111° の無色針状結晶 (I) を得. 収量 3.1 g. 約 0.23%. isoimperatorin の標品と混融して融点降下を示さない. $C_{16}H_{14}O_4$ 計算値 C 71.10, H 5.22, 実験値 C 71.13, H 5.47.

1959 年 9 月中旬熊本県宇土郡三角町で採集した成熟果実 350 g を同様に処理し, (I) を 2.5 g. 約 0.71% の好収量で得た.

5-Methoxy-8-hydroxypsoralen 和歌山県産果実のフラクシオン (A) を真空蒸留に付し, bp₁ 160~200° (浴温) の黄色主留分 (結晶性昇華物混在) を得. これに少量の Et₂O を加え暫時放置後, 結晶性物質を浮取, 再結晶ならびに真空昇華を反復し, mp 210~212° の黄色結晶状粉末少量を得. byak-angelicin から製した 5-methoxy-8-hydroxypsoralen と混融して融点降下を示さない.

Umbelliferone の検出 フラクシオン (B) を前報¹⁾と同様の方法でペーパークロマトグラフィーならびに浮紙電気泳動にかけ, Rf=0.73, 泳動値+66 mm に青紫色スポットを認め, 同時に実験を行なつた umbelliferone の標品に一致した.

本研究に際し isoimperatorin の標品をいただいた京都薬科大学松野隆男博士, 元素分析を担当された京大元素分析センター岩田, 馬野, 堀内氏等ならびに赤外吸収スペクトルを測定された京大薬学部分析化学教室町田, 内田両氏, および原料採集に便宜を与えられた熊本大学薬学部 宮野成二博士ならびに和歌山県西牟婁郡串本町大島京大農学部附属植物園 谷 徳市氏に深謝致します.

京都大学薬学部

UDC 547.978.1 : 581.134 : 582.675.1

今関和泉, 小根山隆祥, 田島宮男: ベルベリンの生合成 (第1報^{*1}) オウレンによる
DL-Tyrosine[2-¹⁴C] からベルベリンへの Incorporation について

Izumi Imaseki, Ryukichi Oneyama, and Miyao Tajima: On the Incorporation
of DL-Tyrosine[2-¹⁴C] into Berberine in *Coptis japonica* MAKINO.

(Tsumura Laboratory^{*2})

Schöpf and Robinson have earlier proposed the hypothesis that protoberberine-type alkaloid (I) is biosynthesized from two moles of β -(3,4-dihydroxyphenyl)-L-alanine (DOPA) (II) and 1 mole of formaldehyde. The present series of experiments were therefore carried out to see if tyrosine took part in biosynthesis of berberine (III), using *Coptis japonica* MAKINO as the test plant. The plant was cultivated hydroponically in Houghland solution containing DL-tyrosine[2-¹⁴C], each component was separately extracted, and their specific radioactivity was measured. It was thereby found that berberine was comparatively well-labeled but there was no radioactivity in the side-chain carbons and this fact showed that berberine was not labeled uniformly. The radioactivity was also found in glucose, a metabolite of tyrosine, and its formation was greater than that of berberine, the secondary metabolite.

(Received April 21, 1960)

プロトベルベリン型アルカロイド (I) に属するものにはベルベリン, パルマチン, コリダリン等数十種にのぼり, そのうちには薬物として極めて重要なものがある. そしてこれらのアルカロイドは高等植物のうちキンボウゲ科, メギ科, ツズラフジ科, ケン科等に広く分布存在している. この種のアルカロイドの生合成機作については今迄多くの説が出されているが, そのなかでも Schöpf¹⁾ は DOPA (II) 2 分子とホルムアルデヒド 1 分子とから下式の反応経路にしたがつて生成されるであろうと推論している.

^{*1} 第 80 回日本薬学会年会で発表 (1960). 本報投稿後 E. Ramstad 等もフェニルアラニン[2-¹⁴C]からベルベリンにインコーポレートされることを認め報告している. cf. J. L. Beal, E. Ramstad: Naturwiss. 47, 206(1960).
^{*2} Kamimeguro 8-Chome, Meguro-ku, Tokyo.

1) C. Schöpf: Angew. Chem. 50, 797(1937).

また同様に Robinson²⁾, Woodward³⁾ 等も有機化学的見地からこの経路があるであろうと理論づけている. しかしながら実際に高等植物体内でこのような生合成反応が行なわれているかどうかについては未だ確実な証明は出されていない. そこで著者等は DOPA と構造の近いアミノ酸であるチロシンが果してペルペリン (III) の生合成に直接関与しているか否かを究明するべくオウレンを供試植物として放射性チロシンを用いて実験を試みた結果二,三の知見を得たのでその詳細を報告する.

実験方法

1) 供試植物ならびにその水耕栽培法: 東京都調布市仙川町, 津村薬草園で栽培生育中のセリバオウレン *Coptis japonica* MAKINO の 2~3 年生のものを 1959 年 6 月 4 日に掘りとり, そのうち 5 株を選び, その地下部をオーレオマイシンの 100 ppm 溶液に浸漬後十分に水洗した後 Table I に示された水耕液に 1 株, 200 cc ずつの割合で地下部を浸し 6 月 6 日より 25 日

迄の 19 日間ドラフト中, 蛍光灯下で水耕栽培を行なつた. この間に吸収ならびに蒸散した水耕液量は 550 cc でこれは最初投与した量の約 55% に相当する.

Table I. Components of Hydroponic Solution (mole)

KNO ₃	5×10 ⁻³	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	2×10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	1×10 ⁻³	DL-Tyrosine[2- ¹⁴ C]	4×10 ⁻⁴
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	2×10 ⁻³	(Total activity, 0.2 mc	
Minor elements	Trace	(Specific activity, 0.5 mc/mM)	

in 1 L. of distilled water: pH 6.5

水耕終了後直ちに十分に水洗し, 赤外線ランプで乾燥して根および根茎 19.0 g を得た. これよりペルペリン, チロシンおよびグルコースを抽出しそれぞれの比放射能をしらべた. なおペルペリンはさらにこれを HI 酸ならびに 20% H₂SO₄ で加熱分解しその側鎖の炭素についても放射能の有無をしらべた.

2) ペルペリンの抽出ならびに分解: i) ペルペリンの抽出: さきに報告⁴⁾したクロマト法を若干改良して抽出, 精製を行なつた. すなわち乾燥した根および根茎 19.0 g を MeOH で抽出, 抽出液の MeOH を留去しそれに水を加えて加温. 冷後濾過しその濾液に 20% KI 液を加えよくかきまぜて微アルカリ性とし加温して沈殿を完全に

2) R. Robinson: "Structural Relation of Natural Products," 87 (1955) Oxford.

3) R.B. Woodward: Angew. Chem. 68, 13 (1956).

4) 今関, 小根山: 植研 33, 334(1958).

溶解させ Na_2SO_4 で脱水後その MeOH 溶液を Al_2O_3 を充填したカラムに通して MeOH で展開する。最初に出してくる黄色の部分を集め、これより MeOH を留去し、 $\text{Et}_2\text{O} \cdot \text{MeOH}$ (6 : 4) 混液に溶解し、これに $\text{CaHPO}_4 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{ハーフスーパースセル}$ (7 : 3 : 3) 混合のクロマトカラムを用いて同混液で再び展開する。流出してくる鮮黄色の部分を取り Et_2O および MeOH を留去し残留物に水を加えて $60 \sim 70^\circ$ に加温し、その半量の Me_2CO を加えた後 10% NaOH 液を加えて微にアルカリ性としよくふりまぜ再び $50 \sim 60^\circ$ に加温した後一夜放置してアセトンベルベリンの結晶を析出させる。再結を繰り返して結晶 25 mg (収率 0.12%) を得た。Rf 0.70 ($\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 2)) さえた黄色で紫外線下ではあざやかな黄緑色。

ii) ベルベリンの HI 酸による分解：上記のアセトンベルベリン 13 mg をとり Byerrum 等⁵⁾ が行なつた方法に準じてメトキシル基の炭素を HI 酸 ($d=1.7$) で加熱分解し MeI となし、これを triethylmethylammonium iodide として分離した。収量 7.8 mg (収率 49%)。Rf 0.52 ($\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 2))。triethylmethylammonium iodide の標品は Rf 0.50。いずれもドラージェンドルフ試液で特有の赤茶色に呈色する。

iii) ベルベリンの 20% H_2SO_4 による分解：アセトンベルベリン 9 mg をとり Kirkwood 等⁶⁾ が行なつた方法にしたがつて 20% H_2SO_4 で加熱分解しそのメチレンジオキシ基をホルムアルデヒドとしこれを formaldimedone として分離した。収量 2.6 mg (収率 39%)、mp 187° 。

3) チロシンの分離：ベルベリンを抽出したのこの組織 2 g を 10% HCl で 15 hr 油浴上で加水分解。分解後濾過し濾液を Amberlite IR-45 (R-OH 型) のカラムに通す。流出液をさらに pH 4.7 に bufferize した Amberlite IRC-50 のカラムに展開すると、この展開液中には中性アミノ酸のフラクションが得られる。この溶液を減圧濃縮し、その濃縮液の一部を 10×40 cm の沓紙を用いて $\text{BuOH} \cdot \text{AcOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (4 : 1 : 2) で一次元上昇法によるペーパークロマトグラフィーを行なう。Rf 0.40~0.45 のチロシンの位置に相当する部分を切り取り、その沓紙片を熱湯で約 30 min 抽出。抽出液を一定量としこれをチロシンの比放射能測定のための検液とした。なおこの検液を再びペーパークロマトグラフィーにかけてチロシンのみであることを確認。また検液中のチロシン量は Udenfriend 等⁷⁾ の方法にしたがつて比色定量した。すなわち、チロシンを 1-nitroso-2-naphthol および HNO_3 で黄赤色に発色させこれを $430 \text{ m}\mu$ で測定した。

4) グルコースの分離：チロシンの抽出に用いたものと同じ組織 2 g を 5% HCl で 6 hr 油浴上で加水分解。分解後濾過した濾液を Amberlite IR-45 (R-OH 型) のカラムに通し Cl^- イオンを吸着除去する。流出液をさらに IR-120 (R-H 型) に通すとその液は強酸性となる。これを再び IR-45 (R-OH 型) および IRC-50 (R-H 型) を交互に用いて中性の水溶液を得。この溶液を減圧下で濃縮しその一部をとり前記チロシンの場合と同様の操作でペーパークロマトグラフィーを行なう。このものはアンモニア性硝酸銀試液で Rf 0.24 および 0.30 の 2 スポットを認める。そしてグルコースに相当する Rf 0.20~0.24 の部分を切り取りその沓紙片を熱湯で約 30 min 抽出。抽出液を一定量としこれをグルコースの比放射能測定に用いた。なおこの検液を再びペーパークロマトグラフィーによりグルコースであることを確認したがそのほかにも極めてわずかに Rf 0.30 に相当する糖が混入していること、またアミノ酸は全く存在しないことを認めた。検液中のグルコース量は Somogyi-Nelson 法⁸⁾ にしたがって比色定量した。すなわち銅試薬のグルコースによる還元で生じた Cu_2O をヒ素モリブデン酸アンモニウム試液で青色に発色させこれを $530 \text{ m}\mu$ で測定した。

5) 比放射能の測定：ベルベリンおよびその分解物については各一定重量に対する放射能から自己吸収の補正を行ない、またチロシン、グルコースの場合は infinite thickness level でそれぞれの比放射能を求めた。また測定には Nuclear-Chicago Corp. の Model 186 Imperial Scaler および同 Model D-47 Gas Flow Counter で Q ガスを使用した。

実験結果ならびに考察

以上の実験方法にしたがつて得られたそれぞれの比放射能は Table II の通りである。

ベルベリンには割合によく標識されておりこれは他のこの種のアルカロイド生合成の実験例からしても比較的

5) S. A. Brown, R. U. Byerrum : J. Am. Chem. Soc. **74**, 1523(1952).

6) M. Sribney, S. Kirkwood : Nature **171**, 931(1953).

7) S. Udenfriend, J. R. Copper : J. Biol. Chem. **196**, 227(1952).

8) M. Somogyi : Ibid. **160**, 61, 74(1945).

Table II. Specific activity

	c. p. m./mM	Incorporation ratio (%) ^{a)}
Berberine acetone	0.98×10^4	0.08
Triethylethylammonium iodide	0	0
Formaldimedone	0	0
Tyrosine	1.21×10^7	100
Glucose	2.32×10^4	0.19

^{a)} Radioactivity (%) of the compounds calculated on the basis of activity of tyrosine.

よく標識されているといえる。またメトキシル基ならびにメチレンジオキシ基の炭素に放射能が認められないことからベルベリンの側鎖の炭素には入らず、その骨核内に ^{14}C がとりこまれており分子全体に overall に標識されていないことを明らかにした。したがって投与した $[2-^{14}\text{C}]$ チロシンが完全に酸化されて $^{14}\text{CO}_2$ となり、このものが再吸収されて生成したのではないことを認めた。

また加水分解して得られたチロシンには極めて高い放射能を認めた。これは最初投与した $[2-^{14}\text{C}]$ チロシンの 6~7% がこの部分にとりこまれていることになる。

グルコースにはベルベリンの約 2.5 倍強い放射能が認められたがそれは次式の如くチロシンからアセト酢酸を経てグルコースにまで変わつたものと考えられ、すでに動物ならびに細菌^{9,10)} においてはこの代謝経路が立証されているが高等植物においても同様の代謝があるものと思われる。

以上の諸結果からチロシンの代謝を観察すると、直接そのままのかたちで蛋白質にとりこまれる割合が最も高く、それ以外には一部酸化されてアセト酢酸およびフマル酸となつて生活代謝に直接関係のある糖や有機酸等の一般常成分にかわつてゆくが、ベルベリンのような二次的代謝物への移りかわる割合はそれよりも少ないことを知つた。

終りに本研究を行なうにあたり御懇篤なる御指導を賜つた東京大学薬学部 柴田承二教授ならびにその機会を与えられ且つ御援助を賜つた社長 津村重舎氏、専務取締役 津村重孝氏および研究所 佐々木一郎氏に厚く感謝致します。放射能測定は東京大学薬学部において行なつたもので、併せて謝意を表します。

津村研究所

9) S. Weinhouse, R.H. Millington: J. Biol. Chem. **175**, 995(1948).

10) D.M. Greenberg, et al.: Ibid. **190**, 245(1951).