



Title	Cryptosporiopsis abietinaの産生するクロモン誘導体の化学構造について
Author(s)	佐藤, 博二; SATO, Hiroji; 浅川, 聡子 他
Citation	北海道大学農場研究報告, 33, 15-19
Issue Date	2003-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/13468
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_p15-19.pdf



Cryptosporiopsis abietina の産生するクロモン誘導体の化学構造について

佐藤 博二・浅川 聡子¹⁾・大橋 聡²⁾・越野 広雪³⁾

(北海道大学 北方生物圏フィールド科学センター生物生産研究農場 植物資源科学部門)

(¹⁾北海道大学院農学研究科 北方資源生態学講座)

(²⁾北海道大学大学院農学研究科 生物有機化学講座)

(³⁾理化学研究所, 分子構造解析室)

(2003年1月20日受理)

結 論

ヒノキ漏脂病は、大正時代から我国の多雪地帯におけるヒノキ造林不成功の原因の一つとして注目され、林業上あるいは樹病学上よく知られた病害であるが、その原因は未解決のまま残されていた。漏脂病に罹病したヒノキは樹幹に亀裂を生じ、いったん生じた傷口は治癒することなく長年にわたって樹脂を流出し続けるという症状を示す。罹病したヒノキが枯死するということは稀であるが幹に変形を生じて用材としての経済上の価値はほとんどなくなり林業経営上大きな問題となっている。

我国では昭和23年頃から西日本各地でマツくい虫が猛威を振るうようになり、1960年代後半より薪炭に代わる石油の普及、いわゆる燃料革命の進行という社会的背景に伴い、伝染源(枯損木)の放置が一般化しマツ材線虫病の大流行をみた。

また、昭和43年には、関東以西の表日本各地を冠雪害が襲い、主にスギの幹折れや幹曲がりなど甚大な被害を受けた。ヒノキは用材として高価であり、林業経営上有利な樹木であることから、松林の枯損消失のマツに代り、また雪害のスギに代ってヒノキの造林面積が急増した。このような社会的な変化とともにヒノキ漏脂病の被害が近年再び問題化した。

ヒノキ漏脂病の原因としては、古くから雪圧説、害虫説、病菌説があげられていたが、小林らにより、被害木の病患部からの菌体検索で普遍的で高い頻度検出されたクリプト菌 (*Cryptosporiopsis*

abietina) の接種試験が行われた。クリプト菌の接種により、接種孔から樹脂を流下することがわかり、クリプト菌が漏脂病の原因であると結論された³⁾。その後、このクリプト菌病原説は、接種後に典型的な病徴である継続的に樹脂を流出し続けるという病班形成に疑問が持たれた⁴⁾。周藤らは病患部から分離したシステラ菌 (*Cistella Japonica*) の接種実験を行い、激しい漏脂症状を継続的に示すことを報告し^{5,6,7)}、現在では漏脂病病原菌本体は *Cistella Japonica* であり *Cryptosporiopsis abietina* は随伴菌と考えられている⁴⁾。

我々はヒノキ漏脂病の病徴である継続的な樹脂の流出現象の発現に病原菌の産生する活性物質が関与しているものと推定し、我々が開発した簡便な生理活性テスト「ウカセ」を用いて *Cistella Japonica* と *Cryptosporiopsis abietina* などの病原性菌の産生する生理活性物質の追求を行っている⁸⁾。すでに、*Cr. abietina* の産生する生理活性物質として、新規化合物である 21-Nor- $\Delta^{17(21)}$ 不飽和ステロール類と (-)-Semivioxanthin を報告した。^{8,9,10)}

今回、さらに *Cr. abietina* の培養濾液部酢酸エチル抽出物より、活性物質として 2-(2'-hydroxy-propyl)-5-methyl-7-hydroxychromone **1** の chromone 誘導体を精製単離し、その化学構造を決定した。化合物 **1** の 2'位の水酸基の立体配位は、ルバーブから報告されている同一平面構造を持つ (2'S)-aloesol に対して、立体異性体 (2'R) であった。(2'R) の配位を持つアロエゾールの天然物からの分離は今回が初めてである (Fig.

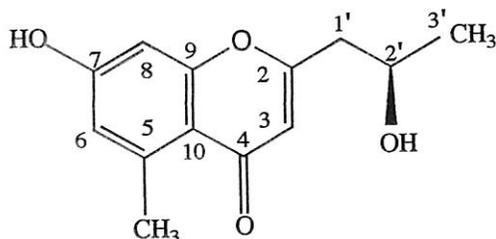


Fig. 1. (2'R)-aloesol

1)^{1,2)}.

実験および結果

1. 培養と分画

Cr. abietina 27-21株は0.2%寒天を含む3%グルコース・バレイショ煎汁培地を500mlの三角フラスコ(249本)に200mlずつ分注し滅菌後、菌を接種、22°C暗所で29日間静地培養を行った。培養液は培養終了後ガーゼで濾別して、菌体部と濾液部に別けた。培養濾液(45l)は含まれる寒天を除くため10l宛て小分けして凍結し、その後ガーゼ上で自然解凍して寒天を除去した。濾液は減圧濃縮後、酢酸エチル抽出し酢酸エチル抽出物(15.92g)を得た。活性物質のクロマトグラフィーはヒノキ鱗片葉を用いた「ウカセ」を指標として検索した⁸⁾。

酢酸エチル抽出物(15.92g)をシリカゲル(Kieselgel 60, カラム4×30cm)カラムでクロロホルム-メタノール(97:3v/v)の溶媒系でクロマトグラフィーを行い、Fr 1からFr 13の13の区分に分画した。「ウカセ」活性の高いFr 9~Fr 12の4区分をまとめて、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶媒系ヘキサン-メタノール

(1:1v/v)に供し、さらにシリカゲルカラムクロマトグラフィー(kieselgel 60, 1×30cm)溶媒系ヘキサン:酢酸エチル:アセトン(2:2:1v/v)で精製した。得た活性物質区分はクロロホルム-メタノールからの結晶化、再結晶を行って化合物1 6.1mgを得た。

2. 化合物1の化学構造

化合物1は淡黄色リン片状の結晶で融点187°C、旋光度 $[\alpha]_D -19.0^\circ$ (C=0.21, MeOH)を示した。FD-MSより分子量が234, EI-HR-MS(m/z obsd. 234.0854; calcd for C₁₃H₁₄O₄ 234.2512)からC₁₃H₁₄O₄と分子式を決定した。化合物1の基本骨格は、UV-スペクトラム(MeOH λ_{max}, nm: 250, 290)IR-スペクトラム(ν_{max}, cm⁻¹: 3320, 1648, 1560)不飽和度などからクロモン骨格を予想した。

DEPTから¹³C-NMRで認められた13個のシグナルの多重度を決定し、2個のメチル基、1個のメチレン、4個のメチン、6個の4級炭素を持つことが明らかとなった(Table 1)。

Table 1. ¹H- and ¹³C-NMR spectral data (600 and 150 Mz, acetone d₆) of compound 1^{*}

Position	δH (Jin Hz)	δC	¹ H long range coupled ^{**}	
			³ J _{CH}	² J _{CH}
2	-	165.43		
3	5.96s	112.77	10, 1'	2, 4
4	-	179.28		
5	-	143.07		
5-Me	2.70s	22.78	6, 10	5
6	6.65br.d (2.4)	117.06	5-Me, 10	7
7	-	161.46		
7-OH	9.30	-	6, 8	7
8	6.68d (2.4)	101.60	6, 10	7, 9
9	-	160.56		
10	-	116.28		
1'	2.61 dd (14.2, 4.9) 2.66 dd (14.2, 7.8)	44.19	3, 3'	2, 2'
2'	4.21 dddq (7.8, 4.9, 4.9, 5.9)	65.63		
2'-OH	3.99 (4.9)		1', 3'	2'
3'	1.24d (5.9)	23.77	1'	2'

^{*} Signal assignments are based on the analysis of 1D (¹H, ¹³C, DEPT) and 2D(COSY, HMBC, HMQC) NMR spectra

^{**} ³J_{CH} and ²J_{CH} indicate the carbons long range coupled with each proton through three and two bonds respectively, as observed in the PFG-HMBC, spectra

$^1\text{H-NMR}$ スペクトラム(Fig.2)から化合物1は関連する2級のメチル基(δ 1.24, 3 H, d, $J=5.9$ Hz), アリルメチレン(δ 2.61, 1 H, dd, $J=14.2, 4.9$ Hz, δ 2.66, 1 H, dd, $J=14.2, 7.8$ Hz)カルピノールメチン(δ 4.21, H, dddg, $J=7.8, 4.9, 4.9, 5.9$ Hz)の存在から2-hydroxypropyl基の存在が示唆され, このハイドロキシプロピル基の存在は2級メチル基の炭素(δ 23.77), アリルメチレンの炭素(δ 65.63), メチンの炭素(δ 44.19)からも支持される。さらにケトンと水素結合していない, ベンゼン環上の水酸基のプロトン(δ 9.30, 1 H, S), ベンゼン環上のメチル基のプロトン(δ 2.70, 3 H, S)が認められた。孤立した1個のメチンプロトンと, 2個のメタカップルを示

すベンゼン環上のプロトン(δ 6.65, 1 H, brd, $J=2.4, \delta$ 6.68, 1 H, d, $J=2.4$ Hz)から3置換クロモン構造が想定された。

HMBC スペクトラムから, 側鎖2'-hydroxypropyl基の1'位のメチレンプロトンとC-2, C-3に, 3位のオレフィンプロトンとC-2, C-4に相関が認められた事から2'-hydroxypropyl基の置換した炭素とオレフィンプロトンの炭素は隣接している事が判明した(Table 1)。

ベンゼン環のメチル基のプロトンとC-5, C-4, C-6, および水酸基プロトンとC-7, C-6, C-8に, それぞれ相関が認められたこと, および5-メチル基と6位のメチルプロトンにまた3位のメチンプロトンと1'位のメチルプロトンにNOE

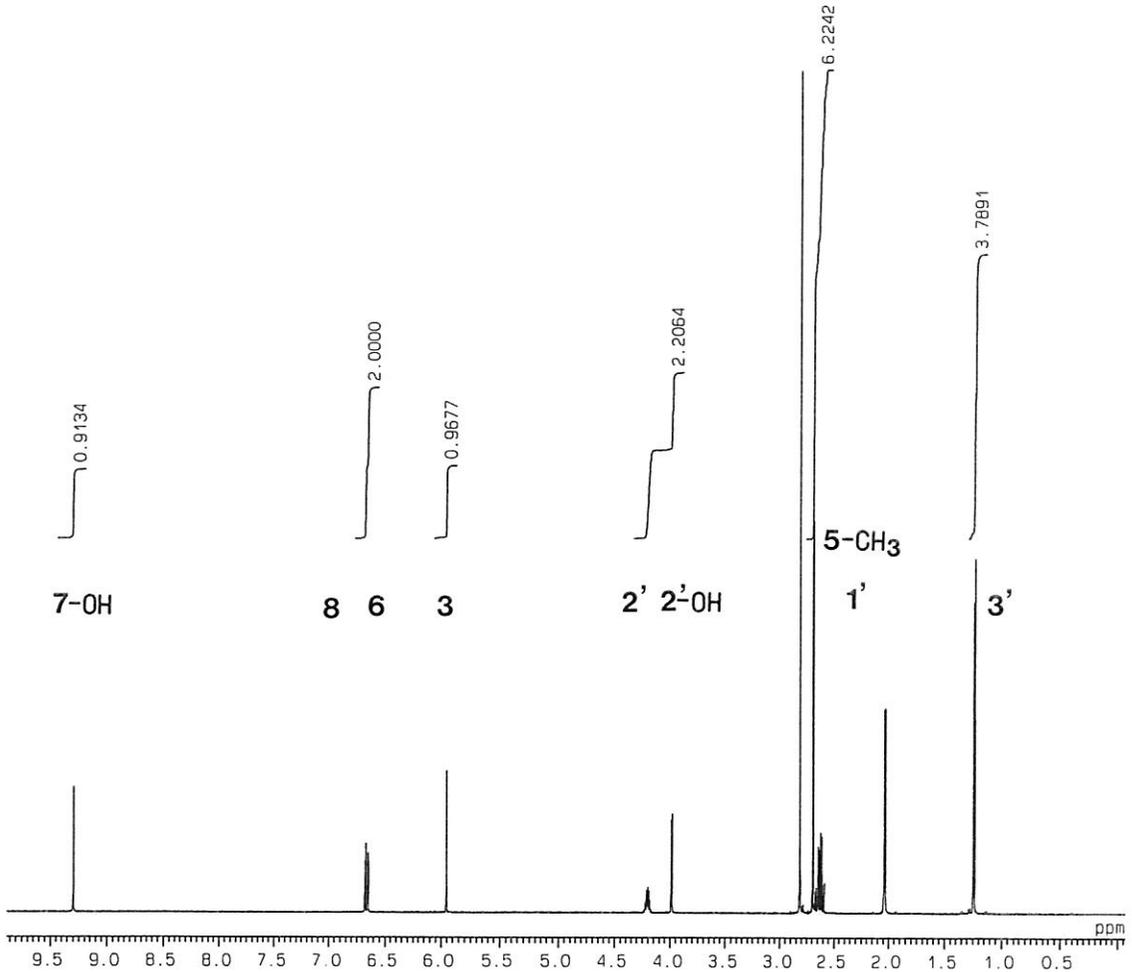


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of aloesol (acetone- d_6)

が認められる事などから化合物 1 は基本骨格として chromone 構造を持ち 2'-hydroxypropyl 基が C-2 位に、C-5 位にメチル基が C-7 位に水酸基の置換した配置をとることが明らかとなった。

化合物 1 の平面構造は 2-(2'-hydroxypropyl)-5-methyl-7-hydroxychromone と決定した。

同一平面構造を持つ化合物はルバーブ (*Rheirhizoma*) より単離、化学構造が決定されて報告されているが、側鎖 2' 位の水酸基の立体は S 配置 ($[\alpha]_D^{20} + 39.1$)²⁾ で、本化合物とは旋光度 ($[\alpha]_D^{20} - 19$) が逆転する。アロエより分離した C-グルコサイドであるアロエジンを NaBH₄ で還元後 HPLC で精製した (2'R)-8-C-glucosyl-aloesol をバクテリアで処理して得た (2'R)-aloesol と旋光度が一致した¹⁾。化合物 1 の 2' 位の立体配位は R の配位で 2-[(2'R)-hydroxypropyl]-5-methyl-7-hydroxychromone と決定した。

2'R の配位の 2-[(2'R)-hydroxypropyl]-5-methyl-7-hydroxychromone [(2'R)-aloesol] は天然界からは初めての単離報告である。

3. 化合物 1 の生理活性

ヒノキ鱗片葉を用いた「ウカセ」活性テストでは 200 ppm で、鱗片葉脱離活性は比較的弱かったが、ヒノキ臭生成能は強い活性を示した。

要 約

Cryptosporiopsis abietina の培養濾液の酢酸エチル抽出物を「ウカセ」活性テストを指標として、生理活性物質の検索を行いクロモン誘導体を単離した。その化学構造は 2-[(2'R)-hydroxypropyl]-5-methyl-7-hydroxychromone と決定した。

引用文献

- CHE, Q., AKAO, T. et al. : Metabolism Aloesin and Related Compounds by Human Intestinal Bacteria : A Bacterial Cleavage of the C-Glucosyl Bond and the Subsequent Reduction of the Acetyl Side Chain. *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 704-708 (1991)
- KASHIWADA, Y., NONAKA, G. et al. : Studies on Rhubarb (*Rheirhizoma*). V. Isolation and Characterization of chromone and chromanone Derivatives, *Chem. Pharm. Bull.* **32**, 3493-3500 (1984)
- 林亨夫, 林弘子ら : ヒノキ漏脂病菌に関する病原学的ならびに病理学的研究 I. 病原菌の検索・分類と病原性. *森林総研研報* **357** : 51-93. (1990)
- 楠木学 : 見えてきたヒノキ漏脂病 山林 1394 号 : 60-68 (2000)
- SUTO, Y., : A new species of *Cistella* (*Discomycetes*) inhabiting bark of *Chamaecyparis obtusa* and *Cryptomeria japonica*, and its cultural characters. *Trans. Mycol. Soc. Japan* **33**, 433-442 (1992)
- SUTO, Y., : Etiology of Resinous Stem Canker of *Chamaecyparis obtusa* : *Cistella Japonica* as the Casual Agent. *J. for. Res.* **2**, 59-65 (1997)
- SUTO, Y., : Traumatic Resin-Canal Formation caused by Introduction with *Cistella Japonica* in Sacandry Phloem of *Chamaecyparis obtuse*. *J. For. Res.* **3**, 99-102 (1998)
- YADA, H., SATO, H. et al. : The structure of Abscisterol A : A novel 21-Nor- $\Delta^{17(21)}$ unsaturated Sterol from *Cryptosporiopsis abietina* Tetrahedron letters **35**, 4943-4396 (1994)
- YADA, H., SATO, H. et al. : The Biogenesis of New Abscisterols and a 21-Oic acid Type Sterol from *Cryptosporiopsis abietina* Tetrahedron letters **36**, 7471-7474, (1995)
- YADA, H., SATO, H. : et al. (-)-Semivioxanthin, A New Abscisic Active compound against *Hinoki Cypress* Leaves Isolated from *Cryptosporiopsis abietina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **65**, 484-486, (2001)

Isolation, Structural Determination, A Chromone Derivative from *Cryptosporiopsis abietina*

Hiroji SATO

(Division of Science of Plant Resources, Experiment Farm, Field Science Center for
Northern Biosphere, Hokkaido University)

Satoko ASAKAWA

(Reserch Group of Northern Bioresources and Ecology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Satoshi OHASHI

(Reserch Group of Bioorganichemistry, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Hiroyuki KOSHINO

(Molecular characterization Division, The Institute of physical and Chemical Reserch)

(Recieved January 20, 2003)

Summary

The chromone derivative, 2-[(2'R)-hydroxypropyl]-5-metyl-7-hydroxychromone **1** was isolated from *Cryptosporiopsis abietina*. The structure was determined as the reversed optical isomer of aloesol by comparing its spectroscopic date with those of aloesol. **1** exhibited absusic activity against Hinoki cypress leave.