

学 位 論 文 題 名

*Calypogeia* 属培養細胞における  
セスキテルペノイドの生産機能に関する研究

学位論文内容の要旨

植物の二次代謝産物は多様な化合物群を形成し、また種々の生理活性を示すが、その中には医薬をはじめ、化粧品、染料などの原材料として産業上の有益性の高いものも多い。その生産は起源となる植物の栽培だけでなく、野生植物の採集にも多くを依存している。植物培養細胞を用いた有用二次代謝化合物の生産技術は管理された環境における安定的な生産技術として重要であり、また非収奪的な生産技術として自然環境保全の考え方からも重要である。

植物の培養細胞による有用二次代謝化合物の生産に関する検討は、主としてその生産性の向上を図ることを目的とし、培養条件の検討、生合成系の生化学的検討、あるいは培養装置の開発など多分野にわたっている。しかしながらその産業的实施例は一、二にとどまっており、植物培養細胞の詳細な代謝生理、特に二次代謝系の制御機構の解明を基盤とした汎用的な技術の確立には至っていない。また、検討の対象とされてきた植物は維管束植物が中心であり、多様な精油成分を含有するコケ植物に関する知見は未だ限定的である。

著者は、植物の二次代謝化合物の中でも主要な化合物群を形成するセスキテルペノイドを精油成分として含有する茎葉体苔類 *Calypogeia* 属植物を用いて、その種間におけるセスキテルペノイドの天然物化学的特徴、カルス培養系ならびに懸濁培養系の確立、二次代謝化合物の検索と新規セスキテルペノイドの単離精製ならびに構造解析、単離したセスキテルペノイドの薬理作用、そしてそれらセスキテルペノイドの生合成促進機構ならびに生合成酵素の酵素学的特徴について検討を行なった。

1. *Calypogeia* 属植物の天然物化学的特徴

5種の *Calypogeia* 属植物において同じ経路によって生合成されていると考えられるセスキテルペノイドについて、その含有比を比較すると、種間において明確に差異が認められることを明らかにし、セスキテルペノイドの生合成の各段階における制御機構が存在することを示唆した。

2. *Calypogeia* 属植物のカルス誘導と懸濁培養の確立

2種の *Calypogeia* 属植物、ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) および *Calypogeia peruviana* のカルス形成および懸濁培養系の誘導、ならびに再分化条件の検討を行ない、植物成長調節剤を用いない培養条件で、発達した葉緑体を有するカルス形成または再分化が誘導されるこ

とを見だし、培地中のグルコース濃度のみが培養細胞の分化、脱分化の制御に関与していることを明らかにした。

### 3. ホラゴケモドキの生産する新規アズレン類の単離と構造

培養したホラゴケモドキから新たに2種のセスキテルペノイドを見だし、単離精製を行ない、次いで種々の分光学的分析法によってその化学構造を解析した。有機溶媒による抽出物よりフラッシュカラムクロマトグラフィーによって単離精製した2種の赤紫色化合物についてプロトン-および炭素-13-核磁気共鳴スペクトル、高分解能質量スペクトル、赤外線吸収スペクトル、紫外線-可視光線吸収スペクトル等を測定し、その解析により化学構造が4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒドならびに4-メチルアズレン-1-カルボン酸であると決定し、これらのアズレン類が新規化合物であることを明らかにした。また、合成実験によっても構造の確認を行なった。

### 4. *Calypogeia* 属培養細胞より単離したアズレン類の特性と薬理作用

ホラゴケモドキ培養細胞より単離した上記のアズレン類について、安全性ならびに薬理作用について検討した。変異原性、急性毒性および皮膚一次刺激性試験は、医薬、化粧品原料としての基本的な安全性を検定するものであることからその検討を行ない、いずれも高い安全性を有することを明らかにした。また、抗炎症、抗潰瘍作用の検定を行ない、抗炎症剤として市販されているグアイアズレンスルホン酸塩と比較してこれらのアズレン類が有意に高い生理活性を示すことを明らかにした。さらに、紫外光に対する安定性、水に対する溶解性は、グアイアズレンスルホン酸塩と比較していずれも高いことを明らかにした。

### 5. *Calypogeia* 属における二次代謝化合物の生合成

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞におけるセスキテルペノイド生合成ならびに活性酸素分解系酵素群に対するエリシターの効果について検討した。エリシターとして酵母細胞壁成分あるいはバナジウム化合物をミドリホラゴケモドキ培養細胞に投与することによって細胞成分であるセスキテルペノイドの生産が高まることを示した。また五酸化バナジウムの投与によってその生合成酵素 (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素) の活性が高まることを示し、同時に細胞内の還元型グルタチオン含量が急速に増加し、スーパーオキシドディスムターゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素の活性も高まることを明らかにした。また、この時、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素、アスコルベートフリーラジカル還元酵素、デヒドロアスコルベート還元酵素、カタラーゼ活性ならびにアスコルビン酸含量は影響を受けなかったことから、エリシターによって生成した活性酸素は、主としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびグルタチオンによって分解されることが示唆された。さらに、この培養細胞に過酸化水素を直接添加することによって、酸化的ストレスを与えたときにもセスキテルペノイドの生産が高まった。このようなセスキテルペノイドの生合成促進と細胞内の活性酸素分解系の活性増加との関係から、エリシターによるセスキテルペノイドの生合成促進には活性酸素の関与することを明らかにした。

また、ホラゴケモドキの4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒド生合成酵素について検討し、この反応がNADPHに依存すること、ならびにP450阻害剤(アンシミドール、SKF 525

A、トリアジメノール、シトクロム c、一酸化炭素) によって用量依存的に阻害されることなどから、4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒドの生合成が P450 依存性酵素によって触媒されることを明らかにした。

以上述べたように、苔類培養細胞による二次代謝化合物の生産に関して、高い生理活性を有する2種のセスキテルペノイドを見いだし、またその生合成の制御が細胞内還元力と密接に関係していることを明らかにした。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 匂 坂 勝之助  
副 査 教 授 水 谷 純 也  
副 査 助 教 授 田 原 哲 士

学 位 論 文 題 名

### *Calypogeia* 属培養細胞における セスキテルペノイドの生産機能に関する研究

本論文は、総頁数 203 で和文で記され、図 51、表 17 を含み、内容は緒論、本論、結論、引用文献 247 からなり、末尾に英文要約が付されている。また、別に参考論文 7 編が添えられている。

植物の二次代謝産物は、多様な化合物群を形成し、また種々の生理活性を示すが、その中には医薬をはじめ、香料品、染料などの原材料として産業上の有益性の高いものも多い。その生産は、起源となる植物の栽培だけでなく、野生植物の採集にも多くを依存している。植物培養細胞を用いた有用二次代謝化合物の生産技術は、管理された環境における安定的な生産技術として重要であり、また非収奪的な生産技術として自然環境保全の考え方からも重要である。

植物の培養細胞による有用二次代謝化合物の生産に関する検討は、主としてその生産性の向上を図ることを目的とし、培養条件の検討、生合成系の生化学的検討、あるいは培養装置の開発など多分野にわたっている。しかしながらその産業的实施例は一、二にとどまっており、植物培養細胞の詳細な代謝生理、特に二次代謝系の制御機構の解明を基盤とした汎用的な技術の確立には至っていない。また、検討の対象とされてきた植物は維管束植物が中心であり、多様な精油成分を含有するコケ植物に関する知見は未だ限定的である。

本論文は、植物の二次代謝化合物の中でも主要な化合物群を形成するセスキテルペ

ノイドを精油成分として含有する茎葉体苔類 *Calypogeia* 属植物を用いて、*Calypogeia* 属の種間におけるセスキテルペノイドの天然物化学的特徴、カルス培養系ならびに懸濁培養系の確立、二次代謝化合物の検索と新規セスキテルペノイドの単離精製ならびに構造解析、単離したセスキテルペノイドの薬理作用、そしてそれらセスキテルペノイドの生合成促進機構ならびに生合成酵素の酵素学的特徴について検討を行ない、その成果をとりまとめたものである。

緒論では、コケ植物の分類学的特徴ならびに細胞構造の特徴、また、コケ植物が多様な二次代謝化合物を生産することについて概説するとともに、本研究の目的と意義について述べている。

第2章では、5種の *Calypogeia* 属植物が含有する主たる精油成分の組成について述べている。これらの *Calypogeia* 属植物において同じ経路によって生合成されていると考えられるセスキテルペノイドについて、その含有比を比較すると、種間において明確に差異が認められることを明らかにしており、セスキテルペノイドの生合成の各段階における制御機構が存在することを示唆している。

第3章では、2種の *Calypogeia* 属植物、ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) および *Calypogeia peruviana* のカルス形成および懸濁培養系の誘導、ならびに再分化条件の検討を行ない、植物成長調節剤を用いない培養条件で、発達した葉緑体を有するカルス形成または再分化が誘導されることを見いだしており、培地中のグルコース濃度のみが培養細胞の分化、脱分化の制御に関与していることを明らかにしている。また、誘導したホラゴケモドキのカルスが含むセスキテルペノイドである4種のアズレン類について含量を測定し、誘導直後のカルスではその培養容器毎に細胞中の含量が著しく異なっていることが明らかにされている。また誘導したカルスからセスキテルペノイド含量の高いカルスの株を取得したことについて述べている。

第4章では、培養したホラゴケモドキから新たに2種のセスキテルペノイドを見だし、単離精製を行ない、次いで種々の分光学的分析法によってその化学構造を解析した結果について述べている。有機溶媒による抽出物よりフラッシュカラムクロマトグラフィーによって単離精製した2種の赤紫色化合物について、プロトン-および炭素-

13-核磁気共鳴スペクトル、高分解能質量スペクトル、赤外線吸収スペクトル、紫外線-可視光線吸収スペクトル等を測定し、それらの詳細な解析により、その化学構造が4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒドならびに4-メチルアズレン-1-カルボン酸であると決定し、これらのアズレン類が新規化合物であることを明らかにしている。また、合成実験によっても構造の確認を行なっている。

第5章では、ホラゴケモドキ培養細胞より単離した上記の新規アズレン類について、安全性ならびに薬理作用の検討結果が述べられている。変異原性、急性毒性および皮膚一次刺激性試験は、医薬、化粧品原料としての基本的な安全性を検定するものであることからその検討を行ない、いずれも高い安全性を有することが明らかにされている。また、抗炎症ならびに抗潰瘍作用の検定を行ない、抗炎症剤として市販されているグアイアズレンスルホン酸塩と比較してこれらのアズレン類が有意に高い生理活性を示すことが明らかにされている。さらに、光（紫外光）に対する安定性、水に対する溶解性は、グアイアズレンスルホン酸塩に比較していずれも高いことが明らかにされている。

第6章では、ミドリホラゴケモドキ (*Calyptogeia granulata*) 培養細胞におけるセスキテルペノイド生合成ならびに活性酸素分解系酵素群に対するエリシターの効果について検討した結果が述べられている。エリシターとして酵母細胞壁成分あるいはバナジウム化合物をミドリホラゴケモドキ培養細胞に投与することによって細胞成分であるセスキテルペノイドの生産が高まることが示されている。また五酸化バナジウムの投与によってその生合成酵素 (3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA 還元酵素) の活性が高まることが示され、同時に細胞内のグルタチオン含量が急速に増加し、スーパーオキシドディスムターゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼ、グルタチオン還元酵素の活性も高まることが明らかにされている。このことからエリシター処理によって細胞内に活性酸素が生成することが示唆されている。また、この時、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素、アスコルベートフリーラジカル還元酵素、デヒドロアスコルベート還元酵素、カタラーゼ活性ならびにアスコルビン酸含量は影響を受けなかったことから、エリシターによって生成した活性酸素は、主としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼおよびグルタチオンによって分解されることが示唆されている。さらに、こ

の培養細胞に過酸化水素を直接添加することによって、酸化ストレスを与えたときにもセスキテルペノイドの生産が高まることを明らかにしている。このようなセスキテルペノイドの生合成促進と細胞内の活性酸素分解系の活性増加との関係から、エリシターによるセスキテルペノイドの生合成促進には活性酸素の関与することを明らかにしている。

また、ホラゴケモドキの4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒド生合成酵素について検討し、この反応がNADPHに依存すること、ならびにP450阻害剤（アンシミドール、SKF 525A、トリアジメノール、シトクロムc、一酸化炭素）によって用量依存的に阻害されることなどから、4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒドの生合成がP450依存性酵素によって触媒されることを明らかにしている。

最後に、本論文の内容を総合的に考察している。

以上のとおり、本研究は植物培養細胞による有用二次代謝化合物の生産に関して、薬理作用を有する2種の新規のセスキテルペノイドを見だし、その生合成の制御機構を解明する上での知見を加えたものであり、今後関連分野の研究に寄与するところが大きいものと思われる。

よって審査員一同は、別に行なった学力確認試験の結果と合わせて、本論文の提出者中河原俊治は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。