Streptomyces luteoreticuli KATO et ARAI の代謝産物について (第 1 報) 代謝産物の単離

山岸三郎, 小山泰正, 深草佑一, 興村伸夫, 大石洵一, 浜道則光,^{1a)} 新井 正^{1b)}

千葉大学薬学部,^{1a)} 千葉大学腐敗研究所^{1b)}

On the Metabolites of *Streptomyces luteoreticuli* KATO et ARAI. I. Isolation of the Metabolites

SABURO YAMAGISHI, YASUMASA KOYAMA, YUICHI FUKAKUSA, NOBUO KYOMURA,
JUN-ICHI OHISHI, NORIMITSU HAMAMICHI^{1a)} and TADASHI ARAI^{1b)}

Faculty of Pharmaceutical Sciences^{1a)} and the Institute of Food
Microbiology, Chiba University^{1b)}

(Received October 29, 1970)

The metabolites of *Streptomyces luteoreticuli* KATO et ARAI were investigated. Four new compounds, luteoreticulin, (V), $C_{18}H_{19}O_5N$, luteothin, (VI), $C_{22}H_{25}O_5N$, metabolite X, (X), $C_{15}H_{12}O_3N_2$, and metabolite XI, (XI), $C_{15}H_{14}O_3N_2$, were isolated from the acetone extract of the mycelial cake. 1-Methoxyphenazine (VII) and methyl phenazine-1-carboxylate (IX), which were first isolated from natural origin, were obtained in addition to aureothricin (I), thiolutin (II), aureothin (IV), and 1,6-dimethoxyphenazine (VIII). The other two metabolites (III and XII) were also isolated but not identified.

Streptomyces luteoreticuli KATO et ARAI は 1957 年に熊本の土壌から、加藤、新井²⁾ により分離された新菌種であり、3 種の色素成分 [mp 156—158° の黄色柱状晶 (fraction A), 229—230° で昇華する淡黄色針状晶 (fraction B), 170—171.5° で昇華する橙色針状晶 (fraction C)] の産生が報告されている。原株はその後事故により失われていたが、1960 年に新井³⁾ は別府の土壌から KS2-74 株と仮称した放線菌を分離し、また著者ら⁴⁾ は、その培養菌体から、上記の fraction A および B に相当すると考えられる結晶を得たほかに、mp 184.5—185° の黄色柱状晶を新たに単離した。放線菌 KS2-74 株は、後に新井ら³⁾ により *Streptomyces* (S. と略記) *luteoreticuli* KATO et ARAI の neotype と同定されたが、その代謝産物については精査を欠いていた。

今回著者らは、本菌の代謝産物の再検討を試み、上記の 4 種の物質を含む 12 種の代謝産物を単離することができたので報告する。

すなわち、本菌を実験の部に記載した条件で培養後、菌体と培養液とに分離し、後者の酢酸エチル抽出部は、Chart 1 に示したように、アルミナおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーを併用して分画し、代謝産物 I および II を単離した。

I は mp 256—257° (decomp.) の橙黄色絹糸状晶として得られ、紫外吸収スペクトル (UV) [λ_{max}^{MeOH} m μ (log ϵ); 248 (3.78), 313 (3.59), 390 (4.04)], および赤外吸収スペクトル (IR) から pyrrothine 型抗生物質と推定される。その組成は $C_9H_{10}O_2N_2S_2$ に一致し、またマススペクトル (Mass spectrum) は m/e 242 に分子イオンピーク、 m/e 186 に分子イオンから水素ラジカルの転移を伴ってメチルケテンが脱離して生じたイオンによると考えられるピーク、 m/e 57 にプロピオニルカチオンによると考えられるピークを示すことから、I は aureothricin と推定され、標品と比較の結果、混融で同一分解点を示し、IR、薄層クロマトグラフィー (TLC) で同定した。なお

1) Location; a) Yayoi-cho, Chiba; b) Ōkubo-4-chome, Narashino, Chiba.

2) 加藤 博, 新井 正, 腐研報, 10, 52 (1957).

3) 未発表資料.

4) 小山泰正, 末永とし子, 本多 宏, 腐研報, 14, 75 (1961).

aureothricin の産生菌としては, *S. thioluteus*,⁵⁾ *S. celluloflavus*,⁶⁾ *S. cyanoflavus*,⁷⁾ *S. pimprina*,⁸⁾ *S. kasugaensis*⁹⁾ が報告されている. また *S. luteoreticuli* の原株から加藤ら³⁾ が得た fraction C が, I と同一物質であることを, 直接加藤らの試料と比較することにより明らかにした.

II は mp 243—245° (decomp.) の橙黄色針状晶として得られ, UV [$\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ (log ϵ); 250 (3.78), 311 (3.75), 388 (4.04)] および IR は aureothricin (I) ときわめて類似し, pyrrothine 型抗生物質と推定される. その組成は $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$ に一致し, また Mass spectrum は I と同様の開裂パターンを示し, m/e 228 に分子イオンピーク, m/e 186 に分子イオンからケテンが脱離して生じた pyrrothine 骨格によると考えられるピーク, m/e 43 にアセチルカチオンによると考えられるピークを示すことから, II は thiolutin と推定される. I から Celmer ら¹⁰⁾ の方法にしたがって誘導した thiolutin と比較した結果, IR, UV, Mass spectrum および TLC で同定した. なお thiolutin

Chart 1

- 5) H. Umezawa, K. Maeda, H. Kosaka, *Japan Med. J.*, **1**, 512 (1948); *J. Antibiotics* (Tokyo), Ser. A, **2**, 105 (1949).
- 6) H. Nishimura, T. Kimura, M. Kuroya, *J. Antibiotics* (Tokyo), Ser. A, **6**, 57 (1953).
- 7) M. Funaki, F. Tsuchiya, K. Maeda, T. Kamiya, *J. Antibiotics* (Tokyo), Ser. A, **11**, 143 (1958).
- 8) D.S. Bhata, R.K. Hulyakar, S.K. Menon, *Experientia*, **16**, 504 (1960); J.H. Martin, W.C. Groth, W.K. Hausman, *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **1963**, 131.
- 9) H. Umezawa, Y. Okami, T. Hashimoto, Y. Suhara, M. Hamada, T. Takeuchi, *J. Antibiotics* (Tokyo), Ser. A, **18**, 101 (1965).
- 10) a) W.D. Celmer, F.W. Tanner, Jr., M. Harfenist, T.M. Less, I.A. Solomons, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 6304 (1952); b) W.D. Celmer, I.A. Solomons, *Antibiotics Annual*, **1953—1954**, 622; c) *Idem*, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 2861 (1955).

の産生菌としては, *S. albus*,¹⁰⁾ *S. celluloflavus*,¹¹⁾ *S. thioluteus*,¹²⁾ *S. pimprina*⁸⁾ が報告されている.

一方, 菌体のアセトン抽出部は, Chart 1 に示したように, アルミナおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに分別再結晶によって分画し, 代謝産物 III, IV および V を単離した.

III は mp >300°, 225—230° で昇華する淡黄色針状晶として得られ, その性状から, *S. luteoreticuli* の原株から加藤ら²⁾ が得た fraction B と同一物質と考えられる. またその組成が $C_{18}H_{14}O_2N_2$ に一致することを確かめたが, 試料が少量のため精査していない.

IV は mp 156—157° の黄色柱状晶として得られ, 組成は $C_{22}H_{23}O_6N$ に一致する. UV は 256 m μ (log ϵ 4.37) および 346 m μ (log ϵ 4.14) に極大を示し, IR は 1666 (γ -pyrone, $>C=O$), 1592, 1516, 1348 ($-NO_2$) cm^{-1} に特徴ある吸収を示す. その性状は, *S. thioluteus* から単離されている aureothin¹³⁾ の性状と一致し, 核磁気共鳴スペクトル (NMR) の各シグナルも, IV が aureothin であるとすれば, 妥当な帰属を与え得る.

これを確かめるために, 平田ら^{13c)} が aureothin から desmethylisoaureothin を得た方法にしたがって, IV を塩酸で加水分解して得た mp 196—198° の結晶の性状は, 文献記載の desmethylisoaureothin (文献値^{13c)} mp 198°) の性状に一致する. また mp 196—198° の結晶をジアゾメタンでメチル化して得られる 2 種の成績体のうち, mp 148—149° の結晶の性状は, 文献記載の iso-aureothin^{13c)} (文献値 mp 148—149°) の性状と一致し, mp 153—155° の結晶は IV に一致する. Aureothin 標品と直接比較することはできなかったが, 以上の結果は, IV が aureothin に他ならぬことを示している. なお *S. luteoreticuli* の原株から加藤ら²⁾ が得た fraction A は, その記載されたデータから, aureothin (IV) であると推定される.

V は mp 184.5—185°, UV [λ_{max}^{EtOH} m μ (log ϵ); 223 (4.11), 258 (3.78), 368 (4.16)] を示す輝黄色柱状晶として得られ, その組成は $C_{19}H_{19}O_5N$ に一致する. また IR からニトロ基 (1550, 1348 cm^{-1}) ならびに共役カルボニル基 (1688 cm^{-1}) の存在が推定される. 著者らはその性状から, これが文献未記載の新化合物であることを確認し, luteoreticulin と命名した. その化学構造¹⁴⁾ については次報で報告する予定である.

菌体のアセトン抽出部から, III, IV および V を可及的に分離した母液を TLC¹⁵⁾ で検索すると, Fig. 1 に示すように 16 種のスبットが確認できる. 便宜上これらのスبットに a—p までの記号を付したが, このうち a, b, c, j, m はそれぞれ上述した II, I, IV, III, V, に対応する. そこで著者らは上記の TLC において検出される I—V 以外の微量代謝産物の単離を試みた.

すなわち, 上記の母液を Chart 2 に示すように, アルミナおよびシリカゲルカラムクロマトグラフィーならびに preparative TLC を併用して分画し, 代謝産物 VI, VII, VIII, IX, X, XI および XII を単離した.

VI は mp 125—126°, UV [λ_{max}^{EtOH} m μ (log ϵ); 250.5 (4.27), 339 (4.10)] を示す橙黄色柱状晶として得られ, その組成は $C_{22}H_{25}O_5N$ に一致する. また IR からニトロ基 (1512, 1345 cm^{-1}) および共役カルボニル基 (1666 cm^{-1}) の存在が推定される. 著者らはその性状から, これが文献未記載の新化合物であることを確認し, luteothin と命名した. その化学構造¹⁶⁾ については後に報告する予定である.

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of the Metabolites of *S. luteoreticuli*

Kieselgel G nach Stahl; solvent: benzene-methylethylketone (5:1)

11) H. Nishimura, T. Kimura, Japan. patent 5400 (1954) [*C.A.*, **49**, 14277 (1965)].

12) 中村路一, 寺尾道也, 赤堀豪士, 三共高峰研, **9**, 35 (1957).

13) a) K. Maeda, *J. Antibiotics* (Tokyo), Ser. A, **6**, 137 (1953); b) F. Washizu, H. Umezawa, N. Sugiyama, *ibid.*, **7**, 60 (1954); c) Y. Hirata, H. Nakata, K. Yamada, K. Okuhara, T. Naito, *Tetrahedron*, **14**, 252 (1961).

14) Y. Koyama, Y. Fukakusa, N. Kyomura, S. Yamagishi, T. Arai, *Tetrahedron Letters*, **1969**, 355 に V の平面構造に関して速報.

15) Silica gel G acc. to Stahl (E. Merck); solvent: benzene-methylethylketone (5:1) を使用.

VII は mp 170—171° の黄色板状晶として得られ、その組成は $C_{13}H_{10}ON_2$ に一致する。UV [$\lambda_{\max}^{MeOH}$ $m\mu$ (log ϵ); 261 (4.78), 365 (3.92), 407 (3.48)], は、VII が phenazine 化合物であることを示し、その NMR は τ 5.87 (3H, singlet) に 1 ケのメトキシ基の存在、 τ 3.10 (1H, doublet doublet, $J_1=7$ cps, $J_2=2$ cps), 2.1—2.45 (4H, multiplet) および 1.55—1.90 (2H, multiplet) に芳香族プロトンのシグナルを示す。 τ 3.01 のシグナルはメトキシ基のオルト位のプロトンによると考えられ、オルト・メタカップリングしていることから、VII は 1-methoxyphenazine と推定される。吉岡¹⁷⁾ の方法にしたがって合成した 1-methoxyphenazine と混融して融点降下を示さず、IR, NMR および TLC も一致して同定した。1-Methoxyphenazine が天然から単離されたのは、本菌が最初の例である。

VIII は mp 248—249° の黄色針状晶として得られ、その組成は $C_{14}H_{12}O_2N_2$ に一致する。UV [$\lambda_{\max}^{EtOH}$ $m\mu$ (log ϵ); 271 (5.03), 367 (3.65), 430 (3.54)] から phenazine 化合物と推定され、NMR は τ 5.86 (6H, singlet) に 2 ケのメトキシ基の存在を示し、 τ 2.92 (doublet doublet, $J_1=8$ cps, $J_2=1$ cps), 2.27 (doublet doublet, $J_3=9$ cps, $J_1=8$ cps) および 2.00 (doublet doublet, $J_3=9$ cps, $J_2=1$ cps) にそれぞれ 2 ケのプロトンに相当する芳香族プロトンのシグナルを示す。文献既知の phenazine 類の NMR データ¹⁸⁾ を参照して各シグナルを解析した結果、VIII は 1,6-dimethoxyphenazine と推定され、標品と比較の結果、混融、IR, NMR および TLC で同定した。1,6-Dimethoxyphenazine の天然からの出現は、*S. thioluteus*¹⁹⁾ について第 2 の例である。

IX は mp 126—127°, UV [$\lambda_{\max}^{EtOH}$ $m\mu$ (log ϵ); 248 (5.00), 346 (4.20)] を示す黄色針状晶として得られ、その組成は $C_{14}H_{10}O_2N_2$ に一致する。IR におけるエステル (1730 cm^{-1}) の吸収ならびに NMR における τ 5.92 (3H, singlet) のシグナルからカルボメトキシ基の存在が認められる。また NMR τ 1.55—1.85 (4H, multiplet) および 2.05—2.25 (3H, multiplet) の芳香族プロトンのシグナルのうち、前者はカルボメトキシ基のオルト位のプロトンおよび phenazine 骨格の窒素のペリ位のプロトンによるシグナル¹⁸⁾ と考えられ、後者は β 位のプロトンと考えられる。以上の結果から、IX は methyl phenazine-1-carboxylate²⁰⁾ と推定される。IX を 95% EtOH 性 KOH で加水分解して得た mp 239—240° の黄色針状晶は、喜谷²¹⁾ の方法に従って合成した phenazine-1-carboxylic acid と混融して融点降下を示さず、IR も一致した。したがって IX は methyl phenazine-1-carboxylate と確定した。Methyl phenazine-1-carboxylate が天然から単離されたのは、本菌が最初の例である。

16) 日本薬学会第 89 年会で発表、名古屋 1969.

17) 吉岡一郎, 薬誌, 72, 1128 (1952).

18) Y. Morita, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 14, 419 (1966).

19) N.N. Gerber, *J. Org. Chem.*, 32, 4055 (1967).

20) L. Birkofer, A. Birkofer, *Chem. Ber.*, 85, 286 (1952).

21) Y. Kidani, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 7, 88 (1959).

X は mp 150—151°, UV [$\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ m μ (log ϵ); 263 (4.67), 348 (3.71), 365 (3.91), 415 (3.39)] を示す黄色針状晶として得られ, その組成は $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$ に一致し, IR におけるエステル (1728 cm^{-1}) の吸収および NMR における τ 5.92 (3H, singlet), 5.83 (3H, singlet) のシグナルから, 1 ケのカルボメトキシル基および 1 ケのメトキシル基の存在が推定される. その性状から, これが文献未記載の新化合物であることを確認したが, その化学構造については目下検討中である.

XI は mp 187—188°, UV [$\lambda_{\max}^{\text{MeOH}}$ m μ (log ϵ); 272 (4.96), 387 (3.79), 436 (3.38)] の橙黄色針状晶として得られ, その組成は $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2$ に一致する. NMR から 3 ケのメトキシル基 [τ 5.90 (3H, singlet), 5.87 (3H, singlet), 5.80 (3H, singlet)] の存在が推定される. その性状から, これが文献未記載の新化合物であることを確認したが, その化学構造については目下検討中である.

XII は mp 194—195° の無色針状晶として得られ, その組成は $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$ に一致するが, 少量のためこれ以上精査できなかった.

以上, 本菌の代謝産物の再検討により, aureothricin (I), thiolutin (II), aureothin (IV), 1-methoxyphenazine (VII), 1,6-dimethoxyphenazine (VIII), methyl phenazine-1-carboxylate (IX) の産生を確認し, さらに 4 種の新化合物 [luteoreticulic (V), luteothin (VI), X, XI] および 2 種の未同定の化合物 [III, XII] を単離することができた. これらの結果は, 今後の検討と相まって, 本菌の分類学的検討, 各代謝産物の生合成を考察するうえで, 興味ある知見を提供したといえよう.

Chart 3

実験の部²²⁾

***S. luteoreticulic* の培養** 斜面寒天培地 (グルコース 1%, K_2HPO_4 0.5%, アスパラギン 0.5%, 寒天 1.5%; pH 7.0 に調整) に継代培養した *S. luteoreticulic* の 1 塊を白金耳でとり, 坂口フラスコ (500 ml 容) に 100 ml ずつ分注した培地 (肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1%, グルコース 0.5%, でん粉 0.5%, NaCl 0.3%; pH 7.2 に調整) に接種し, 27°, 160 rpm, 72 hr 振盪培養して種菌とする. 通気攪拌培養装置 (200 liter 容) に 100 liter の培地 (肉エキス 0.5%, ポリペプトン 1%, グルコース 1%, NaCl 0.3%; pH 7.2 に調整) を仕込み, 上記種菌の坂口フラスコ 5 本分を接種し, 28°, 250 rpm, 50 liter/min 通気の条件で 63 hr 培養した後分取. 湿菌 2.7 kg, 培養液 85 liter を得る.

代謝産物の抽出, 分離 a) 培養液から得られる代謝産物——培養液 85 liter を 1 回 10 liter の AcOEt で 3 回抽出. 抽出液を合し, 水洗後無水 Na_2SO_4 で 1 夜乾燥し, 減圧下 500 ml まで濃縮. 析出した橙黄色結晶を分取. アルミナ 3 kg を用いて結晶部分をクロマト. CHCl_3 ではじめに溶出される黄色分画を除き, ついで溶出される黄褐色分画を集め減圧下濃縮. シリカゲル 2.5 kg を用いてクロマト. CHCl_3 ではじめに溶出される黄色分画を除き, 引続いて溶出される橙色分画およびさらに遅れて溶出される橙色分画を得る. それぞれの分画は濃縮後, それぞれを再びシリカゲルカラムクロマトで精製後, それぞれ EtOH で再結晶. 前者から mp 256—257° (decomp.) の橙黄色絹糸状晶として代謝産物 I (aureothricin) (I) 1.2 g を得る. 後者からは mp 243—245° (de-

22) a) 融点は未補正, 微量融点測定器 (柳本製作所製) により測定; b) TLC は特記せぬ限り Silica gel G acc. to Stahl (E. Merck); solvent: benzene-methylethylketone (5:1) を使用.

comp.) の橙黄色針状晶として代謝産物 II (thiolutin) (II) 18 mg を得る。

b) 菌体から得られる代謝産物——菌体 (湿量 2.7 kg) を 1 回 20 liter の acetone で 3 回抽出。抽出液から溶媒を留去後、1 回 5 liter の CHCl_3 で 3 回抽出。抽出液を水洗後無水 Na_2SO_4 で 1 夜乾燥し、減圧下 500 ml まで濃縮。1 kg のアルミナを用いたカラムに通導。 CHCl_3 で溶出されるすべての黄色分画を合し、減圧下濃縮して黄橙色結晶性粉末を得る。Acetone 2 liter に熱時溶解、冷後析出する淡黄色結晶 (代謝産物 III 分画) を分別。母液は濃縮後再び同様に操作して、さらに代謝産物 III 分画を得る。

代謝産物 III 分画は acetone で 2 回再結晶後、シリカゲル (2.5 kg, 140°, 5 hr 乾燥) カラムクロマトにより精製。Acetone および AcOEt で再結晶。mp $>300^\circ$, 225—230° で昇華する淡黄色針状晶として代謝産物 III (III) 140 mg を得る。

III を分離した母液を減圧下乾固し、ベンゼンで分別再結晶。ベンゼンから先に析出する黄色結晶 (代謝産物 IV, V 分画) と母液 (代謝産物 VI—XII 分画) とに分離する。代謝産物 IV, V 分画をベンゼンに溶解し、2.5 kg のアルミナを用いたカラムに吸着。 CHCl_3 で溶出し、はじめに溶出される黄色分画 (代謝産物 V 分画) およびつづいて溶出される黄色分画 (代謝産物 IV 分画) に分離する。

代謝産物 IV 分画はシリカゲルカラムクロマトにより精製。MeOH および AcOEt で再結晶。mp 156—157° の黄色プリズム晶として代謝産物 IV (aureothin) (IV) 4.4 g を得る。

代謝産物 V 分画はシリカゲルカラムクロマトにより精製。MeOH および AcOEt で再結晶。mp 184.5—185° の輝黄色柱状晶として代謝産物 V (luteoreticulic acid) (V) 0.9 g を得る。なお MeOH による再結晶において黄色柱状晶と橙黄色柱状晶を生ずるが、同一物質であることを、機械的に分離後、混融、IR (CHCl_3), TLC, mass spectrum で確認。

先述したベンゼンによる分別再結晶で可及的に IV および V を分離した母液 (代謝産物 VI—XII 分画) を 1 kg のアルミナカラムに吸着し、2.5 liter のベンゼンついでベンゼン-AcOEt (1:1) で溶出する。

ベンゼン溶出部を濃縮後再び同様のアルミナカラムを用いて精製。EtOH で再結晶。mp 194—195° の無色針状晶として代謝産物 XII (XII) 20 mg を得る。

ベンゼン-AcOEt (1:1) で溶出される黄色分画をすべて合し、濃縮後ベンゼンに溶解し、径 3 cm, 長さ 45 cm のシリカゲルカラムに吸着。ベンゼン-メチルエチルケトン (10:1) で溶出。TLC (Fig. 1) 上の k に相当する橙黄色分画, e, h, g, f の各スポットに相当する黄色分画, d を主として含む黄色分画を得る。

k に相当する分画は、濃縮後 EtOH から再結晶。mp 126—127° の黄色針状晶として代謝産物 IX (methyl phenazine-1-carboxylate) (IX) 16 mg を得る。

e, h, g, f に相当する分画は、濃縮後 preparative TLC [Silica gel G acc. to Stahl; solvent: CHCl_3 -AcOEt (5:1) を使用] による分離操作を 2 回繰返し、TLC 上単一のスポットを与える各成分に分離する。

e に相当する分画は橙色油状物質として代謝産物 VI (luteothin) (VI) 68 mg を得る。なお 1 部結晶化した橙色柱状晶は mp 125—126° を示すが再結晶はしていない。

h に相当する分画はベンゼンから再結晶。mp 170—171° の黄色板状晶として代謝産物 VII (1-methoxyphenazine) (VII) 6 mg を得る。

g に相当する分画は EtOH から再結晶。mp 150—151° の黄色針状晶として代謝産物 X 5 mg を得る。

f に相当する分画は AcOEt から再結晶。mp 187—188° の橙色針状晶として代謝産物 XI 6 mg を得る。

d を主として含む分画は preparative TLC を繰返した後、EtOH から再結晶。mp 248—249° の黄色針状晶として代謝産物 VIII (1,6-dimethoxyphenazine) (VIII) 8 mg を得る。

代謝産物 I (Aureothricin) (I) 橙黄色絹糸状晶 (EtOH)。mp 256—257° (decomp.). *Anal.* Calcd. $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$: C, 44.61; H, 4.16; N, 11.57. Found: C, 44.97; H, 4.21; N, 11.50. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 248 (3.78), 313 (3.59), 390 (4.04). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1670, 1640, 1548, 3250. Mass Spectrum m/e : 242 (M^+), 186 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{CH}=\text{C}=\text{O}$), 57 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CO}^+$). Aureothricin 標品と混融で同一分解点を示し、IR, TLC も一致し同定。また加藤ら²⁾ の fraction C と IR, mass spectrum, TLC で一致し同定。

代謝産物 II (Thiolutin) (II) 橙黄色針状晶 (EtOH)。mp 243—245° (decomp.). *Anal.* Calcd. $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_2\text{N}_2\text{S}_2$: C, 42.09; H, 3.53; N, 12.28. Found: C, 42.81; H, 3.68; N, 12.31. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 250 (3.78), 311 (3.75), 388 (4.04). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1670, 1640, 1600, 1547, 3250. Mass Spectrum m/e : 228 (M^+), 186 ($\text{M}^+ - \text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$), 43 (CH_3CO^+). I から文献記載の方法^{10c)} にしたがって誘導した thiolutin, mp 260—263° (decomp.). [文献値^{10c)} mp 260—270° (decomp.)] と IR, mass spectrum TLC で一致し同定。

代謝産物 III (III) 淡黄色針状晶 (acetone)。mp $>300^\circ$, 225—230° 昇華。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$: 236, 264, 340. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 3200, 3050, 1680, 1610, 1390, 1350. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$: C, 74.47; H, 4.86; N, 9.65. Found: C, 74.43; H, 4.80; N, 9.58. Mass Spectrum m/e : 290 (M^+).

代謝産物 IV (Aureothin) (IV) 黄色柱状晶 (AcOEt)。mp 156—157°. *Anal.* Calcd. $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}$: C, 66.49; H, 5.83; N, 3.52. Found: C, 66.71; H, 5.86; N, 3.61. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 256 (4.37), 346 (4.14). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1666 ($\text{C}=\text{O}$), 1592, 1516, 1348 ($-\text{NO}_2$). NMR (CDCl_3) τ : 1.82 (2H, doublet, $J=9$ cps, aromatic protons), 2.62 (2H, doublet, $J=9$ cps, aromatic protons), 3.63 (1H, singlet, $-\text{CH}=\text{C}<$), 3.80 (1H, singlet, $-\text{CH}=\text{C}<$), 4.88 (1H, triplet, $J=7$ cps, $-\text{O}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-$), 5.20 (2H, broad singlet, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}<$), 6.08 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$).

7.00 (2H, doublet, $J=7$ cps, $-\text{O}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-\text{C}\leq$), 7.99 (6H, singlet, $>\text{C}=\dot{\text{C}}-\text{CH}_3 \times 2$), 8.18 (3H, singlet, $>\text{C}=\dot{\text{C}}-\text{CH}_3$).

平田ら¹³⁾が aureothin から desmethylisoaureothin を得た方法にしたがって, IV を処理. mp 196—198° (文献値^{13c)} mp 198°) の黄色絹糸状晶 (desmethylisoaureothin) を得る. Anal. Calcd. $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$: C, 62.78; H, 5.52; N, 3.65. Found: C, 63.08; H, 5.26; N, 3.67. Mass Spectrum m/e : 383 (M^+). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$: 253, 347.

平田ら¹³⁾が desmethylisoaureothin から isoareothin を得た方法にしたがって, 上記 mp 196—198° の黄色絹糸状晶を処理. mp 148—149° (文献値^{13c)} mp 148—149°) の黄色絹糸状晶 (isoareothin) を得る. Anal. Calcd. $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_6\text{N}$: C, 66.49; H, 5.83; N, 3.52. Found: C, 66.08; H, 5.90; N, 3.41. Mass Spectrum m/e 397 (M^+). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 250 (4.00), 335 (4.19). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1700 (C=O), 1360 ($-\text{NO}_2$).

mp 148—149° の結晶を得た再結晶母液を, EtOH で分別再結晶後, EtOH 易溶の母液を濃縮. シリカゲルカラムクロマトで精製. EtOH から再結晶して mp 153—155° の黄色柱状晶 (aureothin) を得る. 本品は IV と IR, UV, mass spectrum, TLC で一致.

代謝産物 V (Luteoreticulin) (V) 輝黄色柱状晶 (AcOEt). mp 184.5—185°. Anal. Calcd. $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}$: C, 66.85; H, 5.61; N, 4.10. Found: C, 66.61; H, 5.60; N, 4.12. Mass Spectrum m/e : 341 (M^+). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 223 (4.11), 258 (肩), 368 (4.16). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3005, 1688 (C=O), 1635, 1600, 1550, 1520, 1348 ($-\text{NO}_2$).

代謝産物 VI (Luteothin) (VI) 橙黄色油状物質として得られ, 1 部 CHCl_3 から結晶化して mp 125—126° の橙黄色柱状晶を得たが再結晶は行なわず. Anal. Calcd. $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_5\text{N}$: C, 68.91; H, 6.57; N, 3.65. Found: C, 68.69; H, 6.50; N, 3.96. Mass Spectrum m/e : 383 (M^+). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 250.5 (4.27), 339 (4.10). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3010, 1666 (C=O), 1590, 1512, 1462, 1415, 1345 ($-\text{NO}_2$).

代謝産物 VII (1-Methoxyphenazine) (VII) 黄色板状晶 (ベンゼン). mp 170—171°. Anal. Calcd. $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ON}_2$: C, 74.27; H, 4.97; N, 13.33. Found: C, 74.43; H, 4.89; N, 13.29. Mass Spectrum m/e : 210 (M^+), 181 ($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{O}$), 180 ($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{O}$). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ $m\mu$ (log ϵ): 261 (4.78), 365 (3.92), 407 (3.48). NMR (CDCl_3) τ : 1.55—1.9 (2H, multiplet), 2.1—2.45 (4H, multiplet), 3.01 (1H, doublet doublet, $J_1=7$ cps, $J_2=2$ cps), 5.87 (3H, singlet). 文献記載の方法¹⁷⁾にしたがって合成した 1-methoxyphenazine, mp 170—171° (文献値¹⁷⁾ mp 170—171°) と混融して融点降下を示さず, IR, Mass Spectrum, NMR, TLC で一致し同定.

代謝産物 VIII (1,6-Dimethoxyphenazine) (VIII) 黄色針状晶 (EtOH). mp 248—249°. Anal. Calcd. $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{N}_2$: C, 70.00; H, 5.00; N, 11.67. Found: C, 70.17; H, 5.04; N, 11.57. Mass Spectrum m/e : 240 (M^+), 211 (M^+-CHO), 210 ($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{O}$), 182 ($\text{M}^+-2 \times \text{CHO}$), 181 ($\text{M}^+-\text{CH}_2\text{O}-\text{CHO}$). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 271 (5.03), 367 (3.65), 430 (3.54). NMR (CDCl_3) τ : 5.86 (6H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 2.92 (2H, doublet doublet, $J_1=8$ cps, $J_2=1$ cps), 2.27 (2H, doublet doublet, $J_3=9$ cps, $J_1=8$ cps), 2.00 (2H, doublet doublet, $J_3=9$ cps, $J_2=1$ cps). 1,6-Dimethoxyphenazine 標品と混融して融点降下を示さず, IR, TLC も一致し同定.

代謝産物 IX (Methyl Phenazine-1-carboxylate) (IX) 黄色針状晶 (EtOH). mp 126—127° (文献値²⁰⁾ mp 123—124°. Anal. Calcd. $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{N}_2$: C, 70.58; H, 4.23; N, 11.76. Found: C, 70.83; H, 4.31; N, 11.44. Mass Spectrum m/e : 238 (M^+), 180 ($\text{M}^+-\text{COOCH}_3$). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 248 (5.00), 364 (4.20). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1730 (C=O). NMR (CDCl_3) τ : 5.92 (3H, singlet, $-\text{COOCH}_3$), 2.05—2.25 (3H, multiplet), 1.55—1.85 (4H, multiplet).

IX 100 mg を 95% EtOH 30 ml 中に KOH 100 mg を含む溶液に熱時溶解. 水浴上 15 min 加熱. 冷後減圧下 10 ml まで濃縮. 水を加え 10% HCl で酸性とし, ベンゼンで抽出し水洗後濃縮. EtOH から再結晶. mp 239—240° の黄色針状晶 94 mg を得る. Mass Spectrum m/e : 224 (M^+), 180 (M^+-CO_2). UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$: 251, 365. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm^{-1} : 1730. このものは文献記載の方法²¹⁾にしたがって合成した phenazine-1-carboxylic acid mp 238—239° (文献値²¹⁾ mp 239°), と混融して融点降下を示さず, IR も一致し同定.

代謝産物 X (X) 黄色針状晶 (EtOH). mp 150—151°. Anal. Calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$: C, 67.15; H, 4.51; N, 10.44. Found: C, 67.32; H, 4.60; N, 10.87. Mass spectrum m/e : 268 (M^+), 239, 210, 209, 181. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 263 (4.67), 348 (3.71), 365 (3.91), 415 (3.39). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 1728 (C=O). NMR (CDCl_3) τ : 5.92 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 5.83 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 2.91 (1H, doublet doublet, $J_1=7$ cps, $J_2=2$ cps), 2.20 (3H, multiplet), 1.75 (1H, doublet doublet, $J_3=7$ cps, $J_4=1.5$ cps), 1.45 (1H, doublet doublet, $J_5=8.5$ cps, $J_6=2$ cps).

代謝産物 XI (XI) 橙黄色針状晶 (AcOEt). mp 187—188°. Anal. Calcd. $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_3\text{N}_2$: C, 66.65; H, 5.22; N, 10.37. Found: C, 66.65; H, 4.78; N, 10.33. Mass spectrum m/e : 270 (M^+), 255, 241, 226, 202, 182. UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ $m\mu$ (log ϵ): 272 (4.96), 387 (3.79), 436 (3.38). NMR (CDCl_3) τ : 5.90 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 5.87 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 5.80 (3H, singlet, $-\text{OCH}_3$), 3.02 (1H, doublet, $J=7$ cps), 2.0—2.4 (3H, multiplet), 1.82 (1H, doublet, $J=9$ cps).

代謝産物 XII (XII) 無色針状晶 (EtOH). mp 194—195°. Anal. Calcd. $\text{C}_{30}\text{H}_{50}$: C, 87.73; H, 12.27. Found: C, 87.91; H, 12.54. Mass spectrum m/e : 410 (M^+). UV end absorption. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 2900, 1635, 1450, 1380, 885.

謝辞 本研究にあたり, 1,6-dimethoxyphenazine の標品を恵与くださった大阪大学薬学部 吉岡一郎教授, aureothricin の標品を恵与くださった微生物化学研究所 浜田雅博士に深謝します. 元素分析を担当された本学奥 昌子氏, NMR 測定を担当された本学 栗谷川福子氏, Mass 測定を担当された本学 三沢重男氏に感謝します.