この結晶についてはなお実験中である。

2) ステリンに就て 前述の検索表で述べた石油エーテル溶液部の水洗において残つたメタノールを除く時水の部分がエマルジョン状になり、操作の邪魔になるので1度濾過したところ、濾紙上に赤色味を帯びたステリン状物質を得た。この物質はステリンの諸反応を呈したので、直ちに無水醋酸と共に1時間、アスベスト金網上に軽く煮沸した後、減圧下に無水醋酸を除き、残渣をエーテルに溶し、苛性ソーダ、水で逐次洗滌し、エーテルの蒸溜残渣をアルコールで3回再結したところ、m. p. 126~127° のアセチルステロールになった。

アセチルステロール 5g は常法により、鹼化しステリーとし、アルコールで再結を繰返したところ、m. p. 137~138° のもの 0.1g 得た。これを完全に乾燥した後、元素分析をした。Analysis: Calcd. for $C_{27}H_{46}O$ (sitosterin) C 83.94, H 11.92. Found C 83.32, H 11.53. 即ちシトステリンに一致した。

このステリン 0.4g を 5cc のピリジンに溶し、氷冷下に 0.5cc のベンゾールクロリッド 0.5cc を加え、4時間放置後、6N 硫酸に投じ、析出する沈澱物を濾別し、エーテルに溶し、酸及びアルカリで洗滌し、エーテルの蒸発残渣を醋酸エチルで結晶させ、後アセトンで3回再結したところ、m. p. 147~148° のものを 0.05g 得、シトステリンのベンゾアートと一致した。

以上のようにこのステリンは一般にいわれるところのシトステリンであつた。

総 括

蚕糞の合理的利用の基礎的試料を得んとして、その1につづき、本研究を行つた。その結果を一括すると次の通りである。

1. 5 齢糞の粗クロロフィルの不鹼化物のプロビタミン A 量は 3644.2 I. U. /g であつた。
2. 不鹼化物の1成分である m. p. 179~180° の結晶を得た。該結晶は α -, β -カロチン、クリプトキサンチン、稲垣⁽¹⁾のカロチノイドとも異なり、 $C_{10}H_{14}O$ の実験式を有するものであつた。
3. 不鹼化物中のステリンは一般にいわれるシトステリンであつた。

最後に本研究は文部省科学研究費で行つたものであり、又元素分析をして下された東大農芸化学科佐々木研究室の中山氏及びカロテノイドについて種種御助言下された東大農芸化学科佐々木研究室の小山氏に感謝する。

(1) 稲垣長典: ビタミン, 5, 600 (1952).

Summary

Authors studied on the rational utilization of silkworm feces. Results obtained were as follows:

1. The best material for extracting crude chlorophyll was the 5th instar feces.
2. The unsaponifiable matter of silkworm feces contained the crystal of m. p. 179~180° and the sitosterin of m. p. 137~138°.

米糠配糖體のペーパークロマトグラフィ

木原芳次郎, 堀 内 久 彌 (農林省食糧研究所)

昭和 28 年 11 月 19 日 受 理

Paper Chromatography of Glucoside of Rice Bran.

By Yoshijiro KIHARA and Hisaya HORIUCHI

(Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry)

さきに米糠より一種の新配糖体 Nukain を分離し、加水分解によつて aglykon の Nukagenin の結晶と glucose を得たが⁽¹⁾, Nukain は未だ結晶状に得られず、精製を試みるため、今回 paper chromatography によつて Nukain 及び Nukagenin の性状を更に明かにした。

1. Nukain 及び Nukagenin の濾紙上の呈色検出方法と溶剤の選択 Nukain 及び Nukagenin を濾紙上に着けて、 $FeCl_4$, anilinehydrogen phthalate, アンモニア性硝酸銀, アンモニア, 苛性曹達, レゾルシン・塩酸, 三塩化醋酸クロロフォルム溶液等を加えて呈色を検したが目的を達せられず、結局紫外線下で発する螢光を観察するのが最も明瞭であつた。この螢光は殊にアルカリをかけると美しく見える。濾紙上に吸上げる展開溶剤

として *n*-ブタノール・醋酸・水 (4:1:1), *n*-ブタノール・醋酸・水 (4:1:2), *n*-ブタノール飽和水, クロロフォルム・メタノール・水 (10:4:5), フェノール (15%), フェノール飽和水を試みたがブタノール・醋酸・水及びフェノールが最適であつた。

2. **Nukain 及び Nukagenin の R_F** 東洋濾紙の No. 2 を用い、40×2 cm の紙片の下方より 6 cm のところを原点として上昇法によつて、10~16° に一夜置いた後乾燥し、紫外線ランプの上でスポットの位置を測定した。其の結果は Table 1 の如くである。

Table 1. Paper Chromatography of Nukain, Nukagenin and a Coloring Matter "A".

Substance	Color	Solvent	R_F
Nukain	Violet fluorescence	<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water (4:1:2)	0~
"	"	Phenol (15%)	0~
Nukagenin	Green fluorescence	Phenol (15%)	0.21
"	"	<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water(4:1:2)	0.47
"	"	<i>n</i> -Butanol saturated with water	0.04
"	"	<i>n</i> -Butanol-Methanol-Water (4:1:2)	0.28
A Coloring Matter (A)		<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water(4:1:2)	0.15, 0.22, 0.45
"		Phenol	(Violet) (Violet) (Green) 0.16 (Green)

Nukain はスポットとならず尾を引いた形である。之は nukain の精製が不充分のためだろうと考えて多重展開をフェノールを用いて行つたが、変化は認められなかつた。

Nukagenin は特定のスポットを与えるので単一のもので混在するものはないと思われる。

色素 (A) は nukain を分離する際、米糠浸出液に塩基性醋酸鉛を加えた時に得た沈澱を脱鉛しアルコールを加えて沈澱した黄色粉末である。このものは未だ明かにされないが 3 種の螢光物質が含有されていると推定される。

Table 2. Paper Chromatography of Sugar

Fraction of Nukain.

Solvent	R_F
<i>n</i> -Butanol saturated with Water	0.05
<i>n</i> -Butanol-Acetic acid-Water(4:1:2)	0.23

Nukainの加水分解液からnukagenin をエーテルで抽出した残りの液について paper chromatography を行い、anilinehydrogenphthalate で呈色させて 1

個のスポットを得た。この R_F は glucose のそれに一致する。

3. **Nukain のイオン交換樹脂による精製** Nukain の水溶液を三菱化成製のダイヤイオン K 及びダイヤイオン A をそれぞれ充填した管を順次通過せしめ、吸着物及び濾液について paper chromatography を行つ

Table 3. Paper chromatography of Various Fractions of Nukain by Ion-exchange Resin.

Substance adsorbed by	R_F	Color	Solvent
Dia-Ion K	0.02	Violet Fluorescence	Phenol
Substances adsorbed by Dia-Ion A	0.4~0.5 0.27	Violet Fluorescence Green Fluorescence	"
Filtrate through Dia-Ion K and A	0~Tailing	Violet Fluorescence	"

た。樹脂に吸着したものはそれぞれ 0.1 N 苛性曹達及び 0.1 N 塩酸で溶出した。その結果は Table 3 の如くである。

Dia-Ion K 及び A に吸着するものをそれぞれ加水分解したものを paper chromatography を行つたが nukagenin の

螢光スポットは認められなかつた。Nukain は充分吸着できなかつたようで更に検討したい。

色素 A を Dia-Ion K 及び A を通過させたものは、スポットの位置がほぼ同様であつて変化がなく、樹脂に吸着されないものと思われる。溶剤は *n*-Butanol-Acetic acid-Water (4:1:2) を用いた。

Table 4. Paper Chromatography of Various Fractions of a Coloriog Matter "A" by Ion-exchange Resin.

	pH	R_F
A Coloring Matter A		0.15 (violet), 0.22 (violet), 0.43~0.47 (Green)
Filtrate through Dia-Ion K	4.2	0.15, 0.22, 0.41~0.59
Filtrate through Dia-Ion K and A	4.6	0.15, 0.22, 0.47~0.57

4. **Nukain 及び Nukagenin の Paper Electrophoresis** 東洋濾紙製の電気泳動装置 A 号と同社濾紙 No. 50 を用い、paper electrophoresis を行つた。濾紙は 1 cm×26 cm に切り、中央を原点として両端を溶液に浸す。液面から頂点である原点までの距離は 11.5 cm であつた。

(a) Nukain 及び nukagenin をそれぞれ原点につけ乾燥した後, 装置にかける. 1% 硼砂溶液を溶剤に用い, 600 V の直流電流 (最初 1.1 mA/cm, 最終 2.5 mA/cm) を 1.5 時間通じた. 濾紙は乾燥した後紫外線下

Table 5. Paper Chromatography of Nukain and Nukagenin by Paper Electrophoresis in 1% Borax Solution.

Substance	Color	Spots
Nukain	Light green fluorescence	0 -0.6 cm
Nukagenin	Green fluorescence	-0.6 cm

で螢光スポットを測定した. 其の結果は Table 5 の如くである.

Nukain は原点及び酸性側に 2 個のスポットを示し, nukagenin は酸性側に 1 個帯状のスポットを示す.

(b) Nukain 及び Nukagenin を酸性フタル酸加里・苛性曹達液 (pH 5.9) に溶解して (a) と同様に paper electrophoresis を行う. 電流は 500 V, 最初 1.0 mA/cm, 最終 2.0 mA/cm で 1 時間処理する. 乾燥

Table 6. Paper Chromatography of Nukain and Nukagenin by Paper Electrophoresis in Phthalate-NaOH Solution.

Substance	Color	Spots
Nukain	Light green fluorescence	+0.9 cm, -0.2 cm
Nukagenin	Green fluorescence	-2.4 cm

後紫外線下で螢光スポットを測定する.

Nukagenin は酸性側に 1 個のスポットを示し, nukain はアルカリ側と酸性側に 2 個を示した.

5. Nukain に対する酵素の作用 Nukain 0.01 g に 0.2% タカジアスターゼ溶液 1 cc と, pH 5.0 の醋酸緩衝液 4.0 cc を加え, トルオール 1 滴を添加して 30° に 4 日間放置した.

又 nukain 0.01 g に 0.2% エムルシン溶液 1 cc と pH 4.4 の醋酸緩衝液 3.0 cc を加え, トルオール 1 滴を添加し 30° に 4 日間放置した.

これらの処理を行つたものの paper chromatography を行い, その結果を Table 7 に示す.

Table 7. Change of Paper Chromatogram of Nukain by Enzymic Action.

Enzyme	Solvent	R_F (violet fluorescence)
Takadiastase	n-Butanol·Acetic acid·Water (4:1:2)	0.1~0.22 (") 0.27~0.32 (")
"	Phenol·Water (30:5)	0.08 (") 0.35~0.46 (")
Emulsin	n-Butanol·Acetic acid·Water (4:1:2)	0.1~0.22 (") 0.28~0.32 (")
"	Phenol·Water (30:5)	0.12 (") 0.28~0.42 (")

酵素液のみについてコントロールを行つたが, 螢光を発するものは認められなかつたから, 上記のものは nukain から由来したものである. フェノールの方が螢光スポットが見易かつた.

酵素の作用で nukagenin のスポットがあらわれるものと予期したものが, 緑色螢光のものは認められず, 紫螢光のものが 2 個分離された.

Nukain が酵素の作用で 2 種に分れたようであるが, 酸分解とは趣を異にしていって更に研究を要する.

6. Nukagenin の亜鉛末蒸溜生成物の paper chromatography. 前報に nukagenin の亜鉛末蒸溜生成物をピクレートとして, その m.p. がキノリンに近似していて, 蒸溜物にキノリン臭があるので nukagenin はキノリン核をもっているだろうと述べた.

Nukagenin の亜鉛末蒸溜生成物を paper chromatography にかけて塩基を DRAGENDORF 試薬の呈色によるスポットの R_F を決定した.

Table 8. Paper Chromatography of Base in Zinc Dust Distillation Product of Nukagenin and 8-Hydroxy quinoline.

Substance	R_F
Free base from Nukagenin	0.86
H ₂ SO ₄ salt of base from Nukagenin	0.24~0.40
HCl salt of base from Nukagenin	0.15~0.28
Free base from Oxin	0.88~0.95
H ₂ SO ₄ salt of base from Oxin	0.23~0.39
HCl salt of base from Oxin	0.12~0.27

Nukagenin を亜鉛末と混合して乾溜し, 発生するガスを稀塩酸中に吸収させた. 塩酸溶液に苛性曹達を加えアルカリ性とし, エーテルで塩基を抽出した. 抽出液からエーテルを逐出して塩基溶液を得た.

コントロールとして Oxin (8-hydroxyquinolin) を同様に処理した.

塩基溶液の一部は硫酸で中和して硫酸塩とした. これらの Paper chromatography を行い, DRAGEN-

DORF 試薬で赤色のスポットを得た. その R_F は Table 8 の如くであつて, 溶剤は n-ブタノール・醋酸・水

(5:1:4) を用いた。

Nukagenin 及び oxin から得た塩基の R_F は一致し、且キノリンの R_F 0.92, キノリン硫酸塩の R_F 0.42 に近く, nukagenin の亜鉛末蒸溜生成物はキノリンであろう。前報の結果を更に確めることができた。

総 括

米糠水浸出液より分離した nukain 及びその aglycon である nukagenin について paper chromatography を行つた。Nukagenin は特有の一つのスポットを与え、単一の化合物と推定された。Nukain はスポットとならず長い尾を引き、尙多少不純物が混在しているのではないかとと思われるが大体単一のものと考えられる。

米糠水浸出液から塩基性醋酸鉛で沈澱する黄色色素 A は3個のスポットを示したが、nukain と関連はない。

Fig. 1. Paper chromatogram

Solvent: Phenol

1. Nukain
2. Nukagenin
3. A coloring matter A
4. Nukain filtrate through Dia-ion K
5. " through Dia-ion K and A
6. Sub. adsorbed by Dia-ion K from Nukain
7. Sub. adsorbed by Dia-ion A from Nukain
8. Nukain treated with Takadiastase
9. Nukain treated with Emulsin

Fig. 3. Paper chromatogram

Solvent: Butanol-Acetic acid-Water

10. 8-Hydroxy. quinolin (oxin)
11. Free base by Zn dust distillation of oxin
12. " of Nukain
13. HCl salt of base by Zn distn. of oxin
14. HCl salt of base by Zn distn. of Nukain
15. H_2SO_4 salt of base by Zn distn. of oxin
16. H_2SO_4 salt of base by Zn distn. of Nukain

Fig. 2. Paper chromatogram

Solvent: *n*-Butanol-Acetic Acid

1. Nukain
2. Nukagenin
3. A Coloring matter A
6. Sub. adsorbed by Dia-ion K from Nukain
7. Sub. adsorbed by Dia-ion A from Nukain

Fig. 4. Paper chromatogram by Paper Electrophoresis.

I	{	1. Nukain	(1% Borax soln.)
		2. Nukagenin	
II	{	1. Nukain	(K-phthalate-NaOH)
		2. Nukagenin	

ようである。

Nukain 及び nukagenin を paper electrophoresis を行つたところ、nukain は酸及びアルカリ両側に2個のスポットを、nukagenin は酸性側に1個のスポットを与えた。

Nukagenin を亜鉛末蒸溜を行つて得た塩基は paper chromatography によつてキノリンに一致することを認めた。

Summary

A new glucoside, Nukain, was isolated from the water extract of rice bran as previously reported in this Journal 19, 577 (1943). The properties of Nukain and Nukagenin were investigated by the paper chromatography. The fluorescent spots on paper were observed under ultra-violet ray lamp. Though Nukain showed a tailing figure, Nukagenin gave a single spot. An yellow coloring matter isolated from the fraction precipitated with basic lead acetate showed 3 spots. The paper chromatography of the sugar fraction of Nukain by anilinehydrogenphthalate gave the figure of glucose. The selective adsorption of Nukain by ion exchange resin could not be remarkably observed. An yellow coloring matter could not be adsorbed by both anion- or cation-exchange resin. Nukain and Nukagenin gave the characteristic spots by paper electrophoresis as shown in Table 5 and 6. When Nukain was treated with Takadiastase and emulsin two spots were observed as shown in Table 7 but the spot of Nukagenin could not be found. The zinc dust distillation product of Nukagenin showed a spot on paper chromatogram by Dragendorff's reagent, which was identical with that of quinolin. Nukagenin may have a quinolin nucleus.

稲熱菌に関する生化学的研究 (第1報)

稲熱菌毒素結晶の分離及び毒素に関する考察

玉利勤治郎、加 治 順 (新潟大学農学部)

昭和 28 年 11 月 19 日 受理

On the Biochemical Studies of the Blast Mould (*Piricularia Oryzae* CAVARA),
the Causative Mould of the Blast Disease of the Rice Plant.

Part 1. Studies on the Toxins Produced by Blast Mould.

By Kinjiro TAMARI and Jun KAJI (Fac. of Agr., Niigata Univ.)

稲熱菌に依る水稻の被害が菌の生産する毒素に依るものか否かは、植物病理学の分野に於て従来判然としなかつた。又一方水稻品種間に於ける稲熱病に対する抵抗性の差異の本質を更に究明する事が新しく問題となつてゐる。著者等は当農学部植物病理学教室の要請に基づいてこれ等の問題を取り上げたのである。

先ず稲熱菌 (*Piricularia Oryzae* CAVARA) の培養濾液中に中性に於て比較的熱に安定な (100°, 30 分) 毒素の存在を確認し、これの抽出精製を行つて 2 種類の毒素結晶 (毒素 A 及び毒素 B) を分離する事を得た。毒素 A は熱ベンゾールより再結して長柱状結晶 (写真 1 参照)、融点 132° を示し、温水、アルコール、熱ベンゾール、熱醋酸エチルに可溶、リグロインに極めて難溶で、稲苗の生育特に根の生育に著しい阻害作用を示す。元素分析値並びに RAST 法に依る分子量測定の結果より分子式は $C_6H_5NO_2$ に相当する。著者等は此の物質の諸性質及び分子式が α -picolinic acid のそれに一致する所から、両者は同一物質なりと推定して両者の混融試験を試みた結果全く融点の降下は認められなかつた。かくして毒素 A は α -picolinic acid なる事が確認された。 α -Picolinic acid が稲馬鹿苗病菌の毒素 fusarinic acid と全く同一の機構を以て鉄ポルフィリン系呼吸酵素を阻害する事は既に本誌に詳しく報告した所である⁽¹⁾。

毒素 A (α -picolinic acid) を分離した母液を自然蒸発 (加熱して急速に溶剤を追出してはならない) せしめる時は他の毒素結晶 B を得る。此の物質は極めて昇華性に富み、サッカード圧 (真空度約 30 mm) にて約 70° に加温する時は容易に昇華する。但し毒素 A も昇華性があるので、かくして得られた毒素結晶 B には微量の毒素 A の混入の恐れがある。それで毒素 A, B を完全に分離する為めには著者等は実験の部に述べる如く陽イオン交換樹脂による分別精製を行つた。毒素 B は極めて昇華性に富み減圧下昇華法に依つて精製される。無色柱状結晶 (写真 2 参照)、融点 73°, 水及び各種有機溶媒に易溶で、稲苗に対する毒性は毒素 A よりも更に著しい (写真 4 参照)。紫外部にそれぞれ 308 及び 240 m μ に、又赤外部にそれぞれ 3.5, 3.8, 6.3, 6.7, 6.9, 7.1, 7.3, 7.8, 12.3, 12.8 及び 13.5 μ 附近に極大吸収を有し、元素分析値並びに RAST 法に依る分子量測定の結果より分子式は $C_{21}H_{15}O_3N_2$ に一致する。著者等は此の物質を "Piricularin" と命名した。Piricularin は赤外線吸収スペクトルにより $C=O$, $C-O-C$, $\begin{smallmatrix} \text{C} \\ \diagup \quad \diagdown \end{smallmatrix} N-C$ 或は $\begin{smallmatrix} >N-O-C, \\ & C \equiv C \end{smallmatrix}$ 等の存在が推測されている。