タバコアルカロイドの立体特異的分解と 生合成機構に関する研究*

木 佐 木 卓 郎
(日本専売公社中央研究所)

ま え が き

アルカロイドを産生する植物はこれまでに 4000 種以上も知られ、そしてそのアルカロイドは 3000 種程も知られている。そのうちタバコは喫煙に供せられ、人間生活に関係が深いので、その主アルカロイドであるニコチンも 1809 年に発見されて以来、関連化合物も含めて多くの研究がおこなわれた。植物におけるタバコアルカロイドの生合成および分解に関する研究は比較的最近で、簡単に述べれば次のようである。

1950 年代に主に Dawson により、ニコチンはタバコの根で生成され、ノルニコチンは葉で脱メチルにより生成され、ピリジン環はニコチン酸から由来することが明らかにされた。ピロリジン環は Byerrum 一派および Leete によりオルニチンから、そしてメチル基はメチオニンから由来することが明らかにされた。そしてオルニチン-2-¹⁴C の ¹⁴C がニコチンの 2 と 5 の炭素に均等に分布することから対称な共鳴構造を取り得る Δ_1 -ピロリンを含む生合成仮説が提起されていた。分解面については高等動物、微生物あるいは自然酸化について、著者らを含め、比較的多くの研究がおこなわれた。しかし植物体中における代謝については、その代謝速度が遅いこともあり、これに関する研究はほとんどなかった。

ここでは植物体内におけるタバコアルカロイドの分解と生成について、著者がおこなった旋光度観察およびトレーサー実験を主とした研究の結果のあらましを述べる。

I. タバコアルカロイドの分解

脱メチルと旋光度⁽¹⁻³⁾

タバコアルカロイドの植物における分解あるいは生成

第 1 表 異なったタバコ試料から得られた
ノルニコチンの旋光度

試 料	$[\alpha]_D$ nornicotine
1958 年産 紅 葉	-44.99°
1959 年産 紅 葉	-64.96°
1958 年産 指 宿 葉	-48.25°
1960 年産 <i>Nicotiana glutinosa</i>	-71.04°

を研究するきっかけは、第 1 表にみられるように、種々の異なった試料から得られたノルニコチンがいろいろな旋光度を示すことが観察されたことからである。天然に産生するニコチンは、調べた限りでは常に純粋な *l* 型で得られ、根からの溢泌汁液中のニコチン（生成したばかりの）も純粋な *l* 型であった。すなわち、ニコチンは *l* 型で産生するのに、それから由来するノルニコチンの旋光度が変異するのは何によるものか興味をひいた。タバコの根の影響を排除するためにトマトに接木したタバコ（アルカロイドを含まない紅葉種のタバコ）を作り、その切り離した葉の葉柄部より、*l*-ニコチンを供与すると、ニコチンは脱メチルされ、一部ラセミ化したノルニコチンが得られ、ニコチンには旋光度の変化は認められなかった。*d*-ニコチンを供与すると、同様にラセミ化した *d*-ノルニコチンと旋光度に変化のない *d*-ニコチンが得られた。*dl*-ニコチンを供与した場合、少し右旋性のノルニコチンと少し左旋性のニコチンが得られた。これは後述するように、脱メチルが *d*-ニコチンに特異性が高いことによるもので、ともかくラセミ化したノルニコチンの生成はラセミ化したニコチンから由来するものではないことは明瞭であった。*d*、*l* いずれのノルニコチンを供与、再分離しても旋光度に変化は認められなかった。また酸、アルカリと煮沸しても、ラセミ化はおこらなかった。ラセミ化したノルニコチンは少なくともニコチンが脱メチルされてノルニコチンになる以前の過程でおこっていると考えられた。一般にラセミ化は不斉炭素原

* Stereospecific Degradation and Biogenesis of Tobacco Alkaloids.
By Takuro KISAKI (Central Research Institute, Japan Monopoly Corporation)

子の不飽和化か,あるいはカルボニウムイオンの形成によるものと考えられる. 不飽和体の N-メチルミオスミンおよびミオスミンを供与しても, いずれもノルニコチンにならなかった. ほかに不斉炭素原子を持たない開環構造の化合物が考えられるが, 1-(3'-pyridyl)-1-methylethylaminoethane, 3-pyridyldiethylaminoethane, および 3-pyridyldiethylaminoethane はそれぞれ, その脱アルキル生成物を与えるだけで, 他のビリジン化合物の生成は認められなかった. またニコチンについてもペーパークロマト等で調べた限りではノルニコチン以外に, まったく中間体らしいビリジン化合物を観察することができなかった. したがって, 脱メチルによるラセミ化ノルニコチンの生成は酵素-基質状態における不斉炭素原子につくプロトンの易動化によるものと結論された.

ニコチンのメチル基の代謝⁽⁴⁾

d- および l-ニコチン- $^{14}\text{CH}_3$ のメチル基代謝をメチオニン- $^{14}\text{CH}_3$, コリン- $^{14}\text{CH}_3$, ベタイン- $^{14}\text{CH}_3$ のそれと比較すると, 第 2 表のように, ニコチンからノルニコチンへ強力に脱メチルするタバコ (紅葉あるいは原生種) ではもちろん, ニコチンが主アルカロイドであるといわれるタバコ (ブライトエロー) でも, ニコチンのメチルをベタイン, コリン, メチオニンのそれより 20~50 倍も多量に CO_2 に代謝することが認められた. 紅葉においては 10 時間以内に供与されたニコチンのメチル- ^{14}C の 25% が CO_2 として排泄された. ニコチンのメチル- ^{14}C はコリンへも移行し, 時間の経過にともない次第に放射能が増加したが, アミノ酸部にはそれよりも多量に移行しており, 6 時間以内に一定の放射能レベルに達した. アミノ酸中の放射能は主にセリンに認められた. セミカルバジッド共存下でニコチンを供与し, 蒸留するとジメドンに放射能が捕えられた. これはニコチンのメチル基がトランスメチレーションよりもむしろ酸化的に脱メチルされ, ホルムアルデヒドになり, active one carbon とし

て CO_2 あるいは他の植物成分に代謝されることを示していた. 脱メチル中間体としてすでにオキシニコチンが示唆され⁽⁵⁾, Egri⁽⁶⁾ や Il'in⁽⁷⁾ は実験的にノルニコチンの生成を認めていたが, Stepka と Dewey⁽⁸⁾ および著者⁽⁹⁾ もノルニコチンの生成を認めることができなかった. 脱メチルはむしろメチル基の水酸化により始まるとみるのが妥当と考えられた. 酵素的な脱メチルは残念ながらまだ成功するに至っていない.

ニコチンはまた, メチル基の授受の役割を果しているのではないかとの推察がおこなわれている^(10,11). しかしながら切り離さない無ニコチンのタバコの葉に供与して, ベタイン-, コリン-, dl-メチオニン- $^{14}\text{CH}_3$ と, ニコチンあるいはノルニコチンを同時に一定期間培養後再分離したニコチンにまったく放射能が認められなかった. したがってニコチンがメチル授受の役割を果している可能性は極めて少なく, ニコチンのメチル基は一方向的に酸化脱メチルされてゆくものと考えられた.

脱メチルの特異性⁽⁹⁾

タバコの葉はニコチンだけでなく, dl-N-エチルノルニコチンも dl-アナパシンも脱メチルを受けることが Dawson⁽¹²⁾ により報告されていた. 著者はビリジン部を修飾あるいは置換したもの, ピロリジン部を修飾したものの, および N-メチル部を各種アルキル, あるいはアシル基で置換した各種のニコチン類似物質について脱メチルを調べた結果, 脱メチルを受ける構造として, ピロリジン側の N が高い pK_a' 値を持つ必要があることから, アンモニウム型として電離状態にあることが必要であり, またビリジン側はピリドンでもよいことなどから,

の構造が脱アルキルを受け得る最小必要の構造であろうと推定した. 実際に, この活性がタバコアルカロイドだけに特異的に働くものか, 他のメチル基を持つ植物成分の代謝にも関与しているのか判らないが, 興味あるところである⁽¹³⁾. 立体特異性は l-ニコチン- $^{14}\text{CH}_3$, および d-ニコチン- $^{14}\text{CH}_3$ に無標識 l-ニコチンをまぜて供与すると, 第 3 表のように比放射能の低下が認められた. タバコの葉は天然に産生しない d-ニコチンに脱メチルの特異性が高いことを示していた. また, dl-N-メチルアナパシンおよびニコチンの基本構造を持つ dl-1-(3'-pyridyl)-1-methylethylaminoethane は, いずれも d 型

第 2 表 各種化合物のメチル基の CO_2 への代謝

化 合 物	発生した $^{14}\text{CO}_2$ (%)
l-nicotine- $^{14}\text{CH}_3$	11.5
d-nicotine- $^{14}\text{CH}_3$	17.2
dl-methionine- $^{14}\text{CH}_3$	0.6
choline- $^{14}\text{CH}_3$	0.1
betaine- $^{14}\text{CH}_3$	0.7

材料: *Nicotiana tabacum* (ブライトエロー)

時間: 89 時間

第 3 表 ニコチンの立体特異的分解

供与時間	比放射能 (cpm/mg)	
	<i>d</i> -nicotine 供与	<i>l</i> -nicotine 供与
0	15.2×10^3	7.5×10^3
32	10.3×10^3	6.9×10^3
72	7.2×10^3	7.0×10^3

材料: *Nicotiana tabacum* (ブライトエロー)

が特異的に脱メチルを受けて, *l* 型を多く残した. タバコの葉の脱メチルは *d* 型だけに厳密に特異的ではないので, 一つの酵素によるものか, それとも *d* 型および *l* 型にそれぞれ絶対特異性を示す二つの酵素が量的に異なっているのか今のところ判らない.

二級アミン型タバコアルカロイドの分解⁽¹⁴⁾

ニコチンあるいは二級アミン型タバコアルカロイドの生体内分解は, 犬や昆虫といった動物ではピロリジン環→ピロリドン環, 微生物ではピリジン環→ピリドン環あるいはピロリジン環の 1,2 脱水素の形式でおこなわれることが明らかにされているが, 植物においては分解の可能性を裏書きする報告⁽¹⁰⁾のほか, Griffith⁽¹⁵⁾によりニコチン酸が分解物として確認されているだけで, まったく分解の過程は判らなかった. たまたま *Nicotiana glutinosa* の三つの異なった時期に採取した試料のうち, 中間の開花期における葉のメタノール冷浸出液からミオスミンが結晶として分離された. *l*-ノルニコチンをトマト台木に接木したタバコ (紅葉) の接木部位の上方約 5 cm のところに径 5 mm の穴をあけ, 脱脂綿を通じて供与し, 2 週間後に植物体を磨砕し, pH=5.0 でエーテル抽出し, ミオスミンの水解型 (1-(3'-pyridyl)-4-amino-propan-1-one) のピクレートを得た. 元素分析, ガスクロマト, および赤外スペクトルはミオスミンに一致した. つまりミオスミンはノルニコチンから脱水素されてできることが明らかになった. *dl*-ノルニコチンも同様に供与すると, 次第に右旋性を示すようになった. 4 週間で $[\alpha]_D = +4.4^\circ$ を示すに至り, 大きい値ではないが分解には生物学的な関与があることを示していた. *l*-および *d*-ノルニコチン-³H を用いた実験では, *d* 型も分解が認められること, つまり *l* 型が相対的に分解されやすいことを示していた. *d* 型だけが分解されたとして旋光度だけから計算すると, 供与したノルニコチンの少なくとも約 8.5% が分解されたことになる. さらにミオスミンを植物に供与すると, 三つの分解物がペーパークロマトで認められ, 一つはニコチン酸であることが同定され

た. タバコの葉におけるニコチンの分解は *l*-ニコチン *d* 型に特異性が高い → 一部ラセミ化した *l*-ノルニコチン *l* 型に特異性が高い → ミオスミン → ニコチン酸 → … の経路であろうと考えている. *dl*-アナバシンの場合も, あるいは *dl*-1-(3'-pyridyl)-1-ethylaminoethane も同様に葉において光学活性化され, 前者は左旋性を後者 (右旋性が *l* 型と思われる⁽¹³⁾) は右旋性を示した. ノルニコチンとは逆に *d* 型が分解を受けやすいことを示していた. アナバシンとノルニコチンでは脱水素に関与する酵素がそれぞれ別のものである可能性を示していた. アナバシンの場合, 生成物は 1,2-デヒドロアナバシンと思われ, ガスクロマトで相当する位置にピークが得られた. アナバシンは Dawson により *Nicotiana glauca* の地下, 地上のいずれでも生成することが明らかにされているが, その根, 茎, 葉のアナバシンはほとんどラセミ体に近いながら, 根では左旋性に葉では右旋性になってゆく傾向があった. これはアナバシンがラセミ体として生成し, 根では *d* 型が特異的に, 葉では *l* 型が特異的に分解を受けることを示しており, *d* 型 *l* 型それぞれ別々の分解酵素があることを示していた.

II. タバコアルカロイドの生合成

さきに述べたように, ニコチン酸と対称なピロリジウムイオンとからノルニコチンを通り, メチル化によりニコチンが生成されると, Leete⁽¹⁶⁾が生合成式を提出し, それが一般的に信じられ, Tso ら^(10,17,18)は一連の ³H₂O あるいは ¹⁵N 標識ノルニコチン等の供与の実験によりニコチンはノルニコチンから生成されることを報告していた. しかし著者らは, ニコチン生合成の場所であるタバコの根の中に含まれる微量アルカロイド中に未知の生合成中間体があるのではないかという望みを抱いて検索をおこなっていた途中, ノルニコチンとアナバシンが分離された⁽¹⁹⁾. 面白いことに, ノルニコチンは少しラセミ化してはいるが *d* 型であった. もしノルニコチンがニコチンの前駆体であるとする, *d* 型ニコチンが生じてよいであろう. 仮りにラセミ型ノルニコチンが生じて, その *l* 型だけがメチル化されるとすると, 生成したニコチンと当量の *d*-ノルニコチンが残ることになるが, 実際にはニコチンの蓄積量に比べ著しく少ない. 少ない理由が分解によると考えても, 先述のように, 分解はむしろ *l* 型に特異性が高いし, 分解の速さも前述のようにかなり低いので, ノルニコチンがニコチンの前駆体である可能性

は非常に少ないと考えねばならない。オルニチン-2- ^{14}C を *N. rustica* の無菌組織培養根に供与して得たノルニコチン中の ^{14}C の分子内分布をみると、2-C : 5-C = 2 : 1 を示した⁽²⁰⁾。ニコチンにおいては 2-C : 5-C = 1 : 1 であった。得られたノルニコチンは 2-C と 5-C に 1 : 1 に標識されたノルニコチンと 2-C にだけ標識されたノルニコチンとが 1 : 1 の割合に混ざっていることを示していた。根でも葉と同様にニコチンからノルニコチンへの脱メチルが起っている⁽²¹⁾、1 : 1 標識のノルニコチンはニコチンに由来するものと考えられる。したがって、このノルニコチンはニコチンの前駆体ではあり得ない。また 2-C だけに標識されたノルニコチンはニコチンとは異なる経路、つまりリジンからアナパシンのピペリジン環が形成される場合⁽²⁸⁾と同様、カルボキシル基の関与する経路により生成すると考えられ、ニコチンの前駆体でないことは明瞭であった。ニコチンはノルニコチンとは異なる、すでにメチル化された不明の前駆体から来る可能性が強いことを示していた。著者らも⁽²²⁾、Ladesic および Tso⁽¹⁷⁾ らと同様に ^{15}N -ノルニコチンをタバコの根の組織培養根に供与したところ、オルニチンに比べ、ニコチンへの移行は極めて低かった。彼らはアルカロイドの分離をペーパークロマトでおこなっているが、ニコチンとあまり違わない *Rf* にノルニコチンから由来した不明の物質が来ることから、彼らの結論が分析上の誤りから来る可能性が指摘された。

新しいニコチン生成中間体

著者らはオルニチンからニコチンに至る間の代謝物を精査することにより、何か生合成中間体がみつかるだろうという想定に立って、オルニチン-2- ^{14}C をタバコの無菌組織培養根に 5 時間供与後エタノール抽出し、アミノ酸アナライザーとフローモニターで分析の結果、第 1 図のように幾つかの未知の成分に放射能が認められた。ニコチンの前駆体は二級以上のアミンであるべきだと考えていたので、ニヒドリンで少なくとも黄色を呈するであろうと考えた。Y-1、プロリン、Y-2 が黄色に呈色し、特に Y-2 は塩基性であることから興味をひいた。これを再分離してタバコの根に再供与すると、これまでのいかなる物質よりもニコチンへよく移行（6 時間で 30%）することが認められた。オルニチンから代謝されてくるプロリン、グルタミン酸等のアミノ酸の放射能の時間変化を比較してみると、Y-2 は 4 時間でピークに達し、以後下降をたどるのに対し、他のアミノ酸およびニコチン

第 1 図 *N. rustica* の組織培養根に供与した *dl*-オルニチン-2- ^{14}C の代謝物のアミノ酸アナライザーによるフローグラム

上部の図は 150 cm カラムで 0.2 M citrate 緩衝液 (pH = 3.25) による溶出パターン。

下部の図は 50 cm カラムで 0.38 M citrate 緩衝液 (pH = 4.26) による溶出パターン。

の放射能は常に上昇をたどり、明らかに Y-2 はニコチンの前駆体としての性質を示していた。これまで知られているピロリジン環の各種前駆体およびメチル基の前駆体であるメチオニンを供与すると、それらのブタン骨格およびメチル基は Y-2 に移行し、ピロリジン環の前駆体であるニコチン酸- ^3H は移行を示さなかった。

このことから Y-2 はピロリジンを持たず、すでにメチル基とブタン骨格を持つ化合物であることが推定された⁽²³⁾。このものは塩基性で不安定であった。Y-2 フラクションを分画し、純化し、化学テストの結果、アルデヒドおよびアミノ基を有することが判った⁽²⁶⁾。Acrolein から β -chloropropionaldehydediethylacetal, β -cyanopropionaldehydediethylacetal, γ -aminobutyraldehydediethylacetal, formyl- γ -aminobutyraldehydediethylacetal, γ -methylaminobutyraldehydediethylacetal, γ -methylaminobutyraldehyde の経過で、 γ -メチルアミノブチルアルデヒド (γ -MABA) を合成し、Y-2 とこれをまぜてアミノ酸アナライザーでのクロスト像が一致すること、ラジオオートグラムが一致すること、あるいは

- (1) T. Kisaki and E. Tamaki : *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 351 (1961).
- (2) T. Kisaki and E. Tamaki : *ibid.*, **94**, 252 (1961).
- (3) 木佐木卓郎 : 日本専売公社中央研究所研究報告 No. 106, 235 (1964).
- (4) 木佐木卓郎, 玉置英之助 : 農化, **38**, 392 (1964).
- (5) E. Wenkert : *Experientia*, **10**, 346 (1954).
- (6) L. Egri : *Fach. Mittl. Österr. Tabakregie*, 19 (1957).
- (7) G. S. Il'in : *Biokhimiya*, **13**, 193 (1948).
- (8) W. Stepka and L. J. Dewey : *Plant Physiol.*, **36**, 592 (1961).
- (9) 木佐木卓郎, 玉置英之助 : 農化, **38**, 549 (1964).
- (10) T. C. Tso and R. N. Jeffrey : *Arch. Biochem. Biophys.*, **80**, 46 (1959).

- (11) E. Leete and V. M. Bell : *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4538 (1959).
- (12) R. F. Dawson : *ibid.*, **73**, 4218 (1951).
- (13) T. Kisaki and E. Tamaki : *Agr. Biol. Chem.*, **28**, 492 (1964).
- (14) T. Kisaki and E. Tamaki : *Phytochem.*, **5**, 293 (1966).
- (15) G. P. Griffith, T. Griffith and R. U. Byerrum : *J. Biol. Chem.*, **235**, 3536 (1960).
- (16) E. Leete: "Biogenesis of Natural Compounds", Pergamon Press (London), 1963, p. 479.
- (17) B. Ladesic and T. C. Tso : *Phytochem.*, **3**, 541 (1964).
- (18) T. C. Tso and R. N. Jeffrey : *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 4 (1962).
- (19) T. Kisaki and E. Tamaki : *Naturwissenschaften*, **47**, 450 (1960).
- (20) S. Mizusaki, T. Kisaki and E. Tamaki : *Agr. Biol. Chem.*, **29**, 714 (1965).
- (21) S. Mizusaki, T. Kisaki and E. Tamaki : *ibid.*, **29**, 78 (1965).
- (22) S. Mizusaki, T. Kisaki and E. Tamaki : *ibid.*, **29**, 719 (1965).
- (23) 木佐木卓郎, 水崎茂暢, 玉置英之助: 昭和41年農化大会(京都)講演; *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 677 (1966).
- (24) H.-B. Schröter and P. Neumann : *Tetrahedron Letters*, No. 12, 1279 (1966).
- (25) E. Leete, E. G. Gross and T. J. Gilbertson : *ibid.*, No. 11, 587 (1964).
- (26) 水崎茂暢, 木佐木卓郎, 玉置英之助: 昭和42年農化大会(東京)講演; *Plant Physiol.*, 投稿中.
- (27) E. Leete : *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **18**, 179 (1967).
- (28) A. A. Bother-By, R. F. Dawson and D. R. Christman : *Experientia*, **12**, 151 (1956).
-