



## 2. 実験

### 外植体ならびにカルス誘導、培養：

1997年1月17日、仙台市青葉山において採取したイチイ (*taxus cuspidata*) 針葉の若い茎を外植体として用い、すでに報告した方法<sup>2b)</sup>によりカルス誘導、継代培養したカルス (CR-5) を実験に用いた。



### 添加物を加えた生産実験：

上記の CR-5 カルスを用い、以下の添加物の所定量を継代培地に添加し 60 日間、暗所下 25°C で培養し、同一条件で添加物を加えないものをコントロールとして生産物を比較した。

#### 使用添加物

ジャスモン酸メチル (和光純薬、生化学用)

フェニルアラニン (和光純薬、生化学用)

酢酸 (関東化学、特級)

### 生成物の抽出ならびに単離：

新鮮カルスを凍結乾燥して乾燥カルスとし、ヘキサン (13 mL/g dry callus) で浸透、攪拌 (1h) 後、ろ過を行う。この浸透、攪拌、ろ過の操作を 3 回行った。続いて酢酸エチル (13 mL/g) でヘキサンと同様の操作を行い、減圧下で濃縮し、酢酸エチル抽出部を得た。得られた酢酸エチル抽出部をフラッシュカラムクロマトグラフィー (silica gel 60, 230-400 mesh) で荒分けし、続いて順相または逆相の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で各生成物を分取した。

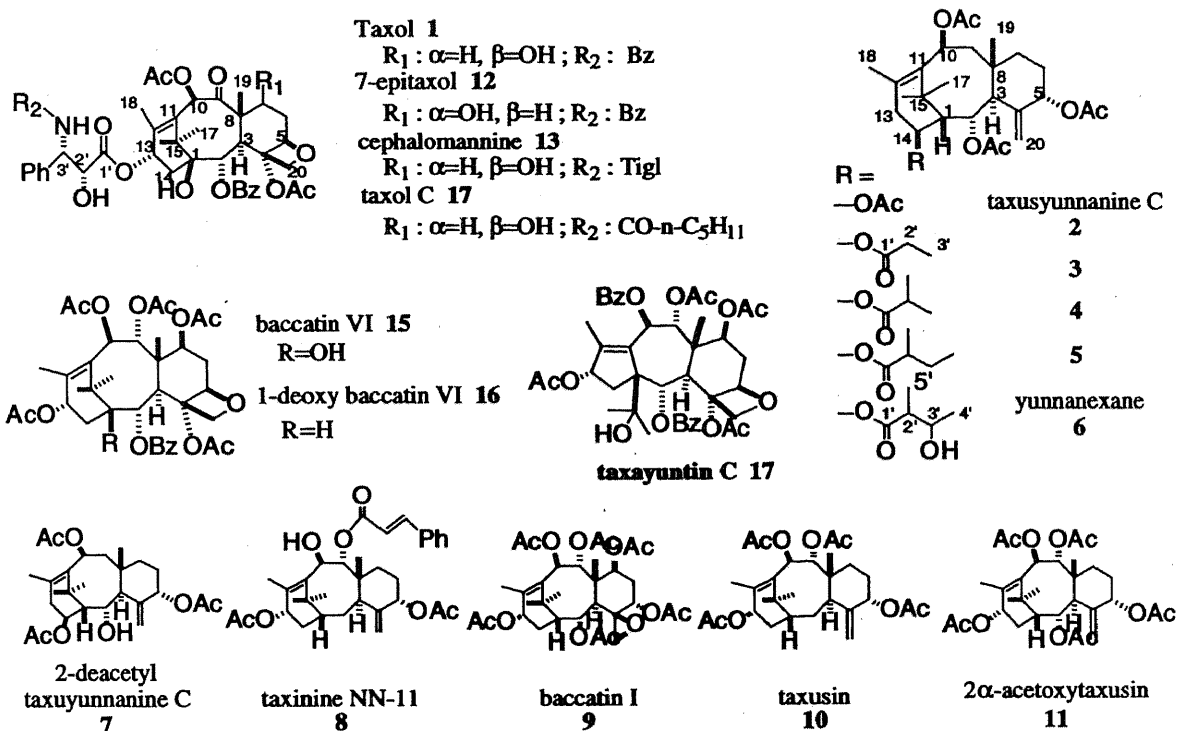
### 生成物の同定、定量ならびに構造決定：

既知物の同定については HPLC の保持時間の一致および単離後の <sup>1</sup>H-NMR のスペクトルの一致により同定した。生成量は全て単離収量で表した。新規化合物の同定ならびに構造決定については主に、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、DEPT、各種 2D-NMR で決定し、高分解能質量スペクトルによる精密分子量の測定により確認した。

## 3. 結果および考察

添加物として代表的なエリシター (植物ホルモン：植物内生生理活性物質) として知られるジャスモン酸メチル (以下、MJ と略記)、およびタキソールの 13 位フェニルイソセリン側鎖の出発物質であるとされるフェニルアラニンおよび酢酸、そして、この両者を組み合わせた場合について同一条件で添加物を加えないものをコントロールとして生産物を比較検討した。(表 1)

まず、タキサン化合物の生合成の初期段階と考えられる、taxuyunnnanin C 2 とその 14 位アシルオキシ同族体 3~7 は、無添加の場合でもその生産量の合計が乾燥カルス基準で 0.486% と大きい値を示したが、MJ を添加するとその生産量はさらに



増加し、乾燥カルス基準で約 1.5%にも達することがわかった。この約 1.5%という値は植物の培養細胞（カルス）の生産する二次代謝物としては極めて大きい値であり、この結果はタキソールを含むタキサン化合物の合成中間体原料としての可能性を示している。また、フェニルアラニン、酢酸の系でも、MJと同程度の生産の向上が認められたが、MJと共存させるとその生成量は約 1%まで低下した。

また、MJおよびフェニルアラニン、酢酸を添加するとコントロールでは確認できなかった 14 位アシル体から 13 位オキシ体となったタキサン 8, 10, 11 やタキソールなどのオキセタン環を持つタキサン化合物への中間段階と考えられる、4,11-エポキシ体 9 などのタキサンの生成を認め、特にフェニルアラニン、酢酸の系で増加が認められた。

タキソール 1 並びに関連オキセタン化合物 12~17 の生成については、タキソールに注目するとコントロールに比べ MeJ を加えると約 2.5 倍（乾燥カルスあたり 0.026%）が得られ、関連オキセタン化合物 12~17 も含めた合計量も顕著に増加した。1 の乾燥カルスあたり 0.026%という含有量は、日本イチイ針葉部中の 1 の含有量 0.004%を遥かに上回っており、1 が初めて単離された大平洋イチイ *taxus brevifolia* の樹皮における含有量 0.01%をも超えている。しかし、フェニルアラニン/酢酸の系ではこのような 1 の増加は見られなかった。

以上のように、本カルスを用い、培養時に種々の添加物を加えることによりその生産物が大きく変化することが認められた。すなわち、添加物の無い場合に比べ、代表的なエリシターである MeJ を加えた場合は、タキサン骨格の生合成が全体的

に進行し、14 アシルオキシ体、4,20-エポキシ体をへてオキセタン環を有するタキソールアナログの顕著な増加が見られ、低酸化度の taxuyunnnanin C 2 とその 14 位アシルオキシ同族体 3~7 の合計量は乾燥カルス基準で約 1.5% に達し、また、1 の含有量も 0.026% とイチイ植物に比べ極めて高い生産を示した。一方、フェニルアラニン、酢酸を添加した場合は、低酸化度の taxuyunnnanin C 2 とその 14 位アシルオキシ同族体 3~7 の生産は顕著な増加が見られたものの、より高度に酸化された 14 アシルオキシ体、4,20-エポキシ体およびオキセタン環を有するタキソールアナログの増加は認められず相違が見られた。

Table 1.

The products and the yields of CR-5 callus cultures with Additives

compounds	isolated yields (% based on dry callus)			
	Additives <sup>1)</sup>			
	-(control)	A	B	A+B
2	0.135	0.642	0.805	0.513
3	0.014	0.054	0.055	-
4	0.009	0.025	0.050	-
5	0.275	0.65	0.487	0.374
6	0.053	0.134	0.040	0.047
7	-	-	0.105	0.018
sub-total	0.486	1.505	1.542	0.952
8	-	0.026	-	0.010
9	-	0.005	-	0.004
10	-	-	0.054	0.005
11	-	0.037	-	0.03
sub-total	-	0.068	0.054	0.049
1	0.010	0.026	0.007	0.013
12	0.002	-	0.002	-
13	-	-	-	-
14	0.001	0.005	0.001	-
15	0.001	0.031	0.003	0.031
16	-	0.010	-	0.011
17	0.003	0.010	-	0.007
sub-total	0.017	0.082	0.013	0.062

1) Additives, A: Methyl Jasmonate, B : Phenylalanine and Acetic acid

## 謝辞

本研究は本学 工学部 安東政義 教授の指導により行われたものであり、適切な助言を賜った 農学部 内山武夫 教授ならびに 自然科学研究科 萩原久大 教授、工学部 鈴木敏夫 教授 に深く謝意を表します。また、本研究を共同して担当して頂いた工学部 安東研究室の学生諸氏に深く感謝致します。

本研究の一部は平成 12 年度科学研究費補助金 奨励研究(B) 12915017 の援助により行われた。

## 文献

- 1) a) M, Ando, J. Sakai, Y, Watanabe, et al., A New Basic Taxoid from *Taxus cuspidata*. *Journal of Natural Products*, 60 (5), 499-501, 1997.  
b) K. Kosugi, J. Sakai, M. Ando, A. Tomida, T. Turuo, et al., Neutral taxoids from *Taxus cuspidata* as modulators of multidrug-resistant tumor cells, *Phytochemistry*, 54 (8), 2000, 839-845  
c) J. Sakai, H. Sasaki, T. Turuo, M. Ando, et al., Two taxoids from *Taxus cuspidata* as modulators of multidrug resistant tumor cells, *Heterocycles*, 54 (2), 2001 (accepted on Aug. 23, 2000).
- 2) a) 安東政義・坂井淳一, 他, 第 40 回天然有機物討論会 (1998 年 10 月, 福岡) 講演要旨集 p.353 ;  
b) 坂井淳一, 第 2 回新潟大学工学部技術発表会報告集, p.47 (2000 年 3 月)
- 3) J. Kobayashi, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 8, 1555 (1998).
- 4) 安東政義・坂井淳一, 他, 第 43 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (1999 年 10 月, 岐阜), 講演要旨集 p.279