

## 論文の内容の要旨

論文題目                      オリーブ培養細胞によるアクテオサイド類の生合成  
氏 名                              西丸 宏

### 【背景】

植物組織培養は、植物生理学的な利用の他、植物が生産する有用な二次代謝産物の安定した生産・供給にも応用できる技術である。また、植物細胞を培養系に移すと、正常な植物体では生産されない特殊な化合物を生産する例も多い。この多くはファイトアレキシンと総称される植物防御物質であるが、天然化合物の探索資源としても魅力のある対象である。

オリーブ(*Olea europaea*)はモクセイ科オリーブ属に属し、その果実を圧搾して得たオリーブ油は古くから食用油として用いられており、日本薬局方収載の医薬品でもある。また、オレアノール酸を中心とするオレアナン型トリテルペンを生産することでも知られており、オリーブから誘導した培養細胞系では有用なオレアナン型トリテルペンおよびその配糖体サポニンを生産することが期待された。

アクテオサイドはフェニルエタノイドと呼ばれる化合物の1つで、C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>型化合物の配糖体という植物天然化合物では珍しい構造を持ち、また、抗菌作用・抗酸化作用など様々な薬理活性を持つことが報告されている構造的にも生理的にも興味深い化合物であるにもかかわらず、その生合成に関する研究はほとんど行われていない。本研究では、オリーブ培養細胞系を用いてアクテオサイド類の生合成機構に関する知見が得られたので報告する。

【1. オリーブ培養細胞が生産する化合物】

オリーブ培養細胞は植物組織培養における基本培地である Murashige & Skoog 培地に一部改変を加えた DK-NH<sub>4</sub> 寒天培地で継代している。これを同液体培地に移植し、4週間後に収穫した細胞のメタノール抽出液を HPLC を用いて精製し、アクテオサイド(1)を中心とする Figure 1 に示したような5種のフェニルエタノイド類が得られた。アクテオサイドは最大条件で細胞質量比 20%弱という高い生産性を示し、今後の供給系としての期待が持てる。この細胞系を用いて、フェニルエタノイド類合成にかかわると考えられる化合物を標識体の形で投与する取り込み実験を行うことにした。

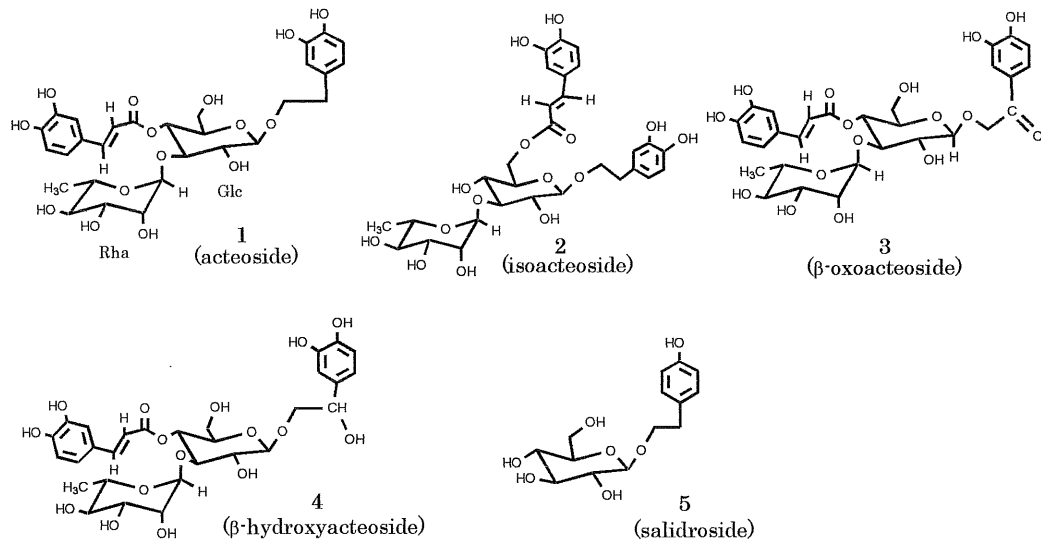


Figure 1. Phenylethanoids isolated from cultured cells of *Olea europaea*.

培養細胞では当初期待したトリテルペン配糖体は生産されていなかったが、培養細胞中のトリテルペン成分を分析したところ、原植物ではオレアナン型が中心なのに対し、培養細胞では Figure 2 に示すようなウルサン型のトリテルペンをオレアナン型の約3倍多く生産していることが明らかとなった。

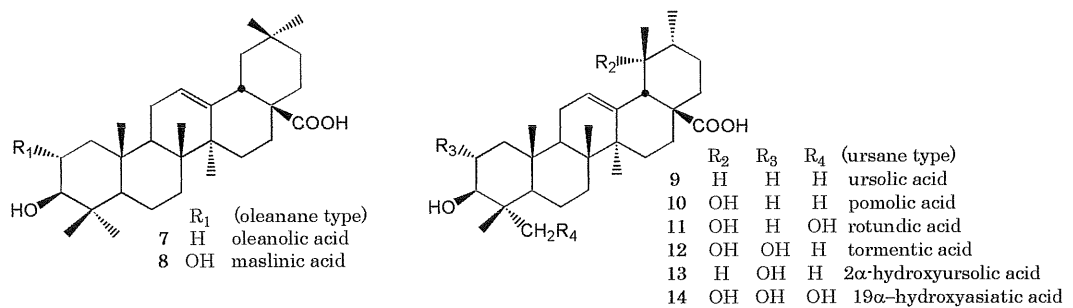


Figure 2. Triterpenoids isolated from cultured cells of *Olea europaea*.

【2.  $^{13}\text{C}$  標識仮想中間体のアクテオサイドへの取り込み実験】

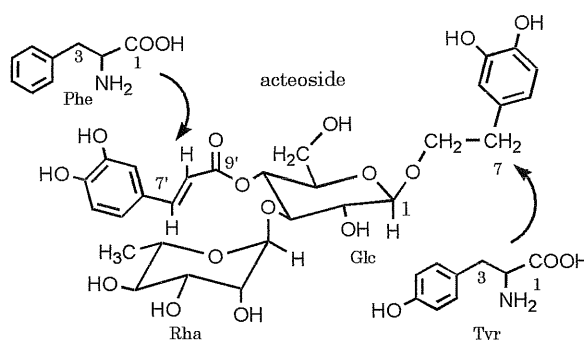
液体培養 3 週間目の細胞に 6 種の標識化合物を投与し、1 週間後に収穫した。細胞の MeOH 抽出液からアクテオサイドを精製し、得られた  $^{13}\text{C}$ -NMR あるいは ESI-LC-MS スペクトルデータから比取り込み率を求めた。その結果、phenylalanine はアクテオサイドの caffeic acid 部分のみに取り込まれ、3,4-dihydroxyphenylethanol 部分には取り込まれないのに対し、tyrosine は 3,4-dihydroxyphenylethanol 部分に高い割合で取り込まれ、caffeic acid 部分にも若干取り込まれたことが判明した。(Table 1)

Table 1. Relative isotopic abundance of acteoside after feeding  $^{13}\text{C}$ -Phe or  $^{13}\text{C}$ -Tyr

Position	A	B
7'	6.4	1.9
9'	7.3	2.2
7	1.1	26.7
Glc-1	1.1	1.1

A: 10 mg/ flask Phe ( $1\text{-}^{13}\text{C}:3\text{-}^{13}\text{C}=1:1$ )

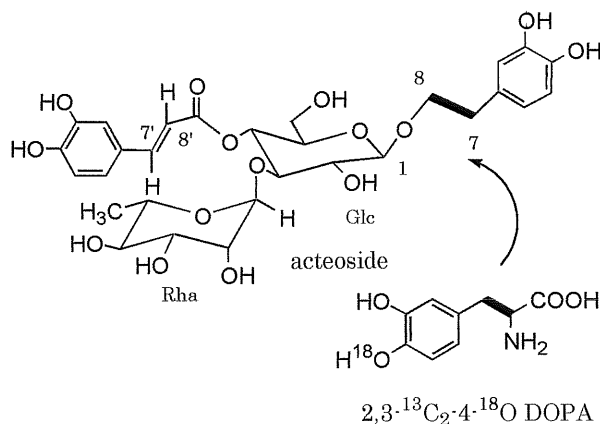
B: 10 mg/ flask Tyr ( $1\text{-}^{13}\text{C}:3\text{-}^{13}\text{C}=1:1$ )



DOPA は 3,4-dihydroxyphenylethanol 部分に取り込まれたが、caffeic acid 部分には取り込まれなかった。(Table 2)

Table 2. Relative isotopic abundance of acteoside after feeding 2,3- $^{13}\text{C}_2$ -DOPA

Position	Abundance
7'	12.3
8'	12.3
7	1.1
8	1.1
Glc-1	1.1

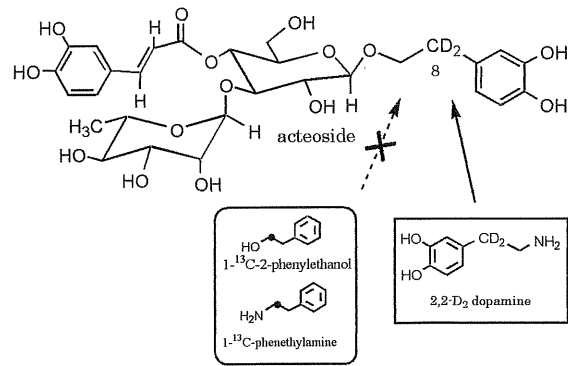


2,2-D<sub>2</sub> dopamine を用いた実験から、dopamine はアクテオサイドの 3,4-dihydroxyphenylethanol 部分に取り込まれることが判明した。また、LC-MS により dopamine の 2 位の D はそのままの状態に取り込まれていることが明らかとなった (Table 3)。一方、2-phenylethanol および phenethylamine はアクテオサイドには取り込まれず、ともに別のフェニルエタノイド配糖体(2-phenethyl β-primeveroside)に変換されていた。

Table 3. Relative MS peak intensity of acteoside after feeding 2,2-D<sub>2</sub> dopamine

ESI-LC-MS <i>m/z</i> [M-H] <sup>-</sup>	non-labeled	labeled
623	100	100
624	29	31
625	5.8	27
626	0.0	6.1

labeled: 10 mg/ flask 2,2-D<sub>2</sub> dopamine



### 【3. 阻害剤を用いたアクテオサイド生産抑制実験】

液体培養 2 週間目の細胞に最終濃度 1mM の  $\alpha$ -methyltyrosine (tyrosine-3-mono-oxygenase inhibitor) および benserazide (DOPA decarboxylase inhibitor) をそれぞれ投与し、2 週間後に培養細胞 MeOH 抽出液中のアクテオサイド量を定量したところ、 $\alpha$ -methyltyrosine ではアクテオサイド生産の抑制は見られなかったが、benserazide ではフラスコあたり・乾燥細胞重量あたり、ともにアクテオサイド生産量の減少が確認された (Figure 3)。

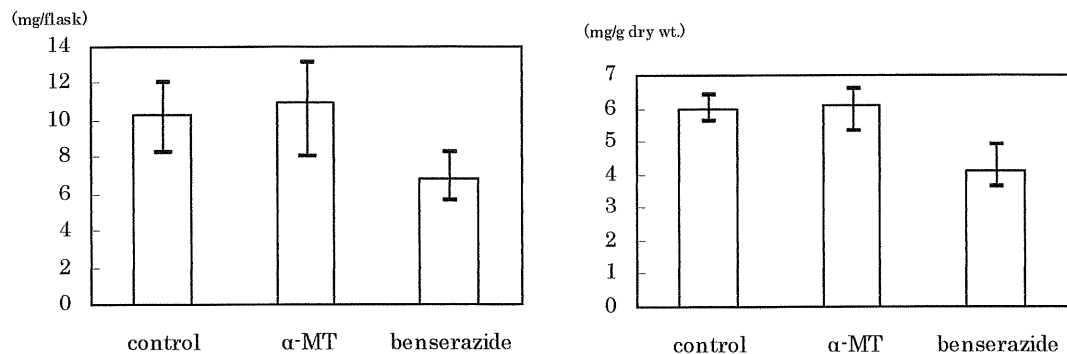


Figure 3. Effects of enzyme inhibitors on the production of acteoside

### 【4. 考察】

今回の結果から、アクテオサイドの caffeic acid 部分は phenylalanine から桂皮酸経路を経て生合成され、一方、3,4-dihydroxyphenylethanol 部分は tyrosine 由来であることが明らかとなった。また、投与実験の結果から、3,4-dihydroxyphenylethanol 部分は DOPA, dopamine を経て生合成されると考えられた。植物界で tyrosine  $\rightarrow$  DOPA  $\rightarrow$  dopamine という経路はベンジルイソキノリンアルカロイド生合成の初期段階で見られる経路であるが、オリーブ培養細胞でアルカロイド類の生成は確認されず、アルカロイ

ドを生産しない植物においても類似の経路が存在するという興味深い結果が示された。また、DOPA 脱炭酸酵素阻害剤として知られる benserazide を培養細胞に投与すると、アクテオサイドの生産が抑制された。一方、tyrosine が脱炭酸されて生成した tyramine とグルコースの配糖体である solidoside がオリーブ培養細胞内で生成されていることから、これがアクテオサイドの中間体である可能性も考えられる。今後アクテオサイド類合成機構のさらなる解明が進むことで、植物二次代謝産物の多様性の一端が明らかになるとともに、新たな有用フェニルエタノイド化合物への応用も期待できる。

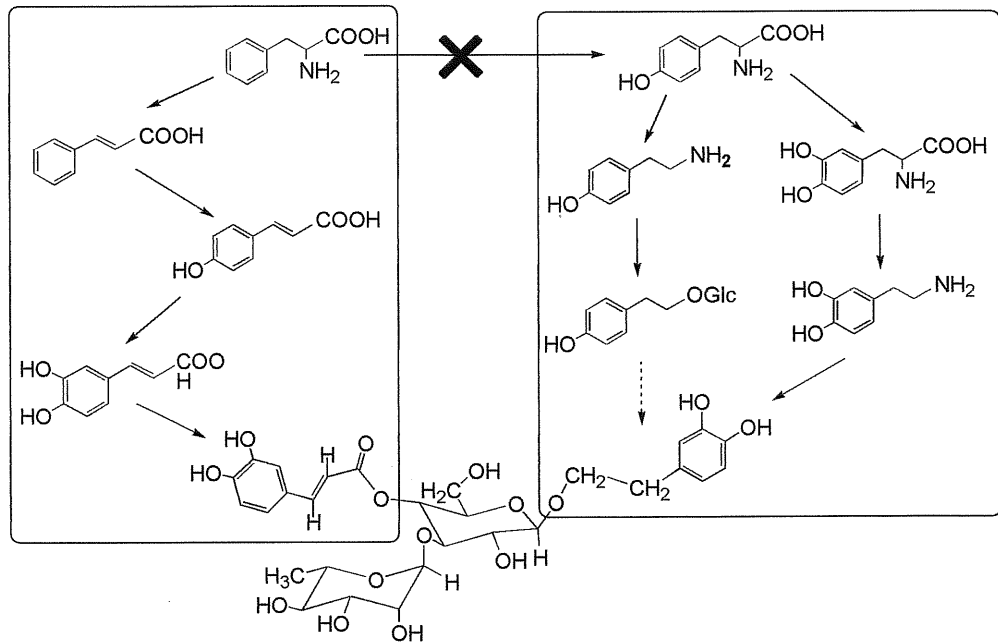


Figure 4. Proposed biosynthetic pathway of phenylethanoids in Olive cell culture