



Title	近紫外光照射下でのニチニチソウCatharanthus roseusにおける抗腫瘍性二量体アルカロイド生合成機構の解析と医薬品生産への応用
Author(s)	浅野, 麻実子
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57941
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

【6】

氏 名	あさの まみこ 浅 野 麻 実 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 2 3 7 4 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学 位 論 文 名	近紫外光照射下でのニチニチソウCatharanthus roseusにおける抗腫瘍性二量体アルカロイド生成機構の解析と医薬品生産への応用
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平 田 収 正 (副査) 教 授 那 須 正 夫 教 授 高 木 達 也 教 授 八 木 清 仁

論 文 内 容 の 要 旨

植物は多種多様な二次代謝物質を生成するが、その生理機能が理解されているものはわずかである。ニチニチソウが産生する二次代謝物質であるDIAsもその一つである。DIAsは、前駆体であるcatharanthineとvindolineが縮合することにより生成されるが、初発反応であるcatharanthineの酸化が引き金となることが明らかとなっている。これまでの研究からcatharanthineの酸化反応は、ペルオキシダーゼによって触媒されることが報告されている。一

方、平田らは、植物体内のDIAs含量が近紫外光特異的に増加することを明らかにした。更に*in vitro*においては、FMN及びマンガンイオンが存在下において近紫外光特異的にDIAs合成反応が非酵素的に進行すること示した。著者は、植物体内での近紫外光によるDIAs生成反応は、これまでに知られていたペルオキシダーゼによる酵素依存的な反応とは別の非酵素的な反応ではないかと推測した。その場合、植物体内での近紫外光によるDIAs生成は、近紫外光ストレスに対する応答の一つとして捉えることができると考えた。そこで第一章では、本DIAs生成経路の非酵素的な反応の存在について解析を行った。まず*in vitro*において、これまでに知られているペルオキシダーゼによる酵素反応とFMN、マンガンイオンを介した近紫外光による酵素非依存的な反応のDIAs合成系を作成し、酵素的な反応が起こらず、酵素非依存的な反応が起こる温度条件を決定した。次にこの温度条件において、ニチニチソウの葉に近紫外光を照射しDIAs含量の変動を解析した。更に植物体内でのDIAs生成が活性酸素(reactive oxygen species, ROS)により影響されるか検証した。

その結果、植物体内での近紫外光依存的なDIAs含量の増加は、酵素反応が抑制されていると考えられる低温条件においても25℃と同程度に見られた。この結果から、植物体内での近紫外光依存的なDIAs含量の増加には、非酵素的な反応の寄与が示唆された。またROSが発生すると考えられるパラコート及びROSそのものである過酸化水素を処理した場合においては、DIAs含量の増加が見られなかったことから、ROSが直接影響を及ぼさないことが考えられる。以上から、近紫外光照射で促進されるDIAs生成メカニズムは、ペルオキシダーゼを介した酵素的な縮合反応が促進されたのではなく、ペルオキシダーゼによらない非酵素的な反応の寄与が大きいことが示唆された。仮に近紫外光によるDIAsの生成が非酵素的な反応であるならば、フラビン等植物体内に存在する光受容体の関与が考えられる。またcatharanthineは、フラビンによって生じる光酸化力を酸化により消去していると考えることができる。つまり、光酸化力により細胞内にROSが発生するのを抑制することに繋がり、これまでによく知られているROS消去機構より一歩先に光酸化ストレス応答として機能すると考えられる。

また第二章では、DIAs医薬品原料生産の低コスト化を目的とし、FMN、マンガンイオン存在下での近紫外光照射によるAVLB合成反応をニチニチソウの粗抽出液に適用した。DIAsは植物体内での含量が極微量であるため抽出、精製コストが高価であるが、現行法に上回る他の生産方法が確立されていないのが現状である。一方で、平田らが報告した近紫外光による*in vitro*でのDIAs合成は、酵素による合成と比較し安価なフラビン、マンガンイオンを使用する。また、DIAs医薬品生産過程で抽出されるニチニチソウからの粗抽出液には高濃度のcatharanthine とvindolineを含有しており、これらを材料としてFMN、マンガンイオンによる近紫外光依存的なDIAs合成を行いDIAsの収率を上げることができれば、この反応を利用して、DIAs医薬品をより低コストで生産することができると考えられる。更に、FMN、マンガンイオンによる近紫外光依存的なDIAs合成において合成されるAVLBは、vinblasntineの前駆体となるだけでなく、非小細胞肺ガンや再発乳ガンにおいて適用されているvinorelbineや、現在治験段階にあるvinflunineといったDIAs誘導体医薬品の合成原料でもあり、今後より安定した供給が求められている。そこで、DIAs医薬品原料生産の低コスト化を目的とし、その第一段階として、反応に用いる有機溶媒の種類、濃度を検討した。有機溶媒を用いることにより、粗抽出液をそのまま反応に適用できるだけでなく、基質の濃度を高めることが可能でありより効率良くDIAsを得ることが可能となる。次に、決定した有機溶媒を用いてFMN、マンガンイオン、光強度等の反応条件を変動させ、最適条件を決定した。更にその条件をもとに、catharanthine、vindolineを含有したニチニチソウ葉部の粗抽出液を用いてAVLB合成を試みた。その結果、1.5 mM catharanthine、vindolineから最も収率高くAVLBを合成するための条件は、10% メタノール溶液において、1 mM FMN、10 mM塩化マンガン存在下、20 W/m²の近紫外光を20分照射であることが明らかとなった。その場合の収率は59%であった。またこの条件において、粗抽出液からのAVLB合成を試みた。また、合成されたAVLB濃度が最大となる時間は、粗抽出液では40分、更に液－液抽出を行うと10分であり、このときのvindolineの初期濃度に対

粗抽出液では40分、更に液一液抽出を行うと10分であり、このときのvindolineの初期濃度に対する収率は、それぞれ11%、22%となった。

本結果は、DIAs医薬品原料の新たな生産方法へ応用できる可能性を示している。その応用に向けて、今後より詳細な条件検討を行うことが必要であると考えられる。本検討において、1 mMまではFMN の濃度が上昇するにしがって収率が上昇することが確認された。このことから、FMNよりも更に溶解度の高いフラビンを選択することによって、収率を向上できる可能性がある。また、光強度が大きくなるにつれて収率が上昇することが確認されたことから、レーザー光やLEDを光源とし光強度をより大きくすることができれば、更なる収率の向上が期待できる可能性がある。また、粗抽出液に液一液抽出を行って夾雑物を除去することによりAVLB収率、反応速度が上昇することが確認された。本反応は光酸化反応であることを考慮すると、光を遮る物質の除去が必要であることが推測される。更に、フラビンやマンガンイオンを回収し、再利用することでより低コスト化が可能であると考えられる。以上から、本研究はDIAs医薬品生産への応用へ向けた第一歩であり、今後更なる改良を加えることで、DIAs医薬品原料の新たな生産方法の確立が実現できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

博士論文「近紫外光照射下でのニチニチソウ *Catharanthus roseus*における抗腫瘍性二量体アルカロイド生成機構の解析と医薬品生産への応用」では、臨床の場で抗がん剤として重要なニチニチソウ由来の二量体インドールアルカロイドの生成機構の解明と、これらのアルカロイドの効率的な生産方法の確立を目的とした研究を行った。まず、アルカロイドの生成部位である植物体葉部と、生成反応を試験管内で再現した反応系での当該二量体アルカロイド合成に対する温度の影響を詳細に検討することにより、これまでの説を覆す非酵素的な生成経路が存在することを明らかにした。また、この非酵素的な反応を利用して、当該二量体インドールアルカロイドの化学合成原料となる前駆体アルカロイドの効率的かつ安価な新規製造法を確立することに成功した。

これらの研究成果は、学術的にも高いレベルにあり、さらに今後の抗がん剤治療の進展に大きく貢献する有用な知見と言える。また、本成果の一部は、原著論文としてすでに英文学術雑誌から受理されている。

以上、論文審査により、本論文は学術的な観点および今後広範な応用が期待できる実用的な応用研究という観点から、非常に優れた研究であることを確認し、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程の博士論文に値するものと判断するに至った。