

植物培養細胞による生理活性物質の生産に関する研究

白

皎*

Studies on the Production of Biologically Active Compounds by Plant Cell Culture

by Jiao BAI

タキソール (taxol[®]) はイチイより単離され、癌細胞微小管の重合促進脱重合阻害作用により進行性卵巣癌、乳がん、肺がんなどに対し、有効な制癌剤であることがよく知られている。また、近年 taxinine NN-1 などの非 taxol 型の taxoid は多剤耐性癌克服活性を有することが報告されている。そこで、博士課程において、私は植物培養細胞により taxol 及び生理活性 taxoid の生産、その構造と生理活性の相関を明らかにすることに主眼を置いて研究を行った。

1. イチイ培養細胞を用いた生理活性 taxoid の生産
まず、入手容易な日本産イチイ (*Taxus cuspidata*) から、若い茎及び針葉部を外植体として用い、カルスを誘導した。このカルスは改変した Gamborg B5 培地に NAA 0.5mg/L を添加した条件で継代し続けると、良い増殖性を示したので、このカルスを基準として用い、種々の培養条件により生産実験を行った。各条件下で得られたカルスにつて、その生産物及び生産量の分析を行ったところ、20 種類の taxoid 化合物及び 12 種類の abietane 化合物を得た。その中で、taxoid **12** (taxinine NN-11)、abietanes **22**, **25**, **30**, **32** は新規化合物であり、それらの構造は主に 1D, 2D-NMR などのスペクトルの解析により決定された。カルスから得られた二次代謝物の種類及び収率は培養条件及び成長状態により大変異なっており、methyl jasmonate や phenylalanine, AcOH などの添加は taxane 化合物の生産を促進し、 β -cyclodextrin や光照射などは abietane 化合物の生合成ルートを活

性化することが分かった。

イチイカルスから単離された化合物 **9**, **12**, **17**, **19** は基準物質 verapamil により強い多剤耐性がん克服活性をしめした。特に、新規化合物 **12** は verapamil に比較し 191 % の活性を示した。また、新規化合物 **12** は 39 種類のヒト培養癌細胞パネル (HCC panel) 検定により新規作用機作をもつ有効物質であると期待された。新規化合物 **12** は高い活性を示したため、イチイカルスによるその増産を試みたところ、KTOS 存在下で、methyl jasmonate を 200 mM 添加すると、**12** は 0.0631% とよい収率で得られた。

2. Taxuyunnanine C 及びその誘導体の構造修飾

Taxuyunnanine C (**16**) 及びその誘導体 (**17**, **20**) は日本産イチイから誘導したカルスの中で dry callus に対し、約 1.5% で含まれ、特に液体懸濁培養の場合、主成分として **16** は 299.0 mg/L という高収率で得られた。しかし、これらの化合物は生理活性が弱いため、その 2, 5, 6, 7, 9, 10, 14 位により嵩高い官能基へ変換後、生理活性を増加させることを期待して、主に化学反応により構造修飾を行った。

まず、taxuyunnanine C (**16**) を加水分解し、さらに 2, 5, 10, 14 位にそれぞれ benzoyl 化, cinnamoyl 化及び aryl 化して、目的物 **52** ~ **54**, **61** ~ **67** を得た。次に、従来の化学反応により得ることが困難な 6, 7, 9, 10 位などの methylene 炭素の酸化は植物培養細胞及び微生物を用いて試みた。taxuyunnanine C (**16**) 及びその誘導体 **19** と **20** を微生物 *Absidia coe-*

*新潟大学大学院自然科学研究科

〔新潟大学博士 (工学) 平成 17 年 3 月 23 日授与〕

*lurea*により変換すると、主に6,7, 9, 10位の水酸化化合物 **33** ~ **39** が生成された。さらに, cinnamoyl 化して, 目的物 **55** ~ **60** を得た。最後に, 14-hydroxyl taxuyunanine C(**43**)の14位にある水酸基の除去を行い, 目的物 **69** を得た。

3. Taxoid 化合物の構造活性相関に関する研究

得られた taxoid 化合物についてヒト培養正常肺細胞 (WI-38), WI-38 から誘導した癌細胞 (VA-13) 及び肝臓癌細胞 HepG2 に対する増殖阻害活性 (IC_{50} 値) を, 現在最も有効な制癌剤 Taxol 及び Adriamycine を対照とし抗癌活性を測定した。また, 多剤耐性がん細胞 2780AD を用いて, 各試験化合物存在下で細胞内に取り込まれた Vincristine 或いは Calcein の量を測定し, 基準物質 vepamamil と比較し, MDR 克服活性を検定した。その結果, それぞれに C-10, 9, 7 位に cinnamoyl 基を持つ化合物 **53**, **56**, **59** は calcein

AM と併用し, 多剤耐性癌細胞 2780AD10 に対して基準物質 verapamil により, 高い活性を示した。5 位に cinnamoyl 基を持つ化合物 **54** は肝臓癌細胞 hepG2 に対して taxol と同程度の活性を示したが, 正常細胞 WI-38 に対し毒性は約 taxol の 1000 の 1 以下であった。14 位に置換基のない化合物 **69** は HepG2 に対して taxol と同程度の活性を示し, 多剤耐性癌細胞 2780AD10 に対しても verapamil により高い活性を示した。また, **53** は 39 種類のヒト培養癌細胞パネルの検定により有効濃度が高いが, Differential growth inhibition が認められ, COMPARE marginal ($0.5 < r < 0.75$) なので作用機作がユニークである可能性がある。

謝辞: 本研究の遂行ならびに学位論文の執筆に当り, 主指導教官である安東政義教授にご指導, ご鞭撻を賜りました。ここに記して深謝申し上げます。