

## キノコに由来する生物活性物質の化学的研究

メタデータ	言語: ja 出版者: 静岡大学 公開日: 2014-01-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 伏見, 圭司 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.14945/00007480">https://doi.org/10.14945/00007480</a>

静岡大学 博士論文

キノコに由来する生物活性物質の化学的研究

2012年1月

大学院自然科学系教育部

バイオサイエンス専攻

伏見圭司

**Chemical studies on biologically active compounds from  
mushrooms**

Keiji Fushimi  
Department of Bioscience  
Graduate School of Science and Technology  
Shizuoka University

## 目次

### 第 1 部 フミツキタケ (*Agrocybe praecox*) に由来する植物成長調節物質の探索

第 1 章 緒論	2
第 2 章 本論	6
第 1 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の単離・精製	6
第 2 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の構造解析	9
第 3 節 植物成長調節活性試験	48
第 4 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の合成	51
第 5 節 考察	53
第 3 章 実験部	56
第 1 節 使用器具および材料	56
第 2 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の単離・精製	58
第 3 節 X 線結晶構造解析	60
第 4 節 植物成長調節活性試験	61
第 5 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の合成	62

### 第 2 部 コフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に由来する抗口腔内細菌活性物質の探索

第 1 章 緒論	67
第 2 章 本論	69
第 1 節 コフキサルノコシカケ由来の抗口腔内細菌活性物質の単離・精製	69
第 2 節 コフキサルノコシカケ由来の抗口腔内細菌活性物質の構造解析	71
第 3 節 抗口腔内細菌活性試験	104
第 4 節 考察	105
第 3 章 実験部	107
第 1 節 使用器具および材料	107
第 2 節 抗口腔内細菌活性物質の単離・精製	109
第 3 節 抗口腔内細菌活性試験	111

論文要旨	112
<b>Summary</b>	115
参考文献	117
謝辞	125

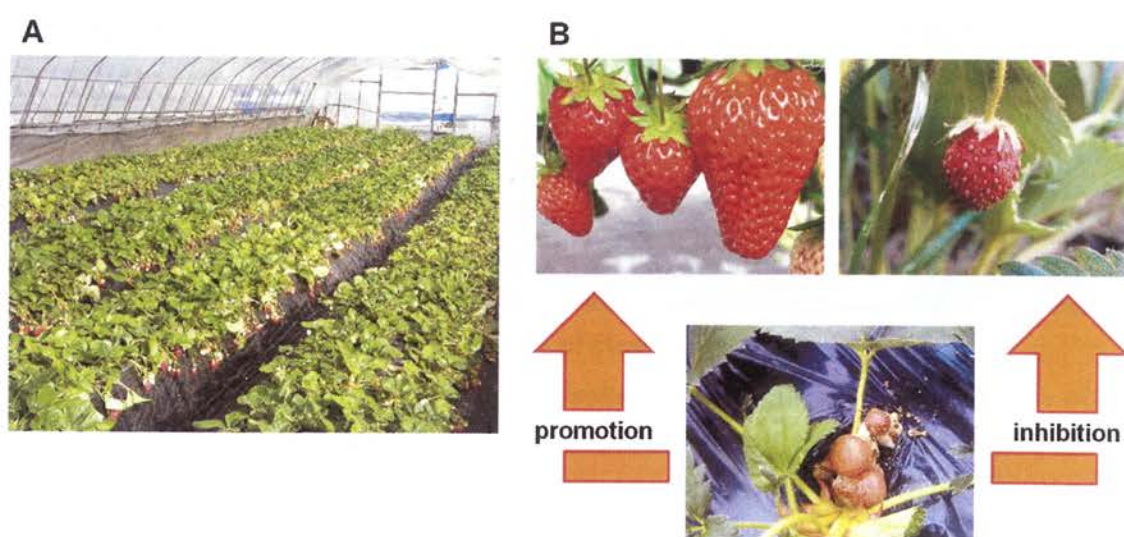
## 第 1 部

### フミツキタケ (*Agrocybe praecox*) に由来する 植物成長調節物質の探索



## 第 1 章 緒論

2007 年、新潟県のあるビニールハウスにおいて、通常よりも肥大したイチゴ (*Fragaria × ananassa* Duchesne) の実が現れ、その後、根元の土壌からキノコが発生するという現象が確認された。このキノコを同定したところ、フミツキタケ (*Agrocybe praecox*) であることが明らかとなった。一方、フミツキタケ属の菌はイチゴのすくみ症状を引き起こす病原菌としても報告されている<sup>1</sup>。これらの対照的な現象は、この菌が植物ホルモンの様な生理活性を示す植物成長調節物質を産生していることを示唆している (Fig. 1)。

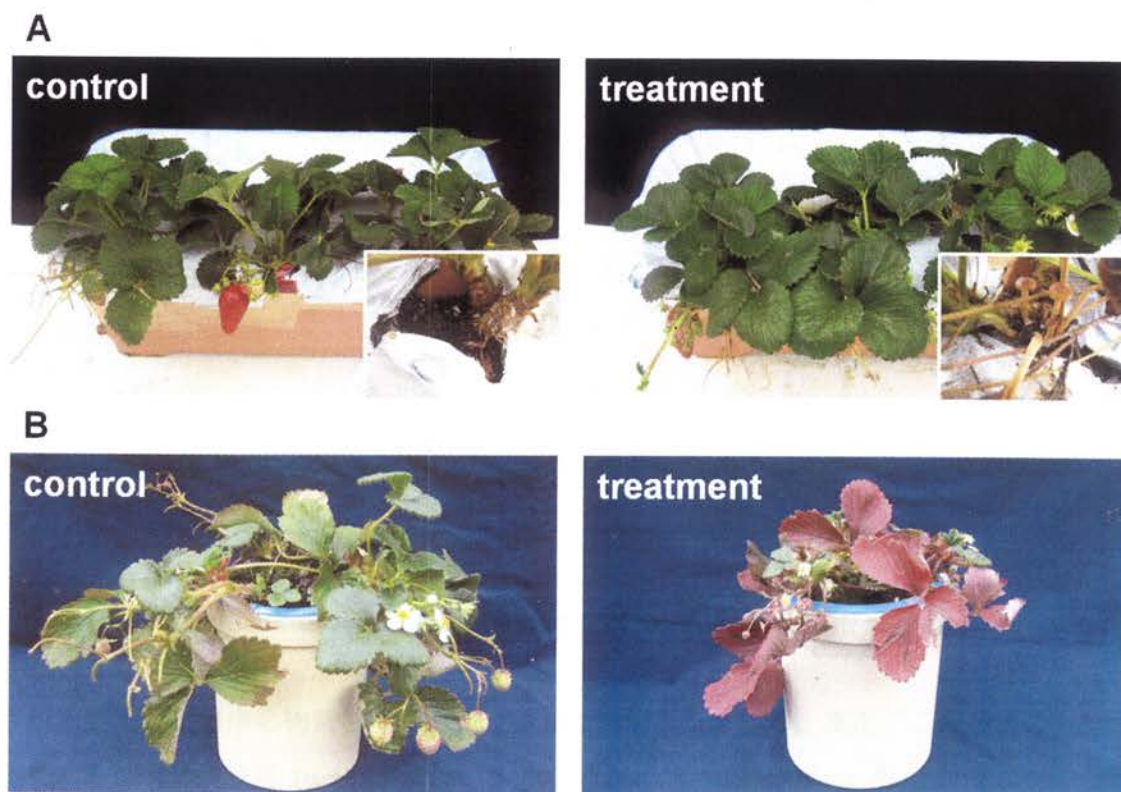


**Fig. 1. Interaction between *A. praecox* and strawberry in a greenhouse.**

(A) In a greenhouse in Niigata prefecture, Japan, soil culture of strawberry fruits. (B) Growth stimulation and suppression toward strawberry fruits by *Agrocybe* genus.

そこで、上記のビニールハウスから単離した菌株を培養し、菌糸体と培養ろ液に分離してイチゴに対する影響を観察した。土耕栽培のイチゴに対しては菌糸体の処理を行い、水耕栽培のイチゴの成長に対しては培養ろ液の処理を行った。その結果、土耕栽培では植物体の成長促進が観察された。さらに、その後、根元の土壌から子実体の発生が観察された。また、菌糸体の植物体への侵入は観察されず、土壌への拡散が観察された。水耕栽培では植物体の成長阻害が観察された (Fig. 2)。これらの観察により、フミツキタケの菌糸体の体内で産生された植物成長調節物質が体外に放出され、イチゴの成長に対して影響を与えている可能性があることを確認した。

イチゴはバラ科の植物であり、世界中で栽培されている重要な作物の1つである。さら



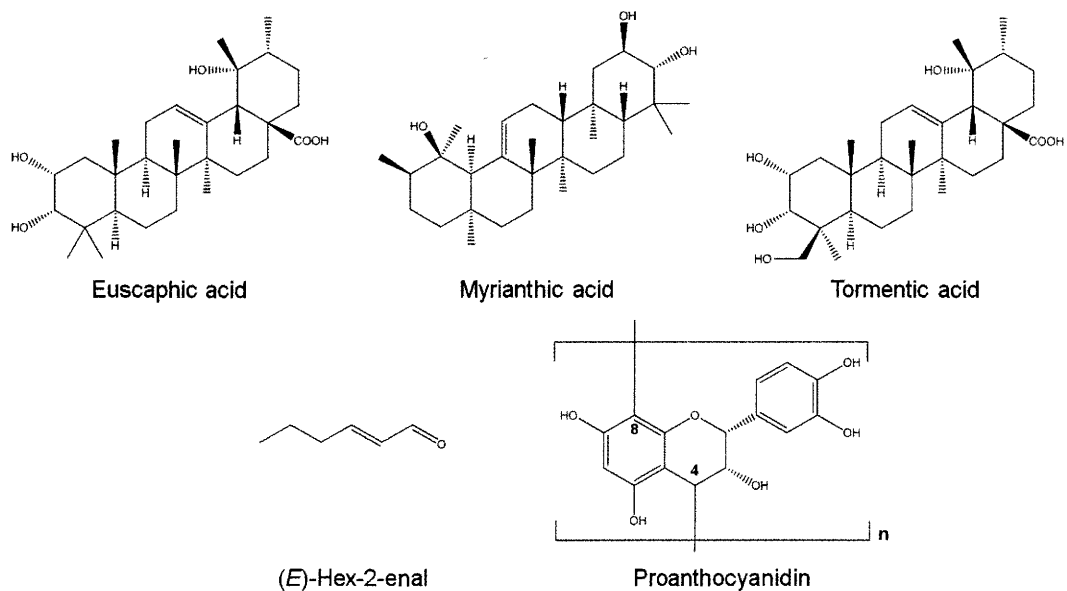
**Fig. 2. Effect of *A. praecox* on the growth of strawberry.**

(A) Effect of *A. praecox* on the growth of strawberry in soil culture. After 5 months of the inoculation of the mycelia, the leaves of the fungus-infected plant grew bigger than the control, and after 10 months the fruiting bodies of the fungus appeared at the plant's base. (B) Effect of *A. praecox* on the growth of strawberry in water culture. After 5 months of the inoculation of the culture broth, the leaves of the fungus-affected plant was dwarfed and altered in color.

に、バラ科の植物の中でもゲノムが小さい、繁殖周期が短い、容易に植物体が発生するという特徴をもつことから、生物的 (昆虫<sup>2-6</sup>、菌類<sup>7-11</sup>)、非生物的 (農薬<sup>12, 13</sup>、温度<sup>14-17</sup>、塩濃度<sup>18, 19</sup>) ストレスに対して耐性をもつ遺伝子組換え体の研究がなされている<sup>20</sup>。また、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) や炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* 等) はイチゴに重篤な被害を与える植物病原菌であるが<sup>20-22</sup>、イチゴは (*E*)-hex-2-enal<sup>23-25</sup>、triterpenes (euscaphic acid, myrianthic acid, tormentic acid)<sup>26</sup>、proanthocyanidins<sup>27, 28</sup> 等の二次代謝産物を生合成することでこれらの病原菌に対して防御反応を起こす (Fig. 3)<sup>29</sup>。

フミツキタケは主として北部温帯に広く生息している食用のキノコである。このキノコは森林中の土壌に生息するリター分解菌であり、非特異的に酵素を産生して細胞外に分泌することで土壌に堆積した葉や枝を分解している<sup>30</sup>。その分解物は土壌微生物や植物に利用

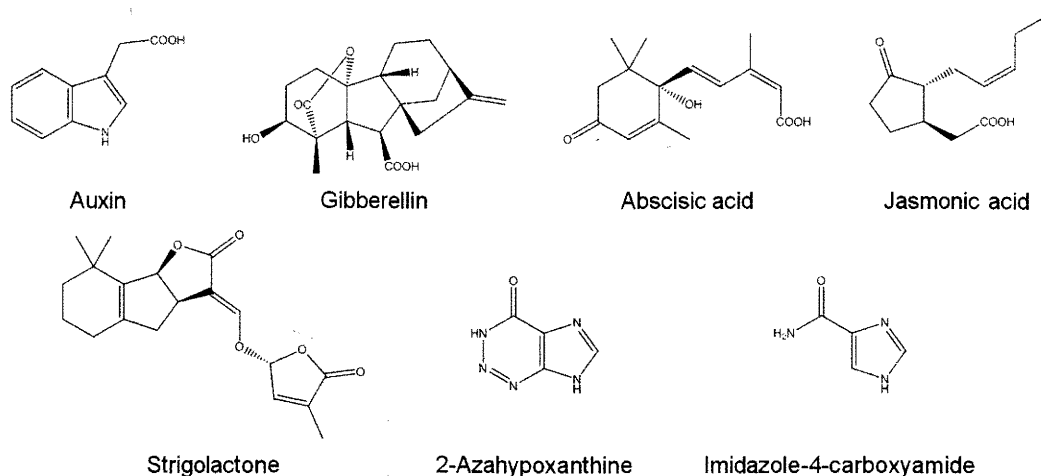




**Fig. 3. Chemical structures of phytoalexins and antifungals from strawberry.**

されるため、土壌中の物質循環において重要な機能をしている。また、この菌種の生態や産生する加水分解酵素 ( $\alpha$ -glucosidase、 $\beta$ -glucosidase、 $\beta$ -cellobiosidase 等)、リグニン分解酵素 (laccase、manganese peroxidase 等) の酵素活性はバイオレメディエーションへの応用に期待されている<sup>31-39</sup>。しかし、フミツキタケと植物の相互作用による共存関係について化学的研究はされていない。

近年、植物ホルモンとして認知されている auxins<sup>40, 41</sup>、gibberellins<sup>42, 43</sup>、abscisic acid<sup>44, 45</sup>、jasmonic acid<sup>46, 47</sup> はそれぞれの基質と受容体との作用機序が解明された。さらに、植物と菌類の相互作用に関与する植物成長調節物質として strigolactones<sup>48, 49</sup> や 2-azahypoxanthine<sup>50</sup>、imidazole-4-carboxamide<sup>51</sup> が発見された (Fig. 4)。



**Fig. 4. Chemical structures of plant hormones and plant growth regulators.**

この様な植物成長調節物質の発見やその作用機序の化学的解明は農業面の応用に対して非常に有効である。以上より、本研究では、フミツキタケに由来する植物成長調節物質の単離・精製および構造解析を目的とした。

## 第 2 章 本論

### 第 1 節 フミヅキタケ由来の植物成長調節物質の単離・精製

フミヅキタケの種菌をポテトデキストロース液体培地に移植して 3 週間培養を行った。その後、遠心分離、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。菌糸体は凍結乾燥後破碎し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次浸漬抽出を行い、*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、エタノール可溶部、水可溶部を得た。培養ろ液は減圧濃縮後、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次分配抽出を行い、酢酸エチル可溶部、*n*-ブタノール可溶部、水可溶部を得た。植物成長調節活性試験を行うにあたり、イチゴを材料として使用するのには十分な培養期間とサンプル量が必要となるため、より簡便に調製することができるレタスを材料として使用した。得られた各画分についてレタスに対する植物成長調節活性試験を行ったところ、菌糸体のエタノール可溶部および培養ろ液の酢酸エチル可溶部に顕著なレタスの伸長抑制活性が確認された (Fig. 5)。

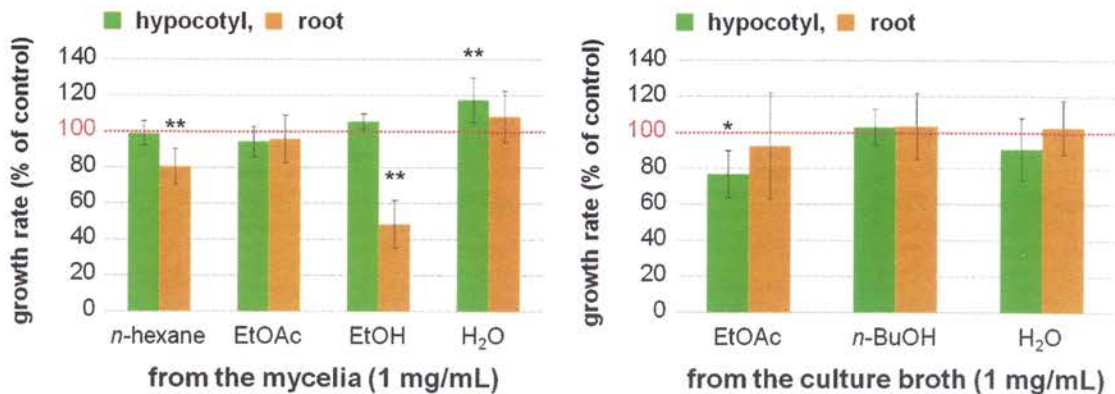


Fig. 5. Effect of each fraction from *A. praecox* on the growth of lettuce.

Lettuce seedlings were treated with extracted fractions from the mycelia (left) and the culture broth (right) (1 mg/mL). The lengths of the hypocotyl and the root were measured using a ruler. Results are the rate of growth length compared with control  $\pm$  standard deviation (\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control,  $n = 7$ ).

そこで、この活性試験の結果を指標にしながら各種クロマトグラフィーによる分画を行った。培養ろ液の酢酸エチル可溶部をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより 12 画分に分画した。画分 3 は順相 HPLC により 7 画分に分画し、さらに、画分 3-6 から逆相 HPLC によって化合物 7 を単離した。画分 4 は順相 HPLC により 9 画分

に分画し、さらに、画分 4-5 から逆相 HPLC によって化合物 1-4, 6 をそれぞれ単離した。画分 5 は順相 HPLC により 8 画分に分画し、さらに、画分 5-5, 5-6 は逆相 HPLC によりそれぞれ 7 画分に分画した。さらに、画分 5-5-6, 5-6-6 から逆相 HPLC によって化合物 2, 5 をそれぞれ単離した (Fig. 6)。

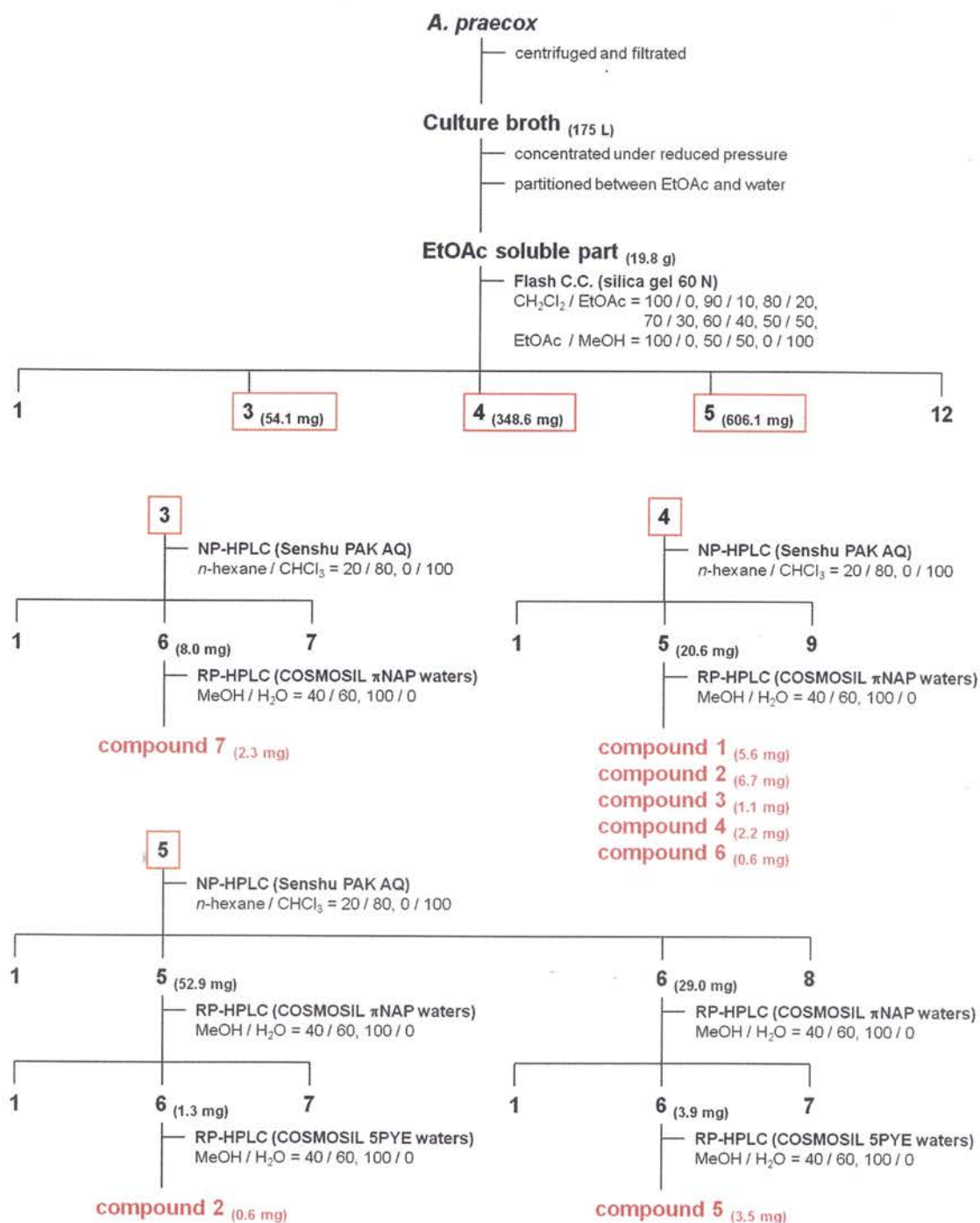
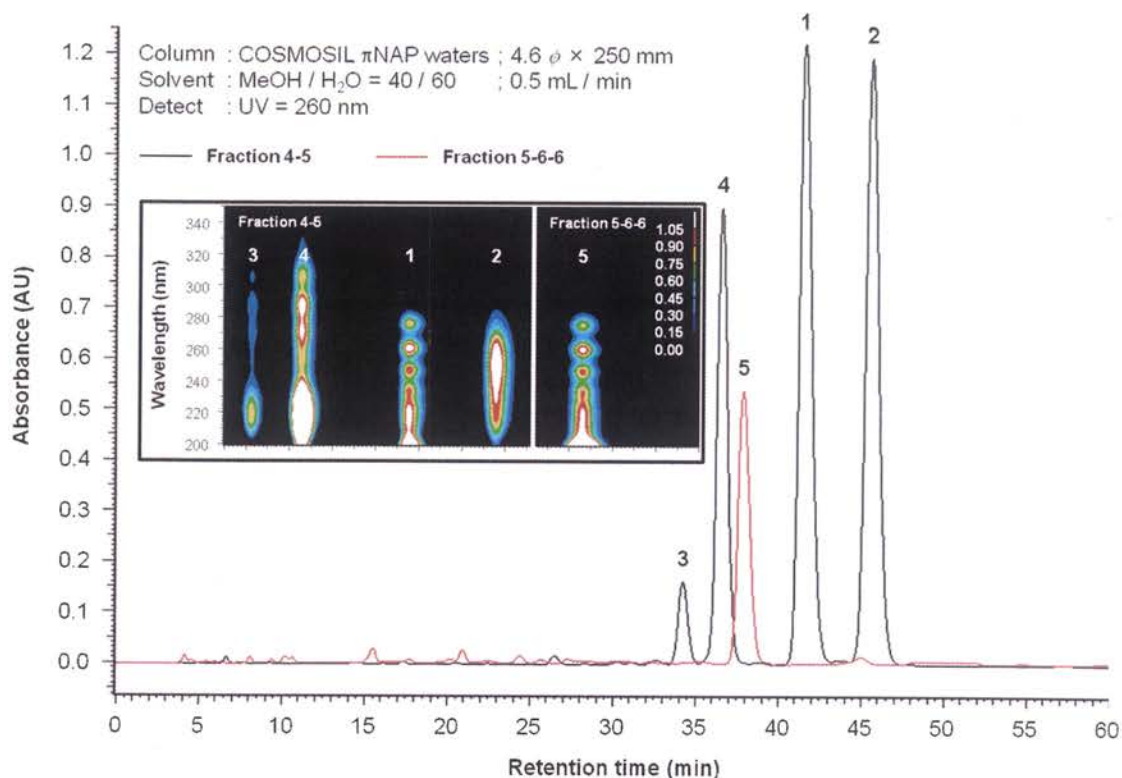


Fig. 6. Purification procedure of culture broth of *A. praecox*.

また、画分 4-5 および画分 5-6-6 から単離した化合物 1-5 は、UV-VIS 多波長検出器を使用した HPLC 分析によって特徴的な UV スペクトルパターンが観測された (Fig. 7)。



**Fig. 7. HPLC analysis of fractions 4-5 and 5-6-6.**

Fractions 4-5 and 5-6-6 were analyzed by HPLC (column, COSMOSIL  $\pi$ NAP Waters, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; solvent, MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60, 0.5 mL/min; detect, UV = 260 nm) and compounds 1-4 and 5 were detected, respectively. Compound 1:  $t_R$  = 41.5 min; UV ( $\lambda_{max}$ ), 200, 218, 233, 247, 261, 276 nm. Compound 2:  $t_R$  = 45.6 min; UV ( $\lambda_{max}$ ), 250 nm. Compound 3:  $t_R$  = 34.2 min; UV ( $\lambda_{max}$ ), 220, 271, 287, 306 nm. Compound 4:  $t_R$  = 36.6 min; UV ( $\lambda_{max}$ ), 218, 271, 287, 306 nm. Compound 5:  $t_R$  = 38.0 min; UV ( $\lambda_{max}$ ), 200, 215, 232, 246, 260, 276 nm.

## 第 2 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の構造解析

フミツキタケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離した各化合物について、各種機器分析による構造解析を行った。

### 2-2-1 化合物 1 の構造解析

化合物 1 は無色針状結晶として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  158.0559  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_8H_9NNaO$ , 158.0582) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_8H_9NO$ 、不飽和度を 5 と決定した (Fig. 9)。IR において 1652 ( $C=O$ )、2244 ( $C\equiv C$ )、 $3136\text{ cm}^{-1}$  ( $NH_2$ ) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 10)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMBC により、メチルが 1 つ、メチレンが 2 つ、4 級炭素が 5 つ存在することが明らかになった (Fig. 11-14, Table 1)。これらのことから、2 つの三重結合とアミドの存在が示唆された。COSY の相関 ( $H7/H6$ ,  $H8$ ) および HMBC の相関 ( $H6/C7$ ,  $C8$ ;  $H7/C6$ ,  $C8$ ;  $H8/C6$ ,  $C7$ ) により、プロピルの部分構造を決定した (Fig. 8, 15, 16)。さらに、HMBC の相関 ( $H6/C2$  to  $C5$ ;  $H7/C5$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_C$  63.7, 67.0, 71.7, 87.3) により、ブタジインの部分構造を決定した (Fig. 8, 16, Table 1)。以上により、化合物 1 を octa-2,4-diynamide と推定した。さらに、X 線結晶構造解析により、化合物 1 の構造を決定した (Fig. 17)。化合物 1 は新規化合物であり、agrocybyne A と命名した (Fig. 18)。

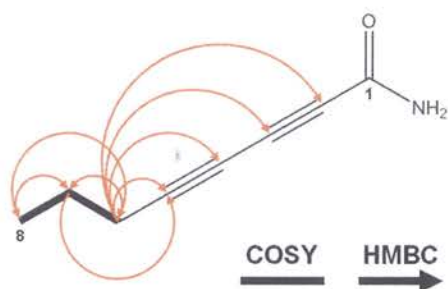


Fig. 8. COSY and HMBC correlations in 1.

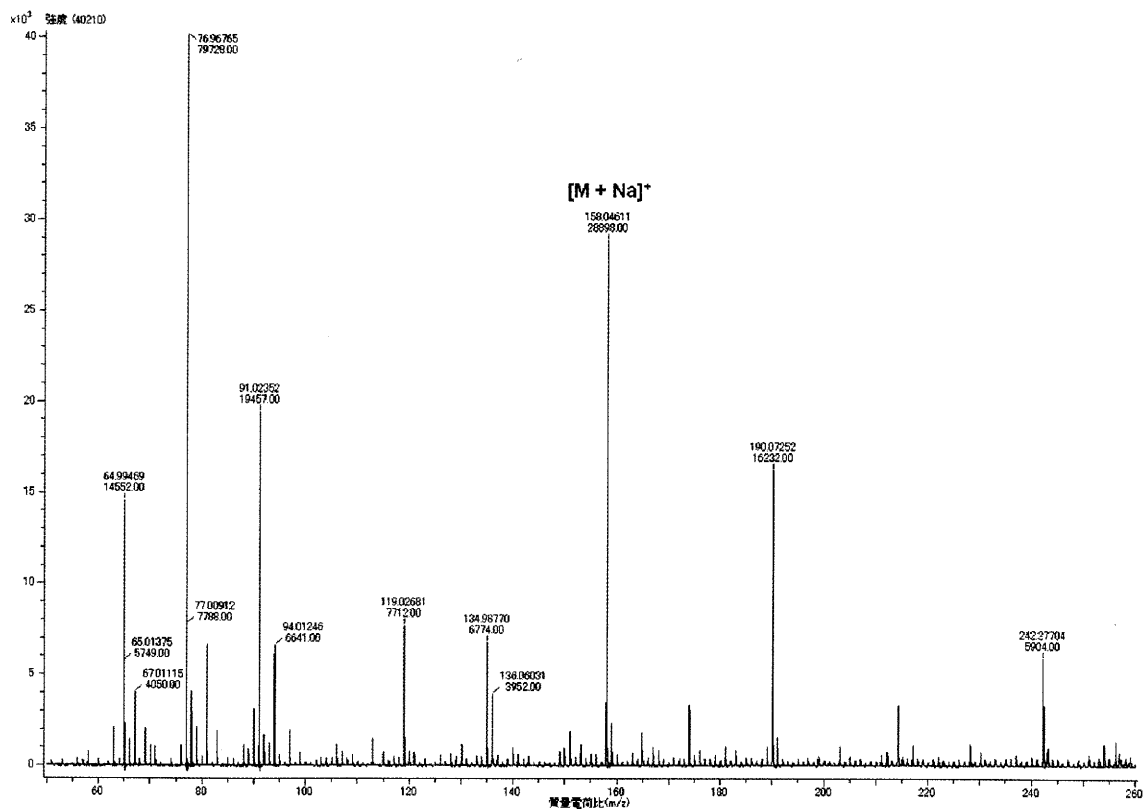


Fig. 9. ESIMS (+) spectrum of 1.

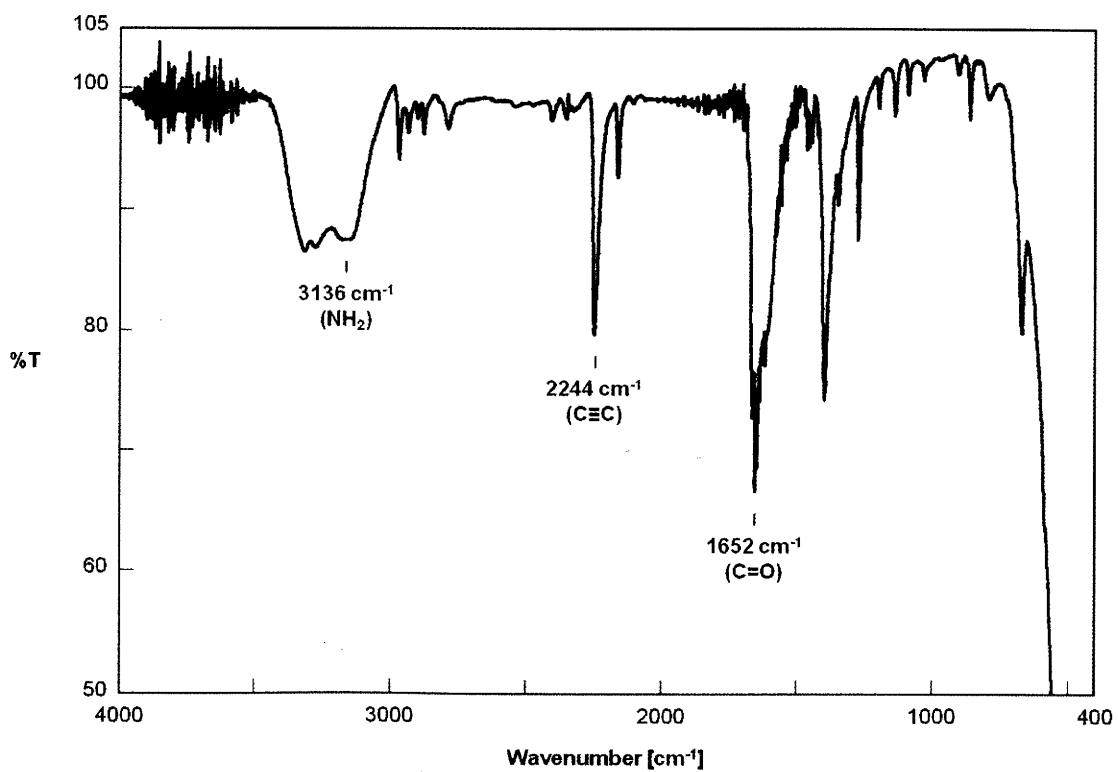


Fig. 10. IR spectrum of 1.

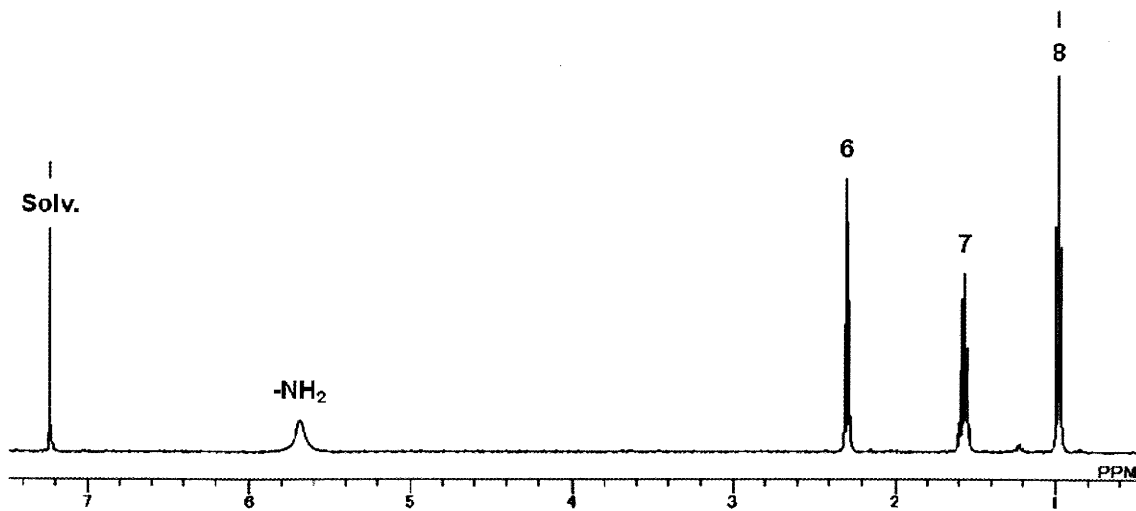


Fig. 11.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

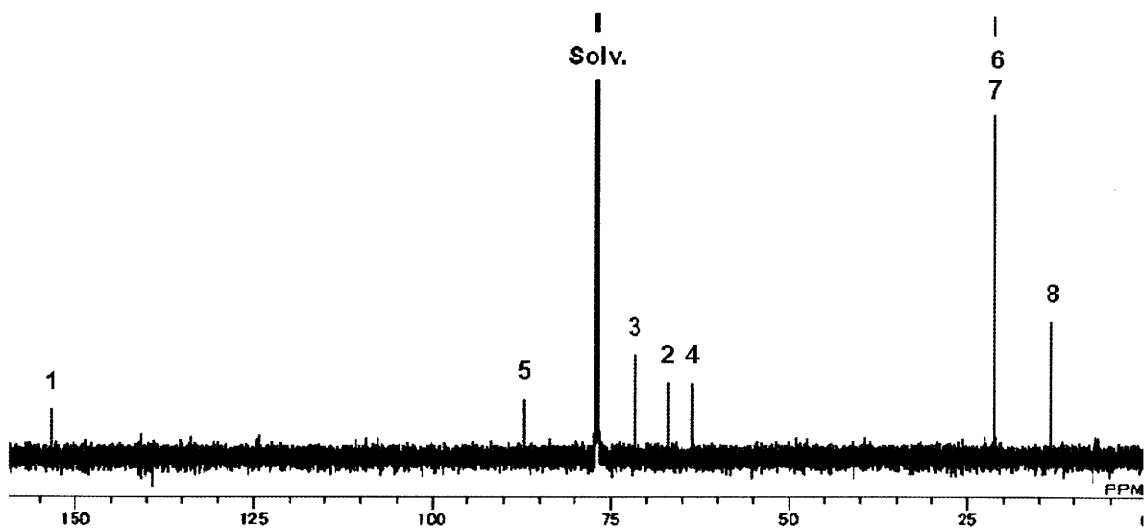


Fig. 12.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

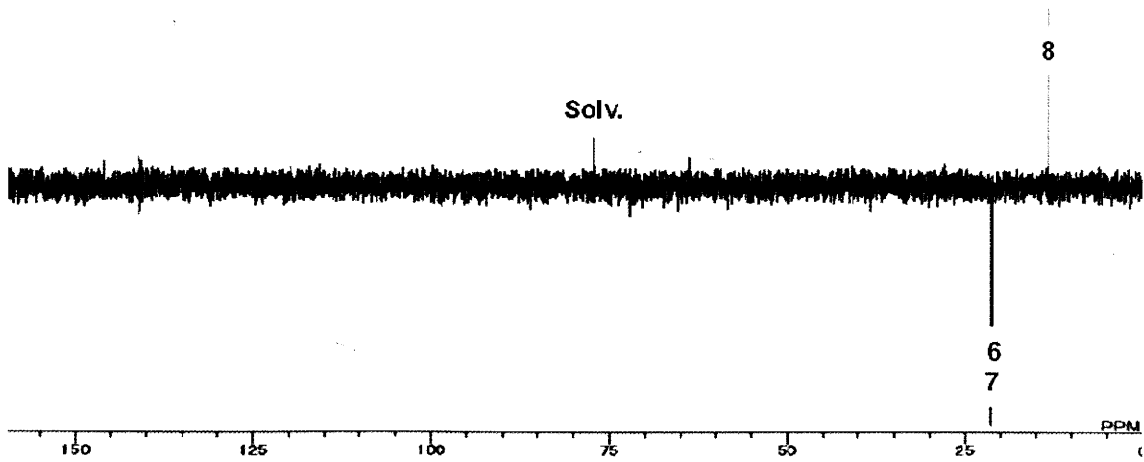


Fig. 13. DEPT spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).



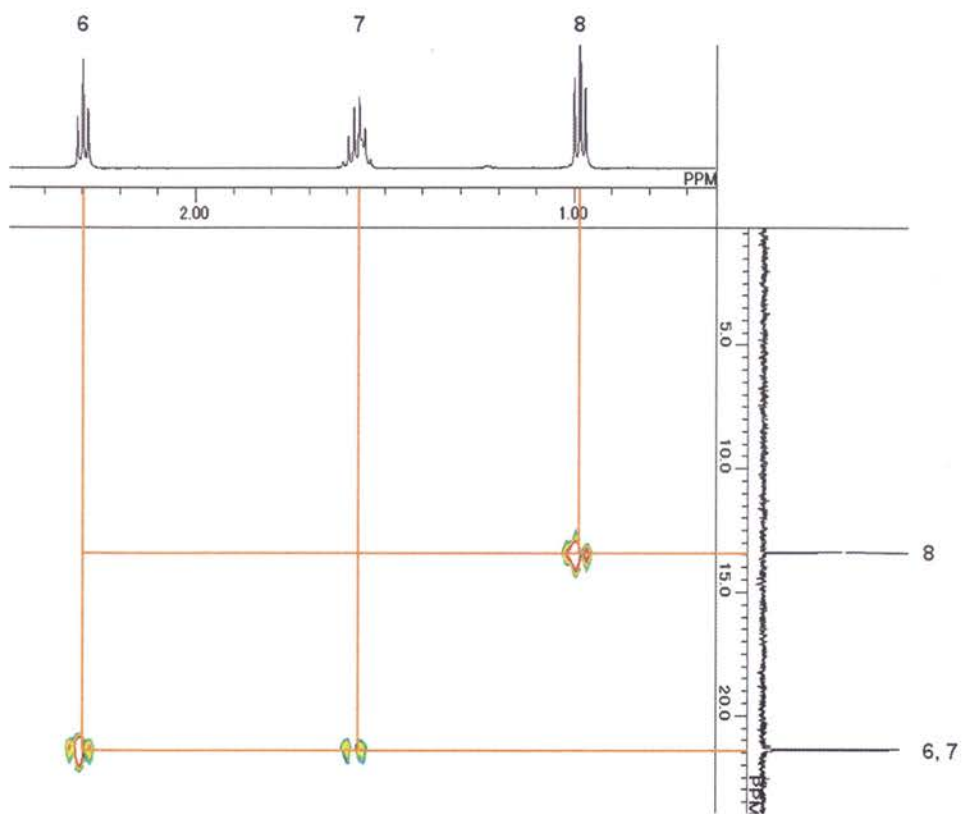


Fig. 14. HMQC spectrum of 1 (in CDCl<sub>3</sub>).

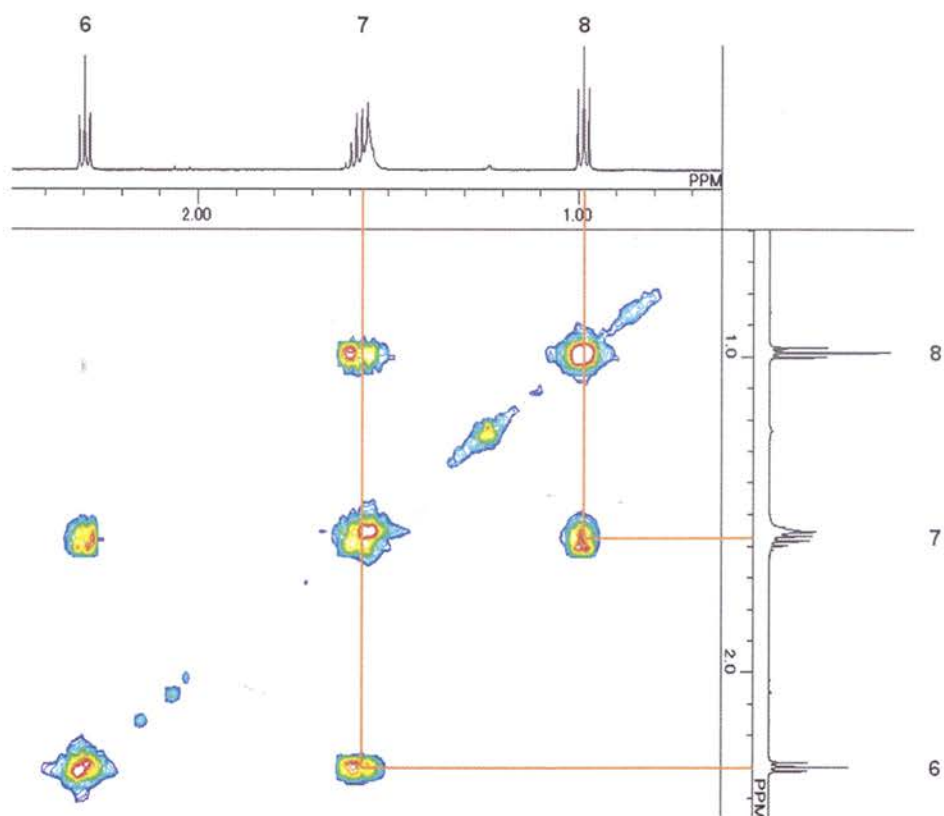


Fig. 15. COSY spectrum of 1 (in CDCl<sub>3</sub>).

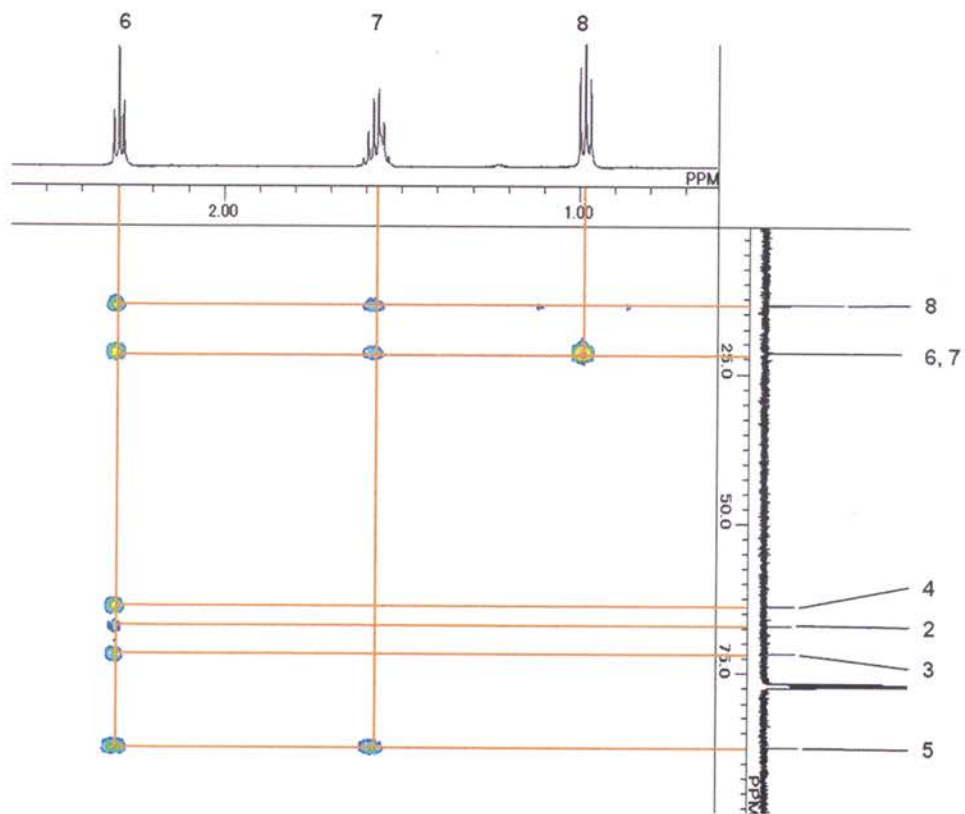


Fig. 16. HMBC spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

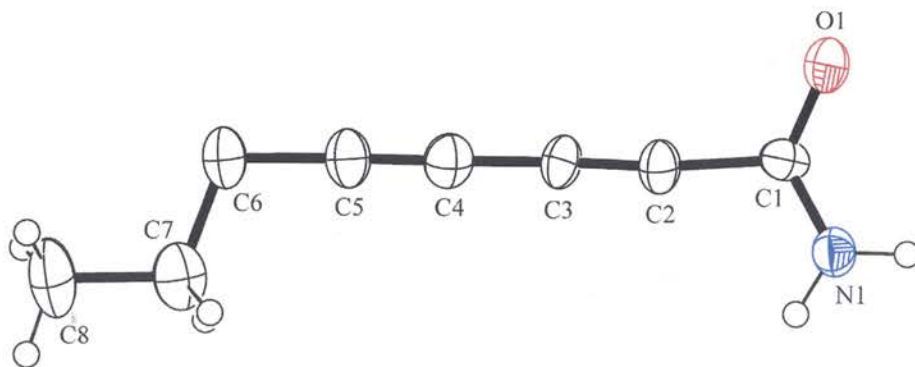


Fig. 17. ORTEP drawing of 1.

Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		153.5	
2		67.0 <sup>a</sup>	
3		71.7 <sup>a</sup>	
4		63.7 <sup>a</sup>	
5		87.3	
6	2.30 (t, 7.0)	21.3 <sup>b</sup>	2, 3, 4, 5, 6, 7, 8
7	1.57 (m)	21.4 <sup>b</sup>	5, 6, 8
8	0.99 (t, 7.3)	13.4	6, 7

<sup>a, b</sup> Interchangeable between the same letter.

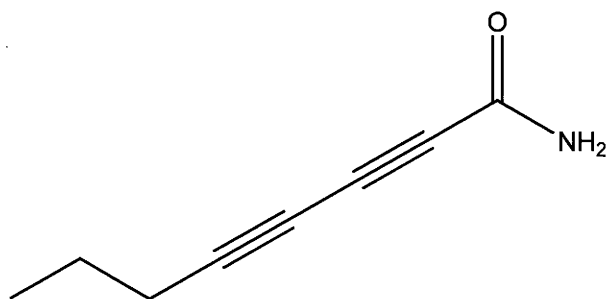


Fig. 18. Agrocybyne A (1).

## 2-2-2 化合物 2 の構造解析

化合物 2 は無色針状結晶として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  160.0731  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_8H_{11}NNaO$ , 160.0738) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_8H_{11}NO$ 、不飽和度を 4 と決定した (Fig. 20)。IR において 1652 ( $C=O$ )、2197 ( $C\equiv C$ )、3136  $cm^{-1}$  ( $NH_2$ ) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 21)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 1 つ、メチレンが 2 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 3 つ存在することが明らかになった (Fig. 22-25, Table 2)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 2 は化合物 1 の 1 つの三重結合が二重結合になった類縁体であることが示唆された。COSY の相関 (H7/H6, H8) および HMBC の相関 (H6/C7, C8; H7/C6, C8; H8/C6, C7) により、プロピルの部分構造を決定した (Fig. 19, 26, 27)。さらに、COSY の相関 (H5/H4, H6)、HMBC の相関 (H4/C2, C6; H5/C3, C6, C7; H6/C4, C5; H7/C5) および  $\delta_H$  5.52 (1H, d,  $J = 16.2$  Hz, H4) の結合定数により、(*E*)-プト-エンインの部分構造を決定した (Fig. 19, 26, 27, Table 2)。以上により、化合物 2 を (*E*)-oct-4-en-2-ynamide と決定した。化合物 2 は新規化合物であり、agrocybyne B と命名した (Fig. 28)。

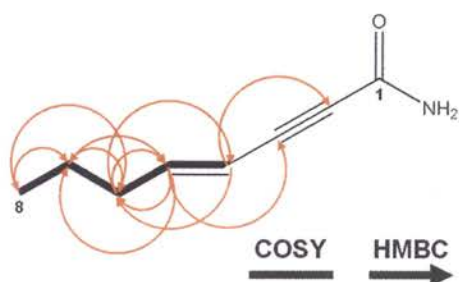


Fig. 19. COSY and HMBC correlations in 2.

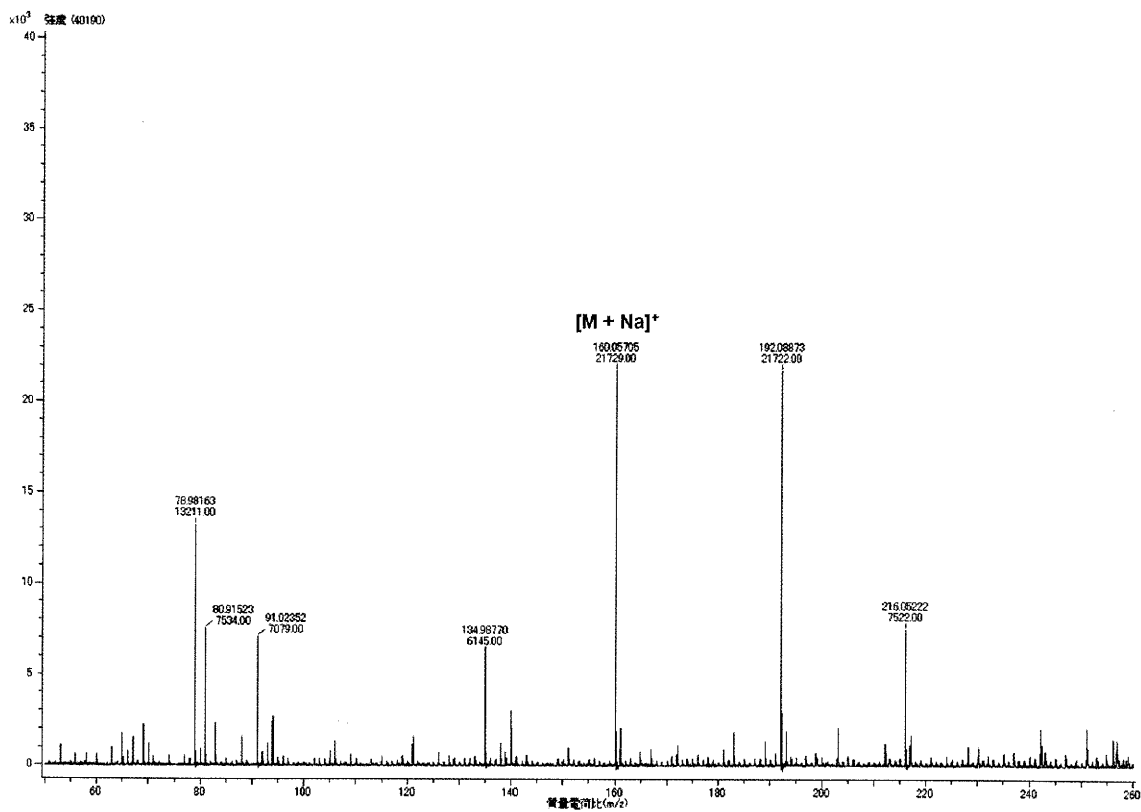


Fig. 20. ESIMS (+) spectrum of 2.

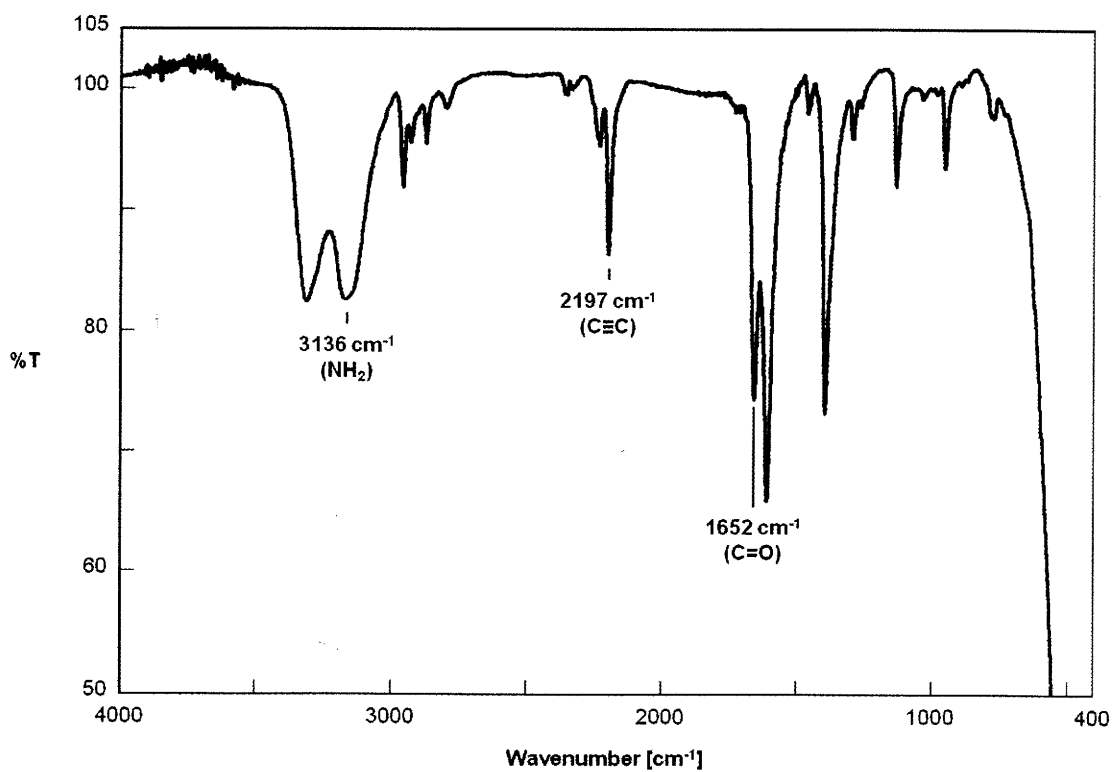


Fig. 21. IR spectrum of 2.

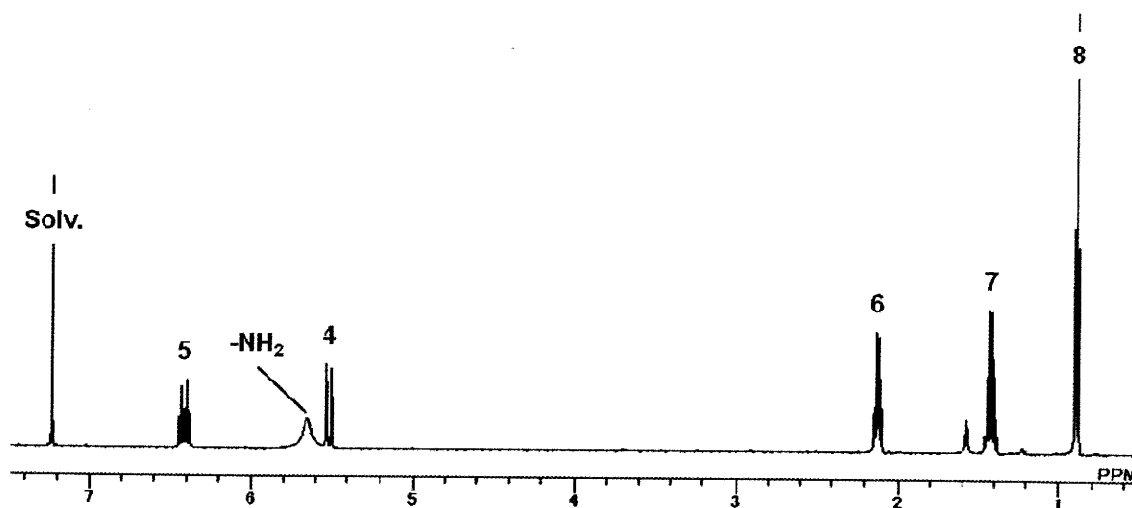


Fig. 22.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

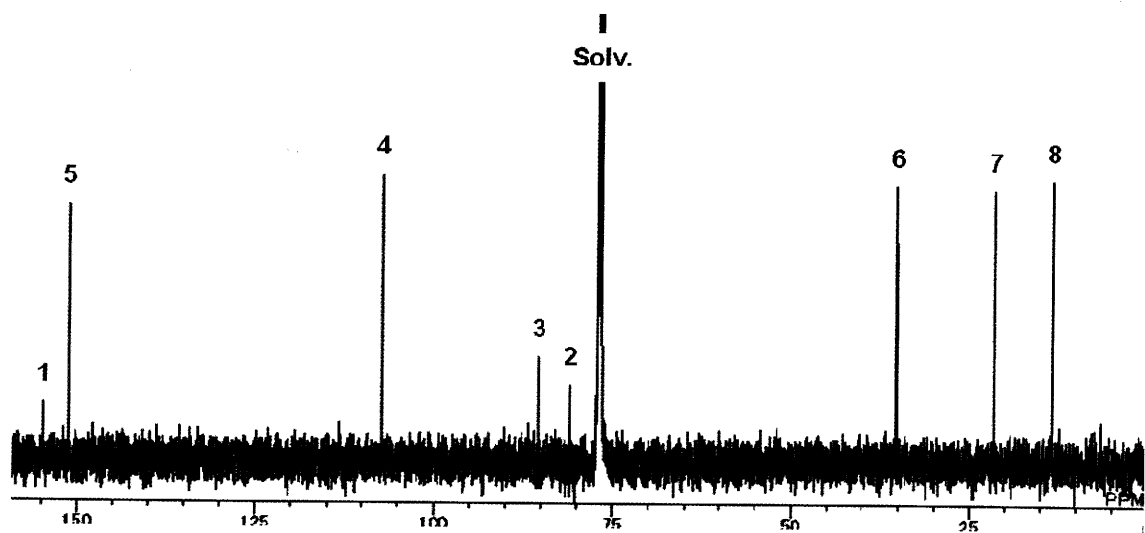


Fig. 23.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

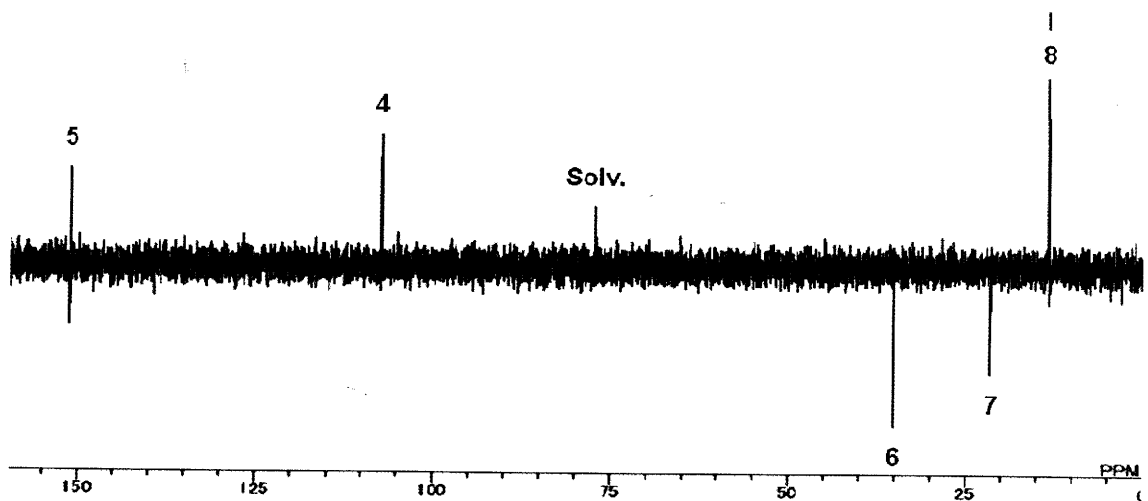


Fig. 24. DEPT spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

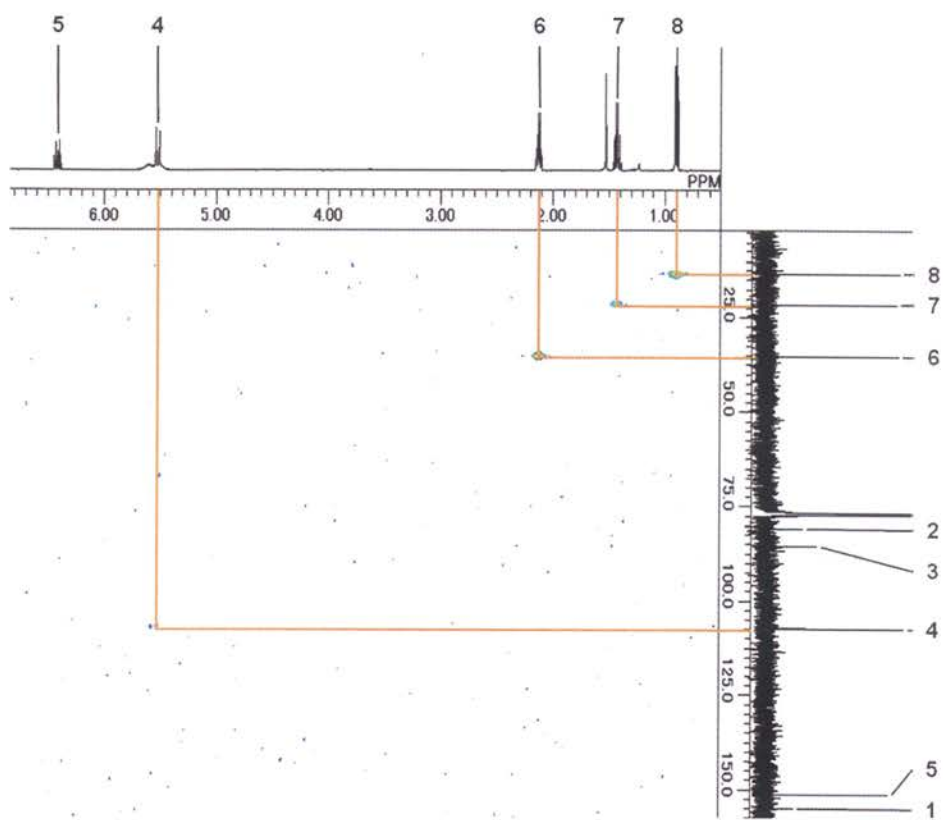


Fig. 25. HMQC spectrum of 2 (in CDCl<sub>3</sub>).

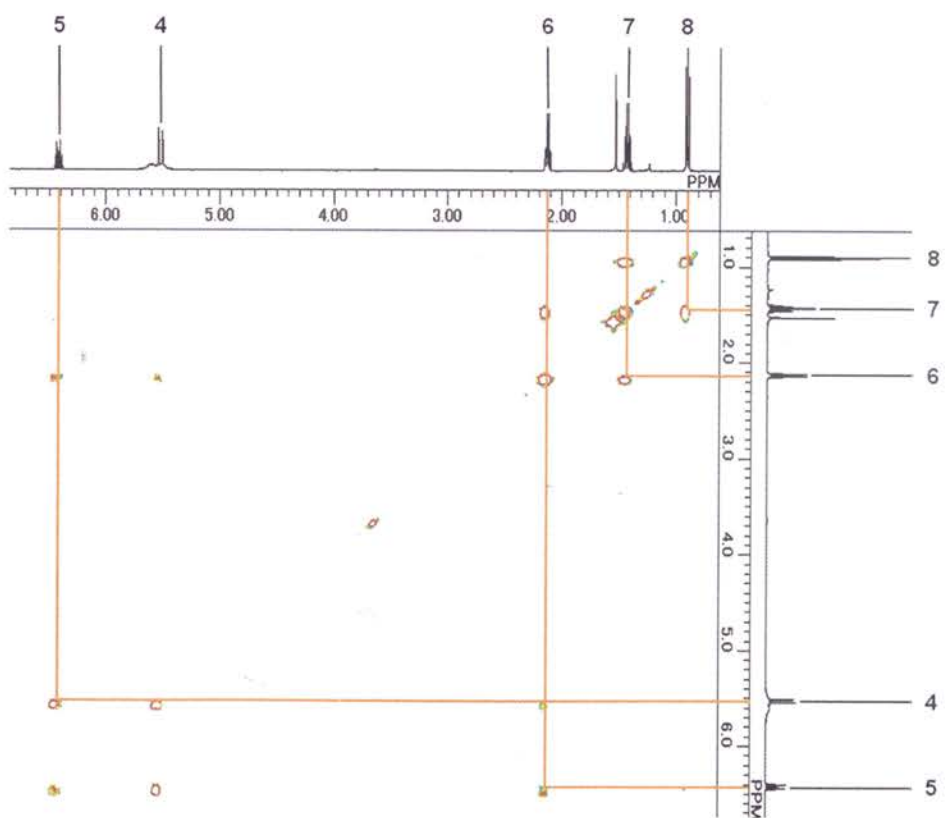


Fig. 26. COSY spectrum of 2 (in CDCl<sub>3</sub>).

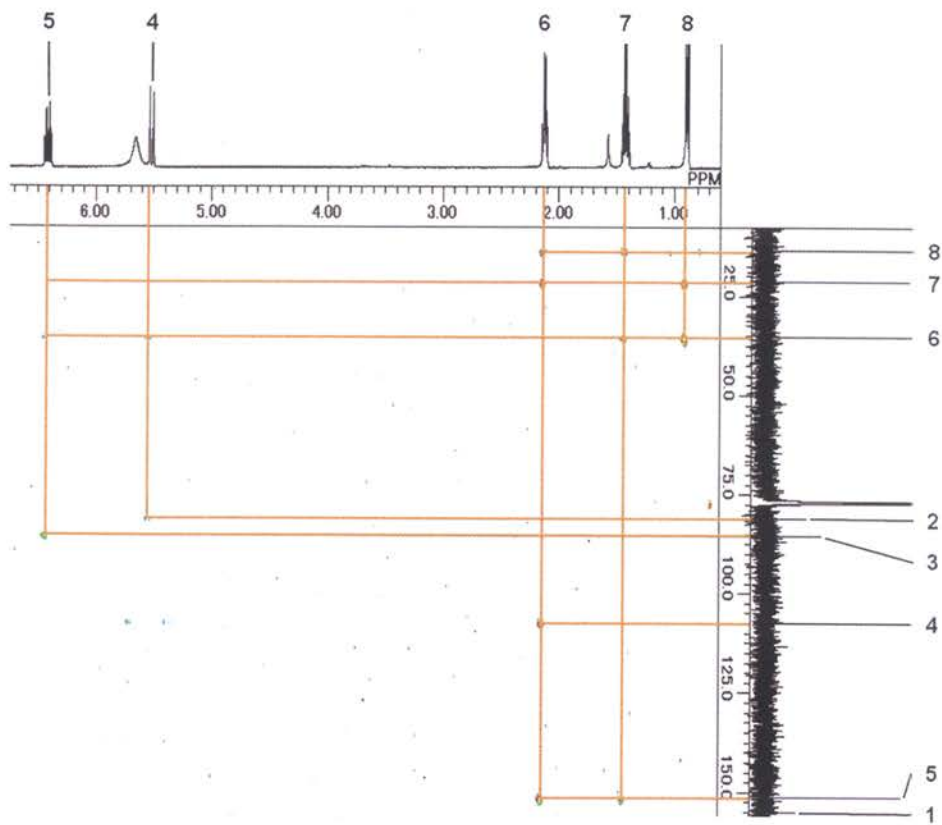


Fig. 27. HMBC spectrum of 2 (in CDCl<sub>3</sub>).



Table 2.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		154.8	
2		81.0	
3		85.5	
4	5.52 (d, 16.2)	107.3	2, 6
5	6.42 (ddd, 16.2, 7.3, 7.2)	151.2	3, 6, 7
6	2.13 (m)	35.4	7, 8
7	1.43 (m)	21.5	5, 6, 8
8	0.90 (t, 7.3)	13.5	6, 7

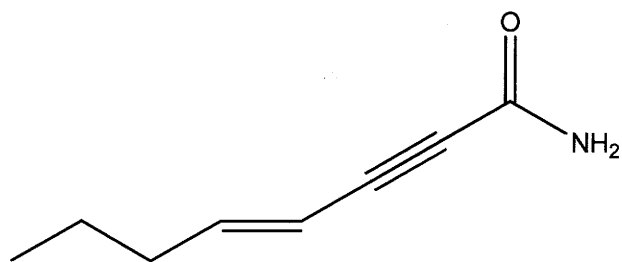


Fig. 28. Agrocycbyne B (2).

### 2-2-3 化合物 3 の構造解析

化合物 3 は白色非晶質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  156.0415  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_8H_7NNaO$ , 156.0425) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_8H_7NO$ 、不飽和度を 6 と決定した (Fig. 30)。IR において 1611 (C=O)、2216 (C≡C)、 $3160\text{ cm}^{-1}$  ( $NH_2$ ) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 31)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 1 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 5 つ存在することが明らかになった (Fig. 32-35, Table 3)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 3 は化合物 1 の 2 つのメチレンがオレフィンになった類縁体であることが示唆された。COSY の相関 (H7/H6, H8)、HMBC の相関 (H8/C4, C5, C6, C7) および  $\delta_H$  5.62 (1H, dd,  $J=11.0\text{ Hz}$ , H6) の結合定数により、(Z)-ペント-エンインの部分構造を決定した (Fig. 29, 36, 37, Table 3)。以上により、化合物 3 を (Z)-octa-6-en-2,4-diyamide と決定した。化合物 3 は新規化合物であり、agrocbyne C と命名した (Fig. 38)。

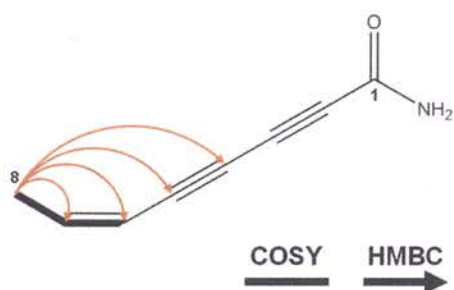


Fig. 29. COSY and HMBC correlations in 3.

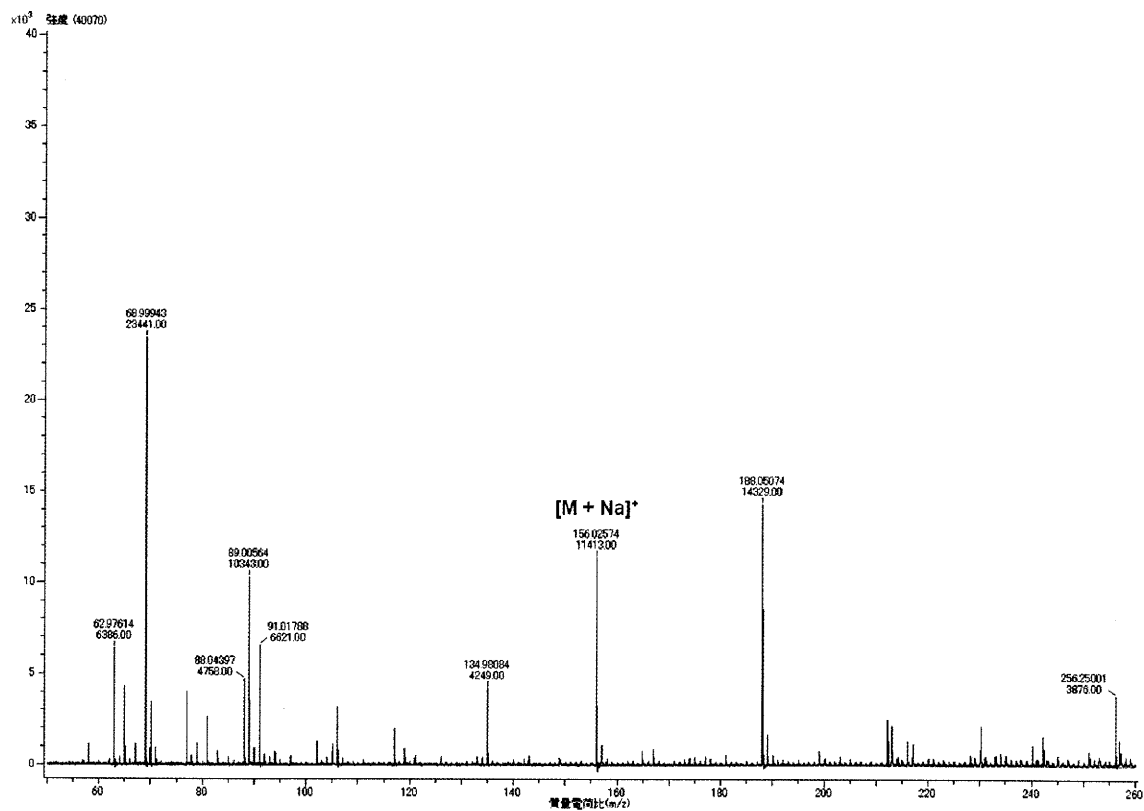


Fig. 30. ESIMS (+) spectrum of 3.

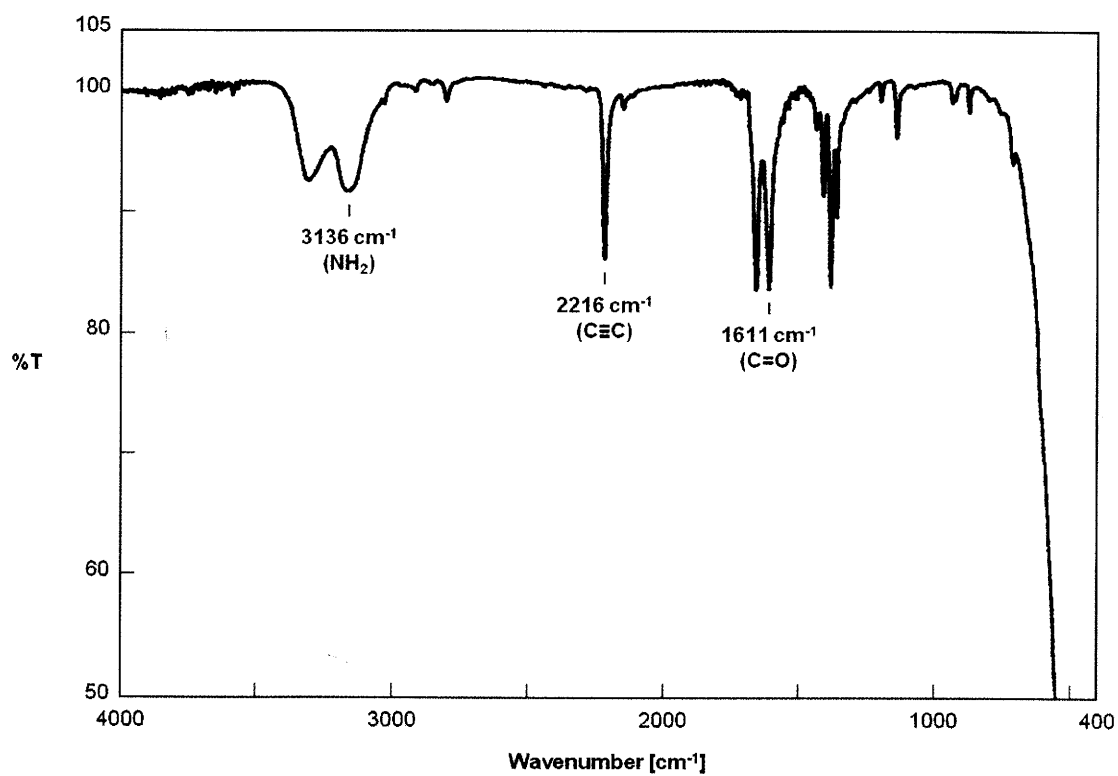


Fig. 31. IR spectrum of 3.

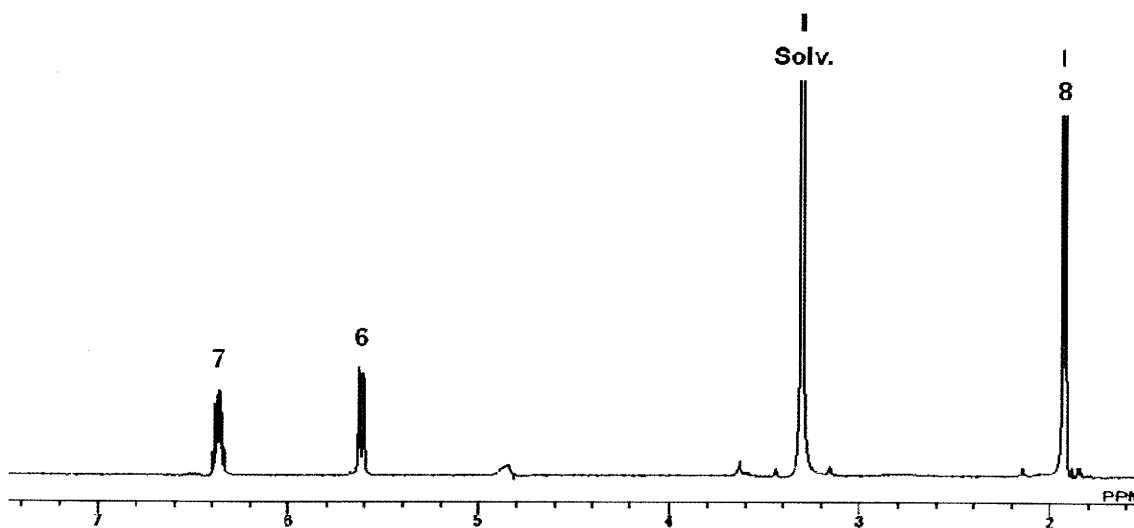


Fig. 32.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

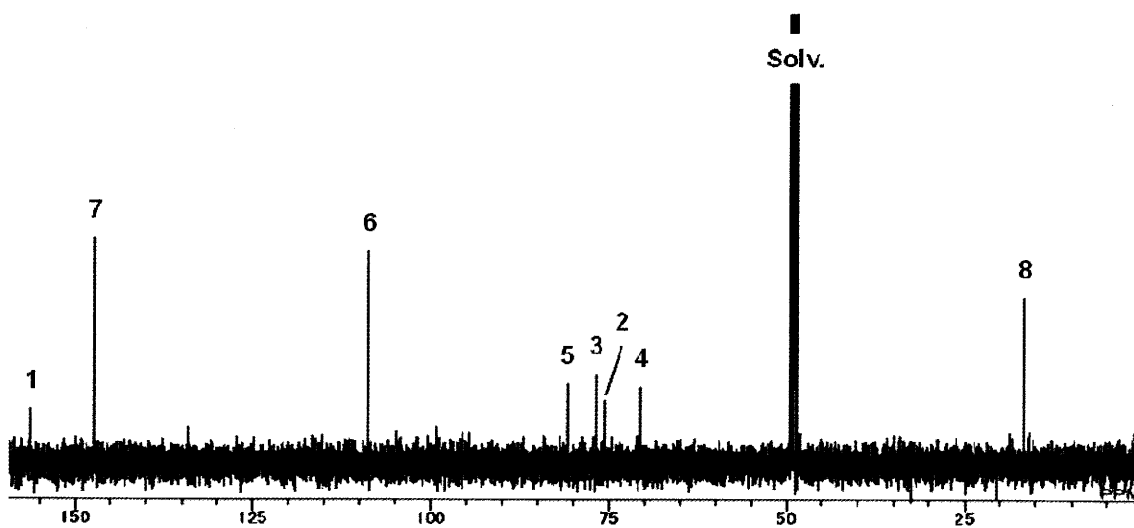


Fig. 33.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

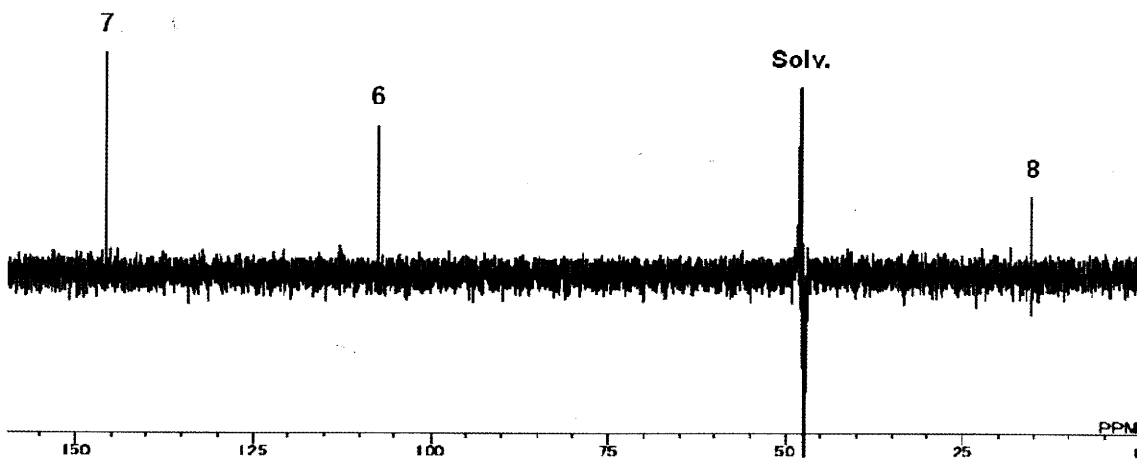


Fig. 34. DEPT spectrum of 3 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

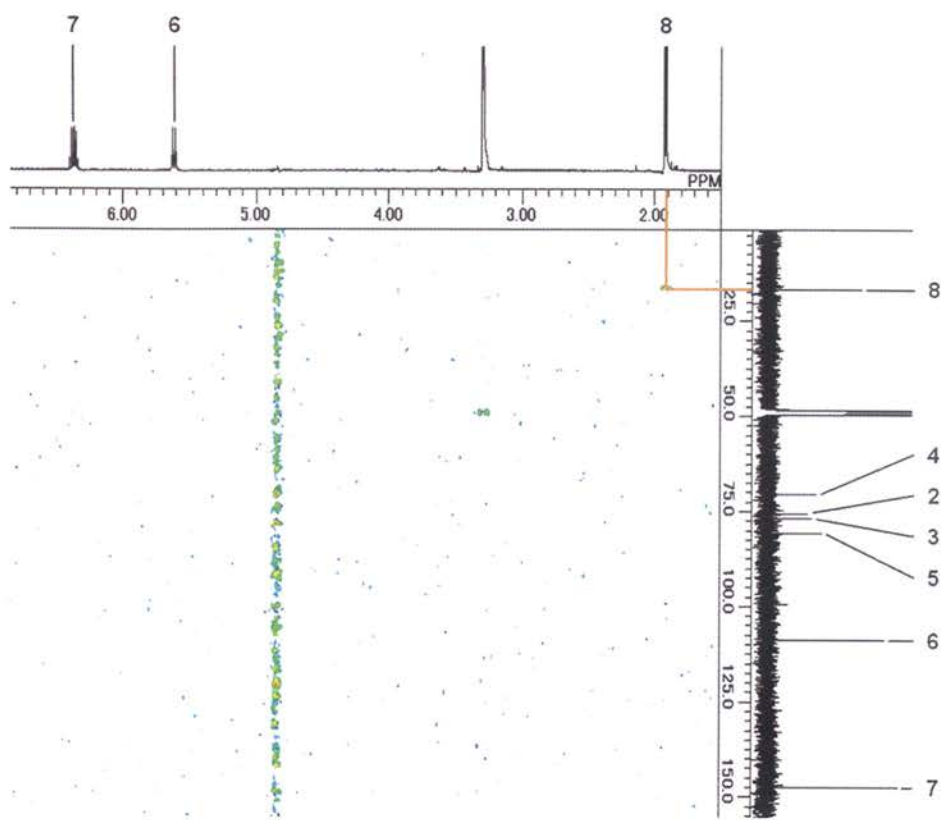


Fig. 35. HMQC spectrum of 3 (in CD<sub>3</sub>OD).

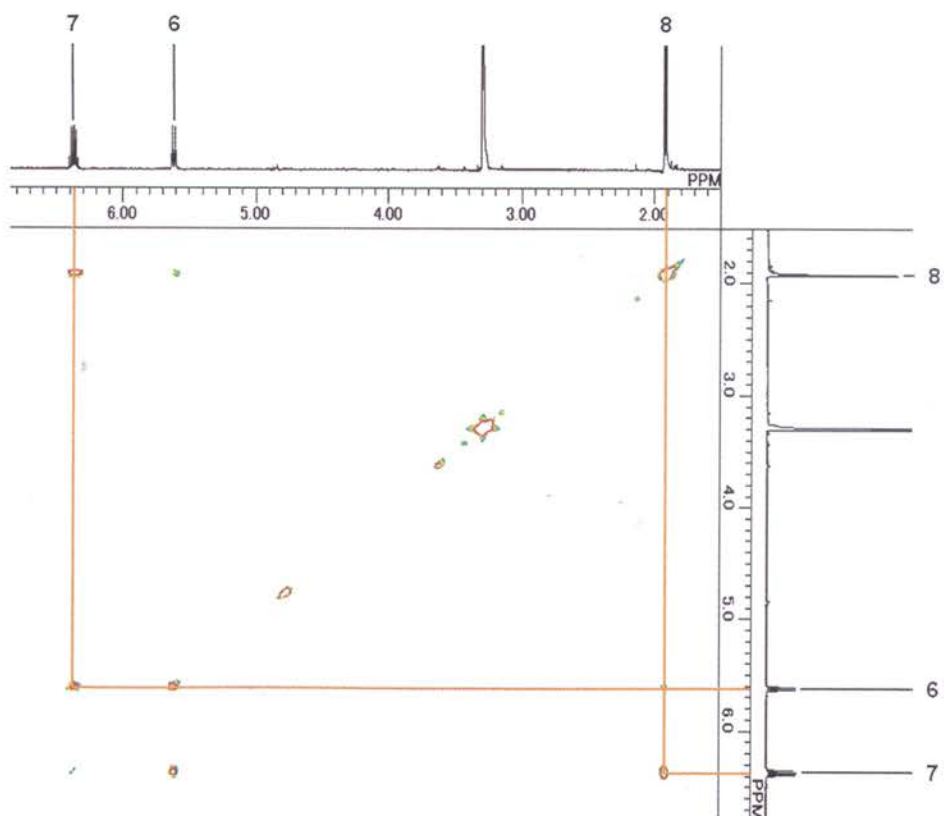


Fig. 36. COSY spectrum of 3 (in CD<sub>3</sub>OD).

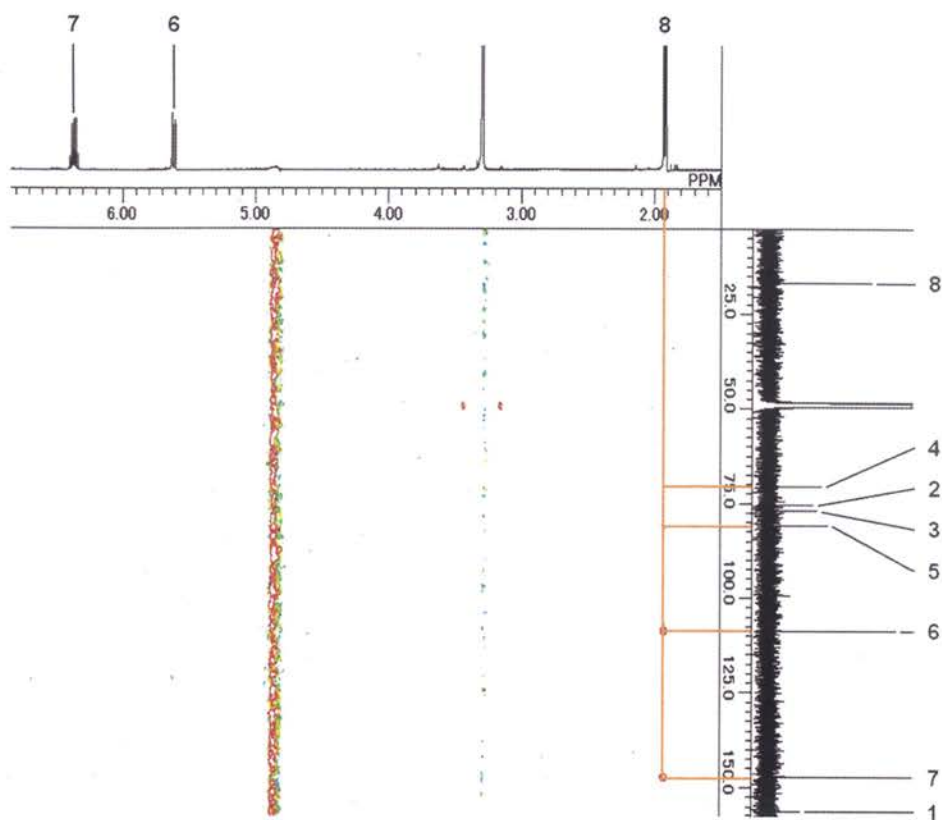
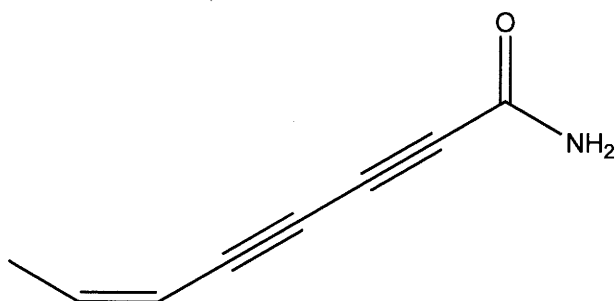


Fig. 37. HMBC spectrum of 3 (in CD<sub>3</sub>OD).

**Table 3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **3** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		156.3	
2		75.5 <sup>a</sup>	
3		76.8 <sup>a</sup>	
4		70.5 <sup>a</sup>	
5		80.9 <sup>a</sup>	
6	5.62 (d, dd, 11.0, 1.5)	108.8	
7	6.37 (dq, 11.0, 7.0)	147.3	
8	1.93 (dd, 7.0, 1.5)	16.7	4, 5, 6, 7

<sup>a</sup> Interchangeable between the same letter.



**Fig. 38.** Agrocybyne C (**3**).

#### 2-2-4 化合物 4 の構造解析

化合物 4 は白色非晶質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  156.0411  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_8H_7NNaO$ , 156.0425) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_8H_7NO$ 、不飽和度を 6 と決定した (Fig. 40)。IR において 1650 (C=O)、2222 (C≡C)、3158  $cm^{-1}$  ( $NH_2$ ) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 41)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 1 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 5 つ存在することが明らかになった (Fig. 42-45, Table 4)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 4 は化合物 3 の *cis*-異性体であることが示唆された。COSY の相関 (H7/H6, H8)、HMBC の相関 (H6/C4, C7, C8; H7/C5, C8; H8/C4, C5, C6, C7) および  $\delta_H$  5.67 (1H, dd,  $J = 15.8$  Hz, H6) の結合定数により、(*E*)-ペント-エンインの部分構造を決定した (Fig. 39, 46, 47, Table 4)。以上により、化合物 4 を (*E*)-octa-6-en-2,4-diyamide と決定した。化合物 4 は合成中間体として知られているが<sup>52,53</sup>、天然物から単離されたのは最初であり、agrocybyne D と命名した (Fig. 48)。

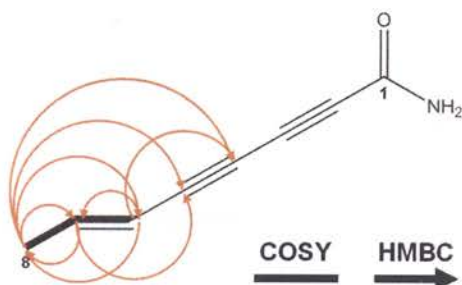


Fig. 39. COSY and HMBC correlations in 4.



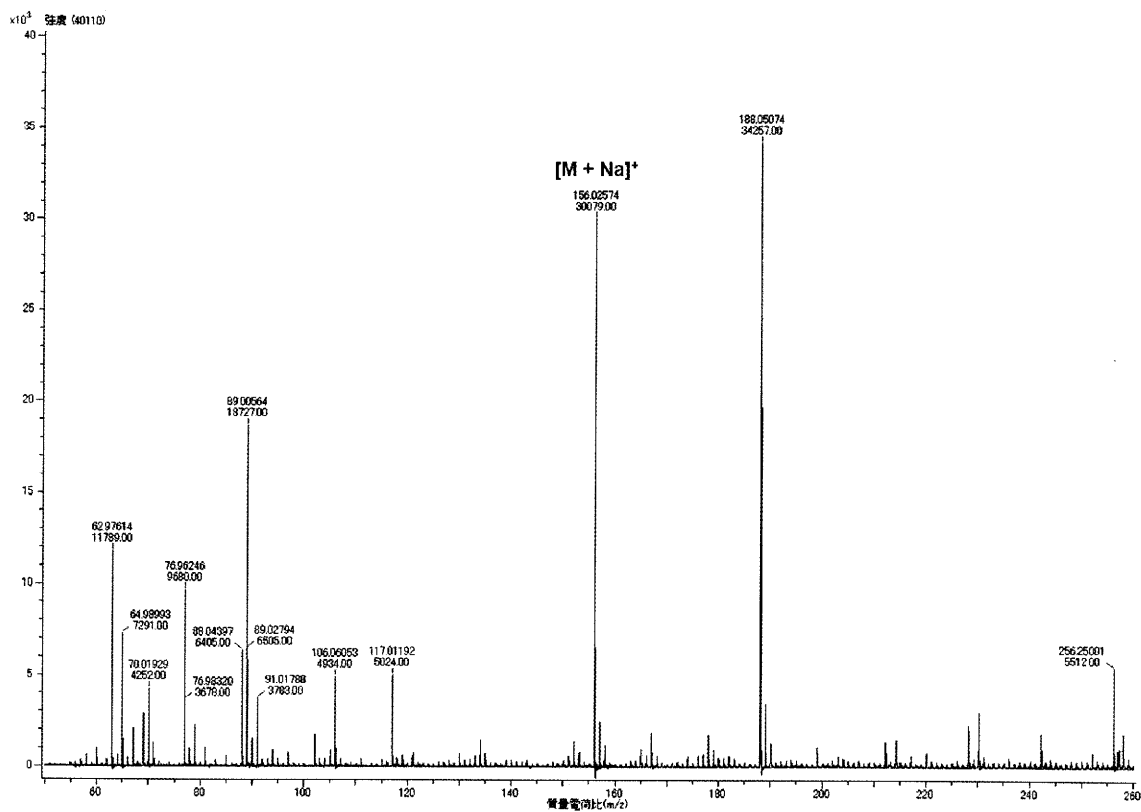


Fig. 40. ESIMS (+) spectrum of 4.

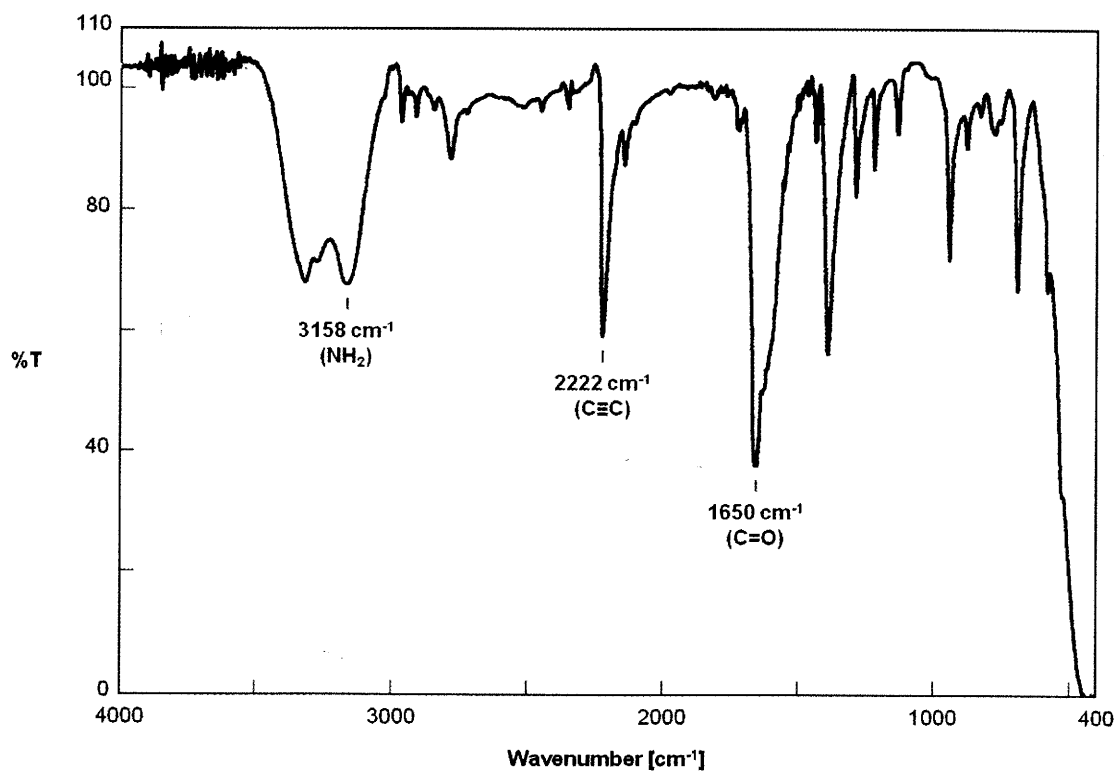


Fig. 41. IR spectrum of 4.

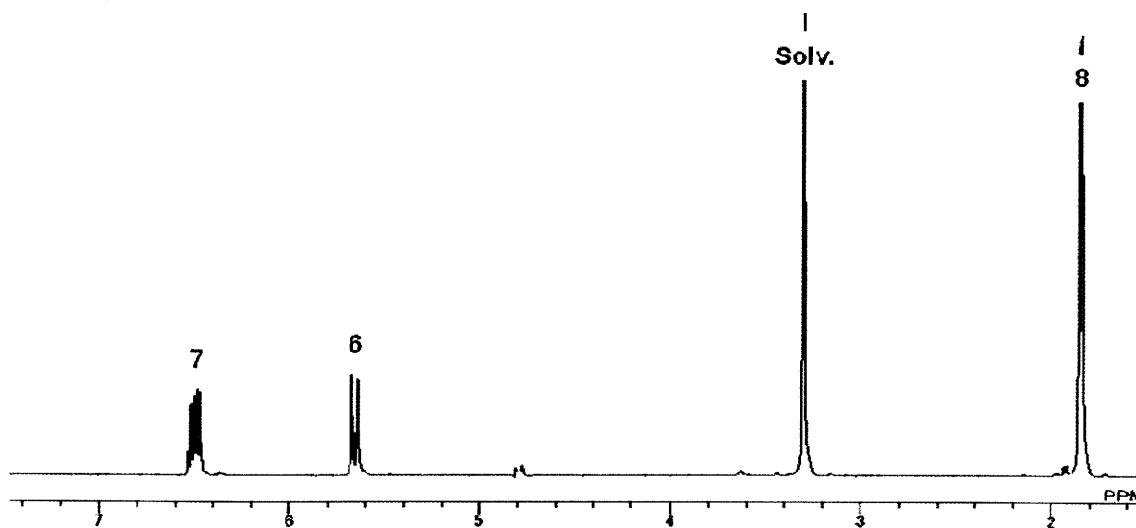


Fig. 42.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

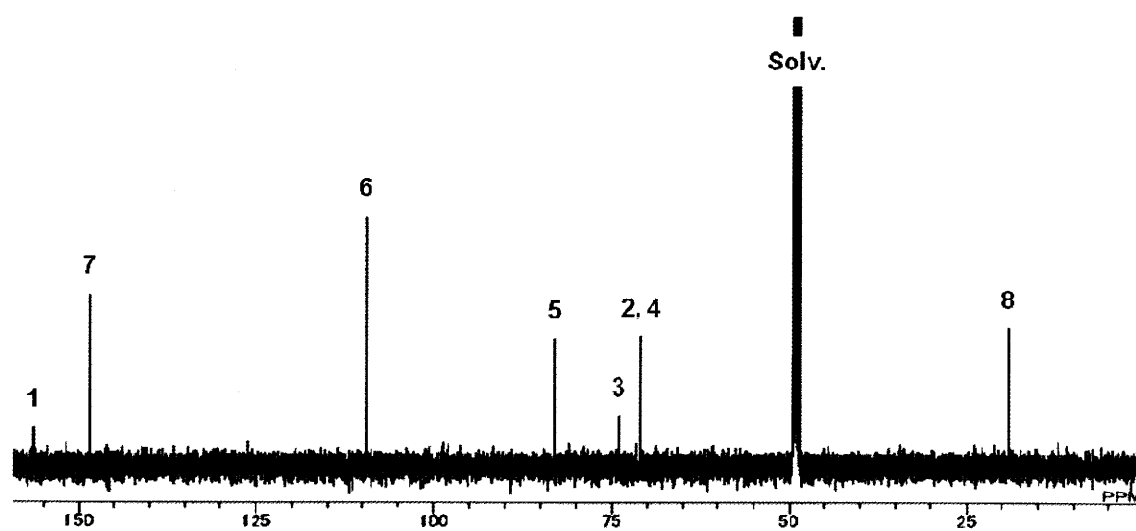


Fig. 43.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

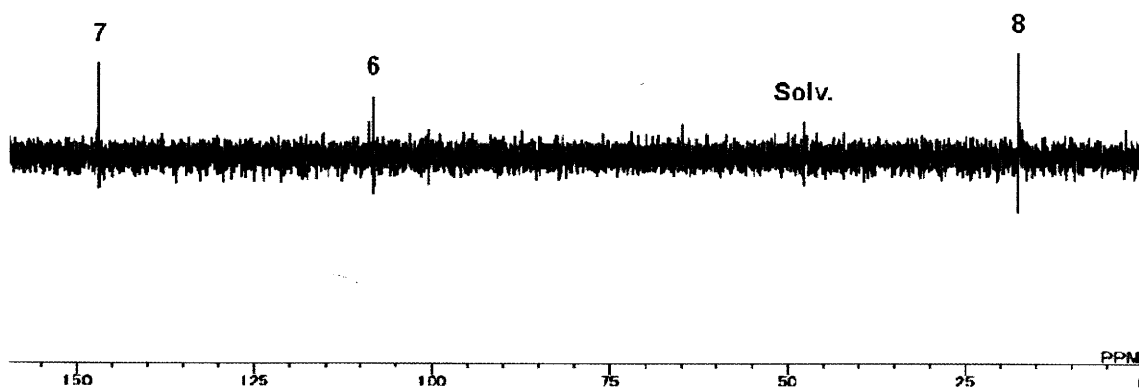


Fig. 44. DEPT spectrum of 4 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

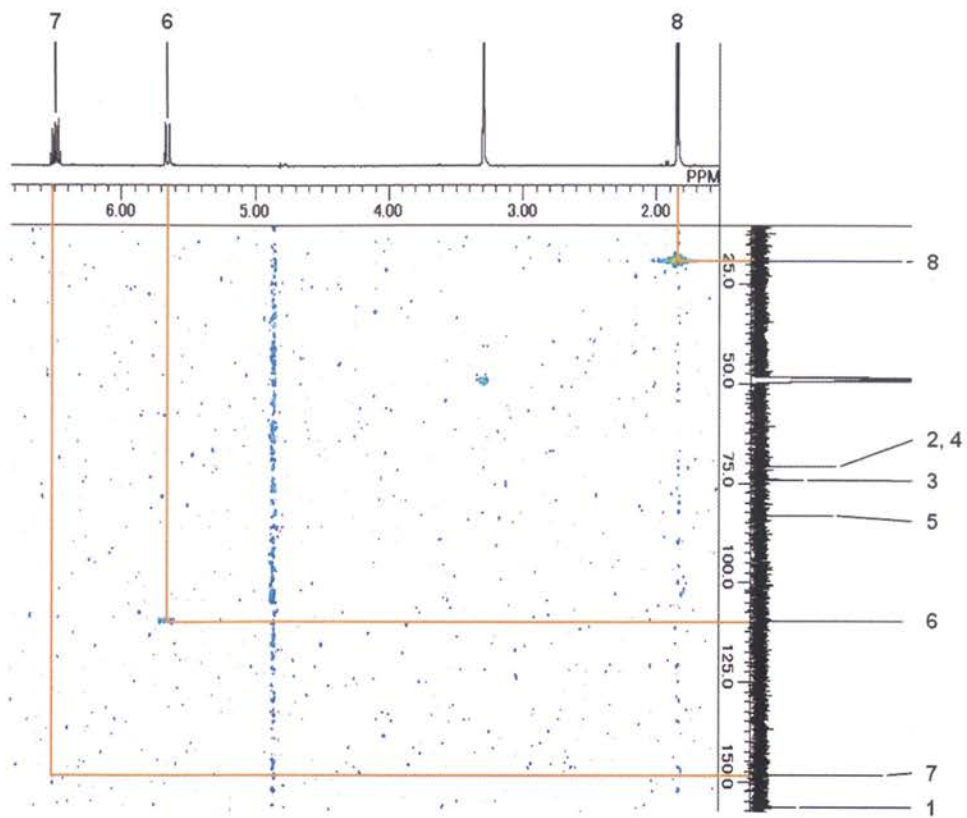


Fig. 45. HMQC spectrum of 4 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

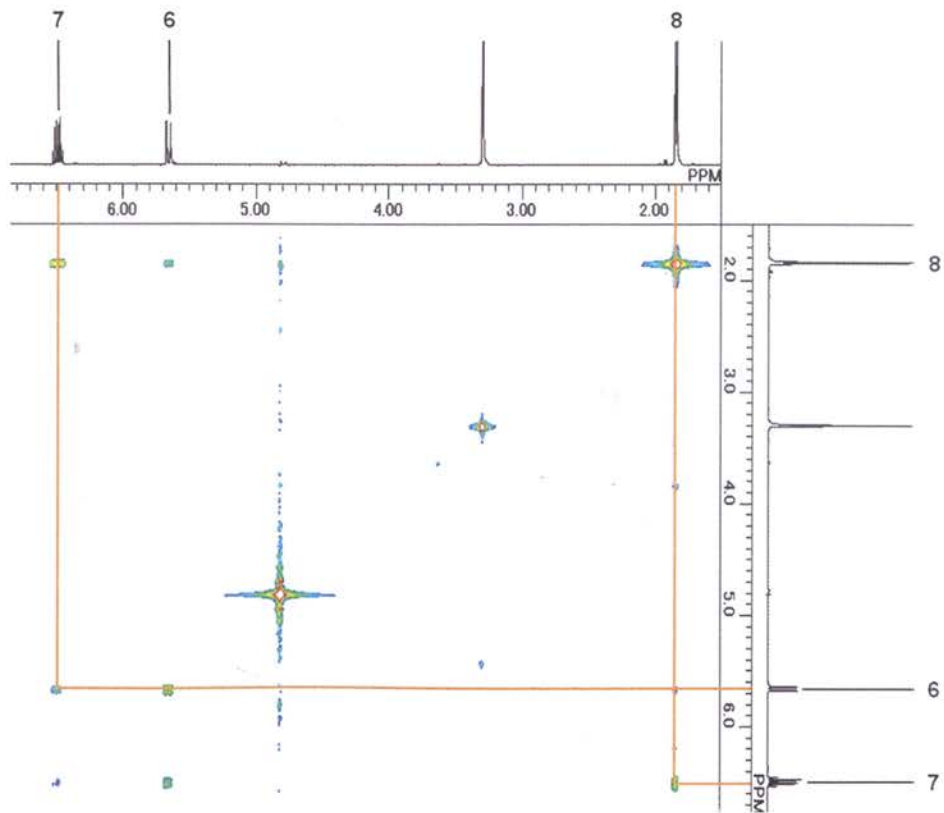


Fig. 46. COSY spectrum of 4 (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

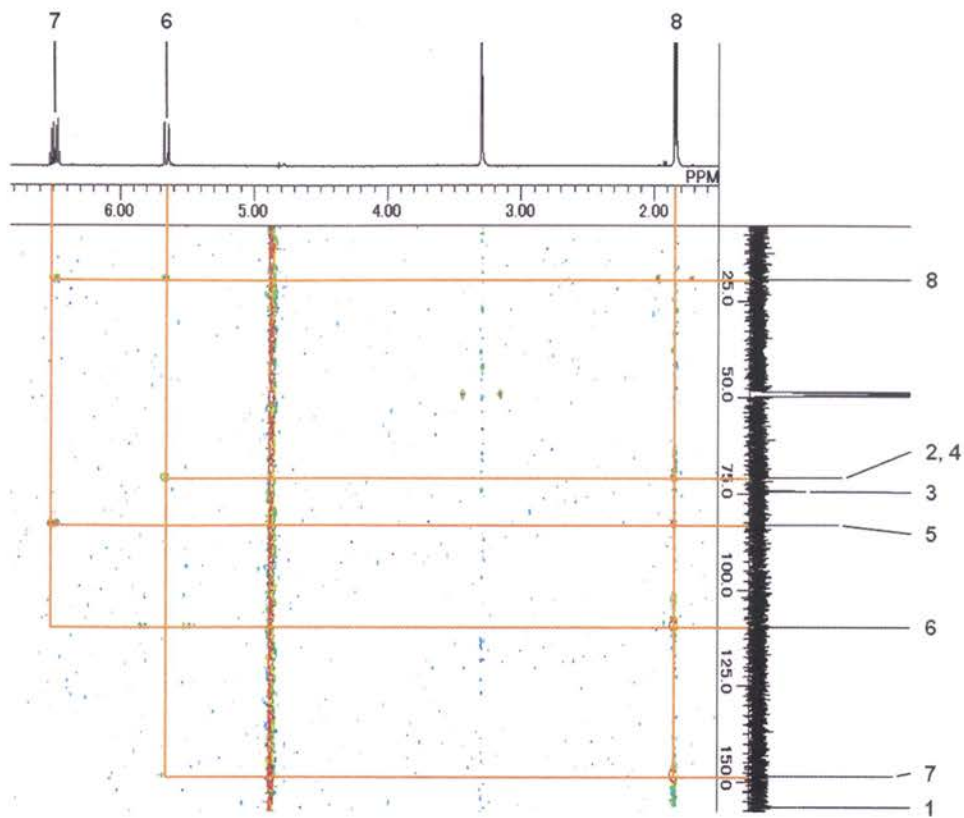
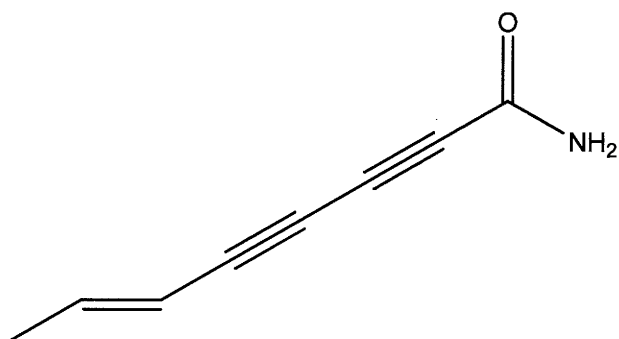


Fig. 47. HMBC spectrum of 4 (in CD<sub>3</sub>OD).

**Table 4.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **4** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		156.4	
2		70.9 <sup>a</sup>	
3		74.2 <sup>a</sup>	
4		70.8 <sup>a</sup>	
5		83.1	
6	5.67 (dd, 15.8, 1.8)	109.6	4, 7, 8
7	6.50 (dq, 15.8, 7.0)	148.4	5, 6, 8
8	1.85 (dd, 7.0, 1.8)	19.1	4, 5, 6, 7

<sup>a</sup> Interchangeable between the same letter.



**Fig. 48.** Agrocybyne D (**4**).

### 2-2-5 化合物 5 の構造解析

化合物 5 は白色非晶質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  216.0608  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{10}H_{11}NNaO_3$ , 216.0637) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{10}H_{11}NO_3$ 、不飽和度を 6 と決定した (Fig. 50)。IR において 1613 (C=O)、2243 (C≡C)、3178  $cm^{-1}$  ( $NH_2$ ) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 51)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 1 つ、メチレンが 3 つ、4 級炭素が 6 つ存在することが明らかになった (Fig. 52-55, Table 5)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 5 は化合物 1 にカルボキシ基をもつ 2 つの炭素が結合した類縁体であることが示唆された。COSY の相関 (H2/H1, H2) および HMBC の相関 (H1/C2, C3; H2/C1, C3; H3/C1, C2) により、プロピルの部分構造を決定した (Fig. 49, 56, 57)。さらに、HMBC の相関 (H1/C1'; H2'/C1') および化学シフトの値 ( $\delta_H$  4.13;  $\delta_C$  62.7, 170.9) により、アセトキシメチルの部分構造を決定した (Fig. 49, 57, Table 5)。さらに、HMBC の相関 (H2/C4; H3/C4 to C7) および化学シフトの値 ( $\delta_C$  64.3, 67.5, 71.2, 85.4) により、ブタジインの部分構造を決定した (Fig. 49, 57, Table 5)。以上により、化合物 5 を 8-amino-8-oxoocta-4,6-diynyl acetate と決定した。化合物 5 は新規化合物であり、agrocybyne E と命名した (Fig. 58)。

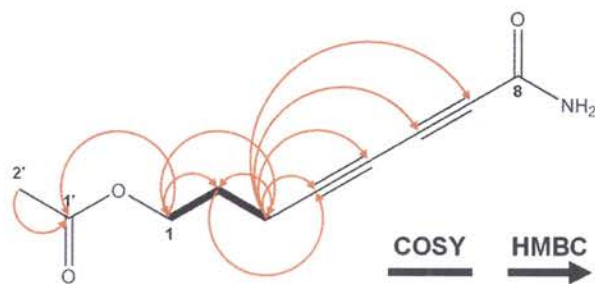


Fig. 49. COSY and HMBC correlations in 5.

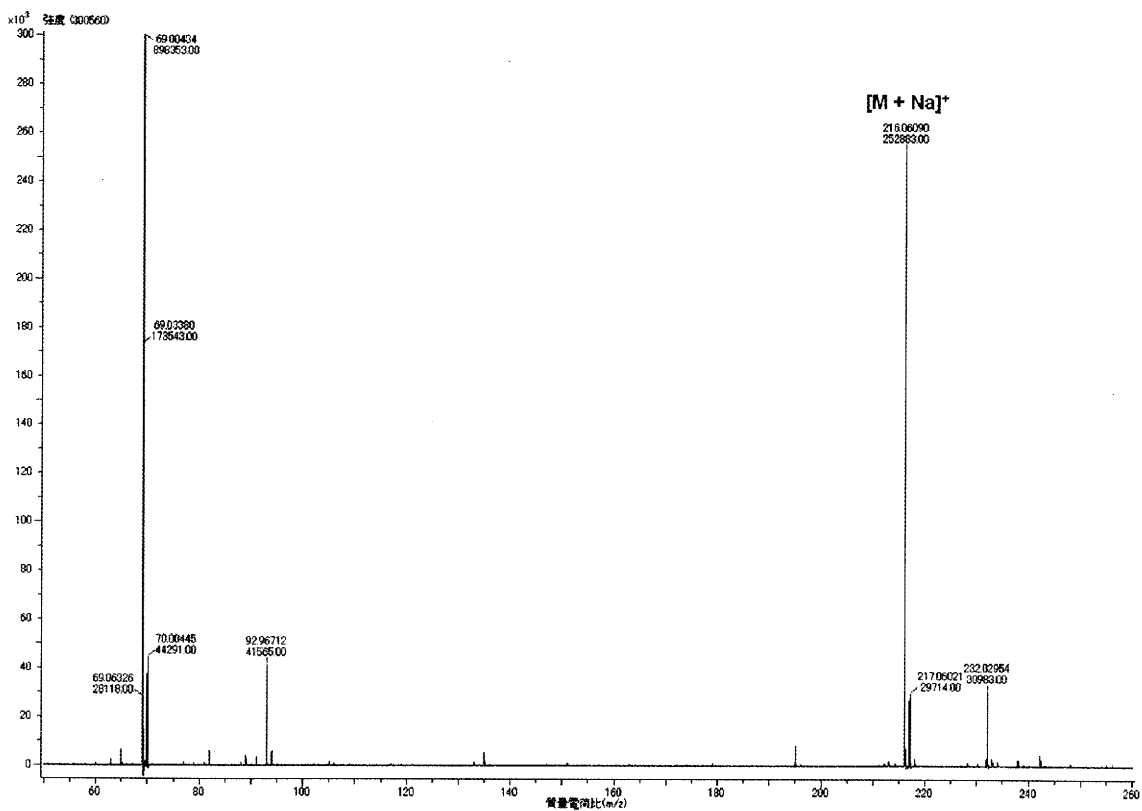


Fig. 50. ESIMS (+) spectrum of 5.

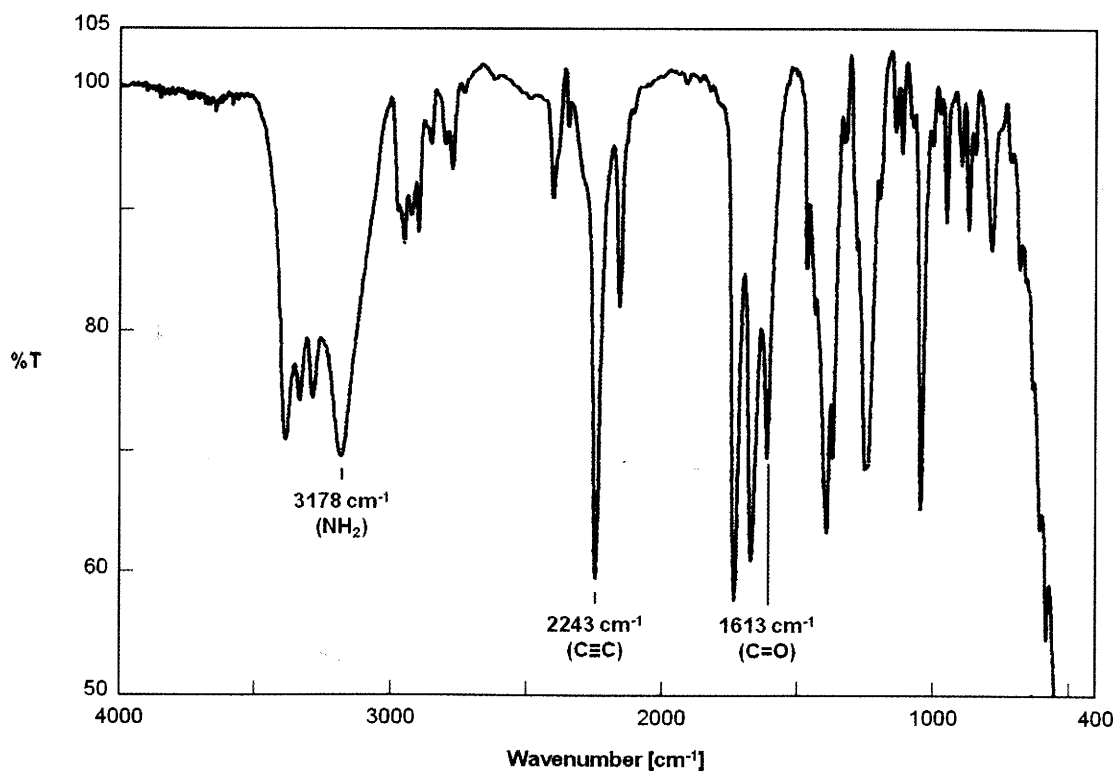


Fig. 51. IR spectrum of 5.

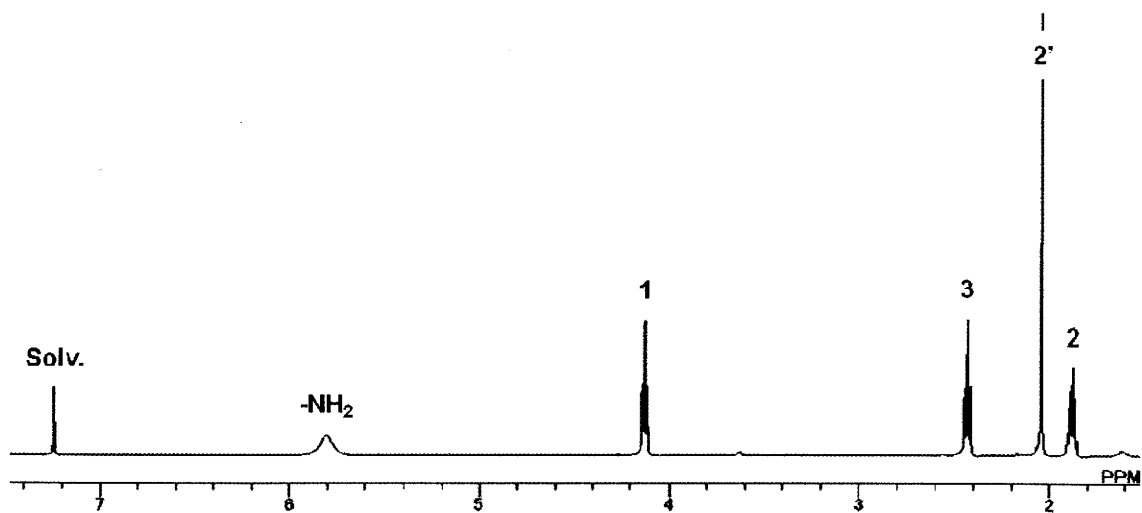


Fig. 52.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

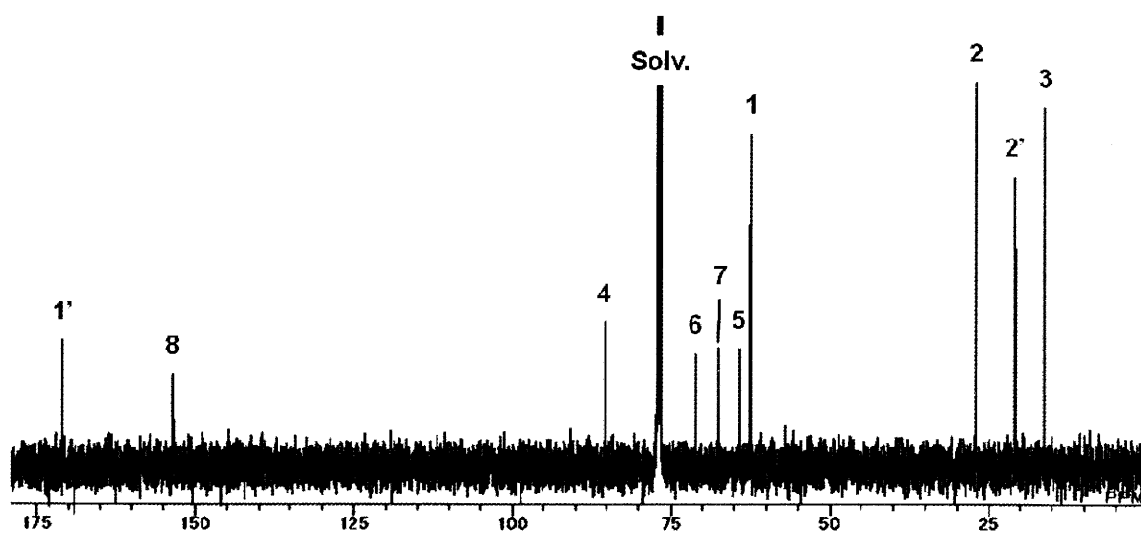


Fig. 53.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

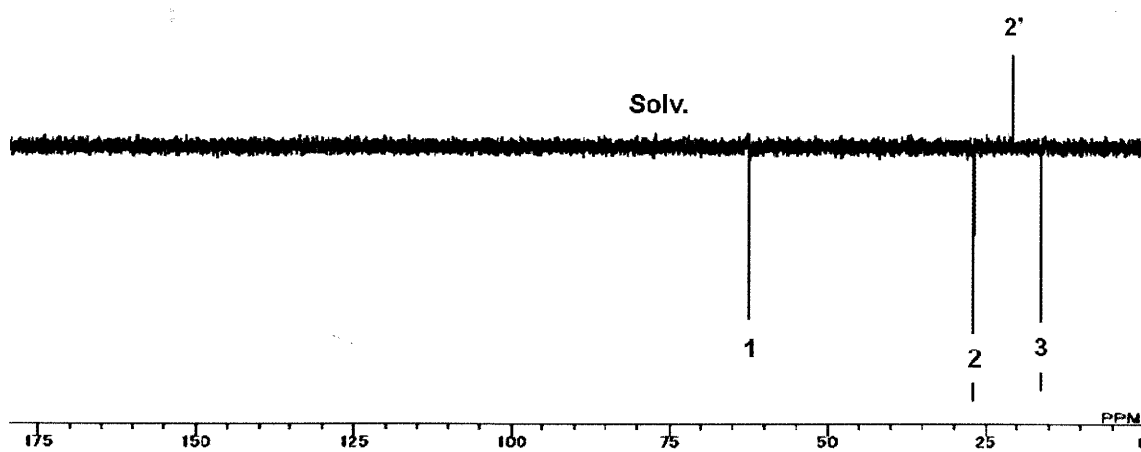


Fig. 54. DEPT spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).



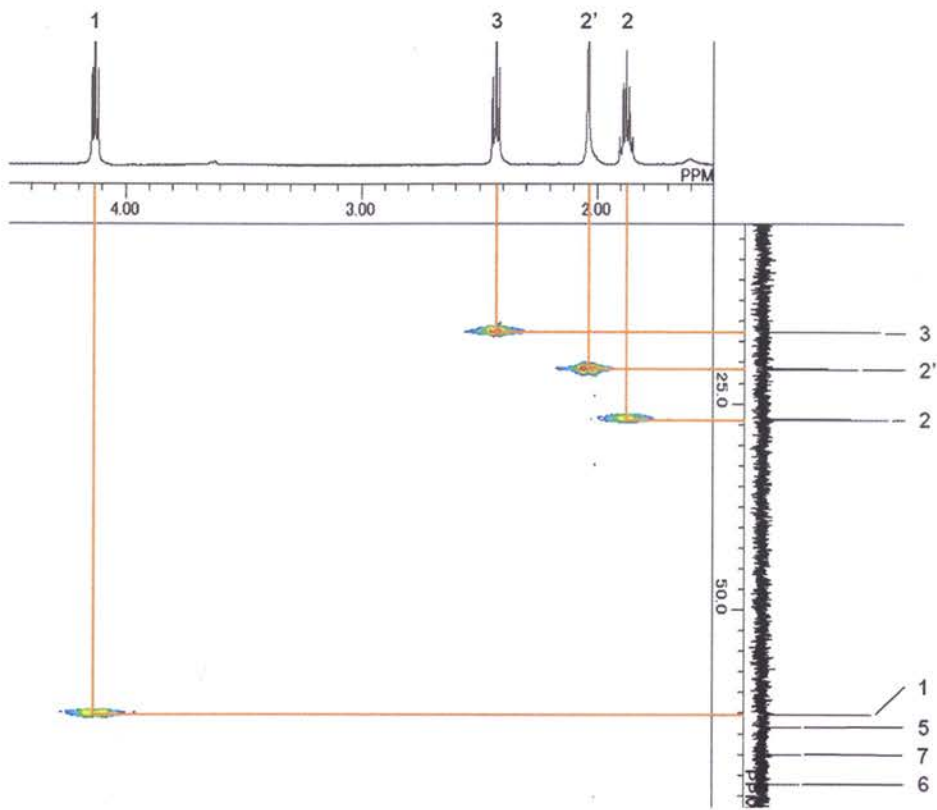


Fig. 55. HMQC spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

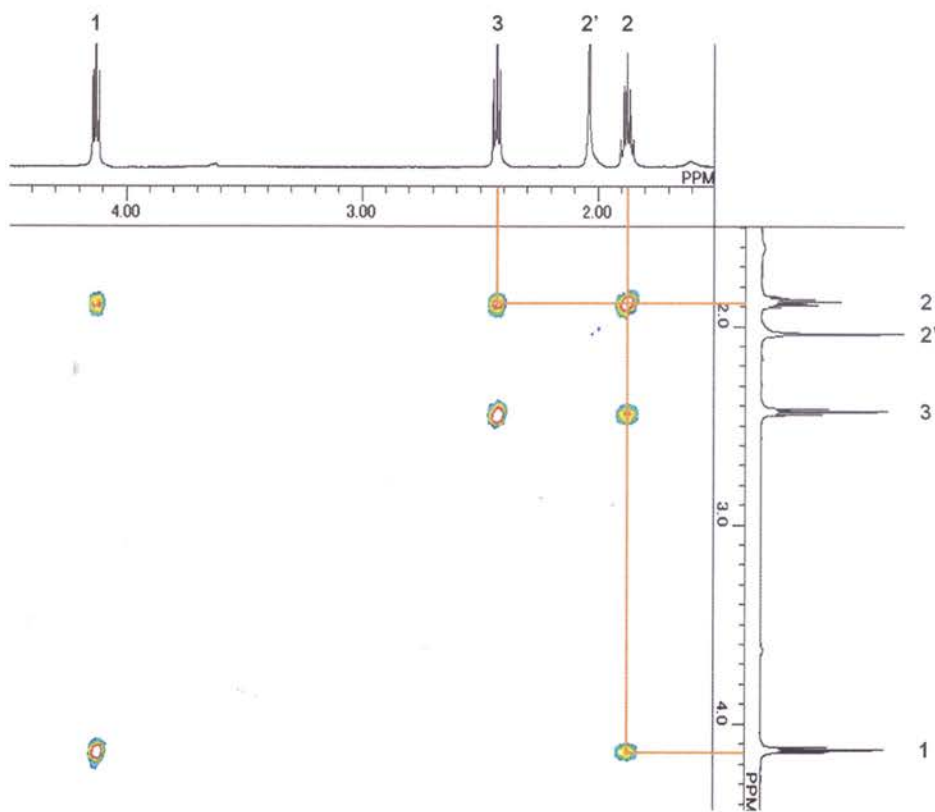


Fig. 56. COSY spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

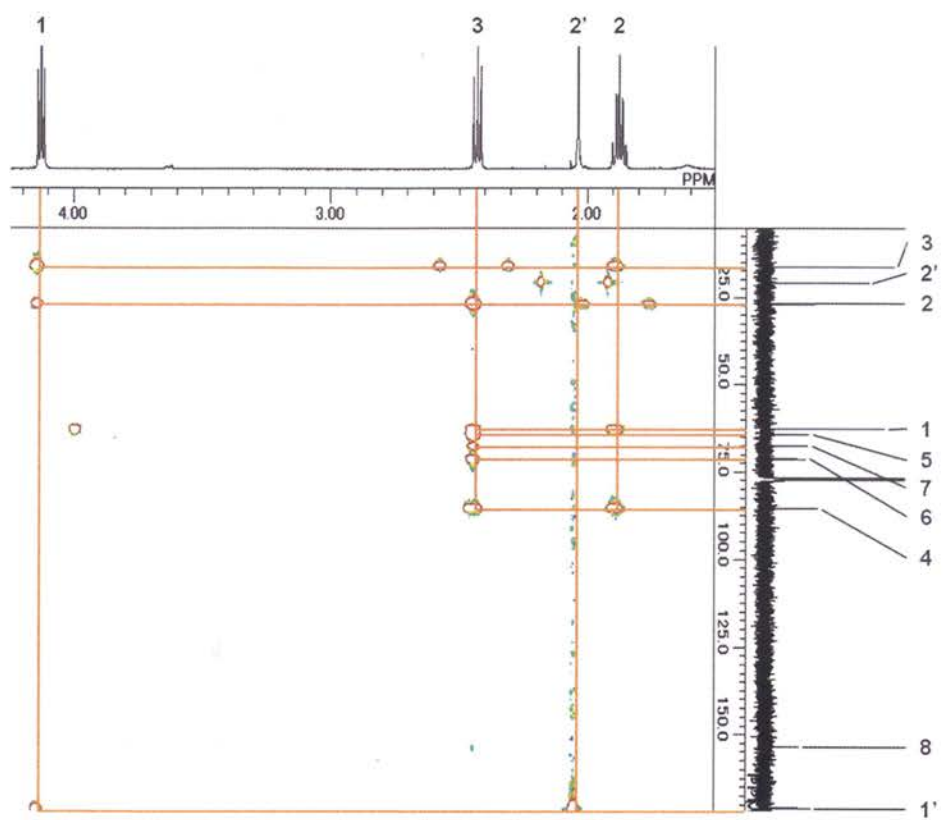
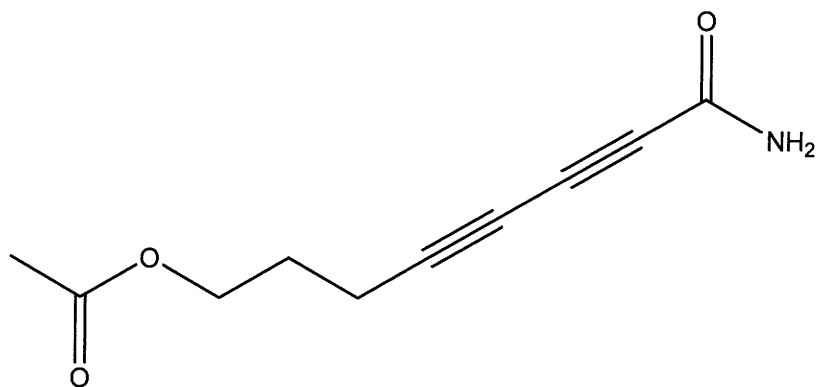


Fig. 57. HMBC spectrum of 5 (in CDCl<sub>3</sub>).

**Table 5.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **5** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$	HMBC
	$\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$\delta$	$^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1	4.13 (dd, 6.4, 6.1)	62.7	2, 3, 1'
2	1.88 (m)	27.0	1, 3, 4
3	2.43 (dd, 7.3, 6.7)	16.4	1, 2, 4, 5, 6, 7
4		85.4 <sup>a</sup>	
5		64.3 <sup>a</sup>	
6		71.2 <sup>a</sup>	
7		67.5	
8		153.4	
1'		170.9	
2'	2.04 (s)	20.8	1'

<sup>a</sup> Interchangeable between the same letter.



**Fig. 58.** Agroclybyne E (**5**).

## 2-2-6 化合物 6 の構造解析

化合物 6 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  233.0410  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{10}H_{10}NaO_5$ , 233.0426) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{10}H_{10}O_5$  と決定した (Fig. 60)。IR において 1627 (C=O)、3287  $cm^{-1}$  (OH) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 61)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 1 つ、メチレンが 1 つ、メチンが 3 つ、4 級炭素が 5 つ存在することが明らかになった (Fig. 62-65, Table 6)。HMBC の相関 (C2-CHO/C2, C3, C4; 3-OH/C2, C3, C4; H4/C2, C3; H6/C2) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  10.1, 12.3) と  $\delta_H$  6.35 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H4),  $\delta_H$  6.45 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H6) の結合定数により、2 つの水素原子がメタ位に存在する2-ヒドロキシベンズアルデヒドの部分構造を決定した (Fig. 59, 66, Table 6)。さらに、HMBC の相関 (C1-CH<sub>2</sub>/C1, C2, C6, C1'; H6/C1-CH<sub>2</sub>; H2'/C1') および化学シフトの値 ( $\delta_H$  5.29;  $\delta_C$  62.5, 170.3) により、アセトキシメチルの部分構造を決定した (Fig. 59, 66, Table 6)。また、HMBC スペクトルの相関 (H4/C5, C6; H6/C4) および化学シフトの値 ( $\delta_C$  162.8) により、ヒドロキシ基の部分構造を決定した (Fig. 59, 66, Table 6)。以上により、化合物 6 を 2-formyl-3,5-dihydroxybenzyl acetate と決定した。化合物 6 のアルコール部分である 2,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)benzaldehyde は天然物として *Aspergillus rugulosus* の変異体から単離されたのが最初であるが<sup>54</sup>、化合物 6 は新規化合物であった (Fig. 67, 68)。

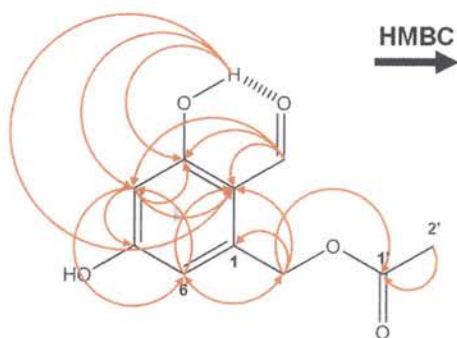


Fig. 59. HMBC correlation in 6.

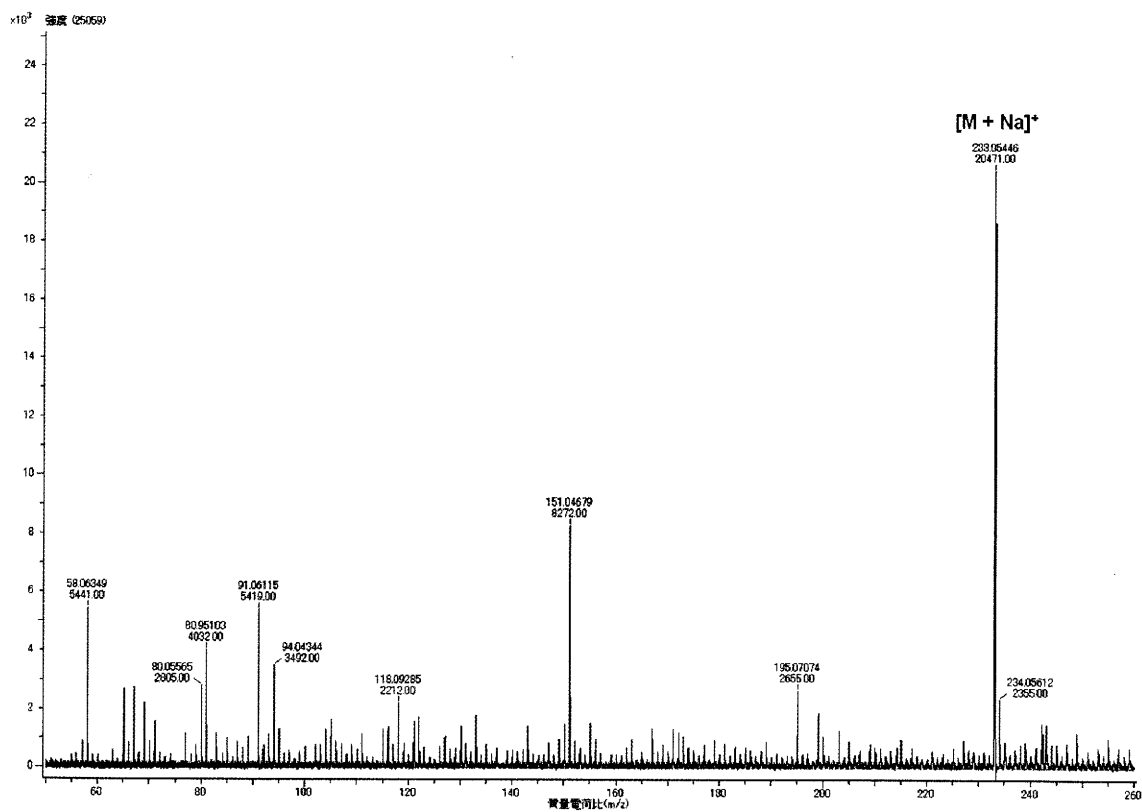


Fig. 60. ESIMS (+) spectrum of 6.

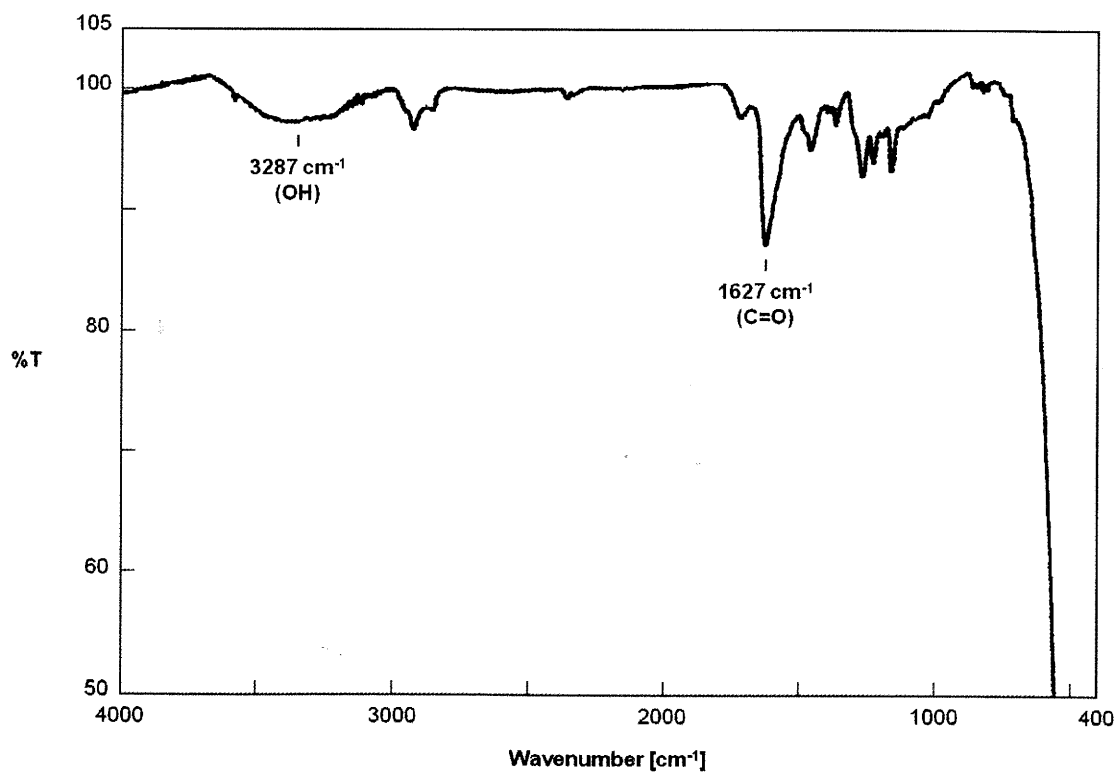


Fig. 61. IR spectrum of 6.

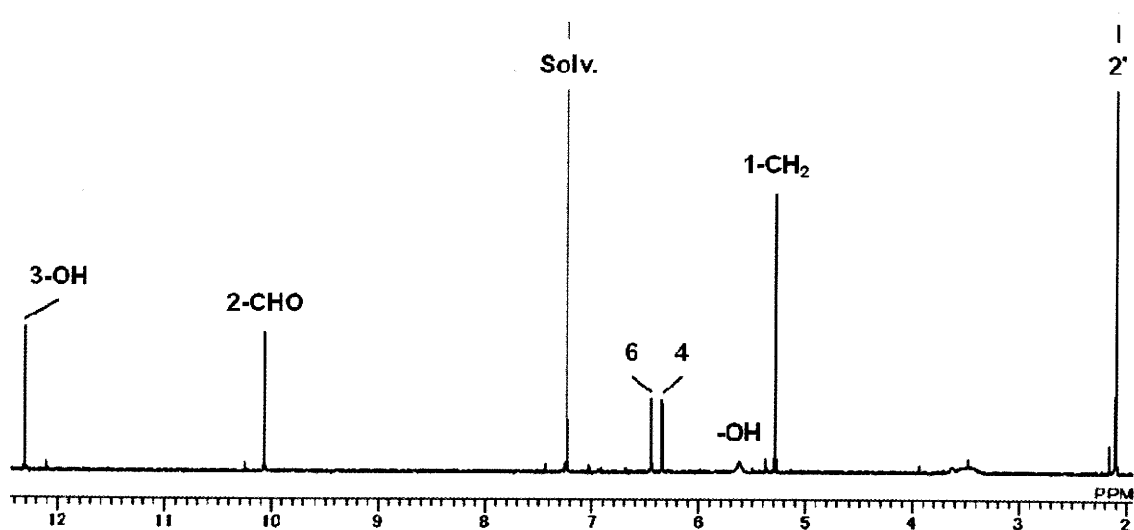


Fig. 62. <sup>1</sup>H NMR spectrum of 6 (in CDCl<sub>3</sub>).

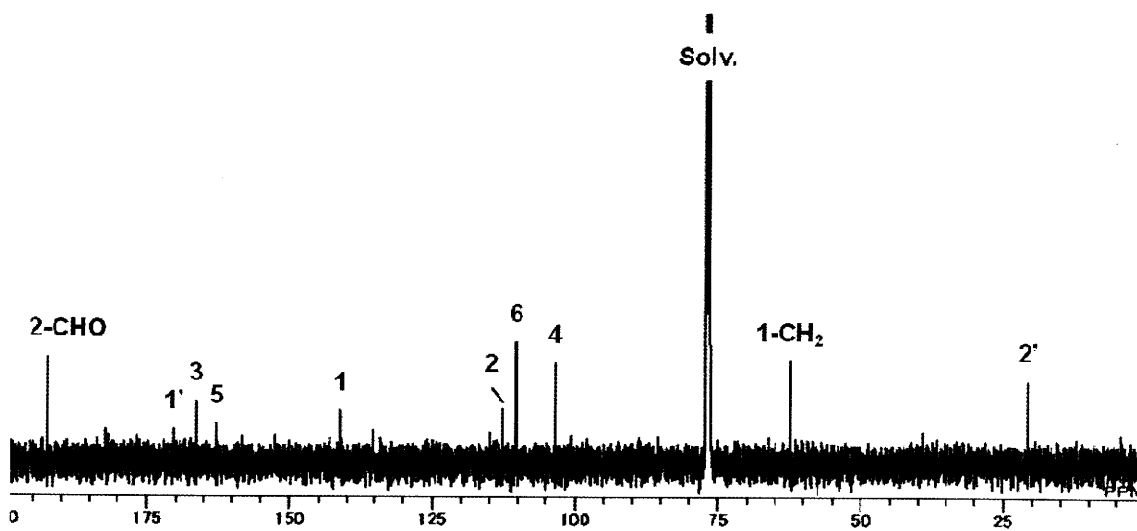


Fig. 63. <sup>13</sup>C NMR spectrum of 6 (in CDCl<sub>3</sub>).

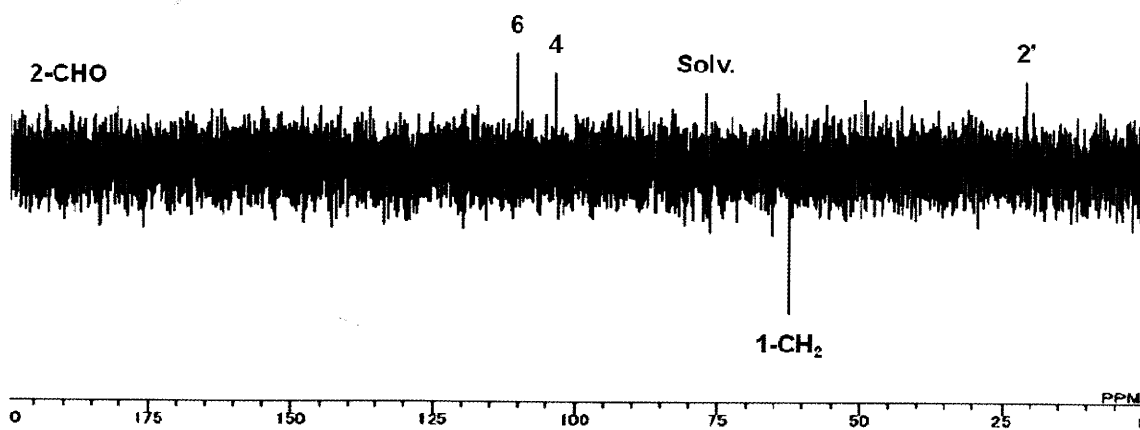


Fig. 64. DEPT spectrum of 6 (in CDCl<sub>3</sub>).

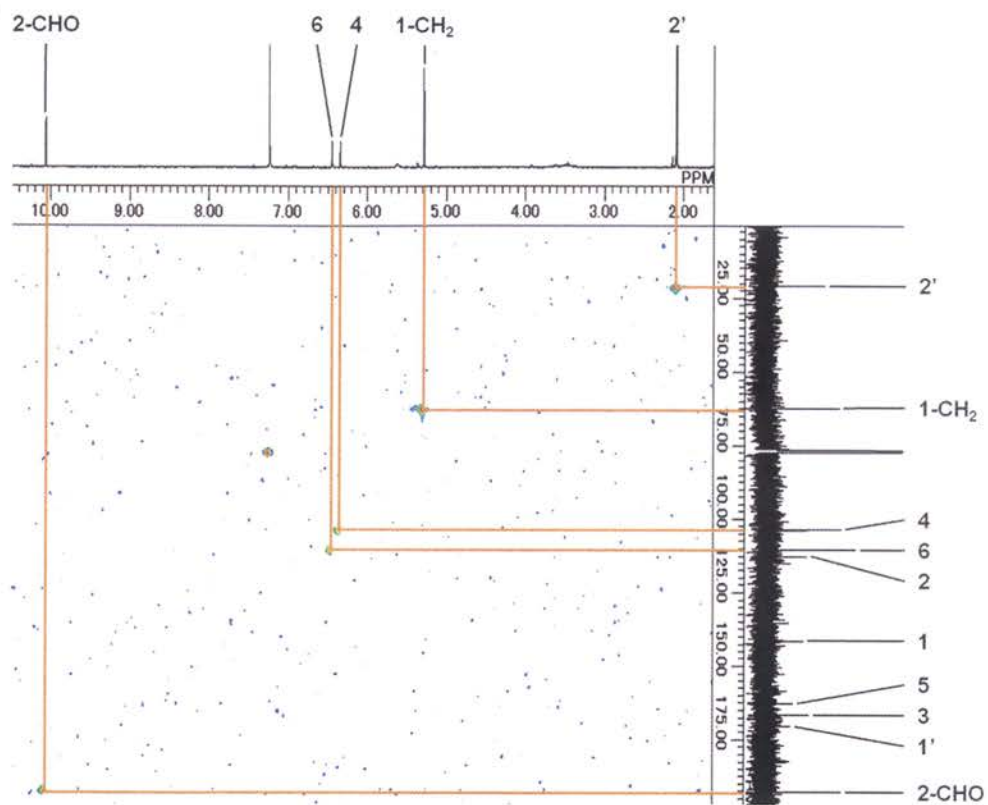


Fig. 65. HMQC spectrum of 6 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

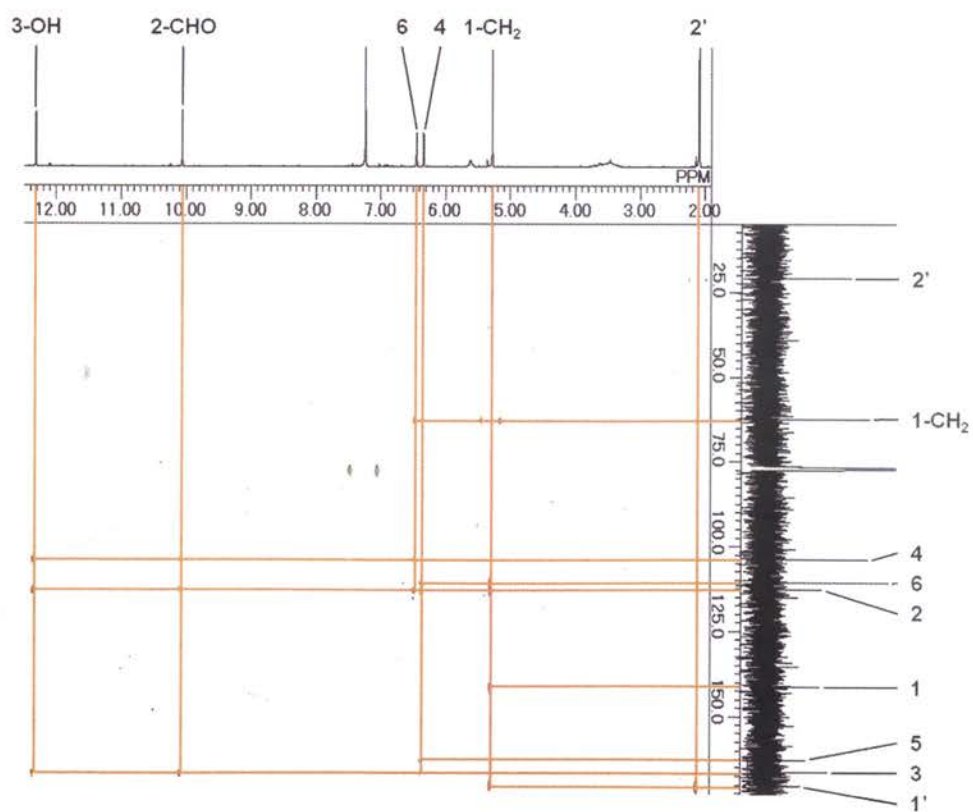
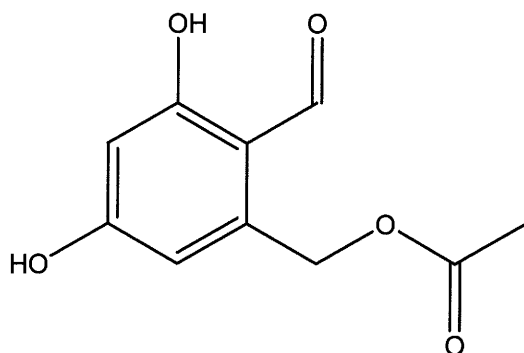


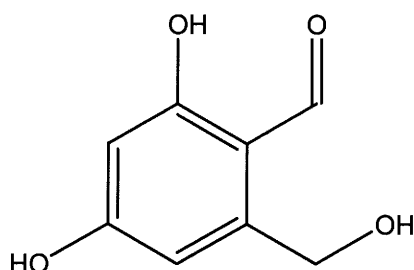
Fig. 66. HMBC spectrum of 6 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

**Table 6.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **6** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		141.3	
1- $\text{CH}_2$	5.29 (s)	62.5	1, 2, 6, 1'
2		112.8	
2-CHO	10.1 (s)	192.5	2, 3, 4
3		166.4	
3-OH	12.3 (s)		2, 3, 4
4	6.35 (d, 2.0)	103.7	2, 3, 5, 6
5		162.8	
6	6.45 (d, 2.0)	110.5	2, 4, 1- $\text{CH}_2$
1'		170.3	
2'	2.11 (s)	20.9	1'



**Fig. 67.** 2-formyl-3,5-dihydroxybenzyl acetate (**6**).



**Fig. 68.** 2,4-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)benzaldehyde.

The compound have been isolated from mutant strains of *A. rugulosus*.



### 2-2-7 化合物 7 の構造解析

化合物 7 は無色油状物質として単離された。ESIMS において  $m/z$  175  $[M+Na]^+$  の分子イオンピークが観測された (Fig. 70)。IR において 1627 (C=O)、3245  $\text{cm}^{-1}$  (OH) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 71)。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  および各種スペクトルデータの比較により、化合物 7 は化合物 6 のアセトキシメチルがメチルになった類縁体であることが示唆された (Fig. 72, 73, Table 7)。構造解析により、化合物 7 を *o*-orsellinaldehyde (2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde) と同定した (Fig. 69, 74)。化合物 7 は合成中間体として知られており<sup>55</sup>、天然物として *A. rugulosus* の変異体から単離されたのが最初である<sup>54</sup>。また、生物活性として、ヒト肝腫瘍細胞 (Hep 3B cell) に対して特異的にアポトーシスを誘引する細胞毒性が報告されている<sup>56</sup>。

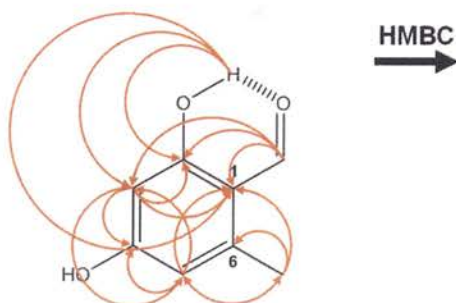


Fig. 69. HMBC correlation in 7.

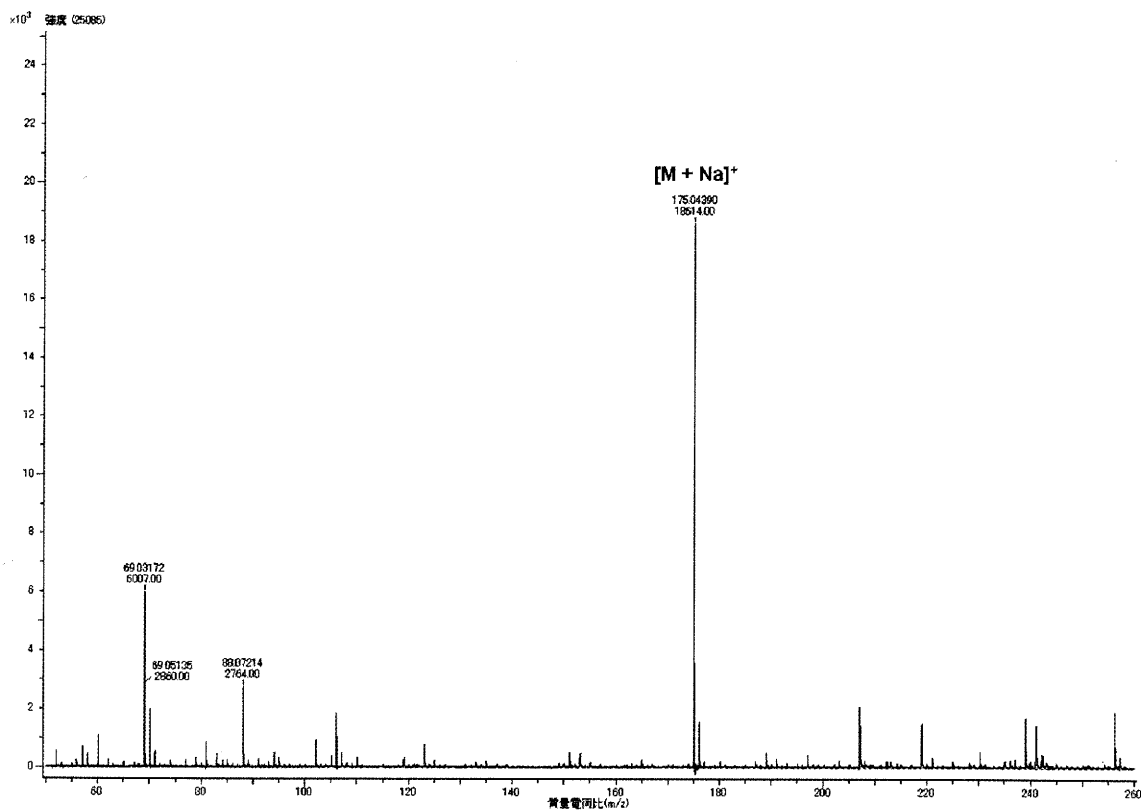


Fig. 70. ESIMS (+) spectrum of 7.

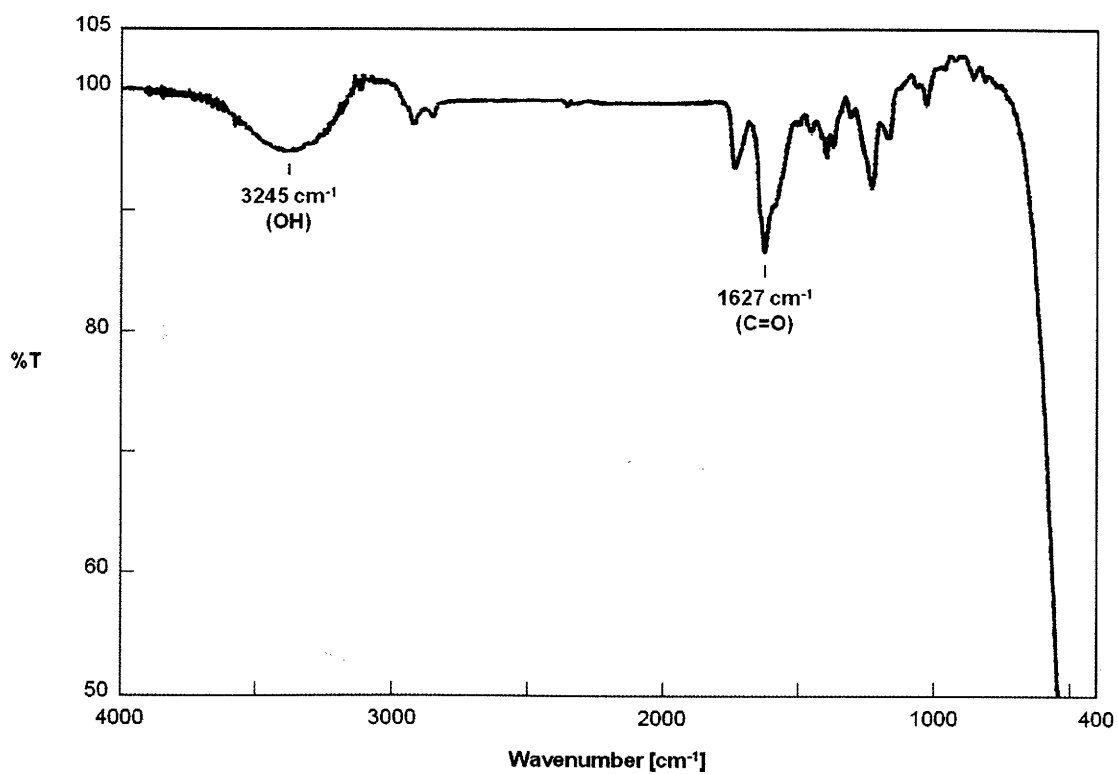


Fig. 71. IR spectrum of 7.

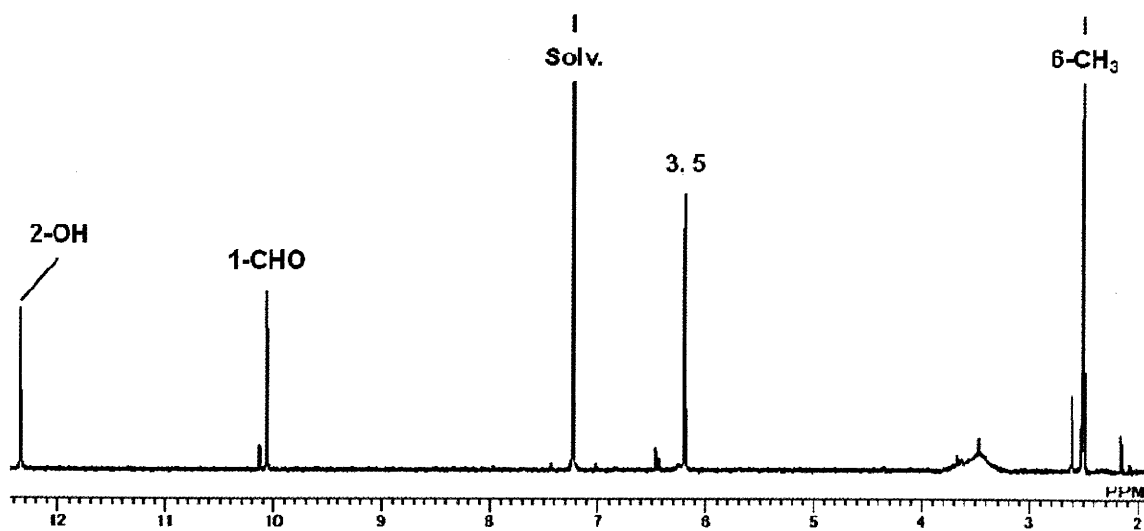


Fig. 72.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 7 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

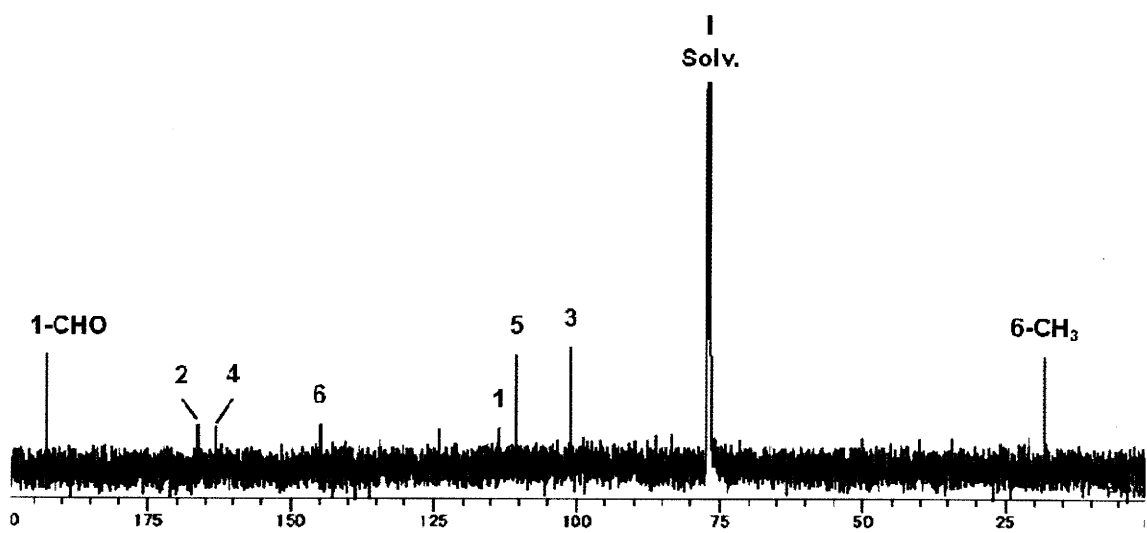
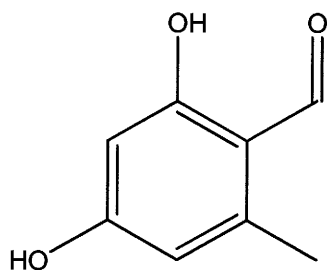


Fig. 73.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 7 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

**Table 7.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **7** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		113.6	
1-CHO	10.1 (s)	192.9	1, 2, 3
2		166.3	
2-OH	12.4 (s)		1, 2, 3
3	6.19 (s)	101.3	1, 2, 4, 5
4		163.2	
5	6.19 (s)	110.5	1, 3, 4, 6- $\text{CH}_3$
6		144.9	
6- $\text{CH}_3$	2.51 (s)	18.2	1, 5, 6



**Fig. 74.** *o*-Orsellinaldehyde (**7**).

### 第 3 節 植物成長調節活性試験

フミツキタケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離した各化合物について、レタス (キク科)、イネ (イネ科) およびイチゴ (バラ科) に対する植物成長調節活性試験を行った。

#### 2-3-1 レタスに対する植物成長調節活性試験

レタスの種子を播種して 1 日間前培養を行い、発芽させた後、1 nmol ~ 1  $\mu$ mol に濃度調整した agrocbynes A-E (1-5) および化合物 6, 7 をそれぞれ処理して 3 日間本培養を行った。その結果、agrocbynes A (1), E (5), 化合物 6, 7 は 10 nmol 以上、agrocbynes C (3), D (4) は 1 nmol 以上で胚軸または根の伸長阻害活性を示し、agrocbyne B (2) は 10 nmol 以上で胚軸の伸長阻害活性および根の伸長促進活性を示した。また、agrocbynes A (1), B (2) は 1 nmol で胚軸の伸長促進活性の傾向も観察された (Fig. 75)。

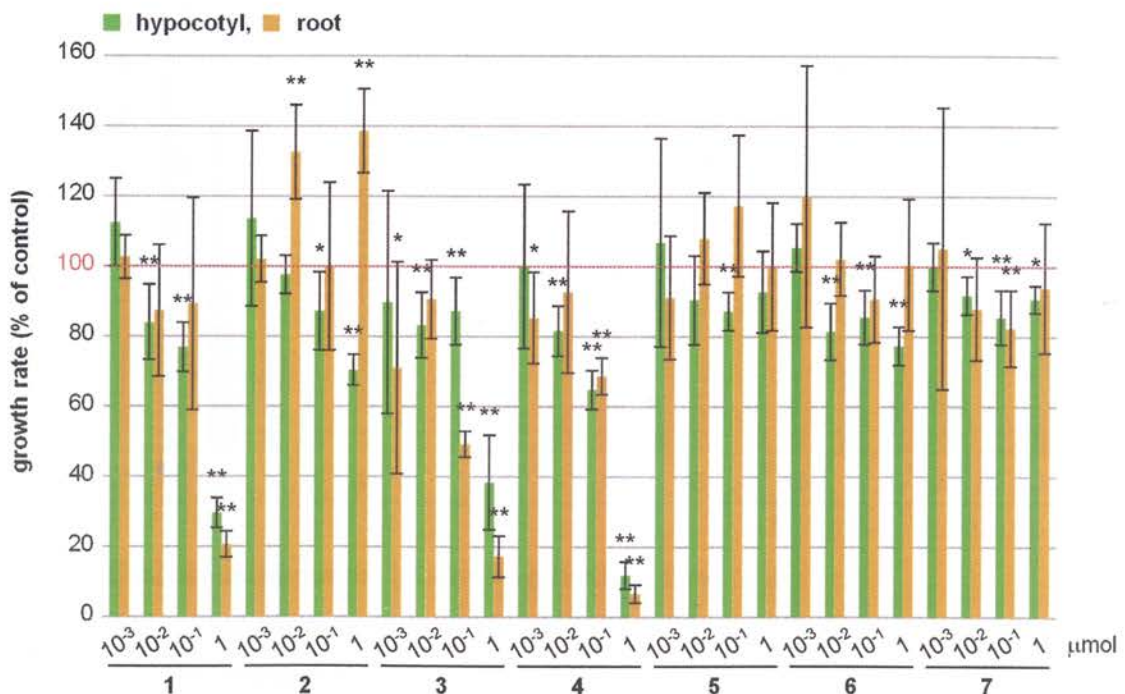


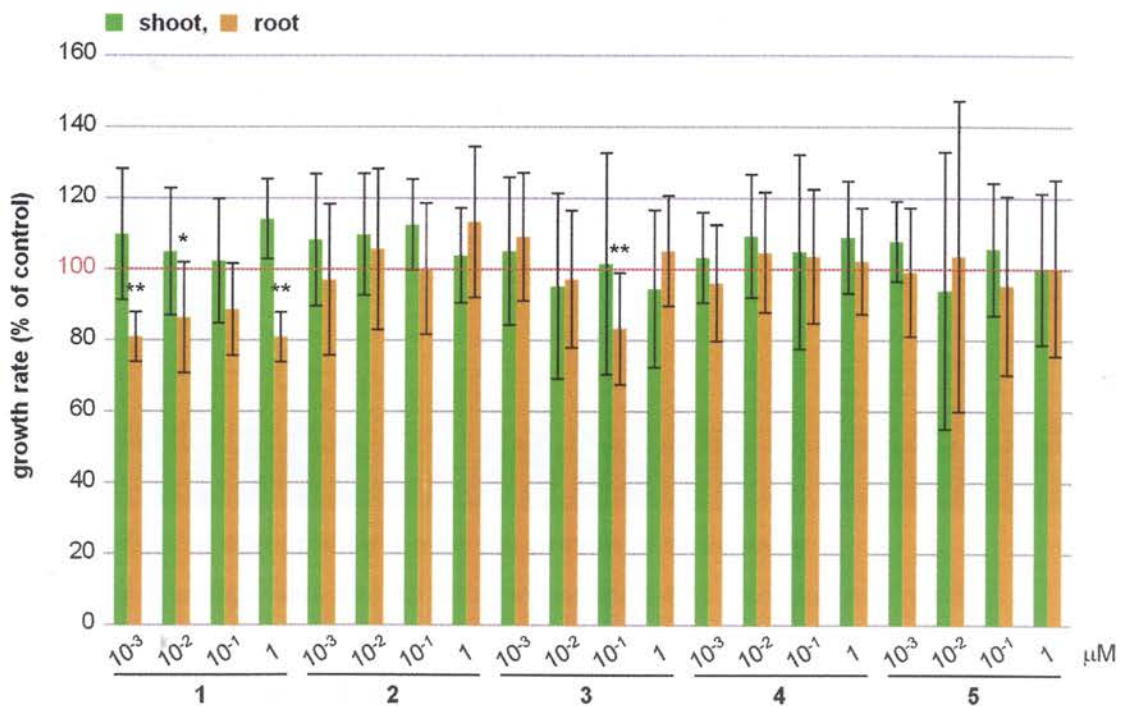
Fig. 75. Effect of compounds 1-7 on the growth of lettuce.

Lettuce seedlings were treated with compounds 1-7 (1 nmol - 1  $\mu$ mol). The lengths of the hypocotyl and the root were measured using a ruler. Results are the rate of growth length compared with control  $\pm$  standard deviation (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control, n = 7).

以上のことから、フミツキタケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離された各化合物は植物成長調節活性物質として機能することが示された。

### 2-3-2 イネに対する植物成長調節活性試験

イネの種子を播種して3日間前培養を行い、発芽させた後、1 nM ~ 1  $\mu$ M に濃度調整した agrocybynes A-E (1-5) をそれぞれ処理して1週間本培養を行った。その結果、agrocybyne A (1) は1 nM 以上、agrocybyne C (3) は100 nM で根の伸長阻害活性を示した。また、agrocybyne A (1) は1  $\mu$ M で地上部の伸長促進活性、agrocybyne B (2) は100 nM 以上で地上部または根の伸長促進活性の傾向も観察された (Fig. 76)。



**Fig. 76. Effect of compounds 1-5 on the growth of rice.**

Rice seedlings were treated with compounds 1-5 (1 nM - 1  $\mu$ M). The lengths of the shoot and the root were measured using a ruler. Results are the rate of growth length compared with control  $\pm$  standard deviation (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs control, n = 16).

### 2-3-3 イチゴに対する植物成長調節活性試験

イチゴの幼苗を園芸用土に移植して1日間前培養を行い、1 nmol/soil $\cdot$ mL に濃度調整し

た agrocybynes A-E (1-5) をそれぞれ処理して 1 週間本培養を行った。その結果、agrocybynes A-E (1-5) 全てに植物体の枯死が観察された。また、agrocybyne B (2) は根の伸長も観察された (Fig. 77)。



**Fig. 77. Effect of compounds 1-5 on the growth of strawberry.**

Strawberry seedlings were treated with compounds 1-5 (1 nmol/soil·mL, n = 3).

Agrocybynes A-E (1-5) は顕著な活性を示したことから、フミツキタケがイチゴの実の成長に対して影響を与えた主な活性物質である可能性が示唆される。現在、agrocybyne 類のイチゴの実に対する植物成長調節活性試験を試みている。

## 第 4 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の合成

フミツキタケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離した agrocbynes は収量が少ないことから、植物成長調節活性試験についてより詳細な実験を可能にするために、各化合物の安定的供給を目的として有機合成を行った。

### 2-4-1 Agrocbyne A の合成

2-Hexyn-1-ol (**1a**) 1.8 g を原料として、Swern 酸化により hex-2-ynal (**1b**) を得た後、Corey-Fuchs 反応により 1,1-dibromohept-1-en-3-yne (**1c**) を経て octa-2,4-diynoic acid (**1d**) を 790.2 mg (収率 32%) 得た。さらに、メチルエステル化により methyl octa-2,4-diynoate (**1e**) を 718.4 mg (収率 82%) 得た後、アミド化により agrocbyne A (**1**) を 38.6 mg (収率 5.4%) 合成した (Fig. 78)。

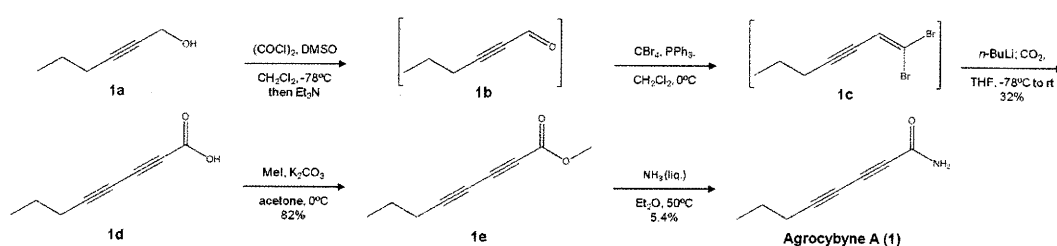


Fig. 78. Synthesis of agrocbyne A.

### 2-4-2 Agrocbyne B の合成

(*E*)-Hex-2-enal (**2a**) 2.0 g を原料として、Corey-Fuchs 反応により (*E*)-1,1-dibromohepta-1,3-diene (**2b**) を経て (*E*)-oct-4-en-2-ynoic acid (**2c**) を 2.0 g (収率 73%) 得た。さらに、メチルエステル化により (*E*)-methyl oct-4-en-2-ynoate (**2d**) を 1.76 g (収率 80%) 得た後、アミド化により agrocbyne B (**2**) を 617.2 mg (収率 39%) 合成した (Fig. 79)。

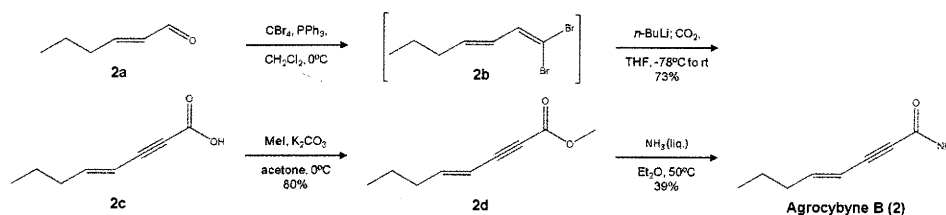


Fig. 79. Synthesis of agrocbyne B.



### 2-4-3 Agrocybynes C-E の合成計画

Propargyl alcohol を原料として、*cis*-bromopropene, *trans*-bromopropene, oxetane をそれぞれ反応させた後、上記と同様の方法で Swern 酸化、Corey-Fuchs 反応、メチルエステル化、アミド化を行い、agrocybynes C-E (3-5) の合成を試みている (Fig. 80)。

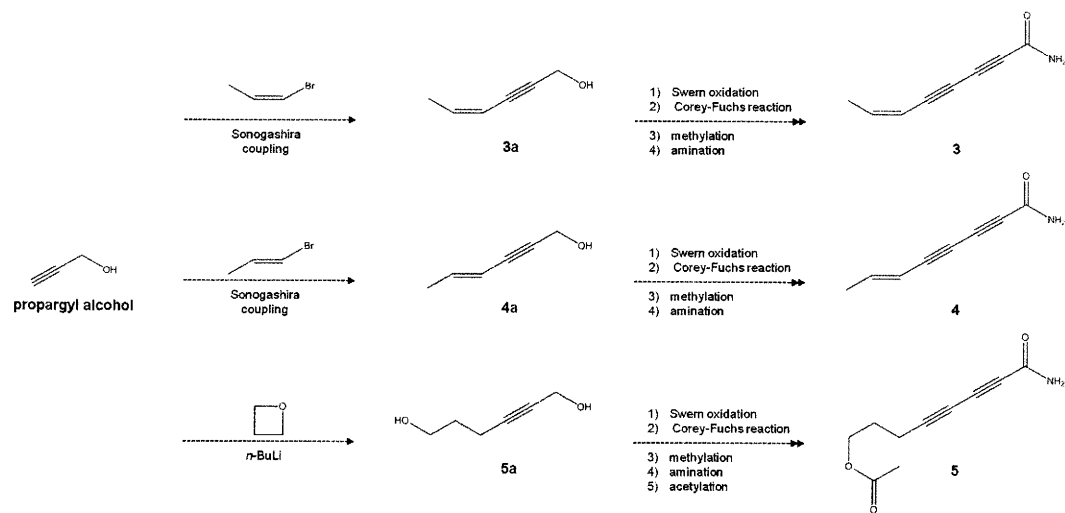


Fig. 80. Synthetic strategy of agrocybynes C-E.

## 第 5 節 考察

フミツキタケの培養ろ液から単離された agrocybynes A-E (1-5) の構造 - 活性相関について考察した。レタスに対する活性において、ジインの部分構造をもつ agrocybynes A (1), C (3), D (4) はインエンの部分構造をもつ agrocybyne B (2) よりも顕著な活性が確認された一方で agrocybyne E (5) には隠微な活性が確認されたことから、ジインまたはインエンの部分構造が活性強度と調節作用に関与し、末端の部分構造の空間的な大きさが活性に対する選択性に関与していることが示唆される (Fig. 81)。

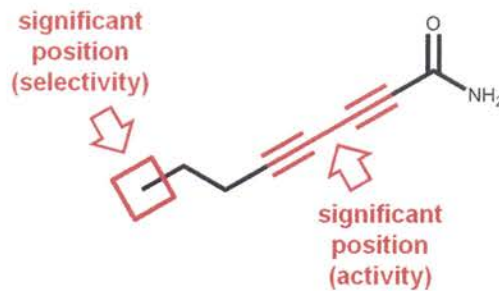
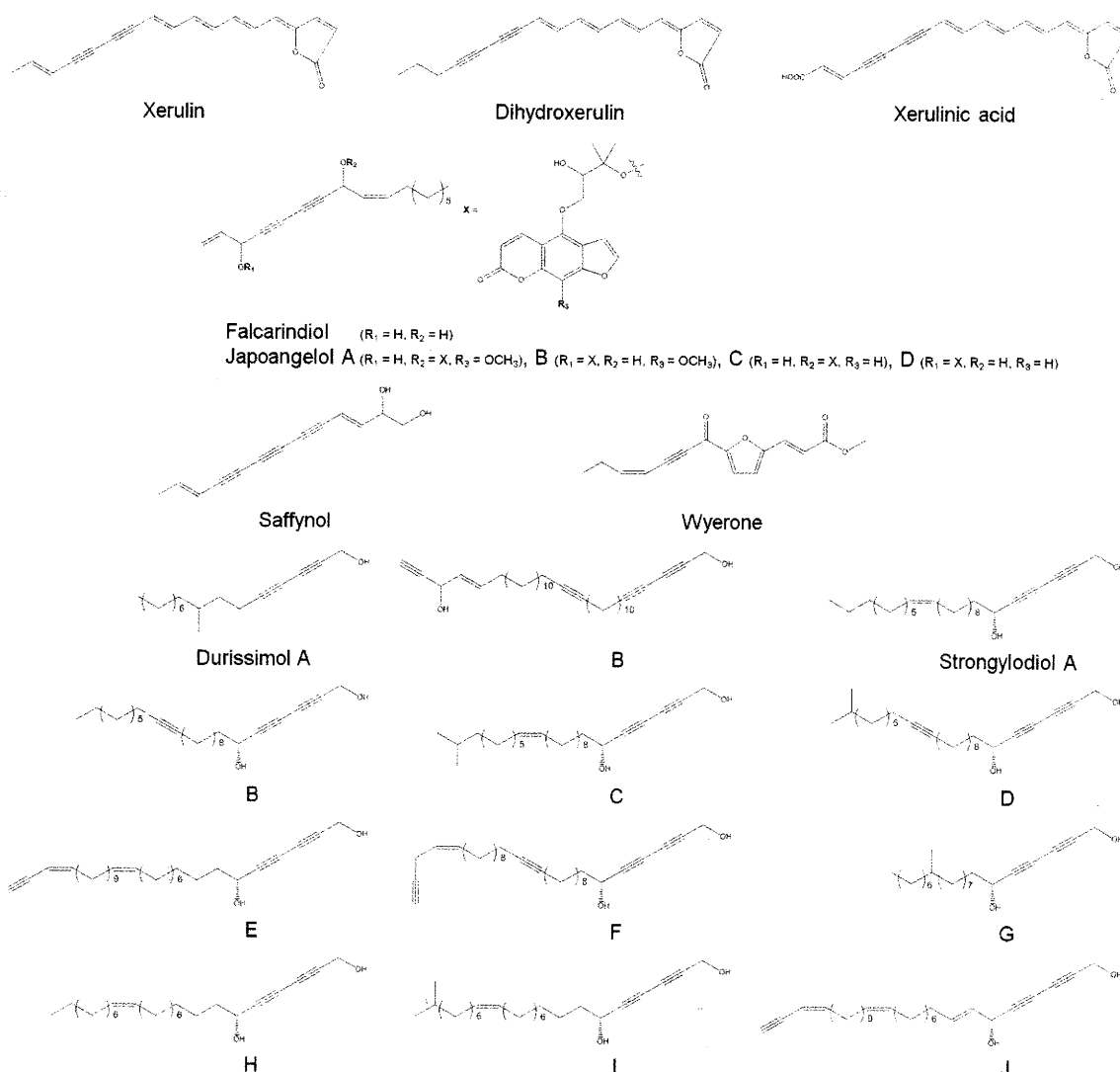


Fig. 81. Structure-activity relationship of agrocybynes toward lettuce.

イチゴに対しては、agrocybynes A-E (1-5) 全てに顕著な活性が確認され、さらに、長期間培養後には対照区も含めた全ての処理区にイチゴの植物体の枯死が確認されたことから、イチゴの体内または体外で agrocybyne 類が揮発性の物質に代謝されたことでイチゴの植物体の成長に影響を与えた可能性が示唆される。

Agrocybynes A-E (1-5) は polyacetylene 類に分類される化合物群である。Polyacetylene 類は天然物として、担子菌 (*Xerula melanotricha*) に由来する xerulin<sup>57</sup>, dihydroxerulin<sup>57</sup>, xerulinic acid<sup>57</sup>、ハマウド (*Angelica japonica*) に由来する falcarindiol<sup>58</sup>, japoangelols<sup>58</sup>、カイメン (*Petrosia (Strongylophora) Okinawa, Strongylophora durissima*) に由来する durissimols<sup>59</sup>, stron- glyodiols<sup>60, 61</sup> 等、約 2000 種類の化合物が単離されている (Fig. 82)<sup>62</sup>。また、生物活性として、xerulin, dihydroxerulin はヒト子宮頸腫瘍細胞 (Hela S3 cell) に対する細胞毒性<sup>57</sup>、falcarindiol および japoangelols A-D はヒト胃腫瘍細胞 (MK-1 cell) およびマウス皮膚腫瘍細胞 (B16F10 cell) に対する細胞毒性<sup>58, 63</sup>、durissimol B はヒト胃腫瘍細胞 (NUGC cell) に対する細胞毒性<sup>59</sup>、stronglydiols A-C はヒト白血病細胞 (MOLT-4) に対する細胞毒性<sup>60</sup> 等が報告されている。さらに、トマト (*Solanum lycopersicum*) やニンジン (*Daucus carota*) が産生する falcarindiol は葉カビ病菌 (*Cladosporium fulvum*) や灰色カビ病菌 (*B. cinerea*) に対する抗菌活性<sup>64, 65</sup>、ソラマメ (*Vicia faba*) が産生する saffynol は赤色斑点病菌 (*B. fabae*)

に対する抗菌活性<sup>66</sup>、ベニバナ (*Carthamus tinctorius*) が産生する wyerone はツルムラサキ疫病菌 (*Phytophthora drechsleri*)、褐色斑点病菌 (*Alternaria carthami*) に対する抗菌活性<sup>67-69</sup> が確認されており、これらの化合物は菌類と植物との相互作用に関与する phytoalexins として報告されている (Fig. 82)<sup>62</sup>。一方、イチゴが産生する (*E*)-hex-2-enal も灰色カビ病菌 (*B. cinerea*)、炭疽病菌 (*C. acutatum*) に対する抗菌活性が確認されており、さらに、病原菌に対する抵抗性を向上させる揮発性の物質として機能していることが報告されている<sup>23-25, 29</sup>。

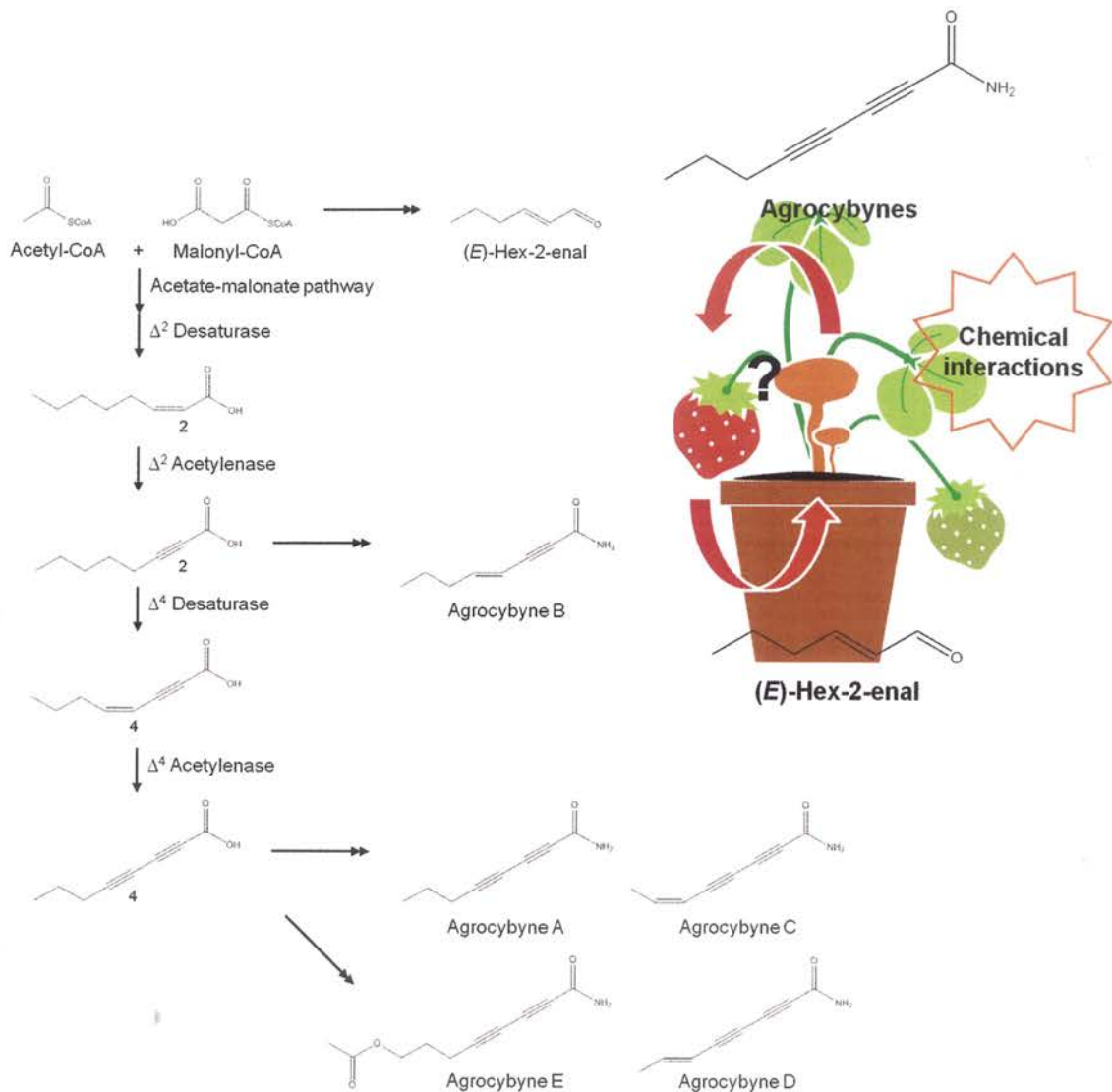


**Fig. 82. Chemical structures of polyacetylenes.**

Each compound has been isolated from natural source; xerulin, dihydroxerulin and xerulinic acid from the mushroom (fungus); falcarindiol, japoangelols, saffynol and wyerone from the vegetables (plants); durissimols and strongylodiols from the sponges (animals).

フミツキタケが産生する agrocybyne 類やイチゴが産生する (*E*)-hex-2-enal は酢酸 - マ

ロン酸経路によって生合成されることが予想され<sup>62, 70</sup>、agrocybyne 類や (*E*)-hex-2-enal がこの生合成経路を仲介することで互いの相互作用に重要な活性物質として機能あるいは代謝されていることが示唆される (Fig. 83)。



**Fig. 83. Hypothesis metabolic pathway of agrocybynes A-E and chemical interactions between the fungus (*A. praecox*) and the plant (strawberry).**

菌類と植物との相互作用をより化学的に解明することで、生化学的、生物有機化学的な基礎研究面と、農業的な応用面に対する貢献を期待できる。

## 第 3 章 実験部

### 第 1 節 使用機器および材料

#### 3-1-1 機器類

- NMR** : JMN-EX-270 FT NMR Spectrometer (JEOL)  
Lambda 500 FT NMR Spectrometer (JEOL)
- MS** : Accu TOF LC-plus JMS-T100LP Mass Spectrometer (JEOL)
- IR** : A-102 Diffraction Grating Infrared Spectrometer (JASCO)
- HPLC** : Column ; Senshu PAK AQ (Senshu scientific Co., Ltd.)  
COSMOSIL  $\pi$ NAP Waters (nacalai tesque)  
COSMOSIL 5PYE Waters (nacalai tesque)
- Pump ; PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump (JASCO)  
PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump (JASCO)  
L-2130 (HITACHI)
- Detector ; UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)  
875-UV Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)  
diode Array Detector L-2455(HITACHI)
- Recorder ; 807-IT Integrator (JASCO)
- Automatic sampler ; AS-2055 Plus Intelligent Sampler (JASCO)
- Software ; Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)  
ELITE(HITACHI)
- Interface ; LC-NeII/ADC (JASCO)
- Silica gel** : 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)
- TLC** : DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck Ltd.)  
DC-Alufolien RP-18 F<sub>254</sub> (Merck Ltd.)

### 3-1-2 材料

新潟県のビニールハウスより単離・同定されたフミツキタケの種菌 (*Agrocybe praecox* F450) を使用した。フミツキタケの単離・同定は新潟県森林研究所の松本則行によって行われた。植物成長調節活性試験には、レタスの種子 (*Lactuca sativa* L. cv. Great Lakes 366)、イネの種子 (*Oryza sativa*, 日本晴)、イチゴの幼苗 (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne, 紅ほっぺ) を使用した。

## 第 2 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の単離・精製

フミツキタケの種菌をポテトデキストロース液体培地 (20 L; 0.4% ポテト抽出物、2.0% デキストロース、Difco; 0.1% アクトコール、Takeda Chemical Industries Ltd.) を注入したジャーファメンター (30 L; Biott Co., Ltd.) に移植し、温度 25°C、回転数 100 rpm、バブリング 1 L/min の条件で 3 週間培養を行った。その後、遠心分離、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。菌糸体は凍結乾燥後破碎し、*n*-ヘキサン (1回)、酢酸エチル (3回)、エタノール (3回)、水 (3回) で順次浸漬抽出を行い、菌糸体 (495 g) から *n*-ヘキサン可溶部 (17.8 g)、酢酸エチル可溶部 (17.3 g)、エタノール可溶部 (15.7 g)、水可溶部 (48.1 g) を得た。培養ろ液は減圧濃縮後、酢酸エチル (4回)、*n*-ブタノール (4回) で順次分配抽出を行い、培養ろ液 (175 L) から酢酸エチル可溶部 (19.8 g)、*n*-ブタノール可溶部 (74.2 g)、水可溶部 (1.75 kg) を得た。

培養ろ液の酢酸エチル可溶部 (19.8 g) をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 250 g, 35  $\phi$   $\times$  520 mm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, EtOAc, EtOAc/MeOH 50:50, MeOH) により 12 画分に分画した。画分 3 (54.1 mg) は順相 HPLC (Senshu PAK AQ, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; *n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> 20:80) により 7 画分に分画し、さらに、画分 3-6 (8.0 mg) から逆相 HPLC (COSMOSIL  $\pi$ NAP Waters, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60) によって化合物 7 (2.3 mg) を単離した。画分 4 (348.6 mg) は順相 HPLC (Senshu PAK AQ, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; *n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> 20:80) により 9 画分に分画し、さらに、画分 4-5 (20.6 mg) から逆相 HPLC (COSMOSIL  $\pi$ NAP Waters, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60) によって化合物 1 (5.6 mg), 2 (6.7 mg), 3 (1.1 mg), 4 (2.2 mg), 6 (0.6 mg) をそれぞれ単離した。画分 5 (606.1 mg) は順相 HPLC (Senshu PAK AQ, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; *n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> 20:80) により 8 画分に分画し、さらに、画分 5-5 (52.9 mg), 5-6 (29.0 mg) は逆相 HPLC (COSMOSIL  $\pi$ NAP Waters, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60) によりそれぞれ 7 画分に分画した。さらに、画分 5-5-6 (1.3 mg), 5-6-6 (3.9 mg) から逆相 HPLC (COSMOSIL 5PYE Waters, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60) によって化合物 2 (0.6 mg, from fraction 5-5-6), 5 (3.5 mg, from fraction 5-6-6) をそれぞれ単離した。

**Agrocybyne A (1).** Colorless needle; mp 101-103°C; IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1652, 2244, 3136 cm<sup>-1</sup>; UV ( $\lambda_{\max}$ ): 200, 218, 233, 247, 261, 276 nm; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Fig. 11, 12 and Table 1; ESIMS *m/z* 158 [M+Na]<sup>+</sup>; HRESIMS *m/z* 158.0559 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NNaO, 158.0582).

**Agrocybyne B (2).** Colorless needle; mp 114-116°C; IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1652, 2197, 3136 cm<sup>-1</sup>; UV

( $\lambda_{\text{max}}$ ): 250 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 22, 23 and Table 2; ESIMS  $m/z$  160  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  160.0731  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NNaO}$ , 160.0738).

**Agrocybyne C (3).** White amorphous; mp 82-84°C; IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1611, 2216, 3160  $\text{cm}^{-1}$ ; UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 220, 271, 287, 306 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 32, 33 and Table 3; ESIMS  $m/z$  156  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  156.0415  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NNaO}$ , 156.0425).

**Agrocybyne D (4).** White amorphous; mp 86-88°C; IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1650, 2222, 3158  $\text{cm}^{-1}$ ; UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 218, 271, 287, 306 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 42, 43 and Table 4; ESIMS  $m/z$  156  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  156.0411  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NNaO}$ , 156.0425).

**Agrocybyne E (5).** White amorphous; mp 72-74°C; IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1613, 2243, 3178  $\text{cm}^{-1}$ ; UV ( $\lambda_{\text{max}}$ ): 200, 215, 232, 246, 260, 276 nm;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 52, 53 and Table 5; ESIMS  $m/z$  216  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  216.0608  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NNaO}_3$ , 216.0637).

**Compound 6.** Colorless oil; IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1627, 3287  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 62, 63 and Table 6; ESIMS  $m/z$  233  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  233.0410  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{NaO}_5$ , 233.0426).

***o*-Orsellinaldehyde (7).** Colorless oil; IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1626, 3245  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 72, 73 and Table 7; ESIMS  $m/z$  175  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ .



### 第 3 節 X 線結晶構造解析

化合物 1 は無色針状結晶として *n*-ヘキサン溶液から単離された。回折データは Saturn70 CCD detector を備え付けた RIGAKU AFC-8 diffractometer を使用した。ブラッグスポットの集積は HKL2000 program<sup>71</sup> を使用した。構造は SIR2004 program<sup>72</sup> を使用した直接法により解析を行い、SHELXL-97 program<sup>73</sup> を使用したフルマトリックス最小二乗法により精密化を行った。

**Crystal data.** C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>ON, *M*<sub>r</sub> = 133.15, triclinic *P*-1, *a* = 8.8879(17), *b* = 9.2843(19), *c* = 10.594(2) Å,  $\alpha$  = 115.980(10),  $\beta$  = 95.452(8),  $\gamma$  = 92.299(6)°, *V* = 779.1(3) Å<sup>3</sup>; *D*<sub>x</sub> = 1.135 Mg m<sup>-3</sup>; *Z* = 4;  $\mu$ (Mo *K*α) = 0.076 mm<sup>-1</sup>, *T* = 90 K.

## 第 4 節 植物成長調節活性試験

### 3-4-1 レタスに対する植物成長調節活性試験

ガラス製のシャーレ (60  $\phi$  × 20 mm) を使用し、1 mL の蒸留水を浸透させたろ紙 (Advantec No. 2, 55  $\phi$ ) にレタスの種子を播種した。25°C、暗所の条件で 1 日間前培養を行った。対照区は  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  または MeOH をろ紙に浸透させ、試験区は  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  または MeOH で濃度調整した各種サンプルをろ紙に浸透させた。自然乾燥をさせた後、1 mL の蒸留水をろ紙に浸透させ、発芽したレタスを移植した。25°C、暗所の条件で 3 日間本培養を行った。培養後、レタスの形態の変化を観察するとともに、レタスの胚軸と根の伸長を測定した。

### 3-4-2 イネに対する植物成長調節活性試験

イネの種子を脱穀し、70% エタノールで 3 分間、2.5% 次亜塩素酸ナトリウムで 15 分間を 2 回繰り返して滅菌し、滅菌水で洗浄した。その後、プラスチック製の滅菌シャーレ (85  $\phi$  × 10 mm) を使用し、20 mL の滅菌水を注入して、イネの種子を播種した。28°C、暗所の条件で 3 日間前培養を行った。アグリポット (80  $\phi$  × 115 mm) を使用し、0.4 g の粉末寒天、50 mL のイネ専用液体培地 (0.40%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.47%  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.26%  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , 0.22%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.61%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.095% Fe-EDTA, 0.15%  $\text{H}_2\text{BO}_3$ , 0.010%  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 3.75 ppm  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 10.0 ppm  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.2 ppm  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) を加えて滅菌後、対照区は 50  $\mu\text{L}$  のエタノールを培地に加え、試験区は 50  $\mu\text{L}$  のエタノールで濃度調整した各種サンプルを培地に加えた。寒天培地を作成した後、発芽したイネを移植した。28°C、暗所、6 時間 / 28°C、明所、18 時間の条件で 1 週間本培養を行った。培養後、イネの形態の変化を観察するとともに、イネの地上部と根の伸長を測定した。

### 3-4-3 イチゴに対する植物成長調節活性試験

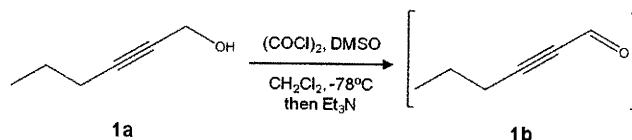
プラスチック製のカップ (250 mL) を使用し、滅菌をした園芸用土 (250 mL) にイチゴの幼苗を移植した。18°C、暗所、12 時間 / 25°C、明所、12 時間の条件で 1 日間前培養を行った。対照区は 250  $\mu\text{L}$  の DMSO を園芸用土に浸透させ、試験区は 250  $\mu\text{L}$  の DMSO で濃度調整した各種サンプルを園芸用土に浸透させた。18°C、暗所、12 時間 / 25°C、明所、12 時間の条件で 1 週間本培養を行った。培養後、イチゴの形態の変化を観察した。

## 第 5 節 フミツキタケ由来の植物成長調節物質の合成

### 3-5-1 Agrocybyne A の合成

#### Step 1: Swern 酸化

-78°C 条件下、28 mL のジクロロメタン (無水) に  $(\text{COCl})_2$  (3.51 g, 27.6 mmol) を加えた後、4.0 mL の DMSO (無水) (4.40 g, 56.4 mmol) を -60°C を越えない様にゆっくり滴下した。-60°C で 30 分間攪拌した後、再び -78°C にした。さらに、38 mL のジクロロメタン (無水) で溶解した 2-hexyn-1-ol (**1a**) (1.80 g, 18.4 mmol) を -50°C を越えない様にゆっくり滴下した。-50°C で 1 時間攪拌した後、5.0 mL のジクロロメタン (無水) で溶解した  $\text{Et}_3\text{N}$  (13.7 g, 135 mmol) を -40°C を越えない様にゆっくり滴下した。-50°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌した後、低温で減圧濃縮し、hex-2-ynal (**1b**) を得た (Scheme 1)。

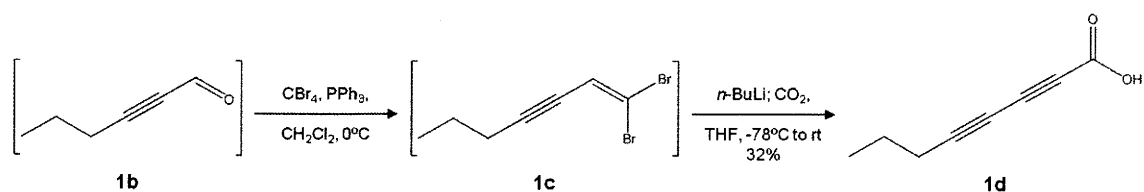


Scheme 1. Swern oxidation of hex-2-ynal (**1b**).

#### Step 2: Corey-Fuchs 反応

0°C 条件下、100 mL のジクロロメタン (無水) に  $\text{CBr}_4$  (12.2 g, 36.8 mmol)、 $\text{PPh}_3$  (19.3 g, 73.6 mmol) を順に加えて 15 分間攪拌した後、50 mL のジクロロメタン (無水) で溶解した hex-2-ynal (**1b**) をゆっくり滴下した。0°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌した後、50 mL の水を加えて反応を停止させた。水 (3回)、飽和食塩水 (3回) の順で有機相を分液・洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 50 g, 50  $\phi$  × 50 mm; *n*-hexane) により (1,1-dibromohept-1-en-3-yne) (**1c**) を精製した。さらに、-78°C 条件下、150 mL のテトラヒドロフラン (無水) に 1,1-dibromohept-1-en-3-yne (**1c**) を加えて 10 分間攪拌した後、14.2 mL の *n*-BuLi (2.36 g, 36.8 mmol in *n*-hexane) をゆっくり滴下した。-78°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌し、さらに 100 g のドライアイスを加えて 4 時間攪拌した後、50 mL の水を加えて反応を停止させた。1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて酢酸エチル (3回) で水相を分液・洗浄し、さらに 1 N 塩酸水溶液を加えてジクロロメタン (3回) で分液・抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、octa-2,4-dienoic acid (**1d**) (790.2 mg, 5.81 mmol,

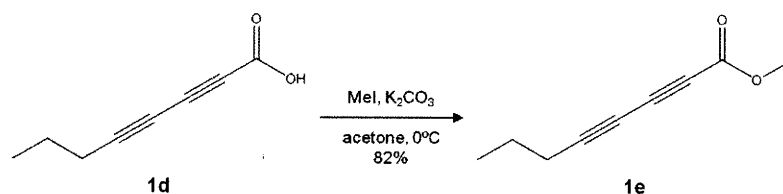
orange oil, 32%) を得た (Scheme 2)。



**Scheme 2. Corey-Fuchs reaction of octa-2,4-diynoic acid (1d).**

### Step 3: メチルエステル化

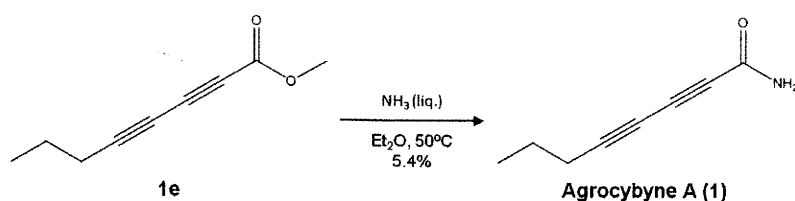
0°C 条件下、60 mL のアセトンに octa-2,4-diynoic acid (790.2 mg, 5.81 mmol) (1d)、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.41 g, 17.4 mmol)、MeI (4.13 g, 29.1 mmol) を順に加えて攪拌した。0°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌した後、低温で減圧濃縮した。酢酸エチルで溶解し、水 (3回)、飽和食塩水 (3回) の順で有機相を分液・洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、methyl octa-2,4-diynoate (1e) (718.4 mg, 4.79 mmol, yellow oil, 82%) を得た (Scheme 3)。



**Scheme 3. Methylation of methyl octa-2,4-diynoate (1e).**

### Step 4: アミド化

50°C 条件下、10 mL のジエチルエーテルで溶解した methyl octa-2,4-diynoate (718.4 mg, 4.79 mmol) (1e) に 10 mL の 25% アンモニア水溶液を加えて攪拌した。1 日間攪拌した後、凍結乾燥し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 125 g, 40 φ × 200 mm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 40:60) により agrocybyne A (1) (38.6 mg, 286 μmol, white amorphous, 5.4%) を得た (Scheme 4)。



**Scheme 4. Amination of agrocybyne A (1).**

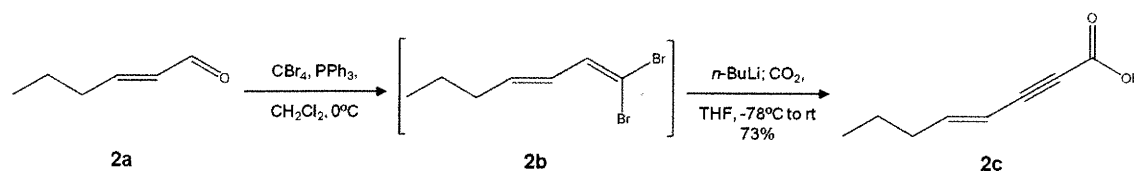
**Agrocybyne A.** IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1652, 2245, 3146  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.99 (3H, t, 7.2, H8), 1.58 (2H, m, H7), 2.30 (2H, t, 7.2, H6);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 13.5 (C8), 21.4 (C7)<sup>a</sup>, 21.5 (C6)<sup>a</sup>, 63.8 (C4)<sup>b</sup>, 67.2 (C2)<sup>b</sup>, 71.8 (C3)<sup>b</sup>, 87.4 (C5), 154.2 (C1); HRESIMS  $m/z$  158.0560  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NNaO}$ , 158.0582).

<sup>a, b</sup> Interchangeable between the same letter.

## 2-5-2 Agrocybyne B の合成

### Step 1: Corey-Fuchs 反応

0°C 条件下、100 mL のジクロロメタン (無水) に  $\text{CBr}_4$  (13.3 g, 40.0 mmol)、 $\text{PPh}_3$  (21.0 g, 80.0 mmol) を順に加えて 15 分間攪拌した後、50 mL のジクロロメタン (無水) で溶解した (*E*)-hex-2-enal (**2a**) (2.0 g, 20.0 mmol) をゆっくり滴下した。0°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌した後、50 mL の水を加えて反応を停止させた。水 (3回)、飽和食塩水 (3回) の順で有機相を分液・洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 50 g, 50  $\phi$  × 50 mm; *n*-hexane) により (*E*)-1,1-dibromohepta-1,3-diene (**2b**) を精製した。さらに、-78°C 条件下、150 mL のテトラヒドロフラン (無水) に (*E*)-1,1-dibromohepta-1,3-diene (**2b**) を加えて 10 分間攪拌した後、16.6 mL の *n*-BuLi (2.56 g, 40 mmol in *n*-hexane) をゆっくり滴下した。-78°C からゆっくり室温に上げて 1 日間攪拌し、さらに 100 g のドライアイスを加えて 4 時間攪拌した後、50 mL の水を加えて反応を停止させた。1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて酢酸エチル (3回) で水相を分液・洗浄し、さらに 1 N 塩酸水溶液を加えてジクロロメタン (3回) で分液・抽出した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、(*E*)-oct-4-en-2-ynoic acid (**2c**) (2.0 g, 14.5 mmol, orange oil, 73%) を得た (Scheme 5)。

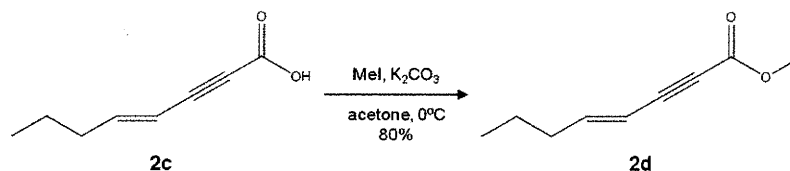


**Scheme 5. Corey-Fuchs reaction of (*E*)-oct-4-en-2-ynoic acid (**2c**).**

### Step 2: メチルエステル化

0°C 条件下、60 mL のアセトンに (*E*)-oct-4-en-2-ynoic acid (2.0 g, 14.5 mmol) (**2b**)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$  (6.0 g, 43.5 mmol)、MeI (10.3 g, 72.5 mmol) を順に加えて攪拌した。0°C からゆっくり室温に

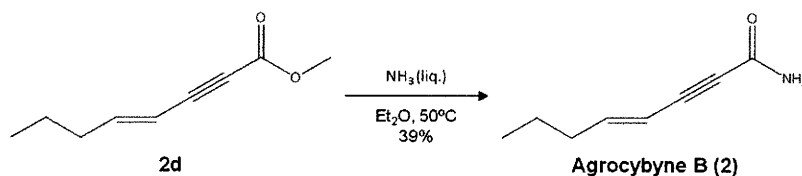
上げて 1 日間攪拌した後、低温で減圧濃縮した。酢酸エチルで溶解し、水 (3回)、飽和食塩水 (3回) の順で有機相を分液・洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥させ、低温で減圧濃縮し、(*E*)-methyl oct-4-en-2-ynoate (**2d**) (1.76 g, 11.6 mmol, yellow oil, 80%) を得た (Scheme 6)。



**Scheme 6. Methylation of (*E*)-methyl oct-4-en-2-ynoate (**2d**).**

### Step 3: アミド化

50°C 条件下、10 mL のジエチルエーテルで溶解した (*E*)-methyl oct-4-en-2-ynoate (1.77 g, 11.6 mmol) (**2d**) に 10 mL の 25% アンモニア水溶液を加えて攪拌した。1 日間攪拌した後、凍結乾燥し、シリカゲルのカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 125 g, 40 φ×200 mm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 40:60) により agrocybyne B (**2**) (617.2 mg, 4.51 mmol, white amorphous, 39%) を得た (Scheme 7)。



**Scheme 7. Amination of agrocybyne B (**2**).**

**Agrocybyne B.** IR (neat,  $\nu_{\text{max}}$ ): 1658, 2197, 3166  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (3H, t, 7.2, H8), 1.41 (2H, m, H7), 2.10 (2H, m, H6), 5.51 (1H, d, 16.1, H4), 6.40 (1H, ddd, 16.0, 7.2, 7.2, H5);  $^{13}\text{C}$  NMR (CDCl<sub>3</sub>): 13.6 (C8), 21.6 (C7), 35.4 (C6), 81.2 (C2), 85.5 (C3), 107.4 (C4), 151.2 (C5), 155.8 (C1); HRESIMS  $m/z$  160.0768 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>NNaO, 160.0738).

## 第 2 部

コフキササルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に  
由来する抗口腔内細菌活性物質の探索



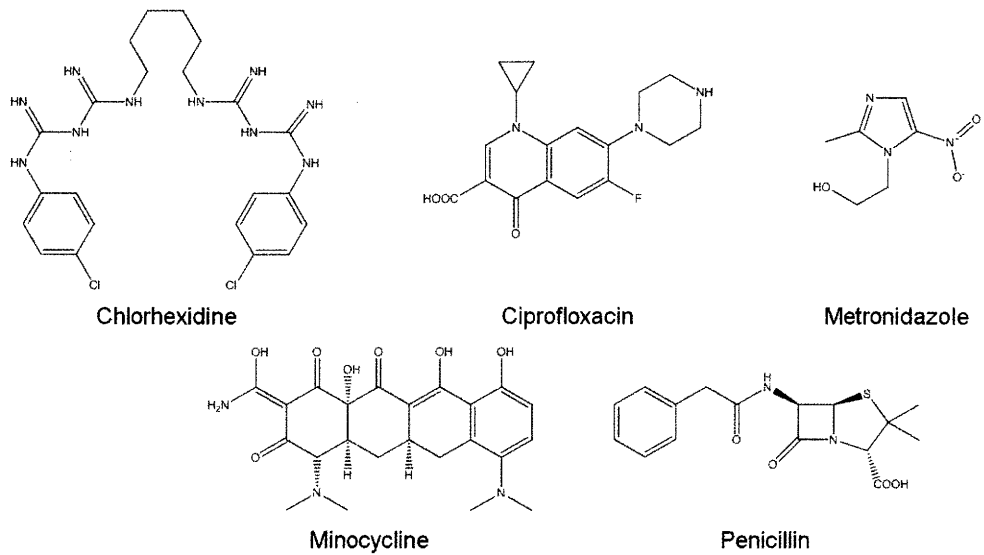
## 第 1 章 緒論

現在、高齢化社会の進行に伴い、人々の健康に対する関心が高まっている。なかでも食生活は高齢化社会における人々の QOL (quality of life) を支える重要な要素であり、そのためには歯や口腔内の健康の維持が必要である。う蝕や歯周病といった慢性変性歯科疾患は感染病原因子 (口腔内細菌)、宿主因子 (生体防御機構)、環境因子 (生活習慣) 等の相互作用が原因とされており、特に、口腔内細菌によって引き起こされる疾病は広範囲にわたって人々に存在するため、公衆衛生上において重要な問題である<sup>1</sup>。ヒトの口腔内には 400 種もの菌種、100 億を越す数の細菌が生息しており、これらの細菌は舌背、歯表面、歯肉溝等でバイオフィームやデンタルプラーク (歯垢) が形成される。その中で歯周病の原因とされる代表的な病原菌は *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. intermedia*, *Actinobacillus actionmycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis* 等であり、これらの病原菌によって全身性疾患にまで発展する危険性もある<sup>2,3</sup>。特に、グラム陰性偏性嫌気性菌である *F. nucleatum* は歯周病の主要な病原菌であり<sup>4,5</sup>、世界人口の 5-15% のヒトに疾病を引き起こしている<sup>6</sup>。*F. nucleatum* には口腔内のバイオフィームの中で他の菌種と凝集体を形成する能力をもち、この作用によって慢性変性歯科疾患が発症または促進される<sup>4,7-10</sup>。従って、*F. nucleatum* の生育を抑制させることは慢性変性歯科疾患の予防または治療することにおいて効果的である。

歯周病の予防・治療として、デンタルプラークの除去や抗菌薬の投与による口腔内細菌の除去が主に一般的に行われている。抗菌薬による治療法において、バイオフィームを形成した細菌の抵抗性は遊離する細菌のそれと比較して 1000-1500 倍高いと言われており<sup>11</sup>、抗菌薬のみの投与では病原菌を死滅させることは困難であるとされている。しかし、バイオフィームを破壊した部位に抗菌薬を投与する等、物理的治療法と化学的治療法を併用することで効果的な治療ができると期待されている。近年、抗菌薬を併用した歯周病の治療に関する様々な研究がなされており、抗菌薬の有効性も報告されている<sup>12</sup>。一方、抗菌薬として chlorhexidine や ciprofloxacin, metronidazole, minocycline, penicillins 等の使用が試みられているが、副作用が強いことや、耐性菌の存在も確認されており、長期間にわたる使用は困難とされている (Fig. 1)<sup>13-15</sup>。従って、疾病の予防には病原菌の生育を抑制し、口腔内の環境を正常に維持することが重要である。そのため、病原菌の殺菌・制菌に有効な物質の探索と開発は、慢性変性歯科疾患とそれに起因する全身性疾患の予防と治療に大いに役立つ可能性がある。

そこで、慢性変性歯科疾患に関与する様々な病原菌に対して抗口腔内細菌活性のスクリ





**Fig. 1. Chemical structures of antibiotic drugs.**

ーニングを行ったところ、コフキササルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に由来する抽出物に *F. nucleatum* に対する抗細菌活性が確認された。

コフキササルノコシカケは世界中に生息している薬用のキノコである。このキノコは森林中の樹木を腐らせる木材腐朽菌である。主に漢方薬や健康食品として利用されており、抗腫瘍活性物質として  $\beta$ -glucan を含有していることが報告されている<sup>16,17</sup>。このような薬理活性の高さから、口腔内の抗細菌作用だけでなく、その環境を正常に維持する調節作用も期待される。以上より、本研究では、コフキササルノコシカケに由来する抗口腔内細菌活性物質の単離・精製および構造解析を目的とした。

## 第 2 章 本論

### 第 1 節 コフキサルノコシカケ由来の抗口腔内細菌活性物質の単離・精製

コフキサルノコシカケの種菌をポテトデキストロース液体培地に移植して 4 週間培養を行った。その後、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。菌糸体は凍結乾燥後破碎し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次浸漬抽出を行い、*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、エタノール可溶部、水可溶部を得た。培養ろ液は減圧濃縮後、*n*-ヘキサン、酢酸エチル、エタノール、水で順次浸漬抽出を行い、*n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部、エタノール可溶部、水可溶部を得た。得られた各画分について抗口腔内細菌活性試験を行ったところ、培養ろ液の *n*-ヘキサン可溶部、酢酸エチル可溶部に顕著な *F. nucleatum* に対する抗細菌活性が確認された (Table 1)。

**Table 1. Antibiotic effect of the each fraction from *G. applanatum* on the growth of *F. nucleatum*.**

		MIC (ppm) <sup>a</sup>			
Fraction	<i>n</i> -hexane	EtOAc	EtOH	H <sub>2</sub> O	
(mycelia)	400	25 <sup>b</sup>	-	-	
Fraction	<i>n</i> -hexane	EtOAc	EtOH	H <sub>2</sub> O	
(culture broth)	< 3.1	< 6.3	-	-	
Positive control	Thymol				
	200				

<sup>a</sup> Minimum inhibitory concentration.

<sup>b</sup> Growth suppression.

そこで、この活性試験の結果を指標にしながら各種クロマトグラフィーによる分画を行った。培養ろ液の酢酸エチル可溶部をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより 13 画分に分画した。画分 8 は ODS ゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより 50% MeOH 溶出部と MeOH 溶出部の 2 画分に分画し、さらに、画分 8-1 は逆相 HPLC により 12 画分に分画した。さらに、画分 8-1-8 から逆相 HPLC によって化合物 6 を単離した。画分 9 はシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィーにより 15 画分に分画し、さらに、画分 9-2, 9-3, 9-4 から逆相 HPLC によって化合物 1-4 をそれぞれ単離した。また、画分 9-5 は逆相 HPLC により 9 画分に分画し、さらに、画分 9-5-4 から逆

相 HPLC によって化合物 5 を単離した (Fig. 2)。

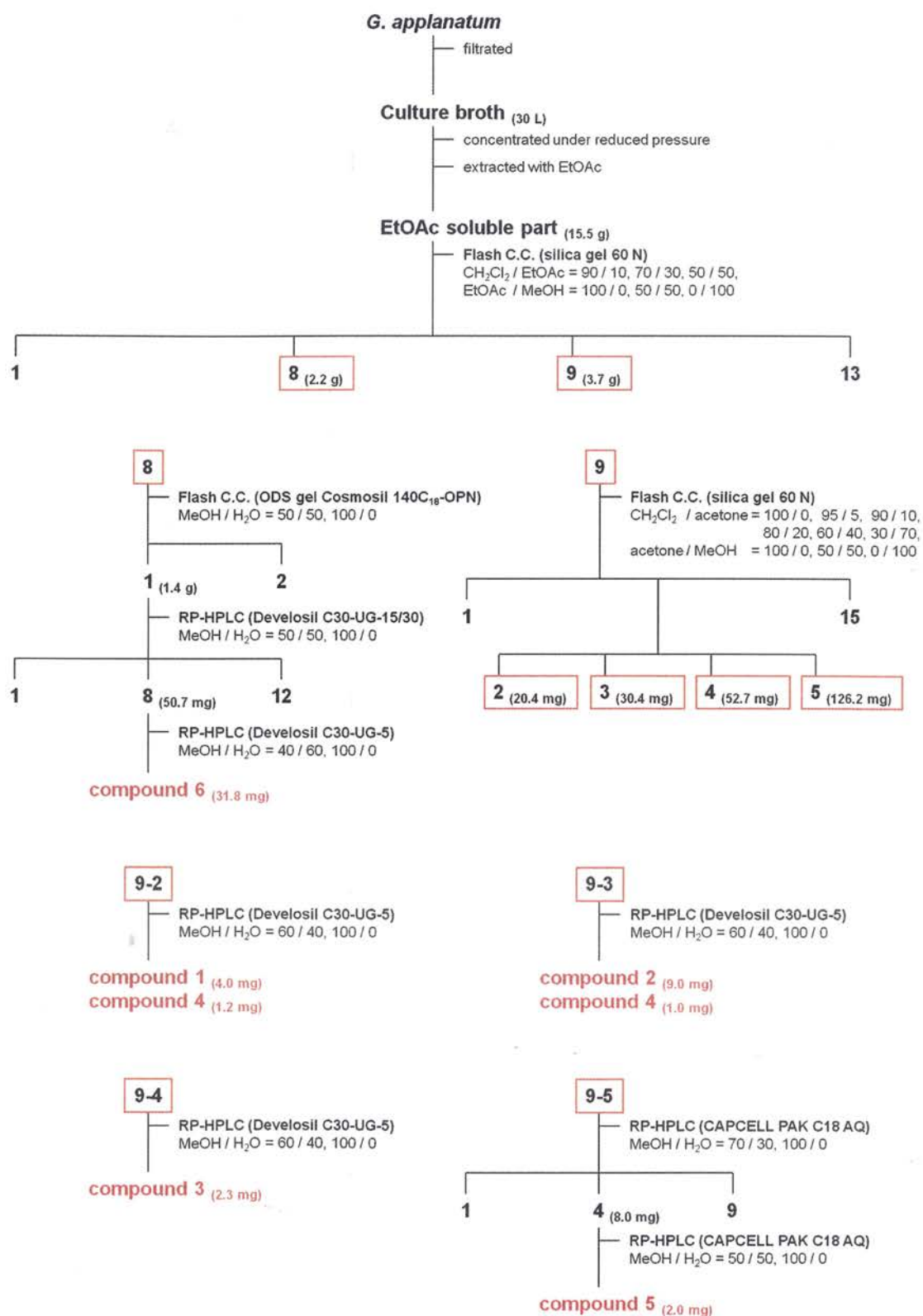


Fig. 2. Purification procedure of culture broth of *G. applanatum*.

## 第 2 節 コフキサノコシカケ由来の抗口腔内細菌活性物質の構造解析

コフキサノコシカケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離した各化合物について、各種機器分析による構造解析を行った。

### 2-2-1 化合物 1 の構造解析

化合物 1 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  301.1761  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{17}H_{26}NaO_3$ , 301.1780) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{17}H_{26}O_3$  と決定した (Fig. 4)。IR において  $3460\text{ cm}^{-1}$  (OH) に吸収ピークが観測された (Fig. 5)。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HMQC により、メチルが 5 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 6 つ存在することが明らかになった (Fig. 6-9, Table 2)。化学シフトの値 ( $\delta_c$  125.1, 133.7, 134.7, 135.3, 138.5, 140.8) により、ベンゼン骨格を部分構造にもつことが示唆された (Table 2)。COSY の相関 ( $H1'/H2'$ )、HMBC の相関 ( $H1'/C2'$ ;  $H2'/C1'$ ,  $C2'-OCH_3$ ;  $C2'-OCH_3/C2'$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.36, 3.42;  $\delta_c$  58.6, 71.4) により、メトキシエチルの部分構造を決定し、HMBC の相関 ( $C4-CH_3/C3a$ ,  $C4$ ,  $C5$ ;  $C6-CH_3/C5$ ,  $C6$ ,  $C7$ ;  $H7/C5$ ,  $C6-CH_3$ ;  $H1'/C4$ ,  $C5$ ,  $C6$ ) により、メトキシエチルと 2 つのメチルがベンゼン骨格に接続することを解明した (Fig. 3, 10, 11, Table 2)。さらに、HMBC の相関 ( $H1/C1-OCH_3$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3$ ,  $C3a$ ,  $C7$ ;  $C1-OCH_3/C1$ ;  $C2-CH_3/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3$ ;  $C2-CH_2OH/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C3$ ;  $H3/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3a$ ,  $C4$ ,  $C7a$ ;  $H7/C1$ ,  $C3a$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.42, 3.63, 3.76;  $\delta_c$  57.2, 68.2) により、(2-メトキシ-1-メチルシクロペンチル)メタノールの部分構造を決定し、NOE の相関 ( $H1/C2-CH_3$ ) により相対立体配置を決定した (Fig. 3, 11, 12, Table 2)。以上により、化合物 1 を ((1*S*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol と決定した。化合物 1 は新規化合物であり、applanatine A と命名した (Fig. 13)。

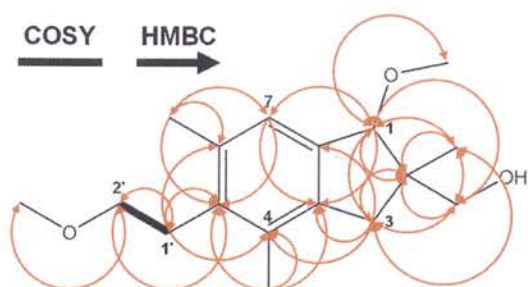


Fig. 3. COSY and HMBC correlations in 1.

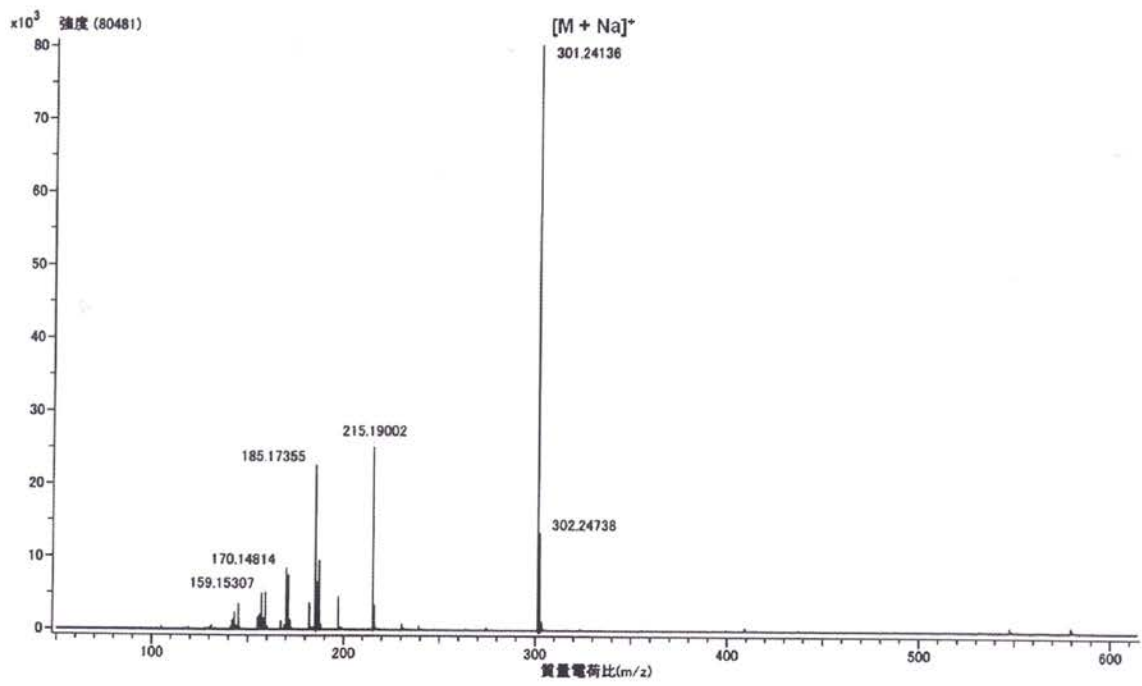


Fig. 4. ESIMS (+) spectrum of 1.

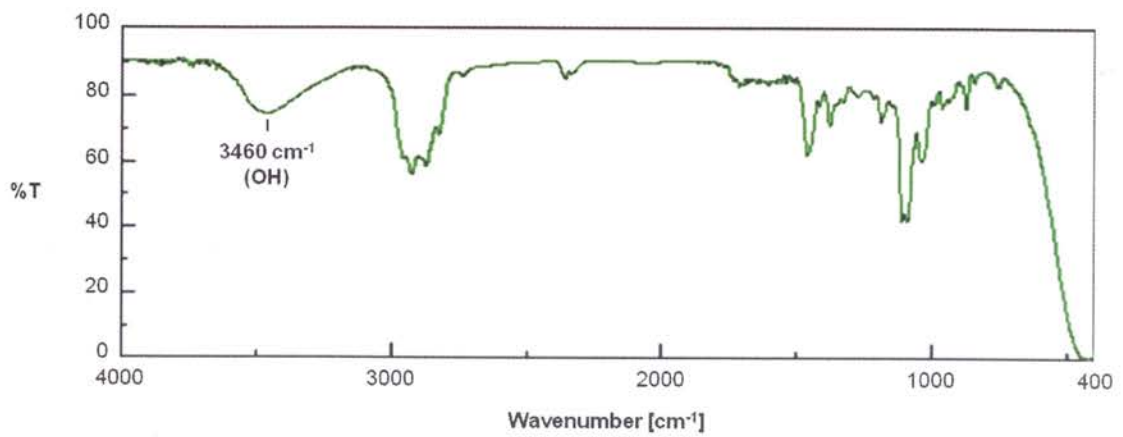


Fig. 5. IR spectrum of 1.

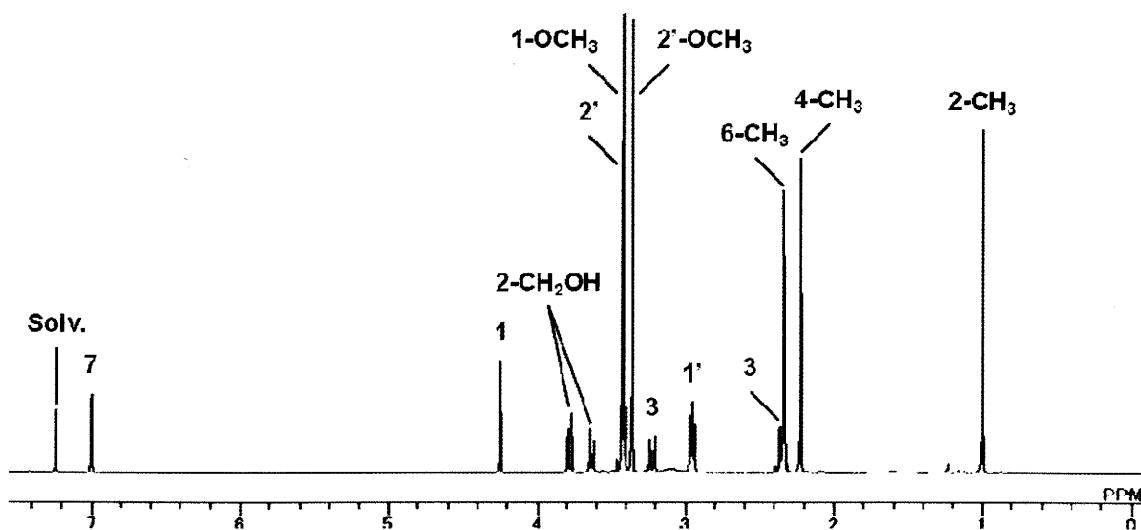


Fig. 6.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

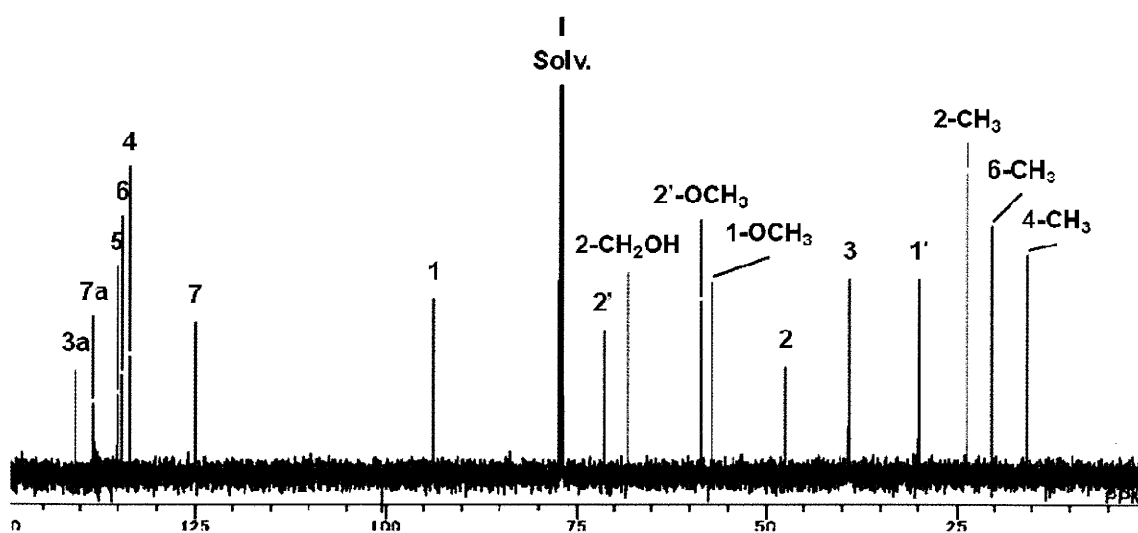


Fig. 7.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

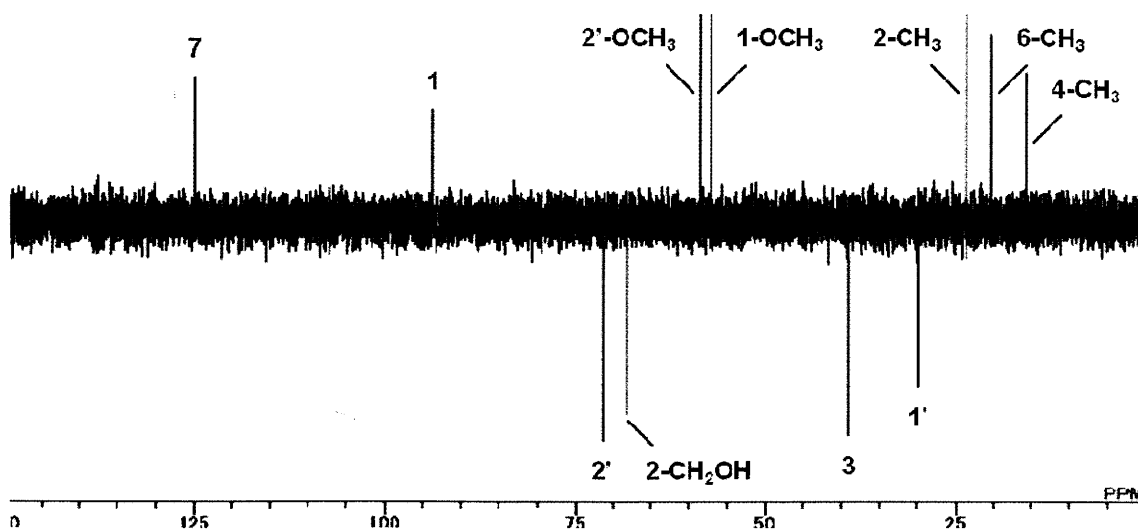


Fig. 8. DEPT spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

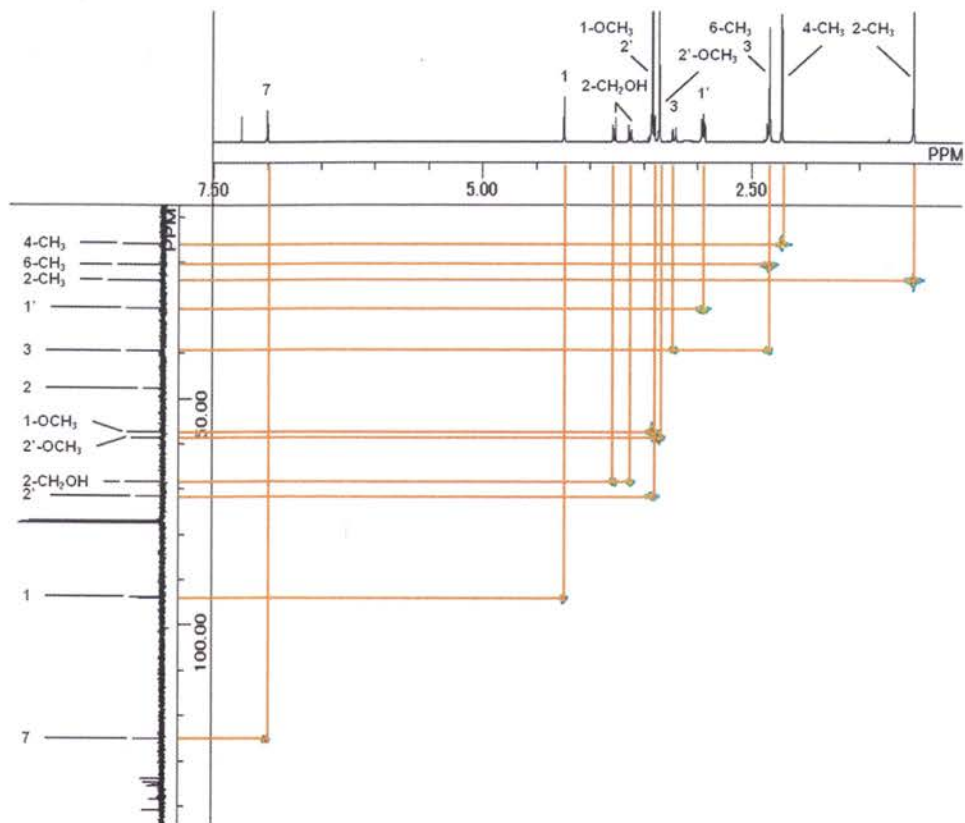


Fig. 9. HMBC spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

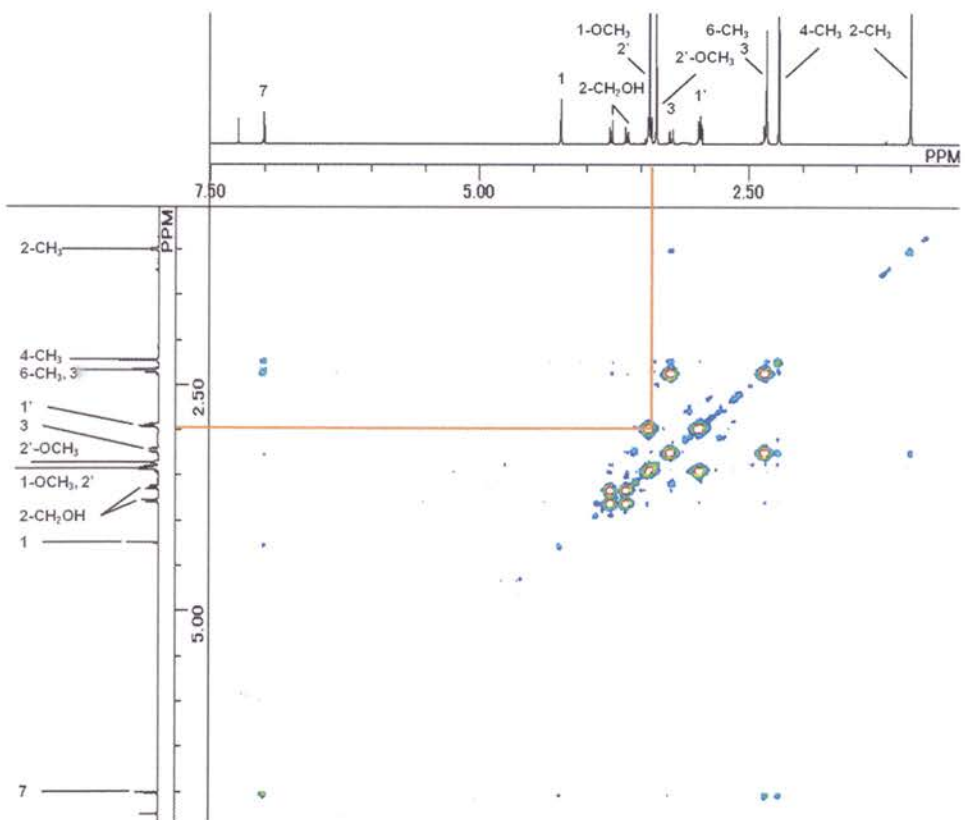


Fig. 10. COSY spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

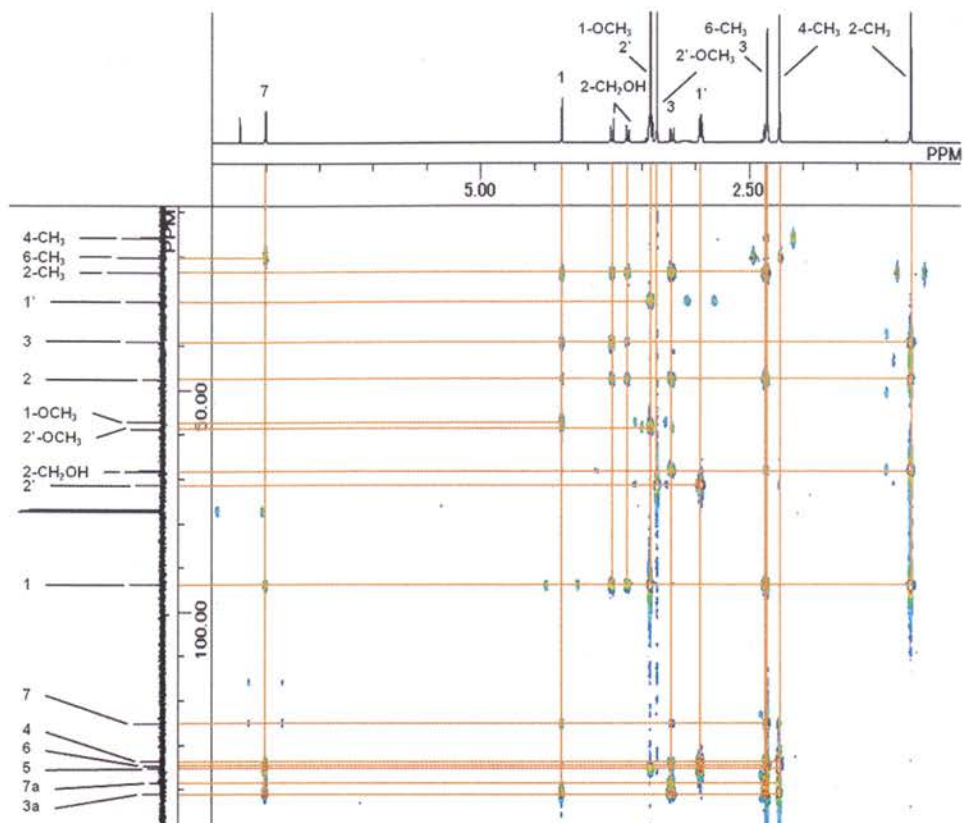


Fig. 11. HMBC spectrum of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

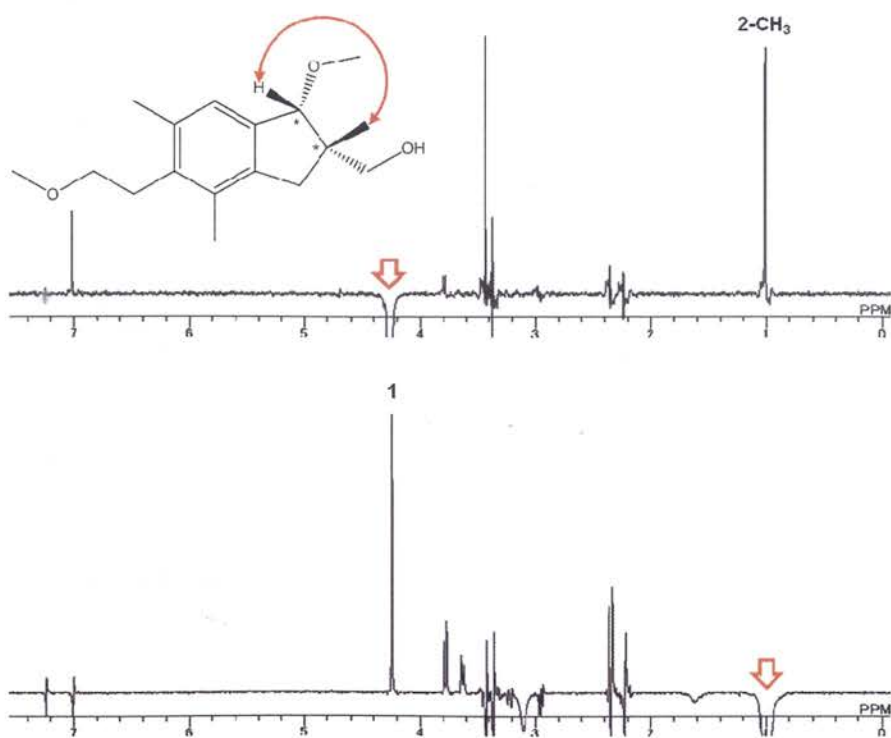
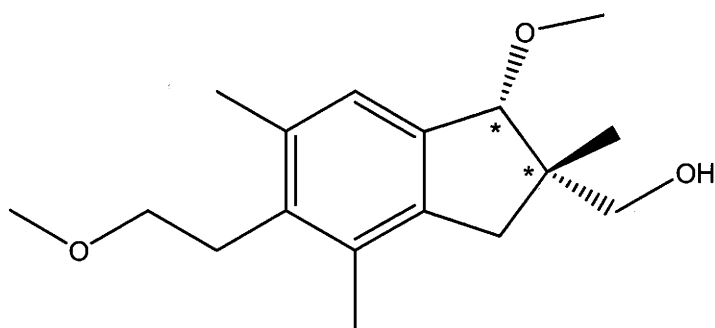


Fig. 12. NOE difference experiment of 1 (in  $\text{CDCl}_3$ ).



**Table 2.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **1** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1	4.25 (s)	93.8	2, 3, 3a, 7, 1-OCH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>2</sub> OH
2		47.6	
3	2.34 (d, 15.9) 3.22 (d, 15.9)	39.2	1, 2, 3a, 4, 7a, 2-CH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>2</sub> OH
3a		140.8	
4		133.7	
5		135.3	
6		134.7	
7	7.00 (s)	125.1	1, 3a, 5, 6-CH <sub>3</sub>
7a		138.5	
1-OCH <sub>3</sub>	3.42 (s)	57.2	1
2-CH <sub>3</sub>	1.00 (s)	23.7	1, 2, 3, 2-CH <sub>2</sub> OH
2-CH <sub>2</sub> OH	3.63 (d, 11.6) 3.76 (d, 11.6)	68.2	1, 2, 3, 2-CH <sub>3</sub>
4-CH <sub>3</sub>	2.22 (s)	15.8	3a, 4, 5
6-CH <sub>3</sub>	2.34 (s)	20.4	5, 6, 7
1'	2.95 (t, 7.9)	30.1	4, 5, 6, 2'
2'	3.42 (t, 7.9)	71.4	5, 1', 2'-OCH <sub>3</sub>
2'-OCH <sub>3</sub>	3.36 (s)	58.6	2'



**Fig. 13.** Applanatine A (**1**).

## 2-2-2 化合物 2 の構造解析

化合物 2 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  301.1763  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{17}H_{26}NaO_3$ , 301.1780) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{17}H_{26}O_3$  と決定した (Fig. 15)。IR において  $3457\text{ cm}^{-1}$  (OH) に吸収ピークが観測された (Fig. 16)。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HMQC により、メチルが 5 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 6 つ存在することが明らかになった (Fig. 17-20, Table 3)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 2 は化合物 1 のジアステレオマーであることが示唆された。化学シフトの値 ( $\delta_C$  124.6, 133.0, 134.6, 135.1, 138.6, 139.9) により、ベンゼン骨格を部分構造にもつことが示唆された (Table 3)。COSY の相関 ( $H1'/H2'$ )、HMBC の相関 ( $H1'/C2'$ ;  $H2'/C1'$ ,  $C2'-OCH_3$ ;  $C2'-OCH_3/C2'$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.35, 3.40;  $\delta_C$  58.6, 71.4) により、メトキシエチルの部分構造を決定し、HMBC の相関 ( $C4-CH_3/C3a$ ,  $C4$ ,  $C5$ ;  $C6-CH_3/C5$ ,  $C6$ ,  $C7$ ;  $H7/C5$ ,  $C6-CH_3$ ;  $H1'/C4$ ,  $C5$ ,  $C6$ ) により、メトキシエチルと 2 つのメチルがベンゼン骨格に接続することを解明した (Fig. 14, 21, 22, Table 3)。さらに、HMBC の相関 ( $H1/C1-OCH_3$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3$ ,  $C3a$ ,  $C7$ ;  $C1-OCH_3/C1$ ;  $C2-CH_3/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3$ ;  $C2-CH_2OH/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C3$ ;  $H3/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3$ ,  $C2-CH_2OH$ ,  $C3a$ ;  $H7/C1$ ,  $C3a$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.47, 3.49, 3.50;  $\delta_C$  58.4, 69.8) により、(2-メトキシ-1-メチルシクロペンチル)メタノールの部分構造を決定し、NOE の相関 ( $C1-OCH_3/C2-CH_3$ ) により相対立体配置を決定した (Fig. 14, 22, 23, Table 3)。以上により、化合物 2 を ((1*R*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol と決定した。化合物 2 は新規化合物であり、applanatine B と命名した (Fig. 24)。

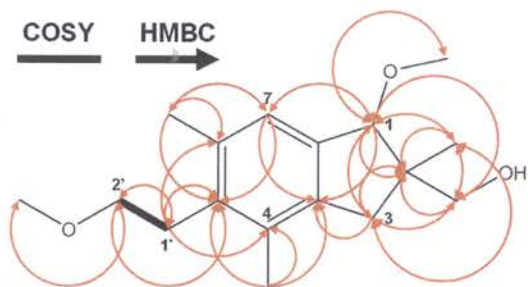


Fig. 14. COSY and HMBC correlations in 2.

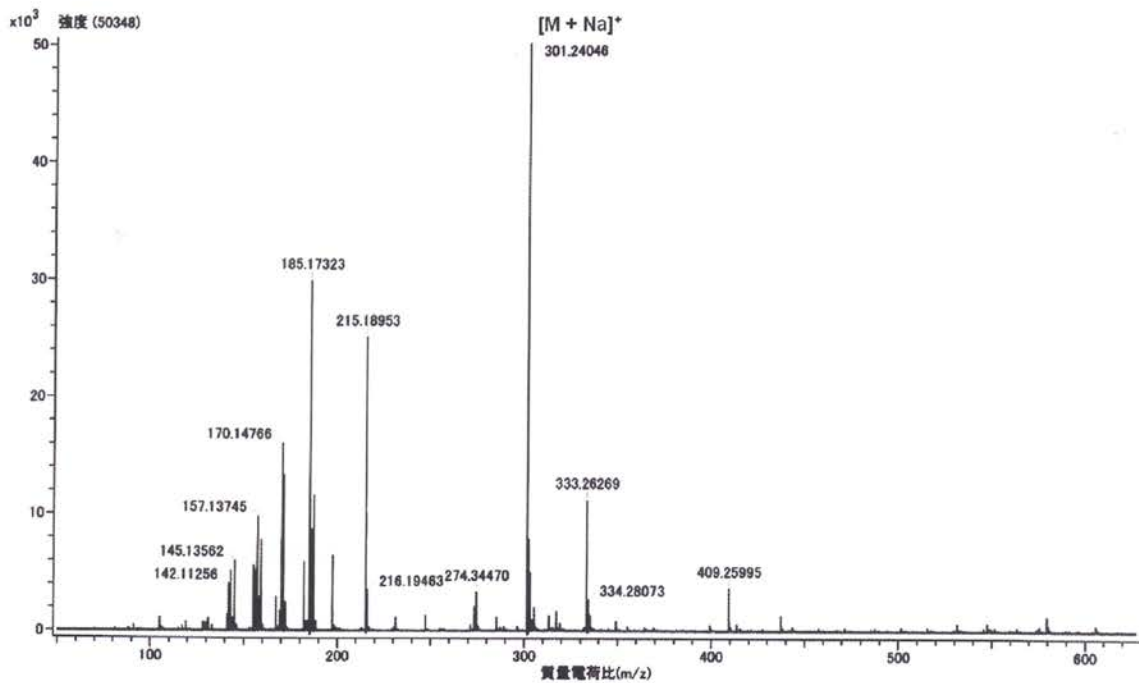


Fig. 15. ESIMS (+) spectrum of 2.

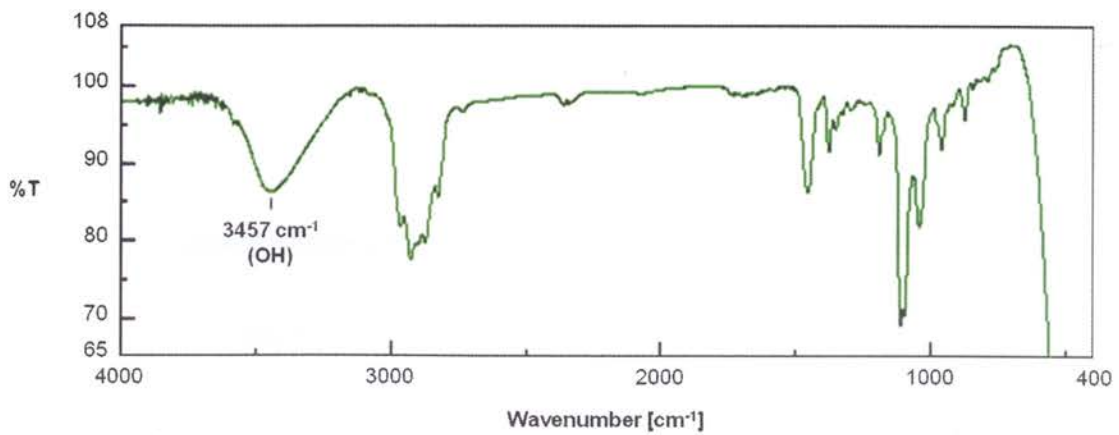


Fig. 16. IR spectrum of 2.

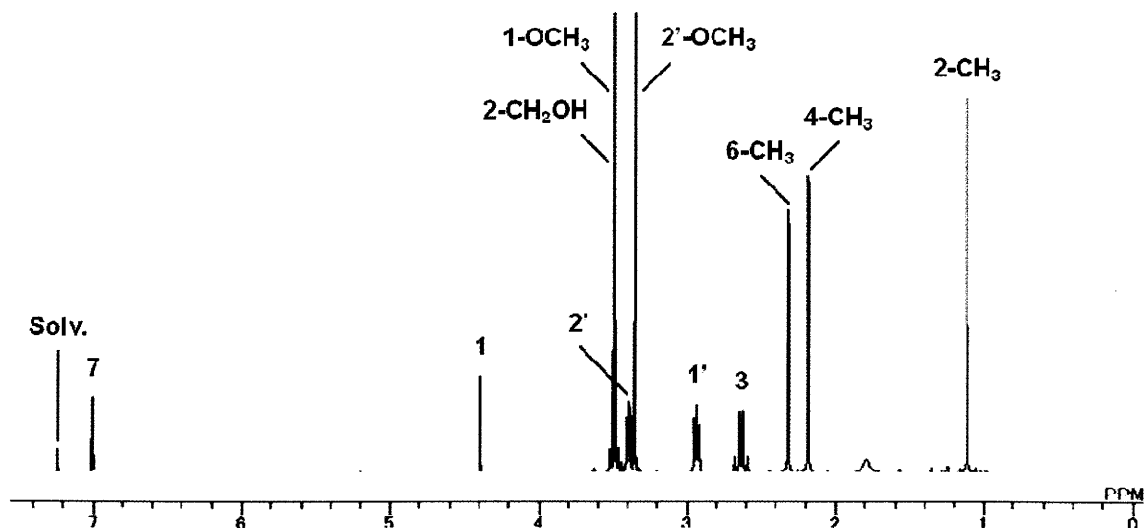


Fig. 17.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

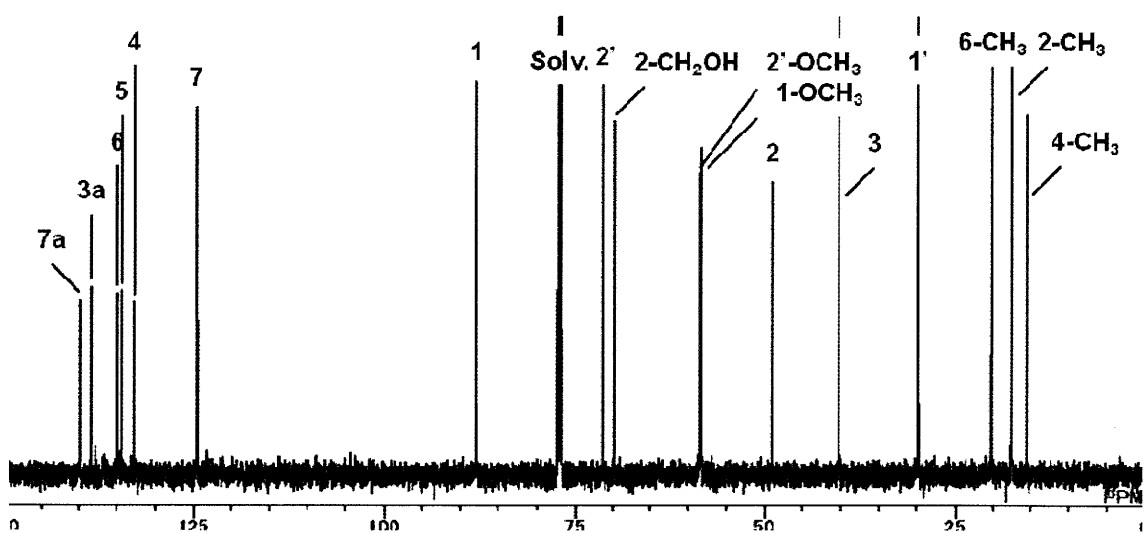


Fig. 18.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

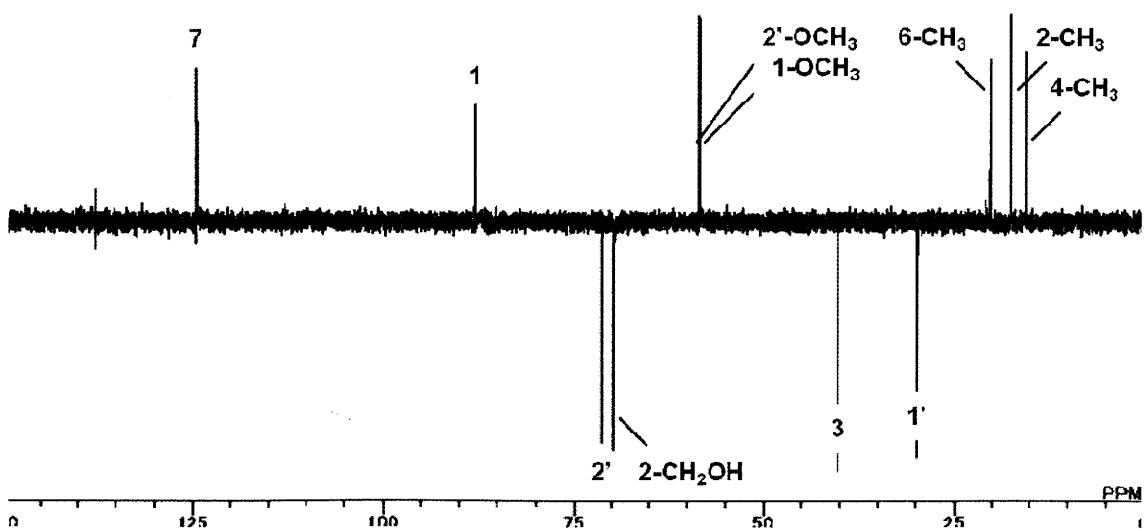


Fig. 19. DEPT spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

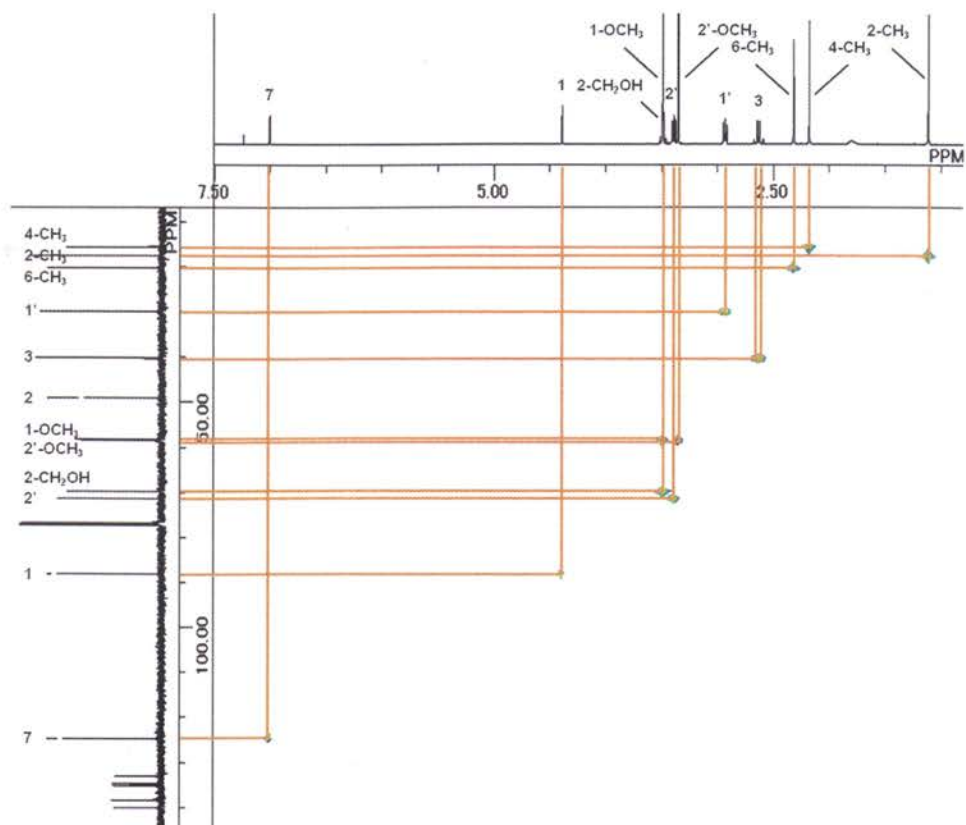


Fig. 20. HMBC spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

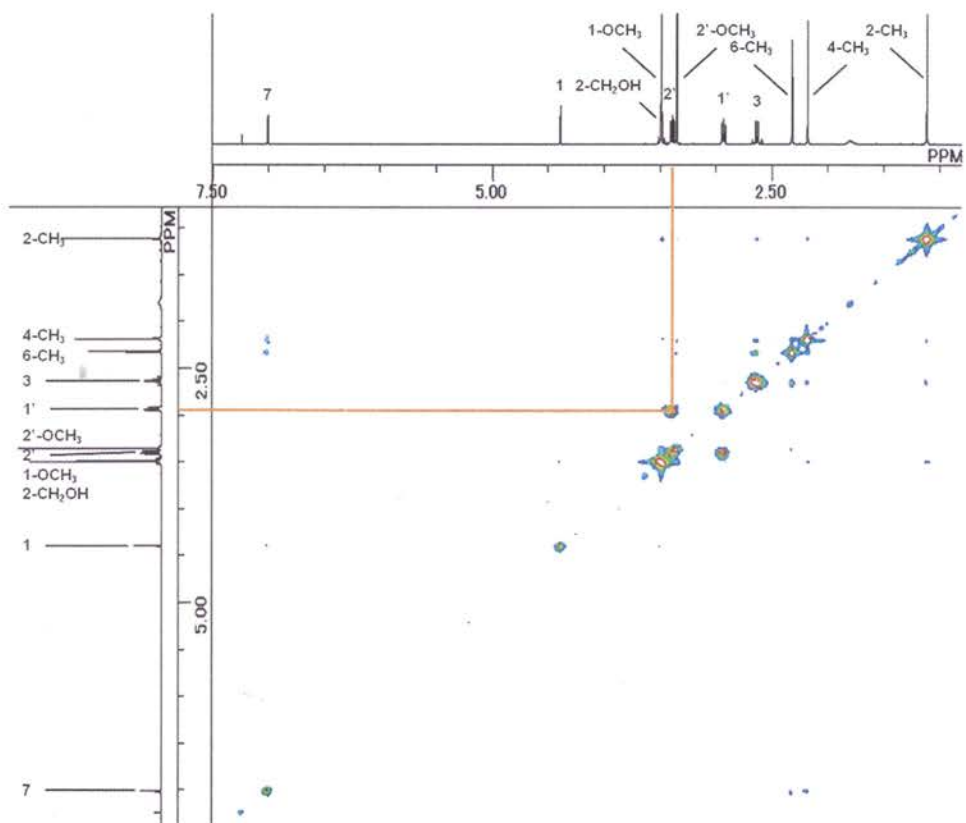


Fig. 21. COSY spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

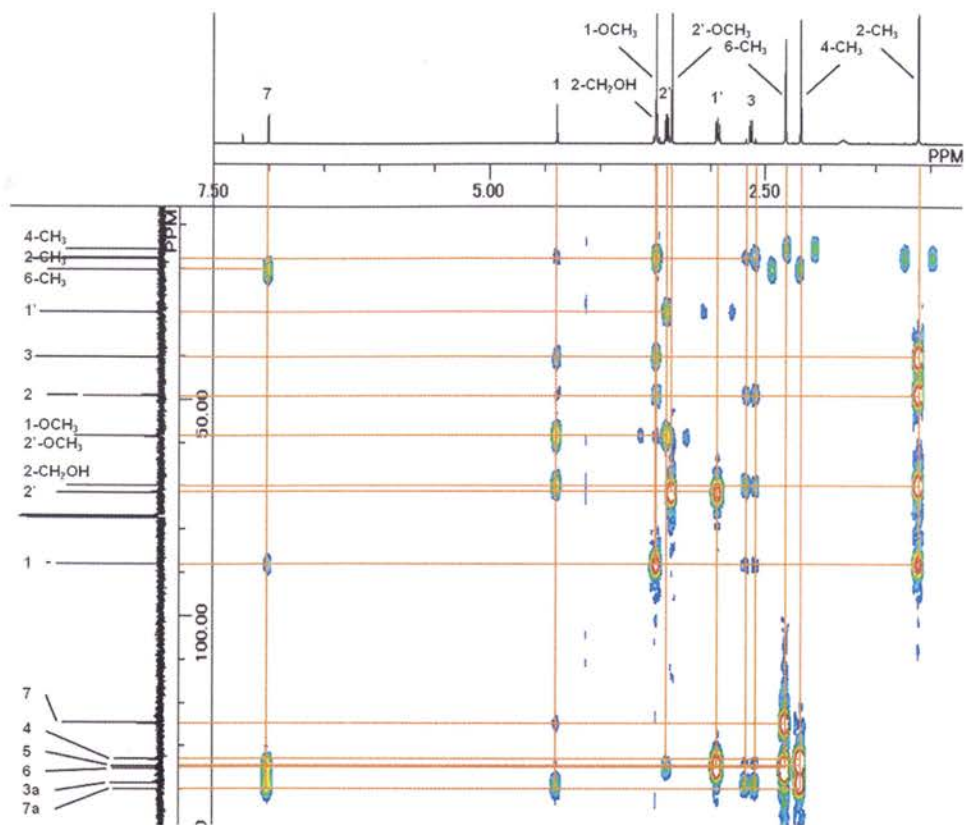


Fig. 22. HMBC spectrum of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

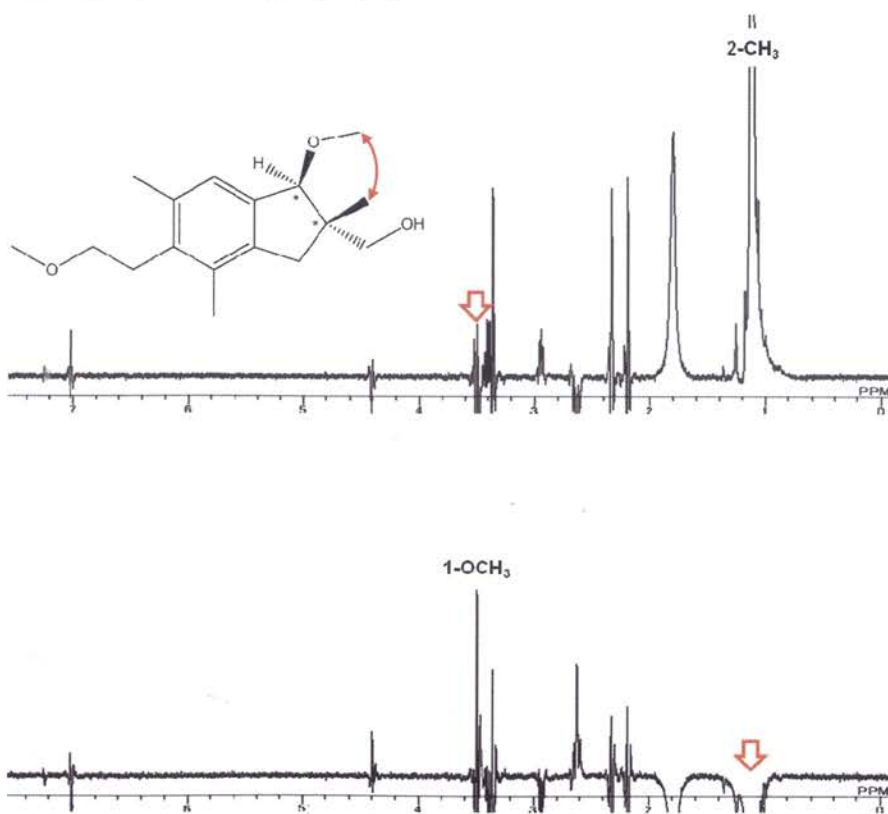
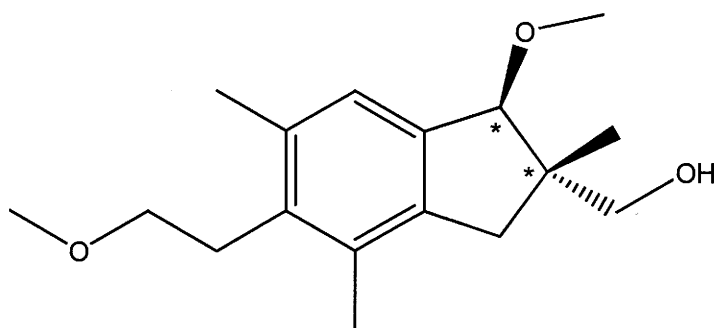


Fig. 23. NOE difference experiment of 2 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

**Table 3.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **2** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1	4.39 (s)	88.0	2, 3, 3a, 7, 1-OCH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>2</sub> OH
2		49.1	
3	2.62 (d, 15.9) 2.66 (d, 15.9)	40.3	1, 2, 3a, 2-CH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>2</sub> OH
3a		138.6	
4		133.0	
5		134.6	
6		135.1	
7	7.01 (s)	124.6	1, 3a, 5, 6-CH <sub>3</sub>
7a		139.9	
1-OCH <sub>3</sub>	3.49 (s)	58.4	1
2-CH <sub>3</sub>	1.12 (s)	17.6	1, 2, 3, 2-CH <sub>2</sub> OH
2-CH <sub>2</sub> OH	3.47 (d, 10.7) 3.50 (d, 10.7)	69.8	1, 2, 3, 2-CH <sub>3</sub>
4-CH <sub>3</sub>	2.18 (s)	15.6	3a, 4, 5
6-CH <sub>3</sub>	2.32 (s)	20.3	5, 6, 7
1'	2.93 (t, 8.1)	29.9	4, 5, 6, 2'
2'	3.40 (t, 8.1)	71.4	5, 1', 2'-OCH <sub>3</sub>
2'-OCH <sub>3</sub>	3.35 (s)	58.6	2'



**Fig. 24.** Applanatine B (**2**).

### 2-2-3 化合物 3 の構造解析

化合物 3 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  301.1780  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{17}H_{26}NaO_3$ , 301.1780) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{17}H_{26}O_3$  と決定した (Fig. 26)。IR において  $3421\text{ cm}^{-1}$  (OH) に吸収ピークが観測された (Fig. 27)。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HMQC により、メチルが 5 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 6 つ存在することが明らかになった (Fig. 28-31, Table 4)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 3 は化合物 1, 2 の構造異性体であることが示唆された。化学シフトの値 ( $\delta_C$  124.7, 133.2, 135.5, 138.3, 140.9, 142.3) により、ベンゼン骨格を部分構造にもつことが示唆された (Table 4)。COSY の相関 ( $H1'/H2'$ )、HMBC の相関 ( $H1'/C2'$ ;  $H2'/C1'$ ,  $C2'-OCH_3$ ;  $C2'-OCH_3/C2'$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.28, 3.57;  $\delta_C$  58.8, 71.8) により、メトキシエチルの部分構造を決定し、HMBC の相関 ( $C4-CH_3/C3a$ ,  $C4$ ,  $C5$ ;  $C6-CH_2OH/C5$ ,  $C6$ ,  $C7$ ;  $H7/C5$ ,  $C6-CH_2OH$ ;  $H1'/C4$ ,  $C5$ ,  $C6$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  4.56, 4.62;  $\delta_C$  64.1) により、メトキシエチル、メチル、ヒドロキシメチルがそれぞれベンゼン骨格に接続することを解明した (Fig. 25, 32, 33, Table 4)。さらに、HMBC の相関 ( $H1/C1-OCH_3$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3a$ ,  $C2-CH_3b$ ,  $C3$ ,  $C3a$ ,  $C7$ ;  $C1-OCH_3/C1$ ;  $C2-CH_3a/C1$ ,  $C2$ ,  $C3$ ,  $C2-CH_3b$ ;  $C2-CH_3b/C1$ ,  $C2$ ,  $C3$ ,  $C2-CH_3a$ ;  $H3/C1$ ,  $C2$ ,  $C2-CH_3a$ ,  $C2-CH_3b$ ,  $C3a$ ,  $C4$ ,  $C7a$ ;  $H7/C1$ ,  $C3a$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.46;  $\delta_C$  58.0) により、2-メトキシ-1,1-ジメチルシクロペンタンの部分構造を決定し、全平面構造を決定した (Fig. 25, 33, Table 4)。以上により、化合物 3 を (1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,2,4-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-6-yl)methanol と決定した。化合物 3 は新規化合物であり、aplanatine C と命名した (Fig. 34)。

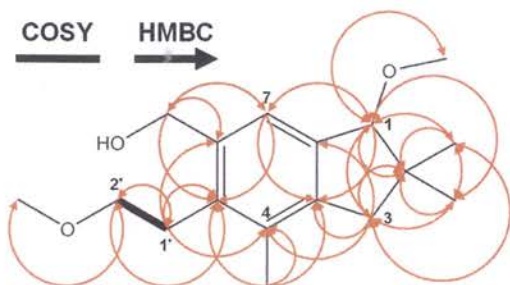


Fig. 25. COSY and HMBC correlations in 3.



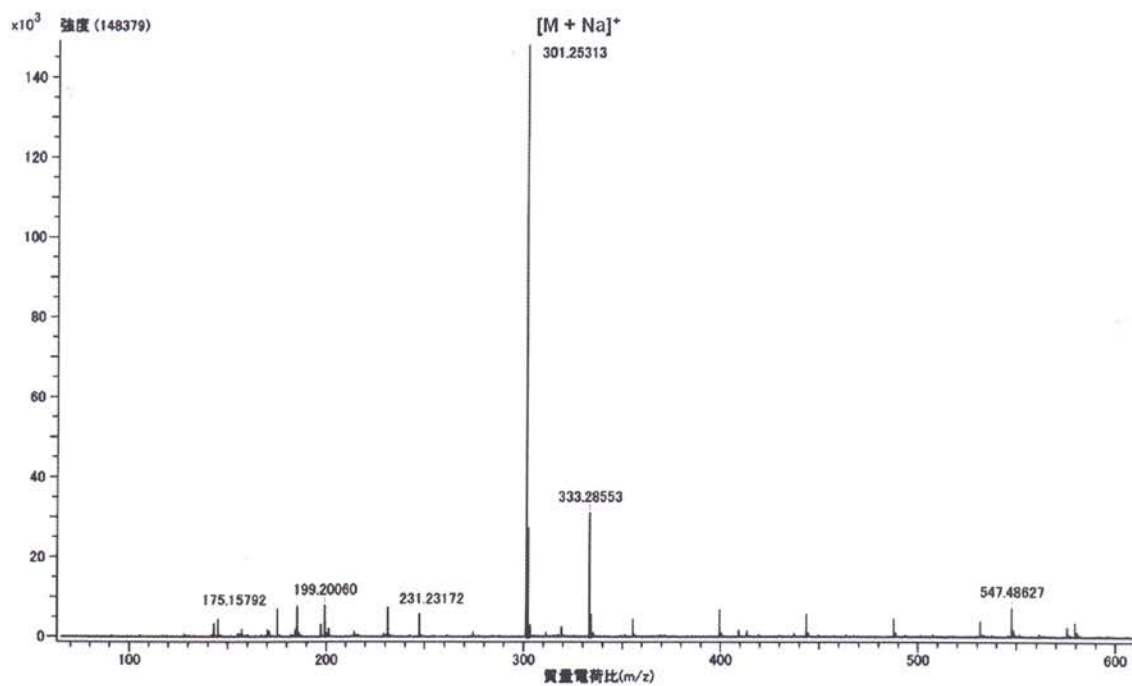


Fig. 26. ESIMS (+) spectrum of 3.

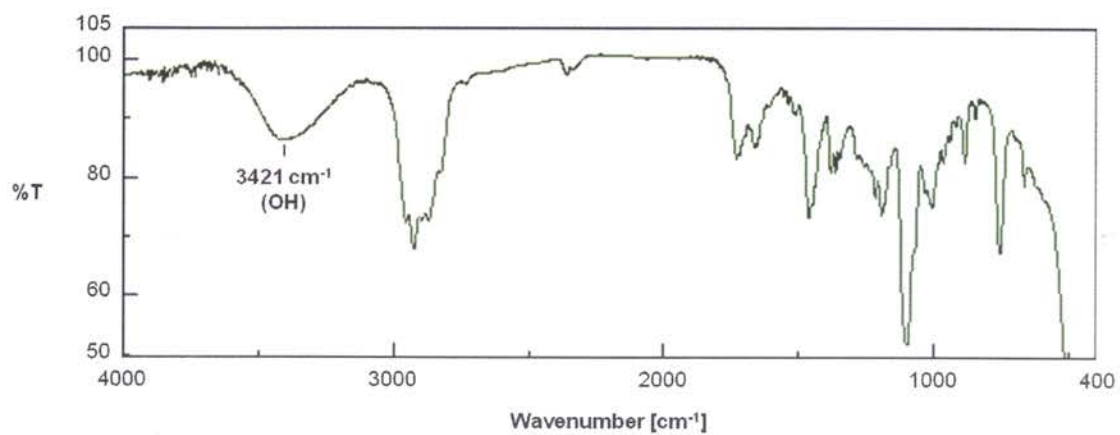


Fig. 27. IR spectrum of 3.

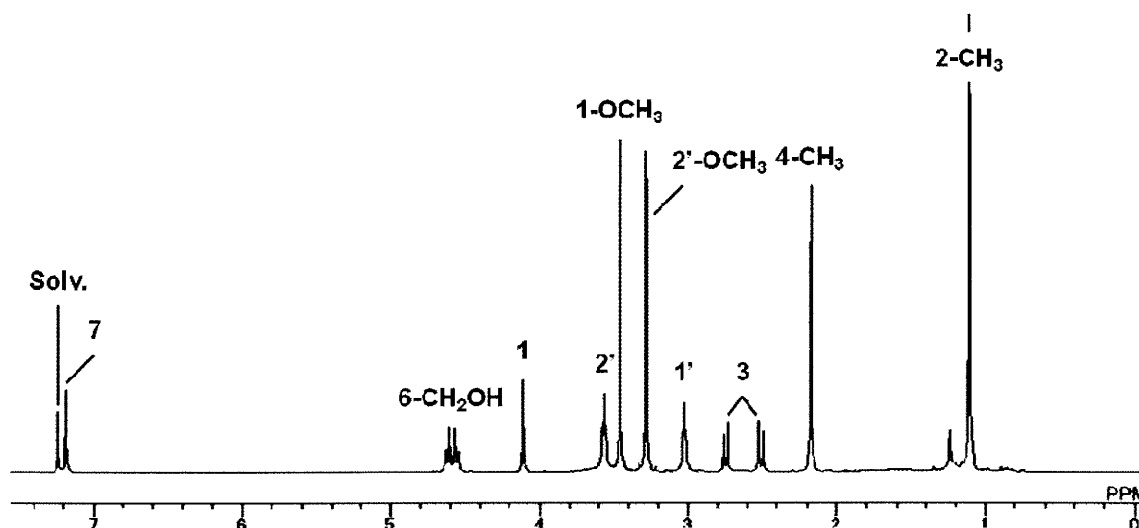


Fig. 28.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

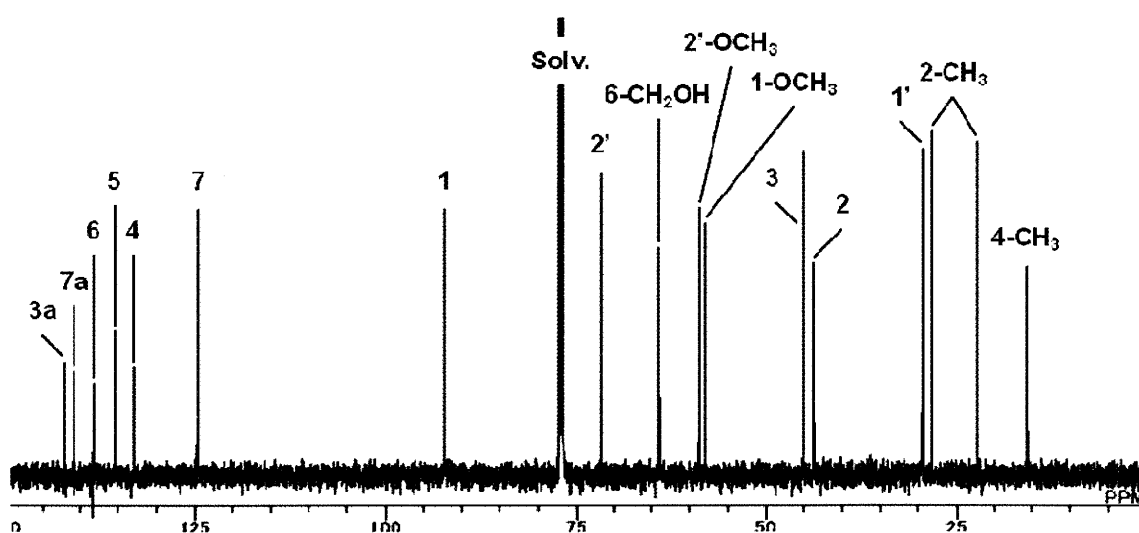


Fig. 29.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

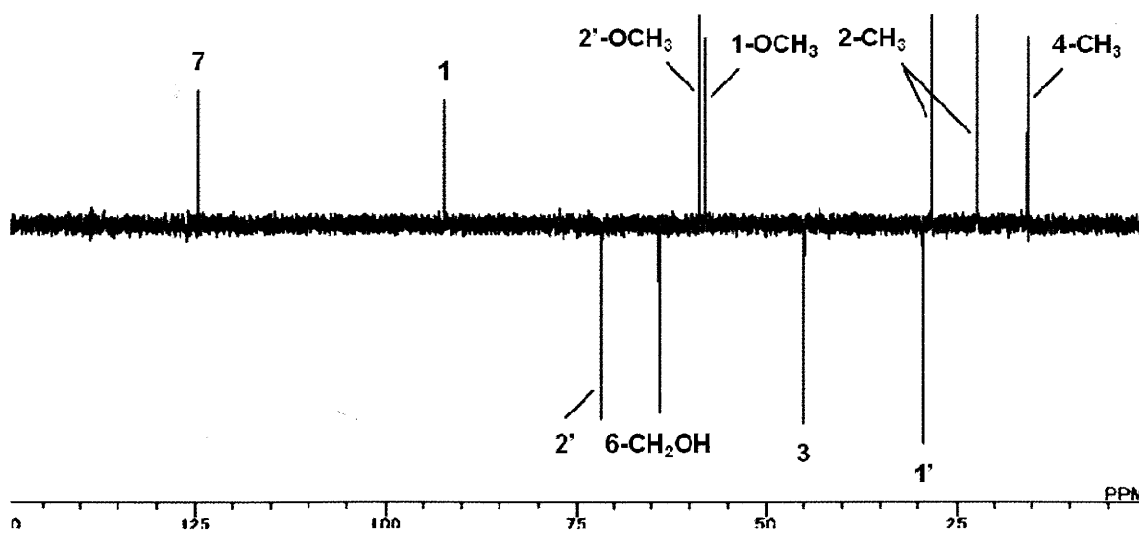


Fig. 30. DEPT spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

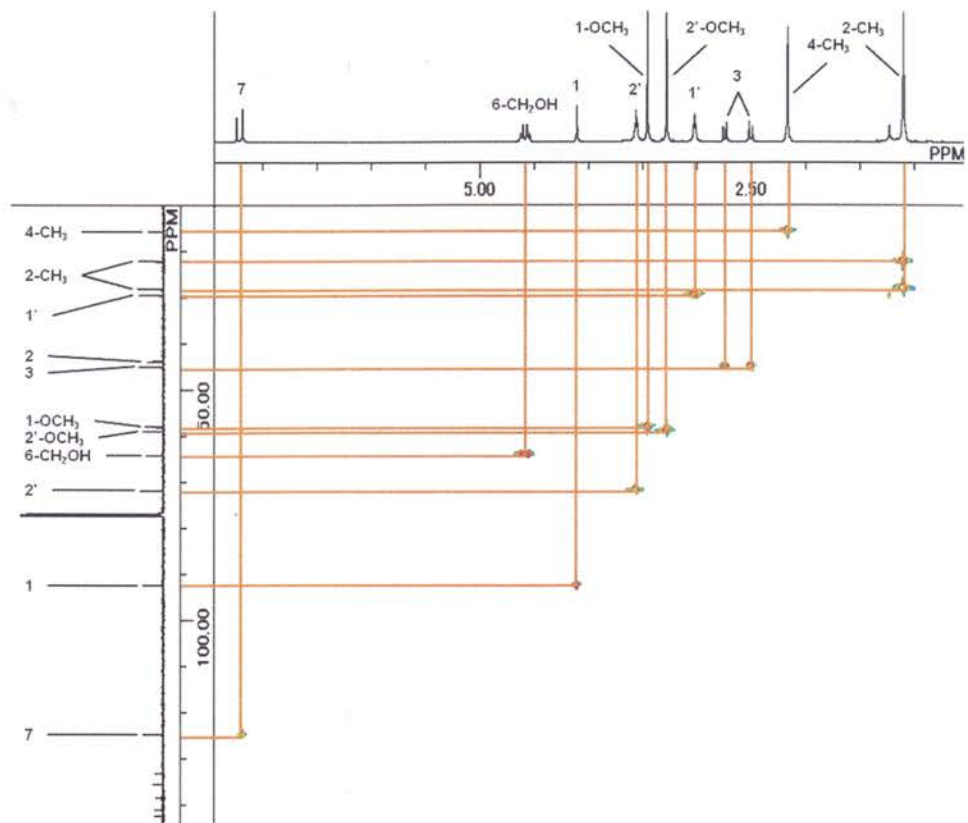


Fig. 31. HMBC spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

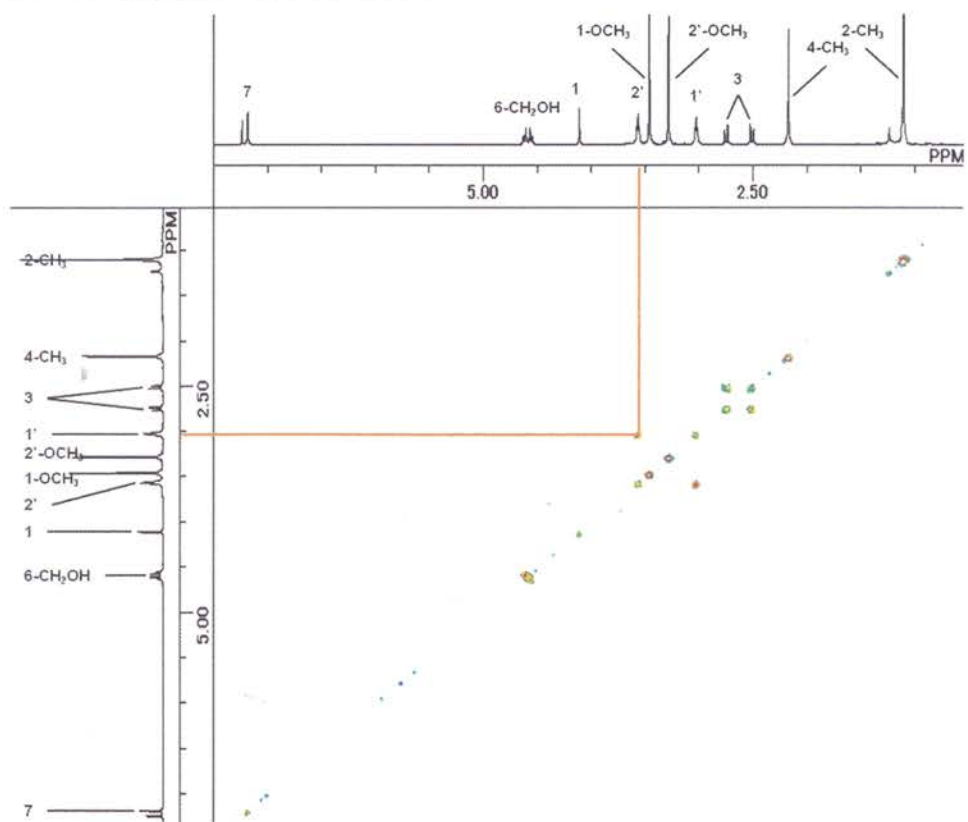


Fig. 32. COSY spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

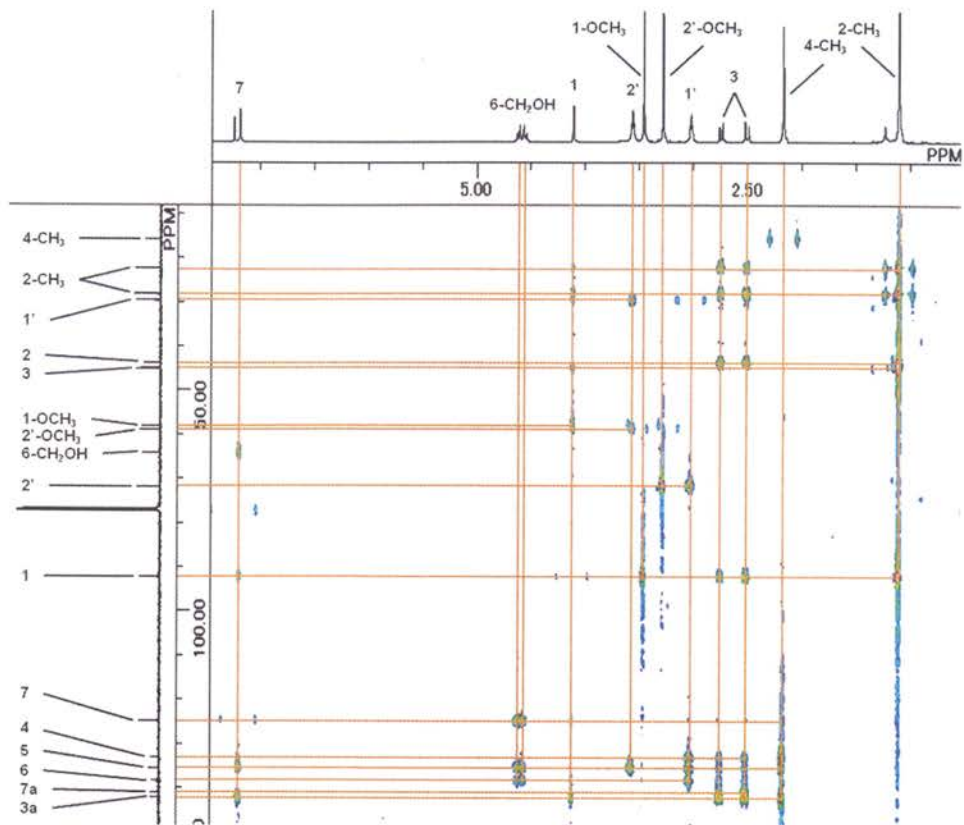
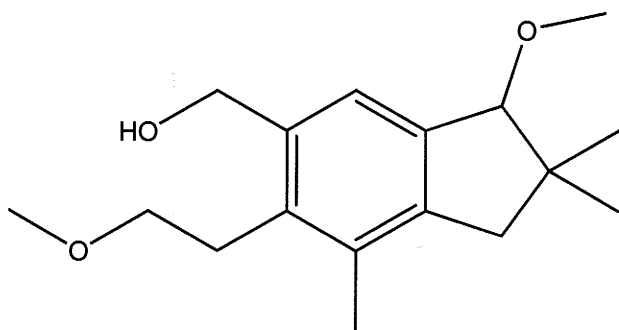


Fig. 33. HMBC spectrum of 3 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

**Table 4.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **3** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1	4.11 (s)	92.3	2, 3, 3a, 7, 1-OCH <sub>3</sub> , 2-CH <sub>3</sub> a, 2-CH <sub>3</sub> b
2		43.8	
3	2.51 (d, 15.6) 2.75 (d, 15.6)	45.1	1, 2, 3a, 4, 7a, 2-CH <sub>3</sub> a, 2-CH <sub>3</sub> b
3a		142.3	
4		133.2	
5		135.5	
6		138.3	
7	7.19 (s)	124.7	1, 3a, 5, 6-CH <sub>2</sub> OH
7a		140.9	
1-OCH <sub>3</sub>	3.46 (s)	58.0	1
2-CH <sub>3</sub> a	1.11 (s)	22.3	1, 2, 3, 2-CH <sub>3</sub> b
2-CH <sub>3</sub> b	1.11 (s)	28.2	1, 2, 3, 2-CH <sub>3</sub> a
4-CH <sub>3</sub>	2.17 (s)	15.8	3a, 4, 5
6-CH <sub>2</sub> OH	4.56 (d, 11.9) 4.62 (d, 11.9)	64.1	5, 6, 7
1'	3.03 (t, 5.5)	29.6	4, 5, 6, 2'
2'	3.57 (t, 5.5)	71.8	5, 1', 2'-OCH <sub>3</sub>
2'-OCH <sub>3</sub>	3.28 (s)	58.8	2'



**Fig. 34.** Applanatine C (**3**).

#### 2-2-4 化合物 4 の構造解析

化合物 4 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  303.1619  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{18}H_{23}O_4$ , 303.1596) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{18}H_{22}O_4$  と決定した (Fig. 36)。IR において  $1718\text{ cm}^{-1}$  (C=O) に吸収ピークが観測された (Fig. 37)。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 、DEPT、HMQC により、メチルが 4 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 8 つ存在することが明らかになった (Fig. 38-41, Table 5)。化学シフトの値 ( $\delta_C$  124.3, 125.7, 131.9, 138.8, 140.8, 150.0) により、ベンゼン骨格を部分構造にもつことが示唆された (Table 5)。COSY の相関 (H3/H4)、HMBC の相関 (H3/C1, C4, C4a; H4/C3, C4a, C5, C11a; H11/C1, C4a)、IR の吸収ピーク ( $1718\text{ cm}^{-1}$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  2.95, 4.47;  $\delta_C$  25.3, 66.5, 165.7) により、 $\delta$ -ラクトンの部分構造とベンゼン骨格との接続を決定し、HMBC の相関 (C5-CH<sub>3</sub>/4a, 5, 5a) により、メチルがベンゼン骨格に接続することを解明した (Fig. 35, 37, 42, 43, Table 5)。さらに、HMBC の相関 (H6/C5, C5a, C6a, C6a-CH<sub>3</sub>, C7, C10a, C10b; C6a-CH<sub>3</sub>/C6, C6a, C7, C10a; H7/C6, C6a, C6a-CH<sub>3</sub>, C9, C10a; C9-CH<sub>3</sub>a/C9, C9-CH<sub>3</sub>b; C9-CH<sub>3</sub>b/C9, C9-CH<sub>3</sub>a; H10a/C5a, C6, C6a, C6a-CH<sub>3</sub>, C9, C10b, C11; H11/C5a, C10a) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.77, 3.81;  $\delta_C$  66.8, 98.1) により、2,2,4a-トリメチルヘキサヒドロシクロペンタ[*d*][1,3]ジオキシンの部分構造を決定し、NOE の相関 (H10a/C6a-CH<sub>3</sub>) により相対立体配置を決定した (Fig. 35, 43, 44, Table 5)。以上により、化合物 4 を (6*aS*\*,10*aS*\*)-5,6*a*,9,9-tetramethyl-3,4,6*a*,7,9,10*a*-hexahydrocyclopenta[*d*][8,10]dioxono[*g*]isochromen-1(6*H*)-one と決定した。化合物 4 は新規化合物であり、aplanatine D と命名した (Fig. 45)。

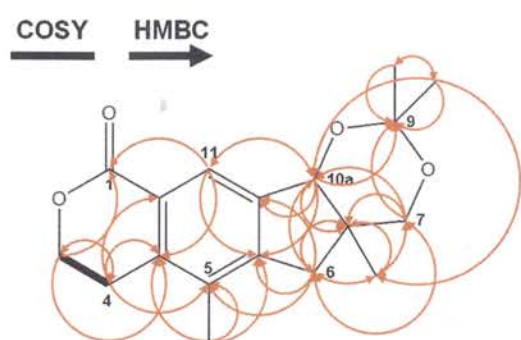


Fig. 35. COSY and HMBC correlations in 4.

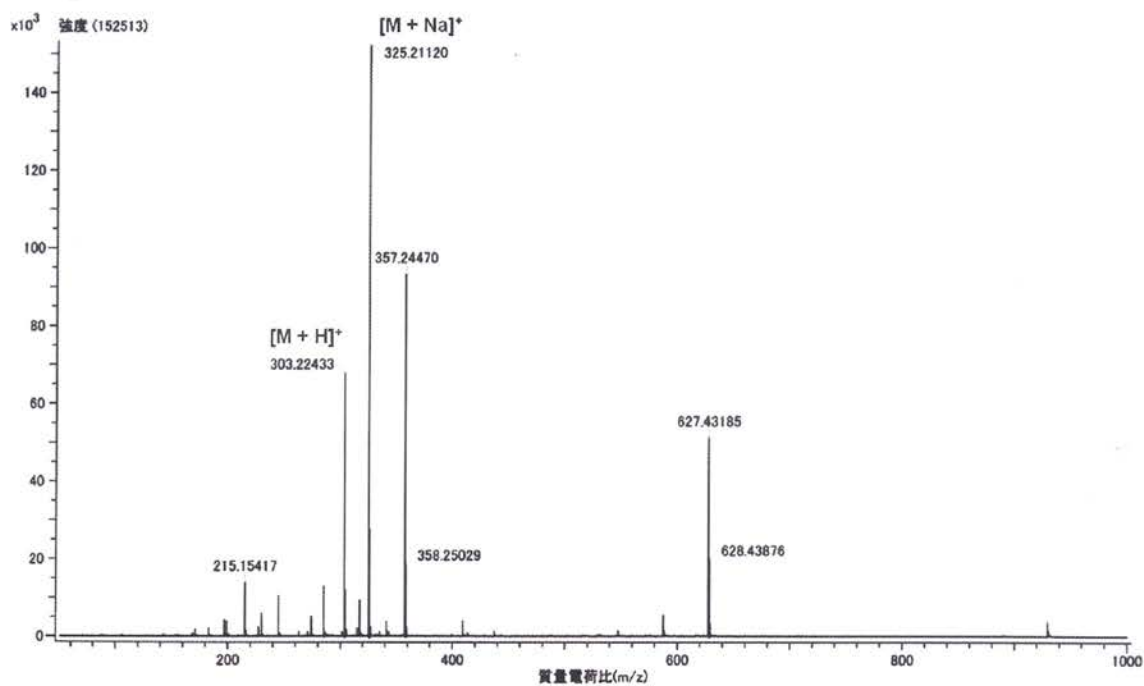


Fig. 36. ESIMS (+) spectrum of 4.

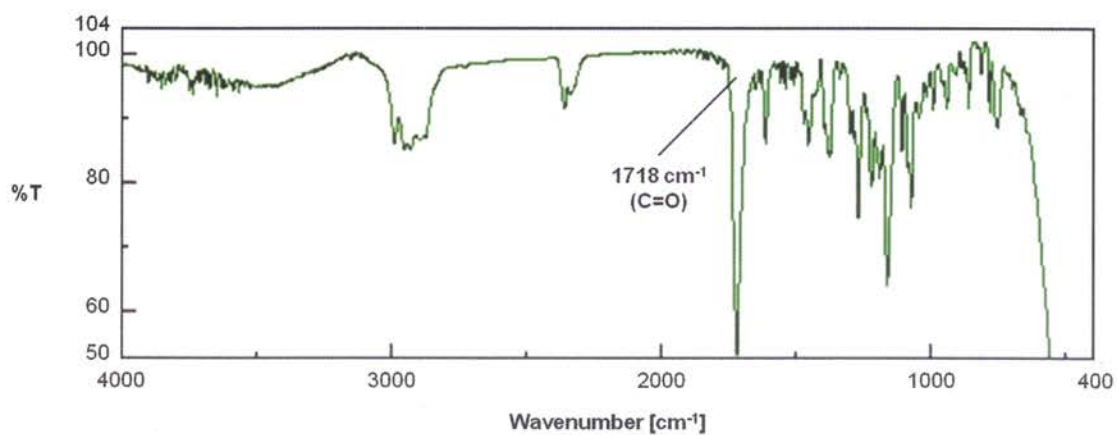


Fig. 37. IR spectrum of 4.

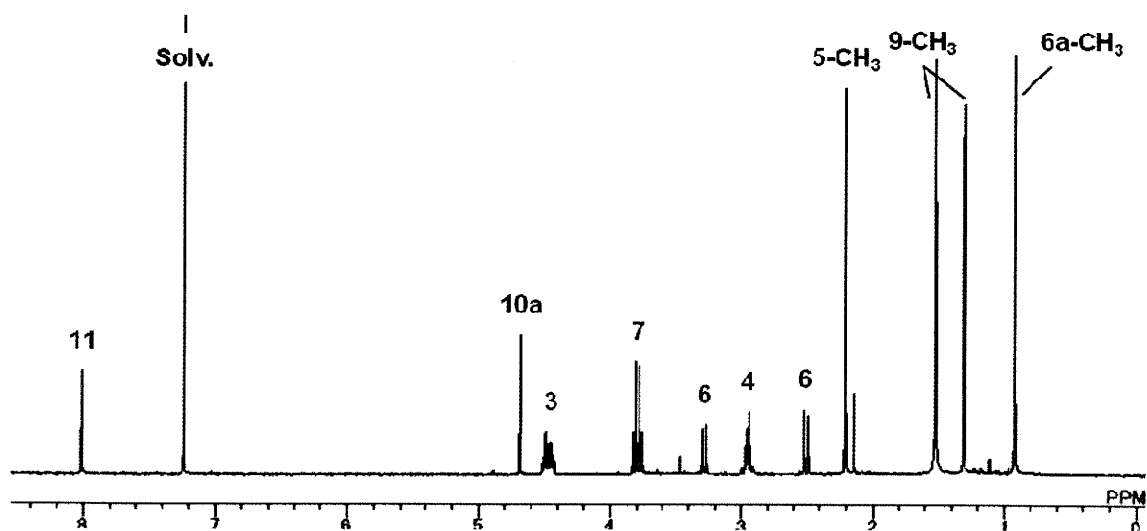


Fig. 38.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 4 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

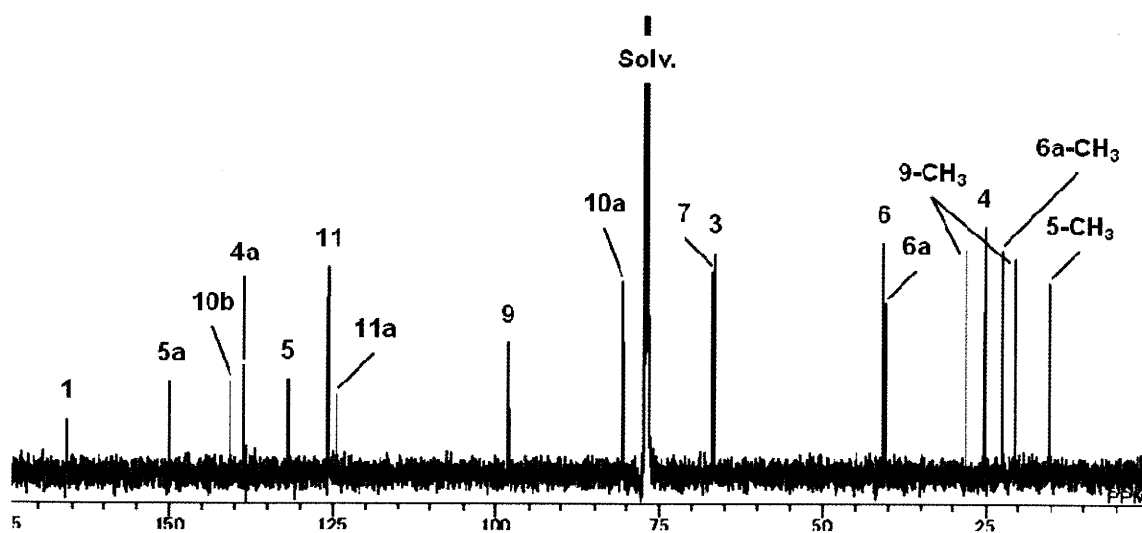


Fig. 39.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 4 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

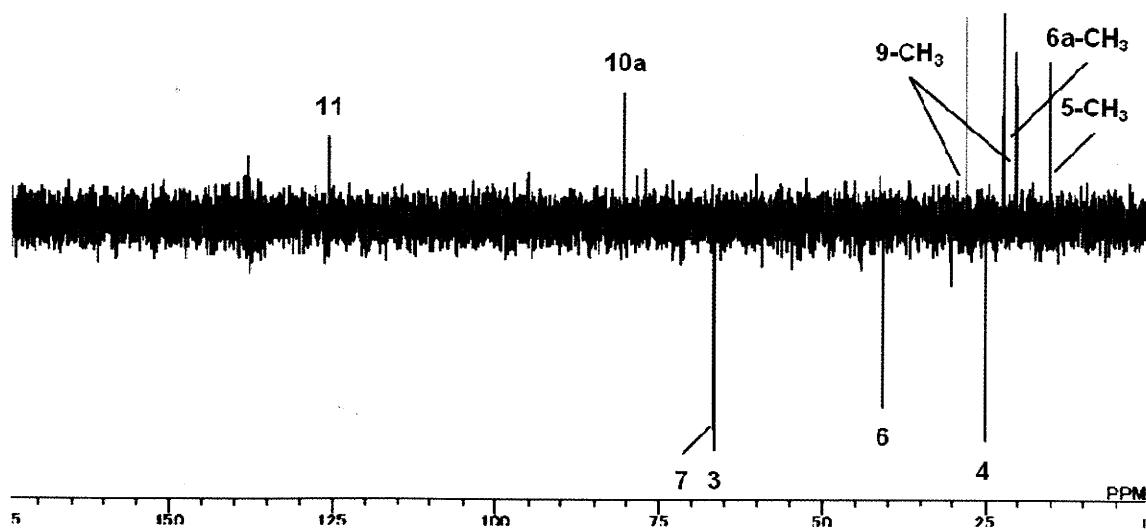


Fig. 40. DEPT spectrum of 4 (in  $\text{CDCl}_3$ ).



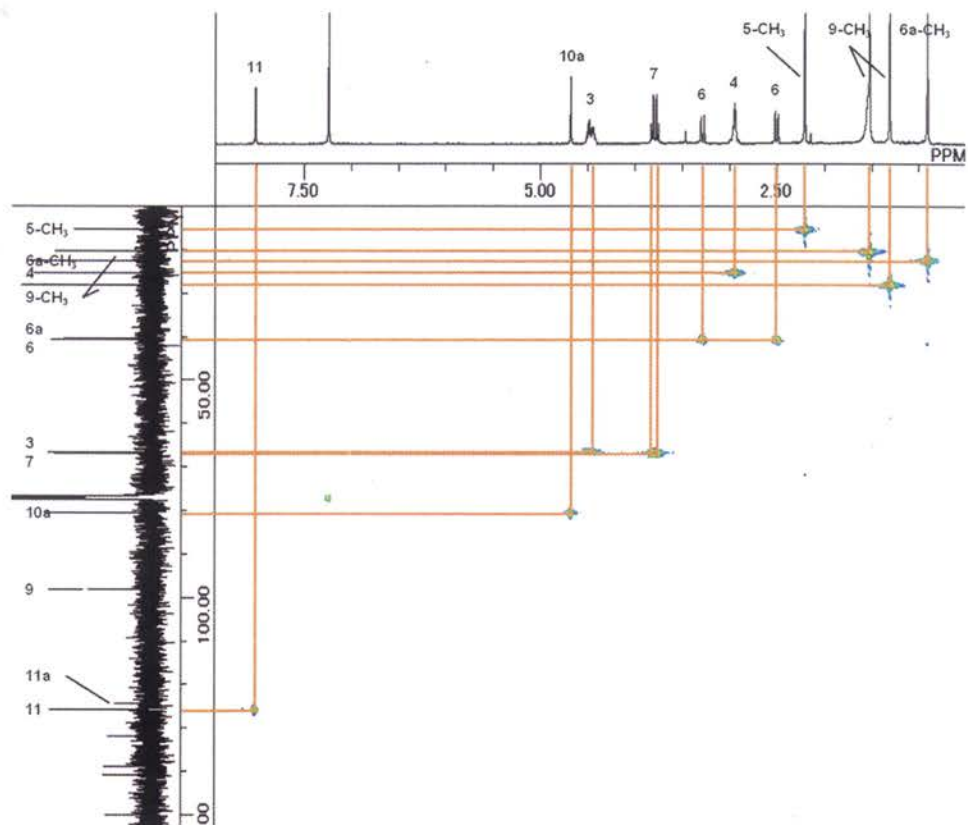


Fig. 41. HMQC spectrum of 4 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

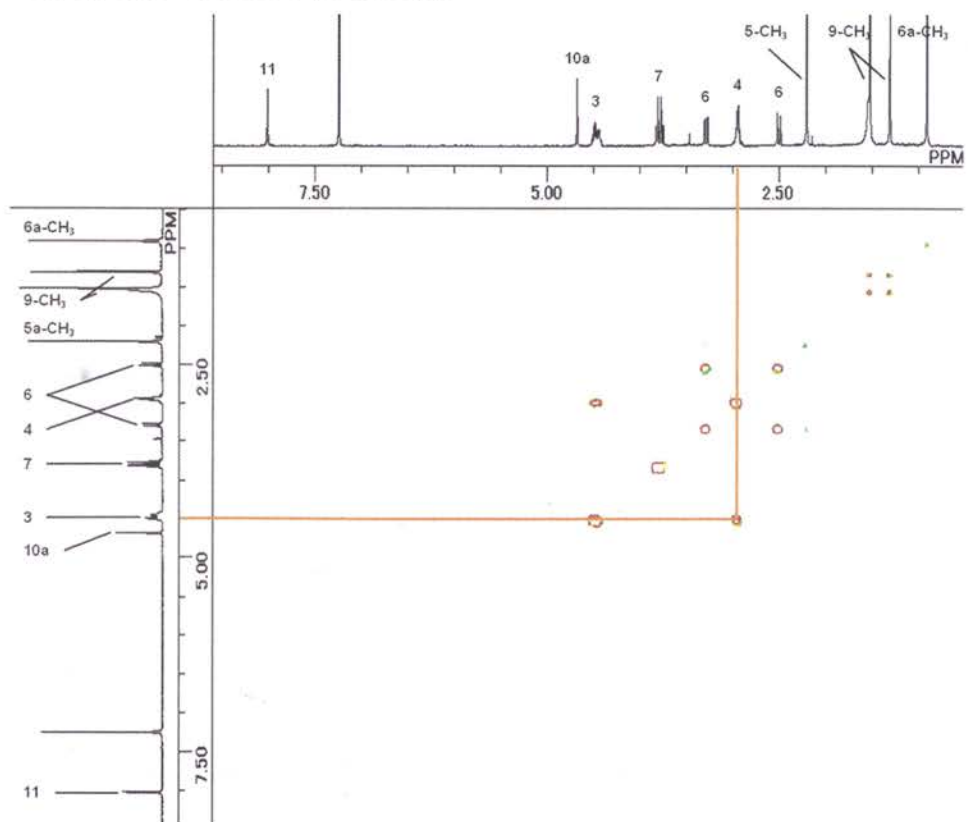


Fig. 42. COSY spectrum of 4 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

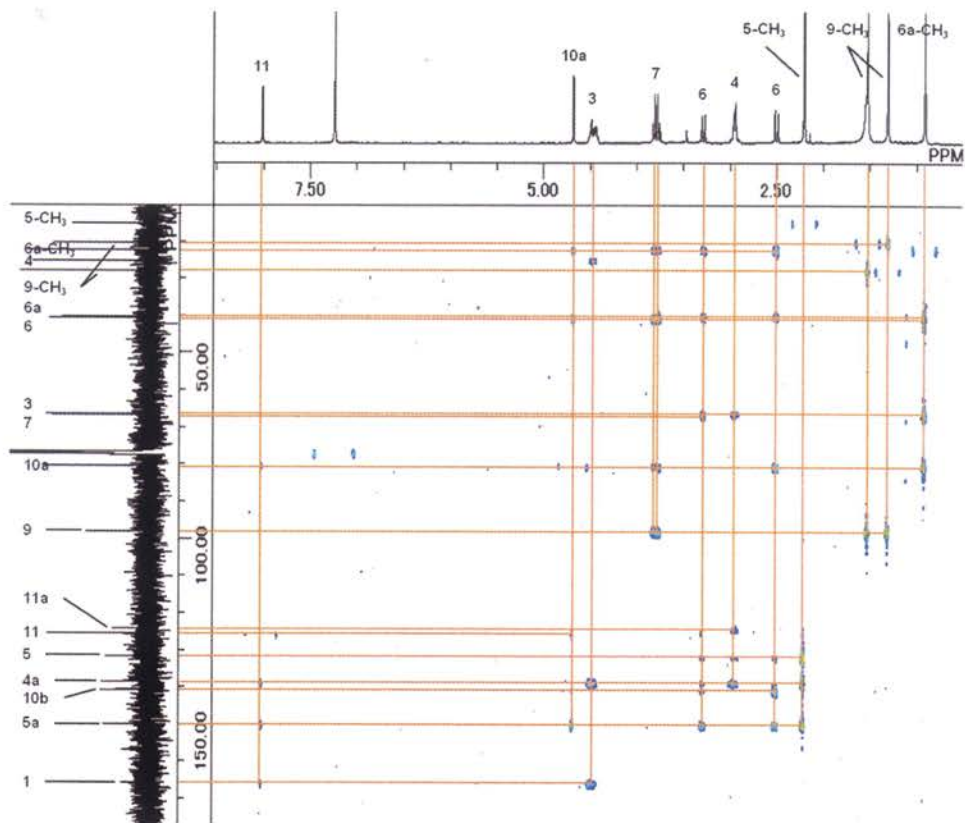


Fig. 43. HMBC spectrum of 4 (in CDCl<sub>3</sub>).

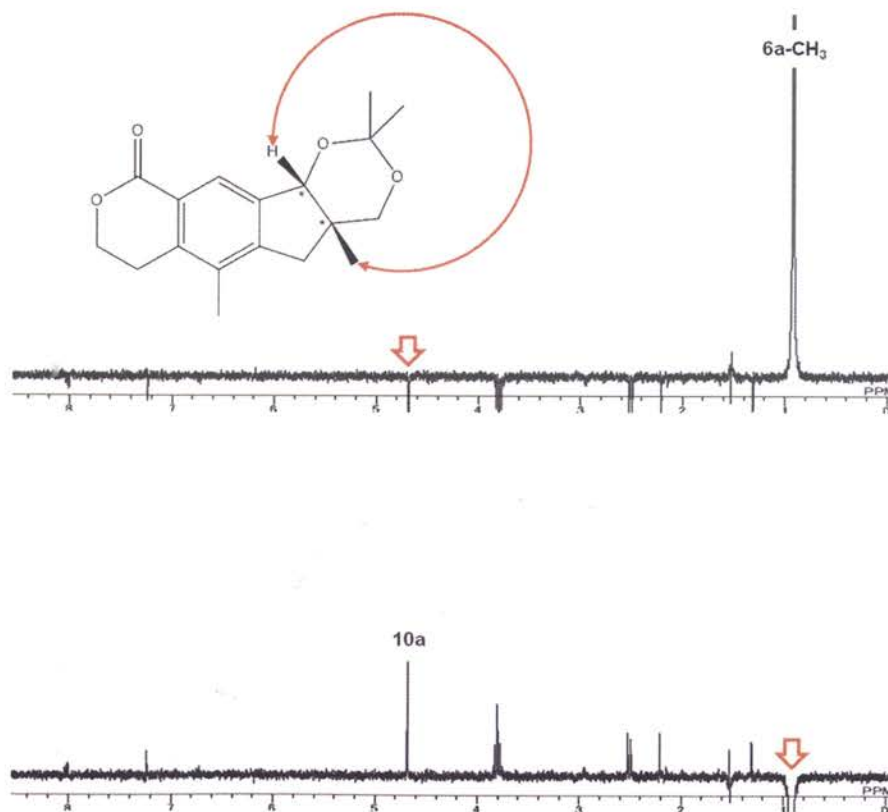
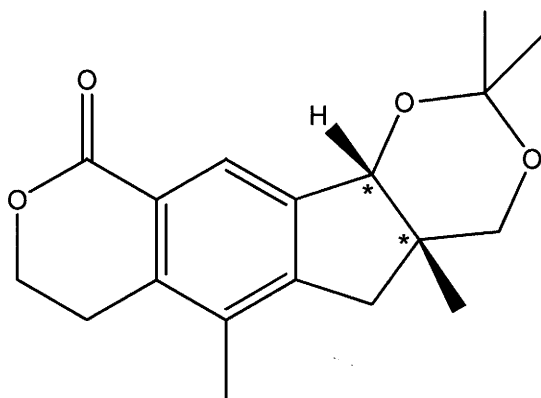


Fig. 44. NOE difference experiment of 4 (in CDCl<sub>3</sub>).

**Table 5.**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for **4** (in  $\text{CDCl}_3$ ).

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		165.7	
3	4.47 (m)	66.5	1, 4, 4a
4	2.95 (m)	25.3	3, 4a, 5, 11a
4a		138.8	
5		131.9	
5a		150.0	
6	2.51 (d, 16.2) 3.38 (d, 16.2)	40.7	5, 5a, 6a, 7, 10a, 10b, 6a- $\text{CH}_3$
6a		40.4	
7	3.77 (d, 12.1) 3.81 (d, 12.1)	66.8	6, 6a, 9, 10a, 6a- $\text{CH}_3$
9		98.1	
10a	4.68 (s)	80.5	5a, 6, 6a, 9, 10b, 11, 6a- $\text{CH}_3$
10b		140.8	
11	8.01 (s)	125.7	1, 4a, 5a, 10a
11a		124.3	
5- $\text{CH}_3$	2.21 (s)	15.3	4a, 5, 5a
6a- $\text{CH}_3$	0.91 (s)	22.5	6, 6a, 7, 10a
9- $\text{CH}_3\text{a}$	1.31 (s)	28.1	9, 9- $\text{CH}_3\text{b}$
9- $\text{CH}_3\text{b}$	1.53 (s)	20.4	9, 9- $\text{CH}_3\text{a}$



**Fig. 45.** Applanatine D (**4**).

## 2-2-5 化合物 5 の構造解析

化合物 5 は無色油状物質として単離された。HR-ESIMS において  $m/z$  285.1098  $[M+Na]^+$  (calcd for  $C_{15}H_{18}NaO_4$ , 285.1103) の分子イオンピークが観測され、分子式を  $C_{15}H_{18}O_4$  と決定した (Fig. 47)。IR において 1703 (C=O)、3400  $cm^{-1}$  (OH) にそれぞれ吸収ピークが観測された (Fig. 48)。 $^1H$ -NMR、 $^{13}C$ -NMR、DEPT、HMQC により、メチルが 2 つ、メチレンが 4 つ、メチンが 2 つ、4 級炭素が 7 つ存在することが明らかになった (Fig. 49-52, Table 6)。各種スペクトルデータの比較により、化合物 5 は化合物 4 の 9 位のイソプロピルをもたない類縁体であることが示唆された。化学シフトの値 ( $\delta_C$  124.3, 124.6, 131.5, 138.5, 143.1, 148.2) により、ベンゼン骨格を部分構造にもつことが示唆された (Table 6)。COSY の相関 (H3/H4)、HMBC の相関 (H3/C1, C4, C4a; H4/C3, C4a, C5, C9a; H9/C1, C4a)、IR の吸収ピーク (1703  $cm^{-1}$ ) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  2.96, 4.48;  $\delta_C$  25.2, 66.7, 166.0) により、 $\delta$ -ラクトンの部分構造とベンゼン骨格との接続を決定し、HMBC の相関 (C5-CH<sub>3</sub>/4a, 5, 5a) により、メチルがベンゼン骨格に接続することを解明した (Fig. 46, 48, 53, 54, Table 6)。さらに、HMBC の相関 (H6/C5, C5a, C7, C8, C8a, C7-CH<sub>3</sub>, C7-CH<sub>2</sub>OH; C7-CH<sub>3</sub>/C6, C7, C8, C7-CH<sub>2</sub>OH; C7-CH<sub>2</sub>OH/C6, C7, C8, C7-CH<sub>3</sub>; C8/C5a, C6, C7, C8a, C9, C7-CH<sub>3</sub>, C7-CH<sub>2</sub>OH; H9/C5a, C8) および化学シフトの値 ( $\delta_H$  3.72, 3.77, 4.89;  $\delta_C$  68.1, 83.6) により、2-(ヒドロキシメチル)-2-メチルシクロペンタノールの部分構造を決定し、NOE の相関 (H8/C7-CH<sub>3</sub>) により相対立体配置を決定した (Fig. 46, 54, 55, Table 6)。以上により、化合物 5 を (7*S*\*,8*S*\*)-8-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one と決定した。化合物 5 は新規化合物であり、applanatine E と命名した (Fig. 56)。

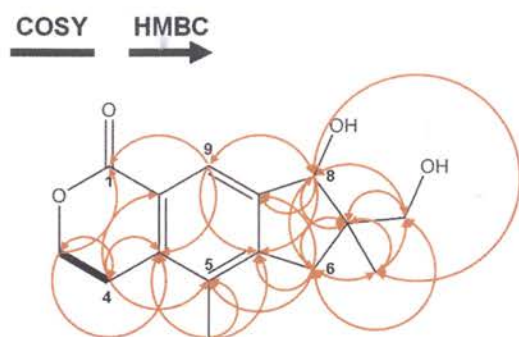


Fig. 46. COSY and HMBC correlations in 5.

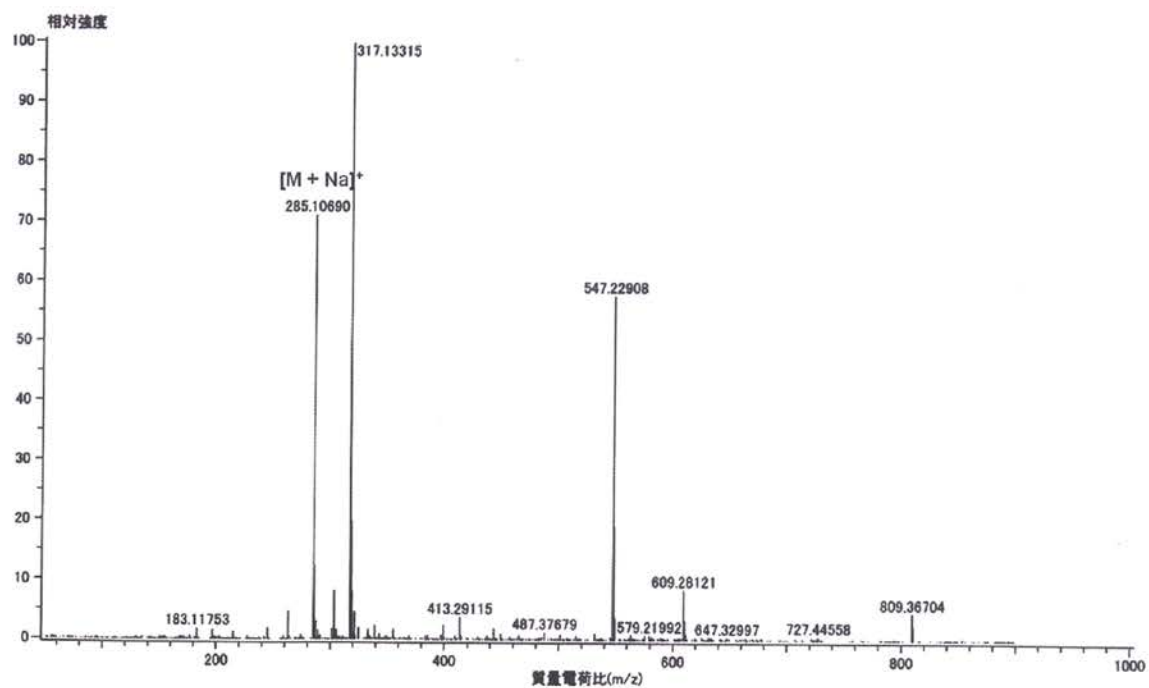


Fig. 47. ESIMS (+) spectrum of 5.

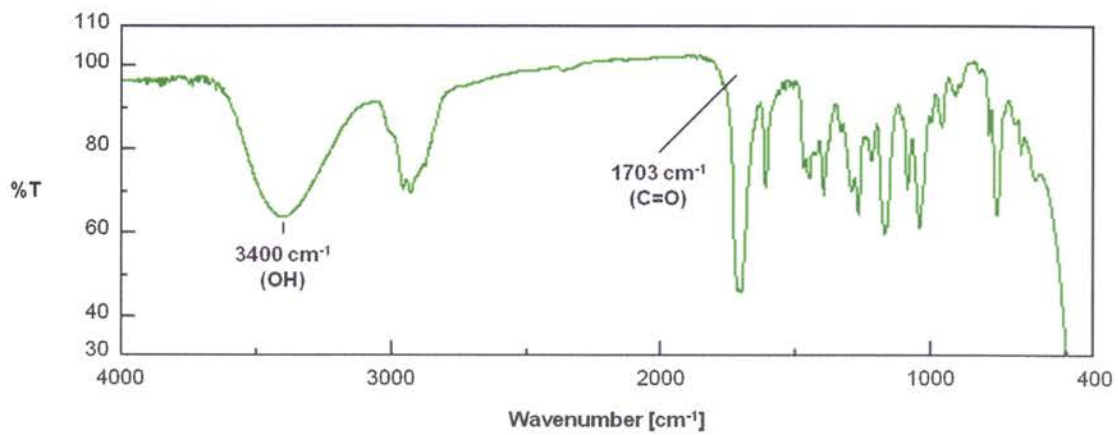


Fig. 48. IR spectrum of 5.

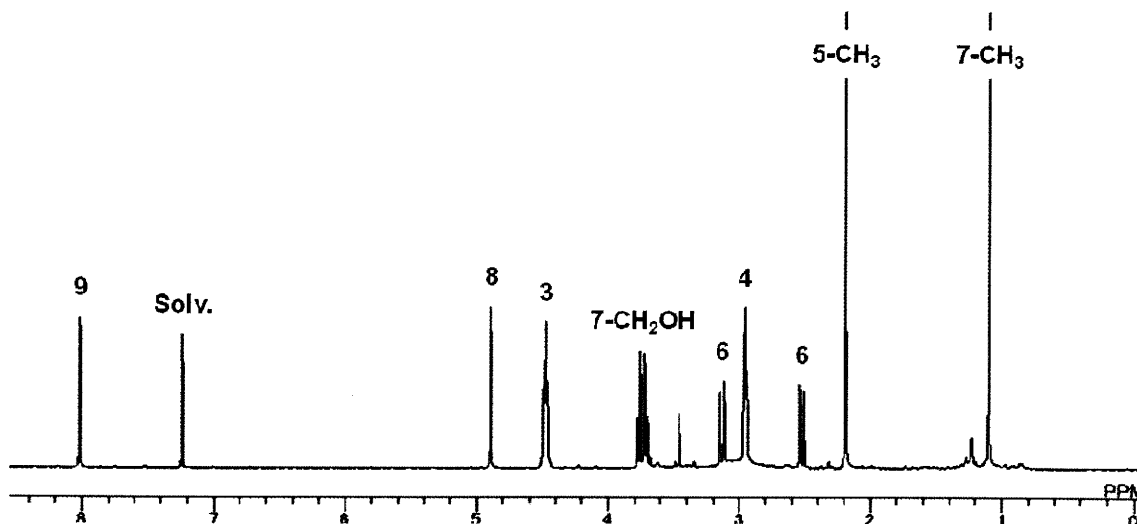


Fig. 49.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

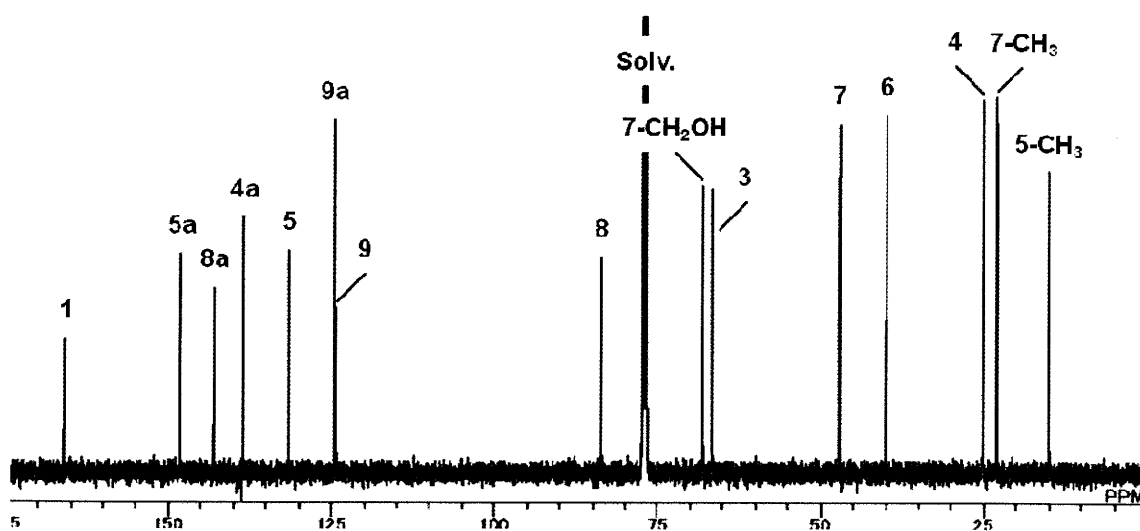


Fig. 50.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

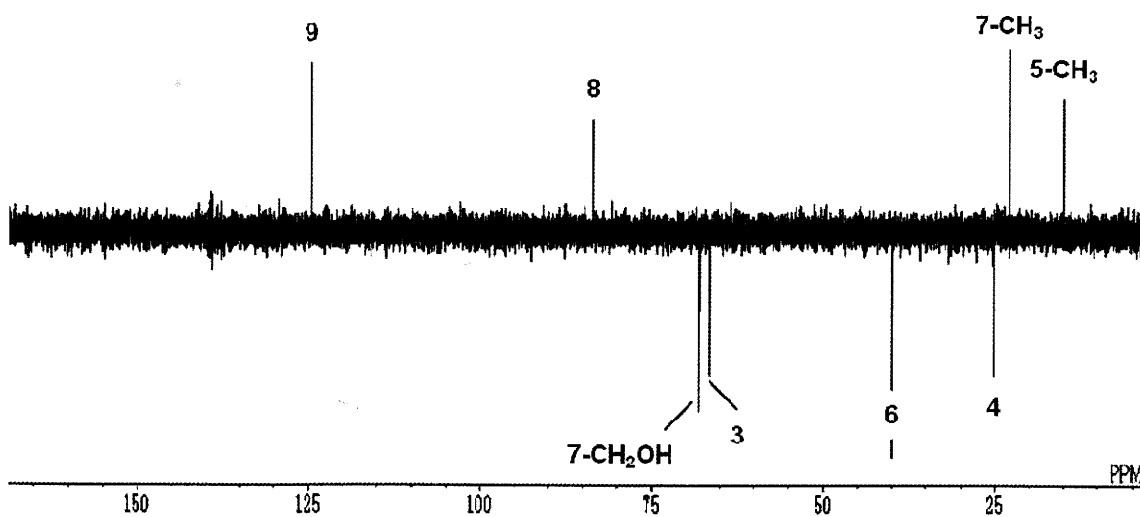


Fig. 51. DEPT spectrum of 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

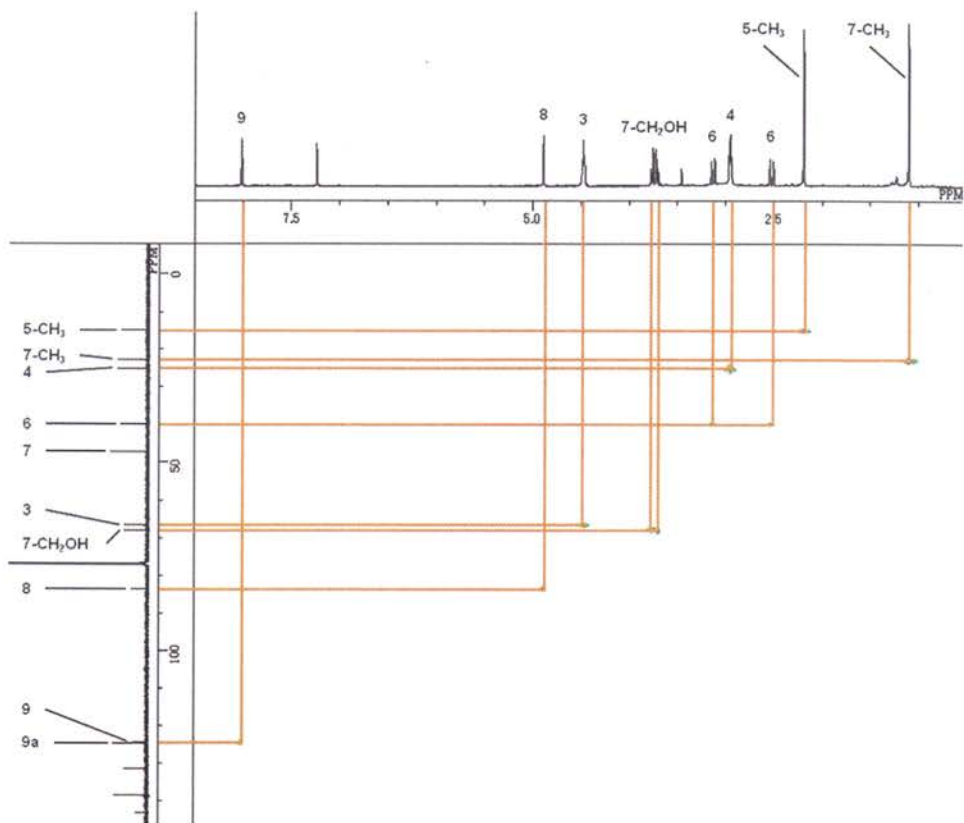


Fig. 52. HMBC spectrum of 5 (in CDCl<sub>3</sub>).

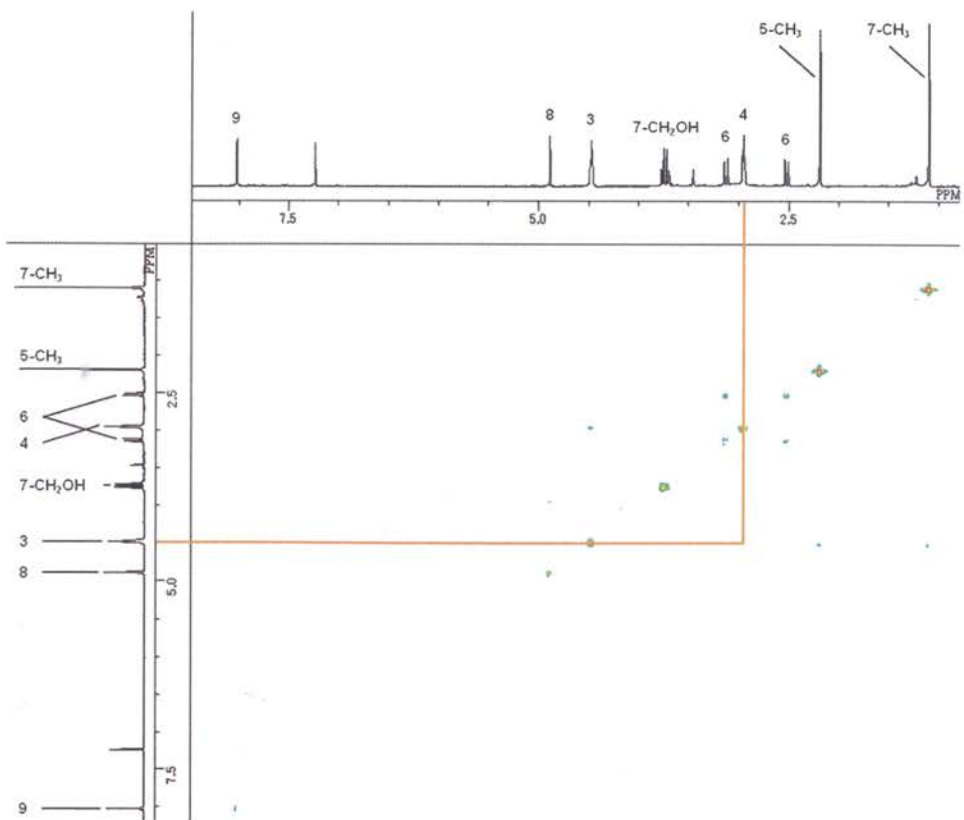


Fig. 53. COSY spectrum of 5 (in CDCl<sub>3</sub>).

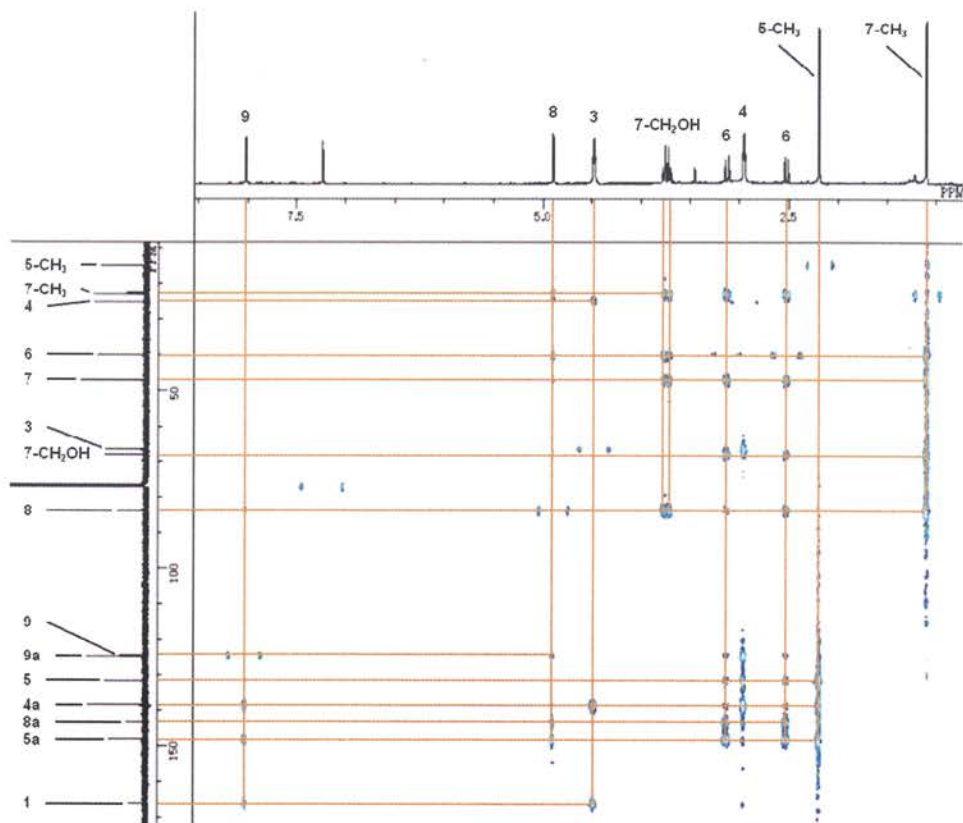


Fig. 54. HMBC spectrum of 5 (in CDCl<sub>3</sub>).

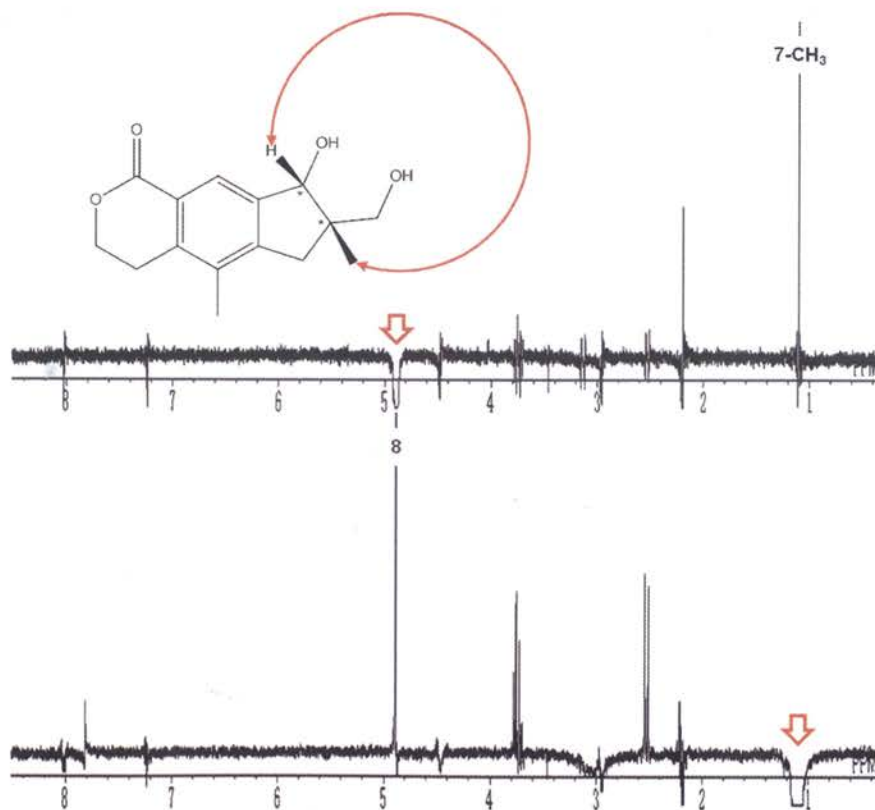
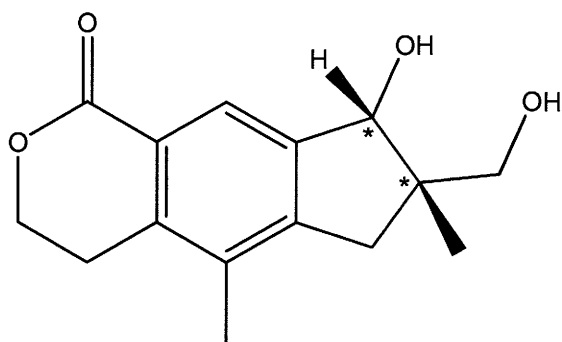


Fig. 55. NOE difference experiment of 5 (in CDCl<sub>3</sub>).



**Table 6.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for 5 (in  $\text{CDCl}_3$ ).**

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		166.0	
3	4.48 (dd, 5.5, 5.5)	66.7	1, 4, 4a
4	2.96 (dd, 5.5, 5.5)	25.2	3, 4a, 5, 9a
4a		138.5	
5		131.5	
5a		148.2	
6	2.53 (d, 16.8) 3.13 (d, 16.8)	40.0	5, 5a, 7, 8, 8a, 7- $\text{CH}_3$ , 7- $\text{CH}_2\text{OH}$
7		47.1	
8	4.89 (s)	83.6	5a, 6, 7, 8a, 9, 7- $\text{CH}_3$ , 7- $\text{CH}_2\text{OH}$
8a		143.1	
9	8.02 (s)	124.6	1, 4a, 5a, 8
9a		124.3	
5- $\text{CH}_3$	2.20 (s)	15.1	4a, 5, 5a
7- $\text{CH}_3$	1.11 (s)	23.0	6, 7, 8, 7- $\text{CH}_2\text{OH}$
7- $\text{CH}_2\text{OH}$	3.72 (d, 11.3) 3.77 (d, 11.3)	68.1	6, 7, 8, 7- $\text{CH}_3$



**Fig. 56. Applanatine E (5).**

## 2-2-6 化合物 6 の構造解析

化合物 6 は無色油状物質として単離された。ESIMS において  $m/z$  269  $[M+Na]^+$  の分子イオンピークが観測された。IR において 1715 (C=O)、3410  $\text{cm}^{-1}$  (OH) にそれぞれ吸収ピークが観測された。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$  および各種スペクトルデータの比較により、化合物 6 は化合物 5 の 8 位のヒドロキシ基をもたない類縁体であることが示唆された (Fig. 58, 59, Table 7)。構造解析により、化合物 6 を echinolactone D ((*S*)-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one) と同定した (Fig. 57, 60)。化合物 6 は天然物としてコウヤクマンネンハリタケ (*Echinodontium japonicum* Imazeki) の培養ろ液から単離されたのが最初である<sup>18</sup>。また、生物活性として、レタスに対する植物成長促進活性が報告されている<sup>18</sup>。

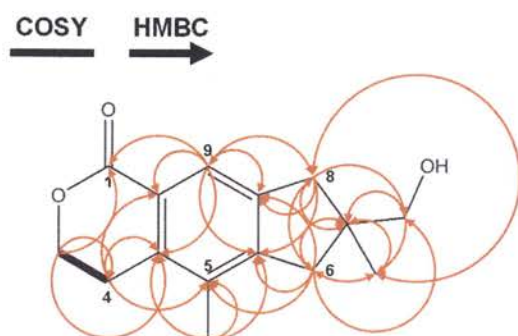


Fig. 57. COSY and HMBC correlations in 6.

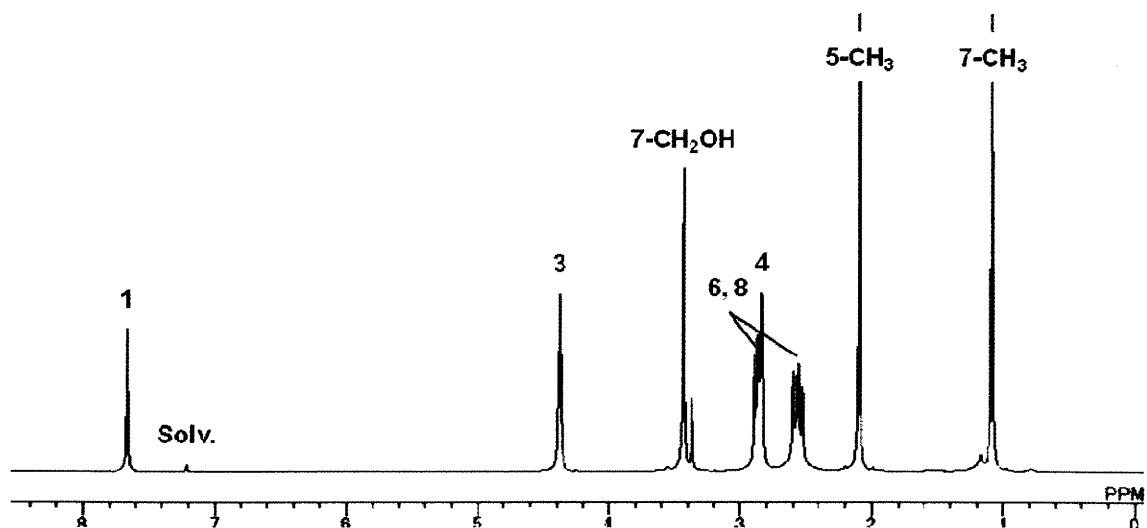


Fig. 58.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of 6 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

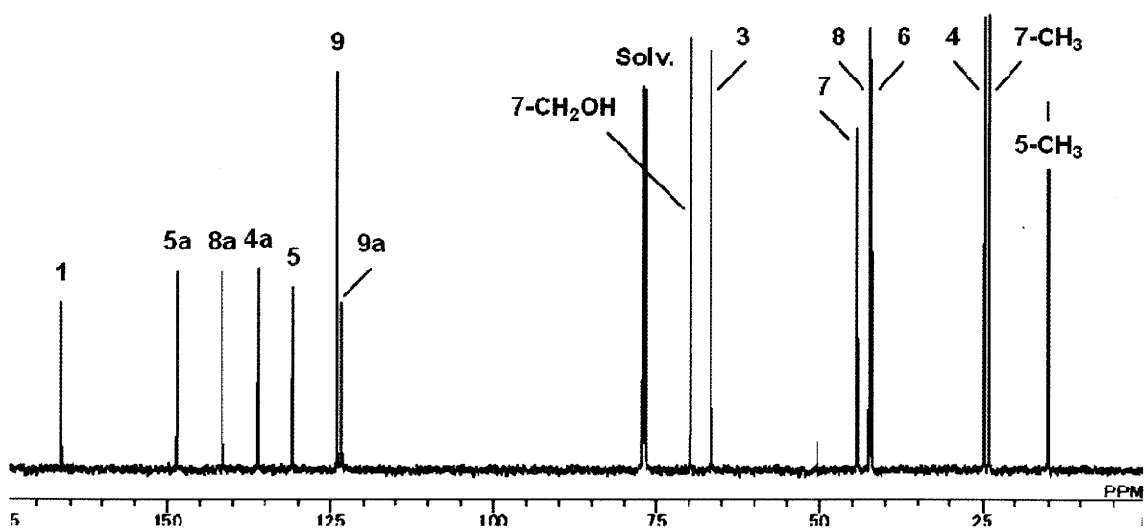
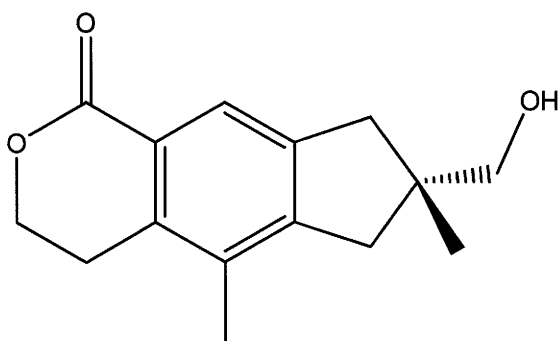


Fig. 59.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of 6 (in  $\text{CDCl}_3$ ).

**Table 7.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data for 6 (in  $\text{CDCl}_3$ ).**

Position	$^1\text{H}$ $\delta$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$^{13}\text{C}$ $\delta$	HMBC $^1\text{H}$ to $^{13}\text{C}$
1		166.3	
3	4.38 (dd, 4.0, 4.5)	66.6	1, 4, 4a
4	2.87 (dd, 12.5, 14.5)	24.8	4a, 5, 9a
4a		136.2	
5		130.8	
5a		148.6	
6	2.54 (d, 14.5) 2.88 (d, 14.5)	42.1	5, 5a, 7, 8, 8a, 7- $\text{CH}_3$ , 7- $\text{CH}_2\text{OH}$
7		44.4	
8	2.59 (d, 13.5) 2.88 (d, 14.5)	42.4	5a, 6, 7, 8a, 9, 7- $\text{CH}_3$ , 7- $\text{CH}_2\text{OH}$
8a		141.5	
9	7.67 (s)	124.0	1, 4a, 5a, 8, 8a, 9a
9a		123.3	
5- $\text{CH}_3$	2.10 (s)	15.1	4a, 5, 5a
7- $\text{CH}_3$	1.09 (s)	24.1	6, 7, 8
7- $\text{CH}_2\text{OH}$	3.44 (s)	69.8	7, 7- $\text{CH}_3$



**Fig. 60. Echinolactone D (6).**

### 第 3 節 抗口腔内細菌活性試験

コフキサノコシカケの培養ろ液の酢酸エチル可溶部から単離した各化合物について *F. nucleatum* に対する抗細菌活性試験を行った。

*F. nucleatum* をトリプチケースソイ液体培地に移植して 2 日間前培養を行い、*F. nucleatum* の培養液に濃度調整した applanatines A-E (1-5) および echinolactone D (6) をそれぞれ添加して 3 日間本培養を行った。その結果、対照区の thymol と比較して、applanatines A (1), B (2), D (4) には強い抗細菌活性が確認され、applanatine C (3), echinolactone D (6) には同じまたは弱いながら抗細菌活性が確認された (Table 8)。

**Table 8. Antibiotic effect of the each compound from *G. applanatum* on the growth of *F. nucleatum*.**

	MIC <sup>a</sup>					
Compound	1	2	3	4	5	6
ppm	3.13	3.13	100	3.13	n.t. <sup>b</sup>	200
( $\mu$ M)	(11.3)	(11.3)	(360)	(10.4)		(813)
Positive control	Thymol					
ppm	100					
( $\mu$ M)	(667)					

<sup>a</sup> Minimum inhibitory concentration.

<sup>b</sup> Not tested.

## 第 4 節 考察

コフキサノコシカケの培養ろ液から単離された applanatines A-C (1-3) の構造 - 活性相関について考察した。*F. nucleatum* に対する活性において、シクロペンタンの部分構造にヒドロキシメチルが存在する applanatines A (1), B (2) には強い抗細菌活性が確認され、ベンゼンの部分構造にヒドロキシメチルが存在する applanatine C (3) には弱い抗細菌活性が確認されたことから、このヒドロキシメチルの位置がこの抗細菌活性に重要であることが示唆される (Fig. 61)。

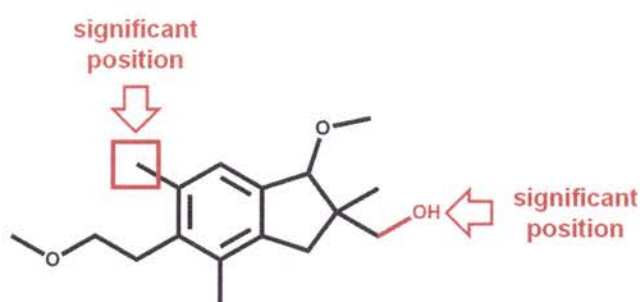
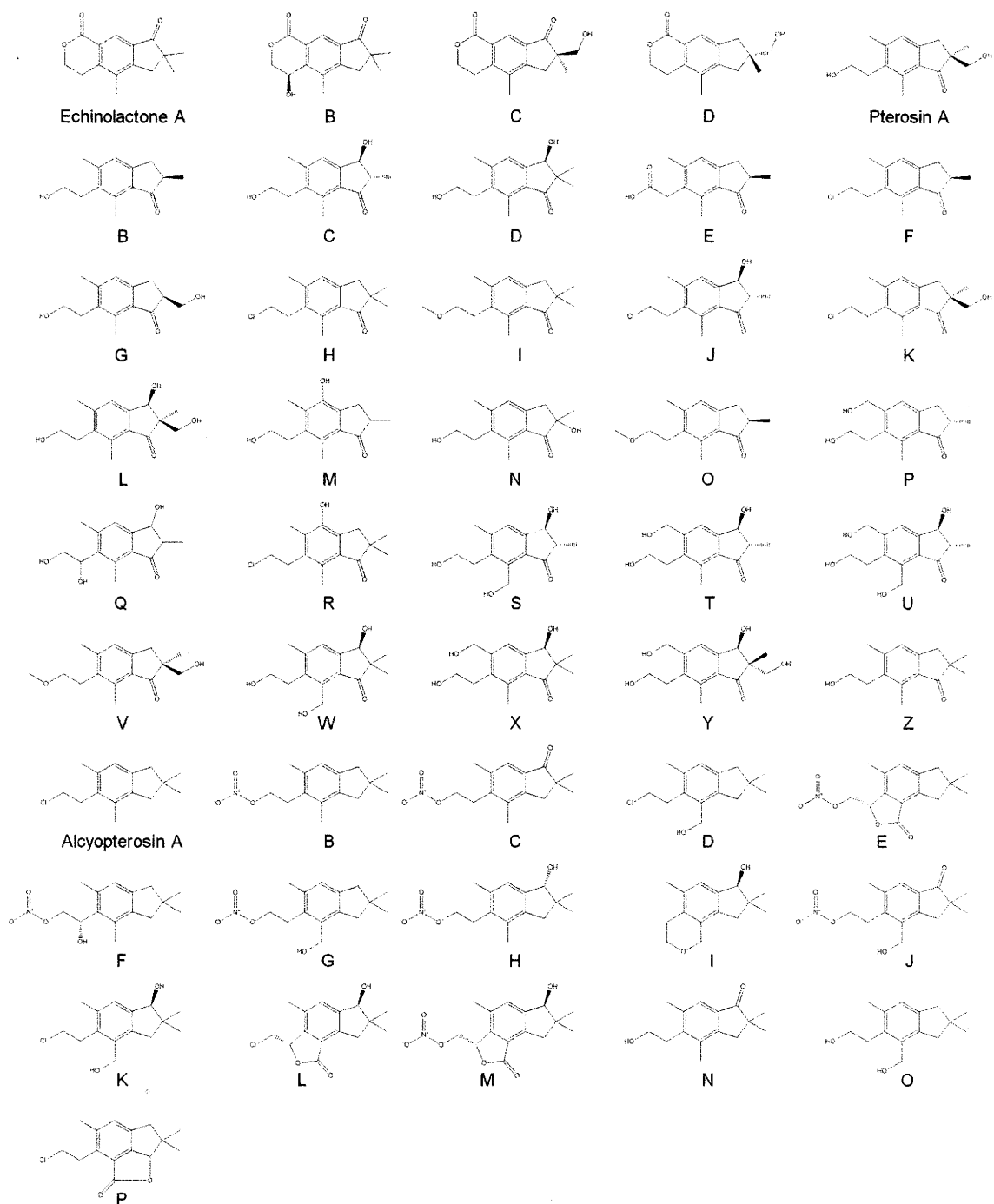


Fig. 61. Structure-activity relationship of applanatines toward *F. nucleatum*.

Applanatines A-E (1-5) および echinolactone D (6) は illudalane sesquiterpenoid 類に分類される化合物群である。Illudalane sesquiterpenoid 類は天然物として、コウヤクマンネンハリタケ (*E. japonicum* Imazeki) に由来する echinolactones<sup>18,19</sup>、イノモトソウ (*Pteris multifida*)、コバノイシカグマ (*Dennstaedtia scabra*)、ニシノコハチジョウシダ (*P. kiuschiuensis*)、ワラビ (*P. aquilinum*, *Pteridium bella*) 等に由来する pterosins<sup>20-27</sup>、軟質サンゴ (*Alcyonium grandis*, *A. paessleri*) に由来する alcyopterosins<sup>28,29</sup> 等、数多くの化合物が単離されている (Fig. 62)。

また、生物活性として、echinolactones A, B, D はレタスに対する植物成長促進活性<sup>18,19</sup>、pterosins B, N, O, alcyopterosins A, C, E, H はヒト腫瘍細胞系に対する細胞毒性<sup>20,29,30</sup> 等が報告されている。しかし、illudalane sesquiterpenoid 類に抗口腔内細菌活性が示されたのは最初の報告である。抗菌薬の長期間にわたる使用は困難とされている中で新しい抗口腔内細菌活性物質を発見したことは非常に有効であり<sup>13-15</sup>、さらに、このような薬理活性の高い化合物群にはさらなる機能性と医薬品の発展に対する貢献を期待できる。



**Fig. 62. Chemical structures of illudalane sesquiterpenoids.**

Each compound has been isolated from natural source; echinolactones from the mushroom (fungus); pterosins from the pteridophytes (plants); alcyopterosins from the soft corals (animals).

## 第 3 章 実験部

### 第 1 節 使用機器および材料

#### 3-1-1 機器類

- NMR** : JMN-EX-270 FT NMR Spectrometer (JEOL)  
Lambda 500 FT NMR Spectrometer (JEOL)
- MS** : Accu TOF LC-plus JMS-T100LP Mass Spectrometer (JEOL)
- IR** : A-102 Diffraction Grating Infrared Spectrometer (JASCO)
- [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>** : Digital polarimeter DIP-500 (JASCO)
- HPLC** : Column ; Develosil C30-UG-15/30 (Nomura Chemical)  
Develosil C30-UG-5 (Nomura Chemical)  
CAPCELL PAK C18 AQ (Shiseido)
- Pump ; PU-2089 Plus Quaternary Gradient Pump (JASCO)  
PU-2080 Plus Intelligent HPLC Pump (JASCO)  
L-2130 (HITACHI)
- Detector ; UV-2075 Plus Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)  
875-UV Intelligent UV/VIS Detector (JASCO)  
diode Array Detector L-2455(HITACHI)
- Recorder ; 807-IT Integrator (JASCO)
- Automatic sampler ; AS-2055 Plus Intelligent Sampler (JASCO)
- Software ; Chromatography Data Station ChromNAV (JASCO)  
ELITE(HITACHI)
- Interface ; LC-NeII/ADC (JASCO)
- Silica gel** : 60N for column chromatography (Kanto Chemical Co., Inc.)
- ODS gel** : Cosmosil 140C<sub>18</sub>-OPN for column chromatography (nacalai tesque)
- TLC** : DC-Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck Ltd.)  
DC-Alufolien RP-18 F<sub>254</sub> (Merck Ltd.)



### 3-1-2 材料

森林総合研究所に保管されているコフキサルノコシカケの種菌 (*Ganoderma applanatum*) を使用した。抗口腔内細菌活性試験には、株式会社ロッテ中央研究所に保管されている歯周病細菌 (*Fusobacterium nucleatum* ATCC25586) を使用した。

## 第 2 節 コフキサノコシカケ由来の抗口腔内細菌活性物質の単離・精製

コフキサノコシカケの種菌をポテトデキストロース液体培地 (250 mL; 0.4% ポテト抽出物, 2.0% デキストロース, Difco) を注入した三角フラスコ (500 mL) に移植し、温度 22°C、回転数 130 rpm の条件で 4 週間培養を行った。その後、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。菌糸体は凍結乾燥後破碎し、*n*-ヘキサン (3回)、酢酸エチル (3回)、エタノール (3回)、水 (3回) で順次浸漬抽出を行い、菌糸体 (1.01 g) から *n*-ヘキサン可溶部 (20.6 mg)、酢酸エチル可溶部 (207.3 mg)、エタノール可溶部 (238.0 mg)、水可溶部 (211.9 mg) を得た。培養ろ液は減圧濃縮後、*n*-ヘキサン (3回)、酢酸エチル (5回)、エタノール (3回)、水 (1回) で順次浸漬抽出を行い、培養ろ液 (1.5 L) から *n*-ヘキサン可溶部 (23.0 mg)、酢酸エチル可溶部 (288.8 mg)、エタノール可溶部 (263.7 mg)、水可溶部 (42.0 g) を得た。さらに、大量培養を行い、培養ろ液 (30 L) から酢酸エチル可溶部 (15.5 g) を得た。

培養ろ液の酢酸エチル可溶部 (15.5 g) をシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 250 g, 35  $\phi$   $\times$  520 mm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc 90:10, 70:30, 50:50, EtOAc, EtOAc/MeOH 70:30, 50:50, MeOH) により 13 画分に分画した。画分 8 (2.2 g) は ODS ゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (ODS gel Cosmosil 140C<sub>18</sub>-OPN, 200 g, 35  $\phi$   $\times$  220 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 50:50, MeOH) により 50% MeOH 溶出部と MeOH 溶出部の 2 画分に分画し、さらに、画分 8-1 (1.4 g) は逆相 HPLC (Develosil C30-UG-15/30, 50  $\phi$   $\times$  500 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 50:50) により 12 画分に分画した。さらに、画分 8-1-8 (50.7 mg) から逆相 HPLC (Develosil C30-UG-5, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 40:60) によって化合物 **6** (31.8 mg) を単離した。画分 9 (3.7 g) はシリカゲルのフラッシュカラムクロマトグラフィー (silica gel 60N, 250 g, 35  $\phi$   $\times$  520 mm; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone 95:5, 90:10, 80:20, 60:40, 30:70, acetone, acetone/MeOH 50:50, MeOH) により 15 画分に分画し、さらに、画分 9-2 (20.4 mg), 9-3 (30.4 mg), 9-4 (52.7 mg) から逆相 HPLC (Develosil C30-UG-5, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 60:40) によって化合物 **1** (4.0 mg, from fraction 9-2), **2** (9.0 mg, from fraction 9-3), **3** (2.3 mg, from fraction 9-4), **4** (2.2 mg, from fraction 9-2 and 9-3) をそれぞれ単離した。また、画分 9-5 (126.2 mg) は逆相 HPLC (CAPCELL PAK C18 AQ, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 70:30) により 9 画分に分画し、さらに、画分 9-5-4 (8.0 mg) から逆相 HPLC (CAPCELL PAK C18 AQ, 20  $\phi$   $\times$  250 mm; MeOH/H<sub>2</sub>O 50:50) によって化合物 **5** (2.0 mg) を単離した。

**Applanatine A (1)**. Colorless oil;  $[\alpha]_D^{25}$  -26 (*c* 0.2, MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 3460 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, see Fig. 6, 7 and Table 2; ESIMS *m/z* 301 [M+Na]<sup>+</sup>; HRESIMS *m/z* 301.1761 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>17</sub>H<sub>26</sub>NaO<sub>3</sub>, 301.1780).

**Applanatine B (2).** Colorless oil;  $[\alpha]_D^{25}$  -20 (*c* 0.9, MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 3457  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 17, 18 and Table 3; ESIMS  $m/z$  301  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  301.1763  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NaO}_3$ , 301.1780).

**Applanatine C (3).** Colorless oil;  $[\alpha]_D^{25}$  -9.5 (*c* 0.2, MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 3421  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 28, 29 and Table 4; ESIMS  $m/z$  301  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  301.1780  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NaO}_3$ , 301.1780).

**Applanatine D (4).** Colorless oil;  $[\alpha]_D^{25}$  +45 (*c* 0.1, MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1718  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 38, 39 and Table 5; ESIMS  $m/z$  303  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  303.1619  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_4$ , 303.1596).

**Applanatine E (5).** Colorless oil;  $[\alpha]_D^{23}$  +24 (*c* 0.2, MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1703, 3400  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 49, 50 and Table 6; ESIMS  $m/z$  285  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; HRESIMS  $m/z$  285.1098  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{NaO}_4$ , 285.1103).

**Echinolactone D (6).** Colorless oil;  $[\alpha]_D^{29}$  +1.0 (*c* 0,5 MeOH); IR (neat,  $\nu_{\max}$ ): 1715, 3410  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR, see Fig. 58, 59 and Table 7; ESIMS  $m/z$  269  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

### 第 3 節 抗口腔内細菌活性試験

ブレインハートインフュージョン寒天培地 (100 mL; 0.6% ウシ脳・心臓抽出物、0.4% 動物組織・ペプシン消化物、1.1% カゼイン・膵臓液消化物、0.4% 塩化ナトリウム、0.2% デキストロース、0.2% リン酸水素二ナトリウム、1.0% 寒天、BBL) で保存された *F. nucleatum* ATCC25586 株をトリプチケースソイ液体培地 (100 mL; 3.0% 大豆ペプトン、BBL; 0.3% 酵母抽出物、BD; 0.1% ヘミン-1 N NaOH, Acros organics; 0.1% メナジオン-50% EtOH, Sigma) を注入した三角フラスコ (500 mL) に移植し、37°C の条件で 2 日間前培養を行った。その後、*F. nucleatum* の培養液を 10 希釈し、96 穴プレートに 100  $\mu$ L の希釈培養液を加えた。対照区は 100  $\mu$ L の 2% DMSO で濃度調整をした thymol を加え、試験区は 100  $\mu$ L の 2% DMSO で濃度調整した各種サンプルを加えた。37°C の条件で 3 日間本培養を行った。その後、目視により最小阻害濃度 (MIC) を確認した。

## 論文要旨

近年、キノコから植物成長調節活性、抗腫瘍活性、抗菌活性など多様な生物活性物質が発見され、農業分野および医薬品分野での応用が期待されている。本論文ではフミツキタケ (*Agrocybe praecox*) およびコフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に由来する生物活性物質に関して以下の2つの項目について研究した。

### 1) フミツキタケ (*Agrocybe praecox*) に由来する植物成長調節物質の探索

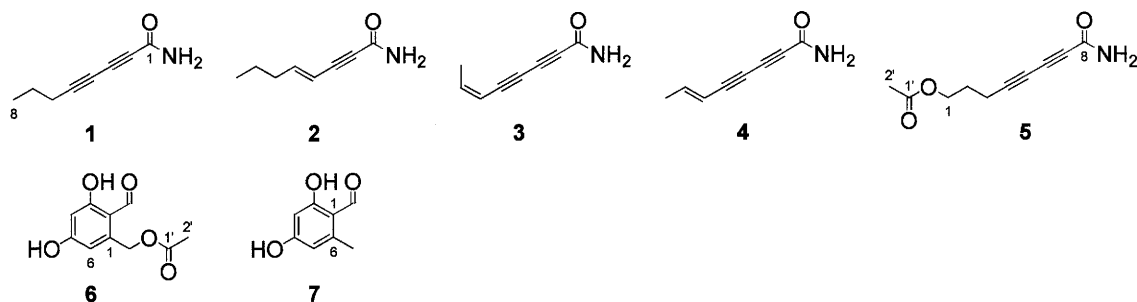
新潟県のあるビニールハウスで、通常よりも肥大したイチゴの実が現れ、その後、根元の土壌からフミツキタケ (*Agrocybe praecox*) が発生するという現象が確認された。一方、フミツキタケ属の菌がイチゴのすくみ症状を引き起こす病原菌としても報告されている。これらの対照的な現象は、この菌が植物に対して成長を調節する物質を産生していることを示唆している。本研究では、フミツキタケに由来する植物成長調節物質の単離・精製および構造解析を目的とした。

上記のビニールハウスから分離したフミツキタケを種菌とし、ポテトデキストロース液体培地に移植して3週間培養を行った。その後、遠心分離、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。培養ろ液を減圧濃縮後、酢酸エチルで分配抽出を行い、生物活性試験の結果を指標にしながら各種クロマトグラフィーによる分画を行った結果、化合物 1-7 を得た。

構造解析の結果、化合物 1-5 をそれぞれ octa-2,4-diyamide (1)、(*E*)-oct-4-en-2-yn amide (2)、(*Z*)-octa-6-en-2,4-diyamide (3)、(*E*)-octa-6-en-2,4-diyamide (4)、8-amino-8-oxoocta-4,6-diynyl acetate (5) と決定し、agrocybynes A-E と命名した。また、化合物 6 を 2-formyl-3,5-dihydroxy benzyl acetate と決定し、化合物 7 を *o*-orsellinaldehyde (2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde) と同定した。

単離した各化合物について、レタス (キク科)、イネ (イネ科) およびイチゴ (バラ科) に対する植物成長調節活性試験を行った。レタスに対しては、化合物 1, 5-7 は 10 nmol 以上、化合物 3, 4 は 1 nmol 以上で胚軸または根の伸長阻害活性を示し、化合物 2 は 10 nmol 以上で胚軸の伸長阻害活性および根の伸長促進活性を示した。また、化合物 1, 2 は 1 nmol で胚軸の伸長促進活性の傾向も観察された。イネに対しては、化合物 1 は 1 nM 以上、化合物 3 は 100 nM で根の伸長阻害活性を示した。また、化合物 1 は 1 μM で地上部の伸長促進活性、化合物 2 は 100 nmol 以上で地上部または根の伸長促進活性の傾向も観察された。イチゴに対しては、化合物 1-5 は 1 nmol/soil·mL で全てに植物体の枯死が観察された。また、化合物 2 は根の伸長も観察された。化合物 1-5 は顕著な活性を示したことから、

フミヅキタケがイチゴの実の成長に対して影響を与えた主な原因物質として活性を示した可能性が示唆される。現在、化合物 **1-5** の合成を行い、化合物 **1-5** のイチゴの実に対する植物成長調節活性試験を試みている。



## 2) コフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に由来する抗口腔内細菌活性物質の探索

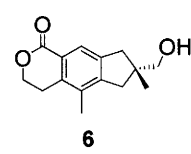
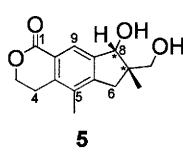
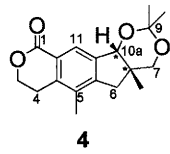
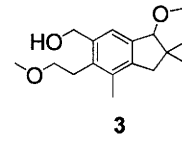
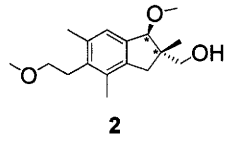
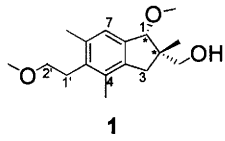
う蝕や歯周病といった慢性変性歯科疾患の原因である口腔内細菌によって引き起こされる疾病は広範囲にわたって人々に存在するため、公衆衛生上において重要な問題である。慢性変性歯科疾患に関与する様々な病原菌に対して抗細菌活性作用のスクリーニングのところ、コフキサルノコシカケ (*Ganoderma applanatum*) に由来する抽出物に歯周病の主要な病原菌である *Fusobacterium nucleatum* に対する抗細菌活性が確認された。本研究では、コフキサルノコシカケに由来する抗口腔内細菌活性物質の単離・精製および構造解析を目的とした。

コフキサルノコシカケの種菌をポテトデキストロース液体培地に移植して 4 週間培養を行った。その後、ろ過によって菌糸体と培養ろ液に分離した。培養ろ液を減圧濃縮後、酢酸エチルで浸漬抽出を行い、生物活性試験の結果を指標にしながら各種クロマトグラフィーによる分画を行った結果、化合物 **1-6** を得た。

構造解析の結果、化合物 **1-5** をそれぞれ ((1*S*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol (**1**)、((1*R*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol (**2**)、(1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,2,4-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-6-yl)methanol (**3**)、(6*aS*\*,10*aS*\*)-5,6*a*,9,9-tetramethyl-3,4,6*a*,7,9,10*a*-hexahydrocyclopenta[*d*][8,10]dioxono[*g*]isochromen-1(6*H*)-one (**4**)、(7*S*\*,8*S*\*)-8-hydroxy-7-(hydroxylmethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one (**5**) と決定し、applanatines A-E と命名した。また、化合物 **6** を echinolactone D ((*S*)-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one) と同定した。

単離した各化合物について、*F. nucleatum* に対する抗細菌活性試験を行った。その結果、対照区の thymol と比較して (positive control, MIC, 100 ppm, 667 μM)、化合物 **1, 2, 4** は強い

抗細菌活性が確認され (1 and 2, MIC, 3.13 ppm, 11.3  $\mu$ M; 4, MIC, 3.13 ppm, 10.4  $\mu$ M)、化合物 3, 6 は同じまたは弱いながら抗細菌活性が確認された (3, MIC, 100 ppm, 360  $\mu$ M; 6, MIC, 200 ppm, 813  $\mu$ M)。



# Summary

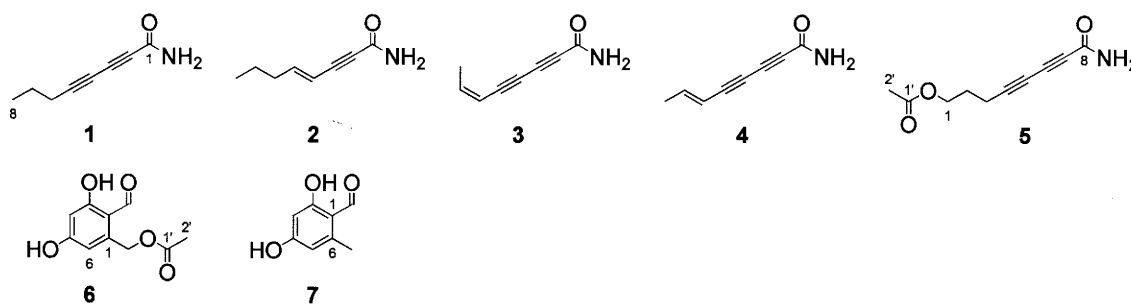
## Chapter 1. Agrocybynes A-E from the culture broth of *Agrocybe praecox*.

In 2007, abnormal enlargement of strawberry fruits was observed and a kind of mushroom grew near the stimulated fruits in a greenhouse in Niigata prefecture, Japan. It was identified as *Agrocybe praecox* (English name, Spring Fieldcap; Japanese name, Fumizukitake). On the other hand, it has been reported that an *Agrocybe* sp. caused cringing of strawberry fruits. These widely varying phenomena related to growth stimulation and suppression, suggest that *Agrocybe* genus produces plant growth regulator(s). Our purpose is to find the plant growth regulators from the fungus, and is chemical studies on effect of the metabolites from the mushroom on plants.

The fungus was cultivated and then it was divided into the mycelia and the culture broth. Each part was successively extracted. The culture broth of *A. praecox*, was concentrated under reduced pressure, and was partitioned between EtOAc and water. The EtOAc-soluble part was fractionated by each column chromatography, being guided by the result of the bioassay, leading to the purification of compounds 1-7.

The structures of those compounds were determined by spectroscopic analyses. As a result, compounds 1-5 were determined as octa-2,4-diyamide (1), (*E*)-oct-4-en-2-ynamide (2), (*Z*)-octa-6-en-2,4-diyamide (3), (*E*)-octa-6-en-2,4-diyamide (4), 8-amino-8-oxoocta-4,6-diynyl acetate (5) and were named agrocybynes A-E, respectively. Furthermore, compound 6 was determined as 2-for myl-3,5-dihydroxybenzyl acetate and compound 7 was identified as *o*-orsellinaldehyde (2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyde).

The effects of the compounds on plant growth were tested toward lettuce (*Asteraceae*), rice (*Poaceae*) and strawberry (*Rosaceae*). As a result, compounds 1, 3-7 inhibited the hypocotyl and the root growth at 1 nmol to 1  $\mu$ mol, and compound 2 inhibited the hypocotyl and the stimulated the root growth at more 10 nmol toward lettuce. Compounds 1 and 3 inhibited the root growth at 1  $\mu$ M and 100 nM toward rice, respectively. Compounds 1-5 were dwarfed and altered in color at 1 nmol/soil-mL toward strawberry. We are now trying to synthesize these compounds and planning cultivating experiments of strawberry fruits using them.





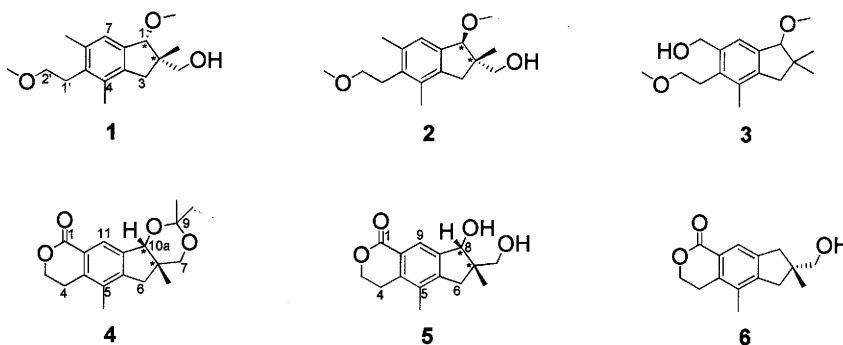
## Chapter 2. Applanatines A-E from the culture broth of *Ganoderma applanatum*.

Chronic-degenerative dental diseases, including periodontal diseases, are widespread in human populations and represent a significant problem for public health. *Fusobacterium nucleatum* is a Gram-negative obligate anaerobe and a prominent member of the oral microflora implicated in periodontitis, a disease affecting 5-15% of most populations worldwide. During screening for the antibiotic activity of extracts of various mushrooms against *F. nucleatum* growth, we found strong inhibitory activity in the extract of the culture broth of a fungus *Ganoderma applanatum* (Japanese name, Kofukisarunokoshikake), and tried to isolate the active molecules from the culture broth.

The fungus was cultivated and then it was divided into the mycelia and the culture broth. Each part was successively extracted. The culture broth of *G. applanatum*, was concentrated under reduced pressure, and was extracted with EtOAc. The EtOAc-soluble part was fractionated by each column chromatography, being guided by the result of the bioassay, leading to the purification of compounds **1-6**.

The structures of those compounds were determined by spectroscopic analyses. As a result, compounds **1-5** were determined as ((1*S*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol (**1**), ((1*R*\*,2*S*\*)-1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,4,6-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-2-yl)methanol (**2**), (1-methoxy-5-(2-methoxyethyl)-2,2,4-trimethyl-2,3-dihydro-1*H*-inden-6-yl)methanol (**3**), (6*aS*\*,10*aS*\*)-5,6*a*,9,9-tetramethyl-3,4,6*a*,7,9,10*a*-hexahydrocyclopenta[*d*][8,10]dioxono[*g*]isochromen-1(6*H*)-one (**4**), (7*S*\*,8*S*\*)-8-hydroxy-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one (**5**) and were named applanatines A-E, respectively. Furthermore, compound **6** was identified as echinolactone D ((*S*)-7-(hydroxymethyl)-5,7-dimethyl-3,4,7,8-tetrahydrocyclopenta[*g*]isochromen-1(6*H*)-one).

The antibiotic effects of the compounds on the growth of *F. nucleatum* were tested *in vitro*. In this experiment, thymol was used as the positive control and its MIC was 100 ppm (667 mM). Compounds **1** (MIC, 3.13 ppm, 11.3 mM), **2** (MIC, 3.13 ppm, 11.3 mM), and **4** (MIC, 3.13 ppm, 10.4 mM) were stronger inhibitors than the control, though **3** and **6** inhibited at higher concentrations, 100 ppm (360 μM) and 200 ppm (813 μM), respectively.



## 参考文献

### 第 1 部

1. 鈴井孝二ら, 日本植物病理學會報, **1980**, 第 46 卷・第 3 号, 396.  
イチゴのすくみ症状を起こすフミツキタケ属菌
2. Graham, J. *et al.*, *Ann. Appl. Biol.* **1997**, *131*, 133-139.  
The effect of the *CpTi* gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae).
3. Graham, J. *et al.*, *Ann. Appl. Biol.* **1995**, *127*, 163-173.  
Towards genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea trypsin inhibitor gene.
4. Graham, J. *et al.*, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2002**, *77*, 163-73.  
The effect of the cowpea trypsin inhibitor in strawberry on damage by vine weevil under field conditions.
5. Graham, J. *et al.*, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2001**, *77*, 33-40.  
The effect of genetically modified strawberries expressing *CpTi* under field conditions.
6. James, D. J. *et al.*, *Phytoparasitica* **1992**, *20*(suppl.), 83-87.  
Progress in the introduction of transgenes for pest resistance in apples and strawberry.
7. 浅尾浩史ら, 生物工学会誌, **2003**, 第 81 卷・第 2 号, 57-63.  
イネ由来キチナーゼ遺伝子を導入したイチゴの安全性評価
8. Asao, H. *et al.*, *Plant Biotechnol.* **1997**, *14*, 145-149.  
Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca fumuli* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene.
9. Jin, W. *et al.*, *Mol. Plant Breed*, **2005**, *3*, 797-800. (in Chinese with English abstract)  
GO gene transformation of strawberry and its resistance to gray mold.
10. Ricardo, V. G. *et al.*, *Transgenic Res.* **2006**, *15*, 57-68.  
Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry.
11. Schestibratov, K. A. *et al.*, *Sci. Hortic.* **2005**, *106*, 177-189.  
Transgenic strawberry plants expressing a *thaumatin* II gene demonstrate enhanced resistance to *Botrytis cinerea*.
12. Morgan, A. *et al.*, *Acta Hortic.* **2002**, *567*, 113-115.  
Production of herbicide tolerant strawberry through genetic engineering.
13. Zhang, Z. *et al.*, *Acta Hortic. Sin.* **2001**, *28*, 189-193. (in Chinese with English abstract)  
Regeneration and transformation in vitro of the strawberry varieties.
14. Firsov, A. P. *et al.*, *Acta Hortic.* **1999**, *484*, 581-586.

- Agrobacterial transformation and transfer of the antifreeze protein gene of winter flounder to the strawberry.
15. Khammuang, S. *et al.*, *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2005**, *27*, 693-703.  
*Agrobacterium*-mediated transformation of modified antifreeze protein gene in strawberry.
  16. Owens, C. L. *et al.*, *Acta Hort.* **2003**, *626*, 93-100.  
Enhancement of freezing tolerance of strawberry by heterologous expression of CBF1.
  17. Owens, C. L. *et al.*, *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **2002**, *127*, 489-494.  
CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry.
  18. Liu, F. *et al.*, *Acta Genet. Sin.* **1997**, *24*, 54-58. (in Chinese with English abstract)  
Salt tolerance of transgenic plants with BADH cDNA.
  19. Wang, J. L. *et al.*, *J. Hort. Sci. Biotechnol.* **2004**, *79*, 735-738.  
Transformation of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) with late embryogenesis abundant protein gene.
  20. Qin, Y. *et al.*, *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26*, 219-232.  
Transgenic strawberry: State of the art for improved traits.
  21. Horowitz, S. *et al.*, *Phytopathology* **2002**, *92*, 743-749.  
Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*.
  22. Sutton J. C. *et al.*, *Ann. Appl. Biol.* **1988**, *113*, 167-175.  
Harvesting and bedding practices in relation to grey mould of strawberries.
  23. Archbold, D. D. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, *45*, 4032-4037.  
Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry, and grape.
  24. Arroyo, F.T. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5701-5707.  
Antifungal activity of strawberry fruit volatile compounds against *Colletotrichum acutatum*.
  25. Fallik, E. *et al.*, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **1998**, *123*, 875-881.  
(*E*)-2-hexenal can stimulate *Botrytis cinerea* growth in vitro and on strawberries in vivo during storage.
  26. Hirai, H. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1707-1712.  
Triterpene phytoalexins from strawberry fruit.
  27. Hébert, C. *et al.*, *Acta Hort.* **2002**, *567*, 659-661.  
Strawberry proanthocyanidins: biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability
  28. Jersch, S. *et al.*, *J. Plant Dis. Protect.* **1989**, *96*, 365-378.  
Proanthocyanidins as basis for quiescence of *Botrytis cinerea* in immature strawberry fruits.

29. Francisco, A. R. *et al.*, *Plant Cell Physiol.* **2011**, *52*, 1873-1903.  
The strawberry plant defense mechanism: a molecular review.
30. Kähkönen, M. A. *et al.*, *Eur. J. Soil. Biol.* **2011**, *47*, 108-113.  
Hydrolytic enzyme activities, carbon dioxide production and the growth of litter degrading fungi in different soil layers in a coniferous forest in Northern Finland.
31. An, X. *et al.*, *Acta Sci. Natur. Univ. Sunyatseni* **2008**, *47*, 93-97. (in Chinese with English abstract)  
Growth and enrichment responses of *Agrocybe praecox* hyphae to single and combined stress of Cd and Pb.
32. Casieri, L. *et al.*, *Antonie Leeuwenhoek* **2010**, *98*, 483-504.  
Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading *Basidiomycetes* for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity.
33. Gramss, G. *et al.*, *J. Basic Microbiol.* **2007**, *47*, 309-316.  
Microbial competition, lack in macronutrients, and acidity as main obstacles to the transfer of basidiomycetous ground fungi into (organically or heavy-metal contaminated) soils.
34. Kähkönen, M. A. *et al.*, *Chemosphere* **2008**, *72*, 708-714.  
Hydrolytic and ligninolytic enzyme activities in the Pb contaminated soil inoculated with litter-decomposing fungi.
35. Steffen, K. T. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *60*, 212-217.  
Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi.
36. Steffen, K. T. *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *54*, 819-825.  
Mineralisation of <sup>14</sup>C-labelled synthetic lignin and ligninolytic enzyme activities of litter-decomposing basidiomycetous fungi.
37. Steffen, K. T. *et al.*, *Enzyme Microb. Tech.* **2002**, *30*, 550-555.  
Purification and characterization of manganese peroxidases from the litter-decomposing basidiomycetes *Agrocybe praecox* and *Stropharia coronilla*.
38. Steffen, K. T. *et al.*, *Biodegradation* **2007**, *18*, 359-369.  
Enhancement of bioconversion of high-molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated non-sterile soil by litter-decomposing fungi.
39. Valentin, L. *et al.*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2009**, *84*, 851-858.  
Evaluation of basidiomycetous fungi for pretreatment of contaminated soil.
40. Guilfoyle, T. *Nature* **2007**, *446*, 621-622.  
Sticking with auxin.
41. Tan, X. *et al.*, *Nature* **2007**, *446*, 640-645.  
Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase.

42. Hedden, P. *Nature* **2008**, *456*, 455-456.  
Gibberellins close the lid.
43. Murase, K. *et al.*, *Nature* **2008**, *456*, 459-463.  
Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor GID1.
44. Miyazono, K. *et al.*, *Nature* **2009**, *462*, 609-614.  
Structural basis of abscisic acid signaling.
45. Sheard, L. B. *et al.*, *Nature* **2009**, *462*, 575-576.  
Signal advance for abscisic acid.
46. Farmer, E. E. *Nature* **2007**, *488*, 659-660.  
Jasmonate perception machines.
47. Sheard, L. B. *et al.*, *Nature* **2010**, *468*, 400-405.  
Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor.
48. Akiyama, K. *et al.*, *Nature* **2005**, *435*, 824-827.  
Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi.
49. Umehara, M. *et al.*, *Nature* **2008**, *455*, 195-200.  
Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones.
50. Choi, J-H. *et al.*, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1373-1377.  
Disclosure of the "fairy" of fairy-ring forming fungus *Lepista sordida*.
51. Choi, J-H. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 9956-9959.  
Plant-growth regulator, imidazole-4-carboxamide produced by fairy-ring forming fungus *Lepista sordida*.
52. Bohlmann, F. *et al.*, *Chem. Ber.* **1956**, *89*, 2268-2272.  
Polyacetylene compounds. XVIII. The light absorption of polyynecarboxylic acid nitriles.
53. Prevost, S. *et al.*, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1961**, 2171-2175.  
Preparation of naturally occurring C10 and C13 polyacetylenes and of related compounds.
54. Ballantine, J. A. *et al. Phytochemistry* **1968**, *7*, 1529-1534.  
Biosynthesis of phenols. XVII. Some phenolic metabolites of mutant strains of *Aspergillus rugulosus*.
55. Hirst, L. E. *J. Chem. Soc.* **1927**, 2490-2495.  
Derivatives of orcinol. I.
56. Lin, J-T. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 7564-7569.  
*o*-Orsellinaldehyde from the submerged culture of the edible mushroom *grifola frondosa* exhibits selective cytotoxic effect against Hep 3B Cells through apoptosis.
57. Kuhnt, D. *et al.*, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1413-1420.  
Antibiotics from basidiomycetes. XXXVII. New inhibitors of cholesterol biosynthesis from cultures of *Xerula melanotricha* Doerfelt.

58. Fujioka, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 96-100.  
Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*.
59. Shen, Y-C. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1686-1688.  
Two new acetylenic derivatives and a new meroditerpenoid from a Taiwanese marine sponge *Strongylophora durissima*.
60. Watanabe, K. *et al.*, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9271-9276.  
Strongylodiols A, B and C, new cytotoxic acetylenic alcohols isolated from the Okinawa marine sponge of the genus *Strongylophora* as each enantiomeric mixture with a different ratio.
61. Watanabe, K. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1001-1005.  
Acetylenic strongylodiols from a *Petrosia* (*Strongylophora*) Okinawa marine sponge.
62. Minto, R. E. *et al.*, *Progr. Lipid Res.* **2008**, *47*, 233-306.  
Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products.
63. Furumi, K. *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 93-96.  
Novel antiproliferative falcarindiol furanocoumarin ethers from the root of *Angelica japonica*.
64. Batista, U. G. *et al.*, *Can. J. Bot.* **1991**, *69*, 822-830.  
Accumulation of phytoalexins in the compatible interaction between *Cladosporium fulvum* and tomato in relation to colonization.
65. Harding, V. K. *et al.*, *Physiol. Plant Pathol.* **1981**, *18*, 7-15.  
The accumulation of inhibitory compounds in the induced resistance response of carrot slices to *Botrytis cinerea*.
66. Nawar, H. F. *et al.*, *J. Phytopathol.* **2003**, *151*, 564-570.  
Wyerone acid phytoalexin synthesis and peroxidase activity as markers for resistance of broad beans to chocolate spot disease.
67. Allen, E. H. *et al.*, *Physiol. Plant Pathol.* **1971**, *1*, 235-240.  
Time course of safynol accumulation in resistant and susceptible safflower infected with *Phytophthora drechsleri*.
68. Allen, E. H. *et al.*, *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1579-1582.  
*trans-trans*-3,11-Tridecadiene-5,7,9-triyn-1,2-diol, an antifungal polyacetylene from diseased safflower (*Carthamus tinctorius*).
69. Tietjen, K. G. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **1984**, *229*, 136-144.  
Induction and suppression of phytoalexin biosynthesis in cultured cells of safflower, *Carthamus tinctorius* L., by metabolites of *Alternaria carthami* Chowdhury.
70. Certik, M. *et al.*, *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 1-14.  
Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production.
71. Otwinowski, Z. *et al.*, *Methods in Enzymol.* **1997**, *276*, 307-326.

Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.

72. Burla, M. C. *et al.*, *J. Appl. Cryst.* **2005**, *38*, 381-388.  
*SIR2004*: an improved tool for crystal structure determination and refinement.
73. Sheldrick, G. M., *Acta Crystallogr. Sect. A*, **2008**, *64*, 112-122.  
A short history of *SHELX*.

## 第 2 部

1. Baldai, D. *et al.*, *Mutat. Res.* **2009**, *667*, 118-131.  
Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: The role of gene-environment interactions.
2. 覚道幸男, 歯を守る-歯の病気のしくみとその予防 (ブルーバックス), 講談社, **1976**.
3. 下野正基, 歯科医療の最前線-自分の歯を守るための最新情報 (ブルーバックス), 講談社, **1995**.
4. Potrykus, J. *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* **2009**, *491*, 16-24.  
Kinetic characterization and quaternary structure of glutamate racemase from the periodontal anaerobe *Fusobacterium nucleatum*.
5. Piovano, S. *Anaerobe* **1999**, *5*, 221-227.  
Bacteriology of Most frequent oral anaerobic.
6. Petersen, P. E., the World Oral Health Report 2003: W. H. Organization, Geneva, **2003**.
7. Kolenbrander, P. E. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 3890-3894.  
Intragenetic coaggregation among strains of human oral bacteria: Potential role in primary colonization of the tooth surface.
8. Kolenbrander, P. E. *et al.*, *Infct. Immun.* **1989**, *57*, 3204-3209.  
Inhibition of coaggregation between *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* by Lactose and Related Sugars
9. Kolenbrander, P. E. *et al.*, *Infct. Immun.* **1989**, *57*, 3194-3203.  
Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria.
10. Kolenbrander, P. E. *et al.*, *J. bacteriol.* **1993**, *175*, 3247-3252.  
Adhere today, here tomorrow: Oral bacterial adherence.
11. Costerton, J. W., *Int. J. Antimicrob Agents* **1999**, *11*, 217-221.  
Introduction to biofilm.
12. 前田亮ら, 日本歯周病学会会誌, **2005**, 第 47 巻・第 3 号, 146-152.  
歯周病関連細菌に対する各種抗菌剤の抗菌力について
13. 岩久正明ら, 抗菌剤による新しい歯髄保存法, 日本歯科評論社, **1996**.

14. 星野悦郎ら, 3-Mix MP 法と LSTR 療法, 日本歯科評論社, **2000**.
15. Takushige, T. *et al.*, *Int. Endod. J.* **2004**, *37*, 132-138.  
Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs.
16. Russell, R. *et al.*, *phytochemistry* **2006**, *67*, 1985-2001.  
*Ganoderma* - A therapeutic fungal biofactory.
17. 水野卓ら, キノコの化学・生化学, 学会出版センター, **1992**, 372.
18. Suzuki, S *et al.*, *Naturforsch.* **2006**, *61b*, 1295-1298.  
Echinolactones C and D: Two illudalane sesquiterpenoids isolated from the cultured mycelia of the fungus *Echinodontium japonicum*.
19. Suzuki, S *et al.*, *phytochemistry* **2005**, *66*, 2329-2333.  
Illudalane sesquiterpenoids, echinolactones A and B, from a mycelial culture of *Echinodontium japonicum*.
20. Kuroyanagi, M. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 2762-2764.  
Pterosin N and O, phenylacetylpterosin C, and pteroside P from bracken, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*.
21. Murakami, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1976**, *24*, 1961-1964.  
Chemical and chemotaxonomic studies on the genus *Pteris* and related genera (*Pteridaceae*). XII. Additional Indan-1-one derivatives of the genus *Pteris*.
22. Murakami, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 1630-1632.  
Chemical and chemotaxonomic investigations of the genus *Pteris* and related genera. VII. Chemical investigation of the constituents of *Dennstaedtia scabra*.
23. Murakami, T. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, *23*, 936-939.  
Chemical and chemotaxonomic investigation of the genus *Pteris* and of the related genera. VI. Chemical investigation of the constituents of *Pteris kiuschiuensis*.
24. Murakami, T. *et al.*, *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1743-1746.  
Chemical and chemotaxonomic studies of ferns. Part 25. Pterosin derivatives from the family *Pteridaceae*.
25. Fukuoka, M. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 2365-2385.  
Chemical and toxicological studies on bracken fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum*. II. Structures of pterosins, sesquiterpenes having 1-indanone skeleton.
26. Ouyang, D-W. *et al.*, *Planta med.* **2010**, *76*, 1896-1900.  
Pterosins from *Pteris multifida*.
27. Tanaka, N. *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 3455-3463.  
Chemical and chemotaxonomical studies of ferns. XXXIX. Chemical studies on the constituents of *Pteris bella* Tagawa and *Pteridium aquilinum* subsp. *wightianum* (Wall) Shich.
28. Carbone, M. *et al.*, *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1357-1360.



Illudalane sesquiterpenoids of the alcyopterosin series from the antarctic marine soft coral *Alcyonium grandis*.

29. Palermo, J. A. *et al.*, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4482-4486.

Illudalane sesquiterpenoids from the soft coral *Alcyonium paessleri*: the first natural nitrate esters.

30. Chan, Y-H. *et al.*, *J. Molecules.* **2008**, *13*, 255-266.

New benzoyl glucosides and cytotoxic pterosin sesquiterpenes from *Pteris ensiformis* burm.

## 謝辞

本研究の指導教官である静岡大学創造科学技術大学院自然科学系教育部バイオサイエンス専攻 教授 河岸洋和 先生には、その遂行にあたり終始御指導くださいましたことをここに深謝の意を表します。同大学院 教授 衛藤英男 先生、教授 渡辺修治 先生、静岡大学農学部応用生物化学科 准教授 平井浩文 先生には、副査として御助言を頂くとともに本論文の細部にわたり御指導くださいましたことをここに深謝の意を表します。

本研究の第 1 部において、新潟県森林研究所 松本則行 氏には、フミヅキタケの菌糸体の単離・同定ならびに試料を提供していただきましたことをここに深謝の意を表します。森林総合研究所 関谷敦 氏、静岡大学農学部応用生物化学科 准教授 徳山真治 先生、安西航太 氏には、フミヅキタケの培養を行うにあたり御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。静岡大学農学部共生バイオサイエンス学科 准教授 切岩祥和 先生、桂武彦 先生、小松芳則 氏には、イチゴの栽培を行うにあたり御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。静岡県立大学薬学部分子薬学大講座 教授 菅敏幸 先生、准教授 濱島義隆 先生、助教 浅川倫宏 先生、助教 稲井誠 先生、永尾大祐 氏には、agrocybyne 類の合成を行うにあたり御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。理化学研究所 橋爪大輔 博士には、agrocybyne 類の構造決定を行うにあたり X 線結晶構造解析を行っていただきましたことをここに深謝の意を表します。東京農工大学工学部生命工学科 教授 長澤和夫 先生には、本研究の学術論文を投稿するにあたり御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。

本研究の第 2 部において、森林総合研究所 関谷敦 氏には、コフキサルノコシカケの培養を行うにあたり御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。静岡大学農学部応用生物化学科 堀川まどか 氏、鈴木香里 氏には、コフキサルノコシカケに由来する天然物の単離・精製および構造決定を行うにあたり実験の援助ならびに資料を提供していただきましたことをここに深謝の意を表します。株式会社ロッテ中央研究所 菅野範 博士、志村進 博士には、抗口腔内細菌活性試験を行うにあたり試験の実施ならびに資料を提供していただきましたことをここに深謝の意を表します。

元静岡大学農学部応用生物化学科 教授 現副学長 碓氷泰市 先生、静岡大学農学部応用生物化学科 准教授 村田健臣 先生、特任助教 尾形慎 先生をはじめとする諸先生方には、修士課程時代から御指導ならびに御助言くださいましたことをここに深謝の意を表します。

静岡大学農学部応用生物化学科の本研究室である生物化学研究室に所属する鈴木智大 博士、崔宰熏 博士、Aditya Kulkarni 博士、服部武史 氏および研究室に所属していた上田恵子 博士、杉浦立樹 博士をはじめとする諸先輩方ならびに研究室の方々、静岡県立大学薬学部分子薬学大講座の医薬品製造化学講座に所属する研究室の方々には、この 5 年間大変御世話になりましたことをここに深謝の意を表します。

元東海大学農学部応用動物科学科 教授 信國喜八郎 先生、東海大学農学部応用動物科学科 教授 芝田猛 先生をはじめとする諸先生方には、学部生時代に御指導ならびに御助言くださり、また大学院に進学するにあたり大変御世話になりましたことをここに深謝の意を表します。

最後に、今日まで学問を追及することを許し、それに対して金銭面のみならず精神面においても支えてくださいました家族、そして親戚、友人、知人の方々には、尽くしきれない感謝の意を表します。本当にありがとうございました。