ダイズシストセンチュウの孵化促進物質，グリシノエクレピン A の単離研究をふりかえって

高 杉 光 雄*・福 沢 晃 夫*・正 宗 直*

Our Journey to Glycinoeclepin A, a Natural Hatching Stimulus for the Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines*).

Mitsuo TAKASUGI*, Akio FUKUZAWA* and Tadashi MASAMUNE*

Some cyst-forming nematodes, such as potato cyst nematode (*Globodera rostochiensis*) and soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*), are known as serious pests in agriculture. The eggs in these cysts remain dormant until hatching is stimulated by root exudates from host plants. Since the first discovery by Baunacke (1922) of this phenomenon for the potato cyst nematode, the isolation of the stimulus has been the object of considerable research. However, its extremely low concentration and relative instability have prevented its isolation.

In this article, we describe how we have isolated the first hatching stimulus, glycinoeclepin A, from the dried roots of kidney bean (*Phaseolus vulgaris*), one of the host plants of the nematode. This substance is active at the concentration of $10^{-11} \sim 10^{-12}$ g/ml *in vitro* against the soybean cyst nematode.

1. はじめに

ダイズシストセンチュウの孵化促進物質グリシノエクレピン A, 世界中でその全合成が競われているこの超微量生理活性物質は、どのような過程を経て単離されたのであろうか。研究の詳細な内容は、昨年の日化欧文誌に述べられているので¹⁾、ここでは一つの報告の裏にどれだけの問題、失敗があったのか、上記論文の実験部にも書かなかったことを含めて述べてみたい。今後、このような興味ある問題に挑戦される方々の参考となれば幸いである。

本研究は人と人との出会いで始まった。北海道大学理学部の正宗、勝井は当時北海道農業試験場(北農試)におられた富山博士(後、名大教授)と Wisconsin 大学留学中に親交を温め、帰国後もジャガイモのファイトアレキシンの研究を協同で行う間柄となった。1967 年のある日、北農試の堤、桜井両氏がダイズシストセンチュウについて興味深い発見をしたと聞かされた。センチュウ(線虫)と言ってもぴんとこないかもしれないが、人に寄生する

回虫もその仲間であり、土壌中には多種多様な線虫が生息している²⁾。そのうち、ある種のは作物に寄生して被害を与えることから害虫扱いされている。最近、わが国に侵入したジャガイモシストセンチュウは第一級の害虫である。ダイズシストセンチュウは大豆萎黄病を引き起こすダイズの重大害虫として知られ、ダイズ、インゲン、アズキなど少数の作物に寄生する。

ダイズシストセンチュウの生活環について簡単に述べておこう。本線虫の卵内 2 令幼虫はシスト(包囊)と呼ばれるカラにびっしり(200 から 300 ヶ位)詰まっており、そのような状態のまま土壌中で数年～10 数年生存可能と言われる。しかし、春になって環境が整い、近くに寄主植物が植えられると孵化し、シストを脱出して根に辿りつき寄生する。そこでまた親となりシストを残して死ぬ。年に数回そのサイクルを繰り返す³⁾。

堤、桜井両氏はこれら寄主植物の栽培土壌滲出液にシストを浸すと、やがて幼虫が遊出してくること、しかし単なる土壌や非寄主であるコムギの栽培土壌滲出液では殆んど遊出しないことを見出した。各作物の根の磨砕液についても同様の結果が得られた⁴⁾。この事実は寄主植物に限って何か孵化遊出を促進する物質が含まれていると仮定すると理解ができる。この仮定上の物質は寄主・寄生者間をつなぐ化学因子という意味で興味があるだけでなく、防除が極めて難しいシストセンチュウを、

* 北海道大学理学部化学科 ()

* Department of Chemistry, Faculty of Science, Hokkaido University ()

寄主植物の存在しない状態で孵化促進物質によって孵化させ、餓死に至らせるという生態的防除の立場からも重要である。

本研究は、1967 年秋、北農試虫害第二研究室の協力を得て、小林(当時 DC 1 年、現在北海道大学農学部助教授)を中心としてスタートした。インゲン根の水抽出液をクロロホルムで連続抽出すると、活性はクロロホルム層に移行した。問題の孵化促進物質は普通の有機化合物であるらしい、もしかしたら単離できるかもしれない! そんな甘い気持ちで研究に突入した。そして研究室のメインテーマの一つとして今日まで続くこととなった⁵⁾。

2. 粗抽出物を得るまで

生物実験であればポットに植えた 1 本の植物を用いても結果が得られる。しかし、物質として確実に捕らえようとすると、スペクトル分析の導入により大巾に必要量が削減された今日とはいえ、相当量を必要とする。我々は孵化促進物質の原料として、最も高い活性を示す滲出液が得られるインゲンを選んだ。しかしながら大量の滲出液を集めることは、設備の面から無理である。そこで、生根および乾燥根について活性を検討し、取り扱いが容易なインゲン乾燥根を原料に選んだ。後にインゲンの水耕液を採取して孵化促進活性を測定したところ、根の抽出物に比べ約 1,000 倍の活性を認めたが、根抽出物の場合と異なり容易に失活した。根と滲出液では異なる孵化促進物質が含まれると考えられる。安定な活性を示す乾燥根を原料に選んだのは、結果的に正しい選択であった。

バイオアッセイによって孵化促進物質の存在は判っても、どれだけの原料を用意すればよいのか我々には予想できなかった。初年度 40 kg の生根でスタートした研究は抽出規模をどんどんエスカレートさせ、17 年にわたって延べ 20 ha 相当のインゲンを処理することとなった。作業は膨大な肉体労働を要求した。これは規模がプラスチックからドラム缶となったためである。研究の初期においては研究室員総出の上に他研究室のボランティアを加え、炎天下の畑で一本一本ハサミをつかつての根切りにはじまり、夏休み中は根の乾燥と粉碎、天気を気にしながらの作業だった。乾燥根の水抽出は、発酵を避けるため厳寒下で行い、雪の融けるまで毎年続けられた。およそ、1 ha のインゲン→1 t の生根→100 kg の乾燥根→1.5 kl の水抽出液→100 l の濃縮液→100 g のクロロホルム抽出物(分離のための活性粗原料)となる。水抽出から最終抽出物を得るまで約半年、インゲン栽培からだとも 1 年を要する。

その後、絞り出し機と大型のフラッシュエバポレータ、および連続抽出装置が導入されて、やや近代化されたが、基本的には初期のものと変わらない。このようにして研究室の経済的許す範囲で毎年クロロホルム抽出物を蓄積していった。本研究で最大の労力と費用を費やした操作の一つは、この粗抽出物を得ることであった。このような一研究室(一講座)の枠を越える“事業”を可能とした一因として、我々の研究室が古いながらも工場と称した建物と装置を持ち、さらに戦前からトリカブトの大量処理を手掛け対外折衝にも特殊才能を発揮した上野技官(のち助手、1981 年退官)を擁していたことが挙げられる。トラックで運ばれてくる大量の原料を手際よく処理するには、年間計画と各作業での段取りが欠かせない。大量処理では予想もしないことがよく起こったが、上野技官の適切な指示のもと、長期にわたる抽出作業が続けられた。

3. バイオアッセイ

成分研究と未知の生理活性物質を追う研究とでは大きく違う点がある。成分研究では、まず主成分が注目され、大抵は TLC 上スポットとして検出される。スポットにならない微量成分は、主成分を分離し尽くした後で対象となる。バイオアッセイを手掛かりとして目的物質を捜す研究では、存在量についての情報はあらかじめ得られない。もちろんどんなタイプの化合物かも全く不明である。問題の孵化促進物質の分離を進めるためには、信頼のおける活性試験が不可欠である。我々は、生物研究者でなければバイオアッセイはとうてい無理と思い込んでいたが、途中から必要に迫られ自分たちの手で行うこととなった。

北農試での最初の方法は、シストから遊出する幼虫数を数え孵化活性としていた。この方法は数々の問題点を含んでいる。シスト毎に蔵卵数が違い、生育度にも差があるので信頼度の高いアッセイを期待するためには使用するシスト数を多くする必要がある。それでもバラツキは避けられない。その上、結果を得るのに 1 か月を要する。生物学者にとって待つことは普通のことで、化学者にとっては耐えられない。考慮のうえ、シストから卵を取り出して使う“ばらし卵法”を採用することにした。この方法では 100 個のシストを使えば約 2 万個の卵が得られ、生育度が平均化されることになる。さらに我々は後で述べるようにシストの前処理を検討し、バイオアッセイの迅速化と信頼性を高めることが出来た。北農試法を化学者向きに改良した我々の試験法を表 1 に示す。なお、バイオアッセイに使うシストは、線虫の被害が大き

表1 孵化活性試験法

線虫被害のでた大豆栽培跡地土壌(〜200 g)
 ↓ 32 および 48 メッシュの篩にかける
 ↓ 顕微鏡下でシストを拾う
 200〜250 個のシスト
 ↓ 10 日間 25°C の水に浸漬する
 ↓ 水中でシストの殻をこわす
 ↓ 325 メッシュの篩を通して殻を除く
 ↓ 汚紙上に集めた卵と幼虫をよく水洗する
 ↓ 水をふきつけて卵と幼虫を集める
 卵と幼虫の懸濁液
 ↓ 1 ml 中に 150〜200 ケの卵を含むように水でうすめる
 ↓ シラキウス時計皿に卵と幼虫の懸濁液 1 ml, 水 8 ml, 試験液 1 ml を加える
 ↓ 10 日間, 25°C に放置
 時計皿の幼虫と卵の数をかぞえる

く、シストの密度が高い畑の土壌から採取した。土壌を冷蔵庫に保存すると、このシストは数年間は使用可能であった。線虫を年間を通じて飼育する必要のない点で大いに助かった。

孵化のはやさは冷蔵庫に保存しておいたシストをすぐ使用した場合と、10 日間 25°C の水につけて前処理して使用した場合とでは後者の方が明らかに良い結果が得られた。そこで 10 日間予浸したシストから取り出した“ばらし卵”を使用することにより、バイオアッセイに要する日数を 1 か月から 10 日まで短縮することができた。シストの前処理は眠っている卵の中の 2 令幼虫を目覚めさせ孵化促進物質に感じやすくさせるらしい。また、自然に遊出する幼虫は、予浸中に先にシストから出てしまうので信頼性も増加した。“ばらし卵法”では、孵化活性は判ってもシストからの遊出活性は不明である。しかしシストを用いた場合、十分活性の強い試料液中では、孵化した幼虫は殆んどすべてシスト外へ脱出していた。一方、水中ではたとえ孵化してもシスト中にとどまる率が高かった。シストの代わりに卵を用いるバイオアッセイは簡便で再現性の良い試験法として以後用いられた。

生物を使う以上、感受性の変動は避けられない。どうしても冬になると孵化率が低下し S/N 比の低下を招き、春になると孵化率は再び上昇した。線虫は冷蔵庫の中でも季節変化を知るらしい。バイオアッセイの結果を客観的に評価するためには、基準物質が望まれる。しかし化学物質で明確な孵化促進活性を示すものは得られていない。北農試ではインゲン栽培土壌からの滲出液を冷蔵庫に保存し標準孵化液としていたが、保存安定性に不安が残った。我々は安定な活性を示すクロロホルム抽出物を 10^{-5} , 10^{-6} , および 10^{-7} g/ml の 3 段階濃度で、また何も入れない脱イオン水をコントロールとして毎回用いた。

4. 孵化促進物質の分離、精製、単離

単離に至らぬまま何度もクロロホルム抽出物からの再出発を繰り返し、1981 年にはじめて 50 μ g の単離に成功した(表 2)。それ迄の、およびそれ以後の単離過程について詳細に述べたい。

4.1. 1967 年〜1970 年(小林) 1.2 ha の畑から得たクロロホルム抽出物 163 g の低級脂肪酸部を留去し、残部のエーテル可溶の部分をヘキサンで処理してヘキサン不溶部を得、これより酸性部 12 g (10^{-6} g/ml で活性)を得た。これをケイ酸-セライトカラムでさらに 80 のフラクションに分け、TLC の結果からこれらを 15 にまとめてバイオアッセイにかけた。活性フラクションについてポリアミドを用いる TLC 分離を 2 度繰返し、 10^{-8} g/ml で活性を示す分画 10 mg を得た。

翌年、2.2 ha のインゲンを栽培し、1 ha 分のケイ酸-セライトクロマト活性部 3.5 g を 60 枚のポリアミド TLC プレートで一氣に分離したところ、量は 130 mg に減少したにもかかわらず、活性は上昇しなかった。TLC 分離操作中に分解したのか、あるいは不可逆吸着が起こったのかは不明である。使用したポリアミドの製造工程が前回のものと異なるとのことだが、それが原因かどうかは不明である。残っていた 1.2 ha 分を同様に処理して 2.5 g のケイ酸-セライトクロマトカラム活性部を得、ポリアミド TLC 分取以外の方法を種々検討したが、活性は多数の分画に分散し、少し活性が上昇しても保存中に低下してしまった。バイオアッセイを北農試へ全面的に依存していたので自主規制が働き、必要なバイオアッセイを省き分離を先行させたきらいがあった。しかし、これらの実験から、孵化促進物質は少なくとも 10^{-8} g/ml 以下の濃度で活性で、根には極少量しか含まれていないことが明らかとなった。

表2 グリシノエクレピン A *p*-BPE の単離過程

インゲン乾燥粉碎根	113 kg (1 ha)
↓ 水抽出 (1.5 kl) (<10°C)	
↓ 減圧濃縮 (<30°C)	
濃縮液	
↓ pH 2~3 とし, クロロホルムで連続抽出	
クロロホルム抽出物 A	102 g (10^{-5} g/ml)
↓ 酢酸エチル-炭酸水素ナトリウム水	
酸性抽出物 B	57 g (10^{-5} ~ 10^{-6} g/ml)
↓ 活性炭-セライトカラム (水-アセトン)	
80% アセトン溶出物 C	21.5 g (10^{-6} g/ml)
↓ Sephadex LH-20 カラム (メタノール)	
活性分画 D	10.1 g (10^{-6} ~ 10^{-7} g/ml)
↓ DEAP-Sephadex LH-20 カラム (72% エタノール/酢酸/アンモニア水)	
活性分画 E	2.16 g (10^{-7} g/ml)
↓ Sephadex LH-20 カラム (ジクロロメタン/メタノール, 95:5)	
活性分画 F	135 mg (10^{-8} g/ml)
↓ <i>p</i> -プロモフェナシルエステル化 (ジイソプロピルエチルアミン, アセトニトリル中 20°C)	
分画 <i>p</i> -BPE G	316 mg (10^{-8} g/ml, 加水分解後)
↓ Hitachi Gel #3019 (メタノール/ジクロロメタン, 7:3)	
分画 <i>p</i> -BPE H	112 mg (10^{-8} ~ 10^{-9} g/ml, 加水分解後)
↓ Bondapak C ₁₈ /Porasil B (メタノール/水, 8:2)	
分画 <i>p</i> -BPE I	29 mg (10^{-9} g/ml, 加水分解後)
↓ μ -Bondapak NH ₂ (ヘキサン/ジクロロメタン/アセトニトリル, 70:18:12)	
分画 <i>p</i> -BPE J	2.2 mg (10^{-10} g/ml, 加水分解後)
↓ μ -Bondapak NH ₂ (ヘキサン/ジクロロメタン/アセトニトリル, 80:12:8)	
分画 <i>p</i> -BPE K	1.2 mg (10^{-10} g/ml, 加水分解後)
↓ μ -Bondapak NH ₂ (ヘキサン/ジクロロメタン/アセトニトリル, 60:36:4)	
グリシノエクレピン A <i>p</i> -BPE	~50 μ g (10^{-11} ~ 10^{-12} g/ml, 加水分解後)

分離には、一発勝負は禁物だ。物を失うと振り出しに戻ることになる。予備実験は不可欠である。予備実験を繰り返し、問題点をつかんでいたはずなのに、本番で失敗することがある。失敗の原因が判れば対策も立つ。しかし原因が判らないまま進むことは全部の原料を失うことに通じる。冬山で道に迷いさまよって体力を使い果たして遭難するようなものだ。初めからうまく行かなければ、別の分離を行ったのに！活性の喪失は見掛は変わらぬだけに残念だった。

4.2. 1970~1974年(高杉) Wisconsin, Virginia 大学での留学を終え、高杉が単離研究に加わることとなった。まず研究の感覚をつかむために、少量のインゲン根を使って分離法を種々検討した。生物試験の検体数が急増し北農試へのバイオアッセイ全面依存は不可能となったので、高杉が北農試へ通ってバイオアッセイ法を習得し、前述のように方法も化学者向きに改良した。以後活性試験は北大で行えるようになった。バイオアッセイを任意に実施でき、また孵化の様子を直接観察出来るので、孵化促進物質を研究している実感が持てた。

分離を進めるに当たり次の基本方針を立てた。1) 細かく分画してから全分画をバイオアッセイに掛け、活性の上昇したフラクションをさらに分離する。2) 予備実験を

先行させ、あらかじめ問題点を明らかにしておく。3) 異なった原理に基づく分離法を組み合わせる。様々なふるいを用意して、混合物を順次ふるいにかけて目的物を濃縮していく！話としてはもっともだが現実には厳しく研究の歩みは遅々たるものであった。合成では目的物を作る。単離研究では目的物は既に手元にある。ただ、複雑な混合物の中に埋もれている。同じ難しさでも性格が異なる。“たとえ性質のよく似た化合物の混合物であっても、どこか違えば単離できるはずだ”と信じて孵化促進物質の分離を続けた。

活性炭カラムクロマトはジベレリンの単離に有効に使われていた。そこで1 ha 分のインゲン(品種-本金時)のクロロホルム抽出物 A から酸性部 B を取り出し、活性炭カラムにのせ、水-アセトンの系でアセトン含量を 10% ずつ増して溶出した。活性は主として 80% アセトン溶出部 C に出現し、活性は 1 桁上昇 (10^{-7} g/ml) した。この分離は溶出に時間がかかること、水を留去しなければならぬ等の難点があるが、逆相タイプという特色を持ち、条件を一定にすれば再現性が得られるので以後荒分け法として利用されることとなった。

次いで分画 C をシリカゲルカラムクロマトで分画した。酸性物質の分離はテーリングが起るためかなり難

しい。そこで5種類の溶媒系を用いてシリカゲル TLC 分取を行ってからバイオアッセイにかけ、硫酸第二セリウムによる呈色も参考にしてクロマトに最も分離が良いと思われる溶媒系を選んだ。フラクションコレクターを利用して161フラクションに分画し、それぞれを10倍稀釈の三段階の濃度でバイオアッセイにかけた。フラクション43~47(分画D)では活性が1桁上昇(10^{-8} ~ 10^{-9} g/ml)した。ここで、不活性フラクションを含めてそれぞれをメチルエステルやTMS誘導体に変え、ガスクロマト分析を行った。多数のピークが現れたが、活性物質由来のピークと判定されるものではなく、目的を達せず断念した。しかし、クロマトグラムから非常に複雑な混合物を扱っていることを改めて認識した。

孵化促進活性の検出は非常に特異的であった。無数の混合物のなかにも検知できたし、また、非常に高感度であった。ガスクロやHPLCでは存在量とシグナル強度が比例するのが普通だが、バイオアッセイでは必ずしも比例しない。フレの程度も大きいし、結果はオンタイムで得られない。生物の研究者にとってじっと待つのは(1年でも)普通であろうが化学屋にとっては焦りたい。10日間じっと待ち切れず、途中の様子を覗いておおよその傾向をみることもあった。このようなことは、バイオアッセイを自分で行って初めて可能となった。

丁度その頃、名古屋大学の平田研究室にVarian社のHPLCが設置されたので、見学にでかけた。早速、Varian社に依頼しHPLCを借りることとなった。HPLCは以後の分離過程で決定的な役割を果たすことになる。今日では想像できないことであるが当時国産で使い物になる装置は開発されておらず、使い方も米国のメーカーに資料を請求し、手探りで会得する状況であった。しかも使用可能なカラムは分析用のシリカゲルカラムが1本あるだけであった。

分画DはHPLCで分取するにはまだ量が多すぎたので、1%の酢酸を含むエーテルを用いてシリカゲル TLC 分取を行ったところ、活性が1桁上昇した分画E(10^{-9} ~ 10^{-10} g/ml)を得た。分画Eは殆んどUV吸収を持たない。この一部を統実験化学講座に記載されている古典的方法で*p*-プロモフェナシルエステル(*p*-BPE)へ変換した。*p*-BPEは結晶性の良いカルボン酸の誘導体であり、X線結晶解析に適した結晶となることが多い。UV吸収を持つ誘導体としたことにより、TLCやHPLCで検出が容易となると同時に、テーリングが減り分離しやすくなった。

分画*p*-BPEsの量は分析用HPLCカラムで分取するにはまだ多すぎたので、一部を分配系の溶媒(ベンゼン-酢

酸-水 3:3:1の上層)を用いてシリカゲル TLC 分取を行った。分離能は素晴らしく、UV下で吸収帯が幾本もはっきりと認められた。UV吸収を目安として分取し、加水分解後強い活性を示す分画*p*-BPE Fを得た。この分画をHPLC分取(マイクロパックSi-10;エーテル-ヘキサン3:2)し、加水分解後、 10^{-10} ~ 10^{-11} g/mlで活性を示す分画*p*-BPE Gを得た(1973年1月)。

少量で好結果を得たので、残っていた活性分画D全量の分離に着手した。10枚のシリカゲル TLC 板を使って分取し活性分画E'(10^{-9} g/ml)を得たが、活性は期待した程には上昇しなかった。前回は1枚で分けたのに対し今回は10枚のTLC板を使ったため、展開が一樣でなく分画が不適当だったこと、さらに操作に手間取り一部分分解した可能性がある。現在であれば分取用HPLCカラムを用いるところであるが、当時は分析用HPLCカラムが1本あるのみであった。

TLC分取が不十分だったので、分画E'を改めてHPLCで繰返し分取し、活性分画E''(10^{-9} ~ 10^{-10} g/ml)を得た。あらかじめ、少量を予備的にHPLC分取し、バイオアッセイによって分取すべき範囲を決めておいたが、カラムの状態が変化したのかクロマトグラムは10日前とはすっかり異なり、期待通りに分取できなかった。分画E''を前回と同様、*p*-BPEへ導き、TLC分取しようとして驚いた。展開の様子がまったく違う!前回の分離は冬行ったものであり、今回は夏だったため温度差による溶媒組成の違いと考え、展開時の温度をいろいろ変えてみたが、前回の分離は再現されなかった。やむなく、HPLC分取に切りかえ分画*p*-BPE F''を得た。しかし量は1/10に減少し、活性はむしろ低下してしまった(10^{-9} g/ml)。*p*-BPE化と、その後の生成物の分離に問題がありそうである。小分けしておいたサンプルの活性は1か月で2桁も低下した。

これまで用いた原料は、インゲンの一品種本金時の乾燥根から得られたものである。我々はこれとは別に、孵化活性はやや劣るが種子の入手が容易な紅金時の大量栽培を行っていた。本金時とは品種が異なるので、大学院に進学した姉帯が紅金時を対象として高杉の分離を追うこととなった。

4.3. 1972年~1977年(姉帯) 1972年から姉帯(当時MC1年、現在、北海道立衛生研究所)が単離研究に加わった。方針として、出来るだけ多くの成分を単離し構造を明らかにすることとした。これにより構造決定の経験を積むことが可能だし、活性物質と構造的に関連性のある物質が得られるかも知れない。また、孵化促進物質の持つ化学的性質を調べて、その性質を分離に積極的

に利用することも計画した。

インゲン(紅金時 1 ha 分)から得た“クロロホルム抽出物 A”を高杉の方法で処理し、再現性よく活性分画 D を得た。前述のシリカゲル TLC 分取の際のトラブルを避けるため、その先 TLC と同じ溶媒系を用いてシリカゲルカラムクロマトによって分離し、活性分画 E を得た。しかし、量的には 1/3 になったにもかかわらず、期待に反して活性は上昇しなかった。前回の分離では、この分画 E を *p*-BPEs へ誘導したが、バイオアッセイの点からは遊離酸のまま分離を続けるほうが有利である。そこで、プロスタグランジン類の分離で有効とされていたシリル化したケイソウ土を充填剤とする逆相分配クロマトを試みることにした。文献で推薦されている 4 種類の溶媒系について、マーカーとして 2 種のヒドロキシカルボン酸を用い、まず粗抽出物の活性がどこに出るかを調べた。ついで、活性分画 E をメタノール-水-酢酸-クロロホルム-イソオクチルアルコールの溶媒系で注意深く分離した。温度コントロールに神経を使い、分離に 1 週間を要したものの上昇した活性を持つ分画 F ($10^{-8} \sim 10^{-9}$ g/ml) を得ることが出来た。活性部は大量の不活性部の後から溶出された。

孵化促進活性が臭素処理あるいは接触還元により著しく低下することは、孵化促進物質に不飽和結合が存在することを示唆する。そこで、プロスタグランジン類の分離に利用されているイオン交換樹脂アンバーリスト-15 の銀塩型を用いて、銀イオンと錯体形成能の差を利用することを計画した。このカラムでオレイン酸とリノール酸が分離されること、またリノール酸とトリエン酸はシクロヘキセンを含むエタノールでないと溶出されないこと、さらに孵化促進物質はエタノールのみで溶出することもあらかじめ確認した。このクロマト分離の際、スルホン酸基が残っているとエチルエステル化が起こるので、完全に銀塩に変える必要がある。また、少しでも銀イオンが溶出するとバイオアッセイが不可能となるので、カラムは長時間(1 か月)にわたって十分洗浄する必要があった。

このようにして得た活性分画 G を、さらにアンバーリスト XN-1005 の銀塩型カラムにより分離し、活性分画 H ($10^{-9} \sim 10^{-10}$ g/ml) を得た。

この後、*p*-BPEs に誘導して分離を進めるためには、エステル化および生成物分離の収率が問題となった。エステル化をク라운エーテル触媒を用いる方法に改めるとともに、過剰の試薬の除去のための TLC 分取をシリカゲルカラムクロマトに変更した。このようにして加水分解後同様の活性を示す分画 *p*-BPE I を得た。しかし、

エステル化の収率はたかだか 30 % だった。

合成において作戦があるように、分離においても作戦がある。分離は論理的に進めたい。しかし頭で考え、文献を調べることも大切だが、分離の場合、まず何かを試み、結果を十分吟味してから次の分離方法をさがす方がよい。分離が完全に思い通り進むことは希だ。失敗をいかに生かすかで勝敗は分かれる。新しい分離法の情報にいつも注意しておくことは重要である。新しいタイプの HPLC カラムは確実に分離を前進させた。分離条件を検討し、カラムの特徴を適確に把握する必要がある。なぜそのような分離が起こったのかと理由を考えることも大切だ。

前回の *p*-BPEs の分離ではシリカゲル HPLC カラムを用いて分取を行ったが、含水率が変化するためか再現性のある結果が得られなかった。そこで、我々が最初に手にした化学結合型カラムであるマイクロバック CN-10 を使ったところ、多くのピークに分離した。5 ヶの分画に大別し、加水分解後、 10^{-10} g/ml で活性を示す分画 *p*-BPE J を得た。このカラムはシリカゲルカラムに比べると、素直で、テーリングも少ない。使用した溶媒はヘキサン-エーテルである。興味あることは乾燥が不十分なエーテルを使った時に限り一段と優れた分離能が得られたため、以後十分水を含ませたエーテルを使用した。

分画 *p*-BPE J を、次に入手した化学結合型カラムであるマイクロバック NH₂-10 で分離した。CN カラムに比べると NH₂ カラムは分離条件にデリケートである。溶媒として HPLC でよく使われるヘキサンとアセトニトリルを混ぜても完全には混合しない。そこでコンソルベントとしてジクロロメタンを選び、溶媒比をいろいろと変えて最適分離条件を探した。分離は順調に進み、約 10 個のピークが現れ、そのうち最も大きいピークが加水分解後活性を示した。分取してブロードながらも単一ピークを示す分画 *p*-BPE K が得られた！

分取前のクロマトグラムから、分画 *p*-BPE K は未だ混合物であることは明らかであったが、かなりの純度を有すると期待されたので、ある会社に依頼して新しいタイプのカラムで分析してもらった。使用したのは日立ゲル # 3011 である。このカラムは驚異的な分離を示し、いくつものピークが出現した。クロマトグラムを前にして、なぜこんなによく分かれたのか、その理由を考えた。このゲルはポリスチレンとジビニルベンゼンとの共重合体で、フェナシル部分のベンゼン環と充填剤のベンゼン環部分で何等かの相互作用が期待される。保持時間が一番長いピークに活性が現れたことは、活性物質の

p-BPE はゲルとの相互作用が特に強いことを示している。もしも活性物質が二塩基酸とすると、その *p*-BPE は一塩基酸の *p*-BPE より保持時間が長くなっても不思議はない。ここで、我々は二塩基酸を扱っているのだと閃めいた。早速種々の一塩基酸と二塩基酸の *p*-BPEs を合成し、このカラムで分析した。確かに二塩基酸の *p*-BPEs の方が保持時間が長くなっている！ここで孵化促進物質は二塩基酸と確信した。活性物質の *p*-BPE は、日立ゲル #3011 カラム(メタノール-ジクロロメタン 9:1)でアゼライン酸 bis-*p*-BPE と同じ保持時間の所に現れた。

分画 *p*-BPE K を上記カラムで HPLC 分取し、カラムから溶出する不純物を除くためもう一度 NH₂ カラムにかけ、分画 *p*-BPE L をおよそ 5 μg 得た。活性は 10⁻¹¹~10⁻¹² g/ml であり、NH₂ カラムで単一ピークを示した(1976年5月)。

高杉が4年前インゲン本金時の根から得た最終 *p*-BPEs を上記方法でさらに分離し、*p*-BPE L と比較したところ保持時間が一致した。異なる原料(本金時)から、途中で異なる分離操作をおこなったにもかかわらず、HPLC で同一保持時間を示したことは、孵化促進物質が単離された可能性を期待させた。しかし分画 *p*-BPE L が単一なのか、まだ何個かの成分の混合物なのか当時のスペクトル測定装置では判断できなかった。

初めのうちは問題とならないが、精製が進んでくると量も減り相対的に不純物が問題となる。不純物の問題を避けて通る訳には行かない。溶媒やカラムの充填剤等から混入する不純物をいつも考えておく必要がある。極微量成分の単離間際では目的物と同量以上の不純物が容易に混入する。入れないことが先決が入ってしまった不純物は積極的に除去する操作が必要だ。それできなければ良いスペクトルは得られない。

微量の物質の分子量を決定する最良の方法は MS スペクトルの測定である。水酸基を持つ既知の飽和および不飽和脂肪酸の *p*-BPEs について、EI-MS、CI-MS、FD-MS を測定したところ、FD-MS においてのみ、明確に M+1 ピークが観測された。そこで活性分画 *p*-BPE L の FD-MS を測定してもらったところ、多くのピークの中に、bis-*p*-BPE 由来の三重線と期待する(Br が2個入ると同位体のため強度比が1:2:1の三重線となる)ピーク?が見出された。

その時まで、我々は多くの直鎖の一塩基酸或いは二塩基酸をインゲン根から単離し、構造を明らかにしていた¹⁾。例えば、前記の逆相クロマトを行った際、3-ヒドロキシドデカン二酸を得ていた。FD-MS スペクトルの

三重線?が同様な直鎖二塩基酸(C₁₁H₁₈O₅) bis-*p*-BPE によるものと考え、合成的に研究を進めるか、あるいはもう一度クロロホルム抽出物から出発して分画 *p*-BPE L をより多く入手して確実に単離を進めるか、意見が分かれた。結局1年間掛かって可能性のある不飽和オキシ二塩基酸をいくつか合成したが、クロマトにおける挙動は全く活性物質のそれと一致せず、活性も全く見られなかった。しかし合成した化合物は、その後マーカーとして役立つこととなった。

姉帯は孵化促進物質の化学的性質、およびそのクロマト上の挙動をマーカー物質と比較して調べ、これまでの分離結果と合わせて博士論文としてまとめた。そしてカナダ留学へと旅立ち単離研究は中断された。

4.4. 1978年~1981年(姉帯) 姉帯が帰国して研究が再開された。前回はおよそ 5 μg の単一物?を得ていた。同一の方法では原料を10倍処理しても 50 μg しか得られない。これまでの方法の問題点を検討し、分離法を見直すことがどうしても必要となった。1年間の研究の空白は新しい視点に立った見直しを可能とした。

クロロホルム連続抽出物を得るまでの行程に問題はない。次の活性炭カラムは、一回の分離操作に10日以上を要する上、大量の水を留去しなければならないため、省こうと努力したが逆に活性炭カラムの良さを再認識することとなった。活性炭カラムで分離しない段階でセファデックス LH-20 カラムを用いても、活性は最も量の多い分画と重なり有効でなく、また吸着樹脂、アンバーライト XAD-2 のカラムクロマト利用も利点は無かった。次のシリカゲルカラムクロマトの段階は、テーリングを防ぐため溶液に酢酸を加えても、いつまでも少量ずつ溶出し、フラクションの数が多くなった上、分解の可能性も示唆された。そこでシリカゲルは使わない決心をした。どんな充填剤が適当であろうか。

当時我々はファイトアレキシンの研究でセファデックス LH-20 にはシリカゲルに見られぬ長所があることを認めていた。一方、姉帯は留学中にこのゲルが天然物分離の初期段階で効果的に使用できることを体験していた。セファデックス LH-20 は、架橋デキストランゲルの表面の水酸基に2-ヒドロキシプロピル基を結合させたもので、非水系溶媒の使用が可能である。普通ゲルろ過クロマトでは分子サイズの大きなものから先に溶出し、吸着や分配を主原理とするこれまでの分離とは、全くモードを異にする。しかしゲルろ過クロマトは純粋に分子サイズのみで分かれるのではなく、二次効果(吸着)が加わることがある。分子サイズ決定の目的には好ましくないが、分離目的には逆に利用することができる。例

えば, メタノールで溶出すると分子サイズによる分離が主となるが, 芳香族化合物はかなり遅れて溶出される傾向がある。

活性炭カラムで得た活性部 C を 1 kg のセファデックス LH-20 を充填した大形カラムにのせメタノールで溶出し, バイオアッセイの後, 活性部を一つに合わせ, 活性分画 D (10^{-6} – 10^{-7} g/ml) を得た。この分離で芳香族化合物を主成分とする不活性部が大量に除かれた。シリカゲルクロマトと分離様式が異なるため, ゲルろ過クロマトでは狭い範囲に集中して溶出するため, フラクションをなるべく少量ずつとる必要がある。また, 溶出速度はシリカゲルクロマトに比べ, 1/10 以下に遅くする必要がある。サンプル溶液の粘度が余り高くならないよう配慮すると, 相当量のサンプルを一度に分離できる。このゲルは高価ではあるが, 繰返し使用が可能な点は長所である。

これまでも, いろいろな方からイオン交換クロマトの使用を勧められてきたが, 緩衝液を使うと後処理が厄介だし, これまでの予備分離でよい結果を与えていなかったので敬遠していた。しかし, 前述のように活性物質は二塩基酸と確信したので, その特徴を生かして一塩基酸と分離することを計画した。一塩基酸と二塩基酸が荒分け出来れば分離効率が格段と向上する。文献を調べると, 脂質の分野でセファデックス LH-20 をジエチルアミノヒドロキシプロピル化した弱陰イオン交換体, DEAP-セファデックス LH-20 が中性物質, 一塩基性, 二塩基性, 多塩基性酸のグループ分離にうまく応用されている。そこでクロロホルム連続抽出物 A および活性炭 80 % アセトン溶出部 C を, 試験的にこのカラムで分離してみた。その結果, 分離は単にカルボキシル基の数だけで決まるわけではなく, 例えばサリチル酸は“多塩基酸部”に溶出されたが, 活性は“二塩基酸部”に集中して現れた。そこでカラムを 10 日間かけて調製し, 活性分画 D を分離した。“中性部”と“一塩基酸部”には殆んど活性はなく, 72 % エタノール-酢酸-アンモニア水で溶出された“二塩基酸部”(pH 6 で溶出)と“多塩基酸部”(pH 9 で溶出)を合わせた分画 E, に活性が集中した。回収率も素晴らしい! 大量分離にも支障ない。この段階は, 全体の分離を通じて一つの山場となった。

次に分画 E を再度セファデックス LH-20 のカラムで分離した。ただし, 今度はメタノールの割合を減らし, ジクロロメタン-メタノールの比を 95:5 とした。アルコールの割合を少なくすることで, 吸着モードが強調される。分離の結果, 最も活性が高い分画 F が得られた。溶出曲線はブロードだが, バイオアッセイで 3 つの活性

の山が現れたことは, この系の優れた分離能を示している。シリカゲルクロマトに代わり得るしかも再現性も良い分離法が見付かった!

ここまでは遊離酸の状態で分離を進めてきた。前回, 効果的な分離結果を与えた“シリル化したケイソウ土”を用いる遊離酸の本格的な逆相分配クロマトは, 操作と準備に問題があり大量分離には向いていない。また, 溶出液に混在する高沸点のイソオクチルアルコールの除去が大変である。モデル化合物の *p*-BPEs を, C_{18} HPLC カラムを用いて分離を検討したところ, 二重結合の有無とその違いで分離できることが判明したので, 今回は遊離酸段階での逆相分配クロマトを省略し次の *p*-BPE 化に進むこととした。

これまで, 活性分画の *p*-BPE 化は混合物を使っただけの反応だったため, 活性低下の原因がはっきりしなかった。どうも反応が完結していない様子だ。そこで各種二塩基酸を用いてモデル実験を行ったところ, クラウンエーテルを触媒として使用しても反応が十分進行しないことが明らかとなった。このことは活性物質のエステル化がモノエステル段階で止まっている可能性を示唆している。その場合, モノエステルは酸性部へ回収されるが活性は失われるので, 見掛上反応が完結しているようにみえる。収率が 100 % か 20 % かで 1 ha 分か 5 ha 分の原料の違いに相当することとなる! 抽出, 分離の手間を考えると, 誘導体にする場合, 徹底した反応条件の検討が必要なることをあらためて痛感した。文献を調べると, プロスタグランジンと温和な条件かつ高収率で *p*-ニトロフェナシルエステルへ導く方法が報告されていた。いくつかの二塩基酸について, この条件で *p*-BPE 化を試みたところ, 効率よくエステル化されることが判かった。そこでアセトニトリル中 *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン存在下, 分画 F を *p*-BPE 化し, ほぼ定量的に分画 *p*-BPE G を得た! 分離過程の山場をまた一つ越えることが出来た。

このようにして得た *p*-BPEs を日立ゲル # 3019 (# 3011 より粒が粗く分取用として使用される)カラムで分離し, 加水分解後, 若干高い活性を示す分画 *p*-BPE H を得た。化学結合型の C_{18} カラムが逆相タイプの分離を示すことは判っていたので, 手元にあった分取用ボンダパック C18/ボラシル B カラムを用いて分画 *p*-BPE H を分離し, ある程度目的を達成した。優れた分離能をもつ分取用の μ -ボンダパック C_{18} カラムは高価で当時購入できなかった。分取後, 分画 *p*-BPE I を分析用の μ -ボンダパック C_{18} カラムで分析したところ後者の分離能が格段と優れていることが判明した。

この後、前回のマイクロパック CN カラムによる分離を省き、分離能が優れた μ -ボンダパック NH_2 カラムとヘキサン-ジクロロメタン-アセトニトリルの溶媒系で分画 *p*-BPE I を分離することにした。予備分離ではよく分かれたので、残り全部を分取したところクロマトグラムが一変してしまった。この NH_2 カラムの分離は素晴らしい。しかし微妙な条件の変化でクロマトパターンが変化した。室温変化や使用するアセトニトリルが変わっても(ロット毎の含水率の差)保持時間が変動した。また、サンプルサイズが違ったり、注入するサンプルと溶出溶媒が異なるようだ。HPLC のクロマトグラムは大きく変化し分離の再現性は著しく損なわれた。今回の分離失敗の原因は、サンプルを溶かすのに使ったクロロホルムの量が多すぎたためと判明した。さらに検討の結果、ジクロロメタンの割合が分離に大きな影響を与えることが判り、3種の溶媒の割合をいろいろ変えた μ -ボンダパック NH_2 カラムによる3段階の分離を経て、単一ピークを示す *p*-BPE をおよそ 50 μg 単離することが出来た(表2)(1981年5月)。

種々の HPLC カラムを用いても、このものは単一ピークを示し、活性は加水分解後 10^{-11} – 10^{-12} g/ml の濃度で発現した。これは原料に対して 20 億分の 1、クロロホルム連続抽出物に対して 200 万分の 1 に当る。ここに単離した活性物質 *p*-ブロモフェナシルエステルを改良された FD-MS を用いて測定したところ、 m/z 838, 840, 842 に強さ 1:2:1 の三重線が現れた。1976 年のサンプルは、HPLC 上今回のものと一致するだけでなく、FD-MS でもまったく同一のピークが観測され、これが最初の単離であったことが判明した。さらに ^1H NMR スペクトルの水素数も合わせ、分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_7$ を推定するに至った。この孵化促進物質をグリシノエクレピン A と命名し、*Nature* 誌に発表した⁶⁾。

4.5. 1981 年～1983 年(福沢, 姉帯) グリシノエクレピン A の構造を明らかにするには、どうしても ^{13}C NMR の情報が必要である。そのためには、前回の 50 μg では測定できない。10 倍量 500 μg が必要となった。そこで長年にわたって抽出を繰り返し蓄積、保存しておいたクロロホルム連続抽出物全量(1,011 g, 10 ha 相当の紅金時と本金時)を一度に処理することになった。福沢(北大理学部助手)が新たに加わり、辛抱強く分離を続け、2 年間かかって単離を完成した。スケールが 10 倍になったため同じ操作を何回も繰り返さなければならなかった。一度失敗すれば 10 数年間の努力が無駄になる。神経を磨り減らすストレスの多い単純作業の日々となった。

分離方法は前回と殆んど同じだが、各分離ステップを 2 度繰り返して分離効率を高めた。即ち、分離した際の弱活性部を同じカラムを用いて再度分離し、活性の上昇した部分を先の活性部と合わせて次の分離へ進んだ。一番時間がかかったのは活性炭カラムによる分離で、10 回同じ操作を繰り返し、その都度バイオアッセイを行った。イオン交換クロマトの後の吸着モードを加味したセファデックス LH-20 クロマトでは、ジクロロメタン-メタノール 95:5 に次いで 97:3 によるクロマトを追加した。このことにより、より細かな分離が可能となった。日立ゲルによる HPLC 分離は、分取目的のため中圧ガラスカラムにかえ、分離度の低下はメタノール中のジクロロメタンの割合を 30% から 20% へ変え溶出を遅らせることで補償した。 C_{18} カラムによる分離は、分離能の高い分取用 μ -ボンダパック C_{18} カラムを購入して行った。この HPLC 分取は *p*-BPE のメタノールに対する溶解度が低いため、少量ずつしか注入できず、100 回も同じ分離を繰り返した。さらに、 μ -ボンダパック NH_2 カラムを用いる分離では、ヘキサン-ジクロロメタン-アセトニトリルの割合を微妙に調節して最適分離条件を見出した。この NH_2 カラムを用いた 2 段階の分離によって、予想を上回る 1.25 mg のグリシノエクレピン A *p*-BPE を美しい結晶として手中におさめることが出来た(1982 年 12 月)。グリシノエクレピン A の構造は機器分析と X 線結晶解析の結果から(式 1)と決定した⁷⁾。

5. 活性本体か

トレース量を扱っていると、たとえ単離され活性を示したとしても、それが活性本体であるかどうか疑問が残る。実際、文献においてもそのような例が見受けられる。構造式(1)に基づいて合成したグリシノエクレピン A が天然品と同じ活性を示せば、孵化促進物質本体が単離されたことが証明される。全合成の持つ意味は大きい。

我々は現時点で次の根拠から孵化促進物質が単離されたと考えている。

1) *p*-BPE が結晶として得られ HPLC で単一ピークを与えた。このことは、純度が高いことを意味する。

2) 再結晶した結晶のほうが母液より、加水分解後僅かに高い活性を示した。

3) *p*-BPE の HPLC ピークの形と, 加水分解後の活性の増減が一致する。

4) 不活性な *p*-BPE を加水分解して得た酸の HPLC 上の単一ピークが活性を示す。

5) 異なる原料(本金時と紅金時)を異なる分離法で分けて同じ活性物質を得た。

6) 共存するグリシノエクレピン A と関連した構造をもつ不活性物質, グリシノエクレピン B を加水分解したところ, 弱いながら活性な物質が得られた。

6. おわりに

以下の二, 三の点について是非書き残したい。

1) バイオアッセイについて 確かにバイオアッセイは感度よく特異的に目的物質を検出できる。そのため相当量あると錯覚してしまう。分離・精製に伴いどこまで活性が上昇するのか判らず, 山頂が見える登山とはこの点で異なる。この先どうなるのかと人に聞かれても「虫に聞いてくれ」と答えるほかは無かった。

超微量活性成分を追うには活性成分をいかに捨るかというよりは, 不活性物質をいかに効果的に捨て去るかが問題となる。不活性物質と一緒に, ある程度は活性物質を切り捨てざるを得ないので, 分離能をあげ活性を狭い範囲に集中させることが重要となる。いくら分離能が良くても分画が不適当だと, セットアップで溶出されたものを再び混合することになる。しかし何を基準として分画するか目安がない。バイオアッセイによって後から知るほかない。あくまでも活性が頼りである。バイオアッセイに使う虫の“機嫌が悪い”ときはじっと待つしかない。活性試験を省略してどんどん進むと失敗したとき原因が掴めない。そこで出来るだけ細かく分けてから活性試験にかけ, 後で纏めるようにした。そのためバイオアッセイの検体数が膨大となった。専任の補助員は定員削減の波にのまれて研究者自身が行わねばならなかった。

2) 再現性について 本研究を通じて痛感したのは再現性の問題である。まずバイオアッセイでは違った日に行った活性試験結果との比較が難しい。標準孵化液についての結果を参考にして判断したが曖昧さが残った。分離については, 1 回だけの分離であれば再現性を気にしなくても良いが, 大量の分離では, 何回にも分けて処理するので長期にわたる再現性が要求された。いかに分離が良くても再現性に乏しければ使えない。条件設定が容易で, そのうえ再現性ある分離法が理想的である。セファデックス LH-20 や化学結合型の HPLC カラムはこの条件をかなり満たす。それでも再現性は条件を同じにして,

はじめて保たれた。注入毎に複雑なクロマトグラムの形が再現されればその分離は再現性があると判断できよう。

3) サンプルの保存について 長期にわたる分離では, サンプルをどの状態で保存するかが問題となる。幸い, クロロホルム抽出物の段階で活性を失うことなく冷凍庫で保存できた。しかし分離が進むにつれ, 安定性が低下し, アルゴン置換後 -85°C の冷凍庫で保管した。安定剤の入っていない重クロロホルムは分解しやすく塩化水素を発生するので, NMR 測定時には特に注意が必要である。

4) 研究者について 原料調製段階を除けば, 微量活性物質の単離研究に何人もの研究者が同時に取り組むことはできない。一人分の試料にも足りない。一人の研究をただ見守るだけだ。一度決めたルートの変更は難しい。なぜなら, 最善と信じて決めたのだから。ルートの変更は, 最初から分離をやり直すときか, 研究者が交替したときに限られた。

我々が, この研究に着手していた頃, 青函トンネル工事が進行していた。まず先進導坑を掘る意気込みで活性の強いところ強いところと追いかけた。一度開通すると希望をもって本坑工事に取り掛かれる。振り返ってみて, 研究が成功するかどうかは, 時代の背景を無視するわけには行かないことを痛感する。HPLC が無かったなら, 到底単離に至らなかったであろう。

(昭和 62 年 10 月 14 日受理)

追記 グリシノエクレピン A の全合成が完了し⁸⁾, 天然品と同じ孵化促進活性が確認された (1987 年 11 月)。

文 献

- 1) T. Masamune, M. Anetai, A. Fukuzawa, M. Takasugi, H. Matsue, K. Kobayashi, S. Ueno, N. Katsui, *Bull. Chem. Soc., Jpn.* 60, 981 (1987)
- 2a) 石橋信義, 線虫の生活, 東京大学出版会 (1978)
- b) 横尾多美男, 植物のセンチュウ (1), (2), 誠文堂新光社 (1972)
- 3) 一戸稔, 北海道農試報告, 48, 1 (1955)
- 4) 堤正明, 桜井清, 応動昆, 10, 129 (1966)
- 5) 姉帯正樹, 正宗直, 現代化学, 174 号, 16 (1985)
- 6) T. Masamune, M. Anetai, M. Takasugi, N. Katsui, *Nature*, 297, 495 (1982)
- 7) T. Masamune, A. Fukuzawa, A. Furusaki, M. Ikura, H. Matsue, T. Kaneko, A. Abiko, N. Sakamoto, N. Tanimoto, A. Murai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60, 1001 (1987)
- 8) A. Murai, N. Tanimoto, N. Sakamoto, T. Masamune, *J. Am. Chem. Soc.*, 110, 1985 (1988)