

氏名・(本籍)	えん どう まもる 遠 藤 衛
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理 第 3 5 4 号
学位授与年月日	昭和47年6月28日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
最終学歴	昭和44年3月 東北大学大学院理学研究科修士課程化学専攻修了
学位論文題目	Antheridiogen-An: an Antheridium Inducing Hormone of Fern Prothalli (アンセリディオージェン-An: シダ前葉体における造精器形 成ホルモン)
論文審査委員	(主査) 教 授 伊 東 檄 教 授 北 原 喜 男 教 授 瀬 戸 秀 一

論 文 目 次

- I 序論：シダ類のアンセリディオージェン
- II Anemia phyllitidis前葉体の培養
- III アンセリディオージェン-Anの単離
- IV アンセリディオージェン-Anの構造
- V NMR, マススペクトル
- VI 生合成経路
- VII アンセリディオージェン-Anの高等植物に対する作用
- VIII 付録：Pteridium aquilinum前葉体培養液から分離された化合物

論文内容要旨

I 序論：シダ類のアンセリディオージェン

1950年 Döpp はウラボソ科のシダ *Pteridium aquilinum* の前葉体培養液に造精器形成を促進するホルモンが分泌されることをみだし、その物質はアンセリディオージェンと名づけられた。その後カニクサ科のシダ *Anemia phyllitidis* についても同様のホルモンの存在が確認され、この物質は構造決定後にアンセリディオージェン-An と命名された。アンセリディオージェン-An は造精器形成作用の他に胞子の暗黒発芽作用をももつことがわかり、一方では、ジベレリン類がカニクサ科のシダに対してこの両作用をももつことが明らかにされた。これら存在の確認された数種のアンセリディオージェンは、それらの種特异性およびクロマトグラフィーによって互いに異なる物質であると考えられている。

II *Anemia phyllitidis* 前養体の培養

培地としてモープの溶液 100ml, 鉄イオン溶液 1ml, 水 900ml, 寒天 9g (成分とするものを用いた。(1)モープの溶液: NH_4NO_3 (5g), KH_2PO_4 (2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1g) を 1ℓ の水にとかしたもの, 2)鉄イオン溶液: ferric tartrate (5g) を 1ℓ の水にとかしたもの, 3)微量成分溶液: H_3BO_3 (2.86g), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08g) を 1ℓ の水にとかしたもの)。胞子を殺菌して 150本のフラスコ (125ml 三角フラスコ, 培地を 37ml 含有する) に接種し, 22°C, 2,200ルクスの条件下で 22日間培養を続け, 発芽した幼若前葉体を培養フラスコ 1,000本に移植し, さらに 31日間培養を続けた。凍結融解により寒天をのぞき約 30ℓ の培養液を得た。

III アンセリディオージェン-An の単離

約 30ℓ の培養液を酢酸エチルで抽出し, シリカゲル TLC に吸着させ, イソプロパノール/濃アンモニア水, 水, 8:1:1 で展開した。造精器形成と暗黒発芽の両作用を生理活性テストとして用い, 上記 TLC を 2回くり返すことによってアンセリディオージェン-An 20mg を単離した。純粋なアンセリディオージェン-An は造精器形成においては 10^{-8} g/ml, 暗黒発芽作用においては 3×10^{-10} g/ml の希しゃくまでそれぞれ有効である。

IV アンセリディオージェン-An の構造

1. 平面構造

平面構造はアンセリディオージェン-An **1**, メチルエステル **2**, メチルエステルモノベンゾエート **3**, メチルエステルジベンゾエート **4**, の NMR によって図-1 のごとく決定された。

グループ I メチルエステルモノベンゾエート **3** において 5.23ppm の C_3 -カルビニルプロトン ($J=11.0, 6.0$ Hz) が 2.4ppm, 1.8ppm の C_2 -プロトンとカップリングしていることが NMR のデカップリングによって明らかにされた。

グループ II メチルエステル **2** の NMR において 6.26ppm の C_{14} -オレフィンプロトンにイラジ

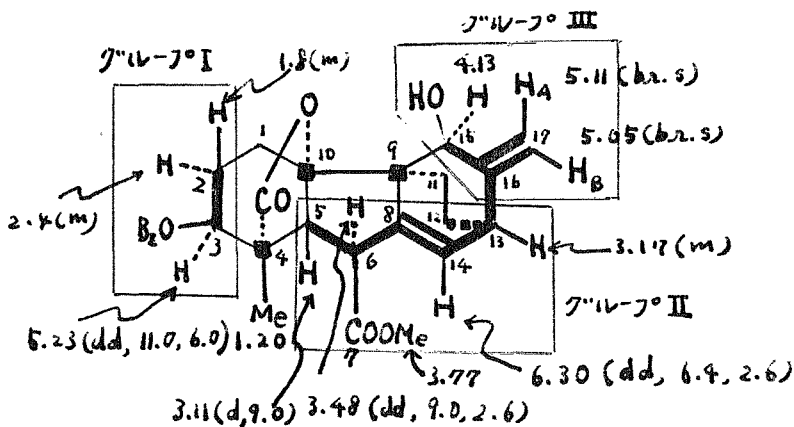
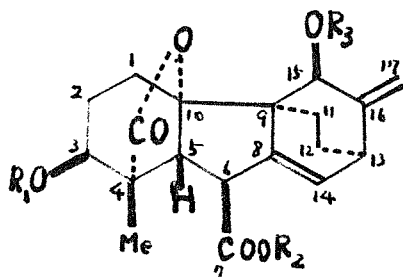


図-1: アンセリディオージェン-Anメチルエステルモノベンゾエート3のNMRデータ; ■プロトンをもたない炭素, 太線はデカップリングまたはNOEで関係づけられたところ



- 1 $R_1 = R_2 = R_3$
- 2 $R_1 = R_3 = H, R_2 = Me$
- 3 $R_1 = Bz, R_2 = Me, R_3 = H$
- 4 $R_1 = R_3 = Bz, R_2 = Me$
- 5 $R_1 = H, R_2 = Me, C = O$

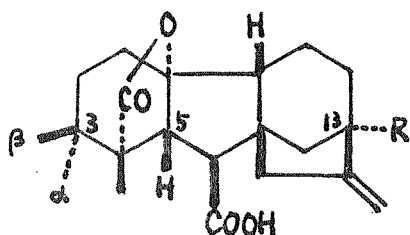
エーションすると 3.45 ppm (dd, $J=9.0, 3.0\text{Hz}$, C_6-H) のアリルカップリングがなくなり, $J=9.0$ のダブルットになった。このとき同時に 3.14 ppm ($C_{13}-H$) のマルチプレットがデカップルされた。一方 1.8 ppm ($C_{12}-H$) をイラジエートすると $C_{13}-H$ のマルチプレットはデカップルされダブルットになった。このようにしてグループ II の存在が示された。

グループ III メチルエステルモノベンゾエート 3 において 4.13 ppm (C_{15} -カルビニルプロトン) をイラジエートすると 5.11, 5.05 ppm ($C_{17}-H_{A,B}$) のブロードなシングレットが両方ともデカップルされシャープなシングレットになった。さらにこのグループ III の存在はクロム酸酸化によって α, β -不飽和ケトン 5 の得られることによって確認された。

平面構造 メチルエステルモノベンゾエート 3 において C_{13} -プロトン (3.17 ppm) をイラジエートすると $C_{17}-H_B$ (5.05 ppm) のピークにおいて 2.7% の NOE が観測された。かくしてグループ II と III が結合され図-1 の太線で示される部分については相互に関係づけられた。メチル基, ラクトン, ABC 環については, アンセリディオージェン-An 1 のセレン脱水素によって 1-メチルフルオレンが得られることによって確認された。ここで C_3-OH のかわりに C_1-OH の可能性もあるが, のちに C_3-OH であると決定される。

2. 3 β -水酸基の決定

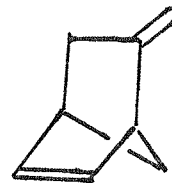
もしも水酸基がC₃-OHでなく、C₁-OHとすると、C₁₅-OHとの距離が充分に近くなり、メチルエステルベンゾエート4においてexciton splittingが起り、そのCDカーブにおいて、219nm, 233nm付近に2つのベンゾエートのChiralityに応じて相異なる付号をもつピーク ($d\epsilon$ 10~15) が観測されることが期待される。事實はこれが観測されなかったためにC₃-OHと決定された。C₃-OHが β であることは、ジベレリンA₁メチルエステル6のC_{3 β} -OHがベンゾイル化されると(C₁₃-OHもベンゾイル化されジベレリンA₁メチルエステルベンゾエート7になる)。C₅-Hのケミカルシフトが、3.21→3.47ppmと大きく(0.26ppm)と低磁場シフトするのに対して、pseudoジベレリンA₁メチルエステル8のC_{3 α} -OHがベンゾイル化された場合C₅-Hの変化は2.76→2.83ppm(0.07ppm)と小さい。アンセリデオージェン-Anメチルエステル2の場合C₃-OHをベンゾイル化することによりC₅-Hは2.89→3.11ppm(0.22ppm)と低磁場シフトしたためC_{3 β} -OHと決定された。ここでジベレリンA₁メチルエステルベンゾエート7においてC_{3 α} -Hはダブルット($J=3.0$)であるのに対して、アンセリデオージェン-Anメチルエステルモノベンゾエート3においてC_{3 α} -Hはダブルダブルット($J=11.0, 3.0$)であった。これはアンセリデオージェン-AnのA環がツイストボート型であるためと考えられる。



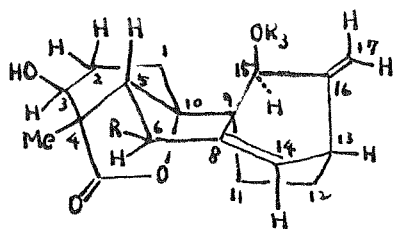
- 6 3 β -OH, 3 α -H, R = OH
- 7 3 β -OBz, 3 α -H, R = OBz
- 8 3 α -OH, 3 β -H, R = OH
- 9 3 α -OBz, 3 β -H, R = OBz

3. C-D環の構造

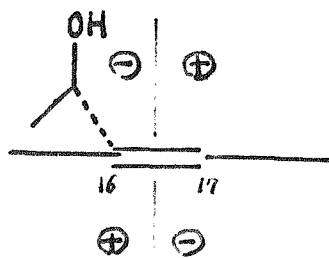
C-D環の構造を決めるにあたって、homoconjugated dieneとアリルアルコールを含むbicyclo[2.2.2]システムに着目した。ここで化合物10のORDカーブが報告されているが、それによれば、10のCDカーブは220nmにおいて+40と計算される。同様のシステムはアンセリデオージェン-Anももっており、アンセリデオージェン-Anメチルエステル2のポジティブコットン効果からC-D環の絶対配置が決定された。一方Scottらのアリルアルコールをもつchiralオレフィンのinverse octant ruleを適用すると(2a)、C_{15 β} -OHならばネガティブの寄与が期待され、メチルエステル2のカーブ(215nm, $d\epsilon$ +13.2)がこれら2つのカーブの合成されたものであるとしてこのブロードなCDカーブを説明できる(1a)。



10



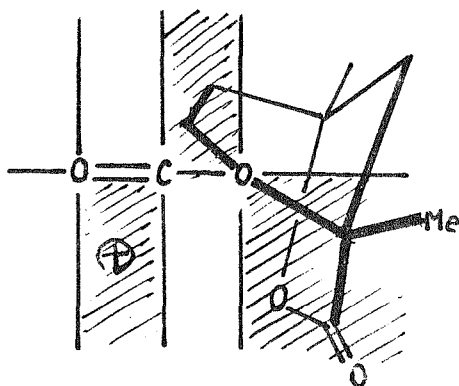
1a R=COOH



2a

4. 絶対配置

メチルエステルモノベンゾエート **3** の CDカーブはメチルエステル **2** のカーブ (ピーク, 215nm, $[\Delta\epsilon]+13.2$) の他に 228nm に $[\Delta\epsilon]+6.0$ のショルダーをもっている。この波長と $[\Delta\epsilon]$ は isolate されたベンゾエートに典型的なもので、ベンゾエートセクタールールを用いることができる。その結果 $3s$ configuration が決定された (**2b**)。



2b

V NMR, マススペクトル

1. NMR

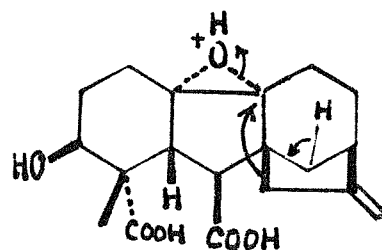
構造決定のために 220MHz, 300MHz の NMR が重要な役割をはたしたのであるが、それらの分解能の良さが、同一化合物で 60MHz と 100MHz のチャートと比較されている。

2. マススペクトル

アンセリディオージェン-*n*-Anメチルエステル **2** の高分解能マススペクトルで分子式が決定された。high mass 領域においてはジベレリン類のメチルエステルと同様のフラグメンテーションを示したが、一方アンセリディオージェン-*n*-An に特異的なピークとして $[M-30]$, $[M-96]$ がみられたが、これはジベレリン類には存在しない C_{15} -アシル水酸基の存在によるものと考えられる。

VI 生合成経路

ジベレリン類が *Anemia phyllitidis* の前葉体および胞子に対して同様の生理作用（造精子形成および暗黒発芽の両作用）を有するという事実からジベレリン A₄ および仮想的な中間体 11 を経由する生合成経路を考えることができる。



11

VII アンセリディオージェン-An の高等植物に対する作用

ジベレリン類が *Anemia phyllitidis* 前葉体および胞子に対して造精子形成ならびに暗黒発芽作用を有することから、逆にアンセリディオージェン-An のジベレリン様作用をレタス下胚軸検定法を用いて調べたところ成長抑制作用がみられた。

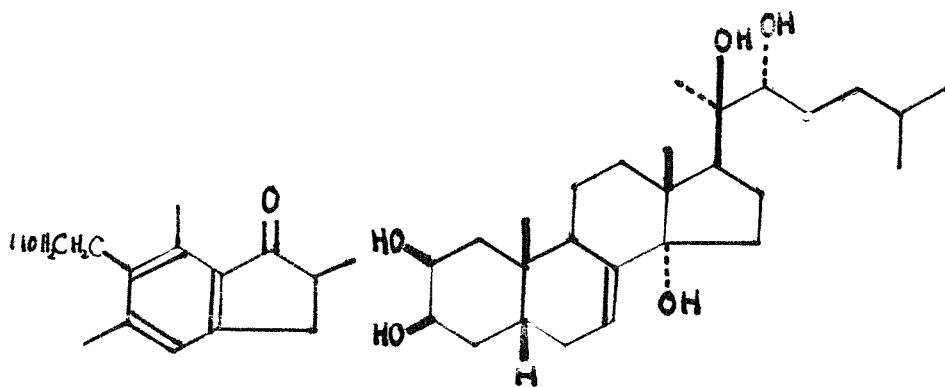
VIII 付録：Pteridium aquilinum 前葉体培養液から分離された化合物

1. ブテロシン B

1-インダノン誘導体のひとつブテロシン B 12 が *Pteridium aquilinum* 前葉体培養液から単離同定された。

2. ボナステロン A

ボナステロン A 13 が *Pteridium aquilinum* 前葉体培養液から単離された。ボナステロン A の含有量の経日変化を液体クロマトグラフィーで調べたところ、胞子接種後 30 日で最高収量 1.08mg/l を得た。



12

13

論文審査結果の要旨

植物中に含まれるホルモン作用をもつ微量物質に関する研究は分離法、構造決定法、および作用検定法の発達によって近年ますます盛んになりつつある。本論文はカニクサ科のシダ *Anemia phyllitidis* から得られる造精子形成作用および暗黒発芽作用を有するアンセリデオージェン-An (*antheridiogen-An*) に関する研究であり8章から成っている。

シダ類にこの種の作用物質が存在することは造精子形成作用の検定から確認されているにもかかわらず、単離にいたっていなかった。著者は上記のシダの発芽した幼若前葉体を培養し上記作用が最大に達した時点で培養を止め培養水溶液から作用物質の抽出を行なった。薄層クロマトグラフにより活性物質をはじめて単離し、アンセリデオージェン-Anと命名した。この物質はそれぞれ 10^{-8} g/ml, および 10^{-10} g/ml で造精子形成および暗黒発芽作用を有する。得られた物質が微量であったので構造決定は非破壊的な物理測定法によって行なわれた。メチルエステル、メチルエステルベンゾエート、およびメチルエステルベンゾエートの核磁気共鳴、二重共鳴法、核Overhauser効果の測定および質量分析法さらには円二色性の測定によって絶対配位を含めて構造が確定された。

この物質はシベレリンA₄と構造が類似し、生合成における関連が示唆される。この物質の高等植物に対する生理作用をレタス下胚軸検定法を用いて検討したところ、成長抑制作用が認められた。

さらに著者はウラボシ科のワラビの培養液から作用物質の単離を試み、プテロシンB、ボナステロンAを単離した。

以上著者は本論文においてシダ類から、はじめて造精子形成作用ならびに暗黒発芽作用を有するアンセリデオージェン-Anを単離しその構造を決定し、植物ホルモンの化学に貢献した。着想、実験技術的に優秀と考える。

よって遠藤衛提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認めた。