

## 放線菌の培養濾液からの植物の生長阻害物質， シクロヘキシミドの分離

鈴木 裕

放線菌の培養濾液の中には植物病原菌の生育を抑制するものがある。この液を植物病の防止用に噴霧する場合、病原菌の生育阻害はみられるものの葉害のために植物自身の生育が阻害されることが時々おこる。この葉害を惹起す物質を単離し、赤外線吸収スペクトルその他により同定した所、シクロヘキシミド（商品名、アクチジオン、ナラマイシンA）と判明したのでここに報告する。

この物質は放線菌によるストレプトマイシン生産の際、副産物の抗生物質として見出され<sup>(1)</sup>、化学構造も3-[2-(3,5-ジメチル-2-オキソシクロヘキシル)-2-オキシエチル]グルタルイミド<sup>(2)</sup>と確定して、玉葱のべト病、から松の先枯れ病の防除に利用されている。<sup>(3)</sup>

### 実験の部

#### 有機溶媒に可溶な各区分の抽出

*Streptomyces* 3979菌をBennet培地とC-4培地（第1表参照）に接種し、27°Cで7日間往復振盪培養をした。培養濾液から常法に従って酢酸エチルに可溶な中性区分、酸性区分、塩基性区分を抽出した。1LのBennet培地培養濾液から得られた上記各区分はそれぞれ約50mg, 88mg, 34mgであり、1LのC-4培地培養濾液からはそれぞれ約62mg, 213mg, 61mgの各区分が得られた。

酢酸エチルで酸性区分と中性区分を抽出した残りのBennet培地培養濾液から、ブタノールで常法によって中性区分、酸性区分、塩基性区分を抽出した。その収量は培養濾液1L当りそれぞれ約100mg, 380mg, 150mgであった。

#### 植物による活性の測定

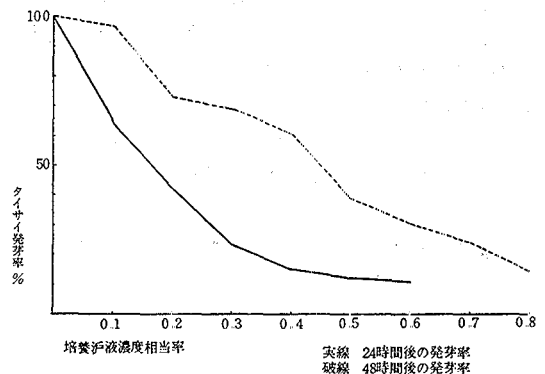
抽出した各区分の植物生育阻害作用を、レタスと稗の芽生えの生育と、体菜種子の発芽と生育を目安として測定した。各区分乾物を適当量の酢酸エチルに溶かし、2枚の濾紙を敷いた5.5cmか9cmのシャーレに適当量の溶液を注加する。溶媒を風乾してから3ccか9ccの $\frac{1}{2}$ Hoagland水耕液を加えた場合、各区分乾物の濃度が原培養濾液と同じかその $\frac{1}{2}$ となるようにする。5.5cmシャーレには芽出しをしたレタス、9cmシャーレには芽出しをした稗か体菜の種子各12個づつを移植して、その後の生育状況を調査した。

その結果48時間後で、Bennet培地中性区分と酸性区分は培養濾液の $\frac{1}{2}$ 濃度でレタスの根の伸長と体菜の生育を阻害した。また中性区分は培養濾液の約3倍濃度で稗の根の伸長を抑制した。

ブタノール可溶各区分の活性を同様にして測定した結果、酢酸エチル可溶性中性区分の約 $\frac{1}{10}$ の活性しか認められなかったので、以後はブタノールによる抽出は取止めた。

一方C-4培地の酢酸エチル可溶各区分では、培養濾液と同じ濃度に溶かした酸性区分がレタスと体菜の生育を阻害した。

植物を利用する3種類の測定法のうちで、体菜種子の24時間後の発芽率を測定するのがこの活性物質の測定に敏感であり、かつ所要時間が最も短いことが分かった。すなわち5.5cmシャーレ2個に $\frac{1}{2}$ Hoagland水耕液3ccづつを注加して、体菜種子50個づつを並べ25°Cに静置した場合の24時間後と48時間後の発芽率は第1図のとおりとなる。以後は体菜の発芽率で活性を測定することとした。



第1図 タイサイ発芽率と活性物質濃度

第1表 培養基の組成

	Bennet	C-4	Emerson	Krainsky	ADB	中 研	Waksman
ブ ド ー 糖	10g	20g	10g	10g	10g	20g	10g
澱 粉		10					
肉 エ キ ス	1	1	4		2	1	5
酵 母 エ キ ス	1	4	1	1	1		
ペ プ ト ン	2		4				5
大 豆 粉		25				10	
ア ス パ ラ ギ ン				0.5	0.5		
乾 燥 酵 母						2.5	
食 塩		1	2.5				5
第 2 磷 酸 カ リ		0.5		0.5	0.5	0.2	
10%苛性ソーダ		3cc					
塩 化 カ リ						4	
硫 酸 ア ン モ ニ ア						5	
炭 酸 カ ル シ ム						4	
水	1L	1L	1L	1L	1L	1L	1L
pH	7.2	6-8				7.8-8.2	7.4

注 実験農芸化学 p.249-253

培地の種類と培養濾液中の活性

培地の組成が変わった場合の培養濾液の活性変化を調べるため、第1表に示した Emerson, Krainsky, ADB, 中研, Waksman の各培地に前述のように培養し、その酢酸エチル可溶性中性区分の活性変化を体菜の発芽率で調べた。活性の強さは Krainsky > Emerson > Bennet > ADB > Waksman > 中研の順であった。体菜の発芽率は中性区分の 20 p p m. 溶液中で Krainsky 培地の場合約 15%、Bennet 培地で約 80% であった。

Bennet 培地はペプトンや肉エキスを使っていて、酢酸エチル抽出に当って乳濁化することが多いが、Krainsky 培地にはこれらが含まれておらず活性物質の抽出が容易であること、中性区分収量も培養濾液 1 L 当り約 100mg と多いこと、次に述べる薄層クロマトグラム上に分離される成分の数が少ないことから、以後は Krainsky 培地を使用した。

活性炭による精製

培養濾液中の活性区分を活性炭に吸着させ精製することを試みた。pH 5.0 の培養濾液に 2% の活性炭を加え、温時攪拌して活性区分を吸着させて濾別する。活性炭を次にブタノールと振って活性区分を脱着する。ブタノールを蒸発させて得た乾物は酢酸エチル可溶性中性区分と同じ程度の活性があり、培養濾液の 1/3 濃度でレタス、稗、体菜の生育を阻害した。

酢酸エチル可溶性中性区分を更に精製しようと活性炭に吸着させると、吸着された活性区分は 50% から 80% アセトン水で溶出されるが、活性は減少しており良い精製法とはいえなかった。

薄層クロマトグラフィによる活性区分の分離と確認

シリカゲル薄層上に中性区分をつけ、ブタノール:酢酸:水=3:1:1により展開した。1%過マンガン酸カリ溶液の噴霧による着色帯出現に基づいて、展開帯を5区分に分けてシリカゲルをガラス板からかきとり、酢酸エチル中で分離された成分を抽出し、活性を測定した。Rf 0.5-0.7の区分がレタスと稗の生育を強く阻害し、体菜の発芽を完全に抑えることが分かった。

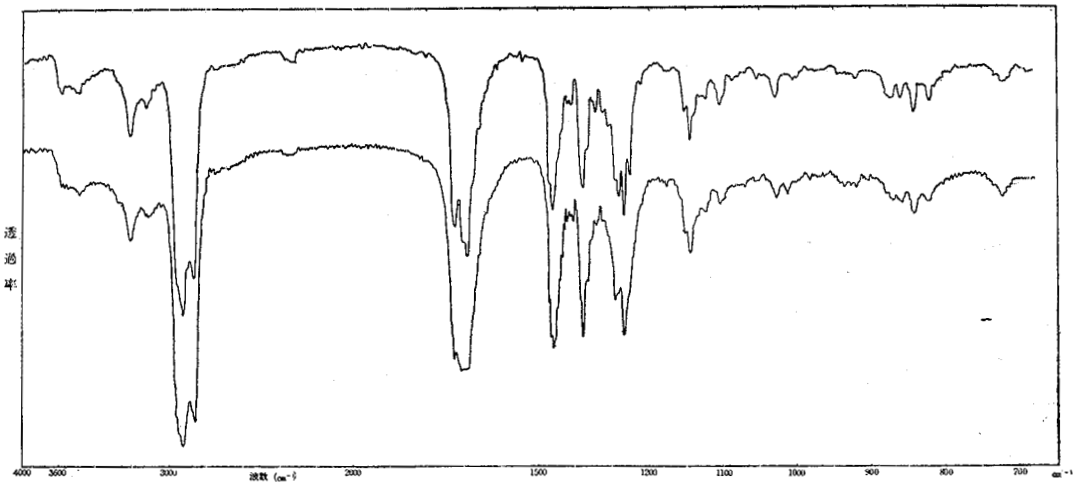
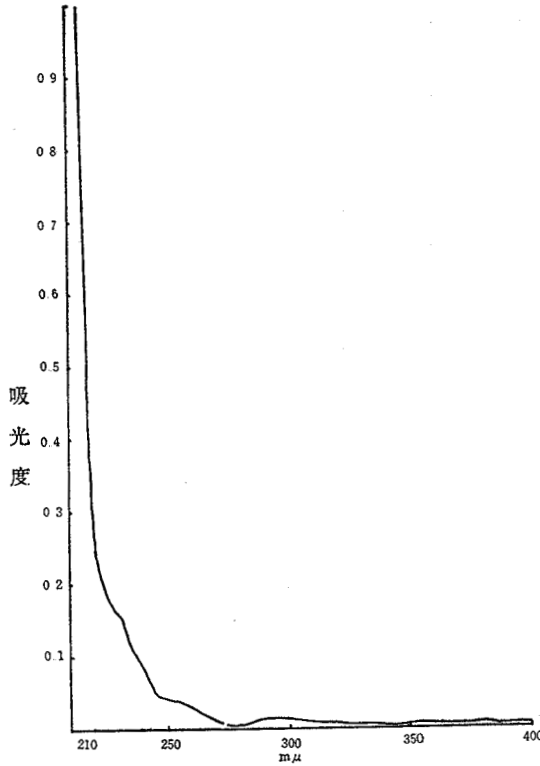
展開溶媒を酢酸エチル:ベンゼン=1:1に変えると、活性区分の Rf は 0.07-0.20 の区分に移り、酢酸エチルのみでは Rf

0.3—0.4, クロロホルムかベンゼンでは活性区分は原点にとどまった. 展開溶媒をクロロホルム:アセトン=90:10にすると活性区分は $R_f$ 0.05—0.25に移った.

硅胶カラムによる精製

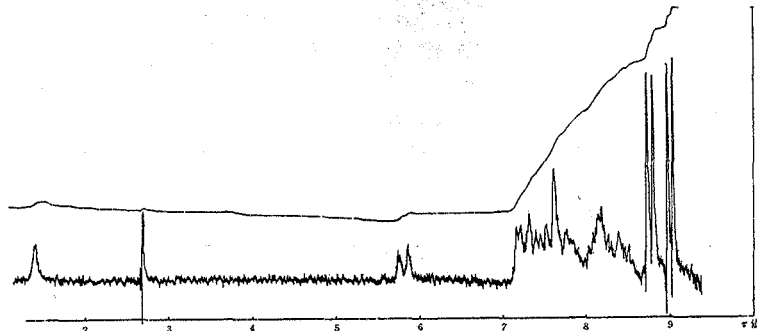
酢酸エチル可溶性区分をクロロホルムに溶かして硅胶カラムに添加し, クロロホルムにアセトンを順次加えながら展開溶出すると, 15—20%アセトンの溶出液の所に活性が表われるので, この区分を再度硅胶カラムに通した. シリカゲル薄層上に溶出区分を展開し, 過マンガン酸カリで発色させた着色点がただ1つになっているのを確かめた. この区分を少量のアセトンに溶かして放置した所, 針状に結晶した. 粗結晶を温酢酸エチルから再結晶を繰返して融点 $120^{\circ}\text{C}$ の結晶を得た.

第2図 紫外吸収スペクトル



第3図 赤外吸収スペクトル (ヌジヨール法)

上側 得られた結晶  
下側 シクロヘキシミド標品

第4図 核磁気共鳴スペクトル (CDCl<sub>3</sub>中)

### 結晶の同定

結晶の紫外吸収スペクトル, 赤外線吸収スペクトル, 核磁気共鳴スペクトルを第2, 3, 4図に示す. 標品のシクロヘキシミドと赤外線吸収スペクトルが一致したので, この物質をシクロヘキシミドと同定した.

シクロヘキシミドが植物の生育を阻害し, 除草剤として使用できることについては, 結晶の同定に先立つ約20日前に竹松ら<sup>(3)</sup>が講演している.

この研究は昭和42年度に内地研究員として東京大学農学部農芸化学科田村三郎研究室に留学中に, その前半約6カ月間に得られたものである. 御指導下さった田村教授はじめ研究室員各位に深く謝意を表します.

### 摘 要

放線菌の培養濾液から植物の生育阻害をおこす物質を結晶として得て, 赤外線吸収スペクトルからシクロヘキシミドと同定した.

### 引 用 文 献

- (1) FORD, J.H., LEACH, B.E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1223 (1948)
- (2) KORNFIELD, E.C., JONES, R.G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 150(1949)
- (3) 竹松哲夫, 竹内安智: 植物化学調節研究会第2回大会, 昭和42年10月22日

## A PLANT GROWTH INHIBITOR, CYCLOHEXIMIDE, ISOLATED FROM CULTURE FILTRATE OF *STREPTOMYCES*

Hiroshi SUZUKI

### Summary

A plant growth inhibitor was extracted from culture filtrate of *Streptomyces* and was purified to a white crystal melting at 120°C. It was found to be cycloheximide from infrared absorption-, nuclear magnetic resonance-, and ultraviolet absorption spectra.

(1969年12月23日受稿)