

|||||
|||||
総 説
|||||
|||||

東洋と西洋の紫色素

正 山 征 洋
(長崎国際大学 薬学部 薬学科)

Purple pigment in Asia and Europe

Yukihiro SHOYAMA

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University)

Abstract

The historical background of purple pigment in Asia and Europe has been reviewed in this article. It became evident that major species for the production of purple pigment in Japan was *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. which had been cultivating widely during 8 to 10 centuries in Japan. The structure of major component in *L. erythrorhizon*, shikonin was elucidated in Japan in 1918, and its biosynthetic pathway was confirmed together with alkannin isolated from *Alkanna tinctoria* in Europe. The author succeeded to isolate and elucidate the structures of 8 components related to alkannin including 3 novel compounds from *A. tinctoria* roots, and determined their anti-cancer activities using human colon cancer cell lines, and confirmed the apoptosis mechanism by docking evidence.

Key words

Lithospermum erythrorhizon, *Alkanna tinctoria*, shikonin, alkannin, human colon cancer cell, apoptosis

要 旨

古来より紫色素は洋の東西を問わず高貴な色として尊ばれてきた。本稿では東洋とヨーロッパで主に流通しているムラサキ科植物を取り上げて基原植物や歴史的な背景を検証した。特にムラサキは日本における自生分布が広く、8～10世紀には各地で栽培が行われ大量の紫根が朝廷へ上納されていた状況について述べた。紫根に含有する紫色素である shikonin は日本で単離構造決定されたのでそれらについても言及した。さらにムラサキ科植物の shikonin や光学異性体の alkannin 等の生合成経路についても述べた。又、光学異性体に関わる基原植物に関しても調査を行った。一方、ヨーロッパで用いられているアルカンナ根から新化合物3種を含む8種の alkannin 関連化合物を単離・構造決定を行い、それらについてヒト大腸がん細胞を用いて細胞抑制作用を確認し、それらの中で最も抑制効果の高かった化合物につき、カスパーゼ-9を介したアポトーシス誘導が起こることを明らかにし、ドッキング試験によりアポトーシス惹起のメカニズムを明らかにした。

キーワード

ムラサキ、アルカンナ、shikonin, alkannin, ヒト大腸がん細胞、アポトーシス

1. はじめに

食品添加物の安全性については、先に本誌で述べたが¹⁾、天然由来の着色料は約20種で、ベニバナ(紅花)やクチナシ(山梔子)が頻繁に

用いられている。紫色素に限定すれば、ヤマイモの仲間であるヤマイモ、サツマイモの一種であるムラサキイモ、トウモロコシとムラサキ等である。その中で歴史が最も古いのがムラサキ

である。ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. はムラサキ科 (Boraginaceae) に属する多年生草本で、葉は長楕円形で先が尖り、全草が毛に覆われざらつく。初夏白い小さな5弁花を開き (Fig. 1)、秋には種子が黒熟し、やがて灰白色となる。根は Fig. 2 に見られる様に紫色素を含むために濃い紫色を呈することから紫根と称される。石灰岩地帯の草原を中心に日本各地に広く自生していたが、現在は特定の地域を除いては希少種で絶滅危惧種となっている。このため栽培が試みられているものの栽培困難な品種の一つである。



Fig. 1 ムラサキ
(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. Et Zucc.)



Fig. 2 紫根

市場では紫根を硬紫根と呼んでいるが、流通が多いのは軟紫根と呼ばれる生薬である。軟紫根の基原植物はムラサキ科に属する *Arnebia euchroma* (Royle) Johnst. (以前は *Macrotomia euchroma* Pauls. と呼ばれていた) でムラサキと後述のアルカンナとの中間的な形態を示し中国北部に自生している (Fig. 3)。



Fig. 3 軟紫根
(*Arnebia euchroma* (Royle) Johnst.)

一方、中東からヨーロッパにかけてはアルカンナ *Alkanna tinctoria* Tausch. (ムラサキ科) が自生している。アルカンナは多年生草本で、太くて長い根が伸びる。長楕円形の根生葉を多数叢生し、夏抽苔して茎を伸ばし茎上部の葉腋に青紫の5弁花を開く (Fig. 4)。ムラサキ同様全体が毛におおわれており、種子は黒熟する。

本稿では東洋と西洋に自生するムラサキとアルカンナの歴史的背景、成分的な相違点、薬理活性等について概説する。



Fig. 4 アルカンナ (*Alkanna tinctoria* Tausch.)

2. 東洋の紫色素の歴史的背景

紫根の色素を紫と呼び、紫で染めた衣服は高貴な位を示してきた。紫根は約2000年前に成立した『神農本草経』に中薬「紫草」として収載されている。紫根配合処方としては花岡青洲（1776-1835年）が考案した「紫雲膏」（紫根・当帰・豚脂・胡麻油配合軟膏）のみなので、内服ではなく専ら外用薬として用いられ、同時に染料としての重要性が高かったものと考えられる。因みに正倉院宝物の中の敷物から紫色素が検出されている。さらに8世紀前半の木簡から紫草が朝廷へ納められていたことが明らかになっている。福岡県太宰府市から出土した木簡には福岡県、熊本県、大分県等の地名が記載されており（Fig. 5）、九州各地から大宰府へ納められ、平城京へと上納されたことが理解できる。一方、平城京では大宰府から納められた上記の地名が書かれた木簡が出土している。10世紀初頭の『延喜内蔵寮式』には全国的な紫草寄進の義務づけが決められており、ちなみに大宰府は年間2.7トンで、全国合わせると年間15トンにもおよび、染料として大量に使用されていたものと推察される。

菅原道真公の詩に、「つくしにも紫生ふる野辺はあれどなき名悲しむ人ぞ聞えぬ」とあり

Fig. 5 大宰府へ納められた紫草の木簡（8世紀前半）



九州歴史資料館提供

（Fig. 6）、太宰府近辺にも自生地があったことを物語っている。また、太宰府に近い地に、紫の付く地名が数か所あり栽培地の特定に興味を持たれる。貝原益軒の『筑前国続風土記』巻之九に、古く異国より紫の種子を持ってきて植えたので紫の地名がついた、との記述があり、栽培が行われていたことは明らかであるが栽培地の特定には至っていない。

紫根から紫色素の単離と構造決定は日本で行われたのでその歴史の一端をご紹介します。黒田チカ（1884～1968）は紫根をベンゼン抽出し濃紫色エキスを得て、そのものを精製して融点が147℃で分子式が $C_{16}H_{16}O_5$ の結晶を得て、紫根から得られたことから shikonin と命名した。Shikonin をアセチル化することによりトリアセチル体が得られることから3個の水酸基を持つことを確認した。Triacetylshikonin をオゾン分解することにより3,6-dihydroxyphthalic acid と succinic acid、acetone が得られ、また、shikonin の亜鉛木蒸留で naphthalene が得られた。これらの結果を総合することにより shikonin の構造式を Fig. 7 と決定した²⁾。1918年のことである。なお、本構造式は後述のアルカンナ根から得られた alkanna との光学異性体であるとの知見から1935年に Fig. 8 に示す構造に訂正さ



Fig. 6 菅原道真公句碑（太宰府市）

れた³⁾。以後 Fig. 9 に示すような shikonin 関連化合物が単離された^{4,5)}。上記の構造決定の方法は大学受験の問題として出題出来そうなステップであるが、現在身近な機器である NMR やマススペクトル等の機器は当時は皆無で、分子式を決める元素分析でさえサンプル量が 100mg 以上必要であったことを考えると、構造決定に莫大なエネルギーが費やされたことが容易に伺える。因みに我々はごく最近ガーナ産植物から睡眠病に有効な成分を単離し X 線解析により構造決定に成功しているが⁶⁾、この場合は結晶 1 個が用いられた。恐らく ng オーダーの量で絶対構造を含めた構造決定がなされる時代となっており、科学技術の進歩がもたらす恩恵を甘受しているなと感じているところである。

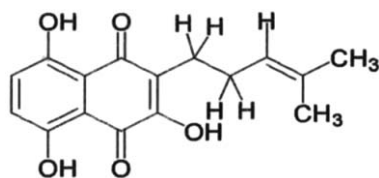


Fig. 7 黒田チカにより決定された shikonin の構造

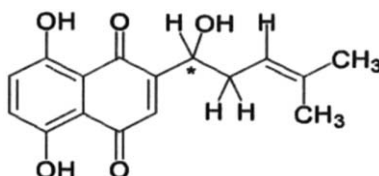
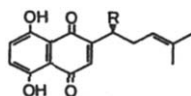


Fig. 8 訂正された shikonin の構造



Compound	R
Deoxyshikonin	-H
Shikonin	-OH
Acetylshikonin	-OCOCH ₃
Isobutylshikonin	-OCOCH(CH ₃) ₂
β,β-Dimethylacrylshikonin	-OCOCH=C(CH ₃) ₂
Isovalerylshikonin	-OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂
α-Methyl-n-butylshikonin	-OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
β-Hydroxyisovalerylshikonin	-OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂

Fig. 9 紫根から単離構造決定された関連化合物

3. シコニンの生合成

1970年代には、生体内で小さな分子から徐々に大きな分子へと合成されてゆくステップに対して生合成経路と言う造語が作られ、小分子を放射化して宿主植物へ投与して生合成経路の証明が積極的に進められた。本誌でも大麻成分の生合成経路⁷⁾ についてご紹介したので参考にして頂きたい。その時代背景を受けて shikonin と平面構造は同一であるが光学異性体である後述の alkanin についてアメリカ産の *Plagiobotrys arizonicus* (ムラサキ科) に投与実験がおこなわれた。放射化した L-phenylalanine、trans-cinnamic acid、p-hydroxybenzoic acid、mevalonic acid、hydroquinone 等を投与した結果、hydroquinone を除いては全て alkanin に取り込まれることから、alkanin は p-hydroxybenzoic acid と mevalonic acid から合成されると推定した⁸⁾。一方、shikonin については、ムラサキの培養細胞を用いて alkanin と同様な生合成経路をたどることが明らかにされると同時に中間体として geranyl-p-hydroxybenzoic acid、geranylhydroquinone を経て shikonin が生合成されることを明らかにしている (Fig. 10)⁹⁾。これらの研究を基に培養細胞による shikonin の生産技術が開発され、タンク培養による大スケールの shikonin 生産を可能とし、パイオ口紅の生産へと発展していった¹⁰⁾。また、一方では shikonin の生合成酵素の精製・単離、遺伝子のクローニング等が進められてきた¹¹⁾。

4. 西洋の紫色素

ヨーロッパにはムラサキと同様な色素をもった植物が古くから知られていた。その一つがサフランである。サフランについては本誌で報告しているので参照されたい¹²⁾。もう一つがアルカンナの根をアルカネットと呼び、『神農本草経』と同時期の 1 世紀頃ディオスコリデスにより著された『マテリアメデイカ』に記載されている。

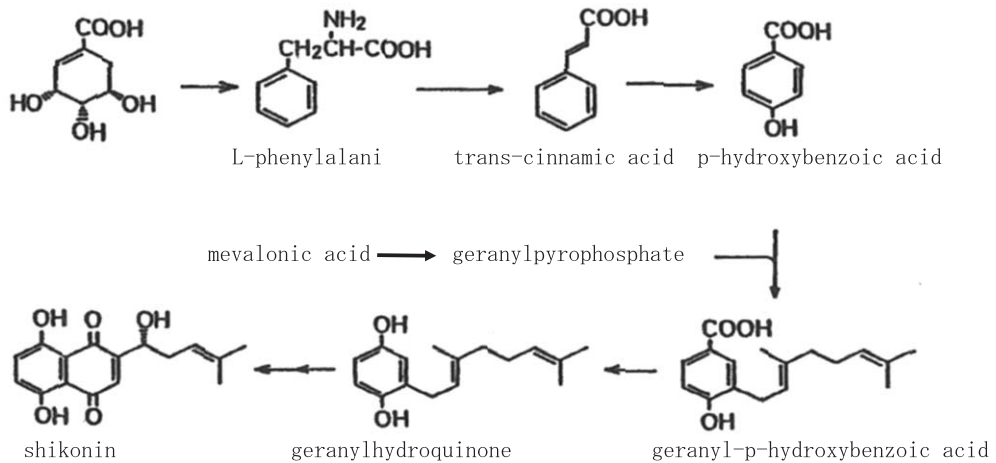


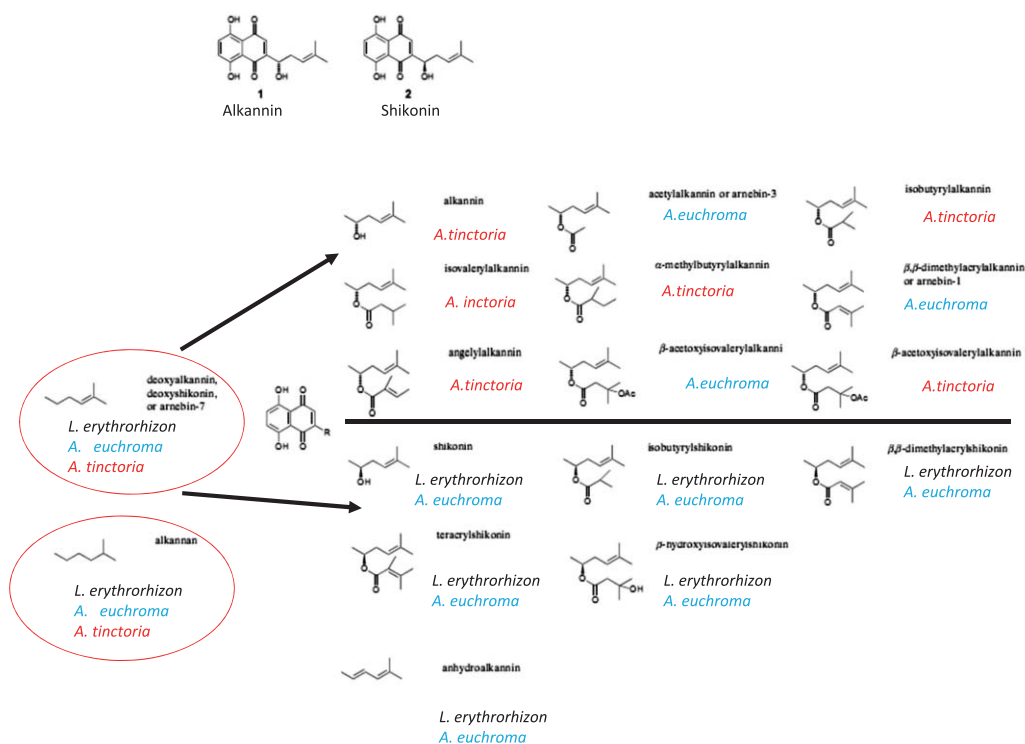
Fig.10 Shikonin の生合成経路

アルカネットは古代ローマやギリシャにおいて若い地上部を野菜として食していたとの記述がある。しかしアルカネット根は上述のムラサキ同様抗炎症作用の強い薬として用いられてきた。前述の紫根とアルカネット根（主成分：alkannin）の成分について検討した結果、両者の成分群は全て鏡を介して対象の構造を持つことが明らかになった。つまりどのような方向から見ても両群は一致することがない構造を持った成分群である。アジアとヨーロッパにおいて同時期に紫色素としてデビューした2種の植物が、平面構造は同一であるが、お互いに対称性を持つ成分群であることは、化学的にも、また植物学的にも興味を持たれる。

Fig. 11は紫根、アルカンナ根および軟紫根の成分とその構造を文献により調査したものである¹³⁾。Deoxyshikonin, deoxyalkannin および arnebin-7, alkanan 等水酸基を持たない化合物群はシコニン、アルカンナおよび軟紫根の何れにも含まれているが、一端水酸基が導入された shikonin, alkannin、さらにエステル結合が導入された, isovaleylalkannin や teracrylshikonin はアルカンナとムラサキではd体とl体に完全に分離している。ところが軟紫根は両者にまたがっていることが明らかとなった。このことはムラサキとアルカンナにおける

生合成酵素群は完全に分離していることが理解できる。しかし軟紫根においてはd体とl体の両者が混在していることから生合成酵素もセットで存在するか、又は酵素の基質特異性が低く、本誌で紹介した大麻成分研究で述べたように、d体とl体の両者を生合成するものと推察している。つまり硬紫根はムラサキとアルカンナとの雑種であることが推察され、このことは前述の通り形態的にもサポートされる。なお、ムラサキやアルカンナの近縁種に含まれる成分の光学異性体の詳細な研究が行われているので紹介したい。酒井ら¹⁴⁾は天然着色料アルカネットの成分検索を行い、数種の化合物を単離しそれら全てが shikonin タイプの類縁体であることを確認している。このことからアルカネットの基原植物とされている *Anchusa officinalis* は間違いで、他の植物を基原とすると推察している。さらに丸山ら¹⁵⁾はDNA分析を行い、アルカネットの基原植物と考えられている *Anchusa officinalis* ではないと推論した。我々は上述の通り、アルカネットの基原植物の一つと言われている *A. tinctoria* の成分検索を行い、単離した全ての化合物が alkannin タイプであったことから、アルカネットの基原植物は *A. tinctoria* であると考えている¹⁶⁾。

Fig. 11 Shikonin 関連化合物の分布



5. アルカンニン誘導体の単離と生物活性

Alkannin 類について最近筆者等が見出した新しい活性として、ヒト大腸がん細胞に対して強い抑制効果が認められたのでこれらの結果について以下に述べる^{17,18)}。

アルカンナ根を含水アルコールで抽出しエキスを得た。本エキスはヒト大腸がん細胞に対する抑制効果が認められたので、エキスを水に懸濁しクロロホルムで抽出することにより色素部分を分離した。色素部分はシリカゲルカラムクロマトを繰り返すことにより8種のalkannin関連化合物(1~8)を単離同定した。なお、これらの内4、7、8は新化合物であったので、NMR、マススペクトル等による詳細な検討を行い、Fig. 12に示すように構造を解明した。

次に2種類のヒト大腸がん細胞系(HCT-116, SW-480)を用いて、化合物1~8の活性を調べたのがFig. 13である。化合物2、8は大腸がん細胞に対して殆ど効果は認められなかった。

また、化合物6、7も効果は低かった。一方化合物4は両細胞系に対して強くかつ容量依存的に細胞抑制を示した。IC₅₀(50%阻害濃度)も化合物4が最も低く4.4 μ mol/lであった。

次にSW-480細胞系を用いてセルサイクルに対する化合物4の影響を調べたのがFig. 14である。化合物4はS期とG2/M期を阻害することにより細胞死を起していることが推察された。

SW-480細胞系においてアポトーシス誘導の状況を調査したのがFig. 15である。化合物4は低濃度(3 μ mol)では初期アポトーシスに留まるが、高濃度(30 μ mol)では後期アポトーシスが起ることが明らかとなった。なお、化合物4以外の化合物によるアポトーシス惹起作用は低かった。

アポトーシス誘導に対しては多くのファクターが絡んでいるが、中でもcaspase-3とcaspase-9タンパクが中心的な働きを担っている。そこ

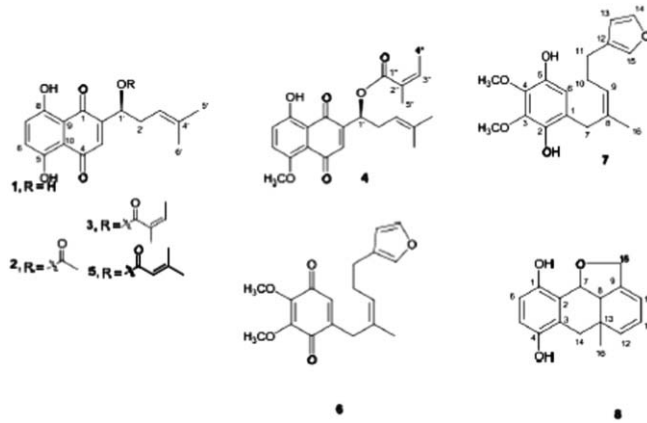


Fig. 12 アルカンナ根から単離した化合物

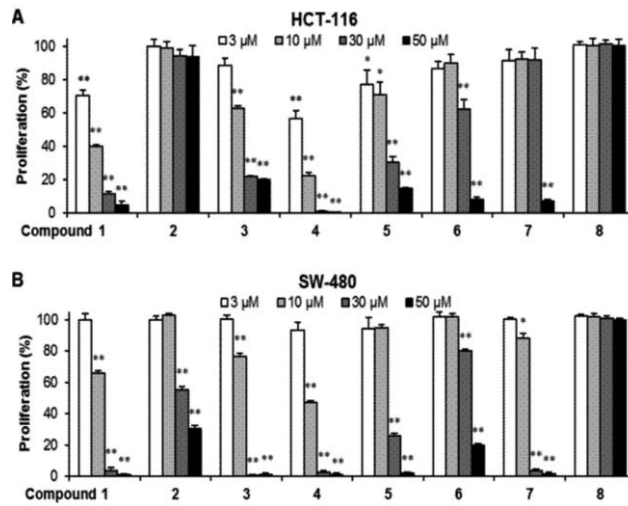


Fig. 13 アルカンナ根から単離した成分のヒト大腸がん細胞系 (HCT-116, SW-480) に対する細胞増殖抑制作用

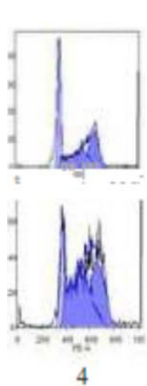


Fig. 14 ヒト大腸がん細胞系 SW-480 のセルサイクルに対する化合物 4 の影響

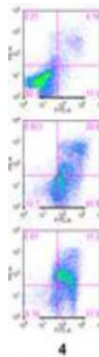
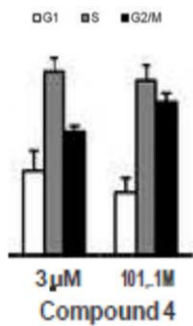
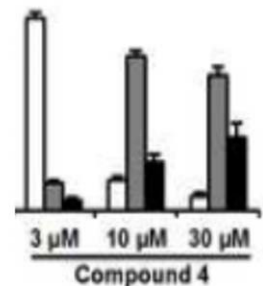


Fig. 15 ヒト大腸がん細胞系 SW-480 のアポトーシスに対する化合物 4 の影響



で化合物4の濃度を変えて caspase-3 と caspase-9 に対する誘導率を調査したのが Fig. 16 である。化合物4の添加量を1、5、10 μ mol と増加すると caspase-3、caspase-9 が容量依存的に増えるが、15 μ mol 添加ではむしろ減少している。この結果アポトーシス誘導に対する化合物4の量は10 μ mol で最高値を示し、そのアポトーシス誘導は caspase-9 を経て caspase-3 を介して惹起するものと推察される。

筆者は本誌において大麻成分生合成酵素 (Tetrahydrocannabinolic acid synthase) と前駆物質 cannabigerolic acid との相互作用をドッキング実験により明らかにしたが⁷⁾、本研究においてもドッキング試験を行った。ヒト caspase-9 タンパクと化合物4の相互作用を見るために Surflex-Dock プログラムを用いてドッキング実験を行った (Fig. 17)。この結果化合物4は、その水酸基がヒト caspase-9 タンパクの Asparagine-340、Serine-339 と水素結合を行うことにより直接 caspase-9 と反応しアポトーシスを惹

起することが明らかになった。

6. おわりに

日本、韓国、中国に自生するムラサキとヨーロッパ～中央アジア地域に自生するアルカンナは平面構造が同一であるが立体的には鏡像の関係にある成分を生合成しており、このような例は極めて稀だと認識している。両植物は何故鏡像体を作る必要性があるのか、両植物が何故このような進化を辿ったのか、等自然の摂理に驚きを禁じ得ない。ともあれ東洋と西洋で共に重要な色素素材として重要視されてきた成分を含む紫根配合の漢方薬「紫雲膏」とアルカネットの製品「ヒストプラスチンレッド」は何れも抗炎症作用が強く例えば火傷や褥瘡（床擦れ）に用いられている。「紫雲膏」は火傷、炎症、痔疾、褥瘡（床擦れ）等に用いられるが最近ベルーで抗リウマチ薬として臨床に供され、現在エチオピアエチオピア・アーマー医学研究所で臨床試験が行われている¹⁹⁾。一方、「ヒ

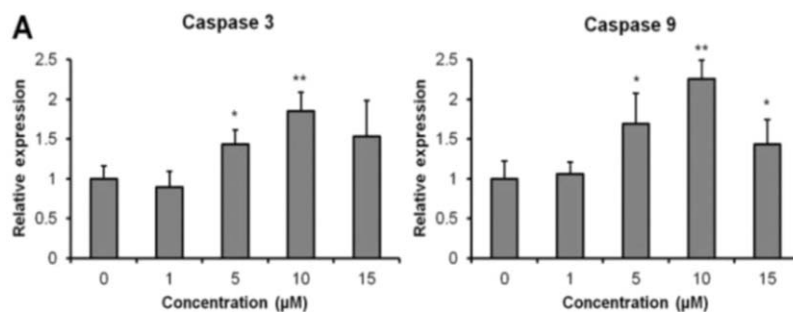


Fig. 16 化合物4の caspase-3 および caspase-9 におよぼす影響

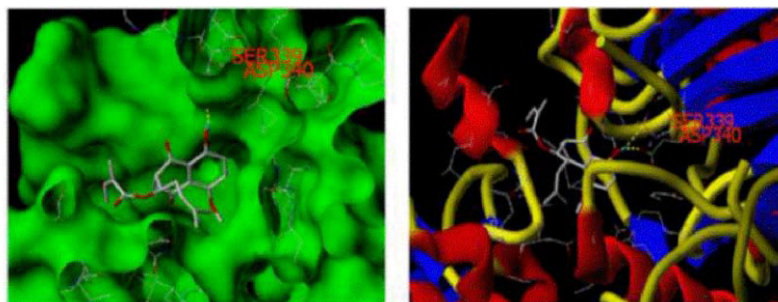


Fig. 17 化合物4と caspase-9 とのドッキング実験

ストプラスチックレッド」は外傷性潰瘍、ハンセン病性潰瘍、褥瘡等に適用され、無痛性潰瘍に対しては4～6週間塗布することにより80%の治癒率であると言われる^{20, 21)}。本稿ではヨーロッパ産の紫色素関連成分がヒト大腸がん細胞に対して強いアポトーシス惹起作用があることを示した。上記の通り長い間薬用として臨床に用いられてきた紫根とアルカネットであるので、その安全性は高いものと推察されるので大腸がんに対する新しい薬剤の創出に貢献出来ればと念じているところである。

引用文献

- 1) 秋田徹, 黒柳正典, 小林公子, 佐竹元吉, 他 (2014) 「天然添加物に関わる基礎的調査研究—その1—天然香料」『長崎国際大学論叢』15, 193-202頁.
- 2) 黒田チカ (1918) 「紫根の色素につきて」『東京化学会誌』39, pp.1051-1115.
- 3) C. Kuroda, M. Wada (1936) 'Studies on the Constitution of Shikonin. Syntheses of Isohexyl-naphthazarin and the Related Compounds'. *Proc. Imp. Acad.*, 12, pp.239-241.
- 4) I. Morimoto, Y. Hirata (1966) 'New naphthoquinone derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*'. *Tetrahedron Lett.*, 7, pp.3677-3680.
- 5) 久保周次, 吉崎文彦 (1982) 「紫根の研究—1—硬紫根中の新微量色素の構造と2種類の Shikonin 誘導体異性体の単離」『生薬学雑誌』27, pp. 31-36.
- 6) S. Karasawa, K. Yoza, NH. Tung, T. Uto et al. (2015) 'Determination of the absolute configuration of the novel anti-trypanosomal iridoid molucidin isolated from *Morinda lucida* by X-ray analysis' *Tetrahedron Lett.*, 印刷中.
- 7) 正山征洋 (2008) 「大麻研究」『長崎国際大学論叢』8, 265-274頁.
- 8) HV. Schmid, MH. Zenk (1971) 'p-Hydroxybenzoic acid and mevalonic acid as precursors of the plant naphthoquinone alkannin'. *Tetrahedron Lett.* 44, pp.4151-4155.
- 9) H. Inouye, S. Ueda, K. Inoue, H. Matsumura (1979). 'Biosynthesis of shikonin in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*'. *Phytochemistry* 18, pp.1301-1308.
- 10) Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga, T. Morimoto (1981) 'Production of shikonin derivatives by cell suspension cultures of *Lithospermum erythrorhizon*, II A new medium for the production of shikonin derivatives'. *Plant Cell Reports*, 1, pp.61-67.
- 11) K. Yazaki (1997) 'Recent advances in quinone biosynthesis and related gene expression in *Lithospermum erythrorhizon*'. *Research Trend, Current Topics in Phytochemistry* 1, pp.125-135.
- 12) 正山征洋 (2009) 「サフランの薬理活性」『長崎国際大学論叢』9, 61-73頁.
- 13) VP. Papageorgiou, AN. Assimopoulou, EA. Couladouros, D. Hepworth, KC. Nicolaou (1999) 'The chemistry and biology of alkannin, shikonin, and related naphthazarin natural products' *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, pp.270-300.
- 14) 酒井信夫, 丸山卓郎, 川原信夫, 合田幸広 (2004) 「天然着色料アルカネット色素の主色素成分に関する研究」『日本食品化学学会誌』12, 10-14頁.
- 15) 丸山卓郎, 酒井信夫, 川原信夫, 合田幸広 (2005) 「天然着色料アルカネット色素の主色素成分と基原種に関する研究」『日本食品化学学会誌』12, 76-79頁.
- 16) 加藤喜昭, 小林公子, 佐竹元吉, 正山征洋, 関田節子, 森本隆司, 義平邦利, 和仁皓明 (2010) 「天然香料基原物質の安全性評価のための基礎的調査研究」『日本食品化学研究振興財団研究成果報告書』76-78頁.
- 17) NH. Tung, C. Wang, CS. Yuan, GJ. Du, Y. Shoyama (2013) 'Naphthoquinone components from *Alkanna tinctoria* (L.) Tausch show significant antiproliferative effects on human colorectal cancer cells'. *Phytotherapy Res.* 27, pp.66-70.
- 18) NH. Tung, GJ. Du, CS. Yuan, Y. Shoyama et al., (2013) 'Isolation and chemopreventive evaluation of novel naphthoquinone compounds from *Alkanna tinctoria*'. *Anti-Cancer Drugs*, 24, pp.1058-1068.
- 19) UMIN CTR 臨床試験登録情報
- 20) VP. Papageorgiou, AN. Assimopoulou, AC. Ballis (2008) 'Alkannins and shikonins: A new class of wound healing agents.' *Curr. Med. Chem.*, 15, pp.3248-3267.
- 21) KL. Comepan, RA. Ynalvez (2014) 'Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A Review.' *Res. J. Medicinal Plant* 8, pp.204-213.