微生物によるニコチン及びニコチン酸の分解 (第3報)

ニコチンの分解 (其の2)

田 淵 武 士 (東京教育大学農学部)

昭和 29 年 12 月 3 日 受 理

Microbial Degradation of Nicotine and Nicotinic Acid. Part 3. Degradation of Nicotine (2)

By Takeshi TABUCHI (Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education)

前報では WARBURG 検圧計による酸素吸収測定でニコチンの酸化経路の追跡を行つた結果を示したが、本報に於ては引き続き通気培養によつて得たニコチン代謝生産物に就て述べる。

培養方法 水道水にニコチン 0.25%, KH_2PO_4 0.15%, MgSO_4 0.05% を加え、硫酸で pH6.5~7.0 に調整した合成培地 5 l を 10 l 容試薬瓶に入れ、殺菌後同じ培地 200 cc に 2 日静置培養したニコチン分解菌を種母として加え、30° で通気培養を行つた。 *Pseudomonas nicotinophaga* (strain No. 41)⁽⁸⁾ を用いた場合の培養経過は Fig. 1 の如くである。

Fig. 1. Degradation of Nicotine by Aerated Culture of *Ps. nicotinophaga* (No. 41)

Fig. 2. Separation of Degradation Products from Culture Broth

過は Fig. 1 の如くである。

尚培地中に葡萄糖を 0.2% 加えれば菌体が多量に出来、従つてニコチンの消費速度も大となつた。又 0.3% 以上のニコチン濃度ではその毒性のためどの菌も殆んど増殖し難いが、その濃度が 0.3% を超えぬように培養中逐次ニコチンを添加する事は可能で、こうして 8 g/l のニコチンを 8 日で消費する事も出来た。

分解生産物の分離 30°, 3 日培養後 Fig. 2 の如くにして分解生産物を得た。即ち培養液を中和後珪藻土を濾過助剤として菌体を濾別。濾液は減圧濃縮して約 200 cc とした後硫酸で pH 2 にすると直ちに著量の沈澱を生じた [IV]。沈澱濾別後約 60 時間エーテル抽出を行い針状結晶を得た [III]。エーテル抽出残液は中和後減圧で更に 100 cc に濃縮後苛性曹達で pH 9 としてエーテル抽出を行い残存ニコチンを除いた [I]。更に強アルカリ性となしクロロホルム抽出して、クロロホルム層より溶媒蒸発後油状物質を得た [II]。

尚アルカリ性にした後には常に強いアンモニア臭があるので、その一部を取り水蒸気蒸溜をなし溜出液を稀塩酸中に受け蒸発乾固した。その 99% アルコール可溶部の m.p. は 225° で methylamine 塩酸塩と混融しても融点降下を示さなかつた。

酸性エーテル抽出部 [III] 60% メタノールで再結して m.p. 160° の針状結晶となる。この物質については既に和田等が 3-succinoyl pyridine ($\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3\text{N}$) である事を推定した⁽⁹⁾。著者はこれをエステル化した後の picrate を ethyl β -nicotinoyl propionate picrate⁽¹²⁾ と混融してその m.p. 107~109° の低下しない事を確認した。

酸性沈澱部 [IV]

(1) 性状：培養液を濃縮後酸性にすると沈澱して来るこの物質は石油エーテル、エーテル、ベンゼン、クロロホルム等大部分の有機溶媒に不溶で、アルコールに極めて難溶、水に難溶であるが、苛性曹達、重曹等の

アルカリには易溶。アルコールで洗滌後、熱水より再結して(活性炭処理) m. p. 288° の無色針状結晶となる。デアゾ呈色反応を示すが塩化鉄の反応はない。ニトロプルシッド曹達によるカルボニル基の反応も示す。BrCN 及び 2,4-dinitrochlorobenzene 等によるピリジン核の反応を示さない。

(2) 元素分析: 灰分, 磷酸, 塩素はなく窒素を含んでいる。Analysis. Found: C, 55.7; H, 4.62; N, 7.32. Calcd. for $C_9H_9NO_4$: C, 55.4; H, 4.62; N, 7.18%

(3) 分子量測定: RAST 法は行えぬので常法通り銀塩を作り 1 塩基性酸としてその分子量を計算すると,

Ag 塩	Ag	分子量
223.3 mg	80.2 mg	193
204.3	73.3	194

$C_9H_9NO_4$ の原子和は 195.17 である。即ちこの物質が 1 塩基性酸であるとする、3-succinoyl pyridine [III] より酸素原子が 1 個多い。

(3) 紫外線吸収スペクトル: 3-Succinoyl pyridine [III] 及びこの物質を 95% アルコールに溶解したもの紫外線吸収スペクトルは Fig. 3 に示す如くかなり異なっており、両者の相違が単に側鎖に由来するものとは思えず⁽¹³⁾, 下記過マンガン酸加里による酸化の実験結果と一致する。

(5) 過マンガン酸加里による酸化: [IV] は [III] のどの位置に酸素の入ったものであるかが問題である。アルカリ性で過マンガン酸加里酸化を行えば [III] の側鎖に酸素が入っているならニコチン酸が得られるであろうが、ピリジン核が酸化されていると核は分解してニコチン酸は出来ぬ訳である。

[III], [IV] の試料各 0.5 g を 2% 重曹 50 cc に溶解し 0.5% 過マンガン酸加里溶液を [III] には 470 cc, [IV] には 400 cc 滴加後二酸化マンガンを濾過, 中和濃縮した後酸性で約 24 時間エーテル抽出して [III] よりは m. p. 233° の針状結晶多量を得た。これはニコチン酸と混融して融点降下を示さない。しかし [IV] よりニコチン酸は得られず、琥珀酸少量を得た。

即ち [IV] は [III] に比較すると側鎖はそのまま、核が酸化されて pyridone, 換言すると oxy-pyridine の型になっている事が最も予想される。

(6) 塩素化した後の過マンガン酸加里酸化: 菅沢, 伴等⁽¹⁴⁾は 3-ethyl-2-pyridone の酸素の位置決定にこれを塩素化した後アルカリ性過マンガン酸加里酸化を行い 2-chloronicotinic acid を得た事より前記物質は 2 の位置の酸化されたものである事を決定している。

この例に倣い以下の実験を行つた。即ち試料 1 g を PCl_5 1.5 g, $POCl_3$ 3 g と混合して水浴中 2 時間加熱, 減圧で $POCl_3$ を溜去して飴状黒色物質を得た。注水, 粉碎, 濾別して水洗後, 純エタノール 10 cc を加え, エステル化して後種々の溶剤で再結を試みたが塩素化された物質を結晶状には得られなかつた。そこで先の黒色物質を粉碎して水に懸濁せしめ, 1% 過マンガン酸加里を 200 cc 滴加後, 過剰の過マンガン酸加里を蟻酸で分解し, 濾過洗滌後, 濾液を中和濃縮して硫酸酸性にした後, エーテルで約 20 時間抽出した。抽出物は水より再結して m. p. 195° (約 0.35 g), 6-chloronicotinic acid と混融して融点降下を示さない。即ち pyridine 核の 6 の位置に塩素が入った。この事はこの位置に水酸基があつたか、或いは N-oxide の転位により出来た事を示している。

(7) 3-Succinoyl pyridine N-oxide との比較: 3-Succinoyl pyridine 2 g, 氷醋酸 6 cc, 過酸化水素 6 cc を混合, 水浴中 2 時間加熱後, 反応体を減圧濃縮乾涸。少量の水より 2 度再結して m. p. 174° の 3-succinoyl pyridine N-oxide を得た。Analysis. Found: C, 55.9; H, 4.85. Calcd. for $C_9H_9NO_4$: C, 55.4; H,

Fig. 3. Ultraviolet Absorption Spectra
III: 3-Succinoylpyridine
IV: 3-Succinoyl pyridone-6

4.62%. 即ち明らかに m. p. 288° の [IV] とは異つている。

以上、分析値の結果、KMnO₄ 酸化で琥珀酸少量を得た事、塩素化に伴う KMnO₄ 酸化で 6-chloronicotinic acid を得た事、3-succinoyl pyridine N-oxide との比較等より該物質は 3-succinoyl pyridone-6 と推定される。

アルカリ性エーテル可溶部 [I] この部分の picrate は m. p. 225° で未分解のニコチンであつた。

アルカリ性クロロホルム可溶部 [II] クロロホルム除去後、ピクリン酸飽和液を加えて樹脂状の沈澱を得たが、これを加温して油状の物質除去後の picrate は水で再結すると m. p. 130°, これをメタノールで再結すると 154° となり、再び水で再結すれば 130° になる。

HAINES 等⁽¹⁵⁾ は pseudo oxynicotine picrate も N-methylmyosmine picrate も共に水より再結して m. p. 128~130°, メタノールより再結して 158~160° なる事を報告しており、又和田等も前記報告⁽⁹⁾でこのものを分解生産物として得て詳しく調査している。

考 察

ニコチンの分解生産物として *Pseudomonas nicotinophaga* n. sp (strain No. 41) のニコチン培養液より、pseudooxynicotine [II], 3-succinoyl pyridine [III], 3-succinoyl pyridone-6 [IV], methylamine 等を得た。又 *Achromobacter*, *Bacterium* 等に属する菌によつても [III], [IV] は容易に得られた。一方, oxynicotine, 3-succinoyl pyridine N-oxide, 3-pyridyl methyl ketone 等は、逐次適応現象による実験から中間体とはなり得ず、又 HAINES 等⁽¹⁵⁾ が記載している如き pseudooxynicotine と N-methylmyosmine との関係から、微生物によるニコチンの分解経路は次の如くに推定される。

3-succinoyl pyridone-6 [IV] が如何に分解を受けるかは不明で、目下その酸化段階の研究を行つている。しかし側鎖が先きに分解されるとすると、[IV] 以外の型の pyridone も出来る訳であるが全く分離出来ない。ニコチン分解菌を培養した場合には極めて容易に 3-carboxyl pyridone-6 が得られている（後報参照）。依つて次の段階では恐らく pyridone 核が直接分解を受けるものと考えられる。

本実験は小林達吉先生の御指導により行つたものであり、又御指導御鞭撻を賜つた東大坂口、朝井、北原諸先生に感謝致します。御助言を頂き 6-chloronicotinic acid 等の混融を許可された東大薬学科菅沢教授、伴、辰野、富沢氏等並びに種種御援助を与えられた専売公社大西、和田、山崎氏等に感謝致します。元素分析は東大薬学科にお願いした。尙本研究の一部は文部省科学助成金に仰いだ。

- (1) FRANKENBURG, W. G. : *Advances in Enzymology*, 10, 386 (1950).
- (2) LARSON, P. S. : *Ind. Eng. Chem.*, 44, 279 (1952).
- (3) FRANKENBURG, W. G. : *Ind. Eng. Chem.*, 44, 301 (1952).
- (4) WERLE, E. and KOEBKE, K. : *Ann.*, 562, 60 (1949).
- (5) LARSON, P. S. : *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 76, 240 (1942).
- (6) WENUSCH, A. : *Z. Lebensm. Untersuch. Forsch.*, 84, 498 (1942).
- (7) BUCHERER, H. : *Zbl. f. Bakt., Abt II*, 105, 166, 445 (1942).
- (8) 田淵 : *農化*, 28, 806 (1954).
- (9) 和田, 山崎 : *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 155 (1954).
- (10) 須田 : *酵素化学シンポジウム*, No. 1, 73 (1949).
- (11) RAYBURN, C. H., HARLAN, W. R. and HARMER, H. R. : *J. Am. Chem. Soc.*, 63, 115 (1941).
- (12) 菅沢, 辰野, 紙谷 : *Pharmaceutical Bulletin*, 2, 39 (1954).

- (13) SWAIN, M. L., EISNER, A., WOODWARD, C. F., and BRICE, B. A. *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1341 (1949).
 (14) 菅沢, 伴: 薬学雑誌, 72, 1336 (1952).
 (15) HAINES, P. G. and EISNER, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 72, 1719 (1950).

Summary

(1) Pseudoxynicotine, 3-succinoyl pyridine, 3-succinoyl pyridone-6 and methyl amine were obtained as degraded products of nicotine.

(2) A new compound, 3-succinoyl pyridone-6, was identified as follows:

When concentrated culture broth was acidified, abundant precipitate appeared. This precipitate is difficultly soluble in water and insoluble in almost every organic solvents, but easily soluble in alkali. By recrystallizing from hot water, colorless needles, which melts at 288°, was obtained. The molecular formula was found to be C₉H₉O₄N, showing that this compound contains one more oxygen atom than 3-succinoyl pyridine. If this substance was oxidized directly by alkaline permanganate, no nicotinic acid but only a small quantity of succinic acid was obtained. However if chlorination was preceded to the oxidation by alkaline permanganate, 6-chloronicotinic acid was obtained. This shows that either hydroxyl group is present in 6-position of pyridine nucleus or 6-chloronicotinic acid is prepared by transformation of N-oxide. 3-Succinoyl pyridine N-oxide melts at 174°. Thus this compound was identified as 3-succinoyl pyridone-6.

(3) Following to the SUDA's method of successive adaptation, it was observed that oxynicotine, 3-pyridyl methyl ketone, nicotinic acid and 3-succinoyl pyridine N-oxide were not related to microbial degradation of nicotine, although nicotinic acid was oxidized adaptively.

(4) From these results the process of decomposition of nicotine by bacteria may be illustrated as follows:

nicotine → N-methylmyosmine → pseudoxynicotine → 3-succinoyl pyridine → 3-succinoyl pyridone-6 → direct decomposition of pyridone nucleus.

穀菽類のビタミン B₁ の蛍光写真による研究 (第 4 報)

ソルナシインゲン種子におけるビタミン B₁ の分布について

竹生新治郎, 堀内久彌 (農林省食糧研究所),

古谷雅樹 (東大, 理, 植), 新関滋也 (お茶の水大, 理, 生)

昭和 29 年 12 月 8 日 受理

Studies on Thiamine of Cereals and Beans by the Photographic Method.

Part 4. The Distribution of Thiamine in the Seed of Kidney Bean.

By Shinjirô CHIKUBU and Hishaya HORIUCHI (Food Research Institute, Ministry of Agriculture and Forestry), Mashaki FURUYA (Botanical Institute, Faculty of Science, Tokyo University) and Shigeya NIIZEKI (Biological Institute, Faculty of Science, Ochanomizu University)

従来、我々は米麦粒のビタミン B₁ について組織化学的研究を行ってきたが、豆類については蛍光の除去が困難であり、的確な B₁ の組織像が得られなかった。今回ソルナシインゲン種子について、手法に若干の改良を加えて難点を除き、ほぼ正確と考えられる分布像を得、同時に B₁ の化学的定量を行って、若干の知見を得たのでここに報告する。

実 験 の 部

1. 実験方法

試料はすべて 1952 年秋に収穫した長野県産の *Phaseolus Vulgaris* L. (品種, Master piece) ソルナシインゲンの貯蔵種子を用いた。実験は 1953 年 7~9 月の 3 カ月にわたり行われたので、実験に供せられるまでに 8~10 カ月の貯蔵期間を経ている。

A. 化学的定量法 実験に先立ち、子葉、胚の部分を実験材料として、赤血塩並びにブロムシアンによるチオクローム法及び桜井法の 3 法についてあらかじめ比較検討を行つた。赤血塩法、ブロムシアン法ともにパームチャートにより B₁ の吸脱着を行い、京大の藤原元典⁽¹⁾、松井清夫の⁽²⁾、術式に従つた。