



Title	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
Author(s)	中河原, 俊治; Nakagawara, Shunji
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第4534号
Issue Date	1994-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3076854
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/50110
Type	doctoral thesis
File Information	000000272932.pdf



*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

中河原 俊治

①

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

中河原俊治

(サントリー株式会社基礎研究所 〒618 大阪府三島郡島本町若山台1-1-1)

Studies on the capability to produce sesquiterpenoids
in cultured cells of *Calypogeia* species

Shunji Nakagawara

Institute for Fundamental Research, Suntory Limited
1-1-1, Wakayamadai, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan

目 次

略 号

第1章 緒 論	1
第2章 <i>Calypogeia</i> 属植物の天然物化学的特徴	7
第3章 <i>Calypogeia</i> 属植物のカルス誘導と懸濁培養の確立	
第1節 序 論	14
第2節 カルス誘導と懸濁培養の確立	16
第3節 誘導したホラゴケモドキ (<i>Calypogeia azurea</i>) カルスの アズレン誘導体の含量	20
第4節 考 察	23
第5節 要 約	27
第4章 ホラゴケモドキ (<i>Calypogeia azurea</i>) の生産する 新規アズレン誘導体の単離と構造	
第1節 序 論	34
第2節 単離精製	35
第3節 構造決定	38
第4節 4-Methylazulene-1-carboxylic acid の化学合成	43
第5節 考 察	46
第6節 要 約	49

第5章	<i>Calypogeia</i> 属培養細胞より単離したアズレン誘導体の特性と 薬理作用	
第1節	序 論	73
第2節	光安定性	74
第3節	水溶解性	76
第4節	安 全 性	77
第5節	抗炎症および抗潰瘍作用	79
第6節	考 察	88
第7節	要 約	91
第6章	<i>Calypogeia</i> 属における二次代謝化合物の生合成	
第1節	序 論	107
第2節	ミドリホラゴケモドキ (<i>Calypogeia granulata</i>) 培養細胞 におけるエリシターによるセスキテルペノイドの 生合成誘導とその機構	113
第3節	ホラゴケモドキ (<i>Calypogeia azurea</i>) における 4-methylazulene-1-carbaldehyde の生合成	128
第4節	考 察	133
第5節	要 約	147
第7章	結 論	169
	引用文献	175
	Synopsis	199
	謝 辞	204

本論文で用いた略号

AAPOD; ascorbic acid peroxidase (EC 1. 11. 1. 11)

AFRRD; ascorbate free radical reductase (EC 1. 6. 5. 4)

BA; benzyladenine

2,4-D; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

DHARD; dehydroascorbic acid reductase (EC 1. 8. 5. 1)

DMAMO; 1,4-dimethylazulene monooxygenase (EC 1. 14. X. X)

DMSO; dimethyl sulfoxide

dry wt; dry weight

DTNB; 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

DTT; dithiothreitol

EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA; ethyleneglycolbis (β -aminoethylether)- N, N, N', N'- tetraacetic acid

ER; endoplasmic reticulum

fresh wt; fresh weight

G6PDH; glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 49)

GSSGRD; glutathione reductase (EC 1. 6. 4. 2)

[¹⁴C]HMGC_oA; 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A, DL-3-[glutaryl- 3-¹⁴C]-

HMGR; 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase (EC 1. 1. 1. 34)

HPLC; high-performance liquid chromatography

KPB; potassium phosphate buffer

P450; cytochrome P450 [一般に cytochrome P450 とよばれているが cytochrome とは本来

ヘム蛋白質のうち、電子伝達体として働くものの名称であり、酵素に対しては妥当

ではない(今井と小森1992)という考えに従って本論文では P450 をもちいた]

6PGDH; 6-phosphogluconate dehydrogenase (EC 1. 1. 1. 44)

PVPP; polyvinylpyrrolidone

SOD; superoxide dismutase (EC 1. 15. 1. 1)

TFA; trifluoroacetic acid

第1章 緒 論

古来人類はその生活史においてさまざまな形で植物を利用し、共に進化の歩みを進めてきた。食糧としてはいうにおよばず医薬としてまた染料、衣料あるいは建築材などの工業原料としてその生活の重要な部分において依存してきた。植物の世界はそれ自身極めて多様であり30 - 35万種が報告されている (Bold 1973)。しかしながら人類がその恩恵を受けている植物種は植物界全体からみるとごくわずかである (堀田ら 1989)。

植物界は分類学上大きく14門に分けられており、緑色植物はコケ植物門 (Bryophyta)、シダ植物門 (Pteridophyta)、種子植物門 (Spermatophyta) などに分類されている (井上ら 1983; 植物界を9門に分け、緑色植物門 (Clorophyta) にコケ植物 (Bryophytina)、維管束 (種子、シダ) 植物 (Tracheophytina) を亜門として含める考えもある (前川 1983))。

人類はその生命活動を支えるためにこれらの中の種子植物門については広く利用してきたが、コケ植物門についてはこれまで人類のみならず多くの動物もほとんど利用してこなかった。

コケ植物は進化段階において維管束 (種子、シダ) 植物に次ぐ位置におかれており、熱帯から極地にまで広く分布し、水中や温泉においてさえも見いだされ、全世界で20,000 - 24,000種、日本国産で1,500種以上が存在しているとされている (服部ら 1972; 前川 1973; Encyclopaedia Britanica 1974; Asakawa 1982)。

またコケ植物は苔綱 (Hepaticae; liverworts、6,000 - 8,000種)、蘚綱 (Musci; mosses、14,000 - 15,000種)、ツノゴケ綱 (Anthocerotae; hornworts、300種) の三

類の総称であり、それぞれ多様な分化を遂げている。さらに苔類はその体制において明確な葉と茎および仮根に分化している配偶体を有する茎葉体 (leafy form) 苔類およびそのようには分化せず扁平な配偶体を有する葉状体 (thallose form) 苔類に分けられている (山崎ら 1974)。

コケ植物は形態的には完全な維管束を有するところまで複雑な器官分化を遂げていないものの、代謝生理的にはその二次代謝も含めて維管束植物と同等に分化していると考えられており、またその細胞を構成する細胞器官もほぼ同等である (Gradstein 1990)。

苔類細胞は蘚類、ツノゴケ類には存在しない油体 (oil body) を有することが特徴的である。油体は原形質に存在するオルガネラで脂質二重膜構造に包まれ、直径 2 - 20 μm である (Gradstein 1990)。その数は種によって異なり一細胞あたり 0 - 10 個である (服部ら 1972)。油体には精油など種々の二次代謝化合物が含まれており、含有化合物により無色から濃青色、濃紫色を呈する。このことは苔類の分類学上においても重要な特徴となっている。しかしながら苔類には、維管束植物において二次代謝化合物の貯蔵器官ともされる液胞も存在しており、油体の役割と液胞との関連については未だ明らかでない。

これらコケ植物は天然物化学の見地から興味を持たれこれまでに数多くの報告がある (Asakawa 1982; Becker 1989; Connolly 1990)。蘚類およびツノゴケ類においては二次代謝化合物、特にテルペノイドに関してはみるべきものがわずかであるのに対し、苔類においては多様かつ特異な炭素骨格を有するテルペノイドなどの二次代謝化合物が見いだされている。またそれらの中には様々な生理活性を有するものがあり (Asakawa 1990)、現在もなお天然物化学における重要な研究分野となっている。

茎葉体苔類ツキヌキゴケ (*Calypogeia*) 属において近年、アズレン骨格を有する

セスキテルペノイドが見いだされ (Meuche and Huneck 1966)、またその培養細胞においても 1,4-dimethylazulene (1、Fig. 1-1) を主成分のひとつとする精油成分を親植物と同等のレベルで産生することが明らかにされた (Takeda and Katoh 1981)。

コケ植物を二次代謝化合物の生産に関する研究のみならず生理生化学的研究の材料として用いる際には、従来、生育が遅いこと、個体が小さいこと、またしばしば他種のコケ植物と混生していることなどのために自然界から大量に収集することが困難であったので、これが大きな制約となっていた。しかしながら Takeda and Katoh (1981) の研究により単一種の比較的均一な細胞を大量に扱うことのできる無菌培養細胞系という極めて有用な技術が確立され、そのような制約が除かれることとなった。

さらに苔類が維管束植物に比べ形態的により簡単な構造を有し、栄養生殖世代が半数体であり、またその染色体数の基本数が 6、8、9 のものがほとんどで天然の倍数体もごく少数である (山崎ら 1974) ことに加え、その培養細胞が発達した葉緑体を有することなど生化学的、遺伝学的あるいは分子生物学的研究における材料として非常に優れた利点を有していると考えられる (Katoh 1988)。

著者はこのような細胞培養技術を基にして苔綱 Hepaticae ウロコゴケ目 Jungermanniales ツキヌキゴケ科 Calypogeiaceae ツキヌキゴケ属 *Calypogeia* Raddi に属するいくつかの苔類植物について培養細胞系を確立し、その特徴あるセスキテルペノイドの生産機能について興味ある知見を得た。

はじめに *Calypogeia* 属植物培養細胞でみとめられたセスキテルペノイドを主とした精油成分の天然物化学的特徴について論じた (第 2 章)。

ついでホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) および *Calypogeia peruviana* の培養細胞系を確立し、そのカルス誘導には培地中の糖濃度のみが関与することを示した

(第3章)。

つぎにこの培養細胞から2種の新規アズレン誘導体を単離精製し、分光学的実験によりその構造を解析し、また合成実験を行なって、それらが4-methylazulene-1-carbaldehyde (2, Fig. 1-1) および4-methylazulene-1-carboxylic acid (3, Fig. 1-1) であると決定した(第4章)。

そしてこれら2種のアズレン誘導体の光安定性、水溶解性、安全性ならびに抗炎症作用などの薬理作用について検討した(第5章)。

さらにこのような二次代謝化合物の生合成について検討した。まず、ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 細胞において1,4-dimethylazulene (1) の蓄積がエリシターあるいは過酸化水素の投与によって高まることを見いだした。この時、ミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 細胞の応答として3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性が一時的に増加し、また superoxide dismutase 活性、ascorbate peroxidase および glutathione reductase 活性が高まり、そして還元型グルタチオンの細胞内濃度が急速に増大することを示した。これらの結果からエリシターの作用によるセスキテルペノイドの蓄積促進の過程には活性酸素が関与することを明らかにした(第6章)。

また、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) の生合成系を調べた結果、この反応がP450の関与する酵素反応であることを示した(第6章)。

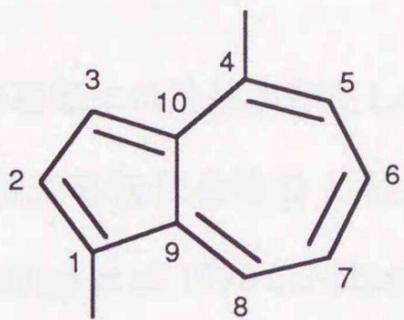
以上のように著者はこれまで人類によってあまり利用されてこなかったコケ植物を新たな植物資源として注目し、特徴ある二次代謝化合物の生産系として位置付けた。そして *Calypogeia* 属植物がどのようなセスキテルペノイドを生産しているのか、それにはどのような生理活性があるのかについて検討した。またとくにどのようにすればそれらの生産性を高めることができるのかという課題に対し、二次代謝化合物の生産促進を植物の代謝生理の応答としてとらえて実験を行ない、

植物の有する有用な二次代謝化合物の生産機能を十分に引き出す方法を探ることを本研究の目的とした。

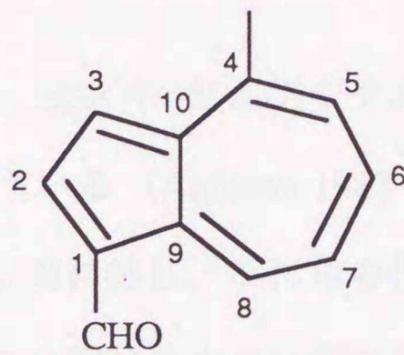
近年、地球上の生物資源を限りあるものとし、その維持保全を前提とした生物資源の有効利用技術の確立が求められている。そのような社会的要請からも植物培養細胞を用いた有用化合物の生産技術はバイオテクノロジーの中心的課題のひとつとされ、環境に対する非収奪的な技術として有益な手段であると考えられる。

本論文はこれらの研究成果についてまとめたものである。

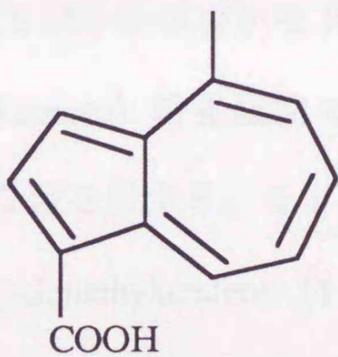




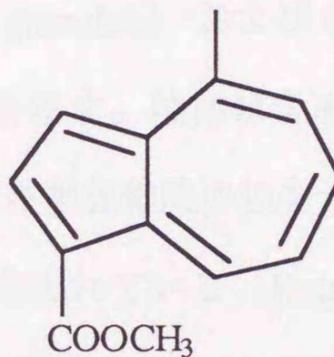
1,4-dimethylazulene
(1)



4-methylazulene-1-carbaldehyde
(2)



4-methylazulene-1-carboxylic acid
(3)



1-methoxycarbonyl-4-methylazulene
(4)

Fig. 1-1 Azulene derivatives in *Calypogeia* species.

第2章 *Calypogeia* 属植物の天然物化学的特徴

ほとんどの苔類には油体が存在し多様なモノ-、セスキ- およびジテルペノイドそして脂溶性芳香族化合物などが見いだされている (Asakawa 1982; Connolly 1990; Nagashima *et al.* 1990; Nabeta *et al.* 1993) のに対し、これらの化合物は蘚類においては、アオゴケ (*Saelania*) 属にカウラン型ジテルペンが知られることを除き、ほとんど見いだされていない。このことは蘚類が油体を欠いているためであるとされている (Asakawa 1982)。

Figure 2-1 にミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) およびホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) 培養細胞で見られる油体を示す。油体は含有する化合物によって様々な色を呈する。ミドリホラゴケモドキ培養細胞の場合、その精油成分に青色の 1,4-dimethylazulene (1, Fig. 1-1) が含まれている (Katoh and Takeda 1981) ためこのような濃青色となり、ホラゴケモドキ培養細胞の場合、赤紫色の 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4, Fig. 1-1) と 1,4-dimethylazulene (1) とを含む (Meuche and Huneck 1966) ためこのような紫色を呈する。

Calypogeia 属全種に関する詳細な成分検索は未だ十分になされていないが、これまでに調べられたいくつかの種では主としてセスキテルペノイド (Meuche and Huneck 1966; Takeda and Katoh 1981; Nakagawara *et al.* 1992; Siegel *et al.* 1992) が見いだされており、また campesterol などのステロイド (Huneck 1974; Beneš *et al.* 1981) や (pre)lunularic acid (Gorham 1977; Ohta *et al.* 1984) などの芳香族化合物が知られている。

しかしながらいくつかの *Calypogeia* 属の産生するセスキテルペノイドについて

は詳細に調べられている (Kato and Takeda 1990)。無菌培養で得られた5種の *Calypogeia* 属植物の精油成分を検索した結果を Table 2-1 およびそれらの構造式を Fig. 2-2 に示す。Figure 2-2 に示した化合物に加えて微量化合物として 3-acetoxycyclogermacrene、2-acetoxy-3-hydroxycyclogermacrene、3-acetoxy-2-hydroxycyclogermacrene、3-hydroxycyclogermacrene などの bicyclogermacrene 誘導体 (Takeda and Kato 1983b) が同定された。

それぞれの精油の組成は *Calypogeia* 属中の種間で異なっており、セスキテルペノイドの生合成が種によって異なった制御を受けていることを示唆する。

Takeda and Kato (1990) は [2-¹³C] acetate を用いた標識実験によって、アズレンおよびインデン型セスキテルペノイドの生合成経路を調べ Fig. 2-3 のような経路を推定した。これらの各段階における制御の結果、Table 2-1 のような種によって異なった成分組成となると考えられる。

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞の精油成分について調べると bicyclogermacrene が最も多く (31.7%)、次いで 1,4-dimethylazulene (1、14.4%) であり、3,7-dimethylindene-5-carbaldehyde (5.5%) も生産しているが、アズレンおよびインデンのメトキシカルボニル誘導体は生産していない (Table 2-1)。ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) では同じく bicyclogermacrene (34.1%) が最も多く、1,4-dimethylazulene (1、22.2%) がこれに続き、またその生合成経路上でより下流に位置付けられる 3,7-dimethylindene-5-carbaldehyde (0.6%)、3,7-dimethyl-5-methoxycarbonylindene (16.7%)、および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4、0.8%) も存在している (Table 2-1)。また、*Calypogeia peruviana* では 1,4-dimethylazulene (1、42.2%) が最も多く、また 3,7-dimethylindene-5-carbaldehyde (10.8%) を生産するがミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) と同様にアズレンおよびインデンのメトキシカルボニル誘導体は生産しない。一

方、トサホラゴケモドキ (*Calypogeia tosana*) では trinoranastreptene (30.4%) や bicyclogermacrene (25.0%) が主たる成分であり、1,4-dimethylazulene (1、4.2%) や 3,7-dimethylindene-5-carbaldehyde (4.7%) の割合は小さくそれより生合成経路上で下流の化合物は生産していない (Table 2-1)。また *Calypogeia muelleriana* では bicyclogermacrene (30.9%) 以降の化合物は生産していない (Table 2-1)。

これら 5 種の *Calypogeia* 属植物の精油における成分比の差異は、そのセスキテルペノイドの生合成の制御が種によって異なっており、それぞれの遺伝的要因を反映していることを示唆している。このような結果から単純にそれぞれの進化段階との関連について議論することはできないがこれらのセスキテルペノイドの生理的意義を考える上で興味深い問題である。

また、このようなセスキテルペノイドの生合成の制御機構が明らかになれば、その遺伝子レベルでの改変などの手段によって、任意の二次代謝化合物、その生合成中間体、あるいは類縁化合物の生産蓄積を向上させた植物の分子育種の可能性が期待できるものと考えられる。

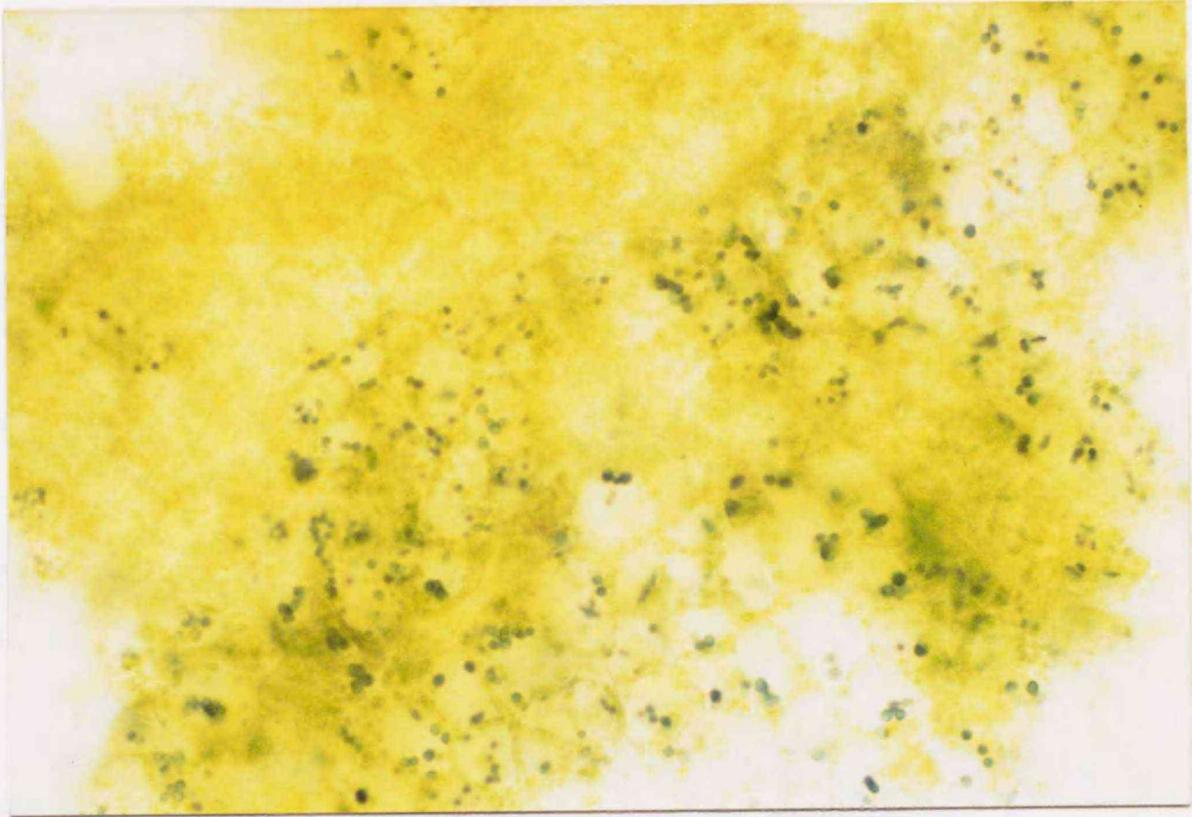
一方、ホラゴケモドキ (*C. azurea*) において 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) および 3,7-dimethyl-5-metoxycarbonylindene はそれぞれ生合成経路上で最終産物であると考えられる (Fig. 2-3)。特に 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) の生合成に関しては 1,4-dimethylazulene (1) との間に中間体の存在することが示唆されたのでそれらを検索し、単離精製した。このことについては第 4 章で詳述する。

Table 2-1 Constituent of sesquiterpenoids from *Calypogeia* species*. Values were determined by gas chromatography and expressed as per cent of essential oil of *Calypogeia* species.

	Bicyclogermacrene	Anastreptene	Trinoranastreptene	1,4-Dimethylazulene	3,7-Dimethylindene-5-carbaldehyde	3,7-Dimethyl-5-methoxycarbonylindene	1-Methoxycarbonyl-4-methylazulene
<i>C. granulata</i>	31.7	5.5	6.0	14.4	5.5	-	-
<i>C. azurea</i>	34.1	9.6	0.4	22.2	0.6	16.7	0.8
<i>C. peruviana</i>	26.4	5.8	-	42.2	10.8	-	-
<i>C. tosana</i>	25.0	11.7	30.4	4.2	4.7	-	-
<i>C. muelleriana</i>	30.9	5.1	-	-	-	-	-

* Redrawn with permission from Katoh and Takeda 1990.

A



B

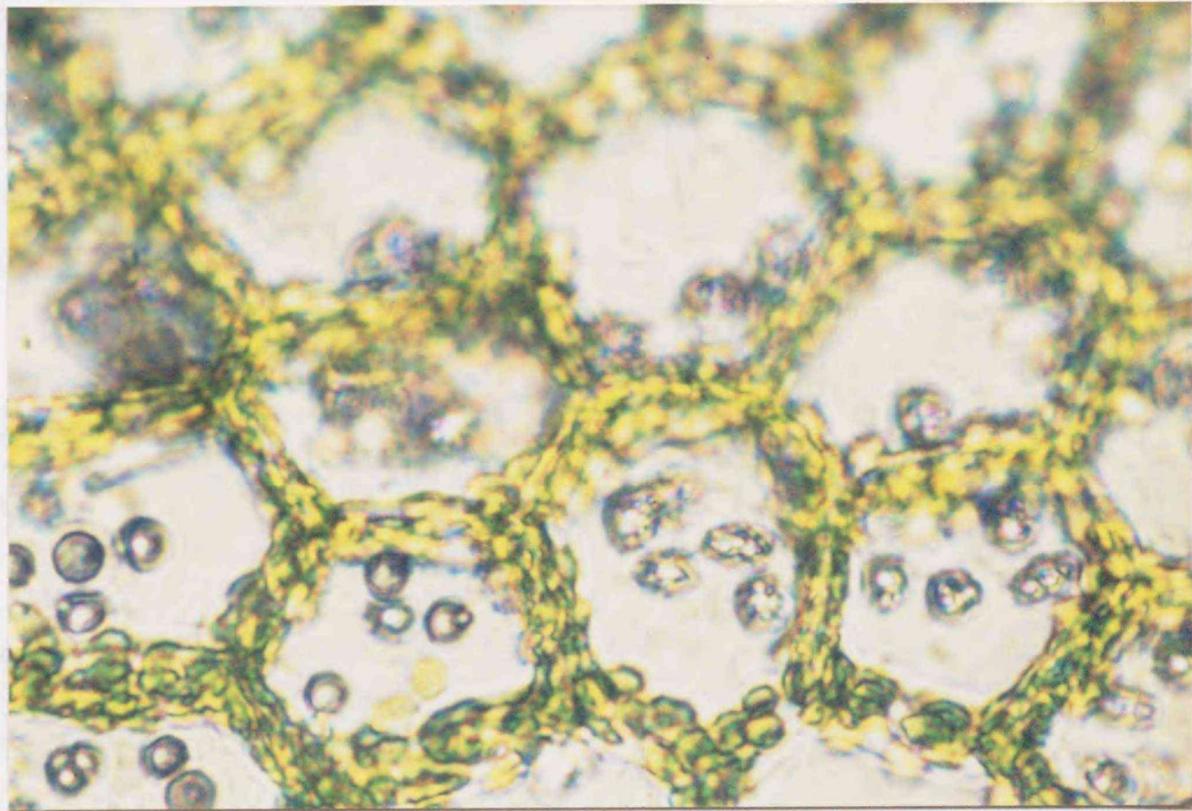


Fig. 2-1 Oil bodies in cultured cells of *Calypogeia granulata* (A; x100) and *Calypogeia azurea* (B; x400).

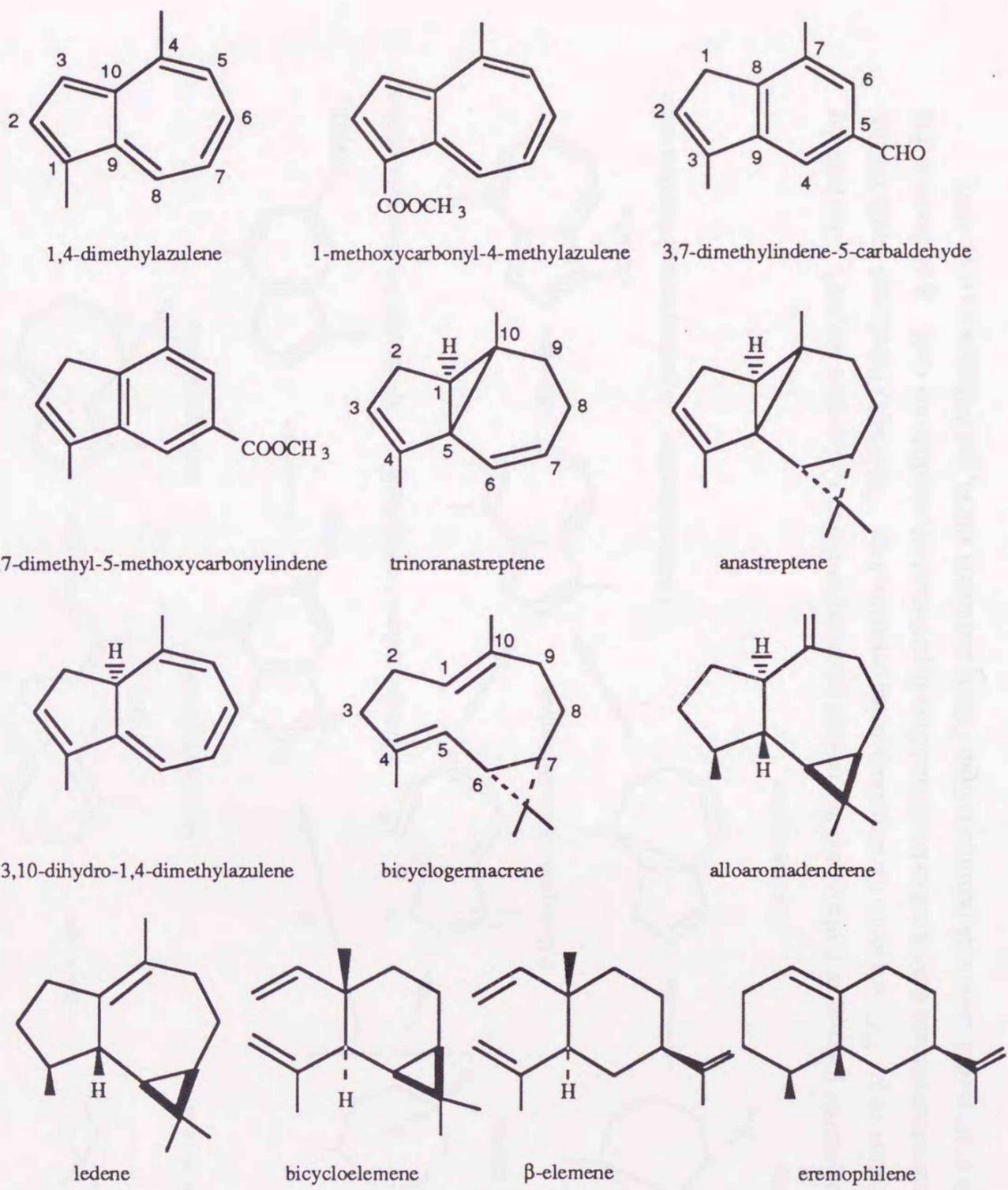


Fig. 2-2 Constituents of essential oil of *Calypogeia* species.
 (Reprinted with permission from Katoh and Takeda 1990.)

第3章 *Calypogeia* 属植物のカルス誘導と懸濁培養の確立

第1節 序 論

第2章で論じたように苔類植物はテルペノイドを主とした種々多様な二次代謝化合物を産生し、1960年代より天然物有機化学的研究が精力的に行なわれてきている。しかしながら苔類植物はその個体が非常に小さく、また、野生では多くの場合複数種が混生しており、実験材料として単一種を多量に採集することが極めて困難である。そのためにこれまで苔類の詳細な天然物化学的研究はいくつかの限られた種においてしか行なわれてこなかった。したがって、細胞培養技術の確立は特に苔類植物の研究においては画期的であり、これにより単一の種のクローンを大量にかつ比較的短時間で得ることができるようになり現在では広く用いられるようになっている。

維管束植物の細胞培養を行なった時、しばしば増殖は速いが目的とする二次代謝化合物をほとんどあるいは全く生産しなかったり、またその組成が親植物とは著しく異なってしまうという現象が見られる。また、その培養細胞では葉緑体が充分にあるいは全く発達しないことが多い。しかしながら、苔類植物ではその精油成分の化合物種、含有量および構成比において親植物と比較して同等あるいはむしろ上回る培養細胞系が確立された (Takeda and Katoh 1981; Wurzel and Becker 1990; Nabeta *et al.* 1993)。

Calypogeia 属植物のセスキテルペノイドの生産機能を調べるためにはこのような培養細胞系が優れた材料であると考えた。*Calypogeia* 属植物の培養細胞系は当

研究室において最初にミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) で確立された (Takeda and Katoh 1981)。そこで著者はミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 以外の *Calypogeia* 属植物としてホラゴケモドキ (*C. azurea*) および *C. peruviana* について無菌培養系を確立し、カルスの誘導を行ない、またその懸濁培養系を確立した。そして得られたホラゴケモドキ (*C. azurea*) カルスを継代培養し、その二次代謝化合物の含量の変化について検討した。

第2節 カルス誘導と懸濁培養の確立

1. 材料および方法

カルス誘導実験には 1988 年にドイツ中央部 Harz 山脈の Hohne Cliffs 付近で採集したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea* Stotler et Crotz) および *C. peruviana* を用いた。両種は京都大学農学部長谷川二郎博士に同定を依頼し、植物標本は京都大学理学部植物園 (KYO) に寄託した。

先端から 5 - 10 mm 長で切り取った茎葉体 (配偶体) を Fig. 3-1 に示した洗浄器を用いて表面滅菌した (Katoh 1988)。滅菌方法はまず、5 - 10 片の茎葉体を細かい網目のスクリーンの中に挟み込み、洗剤液 (1 - 2 滴の 10 % Tween 80 (ナカライテスク、京都) を 10 ml 蒸留水に溶解したもの) に針先を浸け、30 - 60 秒間吸引吐出を繰り返した後、0.35 % 次亜塩素酸ナトリウム液中で同様に 30 - 60 秒間吸引吐出し滅菌した。次に 20 ml 無菌水 (大塚製薬、東京) を逆流させぬように注意して吸引して排出し、これを 5 回以上 (計 100 ml 無菌水) 繰り返し十分に滅菌剤を洗い流した。この後クリーンベンチ内で滅菌した茎葉体を 1 本ずつ寒天培地に置床した。

カルス誘導実験で検討した培養条件は、0.8 % 寒天 (Bactoagar; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を含む MSK-1 培地 (Table 3-1、Katoh 1988) を基本培地とし、これにグルコース (終濃度 0.5 - 6.0 %)、サイトカニンとして benzyladenine (BA、ナカライテスク) を 0 および 0.5 ppm、オーキシンとして 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D、ナカライテスク) を 0.1 - 8.0 ppm、フマル酸 (ナカライテスク) 10 - 50 ppm を種々の濃度で加え、10 ml 斜面培地とした。茎

葉体を植え込んだ培地は連続照明下 ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、 25°C で静置した。4 - 8 週間毎に植え継ぎを行なった。

2. 結 果

0.8 % 寒天を含む MSK-1 培地を基本培地とし、グルコース濃度を終濃度 0.5、2.0、4.0、6.0 %、フマル酸濃度を 10、20、50 ppm、サイトカイニン (BA) 濃度を 0 または 0.5 ppm、オーキシシン (2,4-D) 濃度を 0.1、0.5、2.0、8.0 ppm とした時の組合せでこれらの相互作用について調べた。各区それぞれ 5 本ずつの斜面培地にホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) 茎葉体を 1 本ずつ置床し、継続して観察した。*Calypogeia peruviana* についてはグルコース濃度を終濃度 0.5、2.0、4.0、6.0 %、フマル酸濃度を 0、10、20、50 ppm、オーキシシン (2,4-D) 濃度を 0.1、0.5、2.0、8.0 ppm とした。*C. peruviana* の場合、サイトカイニンを加えた実験区は設定しなかった。その結果を Table 3-2 および 3-3 に示した。Table 3-2 は各実験区に置床したホラゴケモドキ (*C. azurea*) 茎葉体からのカルス形成および再分化の経時的变化を示したものである。

最初に滅菌した茎葉体を培地に置床した後、表記した 4、9、15、23 週間目に植え継ぎを行ない、このときカルス形成を観察した。カルス誘導実験の開始から約 4 週間で低グルコース濃度 (0.5、2.0 %) 区で濃緑色カルスの形成または再分化が認められたが、高グルコース濃度 (4.0、6.0 %) 区ではカルス形成は認められなかった。高グルコース濃度区では 2 回目の植え継ぎ時 (9 週間目) 以降、カルスの形成が見られ始めた。このとき低グルコース濃度区では形成されたカルスから茎葉体が再分化し始め、一方カルス部分は褐変した。4 回目の植え継ぎ時点 (23 週間) において 0.5 % グルコース区では再分化茎葉体が優勢となり、逆に

6.0 % グルコース区ではカルスが優勢であり、また 2.0 および 4.0 % グルコース区では茎葉体およびカルスが混在した。この時点でカルス形成がもっとも旺盛であったのは、6.0 % グルコース、20 ppm フマル酸、0.5 ppm 2,4-D、0 ppm benzyladenine (BA) の実験区であった。しかしながら 2,4-D の顕著な効果は認められないのでこれを除き 6.0 % グルコース、20 ppm フマル酸を含む MSK-1 培地をホラゴケモドキ (*C. azurea*) のカルス誘導培地とした。

誘導したカルスは濃緑色を呈する直径 4 - 8 mm の小集塊として増殖し、以降 4.0 % グルコース、20 ppm フマル酸、0.8 % Bactoagar を含む MSK-1 培地で継代培養を行なった。また低グルコース濃度条件 (1 %) にすることで無菌植物の再分化系を確立した。

Table 3-3 は各実験区に置床した *C. peruviana* 茎葉体の 4 回目の植え継ぎ時 (23 週間) におけるカルス形成の有無を示したものである。新鮮培地への移植は *C. azurea* と同時期に行なった。*C. peruviana* においても高グルコース濃度において再分化を伴わないカルス形成が見られたが、グルコース濃度 6.0 % より 4.0 % の方が旺盛な増殖であった。低グルコース濃度区ではホラゴケモドキ (*C. azurea*) と同様に再分化が見られた。この結果から 4.0 % グルコース、20 ppm フマル酸の培地条件を *C. peruviana* のカルス誘導培地とした。誘導したカルスはやはり濃緑色で直径 2 - 5 mm の小集塊として増殖し、4.0 % グルコース、20 ppm フマル酸を含む MSK-1 培地で継代培養を行なった。

以上のようにして得られたカルスを用いて懸濁培養を確立した。培地は継代培養に用いた培地から寒天を除いた 2 - 3 % グルコース、20 ppm フマル酸を含む MSK-1 培地を用いた。100 ml Erlenmeyer フラスコに対し 40 ml の培地とし、連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 100 rpm で巡回培養を行なった。約 3 週間毎に 10 - 20 % を移植し継代培養を行なった。ホラゴケモドキ (*C. azurea*) および *C. peruviana* 共

によく増殖し、継代培養を重ねるに連れて各細胞小集塊は細くなり、それぞれ直径 0.5 - 1 mm 程度であった。

第3節 誘導したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) カルスの

アズレン誘導体の含量

継代培養しているホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) カルス (寒天培地) の 1,4-dimethylazulene (1, Fig. 1-1)、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) 含量の変化について測定した。ホラゴケモドキ (*C. azurea*) 茎葉体を1本ずつ切り離して前節で確立したように滅菌し、6.0% グルコース、20 ppm フマル酸、0.8% Bactoagar を含む MSK-1 培地 (カルス誘導培地) 10 ml を入れた試験管で斜面培養によりカルス形成を行ない、約 600 本の培養カルスを得た。形成したカルスの継代培養は 4.0% グルコース、20 ppm フマル酸、0.8% Bactoagar を含む MSK-1 培地で行ない、100 ml の Erlenmeyer フラスコに 40 ml の培地とした。

アズレン誘導体は植え継ぎ時に約 0.5 g 新鮮重を採取し、メタノールで抽出し HPLC システム (Gilson, Villiers le Bel, France) で定量した。カラムは逆相 LiChrospher RP18 (e), 4 x 125 mm (Cica-Merck, Tokyo) を用い、移動相は A; 0.1% trifluoroacetic acid (TFA、ナカライテスク) / 蒸留水 (Cica-Merck) および B; 0.1% TFA/アセトニトリル (Cica-Merck) とした。グラジエントプログラムは 0 - 5.5 分の間を B/A = 55/45 の一定とし、5.5 - 10 分の間を B/A = 55/45 - 100/0 の直線勾配、10 - 12 分の間を B/A = 100/0 の一定とした。移動相の流速は 1.0 ml min⁻¹ とし、290 nm の吸収で検出した。1,4-Dimethylazulene (1)、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) の濃度の算出にはそれらの 0.1 mM 混合溶液を調製し、これを標準として検量線を作成して行なった。

培養細胞が含有する4種のアズレン誘導体の含量を2ヶ月毎（カルスの形成後、最初の植え継ぎまでは3ヶ月）の植え継ぎ時に、約600本の試験管から任意に（一回の植え継ぎ時の分析数 $n = 118 \sim 256$ ）選び出して測定した（Fig. 3-2）。

カルス誘導後3ヶ月間培養したカルスにおけるアズレン誘導体の含量は非常にばらついており、全く生産しないものも多かった（Fig. 3-2）。この実験では高生産細胞を選抜してゆくなどの選択圧はかけていないが継代培養を重ねるに従って、親植物と同様の含量レベルに収斂してゆく様子が観察された。このことはカルス誘導直後の細胞はその生理的機能が未だ安定しておらず、二次代謝化合物の生産も不安定であることを示す。滅菌した配偶体をカルス形成させずそのまま再分化させた系では、液体培養を行なっても二次代謝化合物の生産に関して、カルス形成直後の細胞で見られたような不安定さは認められず親植物と同等であった。したがって誘導したカルス培養におけるこのような初期の生理的な不安定さはそれが脱分化状態にあることと関連していると考えられる。そのような生理的に混乱した状態と考えられる脱分化細胞であっても何代かの継代培養を行なうことによってしだいに安定化し、カルスにおける二次代謝化合物生産能も安定してくることは興味深い問題である。したがってこれらの誘導した細胞群のなかから目的の化合物を高含量で生産する細胞系を確立するには、継代培養を繰り返し、安定して生産する細胞を選び出す必要がある。

この実験の後、これらの細胞の中から各アズレン誘導体含量の高い細胞を選抜し維持している。

しかしながら、このような試行錯誤的な選抜方法のみでは目的化合物の高い生産性を有する細胞株の取得には限界があることが知られてきている。したがって高生産性の変異株の選抜取得に加えて、目的化合物の生合成能およびその蓄積あるいは細胞外放出能を高める方法の開発が必要とされているが、二次代謝化合物

の生合成、特にその制御に関する知見は今だ限定的であり、今後の研究の進展が期待されている。

第4節 考 察

本章では 2,4-D などの植物成長調節物質の添加を必要としない再分化系、カルス誘導系およびその懸濁培養系を確立した。植物成長調節物質、たとえば 2,4-D などを用いた培養系を産業的生産に応用した場合、その生産物に対する安全性に関して社会的な疑念が生じる可能性があるため、植物成長調節物質を使用しない培養系を確立することはそのような問題を除外できる点で有意義である。

本研究において *Calypogeia* 属植物におけるカルス形成の誘導は培地中に加えたグルコース濃度に強く依存することを明らかにした。しかしながらホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) と *Calypogeia peruviana* とではグルコース濃度に対する応答が若干異なり、*C. peruviana* ではホラゴケモドキ (*C. azurea*) に比べるとやや低濃度 (4.0 %) でカルス形成が最も旺盛であった。このときフマル酸濃度や 2,4-D などの植物成長調節物質の濃度は調べた範囲ではあまり影響しなかった。このようにして誘導したカルスは、数十代にわたって継代培養した後でさえ、他の培養条件が同一であるとき、0.5 - 1.0 % の低グルコース濃度の培地へ移すと速やかに茎葉体の再分化が開始される。そして再び 4.0 - 6.0 % の高グルコース濃度の培地へ戻すと再度脱分化が開始される。このことから培地中のグルコース濃度が *Calypogeia* 属のカルス形成に直接影響を及ぼすことが明らかである。

同様の現象はトサホラゴケモドキ (*Calypogeia tosana*) および葉状体苔類であるゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) においても認められた (Nakagawara *et al.* 1994a, b)。

トサホラゴケモドキ (*C. tosana*) ではグルコース濃度と 2,4-D 濃度との組み合わせで調べたところ茎葉体発達区とカルス区および枯死区とに分けられ、分散分

析の結果、それぞれの相互作用に有意差が認められた。

ゼニゴケ (*M. polymorpha*) でも同様にグルコース濃度 6.0 または 8.0 %、2,4-D 濃度 0 ppm でカルス形成率が高かった。これらに培養時間の要因を加えて三元配置法により分散分析を行ない、F 検定を行なった結果、それぞれのカルス形成誘導効果には有為な差が認められた。これらのことから苔類のカルス形成誘導には共存するグルコース、2,4-D の相互効果があることが明らかとなり、特にグルコースの寄与が大きいことが分かった。

さらに、このような糖あるいは糖アルコールの添加効果をグルコース、フルクトース、シュクロース、ガラクトース、マンノース、マンニトールの 6 種について検討したところ、フルクトースを 4 % 以上としたときには枯死したがそれ以外の糖では 6.0 - 8.0 % でカルス形成が認められ、その濃度効果はそれぞれで異なっていた。

維管束植物のカルス形成誘導は植え込む外植片の親植物での部位 (葉由来、茎由来など) による誘導のしやすさに違いがあるとされているが、一般にそれはオーキシシンおよびサイトカイニンの種々の組み合わせに依存する (原田と駒嶺 1979; 山田 1984)。特にオーキシシンは必須とされている (山田 1984)。オーキシシンとしては 2,4-D の外に NAA (1-naphthaleneacetic acid) などの合成オーキシシンがよく用いられ、サイトカイニンとしては BA、カイネチン (kinetin) などの合成サイトカイニンが用いられる。これらはその植物ごとに、またはその生理的状态に依存するが通常 0.001 - 5.0 ppm 程度の濃度で用いられている。しかしながら 2,4-D (0.1、0.5、2.0、8.0 ppm) および BA (0.5 ppm) は *Calypogeia* 属 (Table 3-2 および 3-3) およびゼニゴケのカルス形成誘導には殆ど影響を及ぼさない。このことは *Calypogeia* 属植物における脱分化が維管束植物とは幾分異なった機構で起きているのではないかということを示唆する。また、高濃度の糖の効果はその高浸透

圧により再生芽の分化を非局在化し植物切片全体の細胞の二次的分裂を促すと推測され、特に炭素源となる糖では形態形成を阻害し、分裂のみを促進することによりカルス形成が起きるものと推察された。

Calypogeia 属のみならず一般にコケ植物の脱分化によって形成されるカルスは通常濃緑色を呈し、これはよく発達した葉緑体によるものである。ホラゴケモドキ (*C. azurea*) の総クロロフィル含量 (クロロフィル a + b) を Vernon (1960) の方法により 80% アセトンで抽出して測定すると $0.3 - 0.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ fresh wt}$ でこの値は親植物と同等であった。維管束植物では誘導したカルスがよく発達した葉緑体を有することは一般的ではなく、タバコ (Nishida *et al.* 1980) など数種で報告されているのみである。

さらにゼニゴケ (*M. polymorpha*) 培養細胞による光独立栄養培養系は現在までに報告されているいくつかの植物における光独立栄養培養細胞の確立に関する研究の中でも初期の段階で確立されたものであり (Kato *et al.* 1979; Kato 1983)、発達した葉緑体を有することを反映したものと考えられる。コケ植物の培養細胞がほぼ例外なくよく発達した葉緑体を有するという事実は、それが系統発生の上で維管束植物と比べると単細胞藻類に近縁であることも関係していると考えられる (山崎ら 1974) が、*Calypogeia* 属などコケ植物の細胞生理について、維管束植物と比較した詳細な知見は未だ得られていない。

このようにコケ植物から誘導したカルスがよく発達した葉緑体を有することは、葉緑体をその生合成の場とするモノテルペンやジテルペンあるいはカロチノイド (Kleinig 1989) などのテルペノイドの培養細胞による生産を考えるうえでは不可欠な要素である。したがって高グルコース濃度による緑色カルスの形成誘導は二次代謝化合物の培養細胞による生産技術に対し基本的に有用な手段である。

苔類の培養細胞系がその親植物と同等に二次代謝化合物を産生することは最初にミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞において Takeda and Katoh (1981) が示したが、著者が誘導したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) カルスにおいても同様の結果を得た (Fig. 3-2)。また、Siegel *et al.* (1992) も著者らの報告 (Nakagawara *et al.* 1992) と同時にこの事実を見いだしている。このようにテルペノイドなど二次代謝化合物の生合成系の発現が苔類植物培養細胞においては維管束植物の培養細胞とは異なり、一般的な現象であると考えられる。したがって苔類培養細胞の二次代謝系を含めた代謝生理を詳細に調べることが、現在のところ行き詰まりを余儀なくされている維管束植物の培養細胞における二次代謝化合物の生産に対し新たな展開を示すものと期待される。

第5節 要 約

1. 野外で採集したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) および *Calypogeia peruviana* の配偶体を滅菌し、0.5 - 1.0 % グルコース、10 ppm フマル酸を含んだ MSK-1 培地で培養することにより無菌培養植物の再分化系を確立した。
2. *C. azurea* および *C. peruviana* 配偶体を滅菌し、6.0 % グルコース、20 ppm フマル酸を含んだ MSK-1 培地で培養することによりカルス誘導系を確立した。
3. 誘導した *C. azurea* および *C. peruviana* カルスを 2.0 - 4.0 % グルコース、10 ppm フマル酸を含む MSK-1 液体培地で培養することによって懸濁培養系を確立した。
4. 誘導した *C. azurea* カルスの成分分析を行ない親植物と同様にアズレン誘導体を産生することを確認した。その含量は親植物よりやや低かった。誘導直後の *C. azurea* カルスにおけるアズレン誘導体含量は培養フラスコ毎に大きな差が見られた。
5. 本章の内容の一部は投稿論文として発表した。

Nakagawara, S., Abe, S., Katoh, K., Konno, H. and Komemushi, S. (1994a)

Effect of sugars on the callus formation of *Marchantia polymorpha*. *Physiol.*

Plant. in press.

Nakagawara, S., Abe, S., Katoh, K., Konno, H. and Komemushi, S. (1994b)

Effect of sugars on the redifferentiation of *Marchantia polymorpha*. *Physiol.*

Plant. in press.

Table 3-1 Medium formulas of MSK-1 (Katoh 1988).

Mineral salts (mg l⁻¹) (according to Murashige and Skoog 1962)			
NH ₄ NO ₃	1650	KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170	H ₃ BO ₃	6.2
KI	0.83	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
Na-EDTA	37.3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8
Organic constituents (mg l⁻¹) (modification of Kao and Michayluk 1975)			
Vitamins			
inositol	100	nicotinamide	1
pyridoxine HCl (vitamin B6)	1	thiamine HCl (vitamin B1)	1
calcium pantothenate	1	folic acid	0.4
p-aminobenzoic acid	0.02	biotin	0.01
choline chloride	1	riboflavin (vitamin B2)	0.2
ascorbic acid (vitamin C)	2	cyanocobalamin (vitamin B12)	0.02
Organic acids			
sodium pyruvate	20	citric acid	40
malic acid	40	fumaric acid	40
Other sugars and sugar alcohols			
fructose	2.5	xylose	2.5
rhamnose	2.5	ribose	2.5
mannose	2.5	cellobiose	2.5
sorbitol	2.5	mannitol	2.5
pH: 5.7 before autoclaving			

Table 3-2 Induction of callus formation from *Calypogeia azurea* gametophytes. Sterilized gametophytes of *C. azurea* were placed onto MSK-1 medium containing various concentration of glucose, fumaric acid and plant growth regulators. Formation of callus was observed at the time to transfer the explants to fresh medium.

Compound				Time after initial inocuation*			
glucose (%)	fumaric acid (ppm)	BA (ppm)	2,4-D (ppm)	(week)			
				4	9	15	23
0.5	10	0	0.1	C+	R+	R	R, b
0.5	10	0	0.5	R+	R+	R+, b	R+, b
0.5	10	0	2.0	R	R+	R+	R++, b
0.5	10	0	8.0	R	R+	R	R++, b
0.5	20	0	0.1	C+, R	R	R+	R++, b
0.5	20	0	0.5	C, R	R+	R+	R++, b
0.5	20	0	2.0	R	R	R+	R++, b
0.5	20	0	8.0	R	R	R	R++, b
0.5	20	0.5	0.1	C+	R+	R+	R, b
0.5	20	0.5	0.5	R+	R+	R+	R, b
0.5	20	0.5	2.0	R	R+	R+	R, b
0.5	20	0.5	8.0	-	R+	R+	-
0.5	50	0	0.1	R+	R++	R+, b	R+, b
0.5	50	0	0.5	R	R+	R+	R+, b
0.5	50	0	2.0	R	R+	R+	R+, b
0.5	50	0	8.0	R	R+	R+	R+, b
2.0	10	0	0.1	C	C, R	R+, b	C, R+
2.0	10	0	0.5	C, R	C, R+	R+	C, R+
2.0	10	0	2.0	R	R+	R+	C, R+
2.0	10	0	8.0	R	R	R	C, R+
2.0	20	0	0.1	C, R	C, R	R	C, R+
2.0	20	0	0.5	C, R	R	R	C, R+
2.0	20	0	2.0	R	C, R	R	C, R+
2.0	20	0	8.0	R	C, R	R	C, R+
2.0	20	0.5	0.1	C+, R	C, R	R	R, b
2.0	20	0.5	0.5	C+	C, R+	R+	b
2.0	20	0.5	2.0	R	C, R	R	R, b
2.0	20	0.5	8.0	R	R	R	R, b
2.0	50	0	0.1	C	C, R	R	b
2.0	50	0	0.5	C	C, R+	R+	b
2.0	50	0	2.0	C	R	R+	b
2.0	50	0	8.0	-	R	R+	R, b
4.0	10	0	0.1	-	C	C	C+
4.0	10	0	0.5	-	C	C, R	C+, R
4.0	10	0	2.0	C	C	C, R	C+, R
4.0	10	0	8.0	-	C	C, R	C+, R
4.0	20	0	0.1	C	C	C+, R	C, R
4.0	20	0	0.5	-	C	C, R	C+, R+
4.0	20	0	2.0	-	C	C+, R	C+, R+
4.0	20	0	8.0	-	C	C, R	C+, R+
4.0	20	0.5	0.1	-	C	C, R	C+, R
4.0	20	0.5	0.5	R	C+	C+, R	C+, R
4.0	20	0.5	2.0	-	-	C	C+, R
4.0	20	0.5	8.0	-	-	C	C+, R
4.0	50	0	0.1	C	C	C	C, R+
4.0	50	0	0.5	-	C	C	C, R+
4.0	50	0	2.0	-	C	C	C+, R
4.0	50	0	8.0	C	-	C	C+, R
6.0	10	0	0.1	-	C	C	C++
6.0	10	0	0.5	-	C	C	C++
6.0	10	0	2.0	-	C	C	C++
6.0	10	0	8.0	-	-	C	C++
6.0	20	0	0.1	-	-	C	C++
6.0	20	0	0.5	R	C	C+	C+++
6.0	20	0	2.0	-	-	C	C++
6.0	20	0	8.0	-	C	C	C++
6.0	20	0.5	0.1	-	C	C	C++
6.0	20	0.5	0.5	-	C	C+	C++
6.0	20	0.5	2.0	-	-	C	C+
6.0	20	0.5	8.0	-	-	C	C+
6.0	50	0	0.1	-	-	C	C++
6.0	50	0	0.5	-	-	C	C++
6.0	50	0	2.0	-	-	C	C+
6.0	50	0	8.0	-	-	-	C

* n = 5 C : callus formed R : redifferentiated b : browned
 - : not grown + : grown ++ : well grown +++ : very well grown

Table 3-3 Induction of callus formation from *Calypogeia peruviana* gametophytes. Details were same as Table 3-2.

Compound			Time after initial inocuation*
glucose (%)	fumaric acid (ppm)	2,4-D (ppm)	(week)
			23
0.5	0	0.1	C+, R
0.5	0	0.5	C+, R+
0.5	0	2.0	C+, R++
0.5	0	8.0	C, R++
0.5	10	0.1	C+, R+
0.5	10	0.5	C, R+
0.5	10	2.0	C+, R
0.5	10	8.0	C
0.5	20	0.1	-
0.5	20	0.5	-
0.5	20	2.0	-
0.5	20	8.0	-
0.5	50	0.1	-
0.5	50	0.5	-
0.5	50	2.0	-
0.5	50	8.0	-
2.0	0	0.1	-
2.0	0	0.5	-
2.0	0	2.0	-
2.0	0	8.0	-
2.0	10	0.1	-
2.0	10	0.5	-
2.0	10	2.0	-
2.0	10	8.0	-
2.0	20	0.1	-
2.0	20	0.5	-
2.0	20	2.0	-
2.0	20	8.0	-
2.0	50	0.1	-
2.0	50	0.5	C
2.0	50	2.0	-
2.0	50	8.0	-
4.0	0	0.1	-
4.0	0	0.5	C+
4.0	0	2.0	-
4.0	0	8.0	-
4.0	10	0.1	-
4.0	10	0.5	C
4.0	10	2.0	-
4.0	10	8.0	-
4.0	20	0.1	C+
4.0	20	0.5	C+
4.0	20	2.0	C++
4.0	20	8.0	-
4.0	50	0.1	C
4.0	50	0.5	-
4.0	50	2.0	-
4.0	50	8.0	C
6.0	0	0.1	-
6.0	0	0.5	-
6.0	0	2.0	-
6.0	0	8.0	-
6.0	10	0.1	-
6.0	10	0.5	-
6.0	10	2.0	-
6.0	10	8.0	-
6.0	20	0.1	C
6.0	20	0.5	-
6.0	20	2.0	-
6.0	20	8.0	-
6.0	50	0.1	-
6.0	50	0.5	-
6.0	50	2.0	C
6.0	50	8.0	C

* n = 5 C : callus formed R : redifferentiated

- : not grown + : grown ++ : well grown

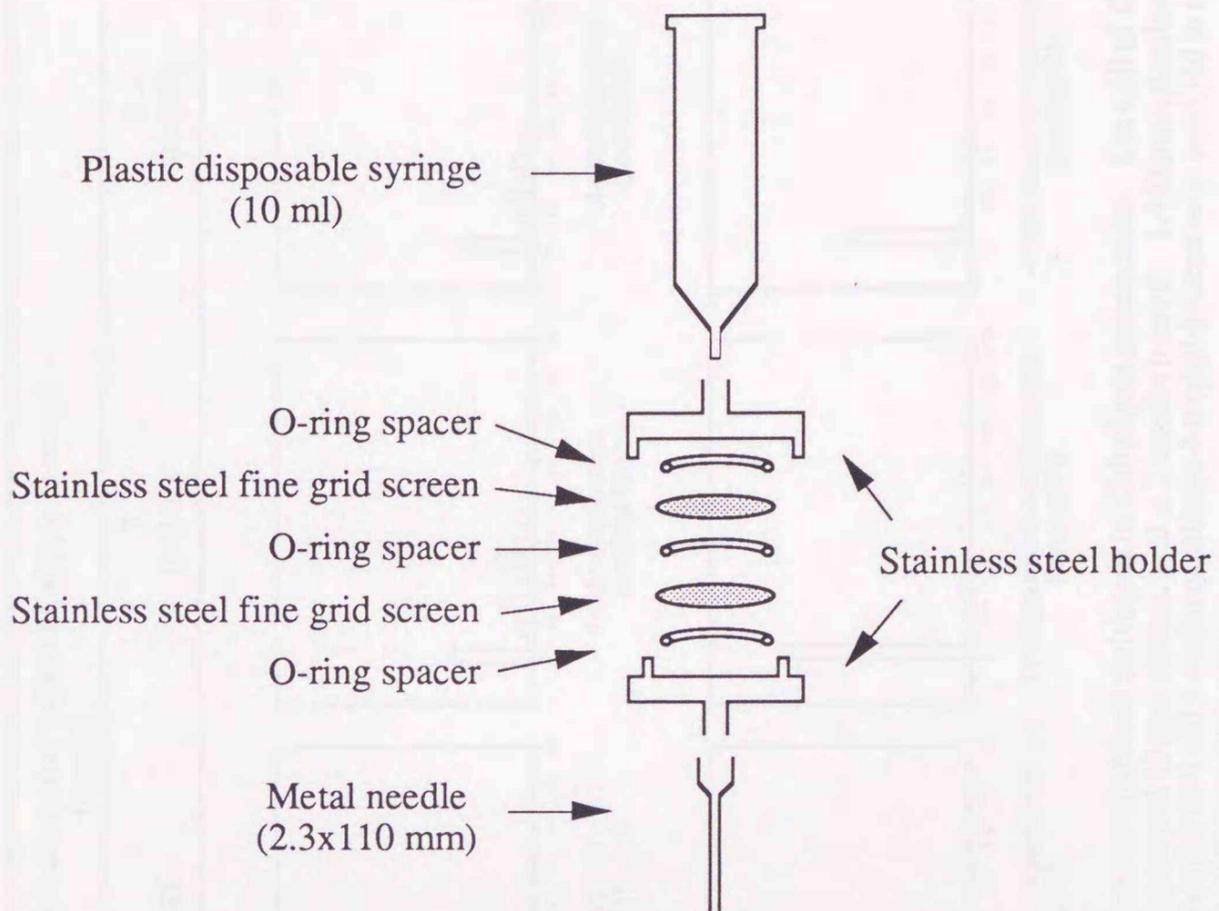


Fig. 3-1 Washing apparatus for surface-sterilizing small liverwort parts.

Inoculation time after induction of callus of *Calypogeia azurea*.
(month)

3 (n=256) 5 (n=178) 7 (n=167) 9 (n=118)

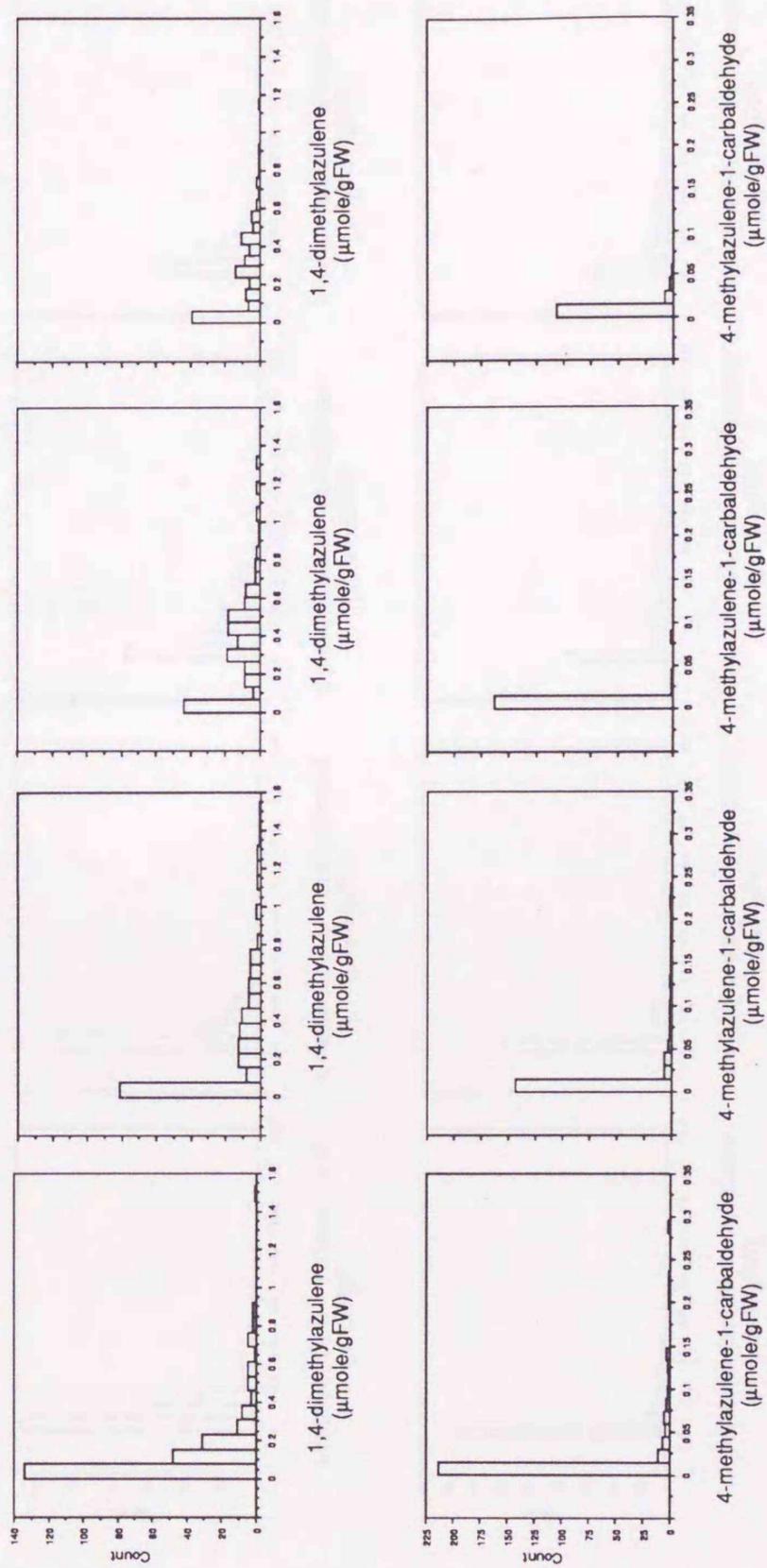


Fig. 3-2 Changes in the frequency distribution in the content of azulene derivatives in *Calypogeia azurea* callus. The calli of *C. azurea* were subcultured on MSK-1 agar medium containing 4 % glucose and 10 ppm fumaric acid at 2 months interval. 1,4-Dimethylazulene, 4-methylazulene-1-carbaldehyde, 4-methylazulene-1-carboxylic acid and 1-methoxycarbonyl-4-methyl-azulene were extracted in methanol and measured by HPLC when the calli of *C. azurea* were transferred to fresh medium.

Inoculation time after induction of callus of *Calypogeia azurea*.
(month)

3
(n=256)

5
(n=178)

7
(n=167)

9
(n=118)

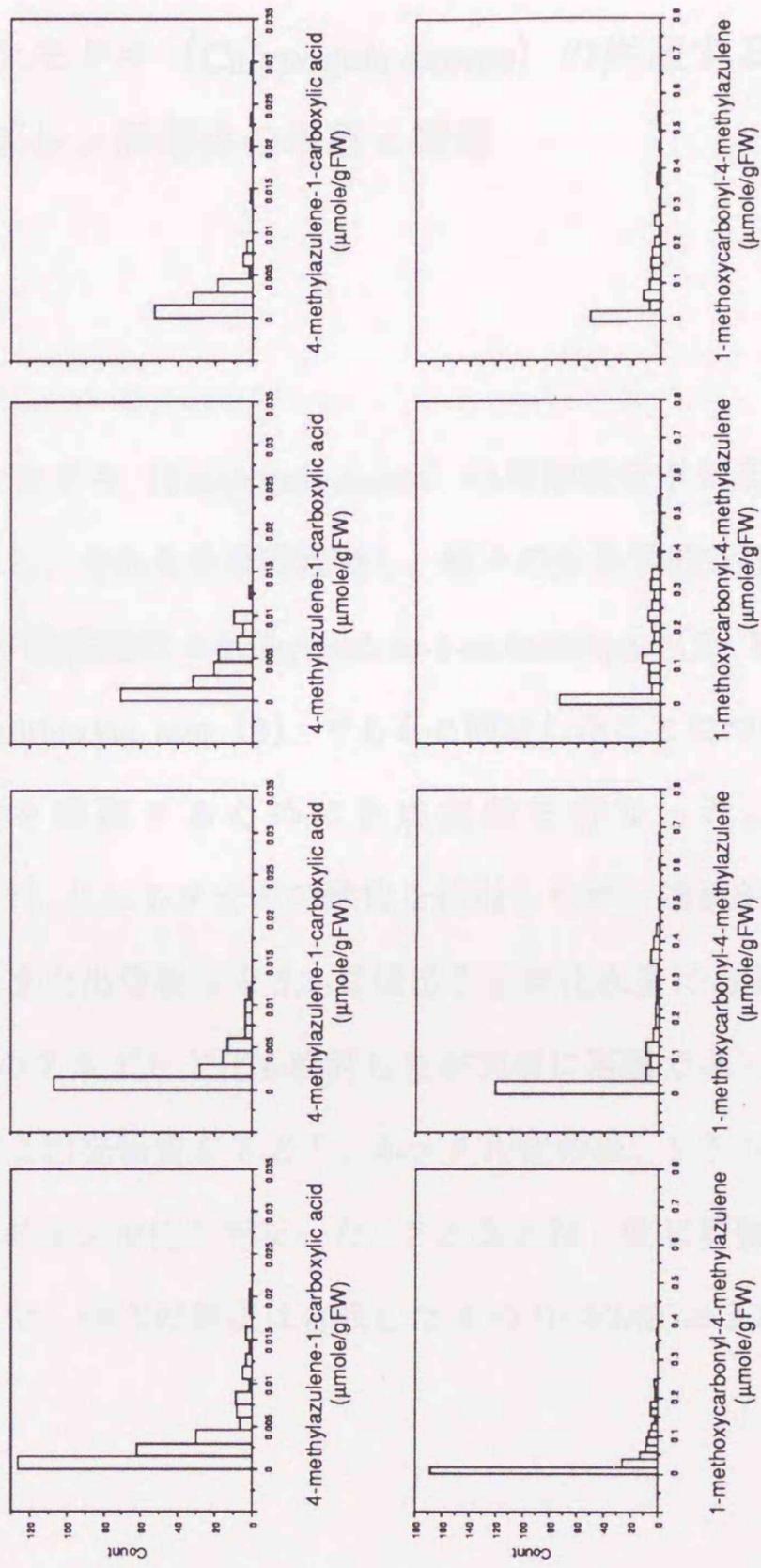


Fig. 3-2 (continued)

第4章 ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) の生産する 新規アズレン誘導体の単離と構造

第1節 序 論

本章ではホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) の精油成分中に未知化合物が存在することを見だし、それらを単離精製し、種々の分光学的分析法を駆使して構造解析を行ない、最終的に 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2, Fig. 1-1) および 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) であると同定したことについて述べる。

次いでその構造を確認するために合成実験を行なった。出発物質を 1,4-dimethylazulene (1) とし 1-メチルの酸化を検討したが、選択的に酸化することはできなかつた。また出発物質を 5,7-員環芳香族炭化水素である azulene (7, Fig. 4-18) とし 1 位のアルデヒド化も検討したが同様に困難であった。そこでカルボン酸の付加を考え出発物質を 7 とし、4-メチル化の後、1-トリフルオロアセチル化を経て 1-カルボキシル化を行なった。2 と 3 とは 1 位に置換した官能基が異なるだけであるので、構造の確認は合成した 3 の $^1\text{H-NMR}$ および IR スペクトルで行なった。

第2節 単離精製

1. 材料および方法

1) 植物材料

ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea* Stotler et Crotz) は 1988 年にドイツ中央部、Harz 山脈の Hohne Cliffs 付近で採集し、京都大学農学部長谷川二郎博士に同定を依頼した。採集したホラゴケモドキ (*C. azurea*) は 0.35 % 次亜塩素酸ナトリウム/Tween 80 で滅菌後、茎葉体 (配偶体) を無菌的に培養した。

2) 培養条件

ホラゴケモドキ (*C. azurea*) の培養は 2 % グルコース、50 mM フマル酸を含んだ 500 ml MSK-4 培地 (Table 4-1、Kato 1988) を用い、25 °C で連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) および 1 % CO₂ 富化した空気により、通気攪拌で行なった。MSK-4 培地は MSK-1 培地 (Table 3-1) の無機塩濃度のみを 1/2 濃度としたものである。3-4 週間毎に継代培養を行ない、抽出精製には 2 ヶ月間培養した茎葉体を用いた。

3) 抽出

新鮮重 600 g (水分含量 90.7 %、乾重量 56 g) を洗浄後、*n*-ヘキサン (ナカライテスク、京都) で 2 回抽出した。抽出液は無水硫酸ナトリウムで乾燥後濃縮し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (Hostettmann *et al.* 1990) に供した。

4) シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー

シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーには Silica gel 60 (粒径 40 - 63 μm , Merck, Darmstadt, FRG., 45 x 250 mm) を用い、窒素圧で加圧した。溶出は *n*-ヘキサンからジクロロメタン (ナカライテスク) : *n*-ヘキサン (1 : 1, v/v)、ジクロロメタン : *n*-ヘキサン (2 : 1, v/v)、2%メタノール (ナカライテスク) /ジクロロメタンへ段階的に溶出溶媒の極性を上げて行なった。流速は 20 - 30 ml 分⁻¹とした。さらに逆相シリカゲル (LiChroprep RP-18, 粒径 40 - 63 μm , Merck) を用いたフラッシュカラムクロマトグラフィーにより単離精製を行なった。

2. 結 果

約 2 ヶ月間培養したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) 培養茎葉体 (新鮮重 600 g、乾重量 56 g) を *n*-ヘキサン で 2 回抽出し、粗抽出物 1.42 g を得た。濃青色の抽出物 1.42 g を少量の *n*-ヘキサンの溶解し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーに供した。段階的に極性を上げて溶出し、画分 I、II、III を得、ロータリーエバポレータで濃縮し、それぞれ 0.30、0.37、0.35 g を得た。濃青色を呈する画分 I は *n*-ヘキサンのみの溶出で得られ、1,4-dimethylazulene (1, Fig. 1-1) 0.25 g (乾重量当り 0.45%) を得た。画分 I には他に bicyclogermacrene、anastreptene、bicycloelemene および trinoranastreptene (Fig. 2-2) が含まれることを GC-MS 分析で標準品のリテンションタイムおよびマススペクトルと構成成分のそれらとを比較して同定した。

ジクロロメタン : *n*-ヘキサン (2 : 1, v/v) で得られた赤紫色の画分 II を濃縮し、再度シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60 ; 粒径 40

-63 μm , Merck, 45 x 250 mm) に供した。溶出はジクロロメタン：*n*-ヘキサン (1:4, v/v) で行ない、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4, Fig. 1-1) 0.30 g (0.54 % dry wt) を得た。さらに溶出溶媒の極性を段階的にジクロロメタン：*n*-ヘキサン (9:1, v/v) まで上げて 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2, Fig. 1-1) を含む赤色画分を得た。

この画分を逆相シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (LiChroprep RP-18, 粒径 40 - 63 μm , Merck, 17 x 250 mm) に供し、溶出はアセトニトリル (ナカライテスク) : 蒸留水 (Cica - Merck, Tokyo) (3:2, v/v) で行ない、この操作を 2 回反復した。溶出された 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) を濃縮して 0.037 g (0.067 % dry wt) を得た。展開溶媒としてアセトニトリル: 蒸留水 (7:3, v/v) を用いた薄層クロマトグラフィー (HPTLC Pre-coated Plate RP-18 F254s, Merck) で赤紫色の単一のスポットを得 (Rf 0.39)、1% バニリン/1% 硫酸/エタノール (各ナカライテスク) で発色させたところ、黄色を呈した。

2% メタノール/ジクロロメタンによる溶出で得た赤褐色の画分 III を濃縮し、アセトニトリルに溶解すると白色沈殿が析出したのでこれを除去し、この操作を 3 回反復した。この画分の全量を逆相のシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (LiChroprep RP-18, 粒径 40 - 63 μm , Merck, 17 x 250 mm) に供し、溶出はアセトニトリル: 蒸留水 (1:1, v/v) で行ない、この操作を 2 回反復した。溶出された 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) を濃縮し 0.0095 g (0.017 % dry wt) を得た。展開溶媒としてアセトニトリル: 蒸留水 (7:3, v/v) を用いた薄層クロマトグラフィー (HPTLC Pre-coated Plate RP-18 F254s, Merck) で赤紫色の単一のスポットを得 (Rf 0.58)、1% バニリン/1% 硫酸/エタノールで発色させたところ、ほとんど変化は見られず赤紫色を呈した。

第3節 構造決定

1. 機器分析

プロトン (^1H) - および炭素-13 (^{13}C) -核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは Nicolet GN-300 spectrometer (各々300 および 75 MHz) で、内部標準としてテトラメチルシラン (TMS) を含んだ重水素化クロロホルム (CDCl_3) 中で測定した。質量 (MS) スペクトルは Hitachi RMU-6 spectrometer を用い、70 eV の直接導入で測定した。赤外 (IR) スペクトルは Nicolet FT-IR 7199 spectrometer で、紫外および可視 (UV-visible) 吸収スペクトルは Shimadzu UV-265 UV-visible recording spectrophotometer で測定した。

2. 帰 属

シリカゲルおよび逆相シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーによって画分 II より単離した 2 は高分解能質量分析 (HR-MS) により $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$ ($[\text{M}^+]$ m/z 170.0710, calcd. 170.0731) の分子式であることがわかった (Fig. 4-1)。紫外および可視部の吸収スペクトルは、ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) に含まれる (Meuche and Huneck 1966) ことが知られている既知物質である 1-methoxy-carbonyl-4-methylazulene (4) と非常によく類似していた (Fig. 4-2、4-3)。それゆえ 2 は類似構造を有する置換アズレンであろうと推定した。紫外-可視吸収スペクトルデータは以下のとおりである。

$\lambda_{\text{max}}^{\text{acetonitrile}}$ nm (ϵ) 581.0 sh (226), 554.0 sh (394), 521.5 (473), 384.5 sh (16600),

372.0 (21700), 343.0 sh (10500), 307.5 (80400), 296.5 sh (66300), 272.5 sh (19600), 236.0 (50300), 224.5 (53600), 210.5 (42700)。

これは 521.5 - 554 nm のピークに由来する赤紫色を呈した。また、その赤外吸収 (IR) スペクトルでは、芳香環に置換した formyl 基による吸収帯 (ν_{\max} 1646 cm^{-1}) を示した (Fig.4-4)。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、 δ (化学シフト, ppm) 2.99 に 1 個のアリルメチルプロトン、7.37 (d), 7.55 (d), 7.58 (dd), 7.79 (dd), 8.23 (d) および 9.65 (d) に 6 個の olefinic なプロトン、そして 10.36 (s) に芳香環に置換した formyl 基のプロトンのシグナルが観測された (Fig. 4-5)。

$^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルでは、 δ (ppm) 25.2 に 1 個のメチル炭素、116.6, 126.3, 128.3, 131.5, 137.8, 138.7, 139.8, 141.3, 144.3, 149.9 に 10 個の芳香環炭素、そして 186.8 に芳香環に置換した 1 個の formyl 炭素のシグナルが観測された (Fig. 4-6)。

また、その distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) スペクトルでは 1 個のメチル炭素、7 個のメチン炭素、4 個の 4 級炭素が観測され (Fig.4-6)、formyl 基の存在も考えあわせれば分子式は $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}$ (M_r 170) となり、HR-MS の結果と一致した。

$^1\text{H-}^1\text{H}$ correlation spectroscopy (COSY) の測定の結果、 \blacksquare - $^2\text{CH}=\text{}^3\text{CH}$ - \blacksquare および \blacksquare - $^5\text{CH}=\text{}^6\text{CH}=\text{}^7\text{CH}=\text{}^8\text{CH}$ - \blacksquare の 2 種の独立したスピン系の存在することが明らかとなった (Fig. 4-7)。

2 の ^1H - および $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルと既に報告されている 1,4-dimethylazulene (1) のそれらを比較した結果、2 は 1 と非常に良く似たアズレン誘導体であることが明らかとなった (Table 4-2, 4-3)。

2 の芳香環に置換した formyl 基の結合位置については phase sensitive nuclear

Overhauser effect spectroscopy (NOESY) および ^1H -detected multiple bond heteronuclear multiple quantum coherence (HMBC) 実験によって決定した。NOESY 実験によると C-1 の formyl 基のプロトンと C-2 および C-8 についたプロトンとの間に、また、アリルメチルプロトンと C-3 および C-5 についたプロトンとの間に核オーバーハウザー効果 (NOE) が存在したことから formyl 基は C-1 に結合していること、メチル基は C-4 に置換していることが推定された (Fig. 4-8)。HMBC 実験では、 $^2\text{C-H}$ は C-1 の formyl 基とクロスピークを示しており、 $^5\text{C-H}$ のシグナルは C-4 のメチル炭素とクロスピークを示した (Fig. 4-9)。

これらの結果から、化合物 2 は 4-methylazulene-1-carbaldehyde と決定した。

シリカゲルおよび逆相シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーによって画分 III より単離した 3 は HR-MS により $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ ($[\text{M}^+]$ m/z 186.0676, calcd. 186.0680) の分子式を有することが分かった (Fig. 4-10)。紫外および可視部のスペクトルは 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) のスペクトルと類似していた (Fig. 4-11、4-3)。それゆえ 3 も 4 と類似構造を有する置換アズレンであろうと推定した。

紫外-可視吸収スペクトルデータは以下のとおりである。

$\lambda_{\text{max}}^{\text{acetonitrile}}$ nm (ϵ) 590.0 sh (345), 554.0 (685), 525.0 (765), 366.0 (6410), 338.5 (4499), 299.0 (33900), 293.0 (31700), 290.0 (31500), 234.0 (19700), 218.0 (16300), 204.0 (14400)。

3 は 525 - 554 nm のピークに由来するややくすんだ赤紫色を呈した。

3 の IR スペクトルにおいては芳香環に置換した carboxyl 基に帰属される吸収帯 (ν_{max} 1636 cm^{-1}) を示した (Fig. 4-12)。

$^1\text{H-NMR}$ スペクトルでは、 δ (ppm) 2.99 に 1 個のメチルプロトン、7.36 (d),

7.50 (d), 7.54 (dd), 7.76 (dd), 8.44 (d) および 9.76 (d) に 6 個の olefinic なプロトンの各シグナルが観測された (Fig. 4-13)。Carboxyl プロトンは観測されなかったが、これは carboxyl 基のプロトンの交換速度の高いことに起因すると考えられる。 ^{13}C -NMR スペクトルでは、 δ (ppm) 25.2 に 1 個のメチル基の存在を示し、 δ (ppm) 115.4, 116.0, 126.9, 130.7, 138.0, 138.1, 140.1, 141.0, 143.4 および 148.9 に 10 個の芳香環炭素、そして 170.2 に芳香環に置換した 1 個の carboxyl 炭素の存在が示された (Fig. 4-14)。

また、その DEPT スペクトルでは、1 個のメチル炭素、6 個のメチン炭素および 1 個の carboxyl 炭素を加えた 5 個の 4 級炭素が観測され (Fig. 4-14)、carboxyl 基の存在を考えあわせると分子式は $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2$ (M_r 186) となり、HR-MS の結果と一致した。

3 についても ^1H - ^1H COSY 実験を行なった結果、2 種の独立したスピン系である \blacksquare - $^2\text{CH}=\text{}^3\text{CH}$ - \blacksquare および \blacksquare - $^5\text{CH}=\text{}^6\text{CH}-\text{}^7\text{CH}=\text{}^8\text{CH}$ - \blacksquare が存在することが推測された (Fig. 4-15)。

さらに、 ^1H -detected heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC) 実験によって、C-5 のメチン炭素と、 δ 7.50 (d) のプロトンとがクロスピークを示し、C-7 のメチン炭素と δ 7.54 (dd) のプロトンとがクロスピークを示したので ^1H -NMR のシグナルを δ 7.50 (H-5), 7.54 (H-7) と帰属した (Fig. 4-16)。

3 についてもその ^1H - および ^{13}C NMR スペクトルについて 1,4-dimethylazulene (1) のスペクトルと比較したところ、よく類似していたためアズレン誘導体であることが示された (Table 4-2, 4-3)。

3 の 2 種の置換基、メチル基と carboxyl 基の結合位置については、NOESY 実験によって決定した。NOESY によるとメチルプロトンと C-3 および C-5 についたプロトンの双方との間に NOE が観測された (Fig. 4-17)。これらの結果から、

メチル基は C-4 位に置換していることが分かったので carboxyl 基を C-1 位に帰属し、最終的に 3 を 4-methylazulene-1-carboxylic acid と決定した。

4-Methylazulene-1-carbaldehyde および 4-methylazulene-1-carboxylic acid は赤紫色を呈する油状物質であった。

第4節 4-Methylazulene-1-carboxylic acid の化学合成

1. 合成方法

前節でホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より単離精製し、分光学的実験により帰結した 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) の化学構造について化学合成を行ない確認した。

合成デザインは Fig. 4-18 のとおりである。

1) Azulene (7) から 4-methylazulene (9) への誘導

アルゴン気流下、azulene (7) 500 mg を 20 ml 無水ジエチルエーテルに溶解し、氷冷下メチルリチウム/ジエチルエーテル溶液 (2 当量) を加えた。室温で 2 時間攪拌した後、 -50°C まで冷却し、1 ml エタノールおよびヒドロ芳香族化合物からの脱水素剤であるクロラニル (chloranil) を 1.76 g 加え、室温で 12 時間攪拌を続けた。反応液に 20 ml 脱イオン水および 10 ml ジエチルエーテルを加えて不溶物を濾別した。ジエチルエーテル溶液を 4 回水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、ジエチルエーテルを溜去し、1.98 g の粗生成物を得た。これを 100 g シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーを行ない、*n*-ヘキサンで溶出し、4-methylazulene (9) 200 mg (収率 40.0%) を得た。

2) 4-Methylazulene (9) から 1-trifluoroacetyl-4-methylazulene (10) への誘導

4-Methylazulene (9) 50 mg を 10 ml 四塩化炭素に溶解し、0.5 ml 無水トリフルオロ酢酸を加え、室温で 5 分間攪拌した後、50 ml ジエチルエーテルを加え、5

回水洗した。ジエチルエーテル溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を溜去し、1-trifluoroacetyl-4-methylazulene (10) 62 mg (収率 12.4%) を得た。

この時、薄層クロマトグラフィー (TLC) (ベンゼン：ジクロロメタン = 1 : 1, v/v) でチェックし、TLC 上で単一のスポットであることを確認した。

3) 1-Trifluoroacetyl-4-methylazulene (10) から 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) への誘導

1-Trifluoroacetyl-4-methylazulene (10) 62 mg を 620 mg 水酸化カリウム、2.5 ml 脱イオン水、2.5 ml エタノールで 4 時間加熱還流した後、20 ml 脱イオン水を加え、30 ml ジクロロメタンで非水溶性物質を抽出除去した。水層に希塩酸を加え、pH 2-3 に調整した後、50 ml ジクロロメタンで抽出した。ジクロロメタンを無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を溜去し 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) 32 mg (収率 6.4%) を得た。

生成物は TLC (クロロホルム：メタノール = 5 : 1, v/v) で単一のスポットを与えた。

得られた 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) について、 $^1\text{H-NMR}$ および IR スペクトルを測定した。

2. 結 果

この合成実験における第1段階の反応である azulene (7) のメチル化では、lithium-4-methyldihydroazulene (8) を単離せず、直接 4-methylazulene (9) へ反応させた。これは 8 が反応容器に付着するような結晶であり、取り出しが困難であったため、操作上のロスを避けるためである。メチルリチウムの使用量はここで

は2当量としたが、1当量では未反応の azulene (7) が残ってしまい、また、7 と 4-methylazulene (9) とは TLC 上のスポットが接近しており、スケールアップ 時における精製工程で不利であることから連続的に反応させた。過剰のメチルリ チウムを使用により、7 はほぼ全量が反応し、効率的に 9 が得られた。その結果、 azulene (7) から収率 6.4% で 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) を得ることが できた。

$^1\text{H-NMR}$ (Fig. 4-19) および IR スペクトル (Fig. 4-20) に示したように、合成 した 4-methylazulene-1-carboxylic acid は前節でホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より単離精製した天然物のスペクトルと完全に一致した。これらのことから最終 的に 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) の構造を確認した。

第5節 考 察

第2章でも述べたように苔類は様々な構造を有するテルペノイドを産生しており、またその中には生理活性を有する化合物も多い (Asakawa 1982, 1990)。これらのテルペノイドは通常、数種類の誘導体の混合物として含まれており、それらの詳細な検索は必ずしも十分ではない。近年では Nagashima *et al.* (1990) が苔類 ツボミゴケ (*Jungermania*) 属の六種から カウレン型など数種のジテルペンやゲルマクラン型セスキテルペンなどのテルペノイドを単離し、そのうち二種は新規化合物であった。また Nabeta *et al.* (1993) は茎葉体苔類の一種 ツクシウロコゴケ (*Heteroscyphus planus*) 培養細胞よりモノテルペンおよび三種の新規化合物を含むカディナン型セスキテルペンを単離し、詳細な構造解析を行なっている。しかしながらこれらのテルペノイドの生理的機能は依然不明である。

本研究ではホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) 配偶体の液体培養においても 1,4-dimethylazulene (1) および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) が産生されることを明らかにし、さらに 1 から 4 への生合成中間体と考えられるアズレン誘導体を検索して 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) ならびに 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) を単離精製し、それらの構造を決定した。

2 の培養細胞における含量は 0.067 % dry wt で、3 は 0.017 % dry wt であったが、これら以外にも TLC プレート上で同じような R_f 値を有する 2 - 3 種の赤紫色微量物質の存在を認めた。

これらのアズレン誘導体に関する著者らの報告 (Nakagawara *et al.* 1992) と全く同時に Siegel *et al.* (1992) も野外で採集したホラゴケモドキ (*C. azurea*) 茎葉体および培養したホラゴケモドキ茎葉体より同じ 2 および 3 の存在を報告した。

Siegel *et al.* (1992) はこの二種以外の微量化合物として、4位にもアルデヒド基またはカルボキシル基が置換したアズレン誘導体六種についても報告している。

さらに Nagashima *et al.* (1990) はツボミゴケ (*Jungermania*) 属の産生するジテルペンがそのタイプによって種間分布が異なることを示している。このことは分類学上有用な事実であるが、しかしなぜある分類学上近縁な種が、よく似ているが少しずつ化学構造の異なった二次代謝化合物を蓄積するのかということは明らかではない。分類学上近縁な種は形態的に類似した体制を有しており、それはその生活環境に適応しているものとされている (山崎ら 1974)。そして植物がその機能の分化として種々の二次代謝化合物を産生することはその生活環境に対応した生合成の制御の結果であると考えられている。このことは植物の二次代謝化合物が、ある生活環境における他の生物などとの相互作用にかかわるものであるということを前提としている考えである。しかしながら分類学上近縁な種が類似した生活環境にあるにもかかわらず、種特異的に少しずつ化学構造の異なった二次代謝化合物を構成成分として産生することにはどのような意義があるのか、あるいはこのような種に固有の二次代謝化合物が、それぞれに特異的な生理的機能を有するのかどうかについては未だ明らかではない。逆に、苔類で見いだされたカディナン型セスキテルペンの新規化合物の一種と非常によく似た化合物がセンダン科 (*Meliaceae*) 植物に見いだされ、さらにある種の腔腸動物にさえ見いだされたことも報告されている (Nabeta *et al.* 1993)。このように何段階もの経路を経て生合成される複雑な化学構造を有する植物の二次代謝化合物が、ある場合は近縁の種の間で少しずつ異なる構造をとり、またある場合では同様の化合物が植物界を越え動物界にさえ不連続的に存在するのである。このような存在様式を含め、二次代謝化合物の生物一般における生理的意義を理解することは大変困難である。しかしながらテルペノイドに限らず二次代謝化合物は動植物界のみならず、

微生物界にも広く存在する。ゆえにこれら二次代謝系の獲得がそれ程新しい時代の出来事ではなく、より生命の誕生に近い時点ですでに獲得していた可能性が考えられ、したがって地球に存在する生命にとって根本的に重要な役割を有するものと推察される。

このように植物の二次代謝化合物の本質的な意義は不明であるが、その応用面では人類に多大の恩恵を与えており、食品用色素、香料や生薬あるいは医薬原料として欠かせないものである。

ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) の産生する 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) および 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) はその構造から抗炎症作用などの薬理作用が期待できるためそれらの安全性試験も含め検討した。その結果について次章で述べる。

第6節 要 約

1. 培養したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より二種の新規アズレン誘導体を単離精製し、各種機器分析によりそれらの構造について、4-methylazulene-1-carbaldehyde および 4-methylazulene-1-carboxylic acid であると結論した。
2. Azulene を出発物質として 4-methylazulene-1-carboxylic acid を三段階の反応で合成し、その $^1\text{H-NMR}$ および IR スペクトルと天然物のスペクトルとの比較により 4-methylazulene-1-carboxylic acid の構造を確認した。
3. 本章の内容の一部は投稿論文として発表した。

Nakagawara, S., Katoh, K., Kusumi, T., Komura, H., Nomoto, K., Konno, H., Huneck, S. and Takeda, R. (1992) Two azulenes produced by the liverwort, *Calypogeia azurea*, during *in vitro* culture. *Phytochemistry* 31: 1667- 1670.

Nabeta, K., Katayama, K., Nakagawara, S. and Katoh, K. (1993) Sesquiterpenes of cadinane type from cultured cells of the liverwort, *Heteroscyphus planus*. *Phytochemistry* 32: 117-122.

Table 4-1 Medium formulas of MSK-4 (Kato 1988).

Mineral salts (mg l⁻¹) (0.5 strength of MSK-1)

NH ₄ NO ₃	825	KNO ₃	850
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220	MgSO ₄ ·7H ₂ O	185
KH ₂ PO ₄	85	H ₃ BO ₃	3.1
KI	0.415	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0125	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0125
Na-EDTA	18.65	FeSO ₄ ·7H ₂ O	13.9

Organic constituents (mg l⁻¹) (same as the MSK-1 medium)

Vitamins

inositol	100	nicotinamide	1
pyridoxine HCl (vitamin B6)	1	thiamine HCl (vitamin B1)	1
calcium pantothenate	1	folic acid	0.4
<i>p</i> -aminobenzoic acid	0.02	biotin	0.01
choline chloride	1	riboflavin (vitamin B2)	0.2
ascorbic acid (vitamin C)	2	cyanocobalamin (vitamin B12)	0.02

Organic acids

sodium pyruvate	20	citric acid	40
malic acid	40	fumaric acid	40

Other sugars and sugar alcohols

fructose	2.5	xylose	2.5
rhamnose	2.5	ribose	2.5
mannose	2.5	cellobiose	2.5
sorbitol	2.5	mannitol	2.5

pH: 5.7 before autoclaving

Table 4-2 ¹H-NMR spectral data for azulene derivatives.*

	1-CH ₃	4-CH ₃	C-2	C-3	C-5	C-6	C-7	C-8	1-CHO
4-Methylazulene -1-carbaldehyde	δ	2.99 s	8.23 d	7.37 d	7.55 d	7.79 dd	7.58 dd	9.65 d	10.36 s
	J		4.3	4.3	10.2	10.2	10.0	9.6	
4-Methylazulene -1-carboxylic acid	δ	2.99 s	8.44 d	7.36 d	7.50 d	7.76 dd	7.54 dd	9.76 d	
	J		4.3	4.3	10.1	10.1	9.7	9.7	
1,4-Dimethylazulene	δ	2.67	7.66 d	7.35 d	7.09 d	7.47 dd	7.04 dd	8.25 d	
	J		3.6	3.6	9.6	9.6	10.0	9.6	
1-Methoxycarbonyl- 4-methylazulene	δ	2.97 s	8.32 d	7.21 d	7.45 d	7.72 dd	7.49 dd	9.71 d	
	J		4.3	4.3	10.1	10.1	9.7	9.8	

*All assignments were accomplished by ¹H-¹H COSY, NOESY, ¹H-detected heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) and ¹H-detected multiple-bond heteronuclear multiple-quantum coherence (HMBC) experiments. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm using TMS as an internal standard and coupling constants (J) by Hz.
s = singlet, d = doublet, dd = doublet of doublets.

Table 4-3 ¹³C-NMR spectral data for azulene derivatives.*

	1-CH ₃	4-CH ₃	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	1-CHO	1-COOH	1-COOCH ₃
4-Methylazulene -1-carbaldehyde	δ	25.2	126.3	137.8	116.6	149.9	128.3	138.7	131.5	141.3	139.8	144.3	186.8		
4-Methylazulene -1-carboxylic acid	δ	25.2	116.0	140.1	115.4	148.9	130.7	138.1	126.9	138.0	141.0	143.4		170.2	
1,4-Dimethylazulene	δ	12.9	24.3	126.4	136.2	114.0	146.0	125.5	120.2	133.7	137.6	136.5			
1-Methoxycarbonyl- 1-methylazulene	δ		25.1	116.8	139.0	115.1	148.6	130.1	126.4	137.8	140.3	142.6		166.0	51.0

*All assignments were accomplished by ¹³C-¹H COSY experiments. Chemical shifts (δ) were expressed in ppm using TMS as an internal standard.

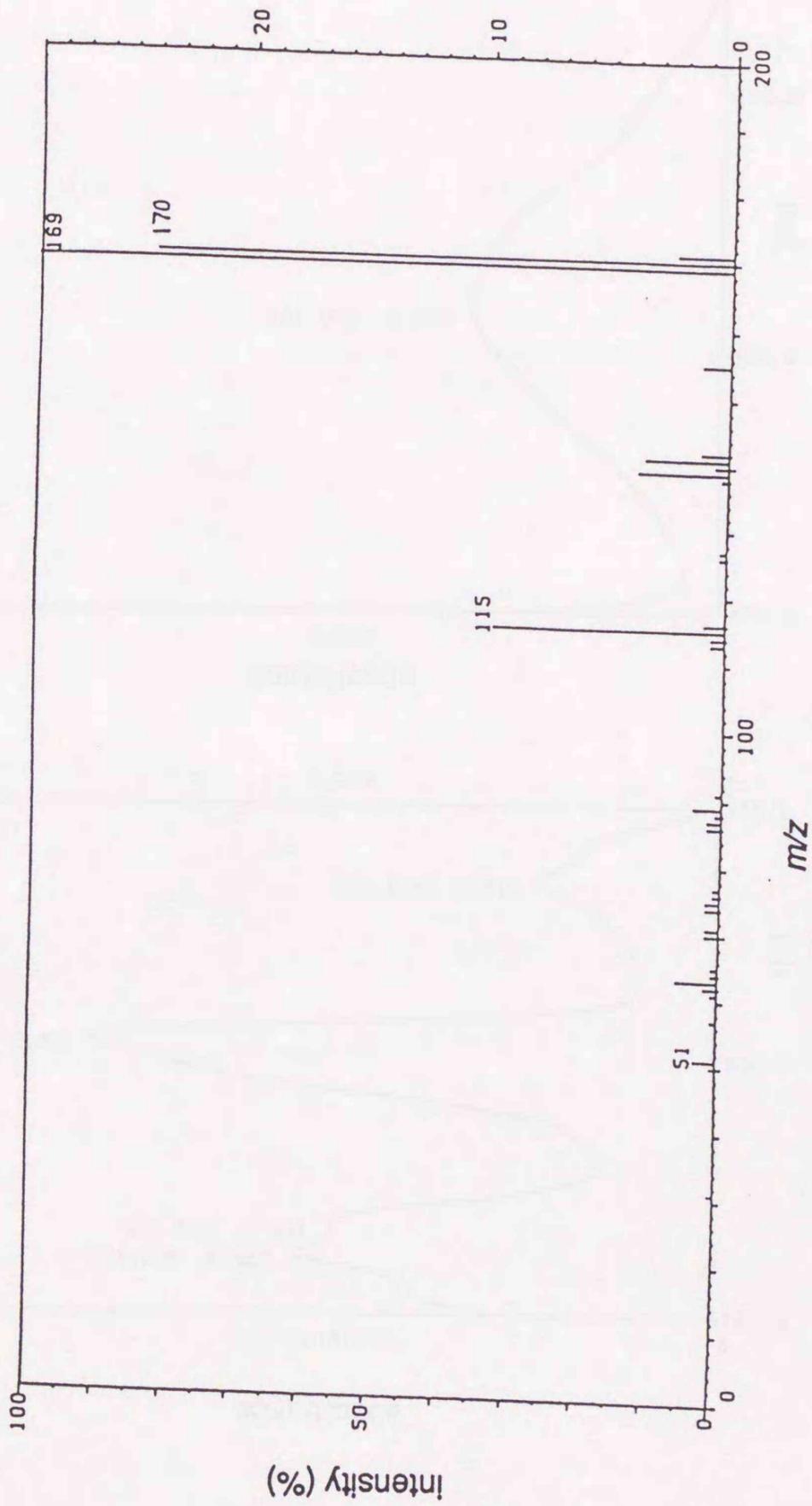


Fig. 4-1 MS spectrum of compound 2. The spectrum was measured with a Hitachi RMU-6 spectrometer using a direct inlet system operating at 70 eV.

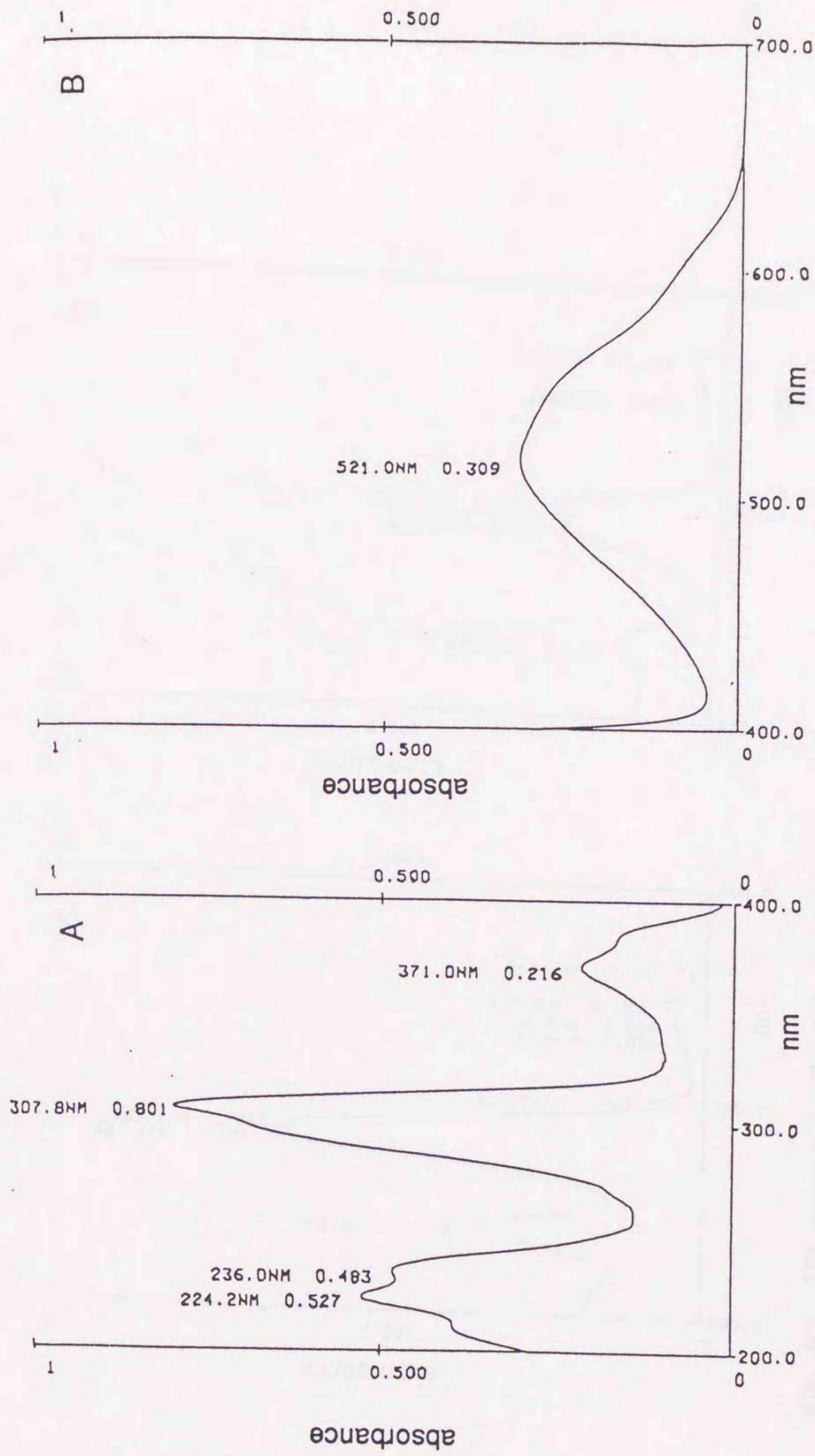


Fig. 4-2 UV (A) and visible (B) spectra of compound 2. The spectra were measured with a Shimadzu UV-265 UV-visible recording spectrophotometer. Compound 2 (0.014 mM) was dissolved in acetonitrile for UV spectrum and 0.282 mM for visible spectrum.

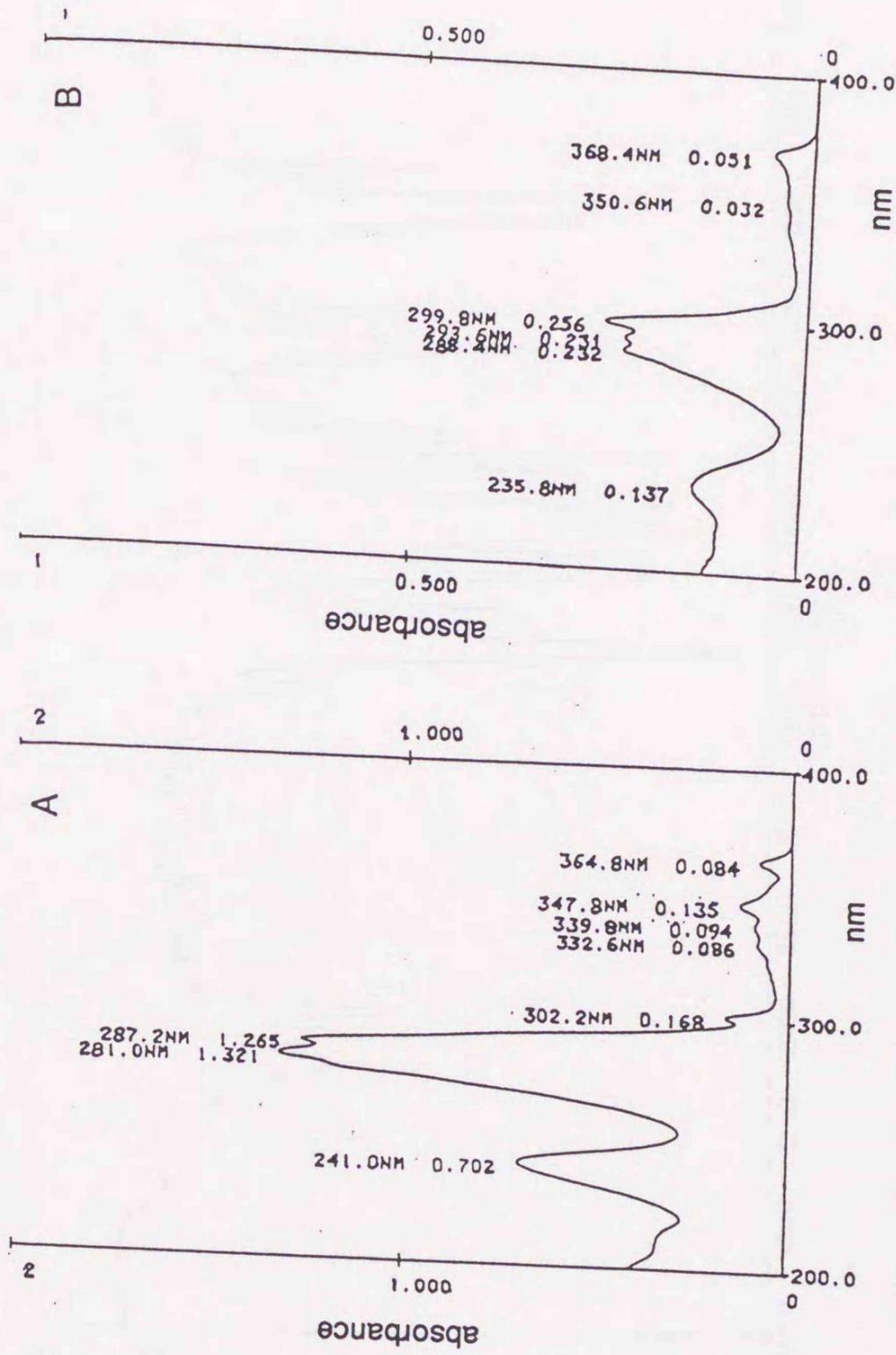


Fig. 4-3 UV spectra of 1,4-dimethylazulene (A) and 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (B). The spectra were measured with a Shimadzu UV-265 UV-visible recording spectrophotometer. 1,4-Dimethylazulene (0.032 mM) and 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (0.019 mM) were dissolved in *n*-hexane.

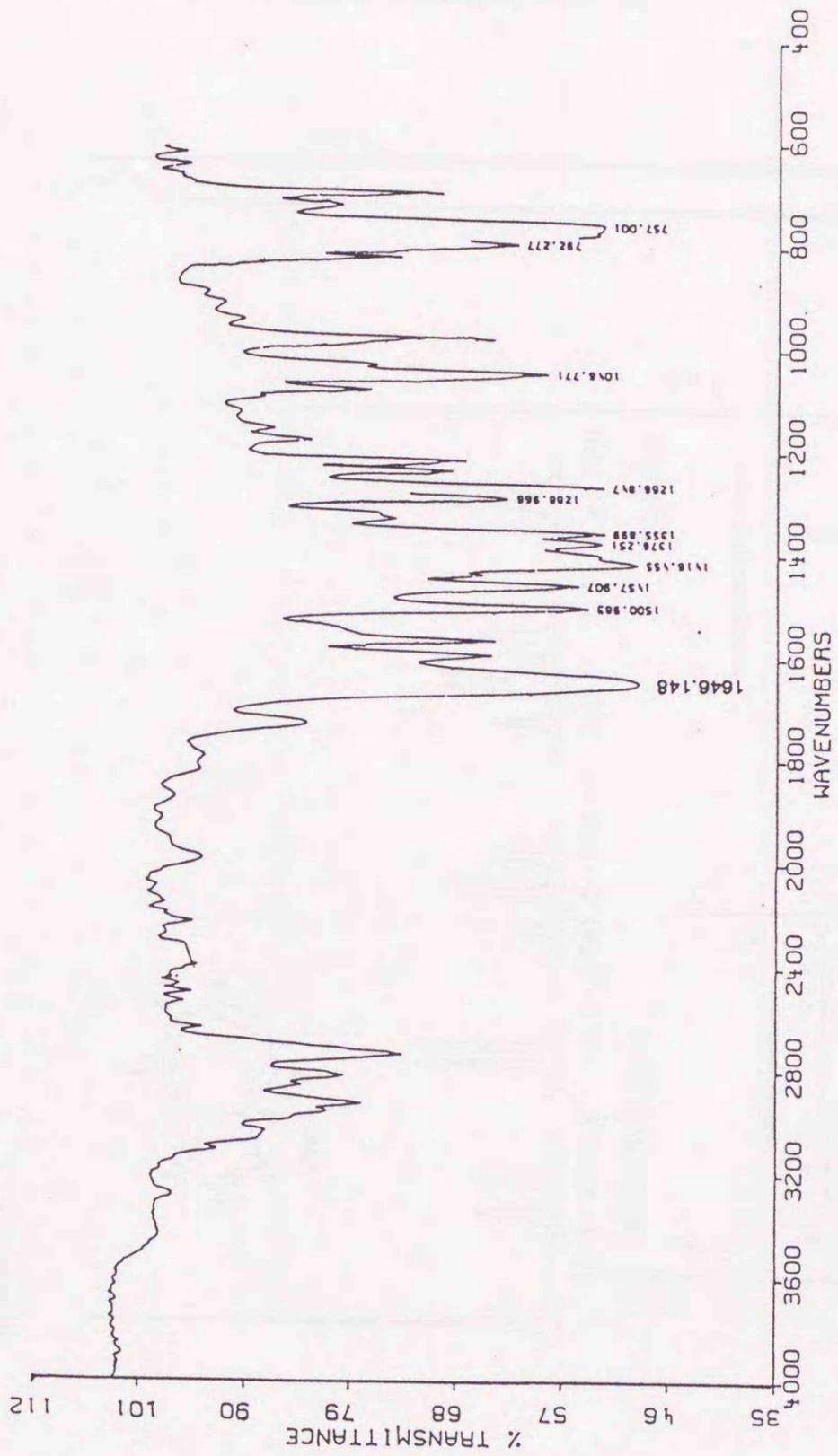


Fig. 4-4 IR spectrum of compound 2. The spectrum was measured with a Nicolet FT-IR 7199 spectrometer (film).

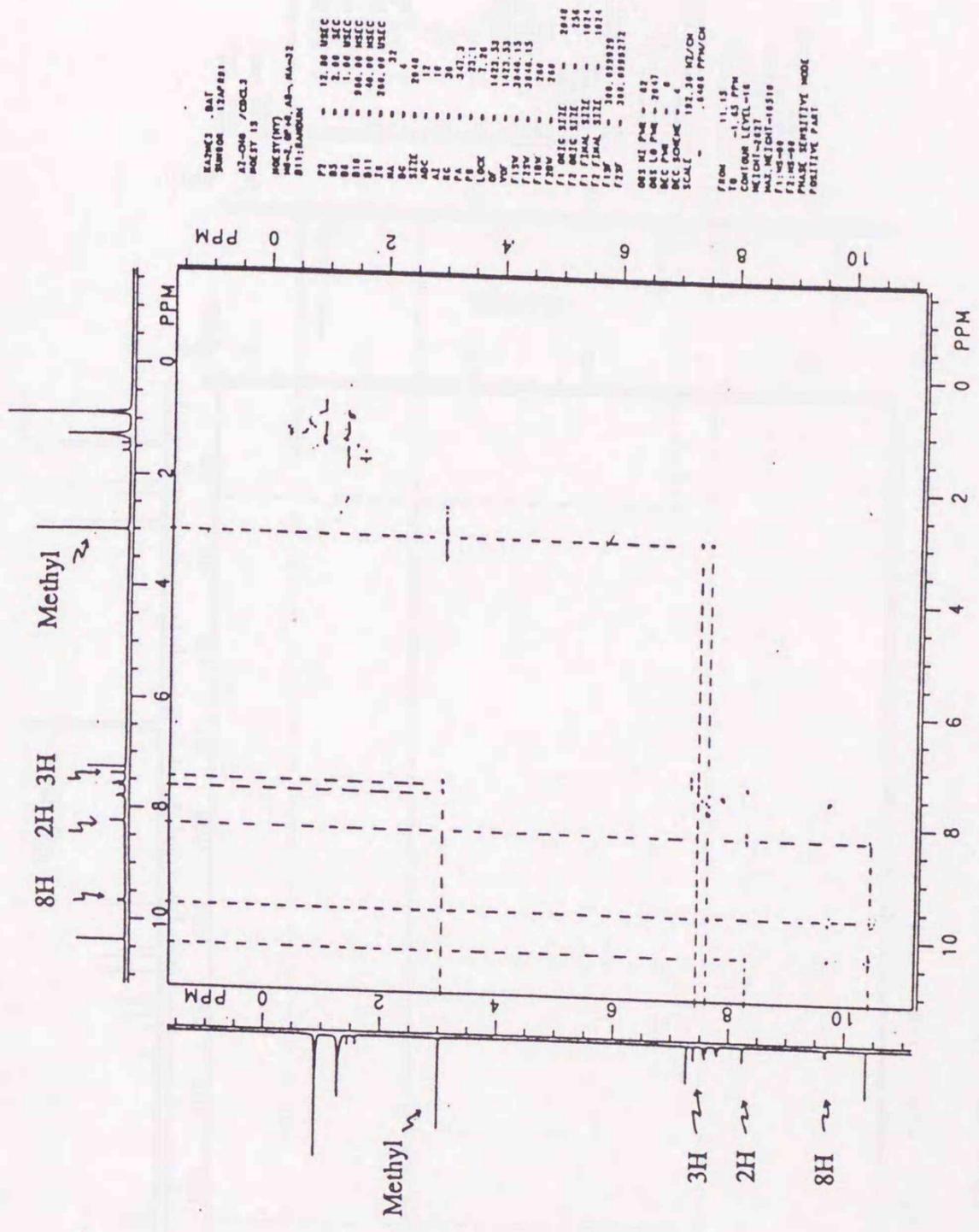


Fig. 4-8 Nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) spectrum of compound 2.

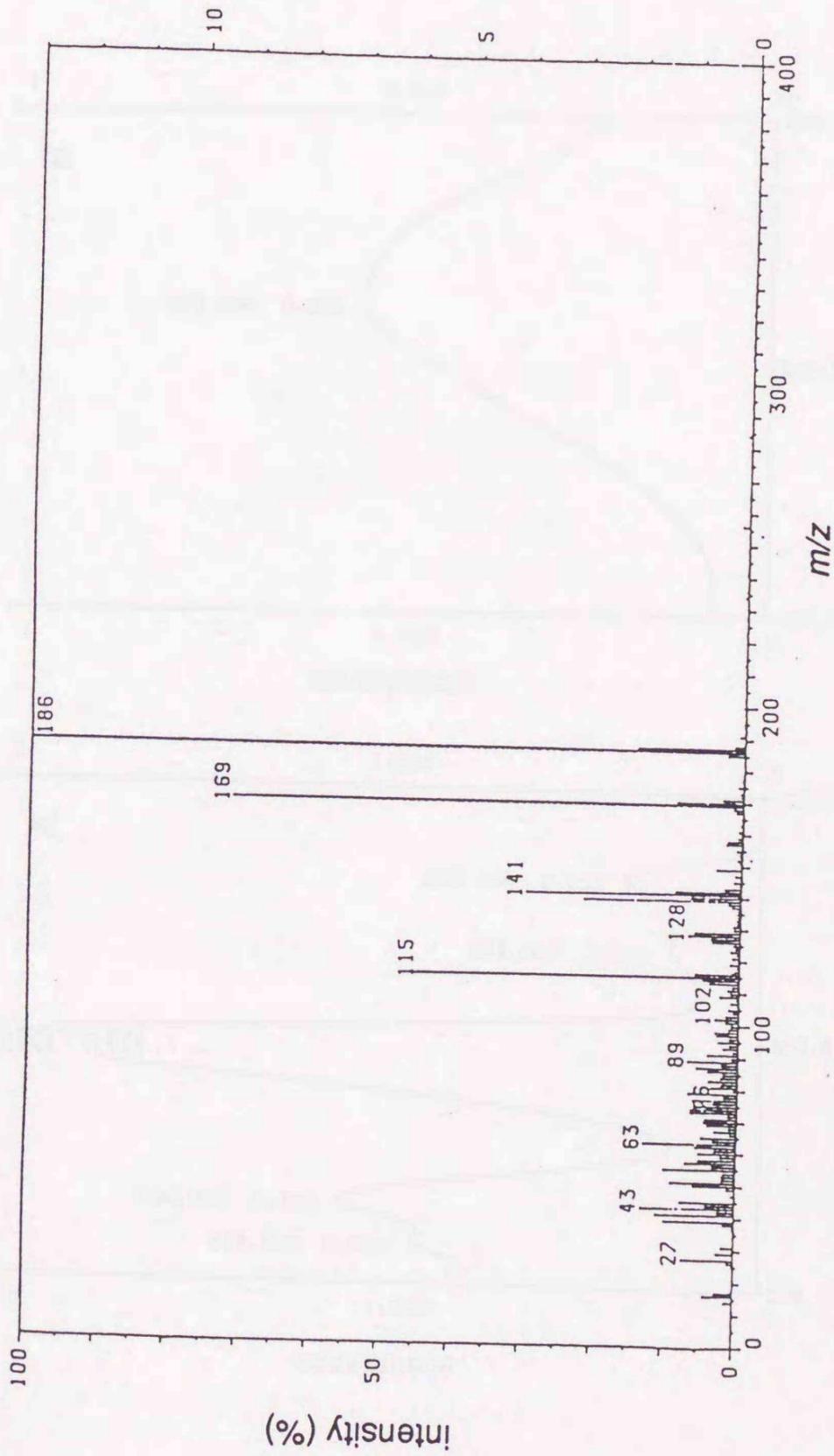


Fig. 4-10 MS spectrum of compound 3. The spectrum was measured with a Hitachi RMU-6 spectrometer using a direct inlet system operating at 70 eV.

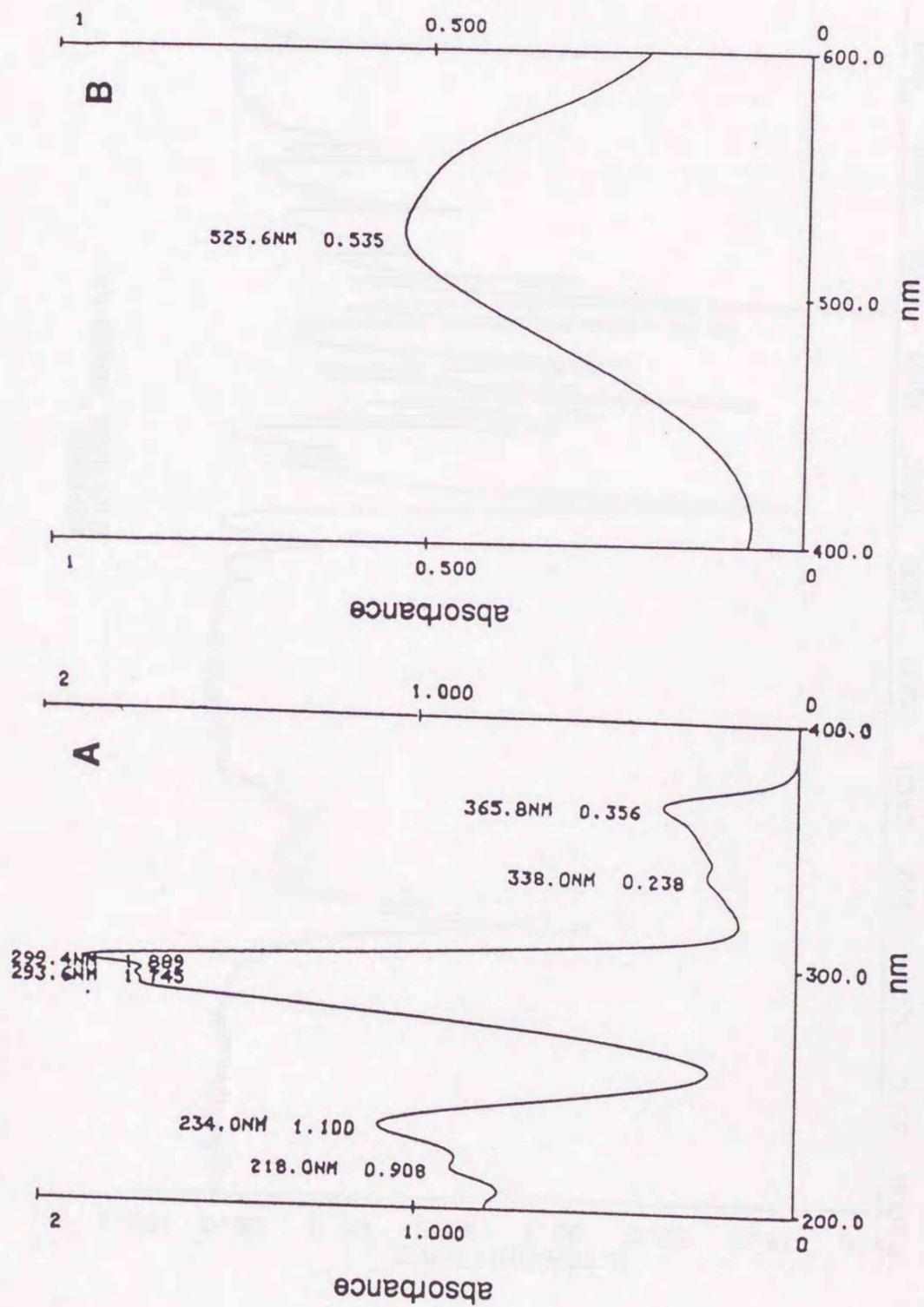


Fig. 4-11 UV (A) and visible (B) spectra of compound 3. The spectra were measured with a Shimadzu UV-265 UV-visible recording spectrophotometer. Compound 3 (0.070 mM) was dissolved in acetonitrile for UV spectrum and 2.51 mM for visible spectrum.

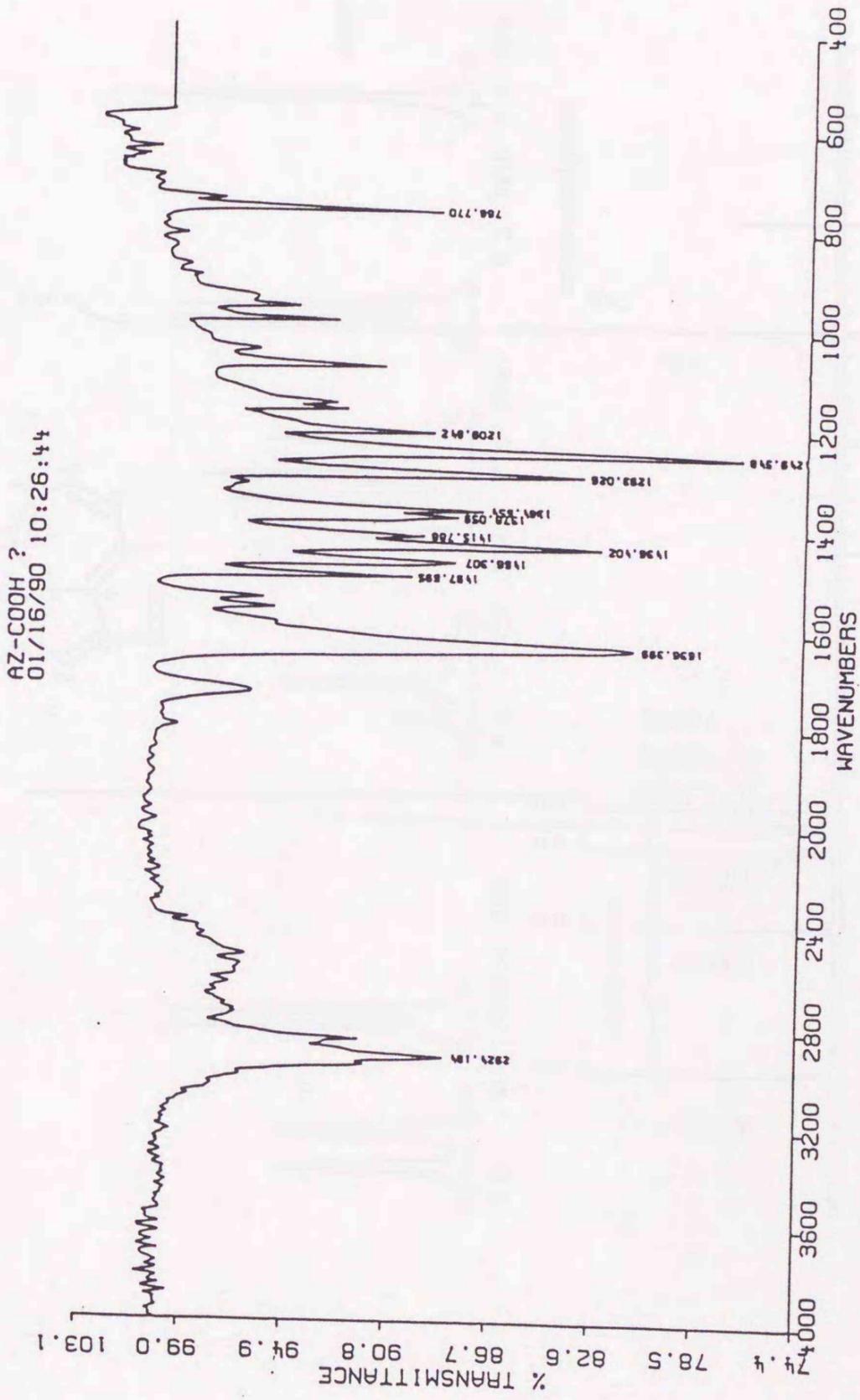


Fig. 4-12 IR spectrum of compound 3. The spectrum was measured with a Nicolet FT-IR 7199 spectrometer (film).

IWAZKA. 100 SUNBOR 02APR91
 AZ-COOH /COCL3
 1H-NMR

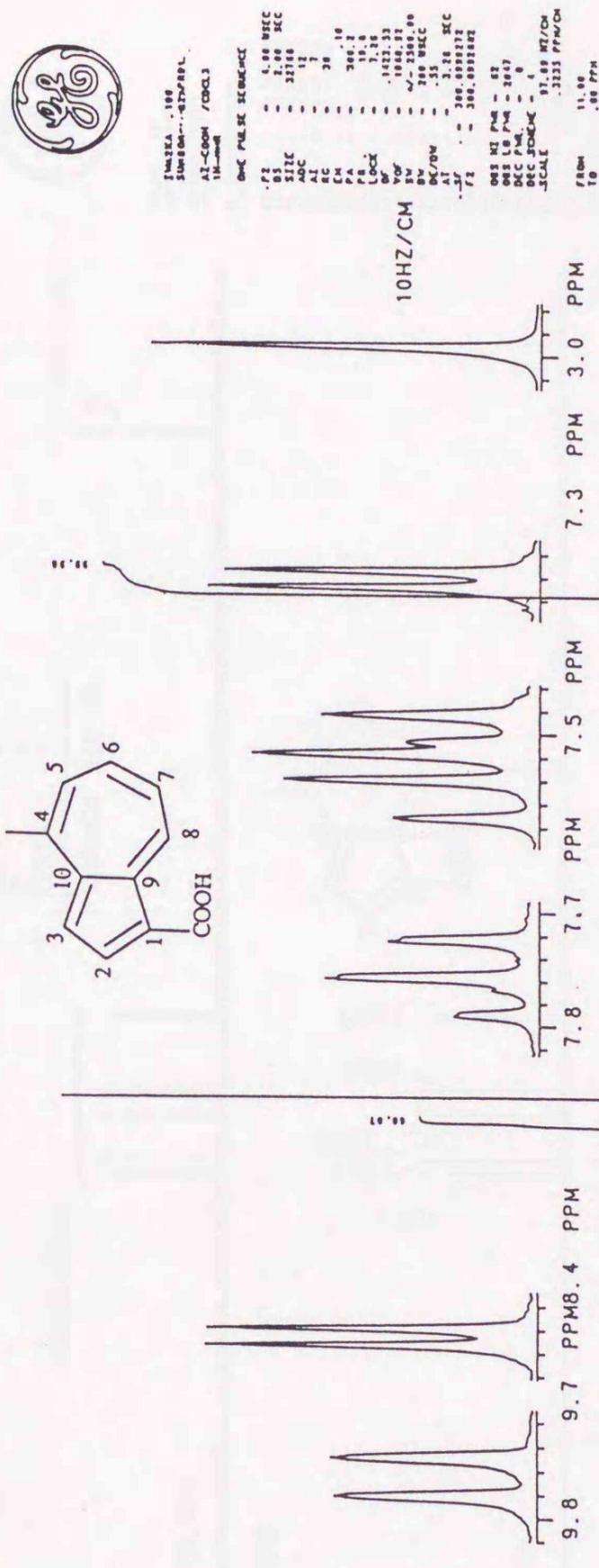


Fig. 4-13 ¹H-NMR spectrum of compound 3. The spectrum was measured with a Nicolet GN-300 spectrometer (300 MHz) in deuterio-chloroform solution containing tetramethylsilane (TMS) as an internal standard.

¹H-Detected heteronuclear multiple-quantum coherence

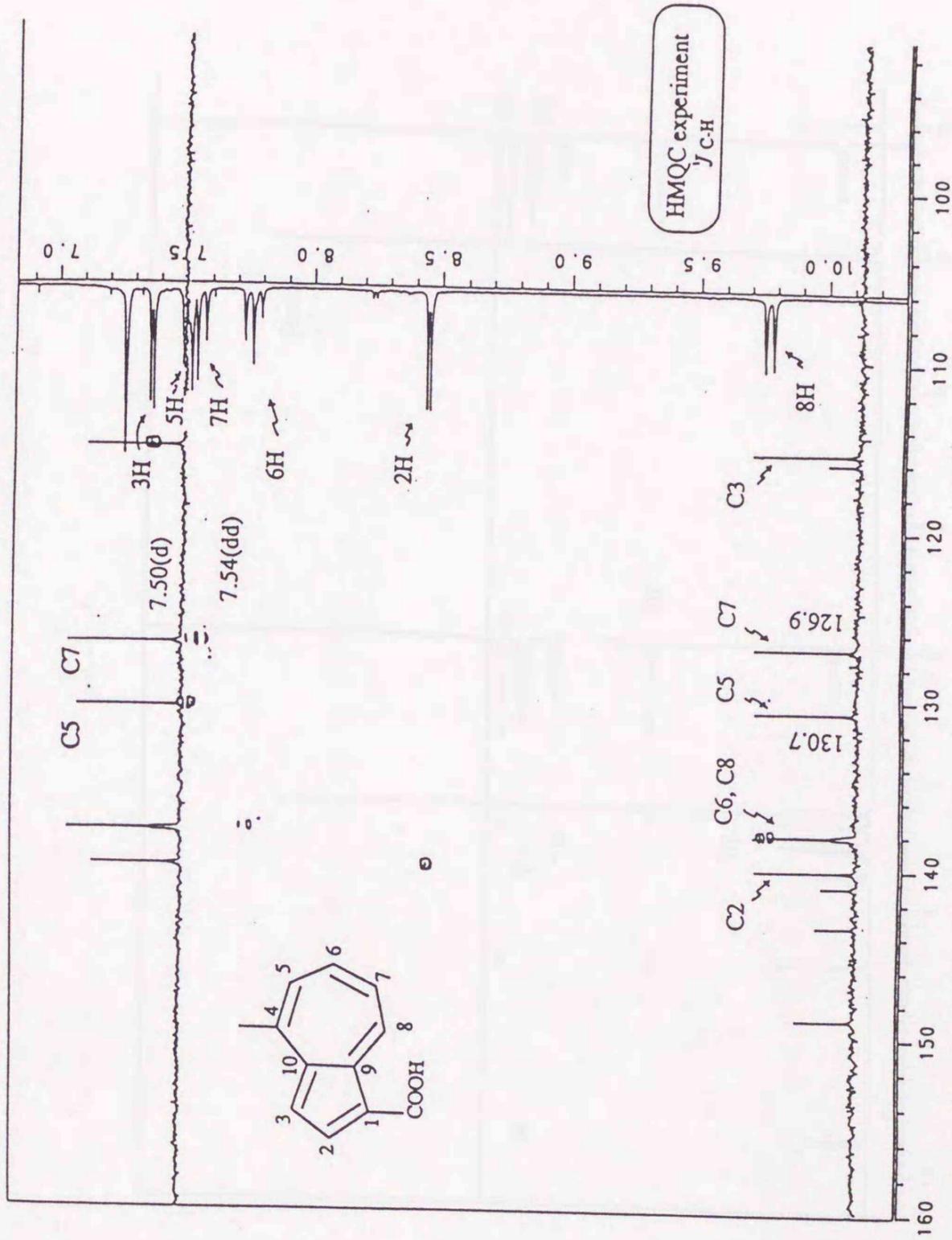


Fig. 4-16 ¹H-detected heteronuclear multiple-quantum coherence (HMQC) spectrum of compound 3.

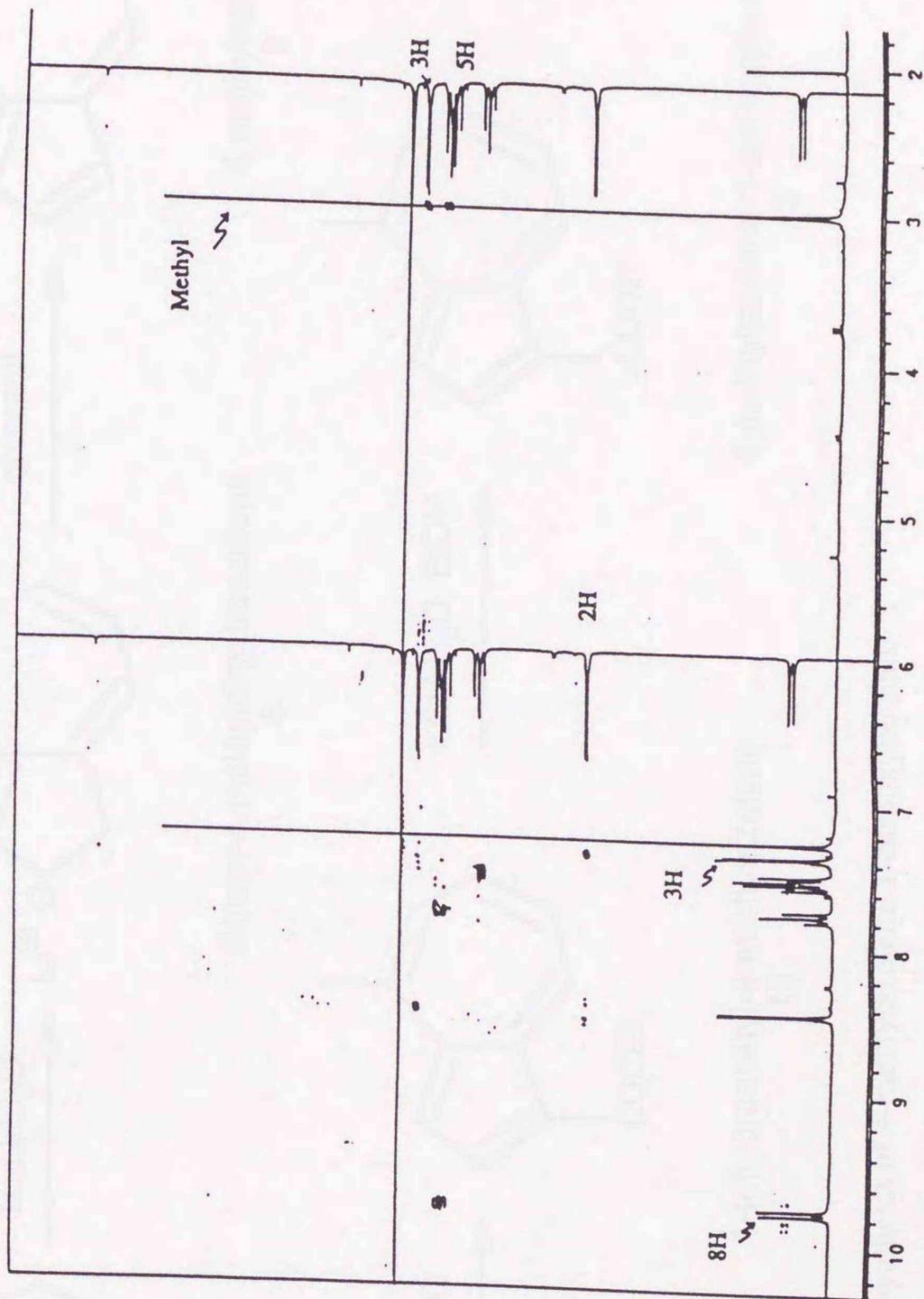


Fig. 4-17 Nuclear overhauser effect spectroscopy (NOESY) spectrum of compound 3.

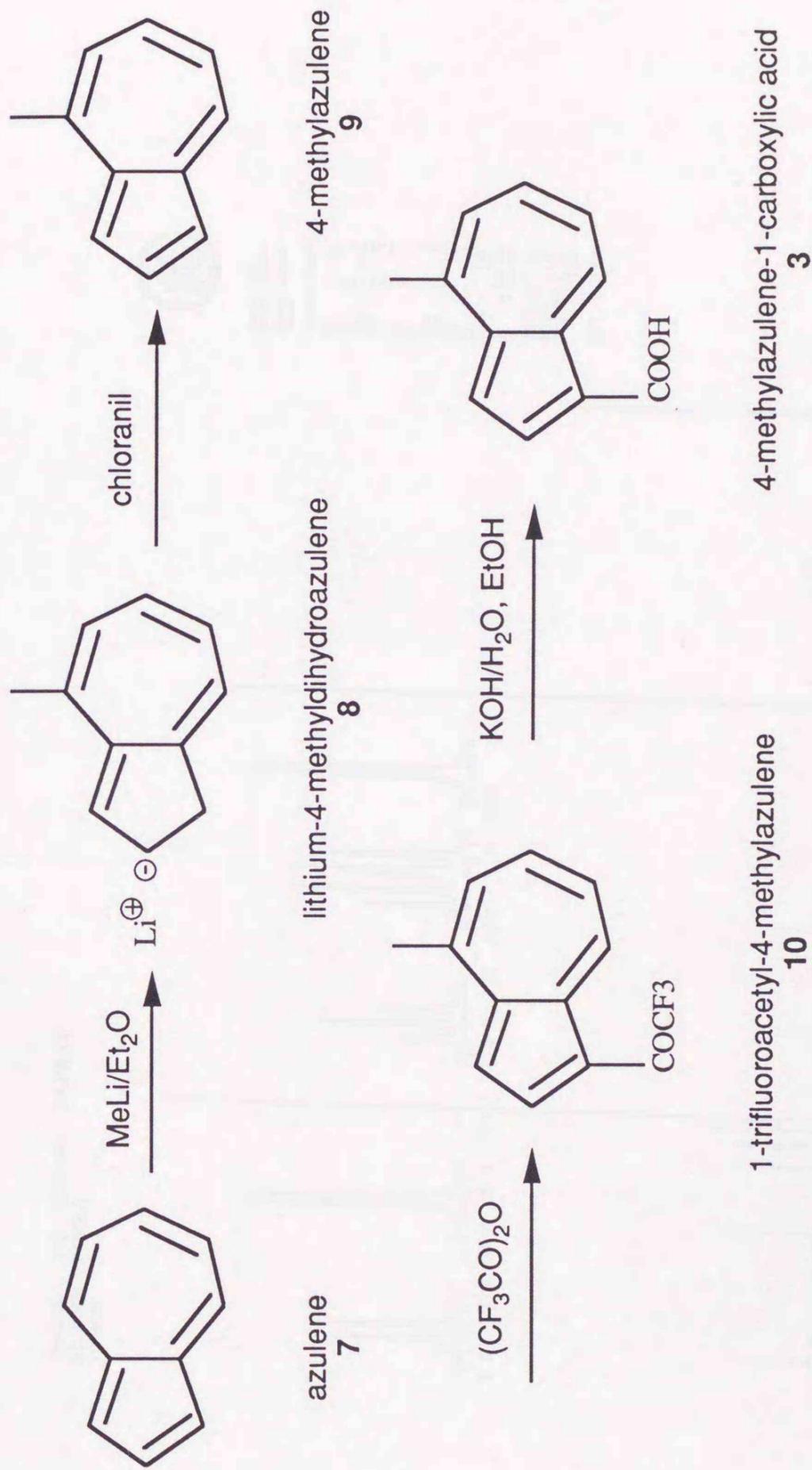


Fig. 4-18 Chemical synthesis of 4-methylazulene-1-carboxylic acid.

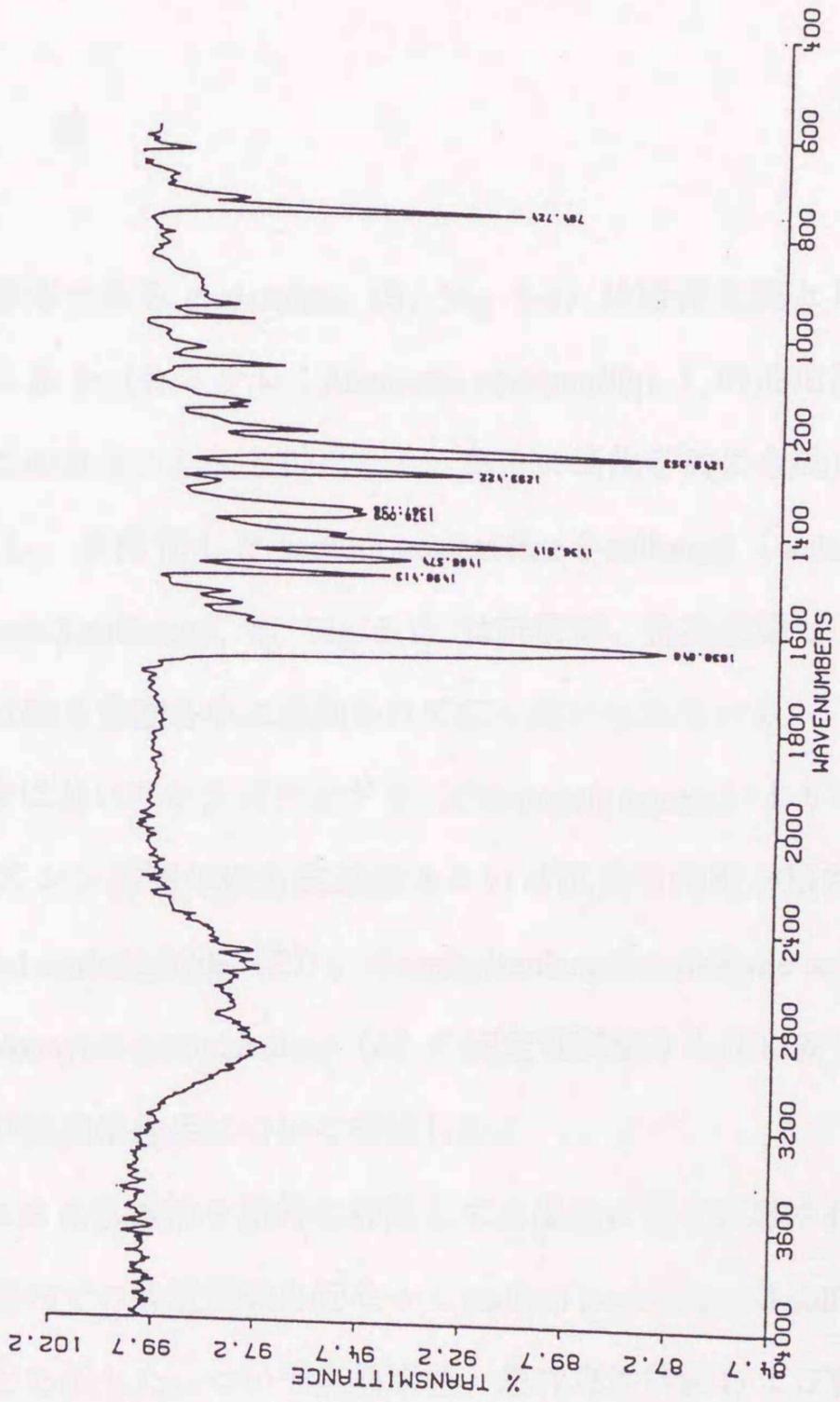


Fig. 4-20 IR spectrum of chemically synthesized 4-methylazulene-1-carboxylic acid.

第5章 *Calypogeia* 属培養細胞より単離したアズレン誘導体の 特性と薬理作用

第1節 序 論

アズレン誘導体である guaiazulene (5, Fig. 5-1) は西洋生薬として使用されてきたキク科カミルレ (カミツレ; *Matricaria chamomilla* L.) の抽出液の主たる有効成分である。このカミルレより抽出した、あるいは化学的に合成した5の3位をスルフォン化し、水溶化した sodium guaiazulene-3-sulfonate (sodium 1,4-dimethyl-7-isopropylazulene-3-sulfonate, 6, Fig. 5-1) は抗潰瘍、抗炎症薬として点眼薬、うがい薬あるいは練り歯磨き中に添加されて広く用いられている。

そこで第4章においてホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より単離精製した含酸素水溶性アズレン誘導体にも抗潰瘍あるいは抗炎症作用が期待できるため、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3)、および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) の安定性試験ならびに安全性試験とともに抗炎症および抗潰瘍作用について検討した。

はじめにこれらの水溶液を屋外に静置して太陽光に曝す試験を行ない、またそれに平行して室内での静置試験を行なって sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) より安定であることを示した。ついで変異原性、急性毒性試験および皮膚一次刺激試験を行ない、いずれも陰性であり安全性の面で問題のないことを示した。そしてこれらのアズレン誘導体についてラットなどを用いた抗炎症ならびに抗潰瘍作用を検討したところ有意な効果を示すことを明らかにした (加藤と武田 1992a, b)。

第2節 光安定性

1. 材料および方法

一般にアズレン誘導体は光（紫外光）に対して不安定である。そこで前節で単離精製したアズレン誘導体、sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3'; 3 のナトリウム塩)、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) および市販されている水溶性アズレン (sodium guaiazulene-3-sulfonate (6)、甲南化工、神戸) の光安定性について調べた。

3' および 6 は 0.03 % 濃度で蒸留水に溶解した。4 は少量のエタノールに溶解した後、蒸留水に溶解し、0.03 % 濃度とした。各試料 (n=3) は共栓付き透明スピッツ管に各 5 ml とし、太陽光を遮らない屋外に、または実験室内に静置した。屋外における紫外光量は積算照度記録装置 PH-11M-2AT (スガ試験機、東京) を用い、波長 300 - 400 nm の紫外光として測定した。紫外光量の単位は LANGLEY であり $1 \text{ Langley unit} = 69.97 \text{ mW min}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ である。各試料は経時的に採取し UV-265 UV-visible recording spectrophotometer (島津製作所、京都) で、可視部スペクトルの λ_{max} での吸収を測定した。各試料の λ_{max} は sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') ; 536 nm、sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) ; 568 nm、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) ; 523 nm であった。

2. 結 果

Figure 5-2 は sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3')、1-methoxycarbonyl-4-

methylazulene (4) および sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) の光に対する安定性を屋外に静置した場合、および実験室内に静置した場合のそれぞれの条件で測定したものである。室内条件においては 3' および 4 では長時間ほぼ 100% を維持したが、6 においては、300 h 以降で退色する傾向を示した。3' および 4 はこの後、約一年間にわたって安定であった。

一方、屋外条件においてはいずれも退色した。6 は速やかに分解退色したが、3' および 4 はこれに対して明らかに退色しにくかった。Figure 5-3 は屋外に静置した試料について紫外光の積算量に対してプロットしたものである。これから 50% 分解量を求めて比較すると、6 は約 10.46 Langley であったのに対し、3' では約 58.77 Langley、4 では約 202.77 Langley であり、3' は 6 に対し約 6 倍、4 は 6 に対し約 20 倍の高い安定性を示した。

アズレン誘導体は一般に高い紫外線吸収を示すが、それはそのアズレン骨格の共役二重結合系によるものである。実験に用いた三種のアズレン誘導体はいずれも共通したアズレン骨格を有しているが、その側鎖の違いにより光分解の受けやすさが異なっていることが明らかとなった。このように 3' および 4 が高い紫外線吸収能を有し、かつ安定性についても優れているという特徴から紫外線吸収剤などの化粧品、医薬品としての応用の可能性が期待できることを示した。

第3節 水溶解性

1. 材料および方法

Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') は水溶性を示すのでその溶解性について調べ、市販の水溶性アズレンである sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) と比較した。

溶解度は平衡法 (水町 1975) により測定した。それぞれの試料を 0.1 ml 蒸留水 (Cica-Merck, Tokyo) に飽和するまで加え密栓して振り混ぜ、室温で一時間静置した後、2,000 x g, 10 分間遠心し、その上清について 3' は λ_{\max} 535 nm、6 は λ_{\max} 565 nm での吸収を測定し (n=3)、検量線により定量した。

2. 結 果

Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') の溶解度は 47.32 % (w/v) であった。これに対して sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) は明らかに溶けにくく、1.53 % (w/v) であった。このことから 3' は、水にも有機溶媒にも溶解し、その高い安定性からも実用上非常に扱いやすいアズレン誘導体であることが明らかとなった。

第4節 安全性

1. 材料および方法

安全性試験は sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') および 1-methoxy-carbonyl-4-methylazulene (4) について変異原性、急性毒性、皮膚一次刺激試験を行なった。

変異原性試験は改良 Ames *Salmonella* test (Ames *et al.* 1975; Sugimura and Nagao 1980) で行なった。Sprague-Dawley 系雄性ラット肝ミクロソーム (S-9 mix) によって代謝活性化する方法ならびに S-9 mix を用いない直接法により、*Salmonella typhimurium* strains で測定した。

急性毒性試験は ICR 系雄性マウスを用い、Lorke 法 (Lorke 1983) で行なった。1,500 または 2,000 mg kg⁻¹ の試料をを経口投与後、1、3、5 時間および一回日⁻¹ 投与でその後7日間症状を観察し、剖検を行なった。

皮膚一次刺激性試験は Hartley 系モルモットを用いたパッチテスト (吉川ら 1984) で行ない、50 および 500 μg の試料を 24 時間貼付後除去し、1、24、48 時間後に肉眼判定し、統計処理した。

2. 結 果

変異原性試験の陽性判定は、1) 対照 (自然発生的に復帰変異したコロニー数) の 200% 以上の復帰変異コロニーが出現すること、および 2) 用量依存的応答が見られることの二点とも満たすことを必要条件として行なった。

その結果、sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) について直接法 (S-9 mix. 無添加) のとき、各々0.25 - 2.5 mg plate⁻¹ および 0.01 - 0.1 mg plate⁻¹ の用量域で突然変異原性が検出されず (Fig. 5-4)、代謝活性化法 (S-9 mix. 添加) を用いたとき、各々 0.5 - 5.0 mg plate⁻¹ および 0.025 - 0.25 mg plate⁻¹ の用量域で突然変異原性が検出されなかった (Fig. 5-4)。

急性毒性試験の結果、投与後の症状として 2,000 mg kg⁻¹ 投与群において自発運動量の低下が認められたがその他の毒性症状は認められなかった。剖検所見として肝臓の小葉像明瞭化および白斑が見られたが用量相関は認められなかった。LD₅₀ 値は経口投与において 2,000 mg kg⁻¹ であった。これらのことからマウス急性毒性に関して 3' および 4 のいずれにも特記すべき毒性は見られず問題はないものと判断された。

皮膚一次刺激性試験の結果、対照 (白色ワセリン) に対し有意差は認められず、また陽性対照とした 1% ラウリル硫酸ナトリウムに対しては有意に差が認められた (Table 5-1)。

このように第 4 章でホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より単離精製したアズレン誘導体の安全性について実施した安全性試験 (変異原性、急性毒性、皮膚一次刺激性試験) の範囲内ではいずれも安全であることを明らかにした。

これらの 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) ならびに 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) の特性を Table 5-2 にまとめた。

第5節 抗炎症および抗潰瘍作用

1. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene の経口投与によるラットの血管透過性抑制作用

1) 材料および方法

経口投与による血管透過性抑制作用の試験は小森谷ら (1984) の方法を一部改変して起炎剤としてヒスタミン (Fig. 5-5) および compound 48/80 (Fig. 5-5) を用いた実験を行なった。

1. ヒスタミンに対する効果

背部を剃毛した Sprague - Dawley 系ラット (1群 8匹) に sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') または 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) を 300 mg kg^{-1} 経口投与した1時間後にヒスタミン $100 \mu\text{g site}^{-1}$ を皮内投与し、さらにその直後に1% エバンスブルー/生理食塩水溶液を尾静脈内投与した。色素投与30分後に放血致死させた後、皮膚を剥離した。この皮膚小片より0.6 Nリン酸:アセトン (5:13, v/v) で色素を抽出し、620 nm における吸光度を測定し、漏出色素量を算出した。陽性対照群には sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) 300 mg kg^{-1} およびプロスタグランジン合成阻害作用を有し抗炎症剤として現在広く用いられているインドメタシン (Fig. 5-5; 興和、東京) 10 mg kg^{-1} を経口投与した。

2. Compound 48/80 に対する効果

背部を剃毛した Sprague - Dawley 系ラット (1群 7匹) に 3' を 300 mg kg^{-1} 経口

投与し、1時間後にネンブタール麻酔下に起炎剤 0.01 % compound 48/80を 0.1 ml 皮内投与し、さらにその直後に 1 % エバンスブルー/生理食塩水溶液を尾静脈内投与した。色素投与 30 分後、放血致死させ皮膚を剥離した。この皮膚小片より 0.6 N リン酸：アセトン (5:13, v/v) で色素を抽出し、620 nm における吸光度を測定して漏出色素量を算出した。陽性対照群には 6 を 300 mg kg⁻¹ および抗アレルギー剤として広く用いられているケトチフェン (Ketotifen, KT, Fig. 5-5; Sigma, St.Louis, MO, USA) 5 mg kg⁻¹ を経口投与した。

2) 結 果

ヒスタミン投与に対する効果を検定した結果を Table 5-3 に示した。Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') はコントロールの漏出色素量に対し、約 19.9 % の抑制効果を示し、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) は 3' よりやや弱く 12.7 % の抑制効果を示した。Sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) は 17.4 % で、陽性対照としたインドメタシンは 44.28 % であった。3' はヒスタミン投与による血管透過性についてコントロールに対しては有意に抑制効果を示したが、インドメタシンより弱く 6 と同程度であった。

起炎剤 compound 48/80 に対する効果を検定した結果を Fig. 5-6 に示す。Compound 48/80 の血管透過作用はヒスタミンの作用の約 2 倍であった。3' はコントロールの漏出色素量に対し、約 25.7 % の抑制効果を示した。6 は 17.7 % で、陽性対照としたケトチフェンは 87.4 % であった。3' は compound 48/80 投与による血管透過性についてコントロールに対しては有意に抑制効果を示し、6 よりやや強い抑制効果が認められたがケトチフェンに比べると弱い抑制効果を示した。

2. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene の局所投与によるラットの血管透過性抑制作用

1) 材料および方法

局所投与による血管透過性抑制作用の試験も小森谷ら (1984) の方法を一部改変して起炎剤としてヒスタミンおよび compound 48/80 を用いた実験を行なった。

1. ヒスタミンに対する効果

背部を剃毛した Sprague - Dawley 系ラット (1群 8匹) に sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) を 0.1% 配合した軟膏 1g を塗布し、その1時間後にヒスタミン $100 \mu\text{g site}^{-1}$ を皮内投与し、さらにその直後に 1% エバンスブルー/生理食塩水溶液を尾静脈内投与した。色素投与 30分後、ラットを放血致死させ、背部皮膚を皮内投与部位を中心に剥離して色素を 0.6 N リン酸：アセトン (5:13, v/v) で色素を抽出後、620 nm における吸光度を測定し、漏出色素量を算出した。陽性対照群には 0.1% sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) 軟膏 1g を経皮投与およびインドメタシン (Fig. 5-5) 10 mg kg^{-1} を経口投与した。

2. Compound 48/80 に対する効果

背部を剃毛した Sprague - Dawley 系ラット (1群 6匹) に 3' を $100 - 1,000 \mu\text{g site}^{-1}$ と起炎剤 0.02% compound 48/80 とを同量ずつ混合し、背部皮内に 0.1 ml 投与した。その直後に 1% エバンスブルー/生理食塩水溶液を尾静脈内投与した。色素投与 30分後、ラットを放血致死させ、背部皮膚を皮内投与部位を中心に剥離して色素を 0.6 N リン酸：アセトン (5:13, v/v) で色素を抽出後、620 nm にお

ける吸光度を測定し、漏出色素量を算出した。陽性対照群には 6 を 300 または 1,000 $\mu\text{g site}^{-1}$ およびケトチフェン (Fig. 5-5) を 5 mg kg^{-1} となるように調製し 0.1 ml を皮内投与した。

2) 結 果

ヒスタミン投与に対する効果を検定した結果を Table 5-4 に示した。Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') はコントロールの漏出色素量に対し、約 12.8 % の抑制効果を示し、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) は 3' より強く 21.1 % の抑制効果を示した。Sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) は 12.3 % で、陽性対照としたインドメタシンは 43.7 % であった。3' もヒスタミン投与による血管透過性についてコントロールに対しては有意に抑制効果を示したが、4 の方が強い効果を示した。3' はインドメタシンより弱く 6 と同程度であった。

起炎剤 compound 48/80 に対する効果を検定した結果を Fig. 5-7 に示す。Compound 48/80 の皮内投与による血管透過作用はヒスタミンの作用の約 2 倍であった。3' (100 μg) はコントロールの漏出色素量に対し、約 19.6 % の抑制効果を示し、300 μg では 38.7 %、1 mg では 82.8 % の用量依存的な抑制効果を示した。6 は 300 μg および 1 mg でほぼ同じ値の 56.0 % であった。陽性対照としたケトチフェンは 71.1 % であった。3' は compound 48/80 投与による血管透過性についてコントロールに対して有意に抑制効果を示し、また同用量の 6 に対しても有意に ($p < 0.05$) 強い抑制効果が認められた。しかしながらケトチフェンに比べた場合は用量を考慮すると弱い抑制効果であった。

3. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene によるラット肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用

1) 材料および方法

抗炎症作用を検定する方法には上記の第5節1、2で述べた血管透過性抑制効果を測定する方法などが一般的であるが、これらはラットなどの生体を用いる *in vivo* 実験である。このような方法は多数の試料から抗炎症活性のスクリーニングを行なう目的の場合、時間的経済的に必ずしも適当ではない。この実験で用いた方法は種々多数の生薬試料の抗炎症活性を迅速簡便に検定する目的で考案されたものである (平井ら1983)。

脱血致死させたウイスター系ラットの腹腔内にタイロード平衡塩類溶液を注入して採取した腹腔細胞から、牛血清アルブミン (BSA) /生理食塩水溶液 (比重 1.068) を用いる重層遠心法により肥満細胞を単離した。得られた細胞は 2×10^6 個 ml^{-1} となるように 0.1% BSA 含有タイロード液に懸濁し細胞浮遊液を調製した。試料溶液 10 μl に細胞浮遊液 10 μl を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間放置した後、compound 48/80 ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) 20 μl を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間で反応させた。その後いったん氷冷し、遠心分離 (150 \times g、5 分) した上清中に遊離したヒスタミン量を蛍光検出器付 HPLC (励起波長 360 nm) により定量した。

ヒスタミン遊離抑制活性は次式により算出し、50% 抑制濃度 (IC_{50}) を求めた。

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \{1 - (\text{SR} - \text{C}) / (\text{R} - \text{C})\}$$

C; 対照細胞から遊離されるヒスタミン量

R; 誘発剤のみを加えたときに細胞から遊離するヒスタミン量

SR; 試料と誘発剤を加えたときに細胞から遊離するヒスタミン量

陽性対照群には抗アレルギー剤として臨床的に用いられている DSCG (disodium cromoglycate; Fig. 5-5) を投与した。

2) 結 果

本法をアズレン誘導体の検定に適用した結果を Table 5-5 に示す。ラット肥満細胞による *in vitro* 実験の結果、sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') には抗アレルギー剤として広く用いられている DSCG の約 2.8 倍の強い活性が認められ、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) は約 2.2 倍の活性であった。このようにアズレン誘導体の抗炎症作用が *in vitro* 実験においても確認された。

4. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene の経皮投与によるモルモットの紫外線紅斑抑制作用

1) 材料および方法

経皮投与による紫外線紅斑予防効果の検定は久木 (1982) の方法を用いて行なった。

背部を剃毛した Hartley 系モルモット (1 群 6 匹) に sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) を 0.1% 配合したエタノール溶液を 0.1 ml 塗布後、最小紅斑量 (MED) の 2 倍量の UV-B (UV ランプ; FL20S-30E/DMR、東芝、東京; 波長域 280 - 370 nm; 中心波長 305 nm; ca. 4 J cm⁻²) を照射した。UV-B 照射 4 時間後に紅斑の程度を肉眼判定した。対照にはエタノールを、陽性対照には 0.1% sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) および紫外線吸収剤として化粧品などで広く用いられている 1.0% オキシベンゾン (Fig. 5-5) を塗布した。

2) 結 果

結果を Table 5-6 に示す。Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (3') はコントロールに対し 52.9 % の予防効果を示し、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) はさらに強く 64.7 % であった。Sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) は 3' と同程度であった。オキシベンズンは 70.6 % であった。投与量を考慮すると 3' および 4 はオキシベンズンより強い効果を示すものと考えられた。このようにアズレン誘導体は紅斑の生成を有意に抑制し、紫外線紅斑予防効果を有することが明らかとなった。これはアズレン骨格の共役二重結合に由来する高い紫外線吸収能によるものと考えられる。

5. 4-methylazulene-1-carbaldehyde および 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene によるラットの胃粘膜傷害抑制作用

1) 材料および方法

緩刺激および脱血再灌流による胃粘膜傷害に対するアズレン誘導体の作用の検定は Wallace *et al.* (1982) の方法を改良したチャンバー法をで行なった (Masuda *et al.* 1991)。この抗潰瘍性を検定する実験にはアズレン誘導体として 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4)、guaiazulene (5)、sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) を用いた。さらに市販のアズレン製剤である Mazulene (ゼリア新薬、東京) を用いた。これは 0.3 % sodium

guaiazulene-3-sulfonate : 99 % L-glutamine の組成の製剤である。

Crlj SD 系雄性ラット (体重 360 - 460 g) を 24 時間絶食後、ウレタン麻酔下を使用した。気道を確保するためカニューレを挿入し、頸部で食道を結紮した。脱血用に左層頸動脈にカニューレを挿入し、術創を縫合した。血圧モニター用に大腿動脈にカニューレを挿入した後、腹部を正中切開し、胃および十二指腸起始部を露呈した。幽門輪を血管を避けて結紮し、胃大弯を切開して粘膜を露出し、アクリル製チャンバーに胃を固定した。胃粘膜を温生理食塩水で洗浄した後、2 ml 生理食塩水をチャンバー内に注入し、胃粘膜表面を覆った。胃粘膜血流量は laser doppler 法で、胃粘膜電位差はチャンバー内と腹腔内 (不関電極) に設置した寒天電極で経時的に記録した。また、血圧および心拍数も同時にモニターした。各々のパラメーターが安定した後、チャンバー内の生理食塩水を Tween 80 /生理食塩水に懸濁したアズレン誘導体と置換し、30 分後、1 M NaCl 溶液で置換した (緩刺激 ; 胃粘膜上皮細胞の広範囲な脱落を誘起) 。30 分後、50 mM 塩酸で置換し、酸の存在下、10 分後に頸動脈より脱血した。血液はヘパリン処理した 5 ml の注射筒に平均血圧が 40 mmHg になるまで採血した。20 分後、血液を再び頸動脈より戻し、チャンバー内の液を新たな 50 mM 塩酸と交換した。30 分後、温生理食塩水に置換し、その後 30 分ごとに生理食塩水を交換し、2 時間、傷害を受けた胃粘膜上皮細胞の再構築を胃粘膜電位差を指標として連続的に記録した。また実験終了時には胃を摘出し、画像解析装置を用いてチャンバー内の胃粘膜面積および傷害部面積を測定した。

2) 結 果

結果を Fig. 5-8 および 5-9 に示す。Figure 5-8、5-9 に示すように 4-methyl-azulene-1-carbaldehyde (2) に胃粘膜保護作用が認められた。これは sodium

guaiazulene-3-sulfonate (6) にもその傾向は見られるが顕著ではない。また Fig. 5-9 に示すようにアズレン誘導体は胃粘膜血流量を増加させる傾向が認められたが、1 M NaCl による血流量の増加、あるいは脱血による血流量減少、再灌流時の血流量増加に対してはほとんど影響をおよぼさなかった。胃粘膜電位差を指標とした傷害後の胃粘膜再構築についてアズレン誘導体が回復促進作用を有することが分かった。

第6節 考 察

南ヨーロッパ原産のキク科カミルレ（カミツレ；*Matricaria chamomilla* L.）には抗炎症、発汗、駆虫作用があり、その有効成分は guaiazulene (5) であるとされている（堀田ら 1989）。5 を水溶性にしたものが現在市販されているアズレン誘導体（sodium guaiazulene-3-sulfonate、6）である。5 は非ステロイド系抗炎症剤とは異なり、シクロオキシゲナーゼ阻害作用を介さない抗炎症作用およびヒスタミン遊離作用を介した抗アレルギー作用を有することが知られている（山崎ら 1958；宇田 1960）。また非ステロイド系抗炎症剤とは逆に抗潰瘍作用や創傷治癒促進作用を有していることも知られている（竹田ら 1983）。この抗潰瘍作用の作用機序としてはトロンボキサン拮抗作用が報告されており（Mochizuki *et al.* 1989）、胃粘膜において血管の収縮や血小板の凝集などを引き起こすトロンボキサンA₂の作用を抑制し、胃粘膜血流量を増加させることにより胃粘膜の再構築を促進するとされている。

このようにアズレン誘導体は優れた抗炎症剤であるが、現在広く用いられている sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) 剤を経口投与した場合、胃が荒れるなどの副作用があるとされている（加藤、私信）。これは摂取後、生体内で加水分解されて生成する遊離の亜硫酸によるものと考えられている。したがってこのような副作用のない水溶性アズレン誘導体が求められている。第4章においてホラゴケモドキ（*Calypogeia azurea*）より単離した二種のアズレン誘導体はその構造（2、3；Fig. 5-1）が示すように酸素を含有し、したがって疎水部分と親水部分とを有しており、天然から得られる水溶性アズレンである。これはスルホン化による水溶性を増大させた誘導体に比べ生体に対してより穏やかな性質を示すと考えられる。

このようなホラゴケモドキ (*C. azurea*) より単離したアズレン誘導体、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) が光安定性および水溶解性において sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) を上回る安定性を示すことを明らかにした。

またそれらのアズレン誘導体の変異原性、急性毒性、皮膚一次刺激試験において高い安全性を示すことを明らかにした。

さらにアズレン誘導体が経口あるいは局所投与による血管透過性抑制作用、ヒスタミン遊離抑制作用、紫外線紅斑予防効果などにおいて6より優れた抗炎症作用を有することを明らかにした。そして胃粘膜傷害に対し高い保護作用および回復促進作用を有することを明らかにした。しかしながらこれらの抗炎症作用は経口投与に比べ局所投与および *in vitro* 実験 (ラット肥満細胞ヒスタミン遊離抑制作用) において高い効果を示すものであった。経口投与の動物実験においてアズレン誘導体の投与後約30分でその尿が着色することが観察された。このことはアズレン誘導体が経口投与では速やかに吸収され、また体外へ排出され易いことを示し、したがってそのため抗炎症効果が低くなったものと考えられる。逆にそれはアズレン誘導体が生体に対し影響を与えにくい化合物であることを示すと考えられる。

また 1,4-dimethylazulene (1) や sodium guaiazulene-3-sulfonate (6) は青色を呈するが、これらの分子に酸素が加わると赤紫色を呈するようになる。したがってアズレン誘導体としての抗炎症作用や抗潰瘍作用に加え、紫外部に強い吸収を持つこと、その色調、安定性、両親媒性、安全性などの特長から 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) および 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) は医薬あるいは化粧品への応用が期待できる。

このように本章では *Calypogeia* 属植物から得たアズレン誘導体が医薬、化粧品

素材として特異的な長を有する優れた化合物であることを明らかにした。

第7節 要 約

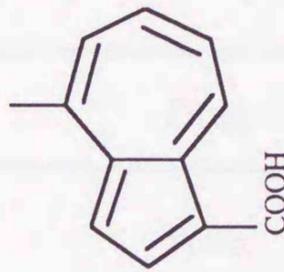
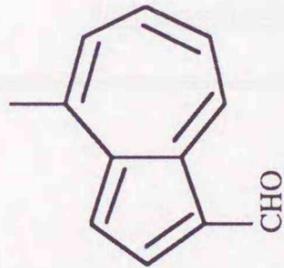
1. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate の野外における光安定性は市販アズレン製剤の有効成分である sodium guaiazulene-3-sulfonate の約 6 倍であり、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene では約 20 倍であった。
2. Sodium 4-methylazulene-1-carboxylate は蒸留水に対し 47 % の溶解性を示し、市販水溶性アズレンの 30 倍以上であった。
3. 安全性試験として変異原性 (*Salmonella*)、皮膚一次刺激試験 (モルモット) を行なった結果、いずれも陰性であり、また急性毒性試験 (マウス) の結果、LD₅₀ 値は 2,000 mg kg⁻¹ で特記すべき毒性のないことを明らかにした。
4. 抗炎症および抗潰瘍試験を行なった結果、*Calypogeia* 属植物から得たアズレン誘導体は市販のアズレン誘導体製剤の有効成分である sodium guaiazulene-3-sulfonate に比して有意に高い抗炎症および抗潰瘍活性を示すことを明らかにした。

Table 5-1 Primary skin irritation test of azulene derivatives in guinea pigs.

compound	Time after treatment (h)					
	1		24		48	
	irritated ratio	average \pm SD of irritation value	irritated ratio	average \pm SD of irritation value	irritated ratio	average \pm SD of irritation value
white vaseline	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.1 \pm 0.14
0.1 % sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.15 \pm 0.14	0/5	0.2 \pm 0.21
1 % sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	0/5	0.15 \pm 0.22	0/5	0.2 \pm 0.21	0/5	0.2 \pm 0.21
0.1 % 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.05 \pm 0.11
1 % 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.1 \pm 0.14	0/5	0.15 \pm 0.14
1 % sodium lauryl sulfate	3/5	0.9 \pm 0.14**	3/5	0.9 \pm 0.14**	1/5	0.9 \pm 0.34**

** : p < 0.01

Table 5-2 Characterization of 4-methylazulene-1-carbaldehyde and 4-methylazulene-1-carboxylic acid isolated and purified from cultured cells of *C. azurea*.



4-methylazulene-1-carbaldehyde 4-methylazulene-1-carboxylic acid

M.W.	170	186
λ_{max}	521.5nm ($\epsilon = 473$) 307.5nm ($\epsilon = 80400$)	525nm ($\epsilon = 765$) 299nm ($\epsilon = 33900$)
UV stability	6 days half-life	3.5 days half-life (sodium salt)
Solubility; organic solv.	freely	freely (sodium salt)
water	slightly	47.32 % (w/v) (sodium salt)
Mutagenicity test	—	negative (sodium salt, ~2500mmole plate ⁻¹)
Primary skin irritation test	—	negative (sodium salt, ~1% patch test)
Acute toxicity test	—	LD ₅₀ = 2000mg kg ⁻¹ (sodium salt)

Table 5-3 Suppressive effects of orally administered azulene derivatives on vascular permeability enhanced by histamine.

Drug	Dose (mg kg ⁻¹)	Exudated pigment (mg site ⁻¹)
none	—	40.2 ± 2.9
sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	300	32.2 ± 2.2
1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	300	35.1 ± 1.6
sodium guaiazulene-3-sulfonate	300	33.2 ± 1.8
indomethacine	10	22.4 ± 1.9

Table 5-4 Suppressive effects of cutaneously administered azulene derivatives on vascular permeability enhanced by histamine.

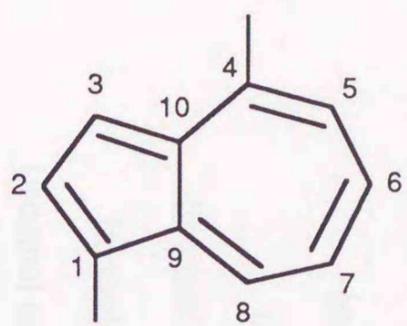
Drug	Dose	Exudated pigment (mg site ⁻¹)
none	—	39.8 ± 3.0
sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	0.1 %	34.7 ± 1.6
1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	0.1 %	31.4 ± 1.5
sodium guaiazulene-3-sulfonate	0.1 %	34.9 ± 1.6
indomethacine	10 mg kg ⁻¹	22.4 ± 2.1

Table 5-5 Inhibitory effects of azulene derivatives on histamine release from mast cell induced by compound 48/80.

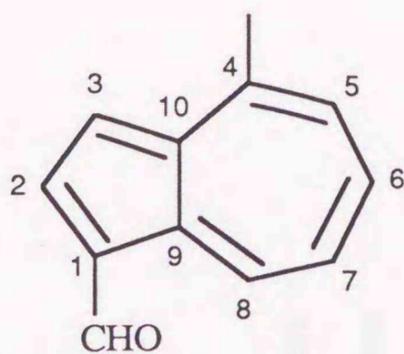
Drug	Inhibition of histamine release IC ₅₀ (ppm)
sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	80
1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	100
disodium cromoglycate	220

Table 5-6 Effects of azulene derivatives on ultraviolet erythema in guinea pigs.

Drug	Dose (%)	Ultraviolet erythema index
control (ethanol)	—	1.7 ± 0.4
sodium 4-methylazulene-1-carboxylate	0.1	0.8 ± 0.2
1-methoxycarbonyl-4-methylazulene	0.1	0.6 ± 0.1
sodium guaiazulene-3-sulfonate	0.1	0.8 ± 0.2
oxybenzon	1.0	0.5 ± 0.2



1,4-dimethylazulene
(1)



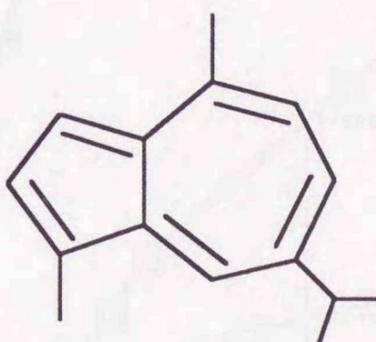
4-methylazulene-1-carbaldehyde
(2)



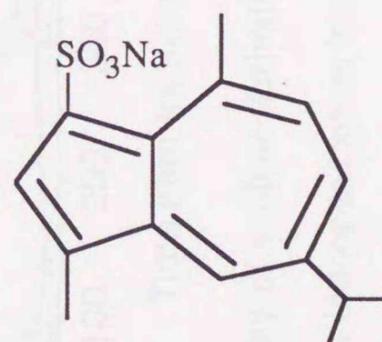
4-methylazulene-1-carboxylic acid
(3)



1-methoxycarbonyl-4-methylazulene
(4)



guaiazulene
(5)



sodium guaiazulene-3-sulfonate
(6)

Fig. 5-1 Azulene derivatives used in the experiments.

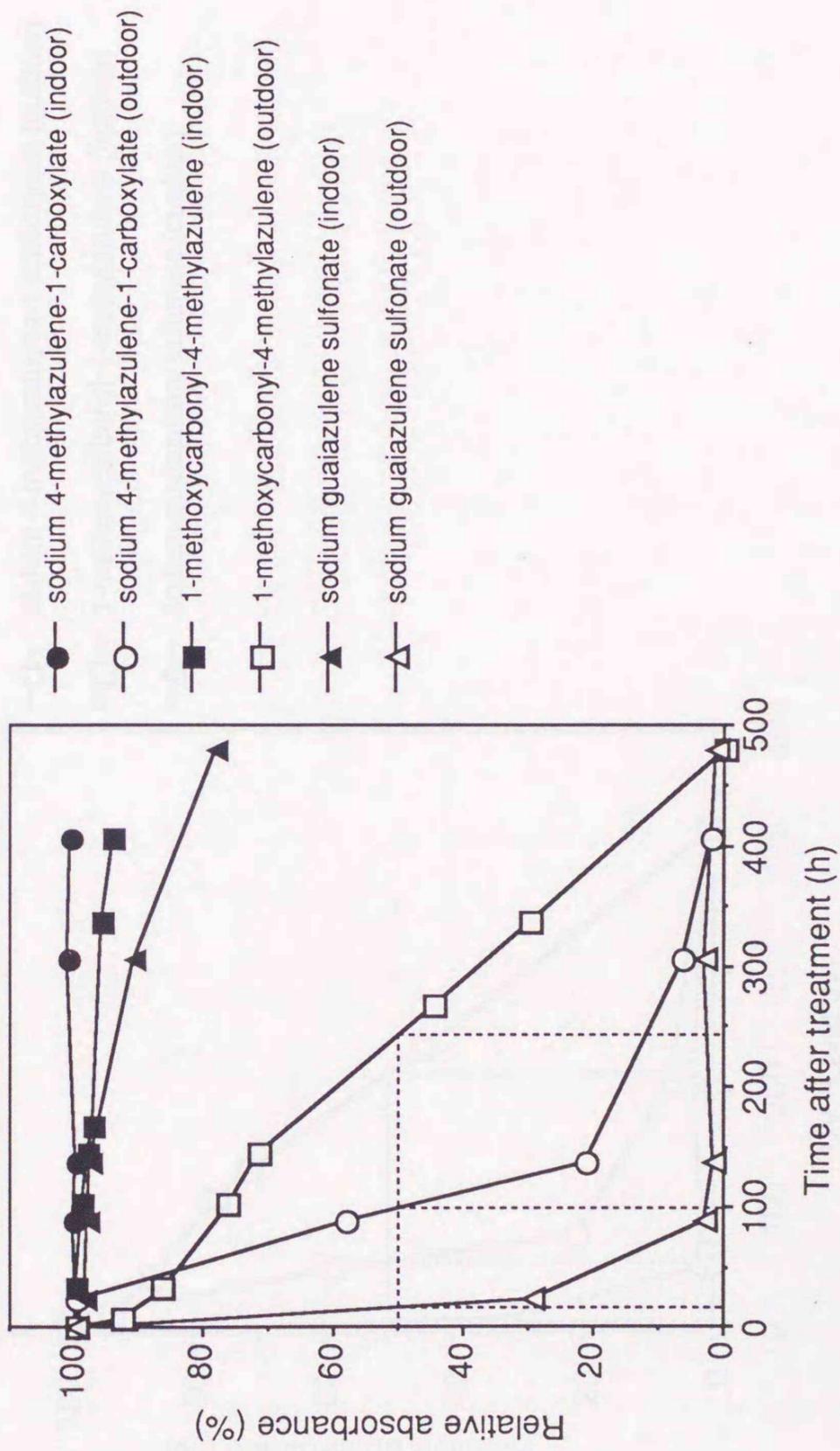


Fig. 5-2 Stability of azulene derivatives for light. Azulene derivatives (0.03 % each) were placed outdoor or indoor to expose to natural light. Relative absorbance of azulene derivatives was plotted to time period of the experiments (n=3).

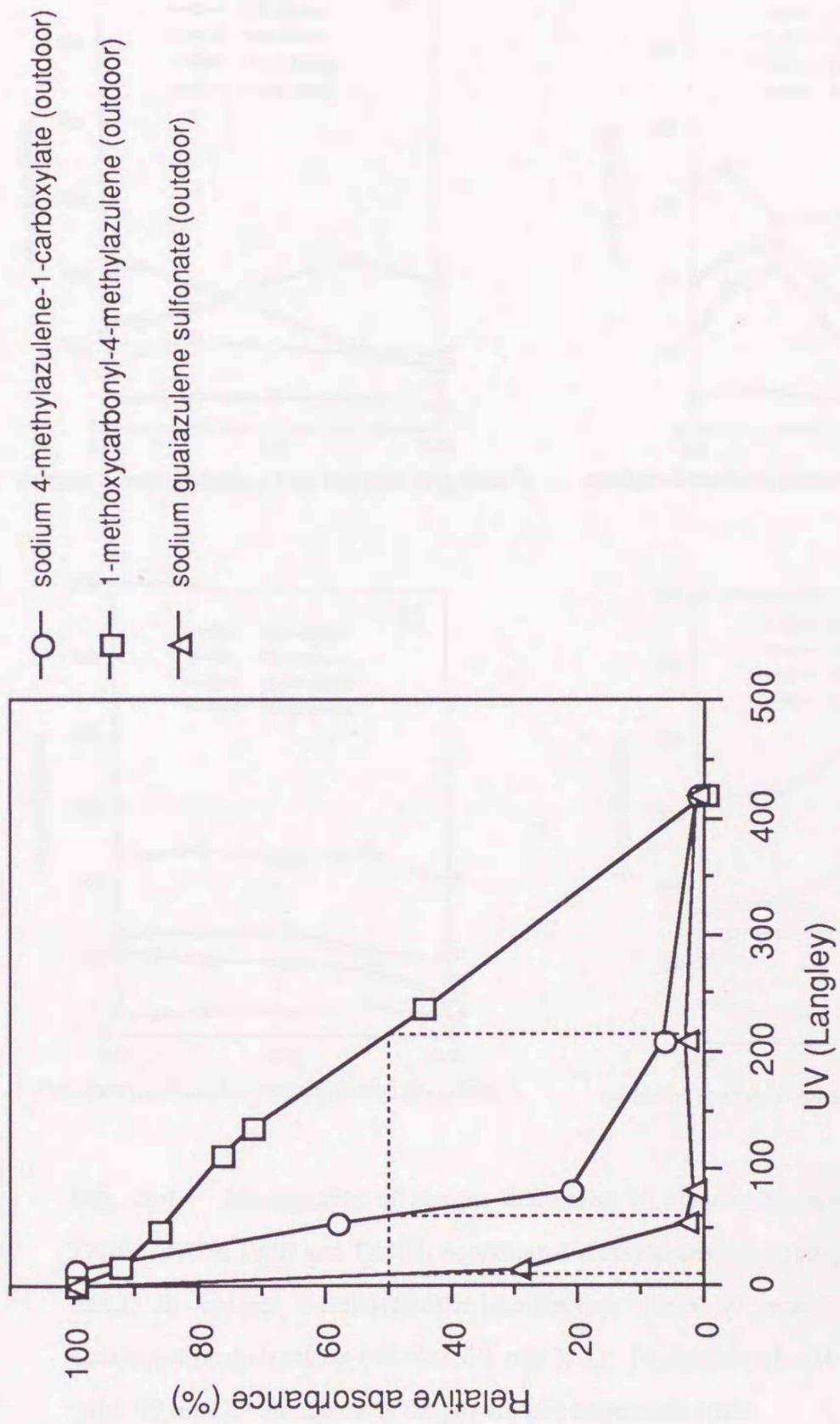


Fig. 5-3 Stability of azulene derivatives for light. Azulene derivatives (0.03 % each) were placed outdoor or indoor to expose to natural light. Relative absorbance of azulene derivatives was plotted to the amount of UV (300-400 nm).

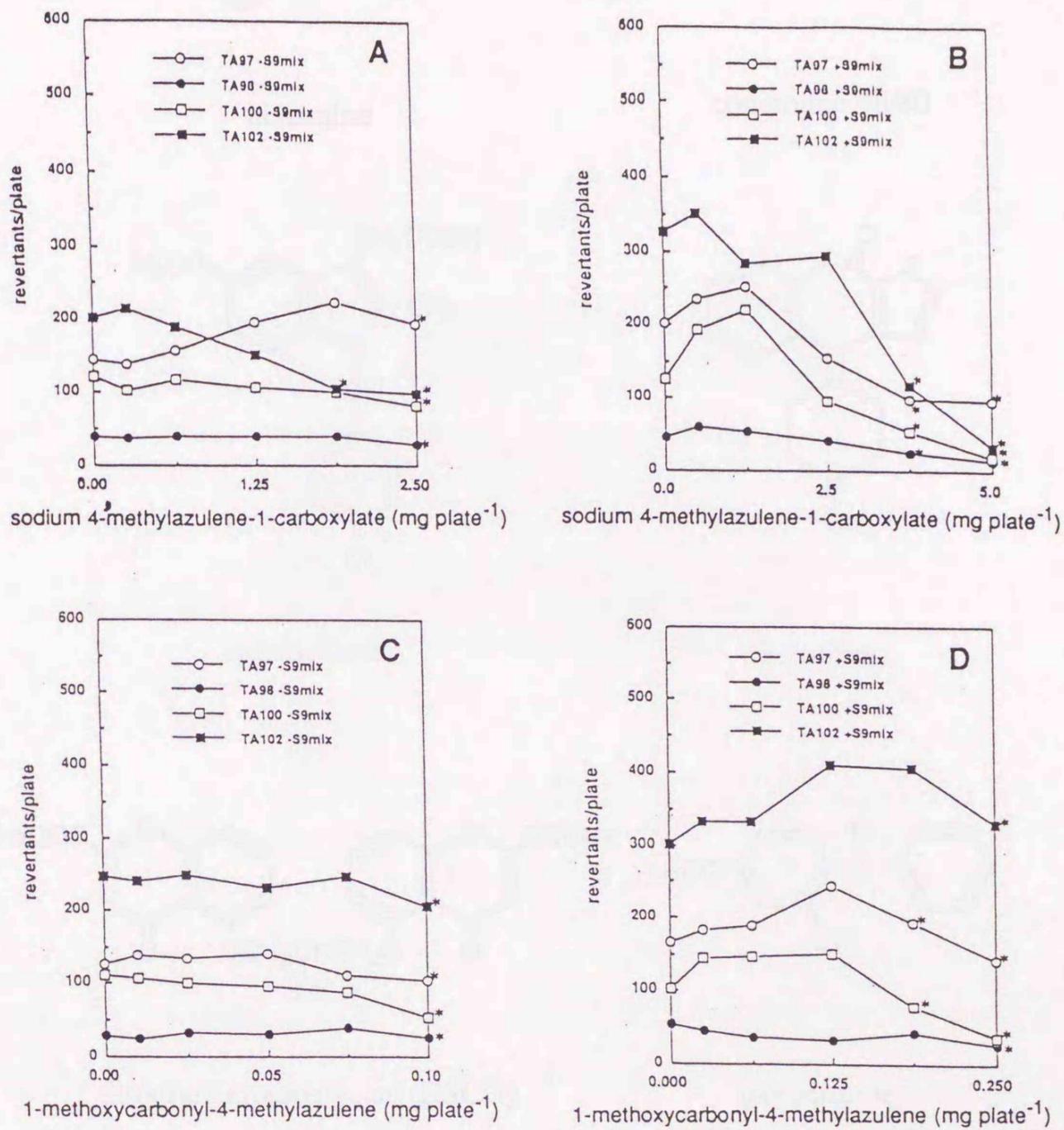
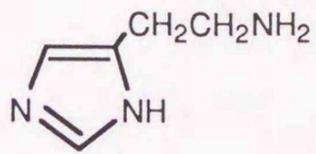
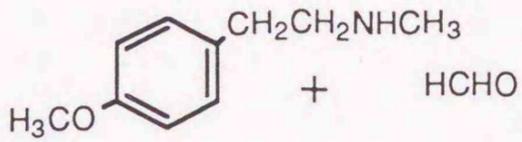


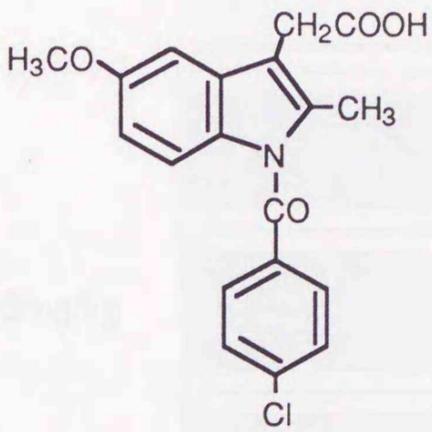
Fig. 5-4 Mutagenicity of azulene derivatives in *Salmonella typhimurium* strains TA100, TA98, TA97 and TA102. A; sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (without S9 mix.), B; sodium 4-methylazulene-1-carboxylate (with S9 mix.), C; 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (without S9 mix.), D; 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (with S9 mix.). * inhibition of the growth of a *Salmonella* strain.



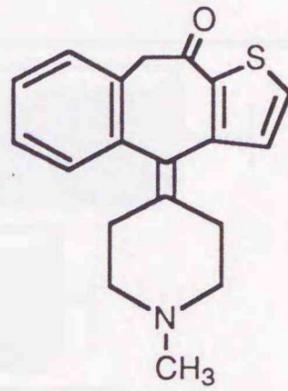
histamine



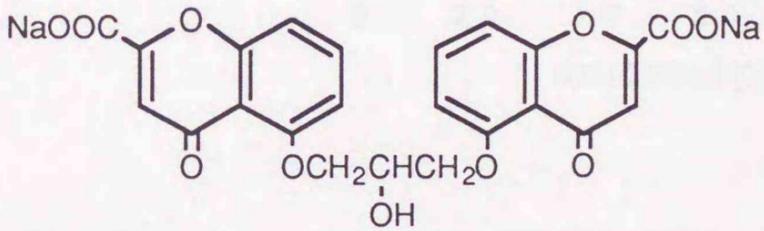
compound 48/80



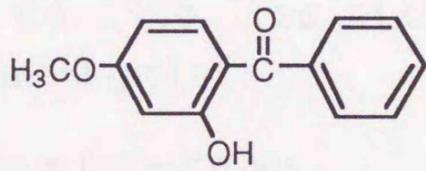
indomethacin



ketotifen

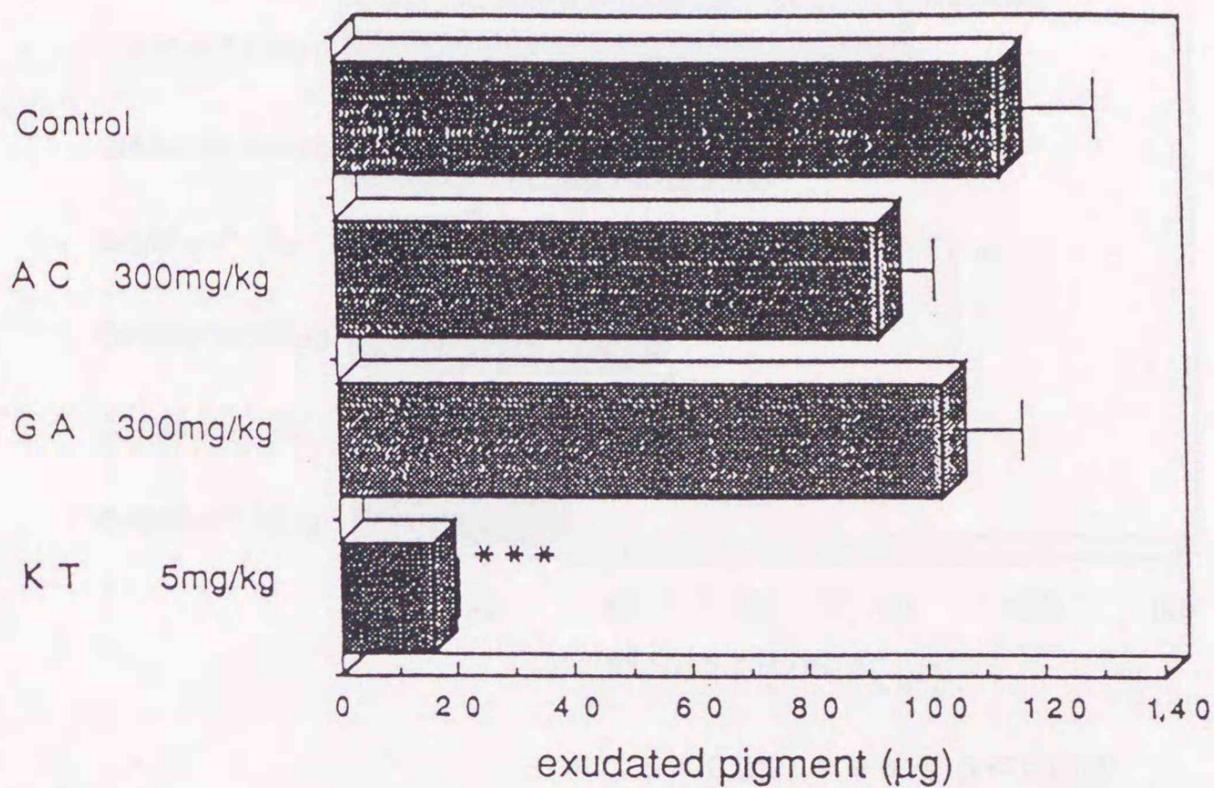


disodium cromoglycate (DSCG)



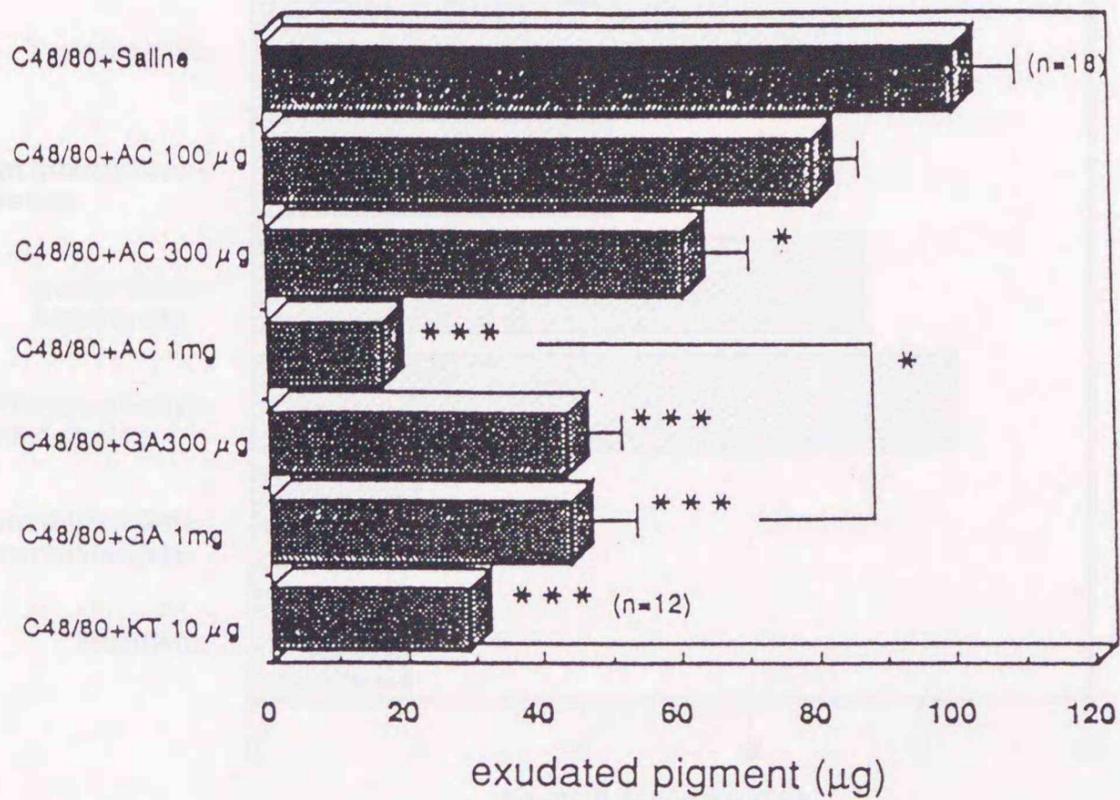
oxybenzone

Fig. 5-5 Drugs used in the experiments.



*** ; $p < 0.001$

Fig. 5-6 Suppressive effects of orally administered azulene derivatives on vascular permeability enhanced by compound 48/80. AC; sodium 4-methylazulene-1-carboxylate, GA; sodium guaiazulene-3-sulfonate, KT; ketotifen.



* ; $p < 0.05$, *** ; $p < 0.001$

Fig. 5-7 Suppressive effects of cutaneously administered azulene derivatives on vascular permeability enhanced by compound 48/80. C48/80; compound 48/80, AC; sodium 4-methylazulene-1-carboxylate, GA; sodium guaiazulene-3-sulfonate, KT; ketotifen.

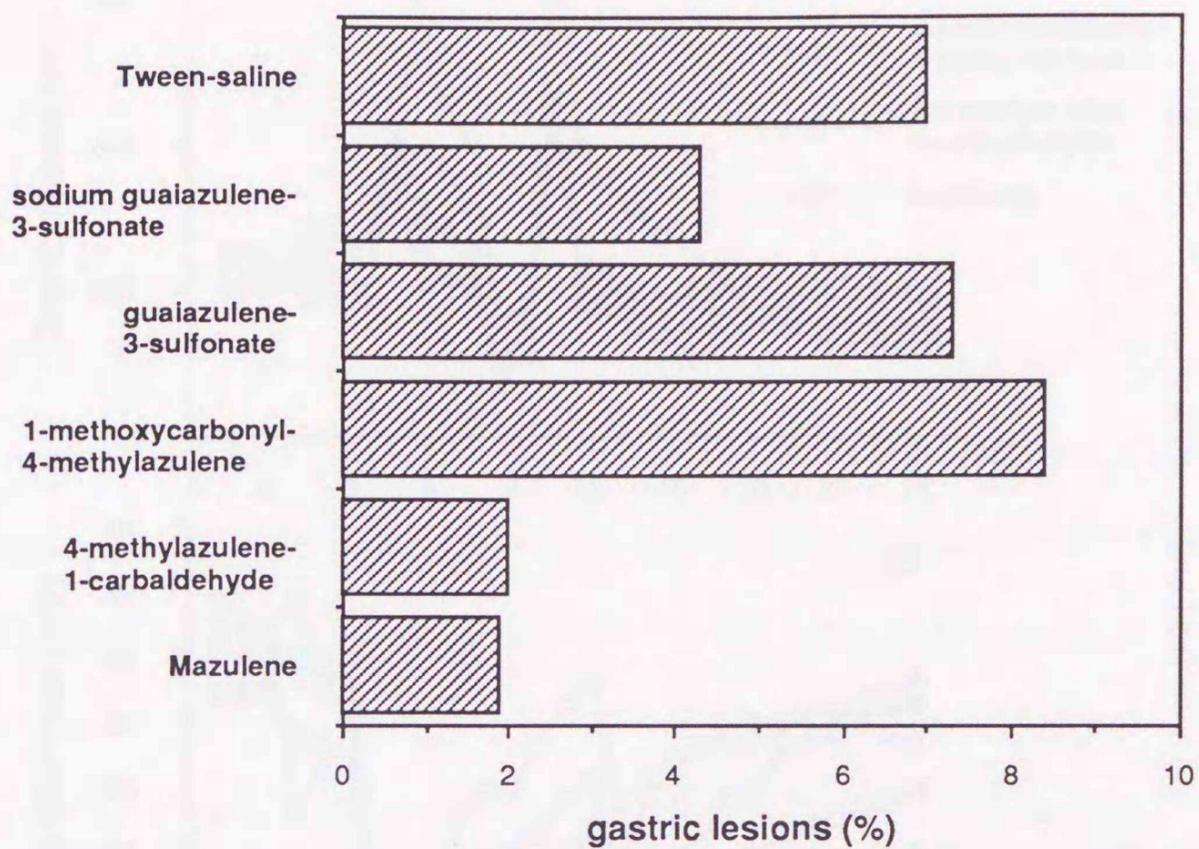


Fig. 5-8 Effects of azulene derivatives on gastric mucosal damage induced by 1 M NaCl plus hemorrhage-reperfusion in chambered stomachs of anesthetized rats.

Mazulene^R; 0.3 % sodium guaiazulene-3-sulfonate : 99 % L-glutamine.

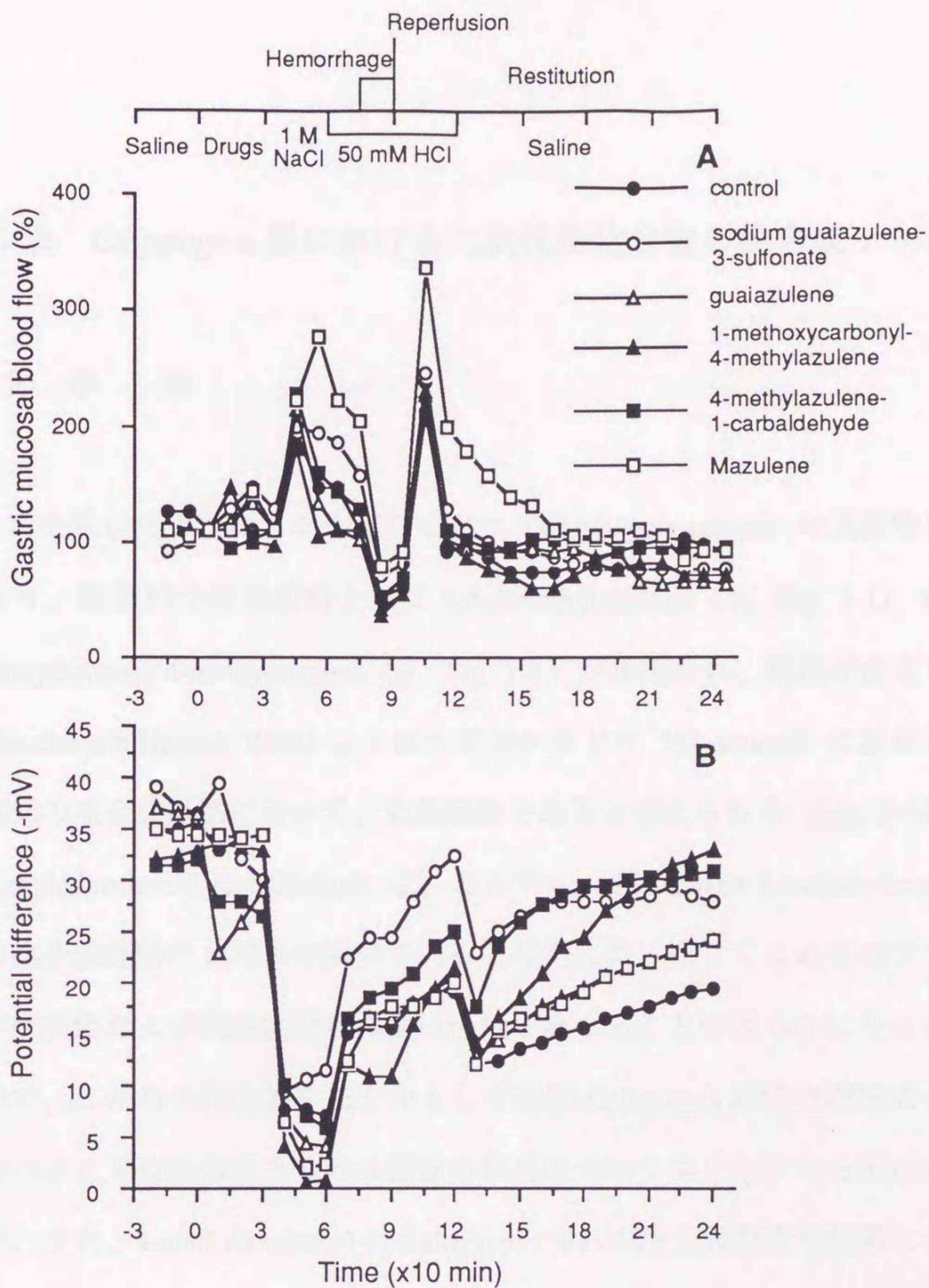


Fig. 5-9 Effects of azulene derivatives on changes of gastric mucosal blood flow (A) and potential difference (B) induced by 1 M NaCl plus hemorrhage-reperfusion in chambered stomachs of anesthetized rats. Mazulene^R; 0.3 % sodium guaiazulene-3-sulfonate : 99 % L-glutamine.

第6章 *Calypogeia* 属における二次代謝化合物の生合成

第1節 序 論

第2章で示したように、ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) の天然物化学的研究により、特徴的な精油成分として 1,4-dimethylazulene (1, Fig. 1-1) が、また 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4, Fig. 1-1) が単離され、構造が決定されている (Meuche and Huneck 1966)。4 はホラゴケモドキ (*C. azurea*) におけるアズレン誘導体の生合成経路において、最終産物であると考えられる (Fig. 2-3) ことから、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) および 4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) がその生合成経路における中間体であると推定した。そしてこれらのアズレン誘導体が抗炎症および抗潰瘍作用の高い活性を有することが明らかになった (第5章) ので、これらの化合物をモデルとして苔類 *Calypogeia* 属培養細胞によるセスキテルペノイドの生合成あるいは蓄積の促進についてエリシターを用いた検討を行ない、また、4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) の生合成酵素の性質について検討を行なった。

生薬成分など植物由来の有用二次代謝化合物の産業的生産を考えると、培養細胞を用いた生産系には従来の野外採集や圃場栽培に比べ、この方法が自然環境に対して基本的に非収奪的であること、栽培圃場を要さないこと、病虫害からの隔離、生産期間の短縮、気候変動に影響されない安定した品質などの優位性があると考えられる。しかしながら、生産物の市場価格に対し生産コストが大きいことなどの理由で現在のところ未だ十分に実用化されているとはいえない。その生

産コストの中で最も問題となるのは細胞当りの生産性の低い点であり、この生産性を向上させることが必須の課題となっている。このことはすなわち、目的化合物の生合成能や細胞外放出を含む蓄積能を向上させることを意味し、実際に唯一の工業的実用例であるといえるムラサキ (*Lithospermum erythrorrhizon*) 培養細胞によるシコニン生産では高生産株の選抜、高生産培地の開発を通してはじめて可能となったのである (Fujita *et al.* 1981a, b)。しかしながらここで採られた方法はいわば試行錯誤的であり、かならずしも普遍的な方法ではなく、多くの植物種に直接適用できるものではない。したがってより普遍的に植物細胞における二次代謝化合物の生産性を向上させる技術の開発が必要であると考えた。

植物 (細胞) がガンマ線 (Ogawa and Uritani 1969)、紫外線 (Gleitz and Seitz 1989; Phillips *et al.* 1992; Ren and West 1992)、機械的傷害 (Tanaka *et al.* 1983; Dalkin and Bowles 1989; Lewinsohn *et al.* 1991)、浸透圧 (Kochs *et al.* 1987; Stuhlfauth *et al.* 1987) などの物理的ストレス、抗生物質などの化学物質 (Kim *et al.* 1974; Oguni *et al.* 1976; Kobayashi and Ohta 1983; Kutney *et al.* 1985; Dougall 1989)、重金属 (Uritani *et al.* 1960; Oba *et al.* 1976; Steffens *et al.* 1989; Hagendoorn *et al.* 1990; Furze *et al.* 1991; Hanawa *et al.* 1992; Shibuya *et al.* 1992) などの化学的ストレス、または病原菌の感染 (Uritani *et al.* 1960; Akazawa and Wada 1961; Kato *et al.* 1971, 1973; Oguni and Uritani 1974; Oba *et al.* 1976; Lawton *et al.* 1983; Habereeder *et al.* 1989; Dalkin *et al.* 1990; Welle *et al.* 1991 ほか多数)、昆虫による摂食 (Uritani *et al.* 1975; Sato *et al.* 1977) などの生物的ストレスに曝されたとき、ファイトアレキシンを含む二次代謝化合物 (ストレス化合物) を生産することが知られている。これは植物 (細胞) が一時的にストレス化合物の生合成能を向上させ、これらのストレスに対し防禦反応を行なっているものと考えられている。

また、植物が温度や上に述べた種々のストレスを受けたとき、ストレス化合物を生産する応答とは別の防禦反応として熱ショック蛋白質あるいはストレス蛋白質と称される一群の蛋白質の生合成を誘導することも知られている (Gething and Sambrook 1992)。このようなストレスによって生体の代謝生理機能は部分的に攪乱されるが、それは種々の蛋白質の変性が原因であるとされている。現在ではこのようなストレス蛋白質の本質は、与えられたストレスによって変性した蛋白質を元どおりに折りたたみなおすという役割を有する「分子シャペロン」であると考えられている (Gething and Sambrook 1992)。このように植物は様々なストレスに対応する防禦機構を有している。

そこで著者は植物の二次代謝化合物の生産性を向上させるために、ストレスに対する防禦反応における二次代謝化合物の生合成能の増大機構 (エリサイテーション) を利用することを考えた。しかしながら現在までのところそれらの外的ストレス (エリシター) がどのような機構で二次代謝化合物の生合成系酵素の活性を増大させているのかについての統一的な理解には至っておらず、活性酸素が植物 (細胞) の情報伝達 (signal transduction) に関与することが示唆されているにとどまっている (Kurosaki *et al.* 1987; 村井ら 1987; Takahama *et al.* 1989; Apostol *et al.* 1989; Masuta *et al.* 1991; Schwacke and Hager 1992; Vera-Estrella *et al.* 1992; Vögeli *et al.* 1992; Kondo *et al.* 1993)。

ここではじめにミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞を用いて、エリシターがその二次代謝化合物の生合成を増加させるのか、またそれがどのような機構で成立しているのかについて、特にその初期段階において細胞内では何が起きているのかを明らかにする目的で実験を行なった。エリシターに対する細胞応答としてミドリホラゴケモドキ培養細胞の生産するトリノルセスキテルペノイド、1,4-dimethylazulene (1, Fig. 1-1) の生産量およびその生合成系に含まれ

る酵素 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase) の活性、細胞内の酸化還元状態を維持すると考えられているいくつかの酵素群 (glucose-6-phosphate dehydrogenase、6-phosphogluconate dehydrogenase、ascorbate free radical reductase、ascorbate peroxidase、dehydroascorbate reductase、glutathione reductase、catalase および superoxide dismutase) の活性、さらに細胞内還元剤であるグルタチオン (GSH) 濃度の挙動について測定した。またこれらの結果からミドリホラゴケモドキ培養細胞におけるエリサイテーションには活性酸素の関与が示唆されたので過酸化水素の影響について検討した。

つぎに、ミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) あるいはホラゴケモドキ (*C. azurea*) 培養細胞における主たる精油成分は 1,4-dimethylazulene (1) であるがその薬理作用は 1 よりむしろそれが酸素の添加を受けた 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) あるいは 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) などのほうがより高かった (第 5 章) ので、その生合成について検討した。

第 5 章で述べたように著者は抗炎症、抗潰瘍作用を有する水溶性アズレン誘導体の有用性を示したが、特に 2 あるいは 3 は培養細胞中の含量が低く (第 3 章)、またその化学合成も困難であるため、それを直接工業的規模で生産することは事実上不可能であろうと考えられる。したがってホラゴケモドキ (*C. azurea*) 細胞自身の有する生合成能に委ねることが必要である。このとき 2 はその生合成経路において酸素がその分子に取り込まれる最初の化合物である (Nakagawara *et al.* 1992) ため、これを触媒する酵素の性質は重要な意味を持つものと考えられた。そこで *Calypogeia* 属の主たる精油成分であり、その含量が比較的高く、またエリシターによって生産が高まることが示された (本章第 2 節) 1 を基質とする 2 の酵素的生産の可能性を検討するために、その合成反応に関与する酵素の性質を明

らかにした。

1 から 2 への反応に注目すると、これはアズレン骨格に対してアリル (allyl) 位の 1-メチルへの一酸素添加反応であり、P450 (cytochrome P450) が関与する反応ではないかと考えた。もしこれが P450 依存性モノオキシゲナーゼであるならばセスキテルペノイドのアルキル側鎖の P450 酵素による一酸素添加反応はこれまでコケ植物のみならず維管束植物においても知られていないという点からも興味をもち、この反応を触媒する酵素について検討を行なった。

P450 は最初にラット肝ミクロソームで一酸化炭素結合色素として見いだされた (Klingenberg 1958; Garfinkel 1958) ヘム蛋白質である (Omura and Sato 1964a) ことが知られている。現在までに動物のステロイド合成や薬物代謝に関連し、多くの研究が蓄積されてきており (Sugita *et al.* 1988; Harada 1988a, b; Iglesias and Gibbons 1989)、また細菌や酵母に関しても数多くの研究があり (Aoyama *et al.* 1989a, b; Sakaki *et al.* 1990; Shibata *et al.* 1990)、その機能の多様性と共に蛋白質レベルおよび遺伝子レベルでの多様性が明らかになっている (Bozak *et al.* 1990; Nebert *et al.* 1991)。

植物における P450 も同様に多様な生体反応に関連しており、近年その報告が蓄積されつつある (Tanaka *et al.* 1974; Rich and Bendall 1975; Rich *et al.* 1975; Fujita *et al.* 1982; Durst 1991; O'Keefe 1991; Donaldson and Luster 1991; Stadler and Zenk 1993; Gerardy and Zenk 1993; Funk and Croteau 1993)。しかしながら、P450 の遺伝子レベルの研究はラットの肝ミクロソームや酵母などの微生物を用いて詳細に行なわれているのに対し、植物における遺伝子レベルの研究は未だ少数である。

植物の P450 の蛋白質としてはチューリップ (Higashi *et al.* 1983, 1985) やキクイモ (Gabriac *et al.* 1985)、アボカド (O'Keefe and Leto 1989) およびメギ科

Berberis stolonifera (Stadler and Zenk 1993) などから単離されているが、その遺伝子についてはごく最近になってアボカドの熟成過程における *p*-chloro-*N*-methylaniline demethylase および *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase 活性 (Bozak *et al.* 1990)、キクイモの *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase 活性 (Teutsch *et al.* 1993)、そしてヤエナリの *trans*-cinnamic acid 4-hydroxylase 活性 (Mizutani *et al.* 1993) に関する P450 蛋白質の遺伝子配列が決定されたにすぎない。

Table 6-1 は植物において P450 依存反応と推定されている例をまとめたものである。このような植物における P450 が関与する反応はそれが動物で知られているような幅広い分子を認識する多様性を有することを示唆しているものの、動物や微生物の P450 に関する知見の蓄積に比べて未だ限定されたものでしかない。これらの反応は維管束植物のメバロン酸経路、シキミ酸経路、脂肪酸合成系といった一次代謝系より、それらから枝分かれする二次代謝系に関与する経路上に多く見られることを特徴としている。コケ植物は形態的には維管束植物ほどには分化していないが、これまでの章で種々のテルペノイドの生産や発達した葉緑体を有することを示したように、代謝的には十分に分化していると考えてよい。したがってコケ植物の P450 を調べることは植物の P450 の分子進化を考える上においても重要である。

本章では 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) を含有するホラゴケモドキ (*C. azurea*) 培養細胞より無細胞抽出液を調製し、1,4-dimethylazulene (1) を基質とする *in vitro* 系でその一酸素添加物である 2 の生成を確認した。この反応は NADPH を要求する酵素反応であり、活性は小胞体 (ER) 画分に局在していた。またこの反応が ancymidol、SK&F-525A、triazimenol、cytochrome c および CO によって阻害されることから P450 の関与する反応であることを示唆した。

第2節 ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞における

エリシターによるセスキテルペノイドの生合成誘導とその機構

1. 1,4-Dimethylazulene 含量に対するエリシターの効果

1) 材料および方法

植物材料

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata* INOUE) 懸濁培養細胞は3週間毎に継代培養を行なった (Takeda and Katoh 1981)。培地は2% グルコースおよび0.5% フマル酸を含んだ MSK-4 培地 (Table 4-1, Katoh 1988) 200 ml を 500 ml の Erlenmeyer フラスコで用いた。培養は連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、旋回培養器で 25°C にて行ない、初期定常期 (early stationary phase) の細胞 (約 $15 \text{ mg dry wt ml}^{-1}$) を実験に用いた。

エリシターの調製

五酸化バナジウム (V_2O_5 ; 和光純薬、大阪) は 20 mM KOH に 5 mM となるように溶解し、貯蔵溶液とした。オルトバナジン酸ナトリウム (Na_3VO_4 ; 和光純薬) およびオキシ硫酸バナジウム (VO_2SO_4 ; ナカライテスク、京都) は蒸留水に溶解し 5 mM 貯蔵溶液とした。酵母の粗グルカン画分は酵母エキス (Yeast extracts; Difco) より Hahn and Albersheim (1978) の方法に従って以下のように調製した。酵母エキス (50 g) を 250 ml 脱イオン水に溶解し、 80% (v/v) となるように $1,000 \text{ ml}$ エタノールを加えた。 4°C で4日間静置し、沈殿を生じさせ上清を除いた。フラスコに残ったゴム状の沈殿を再度 250 ml 脱イオン水に溶解し、 80%

(v/v) となるようにエタノールを加え (1,000 ml)、エタノール沈殿を繰り返した。2 回目の沈殿を 100 ml の脱イオン水に溶解し、4 °C で脱イオン水に対して、脱イオン水を 2 回交換し一夜透析を行なった。これを 20,000 x g、15 分間遠心し、その上清を孔径 1.2 μm のメンブレンフィルタ (Millipore, Bedford, MA, USA) で濾過した。濾液をドライアイス-アセトンで凍結し、一夜凍結乾燥を行なった。3.07 g の灰白色粉末が得られこれを粗グルカン画分とした。

エリシター処理

五酸化バナジウム、オルトバナジン酸ナトリウム、オキシ硫酸バナジウムの貯蔵液をそれぞれ終濃度 0.2 mM となるように 4 日間前培養したミドリホラゴケモドキ細胞に投与した。終濃度は予備実験において 2 mM 以上のバナジウム化合物濃度で増殖阻害が認められたのでその 1/10 濃度として決定した。酵母粗グルカン画分は 0.2 mg ml⁻¹ となるように投与した。五酸化バナジウム実験区のコントロールには同量の 20 mM KOH を投与し、オルトバナジン酸ナトリウム、オキシ硫酸バナジウム実験区のコントロールには同量の蒸留水を投与した。

1,4-Dimethylazulene の定量

1,4-Dimethylazulene (1) の定量は次のように行なった。新鮮重 0.5 g の培養細胞を経時的に採取し、脱イオン水で洗浄濾過後、*n*-hexane に浸漬した。*n*-Hexane 抽出物は SEP-PAK silica cartridge (Japan Millipore, Tokyo) で処理し、極性の夾雑物を除去した。容量を 1 ml に調整し、1 μl をガスクロマトグラフ (GC-15A、島津製作所、京都) に注入した。用いたキャピラリーカラムは 5 % phenylmethylsilicone, Ultra 2; 50 m (Hewlett-Packard, Rockville, MD, USA) で、8 °C min⁻¹ で 120 -180 °C の昇温プログラムで分析した。注入温度は 280 °C、検出器温度は 340 °C とした。

1,4-Dimethylazulene (1) は標準溶液の検量線により定量した。

グルコースの定量

培地中のグルコース濃度は *o*-toluidine-borate 法 (Sasaki 1964) で定量した。0.05 ml の培地をメンブラン濾過し、5.0 ml の Glucose Test Wako (和光純薬) に加え、激しく攪拌した。混合液を 95 °C の温浴中で正確に 8 分間加熱し、流水中で 3 分間冷却した。635 nm の吸収を測定し、予めグルコース標品を用いて作成した検量線で定量した。

2) 結 果

Table 6-2 はいくつかのバナジウム化合物および酵母粗グルカン画分の 1,4-dimethylazulene (1) 含量に対する効果を示したものである。1 の生産はオルトバナジン酸ナトリウム および酵母グルカン画分処理によってコントロールの含量に比べて約 2 倍に高まったが、オキシ硫酸バナジウムには効果がなかった。また、五酸化バナジウム処理した細胞においても促進効果が認められた (Fig. 6-1)。しかしながらこの五酸化バナジウム処理実験のコントロール細胞における 1 の含量は Table 6-2 に結果を示した実験でのコントロール細胞における 1 の含量の約 1/7 に低下していた。これは実験に用いた培養細胞の継代培養回数の違いによるものと考えられ、3 週間毎の継代培養を重ねると褐変枯死する細胞の数が増えてきて乾重量あたりの 1 の含量が低下する結果となるものと考えられた。このことはミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 細胞の懸濁培養条件が必ずしも最適ではないことを示唆し、そのため生細胞における 1 の生合成能の低下を引き起こしている可能性も考えられた。

オルトバナジン酸ナトリウム (Na_3VO_4) および五酸化バナジウム (V_2O_5)

は pH 5.7 の培地中では H_2VO_4^- 体で存在している (Gallagher and Leonard 1982) ので Table 6-2 に見られるバナジウム化合物の 1,4-dimethylazulene (1) 生産促進効果はバナジウムの同じ分子種 (H_2VO_4^-) に起因することが示唆された。

一方、酵母粗グルカン画分も同様に促進効果を示した (Table 6-2)。しかしながらバナジウム化合物では影響する分子種が明らかであるのに対し、グルカン画分は粗標品であり、化学的均一性を欠いている。したがってどの因子が真にこの効果を生じさせているのかを特定することが困難であるので、実験系を単純にするため以下の実験では非生物のエリシターである五酸化バナジウムを用いた。

Figure 6-1 は新鮮培地に移植後 4 日間前培養したミドリホラゴケモドキ細胞に終濃度 0.2 mM の五酸化バナジウムを加えた時の、1,4-dimethylazulene (1) の含量および培地中のグルコース濃度の経時変化を示したものである。エリシター処理した細胞の 1 の含量は直線的に増加し、添加後 8 日目には最大値に達し、 $2.9 \mu\text{mole g}^{-1} \text{ dry wt}$ を示した。その後、含量は 6 日以内にコントロールのレベルまで減少した。コントロールにおける 1 の含量は全培養期間を通して $1.2 - 1.7 \mu\text{mole g}^{-1} \text{ dry wt}$ の範囲で推移した。コントロール細胞における 1 の生成はこれが構成成分として生合成されていることを反映しているものと考えられる。

イソキノリンアルカロイド生合成の鍵酵素とされている L-tyrosine decarboxylase を酵母グルカン由来エリシターで誘導する場合には培地中に 1 L あたり 5 g 以上のシュクロースが残存していることが必要であることが報告されている (Marques and Brodelius 1988)。そこでエリシター処理後 7 日目 (残存培地量約 100 ml) に 2% グルコースを含んだ新鮮培地 150 ml を追加投与したが、エリシター処理細胞の 1 の含量に対する影響は認められなかった。またコントロール細胞の 1 の含量も影響されなかった。

エリシター処理細胞のグルコース消費速度はコントロールと同程度であり、グ

ルコース消費でみた細胞の生存に対して五酸化バナジウムは影響しないことが分かった。

2. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性に対するエリシターの効果

1) 材料および方法

植物材料

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata* INOUE) 懸濁培養細胞は3週間毎に継代培養を行なった (Takeda and Katoh 1981)。培地は2% グルコースおよび0.5% フマル酸を含んだ MSK-4 培地 (Table 4-1、Katoh 1988) 40 ml を 100 ml の Erlenmeyer フラスコで用いた。培養は連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、旋回培養器で 25°C にて行ない、初期定常期 (early stationary phase) の細胞 (約 $15 \text{ mg dry wt ml}^{-1}$) を実験に用いた。

エリシター処理

五酸化バナジウム (V_2O_5) の貯蔵液 (5 mM) を終濃度 0.2 mM となるようにミドリホラゴケモドキ細胞の培養開始時に投与した。コントロールには同量の 20 mM KOH を投与した。

3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性の測定

抽出および分画

3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) 活性は Russell (1985) の方法を一部改変して測定した。この方法は基質として [^{14}C]HMGC_oA を用い、生成したメバロン酸を TLC で分離後定量するものである。

新鮮重約 0.5 g のミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞を経時的に採取し、脱イオン水で洗浄後、液体窒素中で凍結し、1.0 ml の homogenizing medium [10 mM Tris-HCl, pH7.0, 0.35 M sucrose, 30 mM EDTA, 10 mM DTT] および 0.01 g polyvinyl- polypyrrolidone (PVPP, Sigma, St Louis, MO, USA) を加え、3 分間磨砕した。磨砕物は 2 層のガーゼで濾過し、500 x g, 2 分間で遠心し、上清を 3,500 x g, 2 分間で遠心した。3,500 x g の遠心で得た沈殿を rupture medium [10 mM 3-(*N*-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) -KOH, pH7.5, 10 mM KCl, 25 mM EDTA, 10 mM DTT] に懸濁し、50,000 x g, 16 分間で再度遠心して葉緑体画分とした。得られた沈殿に 60 μ l の suspension medium [0.25 M リン酸カリウム緩衝液 (KPB; pH 7.9), 25 mM DTT] を加え、テフロンホモジナイザでよく懸濁し試料とした。

ミクロソーム画分はこの 3,500 x g 上清を 12,000 x g, 10 分間で遠心し、さらに 50,000 x g, 60 分間で遠心した。得られた沈殿に 80 μ l の上記のとは別の suspension medium [0.2 M KPB, pH 6.9, 25 mM DTT] を加え、テフロンホモジナイザでよく懸濁しこれを試料とした。抽出分画操作はすべて 4 $^{\circ}$ C で行なった。

活性測定

ミクロソーム画分については、70 μ l の試料に 5 μ l 0.2 M DTT および 5 μ l NADPH-generating system [0.15 M KPB, pH6.9, 0.2 M glucose-6-phosphate, 40 mM NADP⁺, 1.6 units glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, Boehringer-Mannheim, FRG)] を加え反応液とした。葉緑体画分については、55 μ l の試料に 5 μ l 0.2 M DTT, 5 μ l NADPH-generating system [0.15 M KPB, pH7.9, 0.2 M glucose-6-phosphate, 40 mM NADP⁺, 1.6 units G6PDH] および 15 μ l 0.25 M KPB, pH 7.9 を加え反応液とした。

各反応液を 30 °C で 15 分間プレインキュベートしたのち、20 μ l の hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A, DL-3-[glutaryl-3- 14 C]- (14 C] HMGCoA) : 比放射能 ; 1.805 GBq mmole $^{-1}$ 、使用量 ; 4.114 Bq (NEN Research Products, Boston, MA, USA) を加えて 30 °C で 30 分間反応を行なった。30 分後、10 μ l メバロン酸および 10 μ l 6N HCl を加え反応を停止した後、15 分間室温で静置した。これを 10,000 x g, 2 分間で遠心し、上清 10 μ l について薄層クロマトグラフィーを行なった。TLC プレートは Silica gel 60G (Merck) を用い、クロロホルム : アセトン = 2 : 1 (v/v) で展開した。乾燥後、ポリエチレンフィルムでラップし、イメージングプレート (Type BAS-III, 20 x 25 cm, Fuji photo film, Tokyo) に 86 時間感光させた。イメージングプレートは Bio-Image Analyzer BAS-2000 (Fuji photo film) で解析し、生成したメバロン酸の 14 C の放射能についてバックグラウンドを差し引き、あらかじめ液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した [14 C] HMGCoA (5652.8 dpm μ l $^{-1}$; 339.16 Bq μ l $^{-1}$) と比較して算出した。

2) 結 果

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) の生産する 1,4-dimethylazulene (1) は酢酸からメバロン酸、ファルネシルピロリン酸を経るメバロン酸経路で生合成されることが知られている (Fig. 2-3, Takeda and Katoh 1981, 1983b)。このメバロン酸経路は植物の二次代謝化合物生合成の主要な経路のひとつであり、HMGCoA よりメバロン酸の生成を触媒する HMGR はその重要な生合成酵素のひとつである。これまでのいくつかの先駆的研究によりサツマイモ根 (Suzuki *et al.* 1974) やタバコ培養細胞 (Chappell *et al.* 1991)、ジャガイモ塊茎 (Stermer *et al.* 1991) においてエリシターによって HMGR が誘導されテルペノイドが蓄積することが報告されている。そこでエリシターで処理した細胞における HMGR 活性

の経時変化を測定した (Fig. 6-2)。葉緑体膜およびミクロソーム画分に存在する植物の HMGR はそれぞれ別種の蛋白質で (Russell, 1985)、ジャガイモ塊茎におけるエリシターによって誘導される HMGR はミクロソーム画分に存在している (Stermer *et al.* 1991)。そこで葉緑体およびミクロソーム画分を Quail (1979) の方法に従って分画調製し、それぞれの HMGR 活性について測定した。これらの画分は標識酵素の活性の測定により純度を検定した。小胞体の標識酵素である antimycin A-insensitive NADH : cytochrome c reductase 活性 (Lord *et al.* 1973 ; Bowles and Kauss 1976 ; Nagahashi and Beevers 1978 ; Schwitzguebel and Siegenthaler 1984) の回収率は葉緑体画分、ミクロソーム画分で各々 7.1 および 65.6 % であった。同様に antimycin A-insensitive NADPH : cytochrome c reductase 活性 (Lord *et al.* 1973 ; Bowles and Kauss 1976 ; Nagahashi and Beevers 1978 ; Schwitzguebel and Siegenthaler 1984) は各々 14.9 および 31.3 %、ミトコンドリア標識酵素である フマラーゼ活性 (Racker 1950 ; Douce *et al.* 1972 ; Moore *et al.* 1973 ; Sparace and Moore 1979) は 0 および 44.6 %、さらにもうひとつのミトコンドリア標識酵素である cytochrome c oxidase 活性 (Leonard *et al.* 1973 ; Jackson *et al.* 1979 ; Bergman *et al.* 1980) は 0 および 43.1 %、そしてクロロフィル量 (Vernon 1960) は 26.4 および 63.7 % であった。常法としての分画遠心法で得られたミクロソーム画分は様々な膜断片の集まりであるため、ミトコンドリアやチラコイド膜断片の混入が避けられなかった。

葉緑体およびミクロソームの HMGR 活性はどちらもほぼ同程度、五酸化バナジウムによって活性が増大し、葉緑体 HMGR 活性は 3 - 6 時間までに 6 nmole $\text{mg}^{-1}\text{protein h}^{-1}$ の最大値に達し、ミクロソーム HMGR 活性では 3 - 9 時間までに葉緑体 HMGR 活性と同じレベルに達した。その後葉緑体 HMGR 活性は速やかに減少し、10 時間までにコントロールレベルとなり、ミクロソーム HMGR 活性は葉緑体 HMGR 活性よりやや緩やかに減少し、16 時間までにコントロールレベルに

戻った。

3. NADPH 生成系およびアスコルビン酸-グルタチオン回路の酵素群に対するエリシターの効果

1) 材料および方法

植物材料

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata* INOUE) 懸濁培養細胞は3週間毎に継代培養を行なった (Takeda and Katoh 1981)。培地は2% グルコースおよび0.5% フマル酸を含んだ MSK-4 培地 (Table 4-1, Katoh 1988) 200 ml を 500 ml の Erlenmeyer フラスコで用いた。培養は連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、旋回培養器で 25°C にて行ない、初期定常期 (early stationary phase) の細胞 (約 $15 \text{ mg dry wt ml}^{-1}$) を実験に用いた。

エリシター処理

五酸化バナジウム (V_2O_5) の貯蔵液 (5 mM) を終濃度 0.2 mM となるようにミドリホラゴケモドキ細胞の培養開始時に投与した。コントロールには同量の 20 mM KOH を投与した。

酵素活性の測定

ミドリホラゴケモドキ細胞の活性酸素消去系の酵素群の活性測定は次のように行なった。新鮮重 0.5 g のミドリホラゴケモドキ細胞を経時的に採取し、脱イオン水で洗浄後、3.55 ml の冷抽出緩衝液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.7, 1 mM DTT) に 0.2 g PVPP を加え、Polytron ホモジナイザ (Kinematica, Lucerne, Switzerland) を用

いて2分間磨砕した。磨砕物を 20,000 x g, 10 分間, 4℃ で遠心し、その上清を粗酵素液として用いた。

Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) および 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44) 活性は NADPH を生成する速度を 340 nm で測定した (Nakagawara and Sagisaka 1984)。Ascorbate free radical reductase (AFRRD, EC 1.6.5.4) 活性は ascorbate oxidase によって生成した ascorbate free radical を還元する際の NADH の酸化速度を 340 nm で測定し、ascorbate peroxidase (AAPOD, EC 1.11.1.11) 活性は ascorbate の消費速度を 290 nm で測定し、dehydroascorbate reductase (DHARD, EC 1.8.5.1) 活性は基質とする dehydroascorbate の還元とリンクした glutathione reductase (Boehringer-Mannheim) の反応で消費する NADPH 酸化速度を 340 nm で測定し、また catalase (EC 1.11.1.6) 活性は H₂O₂ を消費する速度を 240 nm で測定した (Nakagawara and Sagisaka 1984)。Glutathione reductase (GSSGRD, EC 1.6.4.2) 活性は NADPH 酸化速度を 340 nm で測定した (Esterbauer and Grill 1978)。Superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) 活性は Droillard *et al.* (1987) の方法に従って、560 nm における nitroblue tetrazolium (NBT; Sigma) の還元阻害率で測定した。SOD の 1 単位は 50% 阻害の際の蛋白質質量で表した。活性測定は 25℃ で分光学的に測定し、3 回の独立した測定を行った。

2) 結 果

終濃度 0.2 mM の五酸化バナジウムを培養開始時に添加し、各酵素活性について経時変化を測定した。Figure 6-3 および 6-4 にそれぞれ G6PDH、6PGDH、catalase および AFRRD、DHARD 活性について示した。五酸化バナジウム処理およびコントロール細胞における G6PDH 活性 (Fig. 6-3A) は、処理直後に 1/2 - 1/3

に低下するが、その後 72 時間まで約 100 - 200 mmole NADP⁺ reduction g⁻¹ dry wt h⁻¹ の範囲で著しい差異は認められなかった。6PGDH 活性 (Fig. 6-3B) は、コントロール細胞で処理直後に増加するが、その後 72 時間まで約 100 - 150 mmole NADP⁺ reduction g⁻¹ dry wt h⁻¹ の範囲で著しい差異は認められなかった。Catalase 活性 (Fig. 6-3C) についても処理直後に増加するが、その後 75 - 100 mole H₂O₂ reduction g⁻¹ dry wt h⁻¹ で差異は認められなかった。コントロール細胞のこれらの酵素活性の五酸化バナジウム処理直後 (3 時間後) での変化は移植ショックといわれるものと考えられるが、6PGDH 活性および catalase 活性においては五酸化バナジウム処理細胞ではそのような変化は見られず理由は不明である。

DHARD 活性 (Fig. 6-4A) は 50 - 150 mmole NADPH oxidation g⁻¹ dry wt h⁻¹ の範囲であったが五酸化バナジウム処理およびコントロール細胞における経時変化は逆の増減変化を示した。AFRRD 活性 (Fig. 6-4B) は 120 - 400 mmole NADH oxidation g⁻¹ dry wt h⁻¹ の範囲であり、五酸化バナジウムで処理した細胞では処理直後 (3 時間後) に一坦増加するがその後コントロール細胞と同様の変化を示した。

一方、SOD (Fig. 6-5)、AAPOD (Fig. 6-6A) および GSSGRD (Fig. 6-6B) 活性は上に述べた酵素活性の経時変化とは異なっていた。SOD 活性は xanthine : xanthine oxidase 系で生成したスーパーオキシドアニオンによる NBT の還元阻害の程度として測定した。Figure 6-5 に示したように SOD 活性はエリシターの添加後 1 時間以内に約 2 倍に高まり、その後コントロールのレベルに低下した。コントロールでは活性が半減したがその後約 60 時間まで一定であった。

AAPOD 活性 (Fig. 6-6A) はエリシター添加後コントロールより高いレベルにあり、45 時間までに最大値に達し、4.3 mole ascorbate reduction g⁻¹ dry wt h⁻¹ を示しその後コントロールのレベルまで減少した。この時この AAPOD 活性のレベルは

AFRRD 活性の約 4 倍であった。

GSSGRD 活性は、エリシター添加直後に上昇し、コントロールに比べて常に 1.5 倍程度を維持した ($100-120 \text{ mmole NADPH oxidation g}^{-1} \text{ dry wt h}^{-1}$, Fig. 6-6B)。

4. グルタチオン含量に対するエリシターの効果

1) 材料および方法

植物材料

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata* INOUE) 懸濁培養細胞は 3 週間毎に継代培養を行なった (Takeda and Katoh 1981)。培地は 2% グルコースおよび 0.5% フマル酸を含んだ MSK-4 培地 (Table 4-1, Katoh 1988) 200 ml を 500 ml の Erlenmeyer フラスコで用いた。培養は連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)、旋回培養器で 25 °C にて行ない、初期定常期 (early stationary phase) の細胞 (約 15 mg dry wt ml⁻¹) を実験に用いた。

エリシター処理

五酸化バナジウム (V_2O_5) の貯蔵液 (5 mM) を終濃度 0.2 mM となるようにミドリホラゴケモドキ細胞の培養開始時に投与した。コントロールには同量の 20 mM KOH を投与した。

細胞内グルタチオンの定量

グルタチオン (還元型) 含量は Mendum *et al.* (1990) の方法に従って HPLC で測定した。経時的に採取したミドリホラゴケモドキ培養細胞は脱イオン水で洗浄濾過後、速やかに液体窒素中で凍結し分析時まで -80 °C で保存した。凍結細胞は

10% 5-sulfosalicylic acid 中でときどき攪拌しながら 15 - 30 分間抽出した。抽出物は 14,000 x g, 10 分間, 4 °C で遠心し、その上清を速やかに HPLC で分析した。用いたカラムは逆相の LiChrospher RP-18 (e), 4 x 250 mm (Cica-Merck) で、移動相は 10 - 20 % CH₃CN / 0.1 % TFA の直線勾配プログラムとし、流速は 1.0 ml min⁻¹ である。溶離したチオール化合物はポストカラムで 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.6) に溶解した 75 μM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; ナカライテスク) と連続的に反応させ、412 nm の吸収を測定した。グルタチオン含量は検量線により算出した。

2) 結 果

前節でみられた GSSGRD 活性の上昇は細胞内グルタチオン含量と関連すると考えられたのでそれに対するエリシターの影響について調べた。Figure 6-7 はエリシター処理細胞における急速なグルタチオン含量の増加を示したものである。エリシター処理細胞ではエリシター添加直後より急速に増加し 24 時間以内に 3.0 μmole g⁻¹ dry wt に達した。その後しだいに減少したがコントロールレベルには戻らず、コントロールレベルの約 2 倍の含量を維持した。このことは 24 時間までの経時変化をより詳しく測定した実験においても再現性よく確認でき、添加 1 時間後から 10 時間までに急速な増加が認められ、24 時間までにさらに増加し最大値に達した。コントロール細胞におけるグルタチオン含量は培養時間 400 時間にわたりほぼ一定で約 0.3 μmole g⁻¹ dry wt であった。

5. 1,4-Dimethylazulene 生産に対する過酸化水素の効果

1) 材料および方法

植物材料

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata* INOUE) 懸濁培養細胞は3週間毎に継代培養を行なった (Takeda and Katoh 1981)。培地は2% グルコースおよび0.5% フマル酸を含んだ MSK-4 培地 (Table 4-1, Katoh 1988) 200 ml を 500 ml の Erlenmeyer フラスコで用いた。培養は連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)、旋回培養器で 25°C にて行ない、初期定常期 (early stationary phase) の細胞 (約 $15 \text{ mg dry wt ml}^{-1}$) を実験に用いた。

過酸化水素処理

過酸化水素処理は次のように行なった。終濃度 0.1、0.5、1.0 mM となるように調製した過酸化水素溶液を同容量ずつ $0.22 \mu\text{m}$ メンブランフィルタ (Japan Millipore, Tokyo) で濾過滅菌し、ミドリホラゴケモドキ細胞の培養開始時に投与した。コントロールには同量の脱イオン水を投与した。

1,4-Dimethylazuleneの定量

1,4-Dimethylazulene (1) の定量は次のように行なった。新鮮重 0.05 g の細胞を経時的に採取し、脱イオン水で洗浄濾過後、アセトン中に浸漬した。アセトン抽出物を濃縮し、アセトンで 0.1 ml とした。本章第2節 2-3) と同様にガスクロマトグラフで昇温分析を行なった。

2) 結 果

本章第2節 4. および 5. でみたようにエリシターに対する応答として活性酸素消去系が活性化することは 1,4-dimethylazulene (1) のような二次代謝化合物の蓄積促進に酸化ストレスが関与することを示唆している。そこで過酸化水

素をミドリホラゴケモドキ培養細胞に直接添加し 1 の生産に対する影響を調べた。

Table 6-3 は 1 の生産に対する種々の濃度の過酸化水素の影響を示したものである。0.1 - 0.5 mM H_2O_2 の濃度の範囲で 1 の含量が 1 日以内にコントロールの約 2 倍に増加し、6 日目までそのレベルを維持した。

第3節 ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) における 4-methylazulene-1-carbaldehyde の生合成

1. 材料および方法

1) 培養細胞

実験には約2ヶ月の培養後、十分に生長したホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea* Stotler et Crotts) 配偶体を用いた。培養は寒天培地または寒天を除いた同一組成の液体培地で連続照明下 ($90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) で行ない、液体培養は1% CO_2 富化空気によって通気攪拌した。収穫したホラゴケモドキ (*C. azurea*) 配偶体はよく水洗し、粗酵素液の調製に用いた。

2) 粗酵素液の調製

Werck-Reichhart *et al.* の方法 (1990) を一部改変して行なった。約10gのホラゴケモドキ配偶体を液体窒素で瞬間的に凍結し、2g海砂 (Merck, Darmstadt, FRG) および1g polyvinylpolypyrrolidone (PVPP, Sigma) を加えて磨砕した。十分細かくなってから31.0mlの磨砕液を加えさらに2分間磨砕し4℃、10分間攪拌抽出した。磨砕液の組成はつぎのとおりである；(終濃度) 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (KPB) (pH7.4), 1mM DTT, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, ナカライテスク), 40mM アスコルビン酸および20% グリセロール。磨砕液中のグリセロールは酵素の安定化およびインキュベート中の反応液の防腐のために有効であり、アスコルビン酸およびEDTAは酵素反応に必須であった。

磨碎物は4層のガーゼで濾過し、10,000 x g, 10分間, 4℃で遠心した。上清を2層の Miracloth (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) で濾過し、再度 10,000 x g, 30分間遠心した。この上清を 105,000 x g, 60分間遠心し、沈殿をミクロソーム画分とした。105,000 x g 上清は終濃度 3 mM となるように塩化マグネシウム六水和物を加え、氷中で1時間攪拌した。マグネシウムイオンが存在すると上清中の残りの膜成分は凝集し沈殿する(マグネシウムシフト)のでその沈殿を再度 105,000 x g, 60分間遠心し、得られた薄い緑色を呈した沈殿を小胞体(ER)画分とした。実験には主にこの ER 画分を粗酵素液として用いた。

3) 酵素活性の測定

Werck-Reinchhart *et al.* (1990) および Hinderer *et al.* (1987) の方法を改良して行なった。反応液は総量 0.25 ml とした。25 mM (終濃度) リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), 25 mM, 20% グリセロール, 40 mM アスコルビン酸, 1 mM EDTA, 1 mM グルコース-6-リン酸 (50 mM KPB, pH 7.4に溶解; Boehringer-Mannheim), 0.5 U グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PDH; Boehringer-Mannheim) に適量の脱イオン水を加え、30℃、2分間インキュベートした。これに 0.25 mM (終濃度) 1,4-dimethylazulene (1, DMSOに溶解) および 0.02 ml の粗酵素を加え、30℃、2分間インキュベートし、その後、0.05 mM (終濃度) NADPH (0.01 N KOH に溶解) を加えて反応を開始した。0時間での測定は NADPH を加えた直後に 0.004 ml の 6 N HCl を加えたものである。反応は 30℃で行ない経時的にサンプリングした。6 N HCl を加えて停止させた反応液は、10,000 x g で 10分間遠心し、その上清 20 µl を直接 HPLC に注入し、基質および反応生成物を定量した。

4) アズレン誘導体の同時定量

反応基質を 1,4-dimethylazulene (1) とし、反応生成物を 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3) とし、これらおよび 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) のアズレン誘導体の HPLC による同時定量条件を種々検討した結果、次のように確立した。

カラムは逆相の LiChrospher RP18 (e), 4 x 125 mm (Cica-Merck) を用い、移動相は A液; 0.1% TFA/蒸留水および B液; 0.1% TFA/アセトニトリルとした。グラジエントプログラムは 0 - 5.5 分の間を B/A = 55/45 の一定とし、5.5 - 10 分の間を B/A = 55/45 - 100/0 の直線勾配、10 - 12 分の間を B/A = 100/0 の一定とした。流速は 1.0 ml min^{-1} とし、290 nm の吸収で検出した。

精製した 1、2、3 および 4 の 0.1 mM 混合溶液を調製し、これを標準として検量線を作成した。

2. 結 果

1) 4-Methylazulene-1-carbaldehyde の生成反応

ここで注目している反応は 1,4-dimethylazulene (1) から 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2) であるのでこの反応を触媒する酵素を 1,4-dimethylazulene monooxygenase (DMAMO; EC 1.14.X.X.) と称することとする。最初にこの反応がホラゴケモドキ (*C. azurea*) 細胞抽出物を用いた無細胞系で起きることを確認した。粗酵素液の抽出法、反応条件、生成物の定量について種々の検討を行ない DMAMO 活性の測定方法を確立した。

この反応を経時的に観察したところ、反応液中の 2 の濃度は反応開始後約 9 時間まで直線的に増加し、さらに 24 時間まで緩やかに増加を続けた (Fig. 6-8)。

このとき基質として加えた1の濃度は直線的に減少し、2の増加と相反的な関係を示した。3は21時間までにわずかに濃度が高まったが、2に対し約2.5%程度の生成しか認められなかった。4は痕跡量が認められたが濃度はほとんど変化しなかった。したがってこの実験系で1から2への反応のみを捕えることができた。

1から2の生成を考えると、その中間体として4-methylazulene-1-methanolが想定されるが、これはその構造上かなり反応性が高いと考えられる。この *in vitro* 反応系においても4-methylazulene-1-methanolが生成している可能性はあるもののこの反応系では非酵素的に2に酸化されていると考えられ、真の酵素反応生成物が4-methylazulene-1-methanolであるとしても、DMAMO活性を2の生成で測定することは妥当であると考えた。

2) 4-Methylazulene-1-carbaldehyde 生成反応の性質

この実験系を用いて、この反応が酵素反応であるのかどうかについて調べた。この活性は粗酵素液の沸騰湯浴中(95℃)10分間の加熱により、また0.1 mM コール酸添加により消失した (Table 6-4)。

この反応の用量依存性を測定したところ、粗酵素液の蛋白質量として100 μg 反応液⁻¹まで反応生成物の濃度が直線的に増加した (Fig. 6-9)。それ以上の蛋白質量では4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)の濃度の増加は見られず一定であったが、基質として加えた1,4-dimethylazulene (1)の濃度は直線的に減少した。このことは粗酵素液中に2の生成の阻害物質が存在し、また1から2を生成する反応とは別の1,4-dimethylazulene (1)消費系が存在することを示唆した。

pH依存性はMES-KOH (pH 6.0)を用いたとき、リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0)を用いたときと比べみかけ上、2-3倍の活性を示した。pH 4-8のリン酸カリウム緩衝液ではpH 5.0-6.5で幅広いピークを示した (Fig. 6-10)。また反応系

から NADPH および NADPH 再生系 (glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase) を除くと活性は約 5% に低下した (Table 6-4)。NADPH の代わりに NADH を加えたところ活性は約 10% に低下した (Table 6-4)。ER 画分とこれを得たときの 105,000 x g 上清 (可溶性画分) とを比較したところ可溶性画分では ER 画分の 10% 以下の活性しか回収できなかった。これらのことからこの反応が ER 画分の膜に結合した NADPH 依存性の酵素反応であるものと推測された。

3) P450 特異的阻害剤の効果

この反応が P450 依存性であるのかどうかについて調べるために、P450 の特異的阻害剤とされる ancymidol、triazimenol、SK&F-525A (Fig.6-11) および cytochrome c の影響について調べた (Fig. 6-12、6-13、6-14)。それぞれの DMAMO 活性の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は ancymidol; 0.8 mM、triazimenol; 2 mM、SK&F-525A; 2 mM および cytochrome c; 0.8 mM であった。

また CO (一酸化炭素) の効果についても測定した。光の影響を避けるために褐色試験管を用い、粗酵素液に CO を 2 分間通気した後に測定したところ、コントロールの約 60% であった (Table 6-4)。

第4節 考 察

1. 第2節の考察

第2節ではミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞における二次代謝化合物である 1,4-dimethylazulene (1) の生産およびその生合成経路上の酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性がエリシター処理によって促進されることを明らかにした。このとき活性酸素消去系酵素群の活性も高まることを明らかにした。また、ミドリホラゴケモドキ培養細胞への過酸化水素の直接投与によって1の含量が高まることを明らかにした。本研究において検討した酵素群に関する代謝経路を Fig. 6-15 に示した。

植物培養細胞における二次代謝化合物のエリシターによる生成誘導は植物病原菌の侵入に対する防禦反応のモデルと考えられる。これに関する研究は二次代謝化合物の生合成を制御する機構を調べるのに適していると考えられるが、多様な化学構造を有する種々のエリシターの植物細胞における統一的な作用機作については未だよく理解されていない。

実験に用いたバナジウム化合物が細胞質膜 (Gallagher and Leonard 1982 ; O'Neill and Spanswick 1984 ; Fricker and Willmen 1987 ; Vreugdenhil and Spanswick 1987 ; Cruz-Mireles and Ortega-Blake 1991) や葉緑体 (Carmeli *et al.* 1992) あるいはトノプラスト (Henry and Pilet 1988) の H^+ -ATPase の特異的阻害剤であることはよく知られている。そして細胞質膜の H^+ -ATPase の阻害はそのイオン透過性あるいは pH 勾配を攪乱する原因となり、またそれがアズキ培養細胞におけるストレス化合物の生産を誘導するということが報告されている (Hattori and Ohta 1985) 。 Steffens *et al.* (1989) は オルトバナジン酸ナトリウム がピーナッツ培養細胞にお

けるスチルベン生合成系酵素の活性を増大させ、その オルトバナジン酸ナトリウムによるスチルベン生合成の誘導パターンは糸状菌由来エリシターを用いたときと同様であると報告しており、またその オルトバナジン酸ナトリウムの効果が ATPase 活性の阻害に関連するとしている。それゆえにエリシターの初期段階で起きている生化学的応答の解析には化学的に均一でない糸状菌由来エリシターよりもバナジウム化合物の方が適していると考えた。

本実験ではまず、二次代謝化合物の生合成の促進がバナジウム化合物によるものと同様に生物学的エリシターによっても誘導されるのかどうかを調べた。このとき生物学的エリシターとして酵母粗グルカン画分を用いた。この酵母粗グルカン画分はダイズ培養細胞におけるグリセオリン生合成を糸状菌由来エリシターと同様に誘導することが知られている (Funk *et al.* 1987)。

その結果、ミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 培養細胞を酵母粗グルカン画分で処理したところ 1,4-dimethylazulene (1) の生成が オルトバナジン酸ナトリウムを用いたときと同様に、無処理細胞に比べて約 200% に増加することが分かった (Table 6-2)。このとき オルトバナジン酸ナトリウムおよび五酸化バナジウムは酵母粗グルカン画分と同程度の効果を示したが、オキシ硫酸バナジウムは 1 の含量の増加に対して影響しなかった。このことは V 価のバナジウム化合物にのみエリシター活性があり、IV 価のバナジウム化合物にはないことを示す。バナジウム化合物の H^+ -ATPase 阻害機作は V 価のバナジウムが H^+ -ATPase の活性中心にリン酸と競合的に結合することによるものであることが示されている (Carmeli *et al.* 1992)。したがってミドリホラゴケモドキ培養細胞においてエリシターとして用いたバナジウムの効果は H^+ -ATPase の阻害と関連することを示唆する。

トリノルセスキテルペノイド炭化水素である 1,4-dimethylazulene (1) はミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 植物体あるいは培養細胞の主な構成成分のひとつ

として存在していることが知られている (Meuche and Huneck 1966; Takeda and Katoh 1981, 1983a,b) ので、これは維管束植物のファイトアレキシンとは異なった生理的役割を有しているのではないかと考えられる。このような構成的な二次代謝化合物のエリシターによる生成促進についてはこれまでにはいくつかの例が知られているのみである (Barz *et al.* 1990 and references therein)。本章で示した実験結果はコケ植物培養細胞あるいは植物体における構成成分としての二次代謝化合物の生成促進を示す最初の例である。

3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase (HMGR) は 1,4-dimethylazulene (1) を含むテルペノイド生合成経路の重要な酵素である (Oshima and Uritani 1968a, b; Hepper and Audley 1969; Berry *et al.* 1972; Bach 1986; Stermer *et al.* 1991)。そして糸状菌の感染を受けたサツマイモ (*Ipomea batatas*) 根においてそのフラノ-セスキテルペンファイトアレキシンであるイポメアマロン (ipomeamarone) の生合成に関連して HMGR 活性が2日以内に高まることが知られている (Suzuki *et al.* 1974)。

そこでエリシター処理による 1 の含量増加とこの酵素の活性化との関連について検討した。

その経時変化を調べると HMGR 活性はエリシター処理細胞において 1 の蓄積に先立って一時的な増加を示した (Fig. 6-2)。したがってこのエリシター処理細胞における 1 の蓄積は HMGR をはじめとするその生合成酵素の活性増大に強く関連するといえる。しかしながら HMGR 活性化がエリシター処理後約 10 時間以内に起きているのに対し (Fig. 6-2B)、1 の蓄積はエリシター処理後約 9 日間までにゆっくりと上昇しており (Fig. 6-1)、生合成酵素の活性化から二次代謝化合物の蓄積までの時間は、フラボノイドファイトアレキシンであるダイズ (*Glycine max*) のグリセオリン類 (glyceollins) 生合成の典型的な誘導パターン (Ebel 1979) に比較するとかなり長い。このことはミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) にお

ける1の生合成経路には HMGR によるメバロン酸の生成よりも下流に制御段階（たとえば sesquiterpene cyclase）が存在することを示唆するものと考えられる。但し、エリシターが1の代謝分解系を阻害することによっても生合成活性の増加によるものと同様の蓄積がみられる可能性のあることに留意する必要がある。

近年、メバロン酸経路を経るイソペンテニルジフォスフェート (isopentenyl diphosphate) およびセスキテルペノイドの生合成の場はプラスチドではなく細胞質（小胞体）であることが報告されている (Kleinig 1989)。このことはミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 細胞より分画した粗ミクロソーム画分で HMGR 活性が認められるということと矛盾しないと考えられる。また、ミドリホラゴケモドキ培養細胞では葉緑体画分でも HMGR 活性が認められる。一方、HMGR 活性の細胞内局在性は種々の生物において異なっていることが知られている (Suzuki and Uritani 1976 and references therein)。たとえばサツマイモ根では健全および切断した組織の HMGR 活性はミトコンドリア画分のみでみられるのに対し、糸状菌の感染した組織ではミトコンドリア画分に加え、ミクロソーム画分の両方で認められている (Suzuki and Uritani 1976)。葉緑体画分においても HMGR 活性が認められることはまた、完全に成熟した葉緑体が一般に代謝的に「分業」化している (Heintze *et al.* 1990) のに対し、ミドリホラゴケモドキ細胞が光混合栄養を行っているために充分「分業」化しておらず、そのまま代謝的自律性を保っているために HMGR 活性を有していることを示すのかもしれない。さらに糸状菌由来エリシターで処理したタバコ培養細胞においてもこのような現象が見られ、10,000 x g 沈殿および 100,000 x g 沈殿のどちらにも同程度の HMGR 活性の誘導が認められたことが報告されている (Chappell and Nable 1987)。ミドリホラゴケモドキ細胞で誘導された HMGR 活性はタバコ細胞のその約 25% であるが、これは生成する二次代謝化合物がミドリホラゴケモドキ細胞では構成成分であるの

に対しタバコ細胞では *de novo* 合成されるファイトアレキシンであることを反映していることを示唆する。

つぎに五酸化バナジウムによる膜機能の攪乱に対し細胞内の酸化還元状態がどのように影響されるのかについてその酸化還元維持系の酵素群の応答を指標として測定した。調べた酵素はペントース-リン酸経路の NADPH 生成系である G6PDH および 6PGDH、そしてアスコルビン酸-グルタチオン回路の AAPOD、AFRRD、DHARD、GSSGRD さらにスーパーオキシドアニオンおよび過酸化水素を消去する SOD および catalase である (Fig. 6-15)。これらの酵素群は維管束植物においてその細胞内の酸化還元状態のバランスを維持する機能を有していると考えられている (Sagisaka 1974; Foyer and Halliwell 1976; Arrigoni *et al.* 1981; Sagisaka and Asada 1981; Nakagawara and Sagisaka 1984; Aono *et al.* 1993; Luwe *et al.* 1993)。そしてこれらの酵素活性が維管束植物と同様にミドリホラゴケモドキ (*C. granulata*) 培養細胞においても存在することを見いだした (Fig. 6-3、6-4、6-5、6-6)。

さまざまな構造をもったエリシターで処理した細胞における 防禦反応の情報伝達 (signal transduction) について考えるとき、過酸化水素のような活性酸素が second signal として提唱されてきている (Takahama *et al.* 1989; Schwacke and Hager 1992; Vera-Estrella *et al.* 1992; Kondo *et al.* 1992、1993; Gupta *et al.* 1993; Shaish *et al.* 1993)。またジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の感染を受けたジャガイモの葉においてスーパーオキシドアニオンの生成が観察されている (Chai and Doke 1987)。さらにダイズ培養細胞において糸状菌由来エリシターで処理すると 48 時間以内にグリセオリンの蓄積がおきるが、このときエリシター処理後 5 分以内に過酸化水素が生成することが報告されている (Apostol *et al.* 1989)。そして越冬中のポプラでも過酸化水素の蓄積が認められ (Sagisaka 1976)、低温処理

したコムギ苗では処理後数分以内に過酸化水素含量が3倍に増加することが示されている (Okuda *et al.* 1991)。

このように植物があるストレスを受けると過酸化水素などの活性酸素が生成するという現象はミドリホラゴケモドキ培養細胞の場合にもあてはまると考えられる。すなわちエリシター処理したミドリホラゴケモドキ細胞で総 SOD 活性が一時的に高まることは、処理直後よりスーパーオキシドアニオンが急速に生成していることを示している。このような活性酸素はある電子伝達系より漏れだした電子によって酸素が還元されて生じるとされている (Okuda *et al.* 1991)。エリシターの投与によって正常な生理的レベルを越えた活性酸素が生成したとき、それはその細胞に対し有害であり、その結果、それらの活性酸素を消去する細胞機能の活性化が誘導されるものと考えられる。このような過酸化水素の消去系酵素 (群) の活性化は病原菌に感染したサツマイモ根 (Uritani and Stahmann 1961; Kawashima and Uritani 1963; Stahmann *et al.* 1966; Shannon *et al.* 1971)、エチレンを投与処理したサツマイモ根 (Imaseki *et al.* 1968; Imaseki 1970) で認められ、あるいは低温で処理したポプラ (Nakagawara and Sagisaka 1984) やリンゴ (Kuroda *et al.* 1990a, b, 1991) においても観察されている。

光合成植物が光合成を行なう際に葉緑体チラコイド膜で発生する (Robinson and Gibbs 1982) 活性酸素は AAPOD を含むアスコルビン酸-グルタチオン回路によって消去される (Foyer and Halliwell 1976; Groden and Beck 1979; Asada 1992)。しかしながら、このアスコルビン酸-グルタチオン回路は葉緑体のみならずポプラの非光合成組織 (Sagisaka 1982, 1985; Sagisaka and Asada 1981; Nakagawara and Sagisaka 1984) あるいはジャガイモ塊茎 (Arrigoni *et al.* 1981; Dipierro and Barraccino 1991; Elia *et al.* 1992)、そして寄生植物 (Tommasi *et al.* 1990) なども機能していることが知られている。その主たる機能は細胞内還元剤である

NADPH を生成するペントースリン酸経路と協同して細胞の酸化還元状態を還元状態に維持することであると考えられている (Sagisaka 1972, 1974; Sagisaka and Asada 1981; Nakagawara and Sagisaka 1984)。

病原菌感受性および抵抗性のヒヨコマメ培養細胞における G6PDH 活性はエリシター処理によって増加することが報告されている (Daniel *et al.* 1990) が、ミドリホラゴケモドキ培養細胞のこの酵素は五酸化バナジウムの影響を受けなかった (Fig. 6-3A)。このことおよび 6PGDH も活性化されなかった (Fig. 6-3B) ことはアスコルビン酸-グルタチオン回路の GSSGRD が要求する NADPH は十分量が供給されており、またエリシターの作用機作が必ずしもすべての植物に対し同じではないということを示唆する。

ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) の培養細胞はよく発達した葉緑体を有しており、また光混合栄養生長し、炭素源として培地中にグルコースが存在していても光なしでは増殖しない (Kato and Takeda 1990)。葉緑体で生成した NADPH は一般にカルビン-ベンソン回路で消費されるのであるが、しかしこれは dihydroxyacetonephosphate-3-phosphoglyceraldehyde shuttle を経て細胞質内に輸送されうることからアスコルビン酸-グルタチオン回路にある GSSGRD の反応においても用いられているのかもしれない。

五酸化バナジウムでミドリホラゴケモドキ培養細胞を処理すると過酸化水素消去酵素のひとつである AAPOD および GSSGRD の活性がコントロールに比べて約 150% に高まった (Fig. 6-6A, B)。AAPOD の作用によって生成したアスコルベートフリーラジカルは次のような経路によってアスコルビン酸に還元されうる。

(1) AFRRD によって触媒される直接の還元。(2) デヒドロアスコルビン酸への非酵素的変換とそれに続く DHARD によって触媒される酵素的還元。(3) デヒドロアスコルビン酸への非酵素的変換とそれに続く細胞内還元剤であるグルタ

チオンによる非酵素的還元 (Foyer and Halliwell 1976)。しかしながら経路 (1) および (2) は、AFRRD および DHARD 活性が AAPOD 活性のそれぞれ約 10 および 5% 程度であるので経路 (3) より貢献しているとは考えにくい。したがってエリシター処理によってミドリホラゴケモドキ培養細胞の還元型グルタチオン濃度が上昇することも考えあわせると主として還元型グルタチオンがアスコルベートフリーラジカルを還元する役割を担っているものと推察された。

還元型グルタチオンは細胞内還元力の貯蔵形態であり、多くの生物において重要な還元剤として供給されるものである (Rennenberg 1982)。これは H_2O_2 、 1O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 HO^{\cdot} 等のさまざまな活性酸素を酵素反応によって還元するとともに、また非酵素的にも還元反応を行なう (Rennenberg 1982)。エリシター処理細胞において全培養期間を通して還元型グルタチオンが高い含量レベルを維持しているということは GSSGRD 活性も高いレベルで維持されていることと関連することを示唆する。

エリシター処理によって SOD 活性が上昇するということからスーパーオキシドアニオンが生成することが示され、次いで SOD の反応によって過酸化水素が生成するので、エリシター処理によるグルタチオン含量の急速な増加や AAPOD、GSSGRD 活性の増大はこれらの有害な活性酸素の生成に対する細胞の防禦応答であると考えてよい。

このことは脂質過酸化の誘導剤であるアシフルオフエン (acifluofen) で処理したインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 培養細胞において、グルタチオンおよびアスコルビン酸の生成量の増加とそれに続く GSSGRD 活性の上昇が、観察される (Schmidt and Kunert 1986) ことや、peroxidizing (photobleaching) herbicides で処理したゼニゴケ培養細胞においても急速な還元型グルタチオン含量の増加が認められる (Iwata et al. 1992) こと、さらにエリシターによって引き起こされる脂質の

過酸化には活性酸素が関与する (Rogers *et al.* 1988) という報告によっても支持される。また、ミドリホラゴケモドキ細胞におけるアスコルビン酸含量はエリシター処理によってはほとんど影響されなかったが、比較的高い状態 (2.3 - 3.4 $\mu\text{mole g}^{-1}$ fresh wt) を維持していた。このような応答は生体膜の過酸化という細胞にとって有害な状況から生き残るというコケ植物を含むすべての植物にとって一般的な戦略であることを示すものと考えられる。

過酸化水素は生体膜を速やかに拡散しうることから、過酸化水素をミドリホラゴケモドキ培養細胞へ直接投与することによってエリシター処理と同様な影響がみられるかどうかを検証することができる。ミドリホラゴケモドキ培養細胞へ直接過酸化水素を投与すると 1,4-dimethylazulene (1) の生産がコントロールに対し約2倍になることが確かめられた (Table 6-3)。ここで 1 mM の過酸化水素においてこれより低濃度の投与に比べて約 20 % 程度効果が低かったということは、この濃度では死には至らぬまでも既に細胞自身に有害であることを示す。このような細胞障害は低温処理によっても生じるが、それは過酸化水素がその消去系で処理しきれないほど過剰に生成したとき、それらの消去系酵素群が不活性化し、そしていっそう過酸化水素が蓄積してゆくことが原因とされている (Kuroda *et al.* 1992; Kuroda and Sagisaka 1992)。

グルタチオン生合成酵素 (γ -glutamylcysteine synthetase) の阻害剤であるブチオニンスルフォキシミン (buthionine sulfoximine) でニンジン培養細胞を処理した実験ではそのファイトアレキシンである 6-メトキシメレイン (6-methoxymellein) 含量の増加が認められた (Guo *et al.* 1993)。このことはグルタチオンなどの細胞内抗酸化剤の生合成を抑制しても同様に二次代謝化合物の生産が高まることを示し、細胞内の酸化状態と二次代謝化合物の生合成促進とが強く関連していることが示唆された。

村井ら (1987) はジャガイモ疫病菌の感染によりジャガイモのファイトアレキシンが誘導されるときに過酸化水素が発生し、また病原菌を感染させずに過酸化水素を投与しても同様にファイトアレキシンが新生すること、そしてそれが投与した過酸化水素の濃度に依存することを示し、過酸化水素が内因性のエリシターであると報告している。Apostol *et al.* (1989) はダイズ培養細胞を用い *de novo* で合成されるファイトアレキシンであるグリセオリンの生産が過酸化水素の直接投与でも高まることを示した。ミドリホラゴケモドキ培養細胞に過酸化水素を直接投与すると細胞成分として存在する 1,4-dimethylazulene (1) の含有量が高まることは二次代謝化合物の生合成の促進に活性酸素が関与することを直接示すものと推定された。

しかしながら五酸化バナジウム処理によってあるいは過酸化水素の投与によって促進されるミドリホラゴケモドキ培養細胞における 1,4-dimethylazulene (1) の産生はいずれもコントロールの2倍程度であった。この値がその上限であるのか、そうであるとすれば何故か、さらに高めることは可能であるのかという問題は重要である。このことはエリサイテーションの一過性の問題とあわせて今後の課題として検討すべきである。

また、バナジウム化合物の動物細胞における細胞毒性の作用機作としてV価のバナジウムが細胞内のグルタチオン (還元型) や他の非蛋白質性チオール基と反応し、IV価のバナジウムおよびチイル (thiyl) ラジカルを生成することにより細胞内グルタチオンの欠乏を招き、さらにこのラジカルが分子状酸素と反応してスーパーオキシドアニオンやヒドロキシラジカルなどの活性酸素を生成して細胞毒性を生じることが示されている (Shi *et al.* 1990)。この実験は *in vitro* 実験であり、植物細胞に単純にあてはまるわけではないが、V価バナジウムのエリシターとしての作用機作が H^+ -ATPase 阻害に加えて直接細胞内の酸化に関与するも

のであるということを示唆する。

結論として、著者はミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 細胞に対してエリシターとして用いたバナジウム化合物によって細胞成分としての二次代謝化合物の生産が高まったこと、およびグルタチオン含量の増大を伴って活性酸素消去系酵素群の活性が高まるという二種の細胞応答を観察した。そして過酸化水素の直接投与によって二次代謝化合物の生産が高まったことから上の両応答が共通の second messenger としての活性酸素によって引き起こされたことを示した。

エリサイテーションの現象は植物が本来有している防禦機構のひとつを利用する、ある二次代謝化合物の産生誘導であり、特定の遺伝子の発現を誘導できるということを含めて、この現象を植物培養細胞による有用物質の実用的生産技術に応用することは非常に重要であると考えられる。

植物の二次代謝化合物は古来より生薬成分として利用されてきているがその作用の詳細な機序は不明であるものも多い。今後の薬理学的研究によってその有効成分が特定できれば、それを生産する技術として植物培養細胞による効率的生産の実用化は必須の課題であり、特に特定の化合物の生合成を制御することはその中核的技術となるものと考えられる。

しかしながらエリサイテーションを利用するとしても現時点ではある特定の二次代謝化合物を選択的に生産するにはいたっておらず、またその生合成の活性化が一過性であるものが多いという問題がまず解決されねばならない。したがって今後の植物培養細胞を利用した二次代謝化合物の生産におけるエリサイテーションの役割は単純な応用だけでなく、その詳細な作用機序の研究を通してより効果的な生合成能の向上技術を確立するためのモデルとしての役割がむしろ重要である。

そのためにはまずエリサイテーションにおける情報伝達 (signal transduction) の

second messenger としての膜脂質の分解との関係について調べることや、また中長期的にはどのようにして特定の遺伝子の発現の制御を行なうか、あるいはどのようにして一過性を回避して二次代謝化合物の産生を持続させられるのか等の点について明らかにしてゆくことが必要であると考えられる。

2. 第3節の考察

第5章で明らかにしたように 4-methylazulene-1-carbaldehyde (2)、4-methylazulene-1-carboxylic acid (3)、1-methoxycarbonyl-4-methylazulene (4) は高い抗炎症活性を有している。特に2ならびに3は水溶性アズレン誘導体として今後の用途開発が期待できる。しかしながらこれらのアズレン誘導体の化学合成は非常に困難であるため、その生産にあたっては生合成酵素による方法を検討する必要がある。

本章第3節では初めにこの反応が酵素反応であることを確認し、1,4-dimethylazulene (1) を基質としたときホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) より調製した無細胞抽出液によって2を生成する実験系を確立した。1が *Calypogeia* 属の精油の主たる成分であり、また本章第2節で示したようにエリシター処理によってその生成が促進されることも含めて比較的入手しやすいことから、1を2の生成の基質とした。

その結果、この反応がモノオキシゲナーゼ活性を有する酵素反応であり、またそれが小胞体膜に局在していることを明らかにした。2を生成する反応がこの膜局在性モノオキシゲナーゼによって触媒されることから、P450蛋白質との関連が推察された。

植物の P450 は近年、精力的に研究がなされているがコケ植物におけるセスキ

テルペノイドに関する反応はこれまで報告されておらず、本節の実験結果はその最初の例である。

そこでいくつかの P450 依存反応の特異的阻害剤を用いて、DMAMO 活性の阻害について検討した。

Kochs and Grisebach (1986) はダイズのイソフラボンであるゲインステイン類 (geinsteins) の生合成阻害について 0.1 μ M ancymidol を用いたとき 39%、1 mM SK&F-525A で 40% の阻害が見られたことを報告している。Werck-Reichhart *et al.* (1990) はキクイモの 7-ethoxycoumarin O-de-ethylase および 7-ethoxyresorufin O-de-ethylase 活性が暗所での 2 分間の CO バブリングでそれぞれ 53.5 および 55.7%、1.8 μ M tetracyclis でそれぞれ 71.4 および 95.9% の阻害があると報告している。一方、Halkier and Møller (1991) はソルガムの *p*-hydroxyphenylacetonitrile C-hydroxylase 活性に対し、0.1 mM SK&F-525A では全く阻害せず、0.1 mM ancymidol で 32%、0.01 mM tetracyclis で 95% の阻害があり、また Zimmerlin *et al.* (1992) はコムギの lauric acid hydroxylase 活性について 16.6% (v/v) CO によるバブリングで 51.4%、0.02 mM tetracyclis で 51.8% の阻害があったとしている。Gerardy and Zenk (1993) はケシの salutaridine synthase 活性の IC₅₀ を測定し、cytochrome c で 1.6 μ M、ancymidol で 30 μ M であるとしている。

これらの値を単純に比較するとホラゴケモドキ (*C. azurea*) の DMAMO 活性に対する各種阻害剤の影響はそれほど大きくないように見える。しかしながら上に示した植物の例のうち、*p*-hydroxyphenylacetonitrile C-hydroxylation (Halkier and Møller 1991) が DMAMO の場合と類似したアリル位への一酸素添加であり、そこでこの時の ancymidol および SK&F-525A の効果のみを比べると、ホラゴケモドキ (*C. azurea*) の DMAMO 活性は 0.1 mM ancymidol で約 22% 阻害され (Fig. 6-12)、0.1 mM SK&F-525A ではほとんど阻害が見られず (2% 阻害; Fig. 6-13)、その

効果は同程度であったといえる。このことはこれらの阻害剤がその酵素の基質特異性を示す活性中心に直接作用することを示唆する。また、*p*-hydroxyphenylacetonitrile C-hydroxylation における基質分子内の環境は 1,4-dimethylazulene (1) とは異なるものの一酸素添加部位が同様のアリル位であるという点では共通していることから *p*-hydroxyphenylacetonitrile C-hydroxylase が DMAMO と類似した性質を有することを示唆する (Fig. 6-16)。

P450 は CO で通気した後、ヒドロサルファイトナトリウムで還元すると 450 nm 付近に極大吸収ピークを示すので、その差スペクトルをとり、モル吸光定数 $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Omura and Sato 1964b) によって定量できる。そこでホラゴケモドキ (*C. azurea*) より調製した ER 画分について P450 を定量しようとしたが、この画分に混在するチラコイド膜断片 (クロロフィル) によると考えられる妨害により測定できなかった。ER 画分の分画操作を繰り返しても薄い緑色は十分に除けなかった。これまでに P450 の差スペクトルが測定されている報告は動物由来、または植物の場合でもクロロフィルによる妨害を避けるため黄化した試料などクロロフィルをほとんど含まない組織に限られていた。ホラゴケモドキ (*C. azurea*) のように発達した葉緑体を有する試料の場合、ER 画分の調製法には改良が必要である。

以上の結果から 1,4-dimethylazulene (1) への一酸素添加反応は cytochrome P450 依存性のモノオキシゲナーゼによるものであることが考えられた。この酵素の詳細な性質は現段階では不明であるが、著者が調べた範囲ではこれまでに知られている植物の P450 依存性酵素と比べて幾分異なる性質を持つのではないかということが示唆された。

第5節 要 約

1. 非生物のエリシターであるバナジウム化合物が酵母粗グルカン画分と同様にミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞において構成成分として生成するセスキテルペノイド 1,4-dimethylazulene の蓄積を促進することを明らかにした。
2. 五酸化バナジウムで処理すると 1,4-dimethylazulene 生合成経路上の 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase 活性が約 2.3 倍に高まった。このことから 1,4-dimethylazulene の蓄積促進はその代謝活性の抑制より生合成活性の促進によるものであることが示唆された。
3. 五酸化バナジウムで処理すると ミドリホラゴケモドキ培養細胞において superoxide dismutase、ascorbate peroxidase、glutathione reductase 活性の増大および細胞内の還元型グルタチオン含量の急速な増加が認められた。このことから五酸化バナジウム処理によりミドリホラゴケモドキ培養細胞内で活性酸素が生成することが推定された。
4. 五酸化バナジウム処理のかわりに過酸化水素処理を行なっても 1,4-dimethylazulene 蓄積の促進が認められた。
5. これらの結果から、エリシター処理による二次代謝化合物の生成促進にはそのシグナルの伝達に活性酸素が関与することを明らかにした。
6. 1,4-Dimethylazulene の 4-methylazulene-1-carbaldehyde への変換反応を調べたところ、この反応がホラゴケモドキ (*C. azurea*) のミクロソーム (ER) 画分に存在する NADPH 要求性の膜酵素によるものであり、ancymidol、SK&F-525A、triazimenol、cytochrome c および CO によって阻害されることを

示した。

7. 本章の内容の一部は投稿論文として発表した。

Iwata, S., Nakayama, N., Nakagawara, S., Ohta, Y., Tanaka, T., Wakabayashi, K. and Boger, P. (1992) Response of liverwort cells to peroxidizing herbicides. *Z. Naturforsch.* 47c, 394-399.

Nakagawara, S., Nakamura, N., Guo, Z.-J., Sumitani, K., Katoh, K. and Ohta, Y. (1993) Enhanced formation of a constitutive sesquiterpenoid in cultured cells of a liverwort, *Calypogeia granulata* Inoue during elicitation; Effects of vanadate. *Plant Cell Physiol.* 34: 421-429.

Guo, Z.-J., Nakagawara, S., Sumitani, K. and Ohta, Y. (1993) Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxymellein in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* 102: 45-51.

Table 6-1 Metabolic reactions related to P450 in plants.

Reaction	Plant	Reference
Phenyl propanoids		
<i>trans</i> -cinnamate-4-hydroxylation	<i>Ipomea batatas</i> (sweet potato) <i>Sorghum bicolor</i> <i>Ricinus communis</i> (caster bean) <i>Solanum tuberosum</i> (potato) <i>Glycine max</i> <i>Medicago sativa</i> (alfalfa) <i>Helianthus tuberosus</i> (Jerusalem artichoke) <i>Glycine max</i> <i>Vigna radiata</i> (mung bean)	Tanaka et al. 1974 Potts et al. 1974 Young and Beevers 1976 Rich and Lamb 1977 Kochs and Grisebach 1989 Kessmann et al. 1990 Gabriac et al. 1991 Kochs et al. 1992 Mizutani et al. 1993
isoflavone 2'-hydroxylation	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Kessmann et al. 1990
isoflavone synthase	<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	Kessmann et al. 1990
formonetine 2'-hydroxylation	<i>Cicer arietinum</i> (chickpea)	Gunia et al. 1991
flavone-2-epoxylation	<i>Glycine max</i>	Hagmann and Grisebach 1984
maackiain biosynthesis	<i>Cicer arietinum</i> (chickpea)	Gunia et al. 1991
maackiain 3'-hydroxylation	<i>Cicer arietinum</i> (chickpea)	Gunia et al. 1991
3,9-dihydroxypterocarpane 6a-hydroxylation	<i>Glycine max</i>	Kochs and Grisebach 1989
liquiriligenin aryl migration	<i>Pueraria lobata</i>	Hashim et al. 1990
naringenin aryl migration	<i>Glycine max</i>	Kochs and Grisebach 1986
psoralen biosynthesis	<i>Petroselinum crispum</i> (parsley)	Wendorff and Matern 1986
Terpenoids		
ipomeamarone 15-hydroxylation	<i>Ipomea batatas</i> (sweet potato)	Fujita et al. 1982
7-ethoxycoumarine <i>O</i> -de-ethylation	<i>Helianthus tuberosus</i> (Jerusalem artichoke)	Werck-Reichhart et al. 1990
geraniol 10-hydroxylation	<i>Vinca rosea</i>	Madyastha et al. 1976
nerol 10-hydroxylation	<i>Vinca rosea</i>	Madyastha et al. 1976
(-)-kaur-16-ene 19-hydroxylation	<i>Echinocystis macrocarpa</i> (cucumber)	Murphy and West 1969
(-)-kaur-16-ene-19-aldehyde oxydation	<i>Echinocystis macrocarpa</i> (cucumber)	Murphy and West 1969
(-)-kaurene-19-hydroxylation	<i>Pisum sativum</i>	Coolbaugh and Moore 1971
camphor 6- <i>exo</i> -hydroxylation	<i>Salvia officinalis</i> (sage)	Funk and Croteau 1993
<i>ent</i> -7-hydroxykaurenoic acid hydroxylation		Hakamatsuka et al. 1991
Others		
lauric acid 8- or 9- or 10-hydroxylation	<i>Helianthus tuberosus</i> (Jerusalem artichoke)	Salaun et al. 1978
lauric acid 11-hydroxylation	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	Zimmerlin et al. 1992
lauric acid ω (12)-hydroxylation	<i>Pisum sativum</i>	Benveniste et al. 1982
L-tyrosine <i>N</i> -hydroxylation	<i>Sorghum bicolor</i>	Halkier and Moller 1991
<i>p</i> -hydroxyphenylacetonitrile <i>C</i> -hydroxylation	<i>Sorghum bicolor</i>	Halkier and Moller 1991
Diclofop hydroxylation	<i>Triticum aestivum</i> (wheat)	Zimmerlin and Durst 1992
<i>p</i> -chloro- <i>N</i> -methylaniline <i>N</i> -demethylation	<i>Ricinus communis</i> (caster bean)	Young and Beevers 1976
3-(<i>p</i> -chlorophenyl)-1,1-dimethylurea <i>N</i> -demethylation	<i>Gossypium hirsutum</i> (cotton)	Frear et al. 1969
bisbenzylisoquinoline alkaloid biosynthesis	<i>Berberis stolonifera</i>	Stadler and Zenk 1993
salutaridine biosynthesis	<i>Papaver somniferum</i>	Gerardy and Zenk 1993

Table 6-2 Effects of different vanadium compounds and yeast crude glucan on 1,4-dimethylazulene content in the cultured cells of *Calypogeia granulata*.

Treatment	Final concentration	1,4-Dimethylazulene (mmol g ⁻¹ dry wt)
control		11.2 ± 1.5
Na ₃ VO ₄	0.2 mM	25.1 ± 4.3
VOSO ₄	0.2 mM	8.4 ± .9
yeast crude glucan	0.2 mg ml ⁻¹	21.0 ± 7.3

Cell cultures were treated with 0.2mM sodium orthovanadate, 0.2 mM vanadium oxysulfate or 0.2mg ml⁻¹ yeast crude glucan for 46 h and 1,4-dimethylazulene content in the cells were determined. The values are mean ± SE of four separate experiments.

Table 6-3 Effects of exogenous hydrogen peroxide on 1,4-dimethylazulene content in the cultured cells of *Calypogeia granulata*.

Final concentration of hydrogen peroxide (mM)	Relative content of 1,4-dimethylazulene (%)			
	Time after treatment (days)			
	0	1	3	6
0	100.0	98.8	97.6	110.6
0.1	100.0	196.5	189.4	212.9
0.5	100.0	194.1	205.9	200.0
1.0	100.0	160.0	157.6	188.2

Filter-sterilized hydrogen peroxide solution was added to cell suspension of *C. granulata* at early stationary phases. 1,4-Dimethylazulene content before addition of hydrogen peroxide (100%) was 5.45 $\mu\text{mole g}^{-1}$ dry wt. Values represent means of results from duplicated experiments.

Table 6-4 Requirements for formation of 4-methylazulene-1-carbaldehyde from 1,4-dimethylazulene by cell-free extracts from cultured cells of *Calypogeia azurea*.

Reaction mixture	Formation of 4-methylazulene-1-carbaldehyde (%, n=3)
complete*	100.0
- ascorbic acid	0.0
- EDTA	12.1
- NADPH	5.1
- NADPH, G6P, G6PDH	0.0
- NADPH + NADH	10.3
+ cholate (0.1 mM)	0.0
boiling (95 °C, 10 min)	0.0
CO bubbling (2 min)	61.2

*complete mixture: 25 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 20 % glycerol, 40 mM ascorbic acid, 1 mM EDTA, 1 mM glucose-6-phosphate/50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 0.5 U glucose-6-phosphate dehydrogenase, 0.25 mM 1,4-dimethylazulene/DMSO, 0.05 mM NADPH / 0.01 N KOH and cell-free extracts from *C. azurea*.

The reaction mixture was incubated for 5-7 h at 30 °C. Amount of 4-methylazulene-1-carbaldehyde formed was determined by HPLC. Formation of 4-methylazulene-1-carbaldehyde in the complete mixture (100 %) was 21.06 ± 5.91 nmol mg⁻¹ protein h⁻¹ (n=6).

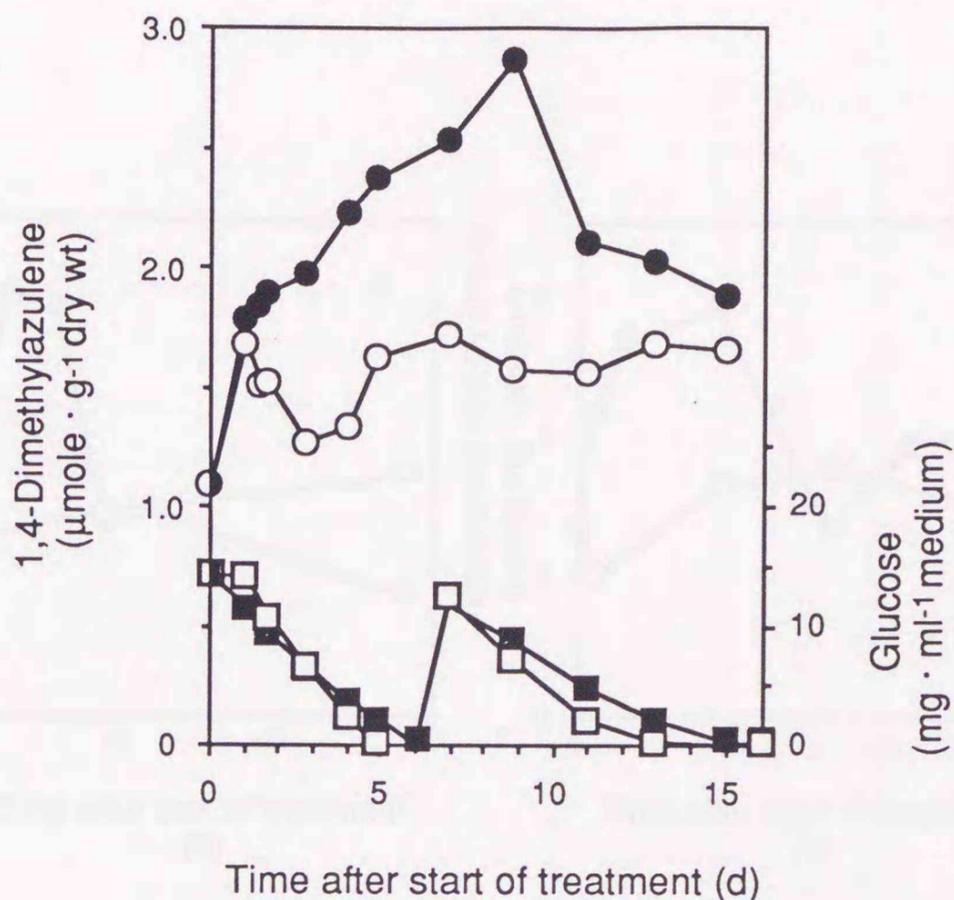


Fig. 6-1 Changes in the 1,4-dimethylazulene content of elicitor-treated suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata* and in the concentration of glucose in the culture medium. The 1,4-dimethylazulene content of the cells was determined in *n*-hexane extracts prepared from control cultures (○) and cultures treated with vanadate (0.2 mM) (●). Glucose consumption in the control cultures (□) and in cultures treated with vanadate (0.2 mM) (■) was measured. Sterilized fresh medium (150 ml) containing 2% glucose was added to the residual medium (about 100 ml) in both elicitor-treated and control cultures on the 7th day. Values represent means of results from four flasks with three replicates and standard errors did not exceed 10% of each value.

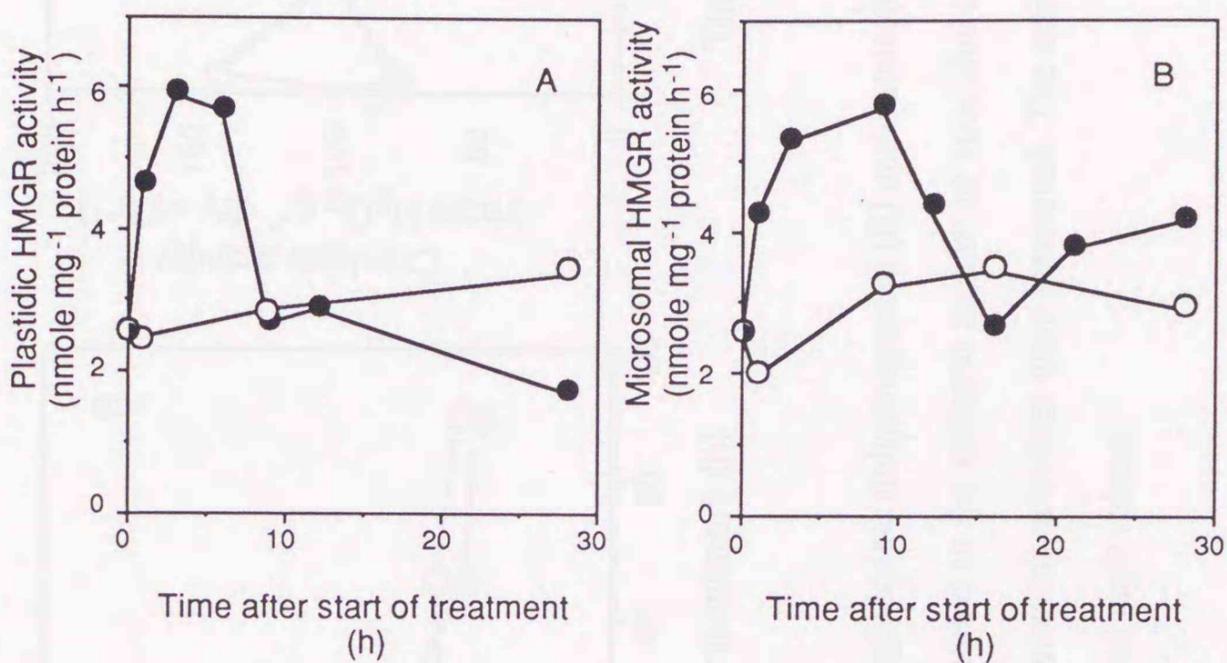


Fig. 6-2 Induction of the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata* by vanadate. Vanadate (0.2 mM) was added to the cultures at the start of subculture. The HMGR activity was measured in plastidic (A) and microsomal (B) fractions prepared from control (○) and vanadate-treated (●) cultures at the indicated times after initiation of the treatment with vanadate. The activities are expressed as nmole mevalonate formed mg⁻¹protein h⁻¹ and represent means of results from two flasks with three replicates.

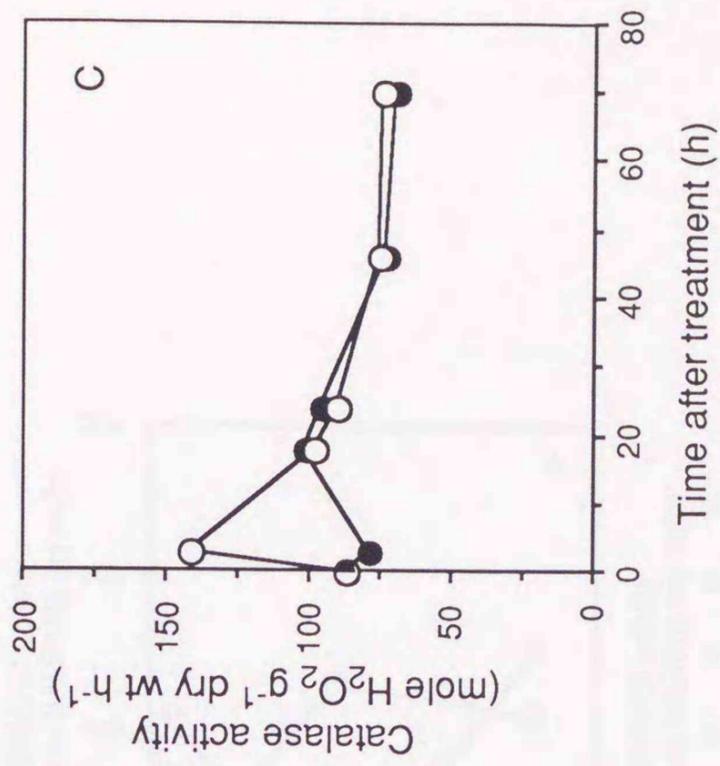
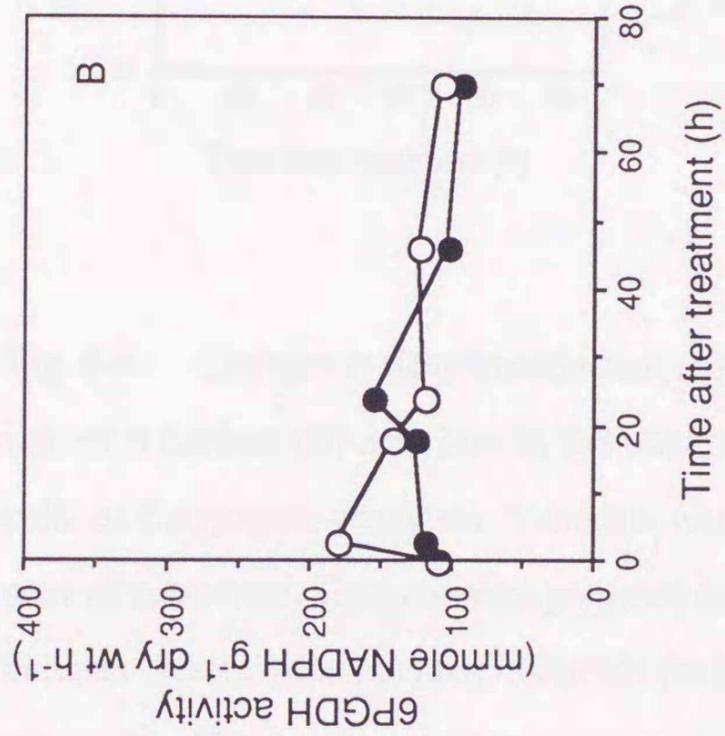
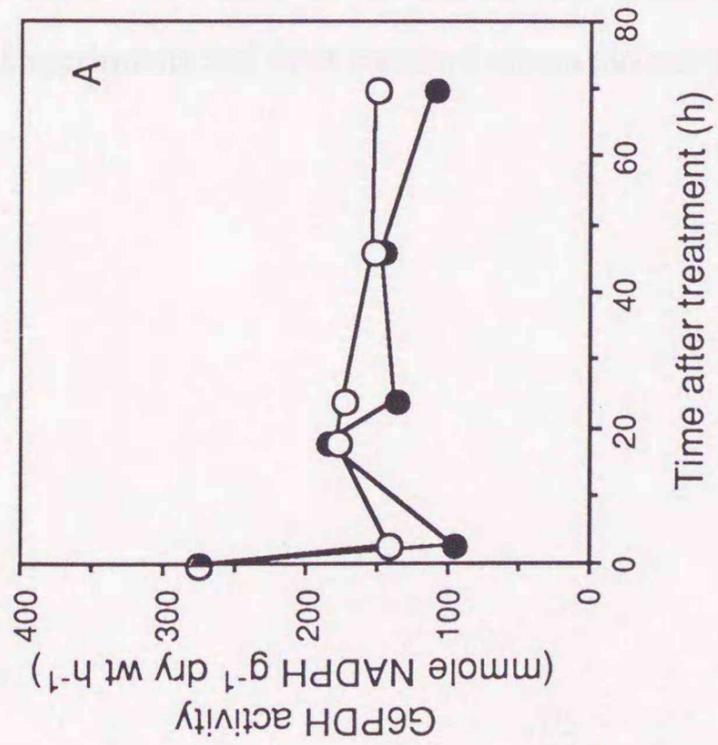


Fig. 6-3 Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase (A), 6-phosphogluconate dehydrogenase (B) and catalase (C) activities in the vanadate-treated suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata*. Vanadate was added to the cultures at start of subculture. Extracts were prepared from control cultures (O) and cultures treated with vanadate (0.2mM) (●), and enzyme activities were measured. The activity values represent means of three independent experiments and their standard errors did not exceed 20 % of each values.

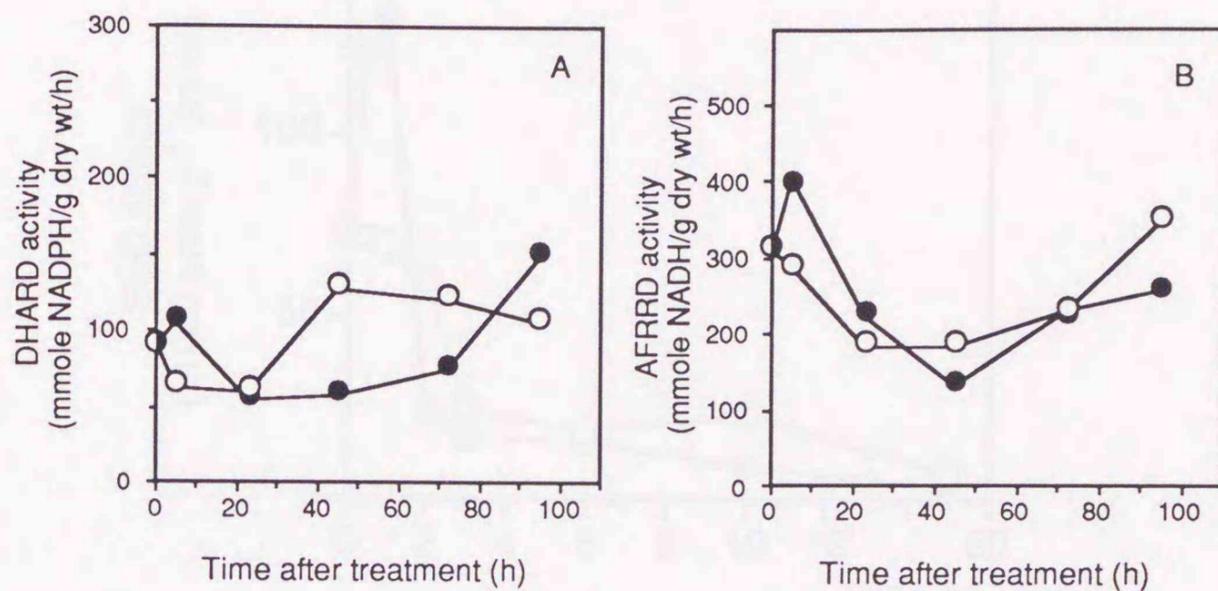


Fig. 6-4 Changes in dehydroascorbate reductase (A) and ascorbate free radical reductase (B) activities in the elicitor-treated suspension cultured cells of *Calypogeia granulata*. Vanadate was added to the cultures at the start of subculture. Extracts were prepared from control cultures (O) and cultures treated with vanadate (0.2mM) (●), and enzyme activities were measured. The activity values represent means of three independent experiments and their standard errors did not exceed 20% of each values.

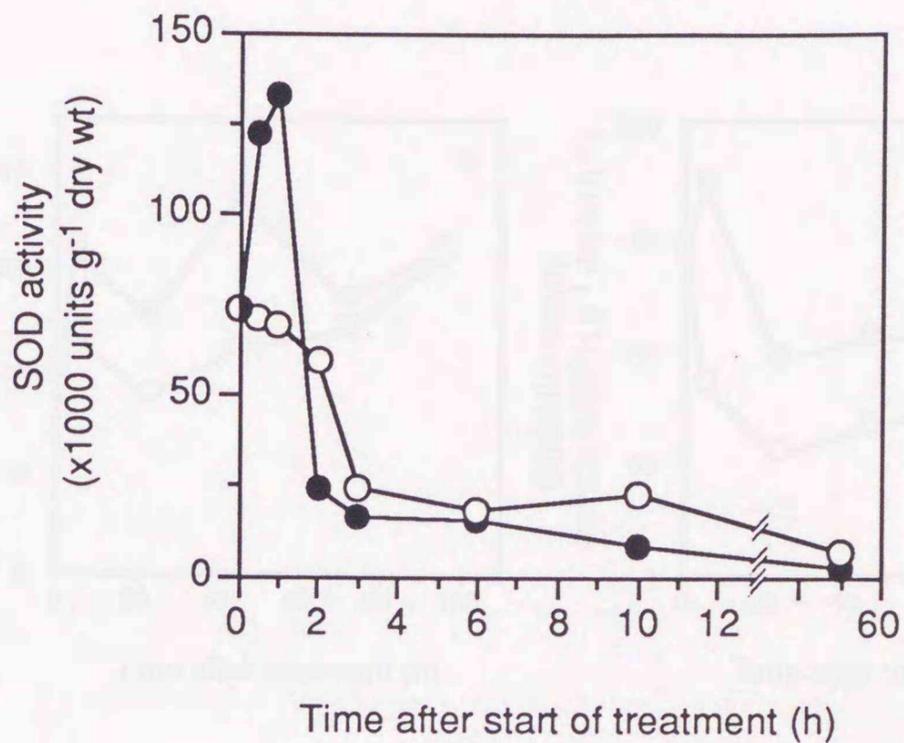


Fig. 6-5 Changes in total superoxide dismutase activity in vanadate-treated suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata*. The elicitor was added to the cultures at the start of subculture. Extracts were prepared from control cultures (○) and cultures treated with vanadate (0.2 mM) (●), and enzyme activities were measured. The activity values represent means of results from two flasks with three replicates.

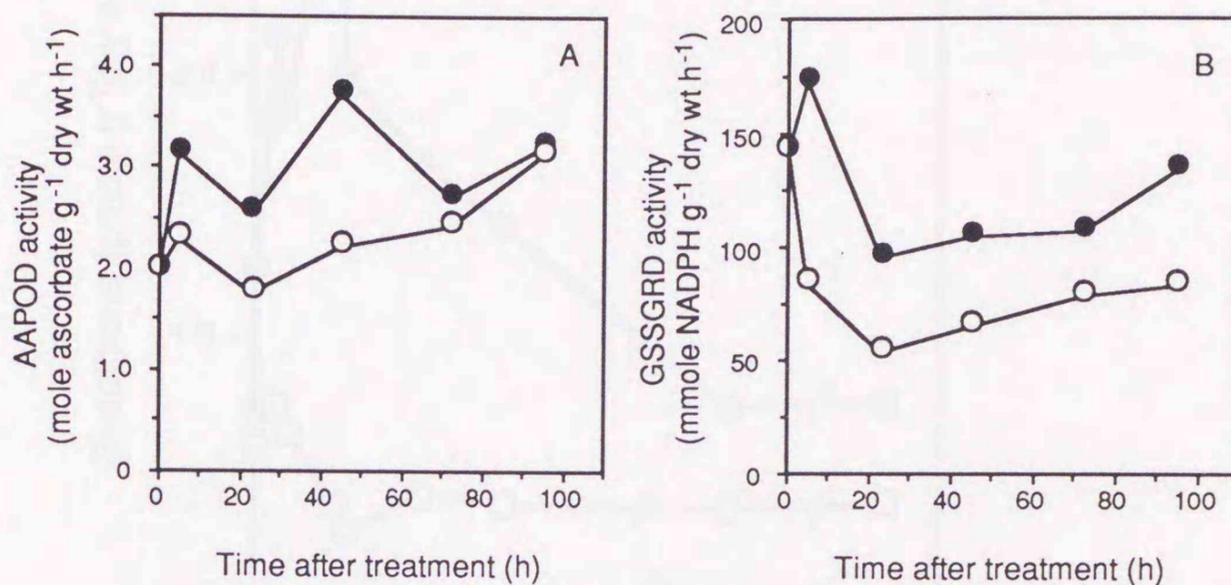


Fig. 6-6 Changes in activities of ascorbate peroxidase (A) and glutathione reductase (B) in vanadate-treated suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata*. Vanadate was added to the cultures at the start of subculture. Extracts were prepared from control cultures (○) and cultures treated with vanadate (0.2 mM) (●), and enzyme activities were measured. The values represent means of results from three flasks with four replicates and the standard errors did not exceed 20 % of each value.

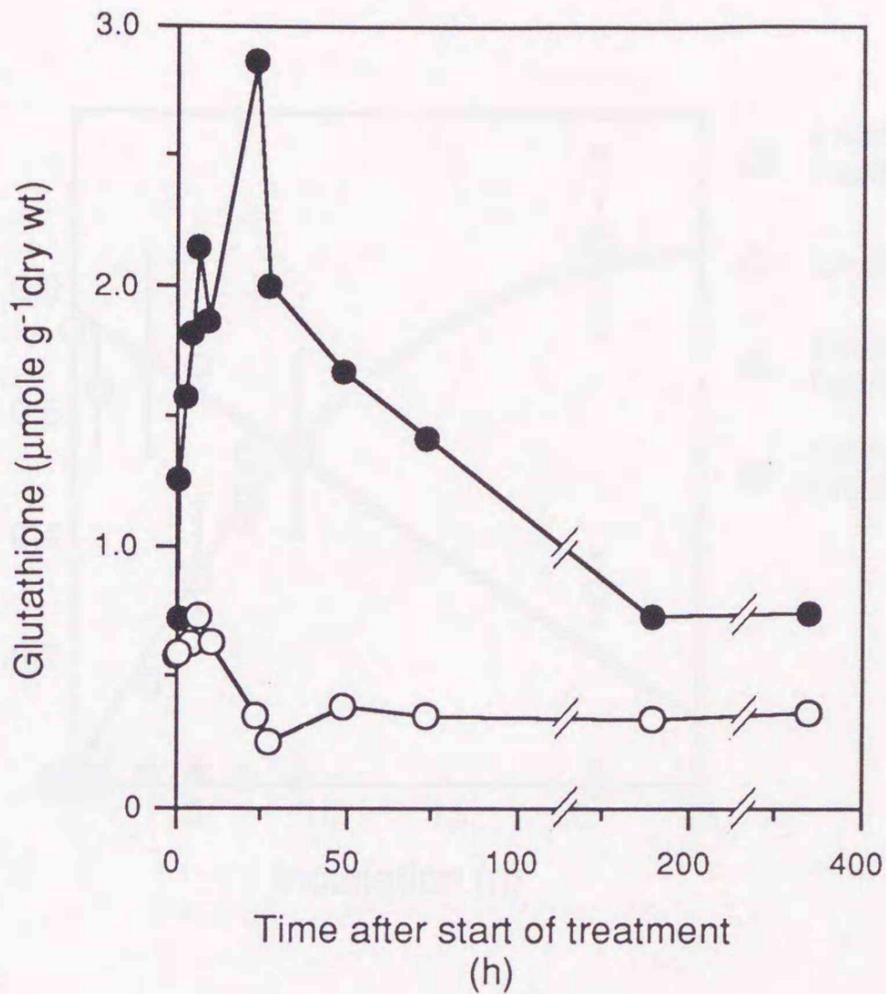


Fig. 6-7 Changes in amounts of glutathione (reduced form) in vanadate-treated suspension-cultured cells of *Calypogeia granulata*. Cultured cells were harvested at the indicated times and frozen immediately in liquid nitrogen. Extracts were prepared from control cultures (O) and cultures treated with vanadate (0.2 mM) (●), and glutathione content was determined. The values represent means of results from duplicate experiments with four flasks and three replicates, and the standard errors did not exceed 10% of each value.

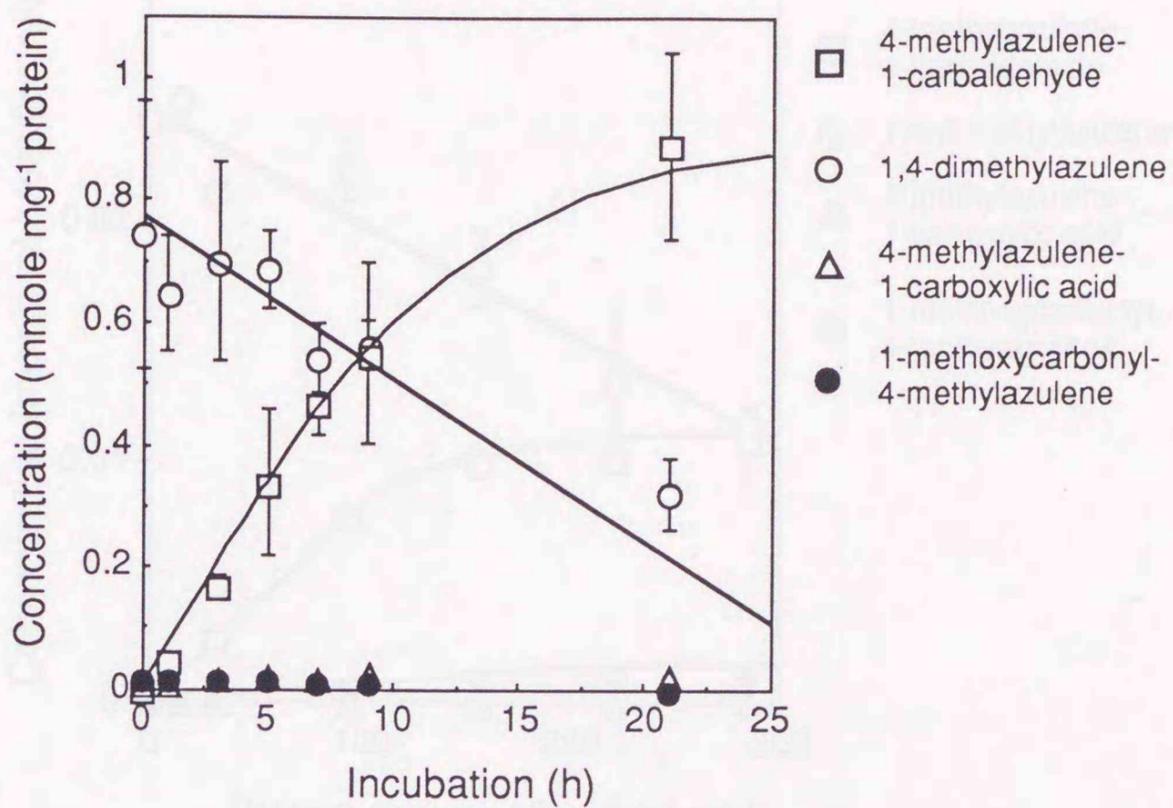


Fig. 6-8 Formation of 4-methylazulene-1-carbaldehyde by cell-free extracts from cultured cells of *Calypogeia azurea*. Reaction mixture was incubated with 150 μg of crude enzyme and 250 μM of 1,4-dimethylazulene as a substrate at 30°C. The reaction was terminated by 6 *N* HCl, and the products were analyzed by HPLC.

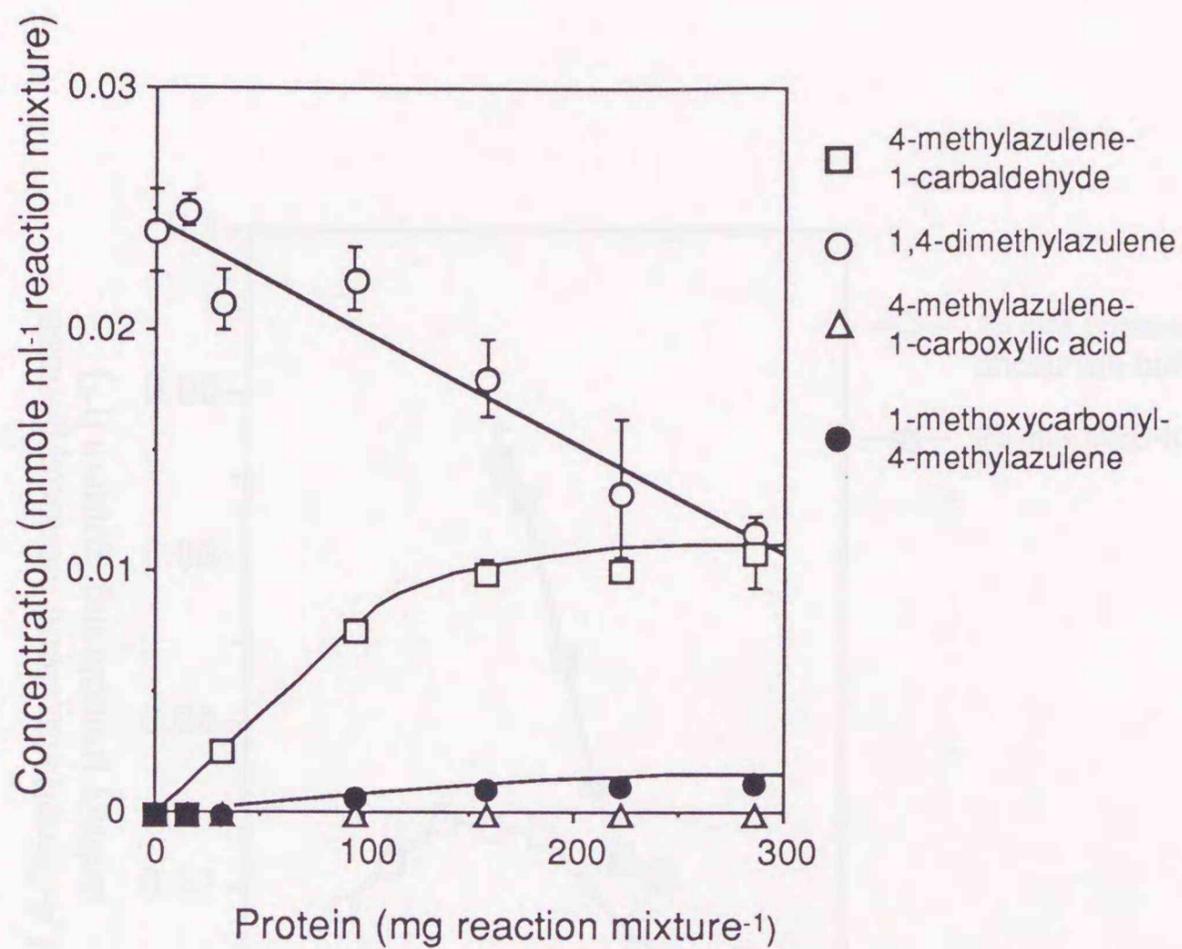


Fig. 6-9 Effect of enzyme concentration on the formation of 4-methylazulene-1-carbaldehyde from 1,4-dimethylazulene. Reaction mixture was incubated with various concentration of crude enzyme prepared from cultured cells of *Calypogeia azurea* and 250 μ M of 1,4-dimethylazulene as a substrate for 5 hours at 30°C. The reaction was terminated by 6 N HCl, and the reaction products and residual substrate were analyzed by HPLC.

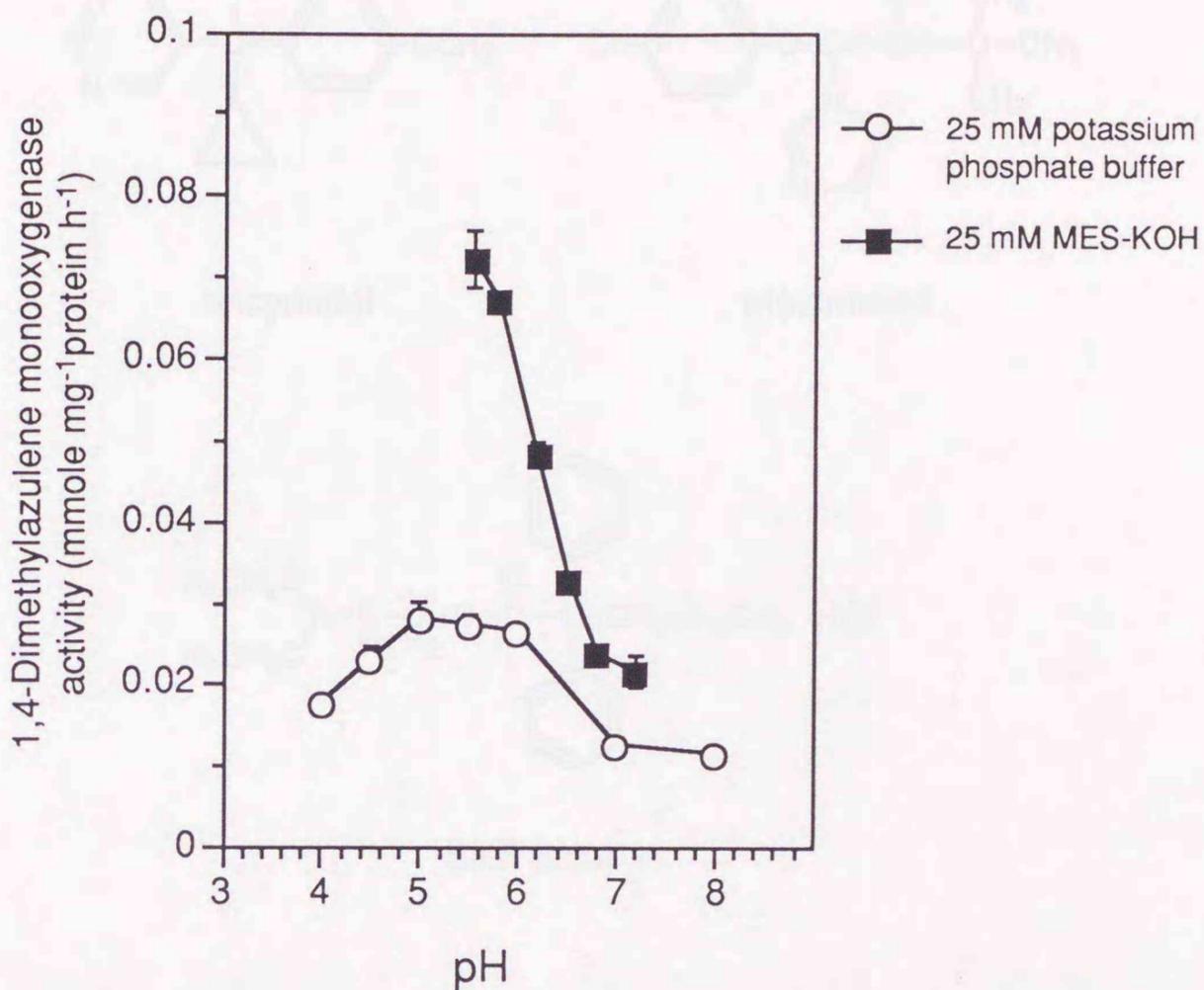
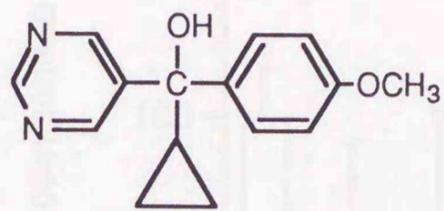
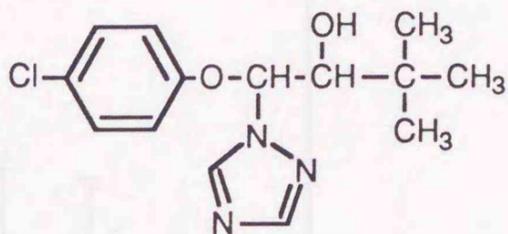


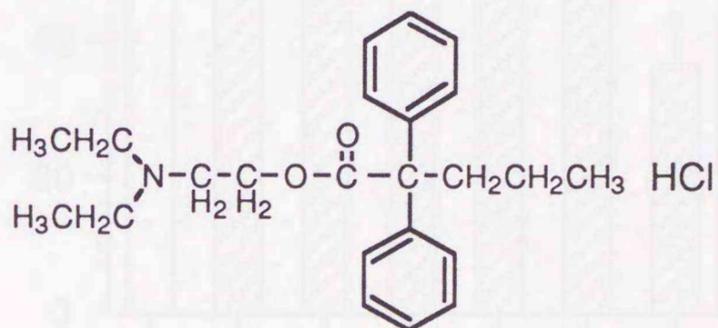
Fig. 6-10 Effect of pH on the activity of 1,4-dimethylazulene monooxygenase prepared from cultured cells of *Calypogeia azurea*. The pH value of reaction mixture was adjusted to 4 - 8 with 25 mM potassium phosphate buffer and of 5.5 - 7.2 with 25 mM MES-KOH buffer. The reaction mixture was incubated with 300 - 350 μ g of crude enzyme prepared from cultured cells of *C. azurea* and 250 μ M of 1,4-dimethylazulene for 5 hours at 30 °C. The reaction was terminated by 6 N HCl, and the products were analyzed by HPLC.



ancymidol



triazimenol



SKF 525A

Fig. 6-11 Inhibitors for P450-dependent monooxygenase.

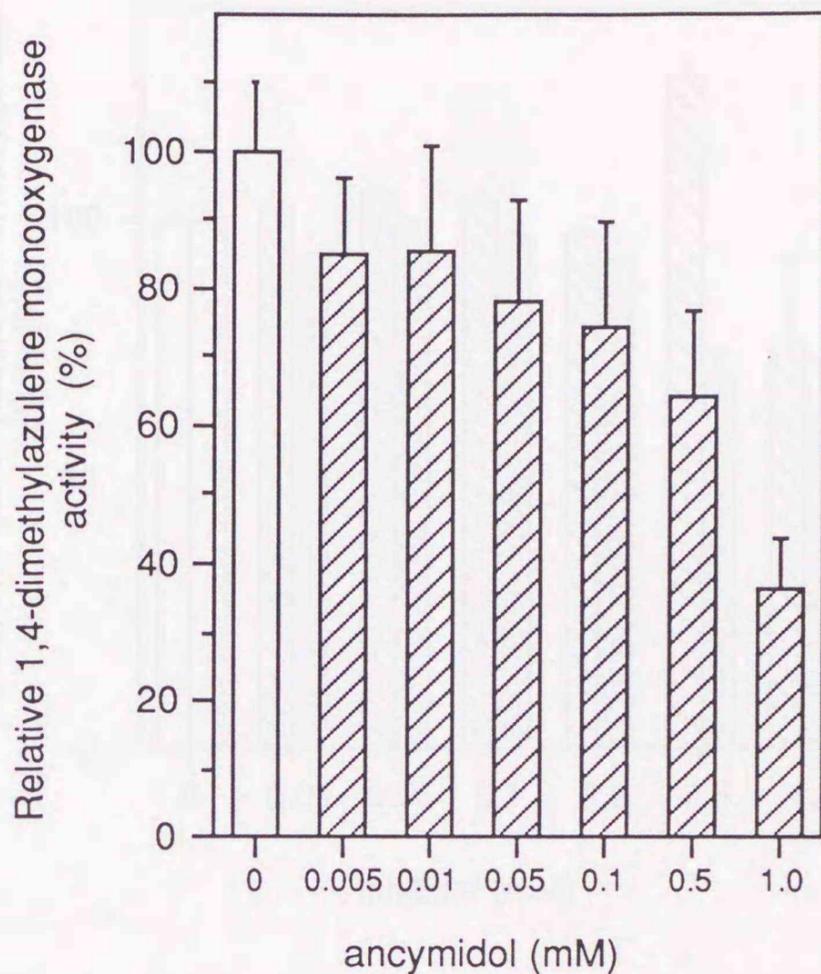


Fig. 6-12 Inhibition of 1,4-dimethylazulene monooxygenase activity by ancymidol. Reaction mixture was incubated with 3.6-8.3 μg enzyme protein and 250 μM of 1,4-dimethylazulene as a substrate for 9 hours at 30 $^{\circ}\text{C}$ ($n=3$). The enzyme activity in the absence of ancymidol (control) was $0.0271 \pm 0.0103 \mu\text{mole mg}^{-1} \text{ protein h}^{-1}$.

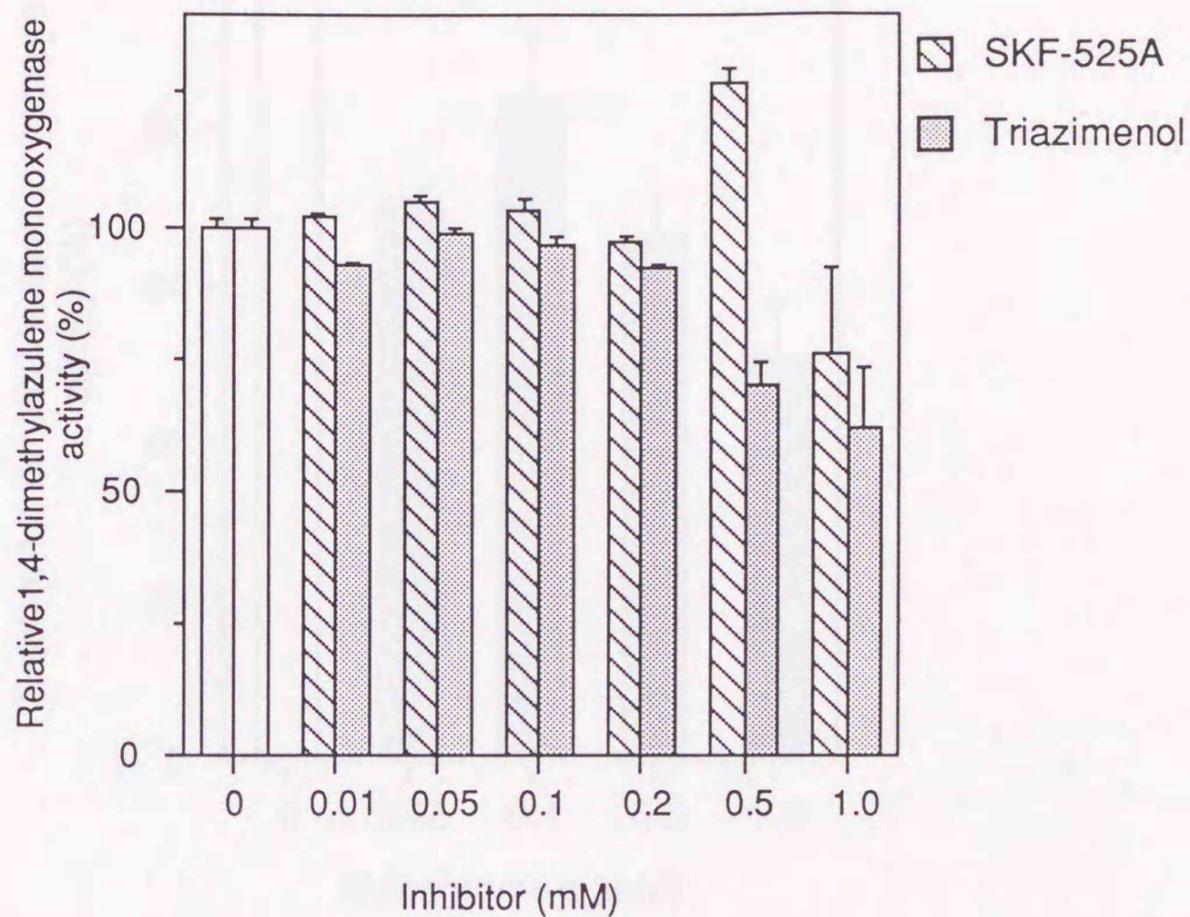


Fig. 6-13 Inhibition of 1,4-dimethylazulene monooxygenase activity by SKF-525A or triazimenol. Reaction mixture was incubated with 47.4 μg enzyme protein and 250 μM of 1,4-dimethylazulene as a substrate for 7 hours at 30°C ($n=3$). The enzyme activity in the absence of SKF-525A or triazimenol (control) was $0.0358 \pm 0.0054 \mu\text{mole mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$.

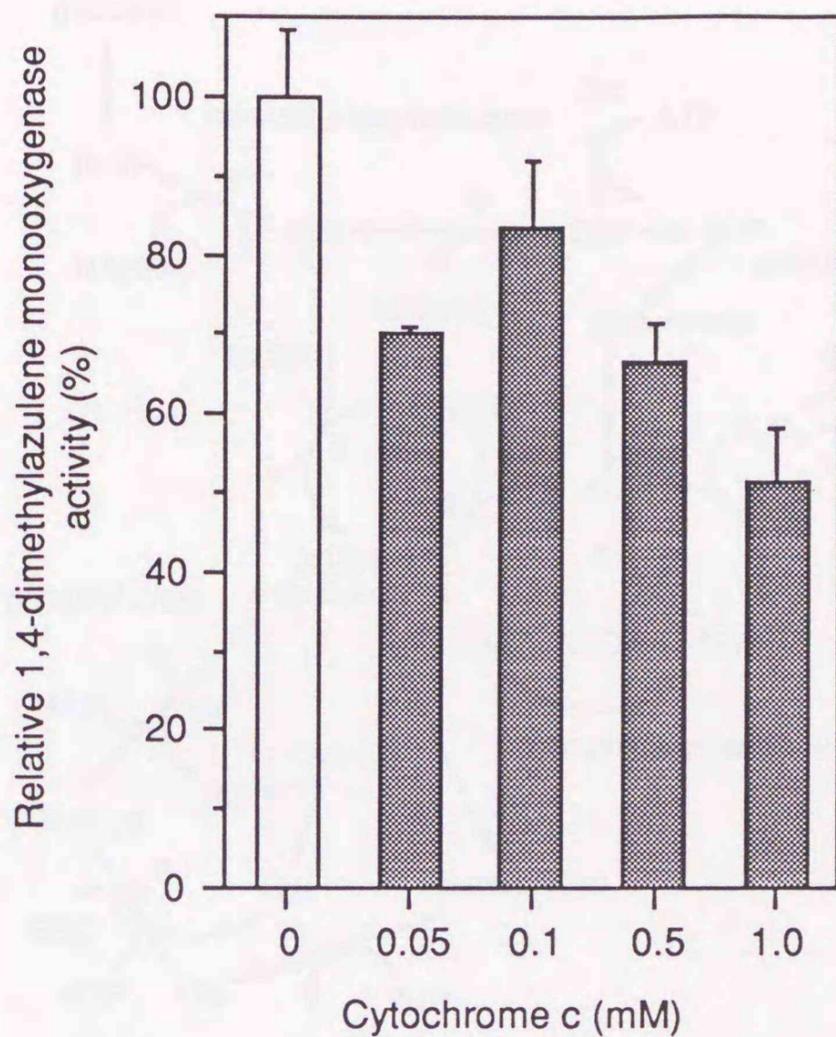


Fig. 6-14 Inhibition of 1,4-dimethylazulene monooxygenase activity by cytochrome c. Reaction mixture was incubated with 47.4-126.1 μg enzyme protein and 250 μM of 1,4-dimethylazulene as a substrate for 7 hours at 30 $^{\circ}\text{C}$ ($n=3$). The enzyme activity in the absence of cytochrome c (control) was $0.0326 \pm 0.0028 \mu\text{mole mg}^{-1} \text{protein h}^{-1}$.

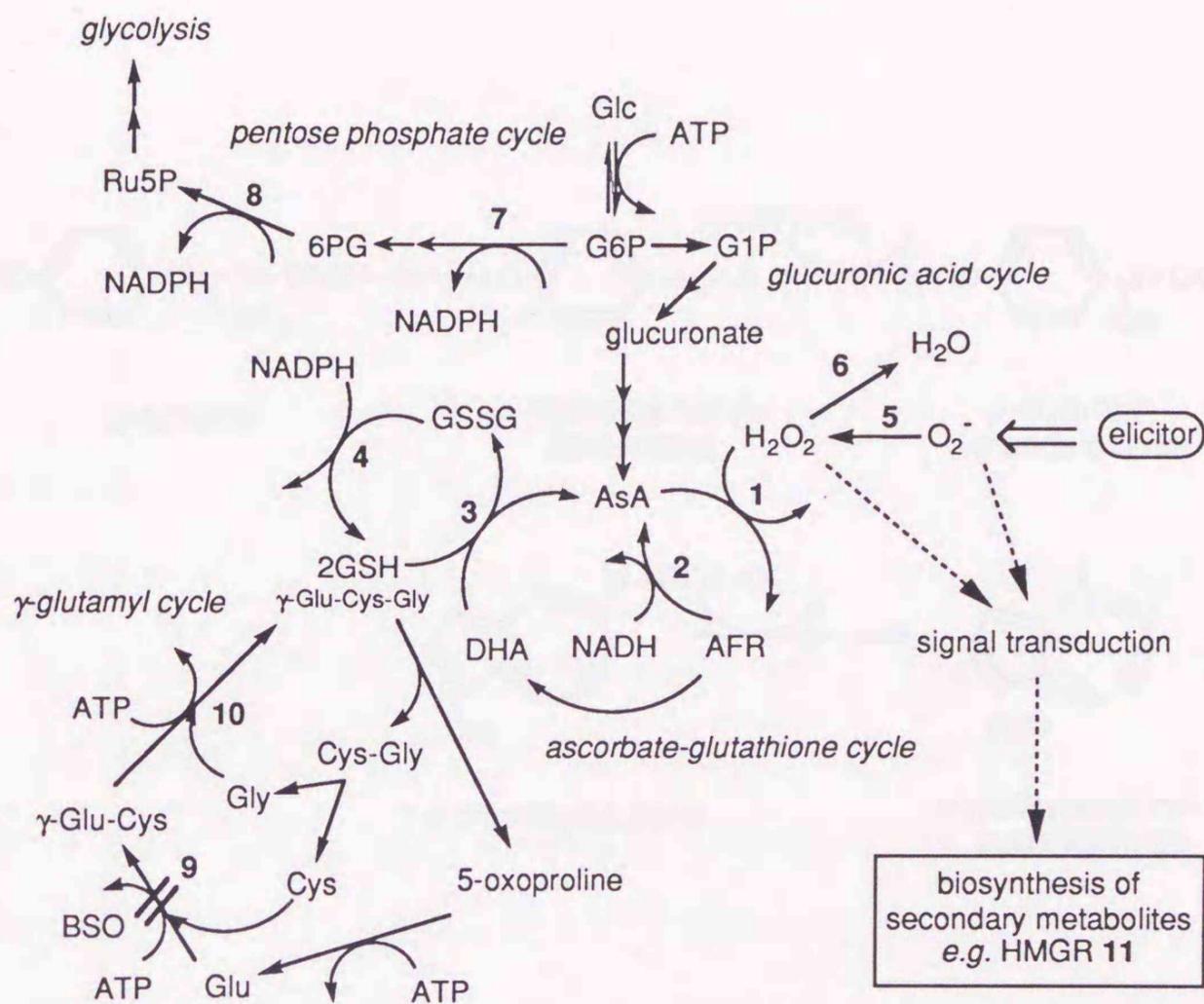


Fig. 6-15 Metabolic pathways included in active oxygen species-scavenging system. AsA; ascorbate, AFR; ascorbate free radical, DHA; dehydroascorbate, GSH; glutathione (reduced form), GSSG; glutathione (oxidized form), Glc; glucose, G6P; glucose-6-phosphate, G1P; glucose-1-phosphate, 6PG; 6-phosphogluconate, Ru5P; riburose-5-phosphate, Glu; glutamic acid, Cys; cysteine, Gly; glycine, BSO; buthionine sulfoximine, a specific inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase (9). 1; ascorbate peroxidase (AAPOD, EC 1.11.1.11), 2; ascorbate free radical reductase (AFRRD, EC 1.6.5.4), 3; dehydroascorbate reductase (DHARD, EC 1.8.5.1), 4; glutathione reductase (GSSGRD, EC 1.6.4.2), 5; superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), 6; catalase (EC 1.11.1.6), 7; glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49), 8; 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH, EC 1.1.1.44), 9; γ -glutamylcysteine synthetase (EC 6.3.2.2), 10; glutathione synthetase (EC 6.3.2.3), 11; 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase (HMGR, EC 1.1.1.34).

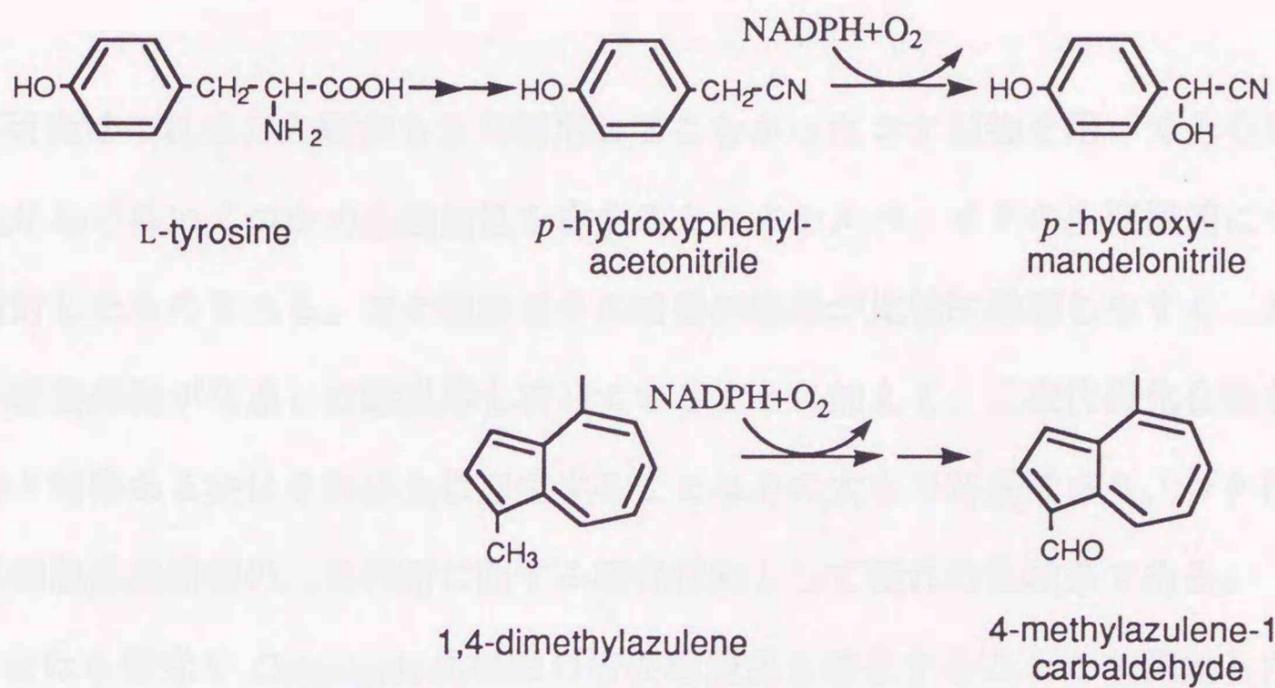


Fig. 6-16 P450-dependent monooxygenation at allyl-position of *p*-hydroxyphenyl-acetonitrile (top) and 1,4-dimethylazulene (bottom).

第7章 結 論

本研究はこれまで人類があまり利用してこなかったコケ植物を用いてその培養細胞におけるいくつかの生理活性を有するセスキテルペノイドの生産機能について検討したものである。コケ植物はその培養細胞系が比較的誘導しやすく、またその培養細胞が発達した葉緑体を有していることに加えて、二次代謝化合物を親植物と同等あるいはそれ以上に産生することはその大きな特長であり、コケ植物培養細胞系は植物の二次代謝に関する研究材料として優れた実験系である。

著者は本研究を *Calypogeia* 属植物の培養細胞系を確立することから開始した。*Calypogeia* 属植物のみならず野外における苔類植物は成長が遅く、またしばしば他種と混生しているため実験材料として用いるには制約があった。そこで比較的均一な実験材料を必要に応じて随時供給するために培養細胞系を確立した。

ホラゴケモドキ (*Calypogeia azurea*) および *C. peruviana* においてそのカルス誘導には、維管束植物における一般的なカルス誘導とは異なり、オーキシン、サイトカイニンなどの植物成長調節物質は必須ではなかった。これら *Calypogeia* 属植物のカルス形成にいたる脱分化には植物成長調節物質にかわって、培地中のグルコース濃度のみが関与していた。培地中に 4-6% (w/v) のグルコースを添加することによって、葉緑体のよく発達したカルスの形成が認められ、0.5-1% (w/v) グルコースでは再分化が認められた。2-3% (w/v) では置床した同じ外植片よりカルス形成と再分化が同時に認められた。培地中で 6% 程度の高濃度のグルコースがどのような機構で脱分化を起こさせるのか、あるいは逆に 0.5-1% 程度の低濃度のグルコースがどのように再分化を引き起こすのかについては、高グルコ

ース濃度においてその高浸透圧による再生芽の非局在化の関与が示唆されるがその詳細は未だ明らかではない。

高濃度のグルコースを加えた培地によって誘導したホラゴケモドキ (*C. azurea*) カルスは約2ヶ月ごとに新鮮な培地に移植し継代培養を行なったが、その際にその精油成分に特徴的なアズレン誘導体4種の含量を測定したところ、誘導直後のカルスにおけるアズレン誘導体含量は培養している約600本の各フラスコごとにそれぞれ大きく異なっていた。この結果は培養条件の影響よりも個別の細胞ごとの生理条件の異なることが反映していると考えられた。しかしながら継代培養を続けると各アズレン誘導体の含量は親植物の組成に近づく傾向にあった。

ホラゴケモドキ (*C. azurea*) 無菌培養配偶体より、その特徴的な成分のひとつである 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene の生合成経路上の中間体を単離精製し、分光学的機器分析実験および合成実験を行ない、その中間体について2種の新規アズレン誘導体、4-methylazulene-1-carbaldehyde、4-methylazulene-1-carboxylic acid であると決定した。これらのアズレン誘導体は天然から得られた最初の水溶性アズレン誘導体である。

これらが光に対して安定で、変異原性、急性毒性などについて調べた範囲において安全であり、また抗炎症ならびに抗潰瘍作用といった生理活性を有することを明らかにした。

植物の二次代謝化合物はしばしば化学合成が困難であり、そのような化合物を利用しようとするときにはその植物自身に生産を委ねなければならない。しかしながらその化合物が必ずしもその植物によって大量に生産されるとは限らず、培養細胞においてはなお困難であることが多い。そこで培養細胞におけるエリサイテーションの現象をモデルとして二次代謝化合物の生合成系の発現機構について調べた。

その結果、ミドリホラゴケモドキ (*Calypogeia granulata*) 培養細胞において五酸化バナジウムをエリシターとして用いたとき細胞成分として存在する二次代謝化合物の産生が高まることを見いだした。この実験結果は植物体および培養細胞を含めたコケ植物における二次代謝化合物の生成促進を示す最初の例である。

この時、細胞の中では一体何が起きているのかという点に注目し、特に細胞内を還元状態に保つ機能を有する酵素群の関与について調べたところ、それらの活性が上昇することを見だし、このことからエリシターの投与直後に細胞内にスーパーオキシドアニオンが、続いて過酸化水素が生成することを示唆する結果を得た。そしてこのような活性酸素が二次代謝化合物生合成系の発現シグナルに関与することを明らかにした。

さらにホラゴケモドキ (*C. azurea*) における 4-methylazulene-1-carbaldehyde の生合成酵素について調べ、セスキテルペノイドのアリル位のメチル基を選択的に一酸素酸化する反応が P450 の関与する反応であることが示唆された。

以上のように本研究において著者は苔類 *Calypogeia* 属植物の培養細胞がいくつかの生理活性を有するトリノルセスキテルペノイド、1,4-dimethylazulene およびその誘導体を産生し、またそのような二次代謝化合物の生合成が活性酸素の関与を伴ってエリシターにより促進されるということを明らかにした。さらに植物の二次代謝化合物の産生を誘導する機構および P450 依存性の特徴的な生合成酵素について論議した。そしてその結論から人類にとって有用な化合物を植物培養細胞の利用によって生産する際の技術的障害を克服しうる可能性を示した。

植物の培養細胞を用いて有用な二次代謝化合物を工業的に生産しようという試みはバイオテクノロジーの中心的課題の一つであり、過去 20 年来取り組まれてきたが、ムラサキ (*Lithospermum erythrorrhizon*) 培養細胞によるナフトキノンであるシコニンの工業的生産が技術的に成功するに至り (Fujita et al. 1981a, b)、

それ以降いわゆるバイオブームとして特に民間企業において研究熱が著しく高まった。

しかしながらそれ以来 10 年を経ても一向にあらたな実用化の成功例が現われず、そのため最近ではこの分野における研究開発をとりやめる企業が増加している。シコニンの例以降ほとんど成功例がみられない原因はいくつか考えられるが、結局その植物細胞が目的の化合物を満足できる水準まで生産できなかったことによる生産コストの問題であると考えられる。しかるにその生産性を高めるための手段としてはこの約 10 年間、培養条件を検討し、優良細胞を選抜するといった試行錯誤的な方法に終始していた感がある。そして当時から既に課題であった細胞の成長が遅いこと、生合成系や代謝系が不明であるといった問題はほとんど未解決のまま残されてきた。

本研究はまさにそのような植物細胞の二次代謝に関する生理学生化学的な理解を通して、我々人類にとって有用な二次代謝化合物の生産性の向上を意図するものである。

こういった中でも培養細胞から生合成酵素をひとつひとつ単離してゆくといった基礎的な研究は積み重ねられてきており、Zenk らのグループのアプローチは次第に成果を挙げつつある (Zenk 1991)。また、近年ファイトアレキシンの産生も含めた植物の防禦反応の発現機構が、情報伝達 (signal transduction) の過程の解析に関する多くの研究の結果、次第に明らかになってきている。しかしながら、現在のところ情報伝達物質 (signal transducer) として候補に挙げられているいくつかの化合物、すなわち活性酸素 (Apostol *et al.* 1989; Nakagawara *et al.* 1993 他)、ジャスモン酸あるいはジャスモン酸メチル (Farner and Ryan 1990; Gundlach *et al.* 1992)、サリチル酸 (Malamy *et al.* 1990; Chen and Klessig 1991; Masuta *et al.* 1991) などそれぞれがどのように作用しているのか、またそれらの

一連の反応において共通の過程を有するのかといった問題は明らかにされていない。

最近、セージ (*Salvia officinalis*) の精油に含まれる成分であるモノテルペンである (+)-camphor を代謝する酵素 (camphor-6-exo-hydroxylase; これは P450 酵素である) がその培養細胞において誘導されていることが示された (Funk and Croteau 1993)。従来、特にテルペノイドの植物培養細胞による生産においてその生合成系酵素活性は *in vitro* で測定するかぎり十分であっても、実際には二次代謝化合物が培養細胞中に蓄積せず、あるいは培地中への放出も見られないことが大きな問題であった (Banthorpe *et al.* 1986)。したがってセージにおける Funk and Croteau (1993) の報告は、二次代謝化合物が培養細胞においても生合成されているにもかかわらず、その代謝分解系が活性化するために細胞中に蓄積しないのであるという考えを示すものである。このような考えが従来の実験方法では二次代謝化合物を蓄積しない多くの植物培養細胞において普遍的に適用できるものであるならば、それらの代謝分解酵素をひとつひとつ特定し、その発現を抑制することによって二次代謝化合物の蓄積を減らすことが可能であるだろう。たとえばある代謝分解酵素が特定できればその遺伝子を解析し、そしてその配列に対するアンチセンス遺伝子を細胞に導入することによりその代謝分解酵素の発現を抑制することも期待できる (van der Krol *et al.* 1991)。あるいは何故培養細胞においてそのような酵素が活性化するのかを注意深く調べることによって、二次代謝化合物の生産系としての植物培養細胞の生物学的理解を一層深めることができると期待できよう。

現在、植物培養細胞の機能を有効に利用した二次代謝化合物の生産技術の確立が求められているが、そのためには植物細胞の生理学および生化学を十分に理解することが不可欠である。本研究で用いた苔類培養細胞は一般に二次代謝化合物

生合成系を一揃いほぼ完全な状態で発現しているため非常に有用な研究材料となるであろう。今後も継続的に植物培養細胞における二次代謝化合物の生産に関する基礎的な研究を積み重ねる努力が必要であり、このことがその実用化を阻むものを取り除く唯一の方法である。

引用文献

- Akazawa, T. and Wada, K. (1961) Analytical study of ipomeamarone and chlorogenic acid alterations in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Physiol.* 36: 139-144.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31: 347-364.
- Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. (1993) Enhanced tolerance to photooxidative stress of transgenic *Nicotiana tabacum* with high chloroplastic glutathione reductase activity. *Plant Cell Physiol.* 34: 129-135.
- Aoyama, Y., Yoshida, Y., Sonoda, Y. and Sato, Y. (1989a) Role of the 8-double bond of lanosterol in the enzyme-substrate interaction of cytochrome P-450_{14DM} (lanosterol 14 α -demethylase). *Biochim. Biophys. Acta* 1001: 196-200.
- Aoyama, Y., Yoshida, Y. and Sato, Y. (1989b) Deformylation of 32-oxo-24,25-dihydrolanosterol by the purified cytochrome P-450_{14DM} (lanosterol 14 α -demethylase) from yeast; Evidence confirming the intermediate step of lanosterol 14 α -demethylation. *J. Biol. Chem.* 264: 18502-18505.
- Apostol, I., Heinstein, P.F. and Low, P.S. (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol.* 90: 109-116.
- Arrigoni, O., Dipierro, S. and Borraccino, G. (1981) Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Lett.* 125: 242-244.
- Asada, K. (1992) Ascorbate peroxidase; a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85: 235-241.
- Asakawa, Y. (1982) Chemical constituents of the Hepaticae. *In* Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Edited by Herz, W., Grisebach, H. and Kirby, G. W. pp.1-285, Springer-Verlag, Wien, Austria.

- Asakawa, Y. (1990) Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. *In* *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Edited by Zinsmeister, H.D. and Mues, R. pp.369-410, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Bach, T.J. (1986) Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase, a key enzyme in phytosterol synthesis? *Lipids* 21: 82-88.
- Banthorpe, D.V., Branch, S.A., Njar, V.C.O., Osborne, M.G. and Watson, D.G. (1986) Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids. *Phytochemistry* 25: 629-636.
- Barz, W., Beimen, A., Dräger, B., Jaques, U., Otto, Ch., Süper, E. and Upmeier, B. (1990) Turnover and storage of secondary products in cell cultures. *In* *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Edited by Charlwood, B.V. and Rhodes, M.J.C. pp. 79-102, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Becker, H. (1989) Bryophytes, a rich source of secondary metabolites. *Botanica Acta* 102: 181-182.
- Beneš, I., Beizae, N., Vaněk, T., Váňa, J. and Herout, V. (1981) Campesteryl behanate, a chemical characters of the liverwort genus *Calypogeia*. *Phytochemistry* 20: 2438-2439.
- Benveniste, I., Salaun, J., Simon, A., Reichhart, D. and Durst, F. (1982) Cytochrome P-450-dependent ω -hydroxylation of lauric acid by microsomes from pea seedlings. *Plant Physiol.* 70: 122-126.
- Bergman, A., Gardeström, P. and Ericson, I. (1980) Method to obtain a chlorophyll-free preparation of intact mitochondria from spinach leaves. *Plant Physiol.* 66: 442-445.
- Berry, D.L., Singh, B. and Salunkhe, D.K. (1972) Incorporation of β -hydroxy- β -methylglutaric acid into carotenoids and other ether soluble compounds in maize seedling. *Plant Cell Physiol.* 13: 157-165.
- Bold, C.H. (1973) *In* *Morphology of Plants*. 3rd edition. pp.668 Harper & Row Publishers, New York, USA.

- Bozak, K.R., Yu, H., Sirevag, R. and Christoffersen, R.E. (1990) Sequence analysis of ripening-related cytochrome P-450 cDNAs from avocado fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3904-3908.
- Bowles, D.J. and Kauss, H. (1976) Characterization, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from *Phaseolus aureus*. *Biochim. Biophys. Acta* 443: 360-374.
- Carmeli, C., Tadmor, O., Lifshitz, Y., Ophir, R. and Carmeli, S. (1992) Inhibition of chloroplast CF₁-ATPase by vanadate. *FEBS Lett.* 299: 227-230.
- Chai, H.B. and Doke, N. (1987) Superoxide anion generation; A response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans*. *Phytopathol.* 77: 645-649.
- Chappell, J. and Nable, R. (1987) Induction of sesquiterpenoid biosynthesis in tobacco cell suspension cultures by fungal elicitor. *Plant Physiol.* 85: 469-473.
- Chappell, J., Von Lancken, C. and Vögeli, U. (1991) Elicitor-inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 97: 693-698.
- Chen, Z. and Klessig, D.F. (1991) Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8179-8183.
- Connolly, J.D. (1990) Monoterpenoids and sesquiterpenoids from the Hepaticae. *In* Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Edited by Zinsmeister, H.D. and Mues, R. pp.40-58, Clarendon Press, Oxford, UK.
- Coolbaugh, R.C. and Moore, T.C. (1971) Metabolism of kaurene in cell-free extracts of immature pea seeds. *Phytochemistry* 10: 2401-2412.
- Cruz-Mireles, R.M. and Ortega-Blake, I. (1991) Effect of Na₃VO₄ on the P state of *Nitella translucens*. *Plant Physiol.* 96: 91-97.
- Dalkin, K. and Bowles, D.J. (1989) Local and systemic changes in gene expression induced in tomato plants by wounding and by elicitor treatment. *Planta* 179: 367-375.

- Dalkin, K., Edwards, R., Edington, B. and Dixon, R.A. (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). I. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 92: 440-446.
- Daniel, S., Tiemann, K., Wittkamp, U., Bless, W., Hinderer, W. and Barz, W. (1990) Elicitor-induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. *Planta* 182: 270-278.
- Dipierro, S. and Borraccino, G. (1991) Dehydroascorbate reductase from potato tubers. *Phytochemistry* 30: 427-429.
- Donaldson, R.P. and Luster, D.G. (1991) Multiple forms of plant cytochromes P-450. *Plant Physiol.* 96: 669-674.
- Douce, R., Christensen, E.L. and Bonner, Jr., W.D. (1972) Preparation of intact plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 275: 148-160.
- Dougall, D.K. (1989) Sinapic acid stimulator of anthocyanin accumulation in carrot cell cultures. *Plant Sci.* 60: 259-262.
- Droillard, M.J., Paulin, A. and Massot, J.C. (1987) Free radical production, catalase and superoxide dismutase activities and membrane integrity during senescence of petals of cut carnations (*Dianthus caryophyllus*). *Physiol. Plant.* 71: 197-202.
- Durst, F. (1991) Biochemistry and Physiology of plant cytochrome P-450. *In* Microbial and Plant Cytochrome P-450: Biochemical Characteristics, Genetic Engineering and Practical Implications. Edited by Ruckpaul, K. and Rein, H. pp.191-232 Academic Verlag, GmbH, Berlin, FRG.
- Ebel, J. (1979) Elicitor-induced phytoalexin synthesis in soybean (*Glycine max*). *In* Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism. Edited by Luckner, M. and Schreiber, K. pp.155-162 Pergamon Press, Oxford, UK.
- Edwards, R., Blount, J.W. and Dixon, R.A. (1991) Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cell cultures. *Planta* 184: 403-409.

- Elia, R.M., Borraccino, G. and Dipierro, S. (1992) Soluble ascorbate peroxidase from potato tubers. *Plant Sci.* 85: 17-21.
- Encyclopædia Britannica (1974) Encyclopædia Britannica p.330.
- Esterbauer, H. and Grill, D. (1978) Seasonal variation of glutathione and glutathione reductase in needles of *Picea abies*. *Plant Physiol.* 61: 119-121.
- Farmer, E.E. and Ryan, C.A. (1990) Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7713-7716.
- Foyer, C.H. and Halliwell, B. (1976) The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Fricker, M.D. and Willmer, C.M. (1987) Vanadate sensitive ATPase and phosphatase activity in guard cell protoplasts of *Commelina*. *J. Exp. Botany* 38: 642-648.
- Fujita, M., Oba, K. and Uritani, I. (1982) Properties of a mixed function oxygenase catalyzing ipomeamarone 15-hydroxylation in microsomes from cut injured and *Ceratocystis fimbriata* infected sweet potato (*Ipomea batatas*) cultivar Norin No.1 root tissues. *Plant Physiol.* 70: 573-578.
- Fujita, Y., Hara, Y., Ogino, T. and Suga, C. (1981a) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorrhizon*. I. Effects of nitrogens sources on the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep.* 1: 59-60.
- Fujita, Y., Hara, Y., Suga, C. and Morimoto, T. (1981b) Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorrhizon*. II. A new medium for the production of shikonin derivatives. *Plant Cell Rep.* 1: 61-63.
- Funk, C. and Croteau, R. (1993) Induction and characterization of a cytochrome P-450-dependent camphor hydroxylase in tissue cultures of common sage (*Salvia officinalis*). *Plant Physiol.* 101: 1231-1237.
- Funk, C., Gügler, K. and Brodelius, P. (1987) Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation

(elicitor). *Phytochemistry* 26: 401-405.

Furze, J.M., Rhodes, M.J.C., Parr, A.J., Robins, R.J., Withehead, I.M. and Threlfall, D.R. (1991) Abiotic factors elicit sesquiterpenoid phytoalexin production but not alkaloid production in transformed root cultures of *Datura stramonium*. *Plant Cell Reports* 10: 111-114.

Gabriac, B., Benveniste, I. and Durst, F. (1985) Isolement et caracterisation de cytochrome P-450 de plantes superieures (*Helianthus tuberosus*). *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris Ser. III.* 301: 753-758.

Gabriac, B., Werck-Reichhart, D., Teutsch, H. and Durst, F. (1991) Purification and immunocharacterization of a plant cytochrome P450: The cinnamic acid 4-hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 288: 302-309.

Gallagher, S.R. and Leonard, R.T. (1982) Effect of vanadate, molybdate, and azide on membrane-associated ATPase and soluble phosphatase activities of corn roots. *Plant Physiol.* 70: 1335-1340.

Garfinkel, D. (1958) Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch. Biochem. Biophys.* 77: 493-509.

Gerardy, R. and Zenk, M.H. (1993) Formation of salutaridine from (*R*)-reticuline by a membrane-bound cytochrome P-450 enzyme from *Papaver somniferum*. *Phytochemistry* 32: 79-86.

Gething, M.-J. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45.

Gleitz, J. and Seitz, H.U. (1989) Induction of chalcone synthase in cell suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) by ultraviolet light; Evidence for two different forms of chalcone synthase. *Planta* 179: 323-330.

Gorham, J. (1977) Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry* 16: 249-253.

Gradstein, S.R. (1990) Morphology and classification of the *Hepaticae*. In *Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy*. Edited by Zinsmeister, H.D. and Mues,

R. pp.3-17 Clarendon Press, Oxford, UK.

- Groden, D. and Beck, E. (1979) Hydrogen peroxide destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 546: 426-435.
- Gundlach, H., Müller, M. J., Kutchan, T.M. and Zenk, M.H. (1992) Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389-2393.
- Gunia, W., Hinderer, W., Wittkamp, U. and Barz, W. (1991) Elicitor induction of cytochrome P-450 monooxygenases in cell suspension cultures of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their involvement in pterocarpane phytoalexin biosynthesis. *Z. Naturforsch.* 46c: 58-66.
- Guo, Z.-J., Nakagawara, S., Sumitani, K. and Ohta, Y. (1993) Effect of intracellular glutathione level on the production of 6-methoxymellein in cultured carrot (*Daucus carota*) cells. *Plant Physiol.* 102: 45-51.
- Gupta, A.S., Heinen, J.L., Holaday, A.S., Burke, J.J. and Allen, R.D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1629-1633.
- Habereder, H., Schröder, G. and Ebel, J. (1989) Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max* L.) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* 177: 58-65.
- Hagendoorn, M.J.M., Traas, T.P., Boon, J.J. and van der Plas, L.H.W. (1990) Orthovanadate induced lignin production, in batch and continuous cultures of *Petunia hybrida*. *J. Plant Physiol.* 137: 72-80.
- Hagmann, M. and Grisebach, H. (1984) Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavone. *FEBS Lett.* 175: 199-202.
- Hahn, M.G. and Albersheim, P. (1978) Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. *Plant Physiol.* 62: 107-111.

- Hakamatsuka, T., Hashim, M.F., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1991) P-450-dependent oxidative rearrangement in isoflavone biosynthesis: Reconstitution of P-450 and NADPH:P-450 reductase. *Tetrahedron* 47: 5969-5978.
- Halkier, B.A. and Møler, B.L. (1991) Involvement of cytochrome P-450 in the biosynthesis of dhurrin in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 96: 10-17.
- Hanawa, F., Tahara, S. and Mizutani, J. (1992) Antifungal stress compounds from *Veratrum grandiflorum* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry* 31: 3005-3007.
- 原田宏、駒嶺穆 (1979) 植物細胞組織培養 理工学社 東京.
- Harada, N. (1988a) Novel properties of human placental aromatase as cytochrome P-450: Purification and characterization of a unique form of aromatase. *J. Biochem.* 103: 106-113.
- Harada, N. (1988b) Cloning of a complete cDNA encoding human aromatase: Immunochemical identification and sequence analysis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 156: 725-732.
- Hashim, M.F., Hakamatsuka, T., Ebizuka, Y. and Sankawa, U. (1990) Reaction mechanism of oxidative rearrangement of flavanone in isoflavone biosynthesis. *FEBS Lett.* 271: 219-222.
- 服部新佐、岩月善之助、水谷正美 (1972) 原色日本蘚苔類図鑑 保育社 大阪.
- Hattori, T. and Ohta, Y. (1985) Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol.* 26: 1101-1110.
- Heintze, A., Golach, J., Leuschner, C., Hoppe, P., Hagelstein, P., Schulze-Siebert, D. and Schultz, G. (1990) Plastidic isoprenoid synthesis during chloroplast development. *Plant Physiol.* 93: 1121-1127.
- Henry, H. and Pilet, P.-E. (1988) Inhibition by vanadate of the tonoplast H^+ translocating ATPase of *Rubus* cells. *Plant Sci.* 56: 149-154.

- Hepper, C.M. and Audley, B.G. (1969) The biosynthesis of rubber from β -hydroxy- β -methylglutaryl-coenzyme A in *Hevea brasiliensis* latex. *Biochem. J.* 114: 379-386.
- Higashi, K., Ikeuchi, K., Karasaki, Y. and Obara, M. (1983) Isolation of immunochemically distinct forms of cytochrome P-450 from microsomes of tulip bulbs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115: 46-52.
- Higashi, K., Ikeuchi, K., Obara, M., Karasaki, Y., Hirano, H., Gotoh, S. and Koga, Y. (1985) Purification of a single major form of microsomal cytochrome P-450 from tulip bulbs (*Tulipa gesneriana* L.). *Agric. Biol. Chem.* 49: 2399-2405.
- Hinderer, W., Flentje, U. and Barz, W. (1987) Microsomal isoflavone 2'- and 3'-hydroxylases from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspensions induced for pterocarpan phytoalexin formation. *FEBS Lett.* 214: 101-106.
- 平井裕子、高瀬英樹、古林浩子、山本道子、藤岡尚美、神田博史、山崎和男、安原義、中嶋暉躬 (1983) 肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を指標とした抗炎症生薬のスクリーニング. *生薬学雑誌* 37: 374-380.
- Hostettmann, K., Hostettmann, M. and Marston, A. (1990) 分取クロマトグラフィーの実際; 天然物を中心に. 小村啓、橘和夫訳. pp. 39-106、東京化学同人、東京.
- 堀田満、緒方健、星川清親、山崎耕宇、新田あや、柳宗民 (1989) 世界有用植物事典. 平凡社、東京.
- Huneck, S. (1974) Campesteryl behenate in liverworts. *Phytochemistry* 13: 1289.
- Iglesias, J. and Gibbons, G.F. (1989) Regulation of hepatic cholesterol biosynthesis; Effects of a cytochrome P-450 inhibitor on the formation and metabolism of oxygenated sterol products of lanosterol. *Biochem. J.* 264: 495-502.
- 今井嘉郎、小森雅之 (1992) シトクロム P450. 新生化学実験講座 5、PP.205-221、東京化学同人、東京.
- Imaseki, H. (1970) Induction of peroxidase activity by ethylene in sweet potato. *Plant Physiol.* 46: 172-174.

Imaseki, H., Uchiyama, M. and Uritani, I. (1968) Effect of ethylene on the inductive increase in metabolic activities in sliced sweet potato roots. *Agr. Biol. Chem.* 32: 387-389.

井上浩、岩月邦男、柏谷博之、田村道夫、堀田満、三浦宏一郎、山岸高旺 (1983) 植物系統分類の基礎. 第4版、北隆館、東京.

Iwata, S., Nakayama, N., Nakagawara, S., Ohta, Y., Tanaka, T., Wakabayashi, K. and Böger, P. (1992) Response of liverwort cells to peroxidizing herbicides. *Z. Naturforsch.* 47c: 394-399.

Jackson, C., Dench, J.E., Hall, D.O. and Moore, A.L. (1979) Separation of mitochondria from contaminating subcellular structures utilizing silica sol gradient centrifugation. *Plant physiol.* 64: 150-153.

Kao, K.N. and Michayluk, M.R. (1975) Nutritional requirements for growth of *Vitis hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.

Kato, N., Imaseki, H., Nakashima, N. and Uritani, I. (1971) Structure of a new sesquiterpenoid ipomeamaronol in diseased sweet potato root tissue. *Tetrahedron lett.* 13: 843-846.

Kato, N., Imaseki, H., Nakashima, N., Akazawa, T. and Uritani, I. (1973) Isolation of a new phytoalexin-like compound, ipomeamaronol, from black rot fungus infected sweet potato root tissue, and its structural elucidation. *Plant Cell Physiol.* 14: 597-606.

Katoh, K. (1983) Kinetics of photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha* cells in suspension culture. *Physiol. Plant.* 59: 242-248.

Katoh, K. (1988) Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures of bryophytes. *In Methods in Bryology.* Edited by Glime, J.M. pp. 99-105, The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan, Miyazaki, Japan.

Katoh, K., Ohta, Y., Hirose, Y. and Iwamura, T. (1979) Photoautotrophic growth of *Marchantia polymorpha* L. cells in suspension culture. *Planta* 144: 509-510.

Katoh, K. and Takeda, R. (1990) Growth and production of secondary metabolites by cultured bryophyte cells. *In* Bryophytes, Their Chemistry and Chemical Taxonomy. Edited by Zinsmeister, H.D. and Mues, R. pp. 349-358, Clarendon Press, Oxford, UK.

加藤研治、武田禮二 (1992a) 4-メチルアズレン-1-カルブアルデヒドとその製造法. 特願平 4-167099.

加藤研治、武田禮二 (1992b) アズレン誘導体を含む化粧品. 特願平 4-254826.

Kawashima, N. and Uritani, I. (1963) Occurrence of peroxidase in sweet potato infected by the black rot. *Agr. Biol. Chem.* 27: 409-417.

Kessmann, H., Choudhary, A.D. and Dixon, R.A. (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) III. Induction of medicarpin and cytochrome P450 enzyme activities in elicitor-treated cell suspension cultures and protoplasts. *Plant Cell Rep.* 9: 38-41.

Kim, W.K., Oguni, I. and Uritani, I. (1974) Phytoalexin induction in sweet potato roots by amino acids. *Agr. Biol. Chem.* 38: 2567-2568.

Kleinig, H. (1989) The role of plastids in isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 39-59.

Klingenberg, M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 75: 376-386.

Kobayashi, M. and Ohta, Y. (1983) Induction of stress metabolite formation in suspension cultures of *Vigna angularis*. *Phytochemistry* 22: 1257-1261.

Kochs, G. and Grisebach, H. (1986) Enzymic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.* 155: 311-318.

Kochs, G. and Grisebach, H. (1989) Phytoalexin synthesis in soybean: Purification and reconstitution of cytochrome P450 3,9-dihydroxypterocarpan 6 α -hydroxylase and separation from cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase. *Arch. Biochem.*

Biophys. 273: 543-553.

Kochs, G., Welle, R. and Grisebach, H. (1987) Differential induction of enzyme in soybean cell cultures by elicitor or osmotic stress. *Planta* 171: 519-524.

Kochs, G., Werck-Reichhart, D. and Grisebach, H. (1992) Further characterization of cytochrome P450 involved in phytoalexin synthesis in soybean, cytochrome P450 cinnamate 4-hydroxylase and 3,9-dihydroxypterocarpan 6 α -hydroxylase. *Arch. Biochem. Biophys.* 293: 187-194.

小森谷恵司、土本雅弘、国沢佳子、竹下徹、成智達之 (1984) Clenbuterol (NAB 365) の抗アレルギー作用. *応用薬理* 28: 615-621.

Kondo, Y., Hanawa, F., Miyazawa, T. and Mizutani, J. (1993) Detection of rapid and transient generation of activated oxygen and phospholipid hydroperoxide in soybean after treatment with fungal elicitor by chemiluminescence assay. *In* Mechanism of Plant Defense Responses. Edited by Fritig, B. and Legrand, M. pp. 148-151, Kluwer Academic Publishers., Dordrecht, The Netherlands.

Kondo, Y., Miyazawa, T. and Mizutani, J. (1992) Detection and time-course analysis of phospholipid hydroperoxide in soybean seedlings after treatment with fungal elicitor, by chemiluminescence-HPLC assay. *Biochim. Biophys. Acta* 1127: 227-232.

Kuroda, H. and Sagisaka, S. (1992) Malfunction of enzyme systems involved in the regeneration of glutathione in perennials at low temperatures. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 712-715.

Kuroda, H., Sagisaka, S. and Chiba, K. (1990a) Seasonal changes in peroxide-scavenging systems of apple trees in relation to cold hardiness. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 59: 399-408.

Kuroda, H., Sagisaka, S. and Chiba, K. (1990b) Frost induces cold acclimation and peroxide-scavenging systems coupled with the pentose phosphate cycle in apple twigs under natural conditions. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 59: 409-416.

Kuroda, H., Sagisaka, S. and Chiba, K. (1992) Collapse of peroxide-scavenging systems in apple flower-buds associated with freezing injury. *Plant Cell Physiol.*

- 33: 743-750.
- Kuroda, H., Sagisaka, S., Asada, M. and Chiba, K. (1991) Peroxide-scavenging systems during cold acclimation of apple callus in culture. *Plant Cell physiol.* 32: 635-641.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A. (1987) Breakdown of phosphatidylinositol during the elicitation of phytoalexin production in cultured carrot cells. *Plant Physiol.* 85: 601-604.
- Kutney, J.P., Aweryn, B., Chatson, K.B., Choi, L.S.L. and Kurz, W.G.W. (1985) Alkaloid production in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cell cultures. XIII. Effects of bioregulators on indole alkaloid biosynthesis. *Plant Cell Reports* 4: 259-262.
- 久木浩平 (1982) 非ステロイド抗炎症薬の局所適用についての研究. *日薬理誌* 79: 461-485.
- Larson, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 27: 969-978.
- Lawton, M.A., Dixon, R.A., Hahlbrock, K. and Lamb, C.J. (1983) Elicitor induction of mRNA activity; Rapid effects of elicitor on phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA activities in bean cells. *Eur. J. Biochem.* 130: 131-139.
- Leonard, R.T., Hansen, D. and Hodges, T.K. (1973) Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots. *Plant physiol.* 51: 749-754.
- Lewinsohn, E., Gijzen, M. and Croteau, R. (1991) Defense mechanisms of conifers.; Differences in constitutive and wound-induced monoterpene biosynthesis among species. *Plant Physiol.* 96: 44-49.
- Lord, J.M., Kagawa, T., Moore, T.S. and Beevers, H. (1973) Endoplasmic reticulum as the site of lectin formation in castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* 57: 659-667.
- Lorke, D. (1983) A new approach to practical acute toxicity testing. *Arch. Toxicol.* 54: 275-287.

Luwe, M.W.F., Takahama, U. and Heber, U. (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.* 101: 969-976.

Madyastha, K.M., Meehan, T.D. and Coscia, C.J. (1976) Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochemistry* 15: 1097-1102.

前川文夫 (1973) ブリタニカ国際大百科事典 p.592-594.

Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D.F. and Raskin, I. (1990) Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.

Marques, I.A. and Brodelius, P.E. (1988) Elicitor-induced L-tyrosine decarboxylase from plant cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 88: 46-51.

Masuda, Y., Ohno, T., Uramoto, H. and Ishihara, T. (1991) Effects of aging on gastric secretion and blood flow in rats. *In Mechanisms of Injury, Protection and Repair of the Upper Gastrointestinal Tract.* Edited by Garner, A. and O'Brien, P.E. pp.309-317 John Wiley & Sons, West Sussex, UK.

Masuta, C., Van den Bulcke, M. Bauw, G. Van Montagu, M. and Caplan, A.B. (1991) Differential effects of elicitors on the viability of rice suspension cells. *Plant Physiol.* 97: 619-629.

Mendum, M.L., Gupta, S.C. and Goldsbrough, P.B. (1990) Effect of glutathione on phytochelatin synthesis in tomato cells. *Plant Physiol.* 93: 484-488.

Meuche, D. and Huneck, S. (1966) Azulene aus *Calypogeia trichomanis* (L.) Corda. *Chem. Ber.* 99: 2669-2674.

水町邦彦 (1975) 新実験化学講座、第1巻、pp 223-250、丸善、東京。

Mizutani, M., Ward, E., DiMaio, J., Ohta, D., Ryals, J. and Sato, R. (1993) Molecular cloning and sequencing of a cDNA encoding mung bean cytochrome P450 (P450C4H) possessing cinnamate 4-hydroxylase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 875-880.

- Mochizuki, S., Wakabayashi, S., Tomiyama, A., Satake, N. and Shibata, S. (1989) Thromboxane A₂ antagonistic action of a new anti-ulcer agent, Azuletil Sodium (KT1-32). *Scand. J. Gastroenterol.* 24 (suppl. 162): 194-197.
- Monk, L.S., Fagerstedt, K.V. and Crawford, R.M.M. (1989) Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76: 456-459.
- Moore, T.S., Lord, J.M., Kagawa, T. and Beevers, H. (1973) Enzymes of phospholipid metabolism in the endoplasmic reticulum of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 52: 50-53.
- 村井章夫、吉沢結子、佐藤郁、長谷川寿夫、正宗直、佐藤章夫、田村守 (1987) フィトアレキシン生成の動的因子としての過酸化水素について. 第29回天然有機化合物討論会講演要旨集. 193-200.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-496.
- Murphy, P.J. and West, C.A. (1969) The role of mixed function oxidase in kaurene metabolism in *Echinocystis macrocarpa* Greene endosperm. *Arch. Biochem. Biophys.* 133: 395-407.
- Nabeta, K., Katayama, K., Nakagawara, S. and Katoh, K. (1993) Sesquiterpenes of cadinane type from cultured cells of the liverwort, *Heteroscyphus planus*. *Phytochemistry* 32: 117-122.
- Nagahashi, J. and Beevers, L. (1978) Subcellular localization of glycosyl transferases involved in glycoprotein biosynthesis in the cotyledons of *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 61: 451-459.
- Nagashima, F., Toyota, M. and Asakawa, Y. (1990) Terpenoids from some Japanese liverworts. *Phytochemistry* 29: 2169-2174.
- Nakagawara, S., Abe, S., Katoh, K., Konno, H. and Komemushi, S. (1994a) Effect of sugars on the callus formation of *Marchantia polymorpha*. *Physiol. Plant.* in press.

- Nakagawara, S., Abe, S., Katoh, K., Konno, H. and Komemushi, S. (1994b) Effect of sugars on the redifferentiation of *Marchantia polymorpha*. *Physiol. Plant.* in press.
- Nakagawara, S., Katoh, K., Kusumi, T., Komura, H., Nomoto, K., Konno, H., Huneck, S. and Takeda, R. (1992) Two azulenes produced by the liverwort, *Calypogeia azurea*, during *in vitro* culture. *Phytochemistry* 31: 1667-1670.
- Nakagawara, S., Nakamura, N., Guo, Z.-J., Sumitani, K., Katoh, K. and Ohta, Y. (1993) Enhanced formation of a constitutive sesquiterpenoid in cultured cells of a liverwort, *Calypogeia granulata* Inoue during elicitation; effects of vanadate. *Plant Cell Physiol.* 34: 421-429.
- Nakagawara, S. and Sagisaka, S. (1984) Increase in enzyme activities related to ascorbate metabolism during cold acclimation in poplar twigs. *Plant Cell Physiol.* 25: 899-906.
- Nebert, D.W., Nelson, D.R., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, F.J., Guengerich, F.P., Gunsalus, I.C., Johnson, E.F., Loper, J.C., Sato, R., Waterman, M.R. and Waxman, D.J. (1991) The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol.* 10: 1-14.
- Nishida, K., Sato, F. and Yamada, Y. (1980) Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophically and photomixotrophically cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 21: 47-55.
- Oba, K., Takematsu, H., Yamashita, K. and Uritani, I. (1976) Induction of furano-terpene production and formation of the enzyme system from mevalonate to isopentenyl pyrophosphate in sweet potato root tissue injured by *Ceratocystis fimbriata* and by toxic chemicals. *Plant Physiol.* 58: 51-56.
- Ogawa, M. and Uritani, I. (1969) Metabolic changes in sweet potato roots induced by gamma radiation in response to cutting. *Radiation Res.* 39: 117-125.
- Oguni, I., Suzuki, K. and Uritani, I. (1976) Terpenoid induction in sweet potato roots by cyclic AMP. *Agr. Biol. Chem.* 40: 1251-1252.
- Oguni, I. and Uritani, I. (1974) Dehydroipomeamarone as an intermediate in the

- biosynthesis of ipomeamarone a phytoalexin from sweet potato root infected with *Ceratocystis fimbriata*. *Plant Physiol.* 53: 649-652.
- Ohta, Y., Abe, S., Komura, H. and Kobayashi, M (1984) Prelunularic acid in liverworts. *Phytochemistry* 23: 1607-1609.
- O'Keefe, D.P. (1991) Biochemical and biophysical characteristics of plant cytochrome P450s. *In Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*. Edited by Pell, E. and Steffen, K. pp.204-213, Amer. Soc. Plant Physiologists, MD, USA.
- O'Keefe, D.P. and Leto, K.J. (1989) Cytochrome P-450 from the mesocarp of avocado (*Persea americana*). *Plant Physiol.* 89: 1141-1149.
- Okuda, T., Matsuda, Y., Yamanaka, A. and Sagisaka, S. (1991) Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of winter wheat is caused by cold treatment. *Plant Physiol.* 97: 1265-1267.
- Omura, T. and Sato, R. (1964a) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239: 2370-2378.
- Omura, T. and Sato, R. (1964b) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J. Biol. Chem.* 239: 2379-2385.
- O'Neill, S.D. and Spanswick, R.M. (1984) Effects of vanadate on the plasma membrane ATPase of red beet and corn. *Plant Physiol.* 75: 586-591.
- Oshima, K. and Uritani, I. (1968a) Enzymatic synthesis of a β -hydroxy- β -methylglutaric acid-derivative by a cell-free system from sweet potato with black rot. *J. Biochem.* 63: 617-625.
- Oshima, K. and Uritani, I. (1968b) Participation of mevalonate in the biosynthetic pathway of ipomeamarone. *Agr. Biol. Chem.* 32: 1146-1152.
- Phillips, N., Imoto, S., Ohta, Y. and Nakanishi, K. (1992) Partial purification of an endogenous elicitor from suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*. *Experientia* 48: 683-687.

- Potts, J.R.M., Weklych, R. and Conn, E.E. (1974) The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* 249: 5019-5026.
- Quail, P.H. (1979) Plant cell fractionation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 425-484.
- Racker, E. (1950) Spectrophotometric measurements of the enzymatic formation of fumaric and *cis*-aconitic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 4: 211-214.
- Ren, Y.-Y., and West, C.A. (1992) Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiol.* 99: 1169-1178.
- Rennenberg, H. (1982) Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry* 21: 2271-2781.
- Rich, P.R. and Bendall, D.S. (1975) Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* 55: 333-341..
- Rich, P.R., Cammack, R. and Bendall, D.S. (1975) Electron paramagnetic resonance studies of cytochrome P-450 in plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* 59: 281-286.
- Rich, P.R. and Lamb, C.J. (1977) Biophysical and enzymological studies upon the interaction of *trans*-cinnamic acid with higher plant microsomal cytochromes P-450. *Eur. J. Biochem.* 72: 353-360.
- Robbins, M.P., Hartnoll, J. and Morris, P. (1991) Phenylpropanoid defence responses in transgenic *Lotus corniculatus*. 1. Glutathione elicitation of isoflavan phytoalexins in transformed root cultures. *Plant Cell Reports* 10: 59-62.
- Robinson, J.M. and Gibbs, M. (1982) Hydrogen peroxide synthesis in isolated spinach chloroplast lamellae. *Plant Physiol.* 70: 1249-1254.
- Rogers, K.R., Albert, F. and Anderson, A.J. (1988) Lipid peroxidation is a consequence of elicitor activity. *Plant Physiol.* 86: 547-553.
- Russell, D.W. (1985) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductases from pea seedlings. *Methods Enzymol.* 110: 26-40.

- Sagisaka, S. (1972) Decrease of glucose 6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenase activities in the xylem of *Populus gelrica* on budding. *Plant Physiol.* 50: 750-755.
- Sagisaka, S. (1974) Transition of metabolisms in living poplar bark from growing to wintering stages and vice versa. *Plant Physiol.* 54: 544-549.
- Sagisaka, S. (1976) The occurrence of peroxide in a perennial plant, *Populus gelrica*. *Plant Physiol.* 57: 303-309.
- Sagisaka, S. (1982) Comparative studies on the metabolic function of differentiated xylem and living bark of wintering perennials. *Plant Cell Physiol.* 23: 1337-1346.
- Sagisaka, S. (1985) Injuries of cold acclimatized poplar twigs resulting from enzyme inactivation and substrate depression during frozen storage at ambient temperatures for a long period. *Plant Cell Physiol.* 26: 1135-1145.
- Sagisaka, S. and Asada, M. (1981) Coordinate and noncoordinate changes in enzyme activities in pentose phosphate cycle in poplar; A control of enzyme activities in differentiated xylem. *Plant Cell Physiol.* 22: 1459-1468.
- Sakaki, T., Shibata, M., Yabusaki, Y., Murakami, H. and Ohkawa, H. (1990) Expression of bovine cytochrome P450c21 and its fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 reductase in *Sccaromyces cerevisiae*. *DNA Cell Biol.* 9: 603-614.
- Salaun, J.-P., Benveiste, I., Reichhart, D. and Durst, F. (1978) A microsomal (cytochrome P-450)-linked lauric acid monooxygenase from aged Jerusalem-artichoke-tuber tissues. *Eur. J. Biochem.* 90: 155-159.
- Sasaki, M. (1964) Ultra-micro determination of blood sugar by *o*-toluidine boric acid method. *Jap. J. Clin. Pathol.* 12: 434-437.
- Sato, K., Uritani, I., Saito, T. and Honda, H. (1977) Isolation of the sweet potato weevil factor causing terpene induction in sweet potato roots. *Agr. Biol. Chem.* 41: 1419-1424.

- Schmidt, A. and Kunert, K.J. (1986) Lipid peroxidation in higher plants; the role of glutathione reductase. *Plant Physiol.* 82: 700-702.
- Schwacke, R. and Hager, A. (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity. *Planta* 187: 136-141.
- Schwitzguebel, J.-P. and Siegenthaler, P.-A. (1984) Purification of peroxisomes and mitochondria from spinach leaf by Percoll gradient centrifugation. *Plant Physiol.* 75: 670-674.
- Shaish, A., Avron, M., Pick, U. and Ben-Amotz, A. (1993) Are active oxygen species involved in induction of β -carotene in *Dunaliella bardawil*? *Planta* 190: 363-368.
- Shannon, L.M., Uritani, I. and Imaseki, H. (1971) *De novo* synthesis of peroxidase isozymes in sweet potato slices. *Plant Physiol.* 47: 493-498.
- Shi, X., Sun, X. and Dalal, N.S. (1990) Reaction of vanadium (V) with thiols generates vanadium (IV) and thiyl radicals. *FEBS Lett.* 271: 185-188.
- Shibata, M., Sakaki, T., Yabusaki, Y., Murakami, H. and Ohkawa, H. (1990) Genetically engineered P450 monooxygenases; Construction of bovine P450c17/yeast reductase fused enzymes. *DNA Cell Biol.* 9: 27-36.
- Shibuya, Y., Sugiura, Y., Tahara, S. and Mizutani, J. (1992) Accumulation of isoflavones in lupin seedlings treated with copper chloride. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 690-691.
- Siegel, U., Mues, R., Donig, R., Eicher, Th., Blechschmidt, M. and Becker, H. (1992) Ten azulenes from *Plagiochila longispina* and *Calypogeia azurea*. *Phytochemistry* 31: 1671-1678.
- Sparace, S.A. and Moore, Jr., T.S. (1979) Phospholipid metabolism in plant mitochondria; Submitochondrial sites of synthesis. *Plant Physiol.* 63: 963-972.
- Stadler, R. and Zenk, M.H. (1993) The purification and characterization of a unique cytochrome P-450 enzyme from *Berberis stolonifera* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.* 268: 823-831.

- Stahmann, M.A., Clare, B.G. and Woodburry, W. (1966) Increased disease resistance and enzyme activity induced by ethylene and ethylene production of black rot infected sweet potato. *Plant Physiol.* 41: 1505-1512.
- Steffens, M., Ettl, F., Kranz, D. and Kindl, H. (1989) Vanadate mimics effects of fungal cell wall in eliciting gene activation in plant cell cultures. *Planta* 177: 160-168.
- Stermer, B.A., Edwards, L.A., Edington, B.V. and Dixon, R.A. (1991) Analysis of elicitor-inducible transcripts encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in potato. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 135-145.
- Stuhlfauth, T., Klug, K. and Fock, H.P. (1987) The production of secondary metabolites by *Digitalis lanata* during CO₂ enrichment and water stress. *Phytochemistry* 26: 2735-2739.
- Sugimura, T. and Nagao, M. (1980) Modification of mutagenic activity. *In* Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection. Vol. 6. Edited by de Serres, F.J. and Hollaender, A. pp.41-60, Plenum, New York, USA.
- Sugita, O., Sassa, S., Miyairi, S., Fishman, J., Kubota, I., Noguchi, T. and Kappas, A. (1988) Cytochrome P-450C-M/F, a new constitutive form of microsomal cytochrome P-450 in male and female rat liver with estrogen 2- and 16 α -hydroxylase activity. *Biochemistry* 27: 678-686.
- Suzuki, H., Oba, K. and Uritani, I. (1974) Occurrence of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in sweet potato. *Agr. Biol. Chem.* 38: 2053-2055.
- Suzuki, H. and Uritani, I. (1976) Subcellular localization of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and other membrane-bound enzymes in sweet potato roots. *Plant Cell Physiol.* 17: 691-700.
- Takahama, U., Egashira, T. and Wakamatsu, K. (1989) Hydrogen peroxide-dependent synthesis of flavonols in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* 30: 951-955.
- Takeda, R. and Katoh, K. (1981) Growth and sesquiterpenoid production by *Calypogeia*

granulata Inoue cells in suspension culture. *Planta* 151: 525-530.

Takeda, R. and Katoh, K. (1983a) 3,10-Dihydro-1,4-dimethylazulene, a labile biosynthetic intermediate isolated from cultured cells of liverwort *Calypogeia granulata* Inoue. *J. Am. Chem. Soc.* 105: 4056-4058.

Takeda, R. and Katoh, K. (1983b) Sesquiterpenoids in cultured cells of liverwort, *Calypogeia granulata* Inoue. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 56: 1265-1266.

竹田秀一、田中康徳、大塚正道 (1983) アズレンの抗炎症、創傷治癒作用、特に粘膜における作用. *応用薬理* 25: 1-6.

Tanaka, Y., Data, E.S., Hirose, S., Taniguchi, T. and Uritani, I. (1983) Biochemical changes in secondary metabolites in wounded and deteriorated cassava *Manihot esculenta* roots. *Agr. Biol. Chem.* 47: 693-700.

Tanaka, Y., Kojima, M. and Uritani, I. (1974) Properties development and cellular-localization of cinnamic acid 4-hydroxylase in cut-injured sweet potato. *Plant Cell Physiol.* 15: 843-854.

Tanaka, Y. and Uritani, I. (1974) Cellular localization of *t*-cinnamic acid 4-hydroxylase produced in sweet potato in response to cut injury. *Agr. Biol. Chem.* 38: 1547-1548.

Teutsch, H.G., Hasenfratz, M.P., Lesot, A., Stolts, C., Garnier, J.-M., Jeltsch, J.-M., Durst, F. and Werck-Reichhart, D. (1993) Isolation and sequence of a cDNA encoding the Jerusalem artichoke cinnamate 4-hydroxylase, a major plant cytochrome P450 involved in the general phenylpropanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4102-4106.

Tommasi, F., De Gera, L., Liso, R. and Arrigoni, O. (1990) The ascorbic acid system in *Cuscuta reflexa* Roxb. *J. Plant Physiol.* 135: 766-768.

宇田昭夫 (1960) Guaiazulene ほか二、三抗炎症性薬物の炎症性浮腫にたいする抑制的態度. *日薬理誌* 56: 1151-1163.

Uritani, I., Saito, T., Honda, H. and Kim, W.K. (1975) Induction of furano-terpenoids in sweet potato roots by the larval components of the sweet potato weevils. *Agr.*

Biol. Chem. 39: 1857-1862.

Uritani, I. and Stahmann, M.A. (1961) Changes in nitrogen metabolism in sweet potato with black rot. *Plant Physiol.* 36: 770-782.

Uritani, I., Uritani, M. and Yamada, H. (1960) Similar metabolic alterations induced in sweet potato by poisonous chemicals and by *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathol.* 50: 30-34.

van der Krol, A.R., Stuitje, A.R. and Mol, J.N.M. (1991) Modulation of floral pigmentation by antisense technology. *In Antisense Nucleic Acids and Proteins: Fundamentals and Applications.* Edited by Mol, J.N.M. and van der Krol, A.R. pp.125-140, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.

Vera-Estrella, R., Blumwald, E. and Higgins, V.J. (1992) Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells.; Evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant Physiol.* 99: 1208-1215.

Vernon, L.P. (1960) Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts. *Anal. Chem.* 32: 1144-1150.

Vögeli, U., Vögeli-Lange, R. and Chappell, J. (1992) Inhibition of phytoalexin biosynthesis in elicitor-treated tobacco cell-suspension cultures by calcium/calmodulin antagonists. *Plant Physiol.* 100: 1369-1376.

Vreugdenhil, D. and Spanswick, R.M. (1987) The effect of vanadate on proton-sucrose cotransport in *Ricinus* cotyledons. *Plant Physiol.* 84: 605-608.

Wallace, J.L., Morris, G.P., Krausse, E.J. and Greaves, S.E. (1982) Reduction by cytoprotective agents of ethanol-induced damage to the rat gastric mucosa: a correlated morphological and physiological study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1686-1699.

Welle, R., Schröder, G., Schiltz, E., Grisebach, H. and Schröder, J. (1991) Induced plant responses to pathogen attack.; Analysis and heterologous expression of the key enzyme in the biosynthesis of phytoalexins in soybean (*Glycine max* L. Merr. cv. Harosoy 63). *Eur. J. Biochem.* 196: 423-430.

- Wendorff, H. and Matern, U. (1986) Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi; Microsomal conversion of (+) marmesin into psoralen. *Eur. J. Biochem.* 161: 391-398.
- Werck-Reichhart, D., Gabriac, B., Teutsch, H. and Durst, F. (1990) Two cytochrome P-450 isoforms catalysing O-de-ethylation of ethoxycoumarin and ethoxyresorufin in higher plants. *Biochem. J.* 270: 729-735.
- Wingate, V.P., Lawton, M.A., Lamb, C.J. (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol.* 87: 206-210.
- Wurzel, G. and Becker, H. (1990) Growth and terpenoid production of an axenic culture from the liverwort *Ricciocarpos natans*. *Z. Naturforsch.* 45c: 13-18.
- 山田康之 (1984) 植物細胞培養マニュアル. 講談社. 東京.
- 山崎英正、入野昭三、宇田昭夫、内田可亮、大野博之、斉藤詔昭、近藤和二、秦泉寺圭、山本孝 (1958) Guaiazulene の薬理、特に抗炎症作用と histamine 遊離抑制作用. *日薬理誌* 54: 362-377.
- 山崎敬、福田一郎、椿啓介、千原光雄、井上浩 (1974) 植物系統進化学. pp.158-194. 築地書館、東京.
- 吉川博文、津吉俊、岡本暉公彦、中村和博、伊藤勝利、今井博 (1984) モルモットクローズドパッチテスト. *皮膚* 26: 1092-1101.
- Young, O. and Beevers, H. (1976) Mixed function oxidases from germinating castor bean endosperm. *Phytochemistry* 15: 379-385.
- Zenk, M.H. (1991) Chasing the enzymes of secondary metabolism; Plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* 30: 3861-3863.
- Zimmerlin, A. and Durst, F. (1992) Aryl hydroxylation of the herbicide Diclofop by a wheat cytochrome P-450 monooxygenase. *Plant Physiol.* 100: 874-881.
- Zimmerlin, A., Salaun, J.-P., Durst, F. and Mioskowski, C. (1992) Cytochrome P-450-dependent hydroxylation of lauric acid at the subterminal position and oxidation of unsaturated analogs in wheat microsomes. *Plant Physiol.* 100: 868-873.

Synopsis

Since the beginning of history of the human, we have been utilizing plants not only as foods, but also as sources of drugs, dyes, fibers for clothes or building materials. Most of the plants useful for the human have been higher vascular plants. Bryophytes have rarely utilized mainly because of their small size.

Recent advances in phytochemistry have revealed that bryophytes, particularly liverworts, are rich sources of a number of chemically and biologically interesting compounds. Some of the compounds of bryophyte origin is believed to be useful for human life as raw materials for drugs and cosmetics, provided enough quantity of the compounds is available. The critical disadvantage of bryophytes as the source of useful natural compounds is the difficulty to collect a specific species of the plant in large quantity, because 1. they are small and grow very slow, 2. they often cohabit with other species in one place. Thus, the experimental technique of cell culture must have a significant advantage in obtaining enough quantity of the plant material to examine the secondary metabolism in liverworts.

Production of useful secondary metabolites in cultured cells of higher plants has been attempted by many researchers during last decade. Nevertheless, only a few compounds have exceptionally been produced in commercial scale through cell culture. One of the problems which make

the development of this technique difficult is the low productivity of secondary metabolites in the cultured cells. Thus, it is urgently required to study the experimental conditions that may increase the productivity of the secondary metabolites in cultured cells.

The present study aimed to examine the possibility to apply the cell culture technique to liverworts of *Calypogeia* species and to improve the productivity of the secondary metabolites through biochemical and physiological investigations.

Leafy liverworts of *Calypogeia* species were revealed to contain several azulene derivatives as characteristic secondary metabolites. *Calypogeia granulata* has been known to contain a sesquiterpene hydrocarbon, 1,4-dimethylazulene. Two other species of *Calypogeia*, *C. azurea* and *C. peruviana* contain, in addition to 1,4-dimethylazulene, 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene which can be considered as the end product in the biosynthetic pathway of this group of compounds. Two new azulene derivatives were also isolated and assigned as 4-methylazulene-1-carbaldehyde and 4-methylazulene-1-carboxylic acid, respectively, by examining their ^1H -, ^{13}C -NMR, HR-MS, IR and UV-spectra. The last two compounds are considered to be the biosynthetic intermediates between 1,4-dimethylazulene and 1-methoxycarbonyl-4-methylazulene. These intermediates may be utilized as raw materials for drugs, because they are soluble in water, have significant anti-inflammatory or anti-ulcer activity, and showed neither mutagenicity

to *Salmonella* strains nor acute toxicity to rat. Furthermore, they were more stable under intense light than guaiazulene sulfonate, a commercial azulene derivative included in some medicines with anti-inflammatory or anti-ulcer activities.

The axenic cultures of *Calypogeia azurea* and *C. peruviana* were established. No plant growth regulators such as auxins or cytokinins were required to induce callus formation or redifferentiation in both *C. azurea* and *C. peruviana*, differing from the case of higher plants which generally require the growth regulators. The induction of callus formation was associated only with glucose concentration in the culture medium. Induction of callus formation was observed in the explants exposed to rather higher concentrations of glucose of 4.0-6.0 % (w/v). Redifferentiation was observed at low concentration of glucose (0.5-1.0 %). Mechanism of the dedifferentiation of explants to form callus in *Calypogeia* species at high concentration of glucose is yet unclear.

The content of the four azulene derivatives determined in the cultured cells of *C. azurea* varied considerably from flask to flask of about 600. This was considered to reflect the difference in the physiological conditions of the cultured cells. Anyway, the cultured cells of *Calypogeia* species were found to have the ability to produce the same secondary metabolites as those in the intact plants.

The amount of secondary metabolites produced in the cultured cells is

generally quite lower than that included in the mother plants. This was also the case in liverwort cells and it is necessary to improve the productivity before utilizing the cultured cells as the source of the secondary metabolites. Elicitation which is the mimic of the defense reaction of the vascular plants against microbial invasion has been shown to be effective for this purpose. Thus, the elicitor-aided enhancement of secondary metabolite production and its mechanism were investigated on the cultured cells of *Calypogeia granulata*.

Production of a constitutive trinorsesquiterpene, 1,4-dimethylazulene, was enhanced by treatment with vanadate used as an elicitor in *C. granulata* cells. This was the first observation to confirm the effect of elicitor in both intact plant and the cultured cells of liverwort.

The activities of some enzymes which participate in maintaining the cellular redox state were measured to reveal the interaction between the elicitor and the cells. The enzymes measured were those in active oxygen species-scavenging system such as the enzymes included in ascorbate-glutathione cycle, catalase and superoxide dismutase. The content of glutathione (GSH) which was the intracellular reductant and the activities of some of the enzymes were increased by treatment of *C. granulata* cells with vanadate. These changes were accompanied by the increase of the activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase, a rate limiting enzyme in the mevalonic acid pathway to biosynthesize sesquiterpenoids. On the basis of these observations, it was concluded that in the cultured cells of *C. granulata* the treatment with

vanadate caused the generation of active oxygen species which is supposed to be involved in a signal transduction system leading to the biosynthesis of secondary metabolites.

In addition, the activity of an enzyme, found in cultured cells of *Calypogeia azurea* and named 1,4-dimethylazulene monooxygenase, by which 4-methylazulene-1-carbaldehyde was formed from 1,4-dimethylazulene through the addition of one molecule of oxygen was examined. This new enzyme was suggested to be related with P450 species.

In conclusion, the suitable experimental system to investigate the secondary metabolism in liverworts was provided by establishing the cultured cells of liverworts of *Calypogeia* species. Also shown is the possibility to control the production of the constitutive secondary metabolites in cultured cells of the plants by revealing the biochemical and physiological responses against elicitation.

謝 辞

本研究の遂行に際し終始懇篤な御指導、御助言を賜わり、また本論文の御校閲の労を賜わりました北海道大学低温科学研究所 匂坂勝之助 教授、北海道大学農学部 水谷純也 教授、北海道大学農学部 田原哲士 助教授に心から感謝いたします。

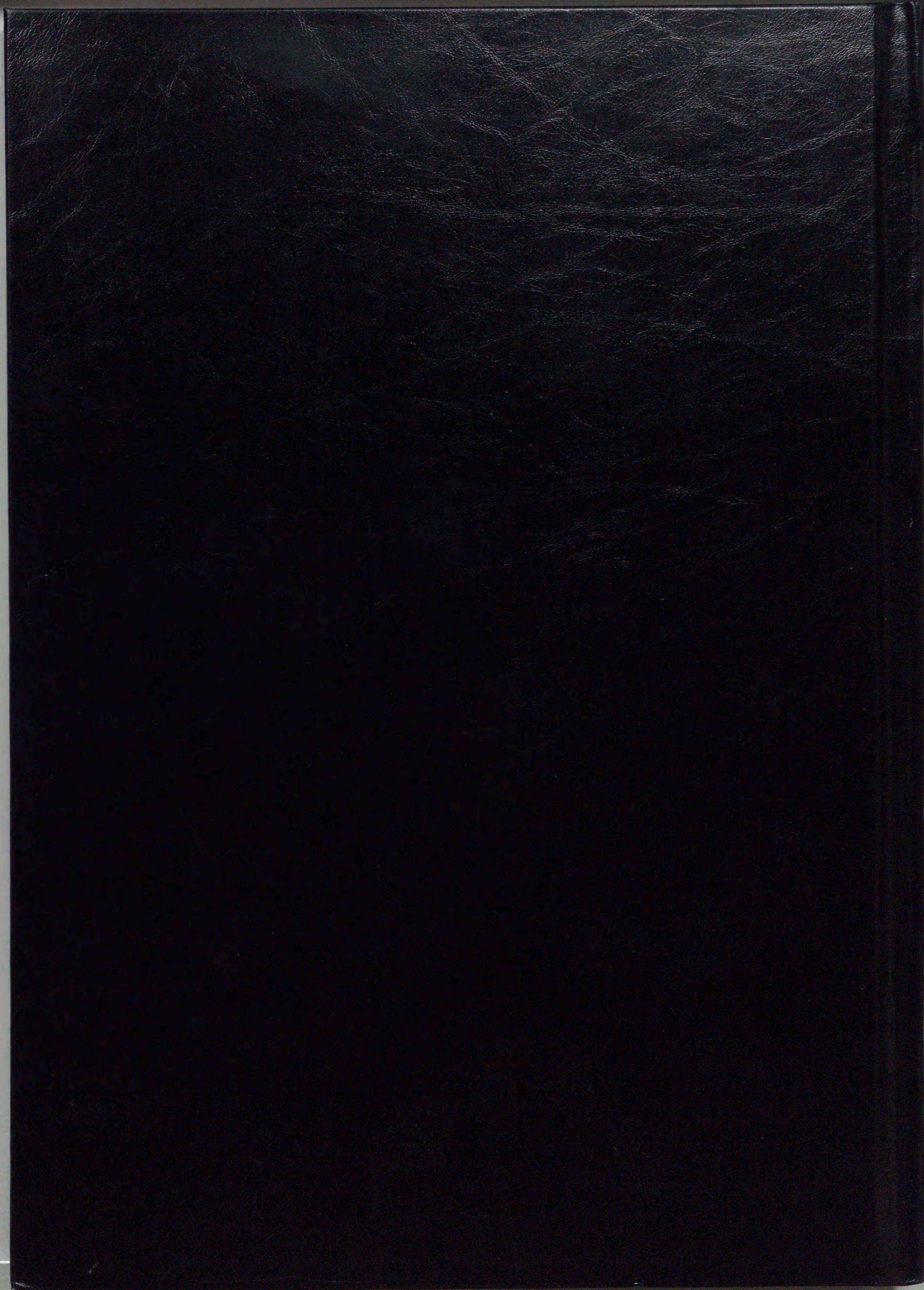
苔類の採集に関し御指導いただき、またその同定をしていただきました京都大学農学部 長谷川二郎博士、ならびに triazimenol および SK&F-525A を恵与いただき、P450 に関して御教示くださいました神戸大農学部 大川秀郎 教授に深く感謝いたします。研究の進め方についての御教示のみならず終始暖かく督励くださいました帯広畜産大学生物資源化学科 鍋田憲助助教授、大和田琢二博士、北海道大学低温科学研究所 佐藤利幸博士、北海道大学農学部 青井俊樹博士、綿貫豊博士、間野勉博士、園山慶博士に心から感謝いたします。

本研究の機会と終始多大なる御指導と御高配をいただきましたサントリー株式会社 取締役 熊田順一博士（現財団法人サントリー生物有機科学研究所）、基礎研究所所長 天知輝夫博士、ヘルスケア事業開発部部長 古賀邦正博士に感謝します。

また本研究の遂行にあたり多大の御指導御教示をいただきましたサントリー株式会社基礎研究所 加藤研治博士（現塩野義製薬株式会社）、財団法人サントリー生物有機科学研究所 武田禮二博士（現塩野義製薬株式会社）、サントリー株式会社基礎研究所 太田喜元博士（現近畿大学生物理工学部教授）に、そして常に有意義な御助言をいただき、種々のスペクトルを測定していただきました財団法人サントリー生物有機科学研究所 野本享資博士、小村啓博士、岩下孝博士、直木秀夫博士に深く感謝します。

有意義な御助言御討論をくださいましたサントリー株式会社基礎研究所分子育種研究室室長 久住高章博士、生物有機化学研究室室長 田中隆治博士および本研究の実施にあたり多大な御協力と御支援をくださいました財団法人サントリー生物有機科学研究所、生物医学研究所ならびに基礎研究所の関係各位そして基礎研究所分子育種研究室の各氏に御礼申し上げます。

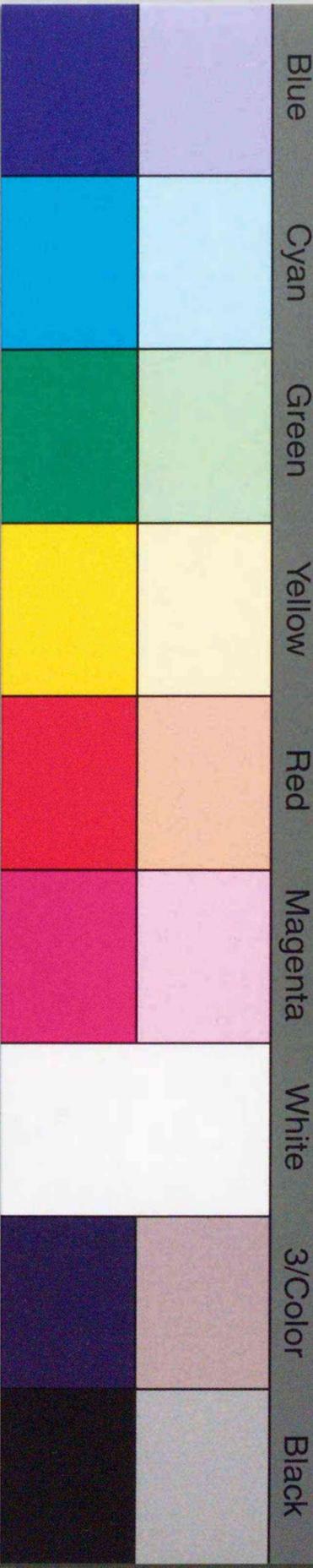
最後に、本研究の遂行ならびに本論文の作成に際しては妻 節子ならびに寛彬の深い理解と励ましによって支えられたことを付記します。



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

