

植物組織培養による大量増殖と有用物質生産

河 邊 誠一郎

倉敷芸術科学大学教養学部

(1995年9月30日 受理)

はじめに

20世紀後半、急激に増大し始めた地球人口。石油と自動車、コンピューター・電子機器と化学製品を中心とした消費文明の急激な発達。なりふりかまわぬ産業活動が吐き出す廃棄物と、性格不明の怪しげな化学薬品にまみれ、いまや地球環境は危機に瀕している。

国・人種・宗教の壁により、人口抑制は難しく、人間の既得権維持と欲望、そして際限のない競争心が物質文明・大量消費の抑制を困難にしている。

今や日常的になってしまった異常気象の連続、温暖化、オゾンホールが増大、奇病の増加、内戦と飢餓……、このままでは地球生物（人類）の未来は暗い。

しかし、生物には無限の可能性が秘められている。中でも、太陽・水・空気と土を上手に利用出来る植物は我々人類にとってだけでなく、地球全体の環境保全に大いに貢献している。動物は増える程に地球環境は悪化するが、植物は増えれば増えるほど地球の環境は良好になっていく。

人口や大量消費文明の抑制が難しい現状では、我々に残された唯一の解決策は生物資源の発掘と大量増殖、そしてその持続的有効利用以外にはない。

近年のバイオテクノロジーの進歩が、絶滅しつつある生物資源の保存と増殖を容易にし、有用植物の持続的有効利用を可能にした。自然のままでは復活不可能な熱帯ジャングル、中国黄土地帯をはじめとする旧文明破壊地帯、牧畜破壊地帯、高山不毛帯などの植物増殖と回復、そして遺伝子の維持・管理に大いに役立っている。

現在我々の研究室では、未知の成分を持った有用植物の探索を行うと同時に、種子による増殖が困難な植物を中心に様々な植物の大量増殖による優良苗の確保、各種植物・培養細胞・組織・器官中に含まれる有用物質の検索と生産、および遺伝子操作による新しい有用植物の作出の問題に取り組んでいる。

現在、多くの植物の培養・増殖・成分について研究¹⁻⁴⁾をおこなっているが、今回はそのうちハシリドコロ (*Scopolia japonica*) 植物の組織培養による大量増殖とその成分に関する報告を行う。ハシリドコロは日本の深山に自生しており、その根茎には医薬成分として重要なスコポラミン、アトロピンなどのアルカロイド成分を含んでいるため、特にロート

コンとして日本薬局方に定められている。しかし、その生育速度は遅く栽培も困難であるうえ山里の荒廃と乱獲により資源枯渇が心配される植物である。

そのため、近年このような薬用植物に対して人工的な組織培養による成分の効率的な有効成分生産の研究が数多く行われ始めている。

一般にアルカロイドをはじめとする二次代謝産物は、培養細胞内に蓄積されにくいと言われているが⁵⁾、ヒヨス⁶⁾、ズボイシア⁷⁾、ペラドンナ⁸⁾、グツラ⁹⁻¹²⁾等の培養細胞に関しては、アルカロイドの生産が確認されている。ハシリドコロに関してもいくつかの報告がなされているが¹³⁻¹⁸⁾、その見解には不明な点が多い。

そのうちの、田端ら¹⁵⁾はカルスによるアルカロイドの産出を報告しているが、これは分析方法に問題があるうえ、その後この結果は山田ら¹⁹⁾によって否定されている。

本研究では、まずこのハシリドコロの培養細胞がアルカロイドを生合成するか否かを明らかにするために、岡山県産ハシリドコロを用いて種々の実験を行った。

なお、本研究は阿野雅史君（岡山理科大学理学部基礎理学科生物化学研究室大学院生、現山陽高校教員）と共同で行ったものの一部である。

材料および方法

1) 供試植物

岡山県北部山間（津黒山周辺）で採集したハシリドコロの茎葉、新芽（写真1）を用い、ホルモンを調整した各種完全合成培地で無菌培養した。

2) 実験方法

A) カルス誘導と培養

(1) 試料（根茎、葉、新芽）中性洗剤で洗い、水道水で良く水洗いした後、蒸留水で

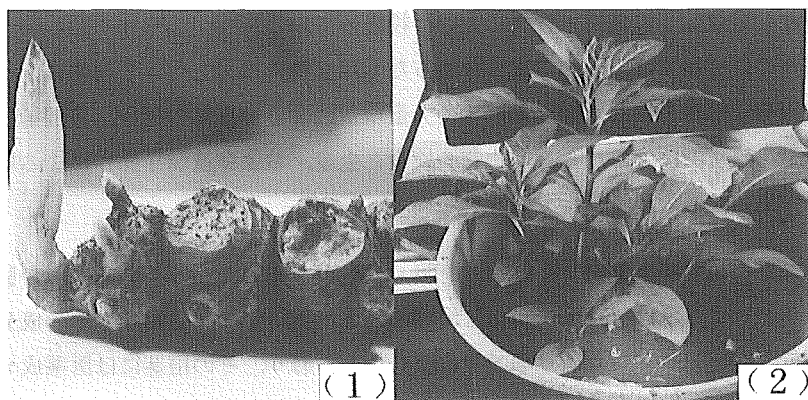


写真1 岡山県北産ハシリドコロの根茎・新芽(1)と茎葉(2)

洗浄。

- (2) 70%エチルアルコールと次亜塩素酸ソーダを用い、植物の状態、汚染度合いに応じた殺菌を行った。
- (3) 殺菌剤を滅菌水で良く落とした後、滅菌したシャーレ上で5mmに切断し、表面に薄く傷をつけた。
- (4) Murashige-Skoog (MS), Linsmaier-Skoog (LS) 培地を基本培地とし、Auxin ホルモンとして2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid (2, 4-D), α -Naphthalene acetic acid (NAA)を、Cytokininとして、Kinetin(Ki), Benzylaminopurin(BAP)を、炭素源として、3% sucrose を添加した完全合成培地に植え付け、25℃、暗黒下または2500lux連続照明下で培養した。

B) 生長点培養による苗条原基、各種組織の誘導²⁰⁾と培養

- (1) 1—2cm大に切断した新芽・茎頂を1%オスバン液に5分間、20%ピューラックス液に5分間浸漬した後、70%エタノールに2—3秒浸け、殺菌した後、滅菌水で十分にすすぐ。
- (2) 実体顕微鏡下で生長点(0.2—0.5mm)を摘出し、各種液体培地に植え付けた。
- (3) 液体培地は、MS基本培地に3% sucrose, NAA(0—4 ppm)とBAP(0—4 ppm)の25目法を行った。
- (4) 培養は、25℃、4000lux 連続照明下、回転培養によって行った。

C) カルスの増殖、緑化と再分化培地の検討

- A) で誘導したカルスを用い、MS,LS 基本培地およびMSK-2 (MS改良)培地に各種濃度の2, 4-D, Ki, NAA, BAP ホルモンおよび2から5%濃度の sucrose を添加した寒天培地で培養を行った。

D) トロパンアルカロイドの抽出、定性と定量

- (1) 抽出は山田らの方法⁹⁾を参考にした。
すなわち、乾燥試料をアンモニア性エチルアルコールで抽出。抽出物を乾固し、これを0.1N塩酸で溶解させる。口液をpH8—9に調整後、クロロフォルムで数回抽出する。
- (2) 抽出液を乾固し、粗アルカロイドとして測定した。
- (3) アルカロイドの定性は、アトロピン、スコポラミンについて、TLC, co-GLC およびGC/MSの開裂から、市販の標準品と比較して行った。
- (4) 微量成分の定量は、ガスクロのピーク面積から検量線を作成し算出した。

E) 二段階培養

- (1) 各種培養法と分析によって得られたハシリドコロの高成長培地とアルカロイド高

- 生産培地を選抜した。
- (2) 一段階目の培養は高成長培地にカルスを移植し、大量培養を行った。
- (3) 予め作成した成長曲線を元に、対数増殖期の終わり頃に二段階目の培養として、アルカロイド高生産培地に移植、増殖を行った後、含有アルカロイドを抽出、定量した。

結果および考察

1) カルス誘導

根茎では粘菌など雑菌の除去が難しく、茎葉が最も成功率が高く効率的であった。茎葉での殺菌時間を検討した結果、70%EtOHで1min、次亜塩素酸ソーダ(有効塩素：1%)で1.5—2.5minが良好であった。最適培地はMSあるいはLS基本培地に1ppm 2, 4-Dと1ppm Kiを添加したものが最もカルス形成率が良好であった(表1)。これを暗条件で培養を続けると白色の軟らかいカルスが大量に得られた(写真2-1)。カルス形成には、高濃度の2, 4-D使用は阻害的であり、NAAとBAP, IAAとKiの組み合わせは不適であった。

ハシリドコロのカルス化には低濃度の2, 4-Dが必要で、約4—7日でカルス化した。

2) カルスの最適増殖培地の検討

MS, LS各基本培地に2, 4-DとKi, NAAとBAPの組み合わせ、各0—4ppm濃度の条件で検討した結果、MS培地に1ppmの2, 4-DとKi：白+淡緑色カルス、LS培地に同条件のホルモン添加培地：淡緑色カルス(写真2-2)ともに、あるいは2ppmのNAAとBAPの組み合わせ：濃緑色カルス(写真2-3)が良好であった。しかし、NAAとBAP組み合わせ条件の方は培養が進むにつれ、カルスの緑化と集塊化が進み、その結果増殖能力は低下することが分かった。NAAやBAPホルモンは細胞の増殖よりもむしろ

表1 MS基本培地における *Scopolia japonica* の最適増殖培地の検討

K i ppm/ℓ	2, 4-D	0	1.0	2.0	3.0	4.0
	ppm/ℓ					
0		±	+	±	±	—
1.0		±	++	+	±	—
2.0		±	++	+	±	—
3.0		—	±	±	±	—
4.0		—	±	—	—	—

±：対照， +：増殖良， ++：増殖最良， —：増殖不良

2, 4-D：2, 4-Dichlorophenoxy acetic acid

K i：6-Furfuryl aminopurine (Kinetin)

MS基本培地，2000lux連続照明，固体静置培養

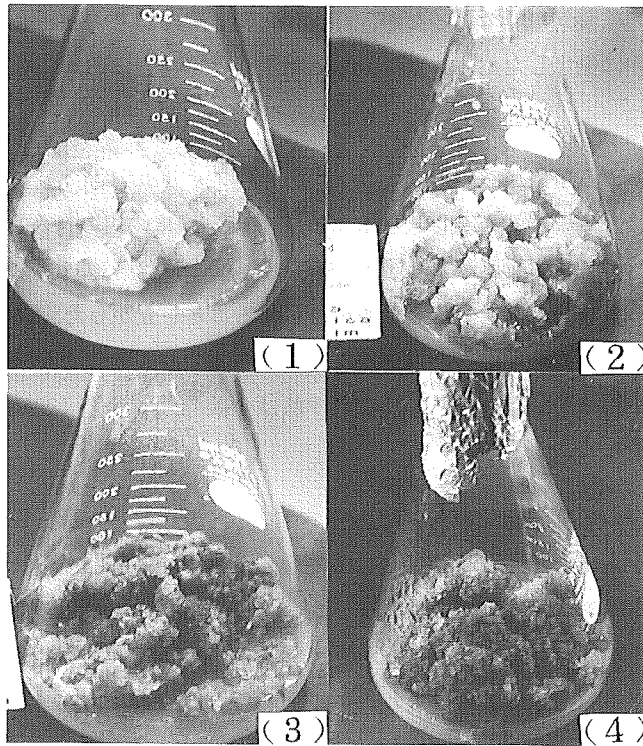


写真2 各種条件下で培養したハシリドコロカルス

(1): LS+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), 暗条件; 白色カルス

(2): LS+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), 2000lux; 淡緑色カルス

(3): MS+NAA (2 ppm)+KAP (2 ppm), 2000lux; 濃緑色カルス

(4): MSK-II+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), 2000lux; 淡・濃緑色カルス

すべて固体静置培養

る緑色化や再分化に適していることが考えられた。

3) カルスの緑色化と再分化

緑色化についてはNAA濃度とは無関係に BAP 濃度が2—3 ppm の時に比較的良好な傾向を示した。また、基本培地による傾向は、NAA-BAP 各2 ppm 条件下では、MSK-II→LS→MSの順に鮮やかな緑色を呈したが、LS, MS では成長が非常に遅くなった。一方、2, 4-D と Ki 各1 ppm 条件下では逆の傾向が見られるなど、はっきりした結果が得られていないが、ホルモンとビタミンの種類と濃度が緑化と成長に影響を及ぼしていることが考えられ、現在検討中である。

1 ppm 濃度の2, 4-D と Ki ホルモンの組み合わせ条件下、MSK-II基本培地²¹⁾で増殖したカルスの中から、一際鮮やかで濃い緑色のカルスを選抜し増殖した(写真2—4)。このカルスは比較的成長も早く緑色カルスを増殖し、再分化植物の大量増殖や有効成分の産出への効果が期待された。さらに、sucrose 濃度については、検討した範囲では高くなれば

なるほど長期間の培養が可能であったが、緑色化に関してはほとんど影響がなかった。ただし、緑化期間中に発生した shoot は sucrose 濃度が低い場合において顕著な成長を示した。

4) 生長点培養による 苗条原基の形成

液体回転培養による物理的ストレスとホルモンの種類・濃度の組み合わせにより濃緑色でしかも成長速度の早い苗条原基を大量に得られた。MS-17培地 (0.02 ppmNAA+2 ppmBAP) 条件下で最も効率良く苗条原基が得られることが分かった(写真3-1)。この苗条原基はホルモン条件を調整した固体培地で継代培養することにより植物苗の大量増殖につなげることが出来た(写真3-2)。この手法は今後の環境緑化研究に役立つものと期待され、現在展開中である。

5) 母植物および各培養細胞中のトロパンアルカロイドの定性と定量

母植物の根茎からは総アルカロイドとして乾燥重量の0.38%が抽出された。この値は日本薬局方のロートコンの定量結果²³⁾とほぼ一致している。さらに、TLC上でドラゲンドルフ試薬²³⁾によってオレンジ色のスポットが検出されることから、この抽出法によって得られた抽出物はロートコンの成分と同じアルカロイドであると考えられる。また、この抽出物をGLC, GLC/MSによって分析・定量し(図1)、アトロピンを乾燥重量の0.093%、スコポラミンを同じく0.033%含有していることが分かった。また母植物茎葉には0.18%の総アルカロイドが含まれており、アトロピン、スコポラミンはともに根茎の約10%程度含有されていることも分かった。母植物を含め、以下の①—⑥の条件で培養した各種カルスの分

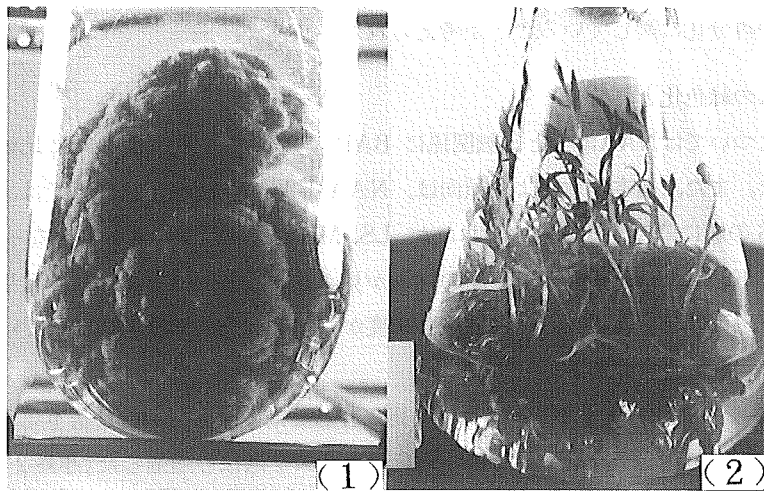


写真3 苗条原基(1)と幼苗(2)

(1): MS+NAA (0.02ppm)+BAP (2 ppm), 3% sucrose, 4000lux, 液体回転培養
 (2): MS+NAA (2 ppm) +BAP (2 ppm), 1% sucrose, 2000lux, 固体静置培養

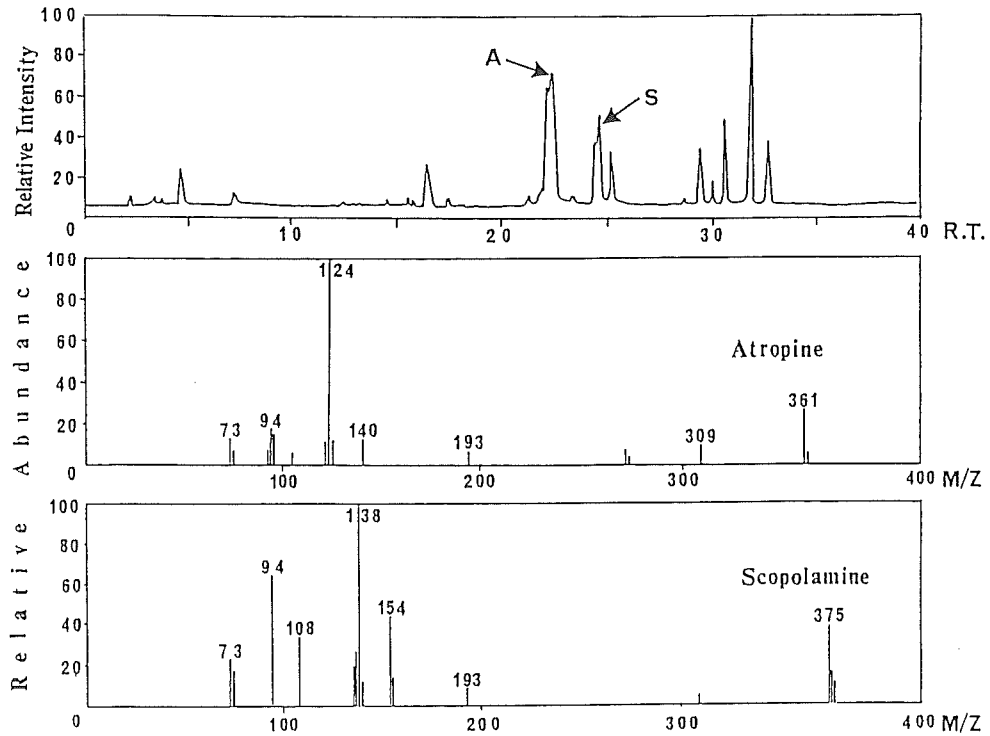


図1 *Scopolia japonica* 植物根茎のガスクロマトグラムとマスペクトル
A: Atropine, S: Scopolamine

表2 *Scopolia japonica* 培養組織中のトロパンアルカロイド

培養条件	形態	全抽出量 (%DW)	アトロピン (%DW)	スコポラミン (%DW)
	母植物根茎	0.38	0.093	0.033
	母植物茎葉	0.18	0.011	0.004
(1)	白色カルス	0.15	—	—
(2)	白・緑色カルス	0.18	—	—
(3)	淡緑色	0.25	0.008	—
(4)	濃緑色カルス	0.09	0.022	—
(5)	淡・濃緑色カルス	0.22	—	—
(6)	苗条原基	0.29	—	—

(1): LS+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), (2): MS+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm)

(3): LS+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), (4): MS+NAA (2 ppm)+BAP (2 ppm)

(5): MSK-II+2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm), (6): MS+NAA (0.02ppm)+BAP (2 ppm)

(1)は暗黒下で, (6)は4000luxで, それ以外は2000lux連続照明で培養

(6)のみ液体回転培養, 他は固体静置培養, —は成分未検出を示す

析²⁴⁾結果を表2に示す。①白色カルス (LS+1 ppm 2, 4-D+1 ppmKi, dark) (図2-1), ②白・淡緑色カルス (MS+1 ppm 2, 4-D+1 ppmKi, 2000lux) ではアトロピン, スコポラミン共に検出されなかった。③淡緑色カルス (LS+1 ppm 2, 4-D+1 ppmKi, 2000lux),

④濃緑色カルス (MS+ 2 ppmNAA+ 2 ppmBAP, 2000lux) (図2-2) では、スコポラミンは検出されなかったが、アトロピンが③のカルスで、母植物根茎の8.6%が、④のカルスでは24%が検出された。④カルスでは母植物茎葉のアトロピン含有量の2倍にも達している。

アトロピン生産に関しては、①、②のような成長の速い白色カルスでは生産されず、カルスの緑色化が進むにつれ発現し、④のような濃緑色になると更に生産性が向上することが分かった。この際に考慮に入れなければならないことは、緑色化が進むにつれカルスが集塊化する傾向があることで、そのため増殖速度は急激低下している。

⑤淡・緑色混合高増殖カルス (MSK-II+ 1 ppm 2, 4-D+ 1 ppmKi, 2000lux) (図2-3) および、⑥高増殖苗条原基 (MS+0.02ppmNAA+ 2 ppmBAP, 液体回転培養, 4000lux) からはアトロピン、スコポラミン共に検出できなかった。一般に増殖と二次代謝産物生産の間には負の相関があり、この場合もアルカロイド生産能発現には緑色化よりもむしろ増殖の制御によるストレス (?) が加わることによる内容物の充実が不可欠であることを示唆している。

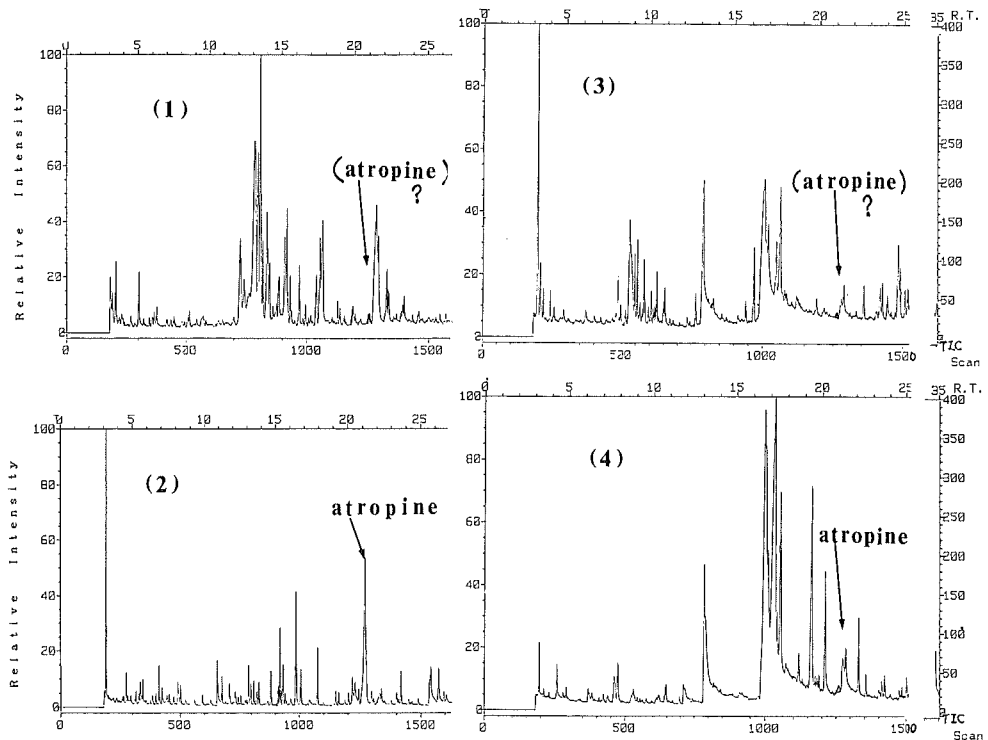


図2 各種条件下で培養したハシドリコロカルスのガスクロマトグラム

- (1): LS+ 2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm); 白色カルス
- (2): MS+NAA (2 ppm)+BAP (2 ppm); 濃緑色カルス
- (3): MSK-II+ 2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm); 淡・濃緑色カルス
- (4): (3)⇒LS+ 2, 4-D (1 ppm)+Ki (1 ppm) 移植, 8ヶ月培養; 二段培養カルス

6) 二段階培養²³⁾

前述のアルカロイド分析結果はハシリドコロ植物の培養細胞による二次代謝成分、アルカロイドの効率的な生産の難しさを示唆している。③と⑤のカルスの培養条件は基本培地の栄養組成が一部異なる以外、ホルモン条件は同じである。植物細胞を移植し継代培養する場合、ホルモン濃度を大きく変化させると細胞に与えるストレスが大きくなりすぎて枯死する率が非常に大きい、LS→MSK-IIの変化であれば枯死はしない。そこでまず⑤(または⑥)で培養を行い、その対数増殖期の終わり頃に③のアルカロイド生産培地に移植すると、その増殖は抑えられたが、安定した状態を維持した。2, 4, 8ヶ月培養したカルスのアルカロイドを測定した結果を表3に示す。

アトロピン合成能の再発現は培養2ヶ月目の初代カルスではほとんど見られなかったが、培養4ヶ月目の2代目カルスで③のカルスの半量程度の回復が見られた。総抽出量は徐々に低下するものの、4代目カルス(図2-4)では③カルスと同量のアトロピンが検出された(表3)。このことから、植物培養細胞による色素生産などに効果が認められている二段階培養の手法がアルカロイド生産にも有効であることが分かった。

また、抽出物のガスクロマトグラフィーによると、③と⑤ではそのピークパターンは大きく異なっていたが、二段階目の培養を続けるにつれて同様な傾向になった。

ハッカ植物の場合、培養条件による培養物の生育・形態の違いがテルペノイド生合成系に影響をあたえていることを報告³⁾したが、ハシリドコロの場合もアトロピン生合成だけでなくアルカロイド全体の生合成系と代謝系にも影響することを示唆している。

摘 要

岡山県産ハシリドコロ茎葉から、良好なカルスを誘導し増殖することができた。このカルスを用い、さまざまな培養条件下で培養し、白色、白・淡緑色混合、淡緑色、淡・緑色混合、濃緑色の様々な形態、性質(高成長、硬・軟、塊状)のカルスを作出した。これらの

表3 二段階培養によるトロパンアルカロイド生産

培養条件	全抽出量 (%DW)	アトロピン (%DW)	スコポラミン (%DW)
(5)	0.22	—	—
(6)	0.18	—	—
(7)	0.13	0.004	—
(8)	0.09	0.007	—

(5): MSK-II + 2, 4-D (1 ppm) + Ki (1 ppm),

(3): LS + 2, 4-D (1 ppm) + Ki (1 ppm)

(6): (5)⇒(3)へ移植, 2ヶ月培養後,

(7): (5)⇒(3)へ移植, 4ヶ月培養後,

(8): (5)⇒(3)へ移植, 8ヶ月培養後,

2000lux連続照明下, 固体静置培養 —は成分未検出

変異は基本培地とホルモンの種類・濃度を適宜組み合わせることにより可能となることが分かった。アルカロイド（アトロピン、スコポラミン）生産に関して、白っぽい高成長カルスには検出されない。緑色カルスではアトロピンが検出される。その含有量は塊状カルスに近づくにつれ多くなるが、この緑色塊状カルスの成長率は低い。そこで、まず高成長培地で培養し白色細胞を大量に増殖し、次に低成長培地に移し緑色塊状化させるとアトロピン生合成能が再び現れた。

これまでハシリドコロ培養細胞からはアルカロイド二次代謝化合物は得られないと考えられていたが、細胞の増殖を制御することによって効率的にアルカロイドが得られることが分かった。スコポラミン生合成に関しては、いまだ培養細胞からは産出できておらず、今後は毛状根、不定胚、幼苗、根茎などの器官の大量培養を行うことの他に、大量生産株を遺伝子面から検討するなどが必要と考えられた。

文 献

- 1) 河邊誠一郎, 遠藤晴彦, 沢田由佳, 佐藤玲子, 馬場志麻, 岡山理科大学紀要, **28**, 85 (1993)
- 2) 河邊誠一郎: FRAGRANCE JOURNAL, No4, 70 (1991)
- 3) S.Kawabe, H.Fujiwara, K.Murakami and K.Hosomi, Biosci. Biotech. Biochem., **57** (4), 657 (1993)
- 4) 河邊誠一郎, 渡邊明美, 渡瀬佳子, 村上公一, 細見和雄: Plant Tissue Culture, **10** (2), 184 (1993)
- 5) 原田宏, 駒嶺あつし, 植物細胞組織培養, p326, (1983), 理工学社
- 6) Y. Yamada and T. Hashimoto, Plant Cell Reports, **1**, 101 (1982)
- 7) T. Endo and Y. Yamada, Phytochemistry, **24**, 1233 (1985)
- 8) T. Hashimoto, F. Sato, M. Mino and Y. Yamada, Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture, Plant Tissue, Culture 305 (1982)
- 9) M. Konoshima, M. Tabata, H. Yamamoto and N. Hiraoka, Yakugaku Zasshi **90** (3) 370 (1970)
- 10) M. Tabata, H. Yamamoto and N. Hiraoka, Colloques internationaux C. N. R. S. **193** 389 (1971)
- 11) N. Hiraoka and M. Tabata, Phytochemistry, **13**, 1671 (1974)
- 12) S. J. Stohs, J. of Pharmaceutical Science, **58** (6), 703 (1976)
- 13) K. Shimomura, Y. Shoyama and I. Nisioka, Shoyakugaku Zasshi, **35** (2), 115 (1981)
- 14) K. Shimomura, Y. Shoyama and I. Nisioka, Shoyakugaku Zasshi, **35** (2), 122 (1981)
- 15) M. Konoshima, M. Tabata, N. Hiraoka and H. Miyake: Shoyakugaku Zasshi, **21** (2), 108 (1967)
- 16) Y. Mano, S. Nabeshima, C. Matsui and H. Ohkawa, Agric. Biol. Chem., **50** (11), 2715 (1986)
- 17) M. Anetani and T. Yamagishi, Doueiken Shoho, **35** (1985)
- 18) M. Anetani and T. Yamagishi, Doueiken Shoho, **36** (1985)
- 19) 山田康之: 第一工業製薬社報, **418**, 4 (1982)
- 20) 田中隆荘, 種苗産業と育種新技術, 171 (1983)
- 21) 阿野雅志, 上野和彦, 星野卓二, 河邊誠一郎: 1988年日本植物学会大会要旨
- 22) 第11改正日本薬局方各条第二部, p1455 (1986)
- 23) L. A. Anderson, N. S. Dogget and M. S. F. Ross, Planta medica, **32** (1977)
- 24) 阿野雅史, 河邊誠一郎, 古門伸介, 永野正行, 米田速水: 1989年植物組織培養大会要旨
- 25) H. Miyasaka, M. Nasu, T. Yamamoto, Y. Endo and K. Yoneda, Phytochemistry, **25**, 637 (1986)

Callus Formations and Useful Components of *Scopolia japonica* by Plant Cell Culture

Seiichirou KAWABE

College of Liberal Arts and Science,

Kurashiki University of Science and the Arts,

2640 Nishinoura, Tsurajima-cho, Kurashiki-shi, Okayama 712, Japan

(Received September 30, 1995)

This study was undertaken with the intent of seeking callus formations and useful components of *Scopolia japonica* by plant cell culture.

Various callus and subsequent formation of somatic embryogenesis and plantlets were obtained from callus cultures derived from shoots and leaves of *Scopolia japonica*.

The various forms of cells were grown on Murashige-Skoog's and Linsmier-Skoog's medium supplemented with 2, 4-D and Ki, NAA and BAP plant hormones.

GC-Mass spectrography showed that there was no detectable amount of the atropine and scopolamine from the white and also more quickly multiplying calls.

On the other hand, there was detectable amounts of the atropine from the green calls, but the growth rate of this calls was very slow. Consequently, at the first stage we used for the cell culture on the high growth medium, and the next stage we used the low growth medium. By using of this culture method, some detectable amount of the atropin was reproduced in *Scopolia japonica* cultured cells.