

毒キノコ由来毒成分の化学的研究

平成 21 年度

松浦 正憲

略号

Ac	acetyl
ACC	1-aminocyclopropanecarboxylic acid
ANOVA	analysis of variance
ATP	adenosine triphosphate
BSA	bovine serum albumin
CBB	coomassie brilliant blue G-250
CM	carboxymethyl
CPK	creatine phosphokinase
COSY	^1H - ^1H correlated spectroscopy
DE	diethylaminoethyl
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
DSS	3-(trimethylsilyl)-propanesulfonic acid, sodium salt
EI MS	electron impact mass spectrometry
ESI MS	electron spray ionization mass spectrometry
FAB MS	fast atom bombardment mass spectrometry
FPLC	fast protein liquid chromatography
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
IC	inhibitory concentration
IEF	isoelectric focusing
IR	infrared absorption
LD	lethal dose
MALDI TOF MS	matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry
<i>Mr</i>	molecular weight
MIC	minimum inhibitory concentration
NMR	nuclear magnetic resonance
ODS	octadecyl silica gel
pI	isoelectric point
PLP	pyridoxal-5'-phosphate
PTLC	preparative thin layer chromatography
PVDF	polyvinylidene difluoride
SAM	<i>S</i> -adenosylmethionine
SDS-PAGE	sodium dodesyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

s.e.m	standard error of mean
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol
TMS	trimethylsilyl, tetramethylsilane
TLC	thin layer chromatography
TSP	3-(trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-<i>d</i>₄ acid, sodium salt

目次

緒論	1
本論	
第一章 ドクヤマドリの毒成分探索	
第一節 概要	3
第二節 毒成分の単離精製の検討	4
第一項 毒成分の性質（溶解性、安定性、分子量）	4
第二項 陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製	6
第三項 ゲルろ過による精製	7
第四項 粗精製画分に含まれる毒蛋白質の分子量	8
第三節 毒蛋白質ボレベニンの単離	13
第一項 イオン交換クロマトグラフィーによる精製	14
第二項 ボレベニンの単離	16
第四節 ボレベニンの構造解析	18
第一項 ボレベニンの分子量	18
第二項 ボレベニンのN末端アミノ酸配列	20
第五節 毒蛋白質ボレベニンの毒性	22
第二章 ニセクロハツの毒成分探索	
第一節 概要	23
第二節 採取地別ニセクロハツ候補菌の化学成分と毒性	25

第一項	関東(埼玉、神奈川)で採取したニセクロハツ候補菌の毒成分探索(マウス腹腔内投与による急性毒性を指標として)	25
第二項	京都で採取したニセクロハツ候補菌の毒成分探索(マウス腹腔内投与による致死活性を指標として)	31
第三項	宮城のニセクロハツ候補菌からのルスフェリン類、ヒドロキシバイキアインの再単離	37
第四項	各種ニセクロハツ候補菌の化学成分と毒性について(ニセクロハツの同定)	40
第三節	京都で採取したニセクロハツからの毒成分の単離精製と構造解析	42
第一項	毒成分の単離精製(マウス経口投与による致死活性を指標として)	42
第二項	毒成分の構造解析	51
第三項	毒成分の誘導化と構造解析	52
第四節	シクロプロペンカルボン酸類の合成と反応性について	56
第一項	シクロプロペンカルボン酸類の合成	56
第二項	シクロプロペンカルボン酸類の反応性	61
第五節	シクロプロペンカルボン酸類の生理活性について	68
第一項	シクロプロペンカルボン酸の急性毒性	68
第二項	マウスの生化学検査[クレアチンホスホキナーゼ(CPK)活性について]	72
第三項	抗菌活性及び細胞毒性	74
第六節	生合成について	76
総括		81
実験項		83
参考文献		110
謝辞		115

緒論

これまで天然より得られた有機化合物は、多岐に渡って利用され、我々人類にとって重要な役割を果たしている。新規化合物の発見は、新たな研究分野の開拓につながるほど強いインパクトを与えることから、今後とも天然物の探索研究は欠かせない研究手段であると考えられる。それら研究の中で「生物現象」に着目し、有機化学的に解明する研究は、複雑な生物の仕組みを理解する上で、重要であると考えられる。なぜなら、現象を分子レベルで解明することは、天然物の生体内での役割や、なぜ生物はその化合物を生合成するのかといった困難な課題を解く鍵となるからである。筆者は研究対象として、近年多数の中毒患者を出しながら毒成分が未解明である 2 種の毒キノコ、ドクヤマドリとニセクロハツを選んだ。これら 2 種の毒キノコの毒成分を研究する目的として、食中毒事故防止の観点から早急な毒成分解明が求められていることはもとより、新たな価値の高い生理活性物質を得る意味でも重要である点が挙げられる。このような考えのもと、2 種の毒キノコから毒成分の探索を行い、ドクヤマドリからは毒蛋白質を¹⁾、ニセクロハツからは不安定な低分子毒の単離に成功した²⁾。蛋白質は生化学分野の研究者にとっては格好の研究対象であるが、その扱いにくさから有機化学者にとっては取り組むのに躊躇する化合物である。また、天然有機化合物の中でも水溶性をもつ低分子化合物は、高極性であるため単離精製に困難が伴う。特に、ニセクロハツから単離した毒成分は水溶性かつ不安定であり、通常の方法では単離することが難しかった。今回このような蛋白質及び水溶性不安定物質へ有機化学的立場からアプローチし、毒成分を解明することに成功した。

ドクヤマドリ(*Boletus venenatus*)はイグチ科、ヤマドリタケ属の毒キノコである。日本国内ではイグチ科のキノコに毒を持つものはないとされ、イグチ科のキノコの多くは食菌として親しまれてきた。しかし、1980 年代ごろから、イグチ科のキノコによる食中毒が発生し、毒性をもつ本菌が発見された。中毒症状としては、誤食後、嘔吐下痢等の胃腸障害が現れる。そこで、このドクヤマドリから、マウスへの腹腔内投与による致死活性を指標に毒成分の探索を行い、毒蛋白質ボレベニン(*bolevenine*)の単離に成功し、部分配列を明らかにした¹⁾。

ニセクロハツ(*Russula subnigrinans*)はベニタケ科、ベニタケ属の致死性猛毒キノコであり、これまでに 7 名の死亡者が報告されている。1950 年代に初めての中毒死亡者が報告されたものの、それから約 50 年間は中毒死亡者の報告がなく、ニセクロハツという種の存在が疑問視されていた。ところが、2005~2007 年にかけて、連続して中毒死亡者が報告され、早急な毒成分解明が求められた。しかしながら、ニセクロハツには複数の近縁種が存在し分類が困難であった。そこで、宮城、埼玉、京都にてニセクロハツ候補菌を採取し、マウスに対する毒性を調べたところ、京都で採取したニセクロハツ候補菌のみ経口投与で致死

活性を示したことから、この京都の子実体がニセクロハツであるとわかった。そこで、経口投与によるマウス致死活性を指標に、京都のニセクロハツから毒成分として、不安定な 2-シクロプロペンカルボン酸を水溶液として単離することに成功した²⁾。さらに、毒性発現機構を解明するために、この毒成分およびその類縁体の化学的性質や毒性を調べた。

以上、上記 2 つの研究について、本論にて詳細を述べる。

第一章 ドクヤマドリの毒成分探索

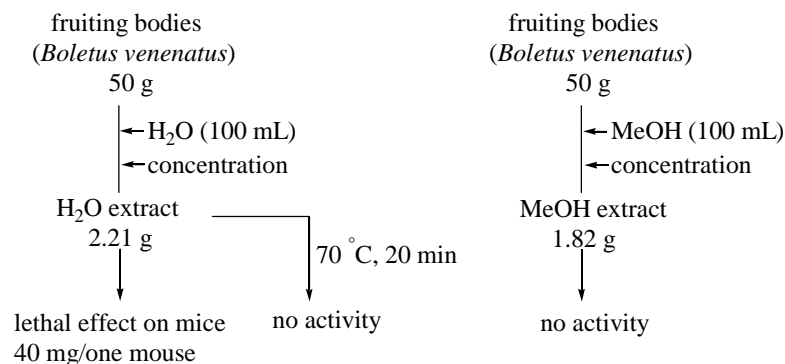
第一節 概要

ドクヤマドリ (*Boletus venenatus*) は日本の北海道や本州中部の亜高山帯で発生するイグチ科 (*Boletaceae*)、ヤマドリタケ属 (*Boletus*) の毒キノコである³⁾。ドクヤマドリの傘の大きさは中型から大型で、傘の裏に多数の管孔があり、黄褐色をしている³⁾。ドクヤマドリは毒性を有するにもかかわらず、種の報告が 1995 年と比較的最近である⁴⁾。その理由として、日本国内ではイグチ科のキノコで毒を持つものはないと考えられており、多くが食菌として親しまれていた背景がある。しかし、実際は 1995 年に新種ドクヤマドリが報告される以前にも、イグチ科のキノコであるヤマドリタケ (*Boletus edulis*) による中毒事故が 1974 年に山梨県と長野県で発生したことが報告されている⁵⁾。その後、1983 年にヤマドリタケに似たキノコにより数名の中毒患者が報告された際に、この中毒事故を起こしたキノコは長野県下ではヤマドリタケと呼ばれているが、本来のヤマドリタケとは異なる種であり、両者が混同されていることが指摘され、中毒事故を引き起こした菌にドクヤマドリと仮称がつけられた⁶⁾。イグチ科のキノコに有毒菌ドクヤマドリが存在すると指摘されて以降、1990 年に山梨県で 4 名、1991 年に山梨県で 4 名、長野県で 3 名の中毒患者が報告された⁷⁾。ドクヤマドリが新種として報告された 1995 年以降も、1997 年には山梨県で中毒患者が 2 名、1999 年には長野県で 3 名、2002 年には山梨県で 5 名、2003 年、2004 年にも長野県で中毒事故が発生、報告されている⁸⁾。中毒症状としては、誤食後、嘔吐、下痢等の症状が現れ、激しい胃腸障害に陥る。いずれの中毒事故においても死亡することなく数日後には回復している。他のイグチ科のキノコでは、ヨーロッパ原産のウラベニイグチ (*Boletus satanas*) や、日本を始め北米やマダガスカルに分布するウツロイイグチ (*Xanthoconium affines*) が知られており、マウスに対する急性毒性を有する毒蛋白質がすでに単離されている^{9) 10)}。国内では他にもミカワクロアミアシイグチ (*Tylopilus sp.*) が毒キノコとして知られており、毒成分として 2-ブチル-1-アザシクロヘキセン イミニウム塩が単離構造決定されている¹¹⁾。しかし、ドクヤマドリの毒成分については研究されておらず、不明であった。そこで、毒成分の単離精製、構造決定を目的に研究を行った。

第二節 毒成分の単離精製の検討

第一項 毒成分の性質（溶解性、安定性、分子量）

ドクヤマドリは 2001 年に岐阜県および 2003 年に長野県にて採取されたものを用いた。まず、毒成分の抽出溶媒として、水およびメタノールを用いた。得られた抽出液を濃縮後、それぞれ 40 mg をマウスへ腹腔内投与したところ、水抽出物にのみ致死活性がみられた (Scheme 1)。このことから、毒成分は水に可溶性成分であることがわかった。また、マウスへの腹腔内投与で致死活性がみられたことから、以後マウスへの腹腔内投与による致死活性を指標に毒性を評価することにした。この水抽出物を、70 °C で 20 分間熱処理した後、活性試験を行ったところ、活性は失われた (Scheme 1)。この結果より、毒成分は熱に対して不安定な成分であることがわかった。



Scheme 1. Investigation of solvents for extraction of the toxin.

続いて、毒成分の大きな分子量を求めるために、限外ろ過(分画分子量：10,000)を行った。その結果、限外ろ過膜の内側(高分子画分)に活性があり、毒成分は分子量約 10,000 以上の高分子であることがわかった (Table 1)。毒成分は水でのみ抽出されること、熱に対して不安定であること、比較的高分子であることから蛋白質であると推定した。そこで次に、種々の pH に対する安定性を調べたところ、pH4 から pH10 の間で毒性に変化がみられず、安定であった (Table 2)。毒成分が蛋白質であることを考慮し、以後すべての操作を低温下 (4 °C) で行った。

Table 1. Relative mass^{a)}.

	Mr	activity
Fr. 1	>10,000	○
Fr. 2	<10,000	×

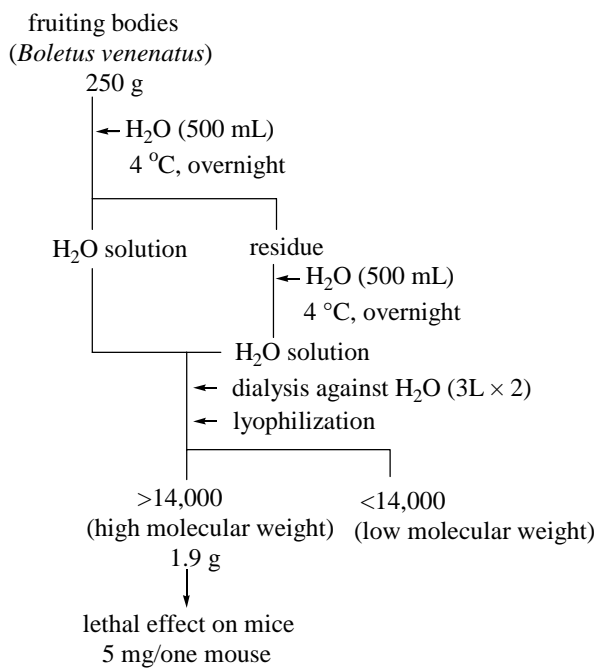
a) H₂O extract 40 mg ,
Ultra filter (*Mr* 10,000), Advantec

Table 2. Stability at various pH^{a)}.

pH	4	5	6	7	8	9	10
activity	○	○	○	○	○	○	○

a) H₂O extract (40 mg) was dissolved into the each pH buffer, and incubated overnight at 4 °C.

水抽出物には酸及び塩基性の低分子化合物が比較的多く含まれている。それらは蛋白質の精製に効果的なイオン交換クロマトグラフィーにおいて、蛋白質の吸着に影響を与える可能性がある。そこで、まず水抽出物を蒸留水に対して透析し、低分子化合物を取り除いたところ、5 mg で致死活性を示す高分子画分を得た(Scheme 2)。先に得られた水抽出物の活性(40 mg/one mouse)から推測して、透析操作により重量にして約 80%もの低分子成分を取り除くことができたことになる。以後、この高分子画分を用いて精製の検討を行った。



Scheme 2. Dialysis of the H₂O extract.

第二項 陰イオンクロマトグラフィーによる精製

ドクヤマドリを水で抽出すると、抽出液は時間の経過と共に茶色く変色する。これはキノコに含まれる酸化酵素(チロシナーゼなど)の働きにより、フェノール化合物がキノンへと酸化され、重合することにより生じると考えられる。色素成分は蛋白質の定量やクロマトグラムの妨害成分となるため、このポリフェノール色素を取り除くことにした。ポリフェノールは陰イオン交換体によく吸着することから、高分子画分を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行った(Scheme 3, Figure 1)。陰イオン交換体(DE-52)を pH 8.0 に平衡化し、塩濃度を段階的に上げ溶出した。大部分の茶色色素成分は担体に吸着したが、塩濃度の上昇ごとに若干色素が溶出された。得られた溶出液のうち、50 mM の塩化ナトリウムを含むバッファーにて溶出された Fr. 4 に活性があった。Fr. 4 は SDS-PAGE 上で 12 kDa 付近にバンドがみられた(Figure 2)。また、64 kDa 付近にも薄くバンドがみられたため、次にゲルろ過による分離を試みた。

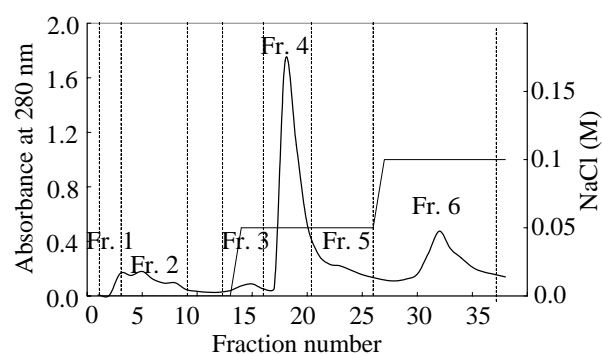
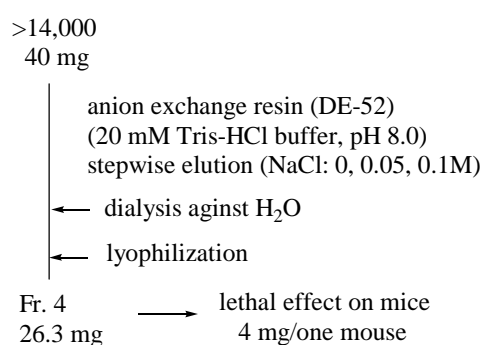


Figure 1. Anion exchange chromatography.

Scheme 3. Anion exchange chromatography.

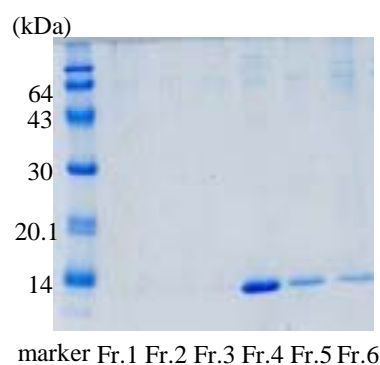


Figure 2. SDS-PAGE of Fr. 1~6.

第三項 ゲルろ過による精製

陰イオン交換クロマトグラフィー後の Fr. 4 を用いて、ゲルろ過を行った(Scheme 4, Figure 3)。SDS-PAGE の結果から、分子量が 12 kDa 程度とみられたため、担体には分画分子量 1.5 kDa から 30 kDa 程度である Sephadex G-50 を用いた。Fr. 4-2 にマウスに対する致死活性がみられ、SDS-PAGE では 12 kDa 付近に 2 つのバンドを確認した(Figure 4)。先ほどの陰イオン交換クロマトグラフィー後の SDS-PAGE(Figure 2)では、12 kDa 付近のバンドは 1 つしかみられなかった。しかし、今回、Figure 4 で 2 つのバンドが確認できたことから、Fr. 4-2 には 2 種類の蛋白質が含まれていると考えた。

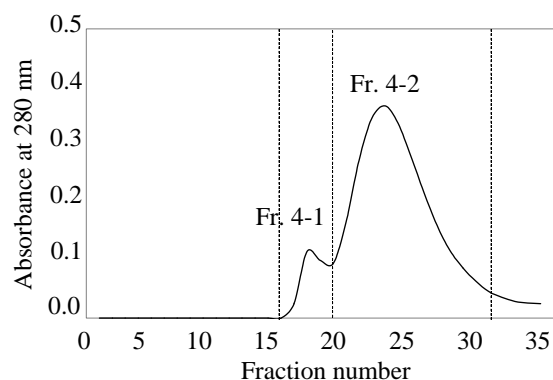
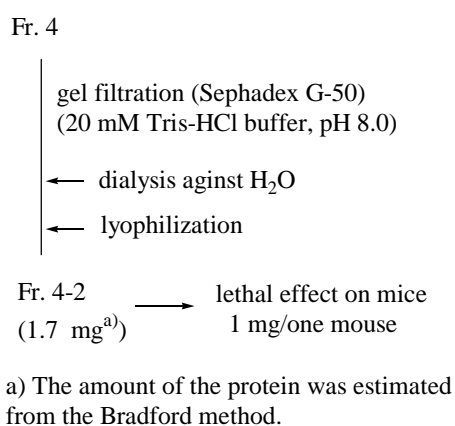


Figure 3. Gelfiltration of Fr. 4.

Scheme 4. Gel filtration of Fr. 4.

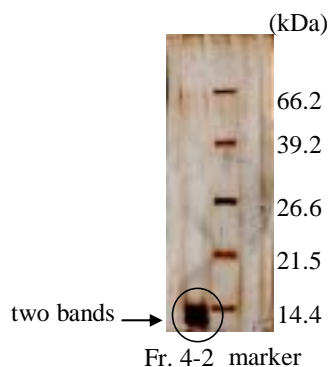


Figure 4. SDS-PAGE of Fr. 4-2.

第四項 粗精製画分に含まれる毒蛋白質の分子量

Fr. 4-2 には分子量約 12 kDa の蛋白質が少なくとも 2 つ含まれていることがわかった。この 2 つの蛋白質を分離するために、FPLC を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製を試みたが、クロマトグラム上ではブロードしたピークしか与えなかった(Figure 5)。また、そのピークを前半部分(peak 1)と後半部分(peak 2)に分け、SDS-PAGE を行ったところ、どちらも同様の泳動パターンを示し、二つのバンドを全く分離することができなかった(Figure 6)。この分離困難であるという結果から、筆者は Figure 4 でみられた二つのバンドが同一蛋白質のサブユニット由来であり、Fr. 4-2 は多量体蛋白質として単一である可能性を考えた。

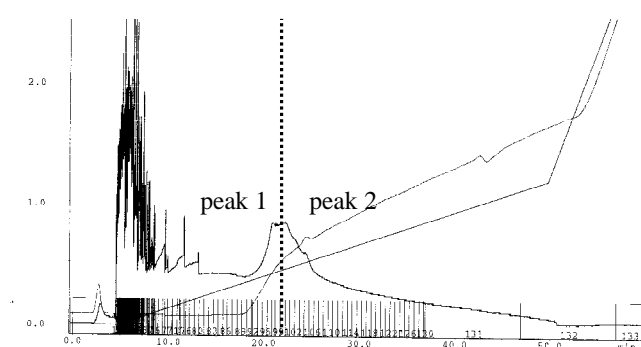


Figure 5. Chromatogram using an anion exchange column (Mono Q) connected to a FPLC system.

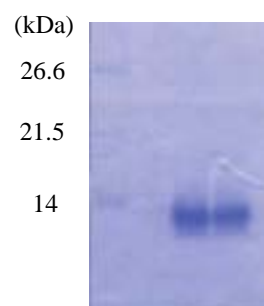


Figure 6. SDS-PAGE after FPLC.

SDS-PAGE では、分析する蛋白質試料に対し、還元剤及び界面活性剤存在下、加熱処理を行う。この操作により、蛋白質は SDS-ポリペプチド複合体となり、その長さや分子量の間に比例関係が成立するほどに変性され、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分子量の大きさにより分離される。よって、分析対象の蛋白質が共有結合(ジスルフィド結合)や非共有結合(疎水性相互作用、水素結合、イオン結合等)によって多量体を形成している場合でも、サブユニットごとに分離された複数の蛋白質として分析される(Figure 7)。

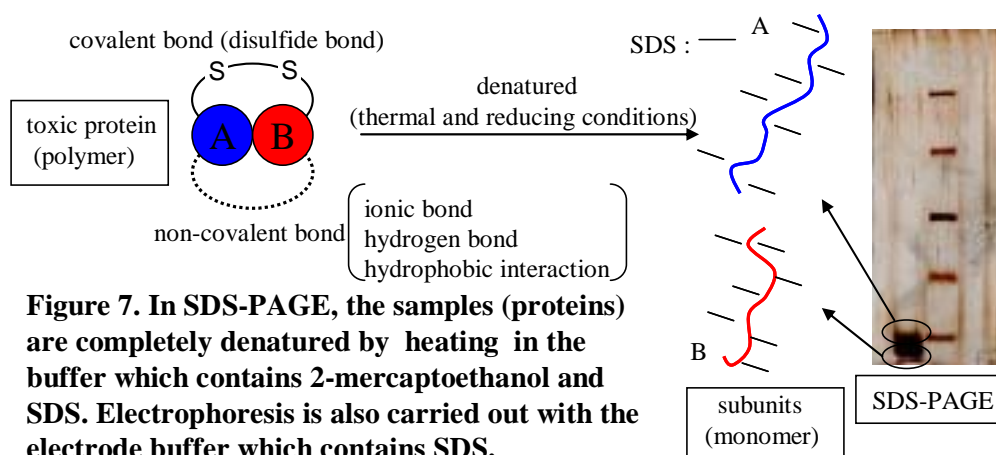


Figure 7. In SDS-PAGE, the samples (proteins) are completely denatured by heating in the buffer which contains 2-mercaptoethanol and SDS. Electrophoresis is also carried out with the electrode buffer which contains SDS.

そこで、蛋白質試料を変性させない条件下で分析できる等電点電気泳動及び Native-PAGE を行った。等電点電気泳動では、両性電解質(両性担体)の混合物を含むゲルに通電し、ゲル中に pH 勾配を形成させ、未変性蛋白質は等電点(pI)の差によって分離される。Native-PAGE では、SDS-PAGE で行う前処理(界面活性剤、還元剤存在下の加熱処理)を行わず、さらに通電中冷却することで、未変性状態で蛋白質を分離できる。これら 2 種の電気泳動により、Fr. 4-2 に混在する蛋白質の数がわかり、SDS-PAGE でみられた 2 つのバンドが同一蛋白質のサブユニットであるならば、等電点電気泳動及び Native-PAGE において多量体蛋白質由来の 1 つのバンドとして泳動されると考えられる。そこで、まず、等電点電気泳動を行ったところ、予想に反し、中性(pI 7.35)付近から酸性(pI 5)にかけて少なくとも 4 つのバンド(○で囲んであるもの)がみられた(Figure 8)。ゲルの染色に用いた CBB は、蛋白質の濃度にほぼ比例して染色するため、この 4 つの蛋白質はほぼ同濃度で含まれていることもわかった。また、Native-PAGE を行ったところ、複数のバンドが連なり帯状となって確認された(Figure 9)。

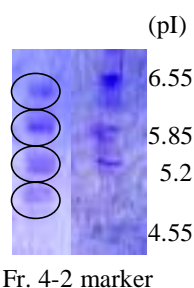


Figure 8. Isoelectric focusing of Fr. 4-2. Figure 9. Native-PAGE of Fr. 4-2.

これら 2 種の電気泳動の結果から、Fr. 4-2 には少なくとも 4 つの蛋白質が含まれていることがわかった。また、先に SDS-PAGE でみられた 2 つのバンドが FPLC で分離困難であったことは、Fr. 4-2 が単一の多量体蛋白質であったからではなく、これら 4 成分の分離ができなかったためであることがわかった。ここで、Fr. 4-2 に複数の蛋白質が存在することには、以下の 2 つの場合があると考えた(Figure 10)。まず、1 つ目は、等電点電気泳動でみられた 4 つのバンドが蛋白質 A、B、C、D と 4 つの蛋白質に対応している場合である。SDS-PAGE では、ABCD 間の分離が不十分であったことから、2 つのバンドとしてみられたと考えられる(Figure 10, I)。2 つ目は等電点電気泳動でみられたバンドが、SDS-PAGE でみられたバンド A、B から構成される多量体蛋白質である場合である。バンド A、B をサブユニットとする多量体蛋白質が、組み合わせの異なる 4 種類存在するとも考えられる(Figure 10, II)。

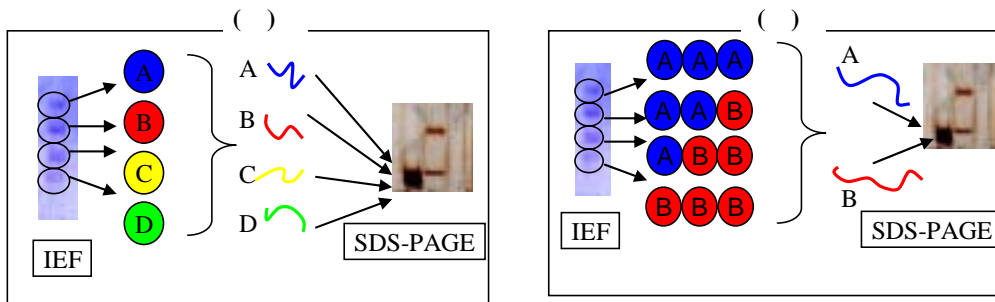


Figure 10

そこで、Fr. 4-2に含まれる未変性毒蛋白質の分子量を求めれば単量体(Figure 10, I)か多量体(Figure 10, II)かを判断できると考え、分子量マーカーを用いたゲルろ過及びMALDI TOF MSの測定を行った。担体にSephadex G-50、マーカー蛋白質に三種類の蛋白質を用いて検量線を作成し、先ほどのFr. 4-2の溶出位置から、その分子量を求めた(Figures 11 and 12)。その結果、Fr. 4-2に含まれる毒蛋白質は分子量約37 kDaであり、SDS-PAGEでみられる12 kDaから予想される溶出位置(マーカー蛋白質C近辺)には全くピークがみられなかった(Figure 11)。この結果から、SDS-PAGEでみられた12 kDa付近の二つのバンドはサブユニットであり、目的の毒蛋白質は多量体であると考えられる。

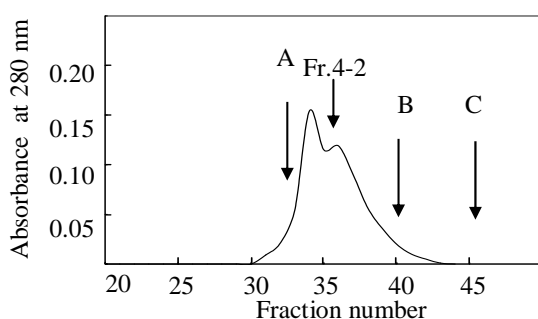


Figure 11. Chromatogram using a Sephadex G-50 column; The markers of the relative molecular mass were ovalbumin, (A; 45,000), chymotrypsinogen (B; 25,000), and ribonuclease (C; 13,700).

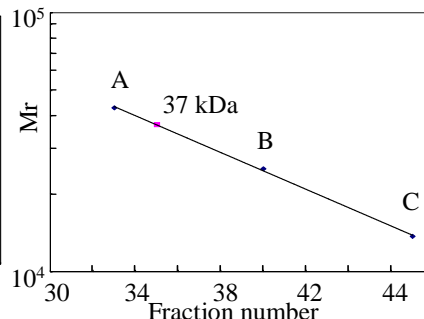


Figure 12. Estimation of relative mass by gel filtration.

続いて、より正確に分子量の評価のできるFPLCによるゲルろ過を行い、分子量を評価した。Sephadexよりも粒子径が小さく、分離能の良い担体であり、分画分子量も3 kDaから70 kDaと大きいSuperdex 75を用い、4種類の分子量マーカー蛋白質から検量線を作成し、毒蛋白質の溶出位置よりその分子量を求めた(Figure 13)。その結果、クロマトグラム上、ピークは1つしかみられず、Fr.4-2に含まれる蛋白質の分子量は約33 kDaとなり、SDS-PAGEの12 kDaとは異なる分子量を示した(Figure 14)。この結果からも、Fr. 4-2に

含まれる毒蛋白質は多量体であると考えられた。

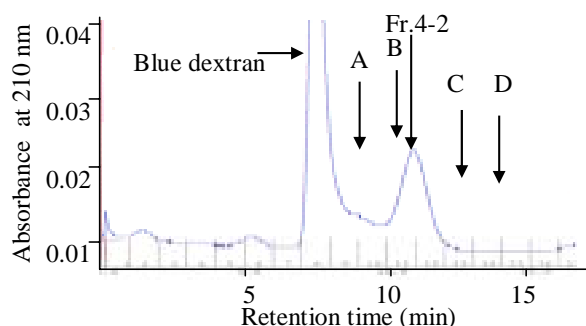


Figure 13. Chromatogram using a superdex 75 column; The markers of the relative molecular mass were BSA (A; 67,000), egg albumin (B; 45,000), pectate lyase¹² (C; 23,800), and cytochrome C (D; 12,400).

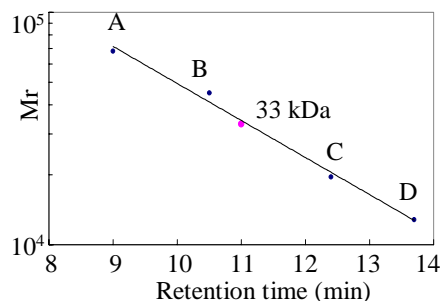


Figure 14. Estimation of relative mass by FPLC gel filtration.

続いて、MALDI TOF MS スペクトルの測定を行った(Figure 15)。マトリックスにはフェルラ酸を用いたところ、11 kDa 付近に 3 本のピークが観測された。このことから、SDS-PAGE でみられた 12 kDa のバンドは MALDI TOF MS スペクトル上の 11 kDa に対応することがわかった。また、33 kDa にもイオンピークが観測された。これは 11 kDa の蛋白質がイオン化中に多量化し、33 kDa のクラスターイオンを与えた可能性もある。しかし、ゲルろ過による分子量評価では、3 量体を示唆する溶出位置にのみクロマトグラム上でピークがみられたことから、Fr. 4-2 に含まれる毒蛋白質の分子量は 33 kDa であり、11 kDa のサブユニット 3 つから構成された 3 量体蛋白質であると考えられる。MALDI TOF MS スペクトルより、11 kDa に 3 本のイオンピークが観測されたことから、少なくとも 3 種類のサブユニットが存在していることがわかった。しかし、3 量体蛋白質がどのサブユニットから構成されているのかは判断できなかった。

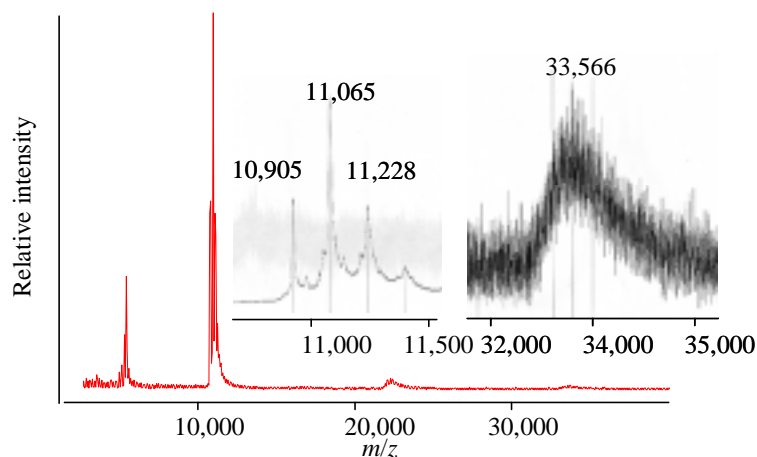


Figure 15. MALDI TOF MS of Fr. 4-2.

以上、未変性条件下での電気泳動及び分子量測定の結果から Fr. 4-2 の毒蛋白質は次のような構造を有していると考えた(Figure 16)。すなわち、MALDI TOF MS で観測された 11 kDa のサブユニットを A、B、C とすると、3 量体の毒蛋白質は AAA、BBB、CCC とサブユニットが同じであるホモトリマーか、AAB や ABC のようにサブユニットが異なるヘテロトリマーである可能性が考えられる。

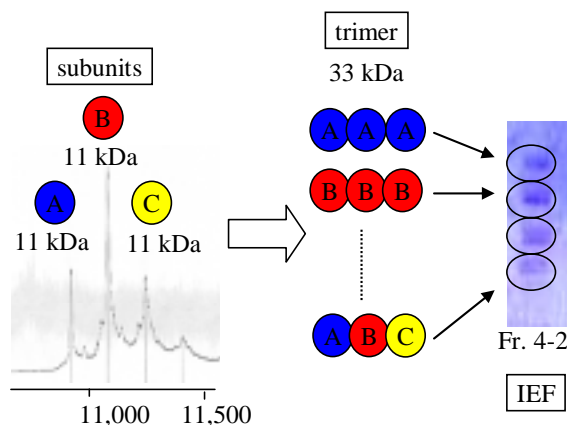


Figure 16

ここで、Fr. 4-2 の N 末端アミノ酸配列解析を 18 残基まで行った。Fr. 4-2 は複数(4 つ以上)の 3 量体蛋白質の混合物であり、サブユニットは少なくとも 3 種類存在する。そのため、N 末端アミノ酸配列解析は 3 種類の混合物を解析することになるが、3 つのアミノ酸残基を除く 15 残基を決定することができた。このことから、サブユニット間のアミノ酸配列に高い相同性があるか、もしくは一種類のサブユニットが主に含まれていると考えられる。

	1	5	10	15														
Fr. 4-2	X	X	S	A	F	L	N	N	Q	X	V	K	L	A	M	L	L	P

Figure 17. N-Terminal amino acid sequence of Fr. 4-2.

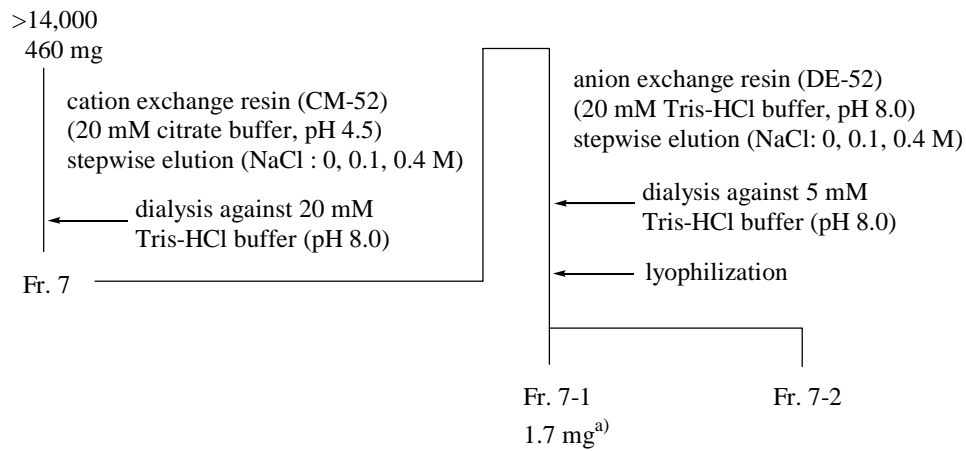
第三節 毒蛋白質ボレベニンの単離

毒蛋白質は分子量 33 kDa の 3 量体蛋白質であることがわかった。また、その 3 量体蛋白質はサブユニットの異なるアイソフォーム(サブユニットの異なる異性体)が数種類あることがわかった。また、N 末端アミノ酸配列の結果から、アイソフォームを構成するサブユニット間には高い相同性があると考えられる。等電点電気泳動の結果(Figure 8)より、Fr. 4-2 に含まれる毒蛋白質は等電点が約 0.6 ずつ異なることから、最終精製には液体クロマトグラフィーシステムを用いたイオン交換クロマトグラフィーによる精製が効果的であると判断した。蛋白質の精製に用いられる液体クロマトグラフィーシステムは、一般的な低分子化合物を分取、分析する高速液体クロマトグラフィーシステムとは異なり、システム内部は金属製の配管を使用しておらず、配管部分への蛋白質の吸着が少ない。また、低温下で操作できるなど蛋白質に適した環境での分取が可能である。しかしながら、通常逆相、順相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーに比べて、分離能が悪く、蛋白質混合物を注入した場合、目的の蛋白質をクロマトグラム上で単一のピークとして得ることは難しい。特に、Fr. 4-2 は性質が近いと考えられるアイソフォーム約 4 成分が、同程度の濃度で含まれていることから、より分離しづらいものと考えられる。実際、Fr. 4 を FPLC による精製を行ったところ、分離困難であった(Figures 5 and 6)。よって、純粋な蛋白質を得るために、システムに注入する蛋白質試料をあらかじめ精製し、できるだけ目的の蛋白質の純度を上げておくことで、分離精製が容易になると考えた。

第一項 イオン交換クロマトグラフィーによる精製

先ほども述べたように、ドクヤマドリの水抽出物には高分子の茶色色素成分が多量に含まれている。色素を含んでいる場合、イオン交換クロマトグラフィーにて pH 条件を変えて精製の検討を行っても、クロマトグラムや蛋白質の定量を妨害するため、よい条件を判断することが難しくなる。また、茶色色素は陰イオン交換体に完全には吸着しなかった。そこで、ポリフェノール色素は陽イオン交換体に吸着しないことを利用して、毒成分を陽イオン交換体に吸着させた後、十分担体を洗浄し色素を溶出させ、塩を加えて毒蛋白質を溶出させることで、色素成分を取り除けると考えた。

そこで、毒蛋白質を pH 4.5 にて平衡化した陽イオン交換体(CM-52)に吸着させ、担体をバッファーにて洗浄することにより大部分の色素成分を溶出させ取り除いた。吸着した毒蛋白質は 400 mM の塩化ナトリウムを含むクエン酸バッファーで溶出することができた(Figure 18)。しかし、得られた吸着画分(Fr. 7)を凍結乾燥すると、活性が著しく減少した。凍結乾燥して得られたものは、水に対する溶解性が減少し、白濁していた。このことから、溶解性が下がったことが、毒性の減少に影響したと推定している。また、これまでに陰イオン交換クロマトグラフィーやゲルろ過後にトリスバッファーにて凍結乾燥を行っても活性の減少がみられなかったことから、活性、溶解性の減少はクエン酸バッファーによるものと考えた。これを防ぐために、得られた画分は次のトリスバッファーで透析後、濃縮せず、次の陰イオン交換クロマトグラフィーの検討を行った(Figure 19)。pH を 8.0 に調整した陰イオン交換体(DE-52)を用いたところ、毒成分は非吸着画分(Fr. 7-1)と吸着画分(Fr. 7-2)とに分かれて溶出された。SDS-PAGE(Figure 20)ではどちらの画分も同様のバンドを示すが、等電点電気泳動では種類や数が異なることがわかった(Figure 21)。先に Scheme 3 で同様の条件で陰イオン交換クロマトグラフィーを行ったが、その際には目的の毒蛋白質はすべて吸着した。今回、非吸着画分(Fr. 7-1)に目的の蛋白質が溶出された原因としては、高分子画分(Scheme 3)に比べ Fr. 7(Scheme 5)には陽イオン交換時のバッファー由来であるクエン酸塩が若干含まれていたことが考えられる。その塩の溶出効果により、非吸着画分(Fr. 7-1)にも毒蛋白質が溶出されたと考えられる。等電点電気泳動(Figure 21)の結果から、非吸着画分(Fr. 7-1)は等電点が最も高い pI 6.5 の蛋白質を主に含み、その他のバンドの数は吸着画分(Fr. 7-2)に比べ少なかったことから、非吸着画分(Fr. 7-1)を用いて更なる精製を進めることにした。なお、どちらの画分もほぼ同程度の毒性を示すことを確認した。



a) The amount of protein was estimated from the Bradford method.

lethal effect on mice
120~150 µg/one mouse

Scheme 5. Purification procedures 1.

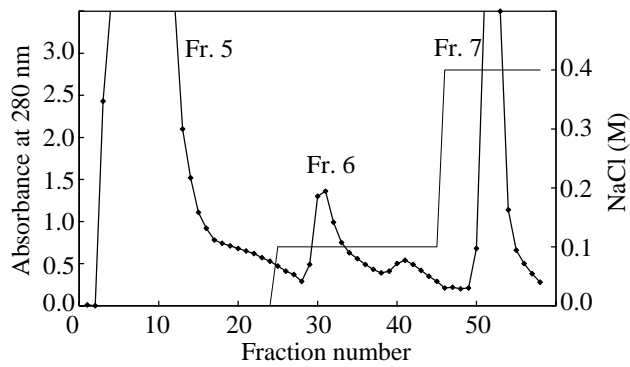


Figure 18. Cation exchange chromatography.

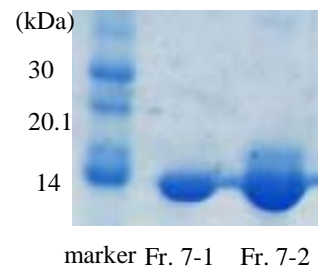


Figure 20. SDS-PAGE.

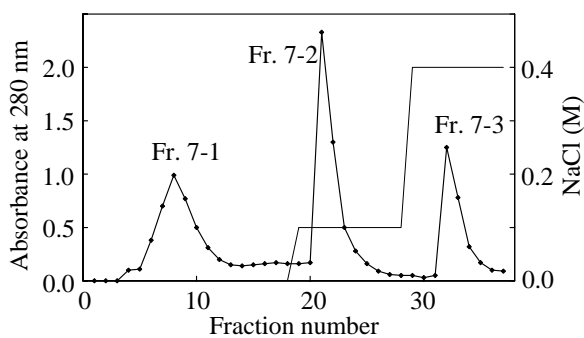


Figure 19. Anion exchange chromatography.

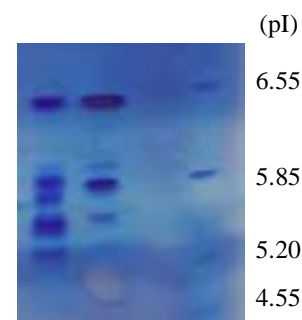


Figure 21. Isoelectric focusing.

第二項 毒蛋白質ボレベニンの単離

pI 6.5 の毒蛋白質を主に含む画分 Fr. 7-1 を得ることができた。先に、陽イオンクロマトグラフィーにて精製を行った際に、凍結乾燥処理により活性の減少がみられたため、Fr. 7-1 の更なる精製には陰イオン交換体を用いることが適当であると考えられる。また、陽イオン交換クロマトグラフィーで用いたクエン酸塩は蛋白質の陰イオン交換体に対する吸着に影響することが予想された。よって、まず、ゲルろ過を行い、陰イオン交換クロマトグラフィーにて使用するバッファーへ完全に交換することにした。毒蛋白質の分子量は約 33 kDa であることがわかったため、担体に分画分子量が 1 kDa から 100 kDa の Sephacryl HR 100 を用い、トリスバッファーにてゲルろ過を行ったところ、Fr. 7-1 はクロマトグラム上、単一のピークを示し、この場合も分子量は約 30 kDa 程度であると見積もることができた (Scheme 6, Figure 22)。

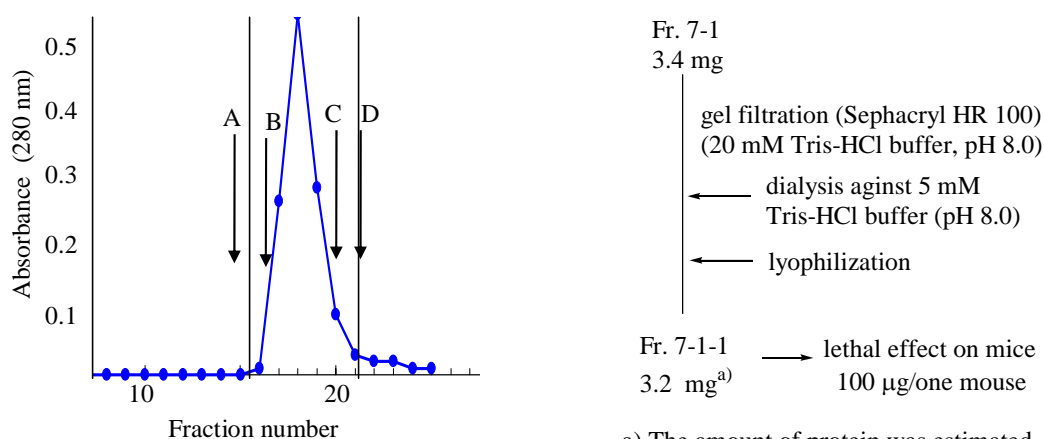


Figure 22. Chromatogram using Sephacryl S-100 HR; The markers of the relative molecular mass were albumin (A; 67,000), ovalbumin (B; 45,000), chymotrypsinogen (C; 25,000), and ribonuclease (D; 13,700).

a) The amount of protein was estimated from the Bradford method.

Scheme 6. Purification procedures 2.

続いて、クロマトグラフィーシステム(AKTA prime)を用いた精製を検討した。カラムには強陰イオン交換体である Q Sepharose を用いた。pH 8.0 で平衡化した陰イオン交換体に Fr. 7-1-1 を 100 µg チャージした。塩化ナトリウムを直線的に 0 M から 250 mM に上昇させたところ、鋭いピーク (Fr. 7-1-1-2) と広幅化したピーク (Fr. 7-1-1-3) とに分離することができた (Figure 23)。得られたフラクションを SDS-PAGE で分析した結果、どちらも 12 kDa 付近に 1 つのバンドを示した (Figure 24)。一方、等電点電気泳動を行ったところ、Fr. 7-1-1-3 には複数のバンドがみられたのに対し、Fr. 7-1-1-2 は pI 6.5 に単一のバンドを示した

(Figure 25)。よって、Fr. 7-1-1-2 には単一の蛋白質が含まれていることがわかり、この蛋白質をボレベニン(bolevenine)と命名した。この操作を 32 回繰り返すことにより、Fr. 7-1-1 の 3.2 mg から、2.1 mg のボレベニンを単離することに成功した(Scheme 7)。

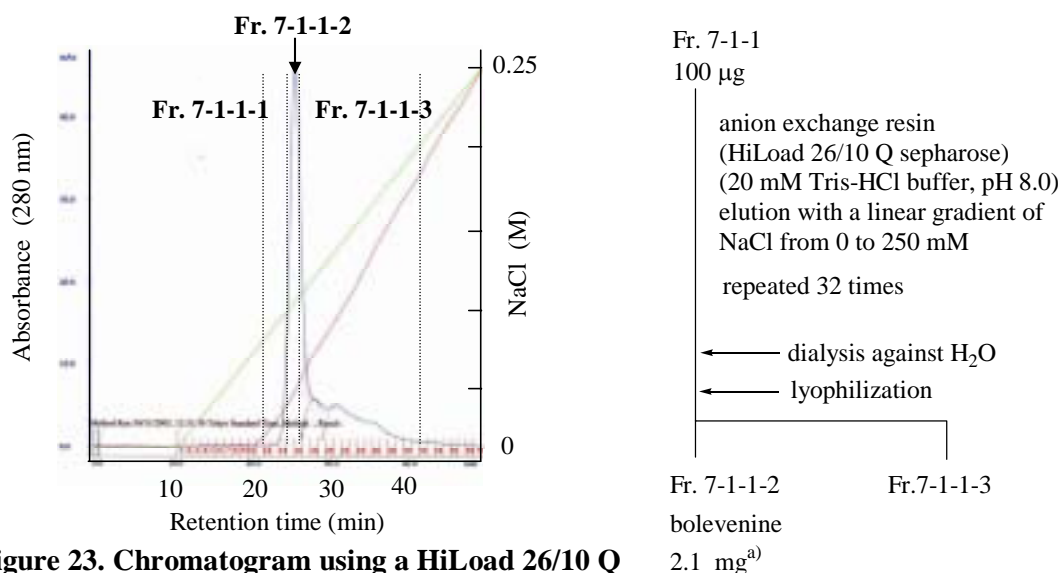


Figure 23. Chromatogram using a HiLoad 26/10 Q Sepharose HP connected to an AKTA prime system.
 • 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)
 • gradient elution with 0–0.25 M NaCl for 40 min
 • flow rate : 2 ml/min

a) The amount of protein was estimated from the Bradford method.

Scheme 7. Isolation of bolevenine.

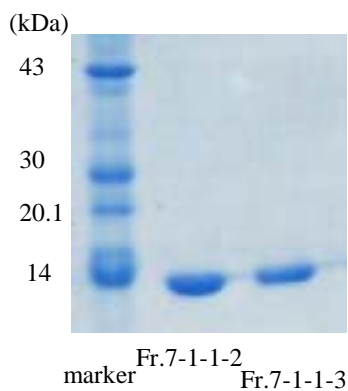


Figure 24. SDS-PAGE.

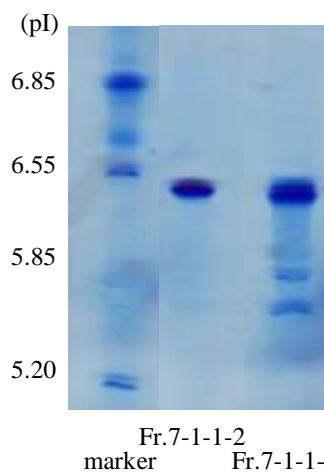


Figure 25. Isoelectric focusing.

第四節 ボレベニンの構造解析

第一項 ボレベニンの分子量

第二節、第四項の結果から、ボレベニンは 11 kDa のサブユニット 3 つからなる 33 kDa の三量体蛋白質であると考えられる。構造解析を行うにあたり、サブユニットが異なるヘテロトリマーである場合、そのサブユニットを分離し、サブユニットごとに構造解析を行う必要がある。そこで、ボレベニンはサブユニットが同一のホモトリマーか、サブユニットの異なるヘテロトリマーかを調べることにした。まず、先ほどと同様に FPLC でボレベニンの分子量を求めた。その結果、分子量は約 30 kDa であることを確認した(Figures 26 and 27)。

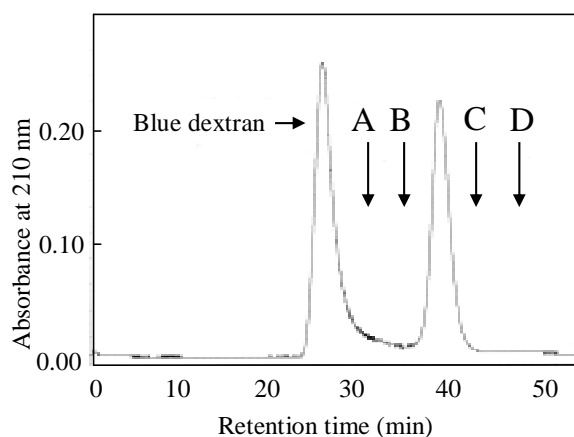


Figure 26. Chromatogram using superdex 75 10/300 GL connected to a FPLC system; The markers of the relative molecular mass were BSA (A; 67,000); egg albumin (B; 45,000); pectate lyase¹²⁾ (C; 23,800); and cytochrome C (D; 12,400).

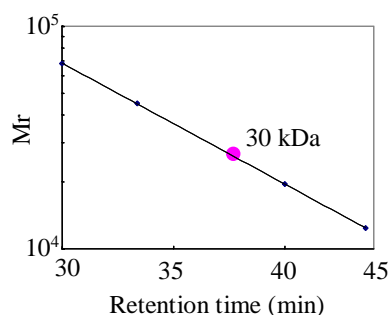


Figure 27. Estimation of relative mass by FPLC gel filtration.

続いて、MALDI TOF MS を測定したところ、33 kDa と 11 kDa にイオンピークが観測された(Figure 28)。特に 11 kDa 付近には 1 つのピークしかみられなかったことから、ボレベニンのサブユニットは 1 種類であり、ホモトリマーであることがわかった。これらの結果から、ボレベニンの構造解析は、サブユニットに分離することなく、そのまま解析が行えることがわかった。

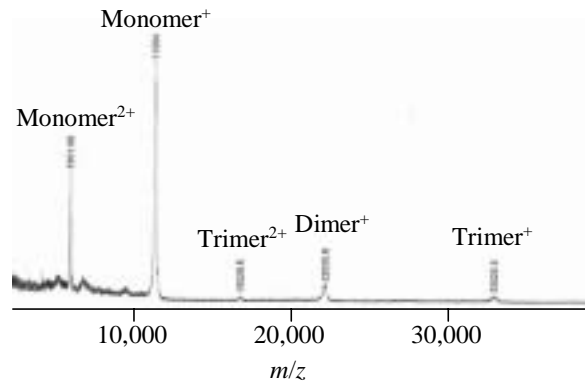


Figure 28. MALDI TOF MS of bolevanine.

また、ボレベニンの三量体形成がジスルフィド結合によるものかを調べるために、SDS-PAGEにて、ジスルフィド結合を切断する還元剤 2-メルカプトメタノールの非存在下でサンプルを調製し泳動させた。すると、還元剤の有無に関わらず、泳動パターンに変化がみられなかった(Figure 29)。この結果から、ボレベニンは非共有結合にて三量体を形成していることがわかった。

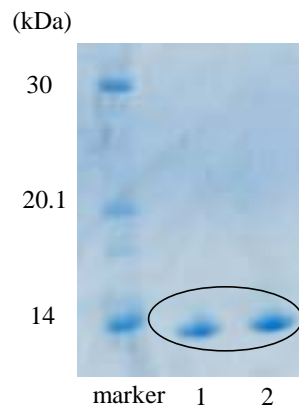


Figure 29. SDS-PAGE of isolated bolevanine; Samples were heated for 10 min at 100 °C in the presence (lane 1) and absence (lane 2) of 2-mercaptoethanol.

第二項 毒蛋白質ボレベニンの N 末端アミノ酸配列

ボレベニンの N 末端アミノ酸配列を解析し、18 残基までの配列を明らかにした(Figure 30)。BLAST データベースを用いて、ホモロジー検索を行った結果、ボレサチン¹³⁾と 70% 以上の高い相同性を有していることが明らかとなった。ボレサチンは、ヨーロッパ原産のイグチ科の毒キノコであるウラベニイグチ(*Boletus satanas*)から、毒成分として単離された蛋白質である。

	1		5		10		15											
bolevenine	<u>T</u>	<u>W</u>	S	A	F	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	Q	S	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	M	<u>L</u>	<u>L</u>	P
bolesatine ¹³⁾	<u>T</u>	<u>W</u>	R	I	Y	<u>L</u>	<u>N</u>	<u>N</u>	Q	T	<u>V</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	L	<u>L</u>	<u>L</u>	P

Figure 30. N-Terminal amino acid sequences of bolevenine and bolesatine; amino acids identical in both toxins are underlined.

ボレサチンの分子量は 63 ± 3 kDa の単量体蛋白質である⁹⁾。また、イグチ科の毒キノコであるウツロイイグチ(*Xanthoconium affines*)から単離された毒蛋白質ボラフィニンのアミノ酸配列は不明であるが、分子量は 22 kDa の単量体蛋白質であると報告されている¹⁰⁾。今回単離したボレベニンの単量体は 11 kDa であることから、ボレサチンはこの 6 倍、ボラフィニンは 2 倍の分子量を有しており、これら 3 種の蛋白質の間には倍数性がみられる。蛋白質の遺伝子の進化は、もともとなる短い塩基配列が重複や変異、組み換えを繰り返しながら高分子化し、機能を獲得すると考えられている¹⁴⁾。また、多量体形成は複数のドメインをもつ蛋白質を作り出すのに効果的な進化方法である¹⁴⁾。ボレサチンやボラフィニンが、今回単離したボレベニンの倍数であることは、これら 3 種の毒蛋白質は同一の祖先型の蛋白質から遺伝子重複や多量体化により進化したと考えることもできる。この考えにより、ボレベニンとボレサチンとの間にアミノ酸配列の高い相同性があることを説明できる。

ボレサチンの等電点は 8.3¹⁵⁾、ボラフィニンの等電点は 9–10¹⁰⁾であることが報告されており、ボレベニンの等電点(6.5)と大きく異なる。蛋白質の等電点は、分子表面に存在する解離性基および極性基の数と種類によって決まるため、アミノ酸配列の相同性がある場合、近い値をとることが予想される。しかしながら、ボレサチンは単量体蛋白質であり、ボレベニンは三量体蛋白質であることから、両者はコンフォメーションに違いがあり、等電点に差がみられたと考えることができる。また、蛋白質の等電点が大きく変化する要因として、翻訳後修飾が考えられる。例えば、糖鎖の結合もその 1 つである。蛋白質への糖鎖の結合様式には大きく分けて、セリンまたはスレオニンへの O-グリコシド結合と、アスパラギン酸への N-グリコシド結合である。糖鎖の結合するアミノ酸は蛋白質表面に露出しているため、アスパラギン酸へ糖鎖が付加すれば等電点が高くなり、シアル酸のような酸性糖

が結合している場合は等電点が低くなる。ボレベニンの糖鎖の有無を調べるため、SDS-PAGE 後、PVDF 膜にブロッティングし、過ヨウ素酸ナトリウムで酸化、ビオチンヒドラジドを用いビオチン化、ペルオキシダーゼ標識アジピンと結合させ発色させる方法にて糖鎖の検出を行ったが、この条件では発色しなかった。一方、ボレサチンは糖蛋白質であることが報告されている¹⁵⁾。糖の蛋白質への結合様式については不明であるが、ボレサチンはコンカナバリン A を結合させたアフィニティーカラムに結合したことから、マンノースを有すると考えられる¹⁶⁾。一般に、マンノースを含む糖蛋白質は *N*-グリコシド結合によって、*N*-アセチルグルコサミンがアスパラギン酸に結合し、その *N*-アセチルグルコサミンにマンノースが結合している。このことから、ボレサチンの等電点が今回単離したボレベニンと比較して高い理由は、アスパラギン酸に糖鎖が結合しているためと考えることもできる。また、翻訳後修飾の 1 つであるリン酸化は、チロシンやスレオニンの水酸基にリン酸が結合する。このリン酸化により蛋白質の等電点は低くなることから、今回単離したボレベニンはリン酸化を受けている可能性もあるが、現在のところ、リン酸基の有無は調べていない。

第五節 毒蛋白質ボレベニンの毒性

単離したボレベニンを、マウスに対して腹腔内投与したところ、100 µg でマウスに対する致死活性を示した。この結果から、LD₁₀₀ 値は約 10 mg/kg(マウス腹腔内投与)程度であるとわかった。単離したボレベニンの量が少なかったことから、経口投与による活性試験は行っていない。過去に、イグチ科の毒キノコより単離された毒蛋白質ボレサチンの LD₅₀ 値は 3.3 mg/kg (マウス経口投与)¹⁷⁾で、毒蛋白質ボラフィニンの LD₅₀ 値は 61 mg/kg (マウス腹腔内投与)¹⁰⁾であることが報告されている。また、ボレサチンはプロテアーゼに対して抵抗性を示すことが報告されており^{17) 18)}、ボレベニンもプロテアーゼの一種であるトリプシンにより、ほとんど加水分解を受けなかった。これらの結果から、ボレベニンは中毒事故を引き起こした原因物質であると考えられる。現在までに、このボレベニンは赤血球(細胞)を凝集させるレクチン活性を有することがわかっており、河岸らによって研究が行われている。レクチンは細胞表面に存在する糖鎖と相互作用し、糖結合部位が蛋白質内に 2 箇所以上存在すると凝集活性をもつ。第二節、第一項において、熱処理によりマウス致死活性が失われることについて述べたが、一方でレクチン活性に関しては熱処理を施しても失活しないことが河岸らの研究によってわかっている。このことは、ボレベニンのレクチン活性部位と毒性部位が異なる可能性を示唆する結果であると考えられる。毒蛋白質の中にはレクチン活性を有するものが知られている。そのなかで最も研究が行われているのが、ヒマの種子より単離されたリシンである。リシンは殺人の道具として使用されたほど強力で、人に対して 0.03 mg/kg 程度で毒性を示すと推定されている。リシンは蛋白質合成阻害活性を有する A 鎖と、細胞凝集活性、糖結合性を持つ B 鎖とがジスルフィド結合で連結した 2 量体蛋白質である¹⁹⁾。ジスルフィド結合を還元的に切断した単量体(A 鎖)ではマウスに対する毒性が減少する¹⁹⁾。ボレベニンの場合でも、リシンのように毒性部位とレクチン活性部位が異なる可能性がある。また、リシンは、B 鎖が細胞表面上の糖鎖に結合し、続いてエンドサイトーシスにより毒性部位 A 鎖が細胞質内に取り込まれ、毒性が発現すると考えられ、両鎖が複合的に機能している¹⁹⁾。ボレサチンについても、比較的研究が行われており、細胞凝集活性(レクチン活性)²⁰⁾、*in vitro*、*in vivo* におけるタンパク質合成阻害活性^{13) 15) 18) 21)}、脂質過酸化作用²²⁾などを有することが報告されている。特に、*in vivo* においても腎臓や肝臓の細胞内に移行し、蛋白質合成阻害がみられたことから、リシンのような細胞内に取り込まれる機構が存在するものと考えられる。今回単離したボレベニンはボレサチンと相同性が高いことから、同様の活性を有することが期待され、さらに、リシンのような毒性発現機構が存在すると考えられる。

第二章 ニセクロハツの毒成分探索

第一節 概要

ニセクロハツ(*Russula subnigricans*)はベニタケ科ベニタケ属の致死性猛毒キノコである²³⁾。1954年(昭和29年)に京都府清水山にて採取したクロハツ様のキノコにより中毒死亡事故が発生した²⁴⁾。当時はクロハツの近縁種に猛毒キノコが存在しているとは考えられておらず、死亡の原因については不明とされていた²⁴⁾。ところが、1958年(昭和33年)に大阪府下でクロハツ近縁種の摂食により、2件の食中毒事故が発生し、3名が死亡した²⁴⁾²⁵⁾。症状としては食後10~20分後に吐き気を催し、しばらくして嘔吐、下痢の症状が現れ、18時間後頃より顔面、四肢に軽い痙攣、意識消失、瞳孔の縮小、摂食後20時間後頃より昏睡状態となり24時間後に死亡した(78歳女性)²⁴⁾。この際に、この死亡事故を引き起こしたクロハツ近縁種が新種のニセクロハツであるとされた。1972年(昭和47年)には富山県下にて5人が中毒を発症し重体となったが、幸いにも死亡することなく回復している²⁶⁾。この事故以降、ニセクロハツによる中毒事故は報告されず、ニセクロハツという種自体の存在が疑問視されていた。ところが、2005年から2007年にかけて、愛知県、宮崎県、大阪府で4名の中毒死亡者が報告された²⁷⁾。2006年(愛知)及び2007年(大阪)に起こった中毒事故においては、担当医師による詳細な中毒症状が報告された。2006年(愛知、女性)の場合は、採取したニセクロハツを味噌汁に入れ喫食し、30分後に嘔吐、下痢の症状が現れた。食後8時間頃、救急車にて病院に搬送された。その際、血尿(褐色尿、ミオグロビン尿)、呼吸困難、冷汗、肩こり等の症状が既に現れていた。翌日、人工呼吸器に切り替えられ、心停止状態となった。この際に血中のクレアチンホスフォキナーゼ(CPK)の値が90,000以上(正常値200程度)を示し、横紋筋融解症が起こっていた(横紋筋は骨格筋や心筋に含まれる筋肉の一種)。同日、多臓器不全により、死亡した。喫食後50時間程度であった。2006年(愛知、男性)のケースでは、採取したニセクロハツを味噌汁に入れ喫食し、30分後に嘔吐、下痢の症状が現れた。食後10時間ほど経過し、来院した。その際に、血尿(褐色尿、ミオグロビン尿)、息苦しさ、縮瞳、四肢冷感等の症状が現れていた。翌日、呼吸困難、痙攣、多臓器不全となり、死亡した。食後50時間程度であった。2007年に大阪府で発生した中毒事故は、3名の重症患者のうち、1名が死亡した。回復した患者の詳細な症状は次の通りである。採取したニセクロハツをその場で天ぷらに調理し、食した。食後直ちに嘔吐し、帰宅後下痢の症状を呈した。翌日、手足のしびれ、筋肉の硬直を感じる。同日、横紋筋融解症がおき、CPKが17,000以上、ミオグロビン尿症が現れた。翌日もCPKが40,000以上を示した。喫食して4日後頃からは症状の回復が見られ、死には至らなかった。一方、死亡した患者の死因は、多臓器不全であり、横紋筋融解症も発症していた。これら中毒症状の中で、ミオグロビン尿症がみられることが本菌の特徴である。このミオグロビン尿症は横紋筋融解症において、筋肉が破壊された際に、筋細胞成分であるミオグロビンが血液中に排出され、それ

が尿中に現れる症状である。また、CPK 値の上昇や、筋肉の痛み、腎不全を伴う。腎不全は筋肉の破壊により血液中に溶出されるものが負荷をかけ、その結果生じると考えられている。

ニセクロハツの中毒症状は特異且つ死に至らしめるほど強力であるにも関わらず、毒成分は未だ不明であった。その理由の一つに、ニセクロハツには複数の近縁種が存在し、分類が確立されていないことが挙げられる。すなわち、現実には食中毒を引き起こしたクロハツ様子実体がニセクロハツと判断されていた。近縁種の一つであるクロハツは、子実体に傷をつけると赤くなった後に黒く変色し、ニセクロハツは赤くなったままであるとされているが非常に曖昧である²³⁾。過去に宮城で採取されたニセクロハツから、細胞毒性物質ルスフェリン類(1~6)²⁸⁾、ルスフェロール(7)²⁹⁾、3-ヒドロキシバイキアイン(8)³⁰⁾が単離、構造決定されている。いずれの化合物もマウスに対する急性毒性は報告されていない。また、これら化合物の単離されたニセクロハツは宮城で採取されたものであるが、これまで、東北地方において中毒事故が報告されていないことから、ニセクロハツであるか疑わしい³¹⁾。

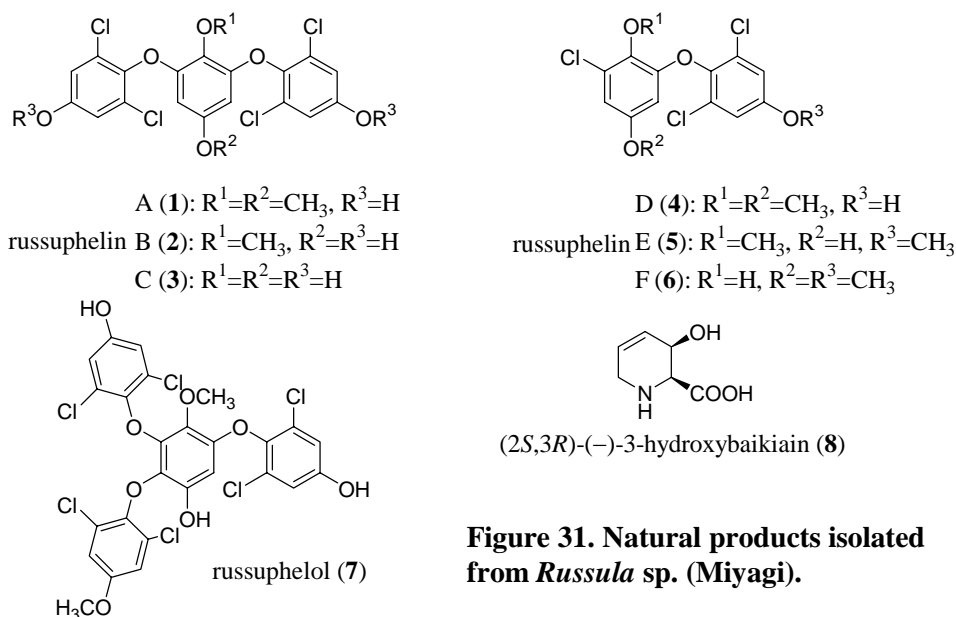


Figure 31. Natural products isolated from *Russula* sp. (Miyagi).

ニセクロハツの中毒事故では多くの死亡者が発生していることから、早急な毒成分解明が求められている。そこで、関東地方(主に埼玉)、宮城、京都でニセクロハツ候補菌を採取した。これまでに報告されている中毒死亡事故は、西日本に集中している。採取地のみを考えた場合、京都のニセクロハツ候補菌が真のニセクロハツである可能性が高い。しかしながら、ニセクロハツの分布に関する報告はなく、関東や宮城でもニセクロハツが発生している可能性もあった。また、これら3地域の子実体はそれぞれ外見が若干異なるものの(詳細は第二節で述べる)、明確な判断基準がないため真のニセクロハツを判別することはできなかった。そこで、ニセクロハツの同定と毒成分解明を目指し、埼玉、宮城、京都で採取したニセクロハツ候補菌の化学成分や毒性を調べることにした。

第二節 採取地別ニセクロハツ候補菌の化学成分と毒性

第一項 関東(埼玉、神奈川)で採取したニセクロハツ候補菌の毒成分探索(マウス腹腔内投与による急性毒性を指標として)

概要でも述べた通り、子実体の外見から真のニセクロハツを同定することはできない。また、ニセクロハツの分布に関する報告はないため、ニセクロハツ候補菌を採取し、それぞれ毒性や化学成分を調べることにした。まず、関東近郊にてニセクロハツ候補菌を採取した。その一つである埼玉にて採取した子実体を示す(Figure 32)。



Figure 32. *Russula* sp. collected in Saitama.

このニセクロハツ候補菌の外見上の特徴は、傘の大きさが 6~7 cm で褐色(一部黒変)、ひだはクリーム色で疎、小ひだがあった。これらは、報告されているニセクロハツの特徴と一致する²³⁾。また、子実体の色は、採取直後は褐色であるが、時間の経過や冷凍庫で保存の際に黒く変色する様子がみられた。ニセクロハツは子実体に傷をつけると赤くなったままで、クロハツは傷をつけると赤くなった後に黒く変色するといわれていることから、この子実体はクロハツと思われた。しかし、クロハツは、どの程度の時間で変色が進行するのか明らかでないため、まず、埼玉で採取したニセクロハツ候補菌の抽出物の活性試験を行った。抽出溶媒として水、メタノールを用いた。水抽出液は、初めは褐色であるが一晩冷温で抽出している間に、非常に濃い黒色へ変化していた。この抽出物をそれぞれ濃縮し、マウスへ腹腔内投与して致死活性を調べた(Table 3)。

Table 3. Lethal activities^{a)}.

	activity
MeOH extract (40 mg)	×
H ₂ O extract (40 mg)	○

a) The lethality was assayed by an intraperitoneal injection into mice (female, ddy, weight of 9~10 g).

その結果、水抽出物のみ致死活性を示した(Table 3)。マウス致死活性を示したことから、この埼玉で採取した子実体はニセクロハツである可能性がある。そこで、この毒成分の精製を試みることにした。これに先立ち、関東の他の場所で採取したニセクロハツ候補菌についても水抽出物の活性試験を行った(Table 4)。

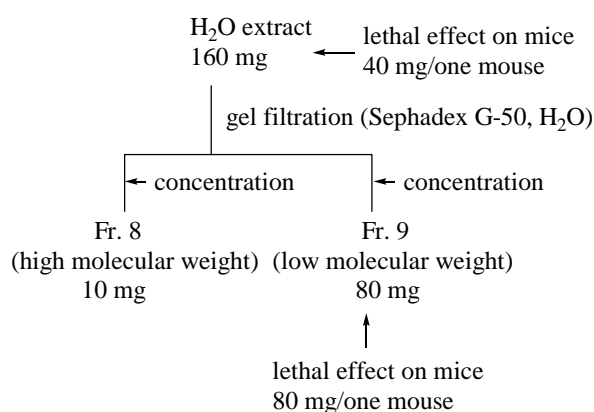
Table 4. Lethal activities^{a)}.

ニセクロハツ候補菌の採取地	H ₂ O extract	
	40 mg/匹	80 mg/匹
埼玉県和光市	0/3	3/3
埼玉県所沢市西武球場	1/2	2/2
埼玉県所沢市森林公園	1/2	2/2
神奈川県横浜市日吉	0/2	2/2

a) The lethality was assayed by an intraperitoneal injection into mice (female, ddy, weight of 9~10 g).

その結果、どれも同程度の致死活性を有していた(Table 4)。関東近郊にてニセクロハツ候補菌を多数採取したが、どれも外見上良く似ており、同一の種のようにみられた。また、毒成分を精製するにあたって、採取地により化学成分のばらつきが予想されたため、これら子実体を混合し、適宜抽出操作を行うことにした。この混合した子実体は埼玉で採取した子実体が最も多かったことから、今後、埼玉のニセクロハツ候補菌と表現する。上に挙げたニセクロハツ候補菌は 2003 年より以前に採取したものであるが、2004 年以降、上に挙げた採取地以外にも、神奈川県川崎市や、神奈川県横浜市獅子ヶ谷市民の森、群馬県等で新たにニセクロハツ候補菌を採取したが、外見上ほぼ同様であることから埼玉のニセクロハツ候補菌として混合し用いた。

毒成分の大まかな分子量を求めるためゲルろ過を行った(Scheme 8)。溶出の後半である低分子画分に活性がみられたことから毒成分は低分子であることがわかった。しかしながら、活性は半分程度にまで減少していた。

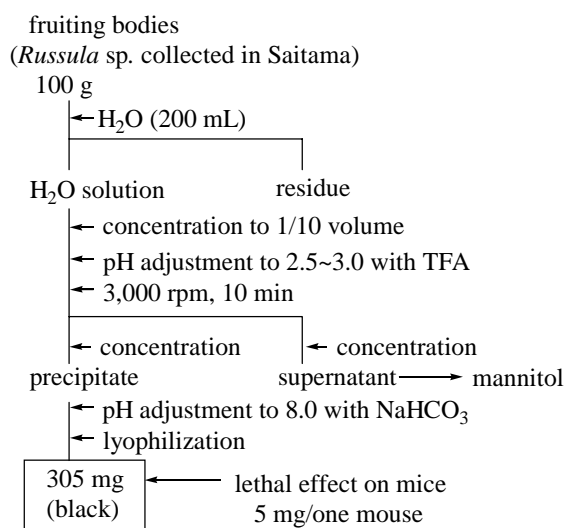


Scheme 8. Gel filtration of H₂O extract.

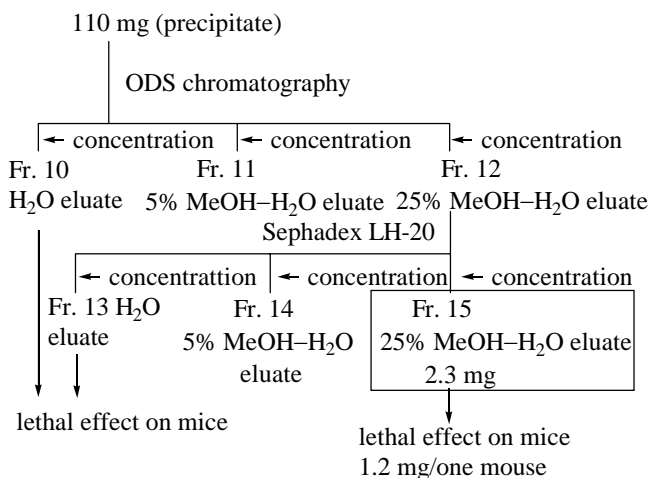
毒成分が低分子であることがわかったため、水抽出物の ^1H NMR スペクトルを測定したところ、主成分はマンニトールであることがわかった³²⁾。そこでまず、毒成分とマンニトールとを分離することを目標とした。マンニトールは中性で高極性であることから、疎水性の担体には吸着しない。そこで、XAD-2 や ODS を用いて毒成分の吸着を試みたが、活性は主に非吸着画分にみられた。これら操作を複数回行ったが、非吸着画分の活性が消失する場合もあり、再現性が得られなかった。得られた非吸着画分について注意深く観察すると、活性の消失した場合は、頻繁に黒い沈殿が生じていることに気が付いた。生じた黒色沈殿は水、及び有機溶媒に難溶であった。そこで、この黒色沈殿が生じる条件では毒成分が失活しているものと考え、酸や塩基にさらし、沈殿の様子を調べた。その結果、酸によって積極的に黒色沈殿が生じ、それにともなって上澄みの活性が消失することがわかった。毒成分が失活していることも考えたが、酸性条件下、活性成分が沈殿した可能性も考え、得られた黒色沈殿をマウスに投与するため、溶解する条件を検討した。水や有機溶媒に難溶であったが、唯一塩基性の水溶液にのみ溶解した。そこで、得られた沈殿に対して少量の重曹水溶液で pH 8 程度に調製し溶解させ、マウスに対し腹腔内投与で活性を調べたところ、5 mg で致死活性があることがわかった (Scheme 9)。

この結果から、毒成分は酸に安定で、酸性条件下では沈殿する成分であるとわかった。得られた黒色沈殿は、マンニトールの大部分が除去され、5 mg で活性があることから、精製度は 10 倍程度にまで向上した。そこで、以後はこの黒色沈殿を用いて精製を進めることにした。

検討の結果、ODS カラムクロマトグラフィーを行い、毒成分を 25%メタノール水溶液にて溶出させた後、ゲルろ過 (Sephadex LH-20) にて精製し、毒成分を 25%メタノール水溶液で溶出させることで、1 mg 程度で活性を示す画分 (Fr. 15) を得ることができた (Scheme 10)。し



Scheme 9. Purification procedures.

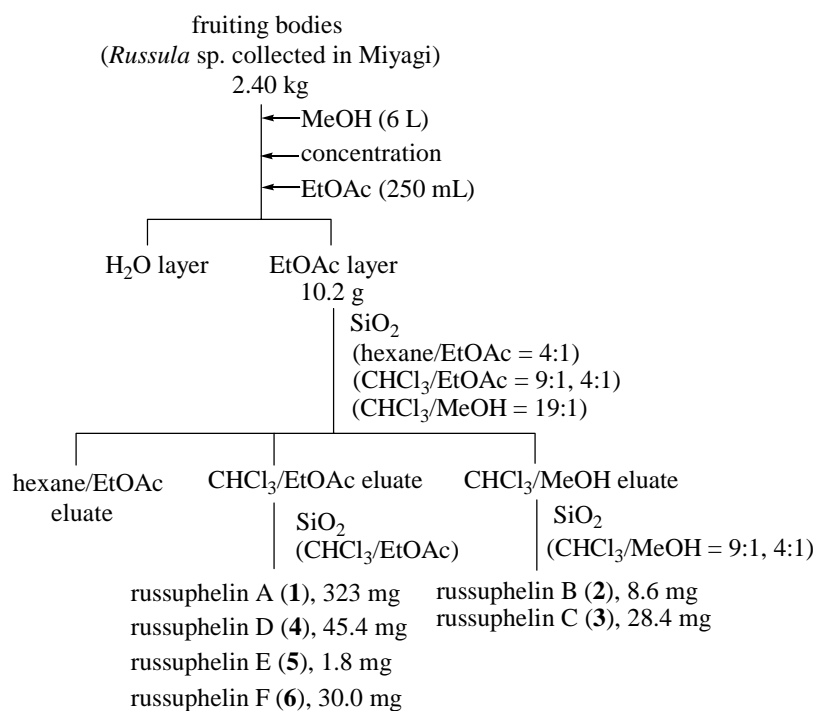


Scheme 10. Purification procedures.

かしながら、活性は複数の画分に分散し、再現性も全く得られなかった(Scheme 10)。また、どの画分にも黒色色素が含まれていた。

そこで、再現性が得られない理由として、活性成分が黒色沈殿(色素)そのものであると推定した。黒色沈殿(色素)は抽出操作や生成過程において生じることから、キノコに特有のチロシン由来の色素であると考えた。チロシン由来の色素であるメラニン色素は酸性条件下沈殿し、塩基性の水溶液に溶解することが知られている³³⁾。抽出操作や精製の過程において、重合度の異なる低分子量の色素が多数生成することで再現性が得られなかったと考えられる。この黒色色素はアーティファクトである可能性が高いと考え、これ以上の精製を断念した。なお、多くのキノコは抽出中に色素を生じるが、埼玉のニセクロハツ候補菌の場合は、その生じる量が極めて多いことから、マウスに対して腹腔内投与で致死活性を示し、擬陽性を与えたと考えた。また、後に、この黒色沈殿はマウスへの経口投与による活性試験において、毒性がないことを確認した。

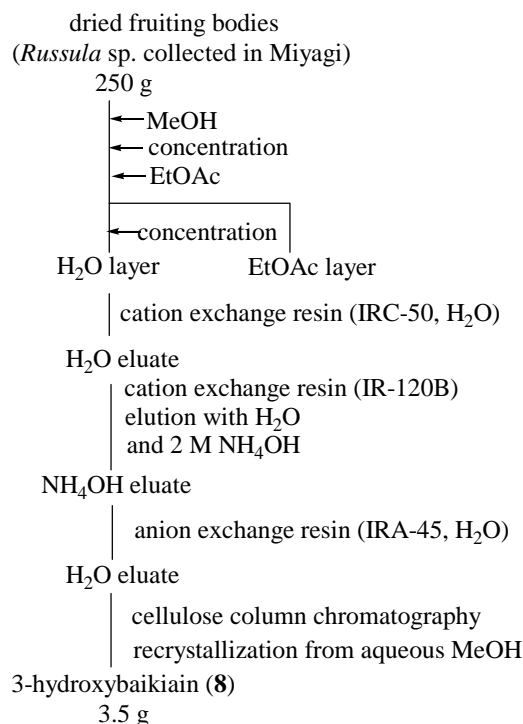
さて、過去に宮城で採取されたニセクロハツより単離、構造決定された 3-ヒドロキシバイキアイン(8)は、水溶性で含有量も高いと報告されている³⁰⁾。しかし、ここまでの毒性試験を指標とした埼玉のニセクロハツ候補菌の水抽出物の精製過程では、¹H NMR スペクトル上でその存在を全く確認することができなかった。そこで、ニセクロハツ同定の手掛かりとして、過去の報告に従い、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)の再単離を試みることにした。ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)は次のように単離されている(Schemes 11 and 12)^{28), 29), 30)}。



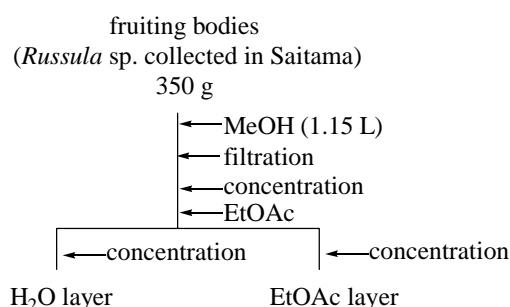
Scheme 11. Isolation procedures of russuphelins.

脂溶性のルスフェリン類(1~6)は、メタノール抽出物の分配操作によって得られる酢酸エチル層を、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を繰り返すことで単離されている(Scheme 11)^{28), 29)}。ルスフェリン類(1~6)は、¹H NMR スペクトル上で、6~7 ppm の芳香族シグナルと、3~4 ppm にメトキシ基のシグナルが観測されることが特徴的である。また、3-ヒドロキシバイキアイン(8)はメタノール抽出物を酢酸エチルで脱脂後、得られた水層を陽イオン交換体(IR-120B)に吸着させ、アンモニア水溶液で溶出させることで単離された(Scheme 12)³⁰⁾。3-ヒドロキシバイキアイン(8)は、¹H NMR スペクトル上で 5.8~6.2 ppm にオレフィンのシグナルが観測されることが特徴的である。これら化合物が含まれていれば、¹H NMR スペクトルを測定することで容易に判断することができる。

そこで、埼玉のニセクロハツ候補菌から、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)の再単離を試みた。子実体をメタノールで抽出し、濃縮後、酢酸エチルで分配し、水層と酢酸エチル層を得た(Scheme 13)。それぞれの¹H NMR スペクトルを測定したところ、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)のシグナルが全く観測されなかった(Figures 33 and 34)。



Scheme 12. Isolation procedures of 3-hydroxybaikiain (8).



Scheme 13. Purification procedures of russphelins and 3-hydroxybaikiain (8).

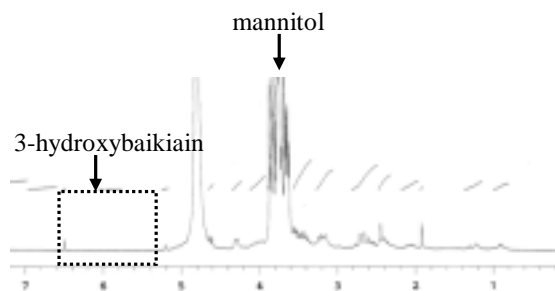


Figure 33. ^1H NMR spectrum of H_2O layer (Saitama).

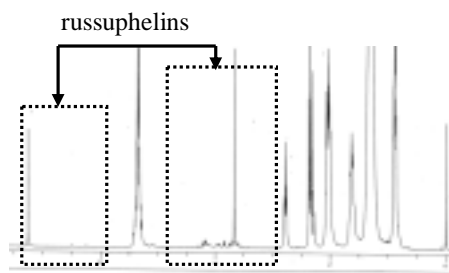


Figure 34. ^1H NMR spectrum of EtOAc layer (Saitama).

また、埼玉のニセクロハツ候補菌の水層を陽イオン交換体を用いて精製しても、3-ヒドロキシバイキアイン(8)のシグナルは ^1H NMR スペクトル上で観測されなかった。酢酸エチル層についても、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでさらに精製を行ったが、ルスフェリン類のシグナルは ^1H NMR スペクトル上で観測されなかった。このことから、埼玉のニセクロハツにはルスフェリン類(1~6)および 3-ヒドロキシバイキアイン(8)が含まれていないとわかり、少なくとも過去に報告のある宮城で採取されたニセクロハツとは異なる種であることがわかった。

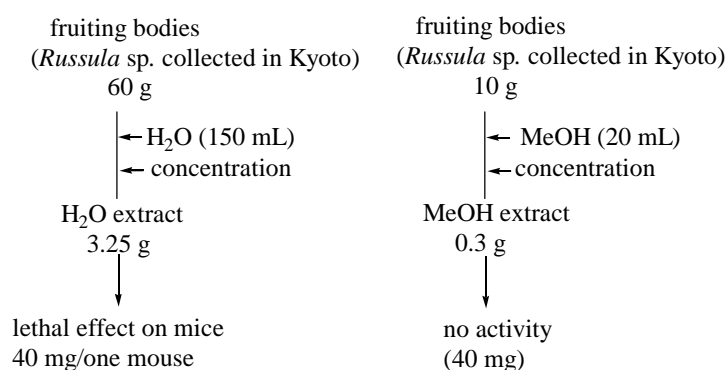
第二項 京都で採取したニセクロハツ候補菌の毒成分探索(マウス腹腔内投与による急性毒性を指標として)

続いて、2004年の8月に京都府清水山でニセクロハツ候補菌を採取した(Figure 35)。



Figure 35. *Russula* sp. collected in Kyoto.

1954年にこの清水山で採取されたニセクロハツの誤食により、ニセクロハツによるものと考えられる初の死亡事故が発生している²⁴⁾。京都のニセクロハツ候補菌は、埼玉のニセクロハツ候補菌と比べて、姿形はほとんど同じであるが、傘は薄い茶色、ひだはクリーム色と外見の色彩が若干異なっていた。特に、冷凍保存中にも変色はほとんどみられなかった。この変色が穏やかな様子はニセクロハツの特徴に一致している。この京都で採取したニセクロハツ候補菌の子実体を水とメタノールでそれぞれ抽出し、濃縮後、粗抽出物の活性試験を行った。粗抽出物をマウスへ腹腔内投与を行ったところ、水抽出物に致死活性がみられた(Scheme 14)。



Scheme 14. Investigation of solvents for extraction of the toxin.

抽出操作中にも、埼玉のニセクロハツ候補菌とは異なる、次のような現象を観察した。即ち、京都のニセクロハツ候補菌の水抽出液は赤色であり、濃縮乾燥した抽出物は若干黒くなるものの、再び水に溶解させても埼玉のニセクロハツ候補菌由来抽出物より格段に色

が薄かった。また、水抽出物を再び水に溶解させたときに、溶解性の悪い白色固体があった。そこで、その白色固体をろ過で分別し、 ^1H NMR スペクトルを測定したところ、チロシン(9)の ^1H NMR スペクトルと一致した(Figures 36, 37, and 38)。埼玉のニセクロハツ候補菌には、水抽出物の ^1H NMR スペクトルから判断して、ほとんどチロシン(9)が含まれていない(Figure 39)。京都のニセクロハツ候補菌には、メラニン系色素前駆体であるチロシン(9)が多く含まれていたことから、チロシナーゼを阻害する物質が含まれているか、チロシナーゼの含有量が少ないことが考えられる。この特徴は、ニセクロハツの子実体に傷をつけたときに観察されるニセクロハツは赤いままであるという現象を支持する結果である。

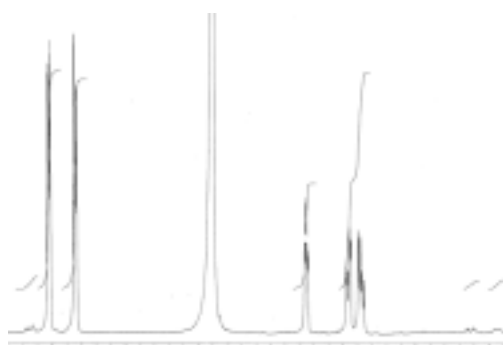


Figure 36. ^1H NMR spectrum of tyrosine (9) (Kyoto).

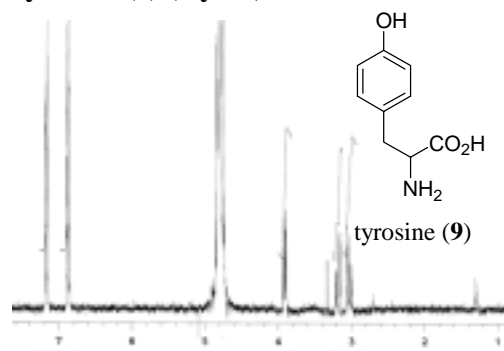


Figure 37. ^1H NMR spectrum of tyrosine (9) (authentic).

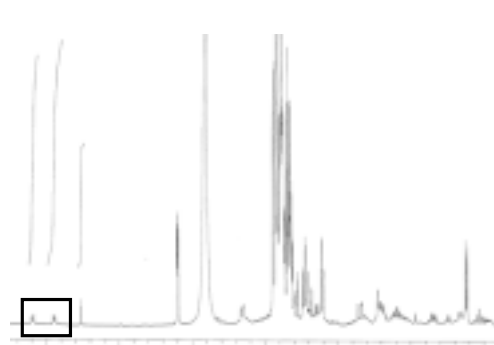


Figure 38. ^1H NMR spectrum of H_2O extract (Kyoto).

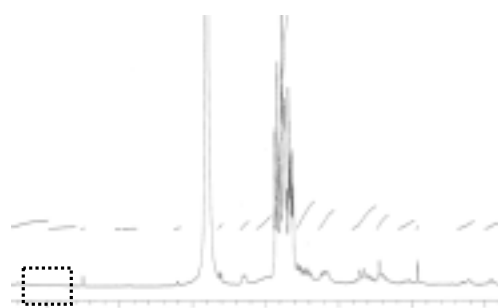
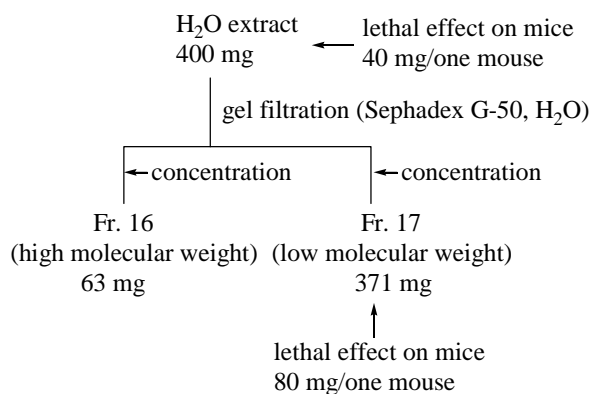


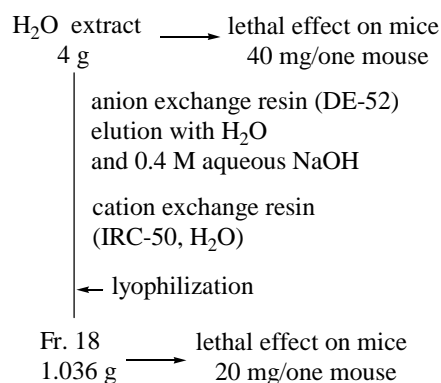
Figure 39. ^1H NMR spectrum of H_2O extract (Saitama).

マウス致死活性を示す水抽出物が得られたことから、毒成分の大まかな分子量を調べるためゲルろ過を行った。担体に Sephadex G-50 を用い、低分子画分と高分子画分とに分離した(Scheme 15)。活性試験を行ったところ、活性は半分程度に減少したものの、低分子画分に活性がみられた。



Scheme 15. Gel filtration of H_2O extract.

毒成分が低分子であるとわかったため、腹腔内投与による致死活性を指標に毒成分の精製を検討した。まず、 ^1H NMR スペクトルを測定したところ、埼玉のニセクロハツ候補菌と同様に、主成分はマンニトールであるとわかった。そこで、毒成分とマンニトールとを分離するため、先ほどと同様にポリスチレン系のポリマー担体である XAD-2、4、7、16、やダイヤイオン HP-20、活性炭を用いたが、吸着せず、水溶出画分に活性がみられた。また、これらの精製において活性のあった非吸着画分はいずれも活性が半分以下に減少していた。次に、イオン交換体による精製を試みた。マンニトールは中性であるためイオン交換体には吸着しない。担体に強塩基性陰イオン交換体(DE-52)を用いたところ、毒成分は吸着した。吸着した毒成分は活性の回収率は半分以下であるものの、0.4 M の水酸化ナトリウム水溶液で再現性よく得られた(Scheme 16)。水酸化ナトリウムは弱酸性陽イオン交換体(IRC-50)を用いて除去した(Scheme 16)。この 0.4 M 水酸化ナトリウム水溶液画分の ^1H NMR スペクトルを測定したところ、主成分はリンゴ酸(10)であることがわかった(Figures 40 and 41)。



Scheme 16. Anion exchange chromatography.

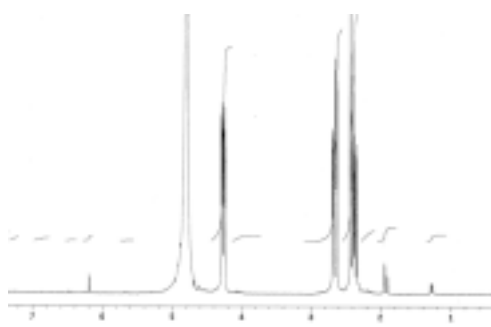


Figure 40. ^1H NMR spectrum of Fr. 18.

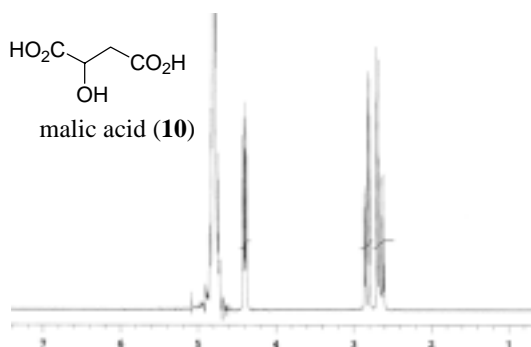
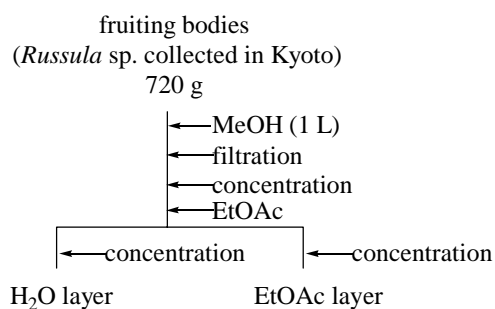


Figure 41. ^1H NMR spectrum of malic acid (10) (authentic).

市販のリンゴ酸(10)をマウスに腹腔内投与したところ、10 mg 程度で致死活性を示した。よって、Fr. 18 の活性成分はリンゴ酸(10)であるとわかった。ここまで、京都のニセクロハツ候補菌の水抽出物について精製を行ってきた。精製の過程、どの操作においても、活性は 1/2 から 1/4 程度にまで減少した。しかし、弱いながらも活性がみられたことから精製を検討したが、弱い活性しか有さず本来は毒性を示すほど含有量の高いリンゴ酸(10)を単離するに留まり、毒成分本体を単離することはできなかった。この結果には二通りの原因

があると考えられた。まず、一つ目は活性成分が不安定なことである。しかしながら、水抽出物を溶液状態で室温に放置した後、濃縮せずに活性試験を行ったところ、活性の減少はみられなかったことから、この時点ではその可能性は低いと考えた(後に毒成分は不安定であることがわかったが、詳細は後述する)。二つ目はリンゴ酸(10)のような弱い活性をもつものが複数あることで、水抽出物全体では致死活性を有している可能性である。精製操作を行うことで、複数の弱い活性成分が分散し、活性は減少したとも考えられる。

ここまで、京都のニセクロハツ候補菌の水抽出物について精製を行ってきたが、埼玉のニセクロハツ候補菌と同様に¹H NMR スペクトル上で3-ヒドロキシバイキアイン(8)の存在を確認することができなかった。そこで、ニセクロハツ同定の手がかりとするため、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)の再単離を試みた。子実体をメタノールで抽出し、濃縮後、酢酸エチルで分配し、水層と酢酸エチル層を得た(Scheme 17)。それぞれの¹H NMR スペクトルを測定したところ、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)のシグナルは全く観測されなかった(Figures 42 and 43)。



Scheme 17. Purification procedures of russphelins and 3-hydroxybaikaiin (8).

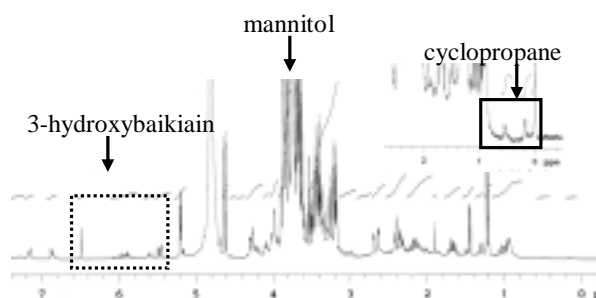


Figure 42. ¹H NMR spectrum of H₂O layer.

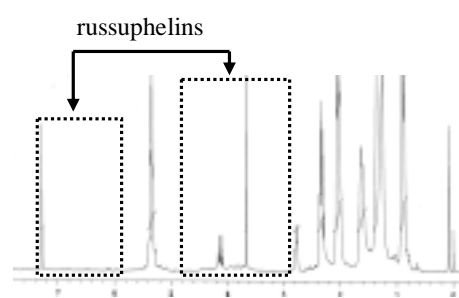


Figure 43. ¹H NMR spectrum of EtOAc layer.

また、京都のニセクロハツ候補菌の水層を陽イオン交換体を用いて精製しても、3-ヒドロキシバイキアイン(8)は検出できなかった。酢酸エチル層についても、シリカゲルカラムクロマトグラフィーでさらに精製を行ったが、ルスフェリン類(1~6)のシグナルは¹H NMR スペクトル上で観測できなかった。このことから、京都のニセクロハツ候補菌も、過去に報告のある宮城で採取されたニセクロハツとは異なる種であることがわかった。

ここで、京都のニセクロハツ候補菌の水層の ^1H NMR スペクトルにのみ高磁場側にシクロプロピル基と考えられる特徴的なシグナルがみられた(Figure 42)。そこでこの京都のニセクロハツ候補菌に特有の成分の精製を行った。

水抽出物を透析し、高分子成分を取り除いた後に、低分子画分を ODS カラムクロマトグラフィーに通し、50%メタノール水溶液で溶出させた。得られた 50%メタノール水溶液画分を再び ODS カラムによる精製、ODS PTLC、ODS カラムを用いた HPLC により精製し、シクロプロパン環を有する化合物を単離した(Scheme 18)。

^1H NMR スペクトルより、カルニチンとシクロプロパンを有する化合物であるとわかり、カルニチンの水酸基の根元のプロトンが 5.64 ppm と低磁場シフトしていることから、カルニチンの水酸基がアシル化されていると推定した。そこで、 ^{13}C NMR、HMBC、HMQC を測定し、**11** はシクロプロピルアセチルカルニチンであると推定した(Figure 44)。

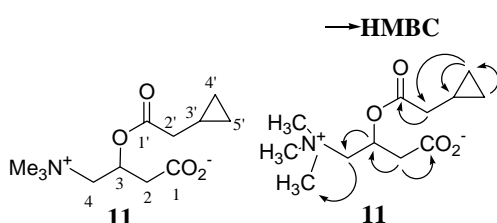
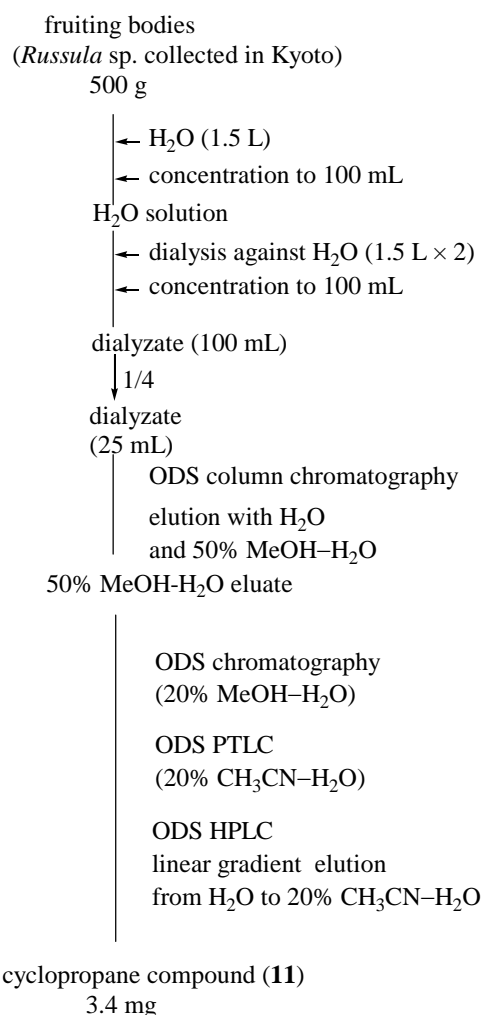


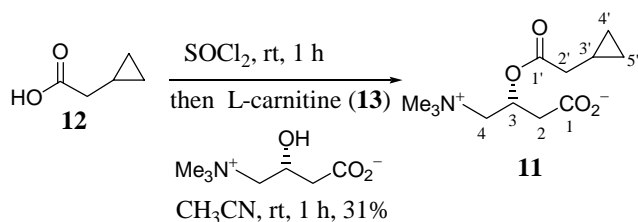
Figure 44. Structure and HMBC correlations of **11**.



Scheme 18. Isolation procedures of **11**.

しかしながら、シクロプロピル酢酸のカルボニル炭素とカルニチンの 3 位のプロトンに HMBC 相関が観測されなかったことから、絶対立体化学を含めた構造確認のため、シクロプロピル酢酸(**12**)と L-カルニチン(**13**)を縮合し **11** を合成した(Scheme 19)。合成品 **11** は天然物 **11** とスペクトルデータおよび旋光度が良い一致を示したことから、絶対立体化学を含めた構造を決定することができた(Tables 5 and 6)。これまでに類縁体である化合物 **14**(Figure 45)が河岸らによってシロヌメリイグチ(*Suillus laricinus*)から単離、構造決定されている³⁴⁾ものの、シクロプロピルアセチルカルニチン(**11**)は新規化合物である。なお、**11**

をマウスに対して腹腔内投与(1g / kg)したところ、毒性はみられなかった。



natural **11**: $[\alpha]_{\text{D}} -14.46$ (*c* 0.96, H_2O);
 HR FAB MS $(\text{M}+\text{H})^+$ *m/z* calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_4$, 244.1549, found 244.1572.
 synthetic **11**: $[\alpha]_{\text{D}} -16.57$ (*c* 0.67, H_2O);
 HR FAB MS $(\text{M}+\text{H})^+$ *m/z* calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_4$, 244.1549, found 244.1555.

Scheme 19. Synthesis of 11.

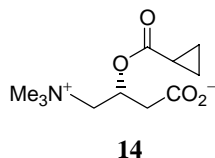


Figure 45. Carnitine derivative 14 from *Suillus laricinus*.

Table 5. ^{13}C NMR data^{a)} of 11.

C No.	natural	synthetic
	δC (ppm)	δC (ppm)
1	177.05	177.07
2	40.88	40.90
3	67.53	67.51
4	68.94	68.90
4- N^+Me_3	54.51	54.50
1'	175.62	175.62
2'	39.71	39.66
3'	6.66	6.65
4', 5'	4.18	4.15
	4.36	4.35

a) 75 MHz, D_2O , DSS = -2.04

Table 6. ^1H NMR data^{a)} of 11.

C No.	natural	synthetic
	δH (ppm)	δH (ppm)
2	2.50 (1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 8.0 Hz), 2.65 (1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 5.6 Hz)	2.48 (1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 8.0 Hz), 2.62 (1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 5.6 Hz)
3	5.64 (1H, m)	5.62 (1H, m)
4	3.62 (1H, d, <i>J</i> = 14.0 Hz) 3.88 (1H, dd, <i>J</i> = 14.0, 8.6 Hz)	3.60 (1H, d, <i>J</i> = 14.0 Hz) 3.86 (1H, dd, <i>J</i> = 14.0, 8.6 Hz)
4- N^+Me_3	3.19 (9H, s)	3.17 (9H, s)
2'	2.28, 2.37 (each 1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 8.0)	2.28, 2.35 (each 1H, dd, <i>J</i> = 16.0, 8.0)
3'	1.00 (1H, m)	0.97 (1H, m)
4', 5'	0.16 (2H, m), 0.53 (2H, m)	0.14 (2H, m), 0.50 (2H, m)

a) 300 MHz, D_2O , DSS = 0.00

第三項 宮城のニセクロハツ候補菌からのルスフェリン類、ヒドロキシバイキアインの再単離

埼玉のニセクロハツ候補菌と京都のニセクロハツ候補菌を採取し、それらの毒成分探索を腹腔内投与によるマウス致死活性を指標に行ってきたが、毒成分の単離には至らず、これら子実体がニセクロハツである確証が得られなかった。また、埼玉のニセクロハツ候補菌と京都のニセクロハツ候補菌について、ルスフェリン類(1~6)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)の再単離を試みたが、含まれていなかった。そこで、2007年10月および2008年10月に宮城にて少量採取されたニセクロハツ候補菌を用いて、その化学成分を調べることにした(Figure 46)。



Figure 46. *Russula* sp. collected in Miyagi.

宮城のニセクロハツ候補菌の外見上の特徴は、京都のニセクロハツ候補菌に近く、採取した後や、冷凍保存中に黒く変色する様子はみられなかった。過去の報告に従い、ルスフェリン類(1~6)とヒドロキシバイキアイン(8)の再単離を試みた²⁶⁾。宮城のニセクロハツ候補菌をメタノールで抽出後、酢酸エチルで分配し、水層と酢酸エチル層の¹H NMRスペクトルを測定した(Scheme 20)。水層の¹H NMRスペクトルから、3-ヒドロキシバイキアイン(8)に特徴的なオレフィンのシグナルを観測した(Figure 47)。さらに酢酸エチル層の¹H NMRスペクトルより、ルスフェリン類(1~6)に特徴的な芳香族のシグナルとメトキシ基のシグナルを観測した(Figure 48)。

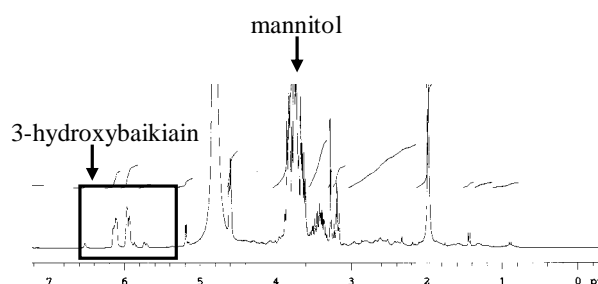


Figure 47. ¹H NMR spectrum of H₂O layer (Miyagi).

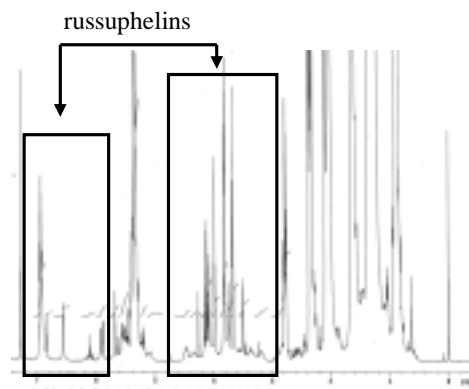
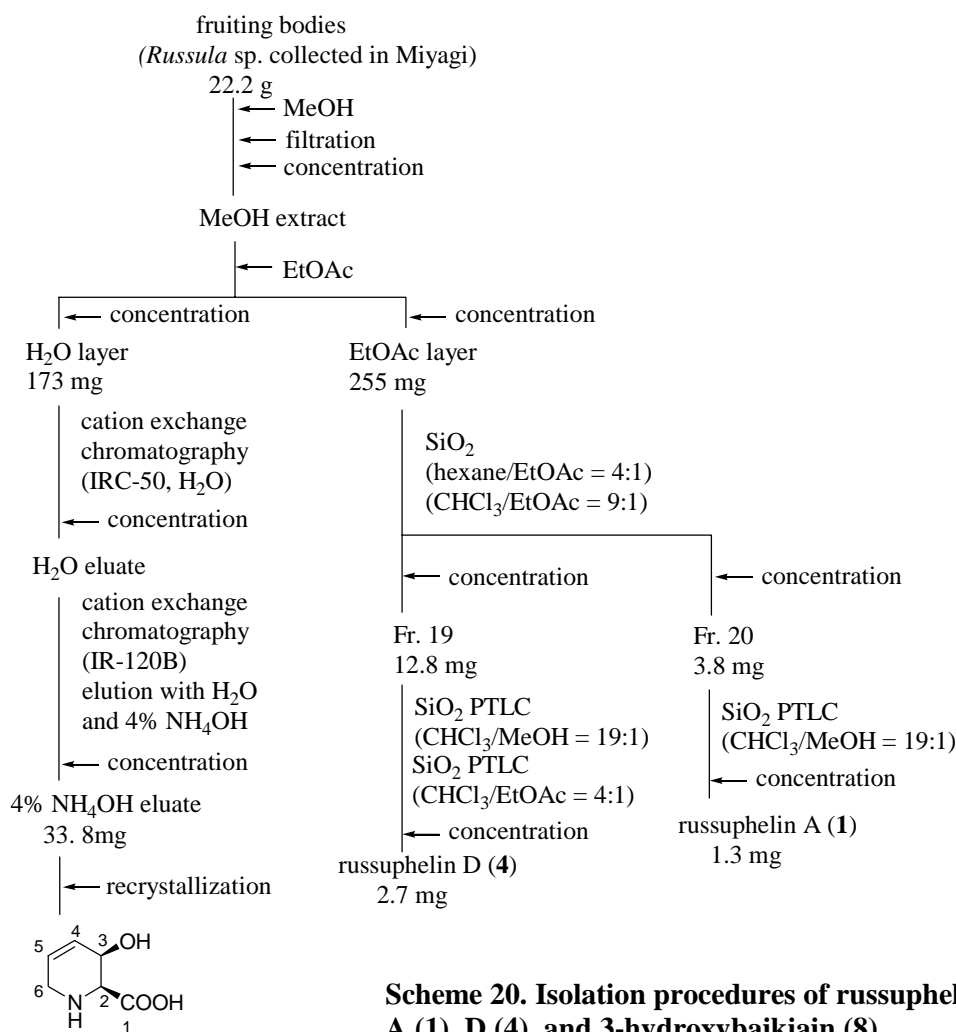


Figure 48. ¹H NMR spectrum of EtOAc layer (Miyagi).

水層については、弱酸性陽イオン交換体(IRC-50)、強酸性陽イオン交換体(IR-120B)、再結晶にて精製し、3-ヒドロキシバイキアイン(8)を単離した(Scheme 20)。酢酸エチル層はシリカゲルカラムクロマトグラフィー、シリカゲル PTLC にて精製し、ルスフェリン A (1)、D (4)を単離した(Schem 20)。再単離した化合物の ^1H NMR スペクトルおよび MS スペクトルは報告されているデータと一致した(Tables 7, 8, 9, and 10)。



(2*S*, 3*R*)-(-)-3-hydroxybaikiain (8)

14.1 mg

Table 7. ^1H NMR data^{a)} of 3-hydroxybaikiain (8).

C No.	δH (ppm)	
		lit. ³⁰⁾
2	3.83 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	3.81 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)
3	4.62 (1H, m)	4.61 (1H, m)
4	6.15 (1H, m)	6.17 (1H, m)
5	5.98 (1H, m)	5.97 (1H, m)
6	3.75 (2H, m)	3.74 (2H)

a) 300 MHz, D₂O, HOD = 4.79.

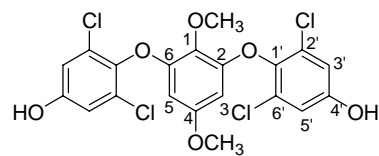
Table 8. ^{13}C NMR data^{a)} of 3-hydroxybaikiain (8).

C No.	δC (ppm)	
		lit. ³⁰⁾
1	171.50	171.49
2, 3	60.78	60.82
4, 5	126.80	126.81
	123.60	123.70
6	42.26	42.39

a) 75 MHz, D₂O.

Table 9. ^1H NMR data^{a)} of russuphelin A (1).

C No.	δH (ppm)	lit. ^{28a)}	
		δH (ppm)	δH (ppm)
3, 5	5.60 (2H, s)	5.61 (2H, s)	
3', 5'	6.92 (4H, s)	6.92 (4H, s)	
1-OCH ₃	4.00 (3H, s)	4.01 (3H, s)	
4-OCH ₃	3.46 (3H, s)	3.48 (3H, s)	

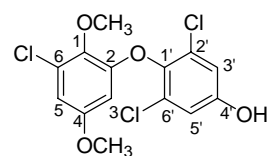
a) 300 MHz, CD₃OD, CHD₂OD = 3.31

russuphelin A (1)

HR EI MS (M)⁺ m/z calcd for
C₂₀H₁₄O₆Cl₄, 489.9544, found 489.9523.

Table 10. ^1H NMR data^{a)} of russuphelin D (4).

C No.	δH (ppm)	lit. ^{28b)}	
		δH (ppm)	δH (ppm)
3	5.88 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	5.88 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	
5	6.58 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	6.56 (1H, d, $J = 3.0$ Hz)	
3', 5'	6.91 (2H, s)	6.89 (2H, s)	
1-OCH ₃	3.98 (3H, s)	4.05 (3H, s)	
4-OCH ₃	3.68 (3H, s)	3.68 (3H, s)	
4'-OH		6.80 (1H, br)	

a) 300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00

russuphelin D (4)

HR EI MS (M)⁺ m/z calcd for
C₁₄H₁₁O₄Cl₃, 347.9723, found 347.9720.

過去の報告通り^{28), 30)}、宮城のニセクロハツ候補菌から、ルスフェリン A (1)、D (4)、3-ヒドロキシバイキアイン(8)を再単離することができた。また、京都のニセクロハツ候補菌により単離、構造決定したシクロプロピルアセチルカルニチン(11)は、宮城のニセクロハツ候補菌には含まれていないことを確認した。なお、宮城のニセクロハツ候補菌の抽出物をマウスに対して腹腔内投与したところ(抽出物 40mg)、致死活性がみられたが、これについては他の候補菌の結果と比較しながら次項で述べる。

第四項 各種ニセクロハツ候補菌の化学成分と毒性について(ニセクロハツの同定)

埼玉のニセクロハツ候補菌、京都のニセクロハツ候補菌、宮城のニセクロハツ候補菌について、これまでに得られた結果をまとめる(Table 11)。

Table 11. Constituents of three *Russula* sp.

	<i>Russula</i> sp. collected in Saitama	<i>Russula</i> sp. collected in Kyoto	<i>Russula</i> sp. collected in Miyagi
russuphelins, hydroxybaikiain	not detected	not detected	isolated
cyclopropylacetyl (<i>R</i>)-carnitine (11)	not detected	isolated	not detected

過去に宮城で採取したニセクロハツから単離、構造決定されたルスフェリン類²⁶⁾、ヒドロキシバイキアイン(**8**)²⁸⁾は、宮城のニセクロハツ候補菌にのみ含まれていた。また、シクロプロピルアセチルカルニチン(**11**)は京都のニセクロハツ候補菌にのみ含まれていた。三種のニセクロハツ候補菌は、それぞれ含有している化学成分が異なることから、異種の菌であると考えられる。しかし、埼玉、京都、宮城のニセクロハツ候補菌いずれの水抽出物もマウスに対して腹腔内投与で致死活性を示したため (Table 12)、これら三種のうち、どれが真のニセクロハツであるか判断することができなかった。

一般的に、経口投与による活性試験は腹腔内投与に比べて感度が悪く、多くの試料を必要とするため、これまでは比較的感度の良い腹腔内投与による活性試験を行っていた。しかし、実際の中毒事故においては、誤食により中毒症状が現れることから、本来ならばマウスに対しても経口投与で活性試験をすべきである。そこで、三種のニセクロハツ候補菌の水抽出物を新たにマウスに対して経口投与で活性を調べた。すると、京都のニセクロハツ候補菌のみ、弱いながらも致死活性を示した(Table 12)。また、マウスの症状として、投与後数時間は異常がみられないものの、3時間後頃より細かな体の震え(振戦)が観察された。また、死亡直前には後ろ足の痙攣がみられるなど、人の中毒事故で観察される症状と似ていた。

概要で述べたとおり、2005年から2007年にかけて、宮崎、愛知、大阪にてニセクロハツによる中毒死亡事故が発生している。同時に2005年から2007年頃にかけて、京都において、年間10 kg程度と大量のニセクロハツ候補菌を採取することができた。この中毒事故の発生時期と大量に発生した時期が重なっていることや、これまで中毒事故は西日本を中心に発生していることを考え併せ、京都のニセクロハツ候補菌が真のニセクロハツであると判断した。

Table 12. Lethal toxicities of three *Russula* sp. in mice.

	<i>Russula</i> sp. collected in Saitama	<i>Russula</i> sp. collected in Kyoto	<i>Russula</i> sp. collected in Miyagi
lethal activity (i.p., mouse) ^{a)}	observed	observed	observed
lethal activity (p.o., mouse) ^{b)}	not observed	observed	not observed

a) water extract, 40 mg/one mouse (ddy female, weight of 10 g)

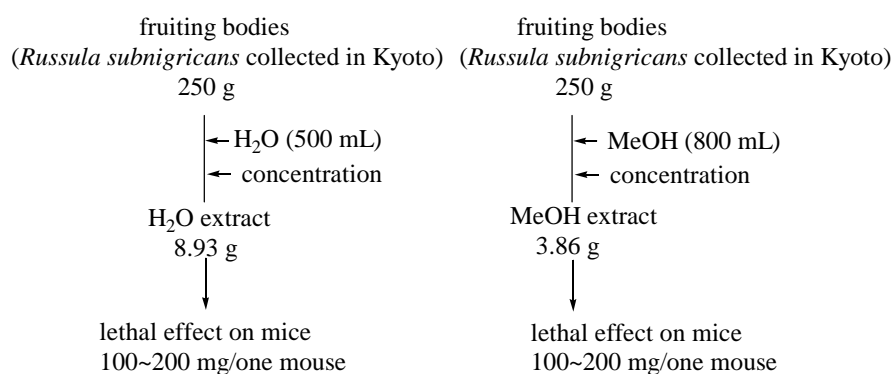
b) water extract, 200 mg/one mouse (ddy female, weight of 20 g)

よって、次節以降は京都のニセクロハツを用いて、毒成分の探索を行うことにした。また、京都のニセクロハツは大量に採取できたことから、経口投与による致死活性を指標にした。投与方法を経口に変更することで、次のような利点がある。腹腔内投与で致死活性を示したリンゴ酸(10)の腹腔内投与による LD₅₀ 値は 50 mg/kg であるのに対し、経口投与による LD₅₀ 値は 1,600 mg/kg であるとされている。すなわち、毒性本体以外の弱い活性成分は、経口投与ではほとんど毒性を示さず、真の毒成分以外の成分が毒性を示すことはほとんどないと考えられる。

第三節 京都で採取したニセクロハツからの毒成分の単離精製と構造解析

第一項 毒成分の単離精製(マウス経口投与による致死活性を指標として)

筆者はここまでに、埼玉のニセクロハツ候補菌、京都のニセクロハツ候補菌、宮城のニセクロハツ候補菌について化学成分と毒成分を調べ、これら三種は含有する化学成分が大きく異なることから異種の菌であることを示し、さらに京都のニセクロハツ候補菌の水抽出物のみ、経口投与でマウス致死活性がみられたことから、京都のニセクロハツ候補菌が真のニセクロハツであることを明らかにした。この結果をふまえて、京都で採取したニセクロハツから、経口投与による致死活性を指標に毒成分の探索を行うことにした。まず改めて抽出溶媒の検討を行った。溶媒には水とメタノールを用いた(Scheme 21)。

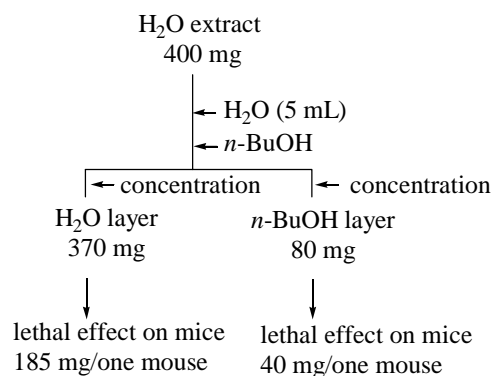


Scheme 21. Investigation of solvents for extraction of the toxin.

その結果、水抽出物とメタノール抽出物の両方に致死活性がみられた。活性の強さには100~200 mgと抽出するごとに多少ばらつきがみられた。また、抽出物200 mgを投与しても、活性がみられない場合もあった。水抽出物とメタノール抽出物を比較すると、両者は同程度の量で致死活性を示すものの、水抽出物のほうがより多くの抽出物が得られたため、毒成分は水で抽出することにした。

毒成分はメタノールでも抽出できたことから、有機溶媒に可溶性成分であると考えられた。そこで、ブタノールを用いて分液を行った(Scheme 22)。

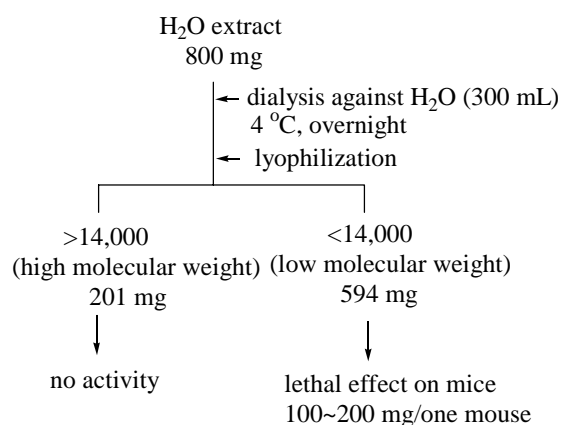
すると、ブタノール層と水層のどちらにも活性がみられた。しかしながら、同様の操作を複数回行った場合、両者に活性がみられないこともあった。この結果から、毒成分は水層と有機層の



Scheme 22. Butanol separation of H₂O extract.

どちらにも分配される成分であると考えられ、分液操作は精製方法としては不適であると判断した。

分液の結果から、毒成分は蛋白質ではなく、低分子化合物であると考えられる。なぜなら、毒成分が蛋白質の場合、ブタノール層に分配されるとは考えづらいからである。そこで、透析により毒成分の大まかな分子量を確認することにした(Scheme 23)。

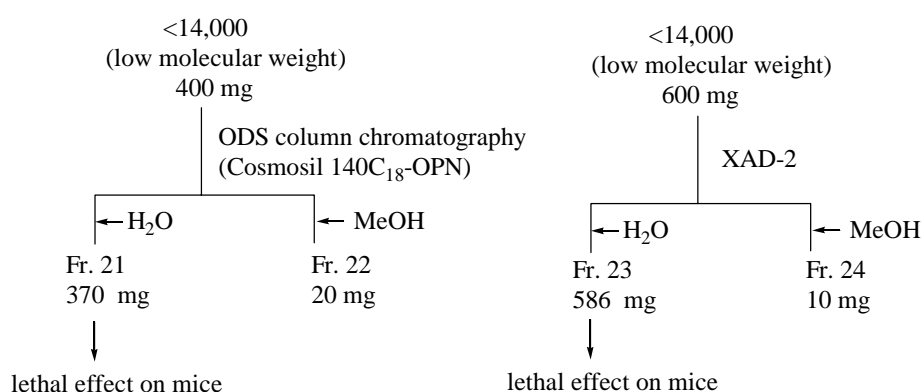


Scheme 23. Dialysis of H₂O extract.

その結果、毒性は透析膜の外側(低分子画分)にのみ活性がみられた。この結果から、毒成分は低分子であることが明らかになった。これ以降、水抽出物を透析して得られる低分子画分を用いて精製を進めることにした。

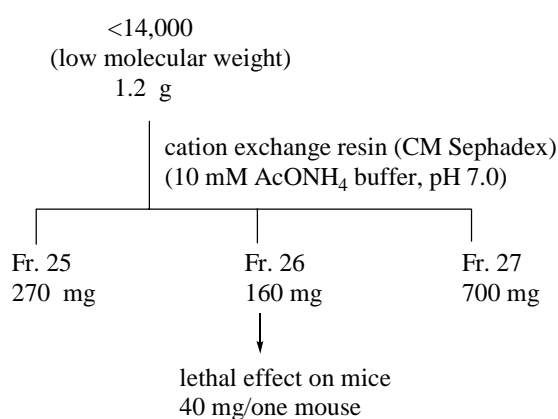
低分子画分に含まれる主成分はマンニトールである。そこで、初めに、マンニトールと毒成分の分離を目標にした。毒成分はブタノールにも可溶であることから、比較的脂溶性の化合物であると考えられた。このことから、疎水性の吸着担体を用いれば、毒成分は吸着し、極性の高いマンニトールは吸着せず、両者の分離が可能であると考えた。そこで、担体に ODS(逆相)と XAD(ポリスチレンポリマー担体)を用いて精製の検討を行った(Scheme 24)。

その結果、予想に反し、どちらの担体にも毒成分は吸着せず、マンニトールと毒成分を分離することができなかった。よって、これらの担体を用いた初期精製は効果的でない判断した。



Scheme 24. Reversed-phase chromatography.

次に、イオン交換体を用いた精製を検討した。まず、陽イオン交換体である CM-Sephadex を用いることにした。一般的に、CM-Sephadex のような架橋デキストラン担体は、イオン強度の低い溶媒(例えば純水)を用いると、ゲル構造が破壊されるため、バッファーを用いる必要がある。通常、バッファーには、強塩基と弱酸から調製される弱塩基性バッファーか、強酸と弱塩基から調製される弱酸性バッファーがある。これらバッファーは強塩基もしくは強酸を使うため、不揮発性の塩が生成する。無機塩を除去するには、目的の成分を担体 (ODS や XAD など) に吸着させ、塩のみを溶出させた後、有機溶媒を用いて成分を溶出させることで脱塩できる。しかしながら、前述した通り、ODS や XAD では毒成分が吸着する条件が見出せなかったため、脱塩操作の必要ない揮発性の酢酸アンモニウムバッファーを用いることにした。pH 7.0 の酢酸アンモニウムバッファーで平衡化した CM-Sephadex を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行い、シリカゲル TLC 分析を行って 3 つの画分に分取した(Scheme 25)。



Scheme 25. Cation exchange chromatography.

各フラクション(Fr. 25~27)には、ある程度の酢酸アンモニウムが含まれているが、経口投与ではほとんど毒性を示さないため、完全に除去をしなくても、活性試験に影響を与えない。活性試験の結果、Fr. 26に活性がみられた(Scheme 25)。また、各フラクションの¹H NMRスペクトルを測定したところ、活性画分(Fr. 26)にはマンニトールやリンゴ酸が含まれていなかった(Figure 50)。リンゴ酸が含まれていない Fr. 26に活性がみられたことから、リンゴ酸以外の活性成分が存在していることがわかった。毒成分は陽イオン交換体に吸着しないにもかかわらず、良い分離が得られたが、これはCM-Sephadexがイオン交換体としての性質と、ゲルろ過担体としての性質を併せ持つからであると考えられる。すなわち、リンゴ酸のような有機酸は陽イオン交換体との反発から、低分子であるにもかかわらず、担体に保持されることなく早め(Fr. 25)に溶出される。一方、マンニトールのような中性成分は担体の分子ふるい効果により、遅く(Fr. 27)溶出されたと考えられる。この陽イオン交換体は効果的な精製方法であるが、弱酸と弱塩基の酢酸バッファーを用いるため担体の平衡化に3~4日を要することや、酢酸アンモニウムの除去に複数回の凍結乾燥操作が必要であった。また、この操作を複数回行った場合、活性の強弱にばらつきがみられた。これらのことから、大量スケールでの初期精製には適さないと考えた。

次に、陰イオン交換体(IRA-45)を用いて精製の検討を行った。この担体は、ポリスチレン系のポリマー担体であるため、物理的に安定であり、バッファー等を用いなくとも簡便に使用することができる。担体には一級アミンが結合しており、陰イオンはアミノ基とイオン結合することで吸着する。担体は、水酸化ナトリウム水溶液を用いて吸着している陰イオン(例えば塩化物イオン)を除去したのち、水で洗浄し使用する。この調製により、吸着力の強い担体を調製でき、強塩基性水溶液から調製した陰イオン交換体はOH⁻型と表記される。陰イオン交換体に吸着した化合物は、通常、塩酸水溶液や酢酸水溶液にて溶出することができる。しかしながら、塩酸水溶液や酢酸水溶液を用いると、担体に微量に含まれるナトリウムイオン由来の塩が生成するため、脱塩操作が必要になる。そこで、OH⁻型の陰イオン交換体(IRA-45)を酢酸で洗浄し、AcO⁻型に調製したものをを用いることにした。これはOH⁻型よりも吸着力の弱い条件であるものの、ナトリウムイオンは酢酸ナトリウムとして既に除かれているため、溶出に酢酸を用いれば塩が生成することはない。

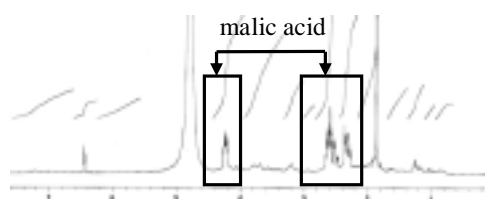


Figure 49. ¹H NMR spectrum of Fr. 25.

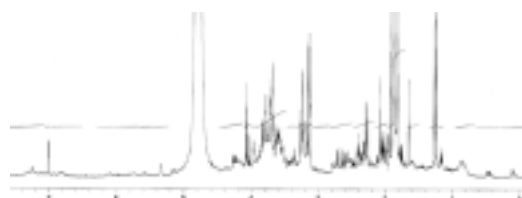


Figure 50. ¹H NMR spectrum of Fr. 26.

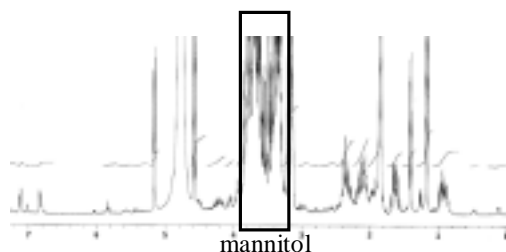
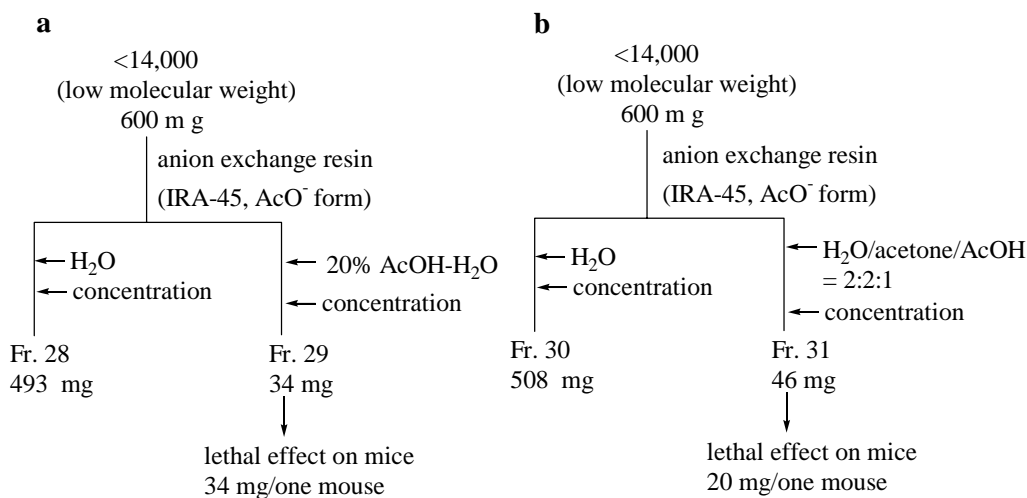


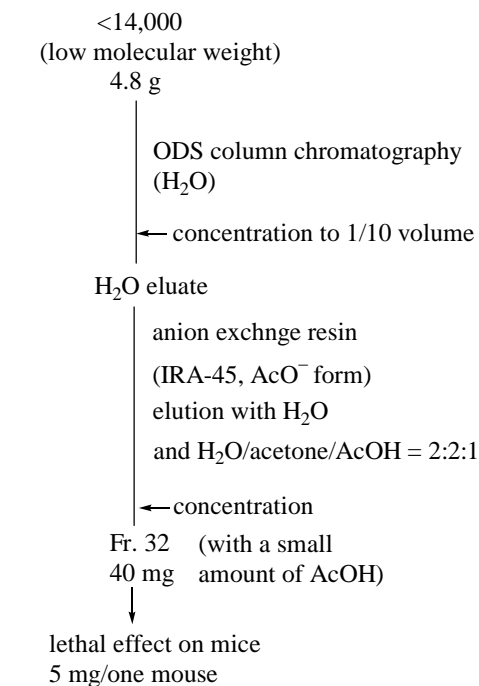
Figure 51. ¹H NMR spectrum of Fr. 27.



Scheme 26. Anion exchange chromatography.

水で溶出し得られる非吸着画分(Fr. 28)と酢酸水溶液にて溶出される吸着画分(Fr. 29)とに分け、活性試験を行ったところ、吸着画分(Fr. 29)に活性がみられた(Scheme 26a)。しかしながら、活性の回収率が悪かった。この原因はポリスチレン系のイオン交換体が、疎水性の吸着担体としての性質を有するため、酢酸水溶液では溶出力が不十分であったと考えられた³⁵⁾。そこで、溶出溶媒に酢酸の他に、アセトンを添加したところ、活性の回収率が向上した(Scheme 26b)。この吸着画分(Fr. 31)は、マンニトールなどの高極性な中性成分が除去されている。また、AcO⁻型に調製した陰イオン交換体を用いたため、この条件ではリンゴ酸(10)は吸着せず、吸着画分(Fr. 31)には含まれていなかった。この陰イオン交換クロマトグラフィーにより、精製度も10倍程度向上したことから、非常に有効な精製方法であると判断した。しかしながら、イオン交換体の疎水性の性質上、非特異的な吸着が多く、脂溶性成分や色素などの吸着も観察された。よって、脂溶性成分や色素成分をあらかじめODSで除去したのち、陰イオン交換体での精製を試みることにした。

低分子画分をODSカラムに添加後、水を展開し水溶出液を得た。得られた水溶出液は濃縮乾燥することなく陰イオン交換体(IRA-45)に吸着させ、水-アセトン-酢酸混合溶媒にて溶出したところ、毒成分の回収に成功した(Scheme 27)。再現性があまり得られず、活性が消失する場合



Scheme 27. Purification procedures.

もあったが、5 mg 以下で活性を有する画分(Fr. 32)が得られたことから、続いて HPLC による更なる精製を試みた。ODS カラムを用い、アセトニトリルの濃度を直線的に上昇させ溶出し、3つのフラクションに分取した(Figure 52 and Scheme 28)。特に鋭いピーク(peaks a, b, and c)については別途精製後、¹H NMR スペクトルを測定し、核酸塩基であるウリジン(15)、アデノシン(16)、グアノシン(17)であると同一した。

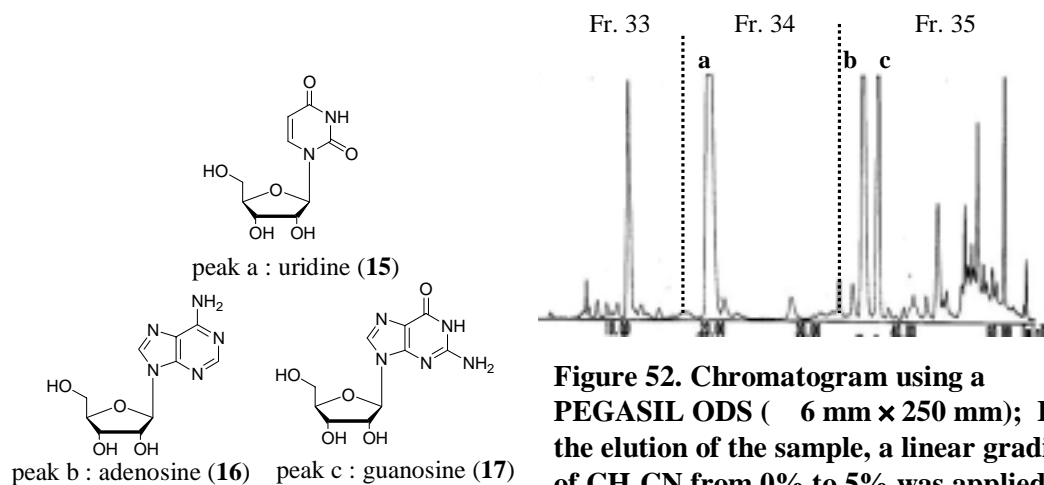
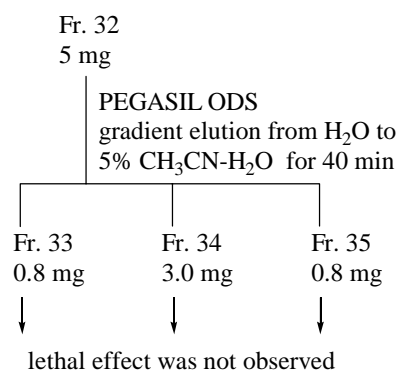


Figure 52. Chromatogram using a PEGASIL ODS (6 mm × 250 mm); For the elution of the sample, a linear gradient of CH₃CN from 0% to 5% was applied for 40 min at a flow rate of 1.5 ml/min with monitoring at 210 nm.

これら核酸塩基類(15~17)は酸性の官能基を有していないが、ODS には吸着しない程度の高極性化合物であり、ポリスチレン系(芳香族系)の陰イオン交換体である IRA-45 には、疎水結合で吸着したと考えられる。得られた画分(Fr. 33~35)の活性試験を行ったところ、活性はみられなかった(Scheme 28)。

ここまで、精製を進めてきたが、いずれの操作においても頻りに活性が消失し、再現性が得られなかった。しかし、この HPLC による精製を行うため、陰イオン交換後の酢酸溶出(吸着)画分(Fr. 32)を、繰り返し調製している間に、活性が消失する原因に気が付いた。

陰イオン交換後の活性画分(Fr. 32)には大量の酢酸が含まれているが、その酢酸を完全に減圧除去したときには活性が消失し、僅かに酢酸が残る程度に濃縮したものは活性が幾分か保持されていたのである。僅かに残った酢酸が致死活性を示すのではないかと疑い、マウスに 10 mg の酢酸を経口投与したところ、全く異常がみられなかった。陰イオン交換後の活性画分(Fr. 32)は酢酸が含まれているにも関わらず、5 mg 以下で致死活性を示す(Scheme 27)。このことは酢酸以外の致死活性成分が存在していることを示している。そこで、酢酸が残っている状態の吸着画分(Fr. 32)と、酢酸を十分減圧除去した吸着画分(Fr.



Scheme 28. ODS chromatography using a HPLC system.

32)の ^1H NMR スペクトルを比較した(Figures 53 and 54)。

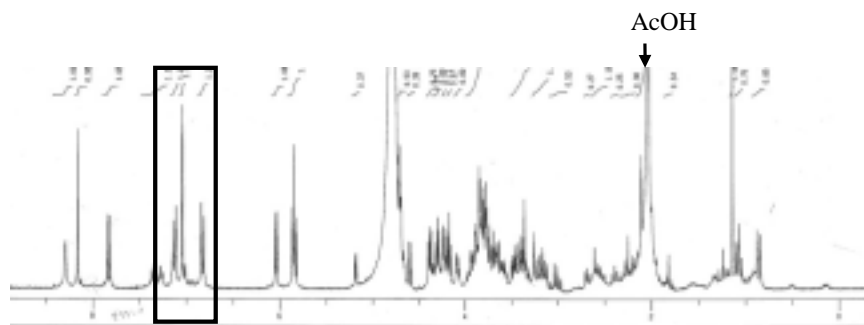


Figure 53. ^1H NMR spectrum of Fr. 32 before removal of AcOH.

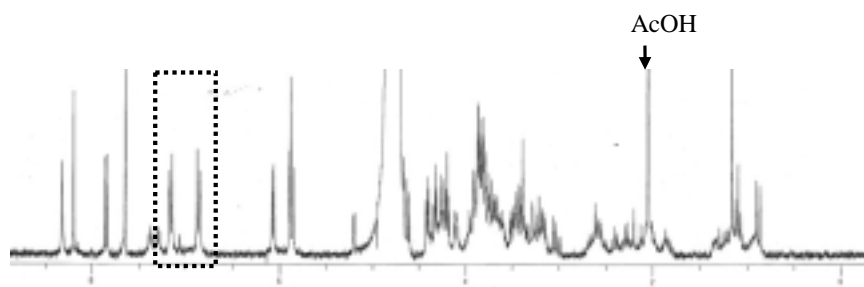
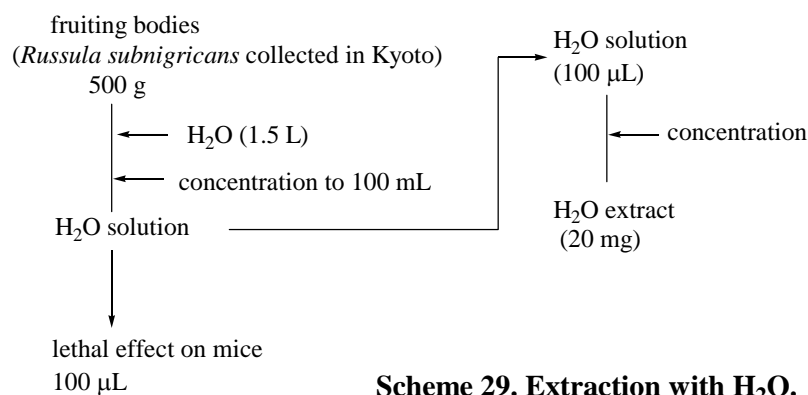


Figure 54. ^1H NMR spectrum of Fr.32 after removal of AcOH.

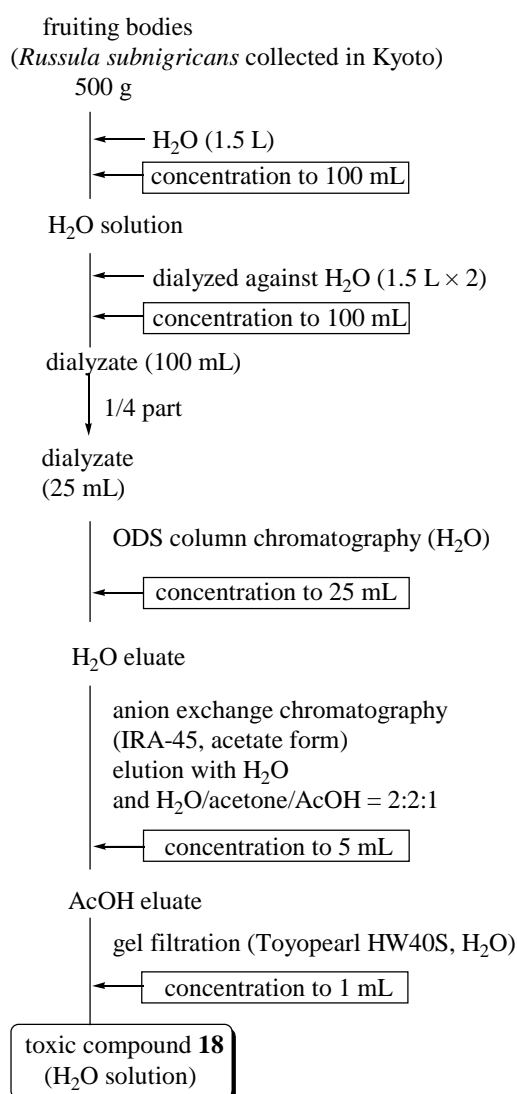
すると、両者にほとんど変化がなかったが、乾燥の前後で 7 ppm ($J = 1.5$ Hz)付近のシグナルのみが消失していることに気が付いた。毒成分が微量成分である可能性もあるが、この消失した 7 ppm 付近のシグナルを示す化合物が毒成分ではないかと考えた。また、TLC 分析により、乾燥後、消失するスポットが存在することもわかった。この濃縮乾燥した時に、 ^1H NMR スペクトル上のシグナルや TLC 上のスポットが消失することは、毒成分が揮発するためと考えられた。そこで、抽出操作から濃縮乾燥操作(乾固)を行わずに、精製を検討することにし、改めて水抽出液の活性試験を行った(Scheme 29)。



Scheme 29. Extraction with H_2O .

その結果、水抽出液は 100 μL で致死活性を示した(Scheme 29)。この 100 μL の抽出液を濃縮乾燥すると僅か 20 mg の水抽出物しか与えない。減圧乾燥した水抽出物は 100~200 mg でしか致死活性を示さないことから(Scheme 21)、水抽出液は水抽出物の約 10 倍の活性を有することが明らかとなった。これは、逆に、抽出の際に抽出液を濃縮乾燥することで、90%もの毒成分が失活していたことを示している。よって、これまで精製操作を行ってきた際に、頻繁に活性が消失した原因が、濃縮乾燥操作にあると考えられた。

そこで、濃縮乾燥操作を行わない条件で精製を行った(Scheme 30)。すなわち、水抽出液を 10 分の 1 程度まで濃縮した後、透析し、得られた低分子画分も濃縮乾燥することなく ODS クロマトグラフィーに通し、水で溶出した。水溶出画分も乾固することなく、次の陰イオン交換クロマトグラフィーを行った。得られた酢酸溶出画分も乾固することなく溶液として、次の精製の検討を行った。この酢酸溶出画分には酢酸が大量に含まれているほか、先ほどの HPLC の結果から、核酸塩基類も含まれている。また、陰イオン交換体への吸着画分であることから、酸性化合物が多く含まれていると考えられる。そこで、今まで使用したカラム担体とは分離モードが異なり、酢酸の影響を受けないゲルろ過による精製を試みた。担体に TOYOPERAL HW40S を用いてゲルろ過を行った。シリカゲル TLC 分析を行い、特に Fr, 32 を乾燥処理した際に消失するスポットを示すフラクションを集めた。得られた画分は濃縮することなく溶液として扱った。この画分の活性を調べたところ、致死活性がみられた。 $^1\text{H NMR}$ スペクトルを測定した結果、単一成分であることがわかり、毒成分 18 を水溶液として単離することに成功した(Scheme 30)。また、この活性画分にはイオン交換クロマトグラフィーで溶出に用いた酢酸やアセトンが含まれておらず、それらは毒成分 18 よりも先に溶出された。また、毒成分 18 が溶出される直前にはコハク酸が溶出されていたことから、酸性化合物との分離にも効果的であることがわかった。この一連の精製において、抽出から一度も濃縮乾燥することなく、毒成分を溶液として扱い、ま



Scheme 30. Isolation of toxic compound 18 from *Russula subnigricans* collected in Kyoto.

た、残存する溶媒が、次の精製に影響を及ぼさないように精製の順序を組み合わせた。そして、最後のゲルろ過では、イオン交換後に大量に含まれる酢酸と毒成分を効率的に分離できたことも特筆すべき点である。後述するが、毒成分 **18** の回収率についても良い結果が得られた。

第二項 毒成分の構造解析

京都産のニセクロハツから、マウスに対する経口投与による致死活性を指標に、毒成分 **18** の単離に成功した。そこで次に、毒成分 **18** の構造解析を行った。毒成分 **18** は濃縮乾燥ができないため、多量の軽水を含む状態で ^1H NMR スペクトルを測定したところ、非常に単純なスペクトルが得られた (Figure 55)。すなわち、濃縮後、消失した 7.09 ppm (2H, d, $J = 1.5$ Hz) と、2.16 ppm (1H, t, $J = 1.5$ Hz) のシグナルのみであった。なお、2.16 ppm のシグナルはイオン交換後の酢酸溶出画分 (Fr. 32) では酢酸のシグナルと重なっている (Figure 53)。

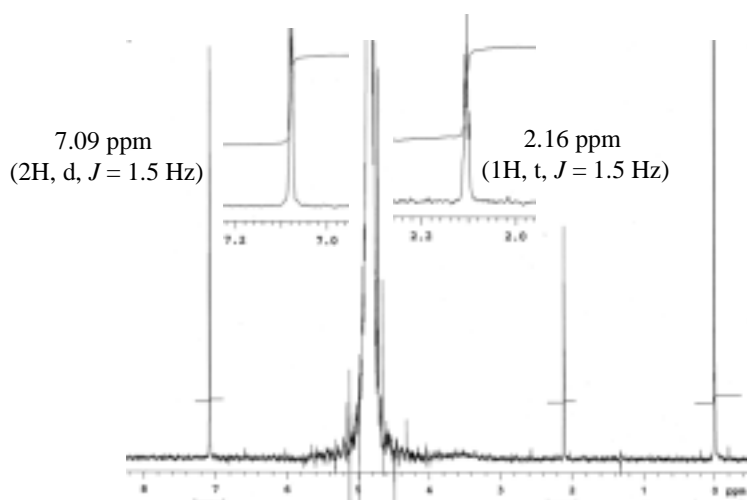


Figure 55. ^1H NMR spectrum of toxic compound **18** (300 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O} = 1:5$, TSP = 0.00).

その他、毒成分 **18** の構造に関する知見として、毒成分 **18** は精製の過程で、陰イオン交換体 (IRA-45) に吸着した。また、毒成分 **18** は酸性条件下でエーテルと分液すると有機層に分配されたが、塩基性条件下では分配されなかった。これら二つの実験結果から、毒成分 **18** はカルボキシ基を有するものと考えられた。 ^1H NMR スペクトルと、カルボキシ基を有することから、毒成分は次のような構造であると推定した (Figure 56)。

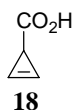
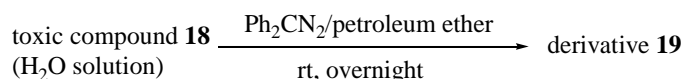


Figure 56. Proposed structure of toxic compound **18**.

しかしながら、毒成分 **18** は不安定であり、低温下 (0 °C)、水溶液中で保存している間にも徐々に分解した。よって、より安定な化合物へ誘導化することにした。

第三項 毒成分の誘導化と構造解析

毒成分 **18** は不安定であったことから、誘導化を行うことにした。カルボキシ基を有すると考えられたため、誘導化にはエステル化を用いることにした。また、毒成分 **18** は非常に低分子であると考えられたため、誘導化によく用いられるメチルエステル化では、さらに揮発性高い誘導体が生じる可能性がある。そこで、ジフェニルジアゾメタンを用いたジフェニルメチルエステルへの誘導を試みた(Scheme 31)。



Scheme 31. Derivatization of 18.

精製した毒成分 **18** の水溶液を若干の水が残る程度まで濃縮した後、直ちにジフェニルジアゾメタン溶液を加えて一晩室温で反応させた。**18** は効率的に誘導体 **19** へ変換された。得られた誘導体 **19** は、非常に安定であり、濃縮乾燥も可能であった。この誘導体 **19** の ¹H NMR スペクトルを測定したところ、積分値より、ジフェニルジアゾメタンが 2 等量反応したことがわかり、ジフェニルメチル基のベンジル位のプロトンは一つのみ(6.90 ppm)であったことから、エステル化以外の反応も進行していることがわかった(Figure 57)。

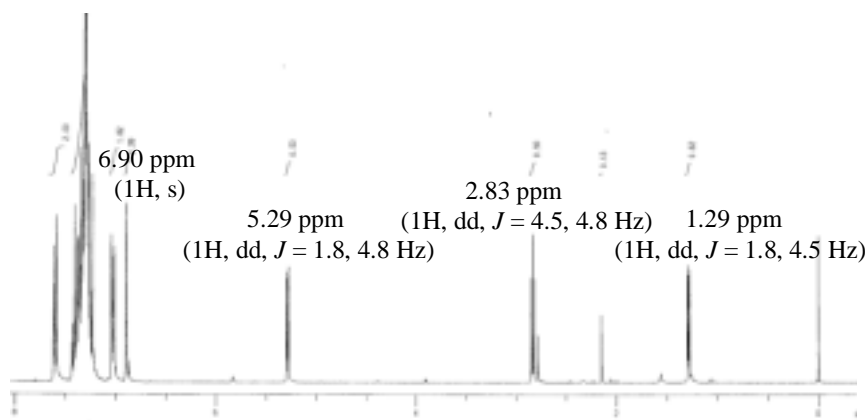
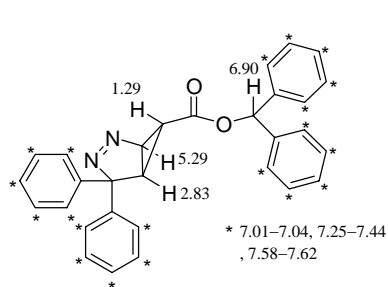
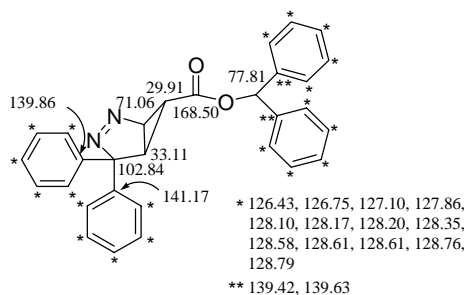


Figure 57. ¹H NMR spectrum of 19 (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00).

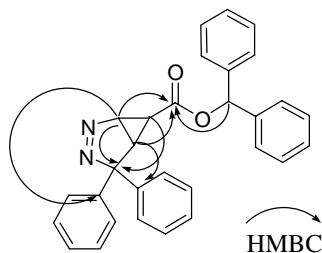
また、シクロプロペン由来のオレフィンと考えられるシグナルが消失し、その代わりに 1.29 ppm(1H, dd, *J* = 1.8, 4.5 Hz)、2.83 ppm(1H, dd, *J* = 4.5, 4.8 Hz)、5.29 ppm(1H, dd, *J* = 1.8, 4.8 Hz)に 1H 分のシグナルが現れた。さらに、¹H-¹H COSY より、これら 3つのシグナルは互いに相関がみられ、隣り合っているとわかった。さらに、¹³C NMR、HMQC、HMBC、HR FABMS による解析を行い、構造決定した(Figure 58)。



¹H NMR data of **19**



¹³C NMR data of **19**



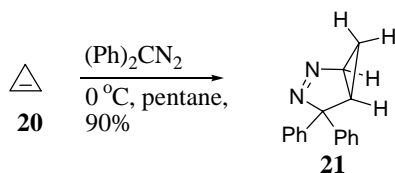
HMBC correlations of **19**

19: HR FAB MS (M+H)⁺ *m/z* calcd for C₃₀H₂₅N₂O₂, 445.1916, found 445.1921.

Figure 58. Structure and spectral data of 19.

この誘導体 **19** の構造は、毒成分 **18** の推定構造である 2-シクロプロペンカルボン酸に対して、エステル化と 1,3-双極子付加反応が進行した生成物であることがわかった。誘導体 **19** のα位のプロトンのケミカルシフトは 1.29 ppm と通常のα位のプロトンに比べて高磁場シフトしているが、これはピラゾリン環上の窒素原子による遮蔽効果によるものと考えられたため、1,3-双極子付加反応はカルボン酸の逆側から進行していることがわかった。また、この誘導化において、エステル化と 1,3-双極子付加のどちらか一方が起こった生成物や、立体異性体は確認されなかった。

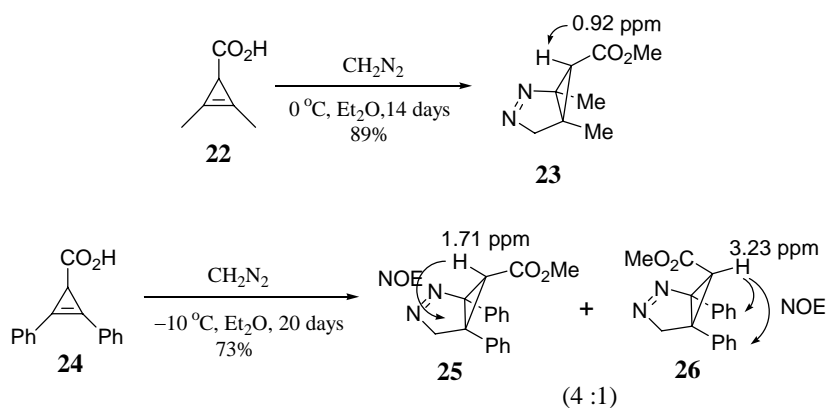
ジアゾ化合物とシクロプロペンの 1,3-双極子付加反応は、非常に速やかに進行することが知られており³⁶⁾、シクロプロペン(**20**)はジフェニルジアゾメタンとの反応により、低温下、速やかに付加体(**21**)を高収率で与える (Scheme 32)³⁷⁾。



Scheme 32. Reaction of cyclopropene (20).

また、2,3-ジメチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**22**)は、ジアゾメタンとの反応により、α位の水素がエンドである付加体 **23** のみを与えることが報告されている (Scheme 33)³⁸⁾。

一方、2,3-ジフェニル-2-シクロプロペンカルボン酸(**24**)とジアゾメタンの反応では、フェニル基とカルボキシ基の立体反発により、付加体 **26** も得られる(Scheme 33)³⁸。その付加体 **26** の α 位のプロトンのケミカルシフトは 3.23 ppm と、付加体 **25** の 1.71 ppm と比較して低磁場である(Scheme 33)。このことから、誘導体 **19** の α 位の水素はエンドであると決定できた。



Scheme 33. Reaction of cyclopropene carboxylic acids.

この誘導体 **19** の構造から、毒成分 **18** は 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)であるとわかった(Figure 59)。 **18** の ^{13}C NMR スペクトルや MS も、この構造式を支持する結果であった。

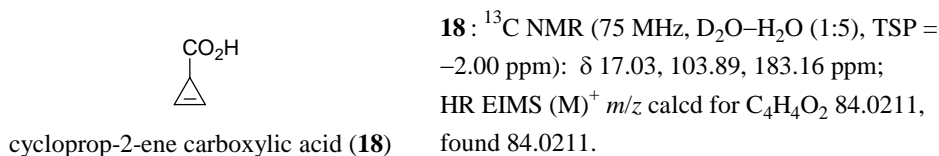


Figure 59. Structure of toxic compound 18.

シクロプロペンは天然物としては極めて珍しい骨格であり、これまでに天然からは脂肪酸類及びステロール類の 2 種類しか報告されていない³⁹。

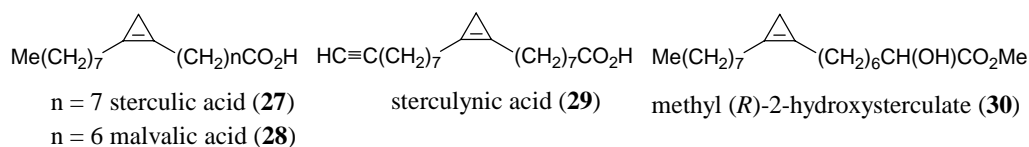


Figure 60. Naturally occurring cyclopropenes.

すなわち、シクロプロペンを有する脂肪酸である、ステルクリン酸(**27**)⁴⁰、マルバリニン酸(**28**)⁴¹、ステルクリニン酸(**29**)⁴²、2-ヒドロキシステルクリン酸メチル(**30**)⁴³が単離、構

造決定されている(Figure 60)。これら脂肪酸は、すべて植物由来である。

また、シクロプロペン骨格を有するステロールとして、海綿からカリステロール(**31**)⁴⁴⁾、その異性体(23*R*)-23*H*-イソカリステロール(**32**)⁴⁵⁾、(24*S*)-24*H*-イソカリステロール(**33**)⁴⁶⁾が単離、構造決定されている(Figure 61)。

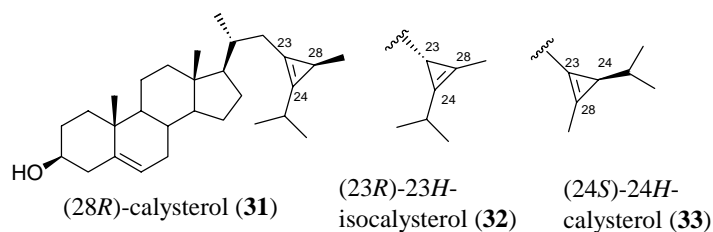


Figure 61. Naturally occurring cyclopropenes.

今回、ニセクロハツより、毒成分として単離、構造決定した 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)は、シクロプロペン環を有する天然物として上記2つに次ぐ3種類目の化合物であり、特に、シクロプロペンの安定性を左右する置換基が1つしかないことが特徴である。

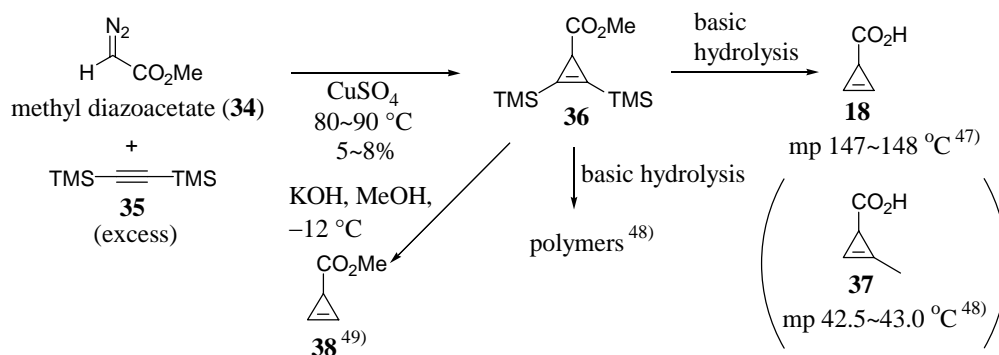
第四節 シクロプロペンカルボン酸類の合成と反応性について

第一項 シクロプロペンカルボン酸類の合成

京都で採取したニセクロハツから、経口投与によるマウス致死活性を指標に毒成分として 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)を単離、構造決定した。そこで、活性を確認するため、合成することにした。

筆者が 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)を単離、構造決定した時点では、**18** の合成に関して 2 例報告されていたものの、スペクトルデータについての記述はなかった。

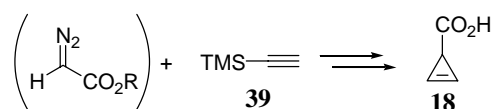
Nefedov らはジアゾ酢酸メチル(**34**)と 1,2-ビス(トリメチルシリル)アセチレン(**35**)とを、銅触媒存在下反応させ **36** を得た後、塩基性条件下、加水分解することにより 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)を得、融点のみ 147~148 °C と報告した(Scheme 34)⁴⁷⁾。しかし、その 2 年後、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**37**)の融点が 42.5~43.0 °C⁴⁸⁾と報告したことと比較して非常に大きく、**18** の最初の合成報告⁴⁷⁾には疑問が残る。



Scheme 34

また、同グループは、**36** を 50 °C 以上で加水分解すると、有機溶媒にほとんど溶解しない重合体を与えると報告し⁴⁸⁾、さらに低温下で脱シリル化を行うことで、シクロプロペンカルボン酸メチル(**38**)を得、スペクトルデータ(¹H NMR, IR)を報告している(Scheme 34)⁴⁹⁾。

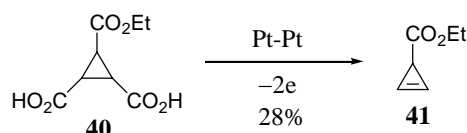
Grichko は、Nefedov ら⁴⁷⁾、Fox ら⁵⁰⁾の合成を参考に TMS アセチレン(**39**)を用いて、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)を合成したと報告しているが、実験方法やデータは記載されていない(Scheme 35)⁵¹⁾。



Scheme 35

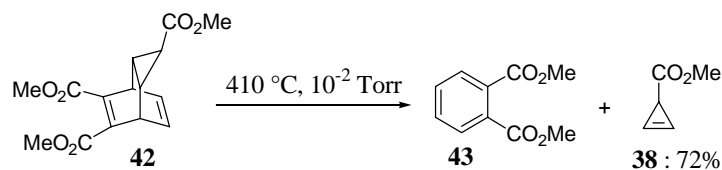
なお、**18**のエステル類については、合成報告がいくつかある。

例えば、Kimura らは、ジカルボン酸 **40** を、白金を用いて電極酸化し、2-シクロプロペンカルボン酸エチル(**41**)を合成し、スペクトルデータ(^1H NMR, IR)と元素分析値を報告している(Scheme 36)⁵²。また、このエチルエステル **41** は、非常に不安定であり、15 °Cにおける半減期は2.5時間であると報告している⁵²。



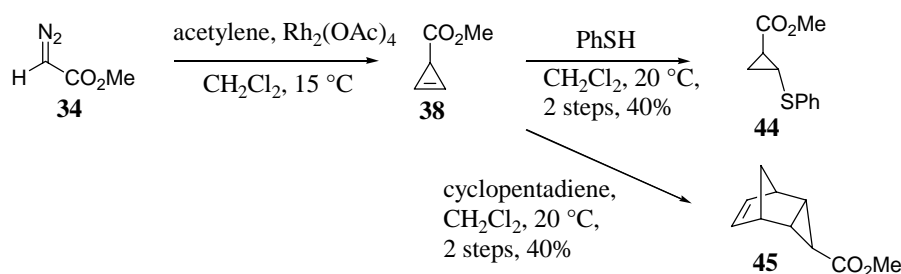
Scheme 36

Myhre らはノナジエン **42** を retro-Diels-Alder 反応することで、2-シクロプロペンカルボン酸メチル(**38**)を得、スペクトルデータ(^1H NMR, ^{13}C NMR)を報告している(Scheme 37)⁵³。また、 ^1H NMR スペクトルより、室温での半減期は1~2時間であると報告している⁵³。



Scheme 37

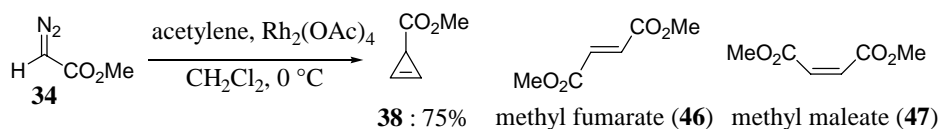
Nefedov らはアセチレンとジアゾ酢酸メチル(**34**)とを、塩化メチレン溶液中、酢酸ロジウム存在下 15 °Cで反応させることにより、2-シクロプロペンカルボン酸メチル(**38**)を系内に発生させている⁵⁴。このメチルエステル体は不安定であったことから、チオフェノールの付加やシクロペンタジエンとの Diels-Alder 反応により、それぞれ安定なトランス付加体 **44**、エンド付加体 **45** へ導いている(Scheme 38)⁵⁴。



Scheme 38

Baldwin らは Nefedov ら⁵⁴の条件を参考に、アセチレンを酢酸ロジウム存在下、ジアゾ

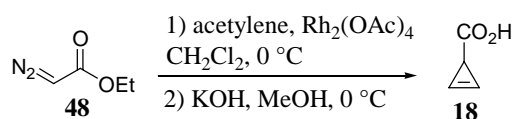
酢酸メチル(34)と反応させ、収率 70%でメチルエステル体 38 を得ている(Scheme 39) 55)。また、副生成物としてフマル酸エステル 46、マレイン酸エステル 47 が約 4%含まれていたが、38 が不安定であったことから、後処理はろ過のみ行い、溶液として扱っている 55)。



Scheme 39

このように、2-シクロプロペンカルボン酸(18)の合成報告はあるものの、スペクトルデータに関する報告はなかった。また、メチルエステル体 38、エチルエステル体 41 の合成に関しては、スペクトルデータを含めていくつか報告されていた。しかしながら、18 及びそのエステル体 38、41 の不安定性が問題となっており、一置換シクロプロペンの合成の困難さがうかがえる。

このような状況下、ごく最近、Fox らは、新たにシクロプロペンカルボン酸の合成を報告した 56)。Fox らは Baldwin らの合成 55)を参考に、原料にアセチレンとジアゾ酢酸エチル(48)を用いて、酢酸ロジウム触媒存在下、2-シクロプロペンカルボン酸エチル(41)を合成し、ろ過後、そのまま塩基性条件下加水分解を行い、酸で中和後、分液し、短いフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(*t*-ブチルメチルエーテルで溶出)ですばやく精製し、融点 40~41 °C の無色固体として 2-シクロプロペンカルボン酸(18)を収率 47%で合成した(Scheme 40) 56)。さらに、18 の各種スペクトルデータ(¹H NMR, ¹³C NMR, IR, HR MS)を報告した 56)。また、18 はオイルとして得られる場合もあるとも述べている。さらに、18 は不安定であり、気体(CO₂と推定されている)を発生し、発熱を伴いながら分解することがあるため、精製後は約 30%の *t*-ブチルメチルエーテル溶液として取り扱うことを推奨している 56)。



Scheme 40

このように、困難にみられた 2-シクロプロペンカルボン酸(18)の合成が報告された。そこで、活性試験実施のために、18 を高純度の水溶液として得ることを目的として、特に精製方法に注意を払い、過去例を参考に合成した。原料には取り扱いやすい TMS アセチレン(39)とジアゾ酢酸エチル(48)を用いることにした。

2 等量の TMS アセチレン(39)とロジウム触媒存在下、室温でジアゾ酢酸エチル(48)を滴下し、エステル 49 を得た。ろ過後、濃縮し、塩基性条件下、低温で加水分解を行うことで、シクロプロペンカルボン酸粗生成物を溶液として得た。しかし、TMS アセチレン(39)とジ

アゾ酢酸エチル(48)との反応は収率が悪く、加水分解前の粗生成物の¹H NMR スペクトルを測定したところ、構造不明な成分が主であり、49は僅かしか生成していなかった(Figure 62)。また、ジアゾ酢酸エチル(48)がホモカップリングしたと考えられる、フマル酸エステル、マレイン酸エステルの存在も確認できた(Figure 62)。加水分解後にはこれら由来の生成物と2-シクロプロペンカルボン酸(18)とを分離する必要がある。ニセクロ

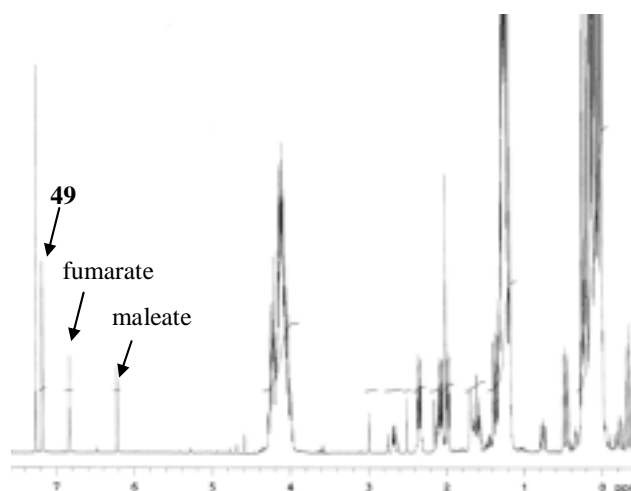
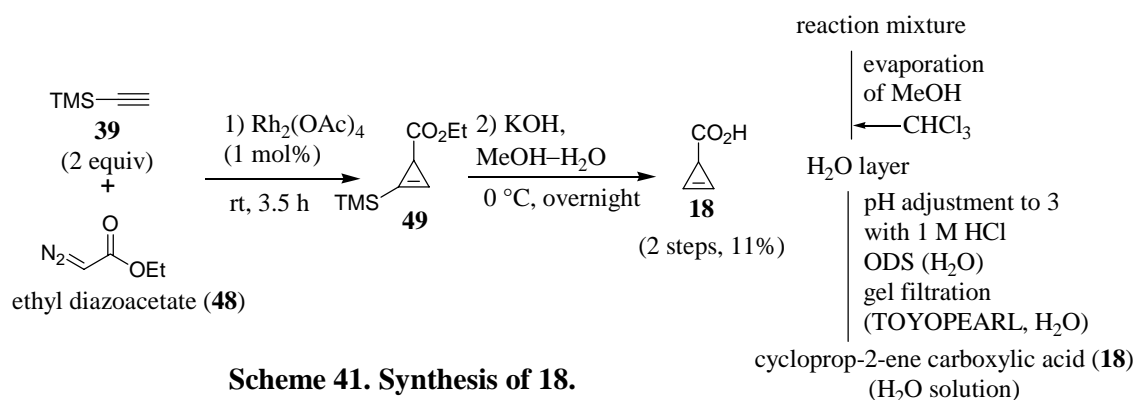


Figure 62. ¹H NMR spectrum of crude 49.

ハツから18を単離した際には、陰イオン交換後の酢酸溶出画分をゲルろ過(TOYOPEARL)で精製し、純度よく得ることができた(Scheme 30)。陰イオン交換後の酢酸溶出画分には、他の酸性化合物(コハク酸等)が含まれているが、ゲルろ過にてそれらとシクロプロペンカルボン酸(18)が分離できたことに注目し、合成品においても同様の精製を行うことで、フマル酸等の化合物を分離できると考えた。

そこで、まず、加水分解後の反応液を中和することなく、クロロホルムで洗浄し、油性物質を除去した。続いて、水層を中和後、ODS カラムにて脂溶性物質を吸着除去し、天然物の場合と同様に TOYOPEARL を用いたゲルろ過を行い、シクロプロペンカルボン酸(18)を水溶液として得ることに成功した(Scheme 41)。なお、水層に含まれる大量の塩化カリウムは、ゲルろ過において18とは大きく異なる位置に溶出されることを確認した⁵⁷⁾。



Scheme 41. Synthesis of 18.

得られた合成品18は天然物18とスペクトルデータが一致した(Tables 13 and 14)。また、シクロプロペンカルボン酸水溶液を重クロロホルムで抽出し、NMR スペクトルを測定し、天然物、合成品のスペクトルデータが文献値と良い一致を示すことを確認した(Tables 13 and 14)。

Table 13. ¹H NMR data for 18.

C No.	natural ^{a)}	synthetic ^{a)}	natural ^{b)}	synthetic ^{b)}	lit. ^{c), 56)}
	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)	δH(ppm)
1	2.16 (1H, t, <i>J</i> = 1.5 Hz)	2.13 (1H, t, <i>J</i> = 1.5 Hz)	2.21 (1H, t, <i>J</i> = 1.5 Hz)	2.22 (1H, t, <i>J</i> = 1.5 Hz)	2.21 (1H, s)
2, 3	7.09 (2H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	7.08 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	6.91 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	6.92 (1H, d, <i>J</i> = 1.5 Hz)	6.92 (2H, s)
-CO ₂ H	—	—	11.3	11.3	11.3

a) 300 MHz, D₂O/H₂O = 1:5, TSP = 0.00.

b) 300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00.

c) 400 MHz, CDCl₃.

Table 14. ¹³C NMR data for 18.

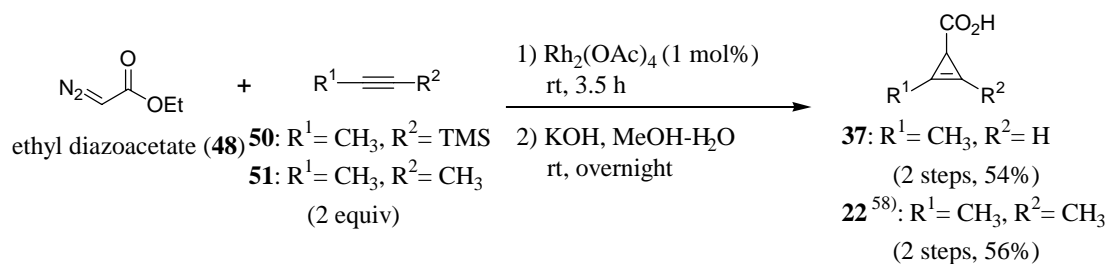
C No.	natural ^{a)}	synthetic ^{a)}	natural ^{b)}	synthetic ^{b)}	lit. ^{c), 56)}
	δC(ppm)	δC(ppm)	δC(ppm)	δC(ppm)	δC(ppm)
1	17.03	17.16	16.51	16.53	16.5
2, 3	103.89	104.05	103.14	103.13	103.0
-CO ₂ H	183.16	183.26	182.31	182.45	182.5

a) 75 MHz, D₂O/H₂O = 1:5, TSP = -2.04.

b) 75 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.00.

c) 100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.00.

また、シクロプロペンカルボン酸類縁体である、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸 (**37**)や 2,3-ジメチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**22**)については、過去の報告に従い合成した(Scheme 42)⁵⁸⁾。

**Scheme 42. Synthesis of 37 and 53.**

このモノメチル体 **37** とジメチル体 **22** は安定であり、合成の間に分解はみられず、濃縮乾燥も可能であった。

第二項 シクロプロペンカルボン酸類の反応性

2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)と2種類の類縁体 **37**、**22** を得たので、まずこれら3種のシクロプロペンカルボン酸の水溶液における安定性を調べた(Figure 63)。濃度は内部基準を用いて、 ^1H NMR スペクトルを測定し求めた。

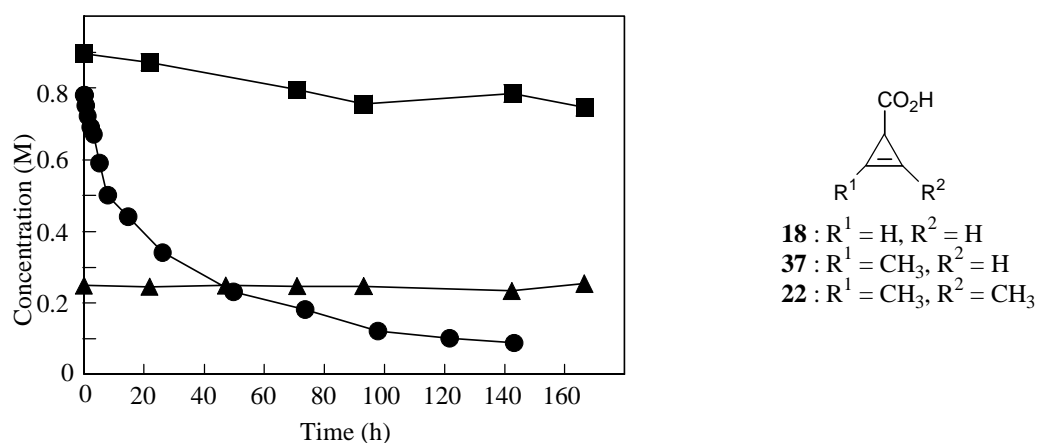


Figure 63. Stability of 18 (○), 37 (□), and 22 (△) in D₂O at ambient temperature checked by ^1H NMR spectroscopy.

その結果、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**37**)と2,3-ジメチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**22**)は、室温下、ほとんど濃度変化がみられず、安定であることがわかった。一方、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)は、時間の経過と共に減少し、0.8 Mの水溶液での半減期が20時間程度であることがわかった。また、0.1 M程度になると分解する速度は下がり、希釈条件では比較的安定であることもわかった。 ^1H NMR スペクトル上で2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)は、時間の経過とともに、高磁場に複雑なシグナルが観察された(Figure 64)。そこで、20時間後に、ESI MS を測定したところ、**18** の分子量の整数倍のイオンピークが観測された(Figure 65)。

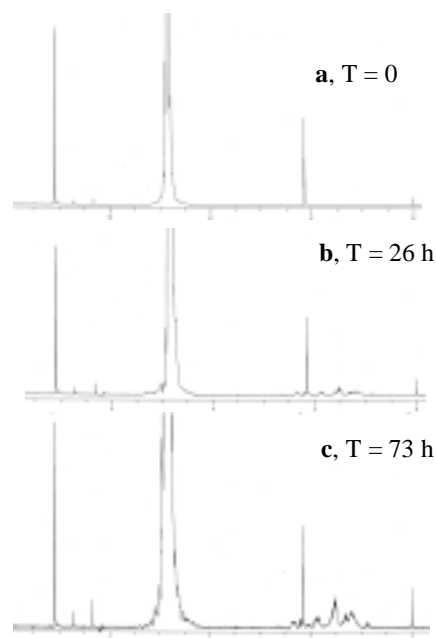


Figure 64. ^1H NMR spectrum of 18. a) Time = 0, b) Time = 26 h, c) Time = 73 h.

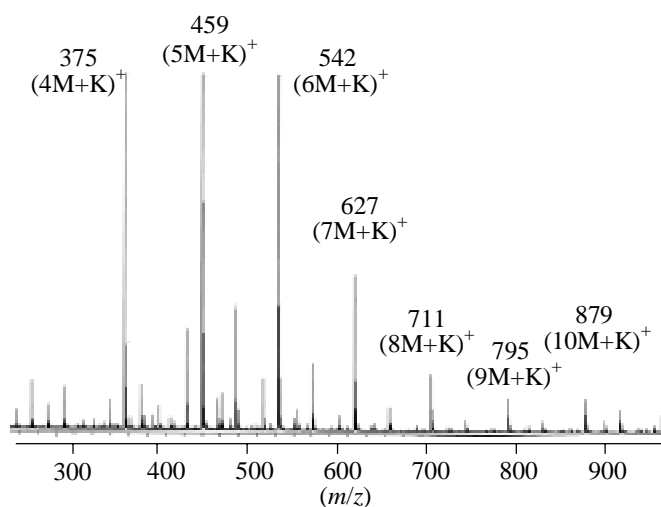
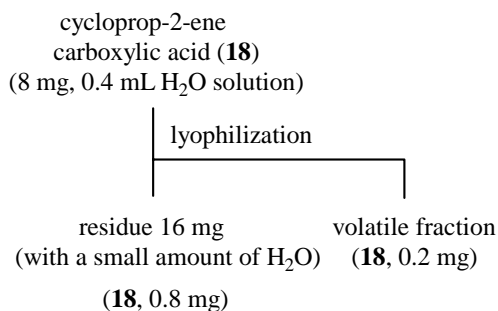


Figure 65. ESI MS of a mixture of polymerized **18** (after 20 h).

続いて、濃縮操作における安定性を調べるため、合成した 2-シクロプロペンカルボン酸 (**18**) の水溶液を凍結乾燥した (Scheme 43)。すると、液体窒素トラップに僅かながら **18** を回収することができ、**18** には若干の揮発性があることが明らかになったが、大部分は白色固体としてフラスコ内に残った。そこで、残渣の白色固体の ^1H NMR スペクトルを測定したところ、シクロプロペンカルボン酸(**18**)は、少量しか存在しておらず、高磁場に複雑なシグナルを示した (Figure 67)。



Scheme 43. Lyophilization experiment of **18**.

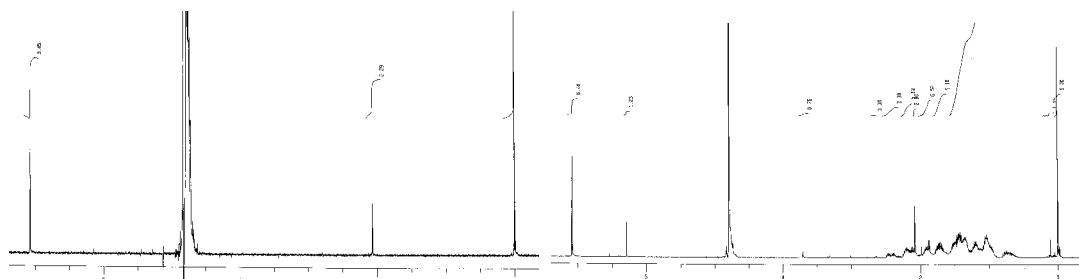


Figure 66. ^1H NMR spectrum of **18**.
(300 MHz, D₂O, TSP = 0.00)

Figure 67. ^1H NMR spectrum of the residue.
(300 MHz, D₂O, TSP = 0.00)

続いて、この白色固体の ESI MS を測定したところ、**18** の分子量の整数倍のイオンピークが観測された(Figure 68)。なお、観測されたイオンピークはナトリウムイオン付加体とカリウムイオン付加体由来である。

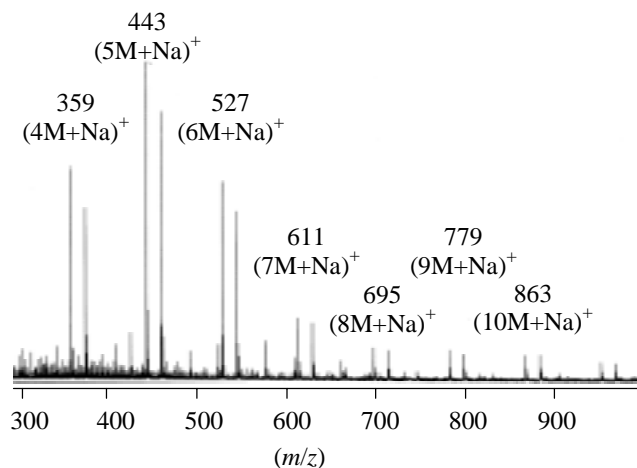
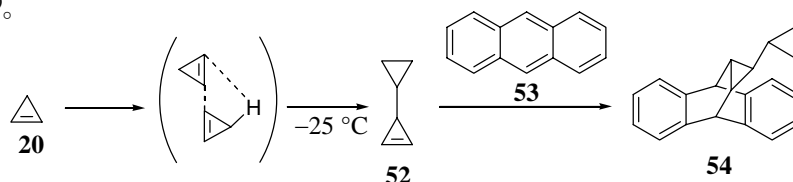


Figure 68. ESI MS of the residue.

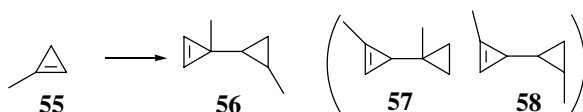
これらの結果を考察する。シクロプロペンの反応性や安定性に関して多数の報告例があり、シクロプロペンはエン反応により重合することが知られている。

無置換のシクロプロペン(**20**)は極めて不安定であり、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ においても複雑な重合体を与える^{59), 60)}。希釈条件下、低温でアントラセン(**53**)存在下反応させることで、2量体の誘導体**54**が得られている(Scheme 44)⁶¹⁾。また、この2量体を得る過程で、ラジカル捕捉剤を添加しても、反応速度に変化がなかったことから、エン反応により生成したと考えられている⁶¹⁾。



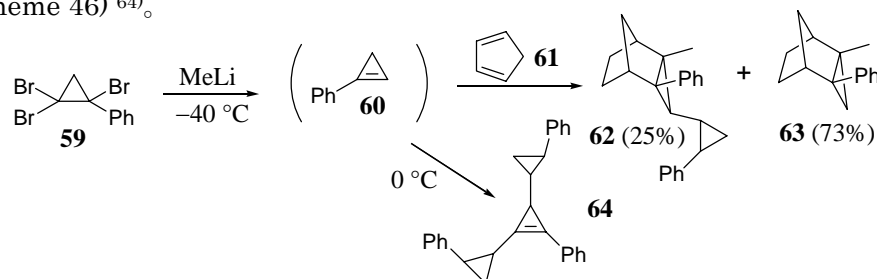
Scheme 44

1置換シクロプロペンである1-メチルシクロプロペン(**55**)は気相状態や $-197\text{ }^{\circ}\text{C}$ では四日程度存在できるほどの安定性を有しているものの⁶²⁾、室温下では数分以内に、 $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ でも数時間以内に分解することが報告されている⁶³⁾。得られた生成物を分析した結果、3種の2量体の存在が確認され、そのうちの1つはエン反応生成物**56**であると構造決定され、残り2つもエン反応生成物**57**、**58**であろうと推定されている(Scheme 45)⁶³⁾。



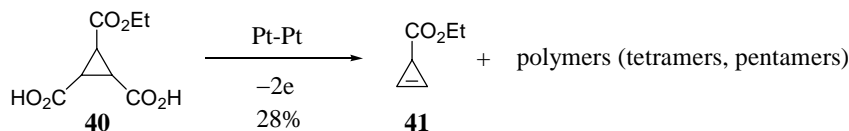
Scheme 45

59 より合成したの 1-フェニルシクロプロペン(60)は、低温下シクロペンタジエン(61)存在下反応させることで、2 量体の誘導体 62 が得られている⁶⁴。また、シクロプロペン 60 を合成後、0 °Cまで昇温することで、3 置換のシクロプロペンを有する 3 量体 64 も得られている(Scheme 46)⁶⁴。



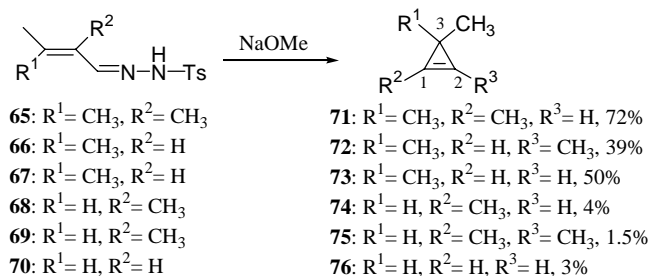
Scheme 46

また、上記 2 例とは置換位置が異なり、18 のエチルエステルである 2-シクロプロペンカルボン酸エチル(41)は、合成の際に、副生成物として重合体が見られることが報告されている(Scheme 47)⁵²。



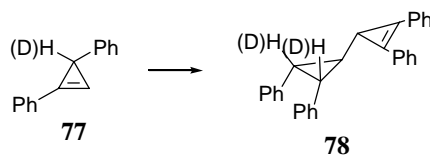
Scheme 47

また、メチル基で置換された種々の 2 置換、3 置換のシクロプロペンが合成され、そのうち、3 位に 1 つしかメチル基のない 74、75、76 は不安定であると報告されている(Scheme 48)⁶⁵。すなわち、エン反応の際に移動する水素原子を有していないシクロプロペンは安定であるが、水素を有しているものはエン反応により重合するため、不安定であると考えられる。



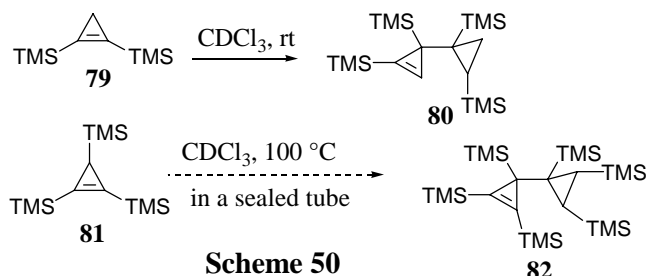
Scheme 48

また、1,3-ジフェニルシクロプロペン(77)は、-60 °Cにおいても 2 量化が進行し、様々な温度における反応速度が報告されている(Scheme 49)⁶⁶。重水素で置換した 77 は反応速度が約 3 分の 1 であったことから、律速段階は水素移動であり 2 量化は協奏的に進行していると考えられている⁶⁶。



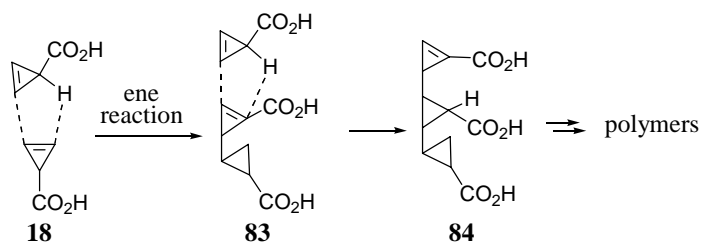
Scheme 49

2 置換の 1,2-ビストリメチルシリルシクロプロペン(79)は、重クロロホルム中、室温で、数分以内に 2 量体 80 を与えるが、3 置換の 1,2,3-トリストリメチルシリルシクロプロペン(81)は 100 °C に加熱しても 2 量体を与えない(Scheme 50) 67)。これは立体障害により水素移動が起こりづらいためと考えられる。

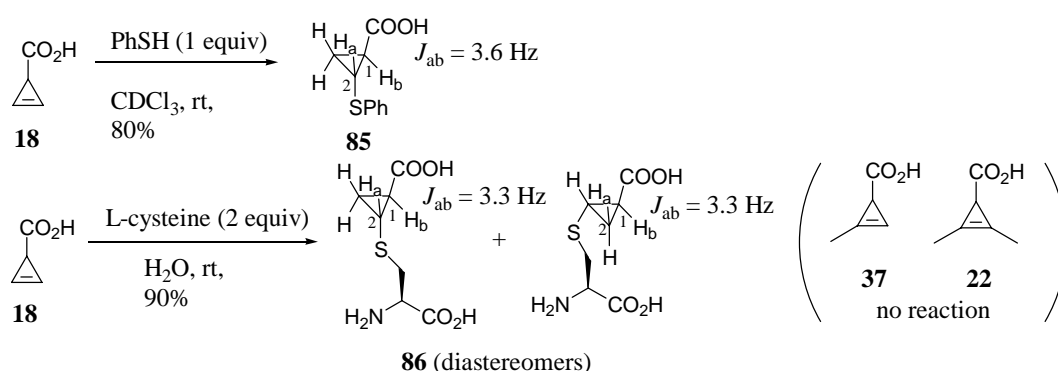


以上、シクロプロペンの反応性について、過去例を列挙した。これら報告から、1 置換のシクロプロペン化合物は不安定であり、容易にエン反応を経て重合することがわかる。このことから、18 が時間の経過や濃縮乾燥によって、ESI MS で 18 の分子量の整数倍のイオンピークが観測された結果は、2-シクロプロペンカルボン酸(18)が、エン反応により容易に重合する性質を有しているためと考えられる(Scheme 51)。このことは、Fox らが 18 の合成において、18 が気体を発生しながら分解すると報告しているのに対し 56)、それとは異なる結果である。また、18 の水溶液における安定性を調べた際に、20 時間後の ESI MS を測定したが、既に複雑な重合体が生成しており(Figure 65)、2 量体 83 を単離することができなかった。18 のエン反応にて得られると考えられる 2 量体 83 は 2 置換のシクロプロペンカルボン酸であるため、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸(37)が安定であることを考慮すると単離可能と思われた。しかしながら、2 量体 83 は 37 とは異なり α, β -不飽和カルボン酸であることから、親エン体としての反応性が増し、さらなる重合が進行したと考えられる。また、過去のエン反応に関する報告において、構造決定されたエン反応成績体は、誘導化されたものを除いて、シクロプロペンが嵩高い置換基を有している場合(Schemes 46 and 49)や、移動する水素を有さない場合(Schemes 45 and 50)が多く、83 のような立体障害の少ないシクロプロペンの場合はさらなる重合化が容易に進行すると考えられる。

以上の結果から、単離精製の過程において、2-シクロプロペンカルボン酸(18)が不安定で、特に濃縮操作により失活してしまう理由は、エン反応により、容易に重合するためと考えられる。



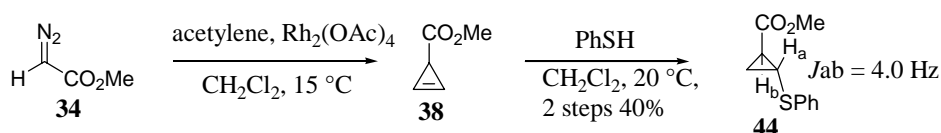
続いて、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)の求核剤に対する反応性を調べた。合成した **18** をクロロホルム溶液として調製し、1 等量のチオフェノールを加えたところ、付加体 **85** を単一のジアステレオマーとして与えた(Scheme 52)⁶⁸。また、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)の水溶液に L-システインを 2 等量加えたところ、付加体 **86** がジアステレオマー混合物として得られた(Scheme 52)⁶⁸。なお、システインを 1 等量加えた際には、付加体 **86** 以外に、二量体に対しシステインが付加したと思われるものが主成分として得られたが、構造決定には至ってない⁶⁹。得られた付加体 **85**、**86** は、1 位と 2 位のプロトンのカップリング値がそれぞれ、3.6、3.3 Hz と小さいことから、両者とも付加したチオールとカルボン酸がトランスであることがわかった。



Scheme 52. Addition of thiols to **18**.

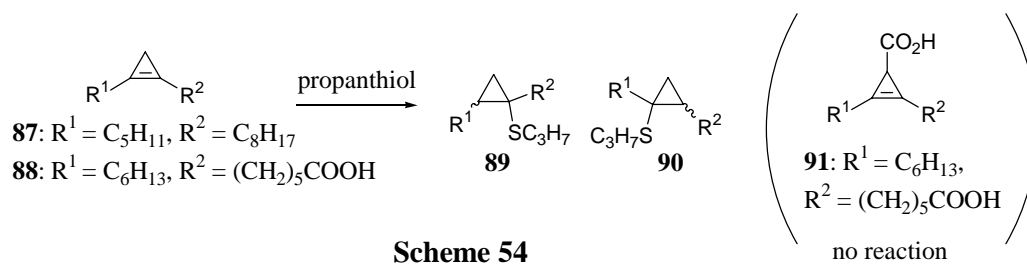
一方、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**37**)や 2,3-ジメチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**22**)の場合は、システインを加えても付加体は得られず、60 °Cに昇温しても付加反応は全く進行しなかった。

過去に、シクロプロペンのチオールとの反応性についても、いくつか報告されており、2-シクロプロペンカルボン酸メチル(**38**)はチオフェノールの付加により、トランス体 **44** を与えている(Scheme 53, Scheme 36 再掲)⁵⁴。



Scheme 53

また、非対称な置換基を持つジアルキルシクロプロペン **87**、**88** はプロパンチオールにより 4 種類の付加体 **89**、**90** を与える(Scheme 54)⁷⁰。また、カルボキシ基を有する **91** は全く反応が進行しない⁷⁰。



Scheme 54

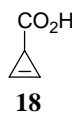
シクロプロペンは高い歪をもった構造であることから、求核剤により容易に付加反応を受けてその歪を解消する性質を有することを確認することができた。生体成分の 1 つであるシステインの付加反応が速やかに進行する点も、**18** の毒性発現機構を考える上で興味深い結果である。

第五節 シクロプロペンカルボン酸類の生理活性について

第一項 シクロプロペンカルボン酸の急性毒性

京都のニセクロハツから、マウスへの経口投与による致死活性を指標に、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)を単離した。また、**18**を合成することができたため、天然物**18**と合成品**18**の致死量を調べた(Table 15)。

Table 15. Lethal toxicities of natural and synthetic 18.

(μg)	natural 18		synthetic 18		
	p.o. ^{a)}	i.p. ^{a)}	p.o. ^{a)}	i.p. ^{a)}	
200	3/3	—	3/3	—	 18 LD ₁₀₀ (p.o.): 2.5 mg/kg LD ₁₀₀ (i.p.): 2.5 mg/kg
100	3/3	3/3	3/3	3/3	
50	3/3	3/3	3/3	3/3	
10	0/3	0/3	0/3	0/3	

a) Lethal toxicities of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) in mice (female, ddy, 19~21 g of weight) were tested by oral (p.o.) or intraperitoneal (i.p.) injection.

その結果、天然物、合成品共に同程度の致死活性を示し、**18**が毒性を有することを確認できた。また、**18**のLD₁₀₀値は経口、腹腔内投与共に2.5 mg/kg程度であることがわかった。経口投与した場合、投与後2、3時間は全く異常がみられず、3時間後あたりから、沈静、立毛、振戦(細かな体の震え)が観察された。6時間後ごろより、腹を地面につけるように横たわり、症状が重篤になった。また、死亡する直前には後ろ足が伸びるような痙攣が起り、死に至った。死亡時間はマウスによって異なり、早い場合(3時間後)や遅い場合(24時間後)もあったが、死に至るまでの症状に変わりはない。腹腔内投与の場合もほぼ同様の症状、経過にて死に至った。これら症状は、粗抽出物(液)を投与した場合と同じであった。また、予備的な結果ではあるが、マウスの組織検査を行ったところ、大腿部骨格筋の変性、脳内神経網の空胞化、肝細胞の空胞化、胸腺、脾臓の萎縮、腎障害などが観察された。

続いて、ニセクロハツに含まれる**18**の含有量と各精製操作における収量を調べた(Table 16)。**18**は¹H NMR スペクトル上で他の成分と重ならず、容易に判別が可能である。

その結果、子実体100 gあたり**18**が70 mg以上含まれていることが明らかになった。また、**18**は不安定であるにも関わらず、各精製操作において中程度の回収率であった。

Table 16. The amount of 18 from fresh fruiting bodies (500 g).

purification stage	18 (mg) ^{a)}	yield (%)
extraction with H ₂ O	360	100
dialysis	320	89
ODS	270	75
IRA	170	47
TOYOPEARL	60	17

a) The concentration of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) of the solution was estimated from ¹H NMR analysis using TSP as an internal standard.

キノコは、約 90%が水分であることから、**18** が子実体に均一に分散しているとすると、キノコ中での濃度は 1 mg/mL 程度である。そこで、**18** の 1 mg/mL の水溶液を調製し、加熱処理したところ(100 °C, 20 min)、分解はほとんどみられなかった。

2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)が埼玉のニセクロハツ候補菌と宮城のニセクロハツ候補菌に含まれているか調べるため、それぞれ同じ重量の子実体を用いて、水抽出液を調整した(Scheme 55)。水抽出液の経口投与による活性試験を行ったところ、活性はみられなかった。また、¹H NMR スペクトルを測定した結果、京都以外のニセクロハツ候補菌には **18** が全く含まれておらず、京都のニセクロハツに特有の毒成分であることがわかった(Figures 69, 70, and 71)。

fruiting bodies
(*Russula* sp. collected in Saitama)
100 g
← H₂O (200 mL)
← concentration to 10 mL
H₂O solution ← no lethal activity
(p.o.) 200 μL

fruiting bodies
(*Russula* sp. collected in Miyagi)
100 g
← H₂O (200 mL)
← concentration to 10 mL
H₂O solution ← no lethal activity
(p.o.) 200 μL

Scheme 55. Lethal activities of H₂O solution (Saitama and Miyagi).

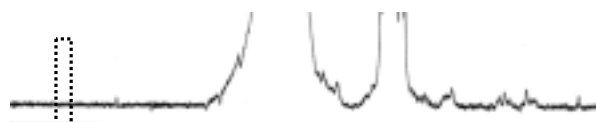


Figure 69. ¹H NMR spectrum of H₂O solution (Saitama).



Figure 70. ¹H NMR spectrum of H₂O solution (Miyagi).

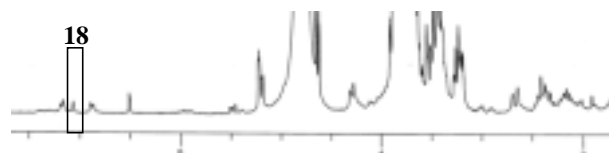


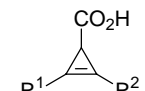
Figure 71. ¹H NMR spectrum of H₂O solution (Kyoto).

以上の結果から、マウスとヒトが同等の感受性を有すると仮定して 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)の LD₁₀₀ 値(2.5 mg/kg)を体重 60 kg の人に換算すると、一人あたりの致死量は

150 mg 程度であると考えられ、これはニセクロハツ数本に相当する。また、**18** は不安定で容易に重合する成分であるが、キノコに含まれている程度の濃度であれば加熱しても変化がみられないことから、人を死に至らしめるほどの毒性と含有量を有しており、ニセクロハツの食中毒原因物質であることがわかった。

続いて、**18** の類縁体である **37**、**22** の活性試験を行った (Table 17)。

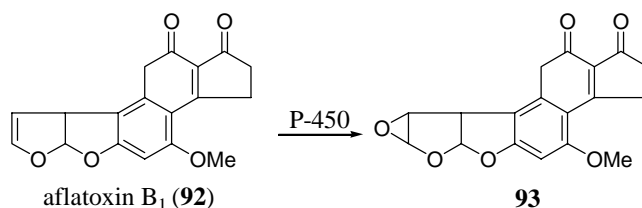
Table 17. Lethal toxicities of congeners, 37 and 22.

	37	22	
(μg)	p.o. ^{a)}	p.o. ^{a)}	
5,000	—	0/3	 37: R ¹ = CH ₃ , R ² = H 22: R ¹ = CH ₃ , R ² = CH ₃ 37: LD ₁₀₀ (p.o.): 25 mg/kg 22: LD ₁₀₀ (p.o.): >250 mg/kg
500	3/3	—	
100	0/3	—	

a) Lethal toxicities in mice (female, ddy, 19~21 g of weight) were tested by oral (p.o.) injection.

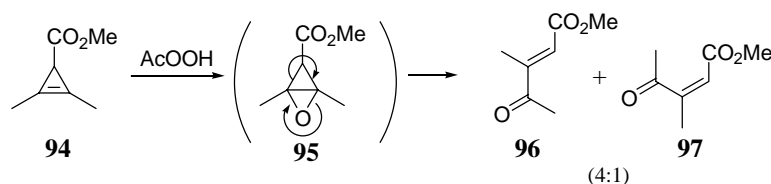
モノメチル体 **37** は、弱いながらも致死活性を示した (LD₁₀₀ 値: 25 mg/kg)。一方、ジメチル体 **22** は **18** の約 100 倍量投与しても活性を示さなかった (LD₁₀₀ 値: >250 mg/kg)。この結果から、シクロプロペンの置換基が増えるにつれ、活性が減少することがわかる。また、置換基が増えることは、シクロプロペンがより安定になると考えられるため、生体内である程度の反応性を有していることが毒性発現に重要であると考えられることもできる。シクロプロペン骨格を有する脂肪酸であるステルクリン酸(**27**)やマルバリン酸(**28**)は、生体内でステアリン酸をオレイン酸へ変換するデサチュラーゼを阻害することが知られている⁷¹⁾。ステルクリン酸(**27**)やマルバリン酸(**28**)はチオールと容易に反応することから⁷²⁾、その阻害は酵素のシステイン残基と結合するためと考えられていた^{71), 72)}。しかし、トリチウムでラベル化したステルクリン酸(**27**)が酵素とほとんど共有結合しないことが報告され、阻害様式は非共有結合的であると考えられている⁷³⁾。このことから、シクロプロペン **18** がアルキル化剤として働き、毒性を発現するとは一概には言えない。

また、毒性の発現機構において、生体内での代謝経路により、化合物が活性化を受ける可能性も考えられる。生体内での代謝の 1 つに酸化反応がある。カビ毒の 1 つであるアフラトキシン B₁(**92**)は肝ミクロソーム内のチトクロム P450 等の酸化酵素により、エポキシ化を受け活性化される (Scheme 56)⁷⁴⁾。このエポキシド **93** に対して、DNA が付加し、発がん性などを引き起こすと考えられている⁷⁴⁾。



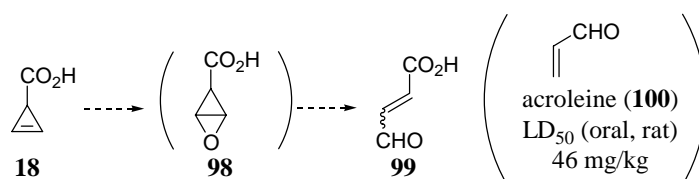
Scheme 56

2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)も、反応性の高いオレフィンを有していることから、生体内で酸化(エポキシ化)され、活性化される可能性がある。過去に、シクロプロペンに対し、エポキシ化を行った例では、シクロプロペンのエポキシ化により生じると考えられる中間体 **95** が開環し、エノン(**96, 97**)が得られている(Scheme 57) ⁷⁵⁾。



Scheme 57

2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)がエポキシ化され、生じると考えられる **99** は、類似の化合物であるアクロレイン(**100**)の毒性を考慮すると、**18** の毒性(LD₁₀₀: 2.5 mg/kg)より低い毒性を示すと考えられる(Scheme 58)。また、2,3-ジメチルシクロプロペンカルボン酸(**22**)も同様な代謝を受ける可能性があるものの、全く毒性を示さないことから、酸化を経て活性化され毒性を発現するとは考えにくい。



Scheme 58

また、生体内での毒性発現には、システインなどの求核剤が付加した代謝産物が活性を示すのではないかと考え、システイン付加体 **86** の活性試験を行ったところ、**18** の約 20 倍量(重量比)を投与しても致死活性はみられなかった(Table 18)。この結果から、生体内でシステイン等が付加した代謝産物が活性を有する可能性は低いと考えられる。

Table 18. Lethal toxicity of cysteine adducts **86**.

86	
(μg)	p.o. ^{a)}
1,000	0/3

OC(=O)C1CC1SCC(N)C(=O)O

86 (diastereomers)
86 : LD₁₀₀ (p.o.) : >50 mg/kg

a) Lethal toxicities in mice (female, ddy, 19~21 g of weight) were tested by oral (p.o.) injection.

第二項 マウスの生化学検査[クレアチンホスホキナーゼ(CPK)活性について]

2-シクロプロペンカルボン酸(18)はニセクロハツの毒成分本体であることが明らかになった。ニセクロハツの中毒事故において、最も特徴的な症状は横紋筋融解症である。横紋筋融解症は横紋筋(骨格筋や心筋)が障害を受け、筋細胞内のミオグロビンやクレアチンホスホキナーゼ(CPK)などの成分が血中に流出する病態のことを指す⁷⁶⁾。その際、腎臓で処理しきれなくなったミオグロビンが尿中に現れる症状をミオグロビン尿症といい、両者はほぼ同義語である⁷⁵⁾。横紋筋融解症を引き起こす原因については、種々知られており、向精神薬、抗菌剤、高脂血症薬などの薬剤や、自然毒(蛇、昆虫等の刺傷)など多岐にわたる⁷⁶⁾。近年、ニセクロハツ以外のキノコでも横紋筋融解症が引き起こされることが報告され、ヨーロッパにおいて、キシメジ(*Tricholoma equestre*)により12件の中毒事故が発生し、3名が死亡した⁷⁷⁾。ニセクロハツはキノコ中毒の中でも横紋筋融解症を併発する最初の例であり⁷⁸⁾、毒成分と横紋筋融解症との関連を調べることは非常に重要であると考えられる。

そこで、マウスに対して2-シクロプロペンカルボン酸(18)を経口投与し、横紋筋融解症の有無を調べることにした。横紋筋融解症を判断する手段として、最も簡便な方法はミオグロビン尿の有無を調べることである。

マウスに18を経口投与し、市販の尿検査紙を用いて血尿の有無を調べた⁷⁹⁾。投与後、数時間おきに検査紙で血尿を調べたが、血尿は観察されず、死亡直後においても尿はほぼ無色であり、検査紙も呈色されなかった。このことから、尿検査においては横紋筋融解症を確認することができなかった。

続いて、血中のCPK活性を測定することにした。CPKは骨格筋や心筋に多く含まれる酵素であり、筋肉内のATP生産を触媒する重要な役割を担っている。血中のCPK活性を測定することは、血尿を調べるよりも、より直接的な方法であり信頼性の高い方法であると考えられる。実際に、臨床の場合においても、CPK活性の上昇が横紋筋融解症の判断基準の1つとされており、CPKは横紋筋融解症においてマーカー蛋白質として重視されている。

マウスに18を5 mg/kg投与後、症状が重篤となったことを確認し(約4時間後)、マウスの尾静脈から採血後、血漿を調製しCPK活性を測定した(Table 19)。また、ネガティブコントロールとして、水(0.2 mL)投与群とメタノール抽出物(1 g/kg)投与群を用いた。メタノール抽出物は濃縮乾燥しているため、18は分解し、ほとんど含まれていない。また、メタノール抽出物は1 g/kgと大量に投与したが、これを生の子実体に換算すると100 g/kgに相当する。これらネガティブコントロール群についても約4時間後に採血し、CPK活性を測定した。また、ポジティブコントロールとして、マウスに対してCPK活性の上昇を引き起こすことが報告されている*p*-フェニレンジアミン(70 mg/kg)投与群を用いた⁸⁰⁾。この、ポジティブコントロール群についても約4時間後に採血し、CPK活性を測定した。なお、*p*-フェニレンジアミンは、今回投与した量では致死活性を示さず、投与後異常がみられないことを確認した。

Table 19. Creatine phosphokinase activities^{a)}.

	control H ₂ O (0.2 mL)	control MeOH extract (1 g/kg)	<i>p</i> -phenylenediamine (70 mg/kg)	cycloprop-2-ene carboxylic acid (18) (5 mg/kg)
CPK (U/L)	240 ± 34	171 ± 15	397 ± 21	3441 ± 1012**

a) Creatine phosphokinase (CPK) activities in mice ($n = 5$ for each group) treated with H₂O (control), MeOH extract which did not contain cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) (almost decomposed), *p*-phenylenediamine, and **18**. Values are means ± s.e.m. and ** indicates significant difference from the control groups; ** $P < 0.01$.

CPK 活性を測定した結果、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)投与群は顕著な増加がみられ、その値は水投与群(ネガティブコントロール)の 10 倍以上であることが明らかとなった。なお、ヒトの CPK 活性は通常 200 程度であり、マウスとほぼ同程度である。ポジティブコントロールとして用いた *p*-フェニレンジアミンはネガティブコントロール群に比べて、CPK 活性は 2 倍程度増加しているものの、**18** 投与群と比較した場合、その増加は僅かである。また、**18** を含まないメタノール抽出物投与群の CPK 活性に増加がみられなかった。この結果から、ニセクロハツにより引き起こされる横紋筋融解症は **18** が原因であるとわかった。なお、各投与群の CPK 活性は平均値(mean)と標準誤差(s.e.m., standard error of mean)で表記し、各群の有意差の指標である *P* 値(有意確率)は、1 元配置分散分析(ANOVA)を行った後、ポストホック検定(Tukey 検定)を用いて算出した。

第三項 抗菌活性及び細胞毒性

合成した 2-シクロプロペンカルボン酸(18)及び、シクロプロピルアセチルカルニチン(11)の抗菌活性を調べた。これら化合物の活性を調べることは、毒性発現機構やキノコ生体内での役割等を考察する上で、知見になると考えた。そこで、種々のグラム陽性菌(1~22)、グラム陰性菌(23~35)、真菌(36~41)に対して抗菌活性を調べたが、活性はみられなかった (Table 20)。

Table20. Antibacterial activities of 18 and 11.

Test organisms	Strain	MIC (µg/mL)	
		18	11
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	FDA 209P	>100	>100
2. <i>S. aureus</i>	Smith	>100	>100
3. <i>S. aureus</i>	MS9610 (MDR)	>100	>100
4. <i>S. aureus</i>	MRSA No.5 (MRSA)	>100	>100
5. <i>S. aureus</i>	MRSA No.17 (MRSA)	>100	>100
6. <i>S. aureus</i>	MS16526 (MRSA)	>100	>100
7. <i>S. aureus</i>	TY-04282 (MRSA)	>100	>100
8. <i>Micricoccus luteus</i>	FDA16	>100	50
9. <i>M. luteus</i>	IFO 3333	>100	100
10. <i>M. luteus</i>	PCI 1001	>100	>100
11. <i>Bacillus subtilis</i>	NRRL B-558	>100	>100
12. <i>B. subtilis</i>	PCI 219	>100	>100
13. <i>B. cereus</i>	ATCC 10702	>100	>100
14. <i>Corynebacterium bovis</i>	1810	>100	>100
15. <i>Enterococcus faecalis</i>	JCM 5803	>100	>100
16. <i>E. faecalis</i>	NCTC 12201 (VRE, vanA)	>100	>100
17. <i>E. faecalis</i>	NCTC 12203 (VRE, vanA)	>100	>100
18. <i>E. faecium</i>	JCM 5804	>100	>100
19. <i>E. faecium</i>	NCTC 12202 (VRE, vanA)	>100	>100
20. <i>E. faecium</i>	NTCTC 12204 (VRE, vanA)	>100	>100
21. <i>Mycobacterium smegmatis</i>	ATCC 607	>100	>100
22. <i>M. vaccae</i>	ATCCB15483	>100	>100
23. <i>Escherichia coli</i>	NIHJ	>100	>100
24. <i>E. coli</i>	K-12	>100	>100
25. <i>E. coli</i>	K-12 ML1629	>100	>100
26. <i>E. coli</i>	BEM11	>100	>100
27. <i>E. coli</i>	BE1121	>100	>100
28. <i>E. coli</i>	BE1186	>100	>100
29. <i>Shigella dysenteriae</i>	JS11910	>100	>100
30. <i>Salmonella enteritidis</i>	1891	>100	>100
31. <i>Proteus vulgaris</i>	OX-19	>100	>100
32. <i>P. mirabilis</i>	IFM OM-9	>100	>100
33. <i>Serratia marcescens</i>		>100	>100
34. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	A3	>100	>100
35. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	PCI 602	100	100
36. <i>Candida albicans</i>	3147	100	100
37. <i>C. tropicalis</i>	F-1	>100	>100
38. <i>C. pseudotropicalis</i>	F-2	100	100
39. <i>C. kurusei</i>	F-5	>100	>100
40. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	F-7	>100	>100
41. <i>Cryptococcus neoformans</i>	F-10	>100	>100

続いて、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)の細胞毒性試験を行った。マウスの組織検査により神経網に空胞化がみられたことや、マウスの症状に振戦や痙攣等がみられたことから、**18**が神経系に作用しているのではないかと考え、神経細胞を中心に試験を行った(Table 21)。

Table 21. Cytotoxicities of 18.

Cell lines	IC ₅₀ (μg/mL)
human astricytoma	>100
human neuroblastoma	>100
human synovial sarcoma	>100
mouse neuroblastoma	>100
doral root ganglion neuron hybridoma	>100
mouse hypothalamic cell	>100

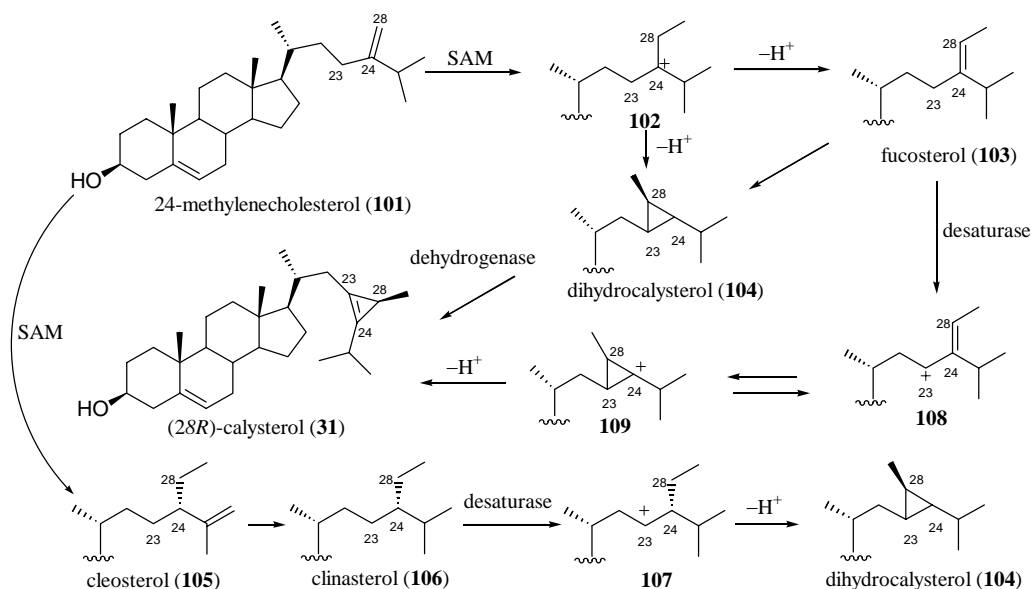
ヒト星状細胞腫、ヒト神経芽細胞、ヒト滑膜肉腫細胞、マウス神経芽細胞、マウス神経芽細胞種とラット感覚神経ハイブリッド細胞、マウス視床下部細胞について細胞毒性を調べたが、100 μg/mLの高濃度においても活性はみられなかった。

2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)は反応性が高いことから、生体内でアルキル化剤として作用すると考えられたが、抗菌活性と細胞毒性を調べた結果、活性はみられなかった。この結果は、**18**がアルキル化剤として非特異的に作用するのではなく、**18**に特異的な作用部位や標的蛋白質が生体内に存在することを示唆していると考えられ、横紋筋融解症や致死活性発現に一連のカスケード反応が関与していると考えられる。

第六節 生合成について

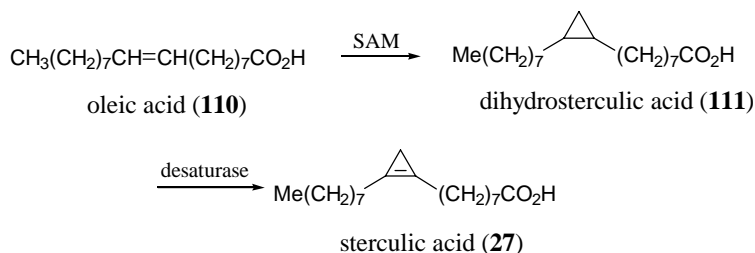
ニセクロハツより 2-シクロプロペンカルボン酸(18)を単離、構造決定した。これまでにシクロプロペン骨格を有する天然物の報告は僅かであることから、生合成にも興味もたれる。そこで、生合成について以下に考察する。

シクロプロペン骨格を有する脂肪酸、ステロールの生合成研究に関して、活発に研究が行われている⁸¹⁾。カリステロール(31)は、24-メチレンコレステロール(101)に対して、*S*-アデノシルメチオニン(SAM)によるメチル化によりカルボカチオン中間体(102)を生成し、脱プロトン化によりフコステロール(103)を経由するか、もしくは直接シクロプロパン環を形成し、ジヒドロカリステロール(104)を与え、さらに、デヒドロ化によりカリステロール(31)を与える経路が提唱されている(Scheme 59)⁸²⁾。なお、ジヒドロカリステロール(104)は同じ海綿より単離されている⁴⁵⁾。また、Wessjohann らは総説の中で、クリナステロール(106)からデサチュラーゼによりジヒドロカリステロール(104)が生合成される報告を参考に⁸³⁾、フコステロール(103)からアリルカチオン 108 を経由する経路を提唱している(Scheme 59)^{81b)}。



Scheme 59. Biosynthetic pathway of carysterol (31).

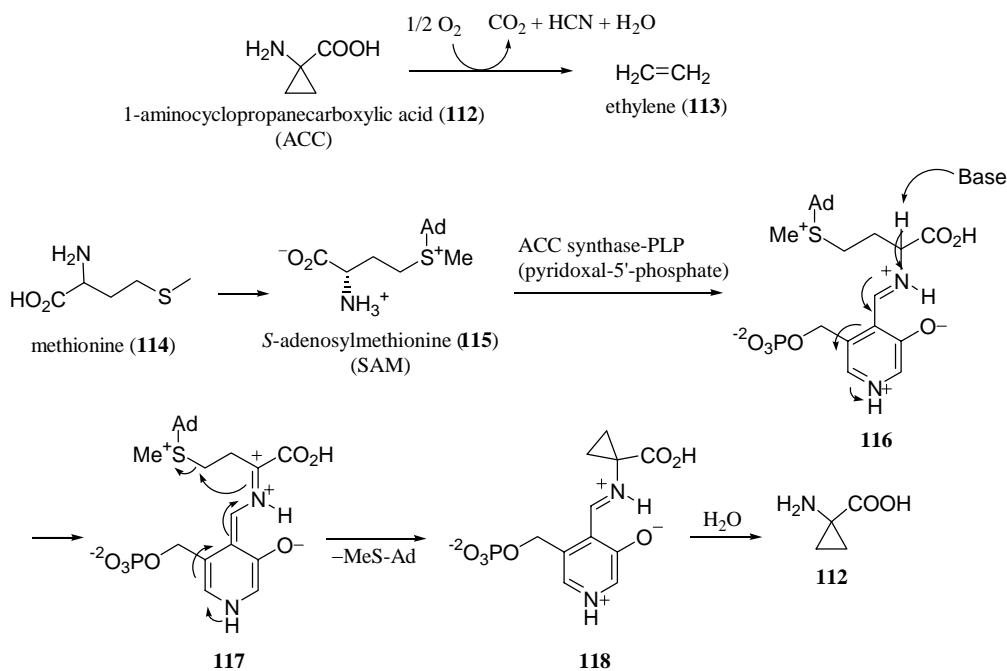
ステルクリン酸(27)の生合成については、オレイン酸(110)とメチオニンの同位体トレーサー実験により、オレイン酸(110)が *S*-アデノシルメチオニン(SAM)によるシクロプロパン化を受け、ジヒドロステルクリン酸(111)が生合成された後、デサチュラーゼによりシクロプロペン骨格が構築されると推定されている(Scheme 60)⁸⁴⁾。



Scheme 60. Biosynthetic pathway of sterculic acid (27).

一方、シクロプロパン環を有する天然物は、シクロプロペンに比べ多く報告されており、その中には非常に単純な化合物もある。

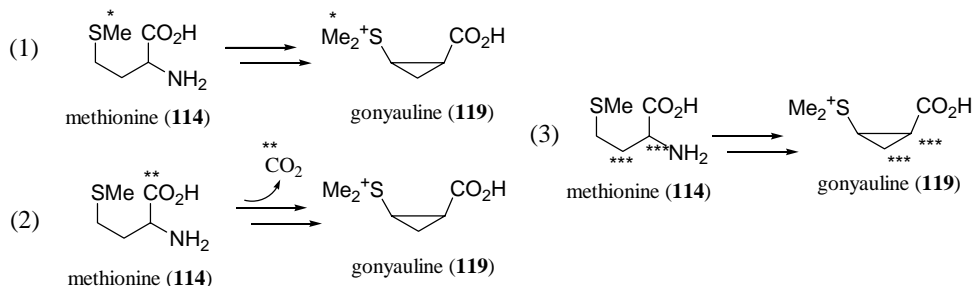
植物ホルモンのエチレン生合成前駆体であるアミノシクロプロパンカルボン酸(ACC, **112**)は、生合成に関して非常に研究が進んでおり、メチオニン(**114**)から ACC シンターゼの働きにより生合成されることがわかっている(Scheme 61) ⁸¹⁾。



Scheme 61. Biosynthetic pathway of ACC (112).

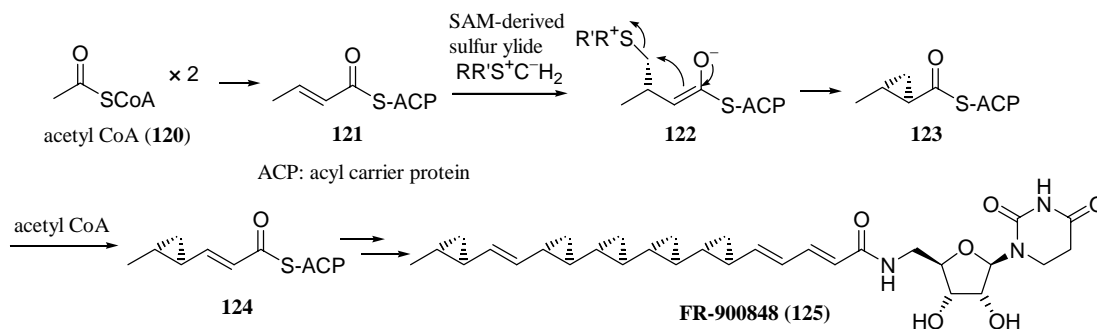
また、単純なシクロプロパン化合物であるゴニオリン(**119**)についても生合成研究が行われている(Scheme 62)。S-メチル基をラベル化したメチオニン(**114**)は取り込まれるものの(Scheme 62, 式(1))、カルボキシ基をラベル化したメチオニン(**114**)は取り込まれなかったことから、一度脱炭酸を経ると考えられている(Scheme 62, 式(2))。また、メチオニン(**114**)の2位、3位をラベル化したものは、シクロプロパン環内に効率よく取り込まれることから

(Scheme 62, 式(3))、再びカルボキシ基が取り込まれると考えられているが、その中間体については明らかでない⁸⁵⁾。



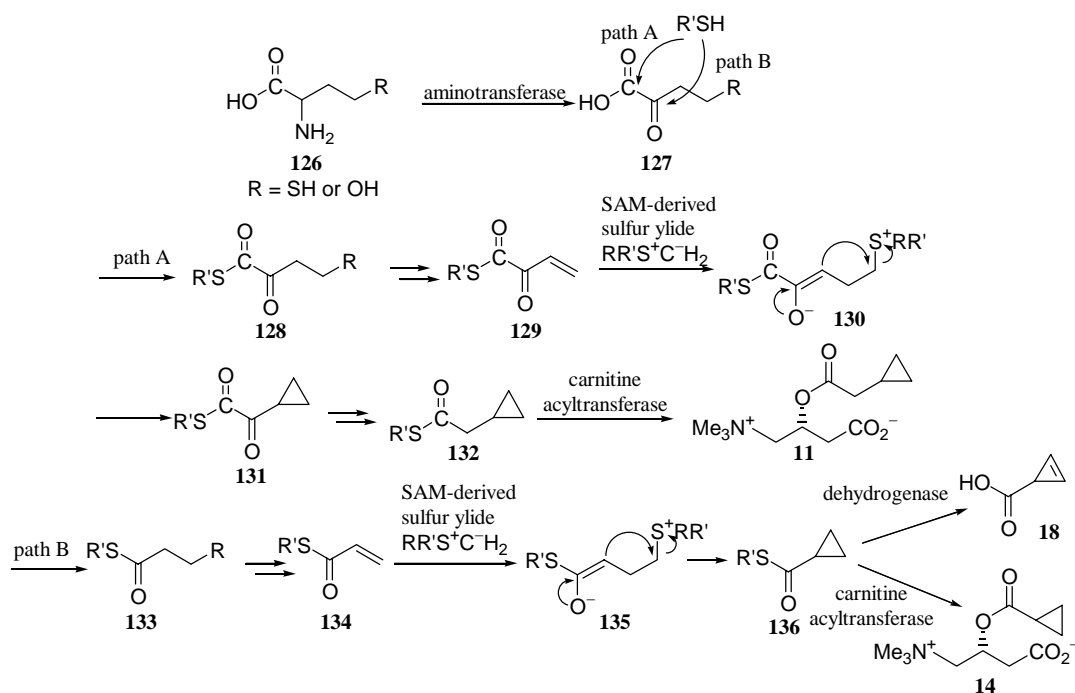
Scheme 62. Plausible biosynthetic pathway of gonyauline (119).

また、ポリシクロプロパン骨格を有する **125** の生合成については段階的にシクロプロパンが導入されると推定され、その生合成は硫黄イリドの共役付加、エノラート中間体 **122** の閉環によるシクロプロパン化、伸長反応により生合成されると考えられている (Scheme 63)⁸⁶⁾。



Scheme 63. Proposed biosynthetic pathway of 125.

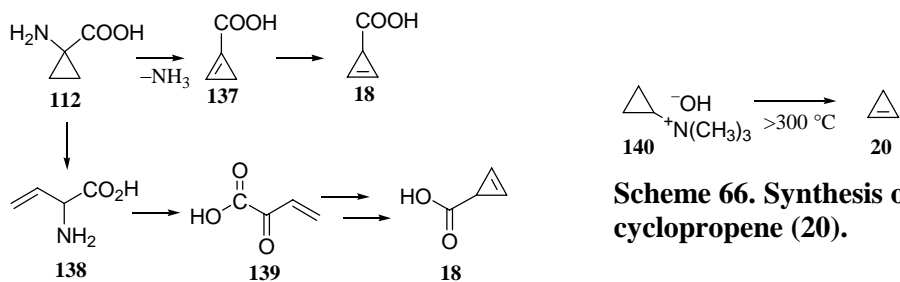
今回、京都のニセクロハツから 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)と共に、シクロプロピルアセチルカルニチン(**11**)を単離、構造決定した。また、河岸らによりシクロプロピルカルボキシルカルニチン(**14**)がキノコから単離されている³⁴⁾。これらシクロプロパン環を有する **11**、**14** も **18** と同様の経路にて生合成されるのではないかと考えた。これら 3 つの化合物は末端にシクロプロパン及びシクロプロペン環を有する。シクロプロパンやシクロプロペン環を有する脂肪酸はいくつか知られているが、末端にこれらの官能基を有していない。そこで **11**、**14**、**18** はステルクリン酸(**27**)のような脂肪酸経路にて生合成されるのではなく、アミノ酸由来ではないかと考えた (Scheme 64)。



Scheme 64. Proposed biosynthetic pathways of 11, 14, and 18.

11 はアミノ酸由来の α -ケト酸 127 がチオエステル化を受けた後、エノン 129 となり、続くシクロプロパン化、還元を経て生合成されると考えた(Scheme 64, path A)。一方、18 は α -ケト酸 127 の酸化的脱炭酸により 133 を経由し、シクロプロパン化、デヒドロ化を経て生合成されると考えた(Scheme 64, path B)。14 は 18 と同様に 133 を経由し生合成されると考えた(Scheme 64, path B)。

また 18 は、シクロプロペン(20)が 4 級アンモニウム塩 140 のホフマン脱離を経て合成されていることから(Scheme 66)⁵⁹、アミノシクロプロパンカルボン酸(112)のアンモニアが脱離した後、異性化し生合成されると考えることもできる(Scheme 65)。また、112 のシクロプロパン環が開環したビニルグリシン(138)を経由し、Scheme 64 とほぼ同様の経路にて生合成される可能性も考えられる(Scheme 65)。しかしながら、ゴニオリン(119)の生合成経路(Scheme 62)を考慮すると、アミノ酸 126 の α 位の炭素はシクロプロパン環内に取り込まれることが予想されるため、2-シクロプロパンカルボン酸(18)が上記のような生合成経路であるかは疑問がもたれる。



Scheme 66. Synthesis of cyclopropene (20).

Scheme 65. Proposed biosynthetic pathway of 18.

以上、生合成に関して考察したが、現在までに 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)の生合成に関する知見は全く得られていない。**18** は、非常に小さな化合物であることから、同位体をトレーサーに用いた場合、その取り込まれ方からの推測は情報量に乏しく、困難が予想される。しかしながら、**18** の由来を探ることは、なぜニセクロハツがシクロプロペンのような反応性の高い化合物を生合成するのかというような、キノコ生体内での役割を考察する上で重要であり、今後、生合成の解明が期待される。

総括

第一章 ドクヤマドリの毒成分探索

ドクヤマドリ (*Boletus venenatus*) から、腹腔内投与によるマウス致死活性を指標に、毒蛋白質を単離し、ボレベニン(bolevenine)と命名した。ボレベニンの LD₁₀₀ 値は約 10 mg/kg (マウス腹腔内投与) 程度であるとわかった。ボレベニンは分子量 11 kDa のサブユニット 3 つが、非共有結合にて 3 量体を形成している蛋白質であることがわかった。また、N 末端アミノ酸配列解析(Figure 72)より、過去にイグチ科の毒キノコより単離された毒蛋白質ボレサチンと相同性が高いことがわかった。ボレサチンはマウスに対して経口投与でも致死活性を示し、蛋白質合成阻害、レクチン活性等様々な活性を示す。ボレベニンも今後、ボレサチンと同様の試験を行うことで、活性発現の解明ができると考えられる。



Figure 72. N-Terminal amino acid sequences of bolevenine.

第二章 ニセクロハツの毒成分探索

ニセクロハツの同定が困難であったことから、宮城、埼玉、京都にてニセクロハツ候補菌を採取した。これら 3 種のニセクロハツ候補菌の化学成分を調べた結果、過去に宮城のニセクロハツ候補菌より単離、構造決定されたルスフェリン A (1)、D (4) と 3-ヒドロキシバイキアイン(8)が、宮城のニセクロハツ候補菌にのみ含まれていることを確認した。京都のニセクロハツ候補菌からは、他の 2 種には含まれていないシクロプロピルアセチルカルニチン(11)を単離、構造決定した(Figure 73)。それぞれの候補菌の化学成分が異なることから、これら 3 種は異種の菌であることがわかった。この 3 種のニセクロハツ候補菌のうち、京都産のニセクロハツ候補菌のみマウスに対する経口投与にて致死活性を示したことから、これまでのニセクロハツによる中毒事故が西日本を中心に発生していることから、京都のニセクロハツ候補菌が真のニセクロハツであると判断した。そこで、経口投与によるマウス致死活性を指標に毒成分の探索を行い、毒成分として 2-シクロプロペンカルボン酸(18)の単離に成功した(Figure 73)。これはシクロプロペンを有する天然物として 3 種類目の報告であり、これまでに報告されている毒物の中で、最も小さいカルボン酸毒である。

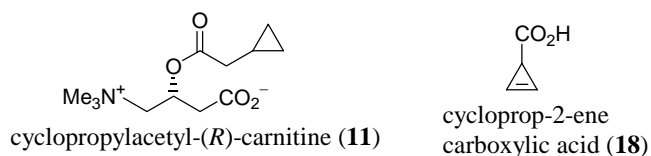
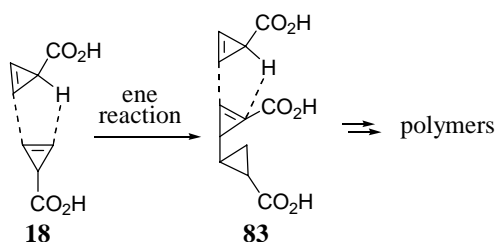


Figure 73

この毒成分 **18** を単離する過程において、濃縮乾燥操作により容易に失活してしまうことがわかり、すべての精製操作を溶液として扱う必要があった。この失活の理由は、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)が容易に重合する性質をもち、また、若干の揮発性もあるためであることがわかった。重合のメカニズムは他のシクロプロペン類と同様にエン反応によるものと推定した(Scheme 67)。このような性質は天然有機化合物において例がなく、2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)が天然物として、非常に新規性の高い化合物であると言える。



Scheme 67. Polymerization mechanism of 18.

また、シクロプロペンカルボン酸の類縁体である、2-メチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**37**)、2,3-ジメチル-2-シクロプロペンカルボン酸(**22**)を合成し、安定性や反応性、活性を調べた結果、置換基が増えるにつれて、安定性が増し濃縮により重合することもなく、チオールとの反応性や活性は減少することがわかった。**18** はチオールとの反応により容易に付加体を与えることから、毒性発現は生体成分との非特異的なアルキル化によるものと考えられた。しかしながら、抗菌活性や細胞毒性を全く示さなかったことから、**18** の毒性発現には生体内における特異的な作用部位や標的蛋白質の存在が示唆される。**18** のマウス経口投与による LD₁₀₀ 値は 2.5 mg/kg であり、子実体 100 g あたり 70 mg 以上と大量に含まれていた。また、**18** をマウスに投与すると、クレアチンホスホキナーゼ活性が顕著に上昇し、ニセクロハツによる中毒症状に特徴的な横紋筋融解症を引き起こすことがわかった。よって、**18** がニセクロハツの中毒死亡事故原因物質であることを明らかにすることができた。

今後、蛋白質や水溶性の不安定物質を対象にした研究は、天然物化学においてますます重要になると考えられ、特に 2-シクロプロペンカルボン酸(**18**)については、非常に興味深い構造を有していることから、活性の発現機構や生成に関して更なる研究が望まれる。

実験項

第一章

General

All separation procedures were carried out at 4 °C. Each fraction was monitored by UV spectra (U-2001, Hitachi) at 280 nm.

Materials

The fruiting bodies of *Boletus venenatus* were collected during 2002 to 2003 in the Nagano and Gifu Prefectures, Japan, and stored at –30 °C until use.

Bioassay on mice

The lethality was assayed by intraperitoneal injection of the sample into the female ddY strain mice (9.5–10.5 g of weight, Japan SLC). The sample was dissolved in saline (0.5 mL). When the lethal effect was observed within 36 hours, the sample was regarded as a toxic fraction. Animal experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Keio University School of Medicine.

Thermal stability, relative mass, and pH Stability

The crude aqueous extract was filtered using filter paper (No. 5A, Kiriya) and the filtrate was concentrated *in vacuo*.

The concentrated filtrate (120 mg) was dissolved in H₂O and then heated at 70 °C for 20 min, which led to a white precipitate. After filtration, the resulting solution was concentrated *in vacuo*. This sample was injected into three mice and no lethal activities were observed.

The concentrated filtrate (120 mg) was dissolved in 1 mL of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) and separated by ultrafiltration (Ultra filter, *Mr* 10,000, Advantec). After lyophilization, the retentate (>10,000) and filtrate each were injected into three mice and the only retentate exhibited lethal activities.

The concentrated filtrate (40 mg) was dissolved in the following buffers and the mixture was allowed stand at 4 °C overnight: 50 mM citrate-NaOH buffer (pH 4, 5, 6), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7, 8), and 50 mM NH₃-CO₂ buffer (pH 9, 10). Each solution was next dialyzed against H₂O, with the retentates lyophilized. Each residue was used for biological assays. Activities were observed for all samples.

Purification

Fruiting bodies of *Boletus venenatus* (250 g) were cut into pieces, soaked in H₂O (500 mL), and extracted overnight. The mixture was filtered through filter paper (No. 5A, Kiriyaama) under suction and the filtrate was concentrated *in vacuo* to 1/10 volume. The solution was then dialyzed (*Mr* 12,000–14,000) against H₂O (3 L × 2) overnight. The retentate was lyophilized to give a crude extract (1.3 g). A second similar extraction gave the second crop (0.6 g). The lethal effect was observed in the crude extract by injection of 5 mg/capita.

The combined extracts (460 mg) were dissolved in 20 mM citrate-NaOH buffer (pH 4.5, 20 mL) and applied to a cation exchange column (CM-52, 2.8 I.D. × 10 cm, Whatman) equilibrated with the same buffer. Stepwise elution with 20 mM citrate buffer (pH 4.5) containing NaCl (0, 100, 400 mM, each 180 mL) was carried out, with 9 mL fractions collected. The Fr. 7 eluted between 423 and 477 mL was concentrated to 1/10 volume and then dialyzed against 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 1 L × 3).

The retentate was loaded onto an anion exchange column (DE-52, 2.6 I.D. × 7 cm, Whatman) previously equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). After the resin was washed with buffer (150 mL), stepwise elution with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing NaCl (100, 400 mM, each 90 mL) was carried out. With 9 mL fractions collected as above. The Fr. 7-1 that eluted between 45 and 117 mL was concentrated *in vacuo* to 1/10 volume, and then dialyzed against 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 2 L). The retentate was next lyophilized. The amount of protein in the Fr. 7-1 was about 1.7 mg as estimated from the Bradford method using BSA as standard. A lethal effect was observed in the Fr. 7-1 by injection of 150 µg/capita.

The Fr. 7-1 (3.4 mg) was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 2 mL), and then subjected to gel filtration on a Sephacryl S-100HR (1.2 I.D. × 40 cm, GE Healthcare Bio-Sciences) pre-equilibrated with the same buffer. Using the same buffer as the eluate, 2 mL fractions were collected. The fractions that eluted between 20 and 40 mL were combined and evaporated *in vacuo* to 1/10 volume. This fraction (Fr. 7-1-1) was then dialyzed against 5 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 2 L) with the retentate lyophilized. The amount of the protein in the Fr. 7-1-1 was about 3.2 mg as estimated by the Bradford method. The markers of the relative molecular mass, Ger Filtration LMW Calibration Kit, were purchased from GE Healthcare Bio-Sciences.

The Fr. 7-1-1 (100 µg) was dissolved in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0, 400 µL) and loaded onto a HiLoad 26/10 Q Sepharose column (GE Healthcare Bio-Sciences) connected to an AKTA prime system (GE Healthcare Bio-Sciences). The column had been equilibrated with 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), and for sample elution, a linear

gradient of NaCl from 0 to 250 mM was applied for 40 min at a flow rate of 2 mL/min with monitoring at 280 nm; 2 mL fractions were then collected. The fractions eluting between 28 and 32 mL, corresponding to the major peak in the chromatogram, were combined and evaporated *in vacuo* to 1/10 volume. This fraction (Fr. 7-1-1-2) was next dialyzed against H₂O (100 mL) and the retentate lyophilized. These manipulations were repeated 32 times and the total amount of the combined product was 2.1 mg as estimated by the Bradford method. A lethal effect was observed in the Fr. 7-1-1-2 by injection of 100 µg/capita.

SDS-PAGE, Native-PAGE, and isoelectric focusing

SDS-PAGE was performed as described by Laemmli (Laemmli, U.K. *Nature* **1970**, *227*, 680–685.) using a 15% acrylamide gel. Samples (each 2 µg) were heated at 100 °C for 10 min in the presence or absence of 2-mercaptoethanol before its application. A calibration kit (LMW Marker Kit, GE Healthcare Bio-Sciences) was used as the standard molecular mass markers. The protein bands were visualized by staining the gels with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka) or silver staining (Silver Stain KANTO III, Kanto Chemical Co. Inc.). SDS-PAGE of bolevanine showed a single band at 12 kDa regardless of presence or absence of 2-mercaptoethanol.

Native-PAGE was performed by the similarly method of SDS-PAGE using a 15 % acrylamide gel in non-denaturing conditions. The protein bands were visualized by silver staining (Silver Stain KANTO III, Kanto Chemical Co. Inc.).

Isoelectric focusing was performed using a prepared gel, Ampholine PAG plate (5 × 11 cm) at pH 3.5–9.5 (GE Healthcare Bio-Sciences). A sample (10 µg) in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) was applied to the gel plate (3 cm from anode), and run on a Multiphor II (horizontal electrophoresis apparatus, GE Healthcare Bio-Sciences) according to the manufacturer's instructions. The pI value was determined using the Broad pI Kit (pH 3.5~9.3, GE Healthcare Bio-Sciences) as the pI markers. Protein bands were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fluka). IEF of bolevanine gave only one band and its isoelectric point was found to be 6.5.

Determination of relative molecular mass

MALDI TOF MS

MALDI TOF MS was measured using a Voyager DE-RP or Voyager DE-STR (Applied Biosystems) in the linear mode. Calibration was performed using ACTH (18-39) (adrenocorticotrophic hormone fragment 18-39) and BSA (bovine serum albumin) as the relative molecular mass standards. CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), SA

(sinapinic acid), and FA (ferulic acid) were used as the matrix. MALDI TOF MS showed peaks at 11,000 (monomer) and 33,000 (trimer).

Gel filtration by FPLC

The purified bolevenine (100 µg) was dissolved in 20 mM phosphate buffer (pH 7.0), and applied to a Superdex 75 column connected to a FPLC system (GE Healthcare Bio-Sciences). The column had been pre-equilibrated with the buffer containing 150 mM NaCl with elution of the sample performed at the flow rate of 1 mL/min with monitoring at 210 nm. The markers of the relative molecular mass, BSA (67,000), egg albumin (45,000), and cytochrome C (12,400), were purchased from Sigma-Aldrich. pectate lyase (23,800) was obtained by the method of Miyairi¹²). The *Mr* of bolevenine was estimated to be about 30,000 (30 kDa).

Amino acid sequence analysis

The N-terminal amino acid sequence of bolevenine was analyzed up to 18 using a PPSQ-10 amino acid sequencer (Shimadzu).

Sugar chain analysis

The sugar chain of the Fr. 7 was analyzed by G. P. SENSOR (Seikagaku Corp.) using PVDF membrane blotting after SDS-PAGE. This analysis showed an absence of sugar.

Lethal toxicity of bolevenine

Bolevenine exhibited hair erection and decreased mobility on mice ($n = 3$) by injection of 10 mg/kg (100 µg/one mouse) through i.p. route. After developing these initial symptoms, the mice died within 18–36h. These results showed that LD₁₀₀ value of bolevenine was 10 mg/kg.

第二章

General

The IR spectra were recorded using a JASCO FT IR-200 spectrometer. The ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Varian MERCURY plus 300 and a JEOL Lambda 300 spectrometer at ambient temperature. ^{13}C chemical shifts were determined with complete proton decoupling. ^1H NMR spectral data were reported as follows: chemical shifts 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). The low- and high-resolution mass spectra were recorded on a JEOL GC Mate (EI and FAB) or JEOL the Accu TOF JMS-T100LCS (ESI). Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck TLC 60F-254 plates (0.25 mm), and visualization was accomplished with ethanolic phosphomolybdic acid and ninhydrin. Organic solvents were distilled by appropriate procedures and stored under an argon atmosphere.

Materials

The fruiting bodies of *Russula* species were collected in Saitama in 2002–2003, Kyoto (Kiyomizu and Fushimi areas) in 2004–2008, and Miyagi in 2007. These mushrooms were stored at $-30\text{ }^\circ\text{C}$ until use.

Bioassay on mice

The samples were dissolved in H_2O (0.2 mL) and orally injected to mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC). In the case of intraperitoneal injection, the sample was dissolved in saline. When the lethal toxicity was observed within 24 h, the sample was regarded as toxic. All animal experiments were conducted in accordance with the guidelines of the Keio University School of Medicine

Isolation of cyclopropylacetyl-(R)-carnitine (11)

The fruiting bodies (500 g) of *Russula subnigricans* collected in Kyoto were cut into pieces and soaked in H_2O (1.5 L) overnight. The H_2O extract was filtered through filter paper under suction and then the filtrate was concentrated to about 100 mL under reduced pressure. The concentrated solution was dialyzed (M_r 14,000) against H_2O (1.5 L \times 2) overnight. The dialyzate was concentrated to 100 mL under reduced pressure; the quarter part of this solution was chromatographed on an ODS column (Cosmosil 140C₁₈ OPN, 16 g) and eluted with H_2O and 50% MeOH– H_2O . The 50% MeOH– H_2O fraction

was concentrated under reduced pressure and the residue was dissolved in H₂O and washed with EtOAc. The H₂O layer was concentrated under reduced pressure and the residue was purified by chromatography on an ODS column and eluted with 20% MeOH–H₂O. Then the fraction which contained a cyclopropane derivative showing the highly upfield signals in its ¹H NMR spectrum was purified by reversed-phase PTLC (RP-18 F-254, Merck, 20% CH₃CN–H₂O) and reversed-phase HPLC (PEGASIL ODS, 6 I.D. × 250 mm, linear gradient from H₂O to 20% CH₃CN–H₂O for 50 min, flow rate 1.5 mL/min, monitoring at 210 nm) to give cyclopropylacetyl (*R*)-carnitine (**11**) (3.4 mg) as a colorless solids: *R*_f = 0.31 (ODS, 20% MeOH–H₂O); [α]_D²⁵ –14.46 (*c* 0.96, H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O, HOD = 4.79) δ 0.16 (2H, m), 0.53 (2H, m), 1.00 (1H, m), 2.28 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.37 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.50 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.65 (1H, dd, *J* = 5.6, 16.0 Hz), 3.19 (9H, s), 3.62 (1H, d, *J* = 14.0 Hz), 3.88 (1H, dd, *J* = 8.6, 14.0 Hz), 5.64 (1H, m); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O, DSS = –2.00): δ 4.18, 4.36, 6.66, 39.71, 40.88, 54.51, 67.53, 68.94, 175.62, 177.05; HR FAB MS (*m/z*) [M+H]⁺: calcd for C₁₂H₂₂NO₄: 244.1549, found 244.1572. These data were identical with those of synthetic **11**.

Synthesis of cyclopropylacetyl (*R*)-carnitine (11)

Cyclopropylacetic acid (20.0 μ L, 0.499 mmol) and thionyl chloride (24.6 μ L, 0.549 mmol) was stirred at ambient temperature. After 1 h, (*R*)-carnitine (**13**) (80.6 mg, 0.499 mmol) dissolved in CH₃CN (0.5 mL) was added and stirred for 1 h at ambient temperature. The reaction mixture was evaporated and the residue was chromatographed on alumina (MeOH) and ODS (H₂O, 50% MeOH–H₂O) to afford cyclopropylacetyl (*R*)-carnitine (**12**) (13 mg, 11%) as colorless solids: *R*_f = 0.31 (ODS, 20% MeOH–H₂O); [α]_D²⁵ –16.57 (*c* 0.67, H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O, HOD = 4.79) δ 0.14 (2H, m), 0.50 (2H, m), 0.97 (1H, m), 2.28 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.35 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.48 (1H, dd, *J* = 8.0, 16.0 Hz), 2.62 (1H, dd, *J* = 5.6, 16.0 Hz), 3.17 (9H, s), 3.60 (1H, d, *J* = 14.0 Hz), 3.86 (1H, dd, *J* = 8.6, 14.0 Hz), 5.62 (1H, m); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O, DSS = –2.00): δ 4.15, 4.35, 6.65, 39.66, 40.90, 54.50, 67.51, 68.90, 175.62, 177.07; HR FAB MS (*m/z*) [M+H]⁺: calcd for C₁₂H₂₂NO₄: 244.1549, found 244.1555. These data were identical with those of natural **11**.

Isolation of russuphelin A (1), D (4) and 3-hydroxybaikiain (8) from Russula species collected in Miyagi

The fruiting bodies (22.2 g) of *Russula* species collected in Miyagi were cut into pieces and soaked in MeOH (200 mL) overnight. The MeOH extract was filtered through filter paper under suction and then the filtrate was concentrated under reduced pressure.

After removal of MeOH, the residual aqueous layer was extracted with EtOAc (50 mL \times 3). Each layer was concentrated *in vacuo* to afford the H₂O layer (173 mg) as a brown syrup, and the EtOAc layer (255 mg) as a red syrup.

The EtOAc layer (111 mg) was chromatographed on silica gel and eluted with 80% hexane–EtOAc, 90% CHCl₃–EtOAc, 80% CHCl₃–EtOAc, 95% CHCl₃–MeOH, and 95% CHCl₃–MeOH. The 90% CHCl₃–EtOAc eluate was further purified by PTLC (95% CHCl₃–MeOH, 80% CHCl₃–EtOAc) to afford russuphelin D (**4**) (2.7 mg). The 80% CHCl₃–EtOAc eluate was also purified by PTLC (95% CHCl₃–MeOH) to afford russuphelin A (**1**) (1.3 mg). Analytical data of russuphelin A (**1**): R_f = 0.31 (SiO₂, 95% CHCl₃–MeOH), 0.31 (SiO₂, 90% CHCl₃–EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, CD₂HOD = 3.31): δ 3.46 (3H, s), 4.00 (3H, s), 5.60 (2H, s), 6.92 (4H, s); HR EI MS (m/z) [M]⁺: calcd for C₂₀H₁₄O₆Cl₄: 489.9544, found 489.9523; LR EI MS (m/z): 490 [M]⁺, 492 [M+2]⁺, 494 [M+4]⁺, 496 [M+6]⁺, 498 [M+8]⁺. These data were identical with those of reference 28a. Analytical data of russuphelin D (**4**): R_f = 0.44 (SiO₂, 95% CHCl₃–MeOH), 0.62 (SiO₂, 90% CHCl₃–EtOAc); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00): δ 3.68 (3H, s), 3.98 (3H, s), 5.88 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.58 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.91 (2H, s); HR EI MS (m/z) [M]⁺: calcd for C₁₄H₁₁O₄Cl₃: 347.9723, found 347.9720; LR EI MS (m/z): 348 [M]⁺, 350 [M+2]⁺, 352 [M+4]⁺, 354 [M+6]⁺. These data were identical with those of reference 28b.

The H₂O layer (173 mg) was subjected to a cation exchange column (Amberlite IRC-50, 24 mL) and eluted with H₂O (250 mL). After concentration, the H₂O eluate was applied to a cation exchange column (Amberlite IR-120B, 20 mL). After the resin was washed with H₂O (200 mL), the adsorbed fraction was eluted with 4% ammonia solution (200 mL). After concentration, the residue was recrystallized from MeOH–H₂O to afford 3-hydroxybaikiain (**8**) (14.1 mg) as colorless solids: $[\alpha]_D^{25}$ –322.7 (c 1.19, H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O, HOD = 4.79): δ 3.75 (2H, m), 3.83 (1H, d, J = 3.0 Hz), 4.62 (1H, m), 5.98 (1H, m), 6.15 (1H, m); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ 42.26, 60.78, 123.60, 126.80, 171.50. These data were identical with those of reference 29.

Isolation of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18)

All separation procedures were carried out at 4 °C. The lethal effect on mice through oral route was used as the toxicity index for the isolation of the toxic components. The fruiting bodies (500 g) of *Russula subnigricans* collected in Kyoto were cut into pieces and soaked in H₂O (1.5 L) overnight. After filtration, the residue was again extracted with H₂O (1.5 L). The combined extracts were filtered through filter paper under suction and then the filtrate was concentrated to about 100 mL under reduced pressure. The concentrated solution was dialyzed (M_r 14,000) against H₂O (1.5 L \times 2) overnight.

The dialyzate was concentrated to 100 mL under reduced pressure; the quarter part of this solution was chromatographed on an ODS (Cosmosil 140C₁₈ OPN, 16 g) column and the toxin was eluted with H₂O (300 mL). The eluate was concentrated to 25 mL and this solution was chromatographed on an anion exchange resin (IRA-45, 50 mL, acetate form). The column was washed with H₂O (400 mL) and then the toxin was eluted with a mixture of H₂O–acetone–acetic acid (2:2:1, 250 mL). The solution was concentrated to 5 mL under reduced pressure, and then it was applied on the gel filtration (TOYOPEARL HW40S, 1.1 I.D. × 40 cm) eluted with H₂O. Each 6 mL was fractionated and the fr 32–34 (186–204 mL) were collected guided by TLC analysis (80% CH₃CN–H₂O) and the combined fractions were concentrated to 1 mL under reduced pressure to afford spectroscopically pure toxin **18** as an aqueous solution. In these purification procedures, the amount of **18** was estimated from ¹H NMR analysis of each solution (100 μL) using TSP (250 μg, 1.49 μmol) as an internal standard. These data were summarized in Table E1.

Table E1. The amount of **18 from fresh fruiting bodies (500 g).**

purification stage	18 (mg)	yield (%)
extraction with H ₂ O	360	100
dialysis	320	89
ODS	270	75
IRA	170	47
TOYOPEARL	60	17

Structure determination of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18)

Analytical data of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**): $R_f = 0.70$ (80% CH₃CN–H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O–H₂O (1:5), TSP = 0.00): δ 2.16 (1H, t, $J = 1.5$ Hz), 7.09 (2H, d, $J = 1.5$ Hz); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O–H₂O (1:5), TSP = –2.00): δ 17.03, 103.89, 183.16; HR EI MS (m/z) [M]⁺: calcd for C₄H₄O₂: 84.0211, found 84.0211. The toxin **18** is also soluble in CDCl₃. The aqueous solution of **18** (about 1 mL) was acidified to pH 3 with 1 M HCl and solid NaCl was added until the aqueous layer was saturated. The aqueous layer was extracted with CDCl₃ (0.6 mL × 5). The combined extracts were concentrated to 0.6 mL under N₂ gas.: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00): δ 2.21 (1H, t, $J = 1.5$ Hz), 6.91 (2H, d, $J = 1.5$ Hz), 11.3 (1H, br); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.00): δ 16.51, 103.14, 182.31; IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1708, 1666, 1425, 1328, 1282, 1248. These data were identical with those of reference 56 and synthetic **18**.

Reaction of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18) with diphenyldiazomethane

To an aqueous solution (0.1 mL) of the toxin **18** (*ca.* 30 mg) was added a solution of diphenyldiazomethane (1.0 M in petroleum ether, 1 mL) and the mixture was stirred overnight at ambient temperature. After quenching the mixture with acetic acid (0.1 mL), H₂O was added and the mixture was extracted with Et₂O. After concentration of the extract, the residue was purified by PTLC (SiO₂, 25% EtOAc–hexane) to give **19** (45 mg) as a colorless syrup. Analytical data of **19**: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00): δ 1.29 (1H, dd, *J* = 1.8, 4.5 Hz), 2.83 (1H, dd, *J* = 4.5, 4.8 Hz), 5.29 (1H, dd, *J* = 1.8, 4.8 Hz), 6.90 (1H, s), 7.01–7.04 (2H, m), 7.25–7.44 (16H, m), 7.58–7.62 (2H, m); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.00): δ 29.91, 33.11, 71.06, 77.81, 102.84, 126.43, 126.75, 127.10, 127.86, 128.10, 128.17, 128.20, 128.35, 128.58, 128.61, 128.76, 128.79, 139.42, 139.63, 139.86, 141.17, 168.50; IR (neat, cm⁻¹): 3065, 3035, 2362, 2342, 1733, 1600, 1522, 1495, 1448, 1395, 1278, 1175; HR FAB MS (*m/z*) [M+H]⁺: calcd for C₃₀H₂₅N₂O₂ 445.1916, found 445.1921.

Synthesis of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18)

To a stirred suspension of Rh₂(OAc)₂ (11.4 mg, 0.0260 mmol) and trimethylsilylacetylene (**39**) (1.04 g, 10.6 mmol) was slowly added ethyl diazoacetate (600 mg, 5.30 mmol) over 3 h at ambient temperature. After additional 30 min, the mixture was diluted with CH₂Cl₂ and then filtrated through silica gel pad (1 g). After concentration, the residue was dissolved in MeOH (5.0 mL) and to this mixture was added an aqueous solution of KOH (1.6 M, 5.0 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at 0 °C overnight. After removal of MeOH, the aqueous phase was washed with CHCl₃. The aqueous layer was acidified to pH 3 with 1 M HCl, and then passed through an ODS column (Cosmosil 140C₁₈ OPN, 1 g) eluted with H₂O. The eluate was subjected to gel filtration (TOYOPEARL HW40S, 1.1 I. D. × 40 cm) and eluted with H₂O. Each 6 mL was fractionated and the fr 32–34 (186–204 mL) were collected and the combined fractions were concentrated to 1 mL under reduced pressure. This solution contained about 50 mg of the toxin **18** (11% yield from ethyl diazoacetate): *R*_f = 0.70 (80% CH₃CN–H₂O); ¹H NMR (300 MHz, D₂O–H₂O (1:5), TSP = 0.00): δ 2.13 (1H, t, *J* = 1.5 Hz), 7.08 (2H, d, *J* = 1.5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O–H₂O (1:5), TSP = –2.00): δ 17.16, 104.05, 183.26; HR EI MS (*m/z*) [M]⁺: calcd. for C₄H₄O₂: 84.0211, found 84.0203. The toxin **18** is also soluble in CDCl₃: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00): δ 2.22 (1H, t, *J* = 1.5 Hz), 6.92 (2H, d, *J* = 1.5 Hz), 11.3 (1H, br); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.00): δ 16.53, 103.13, 182.45; IR (CHCl₃, cm⁻¹): 1708, 1666, 1425, 1328, 1282, 1248. These data were identical with those of reference 56 and natural **18**.

Synthesis of 2-methylcycloprop-2-ene carboxylic acid (37)

To a stirred suspension of $\text{Rh}_2(\text{OAc})_2$ (11.4 mg, 0.0260 mmol) and trimethylsilylpropyne (**50**) (1.04 g, 10.6 mmol) was slowly added ethyl diazoacetate (600 mg, 5.30 mmol) over 3 h at ambient temperature. After additional 30 min, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and then filtrated through silica gel pad (1 g). After concentration, the residue was dissolved in MeOH (5.0 mL) and to this mixture was added an aqueous solution of KOH (1.6 M, 5.0 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at ambient temperature overnight. After removal of MeOH, the aqueous layer was acidified to pH 3 with 1 M HCl and solid NaCl was added until the aqueous layer was saturated. The mixture was extracted with CHCl_3 (5 mL \times 3). The combined extracts were dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel (5% MeOH– CHCl_3) to afford 2-methylcycloprop-2-ene carboxylic acid (**37**) (279mg, 54%) as a colorless syrup: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , TMS = 0.00): δ 2.11 (1H, d, J = 1.2 Hz), 2.17 (3H, d, J = 1.5 Hz), 6.35 (1H, dq, J = 1.2, 1.5 Hz), 10.5 (1H, brs); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , CDCl_3 = 77.00): δ 10.40, 19.81, 94.13, 111.19, 183.12; HR EI MS (m/z) [M] $^+$: calcd for $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$: 98.0368, found 98.0355.

Synthesis of 2,3-dimethylcycloprop-2-ene carboxylic acid (22)

To a stirred suspension of $\text{Rh}_2(\text{OAc})_2$ (7.6 mg, 0.0172 mmol) and 2-butyne (**51**) (0.274 mL, 190 mg, 3.51 mmol) was slowly added ethyl diazoacetate (200 mg, 1.76 mmol) over 3 h at ambient temperature. After additional 30 min, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 and then filtrated through silica gel pad (0.5 g). After concentration, the residue was dissolved in MeOH (5.0 mL) and to this mixture was added an aqueous solution of KOH (1.6 M, 5.0 mL) at 0 °C. The mixture was stirred at ambient temperature overnight. After removal of MeOH, the aqueous layer was acidified to pH 3 with 1 M HCl and solid NaCl was added until the aqueous layer was saturated. The mixture was extracted with Et_2O (3 mL \times 5). The combined extracts were dried over Na_2SO_4 , and concentrated under reduced pressure. The residue (110mg, 56%) was spectroscopically pure without a further purification. Analytical data of 2,3-dimethylcycloprop-2-ene carboxylic acid (**22**): ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , CHCl_3 = 7.26): δ 2.00 (1H, s), 2.05 (6H, s), 11.3 (1H, brs); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , CDCl_3 = 77.00): δ 9.48, 22.79, 101.80, 183.83; HR EI MS (m/z) [M] $^+$: calcd for $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$: 112.0524, found 112.0507.

Instability to concentration

When a solution of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) (8 mg) in H_2O (0.4 mL) was lyophilized, small amount (0.2 mg) of **18** was recovered in the trap (liquid N_2 , -196 °C),

while most was polymerized and remained as colorless powder. The ESI MS analysis indicated that the non-volatile powder consisted of a mixture of polymers, observed mass numbers included 359 [4M+Na]⁺, 375 [4M+K]⁺, 443 [5M+Na]⁺, 459 [5M+K]⁺, 527 [6M+Na]⁺, 543 [6M+K]⁺, 611 [7M+Na]⁺ and 627 [7M+K]⁺, and more high molecular masses, which suggests that each polymer sustains the original skeleton.

Instability of aqueous solution of 18 and its congeners, 37 and 22

The D₂O solution of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) (0.77 M, 64.6 mg/mL) and TSP (2.9 μmol, 0.5 mg) was placed in an NMR tube and allowed to stand at ambient temperature and ¹H NMR spectra were recorded every several times. The concentration of **18** was as follows: 0.78 M after 10 min, 0.75 M after 30 min, 0.72 M after 1 h 10 min, 0.69 M after 2 h 10 min, 0.67 M after 3 h 10 min, 0.59 M after 5 h 10 min, 0.50 M after 7 h 50 min, 0.44 M after 15 h, 0.34 M after 26h, 0.23 M after 50 h, 0.18 M after 73 h 40 min, 0.12 M after 98 h, 0.10 M after 122 h, 0.09 M after 143 h, 0.07 M after 263 h, 0.04 M after 362 h. Under these conditions, the half-life of **18** was *ca.* 20 h.

The D₂O solution of 2-methylcycloprop-2-ene carboxylic acid (**37**) (0.89 M, 87.7 mg/mL) and TSP (5.8 μmol, 1.0 mg) was placed in an NMR tube and allowed to stand at ambient temperature and ¹H NMR spectra were recorded every several times. The concentrations of **37** were as follows: 0.87 M after 22 h, 0.79 M after 71 h, 0.76 M after 93 h, 0.78 M after 143 h, 0.75 M after 167 h. Under these conditions, **37** was almost no decomposition.

The saturated D₂O solution of 2,2-dimethylcycloprop-2-ene carboxylic acid (**22**) (0.25 M, 27.7 mg/mL) and TSP (5.8 μmol, 1.0 mg) was placed in an NMR tube and allowed to stand at ambient temperature and ¹H NMR spectra were recorded every several times. The concentrations of **22** were as follows: 0.24 M after 22 h, 0.25 M after 47 h, 0.25 M after 71 h, 0.25 M after 93 h, 0.23 M after 143 h, 0.25 M after 167 h. Under these conditions, the decomposition of **22** was not observed.

Reaction of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18) with thiophenol

To a solution of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) (16.0 mg, 0.190 mmol) in CDCl₃ (0.6 mL, 0.32 M) was added thiophenol (21 mg, 0.190 mmol) and the mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by PTLC (EA) to afford **85** (30 mg, 80%) as colorless solids: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, TMS = 0.00): δ 1.26 (1H, ddd, *J* = 5.0, 6.0, 8.8 Hz), 1.71 (1H, ddd, *J* = 5.0, 5.3, 8.7 Hz), 1.93 (1H, ddd, *J* = 3.6, 5.3, 8.8 Hz), 2.84 (1H, ddd, *J* = 3.6, 6.0, 8.7 Hz), 7.16–7.23 (1H, m), 7.28–7.36 (4H, m); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, CDCl₃

= 77.00): δ 17.85, 23.47, 24.05, 126.05, 127.57, 129.05, 136.31, 178.44; HR EI MS (m/z) [M]⁺: calcd for C₁₀H₁₀O₂S: 194.0401, found 194.0422.

Reaction of cycloprop-2-ene carboxylic acid (18) with cysteine

To a solution of cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**) (4.0 mg, 0.048 mmol) in H₂O (1 mL) was added L-cysteine (11 mg, 0.090 mmol) and the mixture was stirred at ambient temperature for 3 h. The reaction mixture was evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed on an anion exchange resin (IRA-45, 5 mL, acetate form). The column was washed with H₂O (25 mL) and eluted with 10% aqueous acetic acid (15 mL) and lyophilization to afford a 1:1 mixture of (1*S*,2*R*)- and (1*R*,2*S*)-diastereomers **86** (9.0 mg) as colorless solids: ¹H NMR (300 MHz, D₂O, TSP = 0.00 ppm): δ 1.24 (0.5H, ddd, J = 5.0, 5.3, 9.5 Hz), 1.25 (0.5H, ddd, J = 5.0, 5.3, 9.5 Hz), 1.48 (0.5H, ddd, J = 4.0, 5.0, 8.5 Hz), 1.51 (0.5H, ddd, J = 4.0, 5.0, 8.5 Hz), 1.84 (0.5H, ddd, J = 3.3, 4.0, 9.5 Hz), 1.85 (0.5H, ddd, J = 3.3, 4.0, 9.5 Hz), 2.54 (1H, ddd, J = 3.3, 5.3, 8.5 Hz), 3.10 (0.5H, dd, J = 7.4, 14.5 Hz), 3.13 (0.5H, dd, J = 7.4, 14.5 Hz), 3.23 (0.5H, dd, J = 4.2, 14.5 Hz), 3.24 (0.5H, dd, J = 4.2, 14.5 Hz), 3.99 (0.5H, dd, J = 4.2, 7.4 Hz), 4.00 (0.5H, dd, J = 4.2, 7.4 Hz); ¹³C NMR (75 MHz in D₂O, TSP = -2.00 ppm): δ 17.56, 18.09, 22.53, 22.64, 25.70, 26.08, 34.91, 54.62, 173.58, 179.24, 179.34; HR FAB MS (m/z) [$M+Na$]⁺: calcd for C₇H₁₁NO₄NaS, 228.0307; found 228.0289.

Lethal toxicity in mice

cycloprop-2-ene carboxylic acid (18)

18 was dissolved in H₂O (0.2 mL) and orally injected to mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC). In the case of intraperitoneal injection, the sample was dissolved in saline. When the lethal toxicity was observed within 24 h, the sample was regarded as toxic. **18** was injected at four doses (10, 50, 100, and 200 μ g/one mouse). Three mice were used for each dose of toxin **18**. High doses (50, 100 and 200 μ g) caused tremor, hair erection and decreased mobility in 3 h. After 6 h, serious condition, collapse, and tonic extension were observed. Finally all mice were died. However, at low dose (10 μ g), all mice were normal. These results showed that LD₁₀₀ (i.p., p.o.) value of **18** was 2.5 mg/kg. In the preliminary studies, histopathological changes observed in the ICR mice treated with **18** were degeneration/necrosis of the skeletal muscle in the trunk and femoral region, vacuolation of neuropil in the brain and medulla oblongata, hepatocellular vacuolation in the liver, atrophy of the spleen and thymus, and nephropathy in the kidney.

2-methylcycloprop-2-ene carboxylic acid (37)

37 was dissolved in H₂O (0.2 mL) and orally injected to mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC). When the lethal toxicity was observed within 24 h, the sample was regarded as toxic. **37** was injected at two doses (100 and 500 µg/one mouse). Three mice were used for each dose of **37**. High doses (500 µg) exhibited lethal activities. However, at low dose (10 µg), all mice were normal. These results showed that LD₁₀₀ (p.o.) value of **37** was 25 mg/kg.

2,2-dimethylcycloprop-2-ene carboxylic acid

37 (5 mg) was dissolved in H₂O (0.15 mL) and dimethylsulfoxide (0.05 mL) and orally injected to three mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC). No lethal activity was observed. These results showed that LD₁₀₀ (p.o.) value of **37** was >250 mg/kg.

Cysteine adducts (86)

37 (1 mg) was dissolved in H₂O (0.2 mL) and orally injected to three mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC). No lethal activity was observed. These results showed that LD₁₀₀ (p.o.) value of **37** was >50 mg/kg.

The plasma creatine phosphokinase (CPK) activity in mice

The MeOH extract was prepared as follows. The fruiting bodies (200 g) of *Russula subnigricans* collected in Kyoto were cut into pieces and soaked in MeOH (400 mL) overnight. After filtration, the extract was filtered through filter paper under suction and then the filtrate was concentrated under reduced pressure to give a MeOH extract (6.3 g). The MeOH extract contained no toxin (**18**) checked by ¹H NMR analysis. Twenty mice (female ddy, 19–21 g of weight, Japan SLC) were divided into 4 experimental groups as follows. Group 1: negative control group receiving H₂O ; Group 2: negative control group receiving 1 g/kg of the methanol extract which contained almost no toxin **18** prepared by concentration to dryness (corresponding to twenty times hypothetical toxic dose in a 60-kg person who ingested 100 g of fresh fruiting bodies); Group 3: positive control group receiving 70 mg/kg of *p*-phenylenediamine which is known to cause rhabdomyolysis in mice; Group 4: 5 mg/kg of synthetic cycloprop-2-ene carboxylic acid (**18**). Each sample was dissolved in H₂O (0.2 mL) and orally injected. After 4 h, the experimental animals were anesthetized with ether, and the blood samples were collected in capillary tubes from tail vein and centrifuged at 10,000 rpm to obtain plasma. The creatine kinase activity was determined with the creatine kinase reagents (Cica liquid CK, Kanto Chemical Co. Inc.). The data was shown in Table E2. Values are means ± s.e.m. Statistical analysis on the data was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA) and the post hoc Dunnett's or Tukey test using statistical software (GraphPad). A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Table E2. Creatine phosphokinase activities.

	Group 1 control H ₂ O (0.2 mL)	Group 2 control MeOH extract (1 g/kg)	Group 3 <i>p</i> -phenylenediamine (70 mg/kg)	Group 4 cycloprop-2-ene carboxylic acid (18) (5 mg/kg)
1	153	121	314	1023
2	182	163	404	1761
CPK (U/L) 3	231	168	411	2904
4	304	202	426	5127
5	326	202	426	6389
means ± s.e.m ^{a)}	240 ± 34	171 ± 15	397 ± 21	3441 ± 1012**

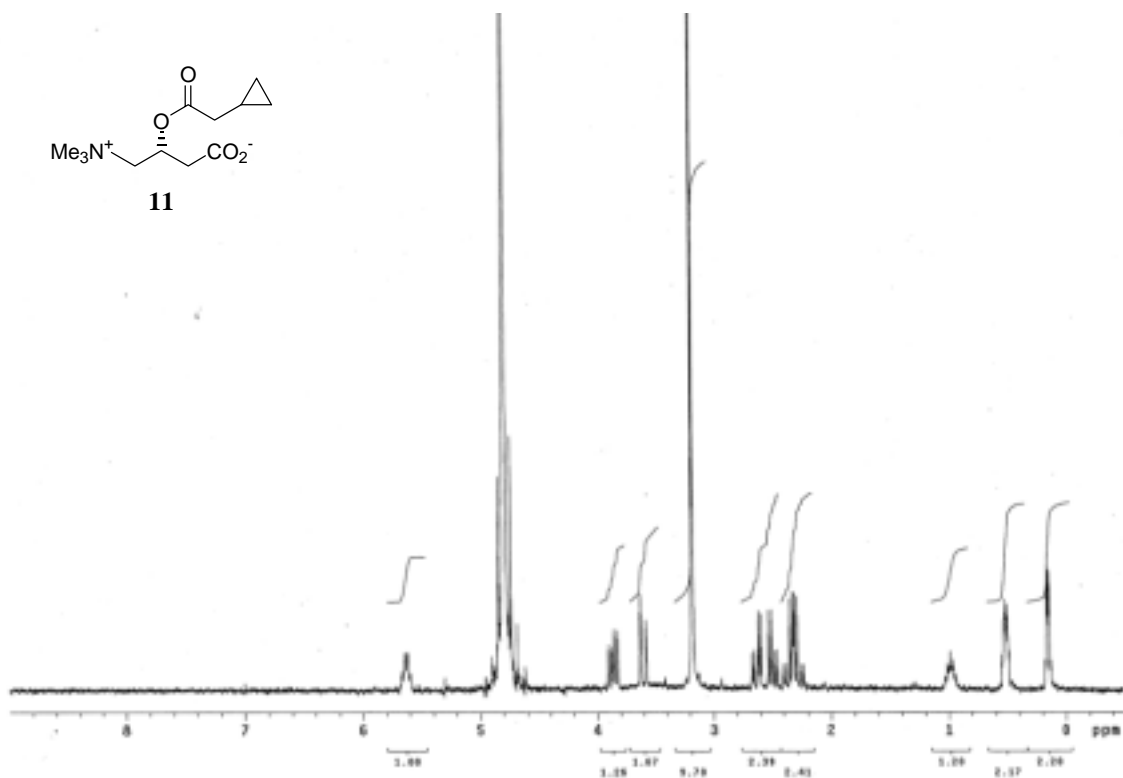
a) Significant difference from the control group. ** $P < 0.01$ (one-way ANOVA).

Antibacterial activities of 11 and 18

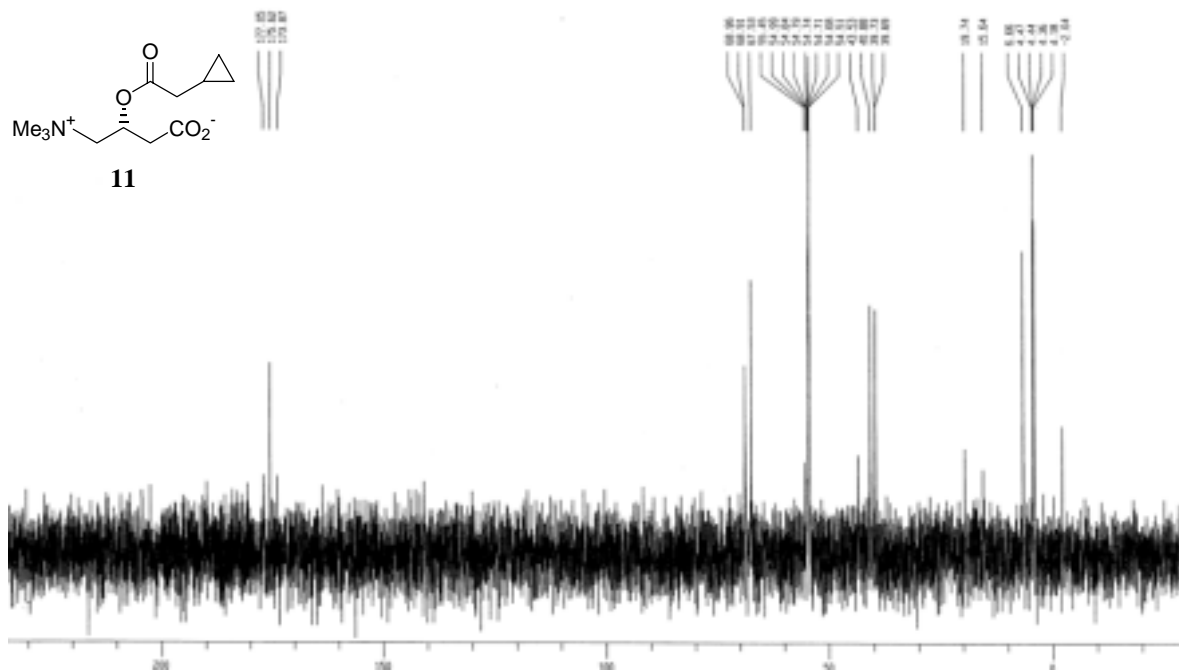
Antibacterial activities were tested against 41 species, including *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus*, *Enterococcus*, *Mycobacterium* species, using the serial agar dilution method on the Muller Hinton agar at 37 °C for 18 or 48 h. All MIC were 100 or larger than 100 µg/mL.

cytotoxicities of 18

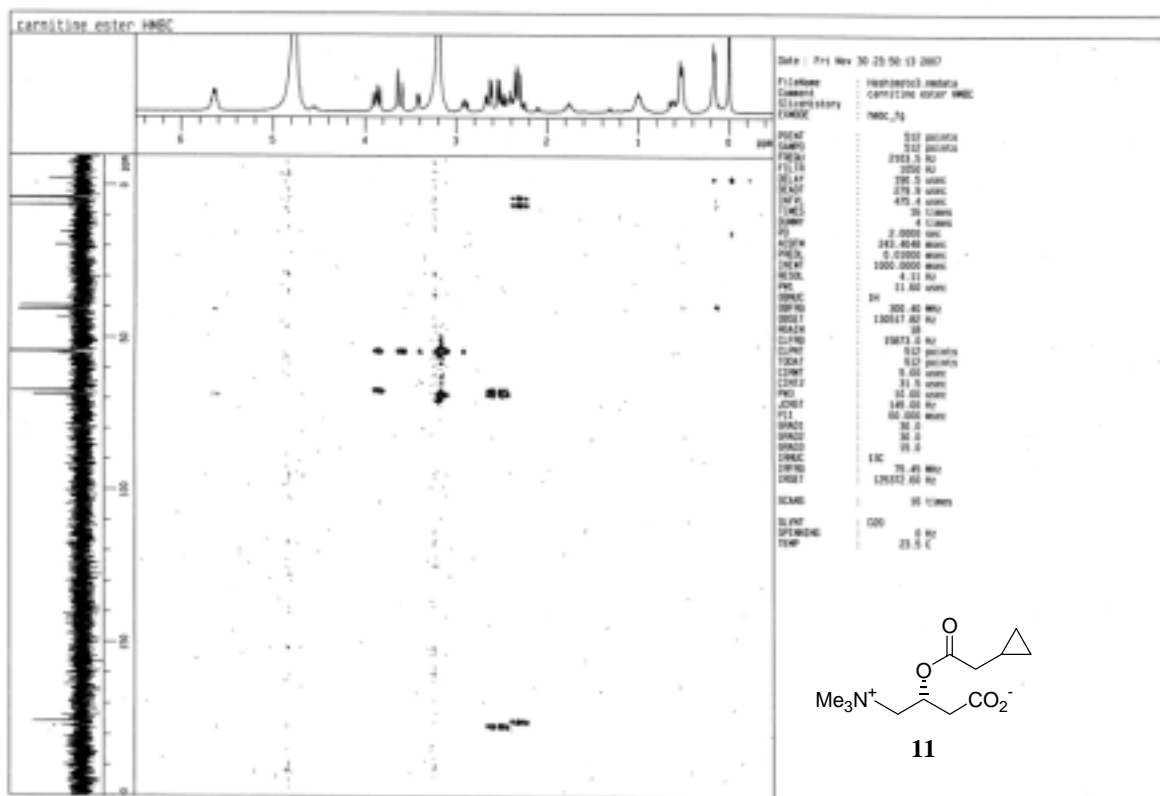
Cytotoxicities were tested against cultured mammalian cell lines including human astrocytoma, human neuroblastoma, human synovial sarcoma, mouse neuroblastoma and dorsal root ganglion neuron hybridoma and mouse hypothalamic cells using MTT assay. Even though at higher concentration (100 µg/mL), none of effects was observed.



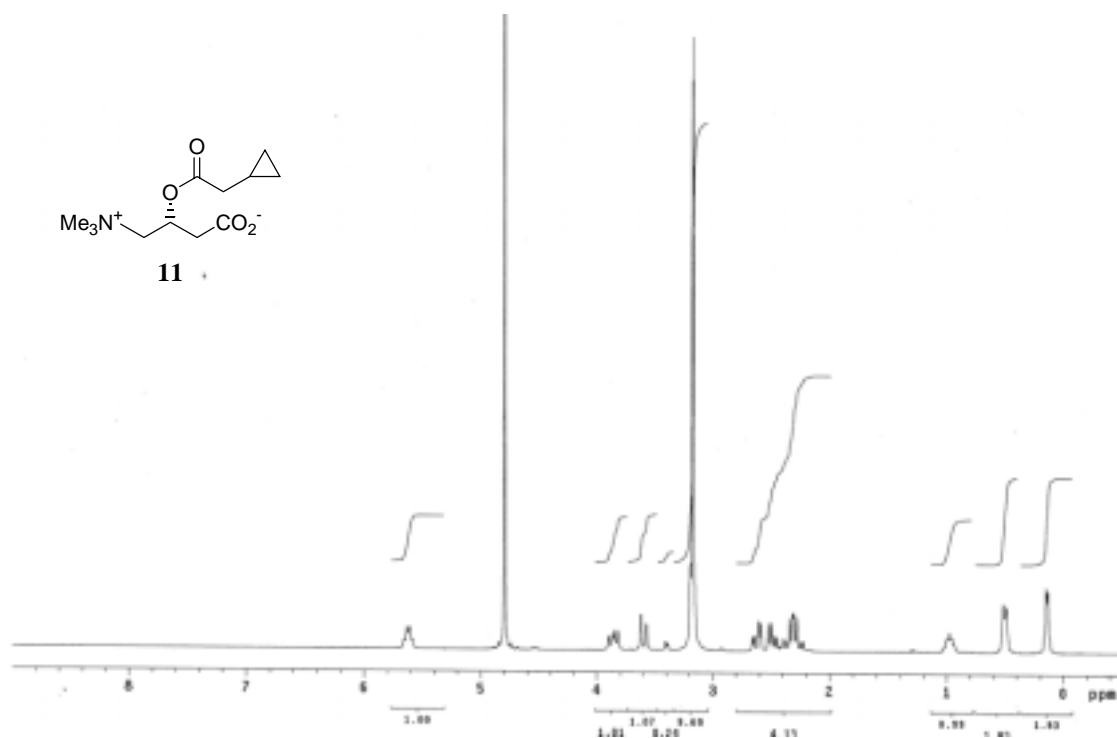
^1H NMR spectrum of 11 (natural) (300 MHz, D_2O)



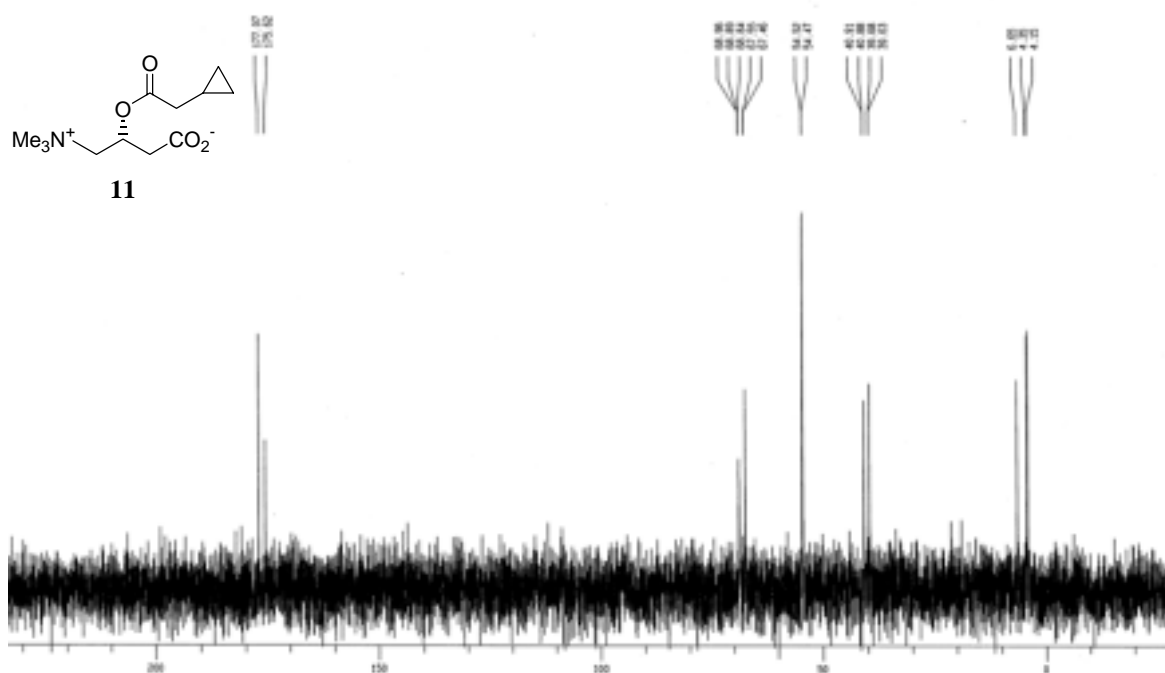
^{13}C NMR spectrum of 11 (natural) (75 MHz, D_2O)



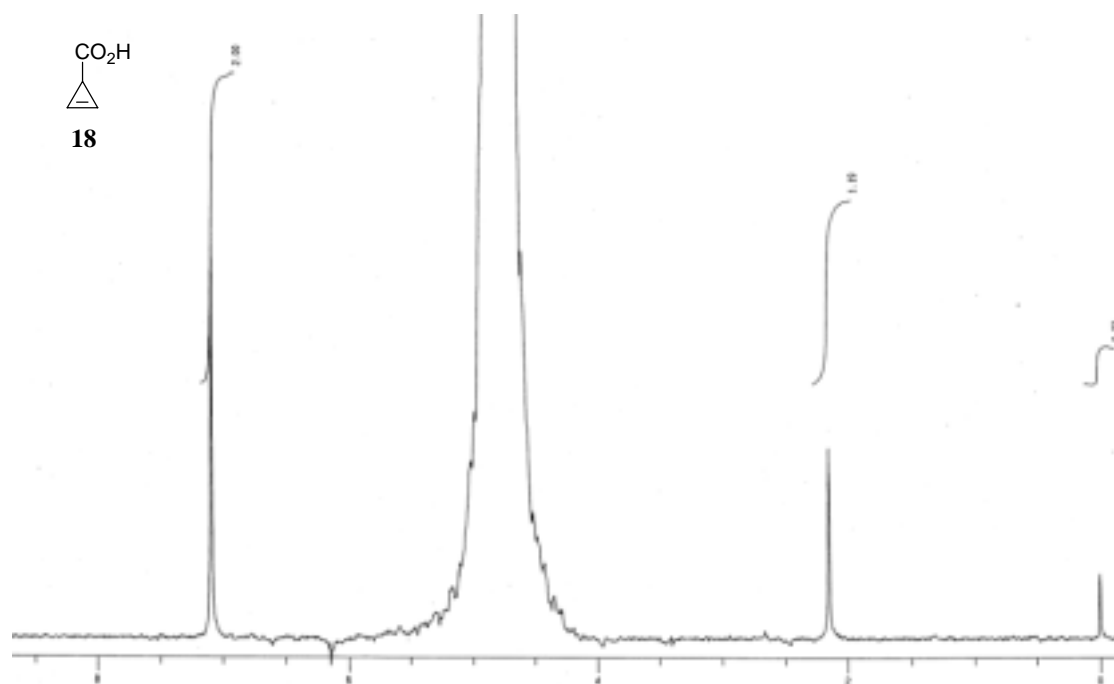
HMBC spectrum of 11 (natural) (300 MHz, D₂O)



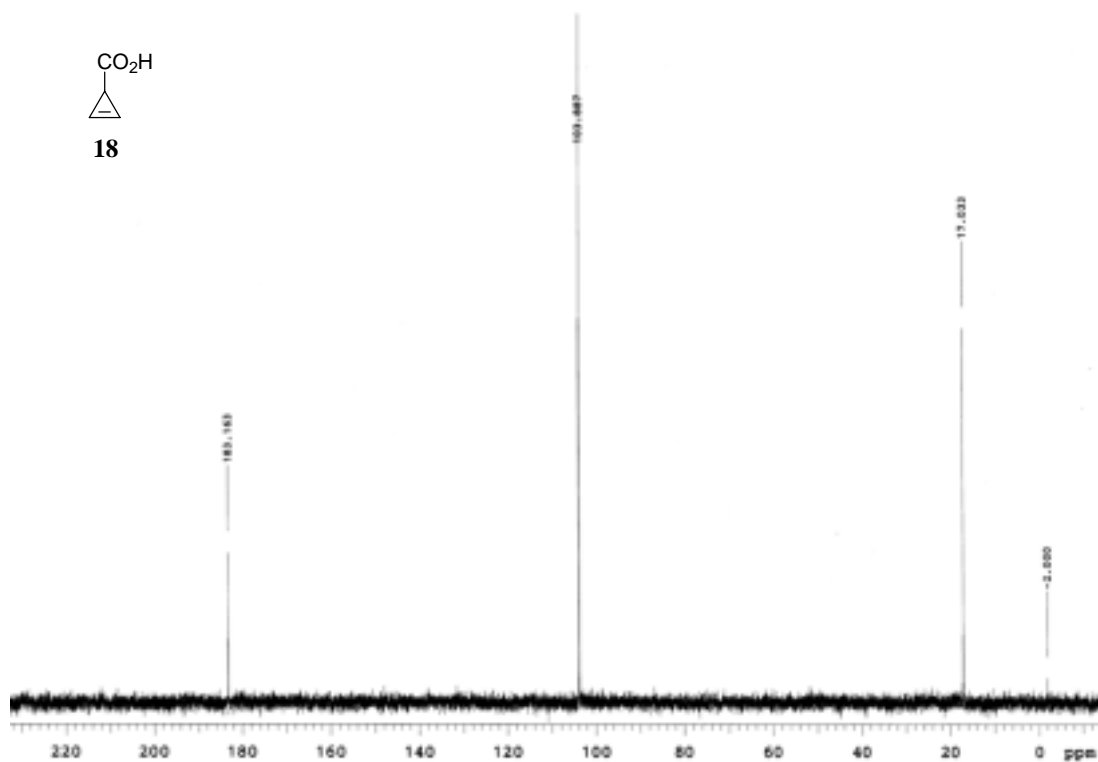
¹H NMR spectrum of 11 (synthetic) (300 MHz, D₂O)



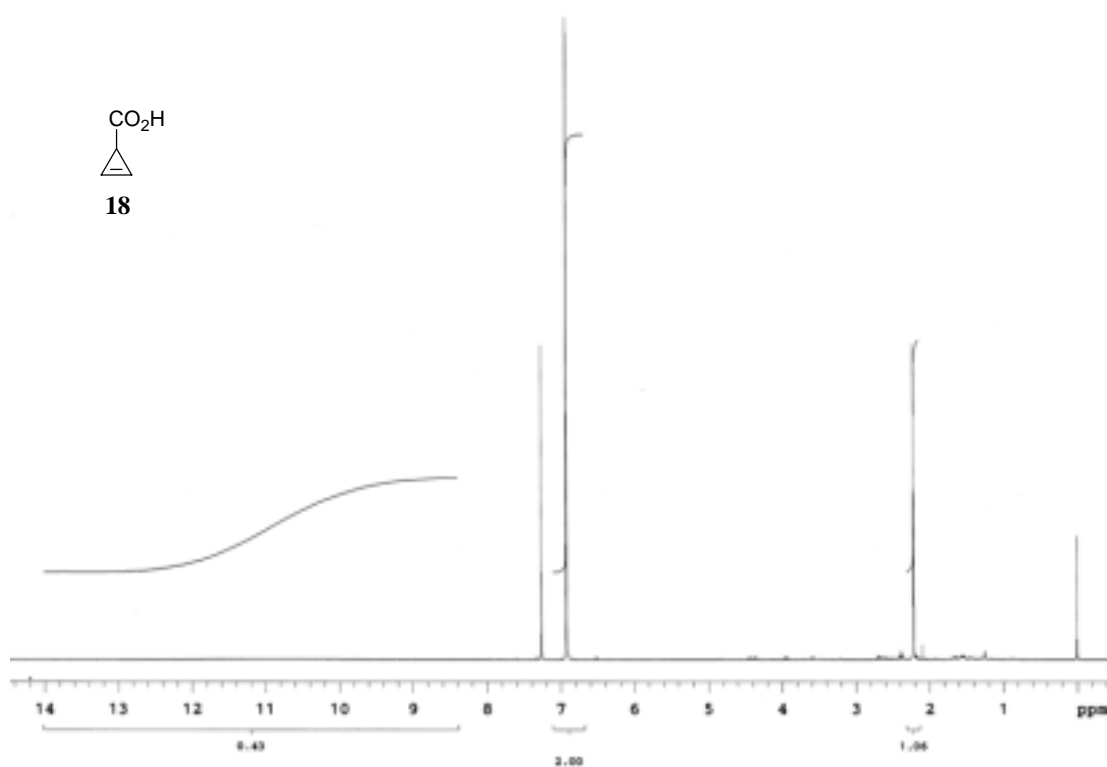
^{13}C NMR spectrum of 11 (synthetic) (75 MHz, D_2O)



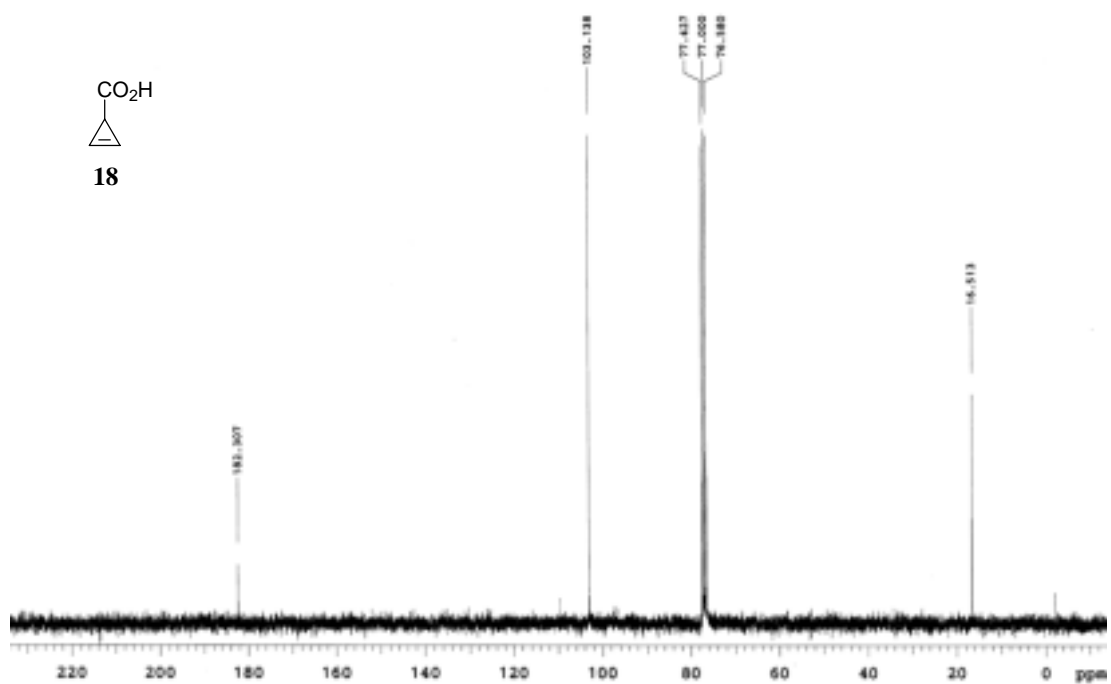
^1H NMR spectrum of 18 (natural) (300 MHz, $\text{D}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 5$)



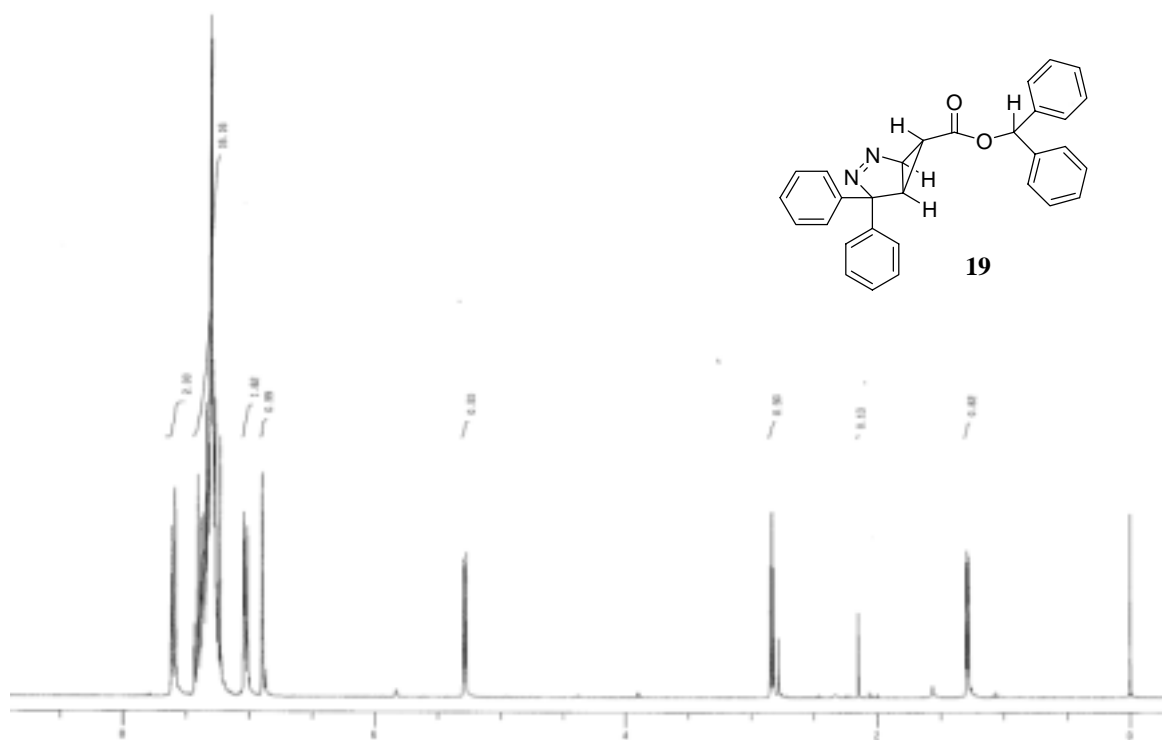
^{13}C NMR spectrum of 18 (natural) (75 MHz, $\text{D}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 5$)



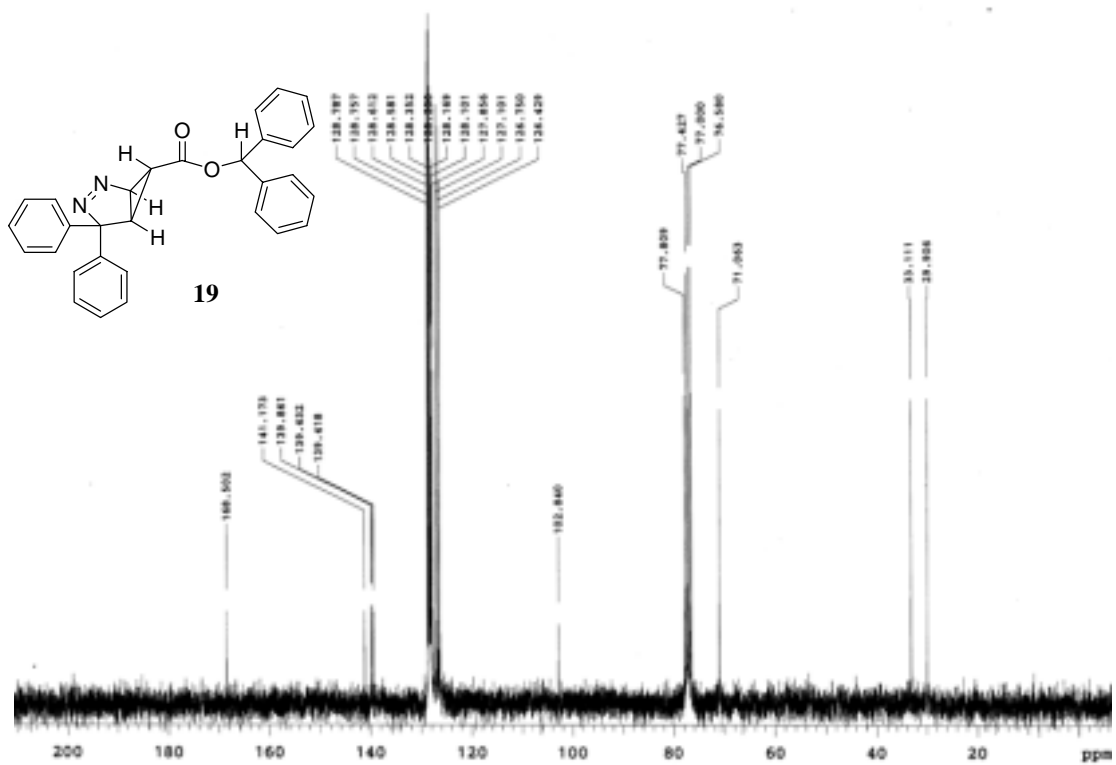
^1H NMR spectrum of 18 (natural) (300 MHz, CDCl_3)



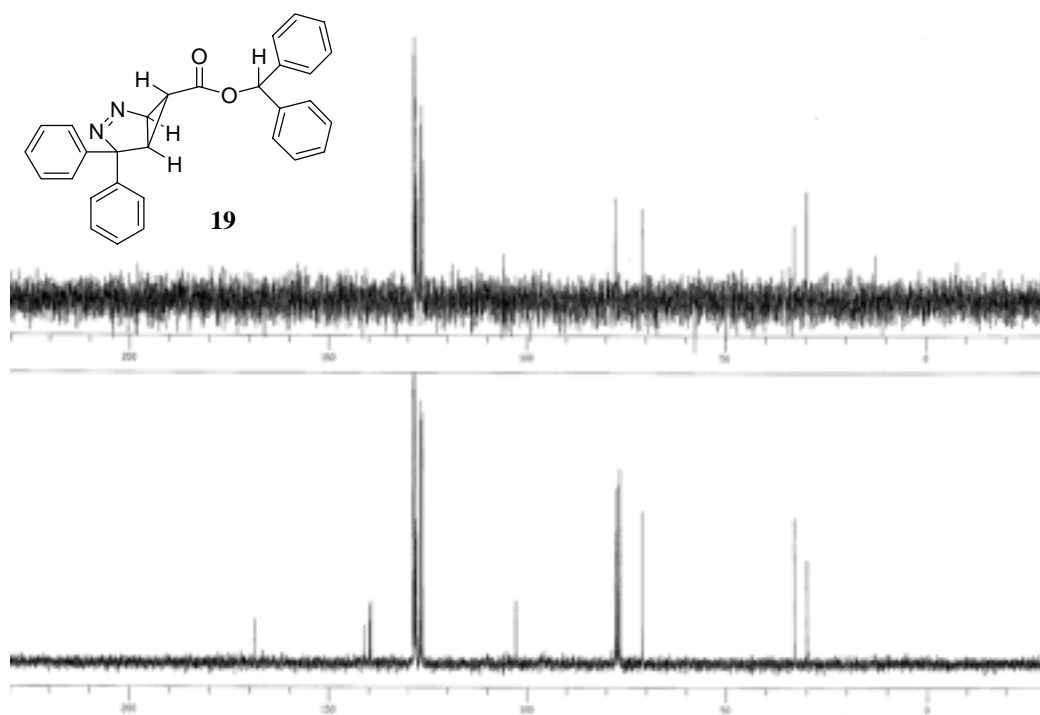
^{13}C NMR spectrum of 18 (natural) (75 MHz, CDCl_3)



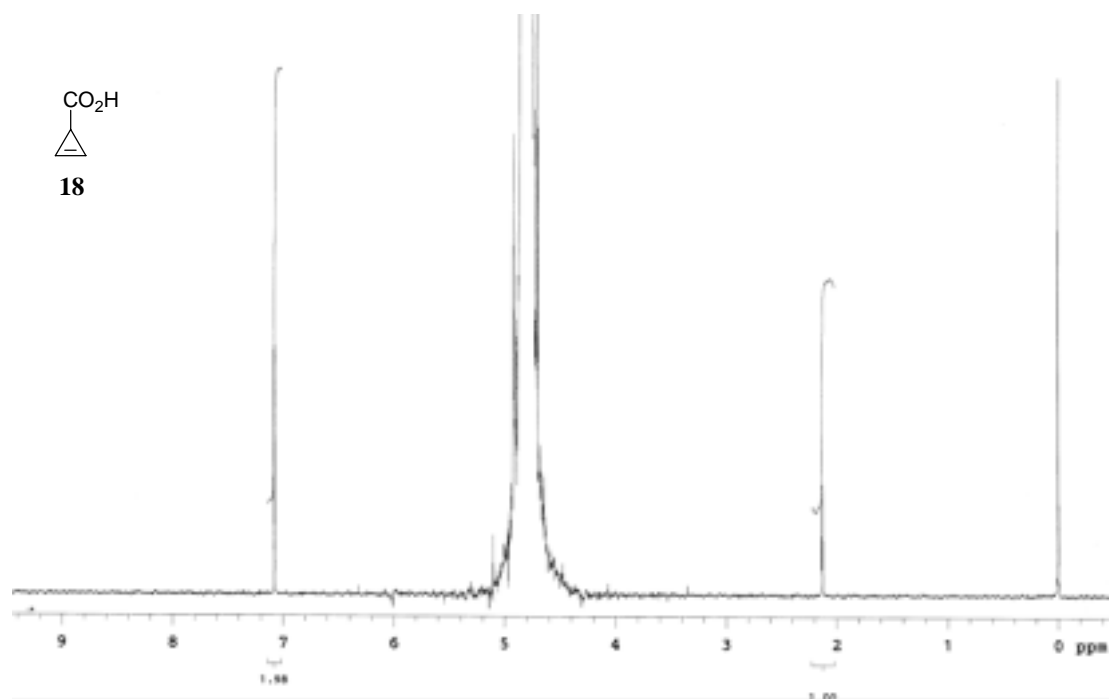
^1H NMR spectrum of 19 (300 MHz, CDCl_3)



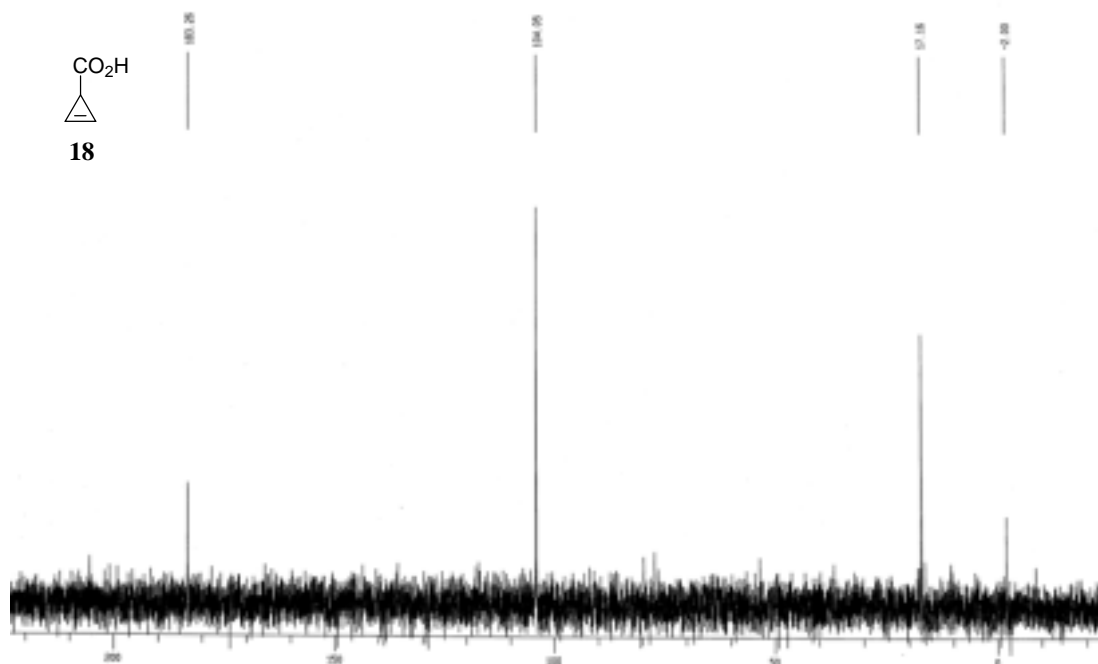
¹³C NMR spectrum of **19** (75 MHz, CDCl₃)



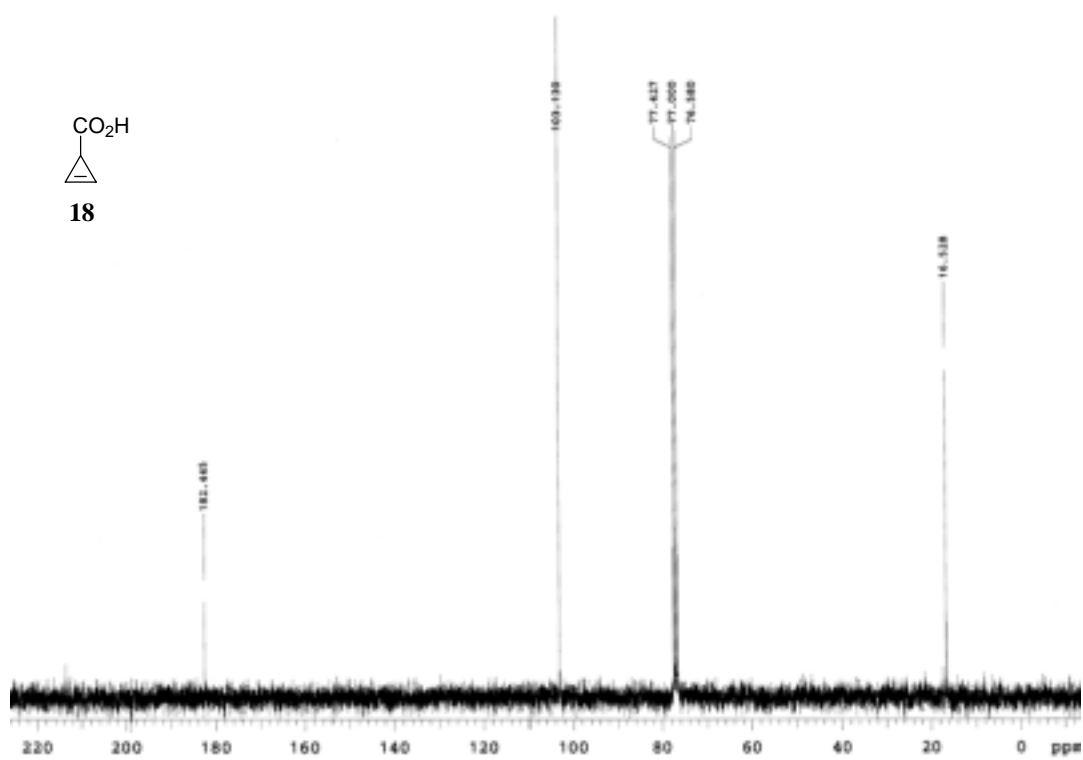
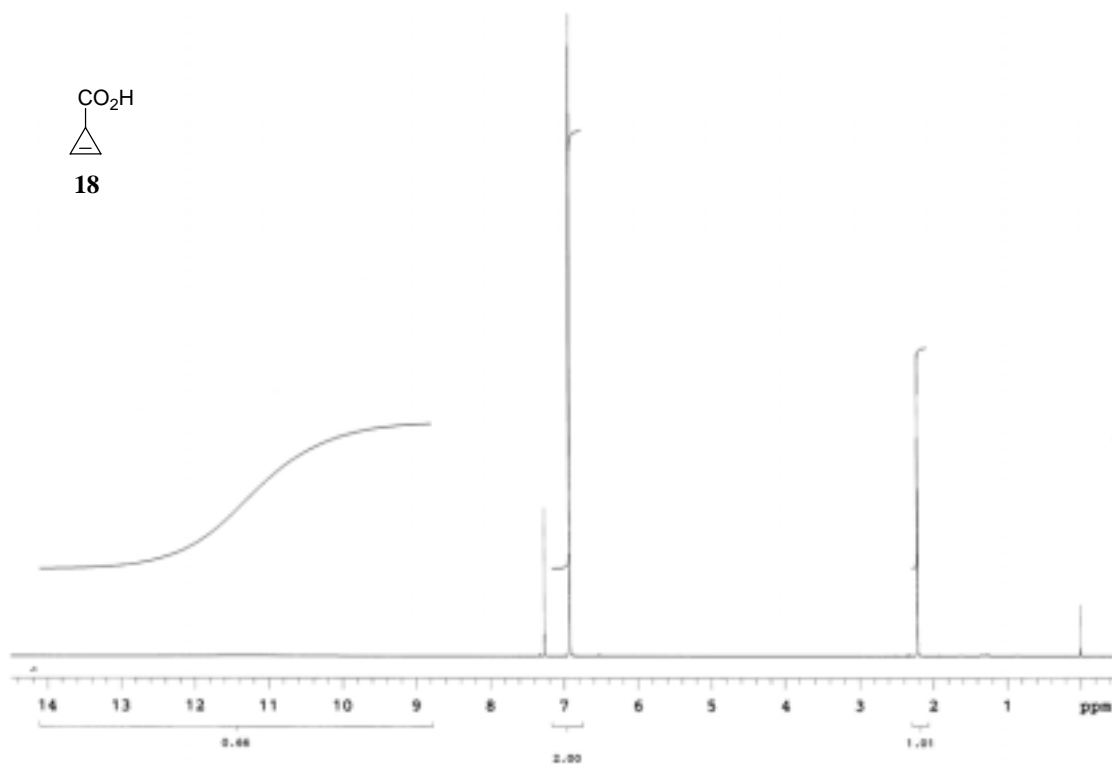
¹³C DEPT spectrum of **19** (75 MHz, CDCl₃)

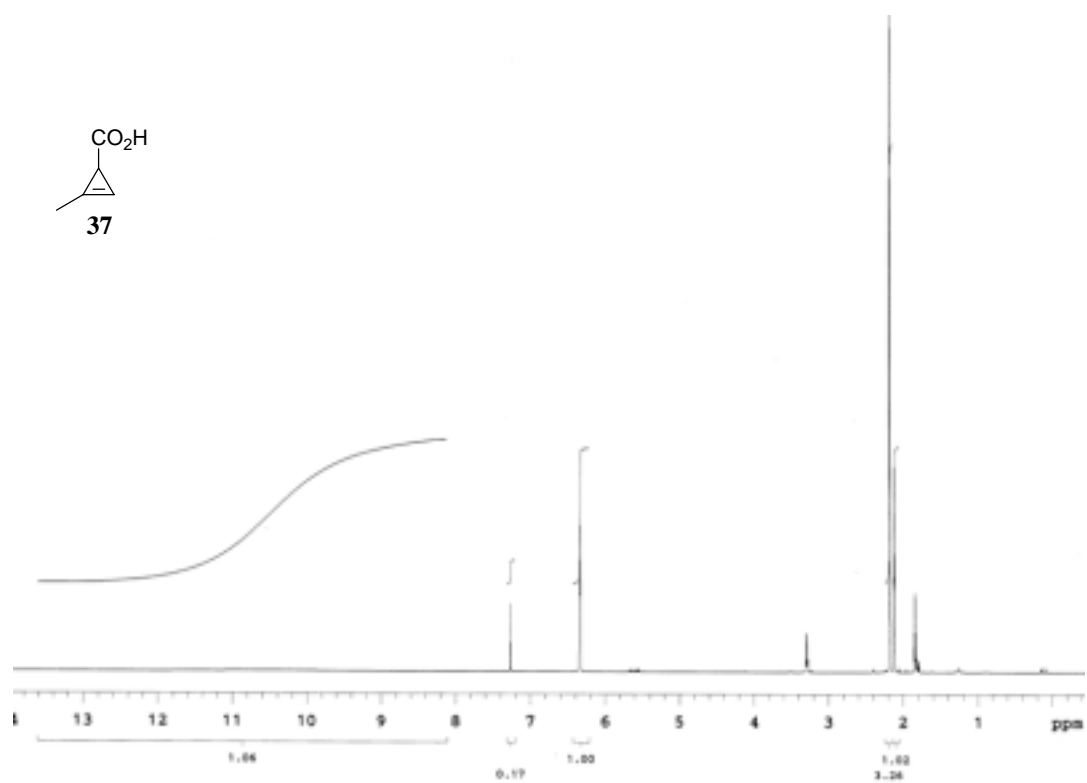


^1H NMR spectrum of 18 (synthetic) (300 MHz, $\text{D}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 5$)

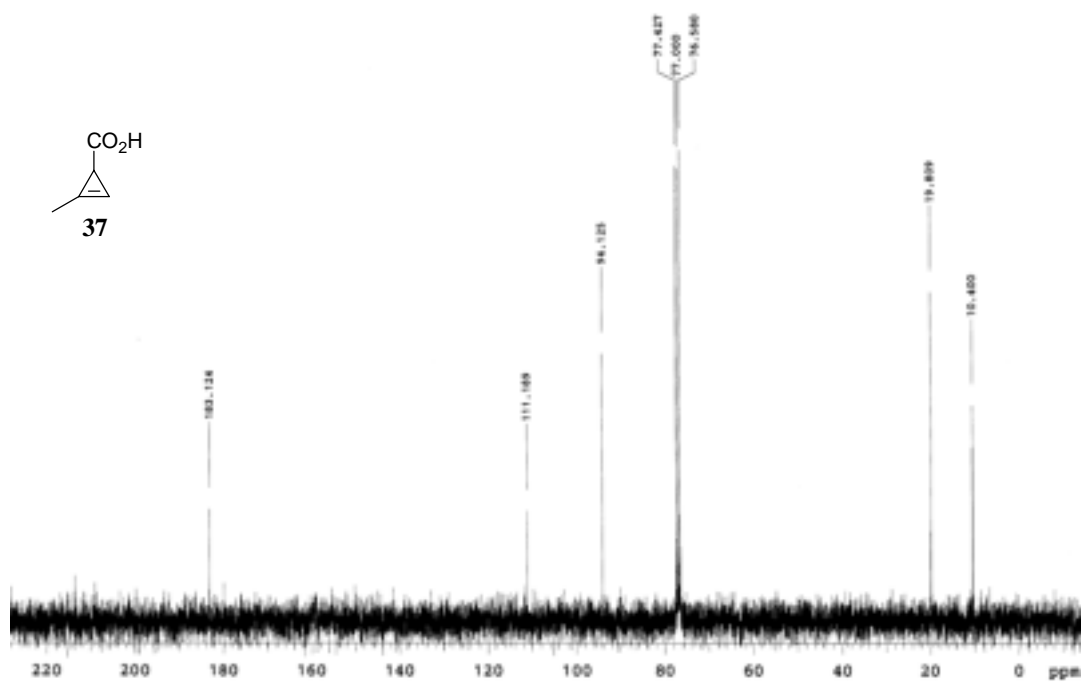


^{13}C NMR spectrum of 18 (synthetic) (75 MHz, $\text{D}_2\text{O} : \text{H}_2\text{O} = 1 : 5$)

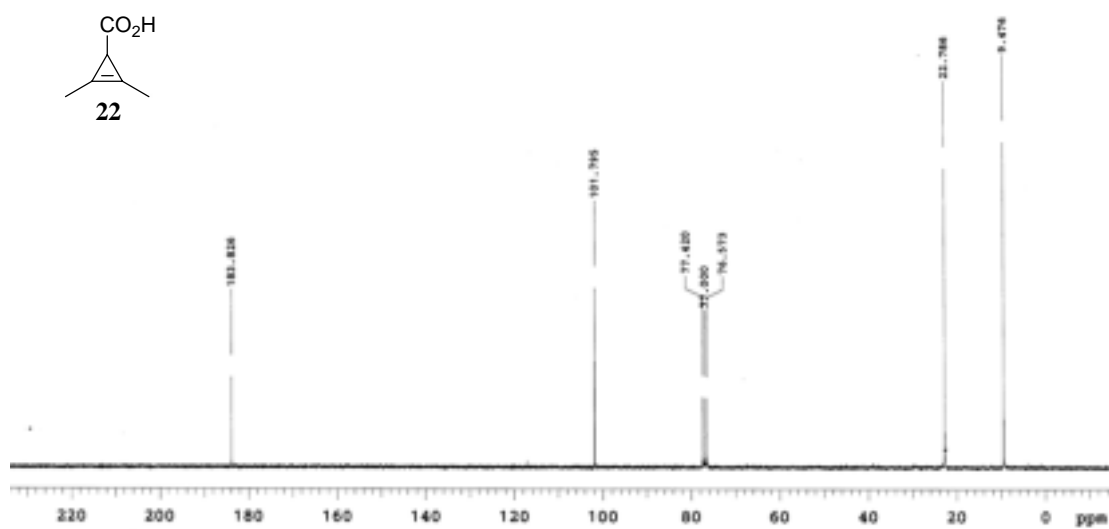
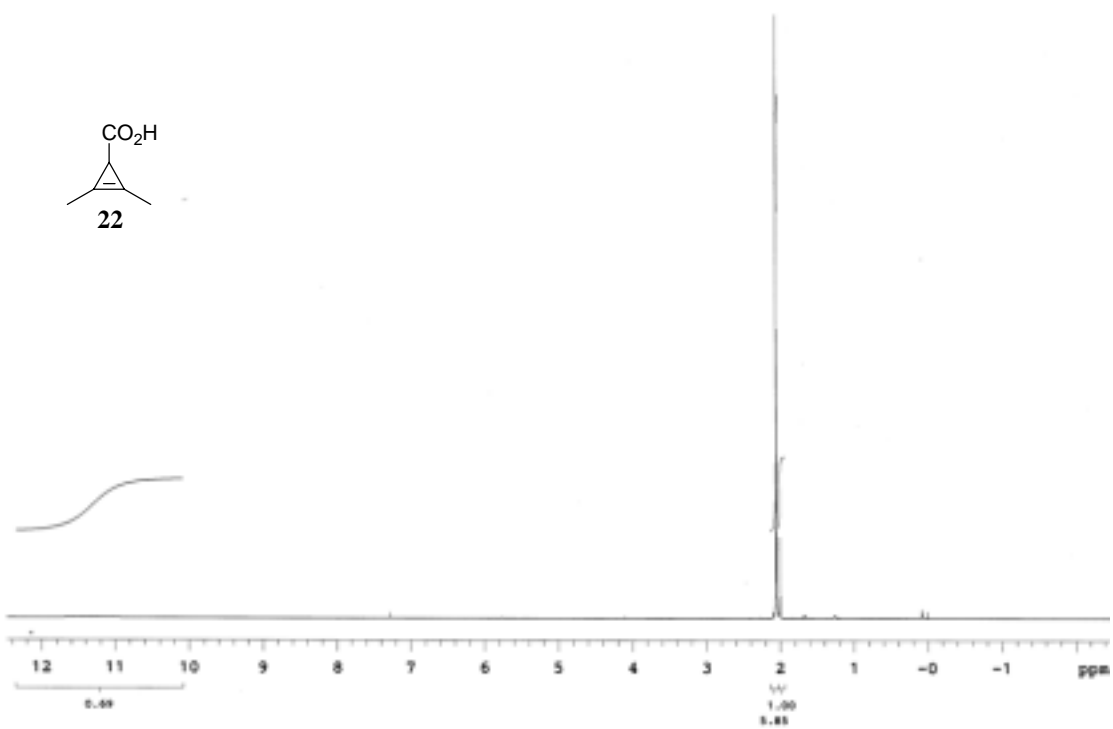


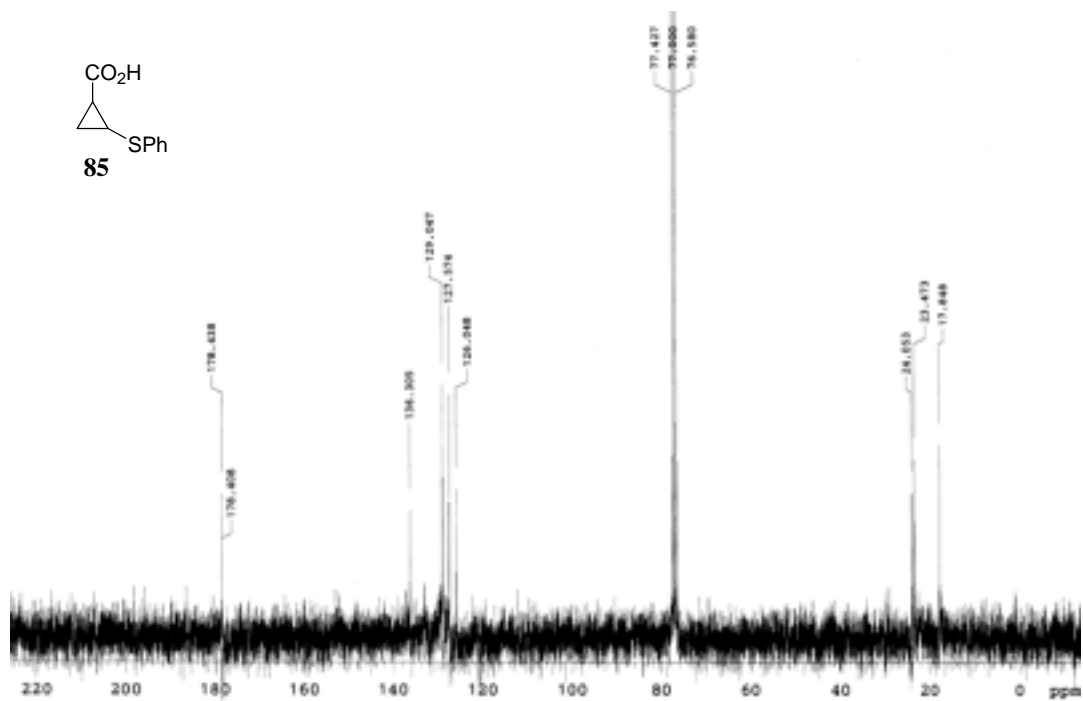
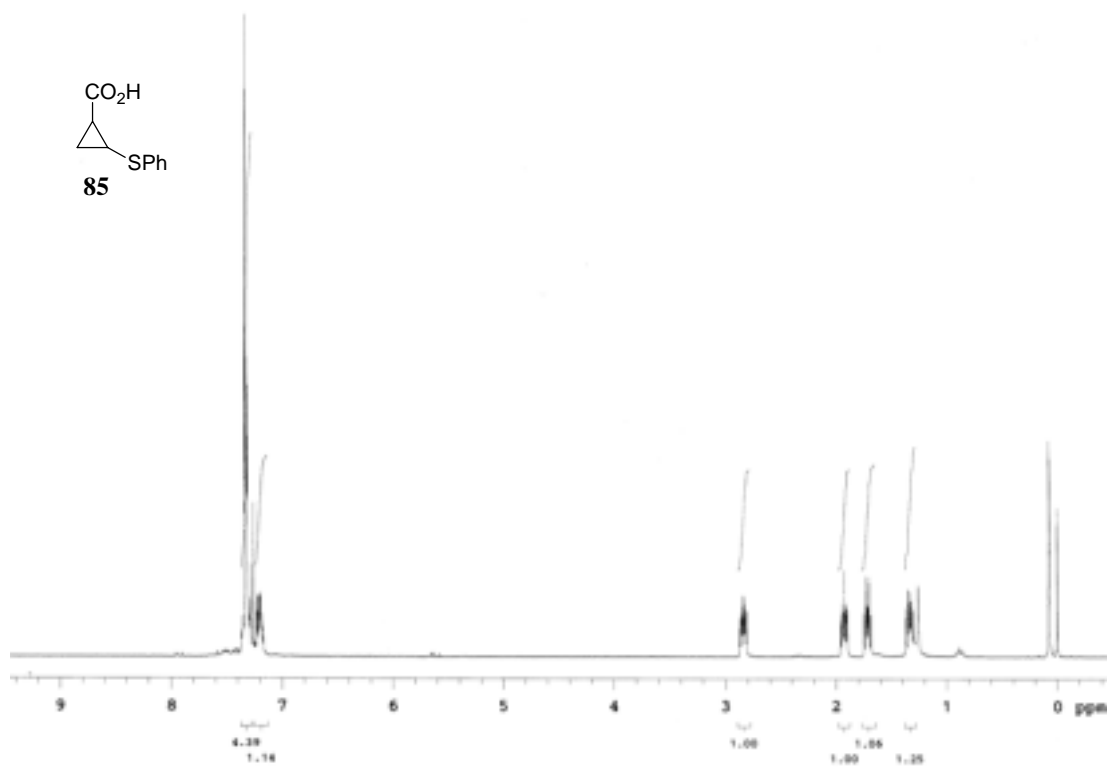


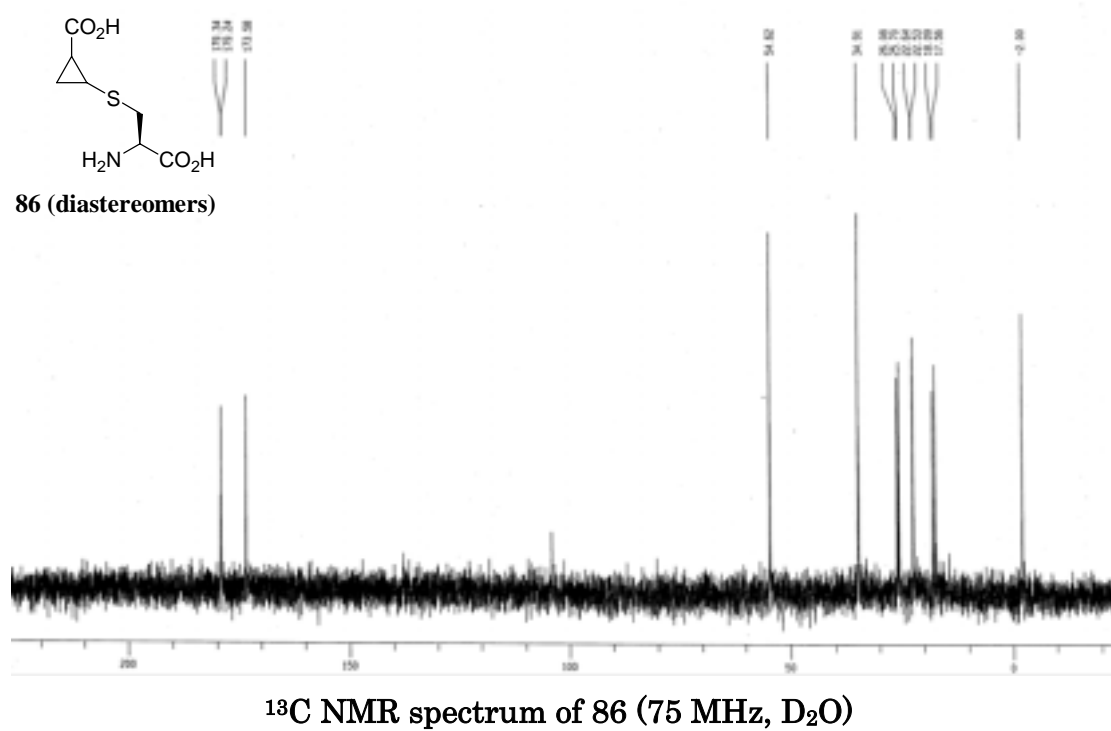
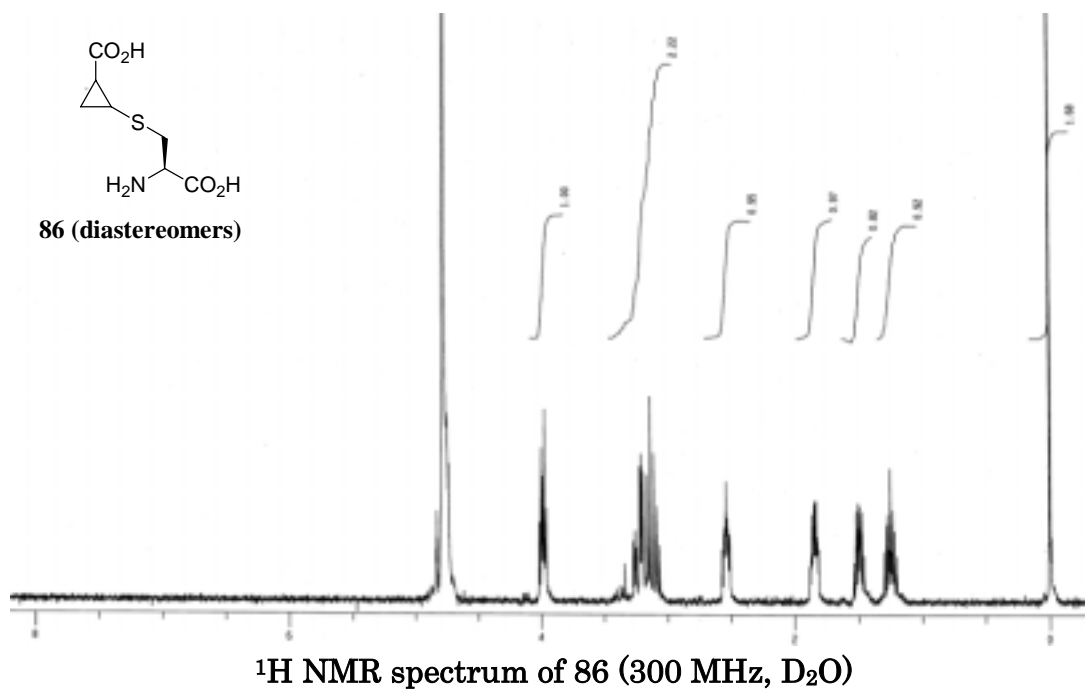
¹H NMR spectrum of 37 (300 MHz, CDCl₃)



¹³C NMR spectrum of 37 (75 MHz, CDCl₃)







参考文献

緒論

- 1) Matsuura, M.; Yamada, M.; Saikawa, Y.; Miyairi, K. Okuno, T.; Konno, K.; Uenishi, J.; Hashimoto, K.; Nakata, M. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 893–898.
- 2) Matsuura, M.; Saikawa, Y.; Inui, K.; Nakae, K.; Igarashi, M.; Hashimoto, K.; Nakata, M. *Nat. Chem. Biol. in press*.

第一章

- 3) 長沢栄史監修「日本の毒きのこ」 p178 (学習研究社、東京、**2003**)
- 4) Nagasawa, E. *Rep. Tottori Mycol. Inst.* **1995**, *33*, 1–6.
- 5) 「全国食中毒事件録」 p54 (日本食品衛生協会、東京、**1974**)
- 6) Izawa, M.; Kawashima, K. *MSJ News* **1985**, 13–15.
- 7) a) 「全国食中毒事件録」 p206 (日本食品衛生協会、東京、**1990**). b) 「全国食中毒事件録」 p112 (日本食品衛生協会、東京、**1991**)
- 8) a) 「全国食中毒事件録」 p137 (日本食品衛生協会、東京、**1997**). b) 「全国食中毒事件録」 p117 (日本食品衛生協会、東京、**1999**). c) 「全国食中毒事件録」 p98 (日本食品衛生協会、東京、**2002**). d) 日本食品衛生協会 (<http://www.n-shokuei.jp>)
- 9) Kretz, O.; Creppy, E. E.; Boulanger, Y.; Dirheimer, G. *Arch. Toxicol. Suppl.* **1989**, *13*, 422–427.
- 10) Razanamparany, J. L.; Creppy, E. E.; Perreau-Bertrand, J.; Boulanger, Y.; Dirheimer, G. *Biochimie* **1986**, *68*, 1217–1223.
- 11) Watanabe, R.; Kita, M.; Uemura, D. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6501–6504
- 12) Miyairi, K.; Ogasawara, A.; Tonouchi, A.; Hosokawa, K.; Kudou, M.; Okuno, T. *J. Appl. Glycosci.* **2004**, *51*, 1–7.
- 13) Kretz, O.; Reinbolt, J.; Creppy, E. E.; Dirheimer, G. *Toxicol. Lett.* **1992**, *64/65*, 763–766.
- 14) a) 堀勝治著「アインザイムの分子生物学」 p125 (共立出版、東京、**1994**). b) 山岸秀夫、梁永弘訳「遺伝子重複による進化」(岩波書店、東京、**1977**). c) 高木淳一訳「ポストゲノム時代のタンパク質科学」 p153 (化学同人、東京、**2007**).
- 15) Kretz, O.; Creppy, E. E.; Dirheimer, G. *Toxicol.* **1991**, *66*, 213–224.
- 16) コンカナバリン A はマンノースに対する親和性の高いレクチンである。
- 17) Kretz, O.; Creppy, E. E.; Dirheimer, G. *Xenobiotica* **1991**, *21*, 65–73.
- 18) Kretz, O.; Barbieri, L.; Creppy, E. E.; Dirheimer, G. *Toxicol.* **1992**, *73*, 297–304.

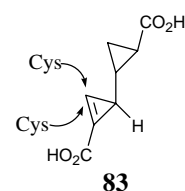
- 19) 船津軍喜「続天然物と生物活性」 p21-36 (東京大学出版会、東京、1984)
- 20) a) Gachet, C.; Ennamany, R.; Kretz, O.; Ohlmann, P.; Krause, C.; Creppy, E. E.; Dirheimer, G.; Cazenave, J. P. *Human & Experimental Toxicol.* **1996**, *15*, 26-29. b) Ennamany, R.; Bingen, A.; Creppy, E. E.; Kretz, O.; Gut, J. P.; Dubuisson, L.; Balabaud, C.; Sage, P. B.; Kirn, A. *Human & Experimental Toxicol.* **1998**, *17*, 620-624.
- 21) a) Basset, L.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Counord, J.; Andrieux, M.; Creppy, E. E. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1991**, *130*, 39-45. b) Basset, L.; Ennamany, R.; Portail, J. P.; Kretz, O.; Deffieux, G.; Badoc, A.; Guillemain, B.; Creppy, E. E. *Toxicol.* **1995**, *103*, 121-125.
- 22) Ennamany, R.; Marzetto, S.; Saboureau, D.; Creppy, E. E. *Cell Biol. Toxicol.* **1995**, *11*, 347-354.

第二章

- 23) 長沢栄史監修 「日本の毒きのこ」 p46 (学習研究社、東京、2003)
- 24) 奥沢康正、久世幸吾、奥沢淳治 共編著 「毒きのこ今昔」 p119-122 (恩文閣出版、京都、2004)
- 25) 「全国食中毒事件録」 p37, 38 (日本食品衛生協会、東京、1958)
- 26) 「全国食中毒事件録」 p58 (日本食品衛生協会、東京、1972)
- 27) 日本食品衛生協会 (<http://www.n-shokuei.jp>)
- 28) a) Takahashi, A.; Agatsuma, T.; Matsuda, M.; Ohta, T.; Nunozawa, T.; Endo, T.; Nozoe, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 3185-3188. b) Takahashi, A.; Agatsuma, T.; Ohta, T.; Nunozawa, T.; Endo, T.; Nozoe, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1726-1729.
- 29) Ohta, T.; Takahashi, A.; Matsuda, M.; Kamo, S.; Agatsuma, T.; Endo, T.; Nozoe, S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5223-5226.
- 30) Kusano, G.; Ogawa, H.; Takahashi, A.; Nozoe, S.; Yokoyama, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 3482-3486.
- 31) Kusano, G. *Shinkei Seishin Yakuri* **1997**, *19*, 251.
- 32) メタノール抽出物を、活性炭で精製し、市販のマンニトールと ^1H NMR スペクトルが一致したことから、ヘキサアセテート体に導き、旋光度を測定することで D-マンニトールであることを確認した。
- 33) 林孝三著「植物色素」 p48 (養賢堂、東京、1988)
- 34) Kawagishi, H.; Murakami, H.; Sakai, S.; Inoue, S. *Phytochem.* **2006**, *67*, 2676-2680.
- 35) 滝田智久「天然有機化合物実験法」 p53 (講談社、東京、1977)
- 36) Deen, M. L. *Synthesis* **1982**, 701-716.
- 37) Gasaman, P. G.; Greenlee, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 980-982.

- 38) Razin, V. V.; Yakovlev, M. E.; Shataev, K. V.; Selivanov, S. I. *Russ. J. Org. Chem.* **2004**, *40*, 1027–1032.
- 39) Salauen, J.; Baird, M.S. *Curr. Med. Chem.* **1995**, *2*, 511–542.
- 40) Nunn, J. R. *J. Chem. Soc.* **1952**, 313–318.
- 41) Macfarlane, J. J.; Shenstone, F. S.; Vickery, J. R. *Nature*, **1957**, *179*, 830–831.
- 42) Jevans, A. W.; Hopkins, C. Y. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *18*, 2167–2170.
- 43) Nakatani, M.; Hase, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1992**, *64*, 2084–3088.
- 44) Fattorusso, E.; Magno, S.; Mayol, L.; Santacroce, C.; Sica, D. *Tetrahedron* **1975**, *31*, 1715–1716.
- 45) Li, L. N.; Li, H.-T.; Lang, R. W.; Itoh, T.; Sica, D.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6726–6732.
- 46) Itoh, T.; Sica, D.; Djerassi, C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 890–892.
- 47) Dolgij, I. E.; Okonnishnikova, G. P.; Nefedov, O. M. *Russ. Chem. Bull.* **1970**, *19*, 204–205.
- 48) Nefedov, O. M.; Dolgij, I. E.; Okonnishnikova, G. P.; Schwedova, I. B. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 929–930.
- 49) Dolgij, I. E.; Okonnishnikova, G. P.; Nefedov, O. M. *Russ. Chem. Bull.* **1979**, 765–771.
- 50) Liao, L. A.; Zhang, E.; Yan, N.; Golen, J. A.; Fox, J. M. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 1803–1816.
- 51) Grichko, V. *Russ. J. Plant Physiol.* **2006**, *53*, 523–529.
- 52) Kimura, K.; Horie, S.; Minato, I.; Odaira, Y. *Chem. Lett.* **1973**, 1209–1212.
- 53) Myhre, P. C.; Maxey, C. T.; Bebout, D. C.; Swedberg, S. H.; Patersen, B. L. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3417–3421.
- 54) Shapiro, E. A.; Kalinin, A. V.; Nefedov, O. M. *Org. Prep. Proc. Int.* **1992**, *24*, 517–520.
- 55) Baldwin, J. E.; Villarica, K. A. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 186–190.
- 56) Yan, N.; Liu, X.; Pallerla, M. K.; Fox, J. M. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4283–4286.
- 57) 塩化カリウム(500 mg)を TOYOPEARL HW40S(1.1 I.D. × 40 cm)にてゲルろ過を行ったところ、fr 19–21 に溶出された(1 fr = 6 mL)。一方、**18** は fr 30 以降に溶出されることから、この精製によって、毒成分 **18** と塩化カリウムは分離できた。
- 58) Zefirov, N. S.; Averina, N. V.; Boganov, A. M.; Laryukova, Z. A.; Rashchupkina, Z. A.; Terent'ev, P. B.; Sharbatyan, P. A. *J. Org. Chem. USSR (English. Transl.)*, **1981** 1291–1300.
- 59) Schlatter, M. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63*, 1733–1737.
- 60) Wiberg, K. B.; Bartley, W. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6375–6380.
- 61) Dowd, P.; Gold, A. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 85–86.

- 62) Fisher, F.; Applequist, D. E. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2089–2090.
- 63) Weigert, F. J.; Baird, R. L.; Shapley, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 6630–6635.
- 64) Lee, G.-A.; Chang, C.-Y. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8949–8951.
- 65) Closs, G. L.; Closs, L. E.; Boll, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 3796–3800.
- 66) Komatsu, K.; Niwa, T.; Akari, H.; Okamoto, K. *J. Chem. Res. (s)* **1985**, 252–253.
- 67) Garratt, P. J.; Tsotinis, A. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 84–88.
- 68) チオフェノールの付加反応は、**18** が 0.3 M の時には 30 分で約 30% が付加を受ける。濃度が下がると反応速度は下がり、12 時間後には約 60% 程度の変換率であった。このことから、反応液を濃縮する際の濃度上昇により反応はさらに進行したと考えている。また、システインの場合は、**18** を 0.05 M 溶液で行ったため、システイン付加は主に濃縮する際に進行していると考えている。
- 69) システインはチオフェノールに比べ、反応性が低く、過剰量必要であった。システインを等量加えた場合、より求核剤に対して反応性の良い α, β -不飽和カルボン酸を有する 2 量体 **83** に対して優先的に付加反応が進行し、2 量体 **83** への付加体が得られたと考えられる。しかしながら、2 量体にシステインが付加したと推定している化合物は複雑な立体異性体混合物であったことから、構造決定には至らなかった。
- 70) Quintana, J.; Barrot, M.; Fabrias, G.; Camps, F. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 10187–10198.
- 71) Reiser, R.; Raju, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, *17*, 8–11.
- 72) Kircher, H. W. *J. Am. Oil Chem.* **1964**, *17*, 4–8.
- 73) Jeffcoat, R.; Pollard, M. R. *Lipids* **1977**, *12*, 480–485.
- 74) Iwaki, M. *化学と生物* **1991**, *29*, 279–281.
- 75) a) Halton, B.; Banwell M. G. In *The chemistry of cyclopropyl group*; Rapport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York, **1987**; pp 1293. b) Prinzbach, H.; Fischer, U. *Helv. Chim. Acta.* **1967**, *50*, 1669–1692. c) Ciabattini, J.; Kocienski, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 6534–6535. d) Friedrich, L. E.; Cormier, R. A. *Tetrahedron Lett.* **1971**, *49*, 4761–4764.
- 76) a) 「別冊日本臨床 骨格筋症候群 下巻」 p235–238 (日本臨床社、大阪、**2001**). b) Penn, A.S. in *Myology*; Engel, A.G.; Franzini-Armstrong, C. Eds.; McGraw-Hill, New York, **1994**; Vol. 2, pp1679–1696.
- 77) a) Saviuc, P.; Danel, V. *Toxicol. Rev.* **2006**, *25*, 199–209. b) Bedry, R.; Baudrimon, I.; Deffieux, G.; Creppy, E. E.; Pomies, J. P.; Ragnaud, J. M.; Dupon, M.; Neau, D.; Gabinski, C.; Witte, S. D.; Chapalain, J. C.; Godeau, P. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 798–802.
- 78) Lee, P.-T.; Wu, M.-L.; Tsai, W.-J.; Ger, J.; Deng, J.-F.; Chung, H.-M. *Am. J. Kidney*



Dis. **2001**, *38*, E17.

79) テルモ社製のウリエース Kc[®] (製品コード: UA-C03K5)を用いた。この試験紙は尿中のヘモグロビンやミオグロビンがペルオキシダーゼ活性を有することを利用して、試験紙に含まれるトリジン(還元型、無色)を酸化し発色させることで、血尿の有無を判断できる。今回マウスの尿では発色を観察することができなかったが、糞に含まれる餌由来の酸化酵素が擬陽性を示すため、マウスの尿を採取する際には糞が混じる可能性があることから、血尿の判断は慎重に行う必要がある。

80) Averbukh, Z.; Modai, D.; Leonov, Y.; Weissgarten, J.; Lewinsohn, G.; Fucs, L.; Golik, A.; Rosenmann, E. *Human Toxicol.* **1989**, *8*, 345–348.

81) a) Liu, H. -W.; Walsh, C. T. In *The chemistry of cyclopropyl group*; Rapport, Z., Eds.; John Wiley & Sons: New York, **1987**; pp 959. b) Wessjohann, L. A.; Brandt, W.; Thiemann, T. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1625–1647.

82) Djerassi, C.; Theobald, N.; Kokke, W. C. M. C.; Pak, C. S.; Carlson, R. M. K. *Pure. Appl. Chem.* **1979**, *51*, 1815–1828.

83) Giner, J. -L.; Silva, C. J.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9626–9627.

84) a) Yano, I.; Morris, L. J.; Nichols, B. W.; James, A. T. *Lipids* **1972**, *7*, 35–45. b) Bao, X.; Katz, S.; Pollard, M.; Ohlrogge, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 7172–7177.

85) a) Nakamura, H.; Jin, T.; Funahashi, M.; Fujimaki, K.; Sampei, O.; Murai, A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 9067–9074. b) 中村英士 有合化, **1998**, *56*, 651–660.

86) a) Barrett, A. G. M.; Hamprecht, D.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 8608–8615. b) Tokiwano, T.; Watanabe, H.; Seo, T.; Oikawa, H. *Chem. Commun.* **2008**, 6016–6018.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました慶應義塾大学理工学部 中田雅也教授に深く感謝致します。

本研究に関して有益な御助言を賜りました慶應義塾大学理工学部 只野金一教授、慶應義塾大学理工学部 上村大輔教授、慶應義塾大学理工学部 末永聖武准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、キノコの採集から終始御指導、御鞭撻を賜りました京都薬科大学 橋本貴美子准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、筆者の実験について多くの御指導、御助言を頂きました慶應義塾大学理工学部 犀川陽子専任講師に心から感謝致します。

キノコの採取にご協力いただきました群馬県野生きのこの会 須田隆氏、関西菌類談話会 正井俊郎氏、森本繁雄氏、上田俊穂氏、滋賀大学 横山和正名誉教授に深く感謝いたします。

毒蛋白質ボレベニンの N 末端アミノ酸配列の分析等さまざまな測定や御指導を賜りました弘前大学農学生命科学部 奥野智且名誉教授（現秋田看護福祉大学教授）、弘前大学農学生命科学部 宮入一夫教授をはじめ、同研究室の学生の皆様に深く感謝致します。

毒蛋白質ボレベニンのマススペクトルを測定していただきました富山大学和漢医薬総合研究所 紺野勝弘准教授、京都薬科大学 濱田貴司氏、青森県技術開発センター 市田淳治氏に深く感謝致します。

SDS-PAGE に関して御指導を賜りました慶應義塾大学理工学部 松村秀一教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、御配慮頂きました京都薬科大学 上西潤一教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、有益な御助言を賜りました慶應義塾大学理工学部 垣内史敏教授、河内卓彌助教ならびに同研究室の学生の皆様に深く感謝致します。

マウスの組織検査を行って頂きました石原産業株式会社 乾公正氏に深く感謝致します。

シクロプロペンカルボン酸の抗菌活性試験、細胞毒性試験を行って頂きました微生物化学研究会 五十嵐雅之博士、中栄功一博士に深く感謝致します。

本研究の成果は共同研究者である加藤優氏の努力の賜物であり、ここに感謝致します。また、同じ抽出班として研究に携わった山田美奈氏、中出健司氏、谷津美樹氏、丹羽瑞穂氏、仁神史生氏、森谷開氏、高嶋美恵氏、秋濃真紀子氏、笹見強志氏に深く感謝致します。

研究生活において多くの時間を共有し、常に支えてくださった森智紀博士、市毛孝弘博士をはじめとする先輩方、そして同期、後輩の皆様に深く感謝致します。

最後に、筆者の学生生活に関しての支援をおしまず、勉強する機会を与えてくださいました父 利廣、母 恵子、妹 浩子に心から感謝致します。

松浦 正憲