

氏名	矢倉とおる
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	薬博第535号
学位授与の日付	平成16年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科創薬科学専攻
学位論文題目	沈香の香気成分の生成機構に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 本多義昭 教授 富岡清 教授 藤井信孝

論文内容の要旨

沈香は、ジンチョウゲ科 *Aquilaria* 属植物の幹に腐朽や傷害などの理由によって樹脂が沈着したものである。沈香は加熱すると特異な芳香を放つことから、古来より薫香料の中心的存在の一つである。また沈香は漢方においては鎮静や健胃などの目的で使用され、家庭薬としても六神丸や奇応丸などに配伍されてきた。最近ではアロマセラピーの観点から、鎮静作用やストレス緩和作用を持つものとして注目されている。

沈香の香気成分には、非常に多種類のセスキテルペン類やクロモン誘導体が含まれており、それらの含量の違いにより様々な品質のものが存在する。しかしながら、沈香の生成機構には謎が多く、科学的解明を目指した研究もこれまでほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、ジンコウ樹における香気成分産生を特異な生物化学的生命現象として捉え、その生成機構の解明とともに、品質の違いを左右する要因や人為的生産の可能性についても検討することを目的として実験を行った。

1. *Aquilaria sinensis* 生木および風倒木の成分比較

従来の沈香に関する成分研究は、いずれも市場品の沈香を用いて行われたものである。そこで本研究では、香気成分の生成過程の手がかりを得るために *A. sinensis* を材料として、沈香生成の初期段階であると考えられる風倒木と健全な生木の成分との比較を行った。

その結果、風倒木は比較的低極性の成分を多く含み、生木は高極性の成分を多く含む傾向がみられた。また、両者に共通する成分として phytosterols や脂肪酸エステル類が含まれており、沈香の樹脂成分として知られているクロモン誘導体は風倒木のみに含まれることが明らかとなった。さらに、風倒木から特異的成分として新規4種 [5-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl) chromone, 6-hydroxy-2-(2-hydroxyphenylethyl) chromone, 8-chloro-2-(2-phenylethyl)-5,6,7-trihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone, 6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone] を含むクロモン誘導体11種を単離し、NMRスペクトルなどから構造を決定した。

今回得られた結果は、沈香に含まれるクロモン誘導体が多様な側鎖の置換パターンを有することを示すものとして興味深い。

2. *A. sinensis* 植物体への傷害実験

本学附属薬用植物園温室にて栽培する *A. sinensis* 植物体に、ステンレスピンによる人為的傷害を加え、一定期間後に収穫し、傷害群と非傷害群の成分比較を行った。

その結果、SPME (Solid Phase Micro Extraction)-GC-MS による分析では、傷害群特異的にセスキテルペンおよびセスキテルペンアルコールを検出した。また HPLC による分析では、傷害群特異的に生成するクロモン誘導体を検出した。

3. *A. sinensis* 培養細胞における香気成分産生

A. sinensis における香気成分生成の初期段階の解明に向け、植物培養細胞系を用いて、香気成分の産生誘導実験を行っ

た。温室にて栽培中の *A. sinensis* の新鮮葉からカルスを誘導し、固形培地上で継代を投与し、SPME-GC-MSに分析を行ったところ、MJ非投与細胞では検出されない数種のセスキテルペン (α -guaiene, α -humulene, δ -guaiene など) の産生を確認した。

固形培地上の培養細胞については、その褐変化 (細胞死) に伴い、セスキテルペンとともにクロモン誘導体が産生することを明らかにした。第1, 2章における結果も合わせて考えると、クロモン誘導体は細胞死の過程で生成すると考えられる。

4. 香気成分の生成に関与する遺伝子のクローニング実験

香気成分の生成に関与する特異的遺伝子を探索する目的で、*A. sinensis* 培養細胞におけるMJ投与群と非投与群についてcDNAサブトラクションライブラリーを作製し、投与群に特異的に発現する遺伝子の探索を行った。また、香気成分であるセスキテルペンの合成酵素遺伝子を探索するため、培養細胞から調製したcDNAを鋳型に、各種テルペン合成酵素の配列から保存性の高い部位に設計した縮重プライマーを用い、PCRを利用したRACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を行った。

その結果、テルペン合成酵素ASS遺伝子のコア配列を得、全長配列をクローニングした。この翻訳領域について *in vitro* 転写/翻訳系によりタンパク発現を行い、SDS-PAGEにより、得られたタンパクは約60kDaであることを確認した。このタンパクについて farnesyl diphosphate を基質とした酵素反応を行い、生成物をSPME-GC-MS分析した結果、分子量204のセスキテルペンを検出した。このセスキテルペンはMJ投与細胞においても検出されているが、構造決定には至っていない。また、サブトラクション実験においては、ASSのほか 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, pectin methylesterase, progesterone 5 β -reductase などの傷害誘導遺伝子を得た。

以上、本研究では沈香の原植物である *A. sinensis* の植物体および培養細胞を用い、傷害や薬剤投与などの刺激に対する反応性の違いを成分レベル、遺伝子レベルで見出した。本研究の結果は、沈香の香気成分の生成の解明に対する有力な知見であるばかりでなく、資源の枯渇がはなはだしい沈香の人為的生産への第一歩となるものであると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本論文で申請者が取り上げた沈香は、加熱により特異な芳香を放つことから古来より薫香料の中心的存在の一つであり、漢方では鎮静や健胃などの目的で使用され、家庭薬としても六神丸や奇応丸などに配伍される。最近ではアロマセラピーの観点から、鎮静作用やストレス緩和作用を持つものとして注目されている。

沈香の香気成分には、非常に多種類のセスキテルペン類やクロモン誘導体が含まれており、それらの含量の違いにより様々な品質のものが存在する。しかしながら、沈香はジンチョウゲ科 *Aquilaria* 属植物の幹に腐朽や傷害などの理由によって樹脂が沈着したものであるが、その生成機構には謎が多く、科学的解明を目指した研究もこれまでほとんど行われてこなかった。そこで本研究では、ジンコウ樹における香気成分産生を特異な生物化学的生命現象として捉え、その生成機構の解明とともに、品質の違いを左右する要因や人為的生産の可能性についても検討することを目的とした。

第一に、香気成分の生成過程の手がかりを得るために *Aquilaria sinensis* を材料として、沈香生成の初期段階であると考えられる風倒木と健全な生木の成分との比較を行った。その結果、風倒木は比較的低極性の成分を多く含み、生木は高極性の成分を多く含む傾向がみられた。また、両者に共通する成分として phytosterols や脂肪酸エステル類が含まれており、沈香の樹脂成分として知られているクロモン誘導体は風倒木のみに含まれることが明らかとなった。さらに、風倒木から特異的成分として新規4種 [5-hydroxy-6-methoxy-2-(2-phenylethyl)chromone, 6-hydroxy-2-(2-hydroxyphenylethyl)chromone, 8-chloro-2-(2-phenylethyl)-5,6,7-thihydroxy-5,6,7,8-tetrahydrochromone, 6,7-dihydroxy-2-(2-phenylethyl)-5,6,7,8-tetrahydrochromone] を含むクロモン誘導体11種を単離し、NMRスペクトルなどから構造を決定した。今回得られた結果は、沈香に含まれるクロモン誘導体が多様な側鎖の置換パターンを有することを示すものとして興味深い。

第二に、本学附属薬用植物園温室にて栽培する *A. sinensis* 植物体に、ステンレスピンによる人為的傷害を加え、一定期間後に収穫し、傷害群と非傷害群の成分比較を行った。その結果、SPME (Solid Phase Micro Extraction)-GC-MS による分析では、傷害群特異的にセスキテルペンおよびセスキテルペンアルコールを検出した。またHPLCによる分析では、傷害

群特異的に生成するクロモン誘導体を検出した。

第三に、*A. sinensis* における香気成分生成の初期段階の解明に向け、植物培養細胞系を用いて、香気成分の産生誘導実験を行った。温室にて栽培中の *A. sinensis* の新鮮葉からカルスを誘導し、固形培地上で継代繰返し、懸濁液体培養に移行させた。この液体培養系にジャスモン酸メチル (MJ) を投与し、SPME-GC-MSに分析を行ったところ、MJ非投与細胞では検出されない数種のセスキテルペン (α -guaiene, α -humulene, δ -guaieneなど) の産生を確認した。固形培地上の培養細胞については、その褐変化 (細胞死) に伴い、セスキテルペンとともにクロモン誘導体が産生することを明らかにした。第1, 2章における結果も合わせて考えると、クロモン誘導体は細胞死の過程で生成すると考えられる。

第四に、香気成分の生成に関与する特異的遺伝子を探索を行った。まず、*A. sinensis* 培養細胞におけるMJ投与群と非投与群についてcDNAサブトラクションライブラリーを作製し、投与群に特異的に発現する遺伝子の探索を行った。また、香気成分であるセスキテルペンの合成酵素遺伝子を探索するため、培養細胞から調製したcDNAを鋳型に、各種テルペン合成酵素の配列から保存性の高い部位に設計した縮重プライマーを用い、PCRを利用したRACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を行った。その結果、テルペン合成酵素 ASS 遺伝子のコア配列を得、全長配列をクローニンした。この翻訳領域について蛋白発現を行い、SDS-PAGEにより、発現蛋白は約60kDaであることを確認した。この蛋白について farnesyl diphosphate を基質とした酵素反応を行い、生成物を SPME-GC-MS 分析した結果、分子量204のセスキテルペンを検出した。このセスキテルペンはMJ投与細胞においても検出されているが、構造決定には至っていない。また、サブトラクション実験においては、ASSのほか 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase などの各傷害誘導遺伝子を得た。

以上、本論文では沈香の原植物である *A. sinensis* の植物体および培養細胞を用い、傷害や薬剤投与などの刺激に対する反応性の違いを成分レベル、遺伝子レベルで見出した。本研究によって得られた結果が端緒となって、沈香原植物に特有の有機化学的反應機構の解明が進むと予想され、需要が増加しつつある沈香の人為的生産、品質の多様性の解明やその制御にもつながるものと期待できる。

よって、本論文は博士 (薬学) の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成16年2月27日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。