

菌類，主にカビ，と付き合いって40年

| | |
|-------|----------------|
| 誌名 | JSM Mycotoxins |
| ISSN | 02851466 |
| 著者名 | 河合,賢一 |
| 発行元 | 日本マイコトキシン学会 |
| 巻/号 | 64巻2号 |
| 掲載ページ | p. 183-196 |
| 発行年月 | 2014年7月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



菌類，主にカビ，と付き合って40年

河合賢一*

星薬科大学（〒302-0025 茨城県取手市西2-10-26）

要旨

1974年に研究対象として以来約40年間菌類，特にカビと付き合ってきた。その間，*Emericella striata* からの大環状マイコトキシン emestrin の単離を端緒に多くの *Emericella* 属菌の成分検索を実施した。さらに，前記以外の菌類の成分検索を行い，たとえば，*Talaromyces derxii* からアオカビの青色色素のもととなる talaroderxine を得た。後半15年では「さび病菌の冬孢子形成誘導物質の解明」や「重篤な輸入真菌症の原因菌の成分検索」を手掛けたが，いずれも途中で終わってしまったのが残念である。最後に，*Malbranchea filamentosa* から malbrancheoside 類というトリテルペン配糖体，いわゆる，サポニンが単離できたことは私にとって光栄なことである。

キーワード：カビ；菌類；emestrin；emethallicin；malbrancheosides；talaroderxine

（2014年6月21日受付，2014年7月2日受理）

菌類，主にカビの成分研究の端緒，すなわち，カビとの付き合い初めは，昭和49（1974）年4月に星薬科大学に助手として着任した時に上司である仲嶋正一教授（当時，現名誉教授）が梅酢カビを中心に菌類の成分研究をされていたことからであり，ほぼ40年間の長きにわたり，カビ達には数々の研究成果を与えてもらい，感謝している。この間の話をする前に，まず大学院時代の研究について少し述べさせていただく。

酸棗仁のサポニンおよびサポゲニンの構造

私の研究は，昭和43年大学4年生になって，柴田承二教授（当時）が主宰する東京大学薬学部生薬学・植物薬品化学教室に卒論配属になったときに始まる。修士課程を修了して，博士課程に進学すると，柴田先生から与えられた新たなテーマは，「酸棗仁」のサポニン成分の研究であった。サポニンは皆さんご存知だと思うが，ステロイドやトリテルペンの配糖体を指し，私が扱ったのはトリテルペンサポニンの一種である。サポニンの構造決定（平面構造まで）は現在では配糖体のままで二次元 NMR スペクトルを初めとする各種 NMR スペクトルの解析で容易に可能であるが，当時は直接配糖体の構造を決めることはできず，まずサポニンを酸加水分解あるいは酵素分解してそのゲニン部 サポゲニンを得てその構造を決定した後，糖部を決めてサポニン全体の構造を決定するという手順を一般的にとっていた。サポニンの酸加水分解の際にしばしば配糖体を構成しているサポゲニン（真性サポゲニンと呼ぶ）とは異なる化合物が得られることがあり，真性サポゲニンの

連絡先

*〒302-0025 茨城県取手市西2-10-26 電話：0297-74-4773. 電子メール：jf35747@zf7.so-net.ne.jp
カラープリントが本誌 WEB サイトよりダウンロードできます

決定に労力を割くこととなる。

「酸棗仁」はクロウメモドキ科に属するサネブトナツメ (*Zizyphus jujuba* var. *spinosa*) の種子であり、漢薬生薬として催眠作用、鎮静作用があるとされ、不眠・多眠の際に使用したものである。

「酸棗仁」は種子であるため、脂肪油が多く重量の30%を占めていることから、サポニン分画を得るために、まずベンゼンで脱脂した後、メタノールで抽出し、再度エーテルで脱脂して、水とブタノールで分配し、そのブタノール層をサポニン分画とした。この分画には主に2つのサポニンが含まれていることがわかり、極性の高いほうから jujuboside A(1) および B(2) と命名した。

Jujuboside A(1) は snail enzyme で処理すると、jujuboside B(2) を与えることから、どちらも同一のサポゲニンを有するサポニンであると考え、サポニン混合物を酸加水分解したところ、サポゲニンとして 16,17-secodammarane 骨格を有する ebelin lactone(3) のみを与え、糖として glucose, rhamnose, xylose, arabinose の4種を得た。Ebelin lactone(3)¹⁾ は、共役トリエン構造を有するので、強い UV 吸収が観測されるが、元のサポニンは TLC 上全く UV 吸収が観測されず、ebelin lactone(3) が酸棗仁のサポニンの真正サポゲニンでないことは明らかとなった。そこで、酸棗仁の真正サポゲニンの解明のために、jujuboside B(2) を Smith-de Mayo 分解 (過ヨウ素酸酸化後、アルカリ分解)²⁾ を2度繰り返した結果、dammarane 系 triterpene である単一のサポゲニン jujubogenin(4) を得、各種 NMR スペクトル等の解析からその構造を決定した³⁾。酸棗仁のサポニンは前述のとおり、主に二つの成分 jujuboside A(1) 及び B(2) とからなっている。Jujuboside B(2) の糖部は glucose, rhamnose, xylose, arabinose を等モルで与え、jujuboside A(1) は jujuboside B(2) にもう一分子の glucose がさらに結合したものであることを確認して、博士論文は修了し、残念ながらサポニンの構造解明までには至らなかった。Jujuboside A(1) 及び B(2) の構造は後輩である大塚英明君 (現広島大学薬学部名誉教授) に引き継がれ、今とは違って、機器分析の解析のみでなく、反応等を多用して相当苦勞をして解明された⁴⁾。その後、jujubogenin(4) を真正サポゲニンとするサポニンは酸棗仁の他、大棗等数種の薬用植物から単離・構造決定されている。

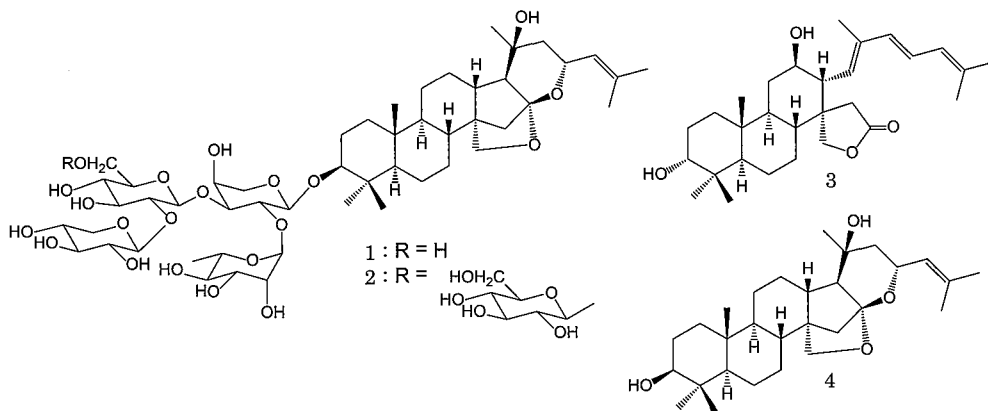


図1 *Zizyphus jujuba* の saponin および sapogenin の構造

カビとの出会い

昭和49年3月に博士課程が修了し、4月から大学の先輩である仲嶋正一教授(当時、現名誉教授)が主宰する星薬科大学薬化学教室に助手として勤め始めた。仲嶋先生は若い頃に梅酢カビ(*Penicillium itaconics*)からitaconitinという特異な構造の化合物を単離し、その構造決定で⁵⁾薬学博士を取得していた。その後もカビを中心とする菌類代謝産物の研究を行っており、植物や生薬と違って採集・購入で材料を手に入れるのではなく、菌株さえあれば培養によりいくらでも多量の成分が得られること、成分検索されていない菌株が植物に比して圧倒的に多いことなどを考慮して、菌類の成分検索を行うこととした。それまでは菌類あるいはカビを実際に手にして扱うことはなく、カビを研究対象として付き合い始める端緒である。ただ大学院時代のサポニンの研究が忘れられず、菌類の代謝産物の研究をしても、しばらくはカビからの配糖体、サポニン様物質の単離を試みていた。しかし、当時の技術や研究対象とした菌の種類が原因なのか、あるいは菌類にはあまり配糖体が存在しないのかは定かではないが、カビからの配糖体の単離はしばらくの間全く成功しなかった。定年退職間際に、ホネタケ科に属する *Marburanchea filamentosa* という菌からトリテルペン類の配糖体、いわゆるサポニンといえるものの単離・構造決定に行き着き、40年来の夢がかなって喜んでいるが、この件は後述することとする。

私が着任した当時既に大学院が設立されており、他の研究室には大学院生がいたが、その総数も少なく、私の研究室には大学院生もおらず、周りにも研究していく仲間も少なく、研究がなかなか進まず、しばらくは悶々とした日々を過ごしていた。その後、徐々にではあるが、大学院生が研究室に来るようになり、4年生(卒論生)の中にも熱心に実験をする学生が増え始め、研究のほうもぼちぼち進展するようになったのは何年か経ってからであった。

Emericella 属菌類との出会い

菌類の研究を続けていくために、菌類のことを少しは知らなくてはと思い、昭和54年頃、国立衛生試験所微生物部真菌室長(当時)宇田川俊一先生を紹介してもらい、お話を聞くとともに菌株の分与をいただき、新たな研究に着手した。これ以後、宇田川先生には折に触れ菌類の相談を受けてもらうとともに、研究材料である先生が分離された菌株を数え切れないほど分与いただき、私の研究にとってなくてはならない人となった。

菌類の生活環は一般に完全世代 (teleomorph) と不完全世代 (anamorph) からなっており、菌類はその完全世代の子実体や胞子等をもとに、子囊菌、担子菌等数種に分類されている。子囊菌は一般にカビといわれ、担子菌は一般にキノコと呼ばれているが、子囊菌であってキノコあるいは担子菌でもカビと呼ばれるものも一部に存在している。宇田川先生の話聞くうちに、完全世代を持つ子囊菌に興味をもち、そのうちでも不完全世代では *Aspergillus nidulans* グループに属する *Emericella* 属菌に着目し、その菌株をいくつかもらい、それらの成分検索を開始した。*Emericella* 属菌は当時30種ほどが知られており、砂漠・炭鉱等過酷な条件に生育するものも多く、珍しい代謝産物が得られる可能性を信じたことが研究を始めるきっかけだった。いくつかの菌株を試した後、*Emericella striata* に出会ったので、その成分検索について述べる。

E. striata の毒性成分 emestrin

E. striata (anamorph: *Aspergillus striatus*) 80-NE-22 株はネパールの生薬市場で購入した香辛料クミンから分離した菌株であり, 本菌株を Zapek-Dox 培地で培養し, 菌体と菌液に分けたものを分離・精製にかけた. 菌体をアセトンで抽出したエキスが強い抗真菌活性を示したので, 本エキスをシリカゲルカラムクロマトグラフィーに繰り返し付し, 既知成分 paxilline, emericelline などとともに, 主要成分の一つとして得られた結晶を emestrin (5) と命名し, その構造解析を開始した. 各種 NMR スペクトル等を検討していくうちに本化合物は, 千葉大学生物活性研究所山崎幹夫教授 (当時) が構造未知のまま論文発表していた *Emericella quodrilineata* から単離された EQ-1⁶⁾ と同一化合物と同定した. 単結晶 X 線結晶解析に適合した良い結晶が得られたので, 大学院生時代から慣れ親しんでいた単結晶 X 線結晶解析を行ってその相対構造を確定した. Emestrin (5) の絶対構造は既知の epipolythiodioxopiperazine 誘導体との CD スペクトルの比較から決定した⁷⁾. 本化合物は大環状構造を有する珍しい構造 (5) である^{7,8)}. 化学的な実験を続行し, 5 をアルカリ加水分解, Raney nickel 処理で, 脱水・脱硫が同時に進行した 6 を得た⁸⁾. 本化合物を分解して, violaceic acid (7)⁹⁾ を得ることに失敗したが, 本菌の培養濾液からは既に violaceic acid (7) を多量に得ていた.

Emestrin (5) は *Emericella striata* や *Emericella quodrilineata* に特徴的な化合物ではなく, その後の検索で *Emericella* 属菌類の 3 分の 1 ほどにその存在が確認された. その際, emestrin (5) を菌体内

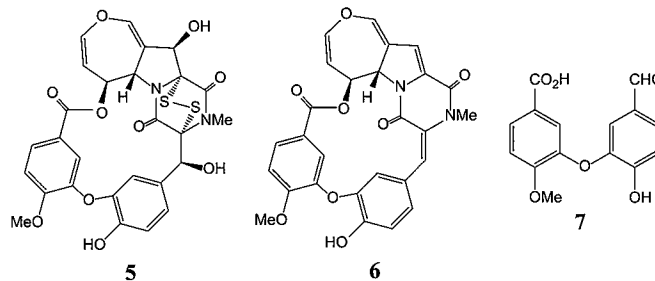


図2 Emestrin (5) およびその類縁体の構造

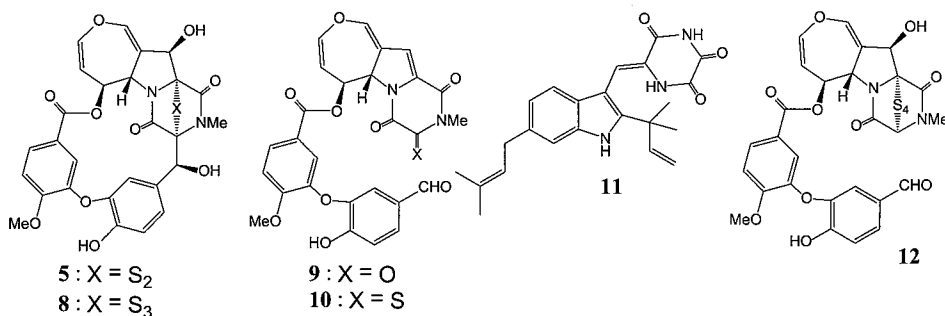


図3 Emestrin (5) 関連化合物の構造

に産生する菌株は必ずと言っていいほどその部分構造である violaceic acid(7) を培養濾液に産生していることを確認したので、現在 violaceic acid(7) は emestrin(5) から二次的に分解してできるものと考えている。

Emestrin(5) は強い抗真菌活性があることを確認していたが、寺尾らによりマウスに対する強い急性毒性 (LD₅₀ 17.7 mg/24 hr, 13.0 mg/48 hr) が確定し、食品・動物飼料に混入すればマイコトキシンになる可能性が十分にあると推定された¹⁰⁾。一方、石崎らは emestrin(5) が肝ミトコンドリアの呼吸阻害作用および膨潤化誘起作用を有することを見出している¹¹⁾。

Emestrin 誘導体の単離

E. striata の菌体からは、主要成分の一つとして emestrin(5) を単離しているが、その後の検索で、微量成分として epitrithiodioxopiperazine 誘導体である emestrin B(8) を単離した¹²⁾。一方、*E. striata* の培養濾液を分離・精製することにより、5 の開裂体 dethiosecoemestrin(9)¹³⁾ および aurantioemestrin(10)¹⁴⁾ を得た。Dethiosecoemestrin(9) は emestrin(5) の脱硫セコ体であり、trioxopiperazine 誘導体と考えられ、研究の時点で *Eurotium amstelodami* から単離された neochnulin(11) の例があるのみだった¹⁵⁾。Aurantioemestrin(10) は dioxopiperazinethione 骨格を有する不安定な化合物で、橙色を呈する。Aurantioemestrin(10) を溶液で放置すると、徐々に dethiosecoemestrin(9) に変化し、最終的に violaceic acid(7) に変換することが確かめられている¹⁴⁾。*Emericella* 属菌では、菌体内で生産・蓄積された epipolythiodioxopiperazine 誘導体である emestrin(5) や emestrin B(8) が菌体の外に放出されて、aurantioemestrin(10) となり、さらに dethiosecoemestrin(9) に変化した後、最終的に violaceic acid(7) を培養濾液中に蓄積すると推定している。

Emestrin(5) を産生する *Emericella* 属菌を液体無機培地で培養すると、その培養初期に培養濾液中に E-5-5 と仮称する化合物が産生し、本化合物は培養終期には消失するため、emestrin(5) や emestrin B(7) から aurantioemestrin(10)、dethiosecoemestrin(9) を経て、violaceic acid(7) を生成する中間化合物だと予想し、本化合物の単離を目指した。本化合物はきわめて不安定であったので、培養濾液の抽出から分離・精製を1日で終了すると、化合物を単離でき、NMR スペクトルの解析等から dethiosecoemestrin(9) に類似したセコ体であることが解明した。ただ E-5-5 を溶液で放置すると、容易に分解し、その液は強い酸性を示した。E-5-5 の高分解能マスマスペクトルでフラグメントイオンに硫黄原子以外に酸素原子を含んでいることから、S₂O 部分の構造が確定できないまましばらく放置していた。

平成5年頃に emestrin(5) 産生菌 *Emericella foveolata* IFM 42015 株からの E-5-5 の単離を再度挑戦した結果、培養濾液から dethiosecoemestrin(9)、aurantioemestrin(10)、violaceic acid(7) とともに E-5-5 に相当する硝酸銀試薬陽性の新規化合物(12)を単離した。本化合物は培養一週間で最大となり、その後徐々に減少していくが、E-5-5 とは違って比較的安定であった。本化合物を secoemestrin C(12) と命名して、その構造を決定した¹⁶⁾。Secoemestrin C(12) は、大環状構造が解裂した形をしており、実験的な確証はないが、emestrin(5) の代謝過程を考える上で興味深い化合物と考えている。

Emericella heterothallica の epipolythiodioxopiperazine 関連化合物

E. heterothallica は *Emericella* 属菌では唯一の雌雄異株の糸状菌であり、mating type A 株と mating type a 株が共存することにより初めて有性世代である子嚢胞子を生成することがわかっている。そ

ここで、それぞれの成分比較をする目的もあり、ATCC 16847 株 (mating type A) 及び ATCC 16824 株 (mating type a) をそれぞれ独立に培養し、それぞれの成分検索をすることとした。まず、epipolythiodioxopiperazine 誘導体の存在を確認するために、ATCC 16847 株の菌体エキスに TLC 上で硝酸銀試薬を噴霧したところ、主要成分として emethallicin A (13) が得られ、少量成分として、emethallicin E (17) 及び F (18) が単離された。一方、ATCC 16824 株の菌体エキスからは、emethallicin B (14) が最も多く単離され、emethallicin C (15) が得られた。本菌株では emethallicin D (16) が存在するが、微量であるとともに emethallicin A (13) と極性が近いために分離ができず、アセチル化して、両者を emethallicin A acetate (19) および emethallicin D acetate (20) として単離した。現在のところ成分の違いの意味は解明されていないが、ATCC 16824 株 (mating type a) のほうが ATCC 16847 株 (mating type A) より酸化状態の進んだ epipolythiodioxopiperazine 誘導体を産生するという結果である¹⁷⁻²⁰⁾。

Epipolythiodioxopiperazine 誘導体類は多数知られているが、一般に生物に対する毒性が強く、強い抗真菌活性を示すものが多い。ここに得られた emethallicin 類は epipolythiodioxopiperazine 誘導体でありながら、抗真菌活性・抗細菌活性を全く示さない珍しい化合物群であり、Compound 48/80 で誘発された mast cell からのヒスタミン遊離抑制作用および 5-lipoxygenase 阻害抑制作用が観測された。特に、emethallicin A (13) および B (14) に強いヒスタミン遊離抑制作用 (それぞれ IC_{50} 0.03, 0.08 μ M) が見られた。なお、emethallicin A (13) についてはマウスに対する急性毒性は 500 mg/kg (p.o.) で全く見られなかった。

その他の *Emericella* 属菌の成分

Emericella desertorum から新たに bicoumarin 誘導体である desrtorin A (21), B (22) 及び C (23) が得られた²¹⁾。Bicoumarin 類は *Aspergillus glaucus* と *Aspergillus clavatus* から kotanin (24) 等が既に得られているが、desrtorin A (21), B (22) 及び C (23) は 4,7-dimethoxy-5-methylcoumarin の非対称 dimer の最初の例である。

Emericella falconensis を寒天平板培地で培養すると、多量の黄色色素の産生が観察された。そこで、本菌を液体培地で培養し、その菌体エキスを分離・精製し、還元型 azaphilone 誘導体である新規淡

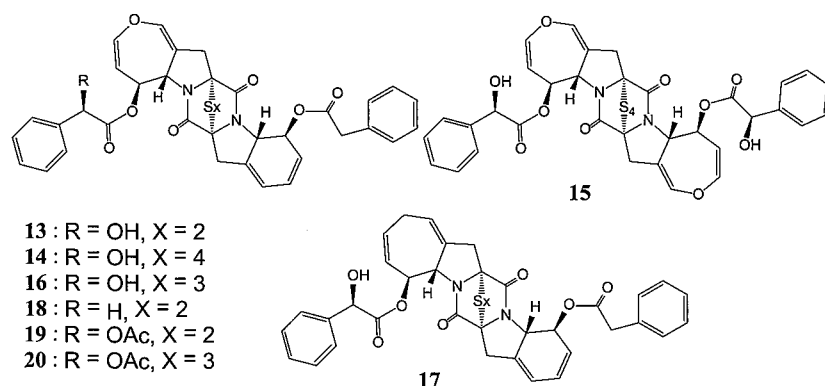
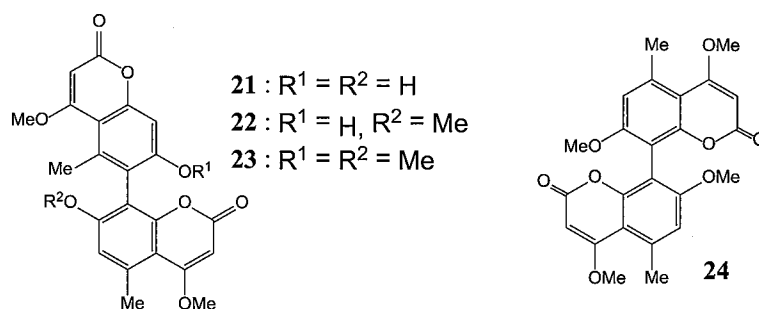
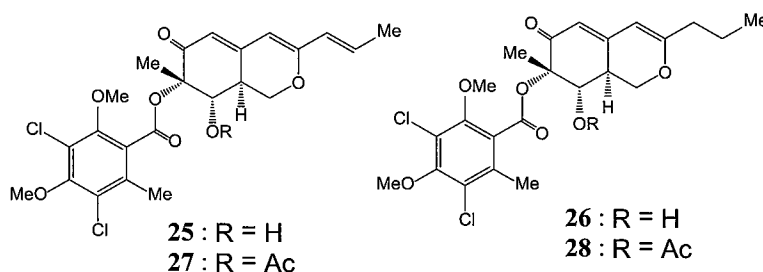


図4 *Emericella heterothalica* の emethallicin 化合物

図5 *Emericella desertorum* の bicoumarin 化合物図6 *Emericella falconensis* の falconensin 化合物

黄色色素 falconensin A (**25**), B (**26**), C (**27**) 及び D (**28**) を得た²²⁾. Falconensin 類の多くは弱いながらも発癌プロモーター抑制作用が観測されている。

Talaromyces derxii の成分

T. derxii (anamorph: *Penicillium derxii*) は *E. heterothallica* と同様に雌雄異株の菌であり, mating type A 株と mating type a 株がそれぞれ独立して分離されており, 両菌株を混ぜることにより子嚢胞子が入った子嚢果が生成することが確認されている。

T. derxii NHL 2981 株 (mating type A) を米培地で培養した後, CH_2Cl_2 抽出エキスをベンゼンから再結晶して, 多量の talaroderxine を得た. *T. derxii* NHL 2982 株 (mating type a) から同様に talaroderxine を得ることができた. 得られた talaroderxine は NMR スペクトルの解析から diastereomer のほぼ 1 : 1 の混合物であると考えられたが, 当時は直接分離することができなかった. そこで, talaroderxine をアセチル化して hexaacetate とし, これを分離・精製して, 2つの atropisomer を単離した. これをそれぞれ加水分解して, 純粋な binaphtho-*a*-pyrone 誘導体である talaroderxine A (**29**) と talaroderxine B (**30**) を得た. ビフェニルの軸性不斉については CD スペクトルにおける励起子キラリティー法を適用して決定した²³⁾.

Viriditoxin (**32**) は, *Aspergillus viridinitans* から単離されたマイコトキシンであり, 構造的に talaroderxine と関連性が強く, CD スペクトルに強い Cotton 効果を認めたことから, 構造の再確認

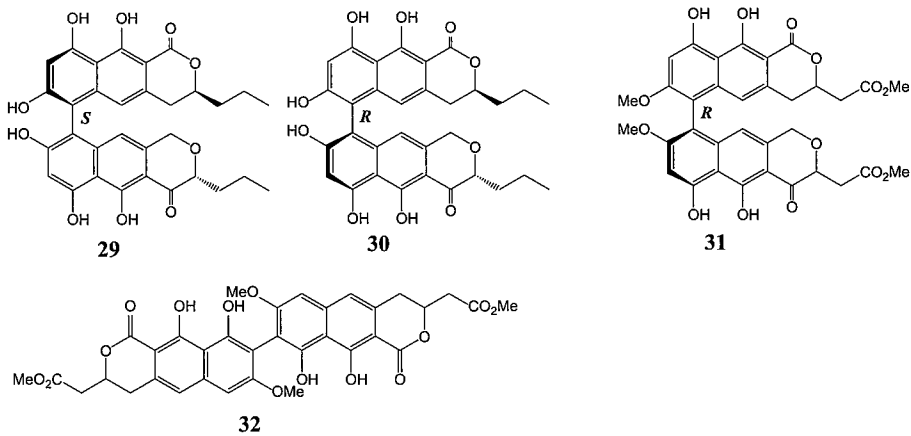


図7 *Talaromyces derxii* および *Aspergillus viridinitans* の binaphtho-*a*-pyrone 類縁体

をするために、*Paecilomyces variotii* から viriditoxin を単離し、NMR スペクトルの解析の結果、naphtho-*a*-pyrone が 8-8' 結合ではなく、6-6' 結合であることがわか、viriditoxin の構造を 32 から 31 と訂正した²⁴⁾。

T. derxii はいわゆる“アオカビ”に属する菌であり、平面寒天培地上で緑色の分生子を生成し、表面全体が緑色を呈している。この緑色色素に興味を持ち、分離していくと、青色の成分が分離されてきて、黄色色素と青色色素の混在により全体が緑色を呈していると予想している。黄色色素のほうは多量に存在する talaroderxine 類で充分説明できると考え、青色色素の分離を試みた。分離を繰り返していく過程で、talaroderxine の溶液に Fe あるいは Cu イオンを添加すると、青色色素とほぼ同様の UV スペクトルを得られることわかった。そこで、ある程度精製された青色色素中の金属を原子吸光法で検出したところ、予想する量の金属は含まれていなかった。青色色素の単離は今後の課題とした。

コムギ赤さび病菌の冬孢子形成誘導物質について

Emericella 属菌をはじめとする子囊菌についてこの他にも数々の結果を残しているが、平成7年頃から新しいテーマをと考え、「さび病菌の冬孢子形成誘導物質の探索」及び「重篤な輸入真菌症原因菌の成分検索」を立ち上げることとし、ここではまずコムギ赤さび病菌の冬孢子形成誘導物質について得られた結果を少し述べておく。

さび菌類は担子菌亜門さび菌目に属し、約 120 属 6,000 種が知られており、担子菌類の大きなグループの一つである。さび菌類は通常、夏孢子、冬孢子、担子孢子、精子、さび胞子の5つの異なる孢子世代を順次形成して行く複雑な長周期型の生活環をもつ異種寄生性の絶対寄生菌であり、主に夏孢子が反復感染し、宿主植物に対してしばしば激しい病害を引き起こす宿主特異性の高い植物病原菌である。一般に、宿主植物が休眠期（多年性植物では落葉時、一年性植物では枯草期）に近づくと、さび菌も冬孢子を形成し、休眠するため、その病害の拡大も終止する。今回、研究材料としたコムギ赤さび病菌を例にとると、日本での被害は比較的少ないが、春蒔きコムギ栽培を主体とする欧米各国等では、夏孢子の反復伝播期間が長く、越冬による再感染も可能であるため、たびた

び激しい被害を記録し、深刻な問題となっていた。したがって、宿主植物上で早期に冬胞子を形成させる化学物質を単離できれば、本菌による病害の防除に有効な手段となる可能性が高いとともにさび菌の生活環の一部を解明するという点で生物学的あるいは化学生態学的にも意義があると考えている。さび病菌の冬胞子形成誘導因子に関しては、光・気温・湿度等の環境条件や宿主植物の生理状態、宿主植物の抵抗性などの報告があるが、さび病菌の各胞子世代における形態変化に関与する物質については未だ研究の例は知られていない。

コムギ赤さび病菌を接種したコムギ子葉を用いた冬胞子形成誘導活性試験法により、最も強い冬胞子形成誘導活性を示したのは、収穫直前の完熟期に採集した冬胞子堆を多数形成した感染コムギ葉であり、多くの夏胞子堆を形成し、冬胞子堆の形成が認められない開花期の感染コムギ葉、枯熟期の感染コムギ葉は、弱い活性しか示さなかった。また、収穫期直前のコムギ赤さび病菌未感染コムギ葉もほとんど活性を示さなかった。このことから、冬胞子形成誘導物質の生成には、コムギの生育段階のみではなく、コムギ赤さび病の感染の有無が強く関与していることが推測された。

収穫期直前に採集した罹病コムギ葉のメタノール抽出エキス及び水抽出エキスを活性試験を併用しながら、HP21, CPC, HPLC 等の分離手法を用いて、冬胞子形成誘導物質の分離・精製を行い、一番強い活性分画を数ナノグラム程度で活性を示すまでに濃縮した。

コムギ赤さび病菌以外のさび菌に罹病した十数種の植物エキスのコムギ赤さび病菌に対する冬胞子形成誘導活性の有無について検討したところ、すべての罹病植物エキスを冬胞子形成誘導活性が認められ、これらの活性はすべてそれぞれのさび菌の冬胞子形成時期であることがわかった。これらの冬胞子形成誘導因子は、基本的に種々のさび菌に共通の物質あるいは物質群であることが示唆された^{25, 26)}。

本誘導物質の植物葉に対する含量は極めて微量であることから、構造解明の第一段階として LC-MS を用いることとし、数ナノグラム程度で活性を示す活性分画の高分解能 MS の解析から、組成式 $C_5H_7NO_3$ を有する m/z 130 の偽分子イオンピークを活性本体の一部と推定した。市販の種々のアミノ酸・カルボン酸を活性試験に付したところ、活性強度から考えて活性物質本体ではないが、L-proline にのみ弱い活性 (2~4 mg/ml) が認められ、その作用は鉄イオンの存在によって増強されることがわかった。

さび病菌は一般に異種寄生菌であり、2種類の宿主が近傍に生育していることが伝播の条件となる。日本でのコムギ赤さび病菌によるコムギの被害の大部分は中国から夏胞子が黄砂とともにくると推測され、大きな被害を与える可能性が少ないことから、コムギ赤さび病菌が感染したコムギ葉から多量の冬胞子形成誘導物質を単離することが難しいと考えている。一方、ポプラさび病菌 (*Melanosora larici-populina*) もコムギ赤さび病菌と同様に異種寄生菌であり、夏胞子の時期はポプラあるいはドロノキを宿主としており、落葉期には冬胞子が生成して冬胞子堆をつけたまま落葉し、カラマツで休眠期を過ごす。したがって、ポプラとカラマツが近くに共存しているところを探せば、必ずといっていいほどポプラさび病菌に感染した落葉が得られる。必要量の冬胞子形成誘導物質を単離する目的で、冬胞子堆が見られる感染ポプラ落葉を多量に集め、エキスを生成し、いよいよ活性物質の単離へ進む予定だった。ところが、平成 18 年度からの薬学 6 年制の開始が決定され、その準備と実施で忙しくなり、本研究を中断せざるを得なくなった。今後、さび病菌の冬胞子形成誘導物質の解明を再開できることを期待している。

重篤な輸入真菌症について

平成4年7月、北京で開催された日中国際真菌学会で知り合った千葉大学真菌医学研究センターの宮治 誠教授（当時）の協力を得て「重篤な輸入真菌症の原因菌の成分検索」を始めることとした。最も重篤な真菌症、コクシジオイデス症の原因菌 *Coccidioides immitis* の成分検索を過去に培養してあった少量のエキスの供給を受けて検索を始めたが、成分分離のための大量培養には培養施設（危険度3以上）の問題等が大きいのしかかったため、まず、重篤な輸入真菌症の原因菌と同じホネタケ科及びその近縁科に属している *Malbranchea* 属菌に着目し、それらの成分検索を開始した。

Malbranchea filamentosa の配糖体

Malbranchea 属菌 15 菌株の米培養エキスについて4種の真菌（酵母2種、糸状菌2種）に対する抗真菌活性を指標に検索した結果、3菌株に何らかの抗真菌活性が認められた。このうち *Cryptococcus neoformans* に対して強い抗菌活性を示した *M. filamentosa* IFM41300 株に着目し、その成分検索に着手した。

M. filamentosa IFM41300 株を米に培養した後、 CH_2Cl_2 -MeOH 混液で抽出し、水と酢酸エチルで分配した酢酸エチル可溶部分を精製して、furanone 誘導体 4-benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one (33)²⁷⁾ 及び

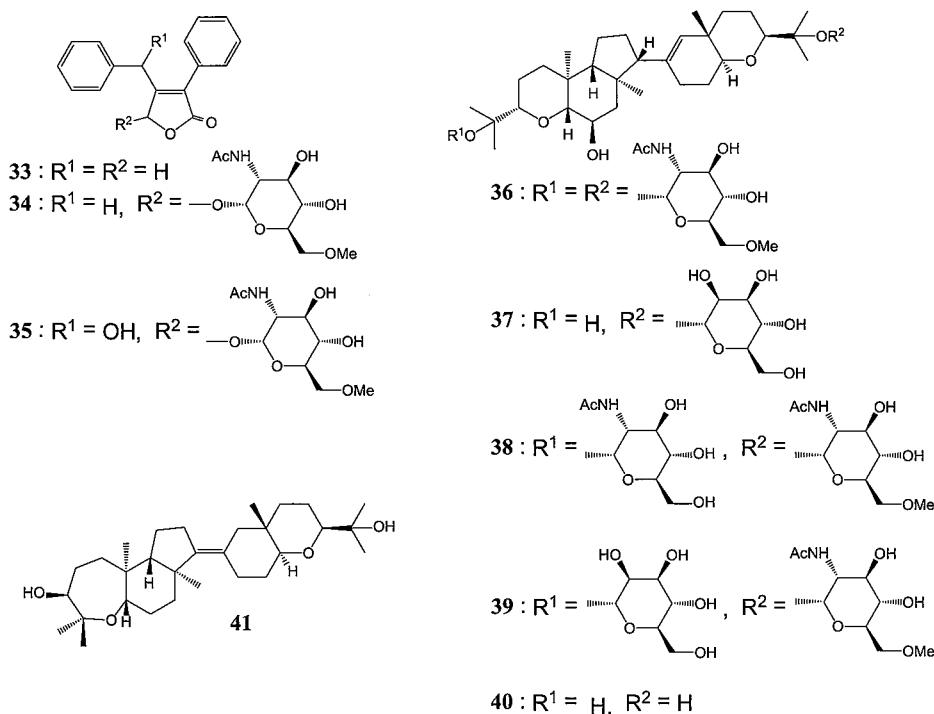


図8 *Malbranchea filamentosa* 由来のグリコシド

新規 furanone glycoside 誘導体 malfilamentoside A (34) 及び B (35)²⁸⁾を得た。Malfilamentoside A (34) 及び B (35) は 33 と構造的に関連する配糖体であり、菌類としては furanone 誘導体の最初の例である。また、6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine が配糖体を構成する糖として見出されたことは、珍しい例と考える。

さらに、*M. filamentosa* IFM41300 株を培養した米をアセトンで抽出した後、水と酢酸エチルで分配した酢酸エチルエキスを種々のクロマトグラフィーを用いて分離・精製し、新規 triterpene glycoside 様物質 malbrancheoside A (36), B (37), C (38) 及び D (39)を得た。Malbrancheosides (36-39) をそれぞれ加水分解すると、ゲニンである triterpene 様化合物 malbrancheogenin (40) 及び pseudomalbrancheogenin を得た。両化合物は種々 NMR スペクトルの解析から一部を除いてそれらの相対構造を決定し、互いに二重結合の位置の違いによる構造異性体であると解明した。配糖体 36-39 のゲニン部分との NMR データの詳細な比較により、malbrancheoside 類の真正ゲニンを malbrancheogenin (40) と決定した。配糖体 malbrancheoside A (36) を塩酸加水分解すると、ゲニンとともに構成糖成分として単一の 6-*O*-methyl-D-glucosamine を得た。各種 NMR データの検討から、malbrancheoside A (36) の二つの構成糖はともに 6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine が α -結合していると決定した。同様に、malbrancheoside B (37), C (38) 及び D (39) はそれぞれ malbrancheogenin (40) に所定の糖がいずれも α -結合しているものと決定した²⁹⁾。

Malbrancheoside 類は菌類から得られたトリテルペン配糖体の最初の例であり、6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine や *N*-acetyl-D-glucosamine のようなグルコサミン類が配糖体の構成糖となっている珍しい例である。また、これらの配糖体を構成しているゲニンとしてのトリテルペンは 1998 年に海洋性海綿 *Ptilocaulis spiculifer* から得られた遊離トリテルペン abdinol A (41)³⁰⁾ と同一の炭素骨格を持っている。同じ新規骨格のトリテルペンが菌類と海綿から単離されたことは興味深いことだ。

今回、*M. filamentosa* IFM41300 株から得られた malbrancheoside A (36), B (37), C (38) 及び D (39) は、菌類から得られたトリテルペン配糖体、いわゆるサポニンの最初の例と考えられ、6-*O*-methyl-*N*-acetyl-D-glucosamine あるいは *N*-acetyl-D-glucosamine のようなグルコサミン類が構成糖をなしている珍しい例である。また、同時にグルコサミン類を構成糖としたフラノン配糖体 malfilamentoside A (34) 及び B (35) が単離できたことは興味深いことだ。この回想録の最初のほうで述べた通り、大学院時代にトリテルペン配糖体、すなわち、サポニンに携わっていた関係上、1974 年に星薬科大学に就職した当時もカビからの配糖体の単離を目指していたが、実験的拙さもあり成功しなかった。今回菌類から約 30 年ぶりにサポニンと呼べるトリテルペン配糖体を得ることに成功したことは就職当初の夢がかなって私にとって非常に喜ばしいことであるとともに、感慨深いことである。

謝 辞

私の 40 年間の研究にご協力・ご指導いただいた多くの先生方に感謝する。また、研究の実際は研究室の歴代のスタッフ、大学院生、卒論生によるところが殆どであり、一同にお礼申し上げたいと思う。

引用文献

- 1) Eade, E.A., Rossler, L.P., Simes, H.V., Simes, J.J.H.: Extractive of Australian timber. *Aust J Chem*, **18**, 1451-1470 (1965).
- 2) Dugan, J.J., de Mayo, P.: Terpenoids X. Pre-senegenin, A quite normal triterpenoid. *Can J Chem*, **43**, 2033-2046 (1965).
- 3) Kawai, K., Akiyama, T., Ogihara, Y., -Shibata, S.: A new saponin in the saponins of *Zizyphus jujuba*, *Hovenia dulcis* and *Bacopa monniera*. *Phytochemistry*, **13**, 2829-2832 (1974).
- 4) Otsuka, H., Akiyama, T., Kawai, K., Shibata, S., Inoue, O., Ogihara, Y.: The structure of jujubosides A and B, the saponins isolated from the seeds of *Zizyphus jujuba*. *Phytochemistry*, **17**, 1349-1352 (1978).
- 5) Nakajima, S.: Studies on the structure of itaconitin. VII. The structures of itaconitin and its derivatives. *Chem Pharm Bull*, **13**, 73-78 (1965).
- 6) 前林行雄, 堀江義一, 山崎幹夫: イラク土壌より分離された糸状菌の毒性検索及びマイコトキシン生産性. *マイコトキシン*, **20**, 28-30 (1984).
- 7) Seya, H., Nakajima, S., Kawai, K., Udagawa, S.: Structure and absolute configuration of emestrin, a new macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*. *J Chem Soc Chem Commun*, **1985**, 657-658.
- 8) Seya, H., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K., Udagawa, S.: Studies on fungal Pproducts. Part 8. isolation and structure of emestrin, a novel antifungal macrocyclic epidithiodioxopiperazine from *Emericella striata*. X-Ray molecular structure of emestrin. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, **1986**, 109-116.
- 9) Yamazaki, M., Maebayashi, Y.: The isolation and structure determination of violaceic acid, a new biphenyl ether type metabolite from *Emericella violacea*. *Chem Pharm Bull*, **30**, 509-513 (1982).
- 10) 寺尾 清, 伊藤恵美子, 宇田川俊一, 河合賢一, 野沢幸平: 新マイコトキシン emestrin によるマウスの急性毒性. *マイコトキシン*, **27**, 31-32 (1988).
- 11) 石崎希代子, 河合 清, 中丸輝彦, 久田和夫, 野沢義則, 河合賢一: 新マイコトキシン emestrin による肝ミトコンドリアの呼吸阻害作用および膨潤化誘起作用. *マイコトキシン*, **28**, 29-32 (1988).
- 12) Nozawa, K., Udagawa, S., Nakajima, S., Kawai, K.: Studies on fungal products. XIV. Emestrin B, a new epitrihiodioxopiperazine, from *Emericella striata*. *Chem Pharm Bull*, **35**, 3460-3463 (1987).
- 13) Seya, H., Nozawa, K., Udagawa, S., Nakajima, S., Kawai, K.: Studies on fungal products. IX. Dethio-secoemestrin, a new metabolite related to emestrin, from *Emericella striata*. *Chem Pharm Bull*, **34**, 2411-2416 (1986).
- 14) Kawai, K., Nozawa, K., Seya, H., Kawahara, N., Udagawa, S., Nakajima, S.: Studies on fungal products. XII. Structure of aurantioemestrin from *Emericella striata*. *Heterocycles*, **26**, 475-479 (1987).
- 15) Cardillo, R., Fuganti, C., Gatti, G., Ghiringhelli, D., Grasselli, P.: Molecular structure of cryptoechinuline, a new metabolite of *Aspergillus amstelodami*, isolated during investigations on echinuline biosynthesis. *Tetrahedron Lett*, 3163-3166 (1974).
- 16) Ooike, M., Nozawa, K., Kawai, K.: An epitetrithiodioxopiperazine related to emestrin from *Emericella foveolata*. *Phytochemistry*, **46**(1), 123-126 (1997).
- 17) Kawahara, N., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K., Yamazaki, M.: Novel epitetrithiodioxopiperazines,

- emethallicins B and C, as potent inhibitors of compound 48/80-induced histamine release, from *Emericella heterothallica*. *J Chem Soc, Chem Commun*, **1989**, 951-952.
- 18) Kawahara, N., Nakajima, S., Yamazaki, M., Kawai, K.: Structure of a novel epidithiodioxopiperazine, emethallicin A, a potent inhibitor of histamine release, from *Emericella heterothallica*. *Chem Pharm Bull*, **37**, 2592-2595 (1989).
- 19) Kawahara, N., Nozawa, K., Yamazaki, M., Nakajima, S., Kawai, K.: Structures of novel epipolythiodioxopiperazines, emethallicins B, C, and D, potent inhibitors of histamine release, from *Emericella heterothallica*. *Chem Pharm Bull*, **38**, 73-78 (1990).
- 20) Kawahara, N., Nozawa, K., Yamazaki, M., Nakajima, S., Kawai, K.: Novel epidithiodioxopiperazines, emethallicins E and F from *Emericella heterothallica*. *Heterocycles*, **30**, 507-515 (1990).
- 21) Nozawa, K., Seya, H., Nakajima, S., Udagawa, S., Kawai, K.: Studies on fungal products. Part 12. The structures of new bicoumarins desertorins A, B, and C. *J Chem Soc Perkin Trans, 1*, **1987**, 1735-1738.
- 22) Itabashi, T., Nozawa, K., Miyaji, M., Udagawa, S., Nakajima, S., Kawai, K.: Falconensins A, B, C, and D, new compounds related to azaphilone, from *Emericella falconensis*. *Chem Pharm Bull*, **40**, 3142-3144 (1992).
- 23) Suzuki, K., Nozawa, K., Nakajima, S., Udagawa, S., Kawai, K.: Isolation and structures of antibacterial binaphtho- γ -pyrones, talaroderxines A and B, from *Talaromyces derxii*. *Chem Pharm Bull*, **40**, 1116-1119 (1992).
- 24) Suzuki, K., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K.: Structure revision of mycotoxin, viriditoxin, and its derivatives. *Chem Pharm Bull*, **38**, 3180-3181 (1990).
- 25) Hosoe, T., Sano, T., Nishikawa, H., Nozawa, K., Kawai, K., Yamaoka, Y., Katsuya, K., Sato, T., Hagiwara, H., Saito, H.: A substance inducing teleospore production in wheat leaf rust, *Puccinia recondita* f. sp. *Tritici*. *Mycoscience*, **42**, 241-245 (2001).
- 26) Hosoe, T., Nozawa, K., Kawai, K., Yamaoka, Y., Katsuya, K.: Teliospore-inducing activity for wheat leaf rust in the extract of various plant leaves infected with telia of rust fungi. *Mycoscience*, **48**, 190-194 (2007).
- 27) Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K., Kawai, K.: 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea filamentosa* IFM 41300. *Phytochemistry*, **66**, 2776-2779 (2005).
- 28) Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K., Kawai, K.: Two new furanone glycosides, malfilamentosides A and B, isolated from *Malbranchea filamentosa*. *Mycotoxins*, **58**, 1-6 (2008).
- 29) Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Okada, H., Fukushima, K., Kawai, K.: Structures of new triterpene glycosides, malbrancheosides A-D, from *Malbranchea filamentosa*. *Heterocycles*, **75**, 1109-1122 (2008).
- 30) Rudi, A., Stein, Z., Goldberg, I., Yosief, T., Kashman, Y.: Yardenone and abudinol, two new triterpenes from the marine sponge *Ptilocaulis spiculifer*. *Tetrahedron Lett*, **39**, 1445-1448 (1998).

About 40 years research for fungal metabolites

Ken-ichi KAWAI

Faculty of Pharmaceutical Science, Hoshi University, 2-10-26 Nishi, Toride, Ibaraki 302-0025, Japan

I took part in the research for fungal metabolites for about 40 years. The metabolites of *Emericella* sp. were studied in the early 15 years. The macrocyclic mycotoxin, emestrin, was isolated from *Emericella striata* etc. and the histamine release inhibitors, emethallicins, were isolated from *Emericella heterothallica*. The yellow pigment related to the blue pigments of *Aspergillus* sp. was also isolated from *Talaromyces derxii*. Recently triterpenoidal glycosides (saponins), malbrancheosides, were isolated from *Malbranchea filamentosa*.

Key words: emestrin; emethallicin; fungi; malbrancheosides; talaroderxine