

植物培養細胞を活用して基礎研究と産学連携研究を追求して

A Study of the Fundamental Research Using Cultured Plant Cells Between University and Industry

濱田 博喜

Hiroki Hamada

岡山理科大学 理学部 臨床生命科学科 教授

Okayama University of Science, Faculty of Science, Department of Life Science, Professor

1. はじめに

筆者は食品および食材の有効成分(2次代謝物；人の体に役立つ生物が作る化合物)を活用して、予防医学の研究を行っている。ヒトは食品成分の機能性を上手く使って病気にかかりにくい体作りを行い、いつまでも健康で生活出来る事が大切である。本原稿では、筆者が行っている新規な食品の素材開発の具体的な事実を報告する。またこの一連の研究成果は産学連携推進の研究基礎になっている。その結果、筆者は岡山理科大学発ベンチャー会社を立ち上げ、これら一連の化合物を含む、機能性食品や化粧品を創製して上市している。

近年、生体触媒としての植物培養細胞が有する物質変換機能が注目されている。陸上に生息し、移動する手段をほとんど持たない植物は、自己防衛および情報伝達のため、様々な二次代謝産物を生産する。このことから植物細胞は多様の酵素を持ち、植物固有の物質変換、合成機能を有していると考えられる。筆者は、この植物に潜在する有機化合物の物質変換機能を酵素的に解明する目的で、植物培養細胞による外来基質の変換反応に関する研究を行っている。これまでに、植物培養細胞が触媒する還元反応、加水分解反応、異性化反応、配糖化反応、エステル化反応、および水酸化反応について、変換研究の成果が得られている。この中でも、植物細胞が行う配糖化反応、エステル化反応、および水酸化反応は、細胞内では代謝産物の活性化に関与する重要な反応である。特に、配糖化反応はその特性から、種々の生理活性化合物の安定化と生理機能の活性化と新規な食品素材開発へ応用できると考えられる。

筆者の研究室では植物培養細胞が触媒する配糖化反応を、生理活性化合物の変換へ応用・展開して、安定性と新規な生理活性を有する食品素材化合物を合成する試みを行っている。本原稿では、これまでに得られている植物培養細胞による生理活性化合物の変換および活性化に関する研究成果とこれらが新規の食品素材であることも紹介する。

2. トコフェロール類の配糖化

(1) トコフェロールの変換

トコフェロールには動脈硬化を防ぐ作用、血栓の生成を防ぐ作用、血行を促進する作用、およびホルモンを調整する作用があり、医薬品、食品添加物、動物薬、動物用飼料など幅広く使われている。しか

し、トコフェロールは光に不安定であり、水溶液に対する溶解度も極めて低い。また、これまでに、植物培養細胞によるトコフェロールの変換研究の報告はない。筆者らは種々の植物培養細胞によるトコフェロールの変換を行い、より安定で生理機能をもつトコフェロール誘導体の合成を検討することとした^{1,2,3)}。

実験で使用する植物培養細胞は、培養用フラスコ内の新鮮な寒天培地に植え継いで、3週間ごとに継代培養を行う。特に、変換反応に用いる培養細胞は、培養細胞の一部を寒天を含まない液体培地に移植し、振盪培養器内において25℃、120回転/分の条件で培養することにより、2週間ほどで均一なサスペンション状態の培養細胞になったものを使用する。この培養細胞(約50グラム)を新鮮な液体培地(100 ml)に移植して、同じ培養条件で1週間前培養を行う。培養細胞への基質の投与はクリーンベンチ内において無菌状態で行う。基質10ミリグラムを前培養した細胞に投与し、一定期間、同じ振盪条件で反応を行う。細胞部分はメタノール浸漬し、メタノール抽出物を有機溶媒と水で分配し、培地部分は有機溶媒で抽出する。変換生成物をシリカゲルカラム、イオン交換カラム、TLC、HPLCを用いる各種クロマトグラフィーにより単離・精製した後に、スペクトル測定により構造解析を行う。

天然のトコフェロールのうち、 α -トコフェロールを基質として用いた。ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による α -トコフェロールの変換の結果を図1に示す。基質 α -トコフェロールは、対応する α -トコフェリル6-O- β -グルコシドへ変換された。ニチニチソウ培養細胞による変換の場合にも同様に、 α -トコフェリル6-O- β -グルコシドに変換した。これに対し、タバコ培養細胞で α -トコフェロールを変換したところ、 α -トコフェリル6-O- β -グルコシドに加え、対応する α -トコフェリル6-O- β -ゲンチオビオシドが生成物として得られた。また、ユーカリ培養細胞による α -トコフェロールの変換では、 α -トコフェリル6-O- β -グルコシドと α -トコフェリル6-O- β -ゲンチオビオシドに加え、 α -トコフェリル6-O- β -ルチノシドが変換生成物として得られた。一方、天然のトコフェロールのうち、 δ -トコフェロールを基質として用いた場合にも、ユーカリ培養細胞は δ -トコフェリル6-O- β -グルコシド、 δ -トコフェリル6-O- β -ゲンチオビオシド、および δ -トコフェリル6-O- β -ルチノシドに変換した。以

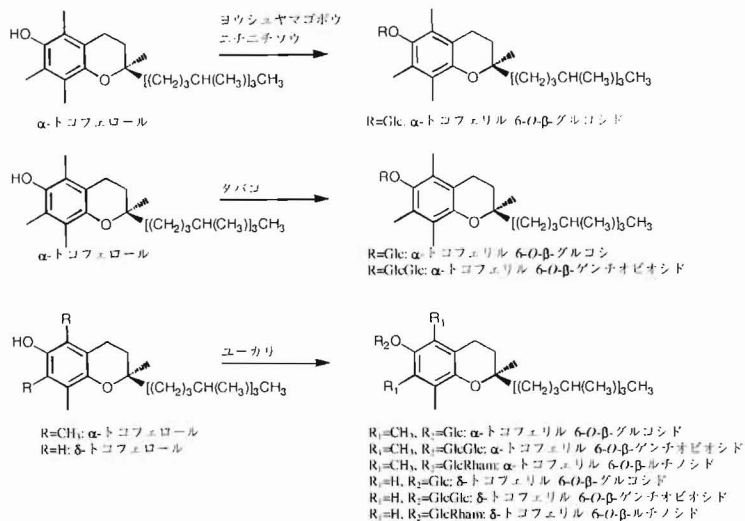


図1 トコフェロールの配糖化

上, ヨウシュヤマゴボウ培養細胞およびニチニチソウ培養細胞はトコフェロール類を単糖配糖体へ変換し, タバコ培養細胞とユーカリ培養細胞はそれぞれ対応する二糖配糖体に変換する能力があることが明らかとなった。また, トコフェロール類をゲンチオビオシドおよびルチノシドへ変換する機能は, タバコ培養細胞及びユーカリ培養細胞のみにみられる特徴的なものである。

(2) トコフェロール類縁体の変換

筆者は, クロマノール環の2位の側鎖の炭素鎖長を様々に変えたトコフェロール類縁体について植物培養細胞による変換を行い, 新規な生理活性化合物を合成しようと試みている^{1,4)}。市販のα-トコフェロール類縁体である2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノールと, 合成した2,5,7,8-テトラメチル-2-(4-メチルペンチル)-6-クロマノール, および2,5,7,8-テトラメチル-

-2-(4,8-ジメチルノニル)-6-クロマノールを基質として用いた植物培養細胞による変換の結果を紹介する。ヨウシュヤマゴボウおよびニチニチソウ培養細胞によるトコフェロール類縁体の変換の結果を図2に示す。ヨウシュヤマゴボウ培養細胞により, これら3種類のトコフェロール類縁体は, それぞれ対応する6-O-β-グルコシドへ変換された。これに対し, ニチニチソウ培養細胞は2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマノールを2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマニル 6-O-β-グルコシド, 2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-クロマニル 6-O-β-ゲンチオビオシド, および1位が加水分解された4-ヒドロキシ-3-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチル)2,5,6-トリメチルフェニル 6-O-β-グルコシドへ変換した。このことから, ニチニチソウ培養細胞はクロマノール環の2位にメチル基を持つトコフェロール類縁体の6位をグルコシル化, ゲンチオビオシル化, および1位を加水分解する機能を有することがわか

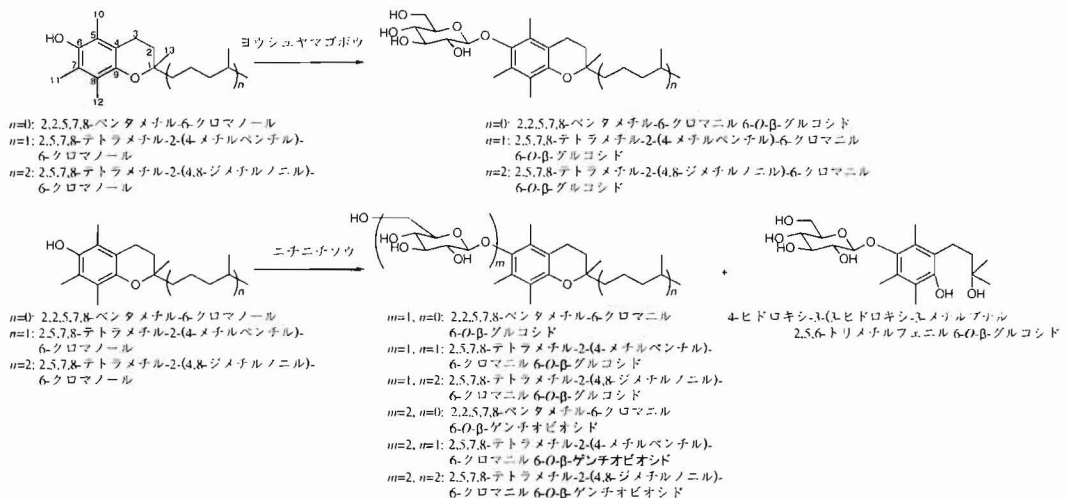


図2 トコフェロール類縁体の配糖化

った。さらにニチニチソウ培養細胞は2,5,7,8-テトラメチル-2-(4-メチルペンチル)-6-クロマノールと2,5,7,8-テトラメチル-2-(4,8-ジメチルノニル)-6-クロマノールを、それぞれ対応する6-O-β-グルコシドおよび6-O-β-ゲンチオビオシドへ変換した。この変換では1位が加水分解された生成物は得られなかった。このように植物培養細胞によって、トコフェロール類縁体に対する異なる変換能力が示されたことは興味深い。

(3) トコフェロール配糖体の生理活性

最近、トコフェロールの配糖体は抗アレルギー活性を有することが報告されている^{5,6)}。植物培養細胞による変換で得られたトコフェロール配糖体の生理機能は大変興味深い。筆者らはトコフェロールおよびトコフェロール類縁体の各種の配糖体について、抗アレルギー活性を検討するため、トコフェロール配糖体を用いる抗体産生抑制試験を行った⁷⁾。オボアルブミンを抗原として腹腔内投与したラットにそれぞれのサンプルを11日間、一定量/日の投与を行い、投与開始から15日目における血中の抗体量として、ラット5匹の平均IgE抗体レベルを調べた。表1に

種々のトコフェロール配糖体による抗体産生抑制活性を指標とした、抗アレルギー機能試験の結果を示す。トコフェロール およびトコフェロール類縁体のβ-ゲンチオビオシドでは抗アレルギー活性が低かったのに対し、トコフェロールおよびトコフェロール類縁体のβ-グルコシドは高い活性を示した。トコフェロール配糖体がこのような生理機能を持つことはきわめて興味深い現象である。

3. フラボン類の配糖化, エステル化

フラボン類はフリーラジカルを直接除去することができる強力なラジカルスカベンジャーとして知られている。クエルセチン, エピカテキン, カテキンなどのフラボン類は, 抗菌作用, 抗腫瘍作用, 血圧上昇抑制作用などの優れた生理作用を有することから, 医薬産業から食品に至るまで幅広い分野で利用されている。

筆者は植物培養細胞によるこれらのフラボン類の変換を行い, 光酸化に対する色沢安定性や生理作用, および天然における希少価値の高い水溶性フラボン(配糖化フラボンおよびマロニル配糖化フラボン)を合成しようと試みている⁷⁾。まず, タバコ培養細胞

表 1. トコフェロール配糖体の抗体産生抑制活性

化合物	IgE 抗体レベル
α-トコフェリル 6-O-β-グルコシド	195
2,5,7,8-テトラメチル-2-(4-メチルペンチル)-6-クロマニル 6-O-β-グルコシド	184
2,5,7,8-テトラメチル-2-(4,8-ジメチルノニル)-6-クロマニル 6-O-β-グルコシド	170
α-トコフェリル 6-O-β-ゲンチオビオシド	337
2,5,7,8-テトラメチル-2-(4-メチルペンチル)-6-クロマニル 6-O-β-ゲンチオビオシド	366
2,5,7,8-テトラメチル-2-(4,8-ジメチルノニル)-6-クロマニル 6-O-β-ゲンチオビオシド	353
ハイドロコルチゾン	341

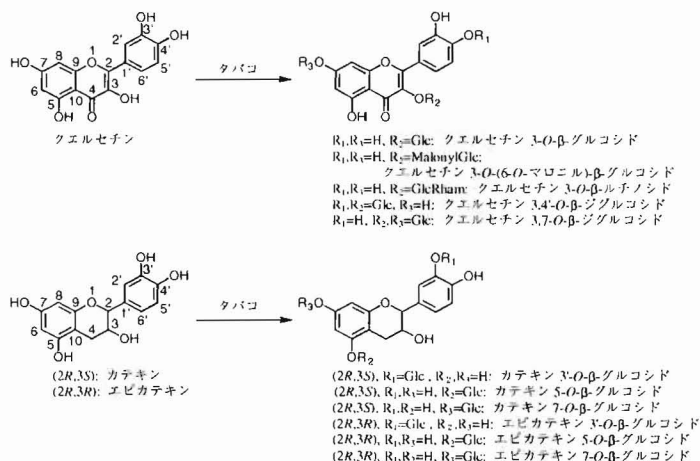


図 3 フラボン類の配糖化, エステル化

によるクエルセチンの変換を調べた。タバコ培養細胞は、クエルセチンをクエルセチン 3-O- β -グルコシド、クエルセチン 3-O-(6-O-マロニル)- β -グルコシド、クエルセチン 3-O- β -ルチノシド、クエルセチン 3,4'-O- β -ジグルコシド、およびクエルセチン 3,7-O- β -ジグルコシドに変換した(図 3)。

変換反応の経時的追跡は、通常物質変換実験と同様にインキュベートさせた複数のフラスコについて、一定時間ごとにフラスコ一本から反応物を抽出することにより行う。生成物の相対量は、抽出物の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)分析により求める。変換の経時変化の様子を図 4 に示す。この結果より、タバコ培養細胞は、クエルセチンの 3 位の水酸基を位置および立体選択的に配糖化して対応する β -配糖体に変換することが明らかとなった。

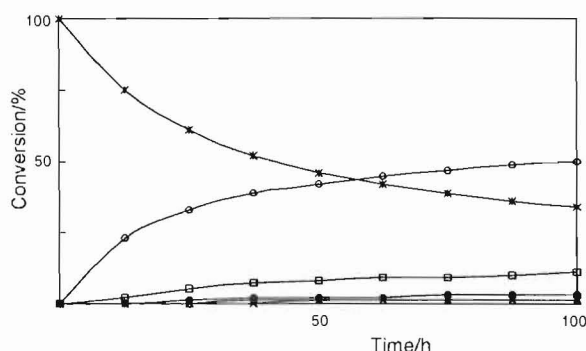


図 4 タバコによるクエルセチン変換の経時変化

- *— クエルセチン
- クエルセチン 3-O- β -グルコシド
- クエルセチン 3-O-(6-O-マロニル)- β -グルコシド
- クエルセチン 3-O- β -ルチノシド
- ×— クエルセチン 3,4'-O- β -ジグルコシド
- △— クエルセチン 3,7-O- β -ジグルコシド

また、タバコ培養細胞はクエルセチン 3-O- β -グルコシドの糖の 6 位の水酸基を位置選択的にマロニル化することが分かった。

次に、タバコ培養細胞によるエピカテキンの変換を調べた。その結果、タバコ培養細胞はエピカテキンをエピカテキン 3'-O- β -グルコシド、エピカテキン 5-O- β -グルコシド、エピカテキン 7-O- β -グルコシドへ変換した。同様にタバコ培養細胞は、カテキンをカテキン 3'-O- β -グルコシド、カテキン 5-O- β -グルコシド、カテキン 7-O- β -グルコシドに変換した。以上の結果から、タバコ培養細胞はカテキンおよびエピカテキンの 3'-, 5-, 7-位をそれぞれ立体選択的に β -グルコシル化することがわかった。また、タバコ培養細胞はクエルセチンを 3 種類の二糖配糖体へ変換したのに対し、エピカテキンおよびカテキンについては単糖配糖体のみに変換することが明らかになった。

クエルセチン 3-O-(6-O-マロニル)グルコシドは、血

中コレステロール低下作用、中性脂肪低下作用、および抗動脈硬化作用を有する生理活性化合物として知られている。また、カテキン 3'-O-グルコシドは高いチロシナーゼ阻害活性を示すことが知られている。今回の研究により、タバコ培養細胞はフラボン類を、高い安定性や生理機能を有する水溶性フラボンへ変換する能力を持つことが明らかになった。植物培養細胞によるフラボン類の変換研究における一層の展開が期待される。

4. 1-フェニルブタン-3-オン類の水酸化、配糖化

ジンゲロンは生姜の有効成分であり、血行を促進し、循環機能を高める効果があることが報告されている⁸⁾。一方、キイチゴに含まれるラズベリーケトンには脂肪燃焼効果があることが報告されている⁹⁾。こ

れまでに、植物培養細胞によるジンゲロンおよびラズベリーケトン等の 1-フェニルブタン-3-オン類の変換研究の報告はない。

筆者の研究室では、植物培養細胞によるこれらの 1-フェニルブタン-3-オン類の変換を行い、より安定性と生理作用の高い誘導体を合成しようと試みている¹⁰⁾。ここではヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるジンゲロンとラズベリーケトンの変換の結果を報告する。ヨウシュヤマゴボウ培養細胞はジンゲロンを 4'-O- β -グルコシドに変換した(図 5)。3 位のカルボニル基が還元されたアルコール体について、4'位, 3'位, 3,4'位をそれぞれ配糖化した。また、ラズベリーケトンを基質として用いた場合には、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は対応する 4'-O- β -グルコシドに変換した。ラズベリーケトンはヨウシュヤマゴボウ培養細胞により 3 位のカルボニル基が還元され、3'位が水酸化された。一方、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は

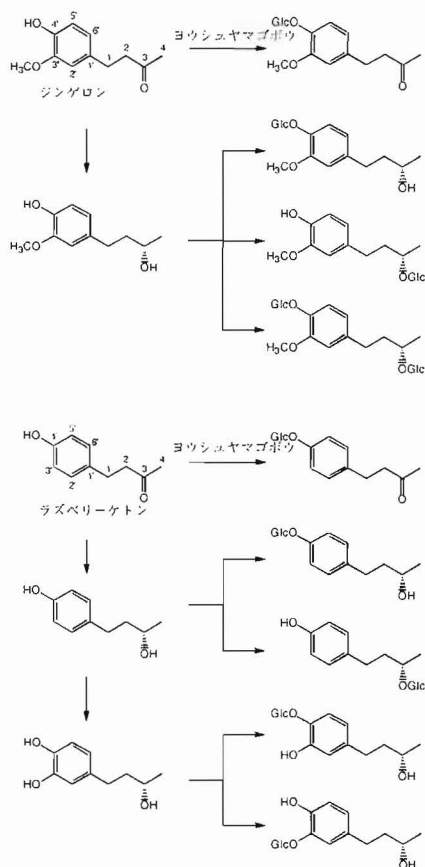


図5 1-フェニルブタン-3-オン類の水酸化, 配糖化

ラズベリーケトンの還元体について4'位と3'位をそれぞれ配糖化し, 水酸化体について3'位と4'位をそれぞれ配糖化し, 対応する β -グルコシドへ変換した。以上のことより, 1-フェニルブタン-3-オン類に対して, ヨウシユヤマゴ培養細胞は還元, 水酸化, および配糖化を生起することが明らかとなった。1-フェニルブタン-3-オンの3'-O- β -グルコシドは水溶液中で強いラジカル消去活性を示す抗酸化性化合物

である。1-フェニルブタン-3-オン類の植物培養細胞による変換反応は, 有機合成化学において興味ある反応であり, 今後この変換研究の一層の進展が期待される。

5. クマリン類の配糖化

植物界に広くみられる芳香族化合物であるクマリン類のうち, スコポレチンやウンベリフェロンなどのヒドロキシクマリン類には, がん抑制効果や, 血圧抑制効果, 脂質代謝の改善効果などの興味深い生理活性があり, 生体触媒によるクマリン類の変換についても高い関心が寄せられている。我々はタバコ培養細胞によるヒドロキシクマリン類の変換を調べている¹¹⁾。これまでの結果を図6に示した。タバコ培養細胞は3-ヒドロキシクマリンおよび4-ヒドロキシクマリンの水酸基を配糖化して, それぞれ対応する β -グルコシドに変換した。また, タバコ培養細胞は7-ヒドロキシクマリンの7位の水酸基を配糖化してクマリン 7-O- β -グルコシドに変換したほか, 6位をメトキシ化して7-ヒドロキシ-6-メトキシクマリン(スコポレチン)に変換した。さらに, タバコ培養細胞は6,7-ジヒドロキシクマリン(ウンベリフェロン)の7位の水酸基を配糖化してウンベリフェロン 7-O- β -グルコシドに変換したほか, 6位をメチル化してスコポレチンに変換した。この配糖化は7位において位置選択的に生起しており, 6位が配糖化された生成物は得られなかった。このことより, タバコ培養細胞は, ヒドロキシクマリン類の7位を位置選択的に配糖化する機能と, 6位を位置選択的にメチル化およびメトキシ化する機能をもつことが明らかとなった。

このような変換の特徴はタバコ培養細胞のみが持っているものであり, 化学試薬ではできない制御である。植物培養細胞によるクマリン類の反応が広く展開されることを期待している。

6. ヒドロキシ安息香酸類の水酸化, 配糖化

サリチル酸やゲンチジン酸などのヒドロキシ安息香酸類には, 解熱作用や鎮痛作用, 抗菌作用, 抗酸

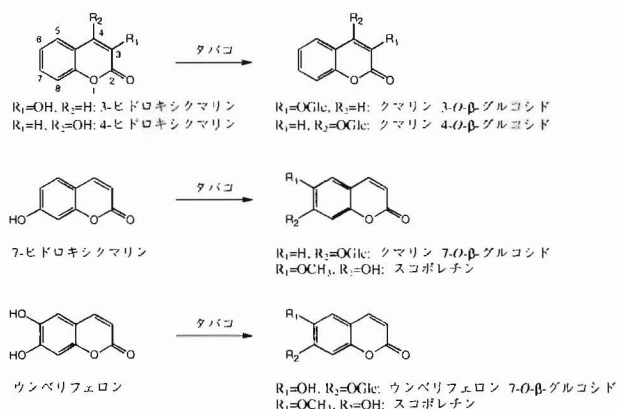


図6 クマリン類の配糖化

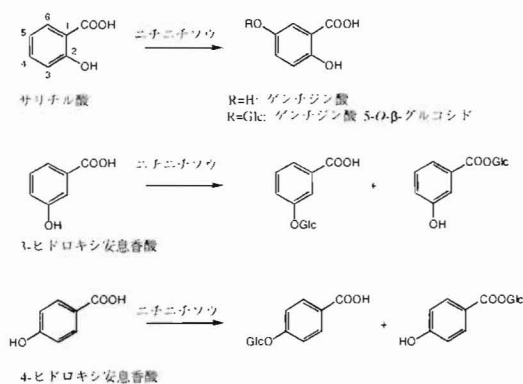


図7 ヒドロキシ安息香酸類の水酸化, 配糖化

化作用, 肝機能を正常に保つ作用をもつものがあり, 古くから利用されてきた。我々の研究室では, ヒドロキシ安息香酸を投与することにより, 植物培養細胞からの効率的なゲンチジン酸の生産を研究している¹²⁾。ニチニチソウ培養細胞は, 2-ヒドロキシ安息香酸(サリチル酸)の5位に水酸基を導入して2,5-ジヒドロキシ安息香酸(ゲンチジン酸)に変換することがわかった(図7)。ゲンチジン酸の5位はさらに配糖化され, 対応するゲンチジン酸5-O-β-グルコシドに変換された。また, ニチニチソウ培養細胞は3-ヒドロキシ安息香酸および4-ヒドロキシ安息香酸をそれぞれ対応するβ-グルコシドとβ-グリコシルエステルに変換した。

7. おわりに

以上のように, 筆者の研究室で行っている, 植物培養細胞による生理活性化合物の変換研究を紹介した。立体選択的な配糖化反応を化学合成で行う場合には, 多段階の行程を必要とし, 一方, 化学合成による位置選択的な水酸化反応は制御が困難な反応である。植物培養細胞はこれらの反応を一段階で行うことができる。植物培養細胞が行うこれらの効率的な酵素反応を, 生理活性化合物の安定化, 水溶化, および高機能化に利用して, 生体触媒としての植物培養細胞を, 新しい食材の素材開発とそれらの生理機能解明に展開していくことも可能になると期待している。

この実験事実の延長にはこれまでにない新規なサプリメントの創製と人の健康維持に必要な新しい食品素材の発見が生まれる。筆者は社会貢献を目指して研究を行っているので, 筆者の研究成果が人の病氣予防の一環に役立つ事は望外の喜びである。大学発ベンチャー会社 マイスターバイオ で一部を商品化して上市している。筆者の基礎研究の延長に実用化が成就されれば, 世界に大学人としての新しい研究哲学を構築できると確信している。

参考文献

- 1) Shimoda, K., Kondo, Y., Abe, K., Hamada, H., Hamada, H., *Tetrahedron Lett.*, 2006, **47**, 2695-2698.
- 2) Shimoda, K., Kondo, Y., Akagi, M., Abe, K., Hamada, H., Hamada, H., *Phytochemistry*, 2007, **68**, 2678-2683.
- 3) Shimoda, K., Kondo, Y., Akagi, M., Abe, K., Hamada, H., Hamada, H., *Chem. Lett.*, 2007, **36**, 570-571.
- 4) Kondo, Y., Shimoda, K., Takimura, J., Hamada, H., Hamada, H., *Chem. Lett.*, 2006, **35**, 324-325.
- 5) Uhrig, R.K., Picard, M.A., Beyreuther, K., Wiessler, M., *Carbohydr. Res.*, 2000, **325**, 72-80.
- 6) Satoh, T., Miyataka, H., Yamamoto, K., Hirano, T. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 948-953.
- 7) Shimoda, K., Otsuka, T., Morimoto, Y., Hamada, H., Hamada, H., *Chem. Lett.*, 2007, **36**, 1292-1293.
- 8) Govindarajan, V.S., *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1982, **17**, 189-258.
- 9) Morimoto, C., Satoh, Y., Hara, M., Inoue, S., Tsujita, T., Okuda, H., *Life Sci.*, 2005, **77**, 194-204.
- 10) Shimoda, K., Harada, T., Hamada, H., Hamada, H., *Phytochemistry*, 2007, **68**, 487-492.
- 11) Hirata, T., Shimoda, K., Fujino, T., Ohta, S., *J. Mol. Catal. B, Enzymatic*, 2000, **10**, 477-481.
- 12) Shimoda, K., Yamane, S., Hirakawa, H., Ohta, S., Hirata, T. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2002, **16**, 275-281.

Contact address

Dept. of Life Sci., Okayama Univ. of Sci.
1-1 Ridai-cho Kitaku Okayama Japan 700-0005
Tel:81-086-256-9473, Fax: 81-86-256-8468
e-mail: hamada@dls.ous.ac.jp
HP: <http://www.ous.ac.jp/DAS/chem/hamada/index.htm>