漢方薬オウギ末よりカイコ変態阻止物質としての L-canavanine の単離とその生物活性

磯貝 彰, 村越重雄*, 鈴木昭憲, 田村三郎
(東京大学農学部農芸化学科, *神奈川県蚕業センター)

昭和 48 年 2 月 8 日 受理

Isolation from "Astragali Radix" of L-Canavanine as an Inhibitory Substance to Metamorphosis of Silkworm, *Bombyx mori* L.

By Akira ISOGAI, Shigeo MURAKOSHI,* Akinori SUZUKI and Saburo TAMURA
Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo,
Bunkyo-ku, Tokyo; *Kanagawa Prefectural Institute of
Sericultural Science, Ebina-shi, Kanagawa-ken

During the course of screening search for biologically active substances to insects among drug plants, "Astragali Radix" was found to inhibit metamorphosis of silkworm, *Bombyx mori* L. Then the active principle was isolated from the plant material and identified as L-canavanine. When fifth instar larvae were fed on an artificial diet containing L-canavanine at a concentration of 5ppm, their metamorphosis was inhibited in the stage of cocoon spinning, pupation or adult emergence. (Received February 8, 1973)

薬用植物に含まれる昆虫生理活性物質を検索する過程で⁽¹⁾, 著者らは漢方薬オウギ末が, きわめて興味ある活性を示すことを見出した。すなわち, オウギ末を人工飼料に混ぜて 4 令カイコ幼虫に経口投与した場合, 幼虫はその成育にはなんらの影響を受けることなく 5 令幼虫となるにもかかわらず, その上簇に際して, 吐糸, 化蛹, 化蛾等の一連の変態過程が阻止される。そこで著者らは, その活性の本体を追求して構造解析を行なったところ, それが L-canavanine と同定されたので, ここに報告する。なお, いわゆる不結繭蚕を誘起する物質として, その化学構造が明らかなものは, これまでに 1 例も知られていない。

方法および結果

1. 試 料

漢方薬オウギ末 (Astragali Radix) は, *Astragalus mongholicus* あるいは同属の植物の根を乾燥, 粉末化したもので, 利尿剤, 強壯剤, 止汗剤などとして用いられている。本実験に用いた試料は, 藤沢薬品工業株式会社

より供与されたものである。

2. 生物検定法

前報⁽¹⁾に準じ, 原末または単離過程における分画物を人工飼料に混合して, 4 令起蚕あるいは 5 令起蚕のカイコ幼虫 (*Bombyx mori* L.) に経口的に連続投与し, 上簇の状態を観察した。なお分画物は水に溶かして, 飼料に添加した。

3. 活性成分の単離

予備試験により, 活性成分は水溶性で, 強酸性イオン交換樹脂 (Dowex 50×8 H⁺) および強塩基性イオン交換樹脂 (Dowex 2×8 OH⁻) に吸着され, それぞれ 1N アンモニヤ, 0.1N 酢酸で脱着されるので, アミノ酸あるいはペプチド類と推定された。ついで, 第 1 図の過程で単離をすすめ, 各段階で生物活性を確認した。すなわち, 50g のオウギ末に 2l の水を加え, 室温に 2 日間放置し, とときとき振とう, ついで濾過した。固形物に対して, さらに 1 回この操作をくりかえしたのち, 濾液を合わせて Dowex 50×8 H⁺ (20~50 mesh, 32mm i.d. ×300mm) のカラムに吸着させた。カラムを 2l の蒸留

第 1 図 オウギ末よりのカイコ変態阻止物質
L-canavanine の単離方法

水で洗浄し、ついで 2l の 1N アンモニヤで溶出した。溶出液を減圧下で約 100ml に濃縮し、さらに Dowex 2×8 OH⁻ (200~400 mesh, 18mm i. d. × 200mm) のカラムを通して、活性部分を吸着させた。カラムを 500ml の蒸留水で洗浄したのち、0.1N 酢酸 600ml で処理した。溶出液を減圧下で濃縮、乾固し、さらに Dowex 50×8 H⁺ (200~400 mesh, 22mm i. d. × 530mm) を用いたイオン交換クロマトグラフィーにかけ、つぎのような濃度の塩酸で溶出した：1N (1.5l), 1.5N (2.0l), 2N (2.0l), 3N (1.0l)。2N 塩酸で溶出される区分に活性が認められたので、この溶出液を Sephadex G-15 (13mm i. d. × 900mm) とピリジン-酢酸緩衝液 (0.1M, pH 6.0) を用いて分画したところ、アミノ酸に相当する区分に活性があらわれた。この活性区分を Dowex 50×8 (200~400 mesh, 13mm i. d. × 370mm) のイオン交換クロマトグラフィー (ピリジン-酢酸緩衝液；0.2M, pH 4.1 および 1.0M, pH 5.0)⁽²⁾ にかけ、1.0M, pH 5.0 の溶媒で

溶出されてくる活性分画を減圧濃縮したのち、Dowex 50×8 H⁺ (200~400 mesh, 10mm i. d. × 50mm) のカラムに吸着させた。カラムを 1N アンモニヤで溶出し、溶出液を減圧濃縮、活性炭で脱色し、エタノールを加えて結晶を得た。水-エタノールより再結晶して、90mg のプリズム状の活性物質結晶を得た。

4. 活性成分の同定

活性成分は分子量 176 (滴定法)。分子式 C₈H₁₂N₄O₈。Anal. Found. C, 34.02; H, 6.92; N, 31.39; O, 27.49. Calcd. C, 34.08; H, 6.86; N, 31.80; O, 27.25%. mp 181~183°C (分解)。呈色反応はニンヒドリン、イサチン、日にさらしたニトロプルシッドナトリウム⁽³⁾ に陽性、坂口反応に陰性であった。[α]_D²⁵ + 6.0° (c=6, H₂O)。NMR δ_{DSS}⁰ (conc. HCl を 1 滴添加後測定)：2.35 (2H, q, J=6.0Hz), 4.16 (2H, t, J=6.0Hz), 4.20 (1H, t, J=6.0Hz)。ペーパークロマトグラフィーにおける R_f 値；ブタノール-酢酸-水 (4:1:1), 0.11；フェノール-水 (4:1), 0.57。以上のデータより、活性成分は L-canavanine^(3,4) (I) と推定され、市販の L-canavanine sulfate より得た L-canavanine (mp 184°C, 分解) と IR を比較したところ、まったく一致した。標品の L-canavanine sulfate をカイコ幼虫に投与した場合にも、オウギ末より単離された化合物を与えた場合と同じ生物活性を示した。

5. 原末中の L-canavanine の定量

オウギ末 2.0g を 40ml ずつの 60% メタノールで 4 回、室温で攪拌、抽出した。遠心分離により上澄液を集め、減圧下で濃縮乾固して、Beckmann Amino Acid Analyser Model 120 C により定量したところ、L-canavanine の含量は約 0.22% であった。

なお、オウギ末よりの L-canavanine の単離法について検討を加えた結果、第 1 図に示した各種クロマトグラフィーのうち、Dowex 50×8 H⁺ イオン交換クロマトグラフィー (塩酸による溶出) と Sephadex G-15 による分画は省略が可能で、Dowex 2×8 OH⁻ カラムよりの溶出液を濃縮して、ただちに Dowex 50×8 (ピリジン-酢酸緩衝液, 1.0M, pH 5.0) のカラムクロマトグラフィーにかけることによって純品が得られることがわかった。

第 1 表 オウギ末のカイコ幼虫に対する影響*

	平均生体重 (g)					4 令および 5 令期間 (日)	上繭 蚕数	化蛹 数
	0 日	1 日	3 日	6 日**	9 日			
対 照 区	0.136	0.302	0.607	1.143	2.930	12	10	10
試 験 区	1.130	0.285	0.625	1.063	3.080	13	0	0

* 試験区は対照区と同一の人工飼料にオウギ末 1% を混入した飼料を用い、両区とも 4 令起蚕幼虫 10 頭に連続投与した。

** 対照区、試験区とも幼虫はすべて 5 令となった。

6. オウギ末および L-canavanine の生物活性

1) オウギ末のカイコ変態阻止作用：1.0% のオウギ末を人工飼料に混合して、1 区 10 頭ずつの 4 令起蚕カイコ幼虫に経口投与した結果を第 1 表に示す。オウギ末 1.0% を混合しても、4 令および 5 令の幼虫の成育および、4 令より 5 令への脱皮に対する影響はほとんど認められず、わずかに上簇が 1 日遅れた。対照区は上簇後 2 日間で吐糸を完全に終了し、その吐糸量（繭層重）は 1 頭あたり 258 mg ですべて化蛹したが、オウギ末 1.0% 区ではわずかに吐糸をしたのみで、すべて化蛹せずに幼虫のまま斃死した。

次に、5 令起蚕のカイコ幼虫、1 区 6 頭（♂、♀ 各 3）にオウギ末の濃度を変えて経口投与した。第 2 表に示すとおり、オウギ末の濃度が 0.2%、0.5% になると、5 令日数が約 1 日延長するとともに、正常な繭を作るものの数、すなわち上繭蚕数は減少した。0.1% でも半数が化

蛹せず斃死し、0.5% では幼虫はすべて化蛹せず幼虫のまま、わずかに吐糸して斃死した。しかしながら幼虫期においては、むしろ生体重がやや増加し、成育異常は見られなかった。すなわち、オウギ末の連続投与による影響は、5 令の最終時期である吐糸、営繭、化蛹という、いわば変態に関係している過程で集約的に現われることが観察された。

2) L-Canavanine の変態阻止作用：第 2 図および第 3 表には 5 令起蚕カイコ幼虫、1 区 10 頭（♂、♀ 各 5）の成育および変態に及ぼす L-canavanine の影響が示

第 2 図 L-Canavanine の変態阻止作用

5 令起蚕のカイコ幼虫 10 頭ずつ（♂、♀ 各 5）を L-canavanine を含む人工飼料で飼育した。L-canavanine の濃度は、上段より、0 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 40 ppm である。

第 2 表 オウギ末の濃度と変態阻止作用

濃度 (%)	平均生体重 (g)				5 令 期間 (時間)	上繭 蚕数	化蛹 数
	0 日	2 日	4 日	7 日			
0	0.75	1.97	3.24	3.23	168	6	6
0.05	0.74	2.04	3.35	3.86	173	5	6
0.10	0.75	2.00	3.28	3.48	170	3	3
0.20	0.70	1.86	3.12	3.91	186	0	1
0.50	0.74	2.06	3.38	4.05	199	0	0

5 令起蚕のカイコ幼虫 6 頭ずつ（♂、♀ 各 3）にそれぞれの濃度のオウギ末を混入した人工飼料を連続投与した。

第 3 表 L-canavanine の変態阻止作用

濃度 (ppm)	平均生体重 (g)				5 令 期間 (時間)	上繭 蚕数	中繭 蚕数	下繭 蚕数	不結 繭蚕 数	化蛹 数	化蛾 数
	0 日	2 日	4 日	7 日							
0	0.66	1.52	2.62	3.24	189	10	0	0	0	10	9
5	0.65	1.63	2.77	3.36	192	7	0	3	0	7	5
10	0.63	1.55	2.62	3.43	193	4	0	5	1	3	2
20	0.61	1.51	2.61	3.53	188	3	2	3	2	4	1
40	0.60	1.50	2.57	3.38	193	0	3	2	5	2	0
80	0.60	1.48	2.55	3.35	196	0	1	1	8	0	0
200	0.66	1.57	2.54	3.41	222	0	0	1	9	0	0

5 令起蚕のカイコ幼虫 10 頭ずつ（♂、♀ 各 5）に L-canavanine を含む人工飼料を連続投与した。

第 3 図 L-Canavanine の投与により生じた変態異常

右：対照，正常に化蛾した。中：正常蛹に見えたが，その後一部化蛾したのみで斃死した。左：繭は作ったが，一部幼虫の形態をとどめ，正常蛹になれずに斃死した。

されている。幼虫期においては，200ppm でも 5 令期間が 1 日延長した以外，成育に対する影響はほとんど見られなかった。ところが，上簇後の状況については，5ppm の L-canavanine を経口投与しても，3 頭がごく薄い繭すなわち下繭となり，その他完全に吐糸したのち蛹の状態で斃死した 2 頭とあわせて，50% が化蛾できずに斃死した。10ppm では 70% が化蛹せずに斃死し，化蛾したのはわずかに 20% であった。40ppm 以上では 100% 変態は阻止され，すべて化蛾することなく斃死した。第 3 図には，変態異常の典型的な例を示してある。

一方，L-canavanine 200ppm を含む人工飼料を同様に，2, 3, 4 令起蚕幼虫に経口投与した場合，幼虫の成育にはまったく影響が見られず，いずれの幼虫も次令に達し，L-canavanine は幼虫脱皮にはまったく影響を与えないことが判明した。

オウギ末中の L-canavanine 含量と，それらの活性の強さを考えると，オウギ末の示したカイコ変態阻止作用は，L-canavanine そのものに起因すると考えることができる。なお著者らは，このような生理活性物質をカイコ変態阻止物質と仮称したが，L-canavanine は化学的に同定されたカイコ変態阻止物質として最初のものである。

考 察

L-Canavanine の植物界における分布は詳しく調べられており^(5,6)，オウギ末と同属の植物の種子にもその存在が知られているが，オウギ末そのものの存在が確

認されたのは，本実験が最初である。L-canavanine が，ある種の微生物あるいは植物などにおいて，L-arginine の拮抗物質として作用することが知られているが⁽⁷⁻⁹⁾，この化合物が昆虫に対しても特異な生理活性を示すことは注目に値しよう。

一方，養蚕の分野では，幼虫が正常な成育をとげて熟蚕となったのち，まったく吐糸しないか，あるいはわずかに吐糸しても薄皮で，幼虫のまま斃死するものを不吐糸蚕，不結繭蚕，「ゴロツキ」などと総称している。これらの成因としては，病原菌に由来するものを除いて，遺伝的，環境的，飼料的，化学的なものが知られている^(10,11)。しかしながら，それらはいずれも定性的な追求に止まっており，単一化学物質に由来するものは，これまで知られていない。とくに，物質の施用濃度との関連で定量的にこの現象をとらえたものは，今回が初めてである。

L-Arginine の人工飼料中の濃度は 3380~5220ppm⁽¹²⁾ であって，L-canavanine が 5ppm 程度で変態に影響を与えることは，不結繭蚕の生起が，両物質の単なる拮抗関係にもとづくものとは考えがたい。L-canavanine によるカイコの変態阻止機構については，今後の検討を待たなければならない。

要 約

薬用植物に含まれる昆虫生理活性物質を検討する過程で，漢方薬オウギ末がカイコの変態を阻止することを知り，活性の本体を追求したところ，活性成分として L-canavanine が単離された。オウギ末中の L-canavanine 含量は約 0.22% であり，この化合物を 5ppm 人工飼料に加えて 5 令起蚕カイコ幼虫に経口投与すると，その 50% が化蛾できずに斃死する。このようなカイコ変態阻止物質が化学的に明らかにされたのは，これが初めてである。

オウギ末を供与くださった藤沢薬品工業株式会社，L-canavanine picrate を分与くださった明治大学農学部稲富秀夫博士に謝意を表します。また，pKa を測定していただいた理化学研究所竹内節男博士，アミノ酸分析をしていただいた専売公社中央研究所野間正名氏，元素分析をしていただいた東京大学応用微生物研究所瀬戸治男博士に感謝いたします。さらに，本実験を遂行するにあたり，終始ご鞭撻くださいました神奈川県蚕業センタ

—森井謙介科長ならびに実験のお手伝いをしてくださった富田一郎氏, 田所トミエ嬢に深く感謝いたします。

- (1) 磯貝 彰, 張 清苓, 村越重雄, 鈴木昭憲, 田村三郎: 農化, **47**, 443 (1973).
- (2) J. Lieberman, K. Kopoldová and M. Doviášová: *Nature*, **191**, 1197 (1961).
- (3) J. P. Greenstein and M. Winitz: "Chemistry of the Amino Acid," Vol. III, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1961, p. 2622.
- (4) "Handbook of Biochemistry," 2nd Ed., ed. by H. A. Sober, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970, p. B-19.
- (5) B. L. Turner and J. B. Harborne: *Phytochemistry*, **6**, 863 (1967).

- (6) P. M. Dunnill and L. Fowden: *ibid.*, **6**, 1659 (1967).
- (7) K. S. Pilcher, K. F. Soike, V. H. Smith, F. Trosper and B. Folton: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **88**, 79 (1955) [*C. A.*, **49**, 6460 f (1955)].
- (8) C. F. Stachtele and P. Rogers: *J. Mol. Biol.*, **14**, 474 (1965).
- (9) "Handbook of Biochemistry," 2nd Ed., ed. by H. A. Sober, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, 1970, p. B-51.
- (10) 福田宗一: 科学, **26**, 118 (1956).
- (11) 川口忠男: 農林省依頼研究員報告, 山梨県農務部, (1971).
- (12) 古沢英美: 私信.