

Fig. 3. Temperature-dependent curves of circular dichroism of nootkatone.

projection diagram to be negative to Ia, positive to Ib and positive to Ic, respectively.

Nootkatone (mp 39–40°C; $[\alpha]_D^{20} + 208.9^\circ$ (c 0.0012 in isooctane); $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 237 nm, ϵ 16,000) was derived⁵ from valencene by means of the tert-butyl chromate oxidation. The UV-, IR- and NMR-spectra data were in good accord with those of natural nootkatone. The ORD curve of nootkatone seems to exhibit the same Cotton effect as reported by MacLeod², as shown in Figure 2. However, the CD-curve was clearly negative. The preferred conformation of nootkatone is thus suggested to be Ia.

The CD-curve and the NMR-spectrum were then examined at various temperatures. The molecular ellipticity in the mixture of ether, isopentane, and alcohol (5:5:2 by volume) increased gradually with a change to lower temperature (Figure 3, a). On the other hand, the ellipticity decreased considerably upon changing the temperature from 25°C to 133°C in decalin (Figure 3, b). The observation on the temperature dependency of nootkatone indicates that conformer Ia is more stable at lower temperature.

The NMR-spectra at 50°C and –58°C showed the same coupling constants: $J_{3a,3e} = 12$ Hz, $J_{4a,3e} = 5$ Hz, and $J_{1,3e} = 2$ Hz in the equatorial proton at C-3. The spectrum at 25°C also gave the same values. This also supports the stability of conformer Ia.

The above observation on CD-curves and NMR-spectra establishes that the preferred conformation of nootkatone (I) is Ia.

Résumé. La conformation la plus fréquente de la nootkatone a été établie d'après la CD et la RMN mesurées à diverses températures.

T. ISHIDA, T. SUGA⁶
and T. MATSUURA⁷

Department of Chemistry, Faculty of Science,
Hiroshima University, Hiroshima (Japan),
2 April 1970.

¹ H. ERDTMAN and Y. HIROSE, *Acta chem. scand.* **16**, 1305 (1962).

² W. D. MACLEOD, *Tetrahedron Lett.* (1965), 4779.

³ M. PESARO, G. BOZZATO and P. SCHUDEL, *Chem. Commun.* (1968), 1152.

⁴ H. C. ODOM and A. R. PINDER, *Chem. Commun.* (1969), 26.

⁵ G. L. K. HUNTER and W. B. BRODGEN JR., *J. Food Sci.* **30**, 876 (1965).

⁶ To whom all inquiries regarding to this report should be addressed.

⁷ The authors wish to express their gratitude to Dr. M. K. VELDHUIS of U.S. Department of Agriculture for a gift of the authentic sample of nootkatone, and to Dr. E. von RUDLOFF of National Research Council of Canada for measurement of 100 MHz NMR-spectra.

Analyse électrophorétique des protéines caroténogènes de *Neurospora crassa*

La caroténogénèse de *Neurospora crassa* est un phénomène induit par la lumière¹. L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse des protéines tels que cycloheximide et chloramphénicol a permis de montrer que les protéines caroténogènes induites par la lumière sont synthétisées en

6 h², à 4°C ou en 1 h³, à 20°C. Une petite quantité de caroténoïdes est produite constitutivement, c'est-à-dire à l'obscurité³.

Dans cette première étude, nous avons tenté de déterminer, par la méthode électrophorétique, le nombre de

protéines caroténogènes chez *Neurospora* et de mettre l'information obtenue en corrélation avec le nombre de gènes impliqués dans le cadre des schémas biosynthétiques déjà proposés⁴. On sait, en outre, que la conversion de substrats caroténoïdes C_{40} à cycle β -ionone (probablement celle du γ -carotène⁵) en un 4- β -apocaroténoïde acide, la neurosporaxanthine, est contrôlée par un produit du gène *ylo-1* (isol. No Y 305304 ou P 1193); cependant, les corrélations enzymatiques et génétiques au niveau des étapes précédentes de la caroténogénèse ne sont pas connues. En plus d'*ylo-1*, seule la situation de la région du gène *al* a pu être éclaircie⁶⁻⁸. D'autres mutants de couleur (caroténoïdes) existent mais, à notre connaissance actuelle, leur mutation affectant la pigmentation s'est révélée être un effet secondaire ou l'action pléiotrope de quelque autre altération génique; par exemple, «yellow-2» (*ylo-2*, isol. No Y256M230T) porte une translocation et «peach» (*pe^m*, isol. No Y8743m) est un mutant conidien. En conséquence, la détection des protéines caroténogènes photo-induites devrait pouvoir indiquer s'il vaut la peine de rechercher de nouveaux types de mutants de pigmentation (caroténoïdes).

N. crassa a été cultivé pendant 5 jours à l'obscurité, dans des flacons contenant 500 ml de milieu minimal de WESTERGAARD et MITCHELL⁹, avec du glucose comme source de carbone. Le gâteau mycélien a ensuite été pressé dans de la gaze de nylon puis exposé à la lumière intense (environ 1500–2000 lux) de tubes fluorescents pendant 2 h à 20°C. Environ 10 g de cultures photo-induites ont été essorés et ajoutés à 20 ml de tampon phosphates à pH 7,4 contenant 15 g de sable de quartz lavé. Ce mélange a été homogénéisé dans un omni-mixer Sorvall pendant 25 min à 0°C. Une centrifugation préliminaire de 20 min à 10000 g a éliminé le sable et les débris cellulaires; la centrifugation finale à 105000 g pendant 2 h a fourni une fraction contenant les protéines solubles. Leur dosage, par la méthode du biuret¹⁰, a permis de standardiser les extraits à 2,0 mg de protéines/ml. 100 ou 150 μ l de ces extraits ont été appliqués sur les colonnes (200 \times 45 mm) de gel d'acrylamide (7,5%) en tampon borate de pH 8,4¹¹; l'électrophorèse a été réalisée pendant 5 h avec l'appareil de Buchler, sous un courant de 190 V avec gradient de 3,3–5,0 A. Les colonnes ont été colorées avec l'amido-schwartz¹² pendant 15 min puis décolorées par l'acide acétique à 7,5% pendant 5 jours. L'intensité des bandes protéiniques colorées a été finalement mesurée au densitomètre enregistreur.

Afin d'exclure les effets de la protéine synthétisant la neurosporaxanthine, la souche neurosporaxanthineless *ylo-1* (Y 305304) a été utilisée. Enfin, les cultures non-induites ont été soumises au même traitement excepté l'exposition à la lumière.

Les résultats, tels qu'ils sont présentés dans les figures 1 et 2, montrent qu'une seule protéine est responsable de la synthèse des caroténoïdes neutres. En effet, les graphiques d'enregistrement des densités optiques montrent (Figure 2), dans les extraits de cultures induites, un pic (No 13) qui est absent à la fois dans les extraits de *ylo-1* ayant poussé à l'obscurité et dans les extraits de la souche albinos (type *al-2*, isol. No 46-11-68) cultivée aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Ce mutant albinos présente une polarité génétique partielle et a été utilisé pour dis-

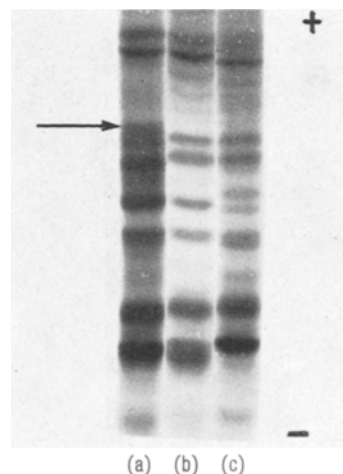


Fig. 1. Séparation électrophorétique sur colonnes de gel d'acrylamide des protéines des mutants de *N. crassa*: (a) *ylo-1*, photo-induit; (b) *ylo-1*, non-induit; (c) *albinos-2*, photo-induit. Flèche sur la bande associée à la caroténogénèse.

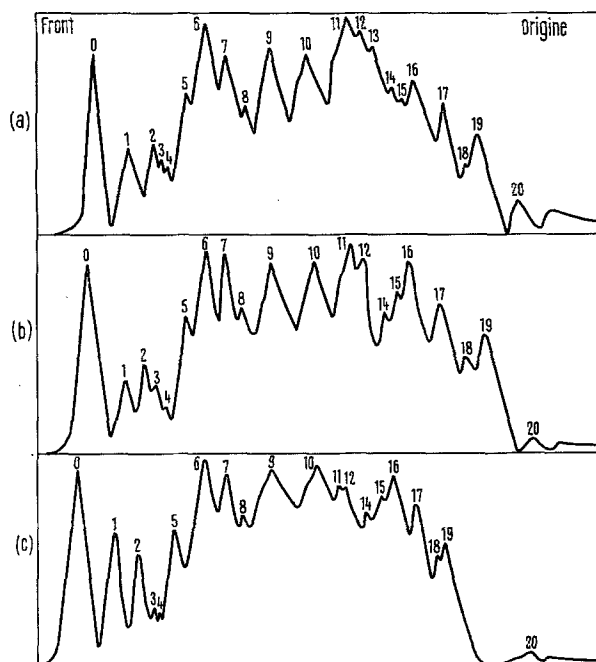


Fig. 2. Graphiques des densités optiques des protéines de mutants de *N. crassa* séparées sur colonnes de gel d'acrylamide: (a) *ylo-1* photo-induit; (b) *ylo-1* non-induit (obscurité); (c) *al-2* photo-induit. Numérotation des pics du front à l'origine. Détection d'une protéine caroténogène photo-induite (a, pic No 13).

¹ M. ZALOKAR, Arch. Biochem. Biophys. 56, 318 (1955).

² R. W. HARDING et H. K. MITCHELL, Arch. Biochem. Biophys. 128, 814 (1968).

³ W. RAU, I. LINDEMANN et A. RAU-HUND, Planta 80, 309 (1968).

⁴ J. W. PORTER et D. G. ANDERSON, Arch. Biochem. Biophys. 97, 520 (1962).

⁵ L. R. G. VALADON et R. MUMMERY, Microbios 1A, 3 (1969).

⁶ M. V. G. HUNGATE, M. A. Thesis, Stanford University (1945).

⁷ P. C. HUANG, Genetics 49, 453 (1964).

⁸ R. E. SUBDEN et S. F. H. THRELKELD, Can. J. Gen. Cytol. 10, 351 (1968).

⁹ M. WESTERGAARD et H. K. MITCHELL, Am. J. Bot. 34, 573 (1947).

¹⁰ J. BAILEY, dans Techniques in Protein Chemistry (Elsevier Publ. Co, Amsterdam 1967), p. 341.

¹¹ L. ORNSTEIN, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321 (1964).

¹² B. J. DAVIS, Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404 (1964).

tinguer les protéines photo-induites responsables de la caroténogenèse de celles, aussi photo-induites, mais ayant des fonctions autres (photomorphogenèse) que celles associées à la pigmentation¹³. Quant aux différences dans la vitesse de migration entre quelques-unes des protéines de la souche albinos (46-11-68) et celles de la souche jaune (Y305304), elles sont probablement l'expression de la diversité de leur apparentement génétique¹⁴.

Des expériences immunoélectrophorétiques préliminaires ont été tentées mais, jusqu'à maintenant, il n'a pas été possible de déceler des différences d'arcs entre extraits protéiniques de cultures induites et non-induites. Cela peut refléter soit l'incapacité des enzymes caroténogènes à provoquer une réponse immunologique, soit l'existence d'une différence quantitative, non décelable par les moyens courants, entre la quantité de protéine caroténogène synthétisée constitutivement, à l'obscurité, et celle photo-induite.

La différence entre extraits protéiniques des cultures induites et non-induites est en bon accord avec les résultats des études faisant usage d'inhibiteurs de la synthèse des protéines associée à la caroténogenèse^{2,3}. Bien que nos résultats s'accordent avec les études antérieures faisant usage des méthodes génétiques à haute résolution¹⁵ et l'étude par complémentation¹⁶, l'information est encore insuffisante, à l'exception de celle concernant la biosynthèse de la neurosporaxanthine, pour affirmer que la caroténogenèse se poursuit à l'aide du produit d'un seul groupement génique. On peut cependant présumer que cette protéine seule est un aggrégat car au moins 2, voire 4 cistrons, ont été génétiquement associés avec les produits géniques de la région *al*. La prédiction minima est celle de deux activités enzymatiques: les déshydrogénations polyéniques successives et la formation du cycle β -ionone, cette dernière étant, chez d'autres organismes au moins, catalysée enzymatiquement¹⁷.

L'interprétation donnée ci-dessus est aussi en accord avec les analyses biochimiques des pools intermédiaires de caroténoïdes¹⁸⁻²¹, indiquant que quelques mutants de la région albinos sont capables de synthétiser une série de caroténoïdes successivement déshydrogénés, à l'exclusion de composés contenant la β -ionone (34508 ou ALS-22-S82) et que d'autres souches peuvent produire la β -ionone mais de petites quantités seulement des caroténoïdes

hautement déshydrogénés (*ylo-b*, RES-25-44⁸). Ainsi, une dualité fonctionnelle est suggérée pour le produit des gènes, à savoir la déshydrogénation et la formation du cycle β -ionone²².

Summary. In an effort to determine the number of proteins responsible for the synthesis of the neutral carotenoids in *N. crassa*, the soluble protein extracts from light-induced and dark-grown cultures of a neurosporaxanthinless strain were compared electrophoretically. The differences relevant to the carotenogenic proteins were identified by reference to an albino polarity mutant. A single, electrophoretically determinable, protein was found to be specific to carotenogenesis. This implication of a single (presumably an enzyme aggregate) protein controlling carotenoid synthesis is discussed and correlated to the existing genetic, complementation and biochemical evidence.

R. E. SUBDEN²³ et G. TURIAN

Laboratoire de Microbiologie,
Institut de Botanique générale de l'Université,
CH-1211 Genève 4 (Suisse), 27 février 1970.

¹³ J. GRESSEL et E. GALUN, *Devel. Biol.* 15, 575 (1967).

¹⁴ D. GINDRAT, R. PEDUZZI, A. S. SIJAK et G. TURIAN, *Mycopath. Mycol. appl.*, sous presse (1970).

¹⁵ R. E. SUBDEN et S. F. H. THRELKELD, *Genet. Res. Cambridge*, sous presse (1970).

¹⁶ R. E. SUBDEN et S. F. H. THRELKELD, *Experientia* 25, 1106 (1969).

¹⁷ M. TOMES, F. QUACKENBUSH et T. KARGL, *Botan. Gaz.* 119, 250 (1958).

¹⁸ R. E. SUBDEN, Ph. D. Thesis, McMaster University (1969).

¹⁹ F. HAXO, *Biol. Bull.* 103, 286 (1952).

²⁰ R. W. HARDING, Ph. D. Thesis, Calif. Inst. Tech. (1968).

²¹ R. E. SUBDEN et G. TURIAN, en préparation.

²² Nous remercions Melle R.-M. VELMELAGE de son aide technique et le Prof. D. D. PERKINS de Stanford University pour les souches de *Neurospora*. Notre reconnaissance (R.E. S.) va aussi au Conseil national de la Recherche du Canada pour son appui financier.

²³ Adresse actuelle: Botany Department, University of Guelph, Guelph (Ontario, Canada).

The Relationship between Urinary Excretion of 17-Hydroxycorticosteroids and Glycosaminoglycans

In 1955 we noticed that the i.v. administration of compound F was followed by an increased urinary excretion of glycosaminoglycans (GAG)¹. In 1960, GHATA et al.² demonstrated in normal individuals a synchronized pattern of excretion of urinary GAG and 17-hydroxycorticosteroids (17-OH-CS). The same authors² found that in patients with Addison's disease the urinary 17-OH-CS (but not the GAG) were decreased; both parameters, however, had lost their normal, rhythmic excretion pattern. Moreover³, they confirmed that administration of ACTH and cortisone produced an immediate increase of urinary GAG. These data were interpreted as indicative of a process of steroid-induced depolymerization of the ground substance, with increased blood levels and urinary excretion of GAG³.

However, the short interval of time which separates adrenal stimulation (or administration of adrenal steroids) and excretion of GAG cannot be reconciled with a metabolic action on connective tissue. In fact, experi-

mental conditions known to cause degradation of proteoglycans (administration of papain, large doses of vitamin A) require at least 24 h to produce an increase in blood levels and urinary excretion of GAG^{4,5}.

Recently, we have studied the correlation between urinary excretion of 17-OH-CS and GAG in 2 young, healthy men, members of a 3-man crew participating in 2 simulated Apollo lunar flights.

N. DI FERRANTE, unpublished observations.

² J. F. GHATA, J. C. MORARD, J. LUBETZKI and E. AZERAD, *Compt. r. Séanc. Soc. Biol.* 154, 1787 (1960).

³ J. C. MORARD, J. F. GHATA, J. LUBETZKI and E. AZERAD, *Compt. r. Séanc. Soc. Biol.* 154, 2231 (1960).

⁴ S. S. SPICER and J. H. BRYANT, *Am. J. Path.* 23, 1237 (1957).

⁵ L. THOMAS, R. T. MCCLUSKEY, J. L. POTTER and G. WEISSMANN, *J. exp. Med.* 11, 705 (1960).