

数種の植物成分の生合成におけるシトクロム P450 酸化酵素の反応と機能

井上 謙 一 郎

Cytochrome P450 Enzymes in Biosyntheses of Some Plant Secondary Metabolites

Kenichiro INOUE

Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, Japan

(Received September 27, 2004)

Secologanin, a secoiridoid glucoside, is a pivotal terpenoid intermediate in the biosynthesis of biologically active monoterpenoid indole alkaloids such as reserpine, ajmaline, and vinblastine which are biosynthesized *via* strictosidine, an alkaloidal glucoside, formed from secologanin and tryptamine. In secologanin biosynthesis, the oxidative cleavage process of loganin to secologanin and the hydroxylation of 7-deoxyloganin to loganin have remained unknown enzymologically and mechanistically. Cornoside is a unique glucoside with 4-hydroxy-2,5-cyclohexadien-1-one (benzoquinol) ring and is widespread in families such as Cornaceae, Oleaceae, and Scrophulariaceae but its biosynthesis, especially the oxidative process, remain to be investigated. Shikonin is a red naphthazarin pigment derived from the roots of *Lithospermum erythrorhizon* and produced biotechnologically by cell cultures. Its biosynthesis including the production regulation mechanism has been investigated in detail. However, the naphthazarin ring formation process, probably starting with the hydroxylation of the side chain of geranylhydroquinone, a key intermediate at the late stage of shikonin biosynthesis, remained unknown. In the present review, cytochrome P450 monooxygenases involved in the biosyntheses of three structurally and biosynthetically interesting compounds, secologanin, cornoside, and shikonin, are described together with the results of previous and recent biosynthetic studies. The biosyntheses of related compounds are also discussed.

Key words—cytochrome P450; plant cultured cells; biosynthesis; iridoid glucoside; benzoquinol glucoside; naphthoquinone

はじめに

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼは動植物から微生物に至るまで広く生物界に分布していることが知られている。動物において薬物やステロイドホルモンの代謝に P450 が関与することが示されたことより、まず個体及び無細胞系レベルでそれらの機能が、続いて P450 の酵素化学的性質が分子レベルで解析され、1980 年代後半遺伝子工学技術の発展に伴い DNA レベルでの研究が急速に進み、多くのデータが蓄積され、P450 がスーパーファミリーを形成していることが明らかになった。その後、あまり研究対象とされなかった微生物や植物の P450 の研究が徐々に増加していった。

植物が生産する 2 次代謝産物は 20 万種を超すとされており、それらの生合成における酸化反応には、多くのシトクロム P450 モノオキシゲナーゼが関わっていると推定されている。P450 モノオキシゲナーゼはヘム酵素であるシトクロム P450 を末端とする複合酵素系であることと植物における発現量が低いことから、植物 P450 蛋白質の酵素研究は少なく、現在でも研究された植物種は限られている。最近の分子生物学や分子遺伝子学的技法の進歩により、P450 クローンの単離や EST (Expressed Sequence Tags) クローンを利用した遺伝子レベルの研究は植物 P450 遺伝子や、それらの遺伝子にコードされた植物 P450 蛋白質の研究が可能になってきた。しかし、1 つの植物には多くの P450 酵素を含んでいるから、その酵素の基質となる 2 次代謝の生合成中間体を特定し、その化合物を入手することは困難である。そのために P450 蛋白質の生理学的役割を解明することは現在でも難しい問題である。実

岐阜薬科大学 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

現住所: 〒546-0033 大阪市東住吉区南田辺 5-12-10

e-mail: inoueken@s9.dion.ne.jp

本総説は、平成 15 年度退官にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

際、本総説でも触れる *secologanin synthase* はわれわれがその機能を明らかにした酵素であるが、本酵素のクローンは異なる起源植物よりわれわれの研究に先立つこと 10 年前には単離されていた。しかしその機能は不明のままであった。このことから上述の経緯は理解していただけたと思う。

本稿では、イリドイド配糖体 *secologanin* の生合成、ベンゾキノール配糖体 *cornoside* の生合成及びナフトキノン誘導体 *shikonin* に至る生合成において重要な生合成段階に関与している酸化酵素の機能について、過去の研究の経緯やこれらの生合成経路における前後のステップとの関係とともに紹介し、それぞれの単報では言及し得なかったことを合わせ検討し、派生する生合成諸問題にも言及したい。

1. イリドイド配糖体生合成におけるロガニンのセコロガニンへの酸化的開裂機構

イリドイドは cyclopentan-[c]-pyran 骨格を持つモノテルペノイドであり、¹⁾ 大部分配糖体として存在する。その発見は古く 19 世紀後半に遡るが、構造が明らかにされたのは前世紀中頃である。その後 cyclopentane 環が開裂したセコイリドイド類も見出され、現在ではセコイリドイドも含めイリドイドは膨大な数に上る (Fig. 1)。またこれらは双子葉植物、特に合弁花類に多く分布していることが知られている。²⁾

イリドイドの構造が確立された数年後には、早くもイリドイドの生合成研究が始まった。インドールアルカロイドの非トリプトファン部分とイリドイドの構造上の類似性からインドールアルカロイドの生合成研究も平行して行われた。イリドイドの起源については、当時テルペノイド生合成の唯一の前駆物質であるメバロン酸 (MVA) を投与することによって検討され、イリドイドがモノテルペノイドであることが証明された。³⁾ しかしながら 1990 年代後半に至り、テルペノイド生合成には 1-deoxy-D-xylo-

ulose 5-phosphate (DOXP) を起源とするもう 1 つの経路の存在が確立された。⁴⁾ 最近 Eichinger らによりイリドイド配糖体 *loganin* の生合成起源について再検討され、*loganin* が非メバロン酸経路 (DOXP 経路) により生合成されることが報告された。⁵⁾ さらに彼らは放射活性メバロン酸が取り込まれたという以前の実験結果は細いながらもメバロン酸経路も存在するのであろうと解釈している。

鎖状モノテルペノイド以後のイリドイド生合成経路に関しては、現在までに化学的あるいは生物学的に調製した前駆物質を種々の植物あるいは培養細胞へ投与した実験の結果に基づき多くの知見が得られている。^{6,7)} それらの結果を Fig. 2 にまとめた。すなわち、DOXP に由来する (副経路として MVA に由来する) dimethylallyl diphosphate と isopentenyl diphosphate より生成する geraniol が酸化され 9-hydroxygeraniol となり、さらに酸化されて 10-oxogeraniol が生成する。このジアルデヒドが閉環酵素により環化生成物 *iridodial* が生成し、このものは hemiacetal へと変形し、数段階の酸化過程を経て deoxyloganic acid aglucone が生成する。このアグリコンが配糖化反応、さらに 7 位の水酸化反応を受け *loganic acid* が形成される。このメチルエステル *loganin* の cyclopentane 環の開裂により *secologanin* が生成する。この *secologanin* と tryptamine とが縮合したのち、さらに種々の反応を経て各種インドールアルカロイドが生成すると推定されている。

モノテルペノイドインドールアルカロイド [当初単にインドールアルカロイドと呼ばれていたが、その後非トリプトファン部分がモノテルペノイド (イリドイド) に由来するものに対して、この名で呼ばれるようになった] は主にキョウチクトウ科、マチン科、アカネ科などの植物に分布している。本群のアルカロイドには生理活性を有するものが多く知られており、天然由来薬物として利用されている (Fig. 3)。しかし、植物におけるこれらの含量は非常に低い。この問題を解消すべく、化学合成のほか植物培養細胞を用いたインドールアルカロイド高生産の試みが種々行われてきたが、現在までのところ必ずしも成功したとは言い難い。その原因はモノテルペノイド部分の低生産性にあることが報告されている。⁸⁾

モノテルペノイドインドールアルカロイドの生合

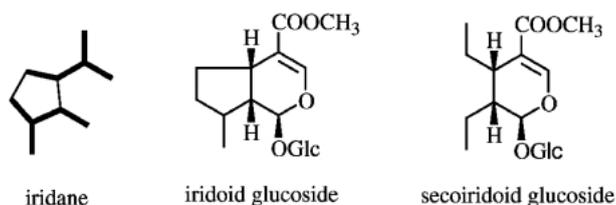


Fig. 1. Skeletons of Iridane, Iridoid and Secoiridoid Glucosides

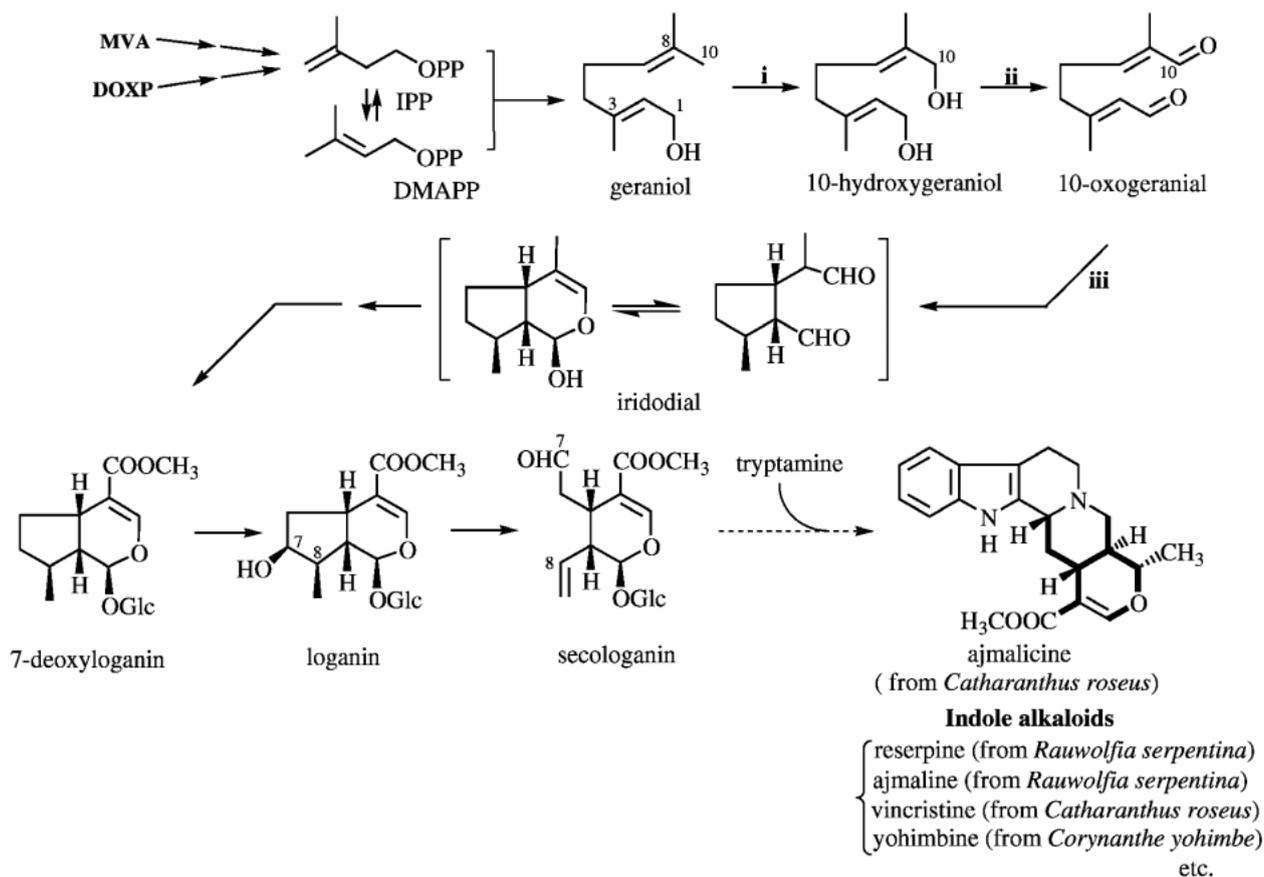


Fig. 2. Proposed Biosynthetic Pathway of Secologanin

i: geraniol 10-hydroxylase, ii: acyclic monoterpene primary alcohol dehydrogenase, iii: 10-oxogeraniol cyclase.

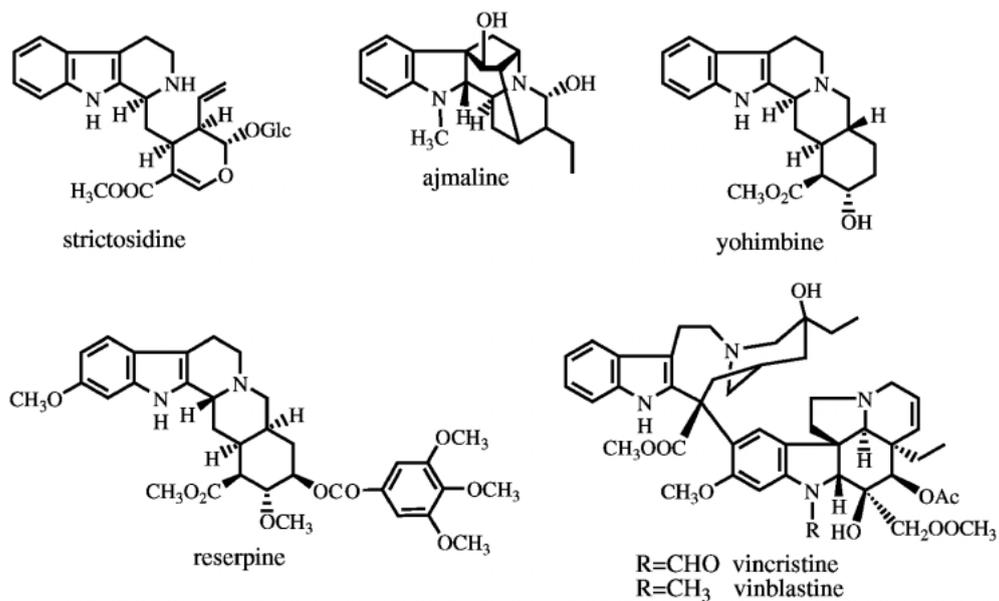


Fig. 3. Monoterpenoid Indole Alkaloids

成は現在までに詳細に研究されてきており、またこの生合成に関与する酵素の研究も多く行われてきている。これに反し、イリドイド配糖体自身及びインドールアルカロイドのモノテルペノイド部分の生合成に関与する酵素研究の知見は少なく、現在までに4種の酵素 geraniol 10-hydroxylase (from *Catharanthus roseus*;⁹⁾ from *Nepeta racemosa*¹⁰⁾, acyclic monoterpene primary alcohol dehydrogenase (from *Rauwolfia serpentina*;^{11,12)} この酵素は 10-hydroxygeraniol より 10-oxogeraniol あるいは 10-hydroxygeranial への脱水素反応と両モノアルデヒドより 10-oxogeranial への酸化を可逆的に触媒する), 10-oxogeranial cyclase (from *Rauwolfia serpentina*;¹³⁾ 10-oxogeranial の iridodial への閉環反応を触媒する酵素), loganic acid methyltransferase (from *Catharanthus roseus*¹⁴⁾) の存在が確認されているに過ぎない。これらの酵素の起源植物は異なっており、1つの植物について系統的に研究されたものはない。

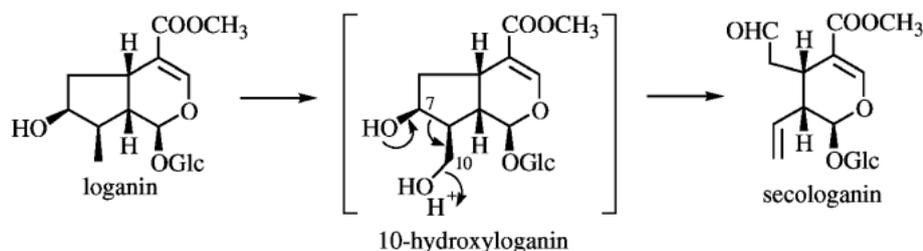
このような背景のもと、われわれは種々のセコイリドイド配糖体の重要な生合成中間体であり、かつインドールアルカロイド生合成における最後のモノテルペノイド中間体である secologanin の生合成を解明すべく研究を進めてきた。Secologanin の生合成に関しては、古く 1967 年に Battersby が secologanin は loganin を経て生合成されることを報告す

るとともに、両化合物の間に 10-hydroxyloganin が介在することを提唱した (Fig. 4(a)).¹⁵⁾ この仮説は長い間証明されないまま、そのエレガントな開裂機構を含め受け入れられてきた。

しかしこの機構は 1980 年の初めにわれわれのグループと独英連合の研究グループにより否定された。われわれは 10-hydroxyloganin の合成を企画し、クチナシ成分 geniposide を出発原料として種々試行錯誤したのち、10-hydroxyloganin を調製することに成功した。¹⁶⁾ さらにそのトリチウム標識体を合成するとともに、生合成中間体であることが確立している化合物 loganin の標識体も合成し、両者の取り込みを比較検討した結果、10-hydroxyloganin は secologanin の真の中間体ではないとの結論に達した。¹⁷⁾ 同時に行った同位体希釈実験もこの結果を支持した。ほぼ時期を同じくして行われた Tietze と本生合成機構提唱者の Battersby の共同研究の結果も同じであった。¹⁸⁾ その後われわれはもう1つの中間体 6-hydroxyloganin を経る機構 (Fig. 4(b)) を想定し、その標識体を4種の植物に投与することにより、その真偽を検討したが、この仮説も否定された。¹⁹⁾

このように methylocyclopentane 環のイオンの開裂による secologanin の生成機構がすべて否定されたので、残る機構としては同環のラジカル的開裂反

a) The pathway via 10-hydroxyloganin



b) The pathway via 6-hydroxyloganin

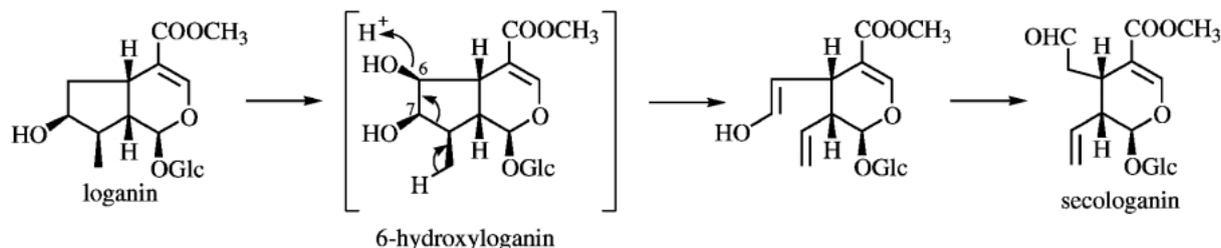


Fig. 4. Two Hypothetical Ionic Mechanisms for the Cleavage of Cyclopentane Ring of Loganin Leading to Secologanin

応を想定した。しかし、この開裂機構を基質レベルで証明することは困難であり、酵素レベルでの実験が不可欠である。

そこで、研究材料として常時入手でき、かつ酵素を容易に抽出し易い植物培養細胞を用いることとし、まず植物のカルス化、培養細胞の作成から始めた。植物素材として、loganin のほかに、secologanin dimethylacetal, vogeloside などの secologanin 誘導体を生産するスイカズラ *Lonicera japonica* Thunb. を使用した (Fig. 5).²⁰⁾

スイカズラ植物の無菌処理した枝より 10 μ M naphthaleneacetic acid と 10 μ M 6-benzylaminopurine を含む Murashige-Skoog 寒天培地上でカルスを誘導した。このカルスより同 MS 液体培地中で懸濁培養細胞を作成した。しかし調製した培養細胞は、残念ながら、植物自身が生成している secologanin 誘導体は生産しなかった。ここで、この培養細胞を用いた生物実験は断念せざるを得ないと思いましたが、念のため証明されている生合成中間体を同細胞に投与したところ、secologanin の生産を再開した。すなわち生合成中間体 loganin 又はその直前の中間体 7-deoxyloganin を培地に投与し 4 日間培養したところ、ともに secologanin を生産していた。²¹⁾ ここで、後者の中間体 7-deoxyloganin を投与したとき、同時に loganin の生成も認められた。この結果は、この培養細胞が少なくとも 7-deoxyloganin より secologanin に至る変換能を有することを示している。

酸素を活性化する酵素として、二次代謝産物の生合成や外来薬物代謝に関与していることが知られているヘム蛋白質であるシトクロム P450 モノオキシ

ゲナーゼ^{22,23)}や、やはり物質代謝に関わる非ヘム金属酵素であるジオキシゲナーゼなどが知られている。^{24,25)} また一般に前者は膜結合蛋白質として(微生物由来の一部は可溶性酵素として知られている)、また後者は可溶性酵素として知られている。そこで、loganin より secologanin に至る酸化的開裂反応を触媒する酵素(secologanin synthase と命名した)の局在性と生化学的性質を検討した。²⁶⁾

Secologanin synthase 活性はスイカズラ培養細胞のミクロソーム画分に認められた (Fig. 6)。本酵素は補酵素として NADPH のみを要求し、さらに分子状酸素を要求した。一方、同反応は暗黒下での一酸化炭素で阻害されるが、光照射により回復した (Fig. 7)。さらに数種のシトクロム P450 阻害剤により阻害され、特に ancymidol により強く活性は阻害された (Table 1)。これらの事実より secologanin synthase はシトクロム P450 モノオキシゲナーゼであることが明らかとなった。その他、8 種のイリドイド配糖体を用いて本酵素の基質特異性を検討したところ、本酵素は loganin のみを基質とすることが分かった。

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼは一般にラジカル反応を通して 1 つの酸素を脂溶性化合物に挿入する反応を触媒することが知られている。しかし loganin より secologanin に至る酸化的開裂反応に見かけ上酸素の関与は見られない。その反応機構の途中に酸素ラジカル関与を想定し、われわれは Fig. 8 に示す 2 種の反応機構 (a, b) を提案した。²⁶⁾ その他、三川らにより c 経路が提出されている。²⁷⁾

シトクロム P450 酵素が動物、植物及び微生物における物質代謝にとって重要であることは周知の事

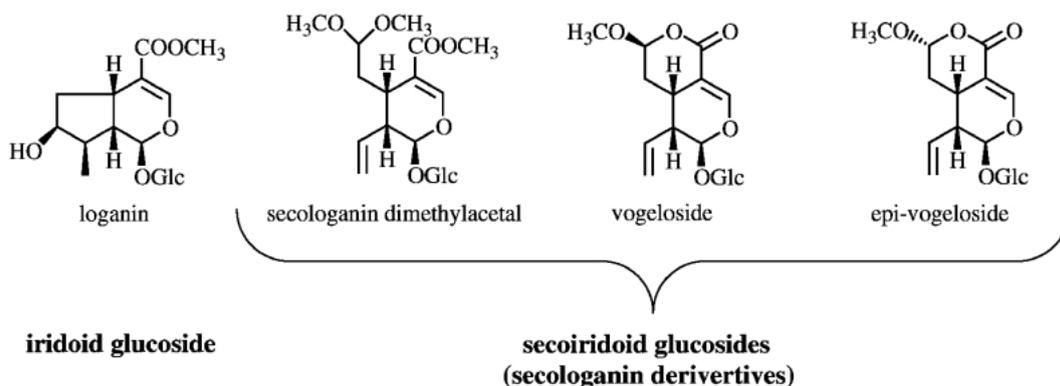


Fig. 5. Iridoid and Secoiridoid Glucosides from *Lonicera japonica*

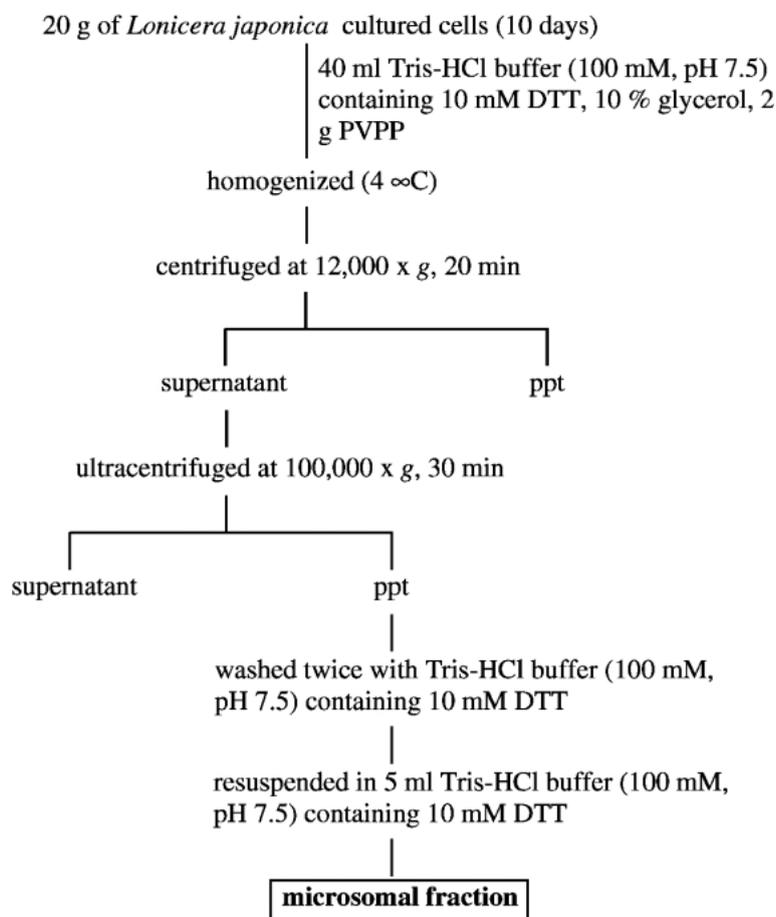


Fig. 6. Extraction and Fractionation of Secologanin Synthase from *Lonicera japonica* Cultured Cells

1. Membrane-bound enzyme
2. Substrate : loganin only
3. Cofactor : NADPH
4. The optimum pH : 7.5
5. The optimum concentration of loganin : 1 mM
6. The optimum concentration of NADPH : 1 mM
7. Linearity of enzymic reaction: 60 min

Fig. 7. Biochemical Properties of Secologanin Synthase

Table 1. Effects of Cytochrome P450 Inhibitors on Secologanin Synthase Activity

Inhibitor (0.1 mM)	Relative activity (% of control)
Control	100.0
Metyrapone	43.7
Cytochrome c	11.0
Miconazole	36.1
Ancymidol	0.0
KCN	79.4

In the control experiment, secologanin synthase activity was 2.54 pkat/mg protein.

実であるが、植物におけるこの酵素類の発現量が動物の場合よりも低いこと、また活性が不安定であること、また可溶化した構成成分の酵素的再構築が難しいことなどの理由で、植物においてはシトクロム P450 酵素の研究は十分進展していない。しかし最近の分子生物学の発展で、遺伝子工学的技法が植物酵素にも応用されるようになってきた。

次の研究段階としてわれわれはこの酸化酵素のア

ミノ酸配列を分子生物学的手法で決定することを考えた。その準備を進めていたところ、Schröderらが1992年に *Catharanthus roseus* から単離していた機能不明の遺伝子²⁸⁾がこの酸化的開裂反応を触媒する酵素をコードしていることを報告した。²⁹⁾ まず、*C. roseus* の培養細胞のミクロソーム画分に secologanin synthase 活性があることを示し、続いてこの機

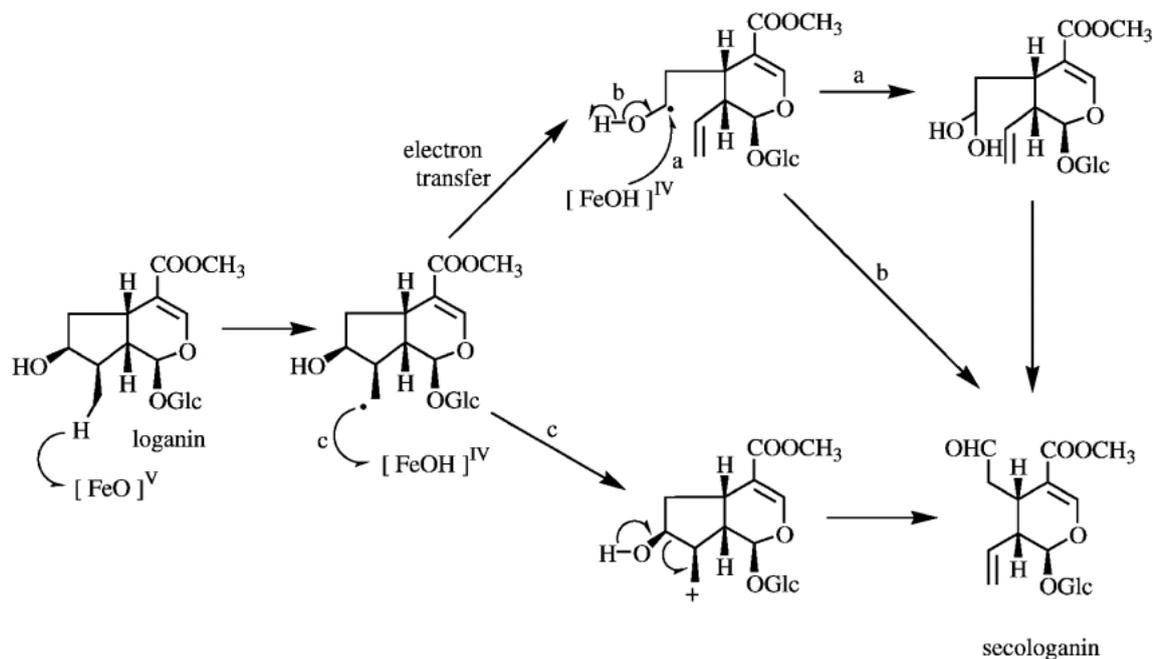


Fig. 8. Possible Reaction Mechanisms for the Cytochrome P450-catalyzed Oxidative Cleavage of Loganin to Secologanin

能不明のシトクロム P450 酵素 CYP72A1 と *C. roseus* P450 reductase とで再構築された複合系が secologanin synthase 活性を持つことも示した。

そこで、われわれは方向転換し、既に 7-deoxyloganin より loganin への変換が認められているスイカズラ培養細胞中の 7-deoxyloganin hydroxylase 活性を調べた。³⁰⁾ この水酸化酵素活性もまた secologanin synthase 活性の場合と同様スイカズラ培養細胞のミクロソーム画分に認められた。本酵素は補酵素として NADPH のみを要求し、さらに分子状酸素を要求した。一方、同反応は暗黒下での一酸化炭素で阻害されるが、照射により回復した。これらのデータは本酵素が P450 モノオキシゲナーゼであることを示唆しており、さらに数種のシトクロム P450 阻害剤により水酸化酵素活性は阻害されるが、これらのうち、あえて言えば cytochrome c により最も強く阻害された (Table 2)。これらの事実より 7-deoxyloganin hydroxylase はシトクロム P450 モノオキシゲナーゼであることが明らかとなった。

その他、16 種の化合物について本酵素の基質特異性を検討した (Fig. 9)。イリドイド骨格の 11 位が carbomethoxy 基 (7-deoxyloganin)、carboxy 基 (7-deoxyloganic acid)、aldehyde 基 (5-deoxystansioside)、hydroxymethyl 基 (11-hydroxyiridodial

Table 2. Effects of Cytochrome P450 Inhibitors on 7-Deoxyloganin 7-Hydroxylase

Inhibitor	Concentration	Relative activity (%)
None		100.0
Ketoconazole	10 mM	7.3
	100 mM	0
Miconazole	10 mM	78.5
	100 mM	26.2
Metryapone	10 mM	92.4
	100 mM	73.6
Ancymidol	10 mM	77.0
	100 mM	58.4
Cytochrome c	10 mM	59.6
	100 mM	44.9
Tropolon	10 mM	129.8
	100 mM	127.1
KCN	10 mM	100.9
	100 mM	106.9

The enzyme activity was 24.95 pkat/mg protein.

glucoside)、methyl 基 (iridodial glucoside) を持つ誘導体及びそれらの 8 α -methyl 体、8 β -hydroxy-8 α -methyl 体、7,8-vinyl 体などについて本酵素の基質特異性を検討したところ、この水酸化酵素は 7-deoxyloganin とそのカルボン酸体 7-deoxyloganic acid 以外のイリドイド配糖体を基質とせず、また 7-deoxyloganin に対して最も高い基質特異性を示し

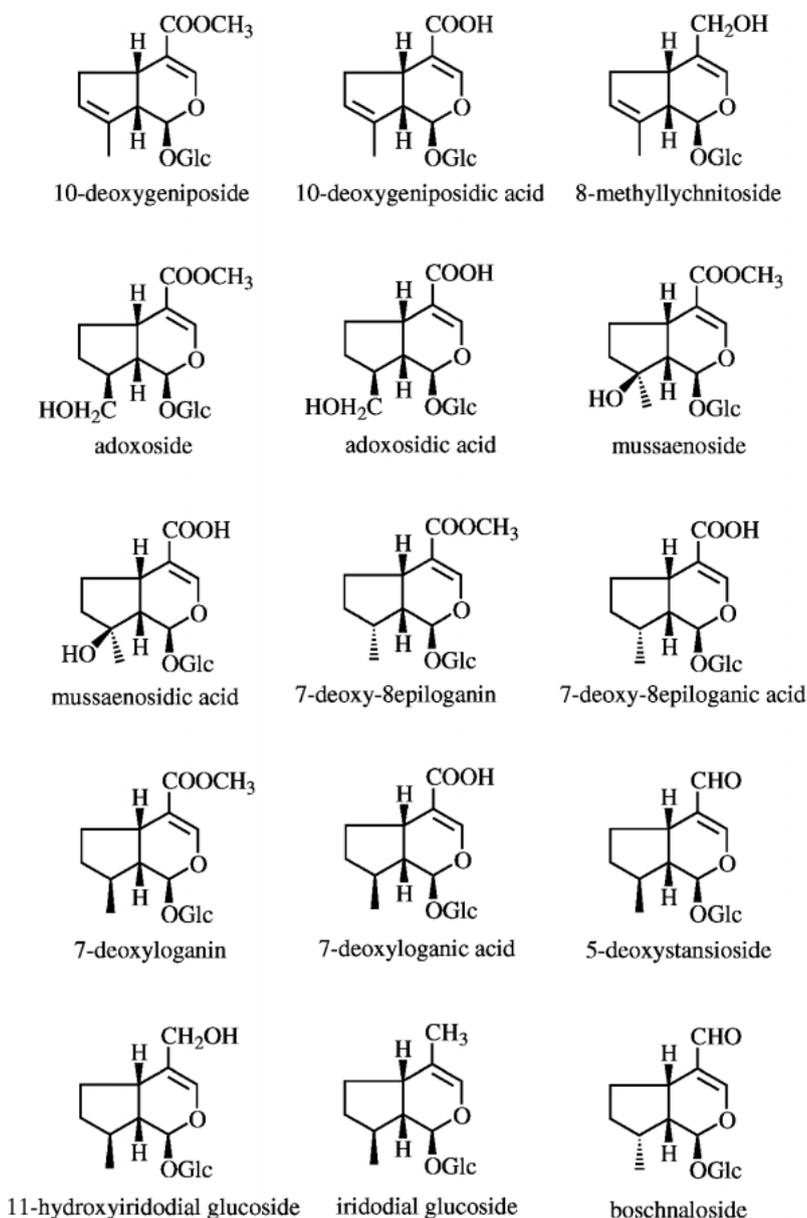


Fig. 9. Structures of Iridoid Glucosides Used for Substrate Specificity Experiment of 7-Deoxyloganin Hydroxylase

たが、その脱メチル体 7-deoxyloganic acid に対しても 7-deoxyloganin に対する酵素活性の 60% の活性を示した。このことは loganin の生合成には 2 経路あることを示唆している。しかしながら、以前の投与実験に基づき、*Galium mollugo* では loganin の生合成中間体は deoxyloganin ではなく deoxyloganic acid であると結論付けている。³¹⁾ 一方、1973 年に Madyastha ら¹⁴⁾ は *C. roseus* より抽出した部分精製したメチル化酵素を用いて基質特異性を検討し、本酵素は loganic acid と secologanic acid (loganic acid の 90%) をメチル化するが、deoxyloganic acid は変換されなかったと報告した。これら

の事実はこれらの植物では deoxyloganic acid → loganic acid → loganin に至る経路が存在することを示している。そこで、予備的な結果ではあるが、われわれもスイカズラ培養細胞より得た部分精製したメチル化酵素の基質特異性を検討したところ、loganic acid の変換率 100% に対し 7-deoxyloganic acid の場合は 10% 程度であった。このことから、本培養細胞においてもまた母植物においても主副の差はあるが 2 つの生合成経路が存在するのか、あるいは植物では 1 つの経路しか存在しないのか、早急には結論を出すことはできない。しかしながら、少なくともスイカズラ培養細胞の loganin 生合成においては

7-deoxyloganin hydroxylase ではなく 7-deoxyloganin acid hydroxylase が主酵素であろう。ちなみに、Schröder ら²⁹⁾は secologanin synthase とともに 7-deoxyloganin hydroxylase の活性も *C. roseus* において検出しているが、基質特異性については検討していない。既報に表れている結論では、高度に酸化されたイリドイド配糖体やセコイリドイド配糖体の生合成における中間体が deoxyloganic acid であったり、あるいはそのメチルエステル deoxyloganin であったりする。これらの中間体を経る経路は起源植物により異なるのか、植物によっては両経路が存在するのか、あるいは代謝調節として植物が両経路をうまく使い分けているのか今後さらに検討する必要がある。

本題から外れるが、われわれはスイカズラ培養細胞中のイリドイド配糖化酵素 glucosyl transferase も検討した。本酵素は不安定で、高度な精製には至らなかった。部分精製した本酵素は loganin のアグルコンである loganetin (配糖化率は最も高かった)、7-deoxyloganetin, 7-deoxyloganetinic acid (7-deoxyloganic acid) など配糖化するが、irido-

trial はほとんど配糖化しなかった。しかし速度論的解析より真の基質は 7-deoxyloganic acid であることが分かった。³²⁾

上述の酵素レベルでの生合成実験の結果をまとめると、secologanin の生合成経路は Fig. 10 のように推定された (白抜きの矢印が主経路である)。

2. ベンゾキノール配糖体 Cornoside の生合成

Cornoside は *Cornus femina* Miller (ミズキ科) から初めて単離された benzoquinol [4-hydroxy-2,5-cyclohexadien-1-one] glucoside である。³³⁾ 本化合物は phenylethanoid glucoside と共存しており、当初化学分類学的視点から注目されていた。³⁴⁾ われわれはモクセイ科植物におけるセコイリドイド配糖体の検索と生合成研究の過程で、朝鮮半島にのみに自生する 1 属 1 種の植物であるウチワノキ (*Abelio-phyllum distichum*) の生葉の成分を検索したところ、予想したセコイリドイド配糖体を見出すことはできなかったが、phenylethanoid 誘導体とともに、高収率で cornoside とその誘導体を単離することができた。³⁵⁾ この単離がきっかけとなり、われわれは cornoside の生合成研究を始めた。モクセイ科植物

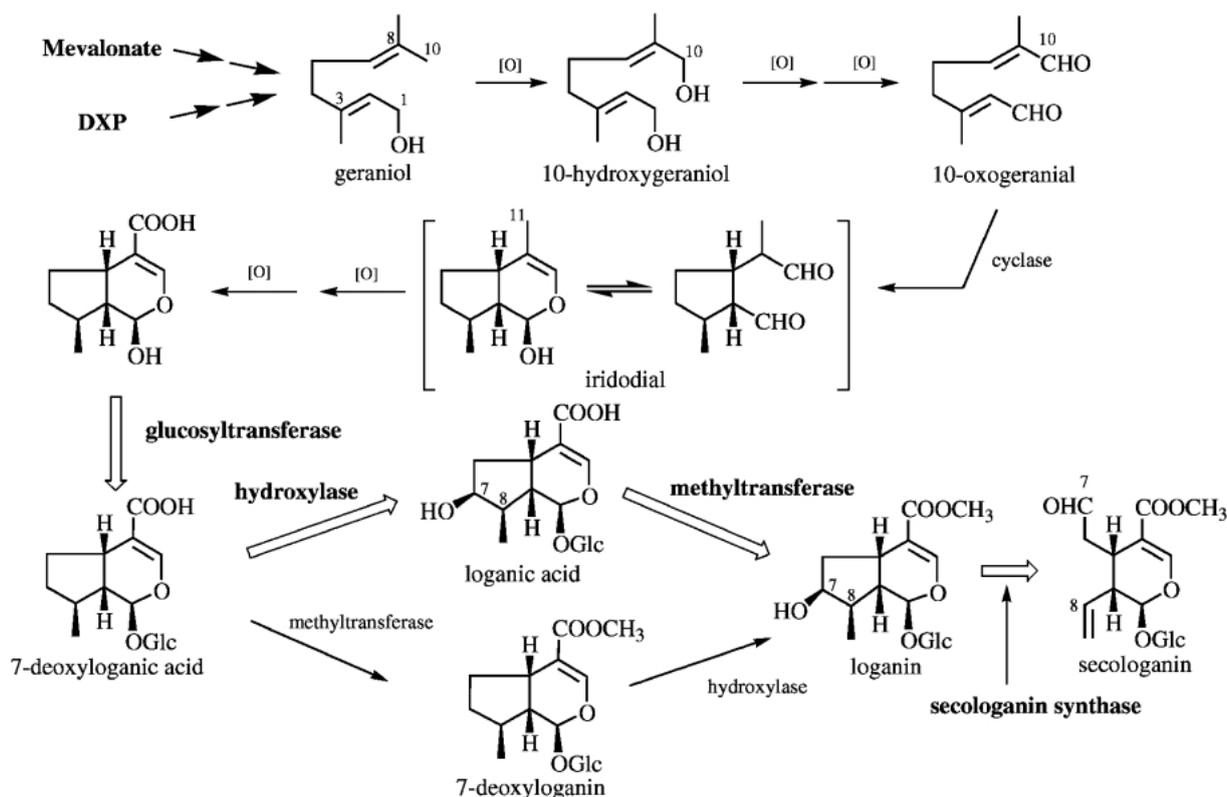


Fig. 10. Possible Biosynthetic Pathway of Secologanin in *L. japonica* Cell Cultures

からは、既に、レンギョウ *Forsythia suspensa* の果実から数種の cyclohexylethanoid (phenylethanoid 還元体) とそれらの配糖体とともに cornoside が単離されていた (Fig. 11).³⁶⁾

Cornoside の生成過程をその構造から考察すると、共存する phenylethanoid glucoside である salidroside 分子中の glycosyloxyethyl 基の ispo 位に水酸化反応が起こり、さらに脱水素反応 (酸化反応) が起こり cornoside が生成するものと考えられる。ただし、salidroside のアグリコンである 2-(4-hydroxyphenyl) ethanol (tyrosol) の段階で上記の一連の酸化反応を受け、その後配糖化が起こり目的の配糖体が生成する可能性もある。われわれはその酸化反応の特異性に注目し、cornoside の生合成を明らかにすることを企図した (Fig. 12).

しかしその生合成研究は既に A. Kjaer らによって放射性化合物の投与実験により行われ、salidroside の酸化によって生合成されることを示唆されたが、そのアグリコンである tyrosol の段階で同様な酸化反応が進行したあとに配糖化反応を受ける可能性も残されていた。³⁷⁾ さらに酵素の性質や反応機作

は不明のままであった。

今回調製したウチワノキの培養細胞においては cornoside を比較的高生産していることを見出した。³⁸⁾ そこで、この培養細胞に安定同位元素で 2 重標識した salidroside³⁹⁾ を投与したところ、糖部分の重水素とアグリコン部分の ¹³C 標識に比率が投与物の場合とほとんど変わらなかったことから、salidroside は加水分解されることなくそのまま cornoside へ変換されることが明らかとなった (Fig. 13).⁴⁰⁾

このように cornoside の前駆物質は salidroside であることが確定したので、salidroside より cornoside への変換を触媒する酵素の性質について調べた。⁴¹⁾ ウチワノキ培養細胞をホモジナイズし、遠心分離により分画した。その結果膜に結合したミクロソーム画分に酵素活性を認めた。この酵素画分は salidroside を唯一の基質とし、補酵素として NADPH を要求し、また分子状酸素は反応に不可欠であった。これらの諸性質は本反応にシトクロム P450 酵素が関与していることを示唆している。この推定を証明するために、暗黒下一酸化炭素の存在

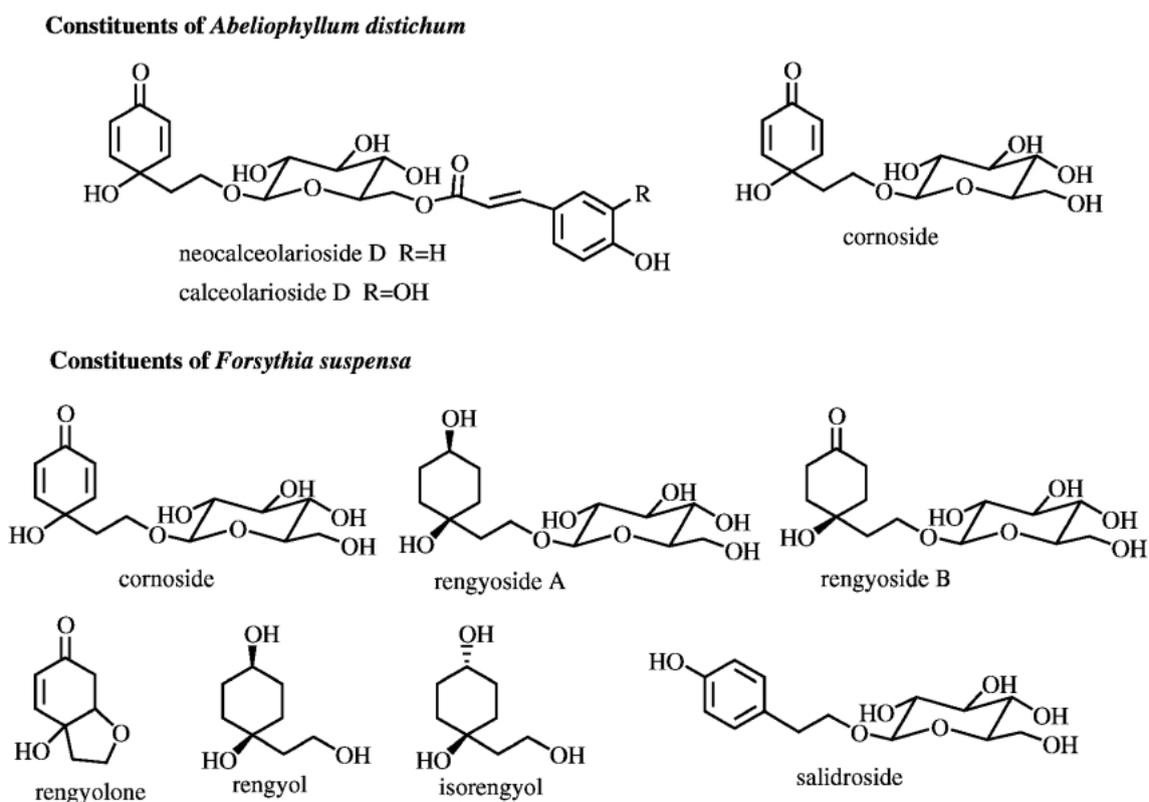


Fig. 11. Constituents of *Abeliophyllum distichum* and *Forsythia suspensa*

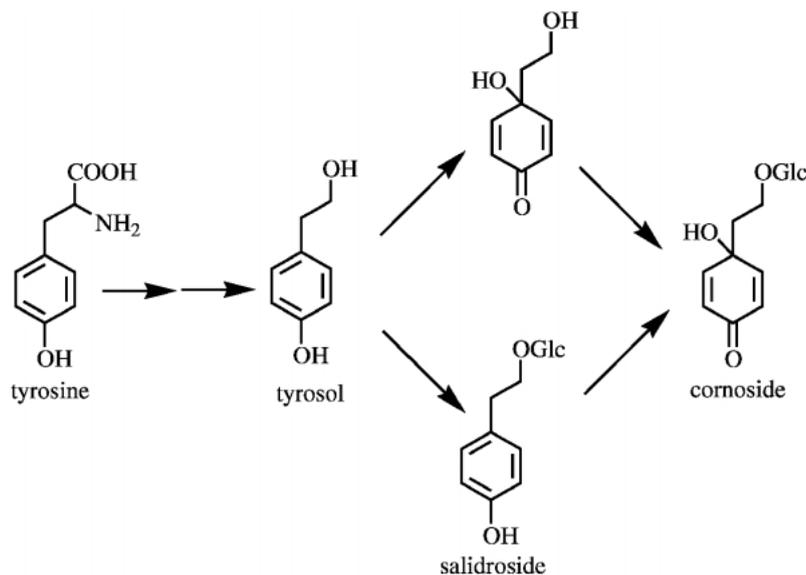


Fig. 12. Hypothetical Biosynthetic Pathways of a Benzoquinol Glucoside, Cornoside, in *Abeliophyllum distichum* Cultured Cells

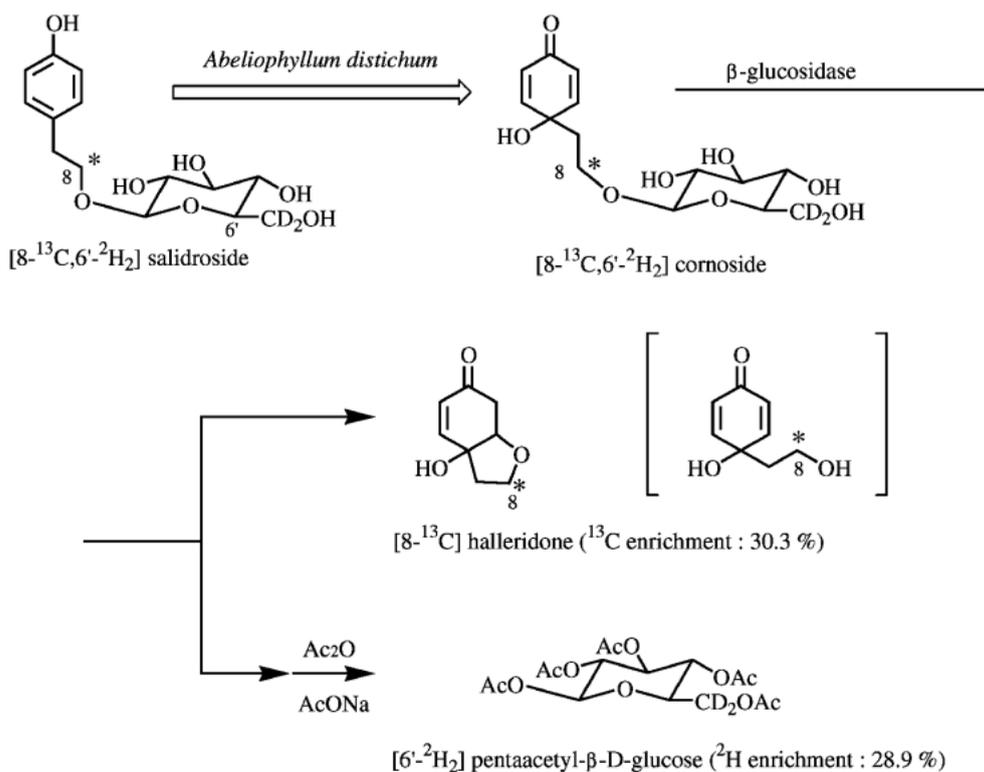


Fig. 13. Enrichment Factors of ^{13}C and ^2H Labels in $[8-^{13}\text{C}, 6'-^2\text{H}_2]$ -Cornoside

下で反応させたところ、阻害されたが、光照射によって完全に回復した。さらにシトクロム P450 阻害剤 *ancymidol* などにより阻害を受けるが、特に *cytochrome c* により強く阻害された。以上の結果に基づき、salidroside の cornoside への酸化酵素はシトクロム P450 モノオキシゲナーゼであることが明

らかとなった。われわれはこの酵素に対し *salidroside mono-oxygenase* と名付け、本酵素の反応機作を Fig. 14 のように提案した。

広部らは P450 化学モデルを用いて種々のパラ置換フェノール類の置換基の脱離を伴って活性酸素がイプソ付加しさらに酸化されて *p*-benzohydroqui-

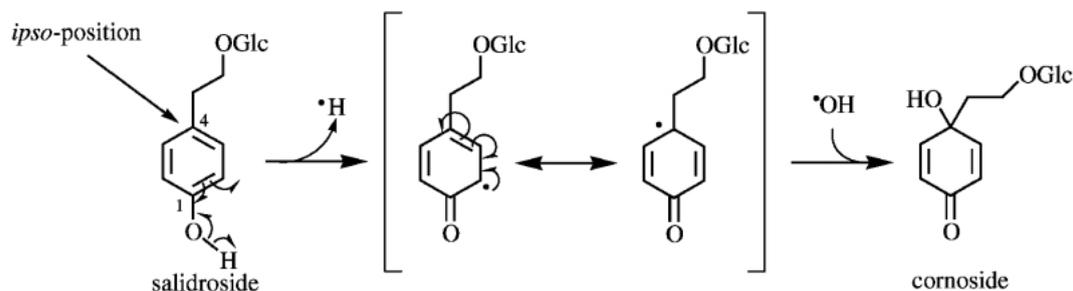


Fig. 14. Mechanism for the Formation of Cornoside from Salidroside

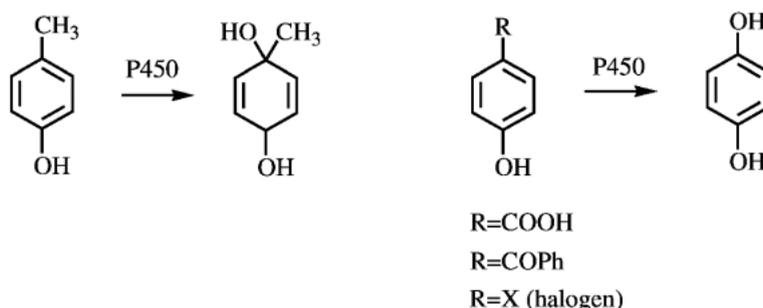


Fig. 15. Reactions by Cytochrome P450 System in Rat Liver Microsomes

none を生成することを見出す⁴²⁾とともに、同様な反応がラット肝臓のミクロソーム画分を用いた場合でも観察されたことを報告している。⁴³⁾ さらにラット起源のシトクロム P450 酵素を用いて、*p*-cresol (substituent = CH₃) 基質としてインキュベートしたとき、メチル基の脱離は起こらずに活性酸素の ipso 付加が起こった *p*-toluquinol が生成することも報告している。この生成反応は今回われわれが観察した反応形式と同じである (Fig. 15)。

3. シコニン生合成におけるナフトキノン骨格形成に関与する重要な中間体 3'-Hydroxygeranylhydroquinone の存在

以上 secologanin と cornoside の 2 種の化合物の生合成の重要な段階に関与しているシトクロム P450 モノオキシゲナーゼについて述べてきた。次に、shikonin のナフトキノン骨格形成に関わる重要な中間体と考えられる 3'-hydroxygeranylhydroquinone の生成機構について検討した。Shikonin は日本薬局方に収載されている生薬、紫根 (植物ムラサキの乾燥根) の抗炎症作用を持つナフトザリン成分である。この中間体は geranylhydroquinone (GHQ) の 3'位における水酸化反応により形成されるものと考えられる。

現在までに明らかにされている shikonin の生合成経路の概略を Fig. 16 に示した。種々の前駆物質の投与実験に基づき、shikonin の炭素はフェニルプロパノイド経路を経て生成される 4-hydroxybenzoic acid (4HB) と C₁₀ ユニット geranyl diphosphate に由来することが明らかにされている。ここで、このモノテルペノイド部分は、通常のモノテルペノイドが DOXP を経て生合成されるのとは異なり、メバロン酸に由来していることが初期の投与実験⁴⁴⁾ においてもまた最近の再実験⁴⁵⁾ においても証明されている。また芳香環部分の生合成前駆物質 4HB は ubiquinone や vitamin E の生合成前駆物質でもある。このようにして形成された 3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid (GHB) は GHQ に変換されたあと、芳香環と側鎖の 3'位のメチル基との間で炭素-炭素結合しナフトキノン核を形成して deoxyshikonin となり、さらに酸化されて shikonin が生成するものと推定されている。⁴⁶⁾

この経路上の生合成反応に関与している酵素のうち、その性質が明らかにされているものは phenylalanine ammonia-lyase,⁴⁷⁾ 4-coumarate: CoA ligase,⁴⁸⁾ 4HB geranyl diphosphate transferase^{49,50)} である。一方、培養細胞におけるシコニンの生合成の

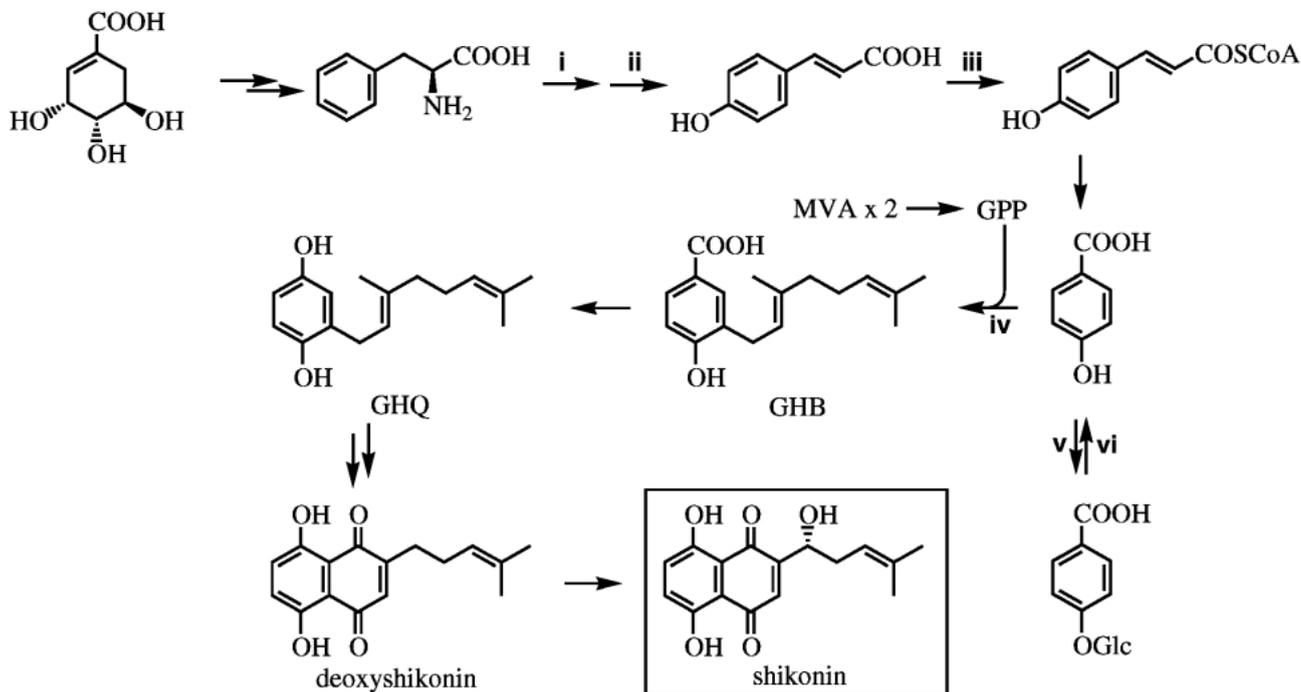


Fig. 16. Biosynthetic Pathway of Shikonin in *Lithospermum erythrorhizon*

i: phenylalanine ammonia-lyase, ii: cinnamic acid 4-hydroxylase, iii: 4-coumarate: CoA ligase, iv: geranyl diphosphate transferase, v: 4-hydroxybenzoate *O*-glucosyl transferase, vi: 4-hydroxybenzoate *O*-glucosidase.

調節機構についても田端, 矢崎らにより詳細に研究されている.^{51,52} 特に PHB の配糖化反応—脱糖反応がこの調節機構に重要な役割を果たしていることが示された. この調節機構に関わっている酵素 4-hydroxybenzoate *O*-glucosyl transferase^{53,54} の性質も明らかにされている.

このように, shikonin 生合成経路の後半のうちナフトレン骨格形成は重要な段階であり, その生成機構を明らかにすることは shikonin 生合成解明にとって最重要課題の 1 つである. そこで, GHQ の次の中間体として 3'-hydroxygeranylhydroquinone (3'-hydroxyl-GHQ) を想定し, その構造とナフトキノン形成に至る可能な機構とを合わせて Fig. 17 に示した. したがって GHQ の 3'位の水酸化反応を解明することは今後の shikonin 生合成研究の重要な第一歩である. この反応にもシトクロム P450 が関与しているものと考え, 水酸化酵素の局在性とその生化学的性質を検討した.⁵⁵

本研究には田端らにより確立されたムラサキ培養細胞⁵⁶ が用いられ, shikonin 生産には M-9 培地⁵⁷ 中で培養された. シコニンを生産するムラサキ培養細胞をホモジナイズし, 遠心分離により分画した.

その結果膜に結合したミクロソーム画分に目的の水酵素活性が認められた. この酵素画分は GHQ と GHB を基質とするが, 両者の反応速度の比較より GHQ が真の基質であると考えられた. また補酵素として NADPH を要求し, また分子状酸素は反応に不可欠であった. これらの諸性質は本反応にシトクロム P450 が関与していることを示唆している. この推定を証明するために, 暗黒下での一酸化炭素の存在下で反応させたところ, 反応は阻害されたが, 光照射によって完全に回復した. さらにシトクロム P450 阻害剤 ancymidol などにより阻害を受けたが, 特に cytochrome c により強く阻害された (Table 3). 以上の結果に基づき, GHQ の 3'位水酸化酵素はシトクロム P450 モノオキシゲナーゼであると結論付けられた. この酵素に対し geranylhydroquinone 3'-hydroxylase と名付けられた.

このように, 先に想定した shikonin のナフトレン骨格形成に関わる中間体として 3'-hydroxyl-GHQ が存在することが証明された. しかしこの化合物が直接環化するのか, あるいはその酸化体 3'-oxo-GHQ が環化反応に関与しているのかは今後解決すべき問題である. もしもこの環化酵素が 3'-oxo-

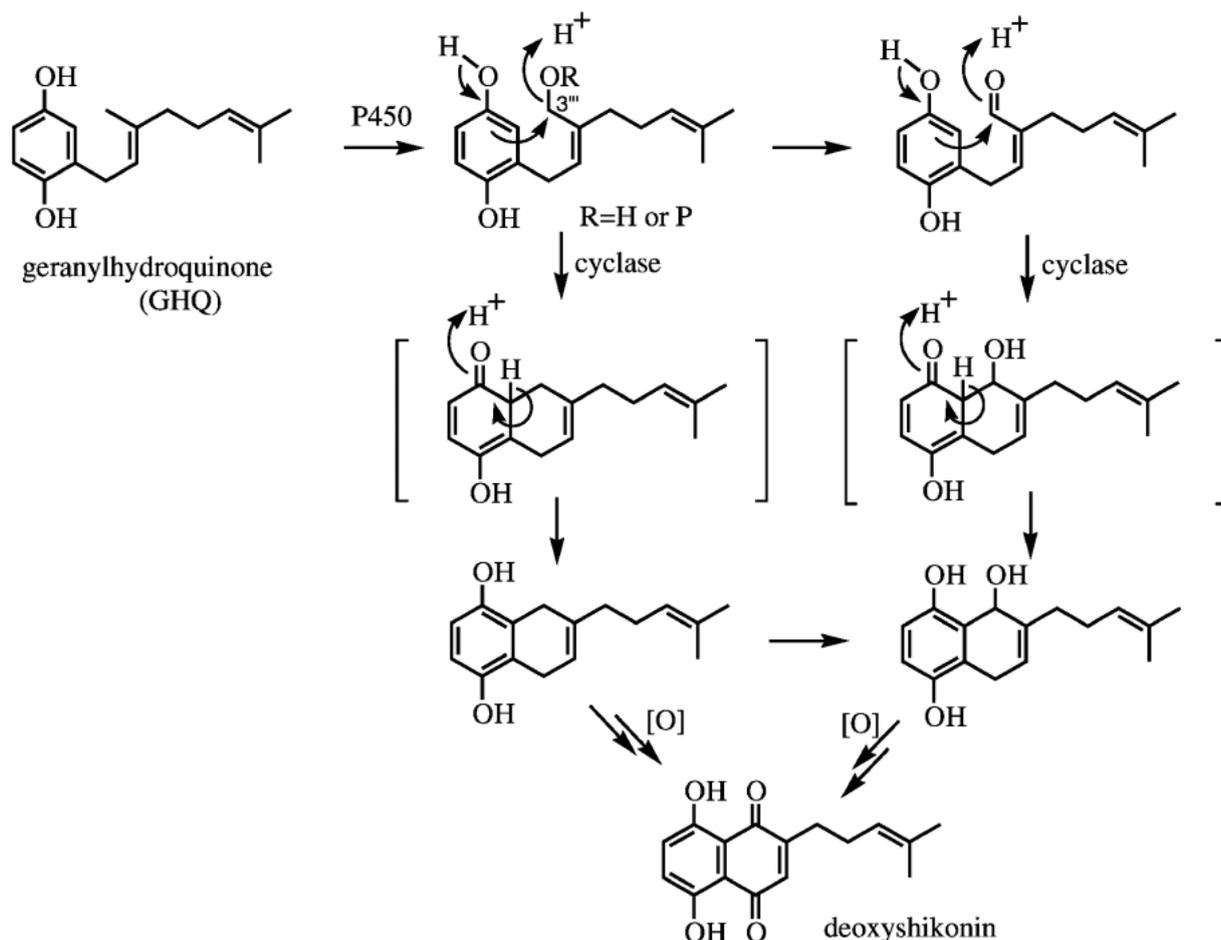


Fig. 17. Supposed Mechanism for Naphthoquinone Ring Formation in Shikonin Biosynthesis

Table 3. Effects of Cytochrome P450 Inhibitors on GHQ 3'-Hydroxylase Activity

Inhibitor	Activity (pkat/mg protein)	Relative activity (%)
Air	14.48	100.0
CO/O ₂ (9 : 1, Dark)	1.18	12.5
CO/O ₂ (9 : 1, Light)	8.13	56.1
None	31.42	100.0
Ancymidol 1000 mM	19.43	61.8
Metyrapone 1000 mM	26.93	85.7
Ketoconazole 1000 mM	12.09	38.5
	100 mM	27.68
Cytochrome c 10 mM	1.32	4.2
	1 mM	13.42
	0.1 mM	25.01

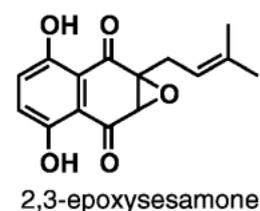
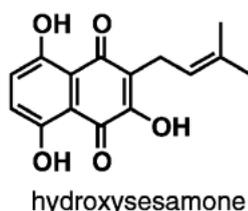
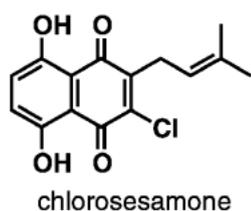
GHQ を基質とするのであれば 3'-hydroxyl-GHQ より 3'-oxo-GHQ への酸化酵素についても検索する必要がある。これら一連の反応と同様な生成過程がノウゼンカズラ科、アカネ科及びイワタバコ科に

広く分布するアントラキノン類の生合成におけるアントラキノン骨格形成においても起こっている可能性がある (Fig. 19 参照)。したがって, shikonin のナフタレン生成機構を解明することは, shikonin 生合成においてのみ重要なのではなく, prenylnaphthohydroquinone を経由して生成するアントラキノンの生合成にとっても重要な問題である。

最近福井らはゴマ科 (Pedaliaceae) 植物 *Sesamum indicum* の根及び不定根より 4-methylpent-3-enyl 側鎖を持つアントラキノン類を単離した (Fig. 18).⁵⁸⁾

これらの構造とシコニンの構造を比較すると, 両者とも共通の 4-methylpent-3-enyl 側鎖を持っている。このことは, シコニンの生成過程を考慮すると, これらアントラキノン類は geranylnaphthohydroquinone (geranyl-NHQ), さらに言えば, 3'-hydroxygeranylnaphthohydroquinone の環化反応により生成すると推定される。このようにこの型の環

Naphthoquinones



Anthraquinones

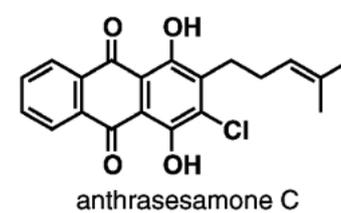
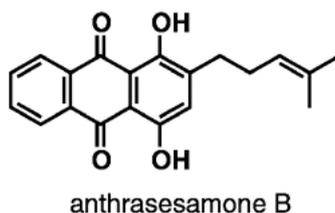
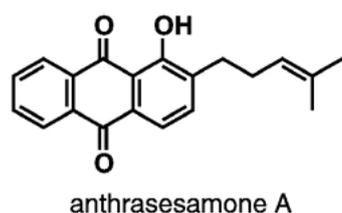
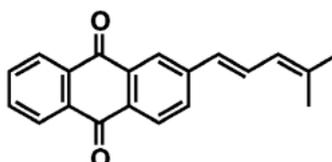
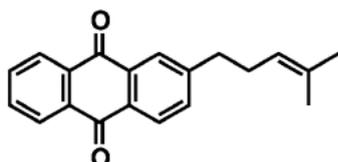


Fig. 18. Naphthoquinones and Anthraquinones from the Roots and Hairy Roots of *Sesamum indicum*

化機構はさらに広く植物界で起こっている可能性を示唆している。

ここで、このアントラキノン類の生合成に関してさらに一步突っ込んだ考察をさせていただく。シコニン生合成における中間体 3'-hydroxyl-GHQ の芳香核部分に相当する部分はアントラキノン生合成中間体 3'-hydroxygeranyl-naphthohydroquinone では NHQ となる。この芳香環の生合成起源は *o*-succinylbenzoic acid (OSB) と考えられる。⁵⁹⁾ その根拠は、これらのアントラキノン類がプレニルナフトキノンである chlorosesamone, hydroxysesamone と共存していることに基づく。これらのナフトキノンの芳香環部分は、その構造からノウゼンカズラ科に存在するプレニルナフトキノンと同じ生合成起源であると推定されるからである。ゴマ科植物由来アントラキノンの生合成は次の 2 経路が考えられる。OSB の閉環後生成する 2-carboxy-4-oxotetralone (COT) あるいはそのエノール体 1,4-dihydroxynaphthoic acid (DHNA) の 2 位にゲラニル化反応が起こり、さらに脱炭酸反応を経て、geranyl-naphthohydroquinone (geranyl-NHQ) が生成する。

Geranyl-NHQ の水酸化反応により 3'-hydroxygeranyl-NHQ となり、環化反応によりノウゼンカズラ科アントラキノン (Fig. 19 の a 経路で生成するアントラキノン；この型のアントラキノンと下記のアカネ科アントラキノンは構造的には区別できない。標識を用いた生合成実験を行って始めて識別できる) 型の 4-methylpent-3-enylanthraquinone が産生する。もう 1 つの可能な経路として、DHNA の 3 位にゲラニル化反応が起こり、geranyl-DHNA が生成する。このものの 3'位が水酸化され、続いて脱炭酸反応を伴う一段階で閉環反応によりアカネ科アントラキノン (Fig. 19 の b 経路で生成するアントラキノン) 型の 4-methylpent-3-enylanthraquinone が産生する。後者のタイプのアントラキノンの生成には geranyl-DHNA の脱炭酸反応によりいったん geranyl-naphthohydroquinone が生成し、3'位の水酸化を経て環化反応が起こりアントラキノン骨格が形成される。このように、ゴマ科のアントラキノンの生合成の場合は、まず naphthohydroquinone 核の前駆物質の確立、この核とゲラニル基の位置関係の確立、その後ゲラニル基側鎖の水酸化、続く環化

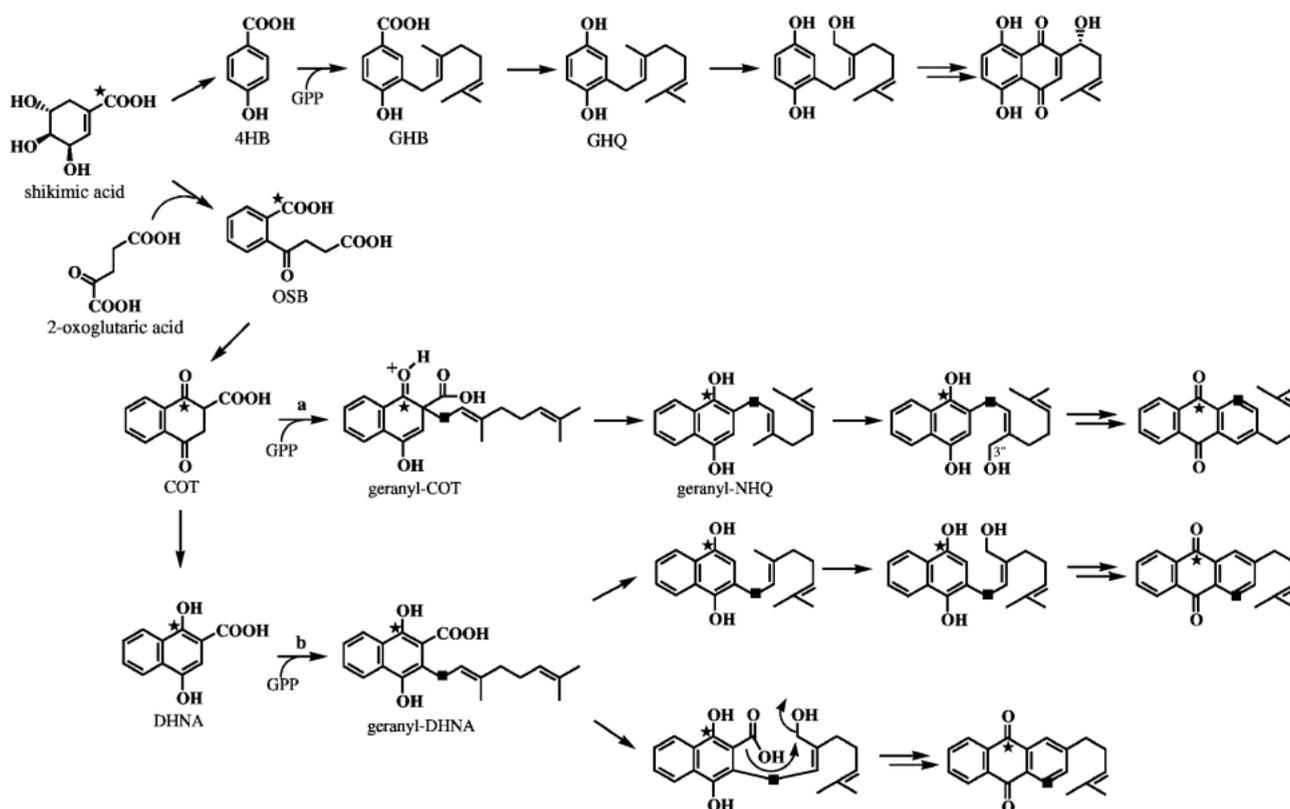


Fig. 19. Possible Biosynthetic Pathways of Anthraquinone from *S. indicum*, in Comparison to that of Shikonin

4HB: 4-hydroxybenzoic acid, GPP: geranyl diphosphate, GHB: 3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid, GHQ: geranylhydroquinone, OSB: *o*-succinylbenzoic acid, COT: 2-carboxy-4-oxotetralone, DHNA: dihydroxynaphthoic acid.

反応などの確立など shikonin の生合成の問題点以外に新たに種々の問題が提起される。

シコニンの生合成からすこし話が逸れたが、また話を戻すと、シコニン生合成 (Fig. 16 参照) の未解明な問題として、3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid (GHB) の geranylhydroquinone への変換機構がある (Fig. 20)。この変換反応は、前項で述べた広部らの反応例のうち *p*-hydroxybenzoic acid のシトクロム P450 酵素による脱炭酸反応を伴う水酸化反応と同じであると期待される。そこで予備的な実験ではあるが、ムラサキ培養細胞より調製したミクロソーム画分を用いて種々の条件で geranylated PHB とインキュベートした。しかし期待した GHQ の生成は認められなかった。⁶⁰⁾ また、ubiquinones の生合成においては、真核生物と原核生物ではその水酸化反応、メチル化反応が 4-hydroxy-3-polyprenylbenzoic acid の脱炭酸反応の以前に起こるかあるいは以後に起こるかの違いはあるが、いずれにしろ、脱炭酸反応と水酸化反応が協奏的に起こるのではなく 2 段階で起こり、キノン構造の ubiquinone 類が

生成することが知られている (Fig. 21)。⁶¹⁾ この考え方をシコニン生合成にも適用し、*p*-hydroxy-*m*-geranylbenzoic acid が脱炭酸反応によりいったん geranylphenol が生成し、続いてパラ位に水酸化反応が起こり geranylhydroquinone が産生するという仮説も成り立つ。そこで、geranylphenol をムラサキの培養細胞に投与したが、この場合も GHQ の産生は認められなかった。以上のように shikonin の生合成においてもいまだ完全解明には至らず、詳細な変換機構がいまだ不明のまま残っている。

あとがき

ご存知のように、一概に二次代謝産物 (天然有機化合物) の生合成研究といってもいろいろなアプローチがある。まず第一段階として、基質レベルで天然物の生合成経路をすべてあるいは部分的に明らかにするものである。この段階の研究は以後の酵素レベルの研究にとって不可欠である。第二段階として、解明された生合成経路の素反応に関与する酵素、通常は粗酵素を用いて反応のタイプあるいは反応機構を明らかにする。最後に、酵素精製によりあ

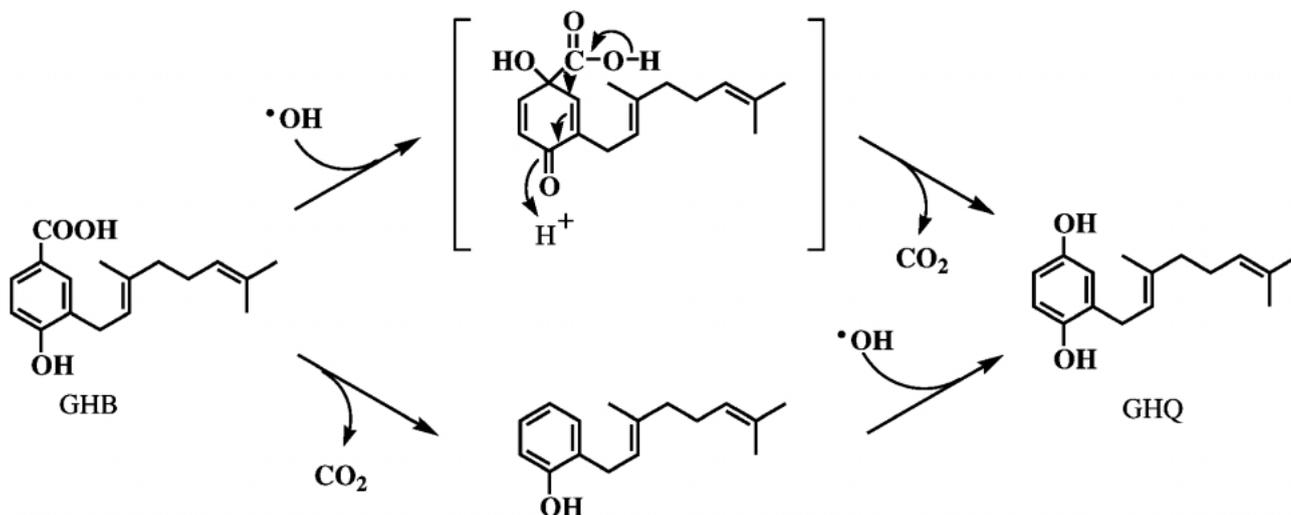


Fig. 20. Supposed Mechanistic Process of GHB to GHQ
GHB: 3-geranyl-4-hydroxybenzoic acid, GHQ: garanylhydroquinone.

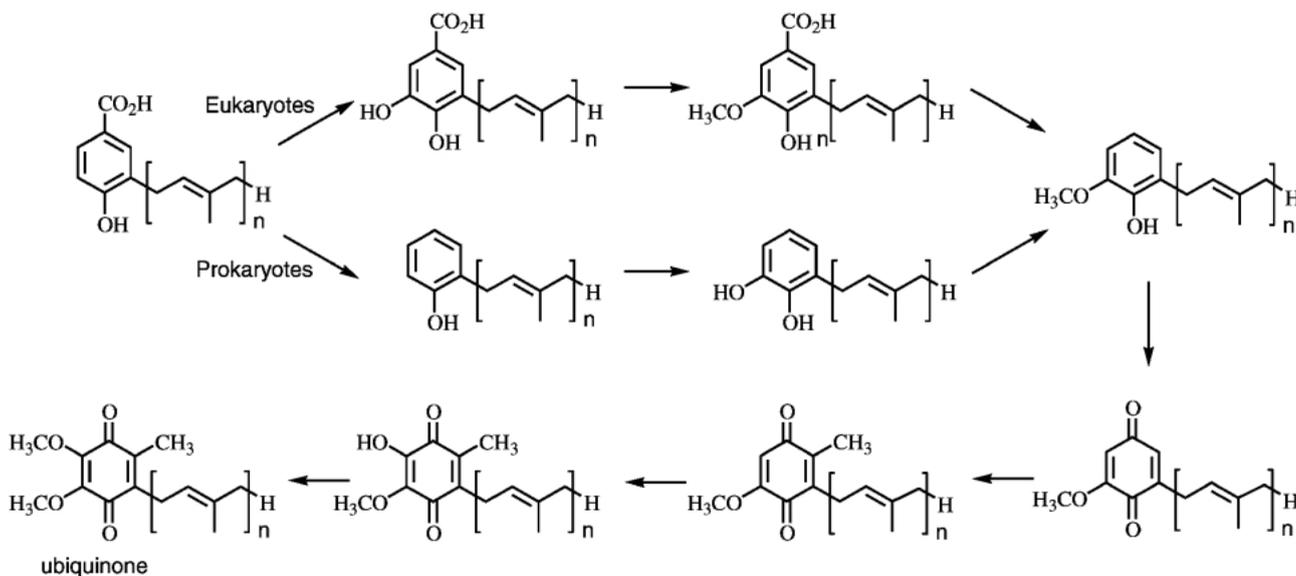


Fig. 21. Biosynthetic Pathway of Ubiquinones⁶¹⁾

るいは遺伝子情報の助けを借りて酵素に関する生化学的性質を明らかにする。これらの各段階を解決して始めて生合成研究は完了する。しかし、二次代謝産物の生産という面から考えると、ここから代謝調節の研究が始まる。すなわち調節物質を検索し、その物質がどの段階の反応をどのような機構で制御しているのかを解明する。実際には、生合成経路とそれに関与する酵素の解明が完成しない段階で代謝調節の研究が同時進行するので、生合成問題をさらに複雑にしている面がある。

筆者が生合成研究の世界に足を踏み入れた時は、

基質レベルでの研究は当然ながら有機化学者の研究領域であり、酵素研究は生化学者の領域であった。しかも後者の酵素研究も一次代謝に関するものが主流であったと思います。

このような状況下、筆者は理学部の天然物化学の研究室で天然苦味物質として多く存在するイリド配糖体の構造研究を行っておりました。当時大学紛争の真っ只中であったこととこの化合物群が縁となり京都大学薬学部で同系配糖体の生合成研究を始めておられた井上博之教授グループに参加することになりました。これより天然物の構造研究と生合成

研究の二足のわらじを履くことになりました。一方で、井上博之教授のご好意で、早石 修先生が主宰されておられた同大学医学部医化学教室に学内留学させていただき、酵素化学の初歩を学ぶ機会を得ることができたことが筆者の研究の方向付けとなりました。

しかしながら、このような生化学的準備段階を経て生合成研究分野に足を踏み入れた訳ですが、研究室のそれまでの研究背景や事情もあり、なかなか方向を修正することができませんでした。平成4年岐阜薬科大学生薬学教室を主宰する機会を与えられたのを機に重点を生化学的研究に移すことができました。ここに紹介した成果は助手山本浩文博士（現東洋大学教授）を中心として行った研究で、同博士を始めご協力頂いた方々に深謝いたします。

最後に、この場をお借りしましてご指導、ご鞭撻を賜りました恩師久保田尚志大阪市立大学名誉教授、井上博之京都大学名誉教授、早石 修京都大学名誉教授、藤多哲朗京都大学名誉教授及び田端 守京都大学名誉教授に心より感謝いたすとともに、この紙面をお借りして今年初めにご逝去されました久保田尚志、田端 守両先生のご冥福をお祈りいたします。

REFERENCES

- 1) El-Naggar L. J., Beal J. L., *J. Nat. Prod.*, **43**, 649–707 (1980).
- 2) Jensen S. R., *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **79**, 284–302 (1992).
- 3) Yeowell D. A., Schmid H., *Experientia*, **20**, 250–252 (1964).
- 4) Rohmer M., *Prog. Drug Res.*, **50**, 135–154 (1998).
- 5) Eichinger D., Bacher A., Zenk M. H., Eisenreich W., *Phytochemistry*, **51**, 223–236 (1999).
- 6) Inouye H., Uesato S., *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **50**, 171–236 (1986).
- 7) Dewick P. M., *Nat. Prod. Rep.*, 507–534 (1995).
- 8) Dagnino D., Schripsema J., Verpoorte R., *Phytochemistry*, **39**, 341–349 (1995).
- 9) Meehan T. D., Coscia C. J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **53**, 1043–1048 (1973).
- 10) Hallahan D. L., West J. M., Wallsgrove R. M., Smiley D. W. M., Dawson G. W., Pickett J. A., Hamilton J. G. C., *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 105–112 (1995).
- 11) Ikeda H., Ezaki N., Nakai S., Hashimoto K., Uesato S., Soda K., Fujita T., *J. Biochem.*, **109**, 341–347 (1991).
- 12) Ikeda H., Nakai S., Hashimoto K., Uesato S., Esaki N., Soda K., Fujita T., *Phytochemistry*, **30**, 2223–2225 (1991).
- 13) Ikeda H. (unpublished results) (1991).
- 14) Madyastha K. M., Guarnaccia R., Baxter C., Coscia C. J., *J. Biol. Chem.*, **248**, 2497–2501 (1973).
- 15) Battersby A. R., *Pure Appl. Chem.*, **14**, 117–136 (1967).
- 16) Inoue K., Takeda Y., Tanahashi T., Inouye H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 970–980 (1981).
- 17) Inoue K., Takeda Y., Tanahashi T., Inouye H., *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 981–990 (1981).
- 18) Battersby A. R., Westcott N. D., Glüsenkamp K.-H., Tietze L.-F., *Chem. Ber.*, **114**, 3430–3438 (1981).
- 19) Inoue K., Tanahashi T., Inouye H., Kuwajima H., Takaishi K., *Phytochemistry*, **28**, 2971–2979 (1989).
- 20) Kawai H., Kuroyanagi M., Ueno A., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3664–3666 (1988).
- 21) Yamamoto H., Katano N., Ooi A., Inoue K., *Phytochemistry*, **50**, 417–422 (1999).
- 22) Bolwell G. P., Bozak K., Zimmerlin A., *Phytochemistry*, **37**, 1491–1506 (1994).
- 23) Sono M., Roach M. P., Coulter E. D., Dawson J. H., *Chem. Rev.*, **96**, 2841–2887 (1996).
- 24) De Carolis E., De Luca V., *Phytochemistry*, **36**, 1093–1107 (1994).
- 25) Que Jr. L., Ho R. Y. N., *Chem. Rev.*, **96**, 2607–2624 (1996).
- 26) Yamamoto H., Katano N., Ooi A., Inoue K., *Phytochemistry*, **53**, 7–12 (2000).
- 27) Hakamatsuka T., Sankawa U., “Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry,” eds. by Ogura K., Sankawa U., Kodansha Scientific, Tokyo, 1997, p. 25.
- 28) Velter H.-P., Mangold U., Schröder G., Marner F.-J., Werck-Reichhart D., Schröder J., *Plant Physiol.*, **100**, 998–1007 (1992).
- 29) Irmiler S., Schröder G., St-Pierre B., Crouch

- N. P., Hotze M., Schmidt J., Strack D., Matern U., Schröder J., *Plant J.*, **24**, 797–804 (2000).
- 30) Katano N., Yamamoto H., Iio R., Inoue K., *Phytochemistry*, **58**, 53–58 (2001).
- 31) Uesato S., Miyauchi M., Itoh H., Inouye H., *Phytochemistry*, **25**, 2515–2521 (1986).
- 32) Yamamoto H., Sha M., Kitamura Y., Yamaguchi M., Katano N., Inoue K., *Plant Biotech.*, **19**, 295–301 (2002).
- 33) Jensen S. R., Kjaer A., Nielsen B. J., *Acta Chem. Scand.*, **27**, 367–369 (1973).
- 34) Jensen S. R., *Ann. Missouri Bot. Gard.*, **79**, 284–302 (1992).
- 35) Kuwajima H., Takahashi M., Ito M., Wu H., Takaishi K., Inoue K., *Phytochemistry*, **33**, 137–139 (1993).
- 36) Endo K., Hikino H., *Can. J. Chem.*, **62**, 2011–2014 (1984).
- 37) Eigtved P., Jensen O. S., Kjaer A., Wieczorkowska E., *Acta Chem. Scand.*, **B 30**, 182–184 (1976).
- 38) Yamamoto H., Yoshida K., Kondou Y., Inoue K., *Phytochemistry*, **48**, 273–277 (1998).
- 39) Kuwajima H., Takai Y., Takaishi K., Inoue K., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 581–586 (1998).
- 40) Yamamoto H., Kuwajima H., Yoshida K., Yata M., Takai Y., Inoue K. (unpublished data).
- 41) Yamamoto H., Hori M., Kuwajima H., Inoue K., *Planta*, **216**, 432–436 (2003).
- 42) Ohe T., Mashino T., Hirobe M., *Tetrahedron Lett.*, **36**, 7681–7684 (1995).
- 43) Ohe T., Mashino T., Hirobe M., *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 116–122 (1997).
- 44) Schmid H. V., Zenk M. H., *Tetrahedron Lett.*, 4151–4155 (1971).
- 45) Li S.-M., Henning S., Heide L., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 2721–2724 (1998).
- 46) Inouye H., Ueda S., Inoue K., Matsumura H., *Phytochemistry*, **18**, 1301–1308 (1979).
- 47) Yazaki K., Kataoka M., Honda G., Severin K., Heide L., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1995–2003 (1997).
- 48) Yazaki K., Ogawa A., Tabata M., *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1319–1329 (1995).
- 49) Yamaga Y., Nakanishi K., Fukui H., Tabata M., *Phytochemistry*, **32**, 633–636 (1993).
- 50) Sommer S., Severin K., Camara B., Heide L., *Phytochemistry*, **38**, 623–627 (1995).
- 51) Tabata M., *Plant Tissue Culture Lett.*, **13**, 117–125 (1996).
- 52) Yazaki K., *Nat. Med.*, **55**, 49–55 (2001).
- 53) Yazaki K., Inushima K., Kataoka M., Tabata M., *Phytochemistry*, **38**, 1127–1130 (1995).
- 54) Li S.-M., Wang Z.-X., Heide L., *Phytochemistry*, **46**, 27–32 (1997).
- 55) Yamamoto H., Inoue K., Li S.-M., Heide L., *Planta*, **210**, 312–317 (2000).
- 56) Tabata M., Mizukami H., Hiraoka N., Konoshima M., *Phytochemistry*, **13**, 927–932 (1974).
- 57) Fujita Y., Hara Y., Suga C., Morimoto Y., *Plant Cell Rep.*, **1**, 61–63 (1981).
- 58) Furumoto T., Iwata M., Feroj Hasan A. F. M., Fukui H., *Phytochemistry*, **64**, 863–866 (2003).
- 59) Inoue K., Inouye H., *Kagaku To Seibutsu*, **21**, 581–590 (1983).
- 60) Yamamoto H., Inoue K. (unpublished data).
- 61) Kawamukai M., *Seikagaku*, **70**, 1344–1349 (1998).