

苔類の細胞培養

太田 喜元*

(1984年12月13日受理)

1. はじめに

植物の組織培養法は植物生理学や遺伝学の基礎研究に貢献しつつあると同時に、育種、種苗生産、有用二次代謝化合物生産等への応用も盛んに研究され、報文数も急速に増加しつつある。その中で蘚苔類の組織培養に関する研究はきわめて少なく、たとえば BIOSIS をカルスというキーワードで検索してみると、1981年以降に収録されているカルスに関する全報文約1,800件中、蘚苔類由来のものは9件にすぎない。うちわずか2件が苔類のカルスに関するものである。苔類は植物そのものの利用価値はほとんどなく、また含まれている二次代謝化合物についても種々の生理作用があることは報告されているものの、実際に利用された例がないことが、組織培養研究者の注目をひかない理由と考えられる。第1表に現在までにカルスが誘導された苔類を示すが、これらの多くのものは、種々の培養条件下での植物体の形態変化に関する研究において観察されたものである。これらの苔の大半は葉状体苔類であり、セスキテルペン類を多く含むことを特徴とする茎葉体苔類 (*Jungermanniales*) に属するものはきわめて少ない。

苔類の培養細胞は染色体数が少ないと、また半数性である場合が多いこと、発達した葉緑体を数多く含んでいること等の特徴を有し、形態形成、遺伝あるいは光合成のような植物生理の研究に適した実験材料となる。また物質生産についても、母植物と同じ化合物を母植物と同程度産生する能力を保持していることから、苔の二次代謝化合物を多量に生産するに有効な手段になると同時に生合成も含め二次代謝化合物生成の基礎研究に利用することもできる。

ここでは苔類培養細胞の誘導と、いくつかの生理的特

徴、および二次代謝化合物の产生、特に苔類の休眠に関与するとされていたルヌラリン酸について述べる。なお本報文中で苔類と比較するために言及する高等植物とは種子植物を指すものである。

2. 苔類カルスの誘導

高等植物のカルス誘導に用いられる根や茎の形成層あるいは生長点に相当するものは、苔類では配偶体の生長点や無性芽であるが、いずれも一般には、肥厚した表皮細胞層やクチクラ層の発達がないため、野外で採取したものを直接滅菌してカルス誘導の材料とすることはきわめて困難である。小野はゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) の無性芽からのカルス誘導に成功しているが¹⁾、一般には胞子を無菌状態で発芽させて得られる原糸体あるいは配偶体を用いる。たとえばツツソロイゴケ (*Jungermannia subulata*) の場合、完熟した胞子のう（蒴）を0.1% 塩化ベンザルコニウムで洗った後、2% 次亜塩素酸ナトリウムで滅菌する。十分に水洗した後、Knop 寒天培地上で胞子を放出させ、照明下に培養して原糸体を得る。この原糸体をグルコース4%を含む Murashige-Skoog 改善培地 (MSK-1 培地) で培養しカルスを得た²⁾。

カルス誘導には MSK-1 培地以外に Knop 培地も多く用いられ、糖、生長調整物質を添加する場合が多い。一般に苔類のカルス誘導には培地に添加するショ糖またはグルコースが重要な役割をはたし、植物ホルモンは直接の要因にならないとされており、事実筆者らは数種の茎葉体苔類のカルス誘導に、比較的高濃度 (4%) のグルコースを用いることにより成功している。しかし糖がカルス形成を誘導する作用機作はわかっていないし、また糖を添加せず窒素源としてアンモニウム塩のみを用いることによりカルスが形成される場合 (*Riccia crystallina*)³⁾、 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ M のオーキシン (*Sphaerocarpus texanus*)⁴⁾、あるいはオーキシンとサイトカininの組合せ (*Athalamia pussilta*)⁵⁾ によりカルスが誘導された例もある。

* Yoshimoto OHTA : Cell Culture of Liverworts

財団法人サンタリー生物有機科学研究所 (〒618 大阪府三島郡島本町若山台 1-1-1)

Suntory Institute for Bioorganic Research (1-1-1 Wakayamadai, Shimamoto-cho, Osaka 618)

第1表 カルスが誘導された苔類

	培地	内容	文献
<i>Fossumbronia pusilla</i>	Knop 培地, 2%グルコース	グルコースによるカルス誘導	24
<i>Reboulia hemisphaerica</i>	"	"	24
<i>Noteroclada confluens</i>	Knop 倍地, 0~4%糖類 0~100mg/l オーキシン類	糖とオーシキンの効果の検討	25
<i>Riccardia pinguis</i>	Knop 培地, 4~6%グルコース	高濃度の糖の効果	26
<i>R. multifida</i>	"	"	26
<i>Sphaerocarpus texonius</i>	Machlis 培地, 2%グルコース 10^{-5} ~ 10^{-6} M オーキシン類	配偶体破碎物からの細胞懸濁培養	4
<i>Marchantia polymorpha</i>	Knop 培地, 2%ショ糖 4ppm IAA, 6ppm GA	無性芽からのカルス誘導, 半数性の確認	1
<i>Petalophyllum ralfsii</i>	Knop 培地	高濃度のグルコースによるカルス形成	27
<i>Riccia crystallina</i>	Knop 培地	アンモニア態窒素によるカルス形成	3
<i>Athalamia pusilla</i>	Knop 培地, 2%ショ糖 オーキシン, サイトカイニン	オーキシン, サイトカイニンによる カルス誘導	5
<i>Marchantia nepalensis</i>	—	配偶体から得たカルスの培養	28
<i>Calyptogea granulata</i>	MSK-4 培地, 4%グルコース	セスキテルペン化合物の生成	10
<i>Jungermannia subulata</i>	MSK-1 培地, 4%グルコース	培養細胞の生長と窒素代謝, 化学成分の検索	2, 14
<i>Lophocolea heterophylla</i>	"	—	29
<i>Scapania parvidens</i>	"	—	29

3. 苔類培養細胞の特徴

3.1 発達した葉緑体

1973年に小野はゼニゴケの無性芽から緑色のカルスを誘導したが¹⁾, 筆者らはこのカルスを液体培地で培養することにより, きわめて均一な懸濁培養細胞系を得た²⁾. この細胞系は細胞乾重量の約2%に相当する葉緑素を含んでおり, 光照射下では炭素源であるグルコースを消費して活発に生長するが, 暗条件では生長を停止するという典型的な光依存型従属栄養生長を行う. この際, 与えたグルコースの約70%を細胞乾重量に変換するという他の培養細胞では見られない高い炭素源利用効率を示し, さらに $^{14}\text{CO}_2$ を用いた実験から, この細胞系は糖を同化すると同時に, 光合成的炭酸固定を行う光混合栄養生長をすることが明らかになった⁷⁾. ゼニゴケ細胞の持つこの光合成能に着目し, 光照射下で炭酸ガスを唯一の炭素源とする無機培地で培養することにより, 光合成的独立栄養生長を行う細胞系を得ることもできた⁸⁾. このように多数の発達した葉緑体を有することは, 苔類培養細胞の一般的な特徴であり, ツツソロイゴケを始めとする第1表にあげた数種の茎葉体苔類の細胞系も同様に高い葉緑素含量を示す.

3.2 染色体数の安定性

苔配偶体の染色体数は比較的少なく ($n=4, 5, 6, 7, 8, 9, 10$ など), 多くの場合は $n=9$ である. ゼニゴケ無性芽から得られたカルスの染色体は母植物と同じ $n=9$, すなわち半数体であると報告されたが¹⁾, 後に細胞の生

長を改善するために種々の改変培地を使用したところ, かなりの頻度で倍数性, 異数性の細胞が認められた⁹⁾. この場合でも培地にココナッツミルクを加えない限り, 半数体の割合は50%以上であり, 異数体はきわめて少ない. ツツソロイゴケやミドリホラゴケモドキ (*Calyptogea granulata*) の細胞はいずれも $n=9$ の半数体のみであった¹⁰⁾. 高等植物の培養細胞では染色体数の分布が広範囲にわたるのに比較すると, 苔類細胞の場合はきわめて高い安定性を保持していることは明らかである.

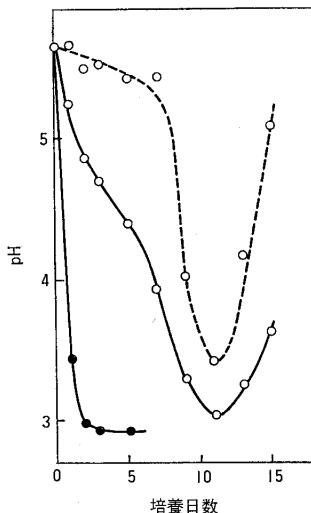
3.3 再分化能

植物の育種にとって組織培養が有力な手段となりつつあるが, その基本は植物細胞の持つ全能性にある. 高等植物の培養細胞を分化させて植物体を得るには, オーキシンやサイトカイニンの組合せと濃度を適切に選ぶことが必須である. 一方, 苔細胞も高い全能性を示すが, この場合, 再分化を誘導するのは生長調整物質でなく, 培地中の糖の濃度であることが知られている. すなわち, カルスの誘導には高濃度の糖が有効であるのとは逆に, 細胞を糖を含まない培地に移すことにより植物体が再生される例が多い. 小野はゼニゴケ細胞を再分化させて, 半数体のみならず倍数性あるいは異数性の染色体を有する配偶体を得ている⁹⁾. また武田と加藤はミドリホラゴケモドキ細胞を MSK-1 無機培地で培養して再分化植物を得, 後述するように, その二次代謝活性が母植物と同じであることを確認している¹⁰⁾.

4. 茎葉体苔類細胞の窒素代謝

茎葉体苔類の一種ツツロイゴケの細胞の培養には、培地に有機酸を添加する必要がある。その理由を検討した結果、この細胞系の窒素代謝がやや特異的であることが判明した²⁾。

一般に培養細胞は前述のゼニゴケ細胞も含め、窒素源としてアンモニウム塩と硝酸塩が共存する場合に活発な生長を行う。この時、培地の pH は、たとえばゼニゴケ細胞の場合、培養開始直後はアンモニウム塩の取込み速度が、硝酸塩のそれより大きく、pH は酸性に傾くがその後は硝酸塩がより大きい速度で消費されるため、pH の変動は生理的に許容される範囲内にとどまる¹¹⁾。一方、ツツソロイゴケ懸濁培養細胞では、第 1 図に示すように、培地にアンモニウム塩が存在する限り硝酸塩はほとんど取込まれない。その結果、培地に緩衝作用がない場合は、pH は 2 日目には 3 以下に低下し細胞は褐変、死滅する。そこでクエン酸等の有機酸を 10mM 以上、あるいはこれに相当する量の炭酸カルシウムを培地に加えて緩衝作用を与えると、pH はやはり 3 近くまで低下するもののその変動速度は小さく、細胞は活発に生長する。硝酸塩のみを窒素源とした場合は、この細胞系は濃緑色を保ち続けるが、その生長はきわめて遅く、乾重量は 15 日間に 18% 増加するのみである。すなわち、この細胞系では無機窒素源の代謝機構が一般的の細胞とは異



第1図 ツツソロイゴケ細胞培期間中の培地 pH の変動 (a) と窒素源の減少 (b)

a : —○—, 有機酸を含む培地; —●—, 有機酸を含まない培地; …○…, 塩酸カルシウムを加えた培地。

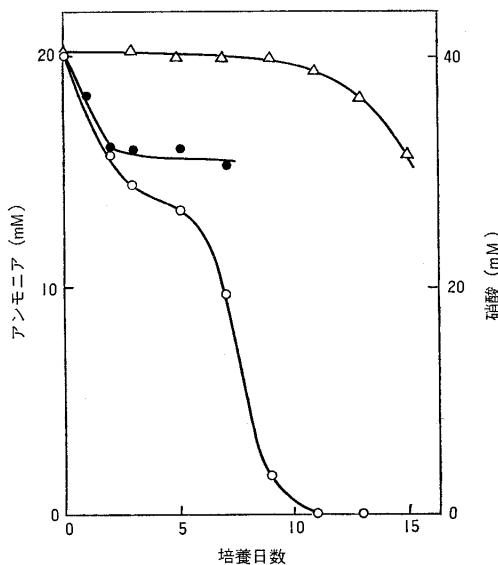
b: —○—, アンモニア(有機酸を含む培地); —●—, アンモニア(有機酸を含まない培地); —△—, 硝酸(有機酸を含む培地).

っており、たとえば硝酸還元酵素の誘導が起こり難いこと等が考えられる。

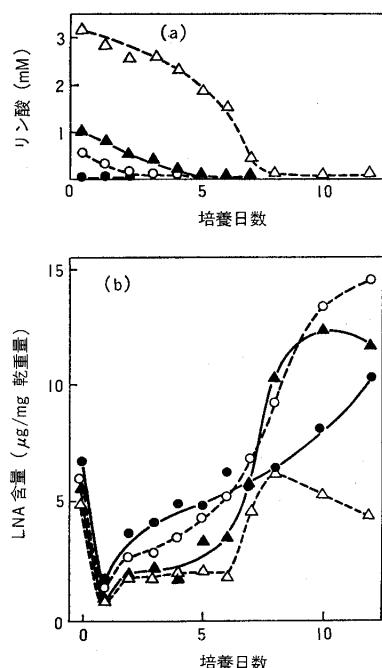
ここで興味あることは、Murashige-Skoog 培地はアンモニウム塩と硝酸塩併せて 60mM の窒素源が含まれており、通常の細胞はこの窒素源のすべてを消費して生長を終え、細胞乾重量は例えゼニゴケの場合約 13mg/ml となる⁶⁾。ところがツツソロイゴケ細胞では、同量の窒素源を含む培地であるのに、アンモニウム塩は生長が停止するまでに完全に消費されるが、硝酸塩は 10~20% 取込まれるのみである。得られる細胞乾重量は、やはり 13mg/ml であり、このことはこの細胞が約 1/3 量の窒素源でゼニゴケ細胞と同様の生長を行うことになる。トサカゴケ (*Lophocolea heterophylla*) およびコヒシャクゴケ (*Scapania parvidens*) の培養細胞も同様に有機酸を添加した培地でのみ活発に生長することから、このような特異的な無機窒素代謝は苔類の細胞に共通することが予想され、植物細胞の窒素代謝を研究する上で興味ある実験材料になり得ると考えられる。

5. 二次代謝化合物の生産

苔類は植物体が小さく多量の試料を入手するのが困難であること、あるいは生薬として利用されることもないことから、その化学成分に関する研究は比較的歴史が短く、わが国では1956年に藤田らにより行われた、ムチゴケ (*Bazzania pompeana*) の精油成分に関するものが最初の



(b)



第2図 種々の濃度のリン酸塩を含む培地からのリン酸の減少(a)とLNA含量の変動(b)
リン酸塩濃度:—●—, 0 mM; …○…, 0.5 mM; —▲—, 1 mM; …△…, 3 mM.

例である¹²⁾。その後分析技術の進歩に伴い、苔類が含む二次代謝化合物として、セスキテルペソ類、フラボン配糖体、ビベンジル類等、多種多様の化合物が確認されており、中には顕著な生理作用を有するものもある¹³⁾。

苔類培養細胞による二次代謝化合物生成の研究は、これまでに筆者らの研究室で行われた2例のみである。前述のツツソロイゴケ細胞は乾重量の約50%に相当する脂質を含んでおり、その40%はパルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸、オレイン酸、アラキシン酸を有機酸成分とするトリグリセリドであり、他にカウレン、フィトール等が確認されている¹⁴⁾。このように脂質生産能がきわめて高いことが、苔類細胞の特徴の1つであり、さらに武田と加藤はミドリホラゴケモドキの細胞を用いて、培養細胞が母植物と同様の二次代謝機能を有することをセスキテルペソ類について確認している¹⁰⁾。すなわち、この細胞系は乾重量の2~3%に相当する精油を產生し、

その主成分はトリノルセスキテルペソである1,4-ジメチルアズレンである(乾重量の約1%)。他にレデン、ビシクロゲルマクレンを始めとする数種のセスキテルペソ類が存在するが、その組成は培養細胞と母植物においてほとんど同じであり、さらに培養細胞を炭素源であるグルコースを除いた培地に移すことにより、再分化させて得た植物体でも同じ精油組成が認められた。

培養細胞によるテルペソ化合物の产生に関する報告は少なく、その含量は母植物よりも低く、また生成される化合物も母植物と異なっている場合が多いが、ミドリホラゴケモドキ細胞では量的にも質的にもほとんど相違がない。このことは苔類では組織的にも維管束植物に見られるような器官分化が発達している場合は少なく、個々の細胞が同等の機能を営んでいるため、懸濁培養系にとってもその二次代謝系に大きな変動が生じないこと、すなわち分化した分泌組織等が生成蓄積の場となる高等植物と異り、苔類は個々の細胞内にある油体にテルペソ化合物等の脂質を蓄積し得ることに基くものと考えられる。浅川によれば、苔類に含まれる化合物の中には、抗腫瘍性、抗菌性、抗黴性、頭花植物に対する生長阻害作用等の生理活性を示すものがあり¹⁵⁾、その数は今後も増加することが予想される。このような化合物の生産あるいは特異な構造を有するものの合成研究に苔類培養細胞は最適の手段となり得る。

6. 苔の生長制御物質について

イスラエル産のミカズキゼニゴケ(*Lunularia cruciata*)が、高温、長日条件下で休眠し、長期間の乾燥にもよく耐えることから、その休眠を制御する物質の存在が予測され、1969年に Valio 等はこの苔のメタノール抽出物から生長抑制作用を示す化合物ルスラリン酸(LNA, 1)を単離、構造を決定した^{15,16)}。その後、LNA は70種以上の苔類から検出され¹⁷⁾、また高等植物における休眠誘導物質であるアブジシン酸との構造の類似性から、苔類に普遍的に存在する生長抑制、および休眠物質であるとされた¹⁸⁾。

筆者らはゼニゴケ、ツツソロイゴケ、トサカゴケ等の培養細胞がやはり LNA を生成蓄積することを確認すると共に、ゼニゴケ細胞を用いてその挙動を詳細に検討した¹⁹⁾。その過程において抽出方法により、LNA 含量が大きく変動すること、すなわち酸およびアルカリに対し



第2表 NaBH_4 で処理した場合の LNA 含量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 乾重量)

	NaBH_4 処理		コントロール	
	抽出物のアルカリ処理		抽出物のアルカリ処理	
	無	有	無	有
ゼニゴケ培養細胞	0.004	0.005	0.127	3.97
ジャゴケ配偶体	0.002	0.002	0.044	1.09

第3表 苔類の preLNA 含量

	preLNA ($\mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮量)
<i>Porella densifolia</i>	25-390
<i>Porella vernicosa</i>	12-19
<i>Plagiochila acanthophylla</i> subsp. <i>japonica</i>	29
<i>Makinoa crispata</i>	n.d.*
<i>Conocephalum conicum</i>	85
<i>Marchantia paleacea</i> var. <i>diptera</i>	210

* 検出されず。

て不安定な、 LNA に関連した構造を有する化合物が存在することを認め、過激な条件を避けて抽出、単離することにより、2のような構造を持つ化合物プレルヌラリシン酸 (preLNA) を得た^{20,21}。構造決定についての詳細は省略するが、preLNA はアルカリ条件では速やかに、かつ定量的に LNA に変化し、同様の変化は徐々にではあるが中性でも起ることから、LNA 生合成の直接の前駆体と考えられる。LNA の前駆体としては、これまでヒドランゲノール(3)が想定されていたが、この化合物は苔類からは検出されていない。preLNA はフェニルプロパノイド-ポリマロネート経路による芳香族化合物の生合成過程における“pre-aromatic”構造を有する中間体として初めて単離されたものとしても興味深い²²。

次にゼニゴケ細胞を水素化ホウ素ナトリウムの存在下に破碎して preLNA を還元し、LNA への変換を防止した後抽出することによって、真の LNA 含量を求めたところ、第2表に示すように、その値は preLNA に由来するものも含めた見かけ上の LNA 量、すなわち、これまで報告してきた値の 0.1% 程度であることが判明した²³。同様の結果はジャゴケ (*Conocephalum conicum*) 植物体についても得られ、また第3表に示すように preLNA は種々の苔類に 10~400 $\mu\text{g}/\text{g}$ 新鮮重量含まれていることから²¹、この化合物が苔類に普遍的に存在するものであり、過去に定量された LNA のほとんどすべてが preLNA であることが明らかとなった。以上の結果は苔植物体成分の生合成に関する知見を得るのに、多量の細胞を均一な条件下で扱うことのできる細胞培養法が有効な手段となることを示す一例である。

また、これらの化合物の産生に関与する要素をゼニゴケ細胞について検討した結果、生長が活発である対数増殖期には少なく、定常期に達し細胞の生長が停止とともに、その含量が急速に増加すること、および培地の主要栄養源の中でリン酸塩の濃度が強く影響し、第2図に示すようにリン酸塩が枯渇すると同時にその生合成が始まることが判明した¹⁹。以上すべての事実を苔植物体に帰納して考えると、preLNA (LNA) は植物の生長にとって好ましくない種々の状況下—ストレス条件—で生成されるストレス化合物の一種と考えられ、LNA が休眠物質であるとするこれまでの説は受け入れ難いものとなる。

7. まとめ

苔類の培養細胞はこれまで研究された例が少なく、その特性についてもすべてが明らかになっているとはいえない。しかし以上述べたように苔の細胞は脱分化、再分化の機構、染色体数、特に半数性の安定性、窒素代謝の特異性、母植物と同じ二次代謝活性の保持等の点において、高等植物のものとはかなり異った特性を有する。これらの事実を両者において対比させながら研究することにより、植物の進化についての知見を得ることも可能であろうし、二次代謝活性の発現機構について高等植物細胞に応用できるような情報を得ることも期待できる。また苔成分の生産についても、たとえば木の葉一枚を生育圏とし、強い芳香を有する長さ数 mm の苔 (ヒメクサリゴケ属のあるもの) の成分あるいはその生理活性を研究しようとすれば、細胞培養が有力な手段になる等、今後の発展が期待される。

文 献

- 1) Ono, K., 1973. Jpn. J. Gen., 48 : 69-70.
- 2) Ohta, Y., M. Ishikawa, S. Abe, K. Katoh, Y. Hirose, 1981. Plant Cell Physiol., 22 : 1533-1540.
- 3) Sood, S., 1974. Phytomorphology, 24 : 186-197.
- 4) Montague, M.J., J. Taylor, 1971. Bryologist, 74 : 18-22.
- 5) Mehra, P.N., D. Pental, 1976. J. Hattori Bot. Lab., 40 : 151-183.
- 6) Ohta, Y., K. Katoh, K. Miyake, 1977. Planta, 136 : 229-232.

- 7) Katoh, K., 1983. *Physiol. Plant.*, **57** : 67-74.
- 8) Katoh, K., Y. Ohta, Y. Hirose, T. Iwamura, 1979. *Planta*, **144** : 509-510.
- 9) Ono, K., 1976. *Jpn. J. Gen.*, **51** : 11-18.
- 10) Takeda, R., K. Katoh, 1981. *Planta*, **151** : 525-530.
- 11) Katoh, K., M. Ishikawa, K. Miyake, Y. Ohta, Y. Hirose, T. Iwamura, 1980. *Physiol. Plant.*, **49** : 241-247.
- 12) 藤田安二, 上田照夫, 小野 孝, 1956. 日化誌, **77** : 400-401.
- 13) Asakawa, Y., 1982. In "Progress in the Chemistry of Organic Natural Products" (ed. by Herz, W., H. Griesbach, G.W. Kirby), p. 1-285, Springer-Verlag, Wien.
- 14) 武田礼二, 太田喜元, 1978. 第6回植物組織培養シンポジウム要旨集, p. 35.
- 15) Valio, I.F.M., R.S. Burdon, W.W. Schwabe, 1969. *Nature*, **223** : 1176-1178.
- 16) Valio, I.F.M., W.W. Schwabe, 1970. *J. Exp. Bot.*, **21** : 138-150.
- 17) Gorham, J., 1977. *Phytochemistry*, **16** : 249-253.
- 18) Pryce, R.J., 1972. *ibid.*, **11** : 1759-1761.
- 19) Abe, S., Y. Ohta, 1983. *ibid.*, **22** : 1917-1920.
- 20) Ohta, Y., S. Abe, H. Komura, M. Kobayashi, 1983. *J. Am. Chem. Soc.*, **105** : 4480.
- 21) Ohta, Y., S. Abe, H. Komura, M. Kobayashi, 1984. *Phytochemistry*, **23** : 1607-1609.
- 22) Weiss, U., J.M. Edwards, 1980. In "The Biosynthesis of Aromatic Compounds," p.326-381, Wiley-Interscience, New York.
- 23) Abe, S., Y. Ohta, 1984. *Phytochemistry*, **23** : 1379-1381.
- 24) Allsopp, A., 1957. *Nature*, **179** : 681-682.
- 25) Allsopp, A., I. Ilahi, 1970. *Phytomorphology*, **20** : 9-16.
- 26) Ilahi, I., A. Allsopp, 1970. *ibid.*, **20** : 126-136.
- 27) Ilahi, I., 1972. *Biologia*, **18** : 127-130.
- 28) Tripathi, B.K., 1978. *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser. D. Sci. Nat.*, **286** : 851-854.
- 29) 太田喜元, 未発表,