[*Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Vol. 63, No. 5, pp. 999～1007, 1989]

7-*O*-Methyl-luteone の *Botrytis cinerea* による代謝産物

田原哲士，John L. Ingham*，水谷純也
（北海道大学農学部農芸化学科，*レディング大学食品科学科）

昭和 63 年 12 月 7 日受理

Metabolites of 7-*O*-Methyl-luteone from *Botrytis cinerea*

Satoshi TAHARA, John L. INGHAM* and Junya MIZUTANI
Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060
**Department of Food Science, University of Reading, Whiteknights, P.O. Box 226, Reading RG6 2AP, England*

An antifungal isoflavone 7-*O*-methyl-luteone [5,2′,4′-trihydroxy-7-methoxy-6-(3,3-dimethylallyl) isoflavone, **2**] was metabolized in cultures of *Botrytis cinerea*. The substrate was transformed into dihydropyrano-isoflavone [(+)-**3**] and 2,3-dihydrodihydroxyprenyl-isoflavone [(−)(2*S*)-**5**] as major metabolites. A small quantity of dihydrofurano-isoflavone (**4**) was also yielded. However the initial intention to detecting a possible metabolic intermediate, 7-*O*-methyl-luteone epoxide, from **2** to **3**～**5** was unsuccessful. (Received December 7, 1988)

緒　　言

マメ科植物が構成的，あるいは適応的に生成するプレニル (3-methyl-2-butenyl または 3,3-dimethylallyl) 化イソフラボン類は，代表的な植物二次代謝産物のひとつで，強い抗菌活性を有しており[1～3]，植物病原菌に対する抵抗性に寄与していると考えられている．一方，特定の植物と親和関係にある微生物は，一般的にその植物の生成する抗菌物質に対して感受性が低い[4]．低感受性の原因として，膜透過性の低下や作用部位の変化，抗菌化合物の解毒代謝などが挙げられている[5,6]．抗菌性化合物の代謝分解や構造変換は，多くの場合極性の増大，生物活性の低下，さらに分解されやすい化合物へと向かう．このような二次代謝産物の代謝的運命は，その植物内における代謝回転や生物間相互作用，あるいは環境中での有機化合物の無機化の面で，それぞれ特徴的な様相を示すが，微生物から哺乳動物までの生物反応は共通性も多く，単純化も可能である[7,8]．

先にわれわれの見出した，カビによるプレニル化イソフラボノイドのプレニル基の環状エーテル構造やグリコール側鎖への変換反応は，明らかに抗菌活性の低下につながっている[9,10]．そして，そこに関与していると予想される生物反応（プレニル側鎖二重結合のエポキシ化が第一番目の反応と思われる）とほとんど同じ過程が，プレニル化イソフラボンを生合成するルーピン中でも展開していると推定される[11～13]．プレニル化イソフラボンの *Botrytis cinerea* や *Aspergillus flavus* の代謝産物として得られる環状エーテル (**a**, **b**) やグリコール (**c**) 誘導体と同じ，あるいは関連部分構造 (**a**～**f**) を有する天然物は，フラボノイド[14]の他にも，テルペノイド[15]，クマリン[16]，アルカロイド[17]など少なくない．また，それらの生成は基本骨格の形成後プレニル化が起こって，さらに側鎖二重結合の酸素化（エポキシ化）を経ていると予想されている[16]が，ロテノイド[18]やプテロカルパノイド[19]の生合成研究によっても，エポキシ中間体の存在を直接証明するような実験結果は得られていない．

プレニル化イソフラボンの側鎖に対するカビの反応性を見出したとき，われわれはさらに，（1）反応の基質特異性および（2）反応生成物ひいては反応の立体化学の解明，（3）代謝経路の確立（代謝中間体の捕捉）の必要性を感じた[20]．その後（1），（2）については，ルーピン類から得られたプレニル基の位置異性体イソフラボン

類の代謝産物を検討することと[9,10,21]，代謝産物の絶対配置の解析により[21,22]，多くの知見を得ることができた．次に（3）の代謝中間体の存在を確認，できればそれを単離し，その立体化学を解析しようと考えた．しかし，オルト-プレニルフェノール部分構造を有する化合物の過酸々化物は，エポキシ中間体を経ると思われるが実際に単離されるのは，環状エーテル（中性有機溶媒中ではジヒドロフラン誘導体 **b**[23]，酢酸や *p*-トルエンスルホン酸存在下ではジヒドロピラン誘導体 **a**[23,24]）のみである．

本論文では，エポキシ中間体捕捉の試みとして，7-*O*-methyl-luteone (**2**)[25] を基質として行った代謝実験の結果について述べる．Luteone (**1**) の *B. cinerea* による代謝産物の 93% が環状エーテル誘導体で，しかも 7 位のフェノール性 OH と環化したものであった[9]ことから，カルボニル基酸素と水素結合している 5 位 OH は，予想されるエポキシ中間体との反応性がかなり乏しいと推測された．そこで，7 位水酸基をメチルエーテルとしこれを基質にすれば，プレニル側鎖二重結合がエポキシ化された代謝反応中間体が得られるであろうと期待した．結果的には，7 位メトキシとしても，代謝反応生成物として 5 位 OH と環化したエーテル誘導体とグリコール側鎖を有するものを与え，エポキシ中間体を検出あるいは単離できなかった．しかし，7-*O*-methyl-luteone (**2**) の *B. cinerea* による代謝の様子は luteone (**1**) の場合[9]と大きく異なり，後者は代謝産物の 78% がジヒドロフラン型 **b** であったのに対し，前者ではジヒドロピラン型 **a**，グリコール型 **c** が 48% および 49% を占めていた．グリコール型代謝産物は *S* 配置を有しており，ジヒドロピラン型代謝産物は，カビによる代謝産物としては今回初めて光学活性（右旋性）のものが得られた．

なお，これらの知見を元に，基質として 7-*O*-methyl-luteone (**2**) とはプレニル基の位置異性体である 7-*O*-methyl-2, 3-dehydrokievitone [5, 2′, 4′-trihydroxy-7-methoxy-8-(3, 3-dimethylallyl) isoflavone] を使用することにより，エポキシ中間体を単離することができた．その結果については別に報告する予定である[26]．

実 験 方 法

1. 機器分析および薄層クロマトグラフィー (TLC)

融点は顕微鏡下，ミクロホットプレート法で測定し，補正は行っていない．マススペクトルは JEOL JMS-DX 300 により，70 eV のイオン化電圧で直接導入法によって測定した．^{1}H-NMR スペクトルは acetone-d_6 あるいは acetone-d_6-MeOH-d_4 (5 : 1) 溶液とし，TMS を内部標準として JEOL FX 100 (100 MHz) または Bruker AM-500 (500 MHz)，UV スペクトルは日立 EPS-3 T で MeOH 溶液として測定した．UV 測定用シフト試薬の使用は Mabry ら[27]に準じて行った．

分析 TLC および調製 TLC (PTLC) はメルクのプレコートシリカゲル 60 F_{254} (0.25 mm 厚さ) を使用，展開溶媒は BE (benzene-EtOAc=1 : 1)，CAAm ($CHCl_3$-acetone-conc. aq. NH_3=70 : 60 : 1) および CEAM ($CHCl_3$-EtOAc-acetone-MeOH=15 : 5 : 5 : 1) を用いた．イソフラボン類の検出は，$UV_{254\,nm}$ 灯下のクエン

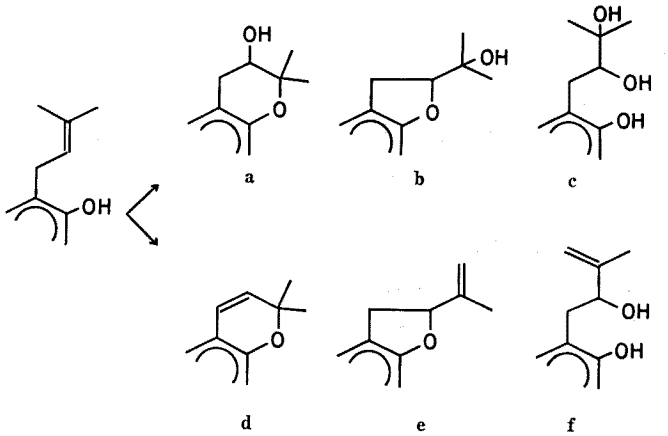


Fig. 1. Derivatization of *ortho*-Prenyl Phenol Compounds. Part structures **a**～**c** were found in the metabolites of prenyl isoflavones by *Botrytis cinerea*, and **a**, **b** and **d**～**f** were in the isoflavonoids of *Lupinus albus* (white lupin).

チングあるいは $UV_{365\,nm}$ 灯下で発する蛍光によった．定性分析の場合には，Gibbs 試薬を噴霧しアンモニア蒸気を当てて呈色の有無，反応の速さ，色調を観察した[12,28]．展開した PTLC プレート上に検出された化合物は，対応するシリカゲル層をかきとり EtOAc で溶出した．

2. 基質 前報のように調製した[25] 7-*O*-methyl-luteone(**2**)を使用した．**2**：無色の小さな棒状晶(EtOAc/benzene より結晶化)，EtOAc 抱合体 (^{1}H-NMR シグナル強度より約 1：1) である．mp：EtOAc 抱合体 65～67℃，EtOAc を失ったもの 179～180℃．$UV_{365\,nm}$ fluorescence：dark purple. Gibbs test：(+), rapid, purple-blue. MS *m/z*(%)：369 (M^++1, 15), 368 (M^+, 62), 353 (19), 326 (21), 325 ($M^+-C_3H_7$, 100), 314 (17), 313 (fragment **h**, 84), 312 (15), 283 (10), 179 (RDA 開裂による A-ring fragment **j**, 28), 134 (RDA 開裂による B-ring fragment **k**, 10). $UV\lambda_{max}$ (MeOH, nm)：230 sh, 266, 287 sh, 330 sh；+NaOMe, 230 sh, 270 (br.), 289 sh；+$AlCl_3$, 233 sh, 276, 310 sh, 374 (br.)；+NaOAc, 変化なし．^{1}H-NMR データは Table I に示した．

3. 代謝実験 500 ml 容振盪フラスコ中のグルコース 5%，ペプトン 1%，酵母エキス 0.1%，水道水よりなる液体培地 100 ml に *Botrytis cinerea* AHU 9424 を接種し，25℃ 4 日間振盪培養した[9]．接種時 pH 6.4 であった培地は，培養後 pH 4.1 に変化した．その後，各フラスコに 1 ml の EtOH に溶解した基質 5 mg を添加（合計 5 本のフラスコ，基質使用量 25 mg)．対照区は，基質を含まない EtOH を 1 ml 加えた．反応培養は基質添加後 24 時間とし，各フラスコにつき 100 ml の acetone を添加して反応を止め，濾別後 50% acetone 10 ml で菌体を洗浄，濾洗液を減圧濃縮し，EtOAc で抽出 (1/2×3) した．EtOAc 層はまとめて 5% $NaHCO_3$ 溶液，飽和食塩水で洗浄（各 2 回)，有機層を無水硫酸ソーダで乾燥後濃縮して代謝産物を単離するための PTLC 用試料とした．対照区は同様に EtOAc 抽出物を得，TLC パターンを基質添加区と対比させることにより，基質由来物質とそうでない成分との区別に用いた．

4. 1,2-グリコールオスメートエステルの CD による立体化学解析 2 位に不斉中心を有する 1,2-グリコール部分構造を持つ化合物は，オスメートエステルのピリジン複合体に誘導し，その 470～480 nm に観察されるコットン効果の符号を調べることにより絶対配置を決定することができる[21,29]．乾燥したグリコール誘導体 **5** 1 mg（約 2.5 μmol) を CH_2Cl_2-pyridine 混合物 (118 μl+4 μl) に溶解し，OsO_4 溶液 (0.69 mg/9.2 μl CH_2Cl_2) を添加して，30℃，4 時間放置，その後 CH_2Cl_2 で 2.7 ml に希釈して，日本分光 J-20 A 自記分光旋光計で CD スペクトルを測定した．対照として，**5** のみを含まないものを並行して調製し基線を画かせた．470～480 nm の CE(−) は *S*，CE(+) は *R* 配置に対応する[29]．

実験結果

1. 代謝産物の単離精製とその性質

代謝産物の EtOAc 抽出液を TLC に供したところ，添加した基質は完全に消失し，対照区にはなく代謝反応液にのみ見出されるイソフラボン様成分 (F_{254}TLC プレート上で $UV_{254\,nm}$ 灯下クエンチングがあり，$UV_{365\,nm}$ 灯下暗赤紫色や暗灰青色の蛍光が見られる）が基質より *Rf* の小さい部分に検出された．CAAm を展開溶媒とすると，基質は *Rf* 0.48 に対し，代謝産物と思われる成分は *Rf* 0.14（2 成分よりなる）と *Rf* 0.08 に検出された．PTLC により 2 成分よりなる上のバンドから 14.1 mg の溶質が得られ，少量の EtOAc で溶解，低温下に保持すると，無色の小さなザラメ状結晶 5.8 mg が析出した．母液を展開溶媒 BE で PTLC を行い，移動度の大きい成分 (*Rf* 0.24) 2.5 mg と小さい成分 (*Rf* 0.09) 1.9 mg を得た．前者は TLC により最初の析出物と同一物質と判明し，高純度であったので 7 ML-M 1 とした．収率は 31.8% であった．微量成分は不純物を含み，CEAM で再度 PTLC を行い (*Rf* 0.46)，無色の無定形固化物約 0.5 mg (7 ML-M 2) を得た．7 ML-M 2 の収率は約 2% であった．代謝産物 1 成分を含む下のバンドの EtOAc 溶出部を濃縮すると 12.7 mg の残渣が得られた．これを少量の EtOAc に溶解，低温に保持すると淡黄色針状晶の集合体 8.3 mg が得られた．さらに母液を CEAM で再度 PTLC を行い，析出物と *Rf* が一致 (*Rf* 0.40) する成分 0.5 mg を単離した．これらを併せて 7 ML-M 3 とした．収率は 32.2% であった．

これら代謝産物の構造解析は，これまでのプレニル化イソフラボン類のカビによる代謝産物の構造を参考に，システマティックに行った[30]．

（i） 質量分析による分子量の決定，基質の分子量からの変化[30]．16 質量単位増：エポキシドを含め，環状

エーテル類（ジヒドロフラン環やジヒドロピラン環化物 **a** や **b**）. 18 質量単位増：二重結合部への水付加物. 34 質量単位増：二重結合部が飽和されたグリコール **c**.

（ii） シフト試薬を利用した UV スペクトルの測定[27]. $AlCl_3$（+HCl）による 5-OH が遊離かどうかの区別. NaOAc（+H_3BO_3）による 7-OH が遊離かどうかの区別.

（iii） 質量分析によるフラグメンテーションより部分構造の推定. M^+-59 や m/z 59 はジヒドロフラン構造 **b** に, M^+-73 はジヒドロピラン構造 **a** に, M^+-89 はグリコール **c** に特徴的. 逆ディールス・アルダー開裂フラグメント（RDA fragment）は置換基の種類や位置の推定につながる[30,31].

（iv） ^{1}H-NMR スペクトルの解析：基本骨格への水酸基やアルキル置換の様式とその構造に関する知見が得られる[30].

3種の代謝産物 7 ML-M 1, 7 ML-M 2 および 7 ML-M 3 は質量分析（EI-MS）の結果, それぞれ MW 384（基質 +16）, MW 384（基質 +16）および MW 402（基質 +34）であったことから, 前二者が環状エーテル化物（末端メチルのアルコールへの酸化や芳香環の水酸化は, これまでにプレニル化イソフラボンの *B. cinerea* による代謝産物としては, 全く見出されていない）, 7 ML-M 3 はグリコール型の代謝産物と予想された.

2. 代謝産物の構造

（1） 7-*O*-Methyl-luteone 代謝産物 7 ML-M 1(3): 7 ML-M 1 は無色小さな立方体様の結晶を与え, mp 272～273°C. $UV_{365\,nm}$ fluorescence : dark gray-blue. Gibbs test : (+), rapid, purple-blue. $[\alpha]_D^{23}$+6.4° および $[\alpha]_{405}^{23}$+16°(c=0.13, MeOH). MS m/z(%) : 385(M^++1, 17), 384(M^+, 71), 326(7.3), 325(14), 314(14), 313(71), 312(100), 311(17), 297(5.9), 283 (7.2), 179 (38), 161 (6.3), 134 (12), 105 (6.4), 69 (5.9). $UV\lambda_{max}$ (MeOH, nm) : 212 sh, 252 sh, 262, 284 sh, 315 sh (br.) ; +NaOMe, 232 sh, 260, 278, 315 sh ; +$AlCl_3$, 213 sh, 264 (br.), 269 sh, 287 sh(塩酸の添加により MeOH 中のスペクトルにもどった) ; +NaOAc, 変化なし.

先に述べたように 7 ML-M 1 はその分子量（M^+ 384＝基質+16）から環状エーテル部分構造を有していると予想され, MS スペクトルでB環由来の RDA fragment m/z 134 (**k**) が検出され, ^{1}H-NMR (Table I) で芳香族プロトンが基質類似であることから, A環側鎖部分の構造変化したものであることがわかる. MS fragment m/z 313 [M^+-71 (**h**), 71%] が検出されることは, この化合物がジヒドロピラン型代謝物 (**a**) であることを示唆している[30]. さらに ^{1}H-NMR スペクトルで C-5-OH が検出されないこと, UV スペクトルで $AlCl_3$ 添加によるシフトが見られるが, このシフトは塩酸の添加で元にもどることから 5-OH とカルボニルの間にアルミニウムがキレートしたのではなく[27], カルボニルと 2′-OH の間にキレートしたもの[32]と判断されることから, 側鎖が 5-OH とジヒドロピラン環を形成していると考えられる. この推定は ^{1}H-NMR で基質と同様に 7-OCH_3 が検出され, 残りのアルキルプロトンがジヒドロピラン環構造を有する **6** の場合 [δ 1.34 と 1.40 (2×3 H, 2 singlet), 2.62 (1 H, dd, J=17, 7.1 Hz), 2.98 (1 H, dd, J=17, 5.4 Hz) および 3.87 (1 H, dd, J=7.1, 5.4 Hz)][9] とよく類似していることによって確認された. ジヒドロピラン部分構造とジヒドロフラン構造は, ^{1}H-NMR によって容易に区別される[30]. 以上より 7 ML-M 1 の構造が Fig. 3 の **3** であると結論した. 本化合物はジヒドロピラン環上水酸基のついた炭素が不斉であり, 右旋性化合物として得られた. 代謝産物に新たに導入された不斉中心の立体化学については後から論じることにするが, プレニル化イソフラボンの代謝産物として単離されたジヒドロピラン型化合物が光学活性で得られた最初のものである.

（2） 7-*O*-Methyl-luteone 代謝産物 7 ML-M 2(4): 7 ML-M 2 は少量のため結晶としては得られなかった. $UV_{365\,nm}$ fluorescence : dark gray-blue. Gibbs test: (+), rapid, purple-blue. 旋光度は 350～650 nm について測定したが, 濃度が 0.02% 以下であり明白な旋光性を観察することはできなかった. MS m/z (%) : 385 (M^++1, 38), 384 (M^+, 94), 326 (57), 325 [M^+-59 (**g**), 100], 323 (15), 193 (22), 192 (25), 191 (**i**, 43), 179 (20), 164 (30), 161 (17), 154 (21), 134(**k**, 15), 107 (17), 97 (24), 59 (**l**, 28). $UV\lambda_{max}$(MeOH, nm) : 263, 282 sh, 320 sh (br.) ; +NaOMe, 235 sh, 261, 275 (br.) ; +$AlCl_3$, 234 sh, 265 sh, 279, 288 sh (塩酸の添加により MeOH 中のスペクトルにもどった) ; +NaOAc, 変化なし.

7 ML-M 2 の分子量は 7 ML-M 1 と同じで環状エーテル部分構造を有する異性体と思われた. MS スペクトル

Table I. ^{1}H-NMR Data[a] for 7-*O*-Methyl-luteone and Its Metabolites

Proton \ Compound	7-*O*-Methyl-luteone 7 ML(**2**) 100 MHz	7 ML-1(**3**)	7 ML-2(**4**)	7 ML-3(**5**)
2-H	8.22 s	8.06 s	8.15 s	8.19 s
5-OH	12.97 s	—	—	13.11 s
7-OCH_3	4.00 s (3H)	3.99 s (3H)	3.99 s (3H)	3.98 s (3H)
8-H	6.69 s	6.67 s	6.66 s	6.69 s
3′-H	6.50 d (i)[b]	6.43 d J=2.4	6.45 d J=2.4	6.45 d J=2.4
5′-H	6.45 dd J=8.6, 2.4	6.39 dd J=8.3, 2.4	6.43 dd J=8.3, 2.4	6.41 dd J=8.3, 2.4
6′-H	7.14 d J=8.6	7.05 d J=8.3	7.10 d J=8.3	7.12 d J=8.3
1″-Ha	3.35 br. d (2H) J=7.1	2.58 dd J=17.2, 7.3	3.12 dd J=15.5, 10.0	2.89 d J=7.4
1″-Hb		2.92 dd J=17.2, 5.5	3.20 dd J=15.5, 8.1	2.90 d J=5.5
2″-H	5.33 br. t J=7.1	3.81 br. t J=*ca.* 6.4	4.88 dd J=10.0, 8.1	3.64 dd J=7.5, 5.5
4″-H_3	1.65 br. s (3H)	1.31 s (3H)	1.25 s (3H)	1.23 s (3H)
5″-H_3	1.78 br. s (3H)	1.41 s (3H)	1.32 s (3H)	1.25 s (3H)

[a] Except where indicated the spectra were determined at 500 MHz (in acetone-d_6, **2** and **4**; in acetone-d_6-MeOH-d_4=4 : 1, **3** and **5**; TMS, reference). J are in Hz.
[b] An incomplete signal for which a coupling constant could not be calculated.

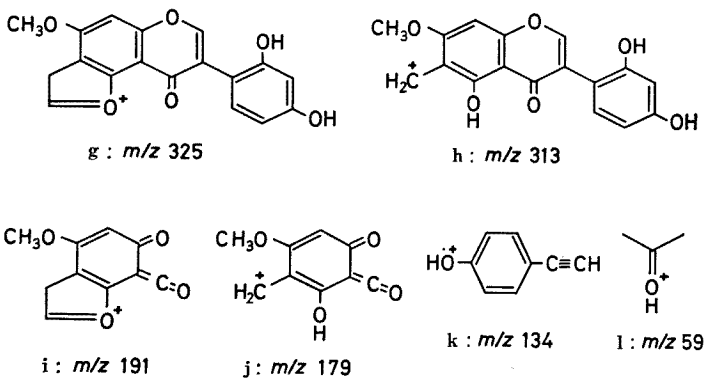


Fig. 2. Mass Spectral Fragments Mentioned in the Text.

で base peak が m/z 325 (M^+-59, **g**) に観察され, m/z 59 (**l**, 28%) も検出されることから 2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2, 3-dihydrofuran 部分構造 (**b**) の存在が示唆された[30]. ^{1}H-NMR スペクトルで 5-OH が検出されず, 7-OMe は基質と同様に検出されることから 5 員環エーテルは 5-OH と側鎖の間で形成されていなければならない. このことはさらに, UV スペクトルが $AlCl_3$ によってシフトを受けるが塩酸添加によって元にもどり, **3** と同様 5-OH がブロックされていると判断されることによっても支持された. ^{1}H-NMR のアルキルプロトンのケミカルシフト (Table I) は, ジヒドロフラン環 (**b**) を有する luteone 代謝産物 BC-1 (**7**) のそれら [δ 1.25 および 1.30 (2×3H, 2 singlet), 3.16 (1H, dd, J=16, 9.8 Hz), 3.21 (1H, dd, J=16, 7.9 Hz) および 4.86 (1H, dd, J=9.8, 7.9 Hz)][9] ときわめてよく類似していた. 以上の結果より 7 ML-M2 の構造を Fig. 3 の 4 と決定した. なお, 7 ML-M1 あるいは 7 ML-M2 がエポキシ基を有していないことは, 5-OH が遊離でないことおよび ^{1}H-NMR スペクトルで, プレニル基がエポキシ化された場合には, 1″-メ

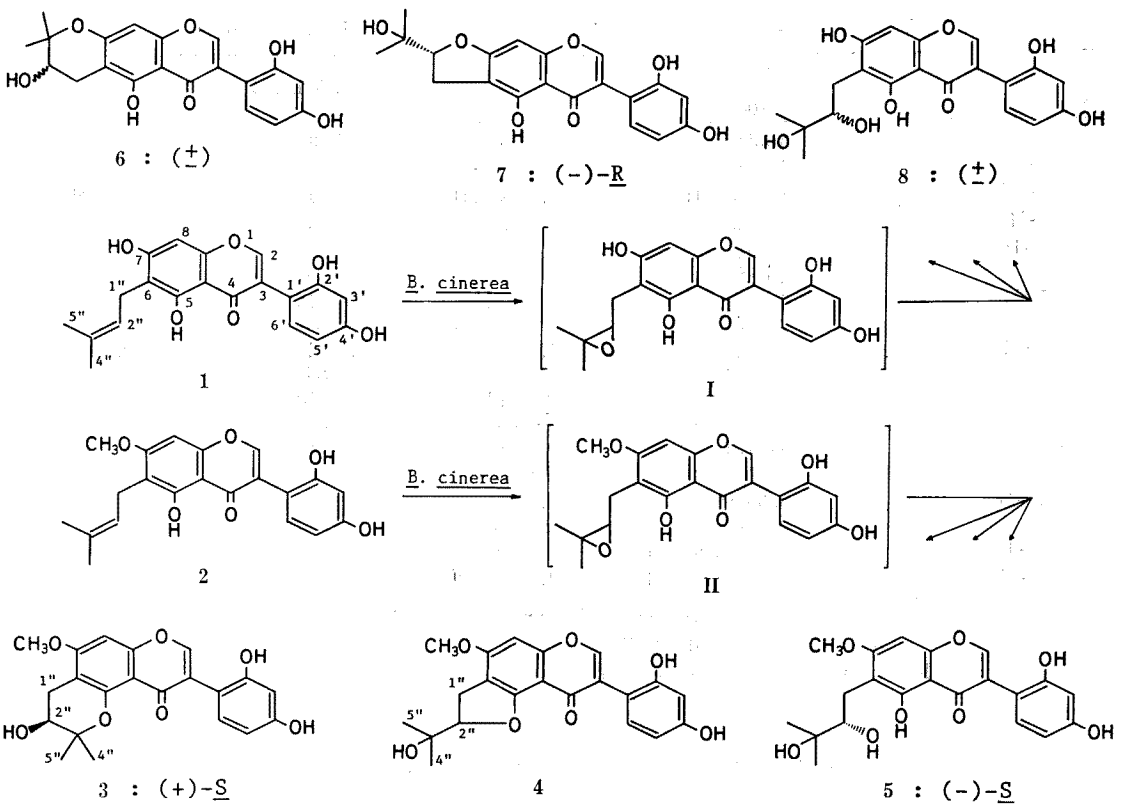


Fig. 3. Metabolites of Luteone (**1**) and 7-*O*-Methyl-luteone (**2**) by *Botrytis cinerea*. I and II are possible metabolic intermediates. The optical property of **4** is not clear, and **6** and **8** were isolated as a racemic form. The absolute configuration of **3** is tentatively induced.

チレンおよび 2″-メチレンプロトンが 2.6～3.1 ppm に検出されねばならない[9]ことからも明白である.

（3） **7-*O*-Methyl-luteone 代謝産物 7 ML-M 3(5):** 7 ML-M 3 は分子量が 402 で基質より 34 増加していることから, グリコール側鎖を有する代謝産物と予想された[30]. 7 ML-M 3 : 淡黄色針状晶 (EtOAc より結晶化), mp 212～214°C. $UV_{365\,nm}$ fluorescence : dark purple. Gibbs test : (+), rapid, purple-blue. $[\alpha]_D^{23}$ −3.0°, $[\alpha]_{405}^{23}$ −7.0° (c=0.143, MeOH). MS m/z (%) : 403 (M^++1, 8.5), 402 (M^+, 21), 384 (5.5), 344 (24), 343 (74), 315 (7.5), 314 (34), 313 [M^+−89 (**h**), 100], 312 (9.6), 301 (13), 295 (9.0), 209 (7.2), 181 (8.1), 180 (9.6), 179 (**j**, 39), 149 (7.7), 134 (**k**, 11), 69 (7.1), 59 (13). $UV\lambda_{max}$ (MeOH, nm) : 212 sh, 266, 287 sh ; +NaOMe, 280 (br.) ; +$AlCl_3$, 212 sh, 234 sh, 276.5, 312 (br.), 376 (br.) (塩酸の添加によりスペクトルの変化なし) ; +NaOAc, 変化なし.

^{1}H-NMR スペクトル (Table I) より, 7-OMe は基質同様に存在し, 水素結合性 5-OH (δ, 13.11) も検出されることから, 6 位プレニル基が側鎖構造を残して部分変換された代謝産物であることがわかる. UV スペクトルからも基質同様 7-OMe であるため NaOAc による長波長シフトは観察されなかった. $AlCl_3$ の添加により約 10 nm の長波長シフトが見られるが, このシフトはさらに HCl を加えても変化しないことから 5-OH とカルボニルの間にアルミニウムがキレートしたもので, 5 位水酸基が遊離であることを示している[27]. MS スペクトルの base peak m/z 313 は分子イオンから 89 質量単位の切断されたもので, 2,3-dihydroxy-3-methylbutyl 側鎖を有する化合物に特徴的なものである[30]. グリコール型側鎖を有することの確証は, ^{1}H-NMR スペクトルのアルキルプロトンが luteone 代謝産物 AF-2 (**8**) のそれら [δ 1.26 および 1.28 (2×3 H, 2 singlet, 4″-および 5″-H_3), 2.62 (1 H, dd, J=14,

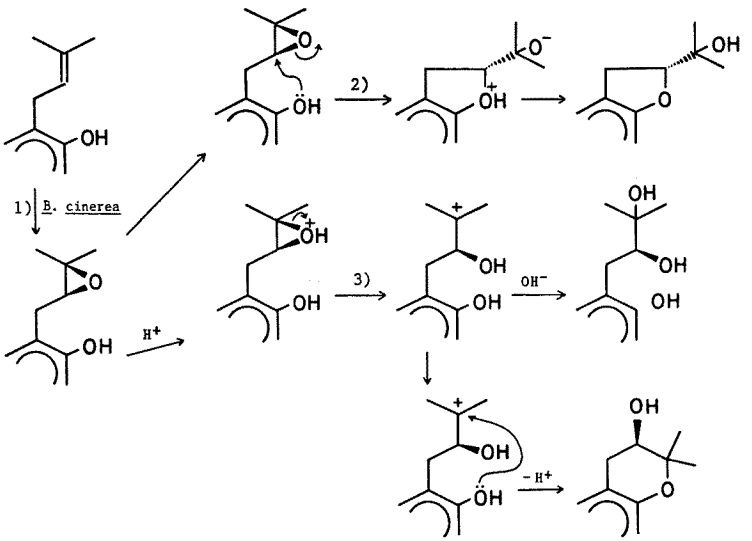


Fig. 4. Reaction Mechanisms and Stereochemistry for *ortho*-Prenyl Phenol Metabolism. 1) Stereo-specific epoxidation by *Botrytis cinerea*. 2) Dihydrofuran-ring formation by SN_2-type cyclization (stereo-inversion). 3) Carbonium ion formation by protonation (stereoretention).

9.8 Hz, 1″-Ha), 3.25 (1 H, dd, J=14, 2.0 Hz, 1″-Hb) および 3.65 (1 H, dd, J=9.8, 2.0 Hz, 2″-H)][9] と同様に帰属されることによって得られた. 7 ML-M 3 のメチレンプロトンがほぼ等価であり AF-2 (**8**) の場合と様子が異なる理由は, AF-2 (**8**) の場合, 7位水酸基が遊離でその磁気異方性効果が 7-OMe よりも大きいことによると考えられる. 以上の結果から 7 ML-M 3 の構造を Fig. 3 の **5** であると結論した.

本代謝産物は MeOH 溶液中左旋性を示すため, 迫田らの方法に従って 1,2-グリコール (2位が不斉) のオスメートエステル・ピリジン複合体を調製し, 470～480 nm に観察される CD コットン効果の符号を測定した[21,29]. その結果 $[\theta]^{23}_{475}$−1440 を与えたことから, 不斉中心側鎖 2″ 位の絶対配置が S と決定された[29]. 2,3-dehydrokievitone[5, 7, 2′, 4′-tetrahydroxy-8-(3, 3-dimethylallyl)isoflavone] のカビによる代謝産物として得られたグリコール誘導体も (−)-S 配置であり[21] 7 ML-M 3 と同じ立体化学を有している.

考　　察

Botrytis cinerea によるオルト・プレニルフェノール化合物代謝の中間体と予想されているエポキシドの存在を確認する目的で, 7-*O*-methyl-luteone (**2**) を基質にして代謝産物を調べたが, 7位水酸基が遊離の場合, 側鎖エポキシ基の環状エーテル形成反応が専らそちらで起こり, 5位水酸基との環化物が得られなかったにもかかわらず[9], 7位をメトキシル基に変換すると, 代謝産物として得られたのは, エポキシドの加水分解によると考えられるグリコール型側鎖を有するもの (**5**) が半分, 残りは5位水酸基と環状エーテルを形成したもの (**3**, **4**) であった.

先の報告[9]によれば, luteone (**1**) は *B. cinerea* により主としてジヒドロフラン型 **7** を生成 (代謝産物の 78% に相当), **6** および **8** はそれぞれ 15% および 7% であった. **2** の代謝産物は, 質的に **1** の場合に対応したタイプのものであるとはいえ, 生成物の比は **3**, **4**, **5** が生成物の 48%, 3%, 49% と大きく異なっていた. この違いは, 7-OH と 5-OH のエポキシ中間体との反応性の差によると思われる. すなわち, **1** のように 7-OH 遊離の場合分子内で SN_2 型の共奏的反応が優先的に起こって5員環エーテルを与え, プロトネーションによるカルボニウムイオン経由環化やエポキシドの加水分解によって生成する **6**, **8** の生成量がかなり小さいのであろう. 一方, 7-OMe の場合には, 水素結合した 5-OH の反応性が相対的に低く, 反応培地の弱酸性条件もあってプロトネートされやすく, カルボニウムイオン経由で6員環

生成反応が優先的に進行（**3** の生成）し，その間，水酸イオンとの反応でグリコール型の代謝産物（**5**）も相対的に多く生成するのであろう．グリコール生成にはepoxide hydrolase[33]が部分的に機能しているのかもしれない．それゆえ，代謝反応の初期にはエポキシドが検出される可能性も少なくないが，5位水酸基の環状エーテル生成反応が起こっていることから，いずれにしても，代謝中間体としてエポキシドを単離同定することは困難であろうと思われた．

プレニル基のオルト位水酸基をブロックした化合物でエポキシ中間体を単離するための代謝実験の基質に使えそうなものに，7-*O*-methyl-2, 3-dehydrokievitone[5, 2′, 4′-trihydroxy-7-methoxy-8-(3, 3-dimethylallyl)isoflavone, **9**] がある．本化合物は **2** とプレニル基の位置異性体（前者は 8-プレニル，**2** は 6-プレニル）であり，プレニル基のオルト位は7位の水酸基のみで，選択的なメチル化も容易である[26]．しかし，2, 3-dehydrokievitone は luteone（**1**）より *B. cinerea* による代謝を受け難く[21]，7-*O*-メチル化物でも同様の傾向があるとすれば，エポキシ化がゆるやかで生成エポキシ中間体がオルト位に水酸基を欠いていてもさらに加水分解反応を受けるこの種の反応中間体を捕捉するのに，**9** が基質として適当であるか疑問に思われた．本実験により **2** が **1** より代謝反応を受けやすい（**1** は 72 時間反応で培地から消失，**2** は 24 時間反応でほぼ消失）ことがわかった．そこで **9** を *B. cinerea* に投与したところ，反応中間体として側鎖二重結合部のエポキシドが生成し，最終的にグリコール型の代謝産物のみを与えることが明らかにされた[26]．目的としたエポキシド中間体の単離同定がうまくいったのは，**9** が 2, 3-dehydrokievitone よりも 10 倍程度酸化反応を受けやすかったことによるようである．

7-*O*-Methyl-luteone（**2**）の主要な代謝産物 **3** および **5** は，それぞれ光学活性体として単離された．光学的純度についての検討は行っていないが，**5** はオスメート・エステルの CD 解析[21,29]より，MeOH 中左旋性を示す化合物の絶対配置が *S* であることが明らかになった．Fig. 4 に示すとおり，エポキシド経由での反応を考えれば，エポキシ化の過程が立体特異的に進行して，ジヒドロフラン環形成は立体反転，ジヒドロピランおよびグリコール形成過程は立体保持の反応が期待される．*B. cinerea* により luteone（**1**）から *R* 配置の **7** が得られた[22]こと，2, 3-dehydrokievitone より生成するグリコールの立体配置が *S* である[21]ことから，エポキシ中間体の立体配置は *S* でなければならない（実験的証拠は(26)参照）．**3** のようなジヒドロピラン型の化合物が，*B. cinerea* の代謝産物として光学活性体で単離されたのは初めてのことである．本化合物は右旋性である（MeOH 中）が，予想される生成反応様式からすれば，**5** と同様 *S* 配置であろうと推定される．オゾン分解を利用した **3** の立体構造解析[34]をいずれ実施する予定である．

要　　約

プレニル化イソフラボンのカビによる代謝中間体を単離する目的で 7-*O*-methyl-luteone（**2**）の *Botrytis cinerea* による代謝実験を行った．

単離された代謝産物は，側鎖二重結合部のエポキシドを経由していると思われる環状エーテル誘導体 **3**，**4** およびエポキシドの加水分解生成物と思われるグリコール誘導体 **5** であった．基質の5位 OH はカルボニル基と強く水素結合しているため，7位 OH が遊離だとほとんど一方的に **6**，**7** の環状エーテルを生成するが，7位 OH をメトキシ基に変換すると，今度は5位 OH 基が環状エーテルを形成するようになり，目的としたエポキシ中間体（Fig. 3, II）を確認することはできなかった．

Luteone（**1**）に比べて **2** はより容易に *B. cinerea* により代謝されること，**5** のグリコールの不斉中心は *S* 配置であることが明らかにされた．今回，微生物代謝産物としては，初めて光学活性体（右旋性）として単離されたジヒドロピラン型イソフラボン（**3**）は，反応様式からして *S* 配置を有すると推定された．

代謝実験に使用した菌株を提供していただいた北大応用菌学講座高尾彰一教授，NMR スペクトルを測定していただいた北大理学部遠藤里美氏，同農学部塙藤徳氏，マススペクトルを測定していただいた同渡部賢二，熱田善子両技官に感謝致します．本研究の一部は文部省科学研究費補助金（一般研究 C，63560116）の援助によって行われた．

（1）H. Fukui, H. Egawa, K. Koshimizu and T. Mitsui : *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 417 (1973).
（2）J. B. Harborne, J. L. Ingham, L. King and M. Payne : *Phytochemistry*, **15**, 1485(1976).
（3）M. D. Woodward : *Phytochemistry*, **18**, 363 (1979).

(4) J. B. Harborne and J. L. Ingham : "Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution," ed. by J. B. Harborne, Academic Press, London, 1978, p. 343.
(5) D. A. Smith : "Phytoalexins," ed. by J. A. Bailey and J. W. Mansfield, Blackie & Son, Glasgow, 1982, p. 218.
(6) H. D. Vanetten, D. E. Matthews and D. A. Smith : "Phytoalexins," ed. by J. A. Bailey and J. W. Mansfield, Blackie & Son, Glasgow, 1982, p. 181.
(7) "Drug Metabolism—from Microbe to Man," ed. by D. V. Parke and R. L. Smith, Taylor & Francis, London, 1977.
(8) P. Millburn : "Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution," ed. by J. B. Harborne, Academic Press, London, 1978, p. 35.
(9) S. Tahara, S. Nakahara, J. Mizutani and J. L. Ingham : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 1471 (1984).
(10) S. Tahara, S. Nakahara, J. Mizutani and J. L. Ingham : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2605 (1985).
(11) J. L. Ingham, S. Tahara and J. B. Harborne : *Z. Naturforsch.*, **38 C**, 194 (1983).
(12) S. Tahara, J. L. Ingham, S. Nakahara, J. Mizutani and J. B. Harborne : *Phytochemistry*, **23**, 1889 (1984).
(13) S. Tahara, S. Orihara, J. L. Ingham and J. Mizutani : *Phytochemistry*, **28**, 901 (1989).
(14) J. L. Ingham : *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **43**, 1 (1983).
(15) J. S. Glasby : "Encyclopaedia of the Terpenoids," John Wiley & Sons, Chichester, 1982.
(16) R. D. H. Murray : *Fortschr. Chem. Org. Naturst.*, **35**, 199 (1978).
(17) J. S. Glasby : "Encyclopedia of the Alkaloids," Plenum Press, New York, 1975 (Vol. 1 & 2) and 1977 (Vol. 3).
(18) L. Crombie : *Natural Prod. Rep.*, **1**, 3(1984).
(19) S. W. Banks and P. M. Dewick : *Phytochemistry*, **22**, 2729 (1983).
(20) 田原哲士：農化，**58**，1247 (1984).
(21) S. Tahara, E. Misumi, J. Mizutani and J. L. Ingham : *Z. Naturforsch.*, **42 C**, 1055 (1987).
(22) S. Tahara, J. L. Ingham and J. Mizutani : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 211 (1987).
(23) R. D. H. Murray, M. Sutcliffe and P. H. McCabe : *Tetrahedron*, **27**, 4901 (1971).
(24) J. C. Breytenbach and G. J. H. Rall : *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1980**, 1804.
(25) S. Tahara, K. Watanabe and J. Mizutani : *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.*, **63**, 155 (1987).
(26) S. Tahara, J. L. Ingham and J. Mizutani : *Phytochemistry*, in press.
(27) T. J. Mabry, K. R. Markham and M. B. Thomas : "The Systematic Identification of Flavonoids," Springer Verlag, Berlin, 1970, p. 165.
(28) F. E. King, T. J. King and L. C. Manning : *J. Chem. Soc.*, **1957**, 563.
(29) 迫田直一，田中俊作，大北耕三，小稲則夫：日化，**91**，265 (1970).
(30) S. Nakahara, S. Tahara, J. Mizutani and J. L. Ingham : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 863 (1986).
(31) K. R. Markham and T. J. Mabry : "The Flavonoids," ed. by J. B. Harborne, T. J. Mabry and H. Mabry, Chapman and Hall, London, 1975, p. 45.
(32) S. Tahara, Y. Hashidoko, J. L. Ingham and J. Mizutani : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1809 (1986).
(33) W. G. Niehaus, Jr. and G. J. Schroepfer, Jr. : *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4227 (1967).
(34) J. Lemmich and B. E. Nielsen : *Tetrahedron Lett.*, **1969**, 3.