

アゾキシ配糖体の研究

西田 孝太郎・共同研究者

Studies on Azoxyglycosides

Kôtarô NISHIDA and Collaborators

(Laboratory of Biochemistry)

目 次

緒 言	IV. 酵素的糖転移反応による Neocycasin C の生成とその構造
第一編 Cycasin に関する研究 (既報)	V. ソテツ雄花中の Azoxyglycosides
第二編 Neocycasins に関する研究	VI. ソテツ種子中遊離 Laminaribiose の存在
I. Neocycasin A の単離及び構造	VII. Résumé
II. Neocycasin B 及び Macrozamin	文 献
III. Cycad Emulsin による Azoxyglycosides 間 の相互変換	

緒 言

著者らは、日本産ソテツ *Cycas revoluta* THUNB. の種子、茎幹及び雄花より一連の配糖体を単離し、それらの aglycone が何れも脂肪族 azoxy 化合物即ち hydroxyazoxymethane $\text{CH}_3 \cdot \text{N}(\text{O}) : \text{N} \cdot \text{CH}_2\text{OH}$ であることを明らかにした。

aglycone がかかる azoxy 構造を有する配糖体は、自然界にはもとより合成的にも従来未知であるが、この aglycone は極めて不安定で糖から独立して遊離状態には存在し得ず、現在のところ合成不能である。

これら一連の配糖体は CN 基がないのに、アルカリ分解により cyan を生成するので、分類上 pseudocyanogenetic glycosides* に属するが、著者は aglycone の特殊構造にもとづき、これらを azoxyglycosides と総称することにした。その基本配糖体は、著者らが cycasin と命名した monoside、即ち β -glucosyloxyazoxymethane であつて、azoxyglycosides の中他の biosides や oligosides は cycasin の glycosyl 誘導体とも云うべきものである。著者らはこのような新 biosides として β -laminaribioside、 β -gentiobioside、また新 tetraoside として β -laminaritetraoside を単離し、その構造を明らかにしてそれぞれ neocycasin A、B 及び C と命名した。

azoxyglycosides はその aglycone が他に類例のない特殊構造であるのみならず、配糖体の糖成分としては初めて発見された laminaribiose や laminaritetraose のような β -1, 3 結合糖を含むことも著しい特徴である。

またこれら配糖体に対する cycad emulsin の作用即ち、水解、糖転移反応を通じて、azoxyglycosides 間の酵素的相互変換関係をも検討し、ソテツ組織内における azoxyglycosides の存在との

* このような配糖体として従来 hiptagin, karakin などが知られていたが、B. Lythgoe らはこれらを pseudocyanogenetic glycosides と総称している。

関連性を明らかにした。

さらに azoxyglycosides の応用的研究の一端として、マウス腹水癌に対する制癌効果が検討されており、注目すべき結果が得られつつある。

以下 azoxyglycosides の研究をまとめ、cycasin に関する研究報文を紹介すると共に、neocycasins に関して得た研究成果を報告したい。

第一編 Cycasin に関する研究

cycasin に関する研究は既に諸誌に報告されたので茲には各項目をあげるに止めたい。

I. Isolation and the Structure of Cycasin¹⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI and Tomonori NAGAHAMA

II. Hydrolysis of Cycasin with Cycad-Emulsin²⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI and Tomonori NAGAHAMA

III. ソテツ茎幹より Cycasin の単離について³⁾

西田 孝太郎・小林 昭・永浜 伴紀

IV. Cycasin の薬理⁴⁾

西田 孝太郎・小林 昭・永浜 伴紀
小島 喜久男・山根 実

V. Quantitative Determination of Cycasin in Cycad Seeds⁵⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI and Tomonori NAGAHAMA

VI. Polarography of Cycasin⁶⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI and Tomonori NAGAHAMA

VII. Polarography of Macrozamin Compared with That of Cycasin⁷⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI, Tomonori NAGAHAMA
and Junko NAWATA

VIII. Polarographically Determined Velocity Constants of the Alkali- or Acid-Decomposition of Cycasin and Macrozamin⁸⁾

Kotaro NISHIDA, Akira KOBAYASHI, Tomonori NAGAHAMA and
Junko NAWATA

IX. Cleavage into Cycasin from Macrozamin⁹⁾

Kotaro NISHIDA, Tomonori NAGAHAMA and Tadao NUMATA

第二編 Neocycasins に関する研究

I. Neocycasin A の単離及びその構造*

西田 孝太郎・小林 昭・永浜 伴紀・沼田 忠男

ソテツ 種子抽出液について carbon column chromatography (carbon c. c.) 或いは paper

* 本研究の要旨は昭和 33 年 10 月 11 日日本農芸化学会西日本支部第 72 回例会(山口)にて講演し、また、大要を *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 460(1959) に掲載した。

chromatography (p. c.) を行い糖組成を詳細に検討したところ, **cycasin** と同一の発色性及び紫外外部吸収を示す一連の spots が認められたので, **cycasin** の他にも **azoxyglycosides** の存在が予想されるに至った. よつてまずその中で **cycasin** に次いで最も顕著な存在を示す **azoxyglycoside** について **carbon c.c.** によりその単離を試みた結果, 新配糖体を得て **neocycasin A** と命名, その構造を検討した.

実験及び結果

1. Neocycasin A の単離

この実験に用いたソテツ種子は, 1958年1月奄美大島名瀬市近郊で採取したものである. 抽出法は従来の **cycasin** 単離法¹⁾ を多少改変した.

種子 10kg を脱殻して得た仁 6.25kg を氷水と共に磨碎, 直ちに 0.2N 硫酸 5l 中に投入して酵素を失活させた後抽出を行つた (最終容積約 10l, pH 1). 残渣は 0.1N 硫酸 5l ずつを以てさらに 3 回繰返し抽出した. 抽出液を炭酸カルシウムにて中和 (pH 6.5) し, 濾液を 50°C 以下で減圧濃縮した後, 5 倍容 **methanol** による処理, また醋酸鉛の添加によつて沈澱する不純物をそれぞれ除去した. 硫化水素を通じて脱鉛, 減圧濃縮してシラップ 450 ml を得た. このシラップから配糖体を単離するため **carbon c.c.** を行つた.

活性炭 (武田製, 白鷺印) 300g を充填したガラス円筒 (径 5×42cm) に上記シラップを注ぎ, 水, 次いで 2, 5, 10, 40% **ethanol** を用いて順次溶出を行つた. 各 fraction に含まれる糖及び配糖

Table 1. Glycosides and Sugars in Each Eluate from the Carbon Column found by Paper Chromatography

Spots							<i>R_f</i>		colors revealed with reagents	
±	+	≡	≡	≡	+	R.			A.	
							.55	cycasin	y	—
≡	+						.46	fructose	rb	pb
						±	.40	A₁	y	—
≡	≡	+	+				.35	glucose	—	b
						+	.33	A₂(neocycasin A)	y	—
						+	.27	A₃	y	—
+	≡	+	+		±		.23	sucrose	rb	b
					≡	±	.20	A₄	y	—
				+	≡	+	.19	L(laminaribiose)	—	b
						±	±	tailing A_r	y	—
						+	.11		rb	—
		+					.10		—	b
						+	.07		rb	—
+						±	.00		rb	b
a	b	c	d	e	f	g	Eluates			

Filter Paper : Tōyō No. 2. Solvent : *n* BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 1).
 Development : multiple ascending (2 runs). Reagents : R, Resorcin-HCl EtOH soln. A, Aniline hydrogen phthalate BuOH soln.
 Eluates : a, with 4.7l H₂O. b, 6.4l followed after a. c, 7.2l after b. d, with 3.2l 2% EtOH. e, 4.0l 5% EtOH. f, 5.0l 10% EtOH. g, 4.0l 40% EtOH.
 Colors : b, brown. y, yellow. r, reddish. p, pale.

体は Table 1 に示す通りである。この中で spot A と仮称した spot 群は, *cycasin* と同様に *resorcin-HCl* 試薬で特異的に黄色を呈し, *azoxyglycosides* の spot 群と考えられるものである。

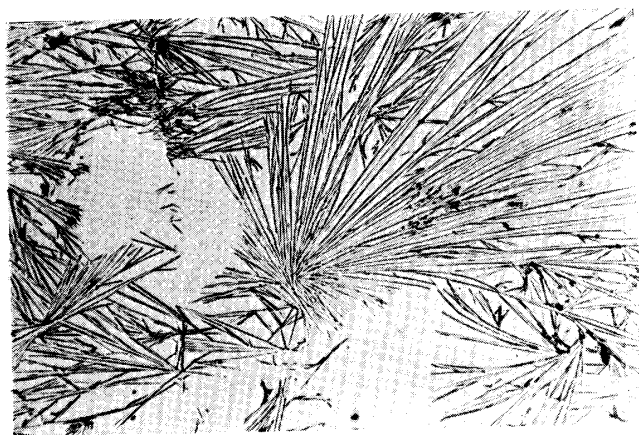


Fig. 1 Microphotograph of Neocycasin A

m. p. $162^{\circ}\sim 163^{\circ}\text{C}$ (decomp.), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35.1^{\circ}$ (c. 1.0, H_2O) で, 分析結果は次の通りである。

$\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{O}_{12}\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 計算値: C, 38.88%; H, 6.52%; N, 6.48%,

分析値: C, 38.59, 38.78%; H, 6.76, 6.55%; N, 6.31%.

水に易溶, 熱 ethanol, 熱 methylcellosolve 可溶, 醋酸エチル難溶, chloroform 不溶. Fehling 溶液を還元し, Molisch 反応陽性, anthrone 試薬により緑青色を呈し, アルカリ分解により cyan を生成する。

3. アセチル誘導体

neocycasin A 500mg を pyridine 10ml に溶かし, 無水醋酸 10ml を加えて 5 日間室温においた後, 常法の如く処理してアセチル化物を得た. ethanol より再結晶の結果, 長柱状品 540mg が得られた. (Fig. 2) m.p. $142^{\circ}\sim 143^{\circ}\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55.5^{\circ}$ (c. 1.0, CHCl_3) で分析結果は次の通りである。



Fig. 2 Microphotograph of Heptaacetylneocycasin A

$\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_{12}\text{N}_2 (\text{CH}_3\text{CO})_7$

計算値: C, 47.46%; H, 5.69%;

N, 3.95%,

分析値: C, 47.76%; H, 5.85%;

N, 4.35%.

分子量 計算値: 708, 分析値: 711 (Rast法)

CH_3CO 計算値: 7mol./mol.,

分析値: 6.8mol./mol.

heptaacetylneocycasin A 98mg を chloroform-methanol 3ml に溶解し, これに 0.5N Na-methylate 一滴を加えて 0°C で脱アセチルを行つた結果, neocycasin A 15mg を回収した. m. p. $162^{\circ}\sim 163^{\circ}\text{C}$ (decomp.) で標品と混融しても融点降下が認められなかつた。

4. 酸加水分解

(1) 完全分解 neocycasin A 97mg を 1N 塩酸 10ml を以て, 2.5 時間 100°C で加水分解の

40% ethanol fraction の spot A₂ は量的に *cycasin* に次ぐもので, またこの fraction には spot A₂ の他に共存物が比較的少ないので, これをそのまま減圧濃縮した. 得られたシラップを ethanol で処理, 氷室に放置して結晶をえ, これについて水, ethanol, また methylcellosolve などから再結晶を繰返した後, neocycasin A 1.6g を微針状品として得た. (Fig. 1)

2. Neocycasin A の性質

上記の如くして得られた neocycasin A は

後、減圧濃縮を繰り返して塩酸及び分解生成物の一つたる formaldehyde を除去し、HANES 法で糖を定量した。その結果 glucose として 81.3mg の値を得たが、これは neocycasin A 1mol. 当り glucose 2mol. に相当し、また p. c. によつて生成糖は glucose のみであることが判つた。さらに加水分解液から常法によつて調製した phenylosazone は黄色針状晶で、m. p. 203°~204°C(decomp.) を示し、glucose phenylosazone の標品と一致した。

(2) 部分分解 neocycasin A 40 mg を 0.2N 硫酸 10ml に溶かし、2 時間 100°C で加水分解し、炭酸バリウムを以て中和した後、p. c. によつて分解生成物を検索した。その結果未分解の neocycasin A の他に cycasin, glucose 及び未知の spot L が認められた。この spot L は aniline 試薬により aldose 様の発色を示し、また移動性が laminaribiose 及び nigerose の文献値¹⁰⁾と近似するので、多重展開を行つてこれら標品と比較の結果 laminaribiose と一致した。Fig. 3 にこれらの chromatogram を示す。

5. エムルシンによる分解 cycad emulsin²⁾ を acetate buffer (pH 4.6) 中 30°C で作用させ 29 時間後 p. c. で検した結果、neocycasin A は完全に分解されて glucose のみが認められた。この際対照の maltose は全く分解されなかつた。

6. Heptaacetyl neocycasin A より Octaacetyl- β -laminaribiose の調製

アセチル化物 250mg を chloroform 5ml に溶解し、2N Na-methylate 溶液 2ml を加えて室温に 1 時間おき、生じた沈澱を濾取、chloroform で洗滌した後、carbon c. c. (活性炭 40g, 径 1.8×25cm) を行つた。水 250 ml を用いて混在する少量の glucose を溶出、次いで 35% ethanol で laminaribiose を溶出した。laminaribiose のみを含むこの fraction を減圧濃縮し、無水磷酸上で減圧乾燥の後、白色粉末 65mg を得て、無水醋酸、醋酸ソーダと共に 110°~120°C に加熱し、アセチル化を行つた。生成したアセチル化物は始めシラップ状に得られたが、ethanol で処理、溶媒を減圧下溜去する操作を繰り返した後結晶化することが出来た。ethanol から再結し、針状晶 13mg が得られた。m. p. 159°~160°C. 分析結果は次の通りで octaacetyl- β -laminaribiose の文献値に一致する。

$C_{28}H_{38}O_{19}$ 計算値 : C, 49.56% ; H, 5.64%,

分析値 : C, 49.39% ; H, 5.70%.

上記アセチル化物の Na-methylate による分解に際し、laminaribiose を分離後の濾液について、

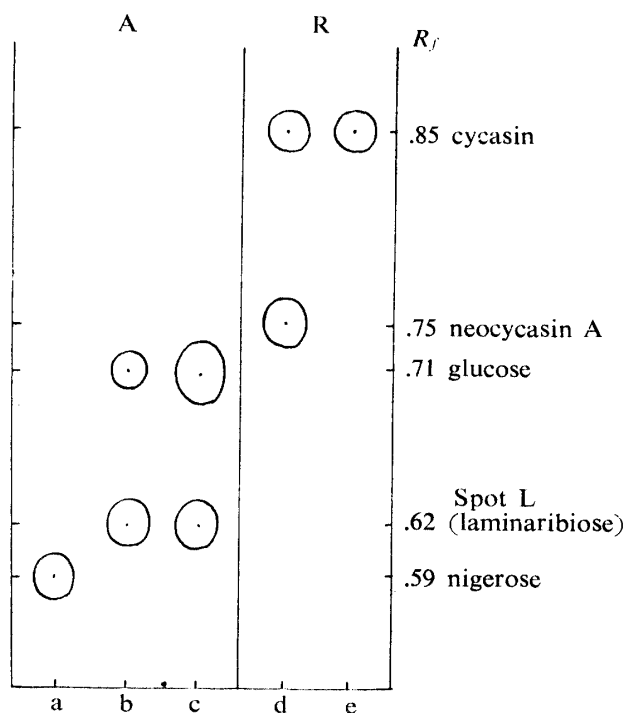


Fig. 3 Paper Chromatogram of the Partial Hydrolysate of Neocycasin A

a, b and e: specimens. c and d: the hydrolysate.

Reagents :- R : resorcin-HCl in aq. EtOH. Azoxyglycosides give yellow spots with this reagent. A : aniline hydrogen phthalate in aq. BuOH.

Development :- multiple ascending method (3 runs) with *n* BuOH-pyridine-H₂O (6 : 4 : 3).

formaldehyde 確認のため常法に従い dimedone 処理を行った。その結果、針状晶が得られ、その m. p. $183^{\circ}\sim 184^{\circ}\text{C}$ で formaldomedone に一致することを知り得た。

また prussian blue 生成反応、醋酸ベンチジン法の何れにおいても cyan が検出された。

7. 吸収スペクトル

neocycasin A の水溶液について、島津製分光光度計を用いて紫外部吸収スペクトルを測定した。 $\lambda_{max}=215m\mu$ ($\log \epsilon=3.89$), $\lambda_{inf}=274m\mu$ ($\log \epsilon=1.66$) の特徴ある吸収を示し、同時に対照として測定した cycasin の吸収曲線と同様のスペクトルを示した。(Fig. 4)

赤外部吸収は nujol にて paste として検した。その結果 Fig. 5 に示す如く、 1537cm^{-1} に特異的な吸収がみられ、azoxyglycosides の特徴をよく示しているが、 1640cm^{-1} 付近における吸収は cycasin については見られぬもので、これは結晶水に基因する。

考 察

ソテツ種子より azoxyglycosides を抽出する際、配糖体の酵素的分解を避けるため、従来仁を加熱処理して酵素の失活化を図っていた。しかし加熱法によると澱粉が糊化して濾過が極め

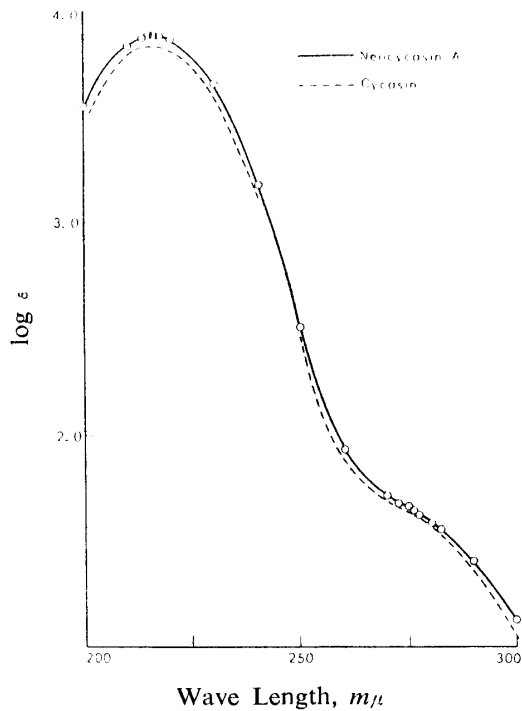


Fig. 4 Ultraviolet Absorption Spectra
Samples were examined as aqueous solution.

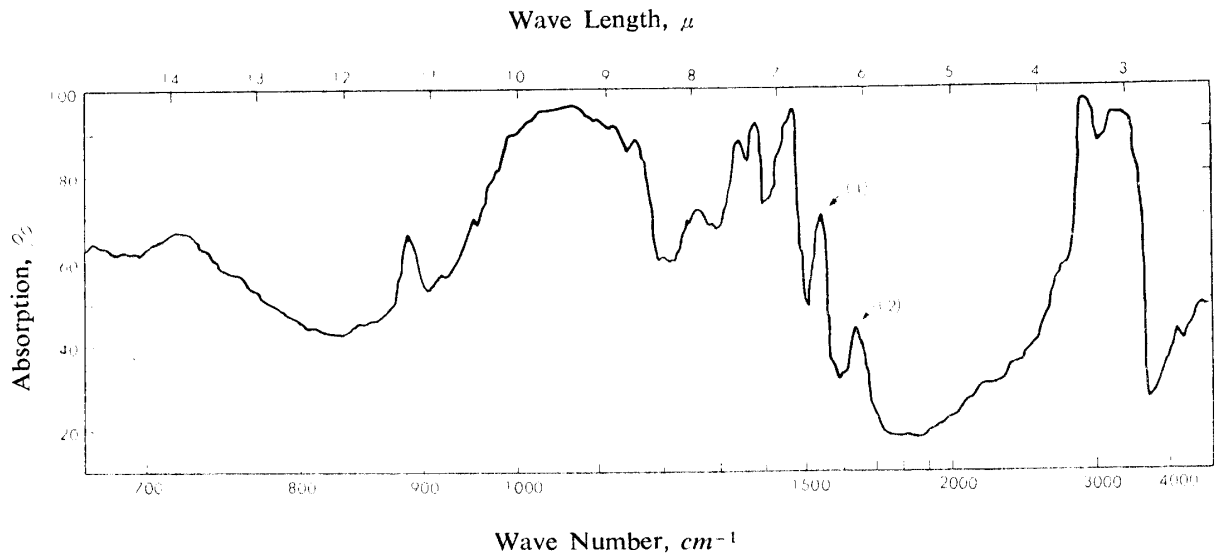


Fig. 5 Infrared Absorption Spectrum

Sample was examined as paste with nujol. The band (1) and (2) are due to the aliphatic azoxy group and the water of crystallization, respectively.

て困難なので、従来原料を一旦風乾粉末とした後抽出を行っていた。かかる操作上の難点と時間の損失をなくするため、本報では酸処理による酵素の失活化を行った。この抽出条件下では、**azoxyglycosides** は安定であり、しかも **cycad emulsin** は完全に失活し、配糖体抽出の目的に不利な点がないのでこのような酸処理法によつて、抽出操作を簡単にかつ迅速に行い得た。

neocycasin A は分析の結果 $C_{14}H_{26}O_{12}N_2 \cdot H_2O$ であつて、アセチル化により **heptaacetate** を得る。酸、**cycad emulsin** で加水分解され、**neocycasin A 1mol.** 当り **glucose 2mol.** を生成し、また部分水解によつて **cycasin, glucose** 及び **glucobiose** の生成が認められたので、その構造は β -**glucosyl cycasin** であることが強く暗示された。

紫外外部吸収スペクトルは $215m\mu$ に極大吸収、 $274m\mu$ に屈曲部があり、また赤外部吸収も $1537cm^{-1}$ に特異的吸収を示した。これらの吸収は、さきに報告¹⁾ した如く脂肪族 **azoxy** 構造に由来するものであり、かつアルカリ性で容易に分解されて **formaldehyde** 及び **cyan** を生成することから、**aglycone** は **hydroxyazoxymethane** であることが明らかである。

赤外部吸収スペクトルにおいて、**cycasin** と異り $1640cm^{-1}$ 附近にも吸収が見られる。糖のスペクトルにおけるこの附近の吸収は、結晶水に由来することが **S. A. BARKER** ら¹¹⁾ によつて報告されているので、**neocycasin A** の場合も結晶水に基因する吸収であると考えられ、このことは元素分析の結果によつても裏書きされた。

糖成分については、部分水解生成物の **glucobiose** が **laminaribiose** であることを標品と共に **p. c.** を行つて同定した。さらに **heptaacetyl neocycasin A** を **methanol** 中で **Na-methylate** によつて処理し、脱アセチルと同時に **aglycone** をも分解して糖成分 **laminaribiose** を遊離状に得た。ついで無水醋酸、醋酸ソーダにより再びアセチル化して **octaacetyl- β -laminaribiose** を結晶状に単離した。

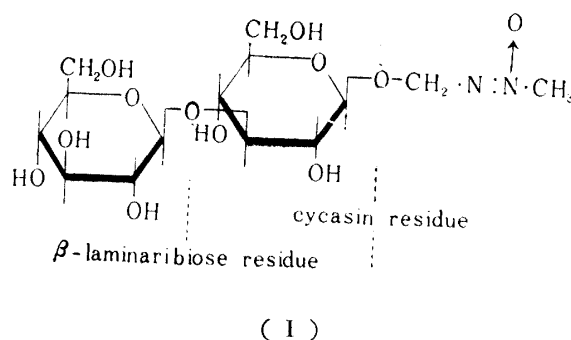
以上のことから **neocycasin A** は β -**laminaribiosyloxyazoxymethane** 即ち **3-O- β -D-glucosyl cycasin (I)** であることが結論される。

このように **laminaribiose** を糖成分とする配糖体の自然界における存在については、今日まで全く報告がない。遊離状の **laminaribiose** も同様であるが、このものは海藻多糖類 **laminarin** の分解生成物¹²⁾ として初めて見出され、その後ハイドロール中に **glucose** の酸逆合成物として、¹³⁾¹⁴⁾ 或いは **almond emulsin**,¹⁵⁾ **Asp. niger**

による糖縮合生成物¹⁶⁾ の一つとして見出されている。最近小野ら¹⁷⁾ は大麦を原料とするアミロ法もろみ中に **laminaribiose** を認めたが、これは大麦中の **polyglucosan** の分解に由来するものと考えられている。

しかしながら以上述べたような二次的生成が、ソテツ種子からの抽出単離過程において起つたとは考えられない。即ち使用した酸濃度は酵素を失活させるに充分であり、しかも酸による糖の重合が起るには余りに低い濃度である。そして種子を加熱処理の後抽出調製したシラップにも **neocycasin A** を始めとして他の **spot A** 群が認められるので、これらはソテツ種子中に本来存在する配糖体であることが明らかである。

従来、**cycasin** 単離に際してこれらの **spot A** 群を認め得なかつたのは、試料としたソテツ種子



の熟度等によつて配糖体と他の糖との量的関係が異なり、**p. c.** に際し、多量の糖の **spot** と重なつて検出されず、あるいは **carbon c. c.** において活性炭による被吸着性が強いいため、溶出し得なかつたものであろう。

要 約

日本産ソテツの種子中に、**cycasin** の他にも、これと同様 **hydroxyazoxymethane** を **aglycone** とする一連の配糖体の存在が検知されたので、**carbon c. c.** によつてこれらの分離を行い、その中の一つを結晶状に得た。構成糖、分解生成物、紫外部及び赤外部吸収スペクトル等を検討した結果このものは **β -laminaribiosyloxyazoxymethane** 即ち **3-O- β -D-glucopyranosyl cycasin** であることを確かめて **neocycasin A** と命名した。自然界に **laminaribiose** を糖成分とする配糖体を見出したのはこれが最初である。

II. Neocycasin B 及び Macrozamin*

永浜 伴紀・沼田 忠男・西田 孝太郎

前報¹⁸⁾において、日本産ソテツ種子中、**cycasin** の外にも一連の **azoxyglycosides** が存在することを検知して、その中の一つ **neocycasin A**, **β -laminaribiosyloxyazoxymethane** を単離した。

これに引続き本報では、残余の **azoxyglycosides** の中 **A₃** 及び **A₄** の分離を行つた後、これらを単一成分として得た。構造検討の結果、**A₄** は **β -gentiobiosyloxyazoxymethane** であり、**neocycasin B** と命名した。また **A₃** は **β -primeverosyloxyazoxymethane** であつて、さきに濠州産ソテツから単離、構造を決定された **macrozamin**¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾ 標品と同定した。

実験及び結果

1. Azoxyglycoside A₃ 及び A₄ の分離

前報に記載したソテツ種子仁 (6.25 kg) 抽出液の **carbon c. c.** における 10% ethanol 溶出区分を減圧濃縮した。得られたシラップは **azoxyglycoside A₃** 及び **A₄** の外に多くの糖を含むので、これについてさらに **chromatography** を行つた。まず **carbon column** (活性炭 70g, 径 3.7×40 cm) に上記シラップを注加し、以後 **methanol** の濃度を連続的に高めながら **gradient elution**²²⁾ を行い、溶出液 100ml ずつについてその糖組成を **p. c.** によつて検した。**methanol** の濃度変化に伴う各糖及び配糖体の溶出状況は **Fig. 1** に示す通りである。即ち **fraction No. 73~94** に **A₃** 及び **A₄** が溶出されるが低 **R_f** 値を有する **ketose** 系あるいは **aldose** 系のオリゴ糖と、痕跡程度ではあるが **neocycasin A** が混在しており、分離の目的を充分達し得なかつた。そこで、この区分について **cellulose c. c.** (粉末濾紙 80g; 径 1.7×55 cm) を行つた。展開溶剤としては **n butanol-ethanol-水 (5:2:1)** を用い、溶出液 10ml ずつを分割採取し、各 **fraction** の組成を **p. c.** によつて検索した。**fraction No. 41~51** に **neocycasin A**, **No. 55~70** に **A₃**, また **No. 82~120** に **A₄** がそれぞれ単一成分として溶出され、オリゴ糖ともよく分離出来た。**A₃** あるいは **A₄** を含む **fraction**

* 本研究の要旨は昭和 34 年 4 月 9 日日本農芸化学会大会 (東京) にて講演し、*Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 23, 556(1959) に速報した。

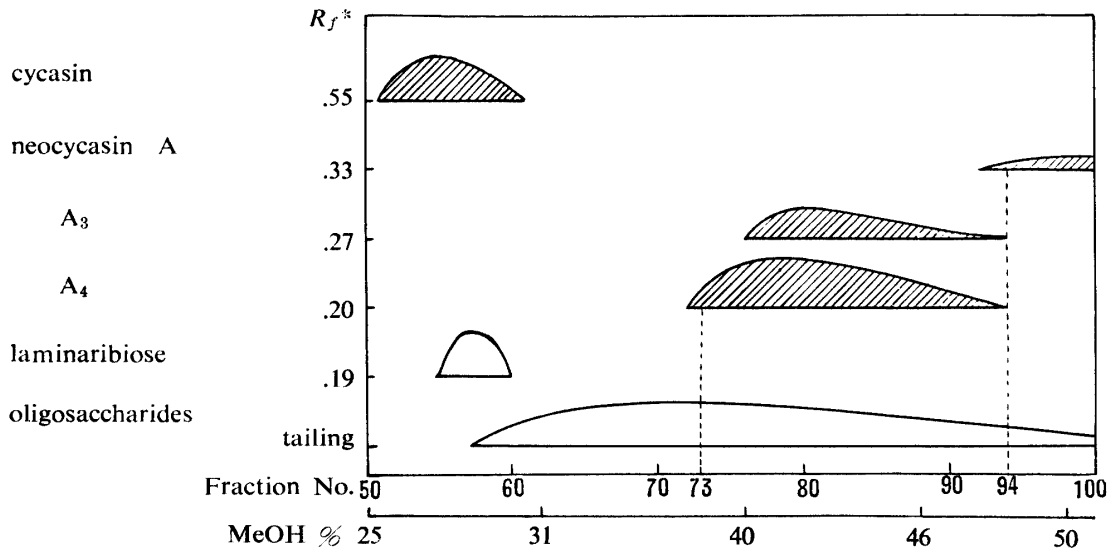


Fig. 1 Fractionation of Azoxyglycosides by Gradient Elution from Carbon Column

*It is R_f values in double development with a mixture of n BuOH-AcOH- H_2O (4:1:1).

The areas under the curves representing each component are roughly proportional to the quantities present as inferred from the intensity and size of the chromatogram spots.

Shaded areas represent azoxyglycosides.

The fractions, from No. 73 to 94, were combined and were successively rechromatographed on cellulose column for effective separation of each component.

はそれぞれ合して濃縮，前者はシラップのまま諸実験に供した。後者即ち neocycasin B は ethanol-ether 等から結晶化を試みたが結晶は得られず，シラップを硫酸デシケーター中で乾燥して吸湿性粉末 150mg を得た。 $[\alpha]_D^{19} = -37.6^\circ$ (c. 1.0, H_2O)。

両者何れも p. c. において単一の spot を示し，アルカリにより分解され cyan を生成する。

2. Neocycasin B

(1) 紫外部吸収スペクトル 水溶液として測定した。 $\lambda_{max} = 215 m\mu$ ($\log \epsilon = 3.81$), $\lambda_{infl} = 275 m\mu$ ($\log \epsilon = 1.56$) で azoxyglycoside の特徴を示した。

(2) アセチル化 neocycasin B 50mg を pyridine 1.5ml 中で無水醋酸 1.5ml と共に室温に4日間放置してアセチル化した。反応液を氷水 7ml 中に投入，攪拌するうちに結晶性物質が生成したので濾取，水洗の後，熱 50% methanol より再結して長柱状晶 53mg を得た。(Fig. 2) m. p. $173^\circ \sim 174^\circ C$, $[\alpha]_D^{20} = -29.4^\circ$ (c. 0.3, $CHCl_3$) で分析値は次の通りである。



計算値: C, 46.28%; H, 5.83%; N, 3.86%,

分析値: C, 46.04%; H, 5.70%; N, 4.06%.

分子量

計算値: 726, 分析値: 705 (Rast micro 法)

CH_3CO

計算値: 7mol./mol., 分析値: 7.07mol./mol.

アセチル化物 5mg を chloroform-methanol

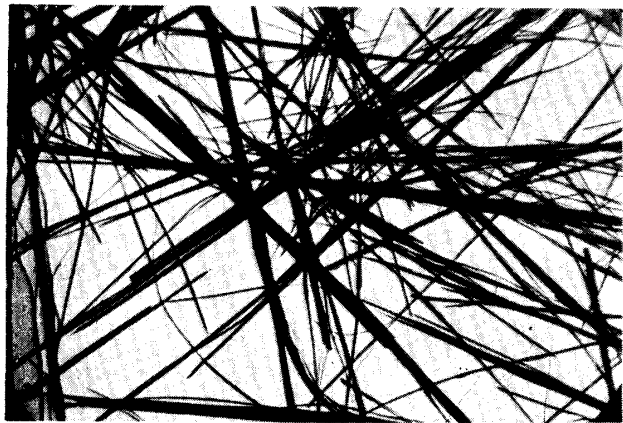


Fig. 2 Microphotograph of Heptaacetylneocycasin B

混液 0.2ml に溶解し, 0.5N Na-methylate 一滴を加えて氷室に一夜おき脱アセチルした. 生じた沈澱を濾取, これについて p. c. を行い, neocycasin B が回収されたことを確かめた.

(3) 酸及び emulsin による分解 試料 5mg を 1N 塩酸 0.6 ml で 100°C, 2 時間加水分解後繰返し減圧濃縮を行つて, aglycone の分解に由来する formaldehyde を除去し, HANES 法によつて糖を定量した. glucose として 1.94mol./mol. であつた.

同時に行つた同様の加水分解液について糖組成を検したところ, glucose の spot のみが認められ, さらに glucosazone としても同定した. また, 溜出液を dimedone で処理して針状晶を得た. m. p. 185°~186°C で formaldomedone 標品と混融して融点降下が認められず, formaldehyde の存在が確かめられた. 0.2N 硫酸による 100°C, 1 時間の部分水解においては cycasin, glucose, gentiobiose の生成がみられた (Fig. 3a). また, cycad emulsin による分解過程でも同様な生成物が検知された. 従つて neocycasin B は 6-O-β-glucosylcycasin と考えられた.

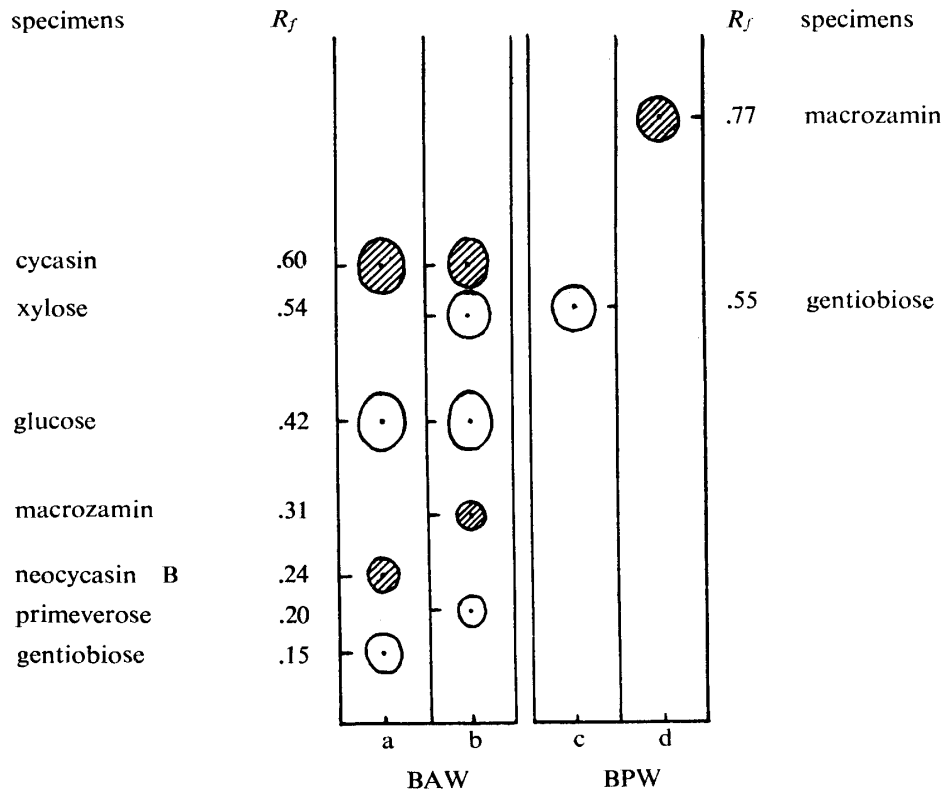


Fig. 3 Paper Chromatograms of Neocycasin B, Macrozamin and their Degradation Products
Samples:— a and b, partial acid hydrolysates of neocycasin B and A₃ respectively. c, sugar component liberated from neocycasin B. d, the syrup of A₃.

Development:— BAW, ascended 3 times with *n* BuOH-AcOH-H₂O(4:1:1).

BPW, ascended 5 times with *n* BuOH-Pyridine-H₂O(6:4:3).

Shaded spots represent those of azoxyglycosides located with resorcin-HCl reagent, and unshaded spots aldoses with aniline hydrogen phthalate one.

(4) 糖成分の確認 試料 50mg を 50% 醋酸 2ml に溶かし, 微量の硫酸銅を加えて, 沸騰水浴中で加熱しつつ, 亜鉛末 200mg を徐々に投入し, 3 時間反応を続けた. この様な処理によれば aglycone だけ分解されて糖成分を遊離状に得られるからである. 反応液を濾過, 濃縮の後, 得られた残渣について糖成分を検討し, p. c. によつて gentiobiose 標品と比較同定した (Fig. 3c).

また pyridine と無水醋酸によつてアセチル化の後、生成物を ethanol から再結して針状晶 38 mg を得た。m. p. 187°~188°C で、octaacetyl- α -gentiobiose に一致した。

3. Macrozamin

cellulose c. c. における fraction No. 55~70 から得たシラップについて、N. V. RIGGS 博士より贈与された macrozamin 標品と対照して同定を行つた。両者の p. c. による比較の結果は Fig. 3d に示した。また前記同様の条件で部分水解した結果、Fig. 3b に示すように、cycasin, glucose 及び primeverose の生成が認められた。紫外部吸収スペクトルは $\lambda_{max}=216m\mu$, $\lambda_{infl}=275m\mu$ で、macrozamin 標品と同じ特徴を示した。

検 討

carbon c. c. における 10% ethanol 溶出区分に、neocycasin B 及び macrozamin が他のオリゴ糖と共存したので、これらの分離のため水-methanol 系を溶出剤として gradient elution 法により carbon c. c. を行つた。共存糖の一部はこれにより除かれたが、この両 azoxyglycosides 及びオリゴ糖それぞれの分離には効果を上げ得なかつた。cellulose c. c. によるこれらの分離にあつては、展開溶媒を種々検討して、この場合 *n* butanol-ethanol-水 (5:2:1) が最も適当であることを知り、これによつて分離を行つた結果、macrozamin と neocycasin B をそれぞれ単一成分に分離出来た。

neocycasin B は収量少く、結晶化するに至らなかつたが、アセチル化物を結晶状に得て諸恒数を定めた。neocycasin B は酸及び emulsin による分解過程において cycasin, glucose, gentiobiose を生成し、完全分解の後 glucose を生成する。従つて 6-O- β -glucosylcycasin と考えられ、このことは glucose の定量値が 1.94mol./mol. であることから裏付けられる。これらのことに加えて、亜鉛-醋酸処理により aglycone を分解し、遊離された糖成分を p. c. により gentiobiose と同定すると共に、アセチル化物として単離し、それが octaacetyl- α -gentiobiose であることを確めた。neocycasin B の紫外部吸収スペクトルは azoxyglycoside の特徴を示している。これらの結果から neocycasin B は β -gentiobiosyloxyazoxymethane であることが明らかである。

一方 A₃ については、macrozamin 標品と p. c. によつて比較同定し、さらに酸部分水解産物の検討及び紫外部吸収スペクトルによつてこのことを確かめた。macrozamin は濠州産ソテツ *Macrozamia* 属、*Bowenia* 属等に広く存在する azoxyglycoside で、*Cycas media* の種子からも単離されている。²³⁾本報において日本産ソテツ *Cycas revoluta* にも macrozamin の存在が認められたが、含量極めて少く、主要な配糖体は cycasin であり、種属によつて、含有される azoxyglycosides に明らかな差がみられる。

要 約

日本産ソテツの種子に含まれる azoxyglycosides の中、neocycasin A の単離に引続き新たに 2 種を単離した。その中の一つ neocycasin B はアセチル誘導体の分析、及び分解生成物、紫外部吸収スペクトルの検討により β -gentiobiosyloxyazoxymethane であることを確かめた。また他の一つは、p. c. によつて、濠州産ソテツから得られた macrozamin 標品と比較同定し、さらに吸収スペクトル、分解生成物の検討によりこれを確かめ、日本産ソテツにも僅かながら macrozamin (β -primeverosyloxyazoxymethane) の存在することを知つた。

III. Cycad Emulsin による Azoxyglycosides 間の相互変換*

永浜 伴紀・西田孝太郎・沼田 忠男

前報¹⁸⁾²⁴⁾までに述べた如く、日本産ソテツには **cycasin** を出発母体として一連の **azoxyglycosides** が存在するが、このように同一植物組織中に **aglycone** を同じくする配糖体が多数存在することは、酵素糖転移の問題と関連して興味あることである。そして **azoxyglycosides** が酵素的相互変換関係にあると考えられたので、本報においては、このような関係を明らかにするため、**cycad emulsin** による **neocycasin A, B** の分解過程、及び **cycasin** を基質とする糖転移反応について検討した。また、糖転移反応において、 β -1, 3 **glucoside** 結合の生成が特に顕著であることから **cycad emulsin** の特異性について予見を得た。

実験及び結果

本実験に用いた **cycad emulsin** は、既報²⁾に準じてソテツ種子からタンニン酸沈澱法により調製したものである。反応過程の追跡あるいは反応生成物の検出、確認は主として **paper chromatography** (p. c.) によつた。展開溶媒としては *n* butanol-醋酸-水 (4:1:1) (BAW) を用いて多重展開を行い、その他目的に応じて *n* butanol-pyridine-水 (6:4:3) (BPW), *n* butanol-ethanol-水-pyridine (5:2:1:1) (BEWP) を用いた。

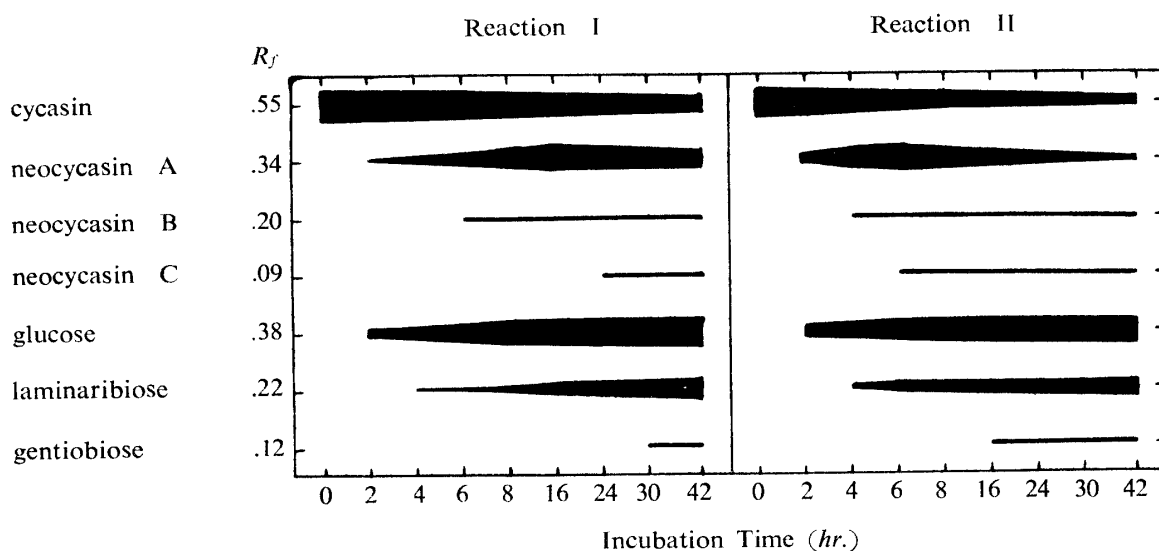


Fig. 1 Paper Chromatogram showing the Fate of Carbohydrates during the Course of Interconversion between the Azoxyglycosides by Cycad Emulsin
Development:— multiple ascending method (3 runs) with a mixture of *n* BuOH-AcOH-H₂O (4:1:1).

Reaction I, with 2mg of cycad emulsin, and Reaction II, with 4 mg of it. The other conditions of reaction were described in text. The widths of solids representing each product in time course are roughly proportional to the intensity and size of the chromatogram spots.

* 本報告の要旨は *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 24, 322(1960) に速報した。なお、この研究は一部、著者の1人西田が受けた文部省科学研究費を以つて行つた。

1. Neocycasin A および B より Cycasin への減成

neocycasin A 20mg (最終濃度 0.05M), 酵素標品 2.5 mg, acetate buffer (pH 4.6) 1ml の組成液を 30°C にて反応させた. 2 時間の後, 生成物を p. c. にて検した. neocycasin B については上記の 1/10 の規模で反応を行つた. その結果, 何れも cycasin の生成が認められ, また未分解配糖体, glucose 及びそれぞれの糖成分即ち laminaribiose あるいは gentiobiose が検出された.

2. 糖転移反応

反応の組成液は 0.25M cycasin 溶液 1.5 ml, N/10 acetate buffer (pH 5.6) 1ml, 酵素標品 2mg (反応 I) 及び 4mg (反応 II) で toluene 存在下 30°C で反応を行つた. 反応過程追跡のため, 適時採取した各試料は, 加熱処理の後, 一定量について p. c. を行い, 反応生成物の spot の呈色度, 大きさからそれらの量的消長を推測した. その結果は Fig. 1 に示す通りである. 即ち, 酵素量の異なる両反応 I, II 何れの場合も, cycasin が分解するにつれて neocycasin A 及び laminaribiose が主要産物として生成し, 次いで neocycasin B 及び gentiobiose もわずかに生成するに至つた. 反応の推移は酵素量の多少によつて可成り相異し, neocycasin A の最大集積がみられるのは反応 I において 16 時間, 反応 II では 6 時間前後であつた.

neocycasin A は最大集積期を経て次第に分解されるが, これに前後して新しく azoxyglycoside, neocycasin C の生成も認められた.

3. 転移反応生成物の分離確認

この目的のために, 反応 I に準じて, 0.25M cycasin 溶液 6ml, N/10 acetate buffer (pH 5.6) 4ml, 酵素標品 8mg の組成液を, toluene 存在下 30°C に 30 時間保つた.

反応液は加熱処理, 濾過した後, carbon column (活性炭 40g, 径 3.0×27.0cm) に注加, 水, 次いで 10, 15, 30, 40% の ethanol で順次溶出, 溶出液 50ml 宛を分割採取して組成を p. c. にて検索した. 各 fraction の組成は Table 1 に示す通りである. 同じ組成の fraction ごとにそれぞれまとめた後, 混合成分を含むものについては, 濃縮後の試料を, 予め洗滌した濾紙 (東洋濾紙 No. 2) の原線に帯状に塗布して p. c. を行い分離を図つた. 使用した展開溶媒は fraction No. 51~54, No. 60, No. 66~67 については BAW, また laminaribiose と neocycasin B が混在する

Table 1. Separation of the Reaction Products by Carbon Column Chromatography

EtOH %, for Elution	Fraction No.	Components
0 (water)	1 ~ 39	glucose
10	40 ~ 45	glucose
	46 ~ 50	gentiobiose
15	51 ~ 54	cycasin, laminaribiose
	55 ~ 59	cycasin, laminaribiose, neocycasin B
30	60	neocycasin A, neocycasin B
	61 ~ 65	neocycasin A
	66 ~ 67	neocycasin A, neocycasin C
40	68 ~ 71	neocycasin C

fraction No. 55~59 については BEWP を用いて、それぞれ 2 乃至 3 回の多重展開を行つた後、常法の如く濾紙上の相当部分を切取つて水で溶出した。同じ物質の溶出液を合して減圧濃縮、硫酸デシケーター中で減圧乾燥して粉末とした。これらの反応生成物は何れも p. c. によつてそれぞれの標品と比較同定し、さらに以下のようにして確認した。

(1) neocycasin A (33.2mg) 試料 5mg を 0.2N 硫酸 1.25 ml をもつて 100°C で 90 分間加水分解し、炭酸バリウムで脱酸後、p. c. (BPW 2 回) にて、部分分解生成物 cycasin, glucose, laminaribiose を検出した。また、試料 28mg を pyridine 及び無水醋酸で室温にて処理、得られたアセチル化物を ethanol から再結して針状晶 27.2mg を得た。m. p. 141.5°~143°C で heptaacetyl neocycasin A の標品と混融しても融点降下を示さない。

(2) laminaribiose (11.3mg) cycad emulsin により分解されて glucose の生成がみられる。また試料 10mg を、pyridine, 醋酸ソーダを助剤として無水醋酸によりアセチル化を行つた。生成物を ethanol-petroleum ether から再結してプリズム晶 4mg を得た。m. p. 165°~166°C (micro hot plate) で octaacetyl-β-laminaribiose 標品と混融しても融点降下を示さない。

(3) neocycasin B (3.5mg) 試料 3mg を 0.2N 硫酸 0.6 ml で前記同様に部分加水分解して、cycasin, glucose, gentiobiose が生成することを確かめた (p. c.; BEWP 3 回)。

(4) gentiobiose (1.9mg) 1N 塩酸による 100°C, 90 分の加水分解により glucose が生成した。

(5) neocycasin C (2.4mg) p. c. における発色性、また、アルカリ分解により cyan を生成することから azoxyglycosides の一つであつて、前記同様の酸部分加水分解によつて cycasin, neocycasin A, glucose, laminaribiose の外オリゴ糖の生成が認められた。(p. c.; BPW, 3 回)。従つて、neocycasin C は glycosylneocycasin A であることが推定されたが、試料量に制約されて構造決定に至らなかつた。なお、この neocycasin C は、別報²⁶⁾におけるソテツ抽出液の paper chromatogram において A₆ として表わした spot と近似した R_F 値を示す。

検 討

cycad emulsin による neocycasin A 及び B の分解過程において、これらの bioside から cycasin

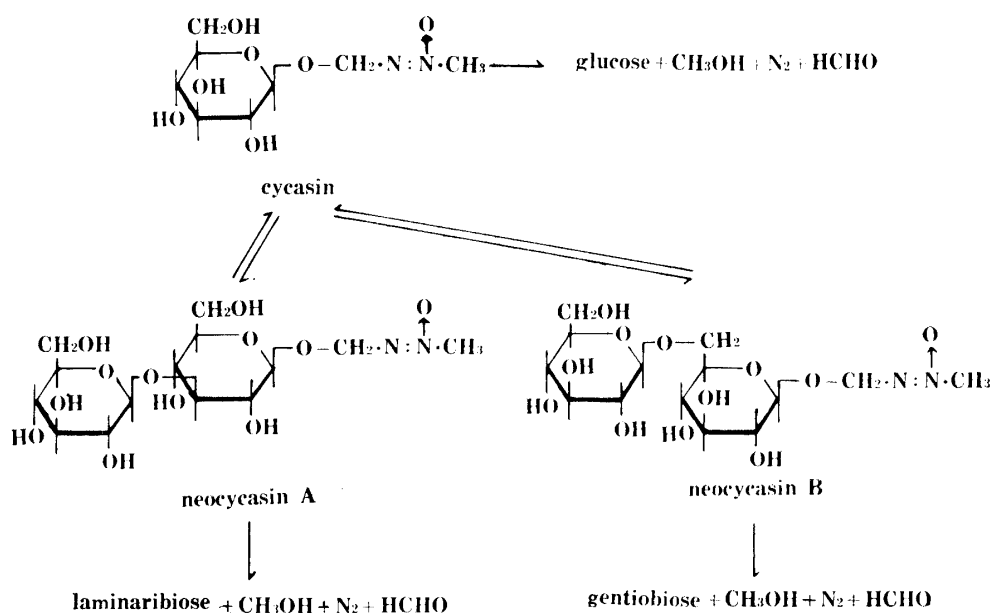


Fig. 2 Interconversion between Cycasin and Neocycasin A or B by Cycad Emulsin

が減成された。一方 *cycasin* を基質とする糖転移反応においては、*neocycasin A* 及び *B* が生成されて、これら三者間の相互関係が明らかになった。Fig. 2 にこれらの関係を示す。

glycosidase による糖転移に関しては従来数多くの成果が報告されている。酵素による基質の加水分解の進行と同時に、一方では、基質から遊離された *glycosyl* 基が基質自体、あるいは水解生成物を受容体として転移し、新しく *glycoside* 結合が形成される。また、反応系に加えた糖や *alcohol* が *glycosyl* 基を受容体となる場合も知られている。 β -*glucosyl* 基転移については次のような報告がある。鈴木²⁷⁾ は起源を異にする β -*glucosidase* についての糖転移における受容体特異性を報告したが、その中で、稲穂より調製した酵素標品を *p-nitrophenylglucoside* に作用させて、*gentiobioside*, *cellobioside* の生成を認めた。S. A. BARKER,²⁸⁾ K. V. GIRI²⁹⁾ らは *Aspergillus niger*, あるいは *A. flavus* から得た酵素標品によつて *cellobiose* から *gentiobiose*, *cellotriose* 及び β -1, 6, 1, 4 両結合を含むオリゴ糖が生成されることを報告している。他方*, T. K. WALKER³⁰⁾³¹⁾ 等は *acetobactor* の *glucose* 培地から、*cellobiose* の他一連の *cellodextrins*, あるいはまた、種によつては *gentiobiose* の外 *sophorose* も見出した。これらの報告の中で *laminaribiose* が認められた例もあるが、主要生成物は β -1, 6 あるいは β -1, 4 結合糖である。

cycad emulsin による糖転移においては、*neocycasin A* 及び *laminaribiose* の生成が極めて顕著で、*cycasin* の分解に伴う β -*glucosyl* 基の転移に際し、 β -1, 3 *glucoside* 結合が他に優先して生成されることを示すものである。反応の進行と共に *neocycasin A* が蓄積するが、ある時期を過ぎると次第に減少するに至る。この前後から *neocycasin C* 即ち *glycosyl neocycasin A* の生成が検知される。*neocycasin B* も生成されるが量的に少く、また反応進行に伴う増加はないようである。

このような *cycad emulsin* による β -1, 3 *glucoside* 結合の優先的生成は、ソテツ中に *neocycasin A* の如き、*laminaribiose* を糖成分とする配糖体が存在することとも考え合せ注目すべきことである。

糖転移に関する知見は生体内でのオリゴ糖生成の機作に関連するものと考えられ、本報において得られた知見もまた、*azoxyglycosides* の生合成機作の一端を知る上の示唆となるものであろう。

要 約

glycosidase の糖転移に関する知見にもとづいて、ソテツの *azoxyglycosides*, 即ち *cycasin* (β -*glucosyloxyazoxymethane*), *neocycasin A* (3-O- β -*glucosylcycasin*), *neocycasin B* (6-O- β -*glucosylcycasin*) 三者間の相互変換関係を検討した。その結果、*cycad emulsin* による *neocycasin A* 及び *B* の分解過程において、*cycasin* が生成することを確かめる一方、*cycasin* を基質とする糖転移反応においては、*neocycasin A* 及び *B* が生成されることを知り、これら転移生成物をそれぞれ単離証明して相互変換関係を明らかにした。

この転移反応において、*neocycasin A* の生成が特に著しい。このような β -1, 3 *glucoside* 結合の特異的生成は、従来の糖転移に関する報告に殆んど例のないことである。

また、転移反応生成物の一つとして、新たに *glycosyl neocycasin A* と推定される *neocycasin C* をも見出し、さらに広く *azoxyglycosides* 相互間に変換関係のあることを予知した。

* この場合、糖転移によるものか、糖縮合によるものかその反応機構は明らかでない。

IV. 酵素的糖転移反応による Neocycasin C の生成及びその構造*

永浜 伴紀・西田孝太郎・沼田 忠男

cycad emulsin による糖転移反応において、基質とした cycasin より、bioside である neocycasin A 及び B が生成されることは前報³²⁾で述べたとおりである。その際、さらに反応が進行するに従い、新たな azoxyglycoside, neocycasin C も生成され、その構造についての予備試験から、neocycasin C は glycosyl neocycasin A であることが推定されたので、neocycasin A にさらに糖転移が行なわれて生成したものと考えられた。

本報においては、neocycasin A を基質として cycad emulsin による糖転移反応について検討した。そして neocycasin C の生成を確かめ、その構造が β -laminaritetraosyloxymethane であることを明らかにすると共に、ソテツにも neocycasin C の存在することを知った。

実験及び結果

cycad emulsin²⁾ は前報³²⁾同様、ソテツ種子からタンニン酸沈澱法によつて調製したものである。諸反応生成物の検出、確認等は主として paper chromatography (p. c.)^{**}によつた。

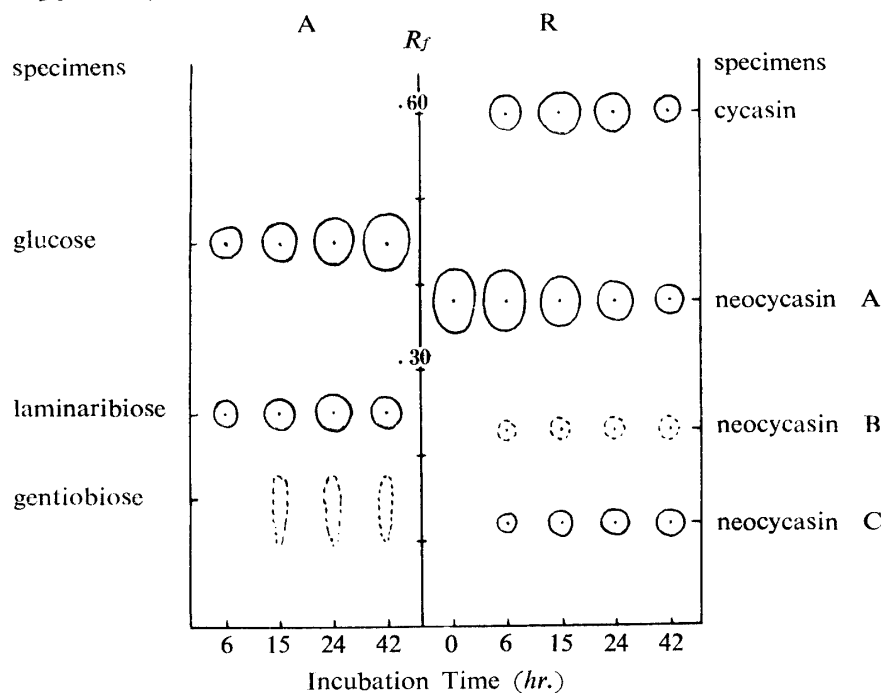


Fig. 1 Paper Chromatogram showing Formation of the transfer Products from Neocycasin A by Cycad Emulsin.

Development:— Multiple ascending method (3 runs) with a mixture of *n* BuOH-AcOH-H₂O(4:1:1).

Reagents:— R, resorcin HCl in aq. EtOH. A, aniline hydrogen phthalate in aq. BuOH.

* 本報告の要旨は昭和 35 年 4 月 6 日日本農芸化学会大会 (東京) にて講演し, *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 536 (1960) に速報した。なお、本研究は一部、著者の 1 人西田が受けた文部省科学研究費を以つて行つた。

** 展開溶媒

BAW : *n* butanol-醋酸-水(4:1:1)

BPW : *n* butanol-pyridine-水(6:4:3)

BEWP : *n* butanol-ethanol-水-pyridine (5:2:1:1)

1. 酵素反応

転移反応の過程をみるため次の反応を行つた。反応液組成は、0.125 M neocycasin A 溶液 0.5 ml, N/10 acetate buffer (pH 5.6) 0.3ml, 酵素標品 0.7 mg で、neocycasin A の最終濃度は 0.075 M である。toluene の存在下 30°C で反応を行い、適時試料 0.1ml 宛採取して加熱処理後 p. c. を行つた。その結果は Fig. 1 に示す通りで、反応初期から neocycasin A の分解生成物 cycasin, glucose, laminaribiose が認められ、何れも時間と共に増加し、cycasin はやがて減少してくる。転移生成物としては、反応開始後 6 時間において neocycasin C の生成が認められ、その後次第に増加するようである。反応の進行に伴い、neocycasin B 及びオリゴ糖の生成も認められたが、42 時間の反応を通じて主要な転移生成物は neocycasin C であつた。

2. 反応生成物の分離及び同定

0.125M neocycasin A 溶液 9ml, N/10 acetate buffer (pH 5.6) 6ml, 酵素標品 12mg の組成液を toluene の存在下 30°C で反応させ、24 時間の後加熱処理して反応を停止せしめた。

反応生成物の分離のために、この反応濾液について carbon c. c. [活性炭-celite (2:1) 60g, 径 4.0×18.0 cm] を行つた。水、次いで 5, 15, 20, 25, 30, 40 % の各濃度の ethanol で順次溶出し、溶出液は 500ml 宛分割採取した。溶出液は組成に応じて合一して、六つの group に分け、それぞれ

Table 1. Separation of the Reaction Products by Carbon Column Chromatography

Products	Group No.										Yield mg
	I		II		III	IV	V	VI			
	EtOH % for Elution										
	0	5	15	20	25	30	40				
	Volume of Eluate										
	2	4	6	8	9	10/					
cycasin			≡	≡	+						45.9
unaffected neocycasin A						≡	≡	≡	+		—
glucose	≡	≡	+	+	+						136.8
laminaribiose			+	≡	≡	+	+	+	±		50.6
neocycasin B						+					1.3
x				+							1.1
y (laminari- triose)								+			1.9
gentiobiose				+							1.1
z (laminari- tetraose)								+			1.5
neocycasin C										+	9.1

Separation of the products was completed by preparative paper chromatography of the respective Groups, and the each product was obtained in the presented yield. For details see text.

の濃縮液を、予め 10% ethanol で洗滌した濾紙（東洋濾紙：No. 131）の原線に帯状に塗布して、**p. c.** による分離、あるいは精製を図つた。これらの結果を総合して **Table 1** に示した。その中で **Group II** は最初 **BAW** にて 2 回の多重展開を行つた。laminaribiose の多量の存在のため gentiobiose の分離が思わしくなく、濾紙上の相当部分を切取つて溶出後、再び同様に濾紙に塗布、**BPW** にて 3 回展開して、それぞれ laminaribiose, gentiobiose 及び未知糖 *x* を単一成分に分離した。**Group IV** についても、**BAW** による 3 回の展開で分離出来なかつた未知糖 *y*, *z* は、同様にして **BPW** により 5 回展開の後、分離出来た。**Group III** は **BEWP**, また **V** 及び **VI** は **BPW** による 2 回の展開を行つた。このようにして、濾紙上で単一成分に分離された各反応生成物は、それぞれ相当部を切り取り溶出後、減圧濃縮し、凍結乾燥して粉末とした。これらは何れも、**p. c.** にて単一 spot を示し、既知物質についてはそれぞれの標品と同定した。

cycasin 及び laminaribiose は、常法に準じてアセチル化を行つた。得られたアセチル化物はそれぞれ *m. p.* 134.5°~135°C 及び *m. p.* 155°~156°C で、heptaacetylcycasin 及び octaacetyl-β-laminaribiose の標品と混融して融点降下を認めなかつた。

3. 反応生成物 *x*, *y*, *z*

酵素反応液から分離された未知糖 *x*, *y*, *z* の試料各 1mg を 0.2 N 硫酸 0.15 ml にて 1 時間 100°C で部分水解後炭酸バリウムで中和して、**p. c.** により生成物を検した。Fig. 2a に示す如く、*y* は

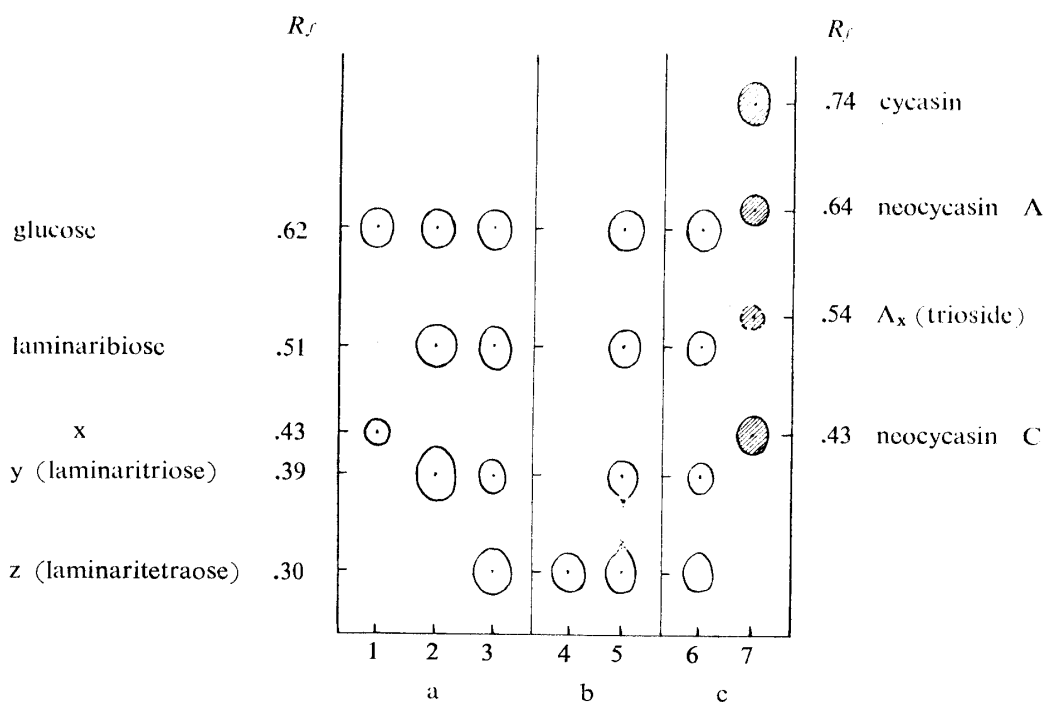


Fig. 2 Paper Chromatogram of the Partial Acid Hydrolysates of Neocycasin C and Product *x*, *y* and *z*.

Sample:— a: 1, the hydrolysate of *x*, 2, of *y* and 3, of *z*.

b: 4, sugar component of neocycasin C and 5, hydrolysate of 4.

c: the hydrolysate of neocycasin C. 6, located with aniline hydrogen phthalate reagent for aldoses and 7, with resorcin HCl one for azoxyglycosides.

Development:— multiple ascending method (3 runs) with a mixture of *n* BuOH-Pyridine-H₂O (6:4:3). Filter paper, Tōyō No. 131.

laminaribiose, glucose を, また, z は, y に相当する spot 及び laminaribiose, glucose を生成した. この結果から, y は laminaritriose であり, 従つて z は laminaritetraose であると考えられた.

同一結合様式をもつ biose, triose 等, 一連のオリゴ糖の間では, 各糖の重合度と $\log [R_f/(1-R_f)]$ 値に関して直線関係が成立することが云われている.³⁸⁾ そこで, 部分水解の結果からそれぞれ laminari-triose, -tetraose と考えられる y と z , 及び glucose, laminaribiose についてこの関係を求めると, Fig. 3 に示すようによく直線関係が成立し, 前記の結論が裏付けられた.

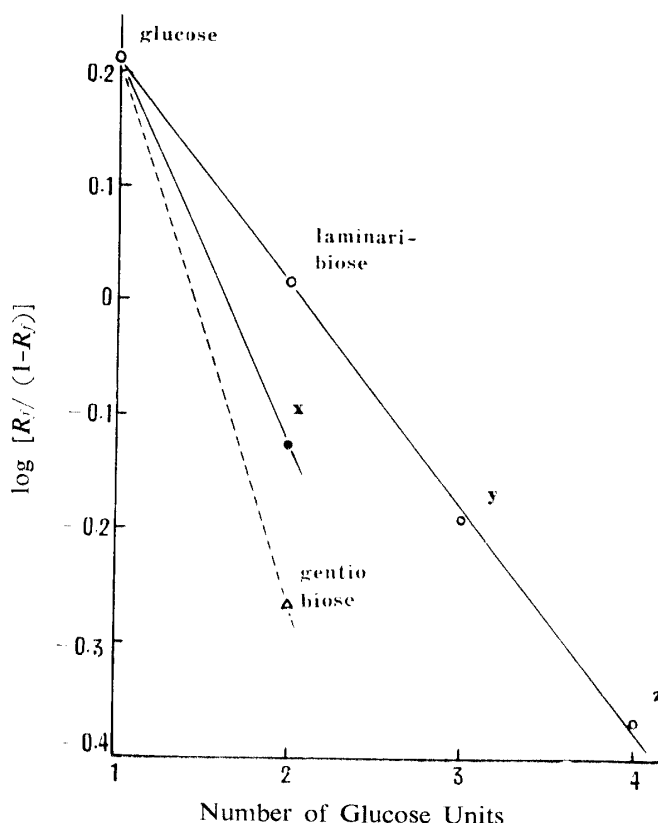


Fig. 3 Paper Chromatographic Mobilities of unknown Aldoses of Reaction Products and the Hydrolysate of Neocycasin C.

Logarithmic values were calculated on the basis of R_f values represented in Fig. 2.

For reference, the value on gentiobiose was also plotted.

x は部分水解によつて glucose のみを生成するので glucobiose と考えられたが, 同定するに至らなかった.

4. Neocycasin C の構造

さきに cycasin を基質とする糖転移反応において, neocycasin C の生成を認め, 単離したが, 試料量に制約されて構造を決定するに至らなかった.³²⁾ そこで, 新たに cycasin 2.8g を用いて同様な酵素的転移反応の後, neocycasin C 27mg を得て, 今回 neocycasin A より得られた neocycasin C と平行して構造を検討し, 同定を行つた.

(1) 定性反応及び紫外部吸収スペクトル アルカリ分解によつて cyan を生成する。

水溶液について紫外部吸収スペクトルを測定した結果, $\lambda_{max}=216m\mu$ ($\log \epsilon=3.57$), $\lambda_{inf}=275m\mu$ ($\log \epsilon=1.75$) で, azoxyglycosides の特徴をよく示している。

(2) 酸加水分解 試料 0.5mg を 1N 塩酸 0.2ml で 100°C, 2 時間加水分解の結果, glucose のみが認められた。また試料 2.5mg について, 0.2N 硫酸 0.28 ml により 100°C 1 時間行つた部分水解の結果は Fig. 2c の通りで, glucose, laminaribiose の外, y 及び z に相当する spots, 即ち laminaritriose 及び laminaritetraose が認められ, さらに, 中間的に生成される配糖体として, cycasin, neocycasin A の外, spot A₆ がみとめられた。

(3) 糖成分 neocycasin C の糖成分を遊離状に得るため, 既報²⁴⁾に準じて, 試料 3mg を微量の硫酸銅と共に沸騰水浴中で加熱しながら 50% 醋酸と亜鉛末で処理して aglycone のみを分解した。反応液を濾過, 陽, 陰イオン交換樹脂で脱イオンの後濃縮して, syrup について p. c. を行つた結果, 糖成分即ち laminaritetraose の spot が認められた。また, この syrup を 0.2N 硫酸で部分水解して, laminaritriose, laminaribiose, glucose が生成することを確かめた。これらの結果は Fig. 2b に示した。

(4) neocycasin C のアセチル化 試料 8mg を pyridine 0.5ml に溶かし無水醋酸 0.5ml を加えて室温に 60 時間おいた後, ethanol を加えて減圧濃縮を繰返し白色残渣を得た。methanol, ethanol, butanol 等より結晶化を試みたが, 何れの場合も膨潤ゲル状を呈した。ガラスフィルターで濾過して母液を分離し, 粉末状に 3.8mg を得た。m. p. 164°~165°C (micro hot plate) であつた。

既報²⁶⁾において, ソテツ種子抽出液の carbon c. c. に際し, 未知 azoxyglycoside の一つを A₆ として表示したが, これはその R_f 値から neocycasin C と考えられた。そこで, これを含む区分の一部をとつて p. c. による分離を試みた。BPW で 4 回展開の後常法の如くして A₆ の粉末 62mg を得たが僅かながらオリゴ糖が混在した。試料 45mg について前記同様の方法でアセチル化を行つたが, alcohol からの再結に際し, やはり neocycasin C 同様にゲル状を呈した。熱 butanol から数回精製操作の後, 白色粉末 17mg を得た。m. p. 164°~165°C (micro hot plate) で, neocycasin C より得たアセチル化物と混融しても融点降下がなかつた。

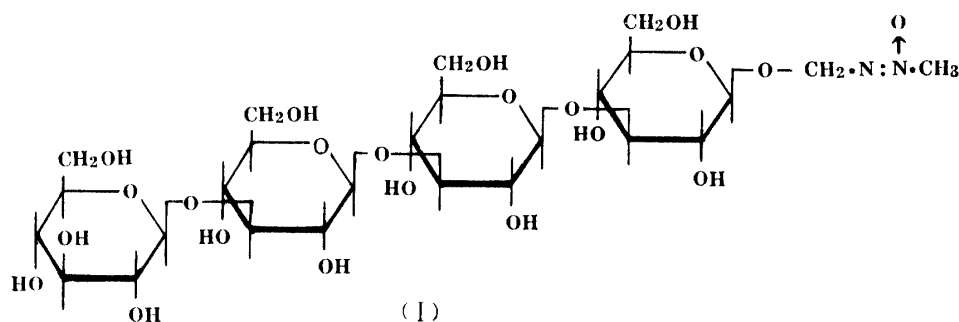
考 察

neocycasin A を基質として, cycad emulsin による糖転移反応を検討し, 主要転移生成物は neocycasin C であることが明らかになつた。その他, neocycasin B, gentiobiose 及び未知オリゴ糖 x, y, z が見出されたが, 何れも neocycasin C の生成量に比し 12~21 %である。

未知糖 y, z について酸部分水解を行つた結果, y は laminaribiose, glucose を生成し, また, z は y, laminaribiose, glucose を生成するので, それぞれ laminaritriose 及び laminaritetraose であることが明らかとなつた。このことは, glucose, laminaribiose 及びこれら laminaritriose, laminaritetraose について, それぞれの重合度と $\log [R_f/(1-R_f)]$ 値の関係を検討し, 直線関係の成立することからも確かめられた。x は glucobiose であることが推定されたが同定するに至らなかつた。

neocycasin C は azoxyglycosides に特有の紫外部吸収スペクトルを示す。また, 還元分解により糖成分 laminaritetraose が遊離され, この水解によつて laminaritriose, laminaribiose, glucose を生成する。さらに neocycasin C の酸部分水解において, 糖成分に由来するものとしては lami-

naritetraose の部分分解生成物と同様なものが見出され、一方、中間的に生成する azoxyglycosides としては *cycasin*, *neocycasin A* 及び *spot A_r* であつた。 *spot A_r* は同定されなかつたが以上の結果から *laminaritriose* 以外には考えられず、また、 *neocycasin C* は *laminaritetraosyloxyazoxymethane* (I) であることが明らかである。



この転移反応において、 *trioside* の生成は検知されず、わずかに *triose* の生成が認められた。また *cycasin* を基質とした反応においても、 *neocycasin A* がかなり集積された後 *neocycasin C* が生成されるようで、われわれのこの反応条件下では *trioside* を検出し得なかつた。このような *tetraoside* の生成状況から、 *neocycasin C* の生成が *neocycasin A* への *laminaribiosyl* 基の転移によるもののように見えるが、酵素反応自体についての詳細は別に検討中である。

要 約

前報に引続き、 *cycad emulsin* の糖転移作用による azoxyglycosides の生成について検討し、反応生成物を検索した。

cycasin を基質とした場合、主要な転移生成物は *neocycasin A* (3-O-β-glucosylcycasin) で、また *neocycasin B* (6-O-β-glucosylcycasin) の外新しく *neocycasin C* も生成されたが、 *neocycasin A* を基質とする転移反応では、 *neocycasin C* が主であつた。そして *neocycasin C* の構造を検討して、これが *laminaritetraosyloxyazoxymethane* であることを明らかにした。その他転移生成物として *neocycasin B*, *gentiobiose* の外 *laminaritriose*, *laminaritetraose* 及び未同定の *glucobiose* がみとめられた。

V. ソテツ雄花中の Azoxyglycosides

沼田 忠男・永浜 伴紀・西田 孝太郎

ソテツ雄花について azoxyglycosides を検索した結果、種子と同じく、 *cycasin* をはじめ *neocycasin A, B* その他一連の azoxyglycosides の存在が認められ、その中、 *cycasin* は単離して同定した。その詳細については既に報告した。²⁵⁾

VI. ソテツ種子中遊離 Laminaribiose の存在

永浜 伴紀・西田 孝太郎・沼田 忠男

ソテツ種子より azoxyglycosides の抽出単離において、従来¹⁹⁾ 酸処理を行つて操作を容易にしてきたが、その際、 *neocycasin A* の糖成分である *laminaribiose* の存在も認められた。本報におい

ては、種子を加熱処理後稀 alcohol で抽出し、その結果 laminaribiose を単離証明した。自然界において遊離状に laminaribiose が存在することは従来知られていない。

また、cycasin の外、neocycasin A 及び B をも単離して、これらがソテツに本来存在するものであることを確証した。その詳細は既に報告した通りである。²⁶⁾

Résumé

A series of new glycosides was discovered by the authors in the seeds and male strobiles of Japanese cycad, *Cycas revoluta* THUNB. These glycosides have the same aglycone, hydroxyazoxymethane, which, such an aliphatic azoxy-compound, is formerly unknown in not only the natural but also the synthetically obtained materials. Once the glycosidic linkage is split, being extremely labile and not able to exist independently, the aglycone decomposes immediately. Its structure was, therefore, deduced from the examination on the degradation products obtained after the treatment with various reagents, and from the spectrophotometrical analyses.

Considering from this characteristic structure of their aglycone, the authors will propose for them a generic term, azoxyglycosides, with settling a new group in the classification of glycosides.

The isolated azoxyglycosides of which structures were decided are as follows; cycasin (β -glucosyloxyazoxymethane), neocycasin A (β -laminaribiosyloxyazoxymethane), neocycasin B (β -gentiobiosyloxyazoxymethane) and neocycasin C (β -laminaritetraosyloxyazoxymethane). Moreover, the presence of macrozamin, β -primeveroside, which was first isolated in the Australian cycads was also proved, though in minor content.

Neocycasin A and C are the first discovered laminari-bioside and -tetraoside as natural occurring glycosides.

Being expected from the concurrent existence of these serial glycosides, the possibility of enzymatic interconversion of them was researched. Both neocycasin A and B were cleaved into cycasin in the course of degradation with cycad emulsin, and reversely from cycasin not only the former two bioside but also neocycasin C were produced by enzymatic transglycosylation. Furthermore, from neocycasin A, neocycasin C and B were produced.

The linkages derived by the transglycosylation with various emulsins were hitherto reported to be mainly β -1, 6 and or β -1, 4 glucosidic linkage. Nevertheless, in the above transfer reaction with cycad emulsin, β -1, 3 linkage such as in neocycasin A and C is predominantly formed, in point of which cycad emulsin is distinguished from other emulsins. These characteristic evidences on the interconversion between azoxyglycosides by cycad emulsin are considered to be the clue for the elucidation of the mechanisms of the accumulation of these glycosides in the plant.

文 献

- 1) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 77 (1955).
- 2) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA : *ibid.*, **19**, 172(1955).
- 3) 西田・小林・永浜 : 生化学, **28**, 70(1956).
- 4) 西田・小林・永浜・小島・山根 : 同上, **28**, 218(1956).
- 5) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 74 (1956).
- 6) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA : *ibid.*, **20**, 122(1956).
- 7) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI, T. NAGAHAMA and J. NAWATA : *Memoirs Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **III**, 1(1957).
- 8) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI, T. NAGAHAMA and J. NAWATA : *ibid.*, **III**, 6(1957).
- 9) K. NISHIDA, T. NAGAHAMA and T. NUMATA : *ibid.*, **IV**, 1(1960).
- 10) 麻生・山内 : 醸酵工学, **33**, 194(1955).
- 11) S. A. BARKER, E. J. BOURNE and D. H. WHIFFEN : *Carbohydrate Structure*. edited by D. GLICK, "Methods of Biochemical Analysis" vol. **III**, p. 224, Interscience (1956).
- 12) V. C. BARRY : *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **22**, 423 (1941). (W. PIGMAN : "The Carbohydrates" Acad. Press Inc., N. Y., p. 511(1957).
- 13) 麻生・柴崎 : 農化, **29**, 856 (1955).
- 14) K. ANNO, N. SENO, E. NAKAMURA, H. SAITO and R. HOSHI : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 67(1959).
- 15) S. PEAT, W. J. WHELAN and K. A. HINSON : *Nature*, **170**, 1056(1952).
- 16) S. PEAT, W. J. WHELAN and K. A. HINSON : *Chem. & Ind.*, **1955**, 385.
- 17) 小野・太宰 : 工業技術院醸酵研究所報告, 第 14 号, 51 頁 (1957).
- 18) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI, T. NAGAHAMA and T. NUMATA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 460(1959).
- 19) J. M. COOPER : *Proc. Roy. Soc. N. S. W.*, **74**, 450 (1940). (*C. A.*, **35**, 4917 (1941)).
- 20) B. LYTHGOE and N. V. RIGGS : *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2716.
- 21) B. W. LANGLEY, B. LYTHGOE and N. V. RIGGS : *ibid.*, **1951**, 2309.
- 22) R. M. BOCK and NAN-SING LING : *Anal. Chem.*, **26**, 1543 (1954).
- 23) N. V. RIGGS : *Australian J. Chem.*, **7**, 123 (1954). (*C. A.*, **48**, 6510 (1954)).
- 24) T. NAGAHAMA, T. NUMATA and K. NISHIDA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 556 (1959).
- 25) T. NUMATA, T. NAGAHAMA and K. NISHIDA : *Memoirs Fac. Agr. Kagashima Univ.*, **IV**, 5 (1960).
- 26) T. NAGAHAMA, K. NISHIDA and T. NUMATA : *ibid.*, **IV**, 9 (1960).
- 27) H. SUZUKI : *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B8**, 80(1957).
- 28) S. A. BARKER, E. J. BOURNE, G. C. HEWITT and M. STACEY : *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3734.
- 29) K. V. GIRI, V. N. NIGAM and K. S. SRINIVASAN : *Nature*, **173**, 953 (1954).
- 30) T. K. WALKER and H. B. WRIGHT : *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**, 362 (1957).
- 31) T. K. WALKER, D. N. PELLEGRINO and A. W. KHAN : *ibid.*, **83**, 161 (1959).
- 32) T. NAGAHAMA, K. NISHIDA and T. NUMATA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 322 (1960).
- 33) D. FRENCH and G. M. WILD : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612 (1953).