

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5408478号
(P5408478)

(45) 発行日 平成26年2月5日(2014.2.5)

(24) 登録日 平成25年11月15日(2013.11.15)

(51) Int. Cl.		F I	
C07D 493/08	(2006.01)	C07D 493/08	CSPC
C12P 17/18	(2006.01)	C12P 17/18	D
C09K 17/14	(2006.01)	C09K 17/14	H
C05G 3/08	(2006.01)	C05G 3/08	
C09K 101/00	(2006.01)	C09K 101:00	

請求項の数 5 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2009-96384 (P2009-96384)
(22) 出願日	平成21年4月10日 (2009.4.10)
(65) 公開番号	特開2010-248088 (P2010-248088A)
(43) 公開日	平成22年11月4日 (2010.11.4)
審査請求日	平成24年3月13日 (2012.3.13)

(73) 特許権者	501174550	独立行政法人国際農林水産業研究センター 茨城県つくば市大わし1-1
(73) 特許権者	501203344	独立行政法人農業・食品産業技術総合研究 機構 茨城県つくば市観音台3-1-1
(74) 代理人	100082876	弁理士 平山 一幸
(74) 代理人	100109807	弁理士 篠田 哲也
(72) 発明者	中原 和彦	茨城県つくば市大わし1-1 独立行政法 人国際農林水産業研究センター内

最終頁に続く

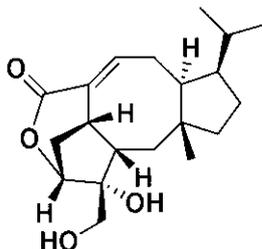
(54) 【発明の名称】 環状ジテルペン化合物とその製造方法、土壌改良剤、硝化抑制剤及び肥料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

化学式(I)で示される環状ジテルペン化合物。

【化1】



化学式(I)

【請求項2】

請求項1記載の環状ジテルペン化合物を有効成分とする土壌改良剤。

【請求項3】

請求項1記載の環状ジテルペン化合物を有効成分とする土壌の硝化抑制剤。

【請求項4】

請求項1記載の環状ジテルペン化合物を含有する肥料。

【請求項5】

クリーピングシグナルグラスの根部をアンモニウム塩に浸して根浸出液を得る工程と、得られた根浸出液を乾燥し乾燥物をメタノール抽出して乾燥する工程と、さらに乾燥物をジクロロメタンで抽出し分配吸着カラムクロマトグラフィーにより分画する工程を含む、請求項1に記載の環状ジテルペン化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の環状ジテルペン化合物及びその製造方法と、その化合物を含有する土壌の土壌改良剤、硝化抑制剤及び肥料に関する。

10

【背景技術】

【0002】

化学肥料に含まれるアンモニア、アンモニウム塩、尿素等のアンモニア態窒素や、有機質肥料が分解することによって生成したアンモニア態窒素は、土壌中、特に畑や水田の表層などの酸化的条件で硝酸態窒素に変化しやすい。硝化と呼ばれるこの作用は亜硝酸菌および硝酸菌等の硝化細菌の働きによって起こり、生成した硝酸態窒素は前述の土壌コロイドに吸着されることなく、地下水や大気中に流亡・放出される。このため硝酸化成作用の強い土壌条件において、施肥した窒素肥料の作物による利用率は非常に低く、また、硝化により生じた硝酸の環境中への拡散が自然環境汚染の原因ともなっている。

【0003】

20

土壌中での硝化を抑制するため、従来、主にニトラピリン(2-クロロ-6-トリクロロメチルピリジン)や、例えば特許文献1に記載のジシアンジアミド等の合成薬剤が用いられている。しかし、ニトラピリンは揮発性が高く、地温が20以上の条件ではほとんど効果がないため、北米の冬季作等、限られた地域の限られた環境下のみで使用されているだけである。

【0004】

また、上記ジシアンジアミドは、ニトラピリンに比較して高い温度でも使用可能である。しかし、高い濃度での使用を必要とし、かつ、高価であるため農業生産コストに大きく影響する。したがって、ジシアンジアミドも利用される地域は限られている。

【0005】

30

熱帯地域において、熱帯イネ科牧草であるクリーピングシグナルグラス(*Bracharia humidicola*)が生育する土壌において硝化が抑制される現象が知られている(非特許文献1及び非特許文献2)が、これを使用した効果的な硝化抑制方法並びに硝化抑制剤は報告されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開平11-278973号公報

【特許文献2】特許公開2008-245628号公報

【非特許文献】

40

【0007】

【非特許文献1】CIAT 1983 ANNUAL REPORT p.224

【非特許文献2】CIAT 1985 ANNUAL REPORT p.210 - 211

【非特許文献3】J. Plant Growth Regntl. 13 39 - 49, 1994

【非特許文献4】Iizumi et al. Appl. Environment. Microbiol. Vol. 64, p. 3656 - 3662, 1998

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、熱帯から温帯にかけての広い地域で利用でき、かつ、天然由来の材料から容

50

易に得られる硝化抑制作用を有する新規化合物とその製造方法、及びそれを含有する土壤改良剤、硝化抑制剤、肥料を提供することを目的としている。

【課題を解決するための手段】

【0009】

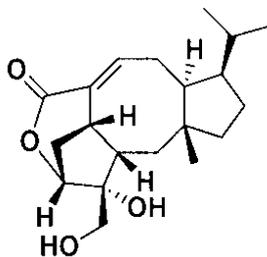
本発明者らは、熱帯イネ科牧草であるクリーピングシグナルグラス (*Brachiaria Humidicola*) が生育する土壤での硝化抑制現象の報告 (非特許文献1 及び非特許文献2) に基づき、クリーピングシグナルグラスが何らかの硝化抑制物質を放出することを予想し、鋭意研究を行ってきた。その結果、硝化抑制物質を単離取得し、その化学構造をつきとめ、更に単離した化合物が硝化抑制効果を有することを確認して、発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明の化合物は、化学式 (I) で示される環状ジテルペン化合物である。以下化学式 (I) の化合物をブラキアラクトンということもある。

【0011】

【化1】



化学式 (I)

【0012】

本発明は、またブラキアラクトンを有効成分とする土壤改良剤又は硝化抑制剤及びブラキアラクトンを含有する肥料である。

さらに、本発明は、クリーピングシグナルグラスの根部をアンモニウム塩に浸して根浸出液を得る工程、得られた根浸出液を乾燥し、乾燥物をメタノール抽出して乾燥する工程、さらに乾燥物をジクロロメタンで抽出し、逆相カラムクロマトグラフィー及び高速液体クロマトグラフィーにより分画する工程を含む、ブラキアラクトンの製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0013】

ブラキアラクトンは、天然由来の優れた硝化抑制作用を有する新規化合物であり、特に熱帯から温帯における土壤改良剤、硝化抑制剤、肥料として使用可能な化合物である。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】本発明に係るブラキアラクトンの電子衝撃イオン化質量スペクトルを表す図である。

【図2】本発明に係るブラキアラクトンに関するスペクトル分析を示し、Aが紫外線吸収スペクトル分析の結果を、Bが円二色性スペクトルの結果を表す図である。

【図3】本発明に係るブラキアラクトンの硝化抑制率を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0015】

ブラキアラクトンのように5-8-5員環構造を有する環状ジテルペン誘導体 (以下、5-8-5環状ジテルペン類ということもある) は微生物や植物に含まれる成分であり、従来から知られている一群の化合物である。これまで、5-8-5環状ジテルペン類は、植物に対しては成長促進などのホルモン様作用やH⁺-ATPaseの活性化による各種物質の膜透過性を増大させる作用を示すことが知られている。一方、動物細胞に対しては

、分化誘導を促進し、抗ガン作用等の働きをもつことが知られている（特許文献2及び非特許文献3参照）。

しかしながら、ブラキアラクトンのように、5 - 8 - 5員環骨格に更にラクトン環を有する誘導体は報告がない。

【0016】

ブラキアラクトンは、クリーピングシグナルグラスの根部をアンモニウム塩水溶液に浸して根浸出液を得た後、得られた根浸出液を乾燥し、さらにメタノールで抽出して乾燥し、さらにジクロロメタン抽出し、分配吸着カラムクロマトグラフィーにより分画することにより得ることができる。

【0017】

クリーピングシグナルグラスの根部をアンモニウム塩水溶液に常温で1～5日間浸漬することにより、ブラキアラクトンが分泌される。ブラキアラクトンは、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、重炭酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなど無機アンモニウム塩で誘導される。無機アンモニウム塩として塩化アンモニウムを使用する場合、その濃度の範囲は1～5mMが好ましい。ただし、この濃度範囲に限定されるものではなく、1mMと5mMでの活性誘導量の比較から、1mM以下でも誘導可能である。

【0018】

クリーピングシグナルグラスの浸出液を抽出する有機溶媒は、アルコール、アセトニトリル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、ヘキサン等である。純度と回収率の関係から、ジクロロメタンを用いた場合が最も効率がよい。

【0019】

得られた有機溶媒抽出液を分配吸着カラムクロマトグラフィーで分画してブラキアラクトンを得ることができる。

【0020】

ブラキアラクトンは、卓越した硝化抑制作用を示し、硝化抑制剤として土壤改良剤・肥料等に添加して使用できる。硝化抑制剤に用いるブラキアラクトンは、牧草により容易に生産させることができる。このため、硝化抑制剤を含有する土壤改良剤を低コストで製造することができる。

【0021】

ブラキアラクトンは、石灰のような無機素材や、黒ボク土のような肥沃土などに添加して土壤改良剤とすることができる。添加量は、必要に応じて適宜選択して決定すればよい。例えば土壌1g当たり15～50μgの範囲である。

ブラキアラクトンを含有する土壤改良剤は、硝化抑制作用を有するので、窒素成分の硝化を抑制し、土壤環境の劣化を防止することができる。

【0022】

ブラキアラクトンは、肥料に配合して硝化抑制剤含有肥料とすることができる。配合する肥料としては、無機肥料や有機肥料が挙げられ、これらの混合肥料でもよい。無機肥料としては、尿素、硫酸、塩安などの窒素質肥料、過リン酸石灰などのリン酸肥料、硫酸カリウム、塩化カリウムなどのカリ肥料を用いることができる。また、有機肥料としては、骨粉、たい肥などを用いることができる。

ブラキアラクトンを含有する肥料は、肥料成分と共に硝化抑制剤を含有しているので、窒素成分の硝化を抑制し、肥料の節約と土壤環境の劣化を防止することができる。

【実施例】

【0023】

以下にクリーピングシグナルグラスからのブラキアラクトンの製造に関する実施例および硝化抑制作用を測定した例を説明する。

【0024】

〔ブラキアラクトンの製造及び分析〕

公知の方法により水耕栽培したクリーピングシグナルグラスの根部を蒸留水によりよく洗浄し、10Lの2mM塩化アンモニウム水溶液に浸して室温にて24時間処理し、根浸

10

20

30

40

50

出液を得た。根浸出液を、ロータリーエバポレータを用いて乾燥させ、残渣を100 mLのメタノールにより抽出した。得られた抽出液をろ過した後、再度乾燥させ、20 mLのジクロロメタンにより抽出し、乾燥させた。乾燥物を少量のメタノールに溶解し、当量の水を加え希釈した。この溶液を、予め50%メタノールにより平衡化しておいた逆相カラム (Sep Pak C18、1 g 溶) に充填し、50~90%のメタノールにより順次溶出した。得られた画分をTSK gel SuperODSカラムを接続した高速液体クロマトグラフィー (移動層: 20~40%アセトニトリル/水、10分間、次に40~43%アセトニトリル/水、8分間のグラジエント、流速1 mL/分、常温) により更に一定時間ごとに分画し、得られた各画分について、後述の方法により硝化抑制活性を測定した。硝化抑制活性を示す画分を選抜し、無色の純粋な化合物0.7 mgを得た。この化合物について質量分析、紫外吸収スペクトル分析、円二色性ならびに核磁気共鳴分析により化学構造を決定した。

10

【0025】

電子衝撃イオン化質量スペクトル分析は、島津製作所製QP-2010質量分析計 (直接導入プローブ使用、70 keV) を用いて行った。エレクトロスプレーイオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量スペクトルは、Bruker Daltonics社製Apex II 70e質量分析計を用いて測定した。結果を以下に示す。また電子衝撃イオン化質量スペクトルを図1に示す。

分子式: $C_{20}H_{31}O_4$

電子衝撃イオン化質量スペクトル (図1参照): (m/z, %): 334 (M^+ , 17), 291 (9), 207 (5), 245 (5), 227 (5), 199 (11), 149 (21), 137 (100), 136 (75), 123 (20), 121 (47), 107 (22)

20

エレクトロスプレーイオン化フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量スペクトル: m/z 335.2213 ($[M+H]^+$)

【0026】

紫外線吸収スペクトル分析は、島津製作所製UV-1600分光光度計を用いて行った。円二色性スペクトル分析は、日本分光製J-820旋光分散計を用いて行った。

結果を図2に示す。Aが紫外線吸収スペクトル分析の結果を、Bが円二色性スペクトルの結果を示している。それぞれのピークは、紫外線吸収スペクトルが、 $\lambda_{max} 230$ nm (methanol, $\epsilon = 2.4 \times 10^3$)、円二色性スペクトルが、 $ext: 232$ nm (methanol, $[\theta] = +6500$, 0.0274 mmol/dl) であった。

30

【0027】

表1に核磁気共鳴スペクトルの結果を示す。核磁気共鳴は、Bruker Biospin社製Avance 800またはAvance 500核磁気共鳴分光計を用いて行った。

【0028】

【表 1】

表 1

原子	δ_{H} (ppm), multiplicity, J (Hz), integral	δ_{c} (ppm)	HMBC	NOESY	
1a	1.34 dd (14.8, 12.1) 1H	38.2	C ₂ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₂₀	1b, 2, 10	
1b	1.50 dd (14.8, 5.4) 1H		C ₂ , C ₆ , C ₁₀ , C ₁₂	1a, 2, 20	
2	2.00 ddd (12.1, 5.4, 5.4) 1H	47.7	C ₁ , C ₃ , C ₆ , C ₇ , C ₁₈	1b, 5, 18a, 18b, 20	
3		82.5			10
4	4.54 dd (4.4, 1.7) 1H	84.0	C ₂ , C ₆ , C ₁₉	5, 18a, 18b	
5	1.92 m 2H	33.8	C ₂ , C ₃ , C ₄ , C ₆ , C ₇	2, 4, 18a, 18b	
6	3.31*	40.5	C ₁₉	5, 9b	
7		131.8			
8	7.12 dd (8.8, 8.5) 1H	146.3	C ₆ , C ₇ , C ₉ , C ₁₉	10	
9a	2.39 dd (12.3, 8.5) 1H	25.0	C ₇ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₁₄	9b, 10, 15	
9b	2.30 ddd (12.3, 11.7, 8.8) 1H		C ₇ , C ₈ , C ₁₀ , C ₁₁	6, 9a, 17, 20	
10	1.64 dd (11.8, 10.7) 1H	55.9	C ₁ , C ₈ , C ₉ , C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₅ , C ₂₀	1a, 8, 9a, 14	20
11		44.7			
12a	1.42 ddd (12.2, 11.8, 8.0) 1H	44.6	C ₁₁ , C ₂₀	12b, 13a, 13b	
12b	1.36 dd (11.8, 7.3) 1H		C ₁₁ , C ₁₄ , C ₂₀	12a, 20	
13a	1.61 ddd (11.2, 8.0, 5.4) 1H	24.4	C ₁₀ , C ₁₁	12a, 13b, 14, 16	
13b	1.52 dddd (12.2, 11.2, 10.4, 7.3) 1H		C ₁₂ , C ₁₄ , C ₁₅	13a, 16, 17, 20	
14	2.21 dddd (10.7, 10.4, 7.8, 5.4) 1H	49.2	C ₁₂ , C ₁₃ , C ₁₅ , C ₁₇	10, 13a, 15, 16	30
15	1.89 dq (7.8, 6.8, 6.7) 1H	30.2	C ₁₀ , C ₁₃ , C ₁₄ , C ₁₆ , C ₁₇	9a, 14, 16, 17	
16	0.92 d (6.7) 3H	23.9	C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₇	9a, 13a, 13b, 14, 15, 17	
17	0.85 d (6.8) 3H	20.4	C ₁₄ , C ₁₅ , C ₁₆	9a, 9b, 13b, 15, 16, 20	
18a	3.40 d (11.4) 1H	68.3	C ₂ , C ₃ , C ₄	2, 4, 5	
18b	3.35 d (11.4) 1H		C ₂ , C ₃ , C ₄	2, 4, 5	
19		168.8			
20	1.00 s 3H	18.7	C ₁ , C ₁₀ , C ₁₁ , C ₁₂	1b, 2, 9b, 12a, 12b, 13b, 15, 17	40

【 0 0 2 9 】

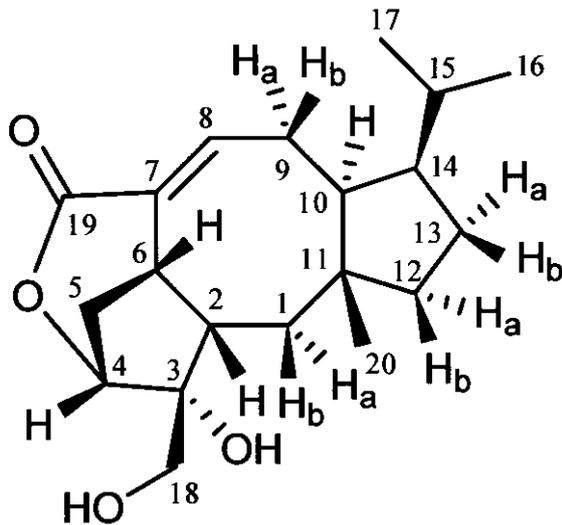
なお、一次元プロトン NMR スペクトルにおける 1 つのシグナルは、溶媒ピークと重複しているため、化学シフト値を HSQC により測定した。

【 0 0 3 0 】

これらの分析結果から、ブラキアラクトンの化学構造を以下のように特定した。

【 0 0 3 1 】

【化2】



10

【0032】

〔ブラキアラクトンの硝化抑制作用の測定〕

硝化抑制作用の測定は、試験管内の硝化細菌を用いて行った。最初に、測定に用いた硝化細菌の懸濁液の調製について説明する。

20

【0033】

細菌由来のルシフェラーゼ遺伝子 (luxAB) を導入した硝化細菌 (Nitrosomonas europaea IFO 14298、非特許文献4参照) を、カナマイシン 25 mg / 1000 cm³ を含むP培地中で、30 において好氣的に7~9日間培養し、洗浄後、新鮮なP培地に懸濁して、硝化細菌懸濁液を調製した。この硝化細菌懸濁液は、実験前に30分以上暗所に静置した。P培地の組成は、(NH₄)₂SO₄ 2.5 g、KH₂PO₄ 0.7 g、Na₂HPO₄ 13.5 g、NaHCO₃ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 100 mg、CaCl₂ · 2H₂O 5 mg、Fe-EDTA 1 mg、水 1000 cm³ からなり、そのpHは8.0であった。

【0034】

硝化作用は、上記の硝化細菌懸濁液 0.25 cm³ と水 0.2 cm³ からなる硝化細菌懸濁液の水溶液と、各実施例及び比較例の試料溶液 0.01 cm³ と、を試験管内で混合した後で、15 で30分間培養する間における、硝化反応に伴う生物発光量を、ルミノメータ (ターナー・デザインズ社製、型名TD20/20) を用いて測定することにより評価した。硝化反応に伴う生物発光量は、各実施例及び比較例の試料溶液に、硝化抑制作用物質が存在すれば、発光量が減少する。このため、硝化細菌懸濁液の水溶液に各実施例及び比較例の試料溶液を添加した場合の発光量を、各実施例及び比較例の試料溶液を加えないで、菌体懸濁液の水溶液だけの場合の発光量で割った値を硝化抑制率とした。図3に実施例のブラキアラクトンの硝化抑制率を示す。

30

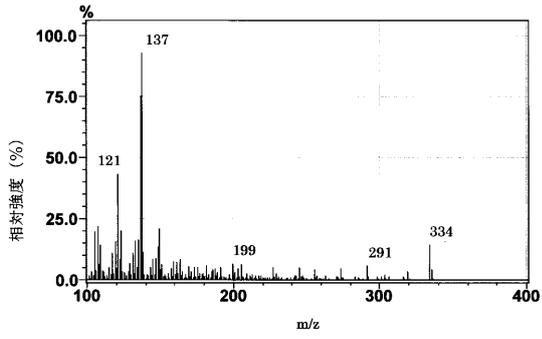
【0035】

従来の合成薬剤からなる硝化抑制剤の80%抑制濃度は、ニトラピリンで6 μMであり、ジシアンジアミドで270 μMである。

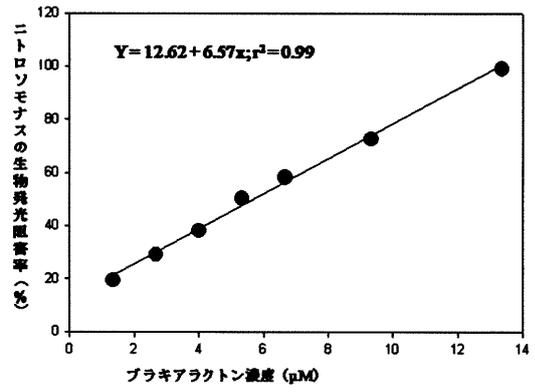
ブラキアラクトンの80%抑制濃度は11 μMであり、これはニトラピリンに匹敵し、ジシアンジアミドよりも、はるかに低濃度でも十分な硝化抑制作用が得られることが判明した。

40

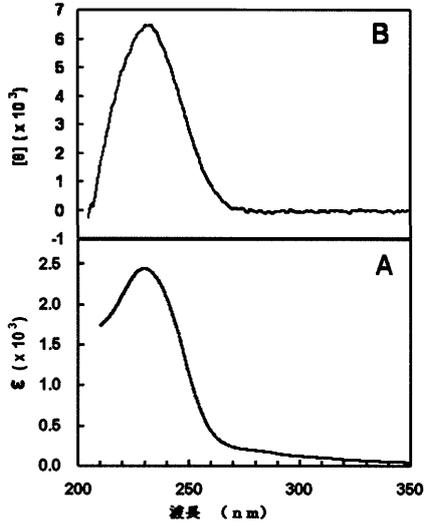
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (72)発明者 グントゥール・ヴァンカタ・スバラオ
茨城県つくば市大わし1 - 1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内
- (72)発明者 吉橋 忠
茨城県つくば市大わし1 - 1 独立行政法人国際農林水産業研究センター内
- (72)発明者 小野 裕嗣
茨城県つくば市観音台2 - 1 - 1 2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研
究所内
- (72)発明者 亀山 真由美
茨城県つくば市観音台2 - 1 - 1 2 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研
究所内

審査官 東 裕子

- (56)参考文献 特開2007-45887(JP, A)
GOPALAKRISHNAN, S. et al, Journal of Agricultural and food chemistry, 2007年, Vol.
55, pp.1385-1388
SUBBARAO, G.V. et al, PNAS, 2009年10月13日, Vol.106, No.41, pp.17302-17307
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C07D 493/08
CAplus/REGISTRY(STN)