

[J. Ferment. Technol., Vol. 47, No. 1, p. 8~19, 1969]

麴菌の生産する蛍光性物質に関する研究

(第8報) Asperopterin B の精製単離と B および
A の化学的性質

金子 安之・真田 実

(名古屋大学農学部醸酵化学教室)

Studies on the Fluorescent Substances Produced by *Aspergillus* fungi(VIII) Purification and Isolation of Asperopterin B and Chemical
Properties of Asperopterin B and A

Yasuyuki Kaneko and Minoru Sanada

(Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, University of Nagoya,
Nagoya, Japan)

A new pterin, Asperopterin B (abbreviated to B), which is a bluish purple fluorescent product of *Aspergillus* fungi, was extracted and isolated in a crystalline form from a culture broth of *Aspergillus oryzae* T-17 together with Asperopterin A (abbreviated to A). Chemical properties of A and B were studied. A was shown to be a glycoside pterin derivative and was hydrolyzed by acid and fractionated into a sugar moiety and aglycon pterin. The former was identified as ribose and its benzylphenylhydrazone precisely coincided with that prepared from D-ribose in the IR spectra and X-ray diffraction pattern, suggesting to have D-configuration. A study on the properties of B proved B was identical with the aglycon of A. A consisted of one mole of B and one mole of ribose, the reducing end of which was bound to the aglycon. B had molecular formula $C_8H_9N_5O_3 \cdot 1/2H_2O$. Its partial structure was investigated and defined as a derivative of 2-amino-4,7-dihydroxypteridine, by the UV and IR spectra, an elementary analysis, its reaction against $AgNO_3$, comparison with synthetic pterins, chelation reaction on Cu^{2+} and hot alkali decomposition. As substituents for $-C_2H_6O$, the $-CH_2OH$ side chain was evidenced to exist at C_6 of the pteridine skeleton and $-CH_3$ was elsewhere. This was evidenced by alkaline $KMnO_4$ oxidation, Al-Hg reduction and others.

緒 論

前報^{1,2)}で広く *Aspergillus*, *Penicillium* 属菌の生産する紫青色蛍光物質のうち, Asperopterin A (A と略記^{1,2)}) を結晶として単離し, これが新しい pterin 誘導体であることを明らかにした。今回配糖体である A の糖部分について研究し, リボースであることを知

った。また麴菌は Asperopterin A 以外に紫青色蛍光物質を 1 種類生産するが^{1,2)}, これを結晶として単離し Asperopterin B (B と略記) と名付けた。A と B の相関性は A を酸で加水分解し, aglycon 区分を精製結晶化したところ, このものは B と同一物であった。したがって A は B のリボシッドであり, B の構造を明らかにすれば A のそれも確定し得ることとなる。次に

Bの物理的, 化学的諸性質を検討しその化学構造の一部を推定したところ, 今まで天然に知られていない新 pterin であることが判ったので報告する. なおAは従来の報告中第2 VS または VS-II と仮称したものを, Bは第1 VS ないし VS-I を指す.

実験方法

1. Asperopterin A 試料の調製 前報^{1,2)}の方法により *Asp. oryzae* T-17 を培養しAを単離, 熱水より3回再結して試料とした.

2. Aの酸加水分解とその炭水化物の定性反応 140 mg のAを 2NH₂SO₄ 40 ml に溶かし沸騰水中に漬し, 2 hr 加温後バリタ水で中和, BaSO₄ を濾別し濾液を糖成分, aglycon の単離その他に供する. α -Naphthol 反応, TTC 反応など5種類の炭水化物の定性反応を^{4~6)}, この加水分解前のAと分解中和濾液に対し行なった. Table 1.

Table 1. Qualitative test reaction of sugar component³⁾ in Asperopterin A.

Test reaction	Before acid hydrolysis	After acid hydrolysis
α -Naphthol reaction	+	+
Indole reaction	+	+
TTC* reaction	-	+
Bial reaction	+	+
Malaprade reaction	+	+

* 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride

3. A加水分解物の D-リボースの benzylphenylhydrazone 結晶X-線回折図 糖区分と標準の D-リボースの hydrazone 結晶を粉末とし, X-線回折図を測定した. North American Philips Co. の Norelco diffractometer, Ni フィルター, CuK α X-線を使った. 計数管は Geiger Counter で記録紙送り速度は 1/2 inch/min. 実験条件は管電圧 35 kV, 管電流 15 mA, time constant 4 sec, 走査速度 2°/min, divergence slit 1°, receiving slit 0.006'', 2 θ Cu K α 18.9°± のものの回折線強度は約 100°. Fig. 3 に両者の回折スペクトルを掲げた.

実験結果および考察

1. **Asperopterin A** の炭水化物側鎖について Asperopterin A, C₁₃H₁₇O₇N₅·H₂O は isoxanthopterin C₆H₄O₂N₅ などの普通の pterin 類に比し, Nが少く CHO が多く, また分子量が著しく大きく, 且

つその IR スペクトルは 3450 cm⁻¹ 付近に強く幅広い吸収を有している. 濾紙電気泳動では多くの緩衝液でAはわずかに陰極に動くのみであるが, N/30 硼砂液により陽極に著しく長距離移動する. したがってAは糖を含む pterin と考えられ³⁾, 硫酸で加水分解すれば, Table 1 のようにその分解液は, α -naphthol 反応, 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 反応など^{4~6)}に陽性となり, Aの分子中には明らかに還元糖が存在することを示している. さらに Bial 反応が強い深青色陽性を呈するゆえ, 少なくとも五炭糖がある^{4~6)}.

Table 1 において加水分解前の試料はAが陰性を示したが他はすべて陽性であった. Aはアルカリ性には安定であるが酸性に対しては比較的弱く, pH 13 で 100°C, 30 min 熱してもほとんど変化しないが, pH 1 に 100°C, 5 min または室温で1日処理すると分解してペーパークロマトグラム上新しい蛍光スポットを生ずる. TTC 反応以外の呈色反応^{4~6)}は強酸性条件下で行なうために, 配糖体の結合が一部加水分解されて, Aそのものも試薬に陽性の反応を与える. しかし TTC 反応の場合は 0.1N NaOH 中で 1~2 min 煮沸されるので分解は起らず, この条件ではAは還元力を示さないものと考えられる. そこでその糖部分は少なくとも還元末端がグリコシド結合により aglycon と結合していることが判る. また TTC と Malaprade 反応^{4~6)}陽性のことから, リボースの C₂, C₃, C₄ のうち少なくとも隣接2炭素は free の OH を有することを示している.

2. **A糖区分のリボースとしての同定** まずAの加水分解中和濾液から糖区分を分離精製した. 加水分解が完了すると液の色が黄色になるが, 紫青色の蛍光はそのまま残る. 中和濾液を Dowex-I-CO₃'' 形のイオン交換樹脂カラムを通し, aglycon と推定される紫青色蛍光物質を吸着除去, 通過液を Dowex-50-H 形を通過させ陽イオン性不純物を除き, 通過液を凍結乾燥すると無色シラップ状の炭水化物区分を得る. ペーパークロマトグラフィ^{7~9)}によりこの成分を調べると anilinehydrogenphthalate により五炭糖の赤色のスポットを生じ Fig. 1, Table 2 のごとく標準の D-リボースと R_f がよく一致した. これ以外の糖は検出されなかった.

次に確認するために benzylphenylhydrazone に導いた. シラップ状糖区分 0.5 ml (約 30 mg) に 30 mg の粉末酢酸ソーダと benzylphenylhydrazine hydrochloride 45 mg とを混じ, さらに 0.3 ml のメタノールを加え1分間烈しく振盪の後一夜放置する. 次に水

0.7 ml を添加 1 時間冷蔵する。析出した糖の hydrazone 結晶を遠沈し, 0.2 ml の水で洗浄し真空で乾燥後, エーテルで洗浄し熱エタノールから再結する^{10, 11)}。収量約 30 mg。同様にして D-リボースの hydrazone の標準試料を市販 D-リボースより調製する。糖区分の hydrazone の mp 124°C, 標準の D-リボース hydrazone の mp 123~124°C (いずれも未補正) で

良く一致した。混融試験も全く mp の低下を示さなかった。両者の IR スペクトル (KBr 法) も Fig. 2 のごとく全く一致した。また両者の結晶 X-線回折図を比較したところ, Fig. 3 に示すごとく回折曲線も完全に合致した。以上により A の糖部分は D-リボースと考えられる。

Asperopterin A $C_{13}H_{17}O_7N_5$ が^{1,2)} 後述のごとく

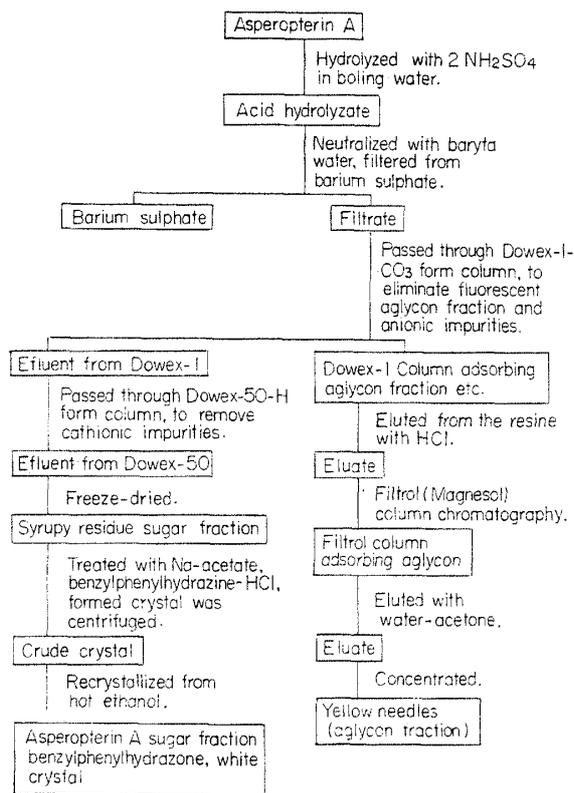


Fig. 1. Fractionation and isolation of sugar moiety and aglycon pterin from acid hydrolyzate of Asperopterin A.

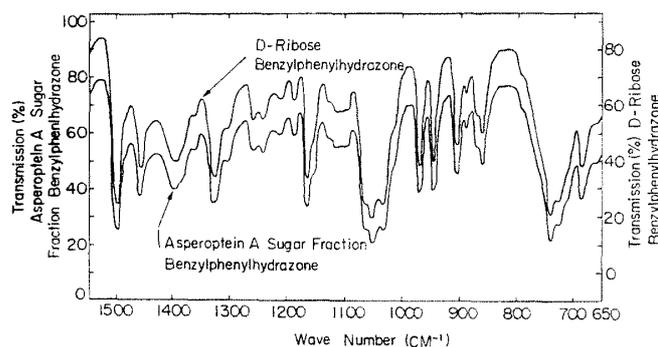
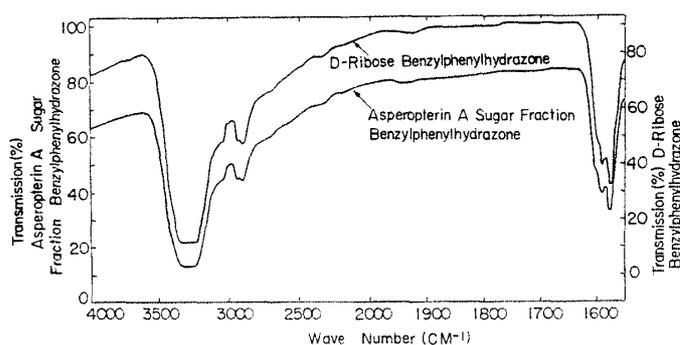


Fig. 2. Comparison in IR spectra of benzylphenylhydrazone of Asperopterin A sugar fraction and D-ribose.

Table 2. Paper chromatographic identification of sugar fraction with ribose.

Solvent	R_g^*	
	Sugar fraction in Asperopterin A hydrolyzate	D-Ribose
<i>n</i> -Butanol, acetic acid, water (4:1:2)	139	141
<i>n</i> -Butanol, ethanol, water (5:1:4)	161	159
Phenol saturated with water	139	140
Ethylacetate, pyridine, water (12:5:4)	123	123
Ethanol, 0.01M citric acid citrate buffer pH 3.5 containing 0.01M boric acid (9:1)	121	121
Isopropanol, water (9:1)	111	110

* R_g : $\frac{\text{distance substance traveled from origin}}{\text{distance glucose traveled from origin}} \times 100$

Spray: *p*-anisidine hydrochloride, aniline hydrogenphthalate, trichloroacetic acid phloroglucinol

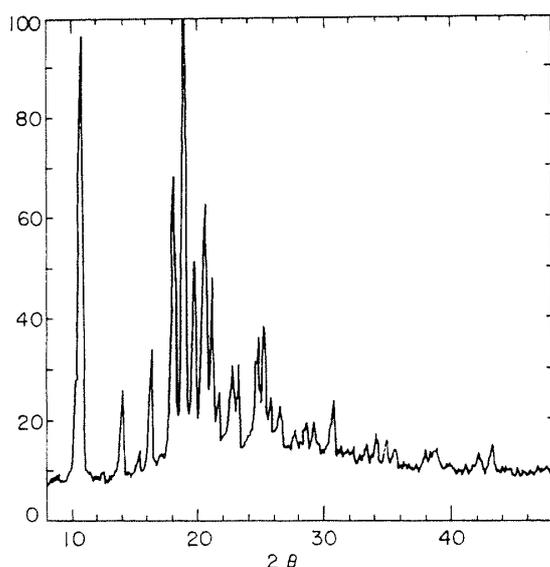


Fig. 3-(1). X-ray diffraction intensity curve of Asperoterin A benzylphenylhydrazone.

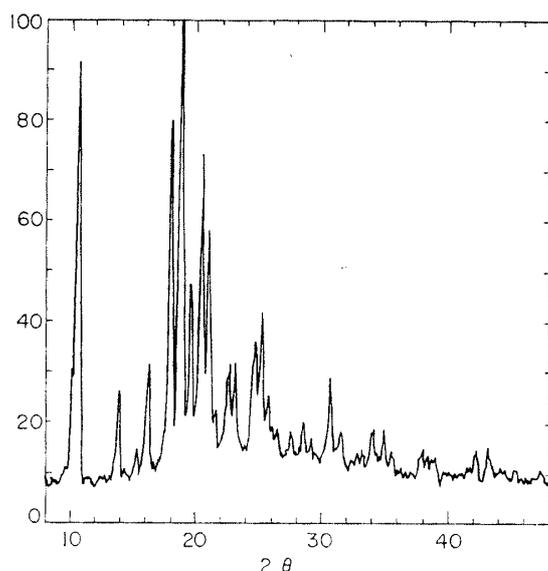
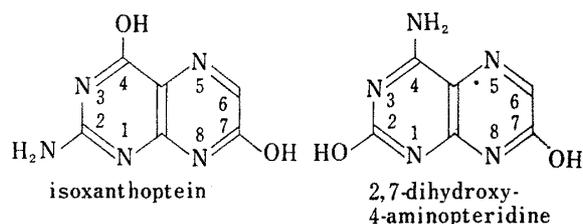


Fig. 3-(2). X-ray diffraction intensity curve of D-ribose benzylphenylhydrazone.

2-amino-4, 7-dihydroxypteridine(isoxanthopterin) (Table 3)- $C_6H_5O_2N_5^{1,2)}$ を母核とし、他にリボース残基 $-C_5H_9O_4$ を含むとすれば、残りは $-C_2H_5O$ のみとなる。これは pteridine 核の側鎖にあると考えられる。

Albert¹²⁾ によれば pteridine 核自身はよく水に溶け融点も低いだが、 $-NH_2$, $-OH$ のごとく水素結合性の官能基が付くと難溶となり、融点を失い $350^\circ C$ でも溶けなくなる。A がかなりの水溶性と低融点 ($193^\circ C$) を有しているのは、リボースとの配糖体をなしているためであろう。

Table 3. Structure of pterins.



3. 麹菌培養液よりの **Asperopterin B** の分別単離 次に麹菌培養液中に微弱ではあるが見出される B を分別単離した。前報^{1,2)} で述べたように *Asp. oryzae* T-17 を培養した後蛍光物質の単離を行ない、90%メタノール抽出液をアルミナカラムクロマトグラフィーにかけ80%メタノールで溶出すると、本菌の生産する別の紫青色蛍光物質 B が A から分画溶出される。また Filtrol (または Magnesol*) カラムに吸着せしめた pterin を、段階的にアセトン濃度を増加してアセトン水で溶出すると A の後から B が分別流下される。このようにアルミナカラムクロマトグラフィーで分別された B 区分を、先ず Filtrol (Magnesol) カラムクロマトグラフィーで不純物を除去し、ついで前報^{1,2)} の A の精製法におけるものと同じ Dowex-I- CO_3^- 形カラムクロマトグラフィーにかける。これらの操作を繰返したが遂に結晶が得られなかった。これは Dowex-I から pterin の溶離の際微量に過剰の HCl が加えられ、ついで濃縮された溶離液中の HCl が配糖体の A の晶出には好影響を与えるが、B に対しては逆に結晶化を妨げるものと考えられる。そこで順序を逆に第一に Dowex-I のカラムで黄褐色不純物を除き、溶離液を濃縮し pH を HCl で 2.0 に補正し、次に Filtrol または Magnesol のカラムに吸着せしめ水洗して HCl を除去後、アセトン水で溶出した B 区分を減圧濃縮すると鮮黄色長針状の結晶が得られた。Magnesol は前報^{1,2)} の Filtrol Grade 58 と全く同じ取扱法でカラムクロマトグラフィーに使用し得る。

4. A の加水分解物からその aglycon の単離とその B との一致 Fig. 1 に示すように A の酸加水分解物から紫青色蛍光の強い aglycon 区分を Dowex-I に吸着せしめたが、これを Dowex-I から A を溶出するのと全く同じ方法^{1,2)} で、batch 法により HCl で置換溶出し濃縮後、pH を 2.0 に補正し Magnesol カラムに吸着せしめ、アセトン濃度を 1%, 2%, 5%……

* 米国 Westvaco Chlor-alkali Division, Food Machinery and Chemical Corp. (New York) 製吸着剤, synthetic magnesium silicate を成分とする。

と段階的に増大してアセトン水で紫青色蛍光帯を溶出する。必要によりこれらのクロマトグラフィーを繰返した後アセトン水溶液を濃縮すれば aglycon 区分が黄色長針状結晶として析出する。この場合も Magnesol クロマトグラフィーが最後の段階であることを要する。この物質のペーパークロマトグラムの R_f 値は麹菌培養液から単離された前記Bのそれと完全に一致する。

この種の化合物の蛍光は通常 pteridine の母核に依存すると考えられるゆえ、加水分解によりAがリボースを失い pterin aglycon のみが現われ、しかもそれは今までBと呼ばれていた物質と同一であると思われる。この関係をペーパークロマトグラフィーにより Fig. 4 と Table 4 に示した。IR, UV スペクトル、融点の比較も両者が同一物質であることを証明した。

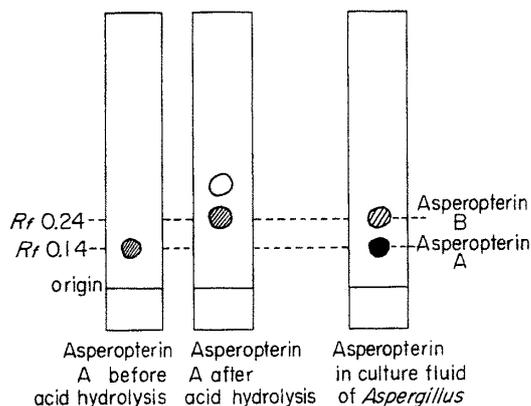


Fig. 4. Paper chromatogram of Asperopterin group before and after acid hydrolysis.
Solvent: *n*-butanol, acetic acid, water (4:1:1).

ロゲン, S, P を含まない。元素分析値: C, 41.66; H, 4.58; N, 29.57 計算値 $C_8H_9N_5O_3 \cdot 1/2H_2O$: C, 41.38; H, 4.34; N, 30.15%; 分子式 $C_8H_9N_5O_3 \cdot 1/2H_2O$ の分子量 232.2。UV, IR スペクトルは Fig. 6, 7。Bの pK を分光学的に決定した^{13,14}。すなわち B分子中の酸および塩基 group の解離に伴って惹起される UV スペクトルの変動を0.1Mグリコロール (pH 2.8~3.7), 0.1M酢酸塩 (pH 4.8~5.6) 0.1Mリン

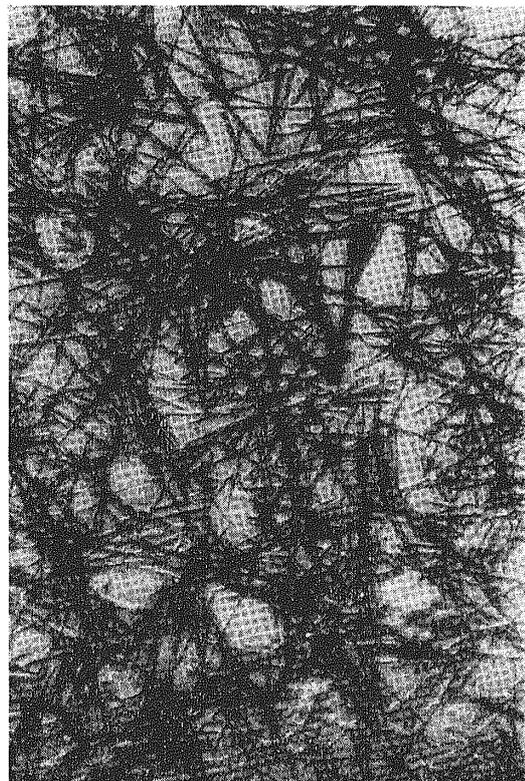


Fig. 5. Crystals of Asperopterin B.

Table 4. Paper chromatographic identification of Asperopterin A aglycon with Asperopterin B.

Solvent	R_f	
	Asperopterin A aglycon	Asperopterin B
<i>n</i> -Butanol, acetic acid, water (4:1:1)	0.14	0.14
5% Na_2HPO_4	0.42	0.42
Methanol, <i>n</i> -butanol, benzene, water (2:1:1:1)	0.53	0.51
4% Na-citrate	0.44	0.45
<i>sec</i> -Butanol, formic acid, water (8:2:5)	0.35	0.35

5. Bの諸性質 Bは熱水より3回再結し真空デシケーター中で乾燥すると鮮黄色長針状結晶として得られる。Fig. 5はその写真である。約260°Cより赤変分解を始め、310°C以上で黒変するが融解しない。ハ

酸塩 (pH 6.0~8.1), 0.1N硼酸塩 (pH 9.5~10.0) などの緩衝液で測定した。特定波長における pH と OD の関係は Fig. 8, 9 であり pK 値として 8.2 と <2.8 を決定した。0.01N NaOH と pH stat による

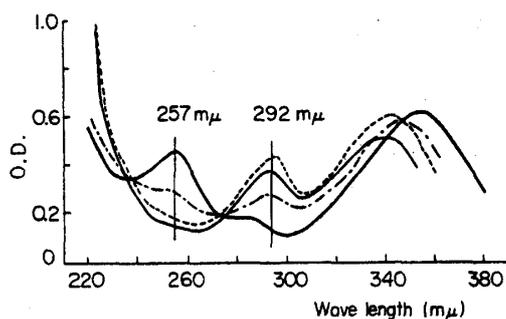


Fig. 6. UV spectra of Asperopterin B.

— 0.1N N NaOH, ---- pH 8.1,
 pH 6.0~2.8, — 0.1N HCl

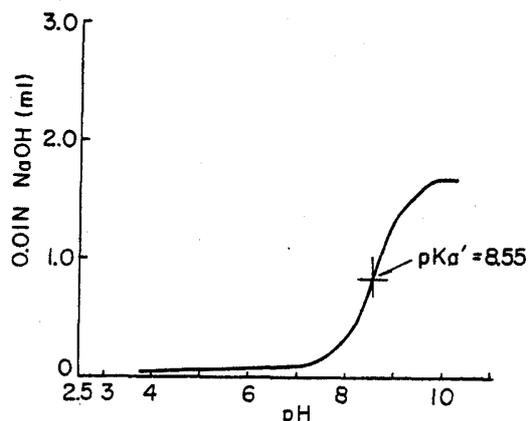
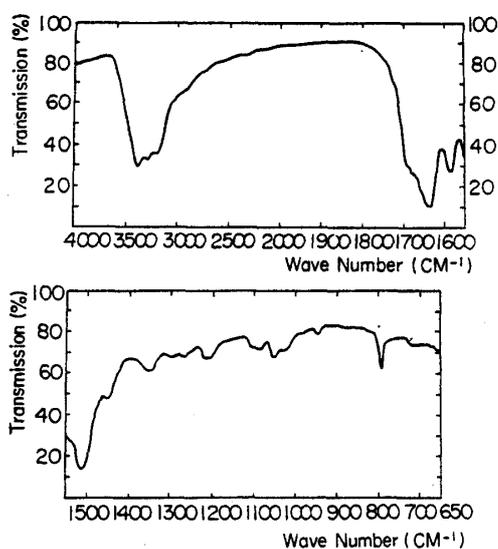
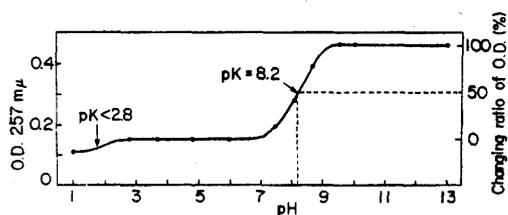
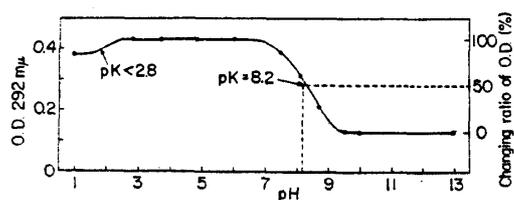


Fig. 10. Alkali titration curve of Asperopterin B.

Fig. 7. IR spectrum of Asperopterin B.
(KBr)Fig. 8. The relation of pH and $OD_{257m\mu}$ of Asperopterin B.Fig. 9. The relation of pH and $OD_{292m\mu}$ of Asperopterin B.

アルカリ滴定曲線は Fig. 10 で pK_a' 値は約 8.6、中和当量より B の分子量 202 を得た。Rast 法が不可能なので B の分子量を次の様にして求めた。B は isoxanthopterin (Table 3) またはその -6-methyl 誘導体と UV スペクトルが近似^{15,16)}で、且つ B は酸化、還元反応と UV スペクトルの比較などから、核の 6 位に不飽和結合または lone pair を有する側鎖を持たず共役が起っていないと推定されるので、これら合成 pterin 類の対応する波長における分子吸光度 ϵ から B の分子量を求め得る。Isoxanthopterin とその -6-methyl 体の 0.1N NaOH 中 340 と 341 $m\mu$ の $\log \epsilon$ は 4.02 と 4.14 で^{15,16)} B の 355 $m\mu$ の $E_{1\%}^{1cm}$ 測定値 523.0 からその分子量は 230 と計算され、上記分子式の分子量とよく一致した。

B は水とフェノールに A より溶け難く特に酸性の水に難溶、アルカリ性ではよく溶ける。結晶、溶液とも A より濃い黄色を帯び、メタノール、ピリジン、酢酸には少量、エタノール、*n*-ブタノール、アセトン、ベンジルアルコールには微量溶解し、エーテル、酢酸エチル、クロロフォルム、ベンゼン、石油エーテルなどには不溶。フェノールを除きどの溶液でも B は A と同様強烈な美しい紫青色蛍光を発し特にアルカリ性において強い。

6. A と B における pteridine 核の存在について Asperopterin A $C_{13}H_{17}N_5O_7$ からリボシド 1 個を差引くと $C_8H_9N_5O_3$ を得、B の分子式と合致する。したがって A は B 1 分子とリボース 1 分子から構成されるとの前の考えは妥当である。

A, B とも水溶液から 10% 硝酸銀により黄色沈澱を生じ、またペーパークロマトグラフィーで A, B に 5% 硝酸銀を噴霧すると黄褐色の斑点を現わす。増田ら¹⁷⁾によれば多数の pteridine 誘導体たとえば lumazine (2,4-dioxopterin), 6,7-dimethylumazine, 2-

amino-4-oxo-pteridine-7-carboxylic acid, 2-amino-4-oxo-6-methylpteridine その他多数は皆この試験に陽性を示す。一方たとえば, uracil, 4,5-diaminouracil, 4-amino-5-nitrosouracil および barbituric acid など他多数の pyrimidine 化合物は陰性である。したがってAとBに pteridine 核があることは明らかである。pteridine 母核 $C_6H_4N_4$ に比し N_5O_3 のBが前述したように, 水に難溶で 310°C 以上でも融解しない事実から, Bは $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ 基を pteridine 核の側鎖として有すると考えられる¹²⁾。

7. Bと2,7-dihydroxy-4-aminopteridineとの比較 この様な多数の pterin のうちから UV スペクトルがBに類似のものを検索すれば isoxanthopterin (2-amino-4,7-dihydroxypteridine) 群と 2,7-dihydroxy-4-aminopteridine 類 (Table 3) がある。そこで後者を合成しBとの異同を調べた。まず Ben-

dick らの法¹⁸⁾に従い 2-hydroxy-4,5,6-triaminopyrimidine を合成し, これと diethylmalacetate を反応させ 2,7-dihydroxy-4-amino-6-methylpteridine を得る^{19,20)}。この合成法は後報に詳述する。そしてBとこれらの合成品並びにそれぞれの KMnO_4 酸化物をペーパークロマトグラフィーにより比較した。後述のごとくこの酸化により各々の pterine は C_6 の側鎖が $-\text{COOH}$ に酸化されるが, Table 5 の通りBは 2,7-dihydroxy-4-amino 体のいずれとも, またそれらの-6-カルボン酸誘導体とも全く異なる。 KMnO_4 酸化によるBの-6-カルボン酸変換体も 2,7-dihydroxy-4-aminopteridine-6-carboxylic acid と一致しない。したがってBは少くとも酸化 KMnO_4 により-6-カルボン酸誘導体を生ずるような範囲内の 2,7-dihydroxy-4-aminopteridine 類ではない。

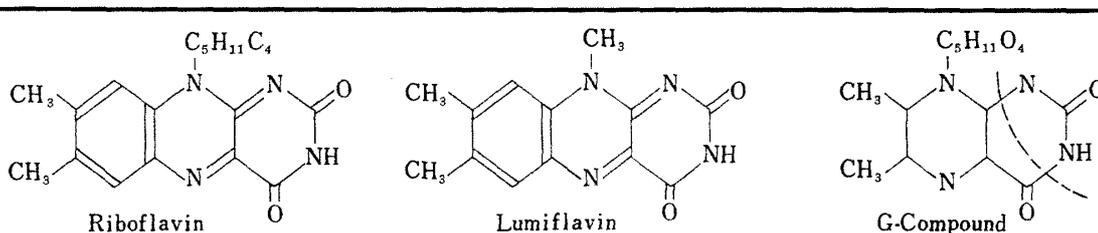
8. Bの熱アルカリ分解 増田ら¹⁷⁾は 6,7-di-

Table 5. Paper chromatographic comparison of Asperopterin B, 2,7-dihydroxy-4-aminopteridine group and their KMnO_4 oxidation product.

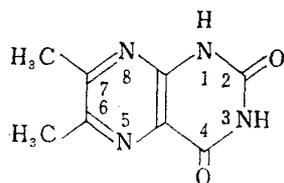
Sample	R_f	
	(1)	(2)
Asperopterin B	0.33	0.37
Its KMnO_4 oxidation product	0.17	0.52
2,7-dihydroxy-4-amino-pt.-6- CH_2COOH	0.51	0.75
Its KMnO_4 oxidation product*	0.13	0.30
2,7-dihydroxy-4-amino-pt.-6- CH_3	0.20	0.45
Its KMnO_4 oxidation product*	0.13	0.30

Solvent: (1) *n*-butanol, acetic acid, water (4:1:1);
(2) 4% Na-citrate. * These were same compounds.

Table 6. Hot alkali decomposition of pterins and flavins.



Ten mg of each sample in 2ml 1N NaOH was heated at 100°C for 30~60 min which resulted in decomposition forming $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}$.



The above treatment did not cause formation of $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}$.

methyl-riboflumazine (G Compound) と 6-methyl-7-hydroxyriboflumazine や Table 6 の類縁物質を熱アルカリ分解し、尿素の生成により lumazine 核の C₂ に -OH または =O の存否を証明した。ただし Table 6 上段のごとく pteridine 核の N₈ に当る所に置換基のあることが反応陽性になるためには必要である。B 10 mg を同様に熱アルカリ分解後 IRC-50 でアルカリ除去、濃縮 ペーパークロマトグラフィー上 Ehrlich 試薬で尿素を検索したが陰性で、B の C₂ に -OH または =O が存在しないかまたは N₈ に置換基がないかを示した。

9. Cu²⁺ と Asperopterin の chelation

以上により B は isoxanthopterin 化合物に属すると考えることが出来るが、これをさらに明らかにするために C₄ の置換基が -OH であることを次のごとく確めた。Albert²¹⁾ によれば Table 7 下段のごとく pterin 類やその類似体は C₄ 位に -OH 基を有する場合にのみ Cu²⁺, Fe²⁺, Co²⁺ の様な各種金属イオンと chelate

化合物を形成する。そこで Turner, 増田^{22,23)} の方法により、B は水に対する溶解度が小であるゆえ、A と硫酸銅を Table 7 のごとき各種の濃度に、しかし [A]+[B] は常に 0.02 モルに保つ様に一定量の水に溶解混合する。[A] は硫酸銅のモル数、[B] は A のセル数を表わす。次にこれらの溶液の pH を NaOH で 11.3 に補正すると、通常 A の λ_{max} の 259, 360 mμ の他に 660 mμ に新たな λ_{max} を chelation により生じ液は青緑色を呈する。これを 660 mμ で比色すると、種々な [A]/([A]+[B]) に対する OD は Table 7, Fig. 11 のように [A]/([A]+[B])=0.5 に達した時すなわち両者が等モル混合された時に最大となった。この結果は A, したがって B も Table 7 下段に説明されるごとき 1:1 の chelate complex を Cu²⁺ とつくることを意味し^{21~23)}, A と B は C₄ 位に明らかに -OH を有する。Table 7.

10. B と isoxanthopterin 類との比較 B の母核が isoxanthopterin-C₆H₃O₂N₅ とすれば B はそれ

Table 7. Relation between Cu²⁺ adding ratio and the formation of Asperopterin B-Cu²⁺ chelate complex.

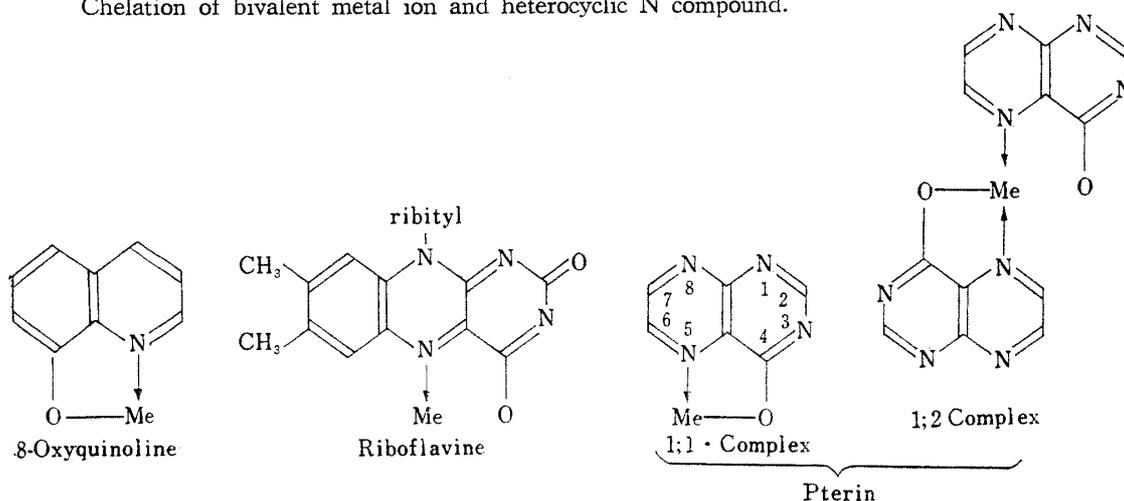
[A]	[B]	$\frac{[A]}{[A]+[B]}$	Optical density pH 11.3 660 mμ
0.004*(mole)	0.016*(mole)	0.2	0.078
0.006	0.014	0.3	0.10
0.008	0.012	0.4	0.158
0.010	0.010	0.5	0.205
0.012	0.008	0.6	0.154
0.014	0.006	0.7	0.085
0.016	0.004	0.8	0.045

[A]: moles of CuSO₄·5H₂O

[B]: moles of Asperopterin A [A]+[B]=0.02 mol

* For example, 0.4 ml and 1.6 ml of each 0.01M solution were mixed.

Chelation of bivalent metal ion and heterocyclic N compound.



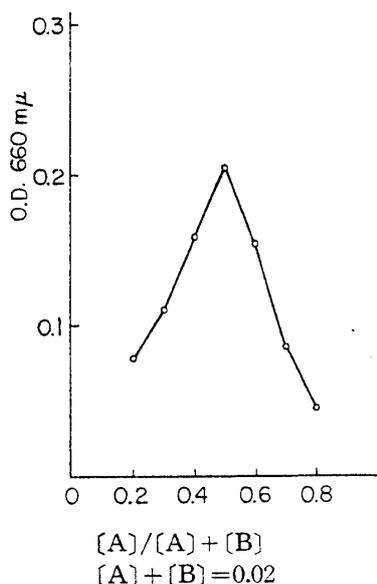
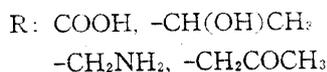
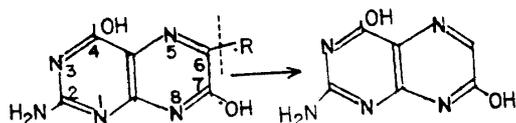


Fig. 11. Formation of Asperopterin B-Cu²⁺ chelate complex.

より -C₂H₆O だけ多い。Bの UV スペクトルをAおよび isoxanthopterin のそれ^{15,23}と比較すると、よく近似しているが対応する吸収極大にはシフトがみられ、 $\lambda_{\max}^{340-359m\mu}$ ではBは isoxanthopterin より約 15 mμ の、またAはBより約 4 mμ の夫々 bathochromic shift を示している。Bでは -C₂H₆O がシフトの原因と考えられ、Aはリボースのためさらにシフトが現われる。

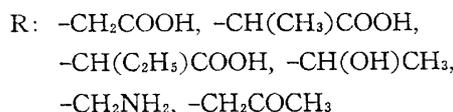
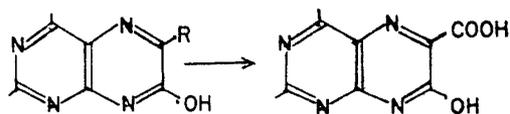
以前に isoxanthopterin-6-carboxylic acid や 6-acetic acid を含む主として isoxanthopterin 系合成品 18種とAおよびBをペーパークロマトグラフィーで比較し、いずれも一致しないことを認めた²⁴。

11. Bのアルミニウムアマルガム還元 名和、松浦ら^{15,16}は先に isoxanthopterin, xanthopterin, 2,4,6-または 2,4,7-trihydroxypteridine の核の C₆ 位に以下の様な置換基を有する誘導体はアルカリ溶液中でアルミニウムアマルガム (Al-Hg と略記)²⁵で還元すると、これら C₆ の側鎖が脱離したとえば isoxanthopterin などを生成し、この反応は pterin の構造決定に利用できることを示した。Bの側鎖の種類と位置を推定するためにこの反応を行なった。10 mg の



Bを5% NaOH 15 ml に溶解し 約 100 mg の活性化した Al-Hg を加え、湯浴上で15分加熱する。冷却後 1N HCl で酸性とし析出する沈澱を遠心し、少量の冷水で洗浄乾燥する。洗浄母液も合併濃縮し共に試料とする。両試料とも *n*-ブタノール・酢酸・水(4:1:1)、4%クエン酸ソーダおよび3% NH₄Cl の3種のペーパークロマトグラフィーでは元のBと R_f が変らなかった^{15,16,25}。また沈澱を3% NaOH に溶かし、塩酸を加え再結し mp, IR スペクトルなどを調べたがBと同じであった。したがってBは C₆ 位にこのような側鎖を有さないものと考えられる。

12. Bの MnO₂ および NaIO₄ 酸化 名和、平田ら²⁶によれば次に示した 7-hydroxypteridine の6位の側鎖は、MnO₂で酸化するとすべて-6-COOH になる。少量のBを5% NaOH に溶かし粉末 MnO



を少量加え、攪拌しつつ 20 min 湯浴上で加熱する。冷却後 MnO₂ を濾別し濾液を Al-Hg の場合と同様にペーパークロマトグラフィーにかけたが、Bはなんらの変化も受けていなかった。次にBに0.2M NaIO₄ 試薬 2 ml を加え30秒振盪後直ちに上と同じペーパークロマトグラフィーにかけたが、Bの変化はみられなかった。したがって6位に上記の置換基は存在しない。

13. Bのアルカリ性 KMnO₄ 酸化 7-Hydroxypteridine 類の中で MnO₂ 酸化で-6-カルボン酸誘導体になし得るのは、pteridine 核の6位に特定の置換基がある場合に限られ、それ以外の側鎖のものでは変化が起らない。しかし、名和ら²⁶によればアルカリ性 KMnO₄ で酸化するとすべての種類の C₆ 側鎖が -COOH に酸化され、しかもこの反応は6位にのみ選択的に起る。Forrest, Van Baalen ら^{27,28}が単離した藍藻類 *Anacystis nidulans* の2種類の pterin でも同様の反応が見られる。そこで前述のごとき MnO₂ で酸化可能なもの以外の側鎖が、Bの6位に存在するか否かを調べるために アルカリ性 KMnO₄ 酸化反応を試みた。20 mg のBを 0.5N NaOH に溶解、50℃に保ち攪拌しつつ2% KMnO₄ を1滴ずつ紫色

が消失しなくなるまで加え、50°C、30分保持する。過剰の KMnO_4 をエタノールで分解し MnO_2 の沈澱を濾別、温水で洗い濾液と洗液を合せ 15 ml に濃縮し希酢酸で酸性にして析出する酸化物の黄色結晶を熱水より再結した²⁶⁾。元素分析値：C, 39.86; H, 3.37; N, 29.02; O, 27.55 計算値 $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}_5\text{O}_4 \cdot 1/8\text{H}_2\text{O}$; C, 40.13; H, 3.05; N, 29.25, O, 27.57% これを B などと比較したペーパークロマトグラフィーを Table 8. UV, IR スペクトルを Fig. 12, 13 に示したが、酸化物はペーパークロマトグラフィー上明らかに B より R_f が変動し、その UV スペクトルは形状は変わらないが著しい bathochromic shift (0.1N NaOH, 365 m μ で 10 m μ) を示した。すなわち基本骨格の pteridine は同じであるが 6 位の側鎖の異なる物質がこの酸化により生成した。しかし isoxanthopterin-6-carboxylic acid ではない。以上を総合して B の 6 位に MnO_2 では酸化されないで、アルカリ性 KMnO_4 で酸化されるような種類の側鎖が確かに存在する。

Table 8. Paper chromatography of Asperopterin B. Its KMnO_4 oxidation product and its KMnO_4 oxidation then Al-Hg reduction product.

Sample	R_f		
	(1)	(2)	(3)
Asperopterin B	0.33	0.37	0.51
Its KMnO_4 oxidation product	0.17	0.52	0.69
Isoxanthopterin-6-carboxylic acid	0.10	0.54	
The derivative made by Al-Hg reduction of the KMnO_4 oxidation product of Asperopterin B	0.38	0.34	0.48
Isoxanthopterin	0.22	0.29	

Solvent: (1) *n*-butanol, acetic acid, water (4:1:1); (2) 4% Na-citrate; (3) 3% NH_4Cl .

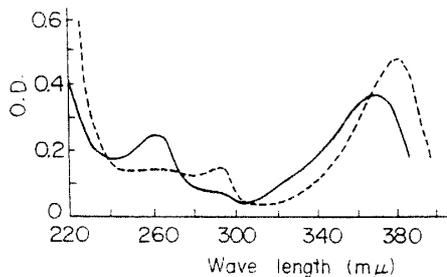


Fig. 12. UV spectra of KMnO_4 oxidation product from Asperopterin B. — 0.1N NaOH, 0.1N HCl

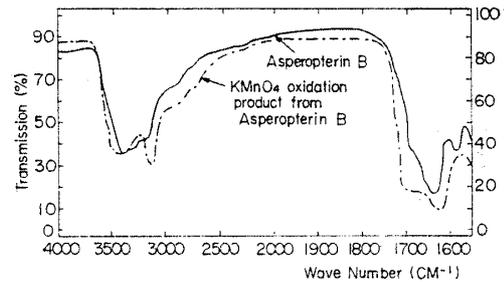
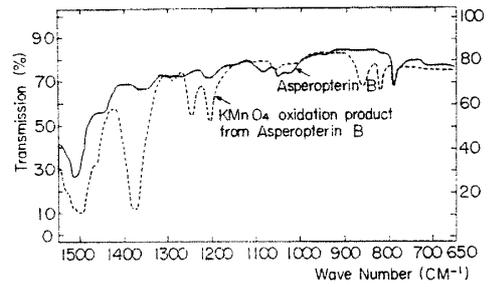


Fig. 13. Comparison in IR spectra of Asperopterin B and its KMnO_4 oxidation product. (KBr).

14. B の KMnO_4 酸化物の Al-Hg 還元 先に述べた通り isoxanthopterin 類の C_6 に $-\text{COOH}$ が結合した誘導体は、アルカリ溶液中で Al-Hg で還元すると、この $-\text{COOH}$ がとれて C_6 に置換基のない isoxanthopterin 類になる。B をアルカリ性 KMnO_4 で酸化して得た物質が 6 位に $-\text{COOH}$ を有するならば、さらに Al-Hg 還元を行えば $-\text{COOH}$ を取り除くことができると考え、 KMnO_4 酸化物に対し還元処理を実施した。酸化物結晶 4 mg を Al-Hg で処理し、反応液を酸性で Magnesol カラムに吸着、水洗後 0.1% アンモニア水で展開溶出した区分を中和濃縮する。HCl で酸性とし析出する沈澱をアルカリ性で溶解、酸性で沈澱を繰返えし精製した。ペーパークロマトグラフィーと UV スペクトルを Table 8, Fig. 14 に示す。処理前に比し R_f が顕著に変化し、

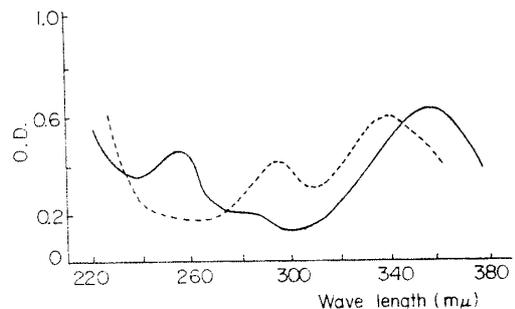


Fig. 14. UV spectra of the derivative made by Al-Hg reduction of the KMnO_4 oxidation product of Asperopterin B. — 0.1N NaOH, 0.1N HCl

また UV は形が変わらないが著しい hypsochromic shift を示した。これにより明らかに B 酸化物より C₆ 置換基がとれて新しい pterin が生成した。しかし isoxanthopterin とは異なる。

15. B の KMnO₄ 酸化物の C₆ 位における -COOH 置換基の存在と B の C₆ 位その他の置換基について 以上を通じて B の KMnO₄ 酸化物が原物質の 6 位の側鎖に由来する -6-COOH 置換基を有することは以下の理由により確実である。

(1) IR スペクトルを B と比較すると (Fig. 13) 酸化物には新たに 3100~3200, 1630, 1700 CM⁻¹ 附近にピークが出現し、いずれも他の pterin 類の場合に似て 6 位に -COOH が生じたためと解釈される。Fig. 15 は isoxanthopterin-6-carboxylic acid の IR スペクトルであるがこれと同じ性質の諸吸収が見られる。

(2) Table 9 に B, B 酸化物, その還元物および 6-methyl-isoxanthopterin, その酸化物, それをさらに還元したものに相当する合成品の 0.1N 苛性ソーダ中の UV 吸収極大を示した。B → B 酸化物で 10 mμ の bathochromic shift を, B 酸化物 → Al-Hg 還元物で 10 mμ の hypsochromic shift を起すが, これは丁度 -6-CH₃ 体 → -6-COOH 体 → -6-(H) 体^{15,16)} の変移に見られるシフトと全く合致する。この事実は B 酸化物が -6-COOH を有し, Al-Hg 還元でそれが脱離するという考えをよく裏書きする。(3)次に Table 10 の様に -COOH 基のある pterin とない pterin および B とその KMnO₄ 酸化物をそれぞれ 0.5N 苛性ソーダと 0.5N アンモニアに溶解し, ルチヂン・コリヂン・水

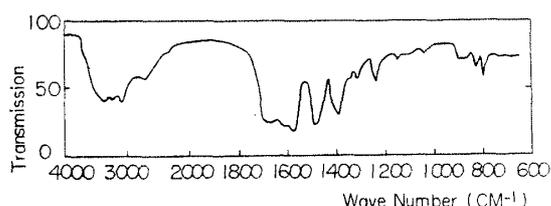


Fig. 15. IR spectrum of isoxanthopterin-6-carboxylic acid.

Table 9. Shift in UV spectra of Asperopterin B and other isoxanthopterin compounds by KMnO₄ oxidation and then Al-Hg reduction.

Sample	λ^*_{max}	shift		λ^*_{max}	shift
Asperopterin B	355 (mμ)	} bathochromic 10(mμ) } hypsochromic 10	isoxanthopterin -6-CH ₃	341 (mμ)	} bathochromic 9(mμ) } hypsochromic 10
Its KMnO ₄ oxidation product	365		isoxanthopterin -6-COOH	350	
Product of KMnO ₄ oxidation and then Al-Hg reduction	355		isoxanthopterin -6-(H)	340	

* In 0.1N NaOH.

Table 10. Paper chromatography of Asperopterin B, its KMnO₄ oxidation product and others in NaOH and NH₄OH solution.

Sample	R _f	
	0.5N NaOH solution	0.5N NH ₄ OH solution
Isoxanthopterin	0.37	0.40
Isoxanthopterin -6-COOH	0.04	0.11
Asperopterin B	0.61	0.67
Its KMnO ₄ oxida- product	0.04	0.19

Solvent: lutidine, collidine, water (1:1:1)

(1:1:1) のペーパークロマトグラフィーを実施した。一般に -COOH を有する合成 pterin に共通の性質として, それらのアンモニウム塩はこの溶媒系により解離して R_f が大きく上昇するが, Na 塩は解離せず原点に止まる。Table 10 で isoxanthopterin と B では塩の種類で R_f に差がみられず, いずれもよく上昇しているが, isoxanthopterin-6-carboxylic acid と B 酸化物では共に Na 塩は原点に止まり, アンモニウム塩は顕著にこれより移動している。これは B には -COOH 基は存在しないが酸化物にはあることを表わすものである。

B の KMnO₄ 酸化物は, 元素分析の結果, 分子式 C₈H₇N₅O₄·1/8H₂O と決定された。したがって B はこの酸化により炭素数の増減はなく, 水素 2 原子を失い酸素 1 原子を増した物質になった。酸化に要した KMnO₄ の消費量も略これに一致する。UV スペクトルが酸化後もシフト以外には変化がないことより C₆ 位置換基以外には変化が起ったとは到底考えられない。そして酸化物から Al-Hg で -COOH を除いた -6-(H) 体は UV が元の B とほとんど一致する。このことは元の B が 6 位の側鎖に不飽和結合, lone pair などを持っていないことを意味する。以上を総合して B の 6 位の反応前における置換基は -CH₂OH と推定さ

れる。

元来 B の側鎖は総計で $-C_2H_6O$ であるゆえ、これ以外に置換基として $-CH_3$ が別の位置に付いていることになる。B の $KMnO_4$ 酸化物とその還元物が isoxanthopterin-6-carboxylic acid と isoxanthopterin に合致しなかった原因も、この $-CH_3$ の存在による。以上の諸結果は Asperopterin B が既知の pterin と一致せず、新しい天然 pterin であることを示している。

総 括

Aspergillus, *Penicillium* 属菌一般が生産する、他の一つの pterin の Asperopterin B を、*Aspergillus oryzae* T-17 の培養液から結晶として抽出単離し、先に単離した Asperopterin A と共に化学的性質を研究した。A は新しい pterin の配糖体であって、その酸加水分解物より糖成分を分別し、benzylphenylhydrazone として単離しリボースと同定した。この hydrazone は D-リボピラノースから調製した標準の hydrazone と IR スペクトル、X-線回折図とも完全に一致し、糖は D-リボースと推定された。B の性質を調べそれが A の aglycon pterin と一致することを知った。A は 1 モルの B と 1 モルのリボースより成り、リボースの還元末端は aglycon と結合している。B は分子式 $C_8H_9N_5O_3 \cdot \frac{1}{2}H_2O$ で、UV, IR スペクトル、諸種の化学反応、合成 pterin との比較などより、明らかに 2-amino-4,7-dihydroxypteridine の誘導体である。残余の置換基の $-C_2H_6O$ のうち $-CH_2OH$ が pteridine 核の C₆ 位に $-CH_3$ が他の位置にあることをアルカリ性 $KMnO_4$ 酸化、Al-Hg 還元などにより推定した。以上により B もまた新しい天然 pterin と決定した。

貴重な各種の合成 pterin 試料を恵与下さり、また種々の重要なご指導とご助言を頂いた名古屋大学教養部松浦貞郎教授と各種の重要なご援助を賜った名古屋大学農学部宗像桂教授、醸酵化学教室の方々に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Kaneko, Y.: *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 965(1965).
- 2) 金子：農化, **40**, 227(1966).
- 3) 小林, 森：紙電気泳動法の実験, 34~39, 南江堂 (1956).
- 4) 荒木：化学実験学, **II-11**, 天然物取扱法 **III**, 167, 169, 河出書房 (1942).
- 5) Feigl, F.: *Spot Tests*, 389, Elsevier Publishing Co., (1956).
- 6) 梅沢：実験有機化学, 304, 丸善 (1956).
- 7) Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z., Seegmiller, J. E.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 386(1951).
- 8) Block, R., Durrum, E., Zweig, G.: *Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, 137, Academic Press Inc. New York, (1955).
- 9) Smith, I.: *Chromatographic techniques*, 168, W. Heinemann Medical Books Ltd., London, (1958).
- 10) 杉山：有機化合物の微量確認法, 241, 培風館 (1960).
- 11) Levene, P. A.: *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, **42**, 1198(1909).
- 12) Albert, A.: *Quarterly Reviews*, (London), **6**, 197(1952).
- 13) Flexer, L. A., Hammett, L. P., Dingwall, A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 2103(1935).
- 14) 日本化学会編：実験化学講座, **5**, 470, 丸善 (1959).
- 15) Matsuura, S., Nawa, S., Kakizawa, H., Hirata, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4446(1953).
- 16) Nawa, S., Matsuura, S., Hiarta, Y.: *ibid.*, **75**, 4450(1953).
- 17) Masuda, T., Kishi, T., Asai, M.: *Chem. Pharmaceutical Bulletin*, **5**, 598(1957).
- 18) Bendich, A., Tinker, J. F., Brown, G. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 3112(1948).
- 19) Albert, A., Lister, J. H., Pederson, C.: *J. Chem. Soc.*, 4621(1956).
- 20) Matsuura, S., Nawa, S., Kakizawa, H., Hirata, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 4446(1953).
- 21) Albert, A.: *Biochem. J.*, **47**, ix, xxvii (1950); **54**, 646(1953).
- 22) Turner, E., Anderson, R. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 912(1949).
- 23) Masuda, T., Kishi, T., Asai, M.: *Chem. Pharmaceutical Bulletin*, **6**, 291(1958).
- 24) 金子：農化, **31**, 122 (1957).
- 25) 日本化学会編：実験化学講座, **19**, 97, 丸善 (1959).
- 26) Nawa, S., Goto, M., Matsuura, S., Kakizawa, H., Hirata, Y.: *J. Biochem.*, **41**, 657(1954).
- 27) Forrest, H. S., Van Baalen, C., Myers, J.: *Science*, **125**, 699(1954).
- 28) Van Baalen, C., Forrest, H. S., Myers, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **43**, 701(1957).

(昭43. 8. 26 受付)