

生物由来の色素および毒の化学的研究

平成16年度

犀川陽子

Abbreviation

本論文において以下に示す略号を用いた。

Ac	acetyl
n-Bu	normal-butyl
t-Bu,	tertiary-butyl
BPO	benzoyl peroxide
calcd	calculated
cfu	colony formation unit
CM	carboxymethyl
COSY	^1H - ^1H correlation spectroscopy
CSA	10-camphorsulfonic acid
DDQ	2,3-dichloro-4,6-dicyano-1,4,-benzoquinone
DEAE	N,N-diethylaminoethyl
DMF	N,N-dimethylformamide
DMSO	dimethylsulfoxide
DSS	3-(trimethylsilyl)-propanesulfonic acid, sodium salt
EI	electron impact
ESI	electron spray ionization
ESR	electron
Et	ethyl
FAB	fast atom bombardment
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
IR	infrared absorption
J	coupling constant
LC	liquid chromatography
lit.	literature
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MS	mass spectrometry
MTPA	α -methoxy(trifluoromethyl)phenylacetyl
mult	multiplicity
MW	molecular weight
NBS	N-bromosuccinimide
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
ODS	octadecyl silica-gel
PCC	pyridinium chlorochromate

PDC	pyridinium dichromate
Pd-C	palladium on activated carbon
Ph	phenyl
PTLC	preparative thin layer chromatography
QAE	quaternary aminoethyl
rt	room temperature
TBS	tertiary-butyldimethylsilyl
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBAOH	tetrabutylammonium hydroxide
TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy
TFA	trifluoroacetic acid
Tf	trifluoromethanesulfonyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography
TMEDA	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
TMS	trimethylsilyl, tetramethylsilane
UV, UV/vis	ultraviolet-visible

目次

緒論	1
本論	
第 1 章 カエントケの毒成分の探索	
第 1 節 概要	3
第 2 節 カエントケの培養液からの毒成分の単離と構造決定	4
第 3 節 カエントケ子実体からの毒成分の単離と構造決定	10
第 4 節 Satratoxin H の立体配置	14
第 2 章 ロクシヨウグサレキン属の色素 xylindein 類の構造と化学的性質	
第 1 節 概要	16
第 2 節 Xylindein の絶対立体配置の決定	19
第 3 節 Xylindein 類縁体の探索	22
第 4 節 Xylindein 誘導体の自己酸化還元反応	26
第 3 章 カバの汗(分泌物)に含まれる色素の化学的研究	
第 1 節 概要	35
第 2 節 カバの汗の採取および色素の抽出	36
第 3 節 色素の分離精製と赤色色素 32 の構造解析	37
第 4 節 赤色色素 32 の化学誘導	41
第 5 節 赤色色素 hipposudoric acid (32) の合成	46
第 1 項 合成計画	46
第 2 項 フルオレン 38 の合成	48
第 3 項 Hipposudoric acid (32) の合成	51
第 6 節 橙色色素 33 の単離と構造決定	54
第 7 節 色素の互変異性と水溶液中の構造	58
第 8 節 汗の性質と機能	64
総括	68
実験編	71
参考文献	139
謝辞	143

緒論

自然界にはさまざまな有機化合物が存在している。それらは各々の生態系においての機能を持っていると考えられるが、我々は常々人間と関わりのある化合物に注目し、その化合物の構造を探り、人間の生活への有用性を求めて研究を進めている。今回研究対象として、猛毒キノコであるカエントケの毒成分、青いキノコであるロクショウグサレキン類の色素、カバの汗に含まれる赤色色素の 3 つを選んだ。実際に我々に直接関わるのはカエントケに含まれる致死毒であり、青いキノコであるロクショウグサレキンおよびカバの赤い汗の色素は我々の生活に関わる有用性に直結しているものではない。しかし、この 3 つの研究の対象となった化合物はいずれも希少な試料から得られる物質もしくは不安定物質であり、その抽出、単離方法自体に新しい方法を用いて研究を進め、新規の骨格、新規な化学的性質を発見することができた。これはその物質が担っている生体での役割を解明する手掛かりになると共に、我々が恩恵に預かることのできる新しい化学物質としての価値を見出す可能性に繋がると考えている。

カエントケ (*Podostroma cornu-damae*) はニクザキン科ツノタケ属の子囊菌類のキノコで、その名の通り炎のような色形をした猛毒キノコである。日本とジャワに生息するが希少種であり、数年前まではこのキノコによる中毒例は 2 件しか報告されていなかったが、その中毒症状は発熱、嘔吐などのキノコ中毒によく見られる症状に加え、脱毛、小脳萎縮による運動障害など特異なものであった。1999 年、新潟県で、5 人のカエントケ摂食による中毒事故がおきた。この時 1 人は 1g 程度を誤食し、2 日後には循環器不全、呼吸器不全、肝不全、腎不全、脳障害からショック状態になり死亡した。また、2000 年には群馬県で 1 人が同様の症状で死亡した。このようにカエントケは他のキノコに類を見ない高い致死活性と特異な症状を引き起こしているが、毒成分は全く未知であることから早急な調査が必要であった。

このような背景から、カエントケを入手し、一部は培養したのち培養液を分離精製、また一部は子実体をそのまま分離精製し、培養液から 3 種、子実体から新たに 3 種の系 6 種のマクロサイクリクトリコテセン類を単離、構造決定した。これらのマクロサイクリクトリコテセン類はそれぞれマウス 1 匹当たり 0.5 mg で致死活性を示した。

ロクショウグサレキン類 (*Chlorociboria* sp.) はズキンタケ科ロクショウグサレキン属のキノコで、この菌糸および子実体は深い緑青色をしており、この菌の着生した材は緑青色に腐食される。この青色色素は青色という珍しさから 200 年以上前から化学者の注目を集めてきたが、溶解性の悪さや、特異な化学的性質によってその構造を定めるにはかなりの時間を要した。この青色色素主成分はナフトキノン系色素 xylindein である。Xylindein は 1965 年、2 つのグループによってそれぞれ平面構造が決定された。また、化学的性質として自己酸化還元など興味深い現象が報告されているが、その扱いの難しさからか、詳しい証明などはなされていない。今回、まず xylindein を化学誘導して得られた化合物の X 線結晶構造解析により、これまで未知であった絶対立体配置を (*S,S*) と決定した。また、粗抽出物から数種の類縁体を単離、構造決定した。さらに、xylindein 類の化学的性質として、dimethylxylindein の不均化反応を見出し

た。

カバ(*Hippopotamus amphibius*)は血のように赤い汗をかくとされている。しかし厳密にはカバには汗腺に相当するものはなく、汗とは全く異なる粘液を分泌する腺が皮膚上に点在している。この汗(分泌物)は分泌された直後は無色透明ですぐに真っ赤に変わり、その後褐色となる。この汗はカバの皮膚を紫外線、細菌、および乾燥から保護していると言われているが詳しい研究はされていない。

今回、この色の変化に対応する赤色色素に注目し、単離、構造決定を目的として研究を行った。上野動物園との共同研究で汗を採取し、不安定な赤色色素を単離、構造決定した。赤色色素および共に存在する橙色色素は酸化度の高い新規フルオレンであった。赤色色素の厳密な異性体構造については合成化学的手法や類縁体の構造解析を通して決定した。さらに色素の化学合成、カバの皮膚上での機能を探るための活性試験などの研究を行った。

以上の3つの研究について本論にて詳しく述べる。

本論

第1章

カエントケの毒成分の探索



第1節 概要

カエнтаケ(*Podostroma cornu-damae*)はニクザキン科ツノタケ属の子囊菌類の毒キノコで、その名の通り炎のような色形をしている。本菌は日本とジャワで生息が確認されているが、稀少種であり、数年前までこのキノコの摂食による中毒例は2件しか報告されていなかった⁴。この中毒症状は発熱、嘔吐などのキノコ中毒によく見られる症状に加え、脱毛、小脳萎縮による運動障害など、特異なものであった。

近年、温暖化により異常繁殖したためか、カエнтаケの摂食による中毒事故が相次いで4件起き、うち2件では中毒死亡者が出た⁴⁻⁷。1999年には新潟県で、5人がカエнтаケを酒に浸して食べるなどして1人が死亡した。死亡した患者が誤食したカエнтаケの量は1g程度であったが、食後30分後から腹痛、悪寒、頭痛、手足のしびれ、嘔吐、下痢が始まり、3日目には循環器、呼吸器および腎不全となり、脳障害を起こし、ショック状態になって死亡した。2000年には群馬県でベニナギナタタケと間違えて摂食し、3日後に腎不全、肝不全を併発して死亡した。回復した患者も運動障害、言語障害に加えて脱毛、顔面脱皮が見られた。これらの毒性を調べるために東京都立衛生試験所ではカエнтаケ子実体をマウスに経口投与したが、24時間観察しても異常は見られなかったため、毒成分の特定はできていなかった⁴。

中毒事故を引き起こすキノコは多種に渡るが、死亡事故に至るものは数種である⁸。しかし、カエнтаケが引き起こす特異な中毒症状はこれらのどれにも当てはまらず、非常に強い毒成分を含むことから早急な調査が必要であった。

このような背景から、カエнтаケを入手し、一部は培養したのち培養液を分離、また一部は子実体をそのまま分離精製し、この強力な毒の本体を明らかにすることにした。

第2節 カエントケ培養液からの毒成分の単離と構造決定

新潟および北海道で採取されたカエントケ数本をご恵与いただいた。カエントケは稀少であるので、まず弘前大学で共同実験者により培養が行われた。ショ糖、芋ショ糖、ブドウ糖を培養養分として培養した培養液を濃縮し、黄褐色固体を得た。これを生理食塩水に溶解し、マウス一匹(体重 25 - 30 g)当たり 40 mg ずつ腹腔内注射したところ、いずれの条件での培養液にも致死活性が見られた。

次にこの黄褐色固体を水に溶解し、ヘキサン、ジエチルエーテルで順次抽出した。ヘキサン層を濃縮して得られた粗抽出物の ^1H NMR スペクトルは、共役オレフィンと 1,1-二置換オキシランに特徴的なシグナルを示した。含有量が多く、安定であった主成分 1 を、シリカゲルクロマトグラフィー(ヘキサン : 酢酸エチル = 1 : 1)で単離した。1 の重クロロホルム中の ^1H および ^{13}C NMR スペクトル、H-H COSY、HMQC、HMBC の各スペクトル解析によって、 α,β -不飽和エステル、 $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -不飽和エステル、1,1-二置換オキシランの部分構造と共に高度に縮環したエーテル部分の存在が明らかになったが、構造決定には至らなかった。また、FAB マススペクトルから計算される分子量 514 と NMR スペクトルの結果を合わせて考えると、水酸基が 1 つ存在するはずであったが、水酸基のプロトンシグナルは認められなかった。

以上の構造情報を元に類似の構造を検索したところ、カビ毒として有名なマクロサイクリックトリコテセン類であると推定された^{9,10}。マクロサイクリックトリコテセン類は高度に縮環したジオールである verrucarol 部分と verrucarol に二箇所エステル結合している不飽和ジカルボン酸から成る構造が特徴的である。1 の部分構造解析で構造決定に至らなかった縮環部分は verrucarol に相当した。マクロサイクリックトリコテセン類における verrucarol 部分は、幾つかの例外を除けばほとんどの場合 Figure 1 に示す構造であり、逆の絶対立体配置を持つものは得られていない。一方、ジカルボン酸部分は非常に多様性に富んでいる。6'位と 13'位の間で開裂して、炭素数 29 となった verrucarol 類、開裂していない炭素数 31 の roridin 類に大きく分けられている。これら多種のマクロサイクリックトリコテセン類の構造と比較して、今回単離した 1 は roridin E 類であることがわかった(Figure 1, Table 1)¹¹⁻¹⁵。

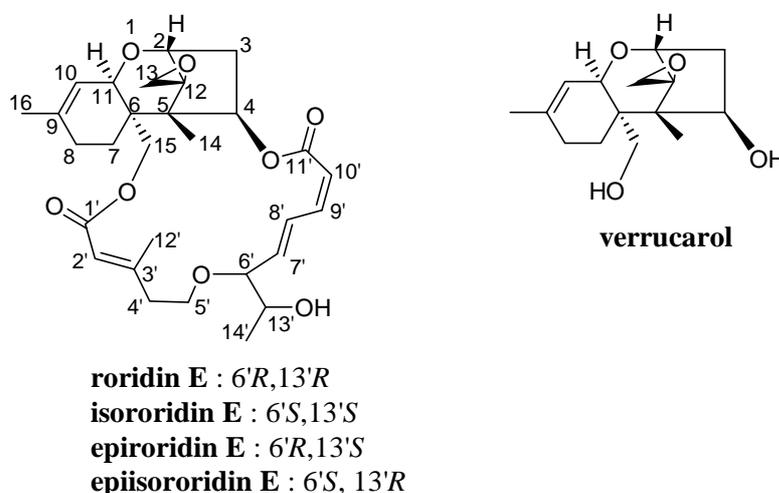


Figure 1

Table 1. ¹H NMR data of compound 1 and roridin E

1 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS=0)		roridin E ¹⁵ (300 MHz, CDCl ₃ , TMS=0)
position	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))
2	3.85 (d, 4.9)	3.8 (m)
3	~2.50 (m)	2.5 (m)
	2.53 (m)	2 (m)
4	6.22 (dd, 8.3, 4.0)	6.22 (dd, 8, 4)
7, 8	~2.02 (m)	2 (m)
10	5.48 (brd, 4.3)	5.5 (d, 5)
11	3.90 (d, 4.3)	3.7 (m)
13	2.82 (d, 4.1)	3.0 (AX, 4)
	3.14 (d, 4.1)	
14	0.79 (s)	0.82 (s)
15	3.94 (d, 12.0)	4.15 (AX, 12)
	4.32 (d, 12.0)	
16	1.71 (br s)	1.75 (s)
2'	5.96 (br)	5.98 (s)
4'	~2.50 (m)	2.4-2.7 (m)
5'	~3.56 (m)	3.5-4.0 (m)
7'	5.90 (dd, 15.4, 3.2)	5.7-6.0 (m)
8'	7.52 (dd, 15.4, 11.4)	7.53 (dd, 15, 11)
9'	6.58 (dd, 11.4, 11.4)	6.58 (t, 11)
10'	5.75 (d, 11.4)	5.75 (d, 11)
12'	2.27 (d, 1.4)	2.30 (d, 1.5)
13'	3.64 (q, 6.1)	3.7 (q, 6)
14'	1.20 (d, 6.1)	1.22 (d, 6)
13'-OH	not detected (br)	

なお、roridin E の文献¹⁵においても¹H NMR スペクトル上 13'位の水酸基のシグナルは観察されていない。スペクトル上では 1.5 ~ 2.5 ppm に非常に広いブロードピークが広がっており、13'位の水酸基のシグナルは水のシグナルと重なってブロードピークとして存在していると考えられる。

Roridin E 類には 6'位と 13'位の立体配置の違いにより、4種の異性体が存在する。これら4種の異性体は Jarvis によって *Myrothecium verrucaria* の培養液から単離、構造決定された。Jarvis はこれら4種の異性体を詳細に解析して比較したデータを報告している^{14a}。そこで1と4種の異性体の文献値とを詳細に比較したところ、¹³C NMR スペクトルの7'および8'位のケミカルシフト値および比旋光度から1はroridin Eであることがわかった(Table 2)。

Table 2 ^{13}C NMR chemical shifts¹⁴⁾ and optical rotations of epimers of roridin E

compounds	δ $^{13}\text{C}/\text{ppm}$		$\Delta \delta$ of C7'/C8' (ppm)	[α] _D (CHCl ₃)
	C-7'	C-8'		
1	138.0	126.5	11.5	-22 (c 0.38, 22.5 °C)
roridin E	138.1	126.6	11.5	-24 \pm 2 (c 0.8, 25 °C) ^{14a)}
isororidin E	135.2	131.0	4.2	-65.1 (24 °C) ^{14c)}
epiroridin E	137.8	126.8	11.0	+0.70 (c 1.8, 30 °C) ^{14a)}
epiisororidin E	134.7	131.0	3.7	-29.2 (c 1.5, 30 °C) ^{14a)}

1 は 1 L のカエントケ培養液をヘキサンで抽出し、濃縮した粗抽出物 28 mg から 22.1 mg 得られた。ヘキサン層では圧倒的な主成分である。ヘキサン層の成分をさらに調べると、1 とよく似た ^1H NMR スペクトルを示す 2 が 3.2 mg 得られた。2 は 1 と同様の解析を経て、verrucarin J^{11-12, 16-18} と同定した (Figure 2, Table 3)。培養液をヘキサンで抽出した後、水層をさらにエーテルで抽出し、エーテル層を濃縮した粗抽出物からは 1、2 とよく類似したスペクトルを示す化合物 3 が主成分 (1.5 mg) として得られた。3 は 1、2 と同様の解析を経て satratoxin H (Figure 2, Table 4) と同定した^{15, 19-20}。以上、カエントケの培養液から主な成分として roridin E (1), verrucarin J (2), satratoxin H (3) を単離、構造決定した。

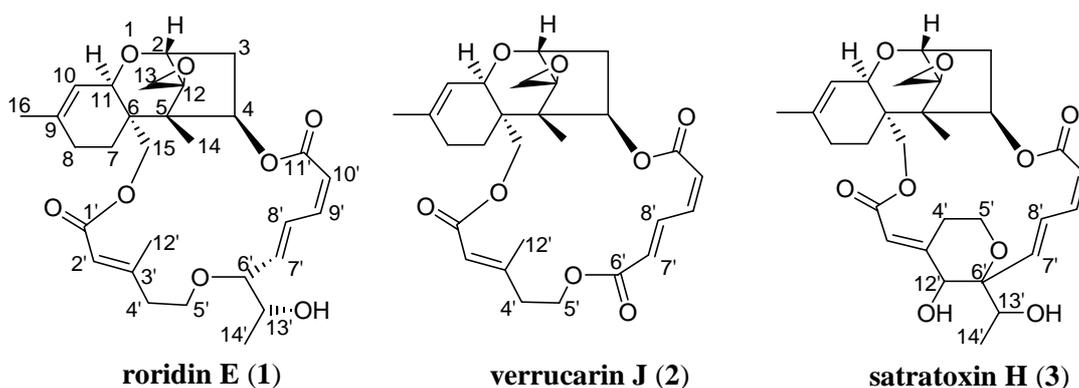


Figure 2

1 と 3 を 0.5 mg ずつ 20% エタノール - 生理食塩水に溶解してマウスに腹腔内注射したところ、致死活性が見られた。2 については 20% エタノール - 生理食塩水に溶解しなかったため活性試験は行わなかった。1 ~ 3 はいずれも *Stachybotrys atra* の培養液からも単離されている^{15, 19-20}。この菌が繁殖したワラを食べた家畜に重度の血球減少を伴うスタキボ中毒症がみられるという。また、*Stachybotrys atra* に感染したワラを

扱ったヒトにも皮膚発疹、咽頭炎、軽度の白血球減少などの症状が見られている。症状の類似性からもカエнтаケの中毒はマクロサイクリックトリコテセン類によるものと考えられる。

このようにして、カエнтаケの培養液には3種のマクロサイクリックトリコテセン類が主に含まれていることがわかった。そこで次に、カエнтаケの子実体からの毒成分の探索を行った。

Table 3. ¹H NMR data of compound 2 and verrucarín J

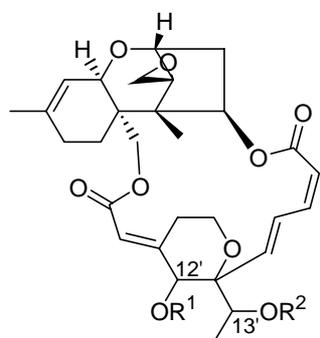
	2 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS=0)	verrucarin J ^{17a} (270 MHz, CDCl ₃ , TMS=0)
position	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))
2	3.85 (d, 5.2)	3.86 (d, 5)
3	2.16 (ddd, 15.2, 5.2, 5.2)	~2 (m)
	2.45-2.60 (m)	2.53 (m)
4	6.00 (dd, 8.2, 4.3)	6.01 (dd, 8, 4)
7, 8	1.7-2.1 (m)	~2 (m)
10	5.47 (brd, 5.1)	5.47 (d, 5)
11	3.75 (d, 5.1)	3.76 (d, 5)
13	2.83 (d, 4.1)	2.84 (d, 4)
	3.14 (d, 4.1)	3.15 (d, 4)
14	0.83 (s)	0.83 (s)
15	3.97 (d, 12.2)	3.97 (d, 13)
	4.42 (d, 12.2)	4.44 (d, 13)
16	1.72 (br s)	1.72 (s)
2'	5.83 (br s)	5.85 (d, 1.5)
4'	2.45-2.60 (m)	2.50 (t)
5'	4.15 (ddd, 11.7, 8.0, 5.3)	4.15 (m)
	~4.45 (m)	4.47 (m)
7'	6.00 (d, 15.2)	6.01 (d, 16)
8'	8.07 (dd, 15.2, 11.5)	8.07 (dd, 16, 11)
9'	6.63 (dd, 11.5, 11.5)	6.63 (t, 11)
10'	6.10 (d, 11.5)	6.11 (d, 11)
12'	2.28 (d, 1.5)	2.28 (d, 1.5)

Table 4. ¹H NMR data of compound 3 and satratoxin H

3 (300 MHz, CDCl ₃ , TMS=0.00)		satratoxin H ¹⁵ (300 MHz, CDCl ₃ , TMS=0)
position	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))
2	3.85 (d, 4.9)	3.9 (m)
3	2.20 (ddd, 15.2, 4.9, 4.9)	2.20 (dt, 15, 4.5)
	2.45 (dd, 15.2, 8.2)	2.45 (dd, 15, 7.5)
4	5.90 (m)	5.9 (m)
7, 8	1.88-1.96 (m)	1.9 (m)
8	2.00-2.09 (m)	2.1 (m)
10	5.45 (brd, 5.1)	5.46 (d, 5)
11	3.60 (d, 5.1)	3.62 (d, 5)
13	2.83 (d, 4.1)	2.81 (d, 4)
	3.14 (d, 4.1)	3.12 (d, 4)
14	0.82 (s)	0.83 (s)
15	3.86 (d, 12.5)	3.88 (d, 12)
	4.56 (d, 12.5)	4.56 (d, 12)
16	1.73 (br s)	1.74 (s)
2'	5.84 (d, 2.2)	5.85 (d, 2)
4'	2.66 (m)	2.6 (m)
	~3.85 (m)	3.74 (dt, 10, 3)
5'	3.74 (ddd, 11.7, 11.7, 2.9)	3.9 (m)
	~3.85 (m)	
7'	6.08 (d, 16.7)	6.09 (d, 17.5)
8'	7.35 (dd, 16.7, 10.0)	7.36 (dd, 17.5, 10.5)
9'	6.61 (dd, 10.0, 10.0)	6.63 (t, 10.5)
10'	5.90 (d, 10.0)	5.91 (d, 10.5)
12'	3.99 (d, 6.5)	3.97 (s)
13'	4.36 (q, 6.6)	4.38 (q, 7)
14'	1.16 (d, 6.6)	1.16 (d, 7)
12'-OH	2.36 (d, 6.5)	
13'-OH	2.41 (s)	

第3節 カエントケ子実体からの毒成分の単離と構造決定

北海道および新潟で採取されたカエントケをメタノールで抽出し、濃縮したのち水と酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層を濃縮した。粗抽出物の¹H NMR スペクトルから数種のマクロサイクリックトリコテセン類の存在を確認した。TLC 分析では主に4種の化合物が存在していることがわかった。このうち最も極性の高いものは satratoxin H (3)であることを確認した。水層にもマウスに対する致死活性が見られたが、これは水にも溶解性のある3によるものであることを確認した。酢酸エチル層の主成分4は培養液から得られた1~3のいずれとも異なるスペクトルを示した。最も類似しているのは3であり、2.09, 2.14 ppm にアセチル基と見られるシグナルが見られた。そこで4は3の2つの水酸基がアセトキシ基となった satratoxin H 12',13'-diacetate であると推定した。Satratoxin H 12',13'-diacetate は、天然物としては新規物質であるが、Eppleyらが3から誘導して得ている¹⁵。この文献値と4のデータを比較したところ、良い一致を示した。さらに、残りの化合物5,6を単離し、¹H NMR を測定したところ、どちらも3,4と類似したスペクトルであり、アセチル基がそれぞれ1つ存在することから5,6は satratoxin H monoacetate であると推定した。5,6は二次元 NMR 解析を経て satratoxin H 12'-acetate および satratoxin H 13'-acetate と決定した(Figure 3, Table 5)。4~6はカエントケ子実体の抽出物を水-クロロホルムで分配したクロロホルム層からも得られるため、酢酸エチルでの抽出操作により3から誘導されたアーティファクトではないことがわかった。



satratoxin H (3) : $R^1=R^2=H$

satratoxin H 12',13'-diacetate (4) : $R^1=R^2=Ac$

satratoxin H 12'-acetate (5) : $R^1=Ac, R^2=H$

satratoxin H 13'-acetate (6) : $R^1=H, R^2=Ac$

Figure 3

この4~6を0.5 mgずつマウスに腹腔内注射したところ、いずれも致死活性が見られた。この結果から、カエントケの毒として satratoxin H およびそのアセテート群が主成分として中毒症状をおこしている可能性が高い。カエントケは子囊菌類であり、カビに近い種であることから、カビ毒として有名なマクロサイクリックトリコテセン類が単離されたことは不思議ではない。先に述べたスタキボ中毒症の例ではワラについた *Stachybotrys atra* が大気中にも放出されたことで、それをヒトが吸入して中毒をおこしているが、吸入した量は毒本体の量を考えればごく少量であろう。一方、カエントケの子実体1gには概算して satratoxin H 類が3 mg 近くも含まれていることになる。少量の子実体を誤食した場合でも *Stachybotrys atra* の例とは比べものにならないほど大量の satratoxin H 類を摂取してしまったことになる。これにより、カエント

ケ中毒の一連の症状が現われ、死に至ったと考えられる。カエнтаケは致死活性の高い猛毒である satratoxin H 類を凝縮して子実体を形成している恐ろしい毒キノコであるといえる。なお、Fong らとの共同研究により、1、3、4、6 について抗マラリア活性を調べたところ²¹、いずれの化合物にも強い活性が見られた。マクロサイクリックトリコテセン類はその強い毒性のため多種の菌との生存競争のための抗菌物質と考えられており、カエнтаケの菌系および子実体中でも 1~6 全体として生体防御に関わっていると考えられる。

この研究において興味深い点は、子実体と培養液からは異なるマクロサイクリックトリコテセン類が得られたことである。子実体には、培養液の主成分だった roridin E (1)や verrucarin J (2)は存在しないか、存在しても非常に微量であると考えられる。逆に、培養液を詳細に調べても、4~6 のような satratoxin H (3)のアセテート類は確認できなかった。1~6 はいずれも同様の毒性を示す(2 については前述の理由により確認していない)ので毒成分の解明の点ではあまり問題にはならないが、これらの生合成を考える上では有意義である。2 は 1 を化学的に酸化(PDC / DMF)した時 6'位から酸化的開裂をおこして生成することから^{14d}、菌体中でも容易に 1 から誘導されると考えられる。また、Eppley によれば、3 は生合成的に 1 から 12'位への水酸基の導入および、6'-12'位間の脱水素を伴う環化により得られる¹⁵。3~6 は 1 の代謝産物であり、これらの satratoxin H 類が子実体形成時に生体内で盛んに合成されるということは satratoxin H 類には特に子実体に必要な大切な役割があるのではないかと思われる。

Table 5 ^1H NMR data of compounds 4, 5, and 6 (300 MHz, CDCl_3)

	4	5	6
position	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))
2	3.84 (d, 5.1)	3.80~4.00 (m)	3.85 (d, 5.1)
3	2.19 (ddd, 15.3, 5.1, 5.1)	2.20 (ddd, 15.6, 4.8, 4.8)	2.20 (ddd, 15.3, 5.4, 5.4)
	2.44 (dd, 15.3, 8.4)	2.44 (dd, 15.6, 8.1)	2.45 (dd, 15.3, 8.2)
4	5.89 (dd, 8.4, 4.9)	5.90 (dd, 8.1, 4.8)	5.90 (dd, 8.2, 5.4)
7, 8	1.8~2.1 (m)	1.86~2.14 (m)	1.86~2.12 (m)
10	5.43 (brd, 5.1)	5.44 (br d, 4.5)	5.45 (brd, 4.0)
11	3.58 (d, 5.1)	3.58 (d, 4.5)	3.60 (d, 4.0)
13	2.84 (d, 4.1)	2.84 (d, 3.9)	2.83 (d, 4.1)
	3.14 (d, 4.1)	3.14 (d, 3.9)	3.14 (d, 4.1)
14	0.83 (br s)	0.82 (s)	0.83 (s)
15	3.85 (d, 12.2)	3.85 (d, 12.8)	3.86 (d, 12.3)
	4.52 (d, 12.2)	4.54 (d, 12.8)	4.55 (d, 12.3)
16	1.72 (s)	1.72 (s)	1.73 (br s)
2'	6.02 (d, 2.2)	6.02 (brd, 2.0)	5.85 (d, 2.2)
4'	2.56 (m)	2.55 (m)	2.62 (m)
	~3.85 (m)	3.80~4.00 (m)	~3.85 (m)
5'	3.70 (ddd, 12.0, 12.0, 3.1)	3.73 (ddd, 11.8, 11.8, 3.0)	3.66 (ddd, 11.8, 11.8, 3.1)
	~3.85 (m)	3.80~4.00 (m)	~3.85 (m)
7'	6.03 (d, 16.8)	6.08 (d, 17.3)	6.04 (d, 16.7)
8'	7.38 (dd, 16.8, 10.0)	7.41 (dd, 17.3, 10.1)	7.33 (ddd, 16.7, 10.1, 1.0)
9'	6.63 (dd, 10.0, 10.0)	6.61 (dd, 10.1, 10.1)	6.64 (dd, 10.1, 10.1)
10'	5.93 (d, 10.0)	5.92 (d, 10.1)	5.93 (d, 10.1)
12'	5.26 (s)	5.29 (s)	3.95 (d, 8.6)
13'	5.41 (q, 6.6)	4.22 (q, 6.7)	5.54 (q, 6.2)
14'	1.08 (d, 6.6)	1.02 (d, 6.7)	1.22 (d, 6.2)
-OR	2.09 (s)	2.12 (s) (-OAc)	2.10 (s) (-OAc)
	2.14 (s)	not detected (OH)	2.38 (d, 8.6) (-OH)

Table 6. ^{13}C NMR data of compounds 4, 5, and 6 (75 MHz, CDCl_3)

	4	5	6		4	5	6
position	ppm	ppm	ppm	position	ppm	ppm	ppm
2	79.06	79.06	79.07	4'	25.84	25.82	25.20
3	34.30	34.28	34.33	5'	60.30	60.40	60.24
4	74.17	74.10	74.17	6'	79.39	80.22	80.72
5	48.89	48.89	48.87	7'	131.42	131.04	131.98
6	43.26	43.28	43.33	8'	134.33	134.25	134.59
7	20.25	20.25	20.28	9'	142.40	142.65	142.57
8	27.45	27.45	27.57	10'	120.90	120.64	120.71
9	140.40	140.38	140.40	11'	166.98	167.06	167.01
10	118.77	118.78	118.78*	12'	73.23	73.25	73.33
11	68.10	68.05	68.13	13'	71.32	69.24	71.83
12	65.45	65.44	65.47	14'	14.89	15.30	15.13
13	48.08	48.08	48.10	-OCOMe	21.20	21.04	21.42
14	7.65	7.63	7.58		21.33		
15	64.15	64.15	64.14	-OCOMe	169.88	169.61	170.35
16	23.36	23.34	23.36		170.20		
1'	166.04	166.04	166.19				
2'	122.34	122.14	119.21*				
3'	149.84	149.97	154.68				

*interchangeable

第4節 Satratoxin H の立体配置

Satratoxin H (3)は6'、12'、13'位の立体配置が未だに未決定である。しかし、Epplyらにより以下の構造が提唱されている¹⁵。テトラヒドロピラン環部分において、2'-12'位のプロトンシグナル間で24%のNOEがみられることおよび、ロングレンジカップリングが全く見られないことから図のように12'位の水素が擬イス形配座のエカトリアルに位置し、2' 3'位のオレフィンの平面上にあるとした(Figure 4)。しかし、これ以上の構造情報は得られていない。

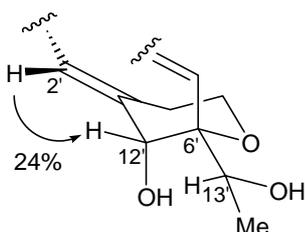
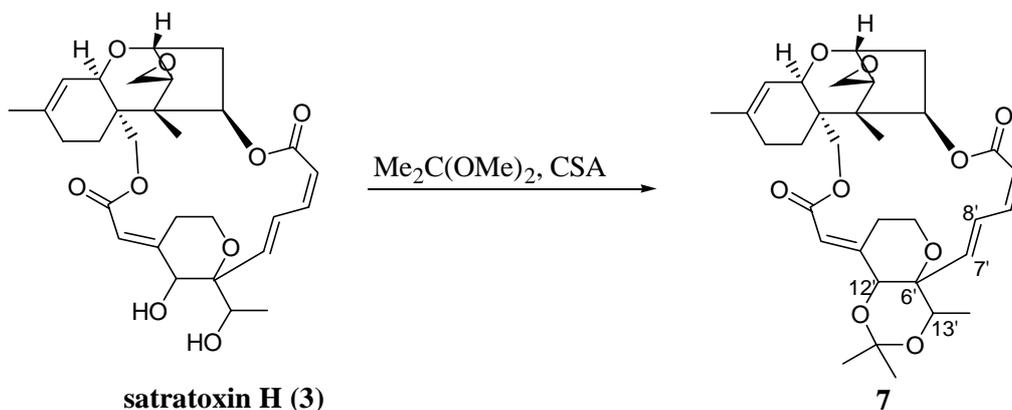


Figure 4 (arrow : NOE on 3, Epply's work)

そこで今回3のテトラヒドロピラン環部分の相対および絶対立体配置を決定することを目的として、3の誘導化を行った。まず、相対立体配置を決定するために、3の2つの水酸基をアセトニドとしてコンフォメーションを固定することを考えた。3はアセトンジメチルアセタールおよびCSAを用いて容易にアセトニド7へ導くことができた(Scheme 1)。



Scheme 1

1.3 ジオールの相対立体配置を決める方法の一つとしてアセトニドの¹³C NMR スペクトルのケミカルシフトを利用する方法が知られている²²。これにならいうアセトニド7の¹³C NMRを測定したところ、アセタール炭素は98.54 ppm、メチル基は19.36、29.82 ppmとなり、典型的なシンジオールのアセトニドの値を示した。また、7の13'位のプロトンシグナルを照射したところ、12'位の水素、14'位のメチル基、ジメチルアセタールのアキシャル位のメチル基と共に7'位の水素にシグナル強度の増加がみられ

た。この結果から 7' 8'位の二重結合はアセトニドによって形成されたイス形配座の 6 員環のエカトリアル位にあり、6',12',13'位の立体配置は 6'S,12'S,13'R (Figure 5-a)もしくは 6'R,12'R,13'S (Figure 5-b)であることが明らかになった。

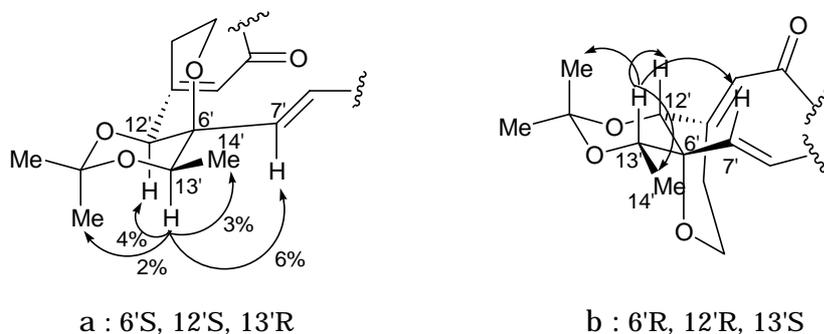


Figure 5 (arrow : NOE on 7)

3と共に培養液から得られた roridin E (1)の 13'位の絶対立体配置が Rである¹²ことから 6'、12'位が Sである可能性が高いが、1は生産する菌種によって立体異性体が生成されることもある¹⁴。そこで 3を MTPA エステルに導き、新 Mosher 法²³を適用することを考えた。12'位の水酸基のみが遊離している satratoxin H 13'-acetate (6)を (+)-MTPA エステル 8 および (-)-MTPA エステル 9 に変換し、それらのケミカルシフトの差を計算したところ、12'位近傍ではエステルの右側が -、左側が + となったが化合物全体の符号は複雑となった (Figure 6)。これは 12'位の水酸基がテトラヒドロピラン環のアキシャル位に位置しているためと考えられる²⁴。近傍のケミカルシフト差の分布を新 Mosher 法に適用すると、3つの不斉炭素の絶対立体配置は 6'R,12'R,13'S となるが、この結果は roridin E (1)の 13'位の絶対立体配置(R)と逆となる²⁵。このため、この環部分の絶対立体配置の決定については再度検討する必要があると考えている。

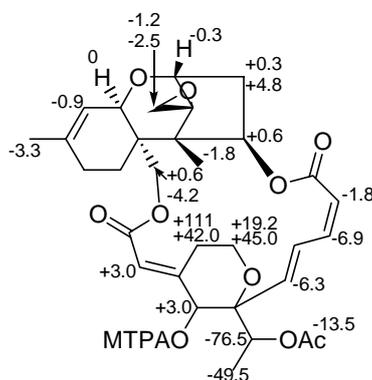
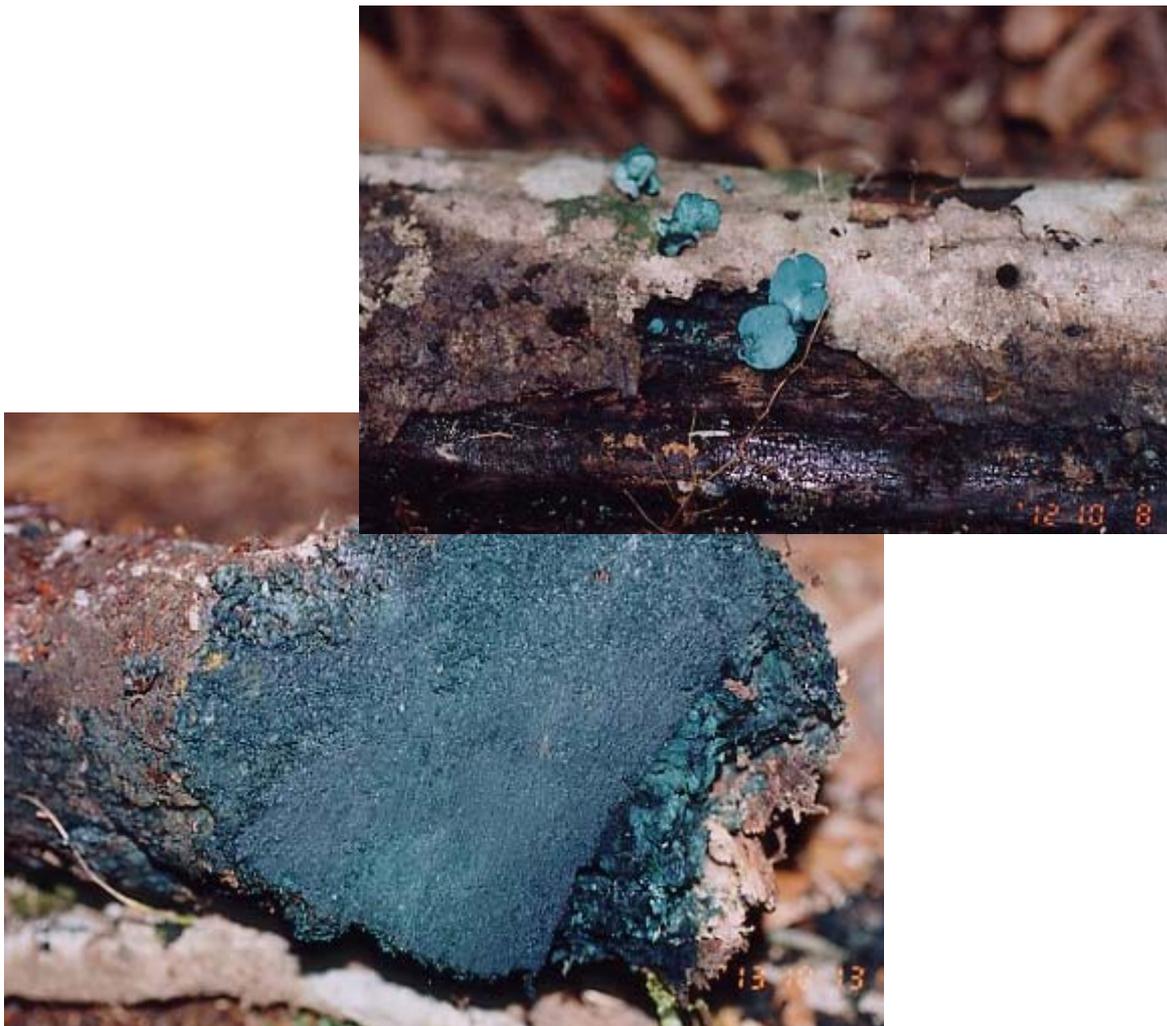


Figure 6: $\Delta\delta$ values ($\Delta\delta = \delta(-) - \delta(+)$ /Hz) obtained for MTPA esters 8 and 9

第2章

ロクショウグサレキン属の色素 xylindein 類の構造と化学的性質



第1節 概要

ロクシヨウグサレキン(*Chlorociboria aeruginosa*)およびロクシヨウグサレキンモドキ(*Chlorociboria aeruginascens*)はズキンタケ科ロクシヨウグサレキン属のキノコで、この菌糸および子実体は深い緑青色をしている。この菌は温帯に分布し、関東では標高 1000 m 付近のブナ林によく生息し、本菌の着生した材は緑青色に腐食される。この青色色素主成分が xylindein (10)²⁶⁻³² である (Figure 7)。

本菌の美しい緑青色は 200 年以上前から人々の興味をひいてきた。1728 年、Geffroy はパリ科学会でこの色素について言及している³²。Rommier はこの色素を xylindein と命名し、Fodos らはこの色素の抽出を行っている^{26a,b}。また、Liebermann は xylindein の効率的な抽出方法を開発し、初めて xylindein の結晶を得ることに成功したほか、xylindein の類縁体色素の存在についても報告している²⁷。構造研究は Kögl らの精力的な研究によって骨格がほとんど解明され²⁸⁻²⁹、1962 年、Blackburn らによって平面構造が提出された³⁰。1965 年には Edwards らがさらに詳細な解析を経て Blackburn らの提出した構造を支持している³¹。構造決定まで実に 200 年以上が費やされた理由には、当時の分析技術の限界のみならず、xylindein の溶解性の問題、解析の困難な構造異性体の問題が構造決定を混迷させたことが考えられる。

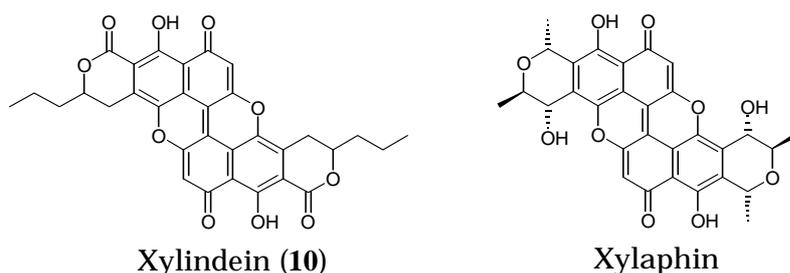
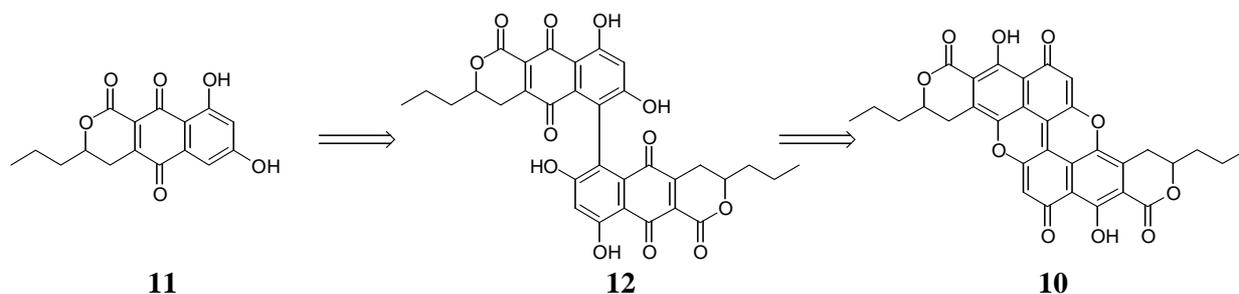


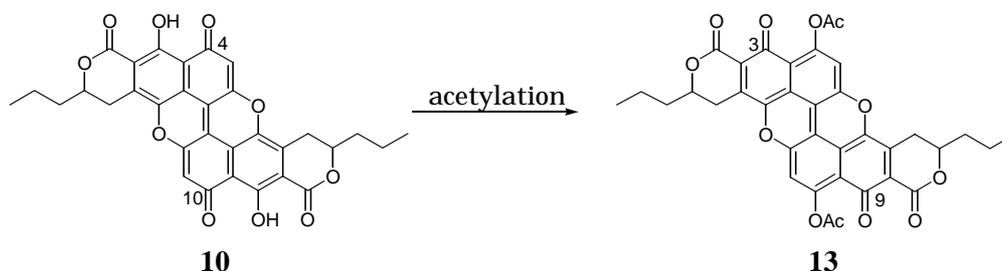
Figure 7

10 の平面構造の特徴として、 γ -ラクトンを持つナフトキノンが二分子縮合していること、 C_2 対称軸を持つこと、extended quinone 構造が存在すること、キノン、ラクトンと強固な水素結合をすると考えられるフェノール水酸基が存在することが挙げられる。生合成についての報告はないが、類縁体である xylaphin (Figure 7) の生合成及び合成研究に関する報告から推察すると³²、ポリケチドから生成したナフトキノン 11 が二量化したのちエーテル結合を構築したと考えられる (Scheme 2)。



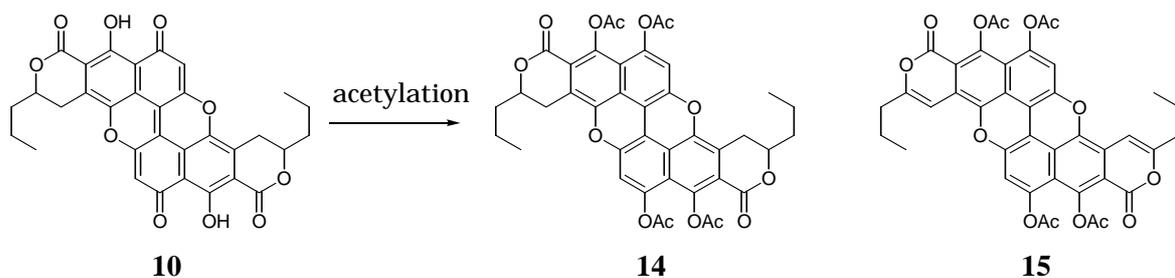
Scheme 2

10の平面構造は赤外線吸収スペクトルの詳細な解析によって、可能な幾つかの構造異性体のうち、もっとも水素結合を安定に保つ Figure 7 に示した構造と決定された³⁰⁻³¹。しかし、Edwardsらは10をアセチル化する条件では3,9-キノン型構造へと平衡が動き、4,10位にアセチル基が導入された13が生成すると報告している(Scheme 3)³¹。このことから10は互変異性体の混合物であると考えられることもできる。このように、Figure 7以外の互変異性体の寄与が反応進行中に見られることも10の構造研究を困難にした一因であろう。10には2つの不斉炭素が存在するが、絶対立体配置は決定されていなかった。10に関する研究はその後途絶えており、1979年、1990年にGilesらが合成研究を報告しているのみである³³⁻³⁴。



Scheme 3

Xylindein (10)の化学的性質については、Köglらが10の化学誘導を行い、その生成物の解析を通して報告している²⁸⁻²⁹。10を無水酢酸、酢酸ナトリウムによってアセチル化した際、10のキノン部位が還元されてアセチル化されたtetraacetylxylindein (14)が生成物として得られたという(Scheme 4)。Blackburnらはこの反応において10がベンジル位で酸化(脱水素化)された15と推定される化合物が同時に得られたと報告しており、アセチル化の反応条件下で自己酸化還元反応を起こしているとした³⁵。



Scheme 4

これらの生成物が真に自己酸化還元反応で生じていることを証明できれば不均化反応の一例として新しい知見になると期待できる。

以上の背景から、ロクショウグサレキンの生産する xylindein (10)の絶対立体配置の決定、類縁体の構造研究と共に xylindein 類の化学的性質を詳細に調べることにした。

第2節 Xylindein の絶対立体配置の決定

Xylindein (10)の平面構造は Edwards ら、Blackburn らによって決定されたが、2'位と2''位の二つの不斉炭素の絶対立体配置は未知であったことから、まず 10 の絶対構造を決定することとした。

ロクショウグサレキンの着生した朽木を 1997 年の春及び 1998 年の春、秋に丹沢山系および奥多摩山系のブナ林で採取した。これを自然乾燥させたのち、Liebermann らの方法²⁷に従って、ソックスレー抽出装置を用いてクロロホルムにて色素を抽出した。色素は難溶性のため、次第に抽出液中に沈殿として析出した。これをろ過して残渣を 80% フェノール水で再結晶した。得られた板状結晶(暗青色)の X 線結晶構造解析によって、前出 2 グループから提出された互変異性構造が結晶状態においては正しいということが実証された(Figure 8)。10 の結晶は 2 つの 10 と 8 つのフェノールからなる単位格子をもっており、ナフトキノン部分構造は配位するフェノールの位置が若干異なるためか、それぞれ異なる結合長と結合角を有していた。特に問題となっていた異性体構造については以下の事がわかった。Figure 8 に示すように、キノンのカルボニルは二重結合(標準結合長 1.22 Å)としては長く、フェノール性水酸基の C-O 結合は単結合(1.43 Å)としては短いことから、この二つの官能基間で強固な水素結合を形成していることがわかった。X 線回折像の強さが構造上のどの結合に関しても等しいことから、1 は 3,9-キノンと 4,10-キノンの平衡混合物ではなく、4,10-キノンであるが水素結合のために結合の長さが増しているものと考えられる。

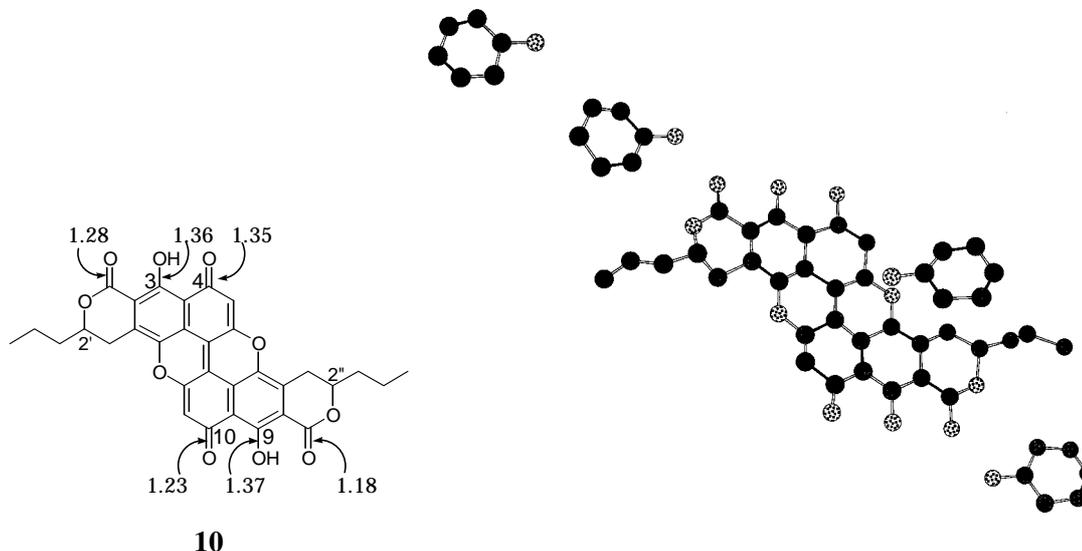


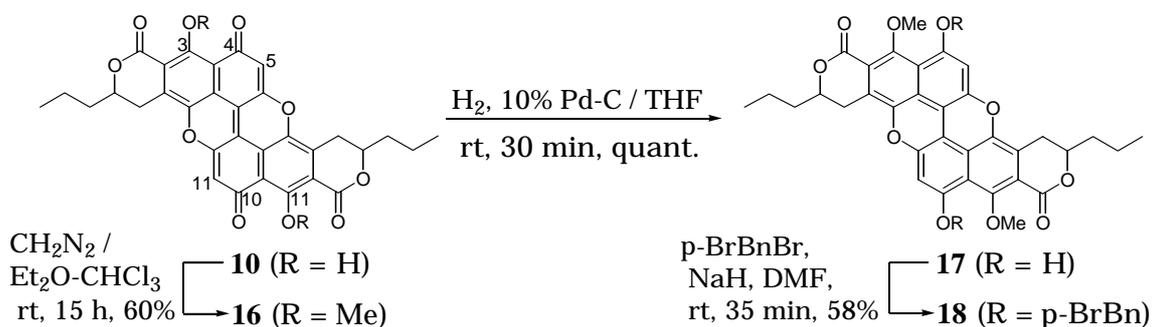
Figure 8 (bond length (Å))

次に、10 の 2 つの不斉炭素の絶対立体配置を決定することにした。このためには幾つか方法がある。即ち、ラク톤を開環したのち Mosher エステルとして決定する方法²³、絶対立体配置既知の化合物、例えば xylaphin へと誘導する方法、10 に重原子を導入して X 線結晶構造解析によって決定する方法などである。この中で、新 Mosher 法では 10 の場合 MTPA 平面をゆがめる可能性のある巨大な発色団があるため結果の信頼性が低い²⁴ こと、xylaphin への誘導は困難が予想されることなどを考慮して、10

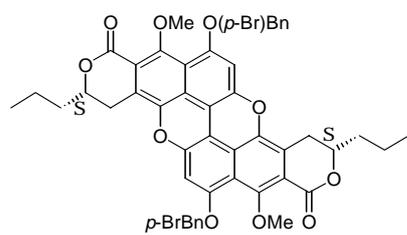
に重原子を導入した誘導体に導くことにした。

10 の化学誘導に関する研究は Edwards ら、Blackburn らが行っているが直接重原子を導入した例はない。10 は種々の溶媒に難溶であるが、化学誘導によって溶解性が改善されると期待して、まず文献^{31,35}に従ってメチル化、アセチル化、ニトロ化を行った。Edwards の報告³¹に従ってジアゾメタンで処理して得られた赤紫色生成物はクロロホルムに対して溶解性が向上した。アセチル化、ニトロ化生成物はそれぞれ、赤色、青色の難溶性物質であった。そこで赤紫色生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム - アセトン)にて精製し、各種スペクトルデータを解析し、3,9-dimethylxylindein(16)であることを確認したのち、これをさらに化学変換して重原子を導入することにした(Scheme 5)。重原子として臭素を 5,11 位に導入することを考え、16 に臭素を作用させたところ青色色素が生成した。¹H NMR スペクトルでは 5,11 位のプロトンが消失していたため臭素が導入されていると予想されたが、この色素は不安定であり、徐々に分解した。そこで直接的なハロゲン導入は断念し、16 を還元して生じるフェノール性水酸基に重原子を含む官能基を導入することにした。Pd-C 触媒を用いて 16 を THF 中で水素添加することによって定量的に黄色色素 17 を得た。17 はシリカゲル上、セライト上で容易に酸素酸化されて 16 に戻るため、用いた Pd-C はアルゴン気流下で素早く過して取り除き、それ以上の精製は行わずに官能基導入の検討を行った。フェノール性水酸基に導入する官能基として、p-プロモベンジル基を選んだ。17 に水素化ナトリウム、p-プロモベンジルブロミドを脱気した DMF 中で作用させ、生成物をシリカゲルクロマトグラフィー(THF - ベンゼン)にて精製し 18 を得た。18 を 10 と同じく 80% フェノール水溶液から再結晶させて、赤色の板状結晶を得た。この結晶の X 線結晶構造解析により、単位格子は 10 と同じく 2 つの 18 と 8 つのフェノールから成り、2 つの不斉炭素の絶対立体配置はいずれも S であることがわかった(Figure 9)。

以上、10 から 3 行程で誘導した 18 の X 線結晶構造解析によって xylindein (10) の 2' 位と 2'' 位の不斉炭素の絶対立体配置が 2'S, 2''S であることを初めて明らかにした。



Scheme 5



18

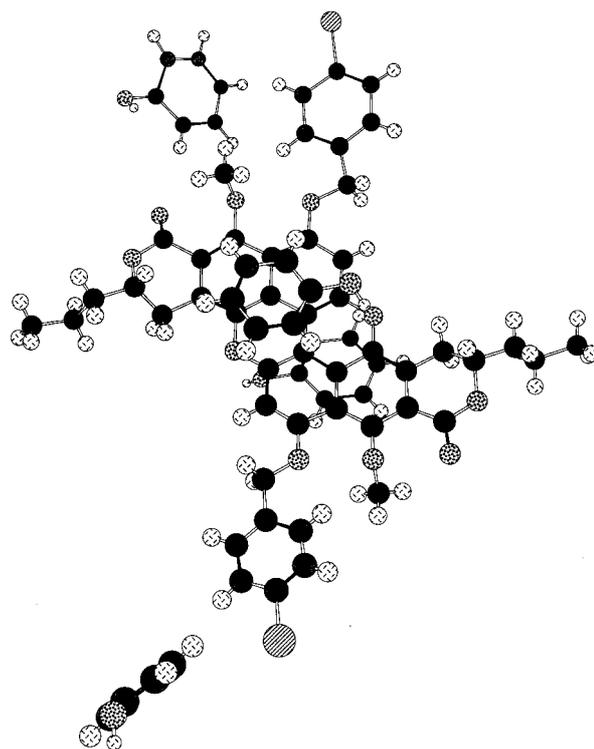


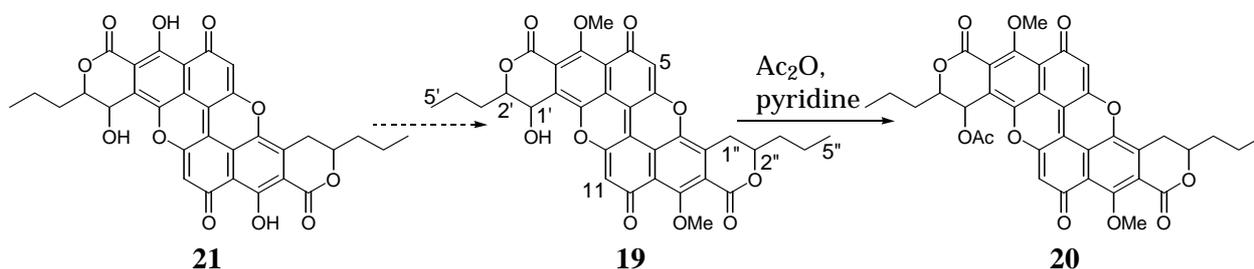
Figure 9

第3節 Xylindein 類縁体の探索

ロクシヨウグサレキン類は xylindein (10)の他にも多種の色素を生産している。Fordos はロクシヨウグサレキンによって腐食された木片をアルコールで抽出すると赤色色素が溶出すると報告しているが、詳細については述べられていない^{26,31}。そこで、まずこの赤色色素の抽出について検討した。前節で述べた 10 の抽出を行ったのち、10 を主成分として含む物をろ過で除いたろ液を濃縮し、これにメタノールを加えると赤色色素が抽出された。この改良法により抽出された赤色色素には、TLC 分析の結果、主に 3 成分が含まれていた。この赤色色素は不安定で、濃縮しても色の変化は見られないが TLC (ODS)分析で分解を確認した。このような不安定性から構造決定はできなかったが、10 の生合成中間体と考えている 12 に近い構造と推定している。

一方、クロロホルム抽出物そのものの中にも様々な色の色素が存在するが、10 と同様に溶解性が悪く、扱いの難しい色素群である。これらの xylindein 類縁体色素を調べるために抽出物をそのままジアゾメタン処理したところ、溶解性、分離状態共に向上した。そこで、ジアゾメタン処理したのちに生成した化合物を分離、構造決定することにした。

主成分は dimethylxylindein (16)であるが、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離する際、16 よりも保持時間は長く色は 16 に似た赤紫色色素 19 が得られた。これを重クロロホルム - 重メタノールの混合溶媒 (5 : 1)中で ¹H NMR スペクトルを測定したところ 16 によく似たスペクトルを与えたが、xylindein 骨格の対称性の崩れた構造であることがわかった。対称性の崩れは 1'位のベンジル位に官能基が置換されているためであると推定した。19 を無水酢酸、ピリジンを用いてアセチル化するとより低極性の赤色色素 20 が生成した。20 は ¹H NMR スペクトルから 19 にアセチル基が 1 つ導入された化合物であることがわかった。このアセテート 20 の各種スペクトルデータから、平面構造を下図のように決定した(Scheme 6, Table 7)^{2b}。



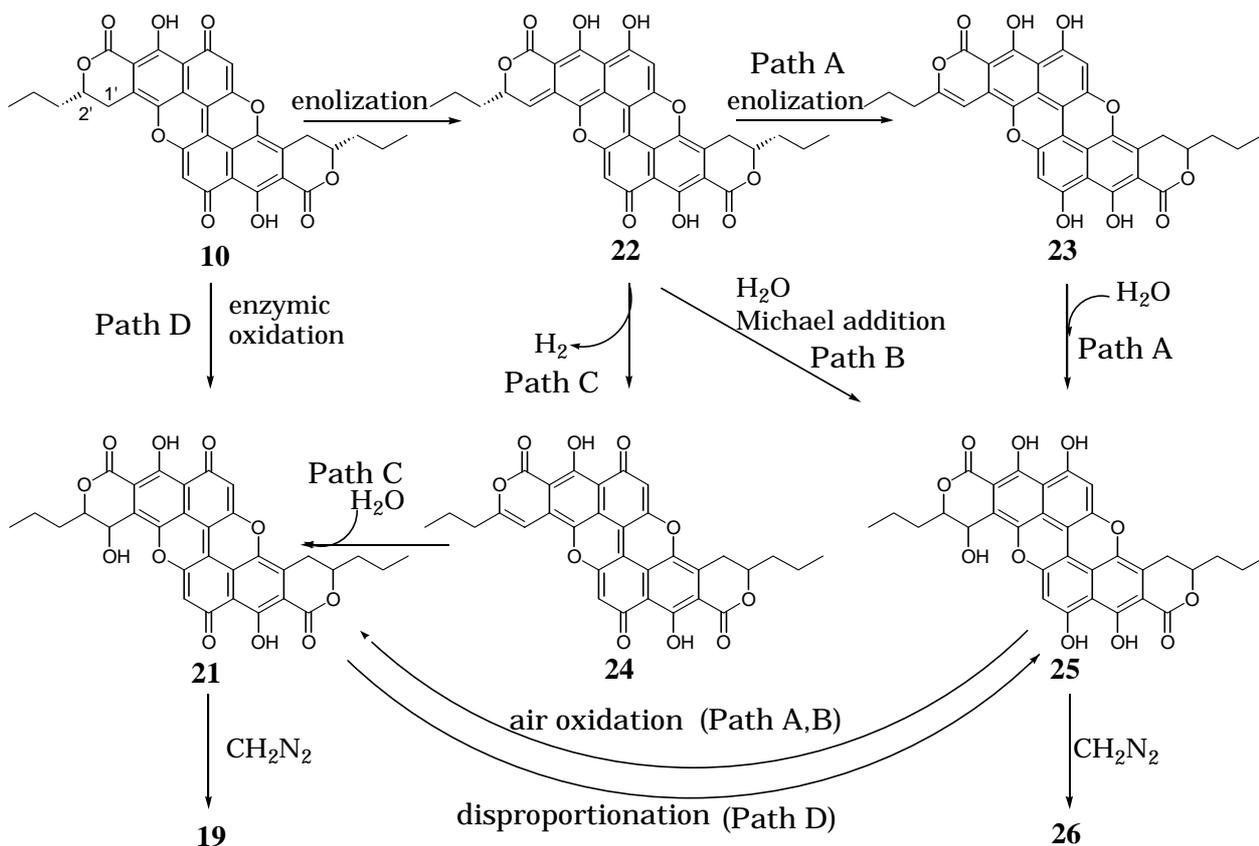
Scheme 6

Table 7 ¹H NMR data of compounds 16, 19, and 20 (300 MHz, TMS=0.00 ppm)

	16 (CDCl ₃)	19 (CDCl ₃ -CD ₃ OD)	20 (CDCl ₃)
position	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))	ppm (mult, J (Hz))
5, 11	6.48 (s)	6.51 (s)	6.48 (s)
		6.52 (s)	6.50 (s)
1', 1''	2.91 (dd, 16.8, 11.5)	5.20 (d, 1.7)(H-1')	6.39 (d, 1.7)(H-1')
	3.42 (dd, 16.8, 2.8)	2.95(H-1'')*	2.89 (dd, 17.4, 15.4)(H-1'')
		3.46 (dd, 16.8, 2.8)(H-1'')	3.41 (dd, 17.4, 2.8)(H-1'')
2'	4.56 (m)	4.76 (m)	4.77 (m)
2''		4.48 (m)	4.46 (m)
3', 3''	1.83 (m)	1.81 (m)	1.81 (m)
	1.94 (m)		
4', 4''	1.65 (m)	1.52 (m)	1.51 (m)
5', 5''	1.04 (t, 7.6)	0.86 (t, 5.9)	0.86 (t, 7.0)
	0.83 (br s)	0.97 (t, 5.9)	0.96 (t, 7.0)
-OMe	4.08 (s)	4.01 (s)	4.01 (s)
		4.02 (s)	4.06 (s)
-OAc			2.09 (s)

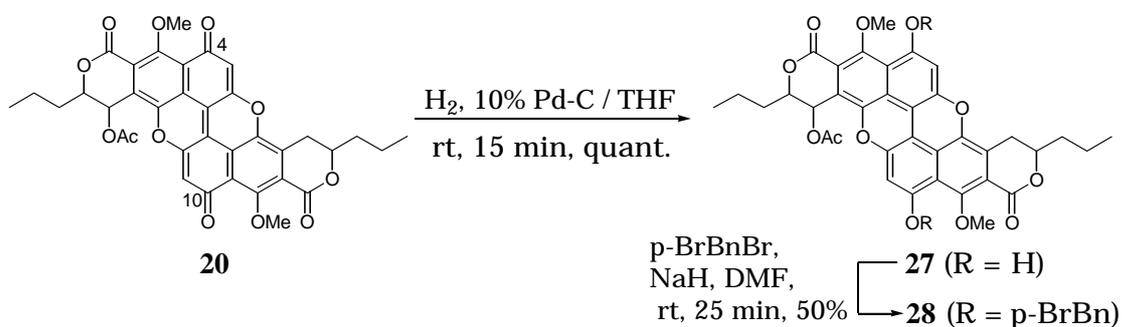
*Chemical shift (ppm) was figured out from ¹H-¹H COSY spectra.

19の前駆体は導入した官能基(メチル基、アセチル基)を除外して考えると xylindein の 1'位に水酸基が導入された構造を持つ 21 であり、10 よりさらに酸化度が高くなっている。この水酸基は生合成過程で導入されたと考えるか、あるいは第 1 節で述べたような 10 の自己酸化還元を経て酸化的(化学的)に導入されたと考えることもできる。そこでその手掛かりを得るために 1'および 2'位の絶対立体配置を決定することにした。生成過程を考えた時、Scheme 7 の A (10 → 22 → 23 → 25 → 21)や C (10 → 22 → 24 → 21)のような経路を経て水が付加するとすると、21 の 2'位の絶対立体配置は 10 と異なる可能性がある。また、Blackburn らの報告している自己酸化還元反応³⁵を経ている場合、1'位、2'位は一旦オレフィンになってしまうため、水が付加した 21 の 1'位、2'位の立体は制御されないであろう。一方、22 に水が付加する経路 B (10 → 22 → 25 → 21)および経路 D のように酸化酵素によって 1'位に水酸基が導入されるならば 2'の絶対立体配置は保持されると考えられる。そこで 1'位および 2'位の絶対立体配置を決定することにした。これは完全な証明にはなり得ないが、21 の生成経路を議論する上では重要な知見になると考えた。



Scheme 7

10の絶対立体配置を決定した時と同様の方法を用いて20を還元して27を得たのち、生じたフェノール性水酸基にp-プロモベンジル基を導入し、アルキル化された28を得た(Scheme 8)。



Scheme 8

28をトルエンから再結晶し、得られた橙色板状結晶についてX線結晶構造解析を行った結果、2'位の絶対立体配置は保持され(S)、1'位の水酸基はRであることがわかった。

た(Figure 10)。もしも、抽出物中のマイナー成分から 1'位もしくは 2'位におけるエピマ - が見つからなければ、この結果からエノール化を経てランダムに水が付加する経路(A、C)および自己酸化還元によって 1',2'-デヒドロ体が生成したのち水が付加する経路は否定される。しかし、経路 B と D のどちらであるかは決定できない。

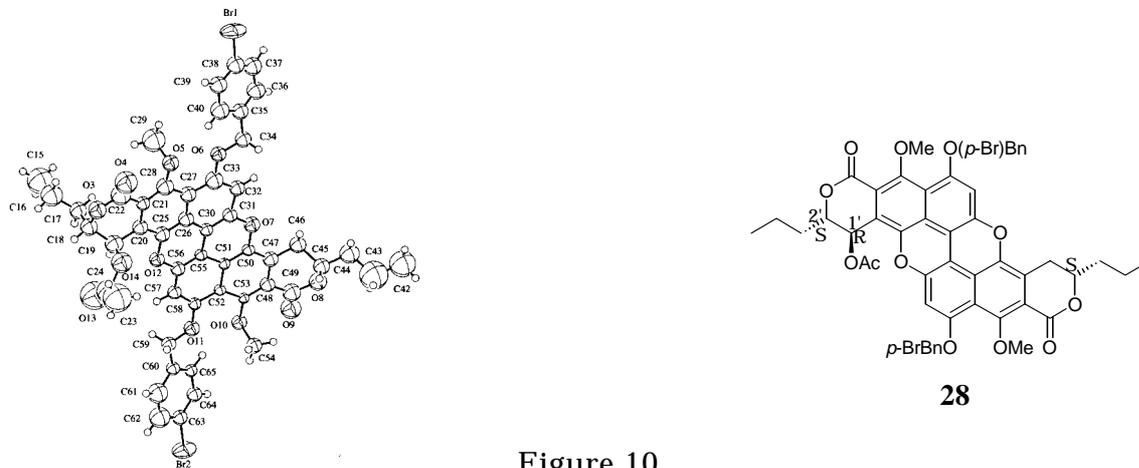


Figure 10

なお、クロロホルム抽出物(ジアゾメタン処理後)からはこの他に 19 と同様に 10 の 1'位に水酸基が導入された構造を持つハイドロキノン型の 26 が得られている(Figure 11)。各種分析により平面構造を決定したが、絶対立体配置の決定には至っていない。26 が得られたことから、特に 26 の前駆体にあたる 25 が 21 の生合成前駆体として存在し、酸素酸化を受けて 21 を生成する経路 B はもっとも自然に見える。しかし、Scheme 7 に示したように、21 から不均化によって 25 が生成するという(経路 D)、新たな可能性が見出されたので次節に述べる。

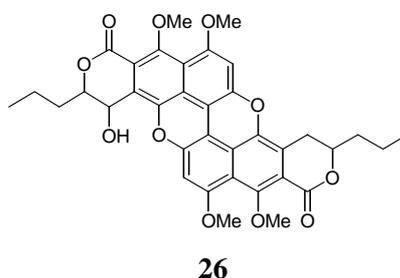
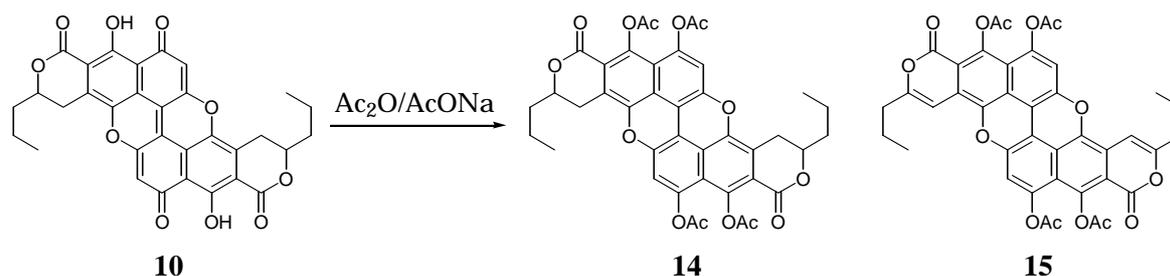


Figure 11

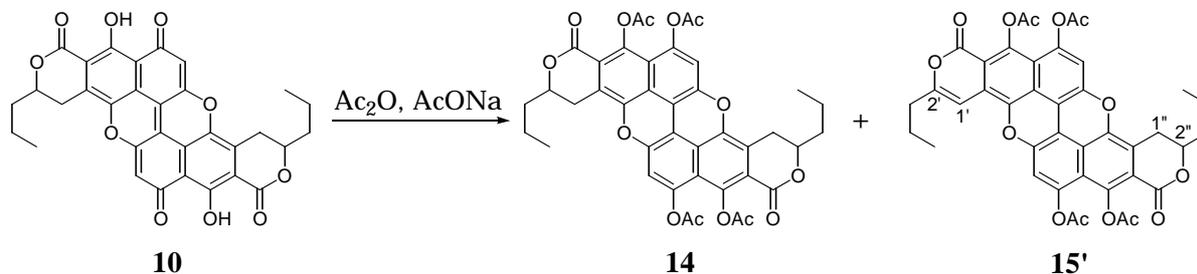
第4節 Xylindein 誘導体の自己酸化還元反応

概要で述べたように、xylindein (10)の構造研究の過程で、Köglらは、10を無水酢酸 / 硫酸でアセチル化するという条件下、14が得られたと報告し、10がキノンであると考えられるにも関わらず、tetraacetylxylindeinが生成するという事は、系内に何らかの還元作用が働いたのではないかと報告しているが、この現象について詳しい説明には至っていない。この報告を受けて、1965年、Blackburnらは同じ条件下で14と同時に15の構造と推定される橙色色素を単離し、10が分子間で自己酸化還元をおこなっていると報告した(Scheme 9)³⁵。



Scheme 9 (Scheme 4 再掲)

今回その真偽を確かめるため、同じ条件で10を反応させたところ、14と共にBlackburnらの報告にあったものと同様の橙色色素が生成することがわかった。しかし、系は多成分の混合物であり、TLC上では未反応の10やその他茶色の色素などが見られた。橙色色素は、量は様々であるが3種あり、最も量の多いものをシリカゲルTLCで分取して単離し、 ^1H NMRスペクトルを測定したところ、Blackburnの提出した化合物15とは異なり、1'、2'位のみが酸化的にオレフィンになり、1''、2''位は飽和のままである化合物15'であった(Scheme 10)。



Scheme 10

15'は、10の構造を1'位、2'位から2度エノール化させて、即ち、Scheme 7に示した22、23を経てアセチル基が導入されると得られるため酸化度は10と同じであり、14の生成に関わる酸化体には相当しない。Blackburnらの構造推定した15と同じものは見つからず、15は主成分ではなかった。酸化還元の出支が合うためには還元体14の量に対応する酸化体が生成するはずだが、この系では10同士で電子の授受を満足するような自己酸化還元を証明することはできなかった。

Xylindein (10)自身は溶解性が悪く、自己酸化還元反応を証明するには不適切であると考え、有機溶媒に溶解性が良いdimethylxylindein (16)を用いることにした。

16を最も溶解性のよいクロロホルムに溶解させ、メタノールを加えて室温で数日静置しておくると新たに黄色色素、青色色素2種の化合物が生成した。これを素早くシリカゲルカラムクロマトグラフィー(5% MeOH-CHCl₃)で分離した。黄色色素の¹H NMRスペクトルを測定すると10から別途化学誘導したdihydrodimethylxylindein (17)と一致した。また、青色色素29の¹H NMRスペクトルはxylindein骨格の対称性の崩れたシグナルが観察され、5位に相当するピークが消失していた。FAB-MSを測定したところ、1195の分子イオンピークを与えた。またESI-MSでは1191の分子イオンピークを与えた。この結果より、29は16の二量体であると決定した(Figure 12)。

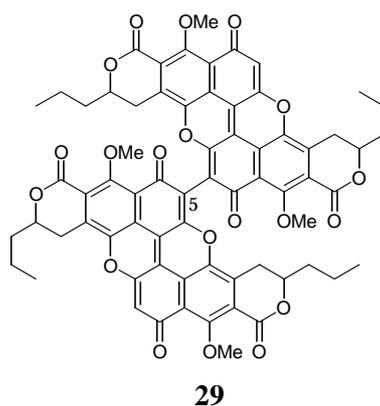
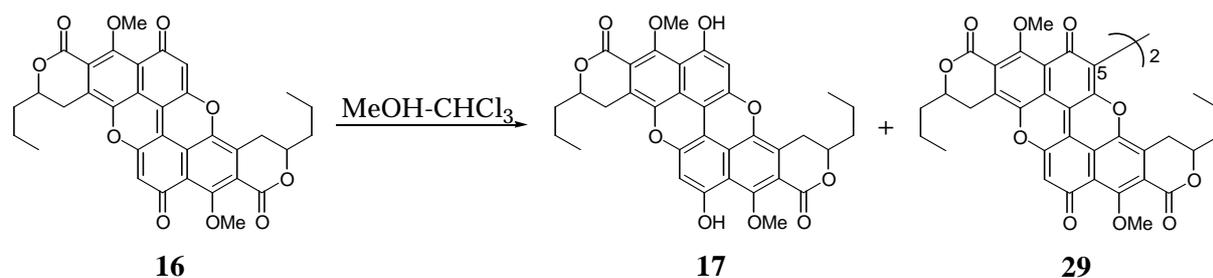


Figure 12

FAB-MSでは[M+H]⁺に対して4 mu多くなるが、キノンはEIなどの比較的強いイオン化法では還元された状態で分子イオンピークを与えることが知られているので、29についてもFAB-MSでは二つのキノン構造が還元された化合物の分子イオンピークが大きく出たものと解釈した。

29は16の二量体であるから、29は16が2電子酸化された酸化体であり、17は16の還元体であるので、この実験は16が不均化して17と29を生成する自己酸化還元反応が起こっている可能性を示唆した(Scheme 11)。



Scheme 11

Blackburn らの報告した自己酸化還元(Scheme 9)とは基質も反応の様式も異なるが、16 の自己酸化還元を証明できれば xylindein 類の新たな化学的性質を明らかにすることができる。そこでこの反応についてさらに詳細に調べることにした。まず溶媒、光照射の有無、温度などの条件を変えて 17 と 29 の存在および生成比を調べた(Table 8)。17 はシリカゲル上で徐々に酸化されて 16 に変わってしまうため、単離せずに反応液を素早く濃縮してその ^1H NMR スペクトルから生成比を求めた。メタノール - クロロホルムおよび酸性溶媒中ではこの反応は光照射下(日光ランプ)で速くなり、17 と 29 をほぼ同量生成することがわかった。また、完全に遮光すると反応しなかった(runs 1-3)。よってこれは光によるラジカル反応である可能性が高くなった。

塩基性溶媒では遮光下で 17 と 29 が生成するが、光を照射すると複雑な混合物となった(runs 5,6)。また、遮光した状態で 16 を溶解させた酢酸を還流させると 17 が生成したが、29 は見られず、若干分解物が見られた。ピリジン中で同様に還流して観察したところ、複雑な混合物を与えた。

Table 8. Generation of 17 and 29 under the various conditions.

run	solvents	in the dark		irradiation	
		temp, time	yield (%) 17 : 29 ^a	temp, time	yield (%) 17 : 29 ^a
1	MeOH-CHCl ₃ (1 : 1)	rt, 1 d	no reaction	19 °C, 20 min	5 : 5
2	HCO ₂ H	rt, 1 d	no reaction	19 °C, 20 min	12 : 11
3	AcOH	rt, 1 d	no reaction	19 °C, 20 min	22 : 21
4	HCl-MeOH (10 eq.) / CHCl ₃	19 °C, 20 min	trace	19 °C, 20 min	25 : 27
5	pyridine	19 °C, 20 min	14 : 13	19 °C, 20 min	complex mixture
6	Et ₃ N (10 eq.) / CHCl ₃	rt, 3 d	29 : 27	—	—
7	AcOH	reflux, 3 h	11 : 1	—	—
8	pyridine	reflux, 3 h	complex mixture	—	—

a) The ratio (17 : 29) was determined by ^1H NMR spectrum.

さらに、系中の酸素の影響を調べるため、以下の条件で反応を行った(Table 9)。まず、29 が酸素酸化で生成することを想定して酢酸中、酸素雰囲気下あるいはアルゴン雰囲気下で 16 に光を照射して 29 の生成について比べたところ、酸素雰囲気下では 29 の生成が遅くなることがわかった(runs 1,2)。また、17 が 16 に付加したのちに酸化されることで 29 が生成する可能性を考えて、16 と 17 を混合させてアルゴン雰囲気下光照射したところ、17 は未反応のまま残り(50%)、16 が反応してほぼ同量の 17(10%)と 29(7%)を与えたことがわかった(run 3)。16 と 17 の混合物を酸素雰囲気下で光照射すると、17 が酸素酸化されて 16 に戻る反応が主に観察された(run 4)。

Table 9. The photo-induced reaction of 16 in AcOH^a.

run	substrate	atmosphere	yield (%) 17 : 29 ^b
1	16	Ar	22 : 21
2	16	O ₂	0 : 2
3	16 : 17 = 1 : 1	Ar	60 : 7
4	16 : 17 = 1 : 1	O ₂	17 : 1

a) A stirred solution of 16 (or 16 + 17) in AcOH was irradiated with sunlight lamp for 20 min at 19 °C.

b) The ratio (17 : 29) was determined by ¹H NMR spectrum.

次に 16 から 17 と 29 が生成する反応の経時変化を観察した。16 を酢酸中で光照射し、時間毎に反応系内から少量の反応物をサンプリングし、ただちに遮光下で濃縮し、¹H NMR スペクトルを測定した。その結果、グラフに示すように反応開始から 40 分後までは 17 と 29 が同時に同量生成することが確かめられた。40 分後からは 17 と 29 の生成量は異なるが、実際 TLC 上では 40 分後からは 17 と 20 以外の色素も何種か生成していた。40 分を過ぎると 17 および 29 の量が 16 を上回るため、生成した 17 や 29 からさらなる電子の授受が行われて複雑な生成物が生成したと解釈した。実際 60 分を過ぎた反応系の生成物を調べたところ、三量体と思われる物質や二量体型のヒドロキノンと思われる物質が存在することがわかったが、明確な構造決定には至っていない。

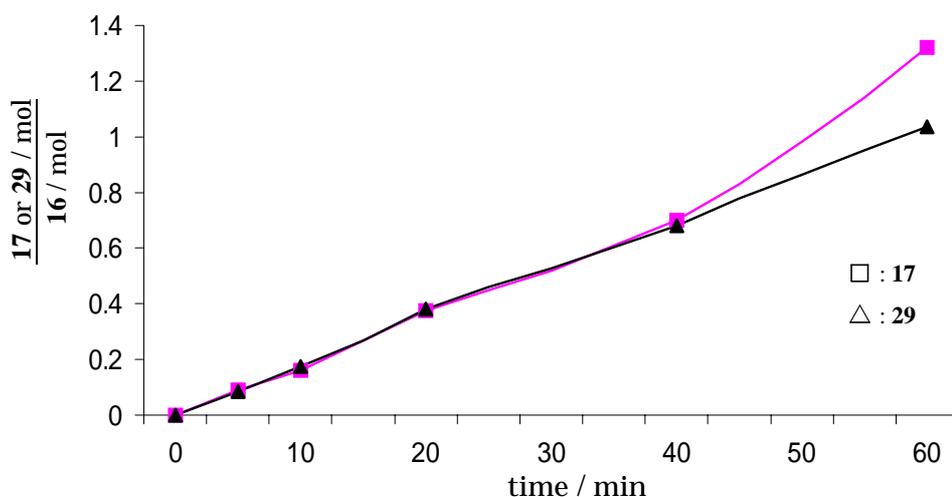
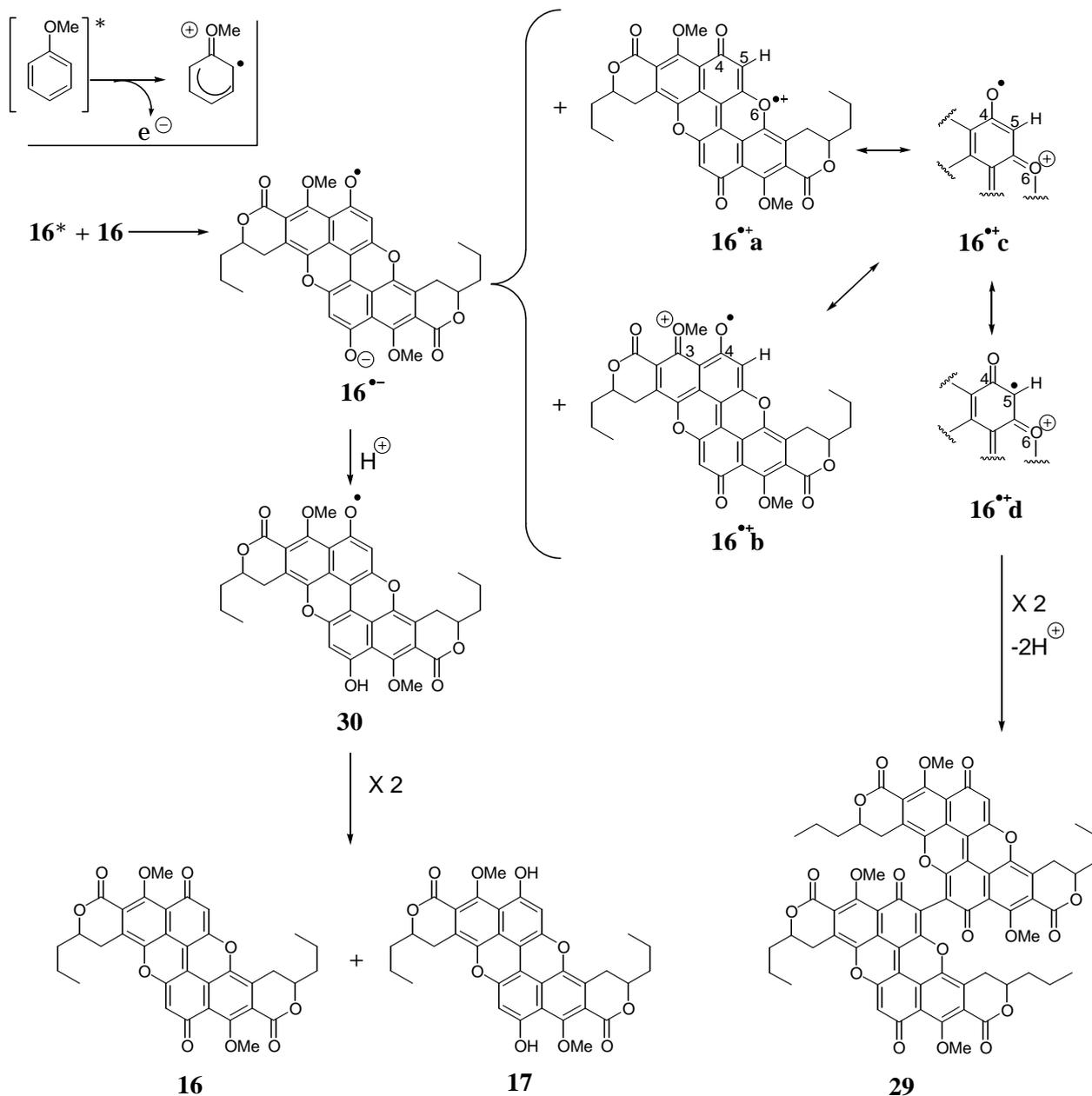


Figure 13 Time-dependent formation of 17 and 29.

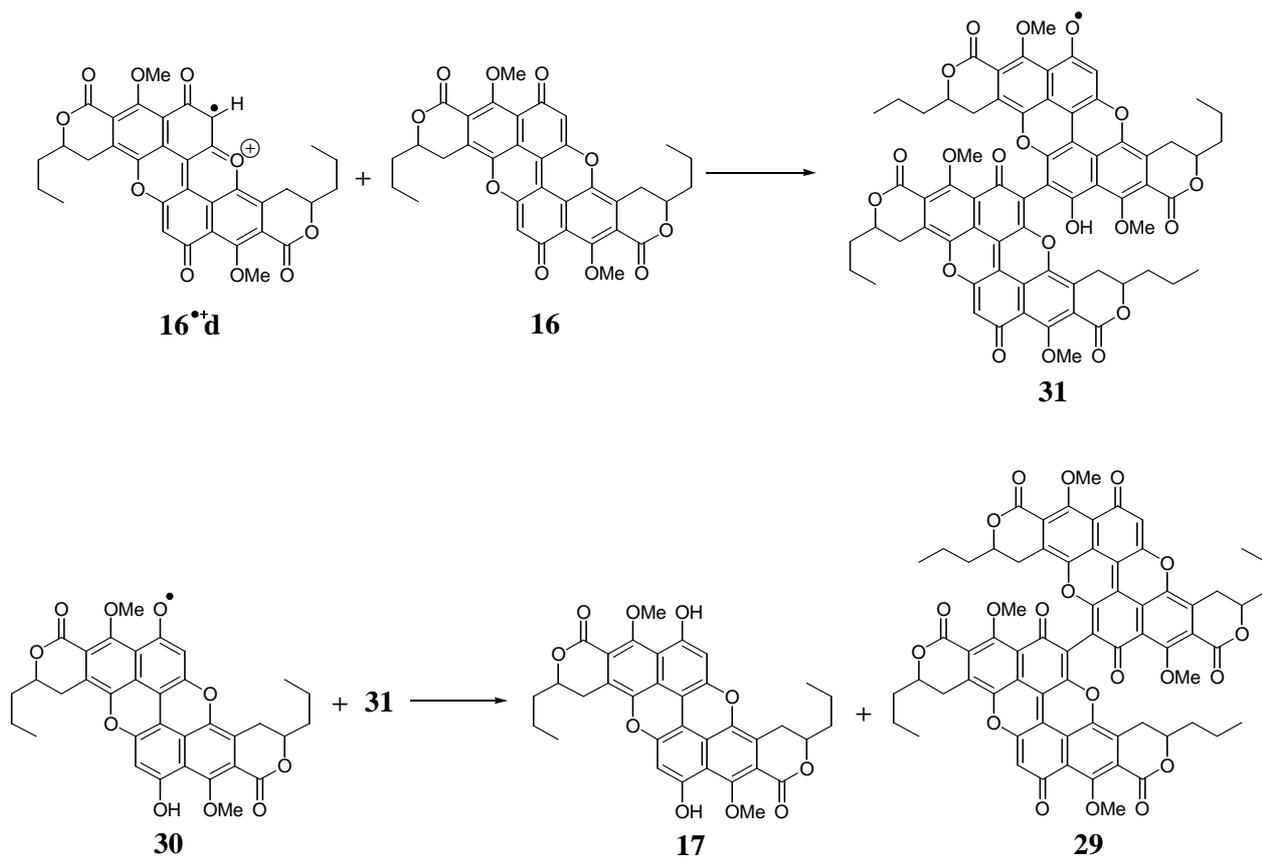
以上の実験から、16 が酸性溶媒およびクロロホルム - メタノール中では光照射によって励起されたのちに不均化し 17 と 29 を与えることを証明した。この場合の反応機構について以下に考察する。

共役系の長いアントラキノン類の中には、光照射下で励起され、励起していないキノンへ電子を与えることでラジカルカチオンとラジカルアニオンへ不均化するものがある³⁶。これは分子内に存在するフェノールまたはアニソール部分が光照射下で励起されラジカルカチオンを生成すると共に電子を放出する反応に基づくと考えられる³⁷。放出される自由電子を受け取るものがあればその方向に電子移動が起こるが、この電子受容体となるのがキノン部分である。これを 16 に当てはめると、 $[16^*+16]$ の場合(*は励起状態を示す)には、 $16^{\cdot+}$ と $16^{\cdot-}$ が生じると考えられる(Scheme 12)。 $16^{\cdot-}$ は、系内でプロトン化を受けて、セミキノンラジカル 30 になる。30 は 2 分子で不均化して 16 と 17 を生成する³⁸。一方、 $16^{\cdot+}$ は、 $16^{\cdot+d}$ より二量化して 29 となる³⁹。



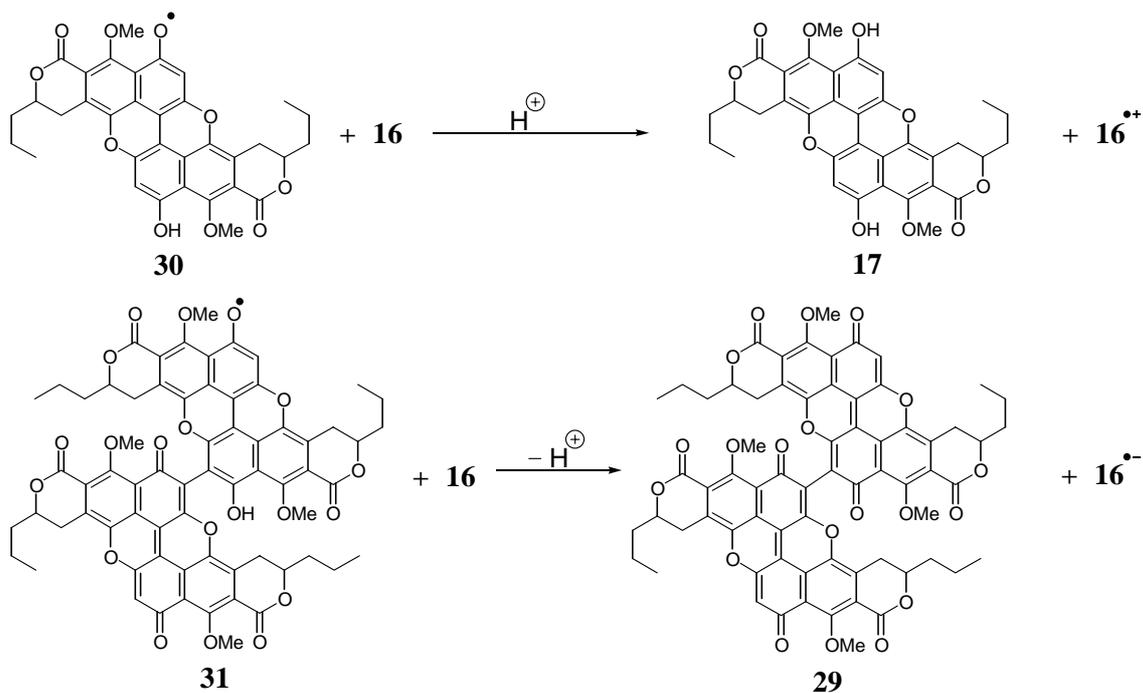
Scheme 12

もう一つの機構は以下の通りである。16^{•+}が16に付加したのち、プロトン移動が起こるとセミキノンラジカル31が生成する。セミキノンラジカル2分子からキノンとハイドロキノンが生成することが知られているので³⁸、30と31の間で電子移動が起こり不均化する考えると17と29が生成することを説明できる。(Scheme 13)。



Scheme 13

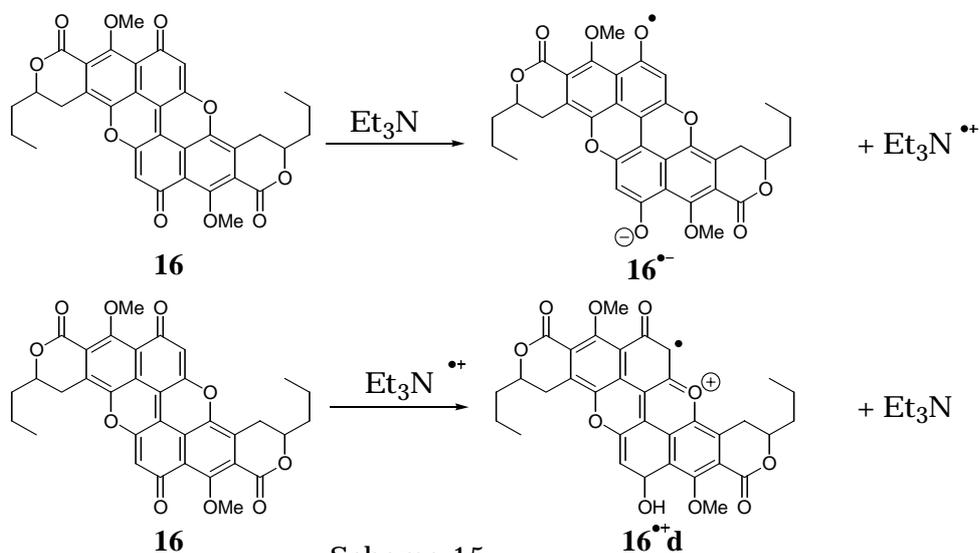
さらにもう1つの機構として、ラジカルの連鎖反応を考えることができる。30と31がそれぞれ系内の16との間で電子の授受を行い不均化すると、17と29が生じる一方で16^{•+}と16^{•-}が生成し、連鎖的に反応が進行する(Scheme 14)。



Scheme 14

また、今回、酸素存在下では反応が遅くなり、29 がわずかに生成したのみであった。これは光で励起した 16^* が基底状態の 16 との間で電子移動を行うより速く酸素が 16^* に対して消光剤として働くためと考えられる。

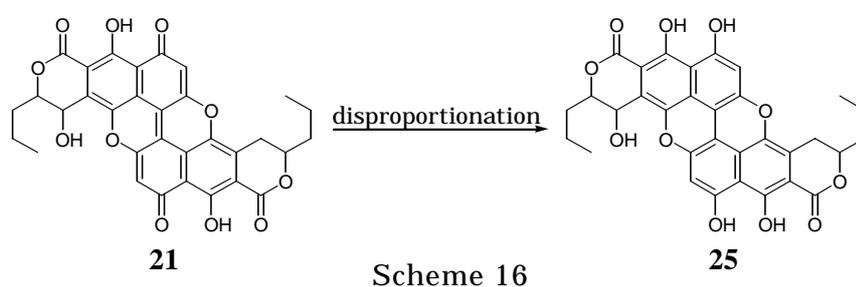
次に、トリエチルアミン、ピリジンなどの塩基性溶媒中では光を照射しなくても自己酸化還元反応がおこる機構について考察する。3級アミンがキノンと相互作用して電子移動をおこすこと⁴⁰が知られているので、これをイニシエーションとすると 16 は光照射下と同様に $16^{\bullet-}$ を生成することになる。トリエチルアミンラジカルカチオンは他の 16 から電子を奪えばトリエチルアミンに戻り、16 は電子を奪われて $16^{\bullet+d}$ になる。つまり、この系ではトリエチルアミンを介して 16 が不均化し、17 と 29 を生成していると考えられる (Scheme 15)。



Scheme 15

また、16 を酢酸還流下で反応させた場合、明らかに 17 が優先して得られた (Table 8, run 7)。このことから熱エネルギーが与えられた場合と光エネルギーが与えられた場合の 16 の反応性は全く異なり、熱条件では 16 同士の電子の収支では納まらない溶媒などの他の因子を介した複雑な反応機構をとるのではないかとと思われる。なお、キノンの光反応においては、励起したキノンが溶媒から水素を引き抜いてヒドロキノンを生じる例がある^{38,41}。16 が同様に溶媒から水素を引き抜いて 17 を生じた可能性もあるが、酢酸の酸化物など、実際に酸化されたものは見つかっていない。

以上、xylindein 類の極めてユニークな化学的性質を明らかにした。今回は 16 のみの反応に注目したが、第 3 節に述べたように、xylindein 類縁体として 21 および 25 の誘導体が天然から得られていることから、21 からの不均化によって 25 が生じている可能性が示唆される (Scheme 16)。



しかし、21 が不均化して 25 を生成しているとしても酸化体に当たる物質は今のところ得られていない。また、xylindein (10) 自体では現在のところ 16 と同様の反応は見られておらず、置換基 1 つの変化でもその反応性はかなり異なると考えられる。キノンやキサントンの反応を含めて、自己酸化還元反応で生じる還元体および酸化体の構造が明らかになっている例はほとんどなく^{42,43}、16 の光反応は酸化還元の収支を極めてシンプルに説明できた珍しい系であると思われる。

第3章

カバの汗(分泌物)に含まれる色素の化学的研究



第1節 概要

動物には色のついた汗をかく種が存在する。例えばカバ、カンガルー、インドサイ、ボンゴは赤い汗を、カモシカやガゼルは黒色や青色の汗を、象は青い汗を出す⁴⁴。これらの中でもっとも有名なのがカバの赤い汗であろう。カバの汗は分泌された直後は無色透明で、次第に真っ赤に変わり、体表面に付着したまま茶色になって乾燥する⁴⁵。しかし、その色の变化や汗の機能については科学的な研究はなされていない。他の動物の汗についても同様、ほとんど研究されていない。この原因として、動物の汗は人間の汗のように大量に採取できないこと、また動物が色のついた汗をかくのは暑い時のみならず、発情期などむしろ興奮した時であることが多いため、その採取は困難であることが挙げられる。

カバの汗は我々と同じ体温調節に使われる汗(温熱性発汗)とは全く異なる分泌物であり、生理学上汗ではなく、解剖所見によるとカバの汗はアポクリン腺でもエクリン腺でもない特殊な腺から分泌されるアルカリ性の粘液である⁴⁶。カバの皮膚は薄い表皮と分厚い真皮からできており、この汗腺は真皮に深く分布している。発汗のタイミングについてはさまざまな観察が行われている^{45,46}。夏と冬では明らかに夏の方が大量の汗をかき、水中でもかいている。また、汗をかくのは陸上にせよ水中にせよ昼のみで、夜、陸にあがって草を食べる時には汗はかいていないという。このような観察結果からは、この汗がヒトの体温調節の時のように働くのか、あるいは緊張した時にかくような精神性の発汗に対応するのかは不明のままである。汗の効果としては、アルビノ(白子)のカバは赤い汗のせいで体色がピンク色になり、アルビノであるにもかかわらず太陽光の下で紫外線に侵されることなく元気に育ったという例がある。また、カバは水中生活が長いが雑菌に皮膚が侵されることがなく、怪我をしても治りが早いという。これらの知見からカバの汗は紫外線や細菌から皮膚を保護する効果があるとされてきた。

しかしながら、カバの汗やその色素についてはまだ何も解明されていないことから⁴⁷、今回まず色の变化に対応する赤色色素に注目して研究することにした。赤色色素は紫外線を防止する上、皮膚を細菌から保護するのではないかとされているためである。そこで上野動物園の協力によりカバの汗を採取し、この汗の成分を解明するために研究を行った。

第2節 カバの汗の採取および色素の抽出

上野動物園には現在2頭のカバ(サツキ(メス・31歳)およびジロー(オス・24歳))が飼育されている。この2頭から5年に渡り汗のサンプリングを行った。採取できるほどの量の汗が観察されるのは毎年5月から10月までで、気温20℃以上が必要なようであるが、実際飼育係の方からの情報では真冬でも赤い汗が水滴のように噴出していることもあるそうで、気温と密接な関係にあるとは言い難い。また、人間の発汗現象と最も異なるのは、陸にあがってから一度大量の汗をかいてしまうと発汗がとまり、その後どんなに気温が高くても日差しが強くても再び汗を流すことはないということである。汗の色や粘性も採取のたびにかなり違いが見られる。カバが陸に上がってすぐの汗を採取したときは、汗はまだ無色であることもあり、これは数分の後に真っ赤に色付く。また、採取時にすでに鮮赤であるときは粘性が高いことが多い。

上野動物園では2~3日に一度、室外側のプールの水抜きを行って掃除をする。14時頃から水が抜かれると、プールに潜っているカバがプールの外へ上がり、飼料の用意されているカバ舎を目指して入り口の柵の前まで来る。15時ごろ柵が開けられてカバ舎の中へ入るまでは、2頭ともこの柵の前で待つことになる。この柵の前で手を伸ばしてガーゼやキムワイプでカバの頭から汗を拭き取った。また、柵を開けてカバをカバ舎へ入れる際にも通路から背中を拭いて汗を採取した。頭と背中では色や粘性に違いが見られないため試料は併せて抽出した。サツキは汗の量が多く、しかも赤い汗をかく。一方ジローはサツキにくらべ汗の黄色みが強かった。この差が個体差なのか性別差なのか年齢差なのか、2頭のサンプルからでは判断できない。色素の構造を決めるに当たって2頭のサンプルを区別することなくその後の処理を行った。

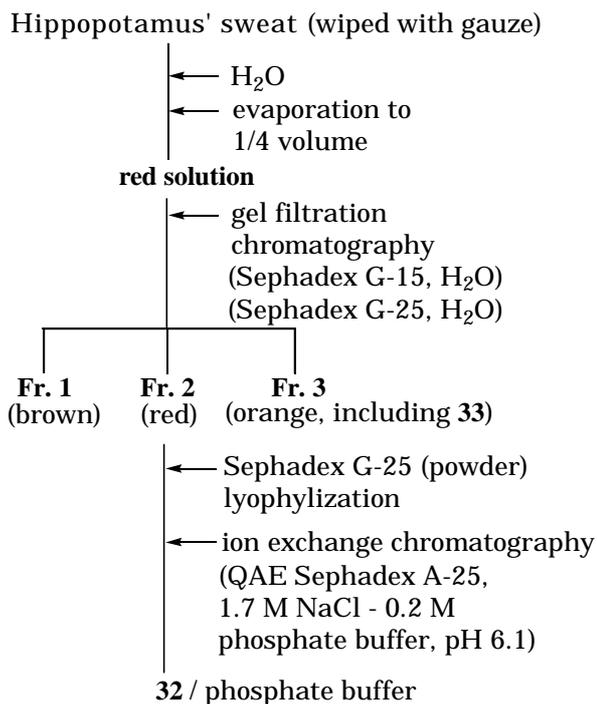
採取した汗のサンプルは室温で放置すると数時間で茶色に変色した。また、冷凍保存しても数日後には色褪せるため、採取した日のうちに抽出することにした。動物園にて汗を採取してすぐにビニール袋に密封し、ドライアイスで冷凍して持ち帰り、ただちに抽出操作を行った。水、メタノール、アセトン、クロロホルムに加え、塩酸、水酸化ナトリウム水溶液、ピリジン、酢酸などの酸性、塩基性溶媒などさまざまな条件で色素の溶出状態を観察したが、結局赤色色素がそのまま溶出されるのは水での抽出のみであった。得られた赤色水溶液は、アセトン、メタノールなどの有機溶媒を大量に添加すると茶色に変色した。また、カバの汗はもともと塩基性(pH 8-10)であるが、抽出物の水溶液に水酸化ナトリウム水溶液を加えて強塩基性にするると黄茶色に変色し、その後中和しても色は戻らなかった。また、酸性ではpH 4付近までは色が橙色を帯びる程度で中性に戻せばまた赤色に戻ったが、塩酸でpH 2以下にすると茶色の沈殿となり、これは不可逆的であった。塩基性では溶解し、酸性では沈殿をおこすことから赤色色素は非常に不安定な酸性物質であると推定した。この赤色水溶液のもっとも困難な問題点は濃縮乾固させると茶変してしまうことである。また濃縮乾固までは至っていない高濃度の状態では冷蔵保存しても明らかに早く茶変することがわかった。また、凍結乾燥を行っても完全に茶変した。

この不安定な色素の構造を決定するため、安定な状態を保持したまま色素を精製する方法と、色素を化学変換して安定な化合物へと誘導する方法について検討した。

第3節 色素の分離精製と赤色色素 32 の構造解析

水にて抽出した色素溶液を 1/4 程度まで濃縮し、分離方法を検討した。この赤色溶液は通常使われるシリカゲルや ODS 上で容易に茶変した。また、吸着系担体である HP-20 には全く吸着しなかった。これは色素が大きな親水性を有していることを示す。そこで次にサイズ排除クロマトグラフィー担体である Sephadex G-15 を用いて分離を検討した。Sephadex G-15 を水で膨潤させてカラムに充填し、試料を添加して水で展開したところ、抽出物は茶色、赤色、橙色の色素を含んでいることがわかった (Scheme 17)。茶色色素がまず溶出され、赤色色素 32 がそれに続いて溶出されたが、G-15 では赤色色素画分に茶色色素が混入した。橙色色素 33 は保持時間が長く、この時点で他の色素からは分離できた。32 は G-15 での分離後に G-25 で精製することによって茶色色素と分離することができた。赤色および橙色水溶液は濃縮操作で茶色に変色した。また、赤色および橙色水溶液をもう一度ゲルろ過すると茶色色素として溶出されたことから、茶色画分は 32 や 33 が重合して生成したと考えられる。実際、鮮度よく得られた汗のサンプルを水で溶出したのち濃縮操作を全く行わずにゲルろ過を行うとほとんど茶色画分は得られない。また、粗抽出物をゲルろ過した時に得られる茶色画分は濁っており、ここに粘性成分が同時に溶出されていることがわかった。

ゲルろ過は汗に含まれる色素を分離する手段として有効であったので、この段階での精製度を調べるため、まず赤色色素の ^1H NMR スペクトルを測定した。 ^1H NMR スペクトル測定のためにはサンプルの溶液を軽水から重水へ置換する必要がある。色素は濃縮を嫌うため溶液を乾固させて重水で再溶解することはできない。濃縮すると茶変することから、色素分子同士が近づくことで重合していることを示していると考えられる。そこで色素を担体に吸着させ、色素同士が近づかない状態で溶媒を留去することにした。吸着させる担体として ODS、Sephadex LH-20、HP-20、Sephadex G-25 を選び、それぞれ試したところ、G-25 との相性がよく、この粉末を色素水溶液に加えてゲル状にしたのち凍結乾燥させることで色素の重合を抑えて溶媒を留去させることに成功した。さらに、ゲルに吸着させて凍結乾燥した色素は、冷凍保存すれば数ヶ月保存が可能であった。これは不安定な色素の構造研究を行う上で有意義であった。色素を採取する毎にこの状態で保存して量を集め、これに重水を加えて色素を溶出し、重水中の 32 の ^1H NMR スペクトルを測定した。その結果、色素由来と期待される低磁場のシグナルとして 2 つのダブルットシグナル (ABq, δ 6.63, 6.55) と 1 つのシング



Scheme 17

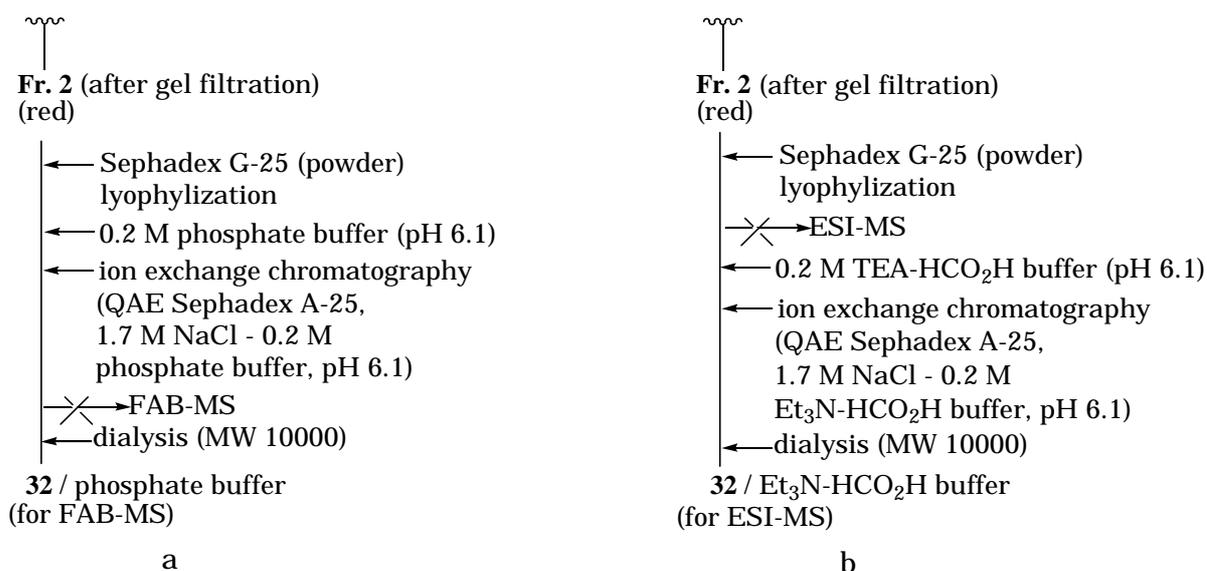
に成功した。さらに、ゲルに吸着させて凍結乾燥した色素は、冷凍保存すれば数ヶ月保存が可能であった。これは不安定な色素の構造研究を行う上で有意義であった。色素を採取する毎にこの状態で保存して量を集め、これに重水を加えて色素を溶出し、重水中の 32 の ^1H NMR スペクトルを測定した。その結果、色素由来と期待される低磁場のシグナルとして 2 つのダブルットシグナル (ABq, δ 6.63, 6.55) と 1 つのシング

レットシグナル(δ 6.44)が観測された。ゲルは水分を吸収しやすいため完全には軽水を留去することができず、4.7 ppm 付近には大量の HOD 由来ピークが見られた。そこでホモゲートデカップリングを行ったが、充分にはピークを消去できず、残存ピークが HOD 由来かサンプル由来かを判断するのは困難であった。また、3~4 ppm には、大量の糖類と思われるシグナルが重なって見られた。芳香族領域のシグナル強度は糖類と推定される 3~4 ppm のシグナルに比べて非常に小さいことから 32 の溶液は未だ非常に多量の不純物を含んでいることがわかった。

前述の通り、色素は酸性物質であると推定していたので、糖類と推定される不純物との分離には陰イオン交換がもっとも適していると考えた。そこで、色素と相性のよい Sephadex にアミノ基が修飾されている DEAE Sephadex A-25 および QAE Sephadex A-25 を選んだ。検討の結果、QAE の方が分離操作における色素の不可逆的吸着がより少なく担体として適していることがわかった。まず、0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で膨潤させた QAE 担体をカラムに充填し、32 の水溶液を添加すると、最初は鮮やかな赤色であったが、徐々に茶変した。また、添加後すぐに 0.4 M 塩化ナトリウム リン酸緩衝液を加えると、赤色色素は担体中を移動しながら茶変し、カラムから溶出させることはできなかった。これらの結果を踏まえ、1) 緩衝液の濃度を溶出ぎりぎりまで高くする、2) 系の pH をなるべく低くする、3) バッチ法にて行うという 3 点を改善することで担体への不可逆的な吸着を弱くし、色素同士が重合するのを防ぐことに成功した。すなわち、色素吸着担体(凍結乾燥後)から 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.1) にて色素を溶出し、ここに同じ緩衝液で平衡化させた QAE Sephadex A-25 を懸濁液の状態に加えた。色素が吸着して、上澄みが赤色から透明になったのを確認して、この担体をカラムに素早く充填し、緩衝液で数回洗った。この担体に 1.7 M 塩化ナトリウム リン酸緩衝液を加えて色素を溶出した。この操作はなるべく氷冷下で行い、また色素を担体に吸着させてからは素早い操作を必要とした。得られた色素は UV で 530, 411, 240 nm に吸収極大をもち、鮮やかな赤色であった。イオン交換後の色素はゲルろ過後よりもさらに不安定であり、色素溶液を冷蔵しても数時間しか保存できなかった。イオン交換によって糖類が除かれたかを調べるため、イオン交換の操作を重水で調製した緩衝液で行い、 ^1H NMR スペクトルを測定したところ、予想通り糖由来と思われるピークは消失し、低磁場の 3H 分のシグナルが明確に現れた。これに加え、低磁場のピークと比較すると 2H 分に値するシグナルが 3.34 ppm にも観察された。このシグナルを照射すると低磁場のシングレットシグナル(6.44 ppm) の高さが有意に増大することからこの二つのシグナルはロングレンジカップリングしていることがわかった。この ^1H NMR スペクトルから、無機塩は存在するが、色素は有機物として単離できたことがわかった。イオン交換の際に色素の量を多くして、濃度の高いサンプルを調製したが、濃度が高くなるにつれて色素の不安定性も高くなり分解が速くなったため、 ^{13}C NMR、二次元 NMR の測定は断念した。

次に 32 の分子量を調べるために、マススペクトルを測定することとし、試料調製を行った。まずイオン交換を行った色素溶液について、分解少なく M+H を効率的に与えと言われる FAB-MS で測定したところ、観測されたピークは全て、マトリックスと塩由来のものであり、分子イオンピークやその関連ピークは観測できなかった。そこで色素溶液を脱塩するために Sephadex G-25 にてゲルろ過を試みたが、予想に反して

色素はゲルのチャージ面に留まり、溶出させることはできなかった。単離操作初期のゲルろ過での分離の際には 32 と糖の複合体となって 32 が安定化していたため、大きな分子としてふるまっていたのであろう。糖が除かれた実際の色素自体はかなり低分子であると考えられる。そこで、分画分子量 10000 の透析チューブによって脱塩を行った。赤色色素と塩の分子量の差は分画分子量と比べれば微々たるものであると考えられたが、透析速度の差を利用して短時間で塩をかなり除くことができた (Scheme 18-a)。



Scheme 18

この 32 溶液を各種マトリックスと混合してマスペクトルを測定したところ、グリセロールおよび m-ニトロベンジルアルコールをマトリックスとしたときポジティブモードで 329、331、333 を中心としたマスペクトルを与えた。331 が最も強度が高く、その脱水フラグメントイオンにあたる 313 及び脱炭酸フラグメントイオンにあたる 287 も強い強度で現れた。しかし、全体にかなりの量のフラグメントイオンが存在し、どれが分子イオンピークなのかを決定することはできなかった。そこで ESI-MS を測定することにした。ESI はマイルドなイオン化法である上、その原理上、水溶性物質に適していると考えた。ESI は FAB 以上に塩を嫌い、とりわけリン酸緩衝液を用いるとスプレー部でリン酸塩が析出してしまう。そこでまずゲルろ過後のサンプルをイオン交換ではなく LC で分離し、LC に直結された ESI-MS で検出する試みを行った。色素は有機溶媒を大量に加えると茶沈することがわかっていたが、LC-MS では色素濃度が非常に低くても検出できること、また、LC カラム内はヘリウムでページされていることから、有機溶媒を含む系でもそれほど安定性に問題はないようであった。しかし、有機溶媒を加えても、水だけの系にしても ODS の LC では色素が保持されずにすぐに

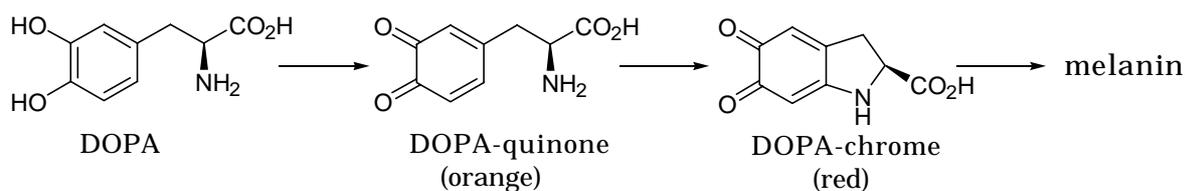
溶出されてしまい、分離は困難であった。TFA を 0.1% 加えた系では、分解がひどく、再現性にも乏しかった。また、不純物由来と思われる等間隔のマスを示すスペクトルが得られ、この不純物が色素のイオン化を妨げている可能性も出てきた。そこで ESI のためのサンプルもイオン交換を経て調製した。まず、イオン交換をリン酸緩衝液の代わりに 0.2 M トリエチルアミン - ギ酸緩衝液を用いて行い、1.7 M NaCl / トリエチルアミン - ギ酸緩衝液で色素を溶出させた。この色素溶液に含まれる大量の塩を FAB-MS の時と同様に透析によって除いた (Scheme 18-b)。

この試料をすぐに LC に挿入し、1% 酢酸を含む 50% アセトニトリル - 水で溶出させた。525 nm で検出してクロマトグラムが一番面積値の大きいピークのマススペクトルを観測した。この結果、明らかな分子イオンピークとして 329、その脱炭酸ピークとして 285 を与えた。この結果は FAB-MS と異なるが、この考察は後に行う。また同様にネガティブモードで 327 の分子イオンピークを得た。

これ以上の機器分析による構造解析は赤色色素 32 の不安定性により断念せざるを得なかった。一切の濃縮操作を受け付けないことから UV の値も後に構造を決定してから求めた。IR は溶液が希薄なため液セルによる測定も不可能であった。これらの少ない構造情報からではその色素の骨格を推定することができないため、更に構造情報を得るために、色素を安定な誘導体へ化学変換することにした。

第4節 赤色色素 32 の化学誘導

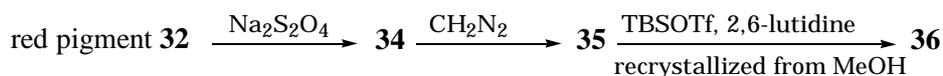
これまでの色素の分析で得られた構造情報は、1) ゲルろ過の結果から推定されるよりも低分子である、2) 酸性物質である、3) 芳香族プロトンを3つ持つ、4) メチレン鎖を持つ、ということである。これらの情報と、溶液が赤色であること、色素が不安定であることから、色素の発色団はオルトキノンではないかと予想した。オルトキノンは大変不安定で、すぐに重合をおこす。特に官能基の少ないオルトキノンは様々な位置で重合をおこしてランダムなポリマーになる。もっとも有名な例は DOPAメラニンで、DOPA (3,4-dihydroxyphenylalanine) から DOPA キノン、DOPA クロームを経て茶～黒色の DOPA メラニンへと重合する (Scheme 19)⁴⁸⁻⁵⁰。この中間体である DOPA キノン、DOPA クロームはオルトキノンであり、色は橙、赤紫である⁴⁹。無色の DOPA から赤色の中間体を経て茶色のメラニンに変化する様子は汗の色素の挙動によく似ており、その期待される機能 (紫外線、細菌からの保護) もメラニンのそれとよく似ていた^{51,52}。そこで DOPA メラニン生合成中間体の構造をイメージして、予想される官能基 (オルトキノン、カルボキシル基) を保護、安定化することでカバの汗の色素を安定な化合物へ変換できるのではないかと考えた。



Scheme 19

まず、骨格を変えずに不安定なオルトキノンを安定化する方法として、還元してカテコール型に導くことを考えた。そこでイオン交換後の 32 の緩衝液溶液にソジウムジチオナイトを添加すると速やかに赤色が消失した。この段階での TLC (ODS, 50% メタノール-水) から、UV(365 nm)で青い蛍光を呈する化合物が生成していることがわかった。TLC 上では他のスポットは見られなかったので分解を起こさずに還元を行えたものと考えて、還元された化合物 34 を単離することにした。まず、還元処理したものをそのまま濃縮すると、色素が分解した時と同様の茶色の生成物を与えた。次にこの還元体の pH 安定性を調べたところ、塩基性に偏ると茶色の生成物を与えるが、酸性には安定で、分解はみられなかった。そこで還元処理した溶液を濃縮せずに塩酸を加えて pH 2 にしたのち酢酸エチルで抽出したところ、有機層に 34 を抽出することができた。しかし、この段階においても濃縮すると茶色の分解物となってしまった。そこで抽出した有機層をそのままジアゾメタン処理したところ、TLC (ODS, 65% アセトン-水) で極性の低い化合物 35 が生成していることがわかった。35 も濃縮によってわずかに着色するが、常にアルゴン雰囲気下で扱うよう注意すれば分解はかなり抑えられることがわかった。この段階で初めて TLC 分取を行い (ODS, 50% アセトン-水) ¹H NMR スペクトルを測定した。その結果、35 は分離困難な二つの化合物 (35a, 35b) の 1 :

1 の混合物であることがわかった。35a, 35b は互いによく似たスペクトルを示した。32 の ^1H NMR スペクトルで見られた 3 つの芳香族プロトン、メチレンプロトンに加え、7.8~9.5 ppm 付近に 3 つのフェノール性水酸基のシグナル、4.9 ppm に 1H 分のシングレットシグナル、3.5~4.1 ppm に 3 つのメトキシ基シグナルが観測された。32 の NMR スペクトルでは単一の化合物だったことからメチル化で生じた位置異性体と思われたが、長時間の測定で次第に色付き、若干の分解が認められたため、さらに化学変換を行うことにした。35 の ^1H NMR スペクトルの結果から、フェノール性水酸基、もしくはアミノ基と考えられるピークが 3 つ存在すると推定されるため、これらを保護すればさらに安定な化合物へ導けると考えた。しかし、フェノール性水酸基を強固に保護するメチル基、ベンジル基、アセチル基、などはいずれも塩基性条件を必要とするものが多く不適であった。また長時間の反応時間を必要とする条件では基質の分解が優先した。そこで、TBSCl、イミダゾールを用いてシリル化を行うと、TLC 上で低極性の生成物が数種生成していることがわかったが、この条件では複雑な混合物であった。そこで、TBSOTf、2,6-ルチジンという前述の条件よりも強い条件で、速やかに反応させると、効率的に TBS 化が進行し、主生成物として 36 が生成した。36 は PTLC (SiO_2 , ベンゼン) で分離した。なお、35 は 2 成分であったが、36 は単一成分であり、35 の異性体のうち片方のみが優先して TBS 化されたと考えられる。以上の誘導化の行程をまとめて、Scheme 20 に示す。



Scheme 20

この 36 は 35 よりかなり安定であったが、クロロホルム中では若干分解が見られたので重ベンゼン中で ^1H NMR スペクトルを測定した。その結果、35 では 3 つあったフェノール性水酸基のうちの 2 つが TBS 化されたことがわかった。また、 ^{13}C NMR スペクトルから 4 置換と 5 置換の芳香環が存在すること、3 つあるメトキシ基のうち 2 つはメチルエステル、1 つはフェニルメチルエーテルであることがわかった。さらに、NOE 差スペクトルの測定を行ったところ、5.04 ppm のメチンシグナルから TBS 基のメチル (0.26, 0.29 ppm) 二箇所への NOE、芳香族プロトン (6.91, 6.57 ppm) からそれぞれ TBS 基の別のメチル (0.28, 0.23 ppm) への NOE、6.21 ppm の芳香族プロトンおよびフェノール性水酸基 (9.83 ppm) からフェニルメチルエーテルのメチル (3.01 ppm) への NOE が見られた。さらに、HMQC、HMBC スペクトルなどの二次元解析を経て部分構造を推定した。メチンは、メチルエステル 1 つおよび芳香環に隣接し、メチレンはもう 1 つのメチルエステルおよび芳香環に隣接していた。FAB-MS では 602、ESI では 603 の強い分子イオンピークを得た。FAB-MS による高分解能測定により分子式は $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8\text{Si}_2$ と確定した。これらの結果から様々な構造を推定したが、決定には至らなかったため、この誘導体の再結晶を試みたところ、メタノールを用いた時に無色の柱状結晶が得られた。この結晶の X 線結晶解析を行い、Figure 14 に示す構造であることがわかった。

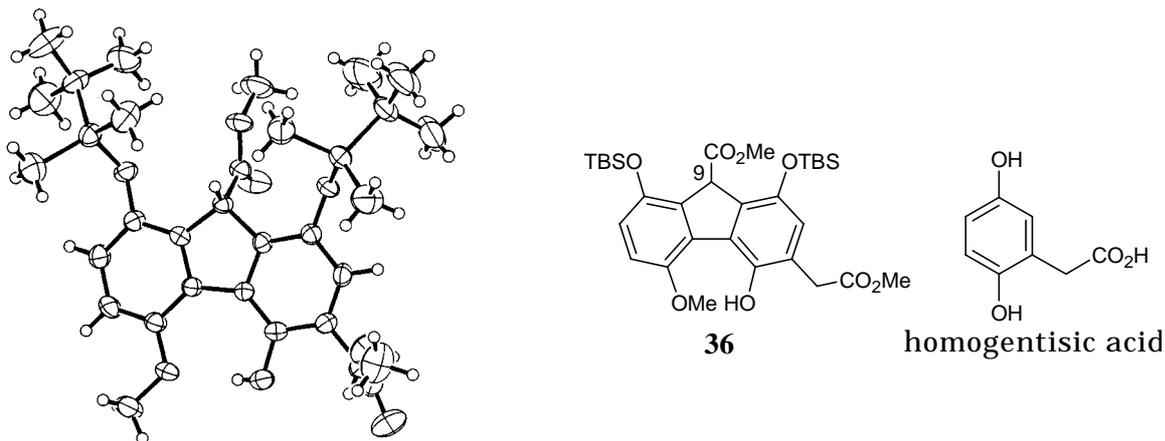


Figure 14

36 は予想とかなり異なる構造であった。メラニンの生合成中間体であるオルトキノロン構造を想定していたため、36 はカテコール誘導体だと推定していたが、実際の構造は二つのハイドロキノンが結合した新規フルオレンであった。 ^1H NMR および ^{13}C NMR スペクトルの帰属を下図に示す。NOE、HMBC の結果も完全に説明することができた (Figure 15)。

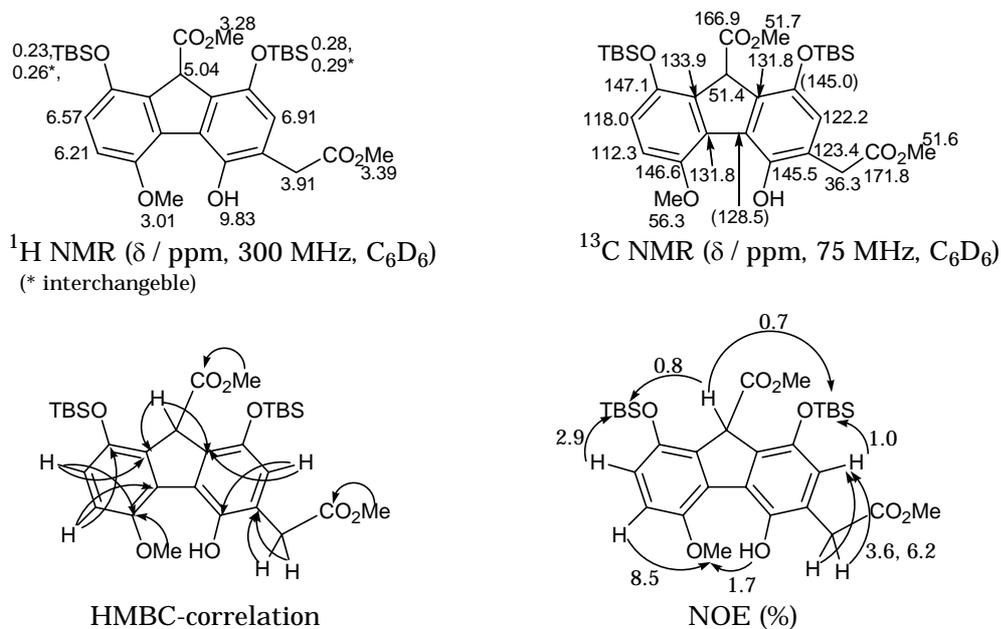


Figure 15

36は、生合成的にはホモゲンチシン酸⁵³の二量体とみなすことができる(Figure 14)。ホモゲンチシン酸は芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、チロシン)の代謝中間体であり、チロシナーゼが欠損したアルカプトン尿症の患者の尿中に分泌される⁵⁴。このホモゲンチシン酸がアルカリ性条件下で重合して黒変することが知られている。カバの汗の色素も同様にアミノ酸代謝の過程でホモゲンチシン酸を経て生成すると考えられる。2分子のホモゲンチシン酸からどのように結合し、何によってどの段階で酸化されて色素となるのか非常に興味を持たれる。

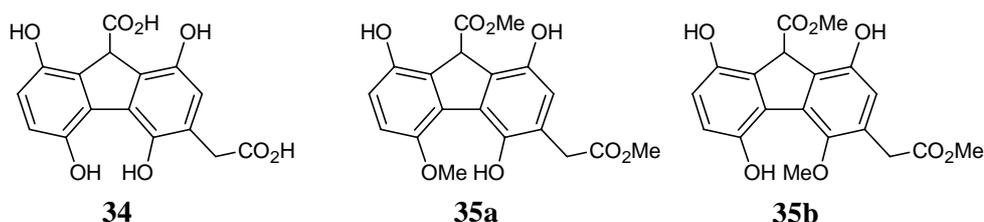
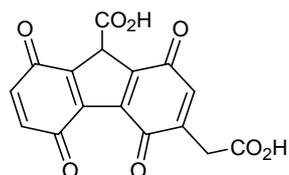


Figure 16

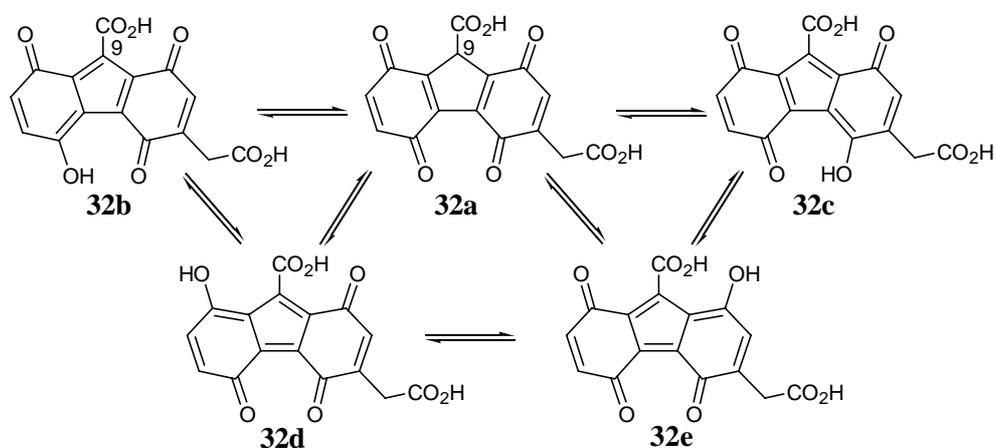
36の構造が決定したことから、34および35はFigure 16に示す構造と判断した。34はハイドロキノン構造を2つ持つが、赤色色素32の誘導化の際に還元操作を行っているので、32の構造はジキノンか、もしくはキノンとハイドロキノンから成ると考えられる。34の分子量は333であるのに対して、32のマスマスペクトルはFABで331、ESIで329の分子イオンピークを示しており、FABの結果ではモノキノンを、ESIの結果ではジキノンを支持することになる。EI-MSやFAB-MSでは不安定なキノンは還元された分子量のイオンピークを与えることが知られている⁵⁵。32のFAB-MSでは331だけでなく333や329も有意な強度で観測されたことを考えると、色素の分子イオンピークは329であり、イオン化の際に還元されたイオンとして331、333が検出されたと考えられる。一方、ESIはマイルドなイオン化法であり、分子イオンピークと推定される329のピークのみが検出されたと判断した。つまり、色素32そのものの分子量は328で、ジキノンであると結論した。この赤色色素32をカバ(hippopotamus)と発汗(sudor)の意味からhipposudoric acidと名付けた(Figure 17)。



hipposudoric acid (32)

Figure 17

32 は、9 位のプロトンが引き抜かれてエノール型で存在する可能性を考えると 5 種の互変異性体を考えることができる (Figure 18)。9 位が sp^2 であるかは、本来色素の ^1H NMR スペクトルにおいて 9 位のプロトンに相当するシグナルが観測されれば容易にわかる。誘導体の ^1H NMR スペクトルにおける 9 位のプロトンのシグナルは 4.7 ~ 5.2 ppm 付近に現れていることから、32 についても同様に 5 ppm 前後に観測されると予想される。しかし、色素のスペクトルにおいては非常に大きな HOD ピークが重なっており、9 位のプロトンが存在するかどうかは判断できなかった。この互変異性体の決定については赤色色素 32 と共に得られた橙色色素 33 の構造解析および 32 の合成研究の結果から決定したので後に述べる。



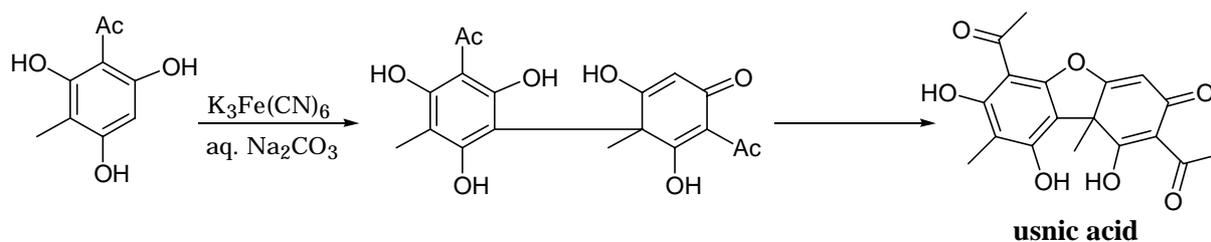
Scheme 21

第5節 赤色色素 hipposudoric acid (32)の合成

第1項 合成計画

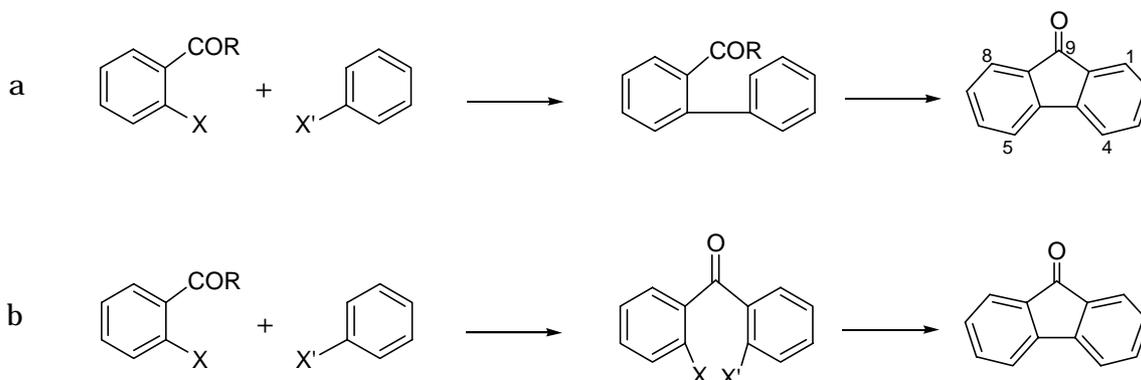
天然から得られる 32 は量が少ないためその構造や性質を調べるのは困難である。また、32 のカバの皮膚上での機能を調べるには、純粋な色素を大量に得られる簡便な方法が不可欠である。そこで赤色色素 32 の化学合成を行うことにした。合成中間体や類縁体は 32 の互変異性体構造決定の手がかりにもなると考えられる。

まず、生合成的にホモゲンチシン酸が二量化することを期待して、ホモゲンチシン酸を酸素存在下、塩基性条件で反応させたところ、ホモゲンチシン酸は塩基性下で容易にラジカル的に重合して茶色のポリマーを生じる性質があり、赤色色素やその酸化前駆体を得ることはできなかった。同様の反応をホモゲンチシン酸保護体やキノン体で試したが、やはり基質の分解に終わった。生合成的な方法で二量体の天然物を合成している例としてはウスニン酸の合成がある (Scheme 22)⁵⁶ が、この合成で生成するのはフラン環であり、32 のようなフルオレンを同様の手法によって合成するのは困難と思われる。



Scheme 22

そこで、一般的なフルオレン合成法を用いて合成を行うこととした。まず、鍵反応となるフルオレノン骨格構築法を調べたところ、主にビアリールを構築したのち Friedel-Crafts 型の手法により閉環する方法 (Scheme 23a) か、先にベンゾフェノン合成してビアリールカップリングを行う方法 (Scheme 23b) が用いられていることがわかった。



Scheme 23

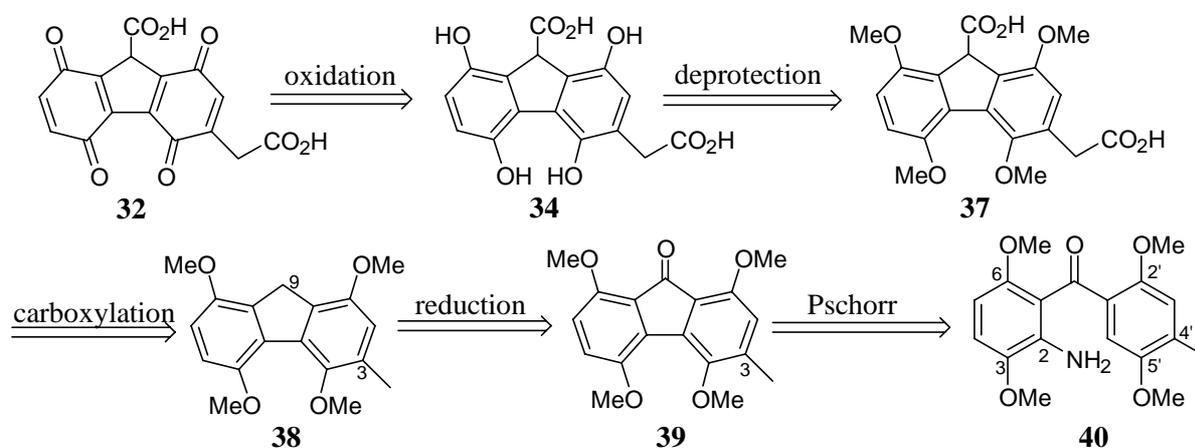
どちらの経路においても、ビアリール構築が鍵となっている。また、フルオレン及

びフルオレノン構築の方法は多数例があるが、32 の中間体合成に必要な、ビフェニル結合をする位置の隣の炭素(フルオレノンの 4,5 位)双方に置換基を持つフルオレノン骨格を構築する方法はわずかであった⁵⁷⁻⁵⁹。

フルオレノン構築の方法として、Pschorr 反応がある⁶⁰。これはオルトアミノベンゾフェノンからアミノ基をジアゾニウム塩へ変換し、銅によって還元的にラジカルを発生させて閉環させる反応である。Pschorr 反応は近年優れた改良法が報告されており^{61,62}、特に銅の代わりにヒドロキノンを用いた Kiesman らの報告ではヒドロキノンに触媒として反応させていて、系内が均一であり、収率も良い⁶²。

この Pschorr 反応を用いた 4,5-二置換フルオレノンの合成例はないが、芳香環のカップリング方法としては最もフルオレノン構築に適していると考えられる。これらの知見をもとに、先にベンゾフェノンを構築したのち、Pschorr 反応によって 5 員環を形成させる経路を考えた。これは Scheme 23-b 型にあたる。

すなわち、赤色素 32 は 34 を直接 4 電子酸化するか、または 2 電子ずつ段階的に酸化して得ることとし、34 はフルオレノン 39 を脱オキシ化してフルオレン 38 としたのち、38 の 2 つのベンジル位(9 位および 3 位メチル基)をカルボキシ化し 37 としたのち、O-メチル基を脱保護することによって得られると考えた。フルオレノン 39 は側鎖伸長の足がかりとしてメチル基が 1 つ導入されたオルトアミノベンゾフェノン 40 から Pschorr 反応によって合成することにした(Scheme 24)。

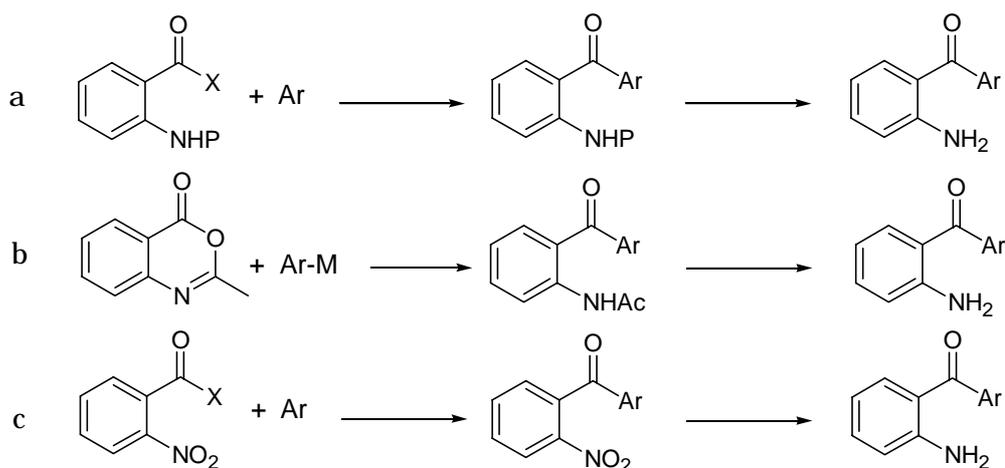


Scheme 24

なお、この逆合成における出発物質アミノベンゾフェノン 40 の実際の合成については次項で述べる。

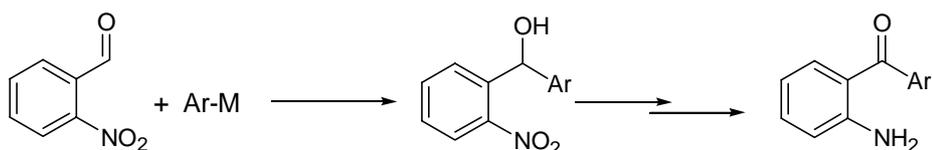
第2項 フルオレン 38 の合成

オルトアミノベンゾフェノンの合成法はさまざまであり⁶³⁻⁶⁷、これらの合成法については Simpson⁶³ および Walsh⁶⁶ がまとめている。主なアプローチとしては、アントラニル酸からアミノ基を保護して Freidel-Crafts 反応でベンゾフェノンを作成したのちアミノ基を脱保護する方法¹(Scheme 25a)、アントラニル酸からオキサジンを作成し、これに対してフェニルマグネシウムハライドやフェニルリチウムを作用させる方法^{64,65}(Scheme 25b)、オルトニトロ安息香酸から芳香環の Freidel-Crafts 反応を経て得られるオルトニトロベンゾフェノンを還元する方法⁶⁷(Scheme 25c)などがある。



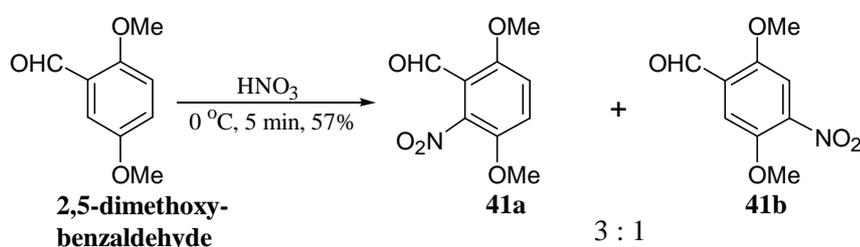
Scheme 25

Scheme 25cのようにニトロ基を有する基質で Freidel-Crafts 反応を行う場合は、アミノ基の保護の段階を省略できる利点がある反面、ニトロ基とルイス酸との副反応によって収率の低下が見られる^{66,67}。また、赤色色素合成中間体である 40 を Scheme 25a および 25c の方法で合成する場合には、ベンゾフェノン構築に伴い ケトアニソール部分が 2 箇所生じるため、Freidel-Crafts 反応に用いる強酸によってメチル基の脱離がおこる恐れがあった。これらを考慮して、できるだけ効率よくオルトアミノベンゾフェノン 40 を合成する方法として、オルトニトロベンズアルデヒドに対してアリール金属を求核付加させたのち、生じるアルコールを酸化する方法を考えた(Scheme 26)。



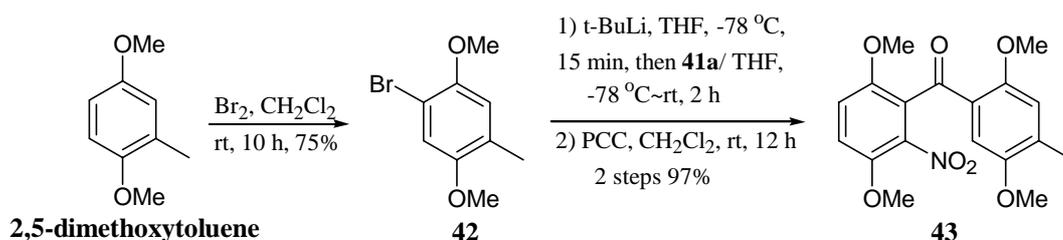
Scheme 26

まず、安価に入手できる 2,5-dimethoxybenzaldehyde を出発原料とし、6 位選択的にニトロ化することを考えた。Raiford らはメトキシ基とアルデヒドの間に当たる位置は、アルデヒドがメタ配向性と予想されるにもかかわらず非常に選択的にニトロ化されると報告している⁶⁸。そこで原料とした 2,5-dimethoxybenzaldehyde についてもニトロ化を試みたところ、文献に従って発煙硝酸を用いた場合は構造不明物が生成したが、濃硝酸を用いると速やかにニトロ化が進行し、二種のニトロアルデヒドが得られた。¹H NMR スペクトルに見られる芳香族シグナルのカップリング定数から、主生成物は望む 3,6-dimethoxy-2-nitrobenzaldehyde (41a)、副生成物はアルデヒドのパラ位にニトロ基の導入された 2,5-dimethoxy-4-nitrobenzaldehyde (41b)であることがわかった。この二つの生成物の比は温度に依存せず、3:1 程度であった。目的化合物は副生成物と分離困難であったが、数回の再結晶で効率的に回収することができ、単離収率はそのスケールにかかわらず 60% 程度であった (Scheme 27)。



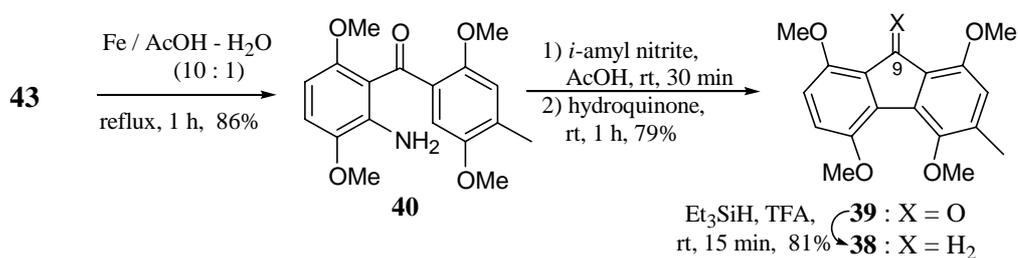
Scheme 27

41a のカップリング相手として、位置選択的にアニオンを発生できる 4-bromo-2,5-dimethoxytoluene(42)を選んだ。これは市販の 2,5-dimethoxytoluene を臭素でブromo化して得ることができた。42 についてリチウム - ハロゲン交換の反応性を調べるため、*n*-BuLi および *t*-BuLi を塩基としてメタル化させ重水素化実験を行ったところ、*t*-BuLi で定量的にリチオ化が進行していることがわかった。そこで *t*-BuLi でリチオ化させたのち、Jebaratnam の報告⁶⁵を参考にして、アルデヒド 41a を反応させたところ、収率よく付加体を得られた。これを精製せずに PCC で酸化することによって、オルトニトロベンゾフェノン 43 を高収率で得ることができた (Scheme 28)。



Scheme 28

次にニトロ基の選択的還元を酸性条件で鉄を用いて行い⁶⁹、副反応なく定量的にアミノベンゾフェノン 40 へ導いた。得られた 40 のアミノ基を Jebaratnam らの報告⁶⁵を参考にして酢酸中亜硝酸イソアミルを作用させることによりジアゾニウム塩とし、前項で述べた改良 Pschorr 反応、すなわちヒドロキノンで還元的にラジカルを発生させてフルオレノン骨格の構築を行った⁶²。Jebaratnam らの報告ではジアゾニウム塩の安定性を考慮して低温で行っていたが、実際の基質では室温で行った方が収率よくフルオレノン 39 を得ることができた (Scheme 29)。また、のちに 9 位にカルボキシ基を導入するため、39 の 9 位のカルボニル基をトリエチルシランでメチレンへと還元し、フルオレン 38 を得た。この還元は TFA 中で効率よく進行した⁷⁰。

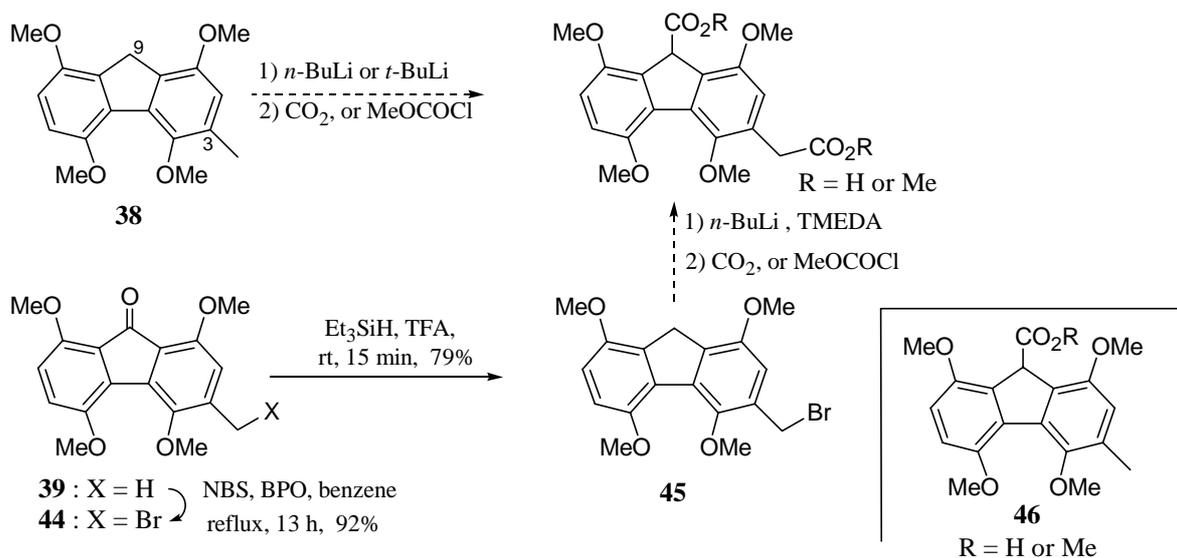


Scheme 29

以上、色素の重要な合成中間体であるフルオレノン 39 およびフルオレン 38 を短行程、高収率で合成した。

第3項 Hipposudoric acid (32)の合成

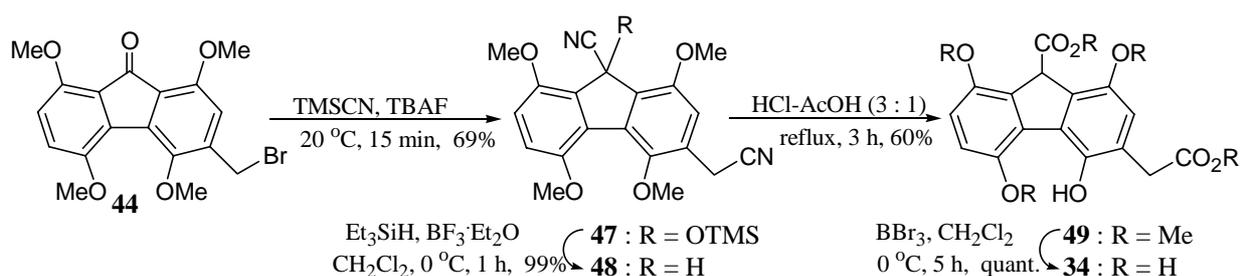
得られたフルオレン 38 に 2 つのカルボキシ基を導入するため、まず 9 位および 3 位のメチル基のダブルアニオン化を検討した (Scheme 30)。しかし、9 位が非常に酸性度が高く、9 位にカルボキシ基が導入された 46 は得られたが、3 位のベンジル位ではアニオンが発生していることは確認できなかった。そこで 3 位のベンジル位をリチオ化する方法として、ハロゲン - リチウム交換反応を利用することを考えた。そのためにまず 39 の 3 位メチル基をプロモ化し 44 としたのち、TFA 中トリエチルシランを作用させ 45 を合成した。この 45 に TMEDA 存在下 *n*-BuLi を作用させたのちカルボキシ化を行った⁷¹。しかし、生成物は複雑な混合物となり、主生成物は 46 であった。これは、リチウム - ハロゲン交換は進行しているにもかかわらず、生成したアニオンはすぐにプロトン化し、9 位のみカルボキシ化されたことを示している。これらの結果より、ダブルアニオン化を経て二つのカルボキシ基を同時に導入する方法は断念した。



Scheme 30

次に、誘導した 44 を利用して、9 位は付加的に、3 位のプロモメチル基に対しては置換的にシアノ基を導入し、加水分解してカルボキシ基へ変換することにした。TMSCN のカルボニルに対する付加に関してはヨウ化亜鉛を用いて効率的に行う方法が知られているが⁷²、この方法を 44 で試したところ、付加は定量的に進行したが、臭素との置換反応を行うことはできなかった。一方、DeShong らの報告⁷³では TMSCN と当量の TBAF を用いることにより定量的にハロゲンとの置換体を得ている。また檜山らは TMSCl と KCN でカルボニルに対する付加を効率的に行う例を報告している⁷⁴。これらの報告から、シアノイオンの量を TBAF の当量を調節することによって行い、TMSCN から遊離したシアノイオンがプロモ基と置換すると同時に TMSCN のカルボニルへの付加反応において触媒的に働くのではないかと考えた。そこで、TMSCN と

TBAF を用いて 44 へのシアノ基の付加と置換反応の検討を行った。まず、通常シアノ基の付加反応、置換反応に使われる溶媒 (DMSO, DMF, MeCN) では基質の溶解性に問題があるため反応は進行しなかったが、TMSCN を溶媒として用いたところ、生成物の溶解性がよいため反応が進むにつれ系内は均一になり、速やかに反応が進行した。TLC 上では黄色のフルオレノン 44 が消失し、無色で UV(365 nm)照射により青く蛍光を発するスポットが観察された。生成するシアノヒドリンは水による後処理で TBAF から生じる塩基である TBAOH に対して非常に不安定であったため、反応液を氷冷したクロロホルムで薄め、氷水中に投じたのち有機相を水でよく洗うという処理をした。この操作により中程度の収率ではあるがシアノヒドリン TMS エーテル 47 を得ることができた。得られたシアノヒドリン 47 からジニトリル 48 へと変換する方法としては、TMS エーテルをアセチル基に変換したのち水素添加によって還元的にアセトキシ基を脱離させる方法⁷⁴、TMSCl-MeCN-NaI の錯体を形成させてヨウ素で還元的に脱シラノールを起こす方法⁷⁵などがある。また、Berden らはトリエチルシランを用いて、シアノヒドリンを還元的にニトリルとしている⁷⁶。そこでこのトリエチルシランを用いて、ニトリルへ導けるのではないかと考えた。トリエチルシランと $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ を用いた還元を効率よく行っている Silverman の報告⁷⁷を参考にして、47 に対して $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 存在下、トリエチルシランを作用させたところ、高収率でジニトリル 48 を得ることができた。ジニトリル 48 を濃塩酸 - 酢酸の加熱還流下で加水分解したところ、ニトリルの加水分解が途中で止まった酸アミドが混在したため、ジアゾメタン処理して分離し、フェノール性水酸基のメチル基が一つ除去されたジエステル 49 を得た。49 のメチル基が除去された位置は 2 次元 NMR スペクトル解析を経て決定した。49 に対して過剰の三臭化ホウ素を 0 で 5 時間反応させると全ての保護基が除去された色素還元体が得られた。これは不安定で精製できないが、粗生成物の ^1H NMR スペクトルは天然物を還元した 34 と一致した (Scheme 31)。

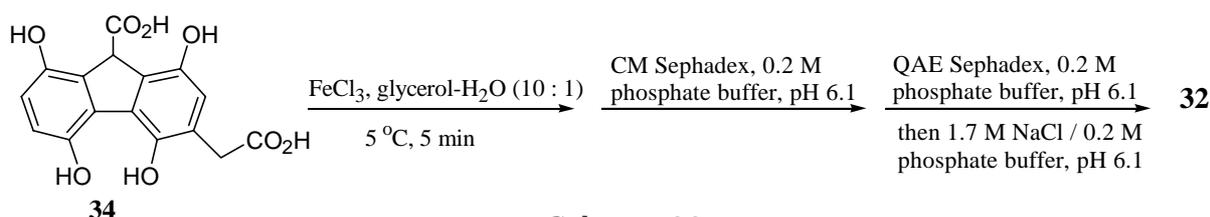


Scheme 31

次に天然物へ導くために 34 の酸化を検討した (Scheme 32)。ジキノンを合成するためには強い条件が必要と考えられるが、天然物が非常に不安定なため、生成してもただちに重合する恐れがあった。分子内に二つのヒドロキノンを持つ化合物をジキノンに導いている例として強酸性条件下で塩化鉄を作用させる報告があったが⁷⁸、この方法を用いると系内が若干色付くものの、すぐに黄茶色に変化した。酸化銀()と酸を用

いる反応はジメトキシアリール類の直接酸化で二量化もなく、よい条件として知られている。34 は遊離のヒドロキノンであるが、強い条件で速やかに反応させた方が分解も少ないと考えてこの方法を検討した。しかし、添加する酸、溶媒を変化させても赤色色素を得ることはできなかった。反応系内に色素が生成しても、すぐに重合分解してしまうため、色素を水中に分配させて、天然色素と同様のイオン交換で精製しようと試みたが、生成する銀試薬が色素と分離される前に色素の分解に影響するせいか、色素を精製して単離することはできなかった。

塩化鉄による酸化においても同じ理由により色素を安定に精製するのは困難であったが、塩化鉄での酸化は酸化銀とは異なり水中で行うことができるため、酸化後の処理が容易であるという利点があった。塩化鉄と 34 を水中で加熱すると色付くのが観察されたが、すぐに茶色に変化した。そこでカバの汗に含まれる糖質の粘液が色素を安定化していたことにヒントを得て、生成する色素を安定化するために、グリセロールを添加して水 : グリセロール = 1 : 1 の溶液にし、塩化鉄を加えたところ、室温でも赤色色素が生成し、長く赤色を保つことがわかった。また、34 はグリセロールに対して水よりも溶解性が良いため、グリセロールの量を増やすとで氷冷下でも均一系で反応が速やかに進行した。しかしこの系内に 0.2 M リン酸緩衝液を加えると、鉄イオンがゲル化し、色素の分解を促進させた。そこで、反応系内に存在する鉄イオンを除くため反応液を 0.2 M リン酸緩衝液で平衡化した CM Sephadex A-25 に直接通したところ、色素の分解を抑えて、緩衝溶液に交換することができた。この時塩化鉄由来と思われるゲル状の沈殿物は担体上に残った。得られた色素溶液を天然色素の単離方法と同様に陰イオン交換を行って精製したところ、赤色色素が得られた。¹H NMR スペクトルではグリセロール由来と思われるピークも混在したが、色素由来ピークのケミカルシフト及びカップリング定数は天然物と一致した。色素の重水溶液に標準物質として DSS を添加して測定し、得られた色素の濃度を計算したところ、収率は 10% であった。以上、反応後の処理や精製法に改善の余地はあるが、赤色色素 32 の全合成を達成した。

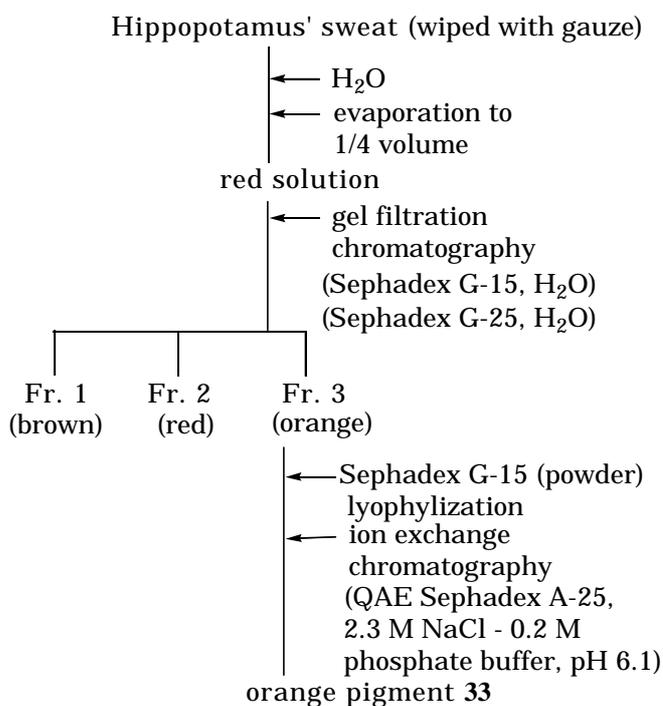


Scheme 32

第6節 橙色色素 33 の単離と構造決定

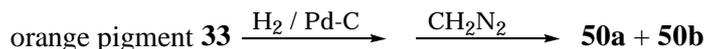
第2節で述べたように、カバの汗の色素は2種類あり、先述の赤色色素 32 と共に橙色色素 33 が存在することがわかった。これまで 32 の構造を中心に述べてきたが、この節では橙色色素 33 の単離と構造決定について述べる。汗中の橙色色素 33 の含有量は赤色色素 32 に匹敵する程である。33 は Sephadex G-15 で他の色素と分離したのち、

32 と同様にイオン交換樹脂を用いて精製した (Scheme 33)。ただし、イオン交換樹脂への吸着力は 33 の方が強かったため、イオン交換体から色素を溶出させるためには 2.3 M 塩化ナトリウム - リン酸緩衝液を要した (32 の場合は 1.7 M)。イオン交換体から重水で調製した緩衝液を用いて橙色色素を溶出させて ^1H NMR スペクトルを測定したところ、メチレンプロトン (2H)、芳香族ダブレットシグナル (2H) とシングレットシグナル (1H) は 32 とよく似ていたが、それに加えて 7.05 ppm にシングレットシグナル (1H) がみられた。また、UV スペクトルを測定したところ、32 とよく似た2山のスペクトルを与えた (511, 418, 243 nm)。長波長側の吸収極大は 32 よりも若干浅色移動していた。この挙動は 32 の方が 33 より長い共役系を有していることを示している。なお、吸収



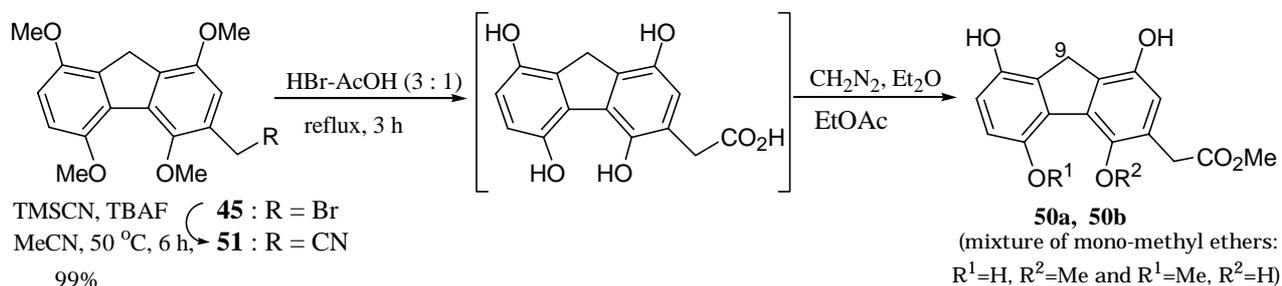
Scheme 33

極大の $\log \epsilon$ は、のちに 33 を構造決定したのち、DSS を標準物質として添加して ^1H NMR スペクトルを測定することで色素濃度を求め、その溶液を希釈して UV スペクトルを測定することによって算出した。マススペクトルの測定は、ゲルろ過後の色素溶液をそのまま LC-ESI-MS で分離、測定することに成功した。この結果、33 の分子量は 284 と決定した。これは 32 から脱炭酸した化合物の分子量に当たる。この色素の骨格を明らかにするため、32 の誘導化の際と同様にソジウムジチオナイトを用いて還元したが複雑な混合物を与えた。そこで、水中で Pd-C 存在下水素添加を行うと、橙色色素 33 は速やかに還元脱色された。反応液をガラスフィルターで素早くろ過したのち、ろ液を酸性にして酢酸エチルで抽出し、ジアゾメタン処理すると、32 から得られた 35 (Scheme 20) に ^1H NMR スペクトルが非常に似ているメトキシ基の位置異性体混合物と推定される 50a、50b (1 : 1) となった (Scheme 34)。



Scheme 34

橙色色素 33 に特徴的な 7.05 ppm のシグナルに相当するシグナルは見られず、代わりに 3.73(4H), 3.75(2H), 3.76(2H) ppm にメチレンプロトン計 8 個分(50a、50b それぞれの化合物としては 4 個分)のシグナルが見られた。このうちメチレン 2 個分のシグナル 2 組については 35 の ^1H NMR スペクトルとの類似性から推測すると、3 位側鎖のメチレンであると考えられる。よって残りの 2 つのメチレンは 9 位の水素に対応し、マススペクトルも考慮して 9 位がメチレンになっていると考えた。そこでこの誘導体 50a、50b の構造決定のため、赤色色素 32 の合成中間体である 45 から誘導して確認することにした。45 のプロモ基をシアノ基で置換し、得られたニトリル 51 を臭化水素酸 - 酢酸で加水分解すると同時に全ての O-メチル基を脱保護し、続いてジアゾメタン処理してジエステルを得た。このジエステルの ^1H NMR スペクトルは橙色色素誘導体 50a、50b のそれと一致した(Scheme 35)。



Scheme 35

これにより、橙色色素 33 は赤色色素 32 から 9 位のカルボキシ基が脱離したものであると結論した。そこで 33 は 32 より 1 炭素少ないことから norhipposudoric acid と名付けた(Figure 18)。

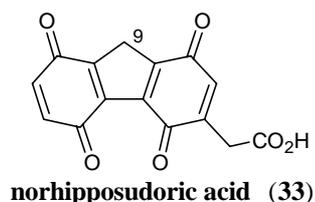
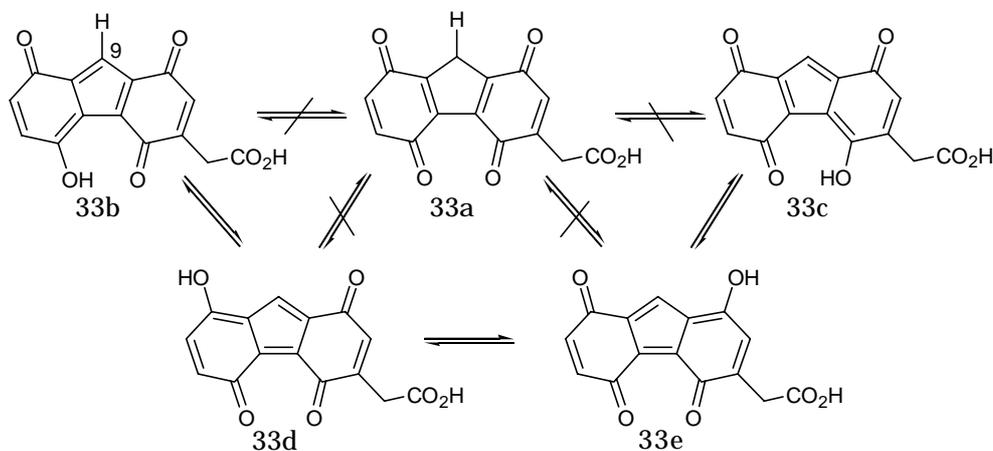


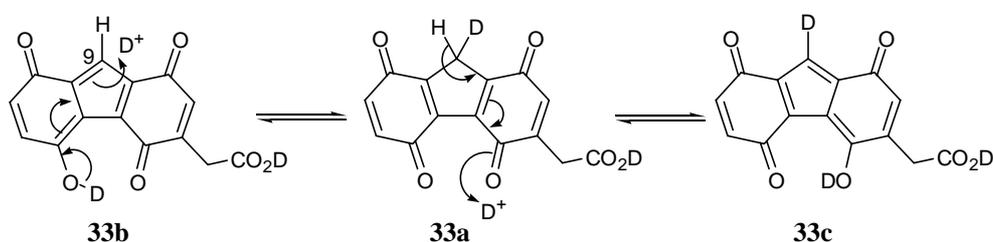
Figure 18

33 の ^1H NMR スペクトル上で 7.05 ppm に 1H 分として現れたのは 9 位の水素と考えられることから、33 はジキノン型 33a ではなくエノール型となったオルトキノンメチド型 33b~e で存在していることがわかる (Scheme 36)。



Scheme 36

赤色色素 32 と橙色色素 33 の UV スペクトルはよく似ていたことから、両者は同じ発色団を有していることは明らかであり、32 もエノール型で存在していると結論した。また、重要な知見として、33 の 9 位の水素を示す 7.05 ppm のシングレットシグナルは ^1H NMR スペクトル測定中には重水素化されないことがわかった。互変異性体の中で、ジキノン 33a が平衡状態で存在していれば、このシグナルは次第に重水素化されるはずである (Scheme 37)。NMR 測定時間は 1 時間程度であるが、スペクトルは単一化合物のスペクトルを示しており、9 位のプロトンの積分値はほとんど変わらないことから、33a が平衡に関わるとしても、非常に寄与が小さいことがわかる。



Scheme 37

この知見より、33 はエノール型であり、ジキノンはほとんど存在しないことが明らかとなった。以上により、赤色色素 32 および橙色色素 33 がケト型（ジキノン）ではなくエノール型（キノン + オルトキノンメチド）で存在することがわかったが、さらに詳細な構造解析を行ったので次節に述べる。

第7節 色素の互変異性と水溶液中の構造

赤色色素 32 および橙色色素 33 はケト型よりエノール型で存在しており、ジキノン型互変異性体はほとんど存在しないことがわかった。平衡がエノール型(オルトキノンメチド)に片寄る理由として、4, 5 位間で水素結合を形成することが考えられる。また、フルオレンの 9 位の炭素原子が sp^2 になることで共役系が拡がり分子の平面性が高くなることも一因と考えられる。そこで、フルオレンキノンの性質を調べるために、52、53、54 を合成した(Figure 19)。

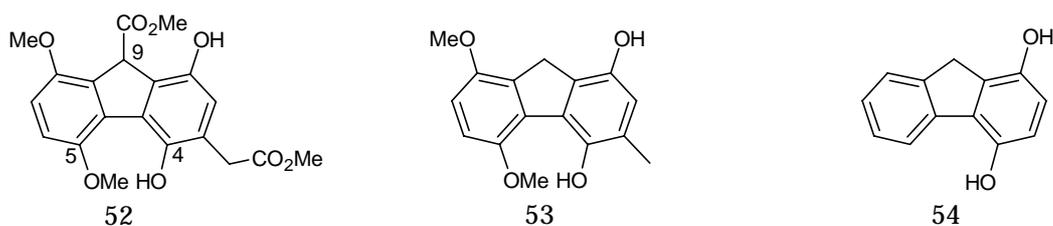
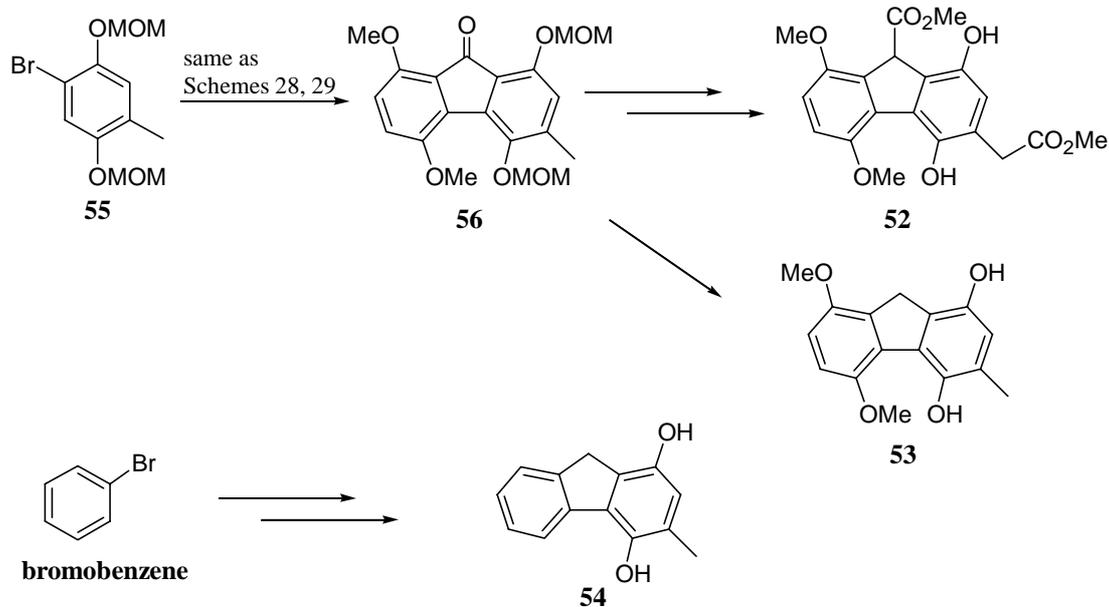


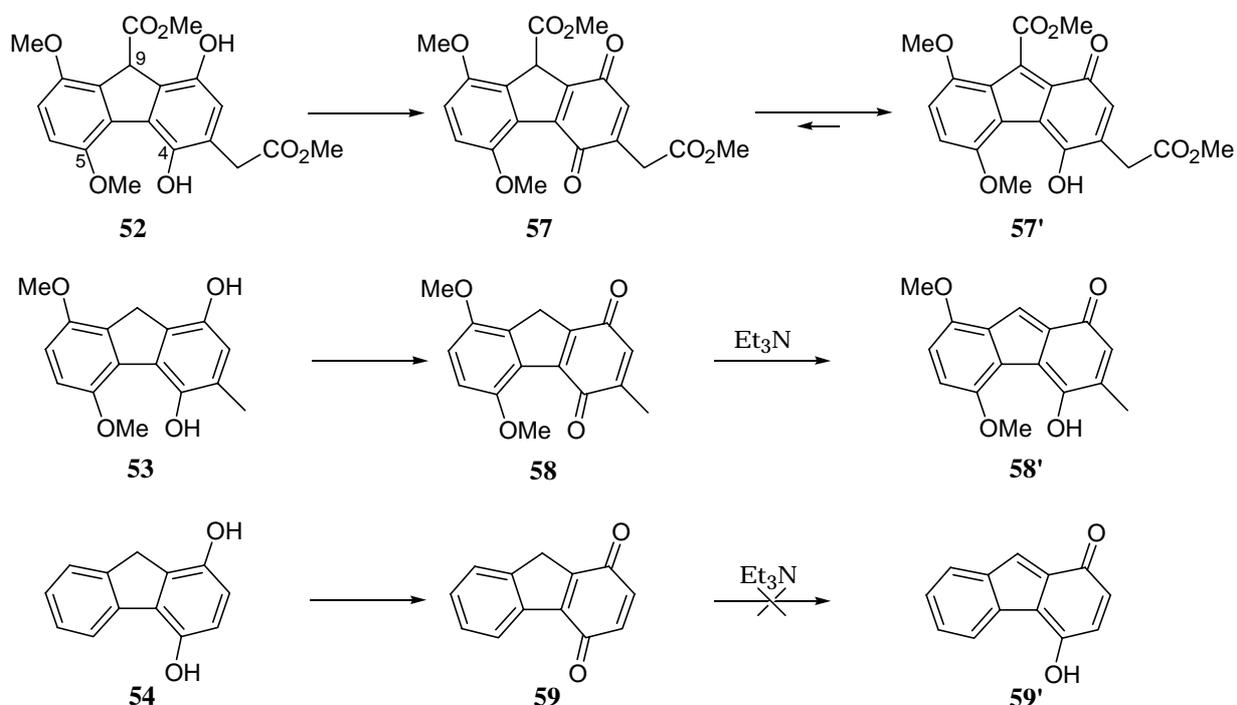
Figure 19

52 は 32 の合成におけるブロミド 42 の代わりに 55 を用いて合成し、53 は 52 の合成中間体 56 をトリエチルシランで脱オキシ化して合成した。また、54 は 32 合成における 42 の代わりに市販の bromobenzene を用いて合成した(Scheme 38)。



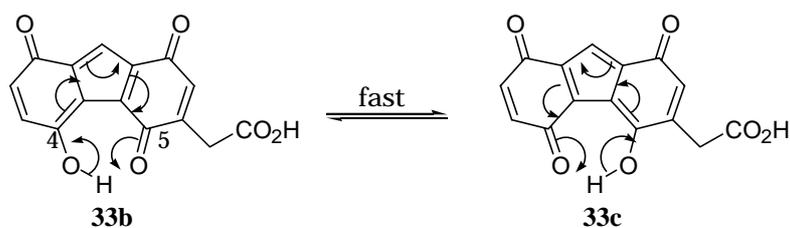
Scheme 38

52 を重クロロホルム中 DDQ で酸化し、ろ過してそのまま $^1\text{H NMR}$ スペクトルを測定したところ、生成物はケト型(キノン 57)とエノール型(オルトキノンメチド 57')の平衡混合物であった。次第に平衡は 57' に移り、数時間後には 57' のみになった。この時 57' のエノールプロトン(4 位水酸基)シグナルは 10.62 ppm に観測されたことから 5 位のメトキシ酸素と多少は水素結合していると思われる。53 を DDQ で酸化すると、ケト型(キノン 58)のみ生成した。これにトリエチルアミンを加えると、エノール型 58' へ平衡が移動し、58' のみになった。この時はエノールプロトン(4 位水酸基)のシグナルは 10.31 ppm に現われた。57 と 58 のエノール化のしやすさの違いは 9 位プロトンの酸性度に依存すると考えられる。どちらもエノール化すると、ケト型へ戻ることはなかった。一方、54 を酸化するとケト型(キノン 59)が生成し、これは塩基を加えてもエノール化せず分解した。これらの結果から、フルオレンキノンがエノール型で安定化する要因の 1 つとして、4, 5 位間の水素結合が重要であると考えられる (Scheme 39)。



Scheme 39

次に、赤色色素 32 および橙色色素 33 のエノール化位置について調べることにした。32 および 33 はエノール化する際、1、4、5、8 位の 4 方向へエノール化する可能性がある (Schemes 21, 36)。この時、前述した 4-5 位間の水素結合を考慮すると、32b(33b) および 32c(33c) がエネルギー的に有利であると考えられる^{79,80}。



Scheme 40

そこで、32 および 33 の互変異性体は 32b(33b)なのか、32c(33c)なのか、それともそれらが平衡状態にあるものなのかを調べることにした。33 の 9 位プロトンが ^1H NMR スペクトル測定中に重水素化されないことから、33b と 33c が平衡状態にあるとすれば、Scheme40 のような平衡を経て 4-5 位間でプロトンの授受を行っていることになる。この平衡を調べるモデルとして、ジヒドロキノン 60 を酸化したジキノン 61 を考えた (Figure 20)。

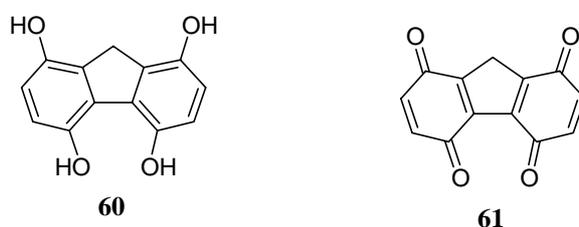
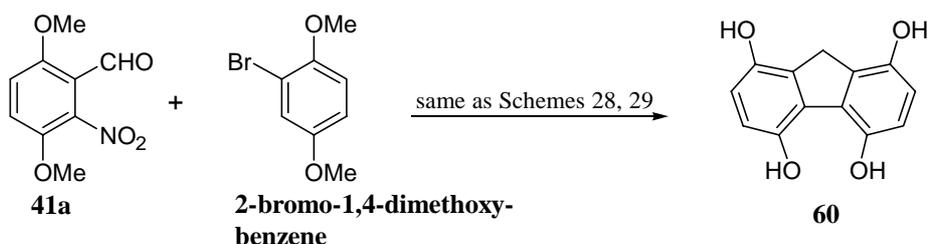


Figure 20

60 は左右対称である。しかし酸化して生じる 61 がエノール化すると、対称性は崩れる。58(キノン型)と 58' (オルトキノンメチド型)の UV および ^1H NMR スペクトルから、キノンは 400 nm 付近、オルトキノンメチドは 530 nm 付近に吸収極大波長を有すること、キノンとオルトキノンメチドの ^1H NMR スペクトルはかなり異なり、オルトキノンメチドでは 9 位プロトンが sp^2 になり低磁場シフトし、エノールプロトンが 10 ppm 以下の低磁場に見られることがわかっている。これらの知見から、61 がエノール化した時、左右対称を示すスペクトルであれば、Scheme 40 の速い平衡が成り立っていることが明らかとなる。一方、非対称のスペクトルを与えれば 4-5 位間のプロトンの授受、すなわち Scheme 40 のような平衡はおこりにくいことになる。まず、60 を 32 の合成と同様の手法で、41a と市販の 2-bromo-1,4-dimethoxybenzene を出発物質として数行程で合成した (Scheme 41)。



Scheme 41

得られた 60 をクロロホルム中 DDQ で酸化すると赤紫色の溶液となった。反応液をろ過して UV スペクトルを測定したところ、538 nm に強い吸収がみられた。また、反応を重クロロホルム中で行い、反応液をろ過して ^1H NMR スペクトルを測定すると、61 は既に全てエノール型として存在しており、7.38 ppm に 9 位の 1H 分のプロトンのシグナルが見られた。また、 2H 分のダブルットシグナルが 2 組観測されたことから、2,3,6,7 位のプロトンのシグナルは左右対称であることがわかった。この結果からエノール化したのちのエノールプロトンは 4-5 位間で速い平衡で授受されることが証明できた。さらに興味深いことに、エノールプロトンは 16.8 ppm に鋭いシングレットピークとして観測された。水素結合しているフェノール性水酸基のプロトンが 11~13 ppm に現れるのに対して、これは非常に低磁場シフトしている。Lluch らはマレイン酸モノアニオンの酸性プロトンが非常に低磁場(18.85 ppm)に現われることから low barrier hydrogen bond が生じていると報告している⁸¹。61 のエノールプロトンの非常な低磁場シフトはこの例と同様に非常に強い水素結合を示唆していると考えられる。赤色素 32 および橙色色素 33 も 61 と同じ部分構造を持つことから、これらの色素のエノールプロトンは 4-5 位間で強固に水素結合を形成し、4-5 位酸素の中間付近で速い平衡状態にあると考えられる。これを平衡状態ではなく、61' のように共鳴安定化したジケトネートとプロトンのイオンペアと表現することもできる^{82,83}(Figure 21)。

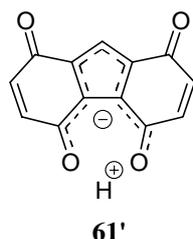


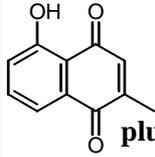
Figure 21

61 の UV スペクトルは、538 nm に 1 つの吸収極大を持つ。一方、赤色素 32 は 530, 411nm、橙色色素 33 は 511, 418 nm に吸収極大を持ち、特徴的な 2 山のスペクトルを示す。61 はクロロホルム中、32 および 33 は緩衝液中であるが、同じ発色団を持つと考えられるにもかかわらず、スペクトルは異なっている。これに注目し、61 のクロロホルム溶液に 61 に対して 10 当量のトリエチルアミンを添加し、UV を測定したところ、522, 412 nm に吸収極大を持つ 2 山のスペクトルへと変化がみられた。このスペクトルは 32 や 33 とよく似ていた。また、61 にトリエチルアミンを添加した状態で ^1H NMR スペクトルを測定したところ、水素結合を形成していた水素のシグナルは消失し、芳香族プロトンのシグナルは全て高磁場へシフトした。また、61 のクロロホルム溶液を ODS(メタノール-水)カラムに通すことでメタノール-水溶液に置換して UV スペクトルを測定すると、518, 410 nm に吸収極大を持つ 2 山のスペクトルが得られた。これらの結果から、61 のエノールプロトンの酸性度は非常に高く、メタノール-水中で容易に解離したアニオンが 2 山の UV スペクトルを与えたのではないかと考えた。

そこで 32、33 および 61 が水溶液中で解離していることを確かめるため、61 の pKa

を測定することにした。61 もクロロホルム中で濃縮に対して不安定であるが、ODS を通してメタノール - 水の溶液に置換したものはさらに不安定であり、氷浴中でもすぐに分解して茶色に変色した。またこの時すでに ODS 担体に分解物が目立って見られた。この状態の 61 は 10^{-4} M の濃度で数時間までは冷蔵保存できる 32 および 33 よりさらに不安定であると言える。そこで、正確な量を測ることはできないが、61 の発色団は 33 と同じであることを利用して、33 の UV スペクトルにおける $\log \epsilon$ を 61 に適用して濃度を算出することにした。61 を ODS(メタノール - 水)で精製したのち直ちに一部をとり、その pH を pH メータにて測定し、残りはすぐに希釈して UV スペクトルを測定し濃度を算出した。測定した pH および濃度から pKa を算出したところ、2.7-3.3 となった⁸⁴。用いた溶液がメタノール - 水であったため、同じ条件でフェノール、安息香酸、酢酸、plumbagin の pKa も算出した。その結果を Table 10 に示す。61 の pKa は同時に測定した有機酸より遥かに小さいことがわかる。この結果から、61 のエノールプロトンの pKa は普通のフェノール性水酸基より非常に小さく、同じ発色団を持つ 32 や 33 も自然状態(pH 8.5-10)や緩衝液中(pH 6.1)においてはほとんど解離してアニオンとして存在することになる。そこで 32 および 33 の pH 6 - 10 における UV スペクトルを測定したところ、この pH 範囲では吸収極大波長も相対強度もほとんど変化しなかった。この結果からプロトンの授受や、エノールの位置異性体、ケト - エノール互変異性などの pH 依存の平衡がスペクトルの波形に関係しているわけではないことが明らかになった。

32 や 33 が水に非常によく溶けるのにはエノールの水酸基の酸性度が最も寄与していると思われる。

	pKa	
	MeOH - H ₂ O (1:1)	H ₂ O ^a
61	2.7-3.3	—
phenol	11.8	10
 plumbagin	10.6	—
acetylacetone	—	9.0
benzoic acid	5.6	4.5 ± 0.5
acetic acid	5.6	4.5 ± 0.5 (4.76)

a) Hendrickson-Cram-Hammond, Organic Chemistry, 3rd Ed., 1970.

Table 10

これらの色素がプロトンを放出しやすいのは、電子の非局在化した安定なアニオン

が生成するためであると考えられる。プロトン化された状態では 4-5 位間で強い分子内水素結合を生じ安定化するため 4,5 位側へのみエノール化しているのに対して、アニオンになって水中に存在する場合は水和による安定化が、分子内水素結合による安定化をしにくことになる。よって、電子は 7 位、8 位の方向へも移動して非局在化していると考えられる。よって、32、33、61 の水溶液中の状態を Figure 22 に示した構造であると結論した。32 および 33 は酸性で速やかに分解するため、プロトン化した構造を解析することはできない。また、逆にプロトン化している 61 は水中で解離することで、自身の酸性によって分解してしまう。カバの汗は塩基性に偏っているため、自然状態では 32 および 33 は比較的安定な状態で存在できると考えられる。

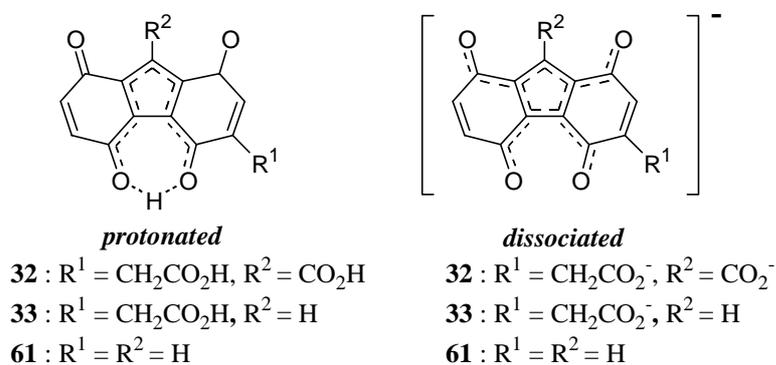


Figure 22

第8節 汗の性質と機能

カバの汗はカバの皮膚を紫外線や細菌、乾燥から保護していると言われていたが、実際に化学的な研究は行われていない。紫外線に関しては今回構造決定した色素のUVが紫外線の波長(UV-A : 320-400 nm, UV-B : 290-320 nm)を完全にカバーしていることから確かに効果がありそうである。紫外線の防御物質は紫外線のエネルギーを吸収して熱エネルギーに変えたり、光を放出したり、化学反応を起こしたりすることで皮膚への紫外線のダメージが届かないようにはたらく⁸⁵。今回構造決定したhipposudoric acid (32)、norhipposudoric acid(33)はどのような仕組みで紫外線を防御しているのだろうか。32 および 33 は不安定であるが、光に反応して重合するわけではない。重合反応を起こすもっとも大きな原因は分子が近づくことである。よって重合は紫外線エネルギーの処理とは直接関係しているとは考えにくい。可能性の1つとして紫外線のエネルギーを吸収して蛍光を発しているのではないかと考えた。32 や 33 の誘導体や合成中間体はTLC上のスポットを検出する時青く発光しているように見える。そこで、32 および 33 のゲルろ過後の試料を用いて蛍光測定を行った。励起波長は365 nmとしたところ、いずれも弱いながらそれぞれ471, 456 nmの蛍光を発していることがわかった。この蛍光はトリエチルアミン - ギ酸緩衝液中では弱められた。照射光を固定して測定しているので一概には言えないが、32 および 33 におけるエネルギーの放出方法の1つになり得ると考えられる。

次に汗が細菌から皮膚を保護しているか、調べることにした。コビトカバに関しては予備的な研究で汗に抗菌物質が含まれているという報告がある⁸⁶。しかしカバの汗の抗菌作用は今まで調べられていない。そこでまずグラム陽性菌、陰性菌で代表的な7種の菌(*Bacillus stearothermophilus*, *Candida albicans* QC, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* Smith, *Mycobacterium vaccae* ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* A3)に対して抗菌活性を調べることにした。まず汗そのものを試験するため、採取した汗をろ過滅菌したものを各菌の寒天培地に対してカップ法で試験したところ、*Bacillus stearothermophilus* では発育阻止帯が見られ、*Pseudomonas aeruginosa* A3、*Klebsiella pneumoniae* では弱い活性がみられた。また、その他4種の菌に対して活性は見られなかった。そこで、*Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* A3、*Klebsiella pneumoniae* とグラム陽性菌 *Staphylococcus aureus* 209P の計4種の菌を対象として、マイクロプレートを用いて、汗を0.1%菌液(10^{-6} cfu/mL)で倍々希釈することにより、MIC(minimum inhibitory concentration)を測定した(Table 11)。その結果、特に *Bacillus stearothermophilus* に対して顕著な抗菌活性が見られた。カバの汗はもともと塩基性であり、2倍希釈濃度ではpH 9、4倍希釈濃度においてはpH 8.5であった。溶液の塩基性が抗菌活性の原因になることもあるのでブランク試験を行ったところ、少なくとも4倍希釈濃度では菌の生育に影響がないことがわかった。次に、色素のみでも同じ活性を示すかを試験することにした。この時問題となったのは32、33は天然物、合成品いずれもイオン交換で精製した状態で溶液中に大量の塩化ナトリウムを含むことであった。精製に用いている塩化ナトリウム濃度(32 : 1.7 M, 33 : 2.3 M)では菌の生育阻害が見られたことから塩濃度は0.1 M程度に抑える必要があった。色素が高濃度の合

成サンプルを調製することは現段階では困難であるため、天然物の 32 を用いてなるべく高濃度の色素溶液を調製し、希釈して 0.1 M の塩濃度にして試験した。希釈した色素の濃度は 4.0 mg / L であったが、この濃度では活性はみられなかった。そこで次にゲルろ過を行った後の色素について試験を行った。この状態では色素が比較的安定なため、32 および 33 の色素濃度はそれぞれ 100 mg / L、176 mg / L にまで高めることができた。また、このサンプルに共存する多糖などの影響を調べるため、ブランクとしてこの試料にイオン交換樹脂を添加して色素のみを吸着させた上澄みを用いた。これらの試料溶液を用いて MIC を測定したところ、汗全体では顕著な生育阻害を示した *Bacillus stearothermophilus* よりもグラム陰性菌の *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* A3 に対して活性があることがわかった (Table 11)。そこでこの 2 種の菌について寒天平板希釈法を行い、cfu を測定して殺菌活性、生育阻害活性を評価した。

Table 11 MIC value of 32 and 33

Bacterial species	hippos' sweat ^a	32	33
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 / 4	25 mg / L ^b	88 mg / L
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A3	1 / 4	12 mg / L ^b	— ^c
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	1 / 512	50 mg / L	88 mg / L
<i>Staphylococcus aureus</i> 209P	1 / 2	50 mg / L	— ^c

a) Sweat sample was directly diluted by 0.1% micro broth medium.

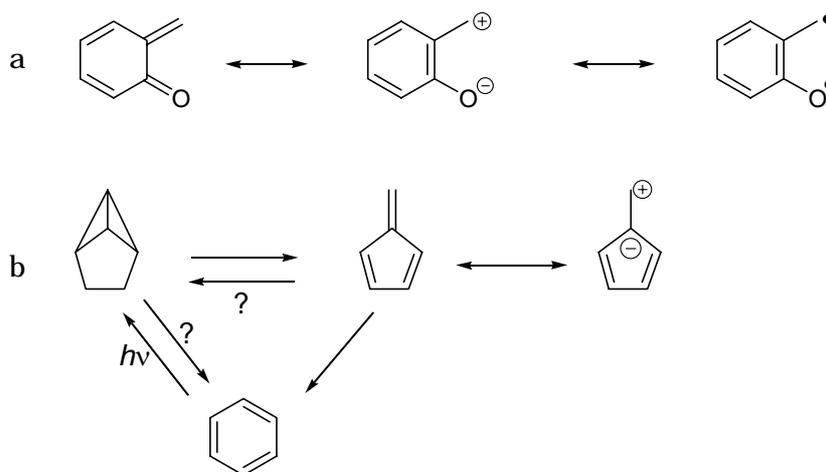
b) Determined from measurement of cfu.

c) Activity was not observed.

その結果、32 は *Klebsiella pneumoniae* に対して 25 mg / L で活性を示し、*Pseudomonas aeruginosa* A3 に対しては 12 mg / L 活性を示すことがわかった。特に、*Pseudomonas aeruginosa* A3 に対しては、32 が 50 mg / L の濃度で試験に用いる前の菌数よりも減少していたことから殺菌効果があることがわかった。また、33 は 32 より明らかに弱い活性を示すのみであった。ブランク試験では活性は見られなかった。33 と 32 の汗中の濃度を測定したところ、採取毎に変化するがおよそそれぞれ 2.0×10^{-4} M (55-60 mg / L) 程度であった。よって、32 は *Klebsiella pneumoniae* および *Pseudomonas aeruginosa* A3 に対して自然状態で充分効果的にはたらいっていると言える。また、汗全体では活性が見られた *Bacillus stearothermophilus* に対して 32 では活性が見られなかったことから、汗の他の成分が *Bacillus stearothermophilus* に対して抗菌活性を示している可能性も高い。そこで、色素の酸化前駆体である 34 を合成し、汗をそのまま試験した時と同様数種の菌に対してカップ法で抗菌活性を調べたところ、特に *Bacillus stearothermophilus* に対して強い活性が見られた。34 は生合成的に 32 の前駆体と予想できるが、実際は汗から検出されていない。32 の前駆体が明らかになっていない現在では 34 の抗菌試験の結果からカバの汗の抗菌作用を評価することはできないが、34 のようなフェノール類は抗菌作用を持つことが多いので⁸⁷、34 に似た生合成前駆体が汗中で抗菌作用を示す可能性は高い。

32 の抗菌活性を示すメカニズムは不明であるが、32 の部分構造であるオルトキノンメチドもしくはフルベンの性質に由来すると考えることができる。オルトキノンメチ

ドは不安定な化学種であるが、自然界では様々な生物がオルトキノンメチドを生成して生体防御に用いているという⁸⁸。オルトキノンメチドの極限構造には双性イオンとビラジカルの寄与があるため不安定であり、ラジカルを発生することで活性を発現すると言われている^{88,89} (Scheme 42a)。フルベンは双極性イオンの寄与が大きく、非常に反応性に富む。また、ベンゼンの光反応の際に生成し、ベンゼンを再生する反応もおこるため、ラジカルの性質もあると思われる。これらの性質のためか、何らかの安定化(双極性イオン構造を安定化するような置換基の存在など)がなければ、フルベン自身は非常に不安定で容易に重合する^{90,91}(Scheme 42b)。



Scheme 42

32 や 33 も容易に重合する性質を持つので、これらの色素の性質を探る 1 つの方法として、ESR を測定することにした。イオン交換後の 33 を用いて、色素濃度をなるべく高濃度に調製 ($7.0 \times 10^{-4} \text{M}$) したがラジカルは検出されなかった。イオン交換後の色素は分解が早く、より高濃度の試料を調製するのは困難だったので、次にゲルろ過後の試料を用いた。ゲルろ過後の 33 溶液を $2.5 \times 10^{-3} \text{M}$ にまで濃縮したところ、弱いながら ESR を検出した。このシグナルは数十分で減衰した。標準物質であるマンガンと Hydroxy-TEMPO との強度の比から算出した 33 のラジカル濃度は $2.19 \times 10^{-6} \text{M}$ となった。この結果から 33 全体の 0.08% がラジカルであることがわかった。 $2.19 \times 10^{-6} \text{M}$ という濃度は水溶液中で測定する ESR の検出限界に近く、分解能を犠牲にして検出感をあげて測定したため超微細構造は確認できなかった。また、g 値は 2.0043 であった。分解が充分早く起こる濃度で測定しているため、33 自体のラジカルの性質を捕らえたのか、33 が分子間で電子移動を起こしてラジカル重合して行く過程を捕らえたのかはまだ不明である。また、酸素をなるべく除去した時シグナルの減衰が少なくなることから、33 が酸素と反応して生成したラジカル種を検出したわけではないことがわかった。以上、予備的な結果ではあるが、色素がラジカル的な性質を持つことがわかった。このように反応性の高い色素 33 および 32 は色素同士で電子移動を起こし易いのはもちろん、様々な化学種と反応して興味深い生物活性を呈することが期待できる。

以上、色素の性質を調べ、次第にその機能が判明しつつある段階である。汗の中には色素の他に粘性物質や色素前駆体が入っていると予想される。色素の構造が明らかになった現在はこの色素を純粋にしてアッセイすること、色素以外の成分を明らかにし、機能を調べるのが次の課題である。

総括

猛毒キノコであるカエнтаケ (*Podostroma cornu-damae*) の培養液からマクロサイクリックトリコテセン類に属する roridin E (1)、verrucarin J (2)、satratoxin H (3) を単離、構造決定した。また、子実体から satratoxin H (3) の他に天然物としては新規物質である satratoxin H 12',13'-diacetate (4)、satratoxin H 12'-acetate (5)、satratoxin H 13'-acetate (6) を単離、構造決定した。1、3~6 はいずれも 0.5 mg でマウスに対して致死活性を示した。1~3 はいずれも *Stachbotrys atra* から単離されている毒成分であり、報告されている症状は本菌で見られる中毒症状とよく類似していることから、これらのマクロサイクリックトリコテセン類がカエнтаケの毒本体としてはたらいっていると考えられる (Figure 23)。

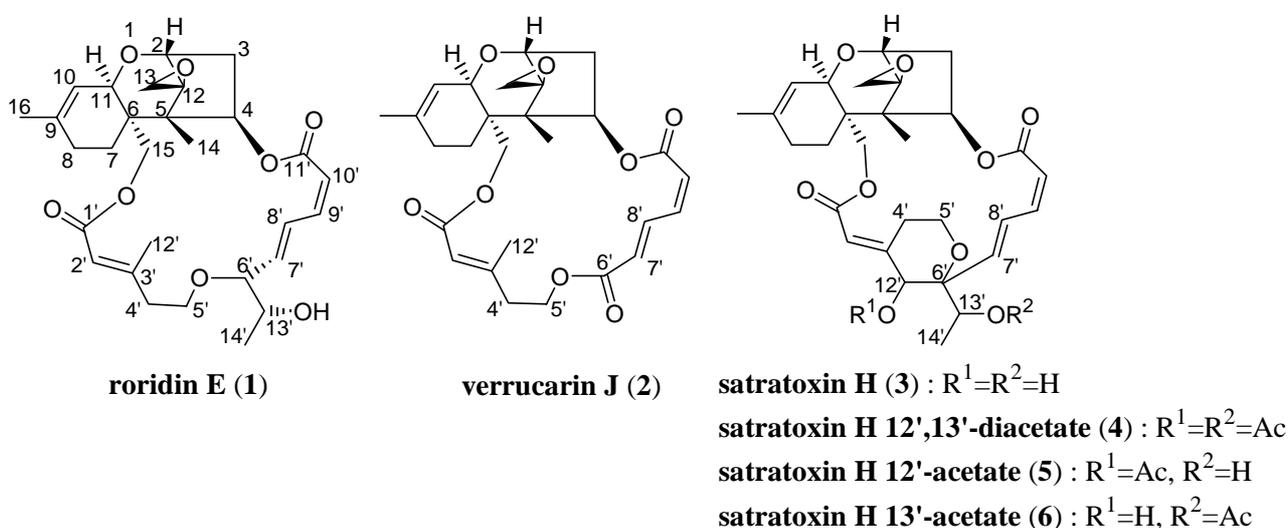


Figure 23

緑青色キノコであるロクショウグサレキン類 (*Chlorociboria* sp.) の青色色素主成分 xylindein (10) の 2', 2'' 位の絶対立体配置を決定するため、xylindein を抽出、単離し、3 行程で tetraalkylxylindein 18 へ化学誘導した。18 の X 線結晶構造解析により 10 の絶対立体配置を 2'S, 2''S と決定した (Figure 24)。

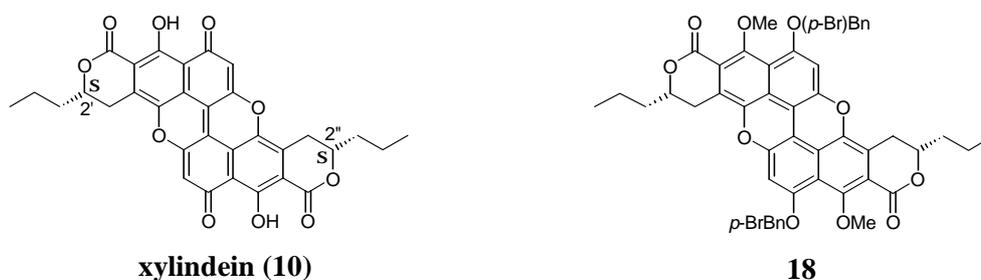


Figure 24

また、粗抽出物をジアゾメタン処理して分離し、1'位が酸化された 10 の類縁体 19、26 を単離、構造決定し、19 を 10 と同様に化学誘導して絶対立体配置を 1'S, 2'S, 2''S と決定した(Figure 25)。

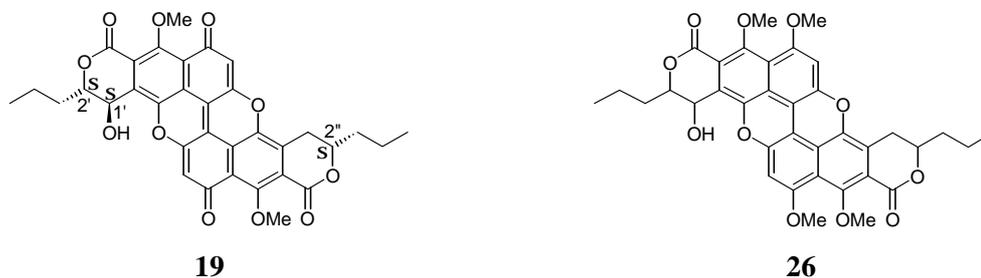
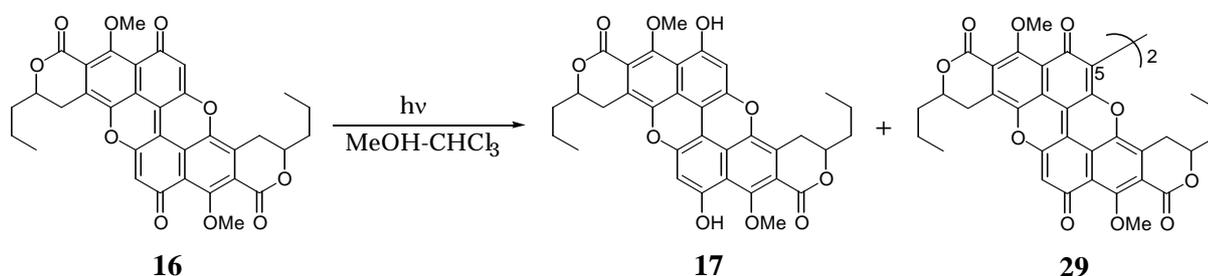


Figure 25

さらに、xylindein 類の化学的性質として、dimethylxylindein (16)がメタノール - クロロホルムおよび有機酸中で照射することにより dihydrodimethylxylindein (17) および dimethylxylindein dimmer (29)を生成することを見出した(Scheme 43)。この反応の経時変化や酸素の影響を調べた結果、光で励起した 16 が不均化を経て自己酸化還元反応をおこし、還元体に対応する 17 と酸化体に対応する 29 を与えたことがわかった。この反応は塩基中では遮光していても進行し、熱をかけると 17 が優先して得られた。



Scheme 43 (Scheme 11 再掲)

カバ(Hippopotamus amphibius)の汗を上野動物園の協力を得て採取し、汗に含まれる赤色色素 32 および橙色色素 33 を単離した。これらは非常に不安定だったため、32 を 3 行程化学誘導して 36 へ導いた。36 の X 線結晶構造解析により、32 は酸化度の高い新規フルオレン骨格を有するジカルボン酸であることがわかった(Figure 26)。

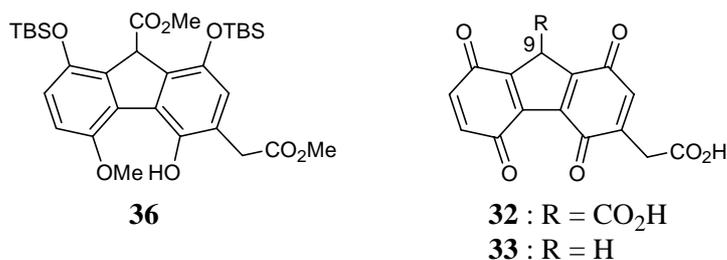


Figure 26

33 は 32 に類似した各種スペクトルを示した。各種スペクトルおよび化学誘導を経て、33 は 32 の 9 位からカルボキシ基を脱離させた構造と決定した。また、¹H NMR スペクトル、UV スペクトルおよび別途合成したモデルの構造解析を経てこれら色素の性質を調べ、4 - 5 位間で分子内水素結合したプロトネーション型の構造と共に、エノールが解離し、その電荷が非局在化した水溶液中の構造を明らかにした (Figure 27)。

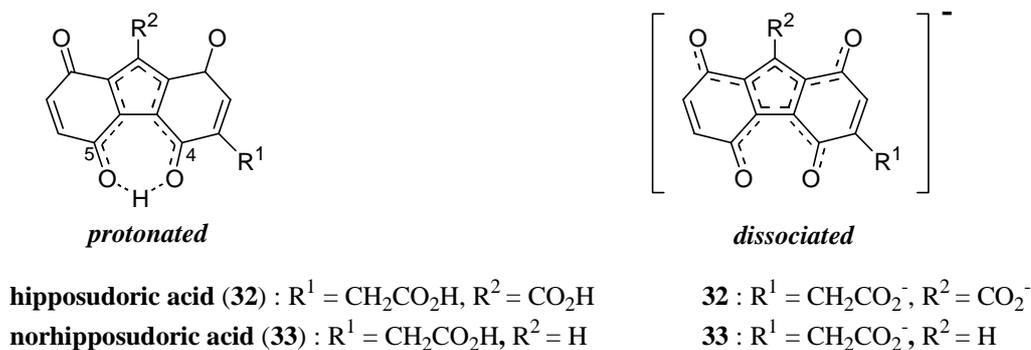


Figure 27

32 および 33 は紫外線の波長を吸収することからカバの皮膚を紫外線から保護する能力があると考えられる。また、32 はグラム陰性菌 2 種に抗菌活性を示したことから皮膚を細菌から保護する役割も担っている可能性がある。この活性の 1 つの要因として 33 が高濃度でラジカルの性質を示すことがあげられる。32 および 33 はオルトキノンメチドおよびフルベンを部分構造として持っており、これらの不安定な化学種に由来する性質が高い生物活性を示すと期待できる。

以上、カエントケ、ロクショウグサレキン、カバの汗から、それぞれ目的とする毒成分および色素を単離、構造決定し、あらたな化学的性質を見出した。Xylindein 類の不均化反応は自己酸化還元反応をシンプルに説明することのできる極めて珍しい系であり、色素の光反応化学の新たな知見になった。また、カバの汗から単離、構造決定した hipposudoric acid、norhipposudoric acid はエノール部分が高い酸性を示し、容易に解離して非局在化したアニオンとなることがわかった。

実験編

General

The melting points (mp) were determined on a micro hot-stage Yanaco MP-S3 and were uncorrected. Optical rotations were measured on a JASCO DIP-360 photoelectric polarimeter. UV /Vis spectra were recorded on a HITACHI U-2001. Fluoresce spectra were recorded on a HITACHI F-4500. IR spectra were recorded on a JASCO FT-IR-200 spectrometer. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a JEOL lambda 300 or Varian MERCURY plus 300 or JEOL alpha 400 at ambient temperature. ¹³C chemical shifts were determined with complete proton decoupling. ¹H NMR spectral data were reported as follows: chemical shift in parts per million (ppm) downfield or upfield from internal standard (noted before data), integration, multiplicity (br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet), coupling constants (/ Hz), assignment. ¹³C chemical shifts are reported in ppm donfield or upfield from internal standard (noted before data), assignment (determined by HMQC, HMBC spectra). ESR spectra were recorded on a JEOL JES-RE3X. High-resolution (HR) and low-resolution (LR) electron impact (EI) mass spectra (MS) were recorded on GC mate mass spectrometer. High-resolution and Low-resolution fast atom bombardment (FAB) mass spectra were recorded on the same instrument using m-nitrobenzylalcohol or glycerol as matrix. Low-resolution electron spray ionization (ESI) mass spectra were recorded on API-300 (PE SCIEX Co.) mass spectrometer. Elemental analysis (Anal.) was obtained on Elemental vario EL analyzer. Analytical thin layer chromatography (TLC) were performed using Merck TLC (silica gel) 60F-254 plates (0.25 mm) and Merck TLC (ODS) F-254 (Art. 5715), and visualization was accomplished with UV lamp (254, 365 nm) or with spraying an ethanolic phosphomolybdic acid or an ethanolic iron trichloride. Column chromatography was performed on silica gel, Fuji silysia PSQ 100B, and Fuji silysia BW-200, or ODS, Merck Silica gel 60 extra pure. Ion exchange chromatography was performed through Pharmacia Biotech QAE Sephadex A-25 (anion exchange) or CM Sephadex A-25 (cation exchange). Gel filtration was performed through Pharmacia Biotech Sephadex G-15 and G-25. HPLC (high performance liquid chromatography), connected ESI-MS, was performed on ODS column UG-80 (Shiseido Co.). Air- and moisture-sensitive reactions were carried out under argon atmosphere with oven-dried glassware. The organic solvents were purified and dried by appropriate procedures, and evaporation and concentration were carried out under reduced pressure below 30 °C, unless otherwise noted.

第1章

Mushroom material

The mushrooms were collected in September, 1999, in Hokkaido and in October, 1999, in Niigata, Japan.

Fermentation

The fungus was isolated from the culture tissue of *Podostroma cornu-damae*. The mycelium was grown in a stationary culture in a 500 mL flask containing 100 mL of a medium consisting of 10 g of malt extract and 2 g of yeast extract per 1 L of distilled water at 27 °C for three weeks.

Extraction and isolation of macrotrichothecenes from culture medium

A culture broth (1010 mL) of *Podostroma cornu-damae* was extracted with hexane (300 mL × 3), and the combined hexane layer was evaporated. The obtained mixture (28.0 mg) was chromatographed on silica-gel PTLC (50% EtOAc-hexane) to give roridin E (1) (22.1 mg) and verrucarins J (3.2 mg). The culture broth was then extracted with Et₂O (300 mL × 3), and the combined ether layer was evaporated. The obtained mixture (24.5 mg) was chromatographed on ODS (20 g) with 50% MeOH-H₂O, and then the main component was purified by silica-gel PTLC (3% MeOH-CHCl₃) to give satratoxin H (3) (1.5 mg).

Extraction and isolation of macrocyclic trichothecenes from culture filtrate

The fruit bodies (100 g, collected in Hokkaido) of *Podostroma cornu-damae* were cut and half (50 g) was extracted with water (100 mL × 2). A part (90.1 mg) of the extracts (3.27 g) was chromatographed on ODS (8.0 g) with 1 : 1 methanol-water to give satratoxin H (3) (2.5 mg). The rest (50 g) of the fruit bodies was extracted with methanol (100 mL × 2). A part (700 mg) of the extracts (1.29 g) was partitioned between H₂O (5 mL) and EtOAc (5 mL × 3). The combined EtOAc layer was evaporated and the residue (48.8 mg) was chromatographed on silica-gel (40 g) with 50% EtOAc-hexane to give satratoxin H (3) (5.5 mg) and satratoxin H 12',13'-diacetate (4) (13.4 mg). The other fractions were concentrated and the residue was subjected to silica-gel PTLC with 30% EtOAc-hexane to give satratoxin H 12'-acetate (5) (3.0 mg) and satratoxin H 13'-acetate (6) (4.9 mg).

Roridin E (1). A colorless amorphous powder; $R_f=0.47$ (40% hexane-EtOAc), $[\alpha]_D^{22.5} = -22$ (c 0.38, CHCl₃) [lit.¹¹ $[\alpha]_D^{25} = -24 \pm 2$ (c 0.798, CHCl₃). lit.¹³ $[\alpha]_D^{23} = -16 \pm 1$ (c 0.815, CHCl₃)]; UV (EtOH) λ_{max} nm (log ϵ): 263 (4.18), 223 (4.26) [lit.¹¹ 263 (4.30), 223 (4.40), 195 (4.2). lit.¹³ 262 (3.98), 218 (4.25), 198.5 (4.26)]; IR (CH₂Cl₂) ν_{max} cm⁻¹: 3578, 2976, 2930, 1712, 1650, 1600, 1438, 1420, 1398, 1362,

1221, 1180, 1150, 1121, 1082, 1038, 1010, 998, 967, 923, 865 [lit.¹¹ 3570, 3050, 2975, 1712, 1647, 1603, 1365, 1220, 1180, 1148, 1142, 1096, 1090, 1080, 966, 814. lit.¹³ 3500, 1705, 1640, 1595]; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0) δ 0.79 (3H, s, H-14), 1.18 (3H, d, J = 6.1 Hz, H-14'), ~1.66 (1H, m, H-7), 1.71 (3H, br s, H-16), ~2.00 (1H, m, H-7), ~2.02 (2H, m, H-8), 2.05 (1H, m, H-3), 2.27 (3H, d, J = 1.4 Hz, H-12'), ~2.50 (2H, m, H-4'), 2.53 (1H, m, H-3), 2.82 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), ~3.56 (2H, m, H-5'), 3.64 (1H, q, J = 6.1 Hz, H-13'), 3.69 (1H, m, H-6'), 3.85 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-2), 3.90 (1H, d, J = 4.3 Hz, H-11), 3.94 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-15), 4.32 (1H, d, J = 12.0 Hz, H-15), 5.48 (1H, br d, J = 4.3 Hz, H-10), 5.75 (1H, d, J = 11.4 Hz, H-10'), 5.90 (1H, dd, J = 15.4, 3.2 Hz, H-7'), 5.96 (1H, br, H-2'), 6.22 (1H, dd, J = 8.2, 4.0 Hz, H-4), 6.58 (1H, dd, J = 11.4, 11.4 Hz, H-9'), 7.52 (1H, dd, J = 15.4, 11.4 Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.00) δ 6.64 (C-14), 18.23 (C-14'), 20.30 (C-12'), 21.55 (C-7), 23.23 (C-16), 27.63 (C-8), 35.78 (C-3), 41.21 (C-4'), 42.67 (C-6), 48.11 (C-13), 48.36 (C-5), 63.69 (C-15), 65.57 (C-12), 67.18 (C-11), 69.83 (C-5'), 70.63 (C-13'), 74.14 (C-4), 79.19 (C-2), 83.89 (C-6'), 117.12 (C-2')*, 117.76 (C-10'), 118.80 (C-10)*, 126.50 (C-8'), 138.00 (C-7'), 140.18 (C-9), 143.62 (C-9'), 159.20 (C-3'), 165.78 (C-11'), 166.42 (C-1') [*: interchangeable]; FAB- MS m/z 515 [M+H]⁺, C₂₉H₃₈O₈.

Verrucarin J (2). A colorless amorphous powder; R_f = 0.66 (40% hexane-EtOAc), [α]_D²² = +8.1 (c 0.20, CHCl₃) [lit.¹¹, [α]_D²² = +20±2 (c 1.011, CHCl₃); UV (EtOH) λ_{max} nm (log ε): 262 (3.90), 220 (4.00) [lit.¹¹ 262 (4.16), 219 (4.30), 196 (4.19). lit.¹⁸ 261 (4.34), 220.5 (4.33)]; IR (CH₂Cl₂) ν_{max} cm⁻¹: 3601, 2958, 2932, 2877, 1712, 1662, 1590, 1462, 1413, 1380, 1358, 1225, 1182, 1151, 1085, 1043, 1000, 968, 880, 822 [lit.¹¹ 2810, 1710, 1650, 1630, 1588, 1352, 1221, 1180, 1147, 1070-1088, 1042, 995, 968, 877, 820. lit.^{17a} 3022, 2962, 1712, 1650, 1224, 1182. lit.¹⁸ (KBr) 1705, 1650, 1595]; ¹H NMR (CDCl₃, solvent residual peak = 7.26) δ 0.83 (3H, s, H-14), 1.7-2.1 (4H, m, H-7, 8), 1.72 (3H, br s, H-16), 2.05 (1H, ddd, J = 15.2, 5.2, 5.2 Hz, H-3), 2.28 (3H, d, J = 1.5 Hz, H-12'), 2.45-2.60 (3H, m, H-3, 4'), 2.83 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.75 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-11), 3.85 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-2), 3.97 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-15), 4.15 (1H, ddd, J = 11.7, 8.0, 5.3 Hz, H-5'), 4.42 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-15), ~4.45 (1H, m, H-5'), 5.47 (1H, br d, J = 5.1 Hz, H-10), 5.95 (1H, br s, H-2'), 6.00 (1H, dd, J = 8.2, 4.3 Hz, H-4), 6.00 (1H, d, J = 15.2 Hz, H-7'), 6.10 (1H, d, J = 11.5 Hz, H-10'), 6.63 (1H, dd, J = 11.5, 11.5 Hz, H-9'), 8.07 (1H, dd, J = 15.2, 11.5 Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.00) δ 6.95 (C-14), 17.19 (C-12'), 20.74 (C-7), 23.26 (C-16), 27.65 (C-8), 35.10 (C-3), 40.20 (C-4'), 43.03 (C-6), 48.05 (C-13), 48.84 (C-5), 60.42 (C-5'), 63.31 (C-15), 65.45 (C-12), 67.28 (C-11), 75.32 (C-4), 79.04 (C-2), 118.12 (C-10), 118.62 (C-2'), 125.51 (C-10'), 127.37 (C-7'), 139.11 (C-8'), 139.46 (C-9'), 140.44 (C-9), 156.58 (C-3'), 165.53 (C-11'), 165.79 (C-1'), 166.09 (C-6'); ESI-MS m/z 485.5 [M+H]⁺, 507.4 [M+Na]⁺. C₂₇H₃₂O₈.

Satratoxin H (3). A colorless amorphous powder; R_f = 0.23 (40% hexane-EtOAc), [α]_D^{22.5} = +73 (c 0.10, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 255 (4.04), 229 (4.29), 205 (4.21) [lit.²⁰ 255 (4.02), 225 (4.17)]; IR (CH₂Cl₂) ν_{max} cm⁻¹: 3580, 2979, 1718, 1652, 1595, 1437, 1410, 1361, 1259, 1239, 1218, 1192, 1153, 1081, 1043, 1002, 964, 882 [lit.¹⁹ 1720, 1650, 1595]; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 0.82

(3H, s, H-14), 1.16 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-14'), 1.73 (3H, br s, H-16), 1.88-1.96 and 2.00-2.09 (each 2H, each m, H-7 and 8), 2.20 (1H, ddd, J = 15.2, 4.9, 4.9 Hz, H-3), 2.36 (1H, d, J = 6.5 Hz, 12'-OH), 2.41 (1H, s, 13'-OH), 2.45 (1H, dd, J = 15.2, 8.2 Hz, H-3), 2.66 (1H, m, H-4'), 2.83 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.60 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-11), 3.74 (1H, ddd, J = 11.7, 11.7, 2.9 Hz, H-5'), ~3.85 (2H, m, H-4', 5'), 3.85 (1H, d, J = 4.9 Hz, H-2), 3.86 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-15), 3.99 (1H, d, J = 6.5 Hz, H-12'), 4.36 (1H, q, J = 6.6 Hz, H-13'), 4.56 (1H, d, J = 12.5 Hz, H-15), 5.45 (1H, br d, J = 5.1 Hz, H-10), 5.84 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 5.90 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-10'), 5.90 (1H, m, H-4), 6.08 (1H, d, J = 16.7 Hz, H-7'), 6.61 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz, H-9'), 7.35 (1H, dd, J = 16.7, 10.0 Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 7.58 (C-14), 15.73 (C-14'), 20.30 (C-7), 23.38 (C-16), 25.25 (C-4'), 27.59 (C-8), 34.35 (C-3), 43.33 (C-6), 48.10 (C-13), 48.89 (C-5), 60.42 (C-5'), 64.17 (C-15), 65.47 (C-12), 68.12 (C-11), 69.65 (C-13'), 73.55 (C-12'), 74.09 (C-4), 79.11 (C-2), 81.26 (C-6'), 118.83 (C-10)*, 119.03 (C-2')*, 120.36 (C-10'), 132.01 (C-7'), 134.23 (C-8'), 140.38 (C-9), 142.93 (C-9'), 154.96 (C-3'), 166.26 (C-1'), 167.11 (C-11')[*: interchangeable]; ESI-MS (CH₃CO₂NH₄ was added) m/z: positive: 529.5 [M+H]⁺, 551.3 [M+Na]⁺; negative: 483.2 [M-H-CO₂]⁻, 527.2 [M-H]⁻, 587.2 [M+CH₃CO₂]⁻, C₂₉H₃₆O₉.

Satratoxin H 12',13'-diacetate (4). A colorless amorphous powder; R_f = 0.63 (40% hexane-EtOAc), mp 167-172 (not recrystallized); [α]_D²⁵ = +28 (c 0.87, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 230 (3.98); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} cm⁻¹: 2976, 1738, 1655, 1595, 1376, 1242, 1226, 1190, 1157, 1094, 1043, 1020, 963; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26) δ 0.83 (3H, s, H-14), 1.08 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-14'), 1.72 (3H, br s, H-16), 1.8-2.1 (4H, m, H-7, 8), 2.09 (3H, s, -OAc), 2.14 (3H, s, -OAc), 2.19 (1H, ddd, J = 15.3, 5.1, 5.1 Hz, H-3), 2.44 (1H, dd, J = 15.3, 8.4 Hz, H-3), 2.56 (1H, m, H-4'), 2.84 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.58 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-11), 3.70 (1H, ddd, J = 12.0, 12.0, 3.1 Hz, H-5'), 3.84 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-2), ~3.85 (2H, m, H-4', 5'), 3.85 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-15), 4.52 (1H, d, J = 12.2 Hz, H-15), 5.26 (1H, s, H-12'), 5.41 (1H, q, J = 6.6 Hz, H-13'), 5.43 (1H, br d, J = 5.1 Hz, H-10), 5.89 (1H, dd, J = 8.4, 4.9 Hz, H-4), 5.93 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-10'), 6.02 (1H, d, J = 2.2 Hz, H-2'), 6.03 (1H, d, J = 16.8 Hz, H-7'), 6.63 (1H, dd, J = 10.0, 10.0 Hz, H-9'), 7.38 (1H, dd, J = 16.8, 10.0 Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.00) δ 7.65 (C-14), 14.89 (C-14'), 20.25 (C-7), 21.20 (-OCOMe), 21.33 (-OCOMe), 23.36 (C-16), 25.84 (C-4'), 27.45 (C-8), 34.30 (C-3), 43.26 (C-6), 48.08 (C-13), 48.89 (C-5), 60.30 (C-5'), 64.15 (C-15), 65.45 (C-12), 68.10 (C-11), 71.32 (C-13'), 73.23 (C-12'), 74.17 (C-4), 79.06 (C-2), 79.39 (C-6'), 118.87 (C-10), 120.90 (C-10'), 122.34 (C-2'), 131.42 (C-7'), 134.33 (C-8'), 140.40 (C-9), 142.40 (C-9'), 149.84 (C-3'), 166.04 (C-1'), 166.98 (C-11'), 169.88 (-OCOMe), 170.20 (-OCOMe); FAB-HR-MS m/z positive 635.2448 [M+Na]⁺, calcd for C₃₃H₄₀O₁₁Na, 635.2469.

Satratoxin H 12'-acetate (5). A colorless amorphous powder; R_f = 0.46 (40% hexane-EtOAc), mp 116-120 (not recrystallized); [α]_D³¹ = +25 (c 0.18, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 255 (4.03), 230 (4.19), 208 (4.08); IR (CH₂Cl₂) ν_{max} cm⁻¹: 3581, 2978, 2937, 1721, 1657, 1595, 1413, 1372, 1259, 1230, 1193, 1157, 1082, 1043, 1018, 964; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26) δ 0.82 (3H, s, H-14), 1.02

(3H, d, $J = 6.7$ Hz, H-14'), 1.72 (3H, br s, H-16), 1.86-2.14 (4H, m, H-7, 8), 2.12 (3H, s, 12'-OAc), 2.20 (1H, ddd, $J = 15.0, 4.8, 4.8$ Hz, H-3), 2.44 (1H, dd, $J = 15.6, 8.1$ Hz, H-3), 2.55 (1H, m, H-4'), 2.84 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-13), 3.14 (1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-13), 3.58 (1H, d, $J = 4.5$ Hz, H-11), 3.73 (1H, ddd, $J = 11.8, 11.8, 3.0$ Hz, H-5'), 3.80-4.00 (3H, m, H-2, 4', 5'), 3.85 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-15), 4.22 (1H, q, $J = 6.7$ Hz, H-13'), 4.54 (1H, d, $J = 12.8$ Hz, H-15), 5.29 (1H, s, H-12'), 5.44 (1H, br d, $J = 4.5$ Hz, H-10), 5.90 (1H, dd, $J = 8.1, 4.8$ Hz, H-4), 5.92 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-10'), 6.02 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2'), 6.08 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-7'), 6.61 (1H, dd, $J = 10.1, 10.1$ Hz, H-9'), 7.41 (1H, dd, $J = 17.3, 10.1$ Hz, H-8'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3=77.00$) δ 7.63 (C-14), 15.30 (C-14'), 20.25 (C-7), 21.04 (-OCOMe), 23.34 (C-16), 25.82 (C-4'), 27.45 (C-8), 34.28 (C-3), 43.28 (C-6), 48.08 (C-13), 48.89 (C-5), 60.40 (C-5'), 64.15 (C-15), 65.44 (C-12), 68.05 (C-11), 69.24 (C-13'), 73.25 (C-12'), 74.10 (C-4), 79.06 (C-2), 80.22 (C-6'), 118.78 (C-10), 120.64 (C-10'), 122.14 (C-2'), 131.04 (C-7'), 134.25 (C-8'), 140.38 (C-9), 142.65 (C-9'), 149.97 (C-3'), 166.04 (C-1'), 167.06 (C-11'), 169.61 (-OCOMe); EI-HR-MS m/z 570.2454 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{38}\text{O}_{10}$, 570.2465.

Satratoxin H 13'-acetate (6). A colorless amorphous powder; $R_f = 0.49$ (40% hexane-EtOAc), mp 152-155 (not recrystallized); $[\alpha]_{\text{D}}^{31} = +71$ (c 0.40, CHCl_3); UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 257 (4.10), 228 (4.29); IR (CH_2Cl_2) ν_{max} cm^{-1} : 3695, 3602, 3063, 2962, 1720, 1605, 1376, 1242, 1191, 1079, 964; ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$) δ 0.83 (3H, s, H-14), 1.22 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, H-14'), 1.73 (3H, br s, H-16), 1.86-2.12 (4H, m, H-7, 8), 2.10 (3H, s, 13'-OAc), 2.20 (1H, ddd, $J = 15.3, 5.4, 5.4$ Hz, H-3), 2.38 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, 12'-OH), 2.45 (1H, dd, $J = 15.3, 8.2$ Hz, H-3), 2.62 (1H, m, H-4'), 2.83 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-13), 3.14 (1H, d, $J = 4.1$ Hz, H-13), 3.60 (1H, d, $J = 4.0$ Hz, H-11), 3.66 (1H, ddd, $J = 11.8, 11.8, 3.1$ Hz, H-5'), ~3.85 (2H, m, H-4', 5'), 3.85 (1H, d, $J = 5.1$ Hz, H-2), 3.86 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-15), 3.95 (1H, d, $J = 8.6$ Hz, H-12'), 4.55 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-15), 5.45 (1H, br d, $J = 4.0$ Hz, H-10), 5.54 (1H, q, $J = 6.2$ Hz, H-13'), 5.85 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-2'), 5.90 (1H, dd, $J = 8.2, 5.4$ Hz, H-4), 5.93 (1H, d, $J = 10.1$ Hz, H-10'), 6.04 (1H, d, $J = 16.7$ Hz, H-7'), 6.64 (1H, dd, $J = 10.1, 10.1$ Hz, H-9'), 7.33 (1H, ddd, $J=16.7, 10.1, 1.0$ Hz, H-8'); ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3=77.00$) δ 7.58 (C-14), 15.13 (C-14'), 20.28 (C-7), 21.42 (-OCOMe), 23.36 (C-16), 25.20 (C-4'), 27.57 (C-8), 34.33 (C-3), 43.33 (C-6), 48.10 (C-13), 48.87 (C-5), 60.24 (C-5'), 64.14 (C-15), 65.47 (C-12), 68.13 (C-11), 71.83 (C-13'), 73.33 (C-12'), 74.17 (C-4), 79.07 (C-2), 80.72 (C-6'), 118.78 (C-10)*, 119.21 (C-2)*, 120.71 (C-10'), 131.98 (C-7'), 134.59 (C-8'), 140.40 (C-9), 142.57 (C-9'), 154.68 (C-3'), 166.19 (C-1'), 167.01 (C-11'), 170.35 (-OCOMe)*; *: interchangeable]; FAB-HR-MS m/z positive 571.2577 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{O}_{10}$, 571.2544.

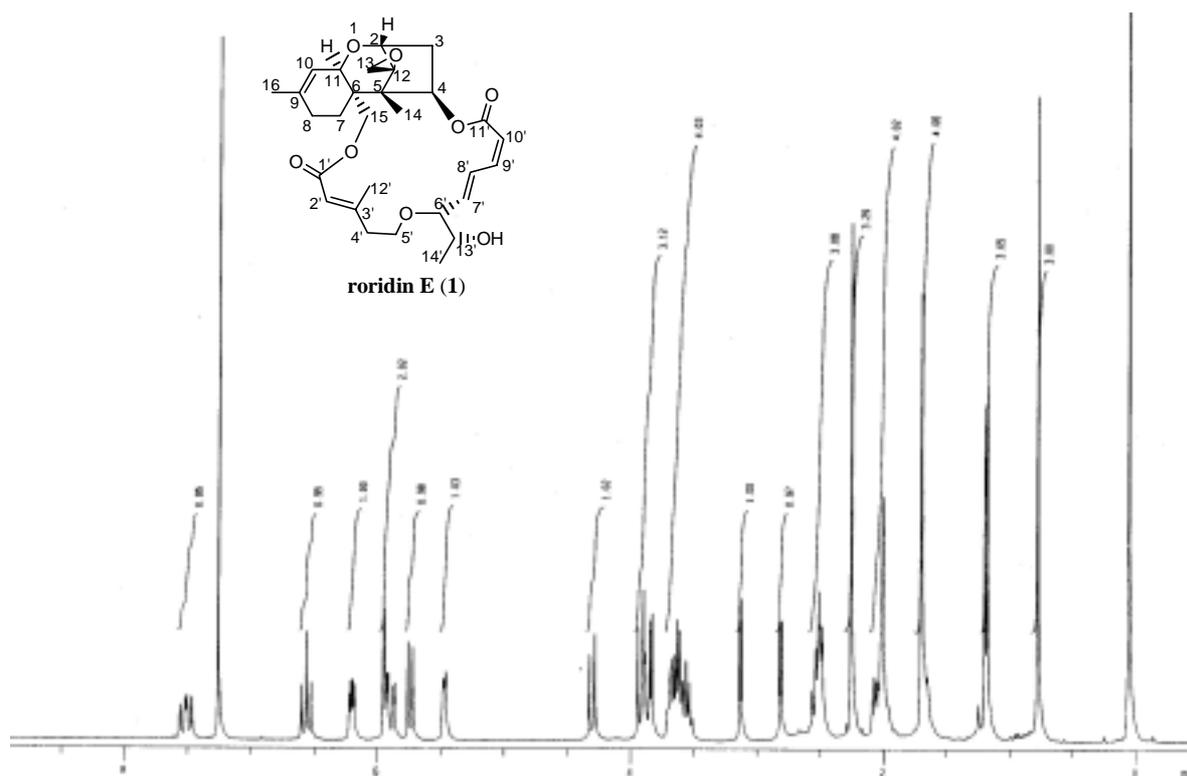
Acetonide of satratoxin H 7. To a stirred solution of satratoxin H (7.7 mg, 0.015 mmol) in acetone dimethylacetal (0.15 mL) was added CSA (0.2 mg, 8.6×10^{-4} mmol) at 0 °C. After stirring for 1.5 h at room temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 (1.0 mL), and extracted with EtOAc (1.0 mL \times 3). The combined extract was dried over Na_2SO_4 , and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (50% EtOAc-hexane) to give satratoxin H 12',13'-dimethylacetal (7)(7.8 mg, 92%) as a colorless amorphous solid: ^1H NMR

(CDCl₃, CHCl₃ = 7.26) δ 0.80 (3H, s, H-14), 1.31 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-14'), 1.50 (6H, brs, CMe₂), 1.72 (3H, br s, H-16), 1.8-2.1 (4H, m, H-7, 8), 2.18 (1H, ddd, J = 15.1, 5.1, 5.0 Hz, H-3), 2.44 (1H, dd, J = 15.4, 8.3 Hz, H-3), 2.78 (1H, m, H-4'), 2.82 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.14 (1H, d, J = 4.1 Hz, H-13), 3.59 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-11), 3.82 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-2), ~3.85 (1H, m, H-4', 5'), 3.82 (1H, d, J = 13.1 Hz, H-15), 3.99 (1H, q, J = 6.3 Hz, H-13'), 4.05-4.12 (1H, m, H-5'), 4.14 (1H, s, H-12'), 4.53 (1H, d, J = 13.1 Hz, H-15), 5.43 (1H, br d, J = 4.6 Hz, H-10), 5.63 (1H, d, J = 16.7 Hz, H-7'), 5.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 5.89 (1H, d, J = 10.2 Hz, H-10'), 5.92 (1H, dd, J = 8.3, 5.0 Hz, H-4), 6.53 (1H, dd, J = 10.2, 10.2 Hz, H-9'), 7.44 (1H, dd, J = 16.7, 10.2 Hz, H-8'); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.00) δ 7.77 (C-14), 14.14 (C-14'), 19.36 (axMe of IP), 20.49 (C-7), 23.48 (C-16), 26.84 (C-4'), 27.73 (C-8), 29.82 (eqMe of IP), 34.54 (C-3), 43.41 (C-6), 48.13 (C-13), 49.18 (C-5), 61.04 (C-5'), 64.12 (C-15), 65.51 (C-12), 68.31 (C-11), 70.88 (C-13'), 71.95 (C-6'), 74.08 (C-4), 74.84 (C-12'), 79.27 (C-2), 98.54 (CMe₂), 118.96, 119.81 (C-2, 10), 120.74 (C-10'), 133.45 (C-7'), 133.90 (C-8'), 140.49 (C-9), 142.89 (C-9'), 153.42 (C-3'), 166.25, 166.86 (C-1', 11').

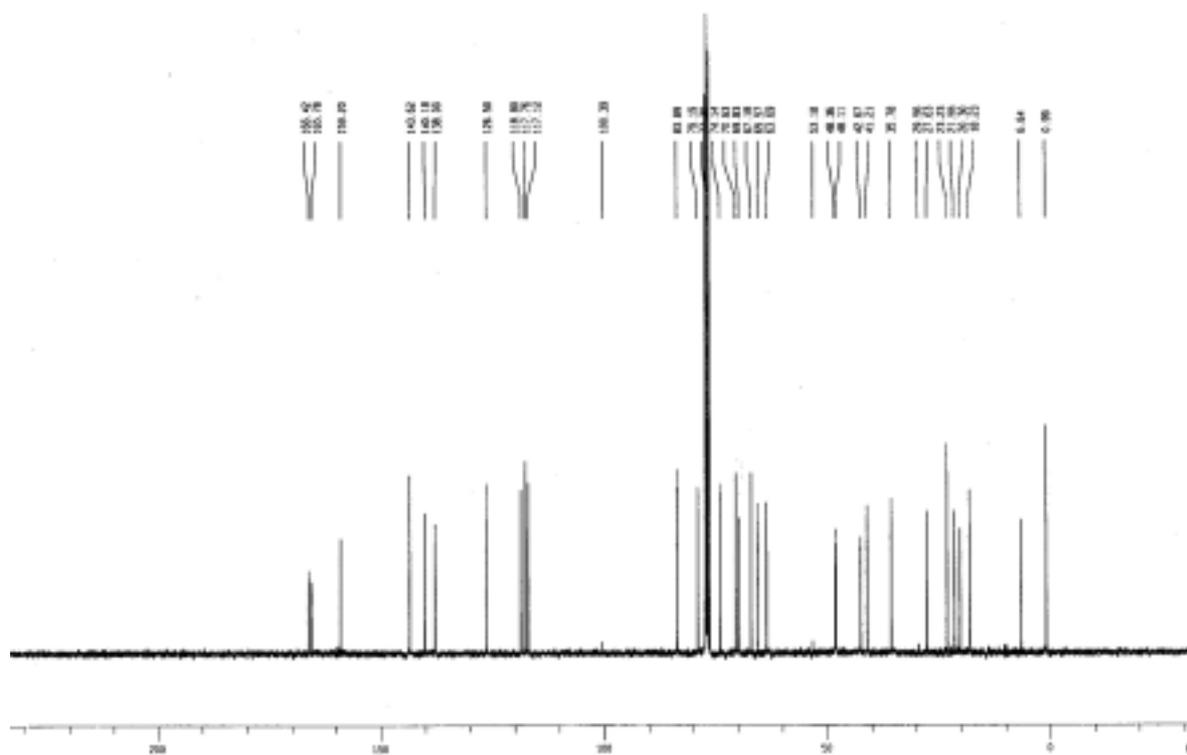
Formation of MTPA esters 8 and 9 from satratoxin H 13'-acetate (6). To a solution of 6 (7.7 mg, 1.5 \times 10⁻² mmol) in dry CH₂Cl₂ (0.15 mL) at 0 °C under Ar were added triethylamine (3.0 μ L, 2.2 \times 10⁻² mmol), DMAP (0.8 mg, 6.6 \times 10⁻³ mmol), and (S)-(+)-MTPACl (3.3 μ L, 1.8 \times 10⁻² mmol). After stirring for 15 min at room temperature, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous NaHCO₃, and extracted with EtOAc. The combined extract was dried over Na₂SO₄, and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on PTLC (50% EtOAc-hexane) to give (+)-MTPA ester of satratoxin H 12' acetate 8 (7.8 mg, 70%) as a colorless amorphous solid. On the other hand, the corresponding (-)-MTPA ester was prepared by the similar manner as above using (R)-(-)-MTPACl to afford 9 as a colorless amorphous solid. (+)-MTPA ester 8: ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26) δ 0.84 (3H, s, H-14), 1.08 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-14'), 1.74 (3H, br s, H-16), 1.8-2.1 (4H, m, H-7, 8), 2.06 (3H, s, 13'-OAc), 2.20 (1H, ddd, J = 15.0, 4.9, 4.9 Hz, H-3), 2.46 (1H, dd, J = 15.0, 8.5 Hz, H-3), 2.56 (1H, m, H-4'), 2.85 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-13), 3.15 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-13), 3.57 (1H, d, J = 5.2 Hz, H-11), 3.63 (3H, s, -OMe), 3.66 (1H, m, H-4'), 3.70 (1H, m, H-5'), 3.85 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-2), 3.89 (1H, d, J = 12.4 Hz, H-15), 4.53 (1H, d, J = 12.4 Hz, H-15), 5.36 (1H, q, J = 6.8 Hz, H-13'), 5.38 (1H, s, H-12'), 5.45 (1H, br d, J = 5.1 Hz, H-10), 5.89 (1H, dd, J = 8.5, 4.9 Hz, H-4), 5.94 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-10'), 6.02 (1H, d, J = 16.9 Hz, H-7'), 6.09 (1H, d, J = 2.4 Hz, H-2'), 6.63 (1H, dd, J = 10.3, 10.3 Hz, H-9'), 7.39 (1H, dd, J = 16.9, 10.3 Hz, H-8'), 7.4 (5H, m, Ph). (-)-MTPA ester 9: ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26) δ 0.83 (3H, s, H-14), 0.92 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-14'), 1.73 (3H, br s, H-16), 1.8-2.1 (4H, m, H-7, 8), 2.02 (3H, s, 13'-OAc), 2.20 (1H, ddd, J = 15.2, 4.9, 4.9 Hz, H-3), 2.33 (1H, m, H-4'), 2.45 (1H, dd, J = 15.2, 8.6 Hz, H-3), 2.85 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-13), 3.15 (1H, d, J = 3.9 Hz, H-13), 3.51 (3H, s, -OMe), 3.59 (1H, d, J = 5.3 Hz, H-11), 3.68 (1H, dd, J = 11.8, 3.5 Hz, H-4'), ~3.85 (2H, m, H-4', 5'), 3.85 (1H, d, J = 5.1 Hz, H-2), 3.88 (1H, d, J = 12.7 Hz, H-15), 4.53 (1H, d, J = 12.7 Hz, H-15), 5.10 (1H, q, J = 6.6 Hz, H-13'), 5.39 (1H, s, H-12'), 5.44 (1H, br d, J = 4.1 Hz, H-10), 5.89 (1H, dd, J = 8.6, 4.9 Hz, H-4), 5.93 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-10'), 6.00 (1H, d, J = 17.0 Hz, H-7'), 6.11 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2'), 6.62 (1H, dd, J = 10.7, 10.7 Hz, H-9'), 7.38 (1H, dd, J = 17.0, 10.3 Hz, H-8'), 7.4 -7.5 (5H, m, Ph).

Lethal toxicity

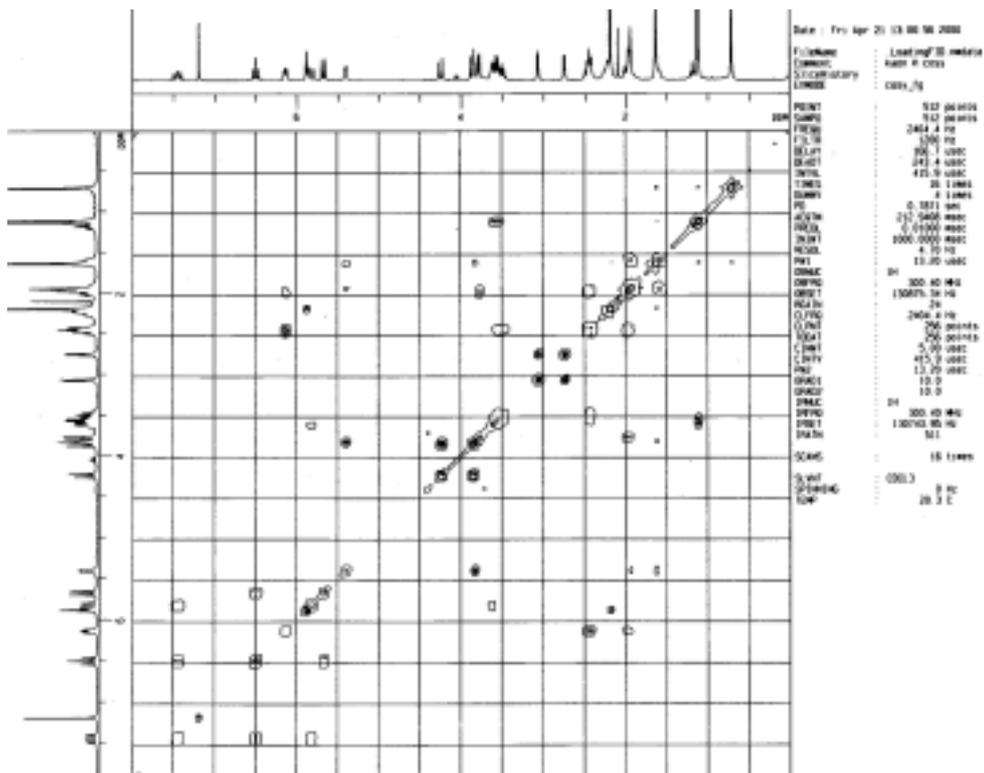
An ethanol (0.05 mL) solution of each compound (1, 3~6: each 0.5 mg) was diluted with 0.2 mL of physiological saline (0.9 wt% aqueous NaCl). This was immediately injected into abdominal cavity of female ddY strain mice, weighing 25-30 g. Lethal activity was observed one day after these injections.



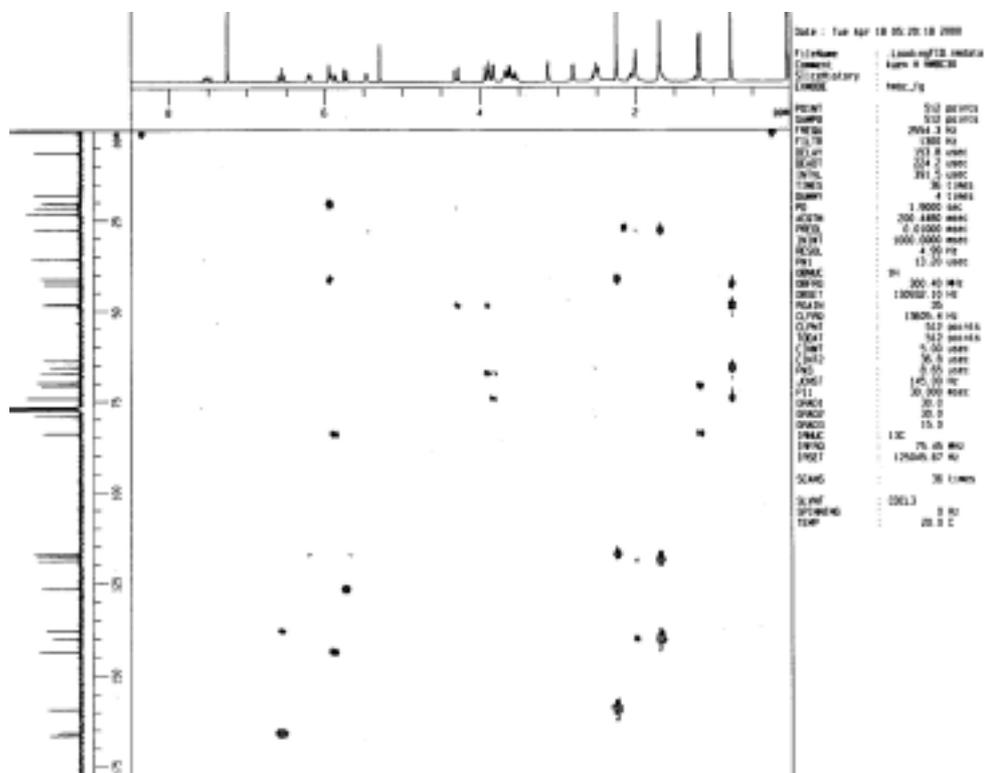
¹H NMR spectrum of roridin E (1) (300 MHz, CDCl₃)



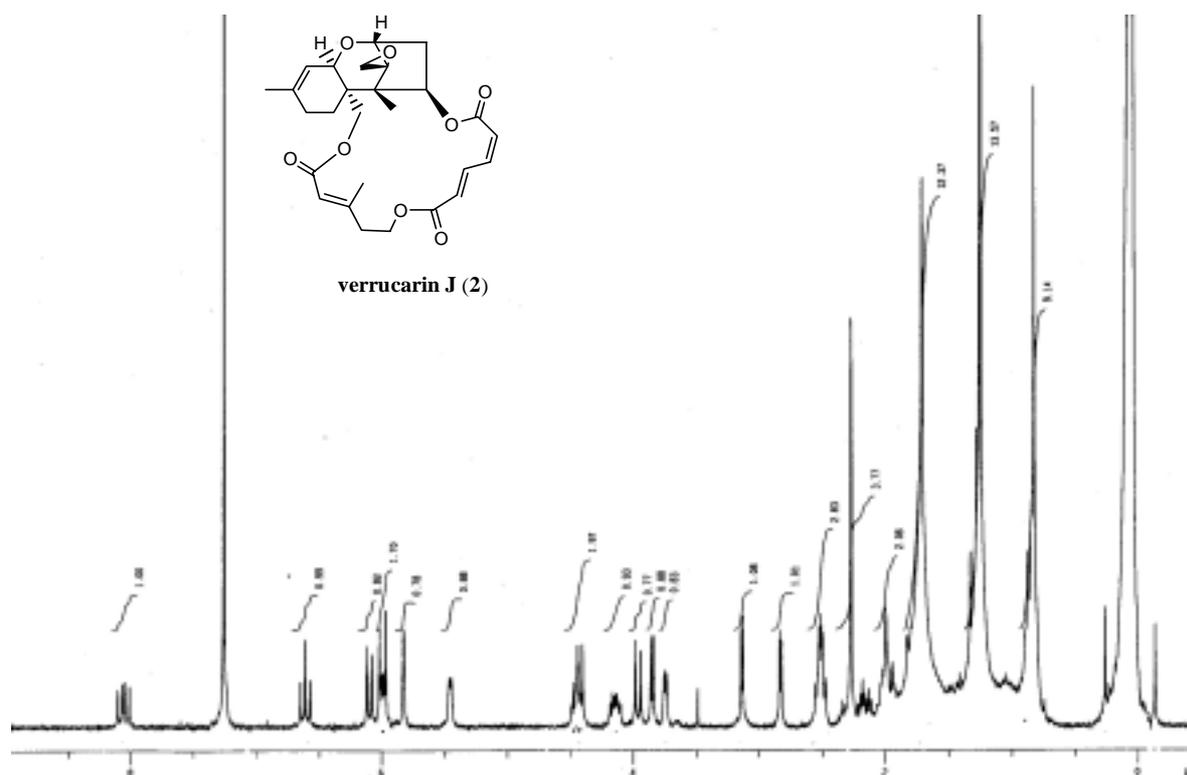
¹³C NMR spectrum of roridin E (1) (75 MHz, CDCl₃)



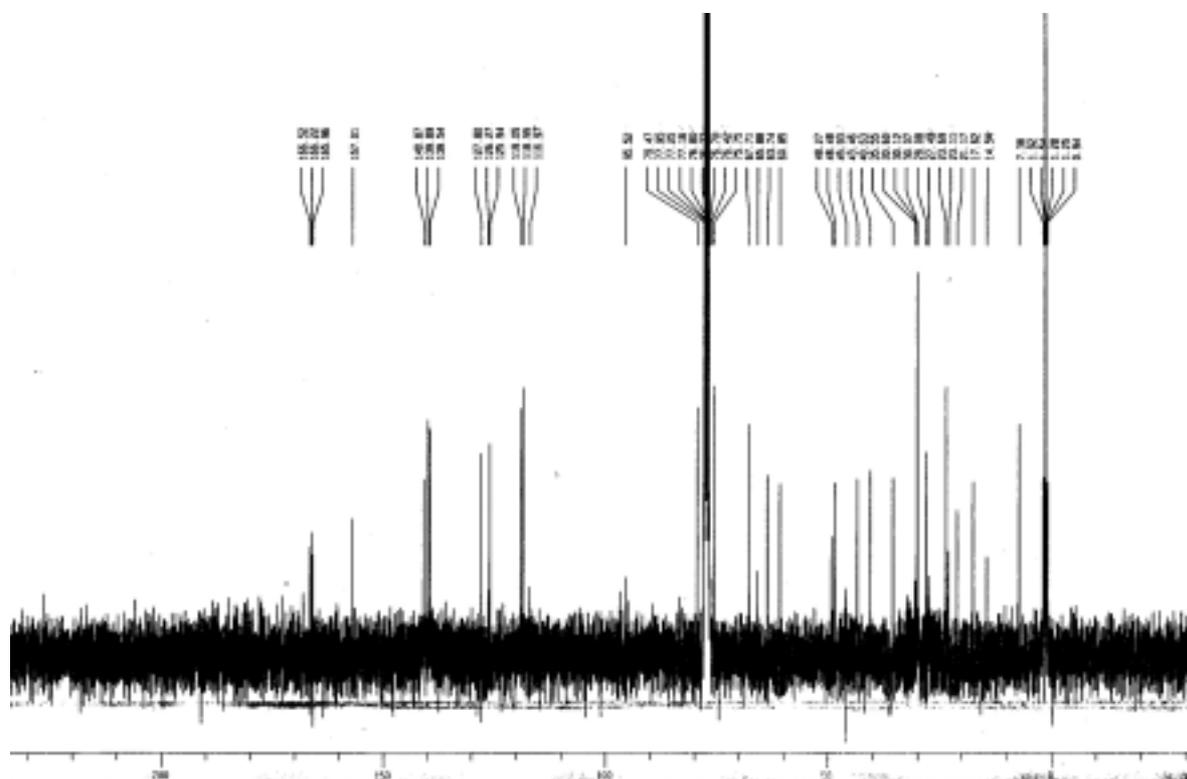
H-H COSY spectrum of roridin E (1) (CDCl₃)



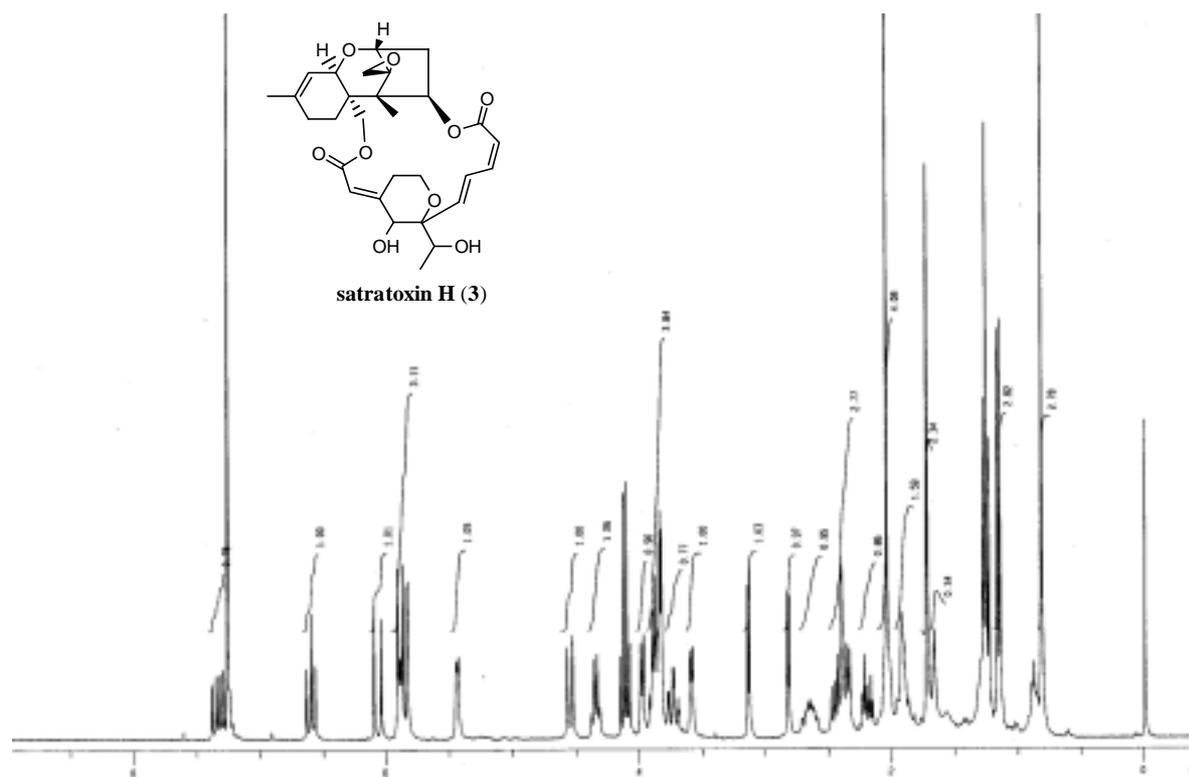
HMBC spectrum of roridin E (1) (CDCl₃)



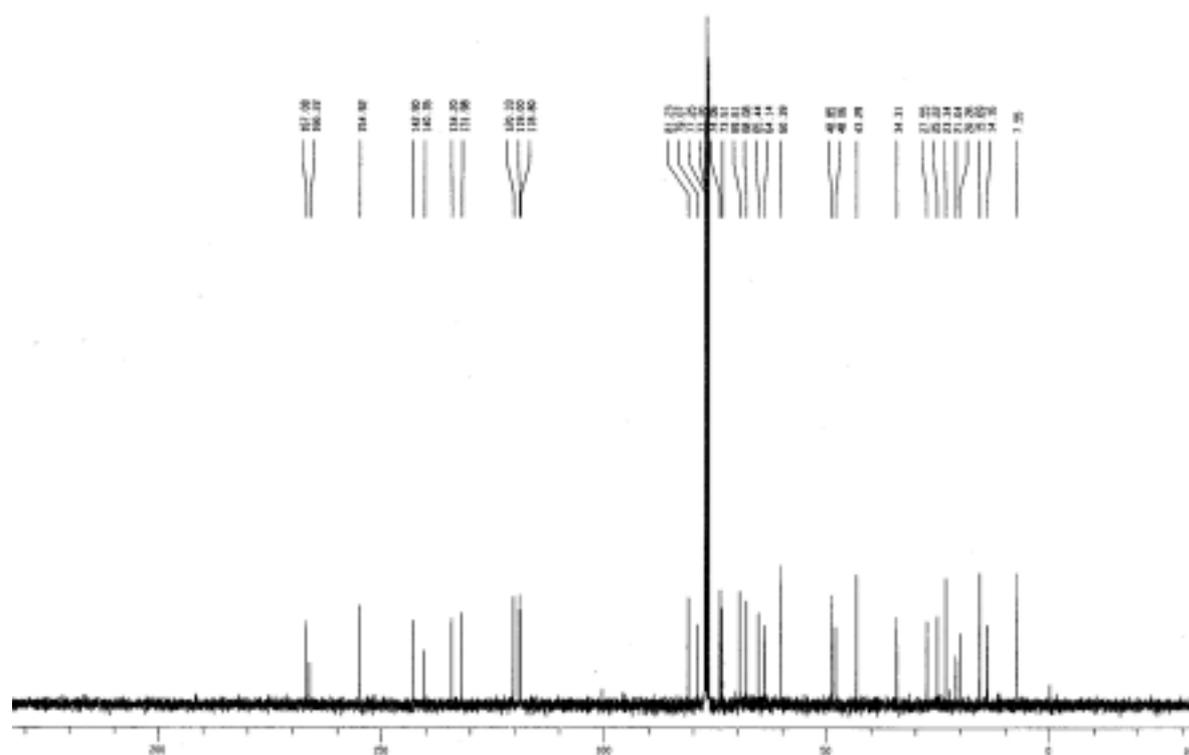
¹H NMR spectrum of verrucarin J (2) (300 MHz, CDCl₃)



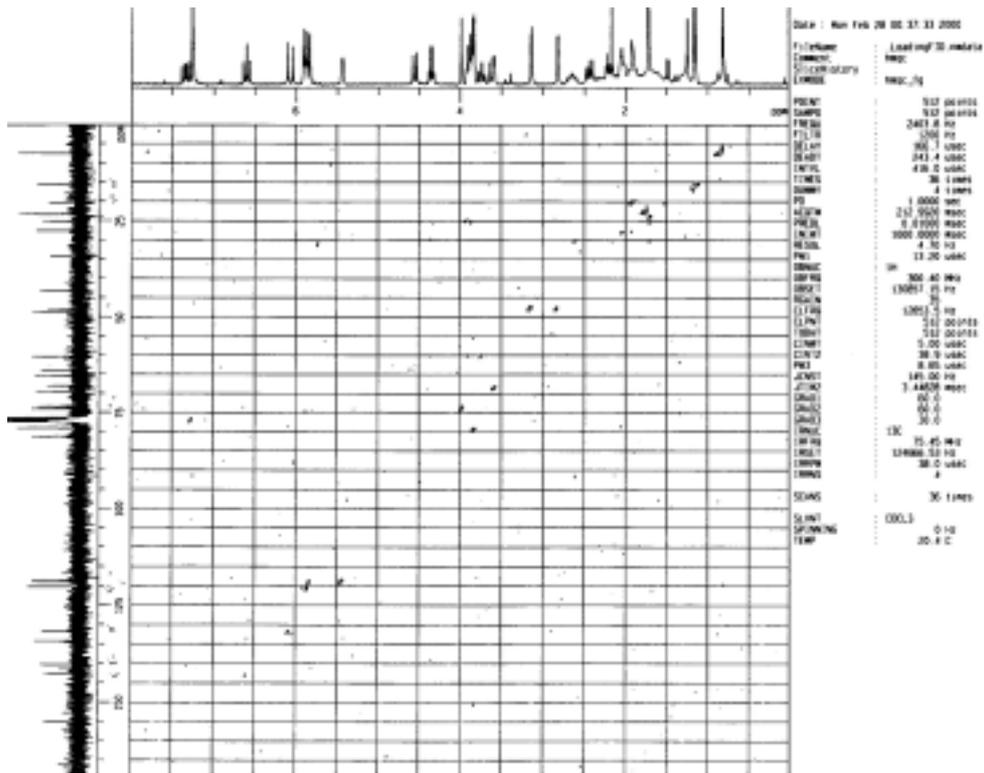
¹³C NMR spectrum of verrucarin J (2) (75 MHz, CDCl₃)



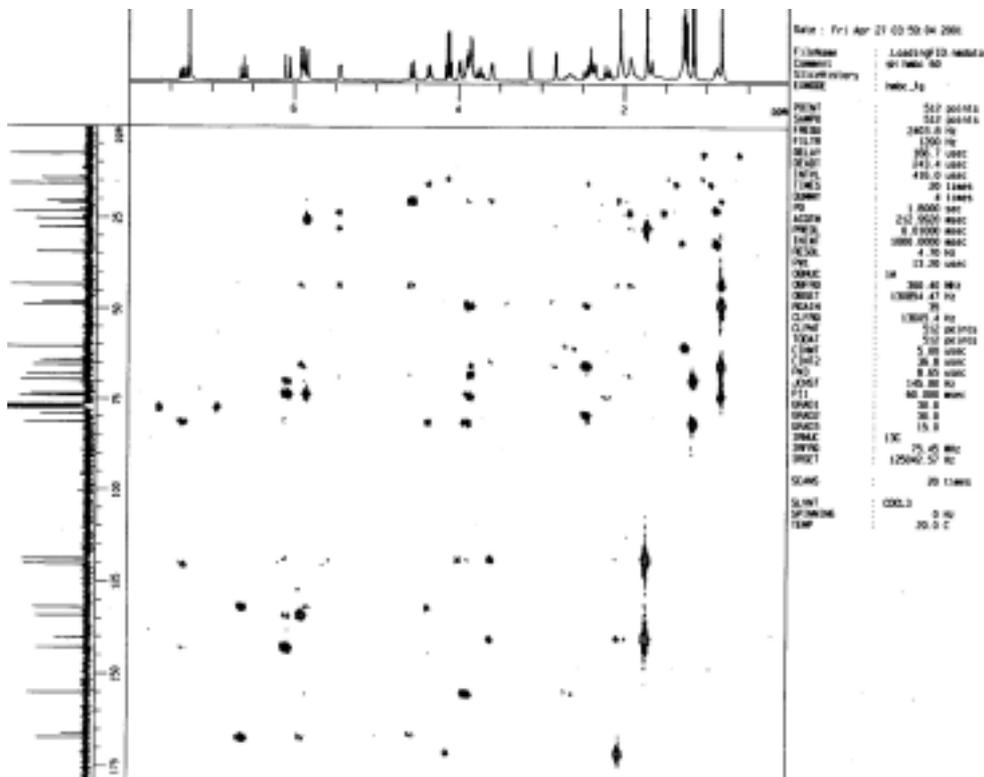
¹H NMR spectrum of satratoxin H (3) (300 MHz, CDCl₃)



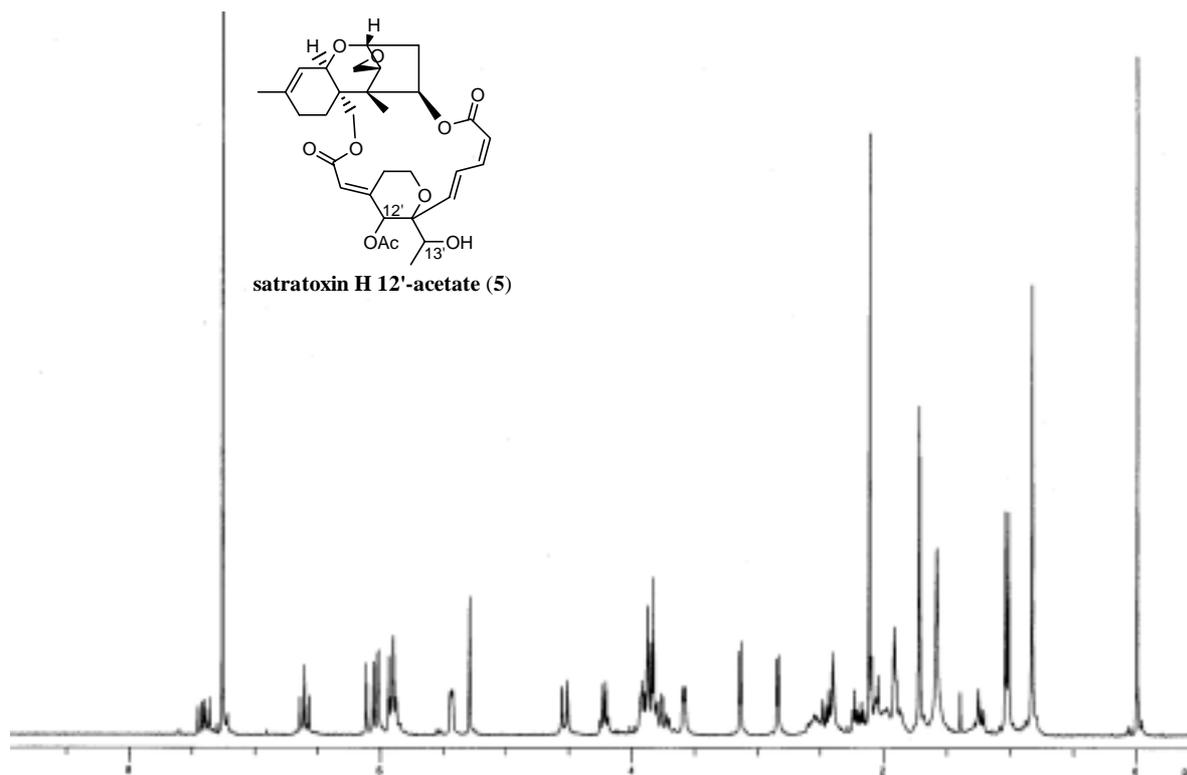
¹³C NMR spectrum of satratoxin H (3) (75 MHz, CDCl₃)



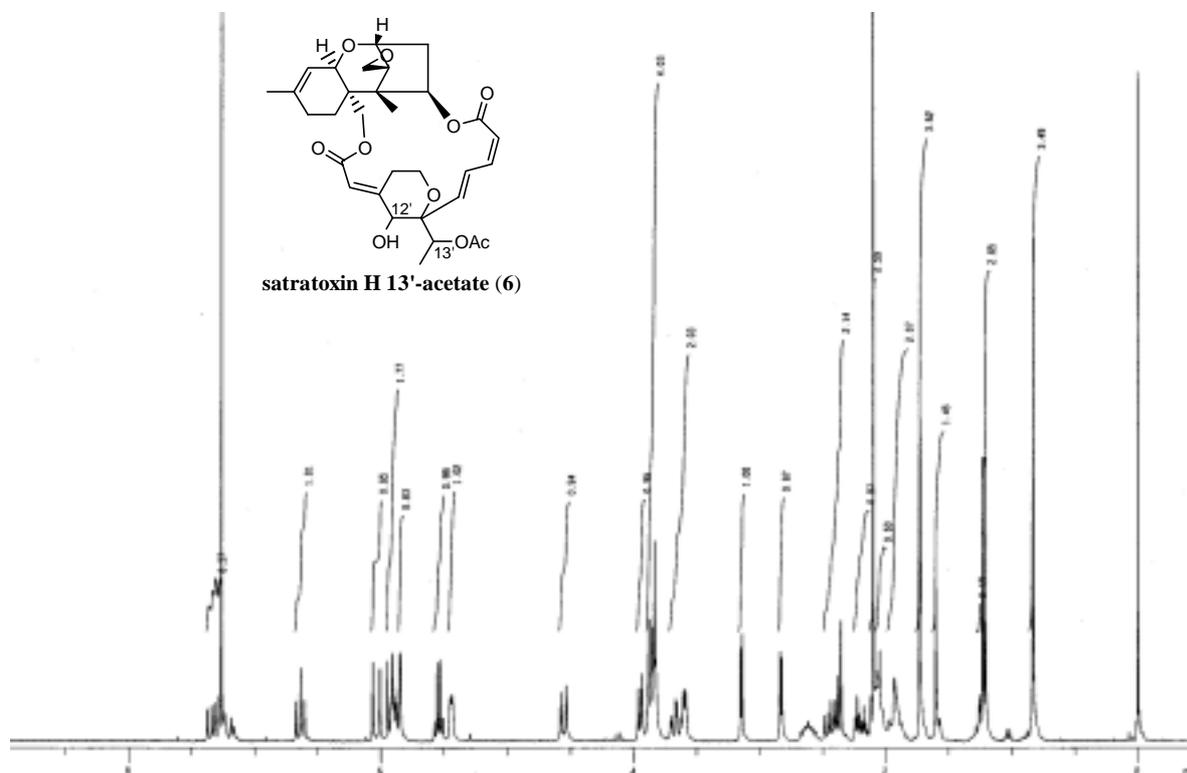
HMQC spectrum of satratoxin H (3) (CDCl₃)



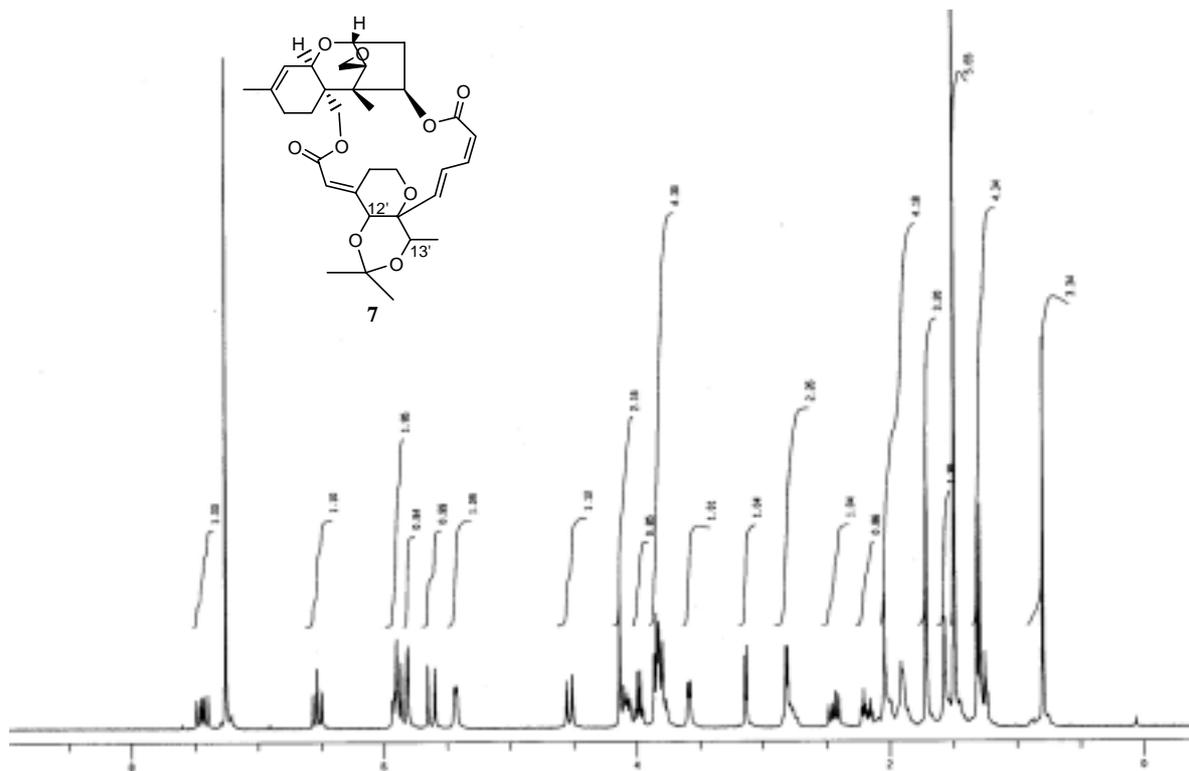
HMBC spectrum of satratoxin H (3) (CDCl₃)



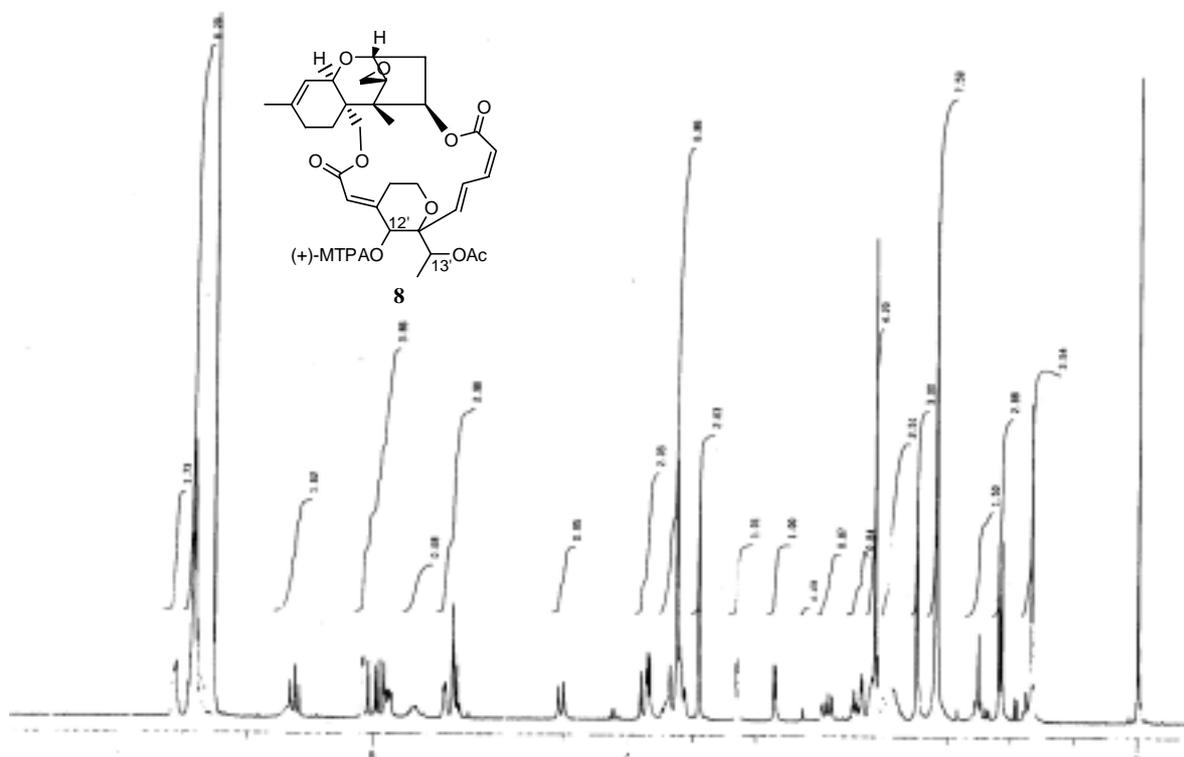
¹H NMR spectrum of satratoxin H 12'-acetate (5) (300 MHz, CDCl₃)



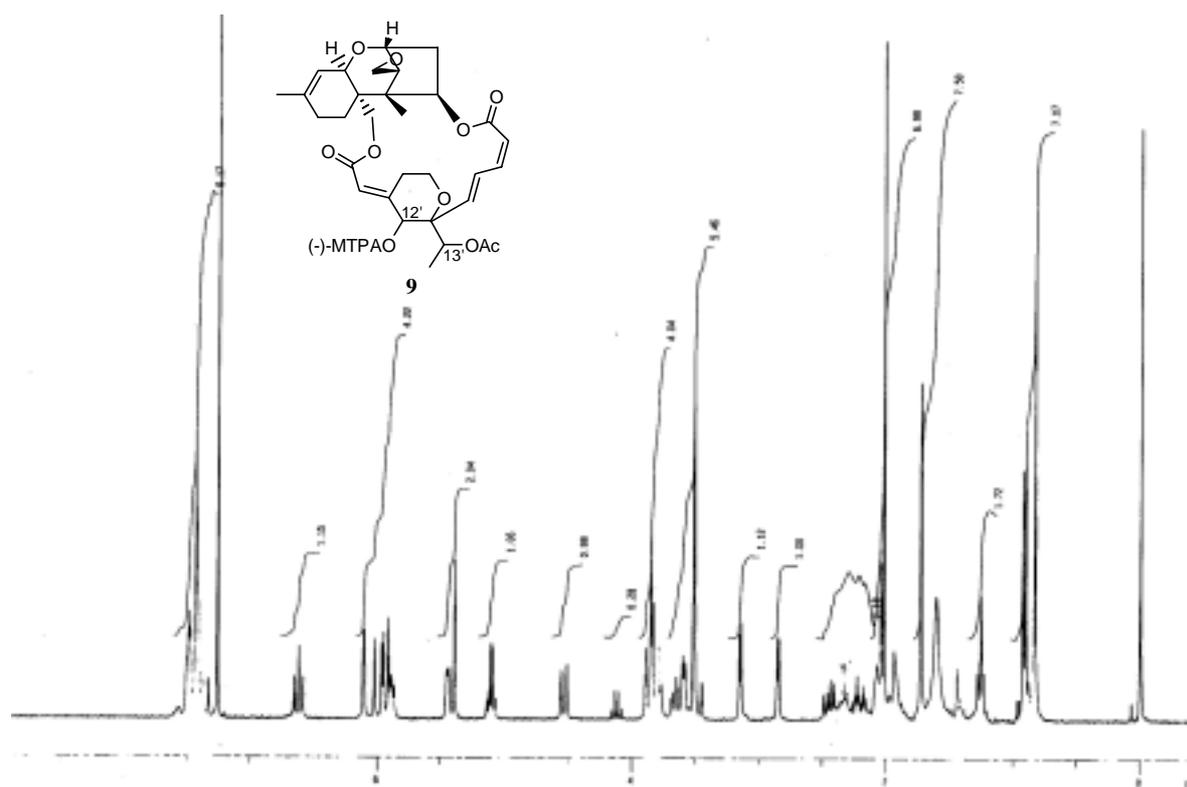
¹H NMR spectrum of satratoxin H 13'-acetate (6) (300 MHz, CDCl₃)



^1H NMR spectrum of acetonide 7 (300 MHz, CDCl_3)



^1H NMR spectrum of (+) MTPA ester 8 (300 MHz, CDCl_3)



^1H NMR spectrum of (-) MTPA ester 9 (300 MHz, CDCl_3)

第2章

Collection of fungus material

The fruiting bodies of *Chlorociboria* species and the infected wood were collected in groves of beech trees in the Tanzawa mountain range and Okutama mountain range in Japan in October 1996, May 1997, October 1997, September 1998, May 1999, October 1999.

Extraction and isolation of xylindein (10)

The chips of the infected wood (20 g) was broken into powder and extracted with 500 mL of refluxing CHCl_3 according to the procedure of Edwards and Kale.³¹ The suspension of crude extract was filtered and the residue was dried in vacuo and crystallized from 80% aqueous PhOH to give magenta–navy plates (28 mg).

Xylindein (10) • 4 PhOH: magenta-navy plates; mp > 200 °C [lit.³¹ 300 °C]; UV (5% 2,2,2-trifluoroethanol- CHCl_3) λ_{max} nm (log ϵ): 658 (4.60), 611 (4.45), 488 (3.55), 428 (4.09), 405 (4.21), 384 (4.19), 348 (4.59), 256 (4.65); IR (nujol) ν_{max} cm^{-1} : 1699, 1625, 1592, 1300, 1241, 1190, 1080, 1064, 980, 885, 842, 805; ^1H NMR ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, TMS = 0.00) δ 1.10 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5', 5"), 1.72 (4H, m, H-4', 4"), 1.98 (2H, m, H-3', 3"), 2.09 (2H, m, H-3', 3"), 3.33 (2H, dd, $J = 11.7, 17.3$ Hz, H-1', 1"), 3.91 (2H, d, $J = 17.3$ Hz, H-1', 1"), 4.91 (2H, m, H-2', 2"), 6.92 (8H, m, PhOH), 7.03 (4H, m, PhOH), 7.03 (4H, m, PhOH), 7.32 (2H, s, H-5, 11); TSI-MS m/z 569 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$; Anal. Found: C 70.63, H 4.87%, calcd for $\text{C}_{56}\text{H}_{48}\text{O}_{14}$: C 71.18, H 5.12%.

Purified 10 was obtained by washing the crystal with ethanol. 10 (free from PhOH): ^1H NMR ($\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$, TMS = 0.00) δ 1.11 (6H, t, $J = 6.9$ Hz, H-5', 5"), 1.71 (4H, m, H-4', 4"), 1.98 (2H, m, H-3', 3"), 2.09 (2H, m, H-3', 3"), 3.33 (2H, dd, $J = 11.7, 17.3$ Hz, H-1', 1"), 3.90 (1H, d, $J = 17.3$ Hz, H-1', 1"), 4.92 (2H, m, H-2', 2"), 7.32 (2H, s, H-5, 11).

X-ray crystallographic analysis of 10 • 4PhOH. Monoclinic, space group $\text{P}2_1$, $a=8.434(1)$ Å, $b = 24.027(2)$ Å, $c = 11.621(1)$ Å, $\beta = 102.222(9)$ Å, $V = 2301.7(4)$ Å³, $Z = 2$, $D_{\text{calc}} = 1.363$ g cm^{-3} . Reflection data were collected on a Rigaku AFC5R diffractometer with graphite-monochromated Cu-K α to $2\theta_{\text{max}} 120.3^\circ$; an empirical absorption correction based on azimuthal scans of several reflections was applied. A final refinement gave $R(R_w) = 0.091$ (0.115) for 1257 reflections with $I > 3\sigma(I)$.

Conversion of 10 to derivative 18

Xylindein 3,9-dimethylether (16). Xylindein (10, 500 mg) suspended in CHCl_3 (360 mL) was methylated with CH_2N_2 (1 M in Et_2O , 20 mL) according to the procedure of Edwards and Kale³¹ and the resulting crude methyl ether was subjected to silica-gel column chromatography (20% acetone- CHCl_3) to give 16 (300 mg) as a magenta amorphous solid; $R_f = 0.78$ (20% acetone- CHCl_3);

UV (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ): 570 (4.58), 525 (4.42), 488 (4.04), 455 (3.67), 405 (3.96), 382 (4.04), 339 (4.49), 259 (4.50); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3460, 2940, 2870, 1738, 1719, 1639, 1580, 1450, 1327, 1200, 1103, 1072, 1040, 978, 942, 850; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0) δ 1.04 (6H, t, J = 7.6 Hz, H-5', 5"), 1.65 (4H, m, H-4', 4"), 1.83 (2H, m, H-3', 3"), 1.94 (2H, m, H-3', 3"), 2.91 (2H, dd, J = 11.5, 16.8 Hz, H-1', 1"), 3.42 (2H, dd, J = 2.8, 16.8 Hz, H-1', 1"), 4.08 (6H, s, 3-, 9-OMe), 4.56 (2H, m, H-2', 2"), 6.48 (2H, s, H-5, 11); ¹³C NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 13.9 (C-5', 5"), 18.2 (C-4', 4"), 28.0 (C-1', 1"), 36.8 (C-3', 3"), 63.6 (3-, 9-OMe), 77.3 (C-2', 2"), 111.0 (C-5, 11), 118.0 (*), 120.0 (*), 121.0 (*), 124.8 (*), 133.2 (*), 142.4 (*), 153.6 (*), 158.0 (C-3, 9), 159.9 (2-, 8-C=O), 180.7 (C-4, 10) [* : C-1, 7 or C-2, 8 or C-3a, 9a or C-5a, 11a or C-6a, 12a or C-9b, 12b or C-12c, 12d]; EI-HR-MS m/z 598.1850 [M+2H]⁺, calcd for C₃₄H₃₀O₁₀, 598.1838.

4,10-Dihydroxylindein 3,9-dimethylether (17). A suspension of xylindein 3,9-dimethylether (16, 300 mg, 0.503 mmol) and 10% Pd-C (30 mg) in THF (80 mL) was stirred for 0.5 h under an atmospheric pressure of H₂. The mixture was rapidly filtered through Celite and the filtrate was evaporated in vacuo, giving 17 (301 mg) as an orange amorphous solid. A small portion of this was subjected to silica-gel column chromatography (12% acetone-CHCl₃) in order to obtain an analytical sample; R_f = 0.82 (20% acetone-CHCl₃); [α]_D²⁷ = -789.5 (c 0.04, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ): 442 (4.62), 415 (4.63), 322 (4.52), 259 (4.57); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3320, 2959, 2938, 2877, 1708, 1619, 1608, 1582, 1499, 1417, 1381, 1362, 1238, 1150, 1104, 1063, 1019, 962, 940, 838, 762; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 1.02 (6H, t, J = 7.0 Hz, H-5', 5"), 1.60 (4H, m, H-4', 4"), 1.73 (2H, m, H-3', 3"), 1.85 (2H, m, H-3', 3"), 2.42 (2H, dd, J = 11.2, 16.8 Hz, H-1', 1"), 2.90 (2H, dd, J = 2.5, 16.8 Hz, H-1', 1"), 4.06 (6H, s, 3-, 9-OMe), 4.39 (2H, m, H-2', 2"), 6.12 (2H, s, H-5, 11), 9.33 (2H, s, 4-, 10-OH); ¹³C NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 13.9 (C-5', 5"), 18.2 (C-4', 4"), 27.2 (C-1', 1"), 36.9 (C-3', 3"), 64.3 (3-, 9-OMe), 77.2 (C-2', 2"), 101.4 (C-5, 11), 102.6 (*), 112.3 (*), 113.5 (*), 118.5 (*), 124.3 (*), 143.6 (*), 146.8 (*), 155.2 (C-4, 10), 155.8 (C-3, 9), 162.3 (2-, 8-CO), [* : C-1, 7 or C-2, 8 or C-3a, 9a or C-5a, 11a or C-6a, 12a or C-9b, 12b or C-12c, 12d]; EI-HR-MS m/z 598.1841 [M]⁺, calcd for C₃₄H₃₀O₁₀, 598.1838.

4,10-Dihydroxylindein 4,10-Bis(bromobenzyl)-3,9-dimethylether (18). To a stirred solution of the above crude 17 (301 mg, 0.503 mmol) and 4-bromobenzyl bromide (377 mg, 0.755 mmol, 1.5 equiv.) in DMF (10 mL, degassed and filled with Ar) was added a suspension of NaH (27 mg, 0.553 mmol, 1.1 equiv.) in DMF (13 mL, degassed and filled with Ar). After 1 h the reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl and the mixture was extracted with EtOAc (10 mL \times 3). The combined extract was washed several times with H₂O, and evaporated in vacuo. The residue was subjected to silica-gel column chromatography (3% THF-benzene) to afford 18 (239 mg, 51%) as an orange amorphous solid. The resulting solid was recrystallized from hot 80% aqueous PhOH to give orange plates. 18 \cdot 4PhOH: R_f = 0.44 (5% THF-benzene); [α]_D²⁷ = -89.6 (c 0.5, CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ): 442 (4.61), 415 (4.65), 393 (4.64), 318, (4.66), 259 (4.76); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3322, 2960, 2930, 2870, 1690, 1600, 1490, 1477, 1440, 1379, 1345, 1330, 1252, 1170, 1118, 1065, 1010, 968, 950,

883, 821, 809, 757, 690; ^1H NMR (CDCl_3 , TMS = 0) δ 0.98 (6H, t, J = 7.3 Hz, H-5', 5"), 1.58 (4H, m, H-4', 4"), 1.69 (2H, m, H-3', 3"), 1.84 (2H, m, H-3', 3"), 2.47 (2H, dd, J = 11.8, 16.8 Hz, H-1', 1"), 3.00 (2H, dd, J = 1.4, 16.8 Hz, H-1', 1"), 3.74 (6H, s, 3-, 9-OMe), 4.35 (2H, m, H-2', 2"), 4.84 (4H, s, PhOH), 4.94 (2H, d, J = 11.6 Hz, BrPh- $\underline{\text{CH}_2}$ -), 5.06 (2H, d, J = 11.6 Hz, BrPh- $\underline{\text{CH}_2}$ -), 6.23 (2H, s, H-5, 11), 6.84 (8H, m, HO-C-CH- $\underline{\text{CH}}$ -), 6.93 (4H, m, HO-C-CH- $\underline{\text{CH}}$ -), 7.25 (8H, m, HO-C- $\underline{\text{CH}}$ -), 7.37 (4H, d, J = 8.4 Hz, Br-C- $\underline{\text{CH}}$ -), 7.51 (4H, d, J = 8.4 Hz, Br-C- $\underline{\text{CH}}$ -); ^{13}C NMR (CDCl_3 , TMS = 0.00) δ 13.9 (C-5', 5"), 18.2 (C-4', 4"), 27.5 (C-1', 1"), 36.9 (C-3', 3"), 63.5 (3-, 9-OMe), 70.7 (BrPh- $\underline{\text{CH}_2}$ -), 77.2 (C-2', 2"), 99.1 (C-5, 11), 103.2 (*), 115.2 (*), 115.3 (HO-C-CH- $\underline{\text{CH}}$ -), 117.2(*), 119.3 (*), 120.6 (HO-C-CH- $\underline{\text{CH}}$ -), 122.1 (Br-C-CH- $\underline{\text{C}}$ -), 125.4 (*), 129.1 (Br-C- $\underline{\text{CH}}$ -), 129.6 (HO-C- $\underline{\text{CH}}$ -), 131.7 (Br-C- $\underline{\text{CH}}$ -), 134.9 (Br- $\underline{\text{C}}$ -), 142.9 (*), 145.9 (*), 155.6 (HO- $\underline{\text{C}}$ -), 156.4 (C-4, 10), 156.8 (C-3, 9), 163.0 (2-, 8-C=O), [* : C-1, 7 or C-2, 8 or C-3a, 9a or C-5a, 11a or C-6a, 12a or C-9b, 12b or C-12c, 12d]; Anal. Found: C 65.31, H 4.65%, calcd for $\text{C}_{72}\text{H}_{64}\text{O}_{14}\text{Br}_2$: C 65.86, H 4.91%.

X-ray crystallographic analysis of $18 \cdot 4\text{PhOH}$. Monoclinic, space group $\text{P}2_1$, $a=12.677(2)$ Å, $b=11.141(4)$ Å, $c=22.048(1)$ Å, $\beta=99.117(6)$ Å, $V=3074.7(9)$ Å³, $Z=2$, $D_{\text{calc}}=1.418$ g cm⁻³. Reflection data were collected on a Rigaku AFC5R diffractometer with graphite-monochromated Cu-K α to $2\theta_{\text{max}} 120.3^\circ$; an empirical absorption correction based on azimuthal scans of several reflections was applied. A final refinement gave $R(R_w) = 0.048 (0.066)$ for 2529 reflections with $I > 3\sigma(I)$. The absolute configuration was determined by comparison of intensity of Friedel pairs which were largest 14 reflections in a value of $|F_o(h)-F_c(h)|/s(F_o)$. The sign of $F_o(h)-F_c(h)$ of all Friedel pairs were consistent with one derived from an absolute configuration of 18 (2'S, 2"S).

Extraction of red pigments from Chlorociboria species

The chips of infected wood (20 g) were extracted according to the procedure of Edwards and Kale.³¹ The suspension of crude extract was filtered and the filtrate was dried in vacuo. The residue (105 mg) was extracted with methanol (dark-green residue (75 mg) was remained) and the resulting red-brown solution was evaporated. The red-brown extract (30 mg) was chromatographed on ODS (66% acetone-H₂O) to give a mixture of three red pigments.

Extraction and isolation of 19 and 26 from crude extract of Chlorociboria species via methylation

The above residue (75 mg, after extraction with methanol) was dissolved in CHCl_3 (50 mL) and added CH_2N_2 (1 M / Et_2O , 1.5 mL). After 1 h, the solution was evaporated in vacuo and the residue was subjected to silica gel chromatography (16% acetone- CHCl_3) to give 16 (23 mg) and 17 (2.0 mg). The other red fraction was further separated on PTLC (silica-gel, 5% MeOH-benzene) to give 1'-hydroxyxylindein 3,9-dimethylether (19) (6.3 mg) as a magenta amorphous solid. While less polar fraction, collected via repeated extraction, was separated on PTLC (silica-gel, 5% MeOH-benzene) to give 4,10-dihydro-1'-hydroxyxylindein 3,4,9,10-tetramethylether (26) as a yellow amorphous solid.

19; $R_f = 0.09$ (5% MeOH-CHCl₃); ¹H NMR (20% CD₃OD-CDCl₃, TMS = 0.00) δ 0.86, 0.97 (each 3H, each t, $J = 5.9$ Hz, H-5', 5"), 1.52 (4H, m, H-4', 4"), 1.75, 1.90 (2H, m, H-3', 3"), 2.95* (1H, H-1"), 3.46 (1H, dd, $J = 2.8, 16.8$ Hz, H-1"), 4.01, 4.02 (each 3H, each s, 3-, 9-OMe), 4.48 (1H, m, H-2"), 4.76 (1H, m, H-2'), 5.20 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-1'), 6.51, 6.52 (each 1H, each s, H-5, 11)[* solvent residual peak was overlapped.]. 26; $R_f = 0.45$ (5% MeOH-CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3450, 2940, 2870, 1720, 1700, 1600, 1580, 1450, 1432, 1407, 1352, 1332, 1252, 1230, 1198, 1165, 1106, 1065, 978; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 0.92, 0.99 (each 3H, each t, $J = 7.5$ Hz, H-5', 5"), 1.2-1.8 (4H, m, H-4', 4"), 1.8 (2H, m, H-3', 3"), 1.9 (2H, m, H-3', 3"), 2.53 (1H, br, H-1"), 2.73 (1H, br, 1'-OH), 3.01 (1H, br d, $J = 15.0$ Hz, H-1"), 3.91, 3.92 (each 6H, each s, 3,4,9,10-OMe), 4.36 (1H, m, H-2"), 4.63 (1H, m, H-2'), 4.96 (1H, m, H-1'), 6.37, 6.39 (each 1H, each s, H-5, 11); EI-HR-MS m/z 643.2262 [M+H]⁺, calcd for C₃₆H₃₅O₁₁, 643.2179.

Conversion of 19 to 28

1'-Acetoxyxylindein 3,9-dimethylether (20). To a stirred solution of 19 (2.8 mg, 4.38×10^{-3} mmol) in pyridine (0.7 mL) was added acetic anhydride (0.1 mL) at room temperature. After 10 min, the reaction mixture was evaporated in vacuo and chromatographed on silica-gel (10% acetone-CHCl₃) to give 20 (2.0 mg, 69%) as a yellow amorphous solid; $R_f = 0.45$ (5% MeOH-CHCl₃); UV (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ): 563 (4.76), 525 (4.76), 488 (4.47), 456 (4.16), 403 (4.35), 381 (4.35), 349 (4.57), 318 (4.56), 258 (4.61); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2600, 1743, 1723, 1638, 1619, 1582, 1455, 1423, 1400, 1370, 1333, 1262, 1190, 1021, 948, 859, 800; ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 0.86, 0.96 (each 3H, each t, $J = 7.0$ Hz, H-5', 5"), 1.51 (4H, m, H-4', 4"), 1.75 (2H, m, H-3', 3"), 1.86 (2H, m, H-3', 3"), 2.09 (3H, s, 1'-OAc), 2.89 (1H, dd, $J = 15.4, 17.4$ Hz, H-1"), 3.41 (1H, br d, $J = 2.8, 17.4$ Hz, H-1"), 4.01, 4.06 (each 3H, each s, 3-, 9-OMe), 4.46 (1H, m, H-2"), 4.77 (1H, m, H-2'), 6.39 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-1'), 6.48, 6.50 (each 1H, each s, H-5, 11); ¹³C NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 13.6 (C-5'), 13.8 (C-5"), 18.1 (C-4'), 18.7 (C-4"), 20.9 (-OCOMe), 28.0 (C-1"), 34.3 (C-3"), 36.7 (C-3'), 63.6, 63.8 (3-, 9-OMe), 62.6 (C-1'), 77.3 (C-2"), 80.6 (C-2'), 111.1, 111.9 (C-5, 11), 118.2 (*), 119.3 (*), 119.4 (*), 120.5 (*), 121.3 (*), 124.3 (*), 123.9 (*), 125.0 (*), 126.8 (*), 133.2 (*), 142.4 (*), 142.4 (*), 153.2 (*), 153.8 (*), 157.7 (2-C=O), 158.6, 159.2 (C-3,9), 160.1 (8-C=O), 169.6 (-OCOMe), 180.6, 180.7 (C-4, 10)[*: C-1, 2, 7, 8, 3a, 5a, 6a, 9a, 11a, 12a, 9b, 12b, 12c, 12d]; EI- MS m/z 657 [M+3H]⁺, C₃₆H₃₃O₁₂.

1'-Acetoxy-4,10-dihydroxyxylindein 4,10-bis(bromobenzyl)-3,9-dimethylether (28). 1'-Acetoxyxylindein 3,9-dimethylether (20, 4.5 mg, 6.88×10^{-3} mmol) was transformed to 28 (2.2 mg, 2.31×10^{-3} mmol, 33.9%) via hydrogenation and alkylation by the similar manner as those for 18. The obtained 28 was recrystallized from toluene to give 28 · 1PhMe as yellow plates. 27 (hydrogenated product); $R_f = 0.52$ (6% THF-benzene); UV (CHCl₃) λ_{\max} nm (log ϵ): 447 (4.08), 421 (4.08), 395 (4.15), 317 (4.14), 252 (4.58); ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00) δ 0.82, 0.88 (each 3H, each t, $J = 7.0$ Hz, H-5', 5"), 1.52 (4H, m, H-4', 4"), 1.75 (4H, m, H-3', 3"), 2.06 (3H, s, 1'-OAc), 2.49 (1H, dd, $J = 14.0, 16.3$ Hz, H-1"), 3.02 (1H, br d, $J = 2.8, 16.3$ Hz, H-1"), 3.98, 4.02 (each 3H, each s, 3-, 9-OMe), 4.35 (1H, m, H-2"), 4.64

(1H, m, H-2'), 6.05 (1H, d, J=1.4 Hz, H-1'), 6.37, 6.42 (each 1H, each s, H-5, 11), 9.35 (2H, br s, -OH). 28; $R_f = 0.72$ (6% THF-benzene); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00) δ 0.86, 0.92 (each 3H, each t, J = 7.0 Hz, H-5', 5''), 1.50 (4H, m, H-4', 4''), 1.80 (4H, m, H-3', 3''), 2.07 (3H, s, 1'-OAc), 2.52 (1H, dd, J=10.6, 16.3 Hz, H-1''), 3.04 (1H, br d, J = 2.8, 16.3 Hz, H-1''), 3.68, 3.73 (each 3H, each s, 3-, 9-OMe), 4.31 (1H, m, H-2''), 4.63 (1H, m, H-2'), 5.04 (4H, s, BrPh-CH₂-), 6.09 (1H, d, J = 1.7 Hz, H-1'), 6.44, 6.50 (each 1H, each s, H-5, 11), 7.37 (4H, d, J = 9.0 Hz, Br-C-CH-), 7.50 (4H, d, J = 9.0 Hz, Br-C-CH-CH-).

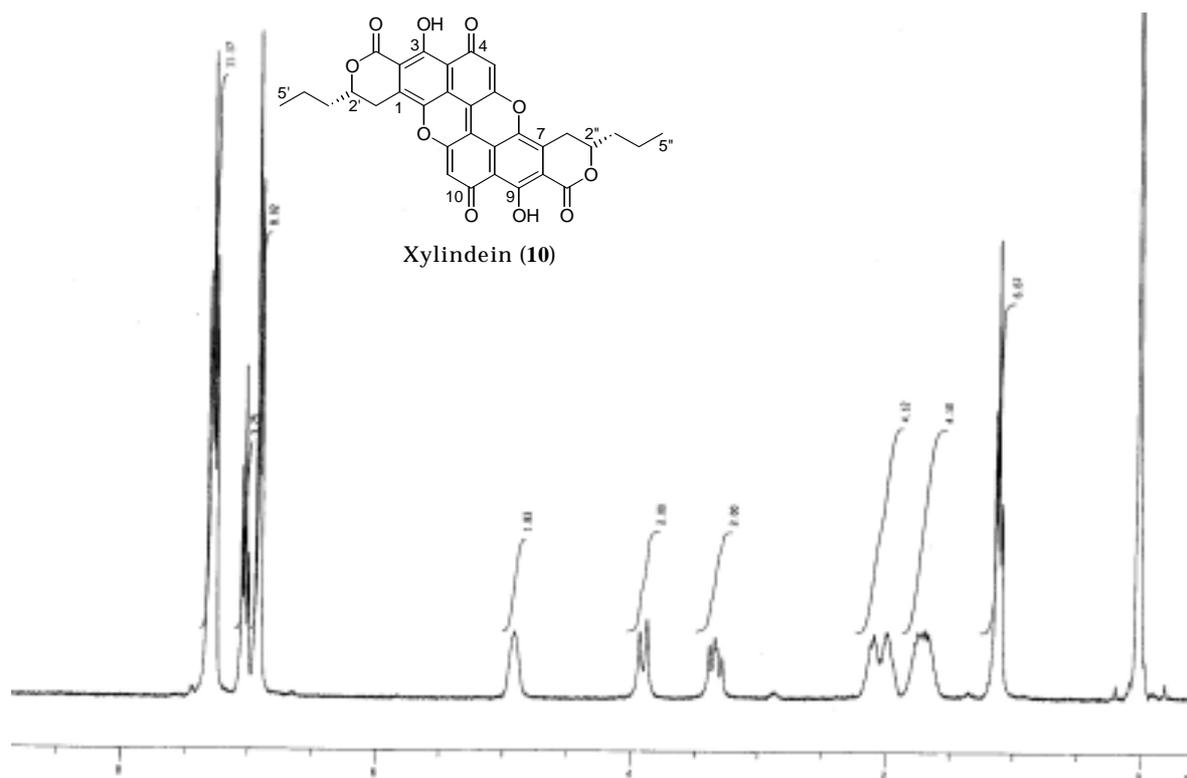
Acetylation of xylindein (10) ³⁵

A mixture of xylindein (120 mg, 2.11×10^{-4} mol), anhydrous AcONa (100 mg, 1.22 mmol), and acetic anhydride (5 mL) was refluxed for 1 h under argon atmosphere. After cooling to room temperature, to the obtained brown mixture was added saturated aqueous NH_4Cl (5 mL) and the resulting mixture was extracted with CHCl_3 (5 mL \times 3). The combined extract was washed several times with H_2O , and evaporated in vacuo. A part (35 mg) of the extract was subjected to PTLC (silica-gel, 0.5% MeOH- CHCl_3), to afford 4,10-dihydroxylindein 3,4,9,10-tetraacetate (14) (4.5 mg, yellow amorphous solid) and 1'2'-dehydro-4,10-dihydroxylindein 3,4,9,10-tetraacetate (15') (2.4 mg, orange amorphous solid). 14; $R_f = 0.58$ (0.5% MeOH- CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00) δ 0.98 (6H, t, J = 7.6 Hz, H-5', 5''), 1.66 (4H, m, H-4', 4''), 1.85 (4H, m, H-3', 3''), 2.38, 2.43 (each 6H, each s, -OAc), 2.62 (2H, dd, J = 11.6, 16.3 Hz, H-1', 1''), 3.09 (2H, dd, J = 2.7, 16.3 Hz, H-1', 1''), 4.41 (2H, m, H-2', 2''), 6.76 (2H, s, H-5, 11). 15'; $R_f = 0.71$ (0.5% MeOH- CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00) δ 0.98, 1.00 (each 3H, each t, J = 6.5 Hz, H-5', 5''), 1.50, 1.71 (each 2H, each m, H-4', 4''), 1.68, 1.84 (each 1H, each m, H-3''), 2.38, 2.39, 2.43, 2.48 (each 3H, each s, -OAc), 2.46 (2H, m, H-3'), 2.59 (1H, dd, J = 11.0, 17.0 Hz, H-1''), 3.05 (1H, dd, J = 2.4, 17.0 Hz, H-1''), 4.40 (1H, m, H-2''), 6.35 (1H, s, H-1'), 6.71, 6.78 (each 1H, each s, H-5, 11).

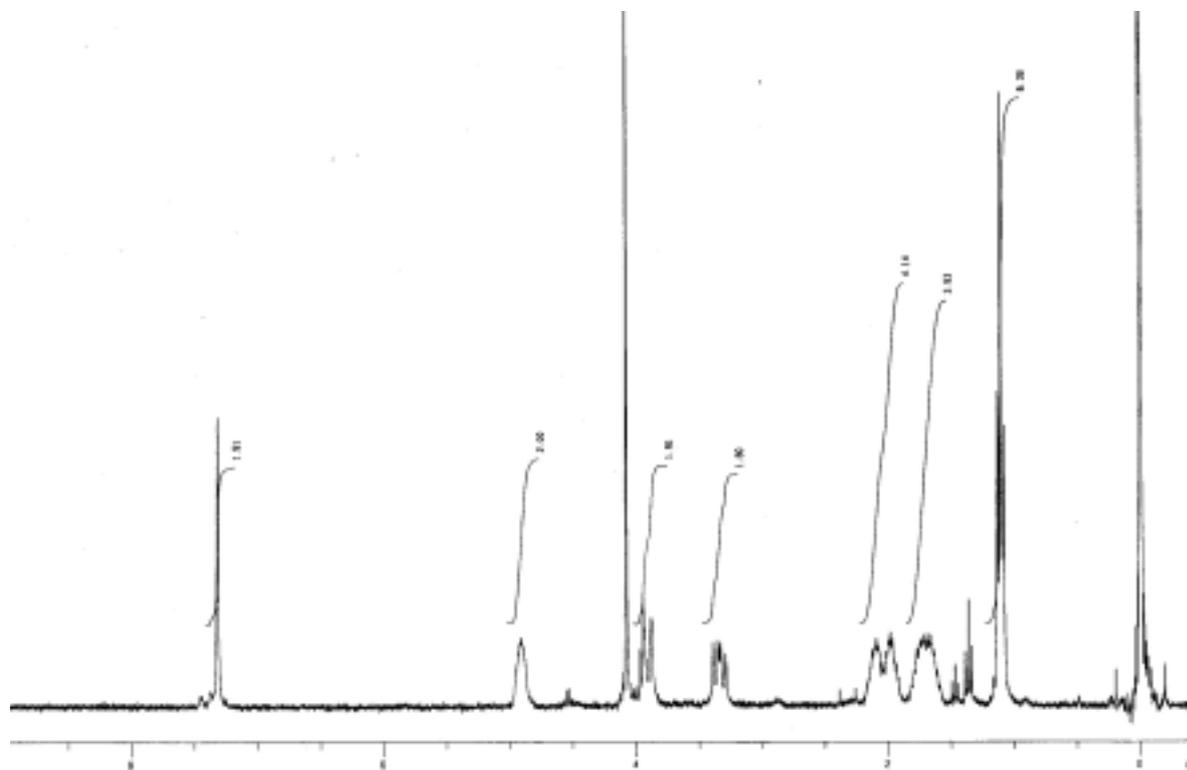
Photo-induced disproportionation of 16

A solution of dimethylxylindein (16) (4.0 mg, 6.71×10^{-3} mmol) in 50% MeOH- CHCl_3 (4.47 mL, 1.5 mM) contained in a pyrex test tube was irradiated by day light lamp (WACOM, 75 W) (interval: 70 mm) at 19 °C under argon atmosphere. After 20 min, the reaction mixture was evaporated in vacuo with shading. The molar ratio of the products, 4,10-dihydroxylindein 3,9-dimethylether (17) and xylindein 3,9-dimethylether dimer (29), against material 16 was determined by $^1\text{H NMR}$ spectrum of the crude products. This method was basically applied to other various conditions (other solvent, temperature, atmosphere, or additive). In order to obtain an analytical sample, the reaction mixture was subjected to silica gel column chromatography (5% MeOH- CHCl_3) to afford 29 as a blue amorphous solid; $R_f=0.23$ (20% acetone- CHCl_3); UV (CHCl_3) λ_{max} nm (log ϵ): 620 (4.49), 588 (4.49), 410 (4.26), 351 (4.68), 259 (4.71); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3460, 2940, 2870, 1730, 1635, 1580, 1535, 1440, 1418, 1375, 1320, 1195, 1100, 1068, 1000, 970, 935, 840; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0) δ 0.92, 0.98 (each 6H, each t, J = 6.4 Hz, H-5', 5''), 1.60 (8H, m, H-4', 4''), 1.86 (8H, m, H-3', 3''), 2.48 (2H, dd, J = 11.8, 16.8 Hz, H-1', 1''), 2.98 (2H, dd, J = 11.2, 17.0 Hz, H-1', 1''), 3.18 (2H, dd, J = 2.2, 16.8 Hz,

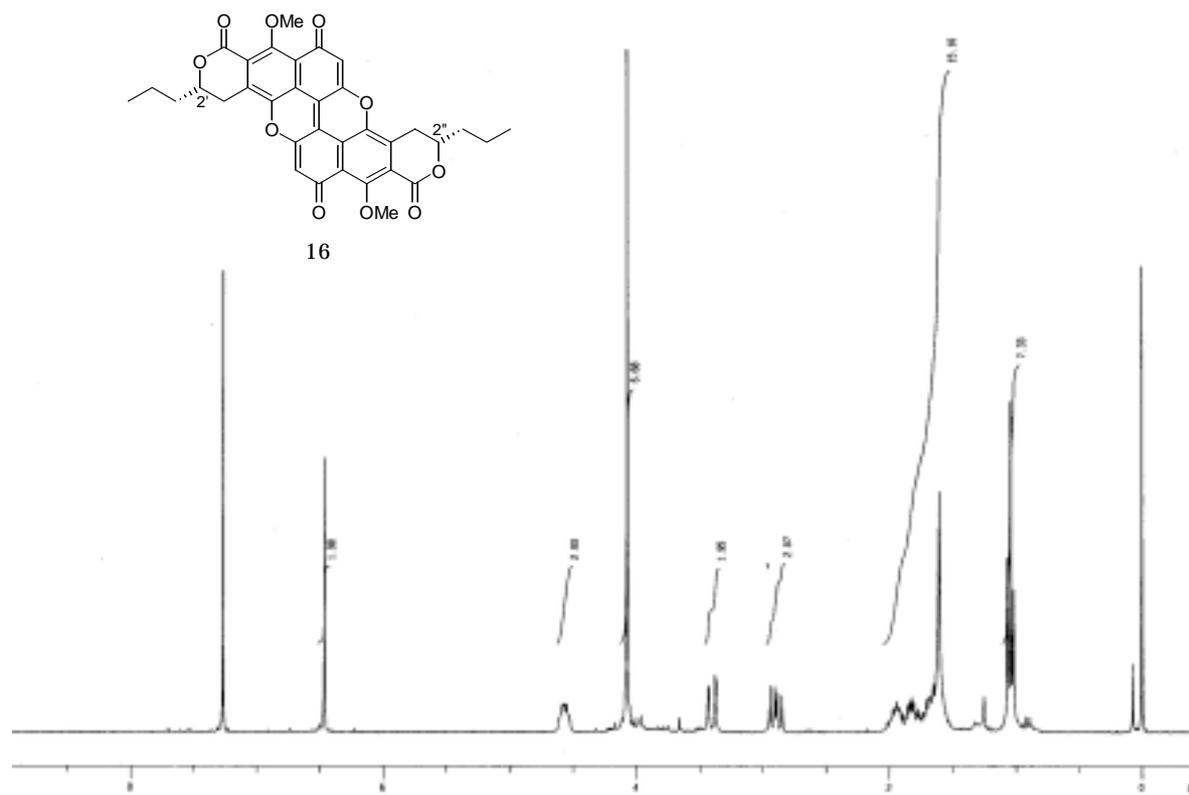
H-1' or 1"), 3.49 (2H, dd, $J = 2.8, 17.0$ Hz, H-1' or 1"), 3.95, 3.99 (each 6H, each s, 3-, 9-OMe), 4.56, 4.90 (each 2H, each m, H-2', 2"), 6.58 (2H, s, H-11); ^{13}C NMR (CDCl_3 , TMS = 0.00) δ 13.4, 13.8 (C-5' 5"), 18.1, 18.2 (C-4', 4"), 28.0, 28.1 (C-1', 1"), 36.1, 36.8 (C-3', 3"), 63.4, 63.6 (3-, 9-OMe), 77.2, 77.6 (C-2', 2"), 111.4 (C-11), 114.0 (*), 118.1 (*), 118.1 (*), 119.1 (*), 120.1 (*), 121.0 (*), 121.5 (*), 123.4 (*), 124.9 (*), 133.4 (*), 134.2 (*), 142.3 (*), 143.0 (*), 151.7 (*), 153.8 (*), 159.3, 159.4 (C-3, 9), 159.8, 160.6 (2-, 8-C=O), 177.2, 180.7 (C-4, 10)[*: C-1, 2, 5, 7, 8, 3a, 5a, 6a, 9a, 11a, 12a, 9b, 12b, 12c, 12d]; EI-MS m/z 1191 $[\text{M}+\text{H}]^+$, $\text{C}_{68}\text{H}_{55}\text{O}_{20}$, 1191; FAB-MS m/z 1195 $[\text{M}+5\text{H}]^+$, $\text{C}_{68}\text{H}_{59}\text{O}_{20}$; Anal. Found: C 67.39, H 4.83%, calcd for $\text{C}_{68}\text{H}_{54}\text{O}_{20}$: C 68.57, H 4.57%.



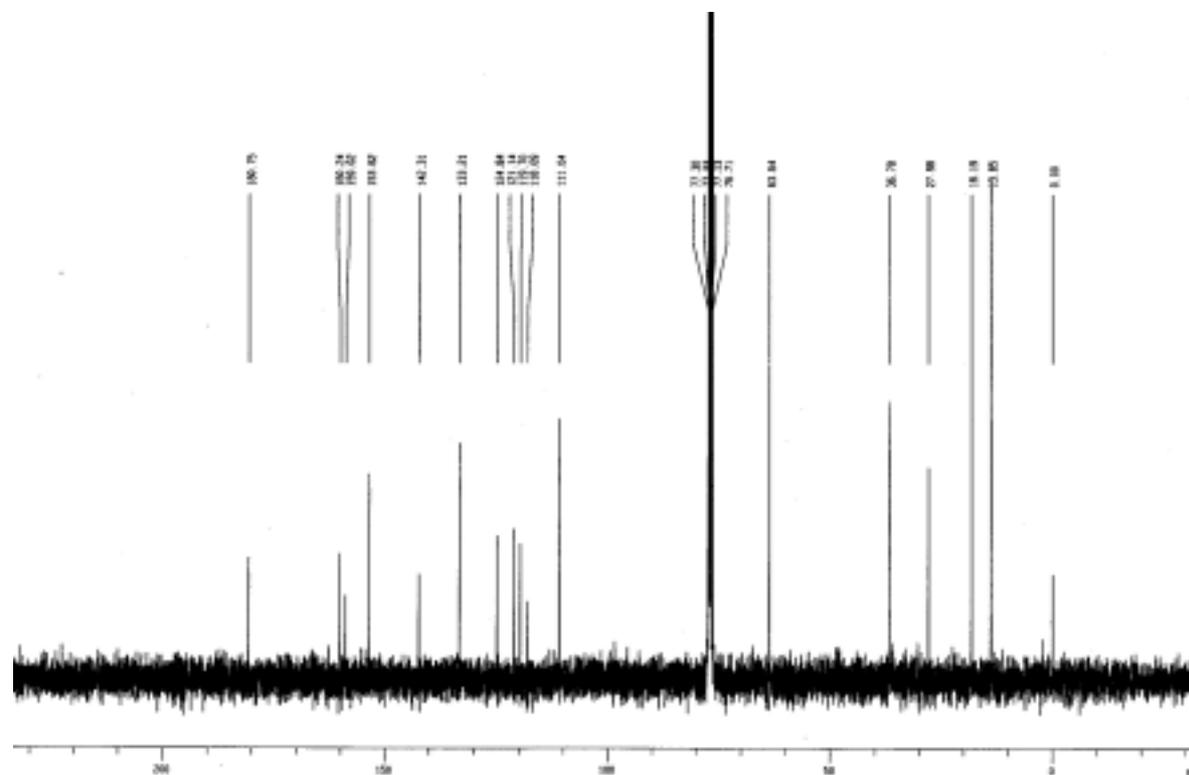
^1H NMR spectrum of xylindein (10) \cdot PhOH (300 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$)



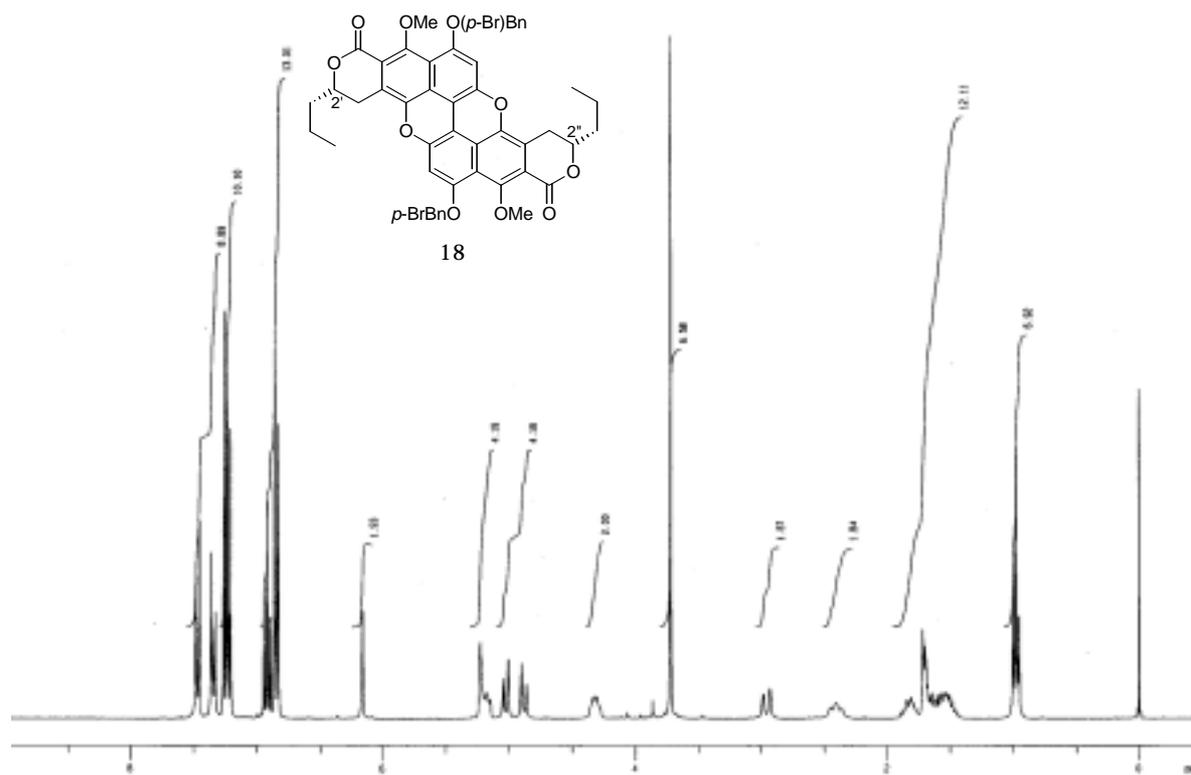
^1H NMR spectrum of xylindein (10) (300 MHz, $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{D}$)



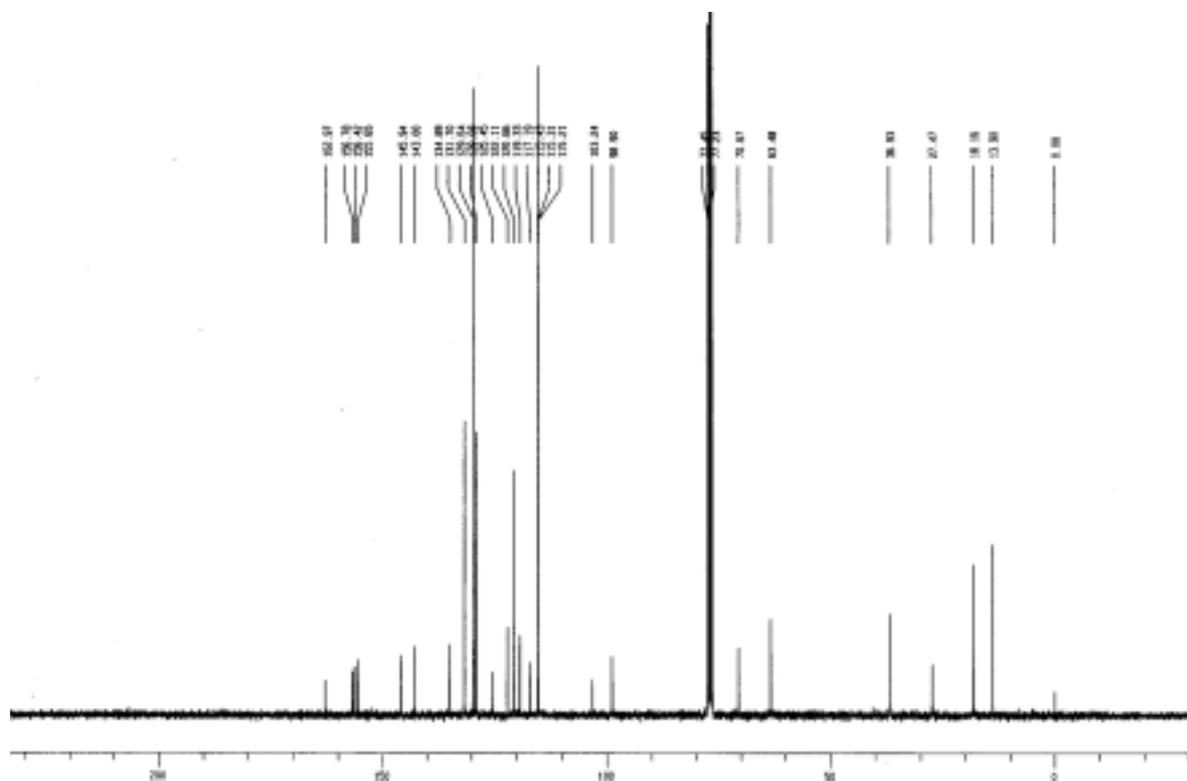
^1H NMR spectrum of 16 (300 MHz, CDCl_3)



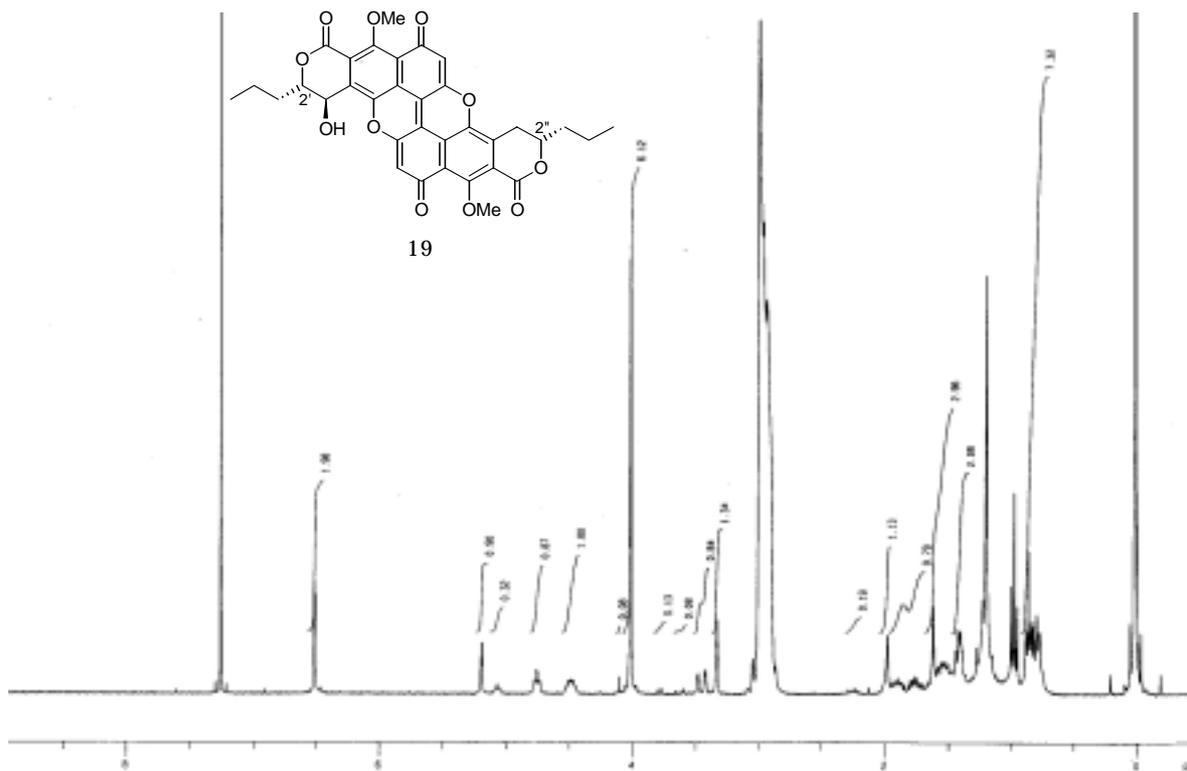
^{13}C NMR spectrum of 16 (75 MHz, CDCl_3)



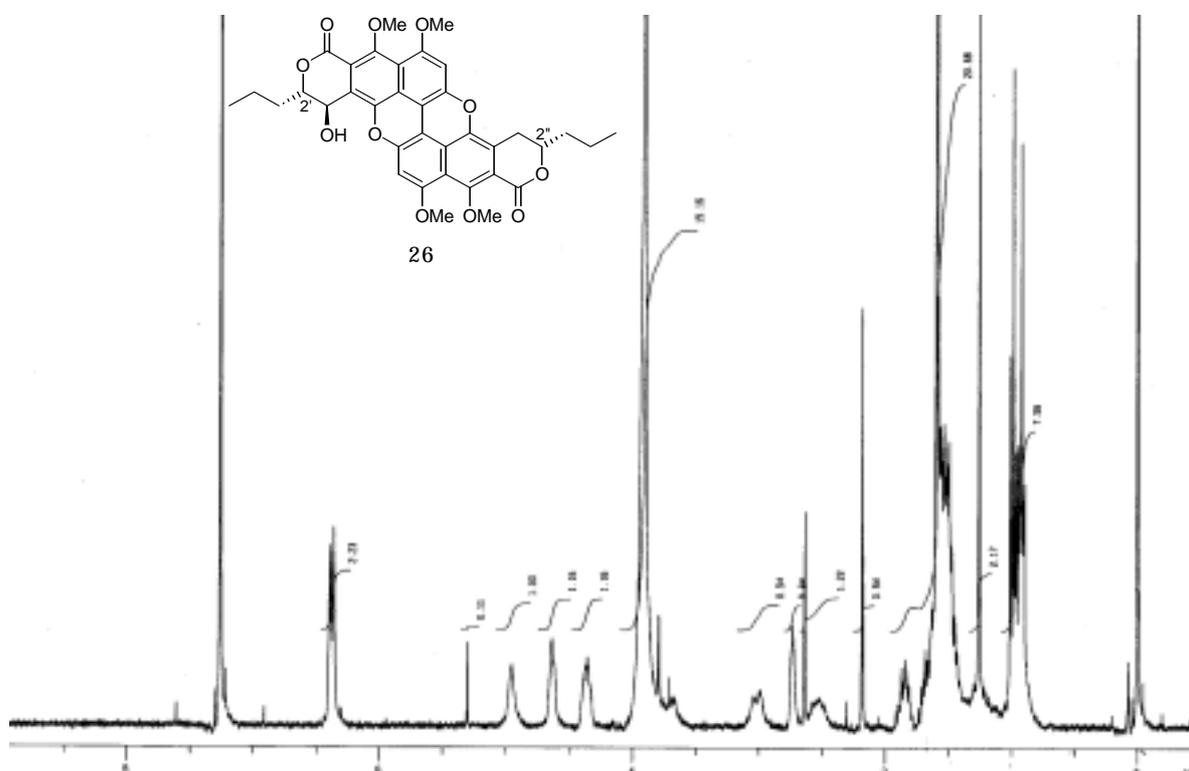
^1H NMR spectrum of 18 (300 MHz, CDCl_3)



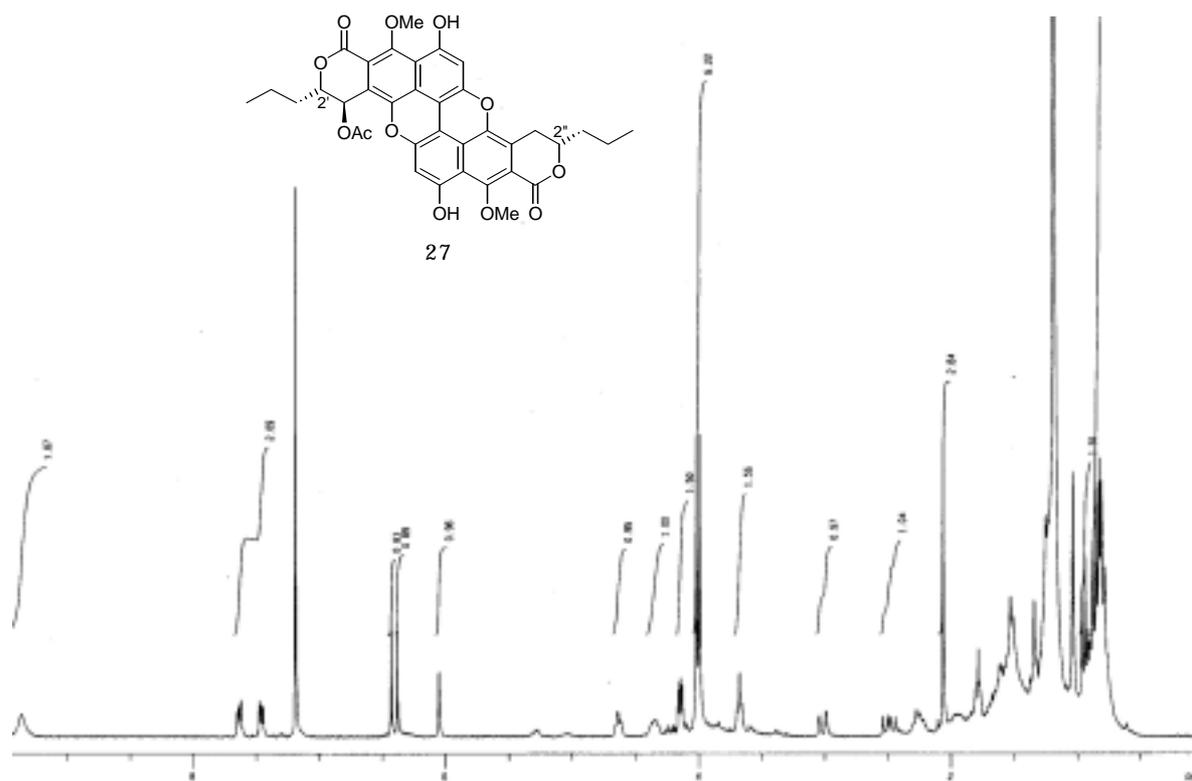
^{13}C NMR spectrum of 18 (75 MHz, CDCl_3)



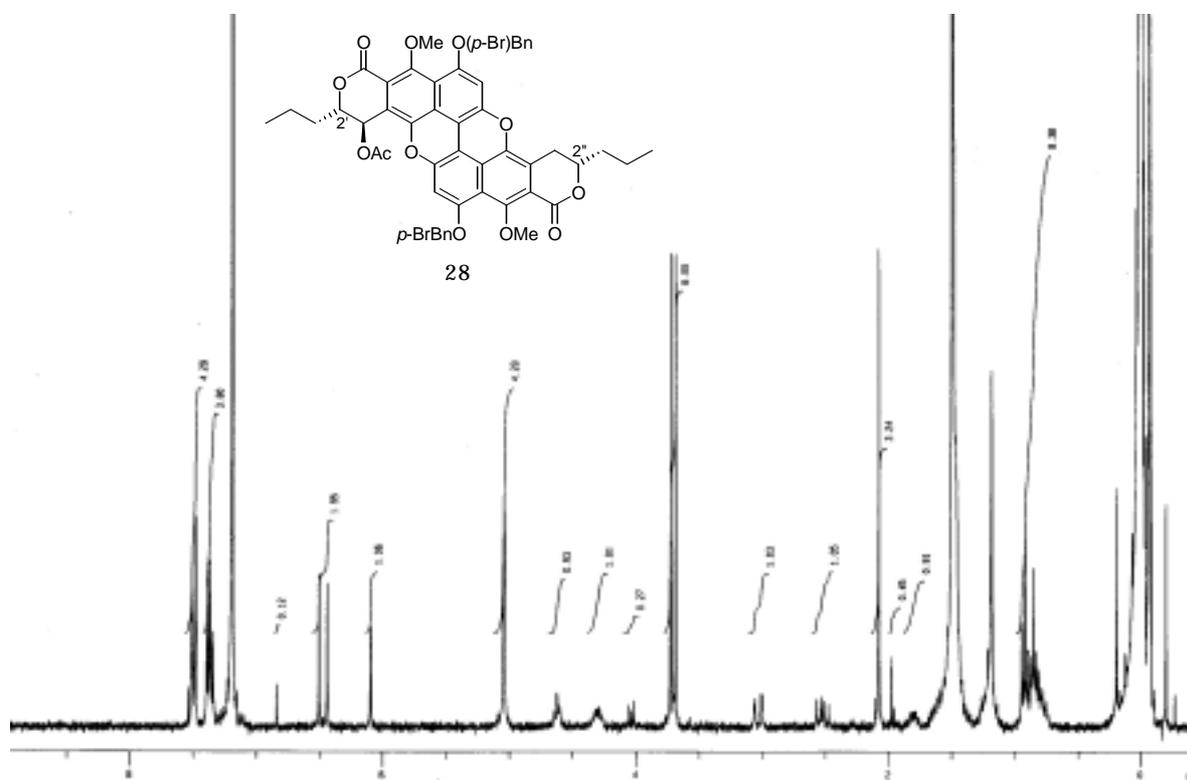
¹H NMR spectrum of 19 (300 MHz, 20% CD₃OD-CDCl₃)



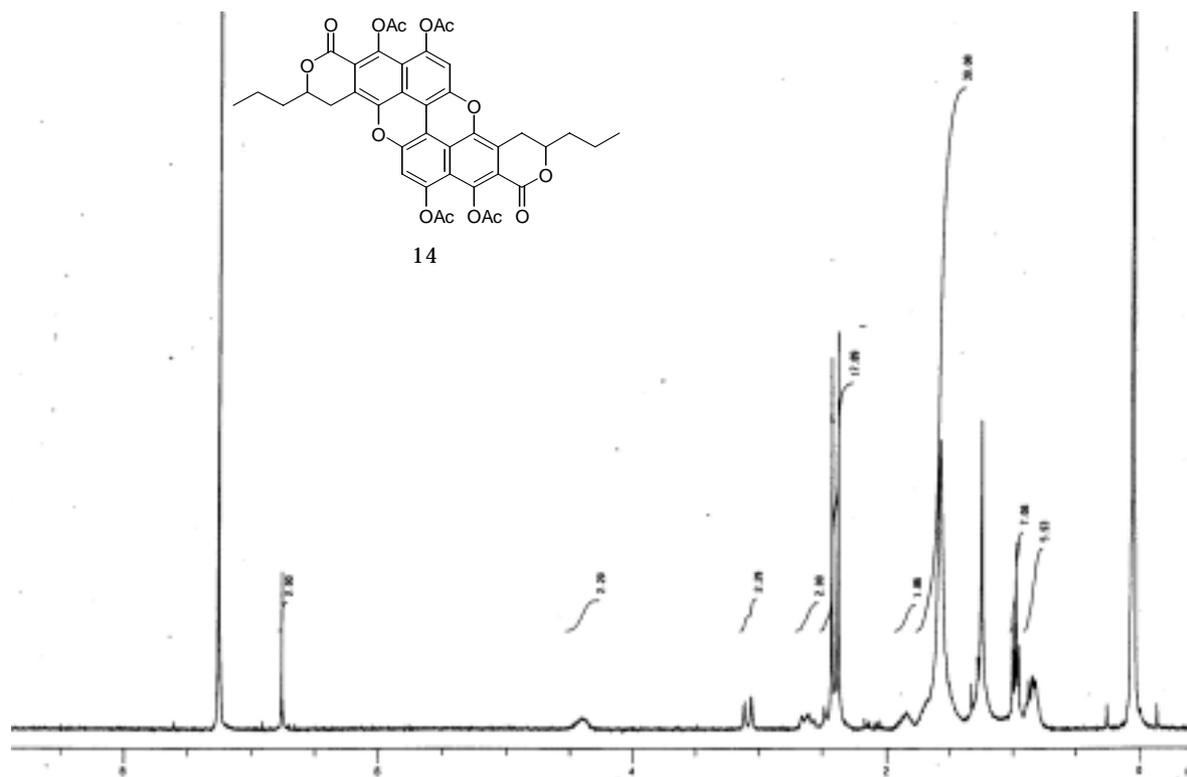
¹H NMR spectrum of 26 (300 MHz, CDCl₃)



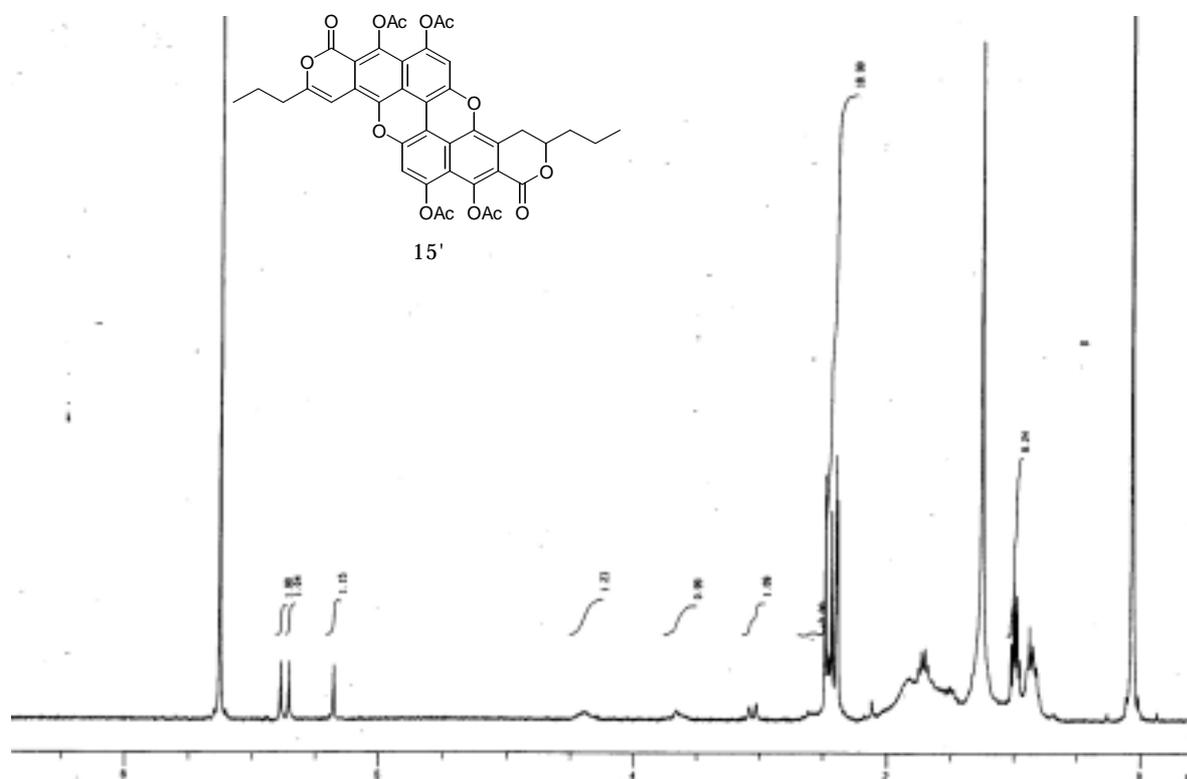
¹H NMR spectrum of 27 (300 MHz, CDCl₃)



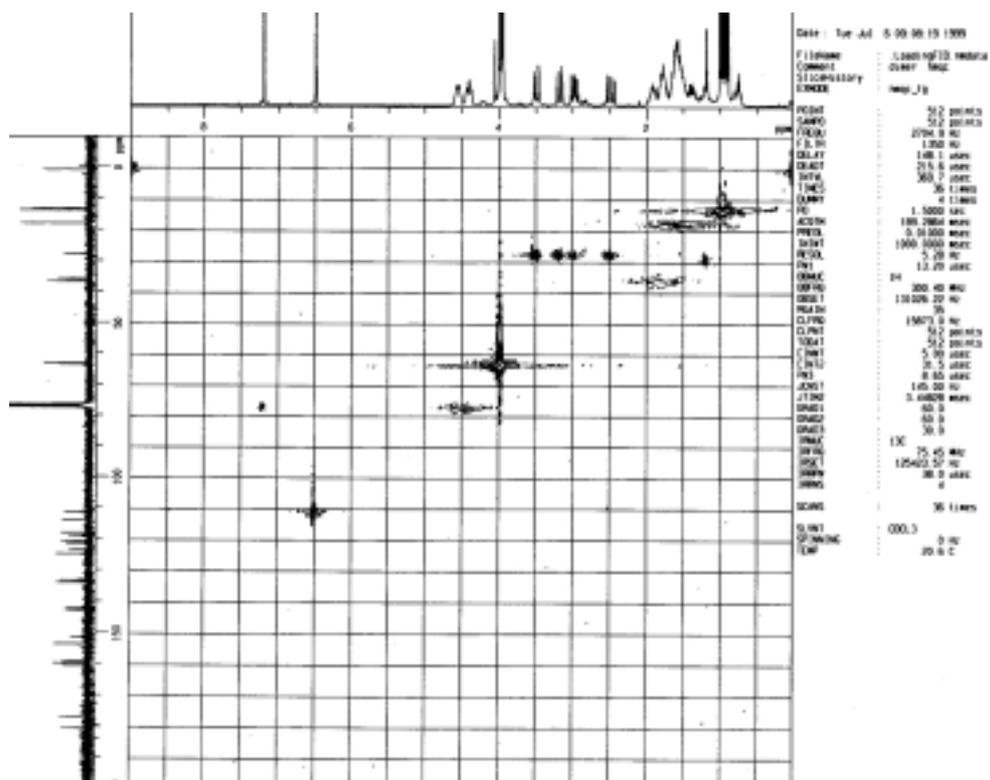
¹H NMR spectrum of 28 (300 MHz, CDCl₃)



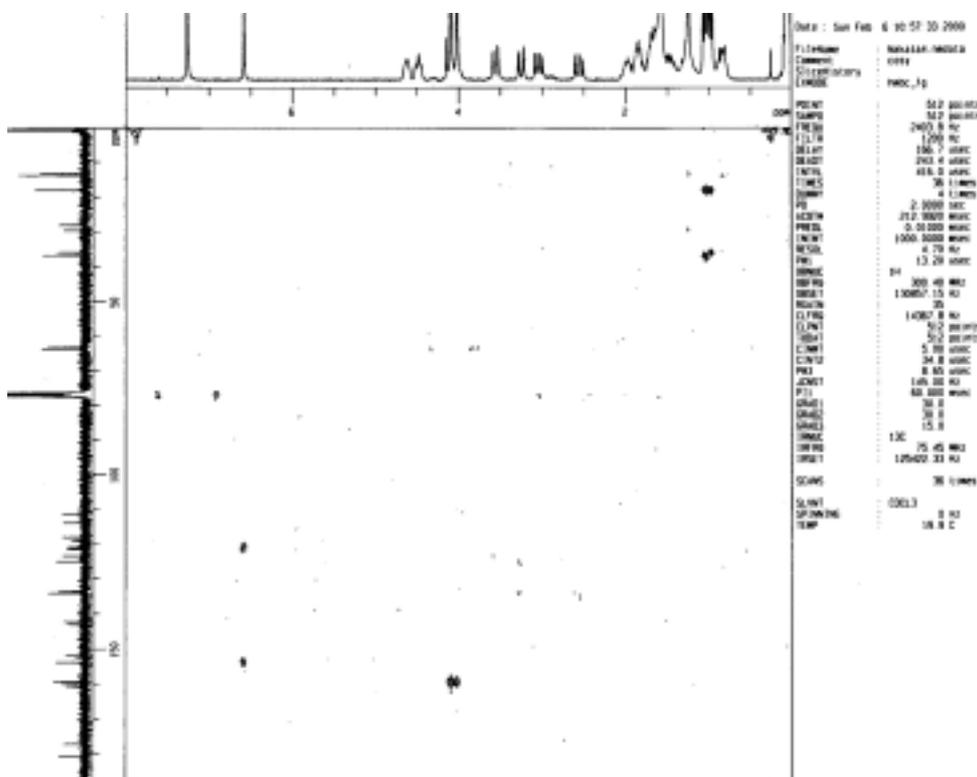
^1H NMR spectrum of 14 (300 MHz, CDCl_3)



^1H NMR spectrum of 15' (300 MHz, CDCl_3)



HMQC spectrum of 29 (CDCl₃)



HMBC spectrum of 29 (CDCl₃)

第3章

Extraction and Isolation of Hipposudoric Acid

The samples of sweat were collected by wiping a hippopotamus' face and back with 3-4 sheets of gauze once a day. The wet gauzes were immediately refrigerated using dry ice. Within one day, the gauzes were extracted with 200 ml of H₂O, and the crude solution was concentrated until 50 mL. The colored solution was applied to gel filtration on Sephadex G-15 (swelling to 120 mL) eluted with H₂O to give a red-brown solution (100 mL) and an orange solution (30 mL). The resulting red-brown solution was concentrated to 30 mL, then applied to gel filtration on Sephadex G-25 (swelling to 100 mL) to give a red solution (30 mL) and a brown solution (30 mL). To the red solution was added a powder of Sephadex G-25, and the mixture was lyophilized. The red pigment was eluted from the pigment-adsorbed gel powder with 0.2 M phosphate buffer (pH 6.1), the resulting red solution was added to a suspension of QAE Sephadex A-25 (pre-equilibrated with 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) until the color of supernatant disappeared. The colored resin was washed with the phosphate buffer (5 mL×3), and washed with the deuterated buffer (prepared with D₂O instead of H₂O) (5 mL×2), and finally added 1.7 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer (pH 6.1) to give red pigment (hipposudoric acid, 32) solution. The ¹H NMR spectrum was measured directly by using the solution, and UV spectrum was then measured by using the recovered sample diluted with 0.2 M phosphate buffer. The amount of sample was estimated by the ¹H NMR spectrum using DSS as an internal standard. The sample for measurement of LC-ESI-MS analysis was prepared as follows; the ion exchange step was performed by using 0.2 M Et₃N-HCO₂H buffer instead of phosphate buffer. The obtained pigment solution was dialyzed (MW = 10000) against H₂O. The desalted sample was purified by ODS-HPLC (50% acetonitrile-H₂O, containing 1% acetic acid, 0.4 mL min⁻¹, 530 nm detection), connected to ESI-MS, to give major peak corresponding to the pigment 32 at 2.0-2.1 min. The ESI-MS spectrum corresponding to the peak of 32 was measured. To obtain HR-MS data, the sample of 32 was prepared in the same manner as those for LC-ESI-MS and analyzed by FAB-MS.

Hipposudoric acid (32). A red buffer solution; UV (0.1 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) λ_{\max} nm (log ϵ): 530 (3.95), 411 (4.08), 270 (4.31, sh), 240 (4.72); ¹H NMR (1.7 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer, pH 6.1, DSS = 0.00) δ 3.34 (2H, s, 3-CH₂-), 6.44 (1H, s, H-2), 6.55, 6.63 (each 1H, ABq, J = 11.0 Hz, H-6, 7); FAB-HR-MS m/z 329.0299 [M+H]⁺, calcd for C₁₆H₉O₈, 329.0297; LC-ESI-MS (50% CH₃CN-H₂O, containing 1% CH₃COOH, flow rate 0.4 ml min⁻¹) m/z (retention time / min): positive 329.4 (2.10, [M+H]⁺), negative 327.5 (2.08, [M-H]⁻).

Chemical Conversion of Hipposudoric Acid (32)

After ion exchange chromatography, to 32 in 1.7 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer (5 mL, c.a.10⁻⁴

M) was added Na₂S₂O₄ until the red color disappeared (c.a. 2-3 mg) to give 34 as a dilute solution. After acidification with one drop of 6 M aqueous HCl, the mixture was extracted with EtOAc (5 mL × 3). The organic layer was collected and concentrated to 5 mL, and filtered through Celite. To the resulting filtrate was added CH₂N₂ (1 M / Et₂O, 0.3 mL), then the solution was dried in vacuo. The methylated mixture (including 35) was dissolved in 0.6 mL of CH₂Cl₂ and silylated by addition of 2,6-lutidine (0.027 mL) and TBSOTf (0.020 mL) under argon atmosphere at room temperature. After 30 min, the reaction was quenched by addition of H₂O and the mixture was extracted with CHCl₃ (3 mL × 3), washed with H₂O (0.5 mL × 2), brine (3 mL × 2), and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (30% EtOAc-hexane), followed by PTLC (SiO₂, benzene) to afford 36 (1.0 mg, collected from several rots) as a comparably stable colorless solid. The structure of the 36 was determined by X-ray crystallographic analysis by using the colorless prism recrystallized from methanol.

Hipposudoric acid derivative 34 (9-carboxymethyl-1,4,5,8-tetrahydroxyfluoren-3-ylacetic acid): R_f = 0.77 (ODS, 50% MeOH-H₂O); UV (phosphate buffer) λ_{max} nm (log ε): 316 (4.72), 275 (4.58), 221 (5.09); ¹H NMR (D₂O, solvent residual peak = 4.79) δ 3.74 (2H, s, 3-CH₂), 6.88 (1H, s, H-2), 6.95, 6.98 (each 1H, ABq, J = 4.8 Hz, H-6, 7). 35a (1,4,8-trihydroxy-5-methoxy-9-methyloxocarbonylfluoren-3-ylacetic acid methyl ester) (35a and 35b were separated partly by repeated PTLC (MeOH-H₂O); R_f = 0.64 (ODS, 66% MeOH-H₂O); ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05) δ 3.62 (6H, s, CO₂Me), 3.63 (2H, brs, 3-CH₂-), 4.07 (3H, s, 5-OMe), 4.86 (1H, s, H-9), 6.74 (1H, s, H-2), 6.82 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6 or 7), 7.05 (1H, d, J = 8.8 Hz, H-6 or 7), 7.94, 8.37 (each 1H, each s, 1-, 8-OH), 9.52 (1H, s, 4-OH). 35b (1,5,8-trihydroxy-4-methoxy-9-methyloxocarbonylfluoren-3-ylacetic acid methyl ester); R_f = 0.64 (ODS, 66% MeOH-H₂O); ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05) δ 3.63 (3H, s, CO₂Me), 3.69 (3H, s, 4-OMe), 3.76 (2H, brs, 3-CH₂-), 3.85 (3H, s, CO₂Me), 4.89 (1H, s, H-9), 6.73, 6.78 (each 1H, ABq, J = 9.0 Hz, H-6,7), 8.07, 8.65 (each 1H, each s, 1-, 8-OH), 9.08 (1H, s, 4-OH). 36 (1,8-bis(t-butyl)dimethylsiloxy)-4-hydroxy-5-methoxy-9-methyloxocarbonylfluoren-3-yl acetic acid methyl ester); A colorless prism, R_f = 0.67 (30% EtOAc-hexane); mp 127-129 °C; UV (MeOH) λ_{max} nm (log ε): 337 (3.94), 327 (3.93), 311(3.81), 276 (4.12), 267 (4.06), 215 (4.63), 207 (4.65); IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 3446, 2856, 1745, 1735, 1635, 1492, 1472, 1465, 1448, 1433, 1401, 1263, 1147, 1075, 1025, 853.4, 841.3; ¹H NMR (C₆D₆, solvent residual peak = 7.16) δ 0.227, 0.260, 0.278, 0.290 (each 3H, each s, Me of TBS), 1.12, 1.15 (each 3H, each s, Bu of TBS), 3.01 (3H, s, 5-OMe), 3.28 (3H, s, 9-CO₂Me), 3.39 (3H, s, 1'-CO₂Me), 3.70, 3.91 (each 1H, ABq, J = 15.6 Hz, H-1'), 5.04 (1H, s, H-9), 6.21 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-6), 6.57 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-7), 6.91 (1H, s, H-2), 9.83 (1H, s, 4-OH); ¹³C NMR (C₆D₆, C₆D₆ = 128.00) δ -4.046, -3.964, -3.816, -3.767 (Me of TBS), 18.56, 25.99, 26.09 (C(CH₃)₃), 36.33 (C-1'), 51.40 (C-9), 51.65 (1'-CO₂Me), 51.68 (9-CO₂Me), 56.31 (5-OMe), 112.34 (C-6), 117.99 (C-7), 122.25 (C-2), 123.38 (C-3), 128.58 (C-4a), 131.78 (C-1a,5a), 133.93 (C-8a), 144.96 (C-1), 145.49 (C-4), 146.58 (C-5), 147.73 (C-8), 169.93 (9-CO₂Me), 171.76 (1'-CO₂Me); FAB-HR-MS m/z 602.2739 [M]⁺, calcd for C₃₁H₄₆O₈Si₂, 602.2731.

X-ray crystallographic analysis of 36. Colorless prism crystals of 36 were grown from MeOH. Crystal data: $C_{31}H_{46}O_8Si_2$, $M = 602.87$, orthorhombic, space group $Pna2_1$, $a = 11.486(1) \text{ \AA}$, $b = 33.999(3) \text{ \AA}$, $c = 8.726(2) \text{ \AA}$, $V = 3407.8(9) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_{\text{calc}} = 1.175 \text{ g cm}^{-3}$. $\mu (\text{MoK}\alpha) = 0.148 \text{ mm}^{-1}$, crystal size = $0.3 \times 0.3 \times 0.05 \text{ mm}$, 4877 reflections measured, 4395 unique reflections. Refinement was based on F^2 with $R_w = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum w(F_o^2)^2]^{1/2}$, $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0.0385P)^2 + 0.4258P$, where $P = (F_o^2 + 2F_c^2) / 3$ against all the 4395 reflections. The R value $\sum w |F_o^2 - F_c^2| / \sum w F_o^2$, was 0.040 for the 2367 reflections with $I > 2\sigma(I)$. The R_w value was 0.103. The absolute structure of 36 was confirmed by Flack parameter, $x = -0.04(16)$.

Total synthesis of hipposudoric acid (32)

2,5-Dimethoxy-6-nitrobenzaldehyde (41a) and 2,5-dimethoxy-4-nitrobenzaldehyde (41b). To 50.0 mL of concd. HNO_3 ($d = 1.38$) was added in one portion 10.0 g of 2,5-dimethoxybenzaldehyde (47.4 mmol) with vigorously stirring in ice bath. As soon as homogeneous solution turned to yellow suspension, the solution was diluted with ice, and the yellow solid products were filtered and washed with water. The crude product was dried and recrystallized from CHCl_3 -hexane to obtain 6.85 g (54%) of 41a as yellow needles: $R_f = 0.23$ (50% EtOAc-hexane); mp $170\text{-}172 \text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3100, 2898, 2842, 1892, 1691, 1611, 1579, 1540, 1491, 1550, 1532, 1480, 1275, 1188, 1090, 1051, 950, 822, 805, 719, 641, 520; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00): δ 3.87 (3H, s, 5-OMe), 3.95 (3H, s, 2-OMe), 7.13 (1H, d, $J = 9.2 \text{ Hz}$, H-3), 7.29 (1H, d, $J = 9.2 \text{ Hz}$, H-4), 10.36 (1H, s, -CHO); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 56.77 (2-OMe), 57.21 (5-OMe), 114.16 (C-3), 116.15 (C-1), 120.05 (C-4), 138.6 (C-6), 144.49 (C-5), 155.30 (C-2), 186.11 (C-1); HR-EI-MS m/z 211.0480 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_5$ 211.0481; Anal. Found: C 51.09, H 4.16, N 6.74%, calcd for $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_5$: C 51.19, H 4.30, N 6.63%. 41b was recrystallized from the mother liquor: yellow needles: $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00): δ 3.95 (6H, s, 2-, 5-OMe), 7.43, 7.58 (each 1H, each s, H-3, 4), 10.40 (1H, s, -CHO).

4-Bromo-2,5-dimethoxytoluene (42). To a solution of 2,5-dimethoxytoluene (9.80 g, 64.4 mmol) in CH_2Cl_2 (93.4 mL) in shaded flask was added Br_2 (3.44 mL, 67.6 mmol). After stirring for 10 h, the reaction mixture was quenched with saturated aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, and extracted with CHCl_3 (100 mL \times 3). The combined extracts were dried over Na_2SO_4 and evaporated in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (20% EtOAc-hexane) to give 42 (14.9 g, 75%) isolated as colorless plates: $R_f = 0.73$ (25% EtOAc-hexane); mp $88\text{-}90 \text{ }^\circ\text{C}$; IR (KBr) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3002, 2958, 2840, 1500, 1462, 1438, 1384, 1372, 1216, 1181, 1053, 1038, 1007, 863, 787, 712; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 2.08 (3H, s, PhMe) 3.68 (3H, s, 2-OMe), 3.74 (3H, s, 5-OMe), 6.64 (1H, s, H-6), 6.99 (1H, s, H-3); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 16.43 (PhMe), 57.08, 56.20 (3-, 6-OMe), 108.15 (C-1), 115.53, 115.35 (C-3, 6), 126.96 (C-4), 149.83 (C-2), 152.31 (C-5); HR-EI-MS m/z 229.9929 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2\text{Br}$ 229.9942; Anal. Found: C 46.78, H 4.74%, calcd for $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2\text{Br}$: C 46.78; H 4.80%.

2,5-Dimethoxy-4-methylphenyl 3,6-dimethoxy-2-nitrophenyl methanone (43). tert- Butyllithium

(1.62 M /pentane, 0.28 mL, 0.45 mmol) was added dropwise over 5 min to the stirred solution of 42 (69.3 mg, 0.30 mmol) in THF (4.0 mL) at $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$. After stirring for 15 min, a solution of aldehyde 41a (50.6 mg, 0.24 mmol) in THF (2.0 mL) was added and the mixture was allowed to warm to room temperature. To the reaction mixture was added water (4.0 mL) and the new mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were dried over Na_2SO_4 and condensed in vacuo. To the solution of the residual pale yellow solids in CH_2Cl_2 (2.0 mL) was added the mixture of PCC (104 mg, 0.48 mmol) and AcONa (8.0 mg). The mixture was stirred at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 h. The reaction mixture was directly separated on silica-gel column chromatography (EtOAc) to give 43 (80.4 mg, 97%) as pale yellow plates after recrystallization from hexane-chloroform: $R_f = 0.37$ (50% EtOAc-hexane); mp $164\text{-}168\text{ }^{\circ}\text{C}$; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}\text{ cm}^{-1}$: 2946, 2841, 1640, 1608, 1522, 1501, 1486, 1465, 1430, 1401, 1357, 1288, 1262, 1217, 1070, 1058, 1039, 1003, 959, 812, 713; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 2.25 (3H, s, 4'-Me) 3.51, 3.71, 3.84, 3.90 (each 3H, each s, 3,6,2', 5'-OMe), 6.71 (1H, s, H-3'), 7.02, 7.04 (each 1H, ABq, $J = 9.8\text{ Hz}$, H-4, 5), 7.40 (1H, s, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 17.16, 55.92, 56.75, 57.14, 57.41, 110.99, 113.80, 114.24, 115.38, 115.81, 123.91, 129.74, 136.03, 145.96, 152.18, 150.24, 154.72, 188.78; HR-EI-MS m/z 361.1153 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_7$ 361.1161; Anal. Found: C 59.50, H 5.35, N 3.81%, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_7$: C 59.83, H 5.30, N 3.88%.

2-Amino-3,6-dimethoxyphenyl 2,5-dimethoxy-4-methylphenyl methanone (40). A solution of ketone 43 (4.40 g, 12.2 mmol) and iron powder (2.43 g, 43.5 mmol) in 90% aqueous AcOH (117 mL) was refluxed for 1 h. After removal of the solvent in vacuo, the residue was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with water (30 mL \times 3), dried over Na_2SO_4 and concentrated. The crude product was purified on silica-gel column chromatography (EtOAc) to give 40 (3.48 g, 86%) as yellow plates after recrystallization from hexane- CHCl_3 : $R_f = 0.67$ (50% EtOAc-hexane); mp $129\text{-}132\text{ }^{\circ}\text{C}$; IR (KBr) $\nu_{\text{max}}\text{ cm}^{-1}$: 3477, 3378, 3000, 2939, 2838, 1630, 1610, 1561, 1480, 1458, 1438, 1398, 1267, 1213, 1162, 1116, 1092, 1042, 873, 810, 791, 719, 636; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 2.24 (3H, s, 4'-Me), 3.41, 3.63, 3.77, 3.84 (each 3H, each s, 3, 6, 2', 5'-OMe), 5.67 (2H, brs, $-\text{NH}_2$), 6.03 (1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$, H-5), 6.70 (1H, s, H-3'), 6.74 (1H, d, $J = 8.8\text{ Hz}$, H-4), 6.92 (1H, s, H-6'); $^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 16.8, 55.89, 56.07, 56.27, 56.94, 97.21, 111.08, 112.82, 113.88, 115.13, 130.59, 130.65, 140.29, 141.91, 151.63, 151.79, 154.72, 1196.17; HR-EI-MS m/z 331.1418 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$ 331.1420; Anal. Found: C 64.96, H 6.35, N 4.11%, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_5$: C 64.90, H 6.28, N 4.32%.

1,4,5,8-Tetramethoxy-3-methylfluoren-9-one (39). To a solution of amine 40 (3.48 g, 10.5 mmol) in AcOH (450 mL) in shaded flask, isoamyl nitrite (2.83 mL, 21.0 mmol) was added at once with rapid stirring at room temperature. The deep red reaction mixture was stirred for 0.5 h, and then hydroquinone (1.40 g, 12.6 mmol) in acetone (30 mL) was added dropwise. N_2 gas evolved, and the reaction mixture became clear yellow. The reaction was stirred additionally for 1 h, and the solvent was removed in vacuo. The yellow residue was dissolved in EtOAc (100 mL), washed with saturated aqueous NaHCO_3 (50 mL \times 3), washed with brine (50 mL \times 2), and filtered through Celite, and the solvent was again removed in vacuo. The product was purified on silica-gel column

chromatography (50% EtOAc-CHCl₃) to give 39 (2.61 g, 79%) as yellow solids. For further analytical samples, recrystallization from hexane-CHCl₃ afforded orange needles: *R_f* = 0.35 (EtOAc); m.p. 198-203 °C; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2939, 2838, 1698, 1588, 1578, 1490, 1480, 1467, 1438, 1268, 1239, 1222, 1178, 1052, 1038, 982, 962, 811; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 2.35 (3H, s, 3-Me) 3.70 (3H, s, 4-OMe), 3.92 (9H, s, 1, 5, 8-OMe), 6.69 (1H, s, H-2), 6.86 (1H, d, *J* = 9.00 Hz, H-7), 7.06 (1H, d, *J* = 9.00 Hz, H-6); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 17.71 (3-Me), 56.43, 56.74, 57.48 (1,5,8-OMe), 62.22 (4-OMe), 115.60 (C-7), 116.21 (C-2), 120.11 (C-1a), 121.54 (C-6), 122.68 (C-8a), 130.49 (C-5a), 135.11, 142.53 (C-3,4a), 148.07 (C-4), 149.14 (C-5), 153.08 (C-8), 154.75 (C-1), 189.27 (C-9); HR-EI-MS *m/z* 314.1162 [M]⁺, calcd for C₁₈H₁₈O₅ 314.1154; Anal. Found: C 68.49, H 5.72%, calcd for C₁₈H₁₈O₅: C 68.78, H 5.77%.

1,4,5,8-Tetramethoxy-3-methylfluorene (38). A mixture of fluorenone 39 (740 mg, 2.35 mmol), triethylsilane (1.21 mL, 5.88 mmol) and TFA (8.4 mL) was stirred at room temperature. After 15 min, the reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL) and extracted with CHCl₃ (10 mL × 3). The combined organic layers were washed with small portion of H₂O (3 mL × 3), and dried in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (50% EtOAc-hexane) to give 38 (602 mg, 82%) as a colorless powder: *R_f* = 0.72 (50% EtOAc-hexane); ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00): δ 2.41 (3H, s, 3-Me) 3.73 (2H, br s, H-9), 3.74, 3.88, 3.89, 3.95 (each 3H, each s, -OMe), 6.70 (1H, s, H-2), 6.82, 6.90 (each 1H, ABq, *J* = 8.7 Hz, H-6, 7).

1,4,5,8-Tetramethoxy-3-methylfluorene-9-carboxylic acid methyl ester (46). *n*-Butyllithium (1.5 M /hexane, 0.084 mL, 0.13 mmol) was added dropwise to the stirred solution of 38 (10.0 mg, 0.033 mmol) and TMEDA (0.02 mL, 0.13 mmol) in benzene (0.50 mL) at 0 °C. A yellow metal salt was precipitated within 1 h. To the yellow suspension was added methyl chloroformate (0.015 mL, 0.20 mmol) and the mixture was allowed to warm to room temperature. the reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (1 mL) and extracted with EtOAc (1 mL × 3). The combined organic layers were dried in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (50% EtOAc-hexane) to give 46 (6.7 mg, 56%) as a white powder: *R_f* = 0.43 (50% EtOAc-hexane); ¹H NMR (CDCl₃, TMS = 0.00): δ 2.39 (3H, s, 3-Me) 3.67, 3.74, 3.84, 3.84, 3.94 (each 3H, each s, -OMe), 4.75 (1H, s, H-9), 6.70 (1H, s, H-2), 6.82, 6.94 (each 1H, ABq, *J* = 9.3 Hz, H-6, 7).

3-Bromomethyl-1,4,5,8-tetramethoxyfluoren-9-one (44). fluorenone 39 (2.61 g, 8.30 mmol) suspended in benzene (160 mL) was warm to 70 °C. To the hot solution, N-bromosuccimide (1.47 g, 8.30 mmol) and benzoyl peroxide (163 mg, 0.50 mmol) was added and refluxed for 13 h. The reaction mixture was evaporated, extracted with CHCl₃ (70 ml), washed with saturated aqueous Na₂S₂O₃ (50 mL × 3). After removal solvent, crude product was separated on silica-gel column chromatography (50% EtOAc-CHCl₃) to give the benzyl bromide 44 (3.01 g, 92%). For further analytical samples, recrystallization from hexane-CHCl₃ afforded yellow plates: *R_f* = 0.45 (EtOAc); mp 211-214 °C; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2940, 2840, 1698, 1582, 1570, 1499, 1480, 1273, 1218, 1181, 1050,

1028, 978, 962, 910, 810; ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 3.83 (3H, s, -OMe), 3.93 (6H, s, -OMe), 3.95 (3H, s, -OMe), 4.58 (2H, s, 3- CH_2), 6.88 (1H, d, $J = 9.00$ Hz, H-7), 6.91 (1H, s, H-2), 7.08 (1H, d, $J = 9.00$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 28.05, 56.55, 56.70, 57.33, 63.43, 115.91, 116.46, 121.72, 122.18, 122.42, 129.91, 135.97, 140.94, 147.75, 149.05, 153.17, 154.67, 188.91; HR-EI-MS m/z 392.0272 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{Br}$ 392.0259; Anal. Found: C 54.88, H 4.49%, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_5\text{Br}$: C 54.98, H 4.36%.

3-Bromomethyl-1,4,5,8-tetramethoxyfluorene (45). A mixture of 44 (25.0 mg, 6.37×10^{-2} mmol), triethylsilane (0.05 mL, 0.32 mmol), and TFA (0.6 mL) was stirred at 0 °C. After 15 min, the reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 (3 mL) and extracted with CHCl_3 (3 mL \times 3). The combined organic layers were washed with small portion of H_2O (1 mL \times 3), and dried in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (30% EtOAc-hexane) to give 45 (19.1 mg, 79%) as a colorless amorphous solid: mp 131-133 °C; $R_f = 0.54$ (30% EtOAc-hexane); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2959, 2938, 2837, 1590, 1508, 1484, 1459, 1268, 1219, 1083, 1061, 1040, 802; ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 3.75 (2H, br s, H-9), 3.88, 3.89, 3.91, 3.95 (each 3H, each s, -OMe), 4.76 (2H, s, 3- CH_2), 6.84, 6.90 (each 1H, ABq, $J = 8.8$ Hz, H-6, 7), 6.88 (1H, s, H-2); ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 29.93, 32.50, 55.78, 55.91, 56.88, 63.19, 109.94, 111.13, 111.52, 129.91, 131.44, 133.53, 134.52, 135.10, 149.64, 150.41, 152.12; HR-EI-MS m/z 378.0459 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{Br}$ 378.0466; Anal. Found: C 58.58, H 5.17%, calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{Br}$: C 57.01, H 5.05%.

9-Cyano-1,4,5,8-tetramethoxy-9-trimethylsilyloxyfluorene-3-ylacetonitrile (47). To a stirred suspension of benzyl bromide 44 (60.2 mg, 0.153 mmol) and TBAF (0.241 mmol, 1.6 equiv) in THF (0.241 mL) was added slowly trimethylsilylnitrile (0.361 mL, 2.71 mmol) at 20 °C. The yellow suspension turned to clear colorless solution. After 15 min, reaction mixture was diluted with cold CHCl_3 (5 mL), washed with cold water (3 mL \times 3) rapidly, filtered through Celite, and concentrated in vacuo. The crude product was separated on silica-gel column chromatography (20% hexane-EtOAc) to give the cyanohydrin TMS ether 47 (46.3 mg, 69%) as a colorless form: $R_f = 0.47$ (50% EtOAc-hexane); mp 149 °C; IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2963, 2838, 1602, 1503, 1483, 1278, 1102, 1043, 1014, 882, 843; ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ -0.22 (9H, s, -OTMS), 3.71 (3H, s, -OMe), 3.88, 3.82 (each 1H, ABq, $J = 11.9$ Hz, 3- CH_2), 3.91, 3.94, 3.99 (each 3H, each s, -OMe), 6.97 (1H, s, H-2), 6.89, 7.08 (each 1H, ABq, $J = 9.21$ Hz, H-6, 7); ^{13}C NMR (CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77.16$): δ 0.83, 19.22, 56.02, 56.10, 57.06, 63.03, 72.08, 112.43, 113.45, 116.67, 118.10, 118.68, 126.69, 129.11, 130.59, 130.84, 132.68, 146.76, 149.05, 151.50, 153.27; HR-EI-MS m/z 438.1611 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$ 438.1611; Anal. Found: C 62.69, H 5.96, N 6.44%, calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_5\text{Si}$: C 62.99, H 5.98, N 6.39%.

9-Cyano-1,4,5,8-tetramethoxyfluorene-3-ylacetonitrile (48). A solution of cyanohydrin 47 (46.3 mg, 0.106 mmol) and triethylsilane (0.084 mL, 0.528 mmol) in CH_2Cl_2 (2.80 mL) was cooled to 0 °C, with stirring. $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (0.067 mL, 0.528 mmol) was added dropwise to the solution and stirred for 1 h. The reaction was quenched with saturated aqueous NaHCO_3 and extracted into CHCl_3 and the

organic layers were dried over Na₂SO₄. After removal of the solvent, the residue was separated on silica-gel column chromatography (50% EtOAc-CHCl₃) to give dinitrile 48 (36.5 mg, 99%) as a colorless needle that was used without further purification: R_f = 0.37 (50% EtOAc-hexane); mp 204-208 °C; IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 2938, 2836, 1597, 1502, 1488, 1461, 1307, 1276, 1188, 1085, 1063, 1037, 993, 842, 811; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 3.76 (3H, s, -OMe), 3.85, 3.92 (each 1H, ABq, J = 18.6 Hz, 3-CH₂), 3.95, 3.96, 4.00 (3H, s, -OMe), 4.78 (1H, s, H-9), 6.99 (1H, s, H-2), 6.94, 7.03 (each 1H, ABq, J = 9.00 Hz, H-6, 7); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 19.18 (3-CH₂), 32.97 (C-9), 56.30 (8-OMe), 56.35 (1-OMe), 57.00 (5-OMe), 63.16 (4-OMe), 111.12 (C-2), 111.94 (C-7), 114.52 (C-6), 116.42 (C-1a or 4a), 118.31 (C-3-CNCH₂-), 126.61 (9-CN), 127.06 (C-8a), 127.21 (C-3), 128.84 (C-1a or 4a), 134.58 (C-5a), 147.03 (C-4), 149.48 (C-5), 150.62 (C-8), 152.52 (C-1); HR-EI-MS m/z 350.1264 [M]⁺, calcd for C₂₀H₁₈N₂O₄ 350.1266; Anal. Found: C 68.23, H 5.19, N 7.84%, calcd for C₂₀H₁₈N₂O₄: C 68.56, H 5.18, N 8.00%.

4-Hydroxy-1,5,8-trimethoxy-9-methyloxocarbonylfluorene-3-ylacetic acid methyl ester (49). A solution of nitrile 48 (45.8 mg, 0.131 mmol) in AcOH (15.2 mL) and hydrochloric acid (45.8 mL) was refluxed with stirring for 3 h. The solvent was removed under vacuum, and the solid dissolved into MeOH (20 mL). To the solution of the crude dicarboxylic acid, CH₂N₂ (1 M in Et₂O, 5.0 mL) was added until the color turned to pale green. The mixture was evaporated and separated on silica-gel column chromatography (12% EtOAc-CHCl₃) to give the diester 49 (31.8 mg, 60%) as pale-yellow needles after recrystallization from CHCl₃: R_f = 0.50 (50% EtOAc-CHCl₃); mp 204-208 °C; IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 2938, 2836, 1597, 1502, 1488, 1461, 1307, 1276, 1188, 1085, 1063, 1037, 993, 842, 811; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 3.68, 3.73 (each 3H, each s, -CO₂Me), 3.66, 3.75 (each 1H, ABq, J = 16.1 Hz, 3-CH₂), 3.83 (3H, s, 1-OMe), 3.84 (3H, s, 8-OMe), 4.01 (3H, s, 5-OMe), 4.77 (1H, s, H-9), 6.73 (1H, s, H-2), 6.77, 6.91 (each 1H, ABq, J = 9.00 Hz, H-6, 7), 9.56 (1H, s, 4-OH); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 36.48 (3-CH₂), 50.35 (C-9), 52.37, 52.19 (-CO₂Me), 56.09 (1-,8-OMe), 56.25, 57.22 (5-OMe), 109.99 (C-7), 112.18 (C-6), 114.01 (C-2), 122.17 (C-3), 127.33 (C-4a), 129.17 (C-1a), 130.95 (C-5a,8a), 144.21 (C-4), 146.12 (C-5), 148.95 (C-1), 151.56 (C-8), 172.63, 171.71 (-CO₂Me); HR-EI-MS m/z 402.1317 [M]⁺, calcd for C₂₁H₂₂O₈ 402.1314; Anal. Found: C 62.55, H 5.54%, calcd for C₂₁H₂₂O₈: C 62.68 H 5.51%.

Hipposudoric acid (32). A mixture of diester 49 (1.0 mg, 3.03 × 10⁻³ mmol) and boron tribromide (1M in CH₂Cl₂, 0.3 mL) was stirred for 4 h at 0 °C. The reaction was quenched by addition of saturated aqueous Na₂S₂O₃ (0.5 mL), and extracted with EtOAc (0.3 mL × 3). The combined organic layers were filtered through Celite, and concentrated in vacuo. The crude 34 was dissolved in 10% glycerol-H₂O (1.0 mL) and added FeCl₃ (2.4 mg, 1.52 × 10⁻² mmol) with vigorously stirring in ice bath. The reaction mixture turned red within 5 min. The resulting red mixture was filtered through CM Sephadex A-25 (pre-equilibrated with 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) and the eluate was subjected to anion exchange chromatography (QAE Sephadex A-25, 1.7 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer, pH 6.1) to give hipposudoric acid 32 in buffer (10% yield, based on 49,

the amount of 32 was estimated by the ^1H NMR spectrum using DSS as an internal standard). 34: ^1H NMR (acetone- d_6 , solvent residual peak = 2.05): δ 3.65 (2H, s, 3- CH_2), 4.90 (1H, s, H-9), 6.72, 6.87 (each 1H, ABq, $J = 8.5$ Hz, H-6, 7), 6.76 (1H, s, H-2); FAB-HR-MS m/z 333.0625 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{O}_8$, 333.0610. 32 (in buffer solution): UV (0.1 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 533 (3.83), 412 (3.95), 275 (3.97, sh), 242 (4.56); ^1H NMR (1.7 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer, pH 6.1, DSS = 0.00) δ 3.34 (2H, s, 3- CH_2), 6.43 (1H, s, H-2), 6.55, 6.63 (each 1H, ABq, $J = 11.0$ Hz, H-6, 7); FAB-HR-MS m/z 329.0284 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{O}_8$, 329.0297.

Isolation of the norhipposudric acid (33)

The preparation of the sample containing norhipposudoric acid (orange solution) via gel filtration was described above. The resulting orange solution was applied to LC-ESI-MS spectra measurements; the orange pigment 33 was chromatographed on ODS-HPLC (50% acetonitrile- H_2O , 0.4 ml min^{-1} , 530 nm detection), connected to ESI-MS, and detected as major peak at 2.25-2.27 min. The ESI-MS spectrum corresponding to the peak of 33 was measured. On the other hand, the sample obtained after gel filtration was added a powder of Sephadex G-15, and the mixture was lyophilized. The orange pigment was eluted from the pigment-adsorbed gel powder with 0.2 M phosphate buffer (pH 6.1), the resulting eluate was added a suspension of QAE Sephadex A-25 (pre-equilibrated with 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) until the supernatant becomes colorless. The colored resin was washed with the phosphate buffer (5 mL \times 3), followed by with the deuterated buffer (prepared with D_2O instead of H_2O) (5 mL \times 2), and finally added 2.3 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer (pH 6.1) to give orange pigment (norhipposudoric acid (33)) solution. The ^1H NMR spectrum of 33 was measured by using the solution and UV spectrum was then measured by using the recovered sample diluted with 0.2 M phosphate buffer. The concentration of 33 was determined by the ^1H NMR spectrum using DSS as an internal standard. HR-FAB-MS of the pigment was measured by using the sample prepared in the same manner as those employed for hipposudoric acid (32).

Norhipposudoric acid (33). An orange buffer solution; UV (0.2 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 511 (3.95), 418 (4.16), 271 (4.29, sh), 243 (4.73); ^1H NMR (2.3 M NaCl / 0.2 M deuterated phosphate buffer, pH 6.1, DSS = 0.00) δ 3.33 (2H, s, H-1'), 6.46 (1H, s, H-2), 6.57, 6.62 (each 1H, ABq, $J = 10.4$ Hz, H-6, 7), 7.05 (1H, s, H-9); FAB-HR-MS m/z 285.0419 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_6$, 285.0399; LC-ESI-MS (50% acetonitrile- H_2O , containing 1% AcOH, flow rate 0.4 ml min^{-1}) m/z (retention time / min): positive 285.3 (2.27, $[\text{M}+\text{H}]^+$), negative 283.7 (2.25, $[\text{M}-\text{H}]^-$).

Chemical Conversion of norhipposudoric acid (33)

After ion exchange chromatography, the 33 in 2.3 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer (5 mL, c.a. 10^{-4} M) under argon atmosphere was added 10% Pd-C (1.0 mg) and stirred for 0.5 h under an

atmospheric pressure of H₂. The mixture was acidified with one drop of 6 M aqueous HCl, and extracted with EtOAc (5 mL × 3). The combined organic layers were concentrated to 5 mL, and filtered through Celite. Resulting filtrate was added CH₂N₂ (1 M in Et₂O, 0.3 mL), then the solution dried in vacuo. The residue was chromatographed on ODS (50% acetone-H₂O), followed by PTLC (ODS, 20% acetone-H₂O) to afford 50a and 50b as colorless solid.

Norhipposudoric acid derivative 50a (1,5,8-trihydroxy-4-methoxyfluoren-3-ylacetic acid methyl ester): R_f = 0.29 (lower)(ODS, 40% acetone-H₂O); ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05) δ 3.62 (2H, br s, 3-, or 9-CH₂), 3.63 (3H, s, -CO₂Me), 3.73 (2H, br s, 3-, or 9-CH₂), 4.06 (3H, s, 5-OMe), 6.72 (1H, s, H-2), 6.81, 6.98 (each 1H, ABq, J = 8.4 Hz, H-6, 7), 7.79, 8.19 (each 1H, each s, 1-, 8-OH), 9.51 (1H, s, 4-OH). 50b (3-(1,4,8-trihydroxy-5-methoxyfluorenyl)-acetic acid methyl ester): R_f = 0.29 (upper)(ODS, 40% acetone-H₂O); ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05) δ 3.69 (3H, s, -CO₂Me), 3.75, 3.76 (each 2H, each br s, 3-, 9-CH₂), 3.84 (3H, s, 4-OMe), 6.69, 6.77 (each 1H, ABq, J = 8.7 Hz, H-6, 7), 6.81 (1H, s, H-2), 7.87, 8.43 (each 1H, each s, 1-, 8-OH), 9.07 (1H, s, 4-OH).

Synthesis of 50

1,4,5,8-tetramethoxyfluorene-3-acetonitrile (51). To a solution of 45 (12.3 mg, 3.24 × 10⁻² mmol) in acetonitrile (0.32 mL) was added trimethylsilylnitrile (0.065 mL, 1.5 equiv) and TBAF (0.006 mL, 1.5 equiv) and stirred at 50 °C. After 6 h, the reaction was quenched with H₂O (1 mL) and extracted with CHCl₃ (1 mL × 3). The organic layer was washed with small portion of H₂O (0.2 mL × 3), and dried in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (30% EtOAc- hexane) to give 51 (10.4 mg, 99%) as colorless powder: m.p. 171-174 °C; R_f = 0.54 (30% EtOAc-hexane); IR (KBr) ν_{max} cm⁻¹: 2998, 2958, 2837, 1590, 1508, 1483, 1467, 1270, 1248, 1221, 1084, 1062, 1041, 808; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 3.74, 3.89 (each 2H, each br s, H-9, 3-CN-CH₂), 3.77, 3.88, 3.91, 3.95 (each 3H, each s, -OMe), 6.84, 6.90 (each 1H, ABq, J = 8.6 Hz, H-6, 7), 6.88 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 18.94, 32.50, 55.84, 56.73, 62.78, 109.47, 110.08, 111.39, 118.88, 123.71, 129.59, 133.22, 133.55, 134.88, 146.92, 149.52, 150.41, 152.17; HR-EI-MS m/z 325.1311 [M]⁺, calcd for C₁₉H₁₉NO₄ 325.1311; Anal. Found: C 68.93, H 5.86%, calcd for C₁₉H₁₉NO₄: C 70.14, H 5.89%.

50 (A mixture of 4-hydroxy-1,5,8-trimethoxyfluoren-3-ylacetic acid methyl ester (50a) and 5-hydroxy-1,4,8-trimethoxyfluorene-3-ylacetic acid methyl ester (50b). A solution of nitrile 51 (23.0 mg, 0.065 mmol) in AcOH (7.7 mL) and hydrobromic acid (23 mL) was refluxed with stirring for 3 h. The solvent was removed under vacuum, and the solid dissolved into MeOH (20 mL). To the solution of the crude dicarboxylic acid, CH₂N₂ (1 M in Et₂O, 5 mL), was added dropwise. The mixture was evaporated and separated on ODS PTLC (50% acetone-H₂O), to afford 50a and 50b as colorless solid.

Synthesis of model compound

1,4-dihydroxy-5,8-dimethoxy-9-methyloxocarbonylfluoren-3-ylacetic acid methyl ester (52). 52 was prepared by the similar manner as those of 49 involved 5,8-dimethoxy-1,4-di(methoxymethyl)-3-methylfluoren-9-one (56). 56 was synthesized from 41a and 4-bromo-2,5-di(methoxymethyl)-toluene (55) which prepared via methoxymethylation and subsequent bromination of methylhydroquinone. Through all steps, it had been careful not to be too acidic.⁹² 55: colorless needles; m.p. 72-73 °C; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2948, 2822, 1490, 1368, 1220, 1193, 1142, 1081, 992, 920, 889, 781, 715; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 2.18 (3H, s, 5-Me), 3.47, 3.52 (each 3H, each s, -OMOM), 5.11, 5.15 (each 2H, each s, -OMOM), 6.96 (1H, s, H-6), 7.24 (1H, s, H-3); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 16.39, 56.05, 56.38, 95.16, 95.88, 109.80, 119.17, 119.24, 127.97, 148.40, 150.89; HR-EI-MS m/z 290.0416 [M]⁺, calcd for C₁₁H₁₅O₄Br 290.0153; Anal. Found: C 45.31, H 4.89%, calcd for C₁₁H₁₅O₄Br: C 45.38, H 5.19%. 56: yellow plates; m.p. 117-119 °C; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 2940, 2900, 2839, 1702, 1588, 1579, 1500, 1439, 1272, 1152, 1013, 1003, 970, 807; ¹H NMR (CDCl₃, CHCl₃ = 7.26): δ 2.37 (1H, s, 3-Me), 3.51, 3.55, 3.87, 3.91 (each 3H, each s, -OMe, -OMOM), 4.96, 5.27 (each 2H, each s, -OMOM), 6.84, 7.04 (each 1H, ABq, J = 9.0 Hz, H-6, 7), 6.85 (1H, s, H-2); ¹³C NMR (CDCl₃, CDCl₃ = 77.16): δ 18.59, 56.52, 56.60, 57.39, 57.91, 95.47, 101.54, 115.19, 120.52, 121.80, 122.36, 130.64, 134.42, 142.94, 147.07, 148.90, 152.14, 153.21, 188.92; HR-EI-MS m/z 374.1374 [M]⁺, calcd for C₂₀H₂₂O₇ 374.1365; Anal. Found: C 63.85, H 5.83%, calcd for C₂₀H₂₂O₇: C 64.16, H 5.92%. 52: pale green solid; R_f = 0.61 (SiO₂, 12% MeOH-CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3283, 2900, 2839, 1737, 1499, 1460, 1408, 1279, 1260, 1195, 1160, 1060, 1018, 965; ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05): δ 3.61 (5H, br s, -OMe, 3-CH₂), 3.63, 3.86 (each 3H, each s, -CO₂Me), 4.01 (3H, s, -OMe), 4.80 (1H, s, H-9), 6.73 (1H, s, H-2), 6.95, 7.15 (each 1H, ABq, J = 9.0 Hz, H-6, 7), 7.90 (1H, s, 1-OH), 9.46 (1H, s, 4-OH); ¹³C NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 29.84): δ 36.12, 50.71, 51.81, 52.31, 56.32, 57.73, 111.13, 113.39, 119.26, 123.75, 127.12, 127.32, 131.27, 131.37, 144.37, 146.83, 146.93, 152.48, 171.91, 172.33; HR-EI-MS m/z 388.1141 [M]⁺, calcd for C₂₀H₂₀O₈ 388.1151.

1,4-dihydroxy-5,8-dimethoxy-3-methylfluorene (53). A mixture of 56 (126.0 mg, 3.37 × 10⁻¹ mmol), triethylsilane (0.173 mL, 8.43 × 10⁻¹ mmol), and trifluoroacetic acid (1.2 mL) was stirred at 50 °C. After 3 h, the reaction was quenched with H₂O (5 mL) and extracted with CHCl₃ (5 mL × 3). The combined organic layers were washed with small portion of H₂O (1 mL × 3), and dried in vacuo. The residue was chromatographed on SiO₂ (30% EtOAc- hexane) to give 53 (17.9 mg, 18.6%) as colorless amorphous solid: R_f = 0.55 (SiO₂, 12% MeOH-CHCl₃); IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3220, 1498, 1463, 1392, 1350, 1278, 1245, 1063, 958, 798; ¹H NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 2.05): δ 2.19 (3H, s, 3-Me), 3.66 (2H, br s, H-9), 3.88, 4.08 (each 3H, each s, -OMe), 6.65 (1H, s, H-2), 6.89, 7.06 (each 1H, ABq, J = 9.0 Hz, H-6, 7), 7.64 (1H, s, 1-OH), 9.36 (1H, s, 4-OH); ¹³C NMR (acetone-d₆, solvent residual peak = 29.84): δ 16.65, 32.37, 56.00, 57.67, 109.77, 111.97, 118.08, 124.69, 126.98, 127.55, 131.47, 132.93, 144.49, 146.45, 147.14, 152.42; HR-EI-MS m/z 272.1049 [M]⁺, calcd for C₁₆H₁₆O₄ 272.1049.

1,4-Dihydroxyfluorene (54). 54 was prepared by removal of methyl groups of 1,4-dimethoxyfluorene which was synthesized by the similar manner as those of 49 from 41a and bromobenzene. The 1,4-dimethoxyfluorene (1.9 mg, 8.40×10^{-3} mmol) in CH_2Cl_2 (0.084 mL) was added boron tribromide (1 M in CH_2Cl_2 , 0.084 mL) and stirred for 1.5 h at room temperature. The reaction was quenched by addition of saturated aqueous $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0.5 mL), and extracted with EtOAc (0.3 mL \times 3). The combined organic layers were filtered through Celite, and concentrated in vacuo. The residue was chromatographed on silica-gel (50% EtOAc- CHCl_3) to give 54 (1.6 mg, 96%) as colorless solid. 1,4-dimethoxyfluorene: $R_f = 0.75$ (SiO_2 , 50% EtOAc-hexane); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 2930, 2835, 1595, 1559, 1503, 1460, 1439, 1392, 1350, 1262, 1096, 1078, 1032, 1019, 950, 800, 778, 738, 718; ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 3.84 (2H, br s, H-9), 3.89, 3.97 (each 3H, each s, -OMe), 6.78, 6.82 (each 1H, ABq, $J = 8.8$ Hz, H-2, 3), 7.27 (1H, ddd, $J = 1.2, 7.6, 7.6$ Hz, H-7), 7.36 (1H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, H-6), 7.54, 8.15 (each 1H, each d, $J = 7.6$ Hz, H-5, 8). 54: white powder; $R_f = 0.46$ (SiO_2 , 50% EtOAc-hexane); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3270, 1495, 1404, 1250, 995, 900, 812, 737; ^1H NMR (acetone- d_6 , solvent residual peak = 2.05): δ 3.82 (2H, s, H-9), 6.64, 6.73 (each 1H, ABq, $J = 8.4$ Hz, H-2, 3), 7.24 (1H, ddd, $J = 1.5, 7.5, 7.5$ Hz, H-7), 7.33 (1H, dd, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H-6), 7.54, 8.15 (each 1H, each d, $J = 7.5$ Hz, H-5, 8), 7.81, 8.28 (each 1H, each s, -OH); ^{13}C NMR (acetone- d_6 , solvent residual peak = 29.84): δ 34.12, 114.05, 114.46, 123.41, 124.43, 124.81, 125.48, 126.34, 127.64, 129.93, 141.64, 142.44, 146.80; HR-EI-MS m/z 198.0684 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2$ 198.0681.

1,4,5,8-Tetrahydroxyfluorene (60). 60 was synthesized by the similar manner as those of 54 from 41a and 2-bromo-1,4-dimethoxybenzene. 60: white powder; $R_f = 0.23$ (SiO_2 , 50% EtOAc- CHCl_3); IR (KBr) ν_{max} cm^{-1} : 3250, 1500, 1380, 1275, 1230, 942, 800, 750; ^1H NMR (acetone- d_6 , solvent residual peak = 2.05): δ 3.73 (2H, s, H-9), 6.70 (4H, s, H-2, 3, 6, 7); ^{13}C NMR (acetone- d_6 , solvent residual peak = 29.84): δ 31.67, 114.54, 114.86, 129.42, 128.16, 143.71, 147.03; HR-EI-MS m/z 230.0579 $[\text{M}]^+$, calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 230.0579.

Oxidation of model compounds with DDQ

A mixture of 52 (3.5 mg, 9.0×10^{-3} mmol) and DDQ (2.0 mg, 9.0×10^{-3} mmol) in CDCl_3 (1.4 mL) was stirred for 50 min. The obtained red solution was filtered and directly analyzed. 53 and 54 were also oxidized by the similar manner as those of 52. 57 (5,8-dimethoxy-9-methyloxocarbonyl fluorene-1,4-quinon-3-ylacetic acid methyl ester): ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 3.53, 3.57 (each 1H, ABq, $J = 15.3$ Hz, 3- CH_2), 3.73, 3.73, 3.85, 3.93 (each 3H, each s, -OMe, - CO_2Me), 4.78 (1H, s, H-9), 6.70 (1H, s, H-2), 6.96 (2H, br s, H-6, 7). 57' (4-hydroxy-5,8-dimethoxy-9-methyloxocarbonyl fluorene-1,9-quinonemethid-3-ylacetic acid methyl ester): UV (CHCl_3) λ_{max} nm (log ϵ): 560 (3.53), 380 (3.30, sh); ^1H NMR (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 3.45 (2H, br s, 3- CH_2), 3.76, 3.82, 3.97, 4.01 (each 3H, each s, -OMe, - CO_2Me), 6.07 (1H, s, H-2), 6.60, 6.81 (each 1H, ABq, $J = 9.0$ Hz, H-6, 7), 10.62 (1H, s, 4-OH). 58 (5,8-dimethoxy-3-methylfluorene-1,4-quinone): UV (CHCl_3) λ_{max} nm (log ϵ): 470

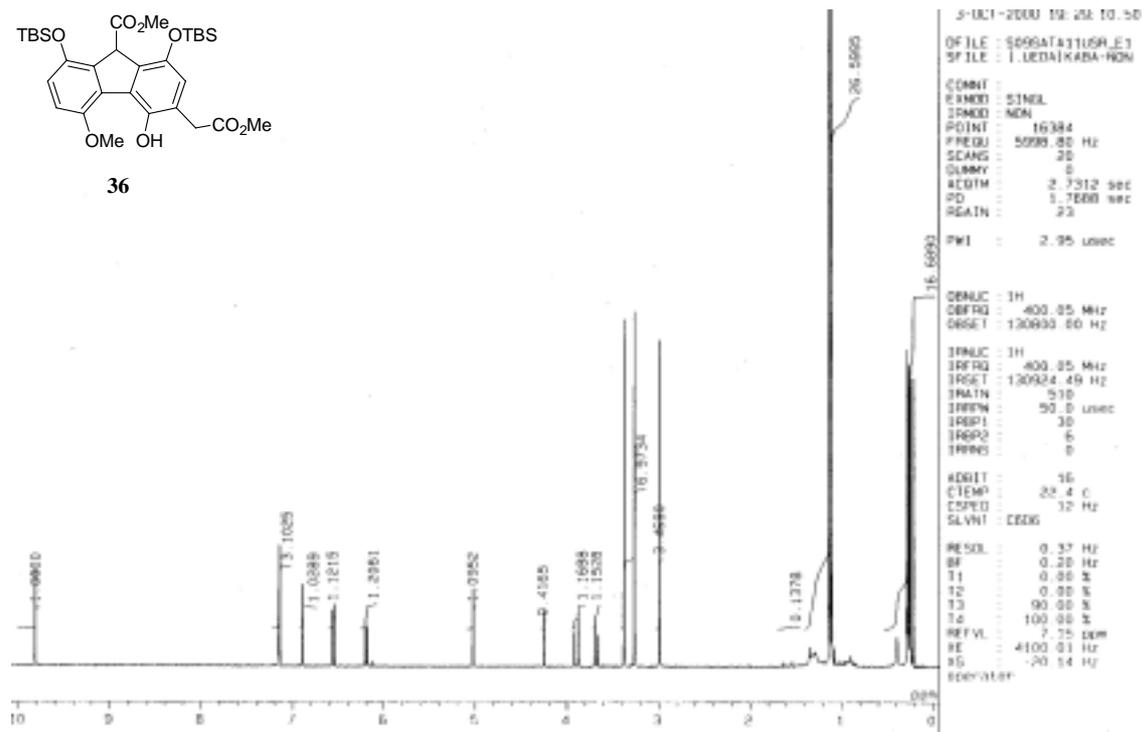
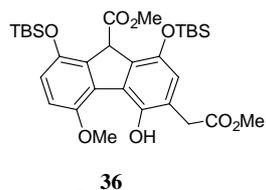
(3.31, sh); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 2.16 (3H, d, $J = 2.1$ Hz, 3-Me), 3.78 (2H, s, H-9), 3.88, 3.95 (each 3H, each s, -OMe), 6.60 (1H, q, $J = 2.1$ Hz, H-2), 6.91 (2H, br s, H-6, 7). 58' (4-hydroxy-5,8-dimethoxy-3-methylfluorene-1,9-quinonemethide)(prepared from 58 by addition of Et_3N): UV (CHCl_3) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 530 (3.82); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7.26$): δ 2.08 (3H, d, $J = 1.6$ Hz, 3-Me), 3.85, 3.99 (each 3H, each s, -OMe), 6.03 (1H, q, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.57, 6.75 (each 1H, ABq, $J = 9.4$ Hz, H-6, 7), 7.54 (1H, s, H-9), 10.31 (1H, s, 4-OH). 59 (fluorene-1,4-quinone): UV (CHCl_3) λ_{max} nm ($\log \epsilon$): 421 (3.36), 343 (3.25), 284 (3.90, sh), 253 (4.27); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00): δ 3.86 (2H, br s, H-9), 6.79 (2H, br s, H-2, 3), 7.45 (2H, m, H-6, 7), 7.59, 8.26 (each 1H, each m, H-5, 8). 61 (fluorene-1,4,5,8-diquinone): UV (CHCl_3) λ_{max} nm (relative absorbance): 538 (1.00), 319 (2.84), 243 (7.22); UV (50% MeOH- H_2O) λ_{max} nm (relative absorbance): 518 (1.00), 410 (1.60); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00): δ 6.67 (2H, d, $J = 10.2$ Hz, H-2, 7), 6.94 (2H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3, 6), 7.38 (1H, s, H-9), 16.05 (1H, s, -OH); $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS = 0.00)(Et_3N added): δ 6.42, 6.49 (each 4H, ABq, $J = 10.2$ Hz, H-2, 3, 6, 7), 7.23 (1H, s, H-9). For pKa measurement, 61 in CHCl_3 was rapidly filtered through ODS (50% MeOH- H_2O). The eluate was partially measured its pH with pH meter, and the rest was subjected to UV analysis in order to determine concentration of 61. The concentration of 61 was determined from UV absorbance of 61 by applying ϵ value of 33 to those of 61, since both chromophores were same; pKa value: 2.7-3.3 (in MeOH- H_2O).

Antibacterial activity

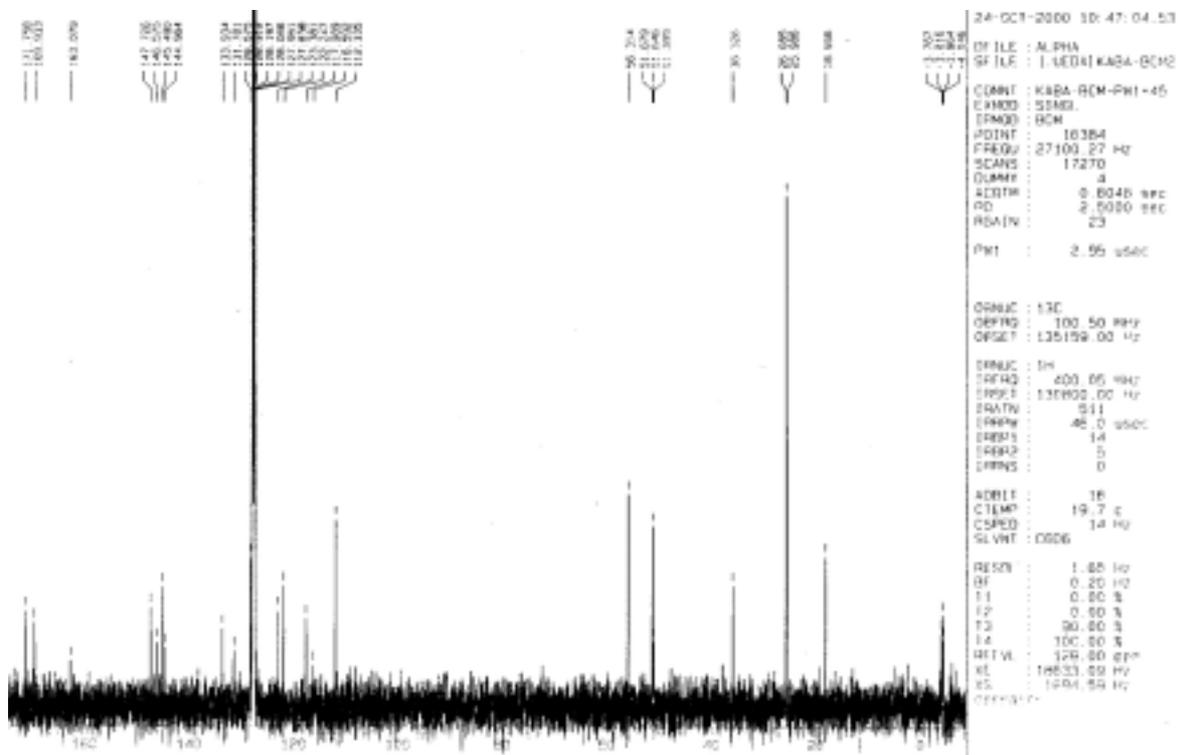
The sweat solution was separated by gel filtration (Sephadex G-15 and Sephadex G-25). The resulting red and orange solutions were concentrated to give sample of 32 (100 mg / L) and 33 (176 mg / L) respectively. These samples were filtered through membrane filter (cellulose acetate, 0.2 μ) and subjected to the test. For a control experiment, to these colored solutions were added suspension of QAE Sephadex A-25 (pre-equilibrated with 0.2 M phosphate buffer, pH 6.1) and the colorless supernatant were subjected to the test. The activities were measured by micro broth dilution method in nutrient broth medium with an inoculum (*Pseudomonas aeruginosa* A3, *Klebsiella pneumoniae* PCI602, *Bacillus stearothermophilus*, *Staphylococcus aureus* 209P) of 10^6 cfu / mL at 37 °C (except for *Bacillus stearothermophilus*: at 50 °C) for 18 h . The red pigment 32 clearly shows growth inhibitory activities against *Pseudomonas aeruginosa* A3 and *Klebsiella pneumoniae* PCI602 at 12 mg / L and 25 mg / L, respectively (shown in Table 11).

ESR analysis of 33

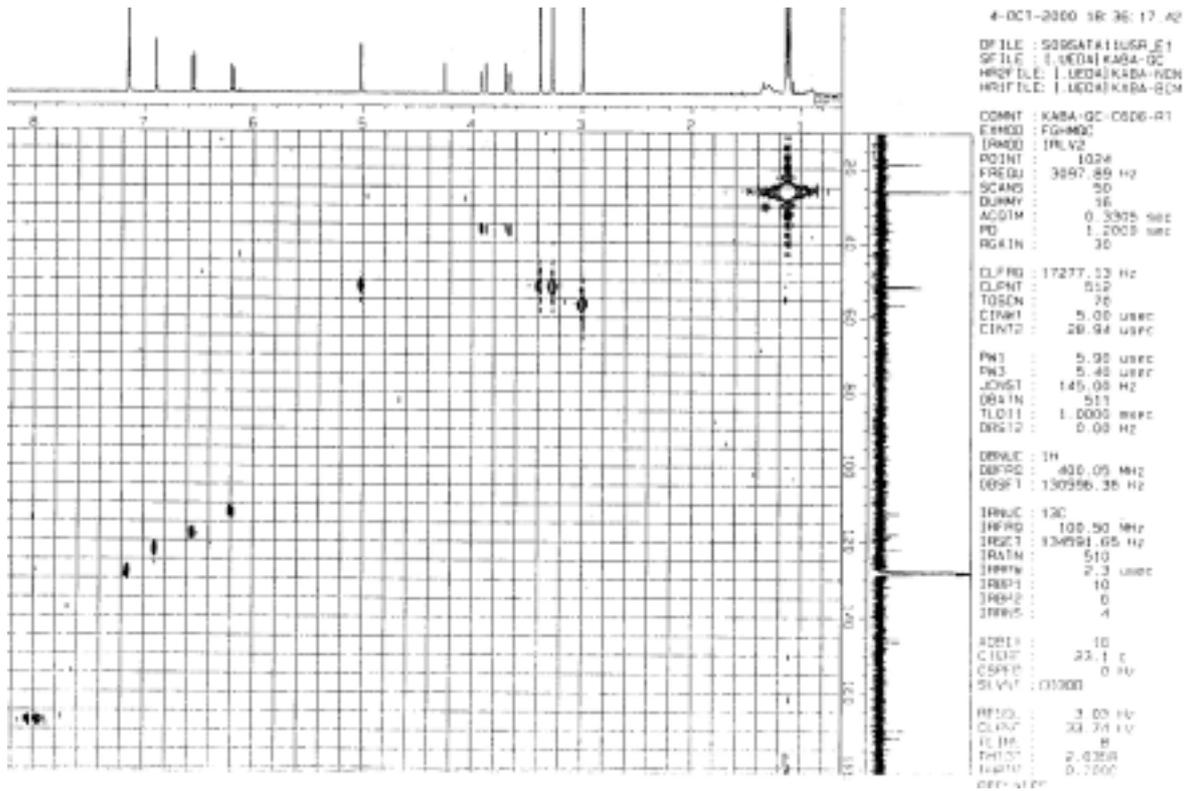
A solution of 33 in water, obtained via gel filtration through Sephadex G-15, was concentrated to 2.65×10^{-3} M and subjected to ESR spectroscopic analysis; g: 2.0043 (2.19×10^{-6} M, determined by comparison with hydroxyTEMPO).



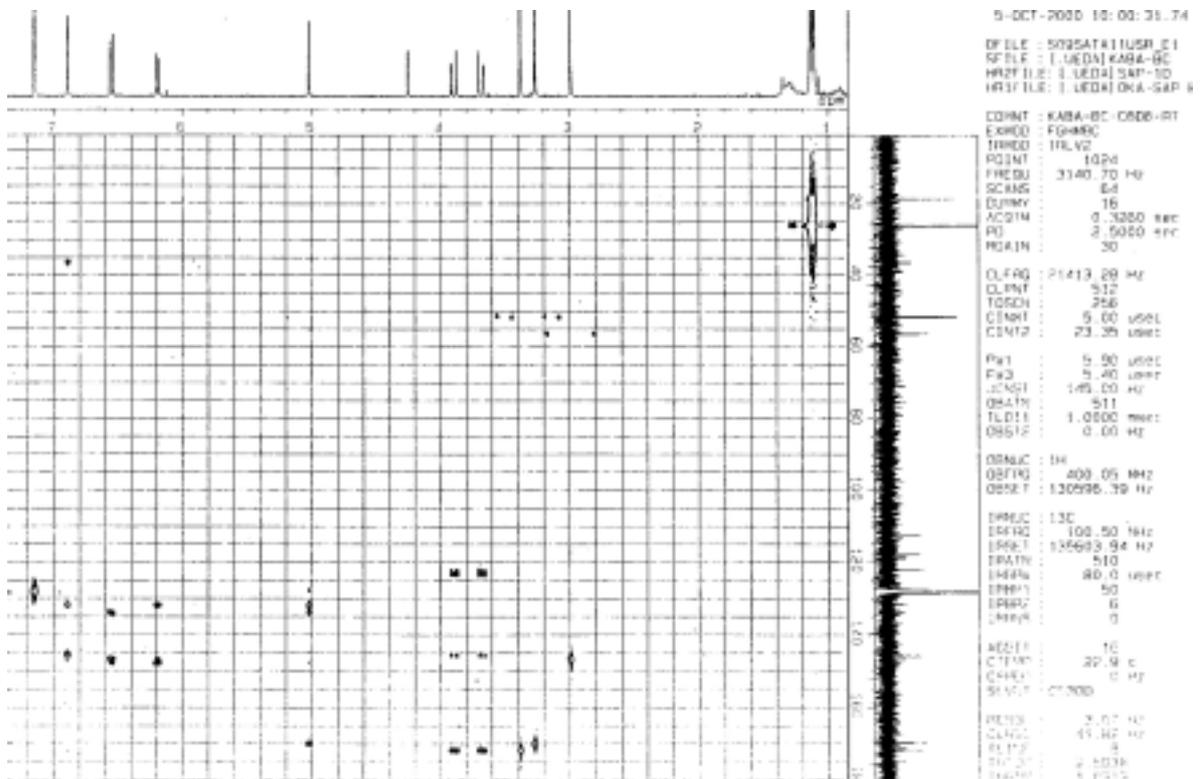
¹H NMR spectrum of 36 (400 MHz, C₆D₆)



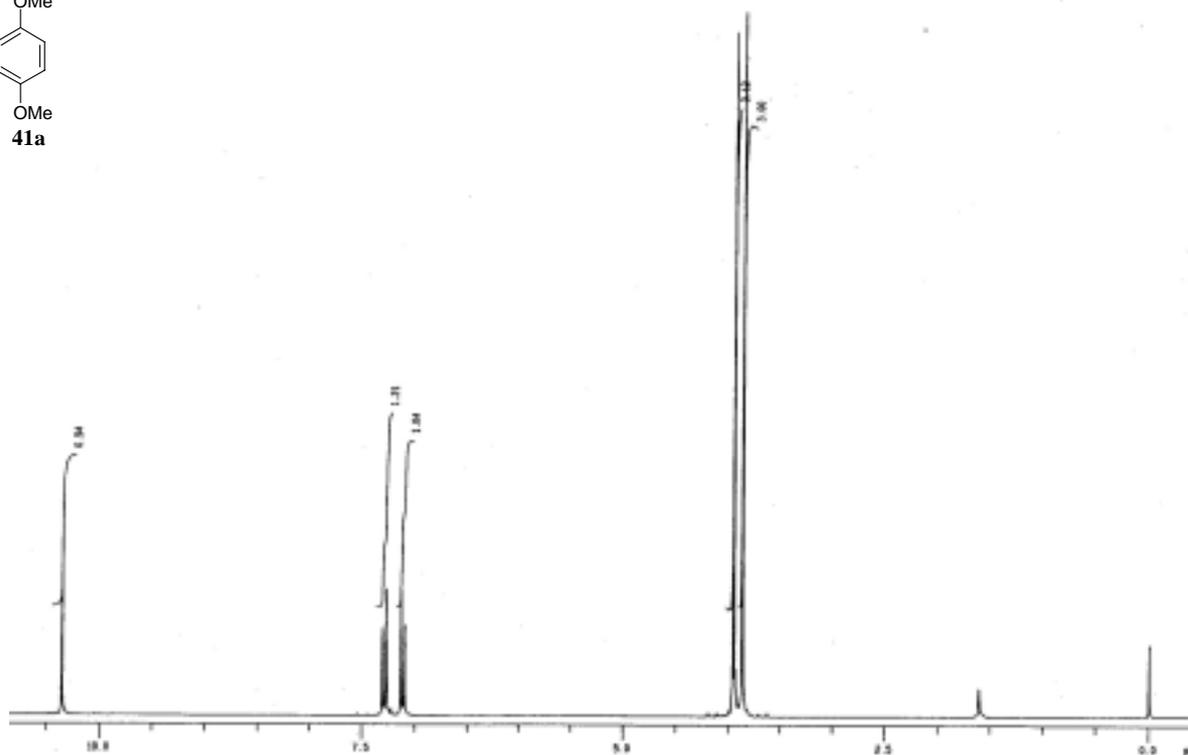
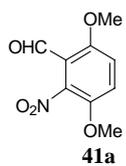
¹³C NMR spectrum of 36 (100 MHz, C₆D₆)



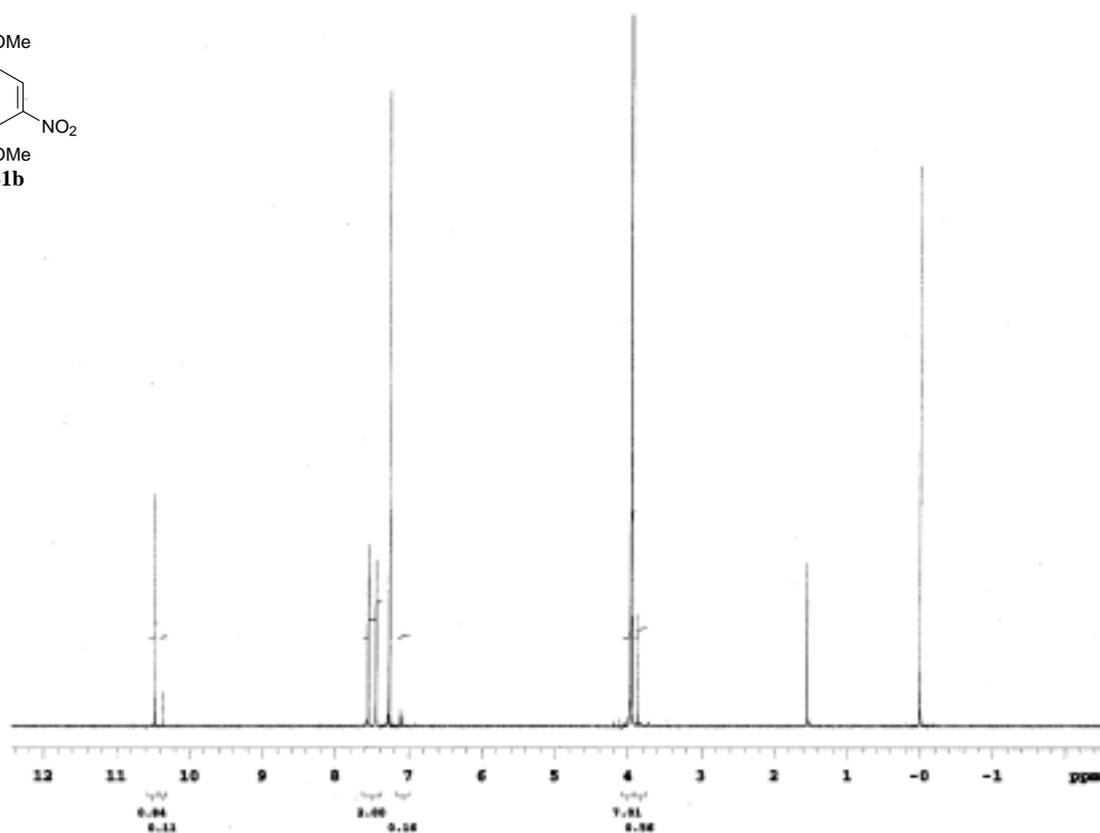
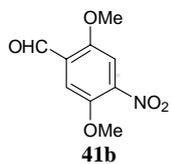
HMQC spectrum of 36 (C₆D₆)



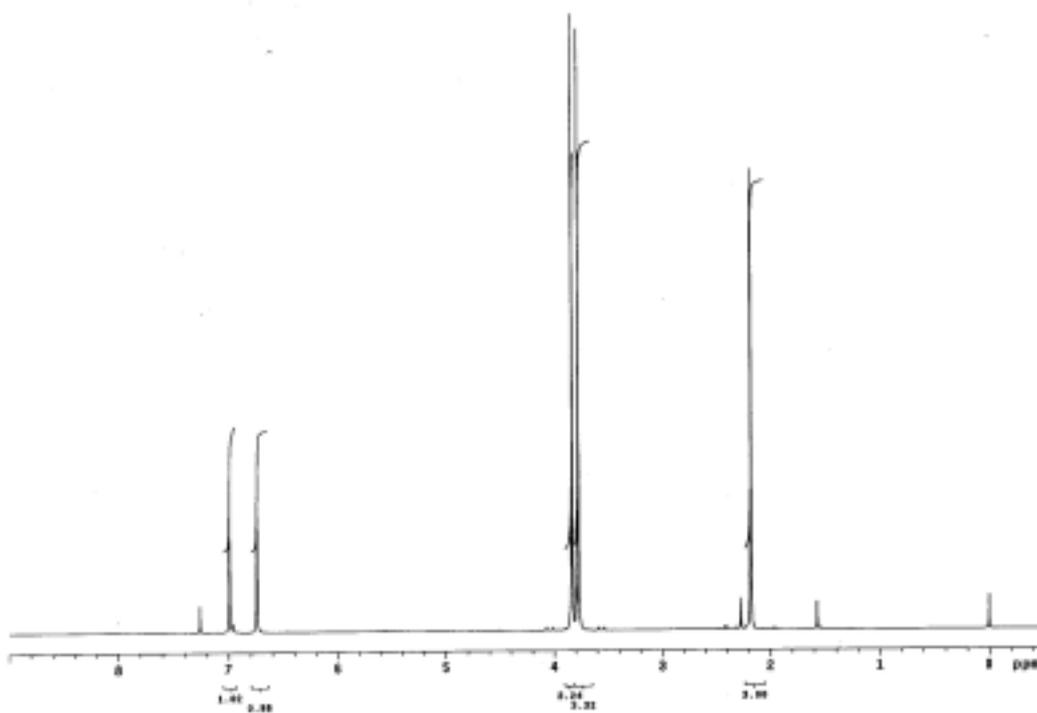
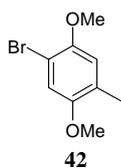
HMBC spectrum of 36 (C₆D₆)



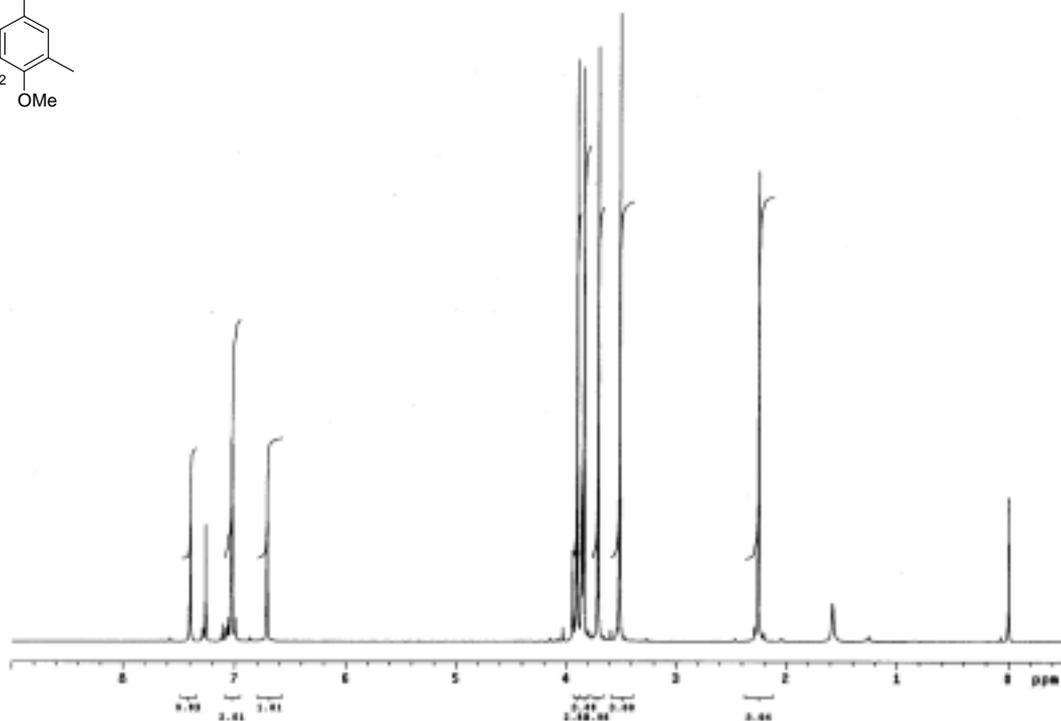
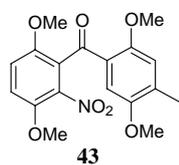
^1H NMR spectrum of 41a (300 MHz, CDCl_3)



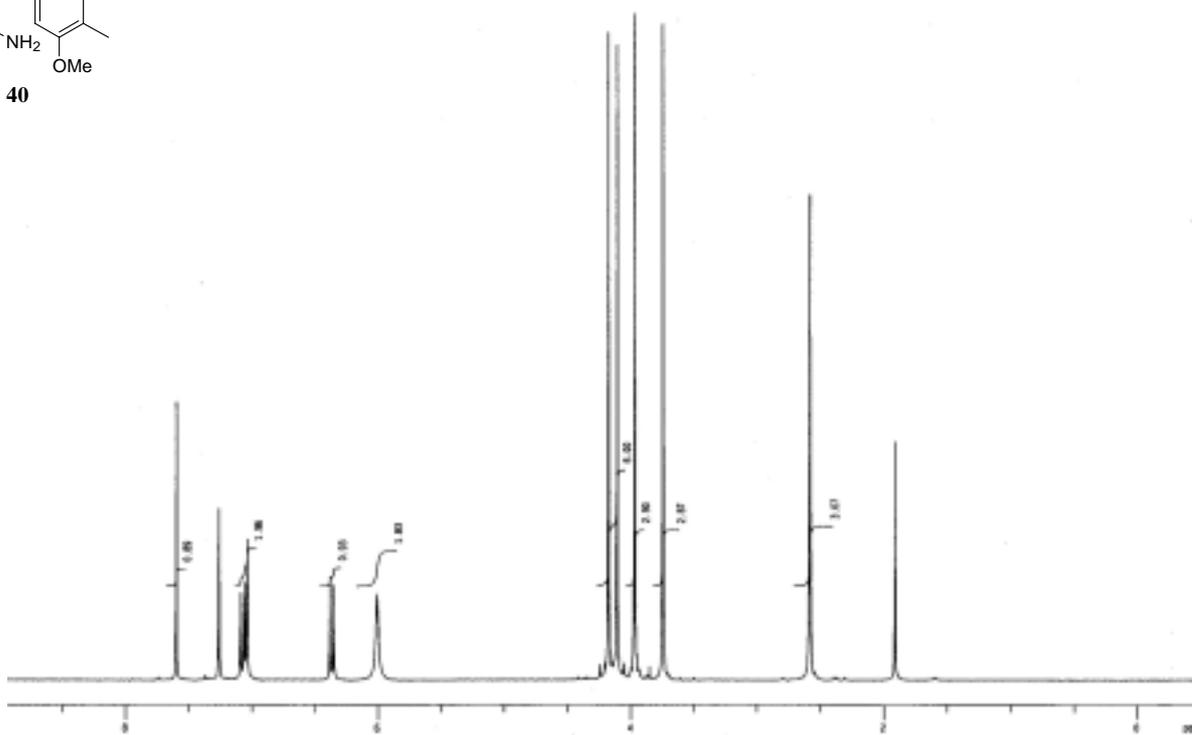
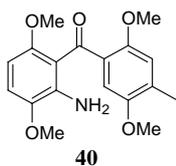
^1H NMR spectrum of 41b (300 MHz, CDCl_3)



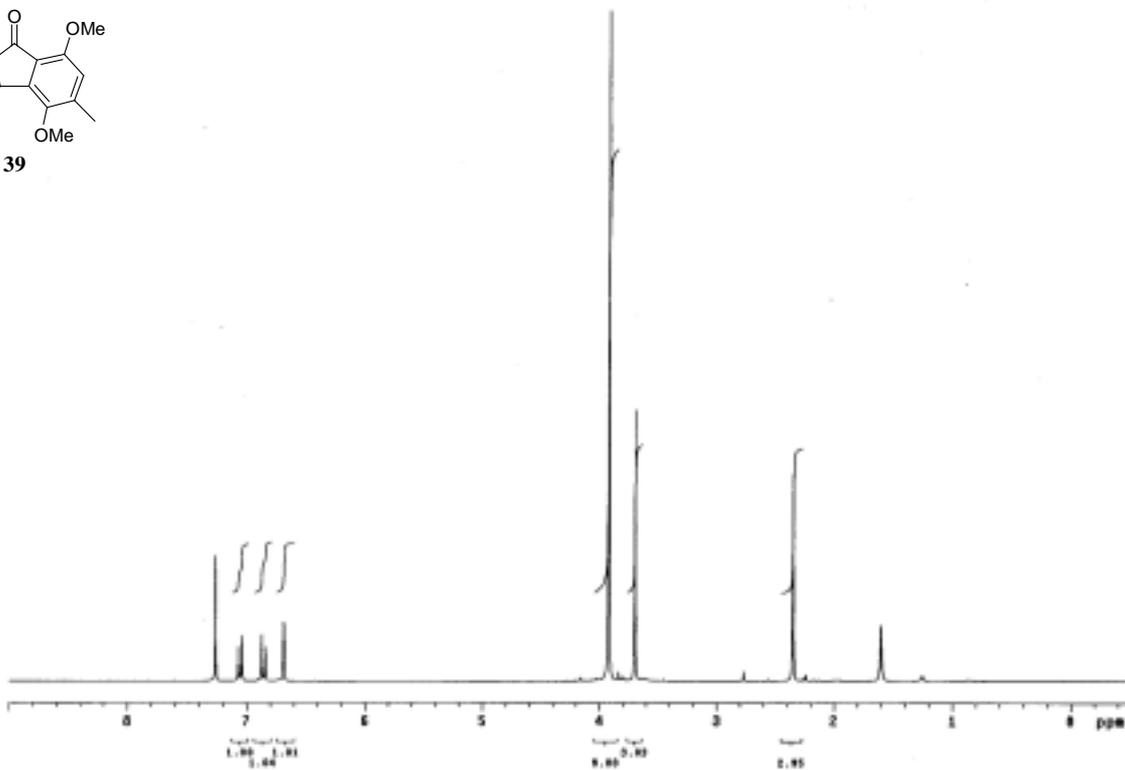
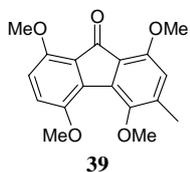
^1H NMR spectrum of 42 (300 MHz, CDCl_3)



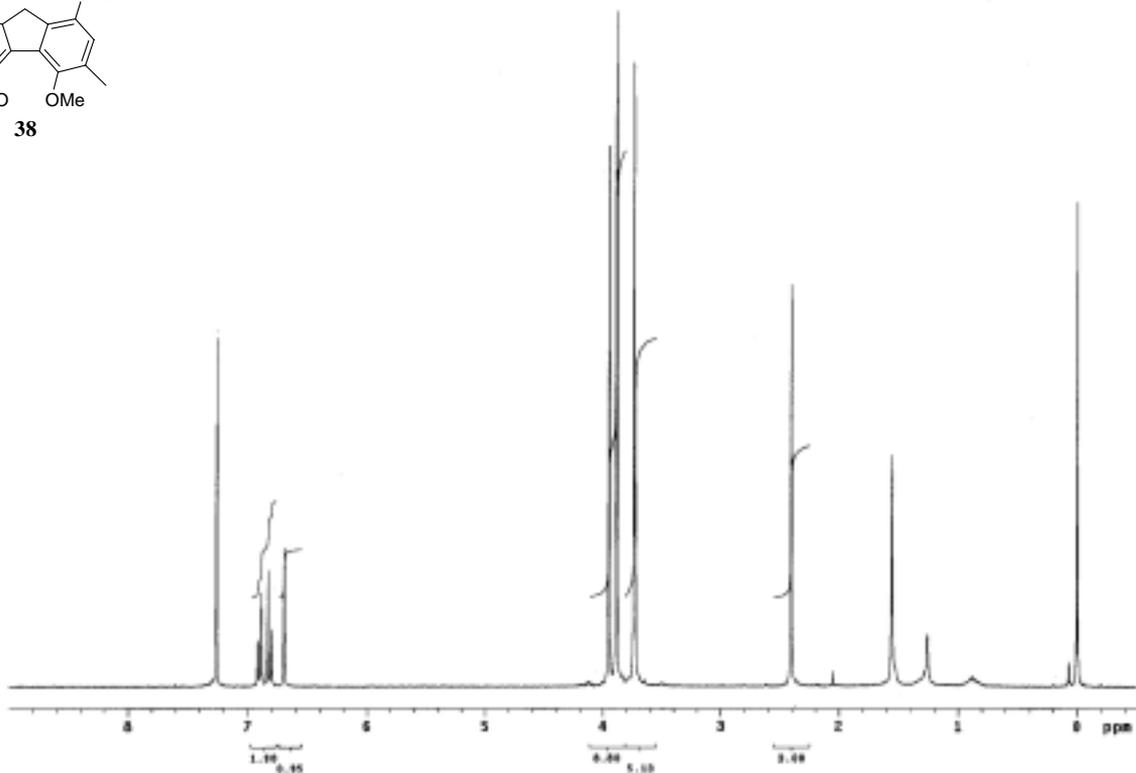
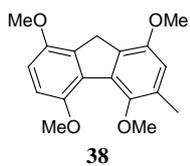
^1H NMR spectrum of 43 (300 MHz, CDCl_3)



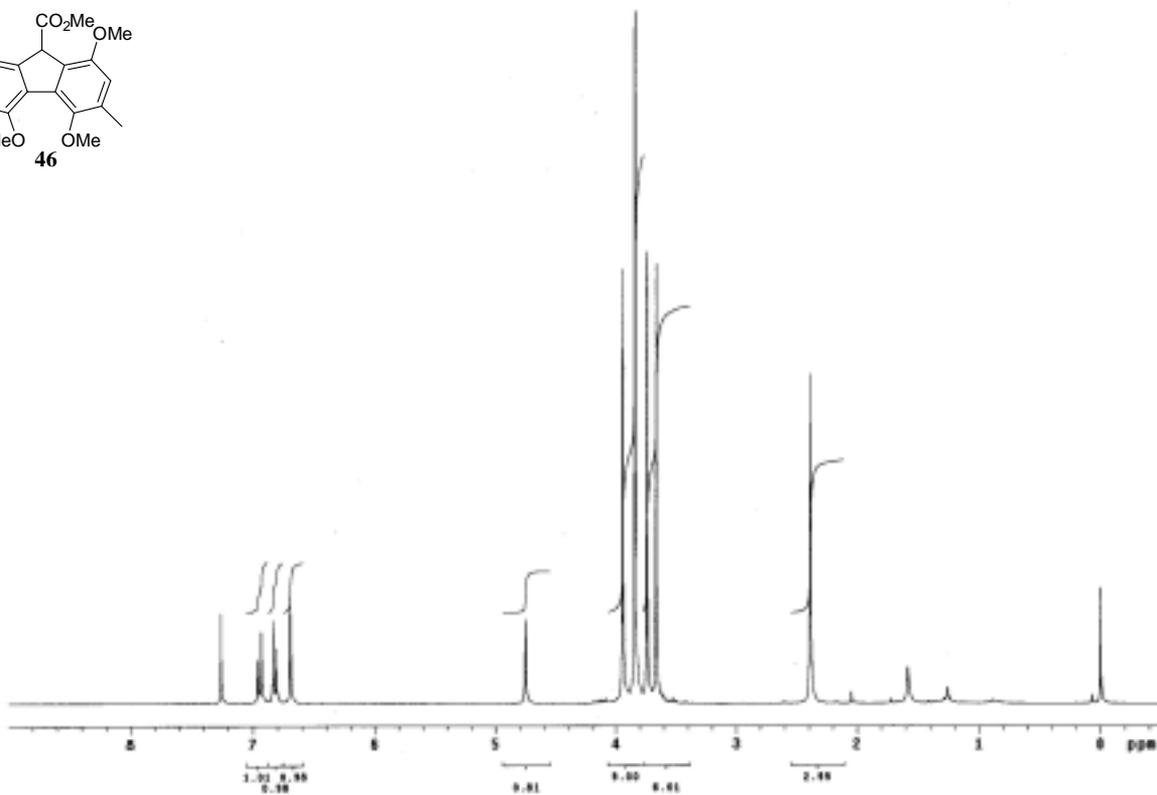
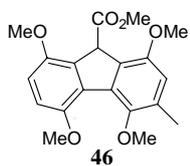
^1H NMR spectrum of 40 (300 MHz, CDCl_3)



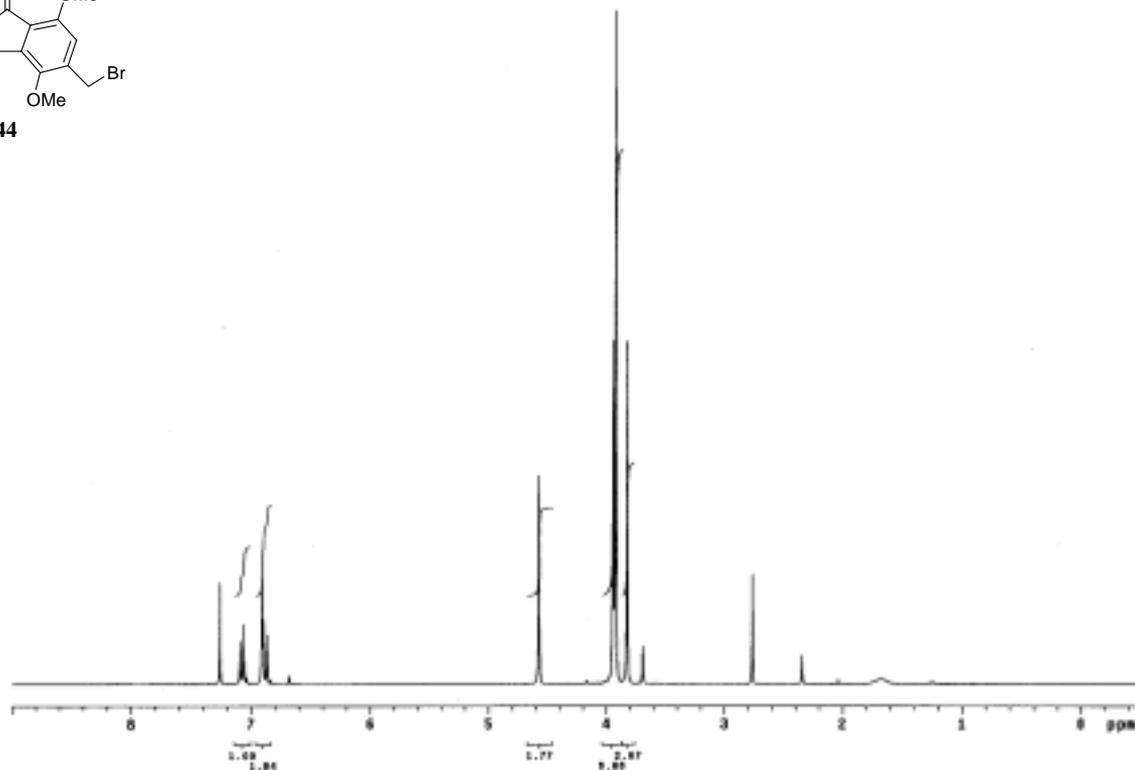
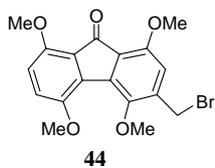
^1H NMR spectrum of 39 (300 MHz, CDCl_3)



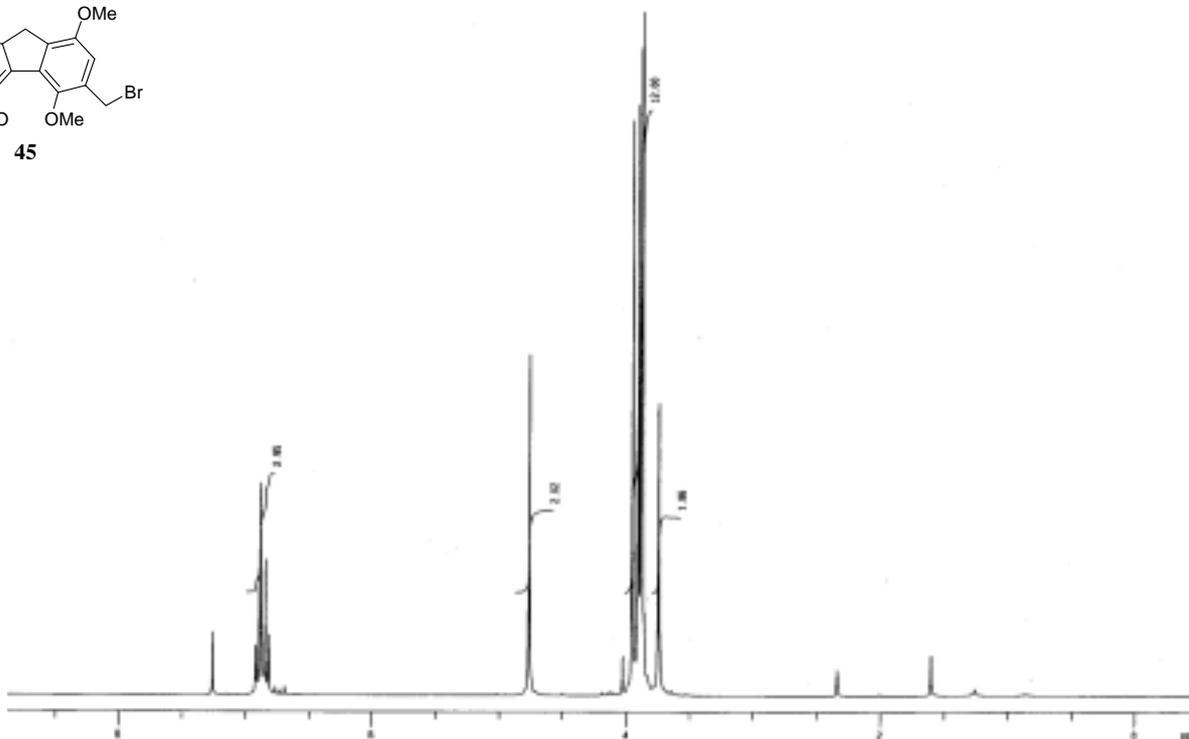
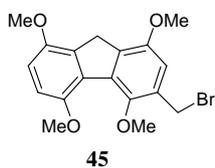
^1H NMR spectrum of 38 (300 MHz, CDCl_3)



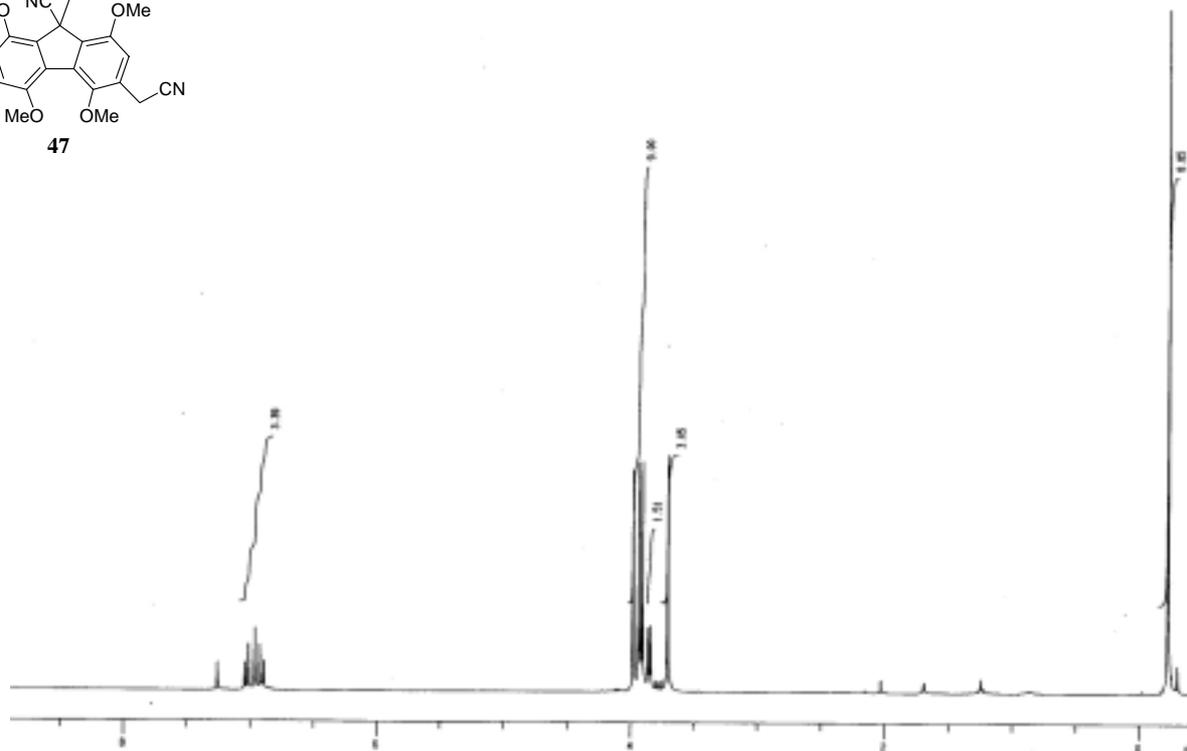
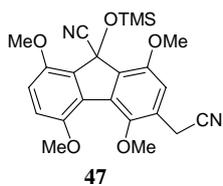
^1H NMR spectrum of 46 (300 MHz, CDCl_3)



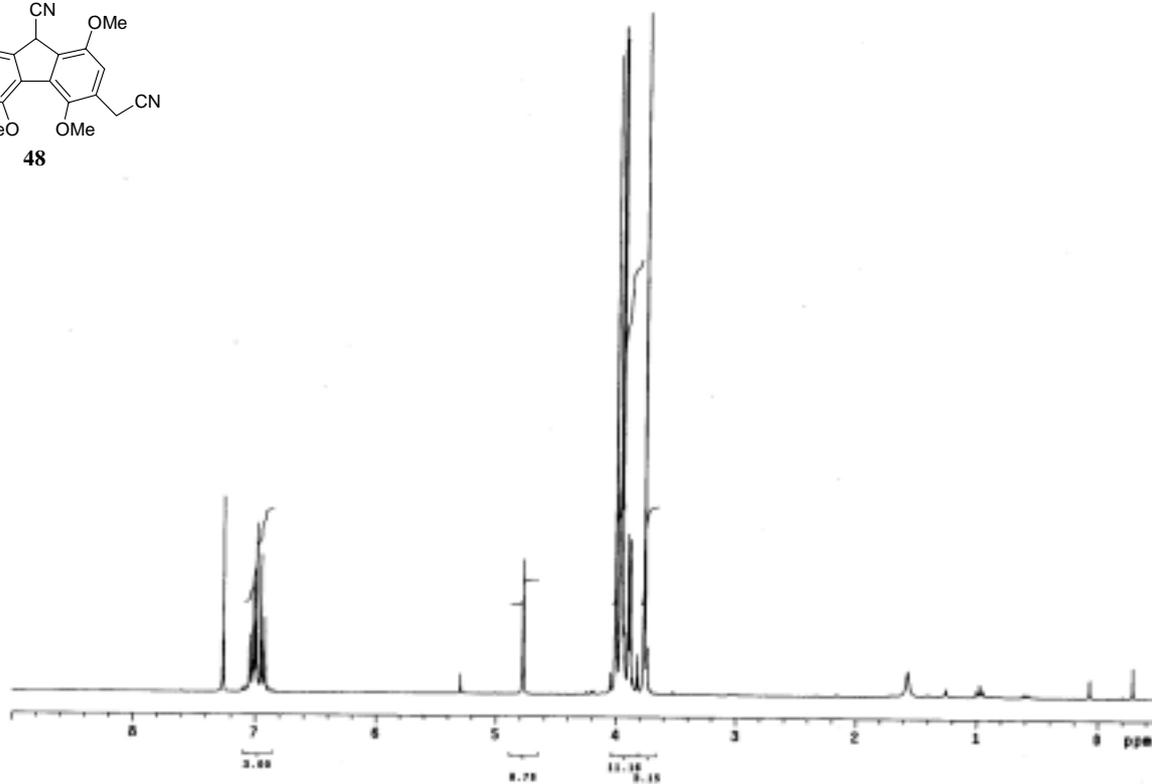
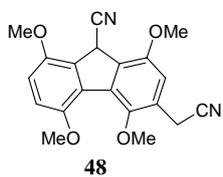
^1H NMR spectrum of 44 (300 MHz, CDCl_3)



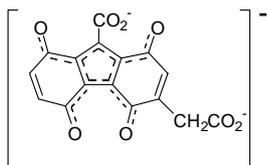
^1H NMR spectrum of 45 (300 MHz, CDCl_3)



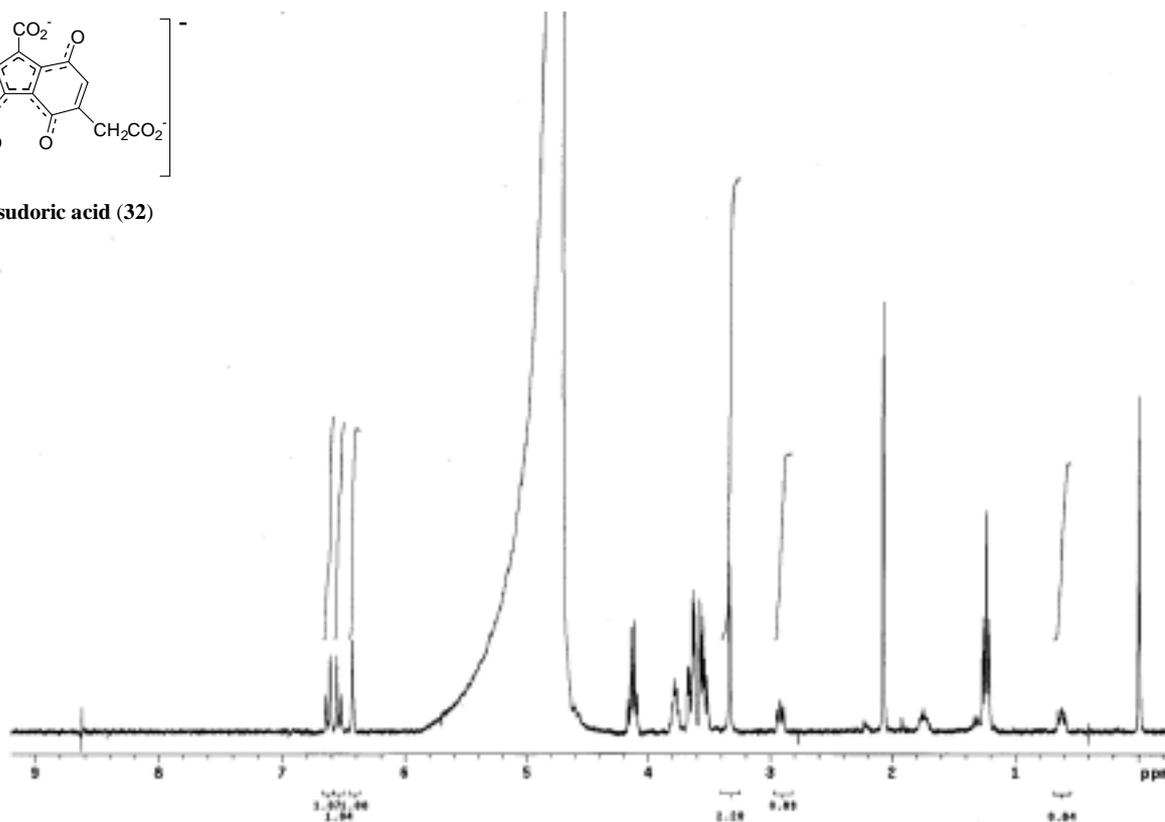
^1H NMR spectrum of 47 (300 MHz, CDCl_3)



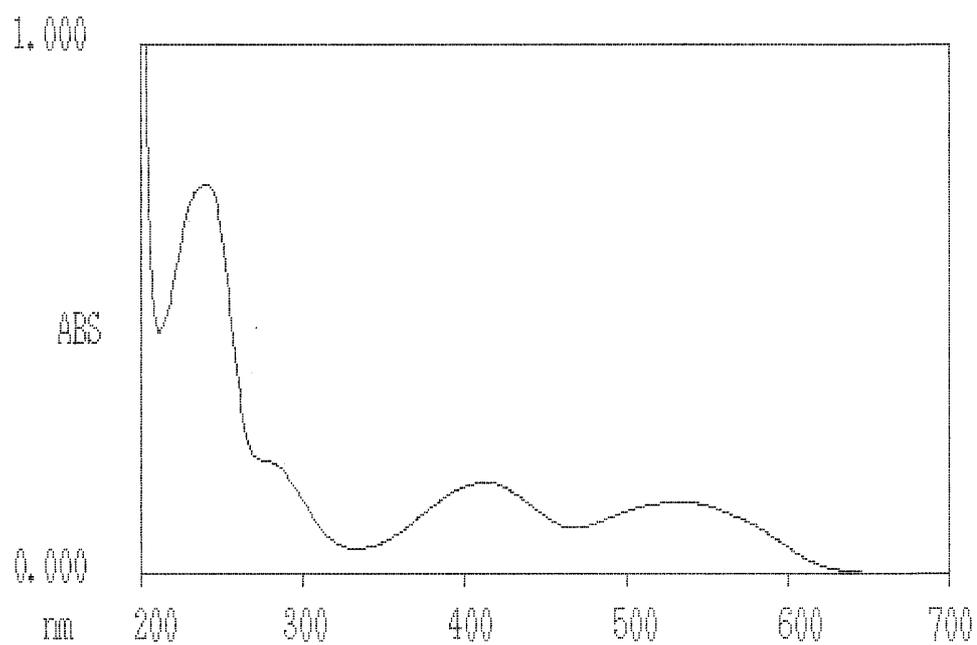
^1H NMR spectrum of 48 (300 MHz, CDCl_3)



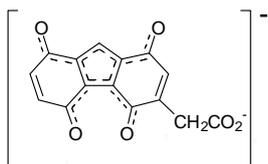
hipposudoric acid (32)



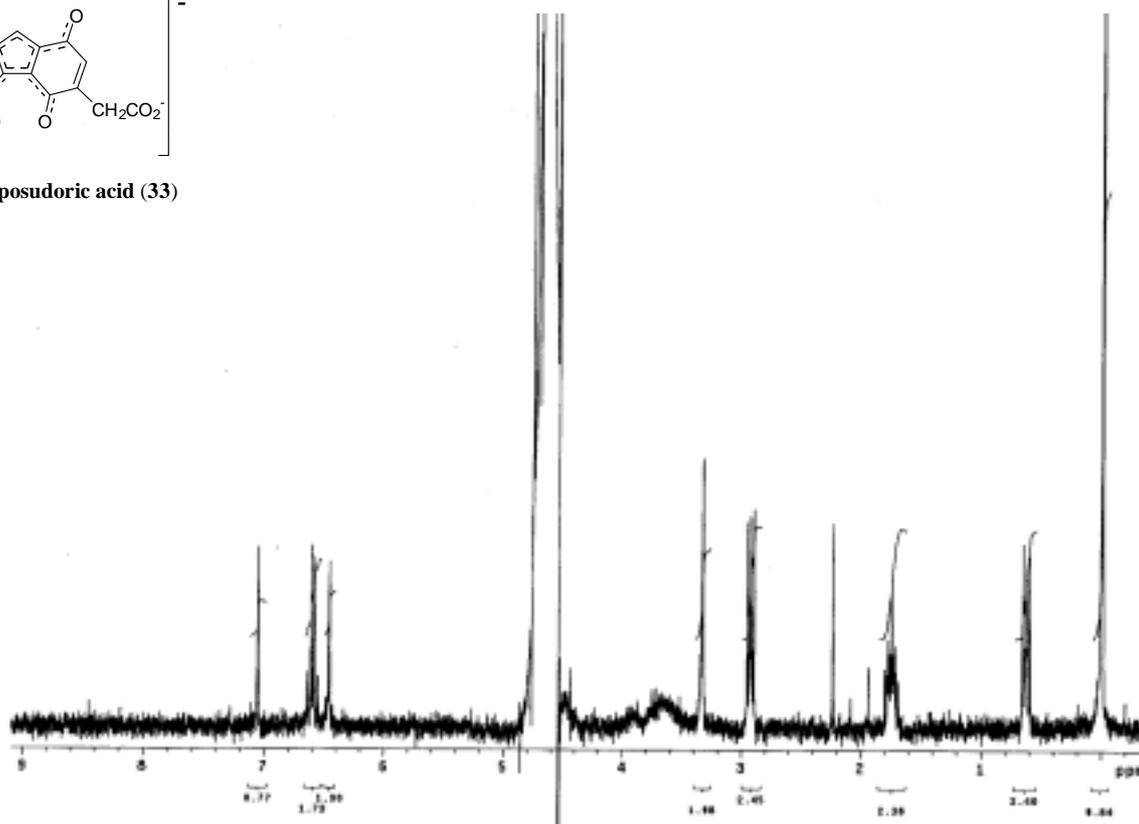
^1H NMR spectrum of 32 (300 MHz, 1.7 M NaCl /
0.2 M phosphate buffer)



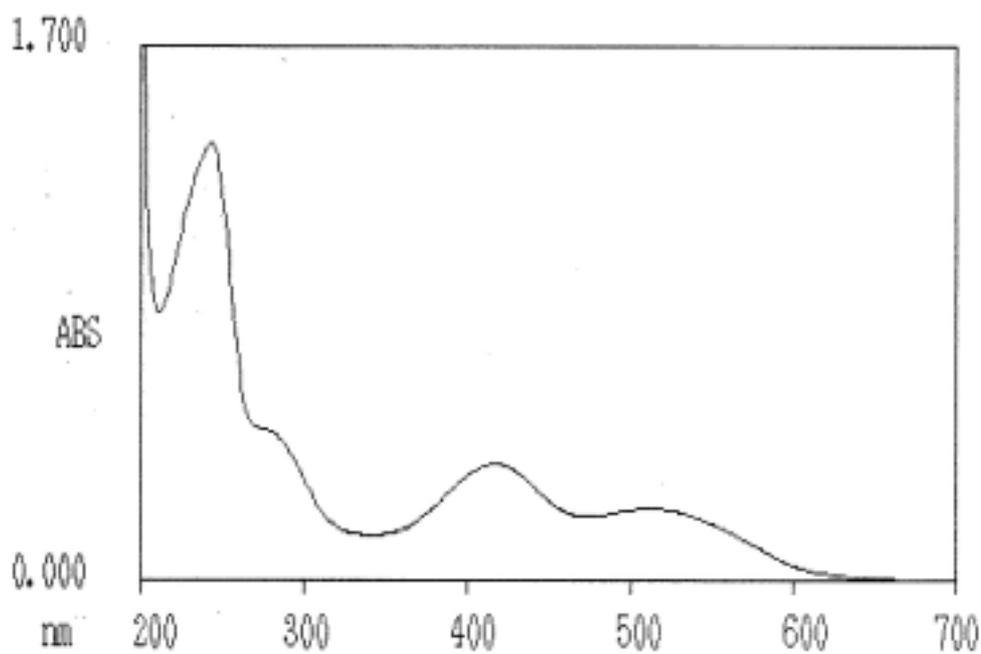
UV spectrum of hipposudoric acid (32) (0.1 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer)



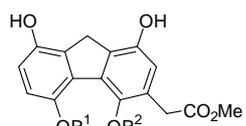
norhipposudoric acid (33)



¹H NMR spectrum of norhipposudoric acid (33)(300 MHz, 2.3 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer)

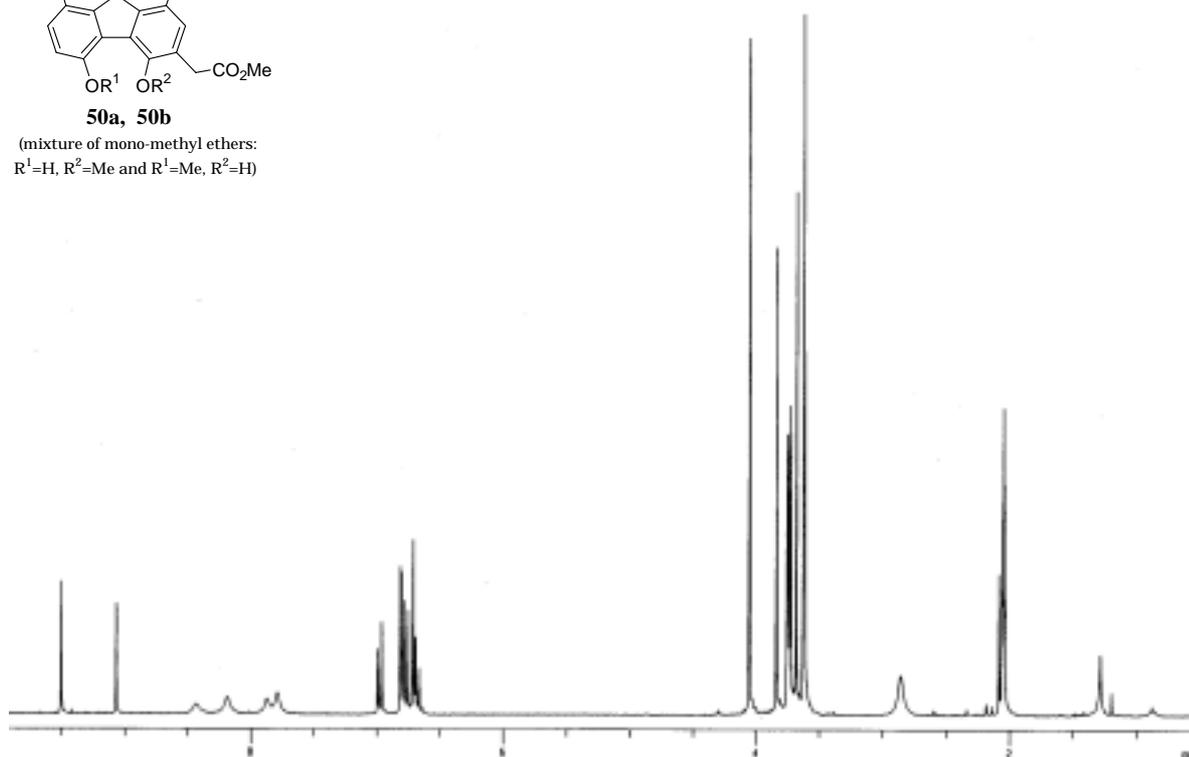


UV spectrum of norhipposudoric acid (33) (0.2 M NaCl / 0.2 M phosphate buffer)

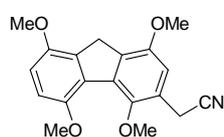


50a, 50b

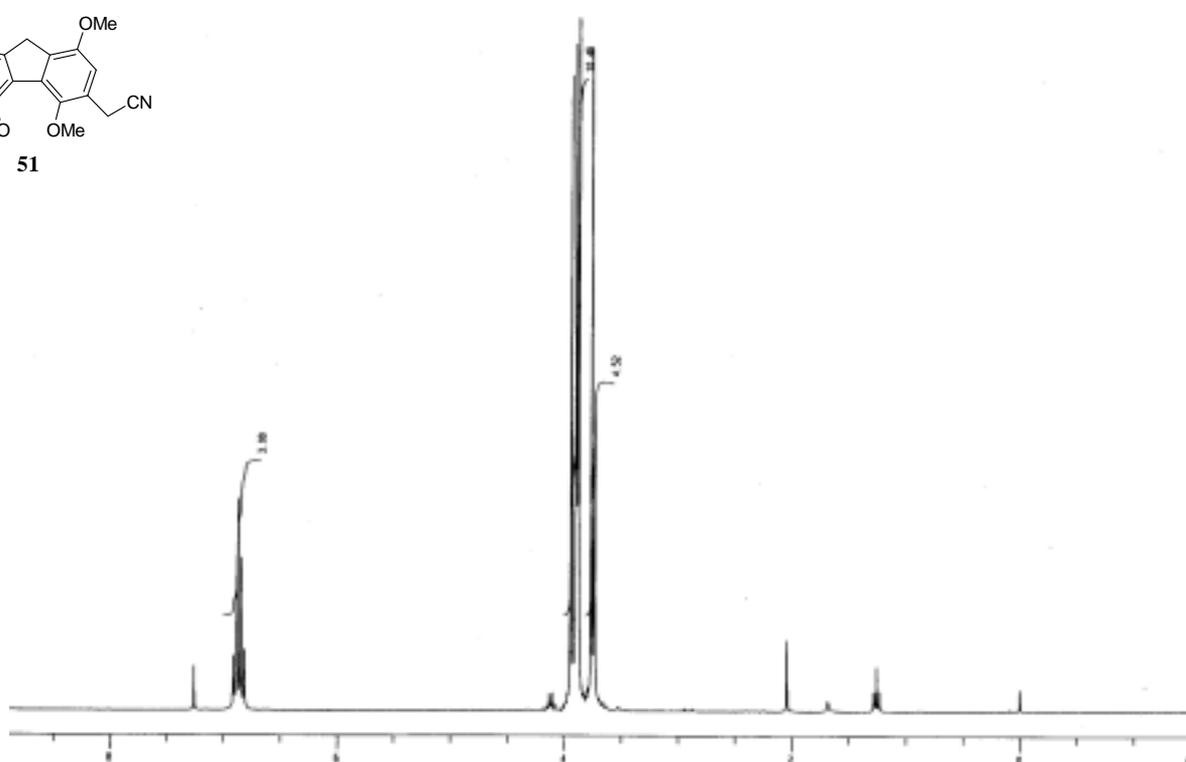
(mixture of mono-methyl ethers:
R¹=H, R²=Me and R¹=Me, R²=H)



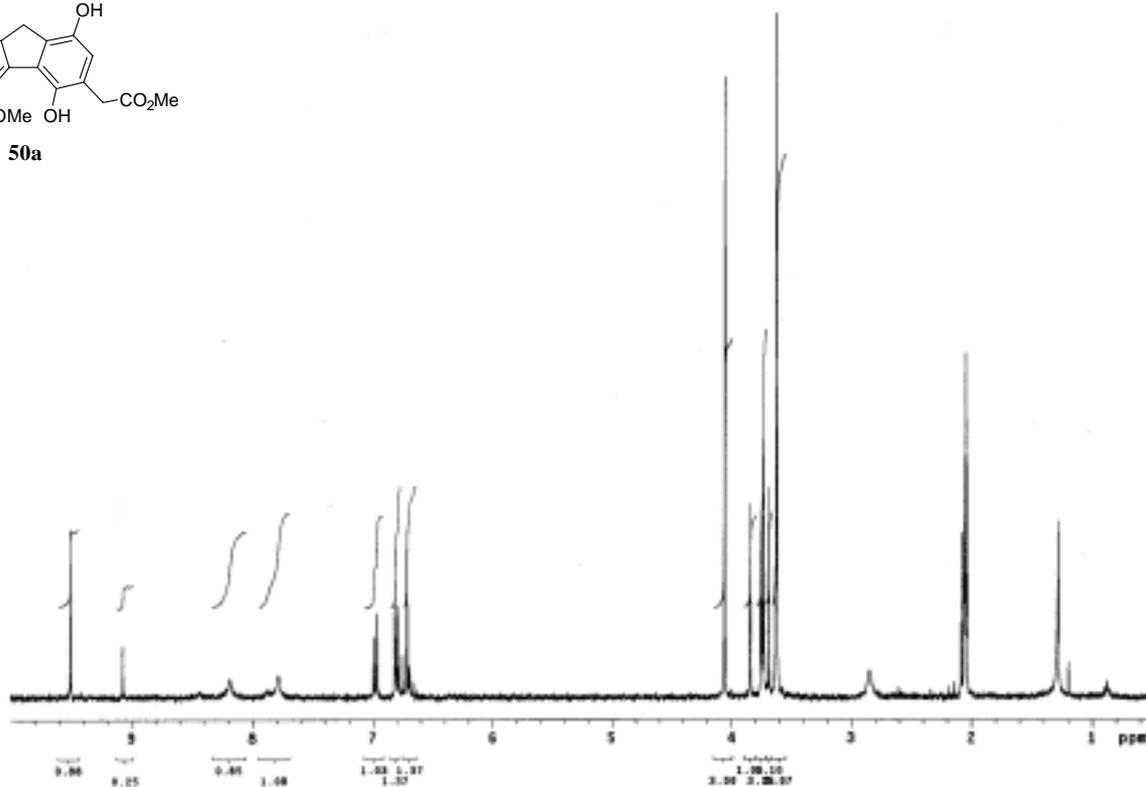
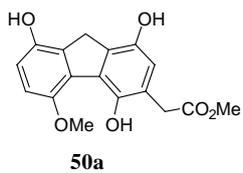
¹H NMR spectrum of 50 (300 MHz, acetone-d₆)



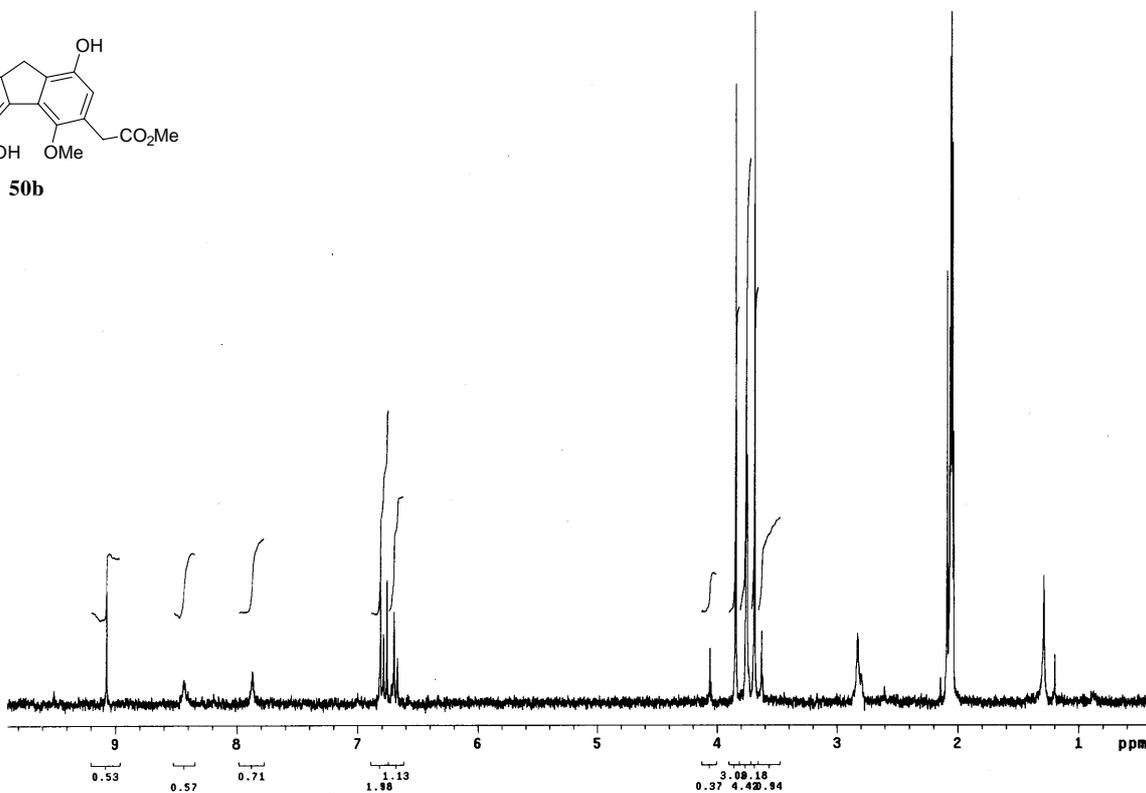
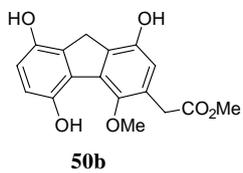
51



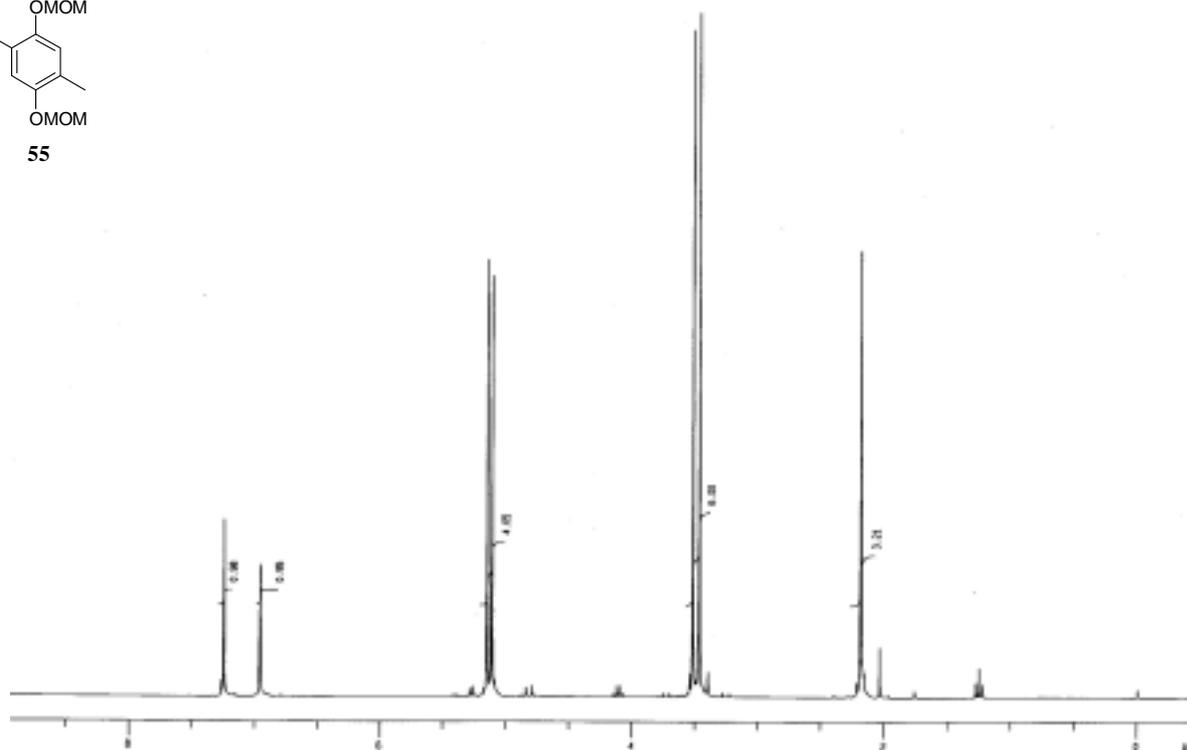
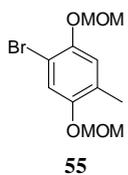
¹H NMR spectrum of 51 (300 MHz, CDCl₃)



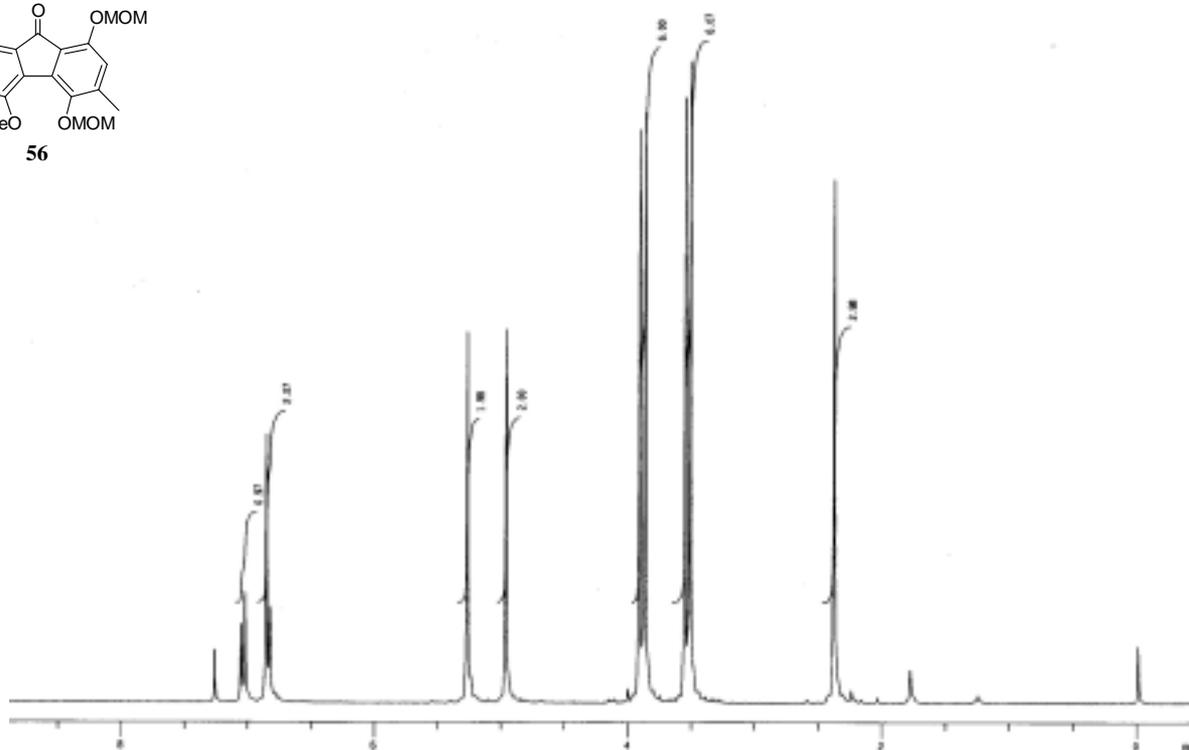
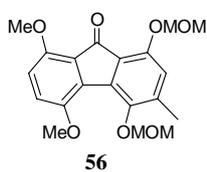
^1H NMR spectrum of 50a (300 MHz, acetone- d_6)



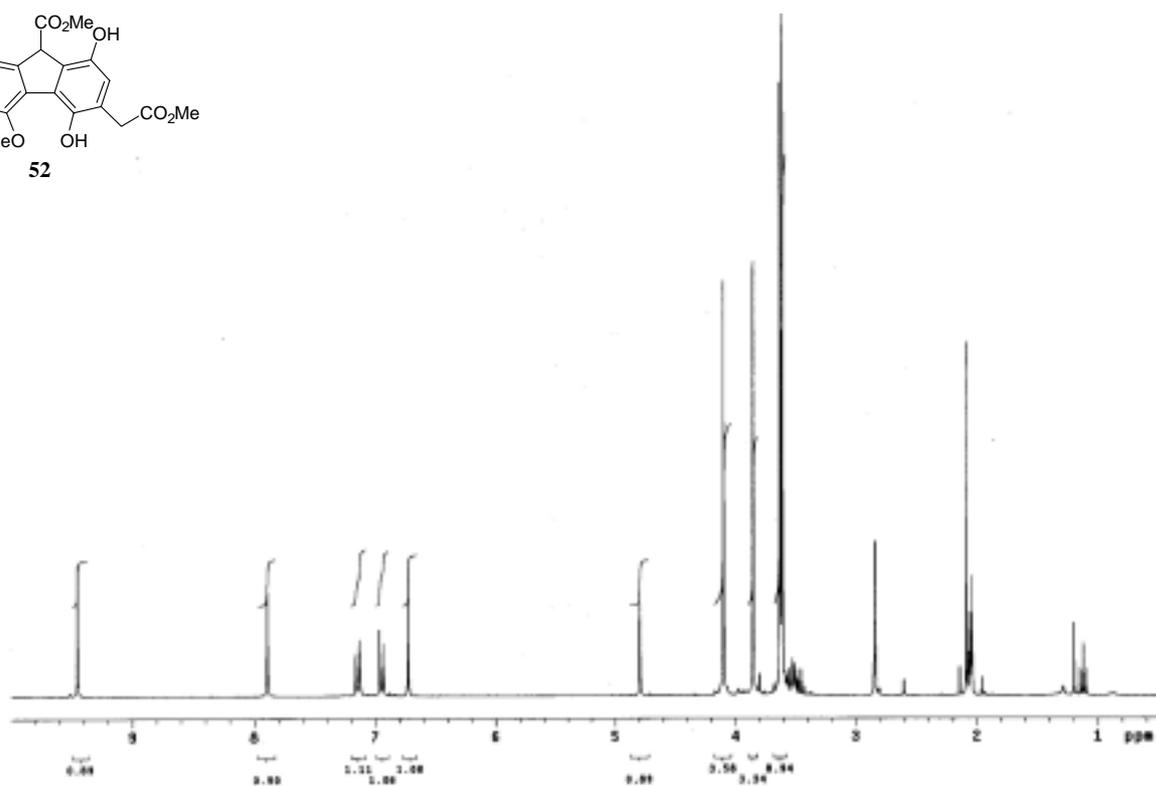
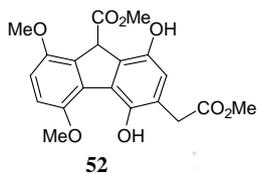
^1H NMR spectrum of 50b (300 MHz, acetone- d_6)



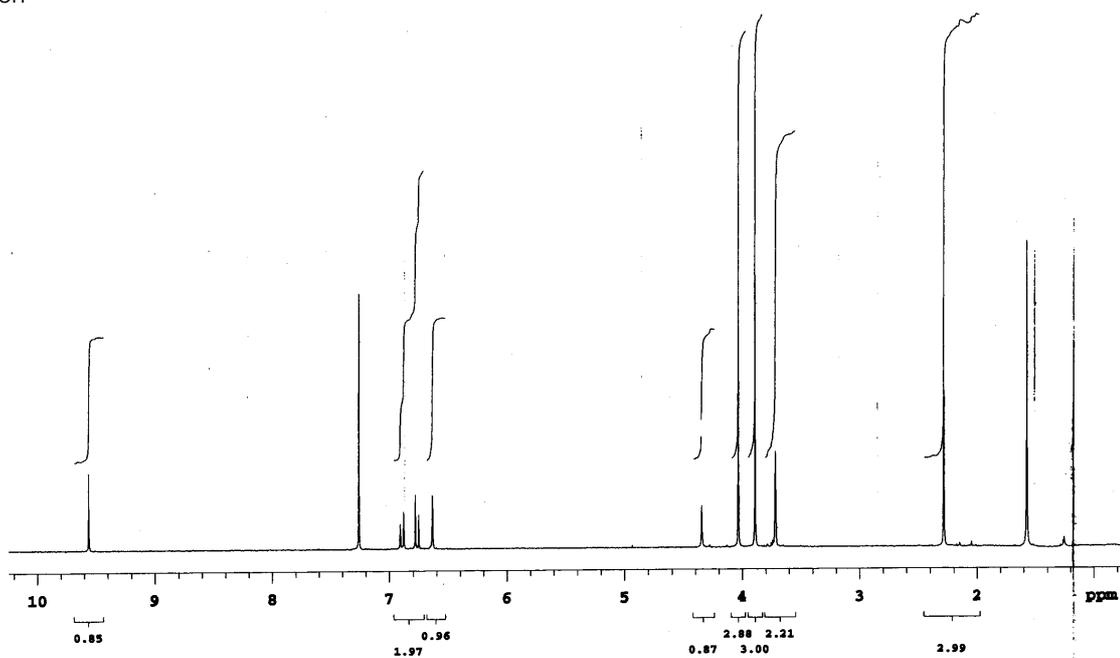
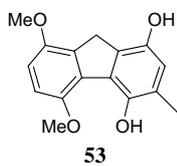
^1H NMR spectrum of 55 (300 MHz, CDCl_3)



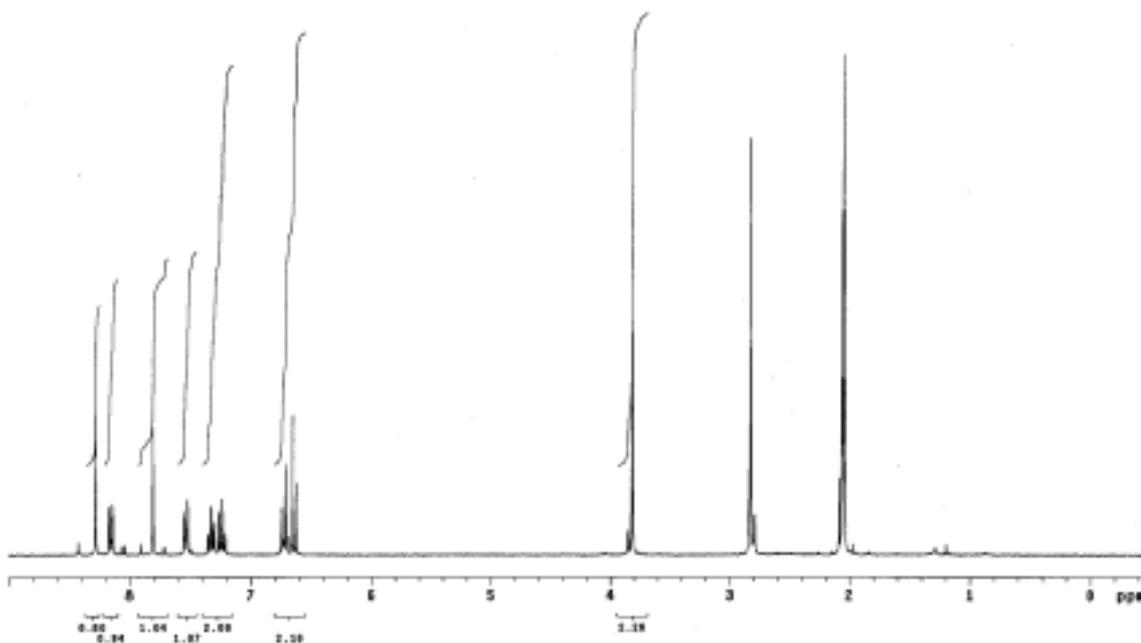
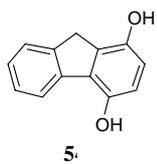
^1H NMR spectrum of 56 (300 MHz, CDCl_3)



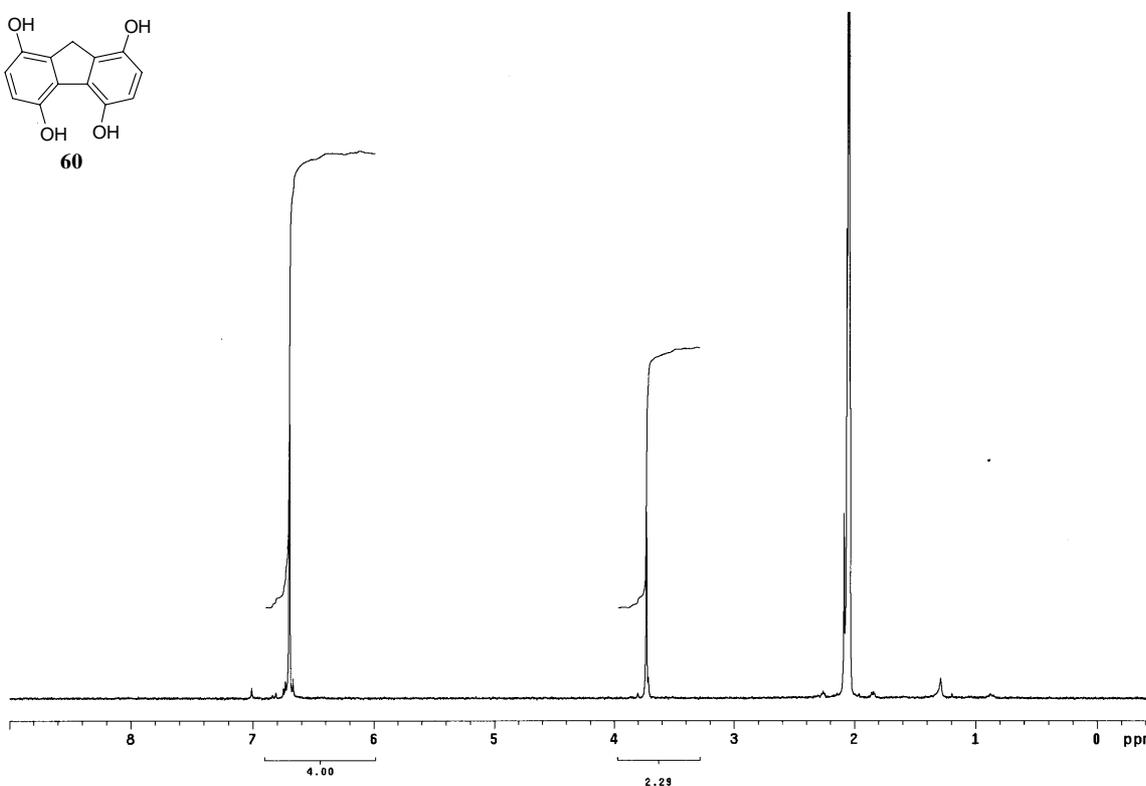
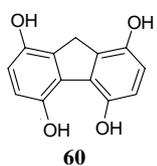
¹H NMR spectrum of 52 (300 MHz, acetone-d₆)



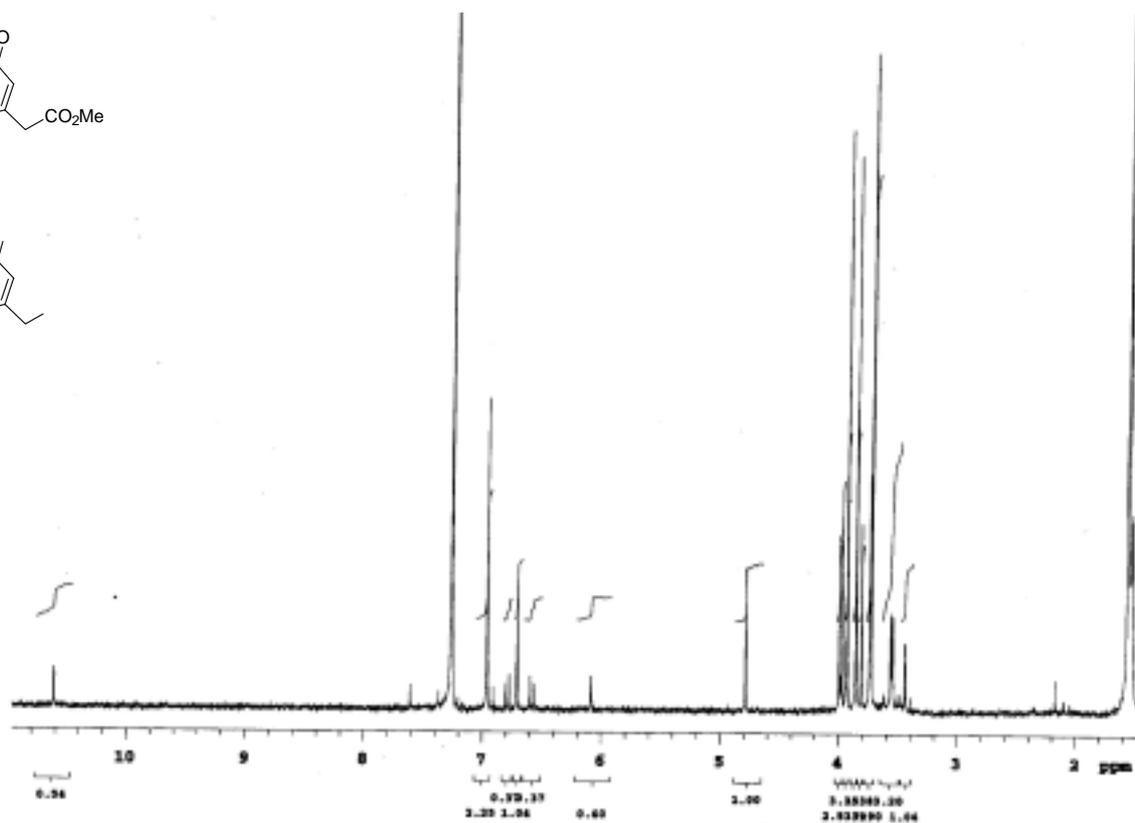
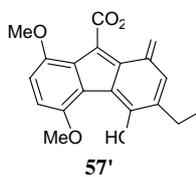
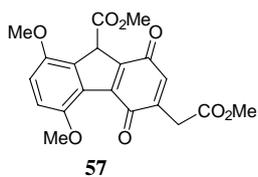
¹H NMR spectrum of 53 (300 MHz, acetone-d₆)



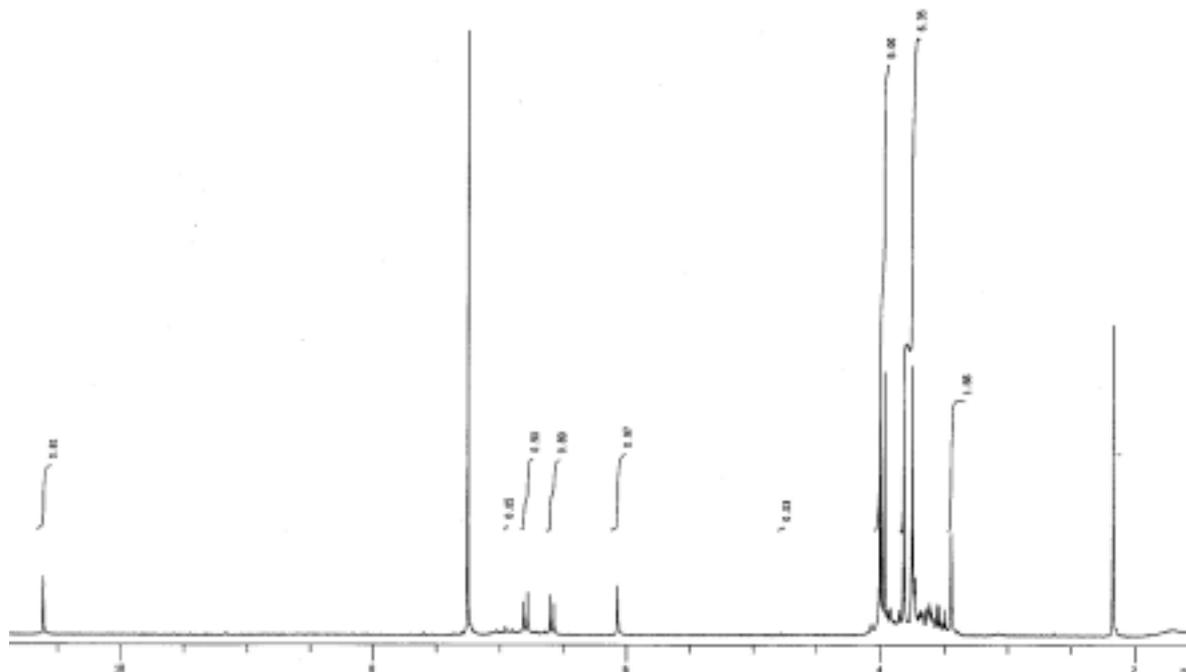
¹H NMR spectrum of 54 (300 MHz, CDCl₃)



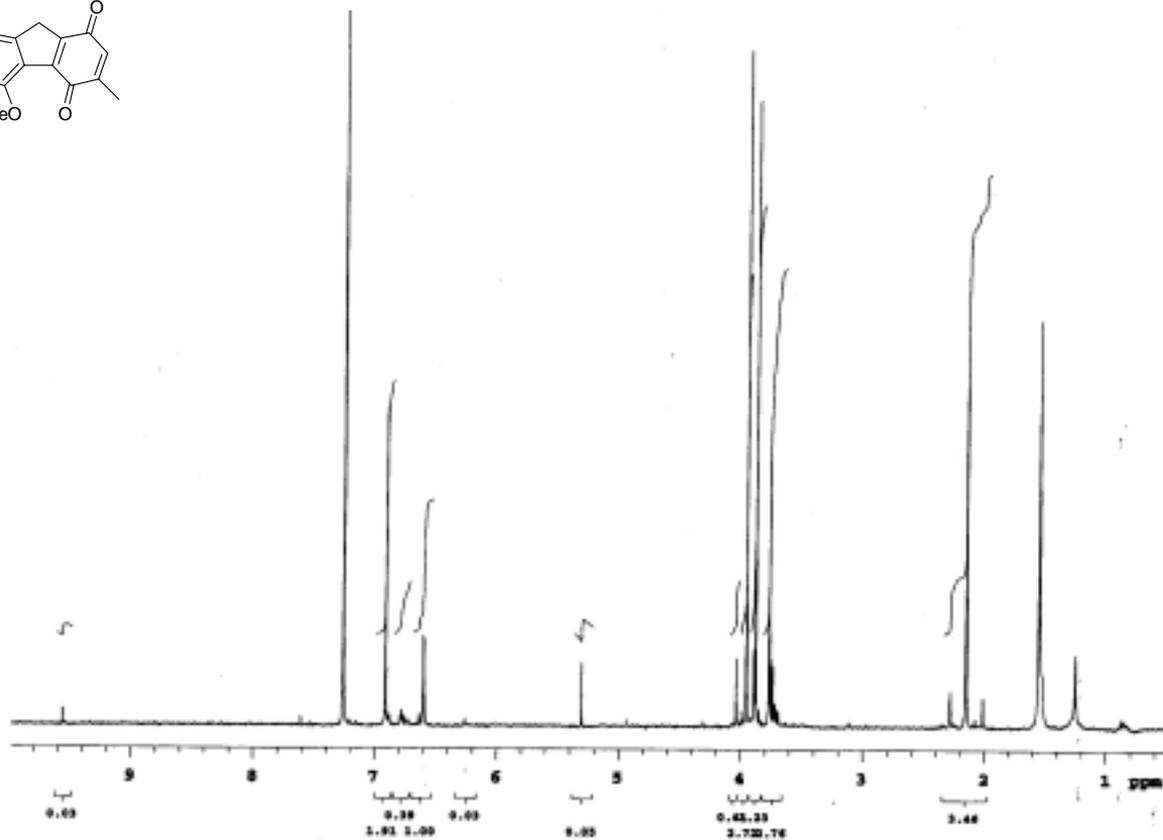
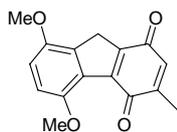
¹H NMR spectrum of 60 (300 MHz, acetone-d₆)



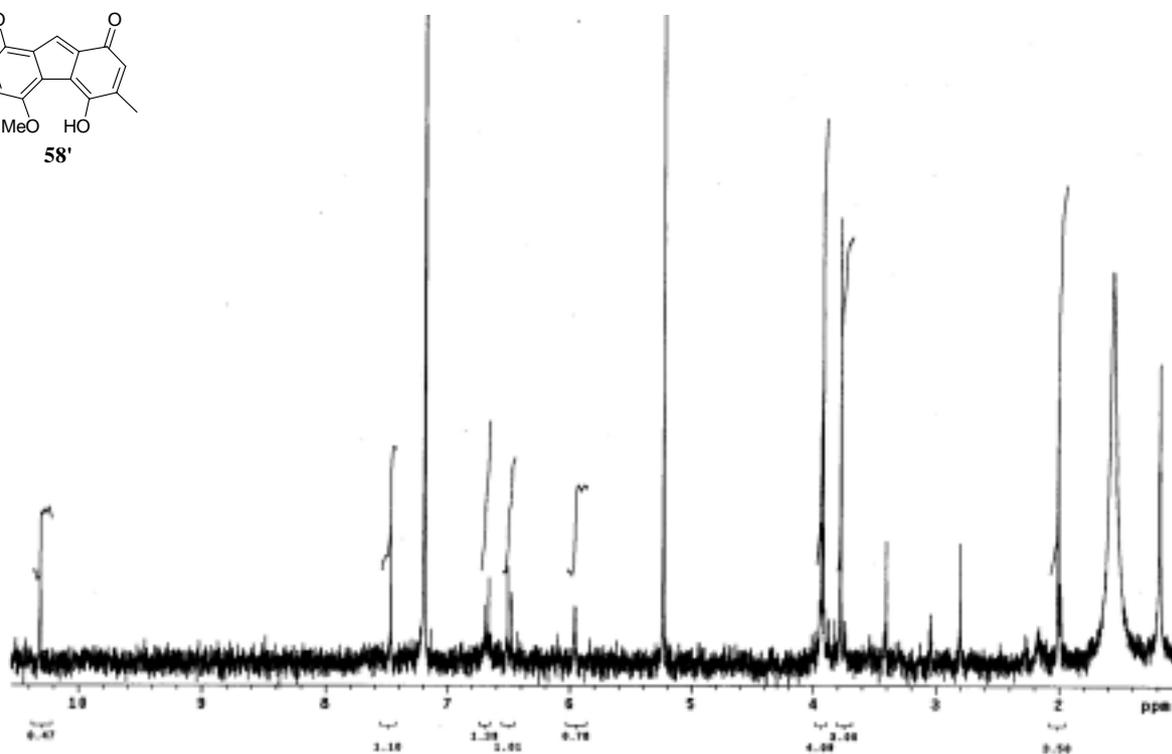
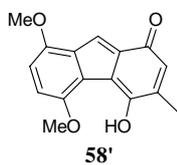
¹H NMR spectrum of mixture of 57 and 57' (300 MHz, CDCl₃)



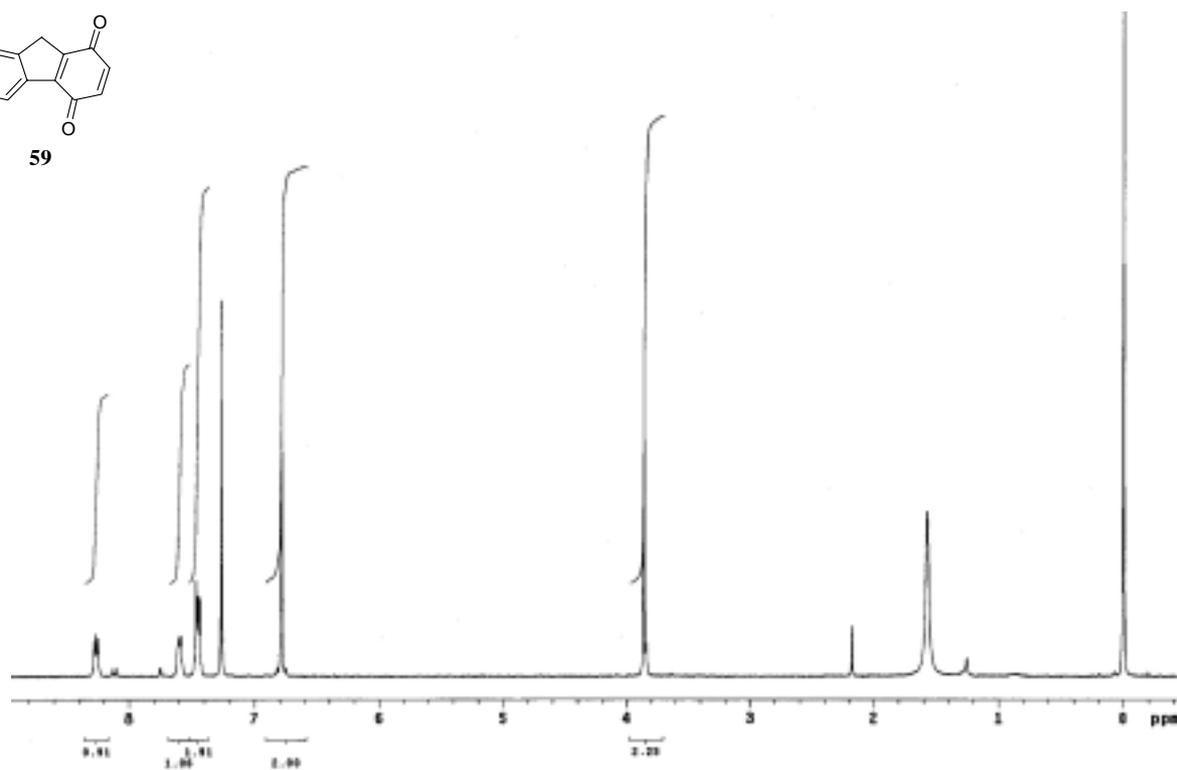
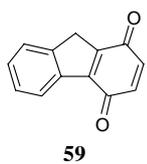
¹H NMR spectrum of 57' (300 MHz, CDCl₃)



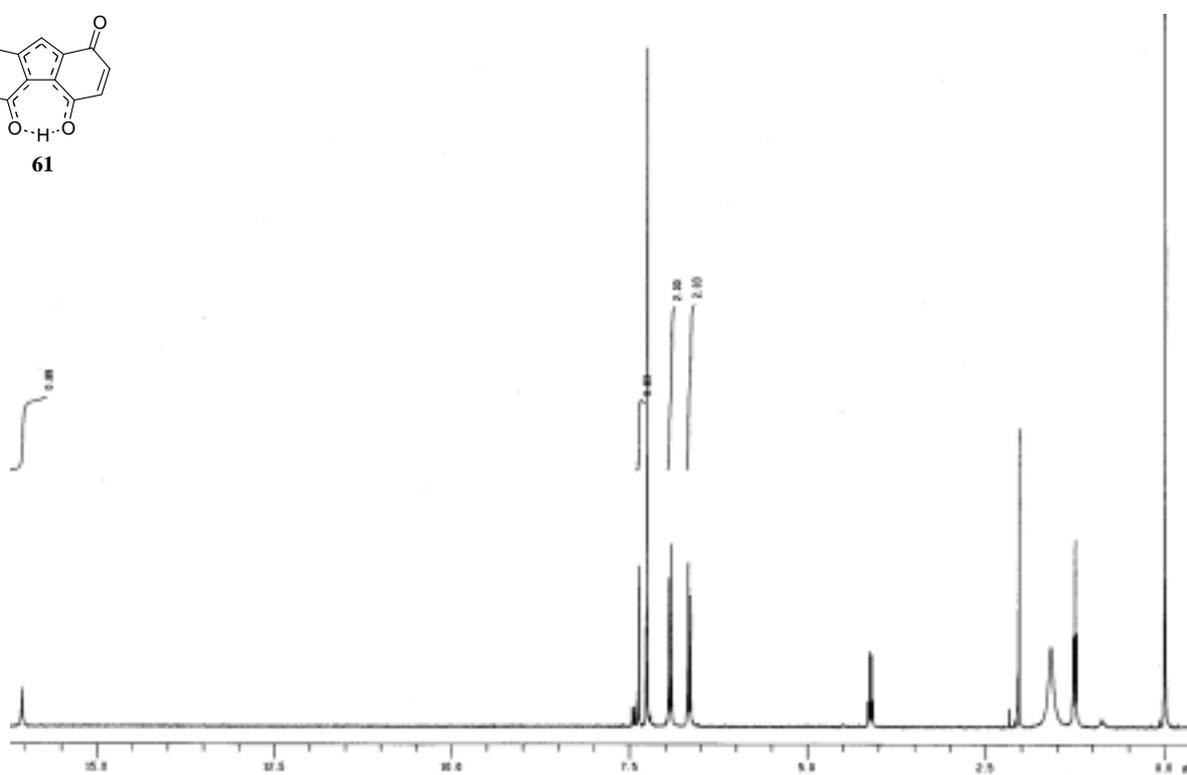
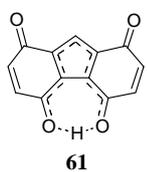
¹H NMR spectrum of mixture of 58 (300 MHz, CDCl₃)



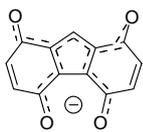
¹H NMR spectrum of mixture of 58' (300 MHz, CDCl₃)



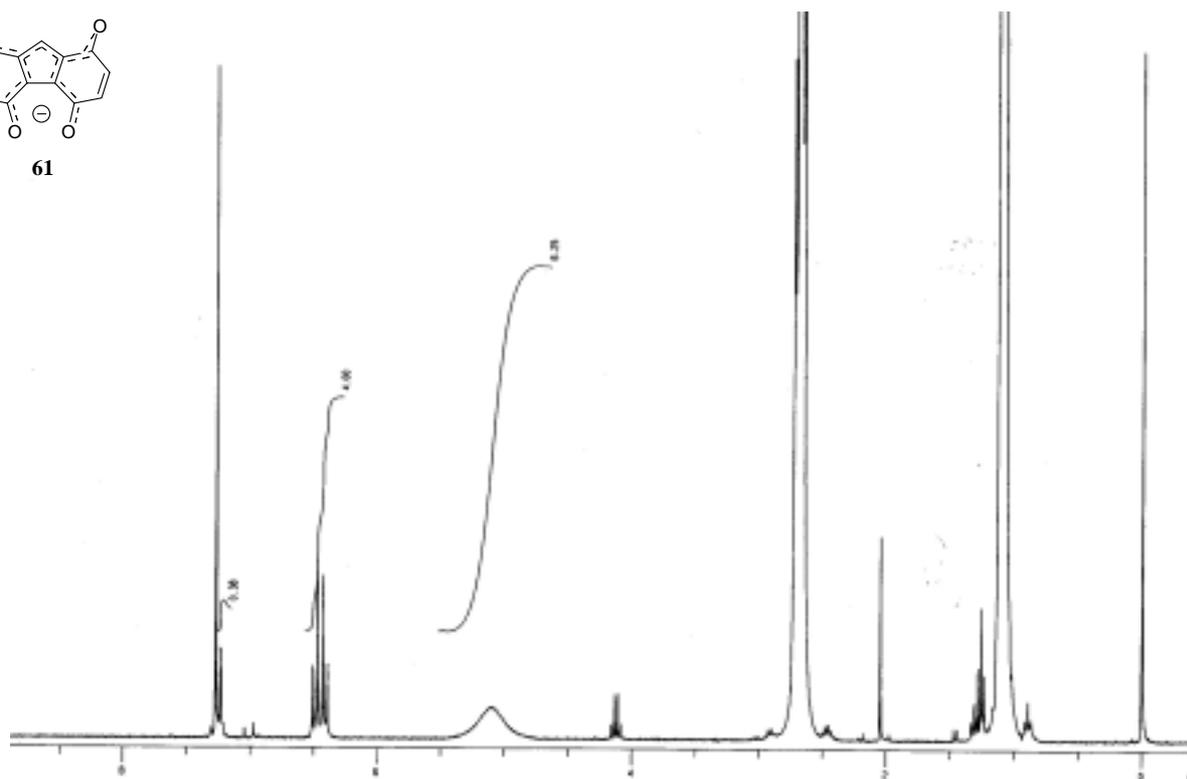
^1H NMR spectrum of mixture of 59 (300 MHz, CDCl_3)



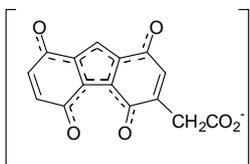
^1H NMR spectrum of mixture of 61 (300 MHz, CDCl_3)



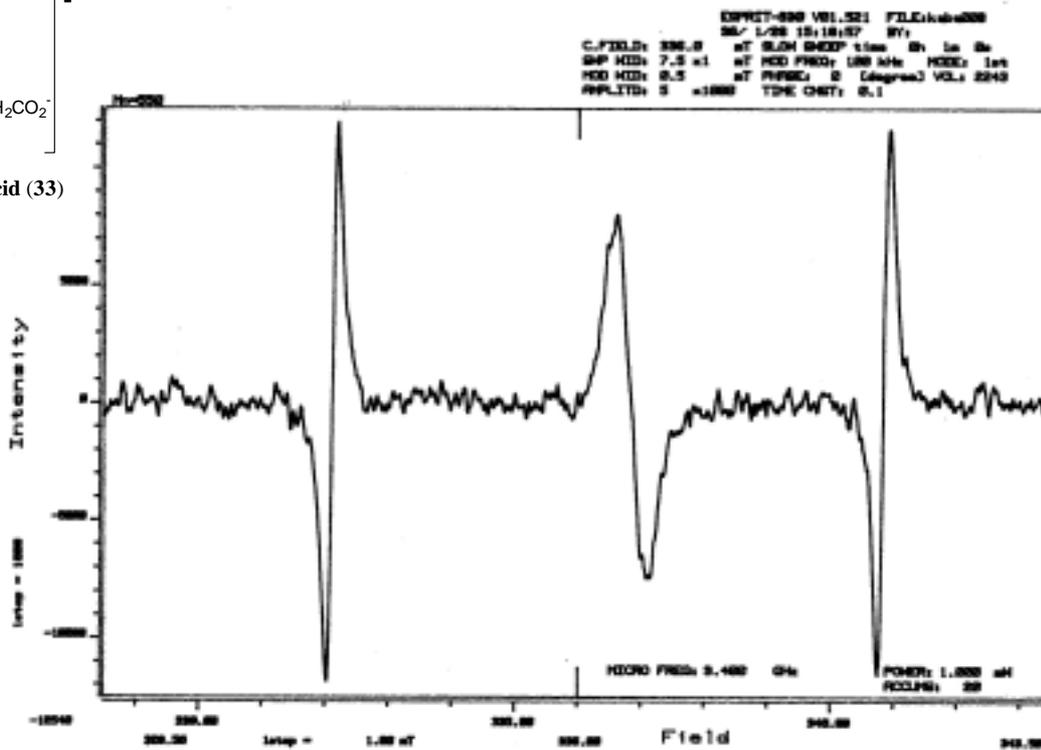
61



^1H NMR spectrum of 61 (Et_3N added) (300 MHz, CDCl_3)



norhipposudoric acid (33)



ESR spectrum of 33 (after gel filtration)

参考文献

第1章

- 1) a) Saikawa, Y.; Okamoto, H.; Inui, T.; Makabe, M.; Okuno, T.; Suda, T.; Hashimoto, K.; Nakata, M. *Tetrahedron* 2001, 57, 8277-8281. b) 犀川陽子、岡本博樹、真壁みどり、奥野智旦、須田隆、橋本貴美子、中田雅也 第43回天然有機化合物討論会講演要旨集 (2001), 443-448.
- 2) a) Saikawa, Y.; Watanabe, T.; Hashimoto, K.; Nakata, M. *Phytochemistry* 2000, 55, 237-240. b) 犀川陽子、徳光直子、山田美奈、岡本博樹、橋本貴美子、中田雅也、渡邊尚志 第42回天然有機化合物討論会講演要旨集 (2000)、499-504.
- 3) a) Saikawa, Y.; Hashimoto, K.; Nakata, M.; Yoshihara, M.; Nagai, K.; Ida, M.; Komiya, T. *Nature in press*. b) 犀川陽子、橋本貴美子、中田雅也、吉原正人、永井清、井田素端、小宮輝之 第45回天然有機化合物討論会講演要旨集 (2003)、187-192.
- 4) Ushiyama, H.; Kan, K.; Shindo, T.; Yasuda, K. *Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P. H.* 1998, 49, 172-178.
- 5) Seto, K. *Bull. Hokkaido Kinoko no Kai* 2000, 42, 11-16.
- 6) *The Bulletin of Shinshu Kinoko no Kai* 2000, 7, 14-15.
- 7) Suzuki, M. *Bull. Yamagata Med. Assoc.* 2000, 591, 15-17.
- 8) Shirahama, H.; Konno, K.; Hashimoto, K. *現代化学* 2000, 10, 43-51.
- 9) *Development in Food Science 4-Trichothecenes: Chemical, Biological and Toxicological Aspects*, Ueno, Y., Ed.; Kodansha: Tokyo, 1983.
- 10) Grove, J. F. *Nat. Prod. Rep.* 1993, 429-448.
- 11) Böhner, B.; Fetz, E.; Härrli, E.; Sigg, H. P.; Stoll, Ch.; Tamm, Ch. *Helv. Chim. Acta* 1965, 48, 1079-1087.
- 12) Fetz, E.; Böhner, B.; Tamm, Ch. *Helv. Chim. Acta* 1965, 48, 1669-1679.
- 13) Traxler, P.; Zürcher, W.; Tamm, Ch. *Helv. Chim. Acta* 1970, 53, 2071-2085.
- 14) a) Jarvis, B. B.; Wang, S. J. *Nat. Prod.* 1999, 62, 1 284-1289. b) Matsumoto, M.; Minato, H.; Tori, K.; Ueyama, M. *Tetrahedron Lett.* 1977, 4093-4096. c) Matsumoto, M.; Minato, H.; Uotani, N.; Matsumoto, K.; Kondo, E. *J. Antibiot.* 1977, 30, 681-682. d) Jarvis, B. B.; Mitiwo, J. O.; Flippen-Anderson, J. L.; Mazzola, E. P. *J. Nat. Prod.* 1982, 45, 440-448.
- 15) Eppley, R. M.; Mazzola, E. P.; Hight, R. J.; Bailey, W. J. *J. Org. Chem.* 1977, 42, 240-243.
- 16) Breitenstein, W.; Tamm, Ch. *Helv. Chim. Acta* 1978, 61, 1975-1983.
- 17) a) Roush, W. R.; Blizzard, T. A. *J. Org. Chem.* 1984, 49, 1772-1783. b) Smitka, T. A.; Bunge, R. H.; Bloem, R. J.; French, J. C. *J. Antibiot.* 1984, 37, 823-828.
- 18) Vittimberga, J. S.; Vittimberga, B. M. *J. Org. Chem.* 1965, 30, 746-748.
- 19) Eppley, R. M. *Mycotoxins in Human and Animal Health*; Rodricks, J. V., Hesseltine, C. W., Mehlman, M. A., Eds.; Pathotox: Park Forest South, 1977; Vol. II, pp 285-293.
- 20) Eppley, R. M.; Bailey, W. J. *Science* 1973, 181, 758-760.
- 21) Zhang, H-j.; Tamez, P. A.; Aydogmus, Z.; Tan, G. T.; Saikawa, Y.; Hashimoto, K.; Nakata, M.; Hung, N. V.; Xuan, L. T.; Cuong, N. M.; Soejarto, D. D.; Pezzuto, J. M.; Fong, H. H. S. *Planta*

Med. 2002, 68, 1088-1091.

- 22) a) Rychnovsky, S. D.; Skalitzky, D. J. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 945-948. b) Evans, D. A.; Rieger, D. L.; Gage, J. R. *Tetrahedron Lett.* 1990, 31, 7099-7100. c) Rychnovsky, S. D.; Rogers, B.; Yang, G. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 3511-3515. d) Rychnovsky, S. D.; Yang, G.; Powers, J. P. *J. Org. Chem.* 1993, 58, 5251-5255.
- 23) a) Kusumi, T.; Ohtani, I.; Inoue, Y.; Kakisawa, H. *Tetrahedron Lett.* 1988, 29, 4731-4734. b) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 4092-4096.
- 24) Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. *J. Org. Chem.* 1991, 56, 1296-1298.
- 25) Myrotoxin 類の X 線結晶構造解析結果から、myrotoxin A, B と類似の NMR スペクトルを示す satratoxin 類の 12'位の絶対立体配置は R であると結論している報告がある。a) Jarvis, B. B.; Menzoglu, F. T.; Lee, Y-W.; Filippen-anderson, J. L.; Gilardi, R. D.; George, C. F. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 1986, 95, 681-697. b) Jarvis, B. B.; Yatawara, C. S. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 2906-2910.

第2章

- 26) a) Rommier, M. A. *C. R. Acad. Sci.* 1868, 66, 108. b) Fordos, M. *C. R. Acad. Sci.* 1863, 57, 50.
- 27) Liebermann, C.; Fischer, O. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1874, 8, 1102-1107.
- 28) Kögl, F.; Taeueffenbach, G. *Liebigs Ann.* 1925, 445, 170-180.
- 29) Kögl, F.; Erxleben, H. *Liebigs Ann.* 1930, 484, 65-84.
- 30) Blackburn, G. M.; Neilson, A. H.; Todd, L. *Pro. Chem. Soc. London* 1962, 327-328.
- 31) Edwards, R. L.; Kale, N. *Tetrahedron* 1965, 21, 2095-2107.
- 32) a) Cameron, D. W.; Chan, H. W.-S. *J. Chem. Soc. (C)* 1966, 1825-1832. b) Cameron, D. W.; Chan, H. W.-S.; Hildyard, E. M. *ibid.* 1966, 1832-1836. c) Blackburn, G. M.; Cameron, D. W.; Chan, H. W.-S. *ibid.* 1966, 1836-1842.
- 33) Giles, R. G. F.; Reuben, M. K.; Roos, G. P. S. *Afr. J. Chem.* 1979, 32, 127-129.
- 34) Giles, R. G. F.; Green, I. R.; Hugo, V. I. S. *Afr. J. Chem.* 1990, 43, 28-33.
- 35) Blackburn, G. M.; Ekong, D. E.U.; Neilson, A. H.; Todd, L. *Chimia* 1965, 19, 208-212.
- 36) a) Phillips, G. O.; Worthington, N. W. *Chem. Commun.* 1967, 834-835. b) Lindquist, L. *Arkiv Kemi.* 1960, 16, 79. c) Kasche, V.; Lindquist, L. *Photochem. Photobiol.* 1965, 4, 923. d) Ohno, T.; Kato, S.; Koizumi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1966, 39, 232.
- 37) 松浦輝男「有機光化学」第4章 p121-132 (化学同人、京都、1970) .
- 38) a) Hu, Y-Z.; An, J-Y.; Jiang, L-J.; Chen, D-W. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 1995, 89, 45-51. b) Reszka, K.; Lown, J. W. *Photochem. Photobiol.* 1989, 50, 297-304.
- 39) a) Musso, H.; Gizycki, U. V.; Záhorszky, U. I.; Bormann, D. *Liebigs Ann.* 1964, 676, 10-20. b) Land, E. J.; Porter, G. *Transaction of the Faraday Society* 1963, 59, 2016-2026. c) Dobson, G.; Grossweiner, L. I. *Transaction of the Faraday Society* 1964, 61, 708-714.
- 40) a) 田村重夫、坪村宏、戸倉仁一郎、三川礼「電荷移動錯体(下)－合成と重合－」第3章 p23-32、第5章 p45-54 (化学同人、京都、1971). b) Kainer, H.; Überle, A. *Chem. Ber.* 1955, 88, 1147. c) Eastman, W.; Engelsman, G.; Carvin, M. *J. Am. Chem. Soc.* 1962, 84, 1339-1345. d) Isenberg, I.; Baird, S. L. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* 1962, 84, 3803-3805.

- 41) a) Philips, G. O.; Worthington, N. W.; McKellar, J. F.; Sharpe R. R. *J. Chem. Soc. A.* 1969, 767-773. b) Khudyakov, I. V.; Prokof'ev, A. I.; Margulis, L. A.; Kuzmin, V. A. *Chem. Phys. Lett.* 1984, 104, 409-412.
- 42) Williams, R. M.; Glinka, T.; Flanagan, M. E.; Gallegos, R.; Coffman, H.; Pei, D. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114, 733-740.
- 43) Carloni, P.; Damiani, E.; Greci, L.; Stipa, P.; Rizzoli, C.; Sgarabotto, P.; Ugozzoli, F. *Tetrahedron* 1993, 49, 5099-5108.

第3章

- 44) a) 小川徳雄「汗の常識、非常識」第3章 p63 - 86 (講談社ブルーバックシリーズ、東京、1998).
b) 小川徳雄「新・汗の話」第3章 p128-130 (アドア出版、東京、1994).
- 45) Eltringham, S. K. *The Hippos (T&AD Poyser Natural History Series, London, 1999).*
- 46) Luck, C. P.; Wright, P. G. *Quart. J. Exp. Physiol.* 1964, 49, 1-14.
- 47) カバの皮膚上に色素を合成する菌はいないとの報告がある。Nitta, H.; Takasu, M. *Nagoya Med. J.* 1958, 4, 45-59.
- 48) Raper, H. S.; Speakman, H. B. *Biological J.* 1925, 20, 69-72.
- 49) Mason, H. S. *J. Biol. Chem.* 1948, 83-99.
- 50) Piattelli, M.; Nicolaus, R. A. *Tetrahedron* 1961, 15, 66-75.
- 51) Korytowski, W.; Kalynaraman, B.; Menon, I. A.; Sarna, T.; Sealy, R. C. *Biochim. Biophys. Acta* 1986, 882, 145-153.
- 52) Chedel, M. R. *Photochem. Photobiol.* 1982, 35, 881-885.
- 53) Munne-Bosch, S.; Alegre, L. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2002, 21, 31-57.
- 54) Moerner, C. T. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 1910, 69, 329-365.
- 55) a) Beynon, H.; Williams, A. E. *Appl. Spectroscopy* 1960, 14, 156. b) Zeller, K-P. *Mass spectra of quinines in The Chemistry of the Quinonoid compounds (Ed. Patai, S., John Wiley&Sons, 1974).*
- 56) Barton, D. H.; Deflorin, A. M.; Edwards, O. E. *J. Chem. Soc. Abs.* 1956, 530-534.
- 57) Horner, L.; Baston, D. W. *Liebigs Ann. Chem.* 1973, 910-935.
- 58) Gould, S. J.; Melville, C. R.; Cone, M. C.; Chen, J.; Carney, J. R. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 320-324.
- 59) Ghassan Qabaja; Graham B. Jones *J. Org. Chem.* 2000, 65, 7187-7194.
- 60) Pschorr, R. *Ber.* 1896, 29, 496.
- 61) Duclos, R. I.; Jr., Tung, J. S.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* 1984, 49, 5243-5246.
- 62) Wassmundt, F. W.; Kiesman, W. F. *J. Org. Chem.* 1995, 60, 196-201.
- 63) Simpson, J. C. E.; Atkinson, C. M.; Schofield, K.; Stephenson, O. *J. Chem. Soc.* 1945, 646-657.
- 64) Lothrop, W. C.; Goodwin, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* 1943, 65, 363-367.
- 65) Williams, W.; Sun, X.; Jebaratnam, D. *J. Org. Chem.* 1997, 62, 4364-4369.
- 66) Walsh, D. A. *Synthesis*, 1980, 677-688.
- 67) Scaarschmidt, A.; Herzenberg, J. *Ber. Dtsch. Chem. Ges. (B)* 1920, 53, 1388-
- 68) Raiford, L. C.; Stoesser, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* 1928, 50, 2556-2563. b) Benington F, Morin

- R. D. and Clark L. C. Jr., *J. Org. Chem.*, 1959, 24, 917.
- 69) *J. Chem. Soc.*, 1945, 646.
- 70) West, C. T.; Donnelly, S. J.; Kooistra, D. A.; Doyle, M. P. *J. Org. Chem.* 1973, 38, 2675-2681.
- 71) Cabiddu, S.; Floris, C.; Gelli, G.; Melis, S. *J. Organomet. Chem.* 1989, 366, 1-9.
- 72) Evans, D. A.; Truesdale, L. K.; Carroll, G. L. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 1973, 55-56.
- 73) Soli, E. D.; Manoso, A. S.; Patterson, M. C.; DeShong, P. J. *J. Org. Chem.* 1999, 64, 3171-3177.
- 74) Hiyama, T.; Inoue, M.; Saito, K. *Synthesis* 1986, 645-647.
- 75) Sakai, T.; Miyata, K.; Tsuboi, S.; Takeda, A.; Utaka, M.; Torii, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1989, 62, 3537-3541.
- 76) Groesbeek, A. J.; J. van Galen; Ippel, J. H.; Berden, J. A.; Lugtenburg, J. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1993, 112, 237-246.
- 77) Fry, J. L.; Orfanopoulos, M.; Adlington, M. G.; Dittman, W. R.; Silverman, S. B. Jr. *J. Org. Chem.*, 1978, 43, 374-375.
- 78) Smith, L. I.; Davis, H. R. Jr.; Sogn, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, 72, 3651-3655.
- 79) Koyama, H.; Kamikawa, T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1998, 1, 203-209.
- 80) Meselhy, M. R.; Kadota, S.; Tsubono, A.; Kusai, A.; Hattori, M.; Namba, T. *Tetrahedron Lett.* 1994, 35, 583-586.
- 81) G-Viloca, M.; G-Lafont, A.; Lluch, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 1081-1086.
- 82) Coulson, C. A. *The hydrogen bond in Hydrogen bonding* (Eds. Hadzi, D.; Thompson, H. W., Pergamon Press, London, 1959).
- 83) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spectroscopic Method in Organic Chemistry 95-96* (Thieme Foundations of Organic Chemistry Series, New York, 1997).
- 84) 大滝仁志 *化学の領域* 1967, 21, 636-642.
- 85) 菅原努、野津敬一「太陽紫外線と健康」(裳華房、ポピュラーサイエンスシリーズ、1998)
- 86) Boman, H. G. *Immunological Reviews* 2000, 173, 5-16.
- 87) Kaye, R. C.; Proudfoot, S. G. *J. Pharm. Pharmacol.* 1971, 23.
- 88) Van De Water, R. W.; Pettus, T. R. *Tetrahedron* 2000, 58, 5367-5405.
- 89) Rosenau, T.; Potthast, A.; Elder, T.; Kosma, P. *Org. Lett.* 2002, 4, 4285-4288.
- 90) a) Uebersax, B.; Neuenschwander, M.; Kellerhals, H-P. *Helv. Chim. Acta* 1982, 65, 74-88. b) Neuenschwander, M.; Kronig, P.; Schnholzer, S.; Slongo, M.; Uebersax, B. *Croat. Chem. Acta* 1980, 53, 625-636.
- 91) Day, J. H. *Chem. Rev.* 1953, 53, 167-189.
- 92) フルオレノンの3位の臭素化はNaHCO₃を加えて行った。また、ニトロ基の還元は別法で行った⁹³。
- 93) a) Clive, D. L. J.; Angoh, A. G.; Bennett, S. M. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 1339-1342. b) Hirashima, T.; Manabe, O. *Chem. Lett.* 1975, 259-260.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻くださいました慶應義塾大学理工学部 中田雅也教授に深く感謝いたします。

本研究に関して有益なご助言を賜りました慶應義塾大学理工学部 只野金一教授、西山繁教授ならびに千田憲孝教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、終始ご指導、ご鞭撻くださいました慶應義塾大学理工学部 橋本貴美子博士(現京都薬科大学助教授)に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多岐にわたりご助言くださいました叶直樹博士、東林修平博士に深く感謝いたします。

カエンタケを採取していただきました群馬県野生きのこの会 須田隆氏、北海道大学 五十嵐恒夫名誉教授、白濱晴久名誉教授ならびに三条きのこの会 中林芳光氏に感謝いたします。

カエンタケ中毒症状に関する情報をくださいました長岡中央総合病院 広瀬慎太郎博士、群馬大学 岸紘一郎博士ならびに山形県立中央病院 鈴木昌幸博士に感謝いたします。

カバの汗の研究にご理解ご協力くださいました上野動物園 吉原正人氏、永井清氏、井田素端氏、小宮輝之氏に感謝いたします。また長年に渡り採取にご協力くださいました上野動物園飼育課 松崎勝氏、栗田武治氏、猪俣康真氏、大塚和夫氏、野口利夫氏、田口眞隆氏、高木明氏、藤本卓也氏、斉藤譲一氏に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、マススペクトルの度々の測定を快諾くださり、有益なご助言を賜りました弘前大学農学生命科学部 奥野智且教授に深く感謝致しますと共に、測定くださいました数馬恒平博士、徳永隆治氏、眞壁みどり氏に御礼申し上げます。

天然物誘導体のマススペクトルおよびNMRスペクトルを測定くださいました慶應義塾大学理工学部 上田実助教授(現東北大学理学部教授)に深く感謝いたします。

天然物誘導体の X 線結晶構造解析を行ってくださいました慶應義塾大学理工学部 大場茂助教授(現慶應義塾大学文学部教授)、槌本昌信専任講師 (現千葉工業大学助教授)ならびに明治製菓株式会社 渡邊尚志氏に深く感謝いたします。

ヒポスドール酸およびノルヒポスドール酸の抗菌活性試験を行ってくださいました(財)微生物化学研究会 西村吉雄博士、五十嵐雅之博士に深く感謝いたします。

ノルヒポスドール酸の ESR スペクトルを測定くださいました慶應義塾大学理工学部 吉岡直樹助教授ならびに長島英明博士に深く感謝いたします。

ヒポスドール酸およびノルヒポスドール酸の蛍光スペクトルを測定くださいました青森県産業技術開発センター 市田淳治氏に深く感謝いたします。

多数の元素分析を担当して頂いた慶應義塾大学理工学部中央試験所 趙梨里氏ならびに加藤祐一氏に深く感謝いたします。

汗に関する有益なご助言をくださいました東海医療技術専門学校 小川徳雄博士に深く感謝いたします。

本論文執筆にあたり、ご理解とご鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部応用化学科教員の方々に深く感謝いたします。

本研究の成果は共同研究者である徳光直子氏、山田美奈氏、岡本博樹氏、乾泰地氏、森谷開氏の絶え間なき努力の賜物であり、ここに深く感謝いたします。また共に抽出研究に携わった杉山恵子氏、上村聡氏、中出健司氏、谷津美樹氏、丹羽瑞穂氏、仁神史生氏、松浦正憲氏、船津啓文氏、藤堂敬子氏、真鍋慎氏の研究の知見が大きな成果をもたらしたことは特筆すべきことであり、心から感謝いたします。

また貴重な研究生活を共に過ごし、常に支えとなってくださいました東林修平博士、井出光昭博士、寺内毅博士、森智紀氏、市毛孝弘氏、田中大介氏を始めとする天然物有機化学研究室の先輩、同輩、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後に、筆者を育て、いつも理解し励ましてくれた母と祖父に深く感謝します。

2004年7月

犀川陽子