ベニナギナタダケに含まれる植物生育阻害物質,
azetidine-2-carboxylic acid の単離・同定とその分布

池田道正, 長沼庸司, 太田恵一, 佐々武史, 三浦勇吉
(山形大学農学部農芸化学科)

昭和 52 年 4 月 22 日 受 理

Isolation and Identification of a Plant-Growth Inhibitor, Azetidine-
2-carboxylic Acid, from *Clavaria miyabeana* S.Ito
and Its Occurrence in the Family *Clavariaceae*

Michimasa IKEDA, Yohzi NAGANUMA, Keiichi OHTA,
Takeshi SASSA and Yukichi MIURA
Department of Agricultural Chemistry, Yamagata University,
Tsuruoka, Yamagata, Japan

Methanol extracts of the fruit body of *Clavaria miyabeana* S.Ito markedly inhibited the growth of the seedlings of turnip, Japanese name: Harumaki-shin-santohsai. The active principle was isolated and was proved to be identical with L-azetidine-2-carboxylic acid by comparison with a synthetic sample of DL-azetidine-2-carboxylic acid.

It inhibited the growth of the turnip at a lower concentration (5 ppm) and germination of the turnip at a higher concentration (25 ppm).

The distribution of this acid in fungi belonging to the family *Clavariaceae* was examined by the combined methods of thin layer chromatography and bioassay, and the results demonstrated that the acid is detected in nine of eleven species. In addition, characteristic patterns of ninhydrin-positive spots on thin layer chromatogram suggested that it is possible to classify the family *Clavariaceae* into two sub-groups.

To the best of our knowledge, this is the first case that the presence of the acid in lower-plant such as fungi has been revealed.

(Received April 22, 1977)

緒 言

微生物が生産する物質で、他の生物に重要な作用を有する物質は近年数多く見だされている。キノコ類については主として毒、味、香り、あるいは医薬の利用など、人間との直接的関係からとらえた研究が多いが、高等植物の生育と関連した面からのものは少ない。

われわれはキノコに含まれる植物生長調節物質の探索を進めているが、これまでのところ、いくつかのキノコには植物の生育を阻害する物質が含まれていることを確認している。特にホウキタケ科 (*Clavariaceae*) ベニナギナタダケ (*Clavaria miyabeana* S.Ito) ではこの活性が強かったので、このキノコから阻害作用を示す活性物

質の単離をおこなった。

その結果、活性の本体はazetidine-2-carboxylic acid (以下 A-2-C と略) であることを確認した。A-2-C はこれまで高等植物にのみその存在が知られており、しかもユリ科植物には特異的に分布しているが⁽¹⁾、他の植物には 2, 3 の例^(2,3)以外に存在の報告はまだなされていない物質である。

ベニナギナタダケからの本物質の単離・同定とその生理活性について研究し、さらに一般に食用されているホウキタケを含め、ホウキタケ科キノコ 11 種類を用いて本物質の分布について検討し興味ある結果を得た。

実験方法および材料

1. 植物活性試験 ペトリ皿 (直径 9 cm) 中の汚紙に一定量の試料を溶かしたメタノール溶液をしみこませ, メタノールが充分気散したのち蒸溜水 4 ml を加えた. あらかじめ 25°C で 24 時間蒸溜水にしたし, 発芽させておいた白菜 (春蒔新山東菜 *Brassica pekinensis*) の種子 20 粒を汚紙上にならべ, ふたをしを散乱光下 25°C で 4 日間培養した. 試験液は蒸発していくので培養 3 日目に蒸溜水 1 ml を加えた. 阻害活性の評価は主根の長さを測定しコントロール (検液: 蒸溜水のみ) の平均値に対する百分率を求め, 50% 以下で有効活性とした.

2. 機器分析 a) 赤外線吸収スペクトル: 日本分光 IR-S 型, IR-G 型のものを使用し KBr 錠剤法で測定した.

b) 核磁気共鳴スペクトル: 日立製作所, R-24 型 (60 Mc) を使用し D_2O 溶液 (規準物質は使用しなかった) で測定した.

c) 質量分析スペクトル: 日本電子, JMS-01SG 型を使用した.

d) 旋光度: 日本分光, ORD/UV (J-15) 型を使用し水溶液で測定した.

3. 薄層クロマトグラフィー (以下 TLC と略) Merck 社, Kieselgel GF₂₅₄ を使用し, 厚さ 0.25 mm に調整し 120°C, 2 時間活性化したものを使用した.

4. 試料キノコ ベニナギナタダケならびにその他のホウキタケ科キノコ 10 種はすべて 1972 年 9 月および 1975 年 9 月に山形県庄内地方, 特に出羽三山周辺で採集した. 学名の決定は子実体の色, 形および胞子の形から, 主として川村の著書⁽⁴⁾に従っておこなった.

実験結果

1. ベニナギナタダケより A-2-C の単離と同定

ベニナギナタダケ, 300 g を新鮮なままメタノール 3 l に 24 時間浸漬し汚過してメタノール層を分離し, メタノールを減圧下に濃縮乾固した. 以後の操作は Fig. 1 に示した. 各操作ごとの活性区分の確認は活性試験でおこなった.

得られた活性物質は $[\alpha]_D^{20} -115^\circ$ ($c=0.3, H_2O$) の比旋光度を有し, 融点を示さず 190°C で徐々に褐色に変化し分解する. 活性物質の分子式 $C_4H_7NO_2$ は元素分析 (Found: C, 47.26; H, 6.99; N, 13.65. Calcd. for

$C_4H_7NO_2$: C, 47.52; H, 6.98; N, 13.86%) と MS [m/e 101 (M^+)] によって決定した. また活性物質はニンヒドリンおよび Feigl⁽⁵⁾ の呈色反応に陽性であることと, IR スペクトル (Fig. 2) は 3400~2000, 1633, 1595 cm^{-1} に特徴的な吸収がみられることからイミノカルボン酸であると推定した. カルボキシル基の存在は MS スペクトルにおいて m/e 56 (M^+-45 , base peak), ならび

Fig. 1. Isolation Procedure for Active Principle I (A-2-C) of *Clavaria miyabeana* S. Ito.

Fig. 2. IR Spectrum of Active Principle I (KBr).

Fig. 3. PMR Spectrum of Active Principle I (D_2O solution).

に m/e 45 が観測されることから支持された。活性物質の PMR スペクトル (Fig. 3) では δ 2.2~2.9 (2H, m) および δ 3.7~4.2 (2H, m) の他に δ 4.8 に部分的に D_2O と重なってはいいるが明らかに ABX タイプの X 部分と考えられる 1H 分のプロトンが 2 組の二重線として観測された。

以上のことから、活性物質は L-(+)-A-2-C と推定し、山田らの方法⁽⁶⁾で合成した DL-A-2-C と TLC 上 (展開溶剤, C_2H_5OH : 28% NH_4OH , 2:1, v/v; R_f 0.56), ならびに PMR スペクトルで完全に一致したことで確認した。

2. L-(+)-A-2-C の生育抑制活性

白菜の幼根に対する A-2-C の最低有効濃度は 5ppm

Fig. 4. Thin Layer Chromatogram of Ninhydrin-Positive Components in Methanol Soluble Fractions from Fungi Belonging to the Family Clavariaceae and Authentic A-2-C.

S: authentic A-2-C

1: *Clavaria fusiformis* Sow (naginata-dake)

2: *Clavaria miyabeana* S. Ito (beninaginata-dake)

3: *Clavaria inaequalis* Muller (kiso-hmen-take)

4: *Clavaria mucida* Pers (sirauotake)

5: *Clavaria vermiculata* Micheli (shirosohmentake)

6: *Clavaria purpurea* Fr. (murasakinaginata-dake)

7: *Clavaria botrytes* Pers (houkitake)

8: *Clavaria formosa* Pers (hanahoukitake)

9: *Clavaria flava* Schaeff (kihokutake)

10: *Clavaria pyxidata* Pers (kotozihoukitake)

11: *Romaria apiculata* Donk (chahoukitake-modoki)

+ mark indicates that ninhydrin-positive compound at R_f 0.56 on the TLC plate markedly inhibited root elongation of Chinese cabbage seedlings and the activity was more than 50%, compared with that of the control. $\pm$ indicates that the activity was less than 50% (plate: Kieselgel GF₂₅₄, Merck, 0.25 mm thickness. solvent: C_2H_5OH : 28% NH_4OH , 2:1).

であった。10 ppm 以上の濃度では幼根の生長は完全に抑制され 25 ppm では発芽種子そのものが溶解してしまうような形で生命力を失った。緑豆 (*Phaseolus mungo*) を用いた同様の試験では、最低有効濃度は 10 ppm, 完全抑制濃度 25 ppm, 種子溶解濃度は 50 ppm であった。

3. ホウキタケ科キノコにおける A-2-C の分布

Fig. 4 に示したホウキタケ科キノコ 11 種について、おのおの 1~5 g を新鮮なままメタノールで抽出し、得られたメタノール可溶性粗抽出物をさらに熱メタノールで抽出した。この操作を 2 回くり返してメタノール可溶性区分を得た。この区分をおのおの新鮮重に対応する割合でメタノールを加え (メタノール 0.2 ml/キノコ 1 g), 試験液とし、TLC 上に一定量 (20 μ l) をスポットしたのち C_2H_5OH -28% NH_4OH (2:1, v/v) で展開した。試験液中の A-2-C の確認は次のように行った。1. 展開後ニンヒドリン試薬を噴霧し、対照として同時に展開した A-2-C との R_f 値および色調との比較, 2. 試験液 50 μ l を TLC で同様に展開し、同時に展開した A-2-C に相当する区分をかきとり、メタノールで抽出したものについて活性試験をおこない、活性の有無を確かめた。各キノコのクロマトグラムおよび活性試験の結果は Fig. 4 に示した。

結果の考察

A-2-C は proline より炭素数が 1 個少ない 4 員環イミノカルボン酸であるが、このものの高等植物界における分布はきわめて限られており、現在までにその含有が確認されている植物は Fowden⁽⁷⁾ によって最初に見いだされたユリ科植物 (*Liliaceae*) を中心に、その近縁のものを含めた 90 種類のうち約 4 分の 1 のものの他には、*Delonix regia*⁽²⁾, *Peltophorum pterocarpin*⁽²⁾ および甜菜⁽³⁾に限られている。キノコのごとく下等な植物から A-2-C が見いだされたのはベニナギナタダケが最初の例である。

A-2-C は白菜や緑豆に対しかなり強い生長阻害作用を示した。A-2-C はこのものを含有しない植物には強い生長阻害活性を示すが、含有する植物には影響を与えない⁽⁶⁾。この現象は proline 賦活酵素の三次元構造における差異がたん白合成の際におこる proline の特異的選択性に影響を与える結果であると考えられている⁽⁹⁾。一方、キノコと高等植物との関係からみると、ベニナギナタダケの生活が単に枯死した植物体を利用するだけの、

いわば消極的なものでなく積極的に周囲の高等植物を死に至らしめながら, おこなわれているという一面を知ることができる。

ホウキタケ科に属するキノコは現在 17 種知られているが, このうち 11 種について A-2-C の分布を調査した。その結果, 9 種のキノコには明らかに A-2-C が含まれていることが TLC および活性試験から確認された。今回, A-2-C が存在するという評価ができなかった 2 種のキノコはいずれも採集量が少なく, くり返して実験できなかったが, TLC 上のニンヒドリン試薬陽性物質のパターンからみると再検討の余地があると思われる。高等植物における A-2-C の分布はこれまでのところ, ユリ科植物では近縁のものを含めてもその 4 分の 1, その他の科の植物では広範な調査にもかかわらず, むしろ含まれているのが特殊であると言える程度に限られている。それに反して, ホウキタケ科キノコでは少なくとも 80% のものに含まれており, A-2-C はホウキタケ科キノコに普遍的に含まれている成分であり, これまでの形態的特徴にもとづいた分類が化学成分のうえからも支持されたと言える。また, ホウキタケ科キノコは外観の形態からみると 2 つのタイプにわけてみることができるが, そのことと TLC 上のパターン全体のようにとよく一致することも観察された。すなわち, 1 つはナギナタダケに象徴される形で, ナギナタ状の子実体が地上より 1~10 本束生するタイプで, TLC 上では Fig. 4 の試料キノコ番号 1~6 まではみられるパターンであり, 他の 1 つはホウキタケにその典型がみられるように, 子実体の下部が 1 本の幹状を呈しており, 上部はホウキ状に細かく枝分れしているタイプで, TLC 上では Fig. 4 の試料キノコ番号 7~11 にみられるパターンである。このことは, ホウキタケ科キノコを 2 つのグループに分けられることの可能性を示唆している。この意味で, 今関ら⁽¹⁰⁾が 1~6 に *Clavaria* の名称を, 7~11 に *Romaria* の名称を与えていることは化学成分的にもその特徴をとらえたものとなっており, 支持される。

ホウキタケ科キノコには, よく食用にされるホウキタケを含むが, 有毒といわれているキホウキタケやハナホウキタケと見誤った中毒事故の発生がままたり, ホウキタケに限らずキノコによる中毒を防止するうえからも化

学的分類が, たとえば TLC を用いるような簡単な方法で確立されることも重要であると考えられる。

要 約

ベニナギナタダケ子実体のメタノール可溶区分には強い植物生長阻害作用があり, この活性の本体が azetidine-2-carboxylic acid であることを物理的・化学的方法, ならびに合成で確認した。本物質がキノコのような下等な植物から得られたのはこれがはじめてである。

ベニナギナタダケが属するホウキタケ科キノコ 11 種について, その分布を TLC と植物活性試験をもとに調査したところ 11 種中 9 種のものにその存在が確認され, ホウキタケ科キノコに広く一般的に存在していることが判明した。また TLC 上のパターンから, ホウキタケ科キノコがさらに 2 つのグループに化学成分的に分けられる可能性を指摘し, そのことが形態的特徴ともよく一致することを明らかにした。

元素分析およびマスマスペクトルを測定して頂きました三共株式会社中央研究所の皆様には謝意を表します。また, 旋光度の測定をして頂きました名古屋大学農学部服部宏之氏に感謝致します。

本研究の一部は, 第 67 回日本農芸化学会東北支部例会で発表した。

- (1) L. Fowden and F. C. Steward: *Ann. Bot. N. S.*, **21**, 53 (1957).
- (2) M. L. Sung and L. Fowden: *Phytochemistry*, **8**, 2095 (1969).
- (3) L. Fowden: *Phytochemistry*, **11**, 2271 (1972).
- (4) 川村清一: “原色日本菌類図鑑”, **6**, 風間書房, 東京, 1953, p. 615.
- (5) F. Feigl: “Spot Tests in Organic Analysis,” Elsevier Publishing Co., New York, 1960, p. 273.
- (6) Y. Yamada, T. Emori, S. Kinoshita and H. Okada: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 649 (1973).
- (7) L. Fowden: *Nature*, **176**, 347 (1955).
- (8) L. Fowden: *Biochem. J.*, **71**, 643 (1959).
- (9) P. J. Peterson and L. Fowden: *Nature*, **200**, 148 (1963).
- (10) 今関六也, 本郷次雄, 椿 啓介: “標準原色図鑑全集 14 菌類”, 保育社, 東京, 1970, p. 31.