

生薬の品質評価の基盤となる
精油ならびに色素の研究

2018

藤原 裕未

【 目 次 】

緒言	1
第一章 シソ属植物およびソヨウに含まれるアントシアニン類	
第一節 シソ属植物の葉、ソヨウおよび色素製剤に含まれるアントシアニン類の分析	3
1. HPLC 分析による色素成分のパターン分類	
2. シソ属植物に含まれるアントシアニン類の同定	
第二節 シソ属植物の精油型と色素成分パターンの関係	11
第三節 ソヨウのアントシアニン類の含有成分比較	13
第四節 考察	15
第二章 シソ属植物のペリラルデヒド生合成反応に関わるシトクロム P450 の同定	
第一節 ペリラルデヒド生合成反応に関わるシトクロム P450 のクローニング	21
第二節 ペリラルデヒド生合成反応に関わるシトクロム P450 の機能解析	26
第三節 考察	35
第三章 生薬類のにおいの吸入投与による自発運動抑制活性評価	
第一節 8 種の生薬類精油の GCMS 分析	37
第二節 精油の吸入投与による自発運動抑制活性の評価	42
第三節 混合した精油の吸入投与による自発運動抑制活性の評価	45
1. 自発運動抑制活性がみられた 5 つの異なる精油の混合試料による自発運動抑制活性の評価	
2. 自発運動抑制活性がみられた 5 つの精油の混合試料に、活性がみられなかった精油を添加した試料による自発運動抑制活性低下の評価	
第四節 考察	49
総括および結語	51
実験の部	53
発表論文目録	62
引用文献	63
謝辞	71

緒 言

天然物を原材料とする医薬品である生薬および生薬製剤類ならびに漢方エキスは、近年のエビデンスの集積や漢方医学教育の充実により、使用量が増加傾向にある。2011年に日本漢方生薬製剤協会（日漢協）により実施された「漢方薬処方実態調査」[1]によると、回答した、歯科、眼科、美容外科、理学診療科等を除く日本の医師 627 名の 89.0%が漢方製剤を使用している。また、2008年度から継続的に実施されている「原料生薬使用量等調査」[2]では、日漢協会員会社で使用した生薬の種類および総使用量が 2008年度の 248品目、20,763 トンから 2014年度は 266品目、25,419 トンに増加している。生薬および漢方エキスが医療上重要な医薬品として利用される機会が増加する中で、その品質や有効性、安全性を確保し適切に利用するためには、公定規格で標準化する必要がある。日本薬局方に収載される生薬類等の数は増加しており、第 16 改正日本薬局方（日局 16）[3]では生薬 253 品目だったものが日局 17 [4]では 291 品目である。漢方処方エキスについては日局 14 [5]まで収載がなかったが、日局 15 [6]では 6 品目が収載され、さらに第一追補および第二追補でそれぞれ 2 品目および 3 品目が追加され、日局 16 [3]では 22 品目、日局 17 [4]では 33 品目が収載されている。

生薬は多成分系であり天然物特有の多様性を有するため、品質の規格化と安全性の確保には化学薬品と異なるアプローチが必要である。医薬品としての生薬が化学薬品と異なる点として、含有成分の多さ、活性本体の多くが未解明であること、不純物に対する考え方、含量規格の設定の方法などが挙げられる。古来、生薬の品質評価は、外部形態、内部形態といった鏡検を用いた形態学的試験と味、におい、色、触感などの官能的特徴について、熟練した専門家の五感を用いる官能試験により行われてきた。しかしながら、その評価には高度な専門的知識を要し、習得に多くの経験が必要とされる。そのため、近年の我が国の医薬品行政における生薬の取り扱いでは、形態学的試験や官能試験に加えて、種々の理化学的試験により正しい基原が使用されていることを確認し、さらに指標成分等を確認することにより、その安全性や品質を担保している。しかし、特定の含有成分についての理化学的評価だけでは、複雑系である生薬の品質を厳密に評価することは困難であり、形態学的試験や五感を用いた官能試験が重要であることには変わりはない。

ソヨウ（蘇葉）はシソ（*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* W. Deane）の葉及び枝先を基原とする生薬であり、日局 17 [4]の定義では、「定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、ペリルアルデヒド 0.08%以上を含む」とされ、生薬の性状の項では、「しわがよって縮んだ葉からなり、しばしば細い茎を含む。葉は両面とも帯褐紫色、又は上面は灰緑色～帯褐緑色で下面は帯褐紫色を呈する」「本品は特異なおいがあり、味は僅かに苦い」と規定している。明の時代に編纂され、約 1,900 種の薬用植物、動物、鉱物などを解説した本草綱目 [7]でも、蘇葉について「葉の両面が赤色で芳香のあるものが良品」と記述され、色とにおいは蘇葉の品質評価に重要な指標とされてきた。日局における生薬の規格で

は、化学薬品では指標として用いられない、においや色、味を医薬品として適、不適を判断する際の基準として用い、色は適否の判断基準、においと味は適否の判定基準としている。生薬の品質評価では官能的な指標が重要視される一方で、その指標について化学的、生物学的、薬理学的分析は乏しいことが多く、主観的ではなく客観的な評価基準の設定も無いことが多いことから、品質評価の基準として規格化するためには、これらの化学的、生物学的、薬理学的データを示す基礎的な研究が望まれている。

日本での医薬品の公定書の規格は、それらについてのさまざまな基礎研究の成果が土台となって定められている。ソヨウの特徴的なにおい成分はペリルアルデヒドであり、日局 16 [3] 以降は定量法の規定があるが、日局 15 [6] までは定量試験は採用されておらず、確認試験で無水酢酸と硫酸を用いたテルペン類の呈色反応を採用していた。この呈色反応は化合物群であるテルペン類を検出する方法であるため、ペリルアルデヒド以外のテルペノイドを含むソヨウは排除することができなかった。その結果、ペリルアルデヒドをまったく含まない不適格なソヨウが流通する事例があった。そこで日局 16 [3] からは、ペリルアルデヒドを TLC 法で確認し、含量を HPLC で測定する方法が規格化された。ペリルアルデヒドの含量値規格を設定することは、同時に健康被害が懸念されるアサロンを含まないことの保証となっているのだが、このしくみは、30 年にわたるシソの精油成分に関するケモタキソノミー研究の成果が基盤にあり、これに精油成分生合成研究の成果を加味して考察することで可能となった規格である。このように、成分の生合成や遺伝的背景、環境要因による変化の幅等を研究することは、天然物医薬品の品質を規格化する上で、非常に重要な意味を持っている。

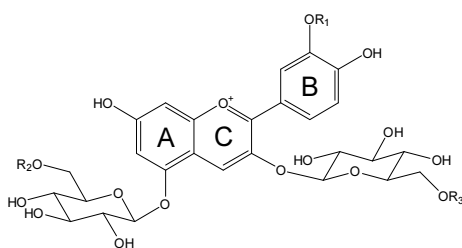
本研究では、生薬の色とにおいについて、これらを品質評価の基準として用いるための基盤となる化学的、生物学的、薬理学的知見の構築を主眼に置き、ソヨウの品質評価の指標となる色素成分アントシアニン類とにおい成分ペリルアルデヒドに注目した。色素成分の種類の多様性やにおい成分の生合成経路について明らかにするとともに、野生種と栽培種があり、それぞれに多様なケモタイプが存在するシソ属植物の多様性の成立についても考察することで、品質評価上重要な成分の化学的、生物学的知見を得ることを目的とした。また、生薬を用いた治療による効果はその生薬の品質に大きく左右されると経験的に言われており、とくに、生薬のにおいは日局ではその適否の判定基準のひとつとされるが、においと生薬の薬理効果についての動物実験は少ない。そこで、生薬のにおいの薬理に関する検討を行った。

第一章 シソ属植物およびソヨウに含まれるアントシアニン類

第一節 シソ属植物の葉、ソヨウおよび色素製剤に含まれるアントシアニン類の分析

シソ (*Perilla frutescens* Britton var. *crispa* W. Deane) に含まれる色素成分であるアントシアニン化合物の種類の多様性については、これまでにいくつかの異なる結果が報告されている。1935年に Kuroda ら [8] が赤シソに含まれる赤色色素成分 shisonin (a) を初めて単離し、Takeda と Hayashi [9] が 1964 年に、Watanabe ら [10] が 1966 年にそれぞれ、化学分解によって shisonin (a) の構造は cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-D-glucoside であると報告した。1978年には Goto ら [11] がプロトン NMR 解析から、shisonin (a) のプロトン位置の帰属を行った。その後 1989 年には、shisonin (a) は赤シソが生成する赤色色素成分ではなく、malonylshisonin (cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside)) (b) の分解により生じた成分であることが Kondo ら [12] によって報告された。近年のシソ色素成分分析では、Yoshida ら [13] によって 7 種のアントシアニン (malonylshisonin (b)、shisonin (a)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (c)、cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (d)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (e)、cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-D-glucoside (f)、cyanidin 3,5-*O*-di-D-glucoside (g)) が報告され、Yamazaki ら [14] によって 6 種のアントシアニン (malonylshisonin (b)、shisonin (a)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (c)、cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (d)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (e)、peonidin 3-(6-*O*-malonyl-D-glucoside)-5-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside) (h)) が報告されている。また、He ら [15] は、7 種のアントシアニン (malonylshisonin (b)、shisonin (a)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (c)、cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-(6-*O*-malonyl-D-glucoside) (d)、cyanidin 3-(6-*O*-caffeyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (e)、cyanidin 3-(6-*O-p*-coumaryl-D-glucoside)-5-D-glucoside (f)、cyanidin 3-(6-*O*-feruloyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (i)) を報告している (図 1)。第 17 改正日本薬局方 (日局 17) [4] ではソヨウの生薬の性状の項に「葉は両面とも帯褐紫色、又は上面は灰緑色～帯褐緑色で下面は帯褐紫色を呈する」とあり、色素はソヨウの品質評価において重要な指標である。しかしながら、アントシアニン化合物の種類の多様性については結論に至っておらず、品質評価の指標として用いるためには、その詳細な検討が望まれている。

日本産シソ属植物にはソヨウの基原である栽培種のシソのほか、三種の野生種、すなわち、レモンエゴマ (*Perilla citriodora* (Makino) Nakai)、トラノオジソ (*Perilla hirtella* Nakai)、セトエゴマ (*Perilla setoyensis* G.Honda) が存在する。これまでの研究から、栽培種のシソは二種の野生種から生じた複二倍体である可能性が高いと推測されており [16, 17]、その成立の過程で色素成分の多様性が生じたと考えられる。そこで、栽培種、野生種の遺伝的に純系を維持した系統とソヨウ市場品およびシソを用いた色素製剤を用いて、成分の多様性について検討し、ソヨウに含まれるアントシアニン化合物の化学的知見を得ることを目的とした。



	R ₁	R ₂	R ₃
shisonin (a)	H	H	<i>trans-p</i> -coumaroyl
malonylshisonin (b)	H	malonyl	<i>trans-p</i> -coumaroyl
cyanidin 3-(6- <i>O</i> -caffeoyl-D-glucoside)-5-(6- <i>O</i> -malonyl-D-glucoside) (c)	H	malonyl	<i>trans</i> -caffeoyl
cyanidin	H	malonyl	<i>cis-p</i> -coumaroyl
3-(6- <i>O-p</i> -coumaroyl-D-glucoside)-5-(6- <i>O</i> -malonyl-D-glucoside) (d)			
cyanidin 3-(6- <i>O</i> -caffeoyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (e)	H	H	<i>trans</i> -caffeoyl
cyanidin 3-(6- <i>O-p</i> -coumaroyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (f)	H	H	<i>cis-p</i> -coumaroyl
cyanidin 3,5- <i>O</i> -di-D-glucoside (g)	H	H	H
peonidin	CH ₃	<i>p</i> -coumaroyl	malonyl
3-(6- <i>O</i> -malonyl-D-glucoside)-5-(6- <i>O-p</i> -coumaroyl-D-glucoside) (h)			
cyanidin 3-(6- <i>O</i> -feruloyl-D-glucoside)-5-D-glucoside (i)	H	H	feruloyl

図 1. シソに含まれるアントシアニン

1. HPLC 分析による色素成分のパターン分類

自家受粉により純系を維持したシソ属植物 28 系統 (青ジソ 7 系統、赤ジソ 10 系統、レモンエゴマ 7 系統、セトエゴマ 2 系統、トラノオジソ 2 系統) の新鮮葉 (表 1a)、近隣の薬用植物園で栽培している赤ジソの新鮮葉、ソヨウ市場品およびシソを用いた色素製剤 (22 サンプル) (表 1b) を AcOH : H₂O : MeOH = 1 : 10 : 9 の混液を用いて抽出し、HPLC 分析を行った。HPLC 分析の結果、528 nm で検出されるクロマトグラムパターンは 4 つに大別された (図 2)。赤ジソ、一部の青ジソ、多くのレモンエゴマ、ソヨウ市場品およびシソを用いた色素製剤はピーク 3~7 の 5 つのピークを検出し、これをパターン A とした。レモンエゴマ No. 87 はピーク 1~7 の 7 つのピークを検出し、これをパターン B、レモンエゴマ

No. 5717 はピーク 1 および 2 の 2 つのピークを検出し、これをパターン C、多くの青ジソ、セトエゴマ、トラノオジソはピークが検出されずパターン D とした。

表 1a. 使用したシソ属植物の種と系統番号

種	系統番号
青ジソ	10, 12, 1841, 1864, 5343, 5598, 5808,
赤ジソ	3, 6, 9, 25, 32, 63*, 79, 5645, 5647, 5807
レモンエゴマ	87, 4931, 4935, 5321, 5498, 5601, 5717
セトエゴマ	5031, 5640
トラノオジソ	4993, 5042

*: 片面ジソ

表 1b. 使用したソヨウ新鮮葉、ソヨウ市場品および色素製剤

実験材料 No.	産地国	都市	入手年月	形状
1	日本	名古屋	2015.09	新鮮葉
2	日本	名古屋	2015.09	新鮮葉
3	日本	名古屋	2015.09	新鮮葉
4	日本	宮崎	2014.11	乾燥葉・刻み
5	日本	静岡	2013.08	乾燥葉・刻み
6	中国	遼寧省	2015.05	乾燥葉・刻み
7	中国	遼寧省	2013.07	乾燥葉・刻み
8	中国	河北省	2015.09	乾燥葉・刻み
9	中国	河北省	2015.09	乾燥葉・刻み
10	中国	河北省	2011.05	乾燥葉・刻み
11	中国	河北省	2014.04	乾燥葉・刻み
12	中国	河北省	2014.12	乾燥葉・刻み
13	中国	河北省	2015.12	乾燥葉・刻み
14	中国	安徽省	2012.02	乾燥葉・刻み
15	中国	福建省	2015.09	乾燥葉・刻み
16	中国	広東省	2015.02	乾燥葉・刻み
17	中国	-	-	乾燥葉・刻み
18	中国	-	2015.02	乾燥葉・刻み
19	中国	-	2015.01	乾燥葉・刻み
20	中国	-	2014.03	乾燥葉・刻み
21	中国	-	2015.12	乾燥葉・刻み
22	日本	-	-	液体製剤

- : 詳細不明

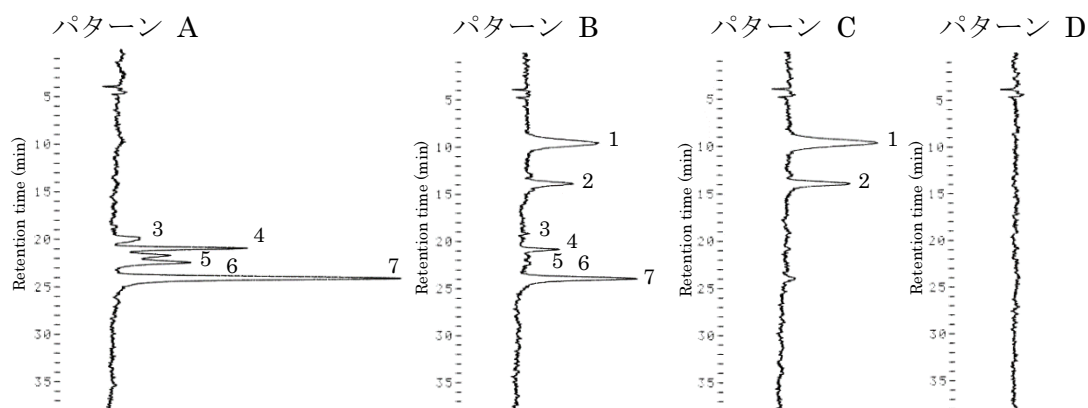


図 2. シソ属植物 HPLC 分析のクロマトグラム

2. シソ属植物に含まれるアントシアニン類の同定

アントシアニンのアグリコンであるアントシアニジンは B 環に付いている水酸基やメトキシ基の数により 6 種類（ペラルゴニジン、シアニジン、デルフィニジン、ペオニジン、ペチュニジン、マルビジン）に大別される。その色は B 環の水酸基の数が多いほど青みを増す傾向があり、水酸基が 1 つのペラルゴニジンは橙赤色で極大吸収波長は 515 nm 付近、2 つのシアニジンは赤紫色で同 528 nm 付近、3 つのデルフィニジンは青紫色で同 543 nm 付近である [18]。HPLC 分析で 528 nm で検出された 7 つのピークはシアニジン系アントシアニンであると推定した。各ピークに含まれる化合物を同定するために、レモンエゴマ No. 5717 の新鮮葉を 73.7 g、同 No. 5601 を 34.5 g 採取し、抽出および精製操作を行い、アントシアニン類を含む溶液を濃縮、乾燥させ、No. 5717 からピーク 1 : 32.1 mg、ピーク 2 : 12.7 mg、No. 5601 からピーク 3 : 13.7 mg、ピーク 4 : 4.60 mg、ピーク 5 : 5.80 mg、ピーク 6 : 8.60 mg、ピーク 7 : 38.2 mg の化合物を得た。得られた化合物は MS および ^1H NMR データをもとに比較し同定した。

ピーク 1~7 はいずれもシアニジン誘導体であったが、シアニジンの 3 および 5 位に結合したグルコースに結合する有機酸に違いが見られた。ピーク 3 に関しては、MS スペクトルデータから 2 つの化合物が混在してピーク 3 となっていることが考えられ、 ^1H NMR 測定を行ったところ、ピーク 3a と 3b の 2 つの共存性が明らかになった。ピーク 1 および 3~7 に相当する化合物は MS [19, 20] および ^1H NMR スペクトルデータ [12, 13] から、ピーク 1 は cyanidin 3,5-*O*-diglucoside (g)、ピーク 3a は cyanidin 3-(6-*O*-caffeylglucoside)-5-*O*-glucoside (e)、ピーク 3b は *cis*-shisonin (f)、ピーク 4 は malonyl-*cis*-shisonin (d)、ピーク 5 は cyanidin 3-(6-*O*-caffeylglucoside)-5-(6-*O*-malonylglucoside) (c)、ピーク 6 は shisonin (a)、ピーク 7 は malonylshisonin (b) であると同定した (表 2、図 3)。

表 2. ピーク 1 (g)、3a (e)、3b (f)、4 (d)、5 (c)、6 (a)、7 (b)の ¹H NMR スペクトルデータ (500 MHz, 3% *d*-TFA CD₃OD, カップリング定数は(*J* in Hz)に示した)

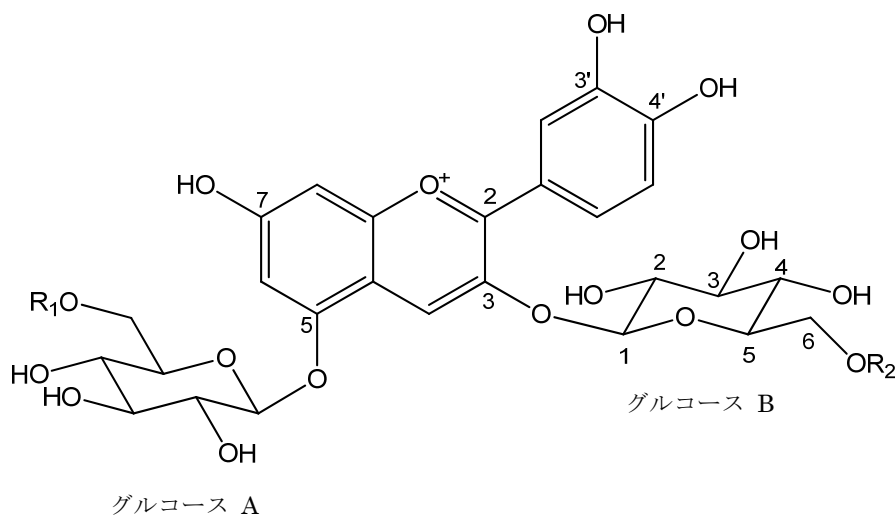
	1 (g)		3a (e)		3b (f)		4 (d)		5 (c)		6 (a)		7 (b)	
アントシアニン														
4	9.04	s	8.89	s	8.68	s	8.50	s	8.93	s	8.94	s	8.92	s
6	6.99	d (2.0)	6.96	d (2.0)	6.99	d (2.0)	6.78	d (2.0)	7.00	d (2.0)	7.00	br s	7.00	d (1.5)
8	6.97	br s	6.89	br s	6.89	br s	6.71	br s	6.96	br s	6.93	br s	6.96	br s
2'	7.97	d (2.0)	8.03	d (2.0)	8.00	d (2.5)	7.90	d (2.5)	8.03	d (2.0)	8.00	d (2.5)	8.02	d (2.5)
5'	6.94	d (8.5)	7.02	d (9.2)	7.02	d (8.6)	6.96	d (8.5)	7.03	d (8.5)	7.01	d (8.6)	7.02	d (8.5)
6'	8.25	dd (8.5, 2.0)	8.26	dd (8.0, 2.0)	8.23	dd (8.6, 2.0)	8.10	dd (8.5, 2.5)	8.28	dd (8.8, 2.3)	8.27	dd (8.5, 2.5)	8.28	dd (8.5, 2.5)
グルコース A														
1	5.20	d (7.5)	5.44	d (7.5)	5.44	d (7.5)	5.31	d (7.5)	5.40	d (7.5)	5.39	d (7.4)	5.42	d (8.0)
2	3.60	dd (9.0, 7.5)	3.76-3.78	m	3.75-3.79	m	3.66	dd (9.0, 7.5)	3.74	dd (9.0, 7.5)	3.76	dd (9.0, 7.5)	3.65-3.80	m
3	3.44	t (9.0)	3.60	t (9.0)	3.56	t (9.0)	3.48	t (9.0)	3.59	t (9.0)	3.59	t (9.0)	3.59	t (9.0)
4	3.31	t (9.0)	3.52	t (9.0)	3.46	t (9.0)	3.34	t (9.0)	3.46	t (9.0)	3.51	t (9.0)	3.48	t (9.0)
5	3.52	ddd (9.0, 7.0, 2.5)	3.90-3.95	m	3.94	m	3.85	ddd (9.5, 9.0, 2.5)	3.91	ddd (9.0, 7.5, 2.5)	3.88	ddd (9.0, 6.5, 3.0)	3.94	ddd (9.0, 8.0, 3.0)
6a	3.87	dd (12.0, 2.5)	4.70	dd (11.0, 3.5)	4.56	dd (12.0, 9.0)	4.58	dd (12.0, 9.0)	4.53	dd (12.0, 2.0)	4.49	dd (12.0, 3.5)	4.51	dd (12.0, 3.0)
6b	3.65	dd (12.0, 7.0)	4.48-4.58	m	4.70	dd (12.0, 2.5)	4.26	dd (12.0, 2.5)	4.44	dd (12.0, 7.5)	4.47	dd (12.0, 6.5)	4.43	dd (12.0, 8.0)
グルコース B														
1	5.06	d (7.5)	5.20	d (6.9)	5.20	d (6.9)	5.22	d (7.5)	5.18	d (7.5)	5.15	d (8.0)	5.19	d (7.5)
2	3.58	dd (9.0, 7.5)	3.76-3.78	m	3.75-3.79	m	3.68	dd (9.0, 7.5)	3.76	dd (9.0, 7.5)	3.75	dd (9.0, 7.5)	3.65-3.80	m
3	3.55	t (9.0)	3.58-3.60	m	3.53	t (9.0)	3.50	t (9.0)	3.56	t (9.0)	3.55	t (9.0)	3.56	t (9.0)
4	3.36	t (9.0)	3.46-3.49	m	3.48	t (9.0)	3.40	t (9.0)	3.50	t (9.0)	3.43	t (9.0)	3.45	t (9.0)
5	3.47	ddd (9.0, 5.5, 2.0)	3.62-3.63	m	3.62	ddd (9.0, 6.0, 2.0)	3.76	ddd (9.0, 6.0, 3.0)	3.79	ddd (9.0, 6.0, 2.0)	3.58	ddd (9.0, 6.0, 2.5)	3.63-3.80	m
6a	3.86	dd (12.0, 2.5)	4.05	dd (12.0, 2.0)	4.05	dd (12.0, 2.0)	4.46	dd (12.0, 3.0)	4.50	dd (12.0, 3.0)	3.97	dd (12.0, 2.0)	4.53	dd (12.0, 2.5)
6b	3.65	dd (12.0, 5.5)	3.78	dd (12.0, 6.3)	3.75-3.79	m	4.44	dd (12.0, 6.0)	4.25	dd (12.0, 6.0)	3.72	dd (12.0, 6.0)	4.22	dd (12.0, 6.3)
<i>p</i> -クマル酸 or コーヒー酸														
α	-		6.21	d (16.0)	5.78	d (12.6)	5.64	d (13.0)	6.20	d (16.0)	6.23	d (16.0)	6.25	d (16.0)
β	-		7.29	d (16.0)	6.61	d (12.6)	6.30	d (13.0)	7.31	d (16.0)	7.38	d (16.0)	7.38	d (16.0)
2	-		6.94	br s	7.27	d (8.0)	7.03	d (8.5)	6.83	d (2.5)	7.29	d (8.6)	7.23	d (8.5)
3	-		-		6.40	d (8.6)	6.23	d (8.5)	-		6.76	d (8.6)	6.72	d (8.5)
5	-		6.71	br s	6.40	d (8.6)	6.23	d (8.5)	6.71	d (8.5)	6.76	d (8.6)	6.72	d (8.5)
6	-		6.71	br s	7.27	d (8.0)	7.03	d (8.5)	6.76	dd (8.5, 2.5)	7.29	d (8.6)	7.23	d (8.5)
マロン酸														
2	-		-		-		3.59	s	3.38	s	-		3.39	s

ピーク 2 の LCMS-IT-TOF では 697.16 [M]⁺ の強い分子量関連イオンおよびシアニジンに結合したグルコースが脱離した 535.11 [cyanidin+glucose+malony]⁺ のフラグメントイオン、続いてシアニジンに結合したグルコースに結合したマロニル基が脱離した 449.11 [cyanidin+glucose]⁺ のフラグメントイオン、さらにシアニジンに結合したグルコースが脱離しアグリコンのみとなった 287.05 [cyanidin]⁺ のフラグメントイオンが得られた。¹H NMR を測定したところ、シグナルは cyanidin 3,5-*O*-diglucoside のものと類似していた [13]。ただし、シアニジンに結合したグルコースの 6 位に結合しているプロトンのケミカルシフト値は、文献値 3.98, 3.73 [13] であるのに対し測定値は 4.55, 4.34 と低磁場シフトしていた。LCMS-IT-TOF からマロニル基が存在すると予測されていることから、この低磁場シフトはグルコースにマロニル基が結合することによって起こったと考えられる。アグリコンに結合したグルコースにマロニル基が結合した pelargonidin 3-*O*-glucoside-5-*O*-malonylglucoside の ¹H NMR スペクトルデータでは、グルコース由来である高磁場側のシグナルのケミカルシフト値は 3.95, 3.74 であるのに対し、グルコースにマロニル基が結合していない pelargonidin 3,5-*O*-diglucoside のグルコースのシグナルのケミカルシフト値は 4.54, 4.34 であり、上記化合物と同様に低磁場にシフトしている [21]。より詳細な検討のため、2D NMR (H-H COSY, HMBC) を測定したところ、図 4 に示すように相関が見られたことから、ピーク 2 に相当する化合物は cyanidin 3-*O*-glucoside-5-*O*-malonylglucoside (j) であると決定した。(表 3)。

これまでに栽培種のシソを用いて、含まれるアントシアニン化合物についての研究が行われており、1990 年にピーク 1 (g) および 3~7 ((e), (f), (d), (c), (a), (b)) を含む報告 [13] や 2003 年にピーク 2 (j)、3a (e)、および 4~7 ((d), (c), (a), (b)) を含む報告 [14] がある。しかし、本研究で栽培種である赤シソで見られたパターン A のようなピーク 3~7 ((e), (f), (d), (c), (a), (b)) のみを含むシソの報告はない。同時に検出される化合物の種類が異なっていることの原因として化合物の安定性の影響が考えられる。アントシアニンは、色素自体の化学構造、濃度、色素溶液の pH、温度、あるいは金属イオン、酸素、酵素などの物質との共存下での反応により色調に変化を与える。そのため、抽出や精製の操作には、化合物の化学変化が生じないようにするための工夫が必要である。[13] の研究では、葉を粉碎し室温で抽出することで化合物を単離している。一方、本研究では、粉碎時に生じる摩擦熱による影響を考慮し、粉碎せずに低温で抽出する方法を用いた。本研究で用いたシソからは検出されなかったピーク 1 (g) の構造は、シアニジンの 3 および 5 位にグルコースが結合したものであり、他の検出された化合物から有機酸を脱離させたものである。アシル化アントシアニンはエステル結合が切れやすいため、その存在が見逃され、かわりに非アシル化アントシアニンが見いだされることがしばしばある。すなわち、ピーク 3~7 ((e), (f), (d), (c), (a), (b)) の有機酸が分解された産物としてピーク 1 (g) が同時に検出された可能性が考えられる。また [14] の研究では、ピーク 2 (j) が検出されているがピーク 3a (e) および 4~7 ((d), (c), (a), (b)) と比較すると非常に微量である。ピーク 2 (j) の構造はシアニジンの 3 位にグルコースが

結合し 5 位にマロニル基が結合したグルコースが結合している。すなわち、これもピーク 1 (g)と同様に、他の検出された化合物から有機酸を脱離すると生じる構造である。[14]におけるピーク 2 (j)の HPLC ピーク面積は他の 5 つの化合物の 1/10~1/100 であり含量が非常に少ないことから、他の検出されたアシル化アントシアニンの分解により生じた化合物の可能性が高いと考えられる。また本研究で検出されたピーク 3b (f)が [14]の研究では検出されていない。この理由としては、HPLC-PDA-MSのみですべての化合物の同定が行われており異性体であるピーク 6 (a)と区別できなかつたためと推察される。

パターン B と C からはピーク 1 および 2 が検出されているが、これまでの研究でピーク 1 および 2 が検出された場合とは、抽出条件、野生種であること、ピーク面積が他のピークに比較して大きいことなどが異なっている。すなわち、パターン B と C に含まれるピーク 1 および 2 は分解により生じたのではなく、野生種のシソが生合成した化合物である可能性が高いと考えられる。



ピーク		R ₁	R ₂
1	cyanidin 3,5- <i>O</i> -di-glucoside (g)	H	H
2	cyanidin 3- <i>O</i> -glucoside-5- <i>O</i> -malonylglucoside (j)	malonyl	H
3a	cyanidin 3-(6- <i>O</i> -caffeoylglucoside)-5- <i>O</i> -glucoside (e)	H	<i>trans</i> -caffeoyl
3b	<i>cis</i> -shisonin (f)	H	<i>cis-p</i> -coumaroyl
4	malonyl- <i>cis</i> -shisonin (d)	malonyl	<i>cis-p</i> -coumaroyl
5	cyanidin 3-(6- <i>O</i> -caffeoylglucoside)-5-(6- <i>O</i> -malonylglucoside) (c)	malonyl	<i>trans</i> -caffeoyl
6	shisonin (a)	H	<i>trans-p</i> -coumaroyl
7	malonylshisonin (b)	malonyl	<i>trans-p</i> -coumaroyl

図 3. ピーク 1~7 の構造

表 3. ピーク 2 (j)の ^{13}C および ^1H NMR スペクトルデータ
 (125 MHz および 500 MHz, 3% *d*-TFA CD_3OD , カップリング定数は(*J* in Hz)に示した)

	位置番号	δ_{C}	δ_{H} (<i>J</i> in Hz)
アントシアニン	2	164.9	
	3	146.7	
	4	135.9	9.14 s
	5	157.1	
	6	106.0	7.03 d (2.0)
	7	169.4	
	8	97.3	7.10 br s
	9	153.9	
	10	113.3	
	1'	121.1	
	2'	118.5	8.09 d (2.5)
	3'	147.6	
	4'	156.6	
	5'	117.6	7.05 d (9.0)
6'	129.1	8.36 dd (9.0, 2.5)	
グルコース A	1	104.0	5.30 d (8.0)
	2	74.7	3.69 dd (8.5, 6.5)
	3	78.3	3.53 t (9.0)
	4	71.3	3.40 t (9.0)
	5	78.9	3.62 m
	6a		3.71 dd (12.0, 7.0)
	6b	62.6	3.97 dd (12.0, 2.5)
グルコース B	1	102.3	5.18 d (8.1)
	2	74.4	3.69 dd (8.5, 6.5)
	3	77.5	3.56 t (9.0)
	4	71.3	3.45 t (9.0)
	5	75.8	3.80 ddd (12.0, 7.0, 2.5)
	6a		4.34 dd (12.0, 6.5)
	6b	65.2	4.55 dd (12.0, 2.5)
マロン酸	1	168.6	
	2	39.4	3.42 s
	3	169.5	

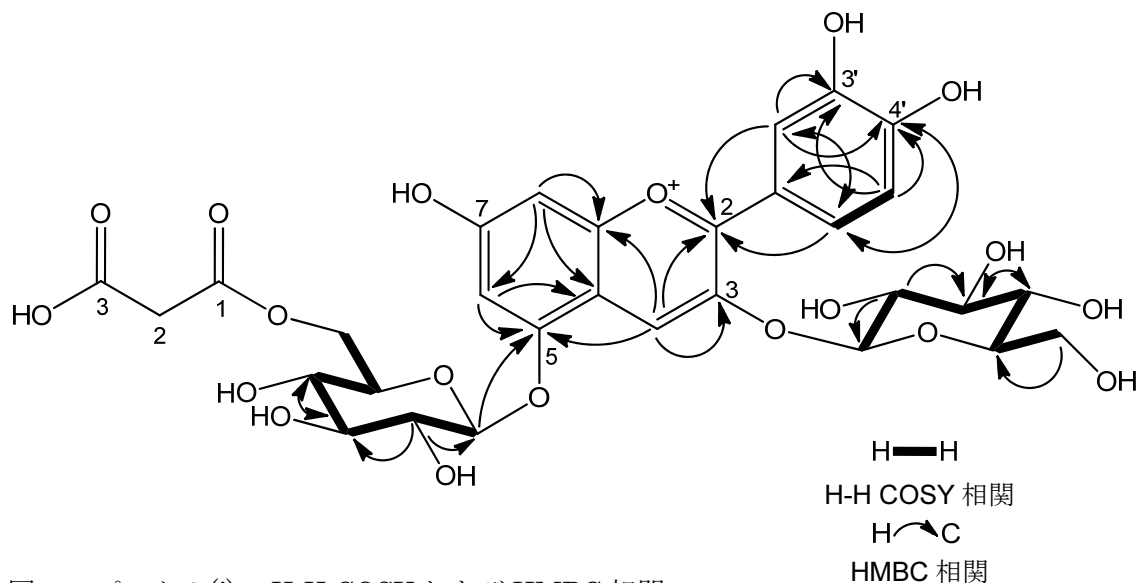


図 4. ピーク 2 (j) の H-H COSY および HMBC 相関

第二節 シソ属植物の精油型と色素成分パターンとの関係

これまでの研究の結果から、シソのにおいの違いは含まれる精油成分の違いに由来し、成分の構成パターンにより約 10 種の精油型に分類されること、またそれら精油成分の生合成は遺伝的に制御されていることが明らかにされており [22-25]、この精油型の遺伝と、赤ジソか否かを定める因子についての遺伝的な制御は独立であることもまた示唆されている [23, 26, 27]。しかし赤色色素の成分構成に複数のパターンがあることはこれまでに知られておらず、第一節で示したものが初めての知見である。そこでこの色素成分パターンと精油型に何らかの関係があるかどうか検討した。

表 4 はシソ属植物の精油型と図 1 で示した色素成分パターンについて系統番号ごとに示したものである。

シソには大きく分けて 11 種の精油型があり、それらは主にモノテルペン化合物で構成されている MT (monoterpene) 型と主にフェニルプロペン誘導体で構成されている PP (phenylpropene) 型の二つのグループに大別される。MT 型は主要な構成成分によって PA (perillaldehyde) 型、C (citral) 型、EK (elsholtziaketone) 型、PK (perillaketone) 型、PL (perillene) 型、SF (shisofuran) 型、PT (piperitenone) 型に、他方 PP 型は PP-m (myristicin) 型、PP-dm (dillapiol + myristicin) 型、PP-em (elemicin + myristicin) 型、PP-dem (dillapiol + elemicin + myristicin) 型、PP-dmn (dillapiol + myristicin + nothoapiol) 型に分類される [22, 28, 29]。

表 4 において No. 6 と No. 32 を比較すると、アントシアニン類の色素成分パターンは同じであるが (パターン A)、精油型は異なっている (No. 6 は PK 型、No. 32 は PA 型)。また、No. 87、No. 4931、No. 5717 はいずれも、精油型は C 型で同じであるが色素成分パターンが異なっている (No. 87 はパターン B、No. 4931 はパターン A、No. 5717 はパター

ン C)。このことから精油成分と色素成分はいずれも二次代謝産物であるが、その生合成に関する遺伝的な制御は独立であることが明らかとなった。

表 4. シソ属植物の精油型と色素成分パターン

種	系統番号	色素成分パターン	精油型
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	10	D	PP-em
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	12	D	PP-m
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	1841	A	EK
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	1864	D	PL
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	5343	A	PA
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	5598	D	PT
<i>P. frutescens</i> (green leaf)	5808	D	PK
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	6	A	PK
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	25	A	PP-emd
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	32	A	PA
<i>P. frutescens</i> (red leaf *)	63	A	PK
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	79	A	EK
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	5645	A	PA
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	5647	A	PA
<i>P. frutescens</i> (red leaf)	5807	A	PA
<i>P. citriodora</i>	87	B	C
<i>P. citriodora</i>	4931	A	C
<i>P. citriodora</i>	4935	A	PK
<i>P. citriodora</i>	5321	A	PP-em
<i>P. citriodora</i>	5498	A	C
<i>P. citriodora</i>	5601	A	PP, PT
<i>P. citriodora</i>	5712	A	PK
<i>P. citriodora</i>	5717	C	C
<i>P. setoyensis</i>	5031	D	SF
<i>P. setoyensis</i>	5640	D	SF
<i>P. hirtella</i>	4993	D	PK
<i>P. hirtella</i>	5042	D	PP-e

* : 片面ジソ

第三節 ソヨウのアントシアニン類の含有成分比較

第一節でソヨウ市場品は 5 つのピークを含むパターン A に分類されることを示した。しかしながら、ソヨウサンプルどうしを比較した場合でも成分の組成比は同じではない。成分組成比の違いが生じる原因について考察した。

表 1b で示したソヨウサンプルのうち、新鮮葉である No. 1~3 の成分組成比はいずれも、ピーク 7 (b) が 60% 以上を占め、次いでピーク 4 (d) および 6 (a) が 8~17% でほぼ同じであり、ピーク 3 ((e) および (f)) と 5 (c) は最も少なく 2~5% である。この組成比は表 1a で示す純系の新鮮葉の組成比と同じである。一方、ソヨウ市場品は、ピーク 7 (b) の割合が 60% を超えるものは No. 4~21 の 18 サンプルのうち 4 個のみであった。また、ピーク 6 (a) の割合が 2 番目に高く、その値は 20~40% と幅広く、ピーク 3 ((e) および (f))、4 (d) および 5 (c) の割合は 2~9% であり、サンプルどうしでのばらつきが大きい。

生薬に含まれる成分の量は、原料植物の生育環境や収穫、調製後の保存条件により影響を受けると考えられる。本研究で使用したソヨウ市場品サンプル No. 4~21 の産地についてみると、日本産が 2 個、中国産が 16 個であり、さらにその県および省は異なる地域である。産地ごとの成分比較を行ったが、パターンや規則性は見いだせなかった (図 5)。次に、生育時期による違いがあるかどうかを調べるため入手年月による比較を行った。18 サンプルは入手年月が分析日から起算して 2 か月前から 56 か月前までであるが、入手年月が新しいほど成分組成比は新鮮葉と近似し、入手年月から長期経過するとピーク 7 (b) が減少しピーク 6 (a) が増加する傾向が見られた (図 6)。産地と入手年月による比較から、同一パターン内での成分組成比の違いは長期保存による化合物の化学変化が原因と考えられる。

アシル化アントシアニンはエステル結合が分解されやすいが、有機酸のうち脂肪族有機酸は芳香族有機酸に比べて、より分解されやすい。これは芳香族有機酸が脂肪族有機酸に比較して相対的に疎水性が高いことに起因する。ピーク 6 (a) すなわち shisonin は、ピーク 7 (b) すなわち shisonin のシアニジンの 5 位に結合したグルコースの 6 位に脂肪族有機酸であるマロニル基が結合した malonylshisonin の分解によって生じることが報告されている [12]。長期保存中には温度や酸素などのアントシアニンの安定性に影響を与える因子を完全に避けることは難しいため、malonylshisonin に結合したマロニル基が分解され shisonin に変化したと考えられる。同様の分解がピーク 4 (d) からピーク 3b (f) の変化でも観察された可能性が高い。すなわち、ピーク 3b (f) はピーク 4 (d) のシアニジンの 5 位に結合したグルコースの 6 位に結合するマロニル基が分解された構造であり、入手年月からの時間経過に従って、ピーク 4 (d) が減少しピーク 3 (f) が増加していた。また、加工品である液体色素製剤に含まれるピーク 6 (a) の割合は約 50% であり、表 1b に示す新鮮葉およびソヨウ市場品の 22 サンプルの中で最も高く、ピーク 7 (b) の割合は約 30% であり最も低い。葉を乾燥させただけであるソヨウに対して、色素製剤はアントシアニンを葉から抽出し、濃縮した後、クエン酸やエタノールなどの添加物を加えて製剤としたものである。加工や添加した化合物がアントシアニンの安定性に影響を与えたと考えられる。

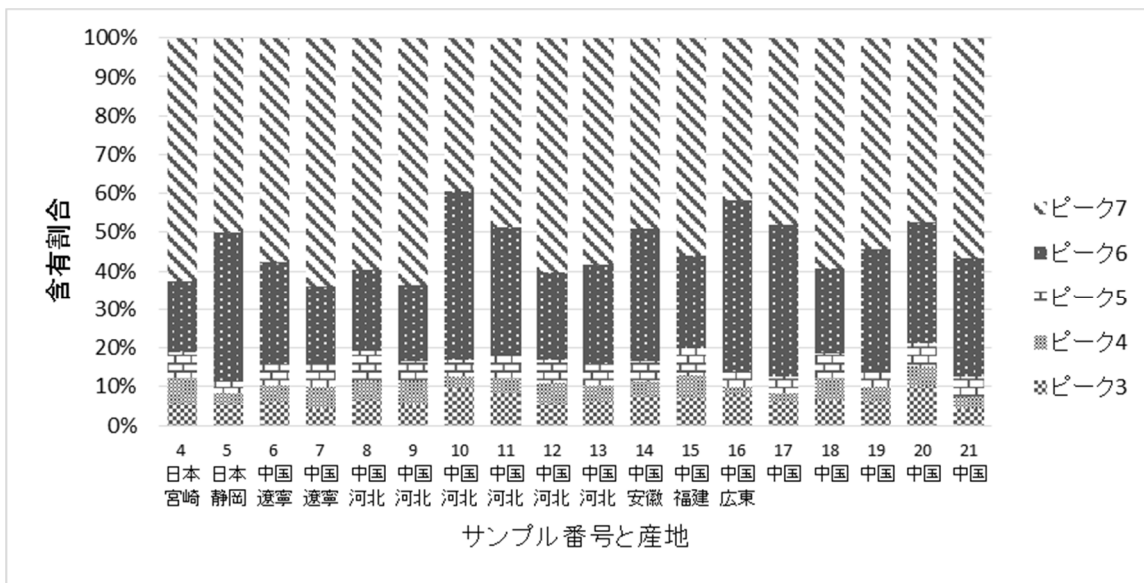
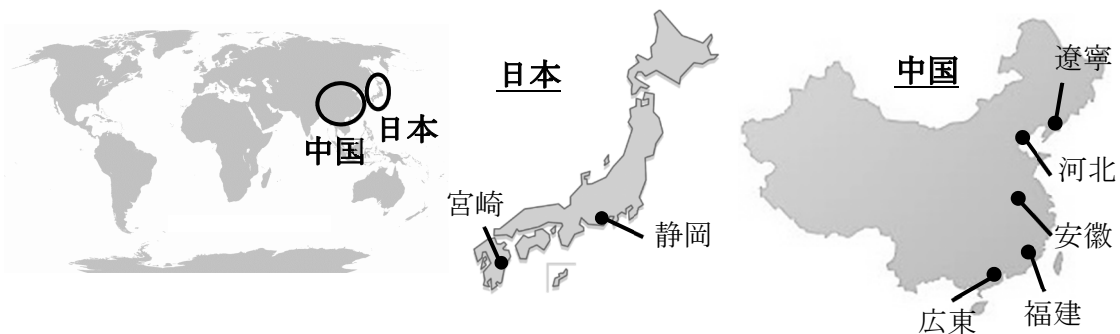


図 5. ソヨウの産地とピーク含有割合の比較

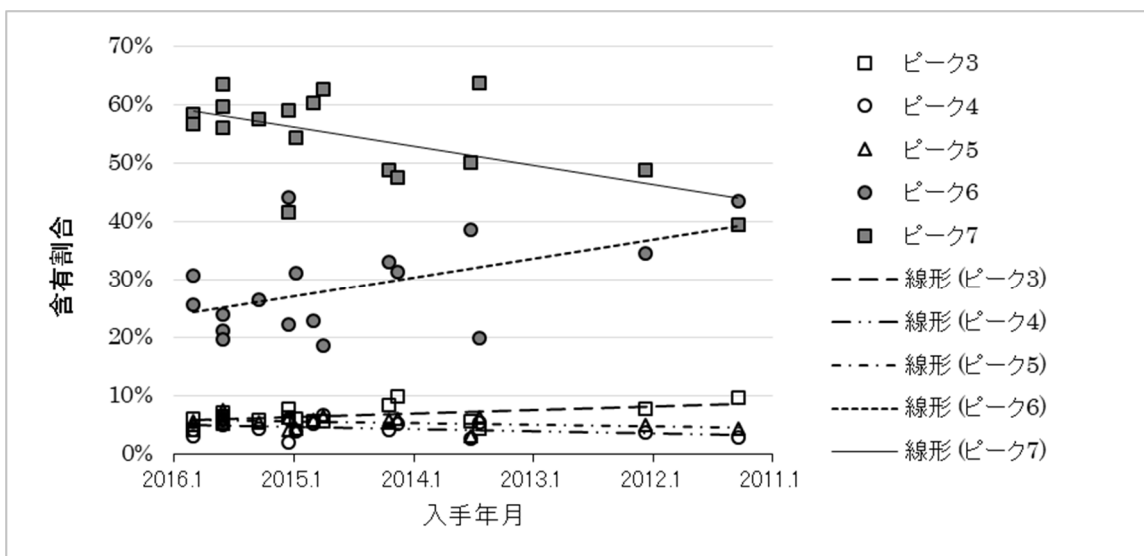


図 6. ソヨウの入手年月とピーク含有割合の比較

第四節 考察

シソ属植物にはシアニジンのアグリコンとする多様なアントシアニン化合物、ピーク 1~7 ((g), (j), (e), (f), (d), (c), (a), (b))が含まれていることが確認された。シソ属植物に含まれるアントシアニン類については、シソ栽培種、多くのレモンエゴマにはピーク 3~7 ((e), (f), (d), (c), (a), (b))が含まれ、レモンエゴマ No. 87 にはピーク 1~7 ((g), (j), (e), (f), (d), (c), (a), (b))が、レモンエゴマ No. 5717 にはピーク 1 (g)および 2 (j)が含まれていた。他方、トラノオジソ、セトエゴマにはエキスおよび HPLC 分析において 528 nm で吸収がなかったことからアントシアニン類が含まれないということが明らかとなった。これはシソ栽培種が異なる 2 つの野生種から生じた複二倍体であり、その一方はレモンエゴマであるというこれまでの仮説 [17] と矛盾しない結果であり、その一つはレモンエゴマ No. 87 のような色素パターンを持つ個体であったと示唆された。

アントシアニンのアシル化は、アントシアニンの生合成過程の最終段階であり、配糖体化前後に行われる。アシル化の過程は植物の種ごとに違いがあり、例えば、シレネ (*Silene dioica* (Linné) Clairv) やエゾリンドウ (*Gentiana triflora* Pall. var. *japonica* (Kusn.) H.Hara) ではシアニジンの 3 および 5 位の配糖体化後に結合糖のアシル化が生じることが報告されている [30, 31]。一方、ダリヤ (*Dahlia pinnata* Cav) の花卉ではシアニジンの 3 位に結合した糖のアシル化がシアニジンの 5 位の配糖体化より先に起こることが報告されている [32]。シソにおいてはダリヤと同様の報告がされている。赤ジソから単離された anthocyanin 3-*O*-glucoside-6"-*O*-hydroxycinnamoyltransferase (3AT) による反応は、cyanidin 3,5-*O*-di-glucoside (g) を基質として用いた場合よりも cyanidin 3-*O*-glucoside (k) を基質として用いた場合の方が低い K_m 値であった。すなわち、アシル化シアニジンである malonylshisonin(b)のアシル化はシアニジンの 3 および 5 位の配糖体化後に起こるのではなく、cyanidin 3-*O*-glucoside (k)のシアニジンの 3 位に有機酸が結合した後、シアニジンの 5 位の糖化が起こり、最後にシアニジンの 5 位の結合糖に有機酸が結合すると予測されている [33]。したがって、シソのアントシアニン生合成経路は、cyanidin 3-*O*-glucoside (k)が anthocyanin acyltransferase によって cyanidin 3-(6-*O*-*p*-coumarylglucoside) (l)あるいは cyanidin 3-(6-*O*-caffeylglucoside) (m)に変換され、さらに UDP-glucose 依存の anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase によって cyanidin 3-(6-*O*-*p*-coumarylglucoside)-5-*O*-glucoside ((a)および(f))、あるいは cyanidin 3-(6-*O*-caffeylglucoside)-5-*O*-glucoside (e)となり、最終的には anthocyanin malonyltransferase によって cyanidin 3-(6-*O*-*p*-coumarylglucoside)-5-(6-*O*-malonylglucoside) ((b)および(d))、あるいは cyanidin 3-(6-*O*-caffeylglucoside)-5-(6-*O*-malonylglucoside) (c)が合成されるという経路が推定されている [34] (図 7)。しかしながら、本研究でピーク 1 (g)および 2 (j)のみを含むレモンエゴマ No. 5717 およびピーク 1~7 ((g), (j), (e), (f), (d), (c), (a), (b))を含むレモンエゴマ No. 87 が存在していたことから、シソ属植物のアントシアニン生合成経路には、推定とは異なる

別の生合成経路の存在が示唆される。ピーク 1 (g) と 2 (j) は有機酸の結合が少ないため、有機酸が複数個結合した他の化合物の分解によって生じる可能性が考えられる。しかしながら、その場合には、有機酸が 2 個結合したピーク 4 (d)、5 (c) や 7 (b) から有機酸が 1 個のみ分解されたピーク 3a (e)、3b (f) や 6 (a) のような中間体が存在する可能性が高く、No. 5717 で確認されたようなピーク 1 (g) および 2 (j) のみを含むパターンが存在することは考えにくい。したがって、推定の生合成経路とは別の経路として、cyanidin 3-*O*-glucoside (k) のシアニジンの 5 位にグルコースが結合したピーク 1 (g) が生成し、その後、ピーク 1 (g) のシアニジンの 5 位に結合したグルコースの 6 位にマロニル基が結合したピーク 2 (j) が生成し、さらにピーク 2 (j) のシアニジンの 3 位に結合したグルコースの 6 位に *p*-クマロイル基が結合したピーク 7 (b) が生成するという経路が示唆された (図 7)。

また、No. 87 では、ピーク 1~7 ((g), (j), (e), (f), (d), (c), (a), (b)) が確認されたが、これは太陽光下で十分に生育させたものである。アントシアニン生合成に関与する遺伝子 (5-*O*-glucosyltransferase、anthocyanidin synthase など) は光によって発現が誘導されることが報告されており [34, 35]、特定の光の波長がアントシアニン類の生成に重要と示唆されている [36, 37]。そこでアントシアニン類の生合成が光によって制御されるかどうかを調べるため、No. 87 を水耕栽培装置を用いて UV を含まない蛍光灯下と UV を含む光照射下で栽培を行った。その結果、UV を含まない蛍光灯下で生育させたものは、ピーク 1 (g) および 2 (j) の 2 個の化合物のみが検出され、UV を含む光照射下で生育させたものは、ピーク 1 (g)、2 (j)、4 (d) および 7 (b) の 4 個の化合物が検出された (図 8)。この結果から、No. 87 では、ピーク 1 (g) からピーク 2 (j) が合成された後、シアニジンの 3 位に結合したグルコースの 6 位に *p*-クマロイル基が結合したピーク 4 (d) および 7 (b) が合成される生合成経路の存在と、シアニジンの 3 位に結合したグルコースの 6 位に *p*-クマロイル基を導入する経路を触媒する酵素は UV 照射により活性化されることが示唆された (図 7)。

アントシアニジンの配糖体化は分子の安定化と可溶化に寄与している。アグリコンであるアントシアニジンの形成後、最初に糖が転移されるのはシアニジンの 3 位に結合する水酸基であり、その糖転移に関与する酵素である flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase (3GT) の存在はシソを含めた多くの植物から報告されている [38-40]。シアニジンの 3 位の配糖体化に続き配糖体化される位置は 5 位の水酸基であり、この転移に関与する 5-*O*-glucosyltransferase (5GT) についてもいくつかの植物で報告されている [41, 42]。赤ジソにおいても 5GT の cDNA はクローニングされており、その組換えタンパク質を用いた酵素反応では、cyanidin 3-*O*-glucoside (k) を cyanidin 3,5-*O*-di-glucoside (g) に変換することを報告している [43]。しかしながら、本研究でピーク 1 (g) が検出されたのは野生種であるレモンエゴマ No. 87 および No. 5717 のみであったことと、シソではシアニジンの 3 位に結合した糖のアシル化がシアニジンの 5 位の配糖体化より先に起こることが予測されていることから、赤ジソにおいて検出された 5GT は、シソ植物体内では cyanidin 3-(6-*O*-*p*-coumarylglucoside) (l) を cyanidin 3-(6-*O*-*p*-coumarylglucoside)-5-*O*-glucoside

((a)および(f))に変換する役割を担っている可能性が考えられる。ピーク 1 (g)および 2 (j)が検出されたレモンエゴマには cyanidin 3-*O*-glucoside (k)に対して高い親和性を持つ 5GT (Cy3Glc 5GT) が存在することが示唆される。レモンエゴマはもともと Cy3Glc 5GT を持っていたが、進化の過程で Cy3Glc 5GT をコードする遺伝子に突然変異が生じ、cyanidin 3,5-*O*-diglucoside (g)を生合成しないタイプのレモンエゴマが生まれ、このレモンエゴマを片親とする複二倍体化により栽培種が成立した可能性が考えられる。同様の現象が、*V. vinifera*に含まれるアントシアニン類について January らにより報告されている [44]。すなわち、*V. vinifera* 以外のブドウ属栽培種、または *V. vinifera* との雑種の多くでは、アントシアニン類の糖の転移は 3 および 5 位に結合する水酸基の両方で起こり、anthocyanidin 3,5-*O*-diglucoside が検出されるが、いくつかの *V. vinifera* では anthocyanidin 3,5-*O*-diglucoside はトレース量しか検出されない。*V. vinifera* と他の栽培種との交配によりできた種からクローニングされた遺伝子には、活性型酵素をコードする 5GT-Cha とその対立遺伝子 5GT-Dia が存在すること、また 5GT-Cha に生じた 2 つの変異が 5GT の不活性化に関わることが示されている。

アントシアニンを生合成する植物には、アントシアニジンの配糖体化やアシル化に関わる酵素が多数存在している。ペチュニア (*Petunia x hybrida* (Hook.f.) Vilm) 花卉の 5GT がシアニジンの 3 位が配糖体化およびアシル化された化合物に高い親和性を示す [42] ように、それぞれに特徴的な性質を持つ。シソには cyanidin 3-*O*-glucoside の 3 位に結合するグルコースのアシル化に関わる anthocyanidin-3-*O*-glucoside acyltransferase (3AT) が存在する [45]。シソ属純系系統間で 3AT の遺伝子発現量に差があるのか、比較を行ったところ、ピーク 1~7 ((g), (j), (e), (f), (d), (c), (a), (b))を生合成する No. 87 は、ピーク 3~7 ((e), (f), (d), (c), (a), (b))のみを生合成する No. 79、No. 5601、No. 5645 に比較して、その発現量は 1/17~1/3 であった (図 9)。No. 87 では cyanidin 3-*O*-glucoside (k)を基質として Cy3Glc 5GT が cyanidin 3,5-*O*-diglucoside (g)を生合成する反応が存在することが示唆されるため、3AT の発現量は他の系統に比較して少ないにも関わらず、生合成反応の最終生成物であるピーク 7 (b)の量は少なくならなかったと推測される。

アントシアニン類の化合物の種類の多様性と生合成経路の検討から、シソ属植物栽培種の成立について考察すると、野生種のレモンエゴマは、安定性の低いアントシアニン類生合成を触媒する Cy3Glc 5GT のみをもつもの (例: No. 5717)、安定性の高いアントシアニン類生合成を触媒する 3AT をもつもの (例: No. 4931 他)、またはその両者をもつもの (例: No. 87)、が存在していたが、進化の過程で Cy3Glc 5GT をコードする遺伝子しか持たない個体は安定性の低いアントシアニン類しか合成できないために不利となり衰退し、AT をもつ野生種が優位に繁栄したと考えられる。Cy3Glc 5GT と 3AT の両方の遺伝子を持つものは、安定性の高いアントシアニンを合成することができるため、生存するのに有利であった可能性が高い。そして、生存していたレモンエゴマ No. 87 と他の野生種との複二倍体化により栽培種が成立し、より安定性の高い化合物を蓄積するように進化したと推測される。

本章では、シソ属植物に含まれる色素成分であるアントシアニン化合物を 7 種類同定した。また、その結果から、各化合物の安定性や生合成経路の考察を行い、シソ属植物栽培種の成立過程についても推察した。ソヨウの品質評価において重要である色素成分の多様性や成分の組成を明らかにしたことは、色素という化合物群ではなく成分レベルで品質の議論を可能にすることが期待できる。また、生薬として調製した後の時間経過に従って、化合物組成が変化するという知見は、品質管理を行う上で生薬の履歴を調べるためのひとつの指標となることが期待される。今後、新たに推定した生合成経路について関連する遺伝子の探索を行うことで、本研究の結果を検証する知見が得られると考えられる。

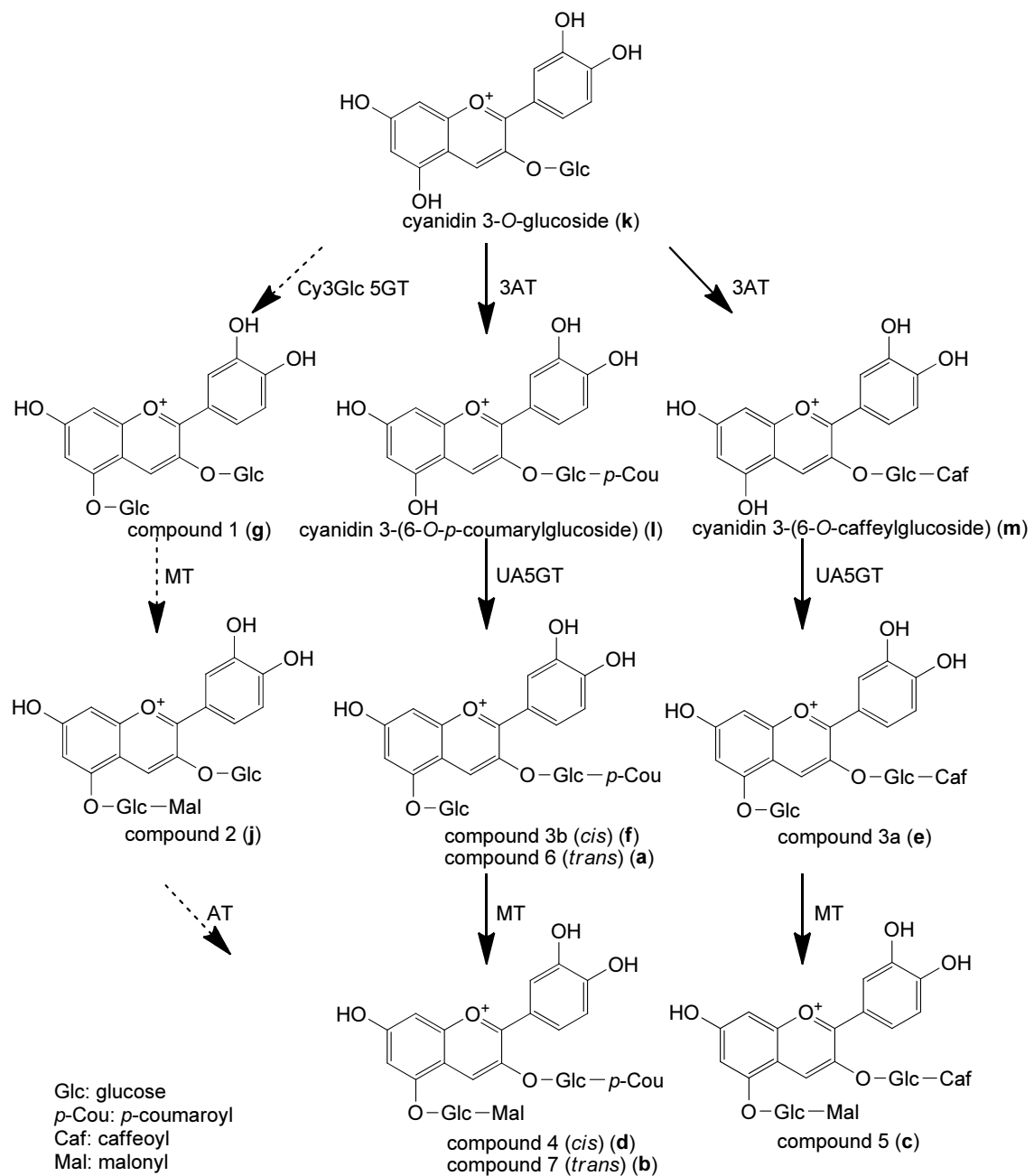


図 7. シソ属植物に含まれるアントシアニンの推定生合成経路

Cy3Glc 5GT: 5-*O*-glucosyltransferase specific to cyanidin 3-*O*-glucoside

3AT: anthocyanin 3-*O*-glucoside acyltransferase

MT: malonyl transferase

UA5GT: UDP-glucose-dependent anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase

AT: acyltransferase

---->: Putative pathway

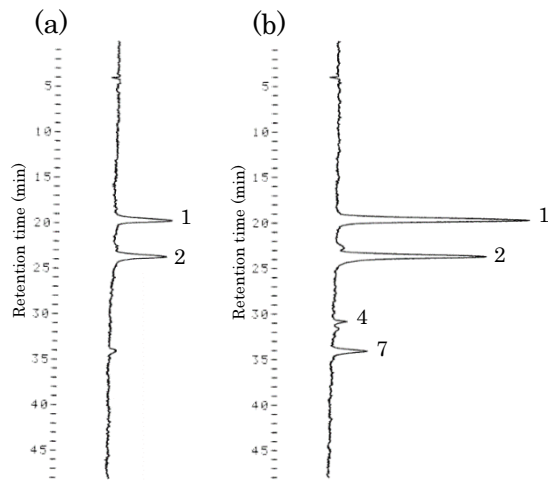


図 8. No. 87 を用いて UV を含まない蛍光灯下と UV を含む光照射下で栽培した場合のアントシアニン量の比較

(a) UV を含まない蛍光灯下での栽培、(b) UV を含む光照射下での栽培

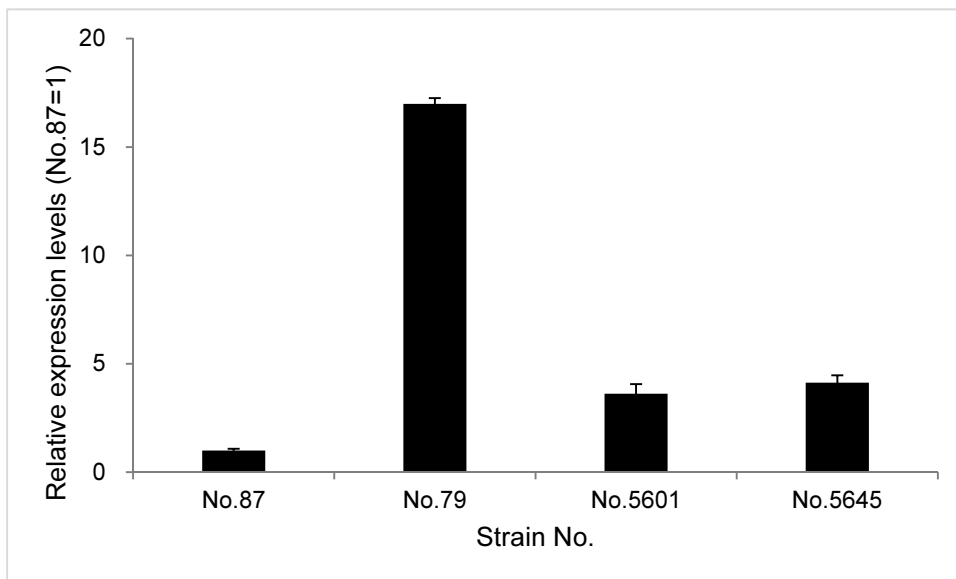


図 9. シソ属純系系統間での 3AT 発現量の比較

第二章 シソ属植物のペリルアルデヒド生合成反応に関わるシトク

ロム P450 の同定

第一節 ペリルアルデヒド生合成反応に関わるシトクロム P450 のクローニング

シソ属植物にはさまざまな精油型があるが、ペリルアルデヒドを豊富に含む精油型が日本では最も有名である。日局 17 [4] ではソヨウについて「本品は定量するとき、換算した生薬の乾燥物に対し、ペリルアルデヒド 0.08%以上を含む」と規定しており、第一章で述べた色素成分と同様にペリルアルデヒドはソヨウの品質評価において重要な化合物である。

シソ属植物に含まれるペリルアルデヒドなどのモノテルペン化合物の生合成の最初のステップは、ゲラニルニリン酸がゲラニオール合成酵素またはリモネン合成酵素により脱リン酸化される反応から始まると推定されており、ペリルアルデヒドの生合成は、リモネンの 7 位の水酸化によりペリルアルコールが生成し、続いてその水酸基の酸化が起こって完了すると推定されている [17] (図 10)。しかし、ペリルアルデヒドの生合成に関わる遺伝子は同定されておらず、医薬品であると判断するためのペリルアルデヒドの生成や含量を決定する因子は不明である。

シトクロム P450 は微生物、動物や植物まで生物界に広く存在する酵素である。モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana* Heynh) およびイネ (*Oryza sativa* Linné) はそれぞれ 273 および 458 分子種のシトクロム P450 をゲノム上にコードしており、ヒト (*Homo sapiens* Linné) の 57 分子種、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の 3 分子種と比較すると、植物はそのゲノム中に多くのシトクロム P450 酵素遺伝子をコードしている [46]。シトクロム P450 は脂肪酸、ステロイド、フェニルプロパノイド、テルペノイド、アルカロイドなどの多くの複雑な二次代謝産物の生合成に関与しており、その機能は多岐にわたる。シソ属植物の生合成に関わるシトクロム P450 としては、アントシアニンの生合成に関わるシトクロム P450 分子種がある。赤ジソから同定された flavone synthase (CYP93B6) と flavonoid 3'-hydroxylase (CYP75B4) は葉の色に関する重要なシトクロム P450 分子種である [47]。シソ属植物の精油成分の生合成に関わるシトクロム P450 についても、Mau らが、リモネンの 7 位を水酸化する (-)-limonene-7-hydroxylase (Gen Bank ID : GQ120438) を報告している [48]。この研究では、既に同定されている limonene hydroxylase の cDNA 配列をプローブとしてハイブリダイゼーション法を利用して当該の遺伝子をクローニングしている。すなわち、同じハッカ属植物のペパーミント (*Mentha x piperita* Linné) とスペアミント (*Mentha spicata* Linné) に発現している limonene hydroxylase (CYP71D13, GenBank ID : AF124816 および CYP71D18, GenBank ID : AF124815) の基質はいずれもリモネンであり酵素反応による水酸基導入位置が各々リモネンの 6 位と 3 位である点が異なる。両者のアミノ酸配列相同性は 70% であって、構造上の

特徴はよく類似している。そこでリモネンの 7 位が水酸化されたペリルアルコールをリモネンから生成する *limonene-7-hydroxylase* も同様の特徴を持つ可能性が高いという予想のもとに遺伝子を同定している。

シトクロム P450 分子種は互いに重複する幅広い基質特異性を示し、不特定多数の脂溶性化合物の代謝に対応することができる。タンパク質およびアミノ酸配列、特に基質認識部位の多様性が、基質および代謝産物となるさまざまな化合物の多様性に対応している。同じ反応に関与する分子種でもアミノ酸配列の保存度は低いことが知られており、進化の過程でアミノ酸配列には多様性が生じている。[48] の方法で同定したシトクロム P450 はリモネンの 7 位を水酸化したが、シトクロム P450 は基質特異性が幅広いこと、機能とアミノ酸配列の保存度が対応していないことを考えると、このシトクロム P450 がシソ属植物でのリモネンの 7 位の水酸化に本当に関与しているかどうかは疑問である。

これまでにシソ属植物から、いくつかのモノテルペン合成酵素が同定されているが [17, 25, 49]、シソ属植物の精油成分生合成は遺伝的に制御されていること [24-27] から、これらの研究では、遺伝的に純系を維持した系統を用いて、それらの遺伝子発現パターンを比較し、精油型特異的に発現する遺伝子を同定している。本研究ではこの手法を利用して、シソ属植物におけるペリルアルデヒド生合成に関わるシトクロム P450 を同定することを目的とした。

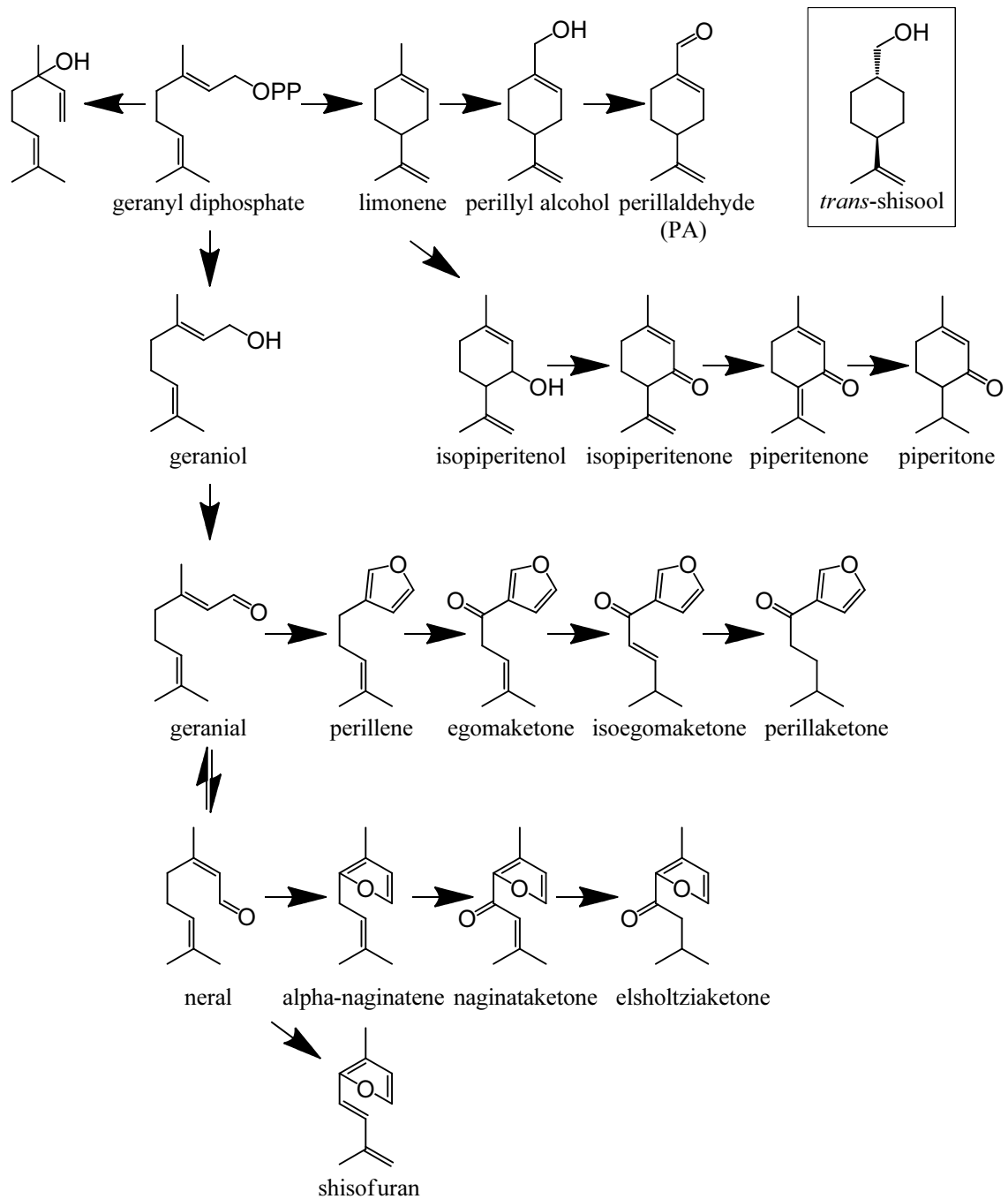


図 10. シソ属植物モノテルペン型精油成分の推定生合成経路

trans-shisool はモノテルペン型精油成分であるが、その生合成ステップはあきらかとなっていないため、別枠に示した。

精油型特異的に発現する遺伝子を同定するために、シソ属植物の新鮮葉由来 EST (expressed sequenced tag) ライブラリーデータを解析し、各 contig の発現量を RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads) 値により比較し、ペリルアルデヒド生合成に関わる可能性のある遺伝子を探索した。PA 型にのみ特異的に高い RPKM 値を示す contig 7307 を得、Pf-7307 と名付けた (GenBank ID : KU674339, CYP family number : CYP71AT146)。Pf-7307 は 1497 bp、499 アミノ酸で構成され、シトクロム P450 に高度に保存されている (●) プロリンリッチ領域、(■) 酸素結合ポケット、(—) ヘム結合領域を保持していた (図 11)。

ペリルアルデヒドの生合成は、ゲラニルニリン酸からリモネンが生成し、リモネンの 7 位の水酸化によりペリルアルコールが生成し、続いてその水酸基の酸化が起こって完了すると推定されている (図 10)。Pf-7307 は PA 型のシソである No. 6、No. 32、No. 5647 に特異的に高く発現していたため、ペリルアルデヒド生合成ステップのいずれかに関わり、リモネンまたはペリルアルコールを基質とした反応を触媒することが予想される。同じくリモネンを基質として反応を触媒する *peppermint* (-)-limonene-3-hydroxylase、*spearmint* (-)-limonene-6-hydroxylase および *perilla* (-)-limonene-7-hydroxylase、ペリルアルコールを基質として反応を触媒する *perilla alcohol dehydrogenase* (Gen Bank ID : JX629453) と Pf-7307 のアミノ酸配列相同性を比較したところ、それぞれ 36%、35%、37%、23%であった。

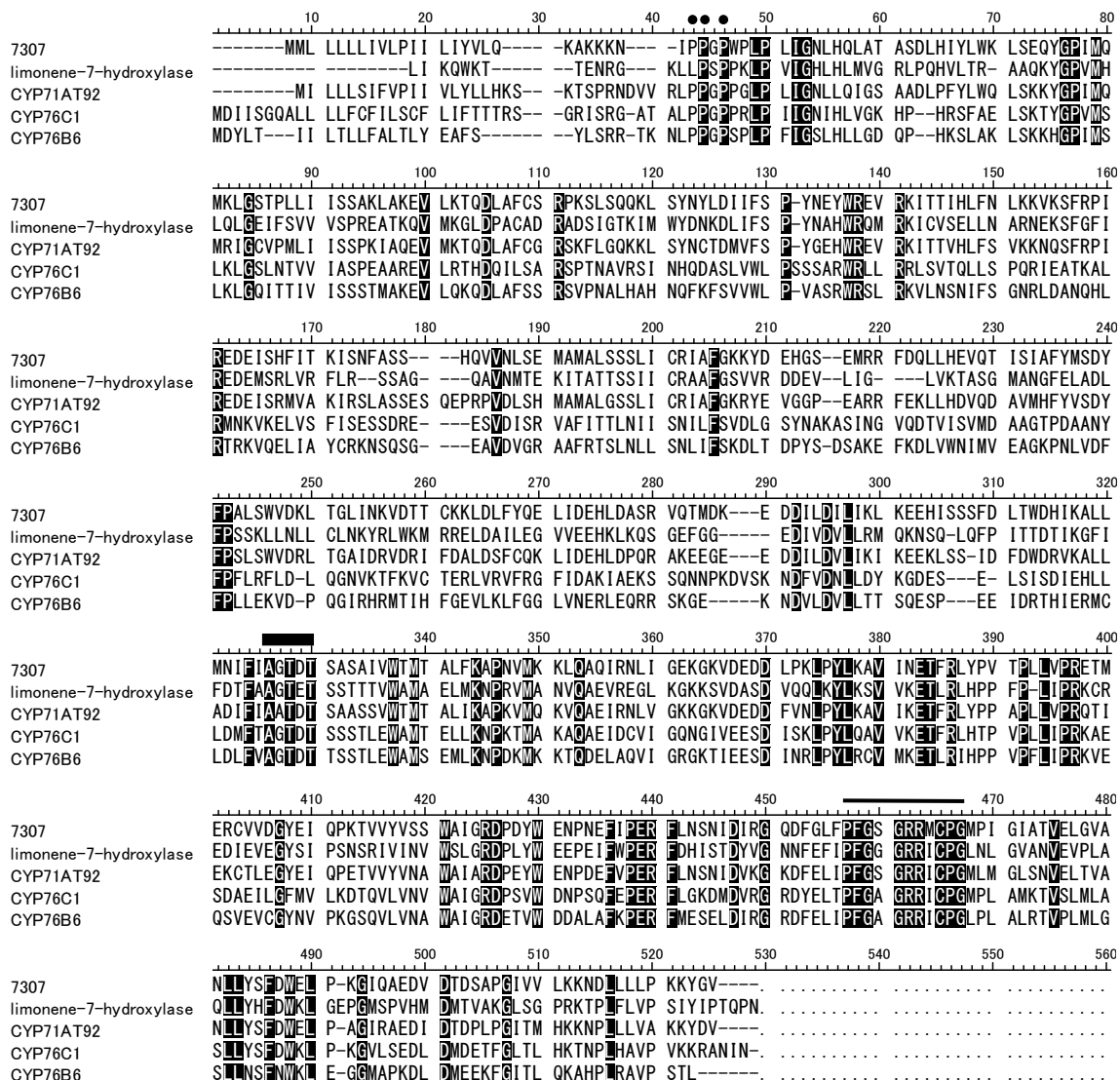
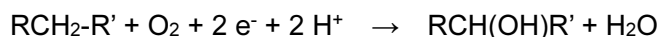


図 11. Pf-7307 のアミノ酸配列

シソ由来 limonene-7-hydroxylase、タンジン (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 由来 CYP71AT92、シロイヌナズナ由来 CYP76C1 およびニチニチソウ (*Catharanthus roseus* G. Don) 由来 CYP76B6 とアミノ酸相同性比較を行い、5つの配列で一致したアミノ酸の背景は黒色で示した。シトクロム P450 によく保存されている領域は配列の上部に記号を示した。(●) プロリンリッチ領域 (PPGP)、(■) 酸素結合ポケット (AGTDT)、(—) ヘム結合領域 (FGxGRRxCxG) を示す。

第二節 ペリルアルデヒド合成反応に関わるシトクロム P450 の機能解析

シトクロム P450 は、プロトヘムをもつヘムタンパク質であり、酸素分子を還元的に活性化し、酸化反応を行うことでモノオキシゲナーゼとして機能する。反応全体の化学量論をスキーム 1 に示す。



スキーム 1. シトクロム P450 による水酸化反応の化学量論

すなわち、シトクロム P450 が機能するためには、分子状酸素の存在とともにヘムを還元しシトクロム P450 に結合した酸素分子を活性化するための還元力の供給が必要である。シトクロム P450 が酸素添加反応を触媒する機構については、Estabrook らによって"cyclic reaction mechanism"として提案されている。すなわち、図 11 に示すように、酸化型シトクロム P450 に基質が結合してから 1 電子が導入されてヘム鉄が還元され、次にヘムに酸素分子が結合し、さらに 2 番目の電子が導入されて酸素分子が活性化され基質の酸素添加反応が進み、反応生成物はシトクロム P450 から離れてシトクロム P450 は酸化型に戻るといふ反応サイクルである [50]。

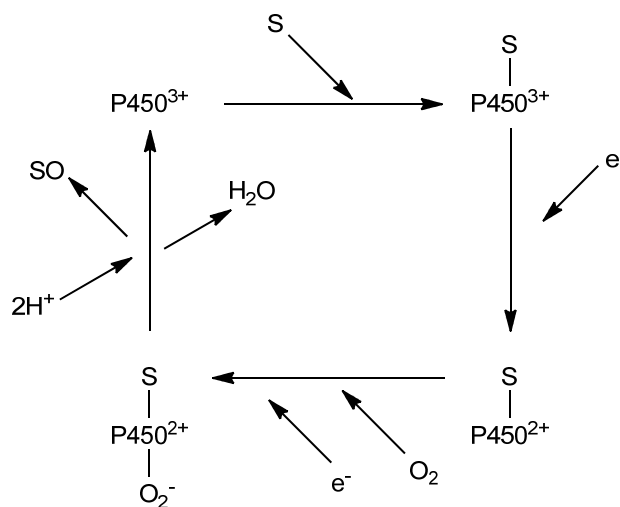


図 11. シトクロム P450 が触媒する酸素添加反応の"cyclic reaction mechanism" [50]

本研究の異種発現系では、還元力の供給源として、NADPH シトクロム P450 還元酵素を用いた。PA 型に高発現している P450 と予想される配列である Pf-7307 は酵母由来 NADPH-P450 還元酵素が共発現するように設計された pGYR-Spe I ベクター [51] にクローニングし、出芽酵母 AH22 株に導入して発現させた。動物、植物、酵母など真核生物のシトクロム P450 は細胞内で小胞体またはミトコンドリアに存在する膜タンパクであるため、タンパク質発現させた酵母培養液からマイクロソーム画分を得た。シトクロム P450 は一酸化炭素を結合すると 450 nm に極大吸収を持つスペクトルが得られる。この吸収スペクトルは

プロトヘムの第五配位座にシトクロム P450 タンパク質のシステイン残基の—SH 基がイオン化したチオレートアニオンが配位していることによる。シトクロム P450 を界面活性剤でマイクロソームから可溶化すると、タンパク質分子の構造変化によって、第五配位座にはヒスチジン残基のイミダゾールが配位した形となり、一酸化炭素結合物の極大吸収が 420 nm に移る。マイクロソーム型は「P-450」、可溶化型は「P-420」と命名されている [52]。一酸化炭素結合物の吸収スペクトルからマイクロソーム中のシトクロム P450 を定量する方法が確立されており [53]、本研究ではシトクロム P450 の活性の有無の目安とするために、吸収スペクトルの測定を行った。しかしながら、特徴的な吸収スペクトルは得られなかった。一般的に植物のシトクロム P450 の発現量は低く不安定であることが知られており、また、酵母を用いた異種発現では、大腸菌などの他の宿主に比較してタンパク質発現量が少ないために、シトクロム P450 に特徴的な 450 nm の極大吸収スペクトルが得られないことが多くあるが、Pf-7307 についても確認ができなかった。そこで、酵素反応を行うことによりその活性を確認した。

得られたマイクロソーム画分を用いて、リモネンを基質とした 16 時間の酵素反応を行い、SPME-GCMS により酵素反応生成物を測定した (図 12)。その結果、ペリルアルデヒド、トランス-シソオール、ペリルアルコールが生成した (図 12 (A))。コントロールとして用いた Pf-7307 をベクターに挿入していない空ベクターの酵素反応液では反応生成物は確認されなかった (図 12 (B))。推定の生合成経路では、リモネンの 7 位に水酸基が導入しペリルアルコールが生成し、さらに水酸基が酸化されたペリルアルデヒドが生成するとされている [17]。しかし Pf-7307 を含む酵素反応液によるリモネンを基質とした反応では、ペリルアルコールだけでなくペリルアルデヒドとペリルアルコールのシクロヘキセン環の二重結合が還元されシクロヘキサン環となったトランス-シソオールが生成された。ペリルアルデヒドとトランス-シソオールは何を基質として生成されたのかを確認するために、経時的変化から反応生成物を考察することとした。反応開始から、30 分、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間でそれぞれ酵素反応を行い、反応生成物を確認した (図 13)。反応開始 30 分後には、ペリルアルデヒドとペリルアルコールが生成した (図 13 (B))。その後 2 時間および 4 時間経過後の反応生成物は同様に、ペリルアルデヒドとペリルアルコールであった (図 13 (C, D))。反応開始後 8 時間では、ペリルアルデヒド、ペリルアルコールに加えてトランス-シソオールが生成し (図 13 (E))、16 時間経過後では 8 時間経過後と同様、ペリルアルデヒド、トランス-シソオール、ペリルアルコールが確認された (図 13 (F))。また、コントロールとして Pf-7307 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、どの時間でも生成物は確認できなかった (図 13 (G-L))。経時的変化による反応生成物の結果で、Pf-7307 含む酵素反応液でのみ、反応開始 30 分後からペリルアルコールとペリルアルデヒドの 2 つの化合物が確認されたことから、Pf-7307 はリモネンを基質としてペリルアルコールおよびペリルアルデヒドを生成することが示唆された。しかし、ペリルアルデヒドの生成がリモネンを基質とした反応なのか、Pf-7307 によってリモネンから生成したペリルアルコールを基質とした

反応なのかを明らかにすることはできなかった。またトランス-シソオールはペリルアルコールおよびペリルアルデヒド生成後に確認されたため、ペリルアルコールおよびペリルアルデヒドを基質とする反応生成物であることが予想される。ところが、ペリルアルコールおよびペリルアルデヒドを基質にトランス-シソオールを生成する反応は還元反応である。酸化反応を行うことでモノオキシゲナーゼとして機能するシトクロム P450 が担う反応であるとは考えにくい。そこで、Pf-7307 はペリルアルコールを基質としてペリルアルデヒドを生成するのか、また、トランス-シソオールの生成反応はどのように起きるのかを検証するために、ペリルアルコールを基質とした酵素反応を行った (図 15)。

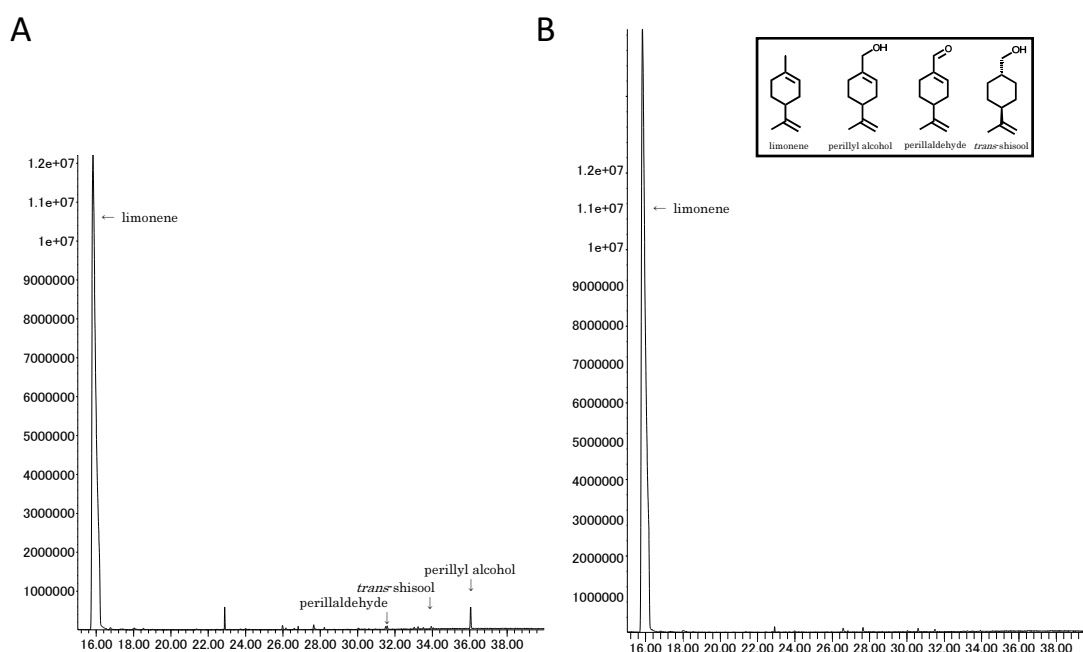


図 12. リモネンを基質とした酵素反応液の反応生成物のクロマトグラム
 (A) Pf-7307 を含む酵素反応液、(B) Pf-7307 を含まない酵素反応液
 $m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

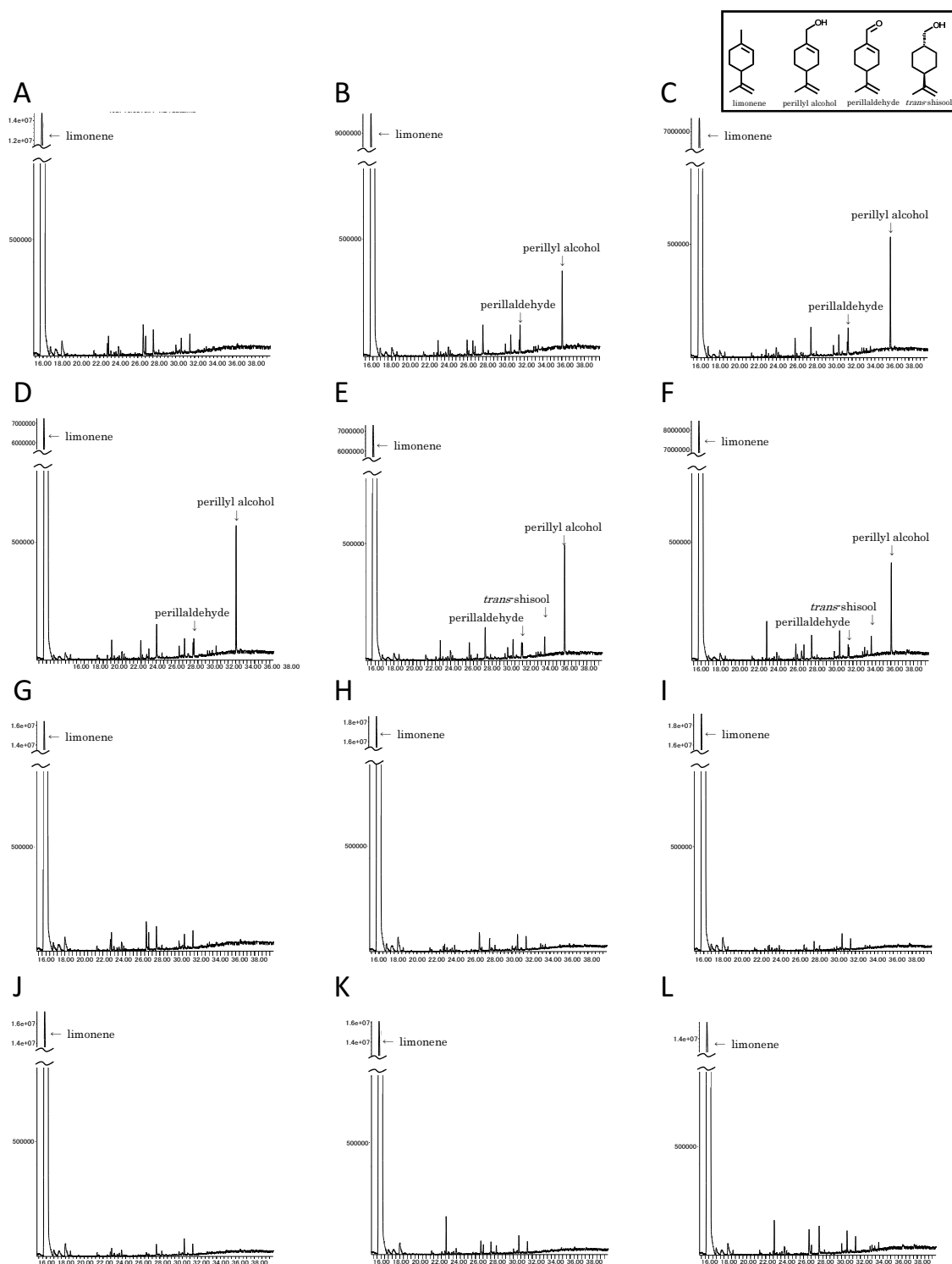


図 13. リモネンを基質とした酵素反応液の経時的反応生成物のクロマトグラム
 (A-F) Pf-7307 を含む酵素反応液、(G-L) Pf-7307 を含まない酵素反応液、(A, G) 反応開始前、(B, H) 30 分間反応、(C, I) 2 時間反応、(D, J) 4 時間反応、(E, K) 8 時間反応、(F, L) 16 時間反応
 $m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

基質として用いた標品のペリルアルコールには購入時からペリルアルデヒドが混在しており、カラムクロマト精製を行ったが、ペリルアルコールのみを単離することができなかった。そのため、基質として用いたペリルアルコールには微量のペリルアルデヒドが存在している (図 14)。ペリルアルコールを基質として、経時的変化による酵素反応生成物の確認を行った。リモネンを基質とした場合同様、反応開始から、30 分、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間でそれぞれ酵素反応を行った (図 15)。反応開始 30 分後には、反応開始前に比較してペリルアルデヒドが増加し、トランス-シソオールが生成した (図 15 (B))。その後 2 時間から 16 時間の経過につれて、ペリルアルデヒドの量が減少し、トランス-シソオールの量が増加した (図 15 (C-F))。コントロールとして Pf-7307 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、いずれの時間でも、ペリルアルデヒドの量は反応開始前から変わらず、トランス-シソオールのみが生成した (図 15 (H-L))。ペリルアルコールを基質として用いた酵素反応生成物の経時的変化の結果において、反応開始後にペリルアルデヒドの量が増加していたため、Pf-7307 はペリルアルコールを基質としてペリルアルデヒドを生成することが強く示唆された。また、トランス-シソオールの生成は、コントロールの酵素反応液でも確認され、トランス-シソオールは、ペリルアルコールを還元すると生成する化合物であることから、還元力の供給源として用いた NADPH シトクロム P450 還元酵素などの、ベクター上に発現するタンパク質による反応であることが示唆された。

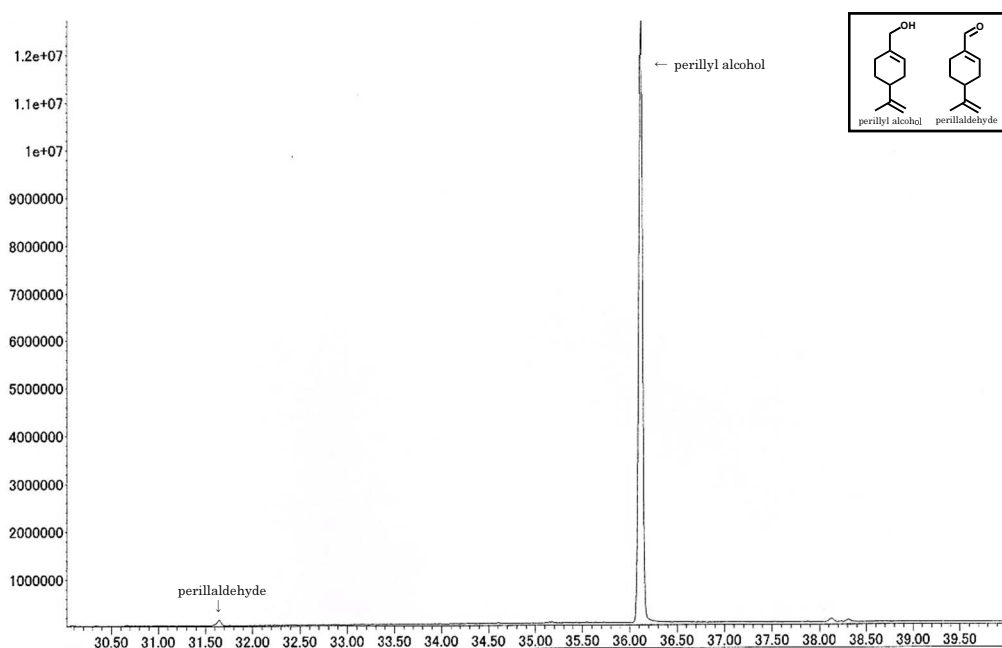


図 14. カラムクロマト精製後のペリルアルコールのクロマトグラム
 $m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

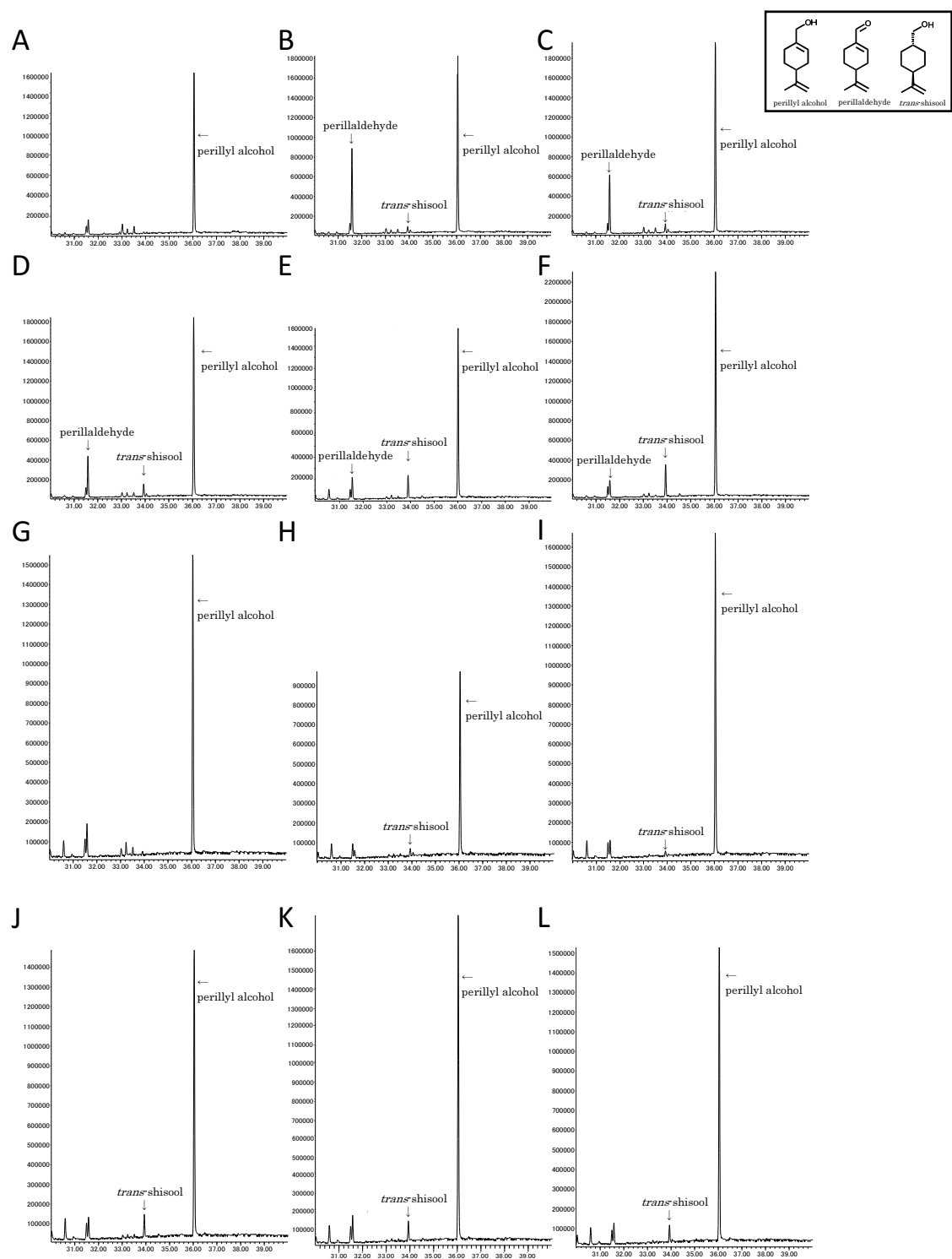


図 15. ペリルアルコールを基質とした酵素反応液の経時的反応生成物のクロマトグラム (A-F) Pf-7307 を含む酵素反応液、(G-L) Pf-7307 を含まない酵素反応液、(A, G) 反応開始前、(B, H) 30 分間反応、(C, I) 2 時間反応、(D, J) 4 時間反応、(E, K) 8 時間反応、(F, L) 16 時間反応

$m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

リモネンから始まるペリルアルデヒドの推定生合成経路はペリルアルデヒドが最終生成物である。精油の成分分析では、PA型のシソにはペリルアルデヒドが蓄積しているということからも、ペリルアルデヒドは Pf-7307 が触媒する反応の基質にはならないと考えられる。ペリルアルデヒドが本当に Pf-7307 の反応の基質としないのかを検証するために、ペリルアルデヒドを基質とした経時的な酵素反応を行った。(図 16)。その結果、反応開始後 30 分でトランス-シソオールとペリルアルコールが生成した。(図 16 (B)) その後、2 時間から 16 時間経過するとともに、基質のペリルアルデヒドは減少するのに対し、反応生成物であるトランス-シソオールとペリルアルコールは増加した (図 16 (C-F))。コントロールとして Pf-7307 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液では、Pf-7307 を含む酵素反応液と同様の化合物量の変化が確認された (図 16 (H-L))。Pf-7307 を含む酵素反応液と含まない酵素反応液で同一の反応生成物が得られたこと、ペリルアルデヒドからトランス-シソオールおよびペリルアルコールが生成する反応はいずれも還元反応であることから、生成した化合物は Pf-7307 による反応の生成物ではなく、ベクター由来のシトクロム P450 還元酵素などのタンパク質の反応による生成物であると考えられる。トランス-シソオールとペリルアルコールはいずれも経時的に増加したが、その増加量はトランス-シソオールの方が多し。また、16 時間経過後の化合物量はトランス-シソオールが最も多い。このことから、ペリルアルデヒドの 7 位のカルボニルが還元されて水酸基となったペリルアルコールが生成した後、ペリルアルコールのシクロヘキセン環の二重結合が還元されてシクロヘキサン環となり、トランス-シソオールが生成したと推測される。

トランス-シソオールは六員環および 7 位の水酸基が還元された構造をしている。モノオキシゲナーゼとして機能するシトクロム P450 の基質となる可能性があるため、トランス-シソオールを基質とした酵素反応を行った。反応時間は 30 分、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間とし、時間経過による反応生成物の変化を確認したが、いずれの時間でも反応生成物は得られなかった (図 17 (A-F))。また、コントロールとして Pf-7307 を含まない空ベクターを用いた酵素反応液の反応でも反応生成物は得られなかった。(図 17 (G-L))。

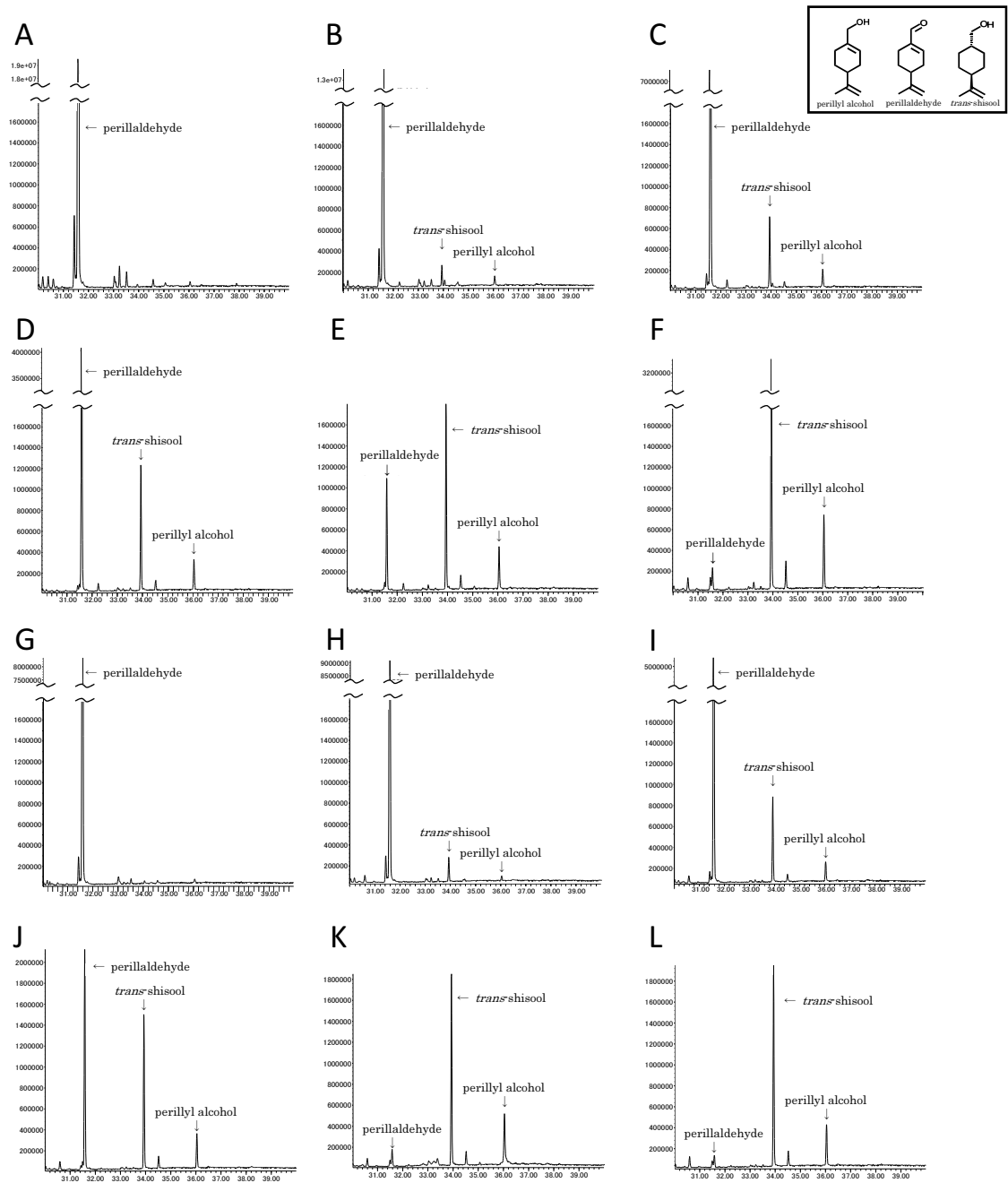


図 16. ペリルアルデヒドを基質とした酵素反応液の経時的反応生成物のクロマトグラム (A-F) Pf-7307 を含む酵素反応液、(G-L) Pf-7307 を含まない酵素反応液、(A, G) 反応開始前、(B, H) 30 分間反応、(C, D) 2 時間反応、(D, J) 4 時間反応、(E, K) 8 時間反応、(F, L) 16 時間反応 $m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

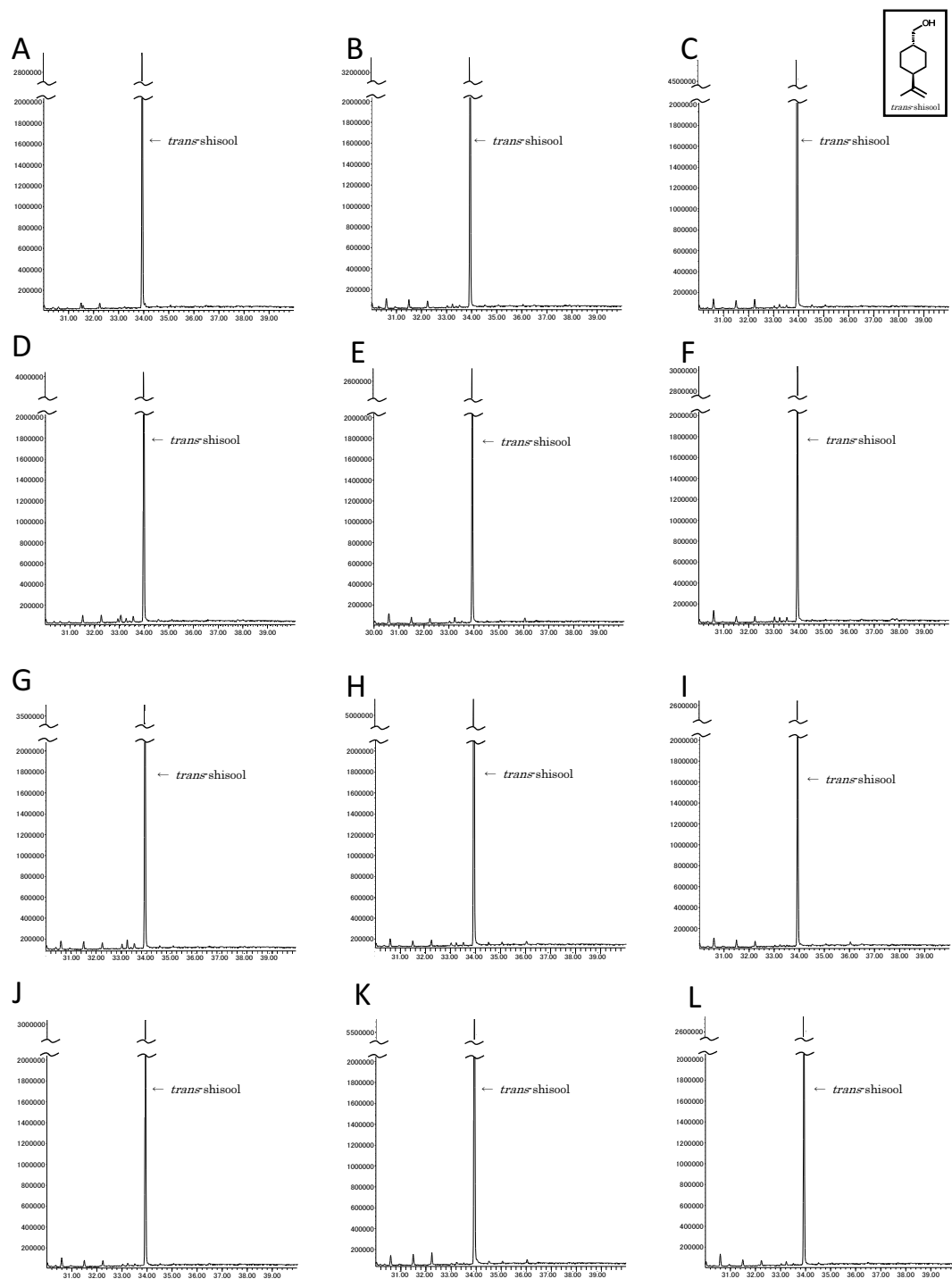


図 17. トランス-シソオールを基質とした酵素反応液の経時的反応生成物のクロマトグラム

(A-F) Pf-7307 を含む酵素反応液、(G-L) Pf-7307 を含まない酵素反応液、(A, G) 反応開始前、(B, H) 30 分間反応、(C, I) 2 時間反応、(D, J) 4 時間反応、(E, K) 8 時間反応、(F, L) 16 時間反応

$m/z = 136-154$ の化合物のみを示した。

第三節 考察

PA型にのみ高発現していた Pf-7307 は、配列内にシトクロム P450 によく保存されている各領域が存在すること、アミノ酸残基が 499 個で構成され、約 500 アミノ酸残基とされる一般的なシトクロム P450 とその特徴が一致することから、シトクロム P450 であると考えられ、CYP family number は CYP71AT146 に分類された。Pf-7307 はリモネンおよびペリルアルコールを基質として、それぞれペリルアルコールおよびペリルアルデヒドへ変換した。

シトクロム P450 は、そのアミノ酸配列の類似度に基づいて、ファミリーおよびサブファミリーに細分化、命名される。一般的にはアミノ酸配列が 40%以上一致すれば同一ファミリーに、55%以上一致すれば同一サブファミリーに分類することになっている。そのため、ファミリー内の各ナンバー間で機能の類似性がほとんど無い、あるいは無い場合がある。Pf-7307 が分類された CYP71 ファミリーは、CYP79 ファミリーなどのファミリー内で機能的類似性が高いとされるファミリーに比較して、機能的類似性は低くその基質特異性には幅がある [54]。ダイズ (*Glycine max* (Linné) Merr. subsp. max) から同定された CYP71A10 はフェニルウレア系除草剤の代謝に関わり、フルオロメツロン、リニュロン、ディウロンなど複数の化合物を基質とする [55]。Pf-7307 と同じ CYP71AT に属するシトクロム P450 として、オオイタドリ (*Fallopia sachalinensis* Ronse Decr) から CYP71AT96 (GenBank ID : LC060449) が報告されている [56]。このシトクロム P450 は *E/Z*-フェニルアセタルドキシムからフェニルアセトニトリルへの合成に関わるが、*E/Z*-4-ヒドロキシフェニルアセタルドキシムや *E/Z*-インドール-3-アセタルドキシムも同様に基質とする。Pf-7307 が 2 種類の化合物を基質としたことは、CYP71 ファミリーが持つ幅広い基質特異性という特徴に由来するのかもしれない。CYP71 ファミリーは幅広い基質特異性を持つが、異なる基質に対する反応の位置特異性は高い。CYP71A10 が触媒する反応の位置は、いずれの基質でもアミドの窒素であり、CYP71AT96 が触媒する反応の位置は、いずれの基質においてもアミンの窒素である。また、Pf-7307 はリモネンおよびペリルアルコールの 7 位の炭素に位置特異的に反応した。

本研究ではシソ精油に含まれるモノテルペン化合物であるペリルアルコール及びペリルアルデヒドの生合成を触媒するシトクロム P450 を同定した。PA型のシソは日本薬局方で医療用として利用できる唯一の精油型であり、ペリルアルデヒドの含量については規定がある。適格な医薬品であると判断するための指標成分についての生合成を明らかにすることは、品質評価のみならず生薬資源の有効利用においても重要である。多様な精油型を持つシソについて、遺伝的に純系を維持した系統を用いて、それらの遺伝子発現パターンを比較し、精油型特異的に発現する遺伝子を同定する手法は、他の精油型の生合成に関わる遺伝子の解明にも適用可能である。本手法を用いることで、遺伝子の混成により複雑となったシソの二次代謝産物の生合成経路の解明が期待できる。

揮発性でにおいを有するモノテルペン化合物の多くは、植物では細菌や寄生虫からの防

御や受粉において重要な役割を果たしている。モノテルペン化合物と我々の生活との関わりでいえば、食品や香料に使用されるほか、抗腫瘍活性が報告されているものもあり、興味深い化合物群である。本研究で使用した化合物では、リモネンは乳癌 [57] に対して、ペリルアルコールは転移性前立腺癌 [58] や膵臓癌 [59] に対して、それぞれ臨床試験が行われている。また、ペリルアルデヒドは *in vitro* で癌腫の増加を抑制するとの報告 [60] がある。ペリルアルコール及びペリルアルデヒドの生合成を触媒するシトクロム P450 を同定したことは、薬学、食品、化粧品など多様な分野での有用物質の分子細胞工学的手法を用いた生産への応用が期待できる。また、医薬品シーズの開発段階では化合物の修飾酵素としてシトクロム P450 は汎用されるが、位置特異的に化合物を修飾することのできるシトクロム P450 は大いに役立つと考える。

第三章 生薬類のにおいの吸入投与による自発運動抑制活性評価

第一節 8種の生薬類精油のGCMS分析

精油成分を含む生薬は健胃作用を示すことが多く芳香性健胃薬と呼ばれ、生薬がもつ独特のにおいが刺激となって胃腸の働きを正常化すると考えられている。また、利気剤とされる生薬には、薄荷 (*Mentha arvensis* Linné var. *piperascens* Malinvaud)、桂皮 (*Cinnamomum cassia* Blume)、丁子 (*Syzygium aromaticum* Merrill et Perry) など、いずれにもにおいが強い生薬が挙げられる。このように、生薬のにおいは生薬の薬理効果と密接に関係しており、日本薬局方では生薬のにおいは安全性と品質担保を目的とした適否の判定基準のひとつとなっている。しかしながら、においを嗅ぐこと、すなわち吸入投与により、生薬の薬理効果を検討した例はこれまでにそれほど多くない。

オープンフィールド法は、精油やにおいのある成分を充満させた空間内にマウスを投入し、その自発運動量を測定する方法で、吸入投与による自発運動抑制活性の評価に使われている [61-66]。すなわち、制約がない自由な環境 (オープンフィールド) 下で実験動物の様々な行動を観察することで、情動変化や身体機能の変化を検出する。動物にとってオープンフィールドはこれまで経験したことがない新奇環境であることから、そこで認められる様々な行動は動物の情動性を評価するための有用な指標と考えられる。精油の吸入投与での生物活性については、ラベンダー精油の鎮静活性 [61]、コリアンダー精油の抗不安および抗うつ活性 [67]、タイム精油の興奮活性 [68] などの報告がある。一方で、いくつかの精油を混合して吸入投与を行った研究はない。

本研究では、オープンフィールド法を用いて、生薬のにおいに薬理活性はあるのか、またその活性は多成分系にしたときにどう変化するのかなどについて検討した。

日本では古くから香りを楽しむ習慣のひとつとして香袋 (匂い袋) を利用する。香袋は常温で香りを発する香薬類、例えば山奈 (*Kaempferia galanga* Linné, galangal)、藿香 (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth, patchouli)、白檀 (*Santalum album* Linné, sandalwood)、甘松香 (*Nardostachys chinensis* Batal, spikenard)、桂皮 (*Cinnamomum cassia* Blume, cinnamon)、丁子 (*Syzygium aromaticum* Merrill et Perry, clove)、大茴香 (*Illicium verum* Hook.f, star anise)、龍脳 (*Dryobalanops aromatic* Gaertn.f, borneol) などを袋に入れたもので、携行して香りを楽しむほか防虫効果を期待して衣類や文書を保管する際にも用いられる。処方はいろいろ考案されているが、ここでは汎用される8種の生薬のにおいについて検討した。

龍脳を除く7種の生薬類は、各100gを日局16 [3] の精油定量法に従い2時間蒸留を行い得られた精油について分析した。龍脳はヘキサンに溶解したものを分析サンプルとした。成分分析の結果は、表5~12にそれぞれ示した。InertCap-Wax columnからの溶出順に並べ、C10~C26のアルカンを基準として計算したretention index (RI) およびtotal ion chromatogram (TIC) データより算出したピーク面積を示した。得られた精油の含量は

それぞれの生薬の乾燥重量あたり、山奈 0.260%(w/w)、藿香 0.240%(w/w)、白檀 0.200%(w/w)、甘松香 0.230%(w/w)、桂皮 0.470%(w/w)、丁子 3.33%(w/w)、大茴香 1.88%(w/w)であった。また、山奈、白檀、丁子、大茴香は無色の溶液、藿香、甘松香、桂皮は薄黄色の溶液であり、それぞれ特徴のあるにおいを有していた。

表 5. 山奈の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
3-carene	1062	1.3
pentadecane	1660	2.6
ethyl cinnamate	2199	30.6
ethyl <i>p</i> -methoxycinnamate	2417	62.5
total identified		97.0
unknown		3.0

表 6. 藿香の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
β -patchoulene	1659	1.0
seychellene	1846	2.3
α -bulnesene	1911	0.8
anethol	2006	1.0
caryophyllene oxide	2117	2.8
cinnamyl aldehyde	2151	0.9
eugenol	2223	1.0
patchouli alcohol	2230	66.2
total identified		76.2
unknown		23.8

表 7. 白檀の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
<i>epi</i> - β -santalene	1832	1.1
camphenenol	2277	1.0
α -santalol	2318	49.5
(<i>Z</i>)- <i>trans</i> - α -bergamotol	2322	6.7
<i>cis</i> - β -santalol	2361	4.3
<i>trans</i> - β -santalol	2371	22.4
total identified		85.0
unknown		15.0

表 8. 甘松香の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
α -copaene	1665	0.9
δ -selinene	1733	2.7
aristolene	1764	1.8
calarene	1792	15.7
α -gurjunene	1821	3.0
calaradiene	1863	1.7
anethol	2006	0.7
β -ionone	2083	3.4
β -ionon-5,6-epoxide	2101	0.7
ledol	2141	0.8
cinnamaldehyde	2151	1.0
(-)-globulol	2166	2.3
spathulenol	2192	5.2
patchouli alcohol	2228	4.9
total identified		44.9
unknown		55.1

表 9. 桂皮の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
α -copaene	1668	2.0
benzaldehyde	1718	0.4
α -muurolene	1920	0.5
δ -cadinene	1949	0.9
cinnamaldehyde	2155	93.9
α -cadinol	2251	0.5
2-methoxycinnamaldehyde	2385	1.9
total identified		100.0

表 10. 丁子の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
α -copaene	1668	0.2
linalool	1726	0.1
<i>trans</i> -caryophyllene	1803	12.6
estragole	1868	0.1
humulene	1874	1.5
<i>endo</i> -borneol	1899	0.2
α -farnesene	1936	0.2
δ -cadinene	1949	0.2
methyl salicylate	1972	0.2
anethole	2009	2.7
caryophyllene oxide	2119	0.2
eugenol	2222	75.0
acetyleugenol	2267	5.2
allyl phenol	2315	0.1
total identified		98.4
unknown		1.6

表 11. 大茴香の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
α -pinene	803	0.2
α -limonene	1167	0.3
linalool	1725	0.4
α -bergamotene	1777	0.2
caryophyllene	1797	0.8
β -farnesene	1866	0.2
estragole	1872	1.9
α -terpineol	1890	0.2
<i>endo</i> -borneol	1898	0.9
(<i>Z</i>)-anethole	1950	0.2
(<i>E</i>)-anethole	2013	91.1
anisaldehyde	2144	1.6
eugenol	2216	0.8
total identified		98.8
unknown		1.2

表 12. 龍腦の精油成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
isoborneol	1867	21.6
borneol	1899	70.0
total identified		91.7
unknown		8.3

第二節 精油の吸入投与による自発運動抑制活性の評価

自発運動抑制活性の評価にはオープンフィールド法を用いた。投与量は、これまでの精油成分吸入投与による自発運動抑制活性の評価で、多数の成分で活性が認められた 4×10^{-4} 、 4×10^{-3} 、 4×10^{-2} mg/cage の範囲で調製し、無臭溶媒であるトリエチルケエン酸に溶解した [65, 66]。またポジティブコントロールとして、 4×10^{-3} mg/cage のペリルアルデヒド (PAH) を用いた。PAH はマウスへの経口投与で、ヘキソバルビタール誘導による睡眠時間を延長させ、鎮静活性があることが報告されている [69]。図 18 に 8 種の精油それぞれについての 60 分間の総運動量を area under the curve (AUC) 値として示した。山奈、藿香、白檀、甘松香、龍脳において、ネガティブコントロールと比較し有意な自発運動量抑制活性が認められた。最も強い活性が見られた濃度は、山奈で 4×10^{-4} mg/cage、藿香で 4×10^{-3} mg/cage、白檀で 4×10^{-4} mg/cage、甘松香で 4×10^{-3} mg/cage、龍脳で 4×10^{-3} mg/cage であった。図 19 には活性があった 5 つの精油を吸入したマウスの自発運動量の 5 分毎の経時変化について、それぞれ最も活性が高かった濃度で示した。活性があった 5 つの精油はいずれも、吸入投与開始 10 分後には自発運動量がネガティブコントロールと比較して約 3 分の 2 まで低下した。60 分間の観察中、マウスに異常行動は見られず、精油の吸入により自発運動量が減少したことが示唆された。一方、活性がみられなかった桂皮、丁子、大茴香では、ネガティブコントロールにおいて自発運動量が低下する 30 分以降でも運動量が増加する、跳びはねる、また、脱糞や排尿回数の増加といった様子が観察された。

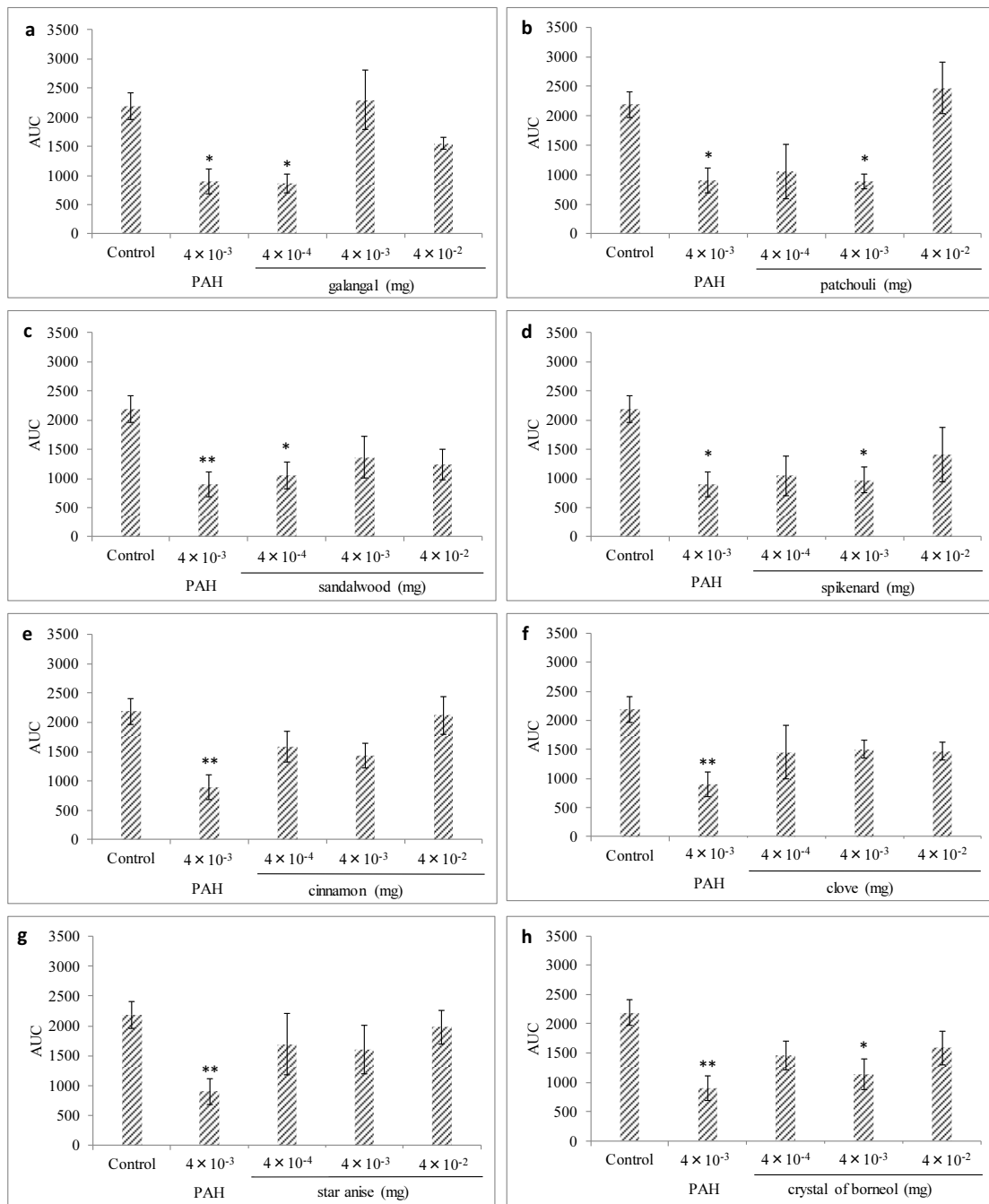


図 18. 8種の精油の吸入投与におけるマウスの総自発運動量

(a)山奈精油、(b)藿香精油、(c)白檀精油、(d)甘松香精油、(e)桂皮精油、(f)丁子精油、(g)大茴香精油、(h)龍腦溶解液。ポジティブコントロールとしてペリルアルデヒド (PAH) を用いた。統計解析は Dunnett's test を使用し、ネガティブコントロール群に対する有意差を $*p < 0.05$ および $**p < 0.01$ で示した。

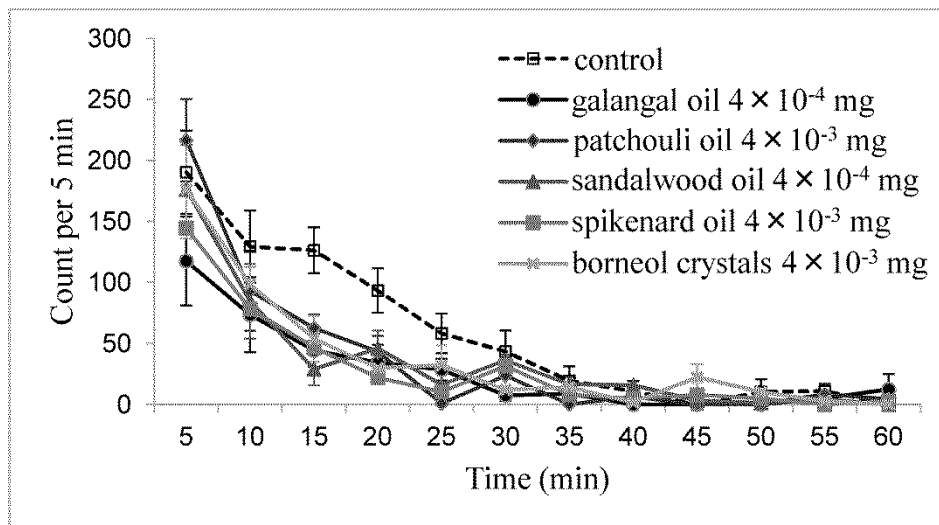


図 19. 活性がみられた 5 つの精油における 5 分毎のマウスの自発運動量

第三節 混合した精油の吸入投与による自発運動抑制活性の評価

1. 自発運動抑制活性がみられた 5 つの異なる精油の混合試料による自発運動抑制活性の評価

8 種の精油の組み合わせ方は多数あり、精油の種類、数、濃度を変えることでさまざまな精油の混合試料を調製することができる。本研究では、まず 8 種の精油すべてを混合した試料について自発運動抑制活性を検討したが、どの濃度でも自発運動抑制活性は認められなかった。そこで、活性がみられた 5 つの精油を混合することにより相加・相乗効果が期待できるのかを検討した。混合試料作製に用いたそれぞれの精油の濃度は、各精油の単独投与で最も活性が強かった濃度を用いた。混合試料の GCMS による成分分析の結果を表 13 に、5 つの精油の単独投与で活性が最も強かった濃度および混合試料での AUC 値を図 20 に示した。混合試料の AUC 値は、5 つの精油の単独試料の AUC 値に比較して低いことから、活性がある精油を混合することでその活性に相加・相乗効果がみられることが示唆された。しかし、それぞれの単独試料の活性と混合試料の活性を Student's *t*-test で統計解析した場合に有意差はみられなかった。

表 13. 混合試料の成分組成

化合物	RI	ピーク面積 (%)
β -patchoulene	1681	0.4
α -copaene	1688	0.3
aristolene	1784	0.7
calarene	1811	4.2
α -gurjunene	1839	1.2
seychellene	1865	2.0
calaradiene	1882	0.8
isoborneol	1885	6.8
borneol	1916	23.4
α -bulnesene	1929	0.3
anethole	2024	0.5
β -ionone	2100	1.1
caryophyllene oxide	2133	0.8
(-)-globulol	2181	0.6
spathulenol	2206	1.9
ethyl cinnamate	2213	0.8
patchouli alcohol	2242	18.8
α -santalol	2309	1.9
β -santalol	2343	2.3
ethyl <i>p</i> -methoxycinnamate	2431	2.5
total identified		71.1
unknown		28.9

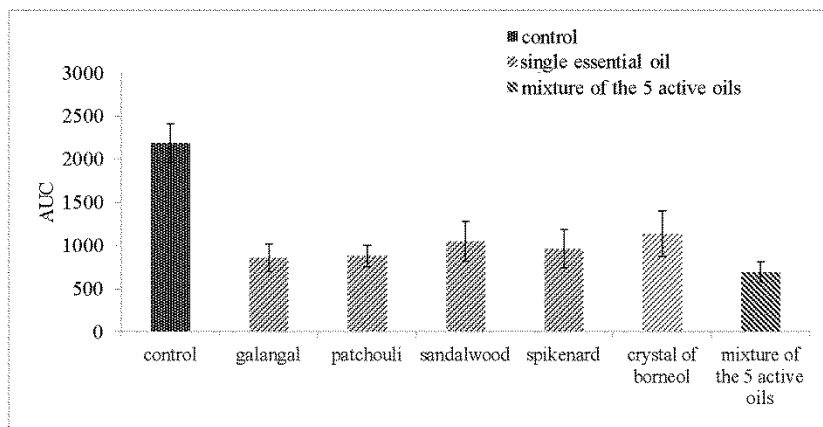


図 20. 5つの精油の単独試料および混合試料投与でのマウスの総自発運動量
 5つの精油はそれぞれ単独投与で活性が最も強かった濃度を用いた (galangal : 4×10^{-4} mg/cage、patchouli : 4×10^{-3} mg/cage、sandalwood : 4×10^{-4} mg/cage、spikenard : 4×10^{-3} mg/cage、crystal of borneol : 4×10^{-3} mg/cage)。

2. 自発運動抑制活性がみられた5つの精油の混合試料に、活性がみられなかった精油を添加した試料による自発運動抑制活性低下の評価

活性がみられた5つの精油の混合試料に、活性がみられなかった桂皮、丁子、大茴香の精油のうち、いずれか1つを添加することによる活性の変化を検討した。桂皮、丁子、大茴香の精油は、それぞれの精油の単独投与で自発運動抑制活性が最も強かった濃度を添加した。図 21 には、それぞれの精油の単独投与で活性が最も強かった濃度、5つの精油の混合試料、この5つの混合試料に活性がみられなかった精油を添加した試料の AUC 値を示した。桂皮、丁子、大茴香を添加した試料ではいずれも活性は低下した。

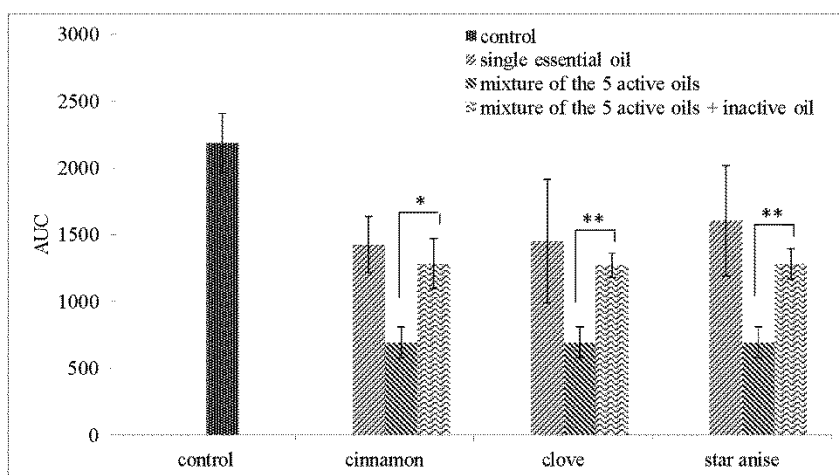


図 21. 5つの精油の単独試料、5つの精油の混合試料、5つの精油の混合試料に1つの精油を添加して投与した場合でのマウスの総自発運動量

それぞれの試料の作製に用いた精油は、単独投与で最も活性が強かった濃度を用いた (galangal: 4×10^{-4} mg/cage、patchouli: 4×10^{-3} mg/cage、sandalwood: 4×10^{-4} mg/cage、spikenard: 4×10^{-3} mg/cage、crystal of borneol: 4×10^{-3} mg/cage、cinnamon: 4×10^{-3} mg/cage、clove: 4×10^{-4} mg/cage、star anise: 4×10^{-3} mg/cage)。5つの精油の混合試料および5つの精油の混合試料に1つの精油を添加した試料間での統計解析は Student's *t* test を使用し、有意差のあるものを * $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ として示した。

第四節 考察

8種の生薬類（山奈、藿香、白檀、甘松香、桂皮、丁子、大茴香、龍腦）の精油について、オープンフィールド法を用いたマウスへの吸入投与によりその自発運動抑制活性を評価した結果、山奈、藿香、白檀、甘松香、龍腦の5つの精油でマウスの自発運動量が有意に減少し、自発運動抑制活性があることが明らかとなった。

自発運動抑制活性のある5つの精油を混合した混合試料をマウスに吸入投与した場合、それぞれの精油を単独で吸入させた場合よりも自発運動抑制活性は上昇し相加・相乗効果が示唆されたが、単独精油と混合試料での総自発運動量を Student's *t*-test で統計解析した結果、両者間に有意差はみられなかった。精油の吸入投与による生物活性の発現メカニズムとして、吸入した精油の成分が血中へ入ること [70]、ラベンダー精油の抗不安作用にはセロトニン 5HT_{1A} 受容体が関与していること [71]、セキショウ精油の鎮静作用には GABA_A 受容体が関与していること [72] などの報告がある。また、精油に含まれる成分による中枢神経系への作用のメカニズムとしては、ラベンダー精油の主成分であるリナロールに関して、グルタミン酸受容体への関与 [73] が示唆されている。これらの研究から、吸入投与での自発運動抑制活性は、血中に吸収された成分が中枢神経系に存在する様々な受容体を介して作用が発現することによると考えられる。本研究で、混合した精油による自発運動抑制活性の相加・相乗効果が示唆されたものの、単独で投与した場合と比較して有意差がなかったのは、単独投与で十分な効果を示していたため、受容体に対する化合物の飽和が起こったのではないかと推察する。

活性のある5つの精油の混合試料に活性がみられなかった精油を添加すると、混合試料の自発運動抑制活性は低下することが明らかとなったが、混合試料中に活性のない精油は1つであるにも関わらず、活性を低下させたことは興味深い。精油の成分が血中へ入り中枢神経系へ作用するためには、化合物が揮発して肺や鼻粘膜より吸収され、血液中に取り込まれたのち、血液脳関門を通過する必要がある。それぞれの精油の主成分の大気圧での沸点、25°Cでの蒸気圧および親油性を表14に示した。一般的に、沸点が低く、蒸気圧が高い化合物ほど揮発性が高く、親油性が高いほど粘膜を通過しやすくなるため体内への移行性は増大する。また、中枢神経は脂肪組織であるため、親油性の高い化合物は中枢神経との親和性が大きく、ここへ集中する。8つの精油のうち活性がなかった3つの精油の主成分は、活性があった5つ精油の主成分に比較して、沸点が低く蒸気圧が高いものが多い。すなわち、6つの精油が混合した試料では、活性がない3つの精油の成分がより早く揮発し、その活性があらわれたのではないかと考えられる。

本研究では、生薬の吸入による自発運動抑制活性について、複雑系では十分な効果がみられた単独投与と比較して有意差はなかったものの相加・相乗効果があることが示唆された。生薬薬理学において、主成分あるいは指標成分について薬理的検討を行うことは重要であり、その結果は生薬の効能を理解するうえで大きな手掛かりとなる。しかしながら、生薬を医薬品として利用する場合には、多成分系あるいは複雑系であることを理

解し活用していくことが重要であり、本研究の知見は、生薬を総合的に理解し利活用するために重要なものである。

表 14. 8つの精油の主成分の沸点、蒸気圧、親油性 [74]

生薬	主成分	沸点 (760 mmHg)	蒸気圧 (25°C)	親油性 (logP (o/w))
galangal	ethyl <i>p</i> -methoxycinnamate	325-326	0.000235	2.650
patchouli	patchouli alcohol	287-288	0.000278	4.484
sandalwood	α -santalol	302	0.000002	4.647
spikenard	calarene	260	0.020000	6.252
borneol crystals	borneol	212	0.040000	3.240
cinnamon	cinnamaldehyde	249-252	0.026500	1.900
clove	eugenol	252-253	0.010000	2.270
star anise	anethole	234-237	0.069000	3.390

総括および結語

本研究では、ソヨウの指標成分である色素成分アントシアニン類の多様性と精油成分ペリラルデヒドの生合成に関わるシトクロム P450 について明らかにした。また、生薬においては自発運動抑制活性があることを見出し、活性のあるものを混合し複雑系にしたときに相加・相乗効果があることが示唆された。

シソ属植物に含まれるアントシアニン類

シソ属植物に含まれるアントシアニン類は、HPLC でのクロマトグラムパターンが 4 つに大別されることを明らかにした。

栽培種のシソには安定性の高いアントシアニン類が蓄積されているが、野生種である一部のレモンエゴマには安定性の低いアントシアニンが蓄積されていた。また、そのレモンエゴマには従来の定説とは異なる安定性の低いアントシアニンを合成する生合成経路が存在することが示唆された。

また、色素成分と精油成分はいずれも二次代謝産物であるが、その生合成に関する遺伝的な制御は独立であった。

生薬ソヨウに含まれるアントシアニン類の組成については、原料植物の生育環境による多様性は小さく、調製後の保存条件や加工処理により安定性の低いアントシアニンは大きく影響を受けることが示唆された。

ペリラルデヒド生合成に関わるシトクロム P450

PA 型のシソを用いてペリラルデヒドの生合成に関わるシトクロム P450 のクローニングおよび機能解析を行い、この酵素がリモネンの 7 位の水酸化によりペリラルコールを生成し、さらにその水酸基を酸化することでペリラルデヒドを合成する反応に関与していることを明らかにした。この酵素は、同じくリモネンを基質とする他の **limonene hydroxylase** とは構造上の類似性が非常に低く、リモネンの 7 位の炭素に位置特異的に反応することが示された。

生薬類のにおいの吸入投与による自発運動抑制活性

8 種の薫香生薬類（山奈、藿香、白檀、甘松香、桂皮、丁子、大茴香、龍脳）のうち、山奈、藿香、白檀、甘松香、龍脳の精油には、マウスの吸入投与による自発運動抑制活性

があることが明らかとなった。活性があった 5 つの精油を混合した混合試料では、それぞれを単独で投与した場合に比較して高い活性があり、相加・相乗効果が示唆された。また、5 つの精油を混合した混合試料に活性がない精油を 1 つ添加すると、混合試料でみられた活性が大きく減少した。

本研究では、ソヨウの基原であるシソについて、天然物化学の面からはアントシアニン類の多様性について、二次代謝成分の生合成の面からは精油成分ペリルアルデヒド合成に関わるシトクロム P450 について、それぞれ新たな知見を得た。また生薬薬理学的手法により、複数の生薬類のにおいにそれぞれ実験的有意差のある自発運動抑制活性が観測されること、さらにその活性が複雑系では相加・相乗効果があることが示唆された。生薬を医薬品として利用する際には、化学薬品とは大きく異なるその特徴を理解し利活用していく必要がある。特に生薬と化学薬品をひとつの法的規制のもとに管理する我が国では、その総合的な理解が必須である。複雑系である生薬については、含有成分のひとつひとつについて、化学的、生物学的、薬理学的研究が必要であり、また、それらが組み合わせり多成分系となったときの化学的、生物学的、薬理学的研究も必要である。本研究の成果は、既報の知見と合わせて考察、理解することで、生薬特有の複雑系を基盤とした研究やレギュレーションに大いに利活用される知見であると考えられる。

実 験 の 部

第 1 章

[植物材料]

研究に用いたシソ属植物 (表 1a) は、京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園で栽培した。いずれの系統も自家受粉により純系を維持しているものである [17]。また、生薬ソヨウのうち、新鮮葉は名古屋にある薬用植物園からご提供頂いた (表 1b、No.1~3)。ソヨウ市場品は生薬品質集談会から提供されたもの、あるいは大晃生薬有限公司から購入したものを頂いた (表 1b、No. 4~21)。シソ色素製剤 (表 1b、No. 22) は日農化学工業株式会社からご提供頂いた。ソヨウ市場品証拠標本 (EST-5017~5034) は京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園資料室に保管されている。

[実験材料]

研究に用いた試薬はすべて、特級あるいは HPLC 用グレード以上である。

[アントシアニン化合物のパターン分類]

新鮮葉から得た直径 5 mm のディスク 5 枚 (約 30 mg) あるいはソヨウ市場品約 30 mg を AcOH : H₂O : MeOH = 1 : 10 : 9 の混液 0.5 mL で 48 時間、4°C 暗所で抽出した。抽出液について HPLC 分析を行った。HPLC 装置は L-2000 series (HITACHI) または LC2000 series (JASSO) を使用した。測定条件は以下の通りである。

カラム : Cholester (150 × 4.6 mm I.D. , COSMOSIL)

移動相 : A : 0.1% TFA H₂O、B : 0.1% TFA MeCN

分析条件 : A : B = 85 : 15 → 52 : 48 (linear gradient, 38 min)

流速 : 0.5 mL/min

オープン温度 : 30°C

注入量 : 15 μL

検出 : 528 nm

[アントシアニン化合物の単離]

レモンエゴマ No.5717 と同 No.5601 の新鮮葉それぞれ 73.7 g および 34.5 g を細片に切断し、3% TFA 水溶液 500 mL および 400 mL で 48 時間、4°C 暗所での抽出を 2 回繰り返した。抽出液を濃縮後、Amberlite XAD-7 (Sigma-Aldrich) を用いて 1% TFA 水溶液でアントシアニン類を洗浄後、1% TFA MeOH で溶出した。アントシアニン類を含む MeOH 溶出画分を濃縮後、1% TFA 水溶液に溶解させた。これを 13,000 rpm で 1 分間遠心後、分取 HPLC を用いて、レモンエゴマ No. 5717 からピーク 1:32.1 mg、ピーク 2:12.7 mg、

レモンエゴマ No. 5601 からピーク 3 : 13.7 mg、ピーク 4 : 4.60 mg、ピーク 5 : 5.80 mg、ピーク 6 : 8.60 mg、ピーク 7 : 38.2 mg を得た。HPLC 装置は Prominence series (SHIMADZU) を使用した。HPLC 条件は次のとおりである。

カラム : Cholester (250 × 20 mm I.D. , COSMOSIL)
移動相 : A : 0.1% TFA H₂O、B : 0.1% TFA MeCN
分析条件 : No.5601 ; A : B = 78 : 22 (75 min isocratic)
 No.5717 ; A : B = 83 : 17 (45 min isocratic)
流速 : 8.0 mL/min
オープン温度 : 30°C
注入量 : 2 mL
検出 : 528 nm

化合物の同定は、各ピークの LCMS および NMR 測定を行い参考文献と照合して行った。LCMS 装置は Prominence series LCMS-IT-TOF (SHIMADZU) を使用し、イオン化には ESI 法を用いた。NMR 装置は JNM-ECA500KP (500 MHz for ¹H、125 MHz for ¹³C、JEOL) を使用し、測定溶媒は 3% *d*-TFA CD₃OD を用いた。

[異なる UV 条件下での栽培]

水耕栽培装置 (ツジコー株式会社) に、赤色 : 612 nm、青色 : 436 nm、白色 : 30,000 K の特性を持つ HEFL (Hybrid Electrode Fluorescent Lamp) 照明を設置し、UV を含まない蛍光灯下と UV を含む光照射下でレモンエゴマ No.87 を栽培した。新鮮葉から得た直径 5 mm のディスク 5 枚 (約 30 mg) を AcOH : H₂O : MeOH = 1 : 10 : 9 の混液 0.8 mL に浸して抽出し、HPLC 分析を行った。HPLC 条件は次のとおりである。

カラム : Cholester (150 × 4.6 mm I.D. , COSMOSIL)
移動相 : A ; MeCN : H₂O : TFA = 7.5 : 92.5 : 0.1
 B ; MeCN : H₂O : TFA = 55 : 45 : 0.1
分析条件 : A : B = 100 : 0 → 20 : 80 (linear gradient, 48 min)
流速 : 0.5 mL/min
オープン温度 : 30°C
注入量 : 15 μL
検出 : 528 nm

[3AT の遺伝子発現量比較]

Total RNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて赤ジソ No.79、レモンエゴマ No.87、レモンエゴマ No.5601、赤ジソ No.5645 の新鮮葉から抽出した後、add2 primer (5'-CCACGCGTCGACTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を用いて ReverTra Ace (Toyobo)

により逆転写反応を行った。合成された cDNA を鋳型として qPCR を行った。装置は Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用した。反応液は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo)、50X ROX reference dye、0.3 μ M forward and reverse primer で調製した。温度プログラムは 95°C 60 s \rightarrow { 95°C 15 s、52°C 15 s、72°C 60 s } \times 40 cycles \rightarrow Melting / Dissociation Curve Analysis { 95°C 15 s、60°C 60 s、95°C 15 s、60°C 15 s }とした。発現量は histone H2A 遺伝子の発現量を基準とし、各系統 3 検体の平均をコントロールのサンプルで補正して比較 Ct 法により算出した。使用したプライマーは以下の通りである。Histone (product size : 141bp) : (5'-CCGTTATCTGAAGAAAGGTCGCTAT-3') (forward) and (5'-ATCCTGTTCTTCTTGTTGTCTCGTG-3') (reverse)、anthocyanidin-3-O-glucoside acyltransferase (product size : 134bp) : (5'-CCCAGATTCAATTCATCTCTCCTCT-3') (forward) and (5'-GTCGTAGATCGATCGGAATCAAGAA-3') (reverse)。

第 2 章

[植物試料]

研究に用いたシソ属植物は、前章と同様に京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園で純系を維持している系統である。異種発現系に供した遺伝子をクローニングしたシソの系統番号と精油型は No.32, PA 型である。また、精油型間の遺伝子発現量比較には、No.87, C 型、No.1861, EK 型、No.4931, C 型、No.5031, SF 型、No.5073, PK 型、No.5601, PT 型、No.5640, SF 型、No.5647, PA 型、No.5712, PK 型を用いた。異種発現系に供した遺伝子が No.32 に特異的ではなく PA 型に特異的に発現していることを確かめるために用いた系統は No.9, PA 型である。

[実験材料]

研究に用いた試薬はすべて、特級あるいは分子生物学用グレード以上である。

[EST ライブラリーの構築]

シソ属植物の新鮮葉から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出し、かずさ DNA 研究所 (木更津) に委託して mRNA-Seq 手法により EST (expressed sequenced tag) ライブラリーを作製した。EST ライブラリーデータを解析し、各 contig の遺伝子発現量を RPKM (reads per kilobase of exon per million mapped reads) 値の指標をもとに比較した。

[ペリルアルデヒド生合成に関わるシトクロム P450 のクローニング]

シソ属植物由来の EST ライブラリーデータを解析し、PA 型にのみ特異的に高い RPKM 値を示す contig7307 を得た。Contig7307 の全長配列は RACE (randomly amplified cDNA ends) 法により決定した。TotalRNA は RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用いて No.32 のシソの新鮮葉から抽出した後、add 2 primer (5'-CCACGCGTCGACTACTTTTTTTTTTTTTTTT-3') を用いて RevTra Ace (Toyobo) により逆転写反応を行った。3'-RACE 法を利用した逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) は合成された cDNA を鋳型として行った。反応液は 0.025 U/ μ L B-Taq (Toyobo)、0.2 mM dNTPs、0.2 μ M primer amm (5'-GGCCACGCGTCGACTAC-3') and 0.2 μ M primer 7307-f (5'-ATGATGCTTCTACTACTACTGGATAG-3') で調製した。温度プログラムは 94°C 100 s \rightarrow { 94°C 30 s, 44°C 30 s, 72°C 90 s } \times 30 cycles \rightarrow 72°C 90 s とした。反応産物はアガロースゲル電気泳動により分離、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) を用いた精製の後、pTA2 ベクター (Toyobo) に挿入し配列を解析した。配列解析は FASMAC 株式会社に委託した。

[ペリルアルデヒド生成反応に関わるシトクロム P450 の酵母を用いたタンパク質発現]

発現用クローンは AH22 株に LiCl 法を用いて形質転換し、それぞれシングルコロニーから concentrated SD 培地中で 30°C、220 rpm にて約 20~24 時間振とう後、600 mL の大容量スケールに移植し、さらに 40~48 時間振とう培養した。菌体は、4°C、8,000×g、10 min の遠心分離により培地を除いた後、zymolyase buffer { 10 mM Tris buffer (pH 7.5)、2 M sorbitol、0.1 mM dithiothreitol、0.1 mM EDTA } で洗浄し、Sonication buffer { 10 mM Tris buffer (pH 7.5)、0.65 M sorbitol、0.1 mM dithiothreitol、0.1 mM EDTA } に再懸濁し一晩 -80°C にて静置した。その後菌体を常温で溶解しダウンス型ホモジナイザー (WHEATON) を用いて破碎し、4°C、12,000×g、20 min の遠心分離を行った。上清は 4°C、100,000×g、60 min の超遠心分離を行い (CP80NX, Hitachi)、沈殿物として得られたミクロソーム画分は、100 mM HEPES / NaOH (pH 7.5) に懸濁させ、使用時まで -80°C で保存した。ミクロソーム画分の総タンパク質濃度は、bovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質として Bradford 法 (Bio-rad) により測定した。酵素活性の有無の目安には CO 差スペクトル法 [53] を適用した。

[標品のペリルアルコールの精製]

市販のペリルアルコール (ALDRICH) をシリカゲルクロマトグラフィー (Wakogel® C-200) に付し、石油エーテル : エーテル = 9 : 1 の展開溶媒で分取した。分取した画分について固相マイクロ抽出法 (Solid Phase Microextraction : SPME) を用いて解析した。バイアル中に分取した試料を添加し、一定時間経過後、バイアルのヘッドスペースに揮散した揮発性物質は SPME ファイバー (100 µm Polydimethylsiloxane, Supelco) に吸着させた。SPME ファイバーを GCMS (6850GC/5975MSD, Agilent Tech) の注入口に挿入し、160°C に保たれた試料導入部で 10 分間化合物を離脱させ GC 部に導入した。分析条件は以下の通りである。

カラム : DB-WAX (60 m×0.25 mm, 0.25 µm film thickness, Agilent Tech)

カラム温度 : 50°C (5 min hold) → (Δ 5°C/min) → 200°C → (Δ 10°C/min) → 240°C (3 min hold)

注入口温度 : 160°C

キャリアガス : He (1.0 mL/min)

化合物の同定には、それぞれのイオンスペクトルと保持時間を標準物質及び MS データライブラリー (NIST11; National Institute of Standards and Technology) と照合することにより行った。

[トランス-シソオール合成]

標準品として市販されていないトランス-シソオールは以下の方法で合成した。市販の

perillaldehyde (7.50 g, 50.0 mmol) を THF (7.80 mL, 96.0 mmol)、Et₃SiH (11.8 mL, 75.0 mmol)、(Ph₃P)₃RhCl (0.150 g, 0.160 mmol) と窒素気流下で反応させた [75]。反応生成物 (4.30 g) は dihydroperillaldehyde のトランス体とシス体の 1 : 1 の混合物として得られた。得られた混合物のうち 0.600 g を、メタノール中炭酸カリウムを用いた異性化反応によりトランス体とした後、エタノール中 NaBH₄ を用いた還元反応によりトランス-シソオールを得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製後、最終的に 0.180 g の黄色いオイルとして純粋なトランス-シソオールを得た。

[ペリラルデヒド生合成に関わるシトクロム P450 の酵素反応]

酵素反応液は、100 mM HEPES/NaOH、1 mM NADPH、1 μM 基質、10~15 μL タンパク質抽出液を混合し、全量 250 μL とし、ポリテトラフルオロエチレンで表面が保護されたシリコンゴム蓋付きの 4 mL 容バイアルに調製した。反応液は 30°C で 30 分、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間それぞれ反応させ、反応終了後、SPME ファイバーをバイアルのヘッドスペース部に挿入し、酵素反応物を室温で 5 分間捕集した後、SPME ファイバーを GCMS の注入口に挿入し、160°C に保たれた試料導入部で 10 分間化合物を離脱させ GC 部に導入した。分析条件は、ペリラルコールの精製画分に用いたものと同一である。

第3章

[植物試料]

研究に用いた8種の生薬類 (batch number: 山奈; 567A、藿香; 591A、白檀; 2687D、甘松香 591C、丁子; 517A、桂皮; 7015、大茴香; 585B、龍腦; 09144206) は三星製薬株式会社から購入した。8種の生薬証拠標本 (EST-5009~5016) は京都大学大学院薬学研究科附属薬用植物園資料室に保管されている。

[実験材料]

研究に用いた試薬はすべて、特級以上である。

[実験動物]

動物実験は京都大学の動物実験倫理憲章に基づいて行った。4週齢オスの ddY マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ 、明暗周期 12 時間、餌と水を自由に摂取できる環境下で飼育した。行動観察実験は 10 時から 17 時の間に、上記と同じ温度、湿度下で行った。

[生薬の水蒸気蒸留]

龍腦を除く7種の生薬類は、各 100 g を日局 16 [3] の精油定量法に従い 2 時間蒸留を行いヘキサンに精油を捕集した。得られた精油は無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、実験に用いるまで -20°C で保存した。

[GC 及び GCMS による分析]

精油成分の定性分析に用いた装置は 6850GC/5975MSD (Agilent Technologies) である。測定条件は以下の通りである。

カラム: DB-WAX (60 m \times 0.25 mm, 0.25 μm film thickness, Agilent Tech)

カラム温度: 山奈: $60^\circ\text{C} \rightarrow (\Delta 3^\circ\text{C}/\text{min}) \rightarrow 240^\circ\text{C}$ (30 min hold)

山奈以外: $60^\circ\text{C} \rightarrow (\Delta 3^\circ\text{C}/\text{min}) \rightarrow 210^\circ\text{C}$ (30 min hold)

注入口温度: 100°C

キャリアガス: He (26 cm/min)

スプリット比: 100 : 1

注入量: 1 μL

イオン化電圧: 70 eV

精油成分の定量分析に用いた装置は G-5000 (Hitachi) である。測定条件は以下の通りである。

カラム : InertCap-Wax (60 m×0.25 mm, 0.25 μm film thickness, GL Sciences)
カラム温度 : 山奈 : 60°C → (Δ 3°C/min) → 240°C (30 min hold)
山奈以外 : 60°C → (Δ 3°C/min) → 210°C (30 min hold)
注入口温度 : 100°C
検出器温度 : 山奈 : 250°C、山奈以外 : 220°C
キャリアガス : He (0.8 mL/min)
スプリット比 : 100 : 1
注入量 : 1 μL

構成成分の保持指標は C10~C26 のアルカンを基準として算出した。化合物の同定には MS データライブラリー (NIST11 データベース、flavors データベース) と照合することにより行った。構成成分の相対濃度は TIC データより算出したピーク面積に基づいて計算した。

[自発運動抑制活性の評価]

自発運動抑制活性の評価はオープンフィールド法を用いて行った。得られた精油成分とヘキサンに溶解した龍脳溶解液は無臭溶媒であるトリエチルクエン酸 (MERCK) に溶解し、全量 400 μL になるように調製した。試料濃度はガラスケージ (縦 30 cm, 横 60 cm, 高さ 34 cm, 容積 0.065 m³) 内に存在する化合物量が 4×10^{-4} 、 4×10^{-3} 、 4×10^{-2} mg/cage となるように調製した。この試料をガラスケージ内にテープで固定した濾紙に滴下し、香気を 60 分間自然拡散させた。試料を滴下してから 1 時間後にマウスをガラスケージ内に投入し、その後 60 分間の行動をビデオカメラで撮影・観察した。ガラスケージ底面に 10 cm 間隔で縦横に引かれた線をマウスが横切る回数を計測し、5 分毎のカウントを y 軸に、時間を x 軸にプロットし、このカーブと x 軸、y 軸で囲まれた面積を総自発運動量 (area under curve : AUC) (平均±SEM) として算出した。統計解析は GraphPad InStat3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、Dunnett's test [76] により行った。統計学的に有意水準 $p < 0.05$ の場合、有意差のあるものとして取り扱い、ネガティブコントロール群に対する有意差を * $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ で示した。また、統計解析に用いた 5 匹のマウスは無作為に選んだ。

[混合した精油を用いた自発運動抑制活性の評価]

8 つの精油すべてを混合した試料は、8 つの精油すべて 4×10^{-3} mg/cage を用いたものと 8 つの精油すべて 4×10^{-4} mg/cage を用いたものを使用した。活性がみられた 5 つの精油を混合した試料は、それぞれの精油の単独投与で活性が最も強かった濃度 (galangal : 4×10^{-4} mg/cage、patchouli : 4×10^{-3} mg/cage、sandalwood : 4×10^{-4} mg/cage、spikenard : 4×10^{-3} mg/cage、crystal of borneol : 4×10^{-3} mg/cage) を混合し調整した。オープンフ

フィールド法は単独の精油と同一の方法により行った。統計解析は GraphPad InStat3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、Student's *t*-test [77] により行った。統計学的に有意水準 $p < 0.05$ の場合、有意差のあるものとして取り扱った。活性がみられた 5 つの精油の混合試料に、活性がみられなかった精油を添加した試料は、それぞれの単独投与で最も活性が強かった濃度 (galangal : 4×10^{-4} mg/cage、patchouli : 4×10^{-3} mg/cage、sandalwood : 4×10^{-4} mg/cage、spikenard : 4×10^{-3} mg/cage、crystal of borneol : 4×10^{-3} mg/cage、cinnamon : 4×10^{-3} mg/cage、clove : 4×10^{-4} mg/cage、star anise : 4×10^{-3} mg/cage) を用いることにより調製した。オープンフィールド法は単独の精油と同一の方法により行った。統計解析は GraphPad InStat3 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用い、Student's *t*-test により行った。統計学的に有意水準 $p < 0.05$ の場合、有意差のあるものとして取り扱った。5 つの精油を混合した試料に対する有意差を * $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ で示した。

発 表 論 文 目 録

1. Synergistic effect of fragrant herbs in Japanese scent sachets.

Yumi Fujiwara, Michiho Ito

Planta Medica, 81, 193-199 (2015)

2. Molecular cloning and characterization of a *Perilla frutescens* cytochrome P450 enzyme that catalyzes the later steps of perillaldehyde biosynthesis.

Yumi Fujiwara, Michiho Ito

Phytochemistry, 134, 26-37 (2017)

3. Anthocyanins in perilla plants and dried leaves.

Yumi Fujiwara, Miya Kono, Airi Ito, Michiho Ito

Phytochemistry, 147, 158-166 (2018)

引用文献

- [1] 日本漢方生薬製剤協会「漢方薬処方実態調査」
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/jittaichousa2011.pdf>
- [2] 日本漢方生薬製剤協会「原料生薬使用量等調査」
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/shiyouyou-chousa.pdf>
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/shiyouyou-chousa02.pdf>
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/shiyouyou-chousa03.pdf>
<http://www.nikkankyo.org/aboutus/investigation/pdf/shiyouyou-chousa04.pdf>
- [3] 厚生労働省, 第 16 改正日本薬局方
- [4] 厚生労働省, 第 17 改正日本薬局方
- [5] 厚生労働省, 第 14 改正日本薬局方
- [6] 厚生労働省, 第 15 改正日本薬局方
- [7] 新註校定 国譯本草綱目. 春陽堂 pp. 634–641
- [8] Kuroda C, Wada M. Coloring matter of shiso. *Proc Imp Acad.* 11, 28–31 (1935).
- [9] Takeda K, Hayashi K. Anthocyanins. XLIII. Oxidative degradation of acylated anthocyanins showing the presence of organic acid-sugar linkage in the 3-position of anthocyanidins; experiments on ensatin, awobanin, and shisonin. *Proc Jap Acad.* 40, 510–515 (1964).
- [10] Watanabe S, Sakamura S, Obata Y. Structure of acylated anthocyanins in eggplant and perilla; and the position of acylation. *Agric Biol Chem.* 30, 420–422 (1966).
- [11] Goto T, Takase S, Kondo T. PMR spectra of natural acylated anthocyanins determination of stereostructure of awobanin, shisonin and violanin. *Tetrahedron Lett.* 27, 2413–2416 (1978).

- [12] Kondo T, Tamura H, Yoshida K, Goto T. Structure of malonylshisonin, a genuine pigment in purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* Benth. *Agric Biol Chem.* 53, 797–800 (1989).
- [13] Yoshida K, Kondo T, Kameda K, Goto T. Structure of anthocyanins isolated from purple leaves of *Perilla ocimoides* L. var. *crispa* Benth and their isomerization by irradiation of light. *Agric Biol Chem.* 54, 1745–1751 (1990).
- [14] Yamazaki M, Nakajima J, Yamanashi M, Sugiyama M, Makita Y, Springob K, Awazuhara M, Saito K. Metabolomics and differential gene expression in anthocyanin chemo-varietal forms of *Perilla frutescens*. *Phytochemistry.* 62, 987–995 (2003).
- [15] He Y, Yao Y, Chang Y. Characterization of anthocyanins in *Perilla frutescens* var. *acuta* extract by advanced UPLC-ESI-IT-TOF-MSn method and their anticancer bioactivity. *Molecules.* 20, 9155–9169 (2015).
- [16] Honda G, Ito M. Phylogenetic relationship of Japanese perilla. In: Ageta H, Aimi N, Ebizuka Y, Fujita T, Honda G. (eds.). *Towards Natural Medicine Research in the 21st Century.* Elsevier Science B. V. Amsterdam. pp. 39–49 (1998).
- [17] Ito M, Honda G, Geraniol synthases from perilla and their taxonomical significance. *Phytochemistry.* 68, 446–453 (2007).
- [18] Yokoi M, Saito N, Kawabata Y, Suzuki S, Hirabayashi H. Relation of quantitative flower color measurement to the flower color in rose cultivars. *Chiba Daigaku Engeigakubu Gakujutsu Hokoku.* 26, 1–8 (1979).
- [19] Charron CS, Clevidence BA, Britz SJ, Novotny JA. Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *J Agric Food Chem.* 55, 5354–5362 (2007).
- [20] He F, Mu L, Yan GL, Liang NN, Pan QH, Wang J, Reeves MJ, Duan CQ. Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules.* 15, 9057–9091 (2010).

- [21] Hosokawa K, Fukunaga Y, Fukushi E, Kawabata J. Acylated anthocyanins from red *Hyacinthus orientalis*. *Phytochemistry*. 39, 1437–1441 (1995).
- [22] Ito M, Toyoda M, Kamakura S, Honda G. A new type of essential oil from *Perilla frutescens* from Thailand. *J Essent Oil Res*. 14, 416–419 (2002).
- [23] Koezuka Y, Honda G, Tabata M. Genetic control of the chemical composition of volatile oils in *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*. 25, 859–863 (1986).
- [24] Honda G, Genetic control of essential oil components in *Perilla*. *FFI J*. 169, 9–15 (1996).
- [25] Masumoto N, Korin M, Ito M. Geraniol and linalool synthases from wild species of perilla. *Phytochemistry*. 71, 1068–1075 (2010).
- [26] Koezuka Y, Honda G, Sakamoto Y, Tabata M. Genetic control of anthocyanin production in *Perilla frutescens*. *Syoyakugaku Zasshi*. 39, 228–231 (1985).
- [27] Honda G, Koezuka Y, Tabata, M. Genetic studies of fruits color and hardness in *Perilla frutescens*. *Jap J Breed*. 40, 469–474 (1990).
- [28] Ito M, Toyoda M, Honda G. Chemical composition of the essential oil of *Perilla frutescens*. *Nat Med*. 53, 32–36 (1999).
- [29] Ito M, Toyoda M, Honda G. Essential oil composition of hybrids and amphidiploids of Japanese wild perilla. *Nat Med*. 53, 118–122 (1999).
- [30] Kamsteeg J, Van B J, Hommels CH, Van NG. Identification properties and genetic control of hydroxycinnamoyl-coenzyme A:anthocyanidin 3-rhamnosyl (1 →6) glucoside 4"-hydroxycinnamoyltransferase isolated from petals of *Silene dioica*. *Biochem Physiol Pflanz*. 175, 403–411 (1980).
- [31] Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Nakao M, Ashikari T, Kusumi T. Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase from *Gentiana triflora* purification characterization and its role in anthocyanin biosynthesis. *European J Biochem*. 249, 45–51 (1997).

- [32] Yamaguchi M, Oshida N, Nakayama M, Koshioka M, Yamaguchi Y, Ino I. Anthocyanidin 3-glucoside malonyltransferase from *Dahlia variabilis*. *Phytochemistry*. 52, 15–18 (1999).
- [33] Fujiwara H, Tanaka Y, Fukui Y, Ashikari T, Yamaguchi M, Kusumi T. Purification and characterization of anthocyanin 3-aromatic acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Sci*. 137, 87–94 (1998).
- [34] Yamazaki M, Makita Y, Springob K, Saito K. Regulatory mechanisms for anthocyanin biosynthesis in chemotypes of *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Biochem Eng J*. 14, 191–197 (2003).
- [35] Saito K, Yamazaki M. Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perilla frutescens* as a model plant. *New Phytol*. 155, 9–23 (2002).
- [36] Nishimura T, Ohyama K, Goto E, Inagaki N. Concentrations of perillaldehyde, limonene, and anthocyanin of *Perilla* plants as affected by light quality under controlled environments. *Sci Hortic*. 122, 134–137 (2009).
- [37] Nishimura T, Ohyama K, Inagaki N, Morota T, Goto E. Ultraviolet-B radiation suppressed the growth and anthocyanin production of *Perilla* plants grown under controlled environments with artificial light. *Acta Hortic*. 797, 425–429 (2008).
- [38] Gong Z, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K. Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in *Perilla frutescens*. *Plant Mol Biol*. 35, 915–927 (1997).
- [39] Kamsteeg J, Van B J, Van N G. Identification and properties of UDP-glucose: cyanidin-3-*O*-glucosyltransferase isolated from petals of the red campion (*Silene dioica*). *Biochem Genet*. 16, 1045–1058 (1978).

- [40] Ogata J, Teramoto S, Yoshitama K. Isolation and characterization of UDP-glucose: cyanidin 3-*O*-glucosyltransferase from the flower buds of *Senecio hybridus*. *J Plant Res.* 111, 213-216 (1998).
- [41] Kamsteeg J, Van BJ, Van NG. Identification properties and genetic control of UDP-glucose:cyanidin-3-rhamnosyl-(1→6)-glucoside-5-*O*-glucosyltransferase isolated from petals of the red campion (*Silene dioica*). *Biochem Genet.* 16, 1059–1071 (1978).
- [42] Jonsson LMV, Aarsman MEG, Van DJ, De VP, Smit N, Schram AW. Properties and genetic control of anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrid*. *Planta* 160, 341–347 (1984).
- [43] Yamazaki M, Gong, Z, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Tanaka Y, Kusumi T, Saito K. Molecular cloning and biochemical characterization of a novel anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase by mRNA differential display for plant forms regarding anthocyanin. *J Biol Chem.* 274, 7405–7411 (1999).
- [44] Janvary L, Hoffmann T, Pfeiffer J, Hausmann L, Topfer R, Fischer TC, Schwab W. A double mutation in the anthocyanin 5-*O*-glucosyltransferase gene disrupts enzymatic activity in *Vitis vinifera* L. *J Agric Food Chem.* 57, 3512–3518 (2009).
- [45] Yonekura-Sakakibara K, Tanaka Y, Fukuchi-Mizutani M, Fujiwara H, Fukui Y, Ashikari T, Murakami Y, Yamaguchi M, Kusumi T. Molecular and biochemical characterization of a novel hydroxycinnamoyl-CoA: anthocyanin 3-*O*-glucoside-6"-*O*-acyltransferase from *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.* 41, 495–502 (2000).
- [46] <http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.htm>
- [47] Kitada C, Gong Z, Tanaka Y, Yamazaki M, Saito K. Differential expression of two cytochrome P450s involved in the biosynthesis of flavones and anthocyanins in chemo-variatal forms of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Physiol.* 42, 1338–1344 (2001).

- [48] Mau CJ, Karp F, Ito M, Honda G, Croteau R. A candidate cDNA clone for (-)-limonene-7-hydroxylase from *Perilla frutescens*. *Phytochemistry*. 71, 373–379 (2010).
- [49] Sato-Masumoto N, Ito M. Isolation and characterization of isopiperitenol dehydrogenase from piperitenone-type perilla. *Biol Pharm Bull*. 37, 847–852 (2014).
- [50] Estabrook RW, Hildebrandt AG, Baron J, Netter KJ, Leibman K. New spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*. 42, 132–139 (1971).
- [51] Sakaki T, Akiyoshi-Shibata M, Yabusaki Y, Ohkawa H. Organella-targeted expression of rat liver cytochrome P450c27 in yeast. *J Biol Chem*. 267, 16497–16502 (1992).
- [52] Omura T, Ishimura Y, Fujii-Kuriyama Y, eds. *Cytochrome P-450*. 2nd ed. Kodansha. pp. 1–15 (1993).
- [53] Omura T, Sato R. New cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem*. 237, 1375–1376 (1962).
- [54] Paul R, Ortiz M. *Cytochrome P450: Structure Mechanism and Biochemistry*. 3rd ed. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. pp. 564–566 (2005).
- [55] Siminszky B, Corbin FT, Ward ER, Fleischmann TJ, Dewey RE. Expression of a soybean cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1750–1755 (1999).
- [56] Yamaguchi T, Noge K, Asano Y. Cytochrome P450 CYP71AT96 catalyses the final step of herbivore-induced phenylacetonitrile biosynthesis in the giant knotweed *Fallopia sachalinensis*. *Plant Mol Biol*. 91, 229–239 (2016).
- [57] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01046929>

- [58] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003238>
- [59] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00003769>
- [60] Elegbede JA, Flores R, Wang RC. Perillyl alcohol and perillaldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. *Life Sci.* 73, 2831–2840 (2003).
- [61] Buchbauer G, Jirovetz L, Jaeger W, Plank C, Dietrich H. Fragrance compounds and essential oils with sedative effects upon inhalation. *J Pharm Sci.* 82, 660–664 (1993).
- [62] Takemoto H, Ito M, Shiraki T, Yagura T, Honda G. Sedative effects of vapor inhalation of agarwood oil and spikenard extract and identification of their active components. *J Nat Med.* 62, 41–46 (2008).
- [63] Takemoto H, Yagura T, Ito M. Evaluation of volatile components from spikenard: valerena-4, 7 (11)-diene is a highly active sedative compound. *J Nat Med.* 63, 380–385 (2009).
- [64] Ito K, Ito M. Sedative effects of vapor inhalation of the essential oil of *Microtoena patchoulii* and its related compounds. *J Nat Med.* 65, 336–343 (2011).
- [65] Miyoshi T, Ito M, Kitayama T, Isomori S, Yamashita F. Sedative effects of inhaled benzylacetone and structural features contributing to its activity. *Biol Pharm Bull.* 36, 1474–1481 (2013).
- [66] Ogawa K, Miyoshi T, Kitayama T, Ito M. Locomotor-reducing effects and structural characteristics of inhaled zerumbone and tetrahydrozerumbone derivatives. *Biol Pharm Bull.* 37, 1559–1563 (2014).
- [67] Cioanca O, Hritcu L, Mihasan M, Trifan A, Hancianu M. Inhalation of coriander volatile oil increased anxiolytic-antidepressant-like behaviors and decreased oxidative status in beta-amyloid (1-42) rat model of Alzheimer's disease. *Physiol Behav.* 131, 68–74 (2014).

- [68] Lim WC, Seo JM, Lee CI, Pyo HB, Lee BC. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice. *Arch Pharm Res.* 28, 770–774 (2005).
- [69] Honda G, Koezuka Y, Kamisako W, Tabata M. Isolation of sedative principles from *Perilla frutescens*. *Chem Pharm Bull.* 34, 1672–1677 (1986).
- [70] Kovar KA, Gropper B, Friess D, Ammon HPT. Blood levels of 1,8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of rosemary oil. *Planta Med.* 53, 315–318 (1987).
- [71] Chioca LR, Ferro MM, Baretta IP, Oliveira SM, Silva CR, Ferreira J, Losso EM, Andreatini R. Anxiolytic-like effect of lavender essential oil inhalation in mice: participation of serotonergic but not GABA_A/benzodiazepine neurotransmission. *J Ethnopharmacol.* 147, 412–418 (2013).
- [72] Koo BS, Park KS, Ha JH, Park JH, Lim JC, Lee DU. Inhibitory effects of the fragrance inhalation of essential oil from *Acorus gramineus* on central nervous system. *Biol Pharm Bull.* 26, 978–982 (2003).
- [73] Elisabetsky E, Marschner J, Souza DO. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. *Neurochem Res.* 20, 461–465 (1995).
- [74] <http://www.thegoodscentcompany.com/>
- [75] Fronza G, Fuganti C, Pinciroli M, Serra S. Stereochemical aspects of the bioreduction of the conjugated double bond of perillaldehyde. *Tetrahedron Asymmetry.* 15, 3073–3077 (2004).
- [76] Charles WD. A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc.* 50, 1096–1121 (1955).
- [77] Student. The probable error of a mean. *Bioetrika.* 6, 1–25 (1908).

謝 辞

本研究を行うに際し、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院 薬学研究科 伊藤 美千穂 准教授に謹んで感謝の意を表します。

本学位論文の作成および提出にあたり、主査として有益な御助言、御指導を戴きました京都大学大学院 薬学研究科 高倉 喜信 教授に心からの謝意を表します。

本研究を実施するにあたり、酵母菌株 AH22 株および酵母内発現ベクター pGYR を御供与いただきました富山県立大学 工学部 榎 利之 教授、酵母発現系実験手技を御指導くださいました京都大学大学院 生命科学研究科 佐藤 文彦 教授、堀 健太郎 博士、トランス-シソオール合成について御指導くださいました徳島大学 薬学部 山田 健一 教授（元 京都大学大学院 薬学研究科 准教授）、実験用植物の栽培にご協力をいただきました京都大学大学院 薬学研究科附属薬用植物園 木田 定美 様、小林 よしみ 様に深謝いたします。

金城学院大学薬学部在職中におきまして、懇切丁寧な御指導、御助言および御協力を賜りました金城学院大学 薬学部 永津 明人 教授に心より感謝を申し上げます。

学部生の際に博士課程への進学および実験の基礎について御指導と御支援を賜りました神戸学院大学 薬学部 赤穂 榮一 名誉教授、神谷 浩平 講師に謹んで深謝いたします。

また、終始温かく励ましてくださいました京都大学大学院 薬学研究科 薬品資源学分野のみなさま、とくに河野 雅 修士、伊藤 愛理 修士に心より御礼申し上げます。

最後に、研究に専念できる環境を与えてくださり、いつも変わらず支え続けてくれた両親に、心より感謝いたします。