[農化 第 40 卷, 第 5 号, p. 227~235, 1966]

麴菌の生産する螢光性物質に関する研究 (第 6 報)

紫青色螢光性物質の精製単離

金子 安之 (名古屋大学農学部農芸化学教室)

昭和 41 年 1 月 6 日 受 理

Studies on the Fluorescent Substances Produced by *Aspergillus* fungi Part VI. Purification and Isolation of Bluish Purple-fluorescent Substance as Crystal

By Yasuyuki KANEKO

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
University of Nagoya

Among many fluorescent products distributed throughout genera *Aspergillus* and *Penicillium*, the bluish purple-fluorescent one, VS-II, was investigated on its purification procedure. Considering that VS can never be produced in shake culture at all, floccose type *Aspergillus* was incubated in duralumin vessel stationary culture containing Pfeffer's medium, the carbon source being autoclaved separately from other ingredients to avoid formation of yellowish brown materials, which would disturb the crystallization of VS later. From about 1,000 liter culture broth VS-II was purified and isolated as a crystalline form by adsorption on charcoal and alumina, ion-exchange, Filtrol column chromatography. VS-II was confirmed to be one of the isoxanthopterin compounds by elemental analysis, UV and IR absorption spectra, and determined to be new glycoside pterin being compared with the known materials.

Detailed fluorescence microscopic observation demonstrated that most VS locates on the hyphal surface layer, septa and vesicle in the mold colony. (Received January 6, 1966)

緒 言

前報⁽¹⁾までにおいて、われわれは東大農学部醸酵生理学教室で保存されていた 249 株の麴菌を液体培養し、生産される螢光性物質の種類と生成量、分布⁽²⁾等を調べ、さらにその中の一種類である紫青色螢光性物質 (以下 VS と略称) の物理的・化学的諸性質⁽³⁾や、乳酸菌に対する葉酸代替生理作用⁽⁴⁾、本物質の定量法⁽⁵⁾、アミノ酸等の光酸化促進作用⁽¹⁾などについて述べ、このものがイソキサントプテリン類に属する物質であろう⁽³⁾と推定した。

しかしながら、この VS 類は極めて微量の麴菌の生産物で、前報までには、その結晶にまで精製することに成功しなかったが、今回麴菌を大量に培養し、抽出精製法を改め、結晶として分離することができたので報告する。なお第 1・2 報で説明したように、麴菌の菌体および培養液中には 2 種類の VS が存在し、そのうち *n*-ブタノ

ール・酢酸・水 (4:1:5) のペーパークロマトで、 R_F 0.24 のものを VS-I, R_F 0.14 を示すものを VS-II と区別する。

実 験 方 法

(1) 供試菌株

一般に麴菌株には VS と同種類の紫青色螢光物質を生産するものが多数存在し、前述の 249 の試験株のうち、この物質を特に多く生産する菌は 21 株も見出されているが、本実験には前回同様、*Aspergillus oryzae* T-17 を使用した。この保存菌は、坂口、山田⁽⁶⁾の分類学研究によれば、*Aspergillus oryzae* (Ahl.) Cohn, 黄糸菌叢、孢子柄 2.0~3.0 mm に属するものである。

(2) 培 養 基

VS は、およそ麴菌が発育するほとんど総ての固体、および液体培地の静置培養において生産される。従来は

あまり複雑な組成の培養液から抽出する困難を回避し、大量培養のため多大の培地材料を要することを考慮し、特に菌体生育に好適な天然培地を使用しないこととし、Pfeffer 氏液を専ら利用した。しかし前報までの結果により、VS は麹菌体の生育が良好なほど多量に生産されることは明らかであるので、大量静置培養に要する労力を節約する目的で、第 1 表のごとき炭素源、窒素源、無機成分ともに濃厚に溶解した通常のものに倍する改変 Pfeffer 氏液を用いることとした。

第 1 表 培 地 組 成

蔗 糖	100 g	硝酸アンモニウム	30 g
磷酸二カリ	7.5 g	硫酸マグネシウム	2.5 g
塩化第二鉄	痕跡	水 道 水	1 l

次に留意した培養液調製法は、いかにして殺菌に伴う黄褐色の着色を防止し、無色に近い液を作製するかとの点である。第 1・2 報⁽³⁾において VS の精製抽出を試みた経験によれば、本生産物の単離を妨げる最大の障害は、このものに夾雑する不純黄褐色色素類であり、VS 精製標品よりその黄褐色物を除去すれば、これの結晶化は可能であるとの推察である。そしてこの物質は、前報までの実験によれば常に必ず VS に随伴され、活性炭、酸性白土、アルミナ、珪酸マグネシウム系吸着剤、Florisil らの各種吸着剤に対し、VS と同じ態度で吸着溶出性を示し、pH の差異による分別吸着も不可能である。有機溶剤に対する性質も同様で、アルコール類、水酢、ピリジン等の極性溶剤に溶け、フェノール類に特異的に転溶し、エーテル、ベンゾール等の極性の小さい非混合性溶媒には不溶性であるなどの点で、VS と着色物質はよく似ている。そしてペーパークロマト、アルミナカラムクロマトなどにおいても両者はほぼ相重る。このように物理的性質が酷似するため、上述の手段を組合せた精製法の各段階で他の不純物は取去られても、このものだけは VS から除去することはとうてい至難であった。そこで今回はこの不純物の成因を考察し、その大部分が菌によって作られるものではなく、当初培養液の殺菌を行なう際、生成せられるものであることを知り、次の方法によりこれが全くできないようにして、VS の精製を極めて容易ならしめた。

一般に、第 1 表のような純粋物質のみよりなる完全合成培地も、加熱殺菌後著しく黄褐色を帯びようになるが、この原因について予備実験の結果、次の二つの要素

に基づくものであることが判った。第 1 に、培地の炭素源として蔗糖より葡萄糖を用いた場合の方が、それが純粋なものであっても遙かにより黄色となる。また、たとえ純粋な蔗糖を使用した場合でも微量の不純物、たとえば転化糖などが含まれると殺菌後着色する。第 2 に通常の培地調製法におけるごとく、第 1 表の成分のうち、糖分と硝酸アンモニウム以下の塩類とを共存させて加熱殺菌すると、著しく褐変が起る。

(3) で後述するように、培養は大型ジュラルミン製容器に 6 l ずつ培地を入れ静置培養を行なったが、以上のようなことを避けるため、まず蔗糖は転化成分の無い最高純度のグラニュー糖を使用した。そして 1 容器分の蔗糖 600 g を沸騰水 300 ml に溶解し、別のフラスコで 110°, 10 分殺菌後直ちに流水に漬けて冷却し、余熱による着色を防ぎ、無色糖蜜約 690 ml を作る。次に培地 6 l 分の炭素源以外の成分を約 5.31 l の水道水に溶かし、容器内で別個に殺菌する。両者は無菌室内で接種する直前に容器中に合併し、無色透明の培養液をつくる。

(3) 培 養 法

前記ジュラルミン製容器を使用する前に、まず液内タンク培養法により、VS を大量に得る目的で予備的に振盪フラスコにより VS が、本菌により生産されるための通気条件その他について調べた。

その実験結果については後の報告でまとめて詳しく論ずるが、この実験により液体培地では静置培養によるものでなければ VS は生成されず、振盪培養ではいかに通気速度を絞っても本実験の目的に利用しうる程度の量は、少なくとも生産されないことが判った。

そこで前記のように大型の円盤状総ジュラルミン製容器に 6 l ずつの培地を入れ、90 個 540 l ずつ 2 回菌蓋培養を実施した。培養液中の残糖の定量には培養濾液 1 ml に 1/5 規定塩酸 1 ml、水 6 ml を加え、30 分沸騰水中で加熱、中和後 25 ml に満たした後 5~10 ml をとり、Somogyi 変法⁽⁷⁾により還元糖を定量した。培養菌株の T-17 菌は VS 生産性にやや不安定な傾向があり、極めて多数回の分離培養により充分に純粋とした斜面株でもそれより Czapek, Pfeffer らの合成培地に累代的に多数植えついでゆくと、芽胞子柄が短少で密生し、芽胞子が多量にびっしりと着いた緑色菌叢株がときに分離してくる。このような変異株は VS をほとんど生産しなくなるので、これが本培養容器に接種され、または本培養中に発生することをできる限り防ぐため、まず本菌を多数の Czapek

寒天斜面に 30°, 3~4 日発育させ、長い芽胞子柄が粗生し胞子が少なく、気菌糸の多い灰緑色菌叢のいわゆる *floccose type* であることを確認した斜面菌体を、さらに暗室内で紫外線により観察し、とくに紫青色螢光を強く発する気菌糸の多い部分を容器に接種する。種母量は 1 本の培養容器に 1 斜面とし、30° で静置約 55 日以上培養した。

(4) 螢光顕微鏡写真

本麴菌の菌体内の VS が分布している状況を精密に調べるため、螢光顕微鏡により観察し、写真を撮影した。Czapek 寒天の *slide culture* を行ない、35°, 72 時間で Leitz の顕微鏡、英弘精機製マツダ UV D₁ フィルター付紫外線光源水銀燈、Ultropak Kondensor 等より成る装置で鏡検し、カメラ；オリンパス S-35 ワイド、PM-5 付、フィルム；富士ネオパン SSS、倍率 26.4、露出時間 1 分で撮影、バンドールで 20°, 16 分増感現像を行なった。

(5) VS の定量法

VS を定量する必要のあるときは、前報⁽⁵⁾で述べた炭末吸着、ペーパークロマト等を含む螢光測定により行なった。

実験結果

(1) 菌体内での VS の存在について

第 1 図に寒天培地上の直立菌糸の螢光顕微鏡写真を示す。もちろん暗視野で紫外線により螢光を発するものの

第 1 図

みを撮影したので、写真中白く写っている部分は、いずれも紫青色の螢光を発しているところであり、また立体的なものを鏡検するため菌体の一部に焦点を合わせると、他はぼやけて大きく写真に写っている。図は一点より放射状に数本の芽胞子柄が分岐しているものであるが、斜面菌叢の肉眼的の外観に一致して、芽胞子柄の先端はいずれも頂囊のみで胞子を着生せず、またいずれも少し振れている。VS は図に表われた菌糸全般に分布しているが、最右下段の横に伸びた菌糸にみられるように、菌糸表面層、隔壁部に特に VS が存在することが観察される。また最先端の頂囊も螢光が極めて強い。これは菌体表面のガス交換が旺盛な場で、酸化還元反応の強く行われるところと、菌糸の伸長の特に盛んな、いわば植物の成長点に当る部位に VS が集中していることを示し、これらの位置における物質代謝作用との関連性を示唆して興味深い。

(2) 大量培養液よりの VS の抽出精製

培養約 45 日前後で、前述の多数の容器中で麴菌蓋が糖を消費しつくすが、通常発育および VS 生成量は少し長引いて最大に達するので、55 日ないし 60 日で逐次すべての容器より培養液を濾過し抽出を始めた。菌体を肉挽器と石英砂を加えた攪碎器で磨砕し、菌体中の VS と黄色螢光物質を抽出するために沸騰水中に投入、しばらく攪拌後放冷し濾過する。培養濾液と抽出濾液とを合併し、pH を 7.5 に補正し活性炭末を 1% 加え VS および黄色螢光物質を吸着せしめる。これらの螢光物質はおおよそ pH 2.0~7.5 で酸性白土や炭末に吸着されるが、pH が低いほど黄褐色雑色素が随伴して螢光物質とともに吸着されるので、pH 7.5 で処理した。吸着炭末を 0.1 N NaOH で洗浄し不純色素を除く。

次に 0.1 N 温苛性ソーダ・アセトン (4:1) を加え、素早く攪拌濾過すれば螢光物質類は炭末より溶出されるから速やかに冷却中和し、減圧濃縮、濃縮液の pH を 3.5 に補正し、エーテル連続抽出器により黄色色素、黄緑色螢光物質、その他のエーテル可溶物を分別する。エーテル可溶性区分よりは、黄緑色螢光物質その他をさらに精製し結晶状に単離したが、それについては後に報告する。エーテル不溶性水層に残った VS は、再び pH 7.5 で炭末に吸着、前と同じく 0.1 N 苛性ソーダ・アセトンで溶出、微酸性に中和濃縮する。

濃縮液に約 9 倍容のメタノールを添加生成沈澱を濾別し、さらに 90% メタノールで沈澱より VS を抽出し、

濾液と合併する。この90%メタノール抽出液を次にアルミナカラムクロマトグラフィーにかけると、VS は褐色不純物とともにカラム上端に吸着されるので、まず80%メタノールをカラムに流すと、緒言で述べた VS-I が展開溶出され、分取の後 60% で溶出すると、VS-II が褐色帯を後に残して分離されてくる。VS-I 区分よりのその精製結晶化については後に述べる。VS-II 溶出液は強烈な紫青色蛍光を有するが、いまだ黄色色素が残っているので、濃縮した後、水溶液のまま再度アルミナカラムを通過せしめ水で展開溶出、濃縮する。

次に濃縮液中に混在する多量の無機塩、およびこの段階までに除き得なかった着色不純物をイオン交換樹脂カラムクロマトにより分別した。Dowex-I×4をまず-OH型とした後、1N 炭酸ソーダで処理-CO₃型とし、常法どおりカラムとする。VS と不純物とはともにカラム上端に吸着されるので、洗浄後暗室紫外線下に紫青色蛍光を発する VS 帯樹脂をカラムより取出し、水に懸濁して攪拌しつつ稀塩酸を滴々加えてゆくと、Cl⁻ と置換されて VS が樹脂より遊離してくる。過剰の塩酸が入ることを避けるため、充分に VS が脱着され、塩酸により液の pH が低下し始めた点でその滴加を止め、pH を4ないし6に保ちつつ減圧濃縮すれば、ほとんど無色ないし微黄色の VS 濃厚溶液が得られる。不純色素は樹脂に結合したまま溶出されない。

この VS-II 液には VS-I が少量混入しているので、Filtrol Grade 58* のカラムクロマトにより分別する。水に懸濁して充填したカラムに精製 VS 溶液を pH 2.0 に補正して通すと VS は Filtrol 上端にまず吸着せられ、水洗後、水・アセトン混液により溶出される。水に対するアセトンの比率を1%より漸次 2%, 4%……30% まで増加してゆくと、第1に VS-II の、第2に VS-I の分別帯がそれぞれ展開溶出されてくる。この VS-II 溶出液を濃縮し、再度 Dowex-I, -CO₃ 型イオン交換樹脂カラムを通し、前回と同様に VS-II をその吸着樹脂より塩酸と置換して溶出する。

この VS-II 精製溶液を減圧濃縮し冷蔵すると、微黄色長針状結晶として VS-II が析出する。熱水より再結を繰返す。以上の操作を第2表に示した。第2図は VS-II の結晶の写真である。総収量は再結前の粗結晶約 400 mg。

第2表 培養液より VS の抽出精製法

* 米国 Filtrol Corporation 社製吸着剤。Complex silicate を成分とする。

第 2 図

(3) VS-II 結晶の諸性質

顕微鏡融点測定器による融点 193° (未補正, 分解赤黒変を伴う), 後述するが, ポーラログラフィー法及びアルカリ滴定法により分子量を推定すると, それぞれ約 300 及び 358.9 と考えられる。なおまた, 後で説明する紫外部吸収スペクトルは, 明瞭に本物質がイソキサンプテリン群 (2-amino-4,7-dihydroxypteridine の誘導体群) に属する化合物であることを示す。以上の 2 理由により, その分子式中の窒素の数は 5 と推定される。 100° で真空乾燥して恒量に達せしめた VS-II の元素分析値は C, H, O, N のみより成り, ハロゲン, S, P を含まず。

元素分析値: C 42.16%, H 5.19%, N 18.23%.

N_5 が最も適当と考えれば,

計算値 $C_{13}H_{17}O_7N_5 \cdot H_2O$:

C 41.82%, H 5.13%, N 18.76%.

分子式 $C_{13}H_{17}O_7N_5 \cdot H_2O$ の分子量 373.3, $[\alpha]_D^{20} = -60.2^{\circ}$. ただし $c = 3.321 \times 10^{-3}$ g/ml, $l = 1$ dm.

この測定後 24 時間で再び測定したが, 変旋光はみられなかった。

(4) VS-II のアルカリ滴定曲線と分子量, pK_a の測定

ラスト法により常法どおり分子量の測定を試みたが, VS-II は camphor, camphene, bornyl chloride, bor-

第 3 図 VS-II のアルカリ滴定曲線

neol, ベンゼン, ニトロベンゼン等にいずれも混融しないし溶解せず, この方法では不可能であった。そこでアルカリ滴定により求めることとし, 0.1 N 苛性カリ, および pH stat により滴定して得た曲線を第 3 図に示した。 pK_a は約 8.0 である。

もし VS-II を一塩基酸と仮定すれば, その中和に要した苛性カリの量より分子量は 359 と計算される。この値は前述の元素分析値より計算した値とよく一致する。

(5) VS-II のポーラログラフィーとそれによる分子量の推定

VS-II 結晶 1,150 mg を pH 6.7 の緩衝液 5 ml に溶かしてポーラログラフをとり, さらに同じおよび他の緩衝液で 5 倍と 10 倍に希釈し測定した (第 4 図, 第 3 表参照)。測定温度 $25^{\circ} \pm 0.1^{\circ}$, 電極恒数 $k_c = m^{2/3} t^{1/6} =$

第 4 図 VS-II のポーラログラム

第3表 VS-II, V物質*, G物質**等の半波電位, 拡散電流恒数等

pH	濃度 r/ml	VS-II				V物質			G物質				
		$E_{1/2}$ V_{vs} NCE	i μA	k_D' $\mu A/(mg/ml)$	k_c	$E_{1/2}$	k_D'	分子量	$E_{1/2}$	k_D'	k_D $\mu A/(mM)$	k_c	分子量
1.66	46	-0.59	0.42	8.32		-0.67	8.45	328	-0.35	7.8	2.55		326
6.70	230	$\begin{cases} -0.90 \\ -0.98 \end{cases}$	$\begin{cases} 1.44 \\ 1.44 \end{cases}$	10.40		-1.02			$\begin{cases} -0.70 \\ -1.46 \end{cases}$				
6.70	46	$\begin{cases} -0.90 \\ -0.98 \end{cases}$	$\begin{cases} 0.38 \\ 0.19 \end{cases}$	11.30									
6.70	23	$\begin{cases} -0.98 \\ -0.98 \end{cases}$	$\begin{cases} 0.19 \\ 0.11 \end{cases}$	11.90									
11.75	46	$\begin{cases} -1.15 \\ -1.40 \\ -1.58 \end{cases}$	$\begin{cases} 0.02 \\ 0.39 \\ 0.14 \end{cases}$	10.9		-1.57			$\begin{cases} -0.97 \\ -1.6 \end{cases}$				

* V物質=6-methyl-7-hydroxy-ribolumazine. ** G物質=6,7-dimethyl-ribolumazine.

1.097, 1N カロメル電極を基準とした。考察の部で述べるが, VS-II は *Eremothecium ashbyii* や *Ashbya gossypii* の生産する新しいプテリンのV物質とG物質⁽⁸⁾に類似しているが, 比較のため, これらの半波電位 $E_{1/2}$, 拡散電流恒数 k_D なども第3表に示した。

一般に拡散電流恒数 k_D (電極恒数 $k_c=1$, 濃度 1mM のときの μA) は, 通常分子量の4乗根に反比例する。 k_D' ($k_c=1$, 濃度 1mg/ml のときの μA) がわかれば, 同種の物質の k_D から, 分子量 $=10^3 \times k_D/k_D'$ で分子量が推定される。第4図にみられるように, 本物質は pH 1.66 では1段の還元波を示し, その波高はV物質, G物質に近く, ほぼ同程度の分子量 $\frac{2.55}{8.32} \times 1000 = 306 \approx 300$ を持つと考えられる。pH 6.7, 11.75 では2~3段の還元波

を示し, 陰電位の波は特異な形を示す。半波電位 $E_{1/2}$ は G物質>VS-II>V物質の順で, プテリン類のうちでは還元され難い方である。

(6) VS-II の UV 吸収スペクトル

1mg/100ml 濃度の VS-II の 0.1N 苛性ソーダと, 0.1N 塩酸溶液における紫外外部吸収曲線を第5図に示す。典型的なイソキサントプテリン類化合物の吸収曲大位置, 曲線の形状等諸特徴を現わすもので, 比較のための 2-amino-4,7-dihydroxypteridine, すなわちイソキサントプテリン母核自身の吸収曲線を第6図に掲げる。Viscontini⁽⁹⁾ の報告より引用した。

(7) VS-II の IR 吸収スペクトル

KBr 法による赤外部吸収曲線を第7図に表わした。

第5図 VS-II の紫外外部吸収スペクトル

○—○ VS-II 0.1N NaOH 溶液, 1mg% 濃度。
□---□ VS-II 0.1N HCl 溶液, 1mg% 濃度。

第 6 図 イソキサントプテリン (2-amino-4,7-dihydroxypteridine) の紫外吸収スペクトル

○—○ イソキサントプテリン 0.1N NaOH 溶液.
 □—□ イソキサントプテリン 0.1N HCl 溶液.

第 7 図 VS-II, IR スペクトル

3400 cm^{-1} 付近に巨大な吸収帯を持つ点が、通常の合成プテリジン類と性質を異にするが、これについては考察で述べる。

考 察

前報^(1,2)までに筆者が扱った 249 株と、この研究の予報⁽¹⁰⁾で木原、室岡らが調べた 187 株の麹菌には、培養液に暗室で紫外線をあてると、次の 3 種類の蛍光を発する物質群を生成する性質がある。(a) 黄色蛍光の強い物質、(b) 紫青色蛍光の顕著な物質、(c) 黄緑色蛍光の強い物質。その中で、(a) はリボフラビン類で、前報⁽¹¹⁾でこれについて述べた。(b) はこの報告の VS で、(c) はおそ

らく数種類の物質より成ると思われ、古くは Klöcker⁽¹²⁾、Raistrick⁽¹³⁾ らの *Asp. glaucus* についてのこの研究、近時は Wolf⁽¹⁴⁾ の *Asp. repens* による研究等があるが、いずれも結晶に単離しその性質を調べるまでには至っていない。また前述の VS 精製過程の項で触れた副産物の黄緑色蛍光物質の結晶は、窒素を含む色素⁽¹⁵⁾でこの (c) に属するが、これについては後報する。最近見いだされ注目を浴びている aflatoxin⁽¹⁶⁾ も、もし極めて稀な場合として、その麹菌株がそれを生産するならば、この (c) に相当するものであろう。

以前に筆者らがペニシリン生産菌⁽¹⁷⁾および東大農学

部醱酵生理学教室保存の多数の *Penicillium* 属カビについて蛍光性物質の生産性を調べたところ、多数の株にリボフラビンや VS と同様な物質の生成が認められた。VS 類はリボフラビンと同じく、特定菌株に限定された生産物ではなく、麴カビ、青カビ全般に亘って広く分布した醱酵生産物である。

実験方法 (3) でふれたが T-17 菌は、floccose type の場合が VS をよく生成し、sporogenous の形態を示すときはほとんど生産しない。これに似た関係が上述の多数麴菌全般に亘るの形態と VS 生産性とにみられ、菌叢の直立菌糸が長く、気菌糸多く、孢子量粗少の株に、概して VS がよく生成される。これについては後報に詳述する。

実験方法 (2) の VS 精製妨害物質に関しては、葡萄糖とアンモニウム塩を加熱するとき黄褐色物質が生成されることと、その物質の本体について古くより研究されており、河本⁽¹⁸⁾は数個のアルコール性水酸基側鎖を持つイミダゾール類の生成を報告し、その他同様なピラジン類の生成も知られている。これらのプテリジン核に似た核を有する着色物質が副成するため、その性質がプテリンに類似していて精製除去が困難であるとも考えられる。

第 5 図の紫外外部吸収曲線では VS-II は 0.1N 苛性ソーダ溶液で 259, 281, 360m μ に、0.1N 塩酸溶液で 293, 347 m μ にそれぞれ吸収極大を有し、比較のためのイソキサントプテリンの吸収曲線 (第 6 図) は、0.1N 苛性ソーダ溶液で 252, 277, 337 m μ に、0.1N 塩酸溶液で 283, 339 m μ に同様な吸収極大を持っている。両物質の相当する吸収極大の間には、もちろん若干のシフトがみられるが、これらの吸収曲線の形状が極めてよく類似することは、前報までに述べた VS-II の蛍光特性、酸化還元剤に対する態度、溶媒に対する性質等とあわせて考えて、本物質がイソキサントプテリン類に属するという今までの考えが確実であることを示すものである。鯉の鱗⁽¹⁹⁾、蚕卵より⁽²⁰⁾単離された ichthyopterin (2-amino-4, 7-dihydroxy-6-[α , β -dihydroxypropyl]-pteridine) や、合成の 2-amino-4, 7-dihydroxy-6-methylpteridine^(21, 22) のような、天然産および合成の多数のイソキサントプテリン誘導体は、いずれも上述のような紫外外部吸収曲線を有する共通の性質がある。

しかしながら、VS-II には既報の多くのこれら誘導体にはみられない特異的性質がある。たとえば ichthyopterin は分子量 253.2, C 42.69%, H 4.38%, N 27.66%.

上記 6-methyl 体は、分子量 193.17, C 43.52%, H 3.65%, N 36.26% であり、VS-II はこれらに比し著しく N 分析値が低く、CH 値高く、分子量も大きい。さきに桑田、増田⁽⁸⁾の報告した 2, 4, 7-trihydroxy-6-methyl-8-ribityl-pteridine は、分子量 328, C 43.9%, H 4.91%, N 17.07% で、本物質は結晶水 1 モルを考慮すれば、比較的このものに近い。したがって VS-II は pteridine 核 1 個に ribitol 1 個の結合したこの物質のように、イソキサントプテリン核 1 個に対し糖 1 個 (分子量: 五炭糖 150, 六炭糖 180) 程度の側鎖のついた化合物を予想させる。

次に VS-II の融点は 193° で桑田らのものを除き、天然産のプテリンがいずれも 300° 以上の分解点で確定しないものと比較し、著しく低い。Albert⁽²¹⁾によれば、一般に -NH₂, -OH 等の水素結合性の置換基を持たぬ pteridine は融点が低いが、これらの置換基が入ると 350° でも融解しなくなる。VS-II が上述のごとく配糖体と仮定すれば、赤変分解を伴う極めて低い融点も理解しうることとなる。

第 7 図の赤外部吸収スペクトルでは、VS-II は (a) 3450 cm⁻¹, (b) 3270 cm⁻¹, (c) 2960 cm⁻¹, (d) 1700 cm⁻¹, (e) 1650~1670 cm⁻¹, (f) 1380 cm⁻¹, (g) 1035 cm⁻¹ 等の強い特異吸収がみられる。これらのうち (c) は、-CH₃ 等の alkane group に基づき、(d) は >C=O , (e) は酸アミド結合を表わし、両者により $\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{H} \\ \parallel \quad | \\ \text{C} - \text{N} - \end{array}$ を示すと考えられる。(f) は -CH₃ 等の alkane group により、(g) は -CH₂OH 等の第 1 級アルコール基による吸収と推定される。以上は、いずれもイソキサントプテリン核およびその側鎖に由来すると考えられるが、特に最も顕著なものは (a), (b) の吸収である。後者は第 1 級または第 2 級のアミンを示し、おそらく (2) 位のアミノ基側鎖を表わすと思われる。しかし前者は第 1, 2, 3 級アルコール基の吸収であり、しかも巨大なものであるから、おそらく糖類のそれに帰せらるべきであって、上述の諸知見と一致する。これらの問題は次報に詳細な実験結果を報告する。

自然界には葉酸の他、各種のプテリジン核を有する化合物が知られ、そのうち糖または糖アルコールを側鎖に持つものが 1, 2 報告されている。青緑藻 *Anacystis nidulans* 等の菌体には "Compound C" という 2-amino-4-hydroxy-6-(1', 2'-dihydroxypropyl) pteridine のグルコシドが存在する⁽²³⁾が融点 (250° 以下では融解せず),

元素分析値が VS-II と一致しない。E. ashbyii は 6-methyl-7-hydroxy-ribolumazine⁽⁸⁾ を生成し、VS-II と似ているが、融点 263° でかつ UV スペクトルで異なり、VS-II とは別であり、後藤らは *Mycobacterium* が Ms-プテリンというグルクロン酸と五炭糖のついたものを報じているが⁽²⁴⁾、分析値、UV 吸収等で明かに異なる。他に Strehler⁽²⁵⁾ が螢より “Luciferesceine” という微量のプテリン様結晶を単離し、リビチル基を有すると述べているが、融点が全く異なり、またその後詳細な報告をみない。

以上により、VS-II は新物質と判断し、Asperopterin A と名づける。VS-I の名については後報で述べる。

要 約

Aspergillus 属カビの生産物で螢光を発するものうち、広く *Aspergillus* および *Penicillium* 属に分布する紫青色螢光物質 VS の精製法を、主として VS-II について述べた。Pfeffer 氏液の炭素源と他の成分とを別々に殺菌することにより、後に精製の妨げとなる黄褐色物質の殺菌による生成を避け、また通気液内培養では VS が絶対に生産されないことを確かめたので、ジュラルミン製容器の多数に floccose type の麹菌を静置培養した。かかる菌叢内の VS の生成部位を知るべく螢光顕微鏡で精査したところ、菌糸表面層、隔壁部、頂囊部等によく分布している。

約 1,000 l の培養液より、炭末吸着、アルミナ、イオン交換樹脂、Filtrol 等のカラムクロマトグラフィーを経て、VS-II の結晶を得、その分析値、UV および IR 吸収曲線等より本物質がイソキサントプテリン類に属する化合物であることを確認し、既知物質との比較によりおそらく配糖体の新しいプテリンであろうと考察した。

終始ご指導いただいた東大坂口謹一郎名誉教授、有馬啓教授、名古屋大土井新次教授、有益なご助言を賜った慶応大学波磨教授研究室、東大および名古屋大農芸化学教室の皆様へ深甚な謝意を表します。またポーラログラフィーの測定でお世話になった武田薬品研究所朝日豊氏、アルカリ滴定をご援助下さった名古屋大理学部平田研岸義人氏、さらにジュラルミン容器を多数お貸し下さったわかもと製薬株式会社、純粋グラニュー糖を多量にご

恵与下さった大日本製糖横浜工場、台糖研究所に対し、いずれも厚くお礼申し上げます。なお本報告の要旨は、昭和 34 年 4 月、農芸化学会大会において講演した。

- (1) 金子安之、井上泰弘：ビタミン，**31**, 267 (1965).
- (2) 金子安之、坂口謹一郎、木原芳次郎：醸工，**27**, 156 (1949).
- (3) 金子安之：本誌，**31**, 118, 122 (1957).
- (4) 金子安之：ビタミン，**31**, 12 (1965).
- (5) 金子安之、鈴木 渉、内田一生：同上，**31**, 19 (1965).
- (6) 坂口謹一郎、山田浩一：本誌，**20**, 65, 141 (1944).
- (7) 東大農化教室編：実験農芸化学，下巻，p. 587 (昭 27).
- (8) 桑田 智：ビタミン，**15**, 65 (1958).
- (9) M. Viscontini, E. Hadorn: *Helv. chim. Acta*, **38**, 397 (1955).
- (10) 木原芳次郎、室岡治義、坂口謹一郎：本誌，**26**, 297 (1948).
- (11) 金子安之、坂口謹一郎、木原芳次郎：醸工，**26**, 367 (1964).
- (12) Klöcker: *Centralblatt f. Bact.*, **II 46**, 225 (1916); *Compt. Rend. Carlsberg*, **11**, 312 (1917).
- (13) Gould, Raistrick: *Biochem. J.*, **28**, 1640 (1934).
- (14) F. J. Wolf: *Physiologia Plantarum*, **10**, 825 (1957).
- (15) 金子安之、梅本春一：農芸化学会中部支部第 29 回例会講演 (1961).
- (16) 高木高明、栗飯原景昭：食品衛生誌，**6**, 1 (1965); R. Schoental et al.: *Nature*, **205**, 57 (1965).
- (17) 玉利勤治郎、有馬 啓、金子安之、和田 弘：ペニシリン，**2**, A, 14 (1949).
- (18) 藤井 聰、河本正彦：本誌，**39**, 114 (1965).
- (19) R. Hüttel et al.: *Ann. Chem.*, **554**, 69 (1943); *Chem. Ber.*, **93**, 2439 (1960).
- (20) 平田義正、名和三郎：名古屋産研報告，**4**, 80 (1951).
- (21) A. Albert: *Quarterly Reviews*, **6**, 197 (1952).
- (22) Elion, Hitchings, Russell: *J. A. C. S.*, **72**, 78 (1950).
- (23) H. S. Forrest et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **78**, 95 (1958); *Plant Physiol.*, **36**, 240 (1961).
- (24) 後藤幹保：日本化学会第 17 年会 (1964).
- (25) Strehler: *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 397 (1951).