

新 制
榮
130

京大附図

ムラサキ培養細胞における
シコニン生合成の中間代謝産物
ならびに代謝調節要因に関する研究

1988

矢 崎 一 史

ムラサキ培養細胞における
シコニン生合成の中間代謝産物
ならびに代謝調節要因に関する研究

1988

矢崎 一史

目 次

第1章	緒 言 -----	1
第2章	従来の研究概要ならびに研究方針 -----	3
第3章	ムラサキ培養細胞における shikonin 生合成中間代謝産物 ----	7
第1節	p-Hydroxybenzoic acid およびその配糖体 -----	7
第1項	単離、同定および細胞内含量 -----	7
第2項	Shikonin 生成との関連 -----	12
第2節	Shikonin 生合成の微量中間体および関連化合物 -----	14
第1項	m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid および geranylhydroqui- none の単離、同定 -----	15
第2項	Deoxyshikonofuran 等の単離、構造決定 -----	18
第3項	Dihydroshikonofuran の単離、構造決定 -----	22
第4項	Shikonin 生合成関連化合物の細胞内含量 -----	28
第4章	細胞内および細胞壁中の微量フェノール性化合物 -----	31
第1節	低分子フェノール類の検索 -----	31
第2節	フェノール類の色素生合成への影響 -----	37
第5章	FMN アナログによる shikonin 生合成阻害 -----	44
第1節	光による色素生成阻害時の中間代謝産物の検索 -----	44
第2節	FMN の光分解物について -----	47
第3節	FMN アナログの shikonin 生成阻害効果 -----	49
第6章	Glutamine による shikonin 生合成の調節 -----	52
第1節	NH ₄ ⁺ の shikonin 生合成抑制効果 -----	52
第2節	アミノ酸と shikonin 生合成 -----	54
第1項	細胞内の遊離アミノ酸と shikonin 生合成に伴う経時変化 ----	54
第2項	主なアミノ酸の shikonin 生成に対する抑制効果 -----	56
第3項	種々の培地における細胞中の NH ₄ ⁺ および glutamine -----	59
第7章	結論および考察 -----	61
実験の部	-----	68

引用文献	91
謝辞	94

第 1 章 緒 言

ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae) は日本、朝鮮、中国の山地に自生する多年草で、その根部は赤色色素を含有し、媒染剤などで美しい紫色が得られることから「紫根」、「紫草」と称され、染料ならびに薬用として古くから用いられてきた¹⁾。現在でも紫根を配合した処方として火傷、凍傷を初めとする種々の皮膚疾患、および切り傷などに華岡青州 (1976-1835) 考案の「紫雲膏」(本間藥軒、「瘍科秘録」、1847) が外用されており、このほか紫根エキスを配合した坐剤、軟膏剤、顆粒剤が痔疾治療に繁用されている。さらに紫根抽出エキスは最近では基礎化粧品にもしばしば配合されるようにならなってきた。

紫根の有効成分はムラサキ科特有の 1,4-ナフトキノ系赤色色素である shikonin 誘導体であるとされている。Shikonin は真島ら²⁾により初めて単離、構造決定され、後に Brockmann³⁾ によって構造訂正がなされた。現在までに紫根から分離された shikonin 誘導体は 9 種で、それらの構造は真島²⁾、平田⁴⁾、荒川⁵⁾、京極⁶⁾、久道⁷⁾らによって決定され、種々の脂肪酸エステルの誘導体であることが明らかにされた。

一方 shikonin 誘導体は抗菌性^{8,9)}、血管透過性抑制および肉芽形成促進作用¹⁰⁾を示し、創傷、皮膚疾患に対する治癒作用が裏付けられ、さらに最近の研究によると抗腫瘍活性¹¹⁾や皮膚潰瘍治癒作用¹²⁾が見出されている。

これら薬用のほかにも shikonin 誘導体は染料としても重要な役割を担ってきたが、生活環境の破壊や乱獲のため、従来は全国の山野に自生していたムラサキは激減し、絶滅の危機に瀕している。またその栽培は幼植物の時はともかく、一般の利用に耐え得る三年生以上の植物体とするのは困難であるとされている。さらに shikonin の全合成は近年成功した¹³⁾とはいえ、反応段数 12 段階、総収率 0.7% と実用化にはほど遠い。

このような実状のなか、植物組織培養法を用いてその二次代謝産物を能率的に生産させるという方法が盛んとなってきており、このムラサキについては田端ら¹⁴⁾がその組織培養法を確立し、さらに生合成調節要因の解明や shikonin 高生

産性培養株の育成が行なわれた。さらに井上ら¹⁵⁾による生合成経路の解明といった基礎研究が進められ、これらの実績をもとに藤田ら¹⁶⁾はムラサキの大量培養を手掛け、二段階式タンク培養法による shikonin の工業的生産に成功した。現在この方法で生産された純粋な shikonin は化粧品などに応用されている。

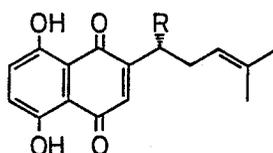
また、基礎研究の分野でも最近、電子顕微鏡を用いた田端ら¹⁷⁾の研究により、shikonin の生成には細胞内の粗面小胞体の際だった伸長と、それに伴う小胞体の膨潤が必須であることが解明された。そしてこの瘤状部は小胞体から切断されて、細胞外に放出され、多量の shikonin 系色素を有する顆粒となることが明らかにされ、「生合成の場」に関する興味深い知見が得られたと共に細胞内微細構造の分化が二次代謝促進にとって重要な因子であるという注目すべき知見が示された。

しかしながら、まだ shikonin 生合成面での基礎的研究、特に化合物の面から見た生合成の流れの制御については解明されるべき多くの問題が残されている。本研究は懸濁培養されたムラサキ培養細胞における生理現象を化合物レベルで追跡し、その生合成の調節機構を解明することを試みるものである。

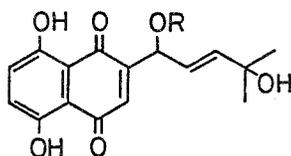
第2章 従来の研究概要並びに研究方針

ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae, ムラサキ科) の根に含有される赤色色素に関する化学的研究は1922年に始まった。すなわち、真島、黒田²⁾ は紫根から1,4-ナフトキノン系赤色色素をモノアセチルエステルの形で初めて単離し、その基本骨格を shikonin と命名した。1936年には Brockmann³⁾ がその化学構造を詳細な実験によって訂正し、shikonin はヨーロッパ産アルカナ根 (*Alkanna tinctoria* Tausch., Boraginaceae) に含有される赤色色素 alkannin の光学異性体 (shikonin はd体、alkannin はl体) であることを明らかにした。さらに Arakawa, Nakazaki⁵⁾ は shikonin をオゾン分解後、malamide にすることによって側鎖の C-1 位における絶対配置をR、またalkannin は Sであると報告した。

また Morimoto⁴⁾、京極⁶⁾ らによって acetyl 体以外の shikonin 誘導体として、種々の脂肪酸エステルである isobutyl, β, β -dimethylacryloyl, β -hydroxyisovaleryl 誘導体、および deoxyshikonin が単離、構造決定された。さらに久道ら⁷⁾ によって、微量色素成分として shikonin類似化合物である lithospermidin A, B が単離、構造決定された(Fig. 1)。



Compound	R
Deoxyshikonin	-H
Shikonin	-OH
Acetylshikonin	-OCOCH ₃
Isobutylshikonin	-OCOCH(CH ₃) ₂
β, β -Dimethylacrylshikonin	-OCOCH=C(CH ₃) ₂
Isovalerylshikonin	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
α -Methyl-n-butylshikonin	-OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
β -Hydroxyisovalerylshikonin	-OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂



Compound	R
Lithospermidin A	-COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Lithospermidin B	-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂

Fig. 1. Shikonin derivatives and related compounds found in the root of Lithospermum erythrorhizon

また、shikonin 側鎖 C-1位の絶対配置については最近の田端ら¹⁸⁾の研究により純粋なR体であるとは限らず、R体が主であるとはいえ、各誘導体について異なった混合比を有するR体、S体の混合物であることが明らかにされた。この知見は植物の根のみでなく培養細胞から得られる shikonin 誘導体についても報告された

一方 shikonin の全合成については最近 Teradaら¹³⁾が成功しており、この合成は 1,5-dihydroxynaphthalene から出発して合計12段階の反応を経、総収率は 0.7 % と報告されている。

生合成の研究は Schmidt, Zenk¹⁹⁾によって shikonin (1) に先立ってその光学異性体の alkannin について、アメリカ産のムラサキ科植物 Plagiobotrys arizonicus (A. Gray) Greene を用いて行なわれた。彼らは植物体に種々の放射性標識化合物の投与実験を行ない、shikimic acid (2)から生合成される L-phenylalanine (3), trans-cinnamic acid (4), p-hydroxybenzoic acid (5) および DL-mevalonic acid は alkannin に取り込まれるが、hydroquinoneは取り込まれないことを見出し、alkannin は p-hydroxybenzoic acid と mevalonic acid から生合成されると推定した。

一方、shikonin の生合成経路についての研究は Inouyeら¹⁵⁾によってムラサキのカルス¹⁴⁾を用いて行なわれ、トレーサー実験の結果、alkannin と同様の経路によって生合成されること、および投与した p-hydroxybenzoic acid (5) が、

shikonin (1) 以外に *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid (6) と geranylhydroquinone (7) に取り込まれることを報告し、shikonin の中間体としてこれらの化合物の存在を示唆した(Fig. 2)。

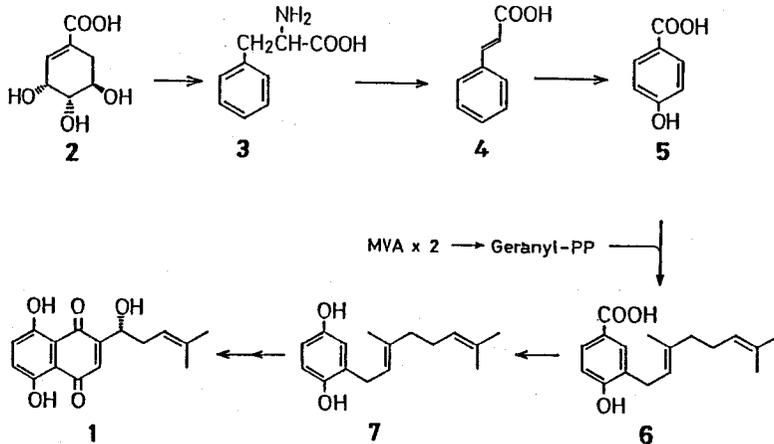


Fig. 2. Biosynthetic pathway of shikonin

(by H. Inouye et al., 1979)

また、その生合成の場についての研究が最近田端ら¹⁷⁾によってなされ、培養細胞および植物体の根において電子顕微鏡を用いた解析が行なわれた。その結果、shikonin (1) の生合成が行なわれるためには、細胞内で粗面小胞体が発達、膨潤することが必要であり、さらにそれが断片化して生じる多数の高電子密度の小胞 (vesicles) が原形質膜と融合して内容物を細胞外に放出し、細胞壁上に赤色の粒状体 (直径 1 μm 以上, globules) として蓄積することが報告され、色素形成と細胞内微細構造との興味深い関係が示された。

ムラサキの培養細胞は田端ら¹⁴⁾によってその培養系が確立され、shikonin 生合成の人為的誘導や、色素高生産性培養株の育成が可能となって以来、種々の生合成調節因子が解明されてきた。次いで藤田ら¹⁶⁾は White の培地を改良した shikonin 生産培地 M9 を開発し、ムラサキ液内培養細胞による shikonin の工業的大量生産を可能にした。

しかしながらムラサキの shikonin 生合成の調節機構に関しては化学的、生物学的に解明すべき問題が多く残されている。すなわちムラサキ培養細胞は前述の

寒天培地上でのカルス培養の場合と異なり、同じ Linsmaier-Skoog (LS)培地²⁰⁾を用いても、液内培養すると全く shikonin 誘導体を作らない事が知られている。一方、その白色細胞を M9 培地¹⁶⁾に移植すると速やかに shikonin 生成が誘導され、約2週間でその生産量が最大となる。この間の変化は劇的であり、この shikonin 生産誘導においてはほとんどすべての細胞が一時に色素生成を始めることから、二次代謝研究に優れた実験系であると考えられる。そこで、著者はこの系を用いることによって、まず shikonin 生産を抑制した時に、細胞内に多量に蓄積する中間体に着目してその構造を明らかにすると共に、shikonin 生成との関連について検討することにした。また併せて微量中間体、shikonin 生合成に関連の化合物、異常代謝産物などの検討も行ない、その挙動の解析を行なった。

さらに shikonin 生産性細胞と非生産性細胞とを比較した時、上記の化合物以外のフェニルプロパノイドなどの低分子フェノール全般にわたって変化を観察すると共に、両細胞の細胞壁に興味深い差異を見出し、これらの細胞内での役割を明らかにすることを試みた。

次いでカルスにおいては光、特に青色光が shikonin 生成を強く抑制し¹⁴⁾、FMN の光分解がそれに関与することが知られており、それを液内培養系で確認し、さらに FMN 光分解物およびその類縁体の shikonin 生成に対する影響を見ることによって光の効果を分子レベルで解明することに成功した。

最後に、ムラサキ培養細胞が LS 培地中で色素を生産出来ない最大の原因である NH_4^+ の抑制効果を解明することに着手し、窒素代謝、特にアミノ酸の挙動の検討、種々の投与実験などから NH_4^+ の作用は間接的なものであり、glutamine がその活性本体であることを明らかにした。

第3章 ムラサキ培養細胞における shikonin 生合成中間代謝産物

ムラサキの培養細胞は通常、細胞増殖用培地である Linsmaier-Skoog (以下 LS と略す) の液体培地²⁰⁾で懸濁培養として継代されており、この状態において、ムラサキの細胞は良い増殖を示すが shikonin 系色素はまったく生成しないため、白色となっている。一方、色素を生産させる時は、LS 培地にて増殖させた白色細胞を色素生産培地 (M9) に移植して2週間培養する。すると細胞は多量の shikonin 誘導体を生成する為に、赤色の細胞となる。この shikonin 生産の誘導はごく短期間に行なわれ、ほとんどすべての細胞に一斉に色素を生産させることが可能である。本章ではこの LS 培地で培養されているムラサキの細胞中では、全く shikonin 生合成は行なわれていないのか否か、どの反応過程で生合成が抑制されているのか、また中間体は何らかの形で蓄積していないかを検討するため、化学的な解析をこれら白色、赤色両細胞について行なった。この研究はこの先、酵素学的な検討、遺伝学的な研究を展開してゆくためにも解明されておかなければならない重要な問題である。

第1節 p-Hydroxybenzoic acid およびその配糖体

LS 培地で培養された白色の細胞について shikonin 生合成がある程度まで進んでいると仮定して、その中間代謝産物ないし、前駆体が存在していないかを TLC を用いて検索した。したがってここではある程度、量的に多く蓄積しているものに注目して、UV 吸収のあるスポットを TLC 上で追跡した。その結果を以下に述べる。

第1項 単離、同定および細胞内含量

ムラサキ培養細胞 (M18株) を β -indoleacetic acid (IAA) 10^{-6} M と kinetin 10^{-5} M を加えた LS 液体培地で暗黒下、25°C、3 週間振盪培養し、試料とした。この状態で細胞は shikonin 系色素を全く生成していないため、白色～淡黄色を呈している。この新鮮な細胞をメタノールで抽出し、濃縮後、Fig. 3 に示すようにベンゼン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出して各エキスを得た。これら各エキスのうち、酢酸エチルエキスと、*n*-ブタノールエキスに TLC において強い UV 吸収のあるスポットが認められたので、これをさらに分画精製した。

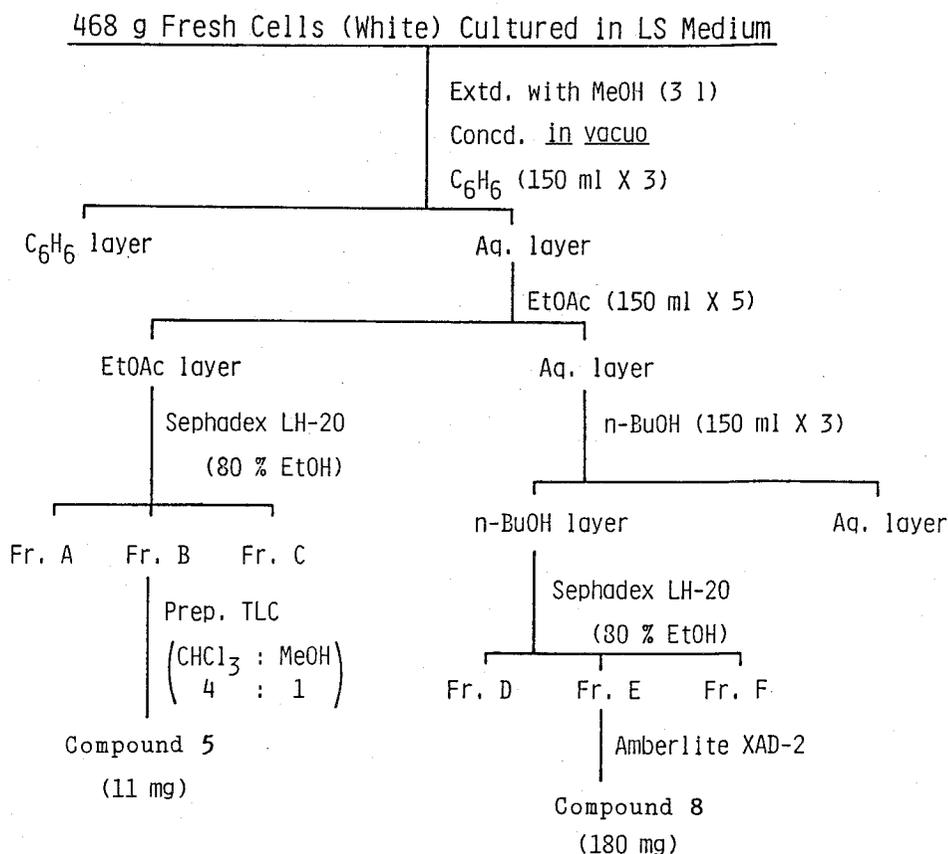
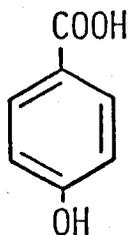


Fig. 3. Separation of the MeOH extract of shikonin-free cells.

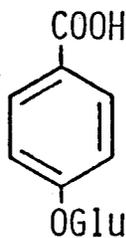
すなわち酢酸エチルエキスを Sephadex LH-20カラムにかけ、80% エタノールで溶出することによって化合物 5を得た。本化合物は無色針状晶で mp. 212-213 °C、展開溶媒 (I) および (II) (→実験の部参照) を用いて TLC (SiO₂)で展開

した時、各々 Rf値 0.77、および 0.24を与え、UVスペクトルにおいては 208 および253 nm に極大吸収があり、フェノール性化合物であることを示している。また $^1\text{H-NMR}$ においては δ 6.92 (d, J=9 Hz)および 7.92 (d, J=9 Hz) にAB タイプのダブルットが観察され、1,4-置換ベンゼンであることが推察された。さらに IR スペクトルにおいてカルボキシル基の存在が示唆されたことも考慮に入れ、本化合物は *p*-hydroxybenzoic acid (5) であると推定し、標品と直接比較することによりそれを証明した。

一方 *n*-ブタノールエキスも同様に Sephadex LH-20 カラムを用いて、80% エタノールで溶出することにより化合物 8 を単離した。本化合物は無色針状晶で、mp. 210-211 °C、TLC [SiO_2 , 展開溶媒 (1)]において Rf値 0.22を与え 5より極性が大きく、UVスペクトルにおいては 205 および 246 nm に吸収極大を示した。さらに IR スペクトルにおいて、その類似性から 8 は 5 の関連化合物であることが予想された。 $^1\text{H-NMR}$ のパターンは 5 と同様、アロマティック領域に ABダブルット [δ :7.98 (2H, d, J=9 Hz), 7.13 (2H, d, J=9 Hz)]が観察され、さらに δ 5.01に 1H分のダブルット(J=7 Hz), δ 3.35-3.97 に 6H 分のプロトンシグナルが認められ、本化合物は配糖体であることが示唆された。アノメリックプロトンに帰属できるシグナルが δ 5.01 (J=7 Hz) に認められること、また β -glucosidaseで本化合物が容易に加水分解されることから、本化合物は *p*-O- β -D-glucopyranosylbenzoic acid (8) であると推定し²¹⁾、別途合成した標品と直接比較することによってそれを証明した。



5



8

ムラサキ培養細胞および根における 5 および 8 の含量

ムラサキ培養細胞が LS培地で培養した時、および色素生産培地の M9培地で培養した時、5 および 8 の含量がどう変化するかを HPLC を用いて定量した結果を Table 1 に示した。なおここで用いた M18株は高い色素生産能を有するが、この他にも田端ら¹⁴⁾は本来、色素生産能を欠く M130株も得ている。また先の M18株においても培地に添加するオーキシンを IAA から 2,4-D に換えて培養を行なうと、色素生成がほとんど完全に阻害される。LY株はこのように、人為的に 2,4-D のみを生長調節物質として加え、その中で継代培養して色素生成を阻止した細胞株として確立したものである。なお、M130および LY株は M9培地中においても shikonin 系色素を生成出来ないが、その理由として前駆体である 5を生合成出来ないという可能性が考えられるので、これらの株についても HPLC による同様の検討を加えた。

Table 1. Contents of 5 and 8 in the cultured cells and roots of Lithospermum erythrorhizon.

Culture strain	Culture medium	Cell yield (g fr.wt/30 ml)	Shikonin (mg/g fr.wt)	5 (mg/g fr.wt)	8 (mg/g fr.wt)
M130	LS	6.3	0	0.018	1.00
LY	LS	6.5	0	0.021	1.25
M18	LS	5.2	0	0.011	1.30
M18	M9	2.7	3.2	trace	0.012
Ko-shikon	-	-	1.4*	0.23**	0.014**

* % of dry wt
** mg / dry wt

ところが、shikonin を生成していない M18 (LS 培地)、M130 および LY の細

胞中には、1.0-1.3 mg/g fresh wt (18-23 mg/g dry wt)といった多量の 8 が、少量の 5 (0.01-0.02 mg/g fresh wt、0.18-0.35 mg/g dry wt)と共に認められた。これに対し、M9培地中で shikonin を生成している M18株の細胞では 5、8 共にわずかしき含まれておらず、M9培地に移植される前の約 1/100の量にまで減少していた。

ムラサキの乾燥根についても同様の定量実験を行なったところ shikonin 誘導体 1.4 % (dry wt あたり) に比して、5 および 8 の含量は各々 0.23 および 0.014mg/g dry wt に過ぎず、shikonin 生産細胞における含量とほぼ同程度の低い値を示した。ここで 8 が 5 より少なく、新鮮培養細胞と比が逆転しているのは根の乾燥、保存過程において配糖体結合が切断されたためと推量される。

8 の蓄積はムラサキ培養細胞に特異的な現象であるのか、あるいは 8 は植物培養細胞一般に常成分として存在するかを確認するために、6種の植物の懸濁培養細胞について定量実験を行なった。その結果は Table 2 に示すように、ごく少量の 8 (4.7 - 8.0 μ g/g fresh wt) と、痕跡量の 5 がアカメガシワ (Mal-lotus japonicus)、ダツラ (Datura innoxia)、シャクヤク (Paeonia albiflo-ra var. trichocarpa) で認められたにすぎず、クチナシ (Gardenia jasminoi-des)、シソ (Perilla frutescens var. crispa)、ニチニチソウ (Catharanthus roseus) およびサイコ (Bupleurum falcatum) の懸濁培養細胞においてはこれらの化合物は全く検出できなかった。この知見は、8 の多量の蓄積はムラサキの shikonin 非生産性細胞に特異的であり、1 の生合成との関連を示唆している。

Table 2. The contents of 5 and 8 in the cell suspension cultures of other plant species

	5 (µg/g fr. wt)	8 (µg/g fr. wt)
<u>Mallotus japonicus</u>	1.66	8.00
<u>Datura innoxia</u>	trace	4.72
<u>Paeonia albiflora</u> var. <u>trichocarpa</u>	N. D.*	6.90
<u>Gardenia jasminoides</u>	N. D.	N. D.
<u>Perilla frutescens</u> var. <u>crispa</u>	N. D.	N. D.
<u>Catharanthus roseus</u>	N. D.	N. D.
<u>Bupleurum falcatum</u>	N. D.	N. D.

* not detected

第2項 Shikonin 生成との関連

8 が前述のように shikonin 生合成と密接な関係を有していることが示唆されたので、その生合成との関連を経時的に追跡することを試みた。Fig. 4 は M18 株を用いて LS 培地中で生長している細胞中の 5 および 8 の生成量を経時的に定量した図である。細胞新鮮重量あたりの 8 は培養期間を通じてほぼ一定の高レベルに保たれており、8 のフラスコあたりの総生産量は細胞の生長とほぼ平行して増加した。一方、5 の含量は 8 に比べてやや遅れて増加し出す傾向が認められた。

LS培地で培養した細胞を M9 培地に移植して shikonin 生産を始めさせると、Fig. 5 に示すように 8 の含量は培養開始後 4日目には急速に低い値まで減少した。それに対して細胞はこの時期から shikonin 生産を開始した。培養開始後 16日目には shikonin 生産は最大になるのに対し、8 はごく少量しか検出できないほどにまで減少した。5 も時間とともにその含量が減少したが、減少の速度は 8 に比べてやや遅いことが認められた (Fig. 5)。

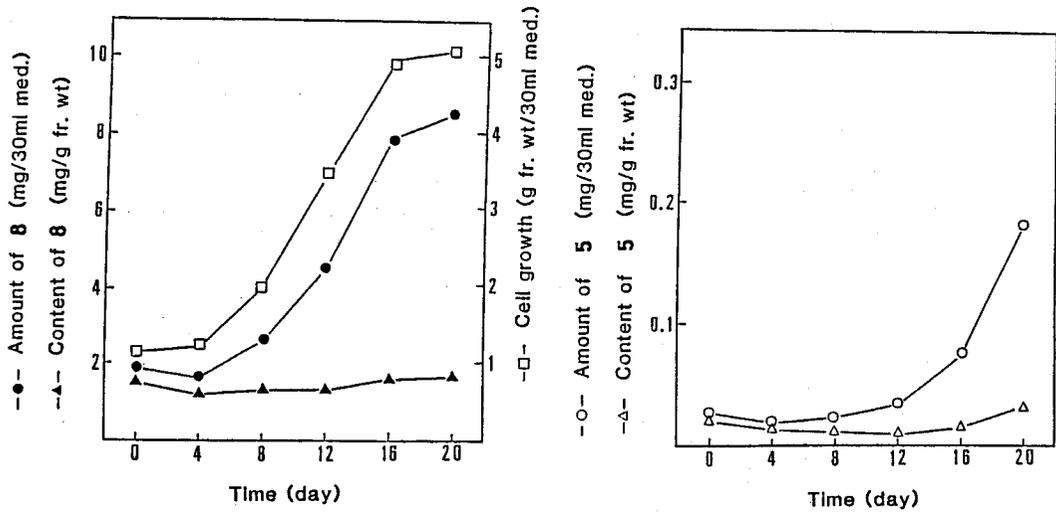


Fig. 4. Time course of 5 and 8 in Lithospermum cells cultured in LS medium

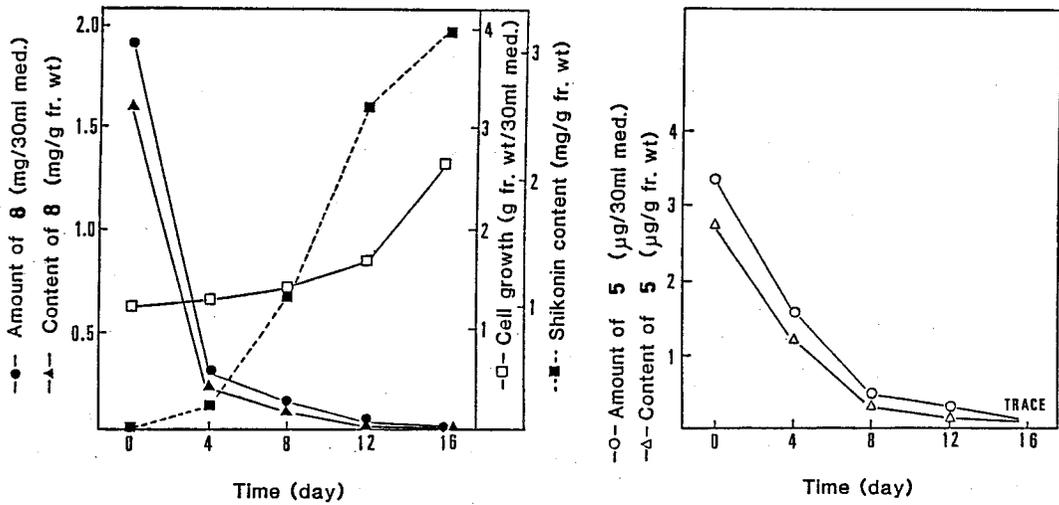


Fig. 5. Time course of 5 and 8 in Lithospermum cells cultured in M9 medium

5 は Plagiobotrys arizonicus の植物体を用いた Zenkら¹⁹⁾の研究、ならびにムラサキカルスを用いた井上ら¹⁵⁾の実験によって trans-cinnamic acid (4) を経て l-phenylalanine (3) から合成され、m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid

(6) および geranylhydroquinone (7) を経て、さらに alkannin ないしそのエナンチオマーである shikonin へと取り込まれると報告されている。さらに井上ら¹⁵⁾はオーキシシンである 2,4-D によって、6 の脱炭酸が阻害されるのではないかと推定している。

本研究では、shikonin を生合成していない、LS液体培地中のムラサキ培養細胞でも多量の 5 を生産し続けており、そのほとんどは配糖化されて 8 となり、蓄積されているということを示した。さらにこの細胞が M9培地へ移植されて shikonin 生成の誘導が行なわれると、8 は速やかに加水分解されて、shikonin 前駆体の 5 となり、shikonin の生合成に利用されていくことを示唆している (Fig. 6)。

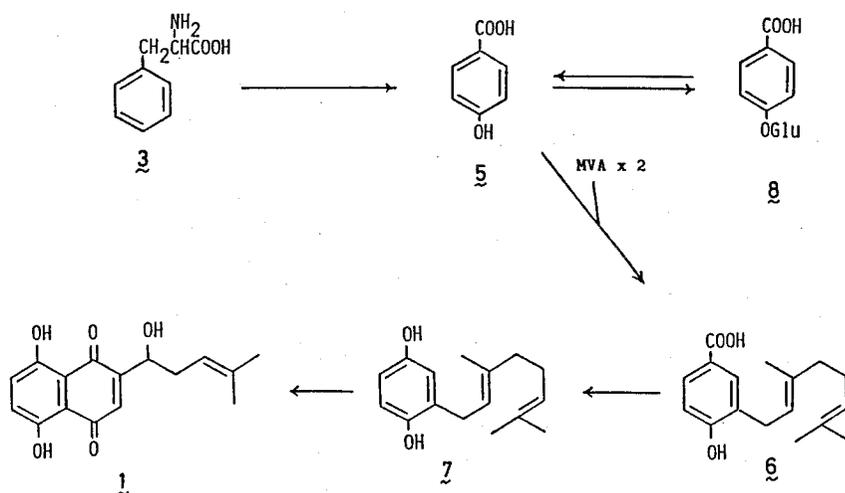


Fig. 6. Biosynthetic pathway of shikonin.

第2節 Shikonin 生合成の微量中間体および関連化合物

LS培地で培養され、shikonin 誘導体を生成していない細胞においても、p-hydroxybenzoic acid (5) までの生合成は特に抑制されることなく、ほぼ正常に行なわれていることが前節の結果から明らかになった。しかし、量的に多く蓄積している化合物の直後の生合成反応が、必ずしも最終代謝産物を合成できない原因になっているとは限らない。すなわち、5 のプレニル化反応が shikonin 生合成

の流れの上で大きなポイントになっていることに間違いはないが、LS培地で培養され、shikonin を全く生成していない細胞においては、このプレニル化が全く進まないために色素を生成できないのか、あるいは生合成はある程度先まで進んでいるが、その流れが完全に抑制されている段階が別に存在するのかは明らかでない。また、ムラサキの細胞が LS 培地中で色素生成能を欠くもう一つの可能性として、細胞が生合成した shikonin の前駆体が shikonin 以外の別の代謝産物に変換されていることも考えられる。このことを明らかにするべく、LS培地で培養した M18株を用いて、shikonin 生合成の中間体ならびに関連化合物の検索を行なった。

第1項 m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6)および geranylhydroquinone(7)の単離、同定

井上ら¹⁵⁾は、ムラサキカルスを用いた生合成のトレーサー実験を行ない、培地に投与した p-hydroxybenzoic acid (5) が shikonin の前駆体として 6 および 7 に変換されることを明らかにした。しかし投与した基質の取り込み率が低いため、6 および 7 は単離されなかった。そこで著者は 6 や 7 が shikonin 生合成の中間体であれば細胞内に存在するはずであると考えて、まずこれら両化合物の単離を試みた。

M9 培地中、25℃、暗黒下で 14日間培養し、多量の赤色色素を生成したムラサキ培養細胞株 M18 (400 g dry wt)をメタノールで抽出し、Fig. 7 に示すように濃縮後、水とエーテルで分配してエーテル可溶部を得た。溶媒を留去した後、そのエーテルエキスを シリカゲルカラムクロマト (ベンゼン：アセトン=5：1)、Sephadex LH-20カラムクロマト (エタノール)、ローバーカラム C-8 (70% アセトン) にかけて分画精製し、得られた画分 H をさらにプレパラティブ TLC (SiO₂、クロロホルム：メタノール=20：1) にかけて精製し、化合物 6 および 7 を単離した。また 6 は画分 K から、7 はローバーカラム C-8のフラクション L からも同様のプレパラティブ TLC により単離された。

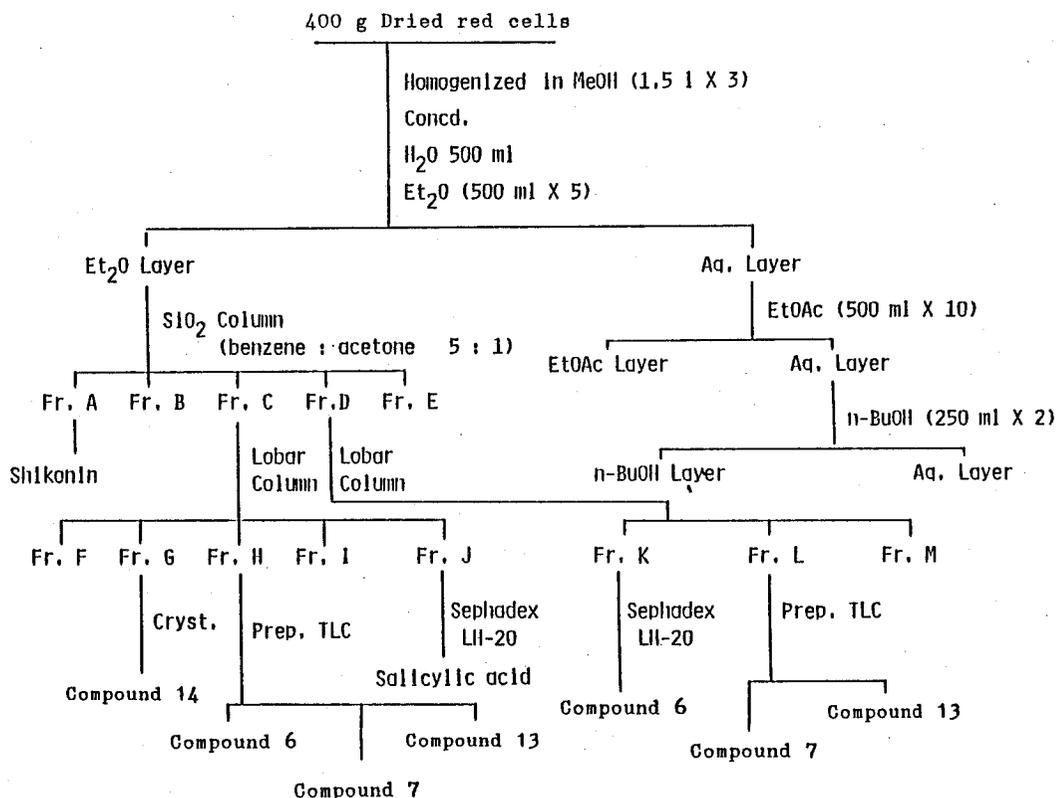
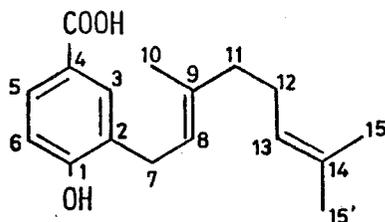


Fig. 7. Separation of the MeOH extract of shikonin-producing cells.

化合物 6 は組成 $C_{17}H_{22}O_3$ 、無色油状物質 (71 mg) として単離された。その UV スペクトルは 207, 257 nm ($\log \epsilon$: 4.12, 3.92) に吸収極大を示し、マススペクトルにおいては m/z 274 に親イオンピークを認めた。またその IR スペクトルにおいて 1685 cm^{-1} に大きなバンドが認められ、分子内にカルボキシル基を有していることが推察された。 $^1\text{H-NMR}$ においては 1,3,4-三置換ベンゼン環に帰属できる ABX タイプにカップリングしたシグナルが δ 7.89 (1H, d, $J=2$ Hz), 7.88 (1H, dd, $J=2, 9$ Hz), 6.85 (1H, d, $J=9$ Hz) と芳香族領域に観察され、 δ 5.32 (1H, t, $J=7$ Hz) および δ 5.07 (1H, br. t, $J=7$ Hz) に 2 個のビニルプロトン、 δ 3.41 (2H, d, $J=7$ Hz) に低磁場シフトしたベンジル位に帰属されるメ

チレンプロトン、 δ 2.00-2.20 (4H, m) に4個分のメチレンプロトン、および δ 1.78, 1.68, 1.60 に二重結合に直接結合した3個のメチル基に帰属される各 3H 分の singlet が観察された。これらのデータは井上ら¹⁵⁾によって報告されている m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) のそれらとよく一致している。最終的に、本化合物が 6 であることは、別途合成した標品と直接比較することによって証明した。



6

本化合物の同定のために 6 を Fig. 8 に示す方法により合成することとした。即ち、p-hydroxybenzoic acid (5) を塩酸-メタノール中、methyl p-hydroxybenzoate (9) とし、9 を無水トルエン中、金属ナトリウムと共に還流してそのナトリウム塩とし、これと別途準備した geranyl bromide とをトルエン中で縮合させた²²⁾。得られた methyl m-geranyl-p-hydroxybenzoate (10) をアルカリ加水分解して 6 を得た¹⁵⁾。

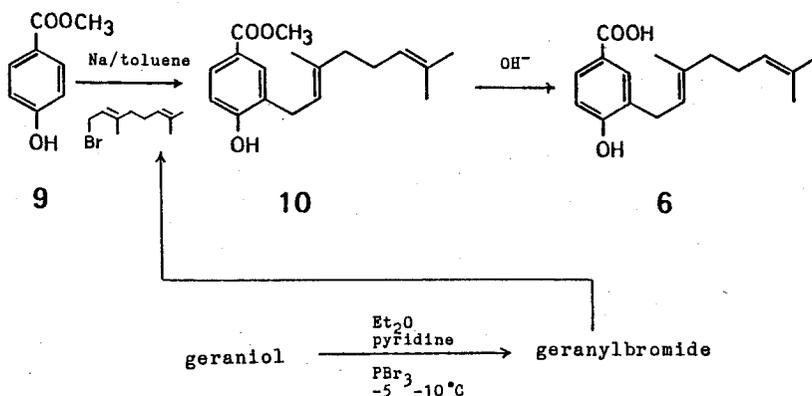
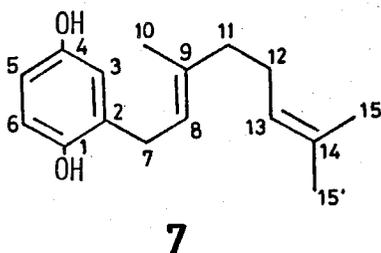


Fig. 8. Synthesis of m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid.

化合物 7 は組成 $C_{16}H_{22}O_2$ 、無色油状物質 (73 mg) として単離された。その UV スペクトルは 208, 293 nm ($\log \epsilon$: 4.05, 3.53) に吸収極大を示し、マススペクトルにおいては m/z 246 に親イオンピークが観察された。また IR スペクトルにおいては 3350, 2920, 1500, 1450, 1180 cm^{-1} に吸収が認められた。その 1H -NMR は、芳香族領域の δ 6.68 (1H, d, $J=8Hz$), 6.60 (1H, d, $J=3 Hz$), 6.57 (1H, dd, $J=3, 8 Hz$) に ABX パターンでカップリングしているシグナル、 δ 5.29 (1H, t, $J=7 Hz$) および 5.07 (1H, br. t, $J=7 Hz$) に 2 個のビニルプロトン、 δ 3.30 (2H, d, $J=7 Hz$) にはベンジル位のメチレンに帰属されるプロトン、 δ 2.00-2.20 (4H, m) はメチレンプロトン 4 個分、さらに δ 1.75, 1.68, 1.60 には二重結合に直接結合したメチル基に帰属される 3H 分の singlet 3 本が認められた。これらのデータは geranylhydroquinone (7) のそれ¹⁵⁾ と同一であることから、本化合物は 7 と推定し、標品と直接比較することによって同定した。



第2項 Deoxyshikonofuran 等の単離、構造決定

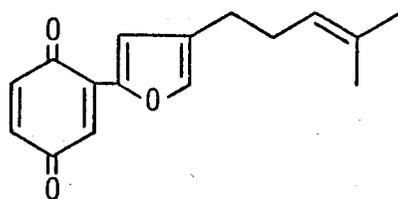
本節第1項で述べた、色素生産性細胞のメタノールエキスから得たエーテル可溶部についてさらに精査を進めた。Fig. 7 の中に示すフラクション H をさらにシリカゲルを用いたプレパラティブ TLC によって、化合物 13 を単離した。また本化合物は 7 と分離しにくく、フラクション L から同様のプレパラティブ TLC を用いて分画し単離することができた。

一方、エーテル可溶部をシリカゲルカラムクロマトにかけて得たフラクション

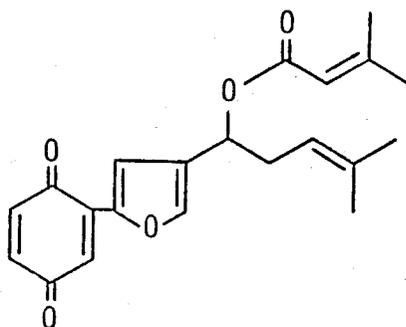
C を、さらにローバーカラム C-8 にて分画精製し、フラクション G を得た。化合物 14 はこの画分をジクロロメタンから結晶化させることによって単離した。

化合物 13 は組成 $C_{21}H_{24}O_5$ 、無色油状物質 (93 mg) として単離された。本化合物は光学活性 $[\alpha]_D -60.8^\circ$ ($c=0.5$, $CHCl_3$) を示し、その UV スペクトルは 214, 264(sh), 269, 281, 323 nm ($\log \epsilon: 4.27, 3.99, 4.08, 3.99, 3.96$) に吸収極大を示し、その分子式はマススペクトルによって m/z 356 に親イオンピークを示すことによって支持された。また本化合物は TLC (SiO_2) にて展開後、一夜放置しておく、と、スポットが橙黄色に呈色する特徴を示した。このことは、本化合物が分子内にヒドロキノン部分を有しており、それが空气中で酸化されることによって、echinofuran²³⁾ のような橙黄色のベンゾキノン誘導体に変化したのではないかと推察された。

エキノフランは、井上ら²³⁾ によってムラサキ科の *Echium lycopsis* の培養細胞から初めて単離されたベンゾキノン誘導体であり、分子内にフラン環を有している橙黄色油状物質である。この類縁化合物である echinofuran B (11) および C (12) は田端ら²⁴⁾ により、LS 培地に活性炭を加えたムラサキ液内懸濁培養細胞から単離されており、ムラサキ培養細胞を M9 培地で培養した時にも少量は生合成される副代謝産物とみなすことができる。



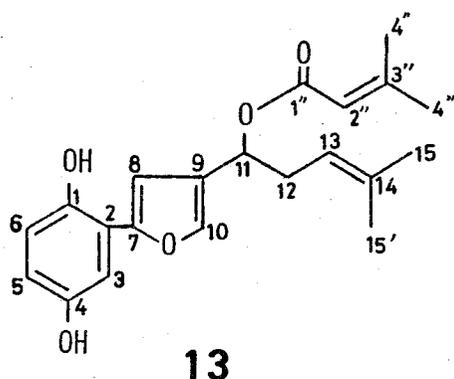
11



12

化合物 13 はその 1H -NMR において、1,2,4-三置換ベンゼンに帰属できる δ 6.99 (1H, d, $J=3$ Hz), 6.79 (1H, d, $J=9$ Hz), 6.68 (1H, dd, $J=3, 9$ Hz) の 3 個のプロトンが芳香族領域に観察され、この他に、フラン環に特徴的な芳香族

プロトン2個が δ 7.44 および 6.70 に各 1H 分の singlet として認められた。またこれらより高磁場領域には、 δ 5.79 (1H, t, $J=7$ Hz) に水酸基の付け根のプロトン、 δ 5.09 (1H, br.t, $J=7$ Hz) にビニルプロトン、 δ 2.60 にはメチレンに帰属される 2H 分の triplet ($J=7$ Hz)、また δ 1.68, 1.61 には二重結合上の2個のメチル基に由来する 3H 分の singlet のシグナルが2本観測された。さらに、 β, β -dimethylacryloyloxy グループに帰属される δ 5.71, (1H, br. s), 2.17 (3H, s), 1.90 (3H, s) のプロトンシグナルが認められた。これらのデータは先に紫根から吉崎ら²⁵⁾によって分離されている shikonofuran E (13) のデータとよく一致している。吉崎らは本化合物 (β, β -dimethylacryl 誘導体)を、shikonofuran D (isobutyl 誘導体)との混合物として分離している。



そこで著者は改めて本化合物が shikonofuran E (13) の構造で表わされることを証明するべく、本化合物の酸化を行なった。化合物 13 はその分子内にヒドロキノン部分を持っているため、この部分だけを酸化すれば対応するベンゾキノン誘導体 echinofuran C (12) に導くことができる。そこで化合物 13 を無水エーテル中、酸化銀 Ag_2O で一夜酸化することによって、ほぼ定量的に橙黄色油状物質 (12) を得ることができた。こうして得た 12 の IR, UV, 1H -NMR, MS の各種スペクトルデータは文献値²⁴⁾とよく一致し、さらに標品の echinofuran C (12) と直接比較することによって同定した。これは 13 が純品として分離された最初の例である。

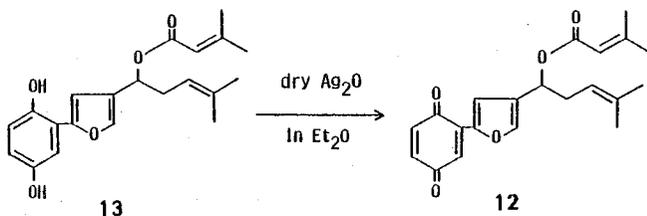
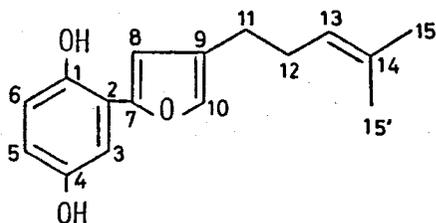


Fig. 9. Oxidation of 13 by Ag_2O .

化合物 14 は新化合物で、組成 $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_3$ 、mp $139-141^\circ$ の無色針状晶(33 mg)として単離された。その UV スペクトルにおいては 207, 266 (sh), 272, 284, 324 nm ($\log \epsilon$: 4.18, 4.02, 4.10, 4.39, 3.94) に吸収極大を有し、このパターンは前述の 13 に非常に良く類似しており、関連の化合物であることが推察された。また化合物 14 は 13 と同様に、TLC 上で一夜放置すると、無色から橙黄色に変色することから、同様の furylhydroquinone 誘導体であることが示唆された。本化合物の MSスペクトルでは m/z 258に親イオンピークが認められ、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいては 13 と同様、芳香族領域にベンゼン環由来の δ 6.97 (1H, d, $J=3$ Hz), 6.83 (1H, d, $J=9$ Hz), 6.67 (1H, dd, $J=3, 9\text{Hz}$) といった ABX パターンの3個のシグナル、フラン環に由来する δ 7.27, 6.56 の2個の singlet が観察された。加えて、ビニルプロトンとして δ 5.16 (1H, t $J=7$ Hz)、メチレンプロトンとして δ 2.48 (2H, t, $J=7\text{Hz}$), 2.27 (2H, dt, $J=7$ Hz)、ならびに二重結合上のプロトンとして δ 1.70 (3H, s), 1.61 (3H, s) が認められた。



14

これらのデータから本化合物は shikonofuran 類の基本骨格の側鎖に酸素官能

基が結合していない 14 の構造を持つものであることが示唆される。そこで、13 の場合と同様に、無水エーテル中、酸化銀 Ag_2O で酸化することによって、14 に対応するベンゾキノン誘導体である echinofuran B (11)²⁴⁾ を収率良く得て、この新化合物の構造を 14 と決定した (Fig. 10)。

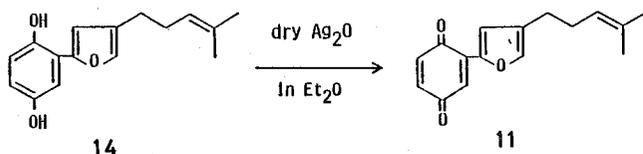


Fig. 10. Oxidation of 14 by Ag_2O .

第3項 Dihydroshikonofuran (15) の単離、構造決定

上述のように、多量の shikonin 系赤色色素を含有するムラサキ培養細胞から 1 種の新化合物を含む 4 種の shikonin 生合成中間体、および関連化合物を単離、構造決定することに成功した。そこで次の段階として、LS 培地において培養された shikonin 系赤色色素を全く生合成していないムラサキ培養細胞について特異的成分の検索を行なった。

LS培地中、25℃、暗黒下で 20日間培養した shikonin 系赤色色素を全く生成していないムラサキ培養細胞株 M18 (400 g dry wt) を、メタノールで抽出し、Fig. 11 に示すように、水とエーテルで分配してエーテル可溶部を得た。この実験においては、赤色細胞と白色細胞の中に含有されている成分の比較を目的としたため、前述の shikonin 生産性細胞と同量の試料を用いて同様の抽出、分離操作を加えた。

細胞のメタノールエキスのエーテル移行部について溶媒を留去した後、シリカゲルカラムクラマト (ベンゼン：アセトン=5：1)、ローバーカラム C-8 (70% アセトン)、プレパラティブ TLC (SiO_2 , クロロホルム：メタノール=20：1)

にかけて分画精製を行なうこととした。しかし、最初のシリカゲルカラムクロマトにおいて6、7などが含まれるはずのフラクション C, D の量が少なく、TLC, HPLC において、微量の 6 がフラクション C に認められたにすぎないため、ローバーカラム C-8 による分画を省略し、直接プレパラティブ TLC (SiO₂, クロロホルム：メタノール=20 : 1) にかけることとした。その結果、m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) を 4 mg 単離することができ、IR, UV, ¹H-NMR 等各種スペクトルデータ、および標品との直接の比較によって同定した。

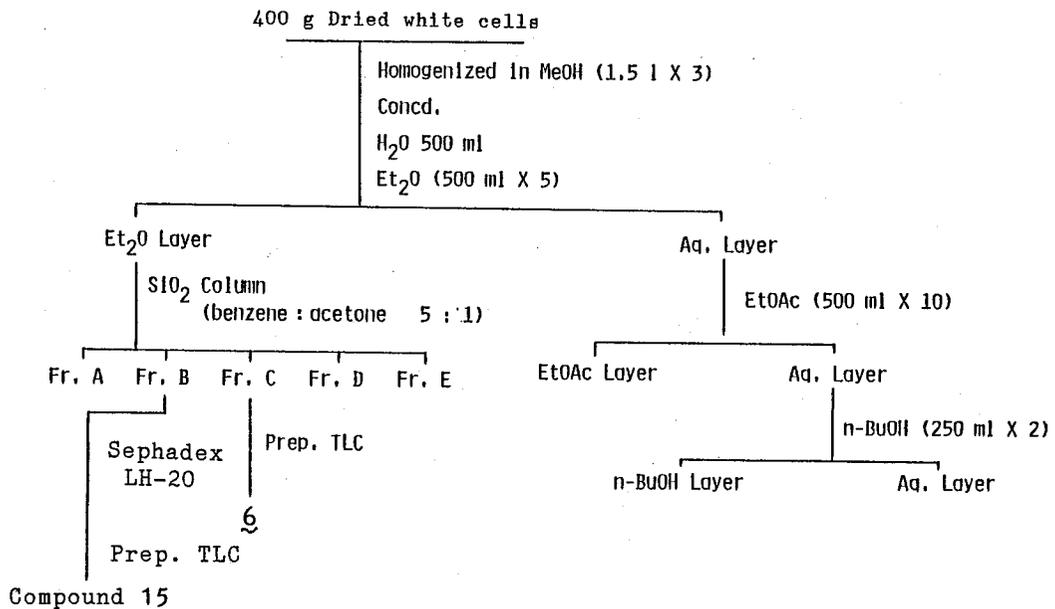


Fig. 11. Separation of the MeOH extract of shikonin-free cells.

次に、他の化合物の存在を TLC, HPLC を用いて検索したが、白色細胞から得たエーテル層は、多量の β -sitosterol などの phytoosterol 類およびトリグリセライド様の脂溶性成分を主な成分として含んでおり、ここで問題にしているベンゼン環を有するような shikonin 生合成に関与すると考えられる UV吸収のある化合物の数は赤色細胞に比べて少なく、7、13、14 は全く検出されなかった。しかし、TLC, HPLC を用いて詳細に検索した結果、最初の分画操作であるシリカゲ

ルカラムクロマトにおいて、6 が溶出してくる前の画分であるフラクション B に、7 に似た極性のスポットが比較的多量に存在することを認め、shikonin 生合成における関連化合物であろうと想定し、単離を試みた。フラクション B をさらに Sephadex LH-20 カラム、プレパラティブ TLC (SiO₂, ベンゼン：酢酸エチル=8：2) によって精製し、化合物 15 を得た。

化合物 15 は無色油状物質 (202 mg) として単離された。本化合物は新化合物であり、光学活性 $[\alpha]_D -90.2^\circ$ (c=0.4, CHCl₃) を示し、その UV スペクトルは 204, 293 nm (log ϵ : 4.15, 3.44) に吸収極大を示し、7 に酷似している。また本化合物の TLC (SiO₂) による R_f 値は、展開溶媒 (I) および (II) (→実験の部) において各々 0.36 および 0.37 であり、6 と 7 の中間の極性を示した。さらに展開後の TLC を空气中に一夜放置しておく、と、スポットが淡橙黄色を呈することから、分子内のヒドロキノングループが空気酸化によってベンゾキノン誘導体に変化したのではないかと推察された。本化合物は ¹H-NMR において 1,2,4-三置換ベンゼンに由来する δ 6.67 (1H, d, J=8 Hz), 6.60 (1H, dd, J=3, 8 Hz), 6.53 (1H, d, J=3 Hz) の 3 プロトンが観察され、さらに δ 5.99 (1H, br. t, J=4 Hz) に O-functional group を持ったベンジルメチンプロトン、 δ 5.60 (1H, d, J=1 Hz), 5.09 (1H, m) に 2 個のビニルプロトン、 δ 4.66 (2H, m) に O-functional group を持ったメチレンプロトン、 δ 2.00-2.30 (4H, m) にメチレン基 2 個分のプロトン、および δ 1.68, 1.60 には二重結合上のメチル基に帰属される 3H 分の singlet が 2 本観察された。このスペクトルパターンは geranylhydroquinone (7) のそれに類似するが、7 ではベンジル位に O-function は存在せずにメチレンとなっていること、また 7 のメチル基が 3 個あるのに対して、15 ではベンジル位にプロトンは 1 個しか存在せず、代わりに O-function が結合していると思われること、および O-function を有するメチレンが 1 個現われている点が異なる。この知見から化合物 15 は 7 の側鎖部分が水酸化された 7 のジヒドロキシ誘導体 (15_a) であるか、もしくは 7 の側鎖部分にエーテル結合を形成して閉環した化合物 (15_b) であろうと予測された。さらにその酸素置換基の位置は、¹H-NMR から判断して 7 の 3 個のメチル基のうちの一つとベンジル位であることが明らかである。¹H-NMR における帰属は、¹H-¹H homo-decoupling

実験、および $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ の low power の selective decoupling を、ゲート付きデカップリングのモードで行なうことによって確認し、Table 3 のように帰属した。

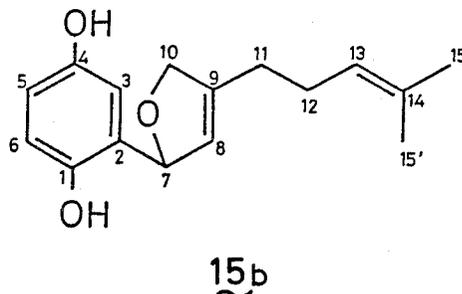
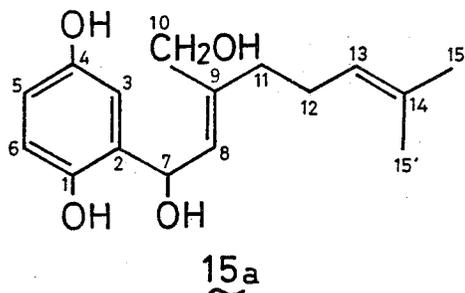


Table 3. ^1H -NMR spectra of 7 and 15 (in CDCl_3)

7					15a, b				
^1H	ppm	No.	J (Hz)		^1H	ppm	No.	J (Hz)	
3	6.60	(d) 1H	3		3	6.53	(d) 1H	3	
5	6.57	(dd) 1H	3, 8		5	6.60	(dd) 1H	3, 8	
6	6.68	(d) 1H	8		6	6.67	(d) 1H	8	
7	3.30	(d) 2H	7		7	5.99	(b.t) 1H	4	
8	5.29	(t) 1H	7		8	5.60	(b.d) 1H	1	
11	2.00	(m) 4H			10	4.66	(m) 2H		
12	2.20				11	2.00	(m) 4H		
13	5.07	(b.t) 1H	7		12	2.20			
10	1.75	(s) 3H			13	5.09	(m) 1H		
15	1.68	(s) 3H			15	1.68	(s) 3H		
15'	1.60	(s) 3H			15'	1.60	(s) 3H		

^{13}C -NMR においても化合物 15 は 7 のカーボンシグナルとよい対応を示し、 ^1H -NMR から推察した通り、7 の O-function を有した誘導体であることが支持された (Table 4)。すなわち、O-function を有している炭素のうちの1個は δ 84.58 に、もう一方は 77.79 ppm に現われており、さらにオフレゾナンススペクトル、および APT の測定によって、前者は1個、後者は2個のプロトンが結合

した炭素であることが証明された。注目すべき点はこの2個のカーボンシグナルのケミカルシフトが、他の一般的な水酸基を持っている炭素のそれよりも低磁場に出ている点で、このことはこれら2個の炭素どうしがエーテル結合を介して閉環しており、5員環を形成していることを示している。すなわち化合物 15 の構造は上の 15_b式で表わされることになる。その5員環部分の推定構造の妥当性は、¹H-NMRにおける H-10 と H-7 との2個のプロトン間で生じるホモアリルカップリングが 4 Hz と大きく、ジヒドロフラン環に特徴的な現象²⁶⁾であることから強く裏付けられている。また EI 及び CI (NH₃) マススペクトルの測定においても最大のイオンピークが m/z 260 であるということは、化合物 15 の構造がジヒドロキシ体ではないことを支持するものである。

Table 4. ¹³C-NMR spectra of 7 and 15 (in CD₃OD)

7				15			
¹³ C	ppm	No.	Off-reso.	¹³ C	ppm	No.	Off-reso.
1	149.87	1	s	1	148.07	1	s
2	130.08	1	s	2	130.79	1	s
3	113.73	1	d	3	114.21	1	d
4	150.95	1	s	4	151.20	1	s
5	116.40	1	d	5	115.64	1	d
6	117.07	1	d	6	116.78	1	d
7	48.81	1	t	7	84.58	1	d
8	125.29	1	d	8	124.76	1	d
9	132.01	1	s	9	133.01	1	s
10	25.87	1	q	10	77.79	1	t
11	29.01	1	t	11	28.10	1	t
12	27.67	1	t	12	27.37	1	t
13	123.84	1	d	13	123.81	1	d
14	136.55	1	s	14	140.82	1	s
15	17.71	1	q	15	25.83	1	q
15'	16.16	1	q	15'	17.78	1	q

この構造を確認するために化合物 15 のアセチル化を行なった。化合物 15 を無水ピリジンに溶解し、常法通り無水酢酸によってアセチル化を行なうと、収量良く化合物 15 のアセチル誘導体 (16) C₂₀H₂₄O₅ (m/z 344, M⁺) が得られ、その ¹H-NMRにおいて δ 2.31 および 2.27 に2個のアセチル基の存在を示すシグ

ナルを与えた (Fig. 12)。もし化合物 15 の構造が 15_a であれば本化合物はテトラアセチル体となるはずであるので、推定通り、化合物 15 の構造は 15_b 式であると決定した。ただし、7 位の絶対配置については未決定である。本化合物は新化合物であり、dihydroshikonofuran と命名した。

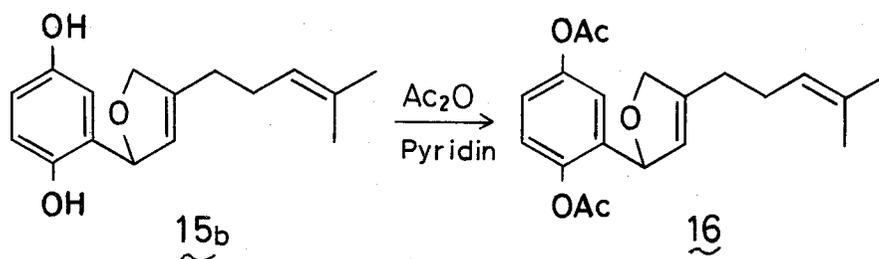


Fig. 12 Acetylation of 15_b

分子内にジヒドロフラン環を有する天然物は少なく、15_b (以下、便宜上 15 と記す) はその構造が特異な化合物でもあり、以下に述べるようにその生合成上の意味は興味深いものがある。

15 は全く shikonin 誘導体を生成していない白色の細胞から単離されたにもかかわらず、分子内にヒドロキノン部分を有しており、このことはとりもなおさず 15 は 7 が水酸化を受け、さらに脱水閉環して生成した化合物ということになり、白色の細胞でも 6 の脱炭酸、および水酸化による 7 の生合成を行なうことができるということになる。さらに白色の細胞において、shikonin 生合成は 15 までは進んでいるが、ナフトレン骨格を持つものが全く検出できないことなどから、この細胞における生合成は 7 の閉環の段階に問題があるため shikonin まで至らないのであろうと推察できる。この知見はムラサキ培養細胞における shikonin 生合成の調節の基本に関する興味深い知見であり、LS 培地中で培養したムラサキの細胞における shikonin 生合成はどこで阻止されているかという疑問に解答を与えるものといえよう。

第4項 Shikonin 生合成関連化合物の細胞内含量

第2節で述べたように、ムラサキの培養細胞系において、キノン系色素に共通の中間体である 6、7、および 7 から誘導されると考えられるベンゾキノン系代謝産物 13、14、15 が見出された。しかし、7 以後のナフトキノン系代謝産物に向かう生合成中間体は、LS 培地で培養した白色細胞においてのみならず、M9 培地で培養した赤色細胞においても検知されなかった。これらの化合物の相互の関係をj知るため、細胞株、または培地の違いによる量的な差違を HPLC を用いて分析した。用いた細胞株は、shikonin 高生産株 M18、非生産株 M130、および M18 株を 2,4-D 培地で継代培養後色素生産能を失った LY 株である。これらをそれぞれ LS 培地ならびに M9 培地の両者で培養した場合について、各化合物の含量を比較した。抽出溶媒についてはクロロホルム、酢酸エチル、アセトン、メタノールなど種々検討した結果、メタノールが最適であることがわかったので、乾燥細胞のメタノールエキスを逆層の HPLC で分析した。なお、定量の際 7 と 15 は 294 nm での吸収により、その他の化合物は 257 nm での吸収によって検出した。

分析試料として、M130 株は IAA と kinetin を含む LS 培地で3週間培養した細胞、一方 LY 株は生長調節物質として 2,4-D のみを含む LS 培地で3週間培養した細胞を用いた。また、各細胞株を shikonin 生産培地 M9 (IAA, kinetin 含有) 中で2週間培養したものをも用いた。いずれの場合も、温度は 25°C、暗黒下で培養した。

結果は Table 5 に示した通りである。M18 株においてはキノン生合成中間体である 6 と 7 は、M9 培地中で shikonin を生成している細胞中に多量含まれていた。6 は LS 培地中の色素を生産していない細胞にも少量存在したが、7 は検出できなかった。同様に、13、14 も LS 培地では生成されなかった。したがって、LS 培地中の細胞の shikonin 生合成は 6 までで止まっているかのように見えるが、意外なことに 15 が多量に蓄積しており、6 の約 40 倍量に達していることがわかった。このことから、6 はさらに 15 まで異常代謝されていると見ることができる。

Table 5. Contents of intermediates and related compounds of shikonin biosynthesis in Lithospermum cell cultures of strain M18, M130 and LY cultured in LS and M9 medium

Compound	M18		M130		LY	
	LS	M9	LS	M9	LS	M9
	(mg / g dry wt)					
6	0.02	0.47	0.02	0.02	0.06	0.04
7	-*	0.04	-	-	-	-
13	-	3.54	-	-	-	-
14	trace	19.03	-	-	-	-
15	0.87	0.08	trace	trace	trace	trace

* not detected

一方、色素生成能を欠く M130 株および LY 株ではいずれの培地においても 15 は蓄積してはおらず、6 のみが、LS 培地中の M18 株のそれとほぼ同程度含まれているにすぎなかった。このことは、これら両細胞株では、6 から先への生合成が進まないことを意味し、変異株の性質を知る上で興味深い知見である。

井上ら¹⁵⁾は先にも述べたように、2,4-D で shikonin 生合成を抑制したムラサキカルスを用いたトレーサー実験では、6 は検出されるが、7 が検出されないことから、6 の脱炭酸と水酸化による 7 への生合成段階が抑制されていると推定している。今回の実験では、7 の異常代謝産物といえる 15 の存在が明らかとなり、IAA を含有する LS 培地中の白色細胞は、6 を 7 を経て 15 に換える能力があることを示している。

ムラサキ培養細胞のキノン系化合物の代謝

本章で明らかにした知見を従来の知見¹⁵⁾と併せて、ムラサキ培養細胞におけるキノン系化合物の推定代謝経路を Fig. 13 にまとめた。

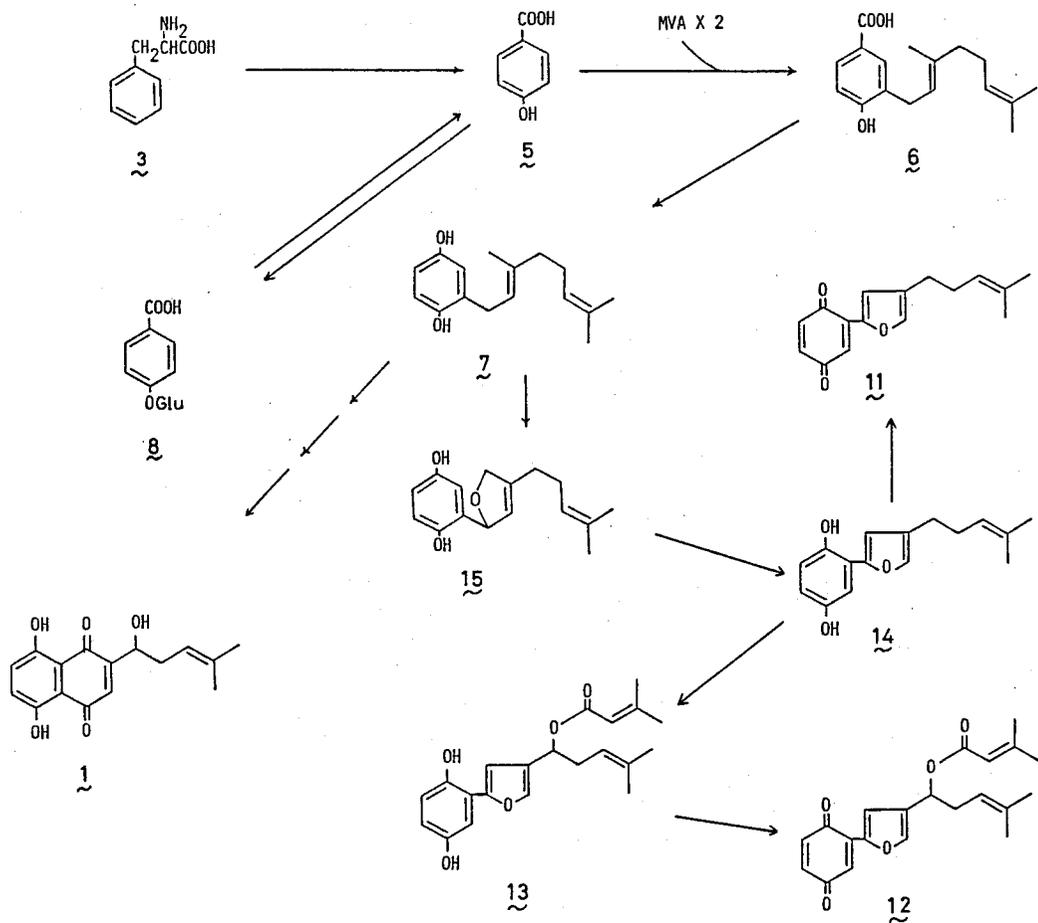


Fig. 13. Biogenetic scheme of quinone compounds in cultured cells of Lithospermum erythrorhizon.

本研究は、LS 培地中の生産株 M18 において、7 は実際に検出できなくても、さらに代謝変換されてナフタレン核の代わりに、5員環を形成したヒドロキノンの形で細胞内に蓄積することを初めて明らかにしたものである。このことは shikonin 生合成は 7 の閉環のステップに最も重要な代謝制御がかけられていることを意味する。

第4章 細胞内および細胞壁中の微量 フェノール性化合物

第3章ではムラサキ培養細胞の shikonin 生合成の流れに直接関係を持っている化合物について述べたが、植物二次代謝は他の化合物の生合成や一次代謝と密接な関わりを持っていることが多く、それらのバランスも無視できない。Shikonin の生合成も、p-hydroxybenzoic acid (5) 以降についてはかなり明らかにされてきたといえるものの、ムラサキにおける 5 をとりまくフェニルプロパノイド等のフェノール性化合物の動態については、同じ shikimic acid から生合成されること以外、何ら明確な知見は得られていない。さらに、細胞壁に存在すると予想される低分子フェノールの役割等についても全く研究がなされていない現状である。本章ではムラサキ培養細胞におけるフェノール代謝全般の流れに興味を持ち、shikonin 生合成の流れと照らしあわせながら、その周辺のフェノール類の代謝研究に着手した。また、それらのフェノール類が shikonin 代謝に及ぼす影響についても考慮し、その役割に対する理解を深め、細胞内での機能を解明することを試みた。

また一方で、ムラサキの細胞をプロトプラストにする際、LS 培地で培養した shikonin を生成していない細胞はプロトプラストになりやすいのに対し、M9 培地で培養した細胞はセルラーゼに対して強い抵抗力を持ち、プロトプラストになりにくいという現象が観察されている。細胞壁のセルラーゼに対する抵抗性の原因としては細胞壁の多糖成分にエステル結合しているフェノール類が良く知られている²⁷⁾。従って、赤色、白色両細胞の細胞壁中のフェノール成分に差異があるものと考え、細胞壁に関しても検討を加えた。

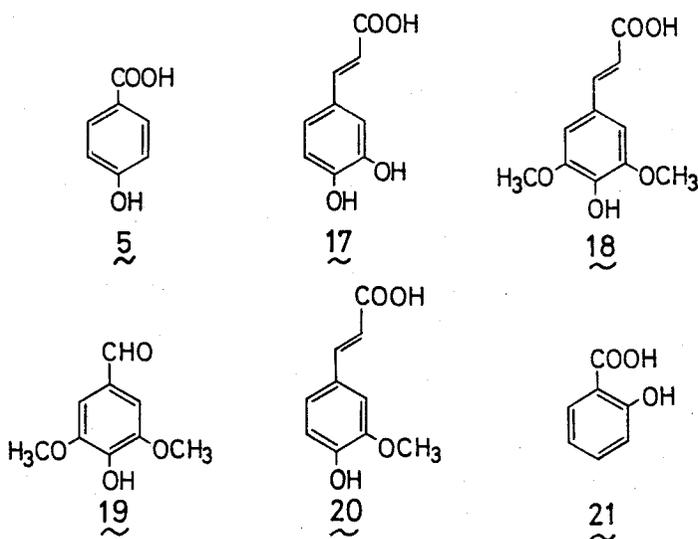
第1節 低分子フェノール類の検索

細胞内フェノール性低分子化合物の単離同定

LS 培地で培養され、shikonin 系色素を含んでいない白色細胞、ならびに M9 培地で培養され、多量の shikonin 誘導体を生成している両細胞にはフェニルプロパノイド系 (C₆-C₃) 化合物や C₆-C₁ のユニットを持つ化合物が種々含有されているが、TLC, HPLC 等の予試験によって、両細胞間にこれら低分子フェノール類の組成、含量上の差異が認められた。そこで、まずこれらの化合物を単離することとした。

LS 培地で培養した新鮮白色細胞 (M18) をメタノールで抽出し、濃縮後、希塩酸で酸性にした後エーテルで数回抽出してエーテル可溶部を得た。これをプレパラティブ TLC (SiO₂, クロロホルム:メタノール=9:1) にかけて UV 吸収のある化合物を目標に分画精製し、5 個のフェノール性化合物を単離した。これらは先に述べた *p*-hydroxybenzoic acid (5) のほか、caffeic acid (17)、sinapic acid (18), syringaldehyde (19), および ferulic acid (20) であることが ¹H-NMR その他各種クロマト上での挙動から判明し、各々標品と直接比較することによって同定した。

一方、M9 培地で培養した赤色の細胞 (M18) についても上記と同様の方法を用いて抽出分画し、5 および 17-20 の化合物に加えて、*o*-hydroxybenzoic acid (21) を単離し、標品と直接比較することによって同定した。



一方、フェニルプロパノイド類は単量体のみではなく、しばしばリグナンなどの二量体やデプシド結合を介する二量体等の存在が知られている。そこで、さらにこれら二量体ないし三量体を単離することを考え、抽出方法を以下のように改変して検索を行なった。すなわち、新鮮細胞をメタノールで抽出、濃縮後、直接ベンゼン、酢酸エチル、*n*-ブタノールで順次抽出して各エキスを得た (Fig. 14)。その酢酸エチルおよび *n*-ブタノールエキスに、TLC 上で明らかな UV 吸収を示し、塩化第二鉄で強く発色するスポットが2個見られたので、これらのエキスを引き続き分画することとした。

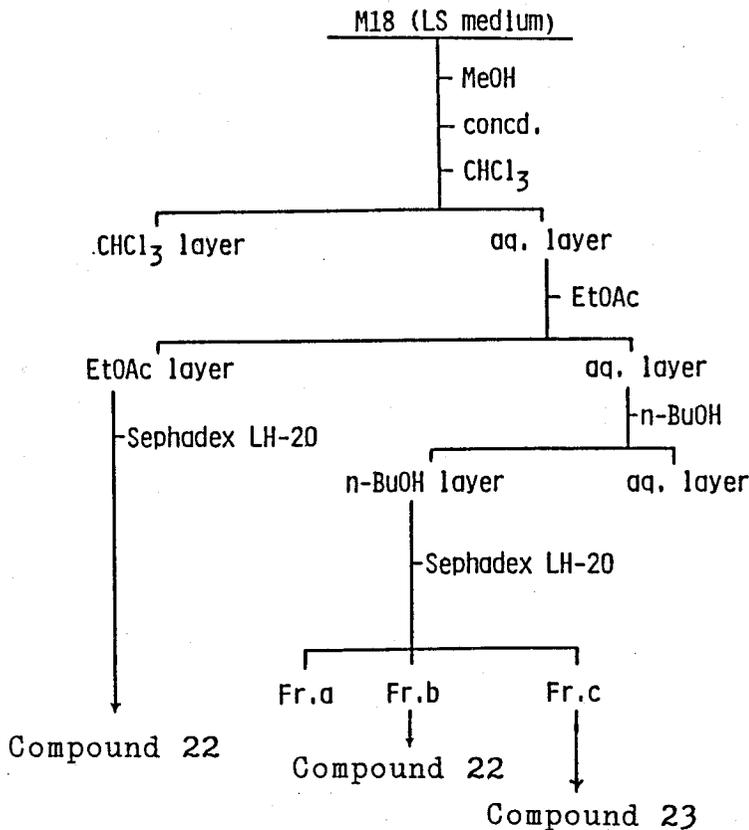
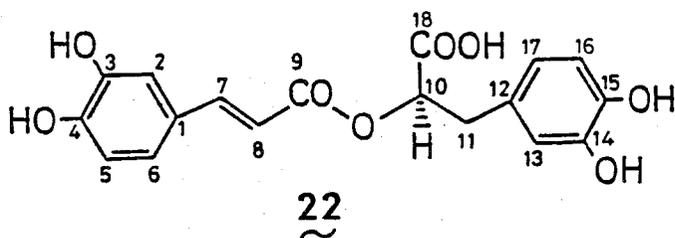


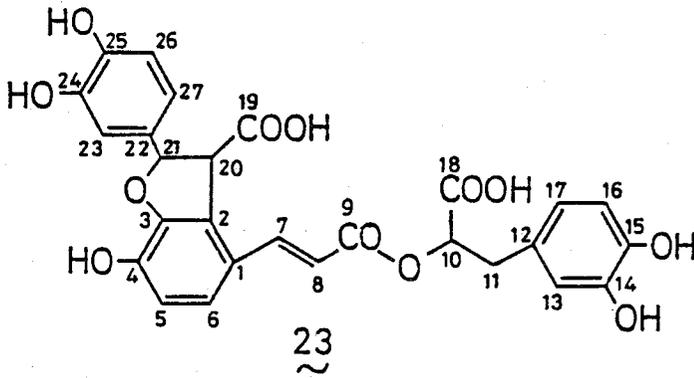
Fig. 14. Isolation of 22 and 23

酢酸エチルエキスを Sephadex LH-20 カラムクロマトにかけて 80% エタノールで溶出させ、類白色無晶形の化合物 22 を得た。本化合物は $^1\text{H-NMR}$ において 2組の ABX システムを δ 7.02 (1H, d, $J=2$ Hz), 6.93 (1H, dd, $J=2, 8$ Hz),

6.78 (1H, d, J=8 Hz) および δ 6.78 (1H, d, J=2 Hz), 6.69 (1H, d, J=8 Hz), 6.62 (1H, dd, J=2, 8 Hz) に認め、1,3,4-三置換ベンゼンが2個分子内に存在することを示唆した。この他に trans-オレフィンに帰属される δ 7.51 (1H, d, J=16 Hz), 6.27 (1H, d, J=16 Hz) の AB システム、メチンプロトンに帰属される δ 5.01 の 1H 分の double-doublet (J=5, 9 Hz)、およびベンジル位のメチレンプロトンに帰属される δ 3.08 (1H, dd, J=5, 14 Hz), 2.95 (1H, dd, J=9, 14 Hz) のシグナルが認められた。このデータは先にシソ科のローズマリー (Rosmarinus officinalis) から単離された rosmarinic acid²⁸⁾ であると推定され、さらに ¹³C-NMR, IR, [α]_D 等の物理恒数の文献値²⁹⁾ との比較、標品との比較によって、化合物 22 を rosmarinic acid (22) と同定した。



一方、n-ブタノールエキスも同様に Sephadex LH-20 カラムクロマトにかけ 80% エタノールで溶出させて、化合物 23 を類白色無晶形粉末として得た。本化合物はその ¹H-NMR において 22 に類似の化合物であることを認め、さらに δ 7.51 (1H, d, J=8 Hz), 6.81 (1H, d, J=8 Hz) にベンゼン環上のオルト位のプロトンに由来する AB システム、および、 δ 5.88 (1H, d, J=5 Hz), 4.35 (1H, d, J=5 Hz) に2個の隣接した SP³ 炭素に結合したプロトンに帰属できる AB パターンのシグナルが観測された。このデータは最初ムラサキ科の Lithospermum ruderale から単離、構造決定³⁰⁾された lithospermic acid (23)ではないかと推定された。その推定は化合物 23 の ¹H-NMR, ¹³C-NMR を始めとする諸データが文献値²⁹⁾とよく一致することにより裏付けられ、さらに標品と直接比較することによって同定した。



細胞壁の分離とフェノール類の抽出

細胞壁を分離する方法としては、現在一般に Van Soestら³¹⁾ の中性界面活性剤を用いる方法が用いられている。ここでは、Hartleyら³²⁾ の改変法によって中性界面活性剤を調製した。

LS、または M9 培地で培養した白色または赤色の細胞をメタノールで前処理して、メタノール可溶性成分を除き、細胞残渣を得た。これを 3% ラウリル硫酸ナトリウムを主成分とする中性界面活性剤で抽出し、ろ過、洗浄後、乾燥して細胞壁成分とした。収率は両細胞とも、細胞乾燥重量あたり約 25% であった (Fig. 15)。

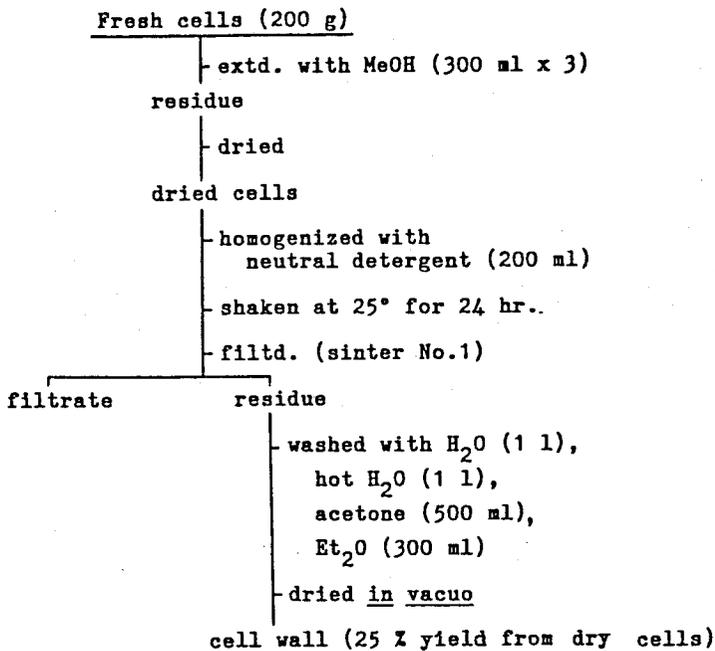


Fig. 15 Separation of cell wall

細胞壁のフェノール性成分はフェノールカルボン酸類が主で、細胞壁構成多糖の水酸基とエステル結合して存在していることが報告されている。そこで、フェノール性成分の溶出は、乾燥細胞壁を 1 M NaOH を用い、窒素气流中 20°C で 20 時間加水分解をすることにより行なった。加水分解後、混合物をろ過してろ液を得、酸性にした後、エーテルで抽出し、溶媒を留去したものをメタノールに溶解して HPLC の試料とした。

フェノールカルボン酸の細胞内および細胞壁中含量と生産

HPLC は逆相系カラムを用いて行なった。細胞中のフェノール性成分は可溶性と考えることができ、一方細胞壁中のフェノール性成分は結合型として考えることができる。それぞれの状態のフェノール性成分を、LS 培地で培養した M18株 (shikonin を生成せず) と、M9培地で培養した M18株 (shikonin を生成) について定量したデータを Table 6 にまとめた。

Table 6. Contents of phenolic compounds in cells (soluble form) and cell walls (bound form) of *Lithospermum* cells cultured in LS (non-pigmented cells) and M9 (pigmented cells) medium.

	Soluble fraction of cell		Cell wall	
	Non-pigmented ($\mu\text{g/g dry wt}$)	Pigmented	Non-pigmented	Pigmented
p-Hydroxy- benzoic acid (5)	880	42	11	506
Caffeic acid (17)	361	26	13	77
Sinapic acid (18)	70	52	-*	-
Syringaldehyde (19)	trace	trace	-	-
Ferulic acid (20)	56	9	-	-
o-Hydroxy- benzoic acid (21)	trace	113	-	-
Shikonin (1)	-	31700	-	-

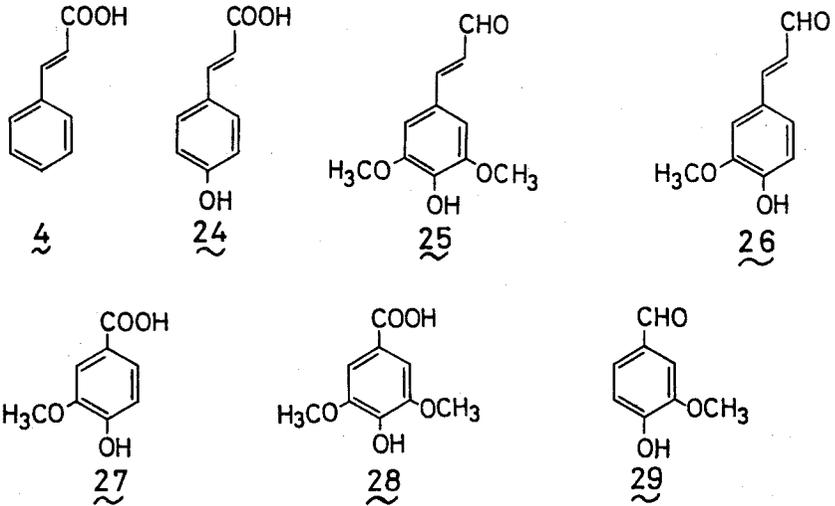
* not detected

21 を除き、他の5種のフェノール性化合物 5 および 17-20 は、可溶化状態としては shikonin を生産していない白色細胞の方に多く含まれていた。これらの化合物は shikonin と同じ前駆体である shikimic acid から生合成されるため、白色細胞の方により多く蓄積されるものと考えられる。

一方、細胞壁にエステル結合しているフェノール性化合物は、5 と 17 のみが両者の細胞壁のアルカリ加水分解物の中から検出された (Table 6)。しかし、細胞内に可溶型として存在しているフェノール性化合物の場合と逆に、細胞壁に結合して存在する 5 と 17 の量は、shikonin を生合成している細胞の方が、白色細胞よりもそれぞれ 47 および 6 倍と高い値を示した。このことは白色細胞に可溶状態で含まれていた 5 や 17 が、細胞を shikonin 生産培地 M9 に移植した後、細胞壁へ取り込まれる可能性を示唆しているがその意義は不明である。

第2節 フェノール類の色素生合成への影響

前節で述べたように HPLC 分析によって、白色細胞と赤色細胞との間にフェノール含量に関する顕著な相違が認められた。そこで、種々のフェノール類と shikonin 生合成との関係を調べるために、これらの化合物をムラサキ培養細胞に投与する実験を行なった。また構造上の相関を考慮するために、内在性のフェノール類のほか、関連化合物が shikonin 生成に及ぼす効果も合わせて検討した。すなわち、外因性のものであるフェニルプロパノイドのカルボン酸である cinnamic acid (4)、p-coumaric acid (24)、アルデヒドである sinapaldehyde (25) および coniferaldehyde (26)、C₆-C₁ 化合物としては vanillic acid (27)、syringic acid (28)、および vanillin (29) を用いた。これに先だって、市販されていない、sinapaldehyde (25) および coniferaldehyde (26) を合成することとした。



Sinapaldehyde (25) および coniferaldehyde (26) の合成

Sinapaldehyde (25) の合成は久津木ら³²⁾の方法を改変して行なった。すなわち、sinapic acid (18) を塩酸-メタノールでメチルエステル (30) とし、ジヒドロピランをフェノールの保護に用いて tetrahydropyranyl methyl sinapate (31) とした。次いで、 LiAlH_4 で還元して tetrahydropyranyl sinapyl alcohol (32) を得、これを活性 MnO_2 を用いて tetrahydropyranyl sinapaldehyde (33) に酸化した。保護基のテトラヒドロピラニルエーテルは 1 N HCl で加水分解して、sinapaldehyde (25) を合成した。coniferaldehyde (26) の場合もこの方法に準じて合成した (Fig. 16)。

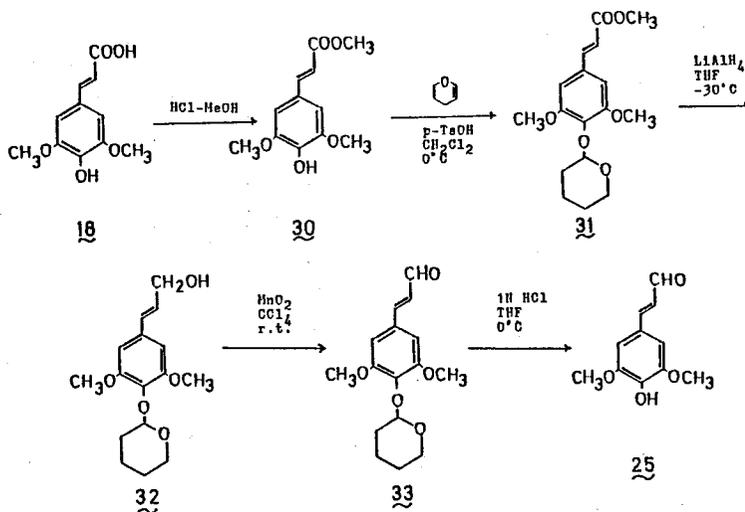


Fig. 16 Synthesis of sinapaldehyde (25)

フェノール類の投与

フェノール類は DMSO に溶解し、メンブランフィルターで、ろ過滅菌して培地に投与した (0.1 ml/7 ml medium)。また、フェノールカルボン酸類の投与による培地の pH 低下を避けるため、MES [2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid] を 10 mM 培地に投与した。この濃度で用いた DMSO および MES は、培養細胞の shikonin 生合成に何の影響も及ぼさなかった。

Fig. 17 に示したように、5 (5) は 10^{-6} – 10^{-4} M の濃度範囲で、shikonin の生合成を促進した。 10^{-5} M における shikonin 生成の増加量は control に比べ約 45 % であり、5 は M9 培地という強力な shikonin 生成の誘導条件下にあって、さらに shikonin 生成を促進することができる。さらに興味深いことは、5 は shikonin 生合成の前駆体であるが、shikonin 生産の増加分 (モル数) は、細胞に投与した 5 のモル数をはるかに上回っていることである (Table 7)。 10^{-6} M の投与実験では投与した 5 全量の 269 倍ものモル数の shikonin 誘導体が増加している。

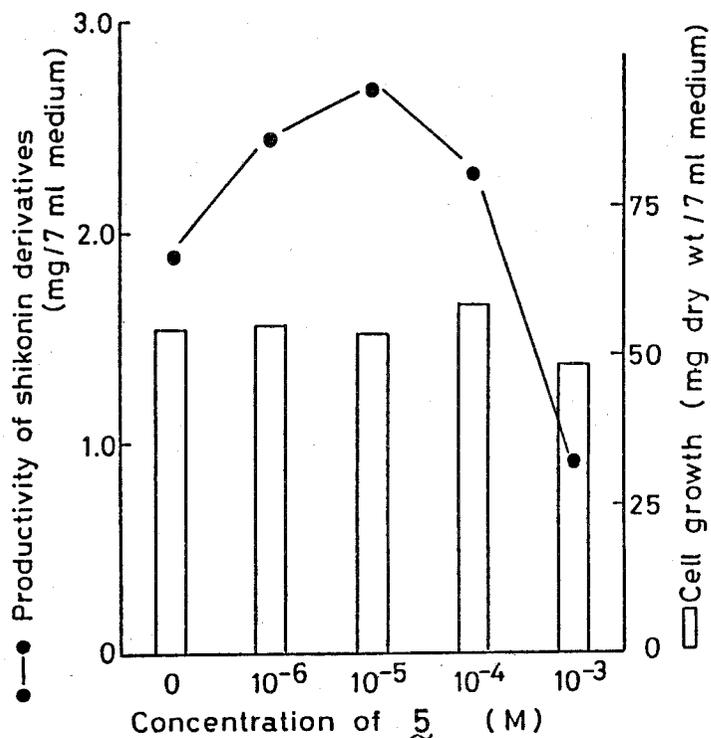


Fig. 17. Effects of p-hydroxybenzoic acid (5) on growth and shikonin derivatives production in Lithospermum cells grown in M9 medium for 14 days.

Table 7. Effect of p-hydroxybenzoic acid (5) supplied to M9 medium (7 ml) on shikonin yield in Lithospermum cells cultured for 14 days in test tubes.

Concentration of 5 (M)	Shikonin yield (μmole)	Increment of shikonin (μmole)
Control	6.57	-
10 ⁻⁶ (0.007)*	8.45	1.88
10 ⁻⁵ (0.07)	9.53	2.96
10 ⁻⁴ (0.7)	8.03	1.46
10 ⁻³ (7)	3.23	-

* μmole

一方その他のフェノール類の色素生成に対する効果は Fig. 18 に示した。p-hydroxybenzoic acid (21) は赤色細胞の方に含まれる化合物であるので、shikonin 誘導体生成と何らかの相互作用を期待したが、予想に反して色素生成、生長いずれに対しても特別な効果は見られなかった。Ferulic acid (20) は $10^{-3}M$ では細胞毒性を示したが、 $10^{-4}M$ 以下では syringaldehyde (19), sinapic acid (18) と同様何の影響も示さなかった。さらに、比較のために投与実験を行なった外来の cinnamic acid (4) および 24-29 も特に細胞の生長や shikonin 合成に対する効果は認められなかった。

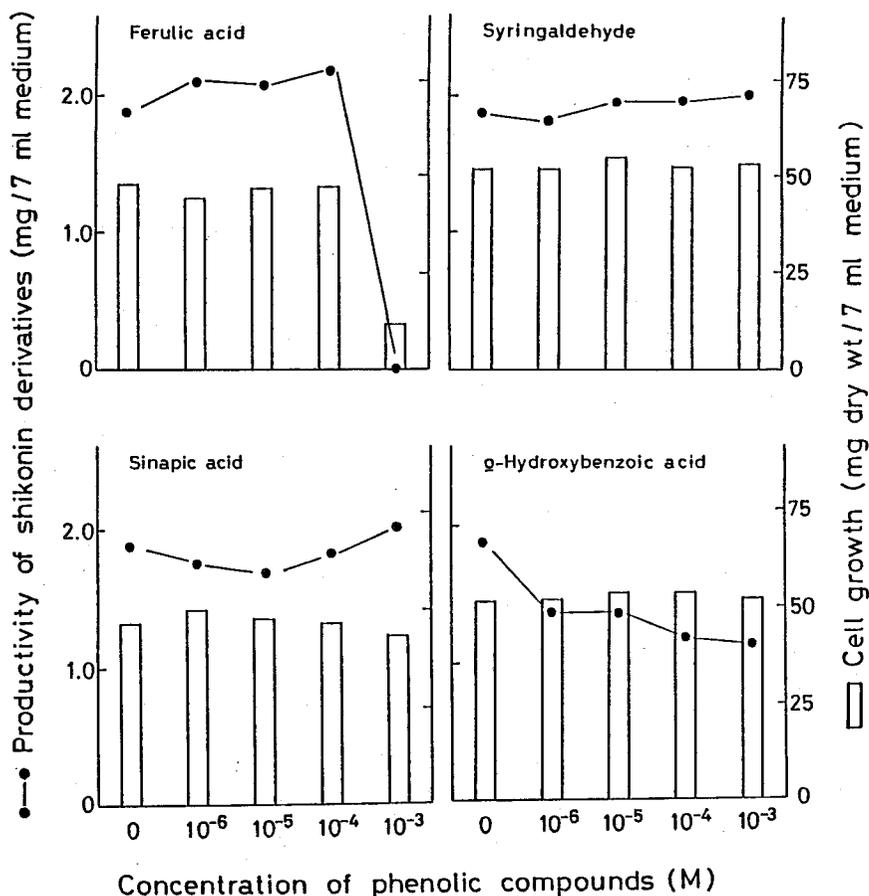


Fig.18 Effects of phenolic compounds on growth and shikonin derivatives production in Lithospermum cells grown in M9 medium for 14 days.

一方、フェニルプロパノイドの二量体である 22 の効果について検討した。この化合物はムラサキ培養細胞から単離してきた試料を用いて投与実験を行なった。

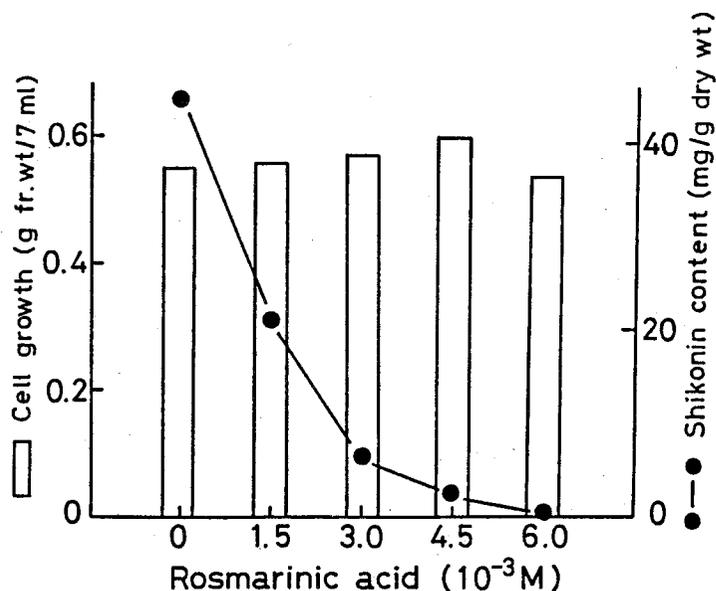


Fig. 19. Effects of rosmarinic acid (22) on growth and shikonin production in *Lithospermum* cells cultured in M9 medium.

Rosmarinic acid (22) は 10^{-3} M 未満 10^{-6} M までの濃度で細胞の生長、shikonin 生成共に影響がなかった。しかし、Fig. 19 に示した様に、 1.5×10^{-3} M の濃度の 22 で 50 %、 4.5×10^{-3} M の 22 で 95 % の色素生成が抑制され、それまでの濃度では細胞の生長は全く抑制されていないことが認められる。この結果から本化合物が白色細胞内において shikonin 誘導体生成を抑制する 1 つの調節因子となっている可能性が示唆された。なお、lithospermic acid (23) に関しては単離収量が低く、投与実験には至らなかった。

本実験で認められた *p*-hydroxybenzoic acid (5) の shikonin 生合成促進効果のメカニズムは不明であるが、5 が培養系に補給されることによって、それを基質とする prenyl transferase³⁴⁾ の活性が高められ、生合成全体の反応効率が上昇するために shikonin の生産量が上がる可能性が考えられよう。また、5 が細胞壁の構成成分として取り込まれて細胞壁の構造を変化させる結果、shikonin の生合成に何らかの機構を介して促進的影響を与えることも考えられる。

第5章 FMN アナログによる shikonin 生合成阻害

ムラサキの培養細胞の shikonin 生成には様々な化学的、物理的要因が関係しているが^{14, 16)}、その物理的調節要因のうちの一つに光がある。M9 培地において shikonin を生産させる時は暗黒下で培養を行なうが、shikonin の生成に対して光が抑制的であることはムラサキカルスを用いた実験で田端ら¹⁴⁾によって詳細に検討されている。すなわち、ムラサキカルスは LS 寒天培地上で培養した場合、暗黒下であれば shikonin 誘導体を生合成するが、蛍光灯による白色光 (5300 lux) の照射下では、色素生成はほとんど完全に抑制されることが知られている。さらに、光による shikonin 生成阻害は青色光 (380-560 nm) によるものであり、青色光は shikonin 生成に対し、非常に特異的、かつ持続的な抑制効果を持ち、その抑制機構として FMN (34) の光分解が考えられている³⁵⁾。

著者は強力な shikonin 生合成誘導培地である M9 培地中においても、光が果して有効であるかどうかをまず確認し、次いで光で shikonin 生成を阻害したとき、細胞内に蓄積する中間代謝産物を検索することを試みた。さらに本章の終わりでは光効果の作用機構を探るために、FMN (34) の光分解に関する実験を行なった。

第1節 光による色素生成阻害時の中間代謝産物の検索

カルス培養の場合、細胞は塊状になっているためにその中心部にまで十分に光が通らないこともあり、実験系としては液内振盪培養の方がこの実験に適している。そこで、M9 培地で懸濁培養した細胞を用いて、光による shikonin 生合成抑制段階の検討を行なうこととした。すなわちムラサキ培養細胞を M9 培地に移

植し、蛍光灯の白色光 (6000 lux) 照射下、14 日間振盪培養を行なった。対照としては、暗黒下、M9 培地中で振盪培養を行なった赤色細胞を用いた。

Table 8. Effect of light on shikonin synthesis in Lithospermum cell suspension cultures

Culture medium	LS	M9	
		Dark	Light
Cell yield (g fr. wt/30 ml)	5.20	1.70	1.80
Total shikonin (mg/30 ml medium)	0	13.2	0.15
Shikonin content (mg/g fr. wt)	0	7.68	0.08
5 ($\mu\text{g/g}$ fr. wt)	11.0	-*	9.41
8 (mg/g fr. wt)	1.30	-	1.79
6 (mg/g fr. wt)	-	-	-
7 (mg/g fr. wt)	-	-	-

* Not detected

Table 8 に示したように、カルスの場合と同様、M9 培地を用いる懸濁培養においても shikonin 生成は光によってほとんど完全に阻害された。Fig. 6 に示した shikonin 生合成の中間体について HPLC を用いて分析した結果をも Table 8 に示した。M9 培地においても、光で shikonin の生成を阻害すると p-hydroxybenzoic acid (5) の glucoside (8) が蓄積し、なかに少量の 5 の存在も認められた。しかし、m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) や geranylhydroquinone (7) はほとんど検出できなかつた。このパターンはちょうど LS 培地で培養した細胞のそれに似ている。

上述の実験系においては、細胞を M9 培地に移植した時点から光照射を始め、収穫まで 14 日間継続して与えた。しかし、shikonin 生合成の途中で光照射した場合はどうかという疑問が出てくる。そのため、培養開始後から 3 日ごとに暗

黒下から光照射下へ細胞培養を移し、移植後 15 日目にすべての細胞を収穫して shikonin 含量と ζ および η の含量を測定した (Fig. 20)。

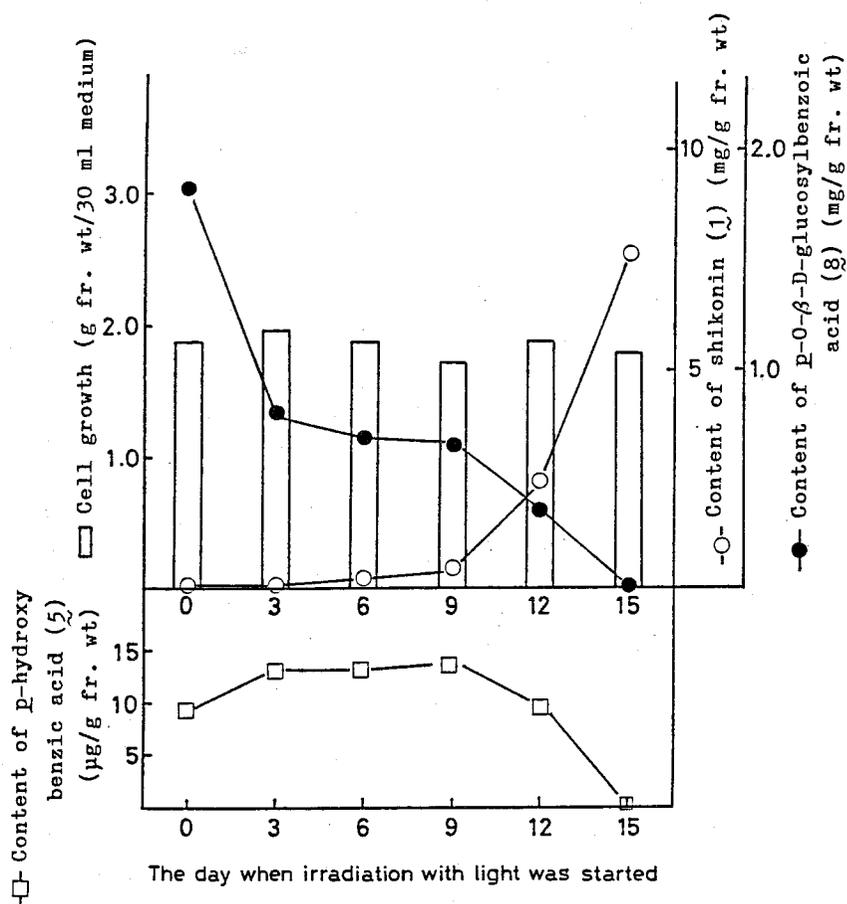


Fig. 20. Effects of white light on shikonin production at different stages in *Lithospermum* cells cultured in M9 medium.

Fig. 20 に示すように、光を始めから照射したものは全く色素を生成せず、6 日、12 日と、次第に暗黒下で培養する日数が長くなるほど、すなわち光照射下に移すのが培養の後期になるほど shikonin の生成が見られた。また光は、shikonin 生成が移植 3日-4日目に誘導されてのちでも抑制効果を示している。一方、 η の蓄積量は予想通り、光照射の日数が長くなるほど増加する傾向を示した。

第2節 FMN (34) の光分解物について

フラビン系酵素の補酵素である flavine mononucleotide (FMN 34) は植物界の青色光に対する光受容体であることはよく知られている³⁶⁾。本化合物は光によって容易に分解され、酸性条件下であれば lumichrome (35)、アルカリ条件下であれば lumiflavine (36) となることが知られている (Fig. 21)³⁷⁾。先に、この FMN (34) の光分解が光による shikonin 生成阻害に関係していることが明らかにされている³⁵⁾ので、この機構の解明を試みた。

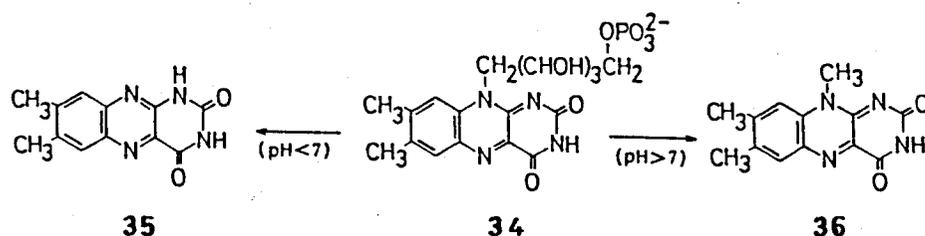


Fig. 21. Photodegradation of FMN (34)

FMN (34) の光分解物の shikonin 生合成への影響

FMN (34) の光分解によって shikonin 生成阻害が起こるならば、その光分解物 35, 36 の両化合物が shikonin 生合成に対し何らかの影響をもつと推察されるので、まずこれらの化合物の投与実験を行なった。培地中に 35, 36 を種々の濃度で添加し、shikonin 誘導体生成に対する阻害効果を検討した結果を Table 9 に示す。

ここに示すように、 $10^{-5}M$ の濃度において、35 は 18% の色素生成阻害を示したのに対し、36 はさらに強い阻害効果 (約 50%) を示した。一方、この濃度では細胞生長に対する阻害は認められなかった。また、 $10^{-4}M$ では 35 は 25% 程度の阻害にとどまったが、36 はこの濃度で細胞毒性を示したので、shikonin 生成の阻害効果は特異的なものとはいえない。しかし、36 は生長よりもむしろ shikonin 生成に対してより阻害的であるといえよう。

Table 9. Inhibition of shikonin production of Lithospermum cell cultures by the administration of 35 and 36 (strain M18 cultured in M9 medium, 7 ml/test tube for 2 weeks).

	Control	35		36	
		10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M
Growth (g fr. wt)	0.61	0.60	0.59	0.59	0.38
Shikonin (mg/g fr.wt)	4.25	3.48	3.19	2.15	0
Inhibition (%)	0	18.1	25.0	49.3	100

細胞内、および細胞外における FMN (34) の光分解

光を細胞に照射した時に 35 または 36 が実際に細胞内で生成することを確認する必要がある。しかし、細胞内の FMN (34) は微量であり、しかも局在しているためか通常の方法では検出が困難であった。そこで、FMN (34) を LS 培地において外から細胞 (M18 株) に取り込ませた後、細胞を洗い、それを新しい培地中に懸濁させて、白色光 (6000 lux) で 24 時間照射を行なった。その後細胞をろ取して抽出し、35 および 36 の検出を行なった。比較として、培地のみ FMN (34) を添加したものも検討した。

Table 10. Degradative products of FMN (34) administered to cell suspension cultures (strain M18 in LS medium) irradiated with white light (6000 lux) for 24 hr.

	Lumichrome (35) (M)	Lumiflavine (36) (M)
Cell	0.68 X 10 ⁻⁵	2.68 X 10 ⁻⁵
Medium	9.40 X 10 ⁻⁵	trace

その結果 Table 10 に示すように細胞内に取り込まれた FMN (34) は光照射を受けると、主として shikonin 生成阻害活性の強い lumiflavine (36) に分解し、一方 pH 6.0 の培地中では、ほとんどすべて lumichrome (35) に変化することが判明した。

第3節 FMN アナログの shikonin 生成阻害効果

35 と 36 の投与実験で 36 が shikonin 生成に対する阻害作用を有していることが判明したが、これら2種の化合物の構造上の違いに着目すると、35の方は flavine 骨格の 10 位の N-CH₃ がなく、その共役系が alloxazine タイプになっているのに対して、36の方は 10 位の N-CH₃が存在し、共役系は FMN (34) と同様の isoalloxazine タイプとなっている (Fig. 22)。この相違が活性の相違につながると考えられるため、その仮説を確認する意味で、FMN (34) のアナログ 8 種を京都大学薬学部米田文郎教授より³⁸⁾御分与いただき、ムラサキ培養細胞 (M18) を M9 培地で培養する際に細胞に与え、その色素生成に対する効果について検討した。

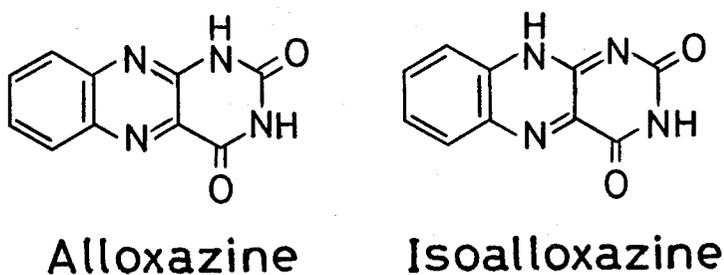
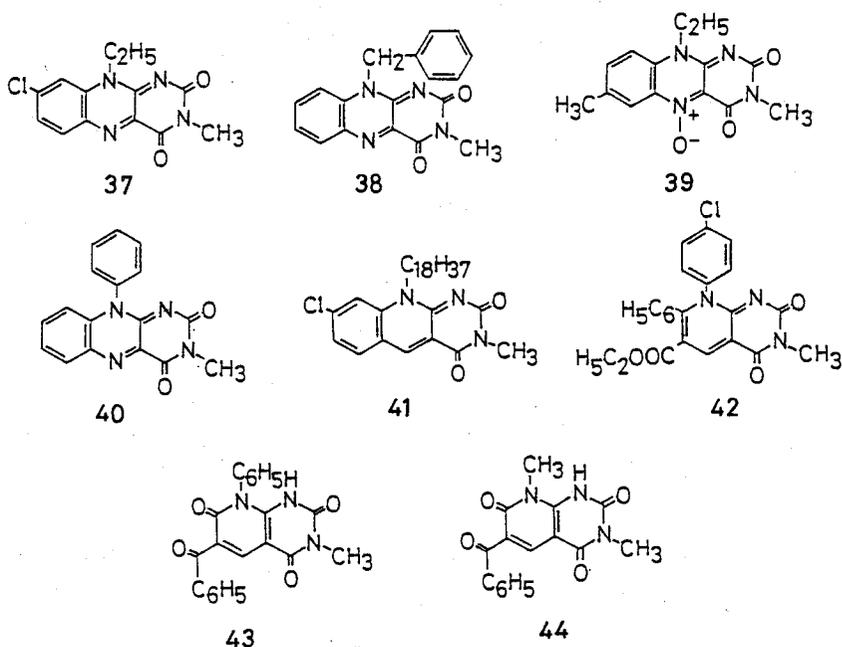


Fig. 22. Structures of alloxazine and isoalloxazine.

Table 11. Inhibitory effect of compounds 37-44 ($10^{-5}M$) on shikonin synthesis of cultured *Lithospermum* cells (strain M18) in M9 medium (culture period: 14 days in the dark).

Compound	Growth (g fr. wt)	Shikonin (mg/g fr. wt)	Inhibition (%)
37	0.70	2.13	59.1
38	0.69	2.30	55.8
39	0.52	0.29	94.5
40	0.71	3.03	41.9
41	0.73	2.46	52.8
42	0.76	2.68	48.5
43	0.79	4.52	13.3
44	0.71	4.89	6.1
Control	0.72	5.21	0



投与した薬物は 37-44 の化合物でその結果を Table 11 に示した。投与の濃度は、36 の場合で細胞増殖を抑制せずに shikonin 生成阻害を示した濃度 $10^{-5}M$ とした。全化合物のうち 36 と同様の isoalloxazine タイプの共役系を有している 37-42 は、色素生成に対して強い阻害効果 (42-95 %) を示した。しかし、35 と同様の alloxazine タイプの共役系を有する 43 および 44 の shikonin 生成の阻害効果は 37-42 に比べてはるかに低く、前述の仮説を支持する結果と思われる。なお、化合物 39 は $10^{-5}M$ の濃度では shikonin 生成を阻害するのみでなく、細胞の生長も阻害しているため、一般的細胞毒性を示していると考えられるが、 $10^{-6}M$ においては細胞の生長は抑制せずに、shikonin 生合成のみ阻害し、これに対して特異的に強い阻害活性を有していることが明らかとなった。

ムラサキ培養細胞における shikonin 生合成が光で特異的に阻害されるという現象は、これらの実験によって化合物のレベルである程度説明ができるようになった。すなわち、細胞内に存在する FMN は酸化系酵素の補酵素として shikonin の生合成反応の一端を担っていると考えられる。それが光照射下では細胞内の pH が高い環境下において、光分解して、主に 36 を生成する。36 は shikonin の生合成に対して抑制的であり、FMN の欠乏と 36 の生成のために色素の生産は強く阻害されるものと推定される。光分解物ないしそのアナログが強い阻害活性を示すためには分子内に isoalloxazine タイプの共役系が必要であるが、その理由として、これらの化合物が FMN と同様の共役系を持つため、酵素に対する親和性が高いことが考えられる。

第6章 Glutamineによる shikonin 生合成の調節

すでに述べた様に、ムラサキ培養細胞の shikonin 生合成には多くの物理的、化学的要因が関与しているが、そのうち特に重要な制御機構はアンモニウムイオンによる shikonin 生合成の抑制である。ムラサキの培養細胞は LS 培地で継代培養しているが、寒天を添加した LS 固形培地上でカルス培養する時は shikonin 系色素の生合成が行なわれる。しかしその細胞を LS 液体培地中に移植し、懸濁培養すると色素は全く生成しなくなる。しかし、藤田ら¹⁶⁾は White の培地⁹⁾で振盪培養した場合、ムラサキ培養細胞は shikonin 系色素を生合成できることを見出した。この理由は LS 培地の中に窒素源として NH_4NO_3 の形で多量に含まれるアンモニウムイオンが shikonin 生合成に対し阻害的であり、一方 White の培地に単一の窒素源として加えられている硝酸イオンは色素生成を阻害しないことによる¹⁶⁾。しかし、 NH_4^+ の shikonin 生合成に対する抑制効果の、生化学的機構についてはまだ明らかにされていない。本実験はその抑制機構を解明することを目的として行なった。

第1節 NH_4^+ の shikonin 生合成抑制効果

Shikonin 生産培地である M9 培地ならびに白色細胞増殖用の LS 培地の組成を Table 12 に示した。M9 培地は窒素源として KNO_3 を 6.7 mM 含むのみであるのに対して、LS 培地では 20.6 mM の NH_4NO_3 と 18.8 mM の KNO_3 を含んでいる。

Table 12. Components of Linsmaier-Skoog (LS) medium and M9 medium

Component	LS	M-9	Component	LS	M-9
	(mg/l)			(mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650	-	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	-
KNO ₃	1900	80	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	3
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	694	H ₃ BO ₃	6.2	4.5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	-	KI	0.83	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	750	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	-
KH ₂ PO ₄	170	-	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.3
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	19	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	-
KCl	-	65	myo-Inositol	100	-
Na ₂ SO ₄	-	1480	Thiamine·HCl	0.4	-
NaFe-EDTA	a	1.8	Sucrose	30000	30000

^a FeSO₄·7H₂O 27.8mg/l, Na₂EDTA 37.3mg/l

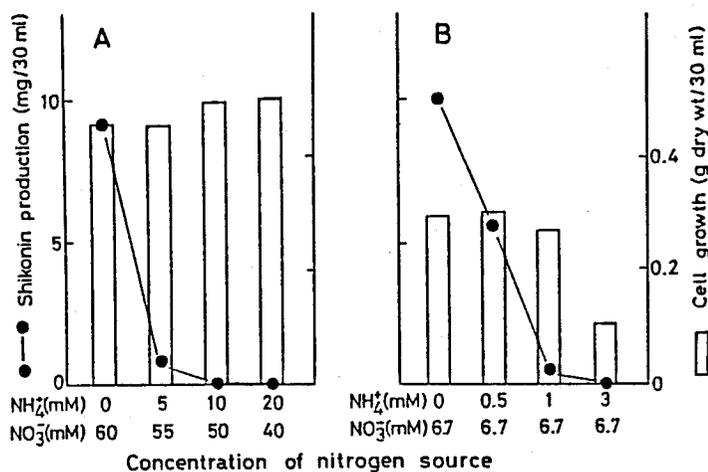


Fig. 23. Effects of NH₄⁺ on cell growth and shikonin production in *Lithospermum* cell suspension cultures. A: The concentration of NH₄Cl was changed without altering the total nitrogen concentration in LS medium supplemented with 1.2 μM Cu²⁺. Culture period: 3 weeks. B: NH₄Cl was added to M9 medium that originally contains 0.7 mM KNO₃ as the sole nitrogen source. Culture period: 2 weeks.

色素高生産株 M18 を用いて、LS培地中の NH_4^+ を NO_3^- に置換する実験を行なってみた (Fig. 23-A)。この系では shikonin 生産を補強するために、 Cu^{2+} を $1.2\mu\text{M}$ の濃度まで高めてある。一方、M9 培地に NH_4^+ を添加する実験も行なった (Fig. 23-B)。

Fig. 23-A で示すように LS 培地の NH_4^+ を NO_3^- で置換していくと、細胞は shikonin 誘導体を生成することができる。一方、M9 培地に NH_4^+ を添加した系では、shikonin 生成が強く抑制され、 1 mM の濃度においてはほとんど完全に抑制されることが認められた。

第2節 アミノ酸と shikonin 生合成

第1項 細胞内の遊離アミノ酸と shikonin 生成に伴う経時変化

前節で述べた NH_4^+ による色素生成の抑制効果について、その機構を解明する手懸かりを得るため以下の実験を行なった。 NH_4^+ の代謝経路を考えると、 NH_4^+ は細胞内でアミノ酸のアミノ基に取り込まれることから、遊離アミノ酸の細胞内含量を測定した。

Table 13 は、LS および M9 培地における定常期初期のムラサキ培養細胞中の遊離アミノ酸をアミノ酸アナライザーを用いて定量した結果である。全体にアミノ酸含量は LS 培地中で盛んに増殖している細胞の方が高いが、特に glutamine (Gln), arginine (Arg), glutamic acid (Glu), aspartic acid (Asp), asparagine (Asn) の含量が M9 培地中の赤色細胞に比べて非常に高く、 NH_4^+ 自身も白色細胞内に高濃度に存在することが判明した。

Table 13. Contents of amino acids in Lithospermum cells grown in LS and M9 medium.

Amino acid	Shikonin-free cells in LS medium ¹⁾ (nmol/g fr. wt)	Shikonin-producing cells in M9 medium ²⁾ (nmol/g fr. wt)
Gln	6530 (40.81) ³⁾	70 (9.61)
Arg	3300 (20.60)	53 (7.30)
Glu	2340 (14.62)	134 (18.30)
Asp	1110 (6.94)	23 (3.19)
Asn	1020 (6.37)	157 (21.46)
Ala	442 (2.76)	101 (13.79)
Ser	403 (2.52)	65 (8.89)
His	357 (2.23)	35 (4.83)
Gly	205 (1.28)	23 (3.15)
Lys	157 (0.98)	22 (3.06)
Val	117 (0.73)	20 (2.74)
Leu	30 (0.19)	- ⁴⁾
Cys	19 (0.12)	16 (2.12)
Tyr	16 (0.10)	11 (1.54)
Total amino acids (nmol/g fr. wt)	16000	731

1) 3-Week-culture, 2) 2-Week-culture, 3) Molar ratio (%) of each amino acid, 4) Not detected

そこで、LS培地から M9 培地に移植された細胞内のアミノ酸が、時間的にどのように推移していくかを、shikonin 生成と照らしあわせてプロットしたのが Fig. 24 である。ここでは量的に主たるアミノ酸および NH_4^+ に限って示してある。 NH_4^+ のレベルのみでなく、Gln, Arg, Glu といったアミノ酸の細胞内含量も、shikonin 生成開始期 (M9 培地に移植後 3 日目) には急激に減少しているのが観察された。また 14 日目には色素含量が 4.2 % (乾燥重量あたり) に達す

る一方で、上記のアミノ酸の含量は移植時の 1/20 以下にまで減少していた。

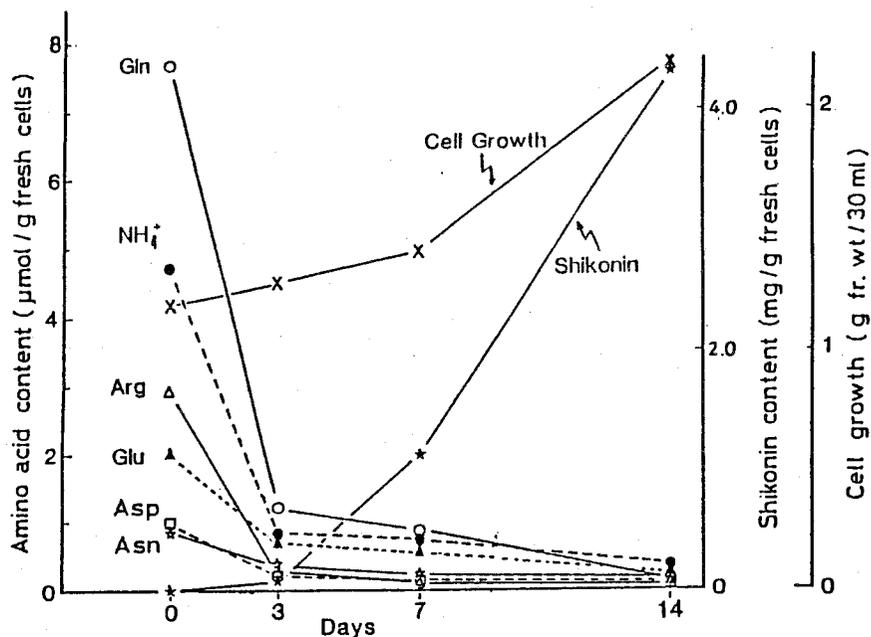


Fig. 24. Contents of amino acids and shikonin in Lithospermum cells (strain M18) transferred from LS medium to M9 medium and cultured in the dark. Gln: glutamine, Arg: arginine, Glu: glutamic acid, Asp: aspartic acid, Asn: asparagine.

第2項 主なアミノ酸の shikonin 生成に対する抑制効果

前項で述べたアミノ酸と shikonin 生成との関連から、ある種のアミノ酸に、shikonin 生成の阻害活性があるのではないかと思われたので、種々の L-アミノ酸を M9 培地中に投与して、色素生成に対する影響を観察した。

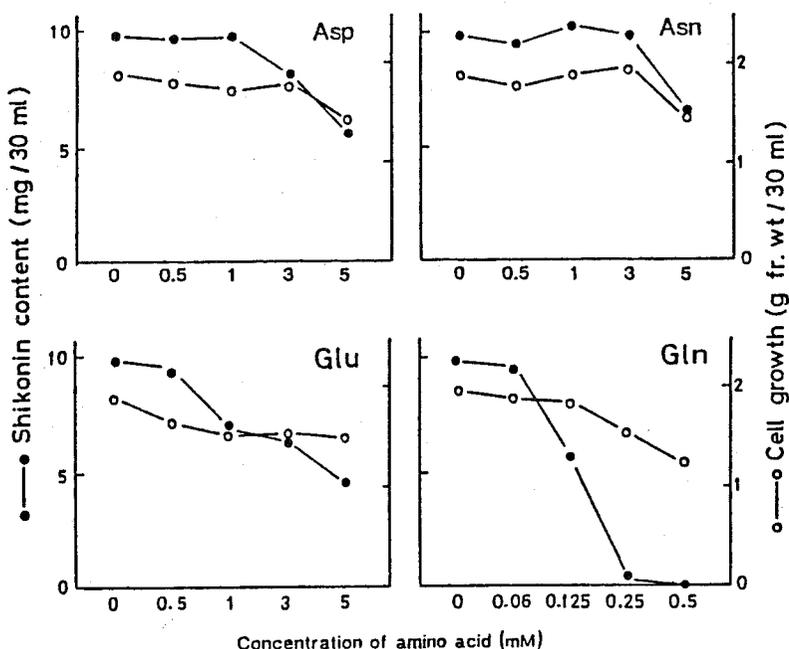


Fig. 25. Effects of amino acids on cell growth and shikonin production in *Lithospermum* cells grown in M9 medium for 2 weeks. Asp: aspartic acid, Asn: asparagine, Glu: glutamic acid, Gln: glutamine.

Fig. 25 に示したように、Gln は他のアミノ酸 (Ala, Arg, Asp, Asn および Glu) に比べてはるかに低い濃度で、強い shikonin 生合成の抑制活性を示した。培地に投与した Gln が 0.5 mM という低濃度で shikonin 生成を完全に抑制してしまうのに対し、Glu は 5 mM においても 50 % しか抑制せず、また炭素数の 1 個短い Asn はほとんど抑制活性を示さなかった。

投与した Gln の shikonin 生合成抑制効果は、Gln が glutaminase によって分解されて二次的に生じた NH_4^+ によるのではないかという可能性も生じた。そこで、Gln を投与して shikonin 生成をある程度抑制した系に、glutaminase の特異的阻害剤 6-diazo-5-oxo-norleucine (DON)⁴⁰⁾ を加えて、Gln 投与による shikonin 生成抑制が解除されるか否かを検討した。Glutaminase を DON によって阻害した場合、もし Gln の阻害活性が変化しないか増加すれば shikonin 生成阻害は Gln 自体によるものといえるし、glutaminase の阻害によって Gln の

shikonin 生合成阻害が起こらなければ、生合成の阻害は Gln の酵素分解による NH_4^+ の効果ということになる。

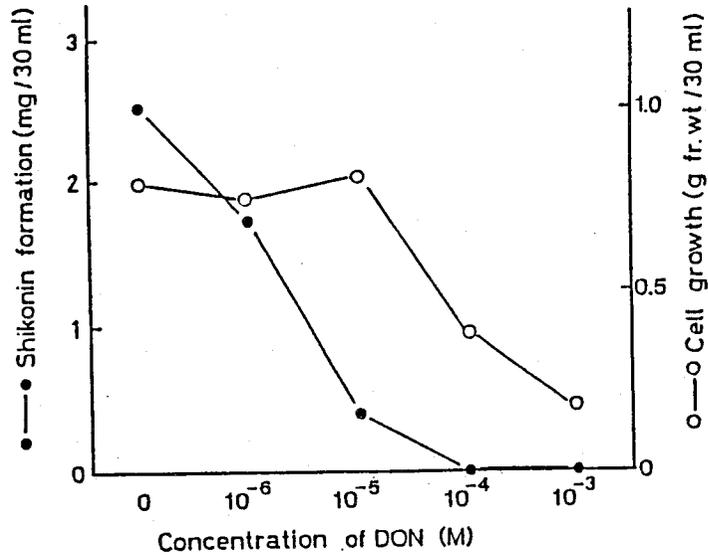


Fig. 26. Effects of DON on cell growth and shikonin formation in *Lithospermum* cells grown for 2 weeks in M9 medium containing 0.2 mM glutamine. Shikonin yield of the control (glutamine-free) culture was 9.3 mg/30 ml medium.

実験の結果は Fig. 26 に示したように、Gln (0.2 mM) を添加して shikonin 生成を約 70% 阻害した系に DON を添加した時、 10^{-6} – 10^{-5} M の濃度において細胞生長には影響を与えずに、shikonin 生成の阻害度を増加させた。すなわち、細胞内の Gln が NH_4^+ に分解されずに色素生成に対する抑制が増強されたと考えられる。従って Gln による shikonin の生合成の抑制は二次的に生じる NH_4^+ の効果ではなく、Gln 自体の作用であると解釈できる。

第3項 種々の培地における細胞中の NH_4^+ および Gln

LS 培地と M9 培地の細胞で比較した時、細胞内 Gln 含量が shikonin 含量と反対の関係にあることは認められたが、shikonin の生産に、Gln 含量が低いことが必須であるか否かはさらに検討する必要がある。LS 培地と M9 培地では組成が違いすぎてこの比較をするのには最適とはいえない。そこで同じ LS 培地の中で、shikonin 誘導体を生産するものとししないもので比較し、色素生産と Gln との相関関係を解析することとした。

先に LS 培地の中でも shikonin を生産させ得ることを述べたが、それは NH_4^+ を除いた代わりに NO_3^- を補充し、 Cu^{2+} を添加した系を用いた場合であった。そこで、LS 培地、 Cu^{2+} 1.2 μM 添加した LS 培地、 Cu^{2+} 1.2 μM を添加しさらに NH_4^+ を NO_3^- に置換した LS 培地、および通常の LS 寒天培地といった各種培地で培養したムラサキの細胞株 M18 について、shikonin 生成量と Gln および NH_4^+ の細胞内含量を分析した。

Table 14. Contents of shikonin, NH_4^+ , Gln and total amino acids in Lithospermum cells grown in different culture media

Medium	Cell growth (g fr. wt)	Shikonin content (mg/g dry wt)	NH_4^+ ($\mu\text{mol/g fr. wt}$)	Gln	Total amino acids
LS	5.1 ¹⁾	0	4.75	7.72	16.00
LS + Cu^{2+}	5.5 ¹⁾	0	9.49	9.79	19.30
LS + Cu^{2+} - NH_4^+ + NO_3^-	6.9 ¹⁾	3.4	0.45	0.16	2.00
LS (agar medium)	5.5 ¹⁾	8.3	11.93	0.61	7.07
M9	2.1 ²⁾	43.1	0.33	0.05	0.75

1) Culture period: 3 weeks, 2) Culture period: 2 weeks.

結果は Table 14 に示した通りである。比較のため M9 培地における定量値も示した。予想通り、shikonin を生成していない LS および LS + Cu²⁺ 培地中の細胞では、Gln, NH₄⁺両方の含量が非常に高かった。これに対し、shikonin を生成している懸濁培養細胞では Gln, NH₄⁺両方の細胞内含量が低かった。注目されるのは、LS 寒天培地上で shikonin を生産している細胞中の Gln 濃度は、LS 液体培地中の細胞に比して非常に低かったのに対し、NH₄⁺濃度はむしろ高いことである。このことは、細胞内の NH₄⁺ 濃度が高くても Gln 濃度さえ低ければ、ムラサキ培養細胞は shikonin 誘導体を生合成できるということを意味する。寒天は LS 培地で培養した細胞においても shikonin 生合成を誘導する能力があり、その活性成分は agaropectin であることが明らかにされているが⁴¹⁾、今回の実験から見て寒天には細胞中に NH₄⁺ が存在しても Gln が多量に蓄積しないように働く効果があると見なすこともできる。

以上の結果から、培地中の NH₄⁺の濃度が高いために shikonin 生合成が阻害される現象は、細胞内に Gln が多量に蓄積するためであることが明かとなった。しかし、Gln が shikonin 生合成を抑制する生化学的な機構については今後の研究に待たねばならない。

第7章 結論および考察

著者はムラサキ培養細胞における shikonin 系色素の生合成中間代謝産物と、その生合成調節因子について検討を行ない、以下の知見を得た。

I ムラサキ培養細胞における shikonin 生合成中間代謝産物

1. p-Hydroxybenzoic acid およびその配糖体

(1. 1) ムラサキ培養細胞の色素高生産株 M18 を LS 培地で培養した白色の細胞から、生合成中間体である p-hydroxybenzoic acid (5) が主にそのグルコサイド (8) として細胞内に多量に蓄積していることを見出した。一方、shikonin (1) を生産している M18 細胞の中にこれらの化合物はわずかしか見出せないこと、および色素生産用の M9 培地においても色素を生産しない系統 M130 および LY 株も本配糖体 (8) を M18 とほぼ同量生成する能力をもつことが認められた。

(1. 2) p-Hydroxybenzoic acid およびその配糖体は、LS 培地で培養した M18 株の白色細胞において、培養期間を通じてほぼ一定の含量で含まれている。しかし、この白色細胞を色素生産培地 M9 へ移植して、shikonin 生合成の誘導をかけると、配糖体 8 は速やかに加水分解されて細胞内含量が減少し、アグリコンの p-hydroxybenzoic acid も shikonin 誘導体に急速に取り込まれ、含量が減少する。その減少は色素生産中継続し、最終的に色素を多量に生産した赤色細胞にはこれらの化合物はわずかしか検出されない。これらのことより、LS 培地で培養した白色細胞においては shikonin 生合成は p-hydroxybenzoic acid のプレニル化の段階で強く抑制され、代謝されない p-hydroxybenzoic acid は

配糖体 8 の形で蓄えられ、shikonin 生成が誘導されると速やかに分解、利用されると推察される。

2. Shikonin 生合成の微量中間体および関連化合物

(2. 1) Shikonin (1) を生産している赤色の細胞から生合成中間代謝物の m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) ならびに geranylhydroquinone (7) を単離した。投与した物質の変換ではなく、正常に shikonin を生成している細胞からこれらの中間体が単離されたことは、その生合成経路の正当性を裏付ける知見として重要である。また両化合物はベンゾキノン誘導体である echinofuran 類の生合成中間体としても考えられ、ナフトキノン、およびベンゾキノン生合成の分岐点にあたる化合物として存在意義は大きい。

(2. 2) さらに、shikonin 誘導体を生産している赤色細胞からキノン系化合物の検索を行ない、ベンゾキノン誘導体 echinofuran B (11) の生合成中間体である deoxyshikonofuran (14) を単離、構造を決定した。また echinofuran C (12) の前駆体にあたる shikonofuran E (13) を得た。両化合物は分子内にハイドロキノン部分を有する geranylhydroquinone (7) からベンゾキノン系化合物へ向けて生合成された代謝中間体と考えられる。

(2. 3) LS 培地で培養した白色細胞 (M18株) から、ごく少量の m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid を単離した。次いで、異常代謝産物として dihydroshikonofuran (15) を単離、構造決定をした。本化合物は geranylhydroquinone の側鎖が5員環を形成した構造を有するもので、先に赤色細胞から得た deoxyshikonofuran の生合成の1段階前のものである。本化合物の存在は色素高生産株 (M18) を LS培地で培養することにより色素生成を抑制しても、細胞はある程度 geranylhydroquinone を生合成する能力があることを示唆するものである。

(2. 4) m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid 以降のキノン生合成中間体の細胞内含量を検索した結果、LS培地で培養したため shikonin 系色素の生合成を抑制された白色細胞 (M18) でも geranylhydroquinone が5員環を形成した dihydroshikonofuran までは生合成が進められているが、ナフトレン骨格を形成したものは全く見出されなかった。それゆえ、この条件下では shikonin 生合成は

geranylhydroquinone の閉環の段階で完全に阻害されているものと推定される。このことは、量的に主要な生合成抑制段階がプレニル化にあるとする(1. 2) 知見と併せて考慮すると生合成の流れを理解するにあたって大変興味深い。また M9 培地においても shikonin 生合成能力を欠く色素非生産株 M130 および LY においては、M18と同程度の m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid しか検出できず、生合成上別の段階に欠陥を有する株であることが推察される。

I I 細胞内および細胞壁中の微量フェノール性化合物

1. 低分子フェノール類の検索

M18 株において、shikonin を生産した赤色細胞から、低分子フェノールとして p-hydroxybenzoic acid (5)の他に caffeic acid (17), sinapic acid (18), syringaldehyde (19), ferulic acid (20), o-hydroxybenzoic acid (21) を検出した。一方、LS 培地中の白色細胞からも o-hydroxybenzoic acid (21) を除く上記5種のフェノール化合物を得た。さらにフェニルプロパノイドの二量体、および三量体として rosmarinic acid (22) ならびに lithospermic acid (23) が白色細胞に多く含有されていることが認められた。次いで、結合型低分子フェノールとして p-hydroxybenzoic acid および caffeic acid が細胞壁に存在することを明らかにした。これら両化合物の含量は、細胞内の可溶性低分子フェノールとは逆に、赤色細胞においてははるかに高いことから、色素生成細胞において細胞壁の構造に変化が起こっていることを示唆し、shikonin 生産との関連において興味を持たれる。

2. フェノール類の色素生合成への影響

上述のフェニルプロパノイドなど低分子フェノールの色素生成に対する効果を

観察するために、これらの化合物を色素生産系に投与した。また比較のために、cinnamic acid (4), *p*-coumaric acid (24), sinapaldehyde (25), coniferaldehyde (26), vanillic acid (27), syringic acid (28), venillin (29) といったフェノール類についても同様の検討を加えた。その結果、生合成中間体の *p*-hydroxybenzoic acid を投与した場合、 $10^{-5}M$ 以下の低濃度で色素生成を促進し、この色素増加量は投与された *p*-hydroxybenzoic acid のモル数をはるかに超すものであり、細胞に対し生理的な変化を生じさせる効果があることが認められ、細胞壁中の含量との相関が予想される。また rosmarinic acid (22) は比較的高濃度でも細胞に対する生長阻害は全く示さず shikonin 生成は抑制したことから、shikonin 生合成調節に関する内的な調節因子の1つである可能性がある。

III FMN アナログによる shikonin 生合成阻害

1. 光による色素生合成阻害時の中間代謝産物の検索

光照射によって shikonin の生合成を中断した時、M9 培地で培養した細胞は、*p*-hydroxybenzoic acid の配糖体を蓄積することを明らかにした。その含量は細胞を LS 培地で培養した時に蓄積する本化合物の含量とほぼ等しい。一方、プレニル化を受けた *m*-geranyl-*p*-hydroxybenzoic acid や geranylhydroquinone 等の蓄積は認められなかった。したがって、5 のプレニル化の段階が、shikonin の生合成の中で最も光に対し敏感な段階といえることができる。さらに光照射による色素生成阻害は、色素生合成が誘導された後においても起こることが確認された。

2. FMN の光分解物について

青色光を吸収する FMN (34) の光分解物を M18 細胞に投与したところ、isoalloxazine タイプの共役系を持つ lumiflavine (36) が細胞の shikonin 生合成を $10^{-5}M$ の濃度で抑制した。培地中の FMN は光照射下 alloxazine タイプの

共役系を持つ lumichrome に分解するのに対し、細胞に取り込ませた FMN は光分解によって lumiflavine を与えた。すなわち光照射による shikonin 生合成阻害の一部は、生合成の酸化段階に必要なと思われる FMN の光分解による減少と、それに伴う色素生合成阻害物質 lumiflavine の遊離で説明できる。

3. FMN アナログの shikonin 生合成阻害効果

FMN のアナログを種々、shikonin 生産系に投与して効果を検討し、lumiflavine の shikonin 生合成阻害活性にはその骨格の中の共役系が重要であることを明らかにした。shikonin 生合成を抑制するためには lumiflavine のような isoalloxazine 骨格が必要であり、lumichrome のような alloxazine 骨格は効果はるかに弱いことを見出した。

IV Glutamine による shikonin 生合成の調節

1. NH_4^+ の shikonin 生合成抑制効果

LS 培地から NH_4^+ を除くことによって、M18 細胞は shikonin を生成できること、ならびに M9 培地に NH_4^+ を添加すると色素生合成が抑制されることを確認した。また、shikonin 生合成をほぼ完全に抑制するのに必要な NH_4^+ の濃度は約 3 mM であることを明らかにした。

2. アミノ酸と shikonin 生合成

(2. 1) LS 培地で培養した白色の細胞は多量のアミノ酸を含んでおり、Gln, Arg, Glu, Asp, Asn 等の含量が高く、特に Gln の含量 ($6.5 \mu\text{mol/g}$ fresh wt) が最も高いことを見出した。この細胞を色素生産培地 M9 に移植すると、これらアミノ酸の含量は急激に減少し、同時に shikonin の生合成が開始した。培

養 14 日目で shikonin 含量が最高値 (42 mg/g dry wt) に達した時のアミノ酸含量は、移植直後のその 1/20 以下に減少していた。

(2. 2) 主なアミノ酸を M9 培地に添加して、shikonin 生成に対する効果を検討したところ、Gln のみが 0.25 mM という低濃度で shikonin 生合成をほぼ完全に抑制した。また、glutaminase の阻害剤 DON の投与実験により、この抑制は NH_4^+ よりはむしろ Gln 自体によるとの裏付けを得た。一方、Glu には効果は認められず、5 mM の濃度においても 50% 程度の抑制にとどまり、また Asn は 3 mM までは shikonin 生合成に対して何の効果も示さず、5 mM でやや抑制的に働く程度であった。すなわち、shikonin 生合成の抑制効果は Gln に特異的であり、Gln プールの大小によって、二次代謝の発現が制御されているとの見方もできる。通常、植物細胞が NH_4^+ を有機物にとりこむ最初の化合物であり、 NH_4^+ の無毒な貯蔵形態である Gln が、ムラサキの二次代謝に対して特異的に影響を及ぼすことは注目に値する。

(2. 3) 種々の培地で培養した細胞中の Gln および NH_4^+ の含量を調べたところ、LS 培地から NH_4^+ を除くと Gln の濃度が減少し、shikonin が生成された。しかし、LS 寒天培地で培養した shikonin を生産する細胞は、 NH_4^+ を多量に含んでいるが Gln の含量は低いことから、shikonin 生合成の抑制は NH_4^+ の直接作用ではなく、細胞内に取り込まれて生成する Gln の効果であると推定される。

以上述べたように、ムラサキ培養細胞の shikonin 生合成を何らかの要因で抑制すると、主な生合成の流れは p-hydroxybenzoic acid (5) のプレニル化の段階で強く抑制され、余剰の p-hydroxybenzoic acid は配糖化されて細胞内に蓄積されるが、5 の一部はプレニル化されて geranylhydroquinone (7) を生成している。しかし、7 の正常な閉環反応でその流れは阻止され、dihydroshikonofuran (15) の形で生合成は停止している。しかし、shikonin 生合成が誘導されると先の配糖体が加水分解されて 5 を与え、プレニル化、ナフトレン核の形成、酸化を経て shikonin が生産される。この場合、細胞内低分子ポリフェノールの

減少、一部の 5 などの細胞壁への取り込み、アミノ酸、特に Gln の急激な減少等が起こり、細胞内の代謝系が大きく変化する。一方、光照射によって shikonin の生合成を阻害した M18 細胞および本来色素を生産できない変異株 M130 や LY 細胞においては、主としてプレニル化が抑制され、細胞には 5 の配糖体が蓄積してくることが分かった。今後、本研究で明らかにした生合成の流れに関する知見をもとに、生合成関連酵素系の解析や遺伝子の発現に関する研究等に発展し、ムラサキ細胞の二次代謝機構が次第に明らかにされていくであろう。

実 験 の 部

第3章から第6章にかけての実験に関しては、特記しない限り、以下の方法によって実験を行なった。

培養株

本実験で使用した色素高生産性細胞株 M18 株、および色素非生産性株 M130 株は元来、ムラサキの芽生えを 2,4-D 10^{-6} M および kinetin 10^{-5} M を含む LS 寒天培地にてカルス誘導した後、IAA 10^{-6} M, kinetin 10^{-5} M を添加した LS 寒天培地にて継代培養期間中に選抜された株である¹⁴⁾。また、LY 株は M18 株を 10^{-6} M 2,4-D のみを含む培地で継代培養されている、色素非生産性培養細胞株である。

培養法

1) ムラサキの培養細胞 (M18 株) は 10^{-6} M の β -indoleacetic acid (IAA)、 10^{-5} M の kinetin を添加した Linsmaier-Skoog (LS)²⁰⁾ 液体培地 (3 % sucrose を含む) 150 ml を pH 6.2 に調整し、500 ml 平底フラスコ中で継代培養した。色素を含まない細胞を得るには、継代培養に用いているものと同じ LS 培地 30 ml を 100 ml-Erlenmeyer フラスコに入れ、ムラサキの培養細胞 1.0 g を移植した後、暗黒下、25°C で 3 週間往復振盪培養 (100 strokes/min) した。収穫はミラクロス (Calbiochem Behring Corp.) を用いて細胞をろ取した。

2) 色素生成の誘導は 1) の条件で前培養した白色の細胞を 1) と同様の生長調節物質及び 3 % sucrose 加えた M9 培地 30 ml (100 ml フラスコ) に 1.2 g 移植し、暗黒下 25°C で 2 週間振盪培養することによって行なった。

色素の抽出

ミラクロスでろ取して収穫した細胞を温風乾燥器中で乾燥後、 CHCl_3 を加えて

ホモジナイズし、溶媒をろ取した。残渣はさらに 2回 CHCl_3 で抽出し、ろ取後、ろ液を合わせて CHCl_3 で希釈して一定量とした。

総色素含量の定量

赤色色素を CHCl_3 で抽出して一定量とした試料溶液から 0.1-0.5 ml を 10 ml のフラスコに採取し、 N_2 気流下で乾固した。その残渣に 5 ml の 2.5 % KOH を加え、振盪して加水分解した。その青色水溶液の吸光度を 620 nm で測定し、shikonin を用いて作成した検量線に基づいて、総色素量を shikonin として算出した。

TLCの条件

TLCプレートは Kiesel-gel PF 254, (Merck) を用い、展開溶媒は主に次の 3 種を用いた。

Solvent I : EtOAc-MeOH- H_2O (200 : 33 : 27)

Solvent II : CHCl_3 -MeOH (9 : 1)

Solvent III : C_6H_6 -EtOAc (8 : 2)

検出は UVライトの照射、ヨード蒸気または 20 % H_2SO_4 の噴霧によった。分取薄層クロマトグラフィー prep. TLC (PLC) には Kiesel gel PF 254 (Merck) を用いた。

融点 (m.p.) は柳本微量融点測定器を使用して測定し、すべて未補正である。NMRスペクトルは日本電子 (JEOL) FT-NMR FX-200 Spectrometer を使用し、TMSを内部標準として測定した。UVスペクトルは Hitachi Model 200-20 Spectrophotometer、IRスペクトルは Hitachi EPI-S Spectrophotometer、旋光度は Hitachi Automatic Digital Polarimeter PM 201、低分解能マススペクトルは Hitachi RMU-6D Spectrometer、高分解能マススペクトルは JEOL JMS-01SG-2 Spectrometer を使用して測定した。

第3章 ムラサキ培養細胞における shikonin 生合成中間代謝産物

第1節 p-Hydroxybenzoic acid (5) およびその配糖体 (8)

第1項 単離、同定および細胞内含量

p-Hydroxybenzoic acid (5) の単離

LS培地中で暗黒下、25℃で3週間振盪培養したムラサキの新鮮細胞をミラクロスで吸引ろ取し、この細胞(468 g)をメタノール 1 l で3回抽出してメタノールエキスとした。これを減圧下で300 mlまで濃縮した後、 C_6H_6 , EtOAc, および n-BuOH で順次抽出して(各 150 ml x 3)各エキスを得た。その EtOAc エキス(460 mg)を Sephadex LH-20 カラムクロマト(2 cm I.D. x 43 cm)にかけ、80% EtOHで溶出し、1 フラクション 5 gずつ分画した。フラクション No. 10-13を合わせて溶媒を留去し、prep. TLC(展開溶媒 $CHCl_3$ -MeOH 4:1)にかけて p-hydroxybenzoic acid (5) 11 mg を単離した。

m.p. 212-213° (from H_2O); TLC (Rf 値) 0.77 (solvent I), 0.24 (solvent II); UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 208 (4.07), 253 (4.11); IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} : 3350, 1670, 1610, 1590, 1510, 1430, 1370, 1300, 1250, 1180, 1090, 1000, 865, 785; 1H -NMR (acetone- d_6): δ 7.92 (2H, d, J=9 Hz, H-2 and 6), 6.92 (2H, d, J=9 Hz, H-3 and 5).

p-O- β -D-Glucosylbenzoic acid (8) の単離

前述の n-BuOH エキス(460 mg)を Sephadex LH-20 カラムクロマトグラフィー(2 cm I.D. x 43 cm)にかけ、80% EtOHで溶出し、1フラクション 5 gずつ分画した。フラクション No. 11-15 を再び Sephadex LH-20 カラムにかけて同様に分画した後、Amberlite XAD-2 (Rohm and Hass Co., Philadelphia, Pennsylvania)を用いたショートカラム(2 cm I.D. x 12 cm)にかけ、 H_2O , MeOH で順次溶出、脱塩し、MeOH溶出画分を得た。この画分の溶媒を留去した後、EtOHから結晶化させて、無色針状晶の 8 (180 mg)を得た。

m.p. 210-211°; TLC (Rf 値) 0.20 (solvent I); UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 205 (4.17), 246 (4.17); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3350, 1670, 1610, 1590, 1435, 1405, 1310, 1295, 1255, 1180, 1110, 1090, 1000, 855, 785; ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.98 (2H, d, J=9 Hz, H-2 and 6), 7.13 (2H, d, J=9 Hz, H-3 and H-5), 5.01 (1H, d, J= 7Hz, glu-1), 3.35-3.97 (6H, glu-H).

8 の酵素分解

8 (1 mg) を 0.01 M の phosphate buffer (pH 6.5) に溶解し、0.5 ml の β -glucosidase を加え、30 °C で 1 時間インキュベートした後、2 倍量の EtOH を加えて反応を停止させ、反応液を TLC および HPLC (後述) にかけて 5 を検出した。

ムラサキ培養細胞および根における 5 および 8 含量

LS または M9 培地で培養した細胞 (M18, M130, LY 株) はミラクロスで吸引ろ過して収穫し、その新鮮細胞に 5 倍量の MeOH を加えてホモジナイズし、ろ過した溶液を HPLC の試料とした。ムラサキの乾燥根は、大阪市場品の「紫根」を用い、同様に処理した。

5 および 8 の定量は HPLC を用いて行なった。HPLC は TSK-GEL ODS 120A, 10 μ m I.D. (Toyo Soda) を充填したステンレスカラム (4.6 mm I.D. x 150 mm) を用い、展開溶媒 H₂O-MeOH-AcOH (385 : 10 : 5)、流速 1.5 ml/min、圧力 100 kg/cm² といった条件下で分析を行ない、250 nm における UV 吸収で検出した。5 および 8 の定量値は Chromatopac C-R1A (Shimadzu) で記録したピーク面積から計算した。

色素非生産株 M130 株および LY 株

M130 株および LY 株は共に色素生産培地 M9 または LS 寒天培地上において shikonin 系色素を生産できない系統である。M130 株は生長ホルモンとして M18 株と同じ条件 (10⁻⁶ M の IAA および 10⁻⁵ M kinetin)、また LY 株は 10⁻⁶ M の 2,4-D のみを含む LS 培地でそれぞれ継代培養されており、LY 株は元は M18 株であったものである。振盪培養は暗黒下、M18 株と同様の条件で行なった。

クチナシ、シソ等の懸濁培養細胞

クチナシ Gardenia jasminoides、シソ Perilla frutescens var. crispa、ア
カメガシワ Mallotus japonicus、ニチニチソウ Catharanthus roseus、サイコ
Bupleurum falcatum、ダツラ Datura innoxia、およびシャクヤク Paeonia al-
biflora var. trichocarpa の懸濁培養細胞は、 10^{-6} Mの 2,4-Dを含む LS培地を
用いてムラサキの細胞と同じ条件下で 2週間ごとに継代培養されているものを用
いた。5 および 8 の定量には上と同じ条件下で 2週間培養した新鮮な細胞を用
い、ムラサキの細胞と同じ条件で試料を調整し、HPLCの検体とした。

第2項 Shikonin 生成との関連

前述の条件でムラサキ培養細胞を LS培地中で培養し、培養開始日から 4日ご
とに 20日まで細胞を収穫し、MeOHで抽出して HPLCの試料とした。一方、LS 培
地で前培養した M18 株を M9 培地に白色の細胞を移植した方は移植日から 4日
ごとに 16日目まで細胞を収穫し、そのエキスを HPLC の検体とし、5 および 8
を定量した。

第2節 Shikonin 生合成の微量中間体および関連化合物

第1項 m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) および geranylhydroquinone (7) の単離、同定

M9培地で暗黒下、14 日間培養した赤色細胞 (M18株) を乾燥後、400 g の乾燥
細胞を MeOH 1.5 l 中でホモジナイズし、ろ過後、その残渣を再び 1.5 l の
MeOH で抽出する操作を 2回繰り返し、MeOHエキスを得た。その MeOHエキスを濃
縮後、H₂O 500 ml とエチルエーテル 500 ml を加えて分液ロートで分配し、水
層はさらに 4回 500 mlのエーテルで抽出して各エーテル層を合わせ、溶媒を留
去してエーテルエキスとした (27.4 g)。そのエーテルエキスをシリカゲル (Wa-
ko Gel C-200, 和光純薬) を用いてカラムクロマト (10 cm I.D. x 15 cm)にか

け、 C_6H_6 -acetone (5 : 1) で溶出し、1 フラクション 12 g ずつ分画して各画分を得た。フラクション B 以前 (Fr. No. 1-34) は shikonin 誘導体の画分 (10.2 g) であり、フラクション C (Fr. No. 35-59) の画分 (3.2 g) に shikonin 誘導体以外のスポットが TLC 上で検出された。この画分を次に Sephadex LH-20 のショートカラム (2 cm I.D. x 25 cm) にかけて EtOH で溶出し、1 フラクション 7 g ずつ分画して β -sitosterol とと思われる画分 (Fr. No. 1-3) を除いた。残りの画分を Lobar Column RP-8 (size B, Merck) にかき、70 % acetone を用いて、流速 2.5 ml/min、1 フラクション 7 g で分画し、画分 H (Fr. No. 28-35) をさらにシリカゲルを用いた prep. TLC ($CHCl_3$ -MeOH = 20 : 1) で精製し、 R_f 0.23 の部分から 6、 R_f 0.55 の部分から 7 を各々 28 mg および 43 mg 得た。また先のシリカゲルカラムの画分 D (Fr. No. 60-82, 0.6 g) も Lobar Column にかき同様に分画し、その画分 K (Fr. No. 46-65) をさらに Sephadex LH-20 を用いて精製することによって 6 (43 mg) を得た。また画分 K の後の画分 L (Fr. No. 66-78) からは 2 つのスポットが得られ、シリカゲル TLC で高い R_f 値を示す方を prep. TLC ($CHCl_3$ -MeOH = 20 : 1) で分離して 7 (30 mg) を得た。

m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) の同定

6 は無色油状物質として 71 mg 得られた。TLC (R_f 値) 0.23 (solvent III); MS: 274 (M^+) 203, 151, 123, 69, 41; UV λ_{max}^{MeOH} nm ($\log \epsilon$): 207 (4.12), 257 (3.92); IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 3400, 2600, 1685, 1605, 1280; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 7.89 (1H, d, $J=2$ Hz, H-3), 7.88 (1H, dd, $J=2, 9$ Hz, H-5), 6.85 (1H, d, $J=9$ Hz, H-6), 5.32 (1H, t, $J=7$ Hz, H-8), 5.07 (1H, br. t, $J=7$ Hz, H-13), 3.41 (2H, d, $J=7$ Hz, H-7), 2.00-2.20 (4H, m, H-11 and H-12), 1.78, 1.68, 1.60 (3H, s, each, H-10, H-15 and H-15'); High-MS for $C_{17}H_{22}O_3$: Calcd. m/z 274.15688, Found m/z 274.15740. これらの物性は文献値¹⁵⁾ とよく一致し、さらに別途合成した標品と、直接比較することによって同定した。

m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) の合成

5 (3 g) を HCl-MeOH でメチルエステルとし、methyl p-hydroxybenzoate (9) を得た。9 (3.2 g) を無水トルエン 50 ml に溶解し、金属ナトリウム 1.2 g

を加えて窒素気流中 5時間還流した。その後、氷冷下、別途合成した geranyl bromide 4.6 g を 2時間にわたり滴下し、さらに 24時間室温で攪拌した。沈澱をろ過して除き、1 N NaOH で抽出 (50 ml x 7) し、水層を 1 N H₂SO₄ で氷冷下酸性にし、エーテルで抽出 (100 ml x 5) した後、エーテル層を無水 MgSO₄ で乾燥してエーテル可溶部を得た (230 mg)。このエーテルエキスをシリカゲルカラムクマト (1.3 cm I.D. x 42 cm) にて C₆H₆-EtOAc (8 : 2) を用いて 4 g ずつ分画し、Fr. No. 35-88 から methyl m-geranyl-p-hydroxybenzoate (10) 19 mg を単離した。¹H-NMR (CDCl₃) δ: 7.86 (1H, d, J=2.5 Hz, H-3), 7.84 (1H, dd, J=2.5, 9 Hz, H-5), 6.89 (1H, d, J=9 Hz, H-6), 5.37 (1H, br. t, J=7 Hz, H-8), 5.23 (1H, m, H-13), 3.90 (3H, s, -COOCH₃), 3.43 (2H, d J=7 Hz, H-7), 2.00-2.20 (4H, m, H-11 and 12), 1.79, 1.68, 1.60 (3H, s, each, H-10, H-15, and H-15')。

この 10 を 1 N NaOH (10 ml) に溶解し、50°C で 6時間攪拌した後、氷冷下、1 N H₂SO₄ で酸性とした。この反応液を Et₂O 10 ml で 5回抽出し、無水 MgSO₄ で乾燥した後、溶媒を留去して 6 を 17mg 得た。

Geraniol のブロム化

10 g の geraniol を無水エーテル 179 ml に溶解、3.6 ml の無水ピリジンを加えて -5 から -10°C に冷却する。これを窒素気流中 PBr₃ 14.3 ml を 1時間かけて滴下し、さらに 1時間攪拌した後、氷水を加える。この反応混合物をエーテルで抽出し、エーテル層を、5 % NaHCO₃ および H₂O で順次洗浄して、溶媒を留去し、geranyl bromide 7.68 g を得、直ちに上記の反応に用いた。

Geranylhydroquinone (7) の同定

先に述べた m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) の単離の際得られる画分 H の、prep. TLC および画分 L の prep. TLC より合計 73 mg の 7 を無色油状物質として単離した。

TLC (R_f値) 0.54 (solvent III); MS: 246 (M⁺), 203, 161, 123, 69, 41; UV λ_{max}^{MeOH} nm(log ε): 208 (4.05), 293 (3.53); IR ν_{max}^{CHCl₃} cm⁻¹: 3350, 2920, 1500, 1450, 1180; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 6.68 (1H, d, J=8 Hz, H-6), 6.60 (1H,

d, J=3 Hz, H-3), 6.57 (1H, dd, J=3, 8 Hz, H-5), 5.29 (1H, t, J=7 Hz, H-8), 5.07 (1H, br. t, J=7 Hz, H-13), 3.30 (2H, d, J=7 Hz, H-7), 2.00-2.20 (4H, m, H-11 and H-12), 1.75, 1.68, 1.60 (3H, s, each, H-10, H-15 and H-15'); $^{13}\text{C-NMR}$ は Table 4 に示した; High-MS for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_2$: Calcd. m/z 246.16196; Found m/z 246.16311.

これらのデータは文献値¹⁵⁾とよく一致し、さらに本学部植物化学教室井上教授より御分与いただいた geranylhydroquinone (7) の標品と直接比較することによって同定した。

第2項 Deoxyshikonofuran 等の単離、構造決定

本節第1項のところで述べた分画精製において画分 H の prep.TLCにおいては 6 と 7 の間に UV吸収のあるゾーンを認め、この部分をかきとり、13 を 55mg 単離した。また分画 L の prep. TLC からはより Rf値の低いゾーンが UV照射下に認められ、この部分をかきとることによって、13 を 38 mg 単離した。また、Lobar Column の画分 G は溶媒を留去した後、 CH_2Cl_2 から結晶化させて 14 を 33 mg 得た。

Shikonofuran E (13) の同定

13 は無色油状物質として合計 93 mg 単離した。 $[\alpha]_D -60.8'$ (c=0.5, CHCl_3)。TLC では Rf値 0.46 (solvent III) を示し、展開後、一夜空气中に放置しておくときスポットが無色から橙黄色に変色する。MS: 356 (M^+), 256, 241, 137, 83, 55; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 214 (4.27), 264 (sh) (3.99), 269 (4.08), 281 (3.99), 323 (3.96); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3350, 2900, 1690, 1440, 1350, 1210, 1156, 1075, 870; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.44 (1H, s, H-10), 6.99 (1H, d, J=3 Hz, H-3), 6.79 (1H, d, J=9 Hz, H-6), 6.70 (1H, s, H-8), 6.68 (1H, dd, J=3, 9 Hz, H-5), 5.79 (1H, t, J=7 Hz, H-11), 5.71 (1H, br. s, H-2''), 5.09 (1H, br. t, J=7 Hz, H-13), 2.60 (2H, t, J=7 Hz, H-12), 2.17, 1.90 (3H, s, each, H-4'' and H-4'''), 1.68, 1.61 (3H, s, each, H-15 and H-15'); High-MS for $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_5$, Calcd. m/z 356.16236, Found m/z 356.16290.

これらの物理恒数は文献値²⁵⁾にある shikonofuran E とよく一致する。

Shikonofuran E (13) の酸化

10 mg の 13 を無水エーテル 1ml に溶解し、無水 $MgSO_4$ 25 mg および、酸化銀 (Ag_2O) 25 mg を加え、30 分間攪拌した後、反応液をろ過して沈澱物を除いた。さらに沈澱物をベンゼンで 3 回洗い、洗液と先のろ液とを合わせて溶媒を留去して、橙黄色油状物質 12 を 8 mg 得た。12 はその TLC, 1H -NMR, IR, UV, および MS スペクトルにおいて echinofuran C (12) とよく一致し、別途、活性炭添加 LS 培地²⁴⁾ で培養したムラサキの懸濁培養から単離した標品と同定した。

Deoxyshikonofuran (14) の構造

14 は無色針状晶として 33 mg 単離され、TLC においては Rf 値 0.51 (solvent III) を示し、展開後、空气中で一夜放置しておく、スポットが無色から橙黄色に変化する。

m.p. 139-141° ; MS: 258 (M^+), 191, 162, 137, 69, 41; UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 207 (4.18), 266 (sh) (4.02), 272 (4.10), 284 (4.39), 324 (3.94); IR $\nu_{max}^{CHCl_3}$ cm^{-1} : 3400, 2900, 1480, 1450, 1170, 940, 870; 1H -NMR ($CDCl_3$): δ 7.27 (1H, s, H-10), 6.97 (1H, d, H=3 Hz, H-3), 6.83 (1H, d, J=9 Hz, H-6), 6.67 (1H, dd, J=3, 9 Hz, H-5), 6.56 (1H, s, H-8), 5.16 (1H, t, J=7 Hz, H-13), 2.48 (2H, t, J=7 Hz, H-11), 2.27 (2H, dt, J=7 Hz, H-12), 1.70, 1.61 (3H, s, each, H-15 and H-15'); High-MS for $C_{16}H_{18}O_3$: Calcd. m/z 258.12558, Found m/z 258.12596.

Deoxyshikonofuran (14) の酸化

14 (10 mg) を無水エーテル 1ml に溶解し、無水 $MgSO_4$ 25 mg を加えて攪拌し、酸化銀 (Ag_2O) 25 mg を加えてさらに 30 分間攪拌した後、反応液をろ過し沈澱物を除いた。この沈澱物をベンゼンで 3 回洗い、洗液を先のろ液と合わせ、溶媒を留去して、橙黄色油状物質 (11) 8 mg を得た。11 はその TLC 上での挙動、 1H -NMR, IR, UV, 及び MS スペクトルにおいて echinofuran B (11) と一致した。さらに別途、硬紫根から単離した標品²⁴⁾ と同定した。

第3項 Dihydroshikonofuran (15) の単離、構造決定

LS 培地にて 25°C、暗黒下で 20日間培養した M18株の乾燥細胞 (400 g) を 1.5 l の MeOH でホモジナイズし、ろ過後の残査をさらに 1.5 l の MeOH で 2回抽出して抽出液を合わせ、濃縮した。濃縮エキスに水 500 ml およびエーテル 500 ml を加えて分液ロートで分配し、水層はさらに 500 ml のエーテルで 4回抽出してエーテル層を合わせ、溶媒を留去した。その水層を EtOAc, *n*-BuOH で順次抽出して各エキスを得たが、ここではエーテルエキスについて分画を行なった。

赤色細胞と同様にエーテルエキス (18.63 g) をシリカゲル (Wako Gel C-200, 和光純薬) を用いたカラムクロマト (10 cm I.D. x 15 cm) にかけて、C₆H₆-acetone (5 : 1) で溶出し、1 フラクション 12 g ずつ分画した。このカラムクロマトの画分 C (Fr. No. 35-60, 88 mg) に 6 と思われるスポットが検出された。次いで直接 prep. TLC (CHCl₃-MeOH = 20 : 1) にかけて精製を行ない、Rf 値 0.23 の部分から 6 を 4 mg 得た。画分 B (Fr. No. 14-34, 184 mg) には 6 および 7 の存在は、TLC および HPLC によって検出できず、代わりに TLC において Rf 値 0.37 (CHCl₃-MeOH = 20 : 1) に UV 照射下スポットが認められた。そこでこの画分を Sephadex LH-20 カラムクロマト (2 cm I.D. x 47 cm) にかけて、EtOH で溶出し (流速 1.3 ml/min)、6 g/Fr. で分画して Fr. No. 8-15 から油状物質を分離し、さらに prep. TLC (C₆H₆-EtOAc = 8 : 2) による精製を重ね 15 を単離した (202 mg)。

m-Geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6) の同定

白色の細胞から得た 6 も赤色の細胞から得たものと同一であることを ¹H-NMR スペクトルによって確認し、標品と直接比較し、同定した。

Dihydroshikonofuran (15) の構造

15 は無色油状物質として単離した。TLC において solvent III では Rf 値 0.36 を示し、展開後空气中で一夜放置しておく、淡橙色にスポットが変色する。

[α]_D -90.2' (c=0.4, CHCl₃); MS: 260 (M⁺), 229, 161, 137, 69, 41; UV

$\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 204 (4.15), 294 (3.44); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 3300, 2900, 1500, 1450, 1380, 1280, 1235, 1170, 1100, 1055, 965, 830; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 6.67 (1H, d, $J=8$ Hz, H-6), 6.60 (1H, dd, $J=3, 8$ Hz, H-5), 6.53 (1H, d, $J=3$ Hz, H-3), 5.99 (1H, br. t, $J=4$ Hz, H-7), 5.60 (1H, d, $J=1$ Hz, H-8), 5.09 (1H, m, H-13), 4.66 (2H, m, H-10), 2.00-2.30 (4H, m, H-11 and H-12), 1.68, 1.60 (3H, s, each, H-15 and H-15'); $^{13}\text{C-NMR}$ は本文中の Table 4. High-MS for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_3$: Calcd. m/z 260.14123, Found m/z 260.14138.

Dihydroshikonofuran (15) のアセチル化

29 mg の 15 を無水ピリジン 1 ml に加え、無水酢酸を 1 ml 加え、一夜室温で放置してアセチル化を行なった。常法により後処理を行ない、prep. TLC (CHCl_3 -MeOH = 30 : 1) で精製し、16 を油状物質として 25 mg 得た。

$[\alpha]_D -90.42'$ ($c=1.2$, CHCl_3); MS: 344 (M^+), 301, 285, 190, 161, 69, 43; UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 204 (4.15), 294 (3.44); IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm^{-1} : 2900, 1760, 1485, 1370, 1230, 1200, 1170, 1140, 1060, 1010, 910, 830; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 7.11 (1H, d, $J=2$ Hz, H-3), 7.06 (1H, d, $J=8$ Hz, H-6), 7.01 (1H, dd, $J=2, 8$ Hz, H-5), 5.84 (ddd, $J=2, 4, 5$ Hz, H-7), 5.48 (1H, q, $J=2$ Hz, H-8), 5.10 (1H, m, H-13), 4.72 (1H, ddd, $J=2, 5, 12$ Hz, H-10), 4.61 (1H, ddd, $J=2, 4, 12$ Hz, H-10), 2.31 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$), 2.27 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$), 2.10-2.25 (4H, m, H-11 and H-12), 1.69, 1.61 (3H, s, each, H-14' and H-15); High-MS for $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_5$: Calcd. m/z 344.16236, Found m/z 344.16290.

第4項 Shikonin 生合成関連代謝産物の細胞内含量

HPLCの条件

化合物の分析は HPLC を用いて行なった。ポンプ: Shimadzu LC-6A (島津製作所) カラム: ステンレスカラム 6 mm I.D. x 150 mm、充填剤: YMC A312 ODS 5 μm (山村化学)、カラム・オープン: CTO-6A (島津)、カラム温度: 40°C、展開溶媒: MeOH- CH_3CN - H_2O -AcOH (34 : 28 : 37 : 1)、圧力: 100 kg/cm^2 、検出器:

SPD-6A (島津)、波長: 254 nm および 294 nm。

検体成分の各ピークの定量は Chromatopac C-R3A (島津) で記録したピークの面積より算出した。検出波長 257 nm は 6、13、および 14 の検出に、294 nm は 7 および 15 の検出に用いた。保持時間は 6: 15.49、13: 14.71、14: 9.83、7: 11.10、15: 6.15 (分) である。

HPLC 用の試料の調整

試料とする M18, M130, LYの各株の細胞は (3. 1. 1) に記した方法に従って得た。細胞は生長が定常期初期に収穫したものを直ちに凍結乾燥後、次いでその約 1 g を精秤し、10倍量の MeOH を加えてホモジナイズし、ろ過後、その残渣は 2 ml の MeOH で 2回洗い、洗液とろ液を合わせて容量を測定し、HPLC の試料とした。なお注入量は 5-10 μ l で注入の直前にメンブランフィルター (Sartorius) でろ過し、微小な不溶物を除去した。

第4章 細胞内および細胞壁中の微量フェノール性化合物

第1節 低分子フェノール類の検索

細胞内のフェノール性低分子化合物の単離、同定

1) LS培地で培養した新鮮細胞 (150 g) を MeOH 300 ml で 3回抽出を繰り返す、ろ液を合わせて減圧下 40℃で濃縮して水性濃縮液を 50 ml 得た。これを 4 N HCl を用いて氷冷下 pH 2.5 に調整したのち、EtOAc で 5回抽出し、EtOAc 層を濃縮乾固して EtOAc エキスを得た。これをシリカゲルを用いた prep. TLC (CHCl₃-MeOH = 9 : 1) にかけて、Rf 値 0.25 の部分から 5、Rf 値 0.15 の部分から 17、Rf 値 0.35 の部分からは 20、Rf 値 0.45 の部分からは 18 が得られた。その同定は、¹H-NMR および TLC, HPLC (後述) を用いた標品との直接比較によって同定した。

2) M9培地で培養した赤色の新鮮細胞 (150 g) についても上と同様の抽出、および分画操作を加え、17-20 の化合物を単離した。また TLC (CHCl₃-MeOH = 20 : 1) で Rf 値 0.21 前後に強いテーリングを示すゾーンが認められ、この部分からは o-hydroxybenzoic acid (21) が得られ、¹H-NMR, TLC および HPLC (後述) により同定した。

Rosmarinic acid (22) の単離と同定

LS培地で培養した新鮮な白色細胞 500 g を MeOH 800 ml で 3回抽出して MeOH エキスを得、次いで減圧下 40℃で 60ml まで濃縮し、C₆H₆ (60 ml x 10), EtOAc (60 ml x 7), 水飽和 n-BuOH (60 ml x 3) で順次抽出して各エキスを得た。そのうち、EtOAc エキスを Sephadex LH-20 カラムクラマト (30 g, 2 cm I.D. x 44 cm)、80 % EtOH を用いて、流速 2.5 ml/min で溶出させ、1 フラクション 5 g ずつ分画した。フラクション No. 24-84 を合わせ、溶媒を留去して 22 (100 mg) を得た。

22は類白色無晶系粉末として単離した。TLC(Rf値): 0.29 (SiO₂, solvent I), 0.38 (SiO₂, toluene-EtOAc-AcOH=4 : 5 : 2), 0.23 (SiO₂, BuOAc-AcOH-H₂O=10 : 2 : 1), 0.78 (cellulose, 0.1 N HCl), 0.45 (cellulose, *n*-BuOH-BuOAc-AcOH-H₂O=9 : 28 : 47 : 16); [α]_D +128° (c=1.0, EtOH); UV λ_{max}^{MeOH} nm: 205, 215 (sh), 287, 325; IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3350, 1700, 1600, 1505, 1340, 1280, 1255, 1230, 1190, 1150, 1110, 1070, 970, 810; ¹H-NMR (CD₃OD): δ 7.51(1H, d, J=16 Hz, H-7), 7.02 (1H, d, J=2 Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, J=2, 8 Hz, H-6), 6.78 (1H, d, J=8 Hz, H-5), 6.78 (1H, d, J=2 Hz, H-13), 6.69 (1H, d, J=8 Hz, H-16), 6.62 (1H, dd, J=2, 8 Hz, H-17), 6.27 (1H, d, J=16 Hz, H-8), 5.10 (1H, dd, J=5, 9 Hz, H-10), 3.03 (2H, m, H-11); ¹³C-NMR(CD₃OD): δ 128.0 (1C, s, C-1), 115.5 (1C, d, C-2), 146.7 (1C, s, C-3), 149.4 (1C, s, C-4), 116.6 (1C, d, C-5), 122.9 (1C, d, C-6), 147.0 (1C, d, C-7), 115.5 (1C, d, C-8), 169.1 (1C, s, C-9), 77.2 (1C, d, C-10), 38.6 (1C, t, C-11), 130.8 (1C, s, C-12), 117.7 (1C, d, C-13), 145.9 (1C, s, C-14), 144.9 (1C, s, C-15), 116.4 (1C, d, C-16), 121.9 (1C, d, C-17), 176.8(1C, s, C-18)

これらのデータは文献値²⁹⁾の 22 によく一致し、さらに Zenk 教授から御分与いただいた標品との直接の比較によって同定した。

Lithospermic acid (23) の単離と同定

先の単離を行なった際得られた *n*-BuOHエキス (1.42 g)を Sephadex LH-20カラム (30 g, 2 cm x 44 cm) にかけて、80 % EtOH で溶出し (流速 2.5 ml/min)、1フラクション 5 gずつ分画した。フラクション No. 23-27 は 22 (98 mg)であり、その後のフラクション No. 30-40 を集めて溶媒を留去し、23 (23 mg)を得た。なお、Fr. No. 28, 29は 22 と 23 の混合物であることが認められた。

23は類白色無晶形粉末として得られた。TLC (Rf値): 0.10 (SiO₂ solvent I), 0.11 (SiO₂, toluene-EtOAc-AcOH=4 : 5 : 2), 0.08 (SiO₂, toluene-ethylformate-HCOOH=28 : 20 : 6), 0.69 (SiO₂, BuOAc-AcOH-H₂O=10 : 2 : 1), 0.73 (cellulose, 0.1 N HCl), 0.34 (cellulose, *n*-BuOH-BuOAc-AcOH-H₂O=9 : 28 : 47 : 16); UV λ_{max}^{MeOH} nm: 207, 225 (sh), 254, 288; IR ν_{max}^{KBr} cm⁻¹: 3300, 1700,

1600, 1510, 1445, 1360, 1260, 1180, 1120, 1070, 1030, 975, 860, 810;
 $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): δ 7.80 (1H, d, $J=16$ Hz, H-7), 7.15 (1H, d, $J=8$ Hz, H-6),
6.81 (1H, d, $J=8$ Hz, H-5), 6.79 (1H, d, $J=2$ Hz, H-13), 6.77 (1H, d, $J=2$
Hz, H-23), 6.79 (1H, d, $J=8$ Hz, H-26), 6.74 (1H, d, $J=8$ Hz, H-16), 6.70
(1H, dd, $J=2, 8$ Hz, H-27), 6.61 (1H, dd, $J=2, 8$ Hz, H-17), 6.20 (1H, d,
 $J=16$ Hz, H-8), 5.88 (1H, d, $J=5$ Hz, H-21), 5.17 (1H, dd, $J=5, 9$ Hz, H-
10), 4.35 (1H, d, $J=5$ Hz, H-20), 2.96 (2H, m, H-11); $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD): δ
123.0 (1C, s, C-1), 127.0 (1C, s, C-2), 147.0 (1C, s, C-3), 146.0 (1C,
s, C-4), 118.0 (1C, d, C-5), 122.4 (1C, d, C-6), 145.0 (1C, d, C-7),
117.0 (1C, d, C-8), 172.5 (1C, s, C-9), 75.0 (1C, d, C-10), 37.8 (1C, t,
C-11), 129.5 (1C, s, C-12), 117.5 (1C, d, C-13), 145.2 (1C, s, C-14),
143.5 (1C, s, C-15), 117.2 (1C, d, C-16), 122.2 (1C, s, C-19), 58.0 (1C,
d, C-20), 88.5 (1C, d, C-21), 134.0 (1C, s, C-22), 113.2 (1C, d, C-23),
145.5 (1C, s, C-24), 143.5 (1C, s, C-25), 117.0 (1C, d, C-26), 118.8 (1
C, d, C-27).

これらのデータは文献値²⁹⁾の 23 によく一致し、さらに Wagner 教授から御
分与いただいた標品との直接の比較によって同定した。

細胞壁の分離

細胞壁を分離する方法は Hartly³²⁾の方法を改変して行なった。

LS 培地で培養した白色の新鮮細胞 210 g (乾燥細胞に換算して 8.45 g) をあ
らかじめ MeOH 300 ml で 3回抽出して MeOH可溶部を除き、その細胞残渣を一度
減圧乾燥後、以下に示す組成の中性界面活性剤 200 ml を加え乳鉢の中で混和し
た。次いでその懸濁液を 25°C で 24時間激しく振盪し、グラスフィルター (No.
1) でろ過して残渣を得、さらに残渣を水 (1 l)、熱水 (1 l)、アセトン (500
ml)、 Et_2O (300 ml) で順次洗浄した後、減圧下、 P_2O_5 存在下で乾燥して、細胞
壁 2.11 g (乾燥重の 25.1%) を得た。

赤色細胞も同様に処理して細胞壁を得た (収量: 乾燥細胞あたり 25.0%)。

Neutral detergent

Sodium laurylsulfate	30.00 g
Disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetic dihydrate	18.61 g
Sodium borate decahydrate	6.81 g
Sodium hydrogen phosphate (anhydrous)	4.56 g
Ethylene glycol monomethyl ether	10 ml
H ₂ O	1000 ml

Adjust pH to 6.9-7.1

細胞壁からのフェノールの分離

乾燥細胞壁 50 mg に 1 N NaOH を加え、N₂ 気流中、20°C で 20 時間振盪し、加水分解を行なった。その反応液をグラスフィルター (No. 3) でろ過し、水 2 ml で 1 回、1 ml で 1 回洗浄してろ液と洗液とを合わせ、4 N HCl で氷冷下 pH を酸性 (2.5) に調節した。これを 5 ml のエーテルで 10 回抽出し、エーテル層を合わせて、乾燥後、N₂ ガスで溶媒を留去した。その残留物を 1 ml の MeOH に溶解し、5-10 μl を HPLC の試料とした。

フェノールカルボン酸の細胞内および細胞壁中の定量

HPLC は以下の条件にて行なった。カラム: TSK-gel ODS 120A, 10 μm (Toyo Soda, 4.6 mm I.D. x 150 mm); 溶媒系 (a) n-BuOH-AcOH-H₂O (10 : 1 : 400), (b) MeOH-H₂O-AcOH (100 : 400 : 1), (c) MeOH-H₂O-AcOH (90 : 110 : 1), (d) MeOH-H₂O-AcOH (20 : 30 : 1); 流速: 1.5 ml/min; 圧力: 100 kg/cm²; 検出波長: 280 nm。これらのうち溶媒系 (a)-(c) は 5 および 17-21 の化合物の検出同定に、(d) は 22 および 23 の検出同定に用いたものである。各々の定量値は Chromatopack C-R1A (島津) を用いて記録したピーク面積を、標品のそれと比較して算出した。

第2節 フェノール類の色素生合成への影響

Sinapaldehyde (25) の合成

2 g の sinapic acid (18) を abs. MeOH 40 ml に溶解し、MeOH-HCl 10 ml を加えて 12 時間攪拌し、メチルエステルとした。溶媒を留去し、MeOH から結晶化させて methyl sinapate (30) 1.86 g を無色針状晶として得た。これを CH₂Cl₂ 40 ml に溶解し、2,3-dihydropyran 1.3 g および p-toluenesulfonate 20 mg を添加し、N₂ 気流下 0°C で 3 時間攪拌した。反応液を triethylamine 2-3 滴加えて中和し、飽和 NaHCO₃ 20 ml で 2 回洗浄して、有機層の溶媒を留去した。反応液中に少量の未反応の原料が混在していたため、シリカゲルカラムクロマト (2 cm x 50 cm, C₆H₆-EtOAc=5 : 1) にかけて、1 フラクション 11 g ずつ分画してその Fr. No. 10-30 から tetrahydropyranyl methyl sinapate (31) 1.36 g を得た。これを 90 ml の THF に溶かし、-40°C に保った。LiAlH₄ 450 mg の THF (30 ml) 懸濁液中に徐々に滴下して還元した。容器内は N₂ 置換しておき、反応液の温度は -40°C 以下に保った。2 時間にわたって滴下した後、0°C まで温度を上げ、水を加えた THF 45 ml を加えて反応を止めた。その後 EtOAc 60 ml を加え、ドライアイスの小片を加えて酸性にし、EtOAc 120 ml および H₂O 30 ml を加えて抽出し、有機層を飽和 NaCl 60 ml で 3 回洗浄した後、無水 Na₂SO₄ で乾燥し、溶媒を留去して tetrahydropyranyl sinapyl alcohol (32) を得た。これを CCl₄ 25 ml に溶解し、N₂ 気流下、活性二酸化マンガン (MnO₂) 435 mg を加えて一夜室温で攪拌して酸化を行なった。反応混合物をろ過し、ろ液の溶媒を留去後、MeOH から結晶化させて tetrahydropyranyl sinapaldehyde (33) 721 mg を得た。そのうちの 250 mg を 10 ml の THF に溶解し、1 N HCl を 1 ml 加えて N₂ 気流下 0°C で 2 時間攪拌し、脱保護を行なった。反応後、30 ml の EtOAc および 30 ml の飽和 NaCl を加えて抽出し、有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥した後、溶媒を留去して油状物質を得た。これを Et₂O-hexane (1 : 1) から結晶化させて sinapaldehyde (25) 202 mg を得た。

TLC (R_f値): 0.21 (SiO₂, CHCl₃), 0.71 (SiO₂, solvent II), IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ cm⁻¹: 3500, 2920, 2800, 2660, 1510, 1460, 1420, 1370, 1330, 1280, 1255, 1220, 1160, 1120, 970, 810; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 9.66 (1H, d, J=8 Hz, -CHO), 7.39 (1H, d, J=16 Hz, Ar- \leftarrow H), 6.82 (2H, s, arom. H), 6.61 (1H, dd, J=8, 16

Hz, $\text{=}\begin{matrix} \text{CHO} \\ \text{H} \end{matrix}$), 3.94 (6H, s, -OCH₃).

Coniferaldehyde (26) の合成も基本的に本法に準じて行なった。

フェノール類の投与

内在性のフェノールとして 5、17、18、19、20、21 を、また比較用に用いたフェノールとして 4、24、25、26、27、28、29 (いずれも半井、和光より購入) を培地に投与する際は DMSO に溶解し、 10^{-6} – 10^{-3} M の各濃度の試量を pore size 0.2 μm のメンブランフィルター (Fluoropore, 住友電工) を用いてろ過滅菌を行ない、その 0.1 ml を無菌的に M9 培地 7 ml に添加した。なお、DMSO はこの濃度 (1.4 %) で色素生成に影響はない。培地にはこれら有機酸による pH の低下を防止するために 2-(N-morpholino)-ethanesulfonic acid (MES) 10 mM を添加した。この濃度においては MES は shikonin 生成に影響を及ぼさなかった。培地 7 ml は試験管 (18 mm I.D. x 180 mm) に入れ、移植量は試験管あたり、0.3 g とし、通常の色素生成の条件で 14 日間振盪培養した。収穫はミラクロスでろ過して行なった。22 の投与に関しては DMSO の代わりに H₂O を用いて溶解し、その他の条件は他の試料と同様に行なった。

第5章 FMNアナログによる shikonin 生合成阻害

第1節 光による色素生成阻害時の中間代謝産物の検索

光照射の条件

1) Table 8 に示した実験においては M18株の細胞を M9培地に移植した直後から、蛍光灯を用いた 6000 lux の白色光照射下にフラスコを設置して、暗所と同条件で振盪培養を行なった。照明は移植 14日後に収穫するまで継続した。対照としては暗所で通常の条件下において培養した (M9培地、M18株) 細胞を用いた。

2) Fig. 20 の実験

M9培地に細胞 (M18株) を移植した時点から、暗黒下にて振盪培養を行ない、移植後 0日から 3日ごとに 12 日目まで 6000 lux の照明下の振盪条件にフラスコを移動し、移植後 15日目にすべての細胞を収穫した。また対照としては培養開始日から最後まで暗黒下で振盪したものを用いた。また対照として培養開始日から 15日間暗黒下で培養したものを用いた。

1)、2) の実験とも、p-hydroxybenzoic acid (5), およびその配糖体 (8) の定量は 3.1.1 に述べた方法を用いて行なった。またその他の生合成中間体である m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid (6), geranylhydroquinone (7) の検出には HPLC を以下の条件で用いた。カラム: 4.6 mm I.D. x 150 mm, TSK-gel ODS 120A (10 μm); 溶媒: MeOH-H₂O-AcOH (70 : 30 : 0.3); 流速: 1.0 ml/min; 圧力: 90 kg/cm²; 検出波長: 6 の検出には 257 nm, 7 の検出には 294 nm を用いた。

第2節 FMN (34) の光分解物について

FMN 光分解物の shikonin 生合成への影響

Lumichrome (35) および lumiflavine (36) は各々 Sigma Chemical Company

および Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. から購入した。

35 および 36 は DMSO 溶液とし、Fluoropore (pore size 0.2 μ m, 住友電工) を用いてろ過滅菌し、無菌的にその 0.1 ml を M9 培地 7 ml (試験管使用) に添加した。対照としては DMSOのみを用いたが、この濃度 (1.4 % v/v) で DMSO は shikonin 生合成に対して何ら影響しなかった。移植する細胞 (M18株) は培地 7 ml あたり 300 mg とし、移植後、暗黒下で培養し、14日後に収穫して分析に用いた。

細胞内、細胞外における FMN (34) の光分解

FMN (34) は 6000 lux の光照射下 24時間でほぼ完全に分解することが予試験により認められた。そこで、細胞内の FMN (34) の光分解の観察のためにあらかじめ FMN (34) 10⁻⁴ M を添加した LS培地中に M18株の細胞を移植し、24時間暗黒下で振盪して FMN (34) を取り込ませた。細胞を収穫後、新しい LS培地で十分洗浄し、新しい LS培地 30 ml を入れた 100 ml のフラスコに細胞を移植し、6000 luxの照明下、24時間振盪培養した。細胞は収穫後、後述の HPLCによって 35 および 36 の定量のための試料とした。

一方培地中の FMN (34) の光分解を観察するためには、10⁻⁵M の FMN (34) を LS培地に添加して、上記と同様の照明条件下で 24時間振盪し、そのまま HPLC の試料とした。

HPLCの条件

5 および 8 の定量条件は 3.1.1 に述べた方法を用いて行なった。またその他の生合成中間体である 6、7 の検出には以下の条件を用いた。カラム: 4.6 mm I.D. x 150 mm, TSK-gel ODS 120A (10 μ m); 溶媒: MeOH-H₂O-AcOH (70 : 30 : 0.3); 流速 1.0 ml/min; 圧力 90 kg/cm² 検出波長: 6 の検出には 257 nm, 7 の検出には 294 nmを用いた。また 35 および 36 の検出には、カラムは上記と同じものを用い、溶媒: MeOH-H₂O-AcOH-triethylamine (40 : 60 : 0.3 : 0.3); 流速: 1.0 ml/min; 圧力 90 kg/cm²; 検出波長: 260 nm といった条件で行なった。これらの条件下で 6、7、35、36 はそれぞれ保持時間13.6分, 7.4分, 23.7分, 13.3分であった。

第3節 FMNアナログの shikonin 生成阻害効果

化合物 37-44 は京都大学薬学部、米田文郎教授より御分与していただいた。各々の化合物は、DMSO に溶解し、M9培地にあらかじめ投与してからオートクレーブにかけて滅菌した。投与量は試験管に入れた 7 mlの培地に対して 0.1 mlとし、薬物最終濃度 10^{-6} - 10^{-9} M となるように調整した。対照としては DMSOのみを添加したものをを用いた。

第6章 Glutamine による shikonin 生合成の調節

第1節 NH_4^+ の shikonin 生合成抑制効果

アンモニウムイオンを含まない LS 培地を調整するために LS 培地に含まれる NH_4NO_3 を除き、代わりに培地中の総窒素含量が変わらないように KNO_3 を添加した。Fig. 23-A に示す NH_4^+ を LS 培地から除く実験においては、 NH_4NO_3 の濃度を本来の $20\mu\text{M}$ から、 10 , 5 , $0\mu\text{M}$ と段階的に減少させ、同時に N を KNO_3 として補った。 Cu^{2+} の添加は M9 培地と同じ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を用い、M9 培地と同濃度 ($1.2\mu\text{M}$) となるように、その 200 倍水溶液を LS 培地に添加した。

Fig. 23-B で示す M9 培地に対する NH_4^+ の添加には NH_4Cl を用い、本来の $0\mu\text{M}$ に対して、 $3\mu\text{M}$ まで段階的に NH_4Cl を添加して効果を観察した。またアンモニウム塩として $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を用いても、同等の結果が得られた。この場合、 NO_3^- の濃度は固定したが、これは NO_3^- の濃度がこれ以下の場合、 NH_4^+ の添加によって細胞が容易に死滅するからである。

第2節 アミノ酸と shikonin 生合成

第1項 細胞内の遊離アミノ酸と shikonin 生合成に伴う経時変化

アミノ酸および NH_4^+ の分析は HITACHI Amino Acid Analyser 835 を用いて行った。試料の調整は、経時変化の実験 (Fig. 22) 以外の時は、定常期初期の細胞を収穫し、その 10g を 8 倍量の 0.02N HCl 中に懸濁させ、Potter-Elvehjem のホモジナイザーでホモジナイズした。そのホモジネートを 3000rpm で 10 分間遠心し、その上清をさらにミリポアフィルター (Sartorius) でろ過して、アミノ酸分析のための試料とした。

経時変化の実験では、LS 培地で 3 週間培養した細胞 (M18 株) を M9 培地に移植し、0 日、3 日、7 日、14 日後に収穫し、半分は上記のようにアミノ酸の分析に、

残りの半分は shikonin 定量用の試料とした。

第2項 主なアミノ酸の shikonin 生成に対する抑制効果

アミノ酸の shikonin 生成に対する効果を観察するために、Gln, Glu, Asn, Arg, Ala を 0-5 μ M の濃度となるように、あらかじめ M9 培地 30 ml (in 100 ml flask) に添加した後、細胞 (1.2 g) を移植して常法通り 14日間培養し、収穫後、shikonin 系色素の定量を行なった。

DON (6-diazo-5-oxo-norleucine)は Sigma Chemicals より購入した。Fig. 26 の実験系においては、あらかじめ 0.2 mMの Glnを M9培地に添加して、shikonin 生産を、元の 30% 程度に抑制した系に 10^{-6} - 10^{-3} M の濃度となるように、M9培地に添加した。添加の方法は、水溶液の DONをミリポアフィルター (Sartorius) を通すことによって滅菌し、無菌的に添加した。この場合も常法通り 14日間振盪培養した後、収穫し、細胞重量測定後、shikonin 系色素の定量用検体とした。

第3項 種々の培地における細胞中の NH_4^+ および glutamine

Gln, NH_4^+ の定量は、6.2.1 に述べた方法によった。また、LS培地に Cu^{2+} (1.2 μ M) を添加した培地、および LS 培地の NH_4^+ を NO_3^- に置換してさらに Cu^{2+} (1.2 μ M) を加えた改変 LS 培地の調製については 6.1 で述べた方法によった。寒天を加えた LS培地は、LS培地調製時に、1% の濃度で寒天 (和光純薬) を添加して加熱溶解し、分注してオートクレーブ後、冷却固化した培地である。

引 用 文 献

- 1) 大塚敬節、矢数道明、清水藤太郎 (1972)、漢方診療医典、p. 378, 南山堂、東京。
- 2) T. Majima and C. Kuroda (1922), Acta Phytochem., 1, 43.
- 3) H. Brockmann (1936), Ann. Chem., 521, 1.
- 4) I. Morimoto, T. Kishi, S. Ikegami and Y. Hirata (1965), Tetrahedron Lett., 4537.
I. Morimoto and Y. Hirata (1966), Tetrahedron Lett., 3677.
- 5) H. Arakawa and M. Nakazaki (1961), Chem. and Ind., 947.
- 6) 京極和旭、寺山博行、館 安英、鈴木 堯、小松曼著 (1973)、生薬誌、27, 24.
- 7) 久道周次、吉崎文彦 (1982)、生薬誌、36, 154.
- 8) 京極和旭、寺山博行、館 安英、鈴木 堯、小松曼著 (1973)、生薬誌、27, 31.
- 9) M. Tabata, M. Tsukada and H. Fukui (1982), Planta Med., 44, 234.
- 10) 林元英 (1977)、日薬理誌、73, 193.
- 11) U. Sankawa, Y. Ebizuka, T. Miyazaki, Y. Isomura, H. Otsuka, S. Shibata, M. Inoma and F. Fukuoka (1977), Chem. Pharm. Bull., 25, 2392.
- 12) V. P. Papageorgiou (1980), Planta Med., 38, 193.
- 13) A. Terada, Y. Tanoue, A. Harada, and H. Sakamoto (1983), J. Chem. Soc. Chem. Commn., 987.
- 14) M. Tabata, H. Mizukami, H. Hiraoka and M. Konoshima (1974), Phytochemistry, 13, 927.
H. Mizukami, M. Konoshima and M. Tabata (1978), ibid., 17, 95.
- 15) H. Inouye, S. Ueda, K. Inoue and H. Matsumura (1979), Phytochemistry, 18, 1301.
- 16) Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino and C. Suga (1981), Plant Cell Reports, 1, 59.

- Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto (1981), ibid., 1, 61.
- 17) M. Tsukada and M. Tabata (1984), Planta Med., 338.
- 18) H. Fukui, M. Tsukada, H. Mizukami and M. Tabata (1983), Phytochemistry, 22, 453.
- 19) H. V. Schmidt and M. H. Zenk (1971), Tetrahedron Lett., 4151.
- 20) E. F. Linsmaier and F. Skoog (1965), Physiol. Plant., 18, 100.
- 21) K. N. Gaint and K. S. Chopra (1976), Planta Med., 30, 174.
- 22) E. A. Kaczka, C. H. Shunk, J. W. Pichter, F. J. Woelf, M. M. Gasser and K. Folpers (1956), J. Am. Chem. Soc., 78, 4125.
- 23) H. Inouye, H. Matsumura, M. Kawasaki, K. Inoue, M. Tsukada and M. Tabata (1981), Phytochemistry, 20, 1701.
- 24) H. Fukui, N. Yoshikawa and M. Tabata (1984), Phytochemistry, 23, 301
- 25) F. Yoshizaki, S. Hisamichi, Y. Kondo, Y. Sato and S. Nozoe (1982), Chem. Parm. Bull., 30, 4407.
- 26) E. プレッシュ、T. クレーク、J. ズィブル、W. シモン著、中西香爾、梶原政宏、堤 憲太郎訳 (1982)、有機化合物スペクトルデータ集、P.149、講談社、東京。
- 27) M. M. Smith and R. D. Hartley (1983), Carbohydr. Res., 118, 65.
- 28) M. L. Scarpani and G. Oriente (1958), Ricerca Sci., 28, 2392.
- 29) C. J. Kelly, J. R. Mahajan, C. Brooks, L. A. Newbert, .W. R. Brennan and M. Carmack, (1975), J. Org. Chem., 40, 1804.
- C. J. Kelly, R. C. Harruff and M. Carmack (1976), J. Org. Chem., 41, 449.
- 30) G. Johnson, S. G. Sunderwirth, H. Gibian, A. V. Culter and F. X. Gassner (1963), Phytochemistry, 2, 145.
- 31) P. J. Van Soest and R. H. Wine (1967), J. Assoc. Off. Analyt. Chem., 55, 50.
- 32) R. D. Hartley, E. C. Jones and J. C. Fenlon (1979), J. Sci. Food Agric., 25, 947.
- 33) H. Kutsuki, F. Nakatsubo and T. Higuchi (1981), Mokuzai Gakkaishi,

27, 520.

- 34) L. Heide and M. Tabata (1987), Phytochemistry, 26, 1651.
- 35) 水上 元 (1976)、博士論文 (京都大学)。
- 36) A. W. Galton (1974), Plant Physiol., 54, 427.
- 37) J. Koziol (1971), in Methods in Enzymology, Vol. 18, Part B, (D. B. Macormic and L. D. Wright, ed.), p. 253, Academic Press, London.
- 38) T. Nagamatsu, M. Koga and F. Yoneda (1984), Chem. Pharm. Bull., 32, 1699.
- 39) P. M. White (1963), The Cultivation of Animal and Plant Cells (2nd ed.), Ronald Press, New York.
- 40) S. C. Hartman (1968), J. Biol. Chem., 243, 853.
- 41) H. Fukui, N. Yoshikawa and M. Tabata (1983), Phytochemistry, 22, 2451.

謝 辞

終わりに臨み、本研究に際し、始終御指導御鞭撻を賜りました恩師京都大学薬学部田端守教授に心より深謝致します。

また、本研究を実施するにあたり、貴重なサンプルを御分与下さり、有益な御指導を頂きました京都大学薬学部井上博之名誉教授、米田文郎教授、ならびに井上謙一郎助手に深謝致します。

アミノ酸の分析に関して種々の便宜を提供して頂き、有益な御助言を下された京都大学薬学部矢島治明教授、赤路健一助手に心より感謝致します。

さらに、本研究の実験遂行にあたり、直接の御指導を賜った京都大学薬学部福井宏至助教授、田中重雄助手に感謝致します。

本研究は下記の方々の御厚情を頂いたものであり、ここに謹んで感謝致します。

EI および CI-MS 測定の便宜をおはかり頂きました京都大学農学部小清水弘一教授ならびに平井伸博博士、ムラサキの新鮮根を提供して頂きました武田薬品工業京都試験農園、rosmarinic acid (22)の標品を御分与頂きましたミュンヘン大学薬学部 M. H. Zenk教授、lithospermic acid (23)の標品を御恵与下さいました同大学薬学部 H. Wagner教授、NMR に関して有益な御助言を頂いた京都大学薬学部黒田義弘博士、ならびにマススペクトルを測定して頂いた同学部秋元直茂博士に感謝致します。また、実験上の便宜を提供して頂いた京都大学薬学部生薬学教室の諸氏、特に菊間美智子学士、西川由美子学士に感謝の意を表します。