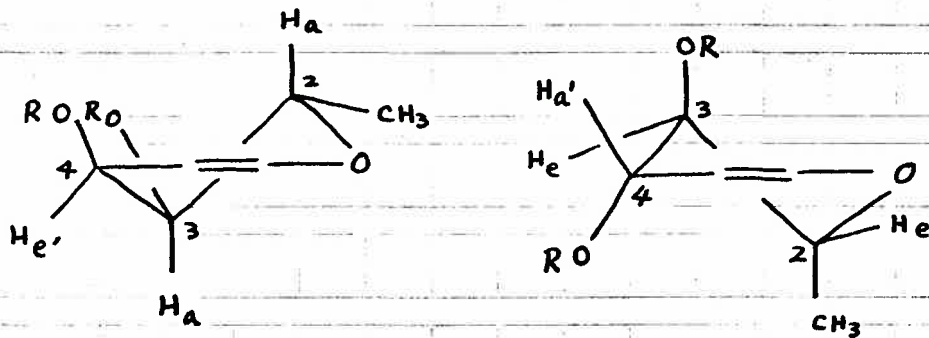


を同条件下に反応させてもアセトナイド体を与えなかった。このことは、4-epi-radicinolの隣接グリコールが互いにシスの関係にあることを示し、radicinolのそれはトランスの関係にあることを示している。

次に絶対構造を明らかにする目的で、隣接グリコール類の絶対構造決定法の1つであるExiton chirality則の適用を試みた。⁽⁴⁰⁾

Radicinolおよび4-epi-radicinolの各々のジパロロロ安息香酸誘導体を常法によりパロロロベンゾイルクロリド、ピリジンで処理することにより調製した。Exiton chirality則を適用するに当たってA環のニコホーニョニが大切であり、この場合、radicinolはジアセテート体

に変換した場合、PMRスペクトルで隣接プロトン間の結合定数が大きく変化した。ジパラクロロベンゾエート体でも変化した (Table 4-4)。この場合、A環のコニホメ-シヨニには半椅子型のコニホマ-が2つある。Table 4-4に



示した結合定数を、既にコニホメ-シヨニの解析のなされている図示したモデル化合物のそれと比較してみると、radicinalolのジアセレート体およびジパラクロロベンゾエート体では $J_{2,3}$ の結合定数が小さく $H(\text{エクアトリアル}) - H(\text{エクアトリアル})$ の関係にあることを示しており、また、4-*epi*-radicinalolのジパラクロロベンゾエート体では $J_{2,3}$ の結合定数は大きく $H(\text{アキシャル}) - H(\text{アキシャル})$ の関係にあることを示している。従って、radicinalolおよび4-*epi*-radicinalolのジパ

Table. 4-4_a

Compound	Coupling constant (Hz)		
	$J_{2,3}$	$J_{3,4}$	
radicinin	11	-	
radicinol	8	6.5	
radicinol di-Ac	4(or 4.5)	4.5(or 4)	
radicinol di-p-Cl-Bz	3	3	$J_{2,4}(W/2) = 2$
4-epi-radicinol	8.5	4.0	
4-epi-radicinol di-p-Cl-Bz	10.7	3.5	

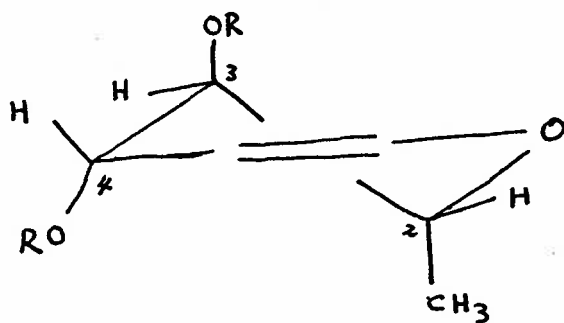
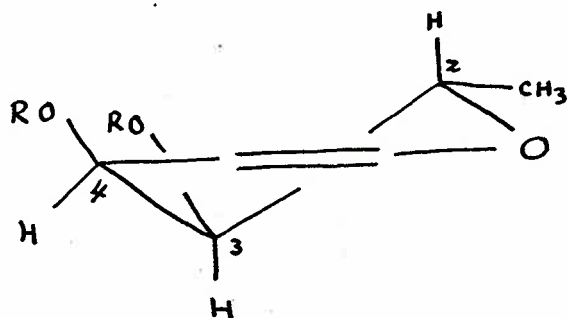
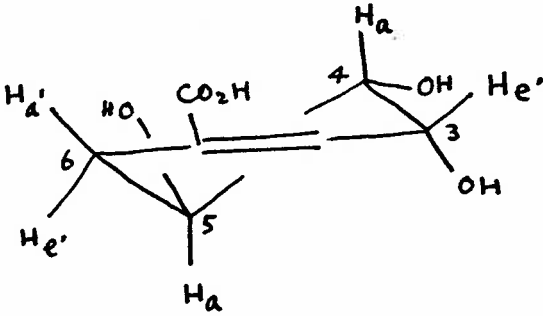
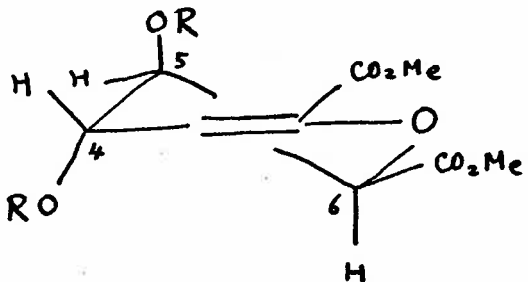
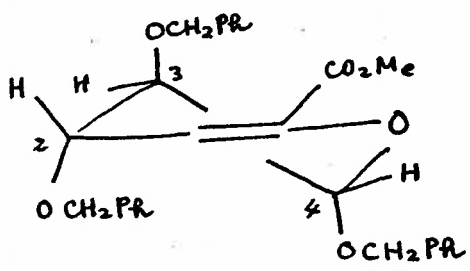
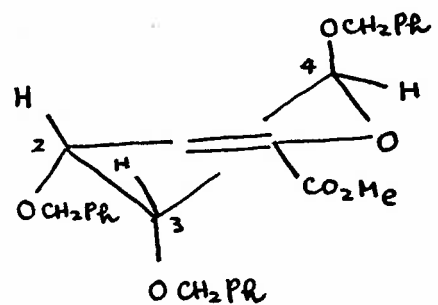
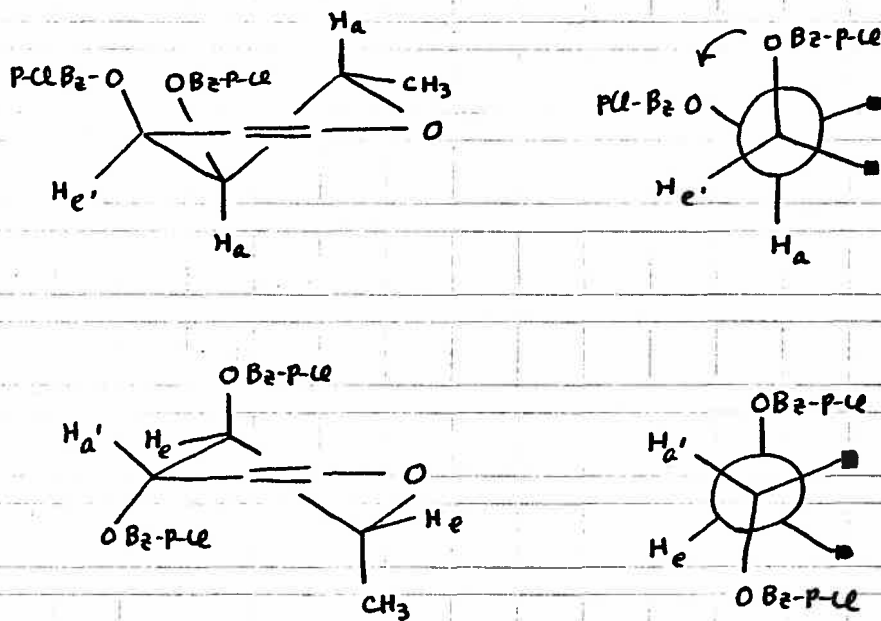


Table. 4-4_b The model compounds and their J values.

(144)

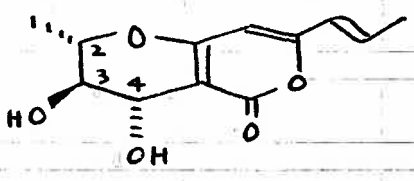
	J(Hz)	Ref.
	$J_{3,4}=3.8$ $J_{4,5}=8.4$ $J_{5,6a}=5.9$ $J_{5,6e}=4.8$	(41)
	R=H $J_{5,6}=2.0$ R=Ac $J_{5,6}=1.8$ $J_{4,5}=4.4$	(42)
	$J_{2,3}=7.5$ $J_{3,4}=2.7$	(43)
	$J_{2,3}=4.5$ $J_{3,4}=3.5$	(43)

ラクロロベンゾエート体は各々下式のコンホ
 ヂ - ミヨンを取って、いゝと結論される。また
 , radicinal のジパラクロロベンゾエート体で
 $J_{2,4}(W/2) = 2H_2$ の遠距離カップリングも、この
 コンホ - ミヨんで W 字形の結合を起して
 いゝとして理解される。これらのコンホ -
 ミヨンでは Newman の投影図がらわかるように

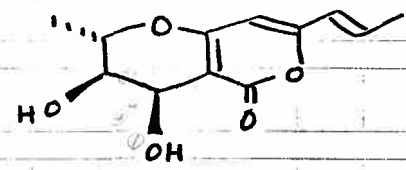


, radicinal のジパラクロロベンゾエート体では
 , ベンゾエート発色団が互いに約 180° の角度
 にあつて相互作用を及ぼし難いと予想される
 が、一方 4-epi-radicinal のジパラクロロベンゾ
 エート体では擬アキシャル - エクソトリアル

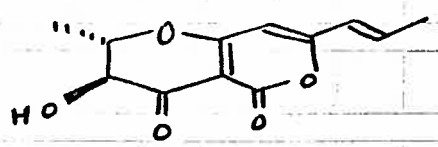
の関係にあ、互いに相互作用を及ぼすと予想される。両ベンゾエート体のCD曲線をFig.4-11に示した。4-*epi*-radicinolのジハラフコロロベンゾエート体は、249 nmに負の Cotton 効果曲線を示しており、このことは4-*epi*-radicinolおよびradicinolの絶対構造が下式であることを示している。また、radicininは従って下式と結論される。



radicinol
(2*S*, 3*R*, 4*R*)

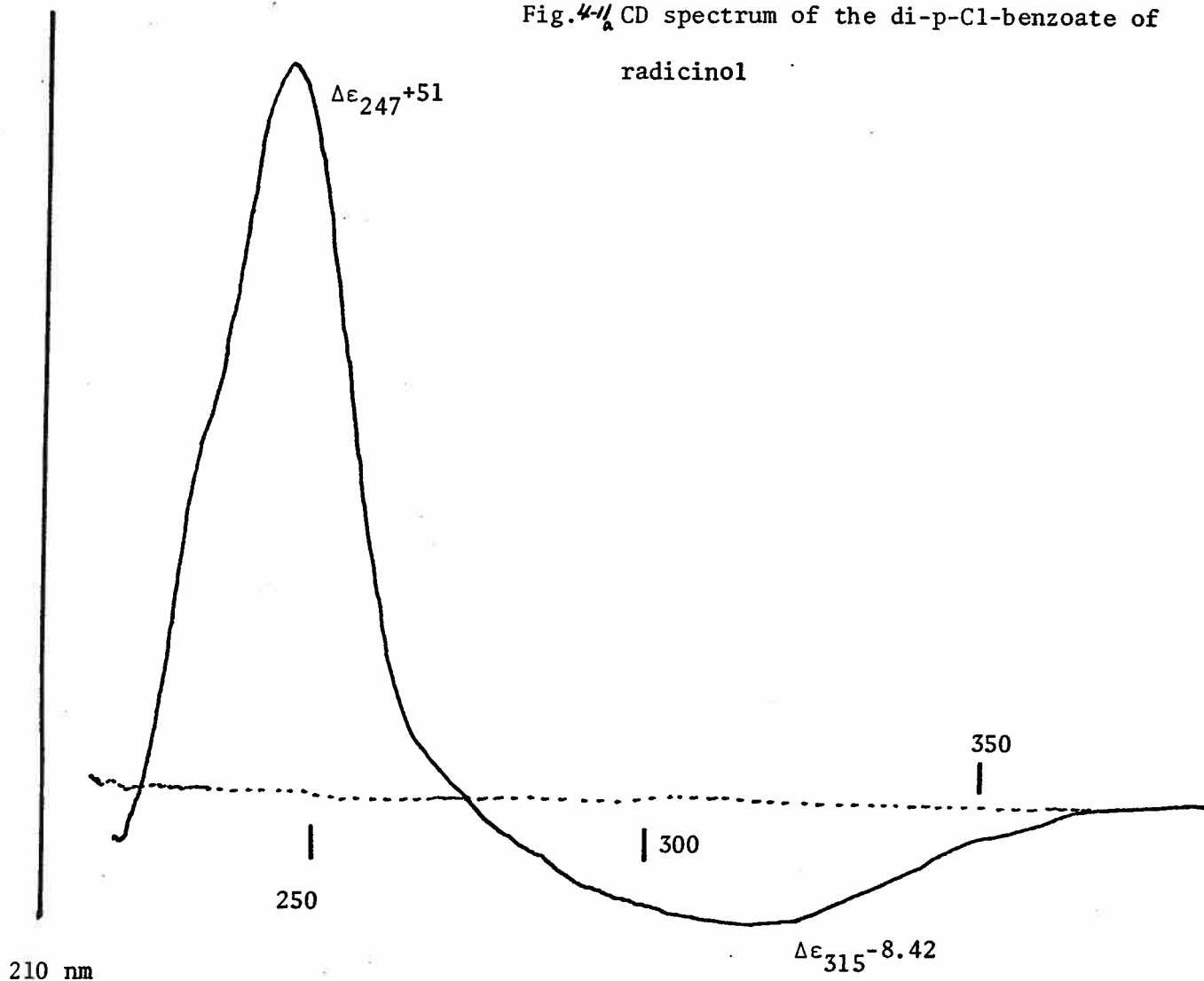


4-*epi*-radicinol
(2*S*, 3*R*, 4*S*)



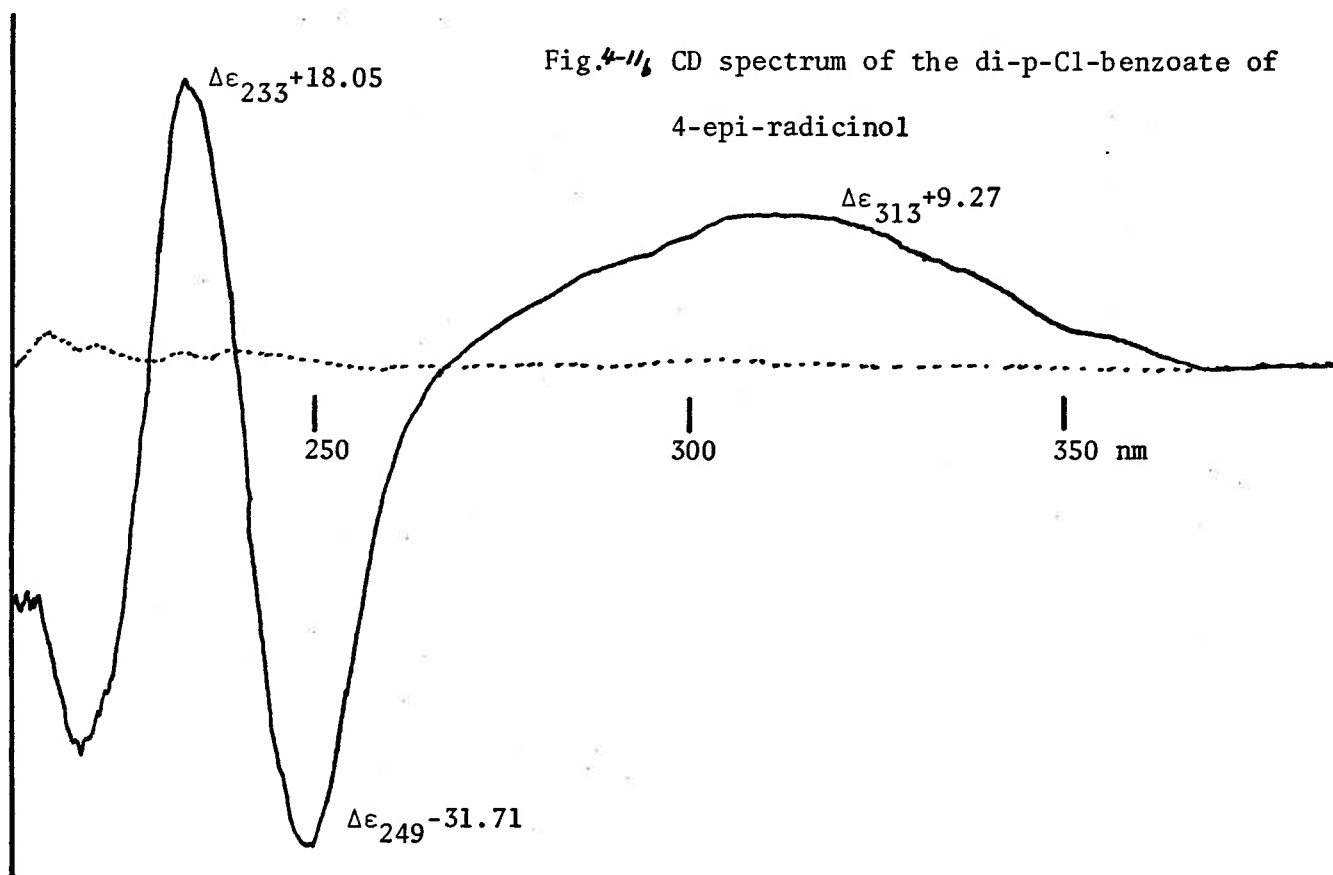
radicinin
(2*S*, 3*S*)

Fig. 4-10 CD spectrum of the di-p-Cl-benzoate of radicicol



210 nm

Fig. 4-11 CD spectrum of the di-p-Cl-benzoate of 4-epi-radicalol



350 nm

第 5 章 Cochliobolus lunata IFO 5997 菌の培地を
 異にした場合の新代謝産物 p-C₁₉
 化合物

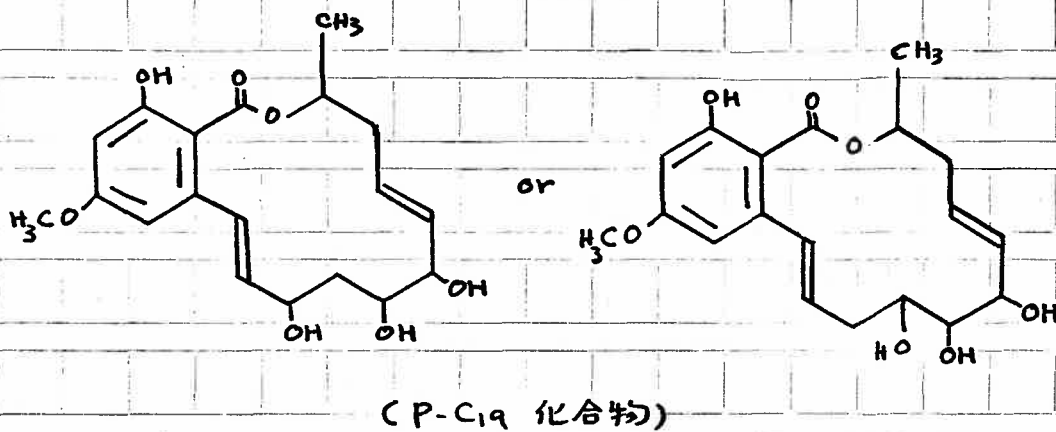
第 1 章で述べた如く、Cochliobolus lunata の
 aversion 現象は、5997 菌をモルト寒天培地上で
 他の IFO 菌株と対峙培養した場合に著しいが
 、興味深いことにポテト寒天培地上で対峙培
 養させた場合には、全く aversion 現象を示さ
 なかった(次回)。

このことは、5997 菌の aversion factor である
 lunatoic acid A がポテト培地では生産されない
 ことを予想させるが、事実、菌叢周辺には黄
 色に着色した領域が観察されず、また本菌を
 ポテト培地で培養した培養液の酢酸エチル
 抽出物を薄層クロマトグラフィで検索して
 も lunatoic acid A を検出することが出来なかつた
 。このことは、培地の違いによりポリケチド
 生合成系が代謝変動を起したと考えられ、
 その際の代謝産物に興味を持ち検索すること



Cochliobolus lunata IFO 5997 菌と IFO 6299 菌
のポテト培地上での対峙培養観察写真
(aversion 現象の消失)。

にした。その結果、ポテト培地で培養した菌体のアセトン抽出物中に、新代謝産物 P-C₁₉ 化合物を見出し、その構造を下記の如くと提出した。



本章では、Cochliobolus lunata IFO 5997 菌のポテト培地での新代謝産物 P-C₁₉ 化合物について述べる。

第1節 培養と抽出, 単離

培養には, ホテト 1 kg の煮汁にデキストロース 100 g を加え蒸留水で 5 l とし, 内容 1 l のフラスコに 350 ml 分注後, オートクレーブ殺菌した培地を用いた。これに前培養した 5997 菌を接種し, 30℃, 暗所に, 28 日間静置培養した。培養物をガーゼで濾別後, 菌体はアセトン 1 l に浸漬し, 培養液は酢酸エチルで抽出した。各操作を Fig. 5-1 に示した。各抽出物を Fig. 5-2 に示した方法により分離を進めた。ホテト培地での培養では, 菌体の生育が著しく良好であったために, 比較的少量に得られた菌体抽出物に含まれる代謝産物の検索から始めた。菌体抽出物中の主成分は, グリセリド類およびエルゴステロール等であったが, より極性の高い区分に P-C₁₉ 化合物の存在を認め, そのスペクトルデータからホリケチドと予想されたので, まず本化合物の構造解析に着手した。なお, 培養液の抽出物中にもホリケチドと予想される未知代謝産物の存在を認

Fig. 5-2

M.-EtOAc-sol. fr.

(511 mg)

silicic acid (10 g)

eluted with

1. 5% EtOAc in hexane 300 ml

2. 20% EtOAc in hexane 300 ml

3. EtOAc 100 ml

collected 10g/tube

Fr. No.	Weight(mg)	
1-4	20.2	
5-10	100.2	trioleoyl glyceride
11-18	43.8	ergosterol
19,20	12.2	
21,22	19.7	
23,24	18.0	
25-30	50.5	monooleoyl glyceride, monolinolyl glyceride
31,32	75.5	
33-36	53.5	
37-40	34.8	
41-43	31.6	P-C ₁₉
44-49	10.8	
50-52	47.0	



Fr. No. 41-43

(31.6 mg)



preparative tlc (kieselgel 60pF₂₅₄; 20cm×20cm×0.5mm)



50% acetone in benzene

Rf=0.36



preparative tlc (Kieselgel 60pF₂₅₄; 20cm×20cm×0.5mm)



50% acetone in benzene

P-C₁₉ compound

(7 mg; amorphous powder)

F.-phenolic fr.

(53 mg)

- silicic acid
eluted with
- 1. 10% EtOAc in benzene 200 ml
 - 2. 30% EtOAc in benzene 100 ml
 - 3. EtOAc 50 ml

Fr. No.	Weight (mg)
1-20	6.5
21-40	22.2
41-70	16.7

F.-acidic fr.

(144 mg)

silicic acid

eluted with

1. 5% MeOH in CHCl_3 100 ml2. 20% MeOH in CHCl_3 100 ml

3. MeOH

collected 10g/tube

Fr. No.	Weight(mg)
1-5	2.8
6-8	49.4
9-14	66.1
15,16	1.6
17-20	13.3
21-25	0.9
26-31	2.3

→ *

Fr. No. 6-8

(49.4 mg)

preparative tlc (Kieselgel 60pF₂₅₄; 20cm×20cm×1.0mm)benzene-Et₂O-HCO₂H=25:75:2

Fr. No.	Weight(mg)
1	4.8
2	15.2
3	4.4
4	1.1

*
↓
Fr. No. 9-14

(66.1 mg)

↓
preparative tlc (Kieselgel 60pF₂₅₄; 5cm×20cm×0.75mm)

benzene:Et₂O:HCO₂H=25:75:2

Fr.	Weight (mg)
1	5.8
2	11.9
3	3.2
4	4.8
5	4.7
6	2.9

めであるが、その構造は現時点では不明である。

第 2 節 P-C₁₉化合物の物理化学的性状

P-C₁₉化合物は、Table 5-1 に記載した物性値を示した。

Table. 5-1

 amorphous powder

 $[\alpha]_D^{26} -92^\circ$ (c 0.467, MeOH)

 $C_{19}H_{24}O_7$ (M^+ (m/e) 364.1524; calcd. 364.1521)

UV

 $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm(ϵ): 237(31500), 274(13440), 316(6300).

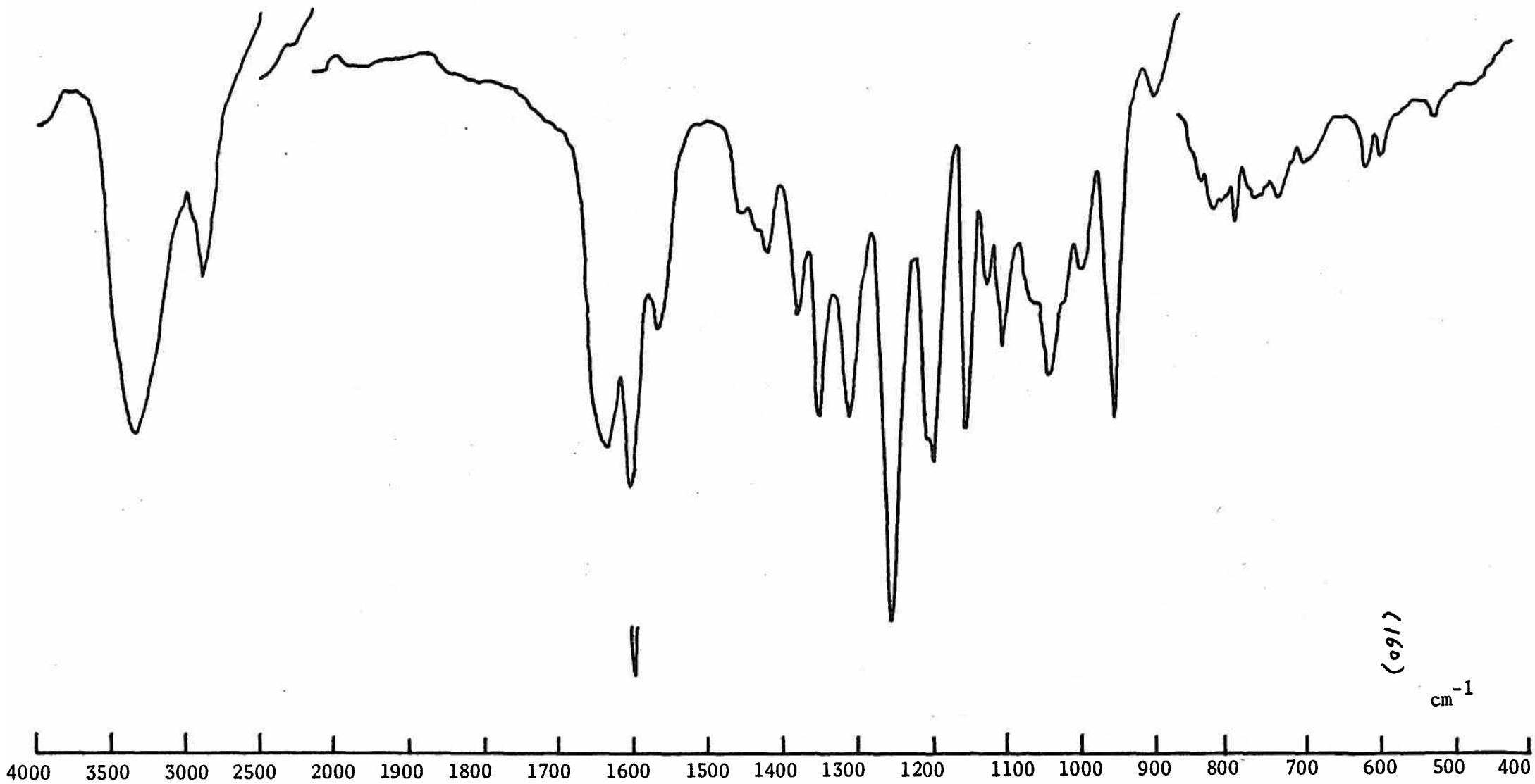
IR

 ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} : 3350, 1640(br.), 1605, 1570, 1255, 960.

P-C₁₉化合物は、薄層クロマトグラフィ - 上 UV ラン 7° (λ_{\max} 2536 Å) で照射すると特徴ある青白い螢光を發し、UV ラン 7° (λ_{\max} 3650 Å) では淡黄色の螢光を發した。

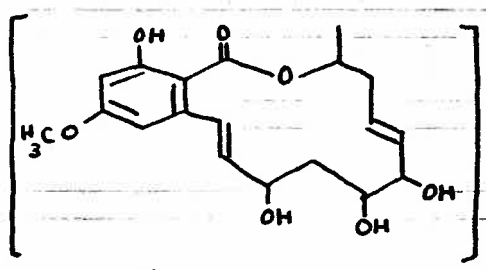
Fig. IR spectrum of P-C₁₉ compound.

(KBr)



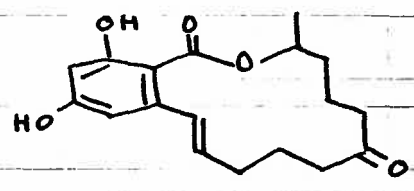
第3節 P-C₁₉化合物の化学構造

P-C₁₉化合物は、分子式 C₁₉H₂₄O₇ を有し、レゾルニン酸ラクトンに特徴的な UV スペクトルを示した。



EtOH
 λ_{max} nm(ϵ): 237 (31500)
 274 (13400)
 316 (6000)

zearalenon (ref. (44))



EtOH
 λ_{max} nm(ϵ): 236 (29700)
 274 (13900)
 316 (6000)

このことは、pmr スペクトルでメタカップロリングをした2個の芳香環上のプロトンが、 δ 6.48 (1H, d, J=2.5 Hz) と δ 6.38 (1H, d, J=2.5 Hz) に現われてゐるとき、および(水素結合した)重水置換される δ 11.90 (brs) の1H分の吸収があり、また IR スペクトルで水素結合したアリールエステルカルボニルの吸収が、 1640 cm^{-1} に短波長シフトを示してゐることを確認される。更に、cmr スペクトルは4置換ベンゼンの吸収帯を示し、それらはオフレゾナンスで doublet

Fig. PMR spectrum of P-C₁₉ compound.

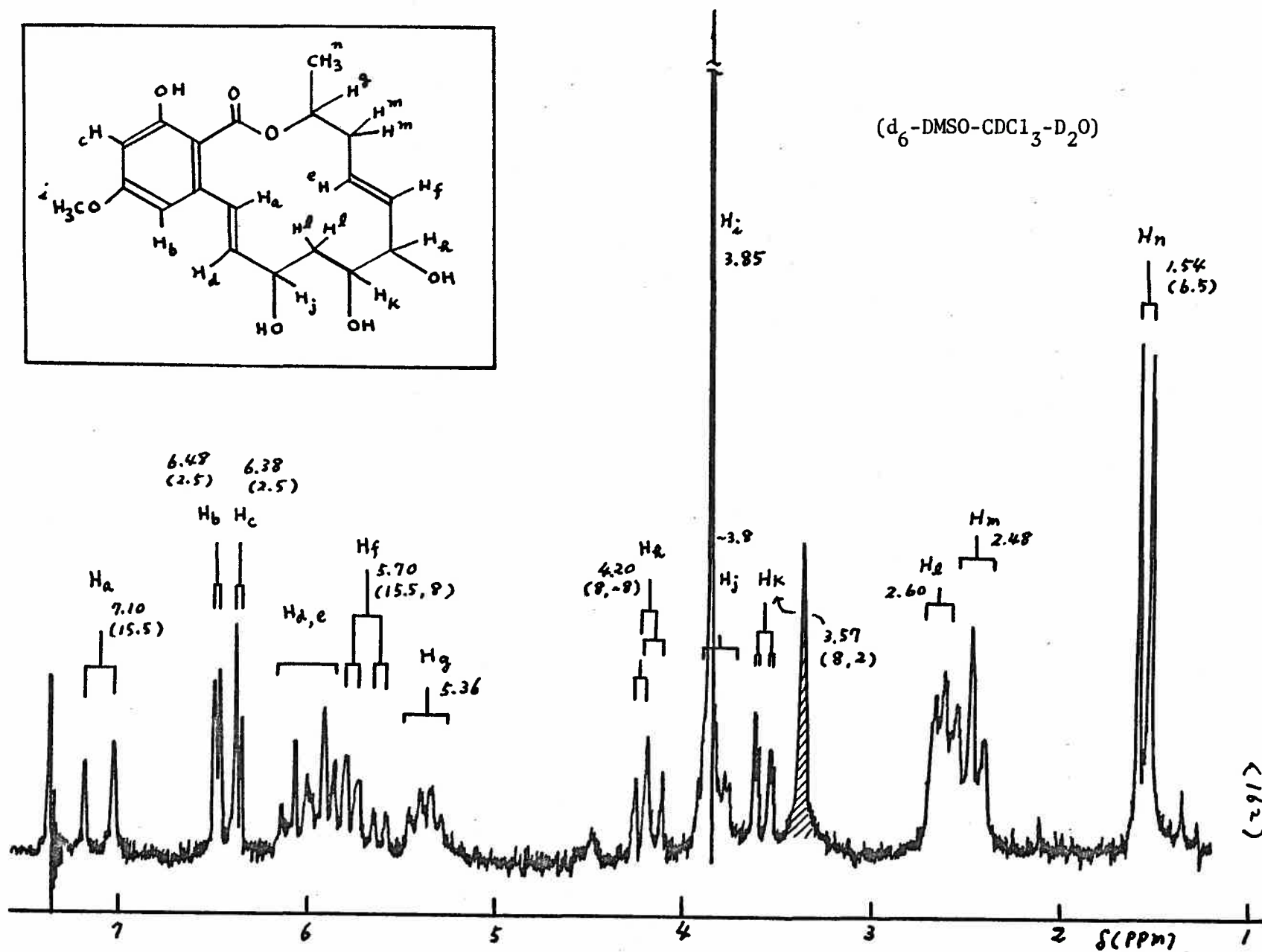


Fig. Proton-Noise Decoupled C^{13} -NMR spectrum of P-C₁₉ compound.

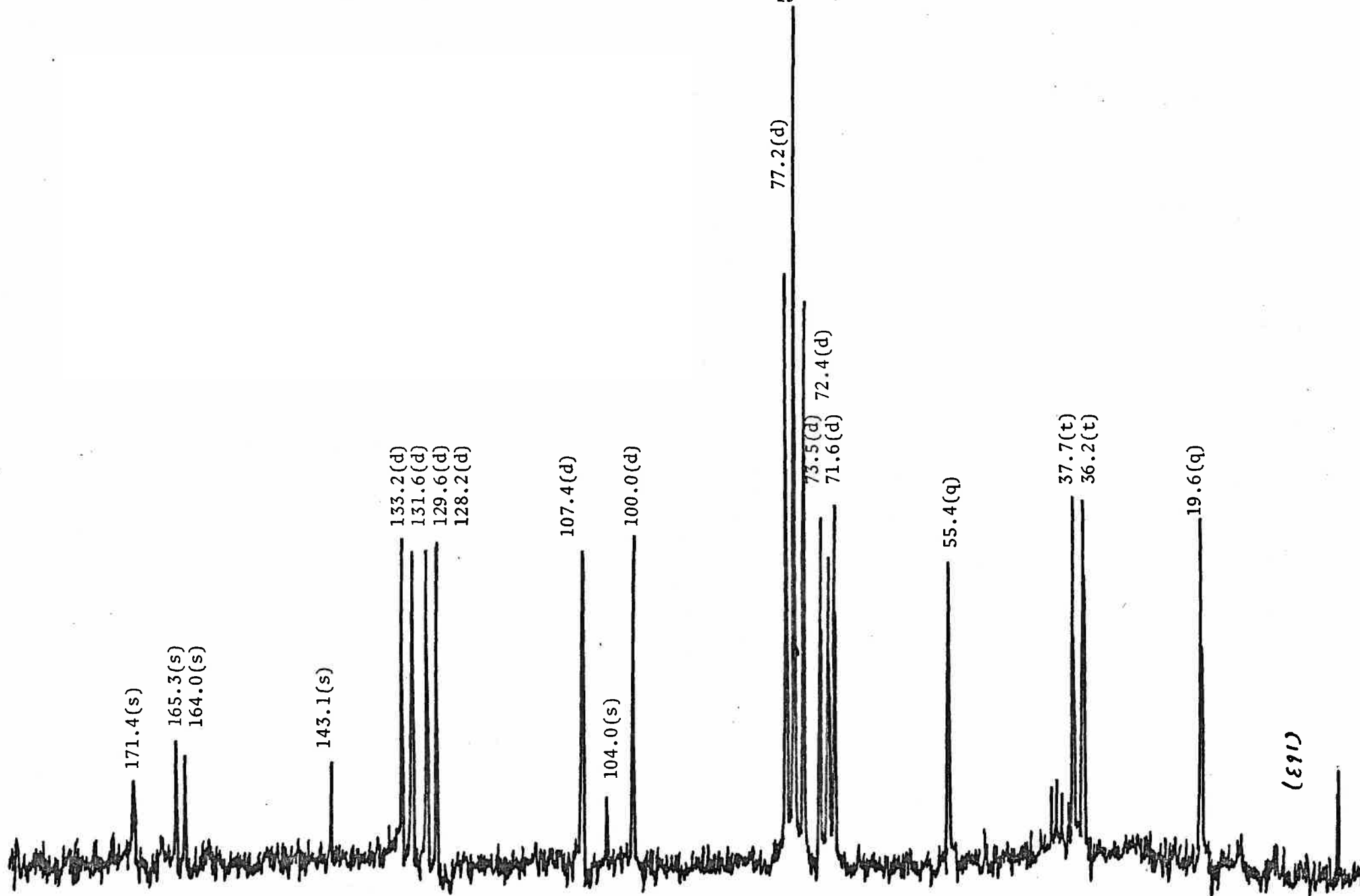
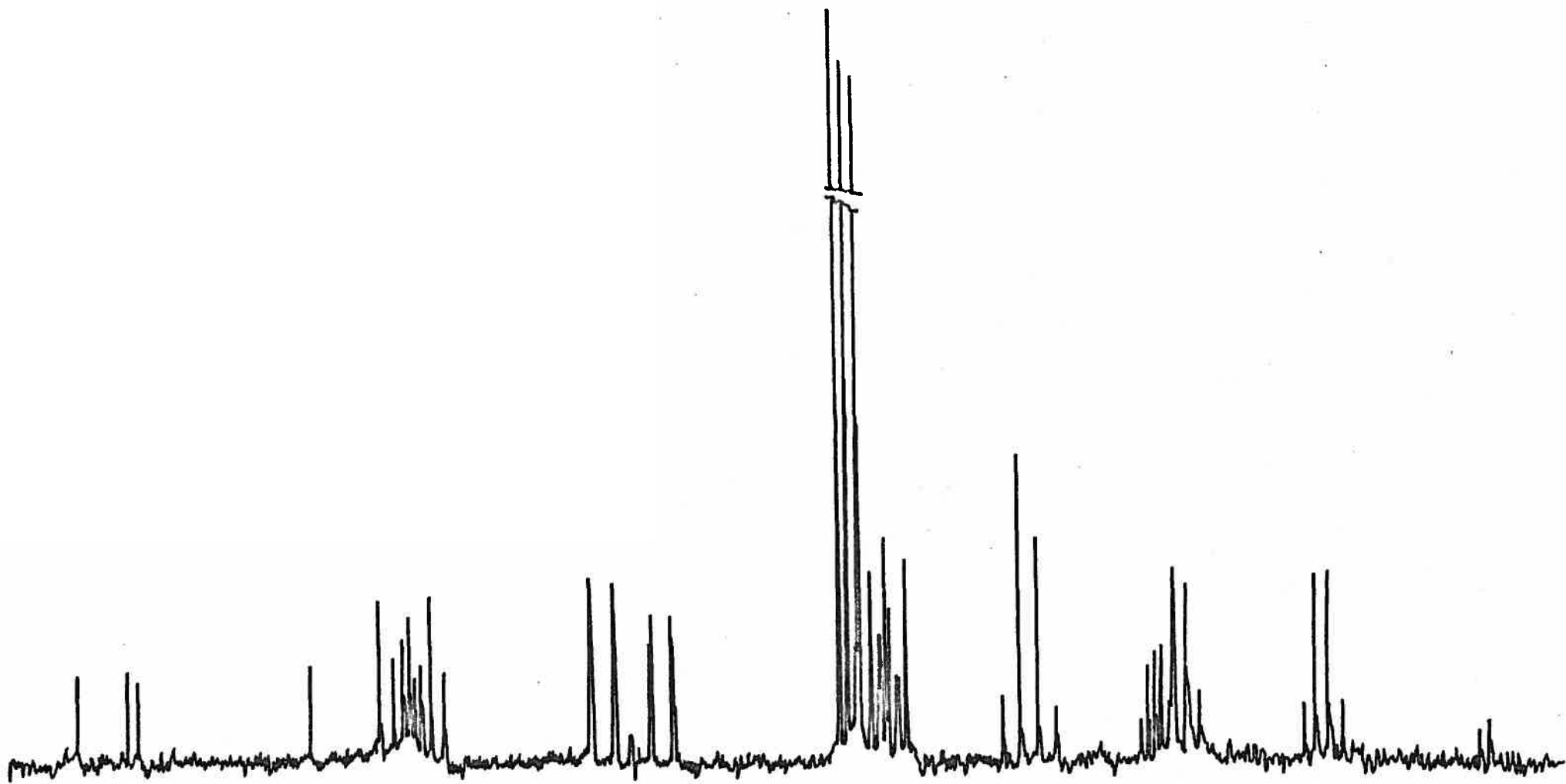


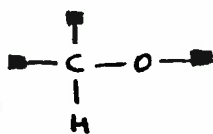
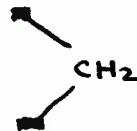
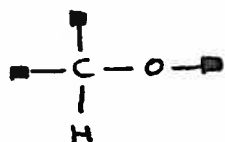
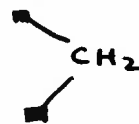
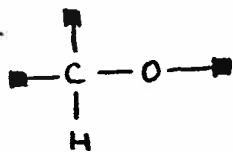
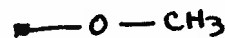
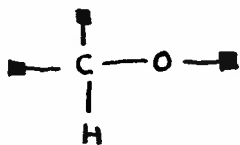
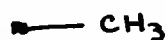
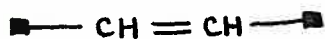
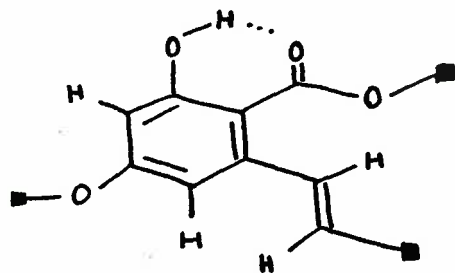
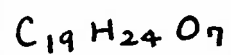
Fig. Off-resonance C^{13} -NMR spectrum of P-C₁₉ compound.



に現われる $\delta 100.0(d)$ と $\delta 107.4(d)$ の 2 本の吸収帯, および *singlet* に現われる $\delta 104.0(s)$, $\delta 143.1(s)$, $\delta 164.0(s)$, $\delta 165.3(s)$ の 4 本の吸収帯として現われていることはこのことを支持している。またスチレン型に共役が伸びた二重結合がトランス配置にあることは, pmr スペクトルで $\delta 7.10$ に, *doublet*, $J=15\text{ Hz}$ でカップリングしていることで判定される。

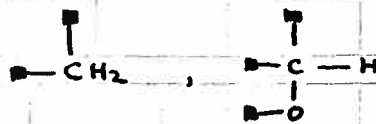
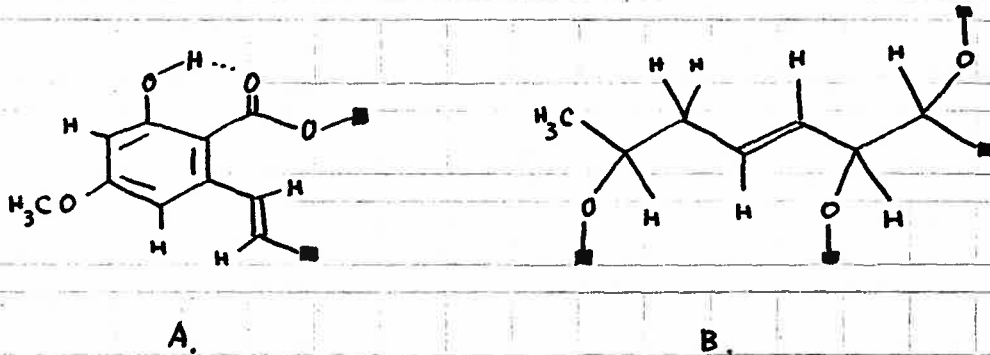
その他の cmr スペクトルの吸収帯は, sp^2 炭素が 4 本 ($\delta 133.2(d)$, $131.6(d)$, $129.6(d)$, $128.2(d)$) すべて *doublet* に現われ, また酸素原子を有する sp^3 炭素が 5 本 ($\delta 77.2(d)$, $73.5(d)$, $72.4(d)$, $71.6(d)$, 55.4) (g) 現われそのうちで *doublet* の吸収はメチル基, *quartet* のそれはメトキシメチル基の存在を示している。残りの吸収は, $\delta 37.7(\pm)$, $36.2(\pm)$, $19.6(g)$ にあつて多重度から各々メチレン, メチレン, メチル基の存在を示している。従つて, p-C₁₉ 化合物の各炭素原子は次の官能基に帰属されることになる。

P-C₁₉ 化合物



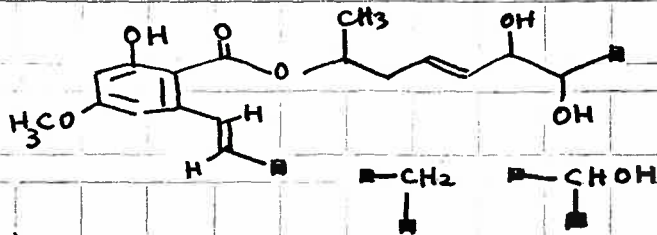
P-C19化合物は、無水酢酸、ピリジンでアセチル化され、テトラアセテート (m/e 532 (M^+)) を与えることからアセチル化される水酸基を4つ有する。従って遊離の2級水酸基は3つである。PMRスペクトルで各官能基の結合状態を調べると、メチル基 (δ 1.54) は doublet として現われ、 $J=6.5$ Hz で δ 5.36 のメチンプロトン (multiplet) とカップリングしてゐることがデカッパリングで示された。 δ 5.36 のメチンプロトンは、 δ (d_6 -DMSO + d_6 -acetone) 2.58 の triplet 様のシグナルと互いにデカッパリングされることからメチレンに繋がってゐる。更にこのメチレン基は、 δ 6.15 ~ 5.82 に現われる複雑なオレフィンプロトンのシグナルとデカッパリングされることから隣にオレフィン基を有する。このオレフィンプロトンは、 δ 5.70 に現われてゐる double doublet ($J=15.5, 8$ Hz) のプロトンと $J=15.5$ Hz でカップリングしてゐることから、トランス配置にあることを示してゐる。 δ 5.70 のプロトンが更に $J=8$ Hz でカップリングしてゐる

相手は、 δ 4.20 の triplet 様のシグナルであることがデカッ、フリニグで示されたことから隣りにメチン炭素が存在することになる。また δ 4.20 のシグナルは、 δ 3.57 の double doublet ($J=8, 2H_2$) とデカッ、フリニグされ、その隣はメチン炭素である。従って、P-C19化合物は次の部分構造を有する。

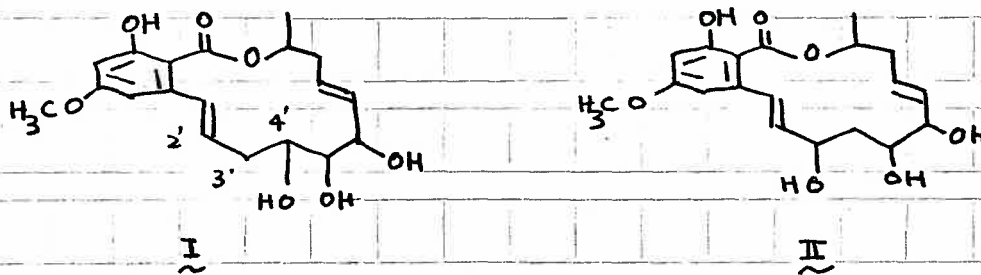


メチンプロトン (δ 5.36) は、遊離の水酸基の付け根のケミカルシフトより約 1 ppm 低磁場シフトしており、他の酸素原子を有するメチンプロトンは、遊離水酸基の有するメチンプロトンのケミカルシフトと考えられるので、部分構造 A. にあるエステルカルボニルの相

手としてこの酸素原子に結合させることができ
 ます。従、て、部分構造 A, B の結合状態は
 次式に拡張される。

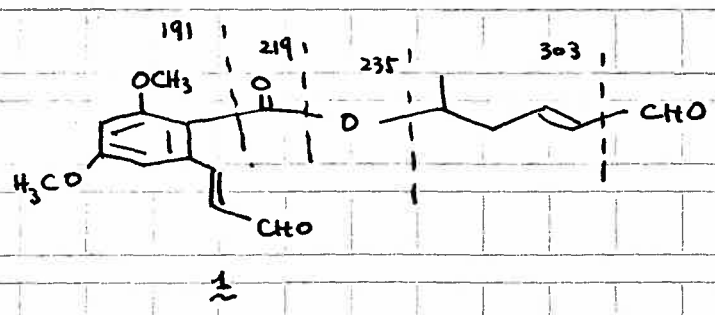


P-C₁₉ 化合物の不飽和度は 8 であり、従、
 て残りの結合手はただ 1 つの環を形成してあ
 り、可能な構造式は 2 つに限定される。両式



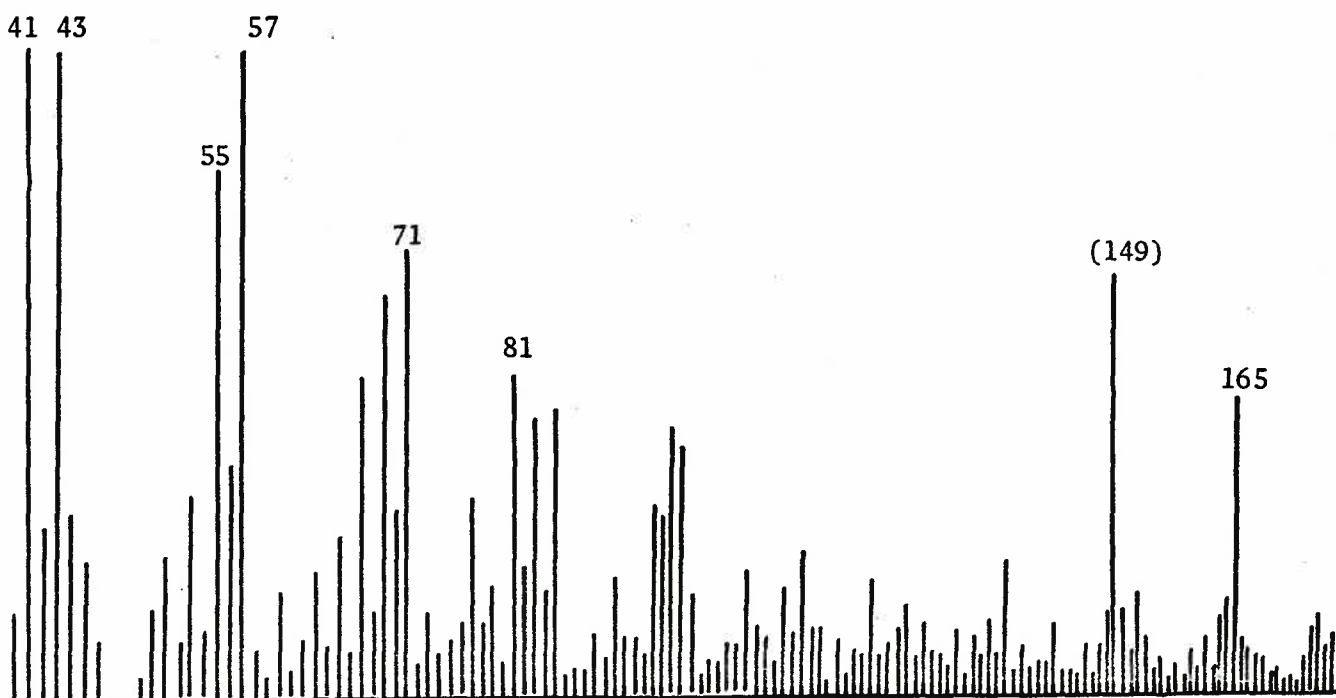
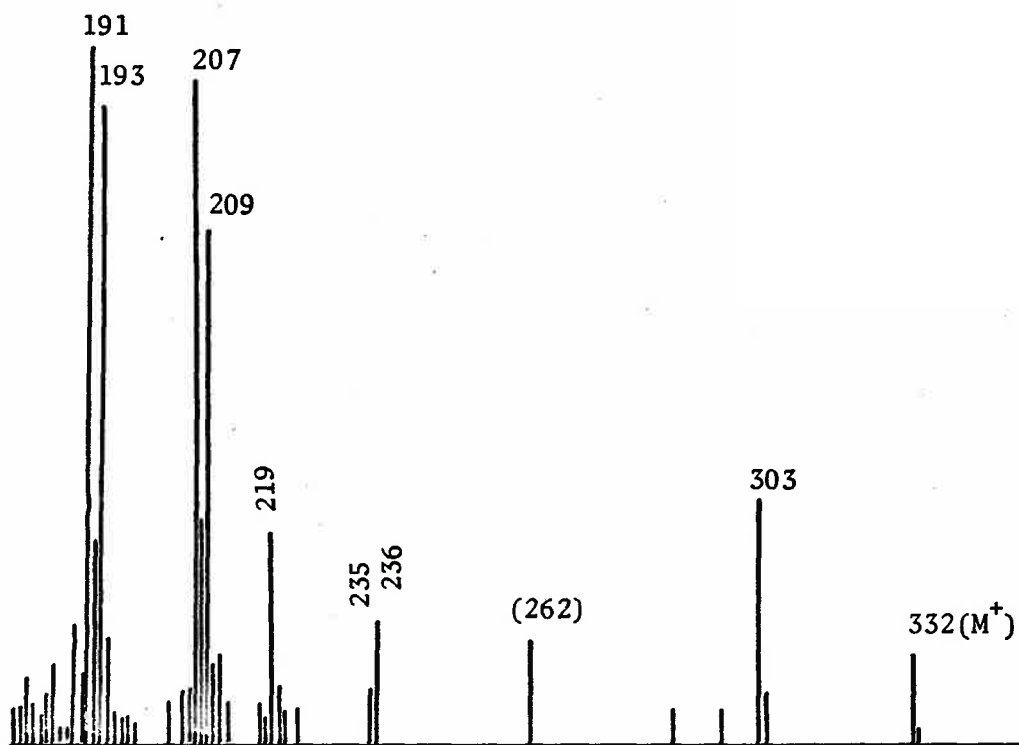
の構造上の相異は、C_{3'}, C_{4'} の結合順序のみで
 ある。この両者を pmr スペクトルにおいてテ
 カ、ポリニゲ実験から区別しようとすること
 は、これらのプロトンの正確な結合定数が因
 がら読みとれ得なから、た、と、およびニゲナ
 ルがこみ入、て、た、と、な、ど、か、ら、不、成、功、で、あ
 った。現時点において、これらの 2 つの可能

な構造式のうちいづれが正しいか結論することは出来な。しかし過ヨウ素酸酸化の実験結果を参考にすれば両者のうち一応Ⅱ式がより妥当のように思われる。即ち、P-C19化合物をメタノール中で、エーテル性ジアルデヒドで処理することにより得たモノメチルエーテル体を、メタノール中過ヨウ素酸ナトリウムで酸化したところ、ジアルデヒド体が単離された。ジアルデヒド体のMSスペクトル (Fig. 5-3) は、 m/e 332 を分子イオンピークと思われるピークを示し、図示したフラグメント



イオンが観察されたので、ジアルデヒド体の構造は²と予想され、ジアルデヒド体のpmrスペクトル (Fig. 5-4) はこの構造を支持している。また、ジアルデヒド体は、2,4-ジニトロフェニルヒドラジン試薬と反応して、赤色の

Fig. 5-3 Mass spectrum of the dialdehyde.



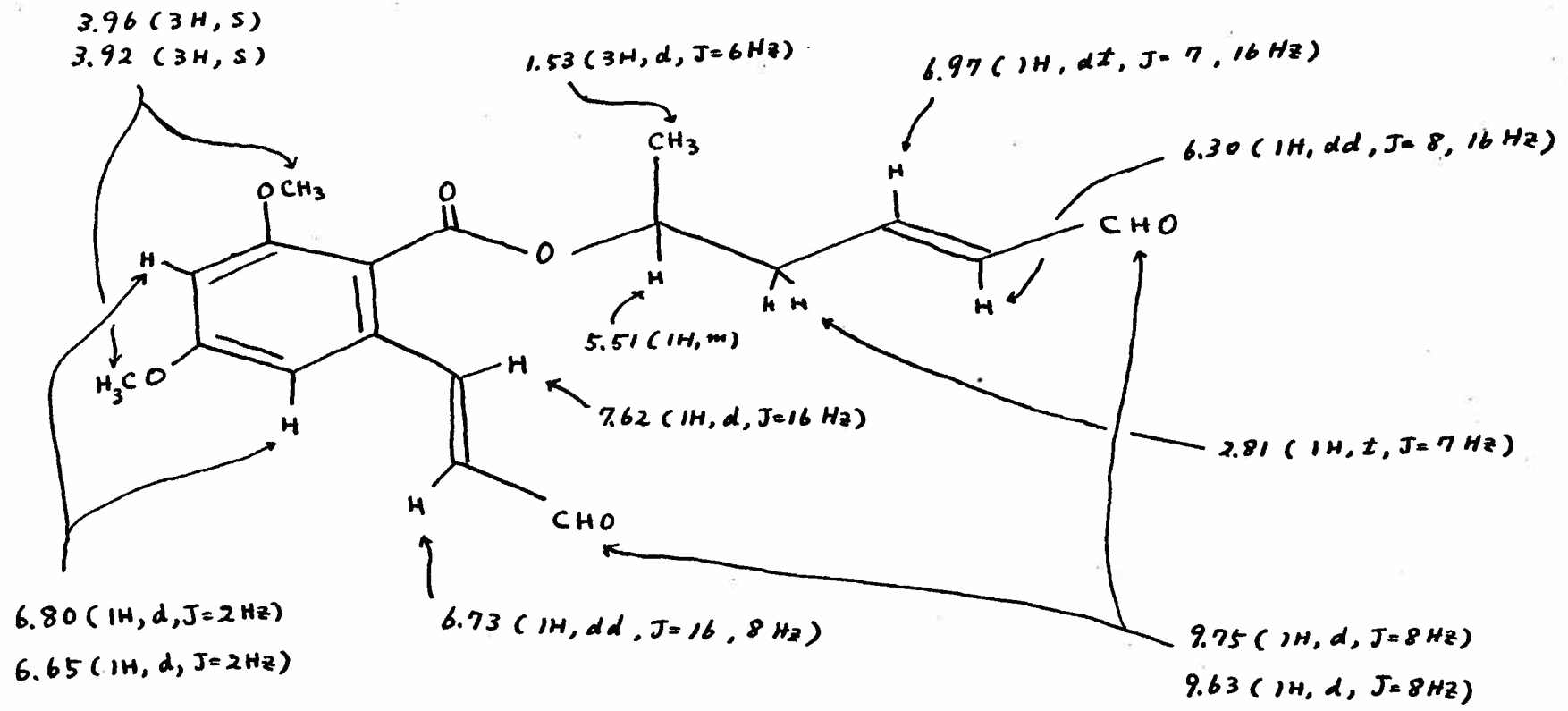


Fig. 5-4 PMR spectrum of the dialdehyde.

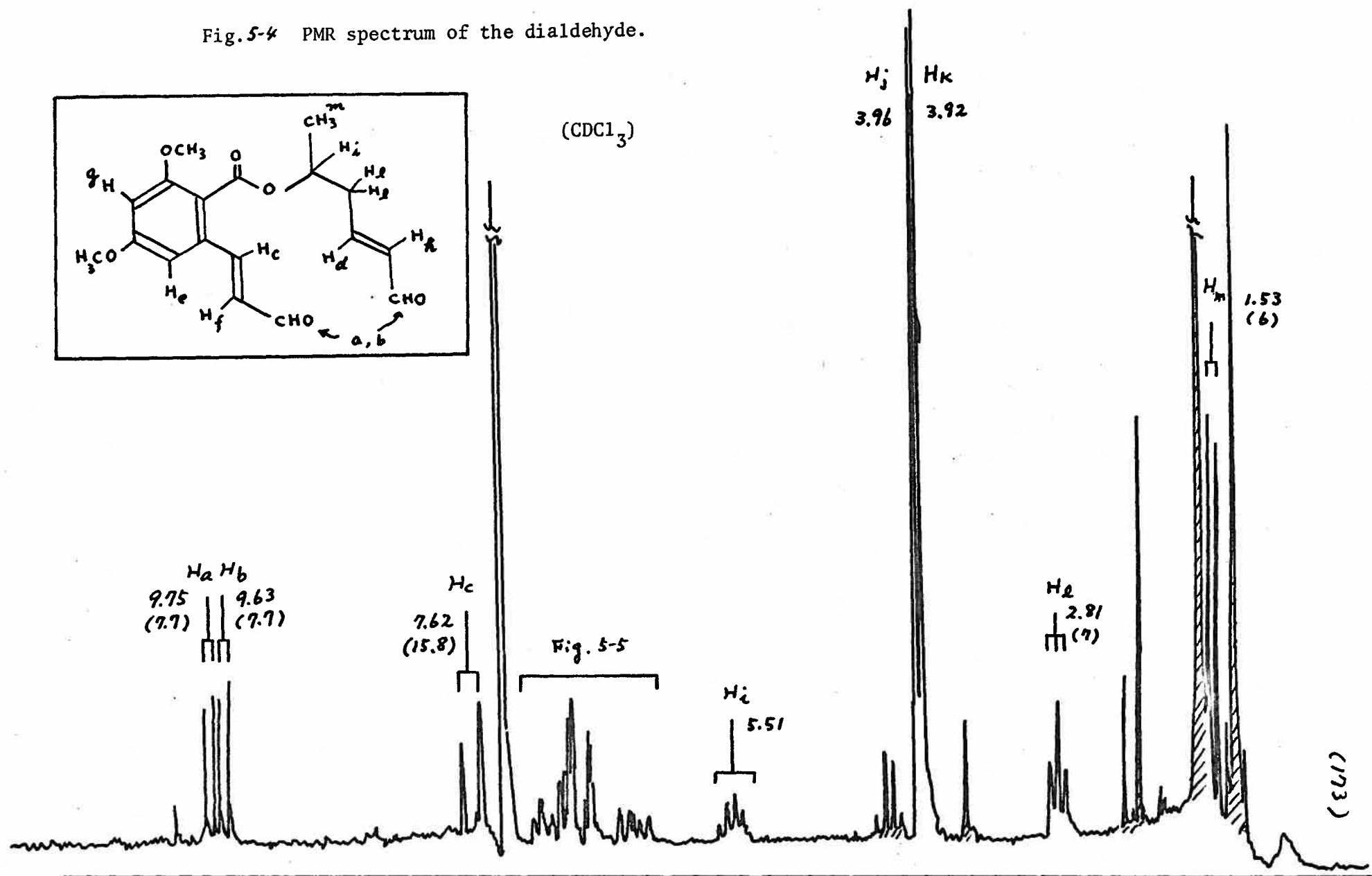
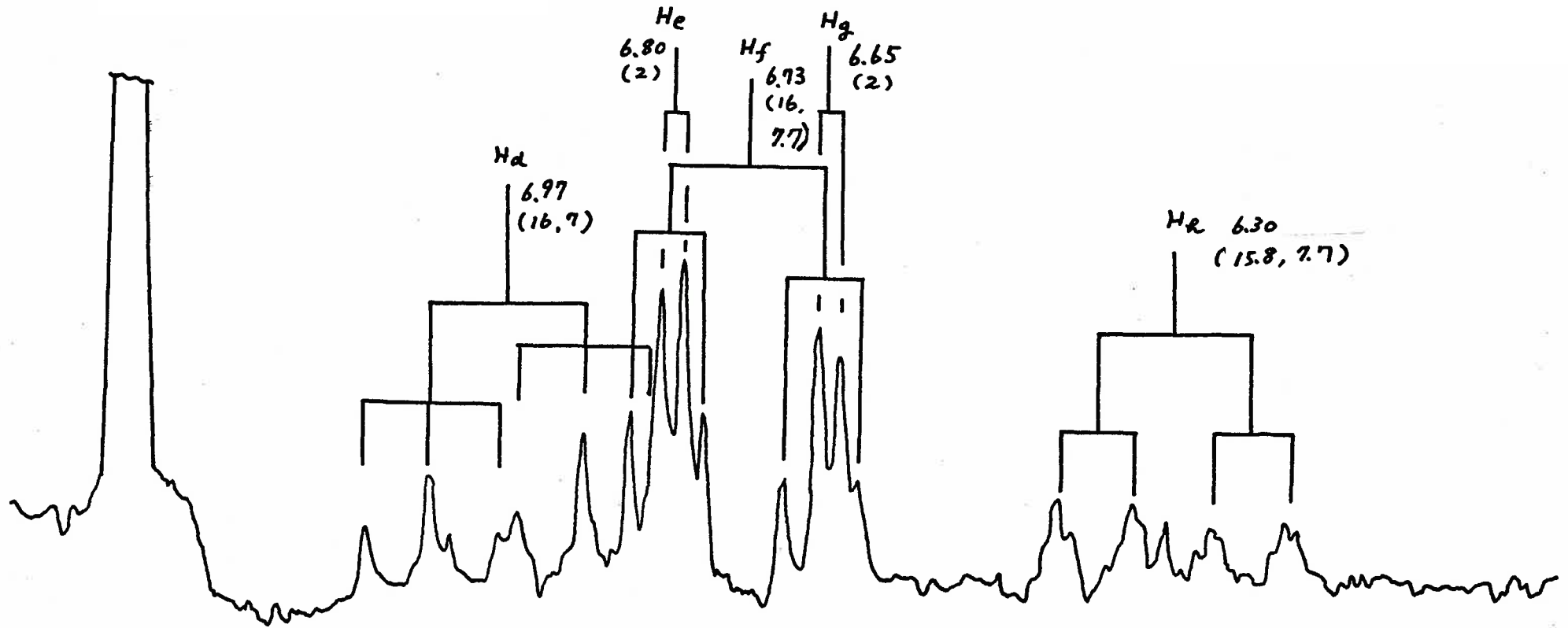
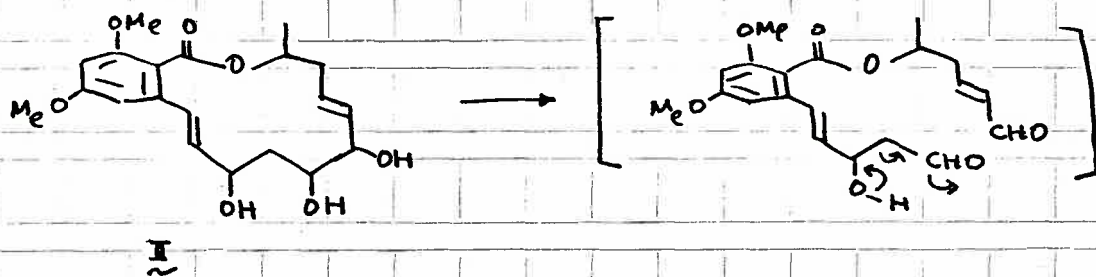
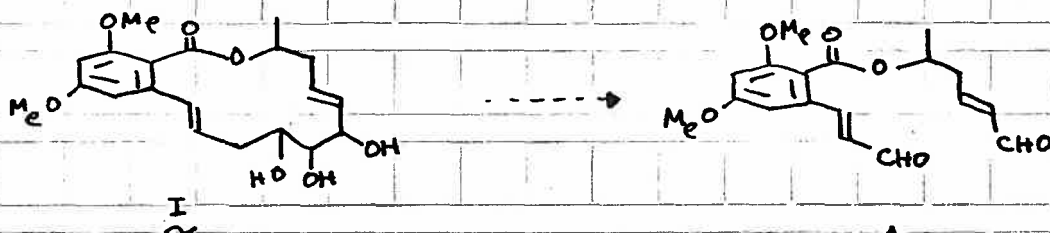


Fig. 5-5



結晶を与えた (mp 274.5°C)。このジアルデヒド体の生成は特別な異常反応がなければ限り、I式では説明が困難である。しかし、II式では隣接グリコールの開裂後生成したアルドールが逆アルドール反応を起こして生成したと考えることにより説明可能であり、以上の結果



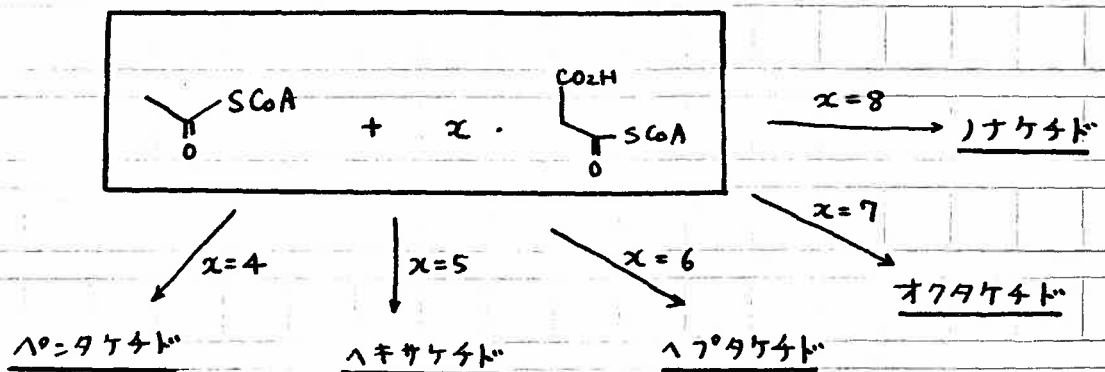
をもとにすれば、 $P-C_{17}$ 化合物の平面構造としてIIを提出することが可能であろう。もしIIが正しければ過ヨウ素酸酸化反応において、逆アルドール反応を起こす前の酸化生成物を確認することが構造を決める鍵化合物であるだろう。今後さらに構造の確認および絶対構

造に ついて は 検 討 を 待 た ね ば な ら ぬ 。

第 6 章 Cochliobolus lunata 菌の生産する代謝産物の生合成的相関についての考察

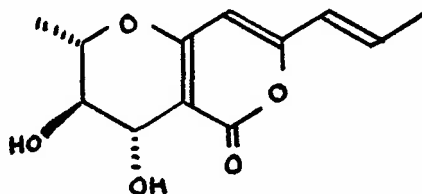
本研究で明らかにした Cochliobolus lunata の代謝産物および既知の Cochliobolus lunata の代謝産物を一括して Table 6-1 に示した。⁽²⁷⁾ 本章では、これら一群のポリケチドの生合成的相関について、分類学的に同種に属するが異なる菌株より得られた代謝産物であるという点を考慮して考察する。

まず第 1 に、同種の菌でも菌株 (strain) が異なると生産されるポリケチドの鎖の長さ、つまりアセチル-CoA をスタートとしてこれに何分子のマロニル-CoA が縮合するかどうかという点が異なることが言えよう。現在ポリケチド生



化合物名	構造	生産菌
Lunatoic acid A		<u>Cochliobolus lunata</u> IFO. 5997 IFO. 6586
Lunatoic acid B		<u>Cochliobolus lunata</u> IFO. 5997
α -Acetylorscinol		<u>Cochliobolus lunata</u> IFO. 6291 IFO. 6299 IFO. 6382
Radicinin		<u>Cochliobolus lunata</u> IFO. 6288 IFO. 6299 IFO. 6382
		<u>Stemphilium radicinum</u>

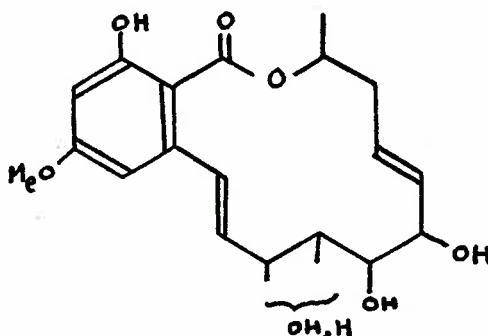
Radicinol



Cochliobolus lunata

IFO. 6288

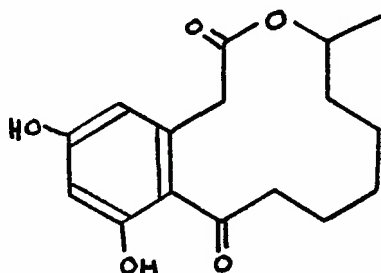
P-C₁₉



Cochliobolus lunata

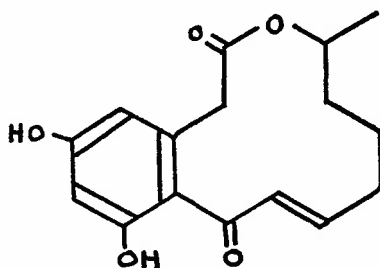
IFO. 5997

Curvularin



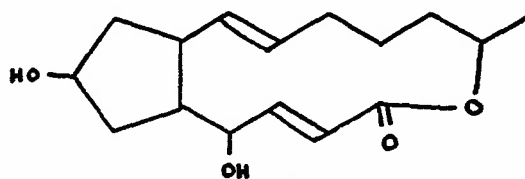
Curvularia lunata

Dehydrocurvularin

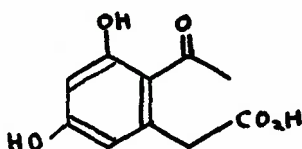


Curvularia lunata

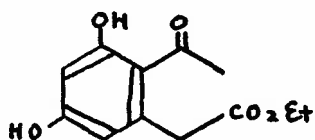
Brefeldin A

Curvularia lunata

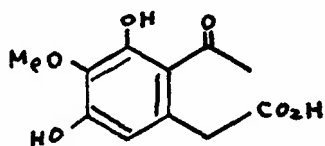
Curvulinic acid

Curvularia siddiqi

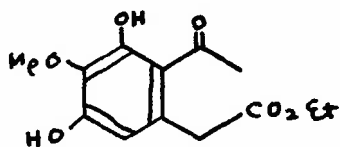
Curvulin

Curvularia siddiqi

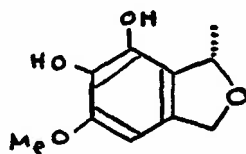
Curvulic acid

Curvularia siddiqi

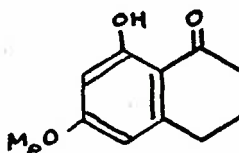
Curvin

Curvularia siddiqi

Curvulol

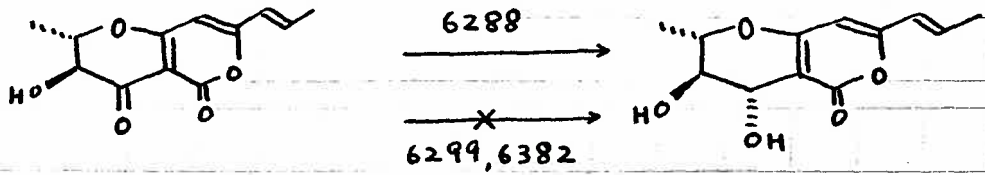
Curvularia siddiqi

O-Methylcurvulinic acid

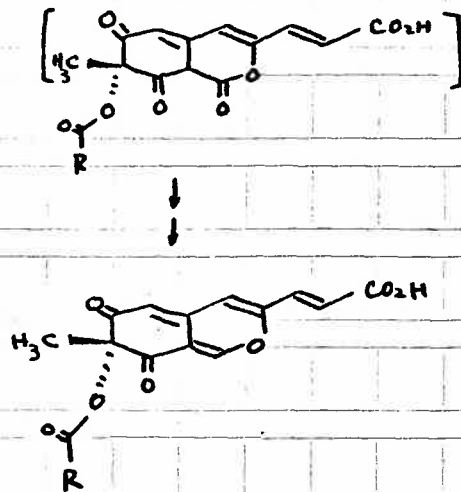
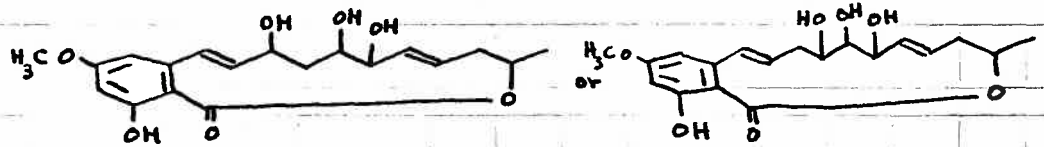
Curvularia siddiqi

合成に關与する酵素は、部分的に精製されて
 いるが multi-enzyme complex (多酵素複合体) をな
 してあり、ポリケト鎖の伸長は、この多酵素
 複合体上で何回縮合反応が繰り返されるかで
 決まるとされて⁽⁴⁵⁾いる。Cochliotolus lunata の場合、
 菌株の相異で生産されるポリケチドの長さが
 異なることは、この縮合に關与する酵素(系)の
 アイソマーではあるうが、質的な相異を意味し
 て⁽⁴⁵⁾いると考えられる。

第2に、縮合反応が終了した後の環化に至
 る生合成過程での類似性と相異性があげられ
 よう。Lunatoic acid A, B, d-acetylornicinol, P-C₁₉化合物
 等は、同様の環化形式に分類されてしかるべ
 き構造的特徴を有しているように思われる。
 つまり、鎖延長反応の最後に縮合したマロニ
 ル単位のメチレンが求核点となって環化して
 いる点である。このことは、radicinin 類への
 生合成機構に一つの興味ある仮想ルートを提
 案する事が出来る。



第4は、培地を異にした場合に生産される第2次代謝産物の変動である。P-C₁₉化合物は lunatic acid A とはポリケト鎖の長さは異なるが生合成上の環化の段階において両者は極めて近い類似性を持つ、というように思われる。



しかし、これに由来して培地成分の相異によ

て生産されるポリペプチドの鎖の長さや修飾反応が異なり、このことは、多酵素複合体上に位置してゐる各段階の酵素(系)が生育条件の相異を反映し得ることを示してゐるよう思われ、どのようなしくみでこのような相異が生じてくるかは極めて興味深い問題と言えよう。また、これまで培地成分の相異が第二次代謝産物の構造的変化をもたらした例として知られてゐるものは極めて少ないが、多くの抗生物質については、その生産条件の検討は必須事項とされておられ、培地成分の相異による代謝の変動という側面から再考察すべき問題が残されてゐるよう思われる。

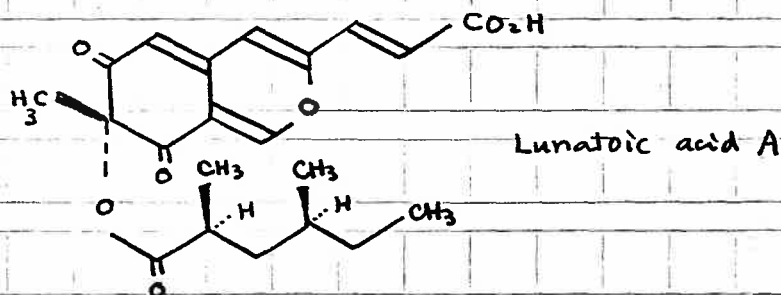
また生産物の構造が、同じ種に属するカゼでも菌株によつて著しく異なる点に関しては、最近放線菌群によつてその遺伝学的実体が非染色体遺伝因子 (extrachromosomal genetic element)、即ちプラスミドに支配されるものとして捉えられつつある⁽³²⁾。つまり、抗生物質の生産能力の有無とが、生産量の増減とこのことが、そ

の菌株の持つプラスミドの種類とか数に依存してゐると考えられ始めてゐる。

本研究で明らかにした代謝産物の構造がう
考えると、Cochliobolus lunata の場合にその菌株特異性
があつて、ポリペプチドの基本的な鎖の長さや
環化反応などで影響を受けてゐるといふ点、プ
ラスミドの関与の可能性を考へてみるの興味
深いと思われり。

結 論

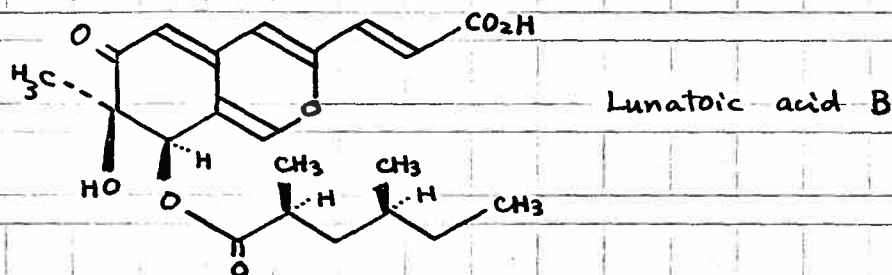
本研究は、D.M. Cayley が 1923 年に発見した aversion 現象—同種のカビの異系統間拮抗現象の化学的解明を行、たものであり、イネのにせ稻熱病菌として知られる *Cochliobolus lunata* の IFO (発酵研究所) 保存の 10 菌株間の aversion 現象を取り上げ、*C. lunata* IFO. 5997 菌の生産する aversion factor を単離し、lunatoic acid A と命名したその新代謝産物の化学構造を物理化学的証拠から下記の如くと決定した。Lunatoic acid A は



他の 8 種の IFO 菌株に対して、液体希釈法では 3~12 %/ml の濃度でその生育を阻害したが、5997 菌、および 5997 菌とは aversion を示さなかつた 6586 菌に対しては 100 %/ml が必要であった。また、lunatoic acid A はバクテリアには全く無効で、カビ類でも多くは 100 %/ml、なにし

それ以上の濃度が必要であったが、イネの稻熱病菌 *Pyricularia oryzae*, およびブドウの晚腐病菌 *Glomerella cingulata* には 50 μ /ml であった。

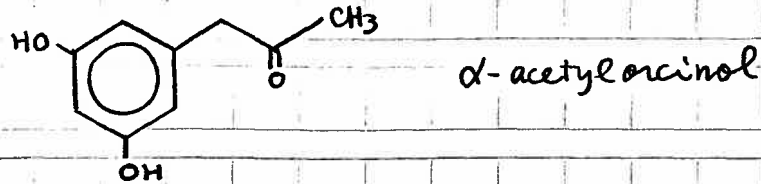
また, *C. lunata* IFO. 5997 菌の生産する関連代謝産物 lunatoic acid B を同時に単離し, その化学構造を下式と決定した。Lunatoic acid B は, 11 μ



の菌株に対しても 100 μ /ml の濃度でその生育を阻害した。

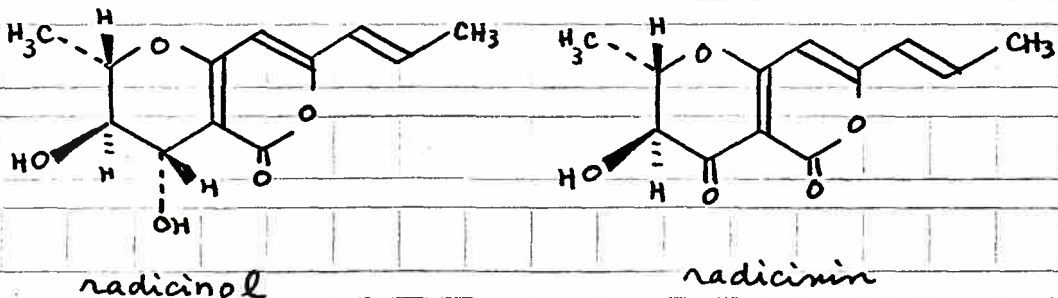
次に, 他の IFO. 菌株の生産する代謝産物, 特にポリケチド類についてその化学構造を明らかにする目的で検索を行い, IFO. 6586 菌から微量ながら lunatoic acid A を単離, 同定した。6586 菌は, 5997 菌とは aversion を示さなかった唯一の菌株であった。IFO. 6291, 6299, 6382 菌株からは新代謝産物 α -acetyl ursinol を単離し, その構造を合成した標品との比較により確

認した。



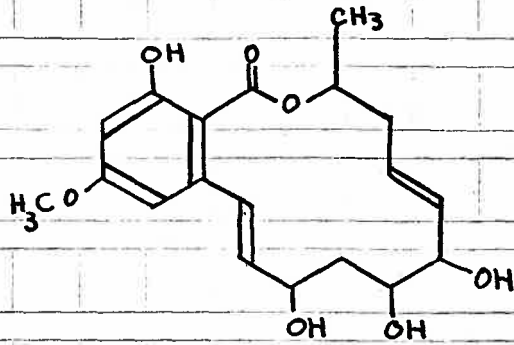
IFO. 6288, 6299, 6382 菌株からは既知の代謝産物 radicinin を単離, 同定した。

IFO. 6288 菌株からは, 新代謝産物 radicinol を単離し, その化学構造を下式と決定し, 同時に未だ不明である radicinin の絶対構造を CD 法により下式と決定した。

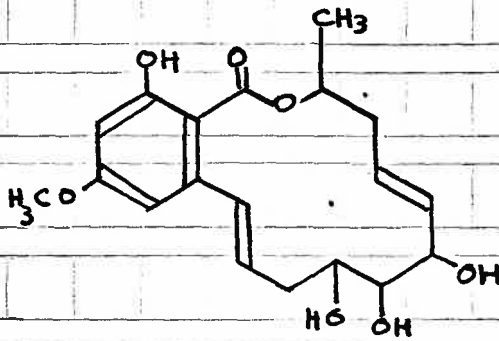


また, C. lunata IFO. 5997 菌株の aversion 現象は培地をモルト培地からポテト培地に変えることにより消失した事実注目し, 5997 菌のポテト培地での代謝産物について精査し, 新代謝産物 P-C₁₉ 化合物の存在を認め, その平面

構造を下式の如くと提出した。



or



〔 実験の部 〕

培地には下記試薬を用いた。

Malt extract : Bacto Malt extract "Difco" certified (Difco Laboratories, Detroit, Michigan USA), または、オリエンタル酵母 KK. の "マルツエキス"

Peptone : Peptone "katayama" (片山化学, 大阪)

Agar : 1st Grade (片山化学, 大阪)

Dextrose, Anhydrous : 1st Grade (片山化学, 大阪)

菌株は大阪の発酵研究所より入手し、菌株の保存は、モルト寒天培地に 30℃, 暗所で斜面培養後, 14℃, 暗所に静置して保存し、使用に際し再びモルト寒天培地に生育させた。保存菌は 3~6 ヶ月に一度移殖した。

各種クロマトグラフイ - には下記のものを用いた。

カラムクロマトグラフイ - : Mallinckrodt "Silicic Acid" 100 Mesh (Powder) $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ Analytical reagent (Mallinckrodt chemical works). Aluminiumoxid aktiv neutral (Aktivität-

stufe I) für die Säulen-chromatographie Al_2O_3 (Merck). Silica Gel (For chromatographic use) (100-200 mesh) (Kanto Chemical Co., Inc). Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals).

薄層クロマトグラフ, - : Kieselgel HF₂₅₄, Kieselgel pF₂₅₄, Kieselgel 60 pF₂₅₄ (Merck). 分析用には 0.25mm, 0.5mm, 分取用には 0.5mm, 0.75mm, 1mm の厚さの薄層を用いた。

溶媒: 使用した溶媒は全て蒸留により精製して用いた。

機器分析: 下記の装置によった。

IR: JASCO IR-G

UV: Hitachi EPS-3T

MS: JEOL JMS-D100, JEOL JMS-01SG

NMR: JEOL MH-100, JEOL FX-100

CD: JASCO J-40

$[d]_D$: JASCO DIP-4

融点測定は, Yanagimoto micro melting point apparatus を用いた, 未補正である。

活性物質の予備的安定性試験

Cochliobolus lunata IFO. 5997 菌をモルト培地で培養した培養汁液 10 ml を試験管に入れ、① 5%塩酸で TB 赤 ($\text{pH} < 2$) にしたものの二本、② 0.1 N 水酸化ナトリウムで BTB で淡緑青色 ($\text{pH} \sim 7$) にしたものの二本、③ 0.1 N 水酸化ナトリウムで TB 青 ($\text{pH} > 9$) にしたものの二本を作り、沸騰水中に 5 分間浸した後、②、③ は 5%塩酸で TB 赤にした後、酢酸エチルで抽出 (10 ml \times 3 回) し、有機層を、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下に濃縮して残渣を 1 ml の酢酸エチル溶液とし、バルゴを 1 回浸した後、バルゴ法で 2 日後に阻止円形成の有無を観察した。〔結果: $\text{pH} > 9$ 阻止円形成無し (分解不活性化)、 $\text{pH} \sim 7$ 小さな阻止円 (やや不安定)、 $\text{pH} < 2$ ジニトロールと同一阻止円 (安定)〕。

生物試験方法

1. 液体希釈法 綿栓した試験管 (内径 15 mm \times 長さ 18 cm) を加熱殺菌 (150°C , 2 時間 - -

液) 後, モルト培地 5 ml を入れ, オートクレーブ (110~120°C, 20分) 後, エタノールで所定濃度に希釈した lunatoic acid A (またはそのメチルエステル) を 0.05 ml 注射器で注入し (最終濃度が 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5 %/ml の系列になるように原液を調製した), よく攪拌後, 前培養したスラントから 1 白金耳菌糸片を接種し, 30°C, 暗所で振盪培養し, 生育の有無を肉眼で観察した。〔結果: 例えば 6299 菌 (感受性菌) の場合には, コントロール (エタノールのみ添加したものの) および 1.5 %/ml の lunatoic acid A 含有の培地中では, 4 日後には, 試験管全面に菌が繁茂したが, 3.125 %/ml ではペレット状菌糸塊となり, 直径 0.7 cm の大きさになり, 6.25 %/ml では更に小さなペレット状菌糸塊で直径 0.4 cm の大きさで, 12.5 %/ml 以上では生育は認められなかった。また, 5997 菌 (生産菌) は, 4 日後には, コントロールでは黒色を帯びたペレット状となり, だが, 50 %/ml では赤色を帯びたペレット状に生育し, 100 %/ml では,

ペレット状の菌糸塊が死滅様になつて白色の細い糸状になつた。

2. 寒天希釈法 直径9cmの乾熱滅菌シャー

ーレに、最終濃度が100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5 μ /ml になるように調製した標品のエタール溶液から0.1ml分注し、まだ固化してないモルト寒天培地10mlを加え、よく混和させた後、固化させ、試験菌を1白金耳接種して、30 $^{\circ}$ C、暗所に所要日数(2~5日)培養し観察した。

3. 分離に用いたバイオアッセイ方法 粗

抽出物から目的とする aversion factor の分離の指標には、以下のバイオアッセイ法を用いた。

直径9cmの乾熱滅菌したシャーレにモルト寒天培地10mlを入れ固化した後、よく繁殖した6299菌の菌糸片の殺菌水溶液をまだ固化してないモルト寒天培地10mlに加えて懸濁させ、上記の固化した培地上に重層し固化させ

た。直径 0.8 cm の厚さ 1° ル 7° (Toyo PAPER DISC for Anti-biotic examination < Thick > size 8^{MM} DIA.) を所定濃度のサンプル溶液に入れ、気泡が止んだ後、殺菌ピペットで取り出し、風乾後、上記の寒天培地上にのせた。2日間、30℃、暗所で培養した後、形成された阻止円の大きさを測定した。所定濃度のサンプル溶液の調製には、培養原液に対する 100 倍の濃縮度になるように抽出物に有機溶剤（酢酸エチルまたはエタノール）を加えて行った。この濃縮度では、直径約 3.0~3.5 cm の大きな阻止円が形成されたので結果の判定に有用であった。

Lunatoic acid A x 4 エステルのアミン化

反応 : Lunatoic acid A x 4 エステル 14.5 mg に, アミン化 (0.8) : 水 = 1 : 1 の溶液 1 ml を加え, 室温に 30 分放置した後, 5% 塩酸を加え, 生成する赤色の沈殿物を濾過し, アミン体を赤色の無定形粉末として 7.0 mg 得た。またこのアミン体は, 希エーテル溶液中振盪することにより, 7.0 mg 得た。[アミン体 : mp 105 ~ 109° (decomp.), $C_{22}H_{27}O_6N$ ($M^+(M/e) \approx 0.1860$; calcd. 401.1838), UV (λ_{max}^{MeOH} nm(ϵ): 291 (28,200), 344 (9,100), 510 (2,800). $\lambda_{max}^{MeOH-1N NaOH}$ nm(ϵ): 298 (42,400), 340 (13,500), 510 (3,600). $\lambda_{max}^{MeOH-1NHCl}$ nm(ϵ): 290 (24,800), 385 (5,500).]

Lunatoic acid A x 4 エステルの加水素分解

Lunatoic acid A x 4 エステル 52 mg をメタノール 5 ml に溶かし, パラジウム黒 2.5 mg を加えて, 水素ガス下, 室温で 16 時間攪拌した後, 濾過し, 濾液を減圧下濃縮して得た残渣を, 1 ml のエーテル溶液とし, エーテル性ジアゾメタンの溶液を 2-3 ml 加え, 発泡が止んだ後,

減圧下に溶媒を留去し、残渣を silicic acid 1.5g の
 カラム (内径 1cm × 高さ 5cm) にかけ、ヘキサン (10 ml),
 10% 酢酸エチル - ヘキサン (10 ml), 50% 酢酸エチ
 ル - ヘキサン (10 ml), 酢酸エチルで順次溶出
 した。ヘキサン溶出区分は, 2,4-dimethyl hexanoate
 を含有していることがガスクロマトグラフィ
 - で確認された。50% 酢酸エチル - ヘキサン
 溶出区分を, 減圧下濃縮して, 淡褐色のオイ
 ル 39 mg を得た。このオイルはイソクロマン誘
 導体であることがスペクトルデータより示さ
 れた。[ジフェニール体: $C_{14}H_{18}O_5$ ($M^+(C^{14})$ 266.1121;
 calcd. 266.1154), UV (λ_{max}^{MeOH} nm(ϵ): 275 (~1,200), 282 (~1,300),
 $\lambda_{max}^{MeOH-1N NaOH}$ nm: 289.)]

また, このオイルを無水酢酸 2ml, 乾燥ポリ
 ジン 1.5 ml で一夜反応させた後, 氷水中に入れ
 , エーテル, 酢酸エチル (計 30 ml) で抽出し,
 有機層を, 飽和炭酸水素ナトリウム, 5% 塩酸
 , 水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリ
 ムで乾燥させ, 減圧下に溶媒を留去して粗
 ジアセチル化物 53 mg 得た。このジアセチル

体を，薄層クロマト ($20\text{cm} \times 20\text{cm} \times 0.5\text{mm}$) にフイード
 し，30% 酢酸エチル - ヘキサン で展開後， R_f
 $= 0.66$ の UV 吸収 ($\lambda_{\text{max}} 2536\text{\AA}$) でクエン酸を示
 すバンドをかき取り，酢酸エチルで溶出し，
 減圧下濃縮して無定形粉末を得た。この粉末
 を，エーテル - 石油エーテルで結晶化させ，
 ジアセテート体を無色針状結晶として 9 mg 得
 た。 [ジアセテート体 : mp $71 - 75^\circ\text{C}$, $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_7$
 ($[\text{M}-\text{Ac}]^+$ (m/e) 307.113 ; calcd. 307.118) , UV ($\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm(ϵ) :
 264 (500) , 272 (470) .) , PMR (δ (CDCl₃) 6.79 (1H, s) , 4.79 (1H, d, $J=15\text{Hz}$) , 4.50 (1H, d, $J=15\text{Hz}$) , 4.23 (1H, m) , 3.70 (3H, s) ,
 2.70 (1H, d, $J=6\text{Hz}$) , 2.52 (1H, t, $J=7\text{Hz}$) , ~2.0 (1H, m) , 2.29 (6H, s) , 1.92 (3H, s))]

Lunatic acid A エチルエステル の部分接触還元

Lunatic acid A エチルエステル 約 5 mg を酢酸エ
 チル 0.5 ml に溶解させ，パウジウム黒をエミク
 ロスポンジに量取り加え，水素ガス下に，室
 温で 40 分間攪拌後，濾過し，濾液を濃縮後，
 薄層クロマト ($5\text{cm} \times 20\text{cm} \times 0.5\text{mm}$) にフイードし，

20% 酢酸エチル - ベンゼンで展開し, $R_f = 0.43$ の UV ランブ ($\lambda_{max} 3650 \text{ \AA}$) で紫の螢光を發するバンドをかき取り, ジヒドロ体 3.54 mg を得た。また, $R_f = 0.52$ にはテトラヒドロ体, $R_f = 0.64$ には出發物質が含まれてゐることから MS スペクトルで示された。 [ジヒドロ体: $C_{22}H_{28}O_7$ ($M^+(m/e)$ 404), UV (λ_{max}^{EtOH} nm(ϵ): 220 (16,900), 329 (19,000)), PMR (δ ($CDCl_3$) 7.84 (1H, d, $J=1 \text{ Hz}$), 6.14 (1H, s), 5.52 (1H, d, $J=1 \text{ Hz}$), 3.72 (3H, s), 2.69 (4H, AB q. like), 2.58 (1H, m), 1.51 (3H, s), 1.18 (3H, d, $J=7 \text{ Hz}$), 0.91 (3H, d, $J=6 \text{ Hz}$), 0.88 (3H, t, $J=6 \text{ Hz}$)), CD ($\Delta\epsilon_{392} 0$, $\Delta\epsilon_{351} - 4.15$, $\Delta\epsilon_{297} 0$, $\Delta\epsilon_{274} + 4.25$, $\Delta\epsilon_{254} 0$, $\Delta\epsilon_{250} - 0.48$, $\Delta\epsilon_{247} 0$)]

Lunatic acid B x エチルエステル の部分接触還元

Lunatic acid B x エチルエステル約 2mg を酢酸エチル 0.5 ml に溶解後, パラジウム黒を 1 ミクロンパウダー量取り加え, 水素ガス下に, 室温, 30 分間攪拌後, 濾過し, 濾液を減圧下濃縮後, 薄層クロマト (10 cm x 20 cm x 0.5 mm) にフイットし, 20% 酢酸エチル - ベンゼンで 3 回展開後

, $R_f = 0.58$ の UV ラニ 7° ($\lambda_{\max} 3650 \text{ \AA}$) で紫色の螢光を發するバンドをかき取り, 酢酸エチルで溶出し, ジヒドロ体を 0.97 mg 得た。 [ジヒドロ体: $C_{22}H_{30}O_7$ (M^+ (m/e) 406), UV ($\lambda_{\max}^{EtOH} \text{ nm}(\epsilon)$: 234 (6,000), 343 (19,000)), PMR (δ ($CDCl_3$) 7.42 (1H, d, $J=1\text{ Hz}$), 6.02 (1H, s), 5.52 (1H, s), 5.38 (1H, d, $J=1\text{ Hz}$), 3.83 (1H, s), 3.71 (3H, s), 2.67 (4H, AB q. like), 2.54 (1H, m), 1.32 (3H, s), 1.06 (3H, d, $J=7\text{ Hz}$), 0.81 (3H, d, $J=6\text{ Hz}$), 0.79 (3H, t, $J=6\text{ Hz}$)), CD ($\Delta\epsilon_{389} 0$, $\Delta\epsilon_{352} +11.8$, $\Delta\epsilon_{329} 0$, $\Delta\epsilon_{310} -6.36$, $\Delta\epsilon_{277} 0$, $\Delta\epsilon_{265} +0.50$, $\Delta\epsilon_{251} 0$, $\Delta\epsilon_{235} -3.43$)]

Dihydroxynatoic acid B × 4 エステルのアルカリ

加水分解: Dihydroxynatoic acid B × 4 エステル約 0.4 mg をメタノール 0.5 ml に溶かし, メタノール性飽和炭酸カリウム溶液を 3 滴加えた。溶液は淡黄色を呈し, 室温, 50 分間攪拌した後, 薄層クロマト ($5\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 0.5\text{ mm}$) にフイードし, アセトン: ベンゼン = 1:1 で展開後, UV ラニ 7° ($\lambda_{\max} 3650 \text{ \AA}$) で暗紫色の螢光を發する $R_f = 0.45$ のバンドをかき取り, アセトンで溶出し

ジオール体を得た。 [ジオール体: MS (m/e)
 280 (M^+), 265 (M^+-15), 263 (M^+-17), 262 (M^+-18), 249 (M^+-31),
 237 (M^+-43), 235 (M^+-45), 221 (M^+-59), 206, 193.]

Dihydrodeacyl luvatoic acid B × 4ルエステルのアセ

トタイド形成: 上記ジオール体には, 2,2-ジメ
 トキシプロパン 3 滴, p-トルエンスルホン酸
 結晶 1 片を加え, 室温, 20 分間静置した後,
 薄層クロマト (5cm × 20cm × 0.5mm) にフィードし,
 アセトン: ベンゼン = 1:1 で展開後, 酢酸
 エチルで溶出した。 [アセトタイド体: MS
 (m/e) 320 (M^+), 305 (M^+-15), 292 (M^+-28), 289 (M^+-31), 277
 (M^+-43), 263 (M^+-57), 262 (M^+-58).]

2, 4 - dimethylhexanoic acid の合成

市販の D, L - 2 - メチル - 1 - ブタノール 8.8g を 50 ml のエロナシ型フラスコに入れ、氷 - 食塩浴で冷却しつつ、三臭化リン 3.5 ml を滴下した。内温は 12℃ まで上昇した。滴下後、一夜攪拌した後、常圧で蒸留し、留分 bp. 103 - 116℃ の分画を水洗し、下層を塩化カルシウムで乾燥してブロミド 7.92g (収率 = 52%) 得た。乾燥エタノール (炭酸ジエチル、ナトリウムより蒸留したもの) 15 ml を、内容 30 ml のナス型フラスコに入れ、ナトリウム 0.73g を細片にしたものを加え、1 時間攪拌した後、メチルマロニ酸ジエチル 5.3g を加え、10 分間攪拌した後、氷水浴で冷却し、上記ブロミド 4.5g を、5 分間で加えた。80℃ に 20 分間加熱した後、放冷し、一夜攪拌した後、少量の水を加えエーテル (3 回、計 100 ml) で抽出した。エーテル層を水、飽和炭酸水素ナトリウム、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下溶媒を留去し、残渣を減圧蒸留した。留

分 bp. 98°C (15 mm.) は未反応のメチルマロニ酸ジエチルで 0.9 g, bp. $120-123^{\circ}\text{C}$ (14-15 mm.) は目的とするアルキル化物で 4.7 g 得た (文献値: bp. $120-123^{\circ}\text{C}$ (14 mm.)). このアルキル化物 4.7 g を, 氷酸化ナトリウム 5.5 g, 水 15 ml, メタノール 50 ml の混合溶液となし, 20 時間加熱還流後, 溶媒を留去して約 15 ml に濃縮し, 6N 塩酸で TB 赤にし, エーテルで抽出した。エーテル層を水, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 減圧下溶媒を留去した残渣を, 160°C , 2 時間加熱後, 減圧蒸留し, 留分 bp 122°C (19 mm.) を 2.1 g 得た (文献値: bp $113-116^{\circ}\text{C}$ (18 mm)).

[2,4-dimethylhexanoic acid : PMR (δ (CDCl_3)) 10.34 (1H, bs), 2.53 (1H, m), 1.21 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 0.94 (3H, d, $J=6\text{Hz}$), 0.92 (3H, t, $J=6\text{Hz}$)]

2,3-dimethylhexanoic acid の合成

2-メチルメタノール 8.8 g を内容 50 ml の二口フラスコに入れ, 氷浴で冷却しつつ, $-5.6 \sim 5^{\circ}\text{C}$ で三臭化リン 3.5 ml を滴下した。30 分間攪拌した

後、氷浴を取除き、室温で一晩攪拌後、常圧蒸留して、留分 (bp 88°C以上) の留出液を水洗後、塩化カルシウムで乾燥し、粗ブロミド 8.6g を得た。このブロミド 4.5g を、メチルマロニ酸ジエチル 5.23g、ナトリウム 0.71g、乾燥エタノール 15 ml の混合溶液に滴下し、83°C で 30 分間加熱還流後、少量の水を加えてエーテルで 3 回抽出し、エーテル層を 5% 塩酸、5% 炭酸水素ナトリウム、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去して残渣を 3.7g 得た。このアシル化物 3.7g をエタノール性 2N 水酸化カリウム 20 ml に加え、80°C で 20 分間還流した後、エタノールを留去し、残渣に水を加え、6N 硫酸で TB 赤にし、エーテルで 3 回 (計 80 ml) 抽出し、エーテル層を水洗後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去して残渣を油状に得た。このオイルを 160°C に 1.2 時間加熱し、放冷後、水を加えてエーテルで抽出し、エーテル層を飽和炭酸水素ナトリウムで再抽出し、

水層を 6N 硫酸で TB 赤にした後、エーテルで抽出し、エーテル層を氷洗後、無水硫酸ナトリウムで乾燥後減圧下に溶媒を留去して、目的物 1.14g のオイルを得た。 [2,3-dimethylhexanoic acid : PMR (δ (CDCl₃) 10.50 (1H, m), 2.51 (1H, m), 1.14 と 1.19 (3H, 各々 d, J=7 Hz), 1.00 (3H, d, J=6 Hz), 0.95 (3H, t, J=6 Hz))]

2,5-dimethylhexanoic acid の合成

市販のイソアミルアルコールを常圧蒸留して留分 (bp 128-131°C) のものを得た。このイソアミルアルコール 46.8g を内容 100 ml の三口フラスコに入れ、攪拌しつつ、三臭化リン 20 ml を氷浴で冷却して 0°C 以下になるような速度で 3 時間かか、て滴下した。氷浴を取除き、攪拌しつつ室温に戻した後、一昼夜放置した。ワイドマ-蒸留器を取りつけ常圧蒸留して留分 (bp. 119-120.5°C) の留出液を集め、氷水で 3 回 (計 60 ml), 5% 炭酸水素ナトリウムで 3 回 (計 30 ml), 水で 4 回 (計 60 ml) で洗浄し、塩

化カルシウムで乾燥させ、イソアミルグロミド 54.0g を得た (収率=67.5%)。内容 500 ml の四口フラスコに乾燥エタノール 246 ml を入れ、ナトリウム 8.56g を細片にして加え、2 時間攪拌した後、この白く濁った溶液にメチルマロン酸ジエチル 65g を 30 分間かき混ぜ滴下した。108℃ に加熱して内温 80℃ に約 5 分間保ち、その後氷浴で冷却し、上記のイソアミルグロミド 54.0g を滴下し始め内温 34℃ で滴下終了後、加熱して 118℃ に 2 時間保ち、その後、加熱を止め酢酸 2~3 ml を加えて BTB 淡緑色にし一夜放置した。ヘンベル精留塔を取りつけエタノールを蒸留後、残渣に水 250 ml を加え、上層と下層とに分別し、下層をベンゼン 100 ml で 3 回 (計 300 ml) で抽出したベンゼン層と上記上層とを一蒸にし、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を常圧にて 320 ml 留去し去、その後、2N 水酸化カリウム 300 ml を加え、3 時間還流後エタノール 156 ml を常圧にて留去し、残渣に水 300 ml を加え、6N 硫酸 100 ml

を加えて有機層と水層とを分別し、水層をエーテルで2回 (1. 200 ml, 2. 150 ml) 抽出し、エーテル層を上記有機層と混合し、水、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧下溶媒を留去し、残渣を 170°C に2時間加熱した後、減圧蒸留して留分 bp $106-108^{\circ}\text{C}$ (10 mm) , 18.5g 得た (文献値 : $127-130^{\circ}\text{C}$ (18 mm)) 。

[2, 5-dimethylhexanoic acid : PMR (CDCl_3) 11.90 (1H, brs), 2.48 (1H, sextet, $J=7\text{Hz}$), 1.23 (3H, d, $J=7\text{Hz}$), 0.95 (6H, d, $J=7\text{Hz}$)]

d-actylorcinol の合成

(i) 3,5-dimethoxybenzoic acid : 3,5-ジメトキシ安息香酸 16 g. を 15% 水酸化ナトリウム 80 ml に溶かし、ジメチル硫酸 34 ml を加えて、100°C, 3 時間加熱還流させた後、放冷し 6N 塩酸で TB 赤にし、生成した沈殿物を濾取し、メタノール-酢酸エチルで溶解させ、溶媒を減圧下に濃縮して粗生成物を油状に 15.2 g 得た。精製するに
 以下に示す反応に用いた。 [3,5-dimethoxybenzoic acid
 : PMR ($S(CDCl_3 + CD_3OD)$) 7.15 (2H, d, $J=2Hz$), 6.60 (1H, t, $J=2Hz$),
 3.76 (6H, s)]

(ii) 3,5-dimethoxybenzyl alcohol : (i) で調製の 3,5-ジメトキシ安息香酸 15 g を乾燥エーテル (水素化アルミニウムリチウムより蒸留したもの) 250 ml に溶解させ内容 1 l の四口フラスコに入れ機械的に攪拌しつつ、水素化アルミニウムリチウム 4 g を乾燥エーテル 250 ml に懸濁した溶液をゆよくりと滴下し、滴下終了後 1 時間加熱還流し、氷浴で冷却しつつ水 25 ml を滴下し、濃硫酸 16 ml と水 330 ml の混液と氷浴で冷却し

た溶液を加えた。分離したエーテル層を5%塩酸、飽和炭酸水素ナトリウムで各々2回洗浄後、水洗し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、減圧下に溶媒を留去し、粗生成物を11.6g、油状に得た。精製するに与る次の反応に用いた。 [3,5-dimethoxybenzyl alcohol : PMR (δ (CCl₄-CH₃OH) 6.46 (2H, d, J=2Hz), 6.28 (1H, t, J=2Hz), 4.52 (2H, s), 3.74 (6H, s))]

(iii) 3,5-dimethoxybenzyl chloride : (ii) で調製した3,5-ジメトキシベンジルアルコール11.6gを乾燥エーテル150mlに溶解させ、乾燥ピリジン1mlを加え、トリフェニルホスファイトより蒸留した塩化チオニル10mlを乾燥エーテル100mlに加えた溶液を入れた。時々手で振盪し、更に塩化チオニル7mlを追加し、30分間放置した後、冷水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下に溶媒を留去して粗ワロリド11gを得た。精製するに与る次の反応に用いた。

[3,5-dimethoxybenzyl chloride : PMR (δ (CCl₄-CDCl₃-Et₂O) 6.54 (2H, d, J=2Hz), 6.38 (1H, t, J=2Hz), 4.48 (2H, s), 3.78 (6H, s))]

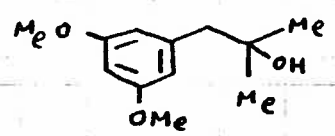
(iv) 3,5-dimethoxybenzyl nitrile : (iii) で調製した 3,5-ジメトキシベンジルクロリド 11g, エタノール 200 ml, シアン化カリウム 27g, 水 52 ml の混合物を 3 時間加熱還流させた後, 氷上にそそいで固形物を濾取し, 粗 = トリル 7.1g を得た。
 [3,5-dimethoxybenzyl nitrile : PMR (δ (CDCl₃) 6.48 (3H, m), 3.79 (6H, s), 3.69 (2H, s))]

(v) 3,5-dimethoxyphenylacetic acid : (iv) で調製した 3,5-ジメトキシベンジルニトリル 7.1g を 5N 塩酸 100 ml 溶液とし, 7.5 時間加熱還流させた後, エタノールで抽出し, エタノール層を飽和炭酸ナトリウムで再抽出し, 水層を 6N 塩酸で TB 赤にし, 生成した固形物を濾取して, 粗 3,5-ジメトキシフェニル酢酸 2.5g 得た。一部水から再結して無色針状結晶, 融点 99.5 - 101.5 °C (文献値: 99 - 100 °C) を与えた。 [3,5-dimethoxyphenylacetic acid : PMR (δ (CDCl₃) 6.51 (3H, m), 3.82 (6H, s), 3.61 (2H, s))]

(vi) 3,5-dimethoxyphenyl acetone : (v) で調製した 3,5-ジ

メトキシフェニル酢酸 244mg を乾燥エーテル 10 ml に溶かした溶液を、ヨウ化メチル 2 ml, リチウム 396 mg から作, たメチルリチウムのエーテル溶液 10 ml にすばやく加えた。10 分間加熱還流後, エーテル性の水を加えた後, エーテルで抽出し, エーテル層を水洗後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥させ, 減圧下に濃縮して油状物を得た。この油状物は $R_f=0.58$ と $R_f=0.42$ (30% 酢酸エチル-ヘキサン) の 2 成分からなり, この混合物を薄層クロマト (20cm x 20cm x 0.5mm, 2 枚) にフイードし, 30% 酢酸エチル-ヘキサンで展開後, 各々のバンドをかき取り, 酢酸エチルで溶出し, $R_f=0.58$ の 3,5-ジメトキシフェニルアセトン 120 mg 得た。 $R_f=0.42$ のスポットを与えるものは PMR スペクトルから下記の構造を有するものであることが示された。

[$R_f=0.58$, 3,5-dimethoxyphenyl acetone : $M^+(m/e)$ 194, PMR (δ (CDCl₃)) 6.44 (3H, s), 3.80 (6H, s), 3.63 (2H, s), 2.14 (3H, s)]

[$R_f=0.42$,  : PMR (δ (CDCl₃)) 6.44 (3H, s), 3.81 (6H, s), 2.51 (2H, s), 1.81 (1H, bs), 1.24 (6H, s)]

(vii) 3,5-dihydroxyphenylacetone (d-acetylornicinol): (vi) で調製した 3,5-ジメチルフェニルアセトン 116 mg を酢酸 2 ml, 47% 臭化水素酸 2 ml と混ぜ, 120°C, 2時間還流させた後, 氷上にとろぎ, 酢酸エチルで2回抽出し, 飽和炭酸水素ナトリウム, 水, 飽和食塩水で洗浄後, 硫酸マグネシウムで乾燥し, 減圧下に濃縮後, 薄層クロマト (20 cm x 20 cm x 0.5 mm) にフイードし, 60% 酢酸エチル-ヘキサンで展開後, $R_f = 0.6$ の UV ラニフ ($\lambda_{max} 2536 \text{ \AA}$) でクエーキングを示すバンドをかき取り, 酢酸エチルで溶出し, d-アセチルオルニチン 1-イルを 25 mg 得た。 [d-acetylornicinol: M^+ (m/e) 166, PMR (δ (d₆-acetone) 8.26 (2H, s), 6.31 (3H, s), 3.58 (2H, s), 2.10 (3H, s))]

Radicinin の水素化ホウ素ナトリウム還元

Radicinin 18.1mg のメタノール (1.5ml) の懸濁溶液に、攪拌しつつ、水素化ホウ素ナトリウム (17.1mg) を含んだメタノール (0.5ml) を滴下し、30 分間攪拌後、水を加え、5%塩酸を数滴加えて TB 赤とし、酢酸エチルで抽出した。有機層を水洗、飽和食塩水で洗ひ、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮して油状の残渣を得た。この油状物は、薄層クロマトグラフィ (10% アセトン - エーテル) では近接した2つのスポット ($R_f = 0.75$ と $R_f = 0.70$) を与えた。 $R_f = 0.75$ は radicinol の R_f 値と一致した。また、70% 酢酸エチル - ヘキサンでは、 $R_f = 0.40$ と $R_f = 0.36$ で、 $R_f = 0.40$ のスポットが radicinol と一致した。この油状の残渣を薄層クロマト (20cm x 20cm x 0.5mm) にフイードし、5% アセトン - エーテルで2回展開後、UV ランクで各バンドを検出し、酢酸エチルで溶出し、各成分を得た。[$R_f = 0.75$, radicinol : 7.9 mg, oil, $[\alpha]_D^{28} -157 \pm 1^\circ$ (c 0.66, CHCl₃) (radicinol の $[\alpha]_D -175^\circ$ から 89.7% の光学純度を有する)] ,

薄層クロマトグラフ, MS スペクトル, IR
 スペクトル, PMR スペクトルは天然物と完全
 に一致した。 $R_f = 0.70$, 4-*epi*-radicinol : 5.7 mg, 無
 定形粉末, $[\alpha]_D^{20} -92 \pm 2^\circ$ (c 0.475, CHCl_3), MS (m/e) 238,
 220, 205, 204, 197, 189, 181 (base peak), 153, 152, 139, 137,
 111, 97, 69, 58, 41], IR ($\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3} \text{ cm}^{-1}$: 3425, 1685, 1655,
 1615, 1570.), PMR (δ (CDCl_3) 6.75 (1H, dq, $J = 7.0, 16 \text{ Hz}$),
 5.99 (1H, dq, $J = 1.5, 16 \text{ Hz}$), 5.85 (1H, s), 4.78 (1H, d, $J = 4.0 \text{ Hz}$),
 4.30 (1H, dq, $J = 6.5, 8.5 \text{ Hz}$), 3.60 (1H, dd, $J = 4.0, 8.5 \text{ Hz}$), 1.90
 (3H, dd, $J = 7.0, 1.5 \text{ Hz}$), 1.45 (3H, d, $J = 6.5 \text{ Hz}$)]

4-*epi*-radicinol のアセトナイド形成

4-*epi*-radicinol 4.03 mg を 2,2-ジメチルプロパノール
 に 0.5 ml に溶かし, p-トルエンスルホン酸の
 結晶 2~3 片を加え, 室温 1 時間攪拌後, 薄層
 クロマト ($5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm} \times 0.5 \text{ mm}$) にアポドール, 60%
 酢酸エチル-ヘキサンで展開し, UV ランクで
 検出し, 酢酸エチルで溶出しアセトナイド
 体を油状に得た。 [アセトナイド体 : MS (m/e
 278, 263, 221, 203 (base peak), 177, 69)]

謝 辞

本研究テーマを与えられ、終始御指導、御鞭達を賜りました丸茂晋吾助教授に深く感謝致します。

また終始御激励と御鞭達を賜りました京像桂教授に深く感謝致します。

また本研究の遂行にあたり御協力して戴きました加藤夏樹、和田弘次郎の両博士、および服部宏之氏を始め農薬研究室の諸氏に感謝致します。

また有益な御助言と顕微鏡観察で御世話になりました富山宏平教授と野末雅之氏に感謝致します。

また下記の方々に多大の御苦勞と御協力をして戴きましたことを感謝致します。

大量培養：科研化学株式会社

ジャ-培養：服部宏之氏

CD測定：加藤夏樹博士

元素分析：北村繁幸氏

高分解能質量分析：服部宏之、片山正人、

北村繁幸の各氏。

文献調査：(京大)小清水弘一教授。

御助言：(理研)安西謙太郎博士，(京大農薬
施設)津田盛也博士，(草地研)西原
夏樹博士。

〔参考文献〕

(1) D.M. Cayley, J. Genetics, 13, 353 (1923).

" The phenomenon of mutual aversion between mono-spore mycelia of the same fungus (Diaporthe perniciosa, Marchal). With discussion of sex heterothalism."

(2) B.O. Dodge, Mycologia, 12, No.3 (1920).

" The life history of Ascobolus magnificus. Origin of the asco-carp from two strains."

(3) D.M. Cayley, J. Genetics, 24, 1 (1931).

" The inheritance of the capacity for showing mutual aversion between mono-spore mycelia of Diaporthe perniciosa (Marchal)."

(4) C.L. Porter, Amer. J. Botany, 11, 168 (1924).

" Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi."

(5) 中田覚五郎, 九州帝国大学農学部学芸雑誌, 第1巻, 第4号, 176 (1925).

" 菌核菌一名白絹病菌 (Sclerotium rolfsii Sacc.) に就て 第1報 嫌触現象と種類との関係"

(6) 中田覚五郎, 九州帝国大学農学部学芸雑誌, 第1巻, 第5号, 310 (1925).

" 菌核菌一名白絹病菌 (Sclerotium rolfsii Sacc.) に就て 第2報 嫌触現象の形態的観察並に其の原因"

- (7) 西門義一, 大原農業研究所報告, 第4号, 203 (1928).
 "第7章 第7節 ヘルミントスポリウム属菌の培養上に於ける嫌触現象".
- (8) M. R. Vandendries, Compt rend. 193 (1934).
 " Les barrages sexuels chez Lenzites betulina (L)Fr. "
- (9) G.H. Banbury, J. Exp. Botany, 3, 77 (1952)
 " Physiological studies in the Mucorales PartI The phototropism of sporangiophores of Phycomyces blakesleeanus."
- (10) 岩本良太郎, 京都大学学位論文 (1961).
- (11) G. Rizet, and J. Schecroun, C.R. Acad. Sci., 249, 2392 (1959).
 " Sur les facteurs associés au couple de gènes S-s chez le Podospora anserina."
 J. Bequeret, Nature New Biology, 235, 56 (1972)
 " Protoplasmic incompatibility: Possible involvement of proteolytic enzymes."
 J. Bequeret, and J. Bernet, Nature New Biology, 243, 94 (1973)
 " Proteolytic enzymes and protoplasmic incompatibility in Podospora anserina."
 J. Labarere, J. Bequeret, and J. Bernet, J. Bacteriology, 120, 854 (1974).
 " Incompatibility in Podospora anserina: Comparative properties of the antagonistic cytoplasmic factors of a nonallelic system."
- (12) R. Blaich, and K. Esser, Molec. Gen. Genetics, 111, 265 (1971).
 " The incompatibility relationships between geographical races of Podospora anserina V. Biochemical characterization of heterogenic incompatibility on cellular level."
- (13) C.A. Williams, and J.F. Wilson, Ann. NY Acad. Sci., 129(1), 853 (1966).
 " Cytoplasmic incompatibility reactions in Neurospora crassa."
- (14) M. Nomura, Ann. Rev. Microbiol., 21, 257 (1967).
 " Colicins and related bacteriocins."

- (15) S. Nozoe, M. Morisaki, K. Tsuda, Y. Iitaka, N. Takahashi, S. Tamura, K. Ishibashi, M. Shirasaka, J. Am. Chem. Soc., 87, 4968 (1965)
" The structure of ophiobolin, a C₂₅ terpenoid having a novel skeleton."
- (16) P. de Mayo, R.E. Williams, and E.Y. Spencer, Can. J. Chem., 43, 1357(1965)
" Terpenoids VIII. The immediate precursors of helminthosporal and helminthosporol."
- (17) F. Dorn, Dissertation ETH (Switzerland), 5554 (1974).
- (18) F. Dorn, P. Bernasconi, and D. Arigoni, Chimia, 29, 24 (1975)
- (19) M. Nukina, H. Hattori, and S. Marumo, J. Am. Chem. Soc., 97, 2542 (1975)
" cis-Sativenediol, a plant growth promotor, produced by fungi."
- (20) M. Nukina and S. Marumo, Agr. Biol. Chem., 40, 2121 (1976)
" Aversion factors, antibiotics among different strains of a fungal species.
Aversion factors of Cochliobolus setariae."
- (21) G. Büchi, J.D. White, and G.N. Wogan, J. Am. Chem. Soc., 87, 3484 (1965)
" The structure of mitorubrin and mitorubrinol."
- (22) R. Locci, L. Merlini, G. Hasini, and J.R. Locci, Giorn. Microbiol., 15, 93 (1966)
" Mitorubrinic acid and related compounds from a strain of Penicillium funiculosum Thom."
- (23) G. Odham, Arkiv. for Kemi, 26, 367 (1966)
" Synthesis of (+)-methyl 2L,4L-dimethylhexanoate and (-)-methyl 2D,4L-dimethylhexanoate involving separation of diastereomers by preparative gas chromatography."
- (24) O. Korver and M. van Gorkom, Tetrahedron, 30, 4041 (1974)
" Optically active 2-methyl substituted acids and esters: Chiroptical properties, conformational equilibria and nmr with optically active shift reagents."

- (25) P.S. Steyn and R. Vlegaar, J. Chem. Soc., Perkin I, 204 (1976)
 " The structure of dihydrodeoxy-8-epi-austdiol and the absolute configuration of the azaphilones."
- (26) F.C. Chen, P.S. Manchand, and W.B. Whalley, J. Chem. Soc., 3577 (1971)
 " The chemistry of fungi. Part LXIV. The structure of monascin: the relative stereochemistry of the azaphilones."
 W.B. Whalley, G. Ferguson, W.C. Marsh, and R.J. Restivs, J. Chem. Soc., 1366 (1976)
 " The chemistry of fungi. Part LXVIII. The absolute configuration of (+)-sclerotiorin and of the azaphilones."
- (27) W.B. Turner, "Fungal Metabolites", Academic Press(London),(1971).
- (28) A. Boller, E. Gaumann, E. Hardegger, F. Kugler, St. Naef-Roth und M. Rosner, Hel. Chim. Acta, 40, 875 (1957)
 " Diaporthin, ein Welketoxin aus Kulturen von Endothia parasitica(Murr.)And."
 E. Hardegger, W. Rieder, A. Walser und F. Kugler, Helv. Chim. Acta, 49, 1283 (1966)
 " Konstitution des Diaporthins und Synthese der Diaporthinsäure."
- (29) 津田 盛也, 上山 昭則, 日本植物病理学会報, 36 (3), 152 (1970)
 " 数種薬剂による誘起される Helminthosporium oryzae の菌糸形態異常"
- (30) A. Endo, K. Kakiki, and T. Misato, J. Bacteriology, 104, 189 (1970)
 " Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D."
 N. Ohta, K. Kakiki, and T. Misato, Agr. Biol. Chem., 34, 1224 (1970)
 " Studies on the mode of action of polyoxin D. Part II Effect of polyoxin D on the synthesis of fungal cell wall chitin."
 S. Bartinicki-Garcia and E. Lippman, J. Gen. Microbiol., 71, 301 (1972)
 " Inhibition of Mucor rouxii by polyoxin D: Effects on chitin synthetase and morphological development."

H. Ishizaki, K. Mitsuoka, and H. Kunoh, Ann. Phytopath. Soc. Japan, 40, 433 (1974)

"Effect of polyoxin on fungi (1) Optical microscopic observations of mycelia of Altenaria kikuchiana Tanaka."

(31) 梅沢純夫, "抗菌性物質", (培風館), 岡見吉郎, "微生物の汗", (大日本図書)

(32) 梅沢純夫, 科学, 46, 130 (1976)

"微生物の二次代謝産物—アラスミド支配と生物活性物質—"

(33) A.J. Birch and F.W. Donovan, Aust. J. Chem., 6, 373 (1953)

"Studies in relation to biosynthesis III. The structure of eleutherinol."

R. Adams, S. MacKenzie, Jr., and S. Loewe, J. Am. Chem. Soc., 70, 664 (1948)

"Tetrahydrocannabinol homologs with doubly branched alkyl groups in the 3-position XVIII."

R. Adams, M. Harfenist, and S. Loewe, J. Am. Chem. Soc., 71, 1624 (1949)

"New analogs of tetrahydrocannabinol XIX."

(34) A.E. Oxford and H. Raistrick, Biochem. J., 27, 634 (1933)

"LXXXV. Studies in the biochemistry of microorganisms. XXX. The molecular constitution of the metabolic products of Penicillium brevi-compactum Dierckx and related species. I. The acids $C_{10}H_{10}O_5$, $C_{10}H_{10}O_6$ and $C_{10}H_{10}O_7$."

(35) G. Pettersson, Acta Chem. Scand., 18, 1202 (1964)

"On the biosynthesis of toluquinones from Aspergillus fumigatus I. The biogenetic role of orsellinic acid and orcinol."

(36) J.F. Grove, J. Chem. Soc., 3234 (1964)

"Metabolic products of Stemphylium radicinum. Part I. Radicinin."

(37) 尾崎茂一郎等, Jap. 11997 July 7 (1967).

(38) J.F. Grove, J. Chem. Soc., 1860 (1970)

"Metabolic products of Stemphylium radicinum. Part III. Biosynthesis of radicinin and pyrenophorin."

- (39) M. Tanabe, H. Seto and L.F. Johnson, J. Am. Chem. Soc., 92, 2157 (1970)
" Biosynthetic studies with carbon-13, Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of radicinin."
- (40) N. Harada and K. Nakanishi, Acc. Chem. Res., 5, 257 (1972)
" The exciton chirality method and its application to configurational and conformational studies of natural products."
- (41) L.M. Jackman and S. Sternhell, " Application of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry", 2nd Ed. ,Pergamon Press,(1969), p.296.
- (42) D.H.R. Barton, B.D. Brown. D.D. Ridley, D.A. Widdowson, A.J. Keys and C.J. Leaver, J. Chem. Soc.,Perkin I, 2069 (1975)
" The structure of daucic acid."
- (43) J. Kiss and W. Arnold, Helv. Chim. Acta, 58, 297 (1975)
" Conformation of some anomeric O-benzylated D-gluco-, L-ido-, and hex-4-enopyranoside derivatives."
- (44) W.H. Urry, H.L. Wehrmeister, E.B. Hodge, and P.H. Hidy, Tetrahedron Letters, 3109 (1966)
" The structure of zearalenone."
- (45) A.I. Scott, L.C. Beadling, N.H. Georgopapadakon, and C.R. Subbarayan, Bioorganic Chemistry, 3, 238 (1974)
" Biosynthesis of polyketides. Purification and inhibition studies of 6 -Methylsalicylic Acid Synthase."