〔農化 第 37 卷, 第 4 号, p. 240~243, 1963〕

Oospora astringenes の培養から

新イソクマリン誘導体 K-1 の分離

大和谷三郎, 山野藤吾, 高津嘉春, 阿部又三 (武田薬品工業株式会社研究所)

昭和 37 年 12 月 10 日 受 理

小林⁽¹⁾はアレルギーの不明な気管支喘息発作には微生物, とくにカビ類の代謝生産する特定の物質が関係しているのではなかろうかとの見解の下で, 毎年一定時期に気管支喘息の発作を起こす患者の居室内から多数のカビ類を分離, 培養するとともにそれら培養物のモルモット気管筋に対する作用をしらべた結果, *Oospora* 属の 1 菌株が強力な気管筋収縮作用物質を生産することを発見した. この菌株は協力者山本⁽²⁾によって *Oospora astringenes* Yamamoto と命名されたが, これに先立ち山本⁽³⁾はこの菌の培養物から eburicoic acid のほかに 0-1 および 0-2 と仮称する 2 種の未知物質を分離した. つづいて山本ら^(4,5)はこれら 2 種の未知物質がいずれもイソクマリン誘導体であることを明らかにし, それらの構造を I 式および II 式としてそれぞれに oospolactone および oosponol の名を与えた. また同時に, これら 2 種の化合物中, モルモット気管筋を強力に収縮する物質は oosponol であり, かつこの oosponol の収縮作用はきわめて特異のものであることが小林ら⁽⁶⁾によって明らかにされた.

著者らは, 上記小林のすすめにより *Oospora astringenes* について, これら化合物を多量に生産するための培養条件を検討してきたが, このほどこの菌株が oospolactone および oosponol だけでなく, ペーパークロマトグラム上でこれら両物質と同様の呈色像を与えるもう 1 つの物質をも生産することを見出した. しかもこの未知物質はどの種の培養基上においても必ず生産されること, また培養条件によっては, ほとんどこの物質だけが生産されることなどを認めることができた. これらのことは本物質が oospolactone あるいは oosponol ときわめて近縁の化合物であるばかりでなく, これら両物質と相互に密接な関係の下に生成されるものであることを示していると思われる. 少なくともこの未知物質がどのような性質をもつものであるかは諸種の面から甚だ興味のあるところであって, 著者らは今回この未知物質を K-1 と仮称するとともに, とりあえずその抽出分離を試み, その目的を達することができたので報告する.

ここに得られた物質 K-1 は, m. p. 116° (uncorr.), $[\alpha]_D^{25} = -71^\circ$ (ピリジン) を示し, 元素分析と分子量測定との結果は, oosponol (II) よりも水素が 2 原子多い $C_{11}H_{10}O_5$ の分子式に相当した. またその紫外線吸収スペクトルは oospolactone (I) の示すそれとほぼ一致し, その赤外線吸収スペクトルから見ても本物質が oosponol, oospolactone と同様のイソクマリン核をもち, これらと構造類似の新物質であることは明らかである. なお, 新物質 K-1 の化学構造については今にわかに判断し得ないが, 上記の諸性質から見て III 式で示される構造をもつのではないかと推察される.

実 験 の 部

[I] *Oospora astringenes* 代謝生産物のペーパークロマトグラフィー *Oospora astringenes* Yamamoto の胞子を麦芽汁培養液に接種して 26° のもと, 約 25 日間静置したのちこれを菌苔と培養液とに濾別した. 次に

* Isolation of a New Isocoumarin Derivative, K-1, from the Saprophytic Culture of *Oospora astringenes*.

By Saburō YAMATODANI, Tōgo YAMANO, Yoshiharu KŌZU and Matazō ABE (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.)

第 1 表 *Oospora astringenes* 代謝生産物のペーパークロマトグラム
(展開液: 1.5 N アンモニア水-*n*-ブタノール 1:1 の上層液)

物質名	R_F 値	紫外線による蛍光像	塩化鉄溶液による呈色像
K-1	0.70	あり	紫色
Oospolactone (0-1)	0.85	あり	紫色
Oosponol (0-2)	0.15	なし	赤紫色

濾液を pH 2.0 に調整し、エーテルとくりかえしふりまぜて塩化鉄反応陽性物質をほぼ完全に抽出した。このエーテル溶液を脱水、濃縮、乾涸し、残留物を少量のメタノールに溶解して試料とした。

上記のようにして調製した試料について東洋濾紙 No. 51 (1.5×50 cm) と 1.5 N ア

ンモニア水-*n*-ブタノール 1:1 の割合にふりまぜて得た上層液とを用いて上昇法によって展開し、展開後濾紙を風乾して紫外線下で蛍光像の有無をしらべたのち 0.5% 塩化第二鉄水溶液を噴霧した。第 1 表はその結果を示したもので、これにより供試の菌株が既知の oospolactone (0-1), oosponol (0-2) のほかに塩化鉄で紫色に呈色し、紫外線下で蛍光像として認められるもう 1 つの物質、K-1 をも生産することが初めて知られた。

[II] *Oospora astringenes* の培養から K-1 その他塩化鉄反応陽性物質の分離

培養法: 前項で用いた *Oospora astringenes*⁽²⁾ を母株とし、単孢子分離法によって未知物質 K-1 を比較的多量に生産する 1 株を選び、一方においては同物質を多量に生産させるのに適した培地組成を検討してブドウ糖 5%, ポリペプトン 1.0%, 酵母エキス 0.1% の水道水溶液を最適培地として選んだ。この組成の培養液を 3 l 平底瓶に 1 l ずつ分注、殺菌したのち、おのおのに前記の K-1 多量生産株の胞子を接種し、26° の下で 30 日間静置培養した。

抽出法: 上記の培養 20 個の菌苔と培養液とを濾別し、まず培養液を希リン酸溶液で pH 2.0 に調整したのち酢酸エチルとくりかえしふりまぜて塩化鉄反応物質をできるだけ完全に抽出した。次にこの酢酸エチル溶液を脱水し、減圧下で乾涸するまで濃縮したのち、ここに得られた黒褐色油状の残留物について常法によりクロロホルムおよび pH 6.0 の McIlvaine 緩衝液各 200 ml と 500 ml 分液ロート 10 本とを用いる向流抽出を行なった。こうすることにより、目的とする K-1 は主として分液ロートの 2 本目から 7 本目までの間に、また oospolactone (0-1) および oosponol (0-2) は主として 8 本目から 10 本目までにそれぞれ分別集積された。そこで K-1 を含んでいる分液ロート部分を合併し、目的物を完全にクロロホルム中に抽出した。なお、oospolactone および oosponol 部分として区別した分液ロートの 8 本目から 10 本目までの部分は、それらのクロロホルム層には主として oosponol が含まれているが、緩衝液部分にはかなりの K-1 を含んでいるので、緩衝液部分だけをもう 1 度前記と同様の向流抽出に付し、K-1 を完全に oosponol および oospolactone と分別した。ここに得られた K-1 部分は前記同様、クロロホルムで抽出してさきに得た K-1 のクロロホルム溶液と合併した。このクロロホルム溶液を脱水したのち乾涸するまで濃縮し、残留物を少量の酢酸エチルに溶解して冷所に放置し、目的とする K-1 を結晶として析出させた。収量 17.5 g。

次に oosponol および oospolactone 部分として残した部分は、これを K-1 の場合と同様にしてクロロホルムで抽出し、脱水後乾涸するまで濃縮したのち、残留物をメタノールに溶解して少量になるまで濃縮すると容易に oosponol の針状結晶が析出した。収量 1.5 g。なお、oosponol を析出させた母液中には oospolactone がかなり濃縮されて含まれているので、この母液を乾涸したのち石油エーテルで処理した。この処理により oospolactone だけが石油エーテルに溶出され、oosponol が残留する。ついでそれぞれの部分をメタノールで処理して oospolactone 400 mg と oosponol 100 mg とを得た。また菌体部分からはこれを風乾したのちアセトン抽出を行ない、アセトン溶液を濃縮、乾涸したのちメタノールで処理して oospolactone の結晶約 10 g を得た。

[III] 新物質 K-1 の理化学的諸性質 本物質は各種の有機溶媒に易溶性であるが、エタノール、メタノール、酢酸エチルなどから微細な針状結晶として析出し、m. p. 116° (uncorr.), $[\alpha]_D^{25} = -71^\circ$ ($c=1.0$, pyridine) を示す。元素分析ならびに分子量測定の結果は次のとおりであって、本物質は oosponol よりも水素 2 原子だけ多い分子式 $C_{11}H_{10}O_5$ に相当する。

$C_{11}H_{10}O_5$ 計算値: C 59.46, H 4.54%, 分子量 222.19

測定値: C 59.40, H 4.56%, 分子量 225 ± 25 (Barger 法)

本物質の紫外線吸収スペクトルは第 1 図に示した如くで、oospolactone の示すそれとほぼ一致する。またその赤外線吸収スペクトルは第 2 図に示した如くで、1700 cm^{-1} 付近の CO に関する吸収は oospolactone の示すそ

第1図 K-1および関連物質の紫外外部吸収スペクトル (アルコール溶液)
 — K-1 Oospolactone
 --- Oosponol

れとはほぼ同様で, oosponol の示すものとは異なっている. また, 3500 cm^{-1} 付近の OH に関する吸収が他のいずれよりも強くなっていることが知られる. これらの諸性質から見て本物質が oosponol の CO 基が還元されたⅢ式のような構造をもつものではないかと推察される.

なお, 本物質の構造決定に関しては金沢大山本教授の下で, また薬理作用に関しては日本医大大橋教授の下でそれぞれ研究が進められており, それぞれ別途に報告される予定である.

要 約

(1) *Oospora astringenes* Yamamoto の培養物中に oospolactone あるいは oosponol などとともに, これらと同様に塩化鉄反応陽性を示す新物質 K-1 を見出し, これらをそれぞれ結晶状に単離することに成功した.

(2) 新物質 K-1 の理化学的諸性質を明らかにし, 本物質を oosponol の CO 基が還元されたグリコール型の構造をもつ1種のイソクマリン誘導体と推定した.

終りに本研究実施の機会を与えられ, 終始御指導御鞭撻くださ

第2図 K-1 および関連物質の赤外部吸収スペクトル (KBr disk)

った当社会長三宅 馨博士, 前研究所長桑田 智博士および現所長立岡末雄博士に深甚の謝意を表する。また本研究課題を提供せられ終始御懇篤な御指導を賜った東大名誉教授小林芳人先生に対し, さらに種々の御助言を戴いた日本医科大学大橋 茂教授, 金沢大学山本譲教授および神戸衛生研究所山本功男技官に対しそれぞれ深謝する。なお本研究に御助力願った山田三郎, 荒井栄男および岸野和之の諸氏, 元素分析ならびに諸種の理化学的測定を担当してくださった研究所第 3 部の方々に厚く感謝する。

-
(1) 小林芳人 : 日新医学, 48, 287 (1961).	<i>ibid.</i> , 25, 405 (1961).
(2) I. Yamamoto : <i>Agr. Biol. Chem.</i> , 26, 341 (1962).	(5) I. Yamamoto, K. Nitta, Y. Yamamoto : <i>ibid.</i> , 26, 486 (1962).
(3) I. Yamamoto : <i>ibid.</i> , 25, 5 (1961).	(6) 小林芳人, 大橋 茂, 山口 優, 山本功男 : 日新医学, 49, 660 (1962).
(4) I. Yamamoto, K. Nitta, Y. Yamamoto :	
-