- (2) RAMSEY, L. L. and PATTERSON, W. I. : *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 29, 337 (1946).
(3) AEPLI, O. T., MUNTER, P. A. and GALL, J. F. : *Anal. Chem.*, 20, 610 (1948).
(4) HARRIS, T. H. : *J. Assoc. Official Agr. Chem.*, 32, 684 (1949).
(5) 安藤 : 東京工業試験所報告, 31の5 (昭和 11 年).

Summary

(1) We have reduced the amount of reagents and the size of apparatus of Harris' chromatographic method to 1/3~1/5 without losing accuracy.

(2) The most suitable silica gel for the chromatographic analysis of γ -BHC is that with a small adsorption capacity below 5% in the vapor pressure shown by 30% H_2SO_4 solution at 30°C.

Fungisporin に関する研究 (第 1 報)

住 木 諭 介, 宮 尾 興 平、(東京大学農学部農芸化学教室)

昭和 26 年 8 月 18 日 受 理

Studies on *Fungisporin*. Part 1.

Yusuke SUMIKI and Kohei MIYAO (Department of Agricultural Chemistry,
Faculty of Agriculture, University of Tokyo)

著者等は *Penicillium chrysogenum* の菌体成分を研究中たまたまその胞子から分解点 355~360° の昇華性の一新物質を得た。即ちこの菌の乾燥菌体を加熱すると、無色の細い繊維状の結晶が昇華して来るのであるが、この物質は P, S, ハロゲンを含まず, C, H, N, O より成る特異な性質を有する極めて安定な化合物で、従来の文献にも記載がなく、又その生理的意義にも極めて興味深いものがあると考えられるので、この物質の研究に着手した。猶この物質は *Penicillium* 属の数種及び *Aspergillus* 属の或る種のものからも得られ、且又これらの胞子の成分として存在している事を確かめたので著者等はこの物質に“fungisporin”なる名称を与えた。現在我々は fungisporin の化学構造を研究中であるが、第 1 報として、その生成、性質、及び一、二の分解生成物等について報告する。

Fungisporin を含有する菌として現在迄に判明したものは、*P. notatum*, *P. chrysogenum*, *P. brevicaulis*, *P. monoverticillata*, *P. asy-biverticillata*, *P. purpogenum*, *P. funiculosum*, *P. clariformis*, 及び *Aspergillus versicolor* 等である。

Fungisporin を生成せしめるには、*P. notatum* 等の液体表面培養、或はパン等に固体培養せしめたものを乾燥粉碎し、鉄板上に薄く一様に拡げ、その上に細目の金網をかぶせて下から加熱し焙焼せしめて、fungisporin を網上に昇華析出せしめる。このものには炭化した菌体末や、微量のタール等が附着しているが、再結溶媒がないので acetone 等で洗い、昇華して精製する。Fungisporin は濃硫酸には溶けるが、水、酸、アルカリ溶液に溶けず、又殆んどすべての有機溶剤にとけないが、acetone, ethylacetate 等にて長期連続抽出を行つて、抽出液から析出させ得る。又 quinoline, benzyl alcohol 等には煮沸時僅かに溶解するが、冷却すればゲル状となる。この様に適当な溶媒がないので、氷点降下或は沸点上昇により、分子量を測定する事はできない。分析結果より $(C_{13}H_{16}N_2O_2)_x$ なる実験式を与えた。次に fungisporin が胞子の構成成分であるという事は 1) submerged culture の如く胞子の形成されない培養法で得た菌体からは fungisporin は生成されないが、胞子を有する菌体からは常に得られ、又表面培養の菌体でも胞子のついていない部分のみからは生成されない。2) 米に培養し、絹布にて振り出した殆んど胞子のみと思われるものからは多量に得られる。3) 更に *P. chrysogenum* の乾燥菌体を ether, alcohol 及び dil. HCl, NaOH soln. で抽出した残渣を KOH soln. にて加水分解し、1% $KMnO_4$ で酸化したその残渣中に fungisporin は含有されているが、この残渣は一般に chitin の fraction と考えられているものである⁽¹⁾⁽²⁾。この残渣から chitin を除き、昇華せしめるか、或は ethylacetate でソクスレーを用いて長期抽出すれば、fungisporin が得られるという事実から証明され、加熱による二次的生成物ではないと云い得るであろう。

次に fungisporin の構造を推定するため、種々の分解反応を検索した。発煙硝酸に溶けて一部分解する事を見

出し濃硝酸による分解を行つて, *p*-nitrobenzoic acid を得た. 従つて fungisporin には benzene 核が存在するであろうと考えられる. 又封管中で濃塩酸による分解を行つて mp. 248°(decomp.) のアミンを得た. このものについては現在研究中である.

猶 fungisporin の赤外線吸収は $-\text{OH}$ 又は $=\text{NH}$, $=\text{CH}-$, $-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{CO}\cdot\text{NH}-$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$ の如き基の存在を示し, 又 fibroin 等の蛋白に特有の吸収帯がある事は興味深い. Fungisporin の溶剤に対する不溶解性や, 安定性, 並びに塩酸分解によるアミンの生成等から見て蛋白質に類似した高分子な物質ではないかと考えられる.

実 験 の 部

1. Fungisporin の生成

(a) 菌体の加熱 (焙焼) に依る方法: *P. chrysogenum* 等の表面培養菌体の乾燥粉末をトタン板上に厚さ 3~5 mm, 直径 15 cm 位の円板状に拡げ, その上に 50 メシの銅網を菌体に密着して敷つて, 500 W の heater で加熱焙焼する. 菌体が炭化する位になると, fungisporin は金網の上に膜の様に拡つて昇華して来る. タール等の溜出物は殆んど着いていないが, 炭化した菌体の粉末等が附着している. 収量は 0.1~0.2% である.

(b) 焙焼に依らざる生成法 乾燥菌体粉末を ether 抽出し, 更に alcohol 抽出し, 次に 5% NaOH 及び HCl 溶液で抽出, 之れを更に 20% KOH で加水分解を行い, fungisporin が, この最後の residue V. に含まれている事は昇華せしめる事により明かに認知できた. 更に SCHOLL, SCHMIDT 氏等が chitin 調製に用いた方法, 即ち KMnO_4 の 1% 溶液で酸化し, 生成した MnO_2 を HCl で除去する方法を適用した. Residue VI は chitin を含むから⁽³⁾, conc. HCl で水解して洗いきり, residue VII を得た. 収量は菌体 25 g から 0.5 g 即ち 2% である. これは褐色の塊であるが, これを昇華すると, その 30% 位の fungisporin を得る. 又 ethylacetate で長期連続抽出を行つて, 粗 fungisporin を得た. かくして得られた fungisporin が (a) によつて得られたものと同一なる事は混融しても分解点が降下しない事により確めた. 次に SCHMIDT が chitin の分離法として行つた如くに, 菌体を直接に 2% KMnO_4 で酸化すると, その残渣からも同様に得られる. Fungisporin の生成にはこの方が簡便で良い収量を与える.

収量 0.65% であつた.

2. 昇 華

図の如き装置で 1 mm/Hg の下に 280~290° で昇華せしめる. 1 回に 30~50 mg を昇華できる. 真中の冷却器は中空のガラス管で何も通さない. 加熱は salt bath で sample の 3 cm 位上まで浸るようにすると昇華したものは bath に浸っている部分のすぐ上に着いて来る.

3. Fungisporin の性質及び実験式

(a) Fungisporin は毛細管に封じて熱すると, 355° 位から黒変し 360° 迄にタール状になつて分解する. 常圧で 280° 位より昇華し high vacuum に於ても昇華温度の降下は殆んど認められないが, 昇華速度は 280° 附近に於て, 常圧の場合に比し相当大きい. 水には全く不溶, 酸, アルカリにも不溶であるが, 濃硫酸には極めてよく溶ける. 有機溶剤に対しては, ether, methanol, ethanol, propyl alcohol, amyl alcohol, CHCl_3 , CCl_4 , CS_2 , benzene, petroleum ether, ligroin, toluol, acetic acid, aniline, dimethylaniline, pyridine, dioxane, cyclohexane 等には, 熱時に於ても不溶又は極めて難溶である. Ethylacetate, acetone 等には難溶ではあるが, これらの

Fig. 2. Salt bath

溶媒を用いてソクスレーにて長期抽出すれば抽出液中にゲル状の粒となつて析出して来る。又 benzyl alcohol, quinoline, benzyl ether, tetraline 等には煮沸時に少量溶解し、その溶液は冷却するとゲル状になる。Naphthalene, phenol, camphor, benzoic acid 等の熔融物にも僅かに溶けるが、これ等の溶媒によつて Rast 法を行う

C(%)	H(%)	N(%)	備 考
67.54	6.85	11.99	昇華 1 回
67.15	6.63	12.07	更に昇華(2 回昇華)
67.28	6.94	11.87	更に昇華(3 回昇華)
Average 67.33	6.83	11.98	

事はできなかつた。
b) Fungisporin の分解点は余り鋭敏ではなく、これによつて純度を知る事は困難であつた。故に前述の方法で昇華せしめたもの、更に 1 回昇華させた

もの、2 回昇華させたものをそれぞれ分析した所、大体一致していたので、その分析結果より実験式

$(C_{13}H_{16}N_2O_2)_x$ を与えた。

	C(%)	H(%)	NC(%)	OC(%)
Calcd. for $C_{13}H_{16}N_2O_2$	67.24	6.89	12.06	13.79
Found.	67.33	6.83	11.98	13.86

	C(%)	H(%)	NC(%)
a	67.25	6.93	11.40
b	67.56	7.03	11.75
c	67.89	6.78	11.78
Average	67.54	6.91	11.65

因みに他の方法により精製したものの分析値は左の如くである。

a, b は共に常圧で昇華したものであり、c はそれを ethylacetate で長期抽出析出せしめたものであるが、減圧昇華のものとはほぼ一致した値である。

なお N は miro KJELDAHL 法によつても 12.1% なる値を示した。

4. 硝酸酸分解

i 分解及び分解生成物の分離 : 260 mg の sample に 10 cc の濃硝酸を加え、摺合せ還流冷却器を附し、水浴上に加熱すると 3 時間位で sample は完全に溶ける。次に摺合せのクライゼンに附け加えて、減圧濃縮し、液

量 1/4 位になると結晶が析出するから、glass filter で濾取し、更に濾液を濃縮して結晶を析出させ、前のものと合せて結晶 A とし、水で洗滌後、素焼板で乾燥し 62 mg を得た。濾液は、水を加えて減圧で蒸発乾涸し、更に同様な操作を 3 回反復して可及的に硝酸を除いた。ここに得られた syrup をリグロインで 10 回程熱抽出する。この抽出物からリグロインを蒸散せしめて粗結晶 B を得た。収量 15 mg。次にリグロイン抽出後の残渣は abs. alcohol にて処理し alcohol 可溶部と不溶部に分離した。

ii. 分解生成物としての *p*-nitrobenzoic acid の証明 : 結晶 A は硝酸で再結後、醋酸、次いで dil. alcohol より再結し、mp. は 235° となり、更に再結しても上昇しなかつた。又 120° 位で昇華するが、昇華したものを混融しても mp. は変らない。水, benzene, ligroin には難溶, ether, alcohol に溶け、アルカリにも易溶であつたので、N/100 NaOH で滴定した滴定値より、一塩基性酸として計算して $M=157$ なる値を得た。アセチル化は行われず、又 2, 4-dinitrophenylhydrazin とも反応しなかつた。又 VAN SLYKE 法により、アミノ態の N を含

まない事を認めた。

分析結果は左の通りで $C_7H_6O_4N$ に一致する。

文献記載の *p*-nitrobenzoic acid (mp. 238°) を *p*-nitro

toluol より合成し、醋酸より 3 回再結した物 (mp. 235°) と混融した所、何等融点降下を示さなかつた。次に

	C%	H%	N%
Calc.	50.29	2.99	8.38
Found.	50.44	3.04	8.74

nitrosomethyl urea より製した diazomethane の ether soln. を用い 10 mg の結晶 A からメチル化物の粗結晶約 10 mg を得た dil. alc. で 2 回再結し, mp. 95° の結晶を得た. 次に合成した *p*-nitrobenzoic acid を上の如く diazomethane にてメチル化し, mp. 95° の methyl ester を得て, 上に得た結晶 A のメチル化物 (mp. 95°) と混融すると, やはり mp. は 95° であつた. 分析値は次の如く一致する.

	C%	H%	N%
Calcd.	53.03	3.86	7.73
Found	53.28	4.10	8.11

従つて結晶 A は, *p*-nitrobenzoic acid なる事が証明された.

iii. その他の生成物: 結晶 B は, リグロインより再結すると mp. 132~5° の無色短柱状の結晶として得られる. 水によく溶けるが水溶液は黄色となる. 塩酸性にした水溶液から, ether にて抽出できる. Alcohol, benzene, ether に可溶で, 結晶を空中に放置すると黄色になり mp. が降下する.

分析値は, C; 49.59%, H; 2.71%, N; 11.31%, であつたが, 未だ構造不明である.

又 ether 抽出物は, 殆ど酸性区分であるが, 結晶状に単離されていない.

5. 塩 酸 分 解

i. 分解及び生成物の分離: Sample 120 mg を conc. HCl (35%) 20 cc と共に, ガラス封管中で 200° に 5~6 時間加熱分解せしめた. 反応液から黒褐色のフミン様物質を glass filter で濾別 [残渣 I (10 mg)] した. 次に ether 抽出を行い ether 抽出物 I として分け, HCl 溶液の方は, 減圧で dry up して HCl を除き, 更に水を加えて dry up する事を反復して, 可及的に HCl を除去し, desiccator で乾燥後, abs. alc. で冷時抽出すると微量の残渣 II を残して溶解する. ここに得た alc. soln. を dry up して alc. を除き, 水に溶解し, 再び ether 抽出し ether 抽出物 II を分ける. 水溶液は中性で, 褐色であるが ninhydrin 反応陽性で, ether 抽出物の方は陰性である.

次に anion exchange resin (IR4B) 10 cc を 10% NaOH で賦活した resin 層に, 上の水溶液を 0.3 cc/min. 位の速度で通じた. 水で resin 層を洗い, 洗液が ninhydrin 反応を与えなくなるに至らしめ, これを合し, 減圧にて dry up すると, 殆んど無色の粗結晶性粉末となる. 収量 60 mg で 50% である. 次にこの resin 層に 10% alkali soln. を通すと, 褐色の液が出て来る. これは酸性フラクションと考えられる.

ii. 塩基性結晶: 上の方法で得た ninhydrin 陽性の粗結晶性粉末は mp. 242° (decomp.) で水によく溶け, ether, alcohol, methanol, benzene 等に難溶又は不溶である. これを少量の熱水に溶かし, 多量の alcohol を加えて冷蔵庫中に放置すると結晶析出し mp. 245° (decomp.) になつた. 更に同様の方法で再結し,

遂に mp. 248° (decomp.) となり一定した. 5 mm/Hg の減圧で 130° 位から昇華するが, 昇華物も mp. 249° (decomp.) で, もとのものと同一な事を混融により確かめた. 分析結果から, $C_8H_{13}O_2N$ なる実験式を与えた.

	C(%)	H(%)	N(%)
Calcd.	61.9	8.4	9.0

	C(%)	H(%)	N(%)
Found.	61.22	8.18	9.44

又 VAN SLYKE により amino 態 N の測定を行つた所, sample 1.19 mg より 0.1 cc の N_2 (760 mm, 31°) を

得て、9.51% となるので、分子中の N は、すべて amino 態の N と考えられる。次に sample 10 mg に対し、benzene sulfonechloride 2 滴と 8% NaOH soln. 10 滴を加え、振盪、放置し、湯浴で数分間加熱し、透明にした後、塩酸酸性にして析出物を濾取、水にて再結を反復、mp. 143° で一定になった。酸性で析出するので第一級アミンのスルホンアミドと考えられる。収量 5 mg で、N のみ分析した。分析値は N が 5.23% で、 $C_8H_{15}O_2N$ を一級アミンと考えた場合のスルホンアミドの N の計算値 4.89% にほぼ一致する。従つてこの mp. 248° の塩基性物質は第一級アミンである事は確実である。猶このアミンは camphor に溶けず、この物質に直接に Rast 法を行う事はできなかった。

iii. その他の生成物 : Residue II は無機物で、NESSLER 反応陽性、 $AgNO_3$ で沈澱を生じ、 NH_4Cl が大部分であると考えられる。

Ether I, II 抽出物は共に頗る小量で追究できなかった。

6. 赤外線吸収

東大理学部化学教室に依頼し、赤外線吸収を測定していただき、次の結果を得た (Baird Associates IR Spectrophotometer による)。

吸収帯 (Wave length in Micron)	推定機能團
31, 32	-OH, or -NH
33	-CH
61	-C=C-
64	H H
69	-CONH ₂ -
73	-CH ₂ -
142~146	-CH ₃ -
	不明なれども、fibroin 等に見出される。

終りに臨み赤外線吸収スペクトルに関し、御援助を賜つた、東大理学部水島研究室島内助教授、倉谷健治氏、並びに分析の労をとられた当教室の方々に対し、感謝の意を表する。

猶本研究は文部省科学研究費によるもので茲に謝意を表する。

- (1) SCHOLL, E. : *Monatsh.* 29, 1023~1036 (1908).
- (2) SCHMIDT, M. : *Arch. Mikrobiol.*, 7, 241~260 (1936).
- (3) 阿部芳郎 : 慶大工紀要, 1, No. 4 (1947).
- (4) BARNES, R. Bowling : *Anal. Chem.*, 20, 402 (1948).

Summary

A new compound was obtained as the crystalline sublimate by destructive distillation from several species of *Penicillium* and *Aspergillus*. It was ascertained that this substance was one of the components of their spores and not the product formed secondarily by the destructive distillation. We gave to this substance the name "fungisporin". It was found that fungisporin consisted of C, H, N and O, having a decomposition pt. 355~60°.

$(C_{13}H_{16}O_2N_2)_x$ was proposed as the experimental formula of fungisporin. The fungisporin was not soluble in the majority of solvents, both organic and inorganic, and therefore, its alkyl and acyl derivatives could not be prepared.

By treating with a conc. soln. of HNO_3 , it gave *p*-nitrobenzoic acid and a crystalline substance, mp. 132~5°, containing N.

By treating with a conc. soln. of HCl , it gave an amine, having an experimental formula $C_8H_{15}O_2N$. The function of this amine is identified as the primary amine.

The absorption spectrum of infrared ray showed the existence of the following groups such as -OH, or =NH, -CH=CH-, -CONH₂, -CH₂-, and -CH₃. From these results, we assume that the fungisporin is a high molecular substance somewhat similar to a simple protein.

Fig. 1
Crystals of Fungisporin
×100