Penicillium roqueforti の培養から festuclavine および

3 種の新インドール・アルカロイド roquefortine

A, B および C の分離*

大桃定洋, 佐藤隆男, 歌川貞一, 阿部又三

(東京教育大学農学部)

昭和 50 年 7 月 10 日 受理

Isolation of Festuclavine and Three New Indole Alkaloids,

Roquefortine A, B and C from the Cultures of

Penicillium roqueforti

(Production of Alkaloids and Related Substances by Fungi Part XII)

By Sadahiro OHMOMO, Takao SATO, Teiichi UTAGAWA and Matazo ABE

Laboratory of Industrial Microbiology, Faculty of Agriculture,

Tokyo University of Education, Komaba, Meguro-ku, Tokyo

A penicillium strain having the ability to produce several indole alkaloids in surface and submerged cultures was isolated from the soil of the surrounding of laboratory. By close investigations into morphological characteristics, this strain was identified as *Penicillium roqueforti* Thom.

By the routine procedures using alumina column chromatography, four indole alkaloids, "X-1," "X-2," "X-3" and "Y," were isolated in crystalline form from the surface cultures of mold mentioned in the yields of 230, 15, 16 and 28 mg, respectively, when a selected strain was grown at 22°C for 15 days in 200 Roux flasks (1 liter capacity), containing each 150 ml of the medium composed of mannitol (30 g), glucose (10 g), succinic acid (10 g), KH_2PO_4 (1.0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 g), NH_4OH (to pH 5.6) and tap water (1 liter).

"X-1" crystallized from methanol as colorless needles; $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$, mp 182°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -130^\circ$ ($c=0.56$, pyr.). On hydrolysis with alkali, it yielded a deacetyl derivative; $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$, colorless needles from methanol, sp 222~224°C (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -148^\circ$ ($c=0.55$, pyr.). This derivative as well as "X-1" gave a purple color with Allport and Cocking's reagent. "X-2" crystallized from methanol as colorless long needles; $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2$, mp 238~239°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -108^\circ$ ($c=0.3$, pyr.). "X-3" crystallized from methanol as colorless needles; $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$, sp 222~225°C (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -147^\circ$ ($c=0.50$, pyr.). On acetylation with acetic anhydride in pyridine, it yielded the alkaloid "X-1" mentioned above. "X-2" and "X-3" were just identical with festuclavine and the above deacetyl derivative of "X-1," respectively, not only in the said properties but also in color reactions, chromatographic behavior, and UV- and IR-spectra. "Y" crystallized from methanol as colorless needles; $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$, mp 225~228°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -764^\circ$ ($c=0.50$, pyr.). It gave a green color turning gradually into a purple color with Allport and Cocking's reagent.

"X-1," "X-3" and "Y" were undoubtedly new indole alkaloids, for which the authors proposed the names roquefortine A, B and C, respectively. From the data mentioned and from the physico- and spectro-chemical properties, roquefortine A and B were considered to be the new ergoline alkaloids having the structure of 6,9-dimethyl-7-

* 菌類によるアルカロイドおよび関連物質の生産 (第 12 報).

O-acetyl ergoline and 6,9-dimethyl-7-hydroxyl ergoline, respectively.

The main alkaloid, roquefortine A, exhibited a variety of weak pharmacological actions, such as muscle relaxant, antidepressant, local anesthetic, etc., in experimental animals. Its LD₅₀ (mg/kg, IP) in mice was 340. It has been found certainly with roquefortine B and other also in various roquefort-type cheeses on the market at the insignificant rate of 0.2~3.6 mg roquefortine A per 1 kg cheese.

(Received July 10, 1975)

緒 言

著者らは、これまでの実験結果に徴し⁽¹⁻⁴⁾、引き続き種々の天然物から、なんらかのインドール反応陽性物質をある程度まで多量に生産しうる糸状菌類の検索につとめた。この場合も、主として各地の土壌および空気中から、多種多様の糸状菌株を分離するとともに、各分離株をすべて同じ条件のもとで静置および振盪培養し、各培養物についてインドール反応陽性物質が生産されているかどうかを呈色反応によってしらべた。その結果、実験室周辺の土壌から分離したペニシリウム属 1 菌株の静置ならびに振盪の両培養において、インドール反応陽性物質が、かなり多量に生産されている事実が見出され、同時に形態学的諸性質から、この菌株が *Penicillium roqueforti* Thom 株であることも確認された。

P. roqueforti Thom がインドール反応陽性物質を多少とも生産するという事実は、Taber & Vining⁽⁵⁾ によっていち早く見出されたところである。すなわち、Taber らは *P. roqueforti* 株の静置培養物中に、微量のインドール反応陽性物質の存在する事実を認め、かつペーパー・クロマトグラフィーによって検討することにより、それが 3 種の麦角アルカロイド agreclavine, elymoclavine および penniclavine からなっているとの結論に達し、1958 年にこれを公表した。そこで著者らは取りあえず、*P. roqueforti* Thom と同定された上記の菌株を、あらためて静置および振盪培養し、各培養物中におけるインドール反応陽性物質を、薄層クロマトグラフィーによって検討してみた。その結果、供試 *P. roqueforti* 株の静置と振盪とのいずれの培養で生産されるインドール反応陽性物質も、いくつかの、いわゆるインドール・アルカロイドからなっているが、それらアルカロイドは薄層クロマトグラフィーにおける挙動において、Taber らが指摘した麦角アルカロイドのいずれとも異なるものであることが見出された。

こうした事実から著者らは、つぎに上記 *P. roqueforti*

株の培養から、個々のインドール・アルカロイドを単離して試みることとした。すなわち、まずこの菌株からコロニー分離法により、総アルカロイドを静置培養において、とくに著量に生産しうる優良株 1 株を選択するとともに、その培養条件をも設定して、静置培養法による多量培養を実施した。ついで、この培養物からアルカロイド分を常法によって抽出し、この抽出物をアルミナ・カラム・クロマトグラフィーにかけることにより、4 種のインドール・アルカロイド “X-1”, “X-2”, “X-3” および “Y” をこの順に分別するとともに、これらのいずれをも結晶として得ることに成功した。

ここに得たインドール・アルカロイドのうち、“X-1” はベンゼン、クロロホルム、メタノールなどから無色の針状結晶として析出し、mp 182°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -130^\circ$ ($c=0.56$, pyr.) を示し、分子式は $C_{18}H_{22}N_2O_2$ に相当した。一方、本アルカロイドはこれをアルカリ性下で加水分解したところ、その脱アセチル体、sp 222~224°C (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -148^\circ$ ($c=0.55$, pyr.), 分子式 $C_{16}H_{20}N_2O$ を与えた。つぎに “X-2” はベンゼン、クロロホルム、メタノールなどから無色の長針状結晶として析出し、mp 238~239°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -108^\circ$ ($c=0.3$, pyr.) を示し、分子式は $C_{16}H_{20}N_2$ に相当した。これらの諸性質から、本物質が麦角アルカロイド festuclavine⁽⁶⁾ であることには疑問の余地のないところであったが、そのクロマトグラフィーにおける挙動はもちろん、IR-スペクトルなども、festuclavine の示すところと全く一致した。また、“X-3” はメタノール、エタノールなどから無色の針状結晶として析出し、sp 222~225°C (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -147^\circ$ ($c=0.50$, pyr.) を示し、分子式は $C_{16}H_{20}N_2O$ に相当した。本アルカロイドのこのような性質、およびその他の諸性質も、“X-1” から得た上記脱アセチル誘導体の示すそれらと、すべてよく一致した。また、本アルカロイド “X-3” は、これをピリジン中、無水酢酸でアセチル化したところ、唯一の反応成積体として “X-1” そのものを与えた。さらに、“Y” はベ

ンゼン, アセトン, メタノールなどから無色の針状結晶として析出し, mp 225~228°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -764^\circ$ ($c=0.50$, pyr.) を示し, 分子式は $C_{22}H_{23}N_5O_2$ に相当した。

上記のような諸性質と後述のような理化学的諸性質とから, “X-1”, “X-3” および “Y” は, とともに新規インドール・アルカロイドであると判断されたので, 著者らはこれらにそれぞれ roquefortine A, B および C の名を与えた。また, これら 3 種のアルカロイドのうち, roquefortine A と B とはそれらの理化学的諸性質, とくに NMR- および MS- 両スペクトルから, とくに麦角アルカロイドに特有のエルゴリン核を有する新エルゴリン・アルカロイドであることが知られ, 両者の化学構造も I 式のごとくであると推定された。

R = -C(=O)-CH₃: roquefortine A, R = -H: roquefortine B (deacetylroquefortine A).

なお, ここに得られた合計 4 種のインドール・アルカロイドのうち, 主要なものは roquefortine A だけであったが, このものは実験動物において微弱ながら筋弛緩作用, その他種々の薬理作用を示し, その急性毒性 (LD₅₀) はマウス, 腹腔内注射で 340 mg/kg という, きわめて低毒性の物質であることも知られた。また, これら 4 種のインドール・アルカロイドのうち, 少なくとも roquefortine A は市販のロックフォール型チーズ中にも含有されている可能性があり, この点に関して, 薄層クロマトグラフィーにより検討してみたところ, 被検のどの種のカビ・チーズ中にも roquefortine A が, 極微量の roquefortine B, C などとともに, チーズ 1 kg 当り 0.2~3.6 mg の割合で含有されているという事実は見出された。実際, この roquefortine A は, その比較的高率に含有されていた市販の 1 種のカビ・チーズ 12 kg から, 粗結晶として約 20 mg が単離・証明されたが, 本アルカロイドのカビ・チーズ中におけるこの程度の含量は, その毒性に照らしても全く問題とするには当たらないであろう。

実験および結果

I. インドール反応陽性物質生産性菌株の検索

実験方法

a) 菌株の分離法: 前報⁽⁴⁾の場合と同様, 主として各地の土壌および空気を分離源とし, コロニー分離法によって糸状菌株だけを選択的に分離採取した。またこの場合も, 分離用培地としては, 主として Czapeck-寒天培地を用いた。

b) 優良株の検索法: 上記の分離菌株のおおのを, 前報⁽⁴⁾の場合と全く同一の方法で静置および振盪培養し, 各培養についてインドール反応の有無ないしその程度を, *p*-dimethylaminobenzaldehyde-硫酸液 (Allport-Cocking 試薬⁽⁷⁾) によってしらべた。

実験結果 供試した合計 150 菌株のうち, 約 12 菌株の静置ないし振盪培養において, なんらかのインドール反応陽性物質が生産されている事実は見出された。なかでも, 実験室周辺の土壌から分離した菌株中のペニシリウム属 1 菌株の静置ならびに振盪の両培養においては, インドール反応陽性物質が, かなり著量に生産されている事実が認められ, ここに一応目的とした菌株 1 株が検索された。

II. 検索されたペニシリウム属 1 菌株の同定

実験方法 常法にしたがい, 被検菌株の slide culture と巨大集落とについて, 形態学的諸性質をしらべた。この際, 培地としてはどの場合も Czapeck-寒天培地を用いたが, 巨大集落を形成させる場合は, ほかに亜硝酸塩を用いる坂口-王氏寒天培地をも使用した。

実験結果 検討したペニシリウム属菌株においては, 1) 菌状体の大部分が不整斉輪生状で, 基底梗子の下で枝分れしている, 2) 集落はあまり大きくなく (26°C, 12 日間の培養で直径 5.2~5.8 cm), その表面はビロード状を呈し, 裏面はほとんど無色である, 3) 分生胞子柄の表面は粗である, 4) 5°C のもとでは生育するが, 37°C のもとでは生育が不能である, 5) 亜硝酸塩培地にもよく生育する, などの諸性質が見出された。これらを Raper & Thom⁽⁸⁾ および Abe⁽⁹⁾ の各分類に照らしてみたところ, *Penicillium roqueforti* Thom について記載されているところと全く一致した。さらに, ここに見出された諸性質は, 財団法人発酵研究所から譲り受けた *Penicillium roqueforti* Thom IFO 5459 について観察されるところともよく一致した。

III. *Penicillium roqueforti* 株の生産するインドール反応陽性物質の吟味

実験方法 前項の実験で検索され、*Penicillium roqueforti* Thom と同定された菌株を、分生孢子懸濁液としてマンニット-ブドウ糖-コハク酸アンモニウムからなる種々の培地に接種し、30°C のもとで 15~20 日間、静置および振盪培養した。つぎに、これらの培養物から、硫酸酸性ないしアンモニア・アルカリ性下、酢酸エチルによって酸性、中性あるいは塩基性成分を抽出し、これらを濃縮したのち、吸着剤としてワコーゲル B-5 F (厚さ 0.25 mm) を、展開剤としてクロロホルム-エタノール混液 [10:1(v/v)] を、さらに発色剤として *p*-dimethylaminobenzaldehyde 2 g を濃塩酸 20 ml とエタノール 80 ml との混液に溶解して調製した試薬 (Ehrlich 試薬) を、それぞれ用いる薄層クロマトグラフィーに付して、試料中にどのようなインドール反応陽性物質が含まれているかをしらべた。

実験結果 供試の *P. roqueforti* 株は、静置と振盪とのいずれの培養においても、インドール反応陽性の塩基性物質、つまりインドール・アルカロイドだけをかなり多量に生産するという事実が確認され、同時にそのインドール・アルカロイドが実施の薄層クロマトグラフィーにおいて、主として *R_f* 0.50, 0.45, 0.25, 0.15 などの各位置に、紫青色の像ないし黄緑色から紫青色へと変化する像として現われる、いくつかのアルカロイドから成っていることも見出された。前述のように Taber ら⁽⁵⁾は、かつて *P. roqueforti* 株の静置培養物中に、微量のインドール反応陽性物質の存在することを認め、かつペーパー・クロマトグラフィーによってしらべることにより、それが 3 種の麦角アルカロイド *agroclavine*, *elymoclavine* および *penniclavine* からなっているとの結論に達した。しかし、著者らが供試 *P. roqueforti* 株の各種培養物について見出した上記のどのアルカロイドも、薄層クロマトグラフィーにおける挙動において、Taber ら⁽⁵⁾が指摘した麦角アルカロイドのいずれとも明らかに異なるものであった。

IV. *Penicillium roqueforti* の培養からインドール・アルカロイド “X-1”, “X-2”, “X-3” および “Y” の分離

実験方法および結果

a) 供試菌株 前項の実験で、静置培養と振盪培養とのいずれにおいても、いくつかのインドール・アルカ

ロイドを生産する事実の確認された *Penicillium roqueforti* 株から、コロニー分離法によって多数の菌株を分離し、それらのうちから総アルカロイドを静置培養において、とくに著量に生産しうる優良株 1 株を選んでこれを用いた。

b) 培養法 培養は、すべて静置培養法によってこれを行なった。この場合、培地としては前報⁽⁴⁾の場合とほぼ同様、マンニット 3%, ブドウ糖 1%, コハク酸 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% の組成の水道水溶液をアンモニア水で pH 5.6 に調節したのち、1 l 容のルー・フラスコに 150 ml ずつ分注・殺菌したものをを用いた。すなわち、これらの培地に供試菌株の分生孢子を殺菌水に懸濁して接種したのち、種々検討した結果に基づいてすべてを 22°C の恒温室内に 15 日間静置した。

c) 抽出法 上記の培養 200 個を、まず菌体と培養液とに分け、菌体 (乾物量として約 240 g) はこれを適量の 1% リン酸水溶液とふりまぜて、その含有ないし付着するアルカロイドをほぼ完全に溶出した。ついで、この溶出液を培養濾液 (約 28 l) と合併し、アンモニア水でアルカリ性 (pH 10) としたのち、酢酸エチルとくりかえしふりまぜて、アルカロイド分をできるだけ完全に酢酸エチル中に転溶した。こうして得たすべての酢酸エチル溶液を集め、減圧下で濃縮してついには乾固させ、総アルカロイドの粗抽出物約 2.1 g を得た (収量、培養瓶 1 個当たり約 10 mg)。さらに、この抽出物のすべてをクロロホルム 200 ml に溶解し、これを 1% リン酸水溶液毎回 200 ml とくりかえし 3 回ふりまぜて、目的のアルカロイドをほぼ完全にリン酸水溶液中に移行させた。ついで、このリン酸溶液をアンモニア水でアルカリ性としたのち、酢酸エチルとくりかえしふりまぜて、アルカロイドをできるだけ完全に酢酸エチル中に転溶した。こうして得たすべての酢酸エチル溶液を集め、これを減圧下で濃縮してアルカロイド分を褐色油状物として残留させ、これをそのまま下記のカラム・クロマトグラフィーの試料とした。

d) 分離法 塩基性活性アルミナ (和光純薬製・カラムクロマト用, 180°C, 3 時間活性化) 200 g を、内径 3 cm, 高さ 50 cm のガラス製円筒につめ、この上部に上記試料を少量のクロロホルムに溶解して載せ、液分をアルミナ層にしみこませてから、まずエタノール 1% を含ませたクロロホルム 700 ml を、ついでエタノール 5% を含ませたクロロホルム 700 ml を、それぞれ 10 ml/

tube/10 min で流下させて分画した。

1) “X-1” (roquefortine A) の分離 : 上記の塩基性アルミナ・カラム・クロマトグラフィーで、エタノール 1% を含ませたクロロホルムを流下させて得た区分を集め、減圧下で濃縮したのち、残留物を今度は中性アルミナ・カラム・クロマトグラフィーにかけて分画した。すなわち、中性アルミナ (メルク社製, 180°C, 3 時間活性化) 100 g を、内径 2 cm, 高さ 60 cm のガラス製同筒につめ、この上部に試料を少量のクロロホルムに溶解して載せ、液分をアルミナ層にしみこませてから、エタノール 1% を含ませたクロロホルムを 10 ml/tube/30 min で流下させ、分画した。こうして得た分画 25 から 45 番目までを集め、その溶液を減圧下で約 5 ml にまで濃縮したのち室温に放置したところ、目的としたアルカロイド “X-1” の粗結晶 230 mg が析出した。この “X-1” は、メタノールからくりかえし再結晶することにより、mp 182°C (decomp.) を示す無色の針状結晶として得られた。本物質は、その別項 V に述べるような理化学的諸性質から、新規インドール・アルカロイドであることが知られたので、これを roquefortine A と名づけた。

2) “X-2” (festuclavine) の分離 : 上記 1) の中性アルミナ・カラム・クロマトグラフィーで、溶剤としてエタノール 1% を含ませたクロロホルムを用いて得た画分 46 から 62 番目までを集め、その溶液を減圧下で濃縮したのち、残留物を上記 1) の場合と同様の中性アルミナ・カラム・クロマトグラフィー (内径 1.5 cm, 高さ 45 cm) にかけた。この際、溶剤は順次 i) クロロホルム-シクロヘキサン-エタノール混液 [100 : 10 : 0.5 (v/v)] 400 ml, ii) クロロホルム-シクロヘキサン-エタノール混液 [100 : 10 : 1 (v/v)] 300 ml および iii) クロロホルム-エタノール混液 [100 : 1 (v/v)] 400 ml を流下させて分画したが、これらのうち、溶剤 iii) を流下させて得た画分全部を減圧下で濃縮し、その残留物を少量の熱メタノールに溶解したのち室温に放置したところ、目的としたアルカロイド “X-2” の粗結晶 15 mg が析出した。本物質はベンゼン、クロロホルム、メタノールなどから無色の長針状結晶として析出し、mp 238~239°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -108^\circ$ ($c=0.3$, pyr.) を示した。また、元素分析の結果はつぎのとおりで、分子式は $C_{16}H_{20}N_2$ に相当した。Anal. found : C, 79.80; H, 8.26; N, 11.62; mol. wt., 240 (MS). Calcd. for $C_{16}H_{20}N_2$: C, 79.95; H, 8.39; N, 11.66%; mol. wt., 240.21. さらに、UV-お

よび IR-スペクトルは、おのおのつぎのような値を示した。UV λ_{max}^{EtOH} m μ (log ϵ) : 224(4.53), 276(3.82), 281(3.84). IR ν_{max}^{KBr} cm $^{-1}$: 3105 (NH), 1610 (C=C) (Fig. 1 参照)。本物質は各種の酸類に容易に溶解し、その溶液は Ehrlich 試薬を改良した、いわゆる Allport-Cocking 試薬⁽⁷⁾によって青色の反応を与えた。また、石油エーテルに不溶; 水にきわめて難溶; ベンゼン、エーテルに可溶; クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、メタノール、ピリジンに易溶であった。

本物質の示す以上のような諸性質は、既知麦角アルカロイド festuclavine⁽⁶⁾ の示すところと、すべてよく一致した。そこで、本物質と festuclavine とを混融してみたところ、融点の降下する事実は認められなかった。また、両者の各種クロマトグラフィーにおける挙動を比較してみたところ、これも全く一致し、本物質 “X-2” が festuclavine と同一の物質であることが確認された。

3) “X-3” (roquefortine B) の分離 : 前記 1) の中性アルミナ・カラム・クロマトグラフィーで、溶剤としてエタノール 1% を含ませたクロロホルムを用いて得た画分 63 から 79 番目までを集め、その溶液を減圧下で濃縮したのち、残留物を前記 1) の場合と同様の中性アルミナ・カラム・クロマトグラフィー (内径 2 cm, 高さ 60 cm) にかけた。この際、溶剤は順次 i) シクロヘキサン-酢酸エチル-エタノール混液 [8 : 2 : 0.5 (v/v)] 200 ml, ii) シクロヘキサン-酢酸エチル-エタノール混液 [7 : 3 : 0.5 (v/v)] 300 ml, iii) シクロヘキサン-酢酸エチル-エタノール混液 [7 : 3 : 1 (v/v)] 400 ml および iv) シクロヘキサン-酢酸エチル-エタノール混液 [6 : 4 : 2 (v/v)] 300 ml を流下させて分画したが、これらのうち、溶剤 iii) を流下させて得た画分の全部を減圧下で濃縮したのち、残留物を少量の熱メタノールに溶解して室温に放置したところ、目的としたアルカロイド “X-3” の粗結晶 16 mg が析出した。この “X-3” は、メタノールからくりかえし再結晶することにより、sp 222~225°C (760 mmHg) を示す無色の針状結晶として得られた。本物質は、その別項 V に述べるような理化学的諸性質から、新規インドール・アルカロイドであることが知られたので、これを roquefortine B と名づけた。なお、後述のように、この roquefortine B は、前記 roquefortine A の脱アセチル体であることも知られた。

4) “Y” (roquefortine C) の分離 : 前記の塩基性アルミナ・カラム・クロマトグラフィーで、溶剤として

エタノール5%を含ませたクロロホルムを用いて流下させた画分の全部を減圧下で濃縮し, その残留物を少量の熱メタノールに溶解して室温に放置したところ, 目的としたアルカロイド“Y”の粗結晶 28 mg が析出した. 本物質は, メタノールからくりかえし再結晶することにより, mp 225~228°C (decomp.) を示す無色の針状結晶として得られたが, その別項に述べるような理化学的諸性質から, 新規インドール・アルカロイドであることが知られたので, これを roquefortine C と名づけた.

V. Roquefortine A, B および C の理化学的性質

Roquefortine A : 本物質はベンゼン, クロロホルム, メタノールなどから無色の針状結晶として析出し, mp 182°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -130^\circ$ ($c=0.56$, pyr.) を示す. また, その UV-, IR-, MS- および NMR-スペ

クトルは, それぞれつぎのとおりである. UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ) : 222(4.20), 276(3.29), 282(3.34), 294(3.28). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm $^{-1}$: 3150(NH), 1735, 1230(O-CO-CH $_3$) (Fig. 1 参照). MS m/e : 298 (M^+), 255 ($M^+-\text{CO}-\text{CH}_3$), 239 ($M^+-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3$), 154, 43. NMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{CDCl}_3}$: 0.96(3H, d, $J=6$ Hz, CH $_3$ -CH-), 2.21 (3H, s, CH $_3$ -CO-O), 2.44 (3H, s, CH $_3$ -N<), 3.40 (1H, dd, $J=4$ Hz, $J=14$ Hz, -CH-CH-CH-), 5.16 (1H, t, $J=10$ Hz, -CH $_2$ -CH-O-CO-), 6.7~7.2 (4H, m, indole protons), 8.12 (1H, broad s, indole-NH, D $_2$ O 添加で消失する) (Fig. 2 参照).

元素分析, 分子量測定の結果はつぎのとおりで, 本物質は分子式 C $_{18}$ H $_{22}$ O $_2$ N $_2$ に相当する. Anal. found : C, 72.02 ; H, 7.54 ; N, 9.32 ; mol. wt., 298 (MS). Calcd.

for C $_{18}$ H $_{22}$ O $_2$ N $_2$: C, 72.45 ; H, 7.43 ; N, 9.39% ; mol. wt., 298.37.

各種の酸類に容易に溶解し, その溶液は Allport-Cocking 試薬によって紫青色の反応を与える. また, 石油エーテル, シクロヘキサン, 水などには難溶; エーテル, クロロホルム, 酢酸エチル, メタノール, ピリジンなどには可溶である. なお, 本物質は Dragendorff 試薬によって橙色の, ニンヒドリン酢酸溶液によって紫色の各反応を与える.

一方, 本物質はアルカリ性下で加水分解すると, 1 種の脱アセチル誘導体を与える. すなわち, roquefortine A 100 mg を 0.5 N 水酸化カリウム・アルカリ性メタノール溶液 10 ml に溶解し, これを 100°C のもとで 45 分間反応させたのち, 反応液に 10 倍量の水を徐々に添加したところ, 白色の沈殿 65 mg ができた. この沈殿を濾取し, 少量の熱メタノールに溶解して放置したところ, sp 222~224°C (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -148^\circ$ ($c=0.55$, pyr.) を示す無色の針状結晶を与えた. 本誘導体の UV-, IR-, MS- および NMR-スペクトルはそれぞれつぎのとおり

Fig. 1. IR-Spectra of Roquefortine A (a), its Deacetyl Derivative (b), Roquefortine B (c), Festuclavine (d) and Roquefortine C (e) in KBr.

Fig. 2. NMR-Spectrum of Roquefortine A in CDCl $_3$.

Fig. 3 NMR-Spectrum of Deacetyl derivative of Roquefortine A in DMSO.

である。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 224(4.65), 275(3.79), 282(3.84), 294(3.78). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3300, 1200 (alcoholic OH), 3120 (NH) (Fig. 1 参照). MS m/e : 256 (M^+), 239 ($M^+ - \text{OH}$), 223, 197, 154. NMR $\delta_{\text{TMS}}^{\text{DMSO}}$: 0.99 (3 H, d, $J=7$ Hz, $\text{CH}_3 - \text{CH}-$), 2.07 (2 H, dd, $J=4$ Hz, $J=10$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$), 2.31 (3 H, s, $\text{CH}_3-\text{N}<$), 3.27 (1 H, dd, $J=4$ Hz, $J=14$ Hz, $-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}-$), 4.80 (1 H, d, $J=8$ Hz, $\text{HO}-\text{CH}-$, D_2O 添加で消失する), 6.8~7.6 (4 H, m, indole protons), 10.03 (1 H, broad s, indole-NH, D_2O 添加で消失する) (Fig. 3 参照).

元素分析, 分子量測定の結果はつぎのとおりで, 本誘導体は分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ に相当する。Anal. found: C, 74.58; H, 7.93; N, 10.77; mol. wt., 256 (MS). Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$: C, 74.96; H, 7.86; N, 10.93%; mol. wt., 256.34.

以上により, 本誘導体が roquefortine A の脱アセチル体であることは明らかである。本脱アセチル体は各種の酸類に容易に溶解し, その溶液は Allport-Cocking 試薬によって紫青色の反応を与える。また, 石油エーテル, シクロヘキサン, ベンゼン, クロロホルム, 酢酸エチルなどには難溶; メタノール, エタノール, ピリジンなどには可溶である。なお, この脱アセチル誘導体も roquefortine A と同様, Dragendorff 試薬によって橙色の, ニンヒドリン酢酸溶液によって紫色の各反応を与える。

上記のように, roquefortine A も, その脱アセチル誘導体も, とともに MS-スペクトルにおいて m/e 154 の位置に麦角アルカロイドのエルゴリン核および関連化合物に特有の顕著なフラグメントイオン⁽¹⁰⁾を与える。また roquefortine A の脱アセチル誘導体について, その二

重共鳴 NMR-スペクトルを図示すると, Fig. 3 のごとくである。すなわち, δ 2.07 の doublet ($-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-$) [A] を照射すると, δ 3.1~3.4 の multiplet の一部 ($\text{HO}-\text{CH}-$) [B] が doublet に変化する。つぎに, [B] を照射すると [A] が doublet に変化する。同時に δ 4.80 の doublet ($\text{HO}-\text{CH}-$) [C] が singlet に変化する。さらに, [C] を照射すると [B] に変化の現われる事実も見出された。これらの事実と上述のような理化学的諸性質とから, roquefortine A とその脱アセチル誘導体とは, 前記 I 式のような化学構造をもつもの, すなわ

ち, 前者は 6,9-dimethyl-7-O-acetyl-ergoline であり, 後者は 6,9-dimethyl-7-hydroxyl-ergoline であると推定された。なお, roquefortine A の脱アセチル体について O-メチル誘導体を調製し, その NOE (nuclear overhauser effect) を測定してみる必要が感じられたが, まだそうした誘導体を調製するにはいたっていない。

Roquefortine B: 本物質はメタノール, エタノールなどから無色の針状結晶として析出し, $\text{sp } 222\sim 225^\circ\text{C}$ (760 mmHg), $[\alpha]_D^{25} -147^\circ$ ($c=0.50$, pyr.) を示す。また, その UV-, IR- および MS-スペクトルは, それぞれつぎのとおりである。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 224(4.65), 275(3.79), 282(3.84), 294(3.78). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3300, 1200 (alcoholic OH), 3120 (NH) (Fig. 1 参照). MS m/e : 256 (M^+), 239 ($M^+ - \text{OH}$), 223, 197, 154.

元素分析, 分子量測定の結果はつぎのとおりで, 本物質は分子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$ に相当する。Anal. found: C, 74.63; H, 7.95; N, 10.81; mol. wt., 256 (MS). Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$: C, 74.96; H, 7.86; N, 10.93%; mol. wt., 256.34.

各種の酸類に容易に溶解し, その溶液は Allport-Cocking 試薬によって紫青色の反応を与える。また, 石油エーテル, シクロヘキサン, クロロホルム, 酢酸エチルなどに難溶; メタノール, ピリジンなどに可溶である。なお, Dragendorff 試薬によって橙色の, ニンヒドリン酢酸溶液によって紫色の各反応を与える。

本物質の以上のような諸性質は, 前記 roquefortine A の脱アセチル誘導体について見出されたところと, すべて全く一致した。そこで, 本物質と前記 roquefortine A の脱アセチル体とを混融してみたところ, 融点の降下す

る事実は認められなかった。また、両者は各種のクロマトグラフィーにおいて全く同じ挙動を示し、本物質が roquefortine A の脱アセチル誘導体と同一の物質であることが確認された。なお、本物質 roquefortine B をピリジン中無水酢酸によってアセチル化し、この反応物を薄層クロマトグラフィーによってしらべたところ、roquefortine A が唯一の反応生成体として見出された。

Roquefortine C: 本物質はベンゼン、アセトン、酢酸エチル、メタノールなどから無色の針状結晶として析出し、mp 225~228°C (decomp.), $[\alpha]_D^{25} -764^\circ$ ($c = 0.50$, pyr.) を示す。また、その UV- および IR スペクトルは、それぞれつぎのとおりである。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 210 (4.50), 243 (4.26), 325 (4.46). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm $^{-1}$: 3180 (NH), 1690, 1660 (C=O), 1604 (C=C) (Fig. 1 参照)。

元素分析、分子量測定の結果はつぎのとおりで、本物質は、分子式 $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2$ に相当する。Anal. found: C, 66.79; H, 5.86; N, 17.62; mol. wt., 389 (MS). Calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_2$: C, 67.85; H, 5.95; N, 17.98%; mol. wt., 389.44.

各種の酸類に容易に溶解し、その溶液は Allport-Cocking 試薬によって、徐々に黄緑色から紫青色へと変化する反応を与える。また、石油エーテル、シクロヘキサンなどには難溶; ベンゼン、クロロホルム、酢酸エチル、メタノール、ピリジンなどには可溶である。なお、本物質 roquefortine C もまた Dragendorff 試薬によって橙色の、ニンヒドリン酢酸溶液によって紫色の、各反応を与える。本物質の化学構造については、目下検討中である。

VI. Roquefortine A の薬理作用

Roquefortine A が、主要なアルカロイドとして生産されるものであり、また麦角アルカロイドに関連した新物質でもあることから、これについて薬理作用を別途しらべてみた (Panlabs, Inc.).

まず、その急性毒性については、マウスにおける腹腔内注射で、LD₅₀ 340 mg/kg を示すことが知られた (ちなみに、本アルカロイドの脱アセチル体である roquefortine B は、同一条件下で LD₅₀ 1000 mg/kg を示した)。つぎに、その循環系その他種々の系に対する作用を検討したところ、これが種々の実験動物において筋弛緩作用、抗うつ作用、局所麻酔作用、食欲減退作用、血管拡張作用、その他の諸作用を示すことが見出された

が、しかし、これらのどの作用も急性毒性量に近い量で初めて発現するという、きわめて弱いものであった。

VII. 市販のロックフォール型チーズ中に roquefortine A が含有されているかどうかについての吟味

実験方法および結果

a) 被検チーズ: 市場で購入した 5 種の内外産ロックフォール型チーズ。

b) 抽出法: まず、被検チーズ 100 g を細切し、これを凍結乾燥したのち、石油エーテルで脱脂するとともに、よくすりつぶして粉末状とした。つぎに、この粉末状脱脂チーズに濃アンモニア少量をまぶし、これを酢酸エチル 100 ml とくりかえし 3 回ふりまぜて、その含有ないし付着する塩基性物質をことごとく溶出したのち、この溶出液を集め、2% リン酸水溶液 50 ml と前後 2 回ふりまぜて、塩基性物質のすべてをリン酸水溶液中に転溶した。このリン酸溶液は、さらにこれをアンモニア水で pH 10 としたのち、エーテル 100 ml とくりかえし 3 回ふりまぜて、含有する塩基性物質をできるだけエーテル中に転溶した。この転溶操作をもう一度くりかえしたのち、最後に得られたエーテル溶液を集め、芒硝で脱水するとともに濃縮して乾固させ、残留物をメタノール 1 ml に溶解して、薄層クロマトグラフィーの試料とした。

c) 薄層クロマトグラフィー: 主として前項 III の方法によってこれを行ったが、展開剤としてはそのほかに、i) アセトン-エタノール混液 [10:1(v/v)], ii) クロロホルム-ジエチルアミン混液 [10:1(v/v)], iii) クロロホルム-アセトン混液 [2:3(v/v)] をも用いた。なお、この薄層クロマトグラフィーで、呈色像の色調、その R_f 値などから、roquefortine A と推定される物質の存在する事実が認められた場合は、そのクロマトグラムをそのままデンシトメーター [OZUMOR 82 型] にかけて、波長 570 m μ のもとで roquefortine A の標品と比色定量した。

本実験の結果、被検のどの種のロックフォール型チーズ中にも、roquefortine A と推定される物質が、極微量の roquefortine B 様の物質その他同様にごく微量の 1,2 のインドール・アルカロイドとともに、チーズ 1 kg 当り最少 0.2 mg から最大 3.6 mg の割合で含有されているという事実が知られた。

d) Roquefortine A の単離: 上記の実験で, roque-

fortune A と推定される物質が比較的高率に含有されている事実の知られた市販の 1 種のカビ・チーズ 12 kg を上記 b) の方法によって処理し、まずすべてのインドール反応陽性塩基性物質を褐色の油状物として分離採取した。つぎにこの油状物を、前項 IV の方法によってカラム・クロマトグラフィーにかけ、その 1 画分から roquefortine A と推定される物質の粗結晶約 20 mg を得た。本結晶をメタノールから再結晶したものは無色の針状結晶で、mp 181~183°C (decomp.) を示した。また本物質の UV-, IR- および MS-スペクトルは、おのおのつぎのような値を示した。UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ): 222(4.20), 276(3.29), 282(3.34), 294(3.28). IR $\nu_{\max}^{\text{KBr}}$ cm $^{-1}$: 3150 (NH), 1735, 1230 (O-CO-CH $_3$). MS m/e : 298 (M $^+$), 255, 239, 154, 43. 本物質の示すこれらの諸性質は、roquefortine A の示すところと、すべてよく一致した。また、本物質と roquefortine A とを混融しても融点は降下せず、本物質が roquefortine A そのものであることが確認された。なお、本実験結果は、供試のカビ・チーズ中に見出されるごく微量の roquefortine B 様の物質が roquefortine B そのものであり、その他のごく微量のインドール・アルカロイドも roquefortine C, festuclavine などであることを明示しているものと結論された。

要 約

実験室周辺の土壌から、静置ならびに振盪の両培養でいくつかのインドール・アルカロイドを生産しうるペニシリウム属の 1 菌株を分離し、かつこの菌株が *Penicillium roqueforti* Thom であることを明らかにするとともに、その 1 選択株の静置培養から、アルミナ・カラム・クロマトグラフィーを用いる常法によって、麦角アルカロイド festuclavine および 3 種の新規インドール・アルカロイド roquefortine A, B および C を単離した。これら新アルカロイドのうち、roquefortine A と B と

は、ともに麦角アルカロイドに特有のエルゴリン核を有するアルカロイドで、前者は 6,9-dimethyl-7-O-acetyl-ergoline であり、後者は 6,9-dimethyl-7-hydroxyl-ergoline であると推定された。また、これらのアルカロイド中、主要なものは roquefortine A であること、この roquefortine A は実験動物において、微弱ながら筋弛緩作用、その他種々の薬理作用を示す低毒性の物質であること、なども知られた。さらにこの roquefortine A は、きわめて微量の roquefortine B その他とともに、市販の各種ロックフォール型チーズ中にも、チーズ 1 kg 当り 0.2~3.6 mg という、全く問題とするには当たらない微量で含有されているという事実も見出された。

終りに、本研究に終始ご協力くださった武田研究所大和谷三郎博士および東京教育大学農学部大橋力氏に厚く感謝いたします。

- (1) M. Abe, S. Ohmomo, T. Ōhashi and T. Tabuchi: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 469 (1969).
- (2) 阿部又三, 大桃定洋, 大橋 力, 田淵武士: 農化, **43**, 575 (1969).
- (3) S. Yamatodani, Y. Asahi, A. Matsukura, S. Ohmomo and M. Abe: *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 485 (1970).
- (4) 大桃定洋, 杉田正徳, 阿部又三: 農化, **47**, 57 (1973).
- (5) W. A. Taber and L. C. Vining: *Can. J. Microbiol.*, **4**, 611 (1958).
- (6) M. Abe and S. Yamatodani: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **28**, 501 (1954); *ibid.*, **33**, 1031 (1959).
- (7) L. Allport and T. T. Cocking: *Quart. J. Pharm. Pharmacol.*, **5**, 341 (1932).
- (8) K. B. Raper and C. Thom: "A Manual of the Penicillia," The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1949, p. 395.
- (9) S. Abe: "The Penicillia," Kanehara Shuppan Co., Tokyo, 1957, p. 179.
- (10) M. Barber: *Chem. and Ind.*, **1965**, 1072.