

|         |                                                                                               |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | カエキ ダイク<br>上杉 大介 (岡山県)                                                                        |
| 学位の種類   | 博士(理学)                                                                                        |
| 学位記番号   | 甲第理107号                                                                                       |
| 学位授与の日付 | 平成29年3月20日                                                                                    |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当(課程博士)                                                                            |
| 学位論文題目  | 植物培養細胞によるスチルベン誘導体の配糖化と機能性解明                                                                   |
| 論文審査委員  | 主査 教授 濱田 博喜<br>副査 教授 浅田 伸彦<br>教授 大平 進<br>教授 折田 明浩<br>教授 石原 浩二<br>教授 妹尾 昌治<br>(岡山大学大学院自然科学研究科) |

# 論文内容の要旨

申請者氏名 上杉 大介

論文題目：植物培養細胞によるスチルベン誘導体の配糖化と機能性解明

食品は、我々が生きていく上で必要なものである。我々は毎日食品を食べることによって、生命を維持し健康な日常生活を営んでいる。これまで、食品の栄養( 第一次機能 ), 味覚( 第二次機能 )機能については十分解明され、認識されているが、近年、食品の持つ生体防御、体調リズム調節、疾病予防及び回復といった第三次機能が注目されている。特に、近年糖尿病やがんなど生活習慣病といわれる疾病が増え、医療費の増大が深刻化しているが、こうした疾病の予防のために日頃から三次機能を有する食品の摂取は重要なことになる。これらのことから、健康食品に注目されている現代であるが、健康思考のきっかけとなったのが、「フレンチパラドックス」における赤ワインの健康ブームではないかと考えられる。また、このフレンチパラドックスの要因をより細かく見ていくと、ワインに含まれるポリフェノールが主な要因なのではないのかということが考えられる。特に、スチルベン誘導体の一つであるレスベラトロールは生理機能としては、抗癌作用、脂肪代謝作用、抗炎症作用、抗酸化作用、美肌作用などの生理活性を持つ事が報告されている。しかし、水溶性、安定性の面で課題が残っている。この課題を解決するために配糖化に注目した。配糖化を行うことで、水溶性の増大、安定性の向上などがこれまでに報告されている。また、安全かつ低コストな配糖体の合成を目標として植物培養細胞による物質変換に注目した。本研究では、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による機能性スチルベン誘導体の効率的物質変換を目的として行った。また、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞の変換メカニズムの解明としてヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素 *PaGT3* の基質特異性や動力学定数などの酵素化学的諸性質を明らかにした。さらに、得られた化合物について、抗酸化活性とチロシナーゼ阻害活性評価を行った。

## 1) ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるスチルベン誘導体の物質変換

ヨウシュヤマゴボウ ( *Phytolacca americana* ) 培養細胞によって、スチルベン誘導体であるレスベラトロールを投与し、反応を行った。その結果、*Resveratrol-4'-O-β-D-glucoside*, *Resveratrol-3-O-β-D-glucoside* が得られた。さらに、光条件における検討では、暗条件下ヨウシュヤマゴボウ培養細胞では、配糖体及びメチル化合物である *Pinostilbene*, *Pterostilbene-4'-O-β-D-glucoside* が得られた。さらに、他の機能性スチルベン誘導体であるピノスチルベン、プテロスチルベン、ピセアタンノール、イソラポンチゲニンに関しても変換を行った結果、明条件下ヨウシュヤマゴボウ培養細胞において、ピノスチルベンにおいては、*Pinostilbene-4'-O-β-D-glucoside*, *Pinostilbene-3-O-β-D-glucoside* が得られた。また、プテロスチルベンについては *Pterostilbene-4'-O-β-D-glucoside* が得られ、ピセアタンノールについては *Piceatannol-4'-O-β-D-glucoside* が得られた。さらに、イソラポンチゲニンに関しては、

Isorhapontigenin-3-O- $\beta$ -D-glucoside を得ることができた。

一方、暗条件下ヨウシュヤマゴボウ培養細胞については、ピノスチルベンでは、Pinostilbene-3-O- $\beta$ -D-glucoside, Pterostilbene が得られ、ピセアタンノールでは Piceatannol-4'-O- $\beta$ -D-glucoside, Isorhapontigenin-3-O- $\beta$ -D-glucoside, Isorhapontigenin を得ることができた。

さらに、イソラポンチゲニンについては、Isorhapontigenin-4'-O- $\beta$ -D-glucoside, Isorhapontigenin-3-O- $\beta$ -D-glucoside を得ることができた。明条件下では配糖化、暗条件下ではメチル化が特に生じた。

## 2) ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素(PaGT3)による配糖体の合成と反応速度定数の決定

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞から生成された酵素(PaGT3)を用いて配糖体の合成を検討することで、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞における変換メカニズムの解明を目的として酵素合成を行った。

その結果、PaGT3 はスチルベン誘導体を配糖化することが明らかとなった。また、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による物質変換結果と比較したところ、レスベラトロールでは主生成物が異なったことから、培養細胞においては異なる酵素が働いたと考えられる。また、ピノスチルベンおよびイソラポンチゲニンに関しては、培養細胞と同様な主生成物であった配糖体のみが選択的に得られた。このことから、ピノスチルベンおよびイソラポンチゲニンを培養細胞に投与した時、PaGT3 が作用するのではないかと考えられた。さらに、ピノスチルベンはレゾルシノールの一方がメチル化された化合物に変換され、イソラポンチゲニンはカテコールの一方がメチル化された化合物に変換された。これらの結果から、PaGT3 はメトキシ基の隣接位の水酸基を選択的に配糖化することが明らかとなった。さらに、酵素の反応速度定数を求めた結果、 $K_m$  値と  $V_{max}$  値から、PaGT3 の親和性や反応速度は基質のメトキシ基の有無と位置関係が大きく関わっていることが明らかとなった。

## 3) 抗酸化とチロシナーゼ阻害活性評価

得られた変換物に関して抗酸化活性試験およびチロシナーゼ阻害活性試験を行った。抗酸化活性試験は ORAC 法を用いて行った。その結果、配糖化することで抗酸化活性の低下が見られた。また、レスベラトロール、ピノスチルベン、イソラポンチゲニンについては糖の結合する位置で活性の大きな差異が見られた。このことから、スチルベン誘導体において抗酸化活性は水酸基が直接関与していることが確認された。またチロシナーゼ阻害活性においては配糖化することで活性が大きく向上した。このことから配糖体は、メラニンの過剰な生成を抑制し、肌の保護作用に寄与すると示唆された。これらの結果から、基質とその配糖体はそれぞれに抗酸化活性とチロシナーゼ阻害活性を有しているので機能性化合物として期待できる。

## 4) 総括

本研究では、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞の有する配糖体酵素を活用して、種々の配糖体が効率的かつ選択的に合成出来る事を解明した。また、その糖転移酵素(PaGT3)による配糖体合成と酵素化学的性質も解明した。更には、それぞれの主変換物配糖体の機能性解明も研究して、活性の高い化合物も見いだした。これらの成果は種々の産業へ応用可能であり、社会へ大きく寄与出来ると結論出来る。

発 表 論 文 (査読有)

- 1) Kei Shimoda, Naoji Kubota, Manabu Hamada, **Daisuke Uesugi**, Masato Tanigawa, Hatsuyuki Hamada and Hiroki Hamada  
Glycosylation of Quercetin with Cultured Plant Cells and Cyclodextrin Glucanotransferase  
*Natural Product Communications*, 9(5), 647 - 648, 2014
- 2) Kei Shimoda, Naoji Kubota, **Daisuke Uesugi** and Hiroki Hamada  
Glycosylation of Artepillin C with Cultured Plant Cells of *Phytolacca americana*  
*Natural Product Communications*, 9(5), 683 - 685, 2014
- 3) Kei Shimoda, Naoji Kubota, **Daisuke Uesugi**, Hatsuyuki Hamada, Masato Tanigawa and Hiroki Hamada  
Synthesis and pharmacological evaluation of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and piceatannol  
*Annals of the New York Academy of Sciences*, 62(3), 267-273, 2014
- 4) Kei Shimoda, Naoji Kubota, **Daisuke Uesugi**, Yuuya Fujitaka, Shouta Okada, Masato Tanigawa and Hiroki Hamada  
Regioselective Glycosylation of 3-, 5-, 6-, and 7-Hydroxyflavones by Cultured Plant Cells  
*Natural Product Communications*, 10(6), 923 - 924, 2015
- 5) Ryo Yasukawa, Natsumi Moriwaki, **Daisuke Uesugi**, Fuya Kaneko, Hiroki Hamada and Shin-ichi Ozaki  
Enzymatic Synthesis of Quercetin Monoglucopyranoside and Maltooligosaccharides  
*Natural Product Communications*, 10(6), 949 - 950, 2015
- 6) Md. Ziaul Karim, **Daisuke Uesugi**, Noriyuki Nakayama, M. Monzur Hossain, Kohji Ishihara and Hiroki Hamada  
Identification of Stevioside Using Tissue Culture-Derived Stevia (*Stevia rebaudiana*) Leaves  
*Biochemistry Insight*, 2, 33-37 2015
- 7) Kei Shimoda, Naoji Kubota, **Daisuke Uesugi**, Masato Tanigawa and Hiroki Hamada  
Hydroxylation and Glycosylation of Phenylpropanoids by Cultured Cells of *Phytolacca americana*  
*Natural Product Communications*, 11(2), 197 - 198, 2016
- 8) **Daisuke Uesugi**, Hiroki Hamada and Kei Shimoda  
Glycosylation of *trans*-Resveratrol by Cultured Plant Cells under Illumination of LEDs  
*Natural Product Communications*, 11(2), 199 - 200, 2016
- 9) Hiroki Hamada, Shouta Okada, Kei Shimoda, **Daisuke Uesugi** and Hatsuyuki Hamada  
Optical Resolution of (*RS*)-Denopamine to (*R*)-Denopamine  $\beta$ -D-Glucoside by Glucosyltransferase from *Phytolacca americana* Expressed in Recombinant *Escherichia coli*  
*Natural Product Communications*, 11(8), 1121 - 1122, 2016
- 10) **Daisuke Uesugi**, Hiroki Hamada, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Shin-ichi Ozaki and Naoki Nagatani  
Synthesis, oxygen radical absorbance capacity, and tyrosinase inhibitory activity of glycosides of resveratrol, pterostilbene, and pinostilbene  
*Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(2), 226-230, 2017

学会発表

(国際学会)

- 1) **Daisuke Uesugi**, Masahiro Matsumoto, Ken Suwada, Mai Takemoto, Shinichi Ozaki, Toru Nakayama, Hiroki Hamada  
The synthesis of the high functional saponines using glucose transferase derived from plant cultured cells  
Bioactive Okayama 2012 (Okayama, Japan), September, 2012
- 2) **Daisuke Uesugi**, Kei Shimoda, Hiroki Hamada  
Synthesis and evaluatio of glycoside of *trans*-resveratrol, pterostilbene, and piceatannol  
The 13th China-Japan-Korea.Joint Symposium on Enzyme Engineering (Jeju, Korea), November, 2014
- 3) **Daisuke Uesugi**, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Hiroki Hamada  
The glycosylation of phenolic compounds using plant cultured cells  
Active Enzyme Molecule (Toyama, Japan), December, 2014
- 4) **Daisuke Uesugi**, Eri Noyama, Minami Araki, Noriyuki Nakayama, Syouta Okada, Shin-ichi Ozaki, Kei Shimoda, Naoji Kubota, Hiroki Hamada  
Biotransformation of stilbene compounds using plant cultured cells  
The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Hawaii, USA), December 2015

(国内学会)

- 1) **上杉大介**, 下田恵, 小崎紳一, 堀尾嘉幸, 濱田博喜  
レスベラトロール配糖体の合成とその機能性解明  
第 16 回 生体触媒化学シンポジウム (富山) 2012 年 11 月
- 2) **上杉大介**, 小崎紳一, 下田恵, 堀尾嘉幸, 濱田博喜  
トランスレスベラトロールの機能性解明  
第 93 回 日本化学会春季年会 (滋賀) 2013 年 3 月
- 3) **上杉大介**, 竹本麻衣, 小崎紳一, 中山亨, 中島伸佳, 濱田博喜  
植物培養細胞と植物培養細胞由来糖転移酵素によるスチルベン誘導体の配糖化  
第 17 回 生体触媒化学シンポジウム (岡山) 2013 年 12 月
- 4) **上杉大介**, 濱田博喜  
再生機能を有する植物培養細胞による物質変換  
第 8 回 バイオ関連化学シンポジウム (岡山) 2014 年 9 月
- 5) **上杉大介**, 下田恵, 久保田直治, 小崎紳一, 濱田博喜  
トランス - レスベラトロール, プテロスチルベンとピセアタンノールの配糖体合成と機能性評価  
第 56 回 天然有機化合物討論会 (高知) 2014 年 10 月
- 6) **上杉大介**, 中山騎維, 川村章吾, 土井翔太, 岡田祥太, 下田恵, 小崎紳一, 濱田博喜  
植物培養細胞による配糖化とメチル化  
第 56 回 天然有機化合物討論会 (仙台) 2016 年 9 月

## 審査結果の要旨

本論文は、多くの生理的機能性を有するが水溶性や安定性に問題があるブドウ由来のレスベラトロールをはじめとしたスチルベン誘導体を植物培養細胞によって、より利便性の高い配糖体の合成方法を確立し、その物質変換様式およびその生理活性を研究した成果をまとめたものである。

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるスチルベン誘導体の物質変換ではヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) 培養細胞によって、スチルベン誘導体であるレスベラトロールを投与し、反応を行った結果、レスベラトロールの3位と4位にそれぞれグルコースが結合した配糖体を得た。さらに、変換条件を変更することで配糖化の位置選択性を制御することに成功した。ここで決定した条件を用いて他の機能性スチルベン誘導体である、ピノスチルベン、プテロスチルベン、ピセアタンノールおよびイソラボンチゲニンを植物培養細胞による配糖化を行い、手法の確立と配糖化の変換様式を解明した。HPLC 測定、MS 測定および NMR 測定のデータから、変換物を明らかにして、さらにヨウシュヤマゴボウ培養細胞におけるメチル化も見出した。

糖転移酵素(*PaGT3*)による配糖体の合成と反応速度定数では、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞から単離精製された糖転移酵素を用いて配糖体を合成し培養細胞の合成と比較することで、反応メカニズムも明らかになった。さらに、基質と酵素の親和性と反応速度を算出しさらに酵素の特性を検討した結果、*PaGT3* の親和性や反応速度はメトキシ基の有無や位置関係が大きく関わってくるのではないかと示唆された。

さらに、得られた変換物に関して抗酸化活性試験およびチロシナーゼ阻害活性試験を行った。

レスベラトロールでは配糖化することで抗酸化活性は低下したが、その低下度合いは大きく見られなかった。さらに、レスベラトロール配糖体はチロシナーゼ阻害活性が大きく向上したことから、この配糖体は今後、機能性化合物として有用であると期待できる。

以上のように、本論文では、多くの有用な機能を有するが化学的性質から利用が制限されているスチルベン誘導体を植物培養細胞用によって簡易に実用化できる可能性を見出すことができた。植物培養細胞を用いた物質変換は、生理的有用な機能を有する物質の使用範囲を拡大することができる手法であると同時に配糖化酵素の基質特異性解明の基礎データの構築に寄与する。特に生体触媒分野への応用例として画期的な成果を上げ、グリーンケミストリー分野に新しい科学貢献の知見を与えた。本研究の成果は論文として国際の学術雑誌に公表されている。よって、本審査委員会において本論文は博士論文に値する内容を備えていると認め、論文提出者上杉大介は博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認める。