

氏 名	魚 森 温 子 うお もり あつ こ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	論 薬 博 第 146 号
学位授与の日付	昭 和 50 年 7 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	高等植物のカルス培養細胞によるイソプレノイドの生成と生合成研究

論文調査委員 (主 査) 教授 井上博之 教授 藤田栄一 教授 木島正夫

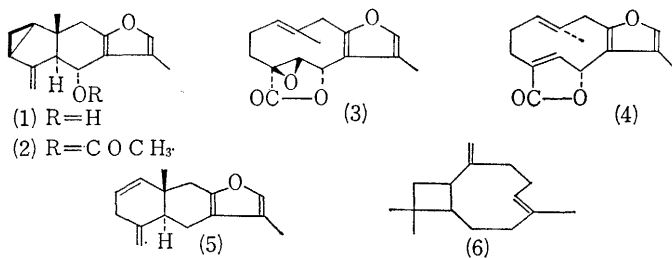
論 文 内 容 の 要 旨

植物のカルス培養細胞は、母植物に含まれる複雑な二次代謝産物の生成能を保持していることが、最近明らかにされてきている。その上、これらのカルス細胞は、母植物に存在する組織間の相互作用を除いた単純な系として、一定の条件下で取り扱いうるという、利点を持っており、二次代謝産物の生合成研究を行うのに適している。

著者は、有用な成分を含有する高等植物からカルスを誘導しその成分組成の特異性を明らかにした。更に、これらのカルス細胞を用いて生合成研究を行い、phytosterol の C-24 側鎖の生合成機構および steroidal sapogenin の生合成経路を明らかにした。

I 天台烏薬 *Lindera strychnifolia* VIEL, オニドコロ *Dioscorea tokoro* MAKINO, *Solanum aviculare* FORST, ミシマサイコ *Bupleurum falcatum* LINNE のカルス誘導と成分

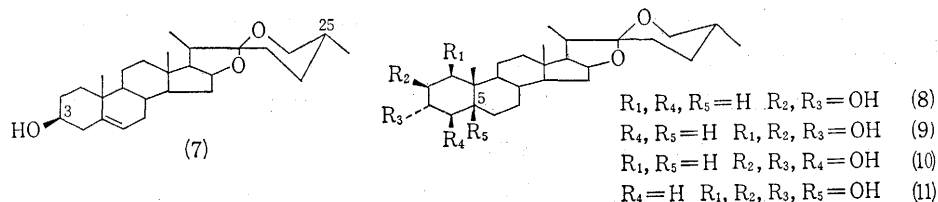
- 1) 漢薬として知られている天台烏薬の若い茎から誘導したカルスは、lindenol (1), acetylindenol (2), linderane (3), linderolactone (4), lindestrene (5), caryophyllene (6) など母植物に含まれるほとんどすべての sesquiterpene を含んでいるが、その成分組成は、母植物のそれとは全く異なることを明らかにした。更に GLC により β -sitosterol, campesterol, stigmasterol の存在を確認した。



- 2) オニドコロの実生から誘導したカルスは、diosgenin (7), yonogenin (8), tokorogenin (9) を生成し、

その主成分は tokorogenin (9) であったが、母植物の実生の主成分である isodiotigenin (10) および微量成分の kogagenin (11) を全く含有せずその成分組成は、むしろ種子に近いものであった。

この結果は、母植物中では起っている C-4, C-5 の酵素的 hydroxylation が、カルスでは阻害されていることを示すものである。



著者らは更にカルスから prototokoronin (12) を単離して、その構造を決定するとともに、diosgenin (7), yonogenin (8) もカルス中ではほとんどすべて furostanolglucoside として存在していることを明らかにした。

また, cholesterol, β -sitosterol, campesterol, stigmasterol のほかに cycloartenol, cycloartanol, 24-methylene cycloartanol などの triterpene および 3 種の mono, di-methyl(9,19)cyclosterol の存在を GLC-MS により確認した。これをもとにして cycloartenol から cholesterol に至る生合成経路を推定した。

- 3) *Solanum aviculare* FORST の実生から誘導したカルスには, cholesterol, β -sitosterol, campesterol, stigmasterol が含まれていたが steroidal alkaloid は全く認められなかった。
- 4) ミシマサイコの葉および茎から誘導したカルスには, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol, α -spinasterol, Δ^7 -stigmasterol, cholesterol, cycloartenol, cycloartanol, 24-methylene cycloartanol のほか, Δ^7 -campesterol と推定される化合物が含まれていることを確認した。

カルスを光照射下培養すると、紫色カルスと緑色カルス (chlorophyll による) が得られ、紫の色素は malvidin を aglycon とする anthocyan であった。また phytosterol の成分組成は培養中の光の有無により影響されぬことを確認した。

これらのカルスは, saikosaponin を生成しないが, auxin 濃度を漸次低下させつつカルスを懸濁培養することにより得られる原基 (primordium) および根を主とする再分化個体は, saikosaponin を生成することを明らかにした。

II phytosterol の C-24 alkyl group の生合成機構

1) 緑藻 chlorella における C-24 alkylation の機構

$[CD_3-]$ -methionine の存在下で培養した chlorella vulgaris より得られる chondrillasterol, Δ^7 -chondrillasterol, Δ^7 -ergosterol は, それぞれ側鎖に 5 個, 5 個, 3 個の deuterium 原子を有し, 同様に chlorella ellipsoidea より得られる poriferasterol は 5 個, Δ^5 -ergosterol は 3 個の deuterium 原子を有していた。

このことは, C-24 methylsterol が cycloartenol から C-24 methylene 中間体を經ずに生合成されることを示しており, これは活性化されていない二重結合への methionine からの transmethyla-

tion において, methylene 中間体を経ずに CH_3 基が導入される経路の存在することを証明した最初の例である。

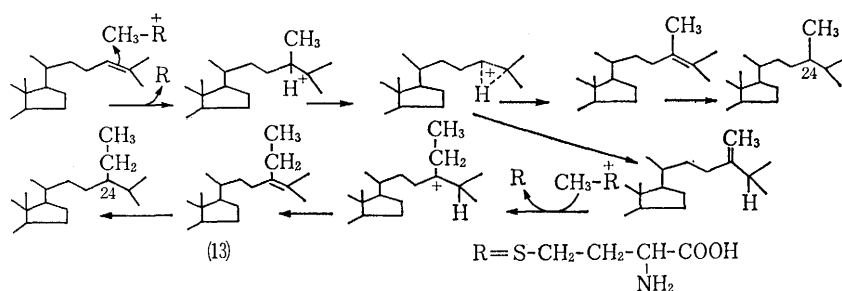
また C-24 ethylsterol についても C-24 ethylidene 体を経ずに生合成される経路のあることを明らかにした。

2) タバコ *Nicotiana tabacum* Wisconsin 38 のカルス および オニドコロ *Dioscorea tokoro* MAKINO のカルスにおける stigmasterol の C-24 ethyl 基の生合成機構

タバコのカルスを, $3\text{R}-[2-^{14}\text{C}, (4\text{R})-4^3\text{H}_1]\text{mevalonic acid}$ と共に培養し, cycloartenol, 24-methylene cycloartanol および stigmasterol を単離した。

これらの化合物とその分解生成物の $3\text{H}/^{14}\text{C}$ の値から stigmasterol の C-24 ethyl 基が Δ^{24-25} 中間体(13)を経て生合成されることを明らかにした。

更に, $[24-^3\text{H}_1]\text{-cycloartenol}$ をオニドコロのカルスにとりこませると, stigmasterol では C-24 の ^3H が失われ, sapogenin では $^3\text{H}_1$ が保持されていることから, Δ^{24-25} 中間体(13)を経る経路の存在を確認した。



III オニドコロ *Dioscorea tokoro* MAKINO のカルス培養細胞による saponin および sapogenin の生合成

1) C-1, C-7, C-15 hydrogen elimination の立体化学

$3\text{R}-[2-^{14}\text{C}, (2\text{R})-2^3\text{H}_1]\text{mevalonic acid}$ および $3\text{R}-[2-^{14}\text{C}, (2\text{S})-2^3\text{H}_1]\text{-mevalonic acid}$ をそれぞれ別個に加えた培地中でオニドコロカルスを培養し, diosgenin (7), yonogenin (8), tokorogenin (9) を単離し, その分解反応と $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ の値から sapogenin 中の tritium 原子の位置を決定した。その結果, 次のことが明らかになった。i) 植物酵素による C-1 の水酸化は基質の配位を保持して起る。ii) 水酸基の多い sapogenin から少い方の sapogenin が生合成されるという Marker 説は, 少なくともカルスでは成立しない。iii) cycloartenol が Δ^7 -intermediate になるときに $7\beta-^3\text{H}_1$ は失われる。iv) cycloartenol の 14α -methyl 基の酸化脱離に伴って, $15\alpha-^3\text{H}_1$ が失われる。

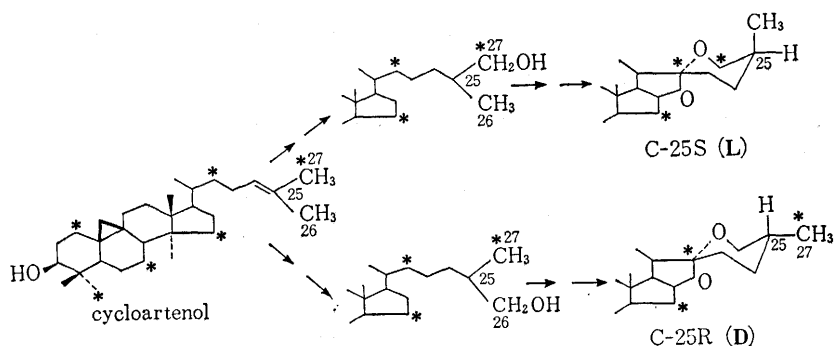
2) cycloartenol および hydroxycholesterol 誘導体の役割

$[24-^3\text{H}_1]\text{-cycloartenol}$, $[4-^{14}\text{C}]\text{cholesterol}$ (市販), $[16\alpha-^3\text{H}_1]\text{-diosgenin}$, $[16\alpha-^3\text{H}_1]\text{yonogenin}$, $25\text{R}-[26-^3\text{H}_1]\text{-26 hydroxycholesterol}$, $25\text{R}-[26-^3\text{H}_1]\text{-16}\beta\text{-hydroxycholesterol}$, $25\text{R}-[26-^3\text{H}_1]\text{-16}\beta\text{-26-dihydroxycholesterol}$, $25\text{R}-[22-^3\text{H}_1, 26-^3\text{H}_1]\text{-22, 26-dihydroxycholesterol}$, および $25\text{R}-[16\alpha-^3\text{H}_1, 26-^3\text{H}_1]\text{16}\beta\text{-22, 26-trihydroxycholesterol}$ を合成し, diosgenin (7), yonogenin (8), tokorogenin (9) へのとりこみ実験をおこなった結果から, 次のように生合成経路を推定した。即ち, mevalonic

acid $\rightarrow$ squalene 2,3-epoxide $\rightarrow$ cycloartenol $\rightarrow$ cholesterol $\rightarrow$ (25R)-26-hydroxycholesterol $\rightarrow$ (25R)-16 β , 26-dihydroxycholesterol $\rightarrow$ (25R)-16 β , 22, 26-trihydroxycholesterol $\rightarrow$ diosgenin $\rightarrow$ yonogenin $\rightarrow$ tokorogenin

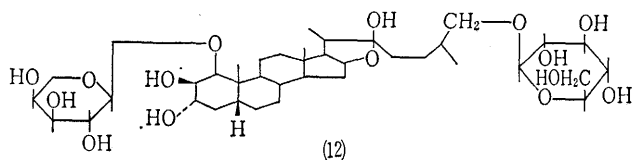
3) sapogenin の C-25R, S 異性体の生成機構の解明

[2- 14 C]mevalonic acid を用いたとりこみ実験の結果から, sapogenin の C-25R(C-25D) および S (C-25L) 異性体は cholesterol の最初の hydroxylation の段階で決定される。即ち, R-series (D) では cycloartenol の C-25 cis に相当する methyl 基が, また S-series (L) では, C-25 trans に相当する methyl 基がそれぞれ hydroxylation をうけることを明らかにした。



4) saponin と sapogenin の生合成的相互関係

カルスにおいて, [16 α - 3 H] α -diogenin が protodioscin fraction および prototokoronin (12) に, また, [16 α - 3 H] α -yonogenin が prototokoronin (12) に, それぞれ収率よくとりこまれることから furostanol type と spirostanol type とは in-vivo で可逆的な関係にあることを証明した。更に 1)~4) の結果をもとにオニドコロカルスにおける saponin の生合成経路を推定した。



論文審査の結果の要旨

本研究は最近種々の観点から注目を集めているカルス培養組織を用いて種々の植物につきステロイド系二次代謝産物の生合成研究を行なった点に特徴を有する。

著者はまず天台烏薬, オニドコロ, *Solanum aviculare*, ミシマサイコからのカルスの誘導を行ない, 各カルスのステロイド系物質を中心とする代謝産物の同定をおこなった。特にオニドコロカルスについては cycloartenol から cholesterol への生合成経路を推定した。

次にカルスとの対照としてえらんだ *Chlorella* のステロイドにつき CD $_3$ -methionine 投与実験を行ない Cycloartenol から C-24-methylene 中間体を經由せずに C-24-methylsterol が生成することを証明した。またタバコカルスに二重標識 MVA を, オニドコロカルスに [24- 3 H]-cycloartenol を投与し生成する

stigmasterol, saponin について検討した結果、これらの生成にあたっては $\Delta^{24(25)}$ 中間体を經由していることを明らかにした。

さらにオニドコロカルスに二重標識 MVA を投与後その sapogenin をとり出し分解反応を行なった結果 sapogenin の生成に際し C-1 β , C-7 β , C-15 α の H 原子が失なわれることを認めた。また同じくオニドコロカルスに標識 cycloartenol, cholesterol, その他の sterol 類を投与し, diosgenin, yonogenin, tokiogenin などの sapogenin への取り込みを調べ cycloartenol 以後のこれら sapogenin への生合成ルートを明らかにした。また同じカルスに 2-14C-MVA を投与後得られる sapogenin の分解反応の結果から sapogenin の C-25 異性体の生成機構を明らかにした。またカルスにおいて標識 diosgenin と標識 yonogenin が各々収率よく saponin にとりこまれる事実から furostanol type と spirostanol type とは *in vivo* で可逆的な関係にあることを証明した。

以上のように本論文は steroid 系二次代謝産物の詳細な生合成過程の解明に寄与するところが極めて大きい。

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。