

植物培養細胞による天然抗腫瘍活性化合物の効率的生産に関する研究

谷口抄子

Effective Productions of Plant Secondary Metabolites Having Antitumor Activity
by Plant Cell and Tissue Cultures

Shoko TANIGUCHI

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

(Received February 17, 2005)

Methods for the effective production of plant secondary metabolites with antitumor activity using plant cell and tissue cultures were developed. The factors in tannin productivity were investigated using culture strains producing different types of hydrolyzable tannins, i.e., gallotannins (mixture of galloylglucoses), ellagi-, and dehydroellagitannins. Production of ellagi- and dehydroellagitannins was affected by the concentrations and ratio of nitrogen sources in the medium. The formation of oligomeric ellagitannins in shoots of *Oenothera tetraptera* was correlated with the differentiation of tissues. Cultured cells of *Eriobotrya japonica* producing ursane- and oleanane-type triterpenes with antitumor activities were also established.

Key words—plant tissue culture; antitumor activity; hydrolyzable tannin; triterpene

1. はじめに

医療の場で使用する医薬品の30—40%が何らかの形で植物に由来するという事実が示すように、植物は、現在においても有用な薬用資源である。わが国はいまだかつて経験したことのない超高齢化社会を迎えようとしており、癌疾患を始め種々の慢性疾患が増加している。これらの疾患の治療あるいは予防に有効な化合物の出現が強く望まれている。薬用植物の生産する二次代謝産物の中でも、タンニン及びその関連のポリフェノールは、一般に強い抗酸化活性を示すことから、活性酸素障害に関連する癌、動脈硬化、糖尿病など様々な慢性疾患の予防への応用が期待され、注目されている化合物群である。また、ビワのように民間的に癌治療に有効とされながら、その有効成分が未解明な植物も多く存在する。一般に、薬用植物の生産する二次代謝産物の供給は、栽培や野生株の採取によっており、季節、場所、栽培条件、植物体の部位などによって生産性が

異なり、含有量も一定ではなく、供給は必ずしも安定していない。また、これらの二次代謝産物は、構造が複雑で人工合成による工業化が困難又は不可能なものが多い。一方、植物組織培養技術は、分化した植物の一部の組織や細胞を無菌的に試験管内で無限に培養増殖させる技術であり、有用物質の生産に利用される。この技術は、1) 地域的、季節的な制約を受けることなく、天候の影響もなく、一定環境下で安定した細胞供給ができる、2) 培養細胞は、大量培養が可能であり、大量の有用物質を生産できる、3) 薬用植物は生育の遅いものが多いが、培養細胞の成育速度は速く、生産効率は高くなり得る、4) 環境の制御が可能なので、代謝を調節し特定の二次代謝産物を蓄積させ、生産性の向上が可能である、といった利点がある。これらの利点を利用して、既に多くの有用物質について植物培養による生産が報告され、工業的に利用された例もある。¹⁾そこで、主として植物組織・細胞培養技術を利用し、これまで困難であるとされてきたタンニン、特に加水分解性タンニンの安定供給、さらに、ビワ培養カルスによる新規な抗腫瘍活性を示す化合物の探索を行った。

岡山大学薬学部附属薬用植物園 (〒700-8530 岡山市津島中 1-1-1)

e-mail: taniguchi@pharm.okayama-u.ac.jp

本総説は、平成16年度日本薬学会中国四国支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

2. 抗腫瘍活性を示す加水分解性タンニンの生産

タンニン類は、“植物に含まれるポリフェノール成分で、タンパク質や塩基性物質などと難溶性の結合体を生じるもの”と定義されている。^{2,3)} それらは化学構造的な特徴から、加水分解性タンニンと縮合型タンニンの2つに大別され、加水分解性タンニンは、さらにガロタンニン、エラジタンニンなどのサブタイプに分類される。植物が加水分解性タンニンを生産する能力は、進化にそって遺伝したものであると考えられ、また、生産されるタンニンの構造、特に加水分解性タンニンオリゴマーの結合様式は、植物分類や進化の系統とある程度関連付けられることが示されている。^{4,5)} 双子葉植物内でも、クロンキストの分類においてバラ亜綱に属する植物は種々のタイプの加水分解性タンニンを生産し、多くの新規化合物が単離構造決定されている。また、縮合型タンニンも多く見出されている植物群である。これまでに抗腫瘍活性を示すとして報告されてきたタンニンには、高度にガロイル化されたガロイルグルコース（ガロタンニン）、エラジタンニンモノマー及びオリゴマーなどがあり、これらを生産する植物はバラ亜綱に属するものが多いことに着目し、それら抗腫瘍性タンニンを含有する、いずれもバラ亜綱に属する植物を研究材料とした。

2-1. マツヨイグサ属植物によるエラジタンニンの生産⁶⁻⁸⁾ これまでにアカバナ科に属するメマツヨイグサ (*Oenothera biennis* L.)、オオマツヨイグサ (*O. erythrosepala* Borbas) 及びコマツヨイグサ (*O. laciniata* Hill) について、タンニン及び関連ポリフェノールの成分研究が行われてきた。その結果、特異な大環状構造を有するエラジタンニンオリゴマー類を含む、数多くの成分が単離、構造決定されている。その中でも、*oenotherin A (1)*、*oenotherin B (2)* は、マツヨイグサ属植物の主タンニンである。また *oenotherin B (2)* は、Sarcoma 180 癌細胞の移植により引き起こされるマウスの腹水癌に対し、テストされた 100 種のタンニン類の中でも最も強い宿主存在性抗腫瘍作用を示した。大環状エラジタンニンオリゴマーは、抗ウイルス、抗 MRSA 作用などを示すものがあり、構造の特異性ととも興味ある化合物群である。そこでまず *oenotherin B (2)* の培養生産を目的に、コマツヨイグサを材料として Linsmaier-Skoog (LS) 培地を基

本培地として誘導を行い、加水分解性タンニン類を多量生産する培養カルス株を確立した。本培養細胞からタンニン類の単離精製を行い、8 種の既知タンニン及び母植物のコマツヨイグサから単離報告されていなかった、構造未知の新規エラジタンニン 3 量体 *oenotherin T₁ (3)* を単離した。確立したコマツヨイグサ培養カルスは *oenotherin B (2)* を多量生産したが、さらなる生産効率の向上を目指し、*oenotherin B (2)* 含有量及び細胞生長に影響を与える因子について、収穫時期、植物ホルモン [indoleacetic acid (IAA), kinetin] 濃度、糖濃度と糖の種類、LS 培地中塩類濃度、培地中の窒素比について検討した。検討した結果を、細胞生長と *oenotherin B (2)* 含有量、及び両者から計算される試験管当たりの生産量としてまとめると、Table 1 の通りとなる。検討した因子の中では、特に培地の塩類濃度が細胞生長に影響を与えずに *oenotherin B (2)* 含有量を大きく向上させた。今回使用した LS 培地は比較的少量の窒素 (60 mM 相当) を含んでおり、窒素源が大きな影響を与えている可能性を踏まえ、窒素量を通常量の 1/4 に希釈した培地に含まれる硝酸性窒素とアンモニア性窒素の比について検討した。その結果、それら窒素源の比がエラジタンニン生産量に大きな影響を与え、最終的に通常の培養条件に比べ、3 倍以上の含有量を示す培養条件を明らかにした (Figs. 1 and 2)。このようにして見出した改変 LS

Table 1. Effects of Culture Conditions on the Productivity of *Oenotherin B(2)* in Callus Culture of *Oenothera laciniata*

Condition							Result		
I	K	S	%	LS	R	W	C	G	P
10	10	Suc	3	1	20/40	4	1.4	1.4	2.0
10	10	Suc	3	1	20/40	5	2.4	1.5	3.6
1	10	Suc	3	1	20/40	4	1.8	1.0	1.7
10	100	Suc	3	1	20/40	4	1.2	1.9	2.3
10	10	Suc	5	1	20/40	4	3.7	0.9	3.5
10	10	Glc	3	1	20/40	4	1.4	1.7	2.4
10	10	Suc	3	0.25	5/10	4	2.9	1.7	4.9
10	10	Suc	3	(0.25)	10/5	4	4.7	1.2	5.4

I: IAA (μM), K: Kinetin (μM), S: Sugar type, Suc: Sucrose, Glc: Glucose, %: Concentration of sugar, LS: LS concentration (fold), R: Ratio of NH_4^+ (mM)/ NO_3^- (mM), W: Harvest weeks, C: *Oenotherin B(2)* content (mg/g fresh weight), G: Cell growth (g fresh weight/test tube), P: Productivity (=C×G, mg/test tube).

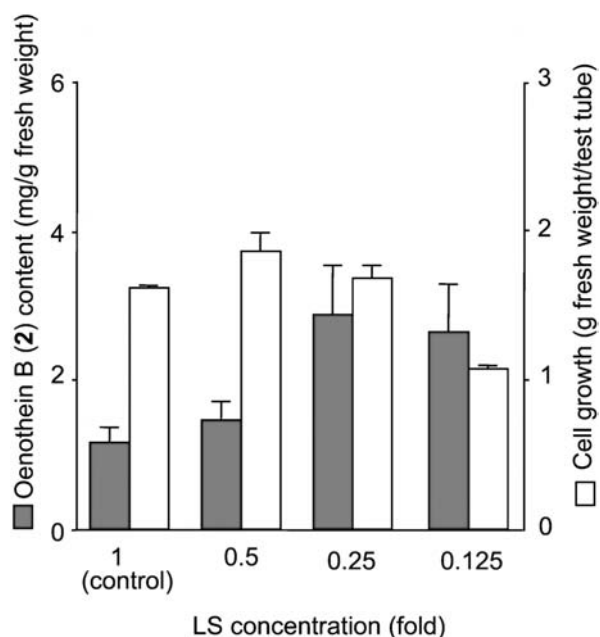


Fig. 1. Effects of Inorganic Elements in LS Medium on Oenothein B (2) Content and Cell Growth in Callus Cultures of *Oenothera laciniata*

Calli were cultured on diluted LS medium (1 to 8-fold) which was supplemented with 3% (w/v) sucrose, 10 μM IAA and 10 μM kinetin. Calli were cultured in the dark at 25°C for 28 days. Bars show standard errors of the mean in three replicates.

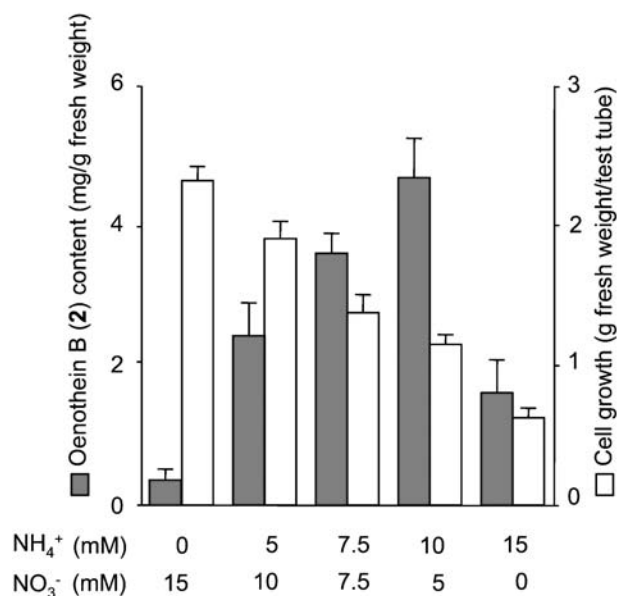


Fig. 2. Effects of NH₄⁺/NO₃⁻ Ratio on Oenothein B (2) Content and Cell Growth in Callus Cultures of *Oenothera laciniata*

Various ratio of NH₄⁺/NO₃⁻ (total 15 mM) were added to nitrogen source-free LS medium, 3% (w/v) sucrose, 10 μM IAA and 10 μM kinetin. NH₄Cl and KNO₃ were used as nitrogen sources. Calli were cultured in the dark at 25°C for 28 days. Bars show standard errors of the mean in three replicates.

培地で培養した場合、oenothein B (2) 含有量は 65 mg/g dry weight となり、インタクト植物の葉の含有量より 1.8 倍高い物であった。コマツヨイグサ培養カルスは種々の生理活性を有する oenothein B (2) の供給源として優れた培養系であると言える。

また、構造未決定であった oenotherin T₁ (3) は、HPLC 分析により同属のツキミソウ (*O. tetraptera* Cav.) の地上部を抽出して得たエキスにも相当量存在することを見出したので、ツキミソウからの単離を行った。その構造は NMR, MS などの各種スペクトルデータさらに、誘導體化、分解反応等の結果に基づき 3 式で表されることを明らかにした (Fig. 3)。

他のマツヨイグサ属植物では、oenothein A (1) 及び oenothein B (2) が主成分であるのに対し、ツキミソウは oenotherin T₁ (3) をも多量に生産することから、特異な酸化経路の活性が高い可能性が考えられた。そこで、ツキミソウについても培養を試みた。その結果、植物体の再生が可能であるツキミソウ培養シュート株を確立し、本培養系により植物の分化、生長過程と加水分解性タンニン生合成に密接な関係があることが明らかとなった。すなわち、ツキミソウ培養シュートは通常、10 μM の IAA と 10 μM の kinetin を添加した培地で生育しているが、このシュートをホルモン無添加培地へ移植することにより再分化が促進され、植物体が再生した。ツキミソウ培養シュートは、1,2,3,6-tetra-*O*-galloyl- β -D-glucose (GG) (4), 1,2,3,4,6-penta-GG (5) に加え、生長したインタクト植物ではほとんど生産していない hexa-, hepta-, octa-GG (6-8) の混合物を多量生産した。また、酸化的段階がさらに進んで生じたとみなし得るエラジタンニン単量体 telimaglandin I, II (9, 10), 2 量体 oenothein B (2) をも生産した。そこで、これら形態の変化と生産されるタンニン組成の関係についてより詳細な分析を行った。その結果、GG 類は分化の程度の低い組織において活発に生合成されることが示された。一方、エラジタンニン単量体の生産は、シュートの分化に伴い増加し、葉のガラス化が消失し、茎が形成される段階で最も高く、再生幼植物体において急激な減少を認めた。エラジタンニン 2 量体 oenothein B (2) の含有量は、分化の程度の低い組織では低く、分化が進み、ガラス化の消失に伴い増加した。鉢上

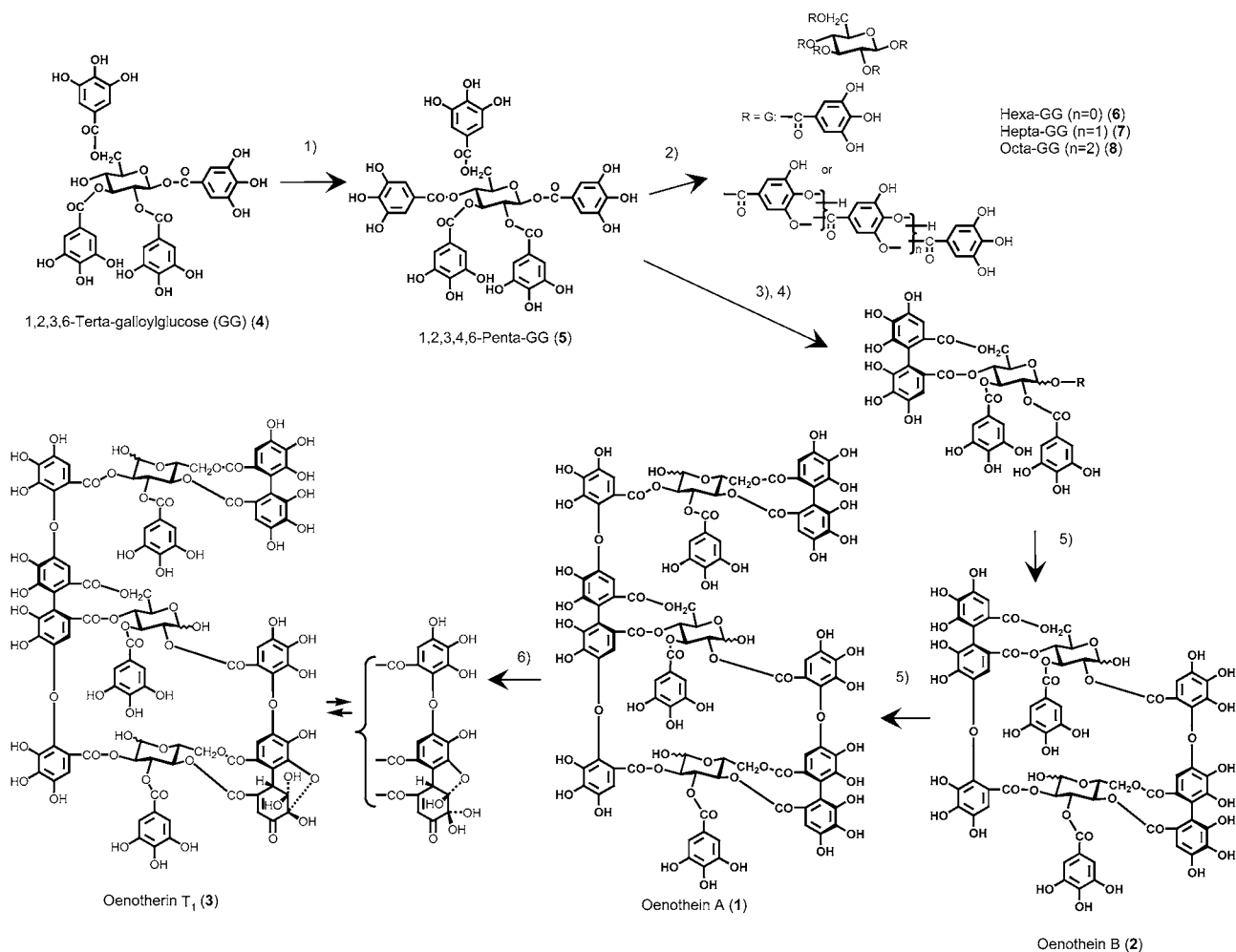


Fig. 3. Biogenetic Relationship of Hydrolyzable Tannins in *Oenothera* Species

1): Galloylation of sugar hydroxy group, 2): Galloylation via depside linkage, 3): Intramolecular C-C oxidative coupling, 4): Degalloylation, 5): Intermolecular C-O oxidative coupling with tellimagrandin I (9), 6): Oxidation.

げした再生幼植物体及び実生からの幼植物では、主に oenotherin B (2) を生産し、また少量の penta-GG (5) の生産を認めた。さらに、両幼植物体は、他のステージではほとんど検出されない 3 量体 oenotherin A (1) 及び oenotherin T₁ (3) を生産し、両化合物の生産は植物体の生長に伴い急激に増加した。これらの結果より、植物組織におけるタンニン生産は、分化に伴って変化し、それらはタンニン合成経路を反映したものであり、大環状エラジタンニンオリゴマーの生産と組織の分化は密接な関係があることが示された (Fig. 3)。

2-2. ヌルデ培養株によるガロタンニン生産^{9,10)}

五倍子は、ウルシ科の落葉高木であるヌルデ (*Rhus javanica* L.) の葉上にヌルデノミミフシという昆虫が寄生することにより発生する虫こぶを処理した生葉で、日本薬局方に収載されているタンニ

ン酸 (ガロタンニンの 1 種である GG の混合物) の製造原料である。タンニン酸は、薬用として用いられるだけでなく、抗腫瘍活性の報告されている penta-GG (5) の原料ともなり、¹¹⁾ また工業的にも重要な化合物である。しかしその原料となる虫こぶの発生は自然にまかされており、それらの安定供給には不安がもたれる。そこで、植物組織培養によるタンニン酸の安定供給を目指し、ヌルデ培養系の確立を行った。その結果、ヌルデの葉柄より 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) の添加によりカルスが誘導された。カルスは通常より柔らかいジェランガム培地で良好な生育を示し、インタクト植物と同様、タンニン酸 (GG の混合物) を生産した。植物ホルモンの最適化を行ったところ、タンニン酸の生産は、1 μ M 2,4-D と 1 μ M benzyladenine (BA) の植物ホルモンの組み合わせにより促進されたが、

細胞生長とタンニン生産は負の相関を示し、長期の培養には、通常の培養条件（ $10\ \mu\text{M}$ 2,4-D と $10\ \mu\text{M}$ BA）が適していることが明らかとなった。一方、液体培地での培養も可能であり、液体培養株は、低ホルモン濃度（ $1\ \mu\text{M}$ 2,4-D と $1\ \mu\text{M}$ BA）において、高いタンニン生産能を有し、かつ、安定な生育を示した。また、タンニン含有量の異なるインタクト植

物から誘導を行い、得られたカルスのタンニン生産能を調べたところ、インタクト植物のタンニン含有量と誘導されたカルスのタンニン生産能には相関はなく、今回確立した条件により、一定の生産能を示すヌルデ培養カルスの確立が可能であることが示された（Fig. 4）。さらに、IAA を添加した培地を用いたところ、不定根が誘導された。不定根のみを継

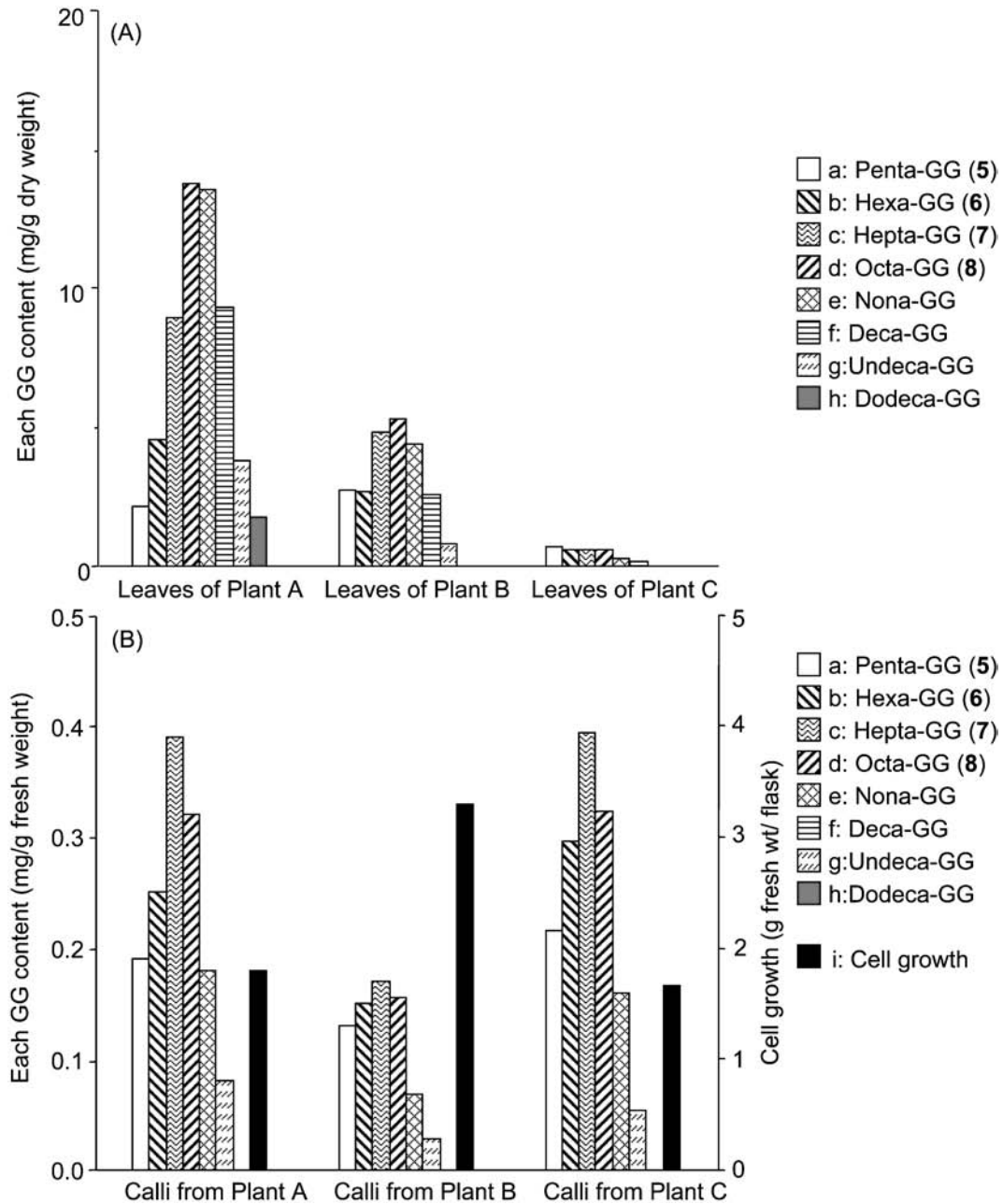


Fig. 4. Comparison of Ability of Tannin Production between Three Callus Strains, and Tannin Content of Corresponding Intact Plants of *Rhus javanica*

(A) Each GG content of leaves in three different intact plants (A, B and C) of *Rhus javanica*. (B) Each GG content and cell growth in three callus strains induced from different intact plants (A, B and C). a: Penta-GG, b: Hexa-GG, c: Hepta-GG, d: Octa-GG, e: Nona-GG, f: Deca-GG, g: Undeca-GG, h: Dodeca-GG, i: Cell growth.

代することにより確立したヌルデ培養不定根は、カルスよりも平均ガロイル化度の高いタンニン酸及び特異な構造を有する赤色素 riccionidin A を生産した。培養不定根におけるこれら二次代謝産物の生産に影響を与える因子について検討を行い、タンニン酸及び色素の生産は光照射により抑制され、また、植物ホルモンとしてオーキシンのみを使用したとき、両者の生産は促進されることを明らかにした。

2-3. シナアブラギリ培養カルスにおけるデヒドロエラジタンニン生産¹²⁾ シナアブラギリ (*Aleurites fordii* Hemsl.) は、トウダイグサ科に属する中国原産の落葉高木である。有毒成分としてフォルボール系のジテルペノイド、12-*O*-hexadecanoyl-16-hydroxyphorbol-13-acetate (HHPA) を含み、¹³⁾ 本化合物は発癌プロモータ作用を有することが明らかにされている。¹⁴⁾ 一方、トウダイグサ科植物には加水分解性タンニンを含むものが多く存在し、それらはエラジタンニンより酸化の進んだデヒドロエラジタンニン類を多量生産する傾向があり、その種の様々な新規タンニンが単離、同定されている。シナアブラギリもタンニンに富み、その主成分

はデヒドロエラジタンニンの代表的な化合物、geraniin (11) である。また、カエデ科メグスリノキ (*Acer nikoense* Maxim.) のエキスが潜在的癌細胞における内因性発癌プロモータ、TNF- α の遊離を阻害することから、癌予防への可能性が期待されており、その活性成分の1つは geraniin (11) であることが示唆されている。^{15,16)} そこでシナアブラギリについても培養系の確立を行った。確立した培養カルスの生産する二次代謝産物の精査を行ったところ、フォルボール系のジテルペノイド類の生産は認められず、 β -glucogallin (12) からの生合成経路を反映した低分子の GG 類、1,6-di- (13)、1,2,6-tri- (14)、1,2,4,6-tetra- (4)、1,2,3,4,6-penta-GG (5) 及びデヒドロエラジタンニン、geraniin (11) を生産していることを明らかにした (Fig. 5)。また、未分化な状態の細胞同様、インタクト植物においても新芽では penta-GG (5) が生産されることが明らかとなった。さらに、培養条件の検討を行い、硝酸性窒素のみを添加した培地 (総窒素 15 mM) では、penta-GG (5) の生産が抑制され、geraniin (11) のみが選択的に生産されることを明らかにした。

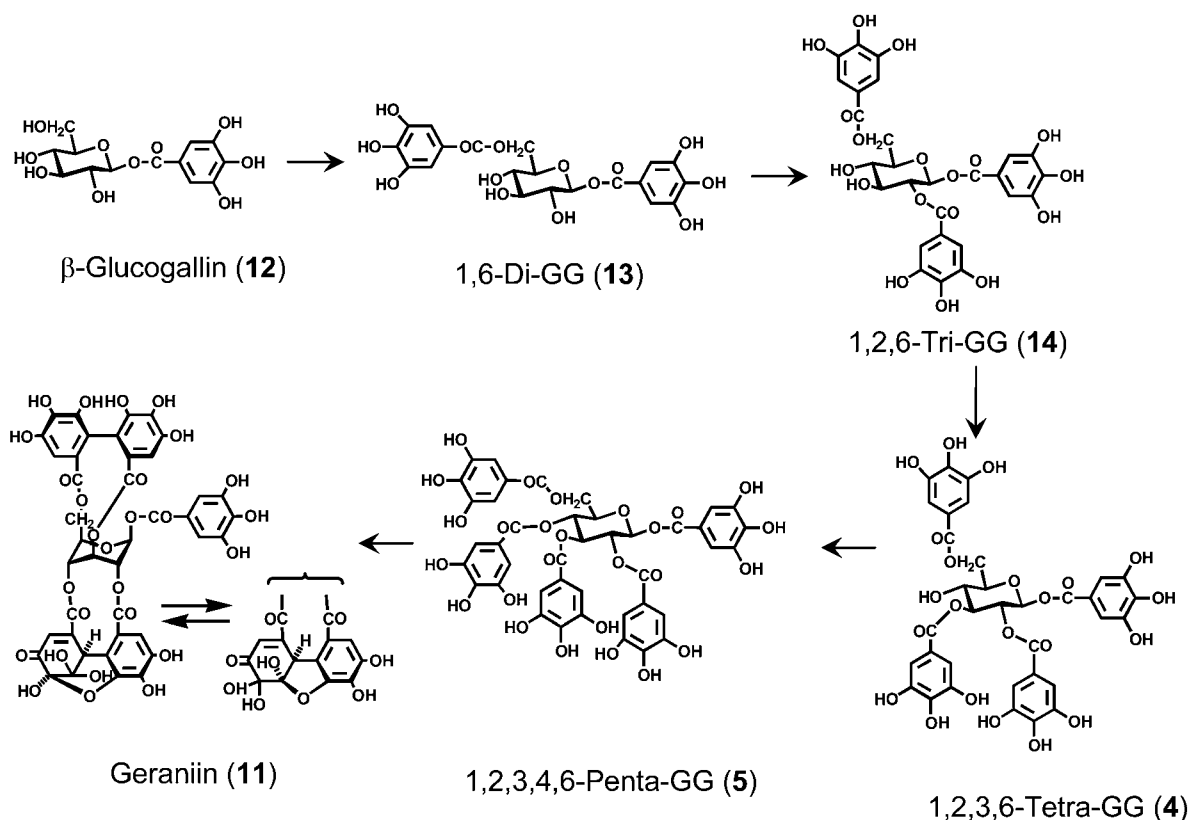


Fig. 5. Biosynthetic Relationship of Isolated Compounds from Callus Culture of *Aleurites fordii*

2-4. 今回確立した加水分解性タンニン生産培養株に共通の知見とそれらの生合成的関係 培地中の窒素源の濃度により, GG類はあまり影響を受けないのに対し, より生合成経路の進んだとみなされるエラジタンニン, デヒドロエラジタンニンの生産は大きな影響を受けることが明らかとなった. 基本培地として使用したLS培地の塩濃度あるいは窒素源の濃度を1/8まで減少させると細胞生長の抑制が認められたが, エラジタンニン, デヒドロエラジタンニンの生産は通常条件に比べ2-4倍促進された. 今回の一連の研究において, 通常光照射下で培養しているツキミソウ及びシナアブラギリ培養株では, 未分化な組織に特有の化合物(GG類, エラジタンニン単量体)の生産は, 暗黒下で培養することにより抑制されたが, より生合成の進んだと考えられる化合物(エラジタンニン2量体, デヒドロエラジタンニン)の生産は, あまり影響を受けなかった. 一方, 通常暗黒下で培養しているヌルデ培養不定根では, 光照射下で培養することにより, GG類及び色素の生産が抑制された. また, 今回確立した培養系はいずれもGG類を生産した. またツキミソウ及びシナアブラギリでは, 生長したインタクト植物からはこれら化合物は検出されないのに対し, 実生の幼植物体や新芽において, penta-GG(5)の生産を認めたことから, 本化合物がエラジタンニン

やデヒドロエラジタンニンの前駆体であることをさらに裏付けた. しかし, 幼植物体や新芽におけるpenta-GG(5)の含有量は低いことから, 植物体の生長に伴って急激にタンニン生産能力そのものが上昇し, 一気に酸化や重合の進んだ化合物が多量に蓄積されると考えられる. このように, penta-GG(5)がさらに酸化され, 生合成されると考えられる広義の意味でのエラジタンニンの生産に関与する酵素は, それぞれの植物群に固有であると考えられ, このことが同属あるいは類縁の植物群内では類似の構造を有するタンニン類が生産されることと関係していると考えられる. また, これら酸化的代謝は, 分化と密接な関係を持つことが示された.

3. ビワ培養カルスによる抗腫瘍活性成分の生産¹⁷⁾

ビワ(*Eriobotrya japonica* Lindl.)はバラ科に属し, その葉は第14改正日本薬局方第1追補にも記載された生薬であり, 浴湯料としてあせもなどに用いられる. また, 民間的に, “ビワの葉療法”と称した温熱療法は, 悪性腫瘍などに有効とされている. しかし, 抗腫瘍活性成分については未詳である. そこで, 培養系によるビワの抗腫瘍成分の生産を目的に実験を行った. われわれが確立したビワ培養カルスは多量のトリテルペンを生産しており, それらは, ウルサン型及び関連構造を有するトリテル

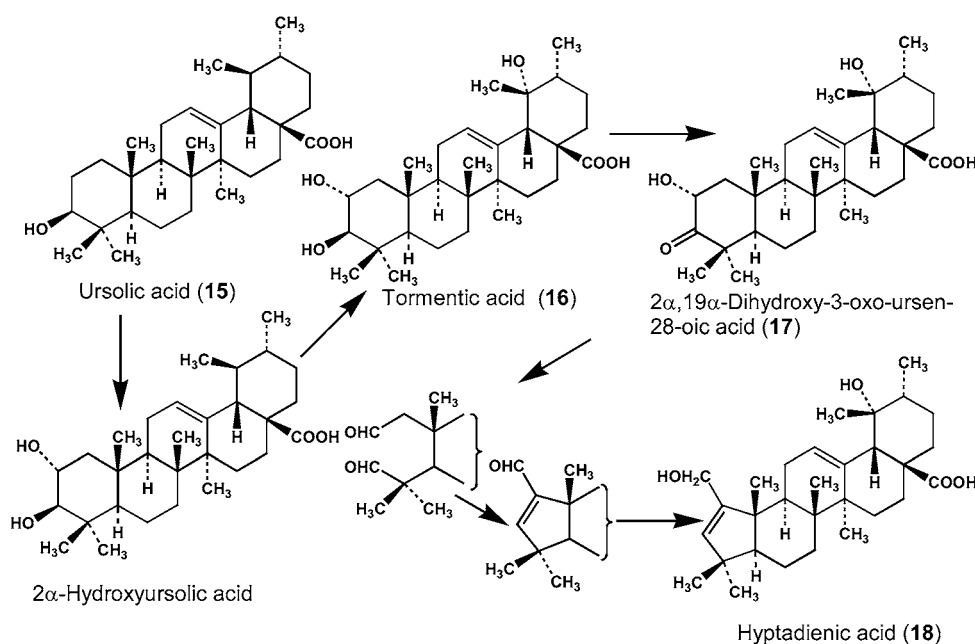


Fig. 6. Possible Biogenetic Correlation for the Triterpenes in the Callus Culture of *Eriobotrya japonica*

ペン (7 種), 及びオレアナン型トリテルペン (2 種) であることを明らかにした. そこで今回単離した化合物について逆相 HPLC を用い, ビワ培養カルスとインタクト植物葉の成分比較を行った. その結果, インタクト植物では ursolic acid (15) を主として生産しているのに対し, カルスは血糖降下作用を持つ tormentic acid (16) を最も多量に生産した. また, tormentic acid (16) とその変化産物とみなされる化合物, $2\alpha, 19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) 及び hyptadienic acid (18) は, 今回用いたインタクト植物の葉ではほとんど生産されていないもので, カルスに特有なものであり, 培養カルスではインタクト植物とは異なるトリテルペノイド生合成経路が働いていることが示唆された (Fig. 6). またカルスは抗炎症作用及び強い抗 HIV 活性を持つ maslinic acid をインタクト植物の乾燥重量当たり約 7 倍生産していることを認めた. 次に, ビワ培養カルスから単離した化合物について抗発癌プロモーションの一次スクリーニング法である Epstein-Barr Virus 初期抗原発現抑制試験を行った. その結果, 誘発剤 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) に対する 500 倍 mol 濃度での初期抗原発現量の比較において, いずれの化合物も 50% 以上の抑制活性を示した. 中でも $2\alpha, 19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) は 76% の高い抑制活性を示した. そこでこの化合物について nitric oxide (NO) {(±)-(E)-4-methyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-6-methoxy-3-hexenamide (NOR1) から発生} を発癌イニシエータとして使用し, TPA をプロモータとするマウス皮膚発癌二段階実験を行った. その結果, 本試験系において, $2\alpha, 19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) は, 発癌抑制作用の知られているお茶の主成分である (-)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) にほぼ匹敵する活性を示した. すなわち, コントロールに比べ, 腫瘍の発生を遅らせ, また, 20 週間後においてマウス 1 匹当たりの発生腫瘍数を約 40% に抑制することが明らかとなった (Fig. 7). 今回確立したビワ培養カルスは, 種々の生理活性を示すトリテルペンを多量生産することから薬用資源として有効であると考えられる.

4. おわりに

種々の薬用植物について抗腫瘍活性を始めとする

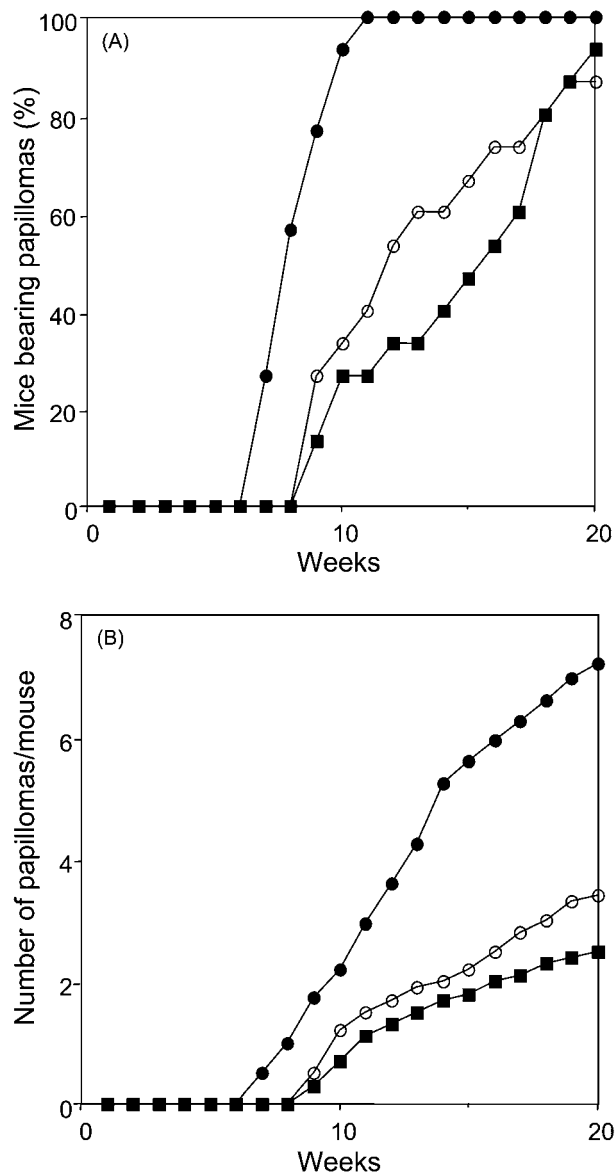


Fig. 7. Inhibitory Effects of EGCG and $2\alpha, 19\alpha$ -Dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) on the NOR1-TPA Carcinogenesis System

Tumor formation was initiated with NOR1 (390 nmol) and promoted with 1.7 nmol of TPA given twice weekly starting 1 week after initiation. (A) Percentage of mice bearing papillomas. (B) Average number of papillomas per mouse. ●: Control (NOR1 and TPA), ■: NOR1+TPA+EGCG (0.0025%), ○: NOR1+TPA+ $2\alpha, 19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) (0.0025%). Papillomas per mouse of EGCG and $2\alpha, 19\alpha$ -dihydroxy-3-oxo-urs-12-en-28-oic acid (17) treatment were significantly different from control at 20 weeks after promotion, $p < 0.005$.

様々な生理活性を有する化合物の単離, 構造決定を行うとともに, それら活性を有する化合物の植物組織・細胞培養による効率的生産に関する研究を展開した. 特に, タイプの異なる加水分解性タンニンを生産する培養株を用い, それぞれのタンニンの生産を調節する因子について検討を行い, 加水分解性タ

ニン生産に共通の知見とそれらの生合成的関係についても明らかにした。また、ピワ培養カルスから単離した、インタクト植物では生産されていない特異な二次代謝産物について、それらの活性を明らかにした。今後、確立した培養株を利用し、これまでに明らかにされている生合成関連酵素の発現量の比較や遺伝子レベルでの解析を行い、今回明らかにした要因とそれぞれの段階を触媒する酵素の関係を明らかにすること、また、大量培養系への展開が必要と考えられる。

謝辞 本研究の遂行にあたりご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました岡山大学薬学部吉田隆志教授に心より感謝申し上げます。また、有益なご助言、ご協力を賜りました岡山大学奥田拓男名誉教授、岡山大学薬学部波多野力助教授、京都大学生存圏研究所矢崎一史教授、岡山大学薬学部伊東秀之助手、活性試験を測定いただいた京都府立医科大学医学部西野輔翼教授、徳田春彦助手、明海大学歯学部坂上宏教授に感謝いたします。本研究は、岡山大学薬学部の修了生、卒業生のご協力のもとに行われました。厚くお礼申し上げます。また、研究の一部は文部科学省科学研究費補助金、奨励研究(A)、若手研究(B) (課題番号 13771333) 及びロッテ株式会社からのご支援により行われました。お礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) Komamine A., "Production of Useful Plant Metabolites by Plant Cell Culture Technology," CMC, Tokyo, 1990.
- 2) Haslam E., "Plant Polyphenols. Vegetable Tannins Revisited," Cambridge University Press, Cambridge, 1989.
- 3) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., "Economic and Medicinal Plants Research," Vol. 5, eds. by Wagner H., Farnsworth N. R., Academic Press, London, 1991, pp. 129-165.
- 4) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., *Phytochemistry*, **32**, 507-521 (1993).
- 5) Okuda T., Yoshida T., Hatano T., *Phytochemistry*, **55**, 513-529 (2000).
- 6) Taniguchi S., Nakamura N., Nose M., Takeda S., Yabu-uchi R., Ito H., Yoshida T., Yazaki K., *Phytochemistry*, **48**, 981-985 (1998).
- 7) Taniguchi S., Imayoshi Y., Yabu-uchi R., Ito H., Hatano T., Yoshida T., *Phytochemistry*, **59**, 191-195 (2002).
- 8) Taniguchi S., Imayoshi Y., Hatano T., Yazaki K., Yoshida T., *Plant Biotechnol.* (Tokyo), **19**, 357-363 (2002).
- 9) Taniguchi S., Takeda S., Yabu-uchi R., Yoshida T., Yazaki K., *Phytochemistry*, **46**, 279-282 (1997).
- 10) Taniguchi S., Yazaki K., Yabu-uchi R., Kawakami K., Ito H., Hatano T., Yoshida T., *Phytochemistry*, **53**, 357-363 (2000).
- 11) Yoshizawa S., Horiuchi T., Suganuma M., Nishiwaki S., Yatsunami J., Okabe S., Okuda T., Muto Y., Frenkel K., Troll W., Fujiki H., "Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health. II: Antioxidants and Cancer Prevention," eds. by Huang M. T., Ho C. T., Lee C. Y., American Chemical Society, Washington DC, 1992, pp. 316-325.
- 12) Taniguchi S., Uechi K., Kato R., Ito H., Hatano T., Yazaki K., Yoshida T., *Planta Med.* **68**, 1145-1146 (2002).
- 13) Okuda T., Yoshida T., Koike S., Toh N., *Phytochemistry*, **14**, 509-515 (1975).
- 14) Ito Y., Yanase S., Tokuda H., Kishishita M., Ohigashi H., Hirota M., Koshimizu K., *Cancer Lett.*, **18**, 87-95 (1983).
- 15) Okabe S., Suganuma M., Imayoshi Y., Taniguchi S., Yoshida T., Fujiki H., *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1145-1148 (2001).
- 16) Fujiki H., Suganuma M., Kurusu M., Okabe S., Imayoshi Y., Taniguchi S., Yoshida T., *Mutat. Res.*, **523-524**, 119-125 (2003).
- 17) Taniguchi S., Imayoshi Y., Kobayashi E., Takamatsu Y., Ito H., Hatano T., Sakagami H., Tokuda H., Nishino H., Sugita D., Shimura S., Yoshida T., *Phytochemistry*, **59**, 315-323 (2002).