菌類によるアルカロイドおよび関連物質の生産 (第9報)

トリプトファンから麦角アルカロイド類への生合成経路について

大橋 力, 渋谷直人, 阿部又三

(東京教育大学農学部)

昭和 46 年 9 月 30 日 受 理

Production of Alkaloids and Related Substances by Fungi

Part IX. A Biosynthetic Route from Tryptophan to Ergot Alkaloids

By Tsutomu OHASHI, Naoto SHIBUYA and Matazō ABE

Faculty of Agriculture, Tokyo University of Education

By patient investigations on the methods of cultivation, mycelium disruption, etc., the cell-free systems capable of synthesizing ergot alkaloids could be prepared from the mycelia of two *Claviceps* strains, *Elymus*-type strain HA-6 and *Agropyron*-type strain KK-2.

In these two cell-free systems, tryptophan- ^{14}C as well as 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H were incorporated overwhelmingly into setoclavine. These radioactive substrates were incorporated also into isosetoclavine as well as into lysergene to a minor degree. The radioactive setoclavine each formed by the incorporation of radioactive substrates was isolated with carrier material, recrystallized from methanol, and identified by melting point as well as by thin-layer chromatography. The specific activity of each of the isolates did not change over several recrystallizations.

The repeated experiments with these cell-free systems by means of the "isotopic competition" method revealed that, in the cell-free systems employed, setoclavine (possibly isosetoclavine as well) was biosynthesized from tryptophan in the route of tryptophan $\rightarrow$ 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan $\rightarrow$ lysergene $\rightarrow$ setoclavine. This finding indicates that, at least in the tested two ergot fungi, there exists such a biosynthetic route which suggests that, of the known ergot alkaloids, lysergene is the parent alkaloid.

(Received September 30, 1971)

緒 言

著者ら⁽¹⁻³⁾は、さきに agroclavine, elymoclavine などの主要なクラビン型麦角アルカロイド類とペプチド型麦角アルカロイド類との間の生成上の関係について、セ

ルフリー系のもと, "isotopic competition"^(4,5) の手法によって検討し, 各種麦角アルカロイドが, 互いにここに示すような関係で生合成されるものであることを明らかにした。

さて, これら麦角アルカロイド類の C-8 置換 N-メチルエルゴリン骨格は tryptophan, mevalonic acid および methionine の S-methyl基から合成されるものであるとされている⁽⁶⁻⁸⁾。また, この合成は 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan システムを経て行なわれるものであるということも, 今や定説⁽⁹⁻¹³⁾になっている。しかし, こうし

て合成される種々の麦角アルカロイド類のうちで、最初につくられる“親アルカロイド”がなんであるかについては、それが agroclavine であるとする説⁽¹⁴⁻¹⁶⁾, elymoclavine であるとする説⁽¹⁷⁻²⁰⁾, chanoclavine-(1) であるとする説^(21,22), あるいはこれらのいずれかであるとする説^(23,24) など、区々の説が行なわれていて、定説というものはない。

これらの説は、いずれも“*in vivo*”の条件下で得られた実験結果に基づいて立てられたものであるが、この場合、“*in vitro*”の系で実験を行なってみるならば、上記諸説中のいずれが天然における真の姿をいい当てたものであるかを、明らかにすることができるのではなかろうか。こうした考えから著者らは今回、まず麦角アルカロイド生産性の互いに異なるハマニソク型 (*Elymus*-type) およびカモジグサ型 (*Agropyron*-type) の 2 種の麦角菌株について、それらの培養菌体から麦角アルカロイド合成能を保持したセルフリー抽出液が得られるかどうかを検討してみた。その結果、さき⁽¹⁾の場合とほぼ同様の方法によるならば、供試の 2 菌株のいずれについても tryptophan から、いくつかの麦角アルカロイドを合成しうるセルフリー抽出液を調製することができるという事実を見出し、同時にそのような合成能を強力に保持したセルフリー抽出液を調製するための方法をも設定することができた。次に著者らは、この方法に従って調製した上記 2 種の菌の活性セルフリー抽出液中で、放射能をもたせた tryptophan, mevalonic acid, 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan あるいは 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene* が、麦角アルカロイド類に取りこまれる状態をしらべ、さらにこれら 2 種のセルフリー抽出液を用い、“isotopic competition”の手法によって、麦角アルカロイド合成の道筋を吟味してみた。その結果、供試の各セルフリー液中において、tryptophan からだけでなく、4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan から、1 種の麦角アルカロイド setoclavine (tryseclavine) が圧倒的に多量に合成されるという事実を見出し、さらにここに合成される setoclavine が、tryptophan $\rightarrow$ 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan $\rightarrow$ lysergene $\rightarrow$ setoclavine なる経路でつくられるものであることを見出すことができた。このように本実験では、種々の麦角アルカロイド中で agroclavine あるいは chano-

clavine-(1) などが、“親アルカロイド”として合成されることを示すどのような経路も見出されず、その代りに lysergene が“親アルカロイド”としてつくられることを示唆する 1 つの生合成経路が発見されたが、セルフリー系によって得られた本実験結果は、少なくとも供試 2 種の麦角菌において、このような合成経路の実在することを示しているものと信じられる。

実験および結果

〔I〕 麦角菌菌体から麦角アルカロイド合成能を保持したセルフリー抽出液が得られるかどうかについての検討

実験方法

(1) 供試菌株 i) ペプチド型麦角アルカロイド類 (主として ergokryptine~ergokryptinine) を多量に生産し、同時に agroclavine, elymoclavine などのクラビン型麦角アルカロイド類をも、かなりの量まで生産しうるハマニソク型 (*Elymus*-type) 麦角菌 HA-6 株、および ii) ペプチド型の麦角アルカロイド類を微量にしか生産せず、その代りに agroclavine をはじめ festuclavine, setoclavine (triseclavine) などのクラビン型麦角アルカロイド類を多量に生産しうるカモジグサ型 (*Agropyron*-type) 麦角菌 KK-2 株を選んで用いた。

(2) 菌培養法 供試のどの菌株についても、培地としては、すべてアルカロイド生産に適したいわゆる“*Abe's medium*”およびこれに tryptophan を含有させたものを用い、培養は斜面、静置あるいは振盪の各培養法によって行なった。この場合、培地は次のようにして調製した。すなわち養液としては、すべてマンニット (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 5.4 に調節したものを用い、これを静置と振盪との両培養用としては、300 ml エルレンマイヤーフラスコ内に 50 ml ずつ分注、殺菌して培地とし、斜面培養用としては寒天を 2% の割合で溶解させたのち、直径 2cm, 長さ 20cm の試験管内に 25 ml ずつ分注、殺菌するとともに斜面とした。また、これら培地に tryptophan を含有させるためには、どの場合も殺菌終了後、直ちに L-tryptophan 一定量 (培地中の濃度 0.1~0.5 mM) を無菌的に培地中に添加した。こうして調製した各培地に供試の菌株を均一に接種し、すべてを 26°C のもとで、静置培養の場合は 15~30 日間、斜面と振盪との両培養

* かつて Weygand⁽²⁵⁾により合成され、麦角アルカロイド合成の中間体であろうとされたもの。

の場合には 12~25 日間, それぞれ培養して菌を發育させた。

(3) 菌体破砕法 各培養で發育した菌体を集め, 1/15 M KH_2PO_4 水溶液でくりかえし 3 回洗浄したのち, 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 4 時間放置して, 菌体内外に残存ないし付着しているアルカロイドをできるだけ除去し, ついでその菌体を破砕した。この破砕法としては, さきに著者ら⁽⁴⁾が麦角菌の菌体から麦角アルカロイド変換性を保持したセルフリー抽出液を調製するに当たって, 最も優れた方法であるとしたフレンチプレス処理法をはじめ, 凍結すりつぶし法, アルミナ磨砕法, Potter-Elvehjem ホモジナイザー処理法など多くの方法を取りあげ, 種々の条件のもとで, これらをくり返し試みた。これらの処理によって得られた各種破砕処理物は, これを 6000×g のもとで 30 分間遠心分離して, 菌体碎片をことごとく沈降させ, ついでこの上澄液を採取して, これをセルフリー抽出液として用い, その麦角アルカロイド合成能をしらべた。

(4) アルカロイド合成実験法 セルフリー抽出液の麦角アルカロイド合成能は, 麦角アルカロイド類の前駆体の 1 つとして知られている tryptophan の ^{14}C ラベル体を基質として合成反応を行なわせ, その放射活性の麦角アルカロイドへの取りこみを指標として, 次のようにしてしらべた。すなわち, セルフリー抽出液 (3g の湿菌体から得られた全量), DL-tryptophan-3- ^{14}C (1.1・ 10^7 dpm, 0.1~1.2 μmole), DL-mevalonolactone (1 μmole), L-methionine (1 μmole), 2-mercaptoethanol (70 μmole), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7 μmole), penicillin G (35 unit), および dihydrostreptomycin (7 unit) の混液を Monod の L 型試験管内にとり, これらに 1/15~1/100 M のリン酸緩衝液 (pH 6.8~7.4) を加えて全量を 7 ml とするとともに, すべてを Monod 型振盪機にかけ, 25~30°C のもとで 1~10 時間振盪して反応を行なわせた。反応終了後は, 直ちに反応液に等量 (v/v) の 1% 酒石酸水溶液を添加して反応を停止させた。

(5) 反応液からアルカロイド分の抽出 反応を停止させた上記の液をアンモニア水でアルカリ性とするとともに, 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り, ついでこのエーテル溶液を 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, この溶液をふたた

びアンモニア・アルカリ性下でエーテルとふりまぜて, アルカロイド分のすべてをエーテル中に転溶した。こうして得られたエーテル溶液を乾固するまで濃縮し, その残留物を一定量のメタノールに溶解して分析に付した。

(6) アルカロイド分へ取りこまれた放射活性の測定 上記のようにして得たメタノール溶液の一定量を取り, これを G-M カウンター (日本無線医理研製) にかけて, その放射活性を測定した。

実験結果

適当な培養方法と適当な菌体破砕法とによるならば, 供試 2 菌株のいずれについても, 麦角アルカロイド合成能を保持したセルフリー抽出液を調製しうるものであることが見出された。培養方法についていえば, どの菌株の場合にも, tryptophan を含有させた斜面上で發育した菌体から, 麦角アルカロイド合成能を最も明瞭に示すセルフリー液が得られ, とくに tryptophan を 0.25 mM の濃度に含有させた斜面上に 16 日間程度發育させて得た菌体からは, アルカロイド合成能のきわめて高いものが得られるという事実が知られた。一方, tryptophan を含有させない斜面上で發育した菌体から得たセルフリー液の示すアルカロイド合成能は, いたって微弱であるということ, さらにどの菌の場合も, 静置, 振盪そのいずれの培養で發育した菌体からも, アルカロイド合成能を保持したセルフリー液をうることができないということも知られた。次に菌体破砕法についていえば, フレンチプレス処理法によるときは, 材料として適当な培養条件下で發育させた菌体を用いるかぎり, 供試のどの菌株からも麦角アルカロイド合成能を保持したセルフリー液が得られ, とくに菌体を 1/50 M リン酸緩衝液とグリセリンとの混液 (1:1 v/v, pH 7.2) 中に浸漬し, これをまず 150~200 kg/cm² 加圧下に 1 回, ついで 450~500 kg/cm² 加圧下に 1 回フレンチプレスで処理するときは, 活性の最も高いセルフリー液が得られるという事実が知られた。

また, こうして調製したセルフリー液を用いて, 麦角アルカロイド合成反応を行なわせる際の反応条件としては, 温度 28°C, 反応液の pH 7.2 のもとで 1~3 時間程度振盪しながら反応させると, 最も効果的に目的が達せられるという事実も見出された。

[II] 麦角アルカロイド類の生合成実験

前項の実験結果に基づき, セルフリー系による麦角アルカロイド類の合成実験を行なった。この場合, 基質と

しては DL-tryptophan-3- ^{14}C および DL-mevalonolactone-2- ^{14}C のほか, 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H あるいは 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ^3H などを用い, これらが供試のセルフリー液中で麦角アルカロイド類に取りこまれる状態をしらべた。

実験方法

供試菌株としては, 前項の実験で供試したハマニシク型麦角菌 HA-6 株とカモジグサ型麦角菌 KK-2 株とを用いた。これらを前項の実験結果に基づいて, “Abe's Medium” に tryptophan を 0.25 mM の濃度に含有させた斜面上に, 26°C のもと, 16~17 日間発育させ, 各菌体を 1/50 M リン酸緩衝液とグリセリンとの混液 (1:1 v/v, pH 7.2) 中に浸漬し, フレンチプレスで, まず 150 kg/cm² 加圧下に 1 回, ついで 450 kg/cm² 加圧下に 1 回処理し, この処理物から前項の場合と同様の方法によってセルフリー抽出液を調製し, これをアルカロイド合成実験に供した。なお, 合成実験で基質として用いた 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H および 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ^3H は, それぞれ Plieninger らおよび Weygand らによって化学的に合成された各結晶を, Wilzbach 法によってトリチウム化し, これをまず, くりかえしメタノールに溶解するとともに, 減圧下で溶媒を駆逐して残存する不安定トリチウムを除去し, ついで適当な薄層クロマトグラフィーにかけて精製したのちに供試した。次に麦角アルカロイド合成実験は, 次のようにして行なった。すなわち, i) tryptophan- ^{14}C のアルカロイドへの取りこみをしらべる場合には, セルフリー抽出液 (3 g の湿菌体から得られた全量), DL-tryptophan-3- ^{14}C ($1.1 \cdot 10^7$ dpm, 0.13 μmole), DL-mevalonolactone (1 μmole), L-methionine (1 μmole), 2-mercaptoethanol (70 μmole), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7 μmole), penicillin G (35 unit), および dihydro-streptomycin (7 unit) の混液を Monod の L 型試験管内にとり, これに 1/50 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加えて全量を 7 ml に調製し, ii) mevalonolactone- ^{14}C のアルカロイドへの取りこみをしらべる場合には, この混液の DL-tryptophan- ^{14}C と DL-mevalonolactone との代りに DL-mevalonolactone-2- ^{14}C ($1.1 \cdot 10^7$ dpm, 1.4 μmole) と L-tryptophan (1 μmole) とを加え, また iii) 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H および 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ^3H のアルカロイドへの取りこみをしらべる場合には, 同様に DL-

tryptophan- ^{14}C を加えた上記混液の DL-tryptophan- ^{14}C と DL-mevalonolactone との代りに, 4-(γ,γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H ($1.6 \cdot 10^8$ dpm, 1.0 μmole) あるいは 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ^3H ($1.6 \cdot 10^8$ dpm, 0.3 μmole) を加えて, これらのすべてを Monod 型振盪機にかけ, 28°C のもとで 3 時間振盪して反応を行なわせた。反応終了後は, 直ちに前項の場合と同様, 各反応液に等量 (v/v) の 1% 酒石酸水溶液を添加して反応を停止させ, 各液から前項と同様にしてアルカロイド分を抽出して, これを分析に付した。この分析は次の要領で行なった。すなわち, 各試料をシリカゲル薄層 (吸着剤: WAKOGEL B-5 または B-5 F, 厚さ 250 μ) 上に定量的にスポットし, 溶媒として i) クロロホルム-エタノール混液 (10:1 v/v), ii) アセトン-エタノール混液 (10:1 v/v), および iii) クロロホルム-ジエチルアミン混液 (10:1 v/v) のいずれか 2 種を組み合わせ 2 次元展開を行なったのち, その薄層を, まず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) にかけて, アルカロイド分離像の与える放射活性を測定し, ^{14}C ラベル体を試料とした薄層については, 次にこれをラジオオートグラフィーに付して, 放射活性のアルカロイドへの取りこみを確認し, 最後に各薄層に *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試薬 (Ehrlich 試薬) を噴霧して, アルカロイドの分離像を発色させ, 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, アルカロイドの量を比色定量した。

実験結果

基質として, DL-tryptophan-3- ^{14}C , あるいは DL-mevalonolactone-2- ^{14}C を用いて実験を行なった場合には, 供試の 2 菌株のどのセルフリー系についても, ほぼ同様の結果が得られた。ここに, ハマニシク型麦角菌株 HA-6 株のセルフリー系について得られた一例を取りまとめて表示すると, Table I のごとくである。表からも知られるように, 基質 DL-tryptophan-3- ^{14}C は, 圧倒的に 1 種の麦角アルカロイド setoclavine (triseclavine) へ取りこまれるという事実が見出された。ここに合成された放射性 setoclavine は, 非放射性的の setoclavine をキャリアーとして分離し, 精製したが, その際くりかえし精製しても, その比放射活性は低下しなかった。tryptophan のラベル体は, また isosetoclavine と lyser-

Table I. Examination for Alkaloids Synthesized by Cell-free System of *Elymus*-type Strain HA-6 (I)

Substrate 1.1 · 10 ⁷ dpm/tube	Radioactivity incorporated (dpm/tube)						
	Agro-clavine	Elymo-clavine	Lysergol	Lysergene	Chano-clavine-(1)	Seto-clavine	Isoseto-clavine
DL-Tryptophan-3- ¹⁴ C (0.13 μmole/tube)	— —*	— —*	— —*	— —*	— —*	4.8 · 10 ⁵ ‡*	— +*
DL-Mevalonolactone-2- ¹⁴ C (1.4 μmole/tube)	— —*	— —*	— —*	— —*	— —*	— —*	— —*

* Examined by radioautography after subjecting the chromatograms to two-dimensional chromatography. — : nothing, + : clearly, ‡ : very clearly.

The test strain was grown at 26°C for 16~17 days on agar slope composed of mannitol (5%), succinic acid (0.8%), KH₂PO₄ (0.1%), MgSO₄·7H₂O (0.03%), NH₄OH to pH 5.4, agar (2%) and L-tryptophan (0.25 mM, added aseptically after sterilization). The mycelia thus obtained were collected aseptically, washed three times with 1/15 M KH₂PO₄ solution, and then immersed in water together with IRC-50 (H-type) resin to remove cellular alkaloids. The resulting mycelia were disrupted twice with French press in a small amount of a mixture of 1/50 M phosphate buffer and glycerol (1:1 v/v, pH 7.2) under pressures first, of 150 kg/cm² and next, of 450 kg/cm². The cell debris in the disrupted materials were removed thoroughly by centrifugation at 6000×g for 30 minutes. Reaction mixture was consisted of cell-free extract (all amount prepared from 3 g of wet mycelium), DL-tryptophan-3-¹⁴C (1.1 · 10⁷ dpm, 0.13 μmole), DL-mevalonolactone (1 μmole), DL-methionine (1 μmole), 2-mercaptoethanol (70 μmole), MgSO₄·7H₂O (7 μmole), penicillin G (35 unit), dihydrostreptomycin (7 unit) and 1/50 M phosphate buffer of pH 7.2 to a total volume 7 ml. When DL-mevalonolactone-2-¹⁴C was applied as a substrate, 1.1 · 10⁷ dpm (1.4 μmole) of the labelled mevalonolactone and 1 μmole of non-labelled tryptophan were mixed instead of the labelled tryptophan and non-labelled mevalonolactone. Each mixture thus prepared was placed in a Monod's L-type tube. Synthetic reactions were allowed to effect at 28°C for 3 hr on a Monod's shaker, and stopped by the addition of 1 part by volume of a 1% aqueous solution of tartaric acid. 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.

Table II. Examination for Alkaloids Synthesized by Cell-free System of *Elymus*-type Strain HA-6 (II)

Substrate* 1.6 · 10 ⁸ dpm/tube	Radioactivity incorporated (dpm/tube)						
	Agro-clavine	Elymo-clavine	Lysergol	Lysergene	Chano-clavine-(1)	Seto-clavine	Isoseto-clavine
4-(γ, γ-Dimethylallyl)-tryptophan- ³ H** (1.0 μmole/tube)	—	—	—	>10 ³	—	6.1 · 10 ⁵	>10 ³
1-(β-Indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ³ H*** (0.3 μmole/tube)	—	—	—	—	—	?	—

* Tritirated by Wilzbach's method.

** The original material was kindly supplied by Dr. H. Plieninger.

*** The original material was kindly supplied by Dr. F. Weygand.

Each reaction mixture was consisted of cell-free extract (all amount prepared from 3 g of wet mycelium), labelled substrate (1.6 · 10⁸ dpm, 0.3~1.0 μmole), DL-methionine (1 μmole), 2-mercaptoethanol (70 μmole), MgSO₄·7H₂O (7 μmole), penicillin G (35 unit), dihydrostreptomycin (7 unit) and 1/50 M phosphate buffer of pH 7.2 to a total volume 7 ml. Other experimental methods and conditions were the same as described in the place of Table I.

gene とへも、微量ながら取りこまることが見出されたが、しかしこれら以外のどの種のアルカロイドへも、取りこまれる事実が確認されなかった。一方、基質 DL-mevalonolactone-2-¹⁴C は、すべての実験を通じて seto-clavine を始め検討したかぎりのどの種のアルカロイドへも、ほとんど取りこまらなかった。この事実は、実施

の実験条件のもとでは、供試した mevalonic acid が十分に活性化されるに至らないことを示しているものと解される。

次に基質として 4-(γ, γ-dimethylallyl)-tryptophan-³H, あるいは 1-(β-indolyl)-2-amino-5-methylhexene-³H を用いて行なった実験においても、供試の 2 菌株の

セルフリー系について、ほぼ同様の成績が得られた。ここに、ハマニシク型麦角菌 HA-6 株のセルフリー系について得られた一例を取りまとめて表示すると、Table II のごとくである。すなわち、基質 4-(γ, γ -dimethylallyl)-tryptophan- ^3H は、tryptophan のラベル体と全く同様、圧倒的に setoclavine に取りこまれるという事実が見出された。これに対して、基質 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene- ^3H は、検討したかぎりのどの種のアルカロイドへも明瞭には取りこまれず、この物質が麦角アルカロイド類合成の中間体であろうとする説に対して否定的な Plieninger ら⁽¹⁰⁾その他⁽¹²⁾の見解を裏付けうる結果が得られた。

〔III〕 “Isotopic competition” 実験

前項の実験で供試した 2 種のどのセルフリー系においても、放射活性をもたせた tryptophan および 4-(γ, γ -dimethylallyl)-tryptophan が、圧倒的に setoclavine へ取りこまれるという事実が見出されたが、このような従来全く考えられていなかった事実を確かめるため、著者らは次にセルフリー系のもと “isotopic competition” の手法によって、くりかえし実験を行なってみた。

実験方法

アルカロイド合成反応は、すべて前々項で見出された最適反応条件下で行なわれたが、この場合セルフリー系としては、前項で供試したと同じ 2 種のものを用い、アルカロイド合成の基質としては、tryptophan のラベル体を用いた。また合成実験は、次のようにして行なった。すなわち、セルフリー抽出液 (3 g の湿菌体から得られた全量)、DL-tryptophan- ^3H (1.1 $\cdot$ 10⁷ dpm, 0.13 μ mole)、DL-mevalonolactone (1 μ mole)、L-methio-

nine (1 μ mole)、2-mercaptoethanol (70 μ mole)、MgSO₄·7H₂O (7 μ mole)、penicillin G (35 unit)、dihydrostreptomycin (7 unit) および追加非放射性物質 (1 μ mole) の混液を Monod の L 型試験管内にとり、これらに 1/50 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) を加えて、全量を 7 ml とするとともに、すべてを Monod 型振盪機にかけ 28°C のもとで 3 時間振盪して反応を行なわせた。反応終了後は前項の場合と同様、各反応液に等量 (v/v) の 1% 酒石酸水溶液を添加して反応を停止させるとともに、アルカロイド分を抽出して、これを分析に付した。

実験結果

供試 2 種のどのセルフリー系についても、ほぼ同様の成績が得られた。ここに、カモジグサ型麦角菌 KK-2 株のセルフリー系について得られた代表的な一例を取りまとめて表示すると、Table III のごとくである。本表か

Table III. Effect of Supplemental Clavine Alkaloids and 4-(γ, γ -Dimethylallyl)-tryptophan on Incorporation of Labelled Tryptophan into Setoclavine in Cell-free System of *Agropyron*-type Strain KK-2

Substrate	Supplement 1.0 μ mole/tube	Radioactivity incorporated into setoclavine
DL-Tryptophan- ^3H 1.1 $\cdot$ 10 ⁷ dpm/tube (0.13 μ mole)	none	5.7 $\cdot$ 10 ⁴
	agroclavine	5.7 $\cdot$ 10 ⁴
	elymoclavine	5.8 $\cdot$ 10 ⁴
	lysergol	5.7 $\cdot$ 10 ⁴
	lysergene	4.6 $\cdot$ 10 ⁴
	chanoclavine-(1)	5.9 $\cdot$ 10 ⁴
	4-(γ, γ -dimethylallyl)-tryptophan	4.2 $\cdot$ 10 ⁴

Each reaction mixture was consisted of cell-free extract (all amount prepared from 3 g of wet mycelium), DL-tryptophan- ^3H (1.1 $\cdot$ 10⁷ dpm, 0.13 μ mole), supplements (1 μ mole), DL-mevalonolactone (1 μ mole), DL-methionine (1 μ mole), 2-mercaptoethanol (70 μ mole), MgSO₄·7H₂O (7 μ mole), penicillin G (35 unit), dihydrostreptomycin (7 unit), and 1/50 M phosphate buffer of pH 7.2 to a total volume 7 ml. Other experimental methods and conditions were the same as described in the place of Table I.

Fig. 1. A Biosynthetic Route from Tryptophan to Ergot Alkaloids.

ら明らかのように, 供試2種の各セルフリー系においては, 追加した6種の非放射性物質のうち, agroclavine, elymoclavine, lysergol および chanoclavine-(1) が, いずれも基質 tryptophan-¹⁴C の setoclavine への取りこみに, なんらの影響も与えないのに対して, lysergene と 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan とは, 明らかにその取りこみを抑制するという事実が見出された。ここに見出された事実は, 本実験条件下において合成される setoclavine (および isosetoclavine) が, tryptophan から順次 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan システムおよび lysergene を経て, つくられるものであることを明示している。すなわち, これにより供試2種のセルフリー系において, 各種麦角アルカロイド中で最初に合成される“親アルカロイド”は, lysergene であるとの事実を示唆する Fig. 1 に示すような1つの生合成経路のあることが発見されたが, elymoclavine, agroclavine あるいは chanoclavine-(1) が, “親アルカロイド”として合成されるどのような経路も全く見出されなかった。

要 約

ハマニソニク型およびカモジグサ型の各麦角菌菌体から, 麦角アルカロイド合成能を保持したセルフリー抽出液を調製することに成功するとともに, これら2種のセルフリー液中で tryptophan からだけでなく, 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan から, setoclavine が圧倒的に多量に合成されるという事実を見出し, かつここに合成される setoclavine が, 各種麦角アルカロイド中で最初に合成されるものは lysergene である, との事実を示唆する tryptophan $\rightarrow$ 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan $\rightarrow$ lysergene $\rightarrow$ setoclavine なる経路でつくられるものであることをも見出した。

終りに, 本研究に当り終始御鞭撻を賜った坂口謹一郎先生に深甚の謝意を表します。また 4-(γ , γ -dimethylallyl)-tryptophan および 1-(β -indolyl)-2-amino-5-methylhexene の各試料それぞれを御恵与くださった H. Plieninger 博士, および故 F. Weygand 博士に厚く

感謝します。

- (1) 大橋 力, 阿部又三: 農化, **44**, 519 (1970).
- (2) 大橋 力, 青木俊三, 阿部又三: 農化, **44**, 527 (1970).
- (3) 大橋 力, 飯村 稔, 阿部又三: 農化, **44**, 567 (1970).
- (4) P. H. Abelson, E. T. Bolton and E. Aldous: *J. Biol. Chem.*, **198**, 165 (1952).
- (5) P. H. Abelson: *ibid.*, **206**, 335 (1954).
- (6) K. Mothes, F. Weygand, D. Gröger and H. Grisebach: *Z. Naturforsch.*, **13 b**, 41 (1958).
- (7) D. Gröger, K. Mothes, H. Simon, H. G. Floss and F. Weygand: *ibid.*, **15 b**, 141 (1960).
- (8) R. M. Baxter, S. I. Kandel and A. Okany: *Chem. Ind.*, **1961**, 1453.
- (9) H. Plieninger, R. Fischer and V. Liede: *Angew. Chem.*, **74**, 430 (1962).
- (10) *idem*: *Liebigs Ann. Chem.*, **672**, 223 (1964).
- (11) S. Agurell: *Acta Pharm. Suecica*, **3**, 11 (1966).
- (12) J. E. Robbers and H. G. Floss: *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 967 (1968).
- (13) S. Agurell and J. E. Lindgren: *Tetrahedron Letters*, **1968**, 5127.
- (14) S. Agurell and E. Ramstad: *ibid.*, **1961**, 501; *Arch. Biochem. Biophysics*, **98**, 457 (1962).
- (15) R. M. Baxter, S. I. Kandel, A. Okany and K. L. Tam: *J. Amer. Chem. Soc.*, **84**, 4350 (1962).
- (16) H. Plieninger: *Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol.*, **3**, 387 (1966).
- (17) 阿部又三, 山野藤吾, 楠本 貢, 大和谷三郎, 高津嘉春: 武田研究所年報, **18**, 1 (1959).
- (18) 大和谷三郎, 阿部又三: 農化, **34**, 246 (1960).
- (19) H. Rochelmeyer: *Dtsch. Apotheker Ztg.*, **101**, 1384 (1961).
- (20) T. Hohman and H. Rochelmeyer: *Arch. Pharmaz.*, **299**, 97 (1966).
- (21) D. Gröger, D. Erge and H. G. Floss: *Z. Naturforsch.*, **21 b**, 827 (1966).
- (22) H. G. Floss, U. Hornemann, N. Schilling, D. Gröger and D. Erge: *Chem. Commun.*, **1967**, 105.
- (23) M. Abe: *Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Chem. Geol. Biol.*, **3**, 393 (1966).
- (24) 阿部又三, 大和谷三郎, 山野藤吾: 農化, **41**, 72 (1967).
- (25) F. Weygand, H. G. Floss and U. Mothes: *Tetrahedron Letters*, **1962**, 873.