

Title	Helminthosporium類縁菌の代謝物質について
Sub Title	Studies on the metabolites of mould, especially of helminthosporium species fungi
Author	津田, 恭介(Tsuda, Kyosuke)
Publisher	共立薬科大学
Publication year	1967
Jtitle	共立薬科大学研究年報 (The annual report of the Kyoritsu College of Pharmacy). No.12 (1967.) ,p.1- 13
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00062898-00000012-0001

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Helminthosporium 類縁菌の代謝物質について*¹

津 田 恭 介

Studies on the Metabolites of Mould, especially of

Helminthosporium species fungiKyosuke TSUDA*²

In the course of systematic screening for antibiotics produced by plant pathogenic fungi, Ishibashi et al found that the fungi belonging to the *Helminthosporium* species are the most promising source of new antibiotics. They isolated, from selected strains of various *Helminthosporium* fungi, several new metabolites which show activity against Trycophytos (20 out of 40 strains show antifungal activity). It was reported that six species, *Cochliobolus miyabeanus*, *Helminthosporium turcicum*, *C. miyabeanus*, *Helminthosporium turcicum*, *C. heterostrophus*, *H. leersi*, *H. panicumiliacei* and *H. zizaneae*, produced new antibiotics named ophiobolin and zizanin, and that pyrenophorin was isolated from *Pyrenophora avenae*, siccanin from *Helminthosporium siccans*. Ppisiological activities and some physical properties were reported, but the structures remained unknown.

In 1962, K. Tsuda and his coworkers started research on the elucidation of the structure and clarification of the biosynthetic pathways of these metabolites in the Institute of Applied Microbiology of the University of Tokyo. In recent years, the determination of chemical structure has been greatly simplified by the introduction of modern investigative methods. It was found that the reported molecular formulae were all erroneous and revised formula were arrived at, by means of X-ray molecular weight determination, and mass spectrometric analysis. The structures [ophiobolin-A (ophiobolin), ophiobolin-B (zizanin-B), ophiobolin-C (zizanin-A), ophiobolin-D (cephalonic acid), pyrenophorin and siccanin] were solved by mainly physical methods, such as X-ray crystallographic analysis, by which the stereochemistry and absolute configuration were also determined. In some cases, chemical correlation studies established the structures. On the other hand, biogenetical investigation of these metabolites were also carried out by the use of tracer experiments using isotopes such as ³H, ¹⁴C, and ¹⁸O. It was found that some of these metabolites were biogenetically unique system which had never before been encountered.

*¹ Jubilee of Lecture in Commemoration of his Sixtieth Birthday at the University of Tokyo on Feb. 10, 1967.

*² 本稿は、昭和42年2月10日東京大学薬学部記念講堂で開催された著者の東大退職記念会において講演したものである。本誌に掲載することを許された本誌編集主任宮本教授に深謝する。

中村, 石橋は各種の植物病原菌*³の代謝物についてその抗菌力を調べ報告しているが,¹⁾それによると被検菌株149株中43株が *Helminthosporium* 属菌*³に入り, その46%, 20株が抗菌性代謝物を生産した. 残りの106株についてはその18%, 20株が抗菌力を示したにすぎなかった. 結論としては *Helminthosporium* 属菌が抗菌性代謝物の研究材料に良いということである. 石橋²⁾は上述の研究において代謝物質として ophiobolin ($C_{24}H_{32}O_4$), zizanin ($C_{30}H_{44}O_5$), siccanin ($C_{30}H_{40}O_4$) pyrenophorin ($C_{24}H_{30}O_9$) を単離している. 併し当時これらの物質の化学構造は決定されるに至らなかった.

1963年から津田グループは石橋の研究を継承し, ophiobolin, pyrenophorin, siccanin 以外に cephalonic acid, zizanin A, zizanin B も単離し, これら物質の分子式を, 石橋の設定した分子式を改めるなどにより, 決定し, さらに物理的手段例えば X-線解析法を効果的に使うことによりこれら物質全部の構造を確定した. また ophiobolin 系列と siccanin 系列の生合成を ³H, ¹⁴C, ¹⁸O を使用して実施した.

この結果, ophiobolin 系列の zizanin AB, cephalonic acid は炭素数25の新しいテルペンであることが判り mono, sesqui, di-terpene など既知の炭素数10, 15, 20のテルペン群に新たに sesterterpene*⁴ の一群を加えることができた. 抗菌力は siccanin が強く, トリコフィトンに対する抗菌力 0.1 μ /ml は既知の抗菌性物質の中でも強力な方に属する. 第1表に石橋および津田等によって単離された物質の抗菌力を示す.

Table 1. 抗菌スペクトル MIC (mcg/ml)

	1	2	3	4	5	6
<i>Escherichia coli</i>	>500	>25	>100	>100	>100	12.5
<i>Alternaria Kikuchiana</i>	12.5	—	—	—	1.5	12.5
<i>Bacillus subtilis</i>	500	>25	—	50	12.5	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	0.2	50	25	50
<i>Trichophyton interdigitale</i>	2.0	3.1	100	>100	0.8	0.1
<i>Candida albicans</i>	100	>25	100	>100	12.5	25

1: ophiobolin, 2: zizanin B, 3: heterostrophin, 4: cephalonic acid, 5: pyrenophorin, 6: siccanin.

*³ 従来 *Helminthosporium* 属に入れられ, したがって不完全菌 (Fungi Imperfecti) として取扱われた菌の中で, 近年世代中に子嚢胞子が発見された結果子嚢菌類の中の *pyrenophora*, *ophiobolus*, *cochliobolus* 属に分類偏入されたものが多い. 本研究ではこれらの菌を一括して *Helminthosporium* 類縁菌と称した.

1) 中村, 石橋: 農化, **32**, 739 (1958).

2) 石橋: 農化, **35**, 253, 257, 323 (1961); **36**, 226, 229, 645, 649 (1962); J. Ant. (A), **15**, 88, 161 (1962).

*⁴ sesterz (lat.) より, dritthalb (2.5) の意味.

なお津田等の行なった *Helminthosporium* 類縁菌代謝物質と全く関係はないが、コムギハンテン病菌 *Helminthosporium sativum* (新名 *Cochliobolus sativum*) の代謝物であるセスキテルペン *helminthosporal*, *helminthosporol*, *sativene**⁵ については、構造、合成、生合成研究が1961~65年 de Mayo, Corey, 田村 (三) によりずれ行なわれているのと、この属の菌から分離される色素 *helminthosporin*, *cynodontin*, *trispurin*, *caterarin*, *ravenelin* が皆近縁のアントラキノ色素であることが判っていることを付記する。

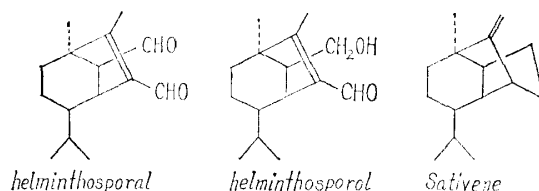
Ophiobolin A (ophiobolin)

Ophiobolin はイネゴマハガレ病菌 *ophiobolus miyabeanus* (新 *cochliobolus miyabeanus*) トウモロコシハガレ病菌 *O. heterostrophus* (新 *C. heterostrophus*) トウモロコシス紋病菌 *H. turicum*, マコモハンテン病菌 *H. zizaniae*, キビ長ハンテン病菌 *H. panici miliacei* を培養したとき得られる代謝物である。奥³⁾ はイネゴマハガレ病の病理学的研究を行なっている。すなわち病菌をイネの葉に接種すると 24 hrs 後に葉の機動細胞から菌糸が入って機動細胞をとりまく柔細胞がジアゾ反応陽性になり *polyphenol* の異常な蓄積が認められる。さらに表皮細胞やジアゾ反応陽性部位が *o*-ジアニジン反応陽性となり *polyphenol* の酸化による *polyquinon* の蓄積が見られる。*polyquinon* は抗菌力を持ちこのためイネの葉の褐色の病斑はあまり拡大しない。*O. miyabeanus* をジャガイモ培地*⁶ に培養すると *ophiobolin* が主として得られるこの *ophiobolin* がイネゴマハガレ病の病変をおこす本態であることが次の実験で確かめられた。*ophiobolin* の 25 ppm 水溶液をイネの葉に点滴すると天然と同じような病斑が生じるまた天然のイネゴマハガレ病斑部をメタノール抽出し抽出エキスをアルミナカラムで分画すると *ophiobolin* が薄層クロマトグラフおよび UV 吸収で証明される。簡単な病害テストとしては水耕法でイネを枯死させる実験が用いられる。この実験では *ophiobolin* は 10 ppm 水溶液で十分生理活性を示す。

Ophiobolin mp. 182° は *O. heterostrophus* の培養液から 1 mg/ml の収率で得られる。分子式はマスペクトルで最終的には $C_{25}H_{36}O_4$ と決定され、IR, UV により OH基, $\alpha\beta$ 不飽和アルデハイド, 五員環ケトンが証明され、また nmr により36個の水素中で27個の性状が判る。化学反応は概して困難で、誘導体中結晶性に得られるものが少ない。

Ophiobolin を1モルのブロムで醋酸ソーダ存在下に処理すると *methoxybromide* を生じ、このものは結晶性が良好で重原子法によるX線解析の材料にした。作業は順調に進み数カ月後に

*5 三者の構造式のみを記す。



*⁶) 蔗糖 2%, ペプトン 0.5%, KH_2PO_4 0.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25%, ジャガイモ煮汁 20%, pH 5.5. 培養温度 25~27°, 培養時間 3~4 日.

3) H. Oku: *Phytopathologische Zeitschrift*, **38**, 342 (1960); **44**, 39 (1962); *Ann. Sankyo Res. Lab.*, **17**, 35 (1965).

絶対配位を含めた構造が確定されたのであるが,⁴⁾ ophiobolin methoxybromide の投影図と解析データを Fig. 1 に示した. ophiobolin の立体式とおもな化学反応を Fig 2, 3 に示してあるが立体式から判ることは 8 員環が安定な boat-chair であること, 左側の 5 員環と 8 員環が *cis*-fusion, したがって 3-OH と 7-CHO の強い水素結合による接近, 右側の側鎖のスピロ環の存在, 15-CH₃ がステロイドの 20-CH₃ と逆配位であること, 全体としては強固な組立てが見られる. さらに分子内のメチル基, アルデハイド基の数と位置からイソプレン単位が head to tail 結合をしていることとイソプレン単位が 5 個であることに気がつく.

m.p. 155-7°, C₂₆H₃₉O₅Br

Orthorhombic a=13.19, b=22.27, c=8.40 Å

d=1.40 g/cm³, P 2₁ 2₁ 2₁, Z=4

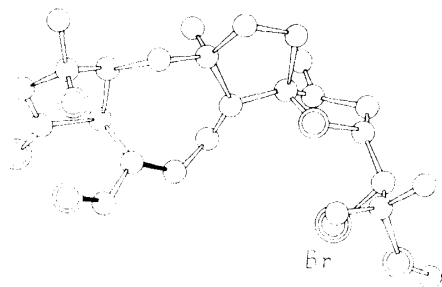


Fig. 1. Ophiobolin A methoxy bromide の X線解析

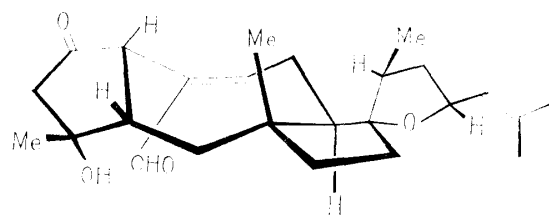


Fig. 2. Ophiobolin A の立体標型

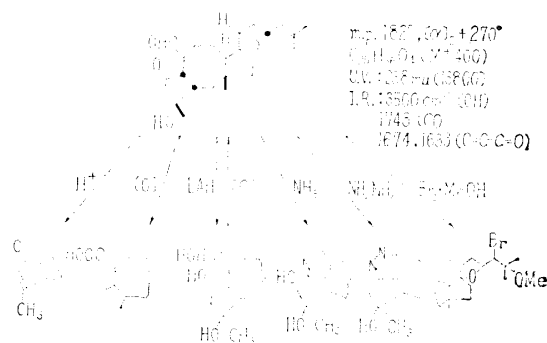


Fig. 3. Ophiobolin A の構造

津田等は ophiobolin の構造式からこのものが天然では MVA→geranyl farnesyl pyrophosphate→の経路で生合成されるところの pentaprenoid であることを考えたのであるが⁴⁾事実後述のように生合成実験法で証明された.

次に ophiobolin 系列の命名法について述べる. ophiobolin という命名は *ophiobolus* からきていて中村, 石橋¹⁾により行なわれた. 津田等はこの研究を踏襲した関係上 ophiobolin の名も引き続き使用した.

たまたま, 抗生物質などでよくある例で, 外国においても三カ所で同一物が分離されてそれぞれ cochliobolin,⁵⁾⁶⁾ cochliobolin A,⁷⁾ ophiobalin⁸⁾ と命名されたので, 同物異名による混乱を避ける目的でイタリアの Canonica 氏と相談の上 Table 2 に示すような命名法を採用することにした.⁹⁾

4) S. Nozoe, M. Morisaki, K. Tsuda, Y. Iitaka, N. Takahashi, S. Tamura, K. Ishibashi, M. Shirasaka : J. Am.Chem. Soc. (Comm.) **87**, 4968 (1965).

5) L. Canonica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle, A. Scala : T. Letters, 1211 (1966).

6) M. Orsenigo : Phytopathol.Z., **29**, 189 (1957).

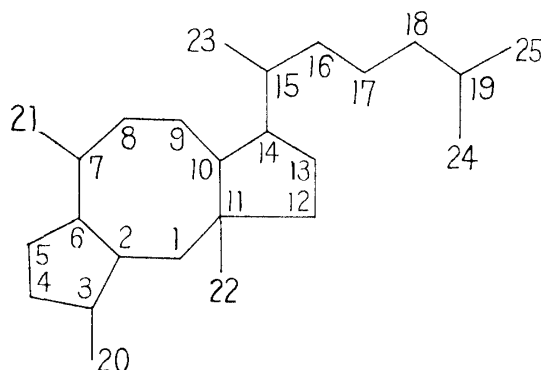
7) L. Canonica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle, A. Scala : T. Letters, 1329 (1966).

8) A. Neelameghan : Hindustan Antibiotic, **2**, 13 (1959).

9) K. Tsuda, S. Nozoe, M. Morisaki, K. Hirai, A. Itai, S. Okuda, L. Canonica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle, A. Scala : T. Letters, No. 35 (1967).

Ophiobolin および後に詳述する zizanin B, zizanin A, cephalonic acid はいずれも C_{25} のセスターテルペンであり、共通の母校を持つから、この母校に OPHIOBOLAN という母校名を与える。そして Table 2 に示すようなナムバリングを採用する場合にそれぞれの構造式が正しく表現される。また四者の俗名は、構造決定順に ophiobolin A (ophiobolin), ophiobolin B (zizanin B), ophiobolin C (zizanin A), ophiobolin D (cephalonic acid) と改め、文献記載上整理しやすくした。⁹⁾

Table 2. Ophiobolin 類の Nomenclature



ophiobolin A (ophiobolin): ophiobola-7,18-diene-21-al-3 α -ol-5-one-14 α ,17-oxide
 ophiobolin B (zizanin B): ophiobola-7,18-diene-21-al-3 α ,14 α -diol-5-one
 ophiobolin C (zizanin A): ophiobola-7,18-diene-21-al-3 α -ol-5-one
 ophiobolin D (cephalonic acid): ophiobola-3,6,18-triene-8 β -ol-21-oic acid

Ophiobolin B (zizanin B)

石橋の得た zizanin から精製により ophiobolin C (zizanin A) とともに得られた。菌は *H. zizaniae* および ophiobolin A 生産菌のどれでも良い。

Ophiobolin B は nmr, IR, UV いずれも ophiobolin A に近似している。例えば Fig. 4 に示してある ophiobolin A のシグナル^{*7} と異なる点は C-18のオレフィン Hのシグナルであって ophiobolin A が doublet であるのに対し Bは triplet, このことは C-17 のメチン H の差で、ophiobolin A の C-17 エーテル酸素が ophiobolin B では欠除していることが判る。弱酸処理により anhydrophiobolin B になる、anhydro 体は IR でも一つの OH が存在することが判るので ophiobolin A のテトラヒドロフラン環の代わりに OH基が存在することが推定される。Fig. 4 に示した ophiobolin B の構造は前記の nmr やマススペクトルで推定できるのであるが、さらに Fig. 5 のような相互の関連づけによって、絶対配位も含めてその構造式が決定された。

Ophiobolin A を LAH 還元で出来る C-5 OH エピマーを分けておのものの OH 配位を nmr で判別してから 5 α -OH 体を Li-NH₃ 還元するとテトラヒドロフラン環が開裂して 14 α -OH が新生する。このものは ophiobolin B の C-5 ケトンの還元で得られるから、ophiobolin B の構造は決定されたわけである。¹⁰⁾¹¹⁾

*7 signal は δ 値 (TMS 基準), d, t, q は doublet, triplet, quartet.

10) S. Nozoe, K. Hirai, K. Tsuda: T. Letters, 2211 (1966).

11) S. Nozoe, K. Tsuda: 4th Symposium on the chemistry of natural products. Stockholm (1966).

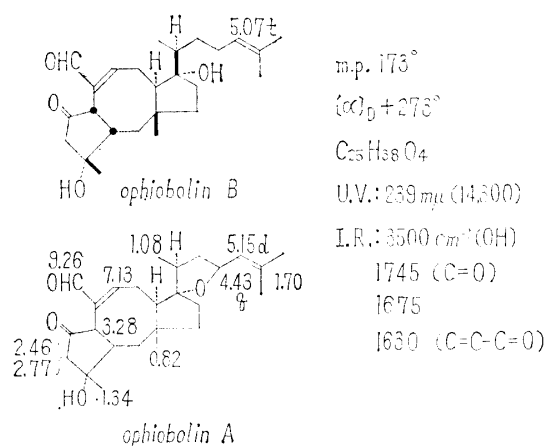


Fig 4. Ophiobolin B の構造

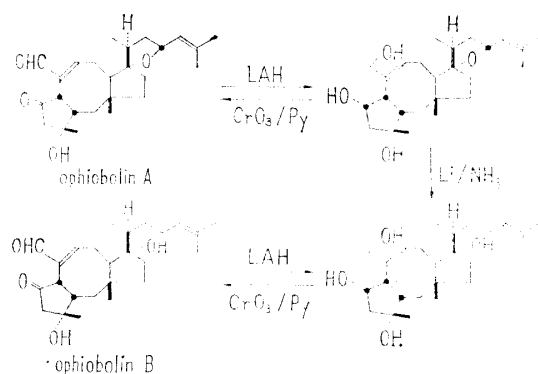
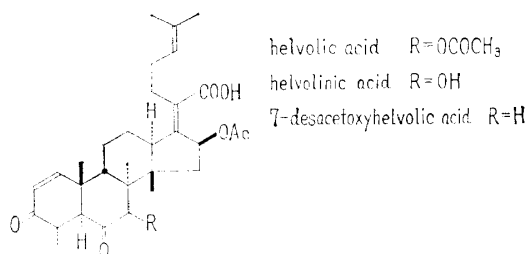


Fig 5. Ophiobolin A と ophiobolin B (zizantin B) の correlation

Ophiobolin D (cephalonic acid)

植物から採れる病原性の無いカビに *cephalosporium caerulens* というものがあり、その代謝物がいくつか知られている。その一つを *helvolic acid* といい、この抗生物質は最初に *aspergillus fumigatus* からとれアメリカ人によって一応構造式が提出されたのであるが、最近津田グループで Fig. 6 のような構造に訂正決定された。¹²⁾¹³⁾ プロトラノスタン型の骨核を持つ、生合成的にはステロイド核到達の前段階のものである。同類には天然物として *fucidic acid*, *cephalosporin P₁* がありペニシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効である。三者のうちフシジン (*fucidic acid*) のみ医薬として市販されている。

Fig. 6 *Cephalosporium caerulens* の代謝物質

津田等は *cephalosporium caerulens* の培養中、新しい代謝物を発見し *cephalonic acid* と命名した。このものはマススペクトルに由り $\text{C}_{25}\text{H}_{36}\text{O}_4$ の分子式が決定された。UV から不飽和ケトン, IR から COOH , CO , 二重結合が判り, nmr からは Fig. 7 に示したシグナルから CH_3 が五個, オレフィン H, OH 基の根元の H, $\alpha\beta$ 不飽和 CO 系 H が観察される。nmr からこの物がセスターテルペンであることが推定される。

迅速に構造を決定するためメチルエステルの 8-OH のプロモアセタートの X線解析を行ない Fig. 8 に示す五体構造を絶対配位を含めて確定することができた。¹⁴⁾

12) S. Okuda, S. Iwasaki, K. Tsuda, Y. Sano, T. Hata, S. Udagawa, Y. Nakayama, H. Yamaguchi : Chem. Pharm. Bull., **12**, 121 (1964).

13) S. Okuda, Y. Nakayama, K. Tsuda : ibid., **14**, 436 (1966).

14) A. Itai, S. Nozoe, K. Tsuda, S. Okuda, Y. Iidaka, Y. Nakayama : T. Letters 4111 (1967).

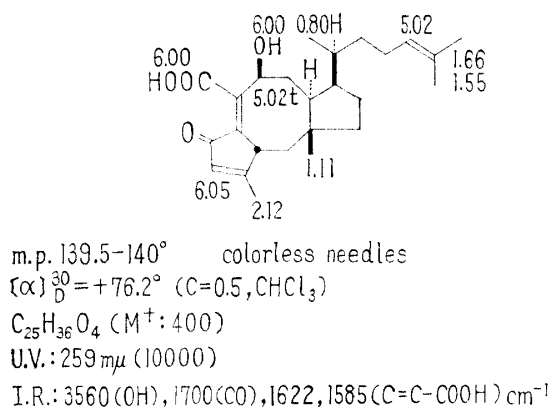


Fig. 7 Ophiobolin D (cephalonic acid)
の構造

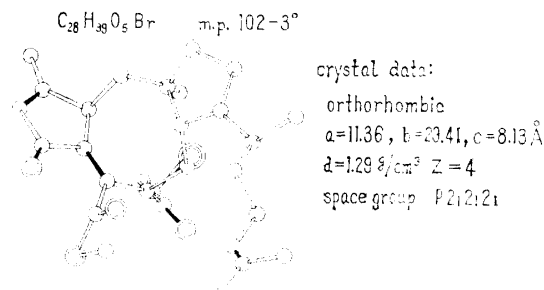


Fig. 8 Methyl cephalonate bromoacetate
の X線解析

Fig. 8 でも判るが, C-11 CH₃ と C-8 OH とはともに β 配位で極めて接近し立体障害のため一見 OH 基の acyl 化困難のようである. 併し実際は前述のように bromacetyl 基が容易に入る. 8 員環は ophiobolin A と同様 boat-chair である. cephalonic acid は新しい命名では ophiobolin D である. D の化学反応は興味があるがその一部を Fig. 9 に示してある. CrO₃ 酸化して融点まで加熱すると COOH が飛んで不飽和 diketone, Pd-H₂ で緩和に水素添加すると C-4 メチレン, エステル化後 PtO₂-H₂ 水素添加するとラクトン, 無醋ピリジンの反応では 3-exomethylene enol lacton を生成する.

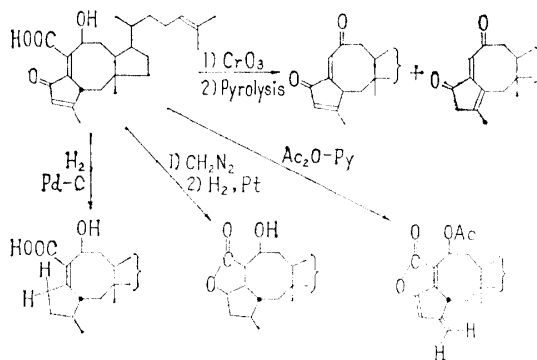


Fig. 9 Ophiobolin D (cephalonic acid)
の反応

Ophioblin C (zizanin A)

石橋の zizanin を精製すると A, B の二物質に分れる. zizanin B, A (ophiobolin B, C) は常に共存する. zizanin A は新しい命名で ophiobolin C と称する. この物の構造式は次に述べる ophiobolin D との関連づけ反応の結果 Fig. 10 のように決定された. その分子式 C₂₅H₃₈O₃, nmr, マススペクトルから C-15 CH₃ の配位を除いては Fig. 10 の構造は容易に推定できる

ophiobolin A, B との関連づけ反応が困難で構造決定に難渋していたが, 幸い ophiobolin D が X線解析により絶対配位を含めて構造決定を見たので D との関連づけを行なった. このルー

15) S. Nozoe, A. Itai, K. Tsuda, S. Okuda: T. Letters, 4113 (1967).

トは Fig. 11 に示してある. ophiobolin D メチルエステルをメシル化, LAH 還元, さらに CrO_3 酸化する. 成績体は油状, ophiobolin C を弱酸処理して得られる anhydrophiobolin C も油状で同定できないので, 両方の油状物を LAH 還元して結晶性の ketal に誘導し, 同定した. この反応で ophiobolin C の構造が決定された.

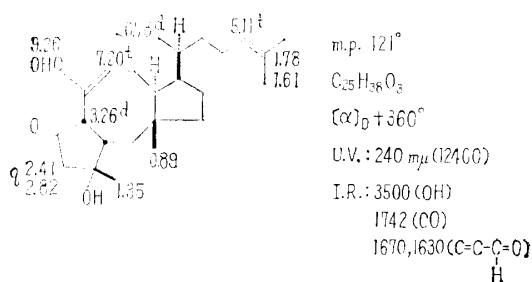


Fig. 10 Ophiobolin C (zizanin A) の構造

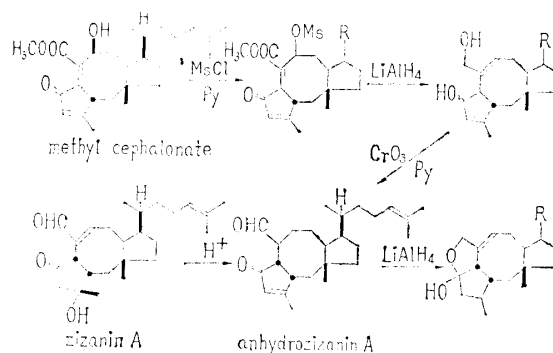


Fig. 11 Ophiobolin C (zizanin A) と ophiobolin D (cephalonic acid) の correlation

Siccanin

Siccanin はライグラス葉の斑点病菌 *H. siccanis* の代謝物で石橋が初めて単離した^{*8} 津田等はその分子式を訂正決定し, UV, IR, nmr のデータを検討した結果 siccanin が prenyl phenol 類に属する化合物であることが推定できた. さらに構造確定のため X線解析用サンプル作製を行い, 重原子を入れるため bromtosylate に誘導した. 幸いこの結晶が解析に好適であったため短時間で Fig. 13 に示す立体式が得られ Fig. 12 のような構造式を絶対配位を含めて決定することができたのである.¹⁶⁾ 特異な構造としてはセスキテルペン部が A/B *cis*-drimane 環を持つことであって, 従来知られていたものは A/B *trans*-drimane 系のみであった. prenyl phenol 類については後述する.

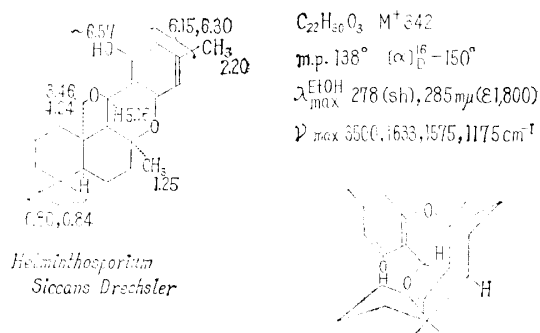


Fig. 12 Siccanin の構造

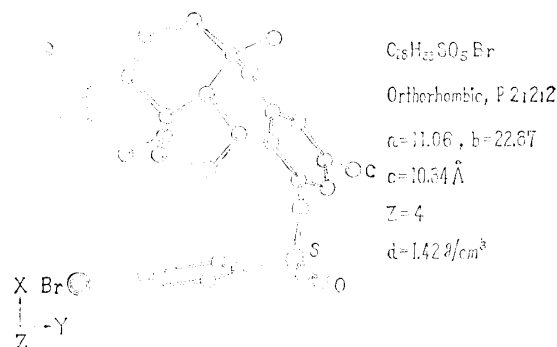


Fig. 13 Siccanin bromtosylate のX線解析

*8) ジャガイモ煮汁 (2 kg), 蔗糖200 g, KH_2PO_4 50 g, ペプトン25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 25 g を10L, pH 5.5. 培養時間 3~4 日.

16) K. Hirai, S. Nozoe, K. Tsuda, Y. Iitaka, K. Ishibashi, M. Shirasaka: T. Letters, 2177 (1967).

Pyrenopholin

H. avenae (新 *Pyrenophora avenae*) はカラスムギハガレ病菌である。代謝物としては pyrenopholin が石橋により単離された。^{*9)} マススペクトルとオスモーゼ法分子量測定両者から分子量308がでてくる。そして $C_{16}H_{20}O_6$ 分子式が得られるが nmr のプロトン積算値から $C_8H_{10}O_3$ ダイマー構造が推定されるが、事実水素添加、加水分解、酸化によって得られるものは C_8 の 4,7-diketooctanoic acid である。たまたま津田等の実験最中に Grove¹⁷⁾ が8員環式を提出した。Grove は分子式をモノマー式 $C_8H_{10}O_3$ と考えたがこれは分子量確定法が不十分であったことに基づく誤りであることが判り津田等の訂正式に同意した。¹⁸⁾ また8員環式ではオレフィン結合が *cis* となり nmr によるオレフィン H のカップリングコンスタント ($J=15.5$) を説明できない。オレフィン結合は当然 *trans* であるべきで、このことも16員環式で説明できる。さらに X 線解析も分子量308を支持した。

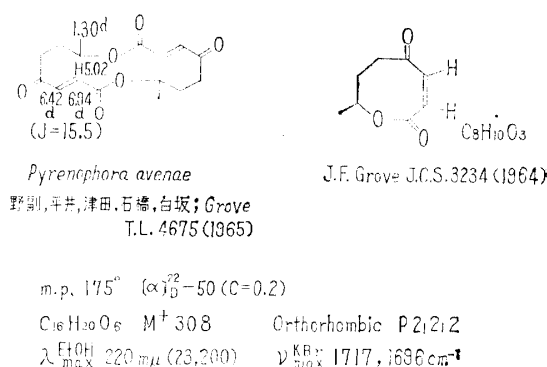


Fig. 14 Pyrenopholin の構造

Ophiobolin 類の生合成

前記の ophiobolin ABC は培養条件で収率に差はあるが大体 *H. heterostrophus* の代謝物として常にとれるものである。その構造から考えて三者の生合成順序、閉環メカニズム等興味ある研究材料である。津田等の実験は (イ) ophiobolin 類が pentaprenoid であることの証明、(ロ) ophiobolin ABC の生合成順序、(ハ) geranyl farnesyl pyrrophosphate から類のできる閉環反応のメカニズムの三点について実験が行なわれた。

(イ) については canonica のグループの実験もある。¹⁹⁾ 津田等の実験も同じ結果を得ており 2-¹⁴C-MVA を *H. heterostrophus* に incubate すると得られる ¹⁴C-ophiobolin A には Fig. 15に示すように *印が radioactive C であるべきだが、全部の ¹⁴C すなわち C-4, 8, 12, 16, 25位置を確認できなかった。併し radioactive ophiobolin A の側鎖二重結合をエポキシ化し glykol に誘導後過ヨード酸で切断すると radioactive acetone が離脱、これは DNPH でトラップする。このアセトンジニトロフェニル ヒドラゾーンの放射活性はもとの ¹⁴C-ophiobolin の放射活性の1/5である。故にオフィオボリン類はイソプレン単位5で構成される pentaprenoid

*9 2%蔗糖, 0.5%ペプトン, 200 g/lL. ジャガイモ煮汁, pH 5.4, 培養時間4日。

17) J.F. Grove: J. Chem. Soc., 3234 (1964).

18) S. Nozoe, K. Hirai, K. Tsuda, K. Ishibashi, M. Shirasaka, J.F. Grove: T. Letters, 4675 (1965).

19) L. Cananica, A. Fiecchi, M. Galli Kienle, B.M. Ranzi, A. Scala: T. Letters, 3035 (1966).

換言すれば sesterterpene にほかならぬ。(ロ)の実験も Fig. 15 に示してある。wilzbach 法にしたがい ophiobolin C (zizanin A) を Trithium ガスと10日間密閉放置後メタノール水中に放置，再結晶をくり返して放射活性を一定ならしめる。この ^3H -ophiobolin C を使って *H. heterostrophus* 培養基に incubate し，培養後 ophiobolin A および B を分離すると ^3H 活性である。故に ophiobolin C が ophiobolin A, B の前駆物質である。次に $^{18}\text{O}_2$ を使って酸素官能基導入を行なった。*H. heterostrophus* 培養後菌体を灼過し，クロラムフェニコール添加培地で $^{18}\text{O}_2$ 含有酸素（窒素加）中 26 \sim 48 hr 培養する。培養後 ophiobolin A を分離，pyridazine 誘導体にしてカルボニル基不安定酸素による混乱を防止する。この pyridazine 体はマスペクトルで molecular ion peak を解析する。 M^+ と $(\text{M}+2)^+$ との peak 高さの比較によって一原子の ^{18}O が一分子の pyridazine 体に存在することが証明された。その位置は，3-OH を離脱して anhydrophiobolin A とし，不安定酸素を除く処理後精製してマスペクトルによる ^{18}O の検索を行なうと $^{18}\text{O}/\text{molecule}$ を証明できることからこの ^{18}O は C-14, C-17 間の橋状酸素であることが証明された。したがって C-3 OH の酸素は水のメディアムから

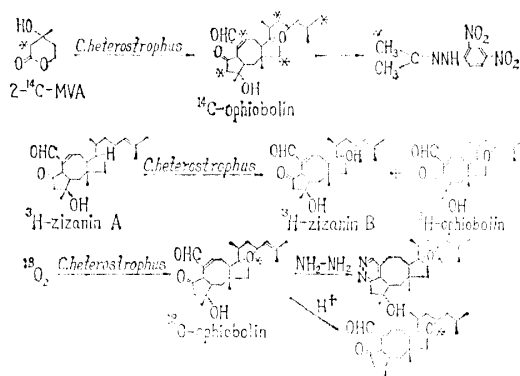


Fig. 15 Ophiobolin 類の生合成実験

くる OH anion に由来するものである。この実験²⁰⁾は ophiobolin C が B, A の前駆であることを証明し，生成状況から ophiobolin A が最終産物であることも確かである。

次に (ハ) の geranyl farnesyl pyrrophosphate から ophiobolin への閉環メカニズムの解明であるが，実験には困難な面もあり，まだ一部しか実験は完了していない。2- ^{14}C -4R4T-MVA を加えて *H. heterostrophus* を培養し ophiobolin A, B, C をそれぞれ分離しておのおのについて ^{14}C と ^3H の活性の ratio を測定すると，ophiobolin C では $^{14}\text{C}/^3\text{H}=5/5$ ，ophiobolin A では $^{14}\text{C}/^3\text{H}=5/4$ という結果を得た。おのおのを pyridazin 体に誘導すると C-6 ^3H が除去されるから pyridazinoophiobolin C は $^{14}\text{C}/^3\text{H}=5/4$ ，pyridazinoophiobolin A は $^{14}\text{C}/^3\text{H}=5/3$ の活性比になる。^{*10} この実験の説明を Fig. 16 に示してある。

以上の実験において ophiobolin C の C-14 の ^3H は重要な知見で，これを根拠にすると一応次の閉環メカニズムが考慮される。geranyl farnesyl pyrrophosphate の閉環は pyrrophosphate 基の solvolysis で起り 5 員 11 員二環性中間駅ができる。この中間駅は後述の gascardic acid 生合成中間駅としても役立つ。 ^{14}C と ^{15}C のカチオンセンターは分子内あるいは分子間の

*10 未発表実験

20) S. Nozoe, M. Morisaki, K. Tsuda, S. Okuda: T. Letters, No. 35 (1967).

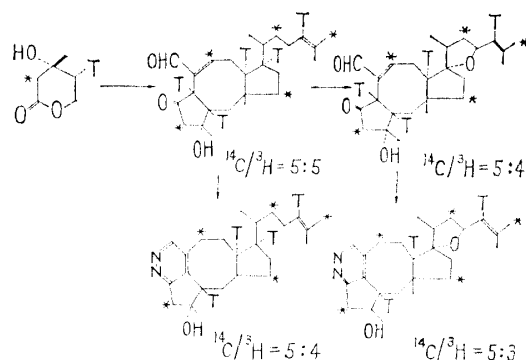


Fig. 16 Ophiobolin 類の生合成実験

H-transfer により解消されまた $14\alpha\text{-H}$ はもとの geranyl farnesyl pyrophosphate の H がそのまま温存され 15S-H は別な場所からの転移によって新生したものである。Fig. 17 にはこの 15S-H が分子内の H-transfer により説明してある, すなわち $\text{C}_8\text{-H}$ が C_{15} に移り代りにカチオンセンターは C_{15} から C_8 に移って, それが $\text{C}_6\text{-C}_7$ 間二重結合の shift, さらに $\text{C}_2\text{-C}_3$ 二重結合の C_2 と C_6 の閉環, 引き続いて OH アニオンの C_3 への攻撃などを誘起する。この one step cyclization は一応合理的で考へ易い。その実験的証明は現在進行中である。

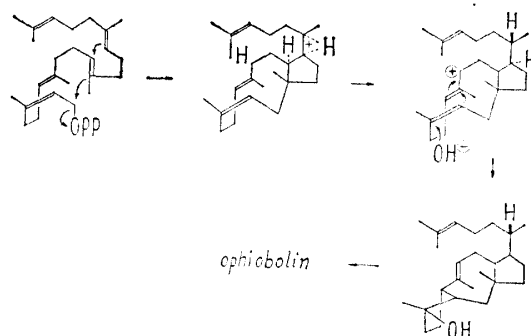


Fig. 17 Ophiobolin 類の生合成メカニズム

Gascardia madagascariensis というマダガスカル島産のエンジムのワックスは昔から欧州では色素の原料に使われたりあるいは lack に使われている。この lack から gascardic acid $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{O}_2$ m.p. 134° という物質が Polonski²¹⁾ により分離されていたが 1960年頃から Arigoni が構造研究に着手していた。たまたま津田等の ophiobolin A 構造決定と時を同じくして, Arigoni は化学的な方法で $\text{C}_{15}\text{-CH}_3$ の配位を除く炭素骨核の解明を了した。津田宛の私信および学会講演で知り得たところでは gascardic acid は C_{25} のセスターテルペンであり, まだ実験的証明はされていないが前述の ophiobolin 前駆物質の中間駅から分枝したルートで生合成される物質であることが推定される。Fig. 18 にその生合成ルートを図示する。

Siccanin, pyrenophorin の生合成実験は完結していない。ただ siccanin については $2\text{-}^{14}\text{C-MVA}$ を加えた *H. siccan* 培養により ^{14}C -siccanin のとれること, その前駆物質と思われる近縁の ^{14}C 化合物も同時にとれることから, いわゆる prenyl phenol であることは疑いのない

21) Polonski: Bull. Soc. Chim. France, 1960, 963

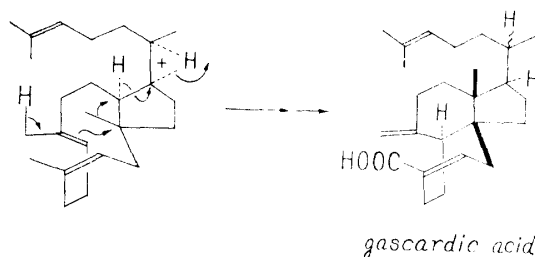


Fig. 18 Gascardic acid の生合成メカニズム

ことである. farnesyl PP が polyacetate rule²²⁾ によりできる orsellinic acid 或は orcinol に trap されて生成するところの triprenyl phenol には siccanin 以外に grifolin と tauranin がある. siccanin は tauranin と異なり, A/B *cis* であるためこのアブノーマルな閉環メカニズムは非常に興味がある. pyrenophorin は polyacetate (polyketide) ルートにより生合成される.

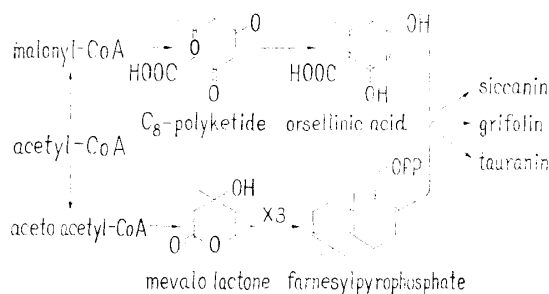


Fig. 19 Triprenyl-phenol 生合成メカニズム

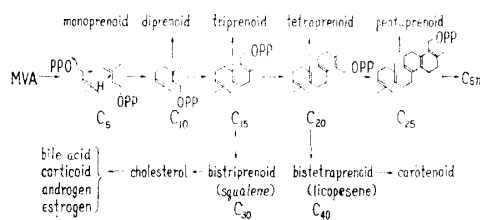
Fig. 20 Δ^3 -isopentenyl pyrophosphate の重合

Fig. 20 に MVA から terpenoid の生合成ルートを略記してある. MVA から dimethylallyl PP と isopentenyl PP, さらに両者の縮合による geranyl PP (10) はいわゆる天然に広く存在する monoterpene, 合理的な名称としては diprenoid への中間駅であり, 燐酸のはずれた geraniol もまた天然に存在する. farnesyl PP (15) 関連物も farnesol はじめ sesquiterpene (triprenoid) として広く存在する. このような head to tail 結合のテルペンは C₂₀ の tetraprenoid (diterpene) までは天然に数多く知られ, pentaprenoid C₂₅ 以上は稀れである. pentaprenoid (sesterterpene) は ophiobolin 類, gascardic acid, それから ubiquinol の中に発見さ

22) F. Lynen: Biosynthetic Pathway from acetate to Natural Products, IUPAC Symposium main Lectures Stockholm, 137 (1967) 参照.

れているに止まる。C₅₀ の decaprenoid である solanesol, C₅₅ の bactoprenol, C₁₀₀ の dolichol 位しか知られていない。一方 farnesol (15) が還元的に tail to tail に対称的に結合²³⁾ した bistrprenoid は squalene はじめいわゆる C₃₀ の triterpenoid および steroid へのルートとして知られ、また bistetraprenoid は carotinoid へのルートである。したがって将来 bispentaprenoid も発見されてしかるべきであろう。

23) H.C. Rilling: J. Biol. Chem. **241**, 3233 (1966).