

## 培養細胞におけるシコニン合成の人為誘導物質

福井宏至\*

(1984年1月18日受理)

## 1. はじめに

近年、植物細胞培養系を利用して二次代謝産物を生産する技術の開発が進み、有用物質を効率よく生産する培養系も確立されている。しかし、細胞選抜や培養条件の検討にもかかわらず、目的物質をほとんどまたはまったく生成しない培養系が多いため<sup>1)</sup>、その合成機能を人為的に誘発する方法が種々模索されている。Böhm<sup>2)</sup>は合成抑制の原因として、(1) 関係遺伝子の欠失あるいは突然変異、(2) 遺伝子発現の抑制、(3) 基質と酵素の局在性の変化、という3つの可能性を挙げている。しかし、培養細胞では発現しない二次代謝が、再分化植物では回復する多数の実験例から判断して、(1)の可能性は少ない。すなわち、遺伝情報は保持されている。この抑制機構はしばしば培養株や成分により異なるため、個々に抑制を解除する手法を考案する必要がある。

以下に、ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.) 細胞のキノ系色素生成能がある種の多糖類や活性炭の添加によって変化する現象<sup>3,4)</sup> (概略は Table 1 にまとめた) を紹介して、二次代謝発現の調節因子について考えてみたい。ムラサキ培養細胞における高生産株の育成、代謝調節、色素成分の立体化学、色素の細胞内局在性と分泌機構、および大量培養生産については、田端<sup>5)</sup>の総説を参照されたい。

なお、シコニンの合成経路については、井上<sup>6)</sup>がカルスを用いた標識前駆体の投与実験に基づき、Scheme 1 を提示した。また、色素非生産株では、*p*-ハイドロキシン安息香酸 (1) のプレニル化反応が阻害されていると推

測している<sup>7)</sup>。

本実験には、ムラサキの実生由来カルスから、クローニングによる細胞選抜および培養条件の改良によって、母植物と同様に多量のナフトキノ系赤色素 (シコニン誘導体) を生産する培養株 (M-18, C-144) ならびに色素非生産株 (M-130, B-17) を使用した。細胞の培養には、 $10^{-6}$ M IAA と  $10^{-5}$ M Kinetin を添加した Linsmaier-Skoog 培地を用い、暗黒下、25°C で静置または液内振盪培養 (100 rpm) を行った。

## 2. 酸性多糖によるシコニン生成の誘導

寒天培地上でシコニンを生成する M-18 株を同一組成の液体培地へ移植すると、増殖は活発であるにもかかわらずシコニンはまったく生成されなくなる。この原因を究明するため、カルス培養と液内振盪培養の環境差を考慮して、種々の方法で培養したところ、培地中に寒天が存在する場合のみシコニン生成が認められた。液内振盪培養では、少量の寒天添加 (0.05% w/v) でシコニン生成が誘導され、その含量は添加量にほぼ比例し、2% 添加ではカルス静置培養のそれに匹敵した (Fig 1)。C-144 株でも同様の現象が認められた。

寒天中の活性成分を追求するために、細胞を含まない液体培地中で寒天末を一昼夜振盪後、10,000 g で遠心し、その上清を透析した。活性は透析されない高分子分画に認められたので、活性成分は水溶性の多糖であろうと推察された。

寒天末は70~80%のアガロースと20~30%のアガロペクチンから成るといわれ、前者はD-ガラクトースと3,6-アンヒドロ-L-ガラクトースが交互に重合した中性多糖で、後者は両単糖のほかに少量のウロン酸 (4~7%)、硫酸基 (1~5%) およびピルビン酸 (<1%) を含む酸性多糖であるとされている。そこで、Hjerten の方法<sup>8)</sup>に従って寒天を両多糖に分画したところ、アガロペクチンに活性が見出された。Fig. 2 に示すように、アガロペクチン 0.2% w/v 投与時のシコニン含量は、寒天末 1~2% 投与時のそれに相当することから、活性成分はアガロ

\* Hiroshi FUKUI: Induction of Quinone Formation by Exogenous Substances in *Lithospermum* Cell Cultures  
京都大学薬学部生薬学教室 (〒606 京都市左京区吉田下阿達町)

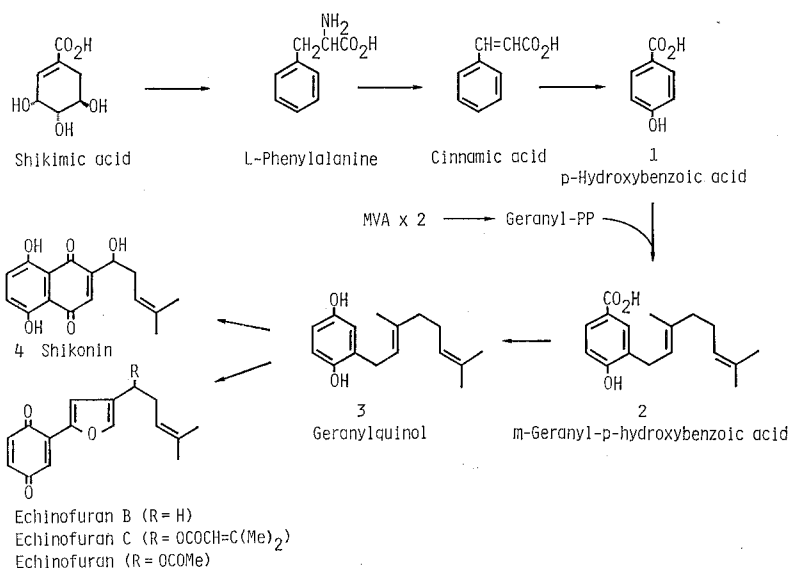
Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University (Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606)

**Table 1.** Pigments produced by *Lithospermum* cells cultured in the medium containing agar powder or activated carbon.

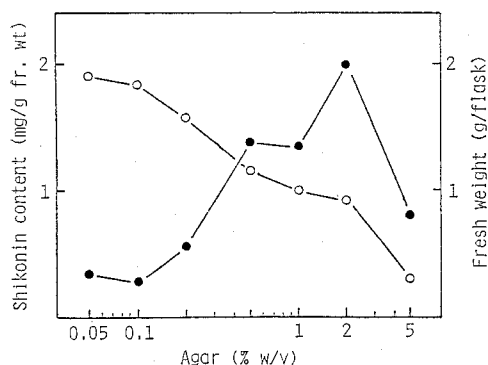
Strain	On agar medium	In liquid medium			
		No addition	Agar powder	Activ. carbon	Agar powder Activ. carbon
M-18	S <sup>a</sup>	—	S	E <sup>b</sup>	E + S
C-144	S	—	S	E	E + S
M-130	—	—	—	E	E + S
B-17	—	—	—	E	E + S

<sup>a</sup> S=Shikonin derivatives.

<sup>b</sup> E=Echinofuran B (5).



**Scheme 1.**

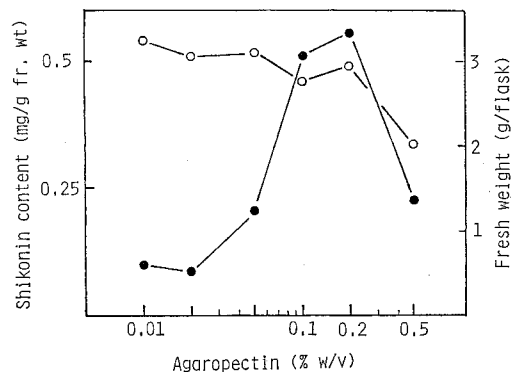


**Fig. 1.** Effects of agar on shikonin formation (●) and cell growth (○) in *Lithospermum* cell suspension cultures.

ペクチンであると推定された。

両多糖の構造の違いと各構成成分自体は不活性であることから、水溶性の酸性多糖がシコニン生成を誘導すると推察されたので、他種の酸性多糖の活性を調べた。その結果、ペクチン酸はアガロペクチンに匹敵する強い活性を示し、ペクチンにも弱い活性が認められたが、コンドロイチン硫酸やアルギン酸にはまったく活性を認めなかった。一方、活性のある多糖にはカチオン交換能を示す可能性が考えられたので、カチオン交換樹脂 (SP-, CM-Sephadex, CM-Sephacrose) を添加したが、いずれにも活性がなかった。それゆえ、酸性多糖の活性はカチオン交換能に基づくものとは考えにくい。

次に、シコニン生成に酸性多糖の添加を必要としない



**Fig. 2.** Effects of agarpectin on shikonin formation (●) and cell growth (○) in *Lithospermum* cell suspension cultures.

変異株の選抜を以下の方法で試みた。不活性であるアガロースで固めた平面培地上に M-18 株の細胞 (5,000/60 cm<sup>2</sup>) をプレートした。形成された 8,000 コロニーのうち、赤色色素を生成した約 200 個 (2.5%) を再度アガロース培地に移植し、増殖・色素生成ともに良好な 60 株を選抜した。これらを多糖無添加の液体培地中で継代培養して、47 株の色素生成株を得た。さらに継代試験に供した 3 つの株の色素生成能は多少の変動を示しながらも 1 年以上継続した。これらの選抜株は、酸性多糖に相当する活性物質を自己合成する能力を備えるものと推量される。このような内生活性物質の本性については現在検討中である。

上述のように、ある種の高糖類が二次代謝発現の誘導要因となっている例はめずらしいが、興味深いことに類似の現象がマメ科植物等におけるファイトアレキシンの誘導について報告されている。すなわち、病原菌侵入部位におけるファイトアレキシン合成のエリシターの 1 つとして、病原菌または宿主植物の細胞壁に由来する多糖類が考えられている。これらの物質は、PAL やカルボン合成酵素などの *de novo* 合成を介して、イソフラボノイド型ファイトアレキシン合成を誘導するといわれている<sup>9)</sup>。また、同様の現象はマメ科植物の培養細胞においても観察され<sup>10)</sup>、多糖類が代謝系に劇的な変化をもたらすものと推測されている。

ムラサキ培養細胞のシコニン合成誘導に関する多糖類の作用機作は不明であるが、おそらく細胞膜に結合して透過性に変化を与えるなど、間接的な作用であろうと想像している。

### 3. 活性炭添加によるベンゾキノン系色素の生成

培養細胞の不定胚形成や器官分化、あるいは葯培養における不定胚形成を促進する手段として、培地への活性炭添加がしばしば有効であるといわれている<sup>11-13)</sup>。Eriksson ら<sup>18-15)</sup>によれば、活性炭は分化に阻害的な細胞生成物質を吸着・除去するという。そこで、活性炭がムラサキ培養細胞の二次代謝系に及ぼす影響を検討した。

活性炭を添加した液体培地で M-18 株を 3 週間振盪培養後、細胞と活性炭の混合物を有機溶媒で抽出すると、橙色の油性物質が得られた。この新物質 (エキノフラン B) は 5 に示す構造を有し、すでに *Echium lycopsis* カルスおよび M-18 株カルスから単離されているエキノフラン C (6)<sup>4)</sup> やエキノフラン (7)<sup>16)</sup> の類縁体であることがわかった。5 の生成量は、活性炭の添加量が 150 mg/30 ml の場合 4.2 mg (細胞乾重当り 2.1%) であった。5 は、その構造から見て、シコニン合成の中間体ジェラニルキノール (3) からフラン環形成を経て生じる異

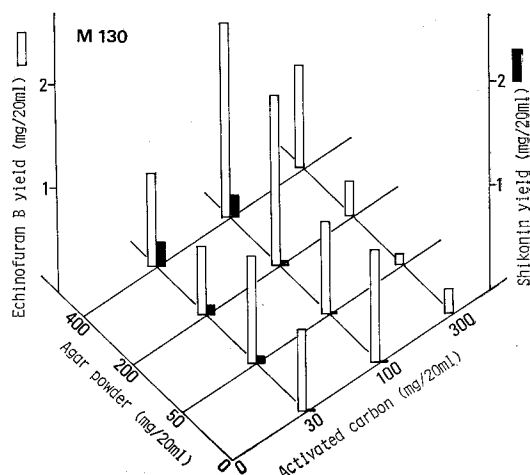


Fig. 3. Effect of agar and activated carbon on pigment formation in *Lithospermum* cell suspension cultures (M-130).

常代謝産物と思われる。活性炭を添加しない時の M-18 株には、1 の配糖体は存在するが、2 以降の中間体が見出されないことから、活性炭は 1, 2, 3 を経て 5 にいたる反応系を活性化したことになる。

活性炭は、細胞との物理的接触によって代謝系に影響することも考えられるが、細胞の分泌する代謝抑制物質あるいはその前駆体を吸着・除去して一連の生合成系を活性化する可能性も考えられる。事実、前述の抽出液中には多種類の物質が存在し、この抽出物にシコニン生成抑制作用が見出され<sup>17)</sup>、現在その本体を追求中である。

### 4. 色素非生産株に対する活性炭と寒天の効果<sup>18)</sup>

ムラサキの B-17 株や M-130 株は、培地に寒天を添加しても色素を生成しない白色変異株である。そこで、活性炭添加培地中で M-130 株を液内振盪培養したところ、橙色色素 5 を生成した。このことは、色素非生産株に対しても活性炭が 1 から 3 に至る生合成系を活性化することを示唆している。次に、活性炭と寒天末とを種々の比率で添加した液体培地で M-130 株を培養し、色素生成の有無を検討した (Fig. 3)。活性炭のみの場合、シコニンはほとんど生成されなかったが、少量の活性炭 (30~100 mg/20 ml) とともに寒天末を添加するとシコニン生成量が増加した。また、寒天添加のみではシコニンを生成しない B-17 株においても、活性炭を同時添加するとシコニン生成を誘導することができた。

### 5. おわりに

酸性多糖類や活性炭がどのような機構で代謝系を変換するのか不明である現在、二次代謝機能の抑制原因を論じることはできない。しかし、内生的に存在しうる酸性

多糖が二次代謝系の誘導因子の1つとして作用し、一方、活性炭は細胞が分泌する未知の抑制物質を吸着・除去して代謝系を活性化すると推察できる。これは、二次代謝の発現が内生の誘導物質と抑制物質の組合せで制御されていることを示唆している。これらの内生物質を化学的に解明していけば、代謝機能の人為的誘導も可能となるばかりでなく、代謝機能の不安定さの原因の解明にもつながるのではないかと考えている。

本稿をまとめるにあたり、種々示唆をいただいた田端守教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 田端 守, 1982. 細胞工学, **1**: 249-255.
- 2) Böhm, H., 1982. In "Plant Tissue Culture 1982" (ed. by Fujiwara, A.), p. 325-328, Maruzen, Tokyo.
- 3) Fukui, H., N. Yoshikawa, M. Tabata, 1983. *Phytochemistry*, **22**: 2451-2453.
- 4) Fukui, H., N. Yoshikawa, M. Tabata, 1984. *Phytochemistry*, **23**: 301-305.
- 5) 田端 守, 1983. 第19回植物化学シンポジウム要旨集, p. 50-57.
- 6) Inouye, H., S. Ueda, K. Inoue, H. Matsumura, 1979. *Phytochemistry*, **18**: 1301-1308.
- 7) 田端 守, 福井宏至 (未発表).
- 8) Hjerten, S., 1962. *Biochim. Biophys. Acta*, **62**: 445-449.
- 9) Lawton, M.A., R.A. Dixon, K. Hahlbrock, C.J. Lamb, 1983. *Eur. J. Biochem.*, **129**: 593-601.
- 10) Dixon, R.A., P.M. Dey, M.A. Lawton, C.J. Lamb, 1983. *Plant Physiol.*, **71**: 251-256.
- 11) Weatherhead, M.A., J. Burden, G.G. Henshaw, 1978. *Z. Pflanzenphysiol.*, **89**: 141-147.
- 12) Fridborg, G., T. Eriksson, 1975. *Physiol. Plant.*, **34**: 306-308.
- 13) Fridborg, G., M. Pederson, L.E. Landström, T. Eriksson, 1978. *Physiol. Plant.*, **43**: 104-106.
- 14) Johanson, L., T. Eriksson, 1982. In "Plant Tissue Culture 1982" (ed. by Fujiwara, A.), p. 543-544, Maruzen, Tokyo.
- 15) Weatherhead, M.A., J. Burdon, G.G. Henshaw, 1979. *Z. Pflanzenphysiol.*, **94**: 399-405.
- 16) Inouye, H., H. Matsumura, M. Kawasaki, K. Inoue, M. Tsukada, M. Tabata, 1981. *Phytochemistry*, **20**: 1701-1705.
- 17) 福井宏至, 矢崎一史, 田端 守 (未発表).
- 18) 福井宏至, 吉川展司, 田端 守, 1983. 第8回植物組織培養シンポジウム講演要旨集, p. 59.