

数種の植物培養細胞を用いたポドフィロトキシンの バイオトランスフォーメーションによる配糖体生産の試み*¹

内藤 隆行*² · Duangporn Premjet*² · 伊藤 和貴*² · 橘 燦郎*²

Trial for podophyllotoxin glucoside production from podophyllotoxin by
biotransformation of cultured cells of some plants*¹.

Takayuki NAITOH*², Duangporn PREMJET*²,
Kazutaka ITOH*² and Sanro TACHIBANA*²

Summary: Calli were induced from leaves and/or stems of young plants of *Gardenia jasminoides*, *Nicotiana tabacum* and *Datura innoxia*, respectively. Each cultured cells were obtained by cell suspension cultures of each callus. Production of podophyllotoxin- β -D-glucoside from podophyllotoxin by biotransformation of cultured cells of *Gardenia Jasminoides*, *Nicotiana tabacum* and *Datura innoxia* was tried. From the results of HPLC analysis of each reaction product, podophyllotoxin- β -D-glucoside was produced by biotransformation of *D.innoxia*. However, podophyllotoxin- β -D-glucoside could not be produced by biotransformation of *G.Jasminoides* and *N.tabacum*. The maximum yield of the glucoside to the substrate was obtained when 1.0mM of the substrate was added to the cell suspension cultures and incubated for 1 day. The yield was 4.6% of the substrate.

要 旨 クチナシ (*Gardenia jasminoides*), タバコ (*Nicotiana tabacum* L.), チョウセンアサガオ (*Datura innoxia*) の植物培養細胞を用いたポドフィロトキシンのバイオトランスフォーメーションによる配糖体の生産を試みた。それぞれの培養細胞からの抽出物の HPLC 分析によって、チョウセンアサガオの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ポドフィロトキシンの β -D-グルコシドが得られた。しかしながら、クチナシとタバコの培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーションでは配糖体は生成されなかった。ポドフィロトキシンの β -D-グルコシドの最高収率は、

*¹ 本報告の1部は第44回リグニン討論会(1999年10月, 岐阜)で発表した。

*² 森林資源利用化学研究室 Laboratory of Chemistry and Biotechnology for Utilization of Forest Resources

チョウセンアサガオの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4.6%であった。

1. 緒 言

組織培養により得られる培養細胞は、母細胞に比べ均一であり、培養条件のコントロールや培養株の選択により目的に応じた調節ができる¹⁾。また、懸濁培養を行えば、いっそう均一で細かい細胞塊を作り、物質の吸収性を良くすることが出来る。これらの理由から、培養細胞は高等植物細胞の代謝生理学的研究の実験系として重要性が増しており、高等植物に特有な代謝系を利用した有用物質への物質変換が試みられている¹⁾。

高等植物には、その細胞内にグルコシルトランスフェラーゼを持つ植物も知られている。これらの植物の培養細胞中のグルコシルトランスフェラーゼはフェノール性水酸基、アルコール性水酸基、アミノ基等を持つ外因性の基質をも特異的に代謝し、相当する配糖体（グルコシド）に変換することができる。クチナシ (*Gardenia jasminoides*)、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.)、チョウセンアサガオ (*Datura innoxia*) は、アルコ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トランスフェラーゼを持っているばかりでなく、外因性の基質をも代謝して配糖体を生産することが報告されている^{2,3,4,5)}。これらの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配糖化を行えば、1段階で配糖体を生産することができる。この方法は多段階を必要とする化学的な配糖化法よりも効率的であると考えられる。

近年、副作用の問題から、副作用が殆どないと言われている植物由来の抗ガン剤が注目されている⁶⁾。ポドフィロトキシンもその一つで、肺ガン、胃ガン、卵巣ガンに抗ガン性を示す^{7,8)}。しかし、その配糖体（ポドフィロトキシン-β-D-グルコシド）をもとにして作られるエトポシド、テニポシド⁹⁾ (Fig.1) は、ポドフィロトキシンよりもさらに強い抗ガン性を示す。そのため、臨床的にはエトポシド、テニポシドが使用されている。

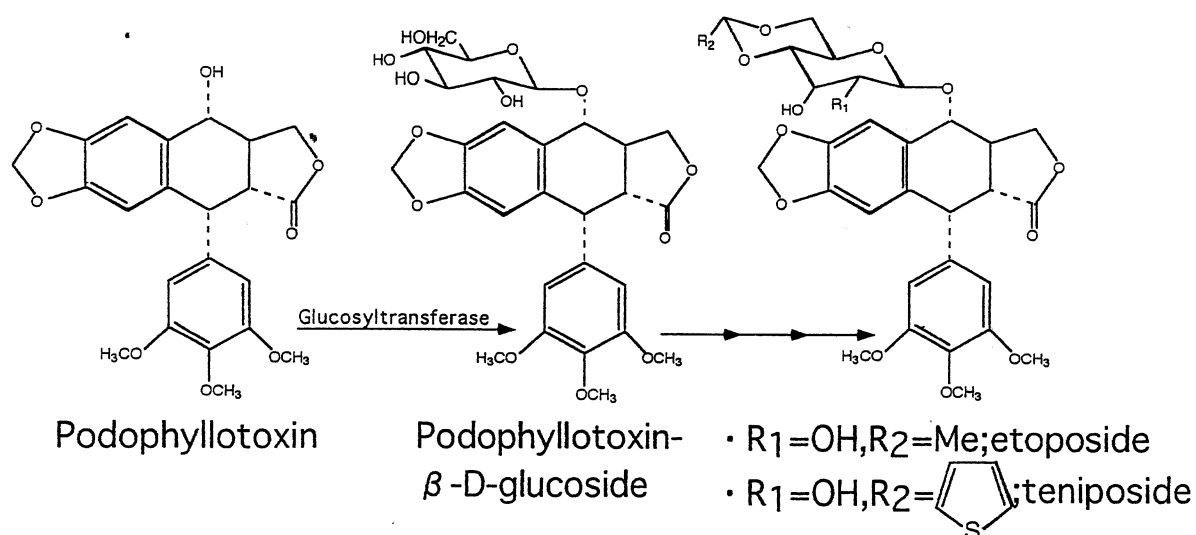


Fig. 1 Conversion of podophyllotoxin to podophyllotoxin derivatives.

そこで本研究では、クチナシ、タバコ及びチョウセンアサガオの葉及び茎から誘導したカルスから細胞懸濁培養液を調製し、これを用いたポドフィロトキシンのバイオトランスフォーメーションにより、エトポシド、テニポシドの出発原料となるポドフィロトキシンのβ-グルコシドの生産を試みた。

2. 実 験

2. 1 クチナシ、タバコおよびチョウセンアサガオの組織培養

外植体として農学部中庭に植栽されているクチナシ (*Gardenia jasminoides*) の葉、農学部内の温室で栽培したタバコ (*Nicotiana tabacum* L.) の葉および茎、チョウセンアサガオ (*Datura innoxia*) の葉および葉柄を用いた。

2.1.1 培地の調製

培地の組成は Table 1 に示した。クチナシおよびタバコの培地は、Murashige-Skoog (MS) 培地を

Table1 Constituents in Murashige-Skoog (MS) medium and Linsmaier-Skoog (LS) medium used for induction of calli from *Gradenia jasminoides*, *Nicotiana tabacum* and *Datura innoxia*.

Chemicals	MS medium	LS medium
	Concentration (mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1,650	
KNO ₃	1,900	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	
KH ₂ PO ₄	170	
H ₃ BO ₄	6	
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	
KI	0.83	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	
Na ₂ -EDTA	37.3	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	
myo-Inositol	100	—
Glycine	2	—
Nicotinic acid	0.5	—
Pyridoxine hydrochloride	0.5	—
Vitamine B1 hydrochloride	0.1	0.1
Saccharose	30,000	
Agar	9,000	

Notes : Growth regulators :

Gradenia jasminoides : Kinetin 0.2mg/l, 2,4-D 0.2mg/l

Nicotiana tabacum : Kinetin 0.2mg/l, IAA 2.0mg/l

Datura innoxia : 2,4-D 0.2mg/l

基本とし、これに生長調節物質として、クチナシの場合はオーキシシンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を0.2 mg/l, サイトカイニンとしてカイネチンを0.2 mg/l 添加した。タバコの場合はインドール酢酸 (IAA) およびカイネチンを各々2.0 mg/l, 0.2 mg/l 加えたものを用いた。また、チョウセンアサガオの場合は、Linsmaier-Skoog (LS) 培地を基本とし、オーキシシンとして2,4-D (0.2 mg/l) のみを加えた。培地は水酸化ナトリウム水溶液 (1N) で pH5.8に調整した後、寒天9 g (0.9%, v/v) を加えた。湯浴上で寒天を加熱溶解後、管ビンに30 ml ずつ分注した。この管ビンをアルミホイルで二重に蓋をした後、オートクレーブ (121℃ 20分間) にかけて滅菌した。

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% (v/v) エタノールに30秒間浸し、予備殺菌を行った。その後、試料をクリーンベンチ内に入れ、1% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸した。滅菌水で3回洗浄した後、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角程度に切断した。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ルで二重に蓋をして、25℃、暗所下で培養した。

2.1.4 カルスの増殖

誘導されたカルスは2.1.1で調製したのと同じ組成のMS培地上で (滅菌シャーレに20 ml 入れた培地) 4週間毎に継代して増殖させた (25℃, 暗所)。

2.1.5 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回継代したクチナシ及びタバコのカルス (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5 ml の培地を加え、滅菌したアルミホイルで二重に蓋をした。これを往復振とう器で25℃, 暗所下, 120 strokes/min の条件で培養した。細胞の増殖は4日毎に Packed cell volume (P.C.V: 圧縮細胞量) を測定した。増殖曲線を Fig.2 に示した。

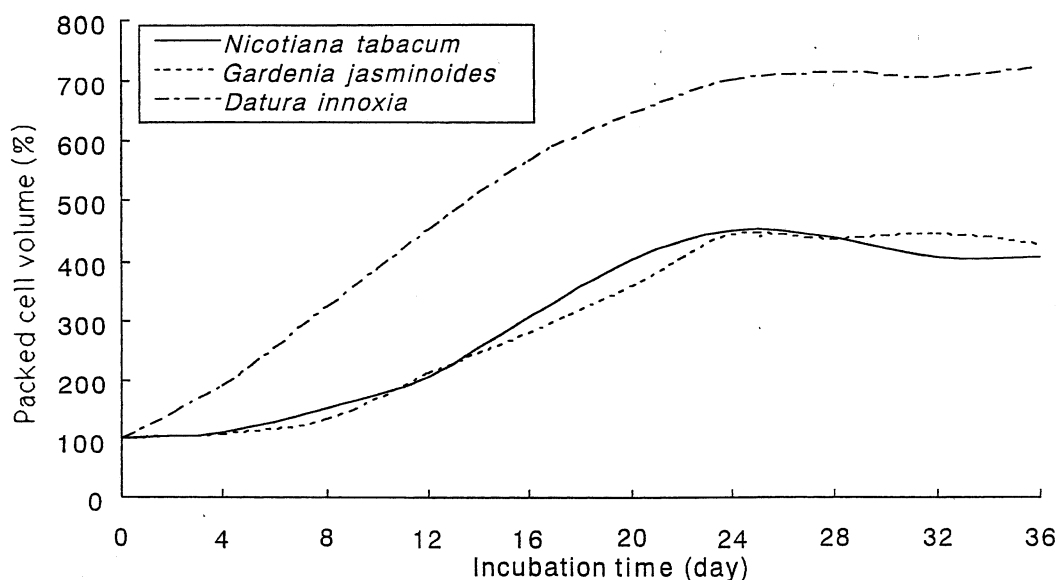


Fig. 2 Growth curves of cells from *Nicotiana tabacum*, *Gardenia jasminoides*, and *Datura innoxia*

2. 2 標品の調製

2. 2. 1 テトラ-O-アセチルポドフィロトキシシ-β-D-グルコシドの合成¹⁰⁾

合成スキームを Fig.3 に示した。無水のポドフィロトキシシ (500 mg) と α-アセトブロモグルコース¹¹⁾ (786 mg) の無水アセトニトリルの溶液 (3.0 ml) に、シアン化水銀 (524 mg) を加え、

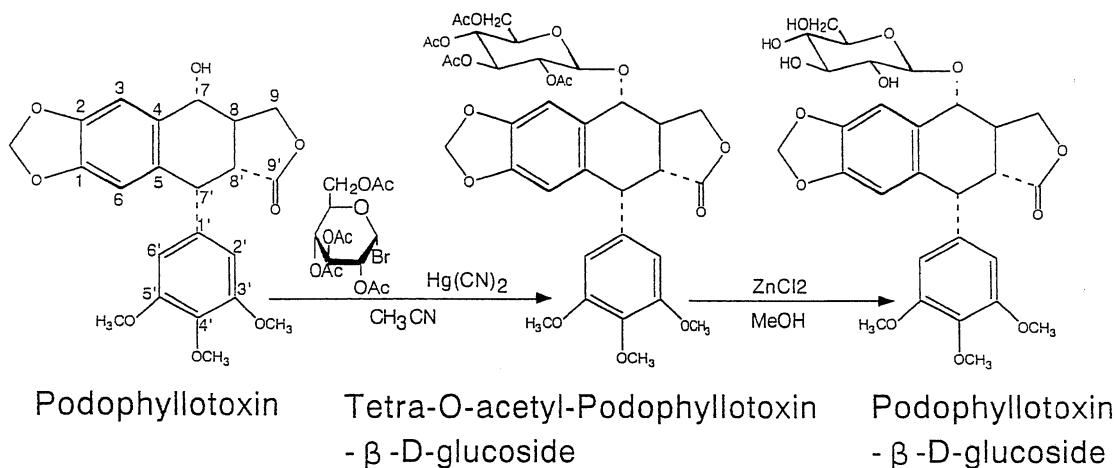


Fig. 3 Synthetic scheme for Podophyllotoxin-β-D-glucoside.

室温で5時間攪拌した。その後、α-アセトブロモグルコース (100 mg) を加え、さらに2時間攪拌した。その後、反応液を減圧濃縮 (60℃) して得た反応物 (油状) にクロロホルム (10 ml) を加えてスパテルでこねた。析出した不溶の水銀塩をデカンテーションで分け、クロロホルム溶液を分液ロートに移した。その後、1N臭化ナトリウム溶液 (5 ml) で4回、純水で3回洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、減圧濃縮した。(濃縮物 165.3 mg) この濃縮物をキーセルゲルカラムクロマトグラフィーに供し、クロロホルム：アセトンの勾配溶媒系で溶離して得られたテトラ-O-アセチルポドフィロトキシシ-β-D-グルコシドをメタノールから再結晶して白色結晶を得た。収量 74.1 mg (m.p. 122-124℃) (lit. m.p. 121-123℃)¹⁰⁾ $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -87.5^{\circ}$ (C=0.04 in CHCl_3) {lit. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -89.0^{\circ}$ (C=0.501 in CHCl_3)}¹⁰⁾

Tetra-O-acetyl-Podophyllotoxin-β-D-glucoside : Formula $\text{C}_{36}\text{H}_{40}\text{O}_{17}$.

EI-MS m/z : 744 (M^+) (100%), 744, 414, 399, 396, 348, 189, 181, 180, 168, 153, 56.

¹H-NMR (400Hz, CDCl_3) δ ppm : 7.01 (1H, s, H-6), 6.54 (1H, s, H-3), 6.39 (2H, s, H-2', H-6''), 6.02 (2H, d, $J=10.2$, -O-CH₂-O-), 5.16 (1H, t, $J=6.4$, H-1''), 5.07-4.92 (3H, m, H-2'', H-3'', H-4''), 4.64-4.52 (3H, m, H-9_α, H-9_β, H-7'), 4.16-4.02 (3H, m, H-7', 2×H-6''), 3.81 (3H, s, OCH₃), 3.78 (6H, s, 2×OCH₃), 3.58 (1H, m, H-5''), 2.94 (1H, m, H-8), 2.86 (1H, dd, $J=10.8, 0.8$, H-8'), 2.16-1.90 (9H, s, 3×OCOCH₃), 1.76 (3H, s, OCOCH₃).

¹³C-NMR (100MHz, CDCl_3) δ ppm : 174.2 (C-9'), 170.1 (OCOCH₃), 168.5 (OCOCH₃), 153.5 (C-3', C-5'), 147.9 (C-1), 147.5 (C-2), 137.5 (C-4'), 135.0 (C-1'), 132.5 (C-4), 129.6 (C-5), 109.2 (C-6), 108.3 (C-2', C-6'), 106.7 (C-3), 101.7 (-O-CH₂-O-), 97.5 (C-1''), 79.1 (C-5''), 76.7 (C-3''), 72.9 (C-2''), 72.5 (C-7), 71.7 (C-9), 68.4 (C-4''), 61.7 (C-6''), 60.4 (OCH₃), 55.8 (OCH₃), 45.2 (C-8'), 43.9 (C-7'), 38.5 (C-8), 21.3 (-OCOCH₃), 20.4 (-OCOCH₃).

2.2.2 ポドフィロトキシン-β-D-グルコシドの合成¹⁰⁾

合成スキームを Fig.3 に示した。テトラ-O-アセチルポドフィロトキシン-β-D-グルコシド (74.1 mg) を 1 ml のメタノールに溶解した溶液に無水 ZnCl₂ (29.64 mg) を加え, 15時間加熱還流した。その後 TLC で出発物のないことをチェックした。(クロロホルム:メタノール:水=75:20:5, v/v) (R_f 値=0.53) 反応液をクロロホルム:イソプロパノール=9:1 (v/v) で 2 回, 引き続き水で 2 回洗浄した後, 有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。濃縮物をキーセルゲルカラムクロマトグラフィーに供した。(クロロホルム:メタノール:水=120:12:1 (v/v) →100:15:2, v/v) 得られたグルコシドフラクションに少量のエタノールを加え60℃に熱し, ピクロ化合物を溶解させ, 一晩放置した。析出したピクロ化合物を濾過して除いた後, ろ液を減圧濃縮した後, メタノールと水から再結晶して, 白色結晶を得た。収量13.9mg (m.p.152-154℃) (lit.m.p.148-151℃)¹⁰⁾ [α]_D²⁵=-87.5° (C=0.501 in MeOH)
lit. [α]_D²⁰=-78.8° (C=0.609 in MeOH)¹⁰⁾

Podophyllotoxin-β-D-glucoside: Formula C₂₈H₃₂O₁₃. EI-MS m/z: 576 (M⁺) (100%), 576, 414, 396, 181, 180, 168, 153. ポドフィロトキシン-β-D-グルコシドを無水酢酸-ピリジンで再びアセチル化して得たアセテートは実験 2.2.2 で得たテトラ-O-アセチルポドフィロトキシン-β-D-グルコシドに一致することを, 混融試験により確認した。

2.3 培養細胞を用いたバイオトランスフォーメーション

2.3.1 基質

基質, ポドフィロトキシンは Sigma 社より購入したものを使用した。

2.3.2 クチナシ, タバコおよびチョウセンアサガオの懸濁培養細胞へのポドフィロトキシンの投与

懸濁培養を始めて20日目のクチナシおよびタバコの懸濁培養液から培地のみ取り除き, 新たに調製した培地を加えたものに, 所定濃度に調製したポドフィロトキシンの70% (v/v) エタノール溶液 (2 ml) を添加し, 2.1.5 と同じ条件で振とう培養を再開した。また, チョウセンアサガオの場合は懸濁培養開始後24日目に上記と同様にして添加した後, 2.1.5 と同じ条件で振とう培養を再開した。ポドフィロトキシンの添加濃度は各々0.5mM, 1.0mM, 2.5mM, 5 mMとし, 70% (v/v) エタノール (2 ml) に溶解したものを加えた。なお, コントロールとして70% (v/v) エタノール (2 ml) のみを培地に添加したのものも行った。

2.3.3 配糖体の分析と定量

クチナシ, タバコ及びチョウセンアサガオ懸濁培養細胞への基質 (ポドフィロトキシン) を投与した後, 3時間, 6時間, 12時間, 18時間, 24時間, 72時間培養した。その後, 培養液を細胞と培地に分け, 各々を予備凍結した後, 各々を凍結乾燥した。培地の凍結乾燥物に対しては培地の量の3倍量の, 細胞のそれに対しては細胞重量の4倍量の50% (v/v) メタノールを加え, 室温で一晩放置して抽出した。その後, 濾過し, 残渣に上記と同様に50% (v/v) メタノールを加えて再び抽出した。得られた抽出液を合併し, 減圧濃縮して得た抽出物を50%メタノール (5 ml) に溶解し, その5 μl を HPLC を用いて分析した。

HPLC 条件: Column: HITACHI GELL # 3056, Solvent; Acetonitrile: H₂O=1:2 (v/v), Flow rate =0.8 (ml/min), Detector: UV (at 290nm), Temp.: 40℃

2.3.4 検量線の作成

ポドフィロトキシン- β -D-グルコシドをメタノールに溶解し（濃度：1.0 mg/ml），これの2 μ l, 3 μ l, 5 μ lをHPLCに供し，各々のピーク面積を測定した。HPLCの条件は2.3.3と同様であった。ポドフィロトキシンの添加量とピーク面積から検量線を作成した。

3. 結果と考察

3.1 クチナシ，タバコの組織培養，細胞懸濁培養

表1に示した組成のMS培地上にクチナシの外植体を置き，カルスを誘導させた。誘導開始後，3週間で切片の切断面及び葉脈よりカルスの発生が見られた。カルスはやや黄色がかった白色で柔らかいものであった。誘導されたカルスは1ヶ月毎にカルス誘導と同じ組成の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見られなかった。

MS培地上で2回継代して増殖させたクチナシのカルスをMS液体培地に加え，細胞懸濁培養を行った。4日毎にP.C.Vを測定して細胞の増殖を調べた。増殖曲線を図2に示した。細胞は24日間で約4.5倍に増加した。図2から1～16日目が誘導期，16～24日目が対数増殖期，24日目以降が定常期と考えられた。また細胞懸濁培養中も培養細胞の褐変は見られなかった。

タバコの場合は，カルス誘導開始後，2週間で切片の切断面及び葉脈よりカルスの発生が見られた。カルスは白色透明で柔らかいものであった。誘導されたカルスは1ヶ月毎にカルス誘導と同じ組成のMS培地上で継代して増殖させた。増殖中にカルスの一部が褐変することが観察された。

クチナシの場合と同様にして細胞懸濁培養を行った。細胞の増殖曲線を図2に示した。細胞は24日間で約4.5倍に増加した。図2から1～16日目が誘導期，16～24日目が対数増殖期，24日目以降が定常期と考えられた。また細胞懸濁培養中に培養細胞の褐変は見られなかった。

3.2 チョウセンアサガオの組織培養

表1に示した組成のLS培地上にチョウセンアサガオの外植体を置き，カルスを誘導させた。誘導開始後，2週間で切片の切断面及び葉脈よりカルスの発生が見られた。カルスは少し茶色がかった白色透明で柔らかいものであった。誘導されたカルスは1ヶ月毎にLS培地上で継代して増殖させた。増殖中もカルスの褐変は見られなかった。

LS培地上で2回継代して増殖させたチョウセンアサガオのカルスをLS液体培地に加え，細胞懸濁培養を行った。細胞の増殖を4日毎にP.C.Vを測定して調べた。増殖曲線を図2に示した。細胞は20日間で約7倍に増加した。図2から1～11日目が誘導期，12～19日目が対数増殖期，20日目以降が定常期と考えられた。クチナシの培養細胞は細胞懸濁培養中に褐変したが，その増殖には影響をおよぼさなかった。

3.3 ポドフィロトキシン- β -D-グルコシドの調製

ポドフィロトキシン- β -D-グルコシドはKuhnら⁹⁾の方法によりポドフィロトキシンから調製した。その調製スキームを図3に示した。ポドフィロトキシンとテトラ-O-アセチル- α -グルコピラノシルブロミドを反応させ，テトラ-O-アセチルポドフィロトキシン- β -D-グルコシドをポドフィロトキシンに対して収率8.3%で得た。引き続きテトラ-O-アセチルポドフィロトキシン- β -D-グルコシドの脱アセチル化により，ポドフィロトキシン- β -D-グルコシドを，テトラ-O-アセチルポドフィロトキ

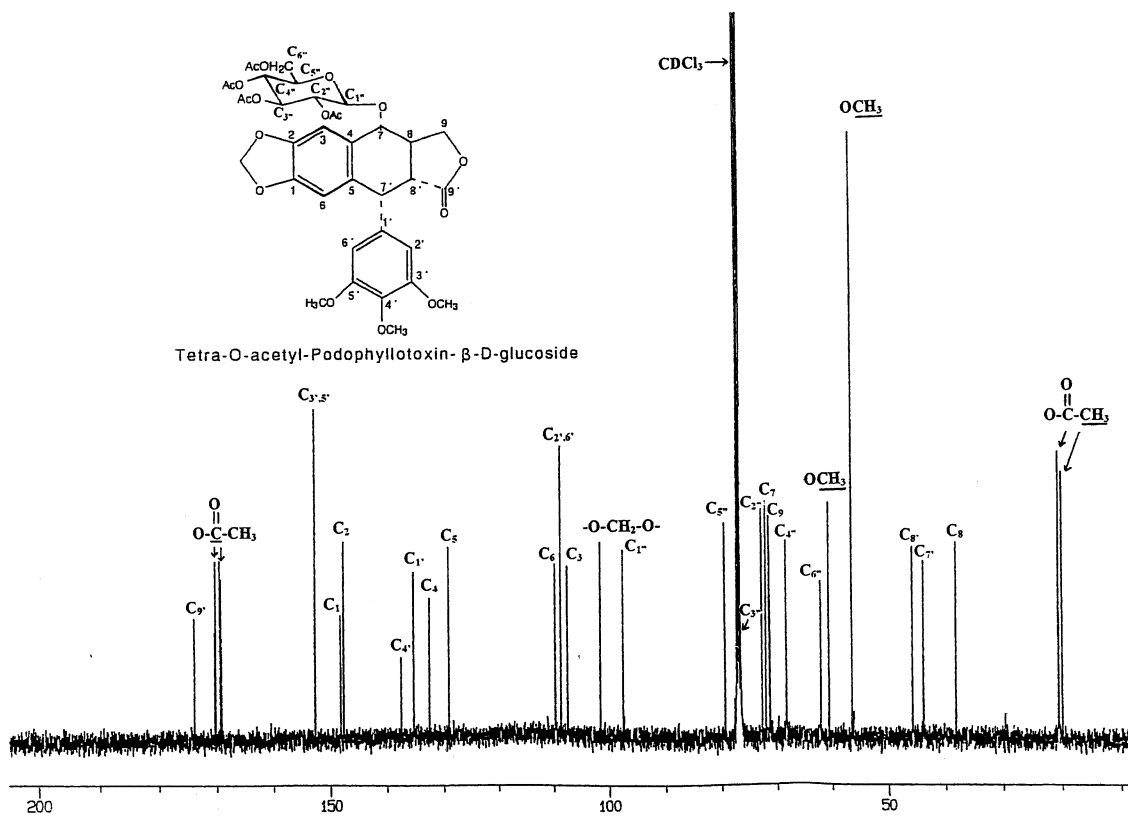


Fig. 4 ^{13}C -NMR Spectrum of the Tetra-O-acetyl-Podophyllotoxin- β -D-glucoside.

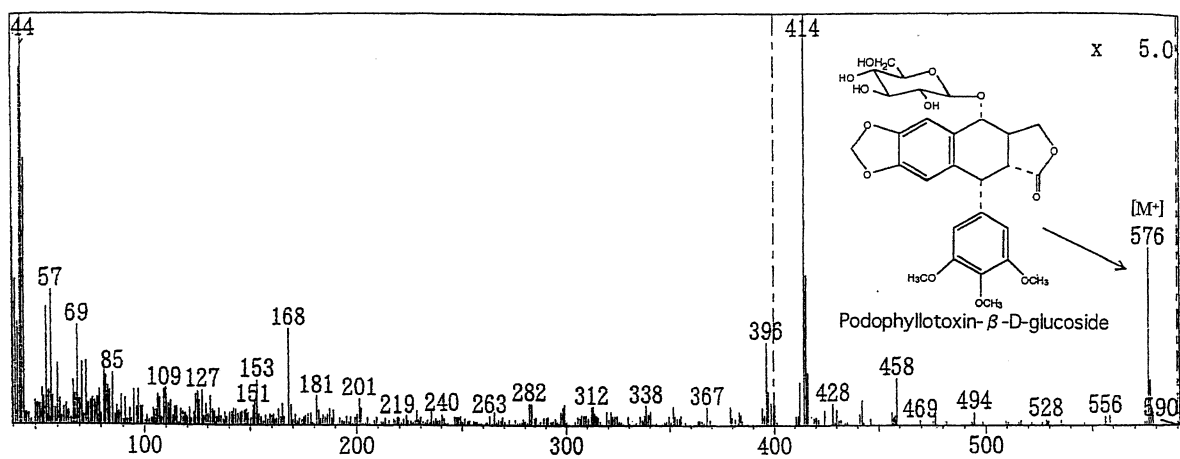


Fig. 5 Mass spectrum of Podophyllotoxin- β -D-glucoside.

シン- β -D-グルコシドに対して24.2%の収率で得た。ポドフィロトキシンからの全収率は2.0%であった。テトラ-O-アセチルポドフィロトキシン- β -D-グルコシドの ^{13}C -NMRスペクトルを図4に、ポドフィロトキシン- β -D-グルコシドのマスマスペクトルを図5に示した。

3. 4 クチナシ、タバコ及びチョウセンアサガオ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日前後のチョウセンアサガオの培養細胞に基質であるポドフィロトキ

シンを投与して所定時間培養した。その後、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ポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドのピークが認められた。このピークがポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドであることは、合成した標品とのリテンションタイムの一致並びにスパイクングにより確認した。一方、培養液からの抽出物の HPLC クロマトグラム上には、ポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドのピークは認められなかった。なお、クチナシ、タバコの培養細胞はポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドを生産しなかった。

ポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドの生成量の経時変化を図 6 に示した。基質 1.0mM を投与して 6 時間培養した場合に最大 (4.6%) の生産量を示した。図 6 から、基質濃度が 0.5mM, 1.0mM と低い場合にポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドの生成量は高かったが、変換率は低いものであった。また、基質投与量が多くなる程ポドフィロトキシシン- β -D-グルコシドの生成量は減少した。このような基質濃度による配糖体の生成量の差は、基質の量が多すぎたために十分に配糖化できなかったためと、クチナシ培養細胞中のアルコール性水酸基をグルコシル化できるグルコシルトランスフェラーゼの活性が低かったためとも考えられた。また、生成されたポドフィロトキシシン- β -D-グルコシド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配糖体の生産量が低かったものと考えられた。細胞内に取り込まれたフェノール性化合物は細胞にとっては毒性物質と考えられるので、配糖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、配糖化して水溶性を付加しているのか、あるいは浸透圧調整のために配糖化しているものと推定された。しかしながら、ここで得られた結果から三つの機構が考えられたが、現段階では不明である。今後、トレーサー実験等で明らかにする必要があると考えられた。

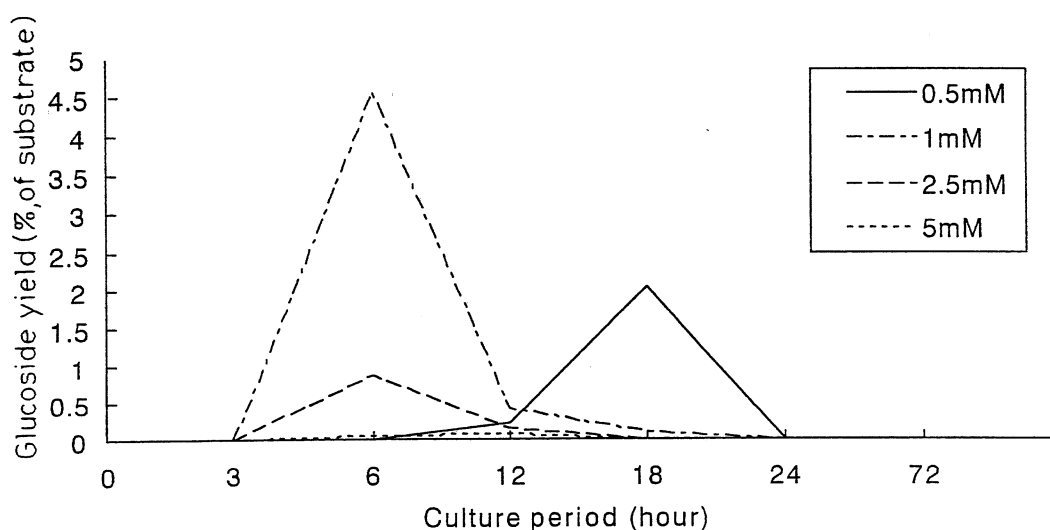


Fig. 6 Time-course of glucosylation of Podophyllotoxin by cell suspension cultures of *Datura innoxia*.

Mizukamiら¹²⁾は、数種の植物培養細胞によるサリシルアルコールの配糖化について研究している。彼らは、タバコおよびチョウセンアサガオの根の培養細胞はアルコール性水酸基が配糖化されたイソサリシンのみを生成するが、クチナシの葉からの培養細胞はフェノール性水酸基が配糖化されたサリシンとイソサリシンを約 7 : 3 の割合で生成することを報告している。しかし、本研究で使用したタ

バコ、クチナシからの培養細胞（各々葉と茎および葉からの）ではポドフィロトキシンのC-7位のアルコール性水酸基を配糖化することはできなかった。

このことから、本研究で使用した葉と茎および葉由来のタバコ及びクチナシの培養細胞にはアルコール性水酸基を配糖化できるグルコシルトランスフェラーゼが含まれていなかったものと考えられた。一方、葉および葉柄由来のチョウセンアサガオの培養細胞はポドフィロトキシンを配糖化することができた。Mizukamiら¹²⁾の結果と本研究の結果から考えれば、本研究で使用したチョウセンアサガオの培養細胞中の（アルコール性水酸基を配糖化できる）グルコシルトランスフェラーゼの活性が根由来の培養細胞のそれよりも低いことが示唆された。根由来のチョウセンアサガオの培養細胞を用いれば、ポドフィロトキシンの β -D-グルコシドの生産性は向上するものと考えられた。また、チョウセンアサガオの培養細胞からグルコシルトランスフェラーゼを単離し、これを用いて反応を行なえば、ポドフィロトキシンの β -D-グルコシドの収率は大幅に向上するものと考えられた。

4. 結 論

チョウセンアサガオからの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、リグナン類の一種であるポドフィロトキシンは相当する配糖体に変換された。最も高い配糖体収率は基質濃度1.0mM、6時間培養した場合に得られ、その収率は4.6%であった。一方、クチナシ、タバコからの培養細胞はポドフィロトキシンの β -D-グルコシドを生成しなかった。ここで得られた結果は、チョウセンアサガオ中にはポドフィロトキシンのベンジナルアルコール型タイプの水酸基をグルコシル化できる酵素（グルコシルトランスフェラーゼ）を含むが、他の二つの植物中にはこのタイプの酵素を含まないことが示唆された。

引 用 文 献

- 1) 三澤正愛 (1985) 第7章物質生産 (植物細胞組織培養—実際・応用・展望 原田宏, 駒嶺穆編, 理工学社, 東京) 325-388.
- 2) Tabata, M., Umetani, Y., Ooya, M. and Tanaka, S. (1988) GLUCOSYLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY PLANT CELL CULTURES. *Phytochemistry*, 27(3), 809-813.
- 3) Furuya, T., Ushiyama, M., Asada, Y., Yoshikawa, T. and Orihira, Y. (1988) BIOTRANSFORMATION OF PHENYLACETIC ACID AND 2-PHENYLPROPIONIC ACID IN SUSPENSION CULTURE OF *COFFEA ARABICA*. *Phytochemistry*, 27(3), 803-807.
- 4) Tabata, M., Ikeda, F., Hiraoka, N. and Konoshima, M. (1976) GLUCOSYLATION OF PHENOLIC COMPOUNDS BY *DATURA INNOXIA* SUSPENSION CULTURES. *Phytochemistry*, 15, 1225-1229.
- 5) Kometani, T., Tanimoto, H., Nishimura, T., Kanbara, I. and Okada, S. (1993) Glucosylation of Capsaicin by Cell Suspension Cultures of *Coffea arabica*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57(12), 2192-2193.
- 6) 白坂正良, 江戸清人 (1994) 植物由来抗癌剤, 新薬展望, 30(S-1), 173-178.
- 7) Damayanthi, Y. and Lown, J. W. (1988) Podophyllotoxins: Current Status and Recent Develop-

- ments. *Current Medicinal Chemistry*, 5, 205-252.
- 8) MacRae, W.D. and Towers, G.H.N. (1984) BIOLOGICAL ACTIVITIES OF LIGNANS. *Phytochemistry*, 23(6), 1207-1220.
 - 9) Saito, H., Yoshikawa, H., Nishimura, Y., Kondo, S., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1986) Studies on Lignan Lactone Antitumor Agents. II. Synthesis of N-Alkylamino- and 2,6-Dideoxy-2-aminoglucosidic Lignan Variants Related to Podophyllotoxin. *Chem. Pharm. Bull.*, 34(9), 3741-3746.
 - 10) Kuhn, M. and Wartburg, A. Von (1968) 16. Abspaltung von Acyl-Schutzgruppen bei alkaliempfindlichen Glucosiden. Synthese von Podophyllotoxin- β -D-glucosid. *Helv.* 51, 163-168.
 - 11) 宮田俊：愛媛大学大学院農学研究科修士論文（平成10年度），P9-10
 - 12) Mizukami, H., Terao, T., Miura, H. and Ohashi, H. (1983) GLUCOSYLATION OF SALICYL ALCOHOL IN CULTURED PLANT CELLS. *Phytochemistry*, 22(3), 679-680.