

# コルク組織を用いた、植物培養細胞における 二次代謝産物の生合成研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 趙 平

## [ 目的 ]

高等植物の二次組織の一種であるコルク組織は、環境ストレスに対する防護や、水・無機物質の貯蔵調節、脂溶性二次代謝産物の蓄積に関与している。マメ科植物クララ (*Sophora flavescens*) においては、sophoraflavanone G (SFG) を始めとする生理活性プレニルフラバノンが地下部コルク組織に蓄積しているが、脱分化したクララ細胞培養系にコルク組織を添加すると、細胞生長に影響を与えることなく SFG 生産が促進される。今回、コルク組織を使用することによって、SFG の生理活性発現に密接に関与する分岐したプレニル側鎖であるラバンドリル基の形成機構を明らかにし、その効率的生産を図るとともに、コルク組織の他の脱分化植物培養系における有用二次代謝産物生産への応用を目的として検討を行い、以下に述べる知見を得た。

## [ 結果 ]

### 1. コルク組織添加による SFG 生合成中間体検索及びフラボノイド生産への影響<sup>1)</sup>

クララ培養細胞にコルク組織を添加して培養したときにコルク組織に蓄積される二次代謝産物について精査を行い、3 種の新規化合物 (18-20) のほか、12 種類のフラボノイド (1, 2, 4, 5, 7-9, 11-14, 17) を効率的に単離・構造決定した (Fig. 1)。これらのうち、8-dimethylallylnaringenin (1) 及び leachianone G (LG, 2) は SFG (3) の生合成中間体であると推測されていたが、これまでクララ植物体や培養細胞系からは単離されていなかった。

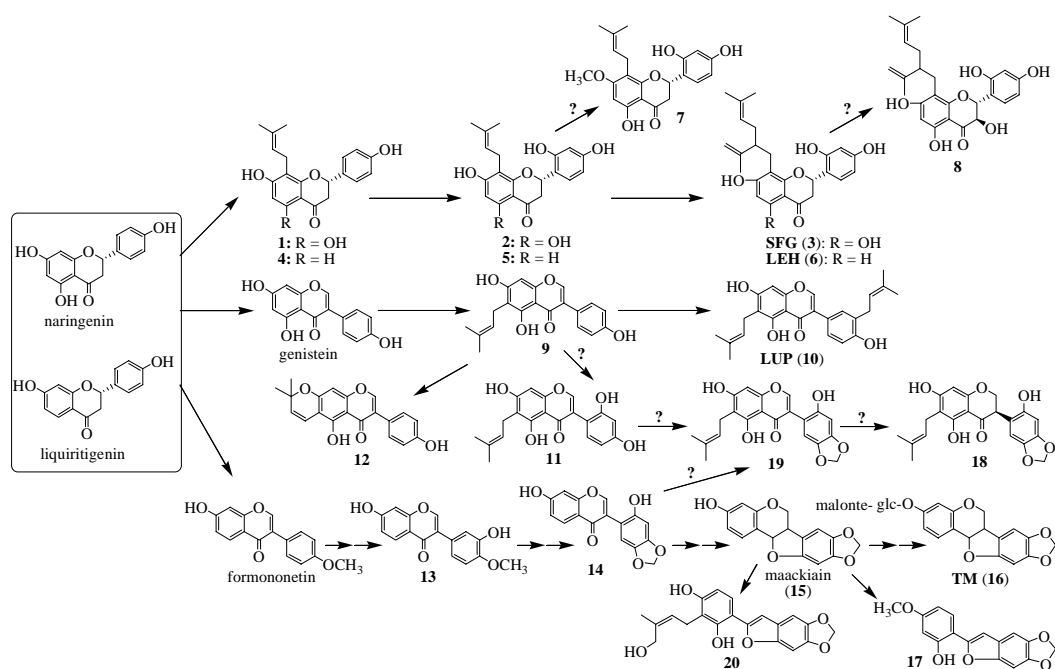
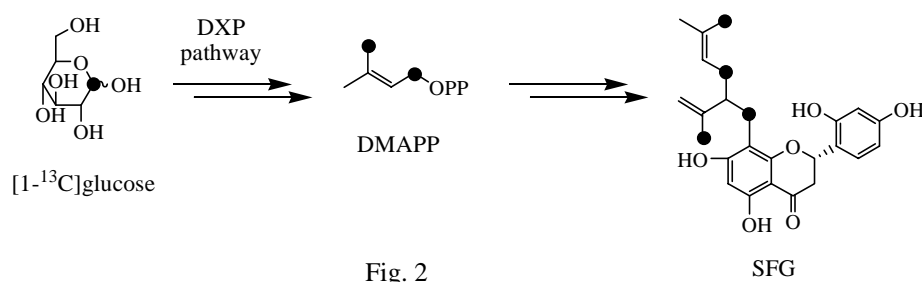


Fig. 1. Flavonoids isolated from cork tissue co-cultivated with *S. flavescens* cells and plausible biosynthetic routes for them.

今回の検討により SFG の生合成過程を化合物レベルで明らかにすることができた。またコルク組織及び methyl jasmonate (MJ) を併用することにより LG の蓄積量が飛躍的に増大することも見だし、これを大量に単離することが容易となった。

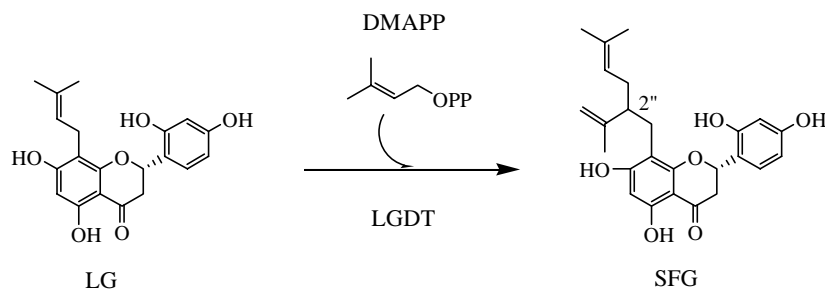
## 2. SFG 中のプレニル側鎖の生合成起源<sup>2)</sup>

コルク組織及び MJ の添加により SFG 生合成能を促進したクララ培養細胞に [1-<sup>13</sup>C]glucose を投与し、<sup>13</sup>C で標識された SFG を単離した。その <sup>13</sup>C 標識部位を <sup>13</sup>C NMR によって解析することにより、ラバンドリル基中の二つのイソプレレン単位は、共に 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) 経路によって生合成されることを明らかにした (Fig. 2)。



## 3. クララ培養細胞中の leachianone G 2''-dimethylallyltransferase (LGDT)<sup>3)</sup>

SFG 生合成過程の最終段階を司る膜結合性プレニル側鎖伸長酵素、LGDT をクララ培養細胞中に見出し、その生化学的諸性質を明らかにした。本酵素は芳香環に結合したプレニル側鎖に新たにプレニル基を転移させるという、これまでに例を見ない新しいプレニル側鎖伸長酵素である (Fig. 3)。



## 4. SFG 形成に關する三つの膜結合性酵素の細胞内局在性<sup>3)</sup>

ショ糖密度勾配遠心法により、ラバンドリル基形成に關する三つの膜結合性酵素の細胞内局在性について検討を行い、naringenin 8-dimethylallyltransferase (N8DT) 及び LGDT は共にプラスチドに存在するのに対し、生合成過程において二つのプレニル化反応の間に位置する 2' 位の水酸化反応を触媒する 8-dimethylallylnaringenin 2'-hydroxylase (2'OH) は、ER に局在していることを明らかにした。このことは、SFG の生合成には複数のオルガネラが協調して機能していることを示しており、また、その効率的生合成のために中間体や最終産物の輸送機構が存在すると推測された (Fig. 4)。

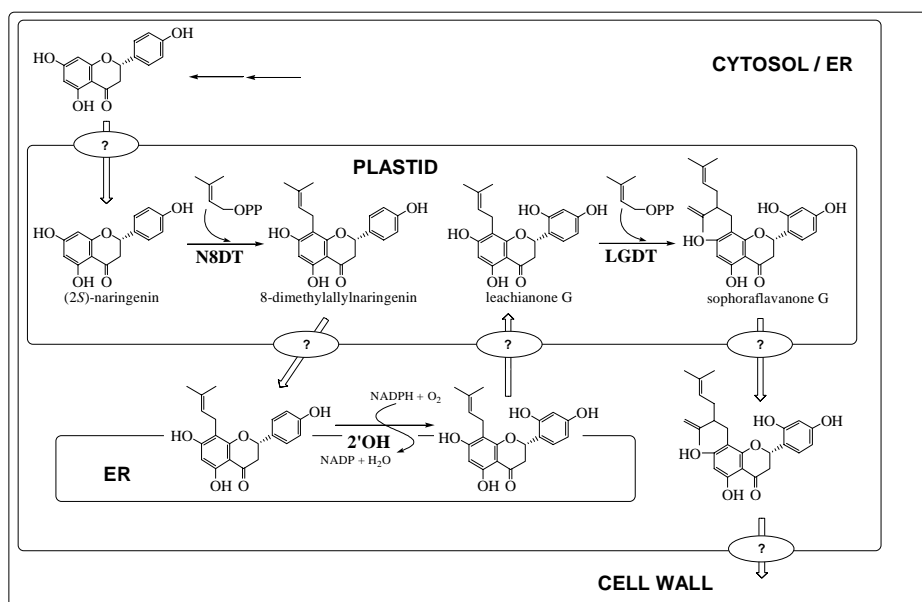


Fig. 4. Biosynthetic route from naringenin to sophoraflavanone G by two discontinuous dimethylallylations and 2'-hydroxylation and precursors/products transport systems in *S. flavescens* cultured cells. N8DT, naringenin 8-dimethylallyltransferase; 2'-OH, 8-dimethylallylnaringenin 2'-hydroxylase; LGDT, leachianone G 2"-dimethylallyltransferase.

## 5. コルク組織の添加による SFG 生産促進機構の検討<sup>4)</sup>

コルク組織添加時のクララ培養細胞中の SFG 生合成酵素活性変動について検討することにより、コルク組織添加による SFG 生産促進効果は、生合成酵素の一部が活性化されるだけではなく、最終産物の効率的吸着によるフィードバック阻害からの回避などの複数の機構によって制御されていると推測した。

## 6. コルク組織の他の植物培養細胞系への応用<sup>5)</sup>

カエサルピニア (*Caesalpinia pulcherrima*) 培養細胞にコルク組織や MJ、酵母エキスを添加することによって、3 種の新規化合物を含む 5 種のホモイソフラボノイドを効率的に単離することに成功した。

### [ 考察 ]

今回の検討によって、コルク組織の使用は、植物培養細胞系を用いての脂溶性二次代謝産物の生産に有効な手法であるとともに、その制御機構の解明に有効な手法であることが示された。

コルク組織は培養細胞の生長にはほとんど影響を与えないことから、今回確立された実験系は植物体における脂溶性二次代謝産物の生産と蓄積との関係を反映している可能性がある。今後、それらの生産と蓄積との関係や、その輸送機構に関する検討を進めることにより、有用脂溶性二次代謝産物のより効率的な生産が可能になるとと思われる。

### 参考文献

- 1) P. Zhao, C. Hamada, K. Inoue, H. Yamamoto. *Phytochemistry* **62**, 1093-1099 (2003).
- 2) H. Yamamoto, P. Zhao, K. Inoue. *Phytochemistry* **60**, 263-267 (2002).
- 3) P. Zhao, K. Inoue, I. Kouno, H. Yamamoto. *Plant Physiology* **133**, 1306-1313 (2003).
- 4) P. Zhao, K. Inoue, I. Kouno, H. Yamamoto. *Plant Physiology & Biochemistry* (submitting).
- 5) P. Zhao, Y. Iwamoto, I. Kouno, Y. Egami, H. Yamamoto. *Phytochemistry* **65**, 2455-2461 (2004).