

研究ノート

ポプラ懸濁培養細胞のペクチナーゼ添加による トリテルペンの生成

鈴木直貴・寺田珠実・佐分義正

植物は動物と違い生育場所を自由に移動することができないため、様々な環境の変化、すなわちストレスに対して対処する術を備えている。微生物の侵入に対しても高等植物は、様々な防御反応を誘導することが知られており、その防御機構の一つとしてファイトアレキシンの生成誘導がある¹⁾。ファイトアレキシンを誘導する物質はエリシターと総称される。微生物や植物に由来する生物学的エリシターの中で、植物細胞壁由来の物質がファイトアレキシンを誘導することも明かになり²⁾、内在性エリシターと呼ばれている。内在性エリシターは、微生物の出すペクチン分解酵素の作用で植物細胞壁より遊離するものと考えられており、重合度 10-20 程度の分子サイズのものに強い活性が認められている。植物の細胞壁に直接ペクチナーゼを与えることによってファイトアレキシンを誘導した例もあり³⁾、植物細胞壁の部分加水分解物はかなり広い範囲でエリシターとしての作用を発揮していると考えられている。

ここでは、ポプラ懸濁培養細胞にペクチナーゼを添加したときに生成するトリテルペンについて、以下に報告する。

材料として、1989年に葉柄から誘導したポプラカルス (×*Populus deltoides* cv. I-72/51) 由来の懸濁培養細胞を用いた。この細胞は、500 ml 容三角フラスコを培養器として、塩酸チアミン 1.0 mg/l、ミオイノシトール 100 mg/l、シュクロース 30 g/l、2,4-D 0.5 mg/l、カイネチン 0.4 mg/l を含む Linsmaier & Skoog⁴⁾ 改変培地 100 ml 中で回転振とう培養 (暗室, 26.5°C, 120 rpm) され、9日周期で継代されているものである。

一般に植物培養細胞は増殖期後期から定常期初期にか

けて二次代謝活性が高まるといわれている。例えば、ニンジンの場合ファイトアレキシンの生成活性は細胞の培養齢に依存し、最も高い活性は定常期初期にあらわれ、盛んに分裂している若い細胞はエリシターを与えられてもほとんどファイトアレキシンを作らない⁵⁾。今回実験に用いたポプラ懸濁培養細胞では定常期がみられないため、培養後半 (継代後 6 日目) にペクチナーゼを添加することにした。

継代後 6 日目に、3 units/ml (0.1 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液溶液, pH 5.2) に調製したペクチナーゼ (Sigma) をフィルター (孔径: 0.45 μm) を通して 100 ml の懸濁培養細胞に 1 ml 添加し、生重量 (吸引濾過後に秤量) の経日変化を測定した。その結果、生長は添加後 1 日目にやや阻害されたものの、その後回復する傾向がみられた (Fig. 1)。

ペクチナーゼ添加後 3 日目に 5 ml の懸濁培養液、または濾液のみをガラス製遠心チューブにとり、そのまま

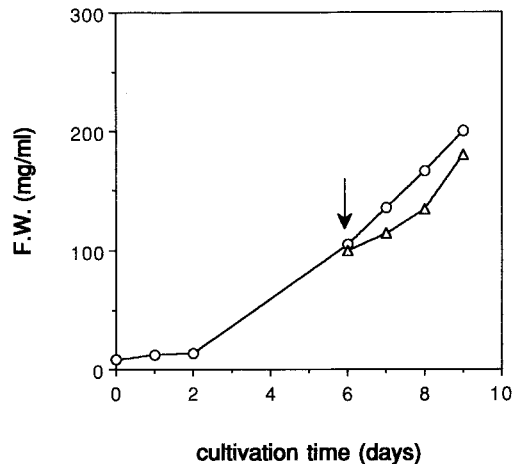


Fig. 1 Effect of pectinase addition on fresh weight of poplar suspension culture. Pectinase was added on the 6th day. The final concentration of pectinase in the culture was 0.03 units/ml. ○; control, △; pectinase added.

Naotaka SUZUKI, Tamami TERADA and Yoshimasa SABURI
Triterpene Production from Poplar Suspension Cell Culture by Pectinase Addition.

東京大学農学部

(〒113 文京区弥生 1-1-1)

Faculty of Agriculture, University of Tokyo,

1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

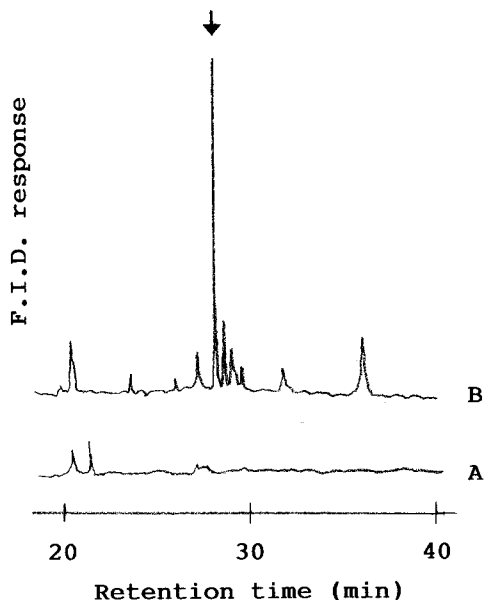


Fig. 2 Gas chromatogram of trimethylsilyl derivatives of ethyl acetate extracts of poplar suspension culture. Suspension cell culture was extracted 3 days after pectinase addition on the 6th day. Arrow indicates trichadonic acid. Column; Shimadzu CBP1, temperature; programmed from 100°C to 300°C at 10°C/min. and 300°C for 20 min. A; control, B; pectinase added.

酢酸エチル 2 ml を加え、30 秒間よく攪拌して抽出した。2000 rpm で 4 分間遠心した後、酢酸エチル層 500 μ l を分離した。減圧下で酢酸エチルを留去して、TMS 化剤 (Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide) 20 μ l とアセトン 20 μ l に溶解し、ガスクロマトグラフィー (GC) 分析に供した。その結果、GC チャート上で約 29 分付近にコントロールにはみられないピークが観察された (**Fig. 2**)。懸濁培養液の濾液のみの抽出物にも、失活したペクチナーゼを加えた場合にもこのピークは出現しないことから、この物質は細胞内で誘導され、保持されるものと考えられた。

次に、ペクチナーゼの添加により生成する物質の構造を分析するために、単離・精製を行った。懸濁培養液から濾別した細胞を、酢酸エチル中に 130 g (fw)/l の割合で 24 時間浸漬した後、この酢酸エチル抽出液を濃縮して逆相シリカゲル (コスモシル 140, Nacalai tesque) オープンカラム (移動相; アセトン/水=7/3-10/0) および分取 TLC (Silicagel 150 A, Whatman, 展開溶媒; ベンゼン/酢酸エチル=4/1) により精製した。最終的に細胞 500 g (fw) から 15 mg の物質が得られ、こ

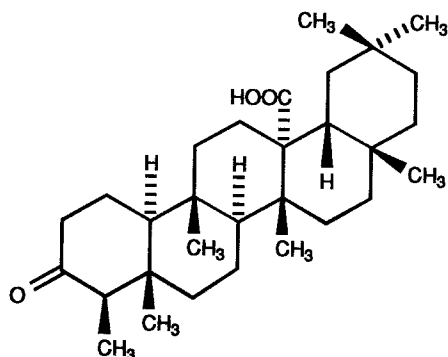


Fig. 3 Structure of trichadonic acid.

れを用いて構造解析を行った。

まず、Folin-Denis 呈色反応陰性、Liebermann-Burchard 呈色反応陽性であったことから、トリテルペノイドと推測された。さらにメチル化物および TMS 化物の GC-MS 分析 (機種: JEOL-DX 303), NMR 分析 (機種: Bruker AC-300) を行い、メチル化物のマススペクトル, ^1H NMR スペクトル, ^{13}C NMR スペクトルの一致からこの物質は trichadonic acid であると同定した⁶⁾ (**Fig. 3**)。これは friedelane 骨格で 3 位にカルボニル基, 27 位にカルボキシル基を持つ五環性トリテルペノイドで、1977 年にイギリス科の *Trichadenia zeylanica* という樹種の樹皮の抽出成分として初めて単離された物質である⁷⁾。ポプラからの検出例はこれまで報告されていない。

Trichadonic acid がファイトアレキシンであるかどうかについては、抗菌性実験を行うことを含め、さらに検討を要する。GC チャート上の trichadonic acid の近縁に数本のトリテルペノイド関連物と考えられる小ピークがみられたことから、ステロール代謝との関連性も予想される。Trichadonic acid 生成の意義に関する詳細は今後の研究課題である。(1993 年 8 月 25 日受理)

文 献

- 1) Ebel, J., 1986. Ann. Rev. Phytopathol., **24**: 235-264.
- 2) Bruce, R. J., C. A. West, 1982. Plant Physiol., **69**: 1181-1188.
- 3) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1985. Physiol. Plant Pathol., **27**: 209-217.
- 4) Linsmaier, E. M., F. Skoog, 1965. Physiol. Plant., **18**: 100-127.
- 5) Kurosaki, F., Y. Tsurusawa, A. Nishi, 1987. Phytochemistry, **26**: 1919-1923.
- 6) Giner-Pons, R. M., A. I. Gray, C. Lavand, G. Massiot, S. Gibbons, P. G. Waterman, 1992. Phytochemistry, **31**: 223-225.
- 7) Gunasekera, S. P., M. U. S. Sultanbawa, 1977. J. Chem. Soc. Perkin I, 483-490.