異担子菌酵母における接合管形成誘導物質に関する化学的研究

(昭和 55 年度農芸化学奨励賞受賞)

神谷 勇 治, 坂 神 洋 次*

(理化学研究所, *東京大学農学部)

微生物の性制御因子に関する化学的研究は、活性物質が微量成分であるために、最近の目覚ましい単離技術の進歩と構造解析法の発展によって初めて可能になってきたと言える。1960年代になると、水カビやケカビの仲間から、その有性生殖過程を制御するホルモンとして *sirenin*, *antheridiol*, *trisporic acids* が相ついで単離され、その化学構造が決定された⁽¹⁻³⁾。これらは、いずれも藻状菌に属するカビの性制御因子で、ステロイドやテルペン骨格をもつ物質である。ついで、1970年代に入ると子のう菌に属する代表的酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から接合制御物質が単離され、オリゴペプチドであることが明らかにされた⁽⁴⁻⁶⁾。

一方、担子菌の仲間の接合制御物質に関しては、早くからその存在が示唆されていたにもかかわらず、化学的な解明には至っていなかったが著者らの研究によって、初めてその物質の本体が明らかにされ、脂溶性側鎖をもつオリゴペプチドであることがつきとめられた。

さて、担子菌のなかには、異担子菌と呼ばれる一連の菌があり、このなかに植物に寄生する黒穂病菌やサビ病菌、そして食用のキクラゲなどが含まれる。異担子菌の一倍体世代は単細胞のいわゆる酵母型で、2種類の接合型がある。単一の接合型だけでは出芽法により増殖するが、適合する接合型の菌が近づくとき情報物質の交換が起り、接合管形成が誘導される。この接合管形成誘導物質の化学構造の解明は、有性生殖における細胞分化の制御機構を研究するうえにきわめて重要である。この接合管形成誘導物質の化学的研究は、二つのグループによって

独自に進められ、理研の神谷らは、黒穂病菌に近い赤色酵母 *Rhodosporidium toruloides* から *rhodotorucine A* を、東大の坂神らは白キクラゲ *Tremella mesenterica* から *tremmerogen A-10* を単離し、構造決定した。

Rhodotorucine A と *tremmerogen A-10* は、ともに脂溶性の高いペプチドで、カルボキシル末端 (C末端) に S-アルキルシステインを持つ点で共通している。最近、藤野らによって、類縁体が合成され、構造と活性の間の興味深い事実が明らかにされた。本総説では、初めに、これら2種の接合管形成誘導物質の単離、構造決定ならびに代謝などをおのおの述べ、最後に両接合管形成誘導物質の合成類縁体の生理活性から、活性発現に必要な化学構造について言及する。

I. *Rhodosporidium toruloides* の接合管形成誘導物質

不完全菌に含まれていた赤色酵母 *Rhodotorula glutinis* の生活史は、1965年、坂野によって明らかにされ、*Rhodosporidium toruloides* と命名された⁽⁷⁾。この菌には、2種類の接合型があり *A* と *a* で示される。阿部らは、この菌が接合する際に、酵母型から菌糸状に著しく形態変化を起すことに興味をもち、接合の初期過程の逐次的変化を調べた。彼らは *A* 型細胞が *a* 型細胞の接合管形成を誘導する低分子物質を培養液中に分泌することを発見し、*A factor* と名付けた^(8,9)。神谷らは、この *A factor* の単離、構造決定に着手し⁽¹⁰⁾、以下に述べる構造を明らかにし、*rhodotorucine A* と命名した⁽¹¹⁾。

(i) *Rhodotorucine A* の単離

Rhodotorucine A は脂溶性に富むペプチドで、*A* 型細胞の培養濾液から容易に *n*-ブタノールで抽出される。粗抽出物から Sephadex LH-20 を用いた12段階の精製を行って、1.6mg の *rhodotorucine A* を 300l の培養濾液から単離した⁽¹²⁾。*Rhodotorucine A* は Sephadex LH-20 のカラムにおいて、メタノール・水系の溶媒を用

† Chemical Study on Hormone Inducing Mating Tube Formation in Heterobasidiomycetous Yeasts.

Yuji KAMIYA (The Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351)

Youji SAKAGAMI (Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo Tokyo 113)

図 1 Rhodotorucine A による *a* 型菌の接合管形成. A(-), B(+), bar=100 μ m (阿部恵子博士の好意による)

いて溶出すると、担体に可逆的に吸着され、溶出位置が遅れてくる。この現象は水の比率を増加させると強調され、効率の良い精製法となった。その後、Sephadex LH-20 のカラムから 60% メタノールで溶出された活性区分を 4°C で一夜放置すると、rhodotorucine A が沈殿することを見出し、図 2 で示すように、初めの精製法より約 5 倍の好収率で、しかも、純度の高い rhodotorucine A を得ることに成功した。純粋な rhodotorucine A は 4~8 ng/ml の濃度で *a* 型菌の接合管形成を誘導する⁽¹³⁾。

(ii) Rhodotorucine A の化学構造

Rhodotorucine A は種々のペプチド検出試薬に反応する。塩酸加水分解と UV 吸収スペクトルから rhodotorucine A には、Arg, Asp, Glu, Gly, Ile, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 各 1 モルが含まれることが示された⁽¹²⁾。さらに塩酸加水分解で、上記のアミノ酸以外に少量の (Cys)₂ が検出されたので、rhodotorucine A には酸加水分解で分解して、(Cys)₂ を与える部分構造の存

Culture filtrate of *A* cells (300 liters)
↓
Extracted with *n*-BuOH
↓
Partitioned between benzene-MeOH-H₂O
(10 : 8 : 2)
↓
Gel filtration on Sephadex LH-20 with MeOH
↓
Gel filtration on Sephadex LH-20 with MeOH-buffer^a (7 : 3)
↓
Countercurrent distributions (9 transfers) with
n-BuOH-benzene-MeOH-buffer^a (4 : 1 : 1 : 2)
↓
Gel filtration on Sephadex LH-20 with MeOH-buffer^a (7 : 3)
↓
Gel filtration on Sephadex LH-20 with MeOH-buffer^a (6 : 4)
↓
Precipitation at 4°C
↓
Reprecipitation from MeOH-H₂O (6 : 4)
↓
Rhodotorucine A (7.3 mg)

図 2 Rhodotorucine A の精製法. ^a 0.01 M ammonium acetate, pH 7.0

在が示唆された⁽¹¹⁾。

Rhodotorucine A のアミノ酸配列の決定は、ダンシル-エンドマン分解法⁽¹⁴⁾と微量の直接エンドマン分解法⁽¹⁵⁾を併用し、さらにアミノペプチダーゼ M による酵素水解を行って、アミノ末端 (N 末端) より 10 残基のアミノ酸配列を以下のように求めることができた^(16,17)。

Tyr-Pro-Glu-Ile-Ser-Trp-Thr-Arg-Asn-Gly-X

Rhodotorucine A をトリプシンで酵素水解すると、Arg の C 末端側で切断が起り、もとのペプチドの N 末端を含む水溶性の octapeptide (Tr-1) と C 末端を含む脂溶性の tripeptide (Tr-2) を与えた。Tr-1 は、さらに α -キモトリプシン、サーモリシンを用いて 3 つのフラグメントに切断し、各フラグメントのアミノ酸分析とマスマスペクトルの解析から、上記のアミノ酸配列の正しいことを確認した。

Tr-2 は水に難溶で、*n*-ブタノールで容易に抽出されるため、アミノ酸以外に脂溶性残基の存在が示唆された。Tr-2 を塩酸加水分解すると、Asp, Gly と少量の (Cys)₂ を与えたことから、C 末端の未知脂溶性アミノ酸は Cys の誘導体と考えられた。Tr-2 の 100 MHz, FT-PMR は、フェルネシル残基に特徴的な吸収 δ 1.60 (6H, S), δ 1.66 (6H, S), δ 2.0 (8H), δ 5.0~5.3 (3H) を示し、未知アミノ酸にフェルネシル残基が含まれることを示した^(11,18)。さらに Tr-2 メチルエステルを無水酢

酸と重無水酢酸 (d_0) の 1:1 の混合物でアセチル化した誘導体の CI-MS を測定すると、図 3 に示すようなマススペクトルを与えた。アセチル化した N 末端を含むフラグメントは、3 m. u. 異なる二重線として現われ、C 末端から由来する通常のピークと容易に区別できる。二重線のうち、 m/e 157(160), 214(217), 332(335), 536(539) はおのおの $[\text{Ac-Asn}]^+$, $[\text{Ac-Asn-Gly}]^+$, $[\text{Ac-Asn-Gly-Cys-OMe}]^+\text{H-NH}_3$, $[\text{Ac-Asn-Gly-Cys(S-farnesyl)-OMe}]^+\text{H-NH}_3$ と説明される。さらに m/e 69, 137, 205, 239 の各ピークは C 末端の S-ファルネシル基に由来すると思われる。高分解能マススペクトルから、Tr-2 中にイオウ原子が含まれることが証明され、CI-MS のフラグメンテーションの帰結の正しいことが証明された。以上の結果から、Tr-2 の構造を Asn-Gly-Cys(S-farnesyl) と推定し、合成により確認した⁽¹⁹⁾。

側鎖の部分の幾何異性については、PMR のケミカルシフトから全トランスと推定したが、合成した *trans-trans*-farnesylcysteine の PMR と Tr-2 の PMR のメチル基の吸収が微妙に異なることから、分解反応による側鎖の確認を試みた。

Rhodotorucine A の分解に先だち、モデル化合物として S-geranylcysteine と S-nerylcysteine を合成し、ヨウ化メチルを用いた側鎖の分解を行った。その結果、側鎖の S のとなりの二重結合がシス体とトランス体では、分解物の種類と量比に差があることが GC-MS の

測定により明らかとなった。そこで、rhodotorucine A を同様の条件で分解し、分解物の GC-MS の解析から側鎖のファルネシル基は全トランスと決定した⁽²⁰⁾。Tr-1 と Tr-2 の構造を合わせることににより、rhodotorucine A の構造は図 7 に示すように決定された^(11,18,19)。

Rhodotorucine A の合成は、藤野らによって行われた^(21,22)。Trp を含むため合成は困難であったが、液相法により C 末端に Cys をもつ undecapeptide を合成し、臭化ファルネシルと反応して、rhodotorucine A を合成した。合成された rhodotorucine A は、天然物と全く同一の生理活性を有し、しかも、種々の酵素水解によっても天然品と同様のペプチドフラグメントを与えたことから、構造の正しいことが確認された⁽²²⁾。

(iii) Rhodotorucine A の α 型細胞による代謝

Rhodotorucine A を含む培地中に α 型菌を入れ数日間培養すると、培養液中の rhodotorucine A 活性は消失する⁽²³⁾。これは rhodotorucine A が α 型細胞に吸着されたか、または α 型細胞によって不活性物質に変化させられたかのいずれかである。そこで rhodotorucine A のゆくえを調べるために放射活性をもつ rhodotorucine A を培養法により調製し、 α 型細胞による代謝実験を行った。 $[\text{S}^{35}]$ cystine, $[\text{C}^{14}]$ arginine, $[\text{H}^3]$ tyrosine によってラベルされた rhodotorucine A の α 型菌による代謝物は、高速液体クロマトグラフィーや薄層クロマトグラフィーによって明らかにされ、rhodotorucine A が

図 3 Ac-Tr-2-OMe の CI-マススペクトル

図4 Rhodotorucine A の α 型菌による代謝と接合の初期過程

きわめて短時間のうちに Tyr-Pro-Glu-Ile-Ser-Trp-Thr-Arg と Asn-Gly-Cys(S-farnesyl) の二つのフラグメントに分解されることがわかった。ファルネシル側鎖の切断は起らず、分解は proteolytic と言える。注目すべきことは、この分解物が rhodotorucine A をトリプシン処理して得られるものと全く同一である点である。 α 型細胞の培養濾液や A 型菌の培養液中では、同一時間内で、rhodotorucine A は分解されなかったの、この分解は α 型菌に特異的に存在する細胞表層の酵素によるものと考えられる⁽²⁴⁾。この α 型菌による rhodotorucine A のすみやかな不活性化が、接合過程においてどのような意味をもつかは、今後の研究によらねばならない。

II. *Tremella mesenterica* の接合管形成誘導物質

T. mesenterica の子実体は白キクラゲとして知られ

ており、その生活環は図5に示すとおりである。有性世代は酵母状の単細胞で、AB, Ab, aB, ab の4種の接合型がある。それぞれの細胞は出芽により増殖するが、Aとaの因子をもつ細胞が共存すると、互いに接合管を出して接合する。このうちBとbとの組合せが成立するときには、二核菌糸を形成して生活環が進行する⁽²⁵⁾。Bandoni は接合管の形成が、A型菌とa型菌の間で、互いに相手方の菌が分泌する物質により誘導されることを報告している⁽²⁶⁾。Reid は、この物質の精製を試みたが、単離することはできなかった⁽²⁷⁾。坂神は、*T. mesenterica* のA型菌 (IFO 9310) が生産し、a型菌 (IFO 9313) に接合管形成を誘導する物質の単離・構造決定を意図して研究を行い、本物質が以下に述べるような構造を有することを明らかにし、tremerogen A-10 と命名した。

(i) Tremerogen A-10 の単離

生物検定法は、Reid の方法を改良して行い、被験試料にa型菌を加えて 26°C, 16 時間培養した。被験液には、約 10^8 /ml のa型細胞が含まれ、その約 30% に接合管が形成された場合を(+)と判定した。被験試料の比活性は(+)の活性を示す最低濃度で表わした。A型菌の培養は 200l のタンクに 100l の培地を入れ、25°C, 42 時間行った。培養濾液は、約 10l に濃縮し、表1に示すような10段階からなる方法で精製し、tremerogen A-10 を単離した⁽²⁸⁾。Tremerogen A-10 は、ブタノールだけでは抽出されにくい、各種のクロマト用担体に対し異常な吸着を示した。たとえば Amberlite XAD-7

図5 *T. mesenterica* の生活環

表 1 Tremmerogen A-10 の精製法

Purification step	Yield (mg)	Specific activity ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Culture filtrate (100 liters)	1,440,000	575
Amberlite XAD-7	231,000	118
Extraction with <i>n</i> -BuOH-EtOH	12,000	5.9
Fractogel PGM-2000	6,000	3.0
Amberlite XAD-2	3,000	1.6
SP Sephadex C-25	75	0.043
Merckogel OR-6000	36	0.024
Fractogel PGM-2000		
with 80% MeOH	8	0.009
with 80% MeOH-AcOH(99:1)	4.9	0.005
with 80% MeOH-AcOH(94:6)	1.8	0.002
with MeOH-H ₂ O-AcOH (85:5:10)	1.0	0.001

の場合には、活性物質はエタノールだけでは完全に溶出されないが、硫酸マグネシウムを添加すると、完全に溶出された。また精製における最終の4段階では、Fractogel PGM-2000を用い、水、メタノール、酢酸の比率を変えることにより活性区分の溶出位置を変化させて、効率の良い精製を行うことができた。構造決定に用いた試料は、以上の培養と精製を繰り返し行うことにより得た。

(ii) Tremmerogen A-10 の構造決定

Tremmerogen A-10 は、プロナーゼなどのタンパク分解酵素により失活することから、ペプチド性の物質であると考えられたので、酸加水分解してアミノ酸組成を調べた。その結果アミノ酸のモル比は、Cysを除き非常に良い整数値を示し、tremmerogen A-10 は、Ala(1), Asp(2), Cys(1), Glu(1), Gly(2), His(1), Pro(2), Ser(1), Tyr(1) の12個のアミノ酸残基から成ること判明しがた。なおCysは、(Cys)₂が0.37モル比検出されたことから1残基存在するものと推定した。UVスペクトルの測定からTrp残基は存在しないことが明らかになった。

Tremmerogen A-10 のアミノ酸配列順序の決定は、ダンシル-エドマン法により行った。またGlu, Asp, Asnについては、直接エドマン法を併用して同定した。その結果N末端より11残基のアミノ酸配列を決定し、アミノ酸分析の結果と合わせて以下のように、12残基のアミノ酸配列を決定した⁽²⁹⁾。なお各種酵素による失活試験の結果から、C末端は修飾されていると推定された。

H-Glu-His-Asp-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys

しかしながら、この構造では tremmerogen A-10 のクロマト用担体に対する異常な吸着性を説明することはできない。またCysの-SH基が精製過程で、安定に存在するとは考えにくいので、C末端部分についてさらに検討した。

Tremmerogen A-10 は、-SH基修飾剤による処理や、メルカプトエタノールによる還元では、生物活性を保持する。一方、過ギ酸で酸化すると完全に失活するが、電気泳動で無処理のものと同じ挙動を示した。以上の結果から tremmerogen A-10 中には、Cysや(Cys)₂は存在せず、Cysの-SH基が、なんらかの基により修飾されている可能性が強いと考えられた。そこで tremmerogen A-10 のPMRスペクトルを測定したところ、ペプチド鎖に由来しないと考えられる吸収が観測された(図6a)。 δ 3.8(3H, S)の吸収は、メチルエステルの存在を示唆しており、このメチルエステルは、ペプチドのC末端あるいは、Cysの-SH基に結合した側鎖部分に存在すると考えられた。一方、 δ 1.6~1.8(3H $\times$ 3, S)の吸収は、イソプレノイド様の構造に含まれるオレフィニックメチル基に由来するものと推定され、側鎖部分は、イソプレノイド様の構造を有すると予想された。

そこで tremmerogen A-10 をヨウ化メチルで処理して、側鎖部分とペプチド鎖部分を切断分解することを試

図 6 (a) Tremmerogen A-10 の FT-PMR スペクトル, (b) ヨウ化メチル処理した tremmerogen A-10 の FT-PMR スペクトル. 100 MHz (D₂O containing 0.2% formic acid)

表 3 Tremerogen A-10 の合成類縁体とその生物活性

H-Glu-His-Asp-Pro-Ser-Ala-Pro-Gly-Asn-Gly-Tyr-Cys(S-R)-X									
E H D P S A P G N G Y C									
Compound No.	Peptide part	X	Lipophilic part (R)	Specific activity (ng/ml)					
(A)									
1.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C (Tremerogen A-10)	OCH ₃		1					
2.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂	H	> 10,000					
3.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	OCH ₃	H	> 10,000					
4.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		4					
5.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	OCH ₃		8					
6.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	OH		1,000					
7.	E-H-D-P-S-A-P-G-D*-G-Y-C	NH ₂		4,000					
8.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		64					
9.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂	S-	16					
10.	H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		> 10,000					
11.	D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		> 10,000					
(B)									
12.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		> 10,000					
13.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		500					
4.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		4					
14.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		1/8					
15.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		1/16					
16.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		2					
17.	E-H-D-P-S-A-P-G-N-G-Y-C	NH ₂		500					
D* : β-OMe-Asp									

ブチドと予想され、その化学構造の相異が興味深い⁽³⁵⁾。

III. *R. toruloides* と *T. mesenterica* の 接合制御物質の構造と活性

Rhodotorucine A と tremerogen A-10 の類縁体の合成は、藤野、北田らによって行われた^(21,22,33,34)。表 2 と表 3 に合成類縁体とその生理活性を示した。Rhodotorucine A と tremerogen A-10 との間には交差性はなく、互いに他の菌の接合管形成を誘導しない⁽³⁶⁾。

Rhodotorucine A と tremerogen A-10 の C 末端のファルネシル側鎖の無い類縁体は全く活性を示さないことから、脂溶性側鎖は活性発現に重要である。興味あることに tremerogen A-10 の類縁体でファルネシル基より isoprene unit の長い側鎖をもつ類縁体は、天然の tremerogen A-10 より強い活性を示し、さらに長くなると活性は強くなる。しかし側鎖の isoprene unit が 6 個を越えると、活性は低下する。また脂溶性側鎖であれば、必ずしも isoprenoid である必要は無く、アルキル

図 8 Rhodotorucine A (A), tremmerogen A-10 (B), α factor (C), LH-RH (D) の構造類似性

スルフィドやアルキルジスルフィド結合でも活性を示した。

N末端およびC末端付近のアミノ酸配列はとくに重要で, rhodotorucine A や tremmerogen A-10 で N 末端のアミノ酸が一つ少ないものは活性が激減した。さらに rhodotorucine A で C 末端の S-farnesylcysteine の無いものは, 全く不活性であった。また, glycine に長いアルキルアミンをつけた誘導体も全く活性を示さなかった。

Rhodotorucine A の末端のカルボキシル基は遊離型であり, これをアミドでブロックすると活性が無くなる。一方, tremmerogen A-10 はメチルエステルで保護されており, これがアミドに交換されても, ほとんど tremmerogen A-10 と同様の強い活性を示す。Tremmerogen A-10 の C 末端カルボキシル基は遊離型のものは活性が弱く, rhodotorucine A の場合とは異なる。以上の結果をまとめてみると

(1) 活性発現にはアミノ酸配列が重要であり, それは種によって特異的である。

(2) 側鎖の脂溶性残基は活性発現に必須であるが, 必ずしも構造に厳密性は要求されない。ある程度の脂溶性があればよい。

(3) C末端のカルボキシル基は種によって異なる。Rhodotorucine A では遊離型であり, tremmerogen A-10 ではメチルエステルである。

さて, 藤野は図 8 で示すように, *R. toruloides*, *T. mesenterica*, *S. cerevisiae* の接合制御物質が類似した部分構造をもち, さらにこれが哺乳類のホルモン LH-RH とも似ていることを指摘している⁽²²⁾。これらの接合制御物質が, とともに自分に適合する接合型の菌の DNA 合成を阻害する点で共通した生物活性を有していること

から, この仮説はきわめて興味深い。現段階でこれらの類似性について推論するのは困難である。今後の研究により近縁の菌から接合制御物質を単離, 構造決定し, 多数の類似体を合成することができれば, 構造活性相関がさらにくわしく明らかにされると思われる。

最後に本研究を進めるにあたり, ご指導を賜った, 東京大学田村三郎名誉教授, 高橋信孝教授, 鈴木昭憲教授, 福井作蔵教授, 理化学研究所副主任研究員桜井成博士ならびに武田薬品化学研究所藤野政彦博士, 北田千恵子女史に深く感謝いたします。また酵母の大量培養をしてくださいました協和醸造東京研究所 (*R. toruloides*) ならびに, 科研化学株式会社 (*T. mesenterica*) にお礼申し上げます。

- (1) L. Machalis, W.H. Nutting and H. Rapoport: *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 1674 (1968).
- (2) T. C. McMorris and A. W. Barksdale: *Nature*, **215**, 320 (1967).
- (3) L. Caglioti, G. Cainelli, B. Camerino, R. Mondelli, A. Prieto, A. Quilico, T. Salvatori and A. Selva: *Tetrahedron*, **7**, 175 (1966).
- (4) D. Stötzler, H. H. Kiltz and W. Duntze: *Eur. J. Biochem.*, **69**, 397 (1976).
- (5) A. Sakurai, S. Tamura, N. Yanagishima and C. Shimoda: *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 395 (1977).
- (6) T. Tanaka, H. Kita, T. Murakami and N. Narita: *J. Biochem. (Tokyo)*, **82**, 1681 (1977).
- (7) I. Banno: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 167 (1967).
- (8) K. Abe, I. Kusaka and S. Fukui: *J. Bacteriol.*, **122**, 710 (1975).
- (9) 阿部恵子: 化学と生物, **12**, 613 (1975).
- (10) Y. Kamiya, K. Yamamoto, A. Sakurai, S.

- Tamura, K. Abe and S. Fukui : *Proc. Jpn. Acad.*, **51**, 571 (1975).
- (11) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya, S. Fukui, C. Kitada and M. Fujino : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **83**, 1077 (1978).
- (12) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, K. Abe, E. Tsuchiya and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1099 (1977).
- (13) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya and S. Fukui : *ibid.*, **42**, 1239 (1978).
- (14) B. S. Hartley : *Biochem. J.*, **119**, 805 (1970).
- (15) K. D. Kulbe : *Anal. Biochem.*, **59**, 564 (1974).
- (16) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 209 (1978).
- (17) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, K. Abe, E. Tsuchiya, S. Fukui and M. Fujino : "Peptide Chemistry," ed. T. Shiba, Protein Research Foundation, Osaka, 1977, p.152.
- (18) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, E. Tsuchiya, K. Abe and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 363 (1979).
- (19) 神谷勇治ら : 第 21 回天然有機化合物討論会要旨集, 1978, p.104.
- (20) Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura and N. Takahashi : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1049 (1979).
- (21) C. Kitada, M. Fujino, Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, E. Tsuchiya, K. Abe and S. Fukui : *Experientia*, **35**, 1275 (1979).
- (22) C. Kitada, M. Fujino, E. Tsuchiya, K. Abe, S. Fukui, Y. Kamiya, A. Sakurai, S. Tamura, N. Takahashi, Y. Sakagami, A. Isogai and A. Suzuki : "Peptide Chemistry," ed. N. Izumiya, Protein Research Foundation, Osaka, 1978, p.195.
- (23) E. Tsuchiya and S. Fukui : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 473 (1979).
- (24) Y. Kamiya, A. Sakurai and N. Takahashi : *ibid.*, **94**, 855 (1980).
- (25) R. J. Bandoni : *Can. J. Bot.*, **41**, 467 (1963).
- (26) R. J. Bandoni : *ibid.*, **43**, 627 (1965).
- (27) I. D. Reid : *ibid.*, **52**, 521 (1974).
- (28) Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, E. Tsuchiya and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1093 (1978).
- (29) Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, E. Tsuchiya and S. Fukui : *ibid.*, **42**, 1301 (1978).
- (30) W. C. Jones, Jr., T. M. Rothgeb and F. R. N. Gurd : *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3875 (1975).
- (31) R. G. Lewis, D. H. Gustafson and W. F. Erman : *Tetrahedron Lett.*, **1967**, 401 ; K. C. Chan, R. A. Jewell, W. H. Nutting and H. Rapport : *J. Org. Chem.*, **33**, 3382 (1968).
- (32) Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, S. Tamura, C. Kitada and M. Fujino : *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2643 (1979).
- (33) Y. Sakagami, A. Isogai, A. Suzuki, C. Kitada and M. Fujino : "Peptide Chemistry," ed. N. Yonehara, Protein Research Foundation, Osaka, 1979, p.1.
- (34) M. Fujino, C. Kitada, Y. Sakagami, A. Isogai, S. Tamura and A. Suzuki : *Naturwissenschaften*, **67**, S.406 (1980).
- (35) 吉田 充, 坂神洋次, 磯貝 彰, 鈴木昭憲 : 日本農芸化学会昭和 55 年度大会講演要旨集, 1980, p.196.
- (36) E. Tsuchiya and S. Fukui : *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 1089 (1978).