菌類によるアルカロイドおよび関連物質の生産 (第 8 報)

ペプチド型麦角アルカロイド類の生成機構

阿部又三, 大橋 力, 大桃定洋, 田淵武士

(東京教育大学農学部)

昭和 45 年 7 月 3 日 受 理

Production of Alkaloids and Related Substances by Fungi Part VIII. Mechanism of Formation of Peptide-type Ergot Alkaloids

By Matazō ABE, Tsutomu ŌHASHI, Sadahiro OHMOMO and Takeshi TABUCHI

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education

Formation of peptide portions of peptide-type ergot alkaloids has been studied by the use of some radioactive prolyldiketopiperazines and the intact mycelia of two ergot strains which are productive of ergokryptine~ergokryptinine or ergotamine~ergotaminine as the main alkaloid.

L-Leucyl-D-proline-lactam-³H as well as L-leucyl-L-proline-lactam-³H were shown to be incorporated into ergokryptine~ergokryptinine, while L-phenylalanyl-D-proline-lactam as well as L-phenylalanyl-L-proline-lactam were shown to be incorporated into ergotamine~ergotaminine.

The radioactive ergokryptinine and ergotaminine formed by the incorporation of L-leucyl-D-proline-lactam-³H and L-phenylalanyl-D-proline-lactam-³H, respectively, were isolated and recrystallized from methanol with carrier materials, and identified by melting point as well as by thin-layer chromatography. The specific activities of the isolates did not change over several recrystallizations. These findings indicate that the incorporation of prolyldiketopiperazines having D-proline configuration into peptide-type alkaloids was effected after the substrates were converted to those having L-proline configuration in the employed mycelia.

From the present results, the mechanism of the formation of peptide-type ergot alkaloids was brought to light to a certain extent.

(Received July 3, 1970)

緒 言

著者ら⁽¹⁾は前報で、麦角菌の菌核であると培養物であるを問わず、その中に ergokryptine, ergotamine などのような、分子内に含プロリン環状トリペプチド構造をもっている、いわゆる“ペプチド型麦角アルカロイド類”がある程度まで生産されているときは、それらペプチド型アルカロイド類のペプチド部分に対応した含プロリン環状ジペプチド類 (prolyldiketopiperazines) が多少とも生産されているという事実を見出し、同時に、これら環状ジペプチド類はペプチド型麦角アルカロイド類生成の前駆体であることを示唆する実験成績をもうこ

とができた。

そこで著者らは今回、麦角菌にみられるこれら含プロリン環状ジペプチド類が、果してペプチド型麦角アルカロイド類のペプチド部分に取りこまれるかどうかを、静止菌体の系のもと、アイソトープ手法によって検討してみた。その結果、ergokryptine~ergokryptinine を主要なアルカロイドとして生産しうる麦角菌の菌体では、L-leucyl-L-proline-lactam もその異性体 L-leucyl-D-proline-lactam もともに、ergokryptine~ergokryptinine に取りこまれ、また、ergotamine~ergotaminine を主要なアルカロイドとして生産しうる麦角菌の菌体では、L-phenylalanyl-L-proline-lactam もその異性体 L-

phenylalanyl-D-proline-lactam もともに, ergotamine ~ergotaminine に取りこまれるという事実が明瞭に見出された。すなわちこれにより, ペプチド型麦角アルカロイド類は, lysergic acid がまず1個のアミノ酸とアミド結合し, ついでその lysergamide が1個の含プロリン環状ジペプチドと結合してできるものであろう, との著者らあるいは Agurell⁽²⁾ の推論ないし仮説の一部を初めて裏づけることができたので, ここにこれを報告する。

実験方法

1) 供試菌株 麦角アルカロイド生産性の異なる次の2種の麦角菌株を取りあげた。すなわち, i) ergokryptine~ergokryptinine を主要なアルカロイドとして生産するハマニソニク型麦角菌の HA-6 株, および ii) ergotamine~ergotaminine を主要なアルカロイドとして含有していたハンガリー産ライムギ着生麦角から分離した, 著者らのいわゆるライムギ型麦角菌のうちの HR-3 株を選んで用いた。

2) 菌培養法 著者ら⁽⁹⁾のさきの実験結果に徴し, 供試のどの菌株をもアルカロイド生産条件にかなった養液を用いて調製した斜面上に発育させた。

斜面: 供試菌株が HA-6 株の場合には, 養液としてマノンニット 5%, コハク酸 0.8%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% の組成の水道水溶液をアンモニア水で pH 5.2 に調整したものを, また HR-3 株の場合には養液としてマノンニット 5%, グルタミン酸 0.8%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03% の組成の水道水溶液をアンモニア水で pH 5.4 に調整したものをそれぞれ用い, これらに寒天を2%の割合に溶解させたのち, それぞれの 25ml ずつを内径 2cm, 長さ 20cm の試験管内に分注, 殺菌して調製した。

培養: これらの斜面上に各菌株を均一に接種し, 26°C のもとに 20 日間放置した。

3) 供試菌体調製法 上記の斜面培養から菌体をはぎ取り, まず 1/10 M KH_2PO_4 水溶液 (pH 4.3) でくりかえし 3 回洗浄し, ついでこれをイオン交換樹脂 IRC-50 (H^+ 型) とともに純水中に浸漬し, そのまま氷冷下に数時間放置して, 菌体内外に残存ないし付着するアルカロイド類をできるだけ除去した。この洗浄菌体は, これを 0.3~0.5cm 角に細切してアルカロイド合成反応実験に供した。

4) 基質およびその精製法 本実験ではペプチド型麦角アルカロイド類の生成に不可欠な基質として, 反応系中に lysergic acids を加えておく必要があったが, 供試のどの菌体にも elymoclavine を lysergic acid に, さらにペプチド型アルカロイド類にまで変換する能力のあることが知られているので^(4,6), 多くの場合, lysergic acids の代りに elymoclavine を基質として用いた。また, 基質環状ジペプチドとしては, 実験に HA-6 株の菌体を用いる場合には L-leucyl-L-proline-lactam およびその異性体 L-leucyl-D-proline-lactam の各結晶を, また HR-3 株の菌体を用いる場合には L-phenylalanyl-L-proline-lactam およびその異性体 L-phenylalanyl-D-proline-lactam の各結晶を, それぞれ Wilzbach 法によってトリチウム化するとともに, 次のようにして精製したものを用いた。すなわち, まず各ラベル体をメタノールに溶解させたのち, 減圧下で溶媒を駆逐し, さらにこの操作を数回くりかえして残存する不安定トリチウムを除去した。ついで, こうして得た各ラベル体を適当な薄層クロマトグラフィーに付し, それぞれを分離, 精製した。

5) ペプチド型アルカロイド合成反応実験 基質環状ジペプチド 8.0×10^8 dpm および elymoclavine 1.0 μmole を pH 7.2 の 1/15 M リン酸緩衝液 5ml とともに Monod の L 型試験管のおのおのにとり, これらに前記の洗浄湿菌体 3~4g ずつを加えてから, すべてを Monod の振盪機にかけ, 28°C のもとで 18 時間振盪して反応を行なわせた。反応終了後は反応混合物に 1% 酒石酸水溶液 5ml ずつを加え, そのまま 2 時間放置して反応を完全に停止させるとともに, 菌体内に浸入したアルカロイドを反応液中に浸出させた。

6) 反応液からアルカロイド分の抽出 上記の反応混合物を菌体と反応液とに濾別し, 菌体はこれを少量の 1% 酒石酸水溶液で洗浄した。ついでこの洗液を濾液と合併し, これをアンモニア水で pH 10 前後とするとともに, エーテルとくりかえしふりまぜて, アルカロイド分をことごとくエーテル中にとった。このエーテル溶液をさらに 1% 酒石酸水溶液とふりまぜて, アルカロイド分を一たん酸液中に転溶させたのち, この溶液をアンモニアアルカリ性下でエーテルとくりかえしふりまぜて, アルカロイド分のすべてをふたたびエーテル中にとった。こうして得たエーテル溶液からエーテルを駆逐し, その残留物を一定量のメタノールに溶解してアルカロイドの

分析に付した。

7) アルカロイドの分析 まず, 上記のメタノール溶液をシリカゲル薄層 (WAKOGEL B-5, 厚さ 250 μ) 上に定量的につけ, クロロホルム-エタノール混液 (10:0.5, v/v) を用いて, また, 二次元展開を行なう場合はこれとアセトン-エタノール混液 (10:1, v/v), またはクロロホルム-ベンゼン-エタノール混液 (8:2:1.6, v/v) とを用いてそれぞれ展開した。次に, この薄層をクロマトグラムラジオスキャンナー (日本無線医理研製 Aloka JTC-201 型) にかける, 各分離像の放射活性を測定したのち, その薄層に, *p*-dimethylaminobenzaldehyde 2 g を濃塩酸 20 ml とエタノール 80 ml との混液に溶解して調製した, いわゆる “Ehrlich 試薬” を噴霧して呈色像を発色させるとともに, これをクロマトグラムスキャンナー (明日香工業製 OZMOR-82 型) にかけて各アルカロイド量を定量した。

実験結果ならびに考察

ここに供試 2 菌株の各菌体により得られた実験結果のうちの代表例をとりまとめて表示すると Table I のごとくである。すなわち, ergokryptine~ergokryptinine

を主要なアルカロイドとして生産しうるハマニシク型 (*Elymus*-type) 菌株の菌体では L-leucyl-L-proline-lactam- ^3H と L-leucyl-D-proline-lactam- ^3H とがともに, 前者の方が後者より明らかによく, ergokryptine~ergokryptinine に取りこまれ, また, ergotamine~ergotaminine を主要なアルカロイドとして生産しうるライムギ型 (*Secale*-type) 菌株の菌体では L-phenylalanyl-L-proline-lactam- ^3H と L-phenylalanyl-D-proline-lactam- ^3H とが, いずれもほぼ同じ程度に ergotamine~ergotaminine に取りこまれるという事実が見出された。もっとも, 基質 L-phenylalanyl-L-proline-lactam- ^3H の ergotaminine への取りこみについては, 使用した基質そのものと生成されたペプチド型アルカロイドとがどの薄層上でもほぼ同じ位置に分別したため, その取りこみ量を測定することができなかったが, いずれにしても, こうして生成された放射性ペプチド型麦角アルカロイド類のうち, L-leucyl-L-proline-lactam- ^3H とその異性体 L-leucyl-D-proline-lactam- ^3H との両者から生成された各活性 ergokryptinine について, さらに L-phenylalanyl-D-proline-lactam- ^3H から生成された活性 ergotaminine についても, それぞれを非放射性

Table I. Incorporation of Radioactive Prolyldiketopiperazines into Peptide-Type Ergot Alkaloids in Intact Mycelia of *Claviceps* Strain

The mycelia were grown at 26°C for 20 days on agar slopes in tubes. The culture medium for strain HA-6 was composed of mannitol (5%), succinic acid (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), NH_4OH to pH 5.2 and agar (2%), and the medium for strain HR-3 was composed of mannitol (5%), glutamic acid (0.8%), KH_2PO_4 (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.03%), NH_4OH to pH 5.4 and agar (2%). Three grams of wet mycelium each was placed in Monod's tube which contained the substrates together with 5 ml of 1/15M phosphate buffer of pH 7.2. Synthetic reactions were allowed to effect in these mixtures for 18 hr at 28°C on a Monod's shaker. From the reaction mixtures, the alkaloids were extracted in the usual way, and subjected to thin-layer chromatography. The radioactivities of the separated alkaloids were determined with a chromatogramradioscanner.

Strain	Substrate	(dpm/tube)	Radioactivity incorporated			
			Ergokryptine	Ergokryptinine	Ergotamine	Ergotaminine
HA-6 (<i>Elymus</i> -type)	L-Leucyl-L-proline-lactam- ^3H **	8.0×10^5	3.2×10^5	4.9×10^5	—	—
	L-Leucyl-D-proline-lactam- ^3H **	8.0×10^5	2.0×10^5	3.1×10^5	—	—
HR-3* (<i>Secale</i> -type)	(as a precursor of D-lysergic acid)					
	L-Phenylalanyl-L-proline-lactam- ^3H **	8.0×10^5	—	—	1.5×10^5	$\times \times \times$ ***
	L-Phenylalanyl-D-proline-lactam- ^3H **	8.0×10^5	—	—	1.4×10^5	2.0×10^5

* Isolated from Hungarian ergot of rye. ** Tritrated by Wilzbach's method.

*** Radioactive substrate interfered with the determination.

の ergokryptinine あるいは ergotaminine とともに分離し、くりかえし精製してみたところ、それらの比放射活性が低下するという事実は認められなかった。すなわち、これにより供試の各菌体において D-proline 構造をもつ環状ジペプチド類も、L-proline 構造をもったそれらとほぼ同程度にまで、同じペプチド型麦角アルカロイド類に取りこまれたことが確認されたが、この事実を Hofmann 一派⁽⁶⁻⁸⁾の、天然ペプチド型麦角アルカロイド類を構成している proline はすべて L-構造のものであるとの知見に照らしてみると、上記の D-proline 構造

をもつ環状ジペプチド類のペプチド型アルカロイドへの取りこみは、供試のジペプチド類が菌体内において一たん L-proline 構造をもつジペプチド類に変換されたのちに行なわれたものであることが容易に理解される。

本実験で見出された以上の事実は、供試 2 種の麦角菌株の一方の菌体では ergokryptine~ergokryptinine が、また他方の菌体では ergotamine~ergotaminine が、それぞれ Fig. 1 に示すような経路で、すなわち、かねてから推定されているとおりの道筋で合成されたものであることを示唆しているものと信じられる。

Fig. 1. Mechanism of Formation of Peptide-Type Ergot Alkaloids.

Fig. 1 で, D-lysergic acid から ergokryptine~ergokryptinine までの一つの間合体として推定された D-lysergyl-L-valine は, ライムギ着生の麦角中にその methyl ester^(9,10) あるいは prolyl-methyl ester⁽¹⁰⁾ としてすでに発見されているところである. 一方 D-lysergic acid と ergotamine~ergotaminine との間の中合体として推定された D-lysergyl-L-alanine は, どの研究者によってもまだ見出されていないが, しかしこのものもまた, 天然において実在し, 単に ergotamine 群ペプチド型アルカロイド類の前駆体としてだけでなく, ergometrine, lysergic acid methylcarbinolamide^(11,12) あるいは ergosecaline⁽¹³⁾ などのような各種麦角アルカロイドの前駆体としての役割をも果しているものと推定される. 事実, Basmadjian ら⁽¹⁴⁾ は最近, lysergic acid と DL-alanine とから化学的に合成した D-lysergyl-L-alanine が, 1 種の麦角菌の培養において ergometrine に変換される事実を見出している.

要 約

麦角菌の菌核および培養物中にペプチド型麦角アルカロイド類とともに見出される含プロリン環状ジペプチド類は, ペプチド型アルカロイド類におけるペプチド部分の前駆体となりうるものであることを明らかにし, ペプチド型麦角アルカロイド類の生成機構に関する推論の一部を裏づけることができた.

終りに, 終始御鞭撻を賜った坂口謹一郎先生に深謝いたします. また本実験に協力下さった高橋治男氏にも厚く感謝します.

- (1) 阿部又三, 福原輝男, 大桃定洋, 堀 正大, 田淵武士: 農化, **44**, 573 (1970).
- (2) S. Agurell: *Acta Pharm. Suecica*, **3**, 71 (1966).
- (3) 大橋 力, 阿部又三: 農化, **44**, 519 (1970).
- (4) 阿部又三, 大和谷三郎, 山野藤吾, 高津嘉春, 山田三郎: 武田研究所年報, **22**, 116 (1963); *Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen*, Fischer-Verlag, Jena, 1965, 19.
- (5) 大橋 力, 青木俊三, 阿部又三: 農化, **44**, 527 (1970).
- (6) P. A. Stadler, A. J. Frey, H. Ott and A. Hofmann: *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1911 (1964).
- (7) W. Schlientz, R. Brunner, P. A. Stadler, A. J. Frey, H. Ott and A. Hofmann: *Helv. Chim. Acta*, **47**, 1921 (1964).
- (8) P. A. Stadler, St. Guttman, H. Hauth, R. L. Huguenin, Ed. Sandrin, G. Wersin, H. Willems and A. Hofmann: *Helv. Chim. Acta*, **52**, 1549 (1969).
- (9) W. Schlientz, R. Brunner and A. Hofmann: *Experientia*, **19**, 397 (1963).
- (10) T. Hohmann and H. Rochelmeyer: *Arch. Pharm.*, **299**, 97 (1966).
- (11) F. Arcamone, C. Bonino, E. B. Chain, A. Ferretti, P. Pennella, A. Tonolo and L. Vero: *Nature*, **187**, 238 (1960).
- (12) F. Arcamone, E. B. Chain, A. Ferretti, A. Minghetti, P. Pennella, A. Tonolo and L. Vero: *Proc. Roy. Soc.*, **B 155**, 26 (1961).
- (13) M. Abe, T. Yamano, S. Yamatodani, Y. Kozu and M. Kusumoto: *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, **23**, 246 (1959); 農化, **34**, 580 (1960).
- (14) G. Basmadjian, H. G. Floss, D. Gröger and D. Erge: *Chem. Commun.*, **1969**, 418.