ノート

[*Nippon Nôgeikagaku Kaishi*
Vol. 57, No. 5, pp. 453~456, 1983]

Hypomyces aurantius の生産する ペプチド型麦角アルカロイド

大和谷三郎, 山本功男*
(神戸女子短期大学, * 武田薬品中央研究所)

昭和 57 年 8 月 23 日 受 理

Peptide-Type Ergot Alkaloids Produced by *Hypomyces aurantius*

Saburô YAMATODANI and Isao YAMAMOTO*
Kobe Women's Junior College, 2-23-1
Nakayamate-dori, Chuo-ku, Kobe 650
* Central Research Laboratories, Takeda
Chemical Industries Ltd., 2-17-85 Juso-
Honmachi, Yodogawa-ku, Osaka 532

Five ergot alkaloids were obtained in crystal-line forms from the culture broth of *Hypomyces aurantius*. They were shown to be identical in physioco-chemical properties with clavine-type ergot alkaloids agroclavine, elymoclavine and chanoclavine and with peptide-type ergot alkaloids ergokryptine and ergokryptinine.

The isolation of peptide-type ergot alkaloids has never been reported from the culture broth of a fungus other than *Claviceps* species. Our study demonstrates that *Claviceps* and *Hypomyces* have a close chemotaxonomical relationship.

(Received August 23, 1982)

麦角菌に特異的な生産物であると考えられていた各種のエルゴリン誘導体, すなわち麦角アルカロイドが, 麦角菌以外の糸状菌によっても生産されることは, すでによく知られた事実となっている^(1~5). しかし, それらのほとんどは chanoclavine, agroclavine など, いわゆるクラビン型に属する水溶性の麦角アルカロイドであって, ペプチド型に属する麦角アルカロイドの生産を確認した事実については未だ報告されていない.

Sallam ら^(6,7) は *Rhizopus* 属, *Aspergillus* 属, *Geotricum* 属に属する糸状菌の培養物中に, ergosine ~ergosinine あるいは ergokryptine~ergokryptinine

が存在することを薄層クロマトグラフィーの結果から推論しているが, それらを結晶状に単離, 同定するまでには至っていない.

著者ら⁽⁸⁾は, さきに約 1000 種の糸状菌株についてアルカロイド生産性を検討したが, これらのなかにペプチド型麦角アルカロイドを疑わせるものの存在を認めたものの, 明らかにペプチド型麦角アルカロイドを生産すると断定できる菌株は見出すことができなかった.

その後, 引き続いて多くの糸状菌についてアルカロイド生産性を吟味していたところ, 著量のペプチド型麦角アルカロイドを生産していると思われる 2, 3 の菌株を見出すに至った. そのうちの 1 株 *Hypomyces aurantius* Tul. (IFO 7773) は, その培養物中に数種の麦角アルカロイドを生産しており, それらのうちの 1 つは明らかにペプチド型麦角アルカロイドであると断定できるものであった.

今回本菌株の大量培養を試み, 本菌株が生産する各アルカロイドの抽出, 分離および同定を行った. その結果, 供試 *Hypomyces aurantius* の培養物中から agroclavine, elymoclavine, chanoclavine などのクラビン型麦角アルカロイドのほかに, ペプチド型麦角アルカロイドである α -ergokryptine および α -ergokryptinine をも結晶として単離, 同定することができた.

Hypomyces aurantius のアルカロイド生産性

Table I に示した 3 種の培地 (pH 5.6) を用い, 振盪培養には 2l 容坂口フラスコに 500 ml を, 静置培養には 500 ml 容ルウの培養瓶に 250 ml を分注, 殺菌し, それぞれに *Hypomyces aurantius* Tul. (IFO 7773) を接種した. これらを培養温度 24°C の下, 振盪培養では 14 日間, 静置培養では 21 日間培養を続け, 7 日目ごとに培養液の pH とアルカロイド生成量を測定した. アルカロイド量は Allport-Cocking 試薬を用いる比色定量法⁽⁹⁾により chanoclavine として算出した.

培養結果は Table II に示したとおりで, 培地 B がアルカロイド生産に最も適していると判断することができる. また 14 日間の培養では静置培養と振盪培養との間にアルカロイド生成量の著明な差が認められないものの, 静置培養のほうにやや生産性良好の傾向が見られ, 培養時間の延長は静置培養のアルカロイド生成量を著増することができる. この現象は麦角菌をも含め, 糸状菌による麦角アルカロイド生産に見られる共通のものである.

Table I. Composition of Media

Component	Medium A	Medium B	Medium C
Mannitol	3.0%	—%	—%
Glucose	1.0	5.0	5.0
Succinic acid	1.0	1.0	1.0
Corn steep liquor	0.2	—	—
Malt extract	—	0.5	—
KH ₂ PO ₄	0.1	0.1	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.03	0.03	0.03

Adjust to pH 5.6 with NH₄OH.

Table II. Effect of Media and Culture Conditions on Alkaloid Productivity

Culture method and time	Shaking culture		Surface culture	
	7 days	14 days	14 days	21 days
Medium A				
pH	5.3	5.0	5.5	5.6
Dry mycelia mg/ml	5.4	5.9	13.0	28.7
Alkaloids γ /ml	8.7	44.0	61.0	135.0
Medium B				
pH	5.5	5.5	5.8	5.7
Dry mycelia mg/ml	3.8	7.2	7.9	13.0
Alkaloids γ /ml	22.0	108.0	89.0	147.0
Medium C				
pH	5.5	5.4	5.6	5.7
Dry mycelia mg/ml	3.9	4.6	5.7	11.5
Alkaloids γ /ml	10.3	59.0	64.0	125.0

Hypomyces aurantius の生産する麦角アルカロイドの抽出

前述のように静置培養のほうが、アルカロイド生産効率は高いが、大量培養の便宜上からタンク培養法を選んだ。

まず、種培養として培地 B を 2l 容坂口フラスコに 500 ml ずつ分注、殺菌したもの 2 本を用意し、これに *Hypomyces aurantius* を接種して 24°C で 7 日間振盪培養した。

次に 50l 容醸酵タンクに培地 B を 30l 仕込み、滅菌、冷却後、さきの種培養 2 フラスコ分 (1l) を添加接種して 24°C で 2 日間通気攪拌培養し、前培養とした。

本培養は 200l 容醸酵タンクを用い、マルトエキスを 0.1% に減量した培地 B 100l を仕込み、滅菌冷却後、前培養液 10l をこれに接種した。培養は通気量 30%/min, 100 rpm, 24°C の条件で 114 時間通気攪拌して行

Fig. 1. Thin-Layer Chromatogram of Fractions by Counter-current Distribution. Solvent system: CHCl₃-MeOH, 9:1. Detection: color given by 0.2% solution of *p*-dimethylaminobenzaldehyde in diluted hydrochloric acid.

った。

培養終了後の pH は 5.9, 総アルカロイド量は 54 γ /ml (chanoclavine に換算) であった。この培養物を吸引濾過して湿菌体 6.6 kg と培養濾液 53.3l を得、菌体は適当量の 0.1 N H₂SO₄ を加えて攪拌し、菌体に含まれている塩基性物質を溶出した。この溶出液を培養濾液と合併し、アンモニア水でアルカリ性としたのち、2分の1量ずつの酢酸エチルで 2 回抽出した。

こうして得られた酢酸エチル溶液を芒硝で脱水したのち、減圧下で 150 ml まで濃縮したところ、この濃縮液中には 2.4 g の総アルカロイド (chanoclavine として) が含有されていた。また、この濃縮液を薄層クロマトグラフィーにかけたところ、少なくとも A, B, C, D, E, F, G および H と仮称する 8 種類のインドール陽性物質が存在することが認められた (Fig. 1 参照)。

各アルカロイドの分離および同定

前記で得た酢酸エチル濃縮液の全量について、500 ml 容分液ロート 20 本を使用し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 5.1) および酢酸エチル 150 ml ずつを用いる 向流抽出

Table III. Physico-Chemical Properties of Alkaloids from *Hypomyces aurantius*

Alkaloid	mp (dec.)	$[\alpha]_D^{20}$ ($c=1.0$)	Formula	Identification
A	239~40°	+408.6° (CHCl ₃)	C ₃₂ H ₄₁ O ₅ N ₅	ergokryptinine
B	212~3°	-185.5° (CHCl ₃)	C ₃₂ H ₄₁ O ₅ N ₅	ergokryptine
C	204~5°	-145.8° (CHCl ₃)	C ₁₆ H ₁₈ N ₂	agroclavine
F	247~8°	-143.0° (pyr.)	C ₁₆ H ₁₈ ON ₂	elymoclavine
H	209~10°	-231.0° (pyr.)	C ₁₆ H ₂₀ ON ₂	chanoclavine-I

法⁽¹⁰⁾を行った。

向流抽出後、各分液ロートに分配されているアルカロイドの種類と量的関係を薄層クロマトグラフィーで確認し、全体を5分画とした。すなわち、分液ロートの1~2, 3~8, 9~10, 11~15 および 16~20 の内容物をそれぞれ合併、抽出、濃縮し、画分 I, II, III, IV および V とした。各画分の含有アルカロイドは Fig. 1 の薄層クロマトグラムに示したとおりである。

各画分に含有されているアルカロイドは、濃縮または乾涸することにより、ひとまず粗結晶または粉末状物質として分離した。すなわち、画分 I からはアルカロイド A および B の粉末状混合物 3.4 g を、画分 II からアルカロイド C の針状結晶 630 mg、画分 III からアルカロイド C, D および F の粉末状混合物 240 mg、画分 IV からアルカロイド F のプリズム状結晶 340 mg、画分 V からはアルカロイド H の針状結晶 180 mg を、それぞれに得ることができた。

画分 I から得たアルカロイド A, B の混合物は、これをベンゼンに溶解させ濃縮することによって、アルカロイド A のみを針状結晶として 480 mg 得た。次いでこの母液を再び濃縮、乾涸したのち、シリカゲルを酢酸エチルに懸濁して充填したカラムにより、酢酸エチルとアセトンの混合溶媒を展開剤とするカラムクロマトグラフィーに付した。

まず試料を酢酸エチルに溶解してカラムに注入し、酢酸エチル-アセトン、8:2 (v/v) の混合溶媒で展開すると、アルカロイド A が溶出してくる。この画分からアルカロイド A の針状結晶が 96 mg 得られた。

次にアセトンを増量した 7:3 (v/v) の比率の展開剤に変えてアルカロイド B を溶出した。この画分からはアルカロイド B 120 mg を黄褐色粉末として分離した。なお、Fig. 1 に示した呈色像のうち、D, E および G の3物質は微量のため、これらを単離することはできなかった。

このようにして分離したアルカロイドのうち、A およ

び B がペプチド型麦角アルカロイドに属することは容易に推察できたが、どの種のものであるかを確かめるため、両者の少量を用いて酸およびアルカリ加水分解を前処理とするペーパークロマトグラフィー⁽¹¹⁾を行った。その結果、酸加水分解物はプロリンとロイシンとを与え、アルカリ加水分解物は dimethylpyruvic acid を与えることを確かめた。このことは、アルカロイド A および B が、それぞれ α -ergokryptinine と α -ergokryptine であることを示している。

また結晶状に分離したアルカロイド C, F および H はペーパークロマトグラフィーでの挙動から、容易にそれぞれが agroclavine, elymoclavine および chanoclavine I であることも推測することができた。

これら5種のアルカロイドを再結晶し、それぞれの融点、旋光度、元素分析値ならびに紫外部および赤外部吸収スペクトルを測定し、標品試料の示すそれらと直接比較したところ、いずれも推定どおりの麦角アルカロイドが示すものと完全に一致した。Table III に測定結果を要約表示した。

今回著者らは、初めて麦角菌以外の糸状菌 *Hypomyces aurantius* の培養物からペプチド型麦角アルカロイドに属する ergokryptine および ergokryptinine を結晶状に単離し、麦角菌以外の糸状菌にもペプチド型麦角アルカロイドを生産する菌株のあることを実証することができた。一方、この菌株 *Hypomyces aurantius* は分類学的には麦角菌すなわち *Claviceps* 属菌と同じように、*Ascomycotina*-*Pyrenomycetes*-*Sphaeriales* に属しているという事実が認められる。これら2つの事実から考えると、*Hypomyces* 属が morphological にも chemotaxonomical にも、*Claviceps* 属ときわめて近縁の関係にあることを示すものと思われる。

本研究に対し種々のご便宜を与えていただいた武田薬品工業株式会社専務取締役大村栄之助博士ならびに種々ご助言を賜った玉川大学農学部教授阿部又三博士に深甚

の謝意を表します。また供試菌株をご供与くださった財団法人発酵研究所に対し厚く感謝いたします。

- (1) W. A. Taber and L. C. Vining : *Can. J. Microbiol.*, **4**, 611 (1958).
- (2) J. F. Spilsburg and S. Wilkinson : *J. Chem. Soc.*, 2085 (1961).
- (3) 山野藤吾, 岸野和之, 大和谷三郎, 阿部又三 : 武田研究所年報, **21**, 95 (1962).
- (4) S. L. Agurell : *Experientia*, **20**, 25 (1964).
- (5) 阿部又三, 大桃定洋, 大橋 力, 田淵武士 : 農化, **43**, 575 (1969).
- (6) L. Sallam, El-pefai, H. Abdel-Monem and N. Naim : *Jpn. J. Microbiol.*, **13**, 218 (1969).
- (7) El-pefai, H. Abdel-Monem, L. Sallam and N. Naim : *Jpn. J. Microbiol.*, **14**, 91 (1970).
- (8) 阿部又三, 大和谷三郎, 山野藤吾, 高津嘉春, 山田三郎 : 農化, **41**, 68 (1967).
- (9) 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).
- (10) 大和谷三郎 : 農化, **34**, 584 (1960).
- (11) 田中邦喜, 須川利男 : 薬学雑誌 **72**, 620 (1952).