

# ソテツの新配糖体 NEOCYCASIN 類に関する研究\*

永 浜 伴 紀

## Studies on Neocycasins, New Glycosides of Cycads

Tomonori NAGAHAMA

(Biochemical Laboratory)

### 目 次

第1章 緒 論	1. 転 移 反 応
第2章 Neocycasin 類の単離	2. 反応生成物の分離, 同定
第1節 抽 出	3. 反応生成物 x, y, z
第2節 活性炭カラムクロマトグラフィーによる分別	4. Neocycasin C の構造
第3節 Neocycasin 類の単離およびそれらの一般的性質	(1) 定性反応および紫外部吸収スペクトル
1. Neocycasin A	(2) 酸加水分解
2. Neocycasin B	(3) 糖 成 分
3. Neocycasin C および D	(4) アセチル誘導体
4. Neocycasin E	第4節 考 察
5. Neocycasin F および G	第5章 <i>Cycas revoluta</i> Thunb. 各部位におけるアゾオキシ配糖体の分布
6. そ の 他	第1節 アゾオキシ配糖体の分別定量
第4節 考 察	第2節 茎幹および雄花のアゾオキシ配糖体
第3章 Neocycasin 類の構造	1. 茎 幹
第1節 吸収スペクトル	2. 雄 花
1. 紫外部吸収スペクトル	第3節 葉のアゾオキシ配糖体
2. 赤外部吸収スペクトル	1. 抽 出
第2節 アルカリ分解	2. 活性炭カラムクロマトグラフィーによる分別
第3節 酸加水分解	3. アゾオキシ配糖体の単離, 同定
1. 完全加水分解	(1) cycasin
2. 部分加水分解	(2) macrozamin および neocycasin B
第4節 エムルシンによる分解	(3) neocycasin A
第5節 糖成分の確認	第4節 考 察
1. アセチル誘導体より糖成分の単離	第6章 <i>Cycas circinalis</i> L. のアゾオキシ配糖体
2. 還元分解による糖成分の単離	第1節 アゾオキシ配糖体の分別定量
第6節 アセチル誘導体の酸分解	第2節 アゾオキシ配糖体の単離, 同定
第7節 考 察	1. 抽出および活性炭カラムクロマトグラフィー
第4章 ソテツ・エムルシンによるアゾオキシ配糖体の相互変換	2. アゾオキシ配糖体の単離, 同定
第1節 Neocycasin 類より Cycasin の酵素的減成	(1) cycasin
第2節 Cycasin より Neocycasin 類の酵素的生成	(2) neocycasin A, B および macrozamin
1. 転 移 反 応	第3節 Neocycasin F および G の単離と構造
2. 反応生成物の分離, 同定	1. 完全加水分解
(1) neocycasin A	2. 部分加水分解
(2) laminaribiose	3. 糖成分の単離
(3) neocycasin B	第4節 考 察
(4) gentiobiose	第7章 総 括
(5) neocycasin C	要 約
第3節 Neocycasin A より Neocycasin Cの酵素的生成	文 献
	英 文 抄 録

\* 本報告は、昭和38年九州大学において審査をうけた学位論文の概要をなすものである。また、研究の一部について、文部省科学研究費および鹿児島大学援助会研究援助金の交付を受けた。

## 図 表 目 次

- Fig. 1. Apparatus for the Evaporation under Reduced Pressure
- Fig. 2. Photograph of Neocycasin A
- Fig. 3. Photograph of Heptaacetylneocycasin A
- Fig. 4. Photograph of Heptaacetylneocycasin B
- Fig. 5. Photograph of Tridecaacetylneocycasin C
- Fig. 6. Photograph of Heptaacetylneocycasin E
- Fig. 7. Ultraviolet Absorption Spectra
- Fig. 8. Infrared Absorption Spectra
- Fig. 9. Paper Chromatogram of the Partially Hydrolysed Products of Neocycasins and Macrozamin
- Fig. 10. The Chemical Structure of Neocycasins
- Fig. 11. Determination of the Products formed during the Course of Cycain-Cycad Emulsin Reaction
- Fig. 12. Paper Chromatogram of the Products formed during the Course of Neocycasin A-Cycad Emulsin Reaction
- Fig. 13. Paper Chromatogram of the Partial Hydrolysates of Neocycasin C and Transfer Product x, y, and z
- Fig. 14. Relative Mobilities on Paper Chromatography of Aldoses produced by Transfer Reaction and the Partial Hydrolysis of Neocycasin C
- Fig. 15. Interconversion between Cycasin and Neocycasins by Cycad Emulsin
- Fig. 16. The Male Strobil of *Cycas revoluta* Thunb.
- Fig. 17. The Nuts of *Cycas revoluta* Thunb. and *Cycas circinalis* L.
- Fig. 18. The Partially Hydrolysed Products of Glucotriosides included Both 1,3- and 1,6- $\beta$ -linkages
- Table 1. Extraction of Azoxyglycosides
- Table 2. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates by Carbon Column Chromatography
- Table 3. General Properties of Neocycasins
- Table 4. Chromatographic Separation of the Products formed from Cycasin by Cycad Emulsin
- Table 5. Chromatographic Separation of the Products formed from Neocycasin A by Cycad Emulsin
- Table 6. Analysis of Azoxyglycosides in the Parts of *Cycas revoluta* Thunb.
- Table 7. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of the Male Strobils of *Cycas revoluta* Thunb. by Carbon Column Chromatography
- Table 8. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of the Young Leaves of *Cycas revoluta* Thunb. by Carbon Column Chromatography
- Table 9. Analysis of Azoxyglycosides in the Seeds of *Cycas circinalis* L.
- Table 10. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of "Green Nuts" of *Cycas circinalis* L. by Carbon Column Chromatography

## 第 1 章 緒 論

ソテツ科植物 *Cycadaceae* は進化史上興味ある植物で、中世代には 34 属 278 種が全世界にわたって繁茂したが、現在では 9 属約 100 種が存続し、それらのうち *Zamia*, *Microcycas*, *Dioon*, *Ceratozamia* の 4 属は東半球に、また *Cycas*, *Macrozamia*, *Bowenia*, *Encephalartos*, *Stangeria* の 5 属は西半球に限って分布している<sup>1)2)</sup>。いずれも熱帯および亜熱帯地方において暴風、旱魃、瘠地にもよく耐えて生育するので、それぞれの分布地では、ソテツの各部位が食糧、医薬、工芸資源として原住民に重用され、特にその澱粉は日常生活あるいは飢饉時において大きな利用価値をもっている。しかしながら、ソテツの葉、茎幹、種子などが有毒成分を含み、食用にする際の前処理が不適當であれば中毒を惹起し、甚だしきは死に至ること、また、住民のみならず家畜にも大きな被害を及ぼすことが古くから知られていた。なかでもこのような被害の著しい濠洲、東インド諸島、メキシコなどにおいては、19 世紀頃からソテツ中毒症例の医学的研究や各種動物試験が数多く報告され、現在なお活潑に行なわれている<sup>3)</sup>。

ソテツ有毒成分の初期の化学的研究の中で特に注目すべきものは VAN DONGEN<sup>4)</sup> の研究である。彼は 1903 年に東インド諸島産 *Cycas circinalis* L. の種子から有毒性無窒素配糖体を粉末状に得て、こ

れに pakoein と命名した。しかし、マウスに対する有毒性を証するにとどまらず化学構造を明らかにするに至らなかった。

濠洲産各種ソテツの各部位における有毒成分も多く、研究者によつて検索された。1876年 NORRIE<sup>5)</sup> は *Macrozamia spiralis* Miq. (地方名 Burrawang Palm) の種子から酸性蔞酸カリウムを単離し、これが有毒性の本態をなすものとした。一方 LAUTERER<sup>6)7)</sup> は種子や葉の1種の樹脂成分が、また GUTHRIE<sup>8)</sup> は1種の揮発成分が、それぞれ有毒であると報告した。しかし、1920年に、PETRIE<sup>9)</sup> が行なつた詳細な検索の結果では、アルカロイド、サポニン両反応いずれも陰性であつて、またその他にも有毒物質を発見し得ず、ソテツの有毒成分は長く不明のままであつた。

本邦においても、奄美大島や沖縄地方に限つて分布する日本産ソテツ *Cycas revoluta* Thunb. の種子や茎幹が特に救荒食糧として重要性をもつ一方、これらが有毒成分を含み、しばしば中毒を惹起することは古くから周知の事実であつた。該地方に伝わる伝承、古文書にも、飢饉時におけるソテツ中毒の悲惨な事例や食用に際しての除毒法などが述べられていて、西田<sup>10)</sup> はこれらの史実を詳しく紹介している。

吉村<sup>11)</sup> は *Cycas revoluta* の化学的成分に関する一連の研究において、1922年に、種子中にフォルムアルデヒドの存在を証明し、ソテツ中毒は該物質に起因するものであることを述べた。西田<sup>12)13)</sup> はこの結果を確認し、さらにソテツ・エムルシンとの関係について研究した結果、種子中のフォルムアルデヒドは酵素反応によつて生成されることを知つて一新配糖体の存在を推定した。

1941年に至り、COOPER<sup>14)</sup> は *Macrozamia spiralis* Miq. の種子から有毒配糖体を結晶状に単離して macrozamin と命名し、濠洲産ソテツの有毒成分解明の端緒を得た。macrozamin はアルカリ水解によつて青酸を生成するが、酸や扁桃エムルシン、酵母をもつてしてはこれを生成しない。従つて、この配糖体は従来知られている hiptagin<sup>15)</sup> や karakin<sup>16)17)18)</sup> などのプソイド青酸配糖体 (pseudocyanogenetic glycosides) とも多少異なつた特殊構造のものであることが推察された。macrozamin の構造はその後1949年から1951年にかけて LYTHGOE, LANGLEY および RIGGS<sup>19)20)</sup> によつて研究された。その結果、macrozamin はアグリコンに脂肪族アゾオキシ基を有する特殊な配糖体で、その構造は primeverosyloxyazoxymethane であることが明らかになつた。RIGGS<sup>21)</sup> は、さらに濠洲に分布する多くのソテツ、すなわち *Macrozamia* 属の5種、*Bowenia* 属の2種の外に、*Cycas media* R. Br. の種子からも macrozamin を単離して同定した\*1。

一方、西田ら<sup>22)</sup> は、第二次大戦後、奄美大島の本土復帰を機会に同島産ソテツ *Cycas revoluta* の種子について戦前の研究を再開続行して、さきに予想された配糖体<sup>12)13)</sup> を結晶状に単離することに成功した。そして、この配糖体が macrozamin と異なることを確かめて cycasin と命名し、その構造が  $\beta$ -glucosyloxyazoxymethane であることを決定した。さらに cycasin について薬理学的研究<sup>23)</sup> を行なつて有毒性の実態を明らかにするとともに、ソテツ・エムルシンによる分解機構<sup>24)</sup> を検討して、分解生成物の1つとしてフォルムアルデヒドを確認した。その後、茎幹<sup>25)</sup> についても検索して種子同様 cycasin を単離し、茎幹の有毒性の本態を知り得た。また、ポーラログラフィーによる研究によつて cycasin の電解還元機構<sup>26)</sup> や加水分解機構<sup>27)</sup> が明らかにされた。

cycasin および macrozamin のごとく、脂肪族アゾオキシ基をアグリコンに有する配糖体は、天然界にはもちろん、合成的にも例をみないものである。従つて、これら配糖体の特にアグリコンに関する研究は、配糖体のみならず未開拓の脂肪族アゾオキシ化合物の研究分野に新しい知見を加えるもの

\*1 アフリカ産ソテツ *Encephalartos barkeri* Carruth 種子からも B. LYTHGOE によつて macrozamin が単離されている<sup>21)</sup>。

であつた。小林<sup>28)29)</sup>は  $\beta$ -グルコシダーゼの精製標品を用いて **cycasin** を水解し、アグリコン自体が遊離状に存在し得ることを証する知見を得た。しかし、そのような遊離状態では不安定であつて、現在のところアグリコン、すなわち **hydroxyazoxymethane** の単離には成功していない。

以上のように、ソテツ配糖体はアグリコンが特徴的であるのみならず、ソテツ属種間において配糖体の糖成分に相違がみられることは興味あることであつた。

著者はこの点に着目し、主として *Cycas revoluta* Thunb. の種子仁について詳細に検討を行ない、さらに同ソテツの各部位および *Cycas circinalis* L. 種子仁にも検討を及ぼした結果、新しく一群の配糖体の存在を検知した。今日までに構造を決定したものは7種で、構造確定の順に従つて **neocycasin A, B, C, D, E, F, G** と命名するとともに、化学的ならびに酵素化学的研究を進めてソテツ配糖体の化学の体系化を行なつた。

新ソテツ配糖体 **neocycasin** 類は **cycasin, macrozamin** と同じくいずれも **hydroxyazoxymethane** をアグリコンとするものであつて、また、従来天然界における配糖体にはみられなかつた糖成分をもつ配糖体をもその中に含んでいる。西田<sup>30)</sup>はこのようなアグリコンの同一性に基ついて、**macrozamin** をも含めて **cycasin** に始まるこの種の一連の配糖体にアゾキシ配糖体なる総称を与え、配糖体の分類上に一新区分を設定した。

本報告においては、**neocycasin** 類の化学、すなわち、単離、構造決定、相互間の酵素的変換関係に加えて、比較生化学的見地から、ソテツ各部位および品種による **neocycasin** 類の相違について述べる。

なお、本報告において次の略語を用いた。

クロマトグラフィー

ペーパークロマトグラフィー	p. c.
バンドペーパークロマトグラフィー	バンド p. c.
活性炭カラムクロマトグラフィー	活性炭 c. c.
セルロースカラムクロマトグラフィー	セルロース c. c.

展 開 剤

<i>n</i> -ブタノール-醋酸-水 (4:1:1) 混液	BAW (411)
<i>n</i> -ブタノール-醋酸-水 (4:1:2) 混液	BAW (412)
<i>n</i> -ブタノール-ピリジン-水 (6:4:3) 混液	BPW
<i>n</i> -ブタノール-エタノール-水 (5:2:1) 混液	BEW (521)
<i>n</i> -ブタノール-エタノール-水 (2:1:1) 混液	BEW (211)
<i>n</i> -ブタノール-エタノール-水-ピリジン (5:2:1:1) 混液	BEWP

ソテツ属名

<i>Cycas</i>	C.
<i>Macrozamia</i>	M.

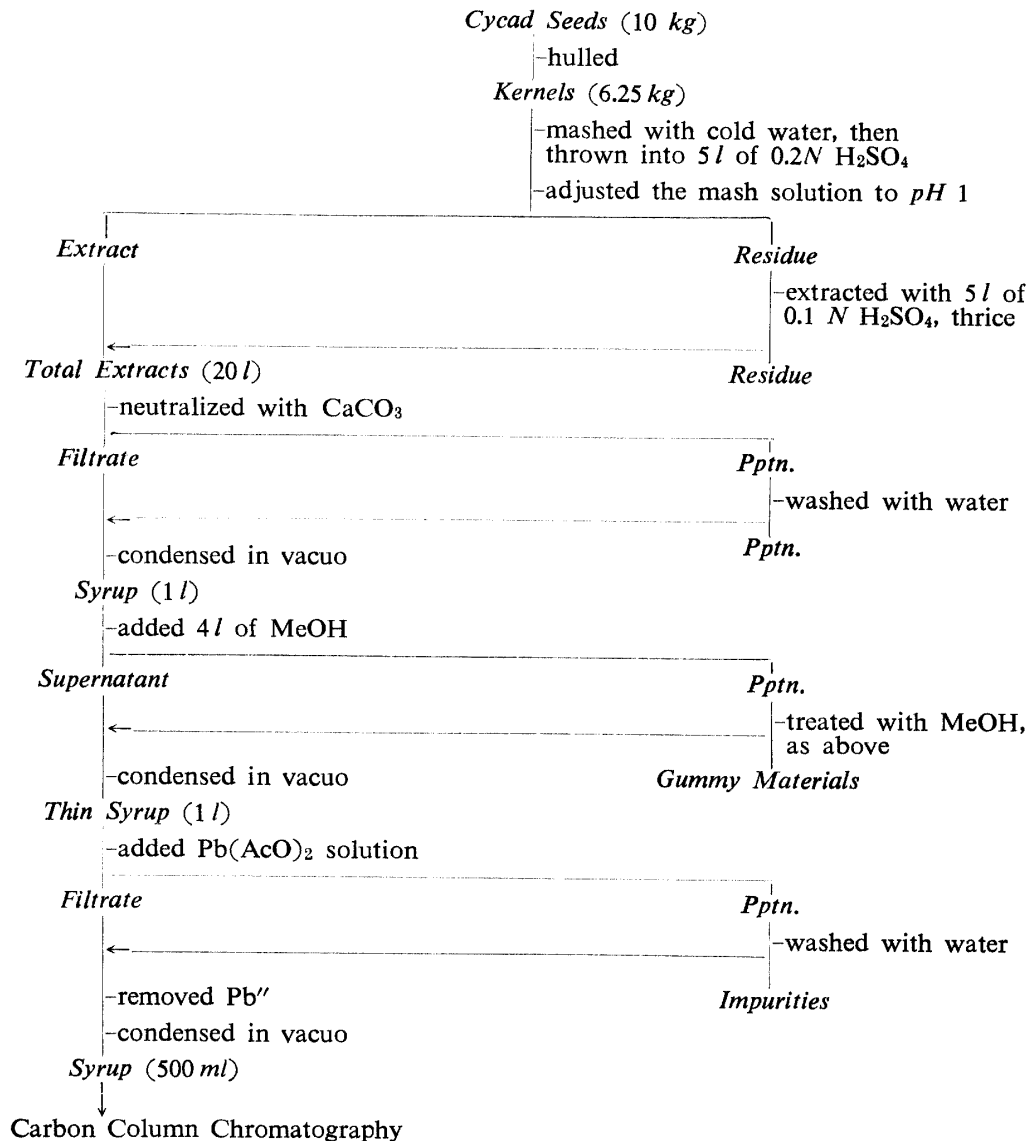
## 第2章 Neocycasin 類の単離

本章におけるソテツ試料は、特記する以外すべて奄美大島産 *C. revoluta* Thunb. の過熟種子であつて、実験方法は **neocycasin** 類研究の一般法ともなるべきものである。

## 第1節 抽出

生体より配糖体を抽出するに際して、まず共存する分解酵素の不活性化が必要であつて、その手段として植物材料の加熱処理が一般になされている。しかし、ソテツ種子のような澱粉質のものにかかる方法をもつてすると、澱粉糊化などのために抽出の際濾過困難など操作上大きな障害があらわれた。そこで稀酸処理による酵素失活化を試みた結果、上記障害を打開でき、このような前処理が *cy-casin* および *neocycasin* 類自体にも何らの影響を及ぼさないことを確かめて、新しく抽出法を確立した。抽出の一例を Table 1 に示したが、この方法はソテツ配糖体抽出の一般法として種々のソテツ試料にも応用される。小規模の抽出にはソテツ試料を熱エタノールあるいはメタノールに投入、20分間加熱の後磨砕して20%アルコールで抽出する方法も行なつたが、稀酸および稀アルコール抽出法のいずれの場合も同様の結果が得られる。

Table 1. Extraction of Azoxyglycosides



\* This example procedure is shown with the seeds of *Cycas revoluta* Thunb.

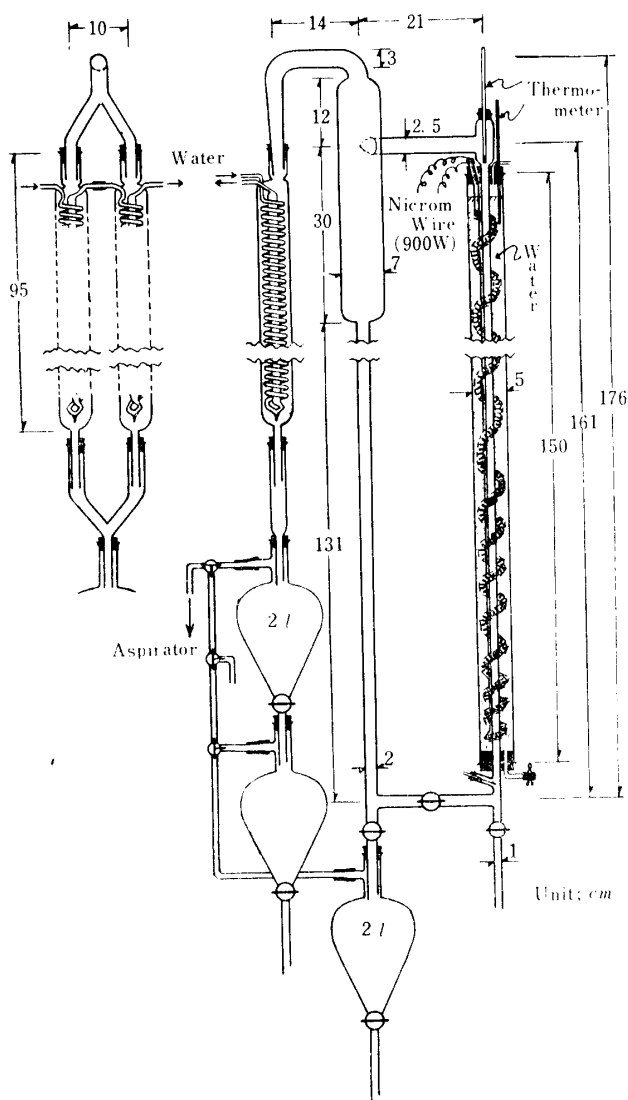


Fig. 1. Apparatus for the Evaporation under Reduced Pressure

抽出液の濃縮に際しては、従来の Kestner 型減圧濃縮装置を改良して使用した。Fig. 1 の装置によると、従来の蒸気加熱法に代えて電熱法を用いるので加熱温度を任意に調節でき、大量の抽出液を連続的に容易に濃縮することが可能である。処理能力は内部液温  $30^{\circ}\text{C}$  約  $25\text{mmHg}$  においてほぼ  $2\text{l}/\text{時間}$  である。

## 第 2 節 活性炭カラムクロマトグラフィーによる分別

COOPER<sup>14)</sup>, LYTHGOE ら<sup>19)</sup> および RIGGS<sup>21)</sup> は、*M. spiralis* Miq, *M. Riedlei* C. A. Gard. およびその他の濠洲産ソテツ種子からの macrozamin 単離に際して、水抽出液を濃縮後エタノール処理によつて容易に結晶を得ている。

*C. revoluta* においては、多量の共存糖のために配糖体の分離が困難であつたが、これら共存糖の分離および配糖体相互の分別は活性炭 c.c.<sup>31)</sup> の応用によつて初めて可能となつた。すなわち、活性炭\*<sup>2</sup> およびセライト\*<sup>3</sup> をガラス円筒に充填して活性炭カラムを調製し、前節にて得た試料シラップを添加後、水、次いで順次溶出剤のエタノール濃度を高めて溶出を続けた。溶出液の一定量ずつを分割採取し、各フラクションはそれぞれ減圧濃縮の後 p.c. によつて組成を検した。neocycasin 類は cycasin 同様、p.c. においてレゾルシン塩酸試薬<sup>32)</sup> により特異的に黄色スポットを示

し、また紫外線照射によつて吸収スポットとしても検知できるので他の糖類と明らかに区別される。そして neocycasin 類相互の識別は多重展開<sup>33)</sup> によつて容易となり、p.c. による検索同定は neocycasin 類の研究上有力な手段の 1 つであつた。

活性炭 c.c. の各フラクションは組成に応じて合一し、必要があればアンバーライト IR 120 および IR 45 にて脱塩処理を行なつた。Table 2 に *C. revoluta* 種子  $30\text{kg}$  の抽出液の活性炭 c.c. における糖および配糖体の溶出状況を示した。活性炭カラムの規模は試料シラップの糖含量、組成に応じて定め、大量処理に際しては、活性炭-セライトの充填量  $3\text{kg}$  の大型カラムも使用して分離を行なつている。

なお、活性炭 c.c. の水溶出区分には、p.c. においてアルカリ性硝酸銀試薬<sup>109)</sup> のみにて呈色するスポットが認められ、inositol 類と推定された。ソテツの環状多価アルコールについては、吉村ら<sup>34)</sup> が *C. revoluta* 種子から myo-inositol を、また、RIGGS<sup>35)</sup> は *M. Riedlei* などの種子から sequoyitol を

\*<sup>2,3</sup> 全実験をとおして、活性炭は武田製白鷺印、セライトは No. 545 を用いた。

Table 2. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates by Carbon Column Chromatography

Elution Reagent Fraction No.	Concentration of EtOH, %						
	H <sub>2</sub> O	2	5	10	15	20	30+50
	36 l	8 l	22 l	30 l	16 l	32 l	8 l 12 l
	1	18, 22,	33,	48,	56,	72, 76,	82
	<i>Rf</i> *						
A-1	.75-.85					.....	
Cycasin	.71		—————			.....	
Fructose	.63	—————					
A-2	.62					.....	
Neocycasin A	.60					—————	
Glucose	.57	—————					
Macrozamin	.55					.....	
Neocycasin E	.50					.....	
A-3 (Neocycasin D)	.48						..
Sucrose	.47	—————	.....				
Laminaribiose	.47					.....	
Neocycasin B	.42					—————	
Melezitose	.37					—————	
Neocycasin C	.36						—
A-4 (Neocycasin F)	.32						...
Oligosaccharide	.23					—————	
<i>myo</i> -Inositol	.20	—————					
A-5	.18					.....	
Oligosaccharide (tailing)						.....	

Sample: The kernels of *Cycas revoluta* Thunb. (18.75 kg).

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand)-Celite (No. 545) 2:1 by weight, total 1.5 kg, dia. 12 cm, length 60 cm.

\* *Rf*-values were determined after multiple ascending development (2 runs) using Tōyō No. 2 strips and a mixture of *n*-BuOH-pyridine-H<sub>2</sub>O (6:4:3) as the solvent.

単離している。そこで、上記水溶出区分の inositol 類を検討すべく、フラクション No. 2 にパン酵母を接種し 30°C に 2 日間保つて糖を除去、アンバーライト IR 120 および IR 45 で処理して後減圧濃縮した。残渣を稀アルコールから再結晶して得られた板状晶 3.5g は m.p. 225°C,  $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$  で *myo*-inositol 標品と一致した。

### 第 3 節 Neocycasin 類の単離およびそれらの一般的性質

cycasin および neocycasin A は活性炭 c.c. によつてほぼ単一成分として得られるが、他の neocycasin 類は概して共存物とともに溶出される。従つて、これらのフラクションについてはセルロース c.c.<sup>36)</sup> やバンド p.c.<sup>87)</sup> などによる再分離によつて単離を図つた。

単離された neocycasin 類はいずれも水に易溶、熱エタノール、熱メチルセロソルブ可溶、醋酸エチル難溶、クロロフォルム不溶。フェーリング溶液を還元し、モリッシュ反応陽性、アンスロン試薬により緑青色を呈し、アルカリ水解により青酸を生成する。

#### 1. Neocycasin A

フラクション No. 64~72 には neocycasin A の外に共存物がほとんどないので、この区分をその

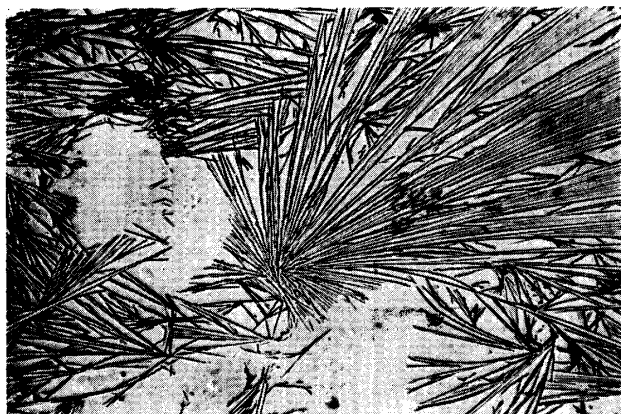


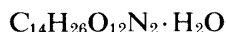
Fig. 2. Photograph of Neocycasin A



Fig. 3. Photograph of Heptaacetylneocycasin A

まま減圧濃縮した。得られたシラップをエタノールで処理，氷室においたところ結晶が生成した。80% エタノールで再結晶を繰返して neocycasin A の針状晶 3.1g を得た (Fig. 2)。

m.p. 162°~163°C (decomp.),  $[\alpha]_D^{20} = -35.1^\circ$  (c. 1.0, H<sub>2</sub>O) で分析結果は次のとおりである。



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 % .

アセチル誘導体 neocycasin A 500mg をピリジン 10ml に溶解し，無水醋酸 10ml を加えて 5 日間室温においた。反応液を氷水中に投入攪拌し，生成した結晶性物質を濾取水洗して，エタノールより再結を行なった。アセチル誘導体は長針状晶で 540mg が得られた (Fig. 3)。

アセチル化に際して，同様の反応組成で 80°C, 2 時間の処理によつても同じ結果が得られる。

アセチル誘導体は m.p. 142°~143°C,  $[\alpha]_D^{20} = -55.5^\circ$  (c. 1.0, CHCl<sub>3</sub>) で，分析結果は次のとおりである。

$C_{14}H_{19}O_{12}N_2 \cdot (CH_3CO)_7$  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<sup>38)</sup>).

CH<sub>3</sub>CO 基 計算値：7 モル, 分析値：6.8 モル (Kögl および Postowsky 法<sup>39)</sup>).

heptaacetylneocycasin A 98mg をクロロフォルム-メタノール混液 3 ml に溶解し，これに 0.5N ナトリウムメチラート 1 滴を加えて 0°C で脱アセチルを行なった結果，neocycasin A 15mg が回収された。m.p. 162°~163°C (decomp.) で標品と混融して融点降下を認めなかつた。

## 2. Neocycasin B

フラクション No. 53~58 は neocycasin B および macrozamin の外に多くの共存物を含むので，再度諸種のクロマトグラフィーを行なった。

濃縮液 1/3 量を活性炭カラム (活性炭 70g, 径 3.7 cm × 長 40 cm) に注加し，最初水で溶出，以後，溶出剤のメタノール濃度を連続的に高めながら gradient elution<sup>40)</sup> を行なった。しかし，メタノール濃度 38~48 % の区分に neocycasin B が macrozamin と共に溶出され，また，オリゴ糖との分離も不完全であつた。そこで，この区分についてさらにセルロース c.c. を行なった。すなわち，上記区分の濃縮シラップを粉末濾紙 2g とともに湯浴上にて乾燥，粉末とし，これをセルロースカラム (濾紙



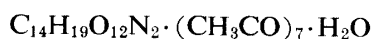
粉末 \*4 80g, 径 1.7cm×長 55cm) の上端に充填して BEW (521) 混液で展開溶出した. 溶出液 10ml ずつを分割採取して各フラクションの組成を p.c. にて検した結果, No. 55~70 に macrozamin, また No. 82~120 に neocycasin B がそれぞれ単一成分として得られたので, 組成に応じてこれらのフラクションを合一して濃縮した.

neocycasin B のシラップをエタノール-エーテル混液あるいはメチルセロソルブなどで処理して結晶化を試みたが, 結晶を得られなかつたので, 減圧乾燥を行なつて吸湿性粉末 150mg を得た.  $[\alpha]_D^{20} = -37.6^\circ$  (c. 1.0, H<sub>2</sub>O).

アセチル誘導体 neocycasin B 50mg をピリジンおよび無水醋酸各 1.5ml と共に 4 日間室温においた後, 前項のように処理してアセチル化物を得た. 熱 50%メタノールより再結して長柱状晶 53mg が得られた (Fig. 4).

m.p. 173°~174°C,  $[\alpha]_D^{20} = -29.4^\circ$  (c. 0.3, CHCl<sub>3</sub>).

分析結果は次のとおりである.



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 微量法<sup>4)</sup>).

CH<sub>3</sub>CO 基 計算値: 7 モル, 分析値: 7.07 モル (Kögl および Postowsky 法<sup>39)</sup>).

heptaacetylneocycasin B 5 mg をクロロフォルム-メタノール混液 0.2ml に溶解し, 0.5N ナトリウムメチラート 1 滴を加えて氷室に 1 夜おき脱アセチルした. 生じた沈澱について p.c. を行ない neocycasin B が回収されたことを確かめた.

macrozamin の同定は前記濃縮シラップについて酸部分水解生成物および紫外部吸収スペクトルを検討して行なつた. これらの結果は第 3 章第 1 節および第 3 節に述べる. また第 5 章第 3 節に詳述するごとく, 葉には macrozamin が高含量で存在し, 好収量でその結晶を得て詳細な同定試験を行なつた.

### 3. Neocycasin C および D

フラクション No. 79~80 を減圧濃縮して得られたシラップを濾紙 (東洋 No. 131, 巾 60cm×長 40cm) の原線上に带状に塗布してバンド p.c. を行なつた. 展開剤 BPW にて多重展開 4 回の後, 濾紙上の紫外部吸収帯およびガイドストリップに従つて neocycasin C 相当部を切り取り温湯にて溶出した. 溶出液を減圧濃縮の後凍結乾燥して白色粉末 50mg を得た. この物質は, 第 4 章第 2 節および第 3 節において述べるように, 酵素的転移反応生成物の 1 つ neocycasin C と Rf 値がよく一致するものであつた.

アセチル誘導体 neocycasin C 40mg をピリジンおよび無水醋酸でもつて室温下にアセチル化して, 最後に熱ブタノールから再結, 白色粉末 15mg を得た (Fig. 5). m.p. 164°~165°C (micro hot plate<sup>5)</sup>).

\*4 セルロース c.c. に用いた濾紙粉末はすべて東洋 A (100 メッシュ) である.

\*5 柳本製微量融点測定器による.

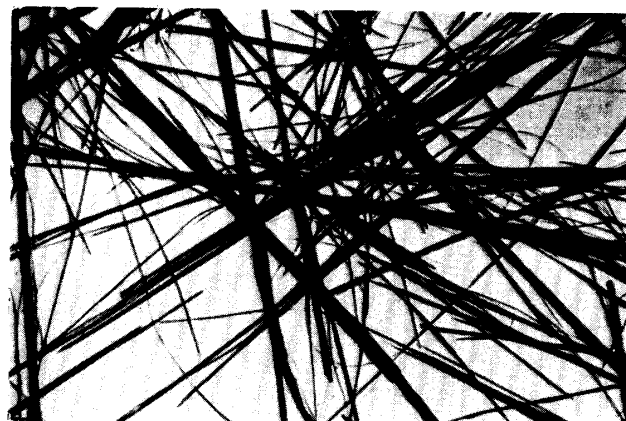


Fig. 4. Photograph of Heptaacetylneocycasin B

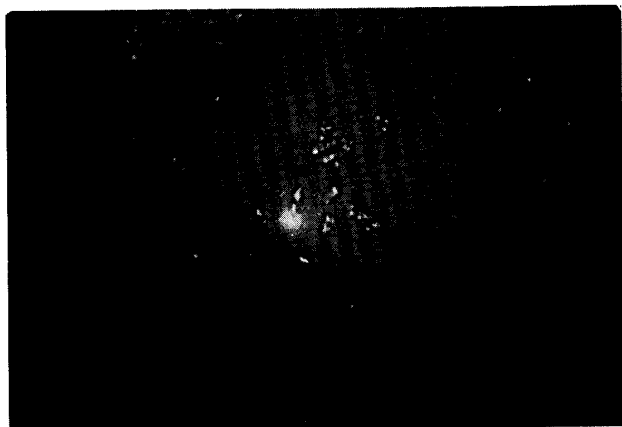


Fig. 5. Photograph of Tridecaacetyl-neocycasin C

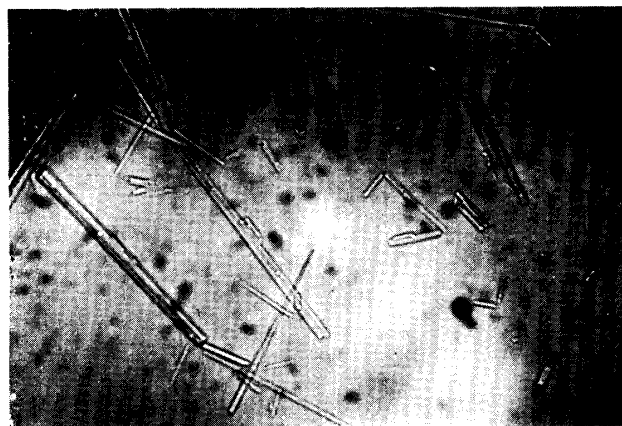


Fig. 6. Photograph of Heptaacetyl-neocycasin E

neocycasin D は第 4 章第 3 節に述べるように、neocycasin C の部分水解生成物としてはじめて認められたものである。Table 2 に示した未知の neocycasin 類の 1 つ A-3 は、 $R_f$  値から neocycasin D と推定されるが、同定するに至っていない。

#### 4. Neocycasin E

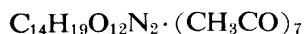
フラクション No. 58 ~ 62 には neocycasin E の外に neocycasin A およびオリゴ糖が混在したので、neocycasin E 単離のためバンド p.c. を行なつた。濾紙 (東洋 No. 131, 巾 30cm × 長 40cm, 5 枚の原線上に試料を塗布し、展開剤 BAW (411) にて 3 回、次いで BEW (211) にて 1 回多重展開の後、常法に従つて濾紙上の相当部を切取り溶出して neocycasin E 70mg を結晶性粉末状に得た。

m.p.  $156^{\circ}\sim 158^{\circ}\text{C}$  (decomp.),  $[\alpha]_{\text{D}}^{15} = -29.2^{\circ}$  (c. 0.9,  $\text{H}_2\text{O}$ ).

アセチル誘導体 neocycasin E 30mg をピリジンおよび無水醋酸各 1.5ml と共に室温下で処理した後、エタノールから再結晶して微針晶 24 mg を得た (Fig. 6).

m.p.  $204^{\circ}\sim 205^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -33.5^{\circ}$  (c. 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ).

分析結果は次のとおりである。



計算値: C, 47.46 % ; H, 5.69 % ; N, 3.95 % ,

分析値: C, 47.87 % ; H, 5.75 % ; N, 3.84 % .

分子量 計算値: 708, 分析値: 712 (Rast 法<sup>38)</sup>).

常法のごとくアセチル誘導体をナトリウムメチラートでもつて氷室中にて脱アセチルの後、neocycasin E が回収されることを p.c. にて確かめた。

#### 5. Neocycasin F および G

*C. circinalis* の種子抽出液について活性炭 c.c. を行ない、30 % および 40 % エタノール溶出区分にそれぞれ neocycasin F および G が発見された。詳細は第 6 章第 3 節において述べる。

*C. revoluta* 種子については、Table 2 における未知の neocycasin 類のうちの A-4 が neocycasin F であると推定される。

#### 6. そ の 他

以上の neocycasin 類の外に、*C. revoluta* 種子にはなお Table 2 に示したような A-1, A-2, A

-5 などの未知の neocycasin 類が検知されているが、これらを単離するに至っていない。後述するように同ソテツの葉、雄花、および *C. circinalis* 種子にも未知の neocycasin 類が検知されている。

#### 第4節 考察

neocycasin 類は一般に含量微少なものが多く、これらを単離して構造を検討するためには、ソテツ試料を大量に処理する必要があった。そこで、植物材料の前処理および抽出操作を容易に、かつ、迅速に行なえるように検討を加えた。その結果、酵素失活化を稀硫酸 ( $pH=1$ ) 処理にて行なうと目的を達し得ることを知った。cycasin は酸に安定であることが既に確かめられており<sup>27)</sup>、また、上記酸処理抽出液の配糖体組成を従来の加熱処理あるいは熱アルコール処理による抽出液のそれらと比較しても相違が認められないので、ここに新しくソテツ配糖体の抽出法が確立された。さらに好能率の濃縮装置を考案して大量処理の体制を整えた。このことは、neocycasin 類の単離を容易にするのみならず、病理学的研究において要求される多量の cycasin の調製をも可能にするものである。

neocycasin 類の単離には活性炭 c.c. を応用し、さらに各区分は必要に応じてセルロース c.c. やバンド p.c. などによる分離を併用して行なつた。その結果、*C. revoluta* 種子については、neocycasin A, B, C, E を単離し、macrozamin の存在をも明らかにした外、neocycasin D および F の存在を推定した。後述するように、neocycasin D は neocycasin C の部分水解生成物として (第4章第3節)、また neocycasin F は neocycasin G と共に *C. circinalis* 種子からはじめて得られたものである (第6章第3節)。Table 3 に neocycasin 類およびそのアセチル誘導体の諸恒数を総括して示した。

neocycasin 類は、これまでの cycasin 単離に際して認め得られなかつたもので、第2節に述べたように、活性炭 c.c. による精細な分別によつてはじめてその存在が明らかになつた。従来 neocycasin 類は抽出液のクロマトグラム上では多量の共存糖類のスポットにマスクされて検出されず、また、活性炭 c.c. においては被吸着性が比較的強いため溶出され得なかつたのであろう。

各 neocycasin 類を活性炭カラムから溶出するに要するエタノール濃度は、カラムの活性炭量と試料シラップの炭水化物組成、含量比によつて一定ではないが、溶出されてくる順序はほぼ一定しているので、溶出の前後関係から構造を推定する手懸りの一つが与えられる。

活性炭 c.c. は WHISTLER<sup>31)</sup>らによつて糖類分離の有力手段として確立されて以来、ハイドロール<sup>42)43)44)45)</sup>、植物組織<sup>46)47)</sup>、その他<sup>48)49)50)</sup>の糖組成や、各種多糖類の構造の研究<sup>51)52)53)54)</sup>などに広く応用され、また、目的に応じていろいろの改変法<sup>55)56)57)</sup>も行なわれている。しかし、本章における知見から、遊離糖に限らず配糖体の分離にも応用の可能性が十分考えられる。

### 第3章 Neocycasin 類の構造

neocycasin 類は諸定性反応が cycasin に類似するので、cycasin 同様にアグリコンに脂肪族アゾオキシ基を有することが予想された。アグリコン自体は極めて不安定で遊離状に得られないので、構造決定にあたり、cycasin と対比しつつ分光学的諸性質や分解生成物について検討を行なつた。糖成分については、一般配糖体化学の常法に加えて、アゾオキシ配糖体の特性を考慮した諸法によつて検討した。

#### 第1節 吸収スペクトル

##### 1. 紫外外部吸収スペクトル

Table 3. General

	Sugar Component	Molecular Formula	m. p.	$[\alpha]_D$
Neocycasin A	$\beta$ -Laminaribiose	$C_{14}H_{26}O_{12}N_2 \cdot H_2O$	162~3°C (decomp.)	-35.1°(29°C) (c 1.0, H <sub>2</sub> O)
Neocycasin B	$\beta$ -Gentiobiose	$(C_{14}H_{26}O_{12}N_2)$		-37.6°(18°C) (c 1.0, H <sub>2</sub> O)
Neocycasin C	$\beta$ -Laminaritetraose	$(C_{26}H_{46}O_{22}N_2)$		
Neocycasin D	$\beta$ -Laminaritriose	$(C_{20}H_{36}O_{17}N_2)$		
Neocycasin E	$\beta$ -Cellobiose	$(C_{14}H_{26}O_{12}N_2)$	156~8°C (decomp.)	-29.2°(15°C) (c 0.9, H <sub>2</sub> O)
Neocycasin F	6-O- $\beta$ -Laminari- biosylglucose	$(C_{20}H_{36}O_{17}N_2)$		
Neocycasin G	3-O- $\beta$ -Gentio- biosylglucose	$(C_{20}H_{36}O_{17}N_2)$		
Cycasin	$\beta$ -D-Glucose	$C_6H_{16}O_7N_2$	144~5°C (decomp.)	-41.3°(28°C) (c 2.0, H <sub>2</sub> O)
Macrozamin	$\beta$ -Primeverose	$C_{13}H_{24}O_{11}N_2$	199°~200°C <sup>19)</sup> (decomp.) 197~8°C (decomp.)	-70°(15°C) <sup>19)</sup> (c 0.4, H <sub>2</sub> O) -84.0°(16°C) (c 0.6, H <sub>2</sub> O)

\* Determined by Micro Hot Plate Method

\*\* Anhydrate

neocycasin 類の水溶液につき島津製および日立製分光光電光度計を用いて測定した。Fig. 7 に明らかなように、スペクトルはいずれも 215~216 $m\mu$  に極大吸収, 274~275 $m\mu$  に屈曲部を有し, 対照として測定した cycasin のスペクトルと同じ特徴を示した。macrozamin も同様である。

## 2. 赤外部吸収スペクトル

neocycasin A を nujor-paste として測定した。Fig. 8 に示すように, 1537 $cm^{-1}$  に脂肪族アゾオキシ基に由来する特異的な吸収がみられ, cycasin の吸収スペクトルと特徴がよく一致する。neocycasin A の 1640 $cm^{-1}$  付近における吸収は cycasin にはみられぬものである。BARKER ら<sup>53)</sup> は糖類の赤外部吸収スペクトルにおけるこの付近の吸収は結晶水に由来することを述べている。従つて, neocycasin A のこの吸収も結晶水に基因するものと考えられ, このことは元素分析の結果によつても裏書きされる。

## 第2節 アルカリ分解

前述のように cycasin は特徴的性質の1つとしてアルカリに甚だ不安定で容易に分解して青酸を生成する。

neocycasin 類の溶液をアルカリ性にて加熱し, 5%硫酸第1鉄溶液1滴を加えて再び加熱の後硫酸

Properties of Neocycasins			
Source	Acetyl Derivative		
	Formula	m. p.	$[\alpha]_D$
<i>C. revoluta</i> (seeds, leaves, stems, male strobils) <i>C. circinalis</i> (seeds) enzymatic transfer product from cycasin	$C_{14}H_{19}O_{12}N_2-$ $(CH_3CO)_7$	142~3°C *146~7°C	-55.5°(29°C) (c 1.0, CHCl <sub>3</sub> )
<i>C. revoluta</i> (seeds, leaves, stems, male strobils) <i>C. circinalis</i> (seeds) enzymatic transfer product from cycasin	$C_{14}H_{19}O_{12}N_2-$ $(CH_3CO)_7 \cdot H_2O$	173~4°C *179~180°C**	-29.4°(20°C) (c 0.3, CHCl <sub>3</sub> )
<i>C. revoluta</i> (seeds) enzymatic transfer product from cycasin or neocycasin A	$\{C_{26}H_{39}O_{22}N_2-\}$ $\{(CH_3CO)_{13}\}$	*164~5°C	
partial hydrolysate of neocycasin C	$\{C_{20}H_{26}O_{17}N_2-\}$ $\{(CH_3CO)_{10}\}$		
<i>C. revoluta</i> (seeds)	$C_{14}H_{19}O_{12}N_2-$ $(CH_3CO)_7$	204~5°C *214~5°C	-33.5°(13°C) (c 0.7, CHCl <sub>3</sub> )
<i>C. circinalis</i> (seeds)	$\{C_{20}H_{26}O_{17}N_2-\}$ $\{(CH_3CO)_{10}\}$		
<i>C. circinalis</i> (seeds)	$\{C_{20}H_{26}O_{17}N_2-\}$ $\{(CH_3CO)_{10}\}$		
<i>C. revoluta</i> (seeds, <sup>22</sup> ) leaves, stems, male strobils) <i>C. circinalis</i> (seeds <sup>111</sup> )	$C_8H_{12}O_7N_2-$ $(CH_3CO)_4$	137~8°C *137~8°C	-25.4°(30°C) (c 0.6, CHCl <sub>3</sub> )
<i>M. spiralis</i> <sup>14</sup> ), <i>M. Riedlei</i> <sup>19</sup> ), <i>M. miquelii</i> <sup>21</sup> ), <i>Bowenia serrata</i> <sup>21</sup> ), <i>C. media</i> <sup>21</sup> ), and <i>Encephalartos barkeri</i> <sup>21</sup> ), (seeds)	$C_{13}H_{18}O_{11}N_2-$ $(CH_3CO)_6$	144~5°C <sup>19</sup> )	-49°(16°C) <sup>19</sup> ) (c 0.85, CHCl <sub>3</sub> )
<i>C. revoluta</i> (seeds, leaves, male strobils) <i>C. circinalis</i> (seeds)		*140~1°C	-44.0°(17°C) (c 1.2, CHCl <sub>3</sub> )

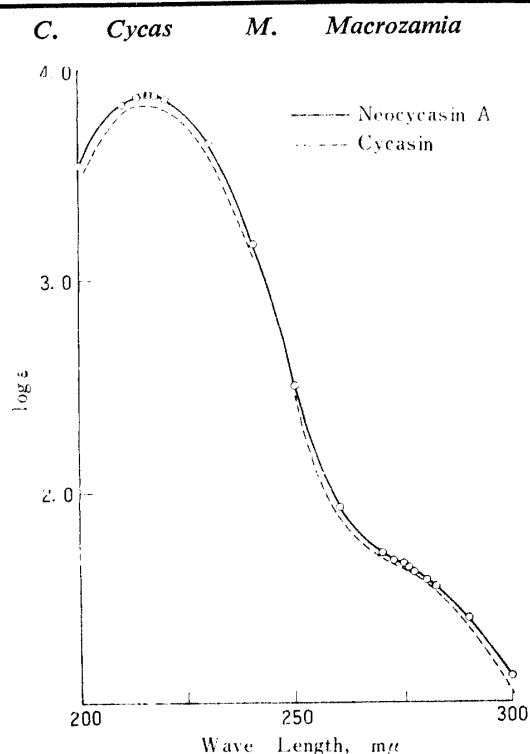


Fig. 7. Ultraviolet Absorption Spectra

	$\lambda_{max}$	$\log \epsilon$	$\lambda_{inflex}$	$\log \epsilon$
Neocycasin A	215m $\mu$	3.89	274m $\mu$	1.66
Neocycasin B	215	3.81	275	1.56
Neocycasin C	216	3.57	275	1.75
Neocycasin E	215	3.75	276	1.86
Neocycasin F	215	3.6	275	1.7
Neocycasin G	215	3.6	275	1.7
Macrozamin	215	3.93	275	1.66

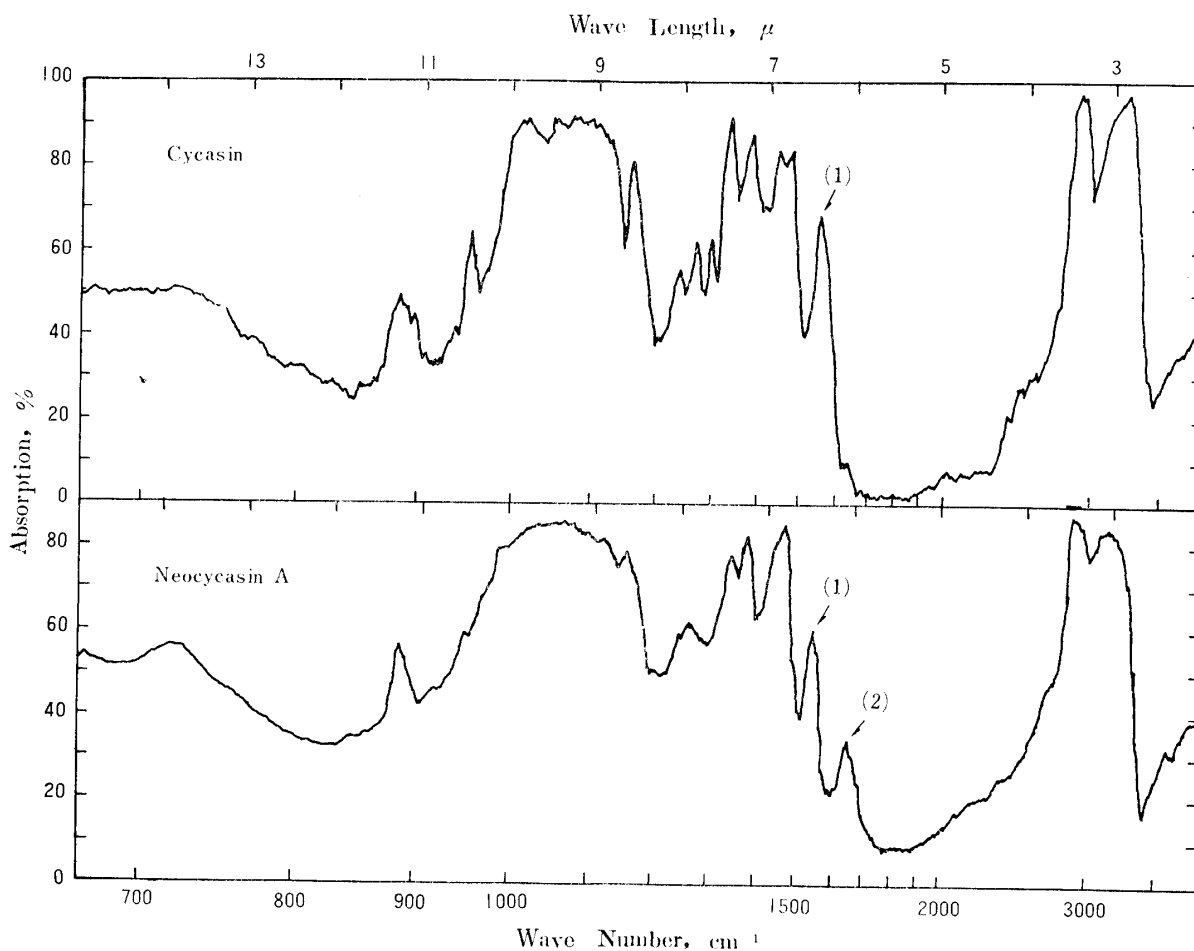


Fig. 8. Infrared Absorption Spectra

The band (1) and (2) are due to the aliphatic azoxy group and the water of crystallization, respectively.

々性にするとベルリン青が生成する (ベルリン青反応). また, 醋酸・ベンチデン反応<sup>59)</sup>によるスポットテストにて青酸の生成が検知された.

### 第3節 酸加水分解

#### 1. 完全加水分解

neocycasin類を1*N*塩酸にて2ないし2.5時間, 100°Cで加水分解の後, p.c.により, あるいはさらに誘導体に導いて糖組成の確認を行ない, また生成する単糖を定量して構成糖モル数を決定した. その結果, neocycasin類の構成単糖はいずれも glucoseのみであることが明らかとなった.

一方, 加水分解液の減圧濃縮に際して得られた溜液についてクロモトロープ酸<sup>60)61)</sup>あるいはジメドン法<sup>62)</sup>によりフォルムアルデヒドを検した結果, いずれもその存在が確認された.

完全加水分解の例を次に示す.

neocycasin A 97 mg を1*N*塩酸 10ml をもつて2.5時間, 100°Cで加水分解した. 水解液を減圧濃縮して塩酸および分解生成物の1つフォルムアルデヒドを除去し, Hanes法<sup>63)</sup>で糖を定量した結果, neocycasin A 1モル当り glucose 2.0モルであった. p.c.によつて glucoseのみが認められ, 常法に従つて水解液から調製したフェニールオサジンは黄色針状晶, m.p. 203°~204°C (decomp.) で, フェ

ニールグルコサザン標品と一致した。減圧濃縮に際する溜液をクロマトローブ酸法で検した結果フォルムアルデヒドの存在が認められた。また, neocycasin A 86mg を同様に水解の後, 使用した逆流冷却管を 1 N 醋酸ナトリウムで洗滌し, 水解液および洗液にジメドン-エタノール溶液を加えて湯浴中で 10 分間反応を行なつた。冷後生成せるフォルムアルドメドンの針状結晶を濾集し, 重量法<sup>62)</sup> によつて定量した結果, neocycasin A 1 モル当りフォルムアルデヒド 0.96 モルであつた。フォルムアルドメドンは再結晶の後 m.p. 186°~187°C で, 標品と全く一致した。

neocycasin B においても同様にして糖の定量を行なつた結果 glucose 1.94 モルの値を得た。

## 2. 部分加水分解

neocycasin 類を 0.2N 硫酸にて 100°C で 1 ないし 2 時間加水分解の後, 炭酸バリウムあるいはアンバーライト IR 45 で脱酸して p.c. により分解生成物を検討した。その結果, Fig. 9 にみられるよ

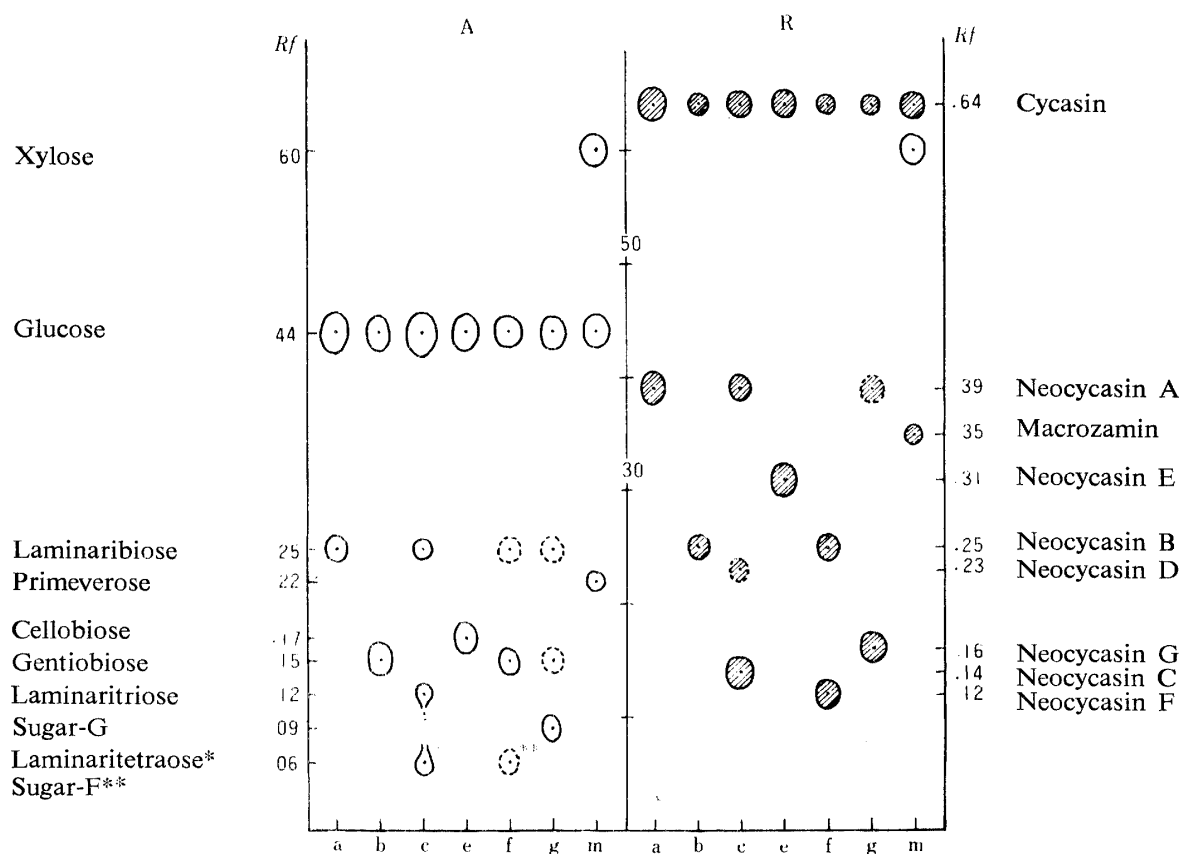


Fig. 9. Paper Chromatogram of the Partially Hydrolysed Products of Neocycasins and Macrozamin

Sugar-F: 6-O- $\beta$ -Laminaribiosylglucose, Sugar-G: 3-O- $\beta$ -Gentiobiosylglucose.  
a, b, c, e, f, g, and m: The respective partial acid hydrolysates of neocycasin A, B, C, E, F, G, and macrozamin.

A: Aniline hydrogen phthalate in aq. BuOH as spray reagent for sugars,  
R: Resorcin-HCl in aq. EtOH as spray reagent for azoxyglycosides.  
Shaded areas represent azoxyglycosides.

Chromatogram was prepared after multiple ascending development (3 runs) using Tōyō No. 2 strips and a mixture of *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4:1:1) as the solvent.

うに, *neocycasin* 類のすべてについて *cycasin* のスポットが認められ, *neocycasin* 類のアグリコンの同一性を示す明らかな証左を得た. また, その他の部分水解生成物をそれぞれの標品と比較同定して, 糖成分決定に有力な知見が得られた. *macrozamin* の同定に際しても部分水解を行なった.

#### 第4節 エムルシンによる分解

エムルシンによる *neocycasin* 類の分解性を検討した.

酵素標品として *C. revoluta* 種子から HELFERICH ら<sup>64)</sup> のタンニン酸沈澱法に準じて調製したソテツ・エムルシン<sup>24)</sup>を用いた. 基質濃度約 0.05M, pH 4.6 (醋酸緩衝液), 30°C, 40 時間の酵素反応の後, 生成物を p.c. にて検した. いずれの場合も酸完全水解と同じく構成単糖である glucose にまで分解されて, *neocycasin* 類の糖間結合はすべて  $\beta$ -結合であることが確かめられた.

#### 第5節 糖成分の確認

*neocycasin* 類の糖成分を単離して同定確認するため次の2方法を行なった.

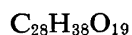
##### 1. アセチル誘導体より糖成分の単離

*neocycasin* 類のアセチル誘導体をアルコラートにて室温で処理すると, 脱アセチルと同時にアグリコン自体も分解されて糖成分が遊離される. 得られた糖成分を p.c. によつて同定する一方, さらにアセチル化してそれぞれの標品と比較同定した.

(例1) heptaacetylneocycasin A より octaacetyl- $\beta$ -laminaribiose の単離 アセチル誘導体 250 mg をクロロフォルム 5 ml に溶解し, 2N ナトリウムメチラート溶液 2 ml を加えて室温に1時間おき, 生じた沈澱を濾取してクロロフォルムで洗滌した. この沈澱を p.c. にて検したところ laminaribiose の外に微量の glucose も認められたので, 精製のため活性炭 c.c. (活性炭 40g, 径 1.8cm×長25cm) を行なった. 水250ml を用いて混在する glucose を溶出, 次いで 35% エタノールで laminaribiose を溶出した. laminaribiose のみを含む区分を減圧濃縮の後, 無水磷酸上で減圧乾燥して白色粉末 65 mg を得た. この粉末は p.c. によつて laminaribiose の単一スポットを示す.

無水醋酸 0.5 ml, 醋酸ナトリウム 33mg とともに上記粉末を 110°~120°C に加熱してアセチル化を行ない, 常法のごとく処理した後, エタノールから再結晶して針状晶 13mg を得た.

m.p. 159°~160°C で octaacetyl- $\beta$ -laminaribiose 標品と混融して融点降下を示さなかつた. 分析結果は次のとおりである.



計算値: C, 49.56%; H, 5.64%,

分析値: C, 49.36%; H, 5.70%.

前記アルコラート処理に際する laminaribiose 分離後の濾液について, フォルムアルデヒド確認のためジメドン法を行なった. 得られた針状晶は m.p. 184°C でフォルムアルドメドンであることを確かめた. また, 上記アルコラート処理液にはベルリン青反応および醋酸ベンチデン法によつて青酸も検出された.

(例2) heptaacetylneocycasin E より octaacetyl- $\beta$ -cellobiose の単離 アセチル誘導体 18mg をクロロフォルム 1.5ml に溶解し, 2N ナトリウムメチラート 0.5ml を加えて室温に1時間おいた. 生成した沈澱をクロロフォルムにて洗滌の後減圧乾燥して白色粉末を得た. この粉末はクロロマトグラム上 cellobiose の単一スポットを示し, さらにアセチル化によつて得られた微針状晶 4 mg は m.p.



200°~201°C (micro hot plate) で octaacetyl- $\beta$ -cellobiose 標品と混融して融点降下を示さなかつた。

## 2. 還元分解による糖成分の単離

neocycasin 類を醋酸および亜鉛末で処理するとアグリコンのみが分解され糖成分が得られる。

(例1) neocycasin B より octaacetyl- $\alpha$ -gentiobiose の単離 neocycasin B 50 mg を 50%醋酸 2 ml に溶解し、微量の硫酸銅を加えて沸騰浴中で加熱しつつ亜鉛末 200mg を徐々に投入して3時間反応を続けた。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た。p.c. によつて gentiobiose であることを確かめ、また、ピリジンおよび無水醋酸各 2 ml とともに 100°C で 2.5 時間アセチル化反応を行ない、常法のごとく処理して針状晶 38mg を得た。このアセチル誘導体は m.p. 187°~188°C で、octaacetyl- $\alpha$ -gentiobiose 標品と混融、同定した。

(例2) neocycasin C, F および G よりそれぞれの糖成分の単離 各試料 2 ないし 3 mg を上記同様に処理して陰、陽両イオン交換樹脂にて脱塩し、得られた糖成分について検討を行なつた。neocycasin C に関しては第4章第3節に、また、neocycasin F および G に関しては第6章第3節において詳述する。

## 第6節 アセチル誘導体の酸分解

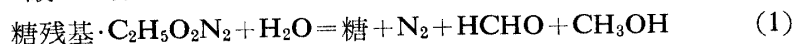
heptaacetylneocycasin A 700mg をクロロフォルム 10ml およびエーテル 2.5ml の混液に溶解し、これに乾燥塩酸ガスを 30 分間通じた後、密栓して室温に 1 時間おいた。生成した沈澱を濾取し、エーテル-クロロフォルム混液で洗滌した後、水 1 ml に溶解、50%硫酸 0.3ml を加えた結果白色沈澱が生成した。これを熱水から再結晶して得られた白色晶は m.p. 247°C で、ヒドラジン硫酸塩標品とよく一致した。

上記の塩酸ガス処理濾液を蒸溜して得られた溜液中にはフォルムアルデヒドがクロモトローブ酸反応により検出された。

## 第7節 考 察

西田ら<sup>22)</sup> や LANGLEY<sup>20)</sup> は cycasin および macrozamin について次のような反応挙動を明らかにした。

### 1. 酸 分 解



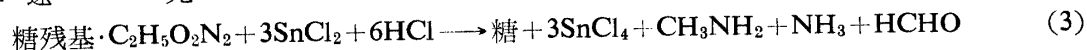
反応は定量的に行なわれて、アグリコンの炭素 2 原子のうち、1 コはフォルムアルデヒドの、他の 1 コはメタノールの炭素原子としてあらわれ、また、窒素 2 原子は分子状 N<sub>2</sub> に化生するものと考えられる。特に定量的な N<sub>2</sub> ガスの生成は cycasin および macrozamin が N-N 結合を有することを示すものである。

### 2. アルカリ分解



N<sub>2</sub> ガスの発生はアルカリ分解においてもみられ、N-N 結合の存在が強く暗示される。しかし、分解生成物はいずれも非化学量論的にあらわれ、酸分解に比べて複雑である。青酸の生成は甚だ特徴的である。

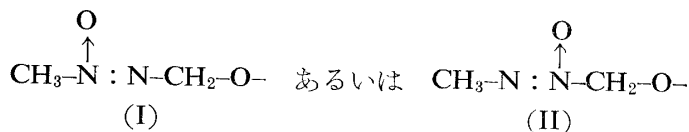
### 3. 還 元



還元の際し、配糖体 1 モル当り塩化第 1 錫 3 モルの消費が認められ、分解生成物は定量的に得られる。

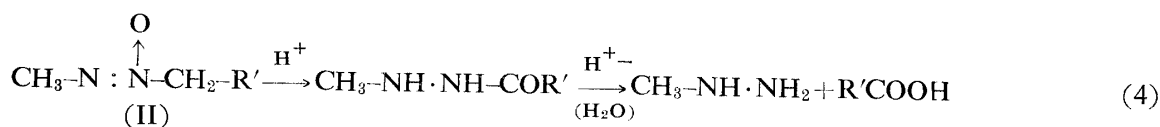
以上の諸反応から、アグリコンは (a) C-N-N 構造を有していること、(b) 糖成分は酸素原子あるいは窒素原子を介してこれに結合していることを結論している。そして、C-N-N 構造の中で、アゾおよびニトロサミン構造はその特徴を示す紫外部吸収のないこと、ジアゾおよびアゾエーテル構造は熱に対して不安定であるが *cycasin* や *macrozamin* は安定であること、また、ニトラスオキサイド構造は糖成分の結合位置を与えないことから、それらの構造はいずれも否定され、結局、アゾオキシ構造のみが可能性を有するものとして残されると述べている。LANGLEY ら<sup>65)</sup>は、アゾオキシメタン、1-アゾオキシプロパンおよび 2-アゾオキシプロパンなどを合成して紫外部吸収を検した結果、特に第 1 級アゾオキシ化合物である前 2 者は *macrozamin* と同一のスペクトルを示すことを認めた。*cycasin* の吸収スペクトルも同様である。赤外部吸収については、前記合成化合物の中で、アゾオキシメタンが  $1527\text{cm}^{-1}$  に特異的吸収を示し、*macrozamin* および *cycasin* の  $1540\text{cm}^{-1}$  における吸収に最も近似する。第 1 級脂肪族アゾオキシ化合物の化学は現在なお未開拓の面が多く、非対象位置に置換基をもつ化合物の合成例がないので、*cycasin* や *macrozamin* のアグリコンをそのような合成物質と比較できないが、アゾオキシメタンとこれら配糖体の間にみられる赤外部吸収位置の上記のような“ずれ”は、糖が置換基として存在することに原因すると考えられる。

これらを論拠として *cycasin* および *macrozamin* のアグリコンが



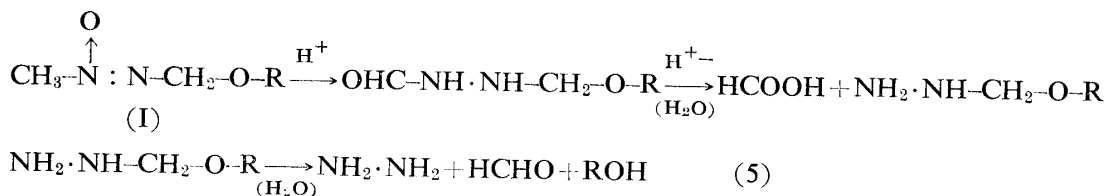
であることを結論するに至った。

第 1 級および第 2 級アゾオキシ化合物の濃硫酸処理に際して得られた従来の知見から考えるに、もし、アグリコンが (II) のタイプであるならば、



の式に従つてメチルヒドラジンが生成するはずである。

また (I) の場合には、



のごとくヒドラジンを生成するであろう。

*hexaacetylmacrozamin* および *tetraacetylcycasin* をクロロフォルム-エーテル混液中で塩酸ガスにて処理するとヒドラジン、フォルムアルデヒドの生成が認められるので、反応は (5) 式に従うことが明らかである。従つて、これら両配糖体のアグリコンの構造は (I) であることが確かめられた。

*cycasin* や *macrozamin* に関するこれらの知見に基づいて *neocycasin* 類の示す諸挙動を考察するに、*neocycasin* 類の紫外部吸収スペクトルはいずれも  $215\sim 216\text{m}\mu$  に極大吸収、 $274\sim 276\text{m}\mu$  に屈曲部を示し (Fig. 7)、さらに赤外部吸収スペクトルも *neocycasin* A が  $1537\text{cm}^{-1}$  に特異的な吸収

を示して (Fig. 8), *cycasin* の吸収スペクトルとよく一致した。

アルカリ分解においては青酸の生成が、また、酸加水分解においてはフォルムアルデヒドの生成が認められた。そして *neocycasin A* 1 モルの加水分解によつて 1 モルのフォルムアルデヒドが得られるので、*neocycasin* 類の酸加水分解も *cycasin* と同様 (1) 式に従つて進行するものと考えられる。さらに *heptaacetylneocycasin A* のクロロフォルム中での塩酸ガス処理によつてヒドラジンやフォルムアルデヒドが生成されることは、*neocycasin* 類の前記諸挙動をも考え合せて、これらのアグリコンが *cycasin* と同じく (I) のタイプの *hydroxyazoxymethane* であることを証するものである。

糖成分に関しては、*neocycasin* 類の完全加水分解物について p.c. を行ない、また、生成する糖を誘導体に導いて検討した結果、構成単糖はいずれも D-glucose であり、その定量によつて glucose のモル数を確かめた。そして、エムルシンにより分解されて glucose が生成されることから glucosido 結合はすべて  $\beta$  型であることが明らかになった。

*neocycasin* 類の部分加水分解物のクロマトグラム (Fig. 9) を検討して次の生成物が同定された。

*neocycasin A*  $\longrightarrow$  *cycasin*, glucose, laminaribiose.

*neocycasin B*  $\longrightarrow$  *cycasin*, glucose, gentiobiose.

*neocycasin C*  $\longrightarrow$  *cycasin*, *neocycasin A*, *neocycasin D*\*, glucose, laminaribiose, laminaritriose, laminaritetraose.

*neocycasin D*\*  $\longrightarrow$  *cycasin*, *neocycasin A*, glucose, laminaribiose, laminaritriose.

*neocycasin E*  $\longrightarrow$  *cycasin*, glucose, cellobiose.

*neocycasin F*  $\longrightarrow$  *cycasin*, *neocycasin B*, glucose, gentiobiose, laminaribiose, 6-O- $\beta$ -laminari-biosylglucose.

*neocycasin G*  $\longrightarrow$  *cycasin*, *neocycasin A*, glucose, laminaribiose, gentiobiose, 3-O- $\beta$ -gentio-biosylglucose.

*neocycasin* 類の部分加水分解生成物として、いずれも *cycasin* が認められることは、アグリコンの同一性を証するものであるのみならず、このことに基づいて *neocycasin* 類を *glycosylcycasin* として体系化することができ、*neocycasin* 類の大きな特徴の一つとなるものである。従つて三糖類、四糖類などのオリゴ糖を糖成分とする *neocycasin* 類の構造を検討する際に、試料量に制約があり、あるいは、糖成分自体の標品を得られない場合においても、*cycasin* の外に中間生成物としての *glycosylcycasin* および糖成分の部分加水分解生成物の数、種類を検討することにより原配糖体の構造をほぼ推定できる。

糖成分はさらに単離を行なつて確認した。*neocycasin* 類のアセチル誘導体を室温下にナトリウムメチラートで処理すると、脱アセチルと同時にアグリコンにまで作用が及びアグリコン自体が分解されて糖成分が遊離する。一方、*neocycasin* 類を醋酸-亜鉛末により処理しても糖成分が得られる。前者によつて *neocycasin A* および *E* からそれぞれ laminaribiose および cellobiose を単離し、アセチル化の後 octaacetyl- $\beta$ -laminaribiose および octaacetyl- $\beta$ -cellobiose として確認した。また、後者によつて *neocycasin B, C, F, G* の各糖成分として gentiobiose, laminaritetraose, 6-O- $\beta$ -laminari-biosylglucose, 3-O- $\beta$ -gentiobiosylglucose をそれぞれ単離し、これらの中で gentiobiose はさらに octaacetyl- $\alpha$ -gentiobiose としても同定、確認を行なつた。

以上のことから結論される *neocycasin* 類の構造式を Fig. 10 に示した。

*neocycasin* 類はアグリコン部において類例のない構造であるとともに、糖成分においても甚だ興味あるものを含んでいる。それらの 1 群は *neocycasin A, C* および *F, G* であつて、糖成分として  $\beta$ -

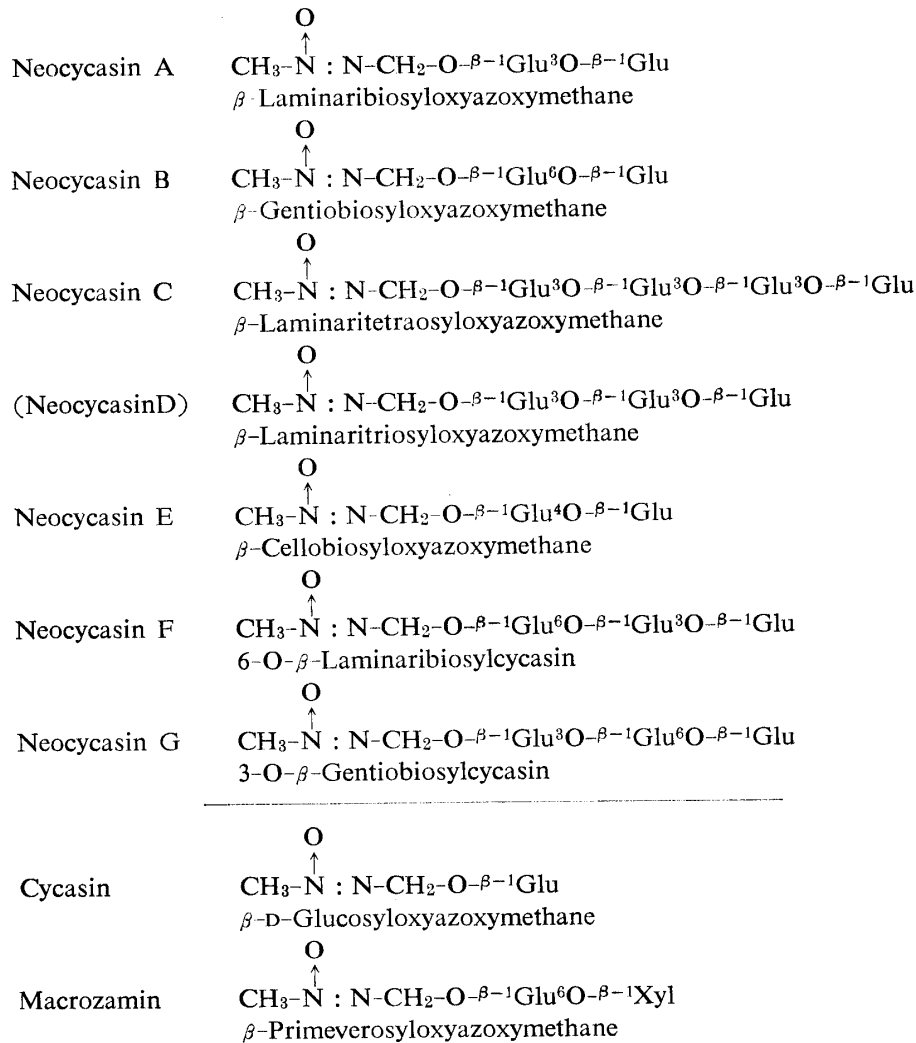


Fig. 10. The Chemical Structure of Neocycasins  
 Glu : Glucosyl residue, Xyl : Xylosyl residue.

1,3 結合糖, すなわち laminari-biose, -tetraose および  $\beta$ -1, 3 と  $\beta$ -1, 6 結合を合わせもつ 6-O- $\beta$ -laminaribiosylglucose, 3-O- $\beta$ -gentiobiosylglucose をそれぞれ有するものであり, 他の 1 つは neocycasin E で糖成分は  $\beta$ -1, 4 結合糖, すなわち, cellobiose である。

特に neocycasin A は, *C. revoluta* 種子の neocycasin 類の中では最大含量で存在し, 最も特徴的なものである。上記 neocycasin 類とともにこのような糖成分をもつ配糖体はいずれも従来天然界において見出されていない。糖成分自体も遊離糖としての存在については報告がなく, ただ, 著者ら<sup>66)</sup>がさきに *C. revoluta* 種子に遊離 laminaribiose の存在を認めた 1 例のみである。

laminaribiose は, はじめ BARRY<sup>67)</sup>によつて海藻 *Laminaria* 属から得られた多糖類ラミナリンの分解生成物として単離され, その構造が決定された。その後, laminaribiose は各種海藻<sup>51)52)</sup>, 茯苓<sup>68)69)</sup>, 菜種菌核<sup>54)70)</sup>, 酵母<sup>71)</sup>の外, 燕麦<sup>72)</sup>, 大麦<sup>73)</sup>, 葡萄樹<sup>74)75)</sup>などの多糖類の構成成分としても見出され, これとともに一連の laminaridextrin<sup>51)54)68)69)71)75)</sup>や 6-O- $\beta$ -laminaribiosylglucose<sup>52)</sup>, 3-O- $\beta$ -gentiobiosylglucose<sup>52)70)</sup>, 4-O- $\beta$ -laminaribiosylglucose<sup>72)</sup>などの三糖類もまた得られている。小野ら<sup>76)</sup>は大麦を原料とするアミロ法もろみ中に laminaribiose および 3-O- $\beta$ -cellobiosylglucose を認めたが, これらは

大麦の多糖類の分解に由来するものとしている。

このように上記の  $\beta$ -1, 3 結合を含む種々のグルコオリゴ糖が多糖類の分解生成物として知られているが、一方、laminaribiose はまた cellobiose や gentiobiose とともに、glucose の酸逆合成物としてハイドロール<sup>42)43)</sup> 中に、あるいは扁桃エムルシン<sup>77)</sup>、*Aspergillus niger*<sup>78)</sup> による糖縮合生成物としても見出されている。しかしながら、ソテツ試料からの抽出過程において、以上述べたような反応によってこれらの一連の neocycasin 類が二次的に生成したとは考えられない。すなわち、抽出に際する酸濃度は、酵素作用を完全に失活させるに十分であり、しかも酸による糖類の分解あるいは縮合の可能性を考えるには余りにも緩和な条件である。そして前章の抽出の項において述べたように、植物試料を加熱処理の後に抽出して調製したシラップにも neocycasin A をはじめとする一連の neocycasin 類の存在が認められるので、neocycasin 類はソテツ中に本来存在する配糖体であることは明らかである。

#### 第4章 ソテツ・エムルシンによるアゾキシ配糖体の相互変換

前章において、ソテツ種子には cycasin を出発母体として一連の neocycasin 類の存在することが明らかになったが、このように、同一植物組織中にアグリコンを同じくする配糖体が多数存在し、また、neocycasin A に代表されるように、天然配糖体としてはまったく新しい  $\beta$ -1, 3 結合糖を糖成分とする配糖体の存在は注目に値するものである。これらの事実は、酵素的糖転移や特異性の問題と関連して甚だ興味あることであつた。

RABATÉ<sup>79)</sup> は柳属などの緑葉粉末が  $\beta$ -配糖体の水解能とともに、遊離する glucosyl 基を受容体に結合させる能力のあることを認めた。その後、糖転移 (transglycosylation) について研究が進められ、三輪ら<sup>80)</sup> は各種植物の  $\beta$ -グルコシダーゼ標品を用いて RABATÉ の結果を確認し、さらにアルコールへの糖転移を定量的に検討した。高野ら<sup>81)</sup> はグルコシダーゼの作用機作を次のように考えた。

酵素 + 基質 ( $R_1-O$ -糖残基)  $\rightarrow$  酵素-基質複合体

酵素-基質複合体 +  $R_2-OH \rightarrow$  酵素 +  $R_2-O$ -糖残基 +  $R_1-OH$  (6)

(6) 式において、 $R_2$  が水素原子、すなわち受容体が水分子の場合が水解であり、 $R_2$  がアルキル基の場合は糖転移であるとして、酵素作用機構を一元的に説明した。さらに西沢ら<sup>82)</sup> によつて、糖転移反応は水解酵素としての  $\beta$ -グリコシダーゼのもつ一般的性質であることが明らかにされた。

糖転移反応において、(6) 式の  $R_2$  が糖残基であれば当然新しくオリゴ糖が生成され、諸グルコシダーゼの糖転移反応は、磷酸の関与する諸反応とならんで、生体内での配糖体やオリゴ糖の生成に重要な役割をなすものと考えられている。

このような知見に基づいて、アゾキシ配糖体の生成過程の一端を知るべく検討を行なつた。

実験に用いた酵素標品は *C. revoluta* 種子より調製したソテツ・エムルシン<sup>24)</sup> である。

##### 第1節 Neocycasin 類より Cycasin の酵素的減成

neocycasin A 20mg (最終濃度 0.05M)、ソテツ・エムルシン 2.5mg、N/10 醋酸緩衝液 (pH 4.6) 1 ml の組成液を 30°C にて反応させた。neocycasin B および C は 1/10 の規模で反応を行なつた。2 時間後、生成物を p.c. で検したところ、いずれも cycasin の減成が認められ、酸部分水解の場合 (Fig. 9) とほぼ同様の結果が得られた。

##### 第2節 Cycasin より Neocycasin 類の酵素的生成

###### 1. 転 移 反 応

反応の組成液は 0.25M cycasin 溶液 3 ml (最終濃度 0.15M), N/10 醋酸緩衝液 (pH 5.6) 2 ml で, 酵素標品 40mg (反応 I) あるいは 8 mg (反応 II) を用いてトルエン存在下に 30°C で反応を行なった. 反応過程追跡のため, 各時間に採取した試料はそれぞれ加熱処理の後 p.c. にて生成物を検する一方, 既報<sup>83)</sup> に準じてアゾキシ配糖体および糖を分別定量した. すなわち, 試料一定量について多重展開法にて p.c. を行ない, 各生成物のスポット相当部をガイドストリップに従って切り取り溶出後, PLUMEL 法<sup>84)</sup> により比色定量を行なうものである. Fig. 11 に反応生成物の消長を示した.

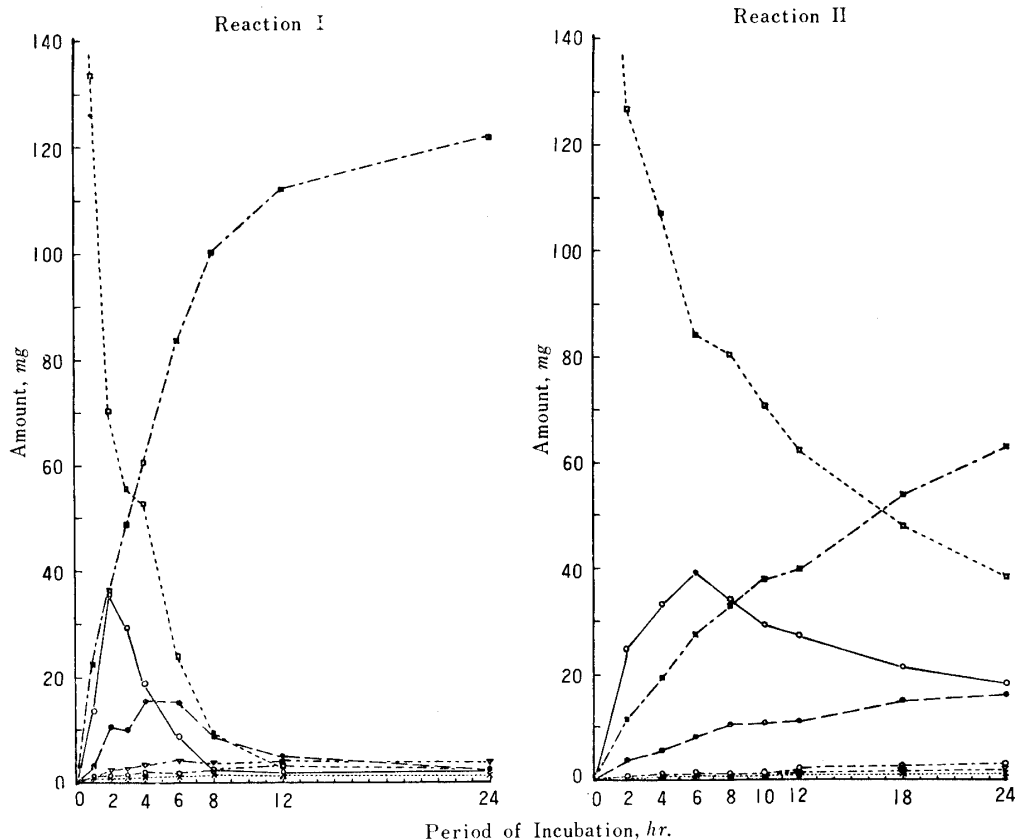


Fig. 11. Determination of the Products formed during the Course of Cycasin-Cycad Emulsin Reaction

□---□ Cycasin (substrate), ■---■ Glucose, ○—○ Neocycasin A, ●---● Laminaribiose, ○---○ Neocycasin C, ▽-----▽ Neocycasin B, ×.....× Gentiobiose.

Reaction I: The reaction mixture, containing 3 ml of 0.25 M cycasin solution, 2 ml of N/10 acetate buffer (pH 5.6) and 40 mg of cycad emulsin was incubated at 30°C.

Reaction II: The condition of reaction is the same as that of Reaction I except 8 mg of cycad emulsin.

反応 I, II いずれの場合も, 基質の cycasin が分解するにつれて neocycasin A および laminaribiose が主要産物として生成し, 次いで neocycasin B および gentiobiose もわずかに認められるに至った. 反応の推移は酵素量の多少によつてかなり相違し, neocycasin A の最大集積がみられるのは, 反応 I において 2 時間 (生成量 35.6 mg, 生成率 23.0%), 反応 II では 6 時間 (生成量 39.2 mg, 生成率 25.2%) であった.

neocycasin A はこの後次第に分解されるが、これに前後して新しく neocycasin C の生成も認められた。

## 2. 反応生成物の分離, 同定

0.25M cycasin 溶液 6 ml, N/10 醋酸緩衝液 (pH 5.6) 4 ml, 酵素標品 8 mg の組成液にトルエン数滴を加えて 30°C で反応を行なつた。30 時間後反応液を加熱処理して反応を停止させ、活性炭カラム (活性炭 40g, 径 3 cm×長 27cm) に注加, 水, 次いで 10, 15, 30, 40 % の各濃度のエタノールで順次溶出, 溶出液 50ml ずつを分割採取して組成を p.c. にて検した。同一組成のフラクションは合してグループに分けた。各グループの組成は Table 4 に示すとおりである。

Table 4. Chromatographic Separation of the Products formed from Cycasin by Cycad Emulsin

Elution Reagent	Fraction No. (50 ml)	Group	Composition
H <sub>2</sub> O	1 ~ 39	I	Glucose
EtOH 10%	40 ~ 45	II	Glucose
	46 ~ 50	III	Gentiobiose
15	51 ~ 54	IV	Cycasin, Laminaribiose
	55 ~ 59	V	Cycasin, Laminaribiose, Neocycasin B
30	60	VI	Neocycasin A, Neocycasin B
	61 ~ 65	VII	Neocycasin A
40	66 ~ 67	VIII	Neocycasin A, Neocycasin C
	68 ~ 71	IX	Neocycasin C

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand)-Celite (No. 545) 2:1 by weight, total 40 g, dia. 3 cm×length 27 cm.

The conditions of enzymatic reaction were described in text.

混合成分を有するグループは、濃縮後の試料を濾紙 (東洋 No. 2) の原線に帯状に塗布してバンド p.c. を行ない各成分の分離を図り、また、単一成分のグループについても同様に行なつて精製した。展開剤として、グループ III, IX については BPW, グループ IV, VI, VII, VIII については BAW (411), また, laminaribiose と neocycasin B の混在するグループ V では BEWP を用いて、それぞれ 2 ないし 3 回の多重展開を行なつた。常法のように濾紙上の各生成物相当バンドを切り取り溶出後減圧濃縮, 硫酸デシケーター中で減圧乾燥して粉末とした。得られた各反応生成物の粉末は、いずれもクロマトグラム上単一スポットを示し、それぞれの標品と一致する。各反応生成物はさらに以下のようにして確認した。

(1) neocycasin A (33.2mg) 試料 5 mg を 0.2N 硫酸 1.25ml をもつて 100°C で 90 分間加水分解し、炭酸バリウムで中和の後 p.c. を行なつた。部分水解生成物として cycasin, glucose, laminaribiose が認められた (p.c.: BPW, 多重展開 2 回)。

別に試料 28mg をピリジンおよび無水醋酸とともに室温においてアセチル化を行ない、生成したアセチル誘導体をエタノールから再結して針状晶 27.2mg を得た。m.p. 141.5°~143°C で heptaacetyl-neocycasin A の標品と混融して融点降下を示さない。

(2) laminaribiose (11.3mg) 試料 10mg をピリジン, 醋酸ナトリウムを助剤として無水醋酸によりアセチル化を行なつた。生成物をエタノール-石油エーテル混液から再結晶してプリズム晶 4 mg を得た。m.p. 166°C (micro hot plate) で octaacetyl-β-laminaribiose 標品と混融して融点降下を示さ

ない。

(3) neocycasin B (3.5mg) 試料 3 mg を 0.2N 硫酸 0.6ml で前記同様に部分水解して, cycasin, glucose, gentiobiose が生成することを確かめた (p.c. : BEWP, 多重展開 3 回)。

(4) gentiobiose (1.9mg) 1 N 塩酸による 100°C, 90 分の加水分解により glucose が生成した (p.c. : BPW, 多重展開 2 回)。

(5) neocycasin C (2.4 mg) p.c. における発色性や, アルカリ分解により青酸を生成することなどから neocycasin 類の 1 つであることが明らかであつて, 酸部分水解により cycasin, neocycasin A, glucose, laminaribiose の外にオリゴ糖の生成が認められた (p.c. : BPW, 多重展開 3 回)。従つて, neocycasin C は  $\beta$ -glycosylneocycasin A であることが推定された。

なお, この neocycasin C は, *C. revoluta* 種子から得られたそれと p.c. において *Rf* 値が一致する。

### 第 3 節 Neocycasin A より Neocycasin C の酵素的生成

前節に述べたように, ソテツ・エムルシンの糖転移反応によつて, cycasin から neocycasin A および B の生成が明らかになつた。その際, さらに反応が進行するにつれて新たに 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  $\beta$ -glycosylneocycasin A であると推定された。従つて, neocycasin C は 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。

#### 1. 転 移 反 応

反応液組成は, 0.125 M neocycasin A 溶液 0.5ml (最終濃度 0.075M), N/10 醋酸緩衝液 (pH 5.6) 0.3ml, 酵素標品 0.7mg で, トルエンの存在下に 30°C で反応を行なつた。転移反応の経過を追跡するために, 各時間において試料 0.1 ml ずつを採取して加熱処理の後 p.c. を実施した。その結果は Fig. 12 に示すとおりで, 反応初期から neocycasin A の分解生成物 cycasin, glucose, laminaribiose が認められ, いずれも時間とともに増加するが, cycasin はやがて減少している。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, その後次第に増加の傾向を示した。反応の進行にともない, neocycasin B やオリゴ糖の生成も認められたが, 42 時間の反応を通じての主要な転移生成物は neocycasin C であつた。

#### 2. 反応生成物の分離, 同定

0.125M neocycasin A 溶液 9 ml, N/10 醋酸緩衝液 (pH 5.6) 6 ml, 酵素標品 12mg の組成液をトルエンの存在下に 30°C で反応させ, 24 時間の後に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, 反応濾液について活性炭 c.c. (活性炭 2 : セライト 1, 計 60g, 径 4 cm  $\times$  長 18 cm) を行なつた。水, 次いで 5, 15, 20, 25, 30, 40 % の各濃度のエタノールで順次溶出し, 溶出液は 500ml ずつ分割採取した。p.c. の結果に従い, 組成に応じてフラクションを合一し, 6 つのグループに分けた。各グループの糖組成は Table 5 のとおりで, それぞれについてさらにバンド p.c. (濾紙 : 東洋 No. 131) による分離, あるいは精製を図つた。

グループ II は最初 BAW (411) にて 2 回の多重展開を行なつた。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 および未知糖 x を単一成分に分離した。グループ IV についても, BAW (411) による 3 回の多重展開で分離できなかった未知糖 y,



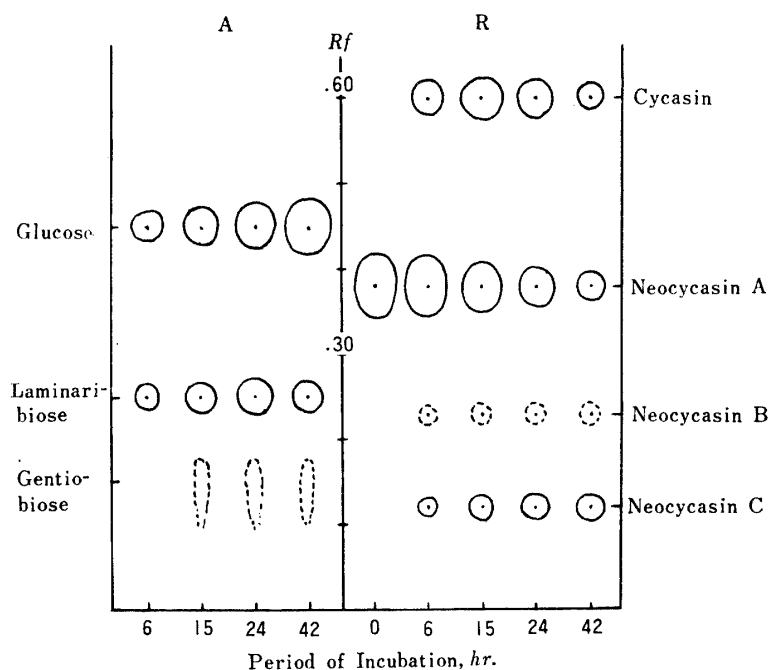


Fig. 12. Paper Chromatogram of the Products formed during the Course of Neocycasin A-Cycad Emulsin Reaction

A: Aniline hydrogen phthalate in aq. BuOH as spray reagent for sugars,

R: Resorcin-HCl in aq. EtOH as spray reagent for azoxyglycosides.

Chromatogram was prepared after multiple ascending development (3 runs) using a mixture of *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1) as the solvent.

The conditions of enzymatic reaction were described in text.

Table 5. Chromatographic Separation of the Products formed from Neocycasin A by Cycad Emulsin

Elution Reagent	Fraction No. (500 ml)	Group	Composition
H <sub>2</sub> O	1 ~ 4		
EtOH 5%	5 ~ 6	I	Glucose
	7 ~ 8		
	15	II	Glucose, Laminaribiose, Cycasin, Gentiobiose, x
	20	III	Laminaribiose, Neocycasin A, Neocycasin B
	25	IV	Laminaribiose, Neocycasin A, y (Laminaritriose), z (Laminaritetraose)
	30	V	Neocycasin A
40	21 ~ 22	VI	Neocycasin C

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand)-Celite (No. 545) 2 : 1 by weight, total 60 g, dia. 4 cm × length 18 cm.

Yields of the Reaction Products: cycasin 45.9 mg, glucose 136.8 mg, laminaribiose 50.6 mg, neocycasin B 1.3 mg, gentiobiose 1.1 mg, neocycasin C 9.1 mg, x 1.1 mg, y 1.9 mg, z 1.5 mg.

The conditions of enzymatic reaction were described in text,

z は、同様にして BPW により 5 回の展開により分離できた。グループ III は BEWP により、また V および VI は BPW によりそれぞれ 2 回の展開を行なった。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、それぞれの相当部を切り取り溶出の後減圧濃縮し、凍結乾燥して粉末とした。いずれも p.c. において単一スポットを示し、既知物質についてはそれぞれの標品と比較同定した。

cycasin と laminaribiose はさらにアセチル化を行なった。得られたアセチル誘導体はそれぞれ m.p. 134.5°~135°C および m.p. 155°~156°C で、tetraacetylcycasin および octaacetyl- $\beta$ -laminaribiose 標品と混融していずれも各標品とよく一致した。

### 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 1 mg を 0.2N 硫酸 0.15ml にて 1 時間、100°C で部分水解して炭酸バリウムで中和、生成物を p.c. にて検した。Fig. 13 a に示すように、y は laminaribiose と glucose を、z は y に相当するスポットおよび 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。

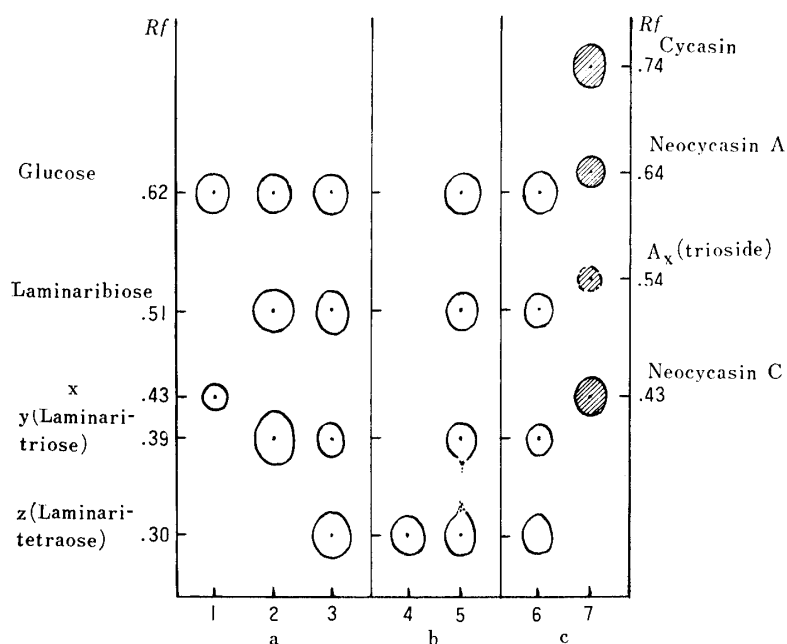


Fig. 13. Paper Chromatogram of the Partial Hydrolysates of Neocycasin C and Transfer Product x, y, and z

- a: 1, 2, and 3 are the partial acid hydrolysates of x, y, and z.  
 b: 4, Sugar component of neocycasin C.  
 5, The partial acid hydrolysate of 4.  
 c: The hydrolysate of neocycasin C 6, Located with aniline hydrogen phthalate reagent for aldoses and 7, With resorcin-HCl reagent for azoxyglycosides.  
 Chromatogram was prepared after multiple ascending development (3 runs) using Tōyō No. 131 strips and a mixture of *n*-BuOH-pyridine-H<sub>2</sub>O (6 : 4 : 3) as the solvent.

同一結合様式をもつ二糖類や三、四糖類などの一連のオリゴ糖の間では、各糖の重合度と  $\log[Rf/(1-Rf)]$  値に関して直線関係が成立することが言われていて<sup>85)</sup>、多くの応用例<sup>(70)86)87)</sup>がある。そこで、加水分解の結果からそれぞれ laminaritriose および laminaritetraose と考えられる y と z について、glucose や laminaribiose とともにこの関係を求めると、Fig. 14 に示すようによく直線関係が

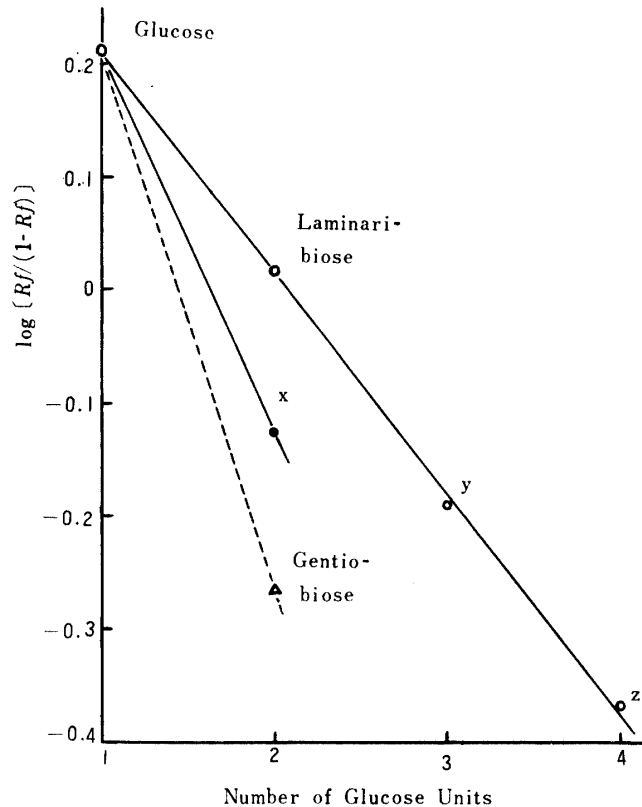


Fig. 14. Relative Mobilities on Paper Chromatography of Aldose produced by Transfer Reaction and the Partial Hydrolysis of Neocycasin C  
Logarithmic values were calculated on the basis of  $R_f$  values represented in Fig. 13. For reference, the value on gentiobiose was also plotted.

成立して前記の結論が裏付けられた。

xは部分水解により glucose のみを生成し、また活性炭 c.c. における溶出状況からも glucobiose と推定されるが同定するに至らなかった。

#### 4. Neocycasin C の構造

Neocycasin Cは収量少なく、構造検討のためには試料量に制約があつた。そこで、新たに第1節に準じて cycasin 2.8g を用いて転移反応を行ない、neocycasin C 27mg を得て、本節において得た neocycasin C と平行して構造を検討し、あわせて同定を行なつた。

(1) 定性反応および紫外外部吸収スペクトル アルカリ分解により青酸を生成する。また、水溶液について紫外外部吸収スペクトルを測定した結果、 $\lambda_{\max.} = 216 m\mu$  ( $\log \epsilon = 3.57$ ),  $\lambda_{\text{inflex.}} = 275 m\mu$  ( $\log \epsilon = 1.75$ ) で neocycasin 類の特徴をよく示している (Fig. 7)。

(2) 酸加水分解 試料 0.5mg を 1N 塩酸 0.2ml でもつて 100°C, 2時間の加水分解の後、glucose のみの生成が認められた。また、試料 2.5mg についての 0.2N 硫酸 0.28ml による 100°C, 1時間の部分水解では、Fig. 13 c のように、glucose, laminaribiose の外に y および z に相当するスポット、すなわち laminaritriose および laminaritetraose が認められ、中間的に生成される配糖体としては cycasin, neocycasin A とスポット  $A_x$  が見出された。

(3) 糖成分 neocycasin C の糖成分を遊離状に得るため、第2章第5節2に述べた方法に準じ、

試料 3 mg を微量の硫酸銅とともに 50% 醋酸および亜鉛末で加熱処理してアグリコンを分解し去つた。反応液をアンバーライト IR 120 および IR 45 で処理後濃縮し、シラップを p.c. にて検した結果、糖成分として z に相当するスポット、すなわち laminaritetraose が認められた。

このシラップを 0.2N 硫酸で部分水解すると、z の場合と同じく、laminaritriose, laminaribiose, glucose が生成する。これらの結果を Fig. 13 b に示した。

(4) アセチル誘導体 試料 8 mg をピリジンおよび無水醋酸各 0.5ml とともに室温に 60 時間おいた後、エタノールを加えて減圧濃縮を繰返して白色残渣を得た。メタノール、エタノール、ブタノールなどから結晶化を図つたが成功せず、いずれの場合も膨潤ゲル状を呈した。ガラスフィルターにて母液を分離して粉末 3.8mg が得られた。m.p. 164°~165°C (micro hot plate) で、さきに *C. revoluta* から単離した neocycasin C のアセチル誘導体と混融しても融点降下がなかつた。

以上の結果から neocycasin C は  $\beta$ -laminaritetraosyloxyazoxymethane であることが結論される。従つて、neocycasin C の部分水解において中間的に生成する配糖体の 1 つ  $A_x$  は laminaritrioxide であることが明らかであつて、これを neocycasin D と命名した。

なお、この後、W. J. WHELAN 博士の好意によつて laminaritriose および laminaritetraose 標品の恵与を受け、本節における y, z および neocycasin C の部分水解生成物と比較検討した結果、Fig. 9 に示したように Rf 値がまったく一致した。

#### 第 4 節 考 察

ソテツ・エムルシンによる neocycasin A, B, C の分解過程において、これらの 3 者からいずれも cycasin が減成される。一方、cycasin を基質とする糖転移反応においては neocycasin A, B, C が生成された。また、neocycasin A を基質とする反応では neocycasin C, B が生成されて、Fig. 15 に示すように、cycasin, neocycasin A, B, C 4 者の酵素的相互変換関係が明らかになつた。このことは cycasin および neocycasin 類のアグリコンの同一性について確証を与えるものでもある。

本章のはじめに述べたグルコシダーゼの作用式 (6) において、反応系に加えた糖に限らず基質自体の糖も glucosyl 基の受容体となり得る。このような反応系においては、基質の水解と同時に、一方では基質自体あるいは水解生成物の糖に基質分子から遊離された glucosyl 基が転移され、諸種の glucosido 結合が形成される。ここに形成される糖間結合様式は、起源の異なる酵素標品それぞれの特異性によつて支配されることが考えられる。

上記反応機構はその後多くのグリコシダーゼについて立証されている。基質 sucrose から  $\beta$ -fructosyl 基転移<sup>98)99)100)</sup> あるいは  $\alpha$ -glucosyl 基転移<sup>91)92)</sup> により sucrose を母体とするオリゴ糖類の酵素的生成が報告され、また、*Aspergillus* 属から得た酵素標品によつて maltose から isomaltose<sup>93)</sup>, nigerose<sup>94)</sup> や panose<sup>93)95)</sup> の外、一連の  $\alpha$ -1, 4 結合のグルコオリゴ糖<sup>98)87)</sup> の生成も知られている。 $\alpha$ -galactosyl 基転移<sup>96)</sup> も検討されて、上記の  $\alpha$ -glucosyl 基転移における反応機構と同様の機構が推定されている。

$\beta$ -glucosyl 基転移に関しては次のような報告がある。

CROOK ら<sup>97)</sup> は *Aspergillus niger* より得た酵素標品によつて cellobiose からオリゴ糖が生成されることを認め、BARKER ら<sup>98)99)</sup> は同様の反応系において cellobiose から cellotriose, 4-O- $\beta$ -gentiobiosyl-glucose の外、gentiobiose, laminaribiose, sophorose も生成されることを明らかにした。BUSTON ら<sup>100)</sup>

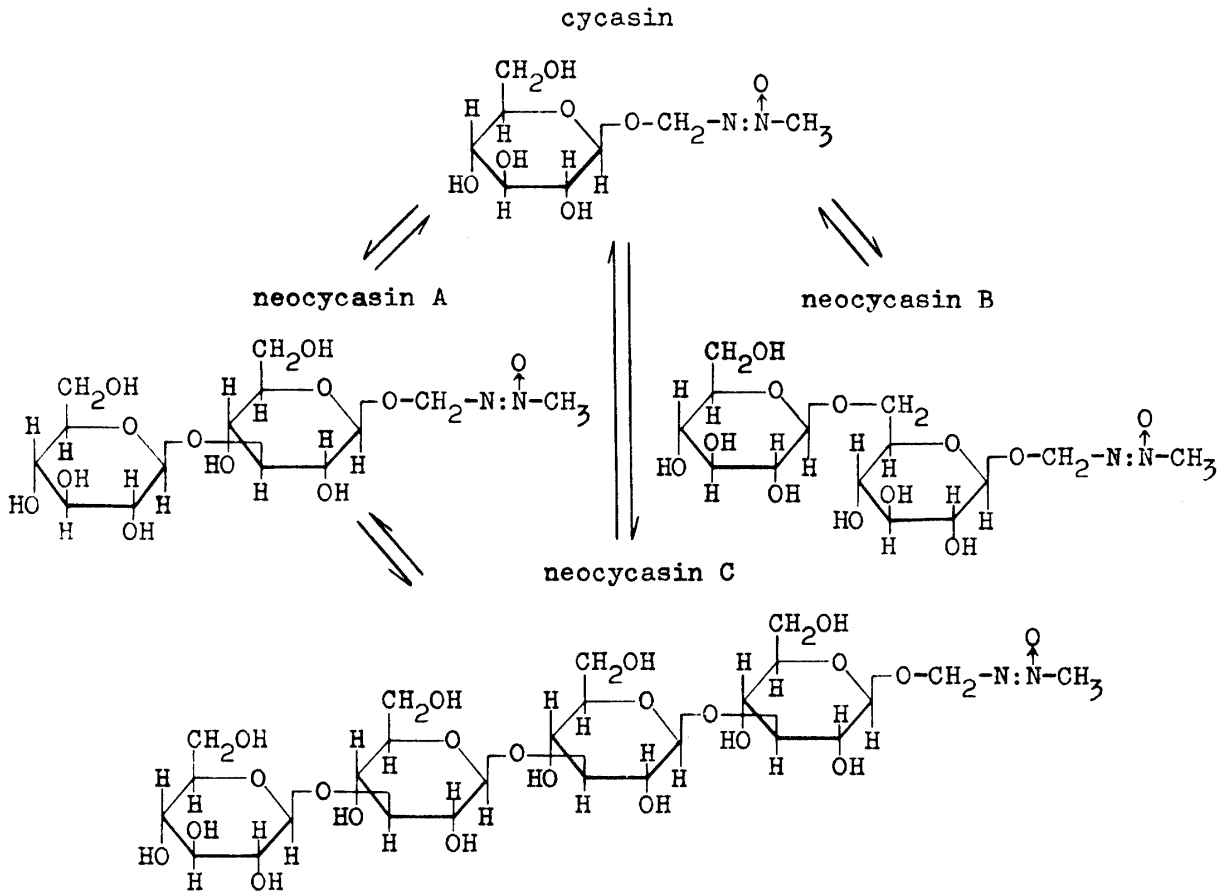


Fig. 15. Interconversion between Cycasin and Neocycasins by Cycad Emulsin

も *Chaetomium globosum* の菌体抽出液を cellobiose に作用させて, gentiobiose や cellotriose の生成を報告している. 同様な  $\beta$ -glucosyl 基の転移反応は, その他の微生物<sup>(101)(102)(103)</sup> やカタツムリの腸<sup>97)</sup>から得られた酵素標品についても行なわれていて  $\beta$ -1, 6 あるいは  $\beta$ -1, 4 結合の生成が知られている.

鈴木<sup>104)</sup>は起源の異なる多くの  $\beta$ -グルコシダーゼについて糖転移における受容体特異性を検討しているが, その中で, 稲穂より調製した酵素標品を *p*-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside に作用させて gentiobioside や cellobioside の生成を認めた. 一方, uridine diphosphate glucose を基質とする諸反応の中で  $\beta$ -glucosido 結合の生成を見出した報告もあつて, YAMAHA ら<sup>105)</sup>は gentiobioside を, また, FEINGOLD ら<sup>106)</sup>は  $\beta$ -1, 3 結合のグルカンを反応生成物として得ている. この種の反応はさておくとして,  $\beta$ -glucosyl 基転移反応において BARKER らのように生成物の1つとして laminaribiose を認めた例もあるが, しかし, ほとんどの糖転移反応における主要生成物は  $\beta$ -1, 6 あるいは  $\beta$ -1,4 結合糖である.

ソテツ・エムルシンによる転移反応において, cycasin を基質とする場合, 反応の進行とともに neocycasin A および laminaribiose が集積されるがやがて次第に減少するに至る. この前後から neocycasin C の生成も検知される. neocycasin B も生成されるが量的に少なく, 反応進行にともなう増加はみられなかつた. neocycasin A を基質とする反応では neocycasin C が主要生成物であつて, neocycasin B は生成量において neocycasin C の約 10%に過ぎない. このように cycasin あるいは neocycasin A を基質とする酵素反応において, neocycasin A および laminaribiose, あるいは

また neocycasin C の生成が極めて特徴的であつて, cycasin あるいは neocycasin A の分解にともなう  $\beta$ -glucosyl 基の転移に際し,  $\beta$ -1, 3 glucosido 結合が他に優先して形成されることを示している。

上記両反応において laminaritrioside の生成は検知されず, ただ, neocycasin A を基質とする反応において laminaritriose がわずかに認められたに過ぎないので, neocycasin C の生成は neocycasin A への laminaribiosyl 基の転移によるものごとくみえる。この点を明らかにするには酵素標品の精製をも含めてさらに詳細に検討する筈である。

いずれにしてもソテツ・エムルシンによる  $\beta$ -1, 3 glucosido 結合の優先的生成の事実は, ソテツ種子に neocycasin A や C のごとき laminaribioside や laminaritetraoside の存在することと考え合わせて注目すべきことであり, これら糖転移反応に関する知見は neocycasin 類の生合成機序の一端を知る上に1つの示唆を与えるものと考えられる。

## 第5章 *Cycas revoluta* Thunb. 各部位における アゾキシ配糖体の分布

*C. revoluta* 種子の neocycasin 類に関する知見から, ソテツ各部位にもアゾキシ配糖体がそれぞれのパターンで存在するであろうことが推察された。糖転移および有毒性の問題とも関連するので, 種子のアゾキシ配糖体を分別定量して量的関係を明らかにするとともに, 茎幹, 雄花および葉についても検討を行なつて, アゾキシ配糖体の分布状態を比較した。

### 第1節 アゾキシ配糖体の分別定量

定量のための供試液調製には, Table 1 の酸抽出法を定量的に行なつた外に, 次のようなメタノール抽出法をも行なつた。すなわち, ソテツ試料を細挫後直ちに沸騰メタノール中に投入, 30分間加熱して酵素を失活させ, 磨碎, 20%メタノールで抽出した。抽出液の一部をとり, アルカリ分解後の醋酸ベンチゼン法による青酸反応が陰性となるまで抽出を繰返した。全抽出液を減圧濃縮して, 以後, Table 1 に準じて除蛋白などを行ない最後にシラップを定容に満たした。

供試液の一定量を, あらかじめ10%エタノールで洗滌した濾紙(東洋 No. 50 あるいは No. 131, 巾40~60cm×長40cm)の原線上に带状に塗布, 展開剤 BAW (411) で3ないし4回多重展開してアゾキシ配糖体の分離を図つた。濾紙上のアゾキシ配糖体は紫外線照射によつてその存在位置を確かめ, かつ, ガイドストリップ上の標品の位置を参照してそれぞれの配糖体のバンドを切抜き溶出, 減圧濃縮の後定容とした。既報<sup>26)</sup>において確立したポーログラフィーによる cycasin の定量条件を neocycasin 類について適用すべく検討した結果, かかる定量条件において目的が十分に達せられることが確かめられたので, 上記によつて分離した各アゾキシ配糖体試料についてポーログラフィーを行なつた。この方法によると, 糖が共存してもアゾキシ配糖体の定量には影響がないので, 定量に先立つ分離に際して配糖体相互の分離さえ十分であればよく, 比色法<sup>89)</sup>におけるような糖の厳密な分離を必要としない。*C. revoluta* 各部位についての定量結果を Table 6 に示した。

いずれの部位においても主要配糖体は cycasin であつて, また, neocycasin A, B および macrozamin も存在するが, アゾキシ配糖体相互の量的割合には部位によつてかなりの相違が認められた。すなわち, 種子, 雄花においては量的に neocycasin A が cycasin に次いで存在するが, 葉, 特に新葉では macrozamin が cycasin に次ぐ含量を示して, 一般に macrozamin 含量の少ない *C. revoluta* としては特徴的な配糖体のパターンを有している。

Table 6. Analysis of Azoxyglycosides in the Parts of *Cycas revoluta* Thunb.

	Seeds (Kernels)		Stems (Pith) Amami- Oshima Oct. 1955	Male Strobils Kagoshima July, 1963	Leaves	
	Matured* <sup>1</sup> Amami- Oshima Nov. 1962	Over- matured* <sup>2</sup> Amami- Oshima Jan. 1961			Young* <sup>3</sup> Kagoshima July, 1962	Old* <sup>4</sup> Kagoshima July, 1962
Moisture	45.33%	41.71%	85.12%	80.67%	82.72%	52.43%
Cycasin	0.296	0.381	0.058	0.016	0.053	0.063
Neocycasin A	0.020	0.053	+	0.016	0.004	0.002
Neocycasin B	0.004	0.009	+	0.005	+	+
Macrozamin	+	+	±	0.006	0.044	0.010

\*<sup>1</sup> The weight of a seed and a kernel averages 18.1 g and 10.3 g, respectively.

\*<sup>2</sup> The weight of a seed and a kernel averages 15.5 g and 10.0 g, respectively.

\*<sup>3</sup> The young leaves are those of unfolding in Spring, 1962.

\*<sup>4</sup> The old leaves are one year old those which unfolded in Spring, 1961.

## 第2節 茎幹および雄花のアゾオキシ配糖体

### 1. 茎 幹

既報<sup>25)</sup>においてソテツ茎幹から cycasin の単離, 同定について報告した. その際, 活性炭 c.c. の 20%アセトン溶出区分を p.c. にて検索して cycasin 同様の発色性を示す2つのスポットを認めたが, いずれも微量であつて精査するに至らなかつた. その後, この区分について追試を行なつた結果, これらが neocycasin A および B であることを p.c. によつて確かめた.

### 2. 雄 花

ソテツの雄花は鹿児島市においては例年6月中旬頃頂生しはじめ, 6月下旬から7月初旬にかけて成熟開花し, 約2週間の後次第に萎凋する.

アゾオキシ配糖体の単離のために用いたソテツ雄花は1959年7月採取したものである. 開花数日後の雄花(Fig. 16) 10.3kg を採取後直ちに Table 1 に従つて抽出処理した. 得られたシラップを活性炭カラム(活性炭500g, 径5cm×長60cm)に注加し, 水, 次いで2, 5, 10, 20, 50%エタノールで順次溶出した. 各溶出液の組成は Table 7に示すとおりであつた. フラクション No. 3~5 を減圧濃縮して白色残渣1.5gを得, 濃エタノール処理の後, さらに再結晶を繰返して純品とした. m.p. 143°~143.5°C (decomp.) で cycasin 標品と混融して融点降下を示さなかつた.

cycasin 200mg をピリジン, 無水醋酸とともに加熱処理して得られたアセチル誘導体は m.p. 136°C で, tetra-acetylcycasin 標品とまったく一致した.



Fig. 16. The Male Strobilus of *Cycas revoluta* Thunb.

Table 7. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of the Male Strobils of *Cycas revoluta* Thunb. by Carbon Column Chromatography.

Elution Reagent	Fraction No.	Component
H <sub>2</sub> O	3.2 l	1 Fructose, Glucose, Sucrose, Melezitose ?
	1.1	2 Fructose, Glucose, Sucrose, Melezitose ?
	4.5	3 Cycasin, Sucrose, Melezitose ?
	2.8	4 Cycasin, Melezitose ? ±
	4.8	5 Cycasin
EtOH 2 %	3.3	6 Cycasin, Neocycasin B, Oligosaccharide
	5 4.0	7 Cycasin
	10 3.0	8 Cycasin, Macrozamin
	20 3.0	9 Cycasin, Neocycasin A, A'-1, A'-2, Oligosaccharide
	50 5.0	10 Oligosaccharide (tailing)

Sample: The male strobils of *Cycas revoluta* Thunb. (10.3 kg).

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand) 500 g, dia. 5 cm × length 60 cm.

フラクション No. 6 に溶出された neocycasin B, No. 8 の macrozamin, および No. 9 の neocycasin A は p.c. によつてそれぞれの標品と比較同定された. No. 9 には未知の neocycasin 類 2 種が検知されたが精査するに至っていない.

### 第3節 葉のアゾキシ配糖体

ソテツの多くの種について葉にも有毒成分が存在し, 中でも若葉による家畜の食中毒例が濠洲においてよく知られている<sup>3)</sup>. 西川ら<sup>107)</sup>は *Cycas* 属の葉について, 住民の若葉の食用例を挙げ, 奄美大島における例にも言及している. しかし, 著者の関知する限りでは奄美大島においてこのような例はなく, むしろ家畜が摂取して中毒を惹起する事例が知られている. このような葉の有毒性は本章第1節におけるアゾキシ配糖体の定量結果によつて十分裏付けられるに至つた.

葉のアゾキシ配糖体のパターンは macrozamin 含量比の高いことで特徴的であり, これら配糖体の単離, 確認を試みた.

#### 1. 抽出

用いた試料は次の2種である.

新葉: 当年初夏出芽伸展せるもの.

25 枚, 1.62kg, 1962 年 7 月初旬鹿児島市にて採取.

古葉: 前年初夏出芽伸展せるもの.

30 枚, 3.20kg, 1962 年 7 月初旬鹿児島市にて採取.

抽出は Table 1 に従つて酸処理により行なつた. 抽出液をそれぞれ 250ml に定容し, その中の 25 ml は糖およびアゾキシ配糖体の分別定量の供試料とした.

抽出液の糖をセミマイクロベルトラン法<sup>108)</sup>で定量した結果は次のとおりであつた.

新葉: 全糖 4.81 %

直糖 4.08 %

古葉: 全糖 4.60 %

直糖 2.32 % (いずれも glucose として)



## 2. 活性炭カラムクロマトグラフィーによる分別

新葉抽出液を活性炭カラム（活性炭 2 : セライト 1, 計 360g, 径 7.7cm × 長 22.0cm）上に注加し, 水, 次いでエタノール濃度を順次高めて溶出を行なった. 溶出液は 750ml ずつ分割採取して各フラクションにつき糖組成を検した. 溶出状況は Table 8 に示すとおりである.

Table 8. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of the Young Leaves of *Cycas revoluta* Thunb. by Carbon Column Chromatography

Elution Reagent Fraction No.	Concentration of EtOH, %										
		H <sub>2</sub> O	2	5	7	10	15	20	30	40	50
		10.5l	6l	9.75l	7.5l	5.25l	9l	3l	3l	4l	
		1	14	22	35	45	52	64	68	72, 77	
	<i>Rf</i> *										
A''-1	.85							-----			
Cycasin	.64			—————							
Xylose	.60	..									
Fructose	.55	—————									
A''-2	.50								---		
Glucose	.44	—————									
Neocycasin A	.39								—		
Macrozamin	.35							—			
Sucrose	.28	—————									
Neocycasin B	.25							—			
Laminaribiose	.25			---							
A''-3	.24								-----		
Primeverose	.22			-----							
A''-4	.20	..								..	
<i>myo</i> -Inositol	.20	..									
Melezitose	.14				—————						
A''-5	.12									..	
Oligosaccharide	.11									---	
Oligosaccharide	.09						—				
Oligosaccharide (tailing)								-----			

Sample: The young leaves of *Cycas revoluta* Thunb. (1.46 kg).

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand)-Celite (No. 545) 2 : 1 by weight, total 360 g, dia 7.7 cm × length 22 cm.

\* *Rf*-values were determined after multiple ascending development (3 runs) using Tōyō No. 2 strips and a mixture of *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1) as the solvent.

アゾキシ配糖体としては, cycasin, macrozamin, neocycasin A, B の外に, neocycasin 類の未知スポット A'' 5 種が検知された. 遊離糖としては fructose, glucose, sucrose の外に laminaribiose と primeverose が同定され, また, *Rf* 値や発色性から melezitose の存在も推定された.

古葉抽出液についても同じく活性炭 c.c. を行なったが, 新葉の場合と同様の溶出状況であった.

なお, 新・古両葉いずれもフラクション No. 2~3 には, *Rf*=0.20 (Table 8) にアルカリ性硝酸銀試薬<sup>109)</sup>にて発色するスポットが見出された. このスポットは *myo*-inositol および sequoyitol<sup>\*6</sup> の *Rf* 値と類似するので, 種子におけると同様にして単離を行なった. 新葉の該フラクションをアンバーラ

\*6 H. MATSUMOTO 博士より恵送を受けた,

イトIR 120 および IR 45 で処理, パン酵母で糖を醗酵, 除去の後醋酸鉛による除蛋白, 硫化水素による過剰の鉛塩除去によつて精製して減圧濃縮した. 得られた白色結晶性残渣を稀エタノールで再結晶操作の後, 無水磷酸上,  $90^{\circ}\text{C}$  で減圧乾燥した. 片状晶  $732\text{mg}$  が得られ, m.p.  $224^{\circ}\sim 225^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{30} = 0^{\circ}$  (c. 2.0,  $\text{H}_2\text{O}$ ) で *myo*-inositol 標品と混融しても融点降下が認められなかつた. 分析結果は次のとおりである.

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  計算値: C, 40.00 % ; H, 6.71 %,  
分析値: C, 40.00 % ; H, 6.81 %.

上記結晶  $150\text{mg}$  を醋酸ナトリウム  $100\text{mg}$  および無水醋酸  $4\text{ml}$  とともに  $120^{\circ}\text{C}$ , 2時間のアセチル化の後, 生成物をエタノールから再結晶してプリズム晶  $250\text{mg}$  を得た. m.p.  $213^{\circ}\text{C}$  で hexaacetyl *myo*-inositol 標品によく一致した. 分析結果は次のとおりである.

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$  計算値: C, 50.00 % ; H, 5.60 %,  
分析値: C, 49.98 % ; H, 5.71 %.

古葉の該当フラクションからも同様にして  $2.68\text{g}$  の粗結晶を得た. 再結晶の後, 純晶  $1.40\text{g}$ , m.p.  $224^{\circ}\sim 225^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{30} = 0^{\circ}$  で, 新葉と同じく *myo*-inositol であつた.

### 3. アゾキシ配糖体の単離, 同定

(1) *cycasin* 新葉フラクション No. 28~36 は陽, 陰イオン交換樹脂にて順次処理, 減圧濃縮の後 *cycasin* の粗結晶を得て稀アルコールから再結晶を行なつた. 収量  $250\text{mg}$ , m.p.  $144^{\circ}\sim 145^{\circ}\text{C}$  (decomp.) で *cycasin* 標品と混融試験の結果もよく一致する.  $[\alpha]_{\text{D}}^{16} = -45.5^{\circ}$  (c. 1.9,  $\text{H}_2\text{O}$ ) で分析結果は次のとおりである.

$\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_7\text{N}_2$   
計算値: C, 38.07 % ; H, 6.39 % ; N, 11.10 %,  
分析値: C, 38.07 % ; H, 6.39 % ; N, 11.06 %.

常法に従つて調製したアセチル誘導体は m.p.  $135^{\circ}\text{C}$ ,  $[\alpha]_{\text{D}}^{17} = -29.3^{\circ}$  (c. 0.9,  $\text{CHCl}_3$ ) で tetraacetyl-*cycasin* 標品とよく一致した.

古葉フラクション No. 26~34 も同様に処理して *cycasin*  $1.22\text{g}$  を得て, *cycasin* 標品と同定試験の結果よく一致した.

(2) *macrozamin* および *neocycasin B* 新葉フラクション No. 53~56 を陽, 陰イオン交換樹脂処理の後減圧濃縮してシラップとなし, 濾紙粉末  $3\text{g}$  を加えて湯浴上でよく混合, 乾燥して粉末状とした. セルロースカラム (濾紙粉末  $70\text{g}$ , 径  $2.4\text{cm}$  × 長  $40\text{cm}$ ) の上端に試料粉末を充填して, BEW (521) で展開, 溶出を行なつた. 溶出液  $5\text{ml}$  ずつを分割採取し組成を p.c. にて検した結果, フラクション No. 47~147 には *macrozamin*, No. 148~177 には少量の *macrozamin* とともに *neocycasin B*, No. 178 以降にはオリゴ糖が溶出された.

*macrozamin* 区分 (No. 47~147) は合一して減圧濃縮の後, 80 % エタノールから再結晶を行なつてプリズム晶  $390\text{mg}$  を得た. この結晶は m.p.  $200^{\circ}\sim 201^{\circ}\text{C}$  (micro hot plate) で *macrozamin* 標品\*7 と混融して融点降下を示さなかつた.

$[\alpha]_{\text{D}}^{16} = -84.0^{\circ}$  (c. 0.6,  $\text{H}_2\text{O}$ ), 紫外外部吸収スペクトルは  $\lambda_{\text{max.}} = 215\text{m}\mu$ ,  $\log \epsilon = 3.93$ ;  $\lambda_{\text{inflex.}} = 275\text{m}\mu$   $\log \epsilon = 1.66$  (Fig. 7). 分析結果は次のとおりである.

$\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_{11}\text{N}_2$

\*7 N. V. RIGGS 博士より恵送を受けた,

計算値 : C, 40.62 % ; H, 6.29 % ; N, 7.29 % ,

分析値 : C, 40.90 % ; H, 6.42 % ; N, 7.13 % , 7.29 % .

macrozamin 196mg をピリジンおよび無水醋酸各 2 ml とともに 90°C で 2.5 時間処理してアセチル化を行なつて後, エタノールより再結晶してアセチル誘導体の短柱状晶 160mg を得た.

m.p. 141°~142°C (micro hot plate) で, macrozamin 標品から同様にして調製した hexaacetyl-macrozamin と混融の結果もまったく一致した.

$[\alpha]_D^{17} = -44.0'$  (c. 1.2, CHCl<sub>3</sub>) で分析結果は次のとおりである.



計算値 : C, 47.17 % ; H, 5.70 % ; N, 4.40 % ,

分析値 : C, 47.37 % ; H, 5.80 % ; N, 4.61 % .

古葉のフラクション No. 53~56 についても同様にしてセルロース c.c. (濾紙粉末 40g, 径 1.8cm × 長 40cm) を行ない, macrozamin の単一組成区分 (No. 66~146) から macrozamin 160mg を得た. m.p. 200°~201°C (micro hot plate) で macrozamin 標品とよく一致した.

上記の macrozamin についてさらに次のような検討を行なつた.

i) 完全加水分解 macrozamin 3mg を 1N 塩酸 1 ml で 100°C, 2 時間加水分解し, アンバーライト IR 45 にて脱酸, 減圧濃縮の後 p.c. を行なつた. 生成糖は xylose および glucose であつた.

ii) 部分加水分解 macrozamin 52 mg を 0.2N 塩酸 3.3ml で 100°C, 1.5 時間の加水分解を行ない, 同様の処理の後生成物を検した結果, cycasin, xylose, glucose, primeverose が認められた (Fig. 9). 減圧濃縮に際する溜液は硫酸酸性クロモトロープ酸試薬で赤色を呈し, フォルムアルデヒドの存在が確かめられた.

部分水解生成物を確認するためそれらの分離を行なつた. 水解液を活性炭カラム (活性炭 20g, 径 2 cm × 長 15cm) に注加後, 水 750ml, 次いで 20 % エタノール 500ml, 50 % エタノール 800ml で順次溶出, それぞれの溶出区分を濃縮してさらにバンド p.c. (濾紙 東洋 No. 50, 40 × 40cm 各 1 枚, 展開剤 BAW (411), 多重展開 3 回) によつて各生成物を分離した. その結果, xylose 16.8mg, glucose 15.5mg, cycasin 9.7mg, primeverose 7.2mg を得た.

このようにして得られた cycasin 9.7mg を常法によつてアセチル化した. アセチル誘導体は微針状晶 4.5mg, m.p. 138°C (micro hot plate) で tetraacetylcycasin 標品と混融して融点降下を示さなかつた.

さきに macrozamin 標品を部分水解してセルロース c.c. によつて生成物の 1 つ cycasin を単離し, cycasin と macrozamin のアグリコンの同一性を証明したが,<sup>110)</sup>ここに *C. revoluta* 葉に由来する macrozamin についても同一の結果が得られた.

(3) neocycasin A 新葉および古葉のフラクション No. 66~68 はそれぞれ減圧濃縮の後バンド p. c. (濾紙 東洋 No. 131, 40 × 40cm, 各一枚, 展開剤 BAW (411), 多重展開 3 回) に付し, neocycasin A を分離した. 新葉から 20mg, 古葉から 24mg の収量で粉末状に得た.

この粉末各 4 mg を 0.2N 硫酸 1.1ml で 100°C, 1.5 時間の部分水解の結果, cycasin, glucose, laminaribiose の生成が認められた.

#### 第 4 節 考 察

*C. revoluta* の種子, 茎幹, 雄花および葉についてアゾキシ配糖体を分別定量し, それらの分布を検討した結果 (Table 6), いずれの部位においても主要配糖体は cycasin であることが明らかになつ

た. *neocycasin* 類の量的割合は各部位によつて著しく異なり, 種子や雄花においては *neocycasin A* が *cycasin* に次ぐ存在であるに反し, 葉では特徴的に *macrozamin* の存在比が高く, また含量も多い. 中でも新葉においてはこの傾向が特に著しく *macrozamin* 含量は古葉の約 4.5 倍にも達する. 種子の *neocycasin A* および *B* は過熟仁における含量が完熟仁のそれらの約 2.5 倍であつて, 各組織のアゾキシ配糖体のパターンはそれぞれ一定のものではなく, 成長過程によつても変化することが推察される.

前章に述べたように, 種子から調製したエムルシンの糖転移特異性と, 種子における *neocycasin A* 含量の高い事実との関連から考えて, 各部位のアゾキシ配糖体パターンの相違はそれぞれの部位の  $\beta$ -グルコシダーゼの糖転移特異性を暗示するものであろう.

定量結果を裏付けるべく各部位のアゾキシ配糖体の単離を行なつた結果, 茎幹に *cycasin* の外, 微量ながら *neocycasin A* および *B* の存在が認められ, 雄花についても *cycasin* をはじめて単離, 同定し, さらに *neocycasin A, B* および *macrozamin* の存在を明らかにした.

葉は *macrozamin* の単離材料としての見地から特に詳細に検討した. 活性炭 c.c.によつて, *cycasin* を単離し同定する一方, セルロール c.c. の併用によつて好収量で *macrozamin* を得たが, 特に新葉は *macrozamin* が高含量で存在することに加えて抽出操作やクロマトグラフィーにおける分離の容易なことなどの点から, 本邦における *macrozamin* の調製材料として好適であることを知つた. 従来, *neocycasin* 類のみならず広くアゾキシ配糖体の研究を推進する上に, *macrozamin* のごとき異種単糖を含む配糖体を必要とする場合があり, 本節における *C. revoluta* 葉に関する知見は *macrozamin* 試料の確保を容易にするものである.

なお, 新, 古両葉から *macrozamin* の外に *cycasin, neocycasin A* をも単離して同定した.

## 第 6 章 *Cycas circinalis* L. のアゾキシ配糖体

*C. circinalis* L. は, 印度, セイロン, 東印度諸島, 南洋群島, 東部熱帯アフリカ, マダガスカル, ニューギニヤ, 濠洲などに広く分布し, 1903 年の VAN DONGEN<sup>4)</sup> の研究によつてソテツ有毒成分の研究史上歴史的なソテツである. RIGGS は *C. media*<sup>21)</sup> から *macrozamin* を単離して同定を行ない, 続いてグアム島産 *C. circinalis* L. の種子について研究を進めた結果, 予想に反して *cycasin* が単離されて<sup>11)</sup> 西田らの *cycasin* 標品と比較同定した. *C. circinalis* に *cycasin* が見出されて以来, グアム島においてこのソテツを常食とする原住民の間に慢性疾患 *amyotropic lateral sclerosis* が高い発生率を示すことと関連して, *cycasin*, ひいてはアゾキシ配糖体はその原因物質の 1 つと推定され, 病理学上の一課題が提起されている.

RIGGS は *C. circinalis* 種子について *cycasin* を単離, 同定するにとどまつて, 定量的検討や *neocycasin* 類の検索は行なつていない. 前章に述べたように, ソテツ各部位に存在するアゾキシ配糖体のパターンはそれぞれ異なり, また, 濠洲産ソテツに関する知見から属, 種の相違によつてもこれが異なることが十分推察されるので, *C. circinalis* のアゾキシ配糖体の検索は比較生化学的見地からも注目された.

### 第 1 節 アゾキシ配糖体の分別定量

試料は 1962 年 3 月および同年 11 月, グアム島にて採集後直送を受けたものである.

*C. circinalis* の種子は Fig. 17 にみられるように完熟後緑色から次第に褐色となるので, 現地では完熟に至るまでの種子を “green nuts”, 過熟種子を “brown nuts” と称している.

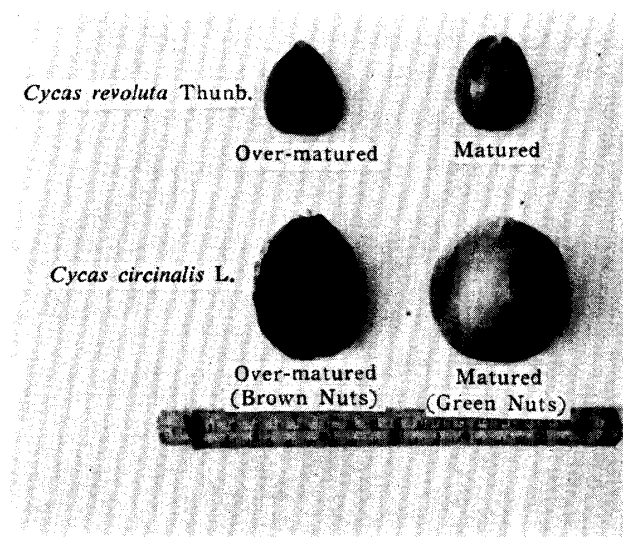


Fig. 17. The Nuts of *Cycas revoluta* Thunb. and *Cycas circinalis* L.

Table 9. Analysis of Azoxyglycosides in the Seeds of *Cycas circinalis* L.

	"Green nuts"* <sup>1</sup> Matured kernels	"Brown nuts"* <sup>2</sup> Over-matured kernels
	Guam Nov. 1962	Guam Mar. 1962
Moisture	44.61%	48.43%
Cycasin	1.535	1.270
Neocycasin A	0.039	0.021
Neocycasin B	0.062	0.073
Macrozamin	0.002	0.031

\*<sup>1</sup> The weight of a seed and a kernel averages 103.7 g and 38.9 g, respectively.

\*<sup>2</sup> The weight of a seed and a kernel averages 95.0 g and 41.5 g, respectively.

アゾキシ配糖体の分別定量は第5章第1節に述べた方法によつて行なつた。その結果、Table 9に示すように、green nuts および brown nuts の仁の cycasin 含量はそれぞれ 1.535% および 1.270% で、*C. revoluta* の 3 ないし 5 倍の cycasin を含有することが明らかになつた。neocycasin 類に関しては、neocycasin B の含量比が比較的の高い反面、neocycasin A が少なく、*C. revoluta* と異なるパターンを有している。neocycasin B および macrozamin は熟度に従つて増加の傾向を示した。

## 第2節 アゾキシ配糖体の単離，同定

### 1. 抽出および活性炭カラムクロマトグラフィー

green nuts 64.69 kg を脱殻後、仁 24.25 kg を得て Table 1 に準じて抽出を行なつた。抽出液のシラップ 2 l の中から一部は前節における定量試験に供し、また、50 ml (仁 606 g 相当) については活性炭 c.c. によりアゾキシ配糖体の分離を試みた。

活性炭カラム (活性炭 2 : セライト 1, 計 100 g, 径 5.5 cm × 長 15.0 cm) に供試シラップを注加後、常法に従つて水、次いで各種濃度のエタノールで順次溶出、溶出液 500 ml ずつを分割採取して各フラクションの組成を p.c. にて検した。Table 10 に示すとおり、水にて fructose, glucose, sucrose, および myo-inositol (未同定) が溶出、さらに cycasin も一部溶出された。20% エタノール区分は組成複雑で、neocycasin B, macrozamin の溶出に続いて neocycasin E と推定されるスポット A'''-3 が neocycasin A の溶出にやや先行して認められた。30% および 40% エタノール区分にはそれぞれ未知 neocycasin 類 A'''-5 および A'''-4 が検知された。

### 2. アゾキシ配糖体の単離，同定

(1) cycasin フラクション No. 5~16 を合一して常法のようにイオン交換樹脂処理の後減圧濃縮してシラップとなし、エタノールにて結晶化して微針状晶 6.1 g を得た。m.p. 144°~145°C (decomp.) で cycasin 標品とよく一致した。

(2) neocycasin A, B および macrozamin フラクション No. 17~19 および No. 20~23 をそれぞれ前項同様に処理した後、各シラップについてさらにバンド p.c. による分離を行なつた。濾紙

Table 10. Separation of Azoxyglycosides and other Carbohydrates of "Green Nuts" of *Cycas circinalis* L. by Carbon Column Chromatography

Elution Reagent Fraction No.	Concentration of EtOH, %					
	H <sub>2</sub> O	10	20	30	40	
	5.5 l	3 l	3 l	3 l	3 l	
	1	11,	17,	23,	29,	35
	<i>Rf</i> *					
A'''-1	.85			-----		
Cycasin	.64	—————				
Fructose	.53	-				
A'''-2	.50			---		
Glucose	.44	—————				
Neocycasin A	.39			—————		
Macrozamin	.35			---		
A'''-3 (Neocycasin E)	.31			---		
Sucrose	.28	—————				
Neocycasin B	.25			---		
( <i>myo</i> -Inositol)	.20	—————				
Neocycasin G (A'''-4)	.16				---	
Melezitose	.14				---	
Neocycasin F (A'''-5)	.12		—————			
A'''-6	.07				---	
Oligosaccharide (tailing)				-----	-----	-----

Sample: The kernels of "green nuts" of *Cycas circinalis* L. 606 g.

Carbon Column: Active carbon (Takeda Pharm. Ind. Ltd., Shirasagi Brand)-  
Celite (No. 545) 2 : 1 by weight, total 100 g, dia. 5.5 cm × length 15 cm.

\* *Rf*-values were determined after multiple ascending development (3 runs) using Tōyō No. 2 strips and a mixture of *n*-BuOH AcOH · H<sub>2</sub>O (4 : 1 : 1) as the solvent.

(東洋 No. 131, 巾 40×60cm) 各 1.5 枚に上記シラップを塗布, 展開剤 BAW (411) にて多重展開 3 回の後, 常法に従つて濾紙上において単一成分に分離された各配糖体を溶出, 凍結乾燥して粉末とした. 得量は neocycasin A 205mg, neocycasin B 325mg, macrozamin 11.2mg でいずれも p.c. によつて標品と同一した.

i) neocycasin A  $[\alpha]_D^{20} = -32.7^\circ$  (c. 1.1, H<sub>2</sub>O), m.p. 158°C (decomp.) で neocycasin A 標品と混融して融点降下がなかつた.

粉末 5 mg を 0.2N 硫酸で常法のごとく部分水解して cycasin, glucose, laminaribiose の生成を確かめた.

neocycasin A 粉末 50mg をピリジンおよび無水醋酸各 1.5ml とともに室温に 11 時間放置後, さらに 70°C, 2 時間の反応を行なつてアセチル誘導体の微針状晶 95mg を得た. m.p. 146°~147°C (micro hot plate) で heptaacetylneocycasin A 標品と混融して融点降下を示さない.  $[\alpha]_D^{20} = -50.8^\circ$  (c. 1.0, CHCl<sub>3</sub>) で分析結果は次のとおりである.



計算値: C, 47.46 % ; H, 5.69 % ; N, 3.95 % ,

分析値: C, 47.46 % ; H, 5.68 % ; N, 4.19 % .

ii) neocycasin B 粉末 5 mg を上記同様にして部分水解し, cycasin, glucose, gentiobiose の生成を確かめた.

一方, 粉末 255mg についてピリジンおよび無水醋酸各 5 ml でもつて 90°C, 2 時間のアセチル化を行なつて後, 常法のごとくして長針状晶 243mg を得た. 無水磷酸上 90°C にて減圧乾燥の後, m. p. 180°~181°C (micro hot plate) で, 同様にして処理した heptaacetylneocycasin B 無水物標品と混融して融点降下を認めなかつた.

$[\alpha]_D^{20} = -33.8^\circ$  (c. 0.7,  $\text{CHCl}_3$ ) で分析結果は次のとおりである.



計算値: C, 47.46 % ; H, 5.69 % ; N, 3.95 % ,

分析値: C, 47.31 % ; H, 5.78 % ; N, 3.89 % .

iii) macrozamin 粉末 3 mg を 2 N 塩酸で 100°C, 2 時間の完全水解によつて xylose および glucose の生成が認められた.

macrozamin 粉末 6 mg をピリジンおよび無水醋酸各 0.3ml とともに i) 項同様に処理して, 生成物を 10 % エタノールにて注意深く結晶化を行ない, 砂状晶 2 mg を得た. m. p. 141°C (micro hot plate) で hexaacetylmacrozamin 標品と混融して融点降下がなかつた.

### 第 3 節 Neocycasin F および G の単離と構造

前節の活性炭 c.c. におけるフラクション No. 24~29 の未知物質 A'''-5 および No. 30~35 の A'''-4 の単離のためバンド p.c. を行なつた. 両区分のシラップをそれぞれ濾紙 (東洋 No. 50, 40×40cm) 各 1.5 枚の原線上に塗布して, 展開剤 BAW (412) で 2 回, さらに BAW (411) にて 1 回, 合計 3 回の多重展開を行なつた. 濾紙上の A'''-4 および A'''-5 は常法に従つて溶出, 凍結乾燥して粉末 9.5mg および 20mg を得た. 両者いずれも p.c. にて neocycasin 類の特異的発色を呈し, 単一スポットを示す. 紫外部吸収スペクトルは  $\lambda_{\text{max.}} = 215m\mu$ ,  $\log \epsilon = 3.6$ ;  $\lambda_{\text{inflex.}} = 275m\mu$ ,  $\log \epsilon = 1.7$  (Fig. 7) で, neocycasin 類の特徴をよく示している. これらのことから A'''-5 を neocycasin F, A'''-4 を neocycasin G と命名して構造を検討した.

#### 1. 完全加水分解

neocycasin F, G 各 2 mg を 1 N 塩酸 0.2ml で 100°C, 2 時間の加水分解の後常法に従つて処理して p.c. により生成物を検した. 両者いずれの場合も生成物として glucose が認められた.

#### 2. 部分加水分解

neocycasin F, G 各 3 mg を 0.2N 硫酸 0.23ml で 100°C, 1 時間の加水分解の後常法のごとく生成物を検索した. これらの結果は Fig. 9 に示した. その中で, neocycasin F における未知糖 F, および neocycasin G における未知糖 G はそれぞれ原配糖体の糖成分と考えられた.

#### 3. 糖成分の単離

糖成分を遊離状に得るために, neocycasin F, G 各 2 mg を氷醋酸 0.1ml に溶解し, 微量の硫酸銅の存在下で亜鉛末 10mg を加えて湯浴上で 1.5 時間加温した. ここに得られた neocycasin F および G の糖成分を p.c. にて検討して, 前項の部分水解における未知糖 F および G はそれぞれ対応する配糖体の糖成分であることが確かめられた.

### 第 4 節 考 察

古くから有毒性が知られている *C. circinalis* の種子をグアム島から入手して、アゾキシ配糖体について検討した。

完熟および過熟種子、いわゆる“green nuts”および“brown nuts”について分別定量を行なった結果、これらの cycasin 含量は 1.5% および 1.3% で *C. revoluta* 種子の約 3 ないし 5 倍の高含量であることが明らかとなり、同島ソテツ常食土民の中毒例の高い事実との関連性が暗示された。アゾキシ配糖体のパターンは、特に neocycasin B の含量比が高く、neocycasin 類の中ではこれが第 1 位を占めている点で特徴的であった。熟度が進むにつれて、cycasin と neocycasin A は幾分減少の傾向に、neocycasin B と macrozamin は増加の傾向にあることが推察されたが、熟度とアゾキシ配糖体の消長の問題はあらためて検討されねばならない。

アゾキシ配糖体を精査し、あわせて cycasin の大量調製のため、green nuts を大量に処理したが、その一部についてまず小規模の活性炭 c.c. を試みた。その結果、cycasin を好収量で単離して RIGGS の報告<sup>11)</sup>を確認し、さらに neocycasin A, B および macrozamin を単離して同定試験を行ないいずれもそれぞれの標品とよく一致することを確かめた。

cycasin の単離に際して、*C. circinalis* 種子の cycasin 含量が高く、一方、cycasin との分離が困難である共存糖類の含量比が低いことなどのために、単離操作を *C. revoluta* 種子の場合に比して容易に、効率よく行ない得る。従つて *C. circinalis* 種子は cycasin の大量調製に一層好適な材料であると考えられる。事実、この後、前記の green nuts の大量処理、すなわち仁 24.25kg の抽出液を活性炭-セライト計 3kg の大型カラムで処理して cycasin 240g を単離し、得量に関して *C. revoluta* 種子の約 7 倍の効率をあげている。

上記アゾキシ配糖体に加えて未知の A'''-4, A'''-5 の 2 種も単離され、neocycasin G および F と命名して構造を検討した。

neocycasin F, G はいずれも p.c. における発色性や紫外部吸収スペクトルにおいて、アゾキシ配糖体の特徴をよく示している。

neocycasin F は完全水解により glucose を、部分水解により cycasin, neocycasin B, glucose, laminaribiose, gentiobiose の外に未知糖 F を生成した。未知糖 F は neocycasin F の還元分解によつても得られるのでその糖成分であることが明らかである。部分水解における glucose, laminaribiose, gentiobiose の生成から考えられる糖成分には、Fig. 18 に示すように、6-O- $\beta$ -laminaribiosylglucose (III), 3-O- $\beta$ -gentiobiosylglucose (IV) および 3,6-di-O- $\beta$ -glucosylglucose (V) の 3 種がある。もし、neocycasin F の糖成分が (V) であれば、部分水解によつて cycasin の外に当然 neocycasin A と neocycasin B も中間配糖体として生成されるはずである。しかし、実際には cycasin と neocycasin B が認められるので糖成分は (III) でなければならない。一方、neocycasin G は部分水解により cycasin, neocycasin A, glucose, laminaribiose, gentiobiose の外、未知糖 G を与えるが、未知糖 G は還元分解の結果から neocycasin G の糖成分であることが明らかである。そして、部分水解における中間配糖体として cycasin および neocycasin A が生成されるので、neocycasin F と同様の考察によつて neocycasin G の糖成分は (IV) である。従つて neocycasin F は 6-O- $\beta$ -laminaribiosylcycasin (III'), neocycasin G は 3-O- $\beta$ -gentiobiosylcycasin (IV') であることが結論される。

第 3 章第 7 節においても述べたように、(III) および (IV) のごとき  $\beta$ -1, 3, 1, 6 両結合をあわせもつ glucotriose はラミナリン<sup>51)52)</sup> や菜種菌核多糖類<sup>54)70)</sup> の分解生成物としてのみ見出されていて、天然界に遊離糖としてはもちろん配糖体成分としても知られていない。

*C. revoluta* 種子におけるアゾキシ配糖体のパターンと異なつて、*C. circinalis* 種子に  $\beta$ -1,6 結合



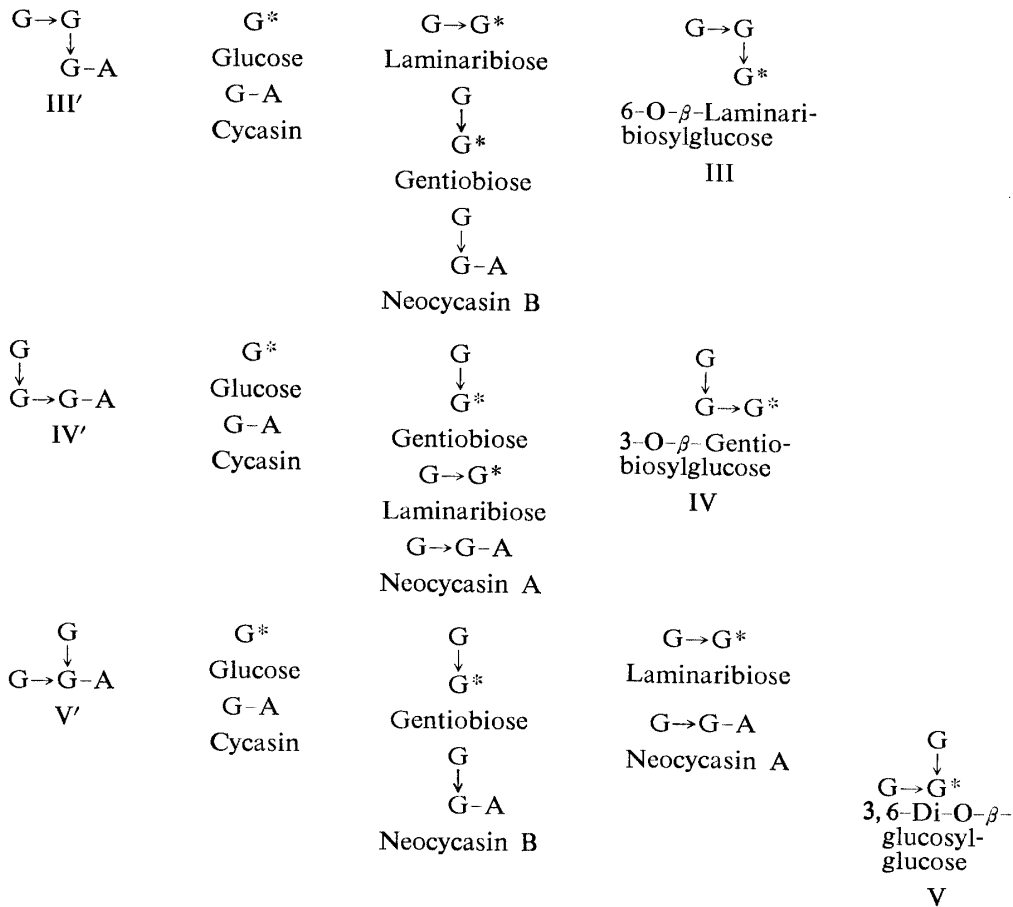


Fig. 18. The Partially Hydrolysed Products of Glucotriosides included Both 1,3- and 1,6- $\beta$ -linkages

G: Glucosyl residue, G\*: Reducing glucose residue,  $\rightarrow$ :  $\beta$ -1,3 Glucosidic linkage,  $\downarrow$ :  $\beta$ -1,6 Glucosidic linkage.

糖をもつ neocycasin B および neocycasin F, G の含量比の高い事実は、酵素的糖転移の特異性の相違を示すものと推察され、未解明の neocycasin 数種の検討とともに今後に残された課題である。

## 第7章 総 括

ソテツの有毒配糖体として、さきに濠洲産ソテツ *Macrozamia* 属や *Bowenia* 属などの数種、および *Cycas media* R. Br. に macrozamin<sup>14)19)20)21)</sup> が見出され、また西田らによつて日本産ソテツ *C. revoluta* Thunb. の種子、茎幹から cycasin<sup>22)23)24)25)26)27)28)</sup> が単離されている。macrozamin, cycasin の両者はいずれも同一アグリコン hydroxyazoxymethane を有するが、糖成分のみが異なるものであり、ソテツ属種間に配糖体の糖成分のこのような相違がみられることは興味あることであつた。

これらの知見に基づいて、著者はまず *C. revoluta* 種子についてソテツ配糖体の抽出法を確立し、抽出液の活性炭 c.c. を精細に行なつた結果、従来見出し得なかつた一連の新配糖体群を検知してこれらを単離した。次いでさらに同ソテツの各部位や *C. circinalis* L. にも検討を加えた。すなわち、ソテツ配糖体の抽出に際し、共存する分解酵素の失活化を稀酸処理によつて行なうと、従来の加熱法においてみられたような澱粉糊化などに原因する抽出操作上の難点が打開され、抽出を容易に行ない得ることを知つた。使用した酸濃度はソテツの  $\beta$ -グルコシダーゼを失活させるに十分であり、かつ

糖類の酸逆合成が起るには余りに緩和な条件である。そして、加熱法やアルコールによる前処理によつて得た抽出液と比較しても糖や配糖体組成に相違が認められないので、稀酸処理法の妥当性が立証され、ソテツ配糖体の新抽出法が確立された (Table 1)。さらに、減圧濃縮装置を改良、大型化して (Fig. 1) 濃縮能率の向上を図り、大量処理の体制を整えた (第2章第1節)。

試料の活性炭 c.c. (Table 2) にあつて、溶出剤エタノールの濃度を検討し、また溶出液の分割、検索を精細に行なつて一連の配糖体群を検知した。これらの配糖体は *cycasin* と同様に p.c. においてレゾルシン-塩酸試薬によつて特異的呈色を示し、また、アルカリ分解によつて青酸を、酸加水分解においてはフォルムアルデヒドを生成する。従つて *cycasin* と同系列の配糖体であることが推定され、これらの一群を *neocycasin* 類と命名した (第2章第2節)。 *neocycasin* 類の p.c. における諸挙動は *neocycasin* 類の検索や同定を容易にするもので、研究推進上の有力な手段であつた。

活性炭 c.c. に際しての各溶出区分は、必要に応じてさらに諸種のクロマトグラフィーに付し、 *neocycasin* 類の単離を図つた。その結果、検知された *neocycasin* 類の中での主要な7種、すなわち、 *neocycasin* A, B, C, D, E, F, G を現在までに単離して諸恒数を定めた (Table 3)。なお、 *neocycasin* D は *neocycasin* C の部分水解生成物として得られたものである。

*neocycasin* 類のアグリコンは *cycasin* と同様に遊離状態では不安定であつて配糖基結合の開裂にともないアグリコン自体も分解するので、構造決定にあつては、 *neocycasin* 類の分光学的諸性質、分解生成物などについて検討して解析を行なつた (第3章)。

*neocycasin* 類の紫外部吸収スペクトルは  $215\sim 216m\mu$  に極大吸収、  $274\sim 276m\mu$  に屈曲部を (Fig. 7)、また、赤外部吸収スペクトルは  $1537cm^{-1}$  にそれぞれ特異的吸収を示して (Fig. 8)、いずれも *cycasin* のスペクトルによく一致する。このような紫外部吸収スペクトルは脂肪族アゾキシ化合物、特に第1級化合物であるアゾキシメタンや1-アゾキシプロパンにおいて特徴的に認められるものである。赤外部吸収スペクトルにおいて、1-アゾキシプロパンは  $1506cm^{-1}$  に、アゾキシメタンでは  $1527cm^{-1}$  にアゾキシ基の特異的吸収が認められ、置換基の相違によつて“ずれ”がある。*cycasin* や *neocycasin* 類の吸収がアゾキシメタンのそれに最も近似しながらも幾分の“ずれ”がみられるのは、 *cycasin* や *neocycasin* 類がアゾキシ基に関して非対象位置に置換基を有することに原因すると考えられる。

アグリコンに由来する化学的諸挙動を考察すると次のとおりである。

*neocycasin* 類は酸完全水解によつて1モル当量のフォルムアルデヒドを生成する。このことはジメドン法による定量結果から確かめられ、 *cycasin* の酸完全水解式 (1) を満足させるものである。

また、アセチル誘導体を非水溶媒中にて乾燥塩酸ガスで処理するとヒドラジンが生成し、フォルム

アルデヒドも検知される。アグリコンのアゾキシ基  $\begin{array}{c} \text{O} \\ \uparrow \\ \text{N}:\text{N} \end{array}$  において、酸素原子がもし配糖基結合をもつメチレン基に隣接した窒素原子に配位するならば、反応は (4) 式に従つて進行して N-N グループはメチルヒドラジンに化生されるはずである。しかし、 *neocycasin* 類では上記のようにヒドラジンおよびフォルムアルデヒドが生成するので、反応は *cycasin* と同じく (5) 式に従うものであつて、アゾキシ基の酸素原子はメチル基に隣接した窒素原子に配位していることが明らかである。

*neocycasin* 類の以上の諸挙動は *cycasin* のそれらと全く一致する。そしてさらに *neocycasin* 類の酸部分水解物の1つとして *cycasin* が確認されたことは (Fig. 9)、これら配糖体群のアグリコンの同一性を明らかに裏付けるものである。従つて *neocycasin* 類のアグリコンは *cycasin* 同様 hydroxy-azoxymethane であり、 *neocycasin* 類は  $\beta$ -glycosyl*cycasin* として体系化され得る。濠洲産ソテツ

に見出された *macrozamin* もまた、いわば 6-O- $\beta$ -xylosylcycasin であつて、この種の配糖体を総括してアゾキシ配糖体と総称するゆえんである。

糖成分に関しては、*neocycasin* 類を酸あるいはエムルシンで完全水解すると両者いずれによつても *glucose* が生成されるので、糖成分はすべてグルコオリゴ糖であり、結合様式は  $\beta$  型である。酸部分水解生成物の検討結果は糖成分決定に有力な知見を与えるものである。各 *glucosido* 結合はそれぞれ水解速度に遅速はあるがいずれも水解をうけて、適時に検すれば可能なるすべての中間生成物を認め得る。従つて、*cycasin* の外に中間生成物としての *glycosylcycasin*、および糖成分の部分水解生成物の数、種類を検討すれば配糖体の全体構造を明らかにできる (Fig. 9, 13, 18)。

糖成分自体は次の 2 つの方法で単離して確認した (第 3 章第 5 節)。

*neocycasin* 類を醋酸-亜鉛末でもつて加熱処理するとアグリコンのみが分解されて糖成分を遊離させ得る。得られた糖成分自体をそれぞれの標品と比較して同定するとともに、さらにこの糖成分を部分水解して生成物を検討し同定結果を裏付ける場合もある。*neocycasin C, F, G* はこの方法によつて糖成分を単離し、前記部分水解の結果などをも合わせて、糖成分がそれぞれ *laminaritetraose*, 6-O- $\beta$ -*laminaribiosylglucose*, 3-O- $\beta$ -*gentiobiosylglucose* であることを確かめた (第 4 章第 3 節 4., 第 6 章第 3 節)。*neocycasin B* においては、このようにして得られた糖成分をさらにアセチル化して、*octaacetyl- $\alpha$ -gentiobiose* として同定確認した。

一方、*neocycasin* 類のアセチル誘導体をアルコールで処理する際に氷室中で行なえば脱アセチルされるが、室温下の処理ではアルコールの作用がアグリコン部にまで及んでアグリコンが分解され糖成分が得られる。*neocycasin A* および *E* の糖成分はこのようにして単離され、さらにアセチル化してそれぞれ *octaacetyl- $\beta$ -laminaribiose* および *octaacetyl- $\beta$ -cellobiose* として確認された。

*neocycasin D* は *neocycasin C* の部分水解物の 1 つで、*neocycasin C* に関する知見から当然 *laminaritrioside* でなければならぬ (第 4 章第 3 節)。以上のようにして *neocycasin A, B, C, D, E, F, G* の 7 種について構造を決定した (Fig. 10)。

これらの *neocycasin* 類はアグリコンのみならず糖成分においても極めて特徴あるものがある。すなわち、*neocycasin A, C, F, G* の  $\beta$ -1, 3 結合糖 4 種および *neocycasin E* の  $\beta$ -1, 4 結合糖 *cellobiose* は従来天然界における配糖体の糖成分としてはまったく例をみないものである。遊離糖としても、*C. revoluta* における *laminaribiose* の存在例を除いては他に報告をみない。*neocycasin A* は *C. revoluta* 種子の *neocycasin* 類の中では最大含量で存在することなどの点からも最も特徴的なものである。このようにアグリコンを同じくして、特色ある糖成分をも有する一連の配糖体群が同じ植物組織に存在することは、その組織の酵素による特異的糖転移と関連して興味ある問題であり、また、*cycasin* と *neocycasin* 類相互間の変換性も推察されたので、*C. revoluta* 種子より調製したソテツ・エムルシンを用いてこれらの問題を検討した (第 4 章)。

ソテツ・エムルシンによる *neocycasin A, B, C* (各最終濃度 0.05M) それぞれの分解過程において、いずれの場合も *cycasin* の減成が認められる。一方、*cycasin* を基質 (最終濃度 0.15M) とする反応過程を定量的に追求した結果、*cycasin* が分解するにつれて *neocycasin A* および *laminaribiose* が主要な転移反応生成物として出現し、次いで *neocycasin B* と *gentiobiose* もわずかに認められるに至つた。反応の推移は酵素量の多少によつて異なり、*neocycasin A* は集積量最大 (反応 I; 2 時間, 生成率 23%, 反応 II; 6 時間, 生成率 25%) に達して後次第に分解されるが、これに前後して新しく *neocycasin C* の生成も検知された (Fig. 11)。このような *neocycasin C* の生成状況から *neocycasin A* にさらに糖転移が行なわれることが推察されたので、*neocycasin A* を基質 (最終濃度

0.075M) とする反応を検討した. *neocycasin A* の分解にともなつて *neocycasin C* の生成が認められ, かつ, 次第にこれが集積される傾向を示した. 反応の進行に従い, *neocycasin B*, さらに *laminaritriose*, *laminaritetraose* もわずかながら認められたが, 42時間の反応を通じての主要な転移生成物は *neocycasin C* であつた (Fig. 12). 上記反応結果は各転移反応生成物をそれぞれ単離して同定したことによつて確証され, *cycasin*, *neocycasin A, B, C* 4者間の酵素的相互変換関係が明らかになつた (Fig. 15).

ソテツ種子のエムルシンによる糖転移反応において, *neocycasin A* あるいは *C* が主要にして顕著なる転移生成物として認められることは, 基質である *cycasin* あるいは *neocycasin A* の分解にともなう  $\beta$ -glucosyl 基の転移に際して  $\beta$ -1, 3 結合が優先して生成されることを示すものである. そして, *C. revoluta* 種子における *neocycasin A* の特徴的存在, さらには *neocycasin C* の存在とも関連して, ソテツ種子組織内での酵素的糖転移による *neocycasin* 類の特異的生成過程が暗示される.

なお, 転移反応による *neocycasin C* の生成過程においては *neocycasin D* のごとき *trioside* が検知されないので, *neocycasin C* は *neocycasin A* に  $\beta$ -*laminaribiosyl* 基が転移して生成されるように見える. このことについてはさらに詳細な検討を要すると思われる.

*C. revoluta* は種子のみならず茎幹や葉も有毒であることが知られているので, これらの各部位についてアゾキシ配糖体を分別定量して定量的考察を試みるとともに, アゾキシ配糖体の検索, 同定をも行なつた (第5章). 種子仁, 茎幹, 雄花, 葉の主要配糖体はいずれも *cycasin* であり, その含量は過熟仁において最も高く 0.381% である. *neocycasin A* も過熟仁に最も多く 0.053% であるが, *cycasin* に対する含量比は雄花が最も高く *cycasin* とほぼ同含量を示した. *neocycasin B* も各部位にみられるが, 葉を除いてはいずれも *neocycasin A* が *cycasin* に次ぐ存在であつた. 葉のアゾキシ配糖体のパターンは特徴的であつて, 他の部位には微量にしか検知されない *macrozamin* が特に新葉において 0.044% 含まれ, 量的に *cycasin* に次ぐ存在を示した (Table 6).

*C. circinalis* 種子についても同様な検討を行なつた (第6章). 同ソテツはその分布地で古くから人畜の中毒例がよく知られているものである. 特にその有毒性が注目されているグアム島産の完熟および過熟種子についてアゾキシ配糖体を分別定量した結果, *cycasin* 含量は 1.535% および 1.270% で *C. revoluta* 種子のその約 3~5 倍であつて, *C. circinalis* 種子の強力な毒性を裏付ける知見の 1 つを得た. アゾキシ配糖体のパターンも *C. revoluta* と異なつていて, *neocycasin B* の含量が 0.06~0.07% で量的に *cycasin* に次ぐものであり, *neocycasin A* あるいは *macrozamin* もこれに続いて存在した (Table 9). 一方, 活性炭 c.c. によつて上記の各配糖体を単離して同定, 確認した外に, 新しく *neocycasin F* および *G* を単離して両者の構造を明らかにした (第6章第3節).

*C. revoluta* の各部位および *C. circinalis* 種子から単離され, あるいはその存在を検知されたアゾキシ配糖体を総括して示すと次のとおりである. なお, アゾキシ配糖体は含量ないしは収量の順に列記した.

*C. circinalis* L. 完熟仁 (Table 9, 10)

*cycasin*, *neocycasin B*, *neocycasin A*, *macrozamin*, *neocycasin F*, *neocycasin E?*, 未知 A'''  
3種.

同 上 過熟仁 (Table 9)

*cycasin*, *neocycasin B*, *macrozamin*, *neocycasin A*, 以下未検索.

*C. revoluta* Thunb. 仁 (Table 2, 6)

*cycasin*, *neocycasin A*, *neocycasin B*, *neocycasin E*, *neocycasin C*, *macrozamin*, *neocycasin*

D ? . neocycasin F ?, 未知 A 3 種.

同 上 茎幹 (Table 6)

cycasin, neocycasin A, neocycasin B, 以下未検索.

同 上 雄花 (Table 6, 7)

cycasin, neocycasin A, macrozamin, neocycasin B, 未知 A' 2 種.

同 上 新葉および古葉 (Table 6, 8)

cycasin, macrozamin, neocycasin A, neocycasin B, 未知 A'' 5 種

未知 A, A', A'', A''' 群はいずれも neocycasin 類と推定されるもので, 同種のもの, あるいは neocycasin C, D, E, F, G など既知のものをも含むと考えられるが, いずれも含量微量で活性炭 c. c. の該当フラクション中の共存物などとの分離が困難であつて詳細を検討するに至らない.

さきに述べたように濠洲産ソテツ *Macrozamia* 属, *Bowenia* 属などからは macrozamin が単離されている. しかし, これまでに明らかにしたソテツの配糖体の多様性の事実からみて, 上記濠洲産ソテツについても macrozamin のみの存在は考えられず, *Cycas* 属とともにこれら各属のアゾオキシ配糖体について検討を及ぼすことは比較生化学上興味あることである.

また, *C. revoluta* 種子のエムルシンによる糖転移反応によつて新たに生成される neocycasin 類の量的順位が種子の主要なる neocycasin 類のそれに一致することから, ソテツ各部位におけるアゾオキシ配糖体の特徴的なパターンが各部位の組織内での酵素的糖転移ないしはその特異性と関連を有することは十分に推察できる. 従つて, 各部位における酵素的糖転移特異性の検討はアゾオキシ配糖体の生合成機序の一端をも明らかにする知見を与えるものと考えられる.

## 要 約

1. 日本産ソテツ *Cycas revoluta* Thunb. 種子の未知配糖体の検索と同時に, 有毒配糖体 cycasin ( $\beta$ -D-glucosyloxymethane) の大量調製を因つて抽出法に検討を加えた. ソテツ試料の稀酸処理によつて, ソテツ配糖体の組成に何らの影響を及ぼすことなく抽出操作を迅速に, かつ, 容易に行ない得ることを確かめて新しく抽出法を確立した. また, 関係諸装置, 特に濃縮装置を改良し, 高能率の大型連続式減圧濃縮装置を考案してソテツ試料の大量処理に応ずる体制を整えた.

2. 上記によつて得た抽出液を活性炭カラムクロマトグラフィーによつて精細に分別, 検索して一連の新配糖体群 neocycasin 類を検知し, さらに同ソテツの各部位やガム島産ソテツ *Cycas circinalis* L. にも検討を加えた.

検知された neocycasin 類のうち, 現在までに主要なる 7 種を単離して, それぞれ neocycasin A, B, C, D, E, F と命名した. なお, neocycasin D は neocycasin C の部分分解生成物として得られたものである.

3. 上記各 neocycasin 類のアグリコンは遊離状態においては不安定であつて, アグリコン自体として単離できないので, 構造の検討にあつては neocycasin 類の分光学的諸性質や分解生成物などについて解析して構造を決定した.

neocycasin 類のアグリコンはいずれも cycasin と同じく hydroxyloxymethane であつて, このような脂肪族アゾオキシ化合物をアグリコンとする配糖体は, 自然界にはもちろん合成的にも, これらのソテツ配糖体の外に従来類例をみないものである. この特徴に基づいて, neocycasin 類は cycasin および濠洲産ソテツ *Macrozamia* 属などの有毒配糖体 macrozamin ( $\beta$ -primeverosyloxymethane) とともに総括して, アゾオキシ配糖体の総称のもとに配糖体の分類上 1 新区分を形成する

ものである。また、糖成分と関連して、neocycasin 類は macrozamin をも含めてすべて  $\beta$ -glycosyl-cycasin として体系化できる。

このように neocycasin 類はアグリコンに関してのみならず、糖成分自体においても特徴あるものをもっている。neocycasin B の gentiobiose は配糖体の糖成分としてよく知られているが、neocycasin A, C, D, F, G の  $\beta$ -1,3 結合糖、すなわち, laminaribiose, laminaritriose, laminaritetraose, 6-O- $\beta$ -laminaribiosylglucose, 3-O- $\beta$ -gentiobiosylglucose や、neocycasin E の cellobiose は従来の天然配糖体の糖成分として例のないものである。

4. *Cycas revoluta* Thunb. の種子から調製したエムルシンを用いて、neocycasin 類の分解反応と、cycasin あるいは neocycasin A を基質とする糖転移反応を検討した結果、cycasin, neocycasin A, B, C の相互間の酵素的変換関係が明らかになった。そして転移反応において  $\beta$ -1, 3 glucosido 結合が優先して顕著に生成されることを確かめて、ソテツ・エムルシンの特異性を推察した。このような neocycasin A あるいは neocycasin C の特異的生成をも含めて、新たに転移生成される neocycasin 類の量的順位は種子に存在する neocycasin 類のパターンの特徴とも一致するものであり、neocycasin 類の生合成機構の解明に1つの示唆を得た。

5. ソテツの各部位や品種間における有毒性の相違、ソテツ配糖体の多様性などに関連して、*Cycas revoluta* Thunb. の各部位および *Cycas circinalis* L. 種子についてアゾキシ配糖体を分別定量した。その結果、上記いずれの試料においても主要配糖体は cycasin であるが、量的にかなりの相違があつて、特に *Cycas circinalis* L. の種子仁には 1.3~1.5% の高含量で存在し、*Cycas revoluta* Thunb. 仁のその 3~5 倍であり、前者ソテツの強い毒性を裏付ける知見を得た。配糖体の他のものについては、*Cycas revoluta* Thunb. の全般に neocycasin A の含量比が高く macrozamin は微量であるが、葉においては macrozamin が cycasin に次ぐ存在量を示している。一方、*Cycas circinalis* L. 仁では量的に cycasin に次ぐものは neocycasin B あるいは macrozamin であつた。

これらのソテツ試料について、さらにアゾキシ配糖体を検索して単離を行ない、既知配糖体を同定、確認した外、なお多数の未知の neocycasin 類の存在を認めた。それらのうち、*Cycas circinalis* L. についての未知の2種は neocycasin F および G としてはじめて単離されるに至つた。

以上のようにして、アゾキシ配糖体の多様性をさらに明らかにするとともに、それらのパターンはソテツの品種、部位によつてそれぞれ特徴を有することを確かめて、4. において得た結果から推察されるソテツの品種別あるいは各部位の酵素的糖転移特異性の問題と関連して興味ある知見を得た。

終りに臨み本研究について終始懇篤なる御指導を戴いた鹿児島大学西田孝太郎名誉教授ならびに懇切なる御助言、御鞭撻を賜つた九州大学大島康義教授をはじめ鹿児島大学渡部常樹教授、小林昭助教授に深甚の謝意を表す。また、諸実験については現旭化成工業株式会社沼田忠男氏、鹿児島大学農学部宇多津篤子嬢の御助力を戴いた。記して深く感謝する。

なお、元素分析、赤外部吸収スペクトル測定は京都大学三井哲夫教授の御好意によつた。さらに貴重なる糖、配糖体などの標品の御恵与を願つた東北大学故麻生清教授、英国 The Lister Institute W. J. WHELAN 博士、濠洲 University of New England N. V. RIGGS 博士、米国 University of Hawaii H. MATSUMOTO 博士、ソテツ試料の採集について御協力を戴いた鹿児島県農業試験場大島支場窪田広技師、米国 National Institutes of Health L. T. KURLAND 博士および M. G. WHITING 博士の御好意に、あわせて深く感謝の意を表す。

## 文 献

- 1) "The Encyclopedia Americana", Americana Corp., N. Y., vol. 8, p. 351 (1951); "Encyclopaedia Britannica", Encyclopaedia Britannica, Inc., Chicago, vol. 11, p. 24 (1960).
- 2) 上原敬二: 樹木大図説, 有明書房, 第1巻, p. 1 (1959).
- 3) M. G. WHITING: *a review of the literature on "Toxicity of Cycads"*, National Institutes of Health, U. S. A., p. 26, 34 (1962).
- 4) Van DONGEN: *Pharm. Weekbl.*, **40**, 309 (1903); *Chem. Z.*, **I**, 1313 (1903).
- 5) G. NORRIE: *J. Roy. Soc. New South Wales*, **10**, 295 (1876).
- 6) J. LAUTERER: *Proc. Roy. Soc. Queensland*, **11**, 96 (1896).
- 7) J. LAUTERER: *ibid.*, **14**, 5 (1898).
- 8) F. B. GUTHRIE: *Agr. Gaz. New South Wales*, **28**, 625, 865 (1917).
- 9) J. M. PETRIE: *Proc. Linn. Soc. New South Wales*, **45**, 424 (1920).
- 10) 西田孝太郎: 鹿児島高等農林学校学術報告, **13**, 1 (1938).
- 11) 吉村清尚: *ibid.*, **5**, 25 (1922).
- 12) 西田孝太郎, 山田有朝: 農化, **11**, 357 (1935).
- 13) K. NISHIDA: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **10**, 524 (1935).
- 14) J. M. COOPER: *Proc. Roy. Soc. New South Wales*, **74**, 450 (1940).
- 15) K. GORTER: *Bull. Jard. bot. Buitenzorg*, (3) **2**, 187 (1920).
- 16) ASTON and EASTERFIELD: *Proc. Chem. Soc.*, **19**, 191 (1903) (R. J. McILROY: "The Plant Glycosides", p. 21 (1951)).
- 17) M. S. CARRIE: *J. Soc. Chem. Ind.*, **53**, 288T (1934).
- 18) C. L. CARTER: *ibid.*, **62**, 238 (1943).
- 19) B. LYTHGOE and N. V. RIGGS: *J. Chem. Soc.*, **1949**, 2716.
- 20) B. W. LANGLEY, B. LYTHGOE and N. V. RIGGS: *ibid.*, **1951**, 2309.
- 21) N. V. RIGGS: *Australian J. Chem.*, **7**, 123 (1954).
- 22) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 77 (1955).
- 23) 西田孝太郎, 小林 昭, 永浜伴紀, 小島喜久男, 山根 実: 生化学, **28**, 218 (1956).
- 24) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **19**, 172 (1955).
- 25) 西田孝太郎, 小林 昭, 永浜伴紀: 生化学, **28**, 70 (1956).
- 26) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 122 (1956).
- 27) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI, T. NAGAHAMA and J. NAWATA: *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **III**, 6 (1957).
- 28) A. KOBAYASHI: *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 203 (1962).
- 29) A. KOBAYASHI: *ibid.*, **26**, 208 (1962).
- 30) 西田孝太郎: 化学の領域, **13**, 730 (1959).
- 31) R. L. WHISTLER and D. F. DURSO: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 677 (1950).
- 32) W. G. C. FORSYTH: *Nature*, **161**, 239 (1948).
- 33) A. JEANES, C. S. WISE and R. J. DIMLER: *Anal. Chem.*, **23**, 415 (1951).
- 34) 吉村清尚, 古賀藤次郎: 鹿児島高等農林学校学術報告, **4**, 31 (1921).
- 35) N. V. RIGGS: *J. Chem. Soc.*, **1949**, 3199.
- 36) L. HOUGH, J. K. N. JONES and W. H. WADMAN: *ibid.*, **1949**, 2511; *ibid.*, **1950**, 1702.
- 37) G. O. ASPINALL and R. G. J. TELFER: *Chem. & Ind.*, **1952**, 1244.
- 38) 化学実験学, 河出書房, 第2部, 第2巻, p. 535 (1946).
- 39) 船久保英一: 有機化合物確認法, 養賢堂, 上巻, p. 92 (1953).
- 40) R. M. BOCK and NAN-SHING LING: *Anal. Chem.*, **26**, 1543 (1954).
- 41) 杉山 登: 有機化合物の微量確認法, 培風館, p. 29 (1957).
- 42) 麻生 清, 柴崎 一雄: 農化, **29**, 856 (1955); A. SATO, K. WATANABE and K. ASO: *Chem. & Ind.*, **1958**, 887.

- 43) K. ANNO, N. SENO, E. NAKAMURA, H. SAITO and R. HOSHI : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 67 (1959).
- 44) J. C. SOWDEN and A. S. SPRIGGS : *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3539 (1954).
- 45) A. THOMPSON, K. ANNO, M. L. WOLFROM and M. INATOME : *ibid.*, **76**, 1309 (1954).
- 46) 渡辺敏幸, 元村佳恵, 麻生 清 : 農化, **34**, 704 (1960).
- 47) 元村佳恵, 渡辺敏幸, 麻生 清 : *ibid.*, **36**, 805 (1962).
- 48) 松田和雄, 麻生 清 : 醸酵工学, **32**, 399 (1954).
- 49) J. W. WHITE JR. and N. HOBEN : *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 386 (1959).
- 50) 麻生 清, 柴崎一雄, 蟻坂昌之 : 醸酵工学, **36**, 355 (1958).
- 51) S. PEAT, W. J. WHELAN and H. G. LAWLEY : *J. Chem. Soc.*, **1958**, 724.
- 52) S. PEAT, W. J. WHELAN and H. G. LAWLEY : *ibid.*, **1958**, 729.
- 53) C. T. BISHOP : *Can. J. Chem.*, **33**, 1073 (1955).
- 54) 北原増雄, 竹内良光 : 農化, **35**, 468 (1961).
- 55) S. A. BARKER, E. J. BOURNE and D. M. O'MANT : *Chem. & Ind.*, **1955**, 425.
- 56) S. A. BARKER, E. J. BOURNE and O. THEANDER : *J. Chem. Soc.*, **1955**, 4276.
- 57) R. S. ALM : *Acta Chem. Scand.*, **6**, 1186 (1952).
- 58) S. A. BARKER, E. J. BOURNE and D. H. WHIFFEN : " *Methods of Biochemical Analysis*" (ed. by D. Glick), Interscience, vol. **III**, p. 224 (1956).
- 59) 石橋雅義 : 定量分析実験法, 富山房, p. 243 (1949).
- 60) *A. O. A. C.*, 7th ed., p. 459 (1950).
- 61) D. A. MACFADYEN : *J. Biol. Chem.*, **158**, 107 (1945).
- 62) M. V. IOZESCU and C. BODEA : *Bull. soc. chim.*, **47**, 1408 (1931) (*C. A.*, **25**, 1183 (1931)).
- 63) 京大農芸化学教室編 : 農芸化学実験書, 産業図書, 第2巻, p. 527 (1957).
- 64) B. HELFERICH, S. WINKLER, R. GOOTZ, O. PETERS und E. GÜNTHER : *Z. physiol. Chem.*, **208**, 91 (1932).
- 65) B. W. LANGLEY, B. LYTHGOE and L. S. RAYNER : *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4191.
- 66) T. NAGAHAMA, K. NISHIDA and T. NUMATA : *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **IV**, 9 (1960).
- 67) V. C. BARRY : *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **22**, 423 (1941) (W. PIGMAN : " *The Carbohydrates*" Acad. Press Inc., N. Y., p. 511 (1957)).
- 68) 藤本健太郎, 松田和雄, 麻生 清 : 農化, **36**, 346 (1962).
- 69) S. A. WARSİ and W. J. WHELAN : *Chem. & Ind.*, **1957**, 1573.
- 70) 北原増雄, 竹内良光 : 農化, **35**, 474 (1961).
- 71) W. Z. HASSID, M. A. JOSLYN and R. M. MCCREADY : *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 295 (1941).
- 72) S. PEAT, W. J. WHELAN and J. G. ROBERTS : *J. Chem. Soc.*, **1957**, 3916.
- 73) G. O. ASPINALL and R. G. J. TELFER : *ibid.*, **1954**, 3519.
- 74) G. O. ASPINALL and G. KESSLER : *Chem. & Ind.*, **1957**, 1296.
- 75) G. KESSLER : *Ber. schweiz. bot. Ges.*, **68**, 5 (1958).
- 76) 小野英男, 太宰宙朗 : 農化, **33**, 644, 645 (1959).
- 77) S. PEAT, W. J. WHELAN and K. A. HINSON : *Nature*, **170**, 1056 (1952).
- 78) S. PEAT, W. J. WHELAN and K. A. HINSON : *Chem. & Ind.*, **1955**, 385.
- 79) J. RABATÈ : *Bull. soc. chim. biol.*, **17**, 572 (1935); *ibid.*, **20**, 449 (1938).
- 80) T. MIWA, K. TAKANO and S. FURUTANI : *Proc. Jap. Acad.*, **25**, 111 (1949).
- 81) K. TAKANO and MIWA : *J. Biochem.*, **37**, 435 (1950).
- 82) K. NISHIZAWA and Y. HASHIMOTO : *Arch. Biochem. Biophys.*, **81**, 211 (1959).
- 83) K. NISHIDA, A. KOBAYASHI and T. NAGAHAMA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **20**, 74 (1956).
- 84) M. PLUMEL : *Ann. biol. chim.*, **9**, 307 (1951). (*C. A.*, **47**, 11082 (1953)).
- 85) D. FRENCH and G. M. WILD : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 2612 (1953).
- 86) 麻生 清, 山内文男 : 醸酵工学, **33**, 194 (1955).



- 87) S. SUGAWARA, Y. NAKAMURA and T. SHIMOMURA : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **24**, 281 (1960).
- 88) J. H. PAZUR : *J. Biol. Chem.*, **199**, 217 (1952).
- 89) D. GROSS, P. H. BLANCHARD and D. J. BELL : *J. Chem. Soc.*, 1727 (1954).
- 90) P. J. ALLEN and J. S. D. BACON : *Biochem. J.*, **63**, 200 (1956).
- 91) J. W. WHITE JR. and J. MAHER : *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1259 (1953).
- 92) J. S. D. BACON and B. DICKINSON : *Biochem. J.*, **61**, xv (1955).
- 93) J. H. PAZUR and D. FRENCH : *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 3536 (1951).
- 94) S. A. BARKER and J. R. CARRINGTON : *J. Chem. Soc.*, **1953**, 5388.
- 95) S. C. PAN, A. A. ANDREASEN and P. KOLACHOV : *Science*, **112**, 115 (1950).
- 96) J. H. PAZUR : *J. Biol. Chem.*, **208**, 439 (1954).
- 97) E. M. CROOK and B. A. STONE : *Biochem. J.*, **55**, xxv (1953).
- 98) S. A. BARKER, E. J. BOURNE and M. STACEY : *Chem. & Ind.*, **1953**, 1287.
- 99) S. A. BARKER, E. J. BOURNE, G. C. HEWITT and M. STACEY : *J. Chem. Soc.*, **1955**, 3734.
- 100) H. W. BUSTON and A. H. KHAN : *Biochim. et Biophys. Acta*, **19**, 564 (1956)
- 101) H. W. BUSTON and A. JABBER : *Chem. & Ind.*, **1954**, 48.
- 102) H. W. BUSTON and A. JABBER : *Biochim. et Biophys. Acta*, **15**, 543 (1954).
- 103) K. V. GIRI, V. N. NIGAM and K. S. SRINIVASAN : *Nature*, **173**, 953 (1954).
- 104) H. SUZUKI : *Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku*, **B8**, 80 (1957).
- 105) T. YAMAHA and C. E. CARDINI : *Arch. Biochem. Biophys.*, **86**, 127, 133 (1960).
- 106) D. S. FEINGOLD, E. F. NEUFELD and W. Z. HASSID : *J. Biol. Chem.*, **233**, 783 (1958).
- 107) 西川五郎, 花田毅一 : *熱帯農業*, **3**, 62 (1959).
- 108) 逸見文雄, 友枝幹夫 : *農化*, **19**, 386 (1943).
- 109) W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER and J. S. HARRISON : *Nature*, **166**, 444 (1950).
- 110) K. NISHIDA, T. NAGAHAMA and T. NUMATA : *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **IV**, 1 (1960).
- 111) N. V. RIGGS : *Chem. & Ind.*, **1956**, 926.

### R é s u m é

It has been reported previously that two toxic glycosides were found in cycads; cycasin ( $\beta$ -D-glucosyloxyazoxymethane) was isolated from seeds and stems of Japanese cycad, *Cycas revoluta* Thunb., and macrozamin ( $\beta$ -primeverosyloxyazoxymethane) was isolated from seeds of Australian cycads, *Macrozamia spiralis* and others. Such an aliphatic azoxy compound had neither been recognized in the natural products nor synthesized in the laboratory. The generic term for these glycosides, azoxyglycosides, characterizes the aglycone.

This paper deals with a new series of azoxyglycosides called "neocycasins" which was first isolated from *Cycas revoluta*, later from Guamin cycad, *Cycas circinalis* L., with the use of carbon column chromatography.

Once each heterosidic linkage of neocycasins was split, the aglycone decomposed and could not be caught in its intact form, being extremely labile. The structure of the aglycone was, therefore, decided by the examination of the degradation products obtained after treating with various reagents, and by the spectrophotometrical analyses.

The neocycasins of which structures were proved are as follows: neocycasin A ( $\beta$ -laminari-biosyloxyazoxymethane), neocycasin B ( $\beta$ -gentiobiosyloxyazoxymethane), neocycasin C ( $\beta$ -laminaritetraosyloxyazoxymethane), neocycasin D ( $\beta$ -laminaritriosyloxyazoxymethane), neocycasin E ( $\beta$ -cellobiosyloxyazoxymethane), neocycasin F (6-O- $\beta$ -laminaribiosylcycasin) and neocycasin G (3-O- $\beta$ -gentiobiosylcycasin).

The aglycone found in all neocycasins is identical with that found in cycasin and macrozamin, and neocycasins may be called  $\beta$ -glycosylcycasins according to their structure.

Neocycasin A, C, E, F and G are also characterized by their sugar components which are first found in naturally occurring glycosides. Neocycasin D is one of the partially hydrolysed products of neocycasin C.

Being expected from the concurrent existence of these serial glycosides in the seeds, the possibility of enzymatic interconversion among them was researched. Neocycasins were cloven into cycasin in the course of degradation with emulsin prepared from Japanese cycad nuts. Reversely, by enzymatic transglycosylation, neocycasin A, B and C were produced from cycasin, and also neocycasin C and B were produced from neocycasin A.

The linkages derived by the transglycosylation with various emulsins have hitherto been reported to be mainly  $\beta$ -1, 6 and or  $\beta$ -1, 4 glucosidic linkage. Nevertheless, in the above transfer reaction with the cycad emulsin,  $\beta$ -1, 3 linkage as seen in neocycasin A or C is predominantly formed. These evidences on the specific interconversion between cycasin and neocycasins by cycad emulsin are considered a clue for the elucidation of the mechanisms of accumulation of these glycosides in the plant.

The respective patterns of azoxyglycosides occurring in seeds, stems, male strobils and leaves of Japanese cycad and seeds of Guamian cycad were examined quantitatively and qualitatively.

The main glycoside of the above cycad parts was cycasin. The fresh kernels of green and brown nuts of Guamian cycad contained 1.535 % and 1.270 % cycasin, respectively, and these values are 3~5 times higher than the cycasin content of those of Japanese cycad.

In most of the parts of Japanese cycad, neocycasin A occurred in a high ratio to other neocycasins among which neocycasin B was the major and macrozamin was only detected in minor content; however, in the leaves, particularly in the young, macrozamin occurred highly and the ratio of neocycasin A to macrozamin was considerably low. Guamian cycad nuts contained neocycasin B as the major one of the azoxyglycosides except cycasin, and neocycasin B was followed in quantitative order by neocycasin A and macrozamin in the green nuts, or by macrozamin and neocycasin A in the brown. In the green, neocycasin F and G were discovered as minor constituents.

Besides the above azoxyglycosides, some unknown members of neocycasins were also detected on paper chromatographic examination of the extracts of the cycad materials, and further isolation is now in progress.

Thus, there is observed that each of the parts of cycads has its characteristic pattern of azoxyglycosides. From the relation of the pattern of azoxyglycosides to emulsin in Japanese cycad nuts, it is deduced that such a pattern differing from different parts may depend on the specificity of their own trans- $\beta$ -glycosylases.