

(328)

(齋藤) 菌體成分に關する研究(第9報)

菌體成分に關する研究(第9報) Fungisterol の化學構造(其の3)

齋 藤 耀(大阪學藝大學)

I. 緒 言

*Penicillium chrysogenum*¹⁾ Q-176 タンク培養菌體より分離した fungisterol は ergosterol の異性體の一種であることがわかつたが¹⁾、ergosterol の異性體のうち既知のものは esgosterol-B₁, -B₂, -D, -E, -F, u-ergosterol 及び ergosterol の紫外線照射生成物の一群即ち lumisterol, tachysterol, calciferol, suprasterol I, II がある。更に calciferol を180°Cに加熱して生ずる pyrocalciferol と iso-pyrocalciferol²⁾ の二つの異性體が知られている。fungisterol は C-3 OH が C-10 CH₃ に對しシス位(normal 系)であることが知られているから¹⁾、これら異性體のうち normal 系の ergosterol B 群, -D, -E, -F, -G について考慮すればよい。これら異性體の主要な恒数を fungisterol と比較すれば Tab. 1 の如くである。

Table 1. Isomers of Ergosterol

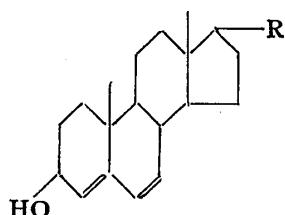
Name of Isomers	Melting Point	Refraction Index $[\alpha]_D$	Melting Point of Acetate
Ergosterol-B	135/6	-32.6 or -8.7	129/31 or 131/2
	148	-40.3	142
	126	-88.4	100
	135/6	-190	132
	165/6 or 170/2	+21 or +24.6	171/4
	124/5	-22.9	119/20
	151/2	-20	152/3
	149/50	-52.2	182
Ergosterol	163/5	-130	131/2
Fungisterol	147.5	-20	158

Ergosterol B(iso-ergosterol)³⁾ (I)

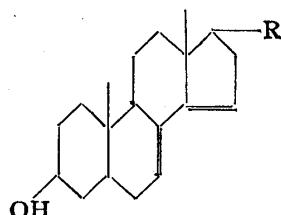
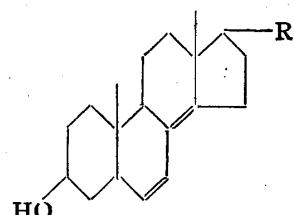
は λ_{\max} 248m μ で $A^{4:5, 6:7, 22:23-}$, B₃ (II) は $A^{7:8, 14:15, 22:23-}$, -F (III) は $A^{6:7, 8:14, 22:23-}$ trienol で何れも共軛二重結合が同一環中になく, -B₁, -B₂ は無水マレイン酸を附加せず。Ergosterol-D 及び -E は化學構造が判明していないが化學恒数は fungisterol と異る。Ergosterol-G (IV) は $A^{6:7, 8:9, 22:23-}$ trienol と推定されたが⁵⁾, 吸收を示さず, また無水マレイン酸を附加せず, プロピルアルコール中で Na と反応しない點から上記構造は否定される。

Pyrocalciferol 及び iso-pyrocalciferol (V)

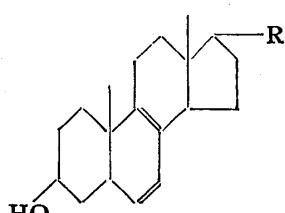
(V) の構造は最初は $A^{6:7, 8:9, 22:23-}$ trienol と推定されたが WINDAUS 等⁶⁾により ergosterol と同じ核構造をもつ立體異性體であることが確認されている。



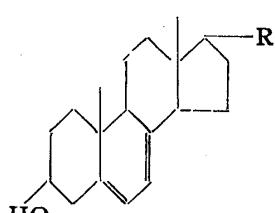
I Ergosterol B

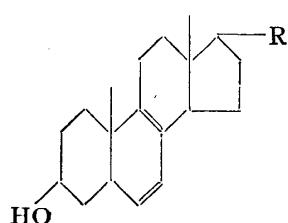
II Ergosterol B₃

III Ergosterol F



IV Ergosterol G (?)

V { Pyrocalciferol (C-3:C-9 cis, C-9:C-10 cis)
Iso-pyrocaliciferol (C-3:C-9 trans, C-9:C-10 trans)}



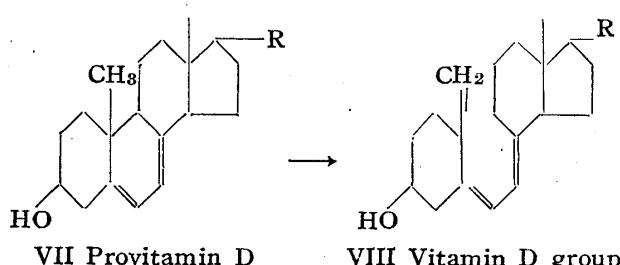
VI Fungisterol
(C-3 OH: C-10 CH₃ cis)

Fungisterol は既知の ergosterol の異性體の何れとも一致せず新しい構造をもつものと考えられたので、核内の二重結合の位置を究めるために fungisterol 及びその誘導體の紫外線照射、還元及び酸化に対する挙動を調べた結果、fungisterol の化學構造は $\Delta^{6:7,8:9,22:23}$ -ergostatriene-3-ol (VI) と判つた。

II. 紫外線照射

Ergosterol は紫外線照射により順次 lumisterol, tachysterol, vitamin D₂, suprasterol I 及び II の段階を経て最後に toxisterol を生ずる。現在 provitamin D として知られているのは ergosterol の外に 7-dehydrocholesterol, 22-dihydroergosterol, で紫外線照射により抗クル病性能を有する Vitamin D₃ 及び D₄ となる。その他照射により僅かながら抗クル病性能を有する物質に變化するものとして $\Delta^{5,7,22}$ -stigmatriene-3-ol 及び $\Delta^{5,7}$ -sitostadiene-3-ol がある。これらはすべてステロール環中の C-5,6 及び C-7,8 に共軛二重結合を有し (VII) λ_{max} は 260~290 m μ に 4 個ある。照射により B 環の開裂が起り環の二重結合が 1 個増加し、生成物の λ_{max} は 265 m μ となる (VIII)。

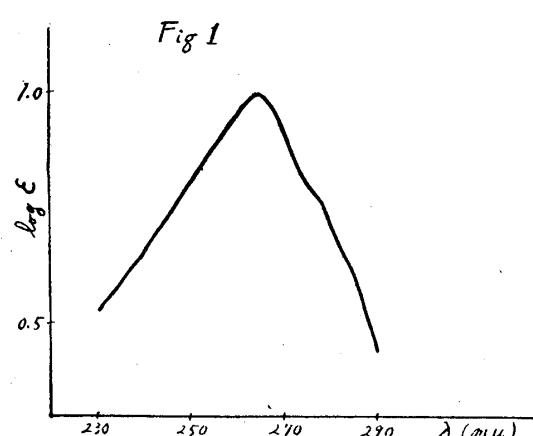
Ergosterol の紫外線照射による calciferol (vitamin D₂) への變化は反應條件に左右されることが著しく一般にその收量も不良である。筆者は紫外線照射には高壓水銀燈を使用した以外は WINDAUS の方法¹⁾に準據した。その結果 ergosterol の照射生成物からは calciferol の結晶 m.p. 114/5°, $[\alpha]_D +92^{\circ}$, λ_{max} 265 m μ (Fig. 1)を得た。



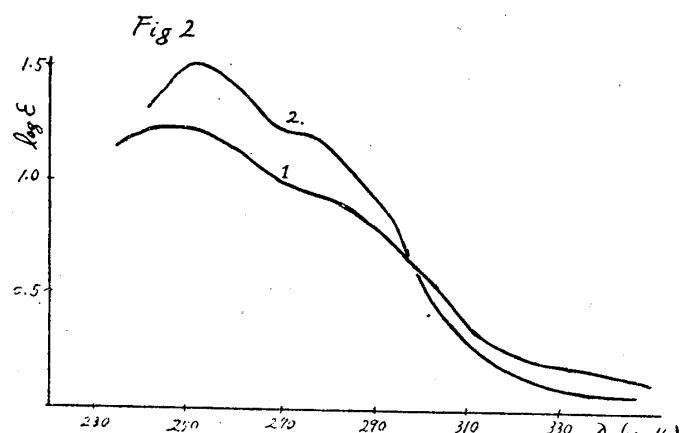
VII Provitamin D

VIII Vitamin D group

全く同條件下に fungisterol を照射し反應物を ergosterol の場合と同様に處理したが、結晶化せしめることはできず、樹脂状物を得た。fungisterol のベンゾール溶液及びエーテル溶液中の紫外線照射生成物の吸收スペクトルは Fig. 2 の如く何れも明確な吸收頂點を示さず、toxisterol の吸收と相似たものを得た。



Absorption Spectrum of Calciferol
(ca. 1/1000 mol in ethanol)



Absorption Spectrum of irradiated Fungisterol
(1) In benzol solution (0.0143% in methanol)
(2) In ether solution (0.00857% in methanol)

以上の結果から fungisterol の核内の共軛二重結合は $\Delta^{5:6,7:8}$ に存在しないことが認められた。

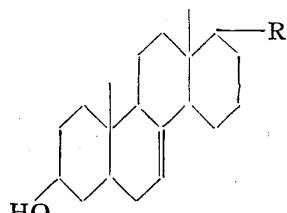
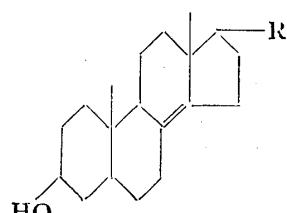
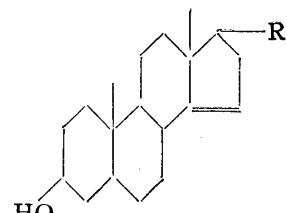
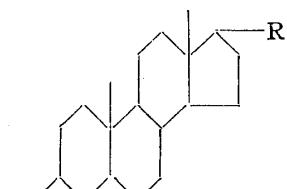
III. 還元

ステロールのうち $\Delta^{5:6,7:8}$ に共軛二重結合を有する 22-dihydroergosterol⁹⁾ 及び 7-dehydrocholesterol¹⁰⁾ 等はアルコール中 Na で還元すれば $\Delta^{5:6}$ のみが還元されて γ -stenol ($\Delta^{7:8}$) (IX) を生ずる。この時側鎖に不飽和を有する ergosterol は側鎖の飽和したステロール類よりも容易に還元される¹¹⁾。

一方 ergosterol を酸性溶媒中 Pd 或は Pt を觸媒として接觸還元すれば $\Delta^{5:6}$ は還元されるが $\Delta^{7:8}$ には水

(330)

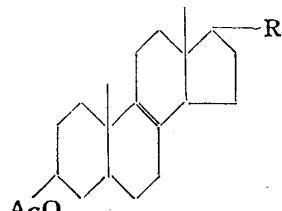
(齊藤) 菌體成分に關する研究(第9報)

IX γ -StenolX α -dihydroergosterolXI β -Dihydroergosterol $R = \text{C}_8\text{H}_{17}$ 7-dehydrocholesterol $R = \text{C}_8\text{H}_{19}$ 22-dihydroergosterol

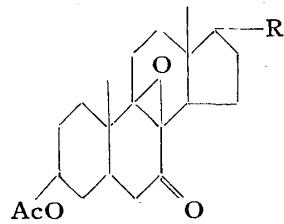
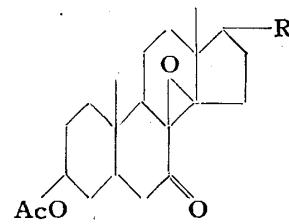
XII Ergostanol

素添加は起らず、二重結合は $\Delta^{8:14}$ に轉位し α -dihydroergosterol (X) を生ずる。この構造のものはクロロホルム中乾燥塩酸ガスを通すれば β -sterol ($\Delta^{14:15}$) (XI) に轉位してこれは接觸還元により ergostanol (XII) となることが知られている。

Fungisterol をアルコール中で Na で還元すれば二重結合の一つが飽和されて dihydrofungisterol を生ずる。これは fungisterol をエーテル溶液中で接觸還元して得られる dihydrofungisterol に一致し、更にこの acetyl 化合物(XIII) を無水クローム酸により常温酸化して Δ^{22} -ergostenol-3-one-7-oxide-8,9 acetate (XIV) を生じたことから、この dihydrofungisterol は $\Delta^{8:9}$ に二重結合を有する δ -dihydroergosterol (new compound) と結論づけられた。



XIII Dihydrofungisteryl acetate

XIV Δ^{22} -Ergostenol-3-one-7-oxide-8,9 acetateXV Δ^{22} -Ergostenol-3-one-7-oxide-8,14 acetate

一方 fungisteryl acetate は Pd を触媒として冰酢酸溶液中で接觸還元すれば 1 モルの水素を吸収して dihydrofungisterol を生ずるが、これはアルコール中 Na で還元して得た δ -dihydrofungisterol と異つている。接觸水添は條件を變えてもそれ以上進行せず、得られたものは ergosterol の接觸水添で得られた α -dihydroergosterol (X) に一致し、核内の二重結合の一つは $\Delta^{8:14}$ に轉位していることが判つた。更にこの α -dihydrofungisterol (α -dihydroergosterol) はクロロホルム溶液中で塩酸ガスにより $\Delta^{8:14}$ は $\Delta^{14:15}$ に轉位して β -dihydroergosterol (XI) を生じた。また acetyl 化合物は無水クローム酸酸化により主として Δ^{22} -ergostenol-3-one-7-oxide-8,14 acetate (XV) を生じたことからも確認し得た。

IV. 酸化

ステロール類の酸化はその化學構造により各種の酸化法がとられ酸化生成物の検索により元の構造を決定する重要な手段となつてゐる。核の直接酸化には CrO_3 による高溫酸化、 HNO_3 、 Br_2 、 KMnO_4 等による酸化が行われるが收量も著しく不良で不飽和化合物の場合は特に反応が困難である。

Fungisterol も側鎖に不飽和結合を有するためその酸化が一般に困難であるが、核を完全に飽和したものを酸化しても核内の重結合の位置の判別はできないので不飽和結合を一部残したまゝ低温で無水クローム酸々化を行つた。STAVERY 等¹⁰⁾が α -dihydroergosterol の構造決定に用いた方法に據り、 δ -dihydrofungisterol 及び α -dihydrofungisterol のアセチル化合物の無水クローム酸々化を行い夫々 Δ^{22} -ergostenol-3-one-7-oxide-8,9 acetate (XIV) 及び Δ^{22} -ergostenol-3-one-7-oxide-8,14 acetate (XV) に對應する化合物を得たので、 δ -化合物は $\Delta^{8:9}$ 、 α -化合物は $\Delta^{8:14}$ なることが確認された。

(発酵) 菌體成分に関する研究(第9報)

(331)

以上の實驗結果から fungisterol の核内の二重結合の位置は $\Delta^{6:7,8:9}$ であることが確認され, fungisterol の化學構造式としては $\Delta^{6,8,22}-ergostatrienol$ (VI) が與えられる。またこの構造をもつステロールはステロイドホルモル Cortisone 合成の中間體として興味あるものである。

Fungisterol の生成機構に關しては菌體中 ergosterol から二次的に生成されると推定される以外、未だ解明するに到つていない。

實驗の部

試料: Fungisterol は第7報¹⁾に述べた如く *P. chrysogenum* Q-176 のタンク培養菌體から單離した結晶を使用前エタノールから一度再結晶したものである。m.p. 147/8°。

I. 紫外線照射

Ergosterol より calciferol の生成

2.5gの ergosterol を50ccの純ベンゾールに溶解し水冷しつゝ高壓水銀燈で照射した。裝置全體は扇風機で冷却した。4時間照射した後クライゼンコルベンに容れ CO₂ ガス氣流中でベンゾールを減壓溜去した。殘溜物を熱メタノール50ccで處理し未反應 ergosterol の析出したものを、ドライアイスで約1時間冷却し生成した結晶を冷却しつゝ濾過し去る。更に0.2gのジギトニンのメタノール溶液を加えて減壓下にメタノールを溜去した。殘渣を石油エーテルで抽出し不溶性のステロールジギトニドを濾別した。石油エーテルは溜去しアセトンに溶解して冰冷すれば1夜後 calciferol の粗結晶が析出した。アセトンメタノールより再結晶した。收量230mg。

m.p. 114/5° [α]_D²⁰ +92.0° 試料 68.2mg, クロロホルム2.3cc d=1dm α +7.3°

吸收スペクトルは Fig. 1 の如くである。

窒素ガスを充填密閉しても數日後に結晶は褐色を呈したが λ_{max} 265m μ で變化しなかつた。

Fungisterol の紫外線照射

1.0gの fungisterol を20ccのベンゾールに溶解し ergosterol の場合と全く同條件で紫外線照射を行つた。反應生成物は ergosterol の場合と同様に處理し未反應 fungisterol をジギトニドとして濾別し、石油エーテル抽出物から石油エーテルを溜去し油狀物をアセトンに溶解し冰冷するも結晶は析出せず。アセトンを溜去しピリジンに溶解し 0.2g の 2,4-dinitrobenzoyl chloride のピリジン溶液を冷却しつゝ滴下し放置するも calciferol の 2,4-dinitrobenzoate は得られず。これを再び石油エーテルで抽出し石油エーテルを溜去した殘溜樹脂狀物の吸收スペクトルは Fig. 2 a の如くである。Fungisterol をエーテル溶液中で同條件で紫外線照射して上と同様な處理を行つて得た樹脂狀物の吸收スペクトルは Fig. 2 b の如くである。

II. Fungisterol の還元

Na と propyl alcohol による還元, δ-Dihydrofungisterol

0.5gの fungisterol を20ccの無水プロピルアルコールに溶解し3時間中に9gのNaの135ccプロピルアルコール液を加え、更に2時間煮沸した。注意して水を加え生成した沈殿をジギトニン處理を行い、未反應 fungisterol を除き、残部から生成する結晶を無水アルコールから2回再結晶した。收量280mg。

m.p. 109/11° [α]_D²⁰ -0.47° 試料 48.6mg, クロロホルム2.3cc, d=1dm, α -0.01°

元素分析 試料 2.3816mg, CO₂ 7.3601mg, H₂O 2.4349mg

C 84.28, H 11.36%

C₂₈H₄₆O として C 84.42, H 11.56%

acetate m.p. 127/9° [α]_D²⁰ -1.7° 試料 26.1mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, α -0.02°

接觸還元, δ-Dihydrofungisterol

Fungisterol 274mg をエーテル110ccに溶解し、Pd 觸媒10mgを加えて水素を通じて振盪した。溫度 14°C, 80分間に水素16.5cc(理論量の1.03モル)を吸收して止まつた。反應物からエーテルを溜去しエタノールに溶解し1%のジギトニンのアルコール溶液を加えて放置し fungisteryl digitonide の沈殿を濾別する。アルコールを溜去した殘溜物をアセトン及びエタノールで再結晶した。收量153mg。

(332)

(齊藤) 菌體成分に關する研究(第9報)

ROSENHEIM 反應陰性 m.p. 108/10° $[\alpha]_D^{20} -0.32^\circ$ 試料 71.2mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, $\alpha -0.01^\circ$

Na とアルコールで還元して得た δ -dihydrofungisterol と混融試験の結果融點の降下がみられなかつた。また母液より δ -fungistenol と推定される結晶の微量を得たが確認には到らなかつた。

 α -Dihydrofungisterol (α -Dihydroergosterol)

fungisteryl acetate 0.8g を200ccの冰酢酸に加温溶解し Pd 触媒100mg を加えて水素ガスを通じて振盪還元した。温度11.8°C, 70分間に水素50.0cc (理論量の1.15モル) を吸收した。反応物から冰酢酸を減圧溜去し残溜結晶を酢酸エチル及びアルコールから再結晶した。

m.p. 178/80° $[\alpha]_D^{20} -24.2^\circ$

この200mg をメタノール性 KOH でけん化し、冷却後生成した結晶をエーテル+アルコール 及び アルコールから再結晶した。收量約70mg。

ROSENHEIM 反應陰性, LIEBERMANN 反應, SALKOWSKI 反應は α -dihydroergosterol に一致した。

m.p. 172/3° $[\alpha]_D^{20} -21.1^\circ$ 試料 55.6mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, $\alpha -0.51^\circ$

 β -Dihydrofungisterol

0.2g の α -dihydrofungisterol を5 ccのクロロホルムに溶解し、冰冷しつゝ乾燥塩酸ガスを通じた。1時間後墨紫色の反応液を湯浴上で蒸發し残渣を1 ccの酢酸エチルと5 ccのメタノールとの混液から再結晶した。

m.p. 108/10° $[\alpha]_D^{20} -23.4^\circ$ 試料 83.8mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, $\alpha -0.34^\circ$

$\lambda_{\text{max}}^{\text{EOH}}$ 248 m μ (BECKMANN Spectrometer)

■. 酸化に對する舉動

(1) δ -Dihydrofungisterol の CrO₃ 酸化 Δ^{22} -Ergostenol-3-one-7-oxide-8,9 acetate (XIV)

δ -Dihydrofungisteryl acetate 1.0g を60ccの冰酢酸と30ccのベンゾールとの混液に溶解し、0.8g のCrO₃の90%酢酸溶液10ccを攪拌しつゝ常温で滴下した。一晝夜放置後減圧濃縮し10%稀アルコールを加えて稀釋しエーテル抽出した。エーテルは中性となるまで洗滌し乾燥後エーテルを溜去し 0.75g の酸化生成物を得た。80%のエタノールから數回再結晶した。收量120mg.

m.p. 221/4° (decomp.) $[\alpha]_D^{20} -42^\circ$ 試料 48.3mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm $\alpha -0.88^\circ$

230m μ 以上に吸收を示さず。

2,4-dinitrophenylhydrazone m.p. 208° (decomp.)

Ergostanol-3-one-7-oxide-8,9 acetate

Δ^{22} -Ergostenol-3-one-7-oxide-8,9 acetate (XIV)60mg を水素を飽和したエタノールに溶解し Pd 触媒20mg を加えて水素を通じて接觸還元した。約40分に 2.9cc の水素を吸收した (理論量の 1.1 モル)。反応生成物は80% エタノールから再結晶した。

m.p. 211° $[\alpha]_D^{20} -36^\circ$ 試料 24.3mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, $\alpha -0.38^\circ$

元素分析 試料 3.2765mg, CO₂ 9.1362mg, H₂O 2.9634mg

C 76.05 , H 10.08%

C₃₀H₄₈O₄として C 76.27 , H 10.17%

STAVERY 等の得た Ergostanol-3-one-7-oxide-8,9 acetate と化學恒數は一致する。

(2) α -Dihydrofungisterol の CrO₃ 酸化 Δ^{22} -Ergostenol-3-one-7-oxide-8,14 acetate (XV)

1.0g の α -dihydrofungisteryl acetate を60ccの冰酢酸及び30ccのベンゾールとの混合液に溶解し、これに

(齊藤) 茎體成分に關する研究(第9報)

(333)

0.8gのCrO₃の90%冰酢酸溶液を攪拌しつゝ常温で滴下し一晝夜放置した。10ccのエタノールを加えて減圧濃縮し、水を加えてエーテル抽出し、アルカリ及び水で洗滌乾燥後エーテルを溜去した。残溜物はヘキサンに溶解しクロマトグラフ分別を行つた。即ち活性アルミナを充填した25×1.8cmの管中を通し、展開剤としてはヘキサン、ヘキサン+ベンゾール(8:2)、ヘキサン+ベンゾール(5:5)、ベンゾール、ベンゾール+エーテル(8:2)。エーテルの各120cc宛を使用した。展開液は6つの區分に分ち、溶剤を溜去すれば結晶が生成する。展開區分2~5からはm.p.143/58°の結晶を得て、これをエタノールから數回再結晶し毛羽状結晶を得た。收量200mg。

m.p. 153° [α]_D²⁰ -97.6° 試料 58.6mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, α-2.48°

230mμ以上に吸收を示さず。

2,4-dinitrophenylhydrazone m.p. 215° (decomp.)

Δ²²-Ergostanol-3-one-7-oxide-8,14 acetate

Δ²²-Ergostenol-3-one-7-oxide-8,14 acetate (XV) 50mg をエタノールに溶解し Pd 觸媒20mg を加えて水素を通じて接觸還元した。30分間に2.8ccの水素を吸收した(理論量の1.13モル)。反應液から触媒を除き濃縮して生成した結晶をエタノールから再結晶した。

m.p. 130° [α]_D²⁰ -72° 試料 18.5mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm, α-0.58°

元素分析 試料 2.8113mg, CO₂ 7.8465mg, H₂O 2.5605mg
C 76.12, H 10.12%
C₃₀H₄₈O₄ として C 76.27, H 10.17%

Δ^{8(14),9(11),22-Ergostatrienol-3-one-7acetate}

(XV) 100mg を20ccのエタノールに溶解し1ccの冰酢酸及び亜鉛末を加えて1時間半還流煮沸した。反應液を50ccの水を加えてエーテル抽出し、エーテルを溜去した。残溜物をピリヂン+無水酢酸及びメタノールから再結晶した。收量32mg。

m.p. 185/7° [α]_D²⁰ -45.7° 試料 20.1mg, クロロホルム 2.3cc, d=1dm α-0.40°

(終りに御指導を賜つた京大野津龍三郎教授に深謝し、併せて實驗に御便宜を與えられた大阪府立工業獎勵館佐藤正典博士、大阪市立大學久保田尙志教授及び元素分析の一部に就てその勞を煩わした鹽野義研究所に感謝する)。

文 献

- 1) 齊藤: 本誌, 29, 457(1951), 同, 31, 141(1953). 2) ASKEW et al.: Proc. Roy. Soc., 109, 488 (1932), WINDAUS et al.: Ann., 492, 239 (1932), BUSSE: Z. physiol. Chem., 214, 211 (1933), MULLER: ibid., 233, 223 (1935). 3) REINDEL, WALTER & RAUCH: Ann., 452, 34 (1927).
- 4) WINDAUS, ANHAGEN, BERGMANN & BUSSE: Ann. 477, 268 (1930). 5) NAKAMIYA: Z. physiol. Chem., 203, 255 (1931). 6) WINDAUS & DIMROTH: Ber., 70, 376 (1937). 7) WINDAUS & LINSERT: Ann. 492, 226 (1932), Z. physiol. Chem., 203, 70 (1931). 8) WINDAUS & LANGER: Ann., 508, 105 (1933). 9) SCHENCK, BUCHHOLZ & WIESE: Ber., 69, 2396 (1936). 10) STAVERY & BOLLENBACK: J.A.C.S., 65, 1290 (1943).

(昭和28, 3, 14 受理)