

## メキシコイトスギ培養細胞中で生産されるモノテルペン類

藤田, 弘毅  
九州大学大学院農学研究院森林資源科学部門

松永, 洋子  
ハリマ化成

<https://doi.org/10.15017/11064>

---

出版情報：九州大学極低温実験室だより. 5, pp.3-8, 2004-08. 九州大学理学部極低温実験室  
バージョン：  
権利関係：

# メキシコイトスギ培養細胞中で生産されるモノテルペン類

大学院農学研究院森林資源科学部門 藤田弘毅  
(株)ハリマ化成 松永洋子

## 要旨

A novel monoterpene, (1*S*, 2*S*, 6*S*)-(+)-1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol, was isolated from an elicitor-treated cell culture of *Cupressus lusitanica* (Mexican cypress). Ten known monoterpenes - limonene, myrcene,  $\beta$ -ocimene, sabinene, terpinolene, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, 4(8)-*p*-menthen-1,2-diol, 4-hydroxyphellandric acid methylester and  $\beta$ -thujaplicin methylether - were also identified. Regioselective metabolisms of monoterpenes were observed in this culture.

エリシターを作用させたメキシコイトスギ (*Cupressus lusitanica*) 培養細胞が生産するモノテルペンを同定した。既知のテルペン類、limonene, myrcene,  $\beta$ -ocimene, sabinene, terpinolene, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, 4(8)-*p*-menthen-1,2-diol, 4-hydroxyphellandric acid methylester,  $\beta$ -thujaplicin methylether とともに未報告のモノテルペン、(1*S*, 2*S*, 6*S*)-(+)-1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-olが見いだされた。本培養細胞におけるテルペン類の代謝反応はレギオ選択的であった。

## 1. はじめに

メキシコイトスギ培養細胞がヒノキチオール ( $\beta$ -thujaplicin) を生産することは既に報告されている<sup>1-4</sup>。ヒノキチオールはトロポロン骨格というユニークな構造を持ったモノテルペンであり、様々な生理活性を持つことが知られている<sup>5</sup>。その生合成においては、ゲラニルニリン酸を出発物質とし、多くのモノテルペン生合成で見られる場合と同様に6員環モノテルペンを中間体として生成すると示唆されている<sup>6-7</sup>。この生合成経路を決定するに当たり、さらなる知見を得るべくこの細胞が生産するモノテルペン類の同定を試みた。

## 2. 実験

B 5 固体培地上で4週間毎に植継ぐことで維持した培養細胞を実験に用いた。既報に従い<sup>3,8</sup>、部分精製した酵母抽出物をエリシターとして、ヒノキチオール生産能を上げる改変B 5液体培地で、8日間、25℃、暗所、72rpmでしんとう培養を行った。培養後、培地と細胞は別々にジエチルエーテルで抽出し、必要ならばNaOHaqあるいはHClaqによる分画を行い、GC/MS (Shimadzu QP-5000) 分析を行った。一部モノテルペンは標品とのリテンションタイムおよびMSスペクトルの比較により同定を行った。標品との一致が得られなかったサンプルについては、順相および逆相HPLCを用いて単離し、MSスペクトルおよびNMR (JEOL AL-400) スペクトルから同定を行った。また、揮発性物質をトラップする能力がある Miglyol<sup>9</sup> を培地に加えて同様の実験を行った。そのとき、Miglyol はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで除去した。

## 3. 結果考察

メキシコイトスギ培養系のジエチルエーテル抽出物から順相HPLCを用いた分画により無色のオイル状物質が得られた。この物質のEI-MSは  $m/z=168(M^+)$  を示した。また、NMRデータ (1H, 13C, DEPT, 1H-1H COSY, HMBC, HMQC) を Table のようにまとめ、Fig. に示す 1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol と同定した。これはSTN

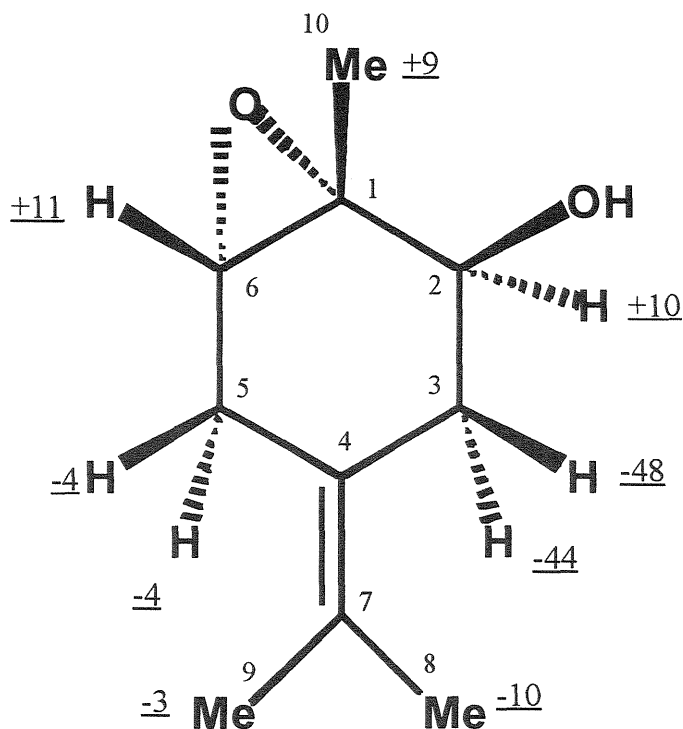


Fig. Structure of (1S, 2S, 6S)-(+)-1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol and  $\Delta\delta$  values of its MTPA esters.  $\Delta\delta$  values are expressed in Hertz (400MHz) with underlines.  $CDCl_3$  was used as a solvent.

データベースにない化合物であった。さらに NOESY 測定と新 Mosher 法<sup>10</sup> による絶対配置決定を行った。NOESY 測定において、H-6 と H-10 の間にクロスピークが見られ、H-2 と H-10 の間にはシグナルが見られないことから、エポキシ酸素と水酸基の配置は *trans* の関係にあるとした。新 Mosher 法による  $\Delta \delta$  値は Fig. に示すように H-2, H-6, H-10 側はすべて正の値であり、その反対側、H-4, H-5, H-8, H-9 ではすべて負の値であることから、絶対配置を含め (1*S*, 2*S*, 6*S*)-(+)-1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol であると決定した。旋光度は  $[\alpha]_{589.3} = +14.9^\circ$  であった。

Table <sup>13</sup>C (100MHz) and <sup>1</sup>H (400MHz) NMR spectral data of 1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol

C	$\delta$ C	$\delta$ H (J in Hz)	HMBC	NOESY
1	60.3			
2	70.9	3.76, m		
3	33.8	2.14, dd (8.7, 13.3)	C-1, C-2, C-4, C-7	H-3 $\alpha$
		2.41, dd (4.9, 13.4)	C-1, C-2, C-4, C-5, C-7,	H-3 $\beta$ , 8
4	122.0			
5	28.2	2.52, dd (3.4, 17.1)	C-1, C-4, C-6, C-7	H-6, 9
		2.64, dd (1.2, 17.1)	C-3, C-4	H-6, 9
6	62.2	3.18, dd (1.2, 3.4)	C-4, C-5	H-10, 5
7	126.9			
8	20.3	1.67, s	C-4, C-7	H-3 $\alpha$
9	20.0	1.64, s	C-4, C-7	H-5
10	19.6	1.44, s	C-1, C-2, C-6	H-6

Miglyol を用いない培養で、培養系のジエチルエーテル抽出物から、4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol が GC/MS において標品との比較で同定された。さらに、標品との比較では不明であった物質を順相および逆相 HPLC による分画・精製し、その MS スペクトルおよび NMR スペクトルの既報との比較から、4(8)-*p*-menthen-1,2-diol<sup>11</sup>, 4-hydroxyphellandric acid methylester<sup>12</sup>,  $\beta$ -thujaplicin methylether<sup>13</sup> が同定された。

Miglyol を用いた培養系からは、limonene, myrcene,  $\beta$ -ocimene, sabinene, terpinolene が GC/MS 上の標品との比較で同定された。いずれも揮

発性の高い炭化水素モノテルペンであることから、Miglyol が存在しない場合は培養期間中に揮発してしまうものと思われる。

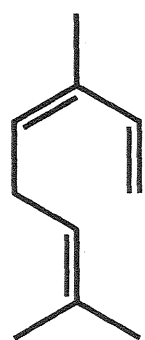
植物の二次代謝においてはアリル位のレギオ選択的な水酸化や、C=C二重結合のステレオあるいはエナンチオ選択的な酸化が報告されている<sup>14</sup>。また、limonene のシトクローム P-450 依存酸化反応も報告されている<sup>15</sup>。今回培養細胞中に見られた含酸素テルペン類も 4-hydroxyphellandric acid methylester を除いてその構造は terpinolene が同様に酸化したものとして解釈できる。その場合、4(8)-*p*-menthen-1,2,6-triol の存在が予想され、また、その可能性が GC/MS 分析において示唆されたが、完全な同定には至らなかった。ヒノキチオールの変質が既に示されていることから<sup>13</sup>、4-hydroxyphellandric acid は培養中に速やかにメチル化されるため見られなかったと思われる。

これらモノテルペン類は、エリシターが存在しないときには観察されなかったことから、これら成分は植物中でヒノキチオールと同様ファイトアレキシンとして作用していると考えられる。

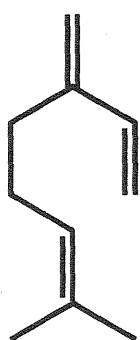
#### 参考論文

- [1] S. Inada, Y. Tsutsumi and K. Sakai (1993). J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 38, 119-126.
- [2] K. Sakai, K. Kusaba, Y. Tsutsumi and T. Shiraishi (1994). Mokuzaigakkaishi, 40, 1-5 (Japanese).
- [3] R. Itose and K. Sakai (1997). Plant Biotechnol., 14(3), 163-167.
- [4] J. Yamada, K. Fujita and K. Sakai (2001). Proceedings of molecular breedings of woody plants. In: N. Morohoshi and A. Komamine (Eds.), Progress in Biotechnology, Vol. 18, pp. 273-277. Elsevier Science, Amsterdam.
- [5] T. Yamaguchi, K. Fujita and K. Sakai (1999). J. Wood Sci., 45, 170-173.
- [6] K. Fujita, T. Yamaguchi, R. Itose and K. Sakai (2000) J. Plant Physiol., 156, 462-467.
- [7] J. Bohlman, G. Meyer-Gauen and R. Croteau (1998). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 4126-4133.

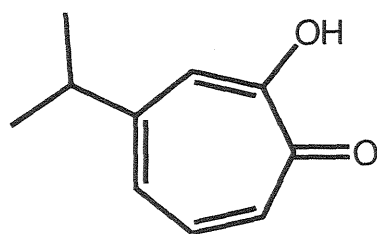
- [8] O.L. Gamborg, R.D. Miller and K. Ojima (1968). *Exp. Cell Res.*, 50, 151-156.
- [9] J. Berlin, L. Witte, W. Schubert and V. Wray (1984). *Phytochem.*, 23(6), 1277-1279.
- [10] I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman and H. Kakisawa (1991). *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4092-4096.
- [11] Spectral data for 4(8)-*p*-menthen-1,2-diol: EI-MS  $m/z$  170( $M^+$ );  $^1H$ -NMR(400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  1.25 (3H, s), 1.38-1.47(1H, m), 1.69(3H, s), 1.70(3H, s), 1.71-1.73(1H, m), 1.95-2.07(2H, m), 2.38-2.45(1H, m), 2.72(1H, dd,  $J=4.2, 13.9$  Hz), 3.45(1H, dd,  $J=4.2, 11.5$  Hz);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  20.35( $CH_3$ ), 21.29( $CH_3$ ), 26.30( $CH_2$ ), 34.31( $CH_2$ ), 37.60( $CH_2$ ), 73.29(C), 76.57(CH), 124.85(C), 126.66(C).
- [12] Spectral data for 4-hydroxyphellandric acid methylester: EI-MS  $m/z$  198( $M^+$ );  $^1H$ -NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ),  $\delta$  0.95(3H, d,  $J=6.8$  Hz), 0.97(3H, d,  $J=7.0$  Hz), 1.51-1.58(1H, m), 1.66-1.71(2H, m), 2.17-2.20(1H, m), 2.30-2.37(1H, m), 2.38-2.44(2H, m), 3.75(3H, s), 6.91(1H, dd,  $J=17, 3.4$  Hz);  $^{13}C$ -NMR (100 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  16.68( $CH_3$ ), 16.73( $CH_3$ ), 21.27( $CH_2$ ), 30.47( $CH_2$ ), 35.26( $CH_2$ ), 36.93(CH), 51.50( $CH_3$ ), 71.48(C), 129.65(C), 136.90(CH), 167.29(C).
- [13] J. Yamada, K. Fujita and K. Sakai (2002). *Phytochem.*, 60(5), 447-450.
- [14] T. Hirata, Y. Ikeda, S. Izumi, K. Shimoda, H. Hamada and T. Kawamura (1994). *Phytochem.*, 37(2), 401-403.
- [15] S. Lupien, F. Karp, M. Wildung and R. Croteau (1999). *Arch. Biochem. Biophys.*, 368(1), 181-192.



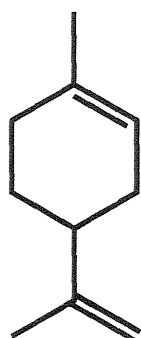
$\beta$ -ocimene



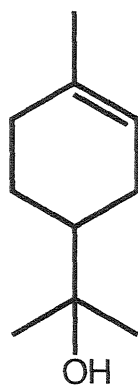
myrcene



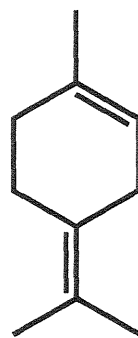
$\beta$ -thujaplicin



limonene



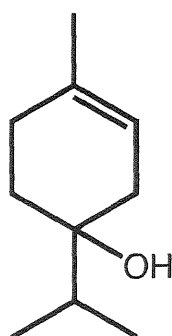
$\alpha$ -terpineol



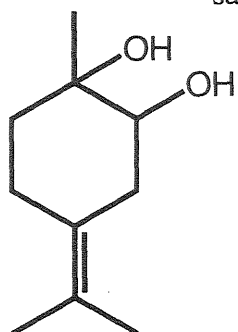
terpinolene



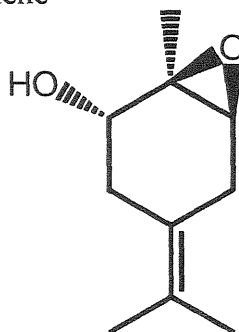
sabinene



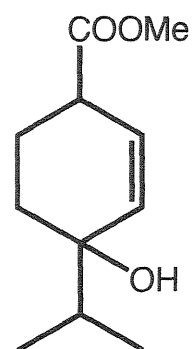
4-terpineol



4(8)-*p*-menthen-1,2-diol



1,6-epoxy-4(8)-*p*-menthen-2-ol



4-hydroxyphellandric acid methyl ester