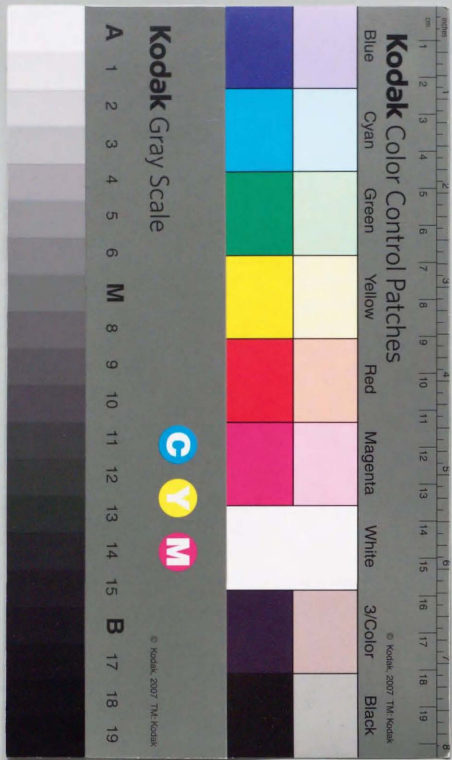


微小管機能阻害活性を有する
微生物代謝産物の研究
— リゾキシンを中心にして —

小林久芳



①

学位論文

微小管機能阻害活性を有する
微生物代謝産物の研究
ーリゾキシンを中心にしてー

小林 久芳

目次

序論	1
第一章 リゾキシンの構造研究と生物活性	8
第一節 序	8
第二節 培養および抽出・単離	10
第三節 構造決定	12
第四節 生合成	37
第五節 生物活性	49
第六節 リゾキシソ類縁体の単離・構造決定	54
第七節 リゾキシソ誘導体および関連化合物の生物活性	62
第八節 要約および考察	63
第二章 菌糸の形態異常によるスクリーニングとフザリエリンAの構造研究	65
第一節 序	65
第二節 菌糸の形態異常を指標にしたスクリーニング方法の確立	71
第三節 研究保存機関の接合菌類ケカビ目既定株を対象とした検索	73
第四節 土壌より分離した糸状菌を対象とした検索	75

第五節	フザリエリンAおよび類縁体の構造決定	83
第六節	フザリエリンAの生合成	103
第七節	フザリエリンAの絶対配置	105
第八節	フザリエリンAの生物活性	110
第九節	要約および考察	113
第三章	まとめ	116
実験の部		117
文献		134
謝辞		142

序論

近年、細胞生物学や分子遺伝学の進歩により生命現象の解明は急速に進んでいる。抗生物質に代表される新しい作用をもつ薬理活性物質や阻害剤の発見は、化学療法剤の開発に道を開くのみならず、物質レベルから生命現象をとらえ、そのメカニズムの知見を得るうえで極めて有用な手段であり、新たな基礎研究の発展が期待される。従って、細胞生物学や分子遺伝学の成果を基にした、特徴的なスクリーニング法の開発による新たな特異的薬理活性物質の検索が強く求められている。また、検索の対象も、放線菌を中心とした微生物代謝産物のみならず、海洋生物を含めたあらゆる生物にその範囲を広げている。

〔抗生物質への道¹⁾〕

化学療法剤の歴史を振り返ると、実用的な問題の解決が、医学と醗酵学と微生物学の発展を促進したことがわかる。

Leeuwenhoek^{1), 2)} がはじめて細菌を見た17世紀よりはるか以前、たぶん古代にさかのぼる大昔から感染症は認められていたであろう。天然痘が伝染性であることは長い間知られていた。病気が人から人へ移ることはわかっていたが、病原体の性質はもちろんのこと、どのようにして起こるのかはわからなかった。

16世紀に Fracastoro は、ヨーロッパに侵入した梅毒の接触伝染性から、実際に病気の微生物説に非常に近い考え方を示している^{1), 3)}。しかしながら、原虫と細菌は野菜や動物の浸出液から生じるといような、微小形生物の自然発生説に終止符を打つためには、それから300年後の Pasteur の研究を待たねばならない。

Pasteur が醗酵や医学の分野で偉大な貢献^{1), 4)}をした19世紀後半の数十年間に医学細菌学、微生物学は大きく発展した。Kochによる炭疽をはじめとする病原微生物の研究^{1), 5)}、Behring・北里による免疫の研究^{1), 6)}、Gramの識別染色法^{1), 7)}など枚挙にいとまないほどの輝かしい成果が得られた。

こうした中で、化学療法学に発展する重要な研究が行われたのもこの時期である。1850年「産褥熱の発生に関する論説」^{1), 8)}で、クワルク石灰による手洗いの効果を示した Semmelweis。1867年「外科の実際における消毒の原理」^{1), 9)}で、手術器具の滅菌とともに石炭酸による消毒を行い、外科的敗血症の発生を大幅に減少させることに成功した Lister がいる。

Lister は、「Pasteurの研究によって、空気が腐敗性の性質を持っているのは、酸素やその他の気体成分によるのではなく、空気中に浮遊していて自らの生活力によってエネルギーを得ている微小生物によることがわかったとき、空気を追い出さなくても、浮遊している粒子の生命を破壊する能力のある何かを包

<序論>

【これからの抗生物質】

1945年以前の日本人の平均寿命は約50歳から54歳であり、なかでも乳児や産婦の死亡率は、現在と比較にならないほど高かった。ペニシリンが使われ始めた1946年から1955年の間に、日本人の平均寿命は著しい速さで延長し、抗生物質製剤の普及によることが示されている。今でも病原性微生物による急性の病気は極めて多い。ところが抗生物質の研究によって発見された治療薬は、このような恐ろしい細菌、リケッチア、大型ウイルスがもたらす病気を克服する大きな武器となった (Fig. 2, 2⁰¹)。

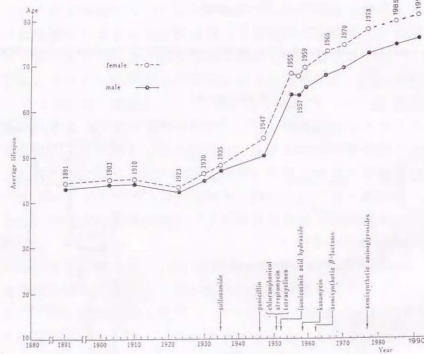


Fig. 2. 日本人の平均寿命と抗生物質

さて、高齢化した日本人の現代の年齢分布は Fig. 3. のようなつりがね型を示し、急速な高齢化が進んで今では世界最高の平均寿命となっている。主要死因別の死亡率を見ると、1950年に死因の第1位であった結核は、いまではその死亡率は非常に低いものになった。現在ではがん、心臓病、脳卒中、肺炎・気管支炎が高い死因となり、高年齢化に伴う病気が占めている (Fig. 4)。さらに主な病気の受診率でも、高血圧、精神障害、脳血管、心臓、糖尿、悪性新生物など高齢化社会、ストレス過剰時代に伴う病気による受診が増加している (Fig. 5)。

<序論>

こうした状況のなか、酵母、カビなどの真菌類が原因となる日和見感染症や深性真菌症、そして、がんや悪性新生物などに対する薬剤の開発研究が、成人病薬剤の開発と共に、ますます重要になっている。ところが、細菌などの原核生物と異なり、真菌類や癌細胞は細胞質の構造に関して人の細胞と比べ差異はないために、選択性を持つ真核細胞活性物質の検索は非常に難しい状況にある。

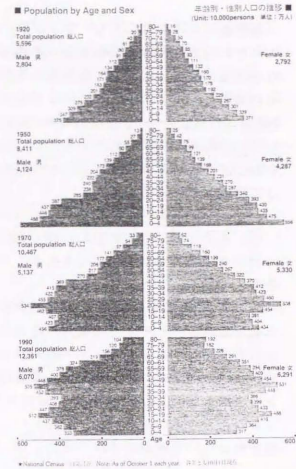


Fig. 3. 日本人の年齢別・性別人口の推移

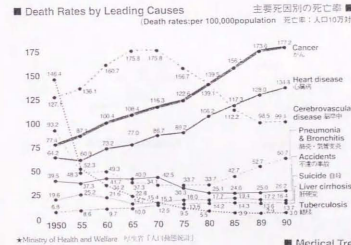


Fig. 4. 主要死因別の死亡率

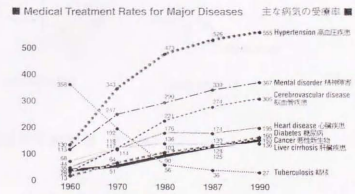


Fig. 5. 主な病気の受診率

[植物病はマクロなスクリーニング系]

さて、自然界には、真核生物である多種多様な植物が生育しており、さまざまな生理現象を営んでいる。植物の生物学的病原由来の病気のなかで、有機化合物がその病徴の主な原因となっている場合がある。例えば、イネばか苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) の研究を発端とし、イネを徒長させるトキシシンとしてのジベレリンの発見²¹⁾ が有名である。こうした植物病原菌が生産する、病徴発現をひきおこす病原性化学物質は Phytotoxin と呼ばれ、Dimond と Wagner は次のように定義している²²⁾

- (1) 一定の病徴を示す植物中には一定の物質が存在し
- (2) その物質は単離することができる
- (3) その物質を健全植物に与えることにより、少なくとも病徴の一部が再現できる

この定義は、Koch の病原菌に対する 3 原則を、物質レベルに置き換えたものと考えられる。このような観点から前述のジベレリン (イネばか苗病-徒長) をはじめリコマラスミン (トマト萎凋病-萎凋)²³⁾、テヌアゾン酸 (イネいもち病、タバコ赤星病、ナシ黒斑病-壊死)²⁴⁾、フザリン酸 (イネばか苗病、トマト萎凋病-萎凋)²⁵⁾、オフィオボリン (イネごま葉枯れ病-壊死)²⁶⁾、ピリキユロール (イネいもち病-壊死)²⁷⁾ など多くの病徴発現物質が単離され、生理活性について検討がされてきた。

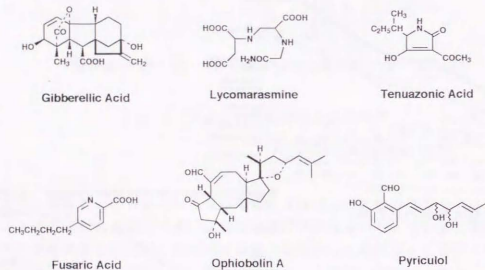


Fig. 6. 植物病原菌が生産する Phytotoxin

植物の病気は、自然のマクロなスクリーニング系である。対象になる植物は、農作物や有用食物のみならず、身近な草木も含まれる。病原の種類は大きく非生物、生物、ウイルスに分けられる。このなかで非生物病原である土壤、気象、大気汚染など物理的、化学的要因によるものや、ウイルスが病原体となる病気、昆虫、線虫、ダニなどによる被害はこのスクリーニング系の対象としない。生物学的病原は主に菌類、細菌などの微生物要因であり、このなかで植物病原菌が生産し、真核生物としての植物に病徴発現をひきおこす病原性化学物質がこの自然のスクリーニングの標的となる。

他方、新たな基礎研究の成果を基にした、特徴的なスクリーニング法の開発による新たな特異的生理活性物質の検索も強く求められている。

[目的]

新しい生理活性物質の発見は新規化学療法剤としての開発に貢献し、その検索は重要であるとの認識のもと、著者は

- (1) イネ苗立枯病発起物質リゾキシンの研究
- (2) イネいもち病菌糸の形態異常を指標にしたスクリーニング法の開発と新規抗カビ抗生物質フザリエリンの研究

を行った。

1970年代、イネの機械移植栽培の普及に伴い育苗法が変わり、*Rhizopus*、*Trichoderma* などこれまで全く無害であった各種土壌生息菌による稚苗の病害が問題になった。育苗期間中に、イネ箱育苗の床土表面に白いカビが繁殖し、イネ苗の茎の地際部からみついたり、あるいは成育不良・苗立枯れを生ずる場合がみられる。これらの苗からは *Rhizopus* 属菌が多く分離されたことから、この植物病はリーゾプス苗立枯病と呼ばれた。

Rhizopus 属菌による立枯病罹病苗の生育は、地上部・地下部とも著しく抑制され、根先端部・鞘葉基部の肥大などの特徴的病徴が現れることが報告されている。^{1, 2)}。被害苗を顕微鏡で観察したところ、罹病イネ体内への菌糸の侵入は確認できなかった。さらに、これらの病徴が本属菌による病害の発生した土壌の浸出液によっても引き起こされることから、病徴の発現には本属菌の生産する毒素の関与が示唆された³⁾。

佐藤らは、育苗床土から分離・同定された5種の *Rhizopus* 属菌 (*R. chinensis*, *R. oryzae*, *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. delemar*) および(財) 醸酵研究所から分離された *R. nodosus* の計6種を用いて、菌のイネ幼苗におよぼす生育障害、培養温度条件と菌糸の生育および液体静置培養で培養液中に生産される毒性物質などについて検討を行った。その6種の中で *R. chinensis* による障害程度が最も高いことが示された。根先端部肥大や鞘葉基部奇形化を再現できるのは *R. chinensis* の培養口液のエチルエーテル抽出物のみであり、他の種では病徴は再現できなかった。こうして、リーゾプス苗立枯病の病徴を再現できる毒性物質を *R. chinensis* から得たことを報告した⁴⁾。

本章では、この毒性物質リゾキシソ (rhizoxin) の単離、化学構造決定、生合成ならびに生物活性について記述する。

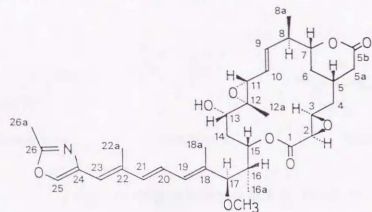


Fig. 1.1. リゾキシソの構造



Fig. 1.2. 病害写真 (苗床:上が病害の発生した育苗箱。下は正常な育苗箱。)



Fig. 1.3. 病徴写真 (イネ幼根比較写真: 右は正常な苗。左が根の肥大などの病徴が現れている罹病した苗。愛知旭)

第二節 培養および抽出・単離

生産菌は、新潟県農業試験所の中育苗圃で brown patch 状に発生した立枯苗から分離した *Rhizopus chinensis* Rh-2 菌⁴⁾を用いた。培養は培地 1 で、32°C、48 時間ジャーレによる液体静置培養を行った。尚、培養口液による根の肥大活性は 4 日目以降低下するのが認められる⁵⁾。

活性物質リゾキシンは、写真に示したような、イネ幼根の肥大作用を用いた生物検定法を指標に単離を行った。

Table 1.1. 培地 1 の組成

glucose	1 %
polypepton	1 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05 %
KH ₂ PO ₄	0.05 %
K ₂ HPO ₄	0.05 %
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01 %

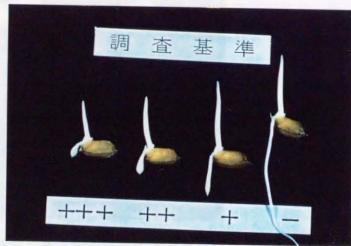


Fig. 1.4. イネを用いた生物検定方法および活性調査基準

リゾキシンの単離精製法のおもな手順は以下の通りである。培養口液をジエチルエーテルにて抽出・濃縮後、有機溶媒で順次分分けを行い、シリカゲルクロマトグラフィー、ローバークラムによる低圧液体クロマトグラフィーなどにより、無色粉末状活性物質のリゾキシンを得た。

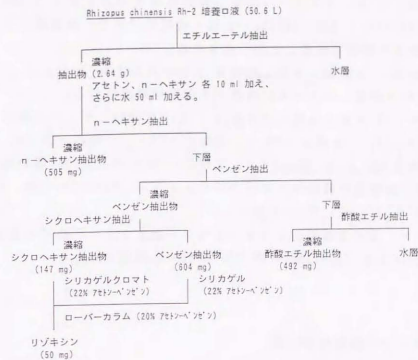


Fig. 1.5. リゾキシンの精製方法 1

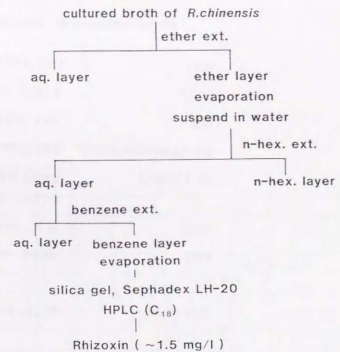


Fig. 1.6. リゾキシンの精製方法 2

第三節 構造決定

[リゾキシンの分子式]

リゾキシンは融点 131-135°C を示す。また旋光度は $[\alpha]_D^{25} = +201^\circ$ (C 0.8, MeOH) と測定された。一方、メタノール溶液の紫外吸収スペクトルは 295nm (ϵ 37,000), 308 (47,800), 325 (35,000) と強く特徴的であり、非環状テトラエン様発色団に由来する吸収であることが示唆される。

赤外吸収スペクトルは、クロロホルム溶液中 3,600-3,400 cm^{-1} および 1,730 cm^{-1} にそれぞれ水酸基、エステルに由来する吸収が観測される。

プロトンおよび炭素-13 核磁気共鳴スペクトル (^1H , ^{13}C -NMR) データを解析することより、7 個の $-\text{CH}_3$ 、4 個の $-\text{CH}_2-$ 、3 個の $>\text{CH}-$ 、7 個の $>\text{CH}-\text{O}$ 、1 個の $>\text{C}=\text{O}$ 、7 個の $=\text{CH}-$ 、4 個の $>\text{C}=\text{}$ 、2 個の $-\text{COO}-$ の合計 35 個の炭素が確認された。電子衝撃高分解能マススペクトロメトリー (HREIMS) では、分子イオンピーク (M^+) を m/z 625.3233 と測定した。

これら NMR のデータ、元素分析値およびマススペクトロメトリーの結果を総合して、リゾキシンの分子式を $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{NO}_9$ (MW 625.3250) と決定した。

Table 1.2. リゾキシンの物理化学定数

physicochemical properties of Rhizoxin

m.p.	131-135°C
$[\alpha]_D^{25}$	+201° (C=0.8, MeOH)
MS	m/z 625 (M^+)
UV ($\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$; MeOH)	295(37000), 308(47800), 323nm(35000)
IR (CHCl_3)	3600-3400, 1730, 1580, 1450, 1110, 1080, 1045 cm^{-1}
Anal.	N % obsd. 2.04, calcd. 2.23
HMS	obsd. 625.3233, calcd. 625.3250
Mol. Form.	$\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{NO}_9$

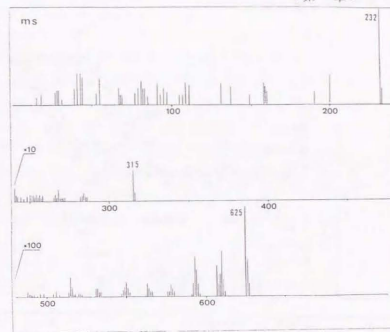


Fig. 1.7. リゾキシンのマススペクトル

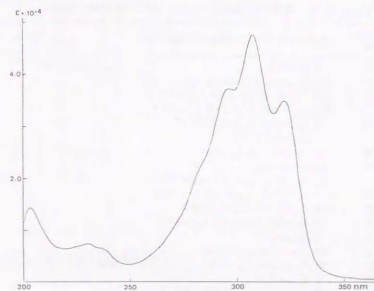


Fig. 1.8. リゾキシンの紫外吸収スペクトル

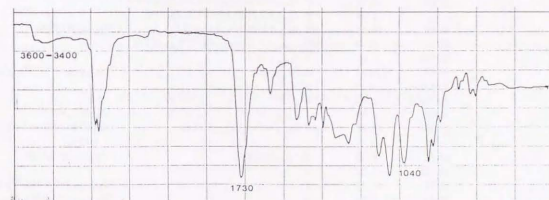


Fig. 1.9. リゾキシンの赤外吸収スペクトル

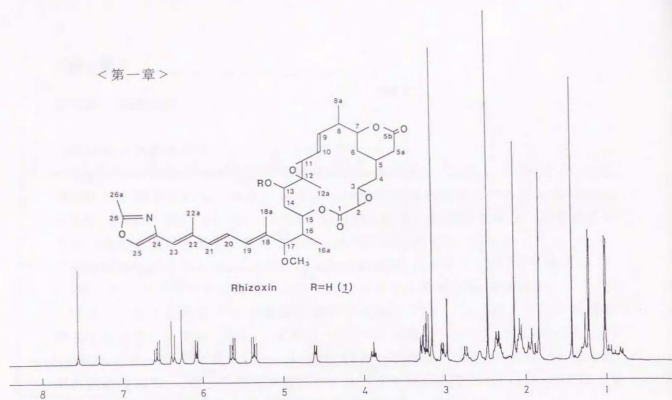


Fig. 1.10. 400MHz ¹H NMR spectra of rhizoxin

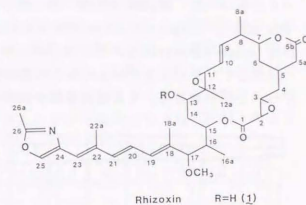
Table 1.3. ¹H NMR data of rhizoxin (1) in CDCl₃ (400 MHz).

Proton	Chemical shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)	Notes
H-2	2.96	d $J_{2,3}=1.6$	$^2J_{H,C(2)}=6.0$ Hz
H-3	3.27	ddd $J_{3,2}=1.6, J_{3,4}=2.0 & 10.5$	
H-4	2.33	ddd $J_{4,3}=2.0, J_{4,5}=13.0, J_{4,6}=7^{(a)}$	
	0.79	ddd $J_{4,3}=10.5, J_{4,4}=13.0, J_{4,5}=10.5$	
H-5	2.05	m $J_{5,4}=10.5, J_{5,6}=12.0 & 7^{(a)}$ $J_{5,8}=2.0 & 12.0$	
H-5a	2.72	dd $J_{5a,5}=2^{(a)}, J_{5a,6a}=17.0$	$^2J_{H,C(5a)}=2^{(a)}$
	2.10	dd $J_{5a,5}=12.0, J_{5a,6a}=17.0$	
H-6	1.93	ddd $J_{6,5}=2.0, J_{6,7}=14.0, J_{6,7}=3.0$	
	0.93	ddd $J_{6,5}=12.0, J_{6,7}=14.0, J_{6,7}=12.0$	
H-7	3.87	ddd $J_{7,6}=3.0 & 12.0, J_{7,8}=9.5$	
H-8	2.30	m $J_{8,7}=9.5, J_{8,9a}=6.3, J_{8,9b}=10.0$	
H-8a	1.20	d $J_{8a,8}=6.3$	
H-9	5.66	dd $J_{9,8}=10.0, J_{9,10}=15.0$	
H-10	5.38	dd $J_{10,9}=15.0, J_{10,11}=9.5$	NOE (12a→10)=+12%
H-11	3.20	d $J_{11,10}=9.5$	
H-12a	1.45	s	
H-13	3.20	dd $J_{13,12}=2.5 & 11.0$	$^2J_{H,C(12a)}=3.0$ Hz
H-14	2.05	ddd $J_{14,13}=11.0, J_{14,14}=15.5, J_{14,15}=9.0$	
	1.88	dd $J_{14,13}=2.5, J_{14,14}=15.5, J_{14,15}=0$	
H-15	4.63	dd $J_{15,14}=0 & 9.0, J_{15,16}=3.0$	$^2J_{H,C(15)}=1.0$ Hz
H-16	2.37	m $J_{16,15}=3.0, J_{16,16a}=6.7, J_{16,17}=9.0$	
H-16a	1.00	d $J_{16a,16}=6.7$	
H-17	3.23	d $J_{17,16}=9.0$	$^2J_{H,C(17-O)}=3.0$ Hz, $^2J_{H,C(15a)}=4.0$ Hz
17-OCH ₃	3.15	s	
H-18a	1.82	s	
H-19	6.08	d $J_{19,18}=11.0$	$^2J_{H,C(18a)}=8.0$
H-20	6.60	dd $J_{20,19}=11.0, J_{20,21}=15.0$	NOE (18a→20)=+13%, (22a→20)=+13%
			$^2J_{H,C(22a)}=3.0$ Hz
H-21	6.38	d $J_{21,20}=15.0$	
H-22a	2.12	s	
H-23	6.27	s	$^2J_{H,C(22a)}=9.0$ Hz, $^2J_{H,C(23)}=6.0$ Hz
H-25	7.58	s	$^2J_{H,C(24)}=15.0$ Hz, $^2J_{H,C(25)}=8.0$ Hz
H-26a	2.45	s	$^2J_{H,C(25)}=8.0$ Hz

^{a)} Spin-spin coupling was observed but its constant could not be determined.

Table 1.4.
¹³C-NMR Chemical Shifts and Uca of Rhizoxin
(solvent: CDCl₃)

Carbon	δc(ppm)	¹ J _{CH}
1	158.1	
2	54.3	181
3	55.0	178
4	36.1	125
5	29.5	125
5a	36.5	125
5b	159.3	
6	34.4	125
7	82.5	145
8	45.4	125
8a	17.0	127
9	139.7	155
10	126.7	155
11	64.2	172
12	65.2	
12a	11.6	127
13	77.5	141
14	31.9	125
15	77.0	142
16	36.2	130
16a	9.6	127
17	89.4	138
17OCH ₃	56.2	140
18	135.3	
18a	11.5	127
19	129.4	150
20	123.8	148
21	137.9	150
22	135.5	
22a	14.4	127
23	120.9	155
24	135.4	
25	136.1	206
26	161.0	
26a	13.6	130



¹³C-NMR(100MHz)

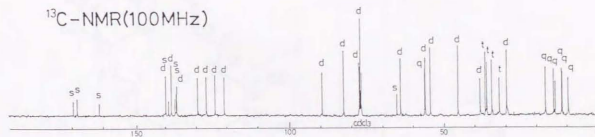


Fig. 1.11. 100MHz ¹³C(¹H) NMR spectra of rhizoxin

リゾキシンは $\text{Ac}_2\text{O} / \text{Et}_3\text{N} / \text{DMAP}$ でアセチル化を行うと、IR の $3600 \sim 3400 \text{ cm}^{-1}$ 、 1045 cm^{-1} の水酸基由来の吸収が消失したモノアセテートが得られ、マススペクトロメトリーで m/z 667 (M^+) を与えることにより、水酸基 1 個の存在が示唆された。

リゾキシンは 400MHz ^1H NMR の spin decoupling 実験および 100MHz ^{13}C NMR による selective proton decoupling, NOE モードによる gate decoupling, long range selective proton decoupling (以下 LSPD と略)⁸² 実験を行った。

以下にリゾキシンを a ~ e の 5 つの部分構造に分けて、それぞれの構造の証明について説明を行う。その後各部分構造の結合について根拠をあげ説明する。

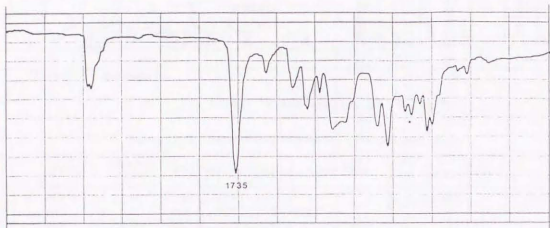


Fig. 1.12. リゾキシンモノアセテートの赤外吸収スペクトル

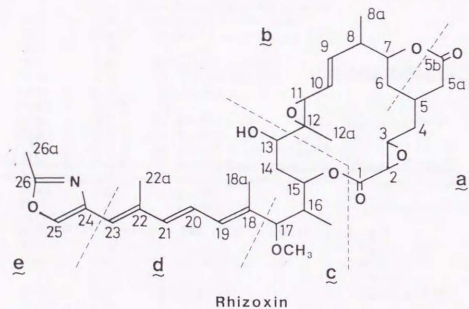
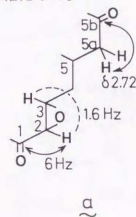


Fig. 1.13. a ~ e のユニット

[部分構造 a (C-1~C-5b)]

^{13}C NMR で 54.3 および 56.0 ppm に観測される C-2、C-3 の ^{13}C - ^1H スピン結合定数 $^1J_{\text{CH}}$ (以下 $^1J_{\text{CH}}$) はそれぞれ 181、178 Hz と大きな値を持ち、その化学シフト値からエポキシドの存在を示している⁷⁷。さらに H-2 (δ 2.96) と H-3 (δ 3.27) のビシナル ^1H - ^1H 結合定数 (以下結合定数) が 1.6 Hz であることより、C-2、C-3 はトランスエポキシドと結論した^{7, 83}。LSPD 実験により 168.1 ppm のカルボニル炭素 (C-1) は H-2 との間に 6 Hz の遠隔スピン結合 (long range coupling) が認められる。一方、H-5a (δ 2.72) への照射で 169.3 ppm のカルボニル炭素シグナルはその形が変化することから遠隔スピン結合と考え、これを C-5b と決定した。以上より部分構造 a を Fig. 1.14 のように決定した。



^{13}C -NMR		^1H -NMR	
No.	δ_{C} ($^1J_{\text{CH}}$)	No.	δ_{H} ($J_{\text{gem,vic}}$)
1	168.1	2	2.96 (1.6)
2	54.3 (181)	3	3.27 (2, 10 1.6)
3	56.0 (178)	4	0.79
4	36.1 (125)	5	2.05
5	29.5 (125)	5a	2.10
5a	36.5 (125)	5b	2.72
5b	169.3		

Fig. 1.14. 部分構造 a (図の中で点線は ^1H - ^1H のスピン結合を、また実線は ^1H - ^{13}C のスピン結合を示している。以下同じ)

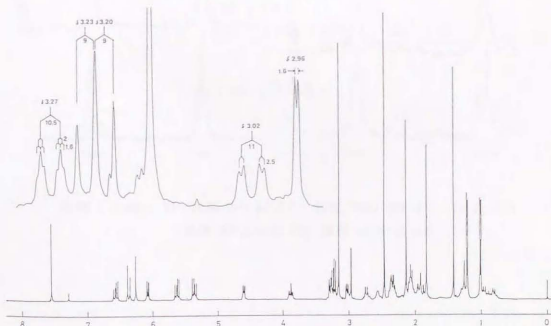


Fig. 1.15. リゾキシンの ^1H NMR スペクトル H-2, H-3 部分拡大図



Fig. 1.16. ^1H NMR decoupling 実験 (δ 3.27: H-3 照射
 δ 2.96: H-2, δ 0.79: H-3 観測)

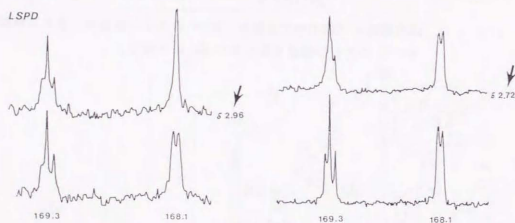


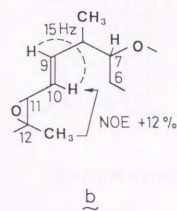
Fig. 1.17. ^{13}C NMR LSPD 実験 (δ 2.96: H-2 照射 168.1 ppm: C-1 観測
 δ 2.72: H-5a 照射 169.3 ppm: C-5b 観測)

[部分構造 b (C-6~C-12a)]

H-7 (δ 3.87) は H-6 (δ 0.93, 1.93) と 12Hz および 3Hz、また H-8 (δ 2.30) と 9.5Hz、さらに H-8 と H-9 (δ 5.66) は 10Hz の結合定数を持つ。続く H-9 と H-10 (δ 5.38) は 15Hz の結合定数から、この二重結合はトランスである。

C-11 (64.2ppm) の $^1J_{\text{CH}}$ は 172 Hz でありエポキシドの存在を示唆しているが、ほかにこの大きさに相当する $^1J_{\text{CH}}$ を持つシグナルが観察されないことから、続く C-12 には水素が結合していないと考えることができる。

核オーバーハウザー効果 (nuclear Overhauser effect: NOE) を観測することにより部分構造 b は支持された。すなわち、 δ 1.45 のメチル基を照射すると H-10 のシグナル強度は 12% 増大した。これは C-12 に C-12a (δ 1.45) のメチル基が存在し、なおかつこのエポキシドはトランス配位であることが判明した。



^{13}C - NMR		^1H - NMR	
No.	δ_{C} ($^1J_{\text{CH}}$)	No.	δ_{H} ($J_{\text{gem,vic}}$)
6	34.4 (125)	6	0.93 (12) 1.93 (3)
7	82.5 (145)	7	3.87 (3,12, 9.5)
8	45.4 (125)	8	2.30 (9.5,6.3,10)
8a	17.0 (127)	8a	1.20 (6.3)
9	139.7 (155)	9	5.66 (10, 15)
10	126.7 (155)	10	5.38 (15, 9)
11	64.2 (172)	11	3.20 (9)
12	65.2		
12a	11.8 (127)	12a	1.45

Fig. 1.18. 部分構造 b

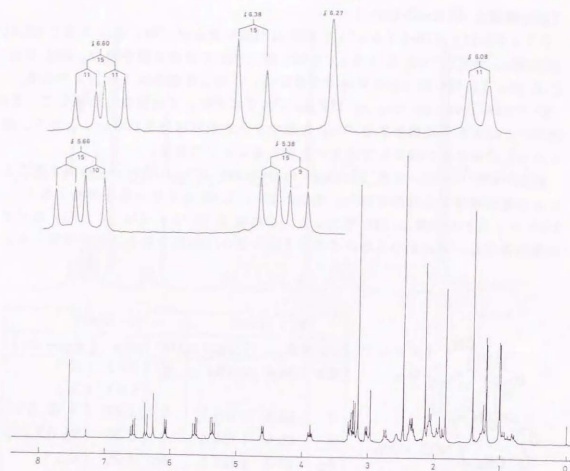


Fig. 1.19. リゾキシンの ^1H NMR スペクトル二重結合部分拡大図

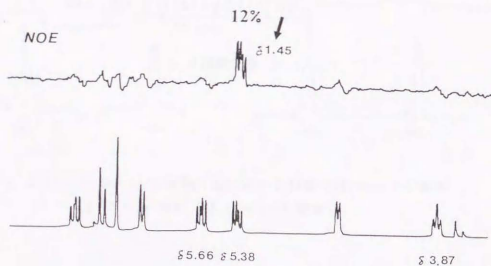
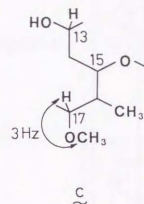


Fig. 1.20. ^1H NMR NOE 実験 (δ 1.45:12a- CH_3 照射 δ 5.38:H-10 観測)

[部分構造 c (C-13~C-17)]

リゾキシンのメトキシメチル (δ 3.15) の結合位置は、そのメチル基炭素 (56.2ppm) と H-17 (δ 3.23) との間に 3Hz の遠隔スピン結合 ($^3J_{\text{CH}}$) が認められることより 17 位と結論した。



^{13}C -NMR		^1H -NMR	
No.	δ_{C} ($^1J_{\text{CH}}$)	No.	δ_{H} ($J_{\text{gem, vic}}$)
13	77.5 (141)	13	3.02 (2.5, 11)
14	31.9 (125)	14	1.88 (2.5)
15	77.0 (142)	15	2.05 (9, 11)
16	38.2 (130)	16	4.63 (3, 9)
16a	9.6 (127)	16a	1.00 (6.7)
17	69.4 (138)	17	3.23 (9)
OCH_3	56.2 (140)	OCH_3	3.15

Fig. 1.21. 部分構造 c

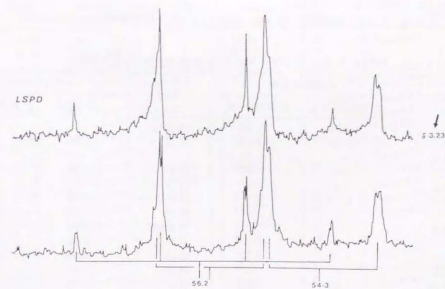


Fig. 1.22. ^{13}C NMR LSPD 実験 (δ 3.23:H-17 照射 56.2ppm: OCH_3 観測)

リゾキシンを $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Et}_3\text{N}/\text{DMAP}$ にてアセチル化を行うと、赤外吸収スペクトルの水酸基由来の $3600\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ および 1045 cm^{-1} の吸収が消失した化合物 2 が得られる。質量分析は $m/z\ 667\ (\text{M}^+)$ を与えることから、化合物 2 はリゾキシシモノアセテートであり、リゾキシシには 1 個の水酸基の存在が確認されたことは既に述べた。 $\delta\ 3.02$ (H-13) のシグナルが、モノアセテート体では $\delta\ 4.22$ に低磁場シフトすることより、水酸基は C-13 に結合していると結論した。

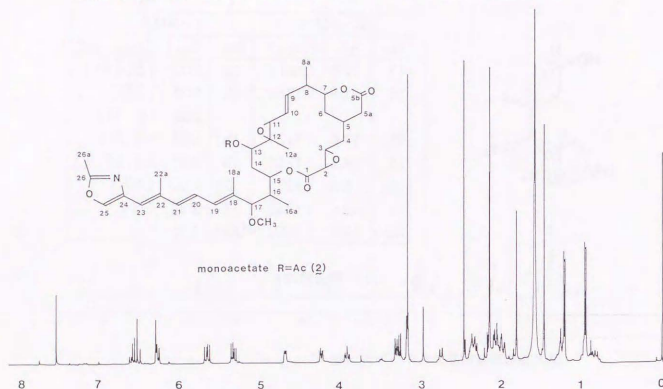


Fig. 1.23. 400MHz ^1H NMR spectra of rhizoxin monoacetate

Table 1.5 ^1H NMR data of rhizoxin acetate (2) (400 MHz).

Proton	Chemical shift		Proton	Chemical shift	
	in CDCl_3	in benzene- d_6		in CDCl_3	in benzene- d_6
H-2	2.96	2.64	13-OAc	—	1.79
H-3	3.30	3.12	H-14	2.06	—
H-4	—	1.52	—	—	—
—	—	0.07	—	—	—
H-5	—	—	H-15	4.68	5.02
H-5a	2.74	—	H-16	—	1.76
—	—	—	H-16a	0.96	0.96
H-6	—	1.21	H-17	3.26	3.38
—	—	-0.07	17-OCH ₃	3.18	3.05
H-7	3.90	3.12	H-18a	1.81	2.07
H-8	—	—	H-19	6.26	6.75
H-8a	1.20	1.08	H-20	6.58	6.85
H-9	5.65	4.44	H-21	6.50	7.08
H-10	5.33	4.48	H-22a	2.14	2.38
H-11	3.18	3.01	H-23	6.30	6.97
H-12a	1.46	1.90	H-25	7.54	7.00
H-13	4.23	4.68	H-26a	2.46	1.96

リゾキシシの H-15 ($\delta\ 4.63$) は H-16 と 3Hz のスピン結合をしている。しかし、H-14 とのスピン結合のうち一方の結合定数が 1Hz 以下であること、さらに H-14 のシグナルが他のシグナルと重なっているために、H-13~H-15 の帰属が困難であった。そこでリゾキシシを加水分解-メチル化-アセチル化して誘導体 3 に導くことにより、H-14 のメチレン由来のシグナルを他のシグナルと分離して観測することが可能になった。こうして部分構造 c を Fig. 1.24 のように決定した。

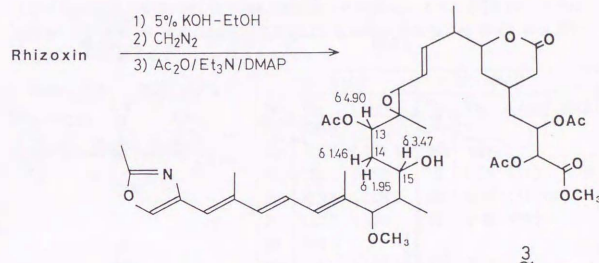


Fig. 1.24.

Table 1.6. ^1H NMR data of compound 3 in CDCl_3 (400 MHz).

Proton	Chemical shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)	Proton	Chemical shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)
1-OCH ₃	3.80	s	H-11	3.68	d $J_{11,13}=4.0$
H-2	5.30	d $J_{2,3}=3.5$	H-12a	1.10	s
H-3	5.34	ddd $J_{2,3}=3.5, J_{3,4}=3.5 \& 10.0$	H-13	4.90	dd $J_{13,14}=5.0 \& 11.5$
H-4	1.87	ddd $J_{4,5}=10.0, J_{4,6}=14.0, J_{4,7}=7^{\text{a}}$	H-14	1.95	ddd $J_{14,13}=5.0, J_{14,14}=13.0, J_{14,15}=2.5$
—	1.43	ddd $J_{4,5}=3.5, J_{4,6}=14.0, J_{4,7}=7^{\text{a}}$	—	1.45	ddd $J_{14,13}=11.5, J_{14,14}=13.0, J_{14,15}=11.5$
H-5	1.90	m $J_{5,6}=7^{\text{a}}, J_{5,7}=7^{\text{a}}, J_{5,8}=12.0 \& 7^{\text{a}}$	H-15	3.46	ddd $J_{15,14}=2.5 \& 11.5, J_{15,16}=7.0$
H-5a	2.76	dd $J_{5a,6}=7^{\text{a}}, J_{5a,16}=16.0$	H-16	1.87	m $J_{16,15}=7.0, J_{16,16a}=7.0$
—	2.03	dd $J_{5a,6}=7^{\text{a}}, J_{5a,16}=16.0$	—	—	$J_{16,17}=4.0$
H-6	1.90	ddd $J_{6,5}=7^{\text{a}}, J_{6,6}=13.0, J_{6,7}=3.0$	H-16a	1.12	d $J_{16a,16}=7.0$
—	1.27	ddd $J_{6,5}=12.0, J_{6,6}=13.0, J_{6,7}=12.5$	H-17	3.68	d $J_{17,18}=4.0$
H-7	4.15	ddd $J_{7,6}=3.0 \& 12.0, J_{7,8}=6.5$	17-OCH ₃	3.22	s
—	—	$J_{7,8}=6.5$	H-18a	1.76	s
H-8	2.52	m $J_{8,7}=6.5, J_{8,16}=7.0, J_{8,9}=7.0$	H-19	6.15	d $J_{19,20}=11.0$
—	—	$J_{8,9}=7.0$	H-20	6.61	dd $J_{20,19}=11.0, J_{20,21}=15.0$
H-8a	0.93	d $J_{8a,8}=7.0$	H-21	6.42	d $J_{21,20}=15.0$
H-9	5.75	dd $J_{9,8}=7.0, J_{9,10}=16.0$	H-22a	2.15	s
H-10	5.68	dd $J_{10,9}=16.0, J_{10,11}=4.0$	H-23	6.28	s
—	—	$J_{10,11}=4.0$	H-25	7.58	s
—	—	$J_{10,11}=4.0$	H-26a	2.47	s

^{a)} Coupling constant could not be determined.

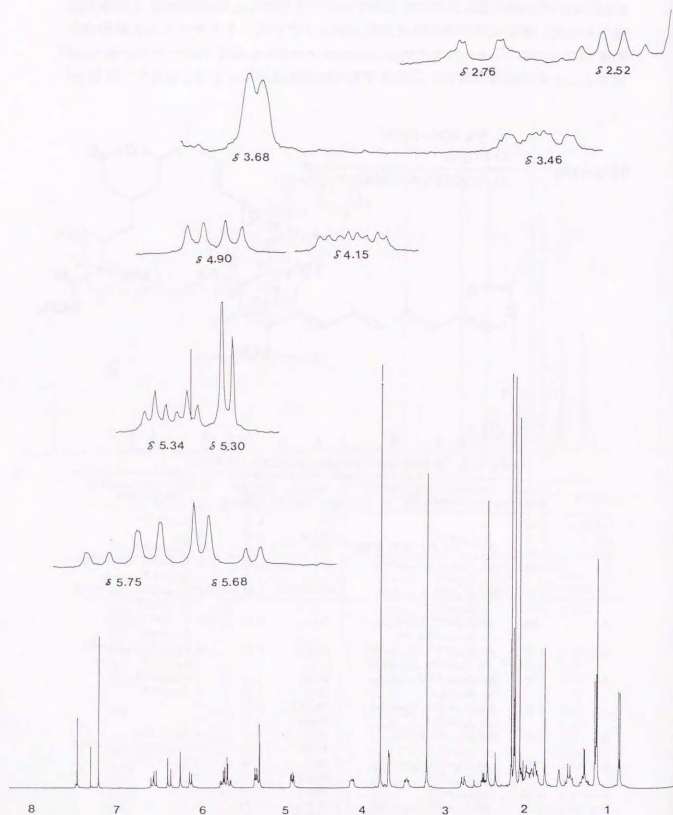
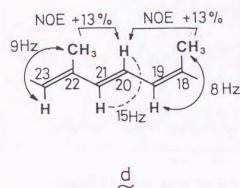


Fig. 1.25. 誘導体3の¹H NMR スペクトル

[部分構造 d (C-18~C-23)]

C-18a (11.5ppm) は H-19 (δ 6.08) と $^3J_{CH} = 8 \text{ Hz}$ 、C-22a (14.4ppm) は H-23 (δ 6.27) と $^3J_{CH} = 9 \text{ Hz}$ がそれぞれ観測される。従って CH₃-18a は C-18に、CH₃-22a は C-22 に結合するメチル基であることが判明した。一方、H-20 (δ 6.60) と H-21 (δ 6.38) のスピ結合は 15 Hz を示し、20、21 位はトランスである (Fig. 1-19)。

さらに NOE 実験を行い、部分構造 d の二重結合はすべてトランス配位であることが証明された。すなわち CH₃-18a (δ 1.82) への照射により、H-20 のシグナル強度が 13% 増大し、また CH₃-22a (δ 2.12) への照射でもやはり H-20 のシグナル強度が 13% 増えることから明らかになった。



¹³ C-NMR		¹ H-NMR	
No.	δ _c (¹ J _{CH})	No.	δ _H (J _{gem,vic})
18	136.3	18a	1.82
18a	11.5 (127)	19	6.08 (11)
19	129.4 (150)	20	6.60 (11, 15)
20	123.8 (148)	21	6.38 (15)
21	137.9 (150)		
22	136.8		
22a	14.4 (127)	22a	2.12
23	120.9 (155)	23	6.27

Fig. 1.26. 部分構造 d

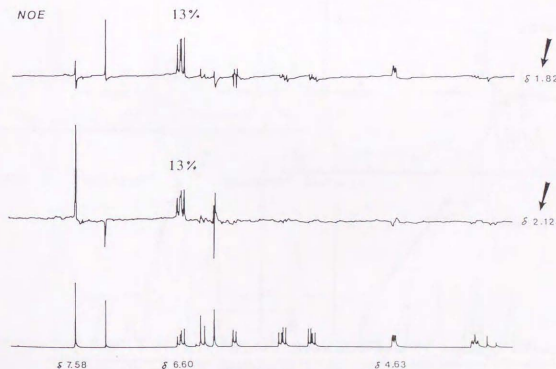


Fig. 1.27. ¹H NMR NOE 実験 (δ 1.82:18a-CH₃, δ 2.12:22a-CH₃ 照射
δ 4.63:H-15, δ 6.60:H-20, δ 7.58:H-25 観測)



Fig. 1.28. ^{13}C NMR LSPD 実験 (δ 3.23:H-17, δ 6.08:H-19 照射 11.5ppm: 18a-CH₃ 観測、 δ 6.27:H-23, δ 6.38:H-21 照射 14.4ppm:22a-CH₃ 観測)

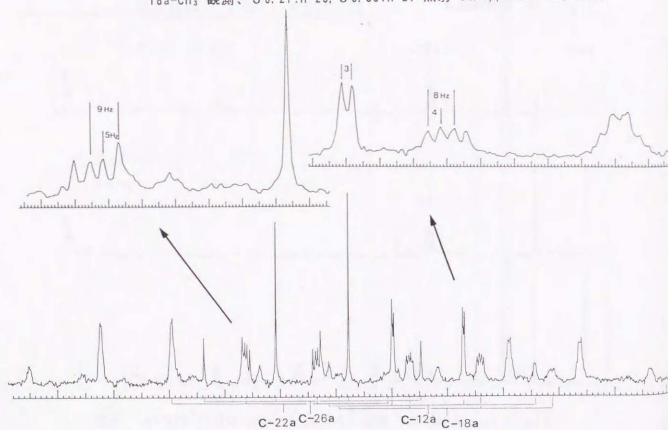
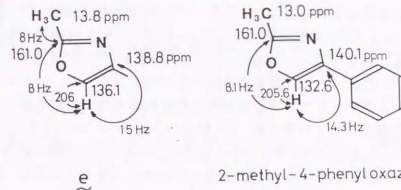


Fig. 1.29. ^{13}C NMR gated decoupling with NOE 法による $^3J_{\text{CH}}$ の測定

[部分構造 e (C-24~C-26a)]

C-25 (136.1ppm) の $^1J_{\text{CH}}$ は 206Hz と非常に大きく、さらに C-24 (138.8ppm) と H-25 (δ 7.58) の結合定数が 15Hz を示す。したがって、これら炭素は芳香族複素環に由来するものと考えられた。van Leusen ら⁹⁾ により報告された 2-メチル-4-フェニルオキサゾールの化学シフト値および遠隔スピンを含めた結合定数と、部分構造 e の各炭素の値がよく一致していることから、部分構造 e は 2-メチルオキサゾールと示唆された。

この推定は、 ^{13}C NMR LSPD 実験での H-26a (δ 2.45) および H-25 (δ 7.58) と C-26 (161.0ppm) とのあいだに $^2J_{\text{CH}}$ $^3J_{\text{CH}}$ が観察されることから正しいことが証明される。



e

2-methyl-4-phenyloxazole

Can. J. Chem., 57 3168 (1979)

Fig. 1.30. 部分構造 e と 2-methyl-4-phenyloxazole 比較

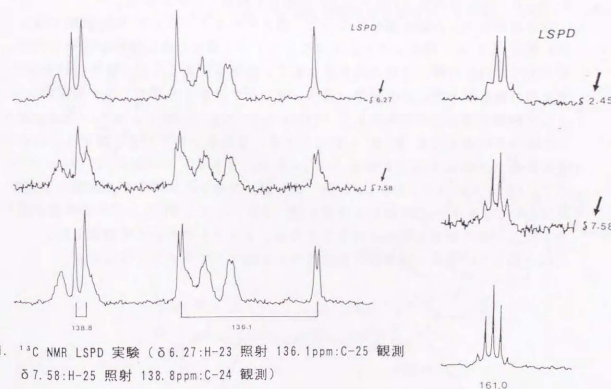


Fig. 1.31. ^{13}C NMR LSPD 実験 (δ 6.27:H-23 照射 136.1ppm:C-25 観測 δ 7.58:H-25 照射 138.8ppm:C-24 観測)

Fig. 1.32. ^{13}C NMR LSPD 実験 (δ 2.45:H-26a, δ 7.58:H-25 照射 161.0ppm:C-26 観測)

<第一章>

[リゾキシンの平面構造]

今までに部分構造 a~e について述べてきた。これらは四級炭素もしくはカルボニル炭素や酸素が部分構造の端に存在する場合が多く、 ^1H NMR のスピンドカッピング実験でこれら部分構造をつなげていくことはできない。そこで NMR での LSPD 実験、NOE 実験、紫外吸収スペクトル、質量分析スペクトルの詳細な解析を行った。さらに ^1H NMR の溶媒を種々変えることにより、目的とするシグナルの化学シフトに変化をもたらし、スピンドカッピング実験を可能にして、各部分構造のつながりを明らかにした。以下に部分構造を e から a の順でそれらの結合部位を記述する。

部分構造 e と d の間には、C-25 (136.1ppm) と H-23 (δ 6.27) に遠隔スピンドカッピング $^3J_{\text{CH}} = 6$ Hz が認められる (Fig. 1-31)。NOE 実験で CH_3 -22a (δ 2.12) への照射により H-25 (δ 7.58) のシグナル強度が 12% 増大する (Fig.1-27)。従って 23 位と 24 位に結合があることが明らかとなった。これにより、紫外吸収スペクトルがテトラエン様の特徴的な吸収曲線を描くことを説明できる。

部分構造 d と c の間には、C-18a (11.5ppm) と H-17 (δ 3.23) に遠隔スピンドカッピング $^3J_{\text{CH}} = 4$ Hz が観測されることから 17 位、18 位間で結合していると結論できる (Fig.1-28)。このことは高分解能マススペクトルでも 16 位と 17 位の間に開裂した m/e 232.1330 ($\text{C}_4\text{H}_4\text{NO}_2$; 232.1336, base peak) のフラグメントが検出されることから支持される。

部分構造 c と b は 12 位と 13 位が結合している。それは C-12a (11.8ppm) と H-13 (δ 3.02) の間に $^3J_{\text{CH}} = 3$ Hz が認められることから決定した。

部分構造 b と a の結合部位について、重クロロホルム中での NMR 実験では、H-4 から H-6 の一部のシグナルが他のシグナルと重なり合い解析が困難である。そこで ^1H NMR の解析を容易にするために、溶媒を変えることにより目的のシグナルの分離を試みた。その結果、重ベンゼン中では多くのシグナルが高磁場シフトして観測できることが判明した (Table 1.7., Fig. 1.33.)。重ベンゼンと重クロロホルムの混合比を 95 対 5 にしたとき、目的のシグナルを分離することができた。それらの化学シフト値は H-4 (δ 0.13, δ 1.62)、H-5 (δ 1.15)、H-5a (δ 1.46, δ 2.18)、H-6 (δ 0.05, δ 1.28) である。スピンドカッピング実験において、H-5 への照射により δ 0.05, δ 0.13, δ 1.46 のシグナルの形が変わりこれらに相関が認められることから、5 位と 6 位の結合を確認した。

以上により、炭素-炭素結合部位についてはすべて明らかとなった。

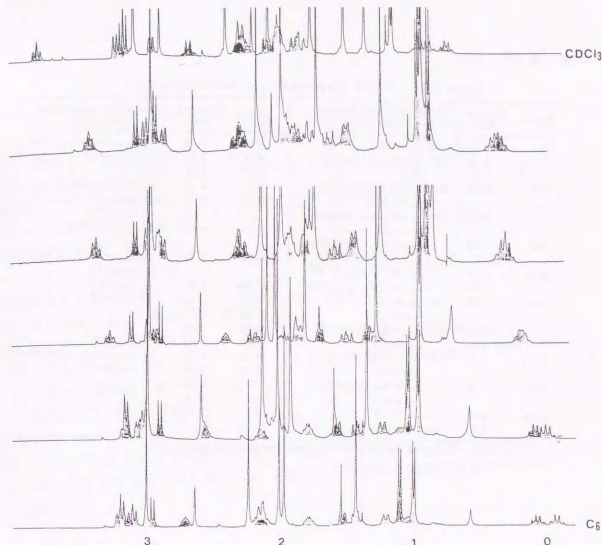


Fig. 1.33. ^1H NMR 溶媒による化学シフトの変化 ($\text{CDCl}_3 - \text{C}_6\text{D}_6$)

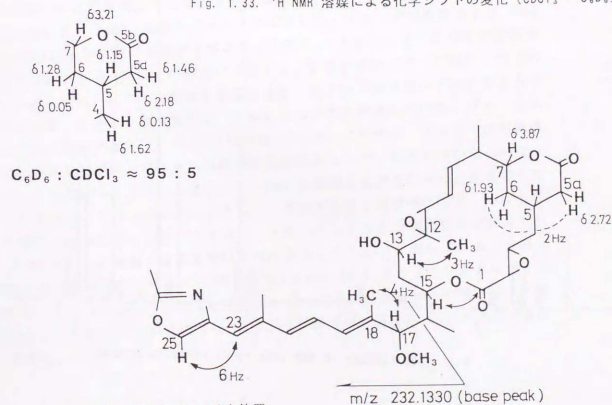


Fig. 1.34. 各部分構造の結合位置

Table 1.7. ¹H NMR data of rhizoxin (1) in benzene-d₆ (400 MHz).

Proton	Chemical shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)	Proton	Chemical shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)
H-2	2.64	d $J_{2,3}=1.6$	H-10	5.03	dd $J_{10,9}=15.5, J_{10,11}=9.5$
H-3	3.10	ddd $J_{3,2}=1.6, J_{3,4}=2.0$ & 11.0	H-11	2.96	d $J_{11,10}=9.5$
H-4	1.52	ddd $J_{4,3}=2.0, J_{4,5}=13.0, J_{4,6}=3.0$	H-12a	1.44	s
	0.07	ddd $J_{4,5}=11.0, J_{4,6}=13.0, J_{4,7}=11.0$	H-13	3.22	dd $J_{13,14}=3.5$ & 10.5
H-5	1.05	m $J_{5,4}=11.0, J_{5,6}=5.0$ & 12.5, $J_{5,7}=3.0$ & 12.5	H-14	2.15	ddd $J_{14,13}=10.5, J_{14,15}=7.4, J_{14,16}=8.0$
H-5a	1.24	dd $J_{5a,5}=5.0, J_{5a,6}=18.0$	H-15	4.87	dd $J_{15,14}=0$ & 8.0, $J_{15,16}=6.5$
H-6	1.42	dd $J_{6,5}=12.5, J_{6,7}=18.0$	H-16	2.72	m $J_{16,15}=3.0, J_{16,17}=6.5, J_{16,18}=9.5$
	1.20	ddd $J_{6,5}=3.0, J_{6,7}=13.0, J_{6,8}=2.5$	H-16a	1.11	d $J_{16a,16}=6.5$
	-0.07	ddd $J_{6,5}=12.5, J_{6,7}=13.0, J_{6,8}=12.5$	H-17	3.18	d $J_{17,16}=9.5$
H-7	3.14	ddd $J_{7,6}=2.5$ & 12.5, $J_{7,8}=10.0$	17-OCH ₃	3.01	s
H-8	1.80	m $J_{8,7}=10.0, J_{8,9}=7.0, J_{8,10}=10.0$	H-18a	2.02	s
H-8a	1.00	d $J_{8a,8}=7.0$	H-19	6.13	d $J_{19,18}=11.0$
H-9	4.51	dd $J_{9,8}=10.0, J_{9,10}=15.5$	H-20	6.73	dd $J_{20,19}=11.0, J_{20,21}=15.0$
			H-21	6.52	d $J_{21,20}=15.0$
			H-22a	2.25	s
			H-23	6.40	s
			H-25	7.08	s
			H-26a	1.98	s

^{a)} Spin-spin coupling was observed but its constant could not be determined.

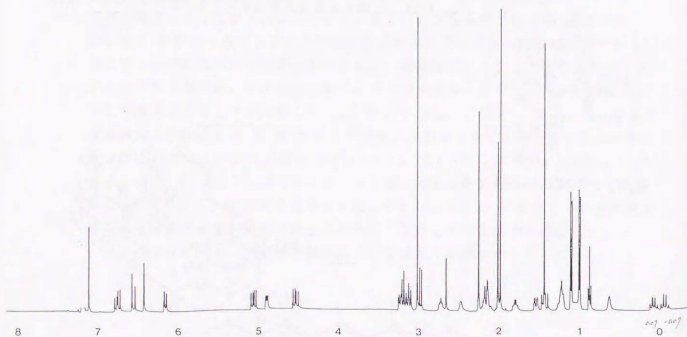


Fig. 1.35. 400MHz ¹H NMR spectra of rhizoxin in C₆D₆

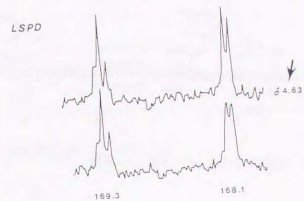


Fig. 1.36. ¹³C NMR LSPD 実験
(δ 4.63: H-15 照射 168.1 ppm: C-1 観測)

次に、残されているラクトン環の結合形成位置について考察する。
168.1ppm に幅の広い二重線として表れている C-1 のシグナルは、H-15 (δ 4.63) への照射の結果鋭くなることより、リゾキシンは 1 位と 15 位間で 16 員ラクトン環を形成している。したがって、もう一つは b 位と 7 位間で 6 員ラクトンを作っていることは間違いない。

以上、¹H NMR および ¹³C NMR の詳細なデカップリング実験、NOE 実験を行いリゾキシンの平面構造を 1 と結論した。さらに、平面構造を確認するために分解反応を試みた。

[オゾン分解]

リゾキシンの誘導した化合物 3 を CHCl₃ 中 -78°C にてオゾン酸化-ジメチルスルフィド-NaBH₄ 処理を行った。水層からは、イオン交換樹脂および HPLC 分取操作により、分解生成物 4 および 5 を得た。生成物 4 は ¹H NMR の解析の結果 C-10 から C-18, 18a の部分に一致する。また生成物 5 は ¹H NMR ¹³C NMR の解析から Fig. 1.37. に示す 5 あるいは 5' の 2 つの構造のいずれかであると推察される。しかし、生成物 5 の ¹H NMR において水酸基の付け根のプロトンが重なり合い解析が難しい。一方、¹³C NMR の化学シフト値を、アルカンの置換基効果による加成則¹⁹⁾ による計算結果と比較検討したが、判定がつかなかった。そこで、生成物 5 をアセチル化して ¹H NMR の詳細な検討を行った。生成物 5 はアセチル化により hexa-acetate となり、アセチル基の付け根のプロトンが分離して解析が可能になったが、メチレン、メチンプロトンの分離は依然分離しておらず decoupling 実験による解析は不能である。しかし、3 組 6 プロトン分の 1 級水酸基の付け根のメチレン (-CH₂-O-Ac) には、AA'X タイプのシグナルが 2 組、AA'XX' タイプのシグナルが 1 組現れていることから、生成物 5 の構造を 5 と推定した。これはリゾキシンの C-1 から C-5a, 5b, C-8a を含む C-9 までの部分に一致する。

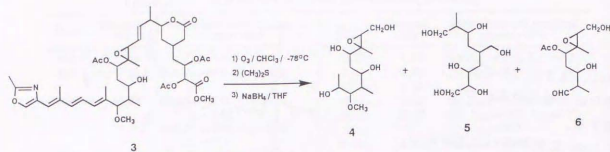


Fig. 1.37. 化合物 3 のオゾン分解と生成物

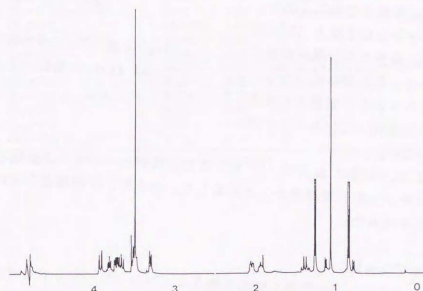


Fig. 1.38. 生成物 4 の ^1H NMR (D_2O)

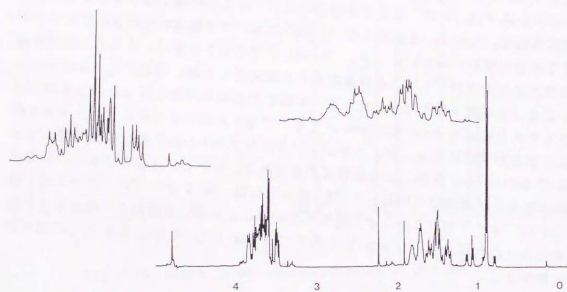


Fig. 1.39. 生成物 5 の ^1H NMR (D_2O) と拡大スペクトル

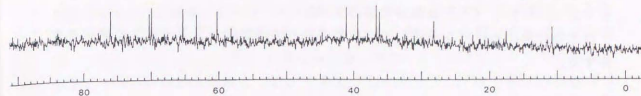


Fig. 1.40. 生成物 5 の ^{13}C NMR (D_2O)

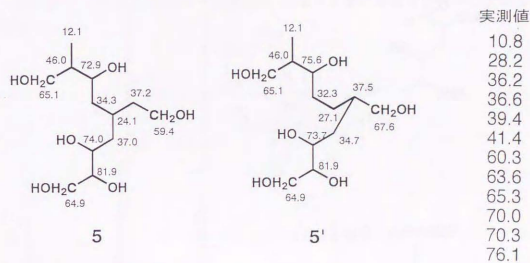


Fig. 1.41. 推定構造式 5, 5' を基に加成則で算出した ^{13}C NMR 化学シフト値

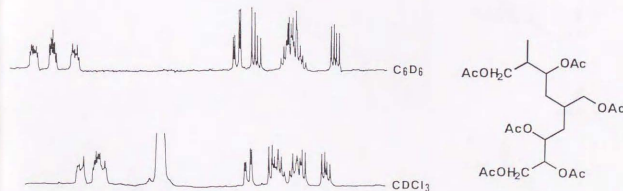


Fig. 1.42. 生成物 5 アセテート体の ^1H NMR 部分拡大 (溶媒は C_6D_6 と CDCl_3)

一方、有機溶媒で抽出された分解物はそれぞれが非常に微量であった。そのなかで、生成物 6 を単離し ^1H NMR の解析などから構造を決定した。これはリゾキシンの C-10 から C-17 の部分に相当する。

以上の結果よりオゾン分解により単離された生成物は、リゾキシンの構造を支持する。

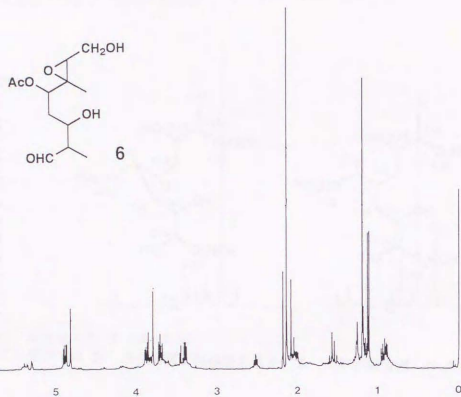


Fig. 1.43. 生成物 6 の ^1H NMR (CDCl_3)

〔立体配置〕

リゾキシンの不斉中心のうち、5 位と 7 位及び 8 位の相対配置については ^1H NMR decoupling 実験で図のように結論した。すなわち、 δ 0.93 に現れる H-6 のシグナルには、H-5 (δ 2.05) および H-7 (δ 3.87) との間に大きなスピン結合 ($J_{5,6} = J_{6,7} = 12.0\text{Hz}$) が認められる。また、H-5、の一方のシグナル (δ 2.10) と H-5 の結合定数も 12Hz である。したがって H-5a (δ 2.10) と H-5 (δ 2.05)、H-6 (δ 0.93)、H-7 (δ 3.87) はそれぞれアキシアル結合していることがわかる。これにより H-5a (δ 2.72) と H-6 (δ 1.93) の 2Hz の結合定数は、5 a 位および 6 位のメチレンのエクアトリアル水素間のジグザグ型の遠隔スピン結合に由来することが判明した。さらに NOE 実験において、 CH_3 -8a (δ 1.20) への照射により H-7 のシグナル強度が 6% 増大するのが認められることから支持される。

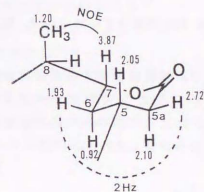


Fig. 1.44. C-5 から C-8 (ラクトン部分) の相対配置

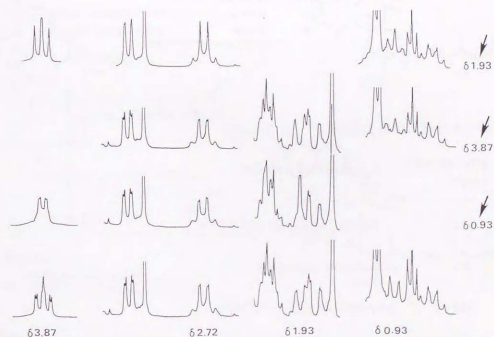


Fig. 1.45. C-5 から C-8 (ラクトン部分) の ^1H NMR decoupling 実験

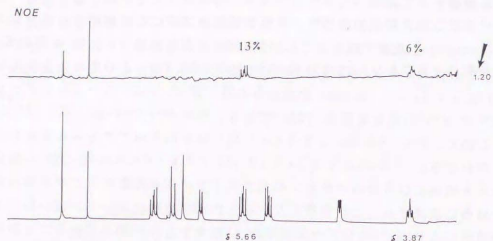


Fig. 1.46. ¹H NMR NOE 実験 (δ 1.20:8a-CH₃; 照射 δ 3.87:H-7 観測)

リゾキシンの絶対構造は、培養抽出物中の類縁化合物7を結晶化し、そのX線結晶解析をおこない、続いて Fig. 1.47. に示すように、誘導体3へ導いた。一方、リゾキシンは H₂¹⁸O によるエポキシドの開裂を経て同じく誘導体3にし、双方を関連つけることにより決定した¹¹⁾。

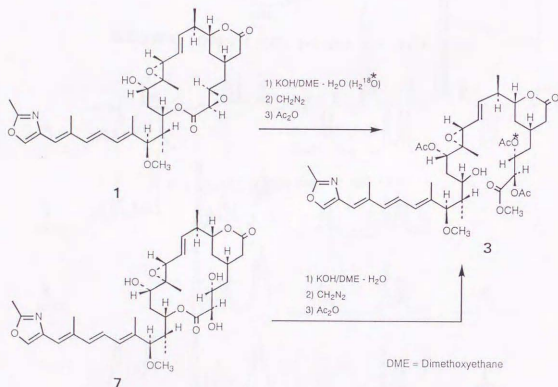


Fig. 1.47. X線結晶解析に用いた化合物7の構造とリゾキシンの関連

第四節 生合成

リゾキシンは真菌由来のマクロライド化合物として初めての例であり、これまでに放線菌より得られている16員環マクロライドと炭素骨格が異なり、生合成的にも興味深い構造である。一方、例外的にプロピオン酸を投与して取り込まれている報告¹²⁾はあるものの、カビの二次代謝産物にプロピオン酸の生合成系は無いとされている。

リゾキシンの炭素骨格を考えたとき、メチル基はプロピオン酸由来なのか、メチオニン由来なのか。さらにオキサゾール環や変則的な6員ラクトン部分の炭素由来についても調べてみることは重要である。

[静置培養下での¹⁴C標識化合物の取り込み]

まず初めに *R. chinensis* の培地2による静置培養中に¹⁴C標識化合物を加え、リゾキシンへの取り込みを検討した。[2-¹⁴C]酢酸ナトリウム、[メチル-¹⁴C]L-メチオニンは取り込みが認められた。しかしながら[3-¹⁴C]プロピオン酸ナトリウムの取り込みは認められなかった。

Table 1.8. 培地2の組成

glucose	1 %
ebios	1 %
KH ₂ PO ₄	0.05 %
K ₂ HPO ₄	0.05 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 %

R. chinensis Rh-2
cultivation at 30°C (100ml)

addition labeled compound
(2μCi after 48h)
96h cultivation
culture broth
ext. with ether
TLC separation
crude Rhizoxin (60-70μg)
addition of cold Rhizoxin
(ca 2mg)
TLC separation
pure Rhizoxin

Table 1.9. ¹⁴C 標識化合物の取り込み結果 (静置培養)

labeled compound	total activity (dpm)	incorporation (%)
[2- ¹⁴ C] Sodium Acetate	270	6×10 ⁻³
[3- ¹⁴ C] Sodium Propionate	20	5×10 ⁻⁴
[Methyl- ¹⁴ C] L-Methionine	7260	1.6×10 ⁻¹

Fig. 1.48. 培養および投与と単離方法

[リゾキシシン高生産株の選別]

ペニシリンの研究でも明らかのように、微生物代謝産物の研究では生産性の改善が常に行われてきた。リゾキシシンの場合においても、生成成研究および生物活性・誘導体変換などの研究を行うにあたって問題になるのは、リゾキシシンの生産量の向上である。この解決のために、高生産株の選出、培養条件などの検討が必要である。

リゾキシシンの高生産株を得る目的で、*R. chinensis* の NG (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine) による変異¹³⁾、UVによる変異¹³⁾を行った。しかしながら *R. chinensis* は本来多核の孢子であるため、変異株の作成、維持は非常に難しいと考えられる。しかしながら、リゾキシシンの高生産株の選別は必須であるため、前記変異処理後の高生産株 (30U-03, 90U-03) の2株を選出した。これより以後、生成成実験では 30U-03 株を用いた。

[培養条件検討]

安定同位元素を用いた代謝産物の生成成研究を行うにあたり解決しなければならない問題は、前述したように生産量の増大と取り込み率の向上をはかることにある。それゆえ培養条件の検討は必須であり、少量の培地でいかに生産量を上げることが鍵になる。

リゾキシシン生産菌 *Rhizopus chinensis* Rh-2 の培養は、当初培地 1 を用いてのシャーレによる静置培養を行ってきた。しかしこの条件ではリゾキシシンの生産量が 1~2 μg/ml と低く、生成成実験には適さない。そこで変異処理後得られた高生産株 30U-03 株による、リゾキシシンの生産量の向上を目的として、振とう培養条件下での培地の検討を行った。その結果、培地 3 を用いることによりリゾキシシンの生産量は 6 μg/ml と向上した。

[振とう培養下での ¹⁴C 標識化合物の取り込み]

R. chinensis (30U-03) の振とう培養下での ¹⁴C 標識化合物のリゾキシシンへの取り込みを検討した。[2-¹⁴C] 酢酸ナトリウムは 0.02%、[メチル-¹⁴C] レーメチオニンは 0.4% の取り込みが認められた。また、[¹⁴C(U)] セリンを投与したところ 0.09% が取り込まれた。しかしながら [3-¹⁴C] プロピオン酸ナトリウムの取り込みは認められなかった。

Table 1.10. 培地 3 の組成

glucose	1%
lactose	1%
polypepton	1%
K ₂ HPO ₄	0.25%
K ₂ HPO ₄	0.75%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2%

Table 1.11. ¹⁴C 標識化合物の取り込み結果 (振とう培養)

labeled compound	total activity (dpm)	incorporation (%)
[methyl- ¹⁴ C]L-methionine 10 μCi	89500	0.4
[2- ¹⁴ C]sodium acetate 20 μCi	10900	0.02
[3- ¹⁴ C]sodium propionate 20 μCi	1200	0.003
[¹⁴ C(U)]L-serine 5 μCi	12300	0.09

次に、¹⁴C 標識化合物の取り込み率を予測するために、*R. chinensis* (30U-03) の振とう培養中に ¹⁴C 標識化合物+非標識化合物を加え、リゾキシシンへの取り込み率を検討した。培地 300 ml に対し試薬を 120 mg 加えたとき、リゾキシシン 1 mol に対して、酢酸ナトリウムは 0.95 mol、レーメチオニンは 1.7 mol という高い数字を示した。この結果は、この条件でのリゾキシシン生産量は低い、高い取り込み率により ¹⁴C 標識化合物取り込み実験が十分可能であることを示している。

Table 1.12. ¹⁴C 標識化合物の取り込み率予測実験

labeled compound	rhizoxin HPLC	rhizoxin TLC	LSC	specific activity	total activity
[methyl- ¹⁴ C]L-methionine 14.82 μCi + L-methionine 120 mg / 300 ml, 70 med.	1350 μg / 300 ml	1120 μg	634000 dpm / 560 μg	11200 dpm / mg	152800 dpm
[2- ¹⁴ C]sodium acetate 15 μCi + sodium acetate 120 mg / 300 ml, 70 med.	750 μg / 300 ml	295 μg	10300 dpm / 295 μg	35000 dpm / mg	28000 dpm

[¹⁴C 標識化合物によるリゾキシシン炭素由来]

R. chinensis (30U-30) の振とう培養中に、予想される生成成前駆体の ¹⁴C 標識化合物を投与し、¹⁴C NMR を測定することによりリゾキシシンの炭素部位の標識位置を確認した。

[メチル-¹⁴C] レーメチオニンの投与実験では、リゾキシシンの7つのメチル基のうち、オキサゾール環上のメチル基を除く、6つのメチル基に効率よく取り込まれ、メチル基はメチオニン由来であり、プロピオン酸由来でないことが明らかになった。加えて、1炭素当りの平均取り込み率は 36% という高い数字を示した。この結果は、[メチル-¹⁴C] レーメチオニンを投与することにより、比放射活性の高いリゾキシシンを生成成的に調製できることを示している。

[1-¹⁴C] 酢酸ナトリウムの投与実験の結果では、Fig. 1.50. に示したように、13個の炭素位置に ¹⁴C の取り込みが認められた。

残るオキサゾール環を含む C-23 から C-25 の炭素は、これまでの二次代謝産物の生成成の例より¹⁴⁾ セリン由来であると推察された。[1-¹⁴C] L-セリンの投与実験の結果、当初の予想通り C-23 に ¹⁴C の取り込みが認められた。

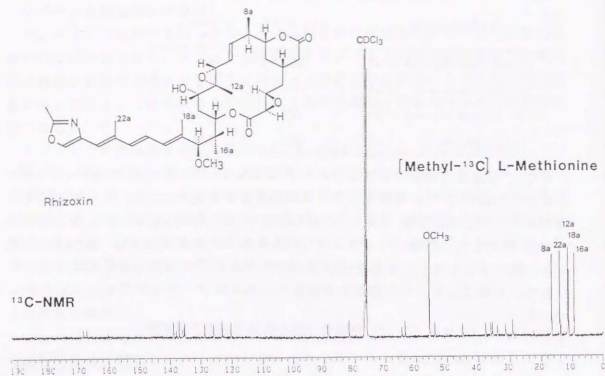


Fig. 1.49. [β - ^{13}C] L-メチオニンの投与による ^{13}C NMR と標識位置

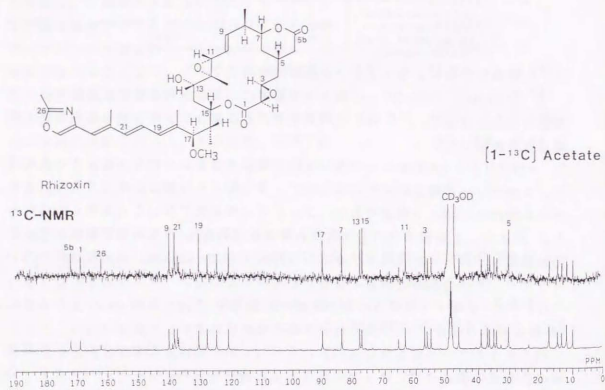


Fig. 1.50. [1- ^{13}C] 酢酸ナトリウムの投与による ^{13}C NMR と標識位置

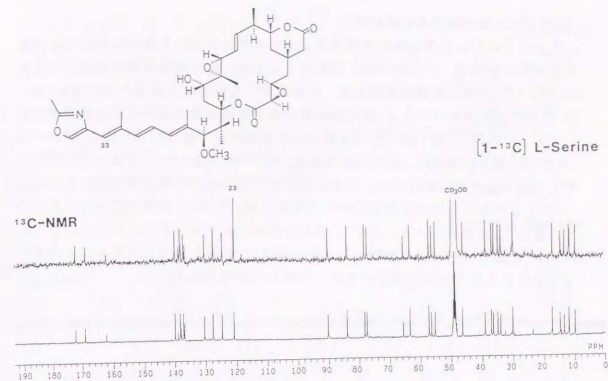


Fig. 1.51. [1- ^{13}C] L-セリンの投与による ^{13}C NMR と標識位置

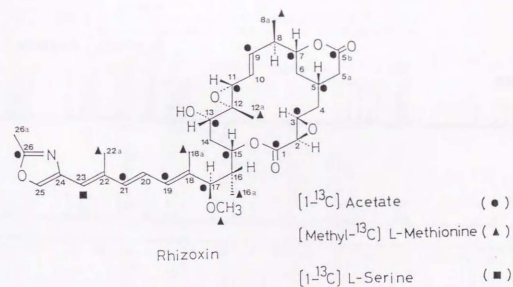


Fig. 1.52. ^{13}C 標識化合物による取り込み位置

< 第一章 >

[^{13}C - ^{13}C 二重標識化合物前駆体]

次に ^{13}C - ^{13}C 二重標識化合物を用いて、リゾキシンの生合成における縮合様式の検討を試みた。[1,2- $^{13}\text{C}_2$]酢酸ナトリウムによる標識実験の結果、1,4対の ^{13}C - ^{13}C スピン結合が観測され、生合成的に変則的な6員ラクトン部の5a、5b位およびオキサゾールの26、26a位が共に酢酸由来であることが確認された。

一方、[1,2- $^{13}\text{C}_2$]グリシンを用いての標識実験では23、24位に ^{13}C - ^{13}C スピン結合が観測され、その結合定数は70.4 Hzであった。さらに25位にも ^{13}C の取り込みが観測された。これはグリシンの一部が分解代謝を受けて、5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸からセリン3位への " $^{13}\text{C}_1$ " の取り込みによるものである。これを裏付けるように、同じくホモシステインからメチオニンが " $^{13}\text{C}_1$ " の取り込みにより標識され、その結果 ^{13}C NMR 上ではメチオニン由来のシグナルにも取り込みが観察されることから証明される。

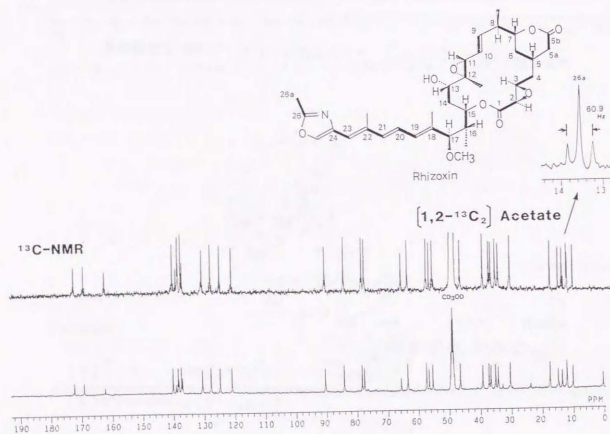


Fig. 1.53. [1,2- $^{13}\text{C}_2$]酢酸ナトリウムの投与による ^{13}C NMR と標識位置

< 第一章 >

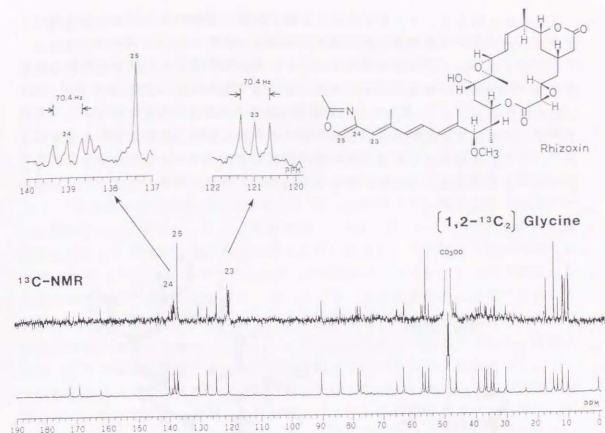


Fig. 1.54. [1,2- $^{13}\text{C}_2$]グリシンの投与による ^{13}C NMR と標識位置

Table 1.13. ^{13}C N.m.r. data* for the incorporation of [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetate, [methyl- ^{13}C]methionine, [1- ^{13}C]serine, and [1,2- $^{13}\text{C}_2$]glycine into rhizoxin.

Carbon	δ	J_{CC}^b /Hz ^b	Carbon	δ	J_{CC}^b /Hz
1	169.3]	77.0	15	77.6]	37.4
2	55.3]		16	39.2]	
3	57.4]	16a	10.0		
4	36.6]	44.0	17	90.5]	44.8
5	30.4]	32.3	18	137.0]	
6	35.2]		18a	12.1	
5a	37.2]	50.6	19	130.6]	57.2
5b	172.5]		20	124.9]	
7	84.3]	38.2	21	138.5]	
8	46.5]		22	138.3]	
8a	17.4]		23a	14.8	
9	140.2]	71.2	23	121.0]	70.4 ^c
10	127.8]		24	139.1]	
11	63.6]	30.1	25	137.4]	
12	65.7]		26	162.4]	
12a	11.9]		26a	13.5]	60.9
13	78.4]	38.9	17-OCH ₃	56.5	
14	34.2]				

* Data were recorded on a Jeol JNM FX-400 n.m.r. spectrometer at 100.7 MHz. Chemical shifts in CDCl_3 are given in p.p.m. relative to Me_4Si . ^b Unless otherwise stated, coupling constants for [1,2- $^{13}\text{C}_2$]acetate incorporation are given. ^c Coupling constant could not be determined because of overlapping of the signals due to C-19 and -20. ^d Coupling constant for [1,2- $^{13}\text{C}_2$]glycine incorporation.

以上をまとめると、リゾキシンは13個の酢酸、1個のセリンおよび6個のメチオニンメチルから生成されていることが明らかとなった。

さらにリゾキシンのスターターユニットについて考察する。生成実験の結果からO-アセチル-L-セリンがスターターとして予想される。O-アセチル-L-セリンは生体代謝系のL-システインの前駆体であると共に、ヘテロサイクルβ置換アラニン類の生成過程に用いられ、脱アセチル化を伴って各化合物へ生成されていくことが知られている。リゾキシンのO-アセチル-L-セリンをそのままスターターとして生成されるか興味もたれる。

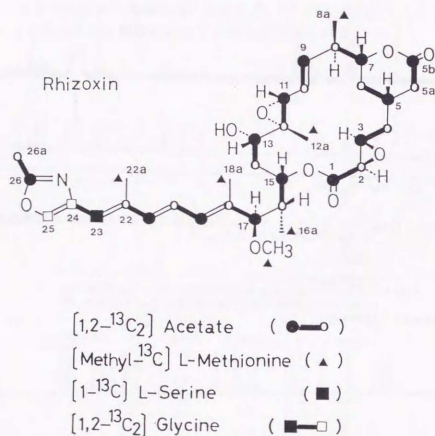


Fig. 1.55. ¹³C, [1,2-¹³C₂] 標識化合物による生成実験結果

[¹⁴C 標識リゾキシンの調製]

培養条件の検討によるリゾキシンの生産性の向上は、安定同位元素を用いてのリゾキシンの生成実験及び放射性標識リゾキシンの調製を可能にした。これにより、¹⁴C-リゾキシンの用いて、他の有糸分裂阻害剤との関係について検討が可能となり、チューブリン上の作用部位の研究が発展した。

リゾキシンの結合タンパク質の解析、他の有糸分裂阻害剤との拮抗、トレーサー実験などについて検討を行うとき、比較放射活性の高い放射性同位元素標識リゾキシンの調製は必須である。標識化合物の調製方法は、合成法、同位体交換法 (Witzbach 法)、生成法などが知られている¹⁸⁾。前二法を用いての調製を行うに当たっては解決すべき点が多い。一方、生成法は [³H-¹³C] L-メチオニンの投与実験の結果から、6つのメチル基に効率よく取り込まれ、1炭素当りの平均取り込み率は36%という高い数字を示した。この結果は、[³H-¹⁴C] L-メチオニンを投与することにより比較放射活性の高いリゾキシンを生合成的に調製できることを示しているとともに、メチル基、メトキシ基という代謝や転移に比較的安定な位置に標識出来る点で優れている。ちなみに他の生成前駆体の場合の1炭素への取り込み率は、酢酸ナトリウムでは約1%、セリンでは約3%であった。

放射性同位元素化合物は安定同位元素化合物に比べ mg 当りの単価が非常に高価である。従って、生成法による標識リゾキシンの調製を行うにあたり (1) 少量培養時のリゾキシンの生産量の増大と、(2) 標識前駆体の利用率の向上を検討した。

培地4で少量培養を行ったときのリゾキシンの生産の経時変化を図に示す。本培養開始24時間目よりリゾキシンの生産が認められ、92時間目に35 μg/mlと生産量は最大となる。しかし、その後リゾキシンの含有量は低下していくのがわかる。

さらに標識前駆体の利用率の検討のために [³H-¹³C] L-メチオニンを投与し、マススペクトロメトリーにより取り込み効率を求め、培地 1 ml あたり 0.4 mg のときに取り込み効率が良いことが判明した。尚、のちに利用率の検討を行うに当たっては、[³H-D₃] L-メチオニンを投与し、リゾキシンの ¹H NMR での各メチル基の積分値より算出した。

E. chinensis (30U-03) を培地4を用いて 16 ml (8 ml x 2) 本培養 18 時間後に [³H-¹⁴C] L-メチオニン 2 mCi (6.28 mg, S.A.: 47.5 mCi/mmol、培地 1 ml あたり 0.4 mg) を投与した。得られた ¹⁴C 標識リゾキシンは 33.7 μCi (225 μg, S.A.: 93.6 mCi/mmol = 20780 dpm/0.1 nmol) であった。これは蛋白の解析、拮抗実験に用いるのに十分高い比較放射活性である。

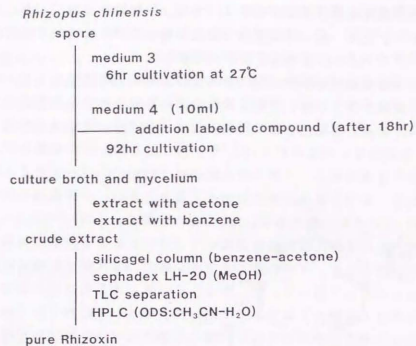


Fig. 1.56. 少量培養条件と投与、精製方法

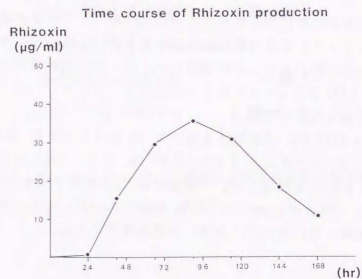


Fig. 1.57. 少量培養方法でのリゾキシシン生産量の推移

[リゾキシシンの生合成における酸素由来 ¹⁸O₂ 実験]

後に述べるリゾキシシン関連化合物の中で、生合成中間体と思われるいくつかの代謝産物を得ている。そのなかで 2,3 が二重結合の化合物 8、さらに 11,12 エポキシドが二重結合となった化合物 9 を得ている (後述)。これらリゾキシシン前駆体と、放線菌由来のマクロリドを比較するといくつかの相違点が認められる。例えば、タイロシンと化合物 9 との二重結合の位置を比較すると、9,10 および 11,12 の二重結合位置が炭素 1 個シフトしていると考えられる。これはリゾキシシンの生合成過程で、Fig. 1.60 に示すような中間体が酸化を受け開裂、二重結合の転移を経て、現在得られている化合物 9 からリゾキシシンへと生合成されるとの仮説を立てた。

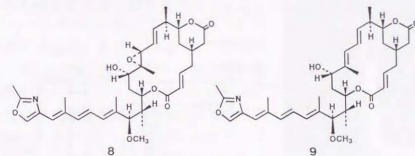


Fig. 1.58. リゾキシシン関連化合物 8、9 の構造

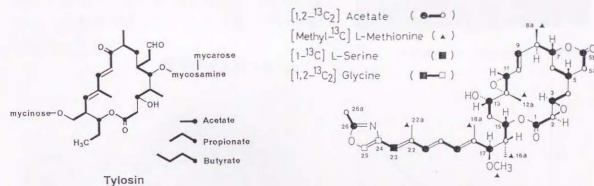


Fig. 1.59. リゾキシシンとタイロシンの生合成と二重結合位置の比較

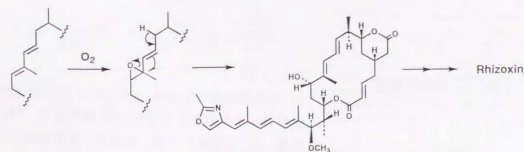


Fig. 1.60. リゾキシシン生合成の仮説

この仮説を証明するためには、13位の水酸基の酸素の由来をはじめ、リゾキシンの酸素由来を知ることから導かれると考えた。そこで $^{18}\text{O}_2$ ガスのリゾキシンの取り込みを、 ^{13}C NMRでの ^{18}O による同位体効果から検討するために、図のような装置を組み実験を行った。*R. chinensis* (30U-03)は培地4各50 mlを2本のルーコルベンで培養し、培養開始より25時間までは $^{18}\text{O}_2$ ガスを用い、25時間より53時間までは $^{18}\text{O}_2$ ガス1 Lを用いて培養を行った。培養終了は93時間目である。このときの酸素使用量とルーコルベン内の $^{18}\text{O}_2$ および $^{18}\text{O}_2$ ガスの存在量の経時変化を図に示す。

生産量は2.2 mg / 100 mlであり、精製したリゾキシンは1.0 mgであった。 ^{13}C NMRの測定では高磁場シフトしたシグナルは、 ^{18}O の取り込みが低く観察されなかった。また、マススペクトロメトリーによる取り込み率は約3%と算出された。

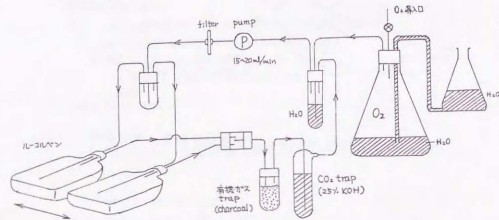


Fig. 1.61. $^{18}\text{O}_2$ ガス導入実験装置

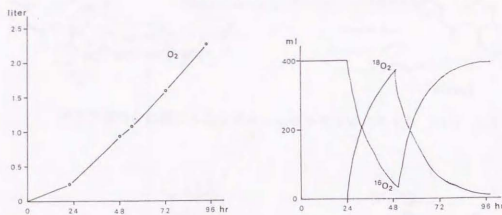


Fig. 1.62. O_2 ガス消費量

Fig. 1.63.
 O_2 ガス消費量をもとに、 $^{18}\text{O}_2$ 、 $^{18}\text{O}_2$ の分圧変化を計算機により求めたグラフ(24時間目に $^{18}\text{O}_2$ へ交換、52時間目に $^{18}\text{O}_2$ に戻す。消費量は0.565 ml/minとした)

第五節 生物活性

リゾキシンの作用機作は今日までの研究で、微小管蛋白質の重合阻害であることが判明している 163 。さらにチューブリン上の作用部位も高橋らにより解明されている 173 。したがって、ここではリゾキシンが微小管の重合阻害作用を持つとわかるまでの、各種生物に対する活性について記述する。

【植物に対する作用】

イネ種子(愛知旭)を28°Cの恒温槽内で1~2 mmに出芽させ、リゾキシンを溶解した水溶液に浸し30°C、5日間後の影響を調べた。リゾキシン10 ng/mlの濃度で、根の肥大・伸長阻害が認められる。また、1 μg/mlで鞘葉基部のふくらみ、10 μg/mlで鞘葉・葉身の伸長抑制が観察された。

肥大した根の組織学的観察については野田らにより報告されている 183 。それによると、リゾキシン処理根の横断切片を健全根のそれを顕微鏡写真で比較したとき、全ての部位の細胞が大きくなっており、外皮・皮層細胞においては長径・短径がそれぞれ2~3倍になっている。さらに皮層細胞壁が著しく厚くなっていることが認められる。

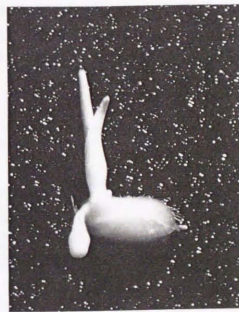
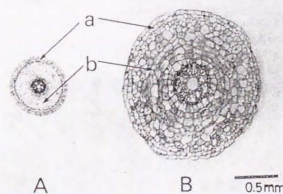
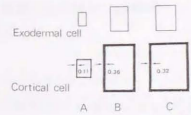


Fig. 1.64. リゾキシン 10 μg/ml (愛知旭)



Transsections of toxin treated and healthy rice seedling roots.
A. Healthy root. B. Toxin-treated root.
a. Exodermal cells. b. Cortical cells.
Bar represents 0.5 mm.



Diagrams showing width and thickness of exodermal and cortical cells of swollen rice seedling roots infected with *Rhizopus chinensis* or treated with the toxin.
A. Healthy root. B. Infected root. C. Toxin-treated root.
Bar represents 50 μm.

Fig. 1.65. 根の横断切片の顕微鏡写真(文献18より 金南風)

イネ幼根に対し肥大作用をもつ化合物としては、すでに菰田らにより抗腫瘍物質メイトサンシが、植物に対する生物活性として報告している¹⁹²⁾。その発現の様子はリゾキシシと酷似していて特徴的である。メイトサンシは抗チューブリン活性を持つことから²⁰²⁾、リゾキシシの微小管蛋白への作用機作が示唆された。そこでアンサマイトシシ P-3、コルヒチン、ビンブラステチシをはじめとするいくつかの微小管重合阻害剤などのイネ幼根に対する影響を調べた。

アンサマイトシシ P-3 はリゾキシシと全く同じ幼根肥大作用を示した。コルヒチンは 100ppm で根の先端部が肥大するのが認められる。一方、ビンブラステチシ 100ppm は著しい根の伸長抑制を起こす、しかし根の肥大は認められない。このように微小管重合阻害剤のなかでも、イネの根に対する発現が異なった。従ってこの方法では、リゾキシシが微小管作用物質であることは示唆するものの、確定は出来なかった。

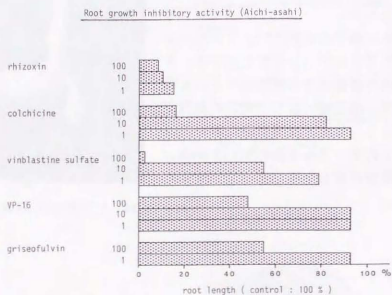


Fig. 1.66. 微小管重合阻害剤などのイネ幼根に対する影響

次にリゾキシシのイネの品種間差に対する影響を調べるため、日本種（10種）、外国種（8種）計18種のイネ種子を用いて、リゾキシシのイネに対する影響を検討した。日本種に対しては例外なく強い根先端部の肥大、根の伸長抑制の症状を引き起こした。しかし外国種では1品種を除き、低い作用効果しか観察されなかった。

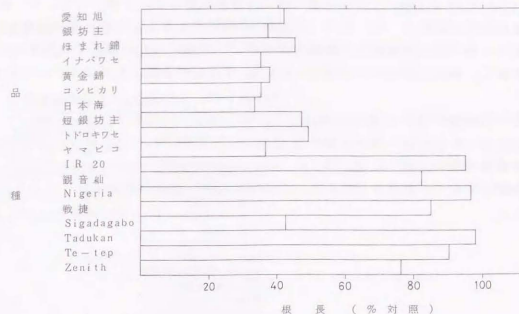


Fig. 1.67. イネ各品種間の根伸長に対するリゾキシシの影響
未処理苗を 100% としたときの各品種の根の長さ%表示 (1 μg/ml)

さらにイネ以外の植物の幼根に対するリゾキシシの影響についても調査した。その結果、多くの植物の根の伸長は抑制される。しかし根の肥大についてはキャベツ、ダイコンに弱い作用が認められるものの、他の植物には観察されず、リゾキシシの根の肥大作用はイネに特異的であることが判明した。

Table 1.14. イネ以外の植物の幼根に対するリゾキシシの影響
(根の伸長を抑制する濃度)

コムギ 1 μg/ml	ライムギ 0.01 μg/ml	キャベツ 1 μg/ml	レタス 0.1 μg/ml
ダイコン 1 μg/ml	ソルガム 1 μg/ml	オオムギ 1 μg/ml	エンドウ 1 μg/ml

[微生物に対する作用]

リゾキシンの微生物に対する作用を検討した。抗真菌作用はイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) ほか9種の植物病原糸状菌を用いて調べたところ、強い抗真菌作用を認めた。とくに *P. oryzae* に対するリゾキシンの作用は特的で、分生胞子の発芽管を顕微鏡下で観察するとき、1 ng/ml 以上の濃度で発芽管の伸長を抑制し、菌糸を縮らすいわゆる curling 作用を引き起こしているのが認められる。

一方、抗細菌作用は、*Xanthomonas campestris* pv *oryzae* ほか9種の植物病原細菌を用いて調べたが、10 μg/ml の濃度ですべてに効果は認められなかった。

Table 1. 15. Antifungal activity^{a)} of rhizoxin.

Organism	Concentration of rhizoxin (ng/ml)		
	10	1	0.1
<i>Alternaria kikuchiana</i>	+	+	-
<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	+	+	+
<i>Fusarium nivale</i>	+	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>lycopersici</i>	-	-	-
<i>Helminthosporium oryzae</i>	+	+	+
<i>Pyricularia oryzae</i>	+	+	+
<i>Pythium ophianderum</i>	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	+
<i>Rhizopus chinensis</i>	+	-	-
<i>Sclerotinia trifoliarum</i>	+	+	+

a) Mycelium growth inhibitory activity: +; inhibition, -; no inhibition.

[動物に対する作用]

ウニ卵による初期発生過程観察実験を行い、リゾキシンの作用機作について検討を行った。リゾキシンの微小管蛋白質系に作用するならば、受精直後のウニ卵にリゾキシンを処理したとき、卵からの核と精子からの核が融合せず、卵割が進行しない。受精5分後に10 ng/ml の濃度でリゾキシンを処理した細胞は、写真に示すように受精後134分後においても分裂を起こさない。さらに精子からきた核と卵の核が融合していないことから、リゾキシンはチューブリンまたは微小管系に作用することが判明した。対照としてのリゾキシン未処理の受精したウニ卵は卵割が進み、受精後72分後に2細胞胚に、受精後124分後には4細胞胚になる。ウニ卵の分裂を阻害する濃度では、リゾキシンによるDNA合成、RNA合成、蛋白質合成の阻害は認められない。

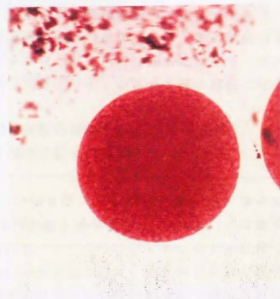


Fig. 1. 68. 受精5分後にリゾキシ処理した、ウニ卵細胞の受精後134分の光学顕微鏡写真。ラクトオルセイン染色。

[ウイルスに対する活性]

リゾキシンのウイルス (TMV) に対する活性は認められなかった。

[DNA polymerase (α・β) に対する活性]

リゾキシン 100 μg/ml の濃度で阻害を示さない。

[抗腫瘍活性]

リゾキシンはマウス白血病細胞 L5178Y に対して 7.8×10^{-4} μg/ml の濃度で80%増殖阻害を示した。さらにマウス腹水がん NH134 に対しても *in vitro*, *in vivo* の実験で高い効果を示すとともに、*in vitro* で1 μg/ml から0.0025 μg/ml の広い濃度範囲で細胞の肥大が観察されるなど、リゾキシンの抗腫瘍活性について調べられている²¹⁾。

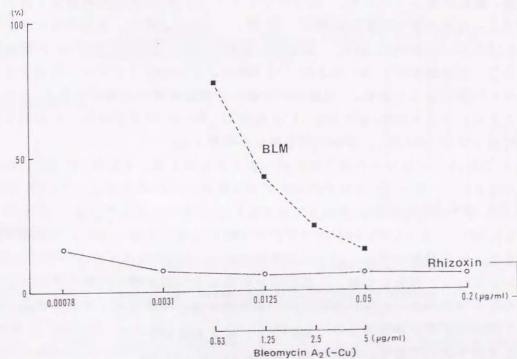


Fig. 1. 69. リゾキシンのマウス白血病細胞 L5178Y Cells 増殖阻害活性

第六節 リゾキシソ類縁体の単離・構造決定

リゾキシソの立体構造の解明と、生合成、構造活性相関などの知見を得るため、リゾキシソの類縁体化合物の検索を行った。ここでは *Rhizopus chinensis* の培養口液抽出物中に、TLC 上でリゾキシソの前後に硫酸発色でリゾキシソと類似のスポットが現れる。これを Rc-I、Rc-II と命名し構造について検討を行った結果を述べる。

30% acetone-benzene

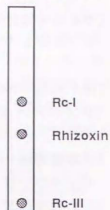


Fig. 1.70. リゾキシソと類縁体 TLC

[Rc-III の構造]

Rhizopus chinensis の培養口液抽出物中に、リゾキシソと類似の紫外吸収スペクトルをもつ化合物の存在が認められた。ジャーファメンター 275 L による培養、抽出の後シリカゲル、セファデックス LH-20 および逆相液体クロマトグラフィーにより無色粉末状物質の Rc-III、14 mg を得た。紫外吸収スペクトルはリゾキシソと同様に 297($\epsilon=25100$), 308(31300), 323(23,800)nm に強い吸収を示し、側鎖部分の ^1H -および ^{13}C NMR のシグナルがリゾキシソの化学シフトと良く一致することから、側鎖部分と同一の構造を持つと結論できる。マスマスペクトロメトリーでは m/z 643 (M^+) を与え、Rc-III はリゾキシソに水が 1 分子分付加した $\text{C}_{35}\text{H}_{49}\text{NO}_{10}$ の分子式を持つと推定した。

^1H NMR はリゾキシソと良く似たスペクトルを与える。 δ 5.96 の H-11 のシグナルは δ 6.12 の H-10 のシグナルとスピン結合していると共に、 δ 4.23 に現れる H-9 の水酸基の根元のプロトンとアールカップリングしている。さらに H-8 (δ 1.93)、H-7 (δ 4.20) のシグナルと続くことがデカップリング実験で説明できる。以下同様にデカップリング実験を行い、Rc-III はリゾキシソの 11, 12 位のエポキシドの開裂した後、二重結合が転移し 9 位に水酸基が導入された 1, 0 のようなトリアルコール体の構造を持つと推定した。やはりリゾキシソとよく似た

^{13}C NMR のシグナルも以上の推定構造を説明できる。さらに Rc-III をアセチル化すると、質量分析で m/z 769 (M^+) のトリアセテート体が得られることからこの結果を支持する。

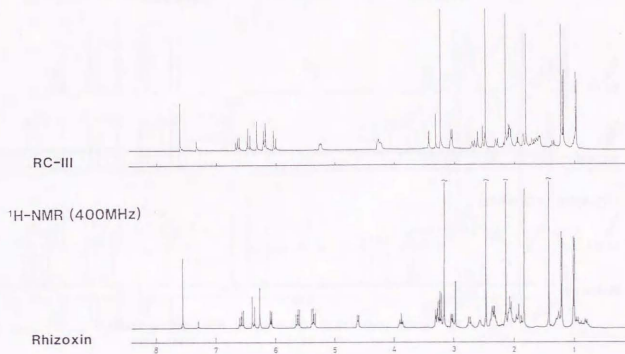
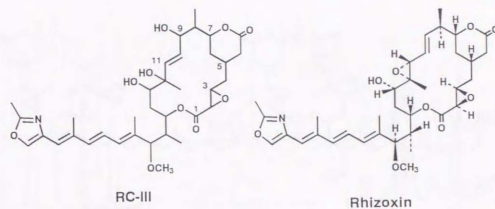
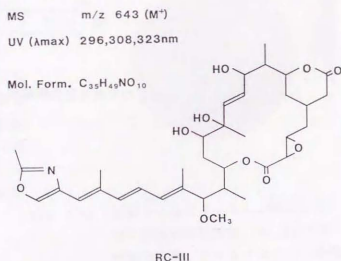


Fig. 1.71. Rc-III とリゾキシソの ^1H NMR (CDCl_3 , 400MHz)

Table 1.16. ^1H NMR data of Rc-III in CDCl_3 (400MHz)

Proton	Chemical Shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)	Proton	Chemical Shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)
H-2	3.28	d 2	H-13	3.01	dd 10, 1
H-3	3.03	ddd 2, 2, 10	H-14	1.70	ddd 13, 1, 1
H-4	0.98	ddd 14, 10	H-15	1.60	ddd 13, 10, 10
	2.28	ddd 14, 2	H-16	5.21	ddd 10, 5, 1
H-5	2.08	m	H-16	2.05	m 7, 9, 5
H-5a	2.05	dd	H-16a	0.97	d 7
	2.64	dd	H-17	3.39	d 9
H-6	1.34	ddd	H-OCH ₃	3.20	s
	2.10	ddd	H-18a	1.80	s
H-7	4.20	ddd 6	H-19	6.13	d 11
H-8	1.93	m 6, 7, 6	H-20	6.58	dd 15, 11
H-8a	1.18	d 7	H-21	6.38	d 15
H-9	4.23	dd 6, 4	H-22a	2.13	s
H-10	6.13	dd 4, 16	H-23	6.26	s
H-11	5.96	d 16	H-25	7.53	s
H-12a	1.22	s	H-26a	2.46	s

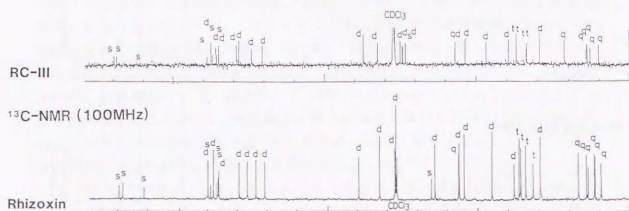
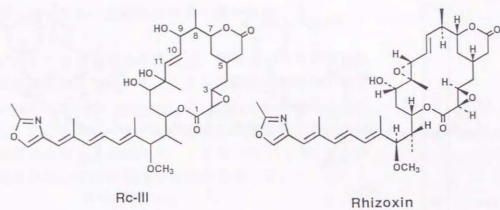


Fig. 1.72. Rc-III とリゾキシンの ^{13}C (^1H) NMR (CDCl_3 , 100MHz)

Table 1.17. ^{13}C NMR data of Rc-III in CDCl_3 (100MHz)

Carbon	Chemical Shift	Multiplicity	Carbon	Chemical Shift	Multiplicity
C-1	168.8	s	C-15	74.2	d
C-2	53.4	d	C-16	39.5	d
C-3	56.7	d	C-16a	10.1	q
C-4	37.0	t	C-17	87.1	d
C-5	29.3	d	17-OCH ₃	56.8	q
C-5a	37.0	t	C-18	135.5	s
C-5b	169.7	s	C-18a	12.9	q
C-6	33.9	t	C-19	129.1	d
C-7	82.4	d	C-20	124.1	d
C-8	46.7	d	C-21	137.4	d
C-8a	13.8	q	C-22	137.0	s
C-9	73.1	d	C-22a	14.4	q
C-10	134.9	d	C-23	120.1	d
C-11	128.2	d	C-24	138.7	s
C-12	74.1	s	C-25	135.9	d
C-12a	14.1	q	C-26	160.9	s
C-13	74.9	d	C-26a	13.8	q
C-14	33.6	t			

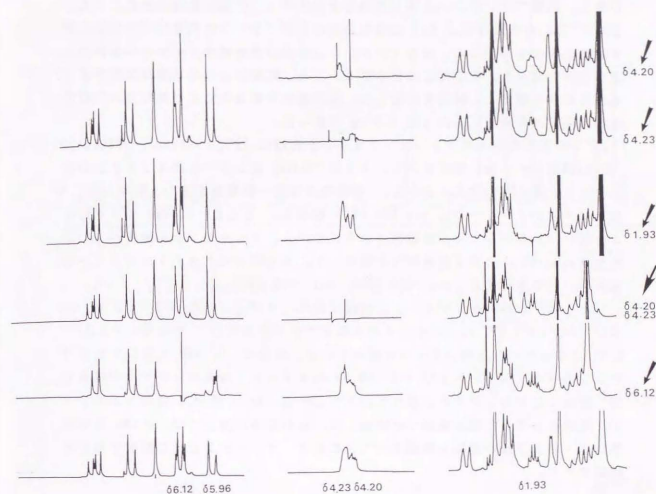


Fig. 1.73. Rc-III の ^1H NMR decoupling 実験 (δ 4.20: H-7, δ 4.23: H-9, δ 1.93: H-8, δ 6.12: H-10, δ 5.96: H-11)

[Rc-1 の構造]

R. chinensis の培養液抽出物中に、TLC 上でリゾキシシより高い R_F 値の位置に、硫酸でリゾキシシと同じ発色をするスポットの存在が確認されていた。さらに TLC かき取りにより、この化合物にもリゾキシシと同様にイネ幼根に対する肥大作用を持つこと、またリゾキシシと類似の紫外吸収スペクトルを持つことが明らかとなった。そこでこの化合物 Rc-1 を、数度にわたる培養抽出物をまとめたものから単離し、構造を決定した。生産量は培養条件により異なるが初期の培養方法では培地 1L あたり約 0.5 mg であった。

Rc-1 の紫外吸収スペクトルはリゾキシシと同様に 297(ε=46000), 308(64400), 323(46300)nm に強い吸収を示し、さらに ¹H NMR のシグナルがリゾキシシの化学シフトと良く一致することから、側鎖部分は同一の構造を持つと推定した。マススペクトロメトリーでは m/z 609 (M⁺) を与え、さらに ¹³C NMR でリゾキシシと同じ 35 本のシグナルが観測されることから、リゾキシシから酸素が 1 つとれた C₁₉H₁₉NO₁ の分子式を持つと推定した。高分解マススペクトロメトリーの結果もこれを支持する (obs.=609.3300, cal.=609.3299)。

Rc-1 の ¹H NMR をリゾキシシと比較すると、リゾキシシの H-2 (δ 2.96) および H-3 (δ 3.27) のエポキシド由来のシグナルが消失し、代わりに δ 5.61, 6.82 にオレフィン上のシグナルが現れている。同様に ¹³C NMR においてもリゾキシシの C-2 (54.3) および C-3 (56.0) のエポキシド由来のシグナルが消失し、SP³ 領域に 2 本のシグナルが現れていることから、Rc-1 は 2,3 位のエポキシドが二重結合となった構造を持つと結論した。なお立体に関しては ¹H NMR での化学シフトおよび結合定数を解析することにより、リゾキシシと同じ配置であると推論できる。

Table 1.18. ¹H NMR data of Rc-1 in CDCl₃ (400MHz)

Proton	Chemical Shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)	Proton	Chemical Shift	Multiplicity and coupling constant (Hz)
H-2	5.69	d 16	H-13	3.07	dd 10
H-3	6.82	ddd 5.5, 11	H-14	1.81	ddd
H-4	1.80	ddd 5.5	H-15	2.10	ddd 10
	2.56	ddd 11	H-15	4.61	ddd 10, 3
H-5	1.80	m	H-16	2.40	m 3, 7, 9
H-5a	2.78	dd 10, 5, 2	H-16a	1.00	d 7
	2.10	dd 18	H-17	3.25	d 9
H-6	0.72	ddd 12, 14, 12,	H-OCH ₃	3.15	s
	1.98	ddd 14, 3, 2	H-18a	1.84	s
H-7	3.75	ddd 12, 3, 10	H-19	6.09	d 11
H-8	2.32	m 10, 5.5, 10	H-20	6.59	dd 11, 15
H-8a	1.19	d 6.5	H-21	6.37	d 15
H-9	5.56	dd 10, 15.5	H-22a	2.34	s
H-10	5.34	dd 15.5, 9.5	H-23	6.25	s
H-11	3.24	d 9.5	H-25	7.54	s
H-12a	1.42	s	H-26a	2.46	s

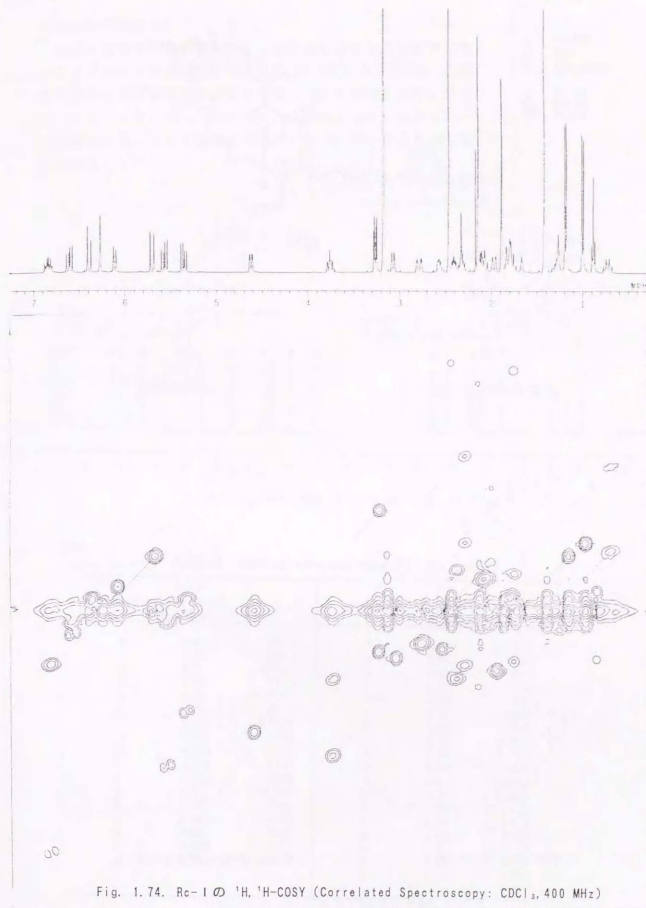
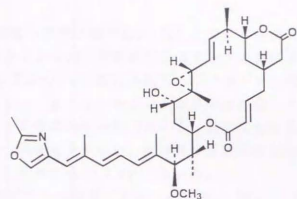


Fig. 1.74. Rc-1 の ¹H-¹H-COSY (Correlated Spectroscopy: CDCI₃, 400 MHz)



Rc-I

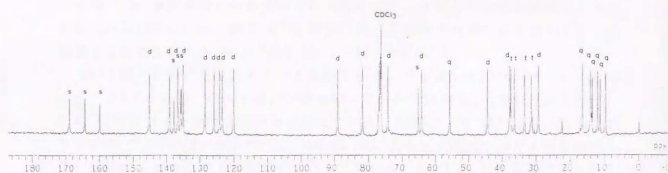


Fig. 1.75. Rc-I の ^{13}C (^1H) NMR (CDCl_3 , 100MHz)

Table 1.19. ^{13}C NMR data of Rc-I in CDCl_3 (100MHz)

Carbon	Chemical Shift	Multiplicity	Carbon	Chemical Shift	Multiplicity
C-1	164.5	s	C-15	74.4	d
C-2	124.2	d	C-16	38.1	d
C-3	145.4	d	C-16a	9.8	q
C-4	37.7	t	C-17	89.2	d
C-5	29.5	d	C-17a	55.9	q
C-5a	36.6	t	C-18	135.9	s
C-5b	169.1	s	C-18a	11.4	q
C-6	33.6	t	C-19	128.7	d
C-7	81.9	d	C-20	123.4	d
C-8	44.7	d	C-21	136.9	d
C-8a	16.5	q	C-22	136.1	s
C-9	139.3	d	C-22a	14.2	q
C-10	125.0	d	C-23	120.1	d
C-11	64.4	d	C-24	138.1	s
C-12	65.3	s	C-25	135.4	d
C-12a	12.1	q	C-26	160.1	s
C-13	76.5	d	C-26a	13.7	q
C-14	31.7	t			

[その他の類縁体]

さらに培養条件を改善し、タンク培養した振とう培養抽出物からリゾキシンの前駆体と考えられる、2,3 および 11,12 位のエポキシドが共に二重結合になった Rc-VII が得られた。加えて、リゾキシンの 17 位のメトキシ基がそれぞれ水酸基となっている類縁体 Rc-IX、Rc-VIII、Rc-VI を単離し構造を決定した²²⁾。

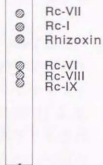
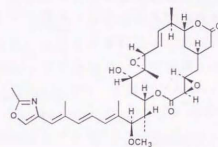
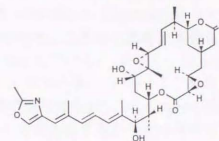


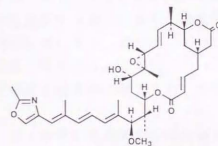
Fig. 1.76. TLC 模式図 (benzene-acetone 系)



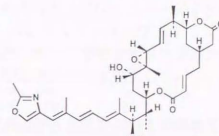
Rhizoxin



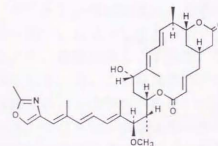
Rc-IX(Rm-A-3-1)



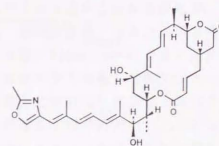
Rc-I



Rc-VIII(Rm-A-2-1)



Rc-VII(Rm-U-4)



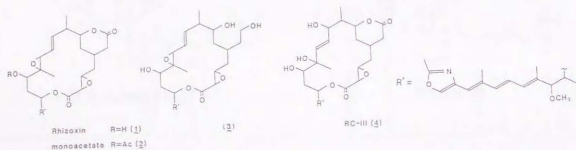
Rc-VI(Rm-A-2-2)

Fig. 1.77. リゾキシン類縁化合物

第七節 リゾキシシ誘導体および関連化合物の生物活性

ここでは、リゾキシシ誘導体および関連化合物の生物活性を、イネの根およびイネいもち病菌分生胞子の発芽管伸長に対する影響について簡単に触れておく。

リゾキシシの 13 位がアセチル化したモノアセテートは、リゾキシシに比べほぼ 1/10 の活性の低下が認められた。一方、リゾキシシを NaBH₄ 処理して得られるトリアルコール体は活性が著しく低下する。さらに、Rc-III の活性は認められない。一方、エポキシドが二重結合になっている Rc-I、Rc-VII の活性はリゾキシシと同程度であることから、リゾキシシの構造活性相関を考えると、2,3 および 9,10 と 11,12 のエポキシド・二重結合は必須であると共に、6 員ラク톤環の存在も必要とすることが明白である。



Compound	Concentration				
	0.001	0.01	0.1	1	10 µg/ml
1	86.6	92.4	28.5	13.7	8.4
2	104.1	92.4	97.4	94.8	44.8
3	103.8	100.9	101.7	107.0	74.1 %

(control : 100 %)

Table 1.20. イネ(愛知種)の根伸長に対するリゾキシシ及び誘導体の影響

Compound	Concentration				
	0	0.001	0.01	0.1	1 10 µg/ml
1	-	+	+	++	++
2	-	-	+	++	++
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-

Table 1.21. イネいもち病菌分生胞子の発芽管伸長に対するリゾキシシ及び誘導体の影響

第八節 要約および考察

- 1) 活性物質リゾキシシは、側鎖にオキサゾール環を持つ新規 1,6 環ラクトン化合物であると構造決定した。
- 2) リゾキシシは 1,3 の酢酸ユニット、1 つのセリンおよび 6 個のメチオニンメチルから生成されていることを証明した。
- 3) リゾキシシはチューブリンまたは微小管系に作用することを明らかにした。

リゾキシシ生産菌である *Rhizopus chinensis* は接合菌類(ケカビ類)に属し、*Mucor*(ケカビ)、*Zygorhynchus*(ツガイケカビ)、*Rhizopus*(クモノスカビ)などが含まれる。このなかで *Rhizopus* は、工業的に生産する微生物酵素の一つであるリパーゼの生産菌として良く知られている。さらに *Rhizopus chinensis* は、中国でアルコール醗酵に用いられている、いわゆる“酒餅”や“Chinese yeast”と呼ばれる雑菌の中の主要な菌である²³⁾。アルコール醗酵に利用されている *R. chinensis* にリゾキシシ生産能を有するか否かは非常に興味を持たれる。この問題は次章において検討した。

近年の構造研究における超伝導 FT-NMR の役割は非常に大きいものがある。分解能が向上し、各シグナルが分離して観測されるようになって、分解反応や誘導体に依存する割合が減り、構造解析が容易に行えるようになった。リゾキシシの場合においても、最初は 100 MHz、次に 270 MHz そして 400 MHz というように測定が行われた。日本電子の 400 MHz NMR (FX-400) 1 号機が東京大学応用微生物研究所研究所に導入され、測定操作を行なったことも研究を推進した。

抗生物質の基礎研究や応用研究の発展のためには、生産量の向上が課題である。ペニシリンの実用化のために Florey らは、当初液体静置培養法で得ていたペニシリンを、菌株の選別・変異やタンク培養等のような培養条件の改善を行うことにより大量に入手することに成功した。こうしてペニシリンの生産力は飛躍的に増大し、人類に計り知れない恩恵をもたらすことになった。

リゾキシシの生産量は、初期の実験ではペニシリンと同じ液体静置培養で行われ、約 1.5 µg/ml であったが、菌株の選択、培地の改良、培養方法の改善などにより、現在は振とう培養法、静置培養法と共に 150 µg/ml 以上まで生産量は向上している。この経過については、生合成実験の中で培地・培養方法がいつも検討され、その時の一番良いとされる方法を用いて実験していることに示されている。リゾキシシ構造活性相関研究、耐性菌の遺伝子解析研究そして抗ガン活性研究などを支えているのが、培養条件等の改善によるリゾキシシの安定供給を可能とした基礎研究であることは言うまでもない。

R. chinensis の場合、培養後期になるとリゾキシンの量が低下する (Fig. 1.57.)。それを防ぐために、リゾキシンをトラップする目的でダイヤイオン HP-20 を添加して培養したところ、含有量が低下することなくリゾキシンを得ることが出来るようになった (Fig. 1.78.)。この方法は他の微生物代謝産物の培養にも応用できると考えられる。事実ダイネミシン A の生合成研究では、この方法を用いて生産量の向上を行い成功している^{2,4)}。

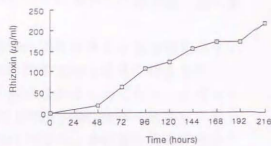


Fig. 1.78. リゾキシシン生産経時変化

有馬らは、立山山麓の土壌より分離した *Rhizopus chinensis* MP-816 株が生産する抗カビ抗生物質リゾプテン ($C_{24}H_{40}NO_{10}$; M.W. 631) の製造法について、特許公報のなかで述べている^{2,5)}。記載されている赤外吸収スペクトルと紫外吸収スペクトルから、この化合物はリゾキシシンもしくは類縁のものと考えられるが、しかし構造決定についての報告は今までに全くなされてない。リゾプテンがリゾキシシンと同一物質であるかどうか確認を試みたが、リゾプテンの標品が入手不能であった。そこで生産菌 *R. chinensis* MP-816 の分譲を受け、Rh-2 菌と比較培養することによりリゾプテンとリゾキシシンの同定を試みた。その結果、シャーレによる静置培養においても、また特許記載培地による振とう培養でも両菌株はリゾキシシンを生産することが判明した。従って、リゾプテンはリゾキシシンと同一物質であると結論した。

微小管蛋白作用物質は現在までに数多く報告されている。植物成分からコルヒチン、ビンブラスチンをはじめ、最近注目されているタキソールなど多くの化合物が報告されている。海洋生物からドラスタチン類が、また放線菌からはアンサマイトシン P-3 が発表されている。糸状菌 (カビ) からの微小管蛋白作用化合物は、リゾキシシンのほかにグリセオフルビン、フォモプシン A として最近構造決定されたウスティロキシシン A がある。これら化合物の詳細については第二章にて述べたい。

第二章 菌糸の形態異常によるスクリーニングとフザリエリン A の構造研究

第一節 序

微小管は、 α および β チューブリンのヘテロダイマー (分子量 10 万) を基本構造とする重合体である。微小管はすべての真核生物に存在し、染色体の有糸分裂装置、細胞骨格、細胞運動装置などその機能は多彩である¹⁾。

微小管の機能を阻害する薬剤は、コルヒチン²⁾、ビンブラスチン³⁾をはじめとして植物成分を中心に多数報告されており⁴⁾、そのほとんどがチューブリンに結合し重合を阻害する。タキソールは、これらとは逆にチューブリンの重合を促進する特異な作用を持ち、微小管構造を安定化させることにより微小管の機能を阻害する化合物である⁵⁾。

イネ幼根肥大などの特徴的な病徴を引き起こす、リゾプスイネ苗立枯病の毒素リゾキシシンは、動物・植物・糸状菌などに強い生育阻害活性を示し、微小管蛋白を標的とする有糸分裂阻害剤であることは、第一章で既に述べた通りである。

有糸分裂阻害剤は、医薬あるいは農業として応用の立場から、多くの誘導体・合成剤を含む関連化合物が検討されており、制がん剤、抗真菌剤、駆虫薬、除草剤、園芸試薬として広く用いられている。一方、新しい生理活性物質の発見は新規化学療法剤としての開発に貢献し、その検査は重要である。

微小管重合阻害活性は、通常、動物の脳より精製した微小管蛋白を用いて濁度法⁶⁾によりその活性を計測する。しかしながらこの方法を一次スクリーニングとして利用することは、蛋白の大量精製、夾雑物によるデータの変動などにより困難である。

ところでリゾキシシンのイネいもち病菌 *Pyricularia oryzae* P-2b に対する作用は特効的で、顕微鏡下で分生胞子の発芽管を観察するとき、1 ng/ml 以上の濃度で発芽管の伸長を抑制し、菌糸を縮らすいわゆる curling 作用を引き起こすことを既に述べた (第一章第五節)。著者はこの現象に着目し、この発芽管形態異常を指標としたスクリーニング法が、微小管機能阻害化合物の検索方法として実用可能か検討を行った。

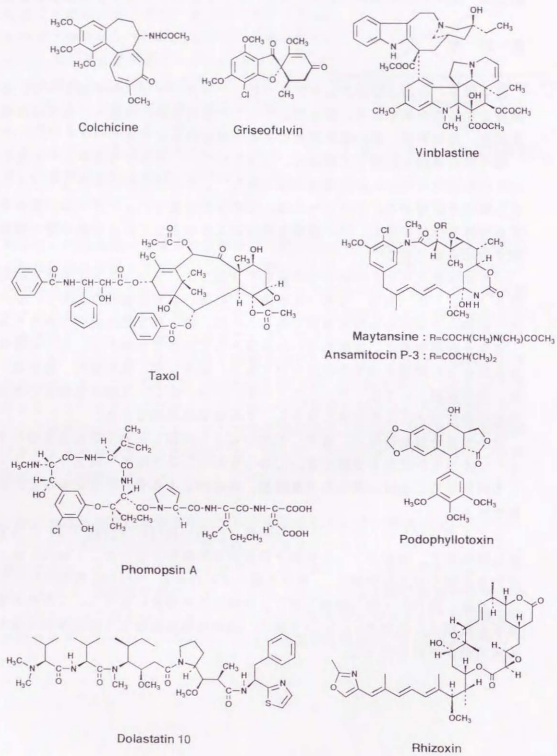


Fig. 2.1. 代表的な微小管機能阻害物質

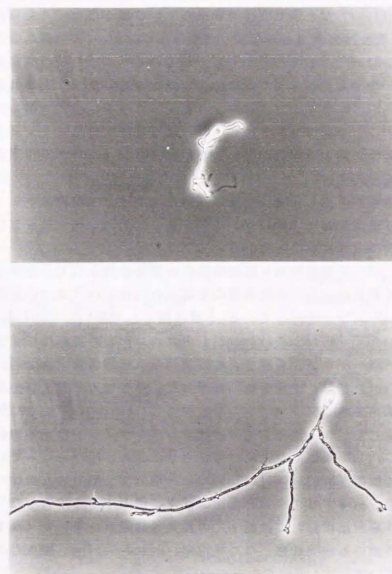


Fig. 2.2. リゾキシンの *Pyricularia oryzae* P-2b に対する作用 (顕微鏡写真)
 上 : リゾキシ 0.1 μg/ml
 下 : コントロール

抗生物質や合成抗菌剤による、糸状菌菌糸に対する菌糸の屈曲 (curling)・膨張化 (swelling) など形態変化を観察している報告例は多く見られる⁷⁾。例えば、微小管重合阻害剤でもあるグリセオフルビンが、真菌菌糸の先端を曲げる "curling factor" として古くから知られている⁸⁾。また、合成有糸分裂阻害剤であるベノミルやカルペンダジムによる菌糸先端部の肥大などの異常が報告されている⁹⁾。さらに、アクチンに作用するサイトカラシン類にも菌糸にビーズ様の肥大を起こすことの報告もある¹⁰⁾。このように細胞骨格系タンパクに作用する物質に形態異常に関する報告が多いことは、スクリーニング系の選択性から考えるとき特徴的である。

一方、磯野らが発見した抗生物質ポリオキシンは、細胞壁のキチン合成酵素の阻害剤であり菌糸先端に swelling を引き起こす¹¹⁾。細胞壁合成阻害剤であるテタインも同様な作用を持っている。

別府らは¹²⁾、低毒性抗カビ抗生物質の検索を目的として、①カビ細胞壁合成阻害による形態異常、②二形性真菌の形態変化阻止という2つの形態観察を指標としたスクリーニングを行っている。被検菌として用いた *Candida albicans*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus chinensis* のコロニーの外周部にサンプルをしみこせたペーパーディスクを置き、被検菌菌糸に形態異常 (spherical swelling, hyphal curling) を起こす化合物の検索した。そしてカビおよび分裂酵母に形態異常を起こす化合物レプトマイシンを放線菌 *Streptomyces* sp. AT51287 より単離・構造決定した¹³⁾。現在までの研究でレプトマイシンは正常繊維芽細胞 3 Y 1 の増殖を G₁、G₂ 両期で可逆的に停止させることが明らかとなっている¹⁴⁾。

貫名は、被検菌 *Cochliobolus lunatus* を用いて、別府らと同様の方法で、菌糸の異常形態を誘導する化合物を菌類の代謝産物の中から検索した¹⁵⁾。

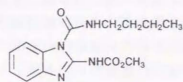
糸状菌以外を対象にした顕微鏡下での異常形態観察を用いたスクリーニング系は、これらの他にも培養細胞、ウニ受精卵、Brine Shrimp、線虫などを用いた例が報告されている。

清遠らは、P388 の細胞肥大を指標とした1次選別スクリーニングを行い、さらにマウス骨髄細胞に対する細胞毒性が癌細胞より低いものを2次スクリーニング系として 13 万株の微生物培養サンプルより、WS-6049 (エスペラミシン)、WF-1360 (リゾキシシン) などを単離することに成功している¹⁶⁾。

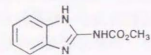
伏谷らは、イトマキヒトデおよびバフンウニの受精卵の発生を観察することにより、海綿成分からカリュキリンを単離した¹⁷⁾。

小林らは、ウニ胚の形態変化を指標とした細胞分裂阻害物質の検索を行い、レゾルシノール類縁体を有糸分裂阻害活性物質として微生物より単離している¹⁸⁾。

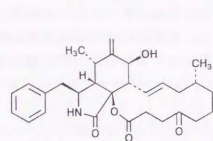
他にも *Caenorhabditis elegans*^{19, 20)}、マツノザイセンチュウ²¹⁾ を用いた生理活性物質の探索が行われている。



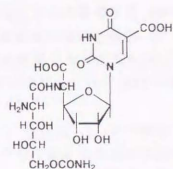
benomyl



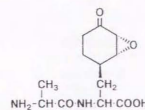
carbendazim



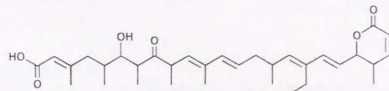
cytochalasin A



Polyoxin D



Tetaïn (Bacilysin)



Leptomycin B

Fig. 2.3. 菌糸に形態異常作用を示す化合物

以上示した多数の報告例があるにもかかわらず、著者が *Pyricularia oryzae* P-2b の分生胞子の発芽管の形態異常を指標としたスクリーニングを行う理由は、この方法が、高感受性、迅速、安価、再現性が良くそして実用的であると判断した為である。すなわち、ペーパーディスクを用いる別府、實名らが行っている方法に比べ、96穴マイクロプレートを用いるこの方法は、試薬濃度の調製や、胞子が比較的大きく特徴的なため容易に活性の判定を行える点で特に優れている。

一方、対象を微生物の中でも糸状菌の代謝産物に的を絞った理由は、以下の3点にまとめられる。




- 1) 天然由来の微小管機能阻害化合物のほとんどが、植物、海洋動物または糸状菌というように真核生物由来であること
- 2) ごく普通の糸状菌がリゾキシンを生産していたという事実
- 3) 抗原核細胞物質は原核生物から、抗真核細胞物質は真核生物が生産する
 という考えのもと、新規化合物の検索と共に既知物質の再評価につながることを期待した。

この章では、*P. oryzae* を用いたスクリーニング系を確立し、糸状菌(カビ)の代謝産物の中から微小管作用物質などの形態異常を起こす物質の検索を行い、新規抗カビ抗生物質フザリエリンAの単離と構造決定を行った。

第二節 菌糸の形態異常を指標にしたスクリーニング方法の確立

標題のスクリーニング方法は、*P. oryzae* 胞子液を 96 穴マイクロプレートに各 50 μ l 分注し、ここにサンプル溶液 50 μ l を加えプレート内で倍々希釈したのち 27 °C で 16 時間培養後、胞子より発芽した菌糸の形状を、倒立顕微鏡にて観察し判定する方法を用いた。

[判定基準]

菌糸の形態異常を数値化することは困難である。そこで判定結果は以下のように記載した。形態異常活性がある場合は(+)で表示し、菌糸の伸長の状態と併せて3段階に分けた(+++: , ++: , +: )。その中で swelling が明かな場合には(SWL(またはS))とした。発芽が認められない場合には(x)、菌糸の伸長抑制が認められる場合には(Δ)、全ての活性を示さない場合には(-)で表示した。両方の状態が認められる場合には併記し、特に微妙な形状の変化は注記した。

[*P. oryzae* に対する溶剤の影響]

薬剤を溶解時に使用する有機溶媒の影響について検討した。

6種の溶媒を用いてその5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%の濃度での影響を観察した。その結果、アセトニトリル、アセトンの影響が少ないことが判明した。以後、非水溶性の物質の検定時には5%以下のアセトニトリルあるいは2.5%以下のアセトンを用いた。

Table 2.1. *P. oryzae* に対する溶媒の影響

solvent	5	2.5	1.25	0.62(%)
acetone	Δ	-	-	-
DMSO	X	Δ	Δ	-
DMF	X	Δ	Δ	-
EtOH	Δ	-	-	-
MeOH	Δ	-	-	-
CH ₃ CN	-	-	-	-

[各種薬剤による検定法の評価]

検定法の評価のために既知の抗真菌剤のなかで、微小管機能阻害物質、細胞膜障害物質、蛋白合成阻害物質、ヌクレオチド・核酸の生合成阻害物質などを用いて検討を行った。その結果、リゾキシリン、アンサマイトシン P-3、グリセオフルピンでは明瞭な curling を示した。特にリゾキシリン、アンサマイトシン P-3 の高濃度領域では、胞子は発芽するが伸長せず短いままで菌糸が太くねじれている。これらの化合物による curling は低濃度領域まで続いており特徴的である。さらにチアベンダゾール、ノコダゾールなどの合成系分裂阻害剤でも curling を示した。コルヒチン、ビンブラスチンでは curling は観察されるものの、発

現は弱く確認するには多少の困難が伴う。一方、細胞膜に作用するアンフォテリシンB、ミコナゾールでは発芽管の成長が著しく抑制するが curling などの形態異常は認められない。蛋白合成阻害作用のカスガマイシンとサイクロヘキシミド、核酸合成阻害の5-フルオロシトシンも同様である。VP16-213では分岐が多い異常が観察された。

以上の結果から、このスクリーニング系を使うことにより微小管機能阻害物質検索が可能であると判断した。

Table 2.2. 各種化合物による *P. oryzae* の形態異常発現

substance	curling	hyphal growth inhibitory activity		
		50 µg/ml	5 µg/ml	0.5 µg/ml
rhizoxin	+	+	+	+
ansamitocin P-3	+	+	+	+
griseofulvin	+	-	-	-
vinblastine sulfate	±	-	-	-
vincristine sulfate	±	-	-	-
colchicine	±	-	-	-
thiabendazole	+	+	-	-
nocodazole	+	+	+	-
VP16-213	±	-	-	-
taxol	±	-	-	-
amphotericin B	-	+	+	+
econazole	-	+	+	-
kasugamycin	-	+	+	-
cycloheximide	-	+	+	+
5-fluorocytosine	-	+	+	-

第三節 研究保存機関の接合菌類ケカビ目既同定株を対象とした検索

Rhizopus などのケカビ類はさまざまな食品上などに生育しているのが、しばしば肉眼でも観察される。古くなった米飯、腐りかけの野菜やイモ、イチゴやモモなどの果実にはえている白色～灰色の綿状のカビはケカビ類であることが多い。

R. chinensis がリゾキシンを生産していたこと、保存機関での保有量が比較的多いことから、*Rhizopus*、*Mucor* 属を中心とした接合菌類ケカビ目計45菌株を日本と中国の研究保存機関から入手し、その培養液を本スクリーニング法で検討した。

Table 2.3. 研究保存機関の既同定株（接合菌類ケカビ目）を対象とした検索

菌名	菌株数(機関:数)	活性を示した株数
<i>Rhizopus arrhizus</i>	3 (農環研 2, 岩手農試 1)	0
<i>Rhizopus chinensis</i>	28 (IAM 東大応微研 2) (HUT 広島大工 1) (AHU 北大農 3) (IFO 発酵研 1) (AS 中国科学院 10) (新潟農試 7) (福島農試 3) (岩手農試 1)	0 0 0 0 0 6 1 0
<i>Rhizopus javanicus</i>	1 (岩手農試)	0
<i>Rhizopus oryzae</i>	2 (農環研 1, 岩手農試 1)	0
<i>Rhizopus stolonifer</i>	1 (岩手農試)	0
<i>Rhizopus</i> sp.	1 (新潟農試)	0
<i>Mucor flavus</i>	1 (IAM)	0
<i>Mucor globosus</i>	1 (IAM)	0
<i>Mucor hiemalis</i>	1 (IAM)	0
<i>Mucor javanicus</i>	2 (IAM)	0
<i>Mucor spinescens</i>	1 (IAM)	0
<i>Absidia glauca</i>	1 (IAM)	0
<i>Cunninghamella echinulate</i>	1 (IAM)	0
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	1 (IAM)	0

合計 45菌株

7菌株

その結果、新潟農業試験場の6株および福島農業試験場1株の計7株の *R. chinensis* の静置培養液、振とう培養液共に形態異常が認められた。これらの株の培養抽出物を HPLC で分析したところ、7株全てがリゾキシンを生産していることが判明した。この7株は全てリゾプス苗立枯病罹病苗から単離した菌株であった。

一方、中国酒の醸造に用いられている、いわゆる“Chinese Yeast”由来の *Rhizopus chinensis* には活性が認められなかった。

同じ菌株でありながら、リゾキシンを産生に差が出る理由は何に起因するのか。中国の長い歴史の中で毒性を持たない変異株を選択した結果なのか、あるいは継代培養を続けるときに経験する抗生物質生産菌の非産生現象なのか、いずれにしても二次代謝産物の生産制御を考えると非常に興味ある問題が示された。

第四節 土壌より分離した糸状菌を対象とした検索

前節でスクリーニング系の機能が確認できたため、次に各地土壌より分離した糸状菌 1000 株の培養口液について検討を行った。形態変化を示した株をさらに培養して、活性物質を単離し構造及び活性について調べた。

[糸状菌の分離]

糸状菌の分離方法には、以下の方法の組合せが用いられている。

① 試料中に存在する菌類をできるだけ多種類分離する方法として

希釈法：*Penicillium*、*Trichoderma* など土壌中に多い菌が出やすい。

アルコール処理、熱処理などを併用することもある。

② 特定の性質を持つ菌類を選択分離する方法として

ポジティブセレクション：特定の菌が利用しえる物質を培地中に加える。

ネガティブセレクション：殺菌作用物質を加え、それに耐性の菌を得る。

クレオソート（殺菌剤）、アクテジオン（抗カビ抗生物質）などを加え、

抗菌スペクトルを利用して *Arachniotus*、*Gymnoascus* などを得る。

などの方法が用いられる。

一方、細菌類の抑制には以下のような、培地の pH の調整や抗菌剤を用いる方法などがよく利用されている。

① 培地の pH 3.5～4.2：一部生育しにくくなる菌がある。

② ローズベンガルの添加：30～100 $\mu\text{g/ml}$ 、熱に安定。

③ ローズベンガルとストレプトマイシンの併用：糸状菌のコロニー小さく効果的。

④ クロラムフェニコール：オートクレーブ可。100 $\mu\text{g/ml}$ で使用。

菌を培地上にて生育し、捨うための物理的かつ具体的な方法は、

① 希釈平板法： $10^3 \sim 10^4$ 希釈。胞子由来の菌がよく出現する。

② 土壌平板法：土壌中で菌糸状態の菌や、土壌粒子、土壌中の植物片中に生息している菌が分離できる。5～15 mg の土壌をペトリ皿に撒く。一般に単離が難しい。MA med. (Malt extract agar)、 $10 \sim 15^\circ\text{C}$ で培養する方法が良い。

③ 菌糸分離法：土壌粒子中の菌糸を、粒子の重さを利用して選り取る方法。水で洗って沈む粒子中の菌糸を実体顕微鏡にて取り出す。*Rhizoctonia* やある種の担子菌に有効。

著者はクロラムフェニコールを細菌抑制剤として、希釈平板法、土壌平板法を用いて約 3000 株の糸状菌を採取した。以下に形態以上活性を示した菌の代謝産物について記載する。

[K27 株]

この菌のPD培地による液体静置培養の培養口液は顕微鏡写真に示すように、*P. oryzae* の菌糸にビーズ状の形態異常を引き起こす。この活性物質本体を抽出・単離精製し ^1H NMR、 ^{13}C NMR IR、UV、MS のスペクトルを総合した結果、この化合物はサイトカラシン類のケトグロボシンA (cheatoglobosin A)²²⁾ と判断した。さらに標品との比較から同定を行った。

この物質は 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で *P. oryzae* 胞子発芽管にビーズ状の活性を引き起こし特徴的である。この様な活性発現はこれまで検討した既知化合物では見られていない。

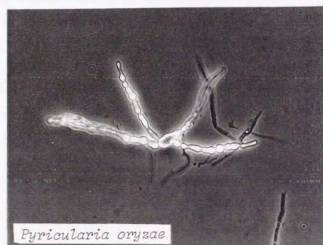


Fig. 2.4. ケトグロボシンA の *P. oryzae* に対する形態異常発現

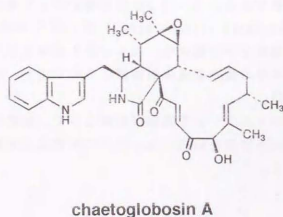
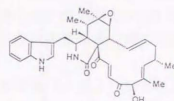


Fig. 2.5. ケトグロボシンAの構造



cheatoglobosin A

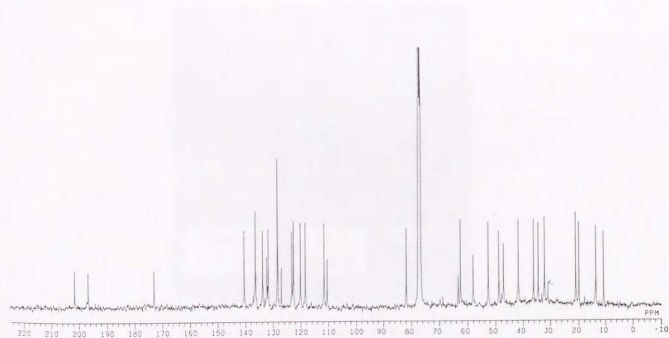
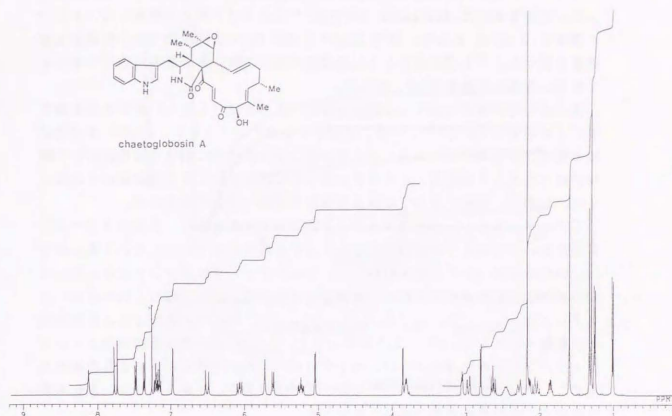


Fig. 2.6. ケトグロボシンAの ^1H NMR (400MHz), ^{13}C NMR (100MHz)

次にケトグロブリンAの微小管重合阻害活性およびイネに対する活性試験を行った。微小管蛋白は Shelanski らの方法²³⁾によりブタ脳より精製した。タンパク濃度を 2 mg/ml として、37°C における 400 nm での濁度法で微小管重合阻害活性を調べた。ケトグロブリンAは高濃度において弱い重合阻害活性を示すのみであり、佐藤らの結果²⁴⁾と一致した。

實名は一部のサイトカラシン系化合物がイネの芽に対し著しい屈曲を引き起こすことを報告している²⁵⁾。一方、リゾキシジンやアンサマイトシン P-3 がイネ幼根の肥大作用を持つことから、ケトグロブリンAのイネに対する活性について興味を持たれた。その結果、イネの芽に対しては屈曲を起こす作用は認められなかった。しかし、幼根に対しては伸長阻害活性を持つことが示された。

マイクロフィラメントに作用するサイトカラシン系化合物が、このスクリーニング系においてどのような形態変化をもたらすか興味を持たれた。そこで表に示す 11 の化合物について作用を観察した。この中でケトグロブリンAのみにビーズ状の異常活性発現が認められる。菌糸の生育抑制肥大作用が認められたのは、ケトブロブリンJ、アスポカラシンB、Dであった。ほかの化合物はこの濃度範囲では影響を与えなかった。この結果より *P. oryzae* に対する活性発現とマイクロフィラメントとの関連性はない。ケトグロブリンAがマウスに対する急性毒性を示すこと²⁶⁾、および催奇形性²⁷⁾を現すことなどから、サイトカラシン系化合物のなかでこの化合物特有の活性と思われる。

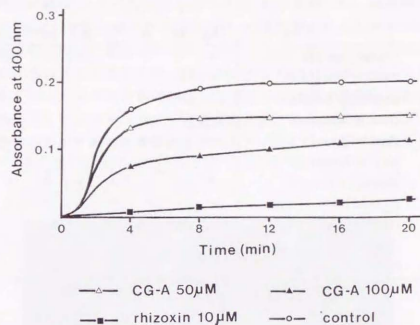


Fig. 2.7. ケトグロブリンAの微小管重合阻害活性

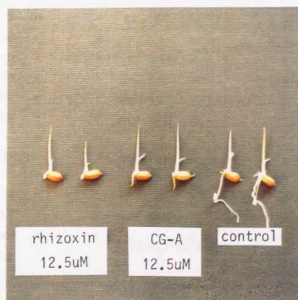


Fig. 2.8. ケトグロブリンAのイネに対する活性 (Todorokiwase)

Table 2.4. サイトカラシン系化合物の *P. oryzae* に対する作用

	50	10	5	1	0.5	0.25	0.125 (μg/ml)
chaetoglobosin A	+	+	+	+	+	-	-
chaetoglobosin B	-	-	-	-	-	-	-
chaetoglobosin C	-	-	-	-	-	-	-
chaetoglobosin D	-	-	-	-	-	-	-
chaetoglobosin E	-	-	-	-	-	-	-
chaetoglobosin F	-	-	-	-	-	-	-
chaetoglobosin J	x	x	x	+	+	+	-
aspochalasin B	x	+	-	-	-	-	-
aspochalasin D	x	-	-	-	-	-	-
cytochalasin H	-	-	-	-	-	-	-
epoxycytochalasin H	-	-	-	-	-	-	-

Table 2.5. サイトカラシン系化合物の抗真菌作用

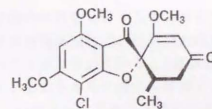
substance	MIC (μg/ml)										*: >100
	phytopathogenic fungi										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
chaetoglobosin A	*	25	13	*	*	*	50	25	*	*	*
chaetoglobosin B	*	*	*	*	*	*	50	*	*	*	
chaetoglobosin C	*	*	*	*	*	*	100	*	*	*	
chaetoglobosin D	*	*	*	*	*	*	100	*	*	*	
chaetoglobosin E	*	100	100	*	*	*	100	*	100	*	
chaetoglobosin F	*	100	100	*	*	*	100	*	*	*	
chaetoglobosin J	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
aspochalasin B	*	50	100	*	*	*	100	*	*	*	
aspochalasin D	*	-	-	*	-	*	-	*	*	-	
cytochalasin H	*	*	*	*	*	*	100	*	*	*	
epoxycytochalasin H	*	100	100	*	*	*	100	*	*	*	
(+)-sclerotiorin	*	*	*	*	*	*	100	*	*	*	
(+)-isortiorin	*	*	*	*	*	*	50	*	50	*	

1. *Alternaria kikuhiana* 2. *Colletotricum lindemuthianum*
3. *Fusarium nivale* 4. *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*
5. *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* 6. *Helminthosporium oryzae*
7. *Pythium aphanidermatum* 8. *Pyricularia oryzae*
9. *Rhizoctonia solani* 10. *Rhizopus chinensis*

[K460 株]

この菌の培養口液は、*P. oryzae* に curling を引き起こす。培養液を菌体ごと抽出し、ベンゼンで振り分けた分画の TLC の活性部分がグリセオフルビンに一致した。さらに HPLC で同定を行った。

既に述べたようにグリセオフルビンは "curling factor" としてよく知られており、このスクリーニング系で検索を行った場合必ず遭遇する物質であると考えていた。このようにグリセオフルビン生産菌を確認できたことは、このスクリーニング系が当初の目的である検索機能を果たしていることが証明されたことによる。



Griseofulvin

Fig. 2.9. グリセオフルビンの *P. oryzae* に対する "curling" 作用

[K55 株]

この菌の培養口液は、*P. oryzae* の菌糸を太くし、伸長抑制作用を示す。また、高濃度においては、発芽抑制作用を持っている。この活性物質本体を抽出・単離精製し ^1H NMR、 ^{13}C NMR IR、UV、MS のスペクトル、旋光度を総合した結果、生育抑制作用を持つ化合物は (+)-sclerotiorin、(+)-5-chloroisotriorin、(+)-isotriorin であることが判明した^{2,81,2,9)}。

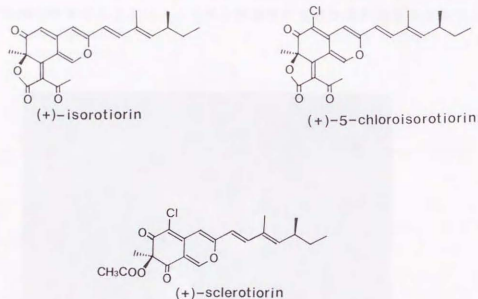


Fig. 2.10. K55 株から単離した sclerotiorin 類

[K39 株]

乳酸、フマル酸を生産している。共に 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で菌糸の伸長が抑制され丸くいびつな状態になる。

[K119 株]

シュウ酸を生産している。100~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で菌糸が丸くいびつな状態になる。

他に菌糸先端に swelling を引き起こす株が十数株得ているが、現在までに代謝産物の検討には至っていない。

第五節 フザリエリンAおよび類縁体の構造決定

K432 株は PD 培地による 20°C で3週間の静置培養を行うことにより、スクリーニング系での *P. oryzae* に curling 作用を誘起する化合物を培養口液中に生産することが判明した。菌体・培養液のアセトン抽出液をさらにベンゼンで振り分け、濃縮した抽出物の TLC 上で硫酸により赤く発色するスポット (benzen: acetone=2:1、Rf=0.4) に活性が認められた。



Fig. 2.11. K432 株培養液による *P. oryzae* の形態異常

この菌は、PDA 培地で菌糸が赤色を示すこと、および、鞘のような特徴ある胞子から *Fusarium* 属であると判定した。*Fusarium* 属は自然界でよく普通に見られる菌であり、分類学的にも確立されている。Nelson らによる報告^{3,9)}を参考にして菌糸の色、胞子の形状などをさらに詳しく観察すると、K432 株は *Fusarium acuminatum* もしくは *F. avenaceum* であると考えられる。*F. acuminatum* は菌糸に chlamydospore と呼ばれる膨らみを形成するが *F. avenaceum* ではこのような膨らみを生じない。K432 株の菌糸を顕微鏡で観察すると、文献に記載されている *F. acuminatum* と同様の膨らみが認められることから、K432 株を *F. acuminatum* とすることが妥当と考えられるが、最終的な結論は得られていない。したがって K432 株を今の段階では *Fusarium* sp. K432 株と呼ぶこととする。

[培養および抽出・単離]

Fusarium sp. K432 株を PD 培地を用いて、2.9 L, 20°C, 25 日間ルーコルベンにて静置培養を行った。培養終了後ルーコルベンにアセトンを加え、容器中で菌体の抽出を行うとともに、形成されている胞子の飛散を最小限に抑えて、人体への汚染を防ぐことを目的とした。菌体・培養液のアセトン抽出液をろ過後さらにベンゼンで振り分けた。濃縮した抽出物をシリカゲル、LH-20、ODS などクロマトグラフィーを行い、活性作用を指標にフザリエリン A (fusarielin A) 900 mg を単離した。さらに TLC 硫酸発色で同じく赤色にスポットが現れる類似化合物フザリエリン B (fusarielin B) 26 mg を単離した。

ところで、フザリエリン A の生産は温度により大きく変動する。27°C での静置培養、振とう培養では共にフザリエリン A は生産されない。一方 20°C での振とう培養ではフザリエリン A は生産する量が少ないことが明らかになっている。

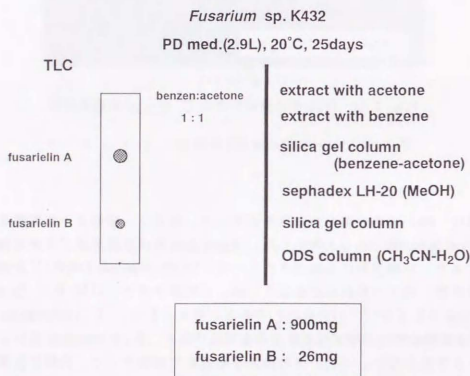


Fig. 2. 12. フザリエリン A および B の精製

[フザリエリン A の分子式]

フザリエリン A の生産量は 300 mg/L 以上と、静置培養という条件下で、また培地や培養条件の検討をほとんど行っているにもかかわらず、カビの 2 次代謝物の中でも生産量は多い。一方、*Fusarium* 類の 2 次代謝産物は多種多様な化合物が既に報告されている。従って、この研究のはじめの段階では、フザリエリン A が既知物質である可能性が高いと考えていた。

さて、常法により IR、マススペクトロメトリー、¹H および ¹³C NMR などの測定から、スペクトルの解析と既知化合物との比較を試みた。

赤外スペクトルでは水酸基による 3620, 3480, 1090, 1030, 1015 cm⁻¹ の吸収、二重結合に由来すると思われる 1660, 975, 830 cm⁻¹ の吸収が見られるだけであり、それ以外の特徴的な吸収は認められない。UV では 239 nm に最大吸収を示す。EI-MS では m/z 384, 402 に、FAB-MS では m/z 385 にイオンピークが観測された。

ところが NMR の測定データが説明できない状況が起きた。すなわち CDCl₃ 中室温での ¹³C NMR は 20 個のシグナルが観測される。さらに NOE モードによる gate decoupling 法により炭素 20 個についている水素は 28 個である。さらに酸素が 4 個存在しその中の 2 個はエポキシドであることが ¹³J_{CH} から推定できる。一方、¹H NMR の積分値から水素の数は 34~40 の範囲であり、そのうち 2 個は D₂O で交換可能であることが分かった。

さて、ここでフザリエリン A の分子式を C₂₈H₄₀O₄ としたとき、分子量は 344 となり EI-MS の結果とは大きな隔たりが起きる。¹H-¹H COSY や ¹³C-¹H COSY の結果も矛盾するデータばかりであり、部分構造を推定することが不可能であった。これら矛盾するデータをひとまず置いて、元素分析値および誘導体から分子式を推定することとした。

元素分析の結果、炭素 73.63%、水素 9.47%、酸素 16.65% であり、総計が 99.75% となって他の元素が含まれていないことが明かとなった。

そこで、元素分析値より各元素比を求め、分子式を作成すると以下のような計算が成り立つ。(C₂H₃O₂)。

C	73.63/12.011 = 6.130=a	a*3.75=22.99	a*3.92=24.03	a*4.08=25.01
H	9.47/1.0078=9.396=b	b*3.75=35.24	b*3.92=36.83	b*4.08=38.33
O	16.65/15.9949=1.040=c	c*3.75= 3.90	c*3.92= 4.08	c*4.08= 4.24
		C ₂₃ H ₃₅ O ₄ (375)	C ₂₄ H ₃₇ O ₄ (389)	C ₂₅ H ₃₉ O ₄ (402)

これらの計算結果と EI-MS の測定データとを併せて考えると、M⁺ は m/z 402 であり、m/z 384 は M⁺-H₂O と推定できる。

フザリエリンAをアセチル化すると、EI-MSで m/z 486(M^+)が観測され、このピークはジアセテートである $402+42 \times 2$ として説明することができる。従って、FAB-HRMSで m/z 385.2714と観測されたピークが $C_{25}H_{34}O_3+H$ (cal. 385.2714)として一致する。そうすると、 ^{13}C NMRでは炭素5つ分のシグナルが現れていないことになる。NMRの溶媒など測定条件を検討した結果、DMSO- d_6 において加熱することにより全ての炭素のシグナルを観測することに成功した。

こうして、フザリエリンAの分子式を $C_{25}H_{34}O_4$ (m.w. 402)と決定した。

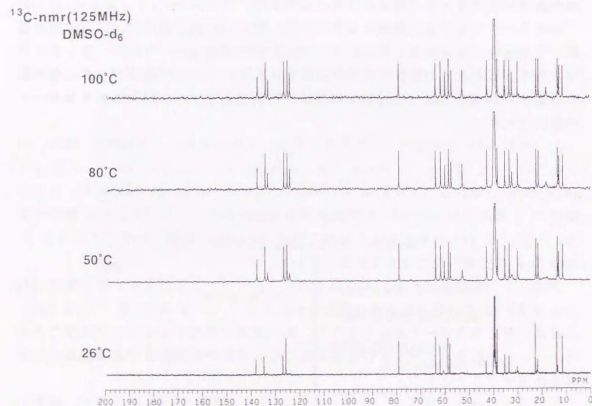


Fig. 2.13. フザリエリンAの ^{13}C NMR (DMSO- d_6)

【フザリエリンAのマスマスペクトロメトリー】

この化合物のEI-MS、FAB-MSでの分子イオンピークは検出しにくい。FAB-MSにおいては、マトリックスとして H^+ を付加しやすいグリセロールや m -ニトロベンジルアルコールなどが用いられて、分子イオンピークはプロトンが付加した $(M+H)^+$ として検出される。しかしフザリエリンAの場合、 m/z 385($M-OH$) $^+$ より強度の弱いピークとして m/z 401($M-H$) $^+$ に現れており、構造未知の場合解析が難しい。

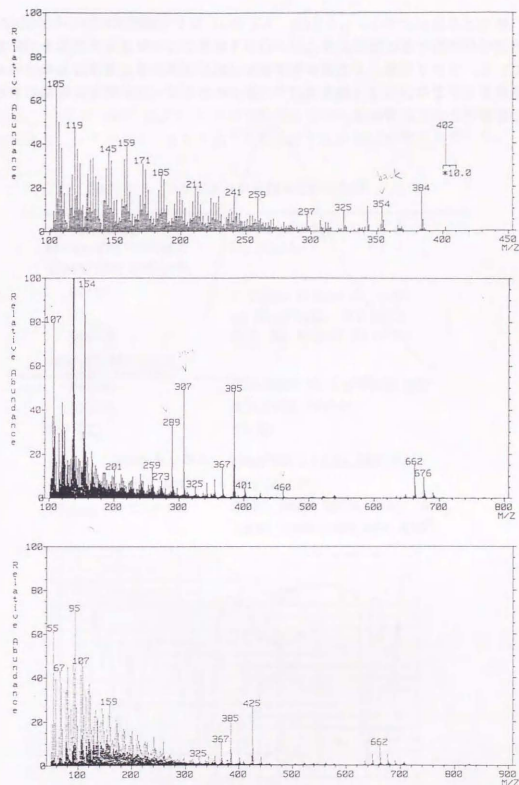


Fig. 2.14. フザリエリンAのマスマスペクトロメトリー
上: EI-MS 中: FSB-MS 下: FSB-MS (+NaCl)

糖などを始めとする、1,3-diol、1,2-diolなどを構造式を持つ化合物は NaCl を試料に添加することにより、(M+Na)⁺ イオンとして検出されることが報告されている。フザリエリンAの場合も同様に NaCl を試料中に微量加えて FAB-MS を測定したところ、*m/z* 425(M+Na)⁺ の分子イオンピークが明瞭に観測できるような改善することができた。

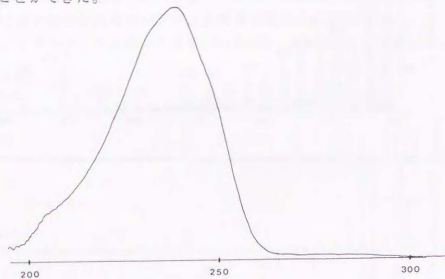


Fig. 2.15. フザリエリンAのUV (MeOH)



Fig. 2.16. フザリエリンAのIR (CHCl₃)

[フザリエリンAの平面構造]

DMSO-d₆ を溶媒として 50°C で測定することにより、¹H および ¹³C NMR のシグナルが明瞭に観測されるようになり、構造の解明は大きく進展した。

¹H-¹H COSY、¹H-¹³C COSY などの 2D NMR 実験の結果から図に示す部分構造を推定した。さらに HMBC により 4 つの四級炭素を挟んだ関係について解き明かすことにより、フザリエリンAはデカリン環を有する新規化合物と決定した。

Table 2.6. フザリエリンAの理化学的性質

Appearance	white powder
Molecular formula	C ₂₅ H ₃₈ O ₄
Elemental analysis	
calcd:	C 73.60, H 9.54, O 16.86
found:	as (C ₂₅ H ₃₈ O ₄ · 0.3 H ₂ O)
found:	C 73.63, H 9.47, O 16.65
HRFAB-MS (<i>m/z</i>)	
calcd:	425.2668 (as C ₂₅ H ₃₈ O ₄ Na)
found:	425.2656 (M+Na) ⁺
MP (°C)	68-72
[α] _D	-132° (c=0.1125, MeOH)
UV _{λmax} nm (ε): MeOH	239 (28400)
IR _{vmax} (CHCl ₃) cm ⁻¹	3620, 3480, 2970, 2925, 1382, 1090, 1060-1000, 975, 830 ⁹

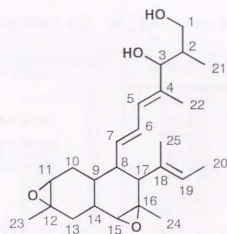


Fig. 2.17. フザリエリンAの平面構造

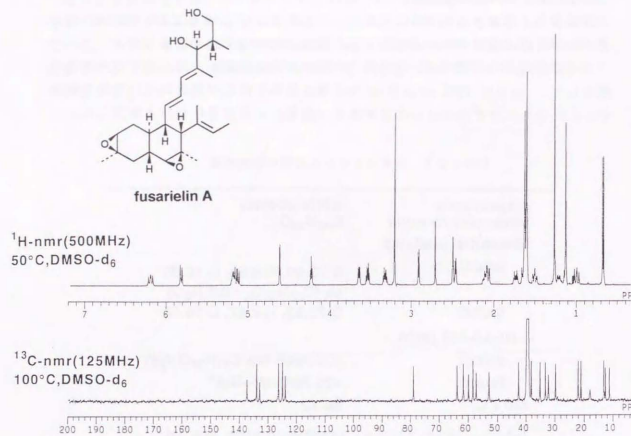


Fig. 2. 18. フザリエリンAのNMR

Table 2. 7. フザリエリンAのNMR data (DMSO-d₆, 50°C)

Position	δH (multiplicity) J value (Hz)	δC (¹³ C-H) (Hz)	Position	δH (multiplicity) J value (Hz)	δC (¹³ C-H) (Hz)
1	3.32 (ddd) J=10.4, 6.0, 6.0	63.8 (140)	15	2.70 (s)	61.8 (178)
2	3.53 (ddd) J=10.4, 4.8, 4.8	60.2	16		60.2
3	1.62 (m)	38.4 (130)	17	2.46 (d) J=5.0	52.9 (128)
4	3.64 (dd) J=8.2, 3.8	78.9 (144)	18		133.1
5	5.81 (d) J=11.0	137.6	19	5.18 (q) J=6.8	124.0 (157)
6	6.19 (dd) J=15.0, 11.0	125.2 (150)	20	1.60 (d) J=6.8	13.2 (126)
7	5.13 (dd) J=15.0, 10.0	134.3 (150)	21	0.69 (d) J=6.8	13.7 (126)
8	2.10 (ddd) J=11.0, 10.0, 5.0	42.8 (133)	22	1.63 (s)	11.5 (126)
9	1.21 (m)	32.5 (128)	23	1.26 (s)	22.4 (126)
10	0.99 (dd) J=15.0, 12.0	30.0 (128)	24	1.13 (s)	21.5 (127)
11	1.73 (ddd) J=15.0, 5.4, 5.4	58.5 (179)	25	1.60 (s)	17.8 (125)
12	2.91 (d) J=5.4	57.7	1-OH	4.22 (dd) J=6.0, 4.8	
13	1.61 (m)	35.3 (126)	3-OH	4.61 (d) J=3.8	
14	2.07 (dd) J=13.8, 3.6				
	1.50 (ddd) J=13.0, 10.8, 3.6	33.5 (130)			

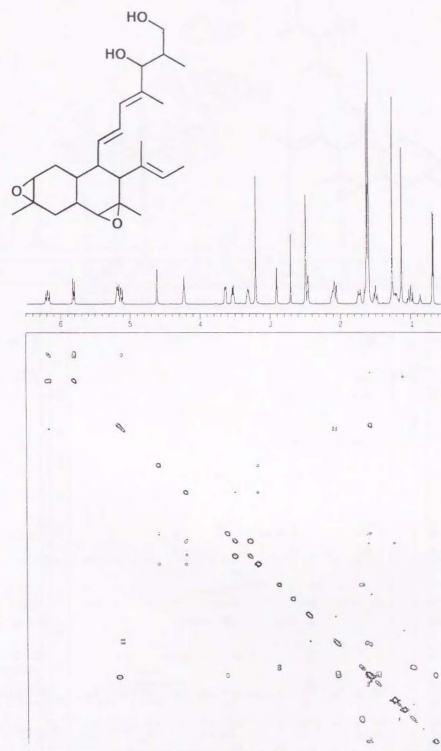


Fig. 2. 19. ¹H-¹H COSY (DMSO-d₆, 50°C)

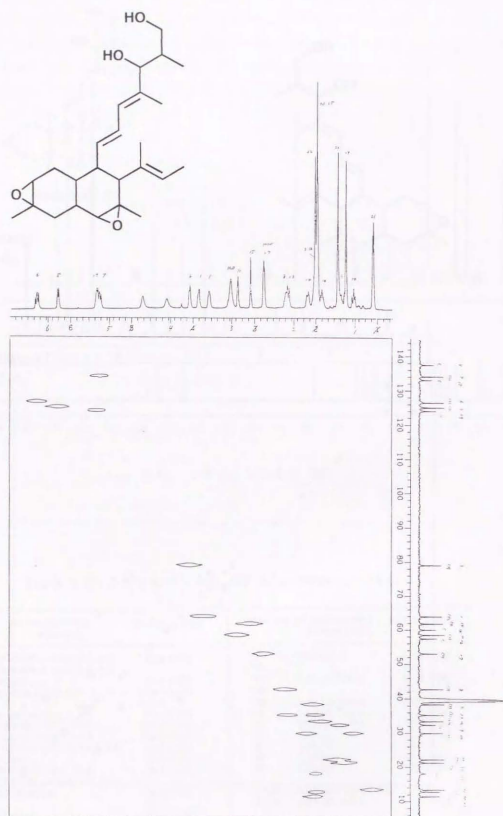


Fig. 2. 20. ^1H - ^{13}C COSY (DMSO- d_6 , 50°C)

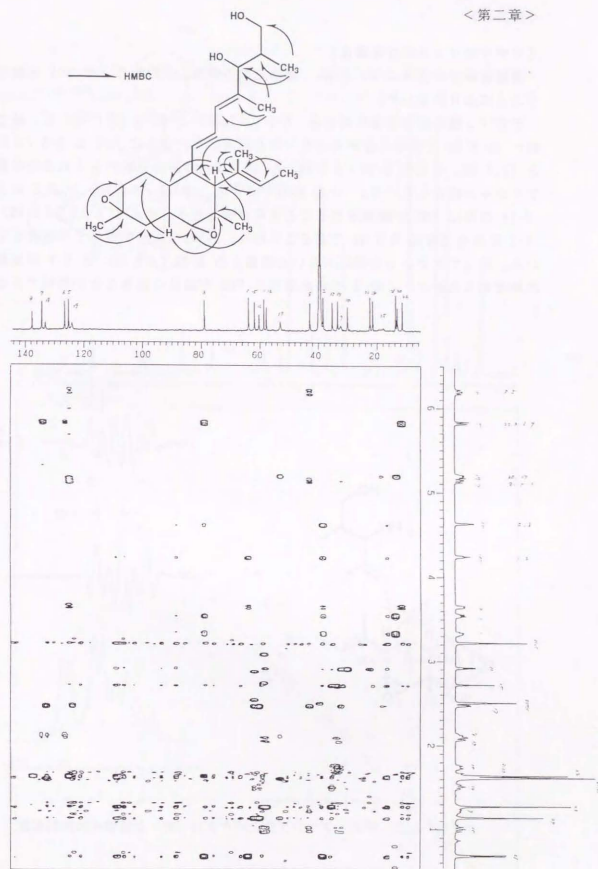


Fig. 2. 21. HMBC (DMSO- d_6 , 50°C)

[フザリエリンAの立体構造]

環構造部分の立体については、結合定数の解析、NOESY などの NOE 実験を行うことにより決定した。

デカリン環の接合部分にあたる H-9 (δ 1.21) と H-14 (δ 1.50) は、結合定数が 10.8 Hz であることからトランスと判定した。さらに H-9 は H-8 (δ 2.11) と 11.0 Hz、そして H-10 (δ 0.99) と 12.0 Hz の結合定数からこれらの水素はアキシアル結合している。一方 NOESY からも、H-10 (δ 0.99) と H-8 および H-14 の間に NOE が観測されることから証明できる。加えて H-17 (δ 2.46) と H-8 の結合定数は 5.0 Hz であることから、H-17 はエクアトリアル結合をしている。従ってアキシアル側に出ている側鎖上の H-19 (δ 5.18) と H-9 が距離的に接近するために、この 2 つの水素間に NOE が認められることが説明できる。

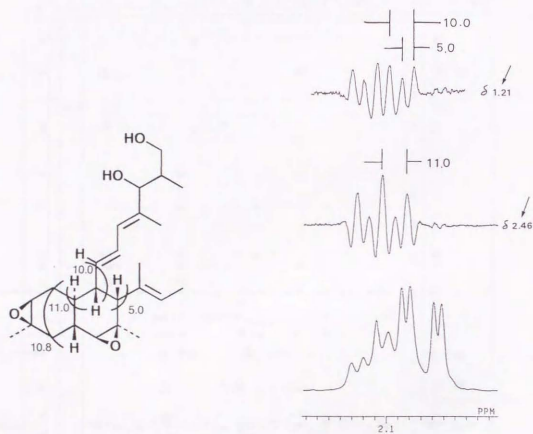


Fig. 2.22. デカリング差スペクトル (右) と環部分の相対配置

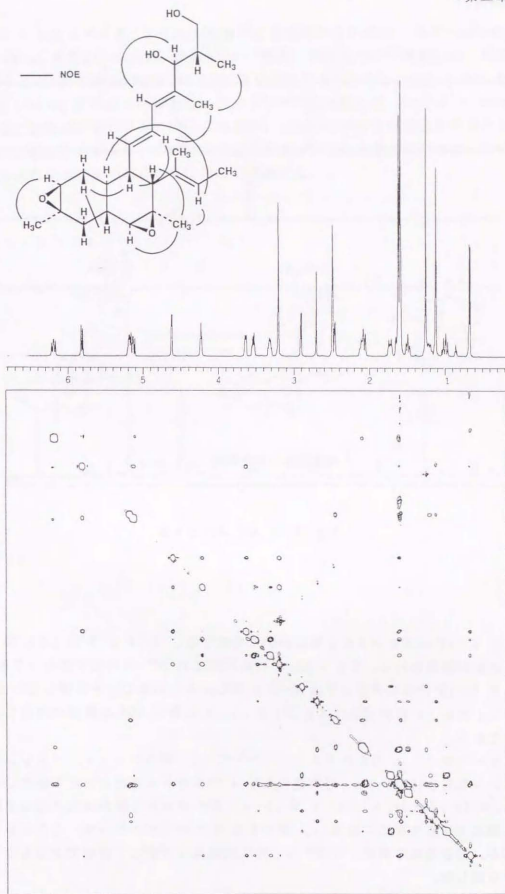


Fig. 2.23. NOESY (DMSO-d₆, 50°C)

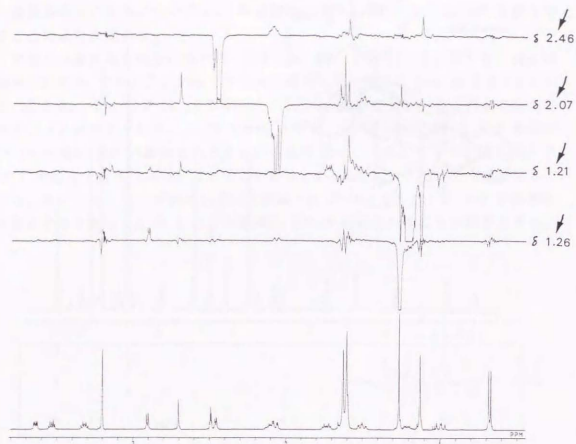
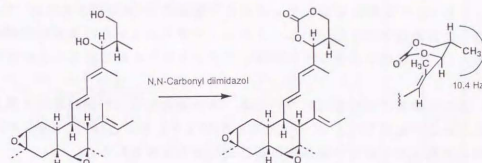


Fig. 2.24. NOE スペクトル

次に2つのエポキシドの立体について考察する。H-14とH-15 (δ 2.70)の結合定数が観測されないことから、2つの水素は約 90° の角度で隣合っており、従って15,16位のエポキシドはH-14と同じ向きであることを示唆している。このことから24位の CH_3 (δ 1.13)とH-19の間にNOEが観測されることが説明できる。

もう一つの11,12位のエポキシドについては、環のコンフォメーションとエポキシドの向きについて、可能性のある4つのモデルを消去法にて検討した。即ち、H-10 (δ 0.99, δ 1.73)とH-11 (δ 2.90)の向きを観測された結合定数により推定できる角度にて固定し、導かれる4つのモデルのうち、ここに示した構造が、結合定数の解析、NOESYなどの実験結果を矛盾なく説明できるものと結論した。

次に2位のメチル基、3位の水酸基の配位を決めるために、N,N'-carbonyl diimidazol を用い cyclic carbonate に導き、配位について検討した。その結果H-2とH-3の結合定数は10.4 Hzと観測されることから、H-2とH-3は共にアクシャル、2位のメチル基はエクワトリアルと判断した。cyclic carbonate 部分は二重結合に対し2通り考えられるが、しかしながらそれぞれが等価となるためにこれ以上の解析は、この時点では行えない。この問題については、フザリエンAの絶対配置の解析の項で改めて議論する。



Scheme 2.1. 側鎖部分の相対配置

[フザリエリンBの構造]

Fusarium sp. K432 株に、より極性の高い物質が TLC 上確認されている。このスポットは硫酸噴霧でフザリエリンAと同様に赤く発色することから類縁体と予想された。単離したフザリエリンBの NaCl を添加した FAB-MS の結果、 m/z 443($M+Na$)⁺ が観測できる。さらにこのピークは高分解マスペクトロメトリーで m/z 443.2763 (cal. 443.2773) と測定され、分子式は $C_{25}H_{40}O_5$ ($m.w.$ 420) と決定した。

各スペクトルをフザリエリンAのものと比較した。IR のスペクトルは水酸基の増加を示唆している。さらに ¹H NMR で水酸基のプロトン由来のシグナルが2個分増えており、 δ 2.91 (H-11) のシグナルも δ 3.27 に低磁場に移動していること、そして、¹³C NMR においてエポキシド領域の2本のシグナルが 70.5、72.8 ppm に低磁場シフトしていることから、フザリエリンBの構造はフザリエリンAの 11,12 位のエポキシドが開裂したテトラオール体であることが判明した。

11,12 位の水酸基の相対配位については、結合定数から 12 位の配位を残したトランスであると結論した。このことは、H-12 (δ 3.26) と H-13 (δ 1.42) の間にW型の遠隔スピン結合が観測されることから支持される。

Table 2.8. フザリエリンBの理化学的性質

Appearance	white powder
Molecular formula	$C_{25}H_{40}O_5$
Elemental analysis	
calcd:	C 71.39, H 9.58, O 19.02
found:	C 70.04, H 9.44, O 19.52
HRFAB-MS (m/z)	
calcd:	443.2773 (as $C_{25}H_{40}O_5Na$)
found:	443.2763 ($M+Na$) ⁺
$[\alpha]_D$	-100° ($c=0.135$, MeOH)
UV λ_{max} nm (ϵ):MeOH	239 (24200)
IR ν_{max} (CHCl ₃) cm^{-1}	3440, 2970, 2850, 1380, 1090, 1040-1000

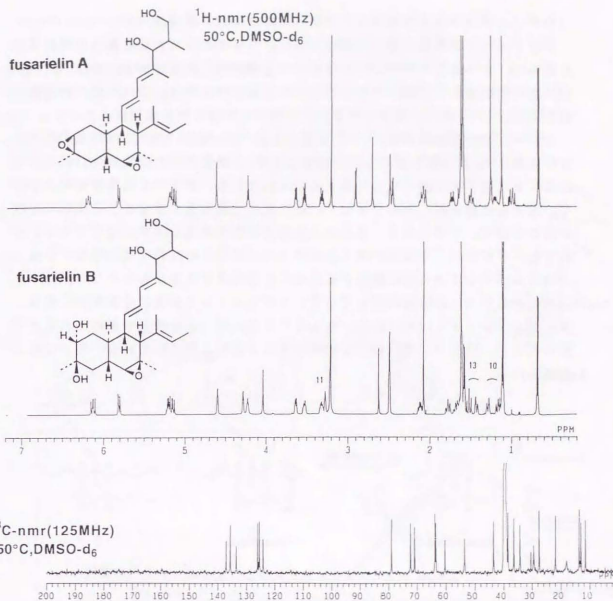


Fig. 2.25. フザリエリンBのNMR

Table 2.9. フザリエリンBのNMR data (DMSO-d₆, 50°C)

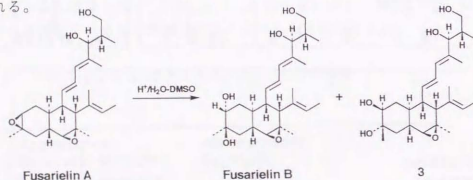
Position	δ H (multiplicity) J value (Hz)	δ C	Position	δ H (multiplicity) J value (Hz)	δ C
1	3.32 (ddd) J=10.2, 6.0, 5.0	63.8	15	2.62 (s)	62.6
2	1.62 (m)	38.4	16		60.4
3	3.65 (ddd) J=8.4, 3.8	78.0	17	2.47 (d) J=5.6	53.6
4	5.80 (dd) J=10.0, 0.8	137.8	18		133.8
5	3.85 (dd) J=15.0, 11.0	126.4	19	5.19 (q) J=6.8	124.0
6	6.13 (dd) J=15.0, 10.2	135.8	20	1.60 (d) J=6.4	13.5
7	5.14 (dd) J=15.0, 10.2	135.8	21	0.66 (d) J=6.8	14.0
8	2.12 (ddd) J=10.2, 10.2, 5.6	43.5	22	1.60 (s)	11.8
9	1.65 (m)	29.8	23	1.10 (s)	27.8
10	1.19 (ddd) J=13.8, 13.2, 2.4	34.4	24	1.12 (s)	22.0
11	1.29 (ddd) J=13.8, 4.0, 2.4	72.8	25	1.60 (s)	18.0
12	3.27 (d) J=3.8, 2.0	70.5			
13	1.43 (dd) J=13.8, 2.2	36.0	1-OH	4.23 (dd) J=6.0, 5.0	
14	1.53 (dd) J=13.8, 13.8	36.8	3-OH	4.60 (d) J=6.8	
	1.76 (ddd) J=13.8, 13.2, 2.0		11-OH	4.26 (d) J=3.8	
			12-OH	4.04 (s)	

[フザリエリンAからフザリエリンBへのエポキシド開裂反応]

フザリエリンBは生産量が少ないために、フザリエリンAからBへの変換反応を試みた。2つあるエポキシドのうち1つを選択的に開裂させるために、*p*-トルエン硫酸を触媒として用いたところ良好な結果が得られた。この反応では同時に副生成物として11,12位のエポキシドが反対に開裂した3を得た。

エポキシドの触媒開裂は S_N2 で起こる。この場合、より立体障害の大きい方の位置に S_N2 攻撃が起こるのが通常であり、遷移状態の安定性は立体因子ではなく主に電子的な因子により決まるとされている。すなわち立体障害のより少ない炭素に攻撃が起こるのではなく、正の電荷を最も良く宿らせる炭素に攻撃が起こるので、フザリエリンAからは3の方が本来生成しやすいはずである。それでもフザリエリンBの方が多く生成することの明らかな説明は出来ない。もう一方のエポキシドより先に開裂することにその回答があるかもしれない。

ここでもう一つの疑問が生じてくる。フザリエリンBが抽出分離段階に出来たアーティファクトではないかと。もしそうであれば、化合物3も単離されると予想されるが、今までに抽出物中に化合物3の存在は確認されていない為この説は否定される。



Scheme 2.2. フザリエリンAからフザリエリンBへの変換

[その他の類縁体]

Fusarium sp. K432株の培養抽出物よりTLC上のスポットの硫酸噴霧でフザリエリンAと同様に赤く発色する類縁体が数種類含まれている。フザリエリンCおよびDはフザリエリンAより極性の低い物質で、フザリエリンAの精製段階で微量成分として得られた。

フザリエリンCのFAB-MSは、NaClを添加することで m/z 409(M+Na)⁺が観測され、さらにフザリエリンAのスペクトルと比較すると、¹³C NMRにおいてエポキシド領域の2本のシグナルがSP²領域に低磁場シフトし、さらに¹H NMRで δ 2.70 (H-15)のシグナルも δ 5.22にシフトしていることから、フザリエリンCは分子式C₂₂H₃₄O₅ (m.w. 386)を示し、フザリエリンAの15,16位のエポキシドが二重結合の構造と決定した。

フザリエリンDのFAB-MSは、 m/z 441(M+Na)⁺が観測でき分子式をC₂₅H₃₈O₅ (m.w. 418)と推定した。さらに¹³C NMRにおいてSP²領域のC-5, C-6の2本のシグナルが消失して70.75, 75.44 ppmに高磁場シフトしていること、¹H NMRで δ 5.81 (H-5)のシグナルも δ 3.76にシフトが見られることから、フザリエリンDの構造はフザリエリンAの5,6位の二重結合がエポキシドに酸化したトリエポキシド体であることが判明した。¹H NMRで22位のメチル基がシングレットのまま δ 1.97へ高磁場シフトしていることから説明できる。

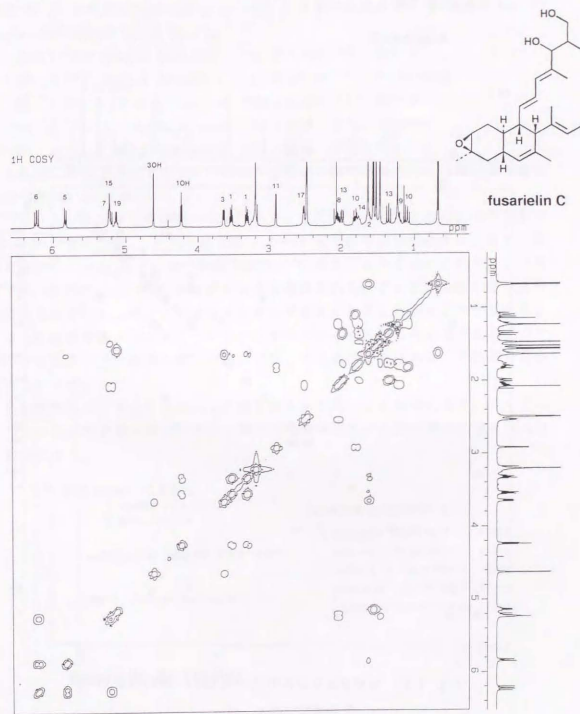
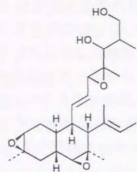


Fig. 2.26. フザリエリンCの¹H-¹H COSY (DMSO-d₆, 50°C)



fusarielin D

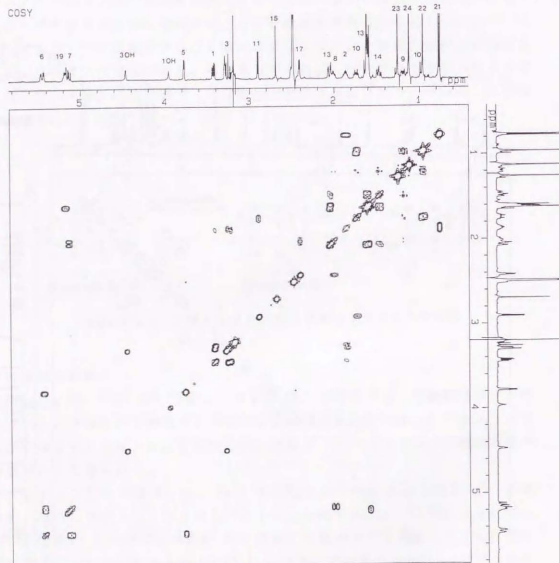


Fig. 2.27. フザリエリンDの¹H-¹H COSY (DMSO-d₆, 50°C)

第六節 フザリエリンAの生合成

フザリエリンAの25個の炭素の由来を明らかにするために、常法に従い安定同位元素を用いた取り込み実験を行い、¹³C NMRにより解析した。この菌のフザリエリンA生産量が高いため予備実験は行わず、各安定同位化合物を0.042%添加する事とした。

Fusarium sp. K432株をPD培地120mlの入ったルーコルベンに接種し、20°Cで25日間静置培養を行った。培養7日目に安定同位体5種類を各々50mg/ml H₂Oに溶解して投与した。

- ① [1-¹³C] Sodium Acetate (92.2 atom% ¹³C, MSD社)
- ② [2-¹³C] Sodium Acetate (91.4 atom% ¹³C, Prochem社)
- ③ [1,2-¹³C] Sodium Acetate (99 atom% ¹³C, MSD社)
- ④ [3-¹³C] Sodium Propionate (90 atom% ¹³C, MSD社)
- ⑤ [methyl-¹³C] L-methionine (90 atom% ¹³C, MSD社)

培養液は菌体と共にアセトンで抽出。その後の操作は第四節と同じ方法で単離精製し各24mgを得た。

フザリエリンAはその構造からポリケタイドであると示唆される。①の実験では25の炭素のうち、メチル基を除く1~20までの偶数炭素に、また、②の実験では1~20までの奇数炭素に¹³Cの取り込みが認められた。③の実験では10組の¹³C-¹³Cカップリングが観察された。プロピオン酸の取り込みは認められず、5つのメチル基はメチオニン由来であることから、フザリエリンAは10組の酢酸ユニットと5つのメチオニンメチルから生合成されるデカケタイドであることが判明した。一方、プロピオン酸の取り込みは、予想通り認められなかった。

生産性が高いこと、メチオニンの取り込み率が良いことを考えると、フザリエリンAの放射性標識は容易であり、標的分子の解明など今後の研究に役立つものと期待できる。

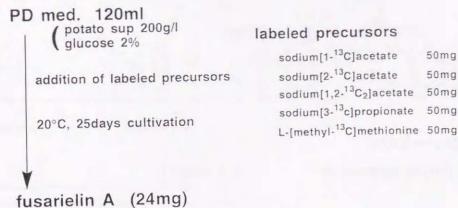


Fig. 2.28. 生合成実験条件

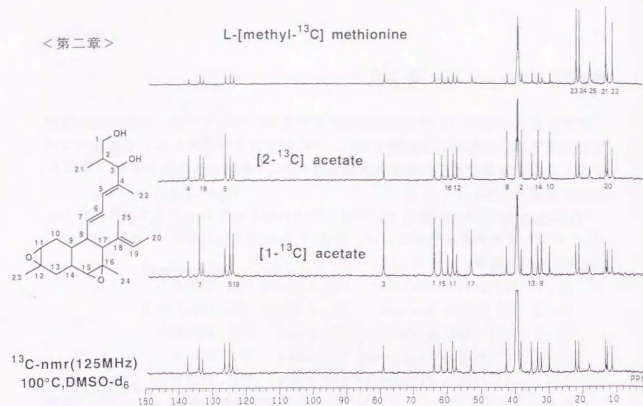


Fig. 2.29. 各 ^{13}C 標識化合物を投与したときのフザリエリンAの ^{13}C NMR

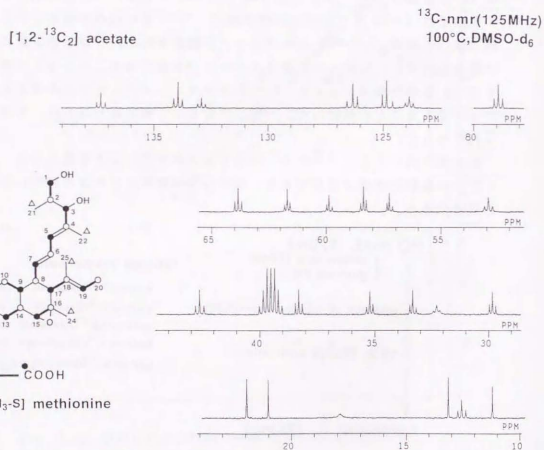


Fig. 2.30. $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ acetate 投与時のフザリエリンAの ^{13}C NMR (拡大)

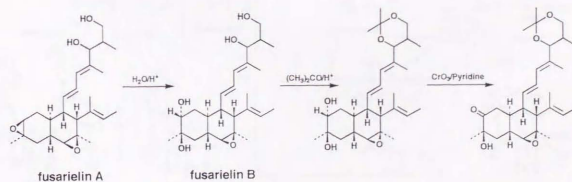
第七節 フザリエリンAの絶対配置

天然有機化合物の構造解析において、絶対配置の決定にはX線結晶解析、オクタント則、助起子カイラリティー法³¹⁾、改良 Mosher 法³²⁾などが信頼できる方法として用いられている。

フザリエリンAの場合、CD および NMR のデータから絶対配置を決定する方針を立てた。CD では 11 位を酸化してオクタント則を使う方法、またはオゾン分解後 5 員ラク톤の形成からラク톤オクタント則を利用する方法が考えられる。一方、構造内の共役ジエンを発色団として、3 位または 11 位にベンゾエト発色団を導入し助起子カイラリティー法による解析を検討する。さらに NMR では、フザリエリンBの 3 位または 11 位の水酸基を (S) および (R) の 2-メトキシ-2-トリフルオロメチルフェニル酢酸 (MTPA) エステルに導入して、異方性効果を利用した改良 Mosher 法を行うこととした。

フザリエリンAから酸触媒条件下フザリエリンBに導き、アセトナイドで 1,3 diol を保護した後、クロム酸により 11 位をケトンに酸化した。この化合物の CD は明瞭な Cotton を与えなかった。

一方、オゾン分解後 5 員ラク톤の形成からラク톤オクタント則を利用する方法はいくつかの問題点を解決しなければならない。すなわちオゾン分解後還元時に生成するジオールの一方のキラリティーがなくなり、その後導く 5 員環ラクトンが 2 種類になることであり、さらにそれらの化合物と比較する CD のデータの収集、加えて 3 位の水酸基については天然からの誘導体と比較する作業が残ることである。こうした問題の解決には相当の時間と労力を費やせねばならず、オゾン分解による誘導体からの方法は断念した。



Scheme 2.3.

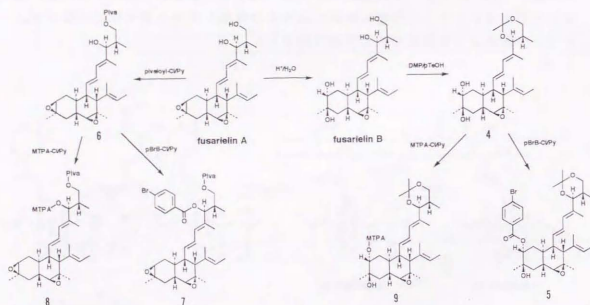
<第二章>

次に励起キラルリティー法を用いる方法を検討した。フザリエリンAは側鎖部分にジエン構造が存在すること、さらにフザリエリンBでは1級、2級、3級の水酸基が存在していることから、共役ジエンを発色団として、3位または11位にベンゾエート発色団を導入し解析を試みた。フザリエリンAのUV吸収はその最大吸収が239 nmにあることから、発色団をP-7'ロセアノエートとした。

フザリエリンBおよびA、保護基を導入した段階での化合物1および6のCDはCottonを示していないが、水酸基に発色団としてのP-7'ロセアノエートを導入した誘導体5および7のCDスペクトルは、共に明瞭な正の第一Cotton、負の第二Cottonを与えた。これらの結果よりフザリエリンAの絶対配置は2S, 3Sおよび8S, 11Rと結論した。なお誘導体7のNMRではCD₂OD中P-7'ロセアノエートの付け根にある3位の水素と、2重結合上の5位の水素との間にNOEを確認している。

一方、改良Moshier法は(S)-MTPAエステルと(R)-MTPAエステルのベンゼン環の向きが逆になり、異方性効果の受け方がMTPA planeの左右で異なることにより、複数の¹Hの化学シフトに生じる差 $\Delta\delta$ ($\delta(S)-\delta(R)$)を測定して2級アルコール等の絶対配置を決定するものである。

フザリエリンAより導かれた(S)および(R)MTPAエステルの化学シフトの差 $\Delta\delta$ ($\delta(S)-\delta(R)$)は、先の励起キラルリティー法の結果と矛盾しないものであった。誘導体9の測定結果もCDの結果を支持するものであった。



Scheme 2.4.

<第二章>

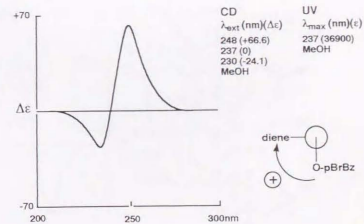
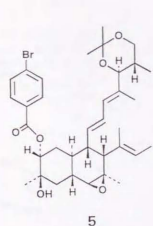
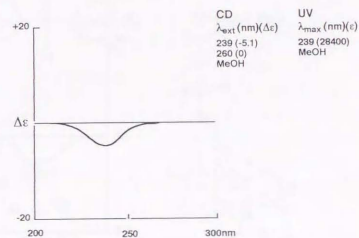
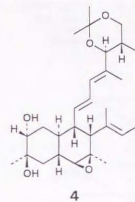
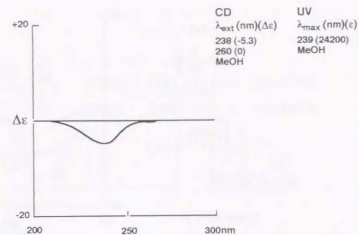
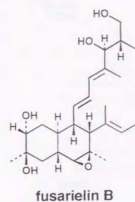


Fig. 2.31. 円二色性励起キラルリティー法による絶対配置の決定 (その1)

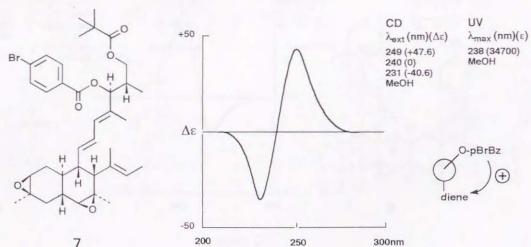
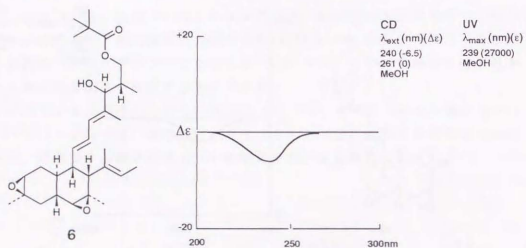
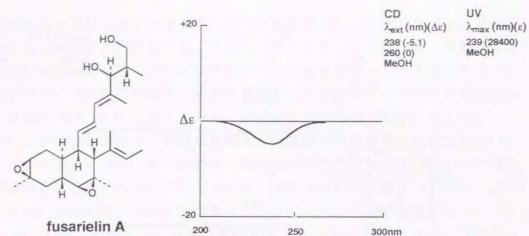


Fig. 2. 32. 円二色性励起子カイラリティー法による絶対配置の決定 (その 2)

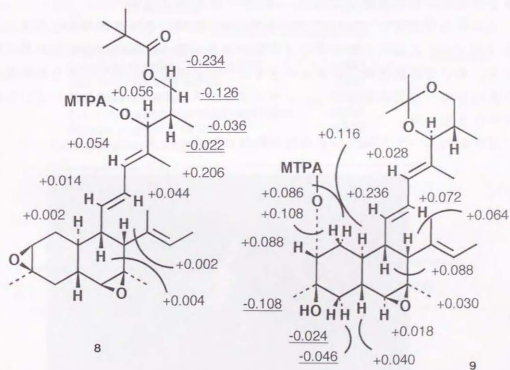
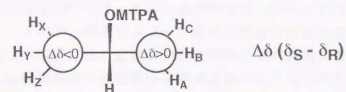
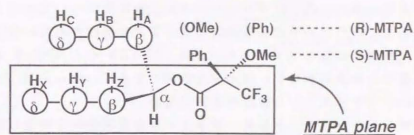


Fig. 2. 33. 改良 Mosher 法による絶対配置の決定

第八節 フザリエリンAの生物活性

今までに調べられたフザリエリンAの生物活性についてここでは述べるが、結論から先に言うと、その分子標的は現在までに解明されていない。

P. oryzae に対しフザリエリンAは 12.5 μM から 100 μM の広い範囲の濃度で、菌糸の伸長抑制に伴い曲がった状態である "curling" 作用を示す。なお全てにおいてフザリエリンBは活性を示さない。

フザリエリンAのブタ脳微小管蛋白の重合阻害活性を測定したが活性は認められなかった。脱重合阻害活性も認められない。

微生物に対する生育阻害活性についても検討を行った。その結果、抗真菌作用は認められるものの、抗細菌作用は認められないことから、フザリエリンAの作用は真核細胞機構に標的が存在することを示唆している。

微小管機能阻害物質の中でも生物種により感受性が異なることが報告されている。例えばコルヒチンの脳由来の微小管蛋白の重合阻害は $IC_{50} = 3 \times 10^{-6}$ であるのに対し、酵母由来のものに対しては $IC_{50} = 2 \times 10^{-3}$ と大きな開きがある。一方MBCの場合はコルヒチンとは逆に、脳由来に対しては $IC_{50} = 1.3 \times 10^{-2}$ 以上であるのに比べ酵母由来では $IC_{50} = 4 \times 10^{-8}$ となっている^{3,3)}。

フザリエリンAは *Aspergillus nidulans* に対する生育阻害活性が高い。一方 *A. nidulans* にはベノミルやリゾキシンの微小管系薬剤耐性株が既に得られている。そこで各耐性株に対するフザリエリンAの影響を調べた。その結果野生株と変わらない阻害作用を示し、フザリエリンAは微小管系に作用していないことが明かとなった。

現在までにフザリエリンAの作用機作は明らかになっていない。

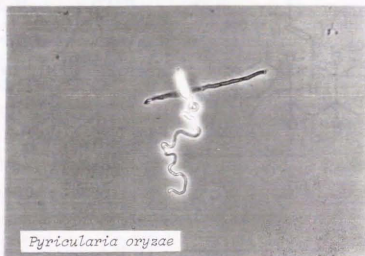


Fig. 2.34. フザリエリンAの *P. oryzae* に対する形態異常作用 (12.5 μM)

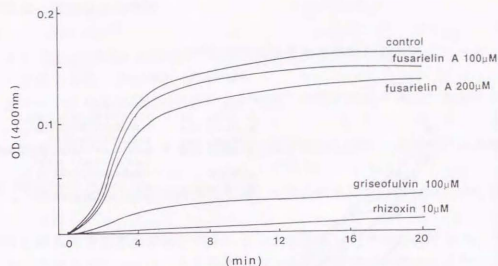


Fig. 2.35. 微小管重合に対するフザリエリンAの効果

Table 2.10. Antimicrobial activity of fusarielin A

Organism	MIC (μg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	>100
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	>100
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	>100
<i>Candida albicans</i>	>100
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	>100
<i>Mucor mucedo</i> 14358	>100
<i>Aspergillus fumigatus</i> 11268	3.1

Table 2.11. Antifungal activity of fusarielin A

Organism	MIC (μg/ml)
<i>Alternaria kikuchiana</i>	50
<i>Colletotricum lindemuthianum</i>	25
<i>Fusarium nivale</i>	12.5
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	>100
<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	>100
<i>Helminthosporium oryzae</i>	25
<i>Pyricularia oryzae</i>	50
<i>Rhizoctonia solani</i>	>100
<i>Rhizopus chinensis</i>	>100

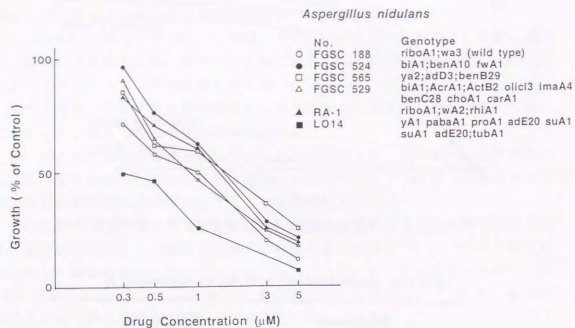


Fig. 2.36. *A. nidulans* の耐性株に対するフザリエリンAの効果

第九節 要約および考察

- 1) *Pyricularia oryzae* の菌糸の形態異常を指標としたスクリーニング系を確立した。
- 2) この系を用いて *Rhizopus chinensis* のなかのリゾキシンを産生する菌の確認を行った。
- 3) 菌糸をビーズ状にする作用を持つ化合物としてケトグロボシンAを単離した。
- 4) 菌糸を太くし伸長抑制作用を起こす化合物として sclerotiorin 類を単離した。
- 5) 新規抗カビ抗生物質フザリエリンAを発見し、構造を決定した。
- 6) フザリエリンAは10の酢酸ユニット、5個のメチオニンメチルから生合成されていることを証明した。
- 7) フザリエリンAの絶対配置を励起子カイラリティー法により決定した。

Fusarium 属からは今までに非常に多くの化合物が報告されている。代表的なものとして fusaric acid, fusarubin, zearalenone, T-2 toxin, fusarin C などがある。こうした多くの研究報告があるにもかかわらず今回フザリエリンAが発見されたことは、温度をはじめとした培養条件を変えることにより糸状菌の能力を活性化させる可能性を示したものである。

気温や栄養など生育条件が整ったときにカビとしてまた植物病やキノコとして私達の前に姿を現すが、微生物はいつもはそっと生活している。冷蔵庫の中で食品に生えたカビを見つけたとき、低温の中でも繁殖する糸状菌のしぶとさに驚かされる。

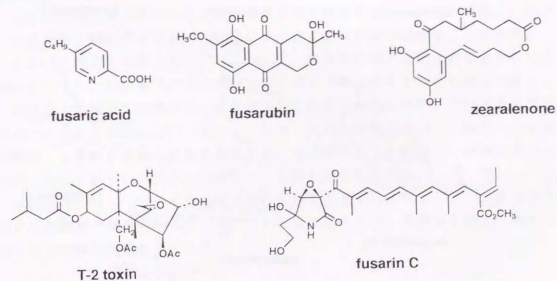


Fig. 2.38. *Fusarium* 属が生産する代表的な代謝産物

微生物代謝産物を研究の場で、菌の最適生育条件と化合物の生産条件が異なることは多々経験することである。さらに、生産菌の長期の継代培養で起こる代謝産物生産性の低下も生育条件と関わりがあると考えられる。従って、土壌より分離した菌の培養を通常より低い温度で静置培養することで、新規化合物の発見に結び付いた。

[デカリン環ポリケタイド化合物]

フザリエリンAと同じように、デカリン環を構造に含むポリケタイドは糸状菌から compactin (WL-236B)²⁴⁾、betaenone A²⁵⁾、rapiculine²⁶⁾ 放線菌からは nargenicin A₁²⁷⁾、chlorothricin²⁸⁾ などをはじめとしていくつかの化合物が報告されている。フザリエリンAの絶対配置が、compactin とは逆の配置をしており、活性の上からも今後の展開に興味もたれる。

さらに生成の問題から見たとき、Cane²⁹⁾ らが nargenicin A₁ の生成反応の中で分子内 Diels-Alder による閉環機構を示唆しているように、フザリエリンの場合も 15.16 位が二重結合のフザリエリンCが得られていることから、同様に分子内 Diels-Alder 機構の関与が考えられ興味深い。

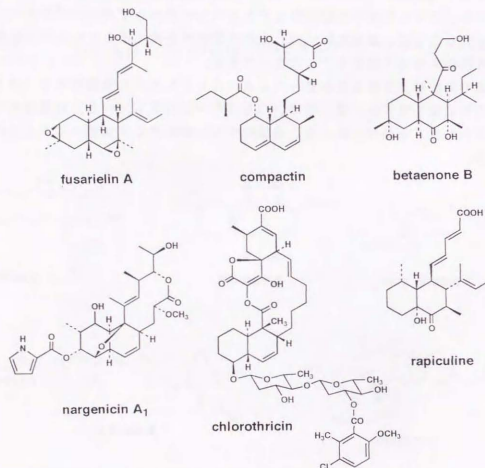


Fig. 2. 37. デカリン環を有するポリケタイド化合物

きて既に述べたように、フザリエリンAの作用標的は今までに解明されていない。一方、compactin は HMG-CoA リダクターゼの阻害剤として知られており、betaenone A は植物病の毒素として単離され RNA とタンパク質の合成阻害剤であることが明らかとなっている。

Compactin はステロールの合成を阻害することから、細胞膜への影響が現れるのではないかと考え *P. oryzae* のアッセイ系にかけ、発芽管への影響について観察を行った。その結果フザリエリンAは 12.5 μM の濃度で明瞭な curling を示すのに対し compactin は 100 μM の濃度で菌糸の生育抑制を示すが形態異常は認められなかった。

[スクリーニング系の長所と短所]

微小管機能阻害物質のなかで、生物種により感受性が異なることがこれまでの研究で分かってきた。例えば、リゾキシンは酵母に対して生育阻害活性を示さないし、コルヒチンも同様である。一方、最近小磯らが稲こうじ粒より単離、構造決定した新規糸分裂阻害物質 ustiloxin⁴⁰⁾ は、イネ幼根に対し肥大作用を持つことから単離された化合物である。しかしながら ustiloxin は、イネもち病菌胞子の発芽管に対し形態異常などの作用を示さない。したがって、イネ幼根に対する作用を併せて調べることで、検索対象が広がることが期待される。ところがこの方法は第一章で紹介したように、煩雑であることや多数のサンプルを扱うことが難しく問題が残る。そこで、これに代わる方法として植物細胞などを使うスクリーニング系が確立できるか今後検討していく余地はある。しかしながら、完璧なスクリーニング系を確立することが目標でなく、最小の努力で最大の効果を得られることこそ重要である。

ここに述べたスクリーニングの特徴は安価・簡便であり、定量化は難しいが一つの生命体を観察することで、状態により大まかな判定が出来ることにある。

近年、生理活性物質のスクリーニングは、酵素阻害剤に代表されるように分子標的をしぼり、試験管内の生化学反応を利用する系により行われる場合が多い。これは抗生物質の作用機序などの基礎研究が進展したためであり、大いなる成果であることを疑う余地はない。しかし、一方で既知の論理に基づいて探そうとする姿勢は、ときには意外な新発見を阻害する可能性があるという別府⁴¹⁾ が指摘するように、自らを新しい発見から遠ざけてしまう危険性をはらむ。

序にも述べたように、多くの研究者が形態を指標としたスクリーニング系を作り、活性物質の検索を行っている。この基礎にあるのは、定量化を超えた現象を探し出す実験者の観察力である。

第三章 まとめ

本論文は以下の研究に関するものである。この中でリゾキシンの発見は、新規抗癌剤の開発研究や有糸分裂阻害剤のチューブリン分子認識機構の解明等に貢献した点で、特筆すべき成果であった。

- 1) リゾキシンの構造決定と生物活性
- 2) 菌糸の形態異常を指標としたスクリーニング系の確立
- 3) フザリエリンAの発見と構造の研究

フザリエリンAは高い温度では生産しない。これと同じ事がペニシリンの研究を行っていたときの梅沢浜夫博士の話の中に出てくる。当時の生産性の低い株では培養温度が25°Cを越えるとペニシリンは採れない。9月に入って涼しくなった頃にある菌株が黄色い色素をつくり始めたとのことである。

多くの研究者の努力により、ペニシリンの発見以来多くの抗生物質が登場し、実用化されている。そうして新しい抗生物質が発見される確率は年々低下するはずだが、dynamicin AやFK-506のような新しい作用を持つ化合物が登場したり、taxolの生産する菌が見つかったりするなど、微生物の世界はまだ奥が深いようである。

私たちは微生物を非常に良く制御する力を身に付けてきた。しかしながら、その能力を見つける力は未だ十分とは言えないように思う。今もって多くの事を微生物にお願いすることがあり、またその成果を期待し信じた。

実験の部

第一章

[分析一般]

融点測定はヤマト製 MP-1 を用いた。紫外線吸収スペクトル (UV) は島津製 UV-300 で測定し、最大吸収を nm (モル吸光係数 ϵ) で表示した。赤外吸収スペクトル (IR) は日本分光製 DS-301、A-102 で測定し、各吸収を cm^{-1} で表示した。核磁気共鳴スペクトル (^1H および ^{13}C -NMR) の測定は日本電子製 JNX FX-400 (^1H : 400.5MHz, ^{13}C : 100.7MHz) で測定し、各シグナルのゲミカルシフトは、内部標準の TMS を 0ppm として、 ^{13}C NMR は ppm、 ^1H NMR は δ で表示した。また結合定数 (J) は Hz で表した。溶媒は CDCl_3 を使用した。マススペクトロメトリー (MS) は島津製 LKB-9000 で測定した。液体シンチレーションカウンタ (LSC) はパッカード社製 Tri-Carb 300 を使用した。

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は島津製 LC-3A を使用した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は Merck DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, F-254) を用いた。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは和光製 WAKO-gel C-200 を使用した。

[*Rhizopus chinensis* Rh-2 菌の培養]

R. chinensis Rh-2 は PDA 培地 (glucose 2%, agar 1.5~2%/potato sup (20g/100 ml)) で 30°C、4~5 日間培養し、形成した胞子を滅菌水 10 ml に懸濁する。リゾキシシン生産用培地 1 (glucose 1%, polypepton 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%) 1 l 当りに胞子懸濁液 4 ml を加え、9 cm ジャーレ 1 枚当たり約 25 ml 分注する。培養は 32°C、48 時間で行った。

[イネ幼根の肥大作用を用いた生物検定法]

表面殺菌したイネ種子を恒温器内 30°C で 1~2 mm に出芽させ、4 粒または 8 粒を一組としてアクリル製の支持台にとめる。これを直径 3 cm、高さ 6 cm のガラス容器内で検定液に浸して 30°C、2~3 日間保った後、イネ幼根部の肥大の程度について判断した。イネ種子は愛知旭を用いた。

[リゾキシシンの単離]

R. chinensis Rh-2 培養口液のエチルエーテル抽出後濃縮した抽出物 (2.64g) に、アセトン 10 ml と n-ヘキサン 10 ml を加え、さらに水 50 ml を加えた後

<実験の部>

順次 n-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルで抽出した。この段階でリゾキシンはベンゼン抽出物中に存在するので、ベンゼン抽出物をさらに n-ヘキサン、シクロヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルで順次抽出した。リゾキシンはシクロヘキサン層中の主成分として振り分けられる。さらにベンゼン層にもリゾキシンは含まれている。シクロヘキサン抽出物 (147mg) とベンゼン抽出物 (604mg) をそれぞれをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (2% 7-ヒドロキシ) で分離したのち、リゾキシン分画をまとめてローバラムクロマトグラフィー (Merck Lobar column size B, 20% 7-ヒドロキシ, 0.6ml/min) を行った。以上の操作によりリゾキシン 50 mg を単離した。また、リゾキシンの他に夾雑物の入った分画が 35 mg あった。培養口液が 50.6 l であるから、リゾキシンの生産量は約 1.7 mg/l となる。

分離方法は改善を行い、エチルエーテル抽出物をアセトンで溶解したのち水を加え、n-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルで順次抽出する。ベンゼン抽出物をシリカゲル、Sephadex LH-20、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、最終段階で HPLC (column: Whatman M9 ODS-3, 55% CH₃CN-H₂O) を用いて精製した (図 1-4)。精製したリゾキシンは、アセトンに溶解後 n-ヘキサンを加え、ロータリーエバポレータで溶媒を溜去すると無色粉末状になる。

[高分解能マスペクトロメトリー]

リゾキシンの高分解能マスペクトロメトリーの測定は、東京薬科大学・志田保夫博士および三共・分析研究所へ依頼した。

m/z 625 (M ⁺)	obs. = 625.299840 (東葉)	cal. = 625.325027 (C ₂₅ H ₄₇ NO ₅)
	obs. = 625.3233 (三共)	625.348834 (C ₂₅ H ₄₉ N ₂ O ₄)
		625.301220 (C ₂₅ H ₄₉ O ₁₀)
m/z 315 :	obs. = 315.186804 (東葉)	cal. = 315.1834 (C ₁₉ H ₂₅ NO ₅)
	obs. = 315.1798 (三共)	315.1807 (C ₁₆ H ₂₇ O ₆)
m/z 232 :	obs. = 232.1330 (三共)	cal. = 232.1336 (C ₁₄ H ₁₈ NO ₂)
(base peak)		232.1311 (C ₁₁ H ₁₆ O ₄)

[元素分析値]

リゾキシンの元素分析は応用微生物研究所・元素分析室に測定を依頼した。
 炭素: obs. = 66.94% cal. = 67.18% (C₂₅H₄₇NO₅) 65.30% (C¹³H¹⁵N¹⁵O¹⁶)
 水素: obs. = 7.78% cal. = 7.57% (C₂₅H₄₇NO₅) 7.67% (C¹³H¹⁵N¹⁵O¹⁶)
 窒素: obs. = 2.04% cal. = 2.23% (C₂₅H₄₇NO₅) 2.18% (C¹³H¹⁵N¹⁵O¹⁶)

[リゾキシンの結晶化への試み]

リゾキシンは ¹³C-NMR (25MHz) で 35 本のシグナルが観測され、元素分析・

<実験の部>

マスペクトロメトリーなどの結果をあわせて、早い時期に分子式が C₂₅H₄₇NO₅ と決定された。しかし構造式となると、¹H-NMR (100MHz) では部分構造の推定も難しい状況であった。ちょうど超伝導 FT-NMR が導入し始めていた頃で、理学部・宮沢研究室での ¹H-NMR (270MHz) 測定により、ダブルレットの 2 本のメチル基はイソプロピル基に由来するものではないことが明らかになった。しかし、応用微生物研究所に 400MHz の超伝導 NMR が導入するまで、NMR での実験は難しかった。そこで X線結晶構造解析を目的として、リゾキシンの誘導体の結晶化を試みた。

①リゾキシンのアセチル化: Rhizoxin 10 μmol (6.3mg) に Ac₂O 15 μmol/15 μl (1mmol/ml benzene)、Et₃N 15 μmol/15 μl (1mmol/ml benzene)、dimethyl amino pyridine (DMAP) 0.5 μmol/10 μl (6mg/ml benzene) を加え室温で攪拌。30 分後に反応が終了していることを TLC で確認。Et₂O で抽出。希釈 HCl、H₂O で洗った後、Na₂SO₄ で乾燥後溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィーにて単離。EIMS: 667 (M⁺: 625+42)。IR(CHCl₃): -OH の吸収消失。¹H-NMR より monoacetate を確認。(イネに対する活性は 1/5 ~ 1/10 に低下)

②リゾキシンの NaBH₄ 還元: Rhizoxin 20mg を MeOH に溶解。水冷下 NaBH₄ 10mg を添加、攪拌。40 min 後 H₂O を加え Et₂O で抽出。H₂O で洗い Na₂SO₄ で乾燥後溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィーにて単離。EIMS: 629 (M⁺: 625+4)。IR(CHCl₃): 3450, 1740, 1720 cm⁻¹。¹H-NMR: δ 3.74(2H) 現れ δ 4.88 消失。¹³C-NMR: 169.4ppm(C=O) 消失し δ 4.88(t) 出現する。(ラクトン環が還元開環していると考えられるのでアセチル化により確認することとする。またイネに対する活性は消失する)

③上記還元体のアセチル化 1: ②の NaBH₄ 還元体 5 μmol (3.2mg) に Ac₂O 15 μmol/15 μl (1mmol/ml benzene)、Et₃N 15 μmol/15 μl (1mmol/ml benzene)、dimethyl amino pyridine (DMAP) 0.5 μmol/10 μl (6mg/ml benzene) を加え室温で攪拌。30 分後に TLC にて反応をチェック。反応十分進行していないので (2 spots) 1 時間後に Ac₂O、Et₃N 各 10 μmol を加えさらに 1 時間攪拌。反応が終了していることを TLC で確認。Et₂O で抽出。希釈 HCl、H₂O で洗った後、Na₂SO₄ で乾燥後溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィーにて単離。EIMS: 755 (M⁺: 625+42x3)。¹H-NMR より tri-acetate を確認。δ 4.08(3H), δ 4.78~4.86(2H)。

④上記還元体のアセチル化 2: ②の NaBH₄ 還元体 3.3 μmol (2.1mg) に Ac₂O 7 μmol/7 μl (1mmol/ml pyridine)、pyridine 0.1ml を加え室温で攪拌。6 時間後反応を終了。H₂O を加え Et₂O にて抽出、H₂O で洗い acetone, benzene を加え溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィーにて単離。mono-acetate, di-acetate, tri-acetate が得られるが、反応のコントロールが難しい。

⑤リゾキシンの LiAlH₄ 還元: 5 つの生成物になる。

⑥リゾキシンの接触還元: H₂/Pd-C による還元による生成物は 2 つ。(M⁺:

<実験の部>

633 と 635) それ以上の検討は行っていない。

⑦ リゾキシンの p-ブロードベンゾイル化: Rhizoxin 19mg (80 μmol), p-Br-benzoyl chloride 18mg (82 μmol), pyridine 0.1ml, DMAP 0.5mg を加え室温で攪拌、終夜。H₂O を加え Et₂O で抽出・濃縮。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (11mg)。EIMS: m/z 807, 809 (M⁺)。

⑧ p-ブロードベンゾイル Rhizoxin の還元: ⑦の生成物 11mg を MeOH 0.3 ml に溶解し、氷冷下 NaBH₄ 7mg を添加、攪拌。40 min 後 H₂O を加え Et₂O で抽出。濃縮後 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (8.5mg)。EIMS: m/z 811, 813 (M⁺)。

⑨ p-ブロードベンゾイル NaBH₄ Rhizoxin のベンゾイル化: ⑧の生成物 8.2mg に benzoyl chloride 12 μl, pyridine 70 μl を加え室温攪拌 2 時間。H₂O を加え benzene で抽出、濃縮後 シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (7.8mg)。EIMS: m/z 1019, 1021。この化合物の結晶化を試みる。n-hexane-acetone, benzene-n-hexane の溶媒系で検討するが、その間に黄色く着色してくる。再クロマトグラフィーで精製し、結晶化を検討するが成功せず。

⑩ UV による変換物の検討: 溶解した条件下でのリゾキシンの安定性が悪いため、UV で先に安定体に変換を行い、その後誘導体へ導くことを検討。条件: UV ランプ (450W)、5mm pyrex tube, 溶媒: EtOH, acetone, CH₃CN, THF, CH₂Cl₂, benzene。濃度: Rhizoxin 0.2mg/0.4ml。照射時間: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 min。各時間での反応を TLC 上で検討する。その結果、CH₃CN での反応がほぼ単一の物質を与えることが判明した。次に Rhizoxin 10mg/2ml CH₃CN。照射時間 10 min (10mm pyrex tube) で反応を行った。反応終了後濃縮、4g シリカゲルカラムクロマトグラフィー (15% acetone-benzene) にて精製。TLC では 1 spot だが ¹H-NMR の測定では 2 種類の化合物が混ざっているようなシグナルが現れる。IR では 2220 cm⁻¹ に CN に由来すると思われる吸収が認められた。

[リゾキシンを加水分解-メチル化-アセチル化して誘導体 3]

リゾキシシン 40 mg を 2 回に分けて反応: Rhizoxin 20 mg に 5% KOH-EtOH 10 ml を加え reflux 3 時間。H₂O 50 ml を加え 5% HCl で pH 5 に調整。AcOEt ext. evaporate。つぎに MeOH:Et₂O=1:1 (ca 1.5ml) に溶解し、CH₂N₂-Et₂O soln. を加えメチル化 (10min)。反応終了後窒素ガスにて溶媒除去。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製 (合計 27 mg)。EIMS: m/z 675 (M⁺)。 ¹³C-NMR: ppm (multi-plicity) (173.0(s), 171.7(s), 161.0(s), 138.8(s), 137.2(s), 137.0(s), 136.8(d), 135.8(d), 133.0(d), 127.4(d), 127.0(d), 124.6(d), 120.0(d), 86.6(d), 83.6(d), 82.2(d), 76.9(d), 75.6(d), 74.3(d), 74.3(s), 70.4(d), 57.1(q), 52.8(q), 41.3(d), 40.9(d), 38.2(t), 36.0(t), 33.7(t), 32.6(t), 28.5(d), 15.2(q), 14.6(q), 14.5(q), 13.8(q), 13.5(q), 10.2(q))

加水分解メチル化体 27 mg (40 μmol) /ml benzene, Ac₂O 0.5 mmol/0.25ml

<実験の部>

benzene, Et₃N 0.5 mmol/0.25ml benzene, DMAP 5 μmol/0.1ml benzene。攪拌室温 2 時間後水水を加え Et₂O にて抽出。H₂O 洗浄後乾燥、溶媒溜去。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製。major product (22 mg): EIMS m/z 801(M⁺: triacetate), minor product (1.1mg): EIMS m/z 875(M⁺)

[誘導体 3 のオゾン分解]

誘導体 3 23 mg (28.7 μmol) を CHCl₃ 2 ml に溶解し、ドライアイス-MeOH 冷却下 O₃ gas を通す。はじめに溶液が黄色に着色するが、約 20 分後に色は消え次第に淡青色に変わってくる。淡青色になってさらに 15 分 O₃ gas を導入。反応終了後氷冷下 N₂ gas でオゾン除去。さらに攪拌氷冷下、dimethyl sulfide 100 mg (1.6 mmol) を添加しオゾンドを還元。1 時間後室温に戻しさらに 1 時間攪拌。反応後溶媒溜去。応生成物 18 mg を dry-THF 1.5 ml に溶解。NaBH₄ 40 mg を加え室温攪拌終夜。H₂O を加え Et₂O にて抽出、続いて水層部分に NaCl を加え飽和状態にして AcOEt 抽出。それぞれ H₂O で洗い溶媒溜去。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製。水層部分は H₂O を溜去後 EtOH にて抽出。IR-120, IRA-410 とイオン交換樹脂処理を行い、HPLC にて分取した (column: SCR-101(50cm)+Shodex S-801(50cm), Flow rate: 1.0ml H₂O/min)。

[静置培養下での ¹⁴C 標識化合物の取り込み]

培地 2 (glucose 1%, ebios 1%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.25%) 100 ml をシャーレ 5 枚に分注した。菌の生育を遅くするために、30°C に温度を下げ、標識化合物は 48 時間後に 100 ml 当たり 2 μCi を添加し、96 時間まで培養した。エチルエーテルで抽出後、TLC にてかき取り操作を行い、リゾキシシンを約 2 mg 添加して再び TLC かき取り後、液体シンチレーションカウンターで放射線量を計測した。

[NG 変異]

R. chinensis Rh-2 株の胞子を WK4 med. で 30°C, 6 時間培養後、クエン酸バッファー (buffer, 0.1 M, pH 5.5) で洗浄し、buffer 4 ml に懸濁した胞子液に 200 μg/0.2 ml buffer の NG (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guanidine) を加え、28°C で振とう培養。0, 15, 30, 45, 90 min の時点で 0.5 ml をサンプリング。リン酸バッファー (0.1 M, pH 7.0) で洗浄後、同バッファーに懸濁 10⁻² ~ 10⁻⁷ に希釈。その 0.2 ml をプレート (PDA med.) にまく。30°C で翌日まで培養後合計 56 株を選出し、それぞれの株の生産量を検討した。生産量の検定方法は、培養口液のエーテル抽出物の紫外吸収スペクトル測定および培養口液のいもち菌胞子の発芽抑制を用いた。これにより 1 株 (30m-11) を選別した。

[UV変異]

NG処理株 30ml-11のスラントに MK4 med. (glucose 1%, polypepton 1%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.25%)を加え懸濁する。無菌的に試験管へ移し、30°C、5.5時間培養。ろ過、リン酸バッファー(0.1 M, pH 7.0)で洗浄後、同バッファーに懸濁(胞子濃度 3 × 10⁸)。シャーレに移し、スターラーで攪拌しながらUV照射。距離は 38 cm。照射時間(生存率) 0 sec(100%), 15 sec(100%), 30 sec(100%), 1 min(50%), 3 min(0.8%), 10 min(0%), 30 min(0.03%), 90 min(0.0006%)でサンプリングし 10⁻² ~ 10⁻⁷に希釈。その 0.2 mlをプレート(PDA med.)にまく。30°Cで翌日まで培養後 1 min照射から 4株、3 minから 4株、30 minから 4株、90 minから 12株、合計 24株を選出し、それぞれの株の生産量を検討した。生産量の検定方法は、培養口液のエーテル抽出物の紫外吸収スペクトル測定および培養口液のいもち菌胞子の発芽抑制を用いた。これにより 2株(30U-03, 90U-03)を選別した。

[振とう培養下 ¹⁴C 標識化合物の取り込み]

R. chinensis (30U-03)の胞子懸濁液を培地 3、100 ml/坂口フラスコに植菌。30°C、56時間目に標識化合物を投与。96時間で培養終了後エーテルで抽出。この時点で一部分 HPLCにてリゾキシンの生産量測定。残りは LH-20、TLCかき取り。一部 HPLCでリゾキシン定量。残りは液体シンチレーションカウンターにて放射線量を計測し取り込み率を算出した。

[¹⁴C-¹⁴C] L-メチオニンの投与実験]

R. chinensis (30U-03)を培地 3、100 ml x 5本(坂口フラスコ)に植菌。30°Cにて 54時間培養後 [¹⁴C-¹⁴C] L-メチオニン(90 atom %, MSD社)を、各坂口フラスコ1本あたり 40 mg 計 200 mgを投与。培養途中で雑菌混入の為か、発泡し始める。94時間で培養終了後エーテル抽出。1/2500を HPLCにて生産量計測(0.66 mg / 500 ml)。生産量が低いので、リゾキシン 0.5 mgを加え精製。Sephadex LH-20、TLCかき取り(benzene:acetone=2:1)、HPLC(Whatmann ODS-2, CH₃CN:H₂O=55:45)にて単離を行う。リゾキシン 0.75 mgを¹³C-NMR測定。メチル基6本のみのシグナルしか観測できず。取り込み率を算出するためにリゾキシン 2.0 mgをさらに加えて測定。このときメチル基(メトキシ基を除く)の平均強度が 28%、取り込みが認められなかったオキサゾール環状のメチル基の強度は 4%。一方、0.75 mgのうち分離前に添加したリゾキシンの比率は 0.32 mg、生産分は 0.43 mg。シグナルの強度 4%は 2.32 mgに相当する。従って 28-4=24%は 13.9 mg分のシグナル強度に相当する。13.9/0.43=32.3(倍)。¹⁴C-¹⁴C L-メチオニンは 90 atom %であるから、32.3/0.9=35.9 従って 1炭素あたりの取り込み率は 35.9%と算出された。

[¹⁻¹⁴C] 酢酸ナトリウムの投与実験]

R. chinensis (30U-03)を培地 3、80 ml x 2本(坂口フラスコ)に植菌。28°Cにて 18時間前培養。本培養:(三共培地)(7-アミノイ 4%, 7-アミノ 3%, polypeptide 1%, KH₂PO₄ 0.25%, K₂HPO₄ 0.75%, MgSO₄·7H₂O 0.25%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, 80 ml x 6本(坂口フラスコ)に前培養した菌体を1本当り 10 ml 植菌し 27°Cで本培養開始。¹⁻¹⁴C 酢酸ナトリウム(98 atom %, MSD社) 480 mgを 12 mlの H₂Oで溶解、ミキサーで 0.45 μmでろ過後使用)をフラスコあたり 40 mgを 2度(24, 48時間後)添加。培養途中で雑菌混入の為か、3本が溶菌状態となる。124時間後に培養終了。正常な3本を菌体ごとまとめて、同量のアセトンを加え抽出。遠心後沈澱物にアセトン 80 mlを加え抽出。上清をまとめてベンゼンで抽出。濃縮後 sephadex LH-20、シリカゲルカラムでアセトンのあと TLCかき取り HPLC分取し、リゾキシン 0.68 mgを得た。

[培養条件の検討]

R. chinensis (30U-30)の坂口フラスコを用いての 30°C振とう培養では、培地 3におけるリゾキシンの生産量は、静置培養時と比べると3倍に伸びていることがわかる。培地 4を用いての坂口フラスコでの 27°C振とう培養では、リゾキシンの生産量が伸びるとともに、培養温度を下げたことによる生産ピークの遅延が見られた。

[少量培養条件の検討]

植え継いでから 4 ~ 5日経過した *R. chinensis* (30U-03)のスラントに 9 mlの培地 3 (glucose 1%, lactose 1%, polypeptide 1%, KH₂PO₄ 0.25%, K₂HPO₄ 0.75%, MgSO₄·7H₂O 0.25%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%)を加えて分生胞子を洗いだし、ガーゼ 2枚でろ過後胞子液を試験管に入れ 27°Cで 6時間、試験管用シェーカーで培養した。そこから 0.2 mlの培養液を取って、10 mlの培地 4(三共培地:7-アミノイ 4%, 7-アミノ 3%, polypeptide 1%, KH₂PO₄ 0.25%, K₂HPO₄ 0.75%, MgSO₄·7H₂O 0.25%, (NH₄)₂SO₄ 0.2%, 三角フラスコ(100 ml))に植菌。培養は3通りの方法を検討した。① 27°C, パーソナルシェーカー ② 27°C, 静置培養 ③ 27°C, 静置培養。それぞれ培養後菌体・培養液まとめて同量のアセトンで抽出、遠心後上清の一部を HPLCにて定量した。

[¹⁻¹⁴C] L-セリンの投与実験]

この実験は少量培養条件で行った。本培養開始 18時間後に [¹⁻¹⁴C] L-セリン(99 atom %, MSD社)をフラスコあたり 4 mg、計 7本(70 ml)に添加した。抽出分離操作は、菌体を培養液アセトンを加え抽出口過し、さらにベンゼンで振

<実験の部>

り分ける。粗抽出物をシリカゲルカラム、Sephadex LH-20 カラム、TLC によるかき取りを行い、さらに HPLC にてリゾキシンを精製した。単離したリゾキシンは 1.11 mg であった。これにリゾキシシン 1.0 mg を加え ^{14}C -NMR を測定した。

[標識前駆体の利用率の検討]

マススペクトロメトリーによる取り込み効率率は、 m/z 232 (base peak) のフラグメントの +1, +2, +3, +4 の強度により判定した。

[^{14}C - ^{13}C 二重標識化合物前駆体]

培養方法は少量培養条件で行った。本培養開始 23, 30, 38 時間後に [1,2- ^{13}C] 酢酸ナトリウム (99 atom %, MSD社) をフラスコあたり 3, 4, 3 mg、計 10 本 (100 ml) に添加した。抽出分離操作は [1- ^{13}C] L-セリンの投与実験と同じ。単離したリゾキシシンは 3.5 mg であった。

[^{14}C 標識リゾキシシンの調製]

植え継いでから 4 ~ 5 日経過した *R. chinensis* (30U-03) のスラントに 9 ml の培地 2 (70med.: glucose 1%, lactose 1%, polypeptone 1%, KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.75%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%) を加えて分生胞子を洗いだし、ガーゼ 2 枚で口過後胞子液を試験管に入れ 27°C で 6 時間、試験管用シェーカーで培養した。そこから 0.2 ml の培養液を取って、8 ml の培地 3 (三共培地: γ -アミノ酪氨酸 4%, β -アラニン 3%, polypeptone 1%, KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.75%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, 三角フラスコ (100 ml)) 計 2 本 16 ml に植菌し本培養をはじめた。本培養開始 18 時間後に標識化合物 [^{14}C] L-メチオニン 2 mCi (6.28 μg , S.A.: 47.5 mCi/mmol, NEN社) を投与、96 時間後にアセトンを加え菌体を培養液と共に抽出口過し、さらにベンゼンで振り分ける。粗抽出物をシリカゲルカラム、Sephadex LH-20 カラム、TLC によるかき取りを行い、さらに HPLC にてリゾキシシンを精製した。得られた ^{14}C 標識リゾキシシンは 33.7 μCi (225 μg , S.A.: 93.6 mCi/mmol) であった。

[リゾキシシンの生合成における酸素由来 ^{18}O 実験]

^{18}O ガスはアマシャム社製 98 Atom % のものを使用した。

[微小管作用物質のイネ幼根に対する影響]

イネ種子は愛知旭を用いた。試料は rhizoxin, ansamitocin P-3, colchicine, demecolcin, vinblastin sulfate, griseofulvin の 6 種。各試料 250 μg を 0.02 ml の EtOH に溶解、さらに H_2O を加え 100 ppm の溶液にし、さらに一部分

<実験の部>

を希釈し 1 ppm, 0.01 ppm の濃度溶液を作った。常法により発芽させた種子を溶液に浸し、蛍光灯下 25°C でインキュベーション。68 時間後に根の膨らみ及び根の長さを測定した。根の長さは、コントロール (1% EtOH) を 100% とした時の値。

[ウイルスに対する活性]

リゾキシシンの抗ウイルス活性の測定は、農林水産省植物ウイルス研究所・伝染研究室 (下村徹博士) に依頼した。タバコモザイクウイルス (TMV) サムソン NN および TMV グルチノーザ について、ウイルス濃度 2 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、リゾキシシン濃度 10 ~ 250 ppm で処理をしてタバコ葉に接種し、病斑形成について調査を行った。リゾキシシンは抗ウイルス性を示さなかった。

[ウニ卵による初期発生過程観察実験]

ウニ卵の実験は、東京大学医学部栄養学教室・長野弘博士、原口徳子博士により行われた。

[マウス白血病細胞 L5178Y の増殖阻害活性]

培養開始時の細胞数は 21,400 cells/ml であった。3 日後の対照の細胞数は 670,000 cells/ml、1% MeOH は 691,000 cells/ml となった。リゾキシシン濃度と細胞数は以下の通りである。0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =40,500; 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =42,500; 0.0125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =42,000; 0.0031 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =53,000; 0.00078 $\mu\text{g}/\text{ml}$ =104,500

[*R. chinensis* のジャーファメンター培養]

ジャーファメンター 1 基あたりの条件は以下の通りである。坂口フラスコ 1 本 (100 ml MK_4 med.: glucose 1%, polypeptone 1%, KH_2PO_4 0.05%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%) にて 30°C, 18 hr 前培養を行った。本培養は 25 L / 基、30°C, 300 rpm, air 25 L/min 等量通気で 30°C, 70 時間行った。培地は MK_4 med. (glucose 2%, polypeptone 2%, KH_2PO_4 0.5%, K_2HPO_4 0.5%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%)。

[その他の類縁体]

リゾキシシン類縁体を得たときの培地は、maltose 3%, polypeptone 1%, KH_2PO_4 0.25%, K_2HPO_4 0.75%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, pharmamedia 4% を用いて、タンク培養を行った。それぞれの 1 l あたりの単離収率は、リゾキシシン 20 mg、Rc-I 2 mg、Rc-VII 0.1 mg、Rc-IX 0.01 mg、Rc-VIII 0.04 mg、Rc-VI 0.1 mg であった。

第二章

〔分析一般〕

顕微鏡はオリンパス光学工業㈱の製品を使用した。実体双眼顕微鏡は VMP 型、倒立顕微鏡は CK-2 型、写真撮影は BH-2 を用いて行った。核磁気共鳴スペクトル (^1H および ^{13}C NMR) の測定は日本電子㈱製 JNM GX-400 (^1H ; 400MHz, ^{13}C : 100MHz)、JNM GSX-500 または JNM ALPHA-500 (^1H ; 500MHz, ^{13}C : 125MHz) で測定し、各シグナルのケミカルシフトは、内部標準の TMS を 0ppm (あるいは DMSO のメチル基を ^1H δ 2.49, ^{13}C 39.5 ppm) として ^1H NMR は δ で、 ^{13}C NMR は ppm で表示した。結合定数 (J) は Hz で表した。溶媒は DMSO-d₆ または CDCl₃ を使用した。マススペクトロメトリーは日本電子㈱製 JMS-HX110 で測定した。フザリエリン系の化合物の場合 FAB-MS は mNBA に NaCl/MeOH を加えて M+Na⁺ として検出した。円二色性スペクトル (CD) の測定は日本分光㈱製 J-20 を使用した。高速液体クロマトグラフィーは島津製作所㈱製の LC-5A, SPD-AV, SPD-M6A, 東ソー㈱製 CCMP, Soma㈱製 S-310A を組み合わせて使用した。HPLC用カラムはセンシュー科学㈱製 sensyu pak ODS, aquasil, ナカライ㈱製 ODS, 武田薬品工業㈱製 ODS カラムを用いて分離した。使用溶媒は、逆相系はアセトニトリル-水系を、また順相系は n-ヘキサン-イソプロパノール系を用いた。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは Werk 社製 No.9385, 7734 を使用した。融点測定、紫外線吸収スペクトル、赤外線吸収スペクトル、薄層クロマトグラフィーは第一章と同じである。

〔*Pyricularia oryzae* の胞子液の調製〕

P. oryzae はスラント (培地: yeast ext. 0.2%, soluble starch 1%, agar 2%) に植え継ぎ 27°C で培養する。5~7 日経過すると、菌糸の表面が灰色になり分生胞子が形成される。このスラントに滅菌水 10 ml を加え、白金耳にて表面をさすり胞子を水中に浮遊した後、ガーゼ 2 枚にて口過をする。得られた胞子液 1 ml あたり 10 $\mu\text{g/ml}$ の 2% yeast 溶液を加え *P. oryzae* の胞子液とした。

〔*Pyricularia oryzae* を用いた検定法〕

96 穴 マイクロプレートに前述の *P. oryzae* 胞子液を各 50 μl 分注する。ここにサンプル溶液 50 μl を加えプレート内で攪拌したのち次の穴へ 50 μl を移し、倍々希釈して行く。通常は一列 8 穴を使って 2 倍から 256 倍まで希釈した。マイクロプレートは 27 °C で 16 時間培養後、倒立顕微鏡 (OLYMPUS CK2, 10 \times 10) で発芽管を観察し判定した。

〔顕微鏡写真〕

形態異常が認められた場合、倒立顕微鏡下もしくはスライドグラス上に移し撮影を行った。(例: 対物レンズ x20、カメラ側 x5)

〔研究保存機関〕

接合菌類ケカビ目のうち *Rhizopus*、*Mucor* 属を中心とした既同定株は下記の研究保存機関から入手した。

- 農林水産省農業環境技術研究所寄生菌動態研究室 (表中 2 と記載)
- 東京大学応用微生物研究所 (IAM)
- 財団法人醸酵研究所 (IFO)
- 広島大学工学部醸酵工学教室 (HUT)
- 北海道大学農学部菌株保存室 (AHU)
- 中国科学院微生物研究所 (北京) (AS)

〔接合菌類ケカビ目既同定株を対象とした検索〕

同定株は振とう培養および静置培養を行い、各上清を倍々希釈して活性を観察した。培地は 70 med. を用いた。

〔K27 株〕

PD 培地 (potato 200g/H₂O 1L, dextrose 20g) 1 L を 50 ml/96-ウェルに分注、菌を接種後 27°C、4 日間静置培養を行った。培養口液の酢酸エチル抽出物 45.2 mg をシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどを行いケトログロブリン A を 9.6 mg を単離した。

^1H NMR (CDCl₃) δ 1.01(CH₃-24), 1.26(CH₃-11), 1.30(CH₃-12), 1.33(CH₃-25), 1.86(H-5), 2.04(H-15), 2.14(H-8), 2.27(H-15), 2.45(H-16), 2.62(H-10), 2.80(H-7), 2.96(H-10), 3.04(H-4), 3.80(H-3), 3.85(19-OH), 5.04(H-19), 5.23(H-14), 5.61(H-17), 5.73(H-2), 6.07(H-13), 6.51(H-21), 6.97(H-2'), 7.15(H-5'), 7.21(H-6'), 7.37(H-4'), 7.49(H-7'), 7.76(H-22), 8.13(H-1')

^{13}C NMR(CDCl₃) ppm 173.0(C-1), 47.2(C-3), 48.8(C-4), 32.1(C-5), 58.0(C-6), 36.1(C-7), 62.4(C-8), 63.3(C-9), 41.8(C-10), 21.0(C-11), 19.9(C-12), 133.8(C-13), 128.3(C-14), 34.4(C-15), 52.6(C-16), 131.7(C-17), 128.3(C-18), 81.8(C-19), 196.7(C-20), 136.4(C-21), 140.4(C-22), 201.6(C-23), 13.6(C-24), 10.6(C-25), 123.2(C-2'), 110.5(C-3'), 120.1(C-4'), 122.6(C-5'), 118.3(C-6'), 111.6(C-7'), 126.9(C-8'), 132.3(C-9')

EI-MS: m/z 528(M⁺)C₃₃H₅₀N₂O₅, IR(cm⁻¹, CCl₄): 3480, 3425, 2980, 1695, 1612, 978. UV(λ , EtOH): 228, 272.5, 280, 290

<実験の部>

[K460 株]

PD 培地 20 ml/フラスコを 20°C で 3 週間静置培養を行った。アセトニトリルで菌体ごと抽出、ベンゼンで振り分け TLC かき取りで活性部分を確認。TLC (benzene:acetone=2:1) 上でグリセオフォルビンと一致した。さらに HPLC (5C₁₈, CH₃CN:H₂O=55:45 1.5ml/min) においても一致した。

[K55 株]

PD 培地 1 l を 50 ml/フラスコに分注、菌を接種後 27°C、4 日間静置培養を行った。胞子が形成されているため、アセトンを 25 ml/フラスコに加え 1 日放置後、ケイソウ土を用いて吸引口過を行った。口液は酢酸エチルにて抽出。一方、菌体部分はアセトン抽出を行ったのち酢酸エチルで振り分けた。活性の一番強い口液の酢酸エチル抽出物をシリカゲルクロマトグラフィーで分離、さらに HPLC (5C₁₈, CH₃CN:H₂O=70:30 1.5ml/min) による分取を行った。(+) -sclerotiorin 13.3mg, (+)-5-chloroisorotiorin 8.7mg, (+)-isorotiorin 3.1mg。

(+) -sclerotiorin: ¹H NMR(CDCl₃) δ 0.86(H-16), 1.01(H-21), 1.32, 1.42(H-15), 1.55(H-19), 1.83(H-20), 2.18(H-18), 2.48(H-14), 5.70(H-13), 6.08(H-10), 6.65(H-8), 7.05(H-11), 7.92(H-1) ¹³C NMR(CDCl₃) ppm 148.8(C-1), 131.9(C-2), 170.0(C-3), 84.6(C-4), 185.6(C-5), 114.6(C-6), 110.9(C-7), 115.7(C-8), 158.1(C-9), 10.3(C-10), 142.8(C-11), 138.6(C-12), 152.5(C-13), 35.1(C-14), 30.0(C-15), 11.9(C-16), 191.7(C-17), 22.5(C-18), 20.0(C-19), 20.1(C-20), 12.3(C-21), EI-MS:m/z 390(M⁺) C₂₁H₂₄O₄Cl, IR(cm⁻¹): 2960, 2930, 2875, 1741, 1720, 1671, 1638, 1621, UV(λ:EtOH): 218, 272, 369, α_D²⁰=+550° (C=0.11, CHCl₃)

(+)-5-chloroisorotiorin: ¹H NMR(CDCl₃) δ 0.86(H-16), 1.01(H-23), 1.33, 1.44(H-15), 1.71(H-21), 1.84(H-22), 2.48(H-14), 2.60(H-20), 5.73(H-13), 6.08(H-10), 6.61(H-8), 7.12(H-11), 8.83(H-1): EI-MS:m/z 414(M⁺) C₂₃H₂₄O₄Cl, IR(cm⁻¹): 2960, 2930, 2875, 1775, 1688, 1633, 1620: UV(λ:EtOH): 208, 244, 285, 423: α_D²⁰=+510° (C=0.04, CHCl₃)

(+)-isorotiorin: ¹H NMR(CDCl₃) δ 0.86(H-16), 1.02(H-23), 1.33, 1.43(H-15), 1.71(H-21), 1.82(H-22), 2.48(H-14), 2.61(H-20), 5.68(H-13), 5.98(H-10), 6.16(H-8), 7.05(H-11), 8.85(H-1): EI-MS:m/z 380(M⁺) C₂₃H₂₄O₃, IR(cm⁻¹): 2960, 2920, 2870, 1768, 1685, 1633, 1620: UV(λ:EtOH): 240, 357, 430: α_D²⁰=+421° (C=0.05, CHCl₃)

[フザリエリン A cyclic carbonate]

フザリエリン A 20 mg (50 μmol) .N.N'-carbonyl diimidazol 10.5 mg (65 μmol) を 1 ml の dry benzene に溶解し、室温下終夜攪拌。TLC (n-hexane:iso-

<実験の部>

ProOH=2:1) で反応の進行を確認後 H₂O を加え、benzene にて抽出し、分離を行い cyclic carbonate 17 mg を得た。

fusarielin A cyclic carbonate: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.77(CH₃-21), 1.02(H-10), 1.13(CH₃-24), 1.23(H-9), 1.27(CH₃-23), 1.51(H-14), 1.60(CH₃-20, 25), 1.64(H-13), 1.68(CH₃-22), 1.75(H-10), 2.08(H-13), 2.15(H-8), 2.22(H-2), 2.48(H-17), 2.72(H-15), 2.91(H-11), 4.06(H-1), 4.28(H-1), 4.60(H-3), 5.20(H-19), 5.32(H-7), 6.03(H-5), 6.26(H-6)

[フザリエリン A からフザリエリン B へのエポキシド開裂反応]

fusarielin A 40.2 mg (100 μmol) を DMSO 6 ml に溶解し、攪拌下 p-トリス(4)フェノール水溶液 (20mg/100ml) 8 ml を加える。24 時間後 TLC にて反応が進んでいることを確認した後、NaHCO₃ 溶液で中和し benzene-acetone で抽出、シリカゲルクロマトグラフィーにて分離。fusarielin B 30 mg, 副生成物 FSB2 17 mg。

FSB2: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.60(H-10), 0.66(CH₃-21), 1.02(CH₃-23), 1.12(CH₃-24), 1.27(H-9), 1.35(H-13, 14), 1.44(H-10), 1.60(CH₃-20, 25), 1.61(CH₃-22), 1.72(H-13), 2.16(H-8), 2.72(H-15), 3.23(H-11), 3.29(H-1), 3.53(H-1), 3.61(H-3), 4.23(12-OH), 4.31(1-OH), 4.35(11-OH), 4.69(3-OH), 5.16(H-7), 5.19(H-19), 5.82(H-6), 6.18(H-6)

[フザリエリン C]

fusarielin C: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.82(CH₃-21), 1.10(H-10), 1.22(H-9), 1.23(CH₃-23), 1.35(H-13), 1.47(CH₃-24), 1.52(CH₃-25), 1.56(CH₃-20), 1.63(CH₃-22), 2.00(H-13), 2.06(H-8), 2.53(H-17), 2.92(H-11), 3.32(H-1), 3.54(H-1), 3.65(H-3), 4.23(1-OH), 4.62(3-OH), 5.13(H-19), 5.22(H-7), 5.23(H-15), 5.83(H-5), 6.23(H-6), ¹³C NMR(DMSO-d₆, 50°C) ppm 11.4(C-22), 13.2(C-20), 13.7(C-21), 17.8(C-25), 21.6(C-24), 22.5(C-23), 29.7(C-10), 33.2(C-9), 33.9(C-14), 37.4(C-13), 38.4(C-2), 47.5(C-8), 53.9(C-17), 57.5(C-12), 58.3(C-11), 63.8(C-1), 78.9(C-3), 122.0(C-19), 125.3(C-5), 126.0(C-15), 126.4(C-6), 134.0(C-18), 134.4(C-16), 134.9(C-7), 137.3(C-4), FSB-MS: m/z 409(M+Na⁺) C₂₃H₂₄O₃(m. w. 386).

[フザリエリン D]

fusarielin D: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.77(CH₃-21), 0.97(CH₃-22), 0.98(H-10), 1.13(CH₃-24), 1.20(H-9), 1.26(CH₃-23), 1.47(H-14), 1.60(CH₃-20), 1.62(CH₃-25), 1.74(H-10), 1.87(H-2), 2.02(H-8), 2.06(H-13), 2.42(H-17), 2.69(H-15), 2.91(H-11), 3.26(H-1), 3.30(H-3), 3.43(H-1), 3.76(H-5), 3.96(1-OH), 4.47(3-OH), 5.14(H-7), 5.18(H-19), 5.45(H-6), ¹³C NMR(DMSO-d₆,

<実験の部>

50°C) ppm 12.9(C-21), 13.4(C-20), 19.7(C-22), 21.7(C-24), 22.7(C-23), 30.4(C-10), 32.5(C-9), 33.0(C-2), 33.7(C-14), 35.4(C-13), 43.2(C-8), 52.9(C-17), 57.9(C-12), 58.8(C-11), 60.5(C-16), 62.0(C-15), 67.1(C-1), 70.8(C-4), 75.4(C-5), 76.4(C-3), 124.0(C-19), 127.7(C-6), 131.6(C-7). C-25, C-18はこの条件ではシグナルとして現れていない。FAB-MS: m/z 441(M+Na⁺), C₂₅H₃₂O₂(m.w. 418)

[Ketone体]

CDでの解析を試みるために、デカリン環の11位をketoneに導いた。

① Fusarielin A から fusarielin B への変換: fusarielin A 80 mg(0.2mmol)/acetone 0.7 ml+H₂O 0.5 ml に p-TsOH 11mg/acetone 0.1 ml 室温攪拌 4 hr 後 5% NaHCO₃ にて pH 9 にして benzene/acetone で抽出。ether-benzene 系で再結晶(微細結晶) 48 mg。② acetonide: fusarielin B 10mg/dry-acetone 0.3 ml/moleculer sieve 3A 室温攪拌下 p-TsOH 0.4 mg/20 μl acetone 添加。30 min 後 pH 7 にして benzene/acetone にて抽出、H₂O 洗。5g シリカゲルカラムクロマトグラフ(F₂₅₄, CHCl₃:CH₃CN=2:1)。③ ketone: pyridine 40 μl/CH₂Cl₂(dry) 0.5 ml に CrO₃ 24 mg を少量ずつ加え室温攪拌 40 min、CrO₃ が未反応に残ったために上層を 2 ml ミクロプーへ取り出しその中へ攪拌しながら acetonide soln.(acetonide 10 mg/0.1 ml CH₂Cl₂)を滴下。40 min 攪拌。途中反応進行は TLC check。反応終了時 ether 1.2 ml を加えさらに無水 MgSO₄ 300 mg を加え攪拌。15 min 後脱脂綿 - シリカゲルにて通過。溶媒溜去後シリカゲルカラムクロマトグラフ(F₂₅₄, CHCl₃:CH₃CN = 3:1)で分離を行った。¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.56(CH₃-21), 1.13(CH₃-24), 1.14(CH₃-23), 1.24(CH₃-eq), 1.38(CH₃-ax), 1.5 - 1.6(H-9,13), 1.57(CH₃-20), 1.58(CH₃-22), 1.71(H-2), 1.84(H-13), 2.02(H-10), 2.07(H-15), 2.20(H-14), 2.27(H-10), 2.35(H-8), 3.47(H-1), 3.64(H-1), 3.86(H-3), 5.17(H-7), 5.20(H-19), 5.94(H-5), 6.25(H-6). FAB-MS: m/z 481(M+Na⁺), C₂₄H₂₄O₂(m.w. 458)

[化合物 4]

Fusarielin B (m.w. 420) 21 mg (50 μmol) を dry-acetone 1 ml に溶解し、2,2-dimethoxypropane (DMP) 200 μl を加え室温攪拌中へ pTsOH 1 mg を添加。直ちに着色。TLC check 後 acetone 2 ml を加え、2% NaHCO₃ soln. にて中和後 H₂O 1 ml 加え benzene にて抽出。シリカゲルカラムクロマトグラフにて単離。21 mg。FAB-MS: m/z 483(M+Na⁺), C₂₄H₂₄O₂(m.w. 460)

[化合物 5]

化合物 4 (m.w. 460) 4.6 mg (10 μmol) を pyridine 40 μl に溶解、p-bromo-

<実験の部>

benzoyl chrolide(m.w.219.5) 3.5 mg (16 μmol), DMAP 0.1 mg を加え攪拌。2% NaHCO₃ にて中和後 benzene/acetone にて抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフにて分離後 HPLC 分取。¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.53(CH₃-21), 1.11(CH₃-24), 1.16(CH₃-23), 1.24(CH₃-eq), 1.35(CH₃-ax), 1.37(H-13), 1.45-1.72(H-2,9,10,10,12), 1.52(CH₃-20), 1.55(CH₃-25), 1.60(CH₃-22), 1.92(H-14), 2.22(H-8), 2.50(H-17), 2.73(H-15), 3.44(H-1), 3.62(H-1), 3.81(H-3), 4.76(12-OH), 4.82(H-11), 5.07(H-7), 5.25(H-19), 5.87(H-5), 6.16(H-6), 7.77-7.84(ph). FAB-MS: m/z 644(M⁺), C₂₉H₂₈O₂Br.

[化合物 6]

Fusarielin A 40.2mg (10 μmol)/pyridine 0.4ml に pivaloyl chloride (CH₃)₃CCOCl 25 μl を加え、室温攪拌。直ちに白濁。TLC check 後 (20min) acetone+H₂O を加え benzene にて抽出。シリカゲルカラムクロマトグラフにて分離後 HPLC 分取 (nakarai 5C₁₈ 80% CH₃CN, 3 ml/min, Det.254nm)。FAB-MS: m/z 509 (M+Na⁺) C₂₉H₂₈O₂(m.w. 486)。

[化合物 7]

化合物 6 (m.w. 486) 4.9 mg (10 μmol) を pyridine 40 μl に溶解、p-bromo-benzoyl chrolide(m.w.219.5) 3.5 mg (16 μmol), DMAP 0.1 mg を加え攪拌。2% NaHCO₃ にて中和後 benzene/acetone にて抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフにて分離後 HPLC 分取。¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.90(CH₃-21), 0.97(H-10), 1.12(CH₃-24, CH₃-piva), 1.22(H-9), 1.25(CH₃-23), 1.48(H-14), 1.57(CH₃-20, 22), 1.62(H-13), 1.72(H-10), 1.74(CH₃-25), 2.06(H-13), 2.12(H-8), 2.35(H-2), 2.45(H-17), 2.71(H-15), 2.88(H-11), 4.03(H-1), 5.16(H-19), 5.22(H-3), 5.25(H-7), 6.01(H-5), 6.22(H-6), 7.74(ph), 7.88(ph). FAB-MS: m/z 693(M+Na⁺) C₂₉H₂₈O₂Br(m.w. 670)。

[化合物 8]

化合物 6 (m.w. 486) 3.5 mg (7.2 μmol) を pyridine 40 μl に溶解、(S) (または(R)) - MTPA chrolide (m.w.252.6:東京化成) 5 μl (20 μmol) を加え攪拌。2% NaHCO₃ にて中和後 benzene/acetone にて抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフにて分離後 HPLC 分取 (sensyu aquasil SS, 3.5% iso-PrOH/n-Hex)。(S)-MTPA ester: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.81(CH₃-21), 1.02(H-10), 1.13(CH₃-24), 1.16(CH₃-piva), 1.23(H-9), 1.27(CH₃-23), 1.51(H-14), 1.58(CH₃-20), 1.59(CH₃-25), 1.64(H-13), 1.71(CH₃-22), 1.73(H-10), 2.08(H-13), 2.15(H-8), 2.22(H-2), 2.47(H-17), 2.72(H-15), 2.89(H-11), 3.70(H-1), 3.92(H-1), 5.18(H-19), 5.28(H-3), 5.31(H-7), 6.07(H-5), 6.25(H-6). (R)-MTPA ester: ¹H NM

<実験の部>

R(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.85(CH₃-21), 1.03(H-10), 1.13(CH₃-24), 1.25(CH₃-piva), 1.24(H-9), 1.27(CH₃-23), 1.50(CH₃-22), 1.52(H-14), 1.59(CH₃-20), 1.60(CH₃-25), 1.65(H-13), 1.75(H-10), 2.08(H-13), 2.14(H-8), 2.24(H-2), 2.46(H-17), 2.72(H-15), 2.91(H-11), 3.93(H-1), 4.06(H-1), 5.19(H-19), 5.23(H-3), 5.30(H-7), 6.02(H-5), 6.21(H-6).

[化合物 9]

化合物 4 (m.w.460) 5.5 mg (12 μmol) を pyridine 60 μl に溶解、(S) (または(R)) - MTPA chrolide (m.w.252.6:東京化成) 8 μl (32 μmol) を加え攪拌。2% NaHCO₃ にて中和後 benzene/acetone にて抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離後 HPLC 分取 (sensyu aquasil SS, 3.5% iso-PrOH/n-Hex)。 (S)-MTPA ester: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.59(CH₃-21), 1.01(CH₃-23), 1.13(CH₃-24), 1.25(CH₃-eq), 1.36(H-13), 1.38(CH₃-ax), 1.39(CH₃-20), 1.45(H-10), 1.50(H-10), 1.51(CH₃-25), 1.52(H-9), 1.64(H-13), 1.66(CH₃-22), 1.73(H-2), 1.90(H-14), 2.23(H-8), 2.51(H-17), 2.68(H-15), 3.49(H-1), 3.66(H-1), 3.88(H-3), 4.92(H-11), 5.10(H-7), 5.15(H-19), 5.92(H-5), 6.25(H-6)。 (R)-MTPA ester: ¹H NMR(DMSO-d₆, 50°C) δ 0.59(CH₃-21), 1.09(CH₃-24), 1.12(CH₃-23), 1.27(CH₃-eq), 1.42(H-13), 1.48(CH₃-20), 1.41(H-10), 1.50(H-10), 1.37(CH₃-25), 1.41(CH₃-ax), 1.34(H-9), 1.67(H-13), 1.64(CH₃-22), 1.73(H-2), 1.87(H-14), 2.14(H-8), 2.45(H-17), 2.66(H-15), 3.50(H-1), 3.65(H-1), 3.90(H-3), 4.83(H-11), 4.87(H-7), 5.10(H-19), 5.89(H-5), 6.18(H-6)。

[微小管蛋白の精製]

ブタ脳からの微小管蛋白の精製は、2 サイクルの重合-脱重合により行った。新鮮なブタ大脳 1 g あたり 0.5 ml の microtubule assembly buffer (100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM 2-ME, 1 mM GTP, pH 6.5) を加え氷冷下 waring blender でホモゲナイズした後、4°C 50,000g で 30 分遠心した上清に同体積の glycerol buffer (100 mM MES, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM 2-ME, 1 mM GTP, 8 M glycerol, pH 6.5) を加え 37°C, 40 min インキュベートした。これを 25°C 100,000g, 45 min 遠心した後上清を捨て、重合した微小管をペレットとして集めた。氷上下、このペレットに 100 ml の microtubule assembly buffer を加えて駒込ピペットでホモゲナイズし 0°C, 30 min 放置して微小管を解重合したのち、4°C, 100,000 g で 1 時間遠心を行う。上清を取り出しこれと同体積の glycerol buffer を加えた後 -70°C で保存した。これと同様の重合-脱重合をもう 1 サイクル繰り返すことにより微小管蛋白を得た。

<実験の部>

[微小管蛋白重合阻害活性の測定]

微小管の重合は濁度法により測定を行った。濁度は島津 UV-300 分光光度計を用い、37°C, 400 nm における吸収の変化を観察した。蛋白濃度は 2 mg/ml、使用した DMSO の量は最終濃度 2 % (v/v) とした。

文献

序章

- 1) T.D. 7'opka. 微生物の一里塚(藤野恒三郎・日本防菌防微学会翻訳委員会訳、近代出版)。(1985)
- 2) van Leeuwenhoek, A.. Observations... concerning little animals observed in rain, well-, sea- and snow-water. Philosophical Transaction of the Royal Society of London. 11, 821-831 (1677)
- 3) Fracastoro, G.. Contagione. Contagious Diseases and their Treatment. (1546)
- 4) Pasteur, L.. Memoir on the alcoholic fermentation. Annales de Chimie et de Physique. 58, 3rd Series, 323-426 (1860).
Pasteur, L.. Animal infusoria living in the absence of free oxygen, and the fermentations they bring about. Comptes rendus de l'Academie des sciences. 52, 344-374 (1861).
Pasteur, L.. On the organized bodies which exist in the atmosphere; examination of the doctrine of spontaneous generation. Annales des sciences, 4th series, 16, 5-98 (1861)
- 5) Koch, R.. The etiology of anthrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. Beitrage zur Biologie der Pflanzen. 2, 277-310 (1877)
- 6) von Behring, E. and Kitasako, S.. The mechanism of immunity in animals to diphtheria and tetanus. Deutsche Medizinische Wochenschrift. 16, 1113-1114 (1890)
- 7) Gram, C.. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. Fortschritte der Medicin. 2, 185-189 (1884)
- 8) Semmelweis, I.. Lecture on the genesis of puerperal fever (childbed fever). Protokoll der allgemeinen Versammlung der k. k. Gesellschaft der Aerzte zu Wien, vom 15 May (1850)
- 9) Lister, J.. On the antiseptic principle in the practice of surgery. British Medical Journal. 2, 246 (1867)
- 10) Florey, H.W., Chain, E., Heatley, N.G., Jennings, N.G., Jennings, M.A., Sanders, A.G., Abraham, E.P. and Florey, M.E.. "Antibiotics." Oxford University Press, 1949

- 11) Fleming, A.. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Brit. J. Exp. Pathol., 10, 226-236 (1929)
- 12) Domagk, G.. A contribution to the chemotherapy of bacterial infections. Deutsche medizinische Wochenschrift. 61, 250-253 (1935)
- 13) Chain, E., Jennings, M.A., Florey, H.W., Orr-Ewing, J., Gardner, A.D. and Sanders, A.G.. Penicillin as a chemotherapeutic agent. Lancet. 2, 226 (1940), Abraham, E.P., Gardner, A.D., Chain, E., Heatley, N.G., Fletcher, C.M., Jennings, M.A. and Florey, H.W., Further observations on penicillin. *ibid.* 2, 177 (1941)
- 14) Tyrothricin contains from 10 to 20% gramicidin and from 40 to 60% tyrocidine.
- 15) Waksman, S.A.. Definition of antibiotics. Antibio. Chemoth., 6, 90 (1956)
- 16) Woodruff, H.B. and Waksman, S.A.. Historical background of actinomycins. Ann. N.Y. Acad. Sci., 89, Art. 2, 287-298 (1960)
- 17) Bartz, Isolation and characterization of chloromycetin. J. Biol. Chem. 172, 445 (1948)
- 18) Duggan, Ann. N.Y. Acad. Sci., 51, 177 (1948)
- 19) Regna, P.P. and Solomons, I.A.. The chemical and physical properties of terramycin. Ann. N.Y. Acad. Sci. 53, 221 (1950)
- 20) 梅沢浜夫. 抗生物質 100 年と将来の展望、*フォルマシア*. 16, 479-492 (1980) を改変
- 21) Yabuta, S., Sumiki, Y.. 稲馬鹿苗病菌の生化学。植物を徒長せしむる作用ある物質 Gibberellin の結晶に就いて。J. Agr. Chem. Sci. Japan. 14, 1526 (1938)
- 22) 鈴木直治. 植物の病気、岩波講座：現代の生物学、第 8 巻、(1966)
- 23) Clauson-Kaas, N., Plattner, P.A. and Gaumann, E., Ber. Schweiz. Bot. Ges., 54, 523 (1944)
- 24) Rosett et al. Studies in the biochemistry of micro-organisms, metabolites of *Alternaria tenuis* AUCT culture filtrate products. Biochem. J., 67, 390 (1957)
- 25) Yabuta, T., Kanbe, S. and Hayashi, T.. 稲の馬鹿苗病菌の生化学、馬鹿苗病菌の一新生産物 fusarinsäure に就いて。J. Agr. Chem. Soc. Japan. 10, 1059 (1934)
- 26) Nakamura, R. and Ishibashi, K.. On the new antibiotics "ophyobolin", produce by *Ophyobolus miyabenus*. J. Agr. Chem. Soc. Japan. 32, 739

(1958)

- 27) Iwasaki, S., Nozoe, S., Okuda, S., Sato, Z. and Kozaka, T., Isolation and structural elucidation of a phytotoxic substance produced by *Pyricularia oryzae* Cavar. Tetrahedron Lett., 3977 (1969)

第一章

- 1) 茨木忠雄, イネ苗立枯病に関する研究1、高温下における *Rhizopus* 属菌の障害。日植病報, 39, 141 (1973)
- 2) 茨木忠雄, イネ苗立枯病に関する研究2、高温下における *Rhizopus* 属菌の障害。日植病報, 39, 191 (1973)
- 3) 古谷真二、倉田宗良、齊藤 正、*Rhizopus* 属菌によるイネ稚苗の生育障害とその予防に関する研究。四国植防研究, 9, 49-55 (1974)
- 4) 矢尾板恒雄、郷 直俊、青柳和雄、浅野 勇、横山竜夫、イネ箱育苗に発生する *Rhizopus* 菌の防除、第4報、*Rhizopus chinensis* Saito について。北陸病虫研報, 24, 60-63 (1976)
- 5) 郷 直俊、佐藤善司、矢尾板恒雄、青柳和雄、イネ箱育苗に発生する *Rhizopus* 属菌の防除、第5報、*Rhizopus* 属菌の産生物質がイネ幼苗におよぼす影響。北陸病虫研報, 26, 90-94 (1978)
- 6) Seto, H., Sasaki, T., Yonehara, H. and Uzawa, J., Studies on the biosynthesis of pentalenolactone, part I. Application of long range selective proton decoupling (LSPD) and selective ¹³C-(1H) NOE in the structure elucidation of pentalenolactone G. Tetrahedron Lett., 923 (1978)
- 7) Stothers, J. B., Carbon-13 NMR Spectroscopy. Academic Press, New York (1972).
- 8) Bobey, F. A., Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Academic Press, New York (1969).
- 9) Hiemstra, H., Houwing, H. A., Possel, O. and van Leusen, A. M., Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of oxazoles. Can. J. Chem., 57, 3168 (1979)
- 10) Breitmaier, E. and Voelter, W., ¹³C NMR spectroscopy. Verlag Chemie (1978)
- 11) Iwasaki, S., Namikoshi, M., Kobayashi, H., Furukawa, J., Okuda, S., Itai, A., Kasuya, A., Iitaka, Y. and Sato, Z., Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VIII. absolute structures of rhizoxin and a

- related compound. J. Antibio., 39, 424-429 (1986)
- 12) Mosbach, K., The role of propionic acid in *Penicillium baarnense*. Formation of homoserellinic acid by utilization of propionic acid. Acta Chem. SCAND., 18, 1591-1595 (1964). Steyn, P. S., Vleggaar, R. and Wesseles, P. L., Biosynthesis of the Aurovertins B and D. The role of methionine and propionate in the simultaneous operation of two independent biosynthetic pathways. J. Chem. Soc. PT1, 1298-1308 (1981)
- 13) Miller, J. H., Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory (1972)
- 14) Kingston, D. G. I., Kolpak, M. X., LeFevre, J. W. and Grochtmann, I. B., Biosynthesis of antibiotics of the virginiamycin family 3. Biosynthesis of Virginiamycin M₁. J. Am. Chem. Soc., 105, 5106-5110 (1983)
- 15) 日本アイトロープ協会編, ラジオアイトロープ薬物代謝実験法、丸善閣、(1980)
- 16) Takahashi, M., Iwasaki, S., Kobayashi, H., Okuda, S., Murai, T., Sato, Y., Haraguchi-Hiraoka, T. and Nagano, H., Studies on macrocyclic lactone antibiotics XI. Anti-mitotic and anti-tubulin activity of new antitumor antibiotics, rhizoxin and its homologues. J. Antibiot., 40, 66-72 (1987)
- 17) Takahashi, M., Iwasaki, S., Kobayashi, H., Okuda, S., Murai, T. and Sato, Y., Rhizoxin binding to tubulin at the maytansine-binding site. Biochem. Biophys. Acta, 926, 215-223 (1987)
- 18) 野田孝人、羽柴輝良、佐藤善司、*Rhizopus chinensis* Saito によるイネ苗立枯病罹病根の組織学的観察。日植病報, 46, 40 (1980)
- 19) Komoda, Y. and Isogai, Y., Scientific Paper of the College of General Education, Univ. Tokyo, 28, 129 (1978)
- 20) Mandelbaum-Shavit, F., DeFilippes, M. K. W. and Johns, D. G., Binding of maytansine to rat brain tubulin. Biochem. Biophys. Res. Comm., 72, 47 (1976)
- 21) Tsuruo, T., Oh-hara, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., Sato, Z., Matsuda, I., Iwasaki, S., Okuda, S., Shimizu, F., Sasagawa, K., Fukami, M., Fukuda, K. and Arakawa, M., Rhizoxin, a macrocyclic lactone antibiotic, as a new antitumor agent against human and murine tumor cells and their vincristine-resistant sublines. Cancer Res., 46, 381-385 (1986)
- 22) Iwasaki, S., Namikoshi, M., Kobayashi, H., Furukawa, J. and Okuda, S., Studies on macrocyclic lactone antibiotics. IX; Novel macrolides

- from the fungus *Rhizopus chinensis*. Precursor of rhizoxin.
Chem. Phar. Bull., 34, 1387-1390 (1986)
- 23) Inui, T., Takeda, Y. and Iizuka, H., Taxonomical studies on genus *Rhizopus*. J. Gen. Appl. Microbiol., 11, 1-121 (1965)
- 24) Tokiwa, Y., Miyoshi-Saitoh, M., Kobayashi, H., Sunaga, R., Konishi, M., Oki, T. and Iwasaki, S., Biosynthesis of dinemicin A, a 3-ene-1,5-diyne antitumor antibiotics., J. Am. Chem. Soc., 114, 4107-4110 (1992)
- 25) 有馬啓、緒田原啓二、新抗生物質リゾプチンの製造法。
特許公報、昭 46-30793

第二章

- 1) Dustin, P., Microtubules. Springer-verlag. (1984)
- 2) Weisenberg, R.C., Borisy, G.G., and Taylor, E.W., The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. Biochemistry, 7, 4466 (1968)
- 3) Owellen, R.J., Donigain, D.W., Hartke, C.A., Dickerson, R.M., and Kuhar, M.J., The binding of vinblastine to tubulin and to particulate fractions of mammalian brain. Cancer Res., 34, 3180 (1974)
- 4) Jesus, A., Microtubules proteins. CRC Press, Inc., (1990)
- 5) Hamel, E., del Campo, A.A., Love, M.C., and Lin, C.M., Interactions of taxol, microtubule associate proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. J. Biol. Chem., 256, 11887 (1981)
- 6) Gaskin, F., Cantor, C.R., and Shelanski, M.L., Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine microtubules. J. Mol. Biol., 89, 737 (1974)
- 7) Richmond, D.V., Effects of toxicants of the morphology and fine structure of fungi. Adv. Appl. Microbiol., 19, 289 (1975)
- 8) Brian, P.W., Studies on the biological activity of griseofulvin. Ann. Bot., 13, 59-77 (1949)
- 9) Micekova, D. et al. Z. Allg. Mikrobiol., 13, 287 (1973)
- 10) Betina, V., and Micekova, D., Morphogenetic activity of cytochalasins, cyanein, and monorden in *Botrytis cinerea*. Zeitsch. Allg. Mikrobiol., 13, 287-298 (1973)

- 11) Isono, K., Kobinata, K., Sasaki, K., and Suzuki, S., Isolation and characterization of polyoxins J, K and L. New components of polyoxin complex. Agr. Biol. Chem., 32, 792 (1968)
- 12) Gunji, S., Arima, K., and Beppu, T., Screen of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. Agric. Biol. Chem., 47, 2061 (1983)
- 13) Hamamoto, T., Seto, H., and Beppu, T., Leptomycin A and B. New antibiotics II, structure elucidation. J. Antibiot., 36, 646 (1983)
- 14) 吉田稔、別府輝彦、細胞周期の進行とその制御の阻害剤。蛋白質核酸酵素 38, 1753-1765 (1993)
- 15) 貫名学、菌糸の異常形態を誘導する菌類二次代謝産物。化学と生物、25, 358-360 (1987)
- 16) 清遠純夫、抗癌抗生物質の探索。遺伝、43, 74-79 (1989)
- 17) Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., Hashimoto, K., Fujita, S., and Furuya, T., Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*. J. Am. Chem. Soc., 108, 2780 (1986)
- 18) 小林昭雄、ウニ胚の初期発生解析に基づく細胞分裂阻害物質の検索と化学的研究。日本農芸化学会誌、60, 725-735 (1986)
- 19) Simpkin, K.G., and Coles, C.C., The use of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. J. Chem. Technol. Biotechnol., 31, 66-69 (1981)
- 20) 川井悟、水谷純也、緑虫を用いた生理活性物質の検出。化学と生物、29, 283-285 (1991)
- 21) Otaguro, K., Liu, Z., Fukuda, K., Li, Y., Iwai, Y., Tanaka, H., and Omura, S., Screening for new nematocidal substances of microbial origin by a new method using the pine wood nematode. J. Antibiotics, 41, 573-575 (1988)
- 22) Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., and Kuwano, H., Structures of chaetoglobosin A and B, cytotoxic metabolite of *Chaetomium globosum*. Tetrahedron Lett., 2109 (1973)
- 23) Shelanski, M., Gaskin, F., and Cauter, C.R., Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70, 765 (1973)
- 24) Sato, Y., Saito, Y., Tezuka, T., Sekita, S., Yoshihira, K. and Natori, S., Viscometric analysis of effects of cytochalasins on *in vitro* polymerization and depolymerization of microtubules. J. Pharm. Dyn., 5, 418-422 (1982)

<文献>

- 25) 貫名学、いもち病菌の代謝産物の菌株間比較と新代謝産物 Pyrichalasin H の構造、天然有機化合物討論会要旨集、705-709 (1988)
- 26) Umeda, M., Ohtsubo, K., Saito, M., Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Sakabe, F., and Kurata, H., Cytotoxicity of new cytochalasins from *Cheatomium globosum*. *Experientia*, **31**, 435-439 (1975)
- 27) Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Sakabe, F., Kurata, H., and Umeda, M., Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(Indol-3-yl)-[13]cytochalasins from *Cheatomium* spp. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 1609-1617 (1982)
- 28) Dean, F. M., Staunton, J., and Whalley, W. B., The chemistry of fungi. Part XXXVI. A revised structure for sclerotiorin. *J. Chem. Soc. C*, 3004, (1959); Holker, J. S. E., Ross, W. J., Staunton, J., and Whalley, W. B., The chemistry of fungi. Part XL. Further evidence for structure of sclerotiorin. *J. Chem. Soc. C*, 4150 (1962)
- 29) Gray, R. W., and Whalley, W. B., The chemistry of fungi. Part LXIII. Rubrorotiorin, a metabolite of *Penicillium hirayamae* Udagawa. *J. Chem. Soc. (C)*, 3575 (1971)
- 30) Nelson, P. E., Toussoun, T. A., and Marasas, W. F. O., *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State Univ. Press, (1983)
- 31) 原田宣之、中西香爾、円二色性スペクトル—有機立体化学への応用—、東京化学同人 (1982)
- 32) Ohtani, I., Kusumi, T., Kashman, Y., and Kakisawa, H., High-field FT NMR application of Mosher's method. The absolute configurations of marine terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 4092-4096 (1991)
- 33) Kilmartin, J. V., Purification of yeast tubulin by self-assembly in vitro. *Biochemistry*, **20**, 3629 (1981)
- 34) Endo, A., Kuroda, M., and Tsujita, Y., ML-236A, MA-236B, and ML-236C. New inhibitor of cholesterol synthesis produced by *penicillium citrinum*. *J. Antibiotics*, **29**, 1346 (1976)
- 35) Ichihara, A., Oikawa, H., Hayashi, K., and Sakamura, S., Structure of betaenones A and B, novel phytotoxins from *Phoma betae* Fr. *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 2707-2908 (1983)
- 36) Nozawa, K., Nakajima, S., Udagawa, S., and Kawai, K., Isolation and structure of a new 1-decalone derivative, rapiculine, from *Ramichloridium apiculatum*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* (1991)

<<文献>

- 37) Celmer, W. D., Chmurny, G. N., Moppette, C. E., Ware, R. S., Waits, P. C., and Whipple, E. B., Structure of natural antibiotic CP-47,444. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 4203 (1980)
- 38) Muntzler, R., and Keller-Schierlein, Die struktur des chlorothricins, eines neuartigen makrolid-antibiotikums. *Helv. Chim. Acta*, **55**, 2071 (1975)
- 39) Cane, D. E., and Yang, C., Biosynthetic origin of the carbon skeleton and oxygen atoms of nargenicin A. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 784 (1984)
- 40) Koiso, Y., Natori, M., Iwasaki, S., Sato, S., Sonoda, R., Fujita, Y., Yaegashi, H., and Sato, Z., Ustiloxin, a phytotoxin and a mycotoxin from flase smut balls on rice panicles. *Tetrahedron Lett.*, **33**, 4157 (1992)
- 41) 別府輝彦、細胞形態異常を指標としたスクリーニング、蛋白質核酸酵素学、**38**, 1639-1646 (1993)

謝 辞

本研究を行うに当たって、終始懇到な御指導と貴重な御意見を与えていただきました東京大学分子細胞生物学研究所教授岩崎成夫先生、同研究所助教橋本祐一博士に心より感謝致します。

また、同研究所教授瀬戸治男先生には懇切なる御指導を賜るとともに、NMR測定に便宜を図っていただきましたこと深く感謝いたします。さらに、農学部降旗一夫博士にはNMRの測定について手とり足とり指導していただきました。

リゾキシンの構造研究の第一歩は、研究室の旅行で北陸農業試験所を訪問した時、佐藤善司先生からイネの根が膨らんだ写真を見せていただき、奥田重信先生がこの活性物質の探究を私に任せて下さったことから始まりました。

佐藤善司先生にはリゾキシンの培養をお願いすると共に、先生の豊富な経験と鋭い観察力を踏まえた自然に対する洞察を開かせていただきました。さらに、スクリーニング法に対する示唆を授けていただきましたこと心より感謝致します。

この研究は旧応用微生物研究所時代にその大半が行われました。そして本当に多くの方々の協力により発展することができました。日野宏子さんは元素分析でフザリエリンAの研究に推進力をつけてくれました。森崎尚子博士は難しいマススペクトロメトリーの測定を親身に手伝っていただきました。小磯邦子さんは生物の取り扱いや分離手段について示唆を下さいました。古川淳博士にはリゾキシンの化学反応に協力をいただきました。浪越通夫博士にはリゾキシン関連化合物の分離と立体構造の決定に携わっていただきました。研究室の人数が少なかった頃、高橋正明博士は良き遊び相手でもあり良き先生でもありました。彼からは微小管蛋白の取り扱いを教わり、リゾキシン耐性株を買いました。リゾキシンの生合成は熊野(山田)栄美子さん、形態異常の研究は福井多佳子さん、山崎綾子さんに手伝っていただきました。ダイネミシンAの生合成で苦勞をかけた須永理恵さんにはフザリエリンAの生合成で協力してもらいました。山下裕紀子さんはスクリーニングとリゾキシン生合成前駆体の問題で力を借りました。感謝いたします。

そして、微小管重合阻害剤とチューブリンの相互作用の研究で博士号を取った李茵さんには、阻害実験での協力を感謝すると共に、励まされ応援していただいたこと心よりお礼いたします。

X線構造解析は東京大学薬学部助教板井昭子博士、円二色性スペクトルは共立薬科大学教授佐藤良博博士、同講師小田泰子博士、東北大学反応化学研究所教授原田宣之博士、マススペクトロメトリーは東京薬科大学助教志田保夫博士にそれぞれ手伝っていただきました。深く感謝いたします。

謝 辞

さらに、次の方々にも本研究に際し多大な協力をいただきました。岩本野田孝人博士、松田泉博士、鈴木日出夫博士、飯高洋一博士、柏谷教博士、長野弘博士、平岡徳子博士、中島栄一博士、磯野藤男博士、加藤雄三博士、三好恵さん、常盤秀志博士、嶋澤るみ子さん、澤田孝之さんたちにも心より感謝致します。

加えて応用微生物研究所第8研究部に在籍していた方々、また応微研の多くの方々のお力をお借り致しました。有難うございます。

この研究の間に私の恩師、東京大学名誉教授奥田重信先生が思いもよらず早くに亡くなられたのは本当に残念な出来事でした。

こうして論文を上梓できたのは、岩崎成夫教授の御理解と忍耐の賜であります。困難な状況を克服できるように、何時も援助を惜みず多くの御便宜を図っていただきましたこと重ねて御礼申し上げます。

この論文の作成に際しては、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生(1993.12.17)から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。また、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。また、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。

また、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。また、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。また、東京大学理学部化学系教授岩崎成夫先生から、フザリエリンAの構造解析に関する貴重な資料を御提供いただきました。

