薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (8) 675-696 (1988)

植物細胞培養による物質生産—デノボ合成と変換の基礎的研究—

古谷 力

北里大学薬学部 〒108 東京都港区白金 5-9-1

Production of Useful Compounds by Plant Cell Cultures
—*De novo* Synthesis and Biotransformation—

TSUTOMU FURUYA

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University,
5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

De novo synthesis and biotransformation of secondary metabolites by plant cell cultures have been studied in my laboratory for about 25 years.

Incorporation of traditional and advanced tissue culture techniques, *i.e.* chemical and physical regulations, engineering of apparatus, selection of high-yielding strains and hairy root cultures transformed with Ri plasmid, has made possible the successful production of; ginseng saponins (ginsenoside Rb₁ and Rg₁), morphinan alkaloids (morphine and codeine), berberine, caffeine, vitamin E, retrochalcone (echinatin) and so on. Furthermore, a large scale production of ginseng cells in 20 ton tank, morphinan alkaloid synthesis in redifferentiated poppy cells, and detection of 6'-deoxychalcone synthase activity in licorice cells have firstly been demonstrated.

The biotransformational ability of cultured plant cells has been examined, employing terpenoids (citronellal, menthol, borneol, *etc.*), steroids (cardiac glycosides, pregnane derivatives and androgens), alkaloids (isoquinoline and indole) and phenolics (phenylpropionic acid, tropic acid, *etc.*) as substrates. Bioreactors with immobilized plant cells have been also developed. The reactions including oxidation, reduction, glycosylation, esterification, methylation and isomerization against administered compounds have been observed, and, consequently, even optical resolution of racemic substrates could be performed.

De novo synthesis of plant products and biotransformation of organic compounds by plant cell cultures will contribute to plant bioindustry by providing medicinals and other useful compounds.

Keywords—plant cell culture; biotransformation; immobilization; Ri plasmid; ginseng saponin; opium alkaloid; 6'-deoxychalcone synthase; menthol; digitoxigenin; tropic acid

植物体は多数の細胞集団からなり、細胞がお互いに認識し合いながら生活している細胞社会である。この複雑な細胞社会から特定の細胞を隔離して生活環境を簡素化することができる。このように単純化された細胞実験系は人為的に成育環境を設定し易くなる。すなわち植物ホルモンや培地添加物による化学的調節、光、温度による物理的調節、攪拌方式、溶存酸素量による生物工学的調節などにより自由にコントロールできる。しかも植物体より短時間に鋭敏に反応するので、物質代謝や分化の要因解析が容易になる。

したがって植物細胞培養は細胞から組織、器官、個体におけるさまざまな生理現象の解明に用いられてきた。一方、物質生産に関しても基礎的研究のみならず工業的に利用できる段階にまで応用されるようになり、植物バイオテクノロジー¹⁾ plant biotechnology の重要な位置を占めるようになった。

著者は薬学領域に初めて植物細胞培養を導入し、とりわけ有用物質(2次代謝産物)の生産に関しては、わが国で初めてデノボ合成 *de novo* synthesis と変換 biotransformation の両面から研究¹⁻³⁾を展開した。

本総説は、昭和 63 年度日本薬学会学術賞の受賞業績を中心に記述したものである。

1. デノボ合成

植物細胞培養によるデノボ合成に関する著者らの研究 (Table I) として、薬用人参の細胞培養によるサポニン ginsenosides の生産,⁴⁻¹⁵⁾ ケシ及びケシ科植物の細胞培養によるあへんアルカロイドの生産,¹⁶⁻²⁰⁾ 黄連の細胞培養による berberine,²¹⁻²³⁾ serendipity の jatrorrhizine の生産,²⁴⁾ タバコカルスによる nicotine の生産,²⁵⁻³⁴⁾ コーヒー細胞培養による caffeine の生産,^{2,3,35)} クララカルスによる l-maackiain の生産,³⁶⁾ 甘草の細胞培養によるレトロカルコン echinatin の生産,³⁷⁻⁵¹⁾ 大黃の細胞培養による chrysophanol,⁵²⁾ ケジギタリスの 4-hydroxydigitolutein^{53,54)} などアントラキノンの生産、紅花の細胞培養による vitamin E (tocopherols) の生産,^{55,56)} またジギタリスの強心配糖体,⁵⁷⁾ ユーカリのトリテルペノイド,⁵⁸⁾ ワサビの辛味成分⁵⁹⁾ の生産などがある。

ここでは薬用人参、ケシ、コーヒー、甘草の細胞培養による物質生産について、最近の研究を中心に概要を述べる。

1-1. 薬用人参の細胞培養によるサポニンの生産

1-1-1. 薬用人参カルスの代謝調節によるサポニン生産——薬用人参サポニンの生産研究⁴⁻¹⁵⁾ に当たり、高生産株を獲得する手段として

- 1) 化学調節 (植物ホルモン、糖、無機イオンなど培地添加物の種類、濃度など)
- 2) 物理調節 (光の種類、照度、日周性の調節など)
- 3) 生物工学調節 (液体培養時の攪拌方法、速度、プロペラの改良、溶存酸素量など)

による薬用人参カルス培養条件の調節を単独又はコンビネーションで活用し、安定な高成長・高生産株が得られた。また生合成前駆物質や代謝阻害剤の利用 (時には二者共用) により薬用人参サポニンの生産量が無添加の約 3 倍に増加した。

以上の基礎研究に基づき薬用人参カルスの 20 トンタンクでの大量培養が可能になり、現在製品化が進められている。植物細胞培養における世界最大のスケールと生産技術は、国内外で高く評価されておりバイオインダストリーへのインパクトは極めて大きいものがある。

ここでは極めて簡略に述べたが、詳細は原報のほか、総説^{1,15)} を参照されたい。

1-1-2. 薬用人参カルスから幼苗育成の要因解析——薬用人参カルスより幼苗を分化、育成するた

TABLE I. *De Novo* Synthesis of Secondary Metabolites by Plant Cell Cultures

Cell	Product	
Terpenoids		
<i>Panax ginseng</i>	Protopanaxatriol	2
	Ginsenoside Rb ₁	5
	Ginsenoside Rg ₁	11
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cycloartenol	2
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Asiatic acid	8
Steroids		
<i>N. tabacum</i>	Campesterol	4
<i>Digitalis purpurea</i>	β-Sitosterol	3
	Digitoxin	3
<i>E. perriniana</i>	β-Sitosterol	1
Alkaloids		
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotine	2
	Anabasine	3
<i>Coptis japonica</i>	Berberine	1
	Coptisine	9
<i>Papaver somniferum</i>	Morphine	4
	Norsanguinarine	8(1)
<i>P. setigerum</i>	Sanguinarine	7
<i>P. bracteatum</i>	Oxysanguinarine	9
<i>P. orientale</i>	Dihydrosanguinarine	8
<i>P. rhoeas</i>	Protopine	8
<i>Eschscholtzia californica</i>	Aporphine	8
<i>Chelidonium japonicum</i>	Sanguinarine	5
<i>Macleaya cordata</i>	Sanguinarine	7
<i>Dicentra peregrina</i>	Protopine	8
<i>Corydalis incisa</i>	Protopine	7
<i>C. pallida</i>	Protopine	8
<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>	Jatrorrhizine	4
<i>Coffea arabica</i>	Caffeine	2
<i>Camellia sinensis</i>	Caffeine	2
Amino acids		
<i>C. sinensis</i>	Theanine	2
Coumarins		
<i>Nicotiana tabacum</i>	Scopoletin	2
Flavonoids		
<i>Sophora angustifolia</i>	1-Maackiain	2
<i>Glycyrrhiza echinata</i>	Echinatin	2(1)
	Licodione	1(1)
	Licoflavone	3(1)
	5'-Prenyl-licodione	1(1)
Tocopherols		
<i>Carthamus tinctorius</i>	α-Tocopherol	4
Benzoquinones		
<i>C. tinctorius</i>	Ubiquinone-9	1
Anthraquinones		
<i>Digitalis lanata</i>	4-Hydroxydigitolutein	3(2)
	3-Methylpurpurin	6
<i>Rheum palmatum</i>	Chrysophanol	2
Fatty acids		
<i>N. tabacum</i>	Palmitic acid	2
Glucosinolates		
<i>Wasabia japonica</i>	Sinigrin	1

Numerals indicate the number of compounds; in parenthesis, the number of new compound.

TABLE II. Effects of KNO₃ and MgSO₄ in Shoot Viability and Root Formation

No.	X1	X2	Concentration (mg/l)		Shoot viability (%)		Root formation (%)	
			KNO ₃	MgSO ₄	1st	2nd	1st	2nd
1	-1	-1	640	79	0	0	27.7	5.3
2	1	-1	3 420	79	16.7	41.6	22.3	39.0
3	-1	1	640	327	11.0	0	16.7	27.6
4	1	1	3 420	327	66.7	58.3	33.3	44.3
5	$\sqrt{2}$	0	4 000	150	91.7	66.7	16.7	44.3
6	$-\sqrt{2}$	0	100	150	41.7	50.0	33.3	55.7
7	0	$\sqrt{2}$	2 000	400	66.7	58.3	27.7	55.7
8	0	$-\sqrt{2}$	2 000	50	16.7	66.7	22.3	27.6
9	0	0	2 000	150	25.0	50.0	61.0	61.0
10	0	0	2 000	150	58.3	83.3	66.7	77.7
11	0	0	2 000	150	91.7	83.3	61.0	61.0
12	0	0	2 000	150	58.3	83.3	55.7	61.0

めの最適条件を検討した。

カルスからシュート形成に及ぼす要因のうち kinetin 濃度の影響を調べ、0.2 ppm の低濃度で形成率 75% と好結果が得られた。またシュート分化カルスから発根条件を indole-3-butyric acid (IBA) と kinetin のコンビネーションで検討したが、各々 1 ppm で発根率 58% であったが根の成育はみられなかった。

つぎに培地中の無機塩 NH₄NO₃, KNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ の 4 要素がシュート生存と発根に及ぼす影響を調査するために、L8 直交配列に基づく実験を行い、その統計解析を行った。その結果、シュート生存率に KNO₃ が高く寄与すること、発根率は NH₄NO₃ と KNO₃ の相互作用が寄与するが、NH₄NO₃ を含まない場合は KNO₃ が大きく影響し、また MgSO₄ の存在も重要であると分析された。

したがって KNO₃ と MgSO₄ の 2 要素の最適化を目的に Box-Wilson 法に基づく実験を行った。

Table II にその時の条件と結果を示したが、評価は

1 代目、2 代目と別々にシュート生存率と発根率の平均値を示した。

シュート 1 代目の解析は極大値が実験範囲をはずれたところにあり、寄与率は 62.2% で信頼性は低い、2 代目の解析は極大値は実験範囲の中心に近づいた。発根率の 1 代目の解析は Fig. 1 のように極大値は実験のほぼ中心にあり、寄与率は 94.3% と高く一応信頼にたる値となっており 2 代目の解析もほぼ同一であった。

以上の結果から、カルスより幼苗の分化誘導、育成に使用する最適の培地組成は、シュート育成には従来の基本培地 (Murashige and Skoog (MS) 培地) でよいが、発根については NH₄NO₃ を除き、MgSO₄ が 185 mg/l と少ない処方の方がよいことが明らかになった。現在はカルスから multiple shoot 形成、発根を経て、幼苗の大量生産に成功している。

1-1-3. 薬用人参への Ri プラスミド導入とサポニン生産——種々の薬用植物に土壌バクテリアの 1 種 *Agrobacterium rhizogenes* を感染させ、生じた毛状根 hairy root を分離培養する試みは近年活発に行われている。

Fig. 1. Effect of KNO₃ and MgSO₄ on Root Formation (1st Generation)

Numbers in this figure are the rates of root formation.

* Maximum
X1=KNO₃ 1953.8 mg/l
X2=MgSO₄ 153.9 mg/l
Y 61%
* R²=94.3%

これは植物へのバクテリアのプラスミド導入という遺伝子工学的手法としてのみならず、それを直接有用物質の生産に利用するという点からも注目されている。

薬用人参の根より 1980 年にカルス化後 4 週間毎に継代培養している固い塊状のカルス Pg-4 株に *A. rhizogenes* A-4 株を以下の方法で感染させた。Pg-4 株を 3 週間液体培地で培養後、集めた細胞塊をセルラーゼ、マセ

Fig. 2. a) *Panax ginseng* Hairy Roots Induced from Callus after Infection of *Agrobacterium rhizogenes*, b) The Enlarged Photo of a, c—e) Hairy Roots Cultures in MS Medium without Hormone, f) Non-transformed Pg-1 IBA 1 Tissues Cultured on Agar Medium Supplemented with 2 ppm IBA and 0.1 ppm Kinetin, g—h) Non-transformed Ordinary Roots Cultured in the Same Liquid Medium as Above

ロザイムで処理する。洗浄後、集めた細胞塊を *A. rhizogenes* A-4 株の懸濁液に入れ感染処理した。つぎに数種の抗生物質を加えた MS 液体培地中で除菌処理を行い、植物ホルモン無添加の MS 基本培地で培養し生じた細根を分離培養した。¹⁴⁾

分離した毛状根はホルモン無添加の MS 基本液体培地中で成育し、細根を分枝した (Fig. 2)。また 1967 年にカルス化後、IBA 1 ppm 存在下に分離した Pg-1 IBA 1 培養根では地上部の分化やカルス化がしばしば見受けられたが、毛状根では良く分枝した細根のみが観察されるのが特色である。因みに実験に用いた Pg-4 株はいずれの培地条件においても、また感染処理以外は同様に行った対照実験においても細根の分化は認められなかった。

つぎに毛状根の抽出液についてオパインの検出を高圧ろ紙電気泳動法により行い、agropine と man-nopine の存在を確認した (Fig. 3)。したがって Ri プラミドの導入が証明されたことになる。

毛状根の成長率、サポニン含量は共に低い値を示したので種々のホルモン条件を検討した結果、IBA に効果が認められた。B2K 培地 (IBA 2 ppm, kinetin 0.1 ppm を含む MS 培地) ではホルモン無添加培地に比べて成長率で約 2 倍、サポニン含量で約 3 倍の増加がみられた。このサポニン含量は培養根の 2 倍の値で、乾燥重量当りにおいてもほとんど同じ値を示した。更にサポニン組成 (Rb/Rg) も天然人参の値に近く、質的にも優れていることが確認された

Fig. 3. Paper Electrophoretic Analysis of Extracts from Ordinary Cultured Roots and Hairy Roots of *Panax ginseng*

A; agropine, M; mannopine.
Lane 1; non-transformed ordinary cultured roots
Lane 2; transformed hairy roots (subcultured in hormone-free medium)
Lane 3; transformed hairy roots (subcultured in B2K0.1 medium)
Lane 4; hairy root (partially purified by Dowex column chromatography)
Lane 5; authentic agropine and mannopine

TABLE III. Growth and Saponin Contents of Callus, Ordinary Cultured Roots, Hairy Roots and Native Root of *Panax ginseng*

Tissue	Medium ^{a)}	Growth ratio ^{b)}	Dry wt (g) per 100 g fr. wt	Saponin content (mg) per 100 g fresh wt			Rb group Rg group	Total saponin per dry mass (wt%)
				Rb group	Rg group ^{c)}	Total		
Pg-4 callus	B2K0.1	2.85	5.97	28.25	10.59	38.84	2.67	0.65
Pg-4								
Hairy roots	—	3.07	10.09	24.78	11.08	35.86	2.24	0.36
Hairy roots	K0.1	2.25	10.29	21.74	14.64	36.38	1.48	0.35
Hairy roots	B2	5.11	9.62	39.57	26.64	66.21	1.49	0.69
Hairy roots	B0.5K0.1	4.30	10.45	56.31	39.97	96.28	1.41	0.92
Hairy roots	B2K0.1	6.20	10.58	55.70	44.54	100.24	1.25	0.95
Pg-1								
Ordinary roots	B2K0.1	3.96	5.57	25.65	25.01	50.66	1.03	0.91
Ordinary roots	—	1.26	5.31	15.32	4.87	20.19	3.15	0.38
Native root			23.91	59.03	37.28	96.31	1.58	0.40

a) Each tissue (duplicate flasks) was cultured in Murashige and Skoog's basal medium containing the following hormones: —; no supplement, B; IBA (ppm), K; kinetin (ppm). b) Growth ratio was determined by increase of the fresh weight after 3-weeks culture. The values are the quotient of the fresh weight after 3-weeks culture and the fresh weight of the inoculum. c) The amount of the Rb group was calculated as the total of ginsenosides Ra, Rb₁, Rb₂, Rc and Rd, having protopanaxadiol as the sapogenin, and the Rg group was calculated as the total ginsenosides Re, Rf, Rg₁, Rg₂ and Rh, having protopanaxatriol. Each value shows the average of duplicate estimations in 2 flasks.

(Table III).

最近、この薬用人参毛状根を用いてステロイド (2-2-3 参照) やフェニルカルボン酸 (2-4-1 参照) などの変換実験を行ったが、培養細胞と異なる興味ある結果が得られている。

1-2. ケシの細胞培養によるあへんアルカロイドの生産 1-2-1. ケシカルスの成分——著者らは 1966 年にケシ *Papaver somniferum* (Papaveraceae) 植物の各部位よりカルスを誘導し、ココナツミルクを添加した培地で活発に増殖するカルスを得た。カルスの成分検索の結果、新物質の *norsanguinarine* をはじめ *sanguinarine*, *oxysanguinarine*, *dihydrosanguinarine*, *protopine*, *cryptopine*, *magnoflorine* などが確認されたが、^{16,17)} *morphine*, *codeine* などは見出されなかった。

このように未分化状態のカルスはモルフィナンアルカロイドを全く含んでいなかったが、その後外国で 2 つのグループによりカルスからのモルフィナンアルカロイドの生産が報告された。しかし、その 1 つは *thin-layer chromatography* (TLC) のみで同定し、他もその含量が余りに高すぎるなどその結果は疑問視されている。むしろ、ある条件下で培養した 1 部仮道管組織を分化したカルスで *codeine* のみ、*thebaine* のみ、あるいは *codeine* と *thebaine* が共に生産されるとの報告がある。更に初期カルスには *morphine*, *codeine*, *thebaine* すべてが含まれていることが *radioimmunoassay* (RIA) 法で確認されたが、3 代継代培養後の 9 週間後にはいずれの生産も認められなかったことも報告されていることなどから、ケシカルスにおいては分化とモルフィナンアルカロイドの生産とが密接に関連していることが示唆された。事実、カルスから分化した胚様体 *embryoid* や根においてモルフィナンアルカロイドの生産が報告されている。

1-2-2. ケシカルスの分化——著者らも成分研究と並行してケシカルスの再分化を試み、高度に分化した組織を高頻度で得ることに成功した。

ケシカルスは 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 1 ppm, kinetin 0.1 ppm 及び 7% ココナツミルクを含む MS 基本培地 (CM 培地) 上で 26°C, 暗所にて非常に活発に増殖する。このカルスを CM 培地よりココナツミルクを除くか、あるいは 2,4-D の代りに 1-naphthylacetic acid (NAA) などを用いた培地に移植しアルビノカルスを分離した。このアルビノカルスは、その後 *meristemoid* と命名された活発な分化能力を有する細胞の塊りである。

この *meristemoid* は水分含量 87% で親カルスの 95—98% に比べて低く、細胞質成分に富んでいる。Sudan III 試薬で染色される顆粒を密に含み、総脂質含量は乾重量当り 34.1% と高く、ケシ種子の 33.6% に匹敵した。*Meristemoid* はサイトカイニン存在下、光照射により濃緑色の芽原基 *primordium* や胚様体を活発に形成し、再分化に際して種子のような重要な役割を演じる。¹⁸⁾

Meristemoid からの再分化には 16—18°C の低温、3500 lux, 16 時間光照射, 8 時間暗所の光周期が最も適していた。通常の培養適温の 26°C においても苗条 *shoot* の再分化は希に認められるが、形成された葉には鋸歯がなく、2 cm 程度で枯死しそれ以上には成育しなかった。16—18°C で分化した *shoot* は正常な鋸歯のある葉を形成し、その後植物成長調節物質を除いた培地で活発に成育し、最終的にはフラスコ内で 15 cm 程度の幼植物体を形成し、光照射の周期を調節することにより開花も観察された。¹⁹⁾ 花は白色のちぢれた 4 枚の花弁をもち開花後 3 週間咲き続けた (原植物では 1 日)。また蒴果も形成されたが乳液や種子は形成されなかった。一方、フラスコ内で 5 cm 程度に成育し、発根した幼植物体を土壌に移植栽培した結果、移植 3 ヶ月後には 50 cm に成育し開花した。花弁は白色 4 枚で蒴果も形成し、乳液の分泌も認められた。更に 3 週間後には多数の種子が形成され、その種子は 100% 近い発芽能力をもち、現在まで 7 代成育している (Fig. 4)。

1-2-3. ケシ分化組織中のあへんアルカロイド——以上のようにして得られた種々分化段階の組織中のあへんアルカロイドについて、TLC, gas-liquid chromatography (GLC), gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), enzyme immunoassay (EIA) などで定性、定量を行った。^{18,20)}

その結果、Table IV に示したように完全に莖葉を分化した植物体 (3—20 cm) では *morphine*, *codeine*, *thebaine* の存在が認められ、その含量も実生からの幼植物体 (5 cm 位) とほぼ同じかあるいはむしろ高い値を示した。しかし再分化した緑色の芽や *shoot* (2 cm 位まで) においては *morphine* の存在は GC-MS により確認されるものの *codeine* が主で *thebaine* が僅かに認められるにすぎず、この結果は他の報告とよく一致した。

つぎに、更に分化程度の低い組織について EIA 法により詳細な検討を行った。緑化カルスにおいてもわずかにモルフィナンアルカロイドとくに *codeine* の存在が認められたが、この緑化カルスには光学顕微鏡下で気孔を含

Fig. 4. Plantlets Developed in Soil after Regeneration from Callus Cultures of *Papaver somniferum*

a) The plantlets cultivated for 3 months after transferring into soil in pot from clonal shoots. b) The flower of a plantlet developed in soil from clonal shoots, which had 4 different sizes of petals. c) The mature capsule of a plantlet developed in soil, which contained many seeds.

む表皮組織や仮道管組織の分化が認められた。しかし完全に未分化のカルス (Ps カルス) 及び meristemoid においては $0.5 \mu\text{g}$ までの検出感度をもつ EIA 法によってもモルフィナンアルカロイドの存在は認められなかった。したがってケンにおいては組織あるいは器官 (おそらく乳管組織) の分化がモルフィナンアルカロイドの生産には不可欠であることが明らかとなった。

以上のようにカルスからの分化条件が確立され、分化組織の液体培養によりモルフィナンアルカロイドの生産が認められたことは、ケン組織培養によるあへんアルカロイドの工業生産の可能性を示すものである。

1-2-4. 固定化ケン細胞——あへんアルカロイド生合成に関与する 2, 3 の酵素について、分離、精製、基質特異性などを調べた。⁸⁰⁾ またケンカルスによるあへんアルカロイドの変換、とくに codeinone から codeine への立体選択的還元反応 (2-3-1 参照)

について、ケン細胞の固定化、固定化細胞を用いたバイオリアクターの利用^{2,8)}及び速度論的解析⁸²⁾も行われた。

以上に紹介した著者ら以外の引用論文は原報^{19,20)}や総説⁸⁰⁾を参照されたい。

1-3. 固定化コーヒー細胞による Caffeine の生産

コーヒーノキ *Coffea arabica* (Rubiaceae) 培養細胞は

TABLE IV. Morphinan Alkaloid Contents in Differentiated Tissues and Plants of *P. somniferum*, in Comparison with Young Plants

Material ^{a)}	Alkaloid content (mg/100 g dry wt.)		
	Morphine	Codeine	Thebaine
Green bud (K0.1, K1)	+ ^{b)}	0.1	0.1
Differentiated shoot (0.5—3 cm)	+ ^{b)}	5.1	0.9
Differentiated plant (3—10 cm)	23.3	5.8	2.1
Differentiated plant (10—20 cm)	57.0	11.8	9.4
Young plant (3—5 cm)	11.1	7.9	1.0

Each alkaloid was determined by GLC and identified by GC-MS

a) See the photographs shown in ref. 19. K 0.1 and K 1 indicate MS medium containing 0.1 and 1 ppm kinetin, respectively. b) Morphine was identified by GC-MS, but not determined by GLC.

Fig. 5A. Shake Culture of Immobilized Coffee Cells

1. Foam ball (diameter 2.7 cm, pore size 5 mm).
2. Foam ball (diameter 2.7 cm, pore size 3 mm).

Fig. 5B. Immobilized Coffee Cells by Polyurethane Foam

The upper part shows the whole. The lower shows the cut face. 1 Foam ball (diameter 2.7 cm, pore size 5 mm). 2 Foam ball (diameter 2.7 cm, pore size 3 mm).

生産した *caffeine* を培地中に放出するため、固定化植物細胞による二次代謝産物の連続生産の実験系に適している。

この細胞は DK 培地 (MS 培地に 2,4-D 1 ppm, kinetin 0.1 ppm を含む) で増殖が良好なためアルギン酸カルシウムのゲルビーズによる固定化細胞では、培養 3 代目 (3 週間で 1 代を 1 batch とする) 以降細胞の遊離が多く、場合によっては内圧によってビーズが崩壊する。

しかしポリウレタンフォームと共に DK 培地で細胞を回転培養して得られた固定化細胞は、孔径 3 mm のフォームでは 3 代目に細胞を高密度に固定化しており (Fig. 5 B-2), 一方孔径 5 mm のフォームでは細胞を十分に固定化しきれず (Fig. 5 B-1), 遊離の細胞が多くみられた (Fig. 5 A-1). 孔径はその他 2, 1 mm と検討したが 3 mm とほぼ同様の結果を得た。孔径とフォーム自体の大きさが固定化に影響を及ぼすと考えられ、直径約 2.7 cm の球状のフォームでは孔径 3 mm 以下の場合が良好な固定化を与えた。

つぎに 1 辺 1 cm の立方体で約 3 mm の孔径のフォーム (約 30 個) で調製した固定化細胞塊は、DK 培地で 230 日以上にわたる培養及び *caffeine* の生産が可能であった (Fig. 6). *Caffeine* の生産量は最高で 28.8 mg/flask (8 代目) であり、細胞の成長とは負の相関を示した。DK 培地から B2K 培地 (MS 培地に IBA 2 ppm, kinetin 0.1 ppm を含む) へ移植した固定化細胞は、細胞の褐変がみられ、3 代目には多量の *caffeine* を生産した。しかし 4 代目には *caffeine* の生産量は激減した。以上の結果から *caffeine* を長期的に連続生産する場合には DK 培地が好ましく、短期的には B2K 培地が適当であると思われる。^{2,3,35)}

細胞の固定化条件のうち、細胞塊の大きさ、フォームの孔径及び材質 (疎水性、親水性) などについて検討を続けているが、疎水性フォームについては、孔径が小さいものほど細胞を多く固定化する傾向があった。親水性フォームは更に多くの細胞を固定化したが、長期の培養では不安定であった。

Fig. 6. Caffeine Production and Growth in Immobilized Coffee Cells

Immobilized cells ○—○ (DK), △—△ (B2K); free cells ○---○ (DK), △---△ (B2K); caffeine ●—● (DK), ▲—▲ (B2K).
a) 1 batch = 3 weeks.

また theobromine (0.4 mg/ml) からの caffeine 生産については, *de novo* でも生産されるため, 固定化細胞は 4 週間目に 0.44 mg/ml の生産物濃度を示し, 加えた theobromine はほとんど消費された。

1-4. 甘草の細胞培養によるレトロカルコンの生合成調節 著者らはカンゾウの 1 種 *Glycyrrhiza echinata* (Leguminosae) 培養細胞においてフラボノイド系黄色色素 echinatin (1) の生合成が, ファイトアレキシンエリシター活性をもつ物質や物理的ストレスによって誘導されることを見出した。

Fig. 7. Biosynthesis of Flavonoids in Cultured *Glycyrrhiza echinata* Cells

フラボノイドの骨格はポリケチドの C_6 (A 環) 部分と phenylalanine 由来の C_6 (B 環)- C_8 部分より構成されるが, echinatin では A, B 環の生合成起源が逆転しており, レトロカルコンと命名された.^{37,38)} 各種ラベル前駆体や中間体の投与実験により Fig. 7 のような生合成経路が確立された.^{38,43,44)} Licodione (2) はフラボン生合成とも関連があり, 2 へのメチル化により 1 への合成経路が決定づけられる。

さてカンゾウ培養細胞から 1 をほとんど含まず, イソフラボン (3, 4) を主に生産する M-2 株が, 化学調節と細胞選抜法により得られた. M-2 株細胞をアルギン酸カルシウムゲル中に包括固定化したところ, 約 2 日という短期間に大量の 1 が生成され, その大半が培地へ放出された.^{45,46)} 1 の生成は細胞を新鮮培地に移植するだけでも観察されるが, 固定化の方が高レベルでまた長期間にわたり生産が持続した. ゲル化しないアルギン酸ナトリウムや, 細胞を含まないゲルビーズの添加によっても 1 の生成が刺激された. また 1 以外に, これらの処理によって生じる新化合物が見出され, その構造を 5'-prenyl-licodione と決定した.⁴⁷⁾ その後, レトロカルコン系の生合成を引き起こす物質として, 上記の外に, エリター活性が知られている酵母エキス (YE), 重金属, 植物細胞壁断片などが有効であることが分かった. このような現象は, レトロカルコンがカンゾウの phytoalexin (PA) であることを暗示しているが, マメ科一般のイソフラボノイド系 PA とは別の経路が発現したことは大変興味深い。

Licodione (2) のメチル化は S-adenosyl-L-methionine (SAM): licodione 2'-O-methyltransferase (LMT) と称されるメチル基転移酵素 (OMT) によって触媒される.⁴¹⁾ カンゾウカルの粗酵素液中には, 他にリグニン系の caffeic acid を基質とする SAM: caffeate 3-O-methyltransferase (CMT), 一般的なフラボン, フラボノールを基質とする SAM: flavone/flavonol O-methyltransferase (FMT) の活性も存在する. M-2 株液体培養細胞に YE を添加すると 8—24 時間のうちに, 1 の生成量の増大とともに LMT 活性が約 3 倍上昇した. LMT の活性の上昇, 1 の生産量の増大は, とともに翻訳阻害剤の同時添加で抑制された. 一方, YE 添加の有無にかかわらず高レベルの CMT, 低レベルの FMT の活性が常に検出され, YE によるレトロカルコン系の OMT の選択的誘導が明らかになった.⁴⁹⁾

カルコン合成酵素 (CHS) は 4-coumaroyl-CoA (5) に malonyl-CoA (6) を順次縮合して C_6 - C_3 - C_6 骨格の形成を触媒し, フラボノイド生合成の鍵酵素と考えられている. カンゾウ培養細胞の CHS 活性 (反応生成物は異性化して 5-ヒドロキシフラバノン naringenin が検出される) は, YE 処理により急速に (10—16 時間) 上昇した. しかしレトロカルコンは, マメ科に特徴的な 5-デオキシイソフラボノイド・ファイトアレキシンと同じように, 6'-デオキシカルコン isoliquiritigenin (7) から生合成されるので, 検出された CHS 活性は見かけ上これらの生成には関与しておらず, また 6'-デオキシカルコン合成酵素 (DOCS) は今まで他の植物からも検出された例がない. カンゾウのプロトプラストを ^{14}C -phenylalanine とともにインキュベートすると一時的に放射性の 5-デオキシフラバノン liquiritigenin (8) が生じ, DOCS 誘導が示唆された.⁵⁰⁾ 最近, YE 処理カンゾウ細胞の抽出液より, 高濃度の nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) (NAD(P)H) 存在下, 7 と 8 を合成する活性を見出した (Fig. 8).⁵¹⁾ 同じ抽出液は, 低濃度の NAD(P)H の存在では naringenin 生成を触媒するので, カンゾウのカルコン合成酵素は *in vivo* では本来 DOCS であり (CHS と還元や脱水反応を触媒するサブユニットの複合酵素か), *in vitro* では還元のコ-substrate の有無によって 6'-デオキシ体と 6'-ヒドロキシ体生成の両方を触媒すると考えられる。

Fig. 8. TLC Autoradiogram of the Assay Products in *G. echinata* Cell-free Extract with 4-Coumaroyl-CoA and $[2-^{14}C]$ Malonyl-CoA as Substrates in the Presence of (a) Various Concentration of NADPH and (b) Different Reducing Cosubstrates

(a) NADPH concentrations in the incubation mixtures; 0, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, and 2 mM for lanes 1—7, respectively. (b) Lane 1, 1 mM NADPH; lane 2, 1 mM NADH; lane 3, 1 mM NADPH+1 mM NADH; lane 4, NADPH generating system (5 mM glucose phosphate, 2 mM NADP⁺, and 5.2 units of glucose-6-phosphate dehydrogenase); lane 5, none. Abbreviations: N, naringenin; I, isoliquiritigenin; L, liquiritigenin; O, origin; F, solvent front.

2. 変換

植物細胞培養による物質の変換, いわゆる植物変換^{60, 61)} plant biotransformation, plant bioconversion は, 主にステロイド⁶²⁾とアルカロイド⁶²⁾について研究が行われており, 種々の変換反応が見出されている. 最近ではテルペノイドやフェノールクスについても進められ, また固定化植物細胞 immobilized plant cell を利用した bio-reactor¹⁻³⁾ による新しい変換実験も展開されるようになった. ここでは最近の進歩について著者らの変換研究 (Table V) を中心に紹介するが, 微生物変換 microbial transformation とは異なる植物変換の多様性と特殊性に注目し, その可能性を追求し続けている.

2-1. テルペノイドの変換 著者ら^{63, 63-65)}はツクスキユーカリ *Eucalyptus perriniana*, ユーカリノキ *E. globulus*, *E. calophylla*, *E. radiata*, *E. dives* の若い茎から, レモンユーカリ *E. citriodora*, *E. polybractea* の無菌芽生えから, それぞれ常法に従いカルスを誘導した. カルス培養の条件検討の結果, いずれのカルスもモノテルペンの生成は認められなかったが, 比較的成長のよい培養株が得られた. なかでもツクスキユーカリ BA 1 株 (MS 培地に benzyladenine 1 mg/l を加えた培地で継代したもの) は均質で成長も良く, 液体培養がし易いので, 以下の変換研究に用いた.

2-1-1. Citronellal—ツクスキユーカリ培養細胞に citronellal を投与し, 7 日間培養して変換物を検索した. その結果, 主変換物としてアルデヒド基が還元された citronellol の存在が確認された.⁶⁵⁾ Citronellal の投与濃度と citronellol への変換率の相関性を調べた結果, 基質濃度を高くすると変換率は急速に低下するが, 全変換量はほぼ一定であり, 抽出効率なども考慮すると基質濃度 200—400 ppm が最適であることが分かった. また変換反応の経時変化を追跡したが, 投与から短時間のうちに変換率は急速に上昇し, 反応はほぼ 1 時間で終了するものと考えられる.

2-1-2. Menthol—3 週間前培養したツクスキユーカリ培養細胞に最終濃度が 200 mg/l となるように (–)-menthol をエタノール溶液として投与した. 更に 1 週間培養後, 細胞を収穫し, メタノール冷浸によりエキスを得, 酢酸エチル, *n*-ブタノールで順次抽出した. *n*-ブタノールフラクションをシリカゲルカラムクロマトグラフィー, high performance liquid chromatography (HPLC) を用いて精製し, 混合物については更にアセチル化後 HPLC により精製した. 以上より 10 種の変換物が得られ, その構造及び推定変換経路を Fig. 9 に示した.⁶³⁻⁶⁵⁾

(–)-Menthol (9) からの収率が 26% である主変換物は, (–)-menthol に glucose 2 分子が配糖化した (–)-menthol β -D-gentiobioside (10) である. 副変換物としては変換物 10 の異性体である (–)-menthol β -D-cellobioside (11), (–)-menthol の 3 位水酸基の酸化, 還元により生成する (+)-neomenthol (12) に gentiobiose が配糖化した変換物 13, (–)-menthol の 8 位が水酸化された後に 3 位又は 8 位に glucose あるいは gentiobiose が配糖化した変換物 14, 15, 16, 17, 1 位が水酸化され 3 位に glucose が配糖化した変換物 18, 2 位に水酸基が導入され, 各々の水酸基に gentiobiose が配糖化した変換物 19, 20 がそれぞれ得られた. 特に変換物 14, 15, 16, 17 のアグリコン部である *p*-menthane-3,8-diol (21) は, レモンユーカリより分離された蚊忌避物質の 1 つであり, 現在上記変換物の活性について検討中である.

以上の変換物はいずれも文献未記載の化合物であり, その変換経路について変換物の構造と仮想中間体の投与実験により以下のように推定した. すなわち配糖化については, 変換物としては (–)-menthol monoglucoside (22) は検出できなかったが, β 1 $\rightarrow$ 6 結合の gentiobioside (10) と β 1 $\rightarrow$ 4 結合の cellobioside (11) が生成すること, しかも (–)-menthol monoglucoside (22) を投与すると両者が生成することから, glucose が 1 分子ずつ段階的に配糖化していくものと考えられる. また配糖化と水酸化の順序については, *p*-menthane-2,3-diol (23), *p*-menthane-3,8-diol (21) の投与により対応する 2 位, 3 位あるいは 3 位, 8 位配糖化の割合が (–)-menthol 投与の場合と比べほとんど変化がないことから, 配糖化後水酸化するのではなく, 水酸化された基質に対して配糖化が進行するものと考えられる.

一方, (+)-menthol を投与した場合には, 主変換物 (変換率 29%) として (+)-menthol gentiobioside, 副変換物 (変換率 2.2%) として未知の化合物 (X) が得られた. X は fast atom bombardment-mass spectrum (FAB-MS) により分子量が 642, carbon-13 nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR) スペクトルにより (+)-menthol に 6 炭糖 3 分子が結合していることが示唆された. つぎに X の acetate の proton nuclear magnetic resonance (¹H-NMR) スペクトルにより糖の 1 $\rightarrow$ 2 結合と 1 $\rightarrow$ 6 結合の存在が予測され, 更に ¹³C-¹H correlation spectro-

TABLE V. Biotransformation by Plant Cell Cultures

Substrate	Product		Cell
Terpenoids			
(-)-Menthol	(-)-Menthol β -D-gentiobioside	10 (10)	<i>Eucalyptus perriniana</i>
(+)-Menthol	(+)-Menthol β -D-gentiobioside	2 (2)	<i>E. perriniana</i>
(-)-Borneol	(-)-Borneol β -D-gentiobioside	3 (3)	<i>E. perriniana</i>
Steroids			
Digitoxin	Pupurea glycoside B	3	<i>D. purpurea</i>
Digitoxigenin	3-Epidigitoxigenin glucoside	5 (1)	<i>D. purpurea</i>
	Periplogenin glucoside	6	<i>Strophanthus amboensis</i>
	3-Epi-4 β -hydroxy-17 β H-digitoxigenin	7 (2)	<i>S. gratus</i>
	3-Epigitoxigenin	10	<i>S. intermedius</i>
Pregnenolone	Pregnenolone palmitate	2 (2)	<i>Nicotiana tabacum</i>
	5 α -Pregnanolone palmitate	2 (2)	<i>Sophora angustifolia</i>
Steroids			
Progesterone	5 α -Pregnanolone palmitate	1 (1)	<i>Nicotiana tabacum</i>
	5 α -Pregnanolone	2 (1)	<i>Sophora angustifolia</i>
	5 α -Pregnanolone glucoside	11 (5)	<i>Digitalis purpurea</i>
5 β -Pregnane-3,20-dione	3 α -Hydroxy-5 β -pregnan-20-one glucoside	7 (4)	<i>D. purpurea</i>
5 β -Pregnanolone	5 β -Pregnanolone glucoside	7 (5)	<i>D. purpurea</i>
Testosterone	5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol dipalmitate	9 (6)	<i>N. tabacum</i>
4 ⁴ -Androstene-3,20-dione	Epiandrosterone glucoside	8 (5)	<i>N. tabacum</i>
Epiandrosterone	Epiandrosterone palmitate	2 (2)	<i>N. tabacum</i>
Alkaloids			
(RS)-Reticuline	(-)-(S)-Cheilanthifoline	4	<i>Papaver somniferum</i>
(-)-Codeinone	(-)-Codeine	1	<i>P. somniferum</i>
14-Hydroxycodeinone	14-Hydroxycodeine	1	<i>P. somniferum</i>
Amines			
	γ -Glutamate	8	<i>Camellia sinensis</i>
Ethylamine	Theanine	1	<i>C. sinensis</i>
Phenolics			
(RS)-2-Phenylpropionic acid	β -D-Glucopyranosyl 2-phenylpropionate (glucosyl ester)	4 (4)	<i>Dioscoreophyllum cumminsii</i>
			<i>Nicotiana tabacum</i>
		2 (2)	<i>Carthamus tinctorius</i>
			<i>Daucus carota</i>
		5 (5)	<i>Panax ginseng</i>
	Ethyl 6-O-2-phenylpropionyl- β -D-glucopyranoside	2 (2)	<i>Aconitum japonicum</i>
	6-O-2-Phenylpropionyl-D-glucose	2 (2)	<i>Glycyrrhiza echinata</i>
	β -D-Fructofuranosyl 6-O-2-phenylpropionyl- α -D-glucopyranoside (sucrose ester)	5 (5)	<i>Coffea arabica</i>
Phenylacetic acid			
	Phenylacetic acid sucrose ester	1 (1)	<i>C. arabica</i>
	6-O-Phenylacetyl-D-glucose	1 (1)	<i>A. japonicum</i>
	Ethyl 6-O-phenylacetyl- β -D-glucopyranoside	1 (1)	<i>G. echinata</i>
Tropic acid			
	Tropic acid glucosyl ester	3	<i>N. tabacum</i>
		5	<i>P. ginseng</i>
	Tropic acid sucrose ester	5 (5)	<i>C. arabica</i>

Numerals indicate the number of compounds; in parenthesis, the number of new compounds.

Fig. 9. Biotransformation of (-)-Menthol by *Eucalyptus perriniana* Cultured Cells

a, hydroxylation; b, glucosylation; c, oxidation; d, reduction.

scopy (^{13}C - ^1H -COSY) (long range) により, X の構造を (+)-menthol 2',6'-di-O-(β -D-glucopyranosyl)- β -D-glucopyranoside と決定した. 植物変換における 3 糖配糖化の例はこれが最初である.

2-1-3. (–)-Borneol——二環性モノテルペンの 1 つ (–)-borneol (24) をツキヌキユーカリ液体培養細胞に 200 mg/l 投与し, 前記と同様に処理し変換物を検索した.⁸⁶⁾ 主変換物 (変換率 11%) は (–)-borneol 2-O-gentiobioside (25), 副変換物 5-hydroxyborneol 2-O- β -D-glucoside (26) (変換率 6%) 及び 6-hydroxyborneol 2-O- β -D-glucoside (27) (変換率 4%) が得られた (Fig. 10). (–)-Menthol の投与実験と比較して, 水酸化された変換物の割合が高いのが特徴である.

Fig. 10. Biotransformation of (–)-Borneol by *E. perriniana* Cultured Cells

a, hydroxylation; b, glucosylation.

2-2. ステロイドの変換 ジギタリスカルスや

ストロファンツスカルスに強心配糖体の生成が認められなかったため, その代謝能力を検討するために, 関連化合物 (testosterone⁸⁷⁾ など) や生合成中間体とされる種々の化合物の変換実験を行った.

2-2-1. プレグナン誘導体——著者らはジギタリス *Digitalis purpurea* (Scrophulariaceae), タバコ *Nicotiana tabacum* “Bright Yellow” (Solanaceae), クララ *Sophora angustifolia* (Leguminosae) の 3 種のカルスによる pregnenolone,⁸⁸⁾ progesterone^{88,89)} などの基質が, 3 位, 20 位, 4^4 位の還元, 3 位の酸化, palmitic acid のエステル化及び配糖化などの変換反応を受けることを明らかにした.

この実験で progesterone の 5 α -pregnane 系の化合物への変換は起こるが, 強心配糖体生合成経路上の 5 β 系への変換反応は観察されなかったため, 5 β -pregnane-3,20-dione⁷⁰⁾ の変換実験を行い, 3-ケトンの還元経路はカルスでも保持されていることが明らかにされたが, 3 α ,3 β の OH (ないし glucoside) 体がほぼ 1:1 で生成されることは digitoxigenin の場合と対照的で興味深い.

2-2-2. Digitoxin——ジギタリス細胞変換の基質として著者らが最初に用いたのが digitoxin (28)⁷¹⁾ であり, glucosylation と 16 β -hydroxylation などの反応が見出された. その後西独の Reinhard ら^{72,73)} により行われたケジギタリス *D. lanata* 培養細胞による変換実験と合わせて Fig. 11 に示す.

2-2-3. Digitoxigenin——ジギタリス培養細胞において 3 β -OH 基のケトンへの酸化とそれに続く 3 α -OH への還元, 3-OH の glucosylation, 5 位への hydroxylation などが明らかになった.⁷⁴⁾ Glucosylation の選択性については, 3 β -OH 体を投与しているにもかかわらず, 3 α -O-glucoside が主変換物で, 同一のジギタリス培養細胞より部分精製した sterol: UDPG glucosyltransferase⁷⁵⁾ が 3-equatorial-OH より axial-OH に対して高い基質特異性を示すことと符合する. なお Reinhard⁷³⁾ らはケジギタリスによる digitoxigenin から digoxigenin などへの変換を報告している.

最近, 著者らは *Strophanthus* 属植物 (Apocynaceae) カルスの digitoxigenin (29) に対する変換能力について検討した. 用いたカルスは *S. amboensis* (Sa), *S. intermedius* (Si) 及び *S. gratus* (Sg) の葉, 茎, 花芽から誘導されたもので, これらに強心配糖体前駆物質 digitoxigenin (29) を投与し, 12–18 日間往復振とう培養した後, 常法により変換物を単離した.

Sa カルス⁷⁶⁾ による変換実験 (使用したカルス 1.0 kg, 29, 600 mg) では, 変換物として periplogenin (30) 33.0 mg, periplogenin β -D-glucoside (31) 26.5 mg を単離した. その他 3-epidigitoxigenin (32), digitoxigenin β -D-glucoside (33), 3-epidigitoxigenin β -D-glucoside (34), 及び 3-epiperiplogenin (35) を検出した.

Si カルス⁷⁶⁾ (1.4 kg, 810 mg) では, 32, 68.0 mg, 3-epi-17 β H-digitoxigenin (36) 6.0 mg, 35, 6.5 mg, また 33 及び 3-epidigitoxigenin (37) を acetate として単離した. その他 gitoxigenin (38), 30 と 42 の存在を確認し, 3 日間の変換実験では digitoxigenone (39) のみが検出された. 同様に Sg カルス⁷⁷⁾ (1.5 kg, 960 mg) においては 17 β H-digitoxigenin (40) 45.0 mg, 36, 64.5 mg, 17 β H-periplogenin (41) 28.0 mg, 3-epi-17 β H-periplogenin (42)

Fig. 11. Biotransformation of Digitoxin by *Digitalis* Suspension Cultures(A) *Digitalis purpurea*, (B) *Digitalis lanata*. D, digitoxose; G, glucose; Ac, acetyl. Fig. 12. Biotransformation of Digitoxigenin by *Strophanthus* Cultured CellsA, *Strophanthus amboensis*; B, *S. gratus*; C, *S. intermedius*.

23.5 mg, 17 β H-acovenosigenin-A (43) 3.7 mg と 36 の 4 β -hydroxy 体 3-epi-17 β H-4 β -hydroxydigitoxigenin (44) 3.0 mg を単離した. その他 30 の存在も明らかにした (Fig. 12).

以上のように 3 種類の *Strophanthus* 属カルスを用いて 29 の変換実験により新物質として 42, 44 が得られ, 今までジギタリスや食用人参カルスで報告されていない新たな変換物として 31, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 43 が得られた. 3 種のカルスには, 5 β -hydroxylation と 3 β -OH の epimerization を行う共通した変換能力のあることが明らかになった. 一方, Sa カルスでは glucosylation, Si カルスでは 16 β -hydroxylation, Sg カルスでは 1 β -, 4 β -hydroxylation と 17 β -ラクトン環の epimerization など, 起源の異なるカルスに特徴的な変換能のあることもわかった. 更に 1 β -, 5 β -hydroxylation は起源植物のもつ能力が培養細胞系のレベルでも発現されていることが示唆され大変興味深い.

また薬用人参毛状根による 29 の変換⁷⁸⁾についても検討した. 500 ml 液体培地に 60 mg の 29 を Tween 80 で懸濁して投与し, 40—50 g の毛状根を移植した後, 25°C, 14 日間, 150 rpm で回転振とう培養を行い, 変換物を検索した. 主変換物として 33 (変換率 11.6%) が単離され, 副変換物として 32, 30 及び 31 が確認された. このように薬用人参毛状根の 29 に対する配糖化能力は, *Digitalis* や *Strophanthus* カルスと比較して高いこと, また配糖化された変換物のほとんどが毛状根中に蓄積されており, 培地中の変換物は 30 と 32 だけ微量検出されたにすぎないことが明らかになった. 今後, 毛状根のような植物器官をバイオリアクターとして考え, 物質変換する実験が数多く進められることと思われる.

2-3. アルカロイドの変換 2-3-1. Reticuline と Codeinone——あへんアルカロイドの重要な生合成中間体 (*RS*)-reticuline (45) は, モルフィナン型アルカロイドを含まないケシ *Papaver somniferum* カルスにより, (–)-(S)-scoulerine (46) (変換率 14.7%) と (–)-(S)-cheilanthifoline (47) (0.5%) に変換され, 同時に光学純度約 100% の (–)-(R)-reticuline (48) (9.6%) が回収された (Fig. 13).⁷⁹⁾ これはケシカルスが (–)-(R)-reticuline からモルフィナン型アルカロイドへの生合成経路が抑制されていることを示しており, 酵素レベルの研究⁸⁰⁾によっても裏付けられた.

つぎにモルフィナン型アルカロイドの thebaine, codeinone (49), codeine (50), morphine (51) を投与して変換実験を行った. その結果, thebaine, codeine (50), morphine (51) は全く変換されず回収されたが, (–)-codeinone (49) より (–)-codeine (50) へ 60.8% の高率で変換⁷⁹⁾され, 51 生合成のすべての経路が欠失しているのではないことが明らかにされた (Fig. 13). またこの 49 の 50 への立体選択的還元は NADPH の存在下に cell-free 系でも観察された. 一方, アルギン酸カルシウムゲルにより固定化したケシ培養細胞を用いて変換反応を行うと遊離細胞より高い変換率 (70.4%) で進行し, しかも生成した 50 の 90% を培地中に放出することを認めた.⁸¹⁾ 更にバイオリアクターにも応用し, NADPH の添加なしで 1 ケ月間も変換活性を保持し続けることも

Fig. 13. Biotransformation of (*RS*)-Reticuline and Codeinone by Cell Cultures of *Papaver somniferum*

Fig. 14. Biotransformation of Tabersonine in Suspension Culture of *Catharanthus roseus*

明らかにした。最近、この固定化ケシ細胞による変換反応の速度論的解析が進んでいる。⁸²⁾

2-3-2. Tabersonine——ニチニチソウ *Catharanthus roseus* は、抗腫瘍活性をもつ vincristine や vinblastine などのアルカロイドを含んでいる。そこでその生合成中間体と考えられる tabersonine (52) をニチニチソウ培養細胞に与えて変換生成体を検索した。⁸³⁾ ニチニチソウ培養細胞は、NAA 1 ppm, kinetin 0.1 ppm, カザミノ酸 0.1% を含む RT 培地を用いて、25°C, 12 時間明所で 3 週間毎に継代培養を行っている株を用いた。この培養細胞を液体培地に移し、2 週間培養後 tabersonine (52) 100 ppm を投与し、投与後 1—9 日目に収穫した。収穫後、培地と細胞に分け、常法により抽出し、主に細胞より変換物 2 種 53, 54 を単離した (Fig. 14)。

MS, ¹H-, ¹³C-NMR の測定により、変換物 53 は tabersonine の 14, 15 位がエポキシ化された化合物 lochnericine, 54 は 53 の 11 位が更にメトキシ化された化合物 lochnerinine (11-methoxylochnericine) と決定された。これら変換物は、添加後の培養日数を 1, 3, 5, 9 日間と変えることによりその生成比に変動が認められた。すなわち 53 は添加後 3 日目でピークに達し、54 は 53 の減少と共に増加する傾向がみられた。

2-3-3. Ethylamine 及びアミン——著者ら⁸⁴⁾はチャ *Camellia sinensis* cv. Yabukita 培養細胞の成分検索を行い、 α -spinasterol glucoside, 22-dihydro- α -spinasterol glucoside, サボゲニンの A₁-barrigenol を単離、同定した。しかし caffeine はコーヒー培養細胞の 100 分の 1 以下と生成量は少なく、caffeine 生産のための培養系としては適さないことが分かった。一方、高級茶の旨味物質として知られる theanine は通常の MS 培地を用いて培養した場合ほとんど生成せず、glutamine が多量に生成した。これに対して MS 培地中の硝酸アンモニウムを等モルの硝酸カリウムに置き換えた場合に総アミノ酸量が著しく減少した。これにアンモニウムイオンあるいは ethylamine·hydrochloride を添加した培地で培養すると glutamine あるいは theanine が生成した。Glutamic acid の添加は theanine の生成にそれほど影響を与えなかった。このようにして ethylamine 40 mM, あるいは ethylamine 20 mM と glutamic acid 10 mM により、最大 dry weight 当り 12%, 総アミノ酸量の 80% の theanine が生成した。

このようにチャ培養細胞は培地中のアンモニアあるいは ethylamine を γ -グルタミル化する能力をもつことが明らかになったので、各種アミンを投与し、 γ -グルタミル化反応の基質範囲の検討を行った。Ethylamine と分子量の近い methylamine, *n*-butylamine, ethanolamine などが高収率で対応する γ -グルタミル誘導体へ変換された。芳香族アミンである aniline, benzylamine, phenylethylamine など同様に γ -グルタミル化されたが収率は低く、diethylamine のような 2 級アミンは変換されなかった。

2-4. フェノールクスの変換 植物培養細胞を用いた変換研究の一環としてフェニルカルボン酸 (benzoic acid, phenylacetic acid, phenylpropionic acid, tropic acid など) に対する変換能を明らかにする目的で実験を行ってきた。

2-4-1. 2-Phenylpropionic Acid——2-Phenylpropionic acid (55) 及びこの ethyl ester (56) は、トリカブト⁸⁵⁾ *Aconitum japonicum*, タバコ⁸⁶⁾ *Nicotiana tabacum*, serendipity⁸⁵⁾ *Dioscoreophyllum cumminsii* の培養細胞により glucose 及び gentiobiose のエステルに変換され、コーヒーノキ⁸⁶⁾ *Coffea arabica* の培養細胞により 55, 56 及び phenylacetic acid は主に sucrose のエステルに変換されることを既に報告した。引き続き薬用人参のカルス培養と器官 (根) 培養 (Fig. 15) による配糖化能について比較検討した。

IBA 2 ppm, kinetin 0.1 ppm を含む MS 培地 (B2K) で継代した薬用人参カルス、カルスより植物ホルモン調節により分化誘導し、IBA 5 ppm, 4-PU 0.1 ppm を含む MS 培地で継代した分化根、*Agrobacterium rhizogenes* を感染させ、ホルモンフリー培地で誘導分離後、B2K 液体培地で継代した毛状根 (1-1-3 参照)⁸⁷⁾ を用いた。こ

Fig. 15. Possible Scheme for the Biotransformation of 2-Phenylpropionic Acid and Its Ethyl Ester by Root Culture of *Panax ginseng*

れらを液体培地に移植し、2—3 週間培養後、**55** を投与し、1—14 日間変換した。変換後、培地及び細胞 MeOH エキスの水懸濁液を HP-20 カラムに通し、水洗後、MeOH で溶出し、MeOH 溶出液中の変換物量を HPLC により定量した。

カルス、分化根は **55** を glucose のエステル (**57**) に変換し、分化根はその約半量を培地中に放出した。変換率はカルスでは 30—35% と低かったが、分化根では 80% 以上の高い値を示した。しかし分化根は培養中にカルスを形成することがあり、この時には変換率は半減する。そこで培養中にカルスの形成のない毛状根による配糖化を検討し、分化根と同様高い変換率を示した。また変換物を培地中へ放出することも認められたので、バイオリアクターへの応用を試みている。

また分化根による **55** 変換物の経時変化を調べると、**55** 投与後間もなく形成されるジアステレオマーの glucosyl ester (**57**) が、3 日後に *S* 配置 **55** の primeverosyl ester (**58**) が、5 日以降に *R* 配置 **55** の inositol ester (**59**) が確認され、**55** の立体と結合する糖の関連に興味をもたれる。

2-4-2. Tropic Acid—Tropic acid (**60**) はトロパンアルカロイドの構成フェニルカルボン酸の 1 つで、前述の **55** の水酸化誘導体にあたる。用いた培養細胞及び器官は薬用人参、コーヒー、タバコなどで、ここでは前 2

Fig. 16. Possible Scheme for the Biotransformation of (RS)-Tropic Acid by Plant Cell Cultures

者について説明する. 方法, 変換物の分離, 精製などは **55** のときとほとんど同じであり, 主な変換様式は Fig. 16 に示した.⁸⁸⁾

(*RS*)-Tropic acid (**60**) は薬用人参・分化根及びタバコカルスにより glucosyl ester のジアステレオマー **61**, **62** に変換されるが, 薬用人参・分化根ではこれとほぼ同量の変換物 tropic acid glucoside (**63**, **64**) が得られた.

またコーヒーカルスでは, その特異的代謝産物である sucrose ester のジアステレオマー **65**, **66** が主変換物として得られた. 副変換物として glucose ester のジアステレオマー **67**, **68** と tropic acid isotrehalose ester (**69**) が単離されたが, isotrehalose は植物界には見出されていない糖であるので, その生成理由や機構については今後の検討に委ねたい.

2-5. 変換のまとめ 以上, 当研究室で行った変換の結果を反応別にまとめると Fig. 17 のようになる.

Fig. 17. Biotransformation by Plant Cell Cultures

謝辞 おわりに本研究は生薬学教室員と多くの内外研究員の熱心な協力により行われたもので, ここに感謝の意を表する.

引用文献

- 1) 古谷 力, 薬誌, **106**, 856 (1986).
- 2) 古谷 力, 吉川孝文, 発酵と工業, **45**, 1209 (1987).
- 3) 古谷 力, 古家健二, 遺伝, 別冊 No. 1, 103 (1988).
- 4) T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 2371 (1970).
- 5) T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, T. Ishii, K. Uotani, M. Nishio, *Chem. Pharm. Bull.*, **21**, 98 (1973).
- 6) M. Nishio, S. Zushi, T. Ishii, T. Furuya, K. Syono, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 2038 (1976).
- 7) T. Furuya, "Plant Tissue Culture 1982," ed. by A. Fujiwara, Maruzen, Tokyo, 1982, p. 269.
- 8) T. Furuya, T. Yoshikawa, T. Ishii, K. Kajii, *Planta Med.*, **47**, 183 (1983).

- 9) T. Furuya, T. Yoshikawa, T. Ishii, K. Kajii, *Planta Med.*, **47**, 200 (1983).
- 10) T. Furuya, T. Yoshikawa, Y. Orihara, H. Oda, *Planta Med.*, **48**, 83 (1983).
- 11) T. Furuya, T. Yoshikawa, Y. Orihara, H. Oda, *J. Nat. Prod.*, **47**, 70 (1984).
- 12) T. Furuya, T. Yoshikawa, K. Ushiyama, H. Oda, *Experientia*, **42**, 193 (1986).
- 13) K. Ushiyama, H. Oda, Y. Miyamoto, T. Furuya, Abstracts of Papers, VI, Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, Minnesota, August 1986, p. 252.
- 14) T. Yoshikawa, T. Furuya, *Plant Cell Reports*, **6**, 449 (1987).
- 15) T. Furuya, "Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants," Vol. 5, ed. by F. Constabel, I. K. Vasil, Academic Press, San Diego, 1988, p. 213.
- 16) T. Furuya, A. Ikuta, K. Syono, *Phytochemistry*, **11**, 3041 (1972).
- 17) A. Ikuta, K. Syono, T. Furuya, *Phytochemistry*, **13**, 2175 (1974).
- 18) T. Yoshikawa, T. Furuya, "Plant Tissue Culture 1982," ed. by A. Fujiwara, Maruzen, Tokyo, 1982, p. 379.
- 19) T. Yoshikawa, T. Furuya, *Experientia*, **39**, 1031 (1983).
- 20) T. Yoshikawa, T. Furuya, *Planta Med.*, **1985**, 110.
- 21) T. Furuya, K. Syono, A. Ikuta, *Phytochemistry*, **11**, 175 (1972).
- 22) K. Syono, T. Furuya, *Experientia*, **28**, 236 (1972).
- 23) A. Ikuta, K. Syono, T. Furuya, *Phytochemistry*, **14**, 1209 (1975).
- 24) T. Furuya, T. Yoshikawa, H. Kiyohara, *Phytochemistry*, **22**, 1671 (1983).
- 25) T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 1189 (1966).
- 26) T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 901 (1967).
- 27) K. Syono, T. Furuya, *Plant Cell Physiol.*, **9**, 103 (1968).
- 28) K. Syono, T. Furuya, *Plant Cell Physiol.*, **12**, 61 (1971).
- 29) T. Furuya, H. Kojima, K. Syono, *Phytochemistry*, **10**, 1529 (1971).
- 30) K. Syono, T. Furuya, *Plant Cell Physiol.*, **13**, 843 (1972).
- 31) K. Syono, T. Furuya, *Bot. Mag. Tokyo*, **85**, 273 (1972).
- 32) S. Yasuda, K. Satoh, T. Ishii, T. Furuya, *Ferment. Technol. Today*, ed. by G. Terui, Soc. Ferment. Technol., Kyoto, 1972, p. 697.
- 33) K. Syono, T. Furuya, *Plant Growth Substances 1973*, ed. by VIII ICPGS, Soc. PGR, Hirokawa, Tokyo, p. 1128.
- 34) K. Syono, T. Furuya, *Plant Cell Physiol.*, **15**, 7 (1974).
- 35) 古谷 力, 古家健二, 酵素工学ニュース, No. 17, 9 (1987).
- 36) T. Furuya, A. Ikuta, *Chem. Pharm. Bull.*, **16**, 771 (1968).
- 37) T. Furuya, K. Matsumoto, M. Hikichi, *Tetrahedron Lett.*, **1971**, 2567.
- 38) T. Saitoh, S. Shibata, U. Sankawa, T. Furuya, S. Ayabe, *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 4463.
- 39) T. Furuya, S. Ayabe, M. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.*, **1976**, 2539.
- 40) S. Ayabe, M. Kobayashi, M. Hikichi, K. Matsumoto, T. Furuya, *Phytochemistry*, **19**, 2179 (1980).
- 41) S. Ayabe, T. Yoshikawa, M. Kobayashi, T. Furuya, *Phytochemistry*, **19**, 2331 (1980).
- 42) S. Ayabe, T. Furuya, *Tetrahedron Lett.*, **21**, 2965 (1980).
- 43) S. Ayabe, T. Furuya, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 2097 (1981).
- 44) S. Ayabe, T. Furuya, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1982**, 2725.
- 45) S. Ayabe, T. Yoshikawa, T. Furuya, "Plant Tissue Culture 1982," ed. by A. Fujiwara, Maruzen, Tokyo, p. 379.
- 46) S. Ayabe, K. Iida, T. Furuya, *Plant Cell Reports*, **5**, 186 (1986).
- 47) S. Ayabe, K. Iida, T. Furuya, *Phytochemistry*, **25**, 2803 (1986).
- 48) S. Ayabe, K. Iida, T. Furuya, Abstracts of Papers, VI Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, Minnesota, August 1986, p. 201.
- 49) S. Ayabe, A. Udagawa, K. Iida, T. Yoshikawa, T. Furuya, *Plant Cell Reports*, **6**, 16 (1987).
- 50) S. Ayabe, A. Udagawa, T. Furuya, *Plant Cell Reports*, **7**, 35 (1988).

- 51) S. Ayabe, A. Udagawa, T. Furuya, *Arch. Biochem. Biophys.*, **261**, 458 (1988).
- 52) T. Furuya, S. Ayabe, K. Noda, *Phytochemistry*, **14**, 1457 (1975).
- 53) T. Furuya, H. Kojima, *Phytochemistry*, **10**, 1607 (1971).
- 54) T. Furuya, H. Kojima, M. Katsuta, *Phytochemistry*, **11**, 1073 (1972).
- 55) T. Yoshikawa, H. Kaneko, T. Kimura, T. Furuya, Abstracts of Papers, VI Intl. Cong. Plant. Tissue and Cell Culture, Minneapolis, Minnesota, August 1986, p. 67.
- 56) T. Furuya, T. Yoshikawa, T. Kimura, H. Kaneko, *Phytochemistry*, **26**, 2741 (1987).
- 57) M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **16**, 610 (1977).
- 58) T. Furuya, Y. Orihara, C. Hayashi, *Phytochemistry*, **26**, 715 (1987).
- 59) 古谷 力, 折原 裕, 高木さつき, 吉田淑子, 植物組織培養, **5**, 印刷中.
- 60) T. Furuya, K. Syono, H. Kojima, M. Hirotani, A. Ikuta, M. Hikichi, *Ferment. Technol. Today*, ed. by G. Terui, Soc. Ferment. Technol. Kyoto, 1972, p. 705.
- 61) T. Furuya, "Frontiers of Plant Tissue Culture," ed. by T. A. Thorpe, The International Association for Plant Tissue Culture, Calgary, 1978, p. 191.
- 62) 広谷正男, 古谷 力, 生薬学, **34**, 1 (1980).
- 63) T. Furuya, Y. Orihara, H. Miyatake, Abstracts of Papers, VI Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Minneapolis, Minnesota, August 1986, p. 140.
- 64) 古谷 力, 折原 裕, 組織培養, **13**, 284 (1987).
- 65) 古谷 力, "未来の生物資源ユーカリ," 西村弘行編, 内田老鶴圃, 東京, 1987, p. 229.
- 66) 折原 裕, 古谷 力, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 319.
- 67) M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **13**, 2135 (1974).
- 68) T. Furuya, M. Hirotani, K. Kawaguchi, *Phytochemistry*, **10**, 1013 (1971).
- 69) T. Furuya, K. Kawaguchi, M. Hirotani, *Phytochemistry*, **12**, 1621 (1973).
- 70) M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **14**, 2601 (1975).
- 71) T. Furuya, M. Hirotani, T. Shinohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1080 (1970).
- 72) E. Reinhard, "Tissue Culture and Plant Science," ed. by H. Street, Academic Press, London, 1974, p. 433.
- 73) A. W. Alfermann, H. M. Boy, P. C. Döller, W. Hagedorn, M. Heins, J. Wahl, E. Reinhard, "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application," ed. by W. Barz *et al.*, Springer-Verlag, Berlin, 1977, p. 125.
- 74) M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **19**, 531 (1980).
- 75) T. Yoshikawa, T. Furuya, *Phytochemistry*, **18**, 239 (1979).
- 76) K. Kawaguchi, M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **27**, in press.
- 77) T. Furuya, K. Kawaguchi, M. Hirotani, *Phytochemistry*, **27**, 2129 (1988).
- 78) 古谷 力, 川口基一郎, 広谷正男, 吉川孝夫, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 320.
- 79) T. Furuya, M. Nakano, T. Yoshikawa, *Phytochemistry*, **17**, 891 (1978).
- 80) 古谷 力, 生命工学レポート, **2**, 1 (1983).
- 81) T. Furuya, T. Yoshikawa, M. Taira, *Phytochemistry*, **23**, 999 (1984).
- 82) S. Furusaki, T. Nozawa, T. Isohara, T. Furuya, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **14**, in press.
- 83) 古谷 力, 阪本一央, 飯田久美子, 浅田善久, 吉川孝文, 坂井進一郎, 相見則郎, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 323.
- 84) 折原 裕, 古谷 力, 第 10 回植物組織培養シンポジウム大会講演要旨集, 仙台, 1987 年 7 月, p. 133.
- 85) T. Furuya, M. Ushiyama, Y. Asada, T. Yoshikawa, *Phytochemistry*, **26**, 2983 (1987).
- 86) T. Furuya, M. Ushiyama, Y. Asada, T. Yoshikawa, Y. Orihara, *Phytochemistry*, **27**, 803 (1988).
- 87) 古谷 力, 牛山正志, 浅田善久, 吉川孝文, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 318.
- 88) 古谷 力, 牛山正志, 熊谷茂浩, 浅田善久, 吉川孝文, 日本薬学会第 108 年会講演要旨集, 広島, 1988 年 4 月, p. 318.