

氏 名	矢 崎 一 史 や ざき かず ふみ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 274 号
学位授与の日付	昭 和 63 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項
研究科・専攻	薬学研究科薬学専攻
学位論文題目	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

(主 査)  
論文調査委員 教授 田端 守 教授 藤多 哲朗 教授 市川 厚

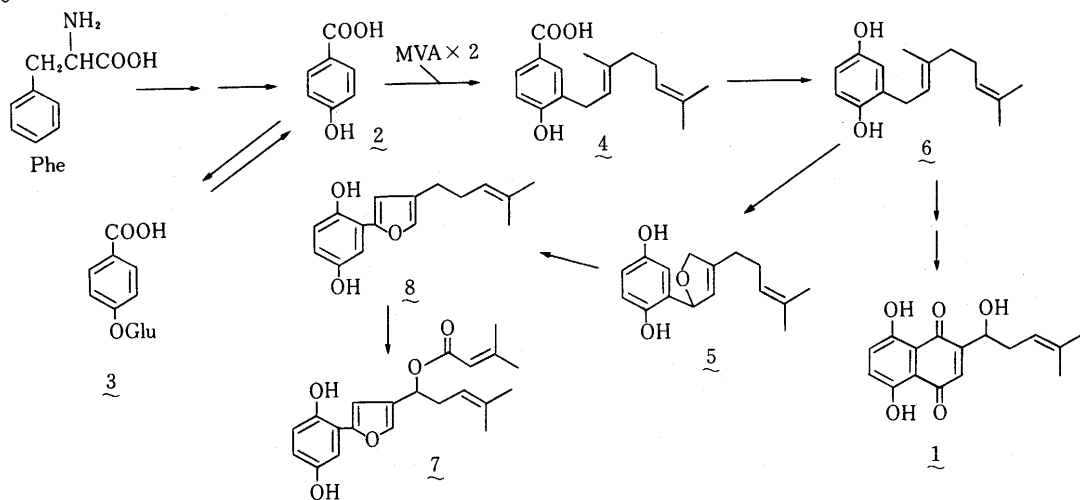
### 論 文 内 容 の 要 旨

ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae) はその根部にナフトキノ系赤色素の shikonin 誘導体を含有する薬用植物であり、近年その細胞培養系が確立され、大量培養による shikonin 生産が工業レベルで行われている。しかしながら、ムラサキ培養細胞による shikonin(1) 生合成の調節機構については未だ解明されていない点が多く残されている。特に生合成中間体や、その関連化合物に関して有機化学的な追求を行った例は少ない。

著者はムラサキ培養細胞を用いて植物の二次代謝の調節に関して理解を深め、その機構を解明することを試みた。その結果、色素非生成細胞に蓄積する生合成中間体の存在を明らかにし、その他の関連化合物と共に shikonin 生合成との関連を検討した。また、関連化合物の検索を低分子フェノール全般に広げ、shikonin 生成細胞と非生成細胞の細胞壁のフェノール性成分に興味深い差異を認め、その役割の解明を試みた。さらに FMN 光分解物を始めとする類縁化合物の shikonin 生合成の阻害効果について検討を加え、光による色素生成阻害効果を分子レベルで解明することに成功した。最後に  $\text{NH}_4^+$  による shikonin 生成抑制効果の解明に着手し、その活性本体の解明を行った。

まず、shikonin 高生産株 M 18 を細胞増殖用の Linsmaier-Skoog (LS) 培地で培養した白色の shikonin 非生合成中間体である p-hydroxy-benzoic acid(2) がその  $\beta$ -D-グルコシド(3)として多量に (1.3 mg/g fr. wt) 蓄積していること、また色素生成能を有しない細胞株 M 130, LY も 3 を M 18 株とほぼ同量含むことが認められた。また LS 培地で培養した M 18 株はその細胞内にごく少量の m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid(4)と、その関連化合物の dihydroshikonofuran(5)を有していることを明らかにした。特に後者は今回新たに構造決定された化合物で、生合成的には shikonin の生合成前駆体の geranylhydroquinone(6)がジヒドロフラン環を形成して生じた代謝産物にあたる。一方、色素生産培地 (M 9) で培養した shikonin 生成細胞から生合成中間体の 4, 6 と共に、ベンゾキノ誘導体の echinofuran 系化合物の前駆体にあたる shikonofuran E(7)および新化合物 deoxyshikonofuran(8)を単離、構造決定を

した。これらの化合物の細胞内経時変化を検討した結果、3はLS培地で培養した細胞中にはほぼ一定量含まれているのに対し、細胞がM9培地へ移殖された直後から3の含量が著しく減少し、加水分解の結果生じた2も速やかに shikonin 誘導体の生合成に利用されるとの知見を得た。すなわちLS培地におけるM18株の shikonin 生合成は2のプレニルの過程で強く抑制されていることが明らかとなった。ただし、この shikonin 非生成細胞においてもある程度2のプレニル化が行われていることを認めている。しかし、この時6のナフタレン環への閉環段階が阻害されており、全く shikonin 誘導体を生成せずに5が生じていることから、このナフタレン骨格形成の段階が shikonin 生合成の key step であると示唆された。



Biosynthetic scheme of shikonin and related compounds

またフェニルプロパノイドを初めとする他の低分子フェノール類の分布を shikonin 非生成細胞と生成細胞で比較した結果、前者からは先の2の他、caffeic acid(9), sinapic acid(10), syringaldehyde(11), ferulic acid(12), rosmarinic acid(13), lithospermic acid(14)を単離した。後者からは2、9–12の5種のフェノール類に加えて、shikonin 生成細胞特有の成分として *o*-hydroxybenzoic acid(15)を得た。細胞壁結合型フェノールとしては、2および9が検出され、shikonin 生成細胞の方で含量が高かった。このことは shikonin 生成との関連において興味深い知見である。これらの色素生成に対する効果を検討するために、色素生産系にこれらのフェノール性化合物を初めとする種々の化合物を投与した。その結果、2を投与した時のみ、 $10^{-5}$  M 以下の低濃度で shikonin 生成が強く促進された。この増加量はM9培地に添加した2のモ数をはるかに超すものであり、2は細胞の shikonin 生成に有利な生理的变化を生じさせる効果があることを明らかにした。

光、特に青色光は shikonin 生成に特異的な抑制因子として知られているが、著者は光照射によって shikonin 生成を抑制した細胞に3がLS培地中の細胞とはほぼ同程度蓄積することを認め、2のプレニル化の段階が shikonin 生合成の中で最も敏感に光で抑制されると推定した。また青色光を吸収する FMN が光分解によって生じる lumichrome, lumiflavine のうち後者が特に強く shikonin 生成を抑制することを認め、さらに細胞内の FMN を光で分解すると、lumiflavine が主に生じることを確認した。すなわ

ち光による shikonin 生成阻害の一部は FMN の欠乏とそれに伴う lumiflavine の生成で説明されることを示唆した。また FMN 類縁体の投与実験により、shikonin 生成阻害には、分子内に isoalloxazine タイプの共役系が必要であると明らかにした。

最後に  $\text{NH}_4^+$  の shikonin 生成抑制の解明に着手し、LS 培地でも  $\text{NH}_4^+$  が存在しない時は shikonin 生成が起こることを確認した。次いで shikonin 非生成細胞には Gln ( $6.5 \mu\text{mol/g fr. wt}$ )、Arg, Glu, Asp, Asn 等をはじめとする遊離アミノ酸が多量に含まれていることを認め、これらのアミノ酸の投与実験を行った結果、Gln のみが特異的に約  $0.3 \text{ mM}$  の低濃度で shikonin 生成をほぼ完全に抑制した。その効果が  $\text{NH}_4^+$  でなく、Gln そのものによるものであることを DON の投与実験によって確認し、これは LS 寒天培地上の shikonin 生成細胞が多量の  $\text{NH}_4^+$  に対し、Gln を少量しか含有していなかったことから支持された。

以上著者はムラサキの培養細胞における種々の shikonin 生成の調節機構を化合物レベルで明らかにし、生合成の流れをより明確に解明することに成功した。これらの成果は shikonin 生合成酵素の研究や、遺伝子の発現に関する研究の基礎となる知見であり、今後さらに他の植物の二次代謝調節解明の手懸かりを提供するものであると考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、薬用植物ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) の培養細胞における薬理活性成分 shikonin 系色素 (1, 4-naphthoquinone 誘導体) の生合成調節機構を追究する目的で、生合成の中間物質およびその関連化合物の検索を行い、かつ代謝制御要因の化学的解明を試みた研究の成果をまとめたものである。

著者はまず、shikonin(1)高生産性細胞株 M 18 を色素生産培地 M 9 で培養した赤色細胞から、1の生合成中間体 m-geranyl-p-hydroxybenzoic acid(2)ならびに geranylhydroquinone(3)を単離・同定した。また後者から派生するベンゾキノ誘導体 shikonofuran E(4)およびその前駆体と見なされる新化合物 deoxyshikonofuran(5)をも単離、構造決定した。一方、同じ M 18 株を 1の生成が起こらない細胞増殖用 LS 培地で培養した白色細胞においては、2の前駆体 p-hydroxybenzoic acid(6)がその  $\beta$ -D-glucoside (7)として多量に蓄積することを見出した。次いで、この白色細胞を生産培地 M 9 に移殖すると、7の加水分解で生じた 6が速やかに 1の生合成に利用されることから、増殖培地 LS 中の細胞では 6のプレニル化過程が強く抑制されていると推測された。しかし、この shikonin 非生成細胞から微量の中間体 2およびその異常代謝産物と考えられる新物質 dihydroshikonofuran(8)が単離されたことから、3のナフタレン環への閉環段階も阻害されていることが示唆された。これらの実験結果から、1の生合成においては、6のプレニル化ならびに 3のナフタレン骨格形成が key step であると推定された。著者はまた、1の生合成に関係すると考えられるフェノール性化合物全般の動態を検討した結果、1の非生成細胞に特徴的な成分として rosmarinic acid および lithospermic acid の存在を認め、前者は 1の生合成を抑制する化学的調節要因の一つであることを示唆した。

さらに著者は、1の生合成に関与する重要な調節要因として知られている光およびアンモニウムイオンの作用機構について検討を加えた。光、特に青色光は1の生成を特異的に阻害するが、光照射した培養細胞では7が多量に蓄積する事実から、著者は6のプレニル化の過程が敏感に抑制されると推定した。また、フラビン酵素の補酵素 FMN が青色光を吸収して生じる分解産物 lumiflavine が強く 1の生成を抑制することを認め、光による阻害の一部は FMN の欠乏とそれに伴う lumiflavine の生成に起因することを明らかにした。一方、増殖用培地で 1 が生成されない最大原因である  $\text{NH}_4^+$  の効果については、 $\text{NH}_4^+$  を添加した培養細胞の分析および生理学的実験により、細胞中で増量する glutamine が 1 の生成を抑制することを実証した。

以上、著者は shikonin 生合成の調節機構を化合物レベルで明らかにし、二次代謝の動的な理解に有益な貢献を行った。よって本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。

さらに昭和 63 年 2 月 24 日論文内容とそれに関連した事項につき試問を行った結果優秀と認定した。