

コケ培養細胞を利用した有用バイオマス及び物質の生産

鍋 田 憲 助

生物資源化学科応用生物化学教授

本研究の最終目的は以下の通りである。

1) コケ細胞培養技術による有用物質生産技術の開発と有用物質の検索を行う。

生産される化学物質の構造を決定し、医薬や農薬としての活性を試験する。/光エネルギーを利用した細胞の最適な生育条件を明らかにし、大量培養技術を確立する。/物質代謝とその制御機構を明らかにする。/前駆物質、代謝制御物質、代謝誘導物質の投与や、その他の培養条件を検討し、物質生産のための培養技術を確立する。/コケの物質代謝に関わる酵素や、それをコードしたDNA及びRNAを検索し、遺伝子工学技術による物質生産に利用する。

2) コケ培養細胞からの幼植物の大量生産技術とその利用法を開発する。

本年度は主として培養細胞の生産する化学物質の構造決定と物質代謝、特に、葉緑体内でのテルペン代謝について研究を行った。

I. ツクシウロコゴケ培養細胞の 2, 3-secoalloaromadendrane 型セスキテルペンの構造決定と alloaromadendrane 型セスキテルペンとの化学変換¹

I-1 目 的

ツクシウロコゴケ (*Heteroscyphus planus*) 培養細胞は、cadinane 型セスキテルペンや clerodane 型ジテルペンを生産する。また、野外から採集された植物からは、*epi*-neovercosane 型ジテルペンや *ent*-2, 3-secoalloaromadendrane 型セスキテルペンが分離されている。今回、培養細胞からの新規物質を含む、3種の *ent*-alloaromadendrane 型(1, 2, 3)、1種の *ent*-bicyclogermacrane 型(6)及び4種の *ent*-2, 3-secoalloaromadendrane (8, 9, 11, 12) 型セスキテルペンの構造を決定し、*ent*-2, 3-secoalloaromadendrane 型の直前の生合成前駆体と推定される(3)から hanegokedial(14)への化学転換を行った。

I-2 方 法

MSK-4 培地で培養した培養細胞を MeOH 抽出し、同抽出液から各種クロマトグラフィーにより各化合物を単離した。各化合物の分子式は EI または FI HR-MS で決定した。¹H 及び ¹³C の NMR ピークの帰属は、DEPT, ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H COSY, NOESY, 差 NOE, HMBC 及び COLOC 分析により行った。

I-3 結 果

Planotriol と命名した新規化合物(1)とそのアセチル化物(2, 3)の絶対配置は dibenzyl 誘導体(4)の X 線結晶解析、軸異性体 2-(2'-methoxy-1'-naphthyl)-3, 5-dichlorobenzoic acid (MNCB) の誘導体(5)の NMR 分析により決定した。即ち、X 線の結晶データから(4)の相対構造は Fig. 1

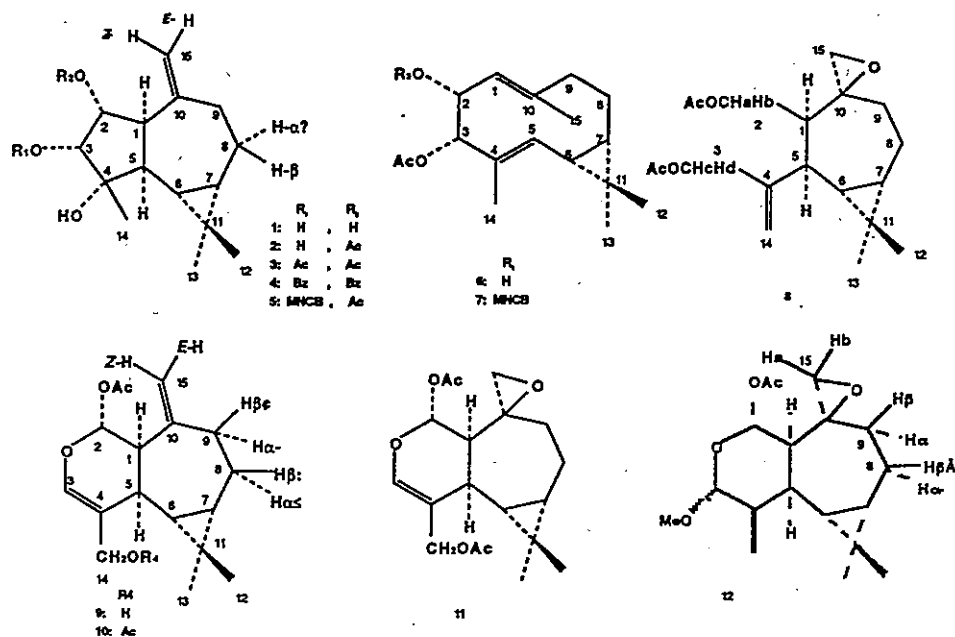


Fig. 1. Sesquiterpenes from cultured cells of *H. planus* and their derivatives.

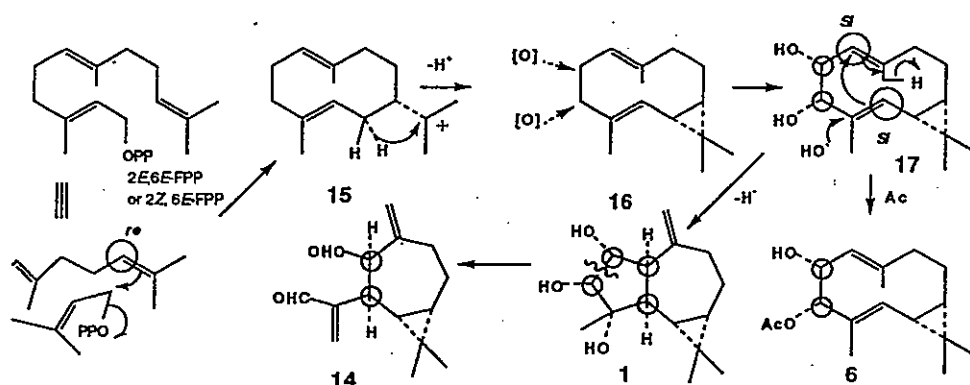


Fig. 2. Biosynthesis of 2,3-secoalloaromandrenes

のように決定された。また、(a*S*)-(5a) 及び (a*R*)-MNCB エステル (5b) の NMR 分析により、5a の naphthalene 環上の MeO プロトンと C-3 位の AcO プロトン間に NOE が観察されたこと、5a と 5b のプロトンのケミカルシフト差 ($\Delta\delta = \delta aS - \delta aR$) のうち、H-1, H-2 及び Ac-Me プロトンが正、14-Me プロトンが負の値を示したことから C-3 の不斉は *R* 配置と決定され、1-3 の絶対構造は図のように決定された。化合物 (6) の絶対配置も MNCB 誘導体 (7) の NMR 分析により図のように決定したが、化合物 (7) では立体障害の為にナフタレン環は 5 とは異なる配座をとると考えられる。Plagiochiline A (11) 及び methoxyplagiochiline A₂ (12) は文献値と全て一致した。化合物 (9) はアセチル化後、既知物質 plagiochiline C (10) に誘導して確認した。化合物 (8) は相対配置を決定した。

コケ植物では、しばしば、*ent*-2,3-secoalloaromandrene 型のセスキテルペンは、*ent*-bicyclogermacrane とともに見いだされており、bicyclogermacrane は 2,3-secoalloaromandrene 型セスキ

テルペンの生合成的前駆体と推定されるが、両者を結び付ける'missing link (s) はまだ見いだされていない。今回分離された planotriol (1) は、C-2 と C-3 の不斉が、 bicyclogermacrane (6) の生合成的に相当する炭素 (C-2 及び C-3) の不斉と一致すること、及び橋頭部の絶対配置が *ent*-2, 3-secoalloaromandendrane 型のセスキテルペンと一致することから、'missing link (s) の可能性が高い。Fig. 2 にこの生合成的な関連を示した。以上の可能性を検討するために、生合成的に最初に生成すると推定される hanegokedial (14) の (3) からの化学転換を行った。その結果脱水、加水分解次いで酸化分解の3段階の反応により hanegokedial が合成され、先の可能性が支持された。

II. ツクシウロコゴケ及びトサカゴケ培養細胞での GGPP 代謝²

II-1 目的

ツクシウロコゴケ培養細胞は、種々のクレロゲン型ジテルペン酸及び γ -ラクトンを生成するが、最主要成分である heteroscyphic acid A (HAA) に酢酸 ($2-^{13}\text{C}$ -) と MVA ($2-^{13}\text{C}$ -及び $4, 5-^{13}\text{C}_2$ -) を取り込ませたところ、それぞれ、HAA は 1.36 と 0.9 atom% excess で ^{13}C 標識された。興味深いことに、HAA の FPP 由来の部位のみが標識され、末端の IPP 部位は標識されなかった。この結果は、維管束植物の茎葉部での、MVA のモノテルペンやセスキテルペンへの IPP 部位への選択的取り込みと対照的であり、全く新しい標識パターンであった。同様の非等価な標識が、葉緑体のチラコイド膜で合成されるカロチノイドやクロロフィル a のフィチル側鎖にも認められるかどうかを確認し、葉緑体内での GGPP 代謝の制御機構を証明することを目的として本実験を行った。

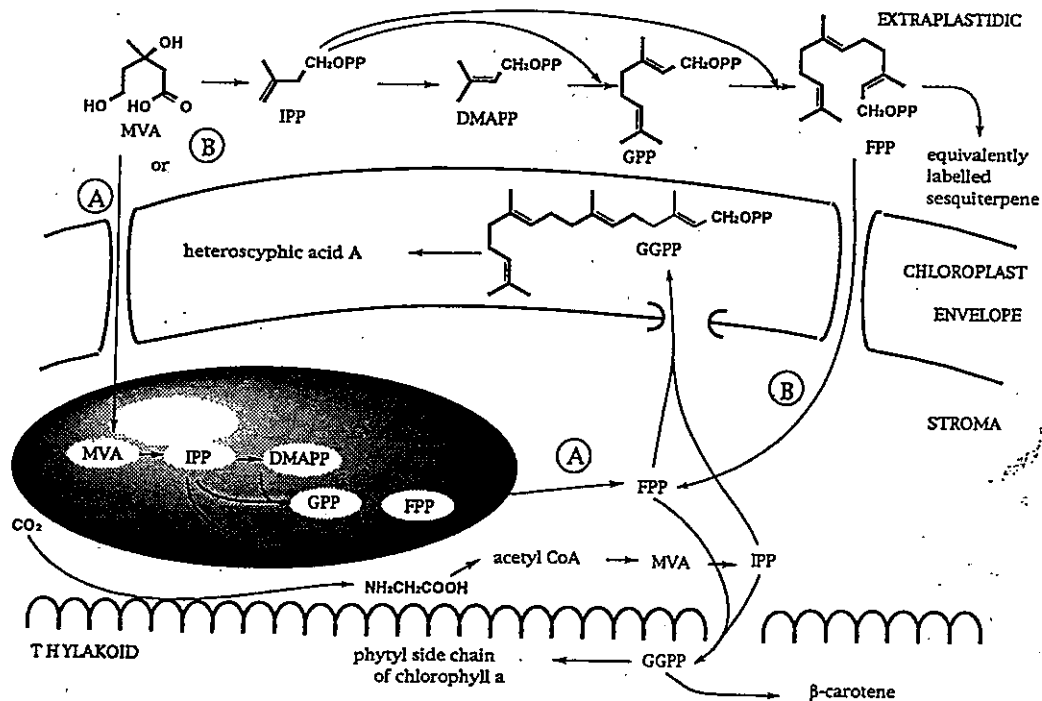


Fig. 3. The preferential labelling of the farnesyl diphosphate-derived portion in biosyntheses of the phytyl side chain of chlorophyll a, β -carotene and heteroscyphic acid A. The shaded portion is a presumed site where exogenous MVA is easily accessible and FPP is rapidly produced from exogenous MVA.

II-2 方 法

ツクシウロコゴケ及びトサカゴケ培養細胞に ^2H あるいは ^{13}C 標識した酢酸, メバロン酸, グリシンを投与した。生成したクロロフィルやカロチノイドを単離し, ^2H 及び ^{13}C NMR を測定した。

II-3 結 果

ツクシウロコゴケ及びトサカゴケ培養細胞中のクロロフィル a のフィチル部分の生合成 (10 atom% excess) やカロチノイド生合成においても観察された。以上から, 葉緑体内での GGPP 代謝系から派生する化合物は, 全て, HAA と同じ標識パターンを持つと推定される。この標識パターンは, 葉緑体内に取り込まれた FPP と葉緑体内で合成された IPP から GGPP の一部が合成される (B, Fig. 3), あるいは, 維管束植物とは異なり, コケ葉緑体はメバロン酸を効率良く取り込み, 取り込まれた MVA から FPP が迅速に合成される (A) と解釈すれば合理的に説明できる。

III. 引用文献

- 1) K. Nabeta et. al. *Phytochemistry*, (1996), 43, 83-93.
- 2) K. Nabeta et. al. *JCS Perkin Trans. I*, 1997, 261.