The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	In vitro Study of Vinblastine Biosynthesis : Near-UV/FMN-Mediated Coupling of Vindoline and Catharanthine and Subsequent Conversion to Vinblastine
Author(s)	Duangteraprecha, Supanee
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40141
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【10】

氏　　名	Duangteraprecha Supanee（ドゥアンティラプリシャ スパニー）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学位記番号	第　13088　号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学位論文名	*In vitro* Study of Vinblastine Biosynthesis : Near－UV／FMN－Mediated Coupling of Vindoline and Catharanthine and Subsequent Conversion to Vinblastine （抗腫瘍性アルカロイドvinblastineの生合成に関する研究：FMN存在下近紫外光照射によって起こるvindolineとcatharanthineの縮合と反応生成物のvinblastineへの変換）
論文審査委員	（主査） 教授　宮本　和久 （副査） 教授　溝口　正　　教授　小林　資正　　教授　北　泰行

論文内容の要旨

ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*）は，100種類近いインドールアルカロイドを含有している。この中で，葉部で生成されるvinblastine（VLB）は，悪性リンパ腫などの治療薬として臨床の場でも広く用いられているが，含量が非常に低いことから極めて高価な物質となっている。VLBは，vindolineとcatharanthineの縮合によって生成されたiminium中間体から生合成されると考えられており，vindolineとcatharanthineの葉部における含量がVLBに比べてはるかに高いことから，この間の生合成経路の中にVLB生成の律速となる反応があると考えられる。

これまでの研究から，VLBの生産器官である葉部を特異的に分化増殖させ得る茎葉器官培養や植物葉部において，370nmに極大を有する近紫外光を照射するとVLB含量が有意に高くなり，同時にvindoline およびcatharanthineの含量が大きく減少することが見い出されている。さらに，vindolineとcatharanthineの縮合反応を試験管内で行ったところ，FMN存在下近紫外光の照射によってiminium中間体の生成が特異的に促進されることが明らかとなっている。

そこで本研究では，VLB生合成反応とその近紫外光による制御機構に関する情報を得るために，上記の非酵素的なvindolineとcatharanthineの縮合反応について，まず種々の物理的および化学的因子の影響について詳細な検討を行った。その結果，この反応には近紫外光照射とFMNが必須であること，一方Mn^{2+}は必須物質ではないが縮合反応を促進する作用を持つことが明らかとなった。各因子の最適条件を組み合わせて用いた場合，iminium中間体（3′，4′－anhydrovinblastineとして定量）収率は反応開始1分後に初期vindoline量の約50％に達した。これは以前の研究に用いた基本条件よりも有意に大きい収率であった。またこの反応の生成物は，HPLCで精製後標品と比較しながらCD，FAB－MS，EI－MS，CI－MSおよび^{1}H－NMRによって分析することにより、C18′が天然2量体アルカロイドと同じα配位である3′，4′－anhydrovinblastineであることを確認した。これらの結果から，上記の非酵素的縮合反応によって，これまでの酵素的あるいは化学的縮合では困難であった生体に近い条件での天然型iminium中間体の供給が可能となった。

そこでこの反応を利用して，生体反応同様iminium中間体を直接基質とする非酵素的および酵素的なVLBへの変換反応について調べた。まず植物材料から調製した粗抽出物によるiminium中間体のVLBへの変換について予備的な検討を行ったところ，粗抽出物を添加しない対照においても生体内還元反応の補酵素である還元型NADH存在下で，縮合反応生成物からVLBが合成されることを確認した。そこで，このNADHによる非酵素的iminium中間体－VLB

変換反応について詳しい検討を行ったところ，10mMを添加した場合に最大のVLB合成速度および収率（初期vindoline 量の7.5%）が得られること，NADPHを添加した場合にも同様にVLBが合成されるが，それ以外の還元剤では全く合成されないことが明らかとなった。またこの反応の生成物は，HPLCで精製後標品と比較しながらFAB －MS，EI－MS，CI－MSおよび^{1}H－NMRによって分析することにより，VLBであることを確認した。

一般に植物二次代謝産物の生合成反応は，ほとんどが特異的な酵素で触媒されると考えられている。VLBの生合成に関してもiminium中間体からのVLB合成は酵素反応であるという考え方が主流であるが，未だ酵素は単離精製されていない。そこで非酵素的vindoline－catharanthine縮合反応を用いて，植物材料からのVLB生成反応を触媒する酵素の検出を試みた。その結果，植物の葉部から得た粗タンパク抽出液を硫酸アンモニウム飽和濃度の20から40%で沈殿した分画で，対照のNADHのみを添加した場合よりも有意に大きいVLB合成速度が得られた。そこで，この分画からVLB生成活性を持つ物質の精製を試みたが，成功しなかった。従って，iminium中間体のVLBへの変換が酵素反応であるか非酵素反応であるか，あるいは両経路が存在するかについて結論を出すことはできなかった。

最後に，生体でのVLB生合成反応の解析に向けた基礎情報を得るために，非酵素的vindoline－catharanthine縮合反応を初発反応であるcatharanthineの酸化と，この酸化物とvindolineの結合反応に分けて速度論的な解析を行った。まず，先に行った縮合反応に対する主要因子の影響に関する結果と，新たに行ったcatharanthineの消費反応に対する各因子の影響に関する結果をもとに，catharanthine酸化反応，酸化物とvindolineの結合反応および生成物であるiminium中間体の分解反応について，反応モデルを立てた。これを用いて基本条件および最適化条件における各アルカロイド量の経時変化のシミュレーションを試みたところ，いずれの条件でも測定値と比較的良く一致した。この速度論的な解析により，近紫外光とFMNはcatharanthineの酸化力の供給源となり，一方Mn^{2+}は主にcatharanthine酸化物とvindolineの結合反応を促進することによってiminium中間体の収率の向上に寄与していることが示唆された。

以上本研究においては，非酵素的vindoline－catharanthine縮合反応は，抗腫瘍性アルカロイド，VLBの生合成反応を解析するための有力な手段であることが示され，さらにこの反応を用いた種々の検討により，これまで明らかにされていない生体内におけるVLB生合成制御機構の解明に向けての基礎情報が得られた。

論文審査の結果の要旨

Vinblastine （VLB）は，抗腫瘍性アルカロイドの一種であり，ニチニチソウ（*Catharanthus roseus*）の葉部でvindolineとcatharanthineから合成される。本研究は，近紫外光によるVLB生合成の制御機構に関して詳細な検討を行い，その反応の律速因子を解明するとともに，VLB生合成反応機構の研究の基礎情報を得ることを目的としている。

最初に，vindolineとcatharanthineの*in vitro*縮合反応がFMN存在下，近紫外光を照射することによって，特異的に促進されることを認めた。さらに，この非酵素的縮合反応によって供給される中間体を基質とする非酵素的反応について詳細な検討を加え，縮合反応物にNAD(P)H を添加することによって天然型VLBが合成されることを明らかにするとともに，植物葉部の抽出物に合成活性を促進する物質が存在することを示唆した。また，catharanthine酸化反応，その酸化物とvindolineの結合反応，および生成物であるiminium中間体の分解反応などを組み込んだ反応モデルに基づいた速度論的な解析により，植物において行われている生合成反応の機構解明への新たなアプローチを提示した。

著者は，これらの反応生成物が天然型であることを確認している。したがって，ここで示された非酵素的vindoline －catharanthine縮合反応は，天然型の基質の供給を可能にし，VLB生合成制御機構を解明する上において重要な意義を持つものである。以上によって，本研究は学位に値すると認められる。