

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

2017 年

岡山理科大学大学院
理学研究科
材質理学専攻
上杉 大介

目次

第 1 章	総論	1
1.1	食品とその機能性	1
1.2	フレンチパラドックス	2
1.3	ポリフェノール	4
1.4	スチルベン	5
1.5	レスベラトロール	7
1.6	配糖体	8
1.7	植物培養細胞	9
1.7.1	組織培養の歴史	9
1.7.2	生体触媒としての応用	10
1.7.3	植物培養細胞の利用とその利点	11
1.8	本研究の目的	13
第 2 章	ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を用いたスチルベン誘導体の物質変換	14
2.1	序論	14
2.2	本論	15
2.2.1	ヨウシュヤマゴボウ(<i>Phytolacca americana</i>) 培養細胞によるレスベラトロールの物質変換	15
2.2.2	植物培養細胞による物質変換における反応条件の検討	21
2.2.2.1	培養時間の検討	21
2.2.2.2	植物ホルモンによる検討	22
2.2.2.3	光条件における検討	23
2.2.3	ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベンの物質変換	27
2.2.3.1	明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベンの物質変換	27
2.2.3.2	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベンの物質変換	29
2.2.4	ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換	30
2.2.4.1	明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換	30
2.2.4.2	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換	30

2.2.5	ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換	31
2.2.5.1	明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換	31
2.2.5.2	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換	32
2.2.6	ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換	34
2.2.6.1	明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換	34
2.2.6.2	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換	34
2.2.7	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による変換経路の解明	36
2.2.7.1.a	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの変換経路の解明	36
2.2.7.1.b	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロール 4'位配糖体の物質変換	37
2.2.7.2	暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの変換経路の解明	38
2.3	結論	40
2.4	実験	41
2.4.1	MS 基本培地の作成	41
2.4.2	植物培養細胞の継代	43
2.4.3	基質の投与	44
2.4.4	変換物の抽出	45
2.4.5	変換物の HPLC 分析	46
2.4.6	物質変換における経時変化の検討	46
2.4.7	物質変換における植物ホルモンの検討	47
2.4.8	物質変換における光条件の検討	47
2.5	データ集	48
第 3 章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素を用いた配糖化		76
3.1	序論	76
3.1.1	糖転移酵素	76
3.1.2	<i>PaGT3</i>	76
3.2	本論	77
3.2.1	<i>PaGT3</i> によるレスベラトロール配糖体の合成	77
3.2.2	<i>PaGT3</i> によるピノスチルベン配糖体の合成	78
3.2.3	<i>PaGT3</i> によるプテロスチルベン配糖体の合成	78
3.2.4	<i>PaGT3</i> によるピセアタンノール配糖体の合成	79
3.2.5	<i>PaGT3</i> によるイソラポンチゲニン配糖体の合成	79
3.2.6	酵素反応速度論の検討	80

3.3	結論	84
3.4	実験	85
3.4.1	リン酸緩衝液の調整	85
3.4.2	UDP-グルコースおよび基質の調整	85
3.4.3	糖転移酵素 <i>PaGT3</i> を用いた合成	85
3.4.4	K_m 値, と V_{max} 値の算出	85
第 4 章	生理活性試験	87
4.1	序論	87
4.1.1	活性酸素	87
4.1.2	ORAC 法による抗酸化活性試験	88
4.1.3	メラニンの生成	89
4.2	本論	90
4.2.1	抗酸化活性試験	90
4.2.2	チロシナーゼ阻害活性試験	91
4.3	結論	99
4.4	実験	100
4.4.1	抗酸化活性試験	100
4.4.1.a	緩衝液の作製	100
4.4.1.b	試薬の調製	100
4.4.1.c	活性試験	100
4.4.1.d	ORAC 値の算出	100
4.4.2	チロシナーゼ阻害活性試験	102
4.4.2.a	緩衝液の作製	102
4.4.2.b	試薬の調製	102
4.4.2.c	活性試験	102
4.4.2.d	IC_{50} の算出	102
第 5 章	総括	104
参考文献		106
研究業績		109
謝辞		112

第1章 総論

1.1 食品とその機能性¹⁾⁻²⁾

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。

食品を食べると、栄養素の有無にかかわらず、体内に送り込まれる。そして、栄養素として生命維持に関与するほかに、栄養素でない成分はのなかには各器官の調子を整えたり、免疫力を増強させたりするものもある。おいしそうな匂いを出して食欲をそそる成分もある。そうやって食物はヒトにいろいろな角度から働きかけている。それを「食品の機能」といい、大きく3つに分けられている。

第一次機能は栄養機能であり、我々が生きていく上での活動を支える働きのことである。食品を摂取することで、食品中の栄養素は我々の体内で消化・吸収され、体を構成する成分やエネルギーとなる。

第二次機能は嗜好・食感機能であり、食品における色、味、香り、歯ごたえや舌ざわりなどといった食べた時に「おいしさ」を感じさせる機能である。この機能は、一次機能が満たされた次の欲求として人が求めるものである。

第三次機能は健康性・生体調節機能であり、老化防止、発がん抑制、血圧上昇抑制、免疫増強などに貢献している。この第三次機能は、近年の疾病に対しての一次予防の重要性から大変注目されている機能である。

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。

こうした食品の三次機能の解明は健康を維持・増進していくうえで重要で、今後さまざまな食品が、この三次機能を考慮した上で作られていくものと思われる。

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。

1.2 フレンチパラドックス

フレンチパラドックスの発端は 1980 年代に世界保健機構によって組織された MONICA プロジェクト（世界的規模の冠動脈疾患のモニターシステム）からの報告であった³⁾。

各国における飽和脂肪摂取量や冠動脈性心疾患の危険因子を比較したところ、フランスにおける飽和脂肪酸摂取量はアメリカやイギリスとほとんど変わらなかったにもかかわらず、冠動脈性心疾患による死亡率が低かったことが報告されている（表 1.1, 1.2）³⁾。

つまり、冠動脈性心疾患による死亡率の大小は、ほとんどの国々でそれまで知られていた食生活を含めた生活習慣の良し悪しや危険因子の大小などで説明がつくが、フランスの低い死亡率という逆説的な状況だけは、どうしても説明がつかなかった。

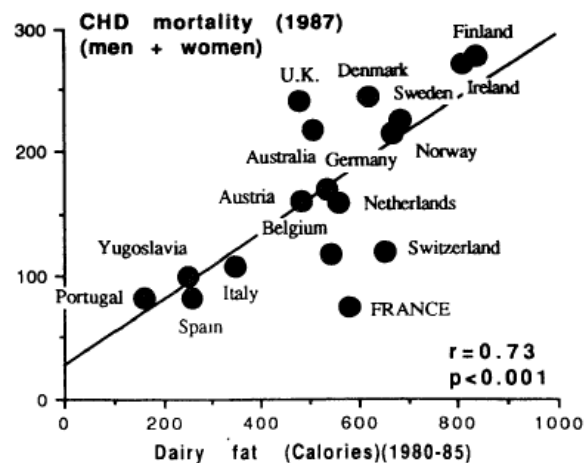
これを冠動脈性心疾患におけるフランスの逆説（フレンチパラドックス）と呼ぶ⁴⁾。

表 1.1 各国における冠動脈性心疾患におけるリスクと死亡率

MONICA centre	Annual CHD mortality/ 100 000 population		Mean serum cholesterol (mg/dl)*		Mean systolic blood pressure (mm Hg)		Proportion of regular cigarette smokers (%)	
	Men	Women	Men	Women	Men	Women	Men	Women
Japan	33	9
Beijing, China	49	27	163	166	130	129	50	16
Toulouse, France	78	11	230	224	133	128	37	17
Strasbourg, France	102	21	218	216	145	137	34	15
Lille, France	105	20	252	248	139	135	39	11
Switzerland	103	17	248	232	132	126	32	21
Stanford, USA	182	48	209	205	128	124	40	37
Belfast, UK	348	88	232	236	135	132	34	33
Glasgow, UK	380	132	244	248	138	134	52	50

Data from ref 1. *mmol/l serum cholesterol = mg/dl ÷ 38.7.

表 1.2 脂肪酸摂取量と冠動脈性心疾患による死亡数の関係



フレンチパラドックスの原因を解く作業はフランス国内の食生活を解析することから始まった。その結果、地中海式の食生活と大量のワイン消費に注目された。また、同じフランス国内でも場所によって少し差異が見られた。

例えば地中海に近い Toulouse での冠動脈疾患による死亡率は人口 10 万人あたり 78 人なのに、内陸部でドイツ国境に近い Strasbourg では 102 人、ベルギー国境、北海に近い Lille では 105 人と、他の地域に比べると Toulouse の死亡率が特に低いことが分かった³⁾。

そこで、これらの地域の食生活の差に着目してみると、Toulouse の食事は同じフランスの他の地域に比べてワインの消費が多く見られた（表 1.3）⁵⁾。

表 1.3 フランスの地域による食生活の差異

	Strasbourg	Toulouse	Lille
<i>CHD mortality/100 000 men</i>	102	78	105
<i>Mean serum HDL cholesterol (mg/dl)</i>	45	52	60
<i>Diet (g/day)</i>			
Bread	164	225	152
Vegetables	217	306	212
Fruit	149	238	160
Butter	22	13	20
Cheese	34	51	42
Vegetable fat	16	20	15
Wine	286	383	267

Data from refs 1-3. About 600 subjects aged 35-64 measured for HDL cholesterol.

これらのことから、フレンチパラドックスの要因にワインが大きく関わっているのではないかと考えられている。

ワインには豊富なビタミン、ミネラル、ポリフェノールが含まれており、特にポリフェノールは抗酸化、血圧降下、殺菌、抗がん作用を有していることがこれまでに報告されている。

例として、Leikert らはワインからポリフェノールを抽出し、その活性試験を行った結果、血管保護性分子として重要な内皮性一酸化窒素（NO）を合成する酵素（eNOS）の発現を増加させたという報告がある⁶⁾。

このことから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。

1.3 ポリフェノール

ポリフェノールは分子内に複数のフェノール性水酸基をもつ化合物の総称であり、野菜や果物など広く植物に含まれ、その種類は1000種以上にも及ぶ。ポリフェノールは、植物の色素や苦味の成分となり、病原体の植物への感染を防ぐ、腐敗を防止するなど、植物にとって重要な働きを持つ。今日、ポリフェノールには抗酸化機能やインスリン抵抗性の低下作用など様々な生理機能が報告されており、その機能性を利用した化粧品や機能性食品の開発が行われている。

ポリフェノールの構造の自然界において以下のような種類に分類することができる (表 1.4) ⁷⁾。

表 1.4 植物中のフェノール化合物の分類

Class	Structure
Simple phenolics, benzoquinones	C ₆
Hydroxybenzoic acids	C ₆ -C ₁
Acetophenones, phenylacetic acids	C ₆ -C ₂
Hydroxycinnamic acids, phenylpropanoids (coumarins, isocoumarins, chromones, chromenes)	C ₆ -C ₃
Napthoquinones	C ₆ -C ₄
Xanthones	C ₆ -C ₁ -C ₆
Stilbenes, anthraquinones	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonoids, isoflavonoids	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignans, neolignans	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonoids	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Lignins	(C ₆ -C ₃) _n
Condensed tannins (proanthocyanidins or flavolans)	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

赤ワインに含まれるポリフェノールにはアントシアニン、フラボノールやスチルベン誘導体などがある (図 1.1)。

特にレスベラトロールは赤ワイン中において主要な抗酸化物質である。

また、レスベラトロールは eNOS 遺伝子の発現を増加させる働きが報告されている ⁶⁾。

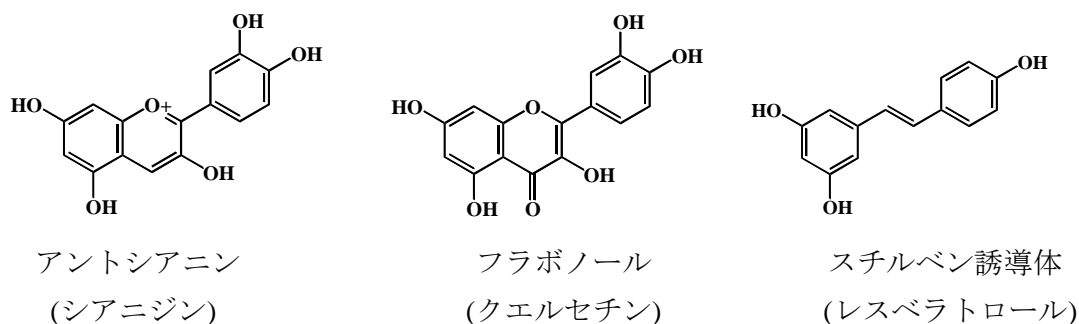


図 1.1 ワインに含まれるポリフェノールの一例

1.4 スチルベン

二重結合のシス・トランス異性により，トランス体（E 体）とシス体（Z 体）が存在するが，熱力学的にはトランス体がより安定である．

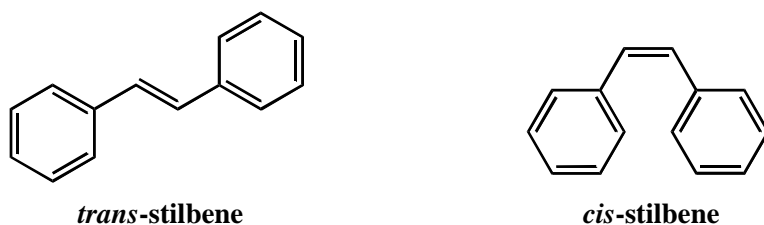


図 1.2 スチルベン構造

化合物名は，19 世紀中期に名づけられたもので，ギリシャ語の *stilbein*（光ること）に由来する．スチルベン，あるいはその誘導体は色素や蛍光増白剤の原料，色素レーザーの利得媒質として用いられる．

天然においては，植物中にスチルベンの誘導体（スチルベノイド）が植物中に見られる．その例がレスベラトロールである．

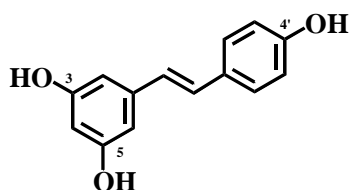


図 1.3 レスベラトロールの構造

スチルベンはジアリールエテン類の中の最も単純な化合物であり，アゾベンゼン同様，紫外光の照射によりシス・トランス異性化を行う．

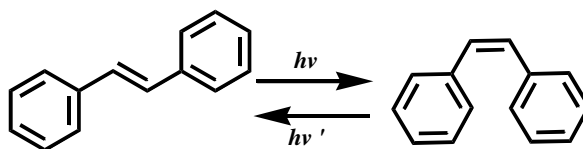


図 1.4 シス，トランス異性

スチルベンは植物において、フェニルアラニン / ポリマロネート経路によって生合成される (図 1.5) .

シキミ酸経路によって合成されたフェニルアラニンとチロシンは酵素によってそれぞれ図 1.5 のように生合成される.

フェニルアラニンはフェニルアラニンアンモニアリラーゼ(PAL)によって桂皮酸を経て、さらに、桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼとなり、p-ヒドロキシ桂皮酸へと合成され、チロシンはチロシンアンモニアリラーゼ(TAL)によって p-ヒドロキシ桂皮酸へと変換される. その後、スチルベンシンターゼ(STS)によってレスベラトロールへと生合成される⁸⁾.

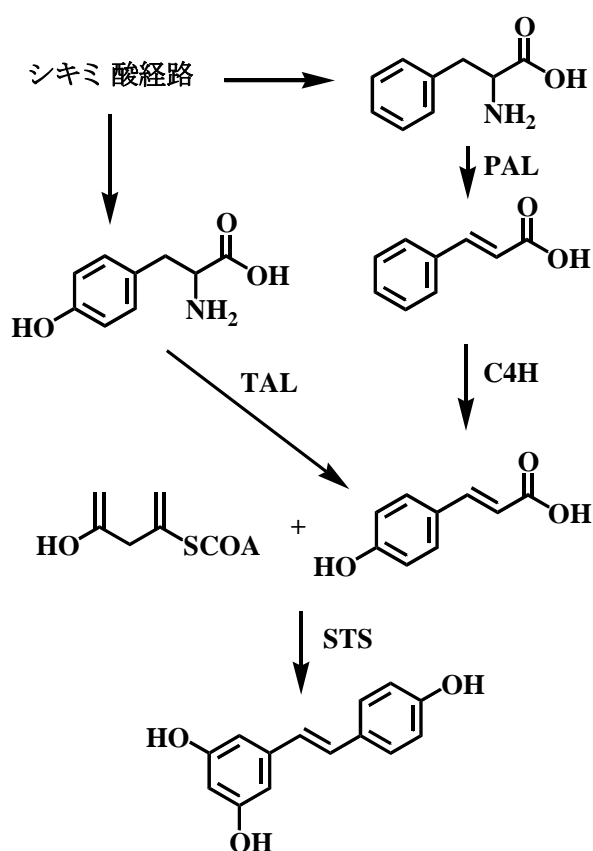


図 1.5 スチルベンの生合成

また、ブドウの果実のファイトアレキシンとして見いだされたレスベラトロールはもっとも構造の簡単なスチルベンながら強い抗酸化作用があり発癌予防効果があるという報告があり注目を集めつつある. 従って、ナンキンマメなどレスベラトロールに富む食材や生薬を発癌予防のサプリメントとして応用する研究が活発に行われている. 中国ではイタドリの栽培によりレスベラトロールの大量供給が計画されていることは本物質に対する市場の関心の高さがうかがえる. 最近、レスベラトロールの酸化カップリングにより生成したオリゴスチルベンやスチルベン誘導体の植物からの単離報告が多く、タンニンに次ぐポリフェノールとして今後の研究の展開が注目されている.

1.5 レスベラトロール

レスベラトロールはポリフェノール類の中でも、様々な生理機能を持つことで特に注目されている。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。

さらに近年では、レスベラトロールはニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD⁺)依存性タンパク質脱アセチル化酵素である SIRT1 を活性化することが報告された⁹⁾。SIRT1 は、胎児期における心臓形成や神経細胞の分化、酸化ストレスからの細胞保護など非常に多様でかつ大切な生理的役割をおこなうことが明らかとなってきた¹⁰⁾⁻¹⁴⁾。レスベラトロールが SIRT1 活性化を介して酸化ストレスに対する細胞耐性を増加させ、さらに、酸化ストレスがその悪化に大きな役割を果たしている慢性心不全について、遺伝性に慢性心不全を発症するハムスターを用いて、レスベラトロールの経口投与が心不全の悪化を抑制し、有意に寿命を延長することが明らかとなっている。

様々な機能を持っており、サプリメントとしても注目されているが水溶性、安定性の面で課題が残っている¹⁵⁾。

1.6 配糖体

植物や糸状菌、細菌などは、二次代謝産物と呼ばれる特定の種特異的で多様な化合物群を生合成し、自らの生存戦略に利用している。これらの化合物は、その骨格形成のあとしばしば糖付加修飾（配糖化）を受けて蓄積されることが知られている。一般に、配糖化を受けた化合物は、元の化合物と比べて水に溶けやすくなる、化合物自体の安定性が増大する、などその物性が大きく変化することから、生理活性物質の機能調節や、物質の貯蔵、解毒などに寄与すると考えられている。植物における配糖化による水溶性の増大は、疎水性の高い分子の局所的濃度を高める効果があり、これにより液胞などの特定の細胞内区画に分子を貯蔵することが可能となる¹⁶⁾。安定性の向上としては分子の分解や化学変化、揮発などを防ぐ役割を果たす¹⁷⁾⁻¹⁹⁾。植物の香気成分は不安定で、アグリコンの状態であると早い段階で揮発してしまう。そこで植物は、体内で配糖化を行うことで、安定に香気成分を貯蔵している。さらに、香りを発する際にはグルコシダーゼで加水分解され、香気成分としての役割を果たす。このように配糖体は、植物の代謝恒常性を保つ働きがあると考えられる。

配糖体の多くは、基質の水酸基に糖が結合した *O*-配糖体である。*O*-配糖体は、特定のグリコシダーゼや酸による糖部の加水分解によって元の化合物に戻すことが可能な「可逆的」な生成物である。上述のように、配糖化修飾は化合物の物性を変化させるとともにその生理活性を調節することが可能となることから、配糖化は化合物の利用の観点においても重要な反応であるといえる。

さらに、配糖体は *O*-配糖体だけではなく、窒素を仲立ちとした *N*-配糖体、炭素間で結合した *C*-配糖体、スルホン酸に結合した *S*-配糖体などが存在する(図 1.6)。

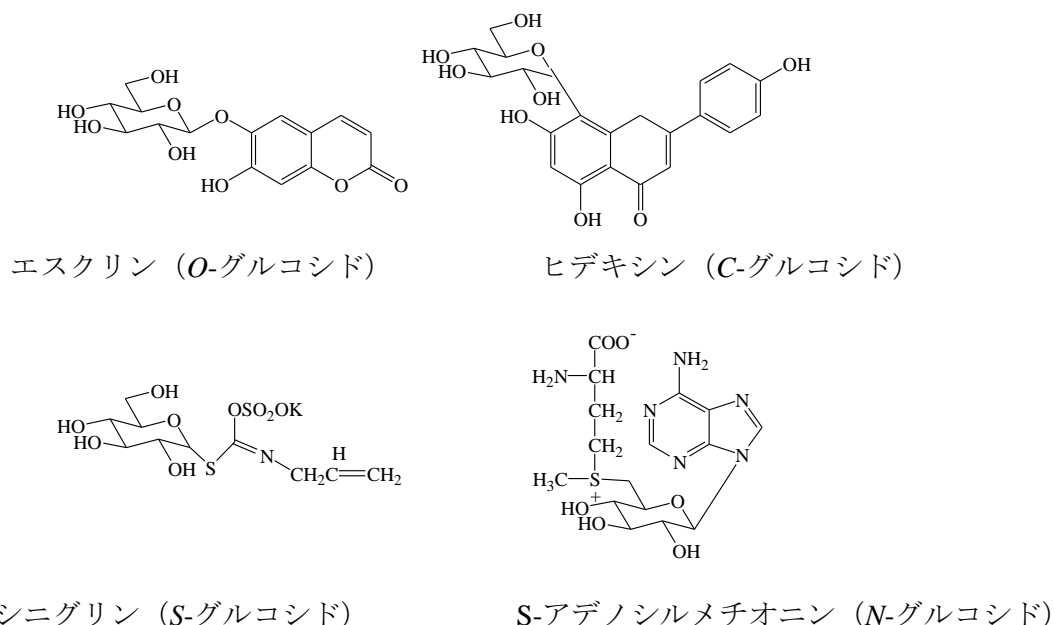


図 1.6 さまざまな結合様式の配糖体

1.7 植物培養細胞

1.7.1 組織培養の歴史

高等植物の *in vitro* 培養の試みは 19 世紀末に始まったとされている。多くの研究者らによって培地組成、培養環境、植物材料などについて研究が進められ、1939 年に White が未分化状態で増殖中のタバコ(*Nicotiana tabacum*)のカルスから不定芽の分化を観察した。その後、1950 年代に Skoog らがプリン核を持つ核酸分解物に強い細胞分裂促進効果があることを見出し、植物ホルモンの一種であるカイネチンを発見した²⁰⁾(図 1.7)。

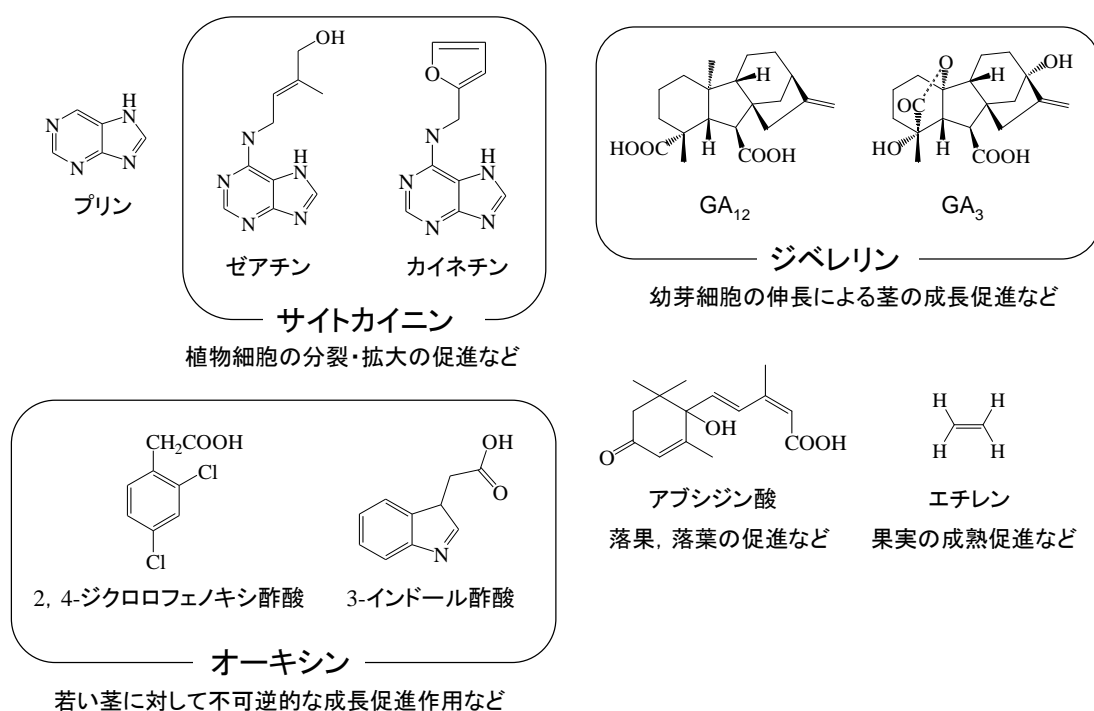


図 1.7 植物ホルモンの種類

植物培養細胞から完全な個体を作り出す試みは、1958 年に Steward らによってニンジン (*Daucus carota*)の根組織由来カルスで行われた。培養中の細胞が完全な植物体に成長する過程は、受精卵から胚発生への過程と類似しているため、不定胚形成と呼ばれている。現在、この不定胚形成は多くの植物で見られることが確認されており、分化機構の研究で重要な実験系として利用されている²¹⁾。

1.7.2 生体触媒としての応用

生体触媒とは生体が作る触媒、及びそれは含む入れ物としての細胞それ自体を意味している。生体触媒反応に用いる酵素や微生物、菌体、植物培養細胞などを総括して生体触媒と呼ぶ。

植物はフラボノイドを始め、サポニンやアルカイドなどの有用な二次代謝産物を生産し、その種類は 10000 種近くにも上る。二次代謝産物とは、全ての生物に存在するわけではないが、天然に見出されている物質が多数あり、生体物質として多量に蓄積している化合物を示す。これに対して、タンパク質や炭水化物、核酸のような生命にとって不可欠な生体物質を一次代謝産物という。したがって二次代謝産物のような高等植物成分は、すべて一次代謝系から分岐したり、一次代謝産物から合成されたものである²²⁾。

これら二次代謝産物は、植物に特有のものや、構造が複雑で化学合成による工業的生産が困難また不可能なものが多い、そのうえ、一般に化学反応は高温高压条件下で行われる。例として、アンモニアを生産するハーバー・ボッシュ法は、200 ～ 350 気圧の圧力と、500 度という高温高压条件下で反応させる必要がある²³⁾。したがって、反応装置は巨大なものとなり、事故の危険性や廃棄物による汚染も問題となってくる。

一方、植物培養細胞が行う反応には酵素が関与しており、過激な反応条件を必要としない。また、酵素の特徴として高い基質特異性や反応特異性を持つため、副生成物が少なく済む。また、植物培養細胞は元植物の遺伝情報を全て備えているため、物質代謝に関しても同様の情報を持っていることを示している。よって、植物培養細胞が植物成分の生産手段となりうるものが原理的に期待できる。そこで、植物細胞、器官および組織を *in vitro* で大量に培養することで、有用な植物成分を計画的に生産し、その安定供給を行う試みが近年進められている。

1.7.3 植物培養細胞の利用とその利点

物培養細胞は、芳香族系の外来性化合物を効率よく配糖化することが知られていた。この配糖化反応は植物の特徴であり、微生物では稀にしか起こらない。芳香族系化合物以外にも、サリチル酸、カプサイシン、ジギトキシゲニンなどが植物培養細胞によって効率的に配糖化されている。配糖化だけでなく、微生物を利用したときと同様に水酸化、酸化還元、メチル化、脱メチル化、エポキシ化、縮合、異性化などの変換も行うことが知られている。

植物が配糖体を合成する場合、さまざまな糖が付加する。しかし、一般に植物培養細胞に配糖化を行わせると、ほとんどの場合グルコースが付加した配糖体が得られる。これは、細胞内でフラボノイドのような二次代謝産物が生合成される場合と、外来基質を解毒したり貯蔵したりする場合では条件が異なるからだと考えられている²⁴⁾。

この他にも、植物培養細胞は一個の単細胞から完全な植物体を再生する事が可能であり、以下の様な点で非常に有効なものである(表 1.5)。

我が研究室でも、植物培養細胞を生体触媒として利用するための基礎研究として植物培養細胞のもつ特異的物質変換機能の解明と、その機能を生体触媒として有機合成に利用し、優れた生理活性を有する化合物の高機能化を主な目的と外来基質の物質変換研究を行っている。

表 1.5 植物培養細胞の利点

1. 希少植物の増殖
増殖が難しい植物や自然環境下で絶滅しかけている植物の増殖に利用。
2. 遺伝変異の拡大
遺伝子導入や細胞融合などを利用した遺伝変異の拡大（品種改良）。
3. 有用物質の生産
より小さな設備で有用物質を大量に回収できる。
4. 育種年限の短縮
薬培養によって作物の品種改良でもっとも時間がかかる、遺伝子をホモ接合の形に固定して分離しなくする作業が短縮できる。
5. 遺伝資源の保持
培養組織の形で生きた細胞を保存。種子のできにくいものや、種子の発芽率が低く長期保存できないものに対応できる。
6. 植物生理の解明
植物の生命現象を研究する際、管理された人工環境化で増殖する培養組織は扱いやすい材料となり、計測分析も容易になる。

以下にこれまでの研究成果について報告する。

トウガラシの辛味成分のひとつ、カプサイシンをヨウシュヤマゴボウ培養細胞に投与することで、配糖体を得た(図 1.8)²⁵⁾。

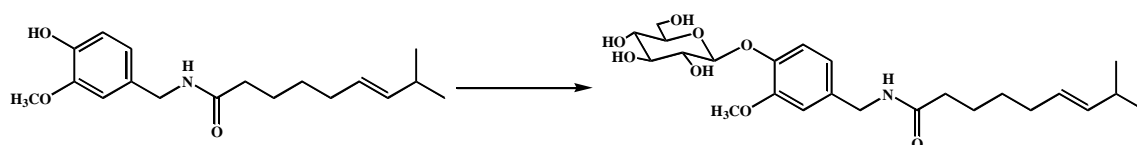


図 1.8 植物培養細胞によるカプサイシンの変換

得られた配糖体を用いて、ラットを用いたダイエット実験、コレステロール実験、脂質代謝実験を行なった結果、辛味を抑えつつ、カプサイシンと同等の高いダイエット効果、コレステロール抑制効果、脂質代謝改善効果を有することを報告している。

茶の渋み成分のひとつ、カテキンをツキヌキユーカリ培養細胞に投与した。その結果、配糖体を得られ、色沢安定性試験を行なったところ、着色を抑えることがわかった(図 1.9)。

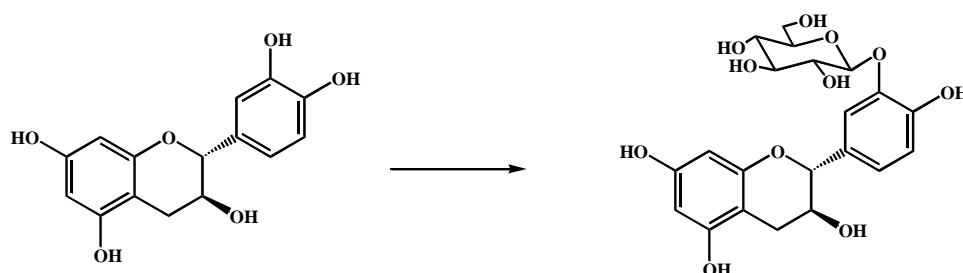


図 1.9 植物培養細胞によるカテキンの変換

また、水酸基への配糖化だけでなく、カルボン酸や *N*-配糖化も報告されている(図 1.10)²⁶⁾。

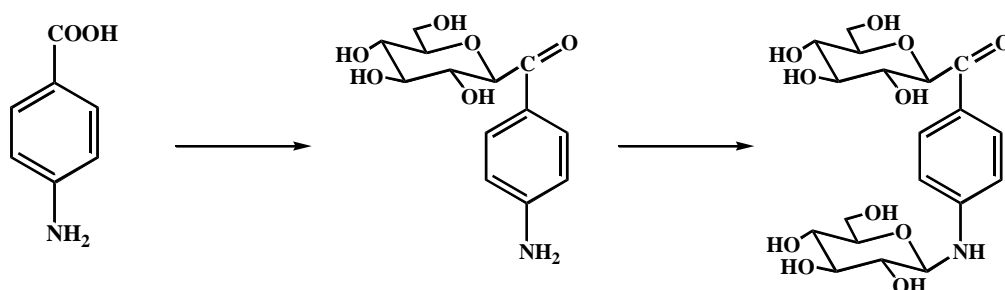


図 1.10 植物培養細胞による 4-アミノ安息香酸の変換

このほかにも、ステロイド類²⁷⁾⁻³⁸⁾、テルペノイド類³⁹⁾⁻⁴⁶⁾、などが報告されている。

また、Pawlowicz らによる acetate を立体選択的に加水分解した報告⁴⁷⁾や、菅らのモノテルペン類の選択的酸化還元反応に関する報告もされている⁴⁸⁾。

1.8 本研究の目的

本研究では、機能性化合物であるレスベラトロール及びその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、ピセアタンノール及びイソラポンチゲニンを用いて配糖化を行った。その方法として、安全かつ低コストで、環境にやさしい反応として植物培養細胞の中でもフラボノイド等の配糖化に関して高い反応性がみられた、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を生体触媒として用いた。また、植物培養細胞において、配糖化の効率化・位置選択的配糖化を制御する目的で反応条件である、時間、植物ホルモン、光条件を変化させ検討を行った。

また、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(*PaGT3*)を用いて酵素反応を行い、植物培養細胞を用いた物質変換結果との比較や基質特異性や動力学定数などの酵素化学的諸性質を検討し、反応メカニズムの解明を行った。

さらに、得られた化合物において、抗酸化活性及びチロシナーゼ阻害活性試験を行い、機能性の評価を行った。

第 2 章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を用いたスチルベン誘導体の物質変換

2.1 序論

レスベラトロールを含むスチルベン誘導体は、これまでに様々な研究が行われてきており、様々な機能が明らかとなっており、非常に有用な化合物である⁹⁾⁻¹⁵⁾。

しかし、前章でも示した通り、水溶性の低さ、安定性の低さから使用が制限されている。

そこで化学的工夫として配糖化に注目した。

配糖化を行うことで、水溶性の増大や安定性の向上が期待できる。

また、配糖化を行うにあたって、安全かつ環境にやさしい変換として植物培養細胞を生体触媒とする変換に注目し当研究を行った。

ここではヨウシュヤマゴボウ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の物質変換を行った。さらに位置選択的配糖化の条件を検討として、酵素反応や有機合成においても重要である反応時間の検討、植物の成長において必要である植物ホルモンと光条件による検討を行った。

また、レスベラトロールを用いて変換した際に決定した条件を用いて他の植物由来のスチルベン誘導体の変換も行った。

さらに経時変化を測定することでヨウシュヤマゴボウ培養細胞における変換経路の解明を行った。

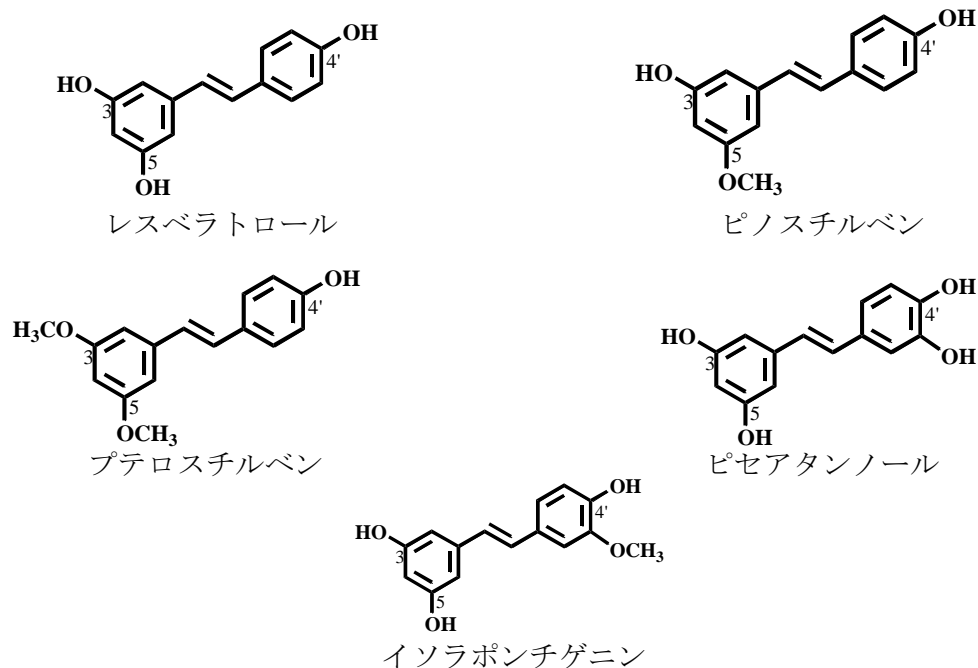


図 2.1 本研究において用いたスチルベン誘導体

2.2 本論

2.2.1 ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) 培養細胞によるレスベラトロールの物質変換

3%スクロース, 0.5 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した Murashige and Skoog (MS)液体培地で白色光(2000 lx), 25°C, 120 rpm で2週間振とう培養した *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞に, ジメチルスルフォキシド(DMSO) 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 0.04 mmol を投与し, 48 時間反応を行った. 反応後, ナイロンメッシュを用いて培地部と細胞部に濾別した.

細胞部は海砂 B を用いてホモジナイズを行いメタノール (MeOH) を加えて静置抽出を行い, 得られた MeOH 抽出物を濾過, 濃縮を行い, 酢酸エチル(EtOAc)と蒸留水を加え分配抽出を行った. さらに EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした.

培地部は, そのまま EtOAc を加えて分配抽出を行い, 細胞部と同様に EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした. 方法の詳細は実験 2.4 に示す.

それぞれのサンプルを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて変換物を確認後, 分取 HPLC を用いて変換物 1 と 2 を単離精製した. また, この変換物 1, 2 を質量分析(ESI/MS), 核磁気共鳴装置(NMR)により構造解析を行った. 詳細は実験 2.4 に示す.

ESI/MS の結果より, レスベラトロールに糖 1 分子結合した質量が観測された. また, ^1H NMR (図 2.2) および ^{13}C NMR (図 2.3) の解析結果から, 出発物質であるレスベラトロールおよびグルコースと思われるシグナルを確認した.

また, ^1H NMR より, 糖の 1'位であるアノメリックプロトンが 4.92 ppm にダブルットシグナルで結合定数が 7.2 Hz であったことから, β -結合であると考えられた.

これらのことより, 変換物 1 はレスベラトロール配糖体であると考えられる. さらに, 本化合物の詳細な解析を行うために二次元測定を行った.

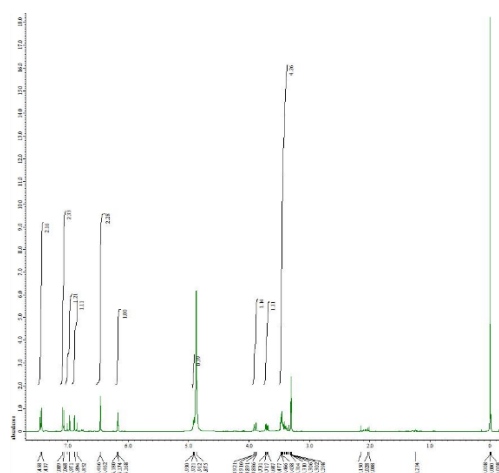


図 2.2 変換物 1 の ^1H NMR

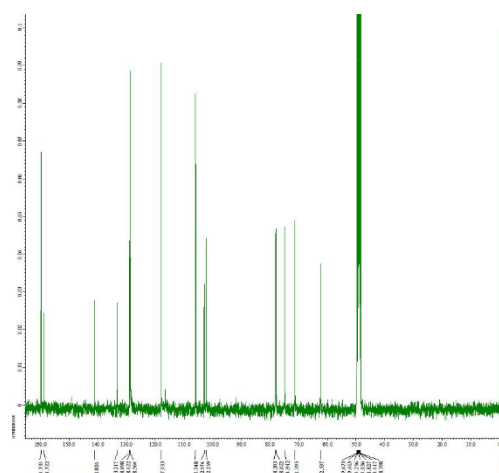


図 2.3 変換物 1 の ^{13}C NMR

まず、直接結合する炭素と水素を検出する ^1H - ^{13}C HMQC スペクトル測定を行うことでそれぞれの水素と炭素の相関を確認した (図 2.4)。

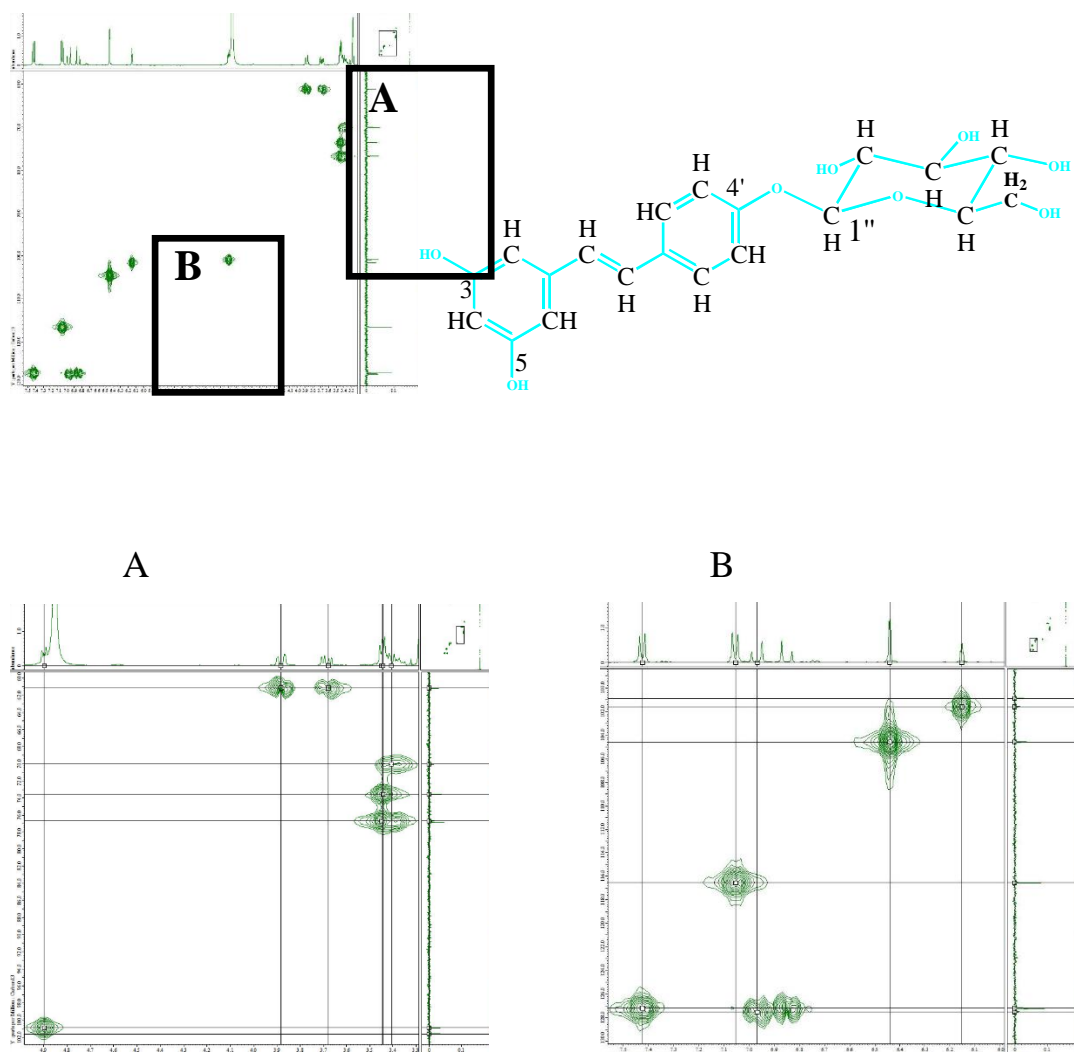


図 2.4 変換物 1 の HMQC スペクトル

次に、隣り合う水素同士を検出する ^1H - ^1H COSY スペクトル測定において 7 位と 8 位, 2'位と 3'位, 1''位と 2''位および 4''から 6''までの相関が確認された (図 2.5)。

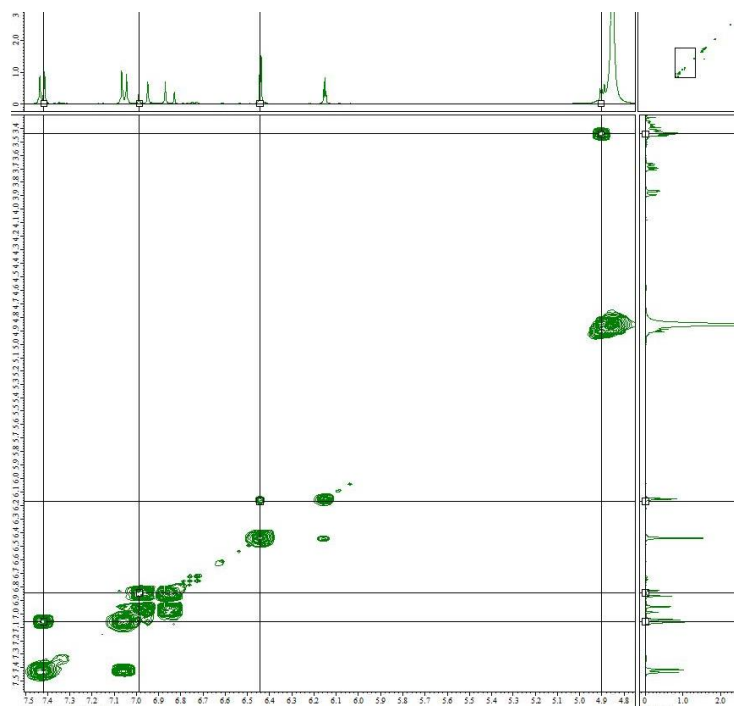
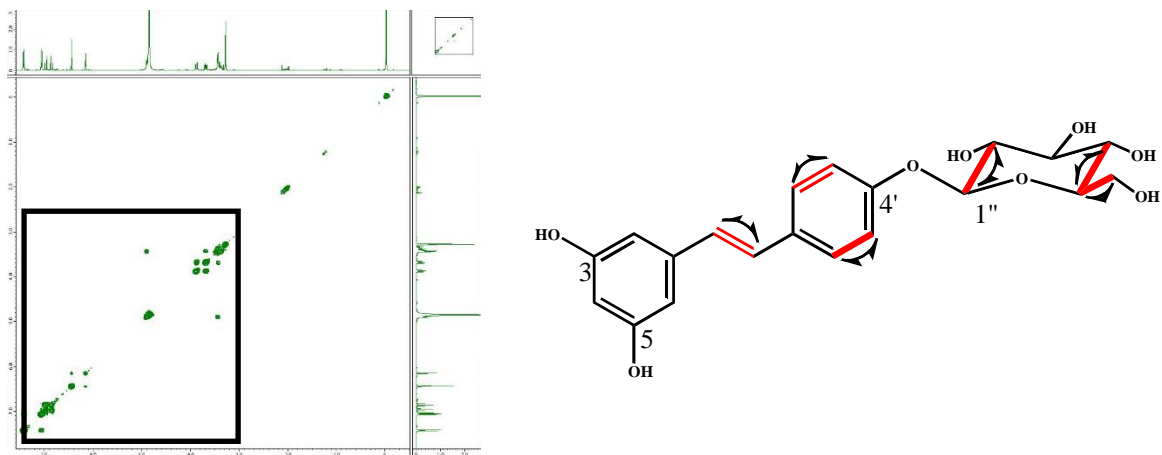


図 2.5 変換物 1 の ^1H - ^1H COSY スペクトル

続いて、ロングレンジスピン結合している水素と炭素を検出する HMBC スペクトル測定を行った (図 2.6)。

その結果、図 2.6 において矢印で示すような相関が確認された。特に、糖の 1''位であるアノメリックプロトンとレスベラトロールの 4'位に相関が見られたことから、糖は、レスベラトロールの 4'位に結合した配糖体であると示唆される。

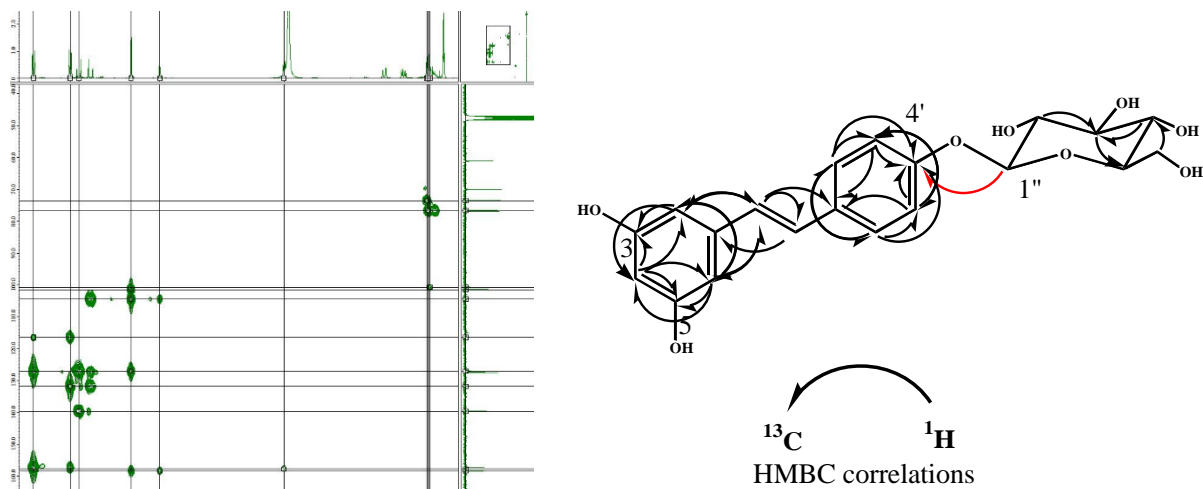


図 2.6 変換物 1 の HMBC スペクトル

最後に、糖の種類の決定を行うため、空間的に近接した水素同士を検出する NOESY スペクトル測定を行った(図 2.7). その結果 1''位と 5''位, 2''位と 4''位の水素同士に相関が見られたことからレスベラトロールの 4''位に結合した糖はグルコースであると決定した.

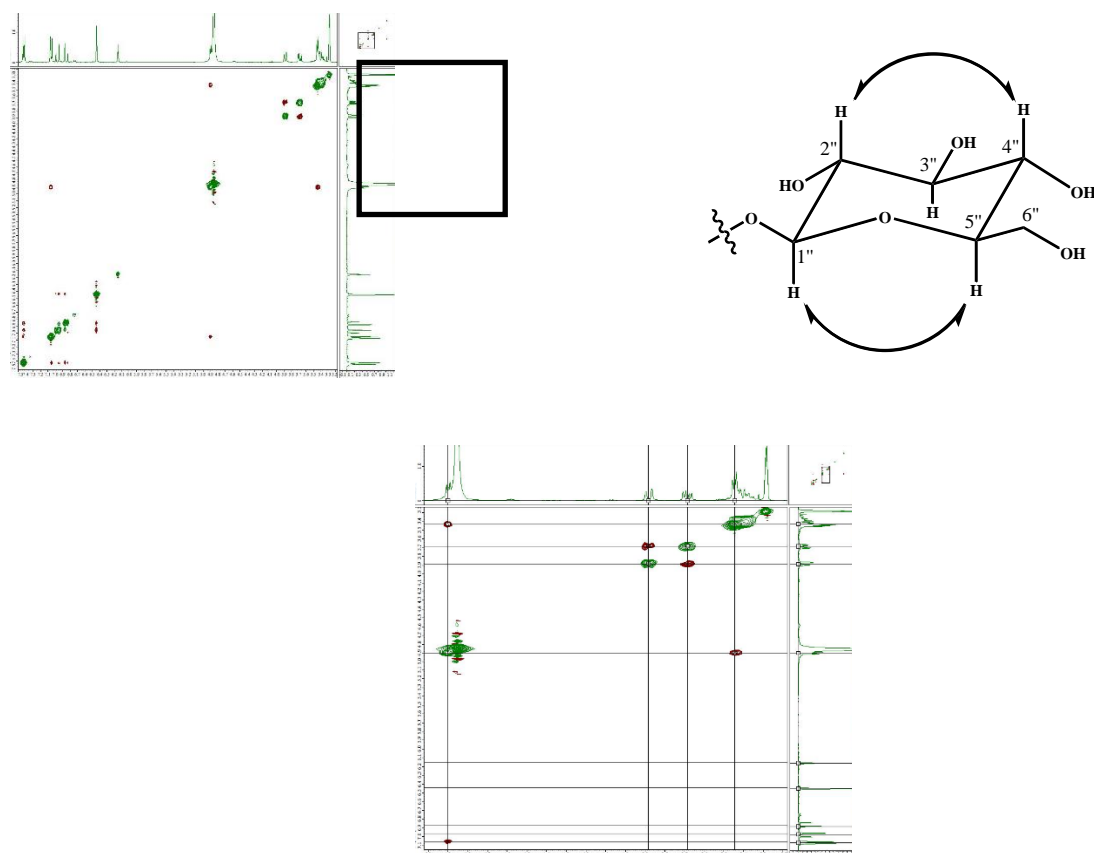


図 2.7 変換物 1 の NOESY スペクトル

以上のことより変換物 1 は Resveratrol-4'-O- β -D-glucoside であると決定した(図 2.7).

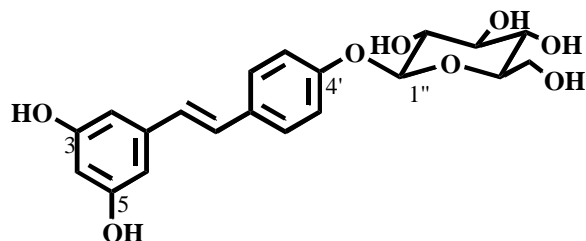


図 2.8 変換物 1 の構造式

変換物2に関しても同様に解析を行っていった結果, ESI/MS の結果より, レスベラトロールに糖 1 分子結合した質量が観測された. また, ^1H NMR (図 2.9) および ^{13}C NMR (図 2.10) の解析結果から, 出発物質であるレスベラトロールおよびグルコースと思われるシグナルを確認した. また, ^1H NMR より, 糖の 1'' 位であるアノメリックプロトンが 4.90 ppm にダブレットシグナルで結合定数が 7.2 Hz であったことから, β -結合であると考えられた.

これらのことより, 変換物においてもレスベラトロール配糖体であると考えられた.

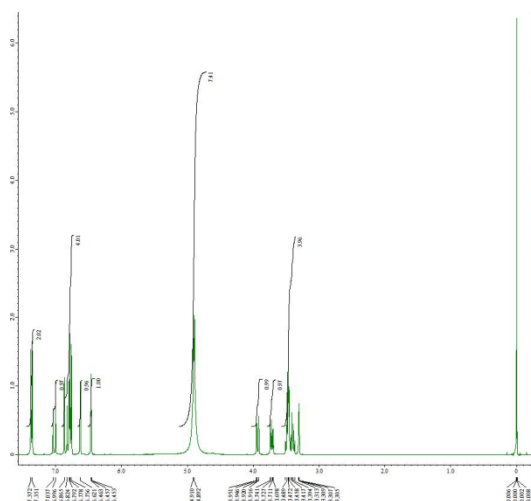


図 2.9 変換物 2 の ^1H NMR

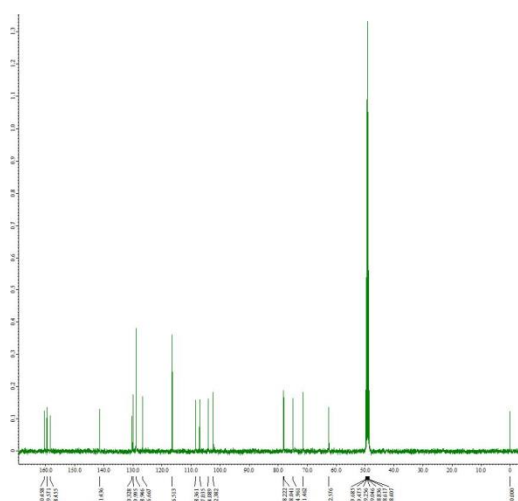


図 2.10 変換物 2 の ^{13}C NMR

また, 2 次元構造解析の結果 (図 2.11) から HMBC スペクトル測定において, アノメリックプロトンと 3 位の炭素に相関が見られたことから変換物 2 は Resveratrol-3-O- β -D-glucoside であると決定した (図 2.12) .

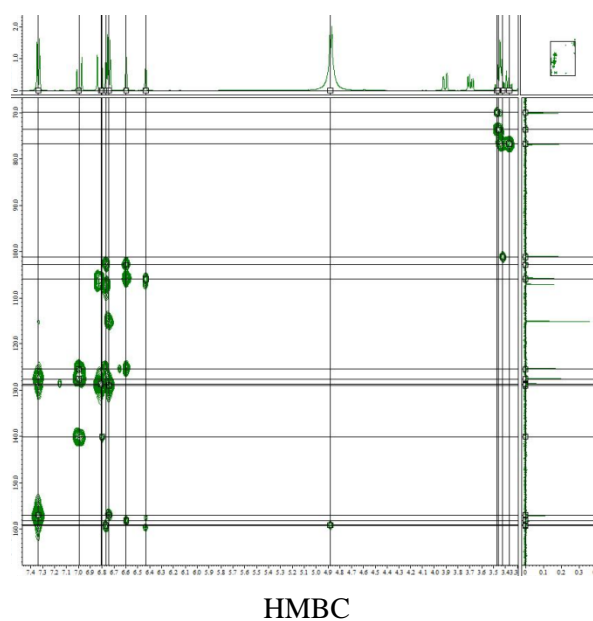
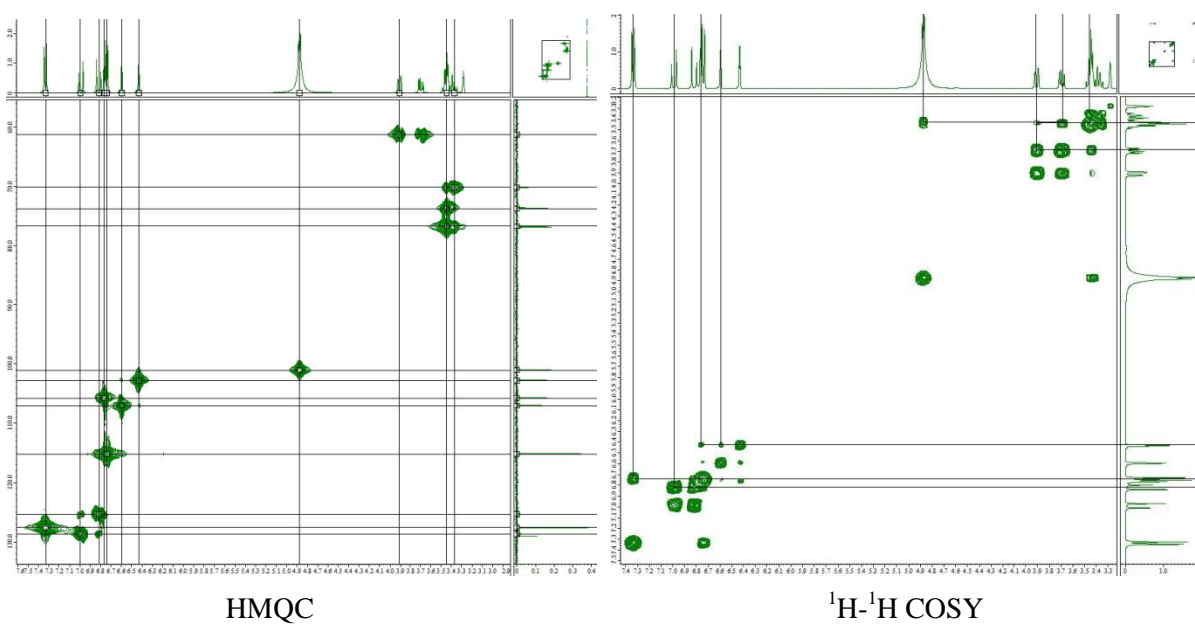


図 2.11 変換物 2 の二次元構造解析スペクトル

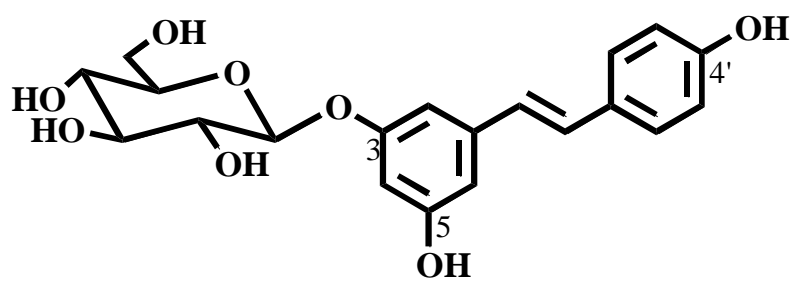


図 2.12 変換物 2 の構造式

2.2.2 植物培養細胞による物質変換における反応条件の検討

2.2.2.1 培養時間の検討

3%スクロース, 0.5 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した Murashige and Skoog (MS) 液体培地で白色光(2000 lx), 25°C, 120 rpm で2週間振とう培養した *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞に, ジメチルスルフォキシド(DMSO) 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 0.04 mmol を投与し, 振盪培養を行った.

今回, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 時間と反応時間を変化させた.

反応後, ナイロンメッシュを用いて培地部と細胞部に濾別した.

細胞部は海砂 B を用いてホモジナイズを行い MeOH を加えて静置抽出を行い, 得られた MeOH 抽出物を濾過, 濃縮を行い, EtOAc と蒸留水を加え分配抽出を行った.

さらに EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした.

培地部は, そのまま EtOAc を加えて分配抽出を行い, 細胞部と同様に EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした. 詳細は実験 2.4 に示す.

それぞれのサンプルを HPLC によって変換物を確認したところ, 実験 2.2.1 で得られた レスベラトロール配糖体が確認できた.

時間による変換率を算出し図に示したところ, 各配糖体は 24 時間から生成されてゆき, 48 時間から位置選択的配糖化に大きな差異が見られた (図 2.13) .

72 時間においてさらに大きな差異が見られたが, 実験の効率等を考慮して以降の実験に関しても反応時間は 48 時間で行うこととする.

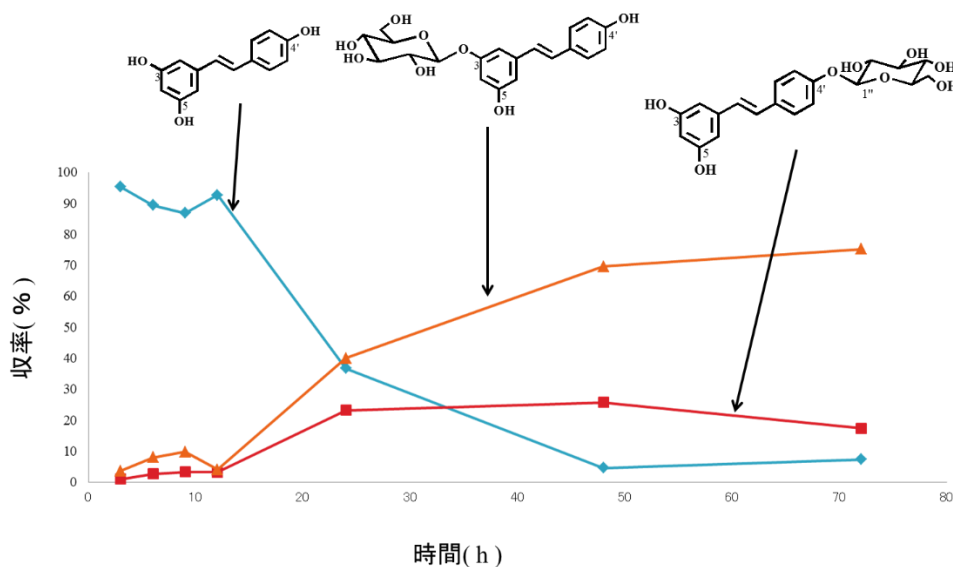


図 2.13 経時変化のグラフ

2.2.2.2 植物ホルモンによる検討

3%スクロース, 0.5 ppm を添加した Murashige and Skoog (MS)液体培地に植物ホルモンとして, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzylaminopurine (BAP), Kinetin, Indole-3-acetic acid(IAA), を加えて白色光(2000 lx), 25℃, 120 rpm で 6 ヶ月間継代培養を繰り返した.

また, 比較物として, ホルモンを添加していないホルモンフリー培地(HF)も作製した.

この *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞に, ジメチルスルフォキシド(DMSO) 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 0.04 mmol を投与し, 48 時間反応を行った. 反応後, ナイロンメッシュを用いて培地部と細胞部に濾別した.

細胞部は海砂 B を用いてホモジナイズを行い MeOH を加えて静置抽出を行い, 得られた MeOH 抽出物を濾過, 濃縮を行い, EtOAc と蒸留水を加え分配抽出を行った.

さらに EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした.

培地部は, そのまま EtOAc を加えて分配抽出を行い, 細胞部と同様に EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした. 詳細は実験 2.4 に示す.

それぞれのサンプルを HPLC によって変換物を確認したところ, 実験 2.2.1 で得られたレスベラトロール配糖体を確認できた.

IAA に関しては, 培養細胞自体がうまく育たずに変換することが出来なかった.

BAP, HF, Kinetin においては 4'位配糖体の変換率が 3 位に比べて少し高かったが全体的な変換率は 2,4-D が最も高かった. また 2,4-D において 4'位配糖体よりも 3 位配糖体の変換率が高く, 変換率にも大きな差が見られた(図 2.14).

このことから植物ホルモンについては 2,4-D が適していると判断した.

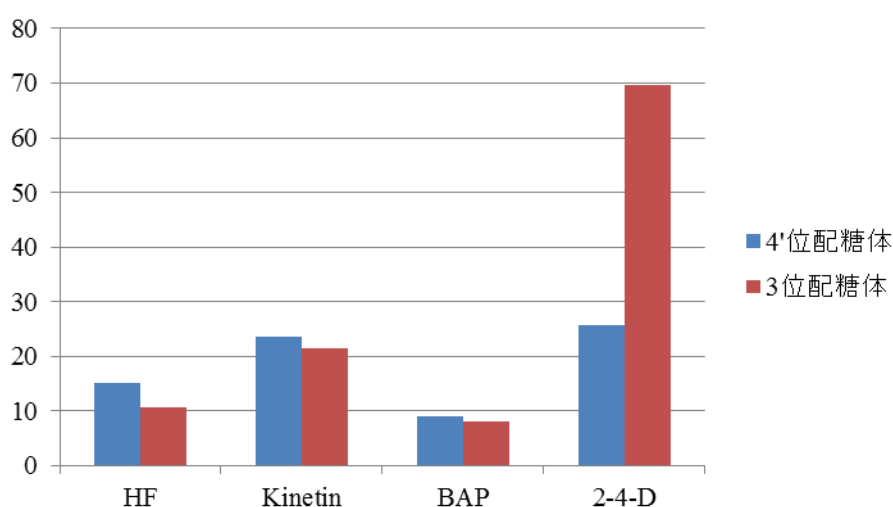


図 2.14 植物ホルモンによる検討

2.2.2.3 光条件における検討

3%スクロース, 0.5 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した Murashige and Skoog (MS) 液体培地で, 暗条件下, 25°C, 120 rpm で振とう培養した *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞に, DMSO 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 0.04 mmol を投与し, 48 時間反応を行った. 反応後, ナイロンメッシュを用いて培地部と細胞部に濾別した.

細胞部は海砂 B を用いてホモジナイズを行い MeOH を加えて静置抽出を行い, 得られた MeOH 抽出物を濾過, 濃縮を行い, EtOAc と蒸留水を加え分配抽出を行った.

さらに EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした.

培地部は, そのまま EtOAc を加えて分配抽出を行い, 細胞部と同様に EtOAc 層を塩析・脱水し, 濃縮後, MeOH 1 mL で溶解し, サンプルとした.

それぞれのサンプルを HPLC により分析を行った結果, 明条件下ヨウシュヤマゴボウ培養細胞で得られた変換物に加えて 2 種類の変換物を確認した. これらを変換物 3 および 4 として分取 HPLC を用いて単離精製した. また, この変換物 3, 4 の構造解析を行った.

方法の詳細は実験 2.4 に示す.

変換物 3 について, ESI/MS の結果より, レスベラトロールに糖 1 分子およびメチル基が 2 分子結合した質量が観測された. また, ^1H NMR (図 2.15) および ^{13}C NMR (図 2.16) の解析結果から, 出発物質であるレスベラトロールおよびグルコースと思われるシグナルを確認した. それに加えて, 3.79 ppm にメトキシ基と思われるシグナルが 2 分子分確認された.

また, ^1H NMR より, 糖の 1"位であるアノメリックプロトンが 4.92 ppm にダブレットシグナルで結合定数が 8.0 Hz であったことから, β -結合であると考えられた.

これらのことより, 変換物はレスベラトロールにメトキシ基が 2 分子結合した プテロスチルベン の配糖体であると考えられる.

さらに, 本化合物の詳細な解析を行うために二次元測定を行った.

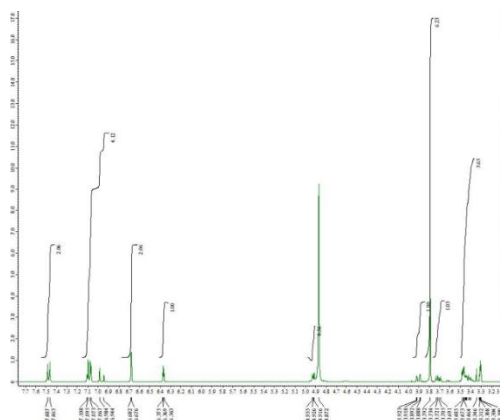


図 2.15 変換物 3 の ^1H NMR

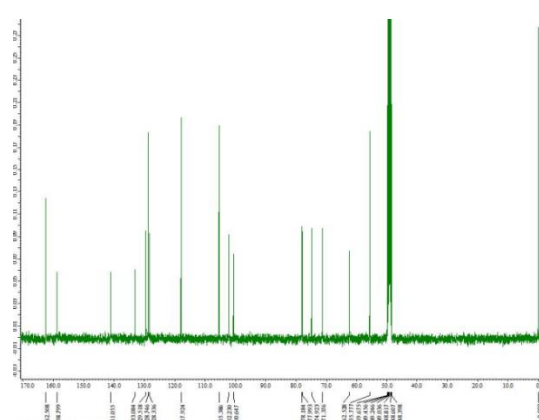


図 2.16 変換物 3 の ^{13}C NMR

二次元構造解析の結果, HMBC スペクトル測定においてアノメリックプロトンが 4'位の炭素と相関が確認されたことから, 変換物3はスチルベン誘導体の4'位配糖体であることが明らかとなった(図 2.17)。また, メトキシ基の水素と 3 位, 5 位の炭素に相関が見られたことから, 変換物 3 はレスベラトロールの 3 位と 5 位の水酸基がメチル化され, 4'位が配糖化された, Pterostilbene-4'-O- β -D-glucoside であると決定した(図 2.18)。

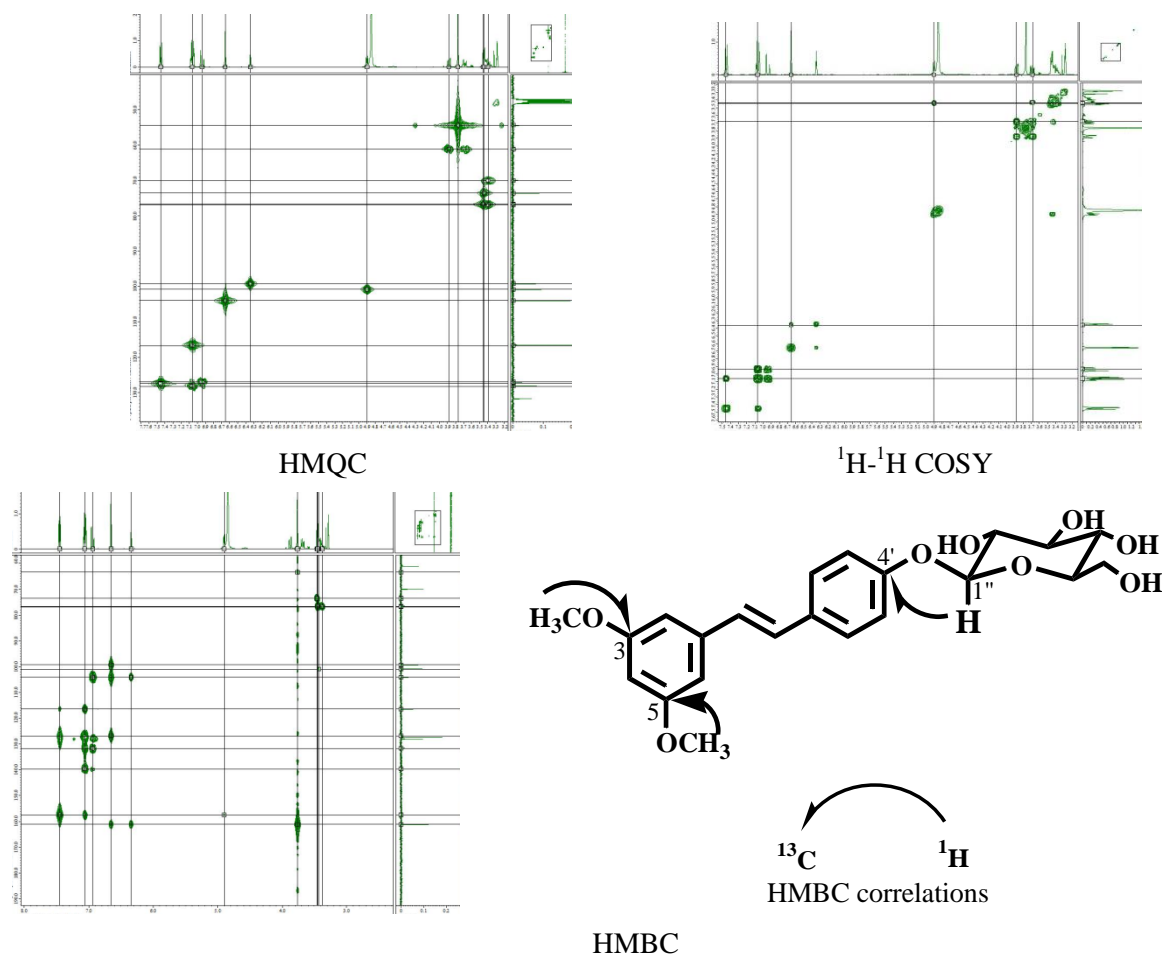


図 2.17 変換物 3 二次元構造解析スペクトル

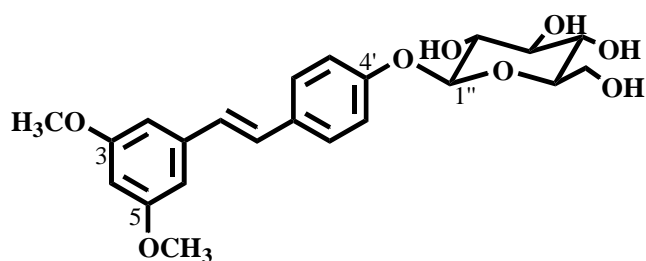


図 2.18 変換物 3 の構造式

変換物 4 については、 ^1H NMR (図 2.19) および ^{13}C NMR (図 2.20) の解析結果から、出発物質であるレスベラトロールおよび、3.76 ppm にメトキシ基と思われるシグナルが 1 分子分確認された。

このことより、レスベラトロールの水酸基が 1 ヶ所メチル化された化合物であると考えられた。

また、詳細な解析を行うため、二次元スペクトル測定を行った結果、HMBC スペクトル解析 (図 2.21) によって、メトキシ基の水素と 3 位の炭素に相関が見られたことから、変換物 4 は Pinostilbene であると決定した (図 2.22)。

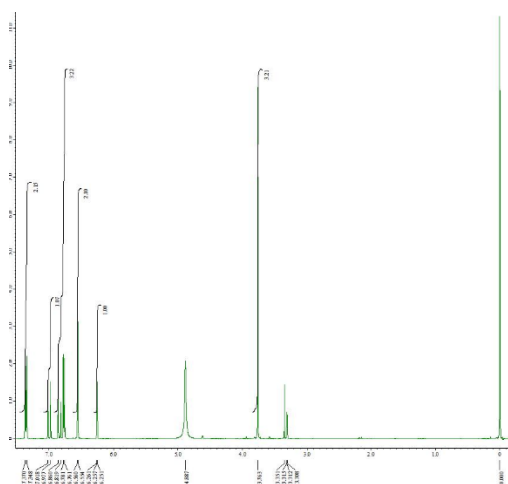


図 2.19 変換物 4 の ^1H NMR

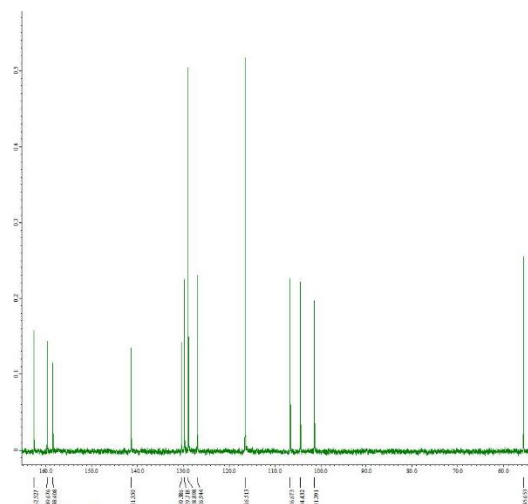


図 2.20 変換物 4 の ^{13}C NMR

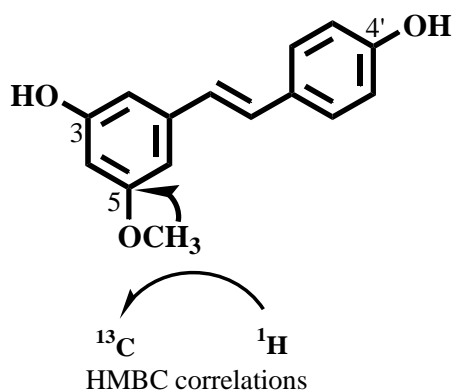
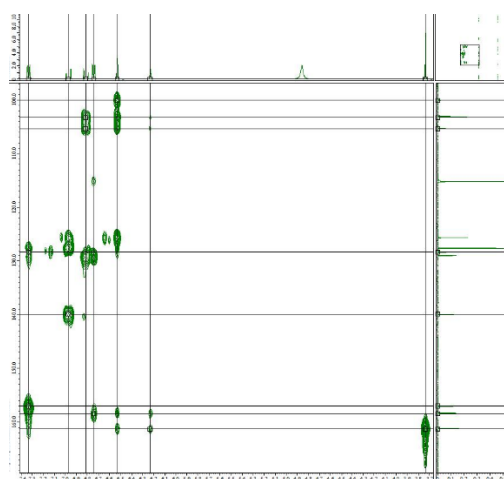


図 2.21 変換物 4 の二次元構造解析スペクトル

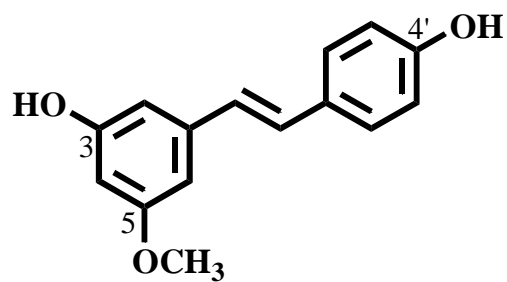


図 2.22 変換物 4 の構造式

これらのことより，暗条件下ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は配糖化及びメチル化することが明らかとなった．

培養条件の検討の結果，以下の物質変換研究について，反応条件においては48時間，植物ホルモンに関しては 2,4-D と決定した．また，光条件に関しては，明条件と暗条件において大きく異なる結果となったので，どちらの条件も用いて研究を行った．

2.2.3 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベン物質変換

2.2.3.1 明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベン物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 2 本検出した。これらを変換物 5, 6 として構造解析を行った。

変換物 5 の解析の結果, ESI/MS の結果より, ピノスチルベンに糖 1 分子結合した質量が観測された。また, ^1H NMR および ^{13}C NMR (図 2.23) の解析結果から, 出発物質であるピノスチルベンおよびグルコースと思われるシグナルを確認した。

また, ^1H NMR より, 糖の 1'' 位であるアノメリックプロトンが 4.88 ppm にダブルレットシグナルで結合定数が 7.2 Hz であったことから, β -結合であると考えられた。

これらのことより, 変換物 5 はピノスチルベン配糖体であると考えられる。さらに, 本化合物の詳細な解析を行うために二次元測定を行った。

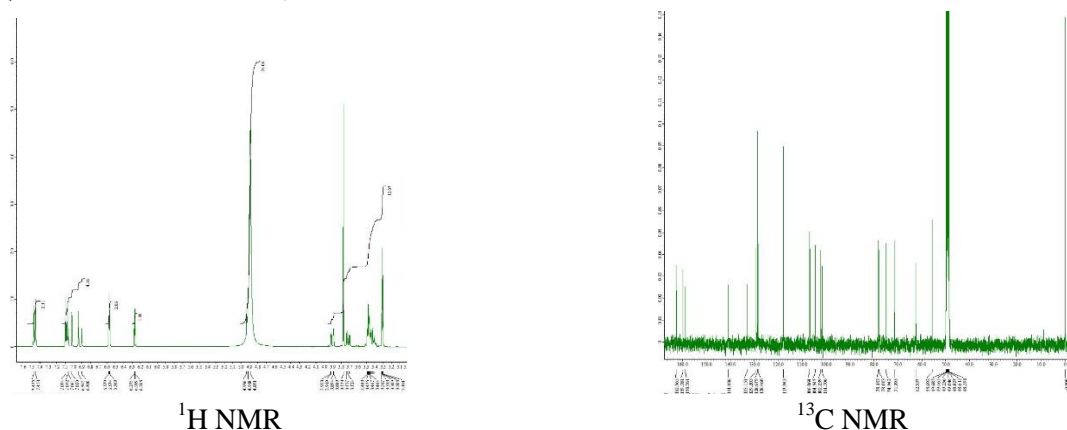


図 2.23 変換物 5 の一次元構造解析

HMBC スペクトル測定の結果, アノメリックプロトンと 4' 位の炭素に相関が確認されたことから, 変換物 5 は Pinostilbene-4'-O- β -D-glucoside であると決定した (図 2.24)。

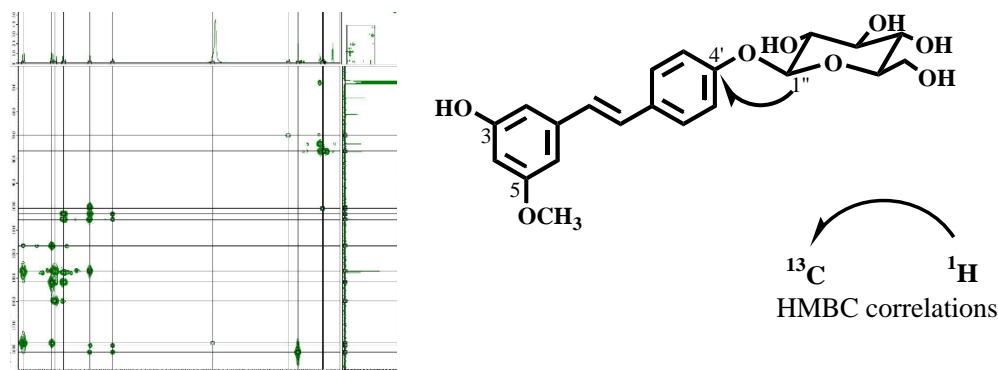


図 2.24 変換物 5 の二次元構造解析スペクトルと構造式

変換物 6 に関しても同様に解析した結果, ESI/MS の結果より, ピノスチルベンに糖 1 分子結合した質量が観測された. また, ^1H NMR, ^{13}C NMR において糖のシグナルが確認され, また, ^1H NMR においてアノメリックプロトンが 4.90 ppm にダブルットシグナルが確認され, 結合定数が 7.6 Hz であったことから, β -結合であると考えられた.

さらに, 二次元構造解析の結果, HMBC スペクトル測定においてアノメリックプロトンと 3 位の炭素に相関が見られたことから, 変換物 6 は Pinostilbene-3- O - β -D-glucoside であると決定した (図 2.25) .

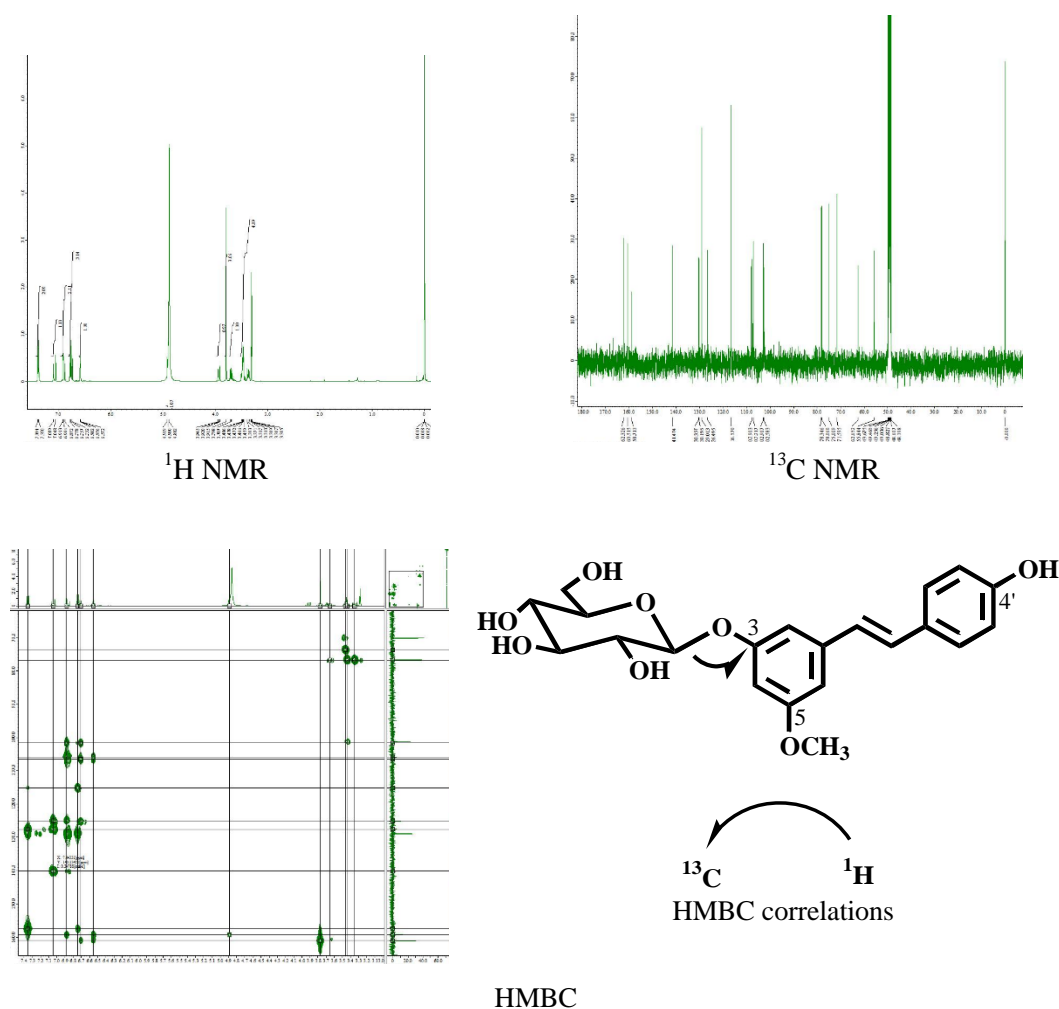


図 2.25 変換物 6 の構造解析結果

2.2.3.2 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピノスチルベンの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 2 本検出した。そのうちの 1 つは、*co*-HPLC において、変換物 6 と保持時間が重なったことから Pinostilbene-3-*O*- β -D-glucoside であることが明らかとなった。もう一つのピークを変換物 7 とした。

変換物 7 に関して、変換率が低かった。

そこで、HPLC 測定において出発物質のピノスチルベンよりも極性が低かった点と実験 2.2.2.3 より、レスベラトロールにおいて暗条件のヨウシュヤマゴボウ培養細胞によって変換したときにメチル化が起こっていたことから、ピノスチルベンがメチル化した化合物ではないかと推測し、ピノスチルベンの 3 位がメチル化されたプテロスチルベンを用いて *co*-HPLC を行った結果、ピークが重なり合ったことから、変換物 7 は Pterostilbene であると決定した（図 2.26）。

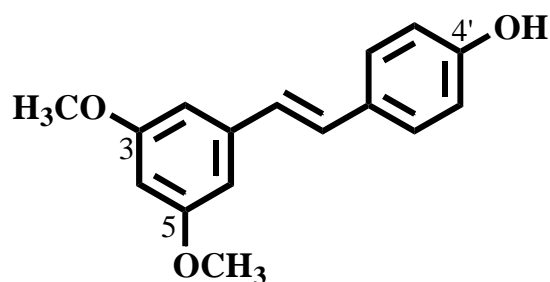


図 2.26 変換物 7 の構造解析結果

2.2.4 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換

2.2.4.1 明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析結果、変換物と思われるピークを 1 本検出した。co-HPLC において、変換物 3 と保持時間が重なったことから *Pterostilbene-3-O-β-D-glucoside* であることが明らかとなった。

2.2.4.2 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるプテロスチルベンの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析結果、変換物と思われるピークは確認できなかった。

2.2.5 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換

2.2.5.1 明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 1 本検出した。これらを変換物 8 として構造解析を行った。変換物 8 の解析の結果、ESI/MS の結果より、ピセアタンノールに糖 1 分子結合した質量が観測された。また、 ^1H NMR および ^{13}C NMR の解析結果から、出発物質であるピセアタンノールおよびグルコースと思われるシグナルを確認した。

また、 ^1H NMR より、糖の 1'' 位であるアノメリックプロトンが 4.78 ppm にダブルットシグナルで結合定数が 7.2 Hz であったことから、 β -結合であると考えられた。

これらのことより、変換物 8 はピセアタンノール配糖体であると考えられる。

さらに、本化合物の詳細な解析を行うために二次元測定を行った結果、HMBC スペクトル測定においてアノメリックプロトンと 4' 位の炭素に相関があったことから変換物 8 は Piceatannol-4'-O- β -D-glucoside であると決定した (図 2.27)。

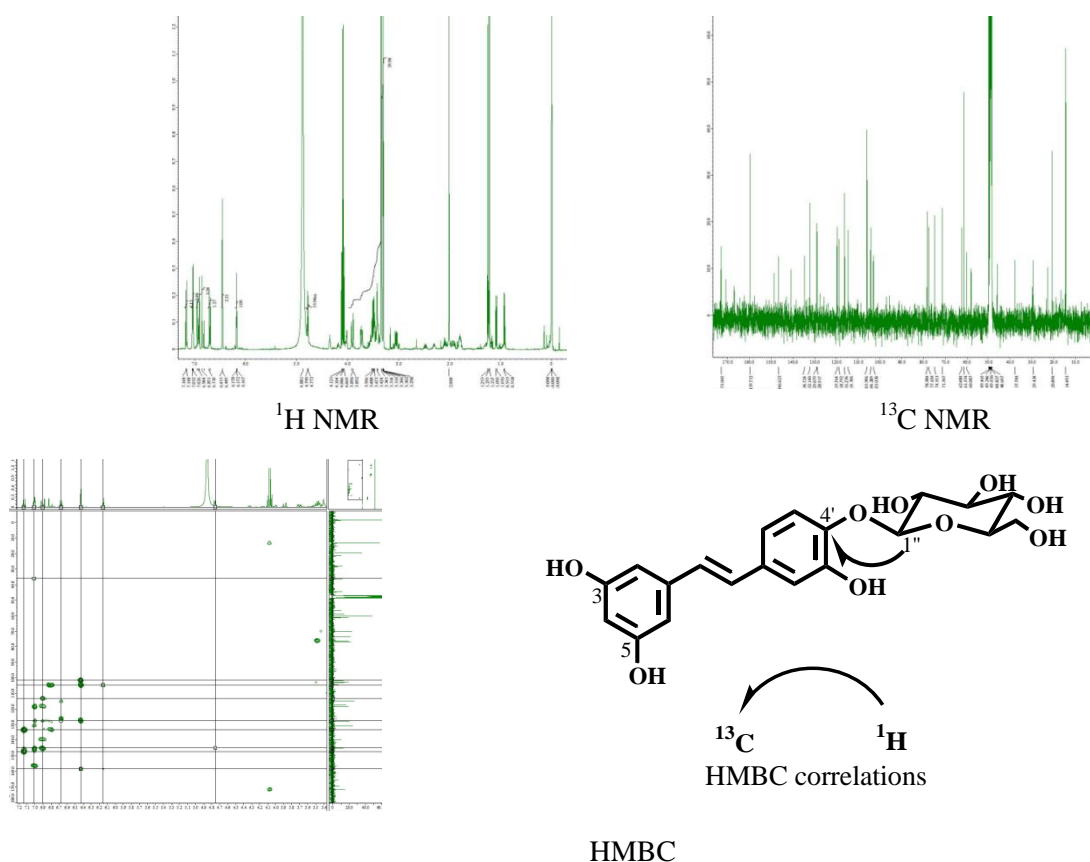


図 2.27 変換物 8 の構造解析結果

2.2.5.2 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 3 本検出した。この中の一つは明条件下で変換を行った際に得られた Piceatannol-4'-O- β -D-glucoside であった。その他の変換物を 9, 10 として構造解析を行った。

変換物 9 について、ESI/MS の結果より、ピセアタンノールに糖 1 分子およびメチル基 1 分子結合した質量が観測された。また、 ^1H NMR および ^{13}C NMR の解析結果から、出発物質であるピセアタンノールおよびグルコースと思われるシグナルを確認した。それに加えて、3.79 ppm にメトキシ基と思われるシグナルが 1 分子分確認された。

また、 ^1H NMR より、アノメリックプロトンが 4.81 ppm にダブルットシグナルで結合定数が 7.6 Hz であったことから、 β -結合であると考えられた。これらのことから、変換物 9 はピセアタンノールにメトキシ基が 1 分子結合したイソラポンチゲニンの配糖体であると考えられる。

さらに、本化合物の詳細な解析を行うために二次元測定を行った結果、HMBC スペクトル測定においてアノメリックプロトンと 3 位の炭素に相関が見られたことから、変換物 9 は Isorhapontigenin-3-O- β -D-glucoside であると決定した (図 2.28)。

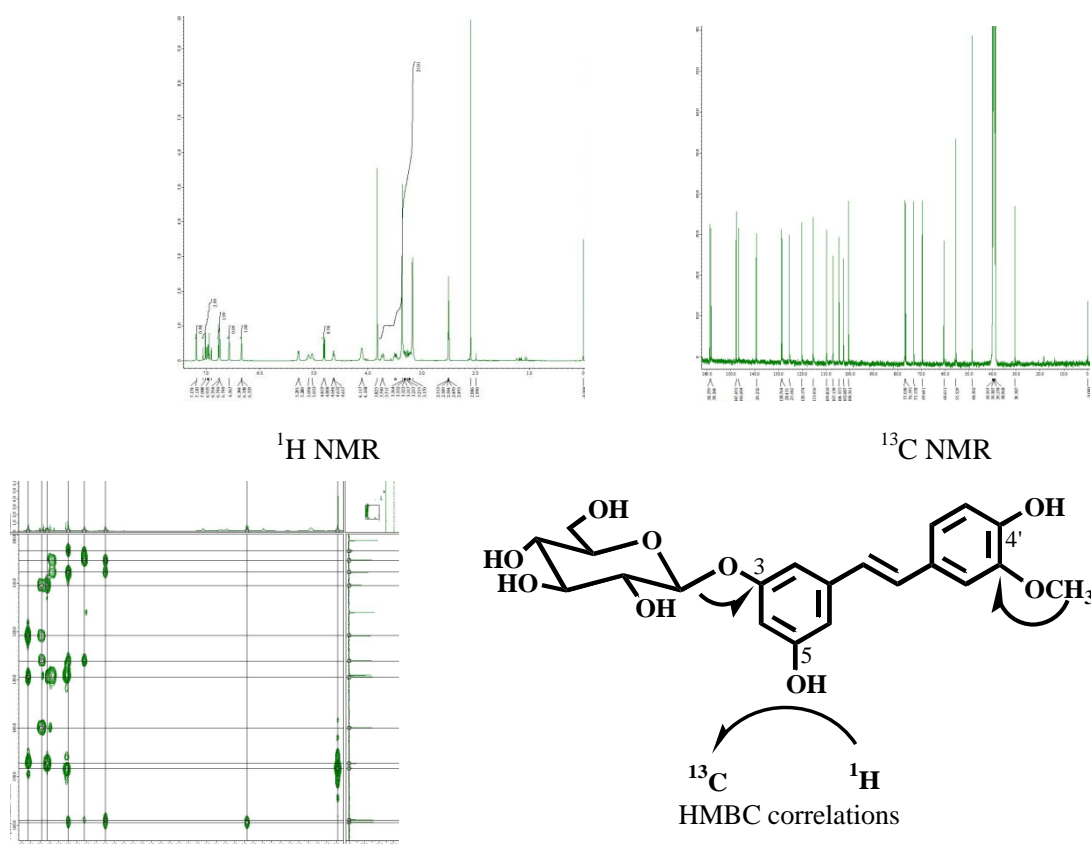


図 2.28 変換物 9 の構造解析結果

変換物 10 については、 ^1H NMR および ^{13}C NMR の解析結果から、出発物質である
ピセアタンノールおよび、3.89 ppm にメトキシ基と思われるシグナルが 1 分子分確認された。

このことより、ピセアタンノールの水酸基が 1 ヶ所メチル化された化合物であると考えられた。

また、詳細な解析を行うため、二次元スペクトル測定を行った結果、HMBC スペクトル解析によって、メトキシ基の水素と 3'位の炭素に相関が見られたことから、変換物 10 は Isorhapontigenin であると決定した (図 2.29) 。

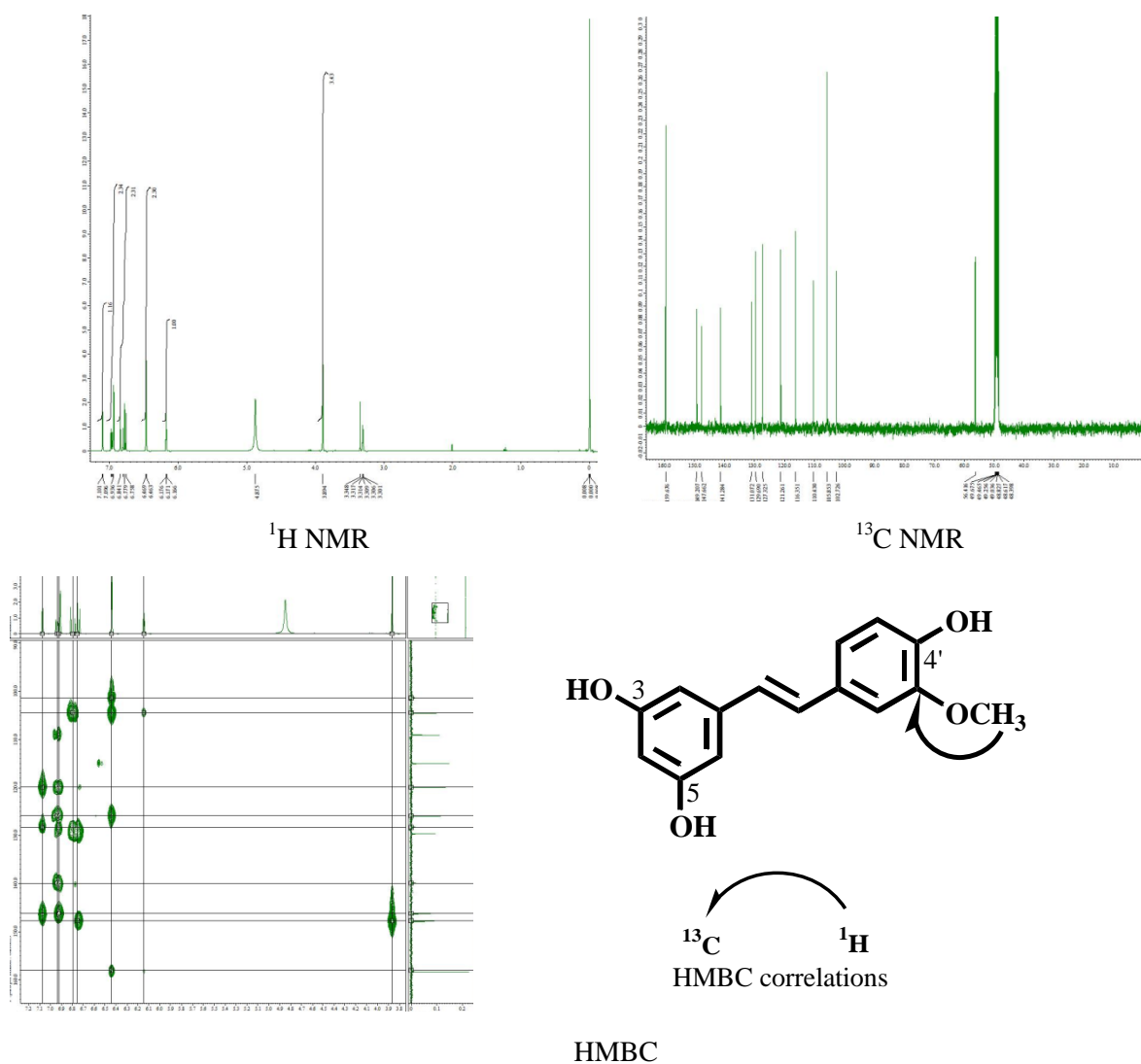


図 2.29 変換物 10 の構造解析結果

2.2.6 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換

2.2.6.1 明条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 1 本検出した。co-HPLC において、変換物 9 と保持時間が重なったことから Isorhapontigenin-3-*O*- β -D-glucoside であることが明らかとなった。

2.2.6.2 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるイソラポンチゲニンの物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

HPLC 分析の結果、変換物と思われるピークを 2 本検出した。そのうちの 1 つは co-HPLC において、変換物 9 と保持時間が重なったことから Isorhapontigenin-3-*O*- β -D-glucoside であることが明らかとなった。もう一方のピークを変換物 11 として構造解析を行った。

ESI/MS の結果より、イソラポンチゲニンに糖 1 分子結合した質量が観測された。また、¹H NMR より、アノメリックプロトンが 4.81 ppm にダブルットシグナルで結合定数が 7.6 Hz であったことから、 β -結合であると考えられた。

これらのことより、変換物 11 はイソラポンチゲニンの配糖体であると考えられる。

また、詳細な解析を行うため、二次元スペクトル測定を行った結果、HMBC スペクトル解析によって、アノメリックプロトンと 4'位の炭素に相関が見られたことから、変換物 11 は Isorhapontigenin-4'-*O*- β -D-glucoside であると決定した (図 2.30)。

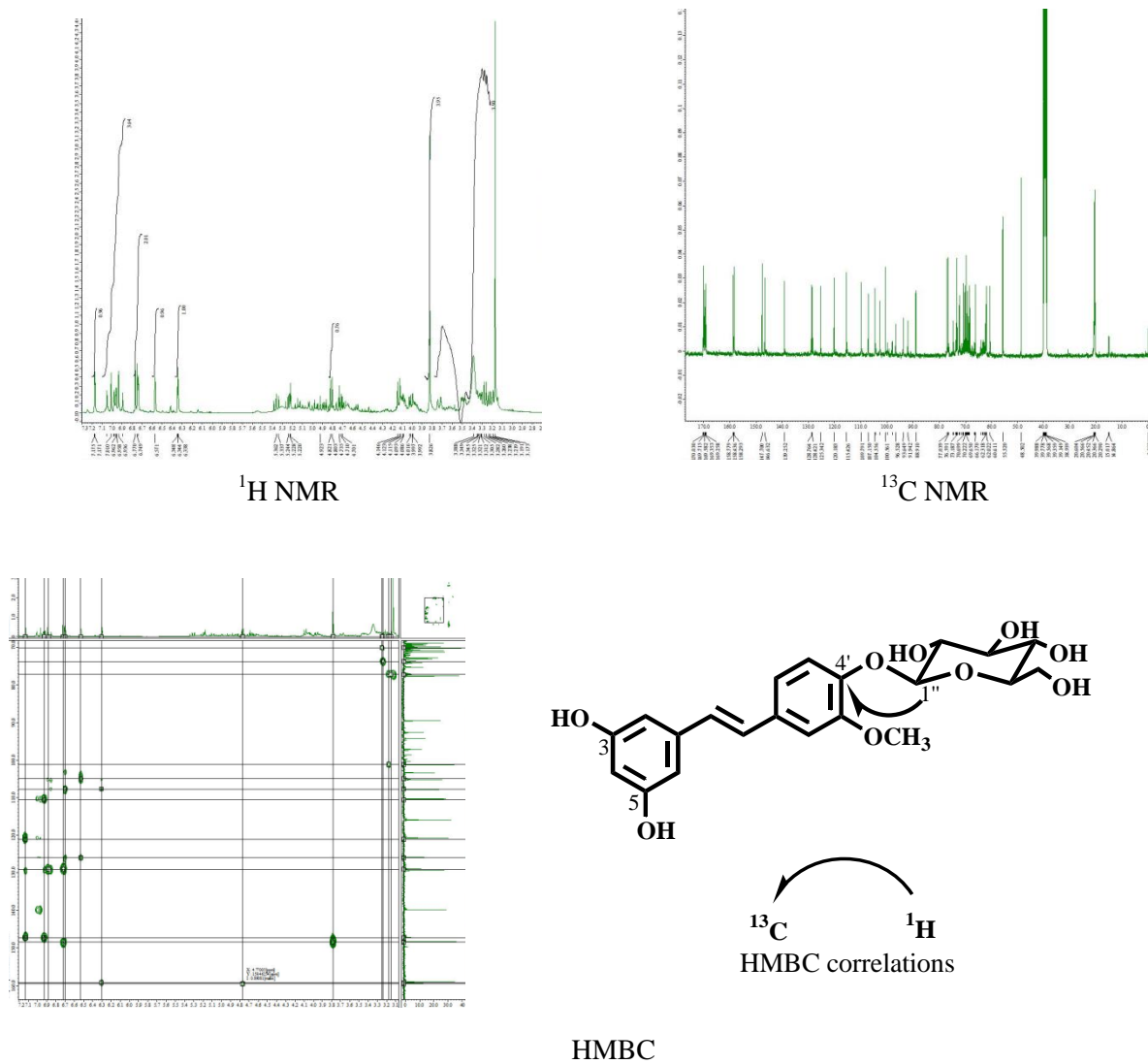


図 2.30 変換物 9 の構造解析結果

2.2.7 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による変換経路の解明

これまでの実験から、暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞において配糖化のみならずメチル化も確認された。そこで、メトキシ基を有していないレスベラトロール、ピセアタンノールを用いて変換を行った場合の変換経路の解明を目的として、経時変化を測定した。

2.2.7.1.a 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの変換経路の解明

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験 2.4 に示す。

得られたサンプルを HPLC で分析し、エリア面積から変換率を算出し、グラフにまとめた(図 2.31)。

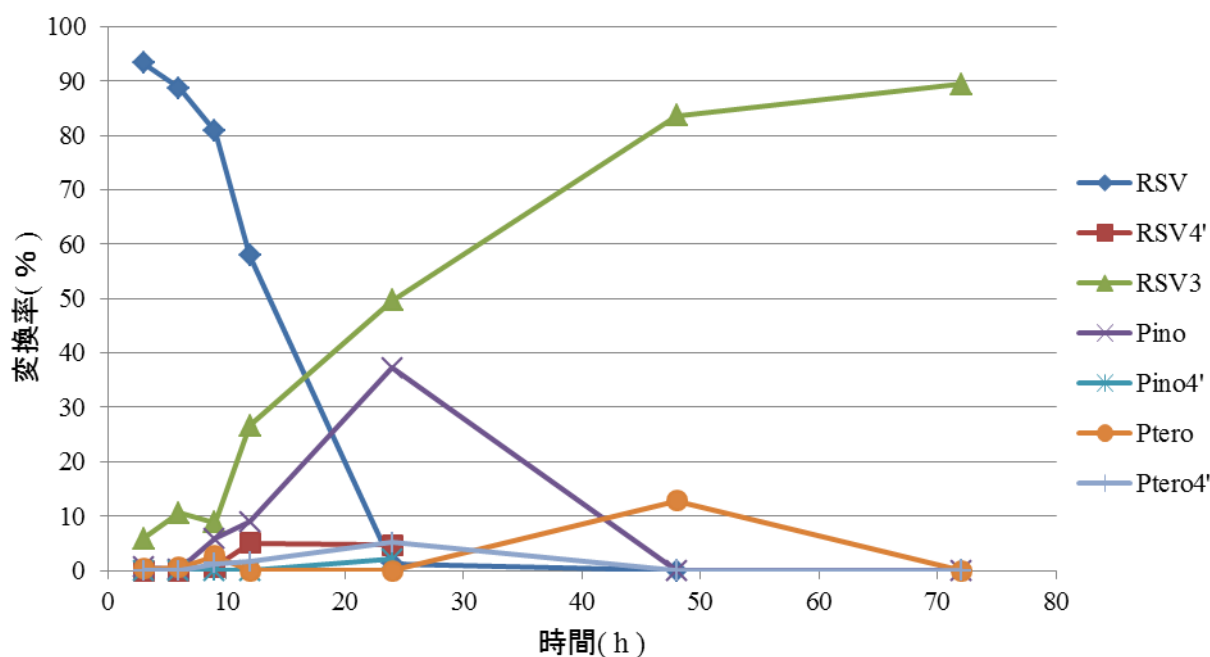


図 2.31 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの経時変化

また、この結果から、メチル化から配糖化の変換は明らかとなったが、配糖体がメチル化されることが明らかとなっていなかったので以下の実験を行った。

2.2.7.1.b 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロール 4'位配糖体の物質変換

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験に示す。

この結果、配糖体を物質変換することで、メチル化は起こらず、加水分解されてレスベラトロールへと戻り、さらに、有意的に変換された 3 位に配糖化されることが明らかとなった。

これらのことから、暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの変換においての変換経路を決定した（図 2.32）。

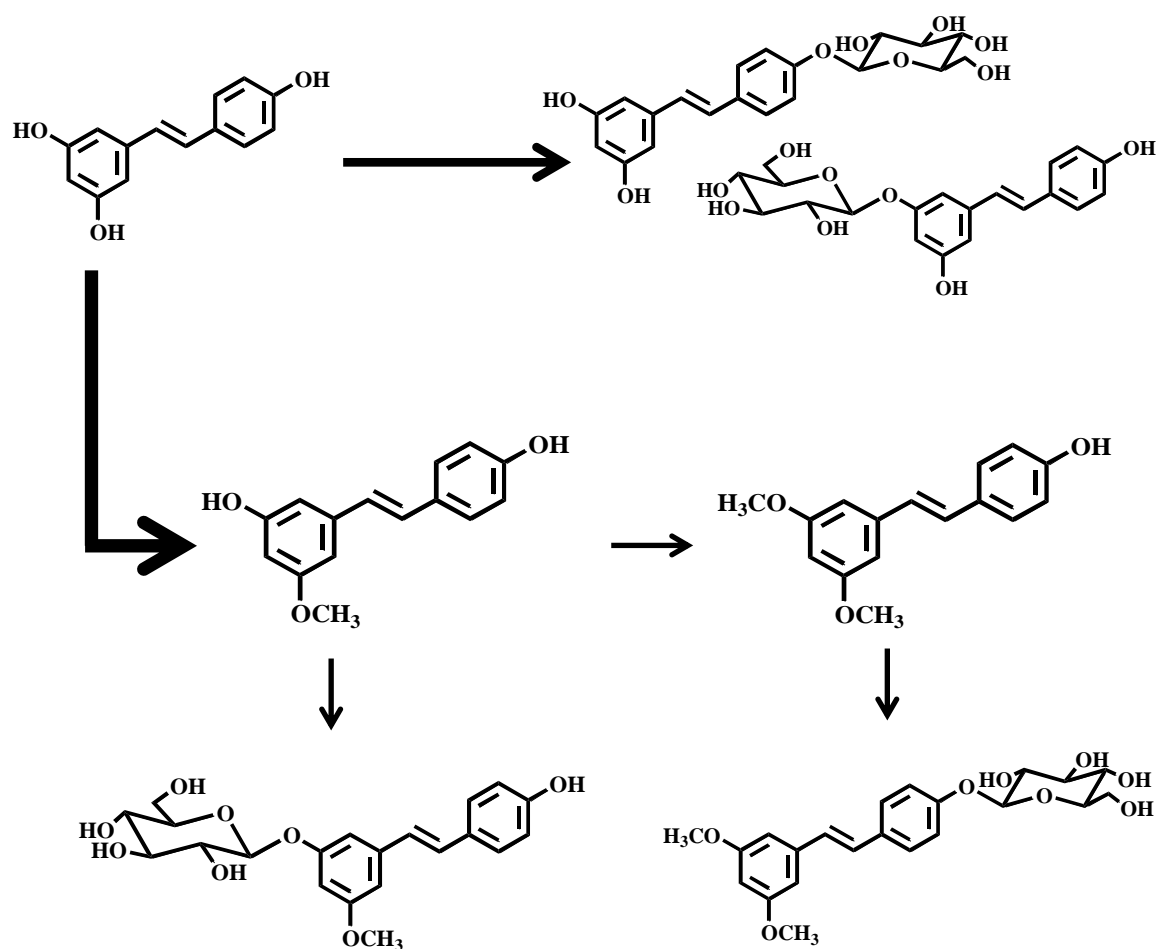


図 2.32 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの変換においての変換経路

2.2.7.2 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの変換経路の解明

変換方法については、実験 2.2.2 において決定した培養条件を用いて行った。詳細な方法は実験に示す。

得られたサンプルを HPLC で分析し、エリア面積から変換率を算出し、グラフにまとめた (図 2.33)。

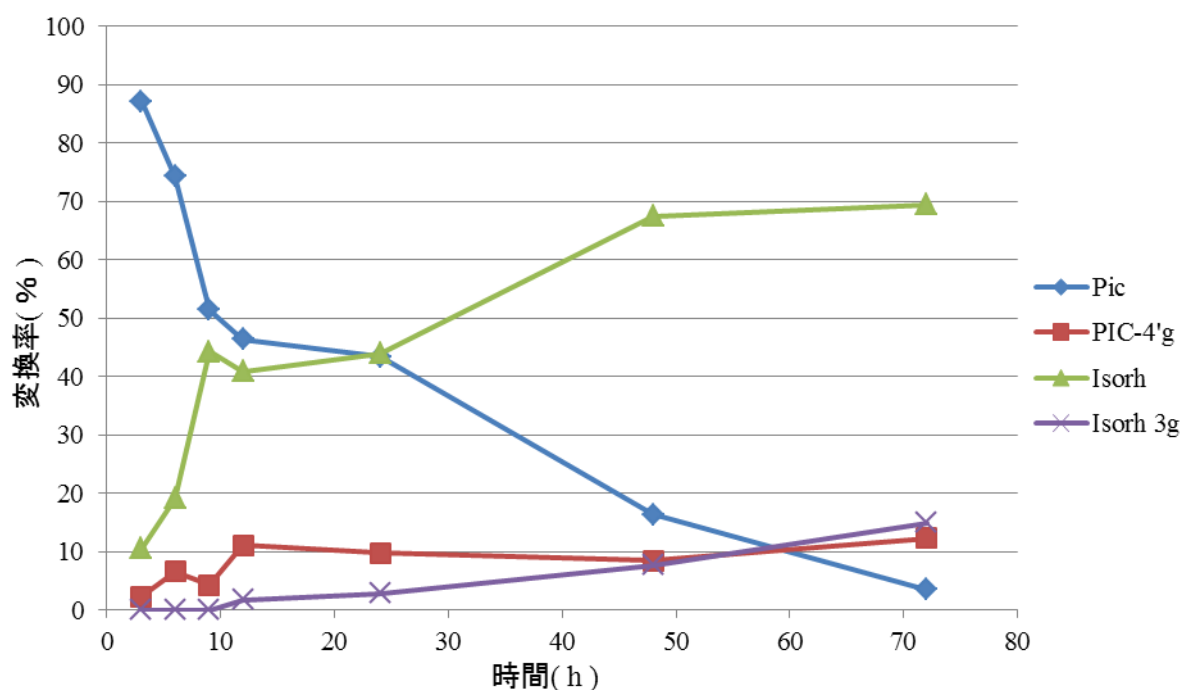


図 2.33 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの経時変化

この結果と先ほどの実験 2.2.7.b の結果も踏まえて、暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるピセアタンノールの変換においての変換経路を決定した (図 2.34)。

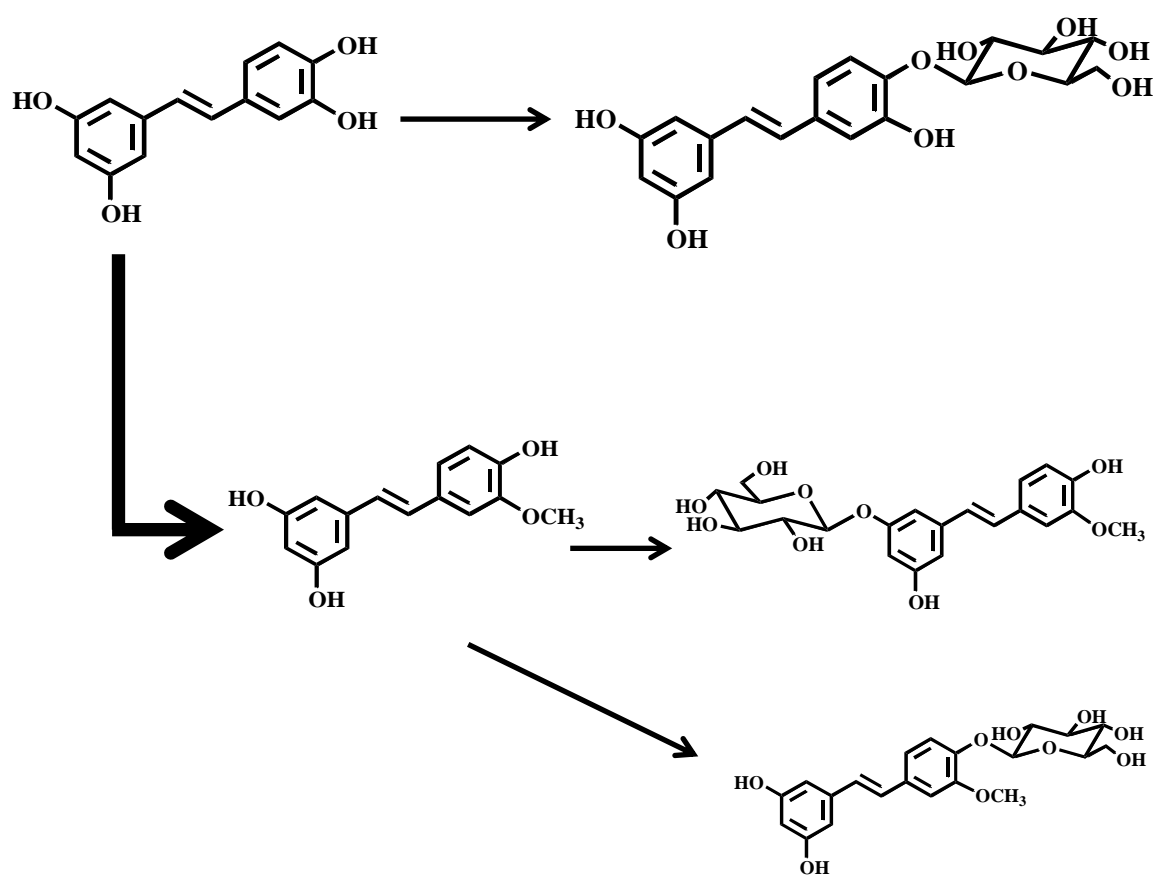


図 2.34 暗条件ヨウシュヤマゴボウ培養細胞によるレスベラトロールの変換においての変換経路

2.3 結論

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞はレスベラトロールおよびその他の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、経時変化の結果から、24 時間から配糖化反応が顕著に現れはじめ、48 時間から大きな位置選択性が見られた。さらに、植物ホルモンにおける検討では、HF, Kinetin, BAP においては 4' 位配糖体がわずかに高い収率で得られたが、2,4-D において 3 位配糖体を高い収率で得ることができた。

また、光条件による検討では、明条件では配糖化反応のみで、暗条件ではメチル化及び配糖化反応がみられた。

配糖化に関して、レスベラトロールとピノスチルベンにおいては 3 位に配糖化の選択性が向上し、プテロスチルベンに関して、変換率が低下していたことから、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は置換基の数によって変化するのではないかと考えられる。

また、ピセアタンノールとイソラポンチゲニンに関してはどちらの環にも水酸基が 2 つ存在しているが、位置の関係からレゾルシノールよりカテコールに生起することが考えられる。

メチル化に関して、レスベラトロールとピノスチルベンにおいて 3 位や 5 位に反応が見られ、4' 位には反応が見られなかったことから、メチル化は水酸基の数によって決まるのではないかと考えられる。さらに、ピセアタンノールについては配糖化反応の場合と同様にどちらの環にも水酸基が 2 つ存在しているが、位置の関係からレゾルシノールよりカテコールに生起することが考えられる。

また、配糖体を変換することで加水分解され次いで配糖化されることが明らかとなった。

これらのことから、スチルベン誘導体の配糖化に成功した。さらに、植物ホルモン等の条件を変化することで位置選択性を制御することに成功した。

2.4 実験

a. 使用機器

HPLC クロマトグラフィーは MD-1510 Multiwavelength Detector (日本分光), PU-2089 plus Quaternary Gradient Pump (日本分光), co-2065 Plus intelligent Column Oven (日本分光) にカラムを装填して行い, JASCO-ChromNAV (日本分光) を用いて解析を行った.

NMR スペクトルは JEOL JNM-ECS400 を用いて, 400 MHz(^1H NMR), 100 MHz(^{13}C NMR)で測定した. また, 各種二次元 NMR 測定も同様に, JEOL JNM-ECS400 で測定を行った. 測定溶媒は重水素溶媒(methanol- d_4 , dimethyl sulfoxide- d_6)を用いた.

b. 植物培養株

Phytolacca americana (ヨウシュヤマゴボウ, ヤマゴボウ科)

1990 年代前半に 14 号館で採取した植物体を 2-4-D を添加した MS 培地によりカルス化し, 以降 25°C, 明所および暗所において 3 週間ごとに継代培養した.

2.4.1 MS 基本培地の作成

植物培養細胞の培地を作成するにあたり, 試薬の保管と利便性を鑑み, 以下に示す培地成分溶液を作成した (表 2.1) .

以下の組成で作成した培地成分溶液と試薬を用いて, 培地を作成した.

培地は主に変換に用いる液体培地と, 主に継代, 培養に用いる液体培地に寒天を加えた固体培地を作成し用途によって使い分けている.

○液体培地

蒸留水を 500 mL 前後計り取り, マグネットスターラーで攪拌しながら各試薬, 培地成分溶液を加えた. この溶液をメスシリンダーに移し, 蒸留水を加えて 800 mL とした. 800 mL の水溶液を元の容器に移し, メスシリンダーの内壁を 100 mL の蒸留水で 2 回洗浄した. 洗液は 800 mL の水溶液に加え, 全体で 1000 mL の培地溶液とした. 培地溶液を攪拌しながら, pH を調整し, 100 mL ずつ 10 本の 300 mL 三角フラスコに取り分け, 液体培地を 10 本作成した.

○固体培地

液体培地と同様の手法で作成した液体培地 100 mL に寒天を適量加え, 固体培地とした. 以下にヨウシュヤマゴボウ培養細胞の培地成分を示した (表 2.2) .

表 2.1 MS 培地成分溶液組成

培地成分 溶液名	培地成分	成分量	希釈率(蒸留水)
MS I	NH ₄ NO ₃	82.5 g	(1000 mL に調製)
	MnSO ₄ ・4H ₂ O	1.115 g (5 水和物の場合 1.205 g)	
	KNO ₃	95.0 g	
	ZnSO ₄ ・7H ₂ O	0.43 g	
	KH ₂ PO ₄	8.5 g	
	H ₃ BO ₃	0.31 g	
	KI	830 mg / 100 mL →5 mL	
	Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	25 mg / 100 mL →5 mL	
	CuSO ₄ ・5H ₂ O	2.5 mg / 100 mL →5 mL	
	CoCl ₂ ・6H ₂ O	2.5 mg / 100 mL →5 mL	
MS II	CaCl ₂ ・2H ₂ O	22.0 g / 500 mL	(500 mL に調製)
MSIII	MgSO ₄ ・7H ₂ O	18.5 g / 500 mL	(500 mL に調製)
MSIV	Na ₂ ・EDTA	1.865 g	(500 mL に調製)
	FeSO ₄ ・7H ₂ O	1.390 g	
MS V	myo - Inositol	10 g	(500 mL に調製)
	nicotinic acid	0.05 g	
	Glycine	0.20 g	
	塩酸ピリドキシン	0.05 g	
	塩酸チアミン	0.01 g	
ホルモン類	2, 4 - D ※1	0.05 g	(500 mL に調製)
	BAP ※2	0.05 g	(500 mL に調製)
	カイネチン	0.05 g	(500 mL に調製)

※1 2, 4 ジクロロフェノキシ酢酸

※2 6 - ベンジルアミノプリン

表 2.2 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞用培地成分(培地 1000 mL 当たりの培地成分)

培地成分溶液, 試薬	成分量	pH 調整試薬	最適 pH	寒天量
MS I	20 mL			
MS II	10 mL			
MSIII	10 mL	NaOH	5.7 ~ 5.8	100 mL あたり
MSIV	10 mL	HCl		0.95 ~ 1.00 g
MS V	5 mL			
2,4-D	10 mL			
スクロース	30 g			

2.4.2 植物培養細胞の継代

植物培養細胞の継代は, 2.4.1 で作製した培地, 薬さじ, 滅菌水, 電子天秤にイソプロピルアルコール(IPA)を噴霧し, クリーンベンチ内に入れ, 20 分間紫外線を照射し滅菌した. 20 分後, 培地, 薬さじ, 滅菌水をアルミホイルごとガスバーナーで口を加熱し, 覆っているアルミホイルを外した. すでに十分増殖している植物培養細胞に IPA を噴霧し, クリーンベンチ内で綿栓を外し, ガスバーナーで三角フラスコの口を加熱した. 培地も綿栓を外し, ガスバーナーで三角フラスコの口を加熱し, 薬さじで植物培養細胞をすくい取り, 培地へと植え込んだ. その後, 再び三角フラスコの口をガスバーナーで加熱し, 綿栓も加熱して栓をした. 使用した薬さじは IPA に浸し, ガスバーナーで IPA を除去して滅菌水に浸した. 液体培地に継代する際は, 必要な細胞量を電子天秤で量り取った. 植え継ぐ細胞は多すぎず少なすぎず, かつ新鮮な細胞を選び, 培地が外気と接している時間はなるべく短くなるよう注意した.

継代が終了した培地は 25°C に保たれた恒温室に入れ, 体培地は静置培養, 液体培地は 120 rpm で振盪培養した (図 2.35) .

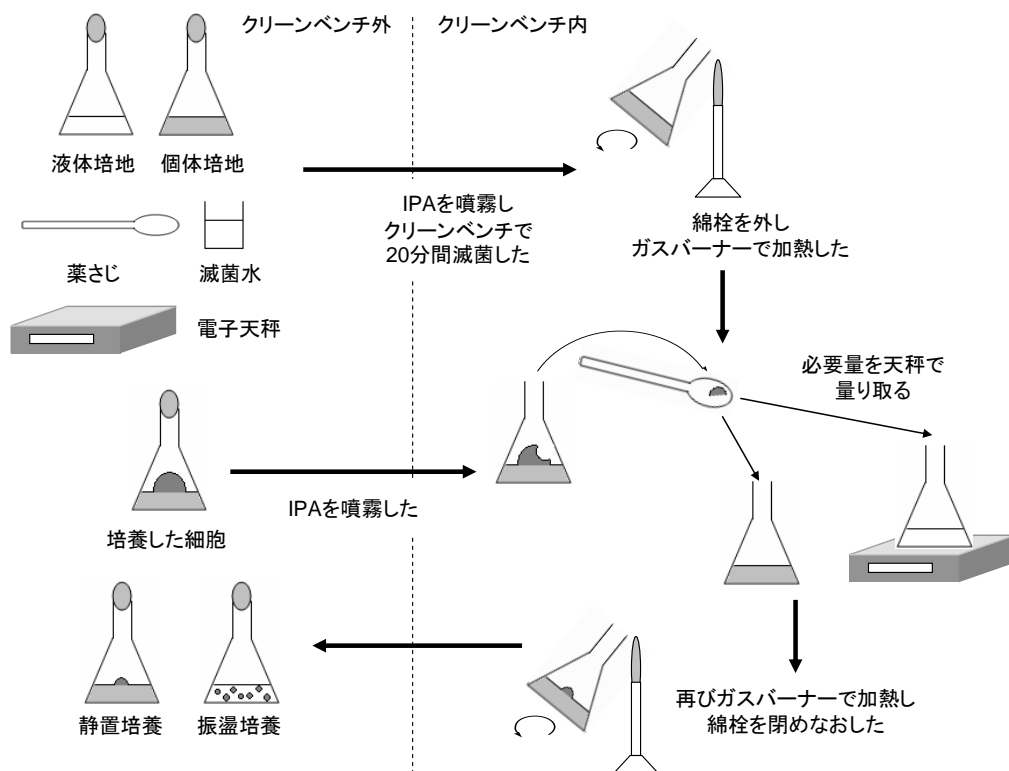


図 2.35 植物培養細胞の継体手順

2.4.3 基質の投与

基質 10 mg を電子天秤で秤量し、エッペンドルフチューブに移したのち 100 μ L のジメチルスルホキシド(DMSO)に溶かした。その後、ピペットマンとともに IPA を噴霧し、クリーンベンチ内で 20 分間紫外線を照射し滅菌した。20 分後、液体培地で植物培養細胞を 48 時間前培養した 300 mL 三角フラスコに IPA を噴霧し、クリーンベンチ内に入れ、綿栓を外し、ガスバーナーで三角フラスコの口を加熱した。次にエッペンドルフチューブ内の基質をピペットマンで吸い取り、口を加熱した 300 mL 三角フラスコ内に基質を投与した。再び、ガスバーナーで、投与し終えた三角フラスコの口を加熱し、綿栓も加熱して栓をした。基質を投与した植物培養細胞は、25°C, 120 rpm で再び 72 時間振とう培養した（図 2.36）。

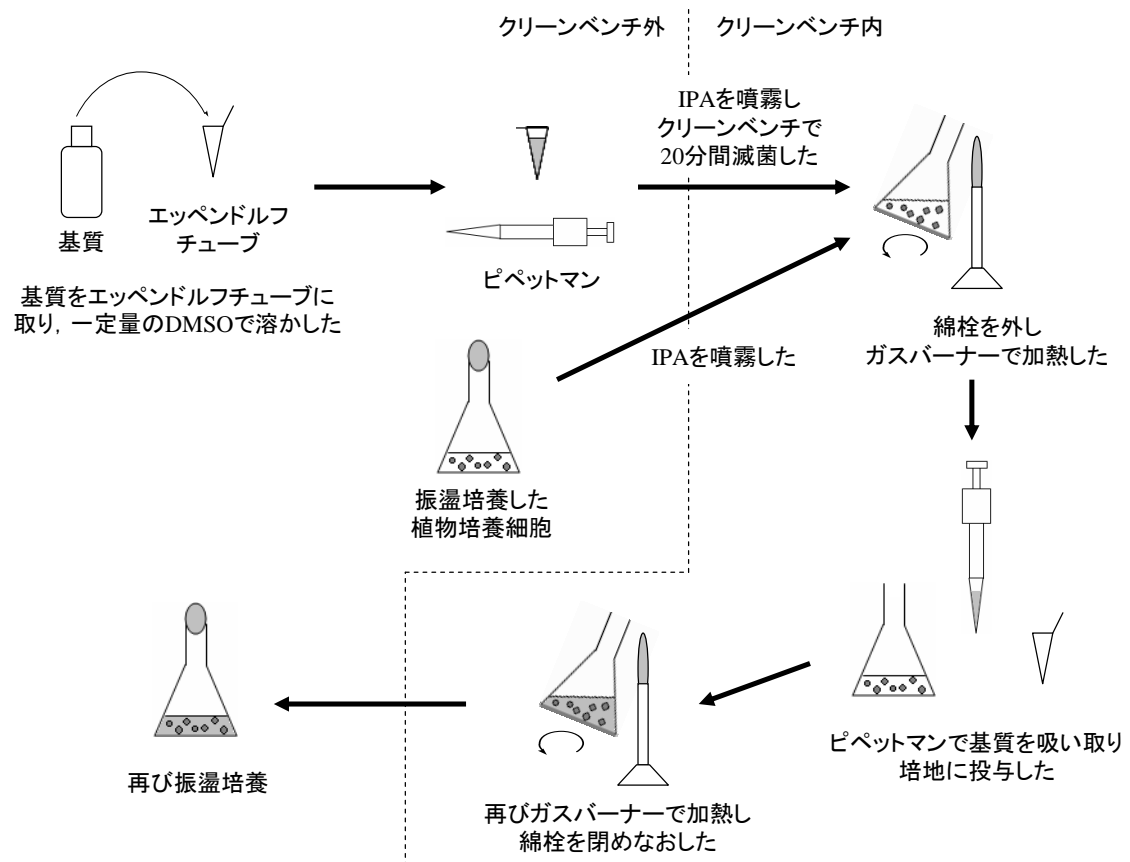


図 2.35 基質投与の手順

2.4.4 変換物の抽出

基質を投与後、本培養した植物培養細胞をナイロンメッシュで培地と細胞とにろ別した。培地部は分液ろうとに移し、酢酸エチルで分配抽出した。また、細胞部はホモジナイズした後、メタノールで24時間静置抽出を行った。その後、吸引ろ過で抽出液をろ別し、少量の水を加えて酢酸エチルで分配抽出した。それぞれの酢酸エチル層を減圧下濃縮した後、メタノールで 1 mL に定溶しサンプルとした（図 2.37）。

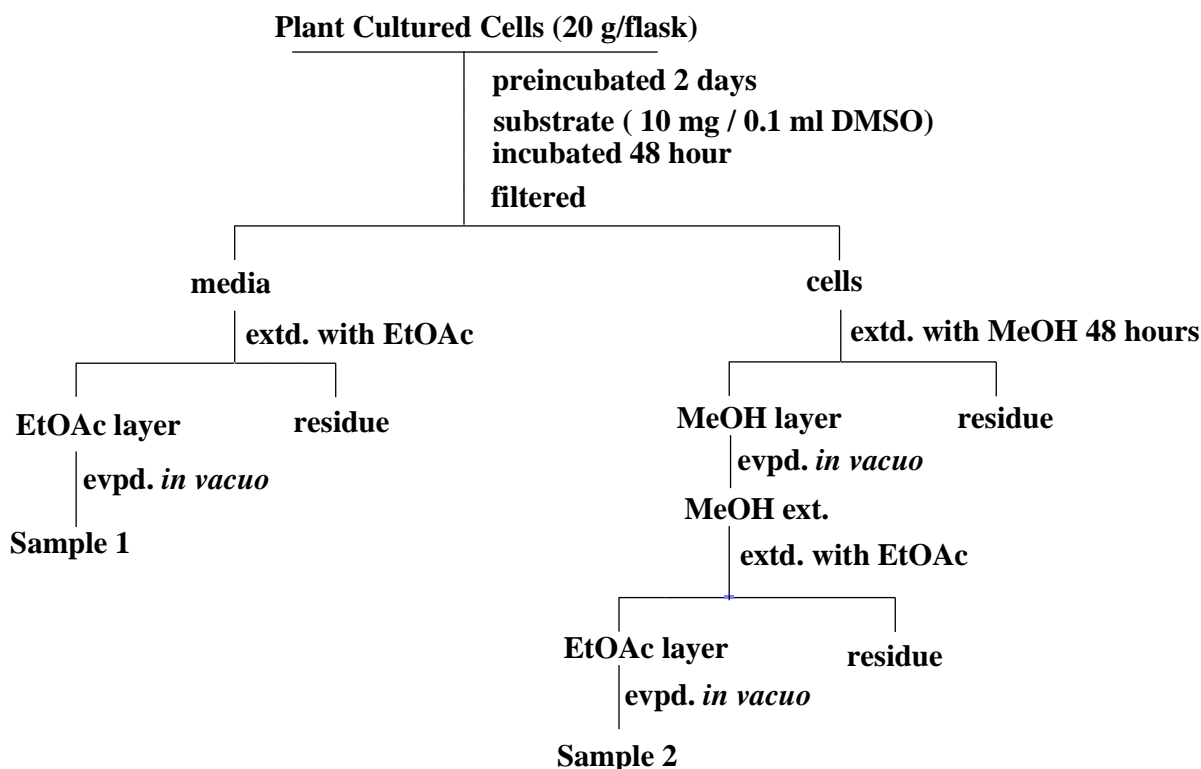


図 2.37 基質の投与からサンプル作製までの手順

2.4.5 変換物の HPLC 分析

得られた変換物を高速液体クロマトグラフィーにて分析を行った。この時、測定条件は以下の通りにした。

カラム：CrestPak C18S (φ 4.6×150)

流速：1.0 mL / min

カラム温度：40℃

溶媒比：A:CH₃CN B:H₂O A:B=15:85 10 min → 35:65 30 min → 100:0 55 min

変換物を比較するため、すべてのサンプルにおいて同じ条件で測定した。

2.4.6 物質変換における経時変化の検討

3%スクロース, 0.5 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した。

Murashige and Skoog (MS) 液体培地で白色光(2000 lx), 25℃, 120 rpm で2週間振とう培養した *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞に、ジメチルスルフォキシド(DMSO) 100 μL に溶解させたレスベラトロール 10 mg を投与して白色光(2000 lx), 25℃, 120 rpm で振とう培養した。

反応時間を, 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72 時間として行い, 所定の時間に抽出を行った。

2.4.7 物質変換における植物ホルモンの検討

3%スクロース, 0.5 ppm を添加した Murashige and Skoog (MS) 液体培地に植物ホルモンとして, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 6-Benzylaminopurine (BAP), Kinetin, Indole-3-acetic acid(IAA), を加えて白色光(2000 lx), 25°C, 120 rpm で 6 ヶ月間継代培養を繰り返した.

また, 比較物として, ホルモンを添加していないホルモンフリー培地(HF)も作製した.

継代培養後, 十分に育成したそれぞれの *Phytolacca americana* (Pa) 培養細胞を液体培地に移植し, 振とう培養を行い, ジメチルスルフォキシド(DMSO) 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 10 mg を投与し, 48 時間反応を行った.

2.4.8 物質変換における光条件の検討

3%スクロース, 0.5 ppm 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を添加した Murashige and Skoog (MS) 液体培地で, 暗条件下で生育した *Phytolacca americana* 培養細胞を液体培地に移植し, 25°C, 120 rpm で振とう培養した. その後, DMSO 100 μ L に溶解させたレスベラトロール 10 mg を投与し, 48 時間反応を行った.

2.5 データ集

Resveratrol-4'-O- β -D-glucoside (変換物 1)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.31-3.92 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 4.92 (1H, doublet, $J=7.2$ Hz, H-1''), 6.17 (1H, triplet, $J=2.4$ Hz, H-4), 6.47 (2H, doublet, $J=1.6$ Hz, H-2, H-6), 6.87 (1H, doublet, $J=16.8$ Hz, H-7), 7.00 (1H, doublet, $J=16.8$ Hz, H-8), 7.08 (2H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-3', H-5'), 7.45 (2H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-2', H-6')

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 62.5 (C-6''), 71.4 (C-4''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 78.2 (C-5''), 102.3 (C-1''), 103.0 (C-4), 105.9 (C-6, C-2), 117.9 (C-3', C-5'), 128.6 (C-7), 128.6 (C-2', C-6'), 128.9 (C-8), 133.2 (C-1'), 141.0 (C-1), 158.7 (C-4'), 159.7 (C-3, C-5).

Resveratrol-3-O- β -D-glucoside (変換物 2)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.31-3.95 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 4.90 (1H, doublet, $J=7.2$ Hz, H-1''), 6.46 (1H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.62 (1H, singlet, H-6), 6.77 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.79 (1H, singlet, H-2), 6.84 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-7), 7.02 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.36 (2H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-2', H-6')

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 62.6 (C-6''), 71.5 (C-4''), 75.0 (C-2''), 78.0 (C-3''), 78.2 (C-5''), 102.4 (C-1''), 104.1 (C-4), 107.0 (C-2), 108.4 (C-6), 116.5 (C-3', C-5'), 126.7 (C-7), 128.9 (C-2', C-6'), 130.0 (C-8), 130.3 (C-1'), 141.4 (C-1), 158.5 (C-4'), 159.6 (C-5), 160.5 (C-3).

Pterostilbene-4'-O- β -D-glucoside (変換物 3)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.34-3.92 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 3.78 (6H, singlet, MeO, MeO), 4.92 (1H, doublet, $J=7.6$ Hz, H-1''), 6.36 (1H, triplet, $J=2.2$ Hz, H-4), 6.67 (2H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-2, H-6), 6.96 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-7), 7.08 (1H, doublet, $J=16.0$ Hz, H-8), 7.08 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-3', H-5'), 7.47 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-2', H-6').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 55.7 (MeO, MeO), 62.5 (C-6''), 71.3 (C-4''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 78.1 (C-5''), 100.6 (C-4), 102.2 (C-1''), 105.4 (C-2, C-6), 117.9 (C-3', C-5'), 128.3 (C-7), 128.7 (C-2', C-6'), 129.5 (C-8), 133.1 (C-1'), 141.0 (C-1), 158.8 (C-4'), 162.5 (C-5, C-3).

Pinostilbene (変換物 4)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.76 (3H, singlet, MeO), 6.26 (1H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.56 (2H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-2, H-6), 6.77 (2H, doublet, $J=8.0$ Hz, H-3', H-5'), 6.84 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-7), 7.00 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.36 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-2', H-6').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 55.7 (MeO), 101.4 (C-4), 104.4 (C-2), 106.7 (C-6), 116.5 (C-3', C-5'), 126.9 (C-7), 128.9 (C-2', C-6'), 129.7 (C-8), 130.4 (C-1'), 141.4 (C-1), 158.4 (C-4'), 159.7 (C-5), 162.5 (C-3).

Pinostilbene-4'-O- β -D-glucoside (変換物 5)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.37-3.92 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 3.77 (3H, singlet, MeO), 4.88 (1H, doublet, $J=7.2$ Hz, H-1''), 6.27 (1H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.57 (2H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-2, H-6), 6.94 (1H, doublet, $J=16.8$ Hz, H-7), 7.04 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.08 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-3', H-5'), 7.40 (2H, doublet, $J=8.8$ Hz, H-2', H-6').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 55.7 (MeO), 62.5 (C-6''), 71.4 (C-4''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 78.2 (C-5''), 101.7 (C-4), 102.2 (C-1''), 104.5 (C-2), 106.9 (C-6), 117.9 (C-3', C-5'), 128.5 (C-7), 128.7 (C-2', C-6'), 129.2 (C-8), 133.2 (C-1'), 141.0 (C-1), 158.8 (C-4'), 159.8 (C-5), 162.6 (C-3).

Pinostilbene-3-O- β -D-glucoside (変換物 6)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.46-3.95 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 3.80 (3H, singlet, MeO), 4.91 (1H, doublet, $J=7.6$ Hz, H-1''), 6.58 (1H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.73 (1H, singlet, H-6), 6.77 (2H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-3', H-5'), 6.90 (1H, singlet, H-2), 6.89 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-7), 7.07 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.38 (2H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-2', H-6')

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 55.8 (MeO), 62.7 (C-6''), 71.6 (C-4''), 75.0 (C-2''), 78.1 (C-3''), 78.3 (C-5''), 102.6 (C-4, C-1''), 107.2 (C-6), 107.9 (C-2), 116.6 (C-3', C-5'), 126.5 (C-7), 129.0 (C-2', C-6'), 130.2 (C-8), 130.4 (C-1'), 141.5 (C-1), 158.7 (C-4'), 160.5 (C-5), 162.3 (C-3).

Piceatannol-4'-O- β -D-glucoside (変換物 8)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.42-3.90 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 4.78 (1H, doublet, $J=7.2$ Hz, H-1''), 6.17 (1H, triplet, $J=2.4$ Hz, H-4), 6.45 (2H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-2, H-6), 6.83 (1H, doublet, $J=16.0$ Hz, H-7), 6.92 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 6.92 (1H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-6'), 7.03 (1H, triplet, $J=4.0$ Hz, H-2'), 7.16 (1H, doublet, $J=8.0$ Hz, H-5').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 62.5 (C-6''), 71.4 (C-4''), 74.9 (C-2''), 78.0 (C-3''), 78.2 (C-5''), 102.3 (C-1''), 103.0 (C-4), 105.9 (C-6, C-2), 117.9 (C-3', C-5'), 128.6 (C-7), 128.6 (C-2', C-6'), 128.9 (C-8), 133.2 (C-1'), 141.0 (C-1), 158.7 (C-4'), 159.7 (C-3, C-5).

Isorhapontigenin-3-O- β -D-glucoside (変換物 9)⁴⁹⁾

^1H NMR (400 MHz in $\text{DMSO}-d_6$): 3.17-3.75 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 3.82 (3H, singlet, MeO), 4.81 (1H, doublet, $J=7.6$ Hz, H-1''), 6.33 (1H, triplet, $J=2.4$ Hz, H-4), 6.56 (1H, singlet, H-2), 6.74 (1H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-6), 6.75 (1H, doublet, $J=8.0$ Hz, H-5'), 6.92 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-7), 6.97 (1H, double-doublet, H-6') 7.02 (1H, doublet, $J=16.4$ Hz, H-8), 7.17 (1H, doublet, $J=2.4$ Hz, H-2').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 60.6 (C-6''), 69.6 (C-4''), 73.2 (C-2''), 76.6 (C-3''), 77.0 (C-5''), 100.6 (C-1''), 102.7 (C-4), 104.5 (C-6), 107.1 (C-2), 109.8 (C-2'), 115.5 (C-5'), 120.2 (C-6'), 125.3 (C-7), 128.4 (C-8), 128.8 (C-1'), 139.3 (C-1), 146.6 (C-4'), 147.7 (C-3'), 158.8 (C-5).

Isorhapontigenin (変換物 10)

^1H NMR (400 MHz in CD_3OD): 3.89 (3H, singlet, MeO), 6.17 (1H, triplet, $J=2.0$ Hz, H-4), 6.47 (1H, doublet, H-2, H-6), 6.77 (1H, doublet, $J=8.4$ Hz, H-2'), 6.82 (1H, doublet, $J=16.0$ Hz, H-7), 6.96 (1H, doublet, $J=16.0$ Hz, H-8), 6.96 (1H, doublet, $J=1.6$ Hz, H-6'), 7.10 (1H, doublet, $J=2.0$ Hz, H-5')

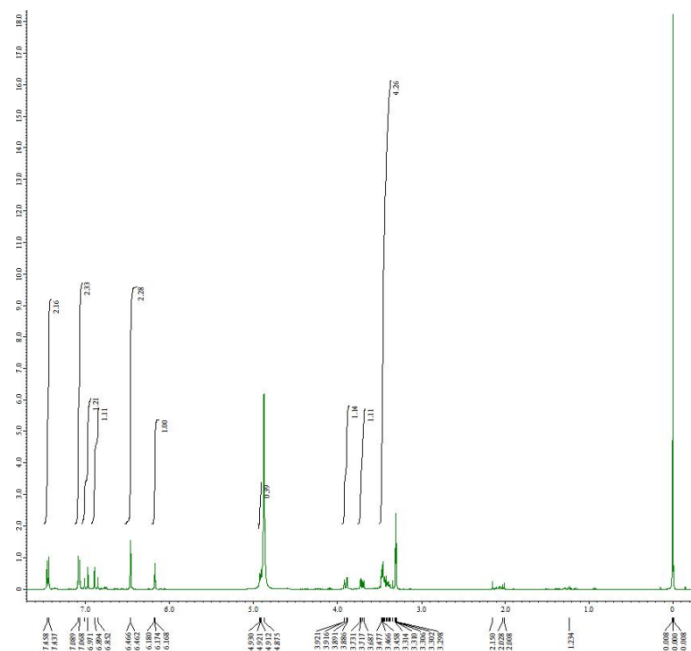
^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 56.4 (MeO), 102.7 (C-4), 105.9 (C-2, C-6), 110.4 (C-5'), 116.4 (C-2'), 121.3 (C-6'), 127.3 (C-7), 129.7 (C-8), 131.1 (C-1'), 141.3 (C-1), 147.7 (C-4'), 149.2 (C-3'), 159.7 (C-3, C-5).

Isorhapontigenin-4'-*O*- β -D-glucoside (変換物 11)⁴⁹⁾

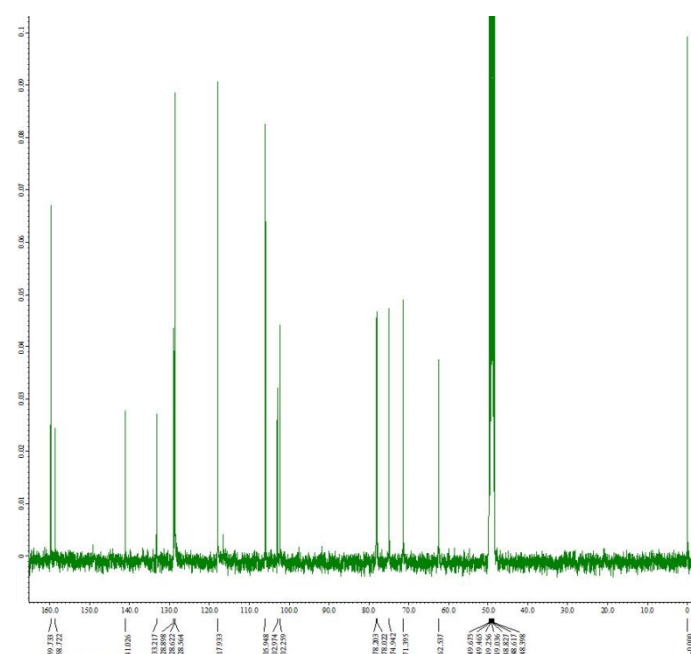
^1H NMR (400 MHz in $\text{DMSO}-d_6$): 3.17-3.75 (6H, multiplet, H-2''-H-6''), 3.82 (3H, singlet, MeO), 4.93 (1H, doublet, $J=7.6$ Hz, H-1''), 6.15 (1H, triplet, $J=2.4$ Hz, H-4), 6.42 (2H, doublet, H-2, H-6), 6.97 (1H, singlet, H-7), 6.97 (1H, singlet, H-8), 7.06 (2H, singlet, H-5', H-6'), 7.23 (1H, singlet, H-2').

^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD): 60.6 (C-6''), 69.8 (C-4''), 73.2 (C-2''), 76.9 (C-3''), 77.0 (C-5''), 100.0 (C-1''), 102.1 (C-4), 104.5 (C-6, C-2), 110.0 (C-2'), 115.3 (C-5'), 119.8 (C-6'), 127.3 (C-7), 127.8 (C-8), 131.2 (C-1'), 139.1 (C-1), 149.1 (C-3'), 158.6 (C-5).

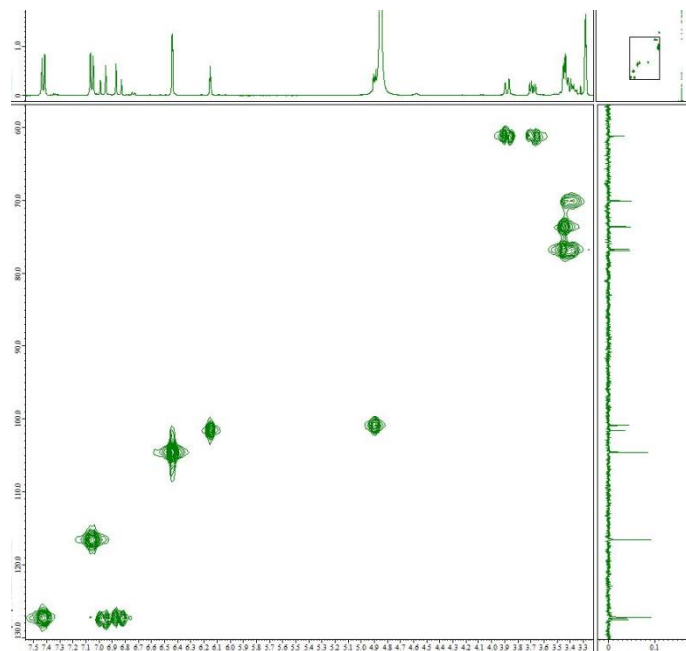
スペクトルチャート集



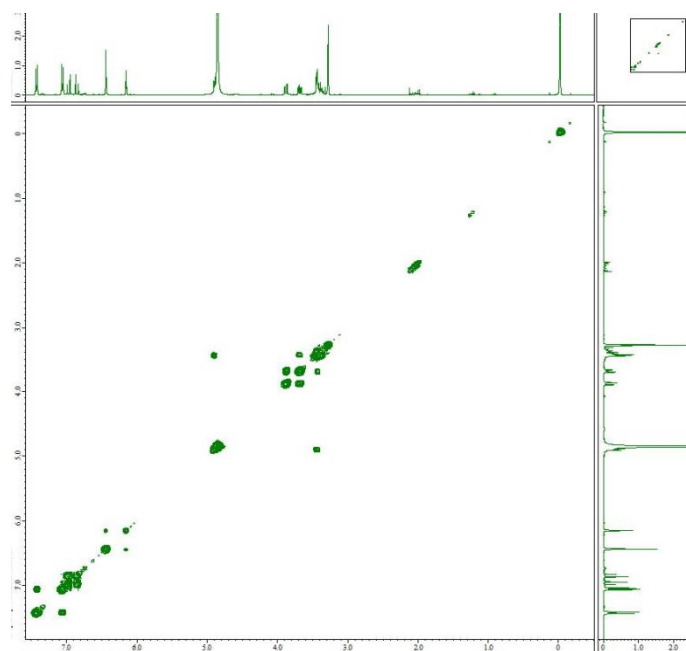
変換物 1 の ¹H NMR (400 MHz in CD₃OD)



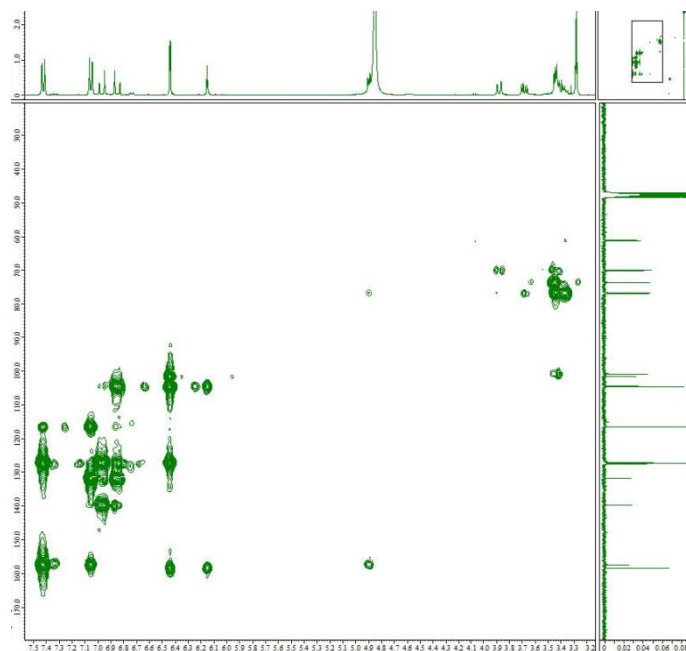
変換物 1 の ¹³C NMR (100 MHz in CD₃OD)



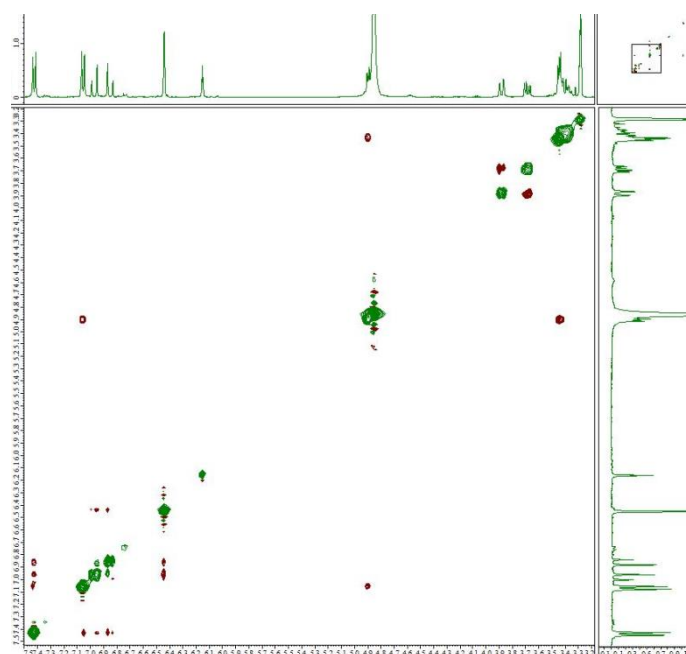
変換物 1 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



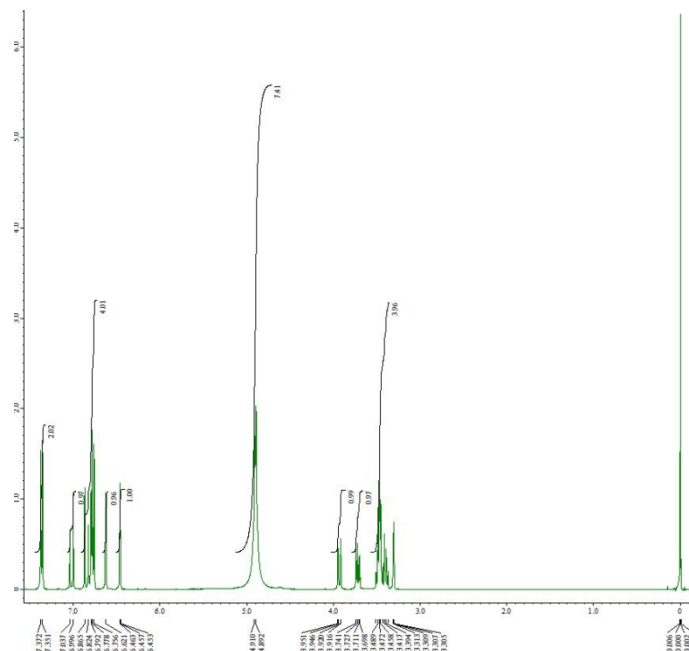
変換物 1 の ¹H-¹H COSY スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



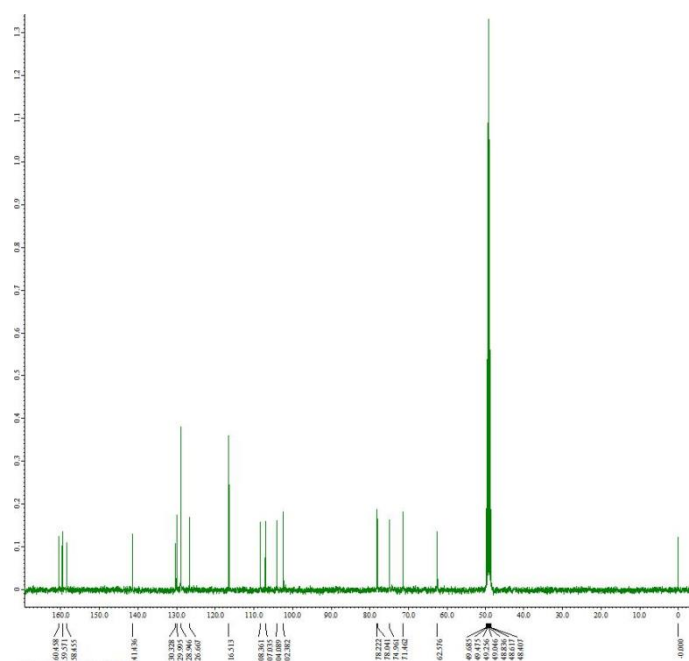
変換物 1 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)



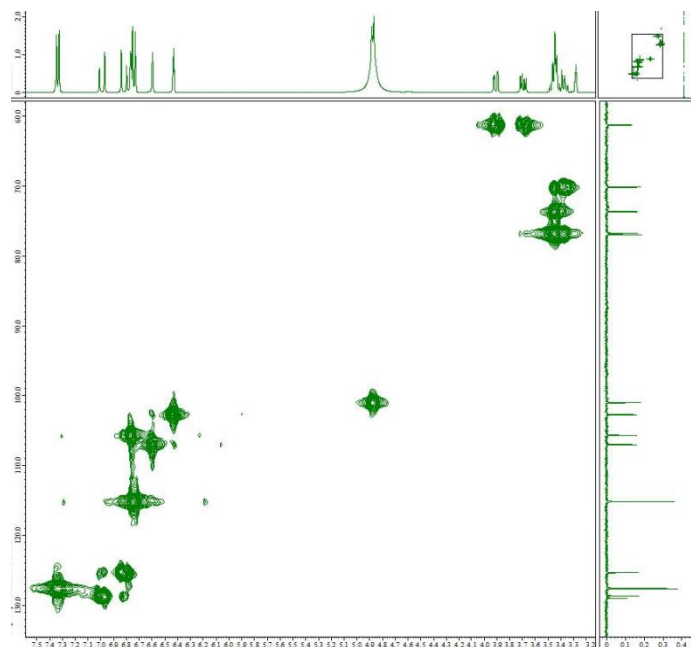
変換物 1 の NOESY スペクトル(400 MHz in CD_3OD)



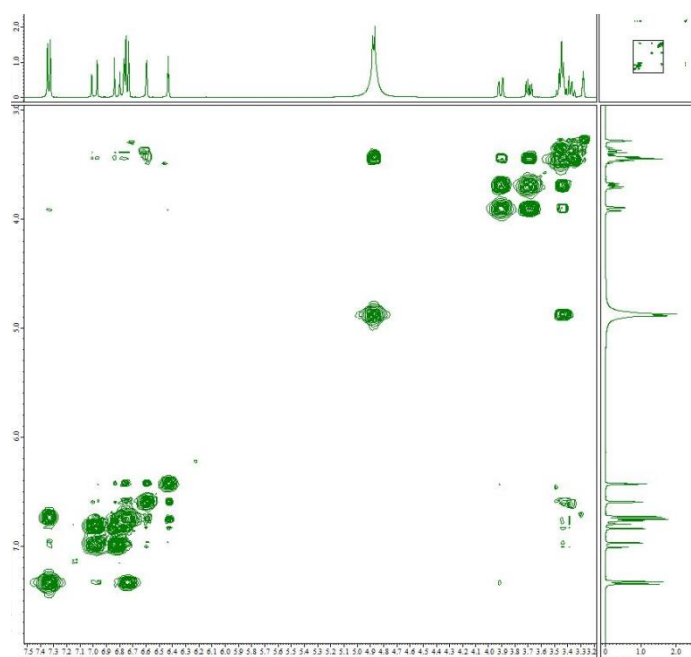
変換物 2 の ¹H NMR (400 MHz in CD₃OD)



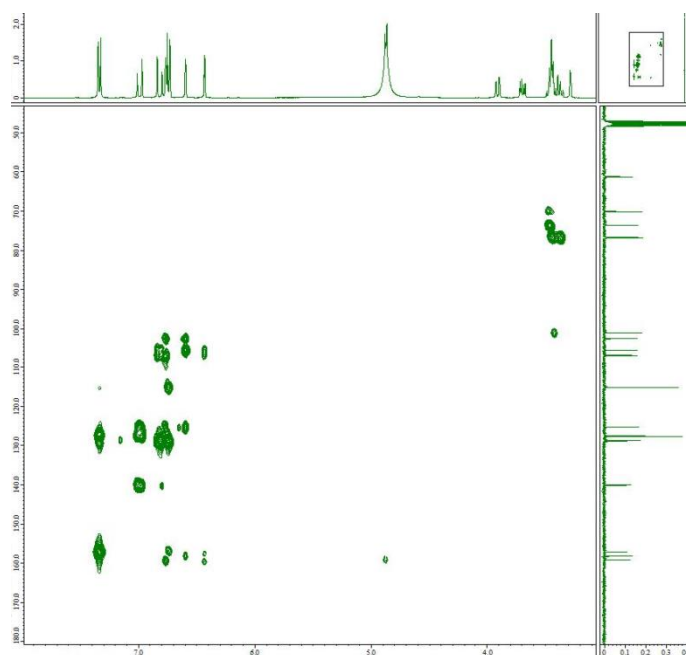
変換物 2 の ¹³C NMR (100 MHz in CD₃OD)



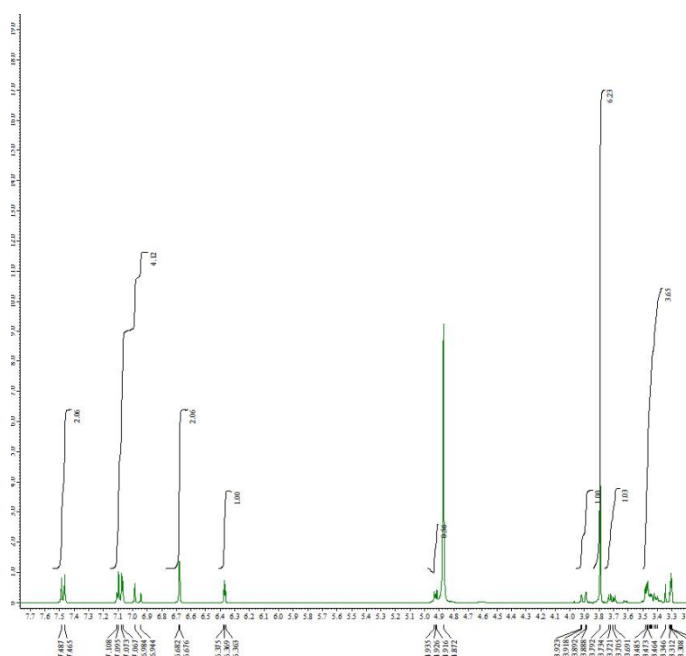
変換物 2 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



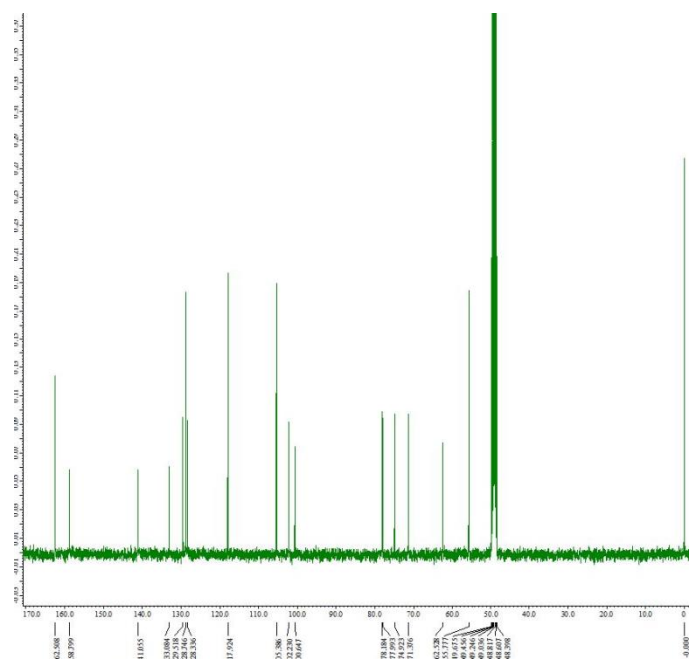
変換物 2 の ¹H-¹H COSY スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



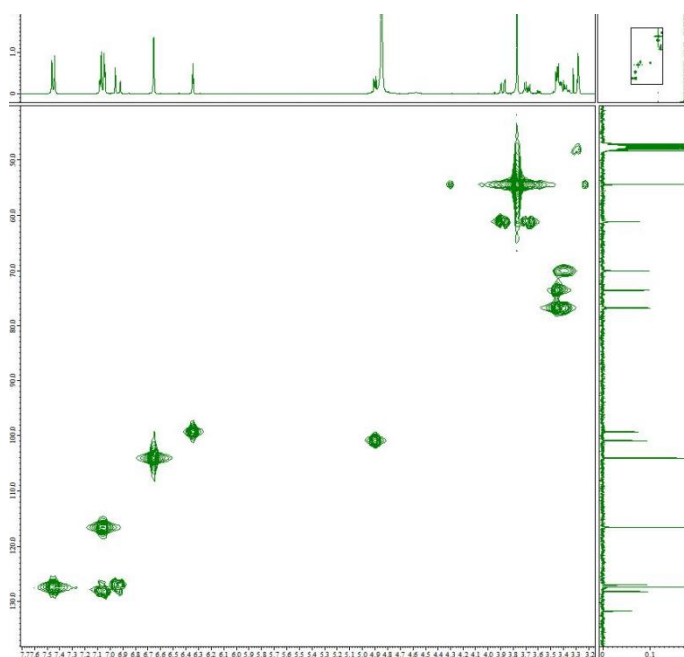
変換物 2 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)



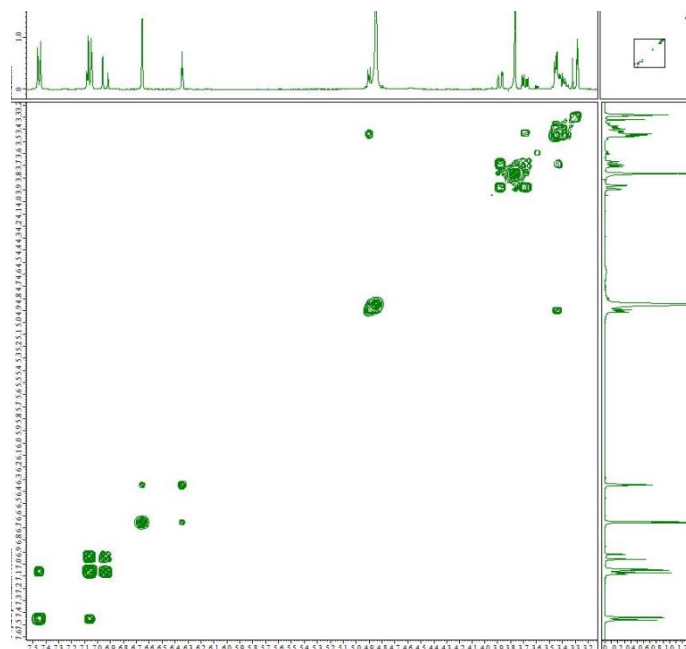
変換物 3 の ^1H NMR (400 MHz in CD_3OD)



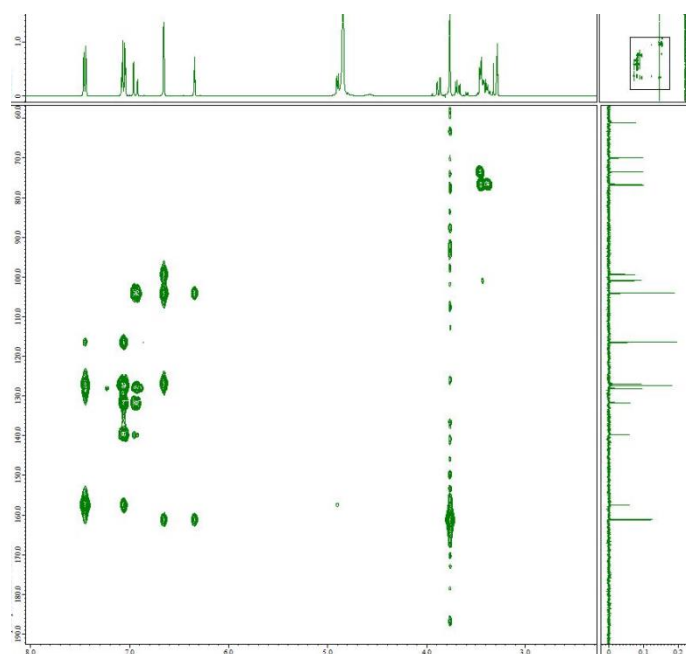
変換物 3 の ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD)



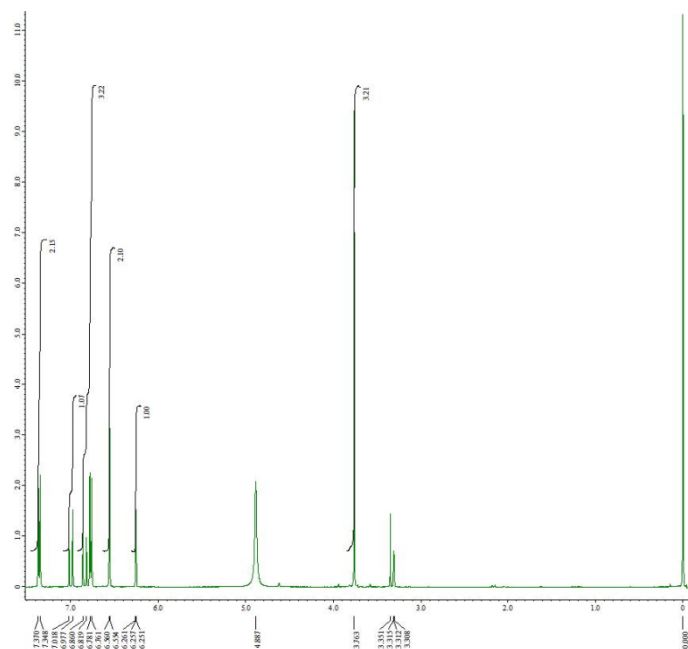
変換物 3 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)



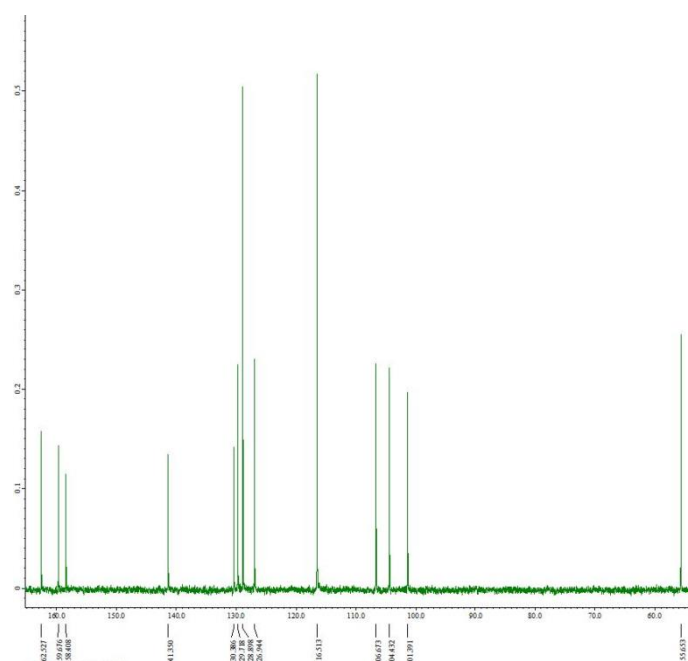
変換物 3 の ^1H - ^1H COSY スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

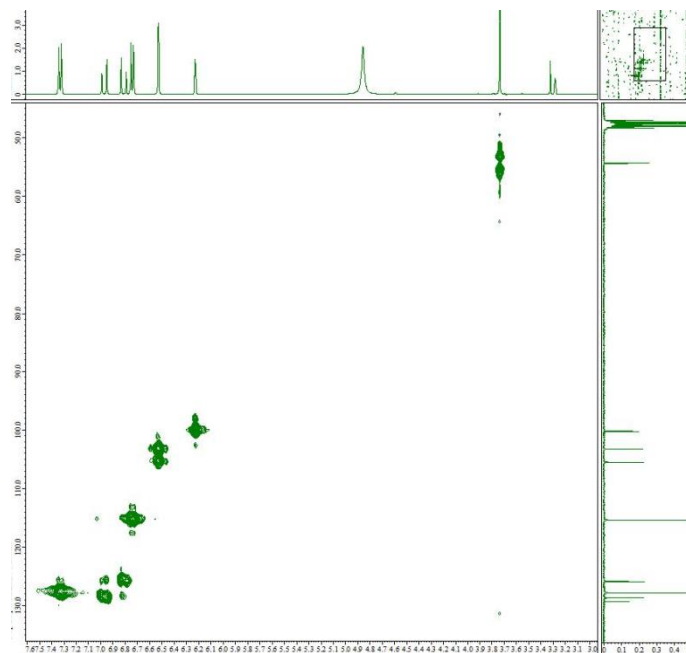


変換物 3 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

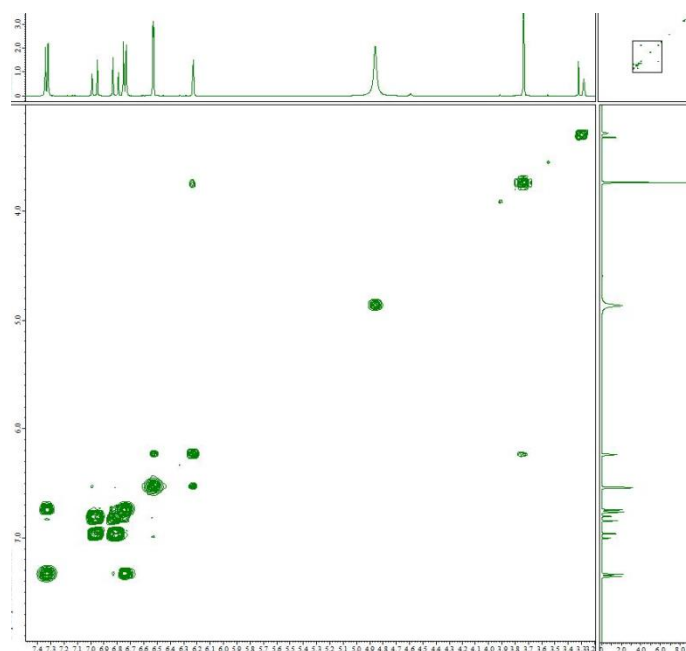


変換物 4 の ^1H NMR (400 MHz in CD_3OD)

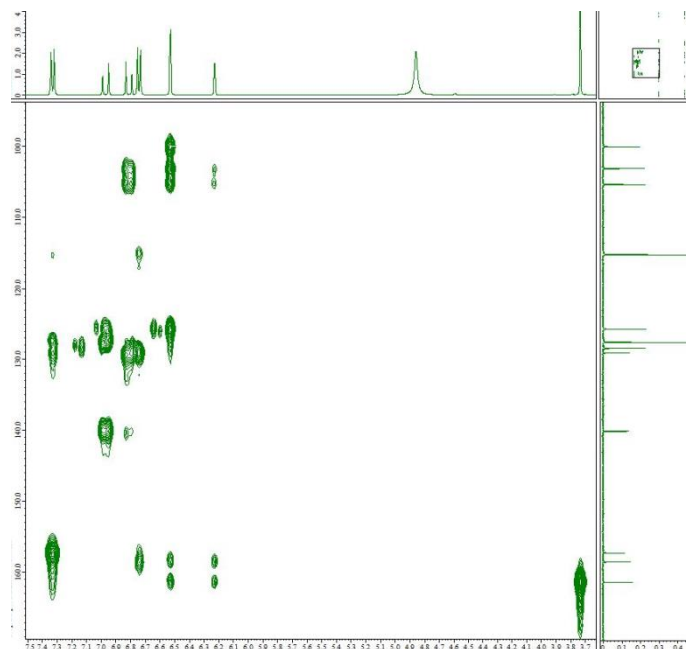




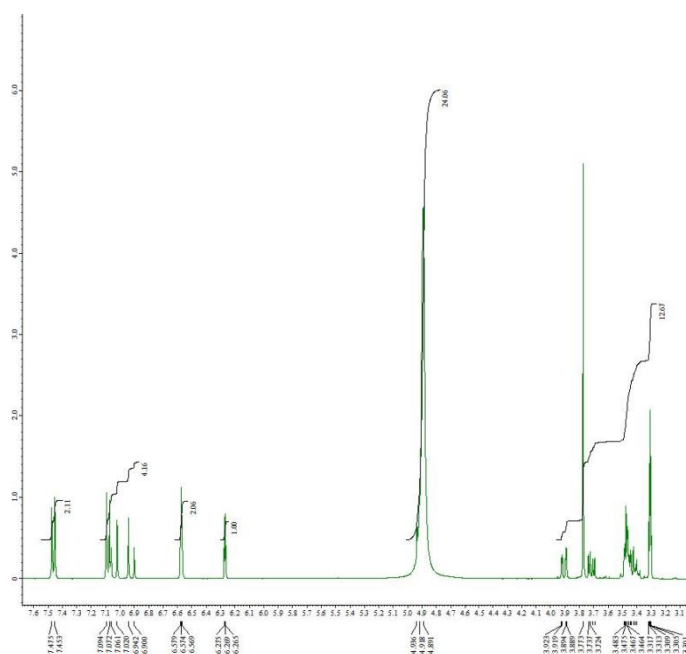
変換物 4 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



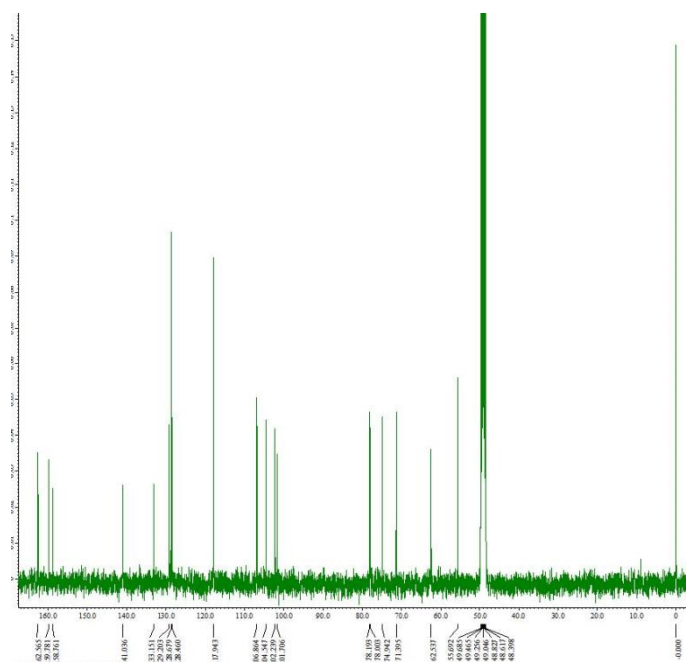
変換物 4 の ¹H-¹H COSY スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



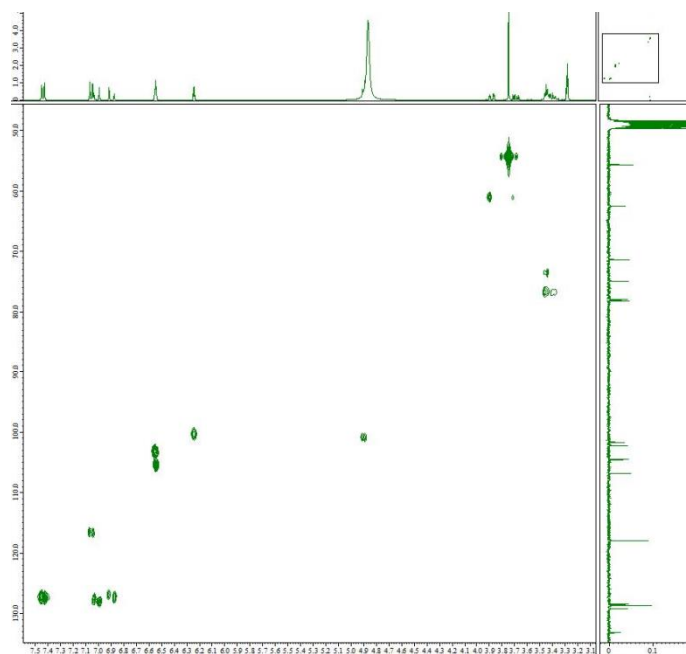
変換物 4 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



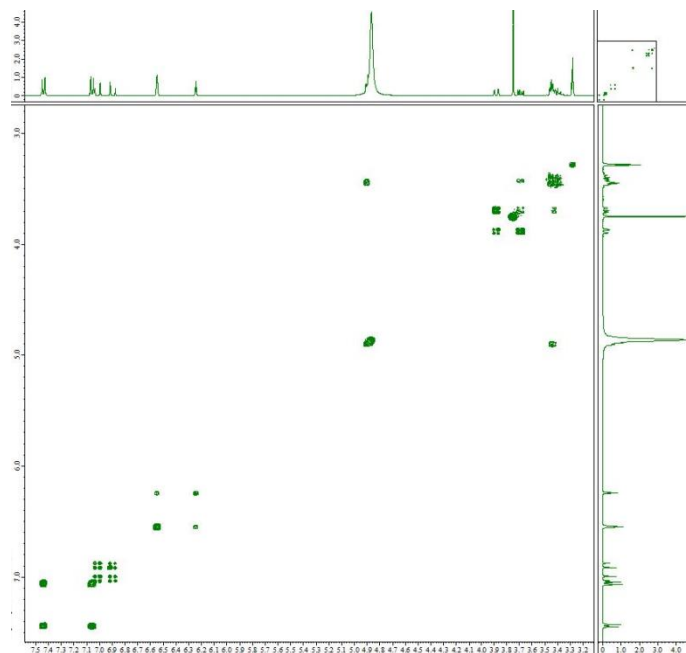
変換物 5 の ¹H NMR (400 MHz in CD₃OD)



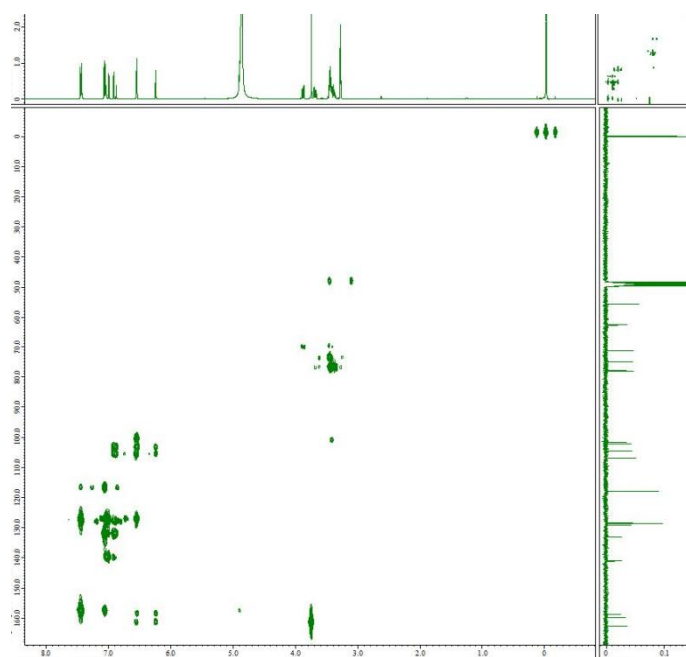
変換物 5 の ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD)



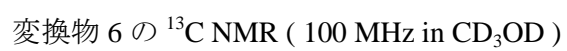
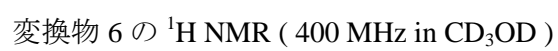
変換物 5 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

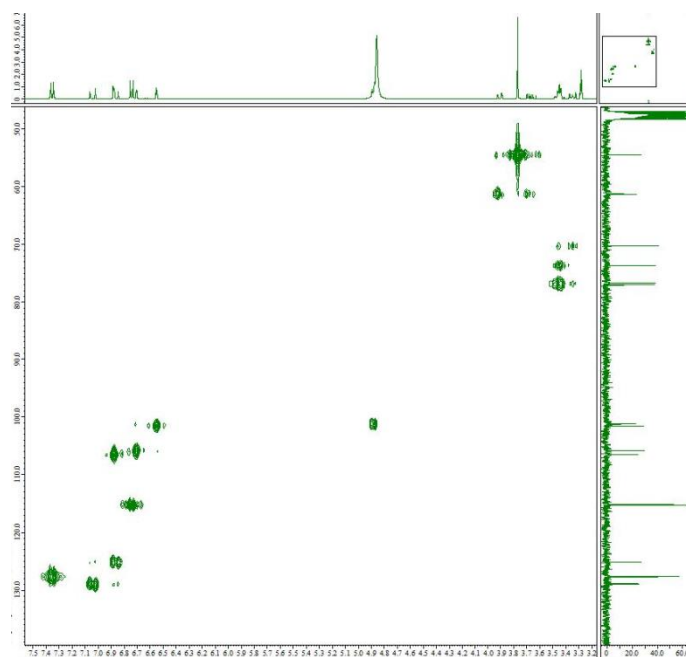


変換物 5 の ^1H - ^1H COSY スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

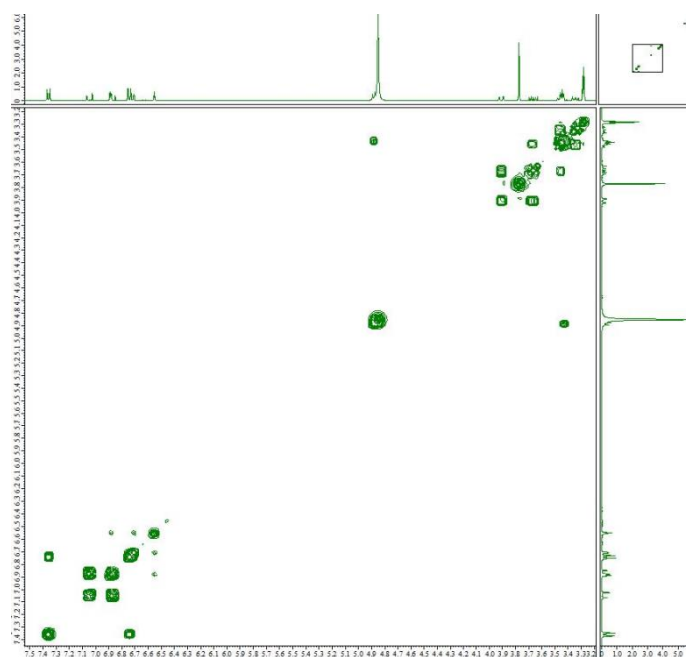


変換物 5 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

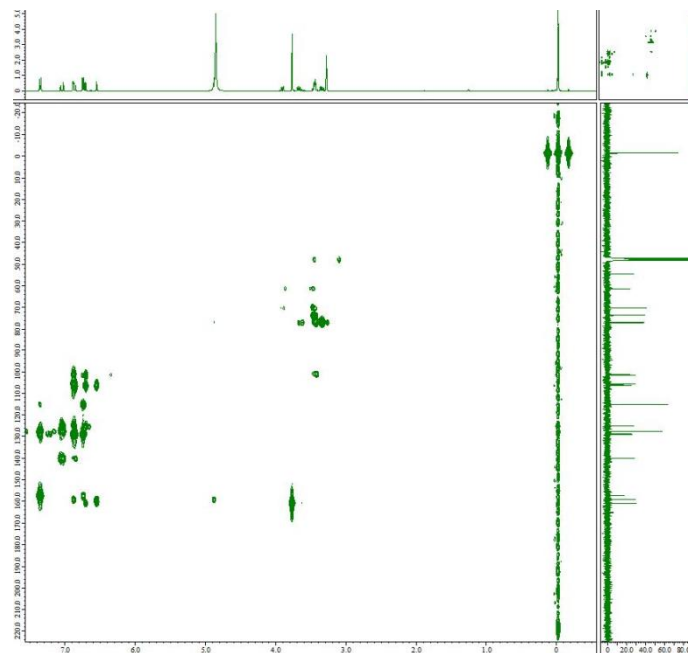




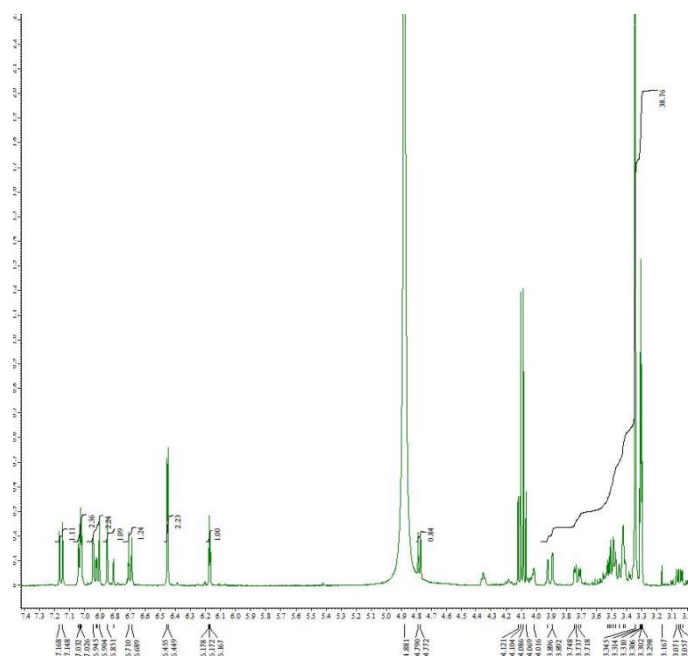
変換物 6 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



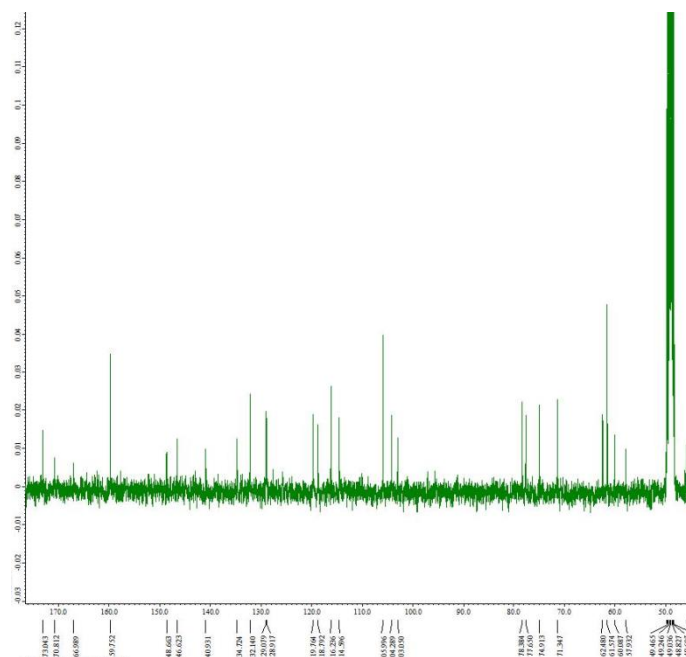
変換物 6 の ¹H-¹H COSY スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



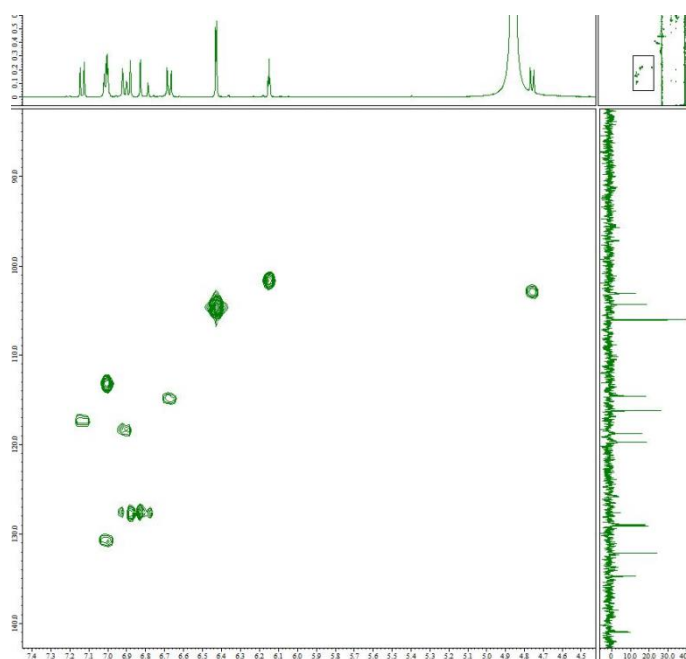
変換物 6 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)



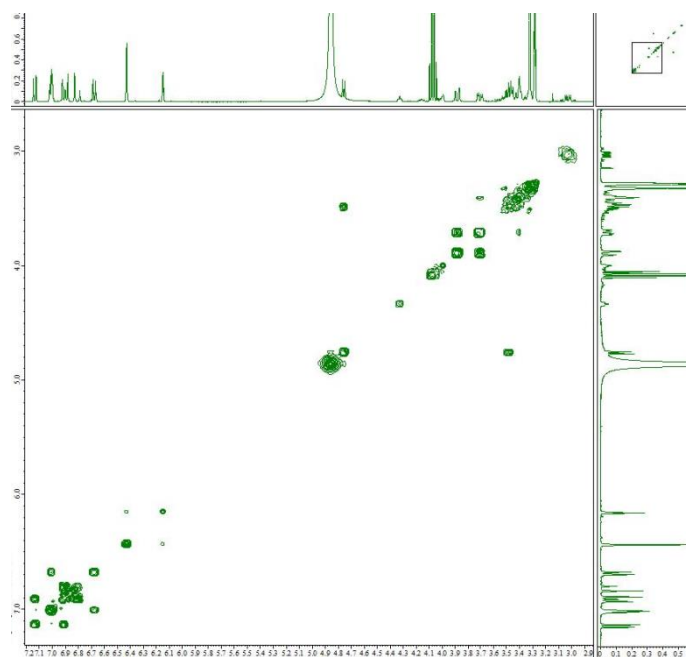
変換物 8 の ^1H NMR (400 MHz in CD_3OD)



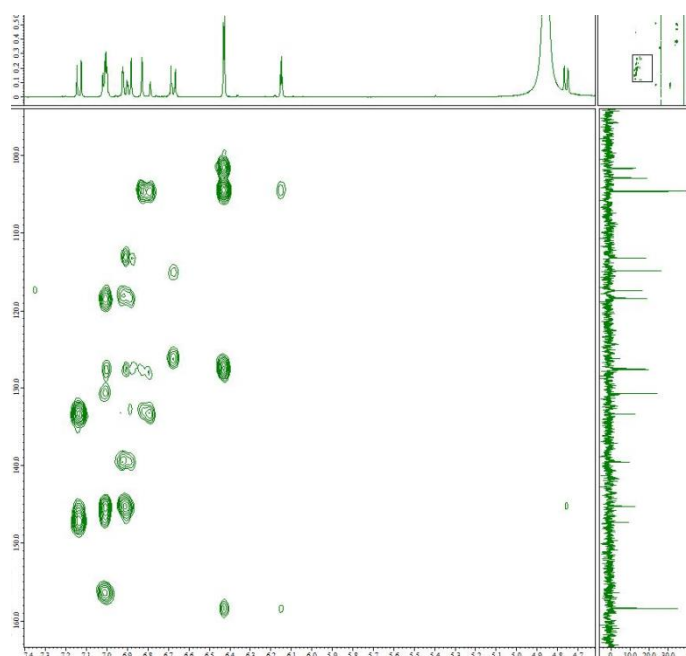
変換物 8 の ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD)



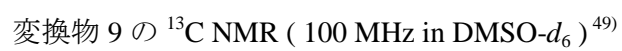
変換物 8 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

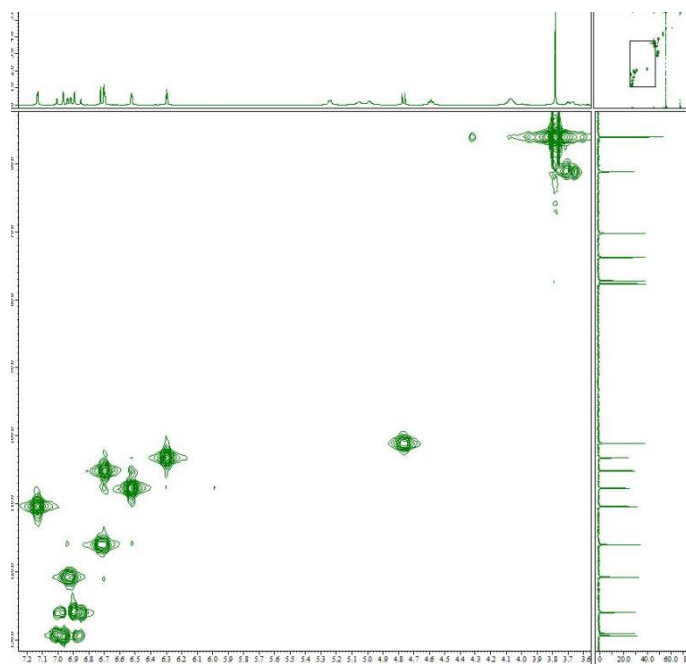


変換物 8 の ^1H - ^1H COSY スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

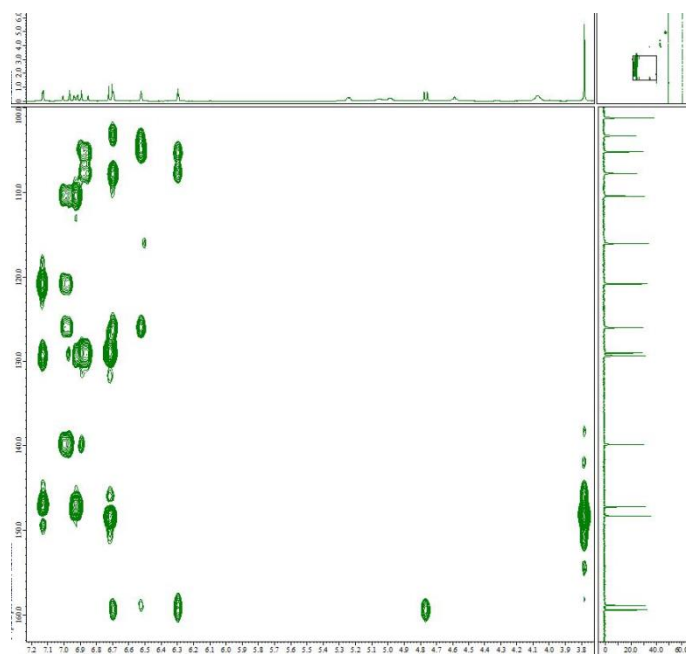


変換物 8 の HMBC スペクトル(400 MHz in CD_3OD)

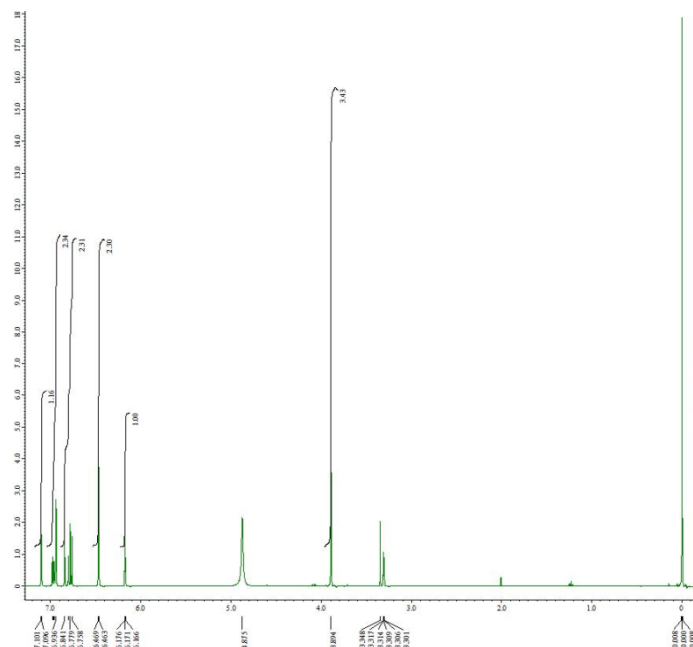




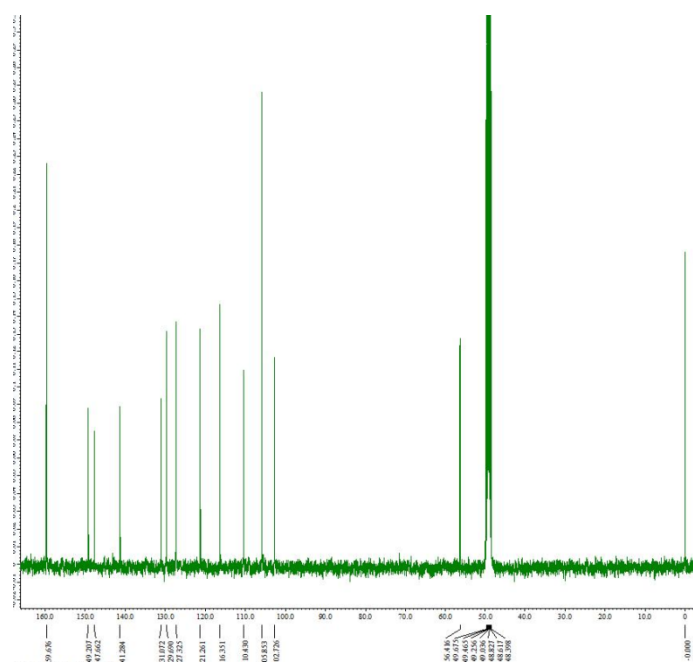
変換物 9 の HMQC スペクトル(400 MHz in DMSO- d_6)⁴⁹⁾



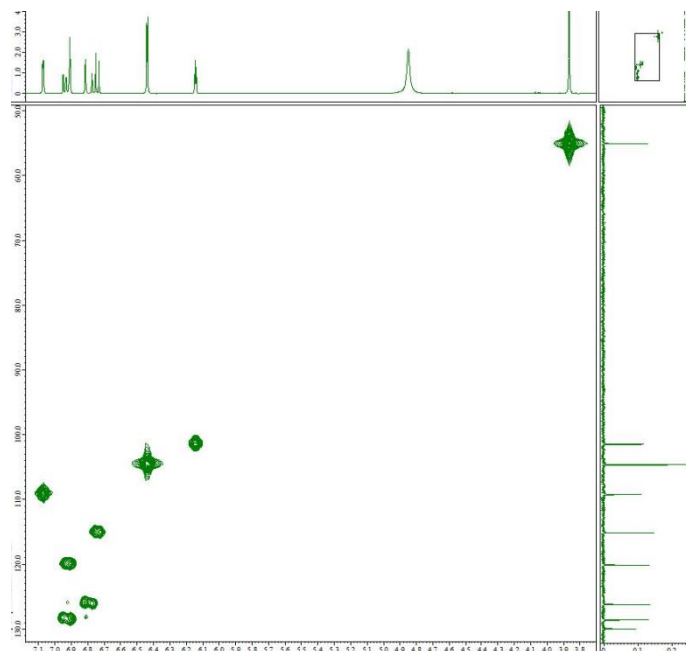
変換物 9 の HMBC スペクトル(400 MHz in DMSO- d_6)⁴⁹⁾



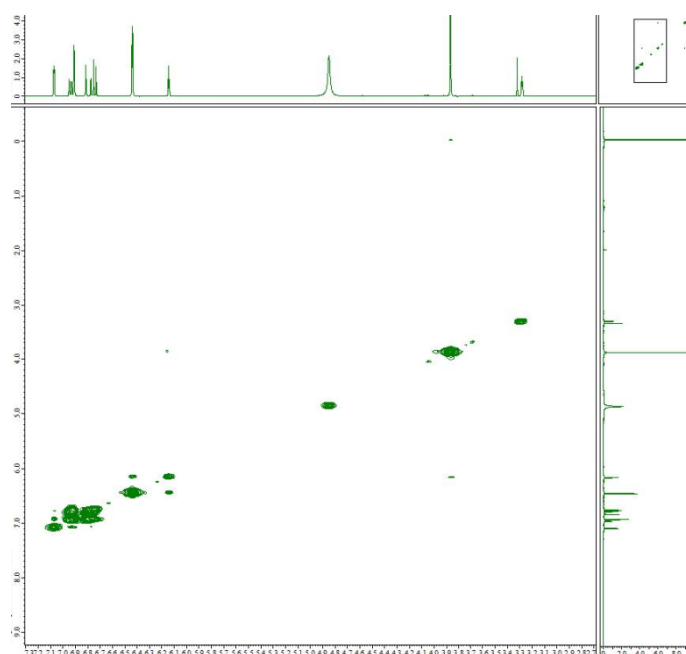
変換物 10 の ^1H NMR (400 MHz in CD_3OD)



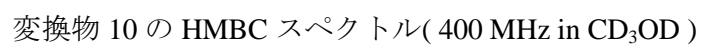
変換物 10 の ^{13}C NMR (100 MHz in CD_3OD)

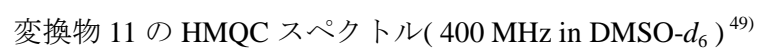
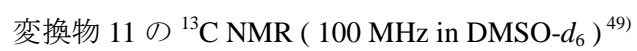


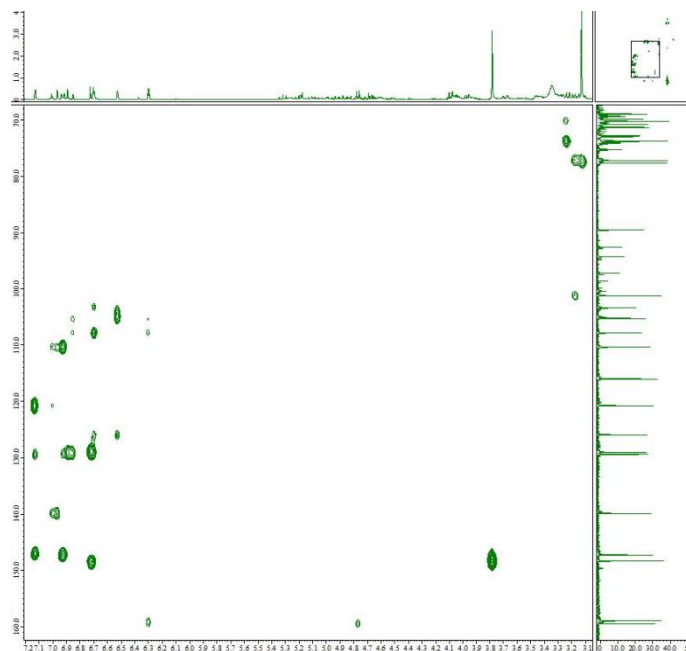
変換物 10 の HMQC スペクトル(400 MHz in CD₃OD)



変換物 10 の ¹H-¹H COSY スペクトル(400 MHz in CD₃OD)







変換物 11 の HMBC スペクトル(400 MHz in DMSO- d_6)⁴⁹⁾

第3章 ヨウシュヤマゴボウ培養細胞由来糖転移酵素を用いた配糖化

3.1 序論

3.1.1 糖転移酵素

植物には様々な酵素を有しており、その酵素を必要な段階で作用させ、有用物質の産生等を行っている。植物の二次代謝における糖転移酵素はヌクレオシド二リン酸によって活性化された糖（糖供与体）を基質（糖受容体）に転移する反応を触媒する。糖供与体については主に UDP-グルコースが用いられる。糖受容体としてはフェノール性化合物やテルペノイド、アルカロイドが挙げられる⁵⁰⁾。

また、有機合成において、水酸基を多数持つ化合物については、位置選択的に配糖化を行う場合、他の水酸基の保護・脱保護などの操作も必要になる。これに比べ糖転移酵素では、位置特異的な酵素を選択することで、容易に選択的配糖化が可能となる。

3.1.2 *PaGT3*

第2章でヨウシュヤマゴボウ培養細胞には高い配糖化能力を有していることが明らかとなった。さらに、2008年に東北大学の中山教授らによってヨウシュヤマゴボウ培養細胞にカプサイシンを投与した際に発現した3種類の糖転移酵素の単離精製に成功した(図3.1)⁵¹⁾。また、これらは、山口大学・小崎教授のもとで大腸菌に *PaGT3* 遺伝子を組み込み、培養を行っている。*PaGT3* はこれまでに、カプサイシン、クマル酸、ケンフェロール、ダイゼインなどの化合物で配糖体の合成が成功しているがスチルベン誘導体に関しての報告は多くない。

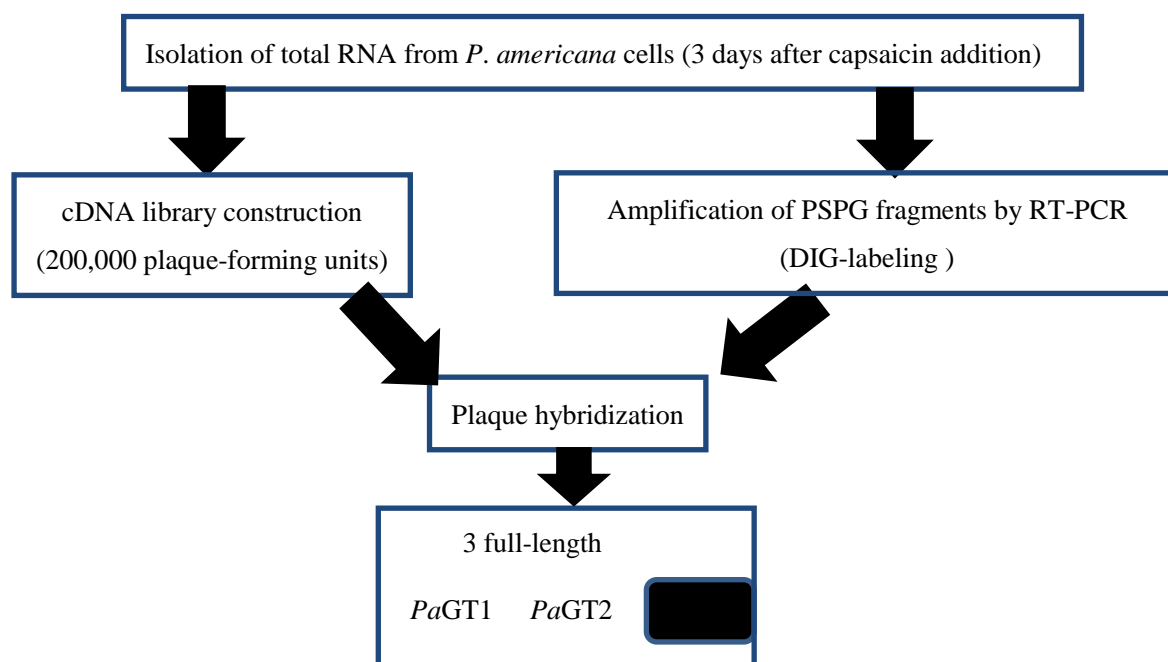


図 3.1 ヨウシュヤマゴボウ由来糖転移酵素の単離精製

3.2 本論

3.2.1 *PaGT3* によるレスベラトロール配糖体の合成

レスベラトロール 0.01 μmol , Uridine-5'-diphosphate-glucose(UDP-glucose) 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30 $^{\circ}\text{C}$, 60 min で反応させた.

反応後, Trifluoroacetic acid (TFA) を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

方法の詳細は実験 3.4 に示す.

HPLC 測定の結果, 2 本のピークを検出した. 第 2 章で得られた化合物で *co*-HPLC を行った結果, 変換物はレスベラトロール 3 位配糖体及びレスベラトロール 4' 位配糖体であることが確認できた (図 3.2) .

変換率を確認したところ, 4' 位配糖体は 68%, 3 位配糖体は 29% であり, 培養細胞を用いた場合と選択性が異なった.

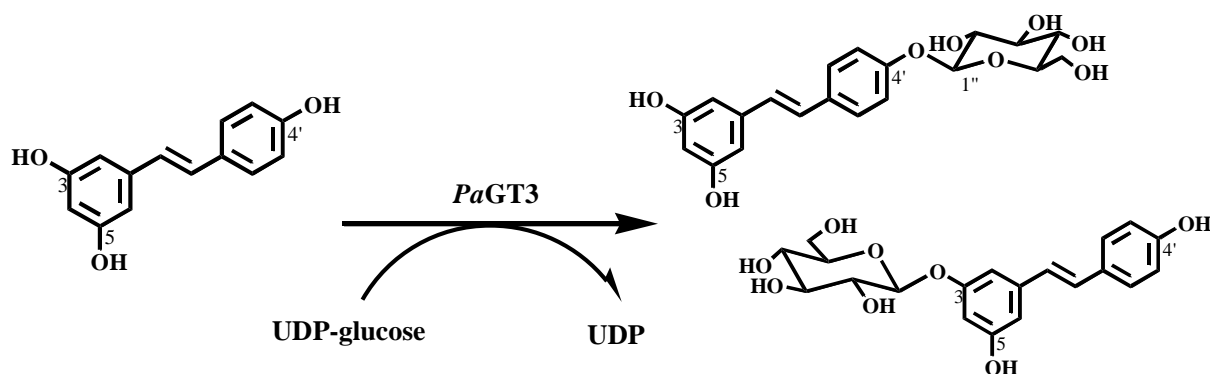


図 3.2 *PaGT3* によるレスベラトロール配糖体の合成

3.2.2 *PaGT3* によるピノスチルベン配糖体の合成

ピノスチルベン 0.01 μmol , UDP-glucose 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30°C, 60 min で反応させた.

反応後, TFA を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

方法の詳細は実験 3.4 に示す.

HPLC 測定の結果, 1 本のピークを検出した. 第 2 章で得られた化合物で *co*-HPLC を行った結果, 変換物はピノスチルベン 3 位配糖体であることが確認できた (図 3.3) .

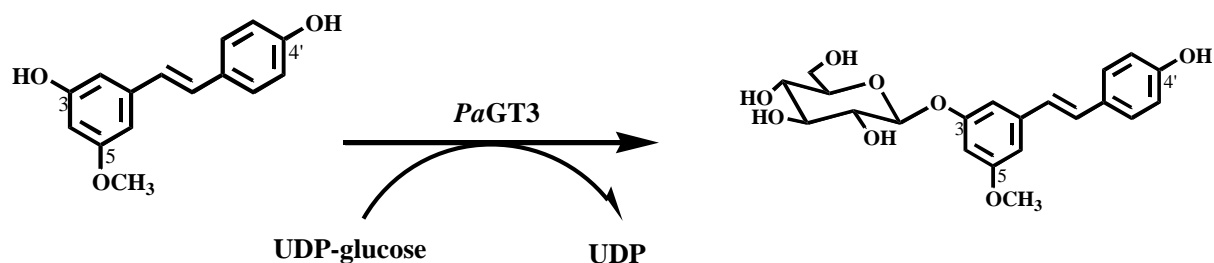


図 3.3 *PaGT3* によるピノスチルベン配糖体の合成

3.2.3 *PaGT3* によるプテロスチルベン配糖体の合成

プテロスチルベン 0.01 μmol , UDP-glucose 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30°C, 60 min で反応させた.

反応後, TFA を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

方法の詳細は実験 3.4 に示す.

HPLC 測定の結果, 1 本のピークを検出した. 第 2 章で得られた化合物で *co*-HPLC を行った結果, 変換物はプテロスチルベン 4' 位配糖体であることが確認できた (図 3.4) .

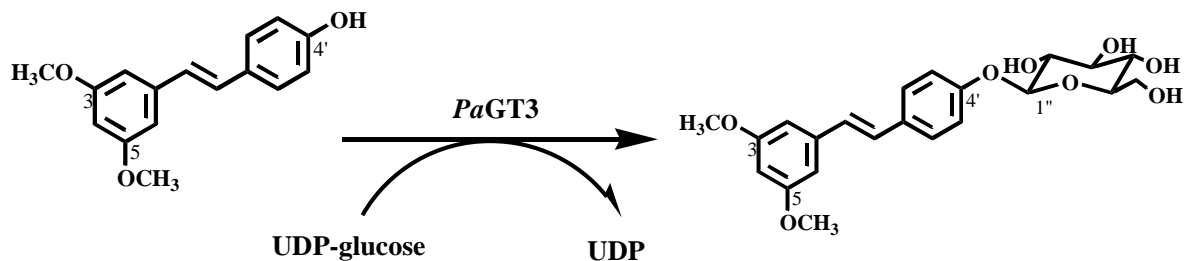


図 3.4 *PaGT3* によるプテロスチルベン配糖体の合成

3.2.4 *PaGT3* によるピセアタンノール配糖体の合成

ピセアタンノール 0.01 μmol , UDP-glucose 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30°C, 60 min で反応させた.

反応後, TFA を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

方法の詳細は実験 3.4 に示す.

HPLC 測定の結果, 1 本のピークを検出した. 第 2 章で得られた化合物で *co*-HPLC を行った結果, 変換物はピセアタンノール 4'位配糖体であることが確認できた (図 3.5) .

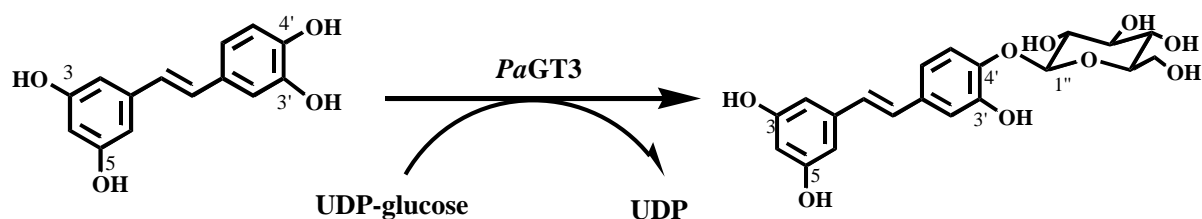


図 3.5 *PaGT3* によるピセアタンノール配糖体の合成

3.2.5 *PaGT3* によるイソラポンチゲニン配糖体の合成

イソラポンチゲニン 0.01 μmol , UDP-glucose 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30°C, 60 min で反応させた.

反応後, TFA を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

方法の詳細は実験 3.4 に示す.

HPLC 測定の結果, 1 本のピークを検出した. 第 2 章で得られた化合物で *co*-HPLC を行った結果, 変換物はイソラポンチゲニン 4'位配糖体であることが確認できた (図 3.6) .

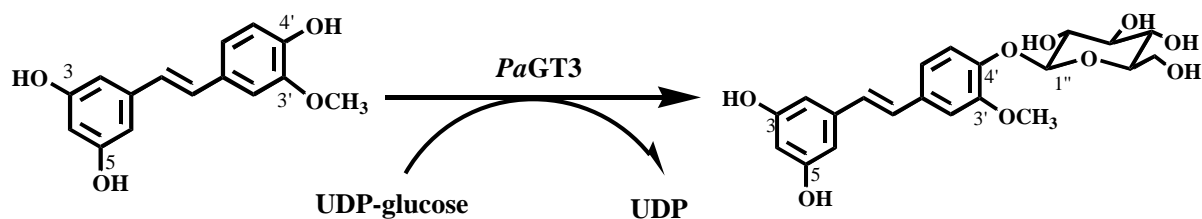


図 3.6 *PaGT3* によるイソラポンチゲニン配糖体の合成

3.2.6 酵素反応速度論の検討

用いた基質と酵素における親和性および反応速度を検討するために K_m 値と V_{max} 値を算出した.

各基質の濃度を変化させて酵素活性を測定した. それぞれの基質についての Lineweaver-Burk Plot を示す (図 3.7-3.11). また,そこから得られた親和性(K_m), と最大反応速度(V_{max})を表 3.1 に示す.

表 3.1 *PaGT3* による親和性と最大反応速度

	K_m (μM)	V_{max} ($\mu\text{M} / \text{min}$)
レスベラトロール	33.697	6.309
ピノスチルベン	295.271	0.039
プテロスチルベン	22.067	1.961
ピセアタンノール	276.907	66.225
イソラポンチゲニン	22.233	1.096

レスベラトロール, ピノスチルベンとプテロスチルベンを比較したところ, レゾルシノールの一方にメチル基が結合することで, 親和性が大きく低下し, さらにもう一方にメチル基が結合することで親和性の向上が確認された.

また, ピセアタンノールとイソラポンチゲニンを比較したところ, カテコールの一方がメチル化されることで, 親和性の向上が見られた. 反応速度においては, メトキシ基を有さない場合の方が高いことが明らかになった.

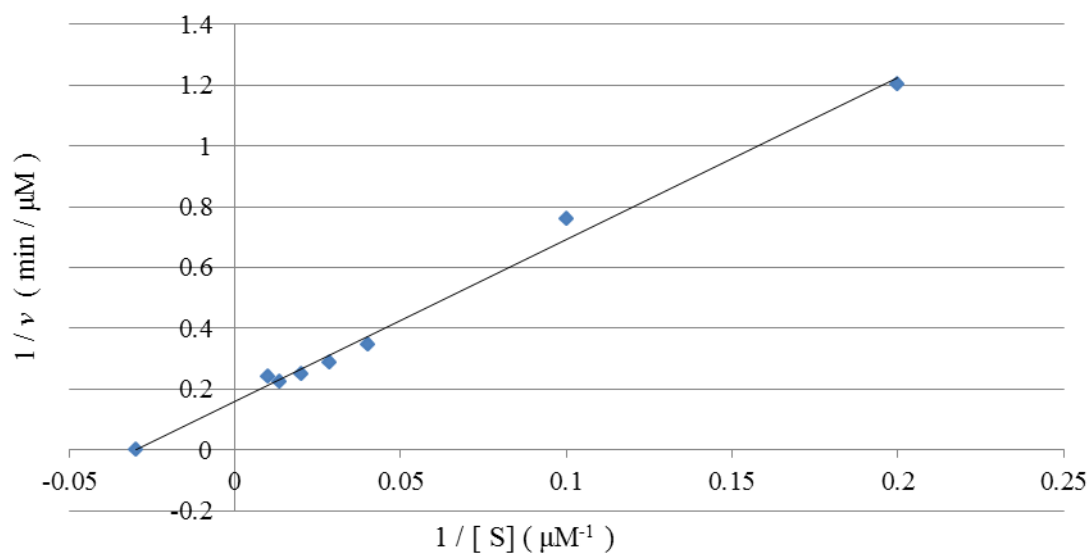


図 3.7 レスベラトロールの Lineweaver-Burk Plot

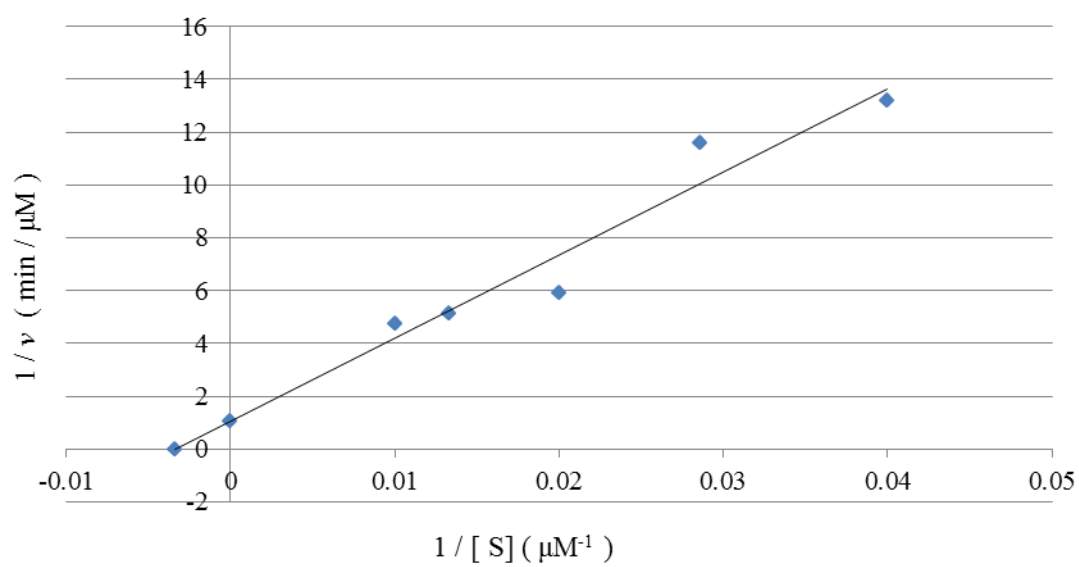


図 3.8 ピノスチルベンの Lineweaver-Burk Plot

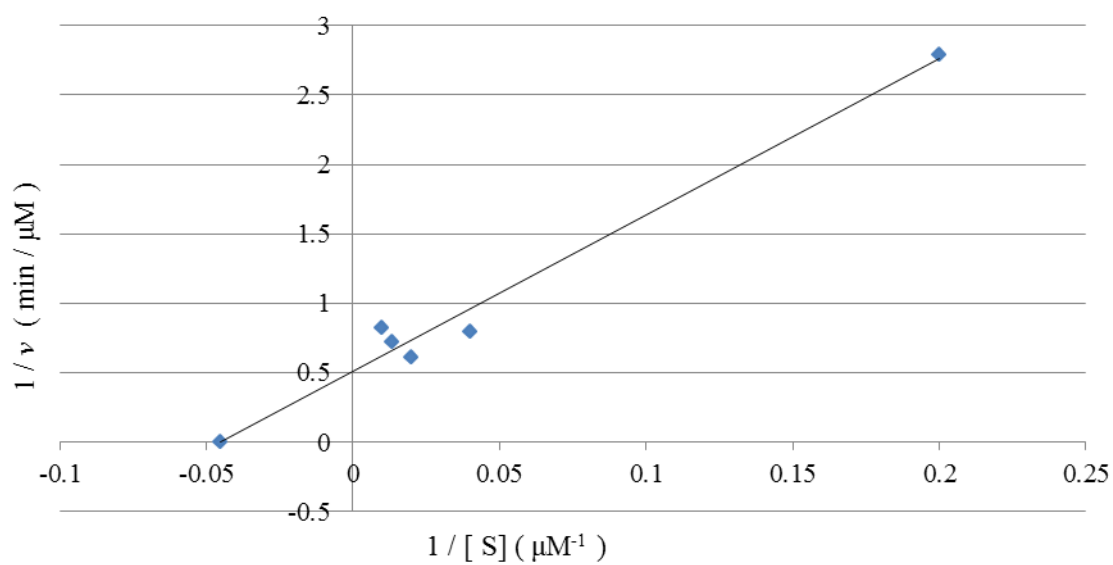


図 3.9 プテロスチルベンの Lineweaver-Burk Plot

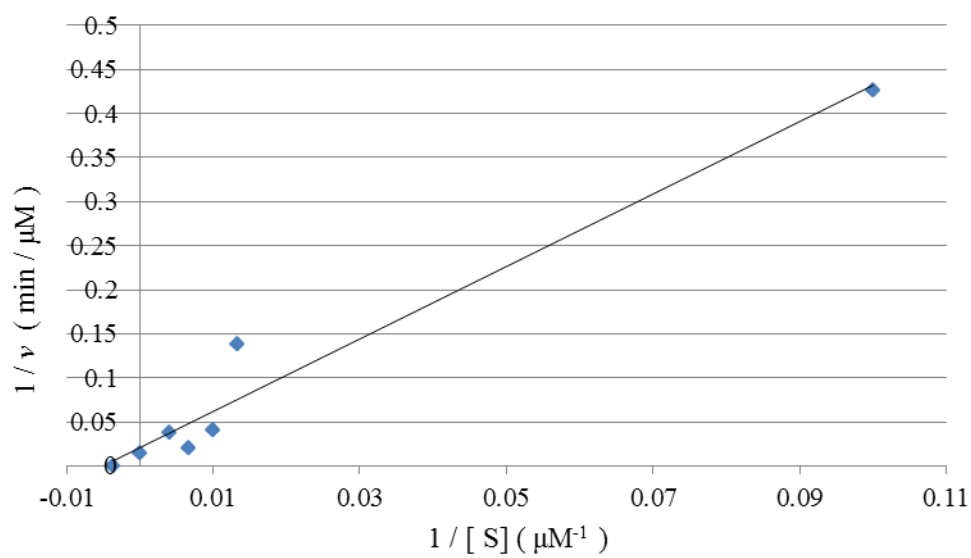


図 3.10 ピセアタンノールの Lineweaver-Burk Plot

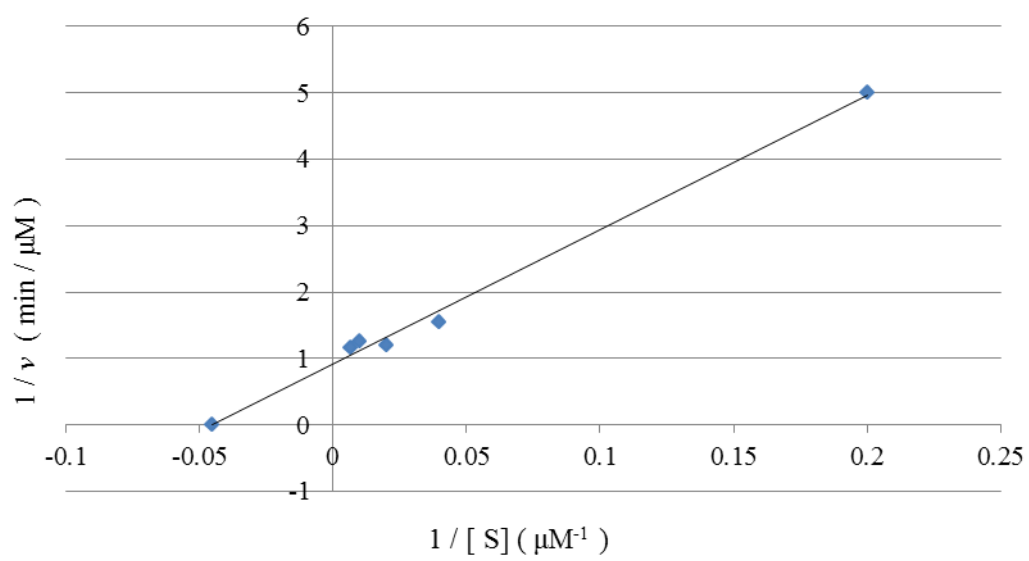


図 3.11 イソラポンチゲニンの Lineweaver-Burk Plot

3.3 結論

ヨウシュヤマゴボウ由来糖転移酵素である *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、主生成物が異なった。このことから、レスベラトロールをヨウシュヤマゴボウ培養細胞に投与した時に作用した酵素は異なるものであると考えられる。また、ピノスチルベンに関しては、培養細胞では、3位と4'位に配糖化が見られ、変換率は3位の方が高かった。*PaGT3* においては3位にのみに選択的配糖化が確認された。

また、イソラポンチゲニンについても、培養細胞では、3位と4'位に配糖化が見られ、変換率は4'位の方が高かった。*PaGT3* においては、4'位にのみに選択的配糖化が確認された。

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場合、*PaGT3* が作用するのではないかと考えられる。さらにピノスチルベンはレゾシノール的一方がメチル化された化合物であること、イソラポンチゲニンはカテコール的一方がメチル化された化合物であり、*PaGT3* によって糖が結合した部分はメトキシ基の存在した環に選択的に結合したことから、*PaGT3* は化合物のメトキシ基を認識するのではないかと考えられる。

さらに、*PaGT3* を生成する段階で、バニリル基を有するカプサイシンを投与した場合に発現した遺伝子を精製したことから、メトキシ基との関係は十分に考えられる。

K_m 値と V_{max} 値の結果から、*PaGT3* の親和性や反応速度はメトキシ基の有無、数、位置関係が大きく関わってくるのではないかと考えられる。

3.4 実験

a. 使用機器

第2章 2.4.a で述べたものと同様の HPLC 装置を用いて分析を行った.

b. 糖転移酵素 (*PaGT3*)

酵素は 2008 年に東北大学・中山亨教授らにおいて単離精製され, 山口大学・小崎紳一教授によって大腸菌において培養, 精製された酵素を用いた.

3.4.1 リン酸緩衝液の調整

75 mM のリン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウムをそれぞれ調製し, pH メーターにて pH 7.2 に調整した.

3.4.2 UDP-グルコースおよび基質の調整

UDP-グルコースと基質について, 5 mM のストック溶液を作製した. また, UDP-グルコースにおいては超純水, 基質についてはエタノールに溶解させた.

3.4.3 糖転移酵素 *PaGT3* を用いた合成

レスベラトロール 0.01 μmol , UDP-glucose 0.02 μmol , *PaGT3* 1unit を加え, pH 7.2 リン酸緩衝液を用いて全量 200 μL として, 30°C, 60 min で反応させた.

反応後, TFA を 3 μL 加えて酵素を失活させ, HPLC にて測定を行った.

3.4.4 K_m 値, と V_{max} 値の算出

K_m 値, と V_{max} 値の算出についてレスベラトロールの結果を例として示す.

反応速度を求めることで Michaelis-Menten の式 (式 3.1) が得られる

$$v = \frac{V_{max} + [S]}{K_m + [S]}$$

式 3.1 Michaelis-Menten の式

酵素反応において基質の濃度を変化させて基質濃度と反応速度のグラフを算出した (図 3.12) .

反応量は, 基質の検量線を用いて算出した (図 3.13) .

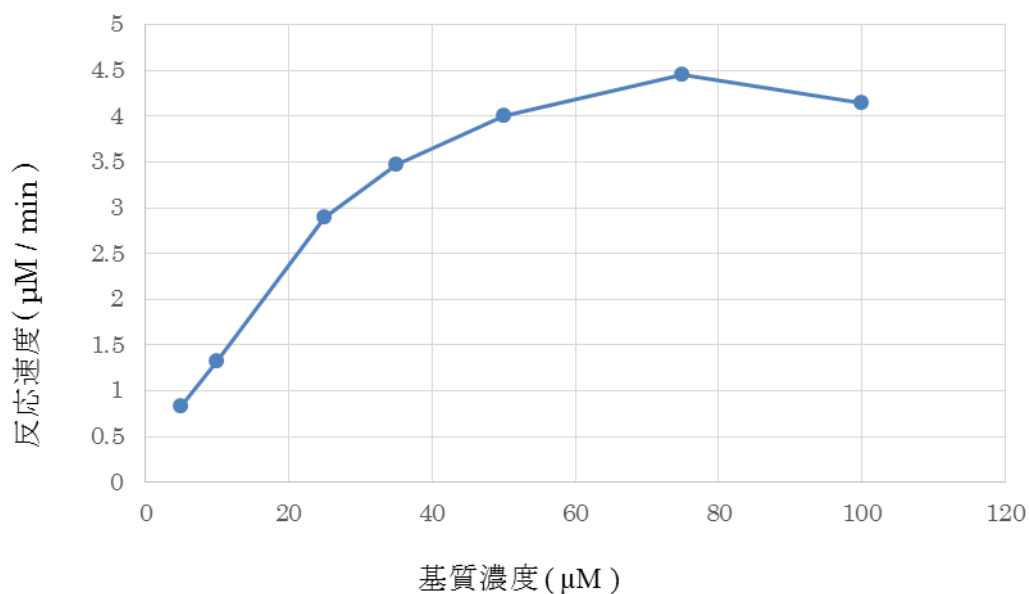


図 3.12 レスベラトロール濃度と反応速度のグラフ

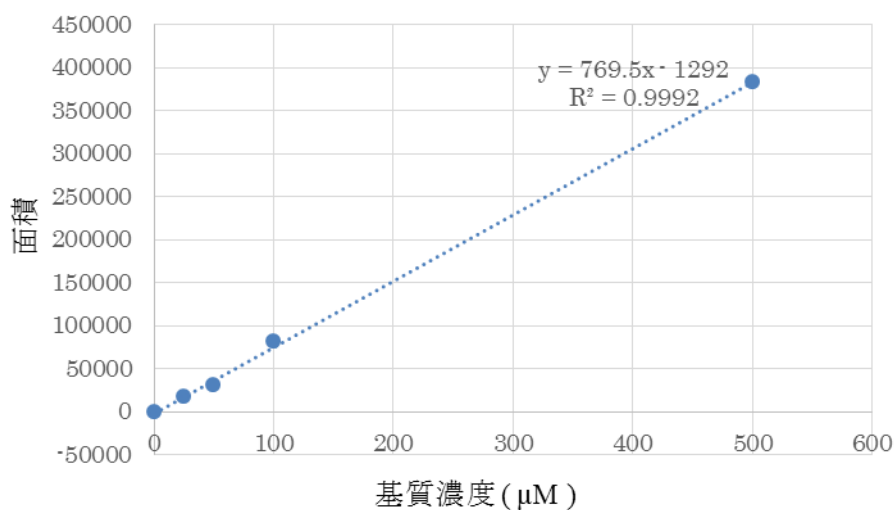


図 3.13 レスベラトロールの検量線

また、式 3.1 を変形させることで、Lineweaver-Burk の式が得られる（式 3.2）。

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

式 3.2 Lineweaver-Burk の式

Lineweaver-Burk プロットでは、横軸に $1/[S]$ 、縦軸に $1/V$ をとる。直線の x 切片が $-1/K_m$ 、y 切片が $1/V_{max}$ となるので、グラフから K_m 、 V_{max} を求めることができる。

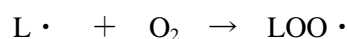
第4章 生理活性試験

4.1 序論

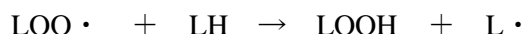
4.1.1 活性酸素

近年、ストレス等の要因によって発生した活性酸素やフリーラジカルによって脂質、タンパク質やDNAなどを攻撃し、それによって脂質の酸化、タンパク質の変性、DNAの主鎖の切断や塩基の修飾を起こしそれが癌や老化に繋がっていくことが明らかとなっている⁵²⁾。

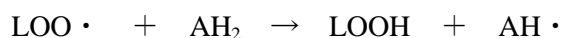
食品中の脂質の酸化は一般的にフリーラジカルを中間体とする自動酸化反応によって進行する⁵³⁾。開始反応によって生成したアルキルラジカルが速やかに空気中の酸素と結合してペルオキシラジカルとなる。



さらに、ペルオキシラジカルは新たな脂質分子から水素を引き抜いてヒドロペルオキシドとなって、同時に新たな脂質ラジカルが生成し、反応は連鎖的に進行する。



ラジカル阻止の抗酸化剤(AH₂)は、ペルオキシラジカルに水素を供与することによって以下の反応を示し、上記の連鎖反応を阻止する。



このように本機構による抗酸化剤としては、水素供与体として作用するものが大部分であり、代表的なものが、フェノール性化合物である。

フェノール性化合物は、ヒドロペルオキシドへの水素供与によってフェノキシラジカルを発生する(図4.1)。

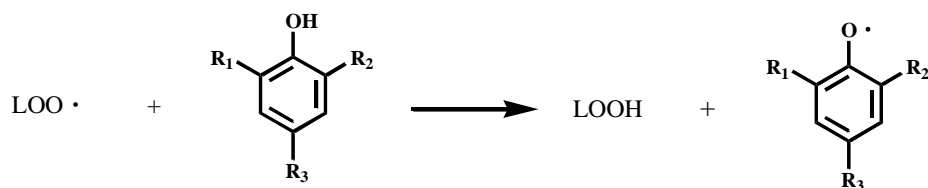


図4.1 フェノール性化合物とペルオキシドラジカルの反応

さらに、フェノキシラジカルは共鳴混成体となり、安定化して連鎖反応を切断する(図4.2)。

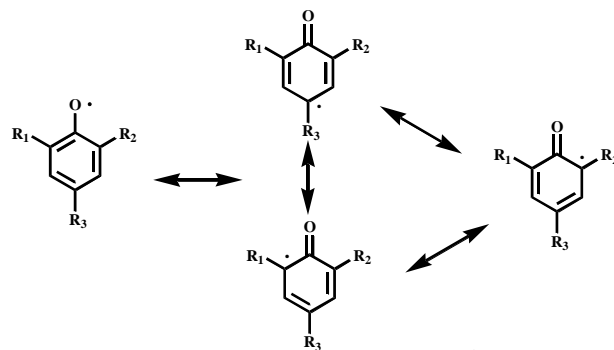


図4.2 フェノキシラジカルの共鳴混成体と連鎖反応

4.1.2 ORAC 法による抗酸化活性試験⁵⁴⁾⁻⁵⁶⁾

ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)は, 1992 年, 米国立老化研究所(National Institute on Aging)の Cao らによって開発され, 米国農務省(USDA)の Prior らによって改良が行われてきた.

ORAC は食品やサプリメントの抗酸化力を科学的に分析する基準として, 米国を中心に世界的に用いられる様になってきた. 米国では既に ORAC 値を表記した食品が多く上市されており, 消費者にその食品がどの程度の抗酸化力を有するかを具体的な数値で示している.

更に, USDA の Prior らにより, ORAC は抗酸化物質の分析法として AOAC (Association of Official Agricultural Chemists)に申請されている. 米国において ORAC が AOAC 法として認可されれば, 抗酸化能の評価方法として世界的に使用される可能性が高い.

ORAC は, 蛍光物質であるフルオレセインを蛍光プローブとして使用し, 一定の活性酸素の存在下, これにより分解されるフルオレセインの蛍光強度を経時的に測定し, その変化を指標として抗酸化力を測定する方法である. この反応系に抗酸化物質が共存するとフルオレセインの蛍光強度の減少速度が遅延するため, 標準物質である Trolox 存在下のフルオレセインの減少速度の遅延度合いと比較して, 標準物質に換算した試料の抗酸化力を算出する (図 4.3) .

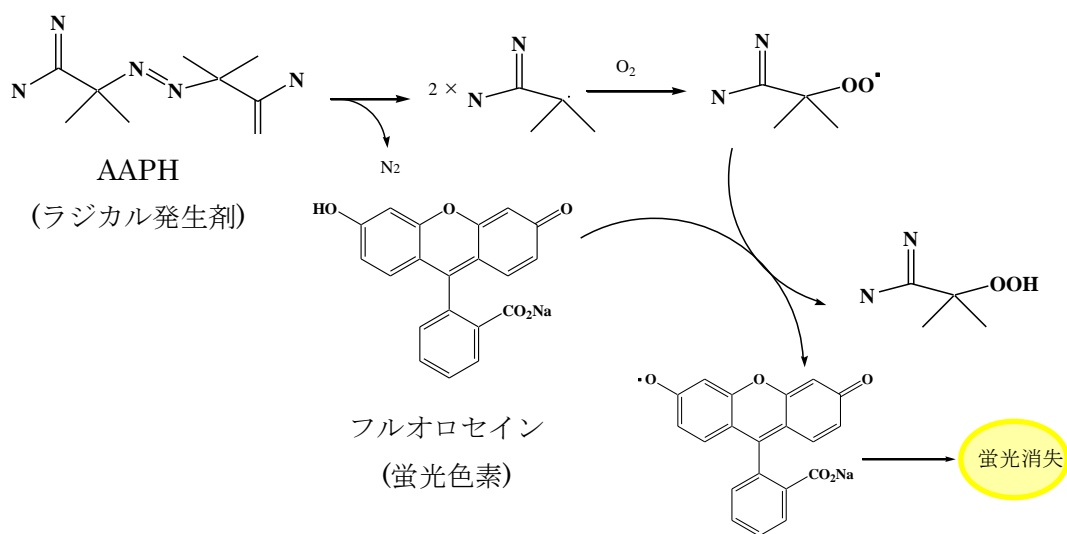


図 4.3 ORAC 法の原理

4.1.3 メラニンの生成⁵⁷⁾⁻⁶¹⁾

メラニンは、ヒトを含む動物、植物、原生動物、また一部の菌類、真正細菌において形成される色素であり、人間などの動物は、細胞核の DNA を損壊する太陽からの紫外線を毛や皮膚のメラニン色素で吸収する。このようにメラニンは皮膚を保護する役割を担っている。

しかし、メラニンが過剰に発現することで、シミやそばかすの原因となってしまう。

メラニンの形成プロセスは近年明らかとなっており、これは、酵素反応と化学反応が組み合わさって形成される。生体で起きるメラニンの生成経路は以下の図のように起こることが解明された（図 4.4）。

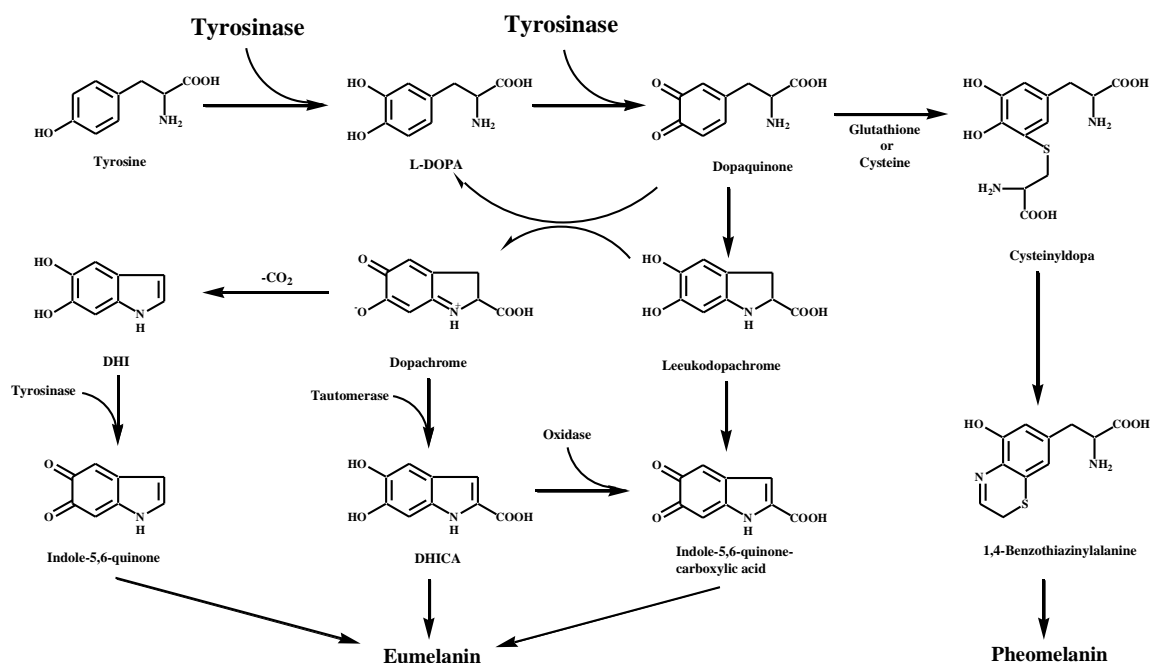


図 4.4 メラニンの生合成

このことから、チロシナーゼの阻害剤は基質としてチロシンや L-DOPA を用いて、ドーパキノンの形成に関して評価される。

以上のことから、活性酸素とメラニンは過剰に発現することで身体に大きな影響を及ぼす要因となってしまう。さらにこれらの活性試験において配糖体における評価とはあまり報告されていない。配糖体において活性の有用性を見出すことができれば、今後、配糖体のさらなる応用・利用が期待できる。

そこで、本研究では上記で示した抗酸化およびチロシナーゼ阻害活性について、第二章で得られた化合物及び基質を用いて評価を行い、アグリコンおよび配糖体の活性の比較を行った。

4.2 本論

4.2.1 抗酸化活性試験

抗酸化活性試験として, ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity)法を用いて行った.

標準物質として水溶性ビタミンである Trolox を用いて行った.

96 穴マイクロプレートにサンプル, 蛍光色素であるフルオロセインを加え, 37°Cで 30 分間インキュベートした. その後, ラジカル発生剤である 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride (AAPH)を加えてマイクロプレートリーダーにおいて蛍光度を測定した.

方法の詳細は実験 4.4 に示す. 結果を以下に示す (表 4.1) .

表 4.1 スチルベン誘導体とその配糖体の抗酸化活性

化合物	ORAC 値
	($\mu\text{M TE}/\mu\text{M}$)
レスベラトロール	5.26 ± 0.26
レスベラトロール 4'位配糖体	4.01 ± 0.71
レスベラトロール 3 位配糖体	4.89 ± 0.79
ピノスチルベン	5.01 ± 0.27
ピノスチルベン 4'位配糖体	1.89 ± 0.25
ピノスチルベン 3 位配糖体	3.13 ± 0.12
プテロスチルベン	2.70 ± 0.30
プテロスチルベン 4'位配糖体	0.68 ± 0.15
ピセアタンノール	9.00 ± 0.44
ピセアタンノール 4'位配糖体	4.56 ± 0.80
イソラポンチゲニン	6.07 ± 0.19
イソラポンチゲニン 4'位配糖体	1.95 ± 0.65
イソラポンチゲニン 3 位配糖体	4.18 ± 0.72

ORAC 値は Trolox 当量を示し, これは化合物 1 μM 当たりの Trolox 相当量を示しており, Trolox の何倍の抗酸化活性を有するかという評価方法である.

この結果, 配糖化を行うことで抗酸化活性は低下したことが確認された.

4.2.2 チロシナーゼ阻害活性試験

エッペンドルフチューブに L-DOPA, チロシナーゼ (マッシュルーム由来), サンプル溶液および pH 7.0 リン酸緩衝液を加えて, 30℃で 5 分間インキュベートした. 反応後, 分光光度計を用いて, 475 nm における吸光度を測定した. 標準物質として, 実際に化粧品等にも利用されているアルブチンも同様に測定した. 方法の詳細は実験 4.4 に示す.

各化合物の濃度と消去率のグラフは以下ようになった (図 4.5-4.17) .

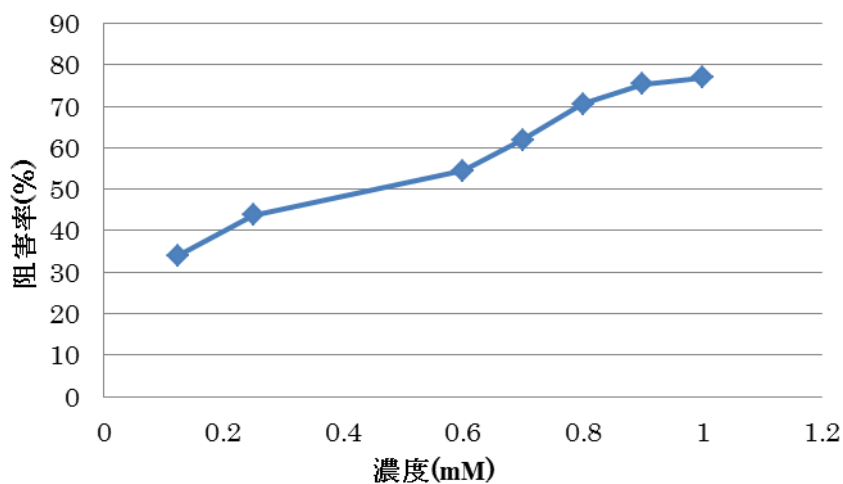


図 4.5 各濃度におけるレスベラトロールの阻害率

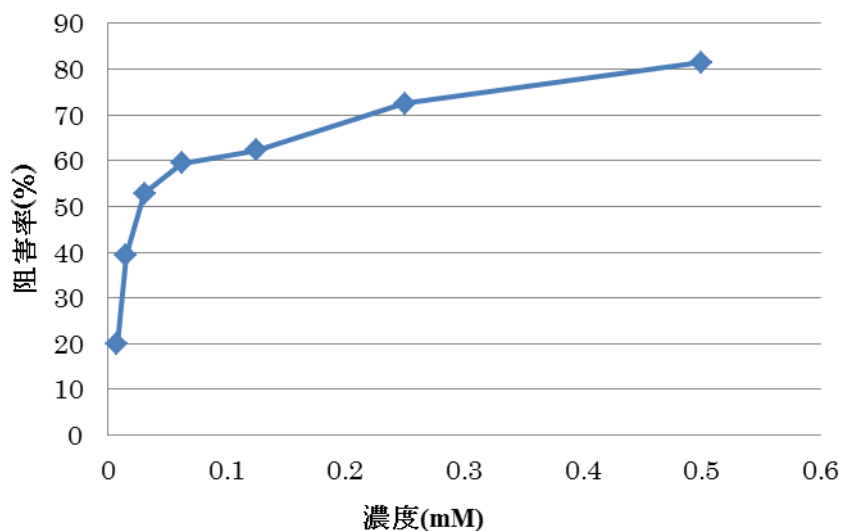


図 4.6 各濃度におけるレスベラトロール 4'位配糖体の阻害率

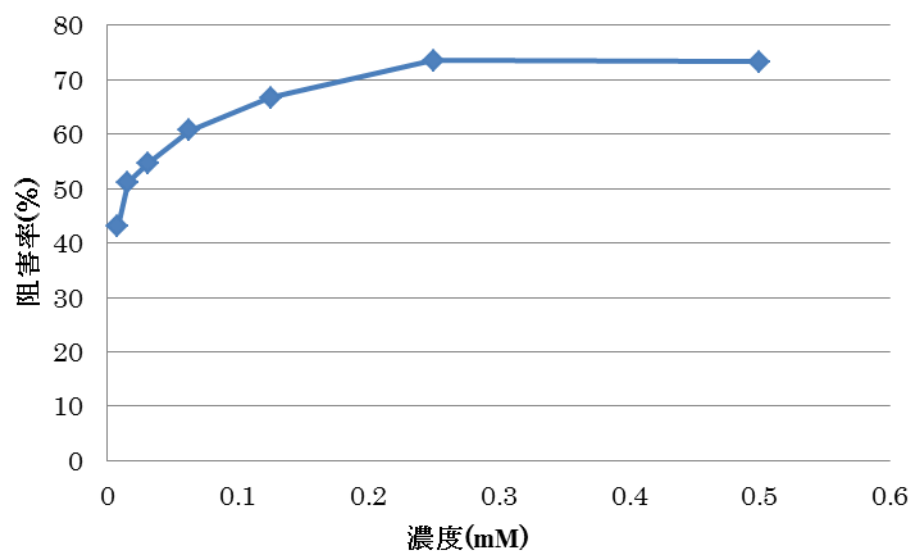


図 4.7 各濃度におけるレスベラトロール 3'位配糖体の阻害率

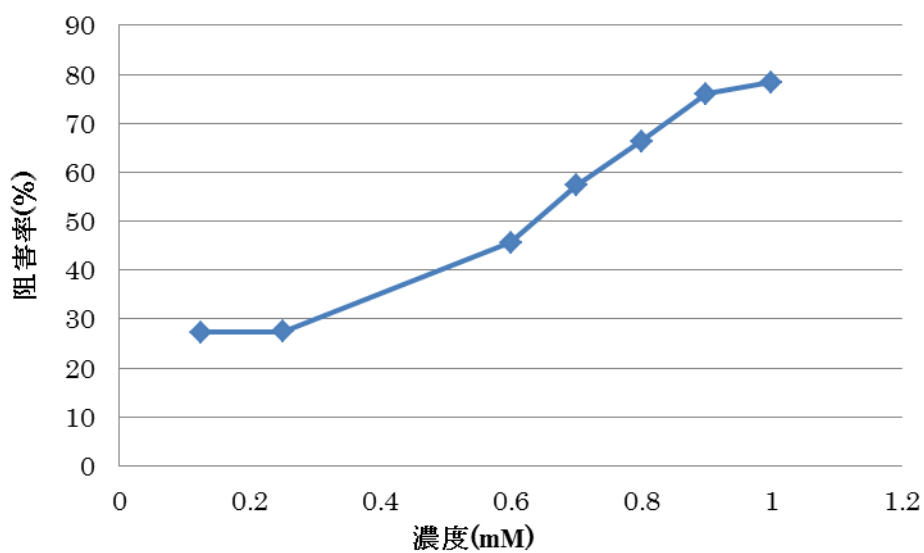


図 4.8 各濃度におけるピノスチルベンの阻害率

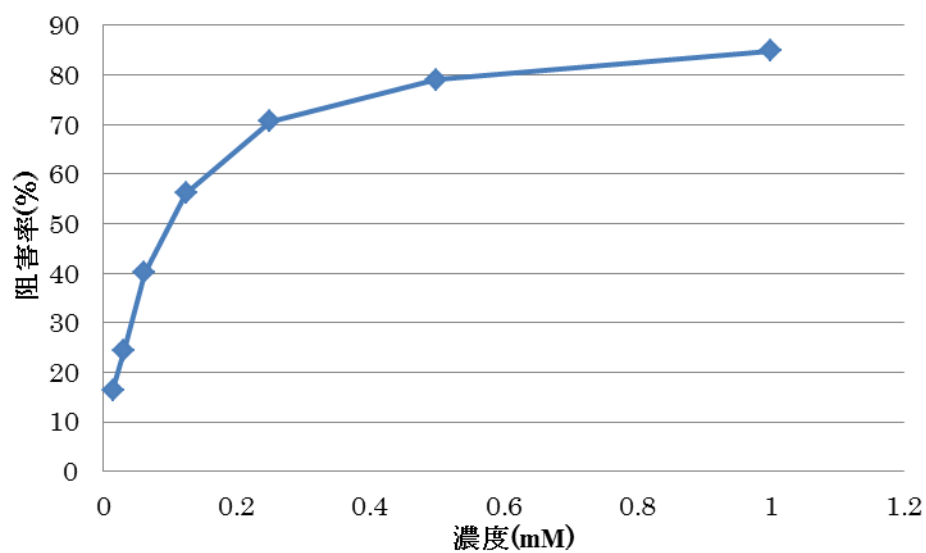


図 4.9 各濃度におけるピノスチルベン 4'位配糖体の阻害率

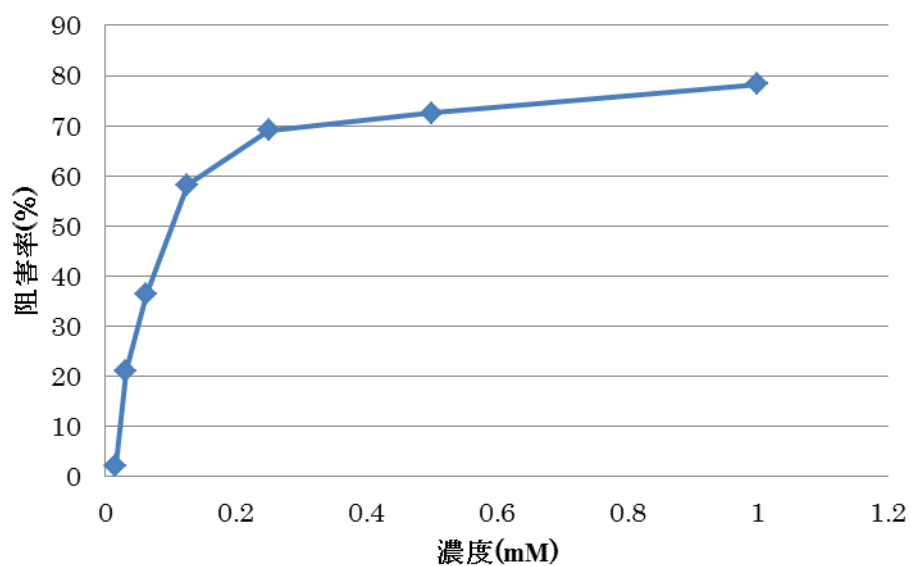


図 4.10 各濃度におけるピノスチルベン 3 位配糖体の阻害率

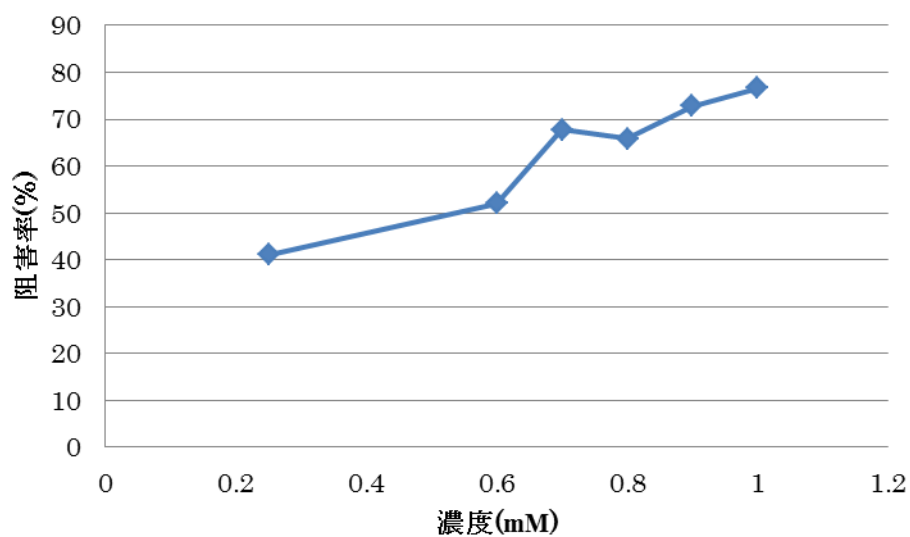


図 4.11 各濃度におけるプテロシルベンの阻害率

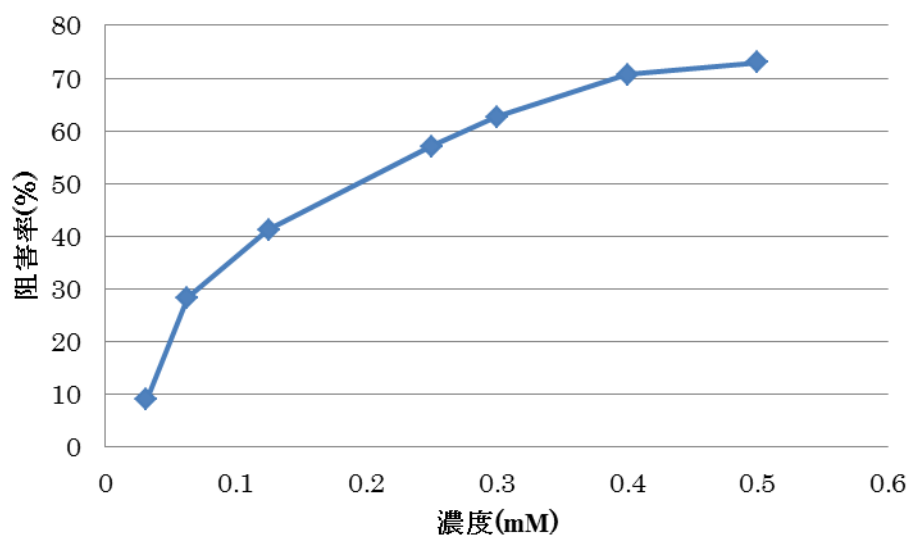


図 4.12 各濃度におけるプテロシルベンの 4'位配糖体の阻害率

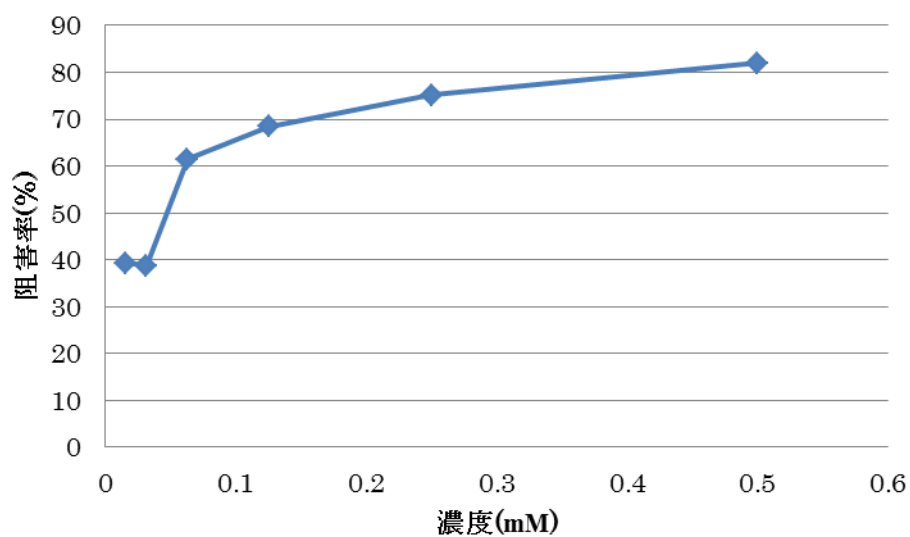


図 4.13 各濃度におけるピセアタンノール 4'位配糖体の阻害率

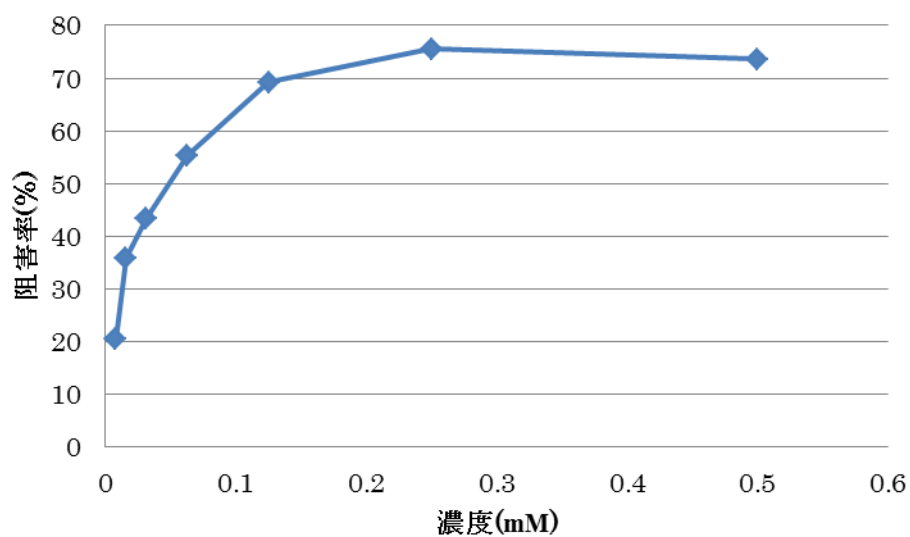


図 4.14 各濃度におけるイソラポンチゲニンの阻害率

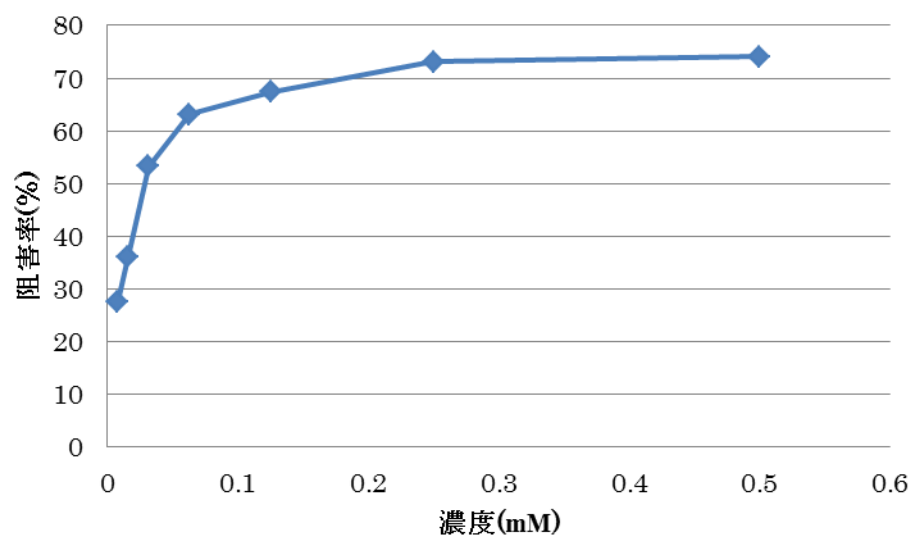


図 4.15 各濃度におけるイソラポンチゲニン 4'位配糖体の阻害率

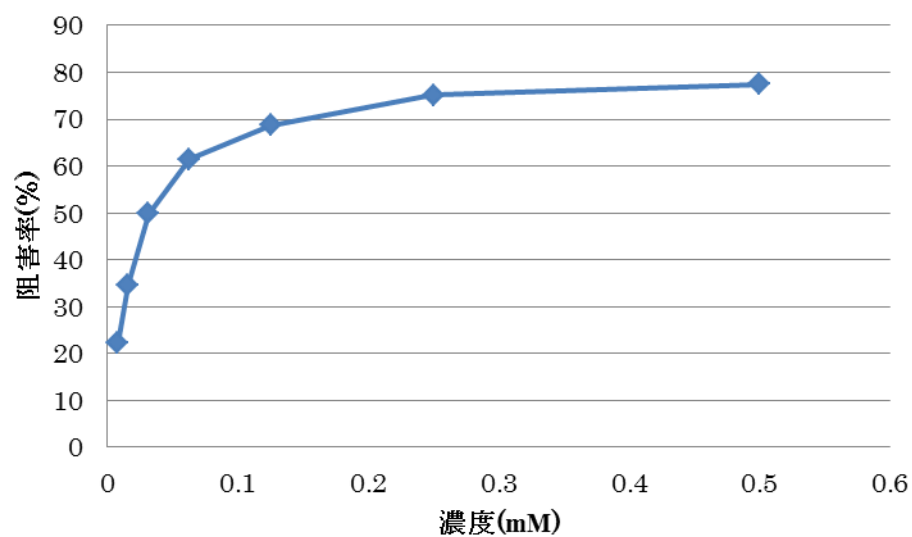


図 4.16 各濃度におけるイソラポンチゲニン 3'位配糖体の阻害率

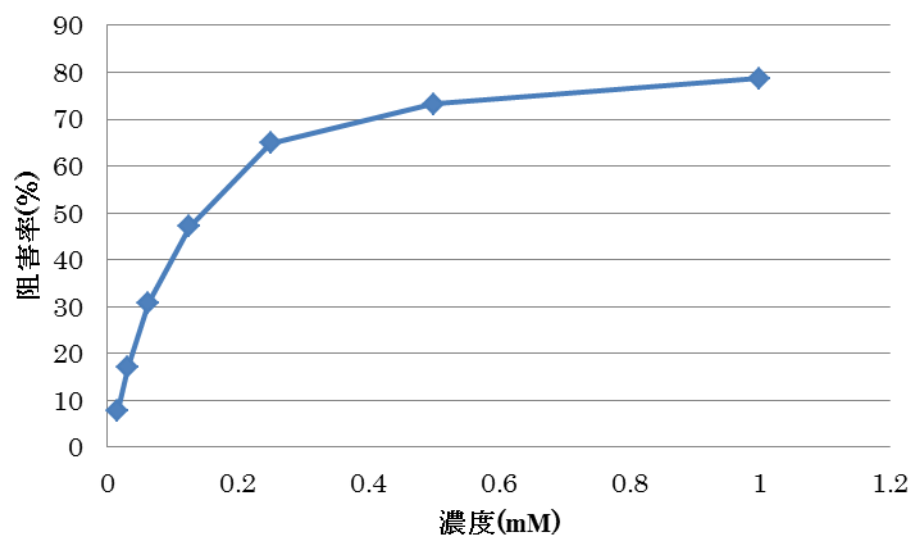


図 4.17 各濃度におけるアルブチンの阻害率

上記のグラフから算出した 50%阻害濃度を以下に示す（表 4.2）。

表 4.2 スチルベン誘導体とその配糖体のチロシナーゼ阻害活性

化合物	IC ₅₀ (mM)
	Tyrosinase inhibitory activity
レスベラトロール	0.57
レスベラトロール 4' 位配糖体	0.03
レスベラトロール 3 位配糖体	0.01
ピノスチルベン	0.59
ピノスチルベン 4' 位配糖体	0.08
ピノスチルベン 3 位配糖体	0.07
プテロスチルベン	0.65
プテロスチルベン 4' 位配糖体	0.23
ピセアタンノール	-
ピセアタンノール 4' 位配糖体	0.04
イソラポンチゲニン	0.05
イソラポンチゲニン 4' 位配糖体	0.03
イソラポンチゲニン 3 位配糖体	0.03
アルブチン	0.15

数値は 50%阻害濃度を示し、数値が低いほど活性が高い。

ピセアタンノールに関しては活性が見られなかった。その他の化合物については、配糖化することで活性が大きく向上した。特にプテロスチルベン配糖体以外はアルブチンよりも高い活性を示したことから化粧品等の応用も期待できる。

4.3 結論

抗酸化作用は水酸基のフェノール性水酸基の数に依存することが報告されている。

各基質を比較した場合、その傾向が顕著に見られる。さらに、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、イソラポンジゲニンについては糖の結合する位置で活性の大きな変化が見られた。このことから、スチルベン誘導体において4'位の水酸基が抗酸化活性に寄与していると示唆される。さらにレスベラトロールに関しては大きな低下が見られなかった。また、第2章のHPLCの結果から、配糖体は基質よりも極性が向上したことが示された。これらのことを踏まえても、抗酸化活性の大きな変化も見られないのであれば水溶性の高い化合物の方が使用範囲が広がると期待される。さらに、抗酸化活性は抗酸化化合物自身が活性酸素により酸化されるので、活性が低下したということは、化合物の活性酸素に対する安定性が向上したとも考えられる。

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、肌を保護に貢献できることが期待できる。

さらに、抗酸化活性の結果と総合するとレスベラトロールにおいては配糖化することで水酸化が向上し、抗酸化活性の低下も大きく見られない。さらに、チロシナーゼ阻害活性が大きく向上したことから、今後、機能性化合物として有用であると期待できる。

4.4 実験

a. 使用機器

分光光度計は U-2800 Spectrophotometer (日立) を用いた.

マイクロプレートリーダーはパワースキャン HT (BioTek) を用いて測定を行った.

4.4.1 抗酸化活性試験

4.4.1.a 緩衝液の作製

A 液. リン酸緩衝液: 75 mM のリン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウムをそれぞれ調製し, pH メーターにて pH 7.4 に調整した.

B 液. MWA 溶液: メタノール, 超純水, 酢酸をそれぞれ 180:19:1 の割合で混合させた.

A 液と B 液を 9:1 の割合で混合させた.

4.4.1.b 試薬の調製

サンプルは 0 - 15 μM の範囲で希釈系列を作製し, Trolox は 0 - 100 μM の範囲で希釈系列を作製した. 蛍光色素であるフルオロセインは 100 nM に調製した. ラジカル発生剤である 2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) Dihydrochloride (AAPH) は 25 mM に調製した. 調製の際に用いた溶媒はすべて 4.3.1.a で作製した希釈緩衝液を用いた.

4.4.1.c 活性試験

96 穴マイクロプレートにサンプル 20 μL , フルオロセイン 200 μL を加え, 37°C で 30 分間インキュベートした. その後, AAPH を 75 μL 加えてマイクロプレートリーダーを用いて励起波長: 485 nm, 蛍光波長: 528 nm における蛍光度を測定した.

4.4.1.d ORAC 値の算出

得られた蛍光度から抗酸化曲線を作成した. 例としてレスベラトロールの抗酸化曲線を示す (図 4.18). AAPH の追加によって誘発される用量依存性の蛍光シグナルの減少を図 4.1 に示している. 測定した蛍光発光値は 100% まで正規化し, AAPH 追加後の初期の蛍光発光信号を 100% とした.

図 4.5 における曲線下面積 (AUC) として表現される抗酸化能は以下のように計算した:

$$\text{AUC} = 1 + \text{RFU1}/\text{RFU0} + \text{RFU2}/\text{RFU0} + \text{RFU3}/\text{RFU0} \\ + \dots + \text{RFUn}/\text{RFU0}$$

RFU0 = ゼロ時点における相対的な蛍光単位数

RFUn = 各時点における相対的な蛍光単位数

算出された AUC を同様に処理した Trolox から得られた検量線(図 4.19)に挿入し、サンプルの各濃度における Trolox 当量を算出した。

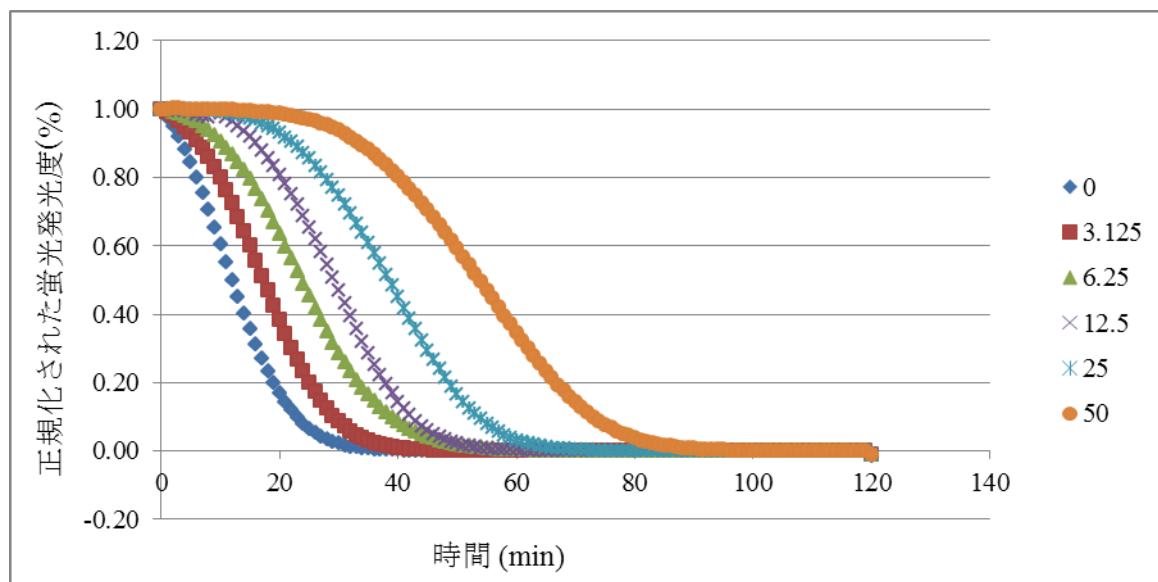


図 4.18 異なるレスベラトロール濃度における抗酸化曲線

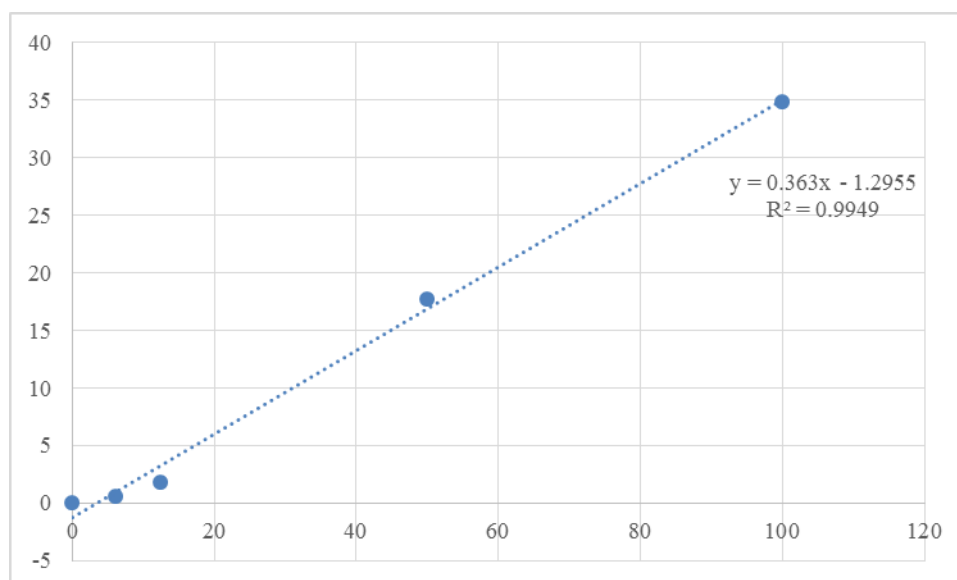


図 4.19 Trolox の検量線

4.4.2 チロシナーゼ阻害活性試験

4.4.2.a 緩衝液の作製

リン酸緩衝液：50 mM のリン酸水素二ナトリウムおよびリン酸二水素ナトリウムをそれぞれ調製し、pH メーターにて pH 7.0 に調整した。

4.4.2.b 試薬の調製

L-DOPA は超純水を用いて 3 mM に調製した。チロシナーゼ(マッシュルーム由来)は超純水を用いて 107.5 unit に調製した。サンプルは 0.007 - 1 mM の範囲で希釈系列を作製した。

4.4.2.c 活性試験

L-DOPA 100μL, サンプル溶液 500 μL, リン酸緩衝液 300 μL, チロシナーゼ溶液 100 μL 加え、30℃で 5 分間インキュベートした。反応後、分光光度計をもちいて 475 nm における吸光度を測定した。この時サンプル無添加の場合も同時に測定を行った。

4.4.2.d IC₅₀ の算出

サンプルの吸光度を A, サンプル無添加時の吸光度を Ac として下記の式から阻害率を算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = [1 - (A / A_c)] \times 100$$

この式より阻害活性における消去率のグラフの一例を示す(図 4.20)。

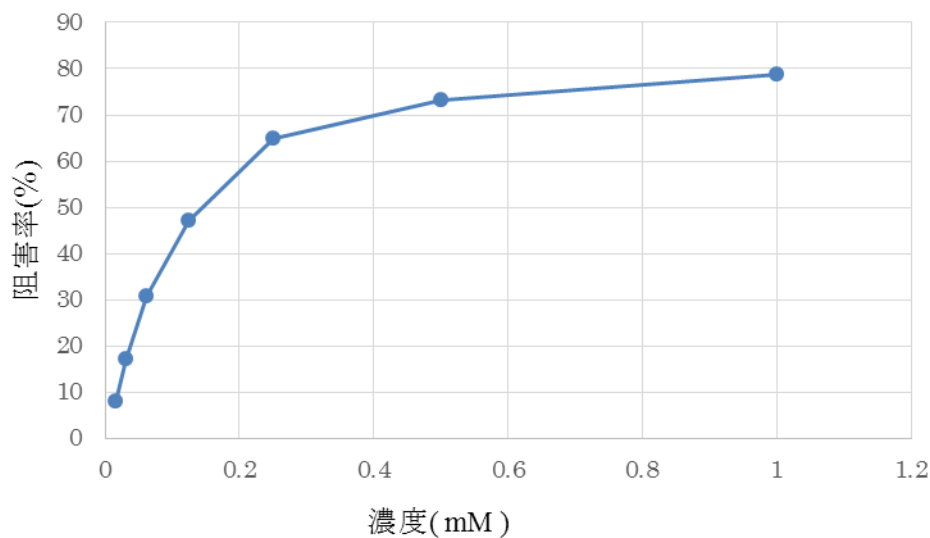


図 4.20 アルブチンの消去率のグラフ

この結果から、以下の式を用いて IC_{50} を求めた.

$$IC_{50}=10^{\left(\text{LOG} \left(A/B \right) * \left(50 - C \right) / \left(D - C \right) + \text{LOG} \left(B \right) \right)}$$

A:50%を挟む高い濃度

B:50%を挟む低い濃度

C:B における阻害率

D:A における阻害率

第5章 総括

ヨウシュヤマゴボウ培養細胞を用いてスチルベン誘導体の物質変換を行ったところ、配糖体が確認できた。さらに、配糖化における位置選択性を制御することを目的としてレスベラトロールを投与する際に時間、植物ホルモン、光条件をそれぞれ変化させ変換を行った。これによって、時間と植物ホルモンを変化させることで位置選択的配糖化が可能となった。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、配糖化のみならずメチル化も確認された。さらに、レスベラトロールにおいて決定した条件において他の機能性スチルベン誘導体に関しても変換を行った結果、明条件培養細胞では各配糖体、暗条件では各配糖体及びメチル体の変換が確認できた。

これらのことから、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞は、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、変換時間、植物ホルモンを変えることで、配糖化の位置選択性を制御することに成功した。さらに、光条件を変えることで配糖化だけでなくメチル化も生起した。

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、培養細胞において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場合、*PaGT3* が作用するのではないかと考えられる。さらにピノスチルベンはレゾルシノール的一方がメチル化された化合物であること、イソラポンチゲニンはカテコール的一方がメチル化された化合物であり、*PaGT3* によって糖が結合した部分はメトキシ基の存在した環に選択的に結合したことから、*PaGT3* は化合物のメトキシ基を認識するのではないかと考えられる。さらに、 K_m 値と V_{max} 値の結果から、*PaGT3* の親和性や反応速度はメトキシ基の有無、数、位置関係が大きく関わってくるのではないかと考えられる。

生理活性試験の結果では、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変化が見られた。このことから、スチルベン誘導体において抗酸化活性に寄与している水酸基が確認された。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、肌を保護に貢献できることが期待できる。

以上、本研究では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を行い、有用物質として期待できる配糖体の合成に成功した。また、植物培養細胞を用いることで、水系溶媒下で、環境にやさしく低コストな反応であると考えられる。また、反応時間、植物ホルモンを変えることで配糖化の選択性を制御することに成功した。また、これまで当研究室においてもあまり確認されていなかったメチル化も確認された。糖転移酵素を用いて配糖体を合成することでヨウシュヤマゴボウ培養細胞に各スチルベン誘導体を投与した際の反応メカニズムの解明に貢献できた。

さらに、得られた変換物で生理活性試験を評価することで、化合物によって抗酸化の低下がわずかでしかないにもかかわらず、チロシナーゼ阻害活性の大きな向上が見られた。このことから、スチルベン誘導体の配糖体は、有用な化合物であることが期待できる。

参考文献

- 1). 池田清和・柴田克己編, 食べ物と健康 1(第2版), 化学同人.
- 2). 森田潤司・成田宏史編, 新食品・栄養科学シリーズ 食品学総論 (第2版), 化学同人.
- 3). World Health Organisation. World health statistics annual. Geneva, *World Health Organisation*, 1989.
- 4). Perdue, W. Lewis, et al. the French Paradox and Beyond. Sonoma, CA, *Renaissance*, 1993.
- 5). Renaud, S. and de-Lorgeril, M. *Lancet*, Jun 20, 339 8808, 1523-1526, 1992.
- 6). Jürgen F. Leikert; Thomas R. Räthel; Paulus Wohlfart, PhD; Véronique Cheynier, PhD; Angelika M. Vollmar, PhD; Verena M. Dirsch, PhD *Circulation*, **106**, 1614-1617, 2002.
- 7). Nagendran Balasundram, Kalyana Sundram, Samir Samman, *Food Chemistry*, **99** 191-203, 2006.
- 8). Philippe Jeandet, Bertrand Delaunois, Alexandra Conreux, David Donnez, Vitale Nuzzo, Sylvain Cordelier, Christophe Clément, and Eric Courot *BioFactors*. 331-341 2010.
- 9). Konrad T Howitz, Kevin J Bitterman, Haim Y Cohen, Dudley W Lamming, Siva Lavu, Jason G Wood, Robert E Zipkin, Phuong Chung, Anne Kisieleski, Li-Li Zhang, Brandy Scherer, David A Sinclair. *NATURE*, **425**, 191-196, 2003.
- 10). Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Horio Y. *J Pharmacol Sci*, **98**, 200-204, 2005.
- 11). Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y, *FEBS Lett*, **556**, 281-286, 2004.
- 12). Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, Horio Y, Isobe K, Ikeda K, Motoyama N. *Int J Mol Med*, **16**, 237-243, 2005.
- 13). Tanno M, Sakamoto J, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. *J Biol Chem*, **282**, 6823-6832, 2007.
- 14). Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, Sato M, Horio Y. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 15599-15604, 2008.
- 15). Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y. *J Biol Chem*, **285**, 8375-8382, 2010.
- 16). Lim, E-K. and Bowles, D.J. *EMBO J*, **23**, 2915-2922, 2004.
- 17). Kahn, R.A., Bak, S., Svendsen, I., Halkier, B.A. and Moller, B.L. *Plant Physiol*, **115**, 1661-1670, 1997.
- 18). Crouzet, J. and Chassagne, D. Occurring Glycosides, Ikan, R., John Wiley & Sons, 225-274, 1999.
- 19). Prince, R.C. and Gunson, D.E. *Trends. Biochem Sci*, **19**, 521, 1994.
- 20). 前田英三, 植物組織培養, 浅倉書店, 19-22, 1988
- 21). 前田宏, 植物組織培養, 理工学社, 65-68, 1993
- 22). 吉田精一, 高等植物の二次代謝, 東京大学出版会, 3-13, 1983
- 23). 江崎正直, 科学研究史, **23**, 15-23, 1996
- 24). 山川隆, FFI JOURNAL, No.167, 107, 1996

- 25). 葛城 寿史, 岡山理科大学 博士学位論文, 2011
- 26). T.Furuya, H.Hamada *et al.*, *Phytochemistry*, **49**, 1, 109-111, 1998
- 27). M. Heins, J. Wahle, H. Lerch, F. Kaiser, E. Reihard, *Planta Med.*, **33**, 57, 1978.
- 28). W. Kreis, E. Reinhard, *Plant Med.*, **143**, 1988
- 29). T. Furuya, M. Hirotani, T. Shinohara, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1080.
- 30). T. Furuya, M. Hirotani, K. Kawaguchi, *Phytochemistry*, **10**, 1013, 1971
- 31). T. Furuya, K. Kawaguchi, M. Hirotani, *Phytochemistry*, **12**, 1621, 1973.
- 32). M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **13**, 2135, 1974.
- 33). M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **14**, 2601, 1975.
- 34). M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **19**, 531, 1980.
- 35). T. Furuya, K. Kawaguchi, M. Hirotani, *Phytochemistry*, **27**, 2129, 1988.
- 36). K. Kawaguchi, M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **27**, 3475, 1988.
- 37). K. Kawaguchi, M. Hirotani, T. Furuya, *Phytochemistry*, **28**, 1093, 1989.
- 38). 広谷正男, 古谷力, 生薬学雑誌, **34**, 1, 1980.
- 39). P. Pawlowicz, K. Piatkowski, A. Siewinski, *Phytochemistry*, **27**, 2809, 1988.
- 40). T. Suga, T. Hirata, H. Hamada, S. Murakami, *Phytochemistry*, **27**, 1041, 1981.
- 41). A. Kergomard, M. F. Renard, H. Veschambre, D. Courtois, V. Petiard, *Phytochemistry*, **27**, 407, 1988.
- 42). 古谷力, 折原裕, 組織培養, **13**, 284, 1987.
- 43). V. S. Rodov, P. S. Bugorskii, R. G. Butenko, A. S. Popov, *Soviet Plant Physiol.*, **35**, 413, 1988.
- 44). F. Cormier, C. Ambid, *Plant Cell Rep.*, **6**, 427, 1987.
- 45). F. Carriere, G. Gil, P. Tapie, P. Chagvardieff, *Phytochemistry*, **28**, 1090, 1989.
- 46). B. V. Milborrow, N. J. Carrington, G. T. Vaughan, *Phytochemistry*, **27**, 757, 1988.
- 47). P. Pawlowicz, K. Piatkowski, A. Siewinski, *Phytochemistry*, **27**, 2809, 1988.
- 48). T. Suga, T. Hirata, H. Hamada, S. Murakami, *Phytochemistry*, **21**, 1041, 1981.
- 49). 土井翔太, 岡山理科大学 修士学位論文, 2017.
- 50). Jones, P. and Vogt, T. *Planta*, **213**, 164-174, 2001.
- 51). Akio Noguchi, Satoshi Kunikane, Hiroaki Homma, Wenhai Liu, Takashi Sekiya, Miho Hosoya, Soonil Kwon, Shingo Ohiwa, Hisashi Katsuragi, Tokuzo Nishino, Seiji Takahashi, Hiroki Hamada, Toru Nakayama. *Plant Biotechnology* **26**, 285-292, 2009.
- 52). Eunok Choe and David B. Min. *Food Science and Food Safety* **8** 346-358, 2009.
- 53). 二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真. 抗酸化物質 学会出版, 1994.
- 54). Huang, D. Ou, B. Hampsch-Woodill, M. Flanagan, J. A. Deemer, E. K. *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 1815-1821, 2002.
- 55). Huang, D. Ou, B. Hampsch-Woodill, M. Flanagan, J. A. Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4437-4444, 2002.
- 56). Ou, B. Hampsch-Woodill, M. Prior, R. L. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4619-4626, 2001.

- 57). Raper, H.S. The anaerobic oxidases. *Physiol. Rev.* **8**, 245-282, 1928.
- 58). Mason, H.S. *J. Biol. Chem.* **172**, 83-99, 1948.
- 59). Cooksey, C.J. Garratt, P.J. Land, E.J. Pavel, S. Ramsden, C.A. Riley, P.A. Smit N.P.M. *J. Biol. Chem.* **272**, 26226-26235, 1997.
- 60). Schallreuter, K.U. Kothari, S. Chavan, B. Spencer, J.D. *Exp. Dermatol.* **17**, 395-404, 2008.
- 61). Wang-Chuan Chen, Tien-Sheng Tseng, Nai-Wan Hsiao, Yun-Lian Lin, Zhi-Hong Wen, Chin-Chuan Tsai, Yu-Ching Lee, Hui-Hsiung Lin & Keng-Chang Tsai. *Scientific Reports*, **5**, 1-8, 2014.

研究業績

・ 学術論文

- 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**, 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**
- 4) 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**
- 5) 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**
- 6) 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**
- 7) **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**

- 8) Hiroki Hamada, Shouta Okada, Kei Shimoda, **Daisuke Uesugi** and Hatsuyuki Hamada
Optical Resolution of (*RS*)-Denopamine to (*R*)-Denopamine β -D-Glucoside by Glucosyltransferase from *Phytolacca americana* Expressed in Recombinant *Escherichia coli*
Natural Product Communications, 11(8), 1121 - 1122, **2016**
- 9) **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, in press **2016**
- 10) 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, in press **2016**

・学会発表（本人発表分のみ）

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

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

謝辞

本研究に際し、主査を務めていただいた本大学・濱田博喜教授には、研究の場を与えてくださり、適切なご指導、ご鞭撻を頂きましたに謹んで感謝申し上げます。また、副査を務めていただきました本学・石原浩二教授におかれましては多くの助言、ご指導を頂きました。心より御礼申し上げます。同じく大分大学・下田恵准教授につきましても多大なご指導、ご鞭撻を頂きました。心より御礼申し上げます。

岡山理科大学教授 大平進教授、折田明浩教授、浅田伸彦教授ならびに岡山大学 妹尾昌治教授におかれましては、副査を引き受けていただきました。心より感謝致します。

糖転移酵素を単離精製して頂き、また、酵素を培養し提供して頂いた東北大学・中山亨教授、山口大学・小崎紳一教授に心より御礼申し上げます。

抗酸化活性試験において、ORAC 法のご指導、ご鞭撻頂いた本大学・永谷尚紀准教授に深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたって様々な協力をして頂きました土井翔太氏をはじめとした濱田研究室の方々に深く感謝いたします。研究以外の何気ない会話ややり取りも研究生活の楽しみであり、また、それが研究活動において大きな支えになりました。ありがとうございました。

最後に私が博士課程後期に進学することに対して理解、協力をしていただき、本研究に対し精神的、経済的に支援して頂きました家族、研究するにあたり助言、指導して頂いたすべての方に心から感謝いたします。

平成 29 年 1 月
上杉大介