HOKKAIDO UNIVERSITY

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; 浅川, 聡子; 大橋, 聡 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

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北海道大学農場研究報告　第33号：15～19（2003）

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・淺川 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）

緒　　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斑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.

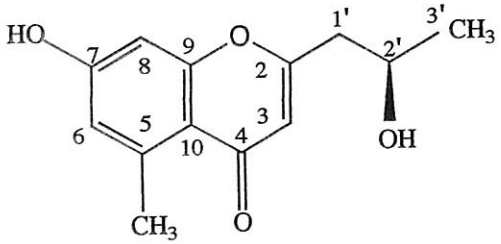

Fig. 1. (2'R)-aloesol

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500 mlの三角フラスコ(249本)に200 mlずつ分注し滅菌後，菌を接種，22℃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(45 l)は含まれる寒天を除くため10 l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(15.92 g)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(15.92 g)をシリカゲル(Kieselgel 60，カラム4×30 cm)カラムでクロロホルム-メタノール(97：3 v/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(kieselgel 60，2×30 cm)溶媒系ヘキサン-メタノール(1：1 v/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 60，1×30 cm)溶媒系ヘキサン：酢酸エチル：アセトン(2：2：1 v/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　6.1 mg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℃，旋光度$[\alpha]_D$ −19.0°(C＝0.21，MeOH)を示した。FD-MSより分子量が234，El-HR-MS (m/z obsd. 234.0854；calcd for $C_{13}H_{14}O_4$ 234.2512)から$C_{13}H_{14}O_4$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 λmax，nm：250，290)IR-スペクトラム(νmax，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^{13}C-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. ^{1}H-and^{13}C-NMR spectral data (600 and 150 Mz, acetone d_6) of compound **1**[*]

Position	δH (Jin Hz)	δc	^{1}H long range coupled[**] $^3J_{CH}$	$^2J_{CH}$
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)	44.19	3, 3'	2, 2'
	2.66 dd (14.2,7.8)			
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 (^{1}H, ^{13}C, 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}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(δ1.24, 3H, d, J=5.9 Hz), アリルメチレン(δ2.61, 1H, dd, J=14.2, 4.9 Hz, δ2.66, 1H, dd, J=14.2, 7.8 Hz) カルビノールメチン(δ4.21, 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, このハイドロオキシプロピル基の存在は2級メチル基の炭素(δ23.77), アリルメチレンの炭素(δ65.63), メチンの炭素(δ44.19) 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(δ9.30, 1H, S), ベンゼン環上のメチル基のプロトン(δ2.70, 3H, 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(δ6.65, 1H, brd, J=2.4, δ6.68, 1H, 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

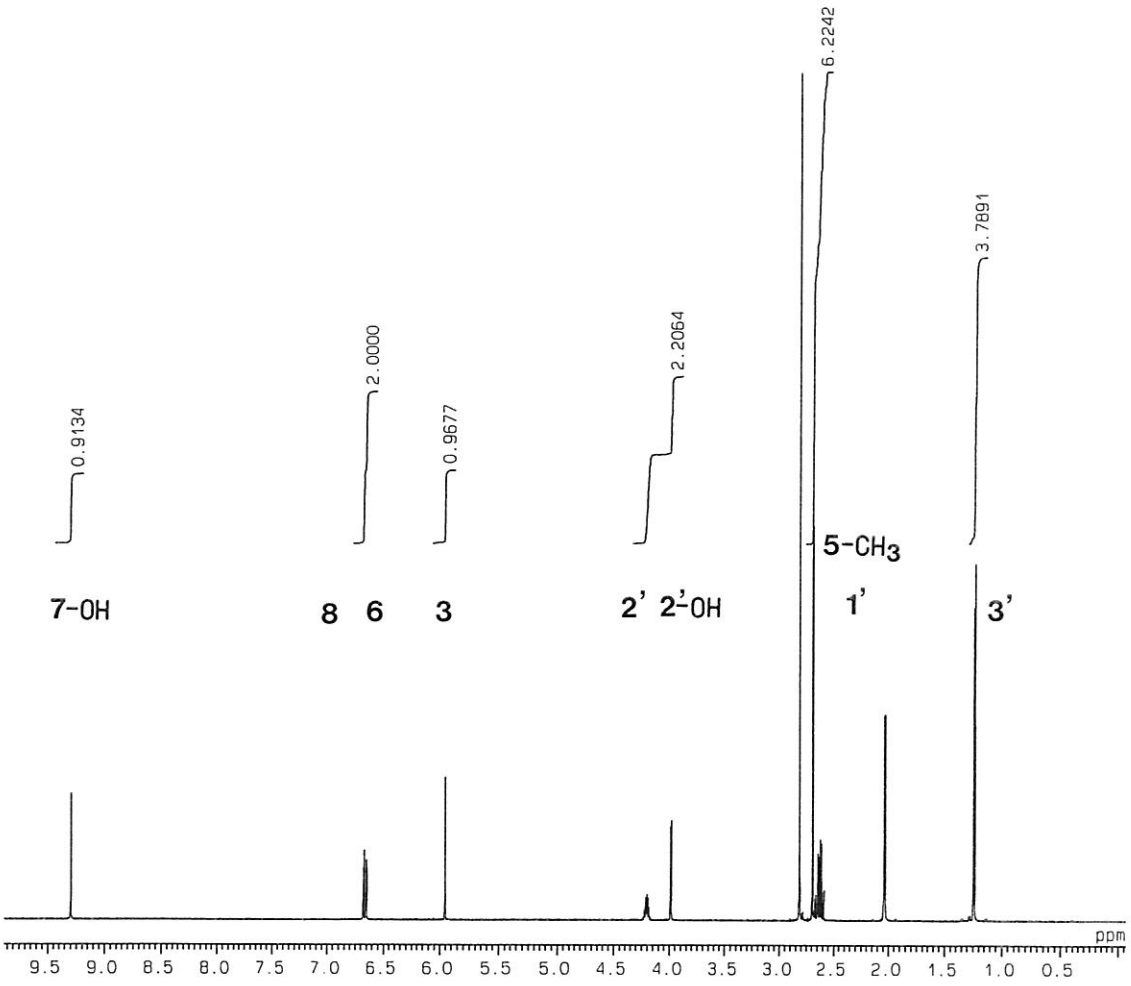

Fig. 2. ^{1}H-NMR spectrum of aloesol (acetone-d_6)

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-metyl-7-hydroxychromoneと決定した。

同一平面構造を持つ化合物はルバーブ（*Rhei rhizoma*）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（$[\alpha]_D$+39.1）[2]で，本化合物とは旋光度（$[\alpha]_D$ −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$NaBH_4$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-metyl-7-hydroxychromoneと決定した。

2'Rの配位の2-[(2'R)-hydroxypropyl]-5-metyl-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

*Cryptosporipsis 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-metyl-7-hydroxychromoneと決定した。

引用文献

1．CHE, Q., AKAO, T. et al. : Metabolism Aloesin and Related Compounds by Human Intestional Bacteria : A Bacterial Cleavage of the C-Glucosyl Bond and the Subsequent Reduction of the Acetonyl Side Chain. Chem. Pharm. Bull **39**, 704-708 (1991)

2．KASHIWADA, Y., NONAKA, G. et al. : Studies on Rhubarb (*Rhei Rhizoma*). V. Isolation and Characterization of chromone and chromanone Derivatives, Chem. Pharm Bull **32**, 3493-3500 (1984)

3．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）

4．楠木学：見えてきたヒノキ漏脂病　山林　1394号：60-68（2000）

5．SUTO, Y., : A new species of *Cistella (Discomycetes)* inhabiting bark of *Chamaecyparis obtusa* and *Cryptmeria japonica*,and its cultural characters. *Trans. Mysol .Sac. Japan* **33**, 433-442 (1992)

6．SUTO, Y., : Etiology of Resious Stem Canker of *Chamaecyparis obusa* : *Cistella Japonica* as the Casual Agent. *J. for. Res.* **2**, 59-65 (1997)

7．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)

8．YADA, H., SATO, H. et al. : The structure of Abscisterol A : A nobel 21-Nor-⊿17(21) unsaturated Sterol from *Cryptosporipsis abietina* Tetrahedon letters **35**, 4943-4396 (1994)

9．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)

10．YADA, H., SATO, H. ： et al. (-)-Semivioxanthin, A New Abscisic Active compound againt *Hinoki Cypress* Leaves Isolated from *Cryptosporiopsis abietina.* Biosci. Biotechnol. Biochem **65**, 484-486, (2001)

Isolation, Structual 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 Bioorganichemistory, 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.