かびの生産する二量体型抗酸化物質 Bisorbicillinoid 類の生物有機化学的研究：生合成経路の解明と新たなラジカル 消去機構の発見

阿部 尚樹*
廣田 陽

Study on Bioorganic Chemistry of "Bisorbicillinoids", Dimeric Compounds Endowed with Antioxidant Activity, Produced by Trichoderma sp. USF-2690: Evidence for the Biosynthetic Pathways and Finding of Novel Radical Scavenging Mechanisms

Naoki Abe* and Akira Hirota

In the course of our screening to find 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavengers, we isolated eleven sorbicillin-related compounds, including seven novel compounds, from the fermentation broth of *Trichoderma* sp. USF-2690. The "bisorbicillinoids" was recently defined by Nicolaou as the term used to designate a group composed of dimeric sorbicillin-related natural products, on which their diverse structures and interesting biological activities were reported by several groups. A few research groups had described biogenesis of bisorbicillinoids, and consequently some distinguishable biosynthetic routes had been presented. Herein we report (1) finding of a functional quinol, sorbicillinol (**12**), postulated as a key compound in bisorbicillinoids biosynthesis for a long time, (2) evidence for the biosynthetic pathway, *via* sorbicillinol (**12**), of sorbicillin (**11**), bisorbicillinol (**1**), bisorbibetanone (**9**), bisorbicillinolide (**3**), and bisvertinolone (**8**), and (3) study on a radical scavenging mechanism of bisorbicillinol (**1**).

Key words: bisorbicillinoids, sorbicillinoids, *Trichoderma* sp. USF-2690, biosynthesis, DPPH radical scavenger, antioxidant, polyketide, bisorbicillinol, sorbicillinol

はじめに

天然物化学の分野には、実験的データからある物質の関与が確実視されているにもかかわらず、その存在量の少なさや安定性の低さなどから単離することが困難とされる“幻の化合物”や、生体内での生成における未知の生合成経路を経ていることが期待されるなど、その解明によりこれまでの定説を覆す可能性を秘めている“革新的生合成経路”，そして、特異な化学構造が予想を越えた生物活性を導き、その分子レベルでの活性機序の解析が新たな生物との接点を切り拓く“ブラックボックスの中の生物活性”など、魅力的な課題が今も数多く残されている。近年の精製法・分析法の急速な進歩は、不安定化合物を純粋な状態で取り出し、微量にしか存在しない複雑な化学構造を持った化合物ですら構造解析することを可能とするまでに到達した。これにより、これまで予想の域を脱することができなかった天然物化学分野における数々の“魅力的な課題”が、実験的手法により解明可能である現実のものとして認識され、ようやくテーマとして実際に手の届くところまで近づいてきたと考えられる

ようになった。

我々は、生体における生体防御機構が崩れたことにより引き起こされると考えられている酸化障害による疾患（がん、動脈硬化、炎症、虚血性心血管病態、脳血管障害、放射線障害、老化など）が、局所的に作用する抗酸化物質を予防・治療薬として投与することにより阻止・軽減される可能性があることから、多彩な二次代謝産物生産能を持つ土壌微生物を分離し、それらの産生する新規な炭素骨格を持つ特徴的抗酸化物質の探索を行うため、簡便で感度の良いケミカルスクリーニングを実施した。この過程において我々は、ツチアオカビ *Trichoderma* 属に分類されるかび USF-2690 株が、強いラジカル捕捉活性 (DPPH ラジカル捕捉活性；後述) を示す二量体黄色活性物質群を生産していることを見出した。この一群の化合物を対象とした最新の手法を用いた生物有機化学的研究が、我々を“幻の生合成鍵物質”，“未知の生合成経路の存在の期待”，そして，“新たなラジカル消去分子機構”との出会いへと導いてくれることとなった。本論文においては，“bisorbicillinoids”¹⁾ と Nicolaou により命名されたこれら二量体型化合物群に対する構造解析学的、化学合成的、そして生合成的研究に加え、多方面で注目をあびているラジカル消去機構の分子解析の研究を、我々が今回新たに明らかにした実験事実を交えて紹介させていただきたいと思う。

* 東京農工大学応用生物科学部栄養科学科
()

* Department of Nutritional Sciences, Faculty of Applied Bio-Science, Tokyo University of Agriculture ()

1. ツチアオカビ *Trichoderma* 属由来の“新規抗酸化物質”の発見

微生物の生産する新規骨格を持った特徴ある抗酸化物質は、その生産量が限定されていたり、あるいは不安定である可能性もあることから、抗酸化活性を感度良くかつ簡便に検出できる方法を検討した。代表的活性酸素であるヒドロキシラジカルのような生体内ラジカル分子を消去・無毒化する代表的な抗酸化活性物質の作用機序として、1電子還元によるラジカル消去作用があげられる。そこで、簡便にラジカルの1電子還元作用を検出できる方法として、安定フリーラジカルである1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)を用いたケミカルスクリーニング法²⁾を採用することとした。この方法は、サンプルを塗布して展開したシリカゲル薄層板上にDPPHのエタノール溶液を噴霧し、DPPH(紫色)の脱色反応を観察することにより薄層板上のラジカル捕捉型抗酸化物質を高感度に検出できる方法である。我々は、各地の土壌より分離した数百株の放線菌、かびをそれぞれ液体培地中で培養し、その生産物に対してこのDPPH法を用いた抗酸化物質のスクリーニングを行った。活性

を指標とした各種クロマトグラフィーによる精製を行い、単離した活性物質の機器分析法による構造解析を行った結果は、単純なフェノール化合物に加え、2-pyrone骨格を持つ化合物³⁾さらには demethyl ovalicin⁴⁾など種々の骨格を持つ抗酸化物質の化学構造を明らかにした。このような結果は、さらなる新規抗酸化物質発見への期待を膨らませた。

1.1 培養・精製・単離

静岡市の土壌より分離したツチアオカビ *Trichoderma* 属のかびの1種(*Trichoderma* sp. USF-2690)をグルコース、ポリペプトン、イーストエクストラクトを主成分とする液体培地(pH 7)を用いて30℃で通気攪拌培養を行った。得られた培養液から菌体を除去した後、培養液を塩酸によりpH 3に調整し、酢酸エチル抽出を行い酸性画分が活性画分として得られた。

シリカゲル薄層板を用いたDPPHラジカル捕捉活性試験は、この中に複数の黄色活性物質の存在を示した。しかし、同じサンプルを薄層板上に塗布した後、一定時間を経過後に展開した結果は、板上に示される活性の強さや挙動などが大きく異なり、活性物質がシリカゲルに対して極めて不安定であることを示唆するものであ

Fig. 1 Structures of sorbicillinoids and bisorbicillinoids.

た。そこで活性物質の生産条件などの検討を行うための分析法としては、活性物質が黄色であることから 370 nm の波長での逆相系高速液体クロマトグラフィーのクロマトグラムの解析を用いた。

複数の生産培地を用いて活性物質の生産性の検討を行った結果、培地組成の違いにより活性物質の生産パターンに大きな違いが認められた。この結果を受け、目的とする活性物質により生産培地の組成を変えて生産菌の培養を行った。

活性物質の精製・単離にはシリカゲルを使用することを避け、Sephadex LH-20 カラム(ファルマシア)、逆相系 YMC-ODS AQ 120-S 50 樹脂(YMC)中圧カラム、さらに分取用 Capcell pak C 18 SG 120(Shiseido)HPLC カラムを適宜用いて実施し、化合物 1 から化合物 11 の計 11 種の黄色活性物質を単離した(図 1)。

1.2 Bisorbicillinol (1) の構造解析

化合物 1 の高分解能質量分析(HRFAB-MS)スペクトルは擬似分子イオンピークに対し m/z 497.2180 $[(M+H)^+]$, 497.2176 for $C_{28}H_{33}O_8$ を与えたことから分子式を $C_{28}H_{32}O_8$ と決定した。IR スペクトルは 1630 および 1740 cm^{-1} にカルボニルの吸収を示し、少なくとも 1 つのカルボニルは強い分子内水素結合を形成しているものと予想された。 ^1H -NMR スペクトル、 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析から部分構造として 2 組の (*E, E*)-1,3-pentadienyl 基の存在が示唆された。その他には互いに 2.0 Hz でカップリングしている 2 個のメチンプロトン、14.30 ppm に強い水素結合性を示す水酸基プロトン、そして 4 本のシングレットメチルプロトンが観測された。 ^{13}C -NMR スペクトルでは 26 個の炭素が観測され、その内訳としては、6 個のメチル基、8 個のオレフィンメチン、2 個の sp^3 メチン、3 個のカルボニル炭素、1 個のブロードな酸素結合性オレフィン炭素、そして 6 個の 4 級炭素であった。しかし、分子式より明らかな 28 個の炭素のうち 2 個はスペクトル上では確認できなかったことから、NMR 上からは分子内での互変異性などが予想された。HMQC, HMBC そして NOESY などの二次元 NMR スペクトルの解析によりさらなる構造の検討を行った。解析の結果図 2 に示す部分構造 1-A および 1-B の 2 個の部分構造を持つことが明らかとなった⁵⁾。

予想される分子式に対し不足分の $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_2$ からなる分子により、部分構造 A と部分構造 B が結合していると考えられる。そこで部分構造 B を中心としたケト-エノール互変異性構造を想定した。予想される化合物 1 のケト-エノール部位をメチル基により固定する目的で 1 のジアゾメタン処理を行ったところ、2 個のメチル化誘導体を得た。これらの C-7 から C-12 までの部分に関する

Fig. 2 Summary of HMBC and NOESY results for 1.

Fig. 3 Summary of HMBC results for the methylated compounds of 1.

HMBC スペクトルの要約を図 3 に示す。以上の結果より化合物 1 の構造を図 1 に示すように決定し、新規化合物であったことから bisorbicillinol と命名した。

1.3 Bisorbibetanone (4) の構造解析

化合物 4 の FAB-MS スペクトルも化合物 1 と同じ m/z 497 に $(M+H)^+$ を与えた。しかし高分解能 FAB-MS スペクトルでは m/z 497.1890 $[(M+H)^+]$, 497.1812 for $C_{27}H_{29}O_9$ と示されたことから、分子式は化合物 1 とは異なり $C_{27}H_{28}O_9$ と決定した。重クロロホルム中での ^1H ならびに ^{13}C -NMR スペクトルは 28 個分のプロトンと 27 本の炭素のシグナルを与えることからこの分子式は支持された。HSQC スペクトルの解析などから、炭素原子の内訳は、3 個のシングレットメチルを含む 5 個のメチル基、1 個の sp^3 メチン、8 個の sp^2 メチン、そして 13 個の 4 級炭素と帰属された。 ^{13}C -NMR スペクトルのケミカルシフトから 2 個の 4 級炭素 (79.2 と 84.8 ppm) は酸素原子と直接結合していることを示し、また、103.4 ppm の 4 級炭素はヘミアセタール構造由来であるものと考えられた。 ^1H - ^1H COSY スペクトルの解析は 1 と同様 2 組の (*E, E*)-1,3-pentadienyl 基の存在を示した。さらに、HMBC スペクトルの解析を加え、部分構造 4-A を導いた(図 4)。

部分構造 4-A の 2 本の手はもう 1 つの (*E, E*)-1,3-pentadienyl 基の 1 位の 4 級炭素を介して結合している化合物 4 の構造が明らかとなった(図 1)。さらに、立体構造に関する知見を得るため NOESY スペクトルならびに CD スペクトルの解析を行った。CD スペクトル

Fig. 4 Summary of the HMBC result for 4.

Fig. 5 Stereochemistry based on the NOESY and CD spectra for 4.

における2個の enol-sorbyl 基間の励起キラルリティーは負の関係を示すことから、化合物4の絶対構造を1*R*, 4*R*, 6*S*, 10*R*, 11*R*, および12*R*と決定した(図5)。化合物4も新規物質であったことから、bisorbibetanoneと命名した⁶⁾。

1.4 その他の活性物質

DPPH ラジカル捕捉活性試験を指標に活性物質の精製を進め、前述の2種の化合物を含め計11種の活性物質を単離した。これらの物質は各種機器分析により構造の検討を行った。二次元 NMR などの詳細な解析によりこれらの活性物質の化学構造を明らかにした結果、新規化合物として既述の bisorbicillinol (1), bisorbibetanone (4) に加えて bisorbicillinolide (3)⁷⁾, demethyltrichodimerol (2)⁵⁾, oxosorbicillinol (5)⁸⁾, demethylsorbicillinol (6)⁸⁾ および isodemethylsorbicillinol (7)⁹⁾ の7種化合物を構造決定し、既知物質として bisvertinolone (8)⁵⁾, bisorbibutenolide (bislongiquinolide, 9)⁷⁾, trichodimerol (10)⁵⁾, および sorbicillin (11)⁷⁾, の4種を同定した。新規物質の中にはこれまで他の菌からは報告のない、メチル基が1個不足している demethyl 誘導体が複数含まれていた。これらの活性物質は炭素数13あるいは14で、(*E,E*)-1,3-pentadienyl 基を分子中に1個しか持たないグループ(グループI: 化合物5, 6, 7および11)と、炭素数27と28で(*E,E*)-1,3-pentadienyl 基を分子中に2個有するグループ(グループII: 化合物1, 2, 3, 4, 8, 9お

び10)の2つの化合物群に分類された(図1)。グループIIの炭素数はグループIの約2倍であるということ、また、(*E,E*)-1,3-pentadienyl 基の数もグループIIではグループIの2倍の2個存在することを考慮すると、グループIIはグループIの化合物が二量体化して生合成されたものと推測できる。しかし、その炭素骨格は非常に変化に富んだものであり、生合成経路およびその分子機構に強い興味をもたれた。

2. 二量体生理活性物質“Bisorbicillinoids”

(*E,E*)-1,3-Pentadienyl 基を側鎖にもつ最初の化合物である sorbicillin (11) は1948年にCramらにより *Penicillium notatum* による臨床用 penicillin の製造過程で、粗精製物中に混在していた色素成分として初めて報告された。彼らは構造解析の過程で dihydrosorbicillin (13) を含む数種の関連化合物を化学的に誘導しその構造を明らかにした^{10, 11)}。その後、時をおいて1981年にDreidingらのグループは *Verticillium intertextum* の代謝物質の研究を行い、液体培養を行った培養液中から先の sorbicillin (11), dihydrosorbicillin (13天然物としては最初の報告)、に加え新規物質として vertinolide (14), bisvertinoquinol (15) の計4種の化合物を単離し、報告した¹²⁻¹⁴⁾。Bisvertinoquinol (15) は側鎖に(*E,E*)-1,3-pentadienyl 基由来の部分構造2個をもつ最初の化合物であった。Dreidingらはその報文の中で polyketide 生合成経路による hexaketide を出発物質とした、二量体化の過程をも含む4種化合物間の生合成経路の仮説を

Fig. 6 Hypothetical biosynthetic pathway proposed by Dreiding *et al.*¹²⁾

Fig. 7 Hypothetical biosynthetic pathway proposed by Dreiding *et al.*¹⁵⁾

示した¹²⁾。この仮説の中で彼らは、生合成の鍵となると予想される未知の quinol (12) の関与とともに、polyketide 鎖生合成過程において酸化が起こるという前例のない可能性についても示唆した(図6)。

1986年に Dreiding らはさらに側鎖に2個の(*E, E*)-1,3-pentadienyl 基由来の構造をもつ4種の新規化合物 bisvertinol 類(16, 17, および18)と bisvertinolone (8)を報告した¹⁵⁾。彼らは sorbicillin (11) をはじめ2,4-dimethyl-hexaketide を基本構造に持つこれらの化合物群を vertinoid と命名し、先の仮想的生合成経路(図6)を発展させた生合成経路(図7)を想定した。新たな予想生合成経路には hexaketide 経路中の酸化は採用されず、新たに sorbicillin (11) が epoxy 化された生合成中間体を想定し、bisvertinol 類の9a位の configuration が *S* との推定からこの中間体と quinol 12 中間体の二分子間 S_N2 反応を経る生成経路を予想した。

1992年 Ayer らのグループは新たな vertinoid である二量体化合物 trichodimerol (10) を bisvertinol (16), bisvertinolone (8) とともに *Trichoderma longibrachiatum* の液体培養液中から単離したことを報告した¹⁶⁾。この論文の中で彼らは、NOE 実験の結果として bisvertinol 類の9a位の configuration は *R* であると結論づけた。これは先の Dreiding らの結論と異なるものであり、推定生合成経路に疑問を呈することにつながるものであった。さらに彼らは5a位 *S*, 4a位 *R* および9b位 *R* と結論づけた(図8)。

1993年 Marumo らのグループは *Acremonium strictum* の培養液中から抗菌活性の新たな活性機序となる β -1,6-glucan 生合成の阻害剤として最初の活性物質となる bisvertinolone (8) を見出したことを報告した¹⁷⁾。

Fig. 8 Revised stereochemistry for 8 proposed by Ayer *et al.*¹⁶⁾ and Marumo *et al.*¹⁷⁾

彼らは、そのユニークな生物活性に加え CPK モデルと CD スペクトルの解析からその立体化学についても検討し、5a *S*, 4a *S*, 9a *R* および9b *R* と結論づけた(図8)。ここに至り bisvertinol 類にはそれぞれ異なる3種類の立体化学が提出されることとなった。

Bristol-Myers Squibb 社のグループは細菌感染症におけるエンドトキシショックを引き起こす原因となるヒト単球系での tumor necrosis factor- α (TNF- α) 産生の阻害物質として、*P. chrysogenum* から trichodimerol (10) を単離しX線構造解析および活性発現機序についての検討を行った^{18, 19)}。その結果、trichodimerol (10) は誘導型 cyclooxygenase-2 (COX-2, PGHS-2) の誘導を翻訳レベルで阻害することにより prostaglandin 合成を阻害し、その結果として TNF- α の産生を阻害するという興味あるデータを与えた²⁰⁾。1996年と1997年に Ayer らは、さらに *T. longibrachiatum* の培養液中から新規物質 trichodermolide (19), sorbiquinol (20), bislongiquinolide (bisorbibutenolide 9), および5-hydroxyvertinolide (21) の単離を報告した^{21, 22)}。彼らもこれらの化合物の生合成における鍵化合物として quinol (12) の存在を強く示唆した。Bislongiquinolide (9) は1997年に Satake らのグループが trichotetronine (21) 位の立体化学をアン

Fig. 9 Biogenesis for 9 proposed by Satake *et al.*²³⁾ and Crews *et al.*²⁴⁾ [route A] and Abe *et al.*⁷⁾ [route B].

チポートの *R* としているが)として²³⁾, 1998 年には我々のグループが bisorbibutenolide として⁷⁾, さらに同様に Crews らのグループ²⁴⁾ がそれぞれ *Trichoderma* 属を起源として相次いで単離を報告した。1998 年以降における我々のグループの類縁体単離報告については前章において述べた通りであるが, 加えて Satake らは 24, 25-dihydrotrichotetronine (22)を²³⁾, Crews らは epoxysorbicillinol (23) の単離²⁴⁾ をそれぞれの論文の中

で報告した。さらにこれらの報文の中で両グループは bislongiquinolide (9) の生合成経路についても言及しており, とともに 5-hydroxyvertinolide (21) の脱水誘導体と quinol (12) との間の Diels-Alder 反応により生合成される経路を提唱した。これに対し, 我々は bisorbicillinol (1) の 12 位の水酸基から 9 位カルボニル基への分子内求核反応により bislongiquinolide (bisorbibutenolide 9) が生合成される案を提示した(図 9)⁷⁾。

天然物として特異な化学構造を持つ vertinoid およびその demethyl 類縁体は有機合成の標的化合物としても注目された。1999 年 Corey らは sorbicillin (11) を出発物質として, 6-*O*-acetylquinol (12') を経由する trichodimerol (10) の全合成を報告した²⁵⁾。

さらに, Nicolaou らのグループも 6-*O*-acetylquinol (12') を経由する trichodimerol (10), bisorbicillinol (1), および bisorbibutenolide (bislongiquinolide 9) の全合成を報告した^{26, 27)}。特に, bisorbibutenolide (9) の合成ルートは我々の提唱する bisorbicillinol (1) を経由する生合成ルートをミミックしたものであり, 生体内での生成機構として 1 を前駆物質として 9 が生合成される可能性を強く支持するものであった(図 10)。彼らは, さらに bisvertinol 類についても Dreiding らの二分子間 S_N2 反応による生合成経路ではなく, 二分子間 Michael 反応と引き続き分子内ケタール化反応によるルートを提案した。

Pettus らも別ルートにより epoxysorbicillinol (23) および bisorbicillinol (1) の全合成を報告した²⁸⁾。

上述してきたような様々な研究成果に見られるよう

Fig. 10 Biomimetic total synthesis of 1, 9 and 10 from acetate 12' ²⁷⁾.

に、近年、化合物群としての sorbicillin 関連化合物は多くの研究者に着目されている。そこで Nicolaou らは 2,4-dimethyl-hexaketide 骨格から脱 methyl 化した類縁体も、報告されている酸化 sorbicillin 二量体型天然物に対し“bisorbicillinoids”というグループ名を提案した¹⁾。我々も同様に、demethyl 体も含まれる単量体に対し“sorbicillinoids”というグループ名を提案した²⁹⁾。

以上述べてきた“bisorbicillinoids”のこれまでの研究における未解決の問題をまとめておくと、(1)“bisorbicillinoids”の生合成の鍵と言われる未知の quinol (12) は実際に存在するのか、(2)存在するとすれば quinol (12) は sorbicillin (11) から誘導されるのか(酸化がどの時点で起こるのか)、(3)複数提出されている bisvertinol 類の立体化学はどれが正しいのか、(4) bislongiquinolide (bisorbibutenolide 9) が生合成される経路は bisorbicillinol (1) を前駆体としているのか、それとも二分子間 Diels-Alder 反応によるものなのか、などがあげられる。

3. Bisorbicillinoid 類生合成鍵物質 sorbicillinol (12) の発見

“Bisorbicillinoids”の生合成については前の章において述べたように、複数のグループから様々な生合成経路が提案されている。しかし、すべてのグループが共通に掲げているのが、hexaketide 生合成の最終生成物としての sorbicillin (11) と、これまでに知られている生合成経路から 11 の酸化により生成すると考えられ、二量体化の鍵化合物として予想される未確認 quinol (12) である。特にこの quinol (12) については初めて生合成への関与が推定されて以来、20 年以上が経過しているにもかかわらず実験的に存在の証明は報告されていなかった。有機合成的にも前述のように Corey や Nicolaou のグループは trichodimerol (10) および bisorbicillinol (1) の全合成において、多くの“bisorbicillinoids”推定生合成経路と同様 sorbicillin (11) を出発物質として未確認 quinol (12) の安定誘導体である 6-O-acetylquinol (12') を誘導し、12' を加水分解と同時に二量体化して標的化合物を合成するという方法により実施した。この結果は、未確認 quinol (12) がかびによる“bisorbicillinoids”生産における鍵中間体として働いているという、予想生合成経路の妥当性を強く示唆するものであった。

一方において我々は、*Trichoderma* sp. USF-2690 の培養における生産物質の経時的変化を観察する目的で HPLC 分析による検討を行った。その解析から、主生成物として培養初期に生成される化合物が、bisorbicillinoids 生成に伴ってその量が徐々に減少していくという現象を見出した。そこで、この物質の単離を試みたところ、

通常、通常の溶媒抽出により、そして凍結乾燥を含む濃縮乾固によってもそれぞれの条件下で速やかに他の物質へと変換し、消失することが判明した。生合成鍵化合物と予想される quinol (12) が化学的により反応性の高い化合物であろうと予想されることから、この化合物こそ 12 であると考え、その精製法ならびに構造解析法の検討を行った。

3.1 Sorbicillinol (12) の精製

種々の方法を検討した結果、培養ろ液をそのまま 50 °C で目的物に変化しない濃度である 1/10 の量まで減圧濃縮し、これをファルマシア社製 Sephadex LH-20 樹脂のカラムにより水を溶出溶媒として分画を行うことにより、高純度で目的物の含まれる画分を得ることができた。

3.2 Sorbicillinol (12) の LC-ESI-MS 分析

得られた目的物画分の LC-ESI-MS (Neg.) による分析を行った。単一ピークとして LC 付属の UV 検出器で溶出が確認されるこの物質が、quinol (12) に予想される擬似分子イオンピーク m/z 247 ($M-H$)⁻ を与えることを確認した。この物質が 12 であることをさらに確認するため、Corey らの方法²⁵⁾ により 6-O-acetylquinol (12') を化学合成し、0.05 M 水酸化カリウム溶液でアルカリ加水分解後、注意深く中和、希薄水溶液とした状態でこの水溶液を同じ条件下 LC-ESI-MS (Neg.) による分析を行った。結果は予想通りカラムからの同じ溶出

Fig. 11 LC-ESI-MS (negative) spectra of (A) 12 and (B) the hydrolyzed product from 6-O-acetylquinol (12').

時間とともに同じ擬似分子イオンピークを与えることを確認した(図 11)。

3.3 Sorbicillinol (12) から 6-O-acetylquinol (12') の誘導

化学構造をより確実なものとするため quinol (12) と予想される化合物を安定な 6-O-acetyl 体 (12') へと誘導する方法を検討した。含有する主生産物の純度が高い LH-20 水溶液画分を用いて条件検討を行った。10 ml の水溶液画分に対し 55 ml の割合で無水酢酸を加え 1 時間攪拌、無水酢酸と等量のピリジンを加えてさらに 1 時間攪拌を続けた後、蒸留水中に注入して反応を止め、クロロホルムで溶媒抽出を行った。得られた溶媒層を脱水後濃縮し、分取 TLC にて精製を行い目的とするアセチル化体を得た。合成法により調製した 6-O-acetylquinol (12') と HPLC 分析による保持時間ならびに ^1H -NMR スペクトルの比較を行ったところ、いずれも良い一致を示した。さらに光学分割カラム Chiralpak AD により分析を行った結果、合成法による 6-O-acetylquinol (12') は 9.6 分 (6*S*) と 11.2 分 (6*R*) にほぼ 1:1 の大きさで 2 本のピークを与えるのに対し、培養液から調製した 12' は 9.6 分に 1 本のピークのみ与えることから 6 位の立体化学は *S* であると決定した。以上の結果より、この化合物の構造を“bisorbicillinoids”生合成の鍵化合物としてその存在が予想されていた quinol (12) (図 1) と決定し sorbicillinol と命名した³⁰⁾。

3.4 Sorbicillinol (12) の化学変換

Sorbicillinol (12) が化学的に不安定であり反応性に富んでいることから、その化学変換について検討した。12 の溶解した水溶液からクロロホルムや酢酸エチルなどの有機溶媒を用いて抽出を行うと、速やかに Diels-Alder 型二量体化反応が起こり bisorbicillinol (1) へと変化することが、また、水溶液のまま濃縮乾固すると Michael 型反応機構を経て trichodimerol (10) へと誘導されることが機器分析の結果明らかとなった。また、Diels-Alder 反応により 12 が二量体化し bisorbicillinol (1) へと導かれるためには、12 が一定の割合で互変異性を引き起こす必要が指摘されていたが、12 からは 6:1 の割合で 2 種のジアセチル体 (12'' と 12''') が誘導されることから、必要とされる互変異性が実際に起こっている可能性を強く示唆した(図 12)³¹⁾。

以上の実験結果により明らかにした事実は、20 年間未解決であった“bisorbicillinoids”生合成における重要な課題の 1 つに明確な答えを与えるものであった。

4. 安定同位体による生合成経路の解析

“Bisorbicillinoids”の生合成についてはすでに述べたように複数のグループから異なった予想経路が提案され

Fig. 12 Chemical conversion for the structural determination of sorbicillinol (12).

ている。生合成経路を明らかにする方法として近年安定同位体である ^{13}C でラベルされた前駆体を用いた取り込み実験が盛んに行われており、 ^{13}C -NMR スペクトルの解析により多くの成果を上げている^{32,33)}。我々は、本菌株における“sorbicillinoids”ならびに“bisorbicillinoids”の生合成経路を実験的に明らかにするため、polyketide 生合成経路におけるスターター物質である酢酸の 1 位または 2 位の、あるいは両方の炭素を ^{13}C ラベルしたものを生育培地中に添加し、それぞれの代謝化合物への ^{13}C ラベル酢酸の取り込みを試みた。さらに洗浄菌体を用いた微生物変換による ^{13}C ラベル代謝化合物の構造変化を明らかにすることにより、代謝化合物間の生合成的関連性についての検討を行った。

4.1 Sorbicillinol (12) の生合成²⁹⁾

“Bisorbicillinoids”の生合成における鍵物質である sorbicillinol (12) を安定な 6-O-acetyl 誘導体 (12') として培養液中から単離することが可能となったことから培地中に 0.1% の濃度で [1- ^{13}C]酢酸ナトリウム ([1- ^{13}C]SA) または [1,2- ^{13}C]酢酸ナトリウム ([1,2- ^{13}C]SA) を添加し、培養を行った後前述した方法により 12 の LH-20 水溶液画分を得、さらにアセチル化を行った。[1- ^{13}C]SA を添加した培地から得られた 12' の ^{13}C [^1H]-NMR スペクトルを解析したところ、C-1, C-3, C-5, C-1', C-3', および C-5' が ^{13}C ラベルされたスペクトルが得

られた。一方, $[1,2-^{13}\text{C}]$ SA を添加した培地から得られた 12' については $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR に加え ^{13}C - ^{13}C 相関を検出する INADEQUATE スペクトルも測定した。結果は C-1/C-6, C-2/C-3, C-4/C-5, C-1'/C-2', C-3'/C-4' および C-5'/C-6' に相関が認められたことから, それぞれに酢酸ユニットが取り込まれていることが明らかとなった。この結果を解析すると, 図 13 に示すように polyketide 生合成経路において酢酸ユニットの典型的な head-to-tail の結合により生成した hexaketide 鎖の 4 位と 6 位がメチル化され, 次にカルボニル末端の 1 位と 2 位の間で閉環が起こり, 6 位の酸化は polyketide 鎖の閉環前, あるいは閉環と同時に 1 位の還元がおきた場合は (sorbicillin 11 の生成) その後に行われることが示された (図 13- I)。つまり閉環後に対称型である中間体を経由する場合 (図 13- II), 酸化は a および b の位置で同じ確率で起こるものと予想できる。また, Dreiding らが予想した生合成経路¹²⁾に従うと, 図 13- III に従うこととなり, いずれの場合も C-1/C-2, C-3/C-4, C-5/C-6 の相関が認められると予想されることから, 図 13- II および III の経路は除外できるものと考えられる。

そこで, 6 位の酸化が生合成のどの時点で起こるかを解明するためにも sorbicillinol (12) と sorbicillin (11) との生合成的な関係に興味を持たれた。

4.2 Sorbicillinol (12) から sorbicillin (11) への生合成経路²⁹⁾

Sorbicillinol (12) が前駆物質となり sorbicillin (11) が生合成される可能性があることから, $[1-^{13}\text{C}]$ SA 添加培地から生成された 12 ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-12) を培地中に添加し

て本菌株の培養を行った。得られた培養液から 11 を単離し $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR を測定した結果, C-1, C-3, C-5, C-1', C-3' および C-5' への ^{13}C の高い率での取り込みが認められたことから, 12 から 11 が生合成される可能性を強く示唆した。この結果は 11 から 12 が生合成される可能性を否定するものではないものの, 6 位の酸化が polyketide 鎖生合成の過程において行われるという, 未知の新たな生合成反応が存在する可能性を期待させるものであると考えられる。

4.3 Sorbicillinol (12) から bisorbicillinol (1) を経由した bisorbibutenolide (9) および bisorbicillinolide (3) への生合成経路²⁹⁾

洗浄菌体を調製し, これを用いて 0.1% の濃度となるように $[1-^{13}\text{C}]$ SA または $[2-^{13}\text{C}]$ 酢酸ナトリウム ($[2-^{13}\text{C}]$ SA) を添加した培地により培養を行い, それぞれの培養液中より bisorbicillinol (1) を得た ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-1 および $[2-^{13}\text{C}]$ SA-1)。 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR を測定した結果, $[1-^{13}\text{C}]$ SA-1 は互変異性により検出されない C-9 と C-11 を除く C-1, C-3, C-5, C-7, C-1', C-3', C-5', C-1'', C-3'' および C-5'' の 10 個の炭素の ^{13}C ラベルが認められた。また, $[2-^{13}\text{C}]$ SA-1 のスペクトルは C-2, C-4, C-6, C-8, C-10, C-12, C-2', C-4', C-6', C-2'', C-4'' および C-6'' の 12 個の炭素について ^{13}C ラベルを示した。この結果は, head-to-tail のルールに従い生成した 2 個の hexaketide 鎖が, 酢酸ユニットのカルボニル炭素由来の C-1 と C-7 およびメチル炭素由来の C-4 と C-8 の間で結合していることを示しており, hexaketide 鎖から生成した sorbicillinol (12) 二分子から 1 が生合成される可能性を強く示唆するものと考

Fig. 13 Proposed biosynthetic mechanism for the formation of ^{13}C -labeled 12 (^{13}C -labeled 12') via a polyketide pathway. ACP = acyl carrier protein.

Fig.14 Labeling pattern of 1 resulting from feeding experiment with sodium $[1-^{13}\text{C}]$ acetate or ^{13}C -labeled 12 ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-12).

えた。 $[1-^{13}\text{C}]$ SA-12 を前駆物質として 0.1% の濃度で培地に添加して培養した後、得られた bisorbicillinol (1) ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-12-1) の $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR スペクトルは、予想通り $[1-^{13}\text{C}]$ SA-1 と同様なラベルパターンを示した (図 14)。これにより 1 が互変異性体として存在する二分子の 12 の Diels-Alder 反応により生合成されるという経路が明らかとなった。

さらに、我々の予想した bisorbicillinol (1) を分岐点とした bisorbibutenolide (9) ならびに bisorbicillinolide (3) の生合成経路⁷⁾ の存在を実験的に明らかにするため 1 の洗浄菌体を用いた微生物変換を試みた。まず最初に洗浄菌体存在下、培養液中での 1 の量的変化を HPLC 分析により検討した。この観察において 1 は培養時間とともに減少していくことが認められ、これと前後して培養液中に 3 および 9 が現れてくることが確認された。これに対し、対照実験として 3 および 9 を同様な条件で培養した結果は 3 と 9 の相互変換あるいは 1 への逆方向の変換が起こらないことを示した。そこで洗浄菌体を用いた $[1-^{13}\text{C}]$ SA-1 または $[2-^{13}\text{C}]$ SA-1 の微生物変換を検討した。それぞれの ^{13}C ラベル化合物の微生物変換により得られた 3 および 9 の $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR スペクトルを測定した結果は、1 の ^{13}C ラベルが微生物変換後も完全な形で 3 と 9 に保存されていることを示した (図 15)。

以上の結果により、我々が予想した 1 を分岐点とした 9 および 3 への生合成経路が存在することを、はじめて実験的に明らかにすることができた^{34,35)}。

この生合成経路から反応機構を予想すると、bisorbicillinol (1) の 12 位の水酸基が 9 位のカルボニル基を求核的に攻撃し、8 位と 9 位の結合の切断によって γ -ラク톤を生じ、これに伴い 8 位に生じたアニオンにプロトンが結合し bisorbibutenolide (9) が生合成され、一方で、8 位に生じたアニオンが 5 位のカルボニル基を求核攻撃して 8 位と 5 位の間に結合が形成される。これと同時に 4 位と 5 位の間の結合が開裂し、新たに 4 位に第

Fig. 15 Labeling pattern of 3 and 9 resulting from feeding experiment with ^{13}C -labeled bisorbicillinols $[1-^{13}\text{C}]$ SA-1 (●) and $[2-^{13}\text{C}]$ SA-1 (▽).

2 のアニオンが生じる。このアニオンが 10 位との間の Michael 型の反応による結合を生じた結果、bisorbicillinolide (3) が生合成されるものと考えられる⁷⁾。

4.4 Bisvertinolone (8) の生合成経路³⁶⁾

我々が *Trichoderma* sp. USF-2690 の培養液中より見出した "sorbicillinoids" である oxosorbicillinol (5)⁸⁾ の構造は、Nicolaou らが trichodimerol (10) の生合成機構で予想した経路¹⁾ と類似の sorbicillinol (12) と 5 との二分子間 Michael 型反応と、それに続く分子内 ketalization によりが生合成される経路の存在を我々に予想させた。そこで、まず bisvertinolone (9) への酢酸ユニットの取り込みを検討するため、 $[1-^{13}\text{C}]$ SA を添加した培養液中から ^{13}C ラベルされた 9 の単離を試みた。3 日間通常の条件で *Trichoderma* sp. USF-2690 の培養を行い、これに 0.01% の $[1-^{13}\text{C}]$ SA と 0.01% のラベル体を含まない SA を添加し、さらに 3 日間培養後、常法に従い bisvertinolone ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-9) を単離した。 $[1-^{13}\text{C}]$ SA-9 の $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR スペクトルは C-1, C-3, C-4 a, C-6, C-8, C-9 a, C-10, C-12, C-14, C-19, C-21 そして C-23 の 12 個の炭素が ^{13}C ラベルされていることを示した。

次に 5 が 9 の生合成前駆物質となっていることを確認するべく ^{13}C ラベル 5 の取得、ならびにその後の 9 への取り込みについての検討を行った。本菌株を 2 日間通常

Fig. 16 Labeling patterns of 8 and 5 incorporating (a) $[1-^{13}\text{C}]$ acetate and (b) labeled 5. In brackets, expressed as number of fold increase in the height of the ^{13}C resonance relative to unlabeled 5 or 8, with correction by standardizing the two samples using the mean peak height for all unlabelled carbons. The ^{13}C -NMR measurement of labeled 5 in experiment (a) and the incorporation study of labeled 5 in experiment (b) were performed by the use of the different samples of labeled 5, prepared individually.

培養した後、 $[1-^{13}\text{C}]$ SA と非ラベル体 SA の 1:1 混合物を 0.02% 培地に添加し、さらに 42 時間培養して得られた培養液から常法に従い oxosorbicillinol ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-5) を得た。 $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR スペクトルからは C-1, C-3, C-5, C-1', C-3' および C-5' の ^{13}C ラベルが認められた。この $[1-^{13}\text{C}]$ SA-5 を用いてさらに 9 への取り込み実験を実施した。2 日間通常培養した後、0.01% の $[1-^{13}\text{C}]$ SA-5 を添加、5 時間培養ののち後処理を行った。精製後得られた bisvertinolone ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-5-9) の $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -NMR スペクトルは C-1, C-3, C-10, C-12, C-14 および C-4 a の 6 個の炭素のみ ^{13}C ラベルが認められ

た。この結果は $[1-^{13}\text{C}]$ SA-5 の ^{13}C ラベルが完全に 9 の中に保存されていることを示しており、我々が事前に予想した結果と合致していることから、oxosorbicillinol (5) は bisvertinolone (9) の 2 種の生合成前駆物質の 1 つであることが実験的に明らかとなった。以上の結果を図 16 に示す。

さらに図 16 に示すように、この実験結果からは、C-6, C-8, C-9 a, C-19, C-21 と C-23 には ^{13}C の取り込みが全く認められないことから、少なくとも oxosorbicillinol (5) が sorbicillinol (12) の生合成における前駆物質とはなり得ないと考えられる。 ^{13}C ラベル sorbicillinol ($[1-^{13}\text{C}]$ SA-12) を用いた取り込み実験についても現在検討中である。

この実験の結果から bisvertinolone (9) の生合成の反応機序を推測すると、oxosorbicillinol (5) より生じた 4 位のアニオンが求核的に sorbicillinol (12) の 1 位に二分子間 Michael 型の反応で結合し、引き続いて 12 の 6 位の水酸基と 5 の 5 位カルボニルとの間で分子内 ketalization 反応による結合が形成されと考えられる。この場合、12 の 6 位の立体配置は *S* 体であることから、最初の求核反応は 5 の 4 位の *re* 面側と 12 の 1 位の *si* 面側とで起こると予想される。モデルを用いてこの反応を再現すると、次の分子内 ketalization 反応も立体的に制御されることが明らかとなった(図 17)。

このように生合成の分子機構から推測される bisvertinolone (9) の立体化学は 4*R*, 4*aR*, 5*aS*, 9*aR* および 9*bR* であり、これは前述した 9 の 3 種類の立体化学のうち Ayer らの報告¹⁶⁾ と一致するものであった。

以上、安定同位体を用いた生合成実験の結果よりこれまでに明らかになった“bisorbicillinoids”の生合成経路を図 18 にまとめる。

5. Bisorbicillinoid 類のラジカル捕捉機構

Trichoderma sp. USF-2690 の培養液から得られた 12 種の“sorbicillinoids”および“bisorbicillinoids”のうち収量の少なかった isodemethylsorbicillinol (7) を除く 11

Fig. 17 Proposed biosynthetic pathway for 9.

Fig. 18 Proposed biosynthetic routes of 1, 3, 5, 8, 9, 11 and 12 via polyketide pathway.
(I) Proposed by Dreiding *et al.*^{12,15}; (II) An expected route resulting from our feeding experiments.

種の化合物について DPPH ラジカル捕捉活性の検討を行った。今回実施した条件⁵⁾において試験開始 30 分後に DPPH ラジカルを 50% 消去する各化合物の濃度を ED₅₀ 値として算出した。この条件において、陽性対照として用いた α -tocopherol (ED₅₀ 22.0 μ M) および BHT (ED₅₀ 27.0 μ M) に対して 1 (ED₅₀ 31.4 μ M), 2 (ED₅₀ 42.4 μ M), 3 (ED₅₀ 500 μ M), 4 (ED₅₀ 62.5 μ M), 5 (ED₅₀ 87.7 μ M), 6 (ED₅₀ >500 μ M), 8 (ED₅₀ 44.3 μ M), 9 (ED₅₀ >500 μ M), 10 (ED₅₀ 53.7 μ M), 11 (ED₅₀ >500 μ M) および 12 (ED₅₀ 49.5 μ M) という結果を得た。フェノール型の抗酸化物質は短時間で活性が現れにくい、いわゆる遅効の活性物質も見られることから、活性の弱かった 3, 6, 9 と 11 については実験開始 30 分以降についても経時的に活性を測定した。得られた反応開始 24 時間経過後の活性は 3 (ED₅₀ 88.8 μ M), 9 (ED₅₀ 80.8 μ M), 11 (ED₅₀ 152.3 μ M) であった。しかし、6 については 24 時間経過後も 33.9% の捕捉活性しか示さなかった。

今回検討した 11 種の化合物のうち bisorbicillinol (1) を除く化合物については活性部位が水素結合性水酸基を持つ (*E, E*)-1,3-pentadienyl 側鎖 (sorbyl 鎖) のケト・エノール構造部分であると予想された。そこで、各化合物

の活性の強さと ¹H-NMR スペクトルにおける水素結合性水酸基の数およびケミカルシフト値を比較した。その結果、より低磁場に水素結合性水酸基のシグナルを与えかつその数が多い化合物ほど DPPH ラジカルに対する捕捉能力が高いという相関性が認められた。

これに対し、今回活性を検討した化合物の中で、最も高い活性を示した 1 に関してはこのような相関性が認められないことから、異なった活性部位、ならびに活性機構が予想された。そこで、最初に 1 と DPPH ラジカルとの反応についてその経過を HPLC 分析により検討した。分析の結果、1 が DPPH ラジカルを消去した後に反応液中に未知の化合物のピークが現れることが明らかとなった。この未知の化合物の構造を明らかにするため、この化合物を単離し、各種機器分析による構造解析を行った結果、得られた構造は 1 よりも水素原子が 2 個少ない完全な対称形の分子であることが判明した。この構造から 1 の DPPH ラジカル消去機構を推測すると、1 の 9 位と 11 位の間の *s-trans* ケト・エノール構造において互変異性に関わっている水素原子を 1 分子の DPPH ラジカルに与え、これを 1 電子還元し消去、同時に 1 の分子中に新たに生じた 10 位のラジカルと、他方、1 が 1' 位の水素原子を、さらにもう 1 分子の DPPH ラジカ

ルに与えることにより2位にもラジカルが生じ、この2個の不对電子が結合を形成し非ラジカル分子である対称体の化合物へと変化して安定化するという機構であった(図19)³⁷⁾。

Fig. 19 Proposed mechanism for the DPPH radical scavenging activity of 1.

我々はこれまでも活性物質とDPPHラジカルの間の反応により新たに生じた物質の構造を解析することにより、活性物質とDPPHが付加体を形成してラジカルを消去するという新たなラジカル消去機構を明らかにしている^{3, 38, 39)}。ラジカル捕捉型抗酸化剤は対象となるラジカルを消去した時に、抗酸化剤側に生じるラジカルをどのようにして安定化させるかが応用面における重要な問題である⁴⁰⁾。つまり、問題となるラジカルをたとえ消去できたとしても、抗酸化剤側に生じたラジカルが活性分子となり他の分子に障害を与えることが危惧されるということである。今回、我々が明らかにした bisorbicillinol(1) のDPPHラジカル消去機構は、ラジカル消去後、安定な非ラジカル対称性分子を生ずるものであり、この化合物の応用面での有用性に期待を持たせるものであると考える。

おわりに

“Bisorbicillinoids” は近年注目されている二量体型の

化合物であること、そして変化に富んだ炭素骨格を有すること、さらにはユニークな生物活性を示すことなどから多くの研究者の興味を引いてきた。2章に示した様々な研究が行われる過程において、この章の最後に示したような未解決の4つの問題点が残されていた。

我々は微生物の生産する抗酸化物質探索の過程において見出した *Trichoderma* sp. USF-2690 の生産する複数の“sorbicillinoids”ならびに“bisorbicillinoids”の構造解析や活性機構の解明に関する研究を行うかたわら、これらの生合成にも興味を持った。培養生成物の経時的HPLC分析や安定同位体の取り込み実験を通じたアプローチの結果は、生合成鍵化合物 sorbicillinol (12) の発見など、残されていた4つの問題点のうちほとんどの問題点に何らかの解答を与えた。しかし、sorbicillinol (12) の6位の酸化が polyketide 鎖生合成の過程ですでに起こることの可能性は指摘したものの、実験的証明にまでは至っていない。もし polyketide 鎖生合成の過程での酸化が起こることが証明できれば、近年遺伝子レベルでもその機能が明らかにされつつあるが、未だ未解明の部分も多く残すカビの iterative 多機能タイプ I 型ポリケタイド合成酵素⁴¹⁾ の新たな機能発現の解明にもつながるものであり、生合成に関しては今後さらに検討していく必要があると考えられる。また、bisorbicillinol (1) で見られるような新たな活性発現機構が明らかとなったことから、生理活性物質としての様々な応用に関しても、今後詳細に検討していくことが求められていると言えるだろう。

最後に、sorbicillin の化学合成に多大な尽力をいただいた静岡県立大学食品栄養科学部有機化学研究室・丹治健一助教授、杉本 収先生に感謝申し上げます。また、本研究は静岡県立大学食品栄養科学部微生物生産学研究室において行われたものであり、研究をともに行った研究室の卒業生諸氏に感謝いたします。

(2003年8月25日受理)

文献

- 1) K. C. Nicolaou, R. Jautelat, G. Vassilikogiannakis, P. S. Baran, K. B. Simonsen, *Chem. Eur. J.*, **5**, 3651 (1999)
- 2) M. S. Blois, *Nature*, **181**, 1199 (1958)
- 3) A. Hirota, A. Nemoto, Y. Tsuchiya, H. Hojo, N. Abe, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 418 (1999)
- 4) C. Ito, N. Abe, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 1993 (1999)
- 5) N. Abe, T. Murata, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 661 (1998)
- 6) N. Abe, T. Murata, K. Yamamoto, A. Hirota, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5203 (1999)
- 7) N. Abe, T. Murata, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 2120 (1998)
- 8) N. Abe, K. Yamamoto, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 620 (2000)

- 9) 荒川忠春, 山本和延, 阿部尚樹, 廣田陽, 日本農芸化学会 2000 年度大会講演要旨集, 14 (2000)
- 10) D. J. Cram, M. Tishler, *J Am Chem. Soc.*, **70**, 4238 (1948)
- 11) D. J. Cram, *J Am Chem Soc.*, **70**, 4240 (1948)
- 12) L. S. Trifonov, A. S. Dreiding, L. Hoesch, D. M. Rast, *Helv Chim Acta*, **64**, 1843 (1981)
- 13) L. S. Trifonov, J. H. Bieri, R. Prewo, A. S. Dreiding, L. Hoesch, D. M. Rast, L. Hoesch, *Tetrahedron*, **39**, 397 (1982)
- 14) L. S. Trifonov, J. H. Bieri, R. Prewo, A. S. Dreiding, L. Hoesch, D. M. Rast, *Tetrahedron*, **39**, 4243 (1983)
- 15) L. S. Trifonov, H. Hilpert, P. Floersheim, A. S. Dreiding, D. M. Rest, R. Skrivanova, L. Hoesch, *Tetrahedron*, **42**, 3157 (1986)
- 16) R. Andrade, W. A. Ayer, P. P. Mebe, *Can. J. Chem.*, **70**, 2526 (1992)
- 17) M. Kontani, Y. Sakagami, S. Marumo, *Tetrahedron Lett.*, **35**, 2577 (1994)
- 18) Q. Gao, J. E. Leet, S. T. Thomas, J. A. Matson, D. P. Bancroft, *J. Nat. Prod.*, **58**, 1817 (1995)
- 19) G. A. Warr, J. A. Veitch, A. W. Walsh, G. A. Hesler, D. M. Pirnik, J. E. Leet, P-F. M. Lin, I. A. Medina, K. D. McBrien, S. Forenza, J. M. Clark, K. S. Lam, *J Antibiot.*, **49**, 234 (1996)
- 20) C. E. Mazzucco, G. Warr, *J. Leukoc. Biol.*, **56**, 271 (1996)
- 21) R. Andrade, W. A. Ayer, L. S. Trifonov, *Can. J. Chem.*, **74**, 371 (1996)
- 22) R. Andrade, W. A. Ayer, L. S. Trifonov, *Aust. J. Chem.*, **50**, 255 (1997)
- 23) O. Shirota, V. Pathak, C. F. Hossain, S. Sekita, K. Takatori, M. Satake, *J Chem Soc, Perkin Trans. 1*, 1997, 2961
- 24) S. Sperry, G. J. Samuels, P. Crews, *J Org Chem.*, **63**, 10011 (1998)
- 25) D. Barnes-Seeman, E. J. Corey, *Org. Lett.*, **1**, 1503 (1999)
- 26) K. C. Nicolaou, K. B. Simonsen, G. Vassilikogiannakis, P. S. Baran, V. P. Vidal, E. N. Pitsinos, E. A. Couladouros, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 3555 (1999)
- 27) K. C. Nicolaou, G. Vassilikogiannakis, K. B. Simonsen, P. S. Baran, Y.-L. Zhong, V. P. Vidal, E. N. Pitsinos, E. A. Couladouros, *J Am Chem Soc.*, **122**, 3071 (2000)
- 28) L. H. Pettus, R. W. V. D. Water, T. R. R. Pettus, *Org. Lett.*, **3**, 905 (2001)
- 29) N. Abe, T. Arakawa, K. Yamamoto, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2090 (2002)
- 30) N. Abe, O. Sugimoto, K.-i. Tanji, A. Hirota, *J Am Chem. Soc.*, **122**, 12606 (2000)
- 31) N. Abe, O. Sugimoto, T. Arakawa, K.-i. Tanji, A. Hirota,

- Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 2271 (2001)
- 32) T. J. Simpson, *Chem. Soc. Rev.*, **16**, 123 (1987)
- 33) T. J. Simpson, *Biosynthesis*, **195**, 1 (1998)
- 34) N. Abe, K. Yamamoto, T. Arakawa, A. Hirota, *Chem. Commun.*, **2001**, 23 (2001)
- 35) 阿部尚樹, 廣田陽, バイオサイエンスとインダストリー, **60**, 31 (2002)
- 36) N. Abe, T. Arakawa, A. Hirota, *Chem. Commun.*, **2002**, 204
- 37) N. Abe, A. Hirota, *Chem. Commun.*, **2002**, 662
- 38) N. Abe, A. Nemoto, Y. Tsuchiya, H. Hojo, A. Hirota, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 306 (2001)
- 39) 阿部尚樹, 化学と生物, **38**, 5 (2000)
- 40) E. N. Frankel, "Lipid Oxidation", The Oily Press, Dundee, 1998, p 129
- 41) J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.*, **18**, 380 (2001)

PROFILE

阿部尚樹 東京農業大学応用生物科学部栄養科学科・助教授

〔経歴〕1985年3月北海道大学農学部農芸化学科卒業, 1987年3月北海道大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了, 1987年4月サッポロビール(株)応用開発研究所研究員, 1994年2月クレラン製薬(株)開発研究センター研究員, 1996年10月静岡県立大学食品栄養科学部助手, 2002年4月東京農業大学応用生物科学部助教授。〔専門〕天然有機化学, 食品衛生学。〔連絡先〕Tel & Fax [redacted], e-mail [redacted]

廣田 陽 静岡県立大学食品栄養科学部食品学科, 大学院生活健康科学研究科・教授

〔経歴〕1968年東京大学農学部農芸化学科卒業, 1973年東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了, 1973年農林省野菜試験場農林技官, 1975年大阪府立大学農学部助手, 1986年同講師, 1991年静岡県立大学食品栄養科学部教授。〔専門〕天然物化学, 食品機能化学。〔連絡先〕[redacted], Tel [redacted], e-mail [redacted]