[農化 第 35 卷, 第 13 号, p.1284~1288, 1961]

麦角菌に関する研究(第44報)*

麦角菌の培養からインドールイソプロピオン酸 およびそのエステルの分離

山 野 藤 吾 (武田薬品工業株式会社研究所)

昭和 36 年 5 月 22 日 受 理

著者は人工培養法で ergotamine を生産する目的で ergotamine を高率に含有することが知られているニュージーランド産 *Festuca* 属植物 (*F. arundinacea*, ウシノケグサの 1 種) に着生していた麦角を入手するとともにそれらから分離した多数の菌株について麦角アルカロイド生産性を吟味した。その際たまたま麦角アルカロイドを微量にしか生産しない菌株にかぎって培養液中にインドール反応陽性の A, B 2 種の未知物質を顕著に生産する事実を発見した。著者はこれら物質がどのような性質のものであるかを明らかにするため、それらの単離を試みた結果、両物質をいずれも微量ながら結晶として得ることに成功した。

これらのうち物質 A はかつて Köggl^(1,2) らおよび Erdtman⁽³⁾ らが化学的に合成した 1 種のインドールイソプロピオン酸, (+)- α -(3-indolyl)-propionic acid (I) とすべての点で一致した。また物質 B は白色の針状結晶で, m. p. 145°, $[\alpha]_D^{24.5} = +51^\circ$ (MeOH), $[\alpha]_D^{24.5} = +51^\circ$ (H₂O) を示し, 分子式 C₁₇H₂₃O₇N に相当した。この物質は *p*-dimethylaminobenzaldehyde-硫酸溶液 (van Urk 試薬) によって時間の経過とともに黄→緑→青色へと変化する呈色反応を与え, その紫外線吸収スペクトルは 280m μ および 290m μ 付近に極大を示した。一方本物質は水, アセトン, メタノールに易溶, エタノール, エーテル, 酢酸エチルに可溶の中性物質で, アルコール性水酸化ナトリウム溶液中で加水分解を受けると前記物質 A と D-マンニットとを与える。これら諸性質から物質 B は (+)- α -(3-indolyl)-propionic acid と D-マンニットとがエステル状に結合した新物質 D-マンニットインドールイソプロピオン酸 (II) であろうと推定される。

前述のようにこれら A, B 両物質は麦角アルカロイドが微量にしか生産されない場合にかぎって多量に生産されるが, この事実から見ると両物質とも麦角アルカロイドと密接な関係で生産されるものと思われる。

実 験 の 部

[I] 麦角菌の培養から A, B 両物質の分離

1) 培養: ニュージーランドの *Festuca* 属植物に着生していた麦角から常法⁽⁴⁾により分離した多数の菌株のうちから目的とするインドール反応陽性物質を比較的多量に生産する 1 菌株を選び, それについて多量培養を実施した。培養基としては従来⁽⁴⁾とほぼ同様マンニット 5%, グルタミン酸 0.7%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.03% の組成の水道水溶液をアンモニア水で pH 5.4 に調整したのち 3 l 平底瓶に 1 l ずつ分注し, 1.5 気圧で 15 分間殺菌したものをを用いた。また培養法も従来と全く同様の⁽⁷⁾供試菌株の分生孢子を殺菌水に懸濁して接種したのち 26° で約 50 日間静置した。

2) 抽出: こうして行なった培養 100 個についてさきと同様の方法⁽⁴⁾によりまず菌苔と培養液とを濾別し, 菌苔はこれを水道水で洗浄し, 次にこの洗浄液と培養濾液とを合併してこれをアンモニア水でアルカリ性にしたのち酢酸エチルとふりまぜ, 含有されている微量の麦角アルカロイドをほぼ完全に溶出した。このようにして得たアルカロイド溶出残液を希塩酸で pH 2.0 前後に調整したのち酢酸エチルとくりかえしふりまぜてインドール反応陽性物質を転溶し, これを A 部とした。こうして得た水溶液部分はなおインドール反応を与えるので, これをさらに *n*-ブタノールとくりかえしふりまぜてインドール反応陽性物質を完全に *n*-ブタノールに抽出し, これをその 1/10 量の水で洗浄して B 部とした。

* Researches on Ergot Fungus. Part XLIV. Isolation of Indoleisopropionic Acid and its Ester from the Saprophytic Culture of the Ergot Fungus.

By Tōgo YAMANO (Research Laboratories, Takeda Chemical Industries, Ltd.)

a) A 部からインドール反応陽性物質の分離 : 前述のようにして得た A 部はこれを脱水するとともに減圧下で濃縮して乾涸させた。この残留物をアセトンに溶解し、不溶分を除去したのちふたたび乾涸するまで濃縮した。この残留物を 1% NaHCO_3 水溶液に溶解し、希塩酸で pH 2.0 に調整したのち、エーテルとくりかえしふりまぜて目的物を完全にエーテルに溶出し、このエーテル溶液から溶媒を駆逐し、その残留物を pH 7.0 の 0.1 M-リン酸緩衝液とエーテルとを 50 cc ずつ、また 200 cc の分液ロウト 20 本を用いて向流抽出に付した。この場合インドール反応陽性物質は分液ロウトの 10 本目をピークとしてその 5 本目から 17 本目の間に集積するのでそれぞれに含まれている目的物を完全にエーテル中に抽出し、抽出溶液を合併して脱水したのち乾涸させた。この残留物についてふたたび前回と同じ向流抽出を行ない、目的物を濃縮乾涸したのち、これをベンゼンで処理して不溶物を除き真空デシケーター中に約 3 日間放置したところ褐色板状の結晶が析出した。この結晶を集め、ベンゼンと石油エーテルとの混液から再結晶して m. p. 139° (uncorr.) を示す板状結晶 (物質 A) 約 120 mg を得た。

b) B 部からインドール反応陽性物質の分離 : B 部として得た前述の *n*-ブタノール溶液を減圧下で乾涸するまで濃縮し、その残留物をアセトンに溶解して不溶分を除いたのちふたたび濃縮して乾涸させた。こうして得られた残留物を pH 5.8 の 0.1 M-リン酸緩衝液と酢酸エチルとを 100 cc ずつ、また 300 cc 分液ロウト 10 本を用いて向流抽出に付した。この場合目的とする物質 B は分液ロウトの 3 本目から 8 本目の間に集積するのでそれらの分液ロウト中の酢酸エチル部分を合併して乾涸させるとともに緩衝液部分はこれを *n*-ブタノールとくりかえしふりまぜて目的物を完全にブタノール中に転溶した。このブタノール溶液を減圧下で乾涸させたのち、その残留物とききの酢酸エチル部分を乾涸させて得た残留物とを合併して、これをふたたび pH 6.0 の緩衝液と酢酸エチルとを 50 cc ずつ、また 200 cc の分液ロウト 20 本を用いて向流抽出に付した。こうすると目的物は分液ロウトの 7 本目から 16 本目の間に集積するのでそれぞれから目的物を抽出し、抽出液を濃縮乾涸させたのち、残留物をアセトンに溶解し不溶分を除いて濃縮したところ白色針状結晶が析出した。この結晶をアセトンと酢酸エチルとの混液またはエタノールから再結晶して m. p. 145° (uncorr.) を示す白色針状の結晶 (物質 B) 約 260 mg を得た。

[II] A, B 両物質の理化学的性質

1) 物質 A : 本物質はベンゼン、アセトンなどから白色板状結晶として析出し、m. p. 139° (uncorr.), $[\alpha]_D^{20} = +76^\circ$ (EtOH), $[\alpha]_D^{21} = +79^\circ$ (MeOH) を示す。その紫外線吸収スペクトルは 280 m μ および 290 m μ 付近に極大を示し、インドール酢酸、インドールプロピオン酸などのそれとほぼ一致する (第 1 図参照)。元素分析、分子量測定の結果は次の通りで本物質は分子式 $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$ に相当する。

$\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$, 計算値 : C 69.84, H 5.82, N 7.40%, 分子量 189.02

実測値 : C 69.69, H 5.86, N 7.34%, 分子量 180 ± 20 (Barger 法)

本物質は水に僅かながら溶解し、溶液は酸性を示す。また石油エーテル、リグロインに不溶、ベンゼン、クロホルムに可溶、酢酸エチル、エーテル、アセトン、ピリジン、アルコールあるいは各種のアルカリ類に易溶で

第 1 図 物質 A および B の紫外線吸収スペクトル (エタノール溶液)

1. 物質 A 2. 物質 B インドール酢酸

ある。さらに本物質は *p*-dimethylaminobenzaldehyde-硫酸溶液によって時間の経過とともに黄→緑→青色に変化する呈色反応を与え、濃硫酸、濃塩酸などでは呈色しない。また本物質はかなり不安定で日光照射下あるいは高温の下で褐色に着色するとともにインドール臭を放つようになる。なお本物質は第 2 図に示すような赤外線吸収スペクトル曲線を与える。これらの諸性質はこの物質 A がかつて Kögl^(3,4) らが植物ホルモンの 1 種として合成したインドールイソプロピオン酸の 1 種 (+)- α -(3-indolyl)-propionic acid に一致することを示している。

2) 物質 B : 本物質はエタノールあるいはアセトンから白色の針状結晶として析出し、m. p.

第2図 物質Aの赤外線吸収スペクトル (KBr disk)

第3図 物質Bの赤外線吸収スペクトル (KBr disk)

145° (uncorr.), $[\alpha]_D^{24.5} = +51^\circ$ (MeOH), $[\alpha]_D^{24.5} = +51^\circ$ (H₂O) を示す。その赤外線吸収スペクトルは第3図に示す如くで、その紫外線吸収スペクトルは前記のそれとほぼ一致する(第1図参照)。元素分析、分子量測定の結果は次の通りで、本物質は分子式 C₁₇H₂₃O₇N に相当する。

C₁₇H₂₃O₇N, 計算値 : C 57.78, H 6.55, N 3.98%, 分子量 353.36

実測値 : C 57.77, H 6.61, N 3.99%, 分子量 350 (Barger 法)

本物質は石油エーテル、リグロインに不溶、エタノール、エーテル、酢酸エチルに可溶、水、アセトン、メタノールに易溶の中性物質で、*p*-dimethylaminobenzaldehyde-硫酸溶液によって物質Aと同じ呈色反応を与える。次に本物質は1N-アルコール性水酸化ナトリウム液に溶解して湯浴上で加温すると前記物質Aとともに1種の未知物質を与える。この未知物質は水溶性の中性物質で、エタノールから再結晶したものは m. p. 164° (uncorr.), $[\alpha]_D^{20} = 0$ (H₂O) を示し、分子式 C₆H₁₄O₆ に相当する。また Lemieux 試薬⁽⁹⁾、依田試薬⁽¹⁰⁾、あるいは Hough 試薬⁽¹¹⁾、そのいずれによっても糖アルコールに特有の呈色像を与え、*n*-ブタノール:酢酸:水(4:1:5)の上層液を展開剤として用いるペーパークロマトグラフィー(東洋濾紙 No. 51, 下降法)で R_F 0.20~0.22 を示す。この物質はこれら諸性質だけでなく第4図に見られるように赤外線吸収スペクトルでも D-マンニットとよく一致する。

第 4 図 物質 B が加水分解で与えた水溶性物質の赤外線吸収スペクトル (KBr disk)

— 加水分解で得たもの D-マンニット

以上の諸事実は供試の物質 B が前記物質 A, すなわち (+)- α -(3-indolyl)-propionic acid と D-マンニットとがエステル結合した新物質 D-マンニット・インドールイソプロピオン酸であることを示している。

[III] A, B 両物質の生理作用 Kögl⁽¹⁾ らはインドール酢酸類似化合物の植物ホルモン作用について検討し, ラセミ体のインドールイソプロピオン酸にその作用が顕著であることを認め, さらに⁽²⁾合成して得たラセミ体を分して, 各対掌体の作用強度を比較することにより, (+)-型は (-)-型よりもその作用が 30 倍も強いことを認めた。

著者は前記物質 A についてその植物ホルモン作用を確かめるとともに, そのエステルである物質 B についてもこれをしらべてみた。すなわち市販の豌豆 (品種: アラスカ) を水中に 6 時間浸漬したのち大型ペトリ皿 (直径 20 cm) 内の砂に播種し, 24~26° の暗室に放置した。約 7 日後新芽が 10~15 cm の長さまで伸長してから赤色ランプの下で芽の第 1~2 節間を約 3 cm の長さに切り取り, その縦に 2 cm の長さに切込を入れて 1 時間水中に浸漬した。次にこの切片を被検液 (検体を 2 mg/l の割合で水に溶解したもの) 中に 3 個ずつ投入し, 20° の暗室に 6~12 時間放置してそれぞれの彎曲度を測定した。その結果物質 A だけでなく B も対照として使用したインドール酢酸と同等の植物ホルモン作用を示すことを認めた。

要 約

(1) ニュージーランド産 *Festuca* 属植物 (*F. arundinacea*, ウシノケグサの 1 種) に寄生していた麦角菌が培養基上で麦角アルカロイドを微量にしか生産しないときにかぎってインドール反応陽性の A, B 2 種の物質を顕著に生産することを認め, 同時にその培養から両物質をそれぞれ結晶として単離した。

(2) 両者のうち物質 A は Kögl らが合成したインドールイソプロピオン酸, (+)- α -(3-indolyl)-propionic acid と一致するものであり, 物質 B はこの A と D-マンニットとがエステル状に結合したものであると推定される。

(3) 物質 A はもちろん B も豌豆試験に関するかぎりインドール酢酸と同等の植物ホルモン作用を示す。

終りに臨み終始御鞭撻を賜った当所長桑田 智博士ならびに副所長佐藤喜吉博士に謝意を表する。また終始御懇篤な御指導を仰いだ北海道大学教授佐々木西二先生, 当研究所第 5 部長阿部又三博士および研究室長大和谷三郎博士に深甚の謝意を表する。なお実験に御協力願った山田三郎氏, 諸種の理化学的測定と元素分析とを御担当下さった神尾英雄, 菅 正巳の両氏にそれぞれ厚く感謝する。

(本報告は昭和 36 年 4 月 1 日, 九州大学における日本農芸化学会大会に講演した。)

(1) F. Kögl, D. G. F. R. Kosterman: *Z. physiol. Chem.*, 235, 201 (1935).

(2) F. Kögl: *Naturwiss.*, 25, 465 (1937).

(3) F. Kögl, B. Verkaariki: *Z. physiol. Chem.*,

- 280, 167 (1944).
 (4) H. Erdtman, A. Jönsson: *Acta Chem. Scand.*, 8, 119 (1954).
 (5) 阿部又三: 本誌, 20, 275 (1944).
 (6) 阿部又三, 山野藤吾, 大和谷三郎, 高津嘉春, 楠本 貢, 小松 肇, 山田三郎: 本誌, 34, 580 (1960).
 (7) 阿部又三: 武田研究所年報, 10, 145 (1951).
 (8) 阿部又三, 大和谷三郎, 山野藤吾, 楠本貢: 本誌, 34, 360 (1960).
 (9) R. U. Lemieux, H. F. Bauer: *Anal. Chem.*, 26, 920 (1954).
 (10) 依田篤信: 日化, 73, 18 (1952).
 (11) L. Hough: *Nature*, 165, 400 (1950).

[農化 第 35 卷, 第 13 号, p.1288~1290, 1961]

パルプ中のマンナンに関する研究 (第5報)*

β -セルロース区分に存在するマンノース基

越 島 哲 夫 (京都大学木材研究所)

昭和 36 年 5 月 23 日 受 理

緒 言

さきにアカマツヘミセルロース中に含まれるマンノース基はセルロースに由来しないグルコース基をともしないグルコマンナンとして存在することを明かにした⁽¹⁾。グルコマンナンの重合度は 33~37⁽²⁾ と考えられるにもかかわらず他のヘミセルロース構成多糖類と異って希アルカリによっては木質材料より容易に抽出されないのは、マンノース基の一部が上述のグルコマンナンとは別の、配向性のよい難抽出性多糖類の構成単位として存在するためと考えることができる。グルコマンナンをホロセルロースパルプから分離、精製するとき、不純物としてマンノースを含む β -セルロース区分が混在し、この区分は温和な条件下で調製されたホロセルロースにも存在する⁽¹⁾ことがわかった。また溶解用亜硫酸パルプの β -および γ -セルロースから Hess および Lüdtke の方法によって“マンナン”を分離するとき象牙椰子マンナンと同じ挙動を示す“ γ -マンナン”のほかにセルロースと同じ挙動をとる“ β -マンナン”が得られることはさきに述べた⁽³⁾。これらの事実から木材およびパルプのアルカリ抽出液を酸性とするととき生成する不溶解部分 (β -セルロース区分) について検討する必要があると考えられる。本報ではグルコマンナン分離の際、 β -セルロース区分としてグルコマンナンとともに抽出されるマンノース基の由来を検討した。

実 験

1) ペーパークロマトグラフィー 東洋ろ紙 No. 50 (40×40 cm) を用い、エチルアセタート-ピリジン-水 (10:4:3) を展開剤とし、つねに2段に展開した。スポットの発色はアニリン水素フタル酸塩を用いた。アセタートの分別区分の糖組成の測定は前報で述べた方法⁽¹⁾によった。

2) β -セルロース区分の精製 アカマツホロセルロースパルプ (240 g, リグニン, 1.88%) をジメチルスル

粗 β -セルロース区分

- 水 (2.5 l) に懸濁, 振とう (懸濁液は沈降しない), メタノール (800 ml) 添加, 遠心分離
- 同操作を6回反復

沈殿 I

- 1% NaOH に溶解, ろ別, AcOH で中和, 遠心分離

沈殿 II

- 10% NaOH に溶解, 中和, 遠心分離
- 同操作を反復
- 透析, 水可溶部を除去
- 水をメタノールで置換

β -セルロース区分 (メタノール含浸)

第1図 β -セルロース区分の精製

ホキシンド, 1% カセイソーダ, 10% カセイソーダで連続的に抽出するとき, 酢酸酸性とした 10% アルカル抽出液から生成する白色無定形沈殿部分⁽¹⁾を β -セルロース区分とした。 β -セルロース区分は第1図のようにして精製した。収量 2.4 g, $[\alpha]_D^{18} -32^\circ$ ($c=0.3$, 10% NaOH), マンノース基 19.8%。水解物のペーパークロマトグラフィーによってグルコースとマンノースのみがみとめられた。

3) β -セルロース区分の酢化 β -セルロース区分 (2.3 g) をメタノールがなお残存する状態でピリジン (75 ml) に懸濁, しばらく攪はんして均質な懸濁液としたものに無水酢酸 (100 ml) を。

* Studies on Mannan in Wood Pulp. Part V. Mannose Residues in β -Cellulose Fraction.
 By Tetsuo KOSHIIJIMA (Wood Research Institute, Kyoto University)