



植物遊離アミノ酸についての研究（第1報）：
ユリ科植物中の環状イミノ酸

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 北海道教育大学 公開日: 2012-11-07 キーワード: 作成者: 渡部, 俊夫, 榊原, 郁子, 岡田, 恵美子, 鶴田, 幸三, 伊藤, 佳代子, 伊藤, 英治 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00003403

植物遊離アミノ酸についての研究 (第1報)
ユリ科植物中の環状イミノ酸

渡部俊夫・榊原郁子・岡田恵美子・鶴田幸三
伊藤佳代子・伊藤英治*

北海道教育大学岩見沢分校化学教室
*北海道大学理学部化学科

Studies on the Free Amino Acids in Plants.
I. Cyclic Imino Acids Occurring in the Liliaceae.

Toshio WATANABE, Ikuko SAKAKIBARA, Emiko OKADA, Yukimitsu TSURUTA,
Kayoko ITO and Eiji ITO*.
Chemical Laboratory, Iwamizawa College,
Hokkaido University of Education, Iwamizawa 068
*Department of Chemistry, Faculty of Science,
Hokkaido University, Sapporo 060

Abstract

We have investigated the presence of cyclic imino acids in the Liliaceae by means of thin-layer chromatography.

Fowden and Steward have shown that azetidine-2-carboxylic acid occurs in many plants belonging to the Liliaceae family, and that it is absent in *Sansevieria* sp. Thunb. and two species of *Cordyline*.

In our experiments, a large amount of azetidine-2-carboxylic acid was detected in *Sansevieria zeylanica* var. *Laurentii*and, and a small amount of the same imino acid in the closely related genera *Nolina* and *Cordyline*.

Two ninhydrin-positive substances which overlapped at the site of the azetidine-2-carboxylic acid on the ordinary thin-layer chromatography were separated from the azetidine-2-carboxylic acid on the two-dimensional thin-layer chromatography, by repeating the development of each solvent. One of the two substances showed a somewhat similar character to azetidine-2-carboxylic acid.

緒 言

植物抽出液中から遊離状態で、タンパク質構成アミノ酸の一つであるプロリンの他に、環状イミノ酸として、ピペコリン酸およびアゼチジン-2-カルボン酸が検出されることがある。

ピペコリン酸は、1952年 Zacharius ら¹⁾がインゲン豆中にその存在を示して以来、各種の植物から認められている。しかし、一般のアミノ酸に適用される条件下では、ピペコリン酸のニンヒドリン反応は、沔紙や薄層のクロマトグラム上においては、極めて発色時間が長くかかり、水溶液の反応では吸光係数が著しく低く、その存在が見落されがちである。

アゼチジン-2-カルボン酸は、1955年 Fowden²⁾によりスズランから発見された。同じ年に Virtanen と Linko³⁾も、分子量測定の見誤りから正しい構造を与え得なかったが、アマドコロとスズランから同一物質を見出している。

ピペコリン酸もアゼチジン-2-カルボン酸もその発見にみるように、前者はマメ科の後者はユリ科の植物に、異常な量蓄積されることがあり、特に後者ではマメ科植物 *Delonix* にその存在が認められる⁴⁾迄は、ユリ科植物の一部のものに特徴的なアミノ酸とされていた。

Fowden と Steward⁵⁾は、ユリ科を中心に80種の植物(ユリ科47属、ヒガンバナ科3属、リュウゼツラン科6属、計56属)について、当時新しく発見されたピペコリン酸、アゼチジン-2-カルボン酸やグルタミン酸誘導体の存否を主として、低分子窒素化合物の検討を行なっている。ユリ科植物からは、最近も葛西ら⁶⁾が新アミノ酸、新オリゴペプチドを見出している。

Fowden らが多数のユリ科植物を試料に試みようとした、植物分類と特殊なアミノ酸との関連は特に興味深く、われわれもユリ科39属49種、ヒガンバナ科(Fowden らのリュウゼツラン科も含む)12属12種について、主として葉を用い、遊離アミノ酸分画の検討を行なった。その結果得られた一般的特徴については別に報告するが、ここではその中で、アゼチジン-2-カルボン酸の存否を中心に、関連する16属、18種の植物について、その他のイミノ酸の存在、およびアゼチジン-2-カルボン酸に性質の類似した、ニンヒドリン反応陽性物質の存在にもふれて検討した結果を報告する。

試料植物および実験方法

1 試料植物

処理し、アミノ酸分画について検討をした試料植物のうち、結果的に環状イミノ酸、特にアゼチジン-2-カルボン酸の存否に関連のある18種を、番号を附して第1表に示した。採取場所の欄で自生および庭としてある植物は、岩見沢近辺で得たものである。

2 試薬

L-アゼチジン-2-カルボン酸は Sigma Chemical Co の結晶を、ピペコリン酸は和光純薬の試薬特級、およびトピックロップより分離抽出した結晶を、その他のアミノ酸は Calbiochem の A grade のものを用いた。

3 遊離アミノ酸分画の調製

植物試料(約10g)を、8~10倍量の80%エタノールとともに、ホモジナイザーで処理し、3,000

第1表 試料植物

番号	植 物 名	属 名	採 取 場 所
1	タマツルクサ	Bowiea	北教大・岩見沢・温室
2	ニラ	Allium	野生
3	ツルボ	Scilla	北大・植物園
4	アツバキミガヨラン	Yucca	北大・植物園・温室
5	トックリラン	Nolina	北大・植物園・温室
6	シロシマセンネンボク	Cordyline	北大・植物園・温室
7	アイチアカ	Dracaena	北大・植物園・温室
8	フクリンチトセラン	Sansevieria	鉢植 (北教大・岩見沢)
9	ユキザサ	Smilacina	野生
10	マイヅルソウ	Maian themum	野生
11	オオアマドコロ	Polygonatum	野生
12	ヒメイズイ	Polygonatum	野生
13	スズラン	Convallaria	北大・植物園
14	ドイツスズラン	Convallaria	個人宅・庭
15	オモト	Rohdea	鉢植 (個人)
16	オキナヤブラン	Liriope	北大・植物園
17	リュウゼツラン	Agave	北大・植物園・温室
18	ゲッカコウ	Polianthes	北教大・岩見沢・温室

北大は北海道大学の、北教大・岩見沢は北海道教育大学・岩見沢分校の略である。

r.p.m., 10分間遠心分離し, 残渣は更に2回60%エタノールを用いて同様処理した. 3回の上清を合わせ, イオン交換樹脂 Amberlite CG-120 Type II (H⁺) を通してアミノ酸を吸着させ, 5%アンモニア水で溶出し, エバポレーターで濃縮し, 蒸留水で一定量にして遊離アミノ酸分画を調製し, 検討のための試料とした.

4 各分画成分の薄層クロマトグラフィーによる分離

Merck の Silica gel 60G を 20×20cm² のプレートに厚さ0.25mm に塗布し, 1時間110°Cで活性化して用いた. 最初にブタノール-酢酸-水(4:1:1 v/v/v)で, 次にフェノール-水(5:1 w/w)で二次元展開をした.

展開後乾燥させたプレートに, 0.2%ニンヒドリン-ブタノール溶液を噴霧し, 各窒素成分を発色させた.

アゼチジン-2-カルボン酸の同定, 加水分解物の検討には, 市販のプレート (Merck Art 5721, 5553) も用いた.

5 加水分解

同一試料の約10枚の薄層クロマトグラムから, 特定の部分を削り集め, 6M塩酸を加えて減圧下に封管し, 110°Cで加水分解を行なった.

実験結果

1 薄層クロマトグラフィーによる環状イミノ酸の分離と検出

薄層クロマトグラフィーでは、ペーパーを用いた場合に比べ、環状イミノ酸は γ -アミノ酪酸、バリン、芳香族アミノ酸、アミドなどとは、プレート上で十分離れた位置に展開される。また、ニンヒドリン反応ではプロリンの黄色をはじめ、ピペコリン酸は青紫で、著しい量の場合には中心部が黄色、アゼチジン-2-カルボン酸は赤～赤紫で、顕著な場合は中心部が青紫の、いずれも特徴的な色調を呈する。ただ、ピペコリン酸の発色には、ニンヒドリン反応の加熱時間をかなり必要とする。

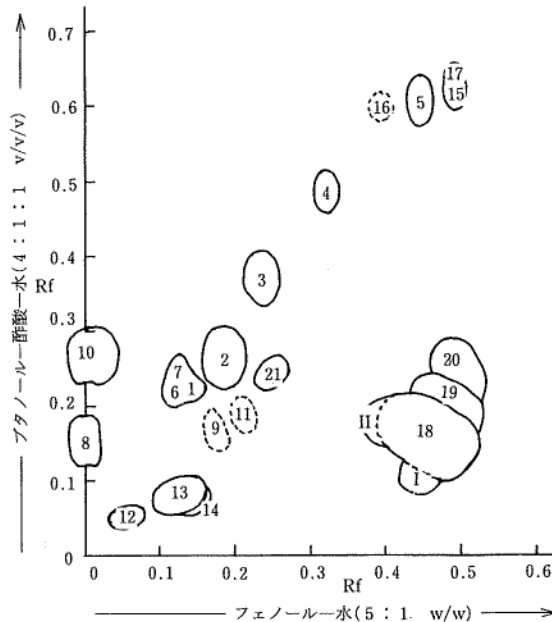


図1 マイヅルソウ葉アミノ酸分画の薄層クロマトグラム

- | | | |
|-----------|---------------|-------------------|
| 1 グリシン | 2 アラニン | 3 γ -アミノ酪酸 |
| 4 バリン | 5 ロイシン・イソロイシン | 6 セリン |
| 7 トレオニン | 8 アスパラギン酸 | 9 アスパラギン |
| 10 グルタミン酸 | 11 グルタミン | 12 リジン |
| 13 アルギニン | 14 ヒスチジン | 15 フェニルアラニン |
| 16 チロシン | 17 トリプトファン | 18 アゼチジン-2-カルボン酸 |
| 19 プロリン | 20 ピペコリン酸 | 21 エタノールアミン |

I および II は未確認のニンヒドリン反応陽性物質

9, 11, 16 は、このクロマトグラム上では検出されなかったが、位置を点線で示した。

第2表 おもなアミノ酸およびイミノ酸の Rf 値

アミノ酸	アラニン	バリン	ロイシン	グルタミン酸	プロリン	ピペコリン酸	アゼチジン-2-カルボン酸
展開溶媒							
ブタノール-酢酸-水	.26	.48	.60	.26	.20	.25	.16
フェノール-水	.18	.33	.45	.01	.49	.50	.45

つばみのできる前の時期のマイヅルソウの葉について、抽出液から得られたクロマトグラムを図1に示した。イミノ酸とおもなアミノ酸の、平均的なクロマトグラムにおける位置を、Rf で示すと

第2表のようになる。

環状イミノ酸の検出結果は第3表に示したが、試料植物のうち、4, 17, 18を除いたものでは、いずれもプロリンとともにアゼチジン-2-カルボン酸の存在が認められた。フクリンチトセラン、マイヅルソウ、オオアマドコロ、ヒメイズイ、スズラン、ドイツスズラン、オモト、オキナヤブランの8種からは著しく多量に、ユキザサからも多量にアゼチジン-2-カルボン酸が認められた。ピペコリン酸はこれら9種のうちの、ユキザサ、ヒメイズイ、オキナヤブランを除いた6種およびゲツカコウで、明確にその存在が認められた。なお、ピペコリン酸については、表にあげた以外のユリ科植物のボルチカムジャイアントには多量に、ムラサキクンシランには普通量、ヘメロカリスには少量認められた。

第3表 葉中の環状イミノ酸およびニンヒドリン反応陽性物質 I, II

番号	イミノ酸等 植物	ピペコリン酸	プロリン	アゼチジン-2- カルボン酸	I	II
1	タマツルクサ		+	++	+	
2	ニラ*		+	+		
3	ツルボ		+	+		
4	アツバキミヨガラン		++			
5	トックリラン		+	+		
6	シロシマセンネンボク		+	++		
7	アイチアカ		++	+		
8	フクリンチトセラン*	++	++	+++	++	+
9	ユキザサ*		+	+++		
10	マイヅルソウ*	+	+	+++	+	+
11	オオアマドコロ*	+	+	+++	+	+
12	ヒメイズイ*		+	+++	+	+
13	スズラン*	+	+	+++	+	+
14	ドイツスズラン*	+	++	+++	+	+
15	オモト	++	+++	+++	+	+
16	オキナヤブラン*		+	+++	+	+
17	リュウゼツラン		+			
18	ゲツカコウ	+	+			

植物名の後の○印は、開花時期の葉を用いたことを示す。

+~+++の記号は、他のアミノ酸との比較的な量関係を示す。

+ 微量 ++ 普通量 +++ 多量 +++ 著しく多量

アゼチジン-2-カルボン酸の著しく多い8種の植物からのクロマトグラムでは、すべて図1にみるように、下方に橙色の突出部分が認められ、また左上方部分も橙色を示した。これらをそれぞれニンヒドリン反応陽性物質 I および II として、アゼチジン-2-カルボン酸とは別に、その検出結果を第3表に加えた。

I および II のクロマトグラム上の位置を Rf で示すと、それぞれ一次方向に 0.08, 0.20, 二次方向に 0.45, 0.36 であり、多量のアゼチジン-2-カルボン酸の一部分のように認められる。

アゼチジン-2-カルボン酸の顕著に認められる3種の植物について、それらの各部分におけるイ

ミノ酸およびIの分布を、第4表にまとめて示した。これら物質の植物部分による分布の違いはあまり大きくはない。

第4表 植物各部分中の環状イミノ酸およびI

植物 (番号)	生育状態	部 分	ピペコリン酸	プロリン	アゼチジン-2- カルボン酸	I
フクリン チトセラ (8)	発 芽	芽	+	++	+++	++
		根	+	++	+++	++
	開 花	根 茎	+	++	+++	++
		茎	+	++	+++	++
		葉	++	++	+++	++
		花	+	++	+++	++
		分泌粘液				++
マイヅルソウ (10)	発 芽	根	++	++	+++	+
		葉	++	++	+++	
	つぼみの できる前	根	+++	++	+++	
		葉 柄	++	+	+++	+
		葉	++	++	+++	+
オオアマ ドコロ (11)	開 花	根	+	+	+++	
		根 茎	+	+	+++	+
		茎	+	++	+++	++
		葉	+	+	+++	+
		花	+	++	+++	

＋～＋＋の記号は、第3表と同じ。

2 ニンヒドリン反応後、稀塩酸噴霧による環状イミノ酸の検出

薄層クロマトグラム上でアミノ酸のニンヒドリン呈色が、2M塩酸の噴霧により褪色してしまうことは良く知られているが、ピペコリン酸は一般のアミノ酸と異なり、青紫の色がそのまま保たれる。プロリンも褪色はしないが、黄色から赤色に変化する。アゼチジン-2-カルボン酸も褪色せず、赤～赤紫から褐色に変わり、多量の場合の中心部は青紫から黄色に変わる。

チトセラ抽出液についての薄層クロマトグラム上で、実施して得た呈色の変化を図2に示した。aはニンヒドリン反応による色調を、bは続いて2M塩酸を噴霧し変化してからの色調を示す。

この反応で、Iは褪色・変色がみられなかった。IIもその部分の消失は認められないが、アゼチジン-2-カルボン酸との境界が不明瞭で、その色調の変化は十分観察できなかった。

3 紫外線照射によるアゼチジン-2-カルボン酸およびI, IIの検出

二次元展開して乾燥させた薄層プレートに、紫外線(2537Å)を照射すると、プロリン、ピペコリン酸とは異なり、アゼチジン-2-カルボン酸は蛍光を発する。またIおよびIIも同様に蛍光が認められる。これらの蛍光部分は、ニンヒドリン発色部分と全く重なる。

このことから、アゼチジン-2-カルボン酸、IおよびIIについては、ニンヒドリン反応など試薬との反応によらずに、紫外線照射だけで検出が可能であり、また蛍光部分からこれらの物質を抽出

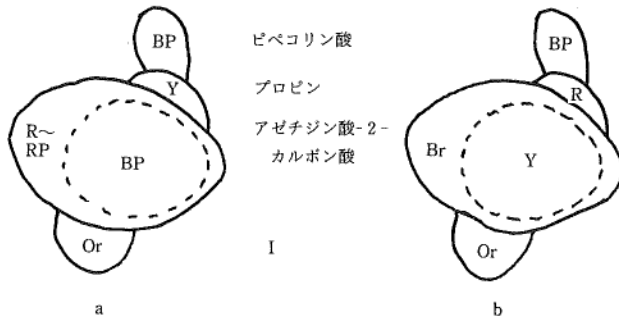


図2 環状イミノ酸およびIの薄層クロマトグラム上における
 a ニンヒドリン反応呈色 b 引き続き稀塩酸噴霧後の色調
 記号：BP 青紫；Br 褐色；Or 橙色；R 赤色；RP 赤紫；Y 黄色
 (R~RP 赤色ないし赤紫に発色する)

することができる。

4 IおよびIIのアゼチジン-2-カルボン酸からの分離

一次方向に展開後乾燥し、また同一溶媒での展開を繰り返し、二次方向にも同様2回の展開を行なって得たクロマトグラム上では、Iは完全にアゼチジン-2-カルボン酸から分離した。IIは図3にみるように、明瞭にアゼチジン-2-カルボン酸とは区別できたが、分離は不十分であった。

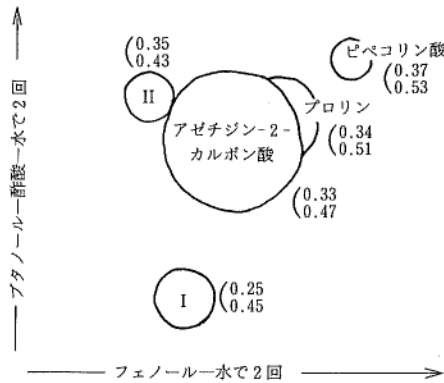


図3 各方向に2回ずつ展開後の薄層クロマトグラム上での環状イミノ酸およびI, IIの相対的位置

各数字は { 一次方向の Rf 値
 二次方向の Rf 値

一次方向の溶媒、ブタノール-酢酸-水の混合比を2：1：1とした場合は、1回の展開でかなり良くIがアゼチジン-2-カルボン酸から分離した。

5 Iの加水分解

Fowden⁷⁾が示したように、アゼチジン-2-カルボン酸は塩酸での加水分解で、環を開いて付加生成物を生ずる。

アゼチジン-2-カルボン酸の6M塩酸による加水分解物を、薄層クロマトグラフィーを用い検討した結果を図4に示した。赤紫のニンヒドリン反応呈色部分は、ホモセリンを加えての二次元展開で全く重なった。他に、ニンヒドリン反応直後にはそれぞれ黄色と橙色を示し、ともに時間の経過で赤紫色に変わる二つのスポットが認められた。

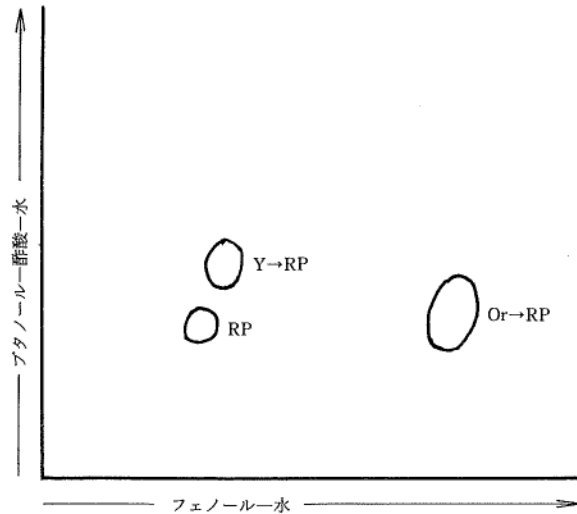


図4 アゼチジン-2-カルボン酸加水分解物の薄層クロマトグラム

記号は、図2と同じであり、ニンヒドリン反応の色調と、時間経過後の変色を示す。

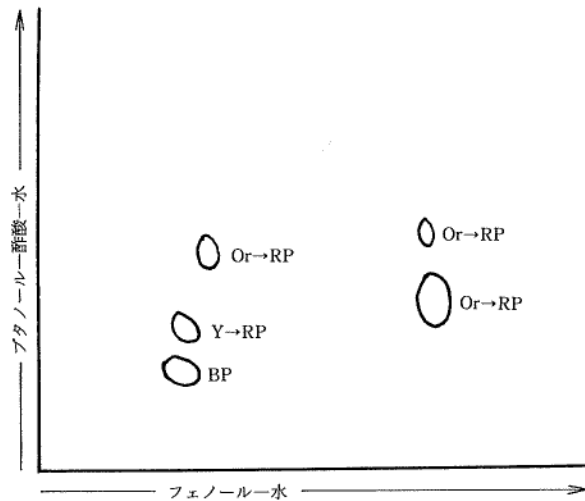


図5 ドイツズランI加水分解物の薄層クロマトグラム

記号などは図4と同じ。

I をドイツスズランの薄層クロマトグラムから、紫外線照射による蛍光を利用してシリカゲルとともに削りとり、塩酸による加水分解を行ない、汙過してシリカゲルを除き、得た分解生成物を薄層クロマトグラフィーで分離し、ニンヒドリンで発色させた結果を図5に示した。試料の量が少なく、各スポットの検討はまだ十分ではないが、図4よりやや低くみえる位置に赤紫のスポットと、他に黄～橙色から時間の経過で赤紫に変わる四つのスポットがみられた。橙色の最も目立つスポットともう一つは、フェノール-水での R_f が大きい。

考 察

Fowden らはその報告⁵⁾の表の注および本文中で、*Yucca*, *Cordyline*, *Dracaena*, *Sansevieria* の4属については、以前からユリ科とは別に分類されていた *Agave* などとともにまとめられ、リュウゼツラン科とされていること (Bailey, 1949) に言及している。しかし、彼らの表中での *Yucca* など4属のとり扱いは、人によりキジカクシ亜科とも分類されるスズラン、キジカクシなどの一群の、すぐ前におく以前からの分類によって位置づけている。(スズランなどをキジカクシ亜科とする場合、*Yucca* などはリュウケツジュ亜科とされる。ここでは便宜的に、この呼び方を用いる)。

彼らはリュウケツジュ亜科の4属、8種を含めた検討からこの亜科については *Dracaena* の4種だけに、それぞれの葉にアゼチジン-2-カルボン酸の存在を認めている。その結果から *Dracaena* から *Liriope* までを通し、それらの葉中にこのイミノ酸が多い点に、積極的にはないが、分類的な意味をもたせようとしている。もちろん *Agave* にはこの存在を認めていない。

本報告でとりあげた植物中で番号4から8までの5属は、リュウケツジュ亜科に、17, 18は *Agave* とその近縁の *Polianthes* である。9から15までの属はキジカクシ亜科であり、16はそれに続いて位置づけられるヤブラン亜科である。Fowden らはキジカクシ亜科とヤブラン亜科のかんりの植物から、それぞれに多量のアゼチジン-2-カルボン酸の存在を示している。

われわれの結果の中で、フクリンチトセラン (*Sansevieria*) では葉をはじめ各部分に、著しい量のアゼチジン-2-カルボン酸が認められた点、シロシマセンネンボク (*Cordyline*) の葉に普通量のそれが認められた点は、彼らとは異なっている。しかしこのことは、Fowden らは扱っていないトックリラン (*Nolina*) の葉にも少量のこのイミノ酸が認められたこと、ゲツカコウ (*Polianthes*) では認められなかったことをあわせ、彼らがまとめようとした、このイミノ酸の分布と近縁の属との間の関係について、かえってリュウケツジュ亜科で補足を加え、*Agave* などとの相違をも補う結果になったようである。ただし、このイミノ酸の存在を葉に限定して、分類との関係に言及することの意味は薄いように思われる。

薄層クロマトグラム上で、アゼチジン-2-カルボン酸の一部分ともみえる、ニンヒドリン反応陽性物質 I および II について、I は完全にアゼチジン-2-カルボン酸から分離することができた。II はブタノール-酢酸-水での展開では R_f の差が小さく、差のやや大きいフェノール-水での展開では、 R_f が0.5に近く、繰り返しての展開によっても分離の効果は低かった。しかし、これも明らかにアゼチジン-2-カルボン酸とは別の物質である。

I および II のクロマトグラム上の位置、つまりアゼチジン-2-カルボン酸の近辺は、酸性、中性、芳香族アミノ酸の位置とは全く離れる。塩基性アミノ酸やアミドに比べて、フェノール-水での R_f は I および II が明らかに大きい。

ニンヒドリン反応後の稀塩酸噴霧や、紫外線照射では、I および II は環状イミノ酸に似た性質を

示した。

I はまた、塩酸により加水分解をうける点から一般のアミノ酸とは異なり、加水分解物からみて、アミドやオリゴペプチドとも考えにくい。

Fowden⁷⁾はアゼチジン-2-カルボン酸が、塩酸で加水分解されて環を開き、ホモセリン、 γ -アミノ- α -ヒドロキシ酪酸、 γ -アミノ- α -クロロ酪酸、 α -アミノ- γ -クロロ酪酸の生成することを、ペーパークロマトグラフィーを用いて確かめている。また生成物のうち、塩素誘導体の二つは、ニンヒドリンと反応して黄色のスポットになり、時間の経過で褐色がかかった色調を経て、紫色に変わること記している。

アゼチジン-2-カルボン酸の6M塩酸での加水分解物を、薄層クロマトグラフィーで分離した結果(図4)から、 γ -アミノ- α -ヒドロキシ酪酸に該当するスポットがみられなかったのは、用いた展開溶媒の関係でホモセリンと分離しなかったものと考えられる。

Iの加水分解物も、アゼチジン-2-カルボン酸のそれと似たクロマトグラムを与えた、即ち、いずれにもともに黄ないし橙色の大きさの違う幾つかのスポットがみられ、それらは皆時間の経過で赤紫に変色した。

Iについては、適当な試料植物から十分な量を単離して、さらに検討を加えることが必要である。

花期以前のマイヅルソウの各部分では、例えば葉について図1に示したように、著しく多量のアゼチジン-2-カルボン酸に隣接して、プロリン、ピペコリン酸がともにやや大きめのスポットとして認められ、環状イミノ酸部分で特徴的なクロマトグラムを形成した。同様なクロマトグラムはフクリンチトセラン、オモトの葉についても得られたが、これを特に意義づけることは難かしそうである。

要 約

ユリ科植物の遊離アミノ酸分画の薄層クロマトグラフィーによる検討の中から、アゼチジン-2-カルボン酸の分布を中心に、環状イミノ酸の検出結果を報告した。

アゼチジン-2-カルボン酸のユリ科植物中での存在については、かなり以前にFowdenらが示しているが、フクリンチトセランの各部分にこのイミノ酸が顕著に含まれ、また、これと近い関係の属にもその存在が認められた。

アゼチジン-2-カルボン酸が著しく含まれる植物に、このイミノ酸とクロマトグラム上で部分的に重なる、二つのニンヒドリン反応陽性物質の存在が認められた。そのうちの一つは薄層クロマトグラフィーの応用で、完全にアゼチジン-2-カルボン酸から分離できた。この物質は幾つかの点で、アゼチジン-2-カルボン酸に似た性質を示した。

試料植物の多種類をおわけいただいた北海道大学附属植物園の園長岡澤養三教授をはじめ皆様、植物採取について貴重なご助言をたまわった同園辻井達一博士、温室利用の便宜と試料植物各種をいただき園芸植物についてのご指導をたまわった本学岩見沢分校吉田昭穂教授、植物の分類および採取に懇切なご指導をいただいた本学岩見沢分校芳賀卓助教授、実地で植物採取のご指導をいただいた栗山町栗山小学校 長谷川正義教諭、岩見沢市上幌向中学校 小久保英夫教諭に深い感謝の意を表します。

文 献

- 1) R. M. Zacharius, J. F. Thompson and F. C. Steward, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2949 (1952).
- 2) L. Fowden, *Nature (London)*, **176**, 347 (1955).
- 3) A. I. Virtanen and P. Linko, *Acta Chem. Scand.*, **9**, 551 (1955).
- 4) M. L. Sung and L. Fowden, *Phytochemistry*, **7**, 2061 (1968).
- 5) L. Fowden and F. C. Steward, *Annals of Botany*, **21**, 53 (1957).
- 6) T. Kasai, T. Nishitoba, Y. Shiroshita and S. Sakamura, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2271 (1984).
- 7) L. Fowden, *Biochem. J.*, **64**, 323 (1956).