

ゼニゴケ培養細胞によるテストステロン類の 生化学的変換における選択性

浜田博喜・河邊誠一郎・渡辺史明・柳井 学・小西孝夫*・須見洋行**

岡山理科大学

(〒700 岡山市理大町 1-1)

*日本ペイント

(〒572 大阪府寝屋川市池田中町 19 番 17 号)

**宮崎医科大学

(〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町木原 5200)

(1987 年 12 月 28 日受付)

(1988 年 2 月 19 日受理)

近年、バイオテクノロジーの有力手段として、植物培養細胞を使用した物質変換（合成）法の開発が特に期待されている。今日まで、植物培養細胞の物質変換機能に関する研究は古谷¹⁾や Alfermann²⁾ らによって行われている。われわれは、生細胞が本来生産、蓄積しえない物質をこの生細胞に外部から投与した場合に、その細胞がそれらの外来物質の構造の相違によって、どのような変換機能を示すかについて化学的解明を図っている。これまでに、タバコ培養細胞は(i)リナロールやテルピネール類の二重結合のアリル位および二重結合自身をヒドロキシル化³⁻⁵⁾すること、(ii)カルボンやプレゴンのカルボニル基や炭素-炭素二重結合を立体選択的に還元すること^{6,7)}および(iii)ビシクロ【3.1.1】ヘプタン類や *カ*-メンタン類の鏡像体を選択的に酸化、還元する機能を有することが明らかになった^{8,9)}。

本研究において、外来物質の構造と変換機能との相関をさらに展開して一般化するために、ゼニゴケ培養細胞によるテストステロン類 (1 および 2) の生化学的変換機能を調べた。

実 験

薄層クロマトグラフィー (TLC) は、0.25 mm のシリカゲル (Merck 60 GF₂₅₄) を用い、展開溶媒として、(1)石油エーテル-酢酸エチル (3:2)、(2)ヘキサン-酢酸エチル (4:1) を用いて行った。比旋光度は、日本分光 DIP-360 旋光計を用いて測定した。HPLC (高速液体クロマトグラフ) は日本分光 TRI ROTAR-V を使用した。GC-MS および LC-MS は日本電子 JMS-DX

303 HF 型を用いて測定した (LC-MS に使用した HPLC は TRI ROTAR-V である)。また、¹H-NMR スペクトルはクロロホルム-d 中、TMS を内部標準として日本電子 PMX-60 (60 MHz) 核磁気共鳴装置を用いて測定した。

1. 基 質

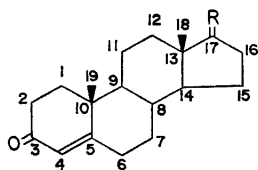
17 α -アセトキシ-エピテストステロン ($[\alpha]_D^{25} + 70.8^\circ$) (1) および 17 β -アセトキシ-テストステロン ($[\alpha]_D^{25} + 101.5^\circ$) (2) は 17 α -エピテストステロン ($[\alpha]_D^{25} + 60.2^\circ$) (3) およびテストステロン ($[\alpha]_D^{25} + 106.8^\circ$ (lit.¹⁰⁾ + 109.0°)) (4) を dry ピリジンの存在下で無水酢酸によりアセチル化して調製した。これら基質の純度は HPLC で 99% 以上であった。

2. 生物変換の方法および条件

実験に使用したゼニゴケカルスはゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の無性芽から誘導し、寒天培地上で 2 年以上継代培養したものを使用した。このカルスを、2、4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2 ppm) およびブドウ糖 (3%) を含む MSK-2 の液体培地¹¹⁾ (フラスコ 1 個あたりに 100 ml) に移植し、培養細胞が、均一の懸濁状態になるまで 25°C、2,000 lux 条件下で約 7 日間、120 rpm で振り混ぜながら培養した。この懸濁培養細胞を含むフラスコ 1 個あたりに基質を 10 mg の割合で投与し、上記と同様な条件下で、さらに 5-7 日間培養することによって変換を行った。

3. 変換生成物の単離および同定

培養後、細胞塊部と培養液部を分離し、細胞塊部はメ



1, 17 α -Acetoxy-epitestosterone ; R = $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{OAc} \end{array}$

2, 17 β -Acetoxy-testosterone ; R = $\begin{array}{c} \text{OAc} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}$

3, 17 α -Epitestosterone ; R = $\begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{OH} \end{array}$

4, Testosterone ; R = $\begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \text{H} \end{array}$

5, Androstenedione ; R = O

6, Unknown

構造式

タノールで抽出した。次いで、このメタノール抽出液から溶媒を留去して得られた抽出物を酢酸エチル抽出して酢酸エチル抽出物を得た。一方、培養液部は酢酸エチルで抽出した。主変換生成物は HPLC により分取単離した。主変換生成物の構造決定と同定は、それらのスペクトルデータの解析あるいは標品との比較によって行った。微量変換生成物の同定は標品との co-TLC, co-HPLC および GC-MS の比較によって行った。

4. 生物変換の経時変化

上記と同様の条件で生物変換を行い、一定時間ごとに無菌的に培養物を 10 ml ずつ採取し、これを酢酸エチル抽出した。次いで、この抽出物中の生成物の相対量を、液体クロマトグラム上にその成分が示す面積から求めた (Fig. 1, 2)。Fig. 1, 2 の縦軸は生成物の相対パーセントを横軸は培養時間を示している。

結果と考察

1. 17 α -アセトキシ-エピテストステロン (1) の変換

17 α -アセトキシ-エピテストステロン (1) は 10 日培養後、17 α -エピテストステロン (3) (変換率: 29.8%) およびアンドロステジオン (5) (変換率: 3.9%) に変換された (Fig. 1)。また、5 は培養後 3 日目まで生成が見られた (Fig. 1)。これらの結果より、1 の 17 位のアセトキシル基は加水分解されてアルコール体の 3 に変換されることがわかった。次に、生成されたアルコール体の 3 は酸化されてケトン体の 5 に変換されることがわかった。

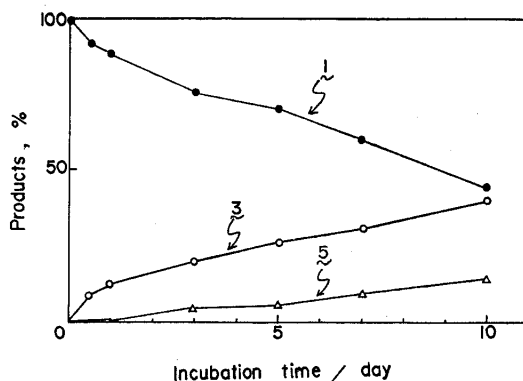


Fig. 1. The time-course in the biotransformation of 17 α -acetoxy-epitestosterone (1) with the cultured cells of *M. polymorpha*. 3: 17 α -epitestosterone, 5: androstenedione.

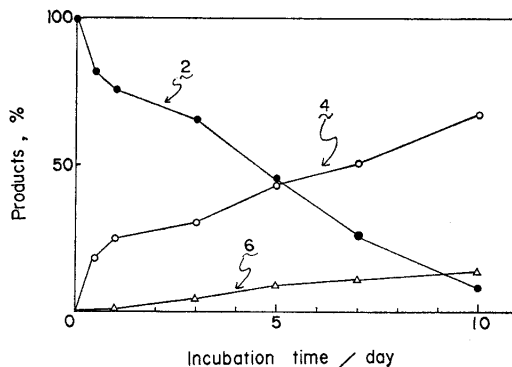


Fig. 2. The time-course in the biotransformation of 17 β -acetoxy-testosterone (2) with the cultured cells of *M. polymorpha*. 4: testosterone, 6: unknown.

2. 17 β -アセトキシ-テストステロン (2) の変換

17 β -アセトキシ-テストステロン (2) は 10 日培養後、テストステロン (4) (変換率: 64.7%) と未知化合物 [M⁺ 304] (6) (変換率: 12.3%) に変換された (Fig. 2)。6 は培養後 1 日目まで生成が見られた。しかし、4 の 17 位が酸化されたケトン体の 5 の生成は見られなかった。未知化合物 6 は GC-MS [M⁺ 304, M⁺-H₂O 286, M⁺-H₂O-CH₃ 271] と LC-MS [M⁺+1 305] の測定結果より、分子量が 304 であることがわかった。6 の絶対構造および生理活性については現在検討中である。これらの結果より、2 の 17 位のアセトキシル基は加水分解されてアルコール体の 4 に変換されることがわかった。次に、生成されたアルコール体の 4 は酸化されずに、未

知化合物の 6 に変換されることがわかった。

結 論

ゼニゴケ培養細胞は、テストステロン類に対して、下記のような生物変換機能を示すことが明らかになった。

1) 17 α -アセトキシ-エピテストステロンおよび 17 β -アセトキシ-テストステロンのアセトキシル基を加水分解する。2) 17 α -アセトキシ-エピテストステロンのアセトキシル基よりも 17 β -アセトキシ-テストステロンのアセトキシル基の方をより選択的に加水分解する。3) エピテストステロンの 17 位のヒドロキシル基を酸化するが、テストステロンの 17 位のヒドロキシル基を酸化しない。

以上の結果より、ゼニゴケ培養細胞はテストステロン類に対して選択的な生化学反応を生起することが明らかとなった。すでに報告しているタバコ培養細胞の物質変換機能³⁻⁹⁾と統合すると、これらの植物培養細胞の物質変換機能の発現は、外来物質の構造のちがいによって規制されていることが明らかとなった。

文 献

1) Hirotani, M., T. Furuya, 1980. Shoyakugaku

Zasshi, **34**: 1-7; Furuya, T., Orihara, Y., H. Miyatake, 1986. In "VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture," p. 140, Minneapolis, U. S. A.

2) Alfermann, A. W., E. Reinhard, 1980. Bull. Soc. Chim., **1980**: Fr. II-35-45.

3) Suga, T., Hirata, T., Hirano, Y., T. Ito, 1976. Chem. Lett., **1976**: 1245-1248.

4) Hirata, T., Aoki, T., Hirano, Y., Ito, T., T. Suga, 1981. Bull. Chem. Soc. Jpn., **54**: 3527-3529.

5) Suga, T., Lee, Y. S., T. Hirata, 1983. Bull. Chem. Soc. Jpn., **56**: 784-787.

6) Hirata, T., Hamada, H., Aoki, T., T. Suga, 1982. Phytochemistry, **21**: 2209-2212.

7) Suga, T., Hirata, T., Hamada, H., S. Murakami, 1988. Phytochemistry, **27**: 1041-1044.

8) Suga, T., Hirata, T., Hamada, H., M. Futatsugi, 1983. Plant Cell Rep., **2**: 186-188.

9) Suga, T., Hamada, H., Hirata, T., S. Izumi, 1987. Chem. Lett., **1987**: 903-906.

10) 日本生化学会, 1979. 生化学データブック I, p. 1372-1373, 東京化学同人, 東京.

11) Katoh, K., Ishikawa, M., Miyake, K., Ohta, Y., Hirose, Y., T. Iwamura, 1980. Physiol. Plant., **49**: 241-247.

Summary

The Selectivity in the Biotransformation of Testosterones with the Cultured Cells of *Marchantia polymorpha*

Hiroki HAMADA, Seiichiro KAWABE, Fumiaki WATANABE,
Manabu YANAI, Takao KONISHI* and Hiroyuki SUMI**

Department of Fundamental Natural Science, Faculty of Science, Okayama
University of Science, Ridai-cho, Okayama 700, Japan

* *Nippon Paint Co., Ltd. 19-17, Ikedanaka-machi, Neyagawa-shi, Osaka 572, Japan*

** *Department of Physiology, Miyazaki Medical College, Miyazaki 889-16, Japan*

The biotransformation of 17 α -acetoxy-epitesterone and 17 β -acetoxy-testosterone with the cultured cells of *Marchantia polymorpha* was investigated. It was found that (i) the cultured cells hydrolyzed the acetoxy groups of 17 α -acetoxy-epitesterone and 17 β -acetoxy-testosterone to their corresponding alcohols, (ii) the cultured cells hydrolyzed predominantly 17 β -acetoxy-testosterone, and (iii) the cultured cells oxidized the hydroxyl group at C-17 of epitesterone, whereas no the oxidation of the hydroxyl group of testosterone occurred.