

日本産ソテツの一新有毒配糖体 Cycasin に関する研究*

西田 孝太郎・小林 昭・永浜 伴紀

Studies on Cycasin, a New Toxic Glycoside, of *Cycas revoluta* THUNB.

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI, and Tomonori NAGAHAMA
(Laboratory of Biochemistry)

緒 言

奄美大島や沖縄に自生するソテツ *Cycas revoluta* THUNB. の種子が1種の有毒成分を含み、しばしば中毒の原因をなすことは、古くから周知の事実であるが、吉村博士⁽¹⁾は種子中に formaldehyde の存在を証明し、その中毒は該物質に基因すべきことを提唱された。著者の一人西田⁽²⁾⁽³⁾は吉村博士の研究を確認し、さらにソテツ emulsin との関係について研究した結果、この formaldehyde は β -配糖体の形態をなす物質の酵素的分解産物であることを知りえた。

その後 COOPER⁽⁴⁾は濠洲産ソテツの1種 *Macrozamia spiralis* の種子から有毒配糖体を単離し、macrozamin の名称を与えた。その構造については最近 LYTHGOE ら⁽⁵⁾⁽⁶⁾は macrozamin の糖成分が primeverose であること、さらに aglycone が脂肪族の azoxy 構造を有することについて研究し、macrozamin が primeverosyloxyazoxymethane であることを明らかにした。なお RIGGS⁽⁷⁾は5種の *Macrozamia*、2種の *Bowenia* 及び *Cycas media* などの濠洲産ソテツについて研究し、それらの有毒成分は何れも macrozamin であると報じている。

著者らは奄美大島の復帰を機会に同島産ソテツについて戦前の研究をつづけた結果、さきに予想した有毒配糖体を純粋に分離し、macrozamin と異なることを明らかにしえたのでこれに cycasin なる名称を与えた。さらにその構造を研究して cycasin が glucosyloxyazoxymethane であることを確定した。なお比較的純粋に分離したソテツ emulsin による cycasin の分解に際して、aglycone のとる態度についても検討したので、茲にそれらの結果を報告する。

I Cycasin の単離

I-1 Cycasin 単離原法**

cycasin は夾雑する種々の不純物、殊に糖類のために syrup 状の濃縮抽出液から晶出せしめ難いので、イオン交換樹脂及び活性炭 chromatography を利用して、予めこれらを除去することによつて始めて単離に成功した。

実験結果及び考察

1. 抽出及び電解質の除去 Table 1 に示した如く、生ソテツ種子を脱殻して得た仁を直ちに熱湯処理し、酵素を破壊した後乾燥粉末とし、冷水にて3回抽出を行い、布で濾別した抽出液を合し、

* 本報告の要旨は *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 77, 172 (1955) に掲載した。

** 昭和29年10月15日第8回日本生化学会栄養食糧学会九州地方部会において講演した。

(1) 吉村 清尚; 鹿高農学術報告, **5**, 25 (1922).

(2) 西田 孝太郎, 山田 有朝; 農化, **11**, 357 (1935).

(3) K. NISHIDA; *Bull. Chem. Soc. Japan*, **10**, 524 (1935).

(4) J. M. COOPER; *Proc. Roy. Soc. N. S. W.*, **74**, 450 (1940), *Chem. Abst.*, **35**, 4917 (1941).

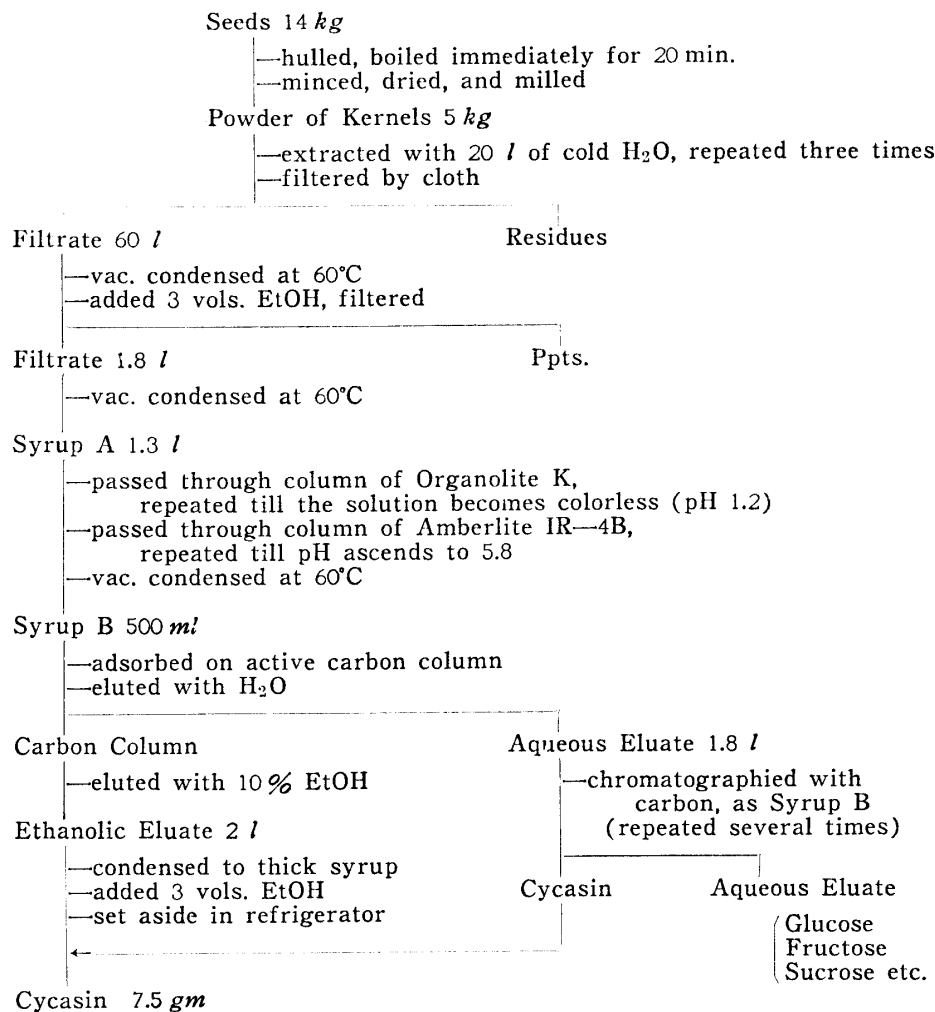
(5) B. LYTHGOE and N. V. RIGGS; *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2716.

(6) B. W. LANGLEY, B. LYTHGOE and N. V. RIGGS; *ibid.*, **1951**, 2309.

(7) N. V. RIGGS; *Australian J. Chem.*, **7**, 123 (1954), *Chem. Abst.*, **48**, 6510 (1954).

減圧下 60°C 以下で濃縮した。残存する不純物を 3 倍容の alcohol にて沈澱せしめ、濾液をさらに濃縮して、褐色のやや濁せる syrup を得てこれを Syrup A とした。LYTHGOE ら⁽⁵⁾ はこれよりなお濃厚な状態で alcohol を添加して, macrozamin の結晶を得ているが, 日本産ソテツの場合にはかかる方法では, 有機酸及び無機塩類の微細な結晶または粉末を少量得るのみであつたので, イオン交換樹脂を用いてまずこれらの電解質を除去することとした。

Table 1. Isolation of cycasin



すなわち 32~60mé に粉碎篩別した陽イオン交換樹脂 Organolite K 約 500 ml 容を, 直径 5cm, 長さ 25cm の硝子円筒に充填し, Syrup A を徐々に通過させた。樹脂の再生, 液の通過を数回繰返して行い, pH 1.8 の白色濁液を得た。次いで陰イオン交換樹脂 Amberlite IR-4B の同様な column にて同様に処理すれば, 液は殆んど透明となり pH 5.8 となるので, これを濃縮して Syrup B とした。

2. 糖類との分別 ここに得た Syrup B は, FEHLING 液を著しく還元し, 糖類及び配糖体のみより成ると考えられるので, paper chromatography による検索を行つた。常法の如く butanol-醋酸-水 (4:1:1) にて上昇法により展開し, 糖類一般試薬を用いて発色せしめたが, resorcin-塩酸及び diphenylamine-三塩化醋酸の両者は殊に良結果を与えたので, これらを主として用いた。

Fig. 1-a に示した如く, Syrup B を Syrup A と比較すれば, その糖類は全く等しく, イオン交換樹脂によつては, 何等の変化も受けないことがわかつた. すなわち著量の glucose, fructose 及び sucrose と共に, $Rf 0.36$ (Spot 1) 及び 0.07 (Spot 2) の位置にそれぞれ spot を与える物質が存在するが, 前者は resorcin 試薬により特異的に黄色に発色する. この発色は methylpentose によるものであるとされているが⁽⁸⁾, この Rf 値に相当するものは従来の文献になく, また acetone-塩酸法による定性反応も陰性であつた. 一方 Fig. 1-b の如く, 煮沸処理を行なかつた種子より抽出した場合, または Syrup B を加水分解した場合にはこの spot は得られなかつたので, この spot が配糖体のものであると考えたのである.

これらのことを手引として, 種々分離法を試みた結果, WHISTLER ら⁽⁹⁾の法を修正した活性炭 chromatography により夾雑する糖類と配糖体とを分別することができた. 活性炭 100gm を充填した前回同様の硝子円筒に Syrup B を移し, 吸引しつつ水にて溶出する. Fig. 2 に示したように, 溶出液量約 1.45l で glucose 及び fructose が溶出され終るので, 次に 10% alcohol 約 2l で column に残存する配糖体を完全に溶出した. 溶出液には, なお少量の sucrose が混在するが, これを濃縮して 3 倍容の alcohol を加え, 冷蔵庫に放置すれば結晶を析出する. 結晶を濾取し再結晶を繰返して分析に供した. 収量は乾燥仁粉末 5kg に対し 7.5gm (0.15%) である.

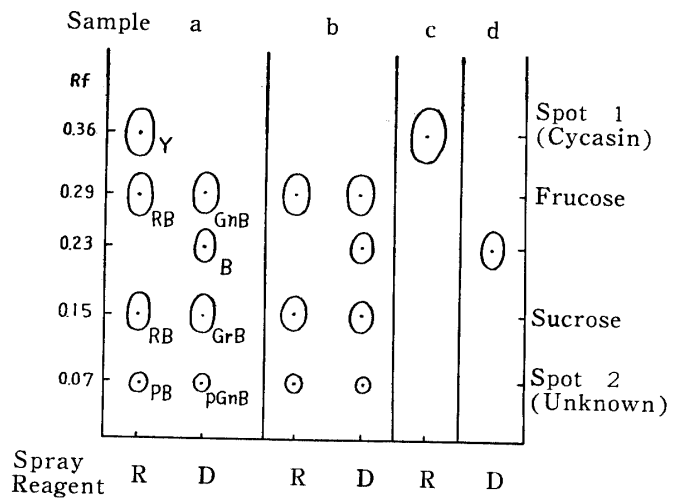


Fig. 1. Paper chromatograms of cycasin and sugars
Sample :— a, Syrup A and B ; b, ext. from non-boiled kernels ; c, crystal of cycasin ; d, hydrolysate of cycasin.

Developing solvent :— BuOH, AcOH, H₂O mixture (4 : 1 : 1)

Spray reagent :— R, 1% resorcin soln. in EtOH, 2N HCl mixture (1 : 9) ; D, 2% diphenylamine, 5% trichloroacetic acid soln. in BuOH, MeOH mixture (1:1).
Color :— Y, yellow ; R, red ; B, brown ; Gr, grey ; Gn, green ; p, pale.

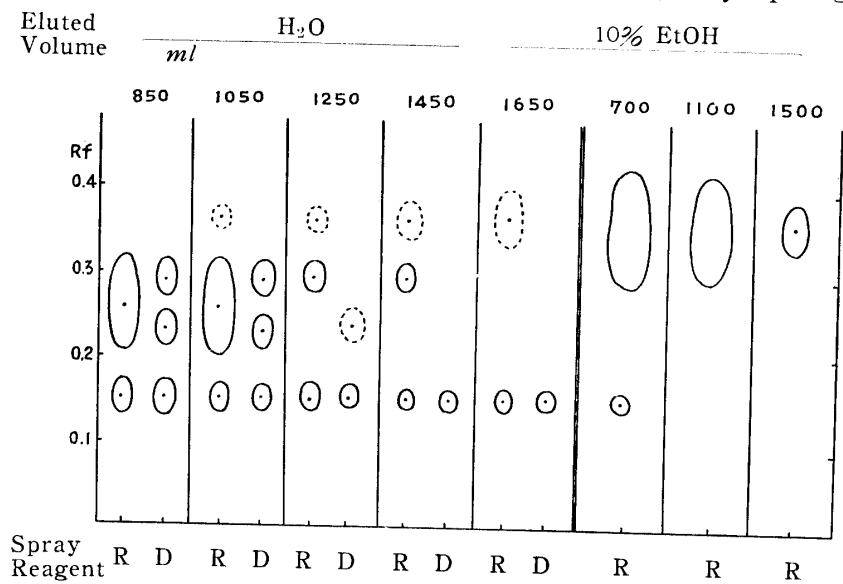


Fig. 2. Elution of sugars and cycasin from the active carbon column, shown in paper chromatograms
Development and reagents are the same as in Fig. 1.

(8) W. G. C. FORSYTH : *Nature*, **161**, 239 (1948).

(9) R. L. WHISTLER and D. F. DURSO ; *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 677 (1950).

3. **Cycasin** 上記の如くして得た配糖体 cycasin は、水、稀 alcohol に易溶、純 alcohol に難溶、benzene, acetone, chloroform, ethyl acetate に不溶である。中性及び塩基性醋酸鉛によつて沈澱しない。MOLISH 反応は陽性、anthrone 試薬により緑青色の呈色反応を示し、塩酸で加水分解すれば Fig. 1-c, d に示した如く、cycasin の spot は消失し glucose の spot のみが見られる。また酸加水分解により formaldehyde を生成し、アルカリ分解によつて青酸及び methylamine を与える。

濃 alcohol から結晶させれば無色針状結晶となる (Fig.3). mp 144°~145° (decomp.). $[\alpha]_D^{25} = -41.3^\circ$ (c 2.0, water). 分析結果は次のとおりである。

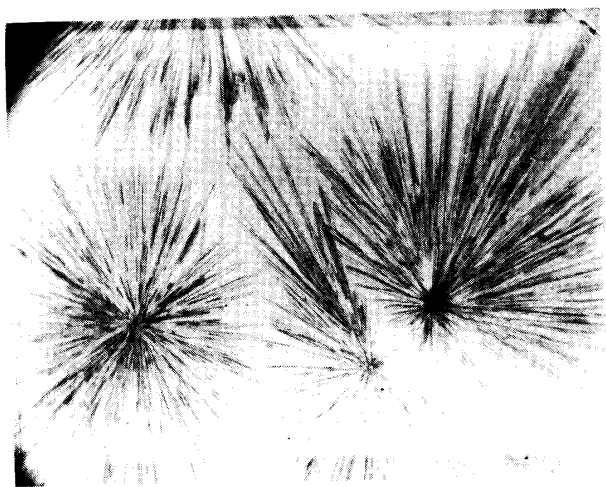


Fig. 3. Photograph of cycasin

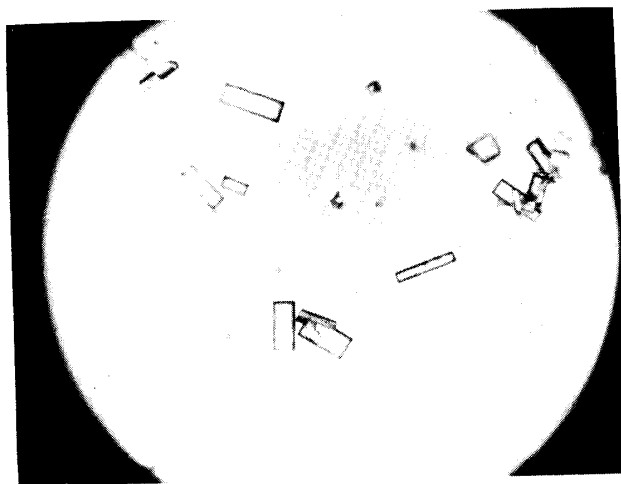


Fig. 4. Photograph of acetyl cycasin

Subst. mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
6.947	9.718	3.952	38.17	6.37
Calcd. for C ₈ H ₁₆ O ₇ N ₂			38.07	6.39
Subst. mg	N ₂ ml			N %
3.885	0.364 (21°C, 765 mm Hg)			10.93
Calcd.				11.11

MW (freez. point method)

Subst. mg	Water mg	Depression°C	Found	Calcd.
502.6	22,947.4	0.164	253	252

以上の如く cycasin はその組成及び分解生成物より macrozamin と類似構造の aglycone を有するものと考えられるが、糖成分が明らかに相違する。すなわちさきに予想した日本産ソテツの有毒配糖体は、macrozamin とは全く異なる一新配糖体である。

4. **Acetyl誘導体** cycasin 0.2 gm を pyridine 2 ml に溶解し、無水醋酸 8 ml を加えて室温に放置し、4日後 chloroform 8 ml にて稀釈し、水、稀硫酸、重曹水にて順次洗滌し、溶媒を溜去した。残留する固形物を熱 benzene より再結して、白色粉末 0.25 gm を得た。これを沸騰水にて処理した後放冷すれば、Fig. 4 に示したような無色板状の矩形晶となる。mp 137°~138°. $[\alpha]_D^{20} = -4.8^\circ$ (c 0.6, CHCl₃). 分析結果は次のとおりである。

Subst. mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
5.929	9.940	3.014	45.75	5.70
Calcd. for	C ₁₆ H ₂₁ O ₁₁ N ₂		45.72	5.75
Subst. mg	N ₂ ml		N %	
4.790	0.284 (21°C, 764 mm Hg)		6.90	
Calcd.			6.66	

MW (Rast's method)

Subst. mg	Camphor mg	Depression°C	Found	Calcd.
4.5	51.5	8.5	409	420

I-2 Cycasin 単離変法

この変法では酵母 invertase を用いて、抽出液中の sucrose をあらかじめ転化消失せしめることにより、活性炭 chromatography における sucrose と cycasin の分離の難点を解決して操作を簡易とし、かつ収量を倍加せしめることができた。

実験結果及び考察

1. **Invertase 液の調製** F.W.REYNOLD⁽¹⁰⁾の方法を参照して調製した。すなわち Table 2 に示す如く圧搾パン酵母(市販品) 450 gm を珪砂と共に磨碎し、水 400 ml, toluene 40 ml を加え、30°C にて autolyse せしめ、7日後に 20% 醋酸鉛溶液 50 ml を加えて生ずる沈澱を除き、濾液を2日間透析し、invertase 液 500 ml を得た。

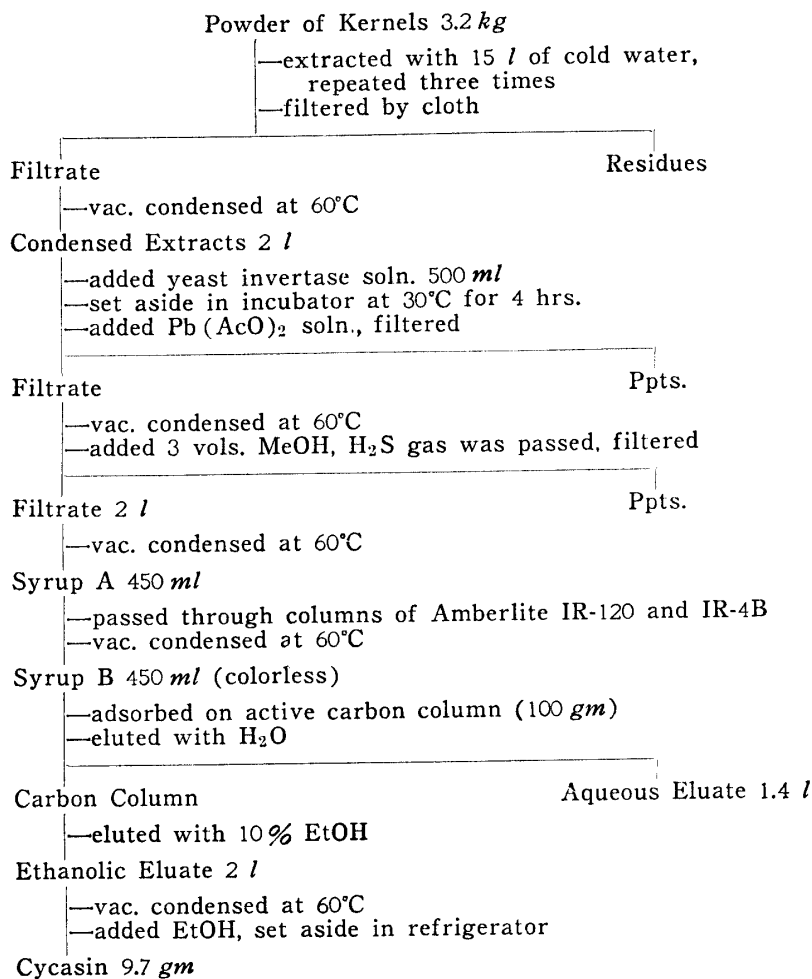
Table 2. Preparation of invertase

Pressed Baker's Yeast 450 gm	
—mashed with sand, then mixed with 400 ml of water	
—added 40 ml of toluene	
—stirred at frequent intervals throughout the first 24 hrs.	
The autolysis was allowed to continue for 7 days.	
—added 50 ml of 20% Pb(AcO) ₂ soln.	
—filtered by pulp	
Filtrate (Pb ⁺⁺ was not detected.)	Ppts.
—dialyzed in cellophane bags for 2 days against running tap water	
Invertase Soln. 500 ml	

(10) F. W. REYNOLD; *Ind. Eng. Chem.*, **16**, 169, 562 (1924).

2. **Cycasin 単離** 操作は Table 3 に示したとおりである。原法と同様にして得た濃縮抽出液 2 l に前記 invertase 液 500 ml を加え、30°C に保つた。0, 3, 4 各時間後反応液の一部をとり、醋酸鉛にて除蛋白後 醋酸カリにて除鉛し paper chromatography を行つた結果、4 時間後には sucrose の転化が完了していることを認めた。

Table 3. Improved method on isolation of cycasin



反応液は 4 時間後醋酸鉛を沈澱の生じなくなるまで加えて沈澱を除き、60°C にて減圧濃縮した。これに 3 倍容の methanol を加えて硫化水素を通じ、沈降せる粘質物と硫化鉛を濾去、濃縮して橙黄色透明の液を得てこれを Syrup A とした。Syrup A は Amberlite IR-120 及び 4B にて順次処理し、電解質を除去した後減圧濃縮し、得られた無色透明液を Syrup B とした。

活性炭 100 gm を用いて原法同様に Syrup B の chromatography を行つた結果は Fig. 5 に示したとおりである。原法では比較的溶出され難い sucrose を多量の水で溶出しつづける中に、cycasin も次第に溶出し、この区分の sucrose と cycasin を分離することが極めて困難であった。すなわちこの両者の分離のために活性炭 chromatography を数回行つても、なお完全には cycasin を分離回収することができず、収量の少い一因をなしていた。しかしながらこの変法では sucrose が存在しないため、共存する他の糖類は水 1.4 l にて容易に溶出され終り、column に残存する cycasin とほぼ完全に分離することができた。次いで 10% ethanol 2 l で溶出し、以下原

法と同様にして cycasin の結晶を得た。数回再結晶を行い、収量は乾燥仁粉末 3.2 kg に対し 9.7 gm (0.3%) であつた。

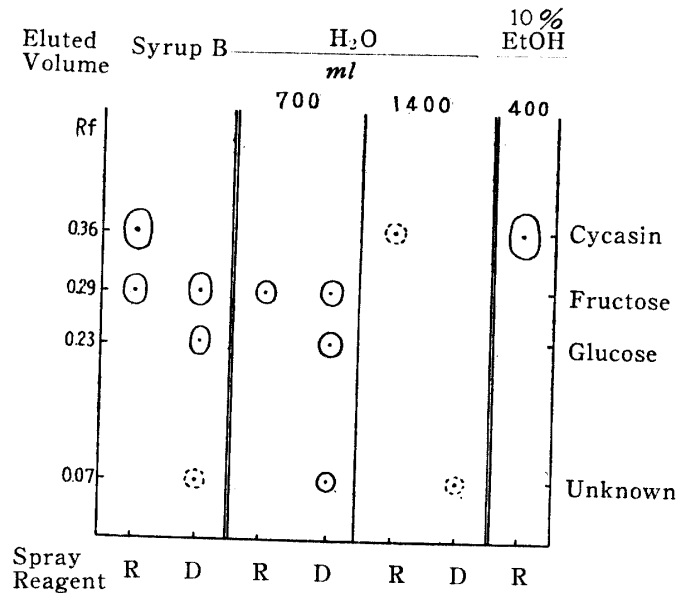


Fig. 5. Elution of sugars and cycasin from the active carbon column, shown in paper chromatograms

Developing solvent :—BuOH, AcOH, H₂O Mixture (4 : 1 : 1) Spray reagent :—R, 1% resorcin soln. in EtOH, 2N HCl mixture (1 : 9) ; D, 2% diphenylamine, 5% trichloroacetic acid soln. in BuOH, MeOH mixture (1 : 1).

得られた結晶は無色針状結晶で mp 144°~145° (decomp.). 分析結果は次のとおりで、該結晶は cycasin であることを確認した。

Subst. mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
4.490	6.310	2.565	38.35	6.39
Calcd. for	C ₈ H ₁₆ O ₇ N ₂		38.07	6.39
Subst. mg	N ₂ ml			N %
3.485	0.363 (32.3°C, 758 mm Hg)			11.34
Calcd.				11.11

II Cycasin の構造決定*

cycasin の構造を決定するため、その化学的挙動及び吸収スペクトルを検討し、macrozamin についての LYTHGOE ら⁽⁵⁾⁽⁶⁾ の報告と比較した。その結果両者の aglycone は同一であるが糖成分において相違することを確認した。

実験の部

A. 酸による加水分解 cycasin を 1N HCl と 100°C に加熱すれば、N₂ gas, formaldehyde, 及び methanol を生成する。分解生成物について分析した結果を、LYTHGOE らが macrozamin について報告した値と比較すれば Table 4 の如くである。

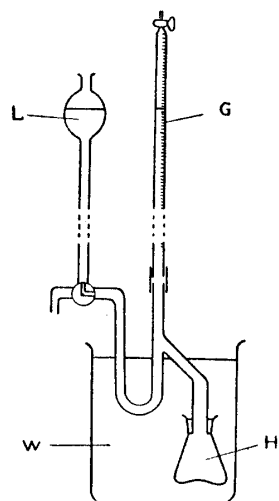
* 昭和 29 年 11 月 2 日 日本農芸化学会西日本支部第 56 回 例会において講演した。

Table 4. The comparison between the decomposition products of cycasin and those of macrozamin

	Decomposition products	per Mole of	
		Cycasin	Macrozamin *
Acid Hydrolysis	N ₂ Gas	0.92 Moles	1.02 Moles
	Formaldehyde	0.94	0.98
	Methanol	1.07	0.51
Alkali Decomposition	N ₂ Gas	0.35	0.45
	Formic Acid	0.31	0.45
	Cyanide	0.37	0.52
	Volatile Bases	0.17 Equivs.	0.18 Equivs.

* cited from Lythgoe's report

1. **N₂ gas** 20 ml 容三角フラスコに cycasin 85.7 mg をとり, 1N HCl を満して Fig. 6 の如く burette に連結し, burette には新たに煮沸した蒸留水を充滿させ, 水浴を沸騰させて約 3 時間

Fig. 6. Apparatus for determination of N₂ gas

G, gas burette; H, hydrolysing flask (cycasin in N HCl); W, water bath; L, levelling bulb.

後に gas の発生が止んだ後放冷, 測定の結果 6.99 ml (cycasin 1 mol. について 0.92 mol.) を得た. この気体について常法による gas 分析を行い, N₂ gas であることを証明しえた.

2. **Formaldehyde** cycasin を小三角フラスコに秤取し, 1N HCl を加え, 逆流冷却管を附して 2 時間加水分解し, 冷却管を水及び 1N Na-acetate を以て洗いフラスコの内容と合し, dimedone の alcohol 溶液を加え, 100°C に 10 分間保つた後冷却, 無色針状結晶を得た. mp 189° 元素分析の結果次の如く formaldomedone に一致した.

Subst. mg	CO ₂ mg	H ₂ O mg	C %	H %
6.457	16.563	4.758	70.08	8.25
Calcd. for C ₁₇ H ₂₄ O ₄			69.83	8.25

定量法は前同様にして得た加水分解液を NaOH にて中和後, TANENBAUM ら⁽¹¹⁾の方法に従い

phenylhydrazine による比色法に倣つたが, cycasin 1 mol. について 0.94 mol. の値を得た.

3. **Methanol** この場合 formaldehyde が同時に生成するので methanol の定量は極めて困難である. LYTHGOE らにならい micro ZEISSEL 法を修正して沃化メチルとして滴定する方法を行つたが, cycasin 1 mol. につき 0.11 mol. の methanol を定量するに止まつたので, dimedone により一旦 formaldehyde を捕捉除去した後蒸溜し, 常法⁽¹²⁾の如く fuchsine-亜硫酸によつて比色した結果, cycasin 1 mol. につき 1.07 mol. の数値を得た.

B. **アルカリによる分解** cycasin を 1N NaOH と加熱した場合の分解生成物は, N₂ gas, NaCN, 蟻酸及び volatile bases であるが, その定量結果は Table 4 に示した通りである.

(11) M. TANENBAUM and C. E. BRICKER; *Anal. Chem.*, **23**, 354 (1951).

(12) A. O. A. C. 7th Ed. (1950) p. 131.

1. **N₂ gas** cycasin 54.5 mg を小三角フラスコにとり, 1N NaOH を満して前と同様に micro burette に連結し, 分解の結果 1.86 ml の gas の発生をみた. この gas は定性分析の結果 N₂ gas であることを証明しえたが, cycasin 1 mol. につき 0.35 mol. に相当した.

2. **蟻酸** 上記分解液を定量的に Pozzi の微量水蒸気蒸溜装置⁽¹³⁾に移し, 磷酸を加えて酸性とした後蒸溜した. 溜液はアンモニア性硝酸銀液を著しく還元し, 蟻酸の存在を確めたので N/50 NaOH にて滴定した結果, その生成量は cycasin 1 mol. につき 0.31 mol. であることを知った.

3. **NaCN** 同様なアルカリ分解液を酸性とした後蒸溜し, 常法⁽¹⁴⁾に従い N/50 AgNO₃ にて滴定した結果, その生成量は 0.37 mol. であつた.

4. **Volatile Bases** cycasin 20 mg 前後を micro-KJELDAHL の蒸溜 フラスコにとり, 1N NaOH を加えて蒸溜し, 0.17 当量の volatile bases の生成を知った. また溜液を HCl-酸性として蒸発濃縮したものにつき Fig.7 の如き paper chromatogram を得た. 図に明らかなように HCl 塩は BPB により黄色の spot としてあらわれ, 標品の NH₄Cl 及び methylamine-HCl の spot と一致する. なおその spot の大きさ及び呈色より両者はほぼ等量混合物であろうと推定された.

C. **還元剤の作用** aglycone 部の N 原子に対する還元剤の作用を検するため cycasin に SnCl₂-HCl を反応せしめた. すなわち試験管に cycasin 50 mg 前後及び SnCl₂·2H₂O 約 350 mg をそれぞれ正確に秤取し, 5N HCl 5 ml を加え空気を吸引排除した後熔封して, 室温に 7 日間放置した. 別に cycasin を含まない区をおき盲験とした. 反応液を定容としその一定量を常法の如く N/10 沃素液にて滴定した結果, 盲験については SnCl₂ の消費がなく, この条件においては空気酸化が起らなかつたことを知った. 一方 cycasin を加えた区ではその 1 mol. につき 3.01 mol. の SnCl₂ が消費された.

上記反応液の一定容をとり水を加えて蒸発する操作を 2 回繰返し, formaldehyde を駆逐した後前記同様 volatile bases を検索した. その結果 ammonia 及び methylamine のほぼ等量混合物である volatile bases が cycasin 1 mol. につき 1.85 当量生成したことを知りえた.

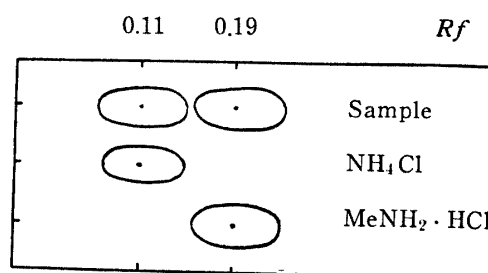


Fig. 7. Paper chromatogram of volatile bases
Developing solvent : BuOH, AcOH, H₂O mixture (4:1:1, set aside several days after preparation)
Spray reagent : 0.2% BPB soln. in abs. EtOH (detected as yellow spot on blue background).

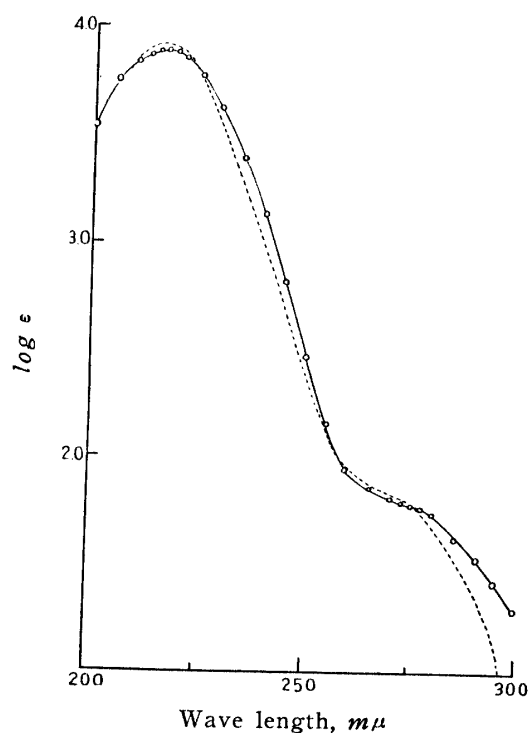


Fig. 8. Ultraviolet absorption spectra
— cycasin, - - - macrozamin (duplicated from Lythgoe's report)

(13) 船久保 英一, 有機化合物確認法上巻 (1953) p. 92.

(14) A. O. A. C. 7th Ed. (1950) p. 354.

さらに一定容の反応液につき formaldehyde の比色定量を行つた結果, その生成量は cycasin 1 mol. につき 0.98 mol. であつた。

D. 吸収スペクトル cycasin の 5/1,000 % 水溶液について島津分光光度計を用いて紫外部の吸収を検し, Fig. 8 に示した吸収曲線を得た. 図には吸収を $\log \epsilon$ に換算してあらわし, 比較のため LYTHGOE による macrozamin の吸収曲線をも示したが, 217 $m\mu$ 附近に顕著な吸収極大があり, また 275 $m\mu$ 附近に屈曲部があらわれることも macrozamin の吸収曲線と極めてよく類似している。

cycasin 及び acetyl cycasin の赤外部の吸収は nujol にて paste として検した. 紫外部同様 macrozamin の吸収スペクトルとともに Fig. 9 に示した如く, この場合も macrozamin と極めてよく一致し, 1,540 cm^{-1} 附近に特異的な吸収があることがわかる。

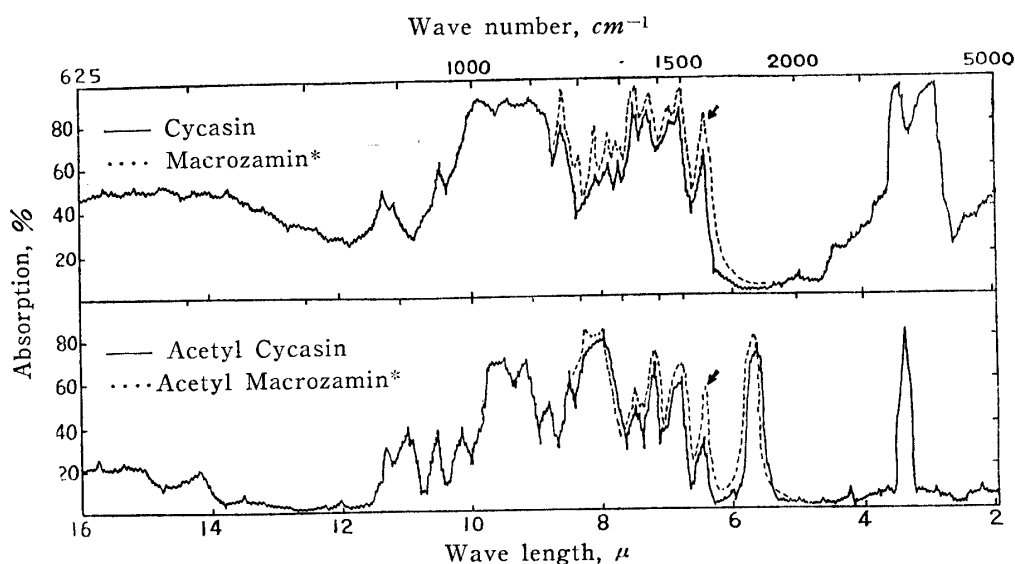


Fig. 9. Infrared absorption spectra

Samples were examined as paste with nujol, to which the bands near 6.85 and 7.25 μ are due. The band at ca. 1760 cm^{-1} is due to the ester carbonyl groups. Marked * are duplicated from Lythgoe's report.

E. 糖成分 前に述べた如く cycasin の糖成分が glucose であることは paper chromatography によつて予想されたのであるが, これを定量し, また誘導体として確認した結果は次のとおりである。

1. Acetyl Cycasin のアルカリ分解 acetyl cycasin を微量の Na-enolate にて低温で鹼化すれば, cycasin を回収することは paper chromatography により確認したが, conc. Na-enolate を常温で反応させればアルカリ分解が aglycone 部にまで及ぶ. すなわち acetyl cycasin 約 100 mg を chloroform 1 ml に溶解し, 2N Na-enolate 2 ml を加え室温に 1 時間放置すれば, 褐色 syrup 状の沈澱を生ずる. 濾液については Na-picrate 試験紙にて青酸の生成したことを, また前記 phenylhydrazine にて formaldehyde の生成したことを証明しえた. 濾取した沈澱は methanol を以て洗滌乾燥した後, 無水醋酸及び熔融醋酸ソーダにて常法の如く acetyl 化を行い白色粉末を得た. mp 115° で, pentacetyl glucose の純品と混融して融点降下を示さない。

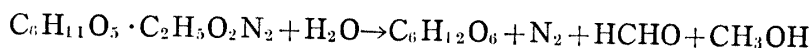
2. **Hanes 法による定量** cycasin 20.2 mg をとり, 1N HCl 5 ml を加え逆流冷却管を附して加水分解した後, 水を加えて減圧濃縮を繰返し formaldehyde を駆逐, 50 ml とした. その 5 ml につき HANES 法にて glucose を定量した結果, 定量値は 14.54 mg で cycasin 1 mol. について 1.01 mol. に相当する.

3. **Glucosazone** 上記と同様の加水分解液を減圧濃縮後常法の如く処理して glucosazone を得た. mp 208°. 純品と混融して融点降下を示さない.

4. **種子中の Xylose 検索** 生のソテツ種子 40 gm を注意して脱殻, 直ちに methanol にて温浸を繰返し, 浸出液を減圧濃縮して paper chromatography を行つた. cycasin は resorcin による黄色 spot としてその存在を示したが, xylose に相当する spot は認めえなかつた.

考 察

以上述べた如く cycasin はその化学的挙動及び吸収 スペクトルにおいて macrozamin と極めてよく類似し, 酸分解においては恐らく次式に従つて加水分解されるものと考えられる.



すなわち aglycone の C2 原子中 1 α は formaldehyde の, 他の 1 α は methanol の C としてあらわれ, また N2 原子は分子状 N₂ に化生するものであろう. 殊に定量的な N₂ gas の発生は macrozamin の場合と同じく cycasin が N=N 結合を有することを強く暗示するものである.

この N₂ gas 発生はアルカリ分解においても起るが, この場合の分解生成物は酸分解に比べて複雑であり, 化学量論的な結果がえられない.

SnCl₂-HCl にて cycasin を還元する反応は次式の如く行われるであろう.



これら cycasin の化学的挙動は macrozamin の場合とよく一致し, LYTHGOE の述べているように aglycone は, (a) C-N-N の system を有していること, (b) 糖成分は O 原子乃至は N 原子を介してこれに結合していることが結論される.

次に LYTHGOE は macrozamin の化学的挙動から考えうる C-N-N の system のうち azo 及び nitrosamine 構造はその示すべき紫外線吸収のないこと, diazo 及び azo-ether 構造は熱に対して不安定であるが macrozamin は安定であること, また nitrous oxide 構造は糖成分の結合位置を与えないことよりそれらの構造は何れも否定さるべく, 結局 azoxy 構造のみが可能性を有するものとして残されるといつている. そして ethyl-2-azoxybutyrate その他 3 種の脂肪族 azoxy 化合物について紫外線吸収を検した結果, これらがすべて macrozamin と同一の吸収曲線を示すことを証明した.

また赤外部吸収についても, 前記化合物が何れも 1495~1505 cm⁻¹ に特異的な吸収を示すことを明らかにし, macrozamin の場合にはそれが有する 2ry あるいは 3ry の hydrocarbon 残基のために 1540 cm⁻¹ にズレるものであろうと述べている. さらに最近 LYTHGOE ら⁽¹⁵⁾ は azoxy-methane などの簡単な脂肪族 azoxy 同族体を合成してこのことを確認した.

cycasin の吸収スペクトルは紫外部及び赤外部とも macrozamin と極めてよく一致し, それと同じく aglycone 部に —N=N— なる chromophore を有することは明らかである.



(15) B. W. LANGLEY, B. LYTHGOE and L. S. RAYER; *J. Chem. Soc.*, 1952, 4191.

以上の如く cycasin の aglycone は macrozamin のそれと一致すると考えられるが、前記実験結果に明らかな如く糖成分は glucose 1 分子のみであつて、単離操作において xylose の離脱があつたのではない。すなわち日本産ソテツの有毒配糖体は macrozamin とは別個の化合物であつて、glucosyloxyazoxymethane $C_6H_{11}O_5-OCH_2-N=N-CH_2$ として存在するものと結論したい。

III ソテツ Emulsin による Cycasin の分解*

前述の如く cycasin を酸又はアルカリで処理すれば、aglycone は低分子化合物に分解し、aglycone 自身をとり出すことはできない。ソテツ種子から比較的純粋に抽出した emulsin を用いて、glucoside 結合を切る場合について検討した結果、この場合も酸による加水分解と同じく、aglycone は糖から離れると同時に N_2 gas, formaldehyde 及び methanol に分解することを確かめえた。

実験の部

1. ソテツ Emulsin の調製 HELFERICH ら⁽¹⁶⁾ の行つた如く、酵素をタンニンで沈澱させ、乾燥粉末とする方法をとつた。その詳細は Table 5 に示したとおりであるが、Crude Enzyme I は

Table 5. Preparation of cycad-emulsin from the seeds of *Cycas revoluta*

Kernels 500 gm	
	—mashed, extracted with 1.25 l of 1% $ZnSO_4$ soln. at 0° for 2 hrs. —filtered with cloth and filter pulp
Filtrate	Residues
	—added 0.35 gm tannin in 125 ml of H_2O —filtered with filter pulp
Filtrate	Ppts.
	—added 3.75 gm tannin in 125 ml of H_2O , centrifuged
Ppts.	Supnt.
	—trituated with acetone, centrifuged
Ppts.	Supnt.
	—repeated twice as above —dried on porous sheet, then in vac. desiccator
Crude Enzyme I ca. 10 gm	
Crude Enzyme I 30 gm	
	—dissolved in 1 l of H_2O , centrifuged
Supnt.	Insoluble Part
	—added 3 gm tannin in 100 ml of H_2O , centrifuged
Ppts.	Supnt.
	—treated with acetone as above
Crude Enzyme II 2.4 gm (β -Glucosidase Value : 0.402)	

* 昭和30年3月30日 日本農芸化学会大会において講演した。

(16) B. HELFERICH, S. WINKLER, R. GOOTZ, O. PETERS und E. GÜNTHER; *Z. physiol. Chem.*, 208, 91 (1932).

水に不溶の部分多く、活度も小であつた。従つてこれを一旦水に溶解し、不純物を除去した後、再びタンニンで沈澱せしめ、同様に処理して Crude Enzyme II を得た。salicin を基質として力価を検定した⁽¹⁷⁾結果、 β -glucosidase value は 0.402 であつた。使用に当つてはこのものの一定量を水と充分磨碎混和し、若干残存する不純物を遠沈除去、乳濁状の上澄液を一定容として用いた。

2. 予備実験 cycasin 溶液を酵素液及び緩衝液と共に小三角フラスコにとり、水を満した倒立 burette に連結し、45°C にて 24 時間反応させた。生成せる burette 中の gas について常法どおり gas 分析を行つた結果、N₂ gas であることを証明しえた。またフラスコ中の反応液についてそれぞれ定性試験を行い、formaldehyde, methanol 及び glucose の生成したことを証明することができた。しかしアルカリによる分解生成物、すなわち cyanide, 蟻酸及び volatile bases は何れの定性反応も認められなかつた。

cycasin の分解に際して発生する N₂ gas は以下すべて WARBURG manometer で測定したが、反応溶液の基本組成は個々に変えた条件以外は Table 6 に示したとおりのものである。

	Quantity employed	Location
M/10 Phosphate buffer, pH 5.61.0 ml	Main flask
Cycasin soln., 40 μ M (10.08mg) in0.5 ml	
Enzyme soln., 5 mg in0.5 ml	Side arm
20% KOH soln.,0.2 ml	Center well
Gas phase, H ₂		Temp., 40°C

3. 基質量及び酵素量との関係 cycad emulsin による N₂ gas の発生は最初の 30 分間ややおくれるが、その後は時間の経過と共に直線的に増加する。一定量の基質に対して酵素量をそれぞれ変えた場合の一例を Fig. 10 に示した。酵素量を一定とし、基質の量を変えた場合にも同様な結果を得た。2 時間後の gas 発生量を cycasin 1 mol. 当りの mol. 数に換算し、用いた酵素あるいは基質の量について比較すれば Fig. 11 に示すとおりである。すなわちある程度以上の酵素乃至は基質濃度では、gas 発生率は増加せずほぼ一定にとどまつた。しかしながら発生 gas の絶対量は、例えば 10 μ M の cycasin の場合 2 時間後で僅かに 32 μ l であつて、低濃度の基質では測定に困難なため基本組成では 40 μ M としたのである。

4. 緩衝液の影響 同一濃度の acetate, phosphate, phosphate-citrate 及び citrate-NaOH の 4 種緩衝液について N₂ gas 発生との関係を検討したところ、前二者ではやや発生が少かつたが著しい差ではなく、また phos-

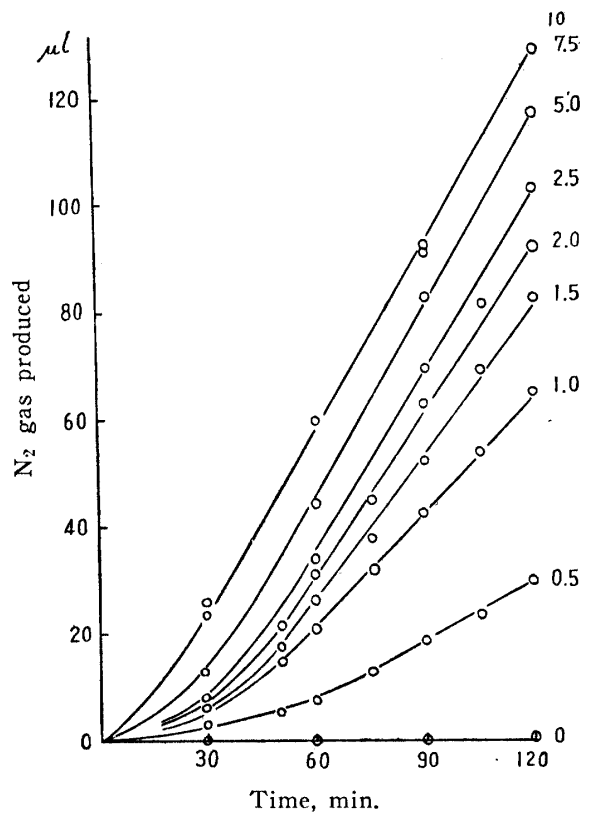


Fig. 10. Formation of nitrogen gas from cycasin with varying amounts of enzyme. Figures on the right indicate mg of cycad-emulsin used. Other conditions are shown in Table 6.

(17) B. HELFERICH und H. APPEL; *Z. physiol. Chem.*, **205**, 231 (1932).

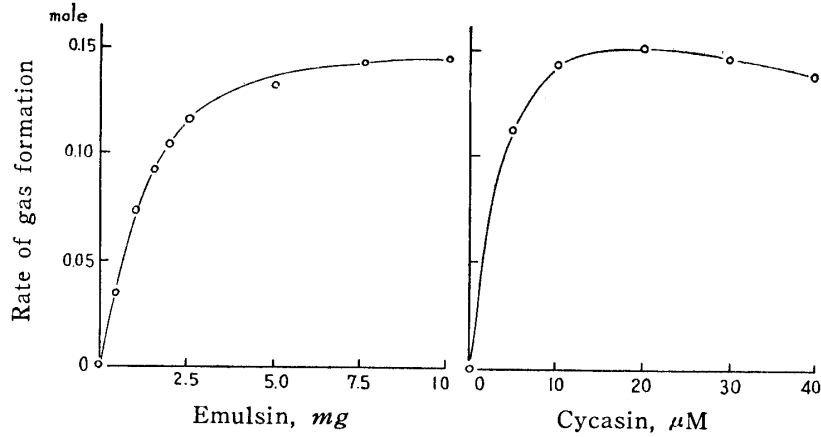


Fig. 11. Relationship between nitrogen gas formation and amounts of enzyme or substrate

Measured after 2 hrs. The rate of formation is expressed in moles per mole of cycasin.

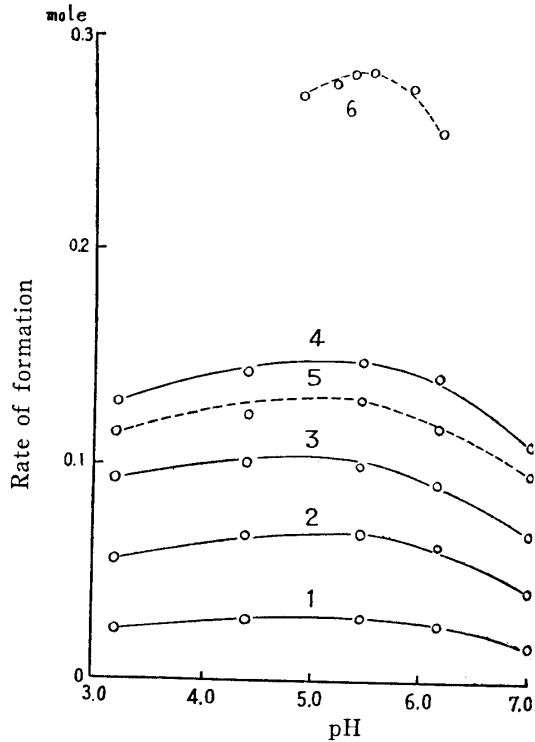


Fig. 12. Influence of pH on nitrogen gas and formaldehyde formation

Nitrogen gas : at 40° after 30 min.(full line 1), 60 min. (2), 90 min. (3), and 120 min. (4). Formaldehyde : after 120 min, at 40° (broken line 5), and at 50° (6). Buffer : phosphate-citrate. Other conditions are shown in Table 6.

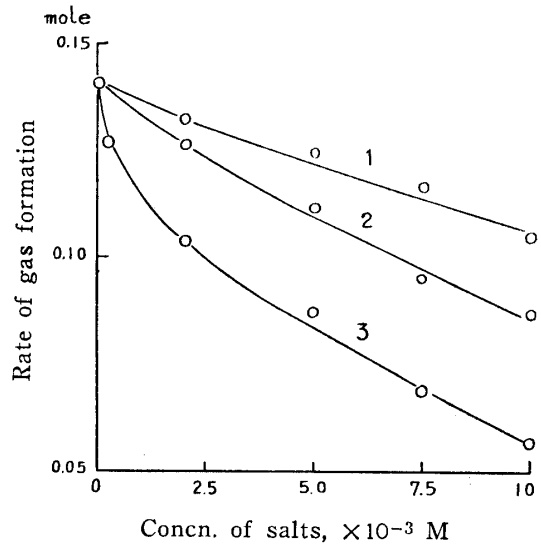


Fig. 13. Influence of heavy metal salts on nitrogen gas formation

1 ; CuSO₄, 2 ; HgCl₂, 3 ; AgNO₃. Measurements were made after 2 hrs. Main flask contained 0.5 ml of the salt soln. and 0.5 ml of M/5 buffer. Other conditions are shown in Table 6.

phate buffer についてその濃度を変えた場合にも N₂ gas の発生には殆んど影響がなかつた。

一方 pH との関係を検討するため, phosphate-citrate buffer を用いて反応せしめ, 2時間後の gas 発生率を pH について比較した (Fig. 12). また formaldehyde の生成量を測定するため, 2時間反応後直ちに 20% 三塩化醋酸溶液 0.5 ml を manometer 容器に加え, 反応を停止除蛋白

し、遠沈後上澄液一定量について phenylhydrazine による比色定量⁽¹¹⁾を行つた。結果は図に示すとおりで、N₂ gas と同じく pH 5 附近において分解が著しいが、顕著な極大はみられなかつた。さらに pH 5 附近を詳細にしらべるため、manometer と同一組成の反応液を小三角フラスコにとり、50°Cで2時間反応せしめた後 formaldehyde を定量した結果 pH 5.6 附近で分解が最大となることを知つた。

5. Emulsin 阻害剤の影響 この場合阻害剤溶液の 0.5 ml を主室に添加し、buffer は M/5 phosphate 0.5 ml として実験を行い、N₂ gas 発生との関係を検討した。硫酸銅、塩化第二水銀、硝酸銀については、それぞれの添加濃度の異なる程 gas 発生は小となり、同一濃度にて比較すれば、銀塩の影響が最も著しく、銅塩は比較的影響が少かつた。(Fig. 13)

従来 emulsin 阻害剤として報告されている phenylhydrazine, sodium hydrogen sulfite, formaldehyde についても検討したが、低濃度ではさほど顕著な影響を示さなかつた。HELPERICH ら⁽¹⁸⁾の行つた如く、formaldehyde を酵素液に添加し、0°C で 24 時間作用させた後、この酵素液を用いる場合には、formaldehyde の濃度の増加とともにその影響がやや顕著にあらわれることを認めた。

6. 反応温度との関係 manometer による N₂ gas の測定を高温で行うことができないので、反応温度との関係はこれと同じ組成の反応液につき、2 時間後の formaldehyde 生成量をもつて比較した。Fig. 14 に示すように温度の高い程生成量も著しく、65°C 附近では最高値すなわち 0.62 mol. に及ぶが、それ以上の高温では著しく生成量が小であつた。

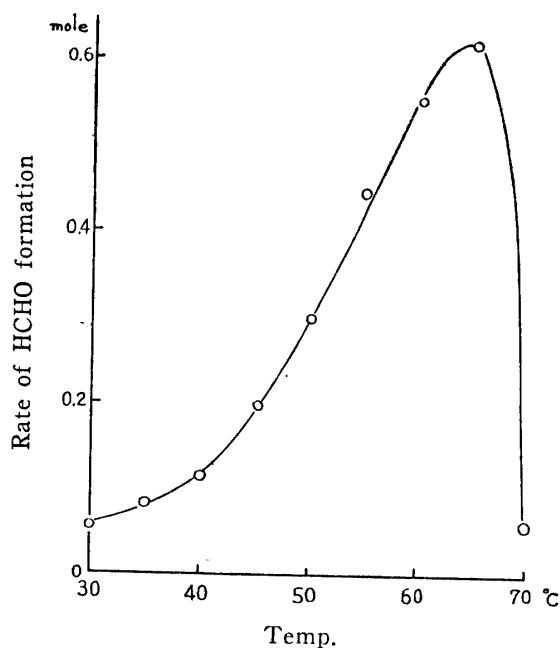


Fig. 14. Formaldehyde formation after 2 hrs. at various temperatures
Other conditions are shown in Table 6.

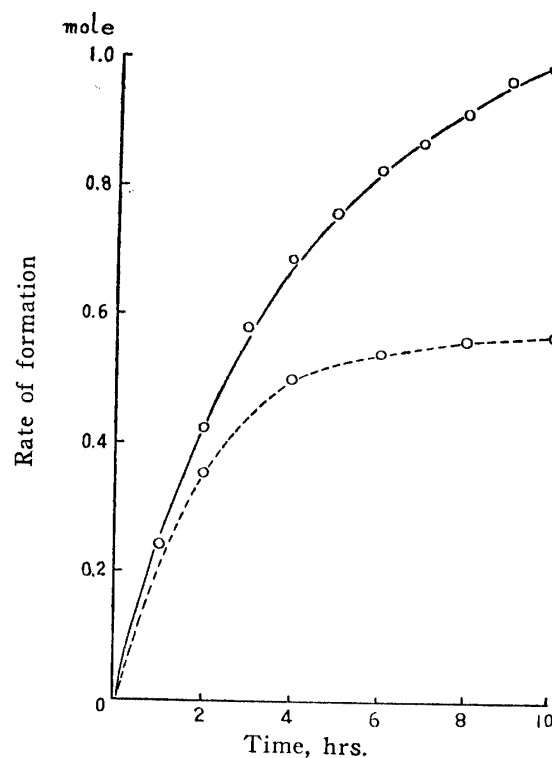


Fig. 15. Complete degradation of cycasin into nitrogen gas and formaldehyde
Nitrogen gas, full line; Formaldehyde, broken line.
Temp., 50°. Enzyme amount employed, 10 mg.
Other conditions are shown in Table 6.

(18) B. HELPERICH und S. WINKLER; *Z. physiol. Chem.*, **221**, 98 (1933).

7. 完全加水分解 完全分解に至る迄の過程をしらべるため、酵素量を 10 mg に増し、50°C で長時間 manometer による測定をつづけた結果は Fig. 15 のとおりで、時間の経過と共に反応速度は次第に減少し、約 10 時間後 cycasin 1 mol. 当り N₂ gas 1 mol. に到達した。各時間反応後の容器内容につき formaldehyde をも定量したが、90 分後迄は N₂ gas とほぼ一致し、その後は次第に差があらわれて約 1/2 量にとどまつた。

N₂ gas 以外の最終産物を定量するため、cycasin 溶液 (5 ml 中に 400 μM)、酵素液 (5 ml 中に 250 mg) 及び M/10 phosphate buffer (10 ml) を小三角フラスコにとり、50°C にて 20 時間反応せしめた後、50% 三塩化醋酸 2 ml を加えて遠心分離し、上澄液についてそれぞれ定量分析を行った。すなわちその 2 ml を中和後水蒸気蒸溜し、溜液一定量につき formaldehyde を定量した結果、cycasin 1 mol. につき 0.74 mol. の値を得た。

methanol を定量するため上澄液 10 ml を中和、10% dimedone 溶液を 1.5 ml 加え、10 分間逆流加熱し、冷後濾過して formaldehyde を除去した後濾液を緩かに蒸溜した。溜液一定量について常法どおり fuchsin-sulfite 法で比色した結果、methanol の生成量は cycasin 1 mol. 当り 1.28 mol. に相当した。

なお上澄液中の電解質をイオン交換樹脂 Amberlite IR-120 及び IR-4B を用いて除き、減圧濃縮して paper chromatography を行つたが、cycasin の spot は検出されず完全に分解したものと認められ、glucose の spot のみを確認しえた。従つてこれを HANES 法により定量した結果、cycasin 1 mol. について 0.85 mol. の glucose に相当した。

考 察

生化学的研究において N₂ gas の消長を WARBURG manometer を用いて検討した例は、従来殆んど報告がないが、著者らは若干の予備試験の結果前記の如き基本条件を定めた。酵素材料としてソテツ種子の搾汁液をそのまま用いた場合には、基質を加えない control においても相当量の gas 発生があり、不適當であつたため、汁液中に存在する基質を一旦分別除去することが必要であつた。酵素材料をさらに精製することも試みたが、cycasin の分解を検討する今回の目的には煩雜であり、タンニンによる沈澱操作を 2 回行う程度で充分であつた。manometer の gas 腔は H₂ で置換したが、この gas 交換及び副室へのアルカリ添加によつて、CO₂ による誤差を無視しうる程度に小ならしめ、N₂ gas 生成を正確に測定することができた。

著者の一人西田⁽¹⁹⁾はさきにソテツ種子の emulsin について酵素学的に詳細な研究を行い、salicin を基質とする場合には最適 pH 5.6、最適温度 55~60°C などの結果を得ている。cycasin の場合 N₂ gas, formaldehyde の生成量は pH 5.6 附近で著しく、温度についてもほぼ同様な結果を得た。65°C 以上の高温において生成量が著しく低いのは熱による酵素の不活性化があつたものであろう。

酵素による配糖体の加水分解を検討する場合、遊離した糖又は aglycone、あるいは残存する配糖体を定量すべきであるが、cycasin 自体の定量法は現在検討中での確簡便な方法を未だ見出しえない。一方 glucose を定量することもこの場合極めて困難である。というのは formaldehyde が同時に生成するため、glucose の還元力を利用する一般定量法をそのまま準用することができず、しかも cycasin はアルカリ性では極めて不安定であり、糖定量の試薬により分解して glucose を生成し、過大な測定値を与えるからである。

(19) 西田 孝太郎; 農化, 11, 1089 (1935).

Résumé

I-1. From the seeds of *Cycas revoluta*, the authors isolated a toxic glycoside, of which one of them predicted the existence previously. The authors named it cycasin, after proving it to be a new colorless needle-formed crystalline compound of constitution of $C_8H_{16}O_7N_2$. In isolation procedures, the co-existing impurities, especially sugars which prevent cycasin from crystallizing, were removed by ion-exchange resins and active carbon chromatography.

I-2. Yeast invertase was added to the extracts of the cycad kernels so as to remove sucrose which was most difficult to be separated from cycasin. Thus, the carbon chromatography being improved to be conducted more easily and effectively, the yield of cycasin was twofold compared with the original method.

II. For the determination of the structure of cycasin the following facts were confirmed. The decomposition products of the aglycone of cycasin with acid, alkali or reducing agent, and the absorption maxima in the ultraviolet and infrared absorption spectra of cycasin were the same as those reported on macrozamin of Australian cycads. However, the sugar component of cycasin was identified to be one molecule of glucose, and xylose could not be proved. Consequently, the structure of cycasin is concluded to be glucosyloxyazoxymethane.

III. An enzymatic hydrolysis of cycasin with the cycad-emulsin, prepared from the cycad kernels, was examined under the various conditions of enzymatic reaction. Being as in the case of acid hydrolysis, nitrogen gas, formaldehyde, methanol, and glucose about one mole respectively per mole of cycasin were obtained as the complete degradation products. Nitrogen gas was measured by the use of Warburg's manometer. It is concluded that the aglycone of cycasin is labile and decomposes into these low molecular compounds, even when it is liberated from glucose with an enzyme.