

審査の結果の要旨

氏名 西丸 宏

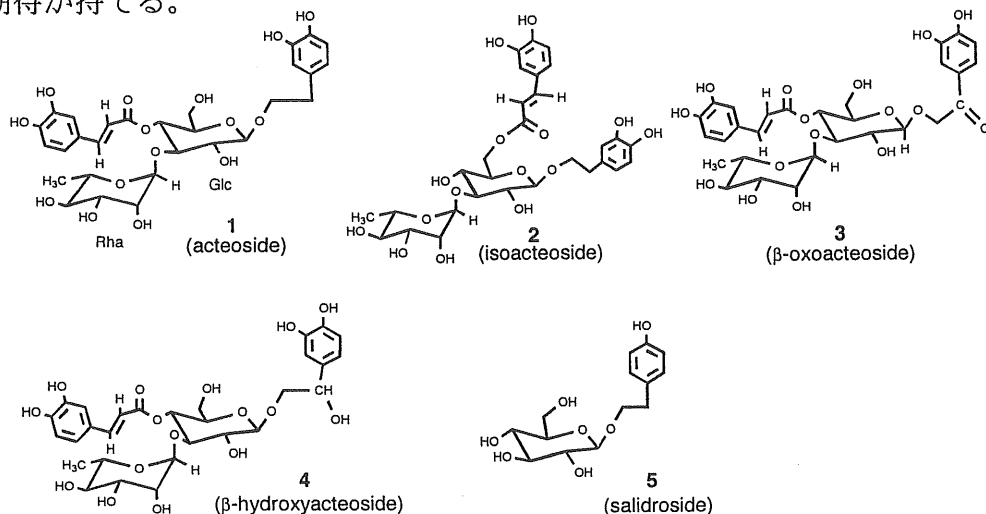
植物組織培養は、植物生理学的な利用の他、植物が生産する有用な二次代謝産物の安定した生産・供給にも応用できる技術である。また、植物細胞を培養系に移すと、正常な植物体では生産されない特殊な化合物を生産する例も多い。この多くはファイトアレキシンと総称される植物防御物質であるが、天然化合物の探索資源としても魅力のある対象である。

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、日本薬局方記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オナン型トリテルペンを含有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は有用なオレオ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。

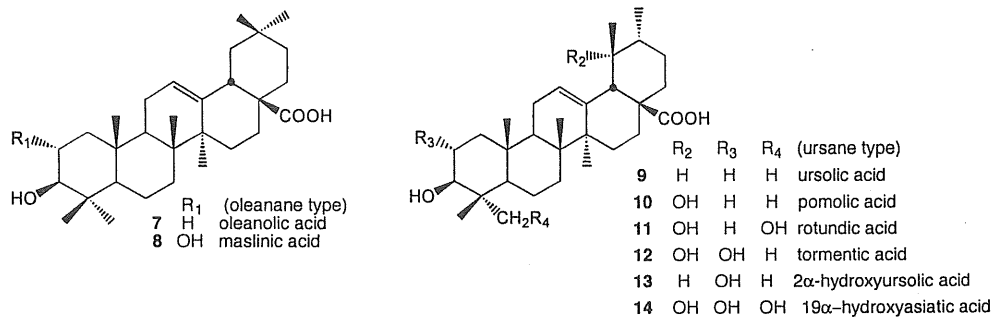
西丸はオリーブをはじめとするモクセイ科植物培養細胞のカルス誘導法の改良を行い、得られた培養細胞より原植物にはほとんど含まれないフェニルエタノイド類が大量に生産されることを見いだした。さらに、オリーブ培養細胞を用い、フェニルエタノイド類の生合成研究を行った。

1. オリーブ培養細胞が生産する化合物

モクセイ科植物培養細胞の誘導には植物組織培養における基本培地であるMurashige & Skoog 培地のアンモニウムイオンをカリウムイオンで置き換えたCM-NH₄あるいはDK-NH₄寒天培地が有効であり、ほとんどのモクセイ科植物よりカルスが誘導された。オリーブ培養細胞はDK-NH₄寒天培地で継代した。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各種カラムおよびHPLCを用いて精製し、アクテオサイド(1)を中心とする下に示した5種のフェニルエタノイド類を得た。フェニルエタノイドはC₆-C₂型化合物の配糖体という植物由来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群である。また、その生産の最適化を行ったところ、オリーブ培養細胞は最大条件で細胞質量比20%弱という高いアクテオサイド生産性を示し、今後の供給系としての期待が持てる。



一方、オリーブ培養細胞は当初期待したトリテルペン配糖体は生産していなかったが、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、培養細胞では下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かとなった。



2. アクテオサイドの生合成

液体培養3週間目のオリーブ培養細胞に各種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¹³C-NMRあるいはESI-LC-MSスペクトルデータの解析を行い比取り込み率を求めた。その結果、フェニルアラニン¹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、チロシン²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。チロシンの代謝物であるDOPA³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。2,2-D₂ dopamineを用いた実験から、DOPAと同様にdopamine⁴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。一方、芳香環部分に水酸基を持たない2-phenylethanolおよびphenethylamine⁵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。

液体培養2週間目の細胞に最終濃度1mMの α -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、 α -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。

以上の結果から、アクテオサイドのcaffeic acid部分はphenylalanine¹から桂皮酸経路を経て生合成され、一方、3,4-dihydroxyphenylethanol部分はtyrosine²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DOPA³, dopamine⁴を経て生合成されることが考えられた。

以上まとめると、西丸は誘導困難なモクセイ科植物のカルス誘導の改良を行い、一般法を確立し、オリーブ培養細胞によるアクテオサイドの生産を最適化した。また、これまで不明であったフェニルエタノイド類の生合成については、phenylethanol部分と

caffeic acid部分がそれぞれチロシン，フェニルアラニンから由来することを標識前駆体および酵素阻害剤の投与実験から明らかにした。以上の結果は，将来的に新たな有用フェニルエタノイド化合物の創製への応用も期待でき，薬用植物学，天然物化学の進展に寄与するところ大であり，博士（薬学）に相応しいと判断した。