- (1) 杉本 洋, 岩浅 孝, 石山二郎, 横塚 保 : 本誌, **36**, 690 (1962).
- (2) C. W. H. Partridge, N. H. Giles : *Arch. Biochem. Biophys.*, **67**, 237 (1957).
- (3) N. H. Giles, C. W. H. Partridge, N. J. Nelson : *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 305 (1957).
- (4) R. Markham, J. D. Smith : *Biochem. J.*, **49**, 401 (1951).
- (5) B. Magasanik, E. Vischer, R. Doniger, D. Elson, E. Chargaff : *J. Biol. Chem.*, **186**, 37 (1950).
- (6) P. Boulanger, J. Montreuil : *Bull. soc. chim. biol.*, **33**, 784 (1951).
- (7) J. G. Buchanan, C. A. Dekker, A. G. Long : *J. Chem. Soc.*, **1950**, 3162.
- (8) 田中勝宣, 中嶋由美, 木下祝郎 : 昭和 36 年度日農化大会シンポジウム講演 (1961).
- (9) J. S. Gots : *J. Biol. Chem.*, **228**, 57 (1957).
- (10) J. B. Wngaarden, D. M. Ashton : *ibid.*, **234**, 1492 (1959).
- (11) A. P. Levin, B. Magasanik : *ibid.*, **236**, 184 (1961).

[農化 第 36 卷, 第 8 号, p.699~703, 1962]

Aspergillus fischeri Wehmer による terrein の生成*

三沢正愛, 奈良 高, 中山 清, 木下祝郎 (協和醸酵工業株式会社東京研究所)

昭和 37 年 1 月 9 日 受理

Terrein, $C_8H_{10}O_3$ は Raistrick 及び Smith⁽¹⁾ により, 糸状菌 *Aspergillus terreus* の代謝生産物の一つとして発見, 分離された物質で, 後に Grove⁽²⁾ は *Penicillium raistrickii* もこの物質を生産することを報告している. この化学構造の決定については, 種々論議されているが^(2,3), 1955 年 Barton⁽⁴⁾ らによって次式が提唱され, 現在に至っている.

Terrein の化学構造式

著者らは糸状菌の代謝産物を検討中, *Aspergillus fischeri* Wehmer が培地中に著量の紫外部吸収物質を蓄積することを認め, これを分離, 同定した結果, terrein であることを確認した. さらに若干の生産培地の検討を行ったところ, 培養条件によっては約 5 mg/ml 程度生産することが明らかになったので, これらの実験結果を報告する.

実 験 方 法

菌株 : われわれの研究所保存の *Aspergillus fischeri* Wehmer A-7-11 株を用いた.

培養 : 大型試験管及び 250 ml 容三角コルペンを使用し, 下記の培地をそれぞれ 10 ml 及び 30 ml 入れ, 4~6 日間 30° で振盪培養を行った. 培地組成はグルコース 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025%, K_2HPO_4 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, 酵母エキス 1.0% 及び $CaCO_3$ 1.0% で, グルコースは別に殺菌し, 植菌前添加した. 試験管培養の場合は, 斜面培養した菌の胞子を直接移植し, フラスコ培養では斜面培養した菌に滅菌水を加えて作った胞子懸濁液を各フラスコに 1 ml ずつ移植した. 植菌時の pH は 7.0 付近である.

定量 : Terrein には紫外部吸収が認められるので, これを利用して定量した. すなわち培養終了後菌体を濾別し, その 0.05 ml (試料濃度により増減) を東洋濾紙 No. 50 にスポットし, イソ酪酸 : 1N-アンモニア = 10 : 3 の溶媒系を用い, 上昇法によりペーパークロマトグラフィーを行った. 上昇後風乾し, UV-detector (マナスル化学工業製 UV-LS-2 型) を用いて terrein の R_F はほぼ 0.70 付近のスポットを確認した. 次にこの部分を切

* Formation of Terrein by *Aspergillus fischeri* Wehmer.

By Masanaru MISAWA, Takashi NARA, Kiyoshi NAKAYAMA and Shukuo KINOSHITA (Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakkō Kōgyō Co., Ltd.)

第1図 Terrein 濃度と吸光度との関係
(波長 $m\mu$)

第2図 Terrein の精製
数字 (mg/ml) は terrein の濃度
() 内の数字 (g) は terrein の総量
培養液からの結晶の収率 57.4%

第3図 Terrein の紫外外部吸収曲線

ら確認される。

- (5) ヨードホルム試験：陽性。CH₃CO 基が存在するか、酸化により容易にこの基を生成することを示す。
(6) 塩化鉄反応：陰性。フェノール核が存在しないと考えられる。

取り、水 5 ml にて沸騰浴中で 1 時間抽出、抽出液の 283 $m\mu$ における吸光度を Beckman 光電比色計を用いて測定、定量した (第1図)。Terrein の吸収曲線は第3図に示した如く 283~4 $m\mu$ に極大を持つ。

実験結果

1. 培養液からの terrein の分離 250 ml 容三角コルベンを用い、実験方法の項で記載した培地により、5 日間 30° で振盪培養した培養液から分離、精製した。

最初炭末吸着、レジン処理等の方法を試みたが、回収率が悪く、殊にこの物質はアルカリ性で容易に分解することから、次に記すエーテル抽出法によって分離を行った。この物質は試験したいずれの pH でもかなりエーテルに転溶することが判明したので、微酸性下でソックスレー・エーテル抽出器を用い抽出する方法を採用した。第2図に精製の概要を示した。図に示した収量は、後述の同定試験でこの物質が terrein であることを確認後計算した値である。

第2図に示す如く、培養濾液をケスナー式濃縮装置により約 1/4 量ほどに減圧濃縮後、pH 6 付近で 1 昼夜エーテル抽出を行った。抽出部を減圧濃縮し、水分を除いた後エタノールにこれを溶解せしめ、ついで白鷺精製炭末を加えて脱色処理を行った。水溶液中での炭末処理により色素類はかなり炭末に吸着されるが、terrein も相当吸着され、溶出に際し再び両者が混ざるため脱色効果が著しく低下する。エタノール溶液中で活性炭処理を行うと色素類のみが炭末に吸着される利点のあることがわかった。炭末処理を 2 度繰返した後、脱色液を減圧濃縮すると、黄褐色の結晶が析出する。これをトルオールから 2 度再結することにより無色針状の結晶を得た。

2. 同定試験⁽⁵⁻⁸⁾

(1) 融点：124°。

(2) 元素分析：次のとおりで、本物質は分子式 C₈H₁₀O₃ に相当する。

C₈H₁₀O₃ 計算値：C 62.34, H 6.42, O 31.14%。

分析値：C 62.19, H 6.50, O 31.22%。

(3) 分子量：本物質は camphor に難溶なため、Rast 法が行えず、水を溶媒として氷点降下法により分子量を測定した。数回の測定結果の平均値は 146 で、C₈H₁₀O₃ の分子量は 154 である。

(4) ヨウ素酸酸化反応：陽性。アルコール、アルデヒド、メチルケトン、フェノール類、アニリン誘導体などの定性試験に用いられるもので、これらの物質がヨウ素酸によって酸化され、I₂ を遊離することから

第 4 図 Terrein 及び試料の赤外部吸収スペクトル

注 Terrein は J. H. Birkinshaw 教授から贈られたもの。

(7) 還元性 : 陽性. 糖定量用の arsemolybdate 試薬及び銅ソモギー試薬により鋭敏に反応することから, 還元性のあることが認められた.

(8) Ferric hydroxamate 試験 : 陰性. エステル, 酸, 無水物, ハロゲン化物を有していないと考えられる.

(9) 2,4-Dinitrophenyl hydrazine 試験 : 陽性. carbonyl 基の存在が予想される.

(10) 過マンガン酸カリ試験 : 陽性. したがって不飽和二重結合が存在すると考えられる.

(11) pH 試験 : 酸性, もしくは塩基性物質とは考えにくい.

(12) 紫外部吸収 : 水溶液中での UV 吸収の極大は, 283~4 mμ で, 分子吸光度 24,700, 極小は 232 mμ 付近. pH の変化によりほとんど変動せず. 95% エタノール中では 276 mμ に極大が移る (第 3 図).

(13) 赤外部吸収 : 赤外部吸収スペクトルは第 4 図に示したように, 3400 cm⁻¹ 付近(OH 基), 1700, 1640, 1570 cm⁻¹ 付近 (COC : C : C : C), 965 cm⁻¹ 付近 (trans-CH : CH) の吸収極大を有する.

以上の理化学的諸性質を総合した結果, 前述の如く *Aspergillus terreus* 及び *Penicillium raistrickii* の培養液から分離されている代謝産物 terrein ときわめて類似していることが判ったので, ロンドン大学 H. Raistrick 教授及び J. H. Birkinshaw 教授より分与された authentic な terrein と赤外部吸収スペクトルを比較したところ, 両者がほとんど完全に一致することを認めた (第 4 図).

3. 培養条件の検討 実験方法の項に記述した培地を基礎としてこの物質の生産条件を若干検討した結果を記す.

第 1 表 酵母エキスの濃度の影響

(A) 4 日間培養				(B) 6 日間培養			
酵母 エキス (%)	生育	pH	terrein (mg/ml)	酵母 エキス (%)	生育	pH	terrein (mg/ml)
0	±	5.4	0	0	±	4.3	0.09
0.25	+	4.6	0.53	0.25	+	6.3	0.44
0.5	+	5.8	0.60	0.5	+	6.5	0.80
1.0	++	5.0	1.14	1.0	++	6.3	1.02
1.5	++	5.0	0.34	1.5	++	6.9	1.25

培地組成: グルコース 5%, (NH₄)₂SO₄ 1.5%, MgSO₄·7H₂O 0.025%, KH₂PO₄ 0.1%, K₂HPO₄ 0.1% 酵母エキス 上記, CaCO₃ 1.0%
培養: 試験管振盪培養による. 30°.

(1) 酵母エキスの濃度 : 試験管培養で 4 日及び 6 日間培養した結果は第 1 表に示す如くであり, 酵母エキス濃度は 1.0% 付近が良好と考えられる.

(2) 糖の種類 : 第 2 表は培地中のグルコースに代え他の炭素源を使用した場合の結果で, 酵母エキスは 1.0% 使用した. この結果試験したほとんどすべての糖から terrein が生成され, 一般に

2.5% より 5% の炭素源使用が良好であるが, グルコースが最も収量良く, 以後の実験ではこれを使用した. しかし全般に生成される絶対量が余り多くない原因の一つに pH の変化が考えられる. すなわち培養中に培養液の pH が上昇すると terrein は急速に分解されるものとみられ, 第 2 表に示された結果の多くは pH がアルカリ側にあり, terrein 生成量は果して生成量のすべてか, 分解されて減少した残りの値なのか判然としにくい.

(3) 無機窒素源の種類 : 従来使用してきた硫酸 1.5% の無機窒素源の代りに硝酸ソーダ, 硝酸アンモニウ

第2表 炭 素 源 の 影 響

炭 素 源 (%)	5 日間培養			6 日間培養		炭 素 源 (%)	5 日間培養			6 日間培養	
	生育	pH	terrein (mg/ml)	pH	terrein (mg/ml)		生育	pH	terrein (mg/ml)	pH	terrein (mg/ml)
グルコース	5	冊	7.6	0.60	7.9	0.39	ラフィノース	5	冊	6.0	0.39
	2.5	冊	8.2	0.04	8.1	0.04		2.5	冊	6.4	0.41
フルクトース	5	冊	7.8	0.11	7.0	0.06	ラムノース	5	冊	5.5	0.04
	2.5	冊	8.2	0.02	8.0	0.16		2.5	冊	5.7	0.03
マルトース	5	冊	7.0	0.36	7.5	0.26	キシロース	5	冊	5.2	0.19
	2.5	冊	8.2	0.12	8.1	0.11		2.5	冊	7.8	0.18
シュクロース	5	冊	8.2	0.05	8.0	0.03	アラビノース	5	冊	5.2	0.03
	2.5	冊	8.2	0.02	8.0	0.02		2.5	冊	8.2	0.06
ラクトース	5	冊	8.2	0.01	7.7	0	ソルビット	5	冊	4.8	0.08
	2.5	冊	8.2	0.01	7.8	0.01		2.5	冊	6.3	0.28
ソルボース	5	冊	6.6	0.03	6.7	0.03	グリセロール	5	冊	5.6	0.13
	2.5	冊	6.8	0	6.0	0.01		2.5	冊	6.2	0.37
マンノース	5	冊	6.8	0.26	7.1	0.18					
	2.5	冊	8.2	0.26	8.2	0.19					

各数値は同一条件下の2試験管での平均値を示す。

培地組成：第1表と同じ。ただし酵母エキスを1.0%、グルコースの代りに上記炭素源使用。

第3表 各種無機窒素源の影響

グルコース 5%					グルコース 10%				
	窒素源 (%)	生育	pH	terrein (mg/ml)		窒素源 (%)	生育	pH	terrein (mg/ml)
硫安	0.5	冊	7.9	0.39	0.5	冊±	5.2	0.90	
	1.0	冊	7.6	0.54	1.0	冊±	4.6	1.00	
	1.5	冊	8.1	0.11	1.5	冊	4.3	0.94	
	2.0	冊	6.2	0.55	2.0	冊	4.2	0.93	
硝安	0.5	冊±	6.7	0.79	0.5	冊	4.6	0.61	
	1.0	冊	7.1	0.58	1.0	冊±	4.6	0.94	
	1.5	冊	6.3	0.31	1.5	冊	4.6	0.62	
	2.0	冊	6.6	0.21	2.0	冊±	4.5	0.47	
硝ソーダ	0.5	冊	8.5	0.48	0.5	冊±	5.4	1.21	
	1.0	冊	8.0	0.72	1.0	冊	5.3	1.24	
	1.5	冊	7.6	0.55	1.5	冊	5.3	1.30	
	2.0	冊	8.3	0.49	2.0	冊	5.5	3.25	
尿素	0.5	冊±	8.1	0.56	0.5	冊±	6.0	1.07	
	1.0	冊±	8.3	0.17	1.0	冊	6.4	0.94	
	1.5	冊±	8.2	0.22	1.5	冊±	5.8	1.36	
	2.0	冊	8.4	0.21	2.0	冊	6.2	0.75	
アミノ酸ニウムモ	0.5	冊±	7.0	1.09	0.5	冊	4.4	1.14	
	1.0	冊	6.0	0.69	1.0	冊	4.4	1.00	
	1.5	冊	7.1	0.73	1.5	冊	4.7	1.22	
	2.0	冊	7.1	0.75	2.0	冊	4.8	0.94	

試験管振盪培養により2試験管の平均値を示す。

培地組成：酵母エキスを1.0%使用。他は第1表参照。

第4表 培養日数との関係

培養日数 (日)	グルコース (%)	生育* (mg/ml)	pH	terrein (mg/ml)	培養日数 (日)	グルコース (%)	生育 (mg/ml)	pH	terrein (mg/ml)
4	2.5	18.3	8.3	0.20	6	2.5	15.8	8.4	0.04
	5.0	20.0	8.1	0.26		5.0	24.2	8.1	0.21
	7.5	36.5	6.8	1.19		7.5	28.5	8.1	0.99
	10.0	42.0	5.3	2.60		10.0	34.0	7.5	1.56
5	15.0	64.3	2.7	2.22	7	15.0	45.1	4.6	2.88
	2.5	10.3	8.2	0.07		2.5	26.9	8.4	0.10
	5.0	21.5	8.2	0.17		5.0	39.2	8.1	0.05
	7.5	25.8	7.7	1.45		7.5	36.5	8.1	0.53
	10.0	28.1	6.5	2.59		10.0	52.5	7.9	1.44
	15.0	32.5	4.1	4.70		15.0	56.5	6.3	3.32

三角フラスコによる振盪培養 30°。各日数別の培養は、別々のフラスコによった。

培地組成：第1表参照。

* 生育は乾燥菌体量 (mg/ml) で示した。

ム、尿素、磷酸二アンモニウムをそれぞれ0.5~2.0%使用し、その効果を調べた(第3表)。

前回同様試験管振盪法で5日間培養の結果のみを第3表に示した。この結果グルコース5%より10%の方がいずれも terrein 生成が多く、培地の pH 上昇はその生成量を低下せしめる。グルコース 10% 使用では硝安の多いものは良くないが、他は大差なく terrein を生成し、特に硝酸ソーダ2.0%で3mg/mlの生成量を示したのは興味がある。

(4) 培養時間：培養液の pH 上昇を避け、最高生成量を知るために三角コルベによる培養時間の検討を行った。なお各日数毎の分析に供した培養液はおのの別のフラスコで培養したので、データーが多少食い違っている(第4表)。

炭素源としてはグルコース(2.5~15.0%)、窒素源として硫安を用いた。フラスコ培養では全般に試験管法より terrein 生成が良いが、pH の上昇は著しく terrein 生成を低下せしめる点は前述のとおりである。したがってグルコース濃度の低いものは単に炭素源が少いためというのみならず、

pH 上昇も速やかであることも一因ではないかと考えられる。グルコース 15% の培地では 5 日間の培養で 4.7 mg/ml の terrein が生成され、条件によってはさらに増収し得るものと考えられる。

4. 生物学的試験 生物学的試験は当社富士工場技術試験第 3 係によって行われたものであるが、ここに要約を引用すると、抗菌力は試験した菌株 (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Xanthomonas oryzae*, *Candida albicans*, *Torula utilis*, *Piricularia oryzae*, *Glomerella cingulata*, *Gloeosporium laeticolor*, *Aspergillus niger*) のいずれに対してもほとんど認められなかった。また sps 系マウスで Ehrlich carcinoma 腹水型についての抗腫瘍性試験でもほとんど効果が認められなかった。

しかし本物質の毒性は比較的低く、マウス静脈注射時で LD₅₀ は 400 mg/kg 前後と考えられる。

考 察

糸状菌の代謝生産物については、イギリスの Raistrick 一派が広範な研究を行っており、今回著者らが *Aspergillus fischeri* で生成することを認めた 1 物質も *Aspergillus terreus* から彼らにより発見、分離されたものの一つ、terrein であることが確かめられた。

しかしこの物質の生合成機構や、生化学的活性については、その後何ら報告されておらず、興味ある問題といえよう。培地組成についての検討は、ごくわずかしが行わなかったが、5 mg/ml 近くの terrein 生成をみたことは、さらに増収の可能性を予想させる。Raistrick らは培地 35 l を用い、24°, 30 日間培養後、結晶として 17.3 g の terrein (文献中の最高値) を得ているが、著者らの *Aspergillus fischeri* では 5 mg/ml を生成し、この精製収量を 50% としても約 5 倍の生成量に相当する。今回検討された抗菌性、抗腫瘍性試験の範囲では生物学的効果が認められなかったが、その毒性が比較的低いことと、生成量が非常に多いことは、今後の用途開発を期待せしめるものである。

要 約

(1) 糸状菌 *Aspergillus fischeri* Wehmer がある条件下で培地中に著量の紫外部吸収物質を蓄積することを認めた。

(2) 分離・精製法を検討し、この物質を結晶状に取出した後、若干の化学的性質、元素分析、紫外部及び赤外部吸収スペクトル等から、この物質は Raistrick らが *Aspergillus terreus* の代謝産物の一つとして発見した terrein (C₈H₁₀O₃) と完全に同一であることを確かめた。

(3) Terrein 収量の増加を目的として行った二、三の培地検討の結果、最高 4.7 mg/ml の成績を得た。

平素御懇篤な御指導を賜っております東大応微研北原覚雄教授、同福井作蔵助教授に深謝します。元素分析は東大応微研第 8 研究部に、赤外吸収スペクトルは当研究所湯浅氏に、生物学的試験は当社富士工場試験第 3 係の方々にお願いしました。厚く御礼申し上げます。また authentic な terrein を分与くださった Raistrick 及び Birkinshaw 両教授に感謝いたします。

最後に発表の許可を賜った当社幹部の方々に感謝いたします。

- (1) H. Raistrick, G. Smith : *Biochem. J.*, **29**, 606 (1935).
- (2) J. F. Grove : *J. Chem. Soc.*, **1954**, 4693.
- (3) H. Raistrick, F. Reuter, P. W. Clutterbuck : *Biochem. J.*, **31**, 987 (1937).
- (4) D. H. Barton, E. Miller : *J. Chem. Soc.*, **1955**, 1028.
- (5) 杉山 登 : 有機化合物の微量確認法, 培風

館 (1957).

- (6) R. L. Shriner, R. C. Fuson : "The Systematic Identification of Organic Compounds", 1956, p. 3.
- (7) 東大農化教室編 : 農芸化学実験書, 上下巻, 朝倉書店 (1960).
- (8) 山口一孝 : 植物成分分析法, 南江堂, p. 81 (1958).