

木本植物、コーヒーの培養細胞を用いた  
4-メトキシフェノールのバイオトランスフォー  
メーションによるメチルアルブチンの生産\*

好川 恵\*\*・伊藤 和貴\*\*・橘 燐郎\*\*

Production of methylarbutin from 4-methoxyphenol by  
biotransformation of cultured cells of woody plant, *Coffea arabica*\*

Megumi YOSHIKAWA\*\*, Kazutaka ITOH\*\* and Sanro TACHIBANA\*\*

**Summary:** Calli were induced from leaves of young trees of Coffee, *Coffea arabica*, on Murashige-Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin. The induced calli were subcultured on the same medium. The cultured cells were obtained by cell suspension cultures of the calli in the MS liquid medium. 4-Methoxyphenol, substrate was converted to methylarbutin having anti-inflammatory and urinary antiseptic actions by biotransformation of cultured cells from *Coffea arabica*. The maximum yield of methylarbutin to the substrate was obtained when 1 mM of the substrate was added to the cell suspension cultures and incubated for 1 day. The yield was 22.7% of the substrate.

**要 旨** コーヒー (*Coffea arabica*) の若木の葉から2,4-ジクロロフェノキシ酢酸及びカイネチンを含む Murashige-Skoog (MS) 培地上でカルスを誘導し、引き続き同培地上で継代培養した。得られたカルスを MS 液体培地で培養し、コーヒーの培養細胞を得た。この培養細胞を用いた4-メトキシフェノールのバイオトランスフォーメーションにより、4-メトキシフェノールは消炎、尿路殺菌の生理作用を持つメチルアルブチンに変換された。メチルアルブチンの最高収率は、細胞懸濁培養液に基質 1 mM を投与し、一日培養した場合に得られた。その収率は 22.7% であった。

\* 本報告の一部は第42回リグニン討論会（1997年10月、札幌）で発表した。

\*\* 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

## 1. 緒 言

植物の細胞懸濁培養により得られる培養細胞は、植物体の細胞に比べて形態的にも一樣で、代謝活性も比較的均一な細胞群と考えられる。さらに、培養細胞は物質の吸収性も比較的容易となり、投与した物質は細胞内に吸収される。これらの利点から、細胞培養系は高等植物の代謝生理化学の研究の有力な実験系としてその重要性が増大してきている<sup>1)</sup>。植物培養細胞は、外部から供給された化学物質を細胞内に取り込み、その中に存在する酵素により他の物質に変換させることができるので、所謂“バイオトランスフォーメーション”に利用されている<sup>2)</sup>。植物の培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションは特定の化合物を目的とする化合物に効率よく変換できる可能性を持っている。

数種の高等植物にはフェノール性水酸基を持つ化合物を特異的にグルコシル化できるグルコシル基転移酵素（グルコシルトランスフェラーゼ）の存在が知られており、その酵素は外因性の基質をも代謝して配糖体を生産すると報告されている<sup>2-4)</sup>。このようなバイオトランスフォーメーションを利用した一段階のグルコシル化は、グルコシル化と脱保護基という少なくとも二段階から成る化学合成<sup>5)</sup>よりも効率的と考えられる。また、この培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションを用いれば、生理活性を持たない化合物から薬理活性を持つ化合物を調製することも可能である。例えば、サリシルアルコールは生理活性を持たないが、そのグルコシドであるサリシンは痛風、リュウマチ、神経痛などの痛みを軽減する作用を持つ。

ツツジ科の小灌木、ウワウルシに含有されているメチルアルブチンは、消炎、尿路殺菌剤としてアルブチンと共に使用されている<sup>6)</sup>。培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションにより、4-メトキシフェノール<sup>6)</sup>からメチルアルブチンが生産できれば、4-メトキシフェノールの有効利用に資するものと考えられた。そこで、本研究では、グルコシルトランスフェラーゼの存在が知られているコーヒー (*Coffea arabica*)<sup>3, 4)</sup>から調製した培養細胞を用いた4-メトキシフェノールのバイオトランスフォーメーションによるメチルアルブチンの生産について検討した。

## 2. 実 験

### 2.1 コーヒーの組織培養<sup>3, 7)</sup>

外植体としてコーヒーの葉を用いた。なお、市販のコーヒーの木（2年生）を室内で数ヶ月生育させたものを使用した。

#### 2.1.1 培地の調製

培地組成を Table 1 に示した。培地は Murashige and Skoog (MS) 培地を基本とし、これに植物ホルモンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) (1.1 mg/l) 及びカイネチン (0.11 mg/l) を補添したものを用いた。表 1 に示した試薬のうち植物ホルモン、寒天を除いたものを蒸留水に溶解し、これに植物ホルモンを溶解した溶液を加え約980 mlとした。この溶液を 1 N 水酸化ナトリウム水溶液で pH 5.8 に調整した後、1000 ml にメスアップした。これに寒天 9 g を加え、湯浴上で寒天を加熱溶解後、管ビンに30 ml づつ分注した。この管ビンをアルミホイールで二重に蓋をし、オートクレーブ (121°C, 20 min) にかけて滅菌した。その後、調製した MS 培地は試料を植え込むまで殺菌灯をつけたクリーンベンチ内で静置した。

Table 1 Constituents in Murashige-Skoog medium used for induction of calli from *Coffea arabica*.

Chemicals	Concentration (mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650
KNO <sub>3</sub>	1,900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370
K H <sub>2</sub> P O <sub>4</sub>	170
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
myo-Inositol	100
Glycine	2
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine hydrochloride	0.5
Vitamine B <sub>1</sub> hydrochloride	0.1
Growth regulator	
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	1.1
Kinetin	0.11
Saccharose	30,000
Agar	9,000

### 2.1.2 試料の滅菌

水洗した外植体を中性洗剤で洗浄した後、70%エタノールに20秒間浸し、予備殺菌した。その後、試料をクリーンベンチ内に入れ、1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸した。その後、滅菌水で3回洗浄し、滅菌濾紙上で風乾させた。

### 2.1.3 培地への植え込み

2.1.2で得た滅菌試料をメスで一辺5~10mm角の大きさに切断した。2.1.1で調製したMS培地にピンセットで組織片を植え込んだ。その後、管ビンを滅菌したアルミホイールで二重に蓋をして培養を開始した。培養は25℃、暗所で行った。

### 2.1.4 カルスの増殖

誘導されたカルスは、2.1.1で調製したと同じ組成を持つMS培地（滅菌シャーレ）上で4週間毎に継代して増殖させた（25℃、暗所）。

### 2.1.5 細胞懸濁培養

2.1.1で調製したMS培地に寒天を加えないものを細胞懸濁培養用の培地として用いた。4回継代したコーヒーのカルス(0.5g, 生重量)を細かく碎き、予め滅菌しておいた管ビンに入れた。これに5mlの培地を加え、滅菌したアルミホイルで二重に蓋をした。これを振とう培養器にかけ、25°C, 暗所, 120 rpm/minの条件で培養を開始した。

## 2.2 標品の調製

### 2.2.1 テトラアセチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシリプロミドの合成<sup>8)</sup>

三口フラスコに無水酢酸(100ml)を入れ、氷水下で攪拌しながら、70%過塩素酸(0.6ml)を滴下した。この溶液を30~40°Cに保ちながら、グルコース(25g)を少量ずつ添加した後、さらに30分間攪拌した。その後、赤リン(7.5g)を加え、20°C以下に保ちながら、臭素(14.5ml)をゆっくり滴下した。さらに、20°C以下に保ちながら、攪拌下に水(9ml)を滴下した後、20°C以下でさらに30分間攪拌した。その後、室温で2時間攪拌した。この反応液をビーカーに移し、クロロホルム(75ml)を加えた後、ガラスフィルターで濾過した。このとき、三口フラスコ及びロートもクロロホルムでよく洗浄した。ろ液と洗浄液を合併し、0°Cの水(200ml)と共に分液ロートに移して分層し、クロロホルム層を分取した。再び、水層に75mlのクロロホルムを加えてよく振りませ、クロロホルム層を分層した。飽和の炭酸水素ナトリウム溶液(125ml)を攪拌しながら、これにクロロホルム抽出液を加え、10分間攪拌した。その後、分液ロートに移し、少量のクロロホルムを加えて振とうした後、クロロホルム層を分取した。このクロロホルム層にシリカゲル(2.5g)を加え、10分間攪拌した。これを濾過し、濾液は無水硫酸ナトリウムで脱水乾燥後、減圧濃縮した。濃縮物にエーテル:n-ヘキサン=2:1(300ml)を加えて結晶化した。その後、結晶をガラスフィルターで濾過した。残渣を冷エーテルで洗浄した。結晶をデシケーターで乾燥させた後、イソプロピルエーテルから再結晶して、テトラアセチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシリプロミド(69.7g), 白色結晶, mp 87~88°Cを得た(収率: 58.9%)。(lit. mp 88~89)<sup>8)</sup>

### 2.2.2 テトラアセチルメチルアルブチン(2)の合成

テトラアセチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシリプロミド(3.3g), 4-メトキシフェノール(1)(1.0g)及びベンジルトリブチルアンモニウムクロリド(2.5g)をナスフラスコに入れ、これにクロロホルム(48ml)と1.25Nの水酸化ナトリウム水溶液(24ml)を加え、室温で3時間攪拌した<sup>9)</sup>。反応の終了をTLC(展開溶媒; ベンゼン:メタノール=4:1)で確認後、反応混合液を分液ロートに移し、有機層を分層した。その後、有機層を1.25Nの水酸化ナトリウム水溶液(20ml)で二回洗浄し後、有機層は芒硝で乾燥した。その後、減圧濃縮、減圧乾燥して得た反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒; ベンゼン:メタノール=20:1→10:1→5:1)にかけ、化合物(2)を得た。これを酢酸エチル-ヘキサンから再結して白色結晶(2)(0.8g), mp 105-107°Cを得た(収率21.9%)。(lit. mp 106-107°C)<sup>9)</sup>。MS m/z: 454 (M<sup>+</sup>), 331, 271, 221, 169, 124, 109, 43 (base).

### 2.2.3 メチルアルブチン(3)の合成

2.2.2で得た化合物(2)(0.5g)に0.1Mのメタノール性KOH(44.5ml)加え、0°Cで攪拌しながら25分間反応させた。反応の終了をTLC(展開溶媒; クロロホルム:メタノール=4:1)で確認した後、減圧濃縮して溶媒を除いた。これに水を加え、HCl(5%)で弱アルカリ性にした後、ブタノールで3回抽出した。抽出液は芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。得られた反応生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(展開溶媒; クロロホルム:メタノール=10:1→4:1)にかけ、

化合物(3)を単離した。これをメタノールから再結晶し、メルアルブチン(3)の白色結晶 (64mg), mp 174–175°Cを得た (収率: 20.3%)。(*lit* mp 175°C)<sup>10)</sup> MS *m/z*: 286 ( $M^+$ ), 256, 219, 162, 124 (base), 109. <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 7.04 (2H, d, *J*=8.3Hz, H<sub>2</sub>, H<sub>6'</sub>), 6.92 (2H, d, *J*=8.3Hz, H<sub>3'</sub>, H<sub>5'</sub>), 4.76 (1H, d, *J*=4.2Hz, H<sub>1</sub>*α*), 3.89 (1H, dd, *J*=9.8, 5.8Hz, H<sub>2</sub>), 3.73 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.71 (1H, dd, *J*=9.2, 5.0Hz, H<sub>4</sub>), 3.42 (2H, m, H<sub>3</sub>, H<sub>5</sub>), 3.38 (2H, m, H<sub>6</sub>)。

## 2.3 生成物の定性および定量

### 2.3.1 基質

基質として用いた4-メトキシフェノールは東京化成工業(株)から購入した。

### 2.3.2 基質の投与<sup>7)</sup>

定常期前期に相当する培養20日前後の懸濁培養細胞液 (5 ml) に、4-メトキシフェノールの添加濃度が0.5mM, 1.0mM, 2.0mM, 10mMとなるように調整した4-メトキシフェノールの70%エタノール溶液 (0.5 ml) を加えた。培養液は基質投与時に新しい培地と交換した。培地 (5 ml) に対して、70%エタノールを0.5 ml投与したものコントロールとした。その後、中断前と同条件で細胞懸濁培養を行った (25°C, 1日, 3日及び7日間)。

### 2.3.3 代謝物の抽出

基質の投与後、1日目、3日目、7日目で培養を中止した。懸濁培養細胞液は、培養液と細胞に分け、各々を予備凍結後、凍結乾燥した。得られた各々の凍結乾燥物を50%メタノールで抽出した (室温, 12時間)。なお、培地に対しては3倍量、細胞に対しては4倍量の50%メタノールを加えた。細胞の抽出は2回繰り返した。得られた抽出液は、予備凍結した後、凍結乾燥して各々の抽出物を得た。

### 2.3.4 HPLC による分析

凍結乾燥して得た各々の抽出物はメタノール (5 ml) に溶解した。この溶液の10  $\mu$ lを HPLC に注入し分析した。HPLC の分析条件は下記に示した条件で行った。HPLC のチャート上で標品とリテンションタイムが一致するピークが認められ、標品とのスペイキングにより、基質のフェノールグルコシドであるメチルアルブチンが生産されていることを確認した。HPLC の条件: Column: HITATI GEL #3056, Solvent: 30% MeOH, Flow rate: 0. ml/min, Detector: UV (at 224nm)。なお、メチルアルブチンの定量は予め標品を用いて作成した検量線から行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 コーヒーの組織培養、細胞懸濁培養

Table 1 に示した組成を持つ MS 培地上にコーヒーの外植体を置き、カルスを誘導させた。誘導開始後、約2週間で切片の切断面及び葉脈よりカルスの発生がみられた<sup>7)</sup>。カルスは柔らかく、白色透明であった。誘導したカルスは4週間毎にカルス誘導の場合と同じ組成の MS 培地上で継代して増殖させた。増殖中もカルスの褐変は認められなかった。

MS 培地上で4回継代して増殖させたもろく崩れやすいカルスを MS 液体培地に加え、細胞懸濁培養を行った。細胞の増殖曲線を Fig. 1 示した。細胞は20日間で5倍に増加した。Fig. 1 から、1～9日目が誘導期、10～20日目が対数増殖期、21日目以降が定常期と考えられた。

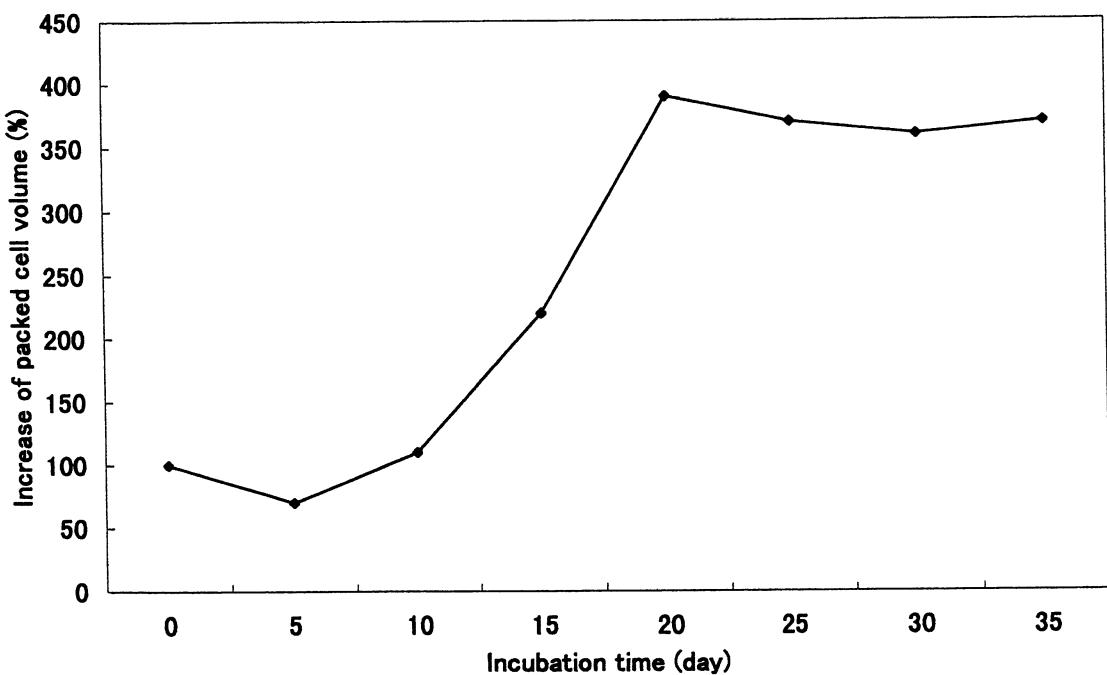


Fig. 1 Growth curve of cells in cell suspension cultures of *Coffea arabica*.

### 3.2 メチルアルブチン(3)の調製

メチルアルブチン(3)の合成スキームを Fig. 2 に示した。4-メトキシフェノール(1)に相間移動触媒 (PTC), ベンジルトリブチルアンモウムクロリド存在下にテトラアセチル- $\alpha$ -D-グルコピラノシリブロミドを作用させ, テトラアセチルメチルアルブチン(2)を化合物(1)に対して21.9%の収率で得た。そして, 化合物(2)の脱アセチル化により, メチルアルブチン(3)を化合物(2)に対して20.3%の収率で得た。化合物(1)からの全収率は4.4%であった。化合物(3)のマススペクトルをFig. 3 に示した。化合物(3)のマススペクトルは  $m/z=286$  に分子イオンピークを示し,  $m/z=162$  にグルコース由

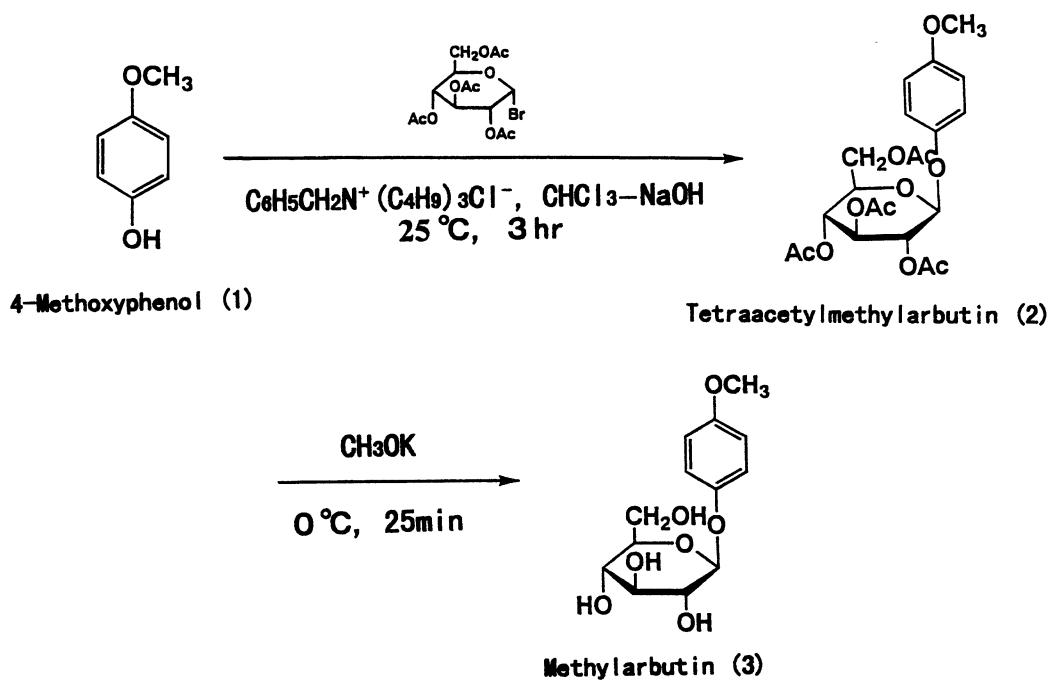


Fig. 2 Synthetic scheme of methylarbutin (3).

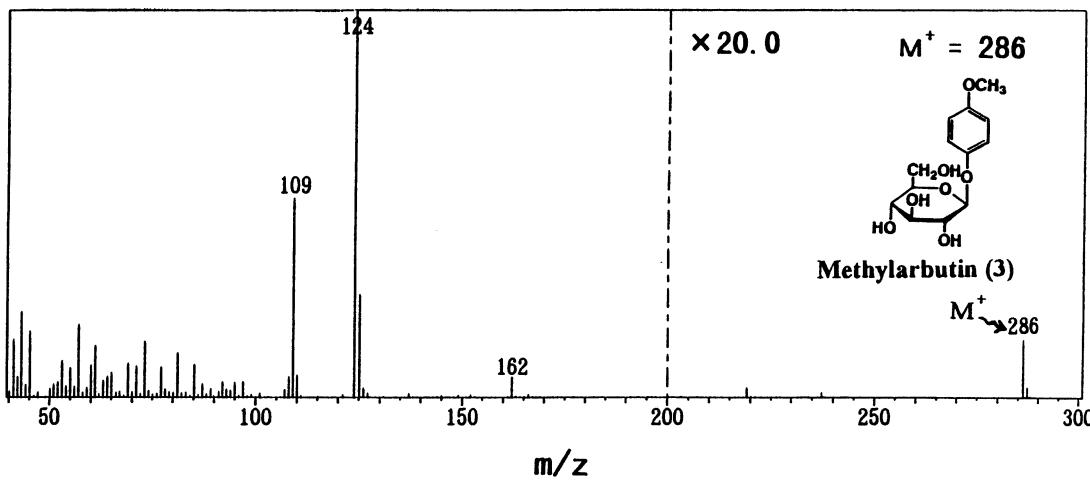


Fig. 3 Mass spectrum of methylarbutin (3).

來のフラグメントイオン ( $C_6H_{10}O_5^+$ ) が見られること、 $m/z=124$ に4-メトキシフェノールのピークが見られることから、この化合物(3)はメチルアルブチンと考えられた。また、化合物(3)の $^1H$ -NMRスペクトルはこの化合物がメチルアルブチンであることをよく説明する。これらのことから、化合物(3)はメチルアルブチンと考えられた。化合物(3)の融点が文献値<sup>10)</sup>と一致すること及び HPLC 上で標品とのリテンションタイムが一致すること並びに標品とのスパイキングにより、化合物(3)はメチルアルブチンと同定した。

### 3.3 コーヒーの培養細胞による配糖体の生産

定常期前期に相当する培養20日前後のコーヒーの培養細胞に基質、4-メトキシフェノールを投与して所定時間培養した懸濁細胞培養液から、実験の項に記したようにして培養細胞及び培養液から各抽出物を得た。培養細胞からの抽出物の HPLC クロマトグラム上に基質の配糖体であるメチルアルブチンのピークが認められた。このピークがメチルアルブチンであることは、合成した標品とのリテンションタイムの一一致並びにスパイキングにより確認した。培養液からの抽出物の HPLC クロマトグラム上には、メチルアルブチンのピークは認められなかった。

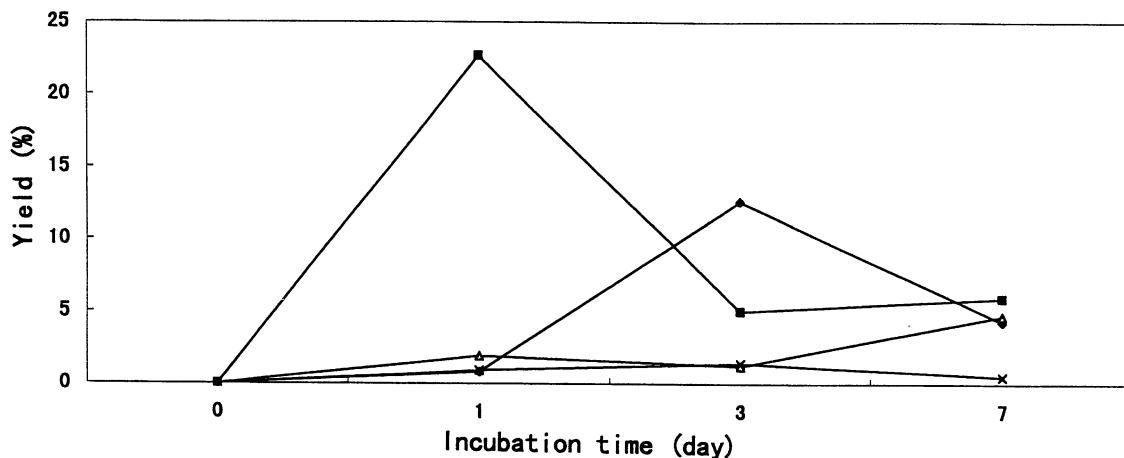
生成したメチルアルブチンを定量した結果を Table 2 及び Fig. 4 に示した。Table 2 に示すように、メチルアルブチンは培養細胞内でのみ認められ、培地中にはメチルアルブチンは認められなかった。このことは投与した基質が細胞内に取り込まれ、細胞内でグルコシルトランスフェラーゼの作用により、基質のフェノール性水酸基がグルコシル化されたことを示している。また、培地中にメチルアルブチンが認められなかったことから、コーヒーの培養細胞はその細胞内で外因性の基質をグルコシド化するが、生成されたグルコシドは細胞外に放出されないことも分かった。

メチルアルブチンの生成の経時変化を Fig. 4 に示した。基質 1 mM を投与し 1 日培養した場合が 22.7% 最もよく配糖体を生産した。全体的に見て、基質濃度が 0.5 mM, 1 mM と低い濃度の場合にメチルアルブチンの生成量は多かった。また、培養日数が短い方が生成量は多かった。基質投与量が多くなる程生成されるメチルアルブチンの生成量は少なくなったが、これは基質の量が多すぎたため、十分にグルコシル化できなかつたためと考えられる。しかし、基質投与量に関係なく培養日数が長くなる程、メチルアルブチンの生成量の減少がみられた。これは生成されたメチルアルブチンが更に別の化合物に変換されるためか、あるいは異化作用により分解され代謝されるためと考えられる。細胞

Table 2 Yields of methylarbutin obtained from 4-methoxyphenol by cell suspension cultures of *Coffea arabica*.

Concentration of substrate (mM)		Yields of methylarbutin (%)		
		Incubation time (day)	1	3
0.5	Cells	0.8	12.6	4.3
	Medium	—	—	—
	Total	0.8	12.6	4.3
1.0	Cells	22.7	4.9	5.7
	Medium	—	—	—
	Total	22.7	4.9	5.7
2.0	Cells	1.8	1.2	4.9
	Medium	—	—	—
	Total	1.8	1.2	4.9
10.0	Cells	1.0	1.5	0.3
	Medium	—	—	—
	Total	1.0	1.5	0.3

Fig. 4 Time-course of glucosylation of 4-methoxyphenol by cell suspension cultures of *Coffea arabica*.



Notes: ◆ : 0.5mM; ■ : 1.0mM; △ : 2.0mM; × : 10.0mM.

内に取り込まれたフェノールは細胞にとって有毒物質と考えられるので、配糖体化することにより解毒しているのか、細胞内で代謝を行うため、グルコシル化して水溶性を付与しているのか、あるいは浸透圧調整のため、グルコシル化しているものと推定される。しかし、いずれであるのかは現段階では不明である。今後、トレーサー実験等により明らかに出来るものと考えられる。

コーヒーの培養細胞を用いたフェノール類のバイオトランスフォーメーションは、Kometani ら<sup>3, 4)</sup>、伊藤ら<sup>11)</sup>、村中ら<sup>12)</sup>、坪田ら<sup>13)</sup>により行われている。Kometani ら<sup>3)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質としてバニリンを投与した場合、バニリングルコシドが最高85%の収率（基質1 mM添加、24時間培養）で得られたことを報告している。彼らも本研究で見られたと同様に基質濃度が高くなる程、また培養期間が長くなる程バニリングルコシドの生成率の低下がみられることを観測している。また、Kometani ら<sup>4)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質としてカプサイシンを投与した場合、カプサイシングル

コシドが最高収率約1%（基質 $1\text{ }\mu\text{M}$ 添加，4日間培養）で得られたことを報告している。伊藤ら<sup>11)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質としてシリングレジノールを投与し，そのグルコシド生成率を調べている。基質濃度 $1\text{ mM}$ で1日培養した場合にシリングレジノールジグルコシドを最高収率29.0%で得ている。村中ら<sup>12)</sup>はコーヒーの培養細胞にフェノール性水酸基とアルコール性水酸基を有するサリシルアルコールを投与した場合，フェノール性水酸基がグルコシル化されたサリシンを最高収率17.5%（基質濃度 $1\text{ mM}$ ，1日間培養）で得たが，サリシルアルコールのアルコール性水酸基がグルコシル化されたイソサリシンは得られなかったことを報告している。坪田ら<sup>13)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質としてピノレジノール及びエピピノレジノールを投与した場合，各々のフェノールグルコシドが最高収率33.6%（基質濃度 $0.5\text{ mM}$ ，1日間培養）及び60%（基質濃度 $0.5\text{ mM}$ ，1日間培養）得られたことを報告している。これらの結果は，基質が異なってグルコシドが得られていることから，コーヒーの培養細胞中のフェノール性水酸基をグルコシル化する酵素，グルコシルトランスフェラーゼの基質特異性はそれほど高くないものと考えられた。しかし，サリシルアルコールを基質とした場合には，フェノールグルコシドの生成が認められただけであったので，コーヒーの培養細胞中の酵素，グルコシルトランスフェラーゼは同一の分子中に二種の水酸基が存在する場合にはフェノール性水酸基を特異的にグルコシル化することも分かった。

一方，コーヒーの培養細胞を用いたカルボキシル基，アルコール性水酸基を有する化合物のバイオトランスフォーメーションも Furuya ら<sup>14)</sup>， Orihara ら<sup>15)</sup>により行われている。Furuya ら<sup>14)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質として，カルボキシル基のみを有するフェニル酢酸及び2-フェニルプロピオン酸を投与した時，各々の基質の配糖体（糖エステル）を最高収率25%（ $0.74\text{ mM}$ 投与，4日間培養）及び15%（ $0.67\text{ mM}$ 投与，2日間培養）で得た。また，Orihara ら<sup>15)</sup>はコーヒーの培養細胞に基質としてアルコール性水酸基並びにカルボキシル基を有するステビオールを投与した場合，カルボキシル基がグルコシルエステル化されたルブソシドを6.2%の収率で得ている（基質 $3.2\text{ mM}$ 投与，8日間培養）。

以上より，コーヒーの培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションの場合，用いた基質によりフェノールグルコシド，グルコシドエ斯特ル及びアルコールグルコシドが生成したことから，コーヒーの培養細胞中には少なくともフェノール性水酸基，アルコール性水酸基及びカルボキシル基をグルコシル化できる3種のグルコシルトランスフェラーゼが存在するものと考えられる。

本研究でのメチルアルブチンの最高収率は22.7%であったが，これは培養日数を1～7日としたためと考えられた。著者ら<sup>13)</sup>はコーヒーの培養細胞を用いたリグナン類のバイオトランスフォーメーションによる有用物質の生産の研究において，培養日数が1日よりも短い方が収率が高いことを見出しているので，培養日数を短縮すれば収率は更に向上的るものと予想される。培養時間の短縮やグルコシルトランスフェラーゼを持つ他の植物培養細胞系の使用による収率向上について今後検討する必要があるものと考えられる。また，コーヒーの培養細胞中のグルコシルトランスフェラーゼの性質の解明もバイオトランスフォーメーションによる配糖体生成量増加のためには大切と考えられる。

Zhang と Magnusson<sup>16)</sup>は4-メトキシフェノールと1,2,3,4,6-ペンタ-O-アセチル- $\beta$ -D-グルコースを  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  の存在化に反応させ，4-メトキシフェニル-2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-グルコピラノシドを収率89%で得ている。彼らは生成物を脱アセチル化してメチルアルブチンを調製していない。そのため，メチルアルブチンの合成収率は算出できないが，脱アセチル化の収率を80%と仮定すると全収率は71%となる。この収率を化学変換の収率とすると，バイオトランスフォーメーショ

ンのそれの22.7%よりも高い。しかしながら、この培養細胞を用いたバイオトランسفォーメーションによるグルコシル化は、化学合成よりも短いステップで目的とする化合物を得ることが出来る。そのため、収率を向上することが出来れば、配糖体調製法の有力な手段の一つとなり得るものと考えられる。この培養細胞を用いたバイオトランسفォーメーションによるメチルアルブチンの生成収率を向上させることが今後の課題と考えられる。コーヒー以外にも数種の高等植物中にグルコシルトランスフェラーゼが存在することも報告されているので、これらの高等植物からの培養細胞を用いたバイオトランسفォーメーションによるメチルアルブチンの生産についても今後検討する必要があるものと考えられる。

#### 4. 結論

コーヒーの培養細胞を用いた4-メトキシフェノールのバイオトランسفォーメーションにより、4-メトキシフェノールはそのフェノールグルコシドであるメチルアルブチンに変換された。コーヒーの培養細胞に4-メトキシフェノールを1 mM投与し、1日培養した場合にメチルアルブチンの生成率は最も高くなった。その収率は22.7%であった。このバイオトランسفォーメーションによる生成物の収率を向上するため、低濃度での基質の投与や基質の投与後の培養時間の短縮、グルコシルトランスフェラーゼを持つ他の植物の使用等が今後の検討課題と考えられる。

#### 引 用 文 献

- 1) 駒嶺 穆 (1979) 新植物組織培養. 430pp, 竹内正幸, 中島哲夫, 古谷 力編, 朝倉書店, 東京, 282-287.
- 2) 田端 守・梅谷康子・田中重雄 (1985) 生化学から物質生産へ. (バイオテクノロジー. 丸尾文治編, 560pp, 学会出版センター, 東京). 524-530.
- 3) Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T., and Okada, S. (1993) Glucosylation of Vanillin by Cultured Plant Cells. Biosci.Biotech.Biochem. 57(8) : 1290-1293.
- 4) Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T., Nanbara, I., and Okada, I. (1993) Glucosylation of Vanillin by Cultured Plant Cells. Biosci.Biotech. Biochem. 57(12) : 2192-2193.
- 5) 厚東伸信・森島直彦・膳性昭之助 (1983) O-グロコシル化反応の最近の進歩. 有機合成化学 41(8) : 701-717.
- 6) 難波恒雄・津田喜典 (1993) 生薬学概論 改訂第2版. 251pp, 南江堂, 東京.
- 7) 村中俊夫 (1995) 愛媛大学農学部卒業論文(平成7年度), 3-5.
- 8) Lemieux, R. U. (1963) Methods in CARBOHYDRATE CHEMISTRY. Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L.(eds.), 260pp, Academic Press, New York, 221-222.
- 9) Dess, D., Kleine, H. P., Weinberg, D. V., Kaufman, R. J., and Sidhu, R. J. (1981) Phase-Transfer Catalyzed Synthesis of Acetylated Aryl  $\beta$ -D-Glucopyranosides and Aryl  $\beta$ -D-Galactopyranosides. Synthesis. 883.
- 10) 大木道則・大沢利昭・田中元治・千原秀明 (1989) 化学大辞典. 東京化学同人, 東京. 2329.
- 11) 伊藤智仁・西坂嘉代・伊藤和貴・沖 妙・橋 燐郎 (1996) 植物の懸濁培養細を用いたリグナン

- 類のバイオトランスフォーメーション. 450pp, 第46回日本木材学会大会研究発表要旨集, 熊本, 5.
- 12) 村中俊夫・伊藤和貴・沖 妙・橋 燐郎 (1996) 植物培養細胞によるフェノール類のグルコシル化の試み. 180pp, 第41回リグニン討論会講演集, 名古屋. 155-156.
- 13) 坪田弘志・伊藤和貴・橋 燐郎ら (1997) 植物培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションによる有用物質の生産. 180pp, 第42回リグニン討論会講演集, 札幌. 163-164.
- 14) Furuya, T., Ushiyama, M., Asada, Y., Yoshikawa, T., and Orihara, T. (1988) BIOTRANSFORMATION OF PHENYLACETIC ACID AND 2-PHENYLPROPIONIC ACID IN SUSPENSION CULTURE OF *COFFEA ARABICA*. *Phytochemistry* 27(3) : 803-807.
- 15) Orihara, Y., Saiki, K. and Furuya, T. (1991) BIOTRANSFOEMATION OF STEVIOL BY CULTURED CELLS OF *EUCALYPTUS PERRINIANA* AND *COFFEA ARABICA*. *Phytochemistry* 30(12) : 3989-3992.
- 16) Zhang, Z. and Magnusson, G. (1996) Conversion of p-methoxyphenol glucosides into the corresponding glycosyl chlorides and bromides, and into thiophenyl glycosides. *Carbohydrate Research* 295 : 41-55.t