

ノ ー ト

4-メチレングルタミンのチューリップ
新鮮葉からの単離

大 山 卓 爾

キーワード 4-メチレングルタミン, チューリップ, アミノ酸アナライザー, 薄層クロマトグラフィ, ^{13}C -核磁気共鳴スペクトル

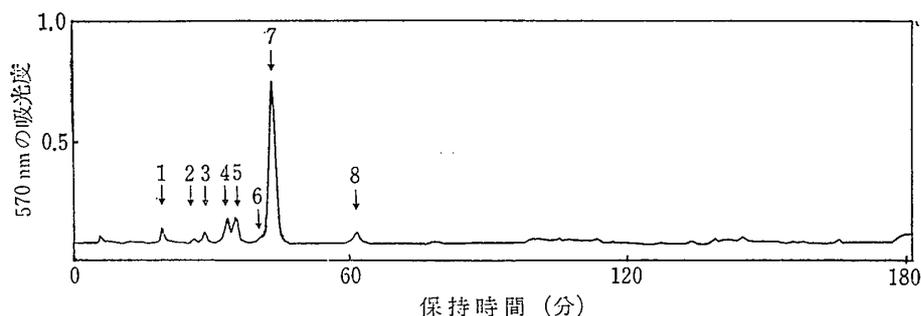
4-メチレングルタミンと4-メチレングルタミン酸はそれぞれグルタミンとグルタミン酸の γ 位メチレン誘導体であり, DONE と FOWDEN により落花生から初めて単離同定された化合物である¹⁾. その後, これらの化合物がチューリップにも存在することが確認され²⁾, FOWDEN と STEWARD はさらにユリ目を中心に 88 種の植物中の遊離アミノ酸組成を調べたが 4-メチレングルタミンはチューリップにのみ検出された³⁾. 植物体中に含まれるアミド化合物のうち, グルタミンやアスパラギンは窒素の移動・貯蔵形態やアンモニアの一次同化産物として植物一般に広く分布しているが, 4-メチレングルタミンの集積は落花生とチューリップに限定されていることから, その合成・分解部位・生合成経路および栄養生理学的意義等に関する研究はきわめて少なく, これらの点はほとんど解明されていない. 落花生では, 4-メチレングルタミンは導管中を移行するほぼ単一のアミノ酸であり^{4,5)},

導管内移動窒素全体の約 70% を占める⁵⁾ことが報告されている. また, チューリップでも茎葉部, 花, 根, 球根内に存在することが知られており⁶⁻⁸⁾, 両植物では窒素の代謝, 移動, 貯蔵等において重要な役割を果たしていると考えられる.

ところで, 現在, 4-メチレングルタミンの標準試薬は市販されておらず, また試薬会社に化学合成を依頼したが合成不可能とのことであった. 筆者はチューリップの窒素栄養の研究に必要な 4-メチレングルタミンの単離精製を試み, チューリップの新鮮葉から簡易な操作で調製できたのでここに報告する.

1. 単離法

チューリップ (品種マルタ) を温室内で促成栽培し, 花茎が約 10 cm くらいに伸長した 12 月 1 日に収穫した. 葉身部のみ新鮮重約 600 g を集めて 80% エタノールで摩砕抽出したのち, ろ過により残渣を除去した. ロータリーエバポレーターを用いてエタノール抽出液をシロップ状になるまで濃縮し, それを水約 200 ml で希釈した. クロロフィル等脂溶性物質を除去する目的で, 希釈液を分液ロートに入れ, 100 ml のクロロホルムで 3 回抽出した. 水層を約 80 ml の陽イオン交換樹脂 Dowex 50 \times 8 (H⁺型) カラムに注入して, 吸着画分を 2 N アンモニア水で溶出した. ロータリーエバポレーターで溶離液を減圧濃縮して得られた褐色シロップ状液体にエタノールを添加して再度減圧乾燥したところ, 粉末固体約 4 g が得られた. この試料を少量の水に溶解してエタノール再沈殿を 3 回繰り返して, 白色結晶状粉末約 500 mg が得られた.



第1図 チューリップ葉の 80% エタノール抽出液中に含まれるカチオン画分のアミノ酸アナライザー (日立 935 型) によるクロマトグラム
() 内の数字は各アミノ酸の保持時間(分)を示す.
1, アスパラギン酸 (19.68); 2, スレオニン (26.77); 3, セリン (28.97); 4, グルタミン酸 (34.12); 5, グルタミン (36.06); 6, 4-メチレングルタミン酸 (41.50); 7, 4-メチレングルタミン (44.41); 8, アラニン (62.50).

* 新潟大学農学部 (950-21 新潟市五十嵐 2の町 8050)
昭和 60 年 11 月 15 日受理
日本土壤肥科学雑誌 第 57 卷 第 3 号 p. 300~303 (1986)

2. 結果および考察

第1図にチェーリップ葉エタノール抽出液の amino 酸アナライザー（日立製 935 型）によるクロマトグラムを示す。4-メチレングルタミンは保持時間 44.41 分に最大のピークとして検出され、その含有量は窒素として全 amino 酸の 90% 以上を占めていた。4-メチレングルタミ

ン酸はこの条件では約 41.50 分に現われるが、ここではほとんど検出されていない。また、4-メチレングルタミン以外では、グルタミン、グルタミン酸、アラニン、アスパラギン酸等が少量ずつ検出された。

写真1には、エタノール再沈殿を1回行ったあとの沈殿画分①、溶液画分②のシリカゲル薄層クロマトグラフ

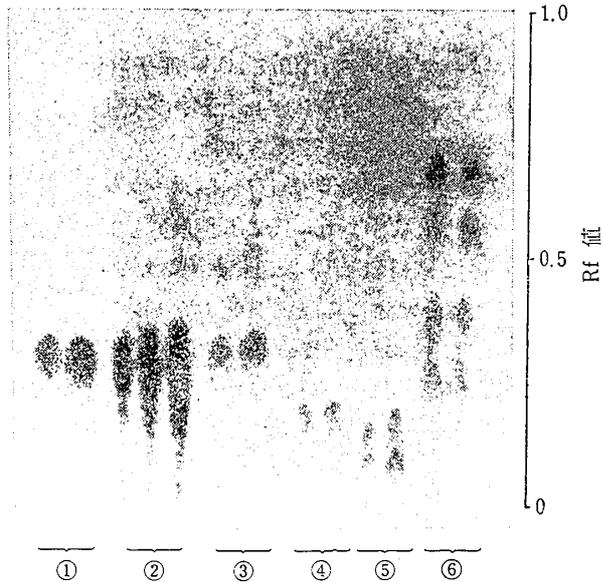


写真1 シリカゲル薄層クロマトグラフィーによる精製度の確認

溶媒は、プロパノール：水=4：1を用い、amino 酸の検出はニンヒドリンを用いた。

- ① カチオン画分を1回エタノール再結晶をした沈殿画分
- ② カチオン画分を1回エタノール再結晶をした上澄画分
- ③ チェーリップ葉エタノール抽出液中のカチオン画分
- ④ 4-メチレングルタミン酸
- ⑤ グルタミン
- ⑥ 標準 amino 酸混合液

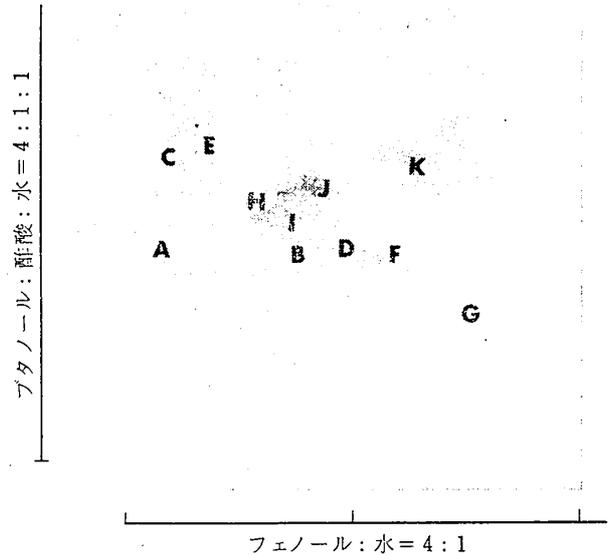


写真3 シリカゲル二次元薄層クロマトグラフィーによる4-メチレングルタミン、4-メチレングルタミン酸の展開位置

フェノール：水=4：1の溶媒で一次元展開後、ブタノール：酢酸：水=4：1：1の溶媒で二次元展開を行った。A, アスパラギン酸(紫)；B, アスパラギン(橙)；C, グルタミン酸(赤紫)；D, グルタミン(赤紫)；E, 4-メチレングルタミン酸(黄橙)；F, 4-メチレングルタミン(黄橙)；G, プロリン(黄)；H, グリシン(赤紫)；I, セリン(赤紫)；J, アラニン(赤紫)；K, バリン(赤紫)。

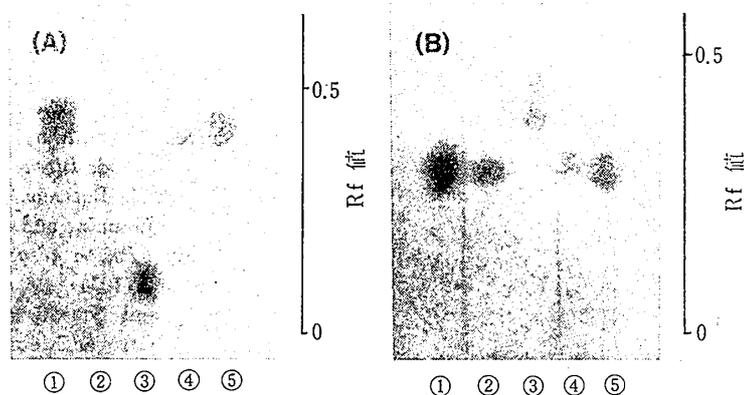


写真2 エタノール再結晶を3回行ったあとの試料のシリカゲル薄層クロマトグラム

(A) フェノール：水=4：1の溶媒で展開、(B) ブタノール：酢酸：水=4：1：1の溶媒で展開。

- ① カチオン画分
- ② グルタミン
- ③ 4-メチレングルタミン酸
- ④ 4-メチレングルタミン
- ⑤ 3回再結晶後の試料

ィー (TLC) によるアミノ酸の分離パターンを示した。1 回の再沈殿操作のみでは沈殿画分に 4-メチレングルタミンのスポット以外に R_f 0.15 付近にグルタミンと思われるニンヒドリン反応が若干認められるが、再沈殿処理前のカチオン画分③と比較すると、検出されたスポット数は大幅に減少している。同時に、エタノール再沈殿上澄液②のクロマトグラムより、4-メチレングルタミン以外に微量に含まれていたアミノ酸類はおもに上澄画分に溶存していたことがわかる。上澄画分②には多量の 4-メチレングルタミンも残存しており、再結操作にはかなりの量のロスがあったと思われるが、カラムクロマトグラフィー等による分離精製法²⁾に比べて、きわめて簡便であり、g 単位の多量の試料を一度に扱える利点がある。

写真 2 には、エタノール再沈殿を 3 回繰り返して得た白色粉末のシリカゲル TLC によるクロマトグラムを示す。(A) は展開溶媒としてフェノール：水 (4:1) を用い、(B) はブタノール：酢酸：水 (4:1:1) を用いた。4-メチレングルタミン酸はどちらの展開溶媒でも 4-メチレングルタミンおよびグルタミンとは明瞭に分かれた。4-メチレングルタミンとグルタミンは (B) ではほぼ同じ R_f 値を示すが、(A) では分離しており、通常、TLC による生体アミノ酸の分離に用いられている、フ

ェノール溶媒、ブタノール：酢酸溶媒による二次元展開法で分離可能であった (写真 3)。二次元展開では、4-メチレングルタミンはグルタミンの、4-メチレングルタミン酸はグルタミン酸の隣接部位に検出されるが、グルタミンとグルタミン酸がニンヒドリン反応で赤紫色を呈するのに対し、4-メチレングルタミンおよび 4-メチレングルタミン酸は黄色～黄橙色を示し識別は容易であった。

得られた試料の元素分析による C/N 原子数比は 2.99 であり、4-メチレングルタミン 1 分子中の C 原子数 6, N 原子数 2 に対応した結果が得られた。

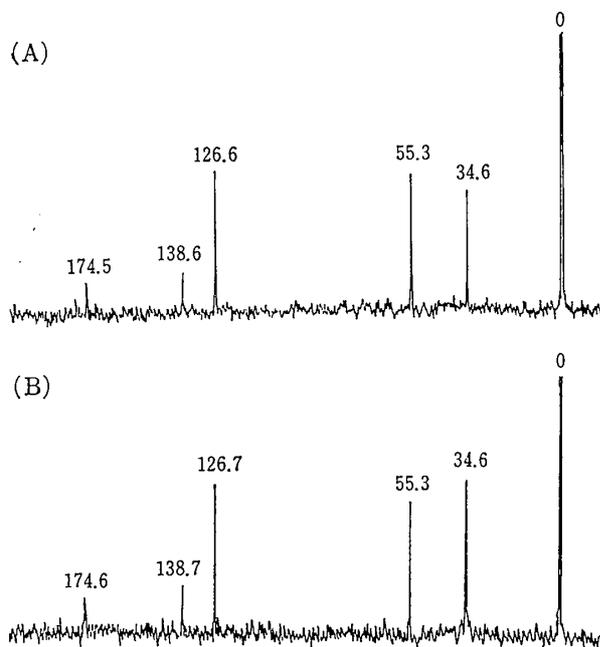
また、落花生の苗から精製した 4-メチレングルタミンの標準物質 (H. C. WINTER 氏より提供) とチューリップの葉より得た試料の ¹³C-核磁気共鳴スペクトルを取り、両者を比較したところ、テトラメチルシランを外部基準物質とする ppm 値がほぼ一致し、両者が同一物質であることが確認された (第 2 図)。

以上の結果より、チューリップ新鮮葉より 4-メチレングルタミンの単離精製が容易に可能であることがわかった。ここでは促成栽培のチューリップを材料に用いたが、促成しない露地栽培の植物でも葉内のアミノ酸組成は類似しているため、通常露地栽培のチューリップ葉からも同じ方法で 4-メチレングルタミンの分離が可能と思われる。ただし、通風乾燥した葉から単離を試みたが成功しなかったことから、新鮮葉から抽出したほうがよいと思われる。

謝 辞 貴重な 4-メチレングルタミン標準試料をご提供いただいたミンガン大学の H. C. WINTER 博士に感謝の意を表します。

文 献

- 1) DONE, J. and FOWDEN, L.: A New Amino acid Amide in the Groundnut (*Arachis hypogaea*). Evidence of the Occurrence of γ -Methyleneglutamine and γ -Methyleneglutamic Acid. *Biochem. J.*, 51, 451~458 (1952)
- 2) ZACHARIUS, R. M., BOLLAND, J. K. and STEWARD, F. C.: γ -Methyleneglutamine and γ -Methyleneglutamic Acid in the Tulip (*Tulipa gesneriana*). *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 1961~1962 (1954)
- 3) FOWDEN, L. and STEWARD, F. C.: Nitrogenous Compounds and Nitrogen Metabolism in the Liliaceae. I. The Occurrence of Soluble Nitrogenous Compounds. *Ann. Bot.*, 21, 53~67 (1957)
- 4) FOWDEN, L.: The Nitrogen Metabolism of Groundnut Plants. The Role of γ -Methyleneglutamine and γ -Methyleneglutamic Acid. *Ann. Bot. N.S.*, 18, 417~440 (1954)
- 5) WINTER, H. C., POWELL, G. K. and DEKKER, E. E.: 4-Methyleneglutamine in Peanut Plants. Dynamics of



第 2 図 チューリップの葉から分離した試料(A)と、4-メチレングルタミン標準品(B)の ¹³C-NMR による測定

各 20 mg を D₂O 約 1 ml 中に溶解して測定した。図中の数値はテトラメチルシランを基準物質 (0 ppm) とした際の各ピークの ppm 値を示す。

(A), 試料; (B), 4-メチレングルタミン標準物質。

- Formation, Levels, and Turnover in Relation to Other Free Amino Acids. *Plant Physiol.*, 68, 588~593 (1981)
- 6) FOWDEN, L. and STEWARD, F.C.: Nitrogenous Compounds and Nitrogen Metabolism in the Liliaceae. II. The Nitrogenous Compounds of Leaves of the Genus *Tulipa*: Environmental Effects on the Composition of *Tulipa gesneriana*. *Ann. Bot. N.S.*, 21, 69~84 (1957)
- 7) ZACHARIUS, R. M., CATHEY, H. M. and STEWARD, F. C.: Nitrogenous Compounds and Nitrogen Metabolism in Liliaceae. III. Changes in the Soluble Nitrogen Compounds of the Tulip and Their Relation to Flower Formation in the Bulb. *ibid.*, 21, 193~201 (1957)
- 8) 馬場 昂・五十嵐太郎：チューリップの Flowering phase における栄養生理 (II), 植物生理, 7, 13~20 (1968)
-