

微生物の生産する昆虫成育制御物質の検索

作田庄平

目次

	頁
序論	1
第一部 摂食法による昆虫成育制御物質の検索	
第一章 摂食法による昆虫成育制御物質生産菌の検索	10
第二章 殺虫性物質leucanicidin類	14
実験の部	56
総括および考察	66
第二部 昆虫のキチナーゼ阻害物質の検索	
第一章 昆虫のキチナーゼ阻害物質生産菌の検索	71
第二章 昆虫のキチナーゼ阻害物質allosamidin類	73
実験の部	109
総括および考察	123
要約	128
謝辞	132
文献	134

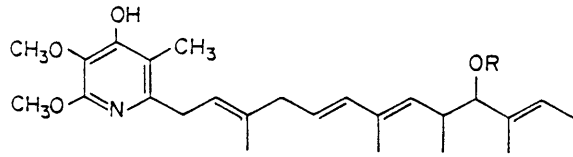
序論

この地球上には100万種におよぶ昆虫が存在するという。そして、その中には数多くの人類の生存を脅かす病害虫が知られている。特に人類の食料として重要な植物資源は昆虫にとっても、必須の食料であり、そこに奪い合いが起こることになる。人類はこれらの病害虫の成育を制御することにより、健康を守り、農業において安定した収穫を得ることに努めてきた。現在、昆虫の成育制御に用いられる第一の方法は、殺虫剤による病害虫の駆除である。その中で、農業用殺虫剤として繁用されるもののほとんどは、有機合成による試行錯誤の結果見いだされたものであり、強い殺虫力を有し農作物の収穫の安定化に絶大なる効果を与えている。しかし、反面哺乳動物に対する毒性や残留性の面から自然生態系への悪影響が懸念されているのも事実である。そこで、こういった問題を解決し得る新しい殺虫剤を含めた昆虫成育制御物質の開発が急がれている。これまで、殺虫剤の開発は主に2通りの方法、即ち、有機合成による試行錯誤及び天然物を対象とした検索によって行われてきた。しかし、近年合成殺虫剤における研究で、新しい母核や活性を有する化合物を得ることは難しくなっており、また現状での残留性の問題の多くは合成化合物の使用において見られるものである。そこで、残

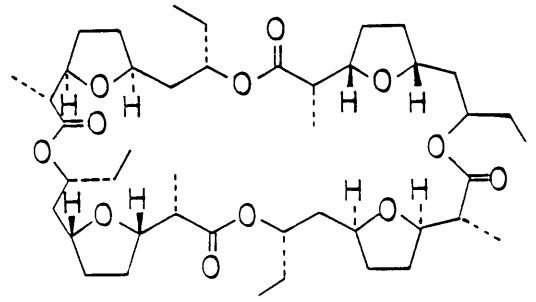
留性の心配の少ない天然物を対象とした検索が重要なものとなってきている。

これまで、天然物を対象とした殺虫成分の検索の試みは数多くなされてきた。特に植物と昆虫との係わりについては、生態化学的な観察、人類の長年の経験を通じた選抜などの結果から、多くの殺虫性植物が知られており、ピレスロイドやロテノイドなどのすぐれた成分が見いだされている¹⁾。また、さらに植物起源の幅広い昆虫生理活性物質の試行錯誤的な検索が試みられている²⁾。一方、微生物の代謝産物を対象にした検索では、放線菌の生産する殺虫性物質 piericidin³⁾ (図-1) を端緒として、いくつかの殺虫活性を有する化合物が得られているが^{4,5)}、昆虫の成育制御物質としての実用化に堪え得るものはいまだに見出されていない。しかし、放線菌の生産する、殺ダニ剤として有用な tetranactin^{6,7)} や milbemycin⁸⁾、さらには抗寄生虫剤として卓効のある avermectin^{9,10)} (図-1) などは、殺虫活性を有する化合物として知られている。これらの有用物質は、近年新しい検定法を用いた検索により得られたもので、微生物の生産する昆虫生理活性物質の検索が始まってまだ日が浅いことを考えると、今後微生物の代謝産物は検索の対象として重要な位置を占めるものと思われる。

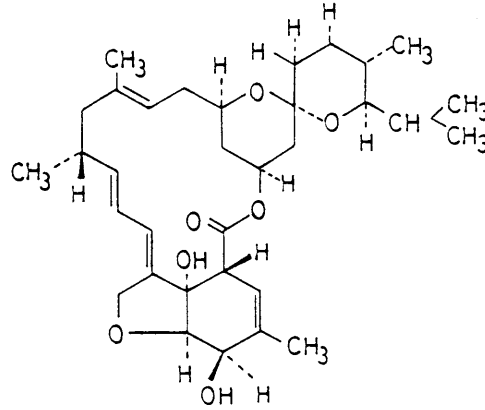
さて、昆虫成育制御物質を検索するに当たって、最も選択性、特



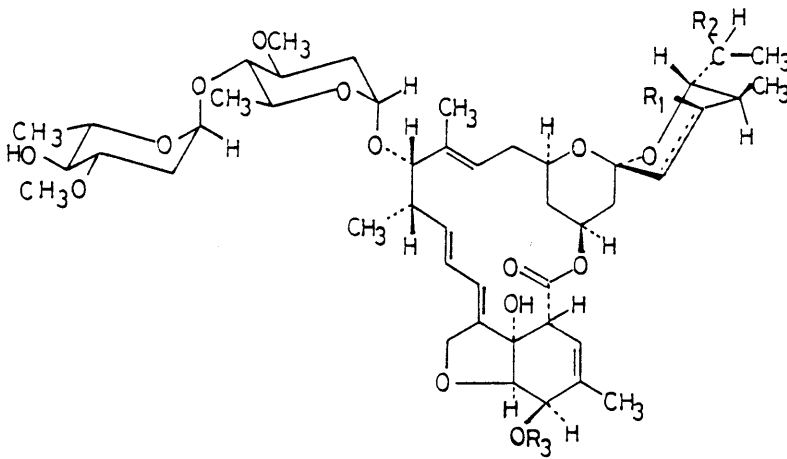
piericidin A R = H
 B R = CH₃



tetranactin



milbemycin D



avermectin

avermectin	R ₁	R ₂	R ₃
A _{1a}		C ₂ H ₅	CH ₃
A _{1b}		CH ₃	CH ₃
A _{2a}	OH	C ₂ H ₅	CH ₃
A _{2b}	OH	CH ₃	CH ₃
B _{1a}		C ₂ H ₅	H
B _{1b}		CH ₃	H
B _{2a}	OH	C ₂ H ₅	H
B _{2b}	OH	CH ₃	H

R₁ が空欄のところは二重結合

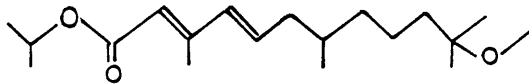
異性の高いものを得ようとするとき、昆虫に特有の現象である、脱皮、変態の過程を阻害あるいは攪乱する物質群を見いだす検定系を確立することが必要である。その際の重要なターゲットになり得るのが、昆虫ホルモン及びキチンである。昆虫ホルモンでは特に脱皮ホルモン、幼若ホルモンの化学構造が解明されて以来おびただしい数のホルモンアナログが合成され、幼若ホルモン様物質として methoprene (図-2) などのすぐれた活性を持つものも開発され実用に供されている¹¹⁾。しかし、農業用のこれまでの有機合成殺虫剤の一部にとってかわるような物質は得られていない。抗幼若ホルモン物質として見いだされた precocene¹²⁾ は、昆虫成育制御物質創製についての新しい概念を打ち出し、その後の抗幼若ホルモン活性を有するイミダゾール化合物¹³⁾ (図-2) などの発見へと発展している。近年、昆虫脳神経ペプチドホルモンに属するもので、前胸腺刺激ホルモン、羽化ホルモンなどの化学構造が目ざましい勢いで解明されつつある。それにより、それらペプチドホルモンの受容体に作用する物質などを得ることも可能となってきた。今後昆虫ホルモンについての基礎研究が進むのと相まって、新しい作用を有する昆虫成育制御物質の創製が可能になっていくものと考えられる。一方のターゲットであるキチンについては、以下に詳しく述べる。

キチンは N-acetyl-D-glucosamine が β -1,4 結合で重合した構造多

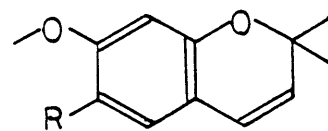
糖であり、自然界では、節足動物、軟体動物、菌類などに存在するが哺乳動物には存在しない^{14,15)}。昆虫類においては、キチンは表皮の主成分となっており、キチンが骨格を形成することにより、外界より身を守る為の強固な表皮が形成されている。昆虫の脱皮現象には、必ず古い表皮の分解及び新しい表皮の合成が伴い、キチンについては、新しい皮膚中でのキチンの合成が行われる一方で、古い皮膚を構成している大部分のキチンがモノマーにまで分解され吸収、再利用される。そこで、このキチンの脱皮時の代謝回転を阻害もしくは、促進するような物質は、昆虫の脱皮に異常を引き起こすような成育制御物質となり得る可能性が強いと考えられてきた^{16,17)}。現在選択性の高い殺虫剤として用いられているdiflubenzuronに代表されるbenzoylphenylurea系の殺虫剤(図-2)は、キチン合成阻害剤として知られており、昆虫の脱皮を阻止することにより強い殺虫効果を示す。しかし、その作用機作の解明は新たなキチン合成阻害剤の開発につながると考えられるが、いまだに作用点は明らかでない¹⁸⁾。

キチンの代謝回転に関与する酵素としては、合成系におけるキチンシンターゼ及び分解系におけるキチナーゼが重要であり、それらの酵素の制御は直接昆虫におけるキチン代謝の攪乱に連がると考えられている。これまで、キチンシンターゼの阻害剤としては放線菌

の代謝産物である polyoxin¹⁹⁾ や nikkomycin²⁰⁾ (図-2) が知られており、それらは、真菌類の細胞壁合成に必須であるキチンシンターゼを阻害することにより抗真菌活性を示す。これらの阻害剤の昆虫に対する活性が調べられた結果、昆虫のキチンシンターゼに対しても阻害活性を有し²¹⁾、また実際に昆虫に投与することにより、脱皮阻害を引き起こすことが明らかとなった。その他、昆虫の脱皮を阻害する plumbagin²²⁾ や benzimidazole 誘導体²³⁾ (図-2) なども、昆虫のキチンシンターゼを阻害することが分かり、キチンシンターゼは今後も昆虫成育制御を考える上での重要なターゲットの一つであると思われる。一方、昆虫のキチナーゼについては、木村、古賀、Kramerらによるカイコ (Bombyx mori) 及びタバコスズメガ (Manduca sexta) を用いての詳細な研究がある。即ち、表皮を分解するキチナーゼは脱皮の際に皮膚に出現し、またそのキチナーゼにはエンド型とエキソ型が存在し、それら両者の相乗作用により速やかにキチンをモノマーへと分解することが明らかになっている^{17,24)}。キチナーゼの阻害剤としては、これまで僅かにタバコスズメガのエキソ型キチナーゼを阻害する数種の glucosamine アナログが知られているだけであり²⁵⁾、それらは in vivo での投与では昆虫の脱皮には影響を与えなかった。昆虫の脱皮時のキチン分解においては、その第一段階であるキチンポリマーのオリゴマーへの切断を司るエンド型キチ

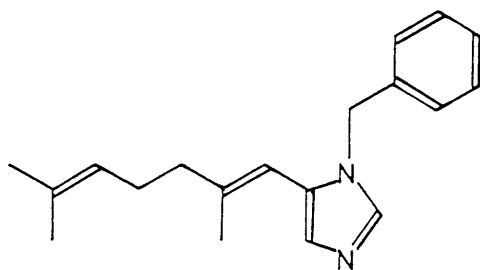


methoprene

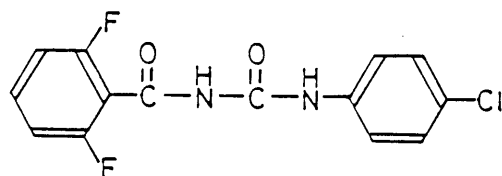


precocene I R = H

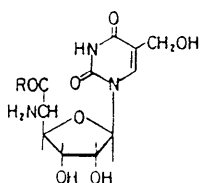
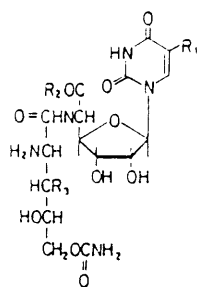
II R = CH₃



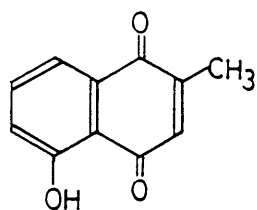
KK-42



diflubenzuron



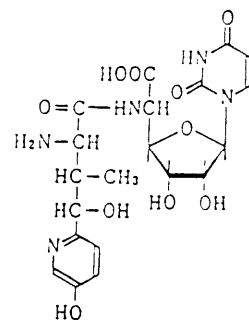
polyoxin



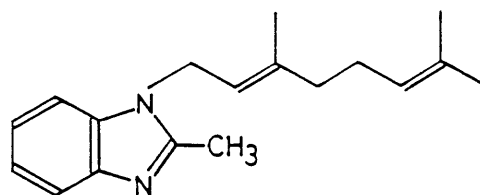
plumbagin

Polyoxin	R ₁	R ₂	R ₃
A	CH ₂ OH		OH
B	CH ₂ OH	HO	OH
D	COOH	HO	OH
E	COOH	HO	H
F	COOH		OH
G	CH ₂ OH	HO	H
H	CH ₃		OH
J	CH ₃	HO	OH
K	H		OH
L	H	HO	OH
M	H	HO	H

Polyoxin	R
C	HO
I	



nikkomycin z



1-citronellyl-2-methyl benzimidazole

ナーゼがより重要であると考えられているが、エンド型キチナーゼを阻害し昆虫の成育を制御する試みは全くなされていない。

以上のような観点より、筆者は、以下に示す2種の生物検定法を用い、微生物の生産する昆虫成育制御物質の検索を行うことにした。まず最初の検定法では、アワヨトウ幼虫を検定幼虫に使用した無菌摂食法を用いた²⁶⁾。この方法によれば、数回の脱皮を経る長期に渡る観察を行うことが可能となり、それによって、速効性だけでなく、脱皮、変態に影響を与える物質を含む、幅広い昆虫成育制御物質を検索することが出来ると考えた。しかし、この方法だけでは、強力な成育制御物質ではあるが、選択性に欠ける物質群のみが優先的に検出されることも考えられた。そこで第2の検定系では、昆虫のキチナーゼを用いた酵素反応系による *in vitro*での検定法を用いた、昆虫のキチナーゼ阻害物質の検索法を考案した²⁷⁾。これにより成育制御物質の作用点を特定し、脱皮時のキチン分解系を攪乱することにより昆虫の脱皮、変態を制御できる可能性を追求することとした。対象としては、これまで新規の有用物質が数多く、放線菌から見いだされていることを参考にして、どちらの検定系においても新たに土壌より分離した放線菌を培養し、その代謝産物を用いることとした。その結果、無菌摂食法を用いた検索により殺虫活性を有する16員環マクロライド化合物である leucanicidin^{28, 29)}類を発見した。

また、in vitroの検定系により特異な擬似三糖構造を有するキチナーゼ阻害物質allosamidin類を発見し、そのallosamidinがin vivoにおいても、脱皮を阻害することにより殺虫活性を示すことを見出した^{30, 31, 32)}。

本論文は、微生物の生産する昆虫成育制御物質の検索に用いた検定法、そして検索の結果得られたleucanicidin類及びallosamidin類の単離、構造解析、生物活性について述べるものである。

第一部 摂食法による昆虫成育制御物質の検索

第一章 摂食法による昆虫成育制御物質生産菌の検索

1-1 生物検定法

摂食法による昆虫成育制御物質生産菌の検索は図-3に示す検定法（以下無菌摂食法と呼ぶ）により行った。

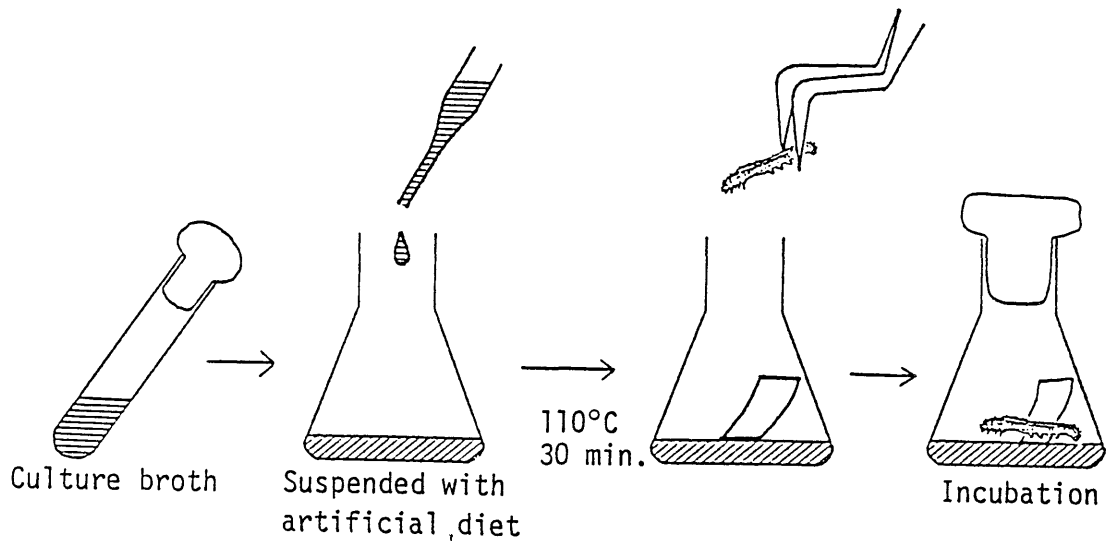


図-3 無菌摂食法

即ち、放線菌の培養液を、菌体を含むまま直接人工飼料に混入し、加圧滅菌したものを飼料とし、アワヨトウ (*Leucania separata*) 幼虫を無菌的に飼育し連続経口投与して飼料中に含まれる試料が成育に

及ぼす影響を観察した。この無菌摂食法は、検定昆虫に用いたアワヨトウの人工飼料による無菌飼育が確立している点、雑食性で微生物の培養液でも摂食させることが可能な点、1度に発育段階のそろった幼虫を大量に供給できる点などの利点を生かし、村越が開発した、カイコ幼虫を用いての摂食法³³⁾を改良したものである。無菌状態にすることにより、摂食法の欠点であった、長期間の観察の為に飼料交換の煩雑さと、大量の被検試料の必要性が解消された。即ち本無菌摂食法では、1度の試料調製で若令期から蛹まで長期に渡る観察を行うことができ、放線菌の培養液を用いるスクリーニング段階での幅広い昆虫成育制御物質の検索が可能となった。

1-2 検索結果

土壌より分離した放線菌約500株につき、無菌摂食法を用いて昆虫成育制御物質の検索を行った結果、12株に活性が見出された。12株の活性の内訳を以下に記す。

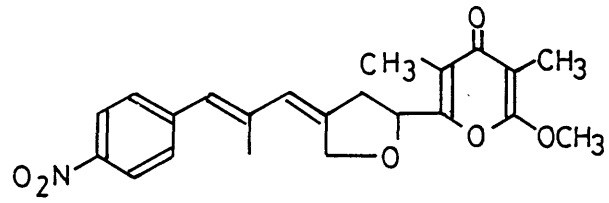
脱皮阻害活性 2株

殺虫活性 1株

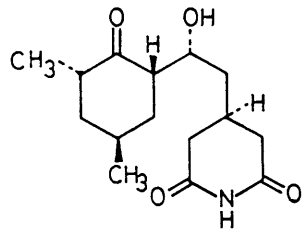
成育阻害活性 9株

このうち、成育阻害物質として、それぞれ未同定の放線菌の培養菌体より aureothin^{34, 35)}、oligomycin A³⁶⁾ が、また培養濾液より cycloheximide³⁷⁾ (図-4) が単離、同定され、また成育阻害活性が強いが、脱皮時には脱皮阻害活性を示す物質として培養濾液より toyocamycin³⁸⁾ (図-4) が単離、同定された。また、摂食時の成育にはほとんど影響を与えず、脱皮の際の頭殻離脱を阻止するという興味深い活性を示す物質として、抗ウイルス剤として知られる L-alanosine³⁹⁾ (図-4) が培養濾液より単離、同定された²⁶⁾。

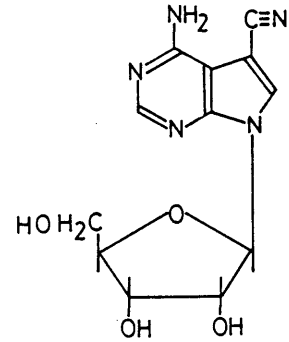
Streptomyces halstedii 3002株の生産する殺虫性物質は、構造未知と新規化合物であることが明らかとなったので、leucanicidinと命名した。第二章においては新規16員環マクロライド化合物 leucanicidin 類について詳述する。



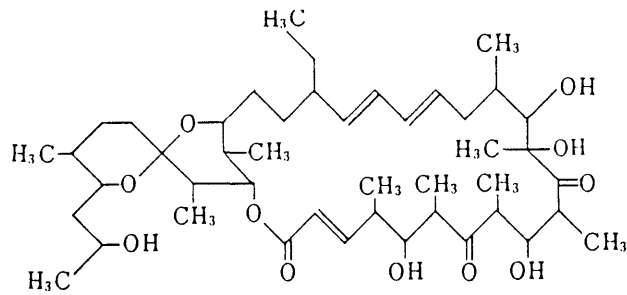
aureothin



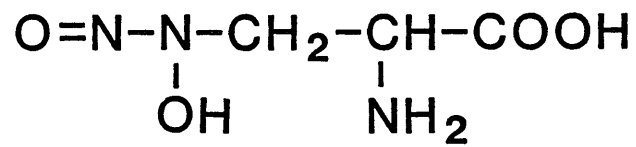
cycloheximide



toyocamycin



oligomycin A



L-alanosine

第二章 殺虫性物質 leucanicidin類

2-1 leucanicidinの生産

leucanicidin生産菌 Streptomyces halstedii 3002株の培養には、種々の培地検討を行った結果表-1に示す組成の培地を用いた。大量培養は、50literのジャーファーメンターで、26.5℃、5日間、通気量25liter/min、回転数400rpm、の条件を用いて行った。

表-1 培地組成

Malt extract	1.0 %
Yeast extract	0.4
Glucose	0.4
CaCO ₃	1.0
pH	7.3

2-2 leucanicidin類の単離

leucanicidin及びその類縁体で微量成分である isobutyrylleucanicidinの単離は図-2に示す方法に従った。即ち、S. halstedii 3002株の培養液より濾別した菌体をアセトンで抽出し、濃縮後、クロロホルムに転溶し、Silicar CC-7カラムクロマトグラフィーにより精製した。ベンゼン-酢酸エチル(60:40)で溶出を行い、クロロホルム-ヘキサンより結晶化すると、白色針状結晶としてleucanicidin-

dinが得られた。結晶母液をさらに逆相の中圧カラム及びHPLCで精製することにより、isobutyrylleucanacidinを白色粉末として得た。収量は50literの培養液より、leucanacidinが126mg、isobutyrylleucanacidinが450 μ gであった。

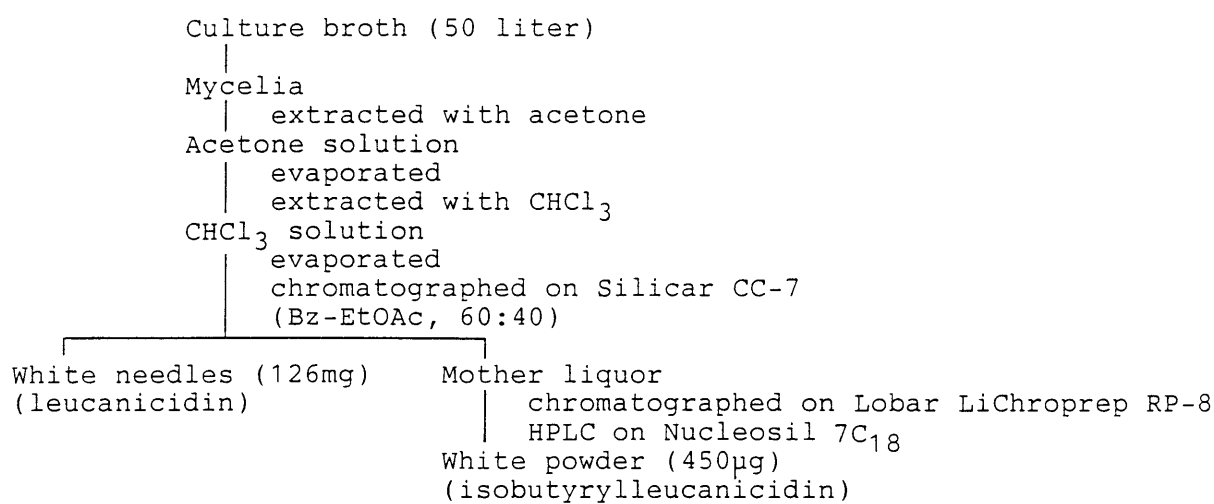


図-5 leucanacidin類の単離

2-3 leucanacidinの構造

2-3-1 物理化学的性質

leucanacidin(I)は、クロロホルム-ヘキサンより結晶化を行うと、クロロホルムを結晶溶媒として取り込み、白色針状若しくはプレート状結晶として得られた。Iは中性物質であり、CHCl₃、EtOAc、acetone、pyridine、MeOH、EtOHには可溶であるが、H₂O、n-Hexane

に不溶であった。また酸性条件下では不安定な性質を示した。

I の FABマススペクトルをジエタノールアミンマトリックスを用いて測定すると m/z 888 にピークが観測され (図-6)、また、グリセロールに NaCl 及び KCl を加えたマトリックスを用いると m/z 805 及び m/z 821 にそれぞれピークが得られた (図-7、8)。これらの結果は、I の分子量を 782 と推定することにより、 m/z 888, 805, 821 のイオンをそれぞれ、 $[M+H+NH(C_2H_4OH)_2]^+$ 、 $(M+Na)^+$ 及び $(M+K)^+$ の擬分子イオンと考えることが出来た。

元素分析の結果より (実験の部 62 頁参照)、I の結晶にはクロロホルムが取り込まれていることが示唆され、そのことは、I の 1H -NMR スペクトルを acetone- d_6 中で測定し、 $CHCl_3$ の水素のシグナル (δ 8.02) が観測されることより確認された。I の分子式はこれらマススペクトル、元素分析及び後述の NMR スペクトルの結果より $C_{42}H_{78}O_{13}$ と決定された。

I の ^{13}C -NMR スペクトルを図-9 に示した。個々の炭素に結合した水素の数は INEPT 法により決定し (図-10)、その総数は 65 個であった。従って残りの 5 個は、I は中性物質であり分子中に窒素を含まないことより水酸基の水素であることが示唆された。また、それぞれの炭素の化学シフトより図-9 に示す各炭素の存在が示された。

I の $CDCl_3$ 中で測定した 1H -NMR スペクトルを図-11 に示した。5

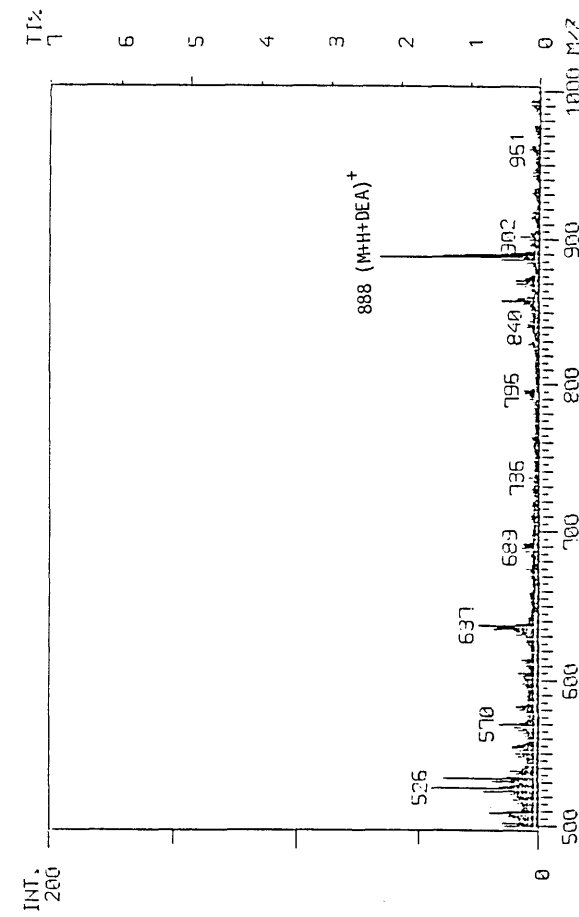


図-6 IのFABマススペクトル (ジエタノールアルミニウムトリックス)

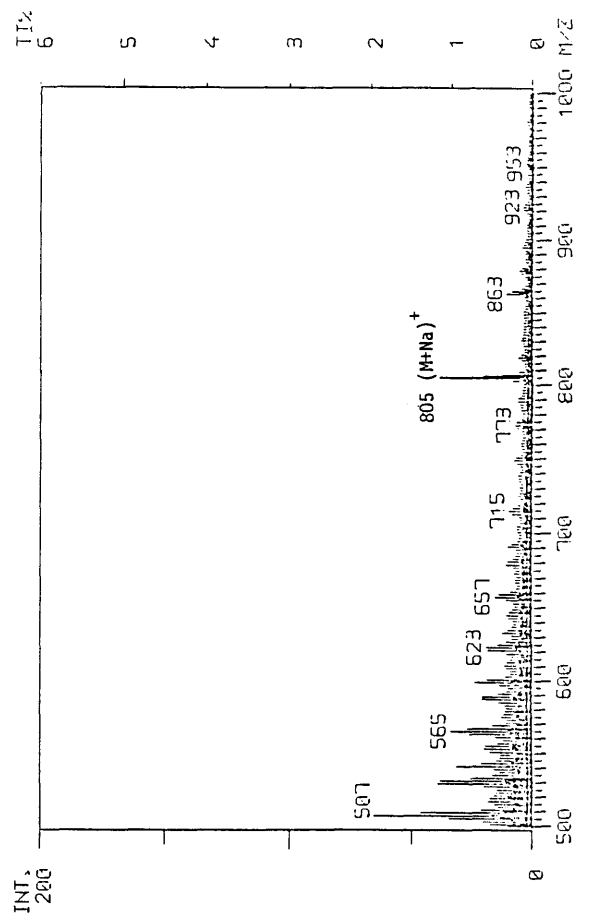


図-7 IのFABマススペクトル (グリセロール+NaClマトリックス)

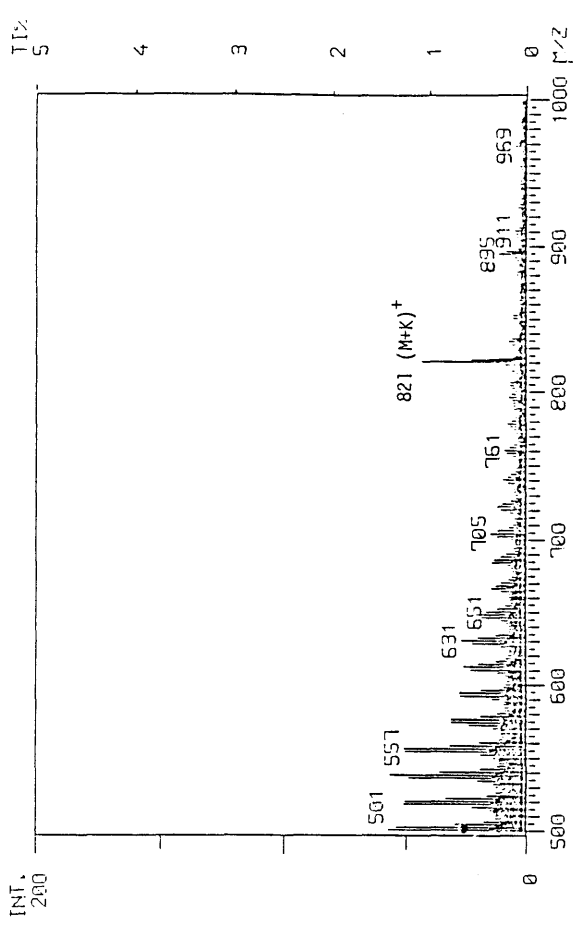


図-8 IのFABマススペクトル (グリセロール+KClマトリックス)

$\text{CH}_3 \times 10$, $\text{CH}_2 \times 2$, $\text{CH} \times 6$, $\text{OCH}_3 \times 3$, $\text{CH-O} \times 10$,
 $\text{O-CH-O} \times 1$, $\text{O-C-O} \times 1$, $\text{CH}=\text{C} \times 5$, $\text{C}=\text{C} \times 3$, $\text{COO} \times 1$

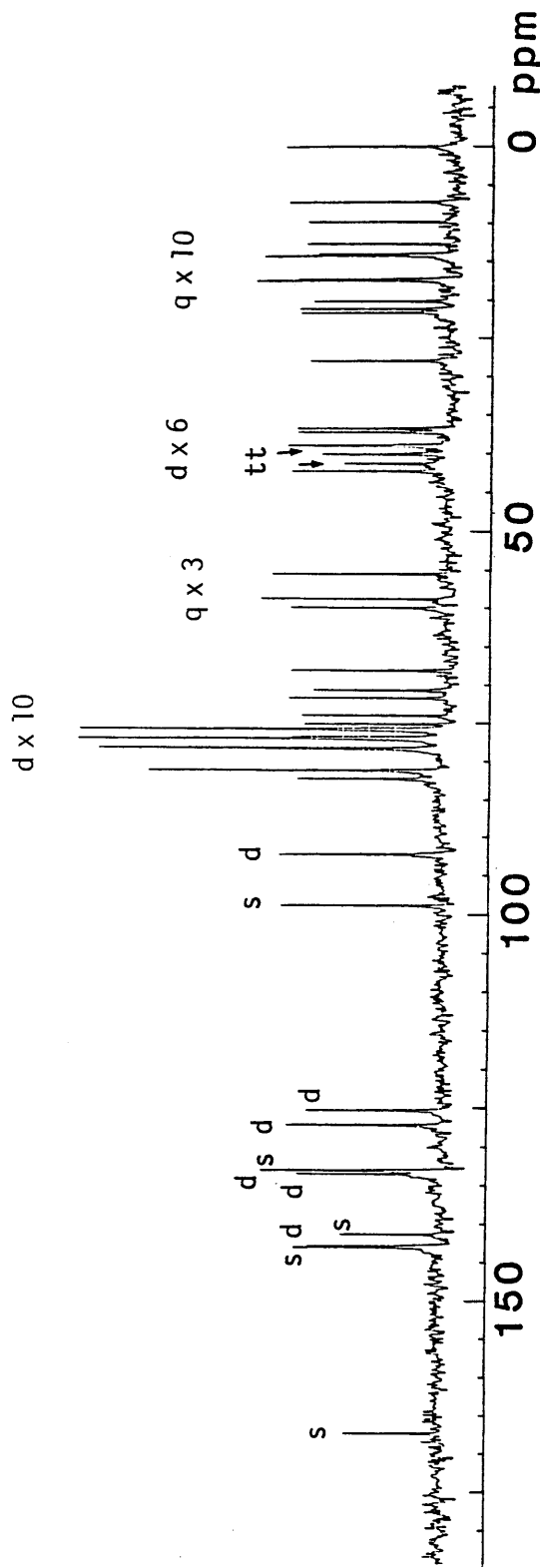


図-9 I の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル (CDCl_3)

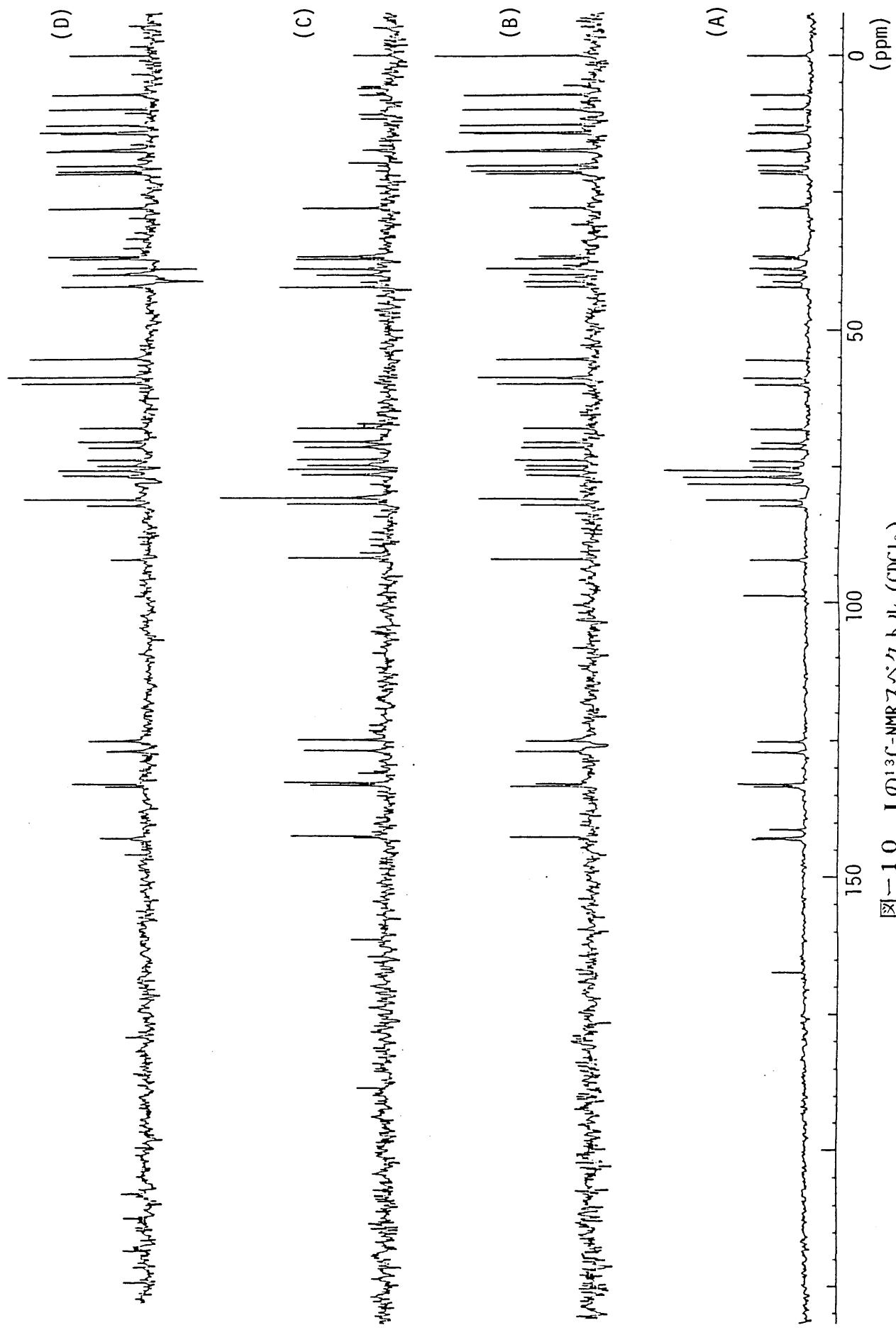


図-10 I の¹³C-NMRスペクトル (CDCl₃)

(A) COM (B) $\Delta=1/4J$ (C) $\Delta=2/4J$ (D) $\Delta=3/4J$

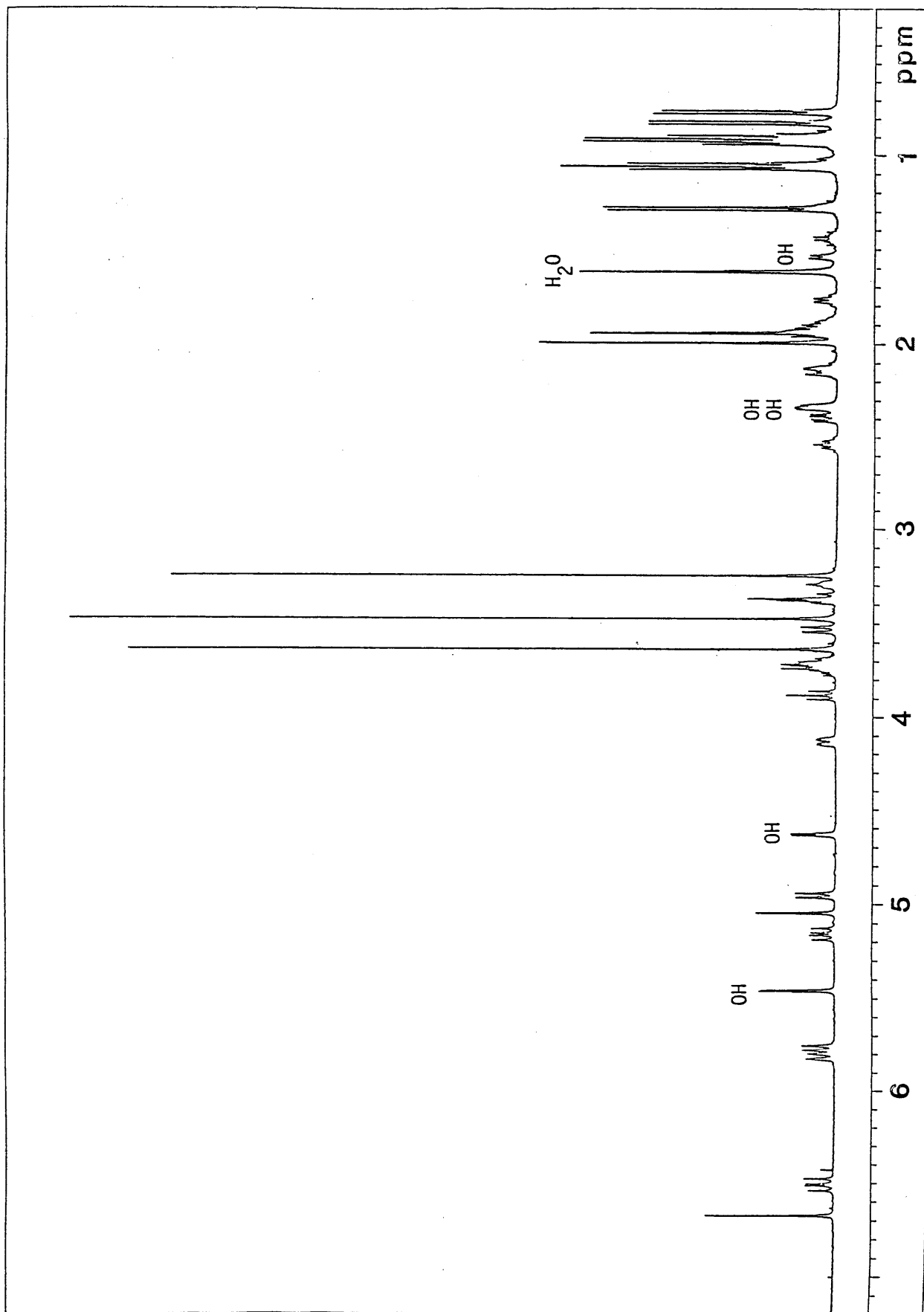


図-11 Iの¹H-NMRスペクトル (CDCl₃, 400MHz)

個の水素のシグナルは、重水を加えて測定することにより消失し、Iに存在する5個の水酸基の水素のシグナルが全てスペクトル上に現れていることが示された。

IのIRスペクトル(図-12)における 1680cm^{-1} の吸収は、Iに存在するエステル基は二重結合と共役していると考えられ、さらにUVスペクトル(図-13)での 287nm の吸収より、共役系はさらに長く、 α 、 β 、 γ 、 δ 不飽和エステル系の存在が示唆された。

2-3-2 部分構造A、B、C

leucanicidin(I)の ^1H シフト相関二次元NMRスペクトル(COSYスペクトル)^{40,41)}の測定は、 ^1H -NMRスペクトル上で各水素のシグナルがよく分離していたため、構造解析を進める上での非常に有力な手段となった。CDCl₃及びpyridine-d₅中で測定したCOSYスペクトル(図-14、15)と、スピンドカップリング、NOE実験より、図-16に示す部分構造A、B、Cの存在が明らかとなった。以下に、個々の部分構造について述べる。

(i)部分構造A

pyridine-d₅中で測定したCOSYスペクトルよりC-2からC-7及びC-10からC-17(図-17、18)の連がりが証明された。C-7とC-17に

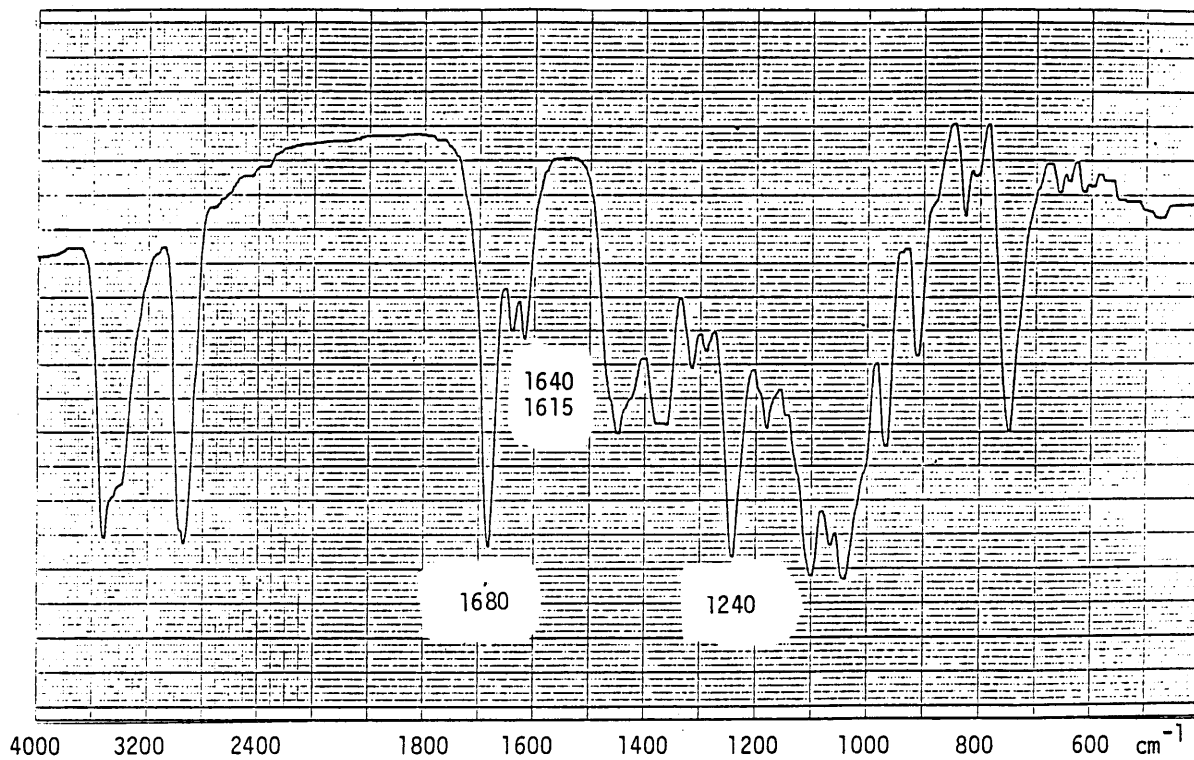


図-12 IのIRスペクトル (KBr)

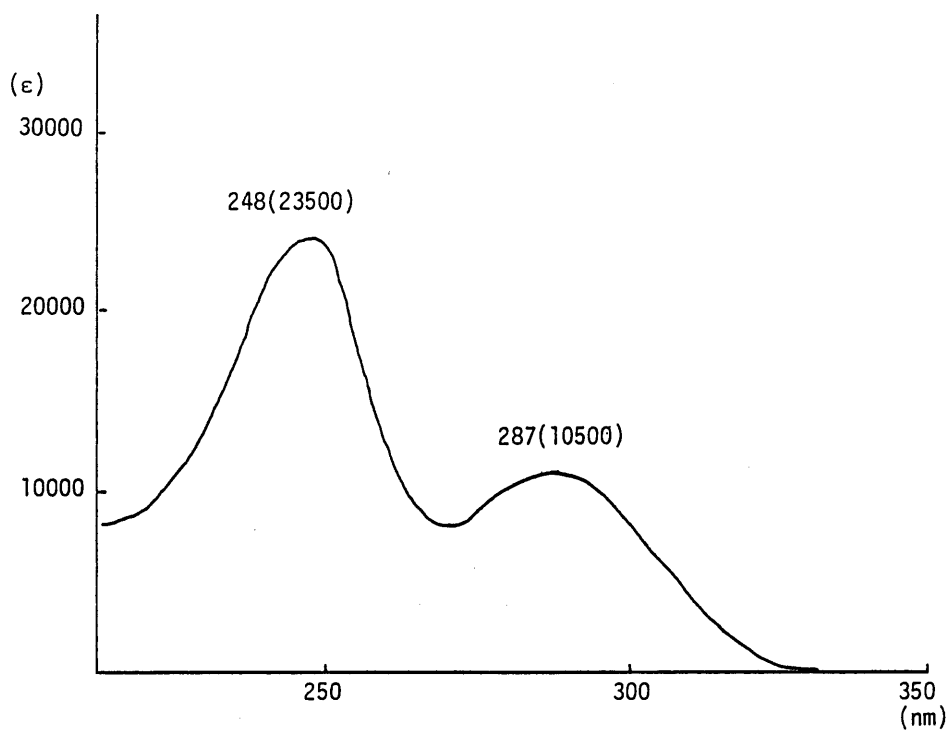


図-13 IのUVスペクトル (MeOH)

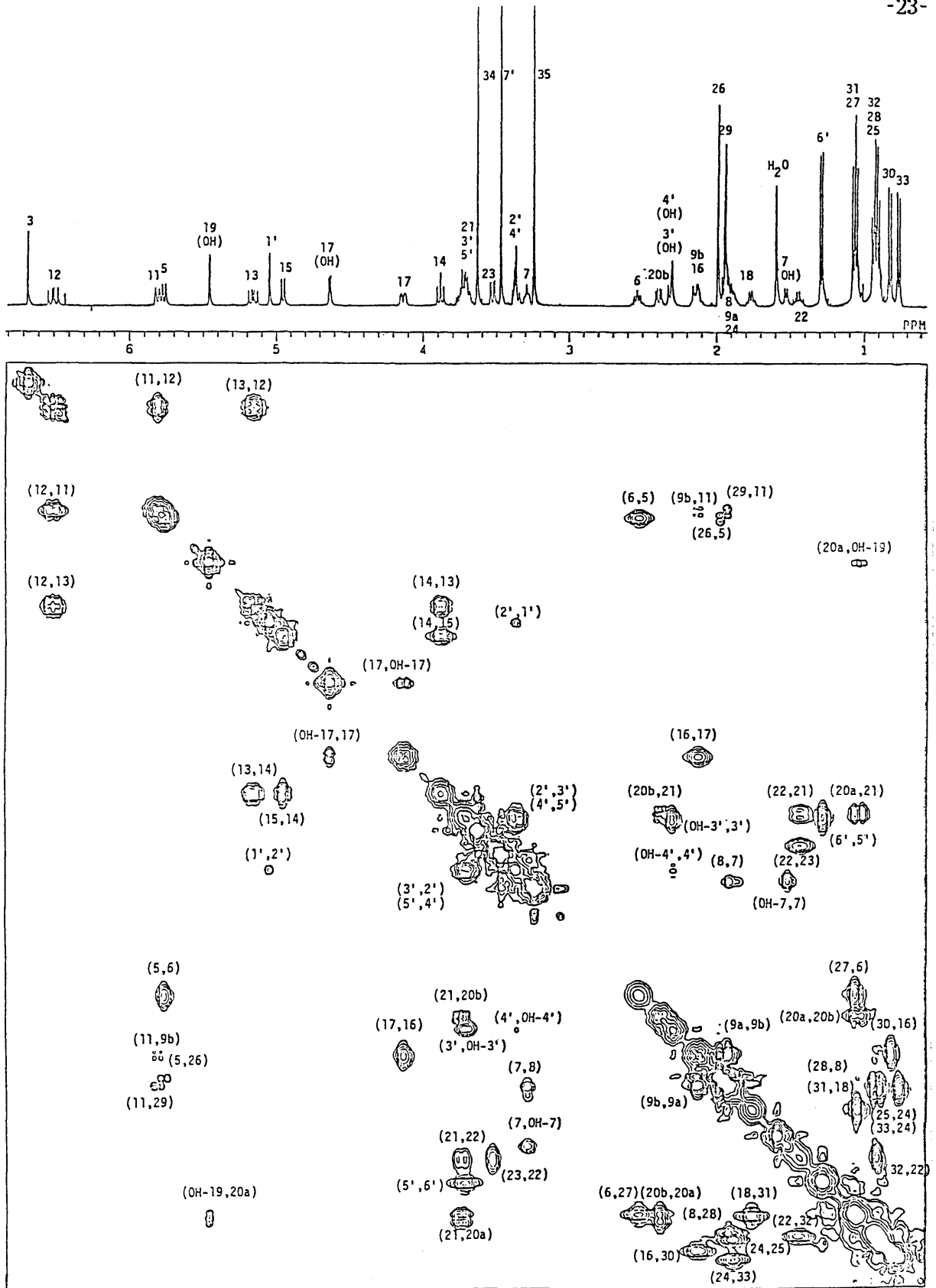


図-14 IのCOSYスペクトル (CDCl₃)

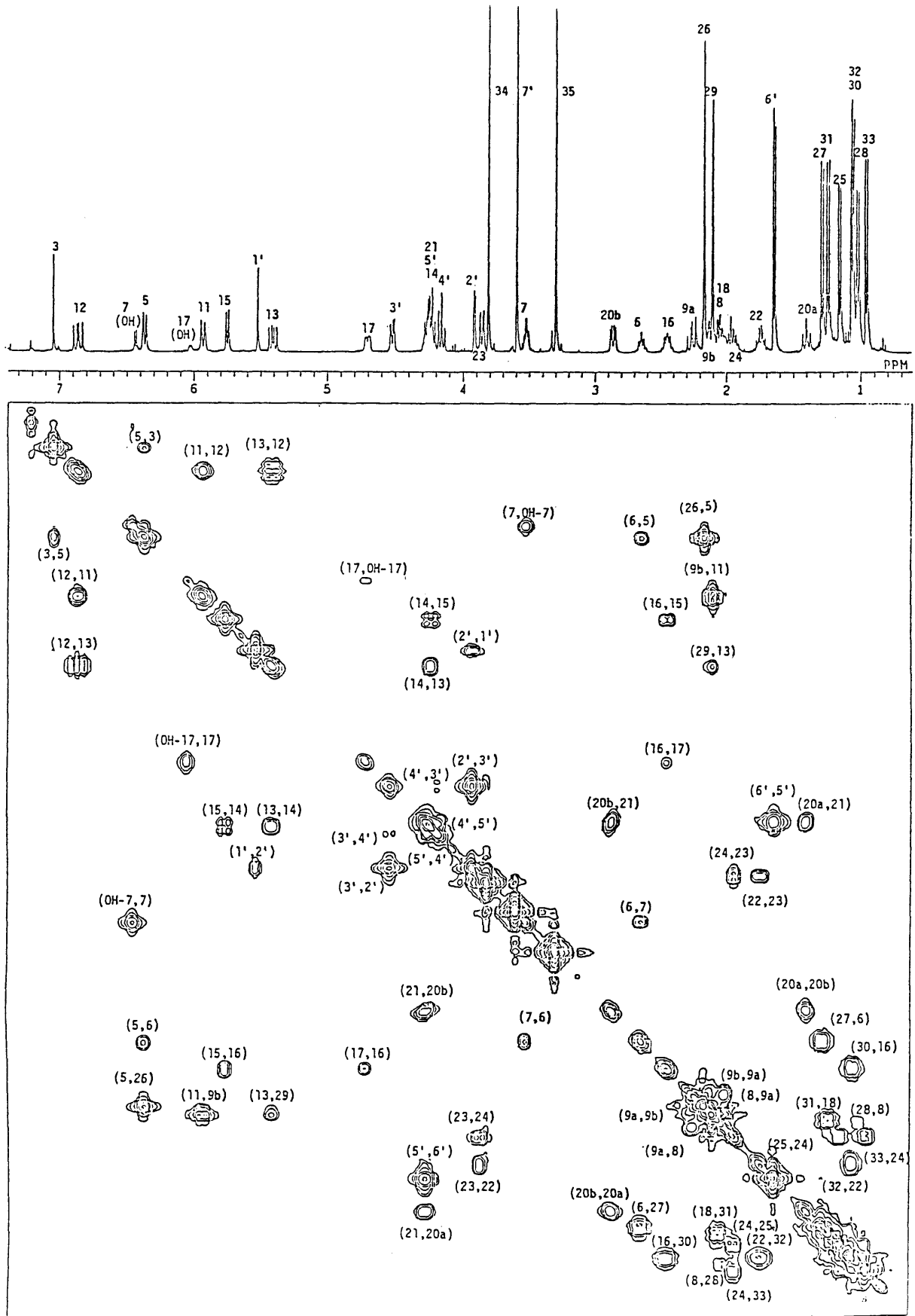


図-15 IのCOSYスペクトル (pyridine-d₅)

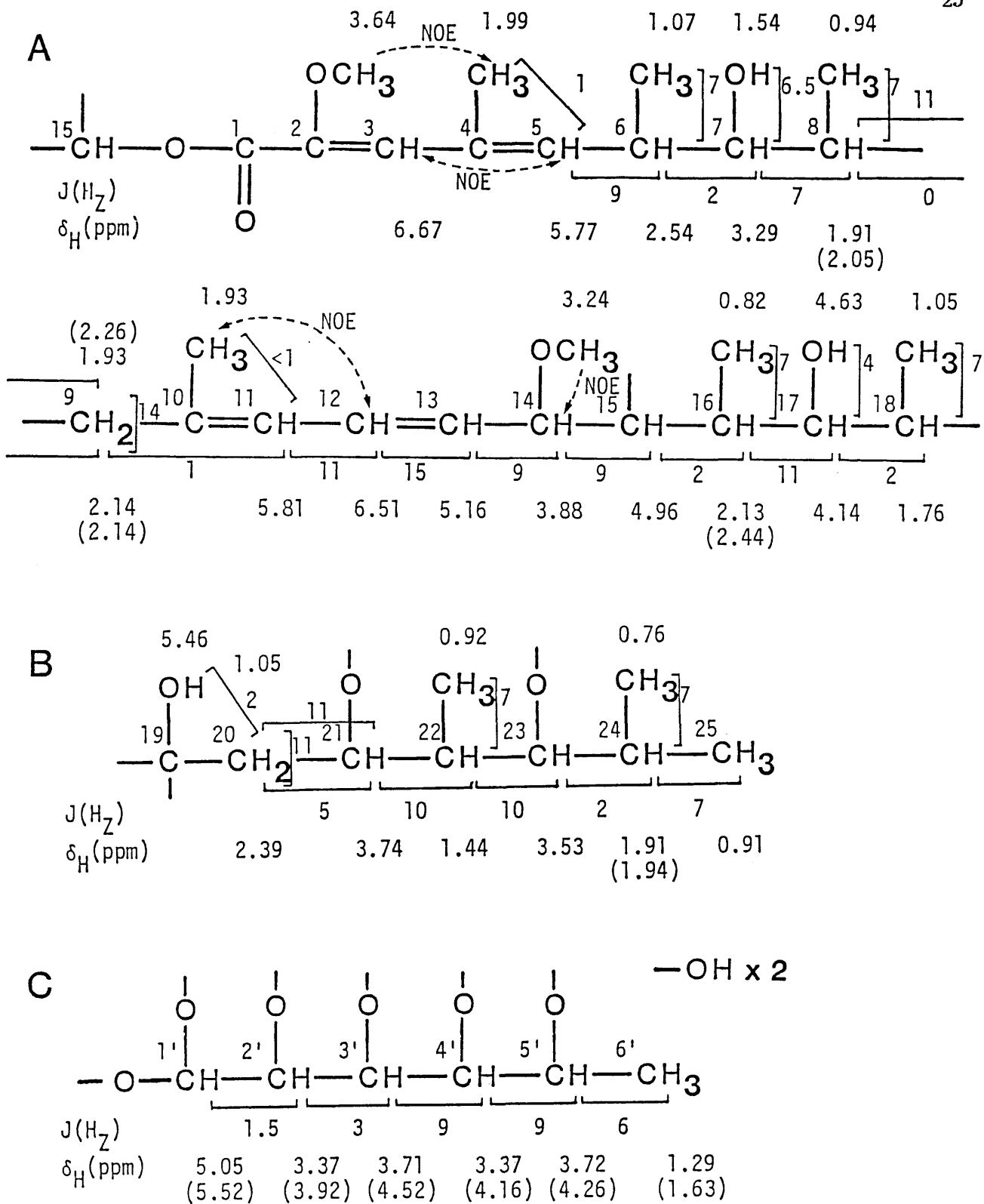


図-16 部分構造A, B, C

括弧内の値はpyridine-d₅中での δ 値を示す。

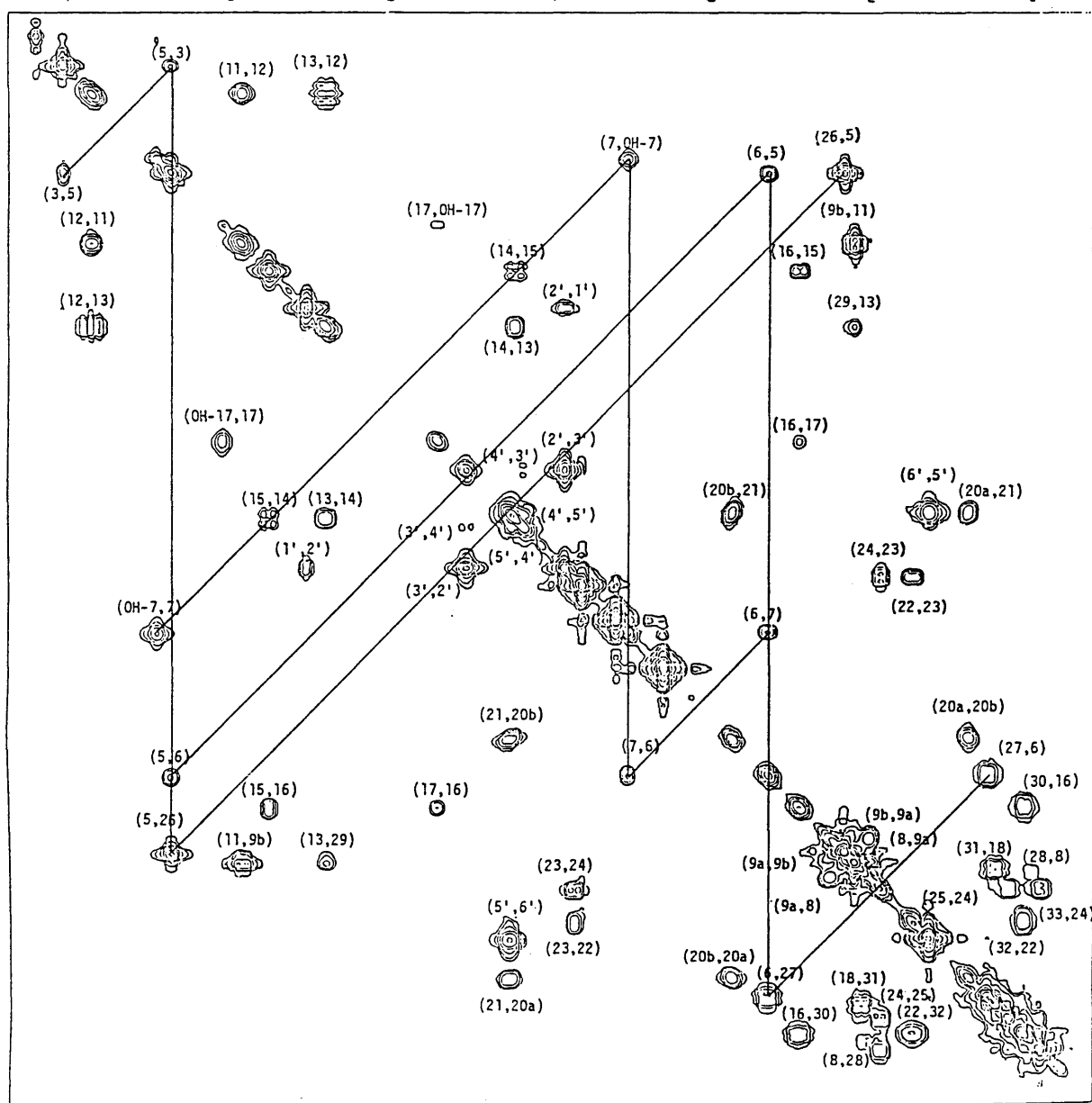
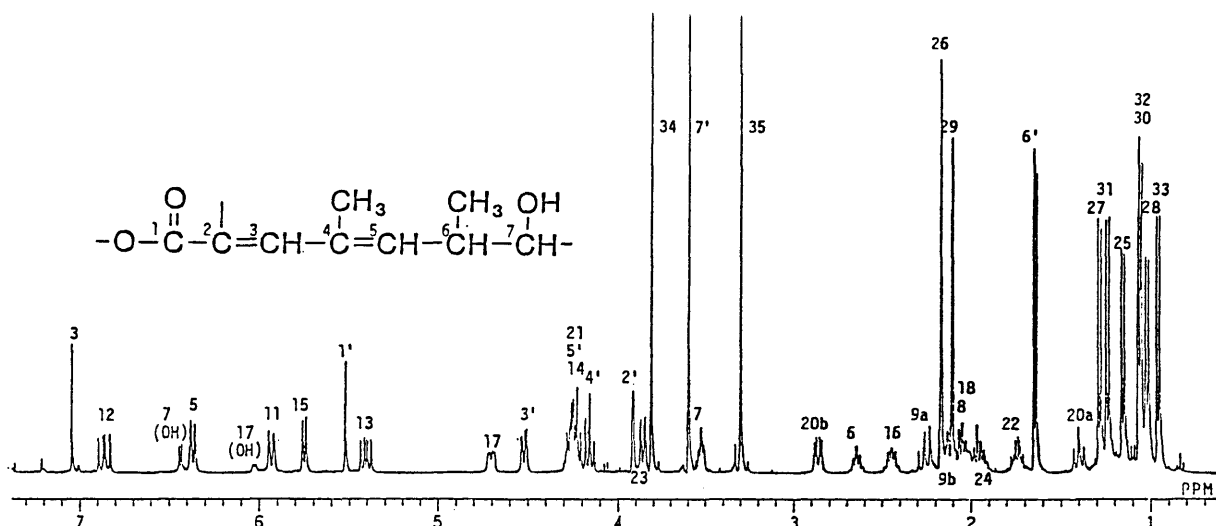


図-17 IのCOSYスペクトル (pyridine-d₅)

結合する水酸基は、それぞれの水酸基の水素とC-7及びC-17のメチン水素とのカップリングが CDCl_3 中でのCOSYスペクトルに於て観測されることより（図-19）結合位置が決定された。 ${}^{-2}\text{C}={}^3\text{C}-{}^4\text{C}={}^5\text{C}-$ の共役ジエン系は、H-5がC-4に結合するメチル基の水素及びH-3とアリル位のロングレンジカップリングが見られることより証明された。

${}^{-7}\text{CH}-{}^8\text{CH}-{}^9\text{CH}_2-$ の連がりには CDCl_3 中の ${}^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては、 δ 1.9付近にH-8、H-9a、H-24の3水素のシグナルが混み合い、また δ 2.14付近ではH-9bとH-16のシグナルが重なり不明であった。しかし、pyridine- d_5 中では、それらのシグナルがよく分離し（図-20）まずC-8とC-9間の結合が判明した。H-7とH-8のカップリングは、pyridine- d_5 中のCOSYスペクトルでは見られなかったが、 CDCl_3 中のCOSYスペクトルで混み合っていたH-24、H-9aのそれぞれの結合が明らかとなったため、残りのH-8のカップリングを考えることにより、C-7とC-8間の結合が示された。C-9とC-10間の結合は、H-9bとH-11のアリルカップリングにより判明し（図-20）、C-10位のメチル基の存在も、H-11とのロングレンジカップリングにより決定された。

C-17とC-18間の結合はCOSYスペクトルでは不明であったが CDCl_3 中で通常のスピンデカップリング実験を行うことにより、H-17とH-18のカップリングが示され証明された。H-18はC-18位メチル基及びH-17と以外にはカップリングが存在せず、C-18の隣には4級炭素が結

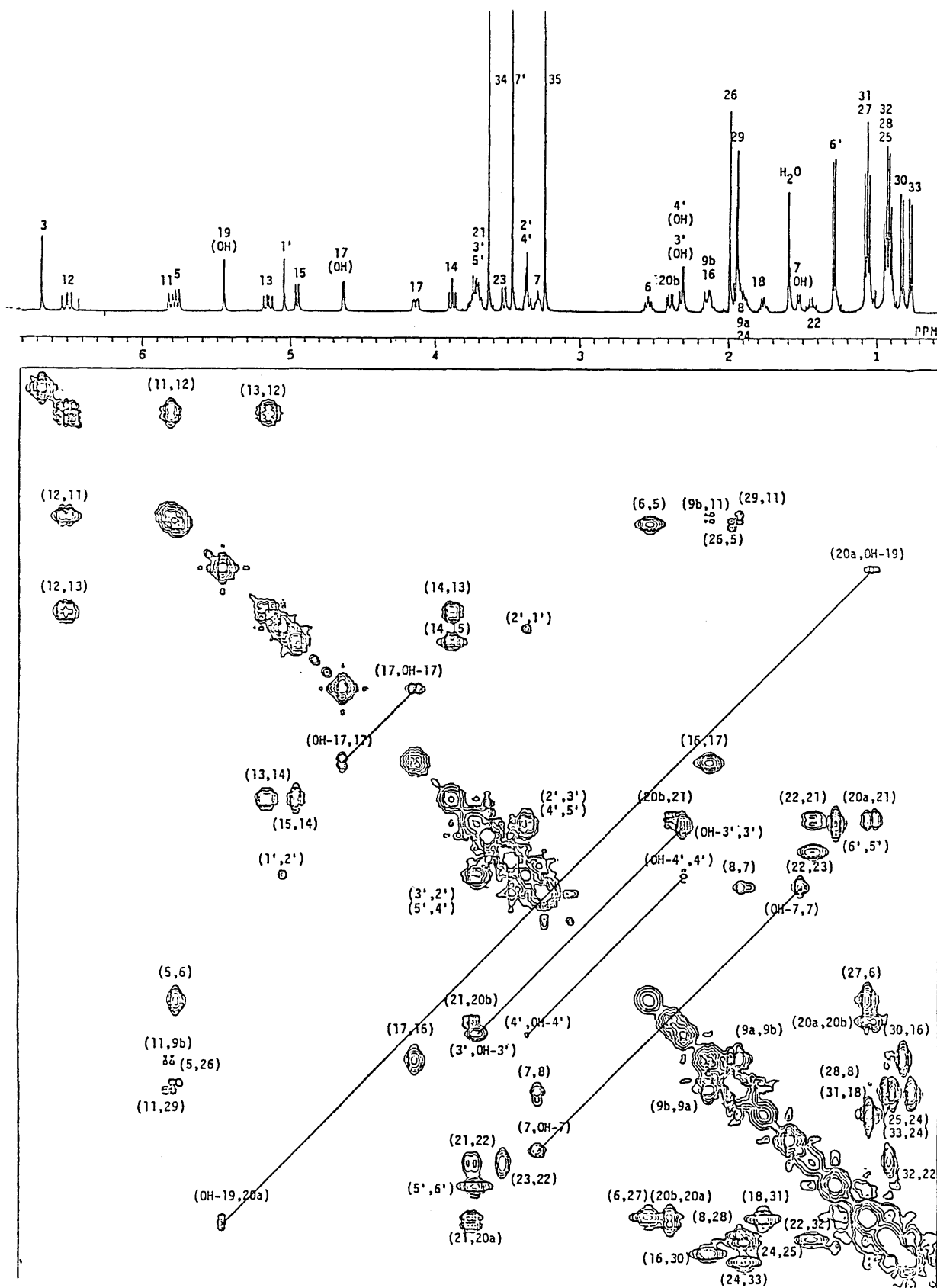


図-19 1D COSY スペクトル (CDCl₃)

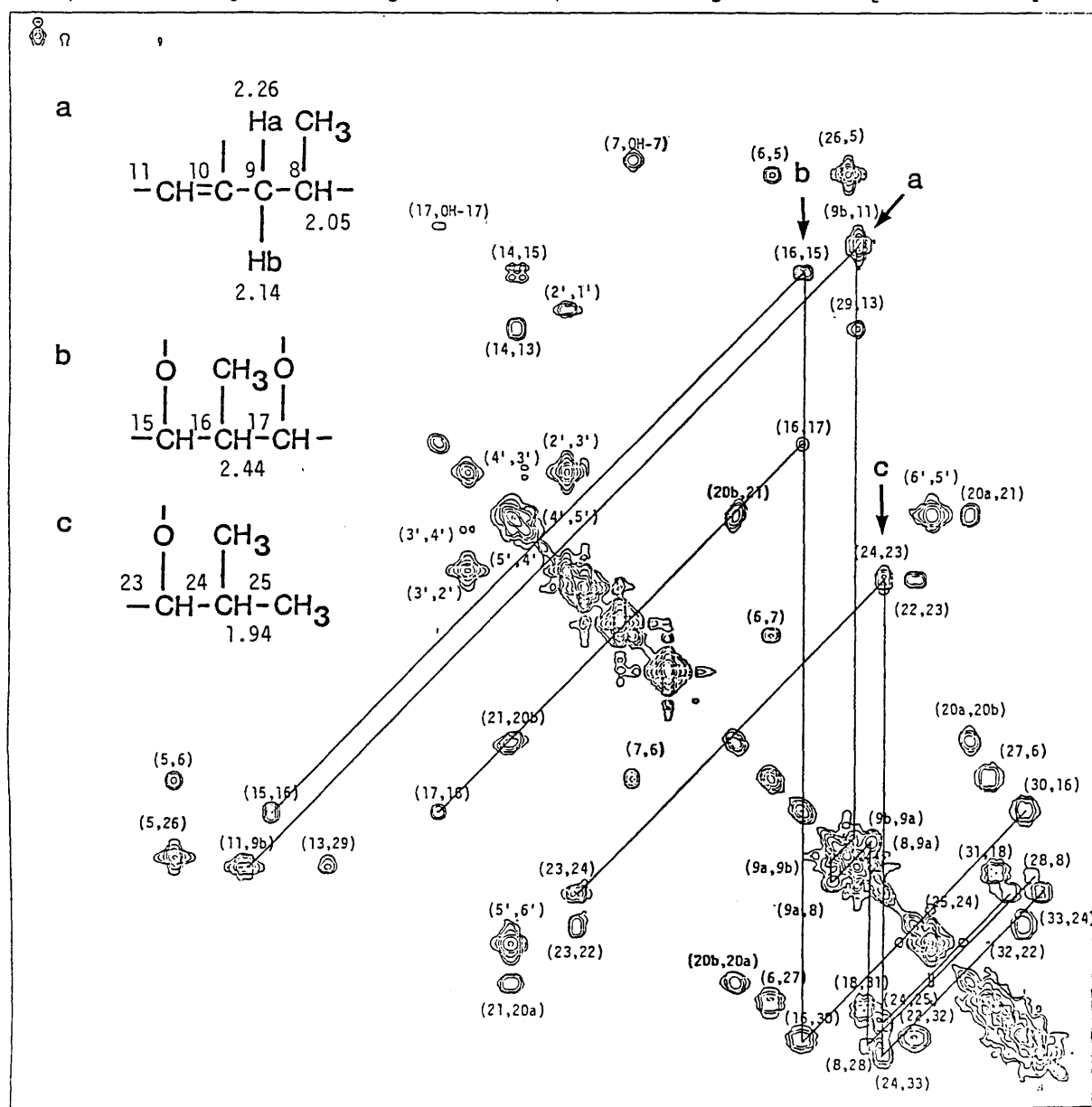
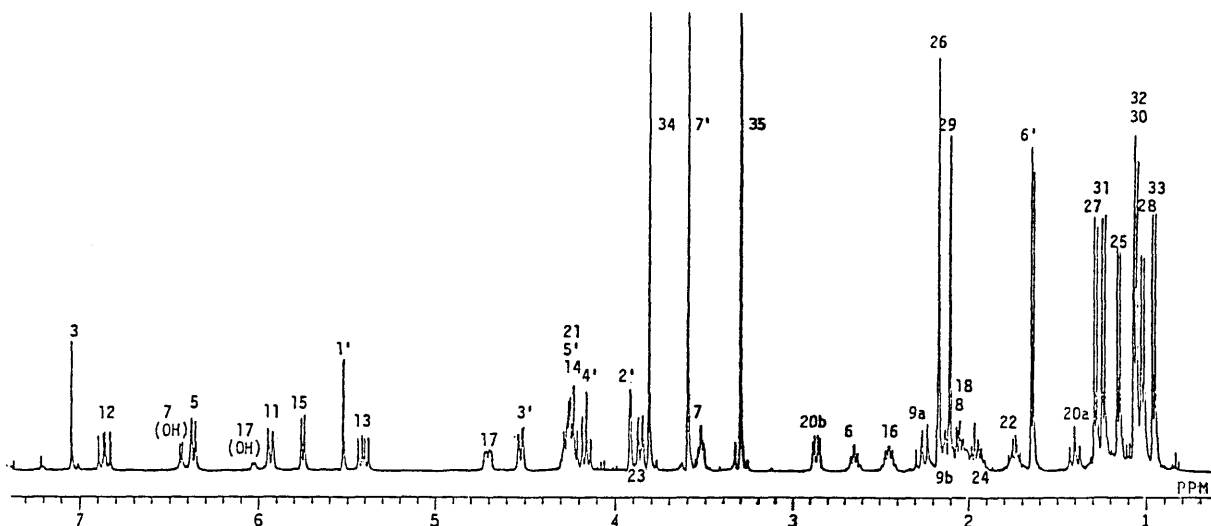


図-20 IのCOSYスペクトル (pyridine-d₅)

合していると考えられた。

IR及びUVスペクトルより存在が示唆された α 、 β 、 γ 、 δ 不飽和エステル系は、Iには炭素間二重結合が4個しか存在せず、それらは全て部分構造A中にあらわれていることより、 $-^2C=^3C-^4C=^5C-$ のジエン系にエステルカルボニルが共役することが明らかになった。これはH-3のケミカルシフト δ 6.67ともよく一致した。H-15のケミカルシフト δ 4.96は、1個の酸素原子と結合したメチン炭素の中では最も低磁場であり、エステル基はC-15と結合していることが示された。従って、C-1からC-15の間で16員環ラクトンが形成されていることが判明した。

C-14及びC-2にメトキシル基が結合していることは、NOE実験により証明された。即ち、 δ 3.24及び δ 3.64のメトキシル基を照射することにより、H-14とC-4位メチル基にそれぞれNOEが観測された(図-21)。二重結合の配置は、上記のC-4位メチル基とC-2位メトキシル基間のNOE実験に加えて、H-12及びH-3の照射により、C-10位メチル基及びH-5にそれぞれNOEが観測されることと、H-12とH-13間のカップリングコンスタントの値(15Hz)より、C-2,3ではZ、C-4,5、C-10,11、C-12,13ではEであることが判明した。

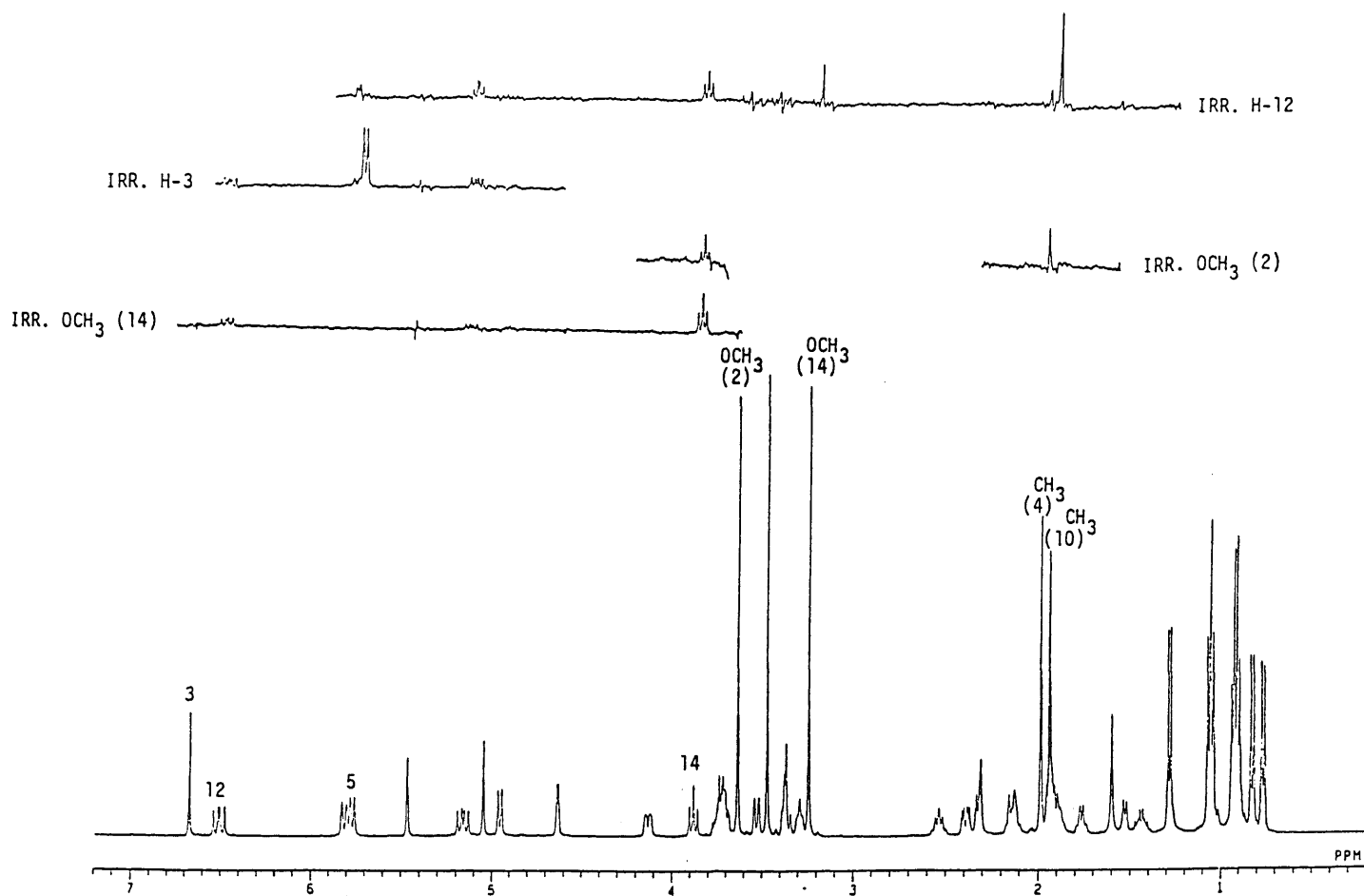
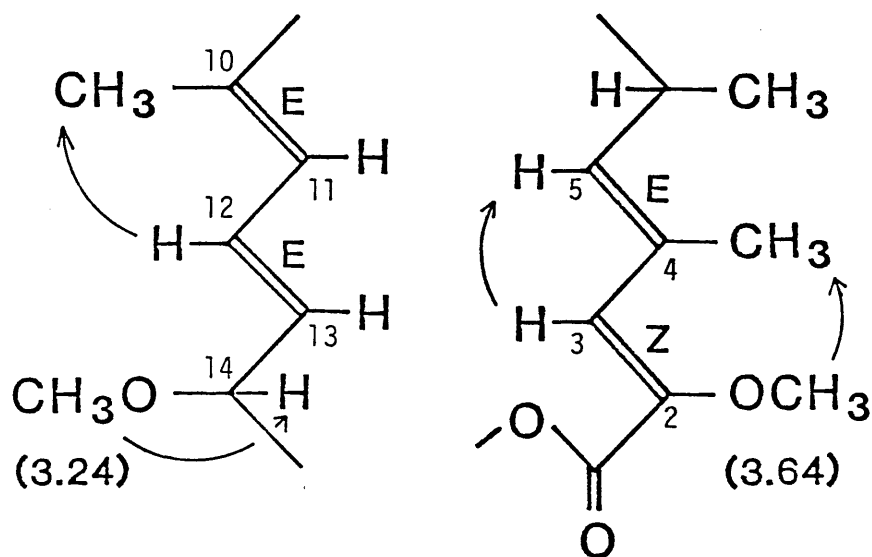


図-21 NOE差スペクトル

(ii)部分構造B

CDCl₃中で測定したCOSYスペクトルより、C-20からC-23までの連がりが明らかになった(図-22)。また、前述したようにH-24はpyridine-d₅中でのCOSYスペクトルより、H-23とのカップリングが示され(図-20)、C-20からC-25までが証明された。

CDCl₃中のCOSYスペクトルでH-20aとのカップリング(J=2Hz)が観測される水酸基は、4級炭素に結合しているものと考えられ、¹³C-NMRスペクトルにより示された-O-C-O-が酸素原子の結合した唯一の4級炭素であることと、残りの2個の水酸基は、以下に述べる部分構造Cに含まれることより、Iは分子中にヘミケタール構造を有していることが示唆された。

(iii)部分構造C

部分構造Cはpyridine-d₅中のCOSYスペクトルより明らかになった(図-23)。さらに、CDCl₃中でのCOSYスペクトルより2個の水酸基が部分構造C中に存在し、1個はC-2'かC-4'に、もう1個はC-3'かC-5'に結合していることが示された(図-19)。

以上述べた部分構造A、B、C中には、メトキシル基1個をのぞき、Iの分子中の原子は全て含まれている。従って、炭素-炭素間の結

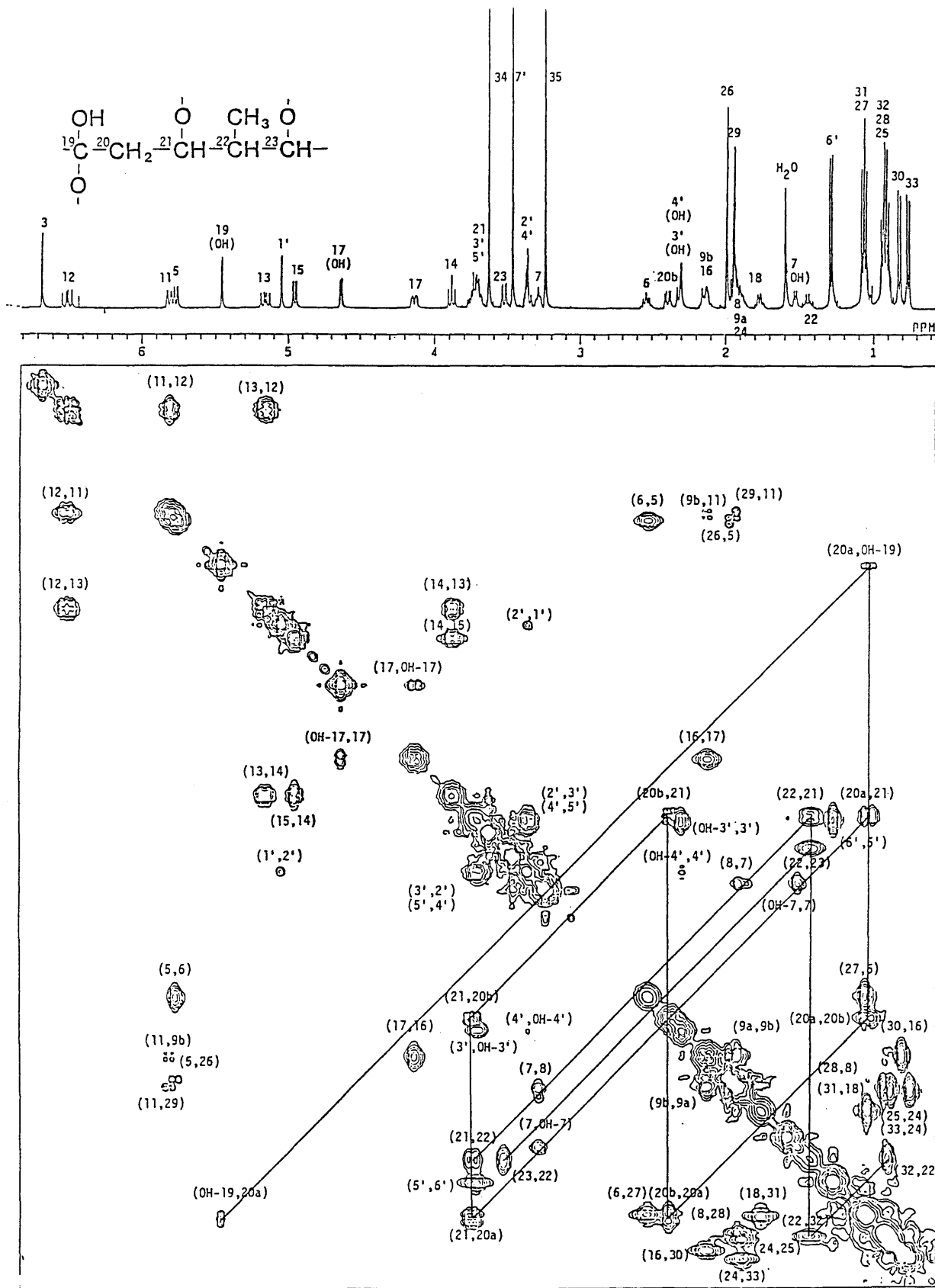


図-22 IのCOSYスペクトル (CDCl₃)

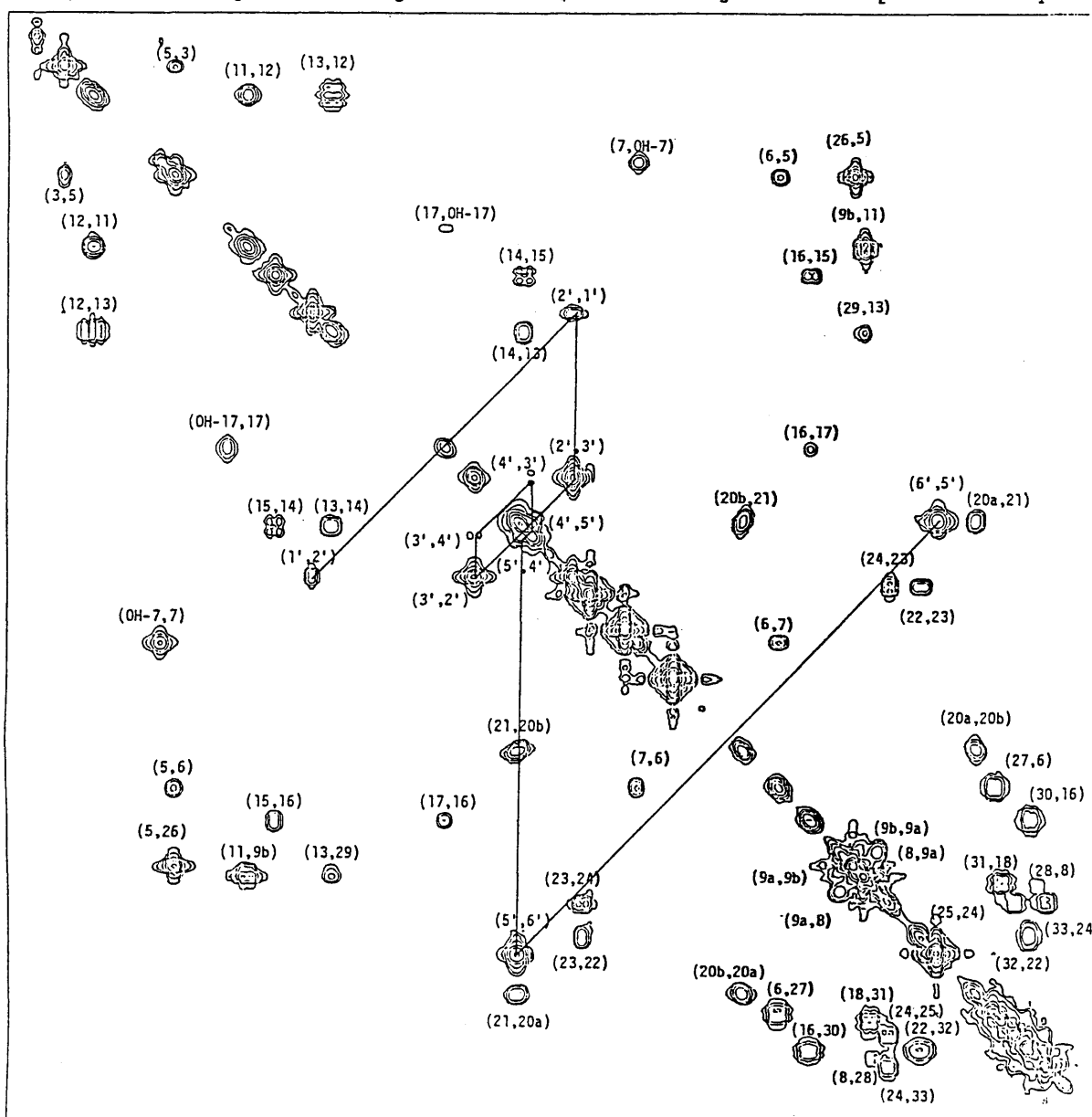
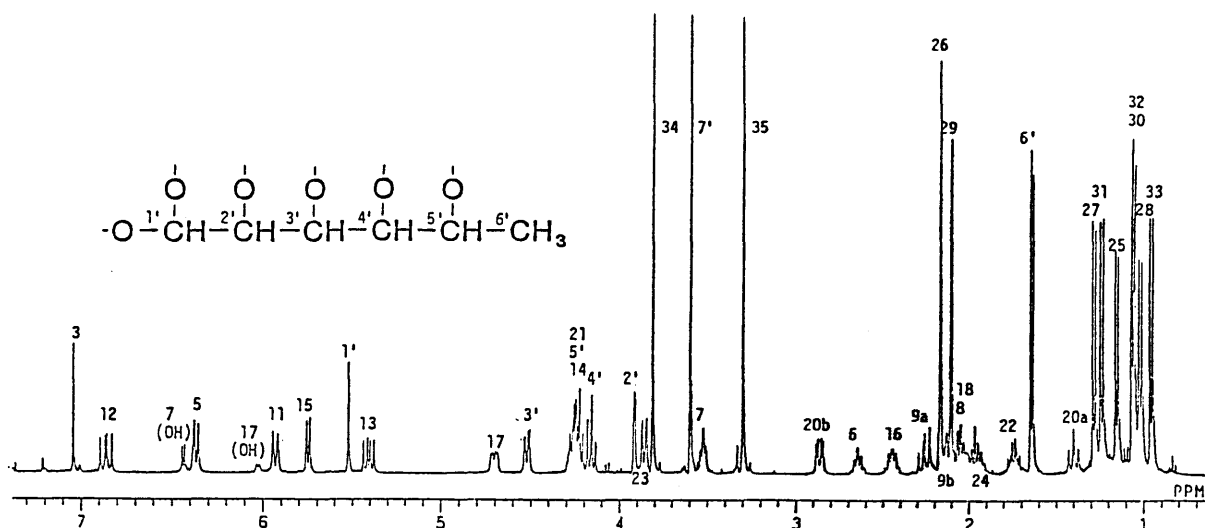


図-23 IのCOSYスペクトル (pyridine- d_5)

合はC-18とC-19の間にしか残っておらず、C-18とC-19は結合することが示された。

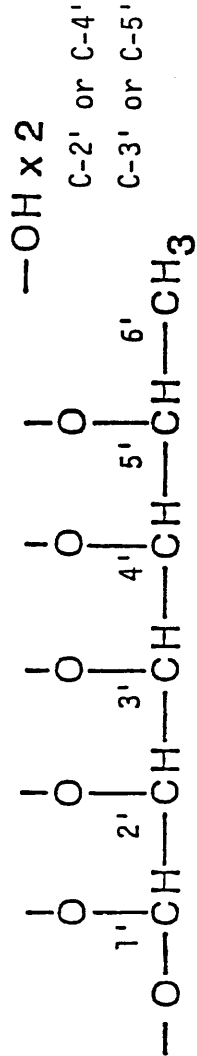
Iの不飽和度は8であり、4個の炭素間二重結合及びカルボニルを差し引くと、Iは3環性の構造を有することになる。うち1つは16員環ラクトンであることが示された。残りのうち1つは、部分構造Cより考えると6-デオキシヘキソースである可能性が強い。そこで、Iの酸加水分解を行い、糖部分の単離を試みた。

2-3-3 leucanicidinの酸化水分解

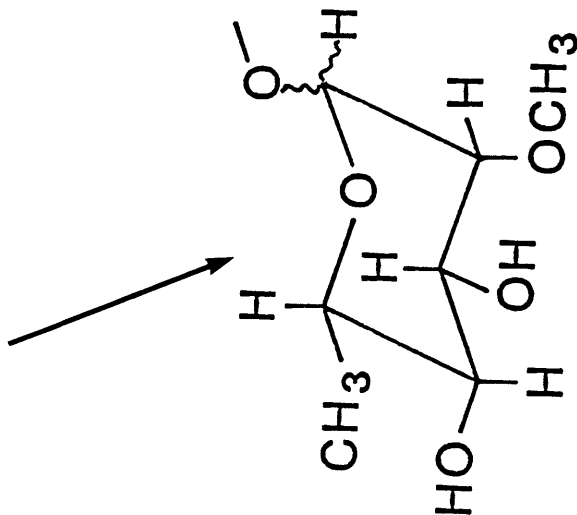
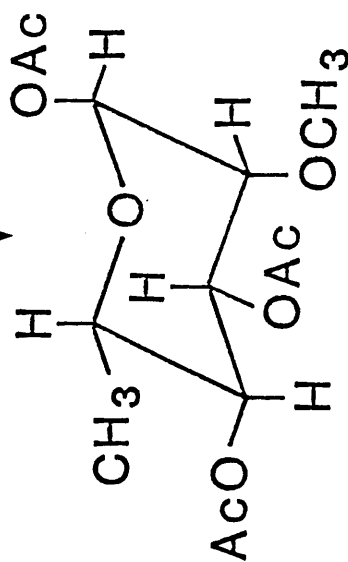
leucanicidinを0.5NHClで処理し、EtOAcで抽出した残りの水溶性区を無水酢酸-ピリジンでアセチル化すると、白色油状物(II)が得られた。IIは分子式 $C_{13}H_{20}O_8$ 、FDMS、 ^{13}C -NMRスペクトル、 1H -NMRスペクトル、及び旋光度より2-O-methyl-1,3,4-triacetyl- α -L-rhamnoseと同定された^{42,43)}。 α アノマーであることは $^1J_{C1'-H1'}$ の値(175Hz)より示された⁴⁴⁾。これより部分構造Cは2-O-methyl-L-rhamnose残基として存在し、水酸基の結合位置はC-3'とC-4'と決定され、最後のメトキシル基の結合位置もC-2'であることが判明した(図-24)。

以上より、糖はC-19、C-21、C-23のいずれかの炭素と結合し、残った2つの炭素は最後の酸素原子を介して結合し、3つ目の環構造

Partial structure C



0.5N HCl
Ac₂O/Pyridine



2-O-methyl-1,3,4-O-triacetyl- α -L-rhamnose

を形成することになった。

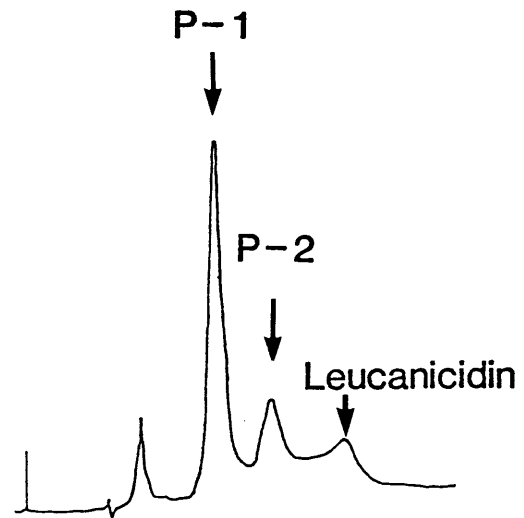
2-3-4 leucanicidinのNaBH₄還元

2-0-methyl-L-rhamnose残基の結合位置の証明、及び構造の確認のため、leucanicidinのNaBH₄での処理を行った。

leucanicidinをNaBH₄とEtOH中で反応させるとP-1、P-2の2つの主な生成物が得られた(図-25)。生成比は、反応温度が室温ではP-1が、45℃ではP-2が多かった。それぞれのFABマススペクトルをジエタノールアミンマトリックスを用いて測定するとP-1はm/z 890に、P-2はm/z 712にそれぞれ[M+H+NH(C₂H₄OH)₂]⁺のイオンと考えられるピークが観測された。従って、分子量はP-1では784、P-2では606と推定された。これらの分子量より、P-1ではヘミケタール部分が還元され2分子量増し、P-2では糖部分の脱離が起り、さらに還元が起ったことが示唆された。

そこで、P-2の¹³C-NMR及びCOSYスペクトルを測定した(図-26、27)。¹³C-NMRスペクトルでは、Iに存在した糖部分(δ 17.5, 58.8, 68.1, 71.7, 74.0, 75.1, 92.3)とヘミケタール(δ 98.8)の炭素のシグナルが消失し、新たに二重結合領域の炭素のシグナルが2本(δ 132.3, 133.6)増えていた。P-2のCOSYスペクトルからは図-28に示すような部分構造が得られた。この部分構造より図-29に

(1) Room temp. 2hr



(2) 45°C 2hr

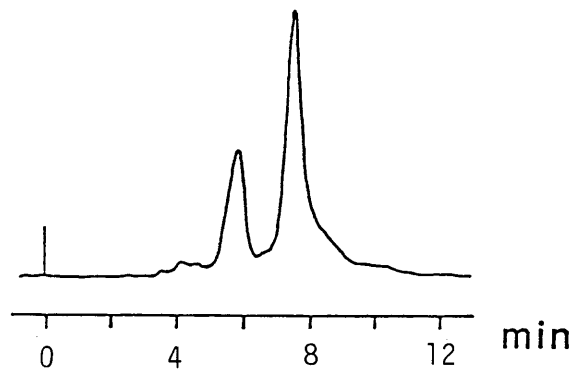


図-25 IのNaBH₄還元生成物のHPLC

カラム：Partisil 10C₁₈ (4.6x250mm)

移動相：CH₃CN-10mM AcONH₄ (13:7)

流速：1.0ml/min

検出：UV 248nm

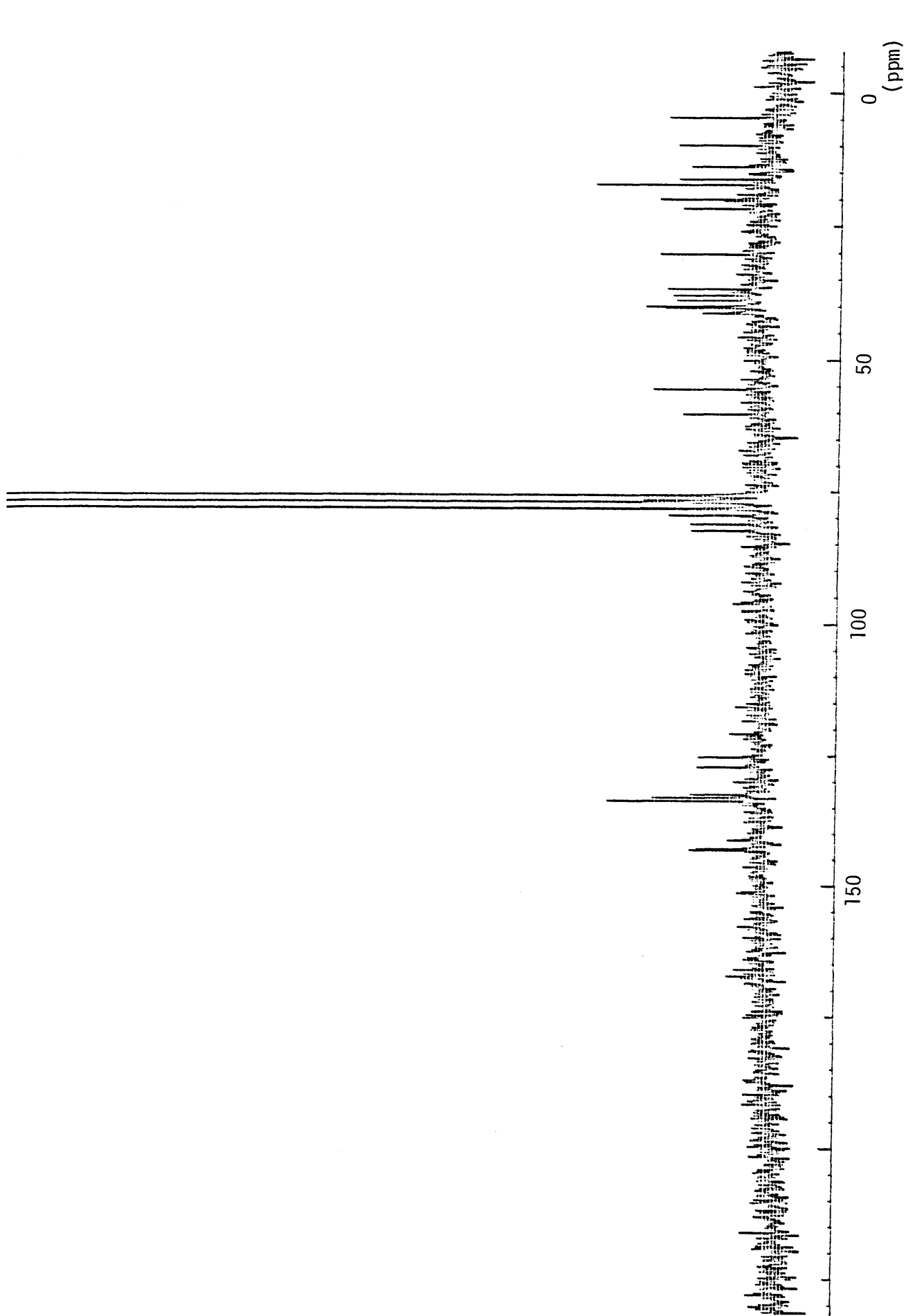


図-26 P-20の¹³C-NMRスペクトル (CDCl₃)

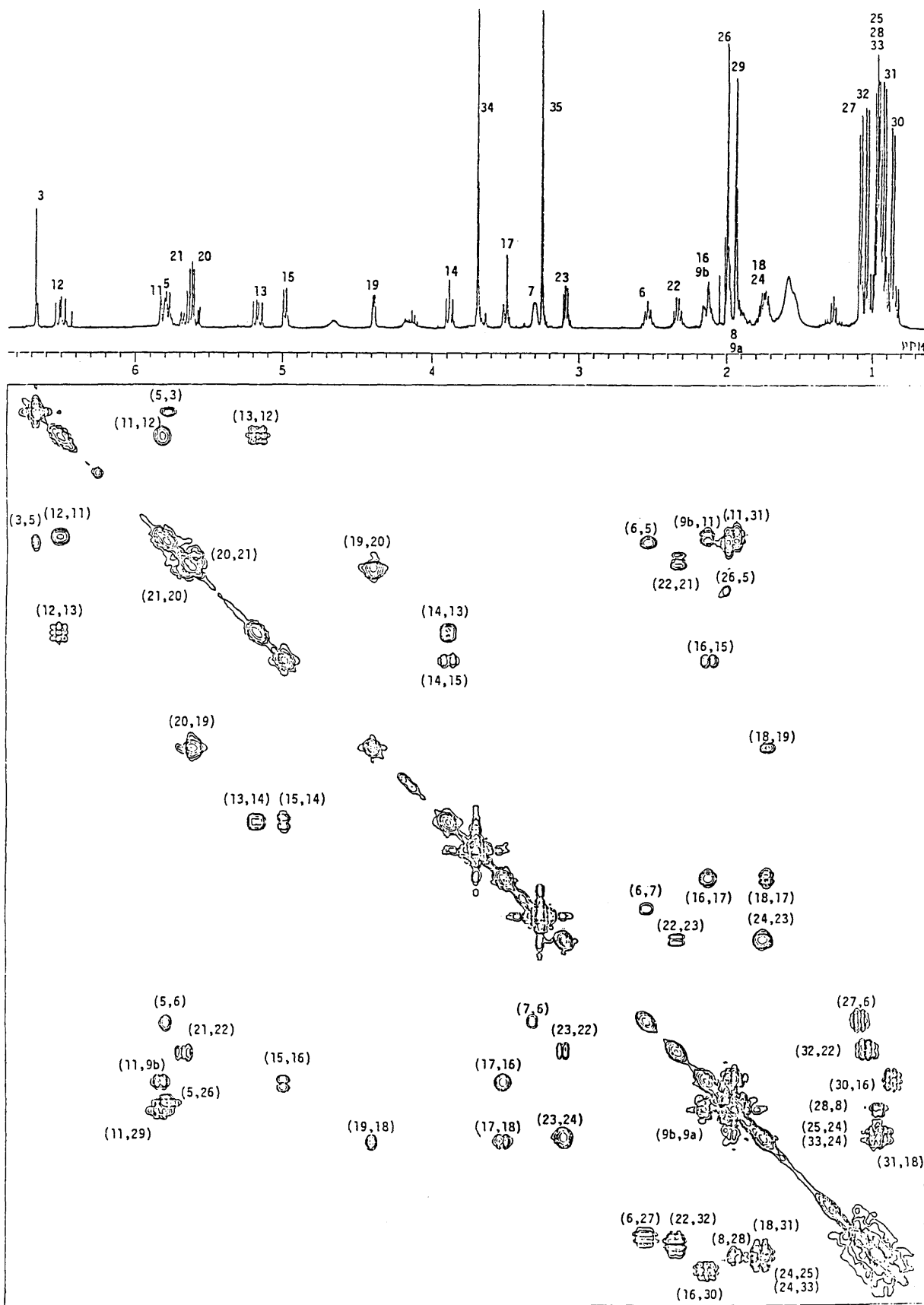


図-27 P-2のCOSYスペクトル (CDCl₃)

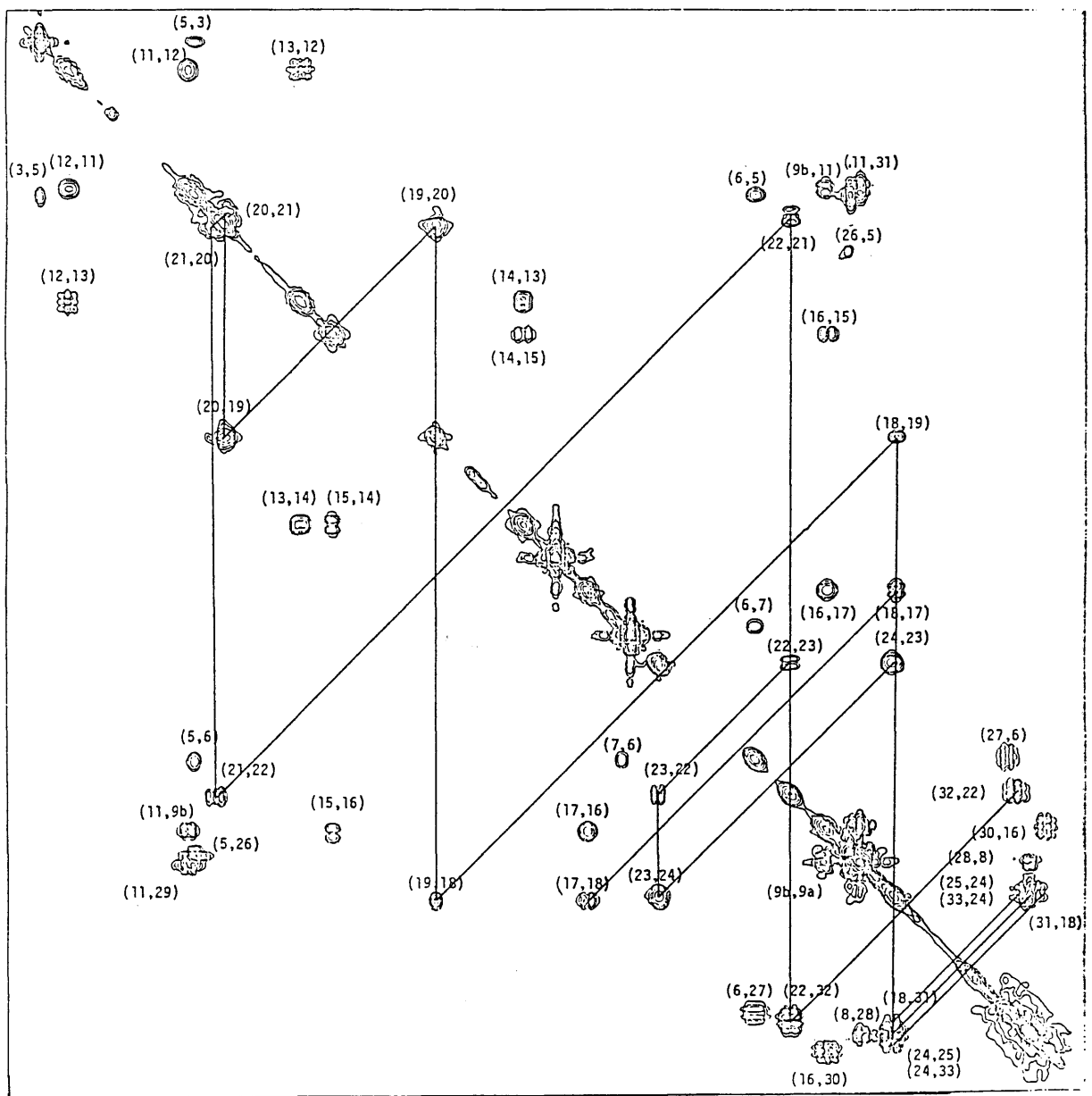
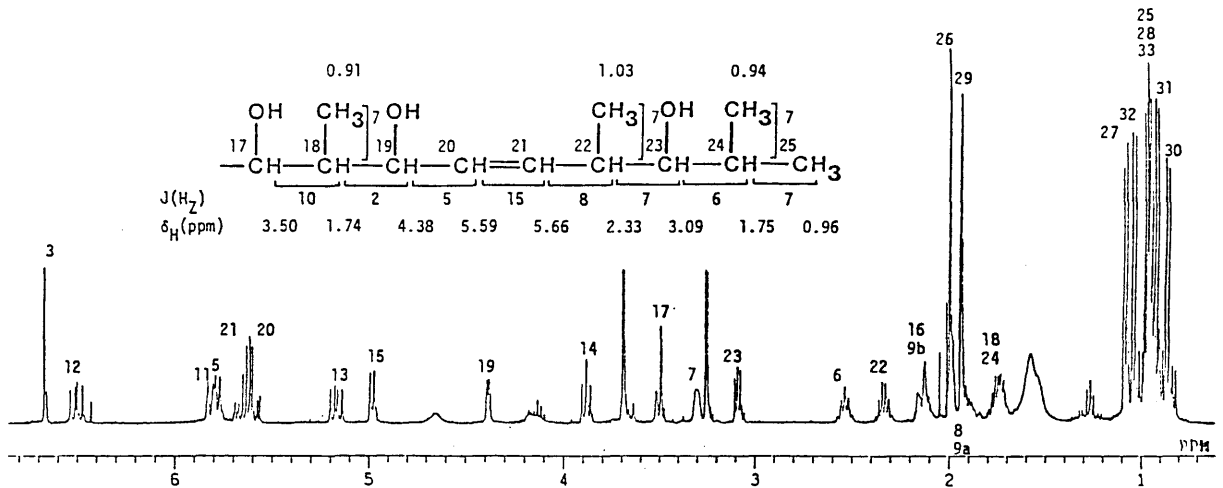


図-28 P-2のCOSYスペクトル (CDCl₃)

示す反応が起ったことが示唆された。即ち、 NaBH_4 の塩基性により糖がC-21より β -脱離し、その後C-19のケトンが還元されたものと考えられる。P-2のスペクトル中には、Iの16員環ラク톤部分のシグナルは全て存在し、P-2の構造は図-30のように決定された。表-2にP-2の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおける各水素の帰属を示した。

表-2 P-2の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの帰属

Position	$\delta(\text{ppm})$	Splitting pattern		J(Hz)
30	0.85	d	3H	7
31	0.91	d	3H	7
33	0.94	d	3H	7
28	0.95	d	3H	7
25	0.96	d	3H	7
32	1.03	d	3H	7
27	1.07	d	3H	7
OH-7	1.54	d	1H	6.5
18	1.73	m	1H	10, 7, 2
24	1.75	m	1H	7, 7, 6
8	1.91	m	1H	11, 7, 7
29	1.93	br.s	3H	
9a	1.94	d.d	1H	14, 11
26	1.99	d	3H	1
16	2.12	m	1H	7, 2, 1.5
9b	2.14	br.d	1H	14, 1
22	2.33	m	1H	8, 7, 7
6	2.53	m	1H	9, 7, 2
23	3.09	d.d	1H	7, 6
35	3.25	s	3H	
7	3.30	m	1H	7, 6.5, 2
17	3.50	m	1H	10, 4, 2
34	3.69	s	3H	
14	3.88	t	1H	9, 9
19	4.38	d.d	1H	5, 2
OH-17	4.65	d	1H	4
15	4.98	d.d	1H	9, 1.5
13	5.17	br.d.d	1H	15, 9
20	5.59	d.d	1H	15, 5
21	5.66	d.d	1H	15, 8
5	5.78	br.d	1H	9, 1
11	5.82	br.d	1H	11
12	6.50	d.d	1H	15, 11
3	6.67	br.s	1H	

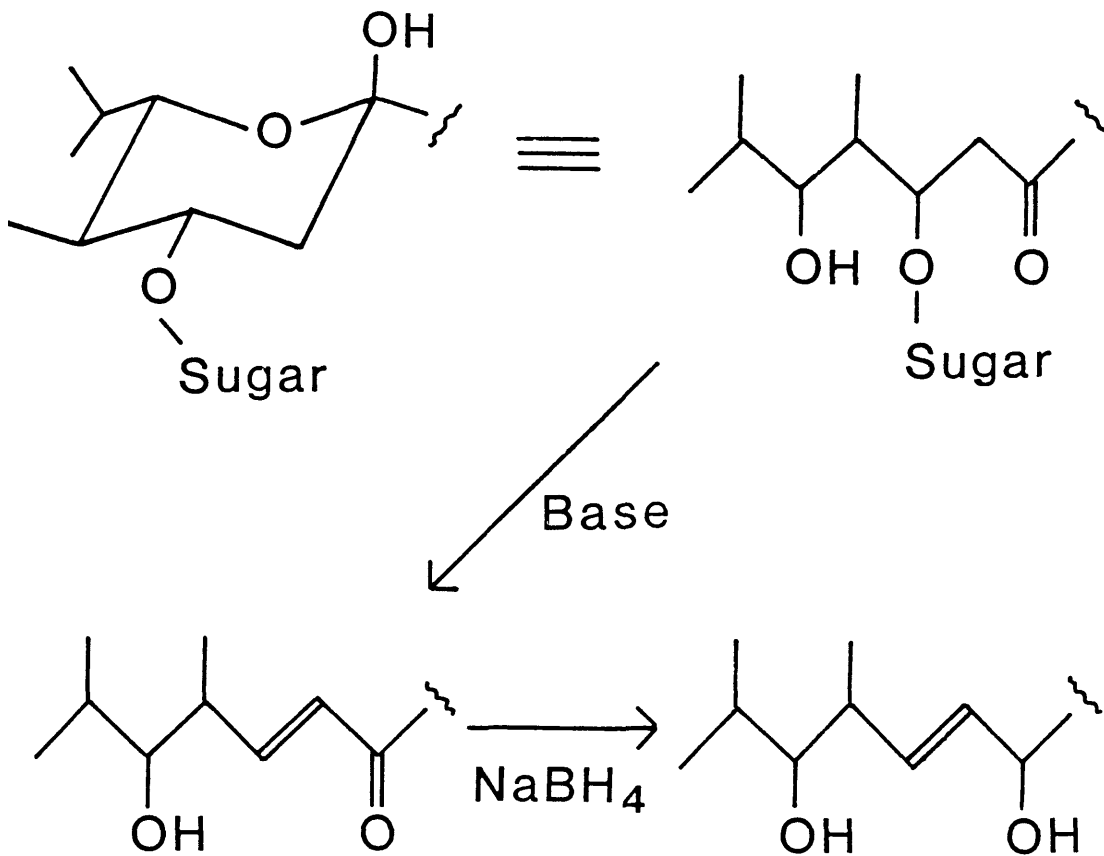


図-29 IのNaBH₄還元

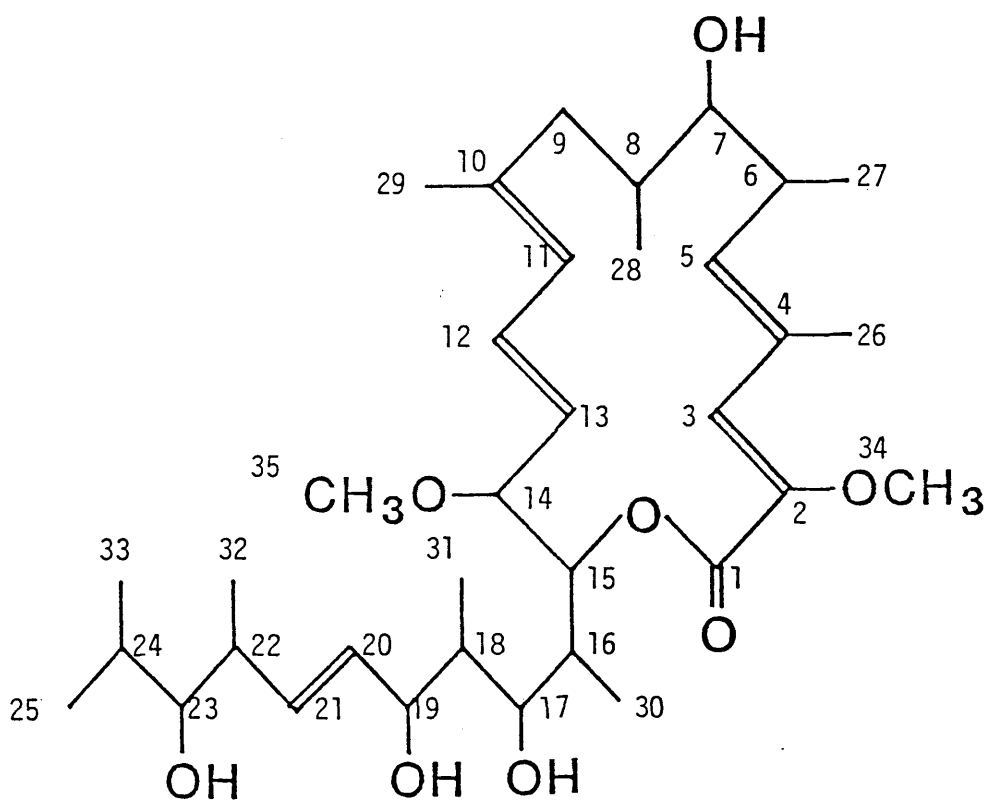


図-30 P-2の構造

2-3-5 leucanicidinの構造

I の NaBH_4 処理により得られた P-2 の構造より、2-O-methyl-L-rhamnose 残基は C-21 にグリコシド結合していたことが証明された。また、H-18 と還元により生じた H-19 との間のスピンカップリングにより C-18 と C-19 の結合は確認された。そして、I においては C-19 ケトンと C-23 位 OH との間でヘミケタールを形成し、テトラヒドロピラン環を形成していることが明らかとなった。こうして leucanicidin の全構造は図-31 のように決定された。

C-19 から C-23 の間でのテトラヒドロピラン環の相対構造は、それぞれの水素間の結合定数の値より、図-32 のように示された。C-19 位の OH と H-20a は 2Hz の結合定数を有しており、両者は W 字型の関係にあることが示された⁴⁵⁾。また、2-O-methyl-L-rhamnose 残基のグリコシド結合の様式は $^1J_{\text{C}1'-\text{H}1'}$ の値 (167Hz) より α であることが決定された⁴⁶⁾。

表-3 及び 4 に leucanicidin の $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルの各シグナルの帰属を示した。 $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルにおける各シグナルの帰属は類縁化合物との比較により行った。

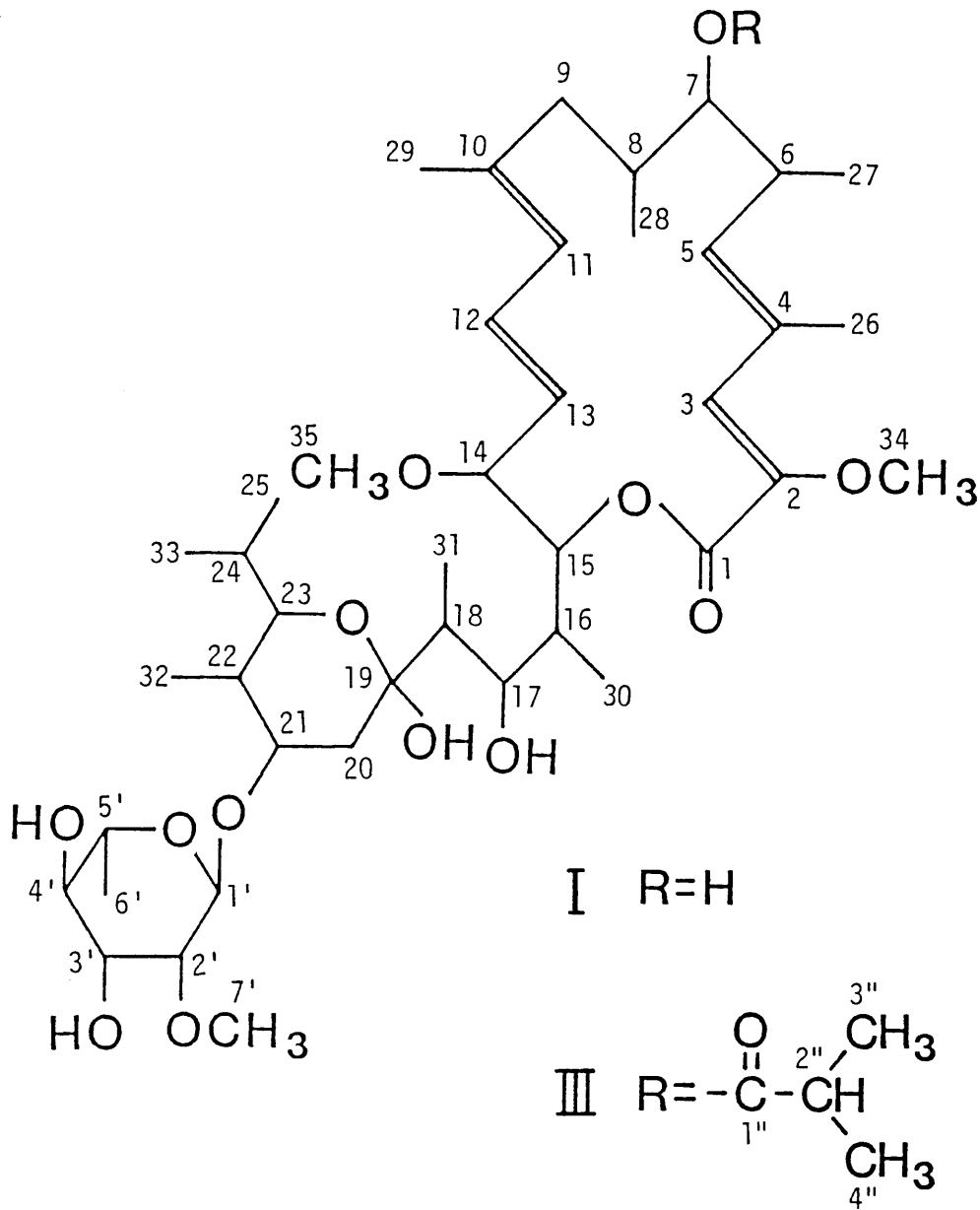


図-31 leucanicidin(I)、isobutyrylleucanicidin(III)の構造

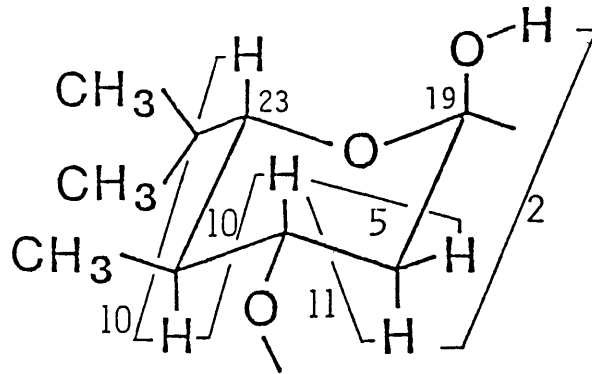


図-32 Iのテトラヒドロピラン環の相対配置

表-3 leucanicidin(I)の¹H-NMRスペクトルの帰属

Position	δ(ppm)	Splitting pattern		J(Hz)
33	0.76	d	3H	7
30	0.82	d	3H	7
25	0.91	d	3H	7
32	0.92	d	3H	7
28	0.94	d	3H	7
31	1.05	d	3H	7
20a	1.05	br.t	1H	11, 2
27	1.07	d	3H	7
6'	1.29	d	3H	6
22	1.44	m	1H	10, 10, 7
OH-7	1.54	d	1H	6.5
18	1.76	br.q	1H	7, 2
8	1.91	m	1H	7, 7, 11
24	1.91	m	1H	7, 7, 2
9a	1.93	d.d	1H	14, 11
29	1.93	br.s	3H	
26	1.99	d	3H	1
16	2.13	m	1H	11, 7, 2
9b	2.14	br.d	1H	14, 1
OH-3'	2.33	d	1H	10
OH-4'	2.33	br.s	1H	
20b	2.39	d.d	1H	11, 5
6	2.54	m	1H	9, 7, 2
35	3.24	s	3H	
7	3.29	m	1H	11, 7, 7
2'	3.37	d.d	1H	1.5, 3
4'	3.37	br.t	1H	9
7'	3.47	s	3H	
23	3.53	d.d	1H	10, 2
34	3.64	s	3H	
3'	3.71	m	1H	10, 9, 3
5'	3.72	d.q	1H	9, 6
21	3.74	m	1H	11, 10, 5
14	3.88	t	1H	9
17	4.14	m	1H	11, 4, 2
OH-17	4.63	d	1H	4
15	4.96	d.d	1H	9, 2
1'	5.05	d	1H	1.5
13	5.16	dr.d.d	1H	15, 9
OH-19	5.46	d	1H	2
5	5.77	br.d	1H	9, 1
11	5.81	br.d	1H	11, 1
12	6.51	d.d	1H	15, 11
3	6.67	br.s	1H	

表-4 leucanicidin(I)の¹³C-NMRスペクトルの帰属

Carbon	δ (ppm)	Multiplicity	Carbon	δ (ppm)	Multiplicity
31	7.2	q	3'	68.1	d
30	9.8	q	17	70.7	d
25	12.7	q	5'	71.7	d
26	14.0	q	4'	74.0	d
32	14.3	q	2'	75.1	d
27	17.3	q	23	75.8	d
6'	17.5	q	15	76.8	d
29	20.2	q	7	81.2	d
33	21.1	q	21	81.2	d
28	21.7	q	14	82.3	d
24	27.9	d	1'	92.3	d
6	36.7	d	19	98.8	s
16	37.2	d	11	125.3	d
22	38.9	d	13	127.2	d
20	39.0	t	4	133.0	s
8	40.0	d	12	133.0	d
9	41.3	t	3	133.5	d
18	42.2	d	2	141.3	s
35	55.5	q	5	142.8	d
7'	58.8	q	10	143.0	s
34	59.9	q	1	167.3	s

2-4 isobutyrylleucanacidinの構造

isobutyrylleucanacidin(III)のUVおよび $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(図-33)は、leucanacidin(I)のものと極めて類似しており、IIIはIの類縁化合物であることが示唆された。IIIのジエタノールアミンマトリックスで測定したFABマススペクトル(図-34)では m/z 958に $[\text{M}+\text{H}+\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})_2]^+$ の擬分子イオンと考えられるピークが観測された。従って、IIIの分子量は852と推定され、それはIより70大きいものであった。IIIの分子式は、後述の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルの結果を考慮し、 $\text{C}_{46}\text{H}_{76}\text{O}_{14}$ と考えることができた。

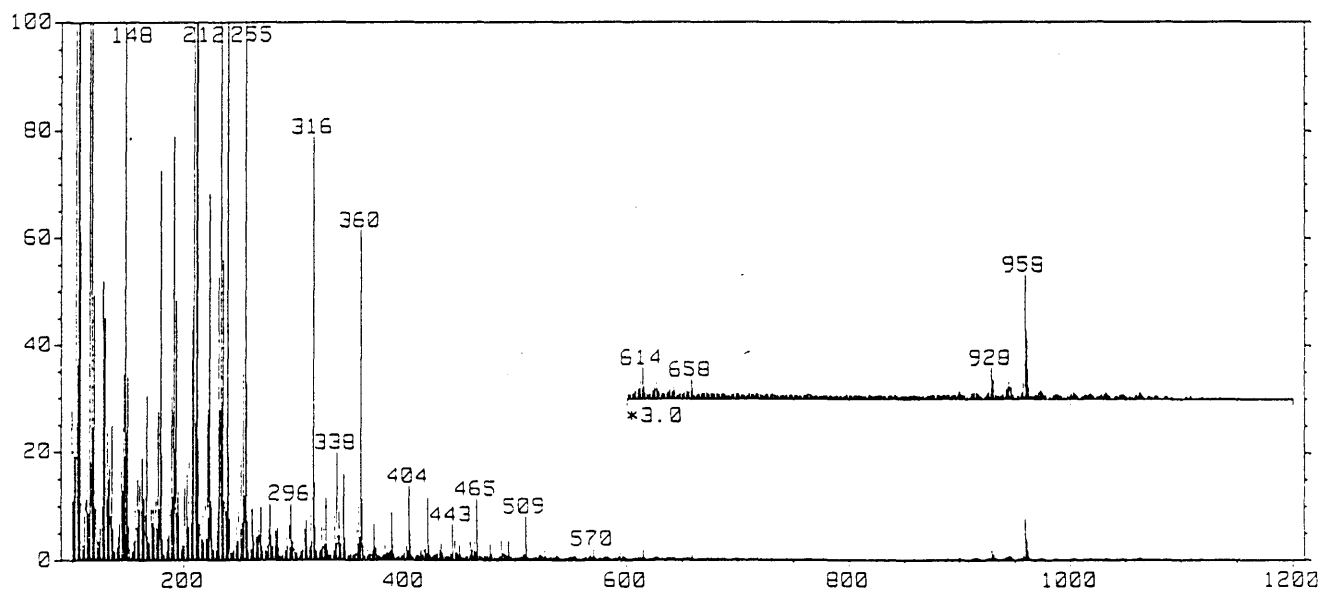


図-34 IIIのFABマススペクトル(ジエタノールアミンマトリックス)

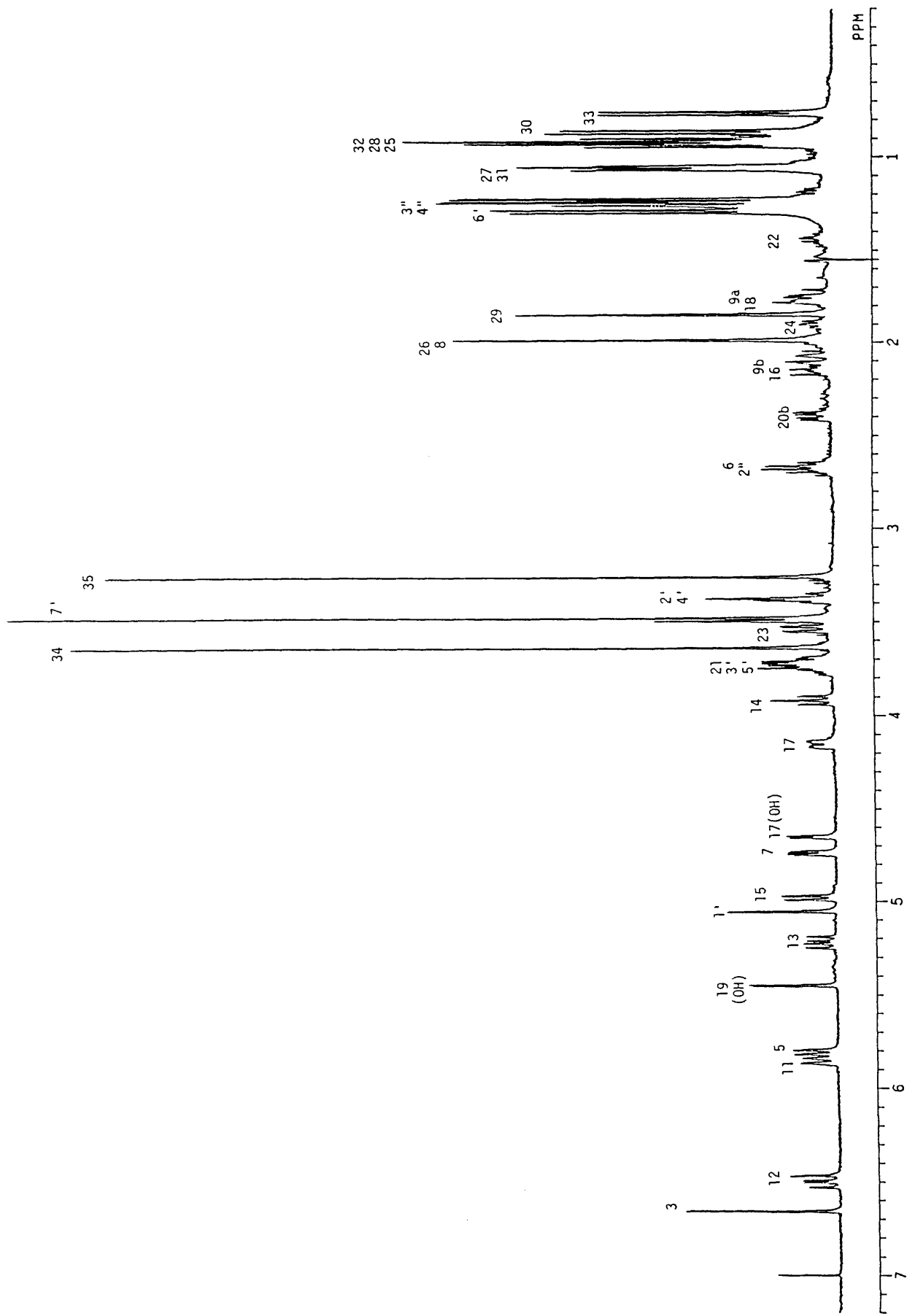


図-33 IIIの¹H-NMRスペクトル (CDCl₃, 400MHz)

ⅢとⅠの¹H-NMRスペクトルの詳細な比較を行った結果、Ⅰで観測されるシグナルのうちC-6からC-8の部分に相当する水素のシグナルについてのみ、Ⅲにおいて大きく変化していることが明らかとなった。特に、C-7位のメチン水素がⅠにおける δ 3.29からⅢの δ 4.74へと大きく低磁場シフトしていた。さらに、Ⅲのスペクトルにおいては、 δ 1.22及び1.23に2組のダブルットメチル水素のシグナルが、また δ 2.68に1個のヘプテット水素のシグナルが新たに観測された。これらの結果はⅢはⅠのmonoisobutyrateであり、isobutyryl化されているのはⅠのC-7位の水酸基であるということを強く示唆した。

isobutyl基の存在は、Ⅲをエタノール中0.1NNaOHで加水分解を行い、分解物に含まれるisobutyric acidをGC-MSで同定することにより確認された。以上より、Ⅲの構造は図-31に示すように決定された。

Ⅲの¹H-NMRスペクトルにおける各水素の帰属を表-5に示した。

表-5 isobutyrylleucanicidin(III)の¹H-NMRスペクトルの帰属

C-Position	δ (ppm)	Splitting pattern		J(Hz)
33	0.76	d	3H	7
30	0.86	d	3H	7
25	0.91	d	3H	7
32	0.92	d	3H	7
28	0.94	d	3H	7
31	1.05	d	3H	7
20a	1.05	br.t	1H	11,2
27	1.06	d	3H	7
3"	1.22	d	3H	7
4"	1.23	d	3H	7
6'	1.29	d	3H	6
22	1.44	m	1H	10,10,7
18	1.76	br.q	1H	7,2
9a	1.76	d.d	1H	15,11
29	1.84	br.s	3H	
24	1.91	m	1H	7,7,2
8	1.99	m	1H	11,7,7
26	1.99	d	3H	1
9b	2.09	br.d	1H	15,1
16	2.15	m	1H	11,7,2
20b	2.39	d.d	1H	11,5
6	2.67	m	1H	9,7,2
2"	2.68	q.q	1H	7
35	3.25	s	3H	
2'	3.37	d.d	1H	1.5,3
4'	3.37	br.t	1H	9
7'	3.47	s	3H	
23	3.53	d.d	1H	10,2
34	3.64	s	3H	
3'	3.71	m	1H	10,9,3
5'	3.72	d.q	1H	9,6
21	3.74	m	1H	11,10,5
14	3.91	t	1H	9
17	4.15	m	1H	11,4,2
OH-17	4.65	d	1H	4
7	4.74	d.d	1H	7,2
15	4.98	d.d	1H	9,2
1'	5.05	d	1H	1.5
13	5.21	br.d.d	1H	15,9
OH-19	5.45	d	1H	2
5	5.81	br.d	1H	9,1
11	5.85	br.d	1H	11,1
12	6.50	d.d	1H	15,11
3	6.66	br.s	1H	

2-5 生物活性

leucanicidinの殺虫活性をアワヨトウ幼虫を用いて検定した結果を以下に示した。

図-35はアワヨトウ3令眠の幼虫を用いて、無菌摂食法により生物検定を行った時の4日後の様子を示している。leucanicidinを20ppmの濃度で混入した人工飼料を摂食させた検定幼虫は全て死亡している。10ppm、5ppmでは生存しているものの対照に比べ、顕著な成育の遅延が見られる。



図-35

図-36は5令幼虫へのleucanicidinの塗布によって引き起こされた諸症状を示している。

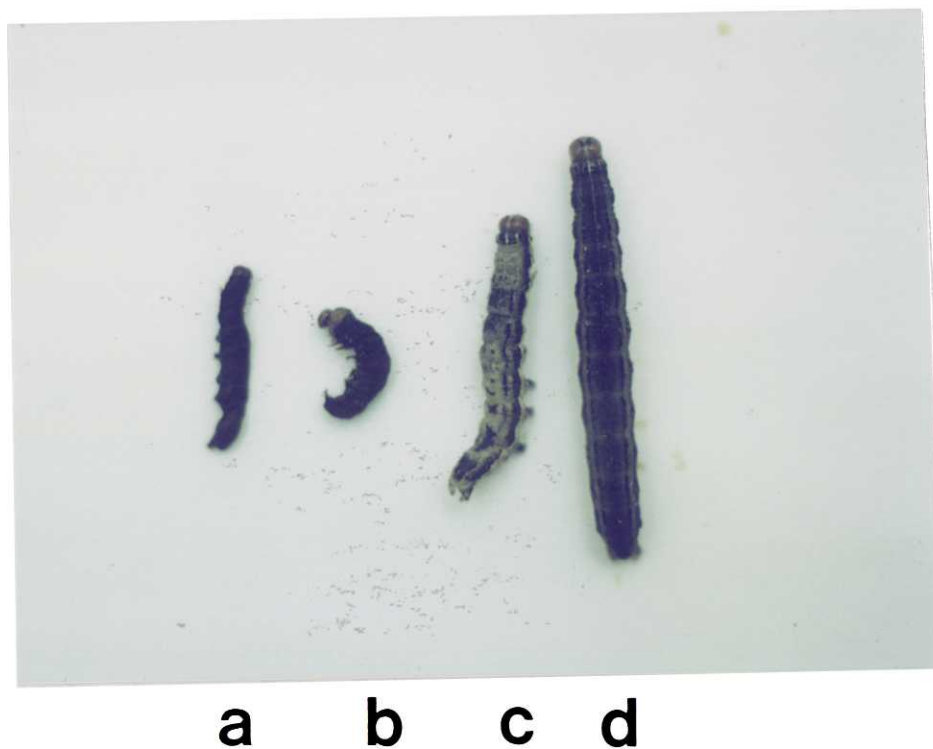


図-36

- a) 5令幼虫のまま死亡。
- b) 5令から6令への脱皮が阻害され死亡。
- c) 5令から6令への脱皮は行ったが、新しく形成された皮膚が白くなっている。その後の成育は正常。
- d) 正常な6令幼虫。

2 μ g 以上の leucanicidin の塗布では、 a)、 b) の症状か、 6 令にな
ってから数日で、 全ての検定幼虫が死亡した。 1 μ g より少ない塗布
量でも、 死亡には至らないが c) のような症状の幼虫が数多く出現し
た。

isobutyrylleucanicidin の殺虫効果は、 leucanicidin に比べ非常
に弱いもので、 5 令幼虫への 2 μ g の塗布によっても若干の成育の遅
延が見られるだけであった。

実験の部

(機器)

第一部においては、以下の機器分析装置を使用した。

マススペクトル JEOL JMS DX-300及びDX-303

IRスペクトル Jasco A-202

¹H-NMRスペクトル JEOL JNM GX-400

¹³C-NMRスペクトル JEOL JNM FX-100

UVスペクトル HITACHI 200-20

NMRスペクトルにおいては、TMS(δ 0.0)を内部基準物質とした。

(無菌摂食法)

表-6に示したアワヨトウの人工飼料(粉体部分1gと水2.6ml)に被検試料を以下のようにして添加した。脂溶性物質の場合は有機溶媒に溶し粉体部分と混合し溶媒を留去した後、水を加えた。水溶性物質の場合は、水部分に加えた。また、放線菌の培養液を用いてスクリーニングを行う際は培養液をそのまま水のかわりとして加えた。こうして調製した飼料を含んだ検定容器(通常は30mlの三角フラス

コを用いた)に綿栓をし、110℃30分の加圧滅菌を行った。そして、表-6の条件で無菌飼育したアワヨトウ幼虫(通常は3令眠幼虫を用いた)を3匹とシェルターとしての濾紙片を各容器に入れた。その後、無菌状態を保ったまま同条件で蛹になるまで飼育を続け、成育に対する影響を観察した。

表-6 アワヨトウの人工飼料組成及び飼育条件

人工飼料成分		飼育条件	
インゲン豆粉末	30g	温度	25℃
フスマ	30	湿度	50-60%
クロレラ	30	光周期	16L, 8D
エビオス	10		
セルロースパウダー	20		
アスコルビン酸	4		
p-ヒドロキシ安息香酸	0.3		
プロピオン酸ソーダ	0.3		
ソルビン酸	0.3		
寒天	7.5		
蒸留水	350ml		

(昆虫成育制御物質生産菌の検索)

放線菌の分離は、各地から採取した土壌より、cycloheximide(約50 μ g/ml)を加えたBennet培地を用いて平板塗抹培養法により行った。放線菌は10mlのBennet培地を含む綿栓大型試験管に1白金耳植菌した後、26.5 $^{\circ}$ C、4日間振盪培養し、その培養液を用いて前述の無菌摂食法により検定を行った。

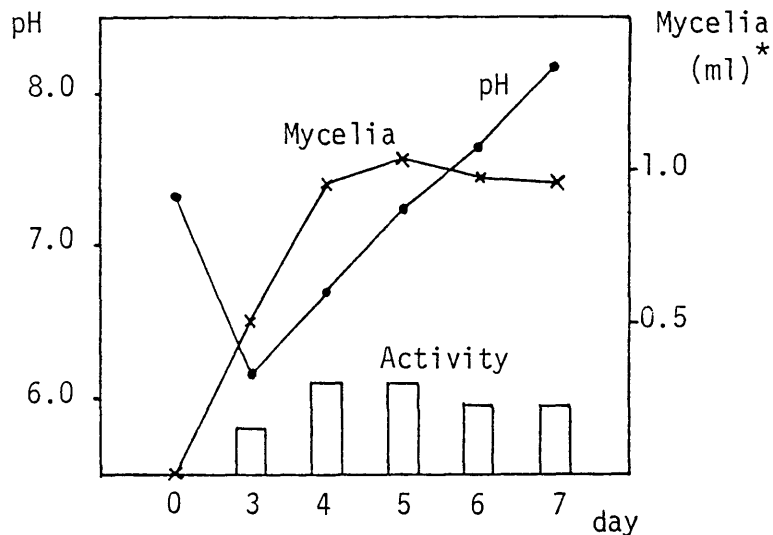
(leucanicidin生産のための培養条件の検討)

(1)培地の検討

まず6種の培地{肉汁培地(肉エキス1.0%、ペプトン1.0%、NaCl 0.5%、pH7.2)、オートミール培地(オートミール2.0%、ZnSO₄7H₂O, FeSO₄7H₂O, MnCl₂4H₂Oそれぞれ0.00001%、pH7.2)、麦芽エキス培地(麦芽エキス2.0%、ペプトン1.0%、ブドウ糖2.0%、pH6.5)、MY培地(酵母エキス0.3%、麦芽エキス0.3%、ペプトン0.5%、ブドウ糖1.0%、pH6.5)、酵母エキス・麦芽エキス培地(酵母エキス0.4%、麦芽エキス1.0%、ブドウ糖0.4%、pH7.3)、Bennet培地(ブドウ糖1.0%、ペプトン0.2%、肉エキス0.1%、酵母エキス0.1%、pH7.2)}で3日間及び7日間培養(10ml/大型試験管、26.5 $^{\circ}$ C、振盪培養)したものをを用いて生物検定を行った。その結果、酵母エキス・麦芽エキス培地において最も強い活性が得られた。

(2)培養日数の検討

酵母エキス・麦芽エキス培地（100ml/500ml三角フラスコ）で培養し、3、4、5、6、7日目にサンプリングし生物検定を行った。その結果を図-37に示した。



* Mycelial volumn(ml) / Culture broth(5ml)

図-37 Streptomyces halstedii 3002株によるleucanicidin類の生産

(3)培地の再検討

酵母エキス・麦芽エキス培地の各成分の量比、炭素源の種類、CaCO₃の添加などの効果を検討した結果を表-7に示した。培養は100ml/500ml三角フラスコで、4日間（26.5℃、振盪培養）行い、得られた培養液（5ml）を用い以下のようにしてHPLCで生産量を分析した。

遠心分離（2000rpm、5分）により菌体を集め、アセトン（2ml）を加えよく混合し、10分間放置した。再度遠心分離にかけた後、得られたアセトン溶液を減圧濃縮後、 CHCl_3 に転溶した。 CHCl_3 溶液を濃縮後、シリカゲルTLC（溶媒系EtOAc、Rf値0.43）で手早く分取、溶出（EtOAc）したものをを用いてHPLC[カラムPartisil 10C₁₈（4.6×250mm）、移動相 10mMAcONH₄:CH₃CN(35:65)]で分析した。

表-7 培地の検討

Composition	%																
Yeast extract	0.4	1.0	2.0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Malt extract	1.0	1.0	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Glucose	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	1.0	1.0	2.0	2.0	0	0	0	0.4	0.4	0.4	
Sucrose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	1.0	0.5	0	0	0	
CaCO ₃	0	0	0	0	0.5	1.0	0	0.5	0	0.5	0	0	0.5	0	0.5	0.5	
Propanol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	1.0	
Yield (mg/l)	4.0	0.4	0.2	4.7	5.3	7.1	1.8	4.7	1.2	3.5	1.2	2.4	1.2	0.9	2.4	0.9	

（Streptomyces halstedii 3002株の培養）

leucanicidin生産菌3002株は三重県津市の土壌より分離された放線菌で、Streptomyces halstediiと同定された。

Bennet培地の保存スラントより一白金耳酵母エキス・麦芽エキス培地（100ml/500ml三角フラスコ）に植菌し、2日間前々培養

(26.5℃、振盪培養)したものより3mlずつ同培地(100ml/500ml三角フラスコ)に再度植菌し、2日間前培養(26.5℃、振盪培養)した。本培養では50literのジャーファーマンターに表-1の培地を25liter仕込み、前培養液を600ml植菌した。培養は、26.5℃、5日間、通気量25liter/min、回転数400rpmの条件で行った。

(leucanicidin類の単離)

Streptomyces halstedii 3002株の培養液50literよりセライトを濾過助剤として用いて菌体を濾別し、これにアセトン(5liter)を加えよくかき混ぜた後、一晚静置した。菌体を濾別して得た、アセトン溶液を減圧濃縮し、得られた残渣をCHCl₃で抽出した。CHCl₃溶液を減圧濃縮すると油状物質(4.267g)が得られ、それを少量のセライトにまぶし、Silicar CC-7カラム(4.0×45cm)に吸着させた。カラムからの溶出はBenzene-EtOAc 70:30、60:40、50:50(3literずつ)で順次行った。60:40溶出区を減圧濃縮後、Hexane-CHCl₃より結晶化を行うとleucanicidinが白色針状結晶として126mg得られた。

leucanicidin(I):

mp 130~132℃

$[\alpha]_D^{26} -47^\circ$ (C=1.0, CHCl₃)

UV λ^{MeOH} nm(ϵ): 248(23,500), 287(10,300)

IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3500-3400, 1680, 1640, 1615, 1240

FABMS m/z 805 (M+Na)⁺ (glycerol+NaCl matrix)

m/z 821 (M+K)⁺ (glycerol+KCl matrix)

m/z 888 [M+H+NH(C₂H₄OH)₂]⁺ (diethanolamine matrix)

FDMS m/z 765 (M-H₂O+H)⁺

元素分析

Found C58.77, H8.02, O23.67, Cl9.40%

Calcd. for C₄₂H₇₀O₁₃.4/5CHCl₃

C58.52, H8.12, O23.68, Cl9.68%

¹H-NMR (表-3)、¹³C-NMR (表-4)

leucanicidinの結晶母液をさらに逆相の中圧カラムクロマトグラフィー[カラム Lobar LiChroprep RP-8(25×310mm), 移動相(CH₃CN:10mMAcONH₄, 85:15)]及びHPLC[カラム Nucleosil 7C₁₈(8×250mm), 移動相(CH₃CN:10mMAcONH₄, 85:15)]により精製すると isobutyrylleucanicidinが白色粉末として450 μg得られた。

isobutyrylleucanicidin(III):

FABMS m/z 958 [M+H+NH(C₂H₄OH)₂]⁺ (diethanolamine matrix)

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm(ϵ): 247(23,500), 286(10,500)

¹H-NMR (表-5)

(leucanicidinの酸加水分解)

leucanicidin(23mg)をMeOH(1.2ml)に溶解し、0.5NHCl(1ml)を加えよく混合し、室温で一晩放置した。飽和NaHCO₃水溶液で中和した後、EtOAcと分配し、水溶性区を凍結乾燥した。残渣に無水酢酸-ピリジン(1:2)溶液(2ml)を加え一晩放置した後、反応液を氷水中に滴下し氷解後CHCl₃で抽出した。CHCl₃層を減圧濃縮後HPLC[カラム Nucleosil 7C₁₈(8×250mm), 溶出CH₃CN:H₂O(20:80)→(80:20)のgradient]により精製し、2-O-methyl-1,3,4-triacetyl- α -L-rhamnose(II)が白色油状物として0.7mg得られた。

II:

FDMS m/z 305 (M+H)⁺

[α]_D -56°(C=0.23, CHCl₃), lit³⁹⁾ [α]_D -52°(C=2.7, CHCl₃)

¹³C-NMR δ (CDCl₃, 25MHz): 17.6, 20.9, 21.0, 21.1, 59.6,

69.0, 70.9, 71.1, 77.3, 90.8, 169.0, 169.7, 170.6.

¹H-NMR δ (CDCl₃, 400MHz): 1.22(3H, d, J=6), 2.05(3H, s),

2.09(3H, s), 2.14(3H, s), 3.50(3H, s), 3.62(1H, dd, J=2, 3),

3.90(1H, m, J=1, 6, 10), 5.16(1H, t, J=10),

5.20(1H, ddd, J=1, 3, 10), 6.15(1H, d, J=2).

(leucanicidinのNaBH₄還元)

leucanicidin(18mg)をEtOH(200 μ l)に溶かし、NaBH₄(900 μ g)を加えた。湯浴上で45 $^{\circ}$ C、2時間反応させた後、反応液を直接HPLCに注入して精製し[カラム Nucleosil 7C₁₈ (8 \times 250mm),移動相 CH₃CN:10mMAcONH₄, (65:35)], P-1、P-2をそれぞれ2.7及び2.8mg得た。

P-2:

分子式 C₃₅H₅₈O₈

FABMS m/z 712 [M+H+NH(C₂H₄OH)₂]⁺ (diethanolamine matrix)

¹³C-NMR δ (CDCl₃,25MHz):4.8, 10.0, 14.0, 16.3, 17.3,17.3

20.0, 20.0, 21.8, 30.3, 36.8, 38.0 ,38.9, 40.0, 40.2,

41.3, 55.6, 60.3, 76.6, 79.5, 81.2, 82.4, 125.2, 127.1,

132.3, 133.0, 133.0, 133.6, 133.6, 141.2,142.9,143.1,

167.3 (P-2には-CH-O-炭素が6本存在することより、2本の炭素のシグナルはCDCl₃に重なっているものと考えられる。)

¹H-NMR (表-2)

(isobutyrylleucanicidinのアルカリ加水分解及びisobutyric acidのGC-MSによる同定)

isobutyrylleucanicidin(100 μ g)を0.1NNaOHエタノール溶液(25 μ l)に溶かし、75 $^{\circ}$ C、40分間の加水分解を行った。反応液を減圧濃

縮後、2Mリン酸(5 μ l)を加え、うち1 μ lをGCに注入してGC-MS分析[カラム PEG-20M(2.6mm \times 2m)、100 $^{\circ}$ Cより8 $^{\circ}$ C/minの昇温]を行った。標品には isobutyric acid を同様に処理したものを、また比較の為 leucanicidin も同様に処理して分析を行い isobutyric acid が生成しないことを確認した。

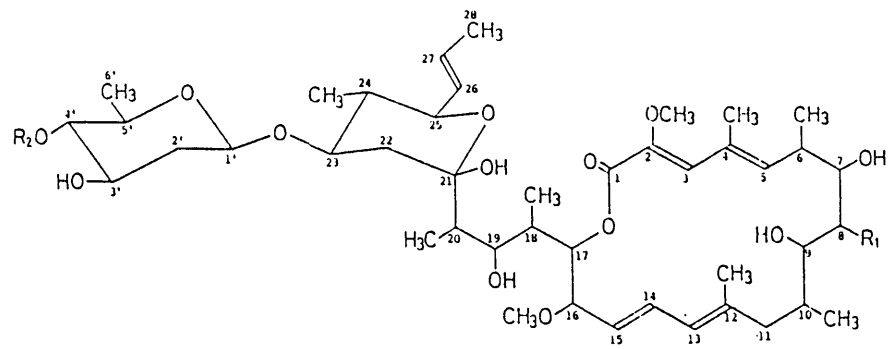
総括および考察

第一部においては、昆虫に特有の脱皮、変態の過程を含む生活環のなかで、昆虫の成育を制御する物質を幅広く検索するために、アワヨトウ幼虫を用いた無菌摂食法を生物検定系として用いた。この方法は、他の注射法や塗布法に比べ、どのような被検試料でも投与できる点がすぐれている。今回も、微生物培養液を特に濾過することなく、菌体ごと試料とすることが出来た。無菌摂食法では、摂食法の欠点であった餌料交換の煩雑さと、試料が大量に必要な点を改良することにより、多くの被検試料について簡便にかつ長期にわたる観察が可能となり、幅広い昆虫成育制御物質の検索が行えた。抗ウイルス剤であるL-alanosineが昆虫の脱皮を阻害するという興味深い活性をも有することを見いだし得たのは、この無菌摂食法の利点によるところが大きいものと考えられる。

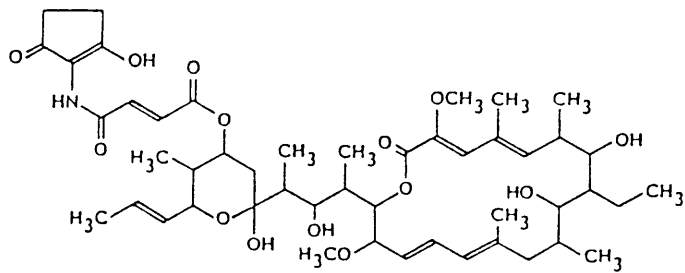
さて、新規殺虫性物質として単離されたleucanicidin類は、近年NMR法の進歩に伴って構造が解明されてきた新しいタイプのマクロライド化合物群に属するものである。その構造の特徴は、16または18員環の大員環ラクトンの側鎖にヘミケタール形成によるテトラヒドロピラン環を有するところにある。そのような化合物としてleucanicidin以前に構造決定されたものには、18員環ラクトンではcon-

canamycin^{47, 48, 49}、virustomycin⁵⁰ また16員環ラク톤では hygrolidin^{51, 52}、bafilomycin^{53, 54}、L-681,110^{55, 56} (図-38) があり、また leucanicidin以降にも、L-155,175⁵⁷、bafilomycin-A₁-21-0-(α -L-rhamnopyranosid)⁵⁸、類似の化合物として PD118,576⁵⁹、bafilomycin D, E, oxohygrolidin⁶⁰ らが見出されている (図-39)。

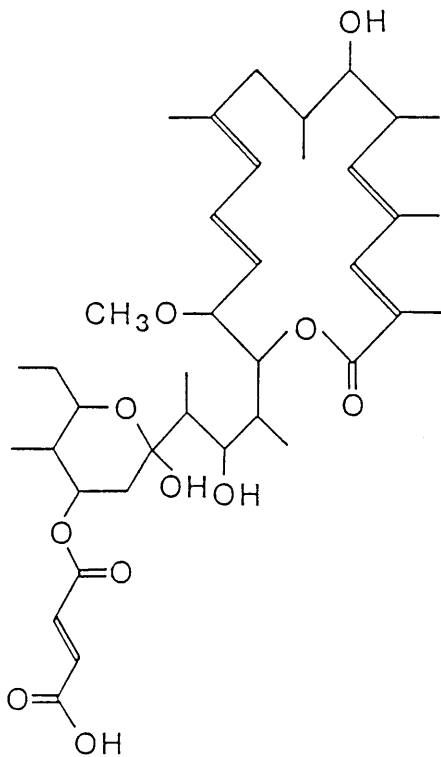
leucanicidinの殺虫活性の機作としては、類似の構造をもつL-681,110が、殺虫活性につながる事が知られているNa⁺, K⁺活性化ATP分解酵素の阻害活性を有し、さらには avermectinと同様の、神経伝達物質の一つである γ -アミノ酪酸の放出促進作用を持つことより、leucanicidinにおいてもおそらくは同様の作用により殺虫活性を示すものと考えられる。微量成分として得られた isobutyrylleucanicidinは、このタイプのマクロライドとしては初めて大員環ラク톤部分の7位の水酸基がアシル化された構造を有するものである。isobutyrylleucanicidinの活性は、leucanicidinに比べ大きく低下することより、7位の水酸基の存在が活性発現に重要であることが示唆される。leucanicidinは比較的強い殺虫力を有するが、哺乳類に対する毒性もきわめて強く、昆虫に特異な過程を選択的に阻害する化合物ではなかった。しかし、新たな生物検定系を用いることにより、興味深い新しい構造を有する殺虫性物質が得られたわけであ



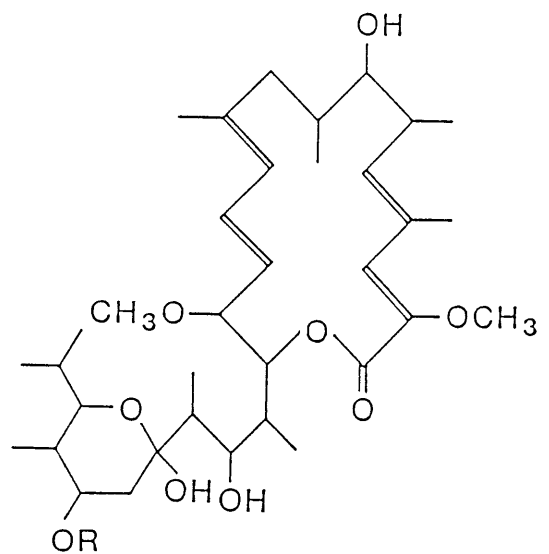
concanamycin A $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{CONH}_2$
 B $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CONH}_2$
 C $R_1 = \text{CH}_2\text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$

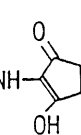


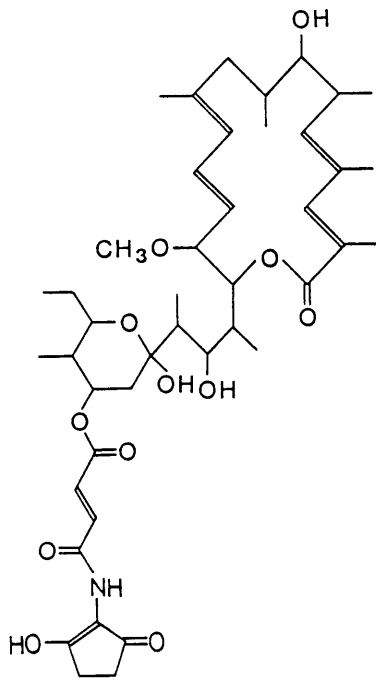
virustomycin A



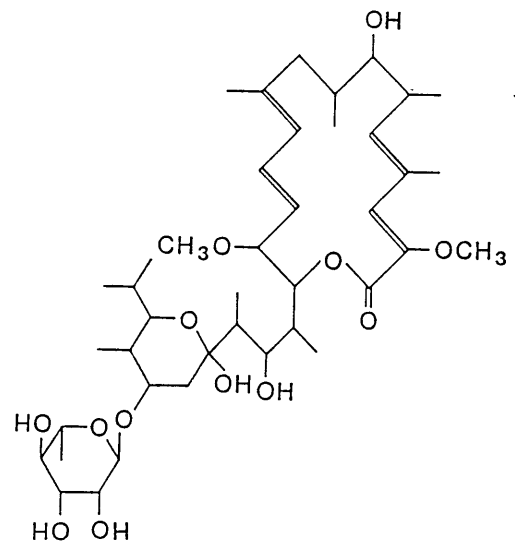
hygrolidin



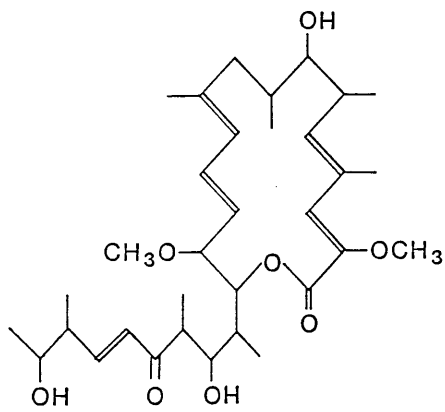
Compounds	R
L-681,110 A ₁	$-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$
B ₁	CH ₃
Bafilomycin A ₁	H
B ₁	$-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{CH}=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{NH}-$ 



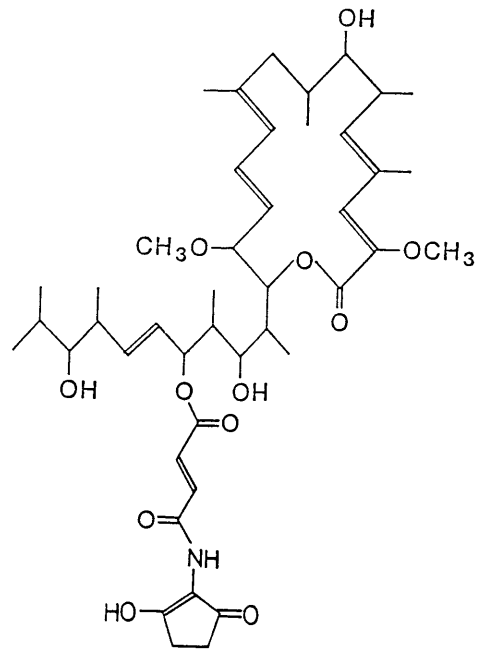
L-155,175



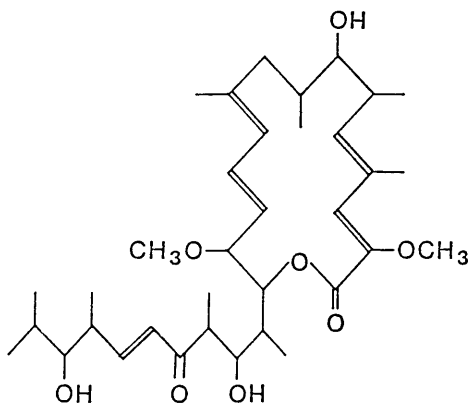
bafilomycin-A₁-21-O-(α-L-rhamnopyranosid)



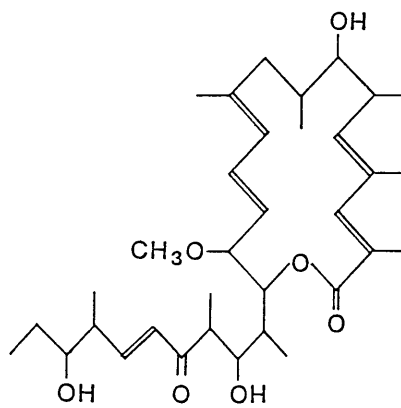
PD 118,576



bafilomycin E



bafilomycin D



oxohygroloidin

り、今後の *in vivo*における微生物の代謝産物を対象にした昆虫成育制御物質の検索の発展のための一助となるものと信じる。

leucanicidinsのアグリコン部分の立体化学は6員環の相対配置をのぞいては不明である。CoreyとPonderはコンピューターシミュレーションによって、その16員環部分の相対配置を推定している⁶¹⁾。また、最近、BakerらはX線結晶解析を用いて、bafilomycin A₁の絶対構造を図-40のように決定し、溶液中でコンフォメーションも結晶中と同一であることを報告している⁶²⁾。これまでに発表されたNMRのデータを考慮するとleucanicidinをふくめ類似の16員環を有する一群の化合物はbafilomycin A₁と同一の立体配置を持つものと考えられ、今後、合成有機化学者の重要なターゲットとなり、構造-活性相関などについての研究を進めば、天然物起源の殺虫剤として新たな展開も期待される。

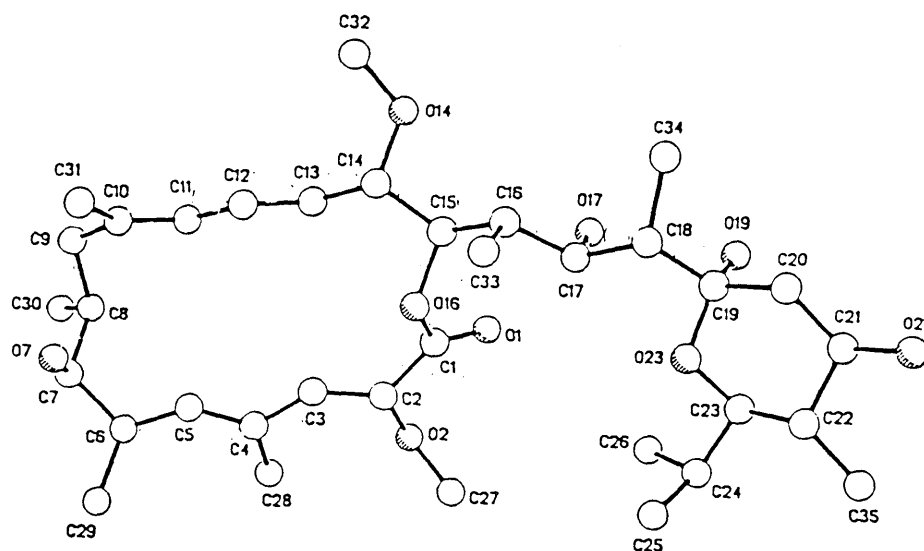


図-40 bafilomycin A₁の絶対構造

第二部 昆虫のキチナーゼ阻害物質の検索

第一章 昆虫のキチナーゼ阻害物質生産菌の検索

1-1 生物検定法

キチナーゼ阻害物質の検索には、木村の方法に従いカイコ蛹中腸より調製した酵素液⁶³⁾、及び基質として、キチナーゼが働くことにより赤色色素が可液化する γ -chitin red⁶⁴⁾を使用する酵素反応系を生物検定法として用いた。放線菌の培養液は、酵素反応液中の水の部分に培養濾液を、またメタノールの部分に菌体メタノール浸出液を加えてそれぞれにつき検定を行った。阻害活性の強さは、酵素反応終了後、遠心分離により得た反応液上清の赤色色素の減少の割合により示された。色素の量は510nmでの吸光度を測定することにより定量化でき、反応開始前(OD_{510B})及び終了後(OD_{510A})の吸光度を測定し、その差の値($\Delta A = OD_{510A} - OD_{510B}$)が無添加のものとは比べて小さくなる程阻害活性大と判定した。

1-2 検索結果

土壌より分離した放線菌約300株の培養液を対象に、キチナーゼ阻害物質の検索を行った。その結果、6株につき阻害活性が認められた。それぞれの株の生産する活性物質に対し、単離、構造解析を行った結果、5株は同一の活性物質を、残る1株もその類縁化合物を生産していることが明らかとなった。第二章においては、これら allosamidin及び methylallosamidinと命名された昆虫のキチナーゼ阻害物質について詳述する。

第二章 昆虫のキチナーゼ阻害物質allosamidin類

2-1 allosamidinの生産

allosamidinの生産にはStreptomyces sp. 1713株を用いた。表-8に1713株の培養に使用した培地組成を、また図-41には500mlの三角フラスコに100mlの培地を仕込み振とう培養(26.5℃、120rpm)した場合の培養経過を示した。キチナーゼ阻害活性は培養液の色が黄色から茶色へと変化した4日目から現われ、6日目には最大となった。この培養経過をもとに、Streptomyces sp. 1713株の大量培養を600literのジャーファーメンターを用いて、26.5℃、5日間、通気量300liter/min、回転数100rpmの条件で行った。

2-2 allosamidinの単離

allosamidinの単離は図-42に示す方法に従った。即ち、Streptomyces sp. 1713株の培養液より濾別した菌体を含水メタノールで抽出した後、活性炭、Dowex-50、SP-Sephadex C-25のカラムクロマトグラフィーを順次行うことにより、allosamidinを白色粉末として単離した。収量は、300literの培養液より280mgであった。図-43に弱陽イオン交換のカラムを用いたHPLCによりallosamidinを分析したクロマトグラムを示した。

表-8 培地組成

Glucose	1.0 %
Peptone	0.2
Meat extract	0.1
Yeast extract	0.1
pH	7.2

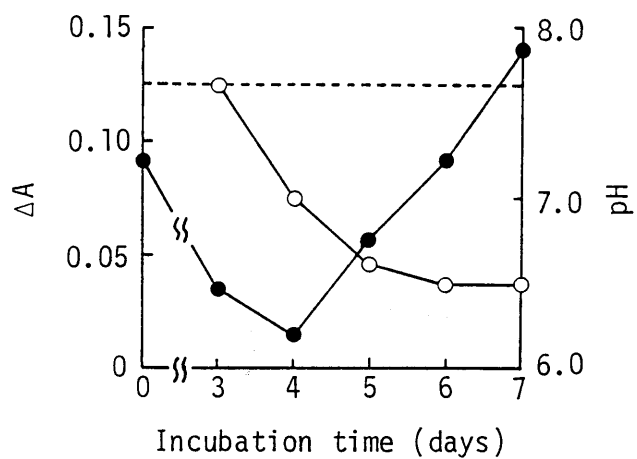


図-4 1 Streptomyces sp. 1713株によるallosamidinの生産

○：培養液0.25ml相当を用いて検定した時のΔAの値

●：pH

---：コントロールのΔA値

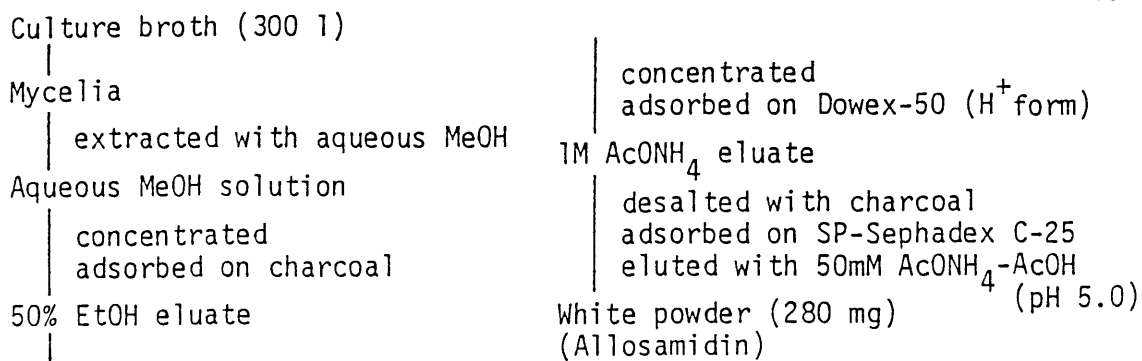


図-42 allosamidinの単離

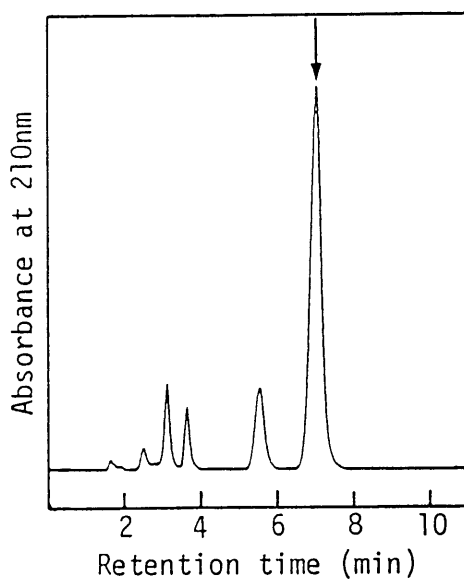


図-43 allosamidinのHPLC分析 (矢印: allosamidin)

カラム: Asahipak ES-502c (7.6x100mm)

移動相: 10mM AcONH₄-NH₄OH (pH8.9)

流速: 1.0ml/min

Sample: SP-Sephadex C-25よりの溶出画分の1活性フラクション

2-3 allosamidinの構造

2-3-1 物理化学的性質

allosamidin (1) は吸湿性の強い結晶性の白色粉末として得られた。1 は塩基性を有し、酢酸エチル、アセトン、エタノール、メタノールなどには不溶で、水に対しても難溶性を示し、弱酸性の水に対してのみ、可溶であった。また強酸性、強塩基性条件では、不安定な性質を示した。

1 のFABマススペクトルをグリセロールマトリックスを用いて測定すると m/z 623 にピークが観測された (図-44)。さらにNaCl及びKClを加えたマトリックスで測定を行うと、 m/z 645及び m/z 661にピークが観測されることにより m/z 623、 m/z 645のピークはそれぞれ $(M+H)^+$ 、 $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ の擬分子イオンと説明でき、1の分子量は622であることが示唆された。

1のIRスペクトルを図-45に、 ^{13}C -NMRスペクトルを図-46に示した。 ^{13}C -NMRスペクトルでは、25本の炭素のシグナルが観測され、それぞれの炭素に結合している水素の数はINEPT法により決定された (図-46)。1の分子式はこれらのスペクトルの測定結果と、後述の1の加水分解物の構造及び 1H -NMRスペクトルの解析結果より $C_{25}H_{42}N_4O_{14}$ と決定した。

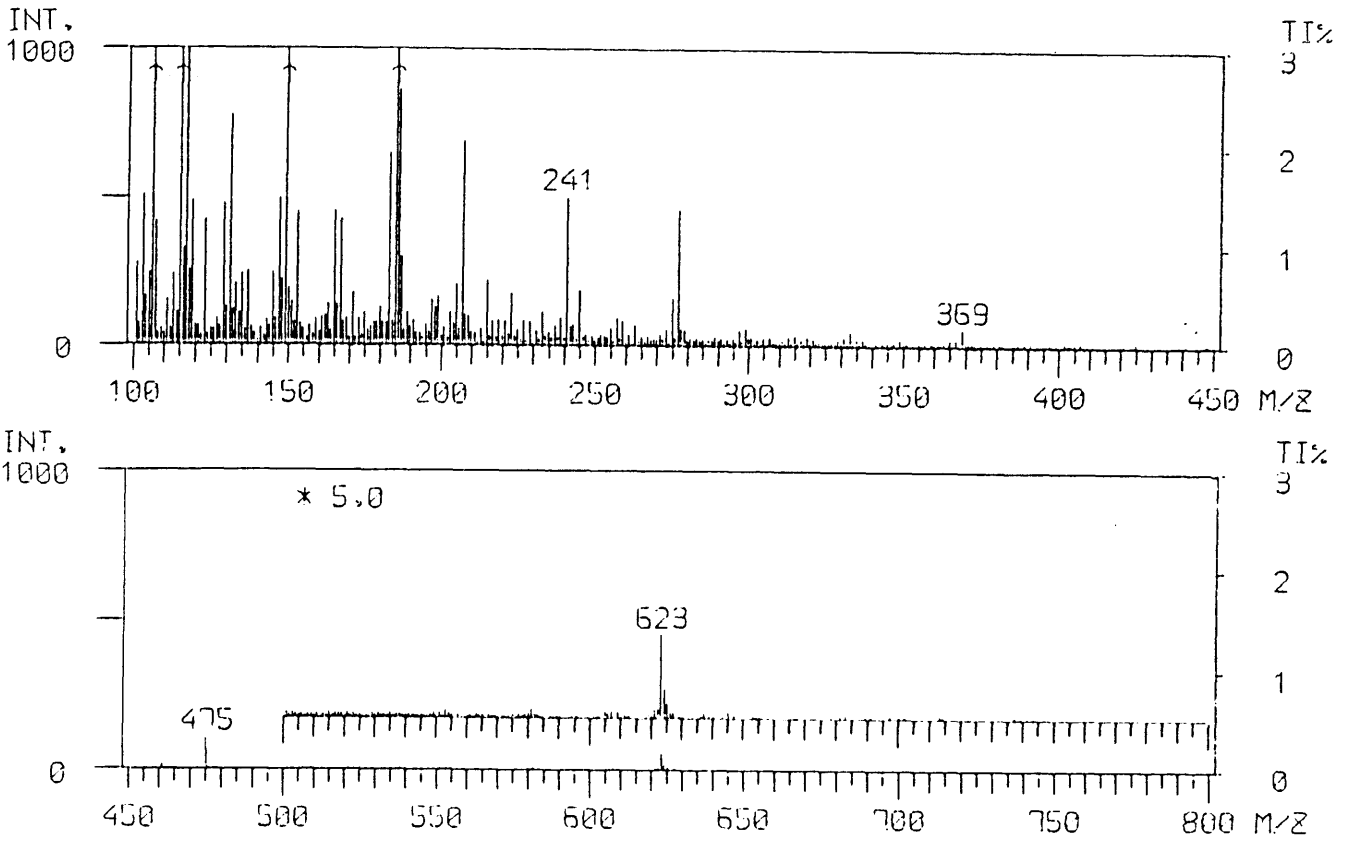


図-44 1のFABマススペクトル (グリセロールマトリックス)

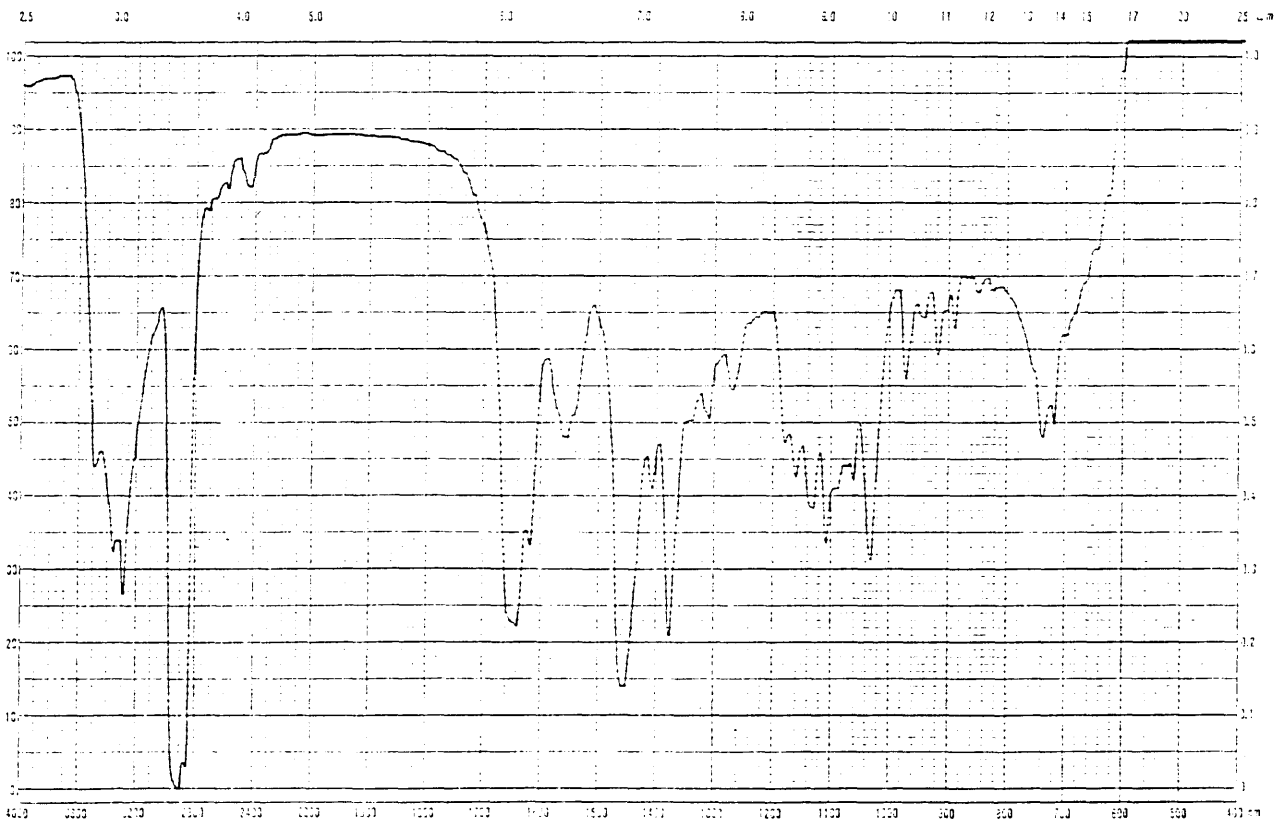
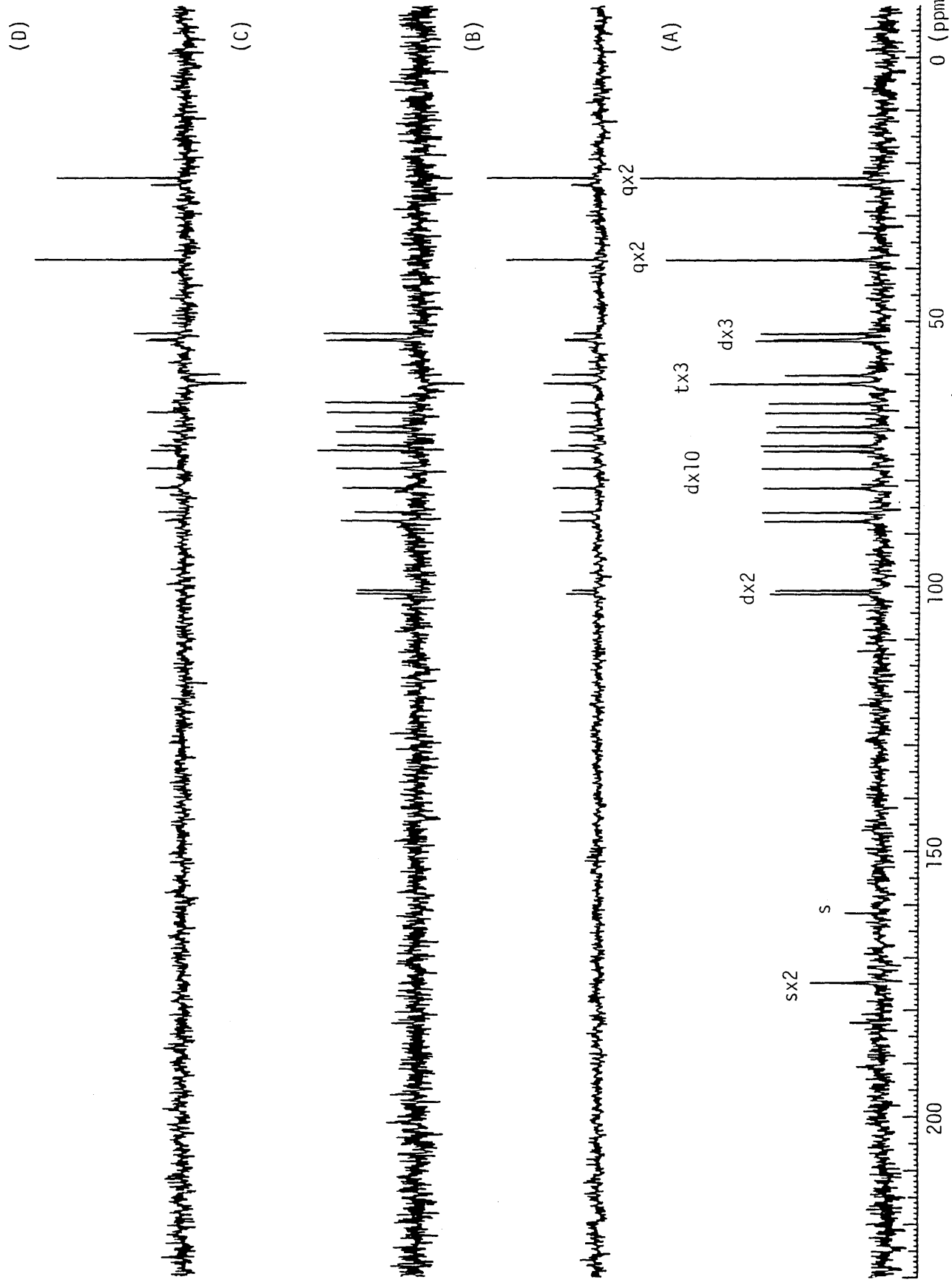


図-45 1のIRスペクトル (nujol)



図一46 1の¹³C-NMRスペクトル (D₂O+CD₃COOD, 25MHz)

(A) COM, (B) Δ=1/4J, (C) Δ=2/4J, (D) Δ=3/4J

1 の IR スペクトルにおいて観測される $3100\sim 3500\text{cm}^{-1}$ 、 $1000\sim 1100\text{cm}^{-1}$ の吸収、さらに ^{13}C -NMR スペクトルにおいての $-\text{O}-\text{CH}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}-$ 領域の炭素のシグナルは、1 が構成成分として糖を含んでいるということを強く示唆するものであった。そこで、1 の酸加水分解実験を行い生成物の同定を試みた。

2-3-2 allosamidin の酸加水分解

1 を 4NHCl で 100°C 、4 時間加水分解を行うと、2 種の塩基性生成物が得られた。一つは D-allosamine と同定された⁶⁵⁾。もう一つは、構造解析の結果、新奇アミノサイクリトール誘導体であることがわかり allosamizoline (2) と命名された。2 は FAB マススペクトルにおいて m/z 217 に $(\text{M}+\text{H})^+$ の擬分子イオンと考えられるピークを与え、また 2 の ^{13}C -NMR スペクトルでは 9 個の炭素のシグナルが観測された (図-47)。2 を無水酢酸とピリジンで処理すると triacetate (3) が得られた。3 の分子式は、その高分解能マススペクトルにより $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_7$ (m/z 342.14063、error -2.0mmu.) と決定された。以上のことにより、2 は $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$ の分子式を有することが明らかとなった。2 に存在する C-1 から C-6 のシクロペンタン部分の構造は通常のスピンドカップリング実験により明らかになり、また 3 個の水酸基の結合位置も、3 の ^1H -NMR スペクトルにおけるアセチル化シフト

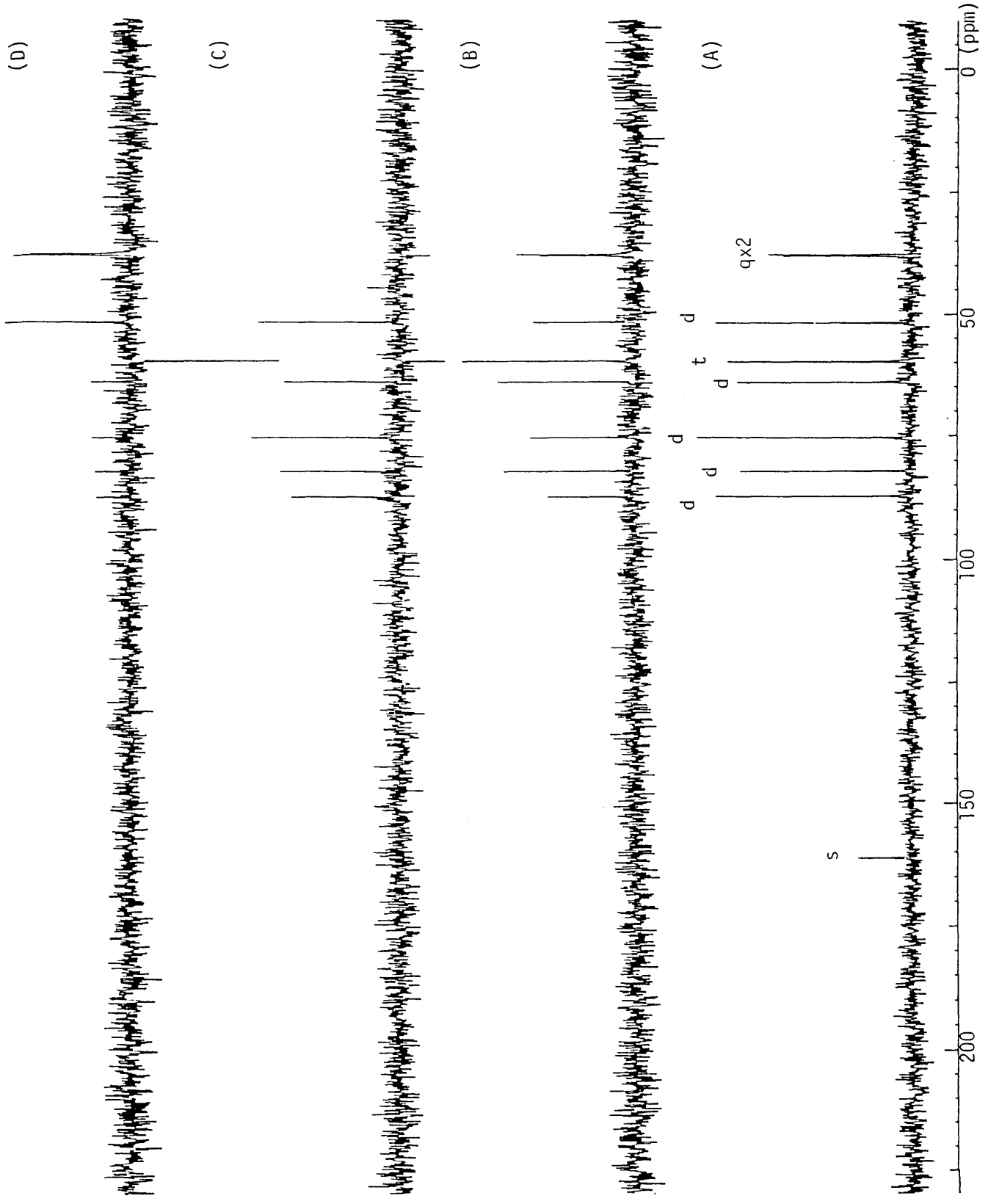


図47 2の ^{13}C -NMRスペクトル (CDCl_3)

(A) $\Delta=1/4J$, (B) $\Delta=2/4J$, (C) $\Delta=3/4J$, (D) $\Delta=3/4J$

より、C-3、C-4及びC-6であることが判明した。ここで、2の ^1H 及び ^{13}C -NMRスペクトルにおいてまだ帰属のつかない3個の炭素 [δ_{C} 37.9(q)、38.1(q)、161.2(s)] 及び6個の水素 [δ_{H} 3.08(3H,s)、3.11(3H,s)] のケミカルシフトを考慮すると、2にdimethylamino-oxazoline骨格が存在することが示唆された⁶⁶⁾。そこで、モデル化合物として2-dimethylamino-5-methyl-2-oxazolineを合成し⁶⁷⁾、2とスペクトルデータを比較したところ両者はよい一致を示し、2の平面構造は図-48のように決定された。

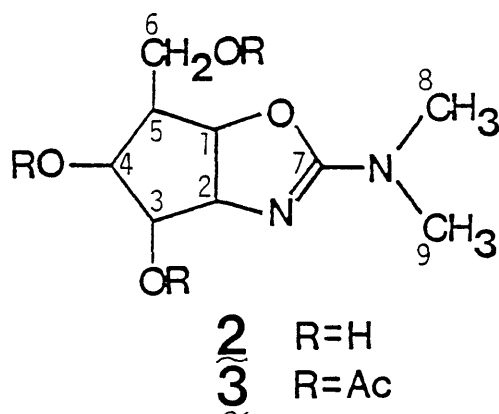


図-48 2、3の構造

次に、2のシクロペンタン部分の相対配置を明らかにするために、3を用いてのNOE実験及び2の種々の誘導体における各プロトンの結合定数の解析を行った。図-49に3のH-1,2,3,4をそれぞれ照射した場合に得られるNOE差スペクトルを示した。H-1を照射した場合、

H-2とH-6にNOEが観測され、H-5には弱く現れた。またH-4を照射した場合には、H-6には明白に、H-5には弱く観測された。これらのことにより、H-1とH-2はシス、H-1とH-5はトランス、またH-5とH-4もトランスの配置であることが強く示唆された。残ったH-3の配置は、H-3を照射した場合に、H-2に弱く、またH-5にも弱くNOEが観測されることから、H-2とH-3はトランスであると考えられた。このH-2とH-3の相対配置は、2のp-(dimethylamino)benzoyl誘導体における結合定数の値により強く支持された。即ち、2及び3ではシクロペンタン環においてトランスの配置を示唆する結合定数は観測できなかったが、後述の2のbisあるいはtris-p-(dimethylamino)benzoyl誘導体(4、5、6、7)では表-9に示すように2Hzの $J_{2,3}$ の値が観測され、トランス配位とよい一致を示した。また、 $J_{3,4}$ 、 $J_{4,5}$ 、 $J_{5,1}$ においても4Hzより小さい値が観測され、H-3とH-4、H-4とH-5、H-5とH-1のトランス配位とよい一致が見られた。以上の結果により2のシクロペンタン部分の相対配置は図-50のように決定された。

2-3-3 allosamizolineの絶対構造

allosamizoline(2)にはC-3位とC-4位に2級の水酸基が、またC-6位には1級水酸基が存在する。そこで、2の絶対構造を決定する為の1つの手段として、それら水酸基をbenzoyl化した誘導体に対し励

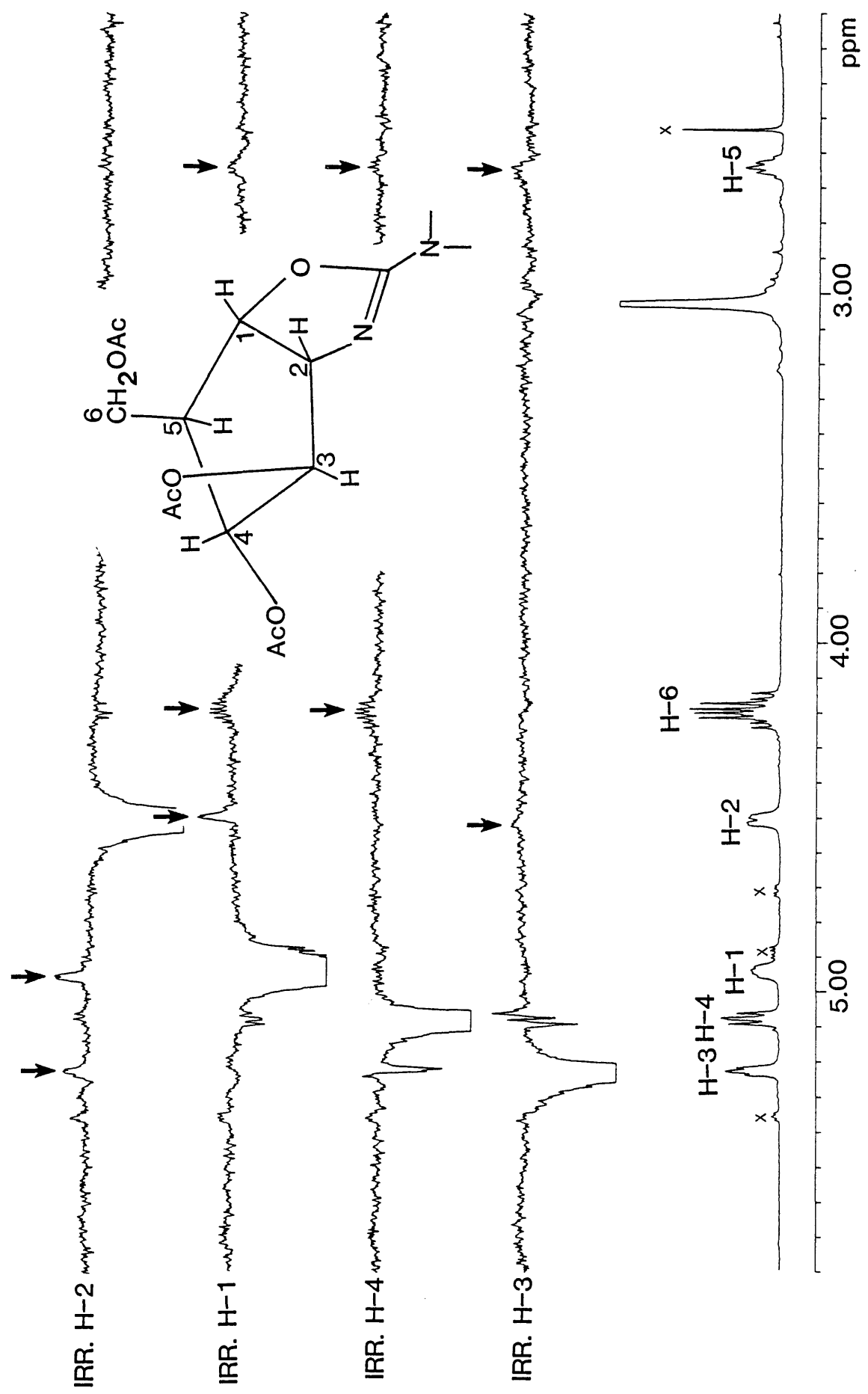


図-49 NOE差スペクトル (CDCl₃, 400MHz)

表-9 2の各種誘導体(3、4、5、6、7)におけるリングプロトンの結合定数

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	J _{1,2}	J _{2,3}	J _{3,4}	J _{4,5}	J _{5,1}
2	H	H	H	9	4	7	8	5
3	Ac	Ac	Ac	8	4	5	7	4
4	H	dma-Bz	dma-Bz	8	2	4	6	4
5	dma-Bz	H	dma-Bz	8	2	4	4	3
6	dma-Bz	dma-Bz	dma-Bz	8	2	<4	<4	3
7	dma-Bz	dma-Bz	trityl	8	<4	<4	3	2

dma-Bz = p-(dimethylamino)benzoyl

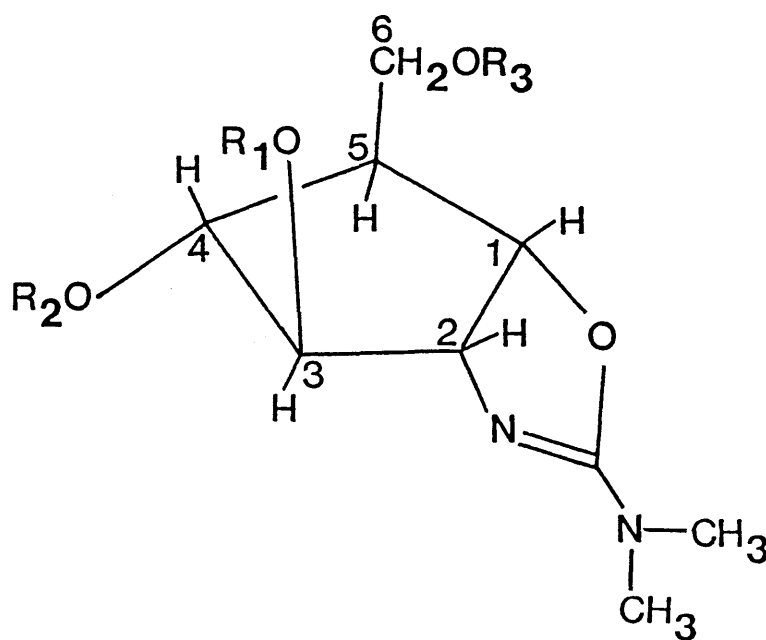


図-50 2の相対構造

R₁, R₂, R₃ : 表-9参照

起子カイラリティー法を適応する方法が考えられた⁶⁸⁾。まず、*p*-(dimethylamino)benzoyl cyanideを用いて、3種の*p*-(dimethylamino)benzoyl誘導体、4,6-bis-, 3,6-bis-, 3,4,6-tris[*p*-(dimethylamino)benzoate] (4、5、6)を調製し、それらのCDスペクトルを測定した(図-51)。4及び5のCDスペクトルにおいては、正の第一コットン効果が観測され、4の4,6位、5の3,6位の2つの*p*-(dimethylamino)benzoyl基はそれぞれ時計回りの空間的な配置をとることが示された。一方、6のCDスペクトルでは逆に負の第一コットン効果が観測されることより、もし4、5、6のスペクトルの振幅において加成性⁶⁹⁾が成り立つならば3位と4位の*p*-(dimethylamino)benzoyl基は反時計回りの配置にあることになり、絶対構造は図-51に示したものであると考えられた。しかし、加成性が成立するには、3種の誘導体間で6位の*p*-(dimethylamino)benzoyloxymethyl基のコンホメーションが同一であるという条件が必須であり、配座解析を試みたが、それらの優位なコンホメーションを決定し得なかった。従ってこれら3種の誘導体より絶対構造を導き出すことはできなかった。

そこで、3位と4位の2つの水酸基に*p*-(dimethylamino)benzoyl基を導入した誘導体の作製を試みた。まず、6位の水酸基を保護する為に、trityl chlorideを用いて2の6-trityl誘導体を得た。そし

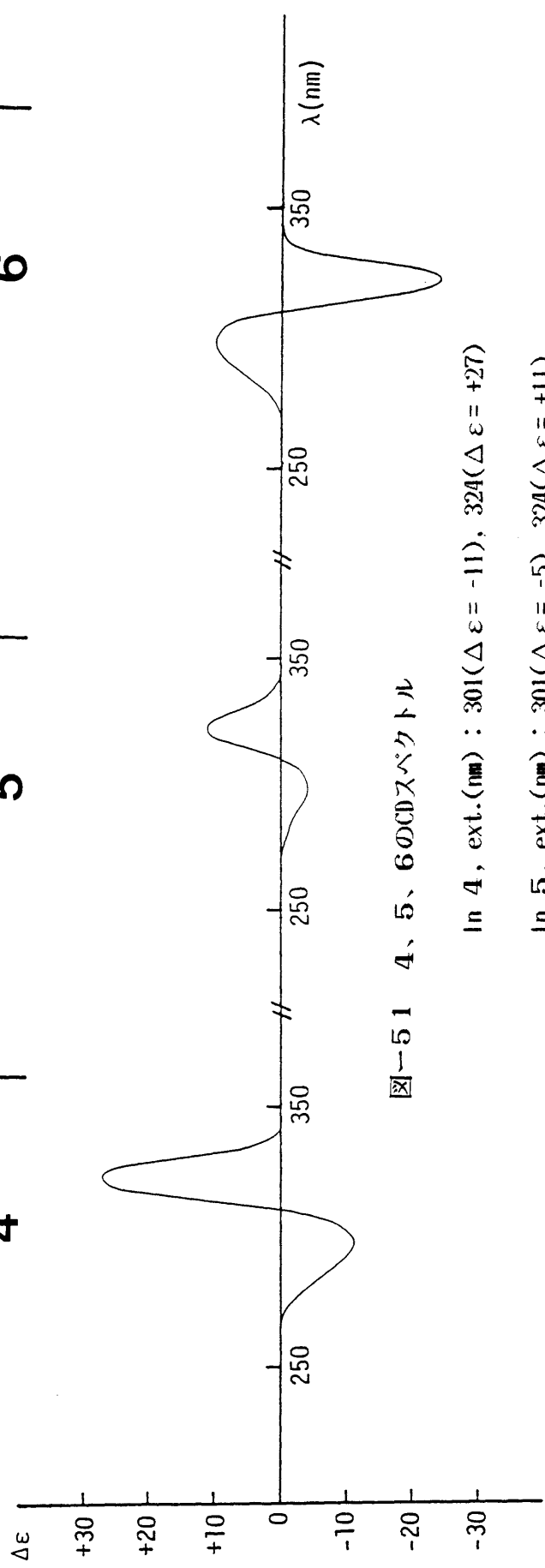
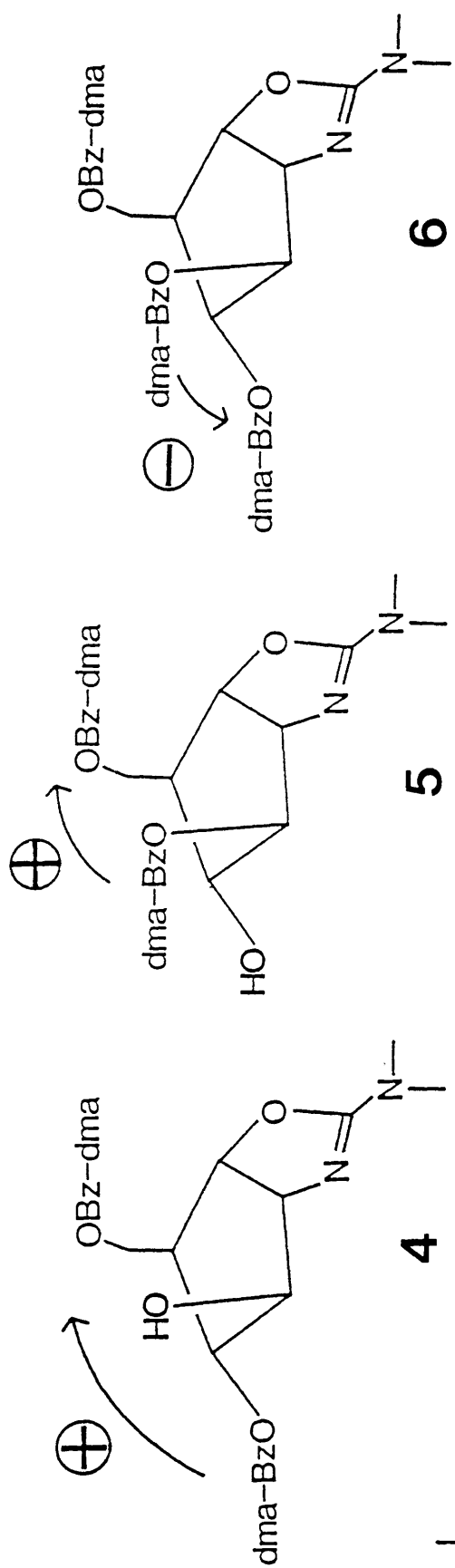


図-51 4、5、6のCDスペクトル

In 4, ext.(nm) : 301($\Delta\epsilon = -11$), 324($\Delta\epsilon = +27$)

In 5, ext.(nm) : 301($\Delta\epsilon = -5$), 324($\Delta\epsilon = +11$)

In 6, ext.(nm) : 301($\Delta\epsilon = +9$), 324($\Delta\epsilon = -24$)

て、引き続き *p*-(dimethylamino)benzoyl化を行うことにより、2の3,4-bis[*p*-(dimethylamino)benzoyl]-6-trityl誘導体(7)を得た。7のCDスペクトルを図-52に示した。3位と4位の2つの*p*-(dimethylamino)benzoyl基の相互作用に由来する負の第一及び正の第二コットン効果が観測されることより、2つの発色団は反時計回りの空間的配置をとることが示された。それら2つの発色団の相対配置はトランスの関係より明白に固定でき、従ってそれらの反時計回りの空間配置より、allosamizolineの絶対構造は1*S*,2*R*,3*R*,4*R*,5*R*と決定された。

ここで得られた結果は、前述の4、5、6のCDスペクトルでの加成性の成立を仮定しての場合と一致した。この一致が偶然のものであるかどうかは、現在の段階では明白ではないが、少なくとも、allosamizolineにおけるようなhydroxymethyl基を持った5員環triol系でのbenzoyl誘導体のCDスペクトルにおける加成性の成立についての一つの可能性を示したものと考えられる。

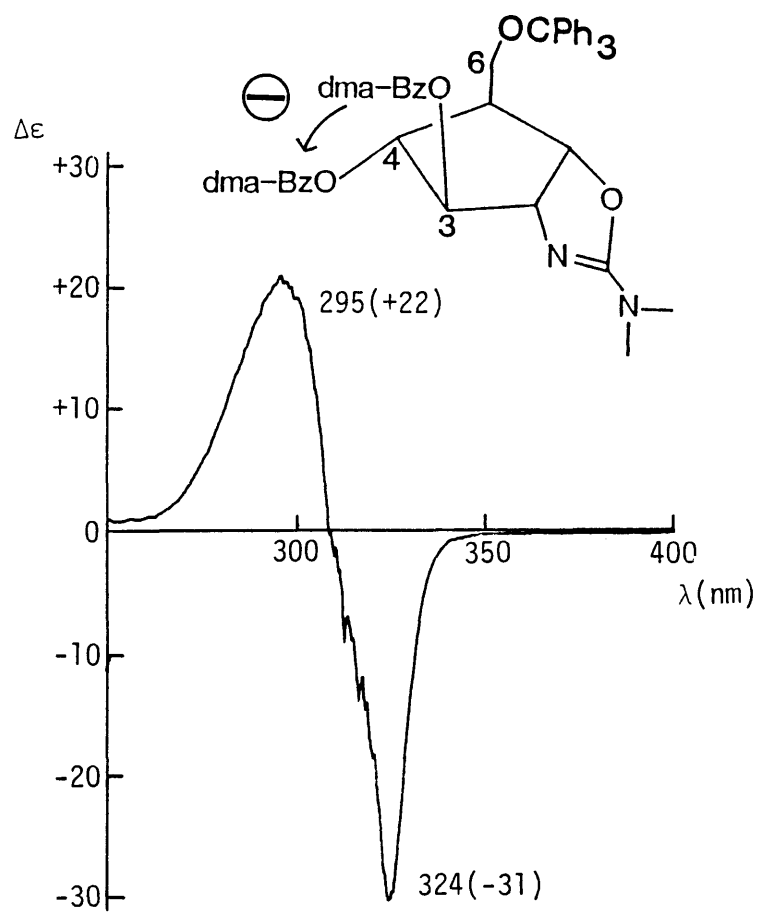


図-52 7のCDスペクトル

2-3-4 allosamidinの構造

allosamidin(1)の全構造の解明は、種々の2次元NMRスペクトルを解析することにより進められた。1の500MHz ^1H -NMRスペクトルを図-53に示した。 δ 3.7~4.0付近の非常に込み入ったシグナルの解析は、J分解2次元NMRスペクトル^{40,41)}(図-54)及びCOSYスペクトル(図-55)により行われ、各プロトンのケミカルシフト、結合定数及び相互のカップリングを明らかにすることができた。これらCOSY及びJ分解2次元スペクトルと、C-Hシフト相関2次元NMRスペクトル^{40,41)}(図-56)の解析より、1には2モルのN-acetylallosamineと1モルのallosamizoline(2)が存在し、それらの合計が1の分子式と一致することが明らかとなった。1のNMRスペクトルにおける各炭素と水素の帰属を表-10、11に示した。1を無水酢酸とピリジンでアセチル化するとheptaacetate(8)が得られた。8のCOSY及びJ分解2次元NMRスペクトルを解析することにより、8の ^1H -NMRスペクトル(図-57、表-10)においてアセチル化シフトしているプロトンが明らかとなった。従ってアセチル基の導入された7つの水酸基の位置は図-58のように決定された。これらの結果、1を構成する2モルのN-acetylallosamineと1モルの2が、1'-4、1''-4'または1''-1'、4'-4のエーテル結合で連がり1を形成していることが明らかとなった。

どちらのエーテル結合の組合せが1に存在するのかを決定する為に、1の緩和加水分解実験を行い、部分加水分解物を得ることにした。1を0.5N HClで80℃、4時間処理すると図-59に示したような多くの分解物が生成し、その一つとしてN-acetylallosamine及び2をそれぞれ1モルずつ有する擬似二糖(9、図-60)が得られた。9および9のpentaacetate(10)のCOSYスペクトルの解析の結果、9のC-4'に新しく水酸基が形成されていることが10のH-4'のアセチル化シフトより明らかとなった。このことは、4'-4'においてエーテル結合が存在し得ないことを示し、1は1'-4'及び1''-4'のエーテル結合を有していることが判明した。2つのアノメリックプロトン(H-1'及びH-1'')の結合定数は9Hzであり、グリコシド結合は両者ともにβであることが示された。以上よりallosamidin(1)の構造は、絶対構造を含めて図-61のように決定された。

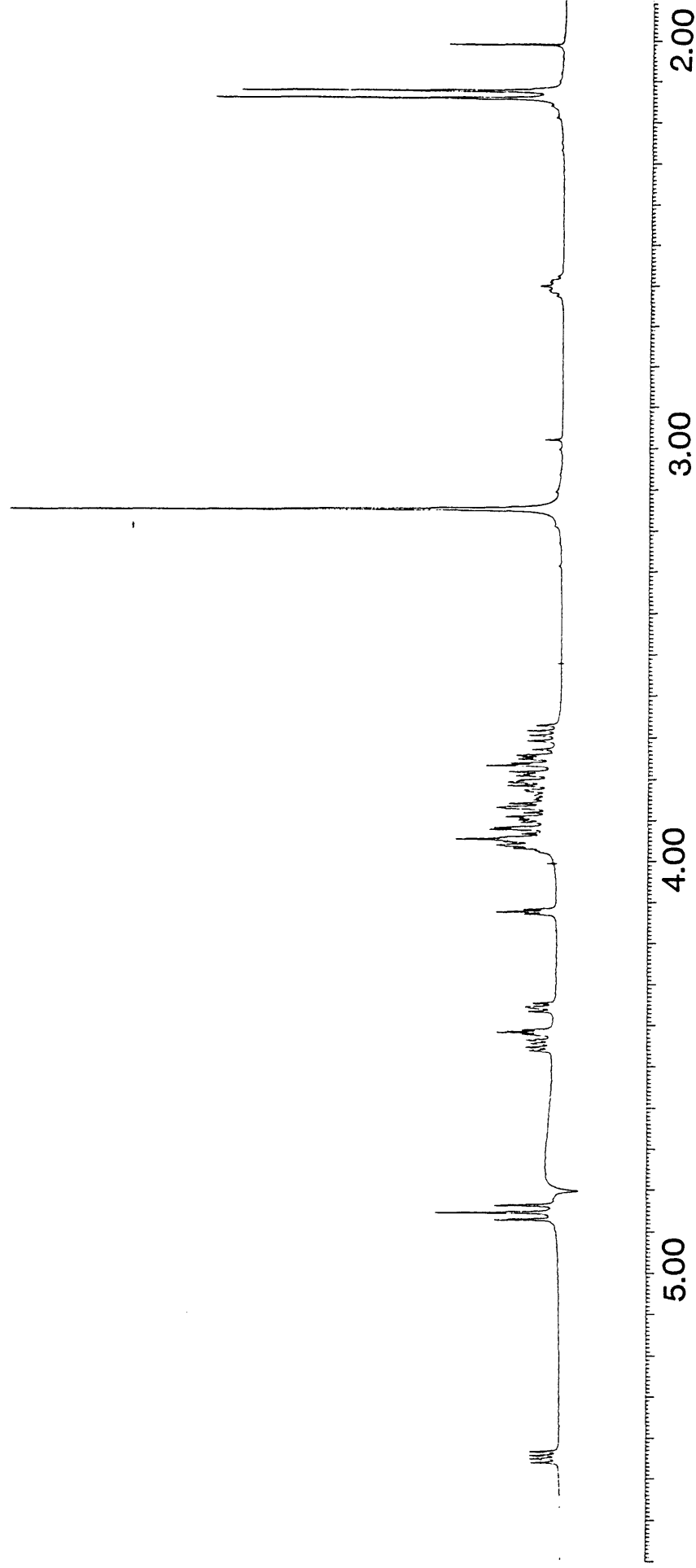


図-53 1の¹H-NMRスペクトル (D₂O+CD₃COOD, 500MHz)

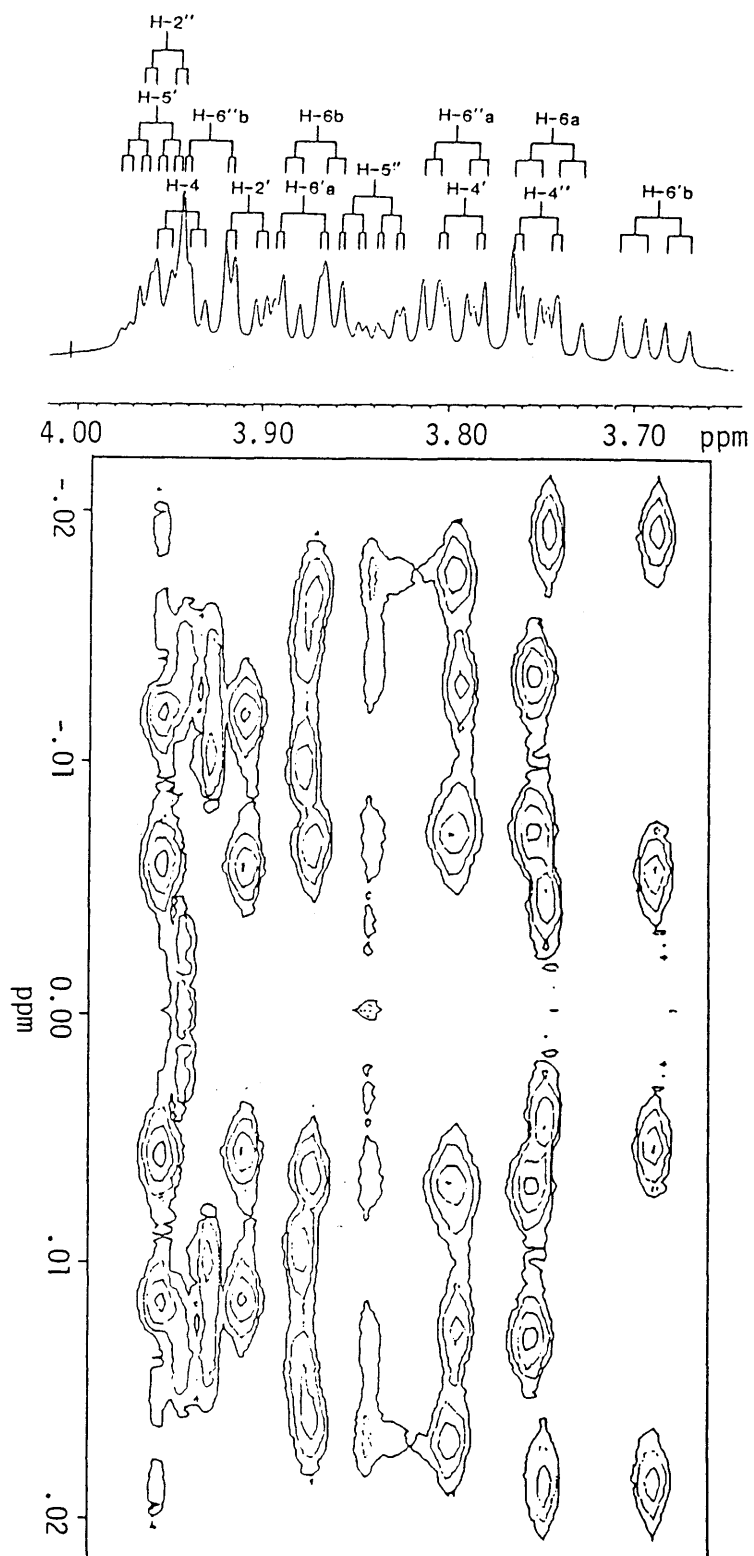
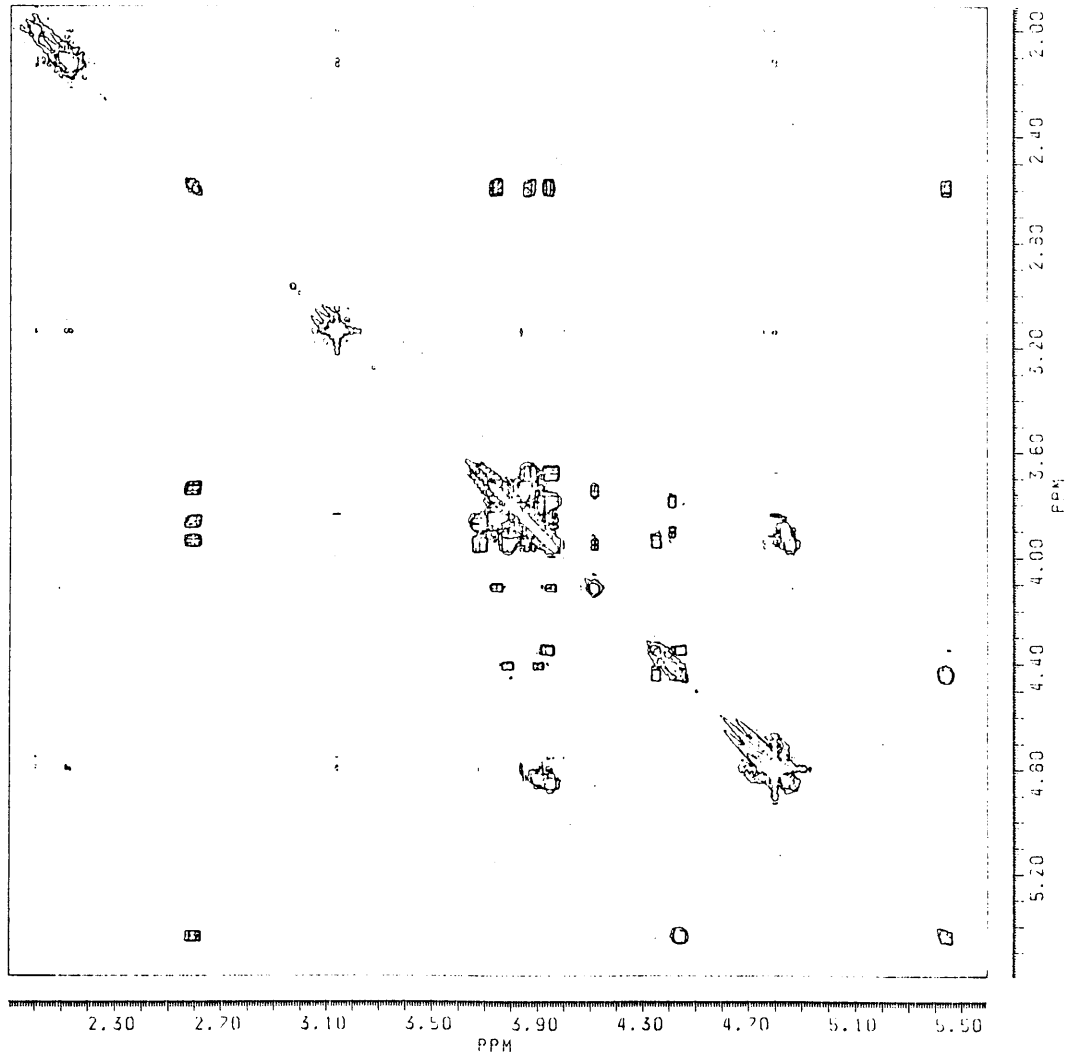


図-54 1のJ分解2次元NMRスペクトル (δ3.7-4.0付近)

(A)

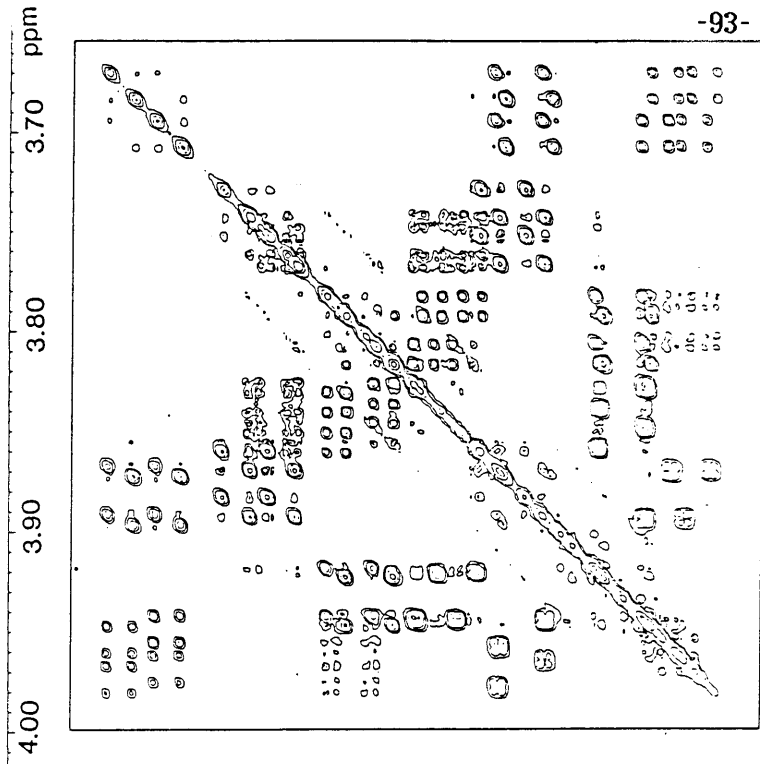
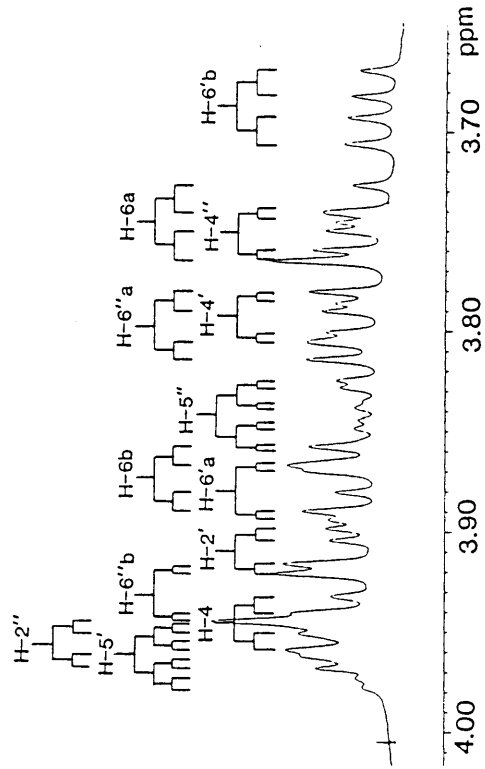


図一55 1のCOSYスペクトル

(A)全体

(B) δ 3.7-4.0付近

(B)



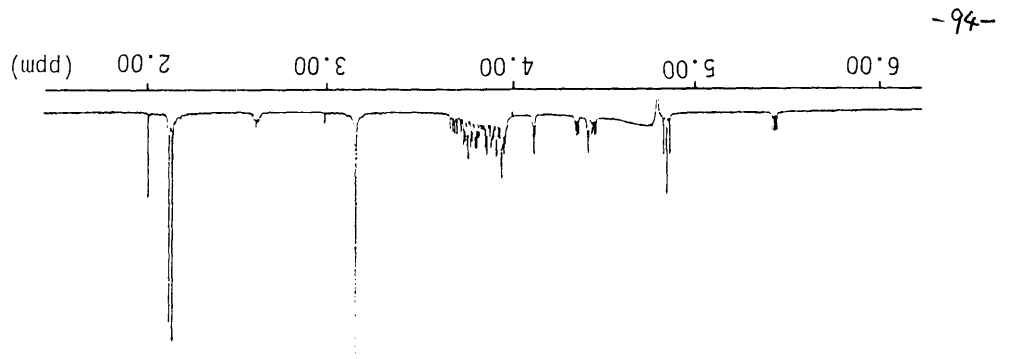
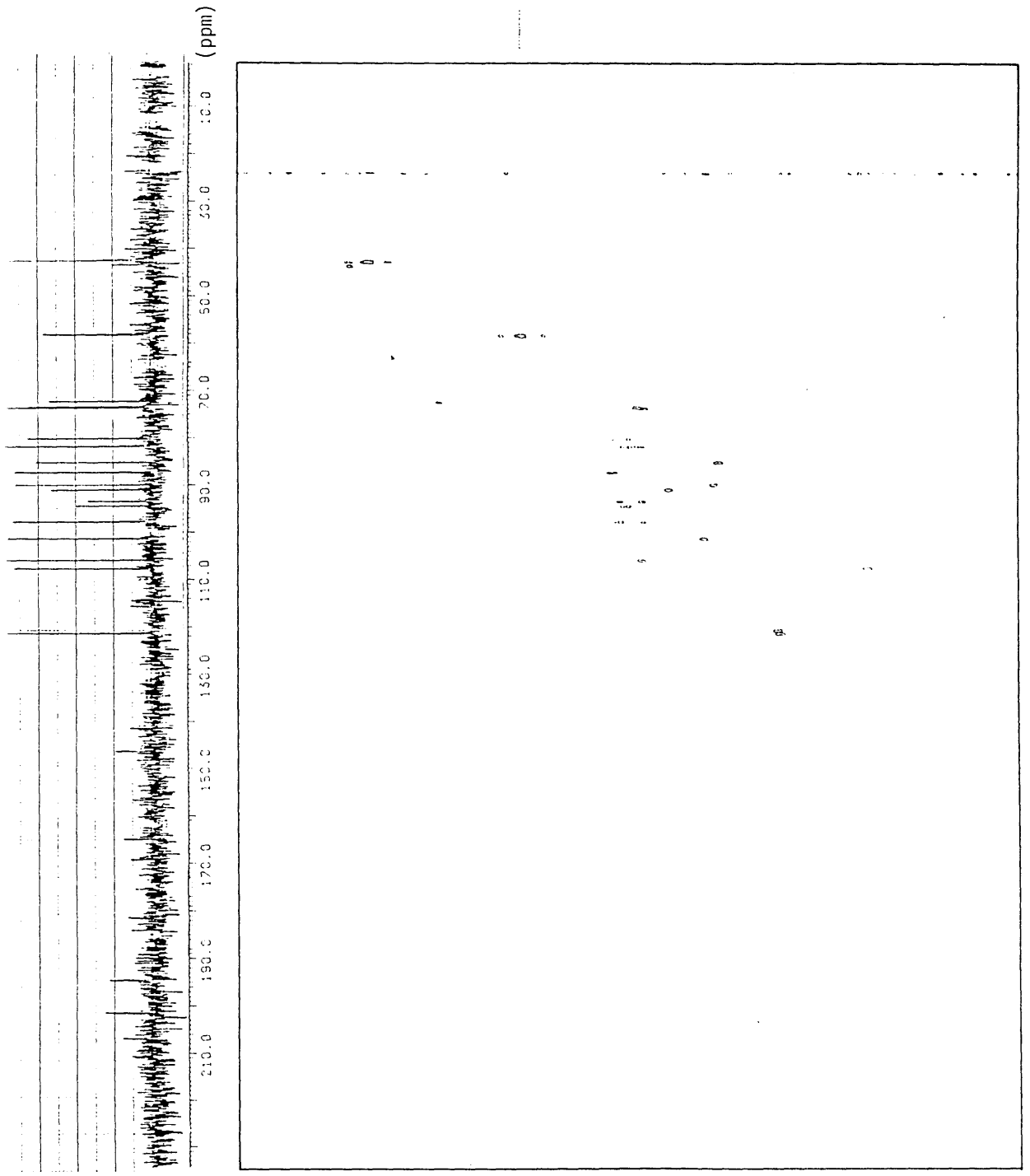


図-56 100-シフト相関2次元NMRスペクトル

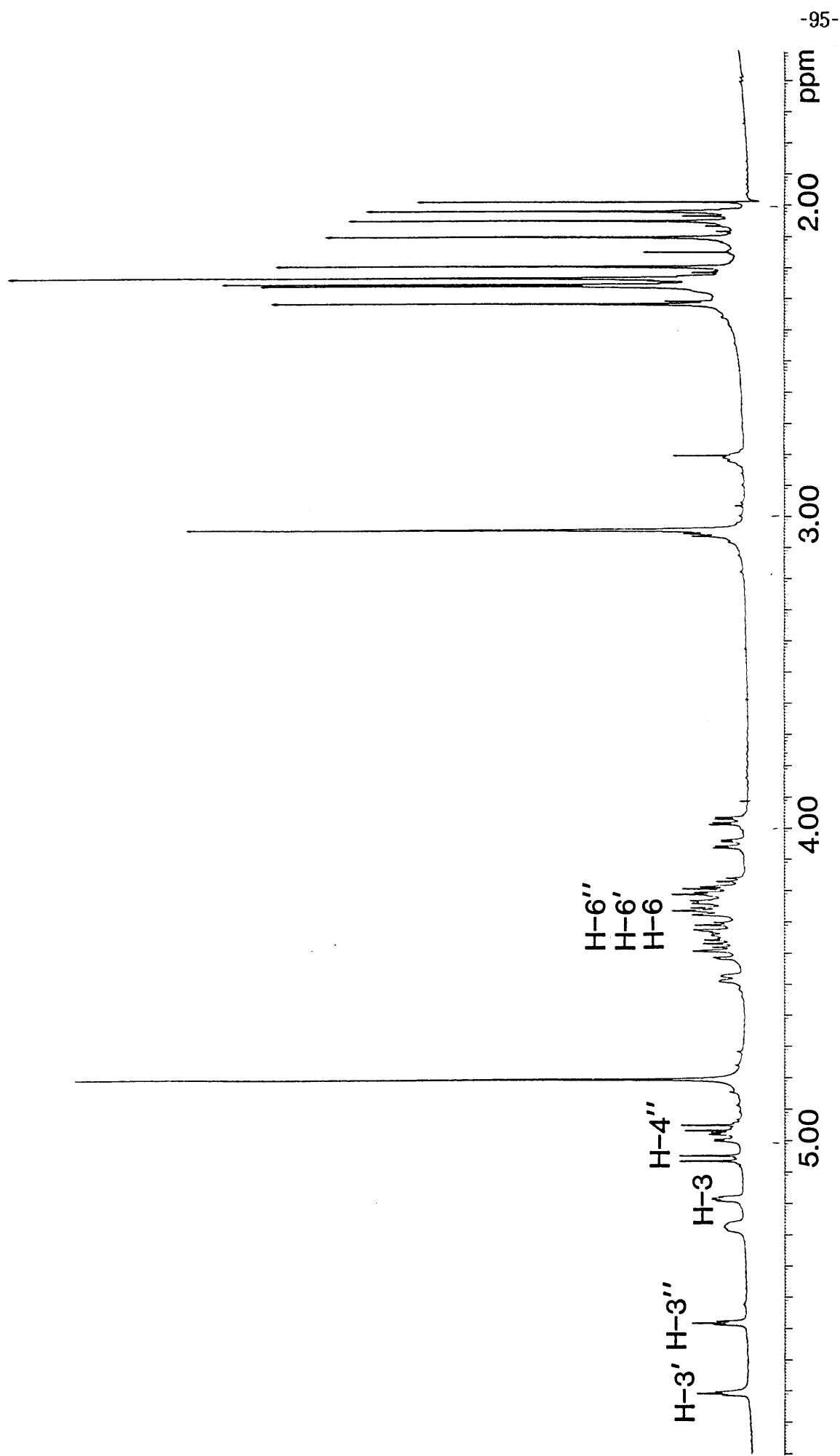


図-57 8の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル ($\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{COOD}$, 500MHz)

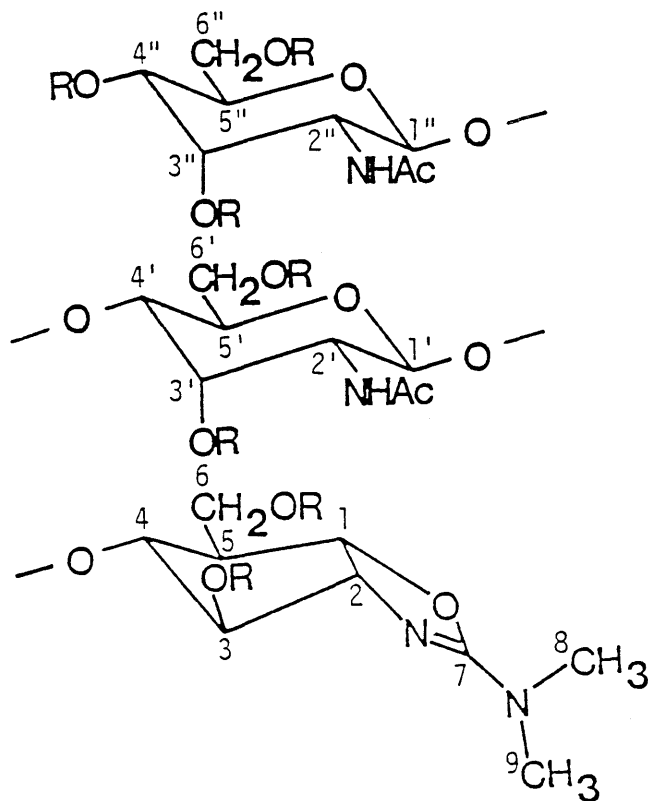


図-58 1 R=H, 8 R=Ac

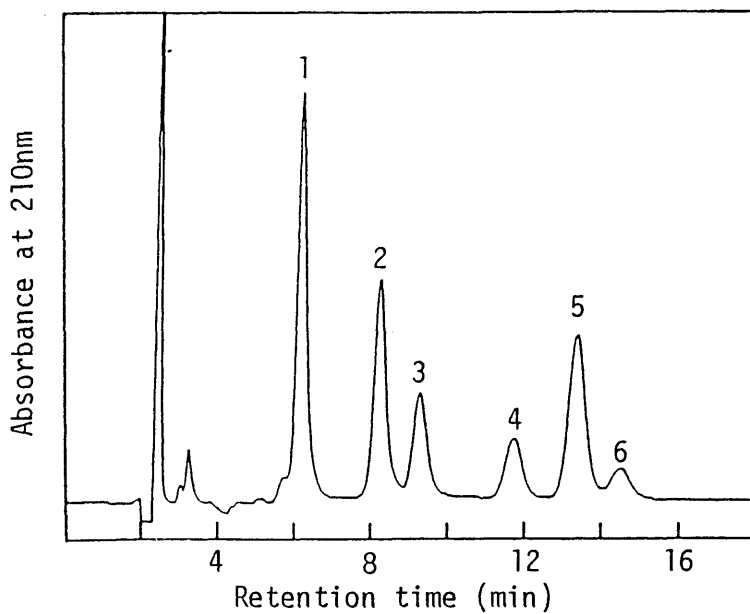


図-59 1の酸加水分解生成物のHPLC

カラム : Asahipak ES-502C (7.6x100mm)

移動相 : 10mM AcONH₄-NH₄OH (pH 9.1)

流速 : 1.0ml/min

検出 : UV 210nm

Peak-1: 1, Peak-2 : 9, Peak-4: 2,

Peak-3,5: 1-Ac, Peak-6: not identified

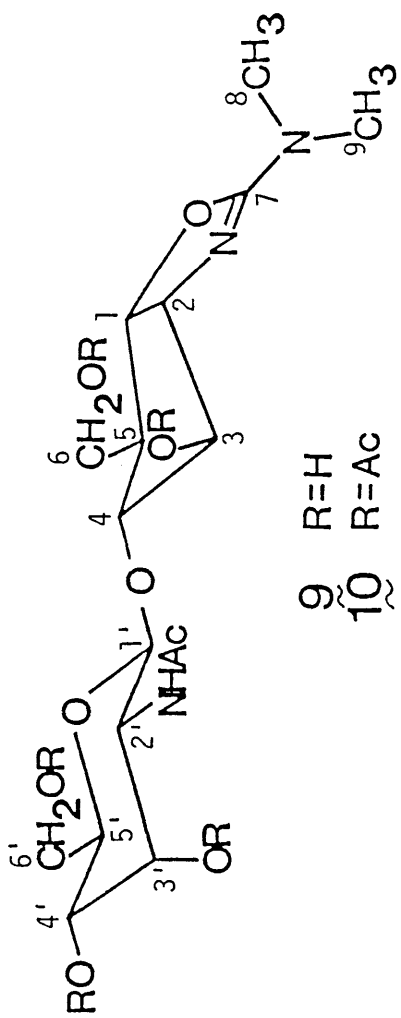


図-60 9、10の構造

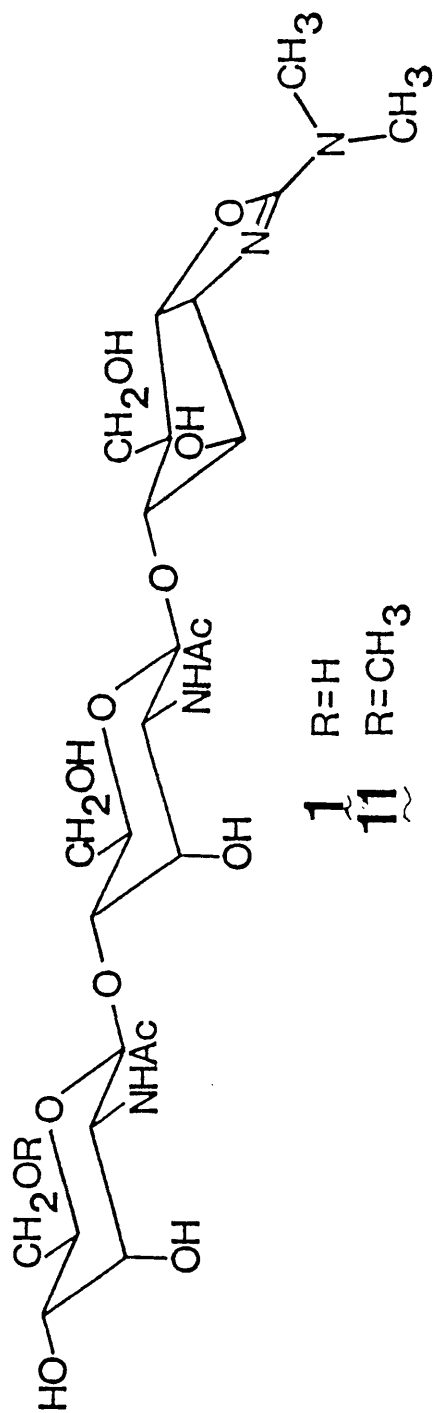


図-61 1、11の構造

表-10 1、8、9、10、11、12の¹H-NMRスペクトルの帰属 a)

Assignment	1	11	8	12	9	10
H-1 ^b	5.45 dd (5,9)	5.44 dd (5,9)	5.27 dd (5,9)	5.57 dd (5,9)	5.20 dd (5,9)	5.30 dd (5,9)
H-2 ^b	4.45 dd (4,9)	4.44 dd (4,9)	4.48 dd (2,9)	4.66 dd (2,9)	4.28 dd (4,9)	4.29 dd (3,9)
H-3 ^b	4.35 dd (4,5)	4.35 dd (4,5)	5.18 dd (2,4)	5.27 dd (2,4)	4.18 dd (4,5)	5.25 dd (3,4)
H-4 ^b	3.94 dd (5,7)	3.93 dd (5,7)	4.25 dd (4,6)	4.35 dd (4,6)	3.84 dd (5,7)	4.50 dd (4,7)
H-5 ^b	2.60 m (5,5,7,7)	2.60 m (5,5,7,7)	2.81 m (5,6,6,7)	2.96 m (5,6,6,7)	2.47 m (5,5,7,7)	2.84 m (5,5,7,7)
H-6	3.74 dd (7,12)	3.74 dd (7,12)	4.26 dd (7,12)	4.26 dd (7,12)	3.72 dd (7,12)	4.25 dd (7,12)
	3.87 dd (5,12)	3.87 dd (5,12)	4.38 dd (6,12)	4.37 dd (6,12)	3.85 dd (5,12)	4.39 dd (5,12)
NCH ₃ ^b	3.14 s	3.14 s	3.04 s	3.15 s	3.04 s	3.06 s
H-1'	4.84 d (9)	4.84 d (9)	4.96 d (9)	4.99 d (9)	4.79 d (9)	5.03 d (9)
H-2'	3.91 dd (3,9)	3.90 dd (3,9)	3.97 dd (3,9)	3.94 dd (3,9)	3.89 dd (3,9)	4.14 dd (3,9)
H-3'	4.41 t (3)	4.39 t (3)	5.81 t (3)	5.80 t (3)	4.10 t (3)	5.61 t (3)
H-4'	3.79 dd (3,10)	3.78 dd (3,10)	4.05 dd (3,10)	4.03 dd (3,10)	3.69 dd (3,10)	5.05 dd (3,10)
H-5'	3.96 ddd (2,7,10)	3.93 ddd (2,6,10)	4.23 ddd (2,5,10)	4.23 ddd (2,5,10)	3.88 ddd (2,7,10)	4.34 ddd (2,4,10)
H-6'	3.69 dd (7,12)	3.70 dd (6,12)	4.17 dd (5,12)	4.16 dd (5,12)	3.71 dd (7,12)	4.27 dd (7,12)
	3.88 dd (2,12)	3.80 dd (2,12)	4.40 dd (2,12)	4.41 dd (2,12)	3.85 dd (2,12)	4.44 dd (4,12)
H-1''	4.86 d (9)	4.84 d (9)	5.05 d (9)	4.99 d (9)		
H-2''	3.95 dd (3,9)	3.94 dd (3,9)	4.19 dd (3,9)	4.14 dd (3,9)		
H-3''	4.12 t (3)	4.11 t (3)	5.58 t (3)	5.56 t (3)		
H-4''	3.75 dd (3,10)	3.74 dd (3,10)	4.99 dd (3,10)	4.97 dd (3,10)		
H-5''	3.84 ddd (2,5,10)	3.87 ddd (2,6,10)	4.33 ddd (3,7,10)	4.15 ddd (2,4,10)		
H-6''	3.80 dd (5,12)	3.68 dd (6,12)	4.22 dd (7,12)	3.57 dd (4,11)		
OCH ₃	3.93 dd (2,12)	3.94 dd (2,12)	4.31 dd (3,12)	3.66 dd (2,11)		
		3.46 s		3.41 s		
Ac	2.12 s, 2.14 s	2.12 s, 2.13 s	2.02 s, 2.05 s	2.02 s, 2.04 s	2.10 s	2.05 s, 2.10 s
			2.10 s, 2.19 s	2.09 s, 2.22 s		2.20 s, 2.23 s
			2.23 s, 2.23 s	2.24 s, 2.24 s		2.23 s, 2.30 s
			2.25 s, 2.26 s	2.27 s, 2.30 s		
			2.31 s			

a) Chemical shifts are in ppm (D₂O+CD₃COOD, 500MHz). Coupling constants in Hertz are given in parentheses.

b) Chemical shifts of these protons were very variable depending on the pH of the solution.

表-11 1、11の ^{13}C -NMRスペクトルの帰属^{a)}

Assignment	δ	δ	Assignment	δ	δ
C-1	87.6	87.4	C-5'	73.4	73.0 ^{c)}
C-2	65.4	64.8	C-6'	61.8	61.4
C-3	81.4	80.9	C-1''	101.4	101.1
C-4	85.9	85.6	C-2''	53.7	53.3 ^{b)}
C-5	52.4	52.1	C-3''	70.9	70.5
C-6	60.2	59.7	C-4''	67.3	67.1
C-7	161.5	161.0	C-5''	74.4	72.6 ^{c)}
C-8	38.4	38.0	C-6''	61.8	71.9 ^{c)}
C-9	38.4	38.0	OCH ₃		59.2
C-1'	100.7	100.3	NAc(C=O)	174.8	174.1
C-2'	53.4	53.1 ^{b)}	(CH ₃)	22.9	22.5
C-3'	69.8	69.5		22.9	23.0
C-4'	77.7	77.4			

a) Chemical shifts are in ppm ($\text{D}_2\text{O}+\text{CD}_3\text{COOD}$, 25MHz).

b),c) May be interchanged.

2-4 methylallosamidinの生産、単離及び構造解析

2-4-1 methylallosamidinの生産と単離

methylallosamidinの生産には未同定の放線菌3301株を用い、その培養はallosamidinの場合と同様の培地（表-8）及び培養条件で行った。ただし、3301株は4日間の培養では、methylallosamidinとほぼ同量のallosamidinを生産し7日間では前者だけという培養経過を示したため培養日数は7日間とした。

methylallosamidinの単離は図-62のスキームに従い行った。収量は200literの培養液より106mgであった。

2-4-2 methylallosamidinの構造

methylallosamidin(11)はallosamidin(1)に極めて類似の物理化学的性質を示した。11のFABマススペクトルにおいては（図-63）、 m/z 637に $(M+H)^+$ の擬分子イオンが観測され、1より14分子量多いことが示された。また11の $^1\text{H-NMR}$ （図-64）及び $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトル（図-65）においては、1には存在しない、 δ_{H} 3.46の鋭いシングレット及び δ_{C} 59.2のメチル炭素のシグナルが観測された。これらのシグナルはメトキシル基の存在を示し、先程の分子量を考慮すると、1の7つの水酸基のうち1つが11においてはメチ

ル化されているものと考えられた。そこでメチル化されている水酸基の位置を決定する為に 11 及び 11 の hexaacetate(12) の COSY スペクトルを測定したところ、C-6" のメチレンプロトンがアセチル化シフトしていないことより (図-66)、メトキシル基の結合位置は C-6" であることが明らかとなった。以上より methylallosamidin (11) の構造を図-61 に示すように決定した。11 の NMR スペクトルにおける各炭素と水素の帰属を表-10、11 に示した。

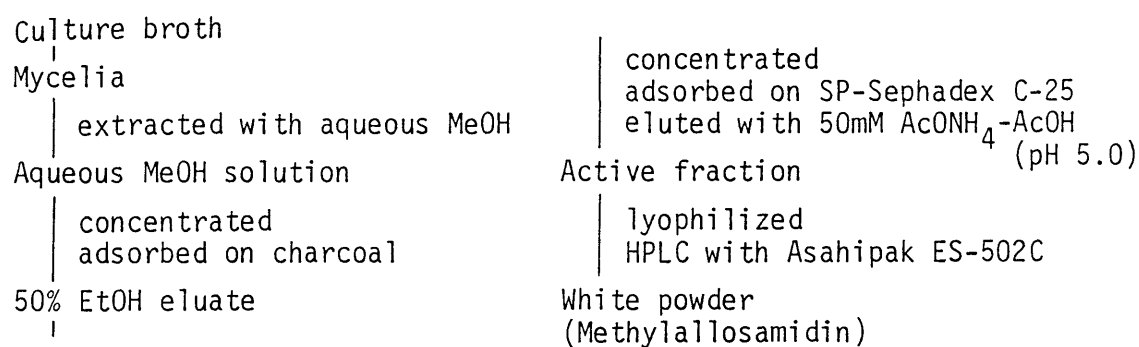


図-62 methylallosamidinの単離

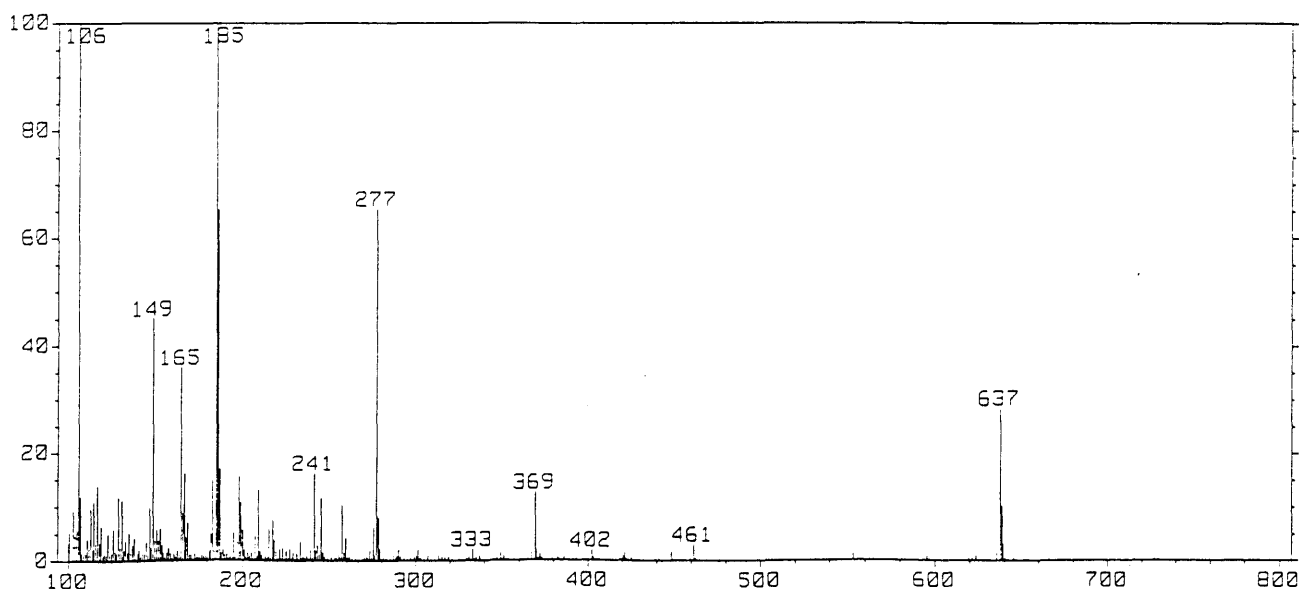


図-63 11のFABマススペクトル (グリセロールマトリックス)

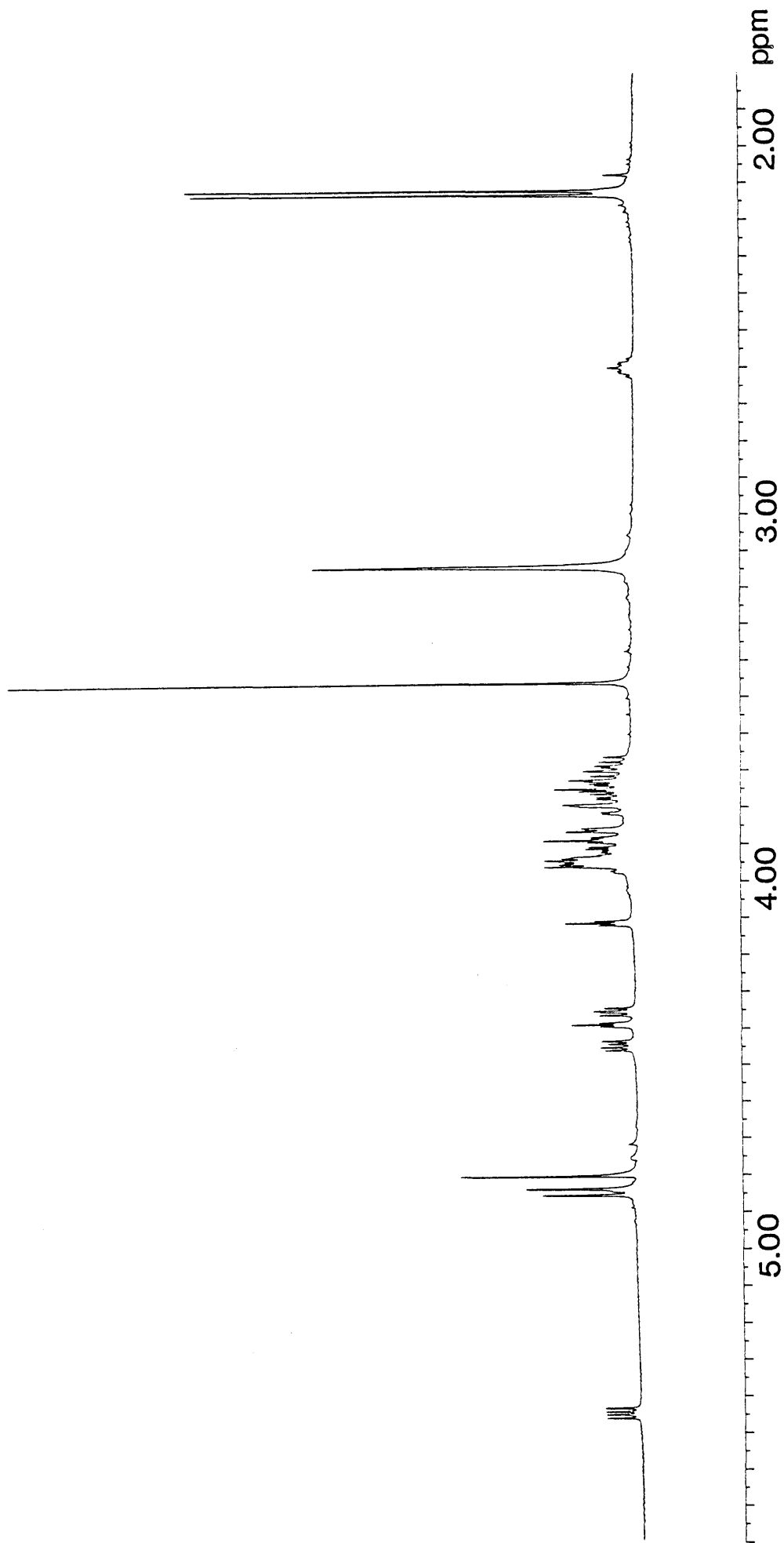


図-64 1,1の¹H-NMRスペクトル (D₂O+CD₃COOD, 500MHz)

(D)



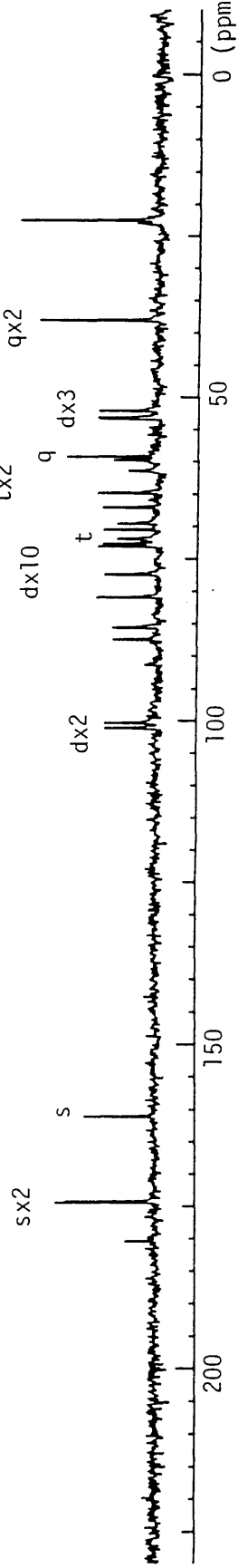
(C)



(B)



(A)



0 (ppm)

50

100

150

200

図-65 11の13C-NMRスペクトル (D₂O+CD₃COOD, 25MHz)

(A) COM, (B) Δ=1/4J, (C) Δ=2/4J, (D) Δ=3/4J

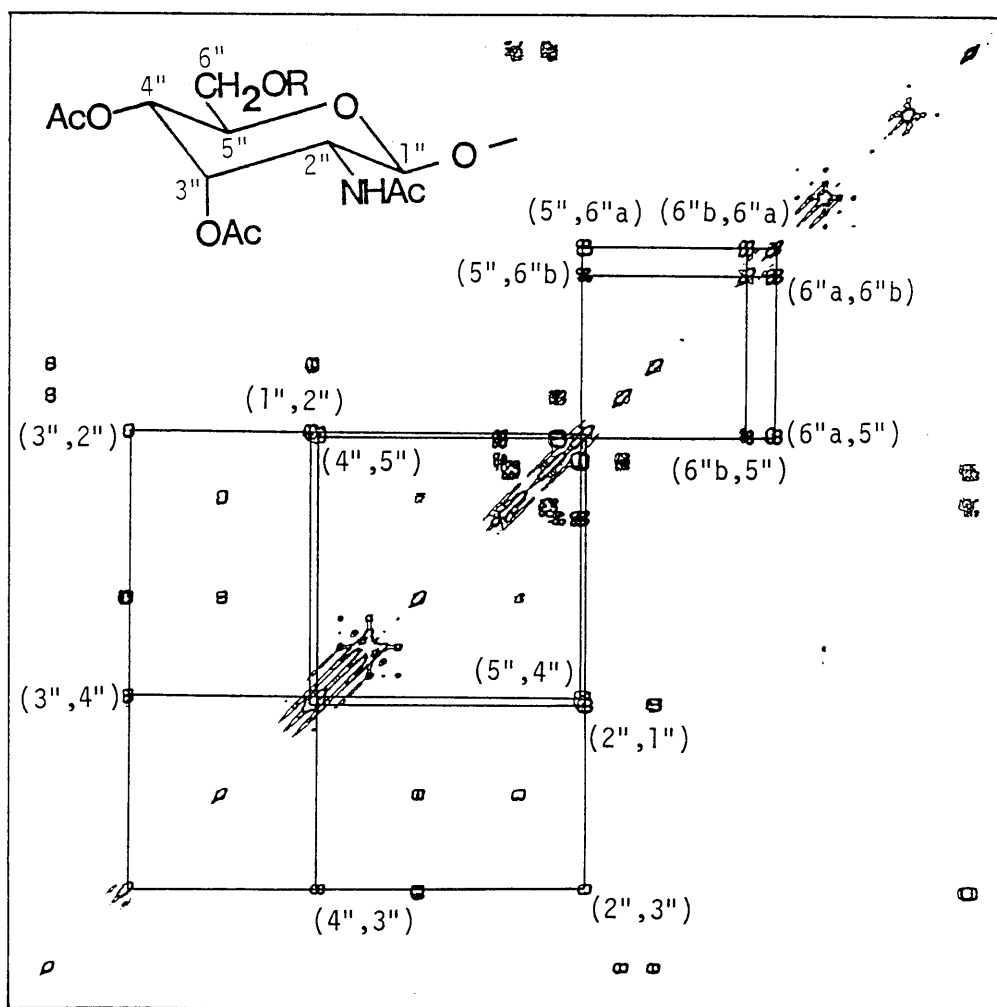
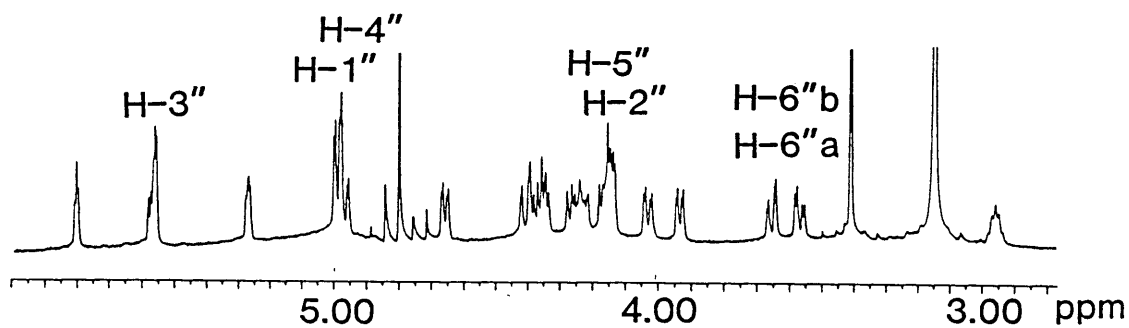


図-66 12のCOSYスペクトル (D₂O+CD₃COOD, 500MHz)

2-5 allosamidinの生物活性

特異な擬似三糖構造を有する昆虫のキチナーゼ阻害物質allosamidinは以下に述べるような*in vitro*及び*in vivo*での生物活性を示した。

2-5-1 キチン分解酵素に対する阻害活性

allosamidinは本研究で使用した生物検定法、即ちカイコ蛹中腸よりの酵素液及び γ -chitin redを用いる酵素反応系では、図-67に示すような阻害効果を示した。allosamidinの濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で、完全にキチナーゼ活性が阻害された。

本検定法では粗酵素液を用いたが、カイコより単離されたキチナーゼに対する阻害活性及び他のキチン分解酵素に対する阻害活性が古賀らによって調べられた⁷⁰⁾。その結果を表-12に記した。

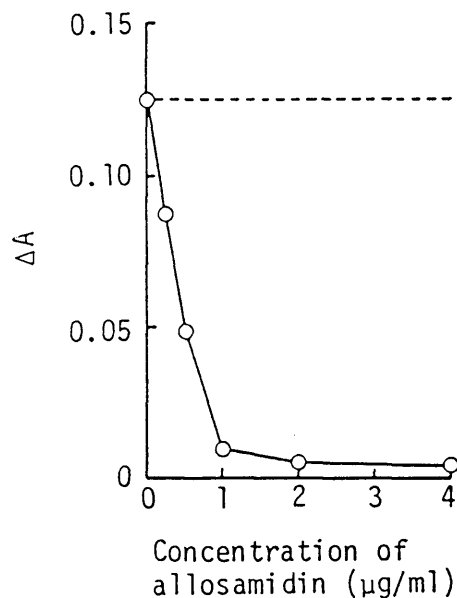


図-67 allosamidinのカイコキチナーゼに対する効果

--- : コントロールの ΔA 値

表-12 allosamidinのキチン分解酵素に対する阻害活性

Enzyme	Allosamidin level (μM)	Inhibition
<u>Bombyx mori</u>		
chitinase(endochitinase)	0 to 10	$\text{ID}_{50}=0.386\mu\text{M}$
from pupal alimentary canal	0 to 0.3	$\text{K}_i=0.07\mu\text{M}$
from larval integument	0 to 0.3	$\text{K}_i=0.11\mu\text{M}$
<u>Bombyx mori</u>		
β -N-acetyl-D-glucosaminidase (exochitinase)		
from pupal alimentary canal	4.95 to 49.5	0
from larval integument	14.7 to 44.1	0
<u>Streptomyces griseus</u> chitinase	53.57	$38.7\pm 0.9\%$
<u>Serratia marcescens</u> chitinase	53.57	$27.0\pm 4.0\%$
Yam chitinase	0 to 100	0
Egg-white lysozyme	47.6 to 70	0
Human urinary lysozyme	43.48	0

2-5-2 殺虫活性

allosamidinの *in vivo*での投与の効果は、2種類の鱗翅目昆虫、カイコ *Bombyx mori*及びアワヨトウ *Leucania separata*を用いて調べられた。allosamidinを4 μ gカイコ4令幼虫に注射した場合、4令幼虫の段階での成育には影響を与えず、5令への脱皮時において、古い皮膚の脱皮を阻止することにより殺虫力を示した。また、カイコ終令幼虫に注射した場合にも、蛹脱皮を阻止した(図-68)。同様に、アワヨトウ5令及び終令幼虫に注射により投与した場合も、幼虫及び蛹脱皮をそれぞれ阻止した(図-69)。表-13にカイコ及びアワヨトウに対する EL_{50} 値を示した。

尚、methyallosamidinは *in vivo*及び *in vitro*においてallosamidinとほぼ同等か若干弱めの活性を示した。

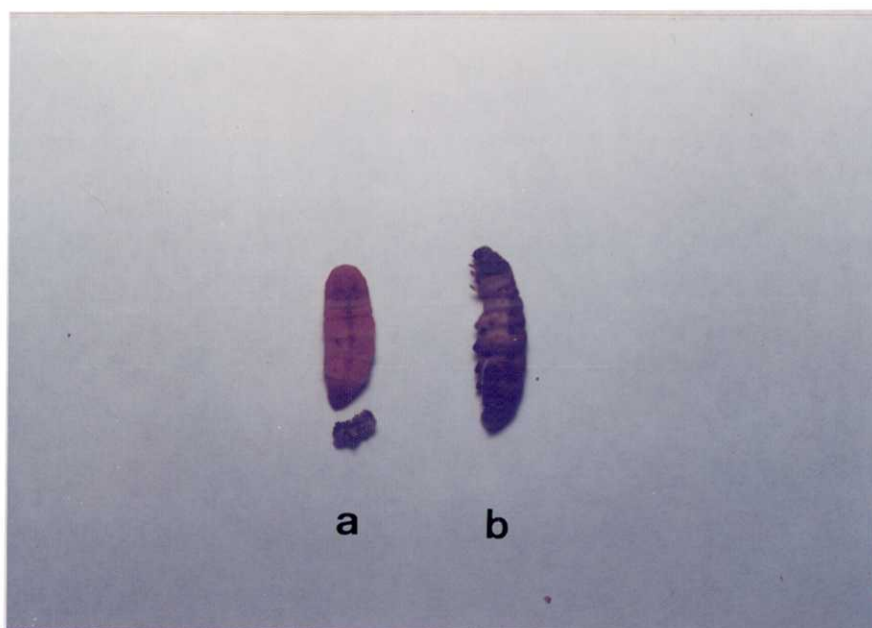


図-68 allosamidinのカイコ幼虫の蛹脱皮に対する効果

a)正常な蛹

b)allosamidin10 μ g蛹化一日前に投与。幼虫の皮膚のまま死亡。

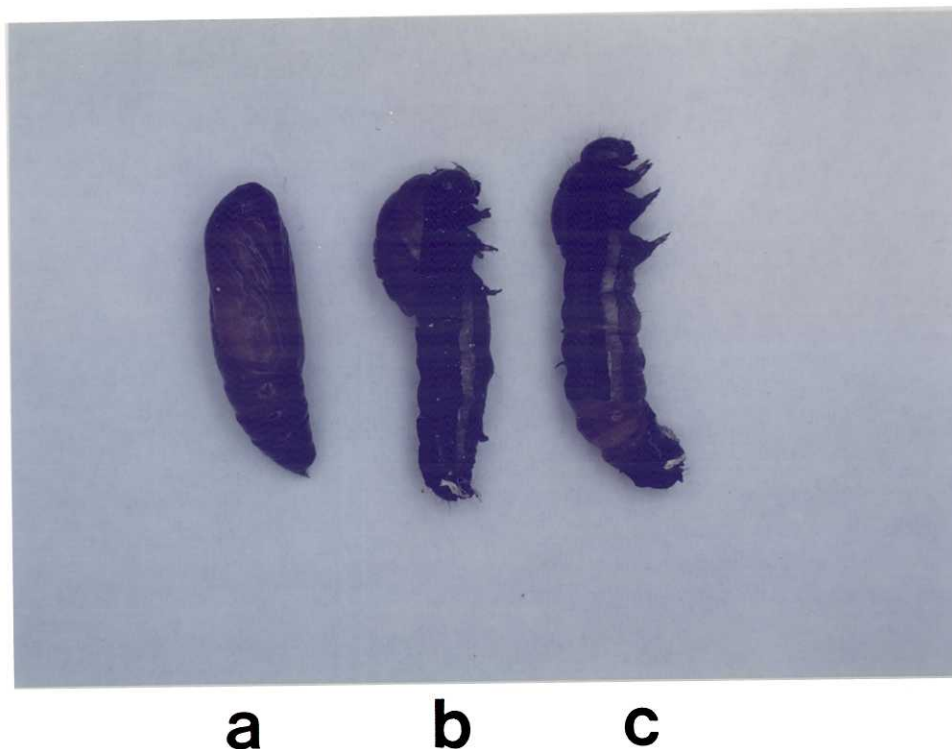


図-69 allosamidinのアワヨトウ幼虫の蛹脱皮に対する効果

a)正常な蛹

b), c)16 μ gのallosamidinを終令時に投与。一部蛹の皮膚が見えるが、大部分の幼虫の皮膚が残っている。

表-13 allosamidinのカイコ及びアワヨトウに対する脱皮阻害活性

Species	Larval stage of application	EI ₅₀ (μ g)
<u>Bombyx mori</u>	4th instar	2
<u>Leucania separata</u>	5th instar	4
	last instar	8

実験の部

(機器)

第二部においては、以下の機器分析装置を使用した。

マススペクトル	JEOL JMS DX-300及びDX-303
IRスペクトル	Jasco A-202
^1H -NMRスペクトル	Brucker AM 500
	JEOL GX-400
	JEOL FX-100
^{13}C -NMRスペクトル	JEOL FX-100
CDスペクトル	Jasco J-20-C
旋光度	Jasco DIP-140

^{13}C -NMRスペクトルでは、dioxane(δ_{C} 67.4)を外部基準とし、 ^1H -NMRスペクトルでは、 D_2O の場合には DHO (δ_{H} 4.8)を、 CDCl_3 の場合には TMS (δ_{H} 0.0)を内部基準とした。

(キチナーゼ酵素液の調整)

本研究の生物検定系で用いたキチナーゼ酵素液は木村の方法に従い以下のように調整した⁶³⁾。蛹化直後(0~5時間)のカイコ蛹より中腸及びその内容物を0.05Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)150ml中に取り出し、氷冷下ワーリングブレンダーを用いて破碎した。ホモジネートを遠心分離(10,000rpm,20min,0℃)にかけ、得られた上清に対し酢酸アンモニウムを0.7飽和になるように加えた。生じた沈澱を遠心分離(同条件)により回収した後、0.05Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)100mlに再度溶解した。こうして得られた溶液を酵素反応系におけるキチナーゼ酵素液として使用した。酵素液は使用時まで-80℃にて凍結保存した。

(キチナーゼ活性測定法)

キチナーゼの酵素反応は、0.1Mクエン酸-リン酸緩衝液(pH5.0)0.9ml、キチナーゼ酵素液0.1ml、水0.8ml、メタノール0.2mlの溶液に、 γ -chitin red 5mgを加えた酵素反応系で行った。放線菌の培養液を用いてスクリーニングを行う際は、酵素反応液組成中の水のかわりに培養濾液を、メタノールのかわりに菌体メタノール浸出液を加えたもの、それぞれにつき検定を行った。allosamidin及びmethylallosamidinの精製の各段階においては、サンプルはすべて水に溶

解し酵素反応系に加えた。酵素反応は、密栓したバイヤル(27.5 x 55mm)中で、35℃、一晚、120spmで行った。遠心分離(2000rpm,5min)により γ -chitin redを沈澱させ、バスツールピペットで注意深く取り出した上清の510nmでの吸光度を反応前(OD_{510B})及び反応後(OD_{510A})に測定し、その差の値($\Delta A = OD_{510A} - OD_{510B}$)をキチナーゼ活性とした。 ΔA の値は前述の酵素反応系で、阻害物質を含まない場合、+0.12~0.14でほぼ一定であった。

(allosamidinの生産)

allosamidin生産菌5株のうち最初に見出された1713株は神奈川県
の土壌より分離された放線菌で、Streptomyces sp.と同定された。
Streptomyces sp. 1713株の大量培養は600literのジャーファーマン
ターに300literの培地(表-8)を仕込み、26.5℃、5日目、通気
量300liter/min、回転数100rpmの条件で行った。

(allosamidinの単離)

Streptomyces sp. 1713株の培養液300liter(pH7.28)より、セライ
ト(関東化学)を濾過助剤として用い、菌体を濾別した。得られた
菌体はメタノール(70liter)で抽出後、80%メタノール(60liter)で再
度抽出を行った。両抽出液を合わせ、減圧濃縮し、得られた15lite

rの水溶液を活性炭（和光純薬 charcoal activated）カラム（7.0×40cm）に吸着させた。カラムを水洗い後、10%、25%、50%EtOH（それぞれ7.5liter）で段階溶出を行った。活性の回収された50%EtOH溶出液を減圧濃縮により半量とした後、Dowex-50カラム（H⁺型、8.4×9.0cm）に吸着させた。カラムを水洗後、1M AcONH₄（3liter）で溶出を行い、溶出液を脱塩のために再度活性炭カラム（2.8×19cm）に吸着させた。50%EtOHで溶出後、溶出液を半量に濃縮することによりEtOHを留去した後、水で3倍に薄め、酢酸でpHを3.9に調整した。そして、0.05M AcONH₄-AcOH（pH5.0）緩衝液で平衡化したSP-Sephadex C-25のカラム（2.8×30cm）に吸着させ、同緩衝液で溶出を行った。各溶出画分をHPLC（図-43）と生物検定により分析し、活性画分を集め凍結乾燥を行った。そして水から結晶化することによりallosamidinが白色の結晶性の粉末（280mg）として得られた。allosamidin（1）:

mp 228~238°C (dec.)

UV(0.1M AcOH) end absorption

IR ν_{\max} (Nujol)cm⁻¹: 3500, 3350, 3300, 1640~1660, 1560.

¹H-NMR (表-10)

¹³C-NMR (表-11)

FABMS m/z623(M+H)⁺ (glycerol matrix).

$[\alpha]_D^{22}$ -24.8° (c=0.5, 0.1M AcOH)

(allosamidinの酸加水分解)

allosamidin(23mg)を4NHCl(5.75ml)に溶かし減圧封管後、100℃ 4時間の加水分解を行った。開封後、反応液を減圧濃縮してHClを除去し、さらに凍結乾燥を行った。得られた残さを0.3NHCl(0.5ml)に溶かしDowex-50カラム(H⁺型、200~400mesh、1×23cm)に吸着させた。カラムより0.3NHClで溶出を行うと、D-allosamine、続いてallosamizolineの溶出画分が得られた。それぞれの画分を凍結乾燥し、D-allosamine hydrochloride 13.2mg及びallosamizoline hydrochloride 7.5mgを得た。

D-allosamine hydrochlorideの同定は糖アルコールアセチル化物を用いてのGC-MS分析及び後述の物理化学的性質により行った。糖アルコールアセチル化物の作製は、以下の方法を用いた。凍結乾燥した試料(0.02mol)を水50μlに溶かしたものにNaBH₄水溶液(0.22mol)50μlを加え、時々攪はんしながら室温に1時間放置した。反応液に酢酸3μlを加え、減圧下、濃縮乾固した。残さにHCl-MeOH、1:1000溶液100μlを加え、濃縮乾固する操作を3度繰り返した後、無水酢酸と乾燥ピリジンをそれぞれ50μl加え、100℃、1時間反応させた。反応後、反応液を直接GCに注入し、カラムはOV-1(3mm×2m)を用い150℃→250℃(8℃/min)の昇温で分析を行った。標品にはN-acetyl-D-allosamine(Sigma)を同様に糖アルコールアセチル化物に導いたも

のを用いた。

D-allosamine hydrochloride:

FABMS m/z 180 (M+H)⁺

$[\alpha]_D^{22}$ 15.4° (C=1.0, H₂O, after 30min)

文献値⁶⁵⁾ 26→17°, 15min (C=0.8, H₂O)

NMRのデータは主に観測されたβ-アノマーのものを記す。

¹³C-NMR δ (D₂O, 25MHz): 54.9(d), 61.5(t), 66.9(d), 68.3(d)
74.6(d), 93.1(d).

¹H-NMR δ (D₂O, 500MHz): 3.28(1H, dd, J=3, 9, H-2),
3.74(1H, dd, J=3, 10, H-4), 3.77(1H, dd, J=5, 12, H-6a),
3.90(1H, ddd, J=2, 5, 10, H-5), 3.94(1H, dd, J=2, 12, H-6b)
4.33(1H, t, J=3, H-3), 5.16(1H, d, J=9, H-1).

allosamizoline hydrochlorideは非常に吸湿性の無色固体として得られた。

allosamizoline hydrochloride:

FABMS m/z 217(M+H)⁺

$[\alpha]_D^{22}$ -22.2° (C=0.5, H₂O)

¹³C-NMR δ (D₂O, 25MHz): 37.9(q), 38.1(q), 51.9(d), 59.9(t)
64.2(d), 75.4(d), 82.2(d), 87.2(d), 161.2(s).

$^1\text{H-NMR } \delta (\text{D}_2\text{O}, 100\text{MHz}): 2.43(1\text{H}, \text{m}, J=5, 5, 7, 8, \text{H}-5),$
 $3.08(3\text{H}, \text{s}, \text{H}-8 \text{ か } \text{H}-9), 3.11(3\text{H}, \text{s}, \text{H}-8 \text{ か } \text{H}-9),$
 $3.72(1\text{H}, \text{dd}, J=7, 12, \text{H}-6\text{a}), 3.83(1\text{H}, \text{dd}, J=7, 8, \text{H}-4),$
 $3.92(1\text{H}, \text{dd}, J=5, 12, \text{H}-6\text{b}), 4.14(1\text{H}, \text{d}, J=4, 7, \text{H}-3),$
 $4.34(1\text{H}, \text{dd}, J=4, 9, \text{H}-2), 5.37(1\text{H}, \text{dd}, J=5, 9, \text{H}-1).$

allosamizoline triacetate(3)は以下の方法で調製した。凍結乾燥直後のallosamizoline hydrochloride(2mg)に氷冷下、無水酢酸-dry pyridine, 1:2の溶液(300 μl)を加え、よくかき混ぜた後、4 $^{\circ}\text{C}$ に一晩静置した。反応液を氷水中(15ml)に滴下し、その溶液をSEP-PAK C_{18} カートリッジ(Waters Associates)に通した。カートリッジを水(10ml)で洗浄した後 CH_3CN (10ml)で溶出を行い、 CH_3CN 溶出区を減圧濃縮するとallosamizoline triacetateが1.8mg得られた。

allosamizoline triacetate(3)

EIMS m/z 342(M) $^+$, 282, 223, 113

$^1\text{H-NMR } \delta (\text{CDCl}_3, 400\text{MHz}): 2.03(3\text{H}, \text{s}), 2.06(3\text{H}, \text{s}), 2.11(3\text{H}, \text{s})$
 $2.63(1\text{H}, \text{m}, J=4, 5, 6, 7, \text{H}-5), 3.03(6\text{H}, \text{s}, \text{H}-8 \text{ 及び } \text{H}-9),$
 $4.17(1\text{H}, \text{dd}, J=6, 11, \text{H}-6), 4.21(1\text{H}, \text{dd}, J=5, 11, \text{H}-6),$
 $4.51(1\text{H}, \text{dd}, J=4, 8, \text{H}-2), 4.94(1\text{H}, \text{dd}, J=4, 8, \text{H}-1),$
 $5.08(1\text{H}, \text{dd}, J=5, 7, \text{H}-4), 5.22(1\text{H}, \text{dd}, J=4, 5, \text{H}-3).$

(2-dimethylamino-5-methyl-2-oxazolineの合成)

N,N'-dimethyl-N'-allylurea(0.8g)と48% HBr (20ml)を混合し封管後、 100°C で4時間反応を行った。空冷後、反応液を10N NaOH で塩基性にし、 CHCl_3 で抽出した。 CHCl_3 層を塩水で洗い、無水 Na_2SO_4 で乾燥後、減圧濃縮し得られた油状物質を蒸留すると無色のオイルとして2-dimethylamino-5-methyl-2-oxazolineが0.6g得られた。

bp $70^{\circ}\text{C}/20\text{mmHg}$

^{13}C -NMR δ ($\text{D}_2\text{O}+\text{DCI}$,25MHz):19.4(q), 37.8(q), 37.9(q),
49.9(t), 82.7(d), 161.5(s).

^1H -NMR δ ($\text{D}_2\text{O}+\text{DCI}$,100MHz):1.39(3H,d,J=6,5- CH_3),
2.92(3H,s,N- CH_3), 2.95(3H,s,N- CH_3),
3.37(1H,dd,J=8,10,H-4a), 3.88(1H,dd,J=8,10,H-4b),
5.13(1H,m,J=6,8,8,H-5).

(allosamizoline p-(dimethylamino)benzoyl誘導体(4、5、6)の調製)

p-(dimethylamino)benzoyl化に用いたp-(dimethylamino)benzoyl cyanideはKoenigらの方法⁷¹⁾に従い以下の様に調整した。p-(dimethylamino)benzoyl chloride(0.64g)とtetrabutylammonium bromide(10mg)の CH_2Cl_2 (30ml)溶液に、 N_2 気流下、 0°C で NaCN (0.2g)の水溶液

(2ml)を加えた。1時間攪拌後、反応液を濾過し、 CH_2Cl_2 で濾紙上の残さを洗浄した後、 CH_2Cl_2 層を無水 Na_2SO_4 で乾燥した。減圧濃縮後、 EtOH より再結晶を行い、鮮やかな黄色の結晶が得られた。

mp 167-168°C (lit⁷²⁾ 172°C)、EIMS m/z 174(M)⁺

allosamizoline hydrochloride(5mg), p-(dimethylamino)benzoyl cyanide(16mg)及び tri-n-butylamine(8mg)をモレキュラーシーブ4Aで乾燥した CH_3CN (1.5ml)に溶かし、室温で一晩攪拌した⁷³⁾。反応後、反応液を直接HPLCにかけ、3種の誘導体の分離を行った。HPLCには Senshu Pak SSC-C₈(4.6×250mm)のカラムを用い、10mM AcONH_4 : CH_3CN (27:73)の移動相にて溶出を行った。収量は4、5、6それぞれにつき、1000 μg 、450 μg 、230 μg であった。

4.6-bis[p-(dimethylamino)benzoyl]allosamizoline(4):

FABMS m/z 511(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR δ (CDCl_3 , 500MHz): 2.95(1H, m, H-5),

4.45(1H, dd, J=8, 11, H-6), 4.50(1H, dd, J=2, 4, H-3),

4.55(1H, dd, J=2, 8, H-2), 4.58(1H, dd, J=5, 11, H-6),

5.17(1H, dd, J=4, 6, H-4), 5.22(1H, dd, J=4, 8, H-1)

UV λ_{max} (CHCl_3)nm:315.5

CD(図-51)

3.6-bis[p-(dimethylamino)benzoyl]allosamizoline(5):

FABMS m/z 511(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR δ (CDCl₃, 500MHz): 2.90(1H, m, H-5),

4.34(1H, t, J=4, H-4), 4.42(1H, dd, J=5, 11, H-6),

4.47(1H, dd, J=9, 11, H-6), 4.84(1H, dd, J=2, 8, H-2),

5.50(1H, dd, J=3, 8, H-1), 5.68(1H, dd, J=2, 4, H-3)

UV λ_{max}(CHCl₃)nm:315.5

CD(☒ - 5 1)

3.4.6-tris[p-(dimethylamino)benzoyl]allosamizoline(6):

FABMS m/z 658(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR δ (CDCl₃, 500MHz): 2.95(1H, m, H-5),

4.45(1H, dd, J=6, 11, H-6), 4.56(1H, dd, J=9, 11, H-6),

5.07(1H, dd, J=2, 8, H-2), 5.41(1H, br.s, J=<4, H-4),

5.61(1H, dd, J=3, 8, H-1), 5.77(1H, br.s, J=<4, H-3)

UV λ_{max}(CHCl₃)nm:316.0

CD(☒ - 5 1)

(3,4-bis[p-dimethylamino)benzoyl]-6-tritylallosamizoline

(7)の調製)

allosamizoline(2.3mg)、trityl chloride(10mg)及び乾燥ピリジン(500 μ l)を混合し、封管後、100 $^{\circ}$ C、1時間反応させた。反応液はHPLC[カラム:Asahipak ES-502C(7.6 \times 100mm)、移動相:10mMacONH₄(pH7.0):CH₃CN(50:50)]により精製し、6-tritylallosamizolineを得た。凍結乾燥した後、6-tritylallosamizolineをp-(dimethylamino)benzoyl cyanide(5mg)、tri-n-butylamine(3 μ l)と混合し、65 $^{\circ}$ Cで4時間反応させた。反応液を直接HPLC[カラム:Senshu Pak SSC-C₈(4.6 \times 250mm)、移動相:10mMacONH₄:CH₃CN(10:90)]に注入して精製し、3,4-bis[p-(dimethylamino)benzoyl]-6-tritylallosamizoline(7)を210 μ g得た。7:

FABMS m/z 753(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

UV λ_{max} (CHCl₃)nm:316.4

¹H-NMR δ (CDCl₃, 500MHz): 2.84(1H, m, J=2, 3, 5, 9, H-5),

3.26(1H, t, J=9, H-6a), 3.47(1H, dd, J=5, 9, H-6b),

4.45(1H, br. d, J=8, H-2), 5.00(1H, dd, J=2, 8, H-1),

5.25(1H, t, J=3, H-4), 5.36(1H, br. s, J=<4, H-3).

CD(図-52)

(allosamidin heptaacetate(8)及びmethylallosamidin hexaacetate(12)の調製)

allosamidin(23.5mg)を乾燥ピリジン(4ml)及び無水酢酸(2ml)と混合し、26.5℃に40時間静置した。反応液は、氷水中(20ml)にゆっくり滴下し、氷解後水をさらに20ml加え、SEP-PAK C₁₈カートリッジに通した。カートリッジは水で洗浄後、50%CH₃CNで溶出を行った。50%CH₃CN溶出区をさらにHPLC[カラム: Asahipak ES-502C(7.6×100mm)、移動相: 10mMAcONH₄(pH 7.0):CH₃CN(80:20)]で精製し、allosamidin heptaacetate(8)を白色粉末として、14.5mg得た。8:

FABMS m/z 917(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR(表-10)

methylallosamidin hexaacetate(12)も8と同様の方法で調整した。12:

FABMS m/z 889(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR(表-10)

(allosamidinの緩和加水分解)

allosamidin(39mg)を0.5NHCl(3.75ml)に溶解し、80℃で4時間加水分解を行った。反応液を凍結乾燥後、HPLC[カラム: Asahipak ES-502C(7.6×100mm)、移動相: 10mMAcONH₄-NH₄OH(pH9.1)]により精製し、

pseudodisaccharide(9)を3.4mg白色粉末として得た。9:

FABMS m/z 420(M+H)⁺ (glycerol matrix).

¹H-NMR(表-10)

9のpentaacetate(10)はallosamidin heptaacetate(8)と同様の方法で調整した。10:

FABMS m/z 630(M+H)⁺ (diethanolamine matrix).

¹H-NMR(表-10)

(methylallosamidin(11)の生産及び単離)

未同定の放線菌であるmethylallosamidin生産菌3301株の培養は、Streptomyces sp. 1713株の培養と比べて培養日数が7日間と異なる以外は全て同条件で行った。

単離方法はallosamidinの場合と同様に200literの培養液より菌体の濾別、含水MeOHによる抽出、濃縮、活性炭カラム(1.9×47cm)、50%EtOH溶出(2.5liter)、濃縮を行った。濃縮後、水にて3倍に希釈し、酢酸でpHを3.9に調整し、0.05MAcONH₄-AcOH(pH5.0)緩衝液で平衡化したSP-Sephadex C-25のカラム(2.2×21cm)に吸着させ、同緩衝液で溶出を行った。活性溶出画分を集め凍結乾燥後、再び同条件でSP-Sephadex C-25のカラムクロマトグラフィーを行い、活性区を凍結乾燥すると、白色粉末としてmethylallosamidin(11)が106mg得

られた。 11:

mp 205~215°C(dec.)

$[\alpha]_D^{23} -30.2^\circ$ (C=0.5, 0.1M AcOH)

FABMS m/z 637(M+H)⁺ (glycerol matrix).

¹H-及び¹³C-NMR(表-10、11)

(allosamidinの殺虫活性検定法)

カイコ及びアワヨトウ幼虫は人工飼料を用いて、25°C、16L8Dの条件で飼育したものを使用した。allosamidinは0.1N酢酸に溶解し、その溶液をマイクロシリンジを用いて検定幼虫の腹足より体腔内へと注入した。注入後、体液がもれない様に糸で腹足をしばった。一匹の幼虫に対し注射する最大液量は4 μlとし、対照には同量の0.1N酢酸を注射した。注射後、同条件で飼育を続け、成育や脱皮に対する影響を観察した。E₅₀値は、半数の検定幼虫が脱皮を阻止される最低有効濃度の値と定義した。

総括及び考察

第二部では昆虫のキチナーゼを用いたアッセイ系について述べた。昆虫のキチナーゼ阻害物質の検索は、昆虫の脱皮時におけるキチン分解系を調節する昆虫成育制御物質の開発を目指して行なわれた初めてのものである。そして特異な擬似三糖構造を有するallosamidinが天然よりの最初のキチナーゼ阻害物質として単離された。allosamidinを構成する成分の一であるN-acetyl-D-allosamineは、N-acetyl-D-glucosamineのC-3位のエピマーであり、これまで合成品としては得られていたが、天然で見出されたのはallosamidinにおいて初めてである。もう一方の構成成分であるアミノサイクリトール誘導体allosamizolineはシクロペンタン及びdimethylaminoxazolineとユニークな環構造を有している。シクロペンタン環は放線菌の代謝産物としては珍しくaristeromycin⁷⁴⁾, pactamycin^{75,76)} (図-70) などにおいて見出されているのみである。allosamizolineのC-2,3位の絶対構造は、D-glucosamineのC-2,3位と同じである。そのことより、allosamizolineのシクロペンタン部分は、pactamycinのシクロペンタノイド部分の生合成研究において推定されているように、D-glucosamineまたはその関連の糖から、C-4位がケトンになった中間体を経て、逆アルドール縮合によって生合成されるのかもし

れない⁷⁷⁾。

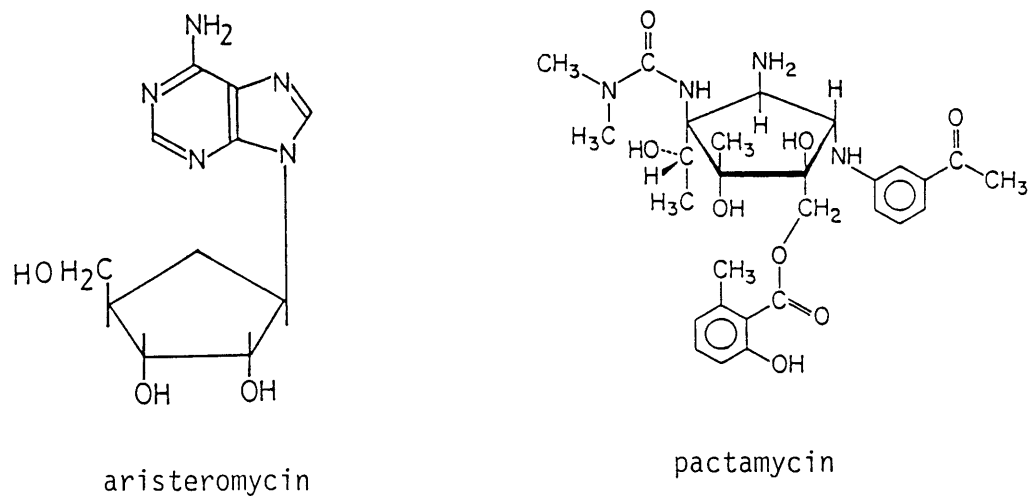


図-70

allosamidinが *in vitro* でキチン分解酵素に対して示した阻害活性は興味深いものであった。即ち、カイコより単離されたエンド型キチナーゼに対しては強い阻害を示したが、同じカイコのエキソ型キチナーゼに対しては阻害を全く示さなかった。また、昆虫以外の生物より得られたキチン分解酵素に対しては、卵白リゾチーム、山芋キチナーゼには阻害を示さず、*Streptomyces griseus* 及び *Serratia marcescens* のキチナーゼにたいしては弱い阻害を示すのみであった(表-12)。また、*Saccharomyces cerevisiae* の増殖に必要であると考えられているキチナーゼに対しても弱い阻害しか示さなかつ

た（作田、未発表データ）。

現在、生物界に存在するキチナーゼとしては、昆虫、ダニ類などの表皮のキチン分解に係わるもの、クモ、ヘビなどの消化液に存在するもの、また病原菌や昆虫などより身を守るために有していると考えられている植物のもの⁷⁸⁾、さらには、真菌類の増殖時に必須であると考えられているもの⁷⁹⁾、そして昆虫病原菌、Streptomyces属、Serratia属などの分泌型のもの、などが見いだされている。前述の allosamidin の昆虫キチナーゼに対する特異的な阻害活性は、これら生物間でのキチン分解酵素の性質の差異を反映するとともに、それぞれの生体における役割の違いを示すものとして最初の例であろう。

In vivoにおいて allosamidin 投与の効果は、脱皮時に顕著に現れた。allosamidin をカイコ幼虫に注射した場合、注射した令での摂食段階での成育には影響を与えず、次ぎの令または、蛹への脱皮時において、古い皮膚の脱皮を阻止することにより殺虫力を示した。同じ鱗翅目昆虫のアワヨトウ幼虫に対しても同様に注射による投与で脱皮を阻害した。

現時点において、我々の実験においては allosamidin は注射による投与でしか鱗翅目昆虫に対して効果を示さないことより、allosamidin そのものの昆虫成育制御物質としての実用化は困難であろう。しかし、allosamidin の発見により昆虫のキチナーゼ阻害物質が確か

に昆虫成育制御物質となり得ることが証明されたわけで、今後実用化に耐えうる化合物の出現も夢ではないと固く信じるものである。また同時に、in vivoでもキチンの分解を阻害すると考えられるこの物質は、昆虫の脱皮の際のキチンの合成と分解について研究する際の重要な試薬としてきわめて有効であるばかりでなく、昆虫以外にも、微生物の内生のキチナーゼなどに効力を有する場合には、それらの分裂や伸長などの機作についての有力な試薬となると予想される。

最近、筆者と同様に昆虫の成育制御物質の検索に際してキチナーゼに着目して、放線菌 Streptomyces griseus のキチナーゼを使用し、基質として chitin azure を用いた生物検定系によって、allosamidin を単離したとの報告がされた⁸⁰⁾。それによれば allosamidin は経口投与でハエ (Musca domestica) に対してその幼虫から成虫への脱皮を抑制したということである。これは現在までに報告された経口投与で allosamidin が昆虫に対して効果を示した唯一の例であり、今後研究例が増えるに連れてこうした例は多くなるかも知れない。彼らの放線菌のキチナーゼを用いたアッセイ系においても allosamidin が発見され得たことは allosamidin の活性からみて不思議ではないが、既に述べたように、自然界のキチナーゼは、その性質がその由来によってかなり異なっていることを考えると、昆虫の成育制御物質とし

てキチナーゼ阻害物質を検索する場合は、昆虫起源の酵素を生物検
定系に使用する必要があると考えている。

要約

筆者は、安全で、選択性の高い農業用の殺虫剤の開発を最終目的として、微生物の代謝産物を対象に新規な昆虫成育制御物質の検索を行った。生物検定法には、幅広く昆虫成育制御物質を検索することを目的としたアワヨトウ幼虫を用いた無菌摂食法及び、昆虫のキチナーゼの阻害物質を検索するキチナーゼ酵素反応系の2種類を考案し用いた。その結果、前者の検定系を使用した検索により、新規殺虫性物質 leucanicidin類を単離し、その構造を分光学的及び、化学的な手法により決定した。leucanicidinは経口のみでなく、経皮的な施用によっても効果を示す強力な殺虫性物質であった。また後者の方法によってキチナーゼ阻害物質 allosamidin類を発見し、それらの単離、構造解析を行った。さらに allosamidin類について、*in vivo*での昆虫への投与により、それらが昆虫の脱皮を阻止し殺虫作用を示すことを見いだした。

新規殺虫性物質として単離された leucanicidin類は、近年、NMR法の発展に伴い、次々と構造が解明されてきた新しいタイプのマクロライド化合物に属し、hygrolidin、bafilomycinなどに類似の16員環ラク톤の側鎖にヘミケタール形成によるテトラヒドロピラン環を有する骨格を持つものであった。微量成分として得られた isobuty-

rylleucanicidinはこのタイプのマクロライドでは初めて、16員環ラク톤部分の水酸基がアシル化された構造を有し、その生物活性がleucanicidinに比べ、著しく弱いことよりラク톤部分の7位の水酸基の存在が活性発現に重要であることが示唆された。

キチナーゼ阻害物質allosamidin類は、その構成成分にN-acetyl-D-allosamine及び、新奇なアミノサイクリトール誘導体allosamizolineを有する特異な擬似三糖であった。N-acetyl-D-allosamineはN-acetyl-D-glucosamineのC-3位のエピマーであり、天然で見いだされたのはallosamidinにおいて初めてである。またもう一方の成分であるallosamizolineは放線菌の代謝産物としては珍しいシクロペンタン及び、dimethylaminoxazolineとユニークな環構造を持っていた。allosamizolineのシクロペンタン部分の絶対構造は、そのC-2, 3位がD-glucosamineのそれと同じであり、allosamizolineの生合成における関連性に興味を持たれる。

allosamidinの種々のキチン分解酵素に対する阻害活性が調べられた結果、allosamidinは昆虫のエンド型キチナーゼを強く阻害するが、エキソ型キチナーゼは阻害せず、また他の植物や微生物起源のキチナーゼに対しても阻害なしか、もしくは弱い阻害しか示さなかった。このallosamidinの昆虫キチナーゼに対する特異的阻害は、生物間でのキチン分解酵素の性質の差異を反映すると共に、昆虫成育制御物

質としてのキチナーゼ阻害剤を検索する場合は、昆虫起源の酵素を生物検定系に用いる必要性があることを示唆するものと考えられる。

一般に生物の生育に対し実用的な意味で特異性の高い作用物質を検索しようとするとき、生物検定法として *in vivo* と *in vitro* の2つの方向からのアッセイが考えられる。本研究における昆虫成育制御物質の検索においても同様であろう。この場合、*in vivo* のアッセイ系においてはまず、昆虫に対して外部からの投与で有効な物質を探し出し、その後それらの作用点、特異性について検討することになる。この場合、特に効果の特異性が問題となるが、例えば哺乳類に対しても強いようなものでも、施用対象に対する有効投与量と哺乳類などに対する毒性との間に大きな違いがある場合には、選択性の高いものとなり得る。milbemycin、avermectinなどはそうした例で、哺乳類に対する毒性とダニや寄生虫に対する毒性の差が極めて大きく実用化されている。今回得られた leucanicidin についても、哺乳類に対する毒性は強いものの、いくつかの昆虫に対しては avermectin と同等の効力が得られており（磯貝彰、私信）、現在実用化の可能性を調べるための、いろいろな試験が行なわれている。

一方、酵素系などを用いる *in vitro* のアッセイ系においては、酵素レベルでは有効であっても、*in vivo* で投与した際に、生物に対して有効であるかどうかは、改めて試験をしてみない限り判定でき

ない。今回の検定系においては、昆虫のキチナーゼの阻害剤を検索し、強力な阻害作用を有する特異な化合物、allosamidin類を発見することが出来た。しかも、これらを昆虫に投与した場合、予期した通り、昆虫の脱皮に影響を与え、致死させた。このことは、allosamidinは *in vivo* の投与においても、その作用点はキチナーゼであることを示唆するものであろう。現在のところ、allosamidinは経口、経皮投与では有効でないというデータが多いが、今後さらにスクリーニングを行なうことによって、キチナーゼの阻害剤で、経皮的な投与によっても有効なものを見いだし得ることが可能であろうと考えている。allosamidinはこのようにキチナーゼの阻害剤として、初めての化合物であり、しかもキチナーゼの阻害剤が昆虫に特異的な脱皮、変態を阻害するという事実を示し得た点で本研究の意義は大きく、また今後の昆虫成育制御物質の開発に新しい視点を示した点においても重要な貢献をなし得たと考える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました東京大学農学部教授鈴木昭憲先生、同助教授磯貝彰先生、同助手松本正吾先生に衷心より感謝の意を表します。

現在、直接御指導、御鞭撻を賜り、本論文を提出する機会を与えて下さり、またallosamidinの絶対構造決定に際して有益な御助言を賜りました大阪大学教授山田靖宙先生に深甚なる謝意を表します。

leucanicidinのNMRスペクトル、allosamidinのNOEスペクトルの測定で大変お世話になり、また構造解析に関して有益な御助言を賜りました東京大学応用微生物研究所降旗一夫先生に深く感謝いたします。

放線菌Streptomyces halstediiの同定をしていただき、また放線菌の取り扱いに関して度々御指導いただきました東京大学応用微生物研究所島津昭先生に深く感謝いたします。

leucanicidinの構造解析に際してhygrolidinの詳細なデータを御教示いただき、また有益な御助言を賜りました東京大学応用微生物研究所名誉教授大岳望先生、同教授瀬戸治男先生に深謝いたします。

Streptomyces halstedii 3002株のジャー培養をしていただきました東京大学応用微生物研究所助手中山宏先生に深謝いたします。

昆虫のキチナーゼに関して色々とお世話下さり、allosamidinの生物活性測定面で大変お世話になりました山口大学農学部助教授古賀大三先生に深く感謝いたします。

allosamidinのNMRスペクトルの測定で大変お世話になり、また構造解析に関して有益な御助言を賜りました日本たばこ産業株式会社古関幸史氏、同兎玉久博士に深謝いたします。

多くのカイコ蛹を御供与下さいました東京農工大学助手普後一先生に深謝いたします。

Streptomyces sp. 1713株の大量培養に関しまして大変お世話になりました三共株式会社醗酵研究所室長岩藤誠吾先生に深謝いたします。

allosamidinの構造解析において、合成面で大変お世話になりましたK・I研究所福田昌平氏に深く感謝いたします。

最後になりましたが、筆者が東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻課程に在学中、卒論学生として一緒に仕事をして下さいました小倉光雄博士、新藤一敏君、牧田司君、そしていつも暖かい励ましのお言葉と有益な御助言を下さいました坂神洋次先生、長沢寛道先生をはじめといたしまして生物有機化学研究室の皆様に深く感謝いたします。

文献

- 1) 山下恭平、水谷純也、藤田稔夫、丸茂晋吾、江藤守総、高橋信孝(1979):
農薬の科学、文永堂.
- 2) 高橋信孝、丸茂晋吾、大岳望(1980):生理活性天然物化学、東大出版会.
- 3) S. Tamura, N. Takahashi, S. Miyamoto, R. Mori, S. Suzuki and
J. Nagatsu (1963): Isolation and physiological activities of
piericidin A, a natural insecticide produced by Streptomyces. Agric.
Biol. Chem. 27, 576-582.
- 4) 犬飼正俊、三島 洋(1987): ”抗線虫および殺ダニ物質のスクリーニング”,
抗生物質研究の最先端. 現代化学増刊, 9, 37-43.
- 5) 高橋 篤, 岡見吉郎(1987): 殺虫性抗生物質研究の最近の動向. 日本放線菌
学会会誌, 50, 14-19.
- 6) K. Ando, H. Oishi, S. Hirano, T. Okutoni, K. Suzuki, H. Okazaki, M.
Sawada and T. Sagawa (1971): Tetranactin, a new miticidal antibiotic
I. Isolation, characterization and properties of tetranactin. J.
Antibiotics 24, 347-352.
- 7) K. Ando, Y. Murakami and Y. Nawata (1971): Tetranactin, a new
miticidal antibiotic II. Structure of tetranactin. J. Antibiotics
24, 418-422.
- 8) Y. Takiguchi, H. Mishima, M. Okuda and M. Terao (1980): Milbemycins,
a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and
physico-chemical properties. J. Antibiotics 33, 1120-1127.
- 9) G. Albers-Schonberg, B. H. Arison, J. C. Chabala, A. W. Douglas, P.
Eskola, M. H. Fisher, A. Lusi, H. Mroziak, J. L. Smith and R. L.
Tolman (1981): Avermectins. Structure determination. J. Am. Chem.
Soc. 103, 4216-4221.
- 10) W. C. Campbell, M. H. Fisher, E. O. Stapley, G. Albers-Schonberg and
T. A. Jacob (1983): Ivermectin: a potent new antiparasitic agent.
Science 221, 823-828.

- 11) 板谷信重(1987): 昆虫幼若ホルモン活性化合物の殺虫剤としての発展. 有機合成化学, 45, 36-47.
- 12) W. S. Bowers and T. Ohta (1976): Discovery of insect anti-juvenile hormones in plants. Science 193, 542-547.
- 13) E. Kuwano, R. Takeya and M. Eto (1985): Synthesis and anti-juvenile hormone activity of 1-substituted-5-[(E)-2,6-dimethyl-1,5-heptadienyl]imidazoles. Agric. Biol. Chem. 49, 483-486.
- 14) R. A. A. Muzzarelli (1977): Chitin, Pergamon Press, New York.
- 15) E. Cabib (1987): The synthesis and degradation of chitin. Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology 59, 59-101.
- 16) K. J. Kramer, C. Dziadik-Turner and D. Koga (1985): "Chitin metabolism in insects." In comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. vol. 3 (ed. G. A. Kerkut and L. I. Gilbert), Pergamon Press, Oxford.
- 17) K. J. Kramer and D. Koga (1986): Insect chitin; physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. Insect Biochem. 16, 851-877.
- 18) E. Cohen (1987): Chitin biochemistry; synthesis and inhibition. Ann. Rev. Entomol. 32, 71-93.
- 19) K. Isono, K. Asahi and S. Suzuki: Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. The structure of polyoxins. ⁽¹⁹⁶⁹⁾ J. Am. Chem. Soc. 91, 7490-7505.
- 20) U. Dähn, H. Hagenmaier, H. Höhne, W. A. König, G. Wolf and H. Zähler (1976) : Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 154. Mitteilung Nikkomycin, ein neuer Hemmstoff der Chitinsynthese bei Pilzen. Arch. Microbiol. 107, 143-160.
- 21) E. Cohen and J. E. Casida (1982): Properties and inhibition of insect integumental chitin synthase. Pestic. Biochem. Physiol. 17, 301-306.

- 22) I. Kubo, M. Uchida and J. A. Klocke (1983): An insect ecdysis inhibitor from the African medical plant, Plumbago capensis (Plumbaginaceae); a naturally occurring chitin synthase inhibitor. Agric. Biol. Chem. 47, 911-913.
- 23) E. Cohen, E. Kuwano and M. Eto (1984): The use of Tribolium chitin synthase assay in studying the effects of benzimidazoles with a terpene moiety and related compounds. Agric. Biol. Chem. 48, 1617-1620.
- 24) 古賀大三(1986): 昆虫脱皮とキチン分解酵素. 化学と生物, 24, 506-512.
- 25) D. Koga, M. S. Mai, C. Dziadik-Turner and K. J. Kramer (1982): Kinetics and mechanism of exochitinase and β -N-acetylhexosaminidase from the tobacco hornworm, Manduca sexta L.(Lepidoptera: Sphingidae). Insect Biochem. 12, 493-499.
- 26) S. Matsumoto, S. Sakuda, A. Isogai and A. Suzuki (1984): Search for microbial insect growth regulators; L-alanosine as an ecdysis inhibitor. Agric. Biol. Chem. 48, 827-828.
- 27) S. Sakuda, A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki (1987): Search for microbial insect growth regulators II. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. J. Antibiotics 40, 296-300.
- 28) A. Isogai, S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto and A. Suzuki (1984): The structure of leucanicidin, a novel insecticidal macrolide produced by Streptomyces halstedii. Agric. Biol. Chem. 48, 1379-1381.
- 29) S. Sakuda, A. Isogai, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto and A. Suzuki (1987): Isolation and structure of isobutyrylleucanicidin produced by Streptomyces halstedii. Agric. Biol. Chem. 51, 2841-2842.
- 30) S. Sakuda, A. Isogai, S. Matsumoto, A. Suzuki and K. Koseki (1986): The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by Streptomyces sp. Tetrahedron Lett. 27, 2475-2478.

- 31) S. Sakuda, A. Isogai, T. Makita, S. Matsumoto, K. Koseki, H. Kodama and A. Suzuki (1987): Structures of allosamidins, novel insect chitinase inhibitors, produced by actinomycetes. Agric. Biol. Chem. 51, 3251-3259.
- 32) S. Sakuda, A. Isogai, S. Matsumoto, A. Suzuki, K. Koseki, H. Kodama and Y. Yamada (1988): Absolute configuration of allosamizoline, an aminocyclitol derivative of the chitinase inhibitor allosamidin. Agric. Biol. Chem. 52, 1615-1617.
- 33) 村越重雄(1977):新昆虫生理活性物質の検索と生理作用に関する研究, 博士論文
- 34) Y. Hirata, H. Nakata, K. Yamada, K. Okuhara and T. Naito(1961): Structure of aureothin, a nitro compound obtained from Streptomyces thioluteus. Tetrahedron 14, 252-274.
- 35) H. Oishi, T. Hosokawa, T. Okutomi, K. Suzuki and K. Ando(1969): Pesticidal activity of aureothin. Agric. Biol. Chem. 33, 1790-1791.
- 36) C. G. Thomas (1976): Structure of oligomycin A and C. Diss. Abstr. Int. B 37, 766-767.
- 37) E. C. Kornfeld, R. G. Jones and T. V. Parke(1949): Structure and chemistry of actidione, an antibiotic from Streptomyces griseus. J. Am. Chem. Soc. 71, 150-159.
- 38) K. Ohkuma (1961): Chemical structure of toyokamycin. J. Antibiotics 14A, 343-352.
- 39) Y. K. S. Murthy, J. E. Thiemann, C. Coronelli and P. Sensi(1966): Alanosine, a new antiviral and antitumour agent from a Streptomyces. Nature 211, 1198.
- 40) 永山国昭(1986):” 2次元NMR—測定法の発展と応用展開” . 新しい磁気共鳴と化学への応用, 化学総説 49, 26-49.
- 41) 引地邦男(1987):” 2次元NMR” . 高分解能NMR—基礎と新しい展開, 現代化学増刊 11, 3-31.

- 42) J. B. McAlpin and J. W. Corcoran (1971): Scopamycin. II
Identification of the sugar moiety of scopamycin A as 2-O-methyl-L-rhamnose. J. Antibiotics 24, 51-56.
- 43) W. Keller-Schierlein and A. Müller (1970): The sugar component of aranciamycin: 2-O-methyl-L-rhamnose. Experientia 26, 929-930.
- 44) K. Bock and C. Pedersen (1974): A study of ^{13}C coupling constants in hexopyranoses. J. C. S. Perkin II, 293-297.
- 45) B. Gillet, D. Nicole, J. J. Delpuech and B. Gross (1981): High field nuclear magnetic resonance spectra of hydroxyl protons of aldoses and ketoses. Org. Magn. Res. 17, 28-36.
- 46) R. Kasai, M. Okihara, J. Asakawa, K. Mizutani and O. Tanaka(1979): ^{13}C NMR study of α - and β -anomeric pairs of D-mannopyranosides and L-rhamnopyranosides. Tetrahedron 35, 1427-1432.
- 47) H. Kinashi, K. Someno, K. Sakaguchi, T. Higashijima and T. Miyazawa (1981):Structure of concanamycin A. Tetrahedron Lett. 22, 3861-3864.
- 48) H. Kinashi, K. Sakaguchi, T. Higashijima and T. Miyazawa (1982): Structures of concanamycins B and C. J. Antibiotics 35, 1618-1620.
- 49) H. Kinashi, K. Someno and K. Sakaguchi (1984): Isolation and characterization of concanamycins A, B and C. J. Antibiotics 37, 1333-1343.
- 50) S. Omura, N. Imamura, K. Hinotozawa, K. Otoguro, G. Lukacs, R. Faghih, R. Tolmann, B. H. Arison and J. L. Smith (1983): The structure of virustomycin A. J. Antibiotics 36, 1783-1786.
- 51) H. Seto, H. Akao, K. Furihata and N. Otake (1982): The structure of a new antibiotic, hygrolidin. Tetrahedron Lett. 23, 2667-2670.
- 52) H. Seto, I. Tajima, H. Akao, K. Furihata and N. Otake (1984): The isolation and structures of hygrolidin amide and defumarylhygrolidin. J. Antibiotic. 37, 610-613.
- 53) G. Werner, H. Hagenmaier, K. Albert , H. Kohlshorn and H. Drautz (1983): The structure of the bafilomycins, a new group of macrolide

- antibiotics. Tetrahedron Lett. 24, 5193-5196.
- 54) G. Werner, H. Hagenmaier, H. Drautz, A. Baumgartner and H. Zahner (1984): Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. J. Antibiotics 37, 110-117.
- 55) O. D. Hensens, R. L. Monaghan, L. Huang and G. Albers-Schonberg (1983): Structure of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase inhibitor L-681,110. J. Am. Chem. Soc. 105, 3672-3679.
- 56) L. Huang, G. Albers-Shönberg, R. L. Monaghan, K. Jakubas, S. S. Pong, O. D. Hensens, R. W. Burg, D. A. Ostlind, J. Conroy and O. Stapley (1984): Discovery, production, and purification of the Na⁺, K⁺ activated ATPase inhibitor, L-681,110 from the fermentation broth of Streptomyces sp. MA-5038. J. Antibiotics 37, 970-975.
- 57) M. A. Goetz, P. A. McCormick, R. L. Monaghan, D. A. Ostlind, O. D. Hensens, J. M. Liesch and G. Albers-Schönberg (1985): L-155,175; A new antiparasitic macrolide; fermentation, isolation and structure. J. Antibiotics 38, 161-169.
- 58) M. Meyer, W. Keller-Schierlein, H. Drautz, W. Blank and H. Zähler (1985): Bafilomycin-A₁-21-(α -L-rhamnopyranosid); Strukturaufklärung durch chemische Verknüpfung mit Bafilomycin A₁ und Leucanicidin. Helv. Chim. Acta 68, 83-94.
- 59) J. H. Wilton, G. C. Hokanson and J. C. French (1985): PD 118,576; a new antitumor macrolide antibiotic. J. Antibiotics 38, 1449-1452.
- 60) A. Kretschmer, M. Dorgerloh, M. Deeg and H. Hagenmaier (1985): The structures of novel insecticidal macrolides: Bafilomycins D and E, and oxohyrolidin. Agric. Biol. Chem. 49, 2509-2511.
- 61) E. J. Corey and J. W. Ponder (1984): Stereochemistry of the hygrolidins. Tetrahedron Lett. 25, 4325-4328.

- 62) G. H. Baker, P. J. Brown, R. J. J. Dorgan, J. R. Everett, S. V. Ley, A. M. Z. Slawin and D. J. Williams (1987): A conformational study of bafilomycin A₁ by x-ray crystallography and NMR techniques. Tetrahedron Lett. 28, 5565-5568.
- 63) S. Kimura (1981): The occurrence of chitinase in the alimentary canal of the silkworm, Bombyx mori. J. Sericult. Sci. Japan 50, 101-108.
- 64) R. H. Hockman and M. Goldberg (1964): New substrates for use with chitinases. Anal. Biochem. 8, 397-401.
- 65) R. W. Jeanloz (1962): 2-Amino-2-deoxy- α -D-allose hydrochloride from D-glucosamine by interconversion. in Carbohydrate chemistry vol. 1. Academic Press, New York.
- 66) V. S. Bogdanov, M. A. Aizhanova, I. A. Abronin and L. B. Medvedskaya (1980): Carbon-13, nitrogen-14, and proton NMR spectra and effect of substituents in oxazoles. Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 305-316.
- 67) L. A. Tsoi, A. D. Salimbaeva and B. D. Abiyurov (1983): Synthesis and structure of 2-aminooxazoline derivatives. Zh. Org. Khim. 19, 2605-2609.
- 68) 原田宣之, 中西香爾(1982):円二色性スペクトルー有機立体化学への応用, 東京化学同人.
- 69) H. Liu and K. Nakanishi (1982): Pyranose benzoates. An additivity relation in the amplitudes of exciton-split CD curves. J. Am. Chem. Soc. 104, 1178-1185.
- 70) D. Koga, A. Isogai, S. Sakuda, S. Matsumoto, A. Suzuki, S. Kimura and A. Ide (1987): Specific inhibition of Bombyx mori chitinase by allosamidin. Agric. Biol. Chem. 51, 471-476.
- 71) K. E. Koenig and W. P. Weber (1974): Synthesis of benzoyl cyanides by phase transfer catalysis. Tetrahedron Lett. 15, 2275-2278.
- 72) R. H. Proirier, R. D. Morin, R. W. Pfeil, A. E. Bearse, D. N. Kramer and F. M. Miller (1962): Beckmann rearrangement of Michler's ketone oxime in the presence of cyanide. J. Org. Chem. 27, 1547-1549.

- 73) A. Hořý and M. Souček (1971): Benzoyl cyanide, a new benzoylating agent in nucleoside and nucleotide chemistry. Tetrahedron Lett. 12, 185-188.
- 74) T. Kishi, M. Muroi, T. Kusaka, M. Nishikawa, K. Kamiya and K. Mizuno (1967): The structure of aristeromycin. J. C. S. Chemical Comm., 852-853.
- 75) P. F. Wiley, H. K. Jahnke, F. MacKellar, R. B. Kelly and A. D. Argoudelis (1970): The structure of pactamycin. J. Org. Chem. 35, 1420-1425.
- 76) D. D. Weller, A. Haber, K. L. Rinehart, Jr. and P. F. Wiley (1978): Carbon-13 nuclear magnetic resonance assignments of pactamycin and related compounds. J. Antibiotics 31, 997-1006.
- 77) D. D. Weller and K. L. Rinehart, Jr. (1978): Biosynthesis of the antitumor antibiotic pactamycin. A methionine-derived ethyl group and a C₇N unit. J. Am. Chem. Soc. 100, 6757-6760.
- 78) A. Schlumbaum, F. Mauch, U. Vogeli and T. Boller (1986): Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. Nature 324, 365-367.
- 79) J. U. Correa, N. Elango, I. Polacheck and E. Cabib (1982): Endochitinase, a mannan-associated enzyme from Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 257, 1392-1397.
- 80) P. J. B. Somers, R. C. Yao, L. E. Doolin, M. J. McGowan, D. S. Fukuda and J. S. Mynderse (1987): Method for the detection and quantitation of chitinase inhibitors in fermentation broths; Isolation and insect life cycle effect of A82516. J. Antibiotics 40, 1751-1756.