

氏 名 (本籍) おお 大 はし 橋 つとむ 力

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 1 3 6 号

学位授与年月日 昭和 5 0 年 9 月 1 1 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学位論文題目 麦角アルカロイドの生合成に関する研究

論文審査委員 (主 査)

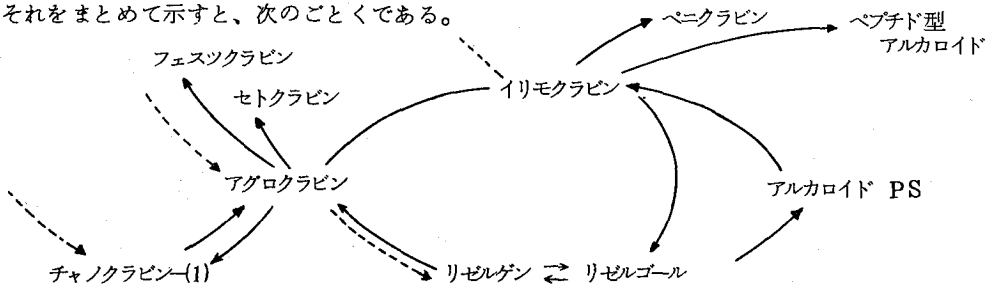
教授 高 橋 甫 教授 志 村 憲 助

教授 松 田 和 雄

論文内容要旨

緒言

阿部らはさきに、種々の麦角アルカロイドが、化学的処理により、あるいは麦角菌その他の微生物によってどのように変換されるかをしらべ、その結果に基づいて、麦角アルカロイドが天然においてどのような経路で合成されるかということについて、総合的な推論を行なった。ここにそれをまとめて示すと、次のごとくである。



本研究は、この説がもっぱら化学的変換と、微生物体そのものが示すかなり不明瞭な変換作用とに基づいて推定された仮説にすぎないことから、これが果して生体内で各アルカロイドが合成される際の実際の道筋をいい当てたものであるかどうかを、"in vitro"の系で確かめてみることを主な目的として行なったものである。

I 麦角菌の菌体からアグロクラビンおよびイリモクラビンに対して変換性を示すセルフリー系の調製^①

まず、麦角菌について果して麦角アルカロイド変換活性を保持したセルフリー抽出液が得られるものかどうかを検討した。この種の試みは Tyler らによっていち早く企てられ、その後 Agurell あるいは Jindra らその他多数の研究者によっても実施されたが、しかしどの研究者もその目的を達成するに至らなかった。こうした実情から、著者はこの検討に当り、供試菌株としてハマニンニク型、カモジグサ型などの麦角アルカロイド生産性が互いに異なる5種の麦角菌を選び、またアルカロイド変換性は、アグロクラビンからイリモクラビンへの変換活性、およびこの反応と同様に重視されているイリモクラビンからペプチド型麦角アルカロイド類への変換活性を始め、種々の変換性に着目して、長期にわたり実験を多角的に進めた。すなわち、供試の各菌株を種々の条件のもとで培養し、発育時期の異なる種々の菌体を現在考えうる様々の方法で破碎してセルフリー抽出液を調製し、各セルフリー液の基質アルカロイドに対する変換作用を、種

々の反応条件のもとでしらべた。その結果、供試のどの菌株についても、アルカロイド生産に適した寒天斜面上に15～20日間程度発育させた菌体を、アンバーライトIRC-50で処理したのち、フレンチプレス処理法または凍結すりつぶし法で破碎することによって、アグロクラビンあるいはイリモクラビンに対してなんらかの変換作用を示すセルフリー抽出液を調製しうるものであることを見出した(表1)。また、これらの活性セルフリー抽出液によって、アグロクラビンあるいはイリモクラビンを他のアルカロイドに変換させる場合の反応条件などを設定した。

II 代表的な麦角アルカロイド間の生成上の関係について^②

前項の成果を基礎として、アグロクラビン、イリモクラビンなど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、阿部らの仮説を、セルフリー系のもとトレーサー技法によって確かめてみた。この場合、セルフリー抽出液としてはアグロクラビン、イリモクラビンなどとともに、ペプチド型麦角アルカロイドを多量に生産しうるハマニンニク型麦角菌から調製した、アグロクラビンとイリモクラビンとの両者に対して変換活性を比較的強力に示すものを主として用い、また基質としては、アグロクラビン、イリモクラビン、チャノクラビン(1)および $\Delta^{8,9}$ -リゼルグ酸を取りあげ、いずれもトリチウム・ラベル体として使用した。

その結果、供試の麦角菌においてアグロクラビンから順次イリモクラビンおよび $\Delta^{8,9}$ -リゼルグ酸を経てペプチド型アルカロイドが生成する経路をはじめ、アグロクラビンからフェスツクラビンへ、アグロクラビンからセトクラビンへ、アグロクラビンから可逆的にチャノクラビンへ、およびイリモクラビンからペニクラビンへの各変換経路が存在していることが見出され、従来“*in vivo*”条件下で推定されていたところを確認することができた(表2)。

III イリモクラビンからアグロクラビンへの生成経路に関する吟味^③

イリモクラビンから若干の中間体を経てアグロクラビンが生成するという阿部らのさきの仮説を、前項の場合と同様、セルフリー系のもとトレーサー技法によって吟味してみた。この場合、セルフリー系としてはハマニンニク型およびライムギ型麦角菌から調製した、イリモクラビンからアグロクラビンへの変換活性の強い2種のものを用い、また基質としてはイリモクラビンだけでなく、リゼルゴール、リゼルゲンおよびアグロクラビンをも取りあげ、これらの各 ^{14}C ラベル体を調製して使用した。

その結果、供試の各菌株において、イリモクラビンから順次リゼルゴールおよびリゼルゲンを経て、アグロクラビンが生成する経路が存在することが明らかとなり、これによって初めて、前記阿部らの仮説を確認することができた。同時に、セトクラビンがリゼルゲンからも導びかれう

るという新しい事実も見出された(表3)。

IV 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^④

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、トリプトファン、メバロン酸およびメチオニンのS-メチル基から合成されるものであるとされている。また、この合成が4-(γ , γ -ジメチルアリル)トリプトファン・システムを経て行なわれるものであることも、現在定説となっている。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、いわゆる“親アルカロイド”(プロト・アルカロイド)が何であるかについては、それがアグロクラビン、イリモクラビンまたはチャノクラビン(1)のいずれかであろうとする前記阿部らの説のほか、諸研究者によって種々の説が提出されていて、定説が得られるに至っていない。この点を解明するために、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を、“in vitro”の系で検討してみることにした。まず、ハマニク型およびカモジグサ型両麦角菌株について、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た。

その結果、さきの第I項の場合とはほぼ同様の方法によるならば、供試のどの菌株についても、トリプトファン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、同時に合成反応の条件その他の実験条件を設定することができた。

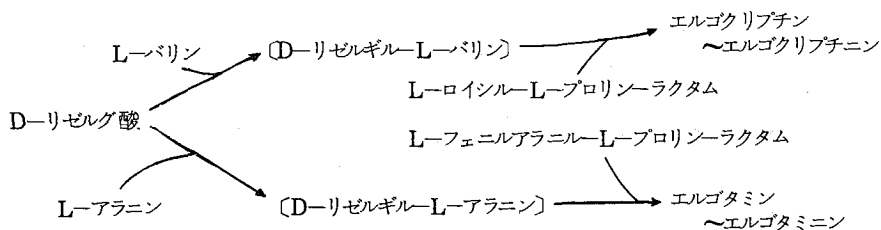
次に、この方法に従って調製した前記2菌株のセルフリー抽出液で、放射性のトリプトファン、メバロン酸、4-(γ , γ -ジメチルアリル)-トリプトファンあるいは1-(β -インドリル)-2-アミノ-5-メチルヘキセンが、麦角アルカロイド類に取りこまれる状態をしらべた。

その結果、アグロクラビン、イリモクラビンあるいはチャノクラビン(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見出されなかったが、トリプトファンから順次4-(γ , γ -ジメチルアリル)-トリプトファンおよびリゼルゲンを経て、セトクラビンが生成する一つの生合成経路が新たに見出され、リゼルゲンが“親アルカロイド”として合成されていることが示唆された(表4, 5)。

V ペプチド型麦角アルカロイド、エルゴクリプチン～エルゴクリプチニンの生合成機構について^⑤

著者が前項までの研究を実施している過程で、阿部ら(著者も協力者として参加)は、麦角菌“in vivo”系における実験に基づき、代表的なペプチド型麦角アルカロイドであるエルゴクリプチン～エルゴクリプチニンおよびエルゴタミン～エルゴタミニンが、それぞれ次に示すよう

な経路で合成されるものであるとの仮説を立てた。



そこでこの仮説におけるエルゴクリブチン～エルゴクリブチニンの生合成経路が果して実在しているかどうかを、“*in vitro*”の系で確かめてみることにした。この場合、セルフリー抽出液としては、エルゴクリブチン～エルゴクリブチニンを多量に生産しうるハマニシク型麦角菌の培養菌体から調製したものを、また基質としては放射性のL-ロイシール-L-プロリン-ラクタム、D-リゼルギール-L-バリン、DL-ロイシン、L-プロリン、DL-バリンおよびイリモクラピンを使用した。

その結果、供試麦角菌において、D-リゼルギルーL-バリンおよびL-ロイシルーL-プロリン-ラクタムが、ともにペプチド型アルカロイドの前駆体となりうる事実(表6-a, b)、およびD-リゼルギルーL-バリンがペプチド型アルカロイド生成の中間体となりうる事実が見出され、さらに“*in vivo*”条件下で推定されたところを確認することができた。

総括

以上のようにして著者が本研究において明確にした麦角アルカロイド類の生合成経路を、本研究においては確認するに至らなかった主要な従来の推定経路とともに、とりまとめて図示すると、図1のごとくである。

表1. 菌培養法および菌体破砕法とセルフリー系のアルカロイド変換活性との関係(麦角菌H A
— 6株の場合)

菌 培 養 法 菌 体 破 砕 法 破 砕 状 態			セルフリー抽出液のアルカロイド変換活性*	
			アグロクラビン→イリ モクラビン	イリモクラビン→ペプ チト型アルカロイド
表	面	フレンチ・プレス 大部分の菌体が破砕	+	—
斜	面		++	++
振	盪		—	—
表	面	凍結すりつぶし "	+	—
斜	面		++	++
振	盪		—	—
表	面	アルミナ磨砕 "	±	±
斜	面		±	±
振	盪		—	—
表	面	ポッター・エルベジ ウムホモゲナイザー "	—	—
斜	面		—	—
振	盪		—	—
表	面	凍 結 融 解 菌体破砕されず	×	×
斜	面		×	×
振	盪		×	×
表	面	音 波 破 砕 "	×	×
斜	面		×	×
振	盪		×	×
表	面	ノサル・シェーカー "	×	×
斜	面		×	×
振	盪		×	×

* ++:強い活性あり、+:活性あり、±:弱い活性あり、—:活性微弱
×:活性全く認められず

表2. 麦角菌H A-6株セルフリー系における放射性アグロクラビン、イリモクラビン、 $\Delta^{8,9}$ -リゼルグ酸およびチャノクラビン-(1)の変換

基質 アルカロイド 1.7×10^6 dpm/tube	追加アルカロイド $10 \mu\text{mole/tube}$	放射能の取りこみ (dpm/tube)						
		アグロクラ ビン	イリモクラ ビン	リゼル グ	チャノクラ ビン-(1)	ペプチド型 アルカロイド	フェスツク ラビン	セトクラビ ン
アグロクラビン- ^3H	-	(7.1×10^5)	6.0×10^5	$< 10^5$	1.1×10^7	2.1×10^5	$< 10^5$	$< 10^5$
	イリモクラビン	(7.5×10^5)	6.7×10^5	$< 10^5$	1.1×10^7	1.5×10^5	$< 10^5$	$< 10^5$
イリモクラビン- ^3H	-	1.1×10^5	(7.0×10^5)	2.0×10^5	-	9.2×10^5	-	$< 10^5$
	リゼルグ	7.2×10^5	(7.3×10^5)	4.4×10^5	-	9.1×10^5	-	$< 10^5$
	$\Delta^{8,9}$ -リゼルグ酸	1.1×10^5	(7.3×10^5)	2.1×10^5	-	5.2×10^5	-	$< 10^5$
$\Delta^{8,9}$ -リゼルグ酸- ^3H	-	-	-	-	-	2.2×10^5	-	-
チャノクラビン-(1)- ^3H	-	2.3×10^5	-	-	(8.2×10^7)	-	-	-

() : 残存基質

表3. 麦角菌SR-134株セルフリー系における放射性イリモクラビン、リゼルゴール、リゼルゲンおよびアグロクラビンの変換

基質アルカロイド (dpm/tube)	追加アルカロイド 10 ⁴ μmole/tube	放射能の取りこみ (dpm/tube)					
		アグロクラ ビン	イリモクラ ビン	リゼルゴ- ール	リゼルゲン ビン-(1)	ペプチド型 アルカロイド	セトクラビ ン
イリモクラビン- ¹⁴ C 7.5 × 10 ⁵	-	1.1 × 10 ⁴	(3.3 × 10 ⁵)	2.1 × 10 ⁴	-	1.2 × 10 ⁴	-
	リゼルゴ-ール	6.0 × 10 ³	(2.5 × 10 ⁵)	2.9 × 10 ⁴	-	1.2 × 10 ⁴	-
リゼルゴ-ール- ¹⁴ C 4.4 × 10 ⁵	-	4.0 × 10 ⁴	6.2 × 10 ⁴	(3.1 × 10 ⁵)	-	-	-
	イリモクラビン	3.9 × 10 ⁴	6.6 × 10 ⁴	(3.3 × 10 ⁵)	-	-	-
	リゼルゲン	2.0 × 10 ⁴	5.8 × 10 ⁴	(2.9 × 10 ⁵)	2.0 × 10 ³	-	-
リゼルゲン- ¹⁴ C 1.1 × 10 ⁵	-	2.3 × 10 ⁴	-	7.0 × 10 ³	(2.5 × 10 ⁴)	-	3.3 × 10 ⁴
アグロクラビン- ¹⁴ C 8.1 × 10 ⁵	リゼルゲン	(4.0 × 10 ⁵)	3.0 × 10 ⁴	-	3.3 × 10 ⁴	< 10 ⁴	< 10 ⁴

() : 残存基質

表4. 麦角菌KK-2株セルフリー系による麦角アルカロイドの合成

基質 1.1×10 ⁷ dpm/tube	放射能の取りこみ (dpm/tube)					
	アグロクラビン	イリモクラビン	リゼルゴール	リゼルゲン	チャノクラビン(1)	イソセトクラビン
DL-トリプトファン -3- ¹⁴ C	-	-	-	-	-	-
	*	*	*	+	*	+
					4.4 × 10 ⁵	
DL-メバロラクト ン-2- ¹⁴ C	-	-	-	-	-	-
	*	*	*	*	*	*

- : 定量限界以下

* : ラジオオートグラフィーによる確認(++++:強い感光像あり、++:感光像あり、+:感光像認められず)

表5. 麦角菌H A-6株セルフリー系におけるトリプトファン-3- ^{14}C のセトクラビンへの取りこみ(各種クラビン型アルカロイドおよび4-ジメチルアリルトリプトファン追加の影響)

基 質	追 加 物	放射能のセトクラビンへの取りこみ (dpm/tube)
	1.0 $\mu\text{mole/tube}$	
DL-トリプトファン-3- ^{14}C 1.1 $\times 10^7$ dpm/tube	—	2.0×10^5
	アグロクラビン	2.2×10^5
	イリモクラビン	2.5×10^5
	リゼルゴール	2.0×10^5
	リゼルゲン	$< 10^5$
	チャノクラビン-(1)	2.2×10^5
	4-(γ , γ -ジメチルアリル)-トリプトファン	$< 10^5$

表6-a 麦角菌H A-6株セルフリー系における放射性L-ロイシル-L-プロリン-ラクタムおよびD-リゼルギル-L-バリンのエルゴクリプチン〜エルゴクリプチニンへの取りこみ

基 (dpm/tube)	質	放射能の取りこみ (dpm/tube)	
		エルゴクリプチン	エルゴクリプチニン
L-ロイシル-L-プロリン-ラクタム- ³ H (4.0×10 ⁶)		3.0×10 ³	2.3×10 ⁴
D-リゼルギル-L-バリン-メチルエステル- ³ H (1.6×10 ⁶)		1.0×10 ³	1.8×10 ⁴

表6-b 麦角菌H A-6株セルフリー系における放射性DL-ロイシン、L-プロリンおよびDL-バリンのエルゴクリプチン〜エルゴクリプチニンへの取りこみ

基	質	放射能の取りこみ (dpm/tube)	
		エルゴクリプチン	エルゴクリプチニン
イリモクラビン 1.0μmole/tube (D-リゼルギル酸の前駆体として)	DL-ロイシン-1- ¹⁴ C	—	—
	L-プロリン-U- ¹⁴ C	—	—
	DL-バリン-1- ¹⁴ C	0.5×10 ³	0.8×10 ³

発 表 文 献

- ① 大橋 力、阿部又三：麦角菌の菌体から *agroclavine* および *elymoclavine* に対して変換作用を示すセルフリー系の調製；農化、44、519（1970）。
- ② 大橋 力、青木俊三、阿部又三：代表的な麦角アルカロイド間の生成上の関係について；農化、44、527（1970）。
- ③ 大橋 力、飯村 穰、阿部又三：*Elymoclavine* から *agroclavine* への生成経路に関する吟味；農化、44、567（1970）。
- ④ 大橋 力、渋谷直人、阿部又三：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；農化、46、207（1972）。
- ⑤ 大橋 力、高橋治男、阿部又三：ペプチド型麦角アルカロイド *ergokryptine* ~ *ergokryptinine* の生合成機構について；農化、46、535（1972）。

審 査 結 果 の 要 旨

麦角アルカロイドはそれらの強い薬理作用のため古くから注目されてきたが、各アルカロイドの相互変換、生合成機構については、主としてトレーサー実験により経路が推定されていたのみであった。その理由は、これらアルカロイドの相互変換、生合成活性のある無細胞抽出液を得ることが従来困難であったためである。

本論文は麦角菌より活性のある無細胞抽出液を調製し、これにより麦角アルカロイドの生合成、相互変換の経路をはじめて *in vitro* の系で解明したものである。

著者はまずアルカロイドの生産性の互に異なる5種の麦角菌を選び、培養条件、菌体の破砕法等について検討した結果、アルカロイド生産に適した寒天斜面上に15～20日間培養した菌体を、フレンチプレス処理または凍結すりつぶし法で破砕すれば、何れの菌株からもアルカロイドの相互変換活性のある無細胞抽出液を得ることができることを認めた。これら無細胞抽出液を用い、トリチウム標識アルカロイド基質と、アイソトープ希釈法により、アグロクラビンからイリモクラビンおよび Δ^8 -リゼルゲ酸を経てペプチド型アルカロイドが生成する経路をはじめ、アグロクラビンから可逆的にチヤノクラビンへ、およびイリモクラビンからペニクラビンへの各変換経路が存在することを見出した。同様の手法により、イリモクラビンから順次リゼルゴール、リゼルゲンを経てアグロクラビンが生成すること、リゼルゲンからセトクラビンが生成することを認めた。

麦角アルカロイドのC-8置換N-メチル・エルゴリン骨格は、トリプトファン、メパロン酸およびメチオニンのS-メチル基から合成されることが知られているが、最初に合成される親アルカロイドが何であるかについては定説がない。著者はこの点を明かにするため、トリプトファンから麦角アルカロイドの生合成能のある無細胞抽出液を調製し、トレーサー法を利用して、トリプトファンから順次4-(γ , γ -ジメチルアリル)-トリプトファンおよびリゼルゲンを経て、セトクラビンが生成する生合成経路が存在することを見出し、リゼルゲンが親アルカロイドとして合成されることを示唆した。

最後に著者はペプチド型アルカロイドの生合成機構に注目し、上と同様の手法でD-リゼルギール-パリンおよびL-ロイシル-L-プロリンラクタムがペプチド型アルカロイドの生合成の前駆体となること、およびD-リゼルギール-パリンがペプチド型アルカロイド生合成の中間体となることを確認した。

以上のように本論文は基礎および応用上微生物学に貢献するいくつかの新知見を含み、著者は農学博士の学位を授与される十分な資格があると判断した。