

タンジン培養細胞によるテルペン類の生成

宮坂 均・那須正夫・山本敏彦
松村久留美・中西 勤*・米田該典

(1984年2月10日 受付)

(1984年6月23日 受理)

大阪大学薬学部

(〒565 大阪府吹田市山田丘 1-6)

タンジン (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 培養細胞は、ジテルペンの ferruginol を親植物を上まわる含量で生成し、また、一部の細胞株では、ferruginol と同様の基本骨格を有する赤色素 cryptotanshinone も多量に生成する¹⁾。cryptotanshinone は、親植物の根に存在するが、今回、分化と二次代謝産物生成の関係を調べるために、含有成分のうちテルペン類を中心にして、培養細胞と、親植物の茎葉および根とを比較した。その結果、ferruginol も cryptotanshinone と同様に、親植物では根だけに存在していることが明らかとなった。また、培養細胞は、親植物の茎葉にだけ多量に存在する成分も生成しており、未分化の細胞において、茎葉と根のそれぞれに局在する二次代謝産物が、同時に生成されていることが示された。

タンジンの親植物としては、大阪大学附属薬用植物園で発芽後1年間栽培したものを用いた。培養細胞は、既報¹⁾において述べた細胞株のうち、cryptotanshinone 等のタンシノン系赤色素の生成能は非常に低く、ferruginol のみを多く生成するものを用いた。培養は、3%の sucrose を含む Murashige-Skoog (MS) 培地²⁾ を使用し、25°C、暗所で行った。カルスの継代培養は、2,4-D 1 ppm, kinetin 0.1 ppm を添加した MS 寒天培地で、約1カ月の間隔で行った。

培養は、回転型振とう培養機 (100 rpm) を使用し、約1カ月ごとに継代した。物質産生には、2,4-D は含まず、kinetin 0.1 ppm を添加した培地を使用し、継代培養の生育曲線の定常期初期にある細胞を、無菌的に吸引濾過して集め、移植する培地と同組成の培地で3回洗浄した後、移植して培養した。

培養細胞と、親植物の茎葉および根の二次代謝産物を比較するため、それぞれのクロロホルム抽出物を薄層クロマトグラフィー (TLC) によって分析した。その結果、親植物においては、ferruginol も cryptotanshinone と同様に、根にだけ存在すること、および、培養細胞が茎葉にだけ多く存在する未知の成分を生成していることが明らかとなった。そこで、まず、この未知化合物の構造を決定するために、乾燥茎葉 56 g をソックスレー抽出器を用いて、クロロホルムで6時間抽出した。抽出物を TLC (Kiesel gel F₂₅₄, 0.5 mm, クロロホルム-酢酸エチル=1:1) で分離し、得られた未知化合物のマススペクトルを測定した結果、トリテルペンの oleanolic acid と ursolic acid の混合物と推定された。そこで、この混合物を常法に従ってジアゾメタンでメチル化し、メチルエステルの混合物を、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) で標品と比較し、methyl oleanolate, 保持時間 (t_R) 26.4分, MS m/z : 470 (M^+) および、methyl ursolate, t_R 29.0分, MS m/z : 470 (M^+) と同定した。GC-MS の GC は、日本電子 JGC-20 K を使い、カラムは、2% OV-1 (80-100 mesh) (2 m × ϕ 2 mm) のガラスカラム、キャリアーガスは、He (2.6 kg/cm²) を使用した。MS 部分は、日本電子 JMS-D 300 を使い、イオン源温度: 250°C, イオン化電圧: 20 eV, とした。

Table 1 は、培養細胞、および親植物の茎葉と根において、ferruginol, oleanolic acid, ursolic acid の含量を比較したものである。培養細胞は、カルス誘導から22カ月間継代した液内培養細胞を、2,4-D は含まず、kinetin 0.1 ppm を添加した培地に移植し、13日後に収穫したものをを用いた。なお、カルス誘導後約3カ月間は、不定根の形成が認められたが、それ以降は、不定根、不定芽の

* 現所属: 摂南大学薬学部

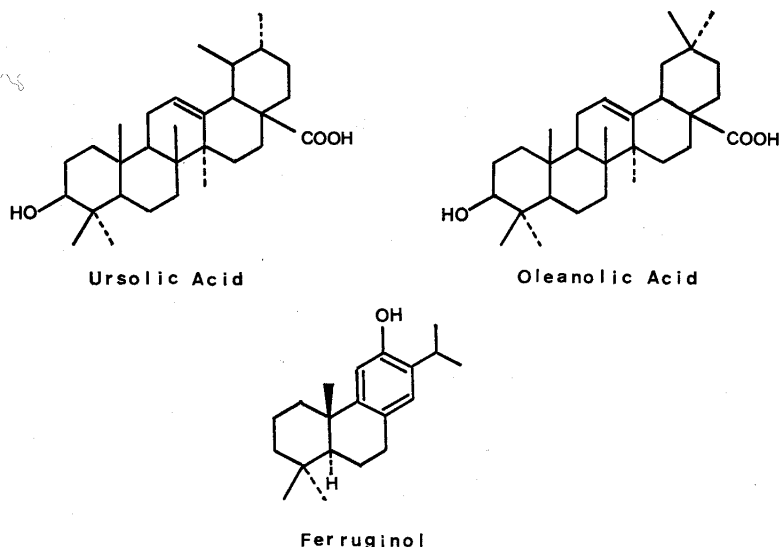


Fig. 1

Table 1. Contents of terpenoids in *Salvia miltiorrhiza* B. (%).

Source	Oleanolic acid and ursolic acid	Ferruginol
Cultured cells	0.29	1.7
Leaves and stems	0.24	N.D.
Roots	trace (0.01 >)	1.1

N.D. : Not detected.

形成は見られなかった。

培養細胞は、四フッ化エチレン樹脂製フィルター（保留粒子径 10 μm ）上で吸引濾過、水洗後、収穫し、80°C で 2 時間乾燥した。抽出は、ソックスレー抽出器を用いて、クロロホルムで 3 時間行い、親植物の茎葉および根についても同様の方法で抽出した。抽出物は、まず、GC で ferruginol を定量し、さらにジアゾメタンでメチル化後、oleanolic acid と ursolic acid を、それらのメチルエステルとして GC で定量した。GC は、日本電子 JGC-20 KFP (FID) を使用し、カラムは、GC-MS の場合と同様のもの、キャリアーガスは N_2 (3 kg/cm²) を使用した。カラムおよび注入部温度は、190°C, 210°C (ferruginol), 260°C, 270°C (methyl oleanolate, methyl ursolate) で分析した。

Table 1 に示したように、ジテルペンの ferruginol は根だけに含まれるが、トリテルペンの oleanolic acid, ursolic acid は茎葉だけに多く存在した。一方、培養細胞中には、ジテルペン、トリテルペンともに存在し、かつその含量は、親植物中の含量よりも高かった。なお、培

養細胞から得られた oleanolic acid および ursolic acid は、これらをメチル化して、GC の t_R を標品と比較することにより同定した。

植物の二次代謝産物が親植物の特定の器官にのみ存在している場合には、一般に、培養細胞においても、それらの生成に一定の器官分化を必要とすることが多い^{3,4)}。これに対して、*Lithospermum erythrorhizon* 培養細胞による根だけに存在するシコニン類の生成⁵⁾、また、*Perilla frutescens* var. *crispa* 培養細胞による葉だけに存在するモノテルペン類の生成⁶⁾、等の報告もあるが、親植物において、茎葉と根とのそれぞれに局在する物質が、培養細胞によって同時に生成された例は、ほとんど報告されていない。今回、未分化状態のタンジン培養細胞において、茎葉に局在するトリテルペン (oleanolic acid, ursolic acid) および、根だけに存在するジテルペン (ferruginol) が、親植物を上まわる含量で同時に生成されていることが明らかとなった。この事実は、トリテルペン、ジテルペンの両者が、1 コの細胞レベルで同時に生成されているか否かについては、なお検討の必要があるものの、親植物においては、本来、器官分化を伴わなければ発現しない代謝経路が、未分化状態の細胞においても発現し、かつ制御の可能なことを示唆しているものと考えられる。

本研究に際して、貴重な標品を御分与頂いた、武庫川女子大学薬学部 上裕和輔博士に深謝致します。

文 献

- 1) Nakanishi, T., H. Miyasaka, M. Nasu, H. Hashimoto, K. Yoneda, 1983. *Phytochemistry*, **22** : 721-722.
- 2) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15** : 473-497.
- 3) Tabata, M., 1977. In "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application" (ed. by Barz, W., E. Reinhard, M.H. Zenk), p. 3-16, Springer-Verlag, Berlin.
- 4) Butcher, D.N., 1977. In "Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture" (ed. by Reinert, J., Y.P.S. Bajaj), p. 668-693, Springer-Verlag, Berlin.
- 5) Tabata, M., H. Mizukami, N. Hiraoka, M. Konoshima, 1974. *Phytochemistry*, **13** : 927-932.
- 6) Sugisawa, H., Y. Ohnishi, 1976. *Agric. Biol. Chem.*, **40** : 231-232.

Summary

Production of Terpenoids in Cell Cultures of *Salvia miltiorrhiza* B.

Hitoshi MIYASAKA, Masao NASU, Toshihiko YAMAMOTO, Kurumi MATSUMURA,
Tsutomu NAKANISHI, and Kaisuke YONEDA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
1-6 Yamada-Oka, Suita, Osaka 565*

The biogenetic capability of undifferentiated cultured cells of *Salvia miltiorrhiza* was examined. Two triterpenes, oleanolic acid and ursolic acid, were found as major components. These compounds were unique in the aerial parts of intact plant. The contents of ferruginol, only found in roots, and these triterpenes were higher than that in the intact plant.