ヒラフスベの成分¹⁾

ヒキノヒロシ, 桑野大一郎, 竹本常松

東北大学医学部薬学科²⁾Constituents of *Laetiporus versisporus*¹⁾

HIROSHI HIKINO, DAIICHIRO KUWANO, and TSUNEMATSU TAKEMOTO

Pharmaceutical Institute, Tohoku University²⁾

(Received February 27, 1969)

Eburicoic acid (containing dehydroeburicoic acid) and sulphurenic acid were isolated from *Laetiporus versisporus* (Polyporaceae). The contents of these triterpenoids during the culture of this fungus *in vitro* were determined.

ヒラフスベ *Laetiporus versisporus* IMAZEKI (Polyporaceae) は日本に分布し, 各種の広葉樹の幹に生ずる. 本菌と同じサルノコシカケ科に属するいくつかの菌がいろいろな四環性トリテルペノイドを含むことが知られているので, 本菌にも同一もしくは近縁の物質が存在するのではないかと考え, 本研究に着手した. ヒラフスベの生品をメタノールで抽出し, 抽出液を濃縮し析出した粗結晶をエタノールから再結晶をくり返して mp 280—281°, 組成 $C_{31}H_{50}O_3$ の物質 (I) を得た. I の IR スペクトルから水酸基とカルボキシル基の存在が予想されたので, ジアゾメタンで処理するとモノメチルエステル (II) mp 140—141° が得られた. また I をアセチル化するとモノアセテート (III) mp 242—243° を与え, これをさらにメチル化するとモノメチルエステルモノアセテート (IV) mp 153—154° を生じた. これら誘導体の NMR スペクトルを測定した結果, I は3級メチル基5コ, 2級メチル基2コ, ビニリデン基1コ, 2級水酸基1コ, カルボキシル基1コをもつことが明らかとなった. 以上の諸性質はエブリコ *Fomitopsis officinalis* BOND. et SING. (= *Polyporus officinalis* FRIES) をはじめ広くサルノコシカケ科の菌から単離されている eburicoic acid³⁾ のそれと一致するので, IV を標品と比較して同定した. なお eburicoic acid にはしばしば dehydroeburicoic acid (V) が共存し, 両者の性質がきわめて似ているため, その分離は困難であることが知られている.⁴⁾ II, III, IV の NMR スペクトルからはデヒドロ体の明らかな共存を認めることができなかったが, II の UV スペクトルを測定すると 243 と 252 mμ に弱い吸収 (log ε 2.88, 2.73) が観察された. これを dehydroeburicoic acid (V) の UV 吸収 (λ_{max} 243, 252 mμ (log ε 4.25, 4.07))⁴⁾ から計算すると I は eburicoic acid を主とし, これに約 4% の $\Delta^{7,9(11)}$ -ジエン体 (V) が共存するものと考えられる.

つぎに上述の粗結晶をジアゾメタンでメチル化し, シリカゲルクロマトグラフィーを行なうと II のほかに mp 177°, 組成 $C_{32}H_{52}O_4$ の物質 (VI) を得た. VI のスペクトルは methyl eburicoate (II) のそれと きわめてよく似ており, とくに NMR スペクトルでは II のそれに比してカルビニル水素のシグナルが1コ多い. そこでその分子式を考え併わせると, V は II の水酸化されたものと結論される. さらにその融点はさきにアイカワタケ *Laetiporus sulphureus* BOND. et SING. (= *Polyporus sulphureus* FRIES) から単離された sulphurenic acid⁵⁾ のメチルエステルのそれに一致するので, 標品と比較して同定した. 以上でヒラフスベは eburicoic acid を主とし,

- 1) この報文は Biochemical Synthesis の第5報である. 第4報: H. Hikino, T. Kohama, T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), 17, 1659 (1969).
- 2) Location: Aobayama, Sendai.
- 3) 刈米達夫, 黒野吾市, 薬誌, 60, 318 (1940); R.M. Gascoigne, J.S. E. Holker, B.J. Ralph, A. Robertson, *J. Chem. Soc.*, 1951, 2346; L.A. Cort, R.M. Gascoigne, J.S.E. Holker, B.J. Ralph, A. Robertson, J.J.H. Simes, *J. Chem. Soc.*, 1954, 3713; J.S.E. Holker, A.D.G. Powell, A. Robertson, J.J.H. Simes, R.S. Wright, R.M. Gascoigne, *J. Chem. Soc.*, 1953, 2422.
- 4) R.M. Gascoigne, A. Robertson, J.J.H. Simes, *J. Chem. Soc.*, 1953, 1830.
- 5) J. Fried, P. Grabowich, E.F. Sabo, A.I. Cohen, *Tetrahedron*, 20, 2297 (1964).

少量の dehydroeburicoic acid および sulphurenic acid を含むことが明らかとなった。

つぎにヒラフスベの生長はきわめて速やかなので、その生長過程における含有成分の消長に興味をもち、菌の培養を行なった。すなわちジャガイモエキスをグルコースを添加した培地に菌糸を接種し、27° で培養した。培養開始後 2, 4, 6, 8 週間目に菌体を採取し、乾燥後、eburicoic acid, dehydroeburicoic acid ならびに sulphurenic acid の含有率を測定し、Table I に示した結果を得た。すなわち eburicoic acid は培養の初期にすでに高含量で存在し、dehydroeburicoic acid および sulphurenic acid も最初からほぼ一定の比率で含まれていること、また菌体量は培養時間とともに増加して行くのでこれらのテルペノイドも絶対量は増え続けるのであるが、その含有率は一定時期に最大に達してから次第に減少していることから、その合成能力は培養初期には菌体の増殖率を上廻り、後に低下して行くことがわかった。

TABLE I. Contents per Dried Mycelia (%)

Cultivation period (Weeks)	2	4	6	8
Methanol extract	34	36	37	33
Eburicoic acid	12.0	15.3	15.9	10.7
Dehydroeburicoic acid	0.4	0.5	0.5	0.3
Sulphurenic acid	0.7	1.2	1.2	0.7

実験の部⁶⁾

Eburicoic Acid の単離 ハリエンジュ *Robinia pseudo-acacia* LINNÉ (Leguminosae) の生きている樹幹に生じたヒラフスベ *Laetiporus versisporus* IMAZeki (Polyporaceae) の生品 600 g を各回 MeOH 1 liter で 5 回沸騰抽出し、得た抽出液を合わせた後濃縮して放置すると粗結晶 34 g を析出した。これを EtOH から 3 回再結晶して eburicoic acid (I) の無色鱗片状晶を得た。mp 280—281°。Anal. Calcd. $C_{31}H_{50}O_3$: C, 79.10; H, 10.71. Found: C, 79.02; H, 10.70. IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3433—3358 (水酸基), 1702 (カルボキシル基), 1642, 887 (ビニリデン基)。

Eburicoic Acid のメチル化 Eburicoic acid を常法により CH_3N_2 でメチル化後石油ベンジンから再結晶して methyl eburicoate (II) の無色鱗片状晶を得た。mp 140—141°。[α]_D +58.5° ($c=1.8$)。Anal. Calcd. $C_{32}H_{52}O_3$: C, 79.28; H, 10.81. Found: C, 79.09; H, 10.75. UV λ_{max}^{EtOH} m μ (log ϵ): 243 (2.88), 252 (2.73). IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3360 (水酸基), 1728, 1257 (エステル基), 3012, 1643, 891 (ビニリデン基)。NMR (CCl_4): 0.68 (3H s), 0.75 (3H s), 0.88 (3H s), 0.95 (6H s), 1.00 (6H d), 3.08 (1H br), 3.57 (3H s), 4.56, 4.65 (各 1H s)。

Eburicoic Acid のアセチル化 Eburicoic acid を常法により Ac_2O -ピリジンと常温で 1 夜反応させ、抽出後、AcOEt から 2 回再結晶して acetyl eburicoic acid (III) の無色針状晶を得た。mp 242—243°。[α]_D +49.3° ($c=2.5$)。Anal. Calcd. $C_{33}H_{52}O_4$: C, 77.29; H, 10.22. Found: C, 77.00; H, 10.25. IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 1726, 1240 (エステル基), 3000, 1640, 890 (ビニリデン基)。NMR (CCl_4): 0.75 (3H s), 0.85 (6H s), 0.87 (3H s), 0.98 (3H s), 1.00 (6H d), 1.97 (3H s), 4.41 (1H br), 4.64, 4.71 (各 1H s)。

6) 融点は未補正。[α]_D は $CHCl_3$ 中で測定した。NMR スペクトルにおけるケミカルシフトは内部標準の TMS からの ppm で表わした。略号: s=一重線, d=二重線, br=幅広いピーク。

Acetylburicoic Acid のメチル化 Acetylburicoic acid を常法により CH_2N_2 でメチル化後, MeOH から再結晶して methyl acetylburicoate (IV) の無色針状晶を得た. mp 153—154°. $[\alpha]_D +54.3^\circ$ ($c=2.1$). *Anal.* Calcd. $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_4$: C, 78.71; H, 10.49. Found: C, 78.44; H, 10.42. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1730, 1240 (エステル基), 3000, 1640, 890 (ビニリデン基). NMR (CCl_4): 0.68 (3H s), 0.86 (9H s), 0.96 (3H s), 0.98 (6H d), 1.94 (3H s), 3.57 (3H s), 4.39 (1H br), 4.59, 4.68 (各 1H s).

Sulphurenic Acid の単離 ヒラフスベの MeOH 抽出液から得た粗結晶 1.5 g を常法により CH_2N_2 でメチル化後, シリカゲル 15 g を使ってクロマトグラフィーを行なった. 石油ベンジン-ベンゼン (1:1) で methyl-eburicoate を溶出させた後ベンゼンで溶出した部分を MeOH から再結晶して methyl sulphurenate (VI) の無色針状晶 (60 mg) を得た. mp 177°. $[\alpha]_D +62.2^\circ$ ($c=1.9$). *Anal.* Calcd. $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_4$: C, 76.75; H, 10.47. Found: C, 76.66; H, 10.32. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3560, 3280 (水酸基), 1710, 1265 (エステル基). NMR (CDCl_3): 0.74 (3H s), 0.78 (3H s), 0.92 (6H s), 0.97 (3H s), 0.98 (6H d), 3.16 (1H br), 3.61 (3H s), 4.17 (1H br), 4.60, 4.70 (各 1H s). 標品と混融して融点降下せず, その IR スペクトルも標品のそれと一致した.

ヒラフスベの培養 ジャガイモ 300 g を水 1.5 liter で 3 hr 煮た後ガーゼで濾過し, 抽出液 1 liter を得た. これにグルコース 50 g を溶かし, HCl で pH 3.6 とした後 8 コのフラスコに均等にわけた. 120° で 20 min 滅菌後ヒラフスベの菌糸を接種し, 27° に放置. 培養開始後 2, 4, 6, 8 週間目に菌体を培地から分離して水洗後, 乾燥した. 乾燥菌体を熱 MeOH で完全に抽出し, 溶媒を留去して MeOH エキスを得た. このエキスを常法により CH_2N_2 でメチル化後, シリカゲルクロマトグラフィーに付し, methyl eburicoate と methyl dehydroeburicoate の混合物および methyl sulphurenate に分離して収量を測定した. 前二者の混合物はその UV スペクトルを測定して混合物中における dehydroeburicoic acid の含有率を求め, 計算によって二者の含量を算出した.

謝辞 本研究にあたりヒラフスベの菌糸を頂いた農林省林業試験場の青島清雄博士, eburicoic acid の誘導体の標品を頂いた国立衛生試験所の名取信策博士, ならびに sulphurenic acid の標品を頂いた Squibb Institute for Medical Research の P. A. Diassi 博士に感謝いたします.