

## 総 説

[木材学会誌 Vol. 52, No. 2, p. 67-76 (2006)]

### 木本性植物の組織培養によるタンニン生産と生合成\*<sup>1</sup>

谷口抄子\*<sup>2</sup>, 波多野力\*<sup>2</sup>, 矢崎一史\*<sup>3</sup>

#### Production of Tannin by Tissue Culture of Woody Plants and Tannin Biosynthesis\*<sup>1</sup>

Shoko TANIGUCHI\*<sup>2</sup>, Tsutomu HATANO\*<sup>2</sup> and Kazufumi YAZAKI\*<sup>3</sup>

This review deals with production of condensed tannins and four types of hydrolysable tannins by plants tissue cultures, especially of woody plants. Tannins are plant polyphenols which are widely distributed in the plant kingdom. Medicinal plants that contain high amounts of tannins have been used in traditional medicine, and various pharmacological activities of tannins, such as anti-virus and anti-tumor effects, have been newly discovered. The effective production of such bioactive tannins in plant cell cultures has been required for further studies of their biological activities or for development of new natural medicines. Several cell and tissue cultures which are capable of producing a large amount of condensed and hydrolysable tannins have been established from tannin-producing plants. Galloylglucoses were common constituents in those undifferentiated cell cultures induced from plants producing hydrolysable tannins. Ellagitannin production was accompanied by tissue differentiation of these cell cultures, substantiating that galloylglucoses were precursors of ellagitannins. Tannin production was controlled by culture conditions, especially the concentration and the ratio of nitrogen sources in the culture media as well as light irradiation.

*Keywords*: proanthocyanidin, hydrolysable tannin, tissue culture, biosynthesis.

この総説では、木本性植物を中心に各種タンニン類の組織培養による生産について紹介する。タンニンは植物界に広く分布するポリフェノールであり、タンニンを多く含む薬用植物が伝統医療で利用されており、最近では抗ウイルス作用、抗腫瘍作用など種々の薬理活性が明らかとなってきた。植物組織培養を利用した効率的生産によって、それらタンニンのさらなる生物活性の研究の進展や新薬候補の開拓が期待されてきており、縮合型タンニンならびに加水分解性タンニン生産培養株を確立した。加水分解性タンニン生産植物から確立した培養株は、未分化な組織の共通の成分として galloylglucose 類を生産した。分化に伴いエラジタンニン生産能が増加する事から、これらの galloylglucose 類がエラジタンニンの前駆体であることが支持された。培地中の窒素濃度や窒素源の組成、光照射などによりこれらタンニン類の生産を制御できた。

#### 1. はじめに

タンニン (tannin) は、植物ポリフェノールの中でも大きな割合を占める重要な化合物であり、植物

ポリフェノールとタンニンはほぼ同義語として使用されている。しかし、植物ポリフェノールとタンニンは厳密には区別されるものである。ポリフェノールとは、ベンゼン環状に複数のフェノール性水酸

\*<sup>1</sup> Received August 17, 2005; accepted November 2, 2005.

\*<sup>2</sup> 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530

\*<sup>3</sup> 京都大学生存圏研究所 Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University, Uji 611-0011

基を持つ化合物のことで、タンニンの他にフラボノイドやリグニン、さらにカテコールやピロガロールなどの低分子化合物まで含むものである。一方、タンニンは“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<sup>1,2)</sup>。これまでタンニンを多量に含む植物は、伝統薬として整腸、止血、止瀉薬などに用いられてきた。最近、タンニンの化学構造の解明に伴い、単一化合物としてのタンニンが持つ様々な生理活性に関する研究が可能となり、種々の *in vitro*, *in vivo* の生物試験系における諸活性が明らかにされてきた。それらには、酵素阻害作用、アスコルビン酸および不飽和脂肪酸の自動酸化抑制作用、抗変異原作用や発がんプロモーター抑制作用、抗 human immunodeficiency virus (HIV) 作用、宿主介在性抗腫瘍活性などが挙げられる。これらの生理活性の作用機序については、単にタンニンが持つ共存物質への強い親和性に基づくものではなく、タンニンのラジカスカベンジャーとしての作用や免疫細胞活性化などが活性発現に関与していると考えられる<sup>3,4)</sup>。このように種々の生理活性を示すことから近年特に注目されているタンニンであるが、その構造は、複雑で、特に後述する加水分解性タンニンの人工合成はようやく端緒についたばかりである<sup>5)</sup>。そこで、タンニンの安定供給を目指し、植物組織培養技術を利用した一連の研究を行ってきた。今回、我々のグループの研究を中心に組織培養によるタンニン生産と、近年諸外国のグループの研究により明らかになってきたタンニンの生合成について紹介する。

## 2. 縮合型タンニンの生産

これまで述べてきたタンニン類は、化学構造式上、加水分解性タンニン (hydrolysable tannin) と縮合型タンニン (condensed tannin, proanthocyanidin) の大きく2つに分類される。また、近年特に注目されている緑茶に含まれる(-)-epigallocatechin gallate (1)をはじめとするカテキン類は、低分子ながらタンパク質と結合しやすいなどタンニンとしての諸性質を備えているためタンニンの1種として取り扱われる<sup>6)</sup>。

タンニンは植物界に広く分布している化合物群であるが、その中でも縮合型タンニンとその構成単位であるカテキン類は、シダ植物から双子葉、単子葉植物まで広くその存在が認められている。縮合型タンニンは基本骨格が加水分解されないタンニンで、flavan-3-ol 類がC-C結合した基本骨格を有する。

すなわち(+)-catechin (2), (-)-epicatechin (3)およびその関連化合物(カテキン類)を構成単位とし、構成単位の一つのC4位ともう一つの構成単位のC8位あるいはC6位がC-C結合でつながったオリゴマーあるいはポリマーである<sup>7)</sup>。これまでに、合成による縮合型タンニンに関する報告は、1970年代から今日に至るまで数多くあり、合成により得た化合物の活性についても報告されている<sup>8-10)</sup>。これらの構成単位である flavan-3-ol 類は、フラボノイドの1種であり、他のフラボノイド類と同様、酢酸-マロン酸経路由来のC<sub>6</sub>単位(A環)と、phenylalanine (4)を経由して shikimic acid (5)から合成されたC<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>単位(B, C環)との縮合によって chalcone → flavanone → dihydroflavonol の順に生合成される<sup>11)</sup>。すなわち dihydroflavonol からの還元により2R, 3S, 4S-leucoanthocyanidin が合成され flavan-3-ol が生成する。この縮合型タンニン生合成の最初の段階の反応を触媒する酵素 dihydroflavonol reductase (DFR) の遺伝子については、多くの植物からクローニングが行われている。また近年、2R, 3S, 4S-leucoanthocyanidin からの2R, 3S-flavan-3-ol 類 [(+)-catechin (2) など] への反応を触媒する leucoanthocyanidin reductase (LAR) がマメ科の *Desmodium uncinatum* より単離され、分子生物学的手法を用いた研究により、そのアミノ酸配列についても報告された<sup>12)</sup>。またそのエピマーである(-)-epicatechin (3)すなわち2R, 3R-flavan-3-ol については2R, 3S, 4S-leucoanthocyanidin から anthocyanidin を経て anthocyanidin reductase (ANR), BANYULS により生成することが、シロイヌナズナ *Arabidopsis thaliana* (アブラナ科)の変異株による研究によって示され、構成単位の生合成については解明されてきた<sup>13)</sup>。しかし、ポリメリゼーションの過程については、quinone methide (またはその等価体)がその中間体として想定されているが、未解明な点が多く残っている<sup>14)</sup>。

組織培養においては、ポリフェノール類が組織の褐変などを引き起こすとされ、ポリフェノールを多量に含む植物、特に樹木からのカルス誘導は一般に困難であるとされている。Fukudaらはイチヨウ *Ginkgo biloba* (イチヨウ科)カルスにおいて(+)-gallocatechin (6)と(+)-catechin (2)およびプロシアニンジン類が褐変の初期段階で増加すること、gallocatechin (6)の蓄積が褐変現象に関連していることを報告した<sup>15)</sup>。また縮合型タンニンは、前述の通り幅広く植物界に存在することから、誘導および継代の可能な培養組織においても生産されていると

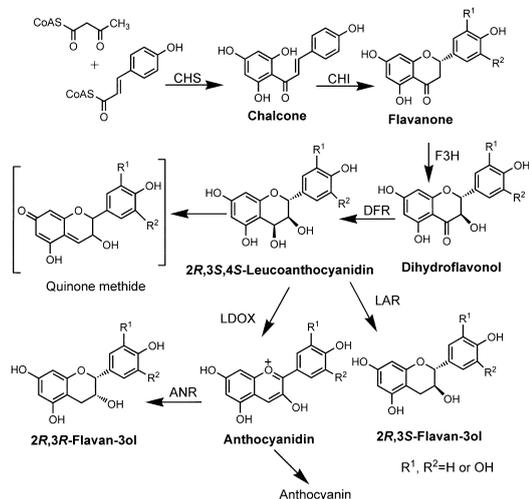


Fig. 1. Biosynthetic pathway to flavan-3-ols. CHS; chalcone synthase, CHI; chalcone isomerase, DFR; dihydroflavonol reductase, F3H; flavanone 3  $\beta$ -hydroxylase, LAR; leucoanthocyanidin reductase, LDOX; leucocyanidin dioxygenase (also called ANS; anthocyanin synthase), ANR; anthocyanidin reductase (also called BAN; BANYULS).

推測されるが、複雑な高分子ポリマーとして存在するため個々の化合物を単離して構造を決定することが困難な場合が多い。そのため、呈色反応に基づきその存在を報告しているのみの場合もある。

著者らの一人 Yazaki は、クスノキ科の *Cinnamomum cassia* カルスによる (-)-epicatechin (3), 縮合型タンニン 2 量体 procyanidin B2 (7), procyanidin B4 (8) および 3 量体 procyanidin C1 (9) の生産<sup>16)</sup>, および草本性植物であるオトギリソウ *Hypericum erectum* (オトギリソウ科) シュートによる procyanidin B2 (7), procyanidin C1 (9), cinnamtannin A2 (10) の生産を報告した<sup>17)</sup>。バラ科のセイヨウサンザシの 1 種 *Crataegus monogyna* のカルスにおいても (-)-epicatechin (3) および procyanidin B2 (7) を含むプロシアニジンの生産が報告されている<sup>18)</sup>。一方、ツツジ科 *Vaccinium palhale* 懸濁細胞は 6 量体を生産していることが<sup>14</sup>C ラベルシクロース添加実験による ESI-MS 分析の結果に基づき示されている<sup>19)</sup>。

これらの縮合型タンニンに加えガロイル化された縮合型タンニンは、カキ *Diospyros kaki* (カキノキ科) のほかにダイオウ *Rheum* spp. (タデ科), ユキノシタ *Saxifraga stolonifera* (ユキノシタ科)<sup>4)</sup> またブドウ *Vitis* spp. (ブドウ科) の種子や果皮などに存在する

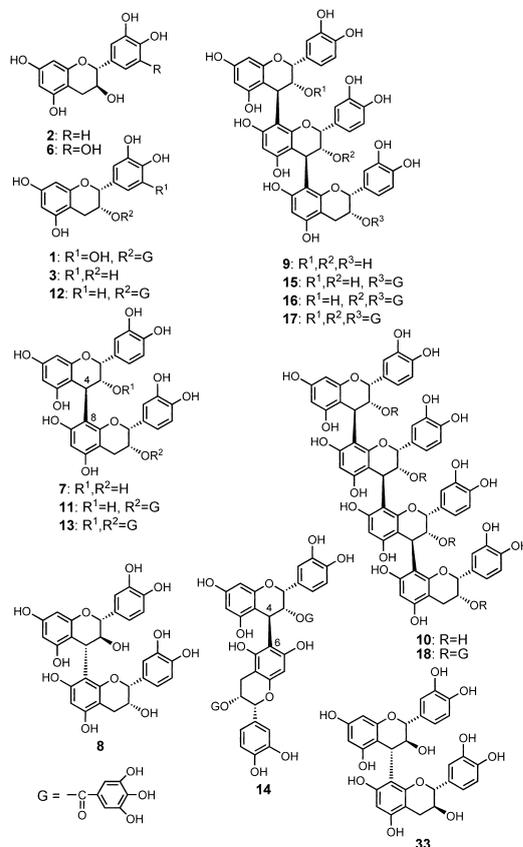


Fig. 2. Structures of condensed tannin and related compounds which were isolated from cultured cells and tissues.

ことが知られている。木本性植物の組織培養によるガロイル化された縮合型タンニンの生産例としてブドウ *V. vinifera* 培養カルスによる procyanidin B2-3'-O-gallate (11) とその構成単位である (-)-epicatechin-3-O-gallate (12) の生産が報告されている<sup>20, 21)</sup>。

また、草本性植物であるユキノシタについて、我々は培養シュートがインタクト植物に比べガロイル化度の低い (-)-epicatechin (3) の縮合体を生産していること、および再分化に伴い重合度ならびにガロイル化度が高くなることを認めている。本培養シュートは、一連のガロイル化された (-)-epicatechin (3) の縮合体を生産しており、(-)-epicatechin-3-O-gallate (12), procyanidin B2-3'-O-gallate (11) に加え procyanidin B2-3, 3'-di-O-gallate (13), C6-C4 結合による 2 量体 procyanidin B5-3, 3'-di-O-gallate (14) や 3 量体 [procyanidin C1-3'-O-gallate (15), procyanidin C1-3', 3'-di-O-gallate (16), procyanidin

C1-3, 3', 3''-tri-*O*-gallate (17)] さらには4量体 cinnamtannin A2-3, 3', 3'', 3'''-tetra-*O*-gallate (18) を本培養シュートより単離し, インタクト葉から単離した化合物との比較を含めその構造を明らかにした。培養組織からのこのような高分子縮合型タンニン (18: MW=1762) の単離例は初めてである<sup>22)</sup>。

### 3. 加水分解性タンニンの生産

#### 3.1 加水分解性タンニンの分類

一方, 加水分解性タンニンは, 酸や酵素により, 糖 (主に D-glucose) または多価アルコールとポリフェノールカルボン酸に加水分解されるタンニン群である。さらに加水分解性タンニンは, ポリフェノール残基として gallic acid (19) のみを持つガロタンニン (gallotannin), 分子内の2個の gallic acid (19) の酸化的縮合により生成した hexahydroxydiphenoyl (HHDP) 基を有し, 加水分解して ellagic acid を生じるエラジタンニン (ellagitannin) に分類される。その他, HHDP がさらに酸化した構造を有する dehydrohexahydroxydiphenoyl (DHHPD) 基を持つデヒドロエラジタンニン (dehydroellagitannin), 加水分解性タンニンの糖部分の1位とポリフェノールが結合して C-配糖体を形成した C-配糖体型エラジタンニン (C-glucosidic ellagitannin) などがある。また, 加水分解性タンニンとカテキン類が縮合した化学構造を持つ複合タンニン (complex tannin) や, 分子内のポリフェノールがカフェー酸 (caffeyl 基) であるカフェタンニン (caffetannin) やシソ科タンニン (labiataetannin) なども加水分解性タンニンの1種とみなしうる化合物群である<sup>23)</sup>。加水分解性タンニンは, 種子植物の中でも双子葉植物にはほぼ限定して存在し, その大部分は双子葉植物の中でも離弁花植物に含まれており, 進化の特定のルートに沿って, その存在が認められている。すなわち加水分解性タンニンを生産する能力は, 進化の系統にそって遺伝したものであると考えられる<sup>24)</sup>。

#### 3.2 加水分解性タンニンの生合成

加水分解性タンニンの生合成については縮合型タンニンに比べ未解明な点が多く, 加水分解性タンニンの構成単位である gallic acid (19) の生合成については phenylalanine (4) から caffeic acid (20) あるいは trihydroxycinnamic acid (21) を經由して生合成される経路や, dehydroshikimic acid (22) あるいは protocatechuic acid (23) がさらに酸化されて生じる経路などが提案されてきた。近年 dehydroshikimic acid (22) から gallic acid (19) への NADP 依存的な反応を触媒する酵素がカバノキ科 *Betula pubescens* の

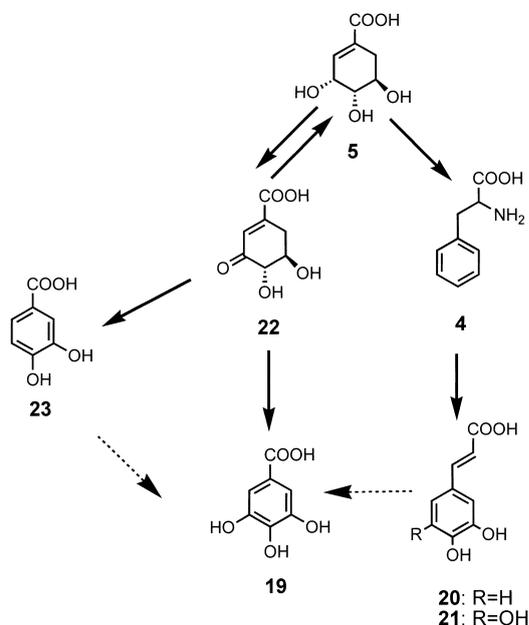


Fig. 3. Biosynthetic pathway of gallic acid from shikimic acid.

葉より単離され<sup>25)</sup>, さらにウルシ科 *Rhus typhina* での  $\delta^{18}\text{O}$  値の測定から dehydroshikimic acid (22) からの合成経路が優先的であることが示された<sup>26)</sup>。

Gallic acid (19) の glucose とのエステル体である galloylglucose (GG) 類はガロタンニンの代表的な化合物群であり, その生合成については, ドイツの Gross らが精力的に研究を行い, これらの反応を触媒するそれぞれの段階ごとの酵素を単離している<sup>27)</sup>。すなわち, gallic acid (19) と UDP-glucose から  $\beta$ -glucogallin (1-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose) (24) が合成され,  $\beta$ -glucogallin (24) がさらにガロイル基のドナーとして働き, 順次, 位置特異的にガロイル化されることが示されている。トウダイグサ科のシナアブラギリ *Aleurites fordii* 培養カルスやモミジバフウ *Liquidambar styraciflua* (マンサク科) 培養カルスは, インタクト植物ではより酸化の進んだ広義のエラジタンニン類を生産しているが, 未分化なカルスの状態では, この生合成経路にそった GG 類すなわち,  $\beta$ -glucogallin (24)  $\rightarrow$  1, 6-di-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (25)  $\rightarrow$  1, 2, 6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (26)  $\rightarrow$  1, 2, 3, 6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (27)  $\rightarrow$  1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) を生産した (後述)。1, 2, 3, 4, 6-Penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) が, さらにデブシド結合を介しガロイル化される過程についても, *Rhus typhina* からそれぞれの段階を触媒する酵素が単離

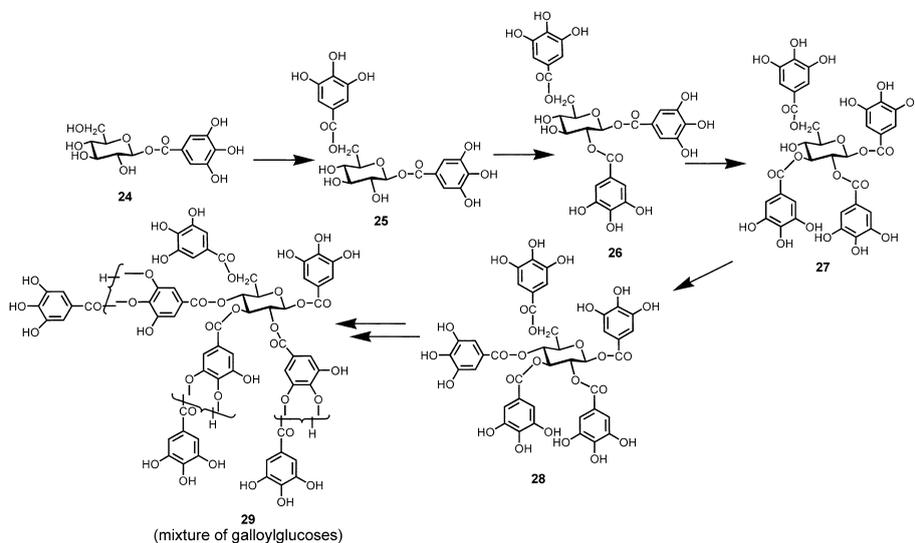


Fig. 4. Biosynthetic pathway of galloylglucoses.

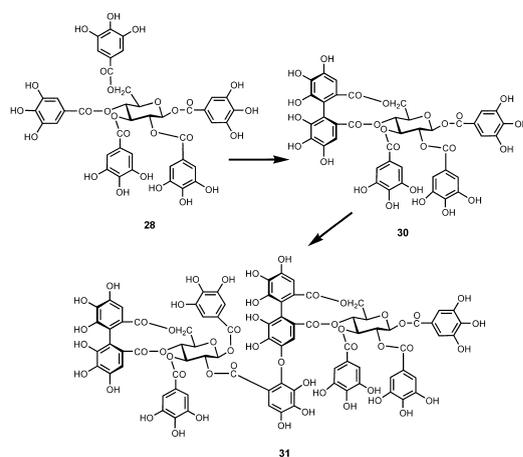
され、基質である penta-, hexa- および hepta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose に対して異なった親和性を持つ、いくつかの酵素が共同的に働くことにより GG 類の混合物である tannic acid (29) を生産することが示された。

天然での分布も広く、種類の多い、さらに酸化の進んだと考えられるエラジタンニンについては、1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) の酸化により生じるとみなされ、より酸化の進む方向への生合成的関係が提唱されている<sup>28)</sup>。実際この1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) からの酸化段階を触媒する laccase-type のポリフェノールオキシダーゼ酵素がユキノシタ科の *Tellima grandiflora* 葉から単離され、1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) から tellimagrandin II (30) への変換を触媒することが示された。またさらに tellimagrandin II (30) 2 分子から成る cornusinin E (31) への変換を触媒する異なる酸化酵素が単離された<sup>29) 30) 31)</sup>。

これまでに我々は多数存在する加水分解性タンニンのサブタイプの中で、特に植物に幅広く分布が認められ、それらが示す生理活性からも興味をもたれる化合物群 (ガロタンニン, エラジタンニン, デヒドロエラジタンニン) に着目し、研究を展開してきた。今回紹介する加水分解性タンニンの構成単位および関連化合物, またそれらから構成されるオリゴマーの関係を Fig. 6 に示した。

### 3.3 ガロタンニンの生産

ガロタンニンの代表である tannic acid (29) は、

Fig. 5. Formation of ellagitannins by enzymes isolated from *Tellima grandifolia* leaves.

日本薬局方に収載されており医薬品として利用される。またインクの原料などにも使用され工業的にも重要な化合物である。没食子 (ブナ科 *Quercus lusitanica* の虫こぶ) および五倍子 (ウルシ科ヌルデ *Rhus javanica* の虫こぶ) が代表的なタンニン酸の原料であるが、現在日本では五倍子が使われている。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 tannic acid (29) の安定供給を目指し、ヌルデ培養系の確立を行った<sup>32)</sup>。その結果、ヌルデの葉柄より 2,4-dichlorophenoxyacetic acid の添加によりカルスが誘

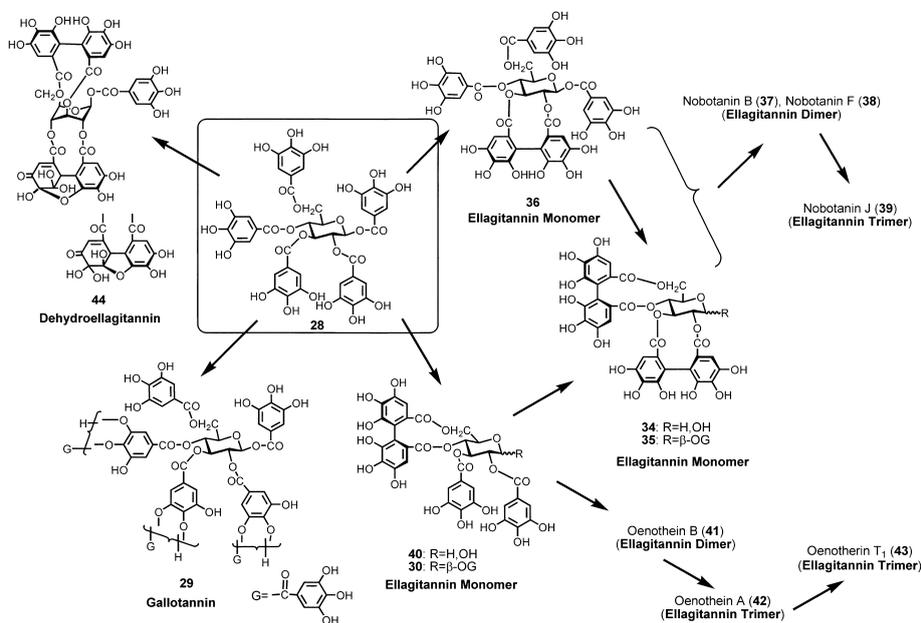


Fig. 6. Relationship of monomeric and oligomeric hydrolysable tannins.

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 GG 類の混合物を生産した。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。さらに、indole-3-acetic acid 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および特異なレトロフロボノイド構造を有する赤色素 riccionidin A (32) を生産した。本化合物は高等植物からは初めての単離例であったが、インタクト植物の根にも含有され、主として細胞壁に局在することが明らかとなった<sup>33)</sup>。また、ブナ科 *Q. robur* のカルスにおいてもガロタンニンの生産が HPLC 分析により認められており、さらに本培養株より tannic acid (29) の生合成の原料となる  $\beta$ -glucogallin (24) の生成を触媒する粗酵素の精製についても報告されている<sup>34)</sup>。

一方、山菜莢は、日本の民間薬や漢方薬に配合される生薬として広く利用されるサンシユ *Cornus officinalis* (ミズキ科) の果実であり、本植物はエラジタンニン類を多量含む代表的な植物である。しか

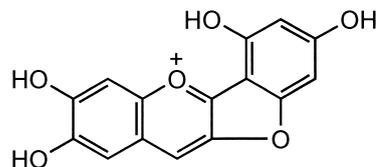


Fig. 7. Structure of riccionidin A.

し、サンシユより得たカルスにおいてはエラジタンニンの生産は認められず、インタクト植物ではほとんど生産されていない 1, 2, 6-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (26), 1, 2, 3, 6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (27), 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) および分子内にデブシド結合を有する 6-*O*-digalloyl-1, 2, 3-tri-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose の生産を認めた<sup>24)</sup>。また同属のヤマボウシ (*C. kousa*) の培養カルスでは縮合型タンニンとその構成単位である (+)-catechin (2), (+)-gallocatechin (6), procyanidin B3 (33) とともに  $\beta$ -glucogallin (24) の生産が報告されている<sup>35, 36)</sup>。さらに Tanaka らは *C. capitata* の不定根培養系において低濃度の銅 (0.1  $\mu$ M) を含む Murashige-Skoog 培地中では 1, 2, 3, 6-tetra-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (27) と 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) を主として生産するのに対し、10  $\mu$ M の銅を含む培地においてはエラグ酸の誘導体類を生産することを報告してい

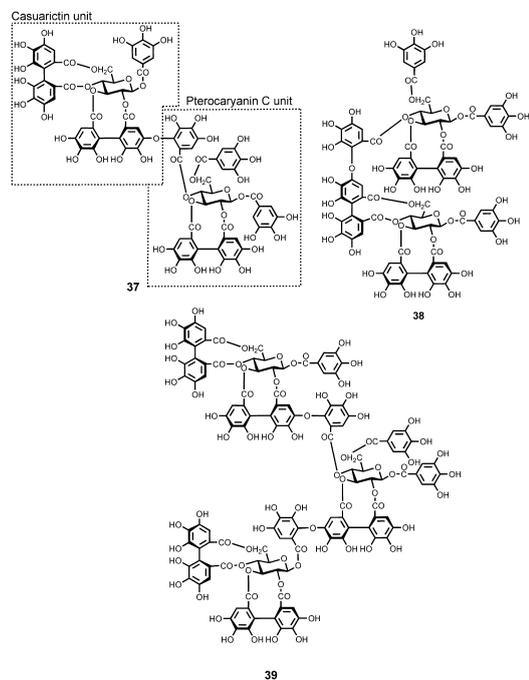


Fig. 8. Structures of oligomeric ellagitannins produced in cultured tissues of *Heterocentron roseum*.

る<sup>37,38</sup>。またインタクト植物において多量含有されるエラジタンニンの生産が脱分化により抑制され、その前駆体とみなされる1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28)がさらにガロイル化されたGG類を多量生産する傾向は、草本性植物のツクミソウ *Oenothera tetraaptera* (アカバナ科) 培養シュートにおいても観察された<sup>39</sup>。

### 3.4. エラジタンニンの生産

GG類が加水分解性タンニンを生産する植物において、未分化な組織(カルスや幼植物体)の共通の成分として生産されるのに対し、エラジタンニンおよびそのオリゴマーについては1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28)分子内でのgalloyl基間の酸化的結合さらに分子間での結合により生合成されるとみなされ、それらの結合位置や結合様式は、植物分類や進化の系統との間に特定の関係があることも示されている<sup>28</sup>。エラジタンニン単量体の生産例としては、前述のモミジバフウの培養系による(+)-catechin (2), (-)-epicatechin 3-*O*-gallate (12), procyanidin B3 (33)やmono~penta-GG類(24-28)に加え、エラジタンニンであるpedunculagin (34)の生産が報告されている<sup>40</sup>。

ノボタン科の植物は、その結合様式から一連の化合物としてみなされるエラジタンニンオリゴマー類

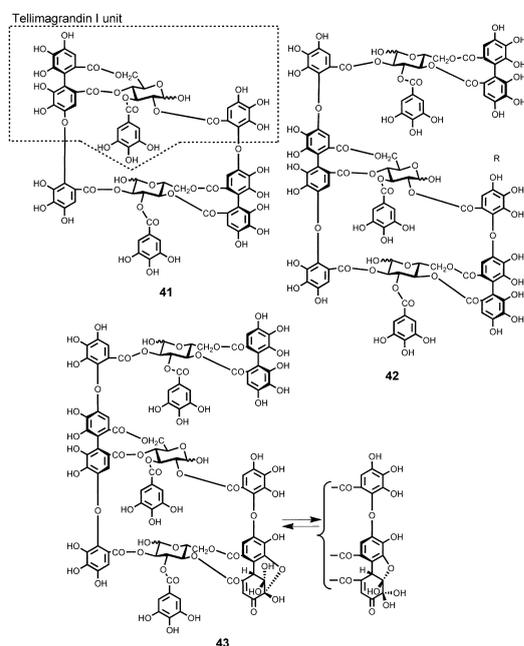


Fig. 9. Structures of oligomeric ellagitannins produced in cultured tissues of *Oenothera* spp.

を多量生産する植物群である。すなわち、これまでにノボタン科植物から単離、構造決定されている加水分解性タンニンオリゴマーは、全て単量体のcasuarictin (35)とpterocaryanin C (36)(およびその誘導体)を基本単位として、それらが交互にC-Oカップリングすることにより生じた構造を持っている。これらエラジタンニンオリゴマー類はケモタキソノミーの指標ともなりうるものである<sup>41,42</sup>。メキシコノボタン *Heterocentron roseum* 培養カルスおよびシュートは、インタクト植物と同様の結合様式をもつ2量体nobotanin B (37), nobotanin F (38), 3量体nobotanin J (39)を生産した<sup>43</sup>。本培養カルスは、活発な分化能を有しておりシュートへの分化に伴いタンニンの生産能が高くなることを認めている。

前述の *Oenothera* 属植物はノボタン科植物とは異なる結合様式を持ち tellimagrandin I (40)を基本単位とする特異な大環状構造を有する oenotherin B (41)や oenotherin A (42)を始めとするオリゴマー類を多量生産している。コマツヨイゲサ *O. laciniata* 培養カルスを用いた実験により、細胞生長には、アンモニア性窒素は有害であるが、タンニン類生産には必要であり、総無機塩量を通常の1/4に希釈し、アンモニア性窒素と硝酸性窒素の比が2:1の時 oenotherin B (41)の生産が最も高くなることを明らかにした<sup>44</sup>。また再生可能なツクミソウ培養シュート

ト系を用い, 再生植物体を得る過程において, 培養組織の形態変化と生産されるタンニンの化学構造との関係について検討した。その結果, 分化に伴い前述の GG 類の生産が減少し, 酸化および重合の進む生合成経路に従った加水分解性タンニン, すなわちエラジタンニン単量体 tellimagrandin I (40), tellimagrandin II (30) から 2 量体 oenotherin B (41), 3 量体 oenotherin A (42) および oenotherin A (42) がさらに酸化された構造を有する 3 量体 oenotherin T<sub>1</sub> (43) が生産されることを報告した<sup>39)</sup>。

### 3.5 デヒドロエラジタンニンの生産

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の代表的な化合物である geraniin (44) は日本の民間薬であるゲンノショウコ *Geranium thunbergii* (フウロソウ科) より単離された化合物である。その後の研究により geraniin (44) および関連の構造を有するデヒドロエラジタンニン類は, トウダイグサ科植物に広く分布していることが明らかにされ, その種の新規化合物がトウダイグサ科植物より数多く単離同定されている<sup>45)</sup>。木本性植物においてトウダイグサ科のナンキンハゼ *Sapium sebiferum* 培養カルスでの geraniin (44) および関連タンニンの生産が認められており, 培地中の硝酸性窒素の除去により geraniin (44) の生産が急増することが報告されている<sup>46, 47)</sup>。そこで, 同じトウダイグサ科のシナアブラギリについて培養を試みた<sup>48)</sup>。その結果得た培養カルスにおいて, Gross らの酵素実験により明らかにされている生合成経路を反映した GG 類 (24-28), さらにエラジタンニンの geraniin (44) の生産を認め, それぞれの化合物を単離同定した。またシナアブラギリのインタクト植物からの GG 類の単離については, 今までに報告がなかった<sup>49)</sup>。しかし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 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) が生産されることが明らかとなった。そこで, ガロタンニン 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) およびデヒドロエラジタンニン geraniin (44) の生産に影響を与える因子について検討した。その結果, 光照射により 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) の生産は促進されるが, geraniin (44) の生産はあまり影響を受けなかった。一方, 培地中の窒素濃度により geraniin (44) の生産は影響を受け, 窒素濃度が低い時, その生産は促進された。また, 硝酸性窒素のみを添加した培地 (総窒素 15 mM) では, 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28) の生産が抑制され geraniin (44) のみが選択的に生産され, Ishimaru らの報告<sup>50)</sup>と同様,

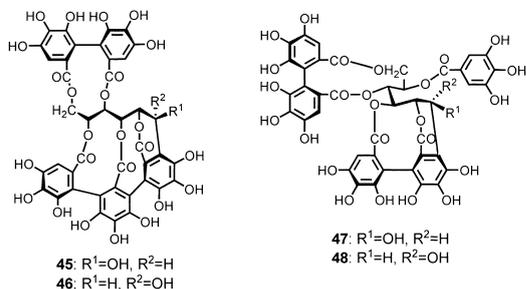


Fig. 10. Structures of C-glycosidic ellagitannins produced in cultured tissues of *Quercus* spp.

培地中の窒素源がガロタンニンからエラジタンニンへの変換において重要な因子であることが示された。

### 3.6 C-配糖体型エラジタンニンの生産

C-配糖体型エラジタンニンが最初に見出されたのはブナ科植物であり, 家具や建材, またワインの樽として幅広く利用されるヨーロッパオーク (*Quercus robur*, *Q. petraea*) の心材は約10%のエラジタンニン, 主としてC-配糖体型エラジタンニン castalagin (45) と vescalagin (46) を含有している。また casuarinin (47), stachyurin (48), casuarinin などのC-配糖体型エラジタンニン単量体は, モクマオウ科, キブシ科, フトモモ科, グミ科など諸植物に見出され分布範囲が広い。さらに構成単位がC-C結合により縮合したと見られるオリゴマー類や, C-配糖体型エラジタンニンにさらに(+)-catechin (2)や(-)-epicatechin (3)などが結合した複合タンニンなどがC-配糖体型エラジタンニンとして知られている<sup>23)</sup>。

前述 (3.3) の通り *Q. robur* のカルスにおいてはガロタンニンの生産が報告されている<sup>34)</sup>。また Scalbert らは同植物のカルスが呈色反応に基づき HHDP エステル体と縮合型タンニンを生産していることと, HPLC 分析により微量のC-配糖体型エラジタンニン castalagin (45) と vescalagin (46) を生産していることを報告している<sup>51)</sup>。さらに, *Q. acutissima* 培養カルスからは低分子ポリフェノール類 [(+)-catechin (2), gallic acid (19)], GG 類 [ $\beta$ -glucogallin (24), gallic acid 3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside, 1, 2, 3, 4, 6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glucose (28)], エラジタンニン類 [tellimagrandin I (40), tellimagrandin II (30), pedunculagin (34), casuarictin (35)] に加え, C-配糖体型エラジタンニンである castalagin (45), vescalagin (46), casuarinin (47) および stachyurin (48) の単離が報告

され、 $\text{NH}_3\text{NO}_4$ の除去によりGG類の生産と細胞生長が促進されることが報告されている<sup>52)</sup>。また、ホワイトオーク (*Q. alba*) のカルスは心材と同様のHPLCプロファイルを示し、castalagin (45) と vescalagin (46) を主として生産した。また $\text{NH}_3\text{NO}_4$ の除去と銅イオンの添加がこれらタンニンの生産性を向上させることが報告されている<sup>53)</sup>。

以上、木本性植物を中心に組織培養によるタンニン生産についてまとめた。種々の生理活性を示すタンニンの供給源として培養技術は有効である。しかし、より酸化の進んだ、高分子の加水分解タンニンの生産は未分化な状態のカルスでは抑制される傾向があることから、さらに生産性を向上させる因子やその制御機構の解明が必要である。また植物種により異なると考えられる加水分解性タンニン生成酵素について、タイプ別にそれぞれの酵素が単離され、それらの遺伝子配列等と植物進化過程の関係が明らかになることが期待される。

## 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奥田拓男名誉教授ならびに吉田隆志名誉教授に心より感謝申し上げます。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。

## 文 献

- Haslam, E. : "Plant Polyphenols : Vegetable Tannins Revisited", Cambridge University Press, Cambridge, 1989, pp. 1-13.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. : "Economic and Medicinal Plants Research" vol. 5, Wagner, H., Farnsworth, N. R. eds., Academic Press, London, 1991, pp. 129-165.
- 波多野力, 吉田隆志 : *Food Style 21* **4**(1), 39-44 (2000).
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. : "Plant Polyphenols : Synthesis, Properties, Significance" vol. 59, Hemingway, R. W., Laks, P. E. eds., Plenum, New York, 1992, pp. 539-569.
- Feldman, K. S., Sahasrabudhe, K., Quideau, S., Hunter, K. L., Lawlor, M. D. : "Plant Polyphenols 2 : Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology", Gross, G. G., Hemingway, R. W., Yoshida, T. eds. Kluwer, New York, 1999, pp. 101-126.
- 吉田隆志, 波多野力, 伊東秀之 : 有機合成化学協会誌 **62**(5), 500-507 (2004).
- Khanbabaee, K., Ree, T. : *Nat. Prod. Rep.* **18**(6), 641-649 (2001).
- 河本晴雄, 田中憲文, 中坪文明, 村上浩二 : 木材学会誌 **39**(7), 820-824 (1993).
- Saito, A., Mizushima, Y., Ikawa, H., Yoshida, H., Doi, Y., Tanaka, A., Nakajima, N. : *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **13**(8), 2759-2771 (2005).
- Ferreira, D., Slade, D. : *Nat. Prod. Rep.* **19**(5), 517-541 (2002).
- Knaggs, A. R. : *Nat. Prod. Rep.* **20**(1), 119-136 (2003).
- Tanner, G. J., Francki, K. T., Abrahams, S., Watson, J. M., Larkin, P. J., Ashton, A. R. : *J. Biol. Chem.* **278**(34), 31647-31656 (2003).
- Marles, M. A. S., Ray, H., Gruber, M. Y. : *Phytochemistry* **64**(2), 367-383 (2003).
- Xie, D.-Y., Dixon, R. A. : *Phytochemistry* **66**(18), 2127-2144 (2005).
- 福田忠徳, 円 由香, 安田征市 : 木材学会誌 **43**(10), 819-823 (1997).
- Yazaki, K., Okuda, T. : "Biotechnology in Agriculture and Forestry" vol. 24, Bajaj, Y. P. S. ed., Springer-Verlag, Berlin, 1993, pp. 122-131.
- Yazaki, K., Okuda, T. : *Phytochemistry* **29**(5), 1559-1562 (1990).
- Bahorum, T., Aumjaud, E., Ramphul, H., Rycha, M., Luximon-Ramma, A., Trotin, F., Aruoma, O. I. : *Die Nahrung* **47**(3), 191-198 (2003).
- Yousef, G. G., Seigler, D. S., Grusak, M. A., Rogers, R. B., Knight, C. T. G., Kraft, T. F. B., Erdman, J. W. Jr., Lila, M. A. : *J. Agric. Food Chem.* **52**(5), 1138-1145 (2004).
- Decendit, A., Waffo-Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J.-P., Defieux, G., Mérillon, J.-M. : *Phytochemistry* **60**(8), 795-798 (2002).
- Waffo-Tégou, P., Hawthorne, M. E., Cuendet, M., Mérillon, J. M., Kinghorn, A. D., Pezzuto J. M., Mehta, R. G. : *Nutr. Cancer* **40**(2), 173-179 (2001).
- Yoshida, T., Hara, T., Taniguchi, S., Hatano, T., Ito, H. : The 4th Tannin Conference, Philadelphia, USA, 2004, p. Cell-1.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. : "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" vol. 66, Herz, W., Kirby, G. W., Moore, R. E., Steglich, W., Tamm, C. eds., Springer-Verlag, Wien, 1995, pp. 1-117.
- Yazaki, K., Okuda, T. : "Biotechnology in

- Agriculture and Forestry” vol. 21, Bajaj, Y. P. S. ed., Springer-Verlag, Berlin, 1993, pp. 104-114.
- 25) Ossipov, V., Salminen, J.-P., Ossipova, S., Haukioja, E., Pihlaja, K. : *Biochem. Syst. Ecol.* **31** (1), 3-16 (2003).
- 26) Werner, R. A., Rossmann, A., Schwarz, C., Bacher, A., Schmidt, H.-L., Eisenreich, W. : *Phytochemistry* **65** (20), 2809-2813 (2004).
- 27) Niemetz, R., Niehaus, J. U., Gross, G. G. : “Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology”, Gross, G. G., Hemingway, R. W., Yoshida, T. eds., Kluwer Academic, New York, 1999, pp. 63-82.
- 28) Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T. : *Phytochemistry* **55** (6), 513-529 (2000).
- 29) Niemetz, R., Gross, G. G. : *Phytochemistry* **62** (3), 301-306 (2003).
- 30) Niemetz, R., Schilling, G., Gross, G. G. : *Phytochemistry* **64** (1), 109-114 (2003).
- 31) Niemetz, R., Gross, G. G. : *Phytochemistry* **66** (17), 2001-2011 (2005).
- 32) Taniguchi, S., Takeda, S., Yabu-uchi, R., Yoshida, T., Yazaki, K. : *Phytochemistry* **46** (2), 279-282 (1997).
- 33) Taniguchi, S., Yazaki, K., Yabu-uchi, R., Kawakami, K., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T. : *Phytochemistry* **53** (3), 357-363 (2000).
- 34) Krajci, I., Gross, G. G. : *Phytochemistry* **26** (1), 141-143 (1986).
- 35) Ishimaru, K., Arakawa, H., Neera, S. : *Phytochemistry* **32** (5), 1193-1197 (1993).
- 36) Ishimaru, K., Tanaka, N., Kamiya, T., Sato, T., Shimomura, K. : “Biotechnology in Agriculture and Forestry” vol. 41, Bajaj, Y. P. S. ed., Springer-Verlag, Berlin, 1998, pp. 113-131.
- 37) Tanaka, N., Nishikawa, K., Ishimaru, K. : *J. Agric. Food Chem.* **51** (20), 5906-5910 (2003).
- 38) Tanaka, N., Tanaka, T., Fujioka, T., Fujii, H., Mihashi, K., Shimomura, K., Ishimaru, K. : *Phytochemistry* **57** (8), 1287-1291 (2001).
- 39) Taniguchi, S., Imayoshi, Y., Hatano, T., Yazaki, K., Yoshida, T. : *Plant Biotechnol.* **19** (5), 357-363 (2002).
- 40) Neera, S., Arakawa, H., Ishimaru, K. : *Phytochemistry* **32** (4), 921-924 (1993).
- 41) Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Okuda, T. : “Studies in Natural Products Chemistry” vol. 23, Atta-ur-Rahman ed., Elsevier Science, Amsterdam, 2000, pp. 395-453.
- 42) Yoshida, T., Ito, H., Hipolito, I. J. : *Phytochemistry* **66** (17), 1972-1983 (2005).
- 43) Yazaki, K., Okuda, T. : “Biotechnology in Agriculture and Forestry” vol. 33, Bajaj, Y. P. S. ed., Springer-Verlag, Berlin, 1995, pp. 248-260.
- 44) Taniguchi, S., Nakamura, N., Nose, M., Takeda, S., Yabu-uchi, R., Ito, H., Yoshida, T., Yazaki, K. : *Phytochemistry* **48** (6), 981-985 (1998).
- 45) Yoshida, T., Hatano, T., Ito, H., Okuda, T. : “Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology”, Gross, G.G., Hemingway, R. W., Yoshida, T. eds., Kluwer Academic, New York, 1999, pp. 127-144.
- 46) Neera, S., Ishimaru, K. : *Phytochemistry* **31** (3), 833-836 (1992).
- 47) Neera, S., Arakawa, H., Ishimaru, K. : *Phytochemistry* **31** (12), 4143-4149 (1992).
- 48) Taniguchi, S., Uechi, K., Kato, R., Ito, H., Hatano, T., Yazaki, K., Yoshida, T. : *Planta Med.* **68** (12), 1145-1146 (2002).
- 49) Nonaka, G., Hayashi, M., Tanaka, T., Saijo, R., Nishioka, I. : *Chem. Pharm. Bull.* **38** (4), 861-865 (1990).
- 50) Ishimaru, K., Shimomura, K. : “Studies in Natural Products Chemistry” vol. 17, Atta-ur-Rahman ed., Elsevier Science, Amsterdam, 1995, pp. 421-449.
- 51) Scalbert, A., Monties, B., Favrea, J.-M. : *Phytochemistry* **27** (11), 3483-3488 (1988).
- 52) Tanaka, N., Shimomura, K., Ishimaru, K. : *Phytochemistry* **40** (4), 1151-1154 (1995).
- 53) Zhentian, L., Jervis, J., Helm, R. F. : *Phytochemistry* **51** (6), 751-756 (1999).