

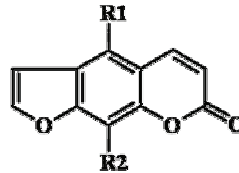
# 抗菌性低分子化合物 furanocoumarins の

## ハマボウフウ培養組織における生合成に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻 石川 彩

### [背景]

Furanocoumarins (FCs)(図 1)は現在医薬品として、尋常性白斑、尋常性乾癬、菌状息肉症などの皮膚疾患の治療に用いられる PUVA



**Furanocoumarin**  
R1=R2=H : psoralen  
R1=OMe R2=H : bergapten  
R1=OH R2=H : bergaptol  
R1=H R2=OMe : xanthotoxin  
R1=H R2=OH : xanthotoxol

図1 furanocoumarins の構造

(psoralen plus ultraviolet A)療法において、UVA 感受性を増強するために使用されている。PUVA 療法の主な作用機序は、FCs が UVA を吸収して示す DNA 合成阻害作用や免疫反応の抑制と言われている。海外では皮膚 T 細胞リンパ腫の治療法として血液の体外循環と組み合わせて白血球のみに UVA を照射する方法が認可されたり、輸血用血液製剤(血小板、血漿)の滅菌、ウイルス不活化法として使用されるなど利用の幅が広がっている。さらに、FCs は高度に分化した T および B 細胞の一部で高発現しているカリウムチャンネルのひとつ Kv1.3 を阻害し、これらの細胞による自己免疫反応を抑制する可能性が示され、新たな治療法としての可能性が期待されている。

医薬品として今後更なる需要の可能性が期待されているものの、FCs は植物由来成分で、化学的な全合成は実用化には至っておらず、現在も商業的には植物からの抽出に依存している。しかし生育地域の環境の変化等の影響で、最近、植物資源の枯渇が特に危ぶまれている。したがって、安定した FCs の供給のために、環境条件等の影響を受けない、植物培養組織を利用した生産方法が有効と考えられる。また、現在 FCs の生合成の機構には未解明な部分が多く、効率のよい FCs の生産を目指すには生合成機構の解明も不可欠と考えられる。

### [目的]

本研究では、セリ科の *Glehnia littoralis* (ハマボウフウ)を用い、FCs 生産材料としての利用の可能性を明らかにするため、種々の培養組織を確立し、FCs の生産に適した材料および条件の検討、並びに FCs 生合成機構の解明を行った。

[結果および考察]

第1章で、培養細胞は通常はFCsを生産しないが、yeast extract(YE)の添加により、白色細胞がFCsのひとつである bergapten(Ber)を誘導生産し、ほぼ全てを培地に放出することを明らかにした(図2)。生合成経路の最初の酵素 phenylalanine ammonia-lyase (PAL)の発現及び酵素活性はそれぞれ6、12時間後にピークに達し、Berの生産は24時間後ごろ最大に達したことから、FCsの生合成が *de novo* で誘導されることを示した。

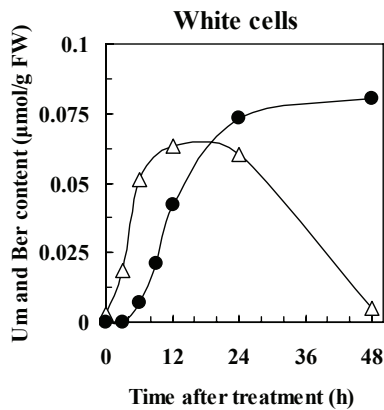


図2 白色細胞における YE 処理後の Ber(●)および Um(△) 生産の経時変化

液体培地にて培養10日目の白色細胞に10g/lになるようにYEを添加し、培養した。3,6,9,12,24,48時間後に細胞と培地を分離回収し、培地に含まれるUm、Berを抽出しHPLCにより定量分析した。

第2章では白色細胞に非誘導条件下でBerの生合成中間体を添加し、中間体のBer生産への利用を検討した。その結果、psoralen(Pso)と bergapton (Bol) が Ber に変換される事を明らかにした。遺伝子の発現、酵素活性、阻害剤を用いた実験により、BolをBerに変換する酵素 bergapton O-methyltransferase(BMT)は、誘導ではなく常発現していることを初めて証明した(図3)。これにより、培養細胞をバイオリクターとして用いれば、中間体からBerを生産できることを示した。

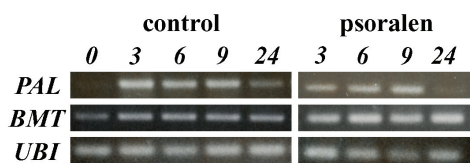


図3 白色細胞における Pso 添加時の PAL および BMT の発現

Pso 添加後 3,6,9,24 時間の細胞から total RNA を抽出し、RT-PCR により PAL、BMT の発現を測定した。コントロールとして polyubiquitin(UBI)を用いた。特異的なプライマーの設計のため、ハマボウフウの PAL、BMT、UBI(Genbank accession nos. AB374257, AB363638, AB363637)のクローニングを行い実験に用いた。なお、Pso 添加のコントロールとして DMSO を用いた。

第3章では培養細胞よりも分化した、培養器官を用いて、FCs 生産能を調べた。器官でも、通常はFCsを生産せず、YE 処理により初めてFCsを生産することを

培養葉を用いて明らかにした(図 4)。葉を用いた場合、生産のピークは遅くなるものの、Ber と xanthotoxin (Xan) を生産し、白色細胞と比較して FCs の生産量が約 2 倍に増加した。

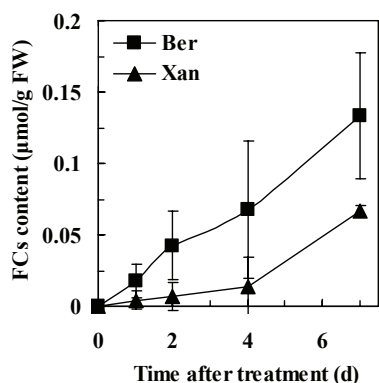


図 4 葉における YE 処理後の Ber(■)および Xan(▲) 生産の経時変化

液体培地で前培養した葉に 10g/l になるように YE を添加し、培養した。1,2,4,7 日後に組織と培地を分離回収し、培地に含まれる FCs を抽出し HPLC により定量分析した。

培養根の系では FCs を生産させるのに YE は効果がなかった(第 3 章)が、第 4 章で、ascorbic acid (AsA)が極めて有効である事を初めて明らかにした(図 5)。AsA の有効濃度は 10~40 mM で、培養葉に対しても YE 処理よりも FCs を高生産させることを明らかにした。

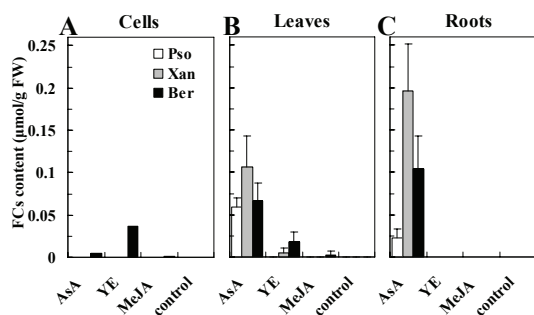


図 5 AsA、YE、MeJA(methyljasmonate)処理後 24 時間の(A)白色細胞 (B)葉 および (C)根 で生産された FCs の培地における含量

白色細胞、葉および根にそれぞれ 20 mM AsA、10 g/l YE、0.1 mM MeJA となるように添加し、24 時間培養した後、回収した培地に含まれる FCs を抽出し HPLC により定量した。コントロールとして同量の滅菌水(AsA、YE)または DMSO(MeJA)を用いた。

本研究により、ハマボウフウ培養組織を FCs の生産に利用できる可能性を示した。培養細胞は YE 処理で *de novo* で Ber の生産を誘導するだけでなく、恒常的に Pso を Ber に変換できることを示した。また、器官培養した根や葉では AsA 処理で特異的に、FCs を高生産できることを初めて明らかにした。生産された FCs はどの培養組織でもほぼ培地に放出されるため、培地を回収すれば FCs を集めることが可能であり、培養組織を再利用することで、バイオリアクターによる大量生産への応用が可能と考えられる。

以上、本研究の結果は、いずれも今後の FCs の生産と、これを用いた医療に貢献できると期待される。