

研究ノート

植物培養細胞によるフェノール化合物の配糖化

水上 元*

高等植物は極めて多種多様な配糖体を含有しており、それらのなかには、ジギタリスの強心配糖体に代表されるように、強い生理活性を持ち薬学的に利用価値の高いものが多い。このような配糖体の生合成は、植物細胞に特徴的な代謝能力の一つであると考えられる。

植物細胞が特異的に持つ代謝能力を利用して、特定の化合物をより有用な誘導体に変換しようとする生物学的物質転換 (Biotransformation) は、植物細胞培養の重要な応用分野の一つであるが、植物に特異的な反応であること、および生産物の付加価値の高さからみて配糖化反応を利用する有用配糖体の培養生産はその重要な対象である¹⁾。

一方、植物細胞の配糖化反応は、生体外異物をより極性が高く水に可溶性の代謝産物にかえる抱合反応 (グルコース抱合) であり、植物の持つ異物処理機能の一つであるとも考えられている²⁾。したがって、配糖化反応の調節機構を詳細に検討することは、植物が異物を認識し、それに応答する機構を解明していく上での有力なアプローチになると期待される。私たちは、このような見地にたって植物培養細胞によるフェノール性化合物の配糖化について検討を行ってきたので、その結果を報告したい。

配糖化反応の基質としては、1 個の分子内にフェノール性とアルコール性という化学的性質の異なる 2 つの水酸基を持つ salicyl alcohol (第 1 図, 1) を主として取りあげた。Salicyl alcohol の配糖化に関する研究は、古く 1916 年にまでさかのぼることができるが、その後、Pridham ら³⁾、Zenk⁴⁾、Pilgrim⁵⁾、Tabata ら⁶⁾ の各種植物の器官、培養細胞あるいは無細胞系を用いた研究によって、外から与えた salicyl alcohol は、そのフェノール性水酸基が配糖化された salicin (第 1 図, 2) ではなく、アルコール性水酸基が配糖化された isosalicin (第 1 図, 3) へと変換されることが、いずれの場合に

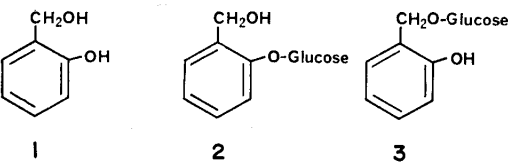
においても明らかにされ、salicyl alcohol は salicin の直接の前駆体ではないと考えられるにいたっていた。

私たちは、まず各種植物由来の液体培養細胞に salicyl alcohol を投与し、その変換産物を TLC および HPLC を用いて確認した (第 1 表)。検討した 8 種の培養細胞のうち 6 種のものでは、従来の報告と同様に変換産物の大部分が isosalicin であった。しかしながら、クチナシ (*Gardenia jasminoides*) とムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) の培養細胞では、salicyl alcohol 配糖化の主産物は salicin であった⁷⁾。このことは、従来いわれてきたように、salicyl alcohol は salicin の直接の前駆体となりえないわけでは必ずしもなく、glucose がフェノール性水酸基につくか、アルコール性水酸基につくかという配糖化反応の位置特異性は、植物の種によって異なっていることを示している。

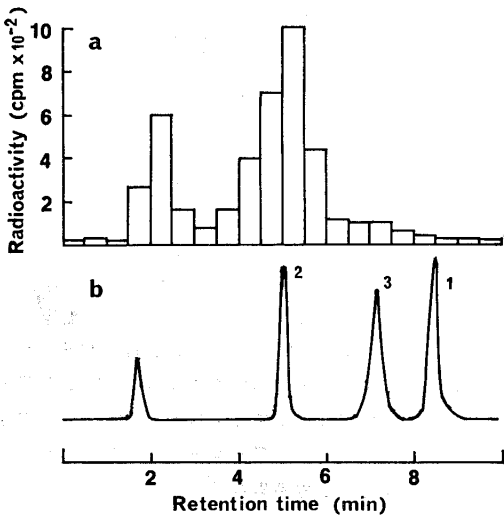
クチナシの培養細胞は、増殖が活発であり、かつポリフェノール含量も低いので酵素レベルの実験を行なう場合には材料として適していると考え、この培養細胞を用いて salicyl alcohol の配糖化についてさらに詳細な検討を行った⁸⁾。培養細胞の増殖曲線の各段階で salicyl alcohol を投与して配糖体への変換率を比較したところ、対数増殖期の細胞で最も高く、以後定常期に至るまで徐々に減少した。生成した配糖体のうちの salicin と isosalicin の割合をみてみると、対数増殖期の細胞では、isosalicin の割合は 20% と低いのにに対して、定常期では isosalicin が 40% を占めるようになる。すなわち、培養細胞による salicyl alcohol 配糖化の位置特異性は、植物の種によって異なるだけでなく、用いる培養細胞の増殖段階によっても異なっていることが明らかになった。また、salicin の生成は salicyl alcohol 投与直後から直線的に増加するのに対して、isosalicin の生成には一定の誘導期が存在していることもわかった。

これらの結果は、位置特異性の異なる 2 種類の salicyl alcohol glucosyltransferase (以下では SAGT と略する) が存在していて、その活性の相対的な強度が植物の種や培養細胞の増殖段階によって異なっていると考えれば、よく説明できるように思われた。そこで、これらの酵素

* Hajime MIZUKAMI: Glucosylation of Phenolic Compounds in Cultured Plant Cells
長崎大学薬学部 (〒852 長崎市文教町 1-14)
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University, Nagasaki-shi, 852



第1図 Salicyl alcohol およびその配糖体



第2図 HPLC による酵素反応生成物の同定

活性の存在を証明するためにクチナン培養細胞から調製した無細胞系を用いて salicyl alcohol の配糖化を検討した⁹⁾。この無細胞系は、UDP-glucose と salicyl alcohol を基質として高い配糖化活性を示した。ところが、その酵素反応産物を HPLC と担体希釈法を用いて分析してみたところ、予期に反して salicin の生成のみがみられ、isosalicin の生成はまったく認められなかった(第2図)。培養細胞では salicyl alcohol から salicin と isosalicin が生じるにもかかわらず、無細胞系では salicin のみが生じているわけである。反応 pH をはじめとして反応条件を変えたり、細胞内小器官をふくむ懸濁液を用いて反応を試みたりしたが、いずれの場合にも isosalicin の生成はみられなかった。Isosalicin の生成を触媒する酵素活性を発現させる条件を見つけれないでいる可能性を否定することはできないが、そういう酵素そのものが存在しないと考えることも可能である。すなわち、SAGT には salicyl alcohol のフェノール性水酸基に位置特異性を有する酵素一種類しかなく、isosalicin は salicyl alcohol からではなく、salicin から分子内の糖転移によって生じると考えるのである。Isosalicin の生成に一定の誘導期が存在するという実験事実はこの考

第1表 種々の培養植物細胞による salicyl alcohol の配糖化産物

植 物 名	起 源	配糖化産物(%)	
		Salicin	Isosalicin
<i>Nicotiana tabacum</i>	根	3	97
<i>Datura innoxia</i>	根	0	100
	薬	0	100
<i>Duboisia myoporoides</i>	葉	0	100
<i>Catharanthus roseus</i>	葉	3	97
<i>Bupleurum falcatum</i>	芽生	0	100
<i>Gardenia jasminoides</i>	葉	69	31
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	芽生	81	19

第2表 SAGT およびクチナン培養細胞による配糖化反応の基質特異性

基 質	相対活性 (%)	
	SAGT	培養細胞
Salicyl alcohol	100	100
<i>m</i> -Hydroxybenzyl alcohol	9.8	12 ^a
<i>p</i> -Hydroxybenzyl alcohol	0.7	2 ^a
Resorcinol	5.6	108
Hydroquinone	0	100

^a 培地に添加した基質量の50~70%が細胞内で未変化のまま検出されており、これらの基質は細胞内へは取り込まれている。

えかたを支持しているように思われる。今後、この作業仮説に沿った検討を進めていきたいと考えている。

ところで、植物細胞の glucosyltransferase の生理的機能としては、(1) その植物本来の第二次代謝産物(膜構成成分としての steryl glucosides も含めて)の生合成、(2) オーキシンやサイトカイニンの配糖化を通じての生長や分化の調節、(3) 生体外異物の処理という三つのことが一応考えられる。クチナン培養細胞の SAGT の生理的機能を明らかにするために、この酵素の部分精製を行ない、その基質特異性を調べてみた¹⁰⁾。塩析、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過によって比活性で110倍に精製された酵素標品を用いて、salicyl alcohol およびそれと構造的に類縁のフェノール化合物に対する配糖化活性を比較検討したところ、SAGT の基質特異性はかなり高く、調べた基質の範囲内では salicyl alcohol にのみ有意な配糖化活性を示した(第2表)。一方、培養細胞を用いて同じフェノール化合物に対する配糖化活性を調べてみると、resorcinol や hydroquinone は salicyl alcohol と同定度の効率で配糖化されることがわかった。これらのことは、クチナン培養細胞による salicyl alcohol と diphenol 類との配糖化

は、別々の酵素によって触媒されていることを示しており、細胞内には基質特異性を異にする多数のフェノール化合物配糖化酵素が存在していることを予想させるものである。

異物代謝に関与する抱合酵素としては哺乳動物のグルクロン酸抱合酵素が有名であるが、この酵素では基質特異性の異なる3種類の多形が現在までに知られており、その基質特異性はそれぞれの範囲内でかなり広いことがわかっている。SAGTの場合、その基質特異性が高いこと、それが誘導酵素ではなく構成的な酵素であることなどを考えあわせると、異物代謝にのみ関与するとは現在の段階では考えにくい。いずれにしても、SAGTを均一にまで精製して、その基質特異性を詳細に検討することが必須であると考えている。

ところで、クチナシの培養細胞は、異物として投与したすべてのフェノール性化合物を配糖化するわけではない。私達の予備的な検討の結果では、diphenol類は比較的速やかに細胞内に取込み、これを配糖化するが、例えば、*p*-acetoaminophenolのような物質はほとんど細胞内に取り込まない(水上元, 平野敦子:未発表)。すなわち、前者に対しては、細胞内に吸収し配糖化することによって処理するが、後者にたいしては、細胞内に

取り入れないことによって身を守っているとも考えられる。このような応答の違いは、細胞が異物の何を、どのようにして認識することによって生じるのだろうか。今後、これらの点について酵素レベルでの検討が必要であろう。(1985年10月30日受理)

文 献

- 1) 田端 守, 1982. 細胞工学, **1**: 249-255.
- 2) Barz, W., J. Koster, 1981. In "The Biochemistry of Plants, Vol. 7" (ed. by Conn, E.E.), p. 35-84. Academic Press, New York.
- 3) Pridham, J.B., M.J. Saltmarsh, 1963. Biochem. J., **87**: 218-224.
- 4) Zenk, M.H., 1967. Phytochemistry, **6**: 245-252.
- 5) Pilgrim, H., 1970. Pharmazie, **25**: 568.
- 6) Tabata, M., F. Ikeda, N. Hiraoka, M. Konoshima, 1976. Phytochemistry, **15**: 1225-1229.
- 7) Mizukami, H., T. Terao, H. Miura, H. Ohashi, 1983. Phytochemistry, **22**: 679-680.
- 8) Mizukami, H., T. Terao, A. Amano, H. Ohashi, Plant Cell Physiol., 印刷中.
- 9) Terao, T., H. Ohashi, H. Mizukami, 1984. Plant Sci. Lett., **33**: 47-52.
- 10) Mizukami, H., T. Terao, H. Ohashi, 1985. Planta Med., 104-107.