

ふりがな バイ ジョウ
氏 名 白 皎

学 位 博 士 (工 学)
学 位 記 番 号 新大院博 (工) 第 190 号
学位授与の日付 平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

博士論文名 **Studies on the Production of Biologically Active Compounds by Plant Cell Culture**
(植物培養細胞による生理活性物質の生産に関する研究)

論文審査委員 主査 安東 政義 教授
 副査 萩原 久大 教授
 副査 鈴木 敏夫 教授
 副査 鎌田 正善 教授
 副査 谷口 正之 教授
 副査

博士論文の要旨

タキソールはイチイから単離され、癌細胞微小管の脱重合阻害作用により進行性卵巣癌、乳癌、肺癌などに対し、有効な制癌剤である。また、taxinine NN-1 などの非 taxol 型の taxoid は多剤耐性癌克服活性を有する。本論文は、植物培養細胞による taxol 及び生理活性 taxoid の効率的生産条件の解明、生産されたタキソイド類およびその誘導体の構造と生理活性の相関を明らかにすることを目的としている。

第一章では『イチイ培養細胞を用いて生理活性 taxoid の生産』について述べている。入手容易な日本産イチイ(*Taxus cuspidata*) から、若い茎及び針葉部を外植体として用い、カルスを誘導した。このカルスは改変した Gamborg B5 培地に NAA 0.5 mg/L を添加した条件で継代し続けると、良い増殖性を示したので、このカルスを基準として用い、種々の培養条件により生産実験を行った。各条件下で得られたカルスにつて、その生産物及び生産量の分析を行ったところ、20 種類の taxoid 化合物及び 12 種類の abietane 化合物を得た。その中で、taxinine NN-11 (12), abietane 誘導体 22, 25, 30-32 は新規化合物であり、それらの構造は主に NMR などのスペクトルの解析により決定された。カルスから得られた二次代謝物の種類及び収率は培養条件及び成長状態により大変異なっており、ジャスモン酸メチルや、フェニルアラニン、酢酸などの添加はタキソイドの生産を促進し、 β -cyclodextrin や光照射などの条件ではアビエタン類の生合成ルートを活性化することが分かった。カルスから単離された化合物 9,12,17,19 は基準物質 Verapamil より強い多剤耐性癌克服活性を示した。特に、新規化合物 12 は Verapamil に比較し 191%の活性を示した。また、新規化合物 12 は 39 種類のヒト培養癌細胞パネル (HCC パネル) により新規作用機作をもつ有効物質であると期待される。新規化合物 12 は高い活性を示したため、イチイカルスによるその増産を試みたところ、KTOS が存在した条件下で、メチルジャスモン酸を 200 μ M 添加すると、12 は 0.0631% と良い収率で得られた。

第 2 章では、『Taxuyunnanin C 及びその誘導体の構造修飾』について述べている。Taxuyunnanin C (16) 及びその誘導体 (17-20) は日本産イチイから誘導したカルスの中で dry callus に対し、約 1.5% 含まれ、特に液体懸濁培養の場合、主成分として 16 は 299.0 mg/L という高収率で得られた。しかし、これらの化合物は生理活性が弱いため、その 2, 5, 7, 9, 10, 14 位により嵩高い官能基へ変換後、生理活性を増加させることを期待して、主に化学反応により構造修飾を行った。まず、Taxuyunnanin C (16) を

加水分解し、さらに 2, 5, 10, 14 位にそれぞれベンゾイル化、シンナモイル化及びアセチル化をして、目的物 52-54, 61-67 を得た。次に従来の化学反応により得ることが困難な 7, 9, 10 位などの methylene 炭素の酸化は植物培養細胞及び微生物を用いて試みた。Taxuyunnanine C (16) 及びその誘導体 19 と 20 を微生物 *Absidia coelurea* により変換すると、主に 6 位、7 位、9 位および 10 位の水酸化化合物 33-39 が生成された。さらに、シンナモイル化して、目的物 55-60 を得た。最後に、14-ydroxyl taxuyunnanine C (43) の 14 位にある水酸基の還元を行い、目的物 69 を得た。

第 3 章では『Taxoid 化合物の構造活性相関』についてのべている。得られた Taxoid 化合物についてヒト培養肺繊維芽細胞 (WI-38), から誘導した肺悪性腫瘍 (VA-13) 及び肝臓癌細胞 HepG2 に対する増殖阻害活性 (IC_{50} 値) を、Taxol 及び Adriamycine と対照し抗癌活性を測定した。また、多剤耐性がん細胞 2780AD を用いて、各試験化合物存在下で細胞内に取り込まれた Vincristine 或いは Calcein AM の量を測定し、基準物質 Vepamapil と比較し、MDR 克服活性を検定した。それぞれに C-10, 9, 7 位にシンナモイル基を持つ化合物 53, 56, 59 は Calcein AM と併用し、多剤耐性癌細胞 2780AD10 に対して基準物質 Verapamil より、高い活性を示した。5 位にシンナモイル基を持つ化合物 54 は肝臓癌細胞 hepG2 に対して Taxol と同程度の活性を示した。それぞれに C-10, 9, 7 位に cinnamoyl 基を持つ化合物 53, 56, 59 は制癌剤 calcein AM と用い、多剤耐性癌細胞 2780AD10 に対して基準物質 Verapamil より高い活性を示した。また、53 は 39 種類のヒト培養癌細胞パネルにより有効濃度が高いが、Differentialgrowth inhibition が認められ、COMPARE marginal ($0.5 < r < 0.75$) なので作用機作がユニークである可能性がある。

博士論文の審査要旨

本論文は 3 章から成り立っている。第 1 章ではイチイ培養細胞を利用して、タキソールおよびその類縁体の生産する事を目的として研究を行った経過とその生成物の収量、生産条件等を詳細に検討をしている。Gamborg B5 培地に NAA 0.5 mg/L を添加した条件で継代し続け、良い増殖性を示すカルスを基準カルスとして、用いている。このカルスは大きく分けて、4 つのグループの化合物を生産している。①14-オキシタキソイド類、②タキソールとその類縁体、③13-オキシタキソイド類、④アビエタン類である。この成長の良いカルスの主生成物は①の 14-オキシタキソイド類であり、これにジャスモン酸メチルルを加えると、②のタキソールおよびその類縁体の収率は著しく改善され、タキソールに至る生合成中間体である③の 13-オキシタキソイド類の収量も向上する。一方この成長の良い基準カルスの培地に β -シクロデキストリンを加えるか、光照射下に培養を行うと④のアビエタン類の生産が促進される。この過程で、新規化合物 TaxinineNN-11 (12) を単離しているが、これは多剤耐性癌克服活性と活性は弱いながら新規作用機作に基づく制癌剤である事を明らかにしている。またこの 12 培地にオリゴサッカライド (KTOS) を加えた条件下で、ジャスミン酸メチルの量を増加させるとその生成量は増加する事を見出している。

第 2 章では①の 14-オキシタキソイド類の加水分解とそれに続く水酸基のアシル化反応により 14 位、2 位、5 位、10 位の構造修飾された化合物を得ている。①の 14-オキシタキソイド類の生物変換反応により、7-位、6-位、9-位に水酸基が新たに導入された化合物を得、さらにこれらのアシル化による化学修飾反応により、14 位、2 位、5 位、6 位、7 位、9 位、10 位の構造修飾された化合物を得ている。さらに 14-オキシ体の Barton 還元反応により、14-デオキシ体を得ている。

第 3 章では、第 1 章および第 2 章で得られた Taxoid 化合物の構造と活性相関に関して述べている。得られた Taxoid 化合物についてヒト培養肺繊維芽細胞 (正常細胞モデル、WI-38), から誘導した肺悪性腫瘍 (VA-13) 及び肝臓癌細胞 HepG2 に対する増殖阻害活性 (IC_{50} 値) を、また、多剤耐性癌細胞 2780AD を用いて、MDR 克服活性を検定している。その結果、それぞれに C-10, 9, 7 位にシンナモイル基を持つ化合物は Calcein AM と併用し、多剤耐性癌細胞 2780AD10 に対して基準物質 Verapamil より、高い活性を示す事を見出している。5 位にシンナモイル基を持つ化合物 54 は肝臓癌細胞 hepG2 に対して Taxol と同程度の活性を示し、また Verapamil と同程度の耐性癌克服活性を示した。また、53 は 39 種類のヒト培養癌細胞パネルにより有効濃度が高いが、Differentialgrowth inhibition が認められ、COMPARE marginal ($0.5 < r < 0.75$) なので作用機作がユニークである可能性がある事を見出している。

以上の学位論文の審査の結果は博士 (工学) として十分な内容を備えているものと判断した。