

Callus 成分と Chemotaxonomy

生田安喜良*

(1986年12月6日受理)

1. はじめに

重要な薬用植物の組織培養による有効成分の生成についての研究は生薬の分野で特に10数年来、盛んに研究されつつづけられ、多くの植物の callus 成分について研究成果が発表されてきた。かつて多くの植物成分の研究結果が植物の分類と化学成分の関連についての議論へと発展し、成分分類学 (chemotaxonomy) とよばれる分野が発達してきた様に、callus 成分と植物分類との間にも相関関係が見い出されるのではないかと考え、callus の二次代謝産物の研究を続けてきた。

筆者は薬用植物としても重要な isoquinoline 系 alkaloids を含むケシ科、キンボウゲ科、メギ科の植物、さらに分類学的に近縁なアケビ科植物について chemotaxonomy を考慮しつつ、これらの科の植物の callus 化を行いその原植物の成分と比較しながら、callus 成分の検索を行ってきた。以下これまでに筆者等が検討してきた callus 成分の結果について、chemotaxonomy の議論を交えながら植物の科ごとにのべていきたい。

2. ケシ科 (Papaveraceae) 植物

ケシ科植物には生薬として、あるいは医薬品原料として古くから重要な植物が多く、特にケシ (*Papaver somniferum*) 植物は止瀉、鎮痛、鎮静、鎮痙作用を持ち、その主成分は複雑な骨格を持つ morphine を始めとして30種以上の isoquinoline 系 alkaloids を含有し、その骨格も多岐にわたっている。ケシは今日でも重要な医薬品原料として栽培されているが、しかしケシは麻薬のために栽培許可が必要であり、管理上からも培養によって morphine が生産可能になるならば有効な生産手段となる。その他に複雑な morphine 骨格が callus により生成されるかどうかの興味などから世界中の研究者がケ

シの組織培養に注目してその生成を試みてきた。筆者等も上記の観点で、ケシの種子から seedling callus を誘導し、その成分検索を行ってきた。その結果、ケシの callus からは morphine は生成されず、benzophenanthridine 骨格の norsanguinarine (1), oxysanguinarine (2), dihydrosanguinarine (3), sanguinarine (4), chelirubine (5), protopine 骨格の protopine (6), cryptopine (8), aporphine 骨格の magnoflorine (7) が単離同定された¹⁾。

この様に callus から主成分として得られた benzophenanthridine alkaloids は原植物では微量にしか存在せず、これらの alkaloids が callus から主成分として生成した事は callus と原植物の代謝経路のちがいを示唆している。さらに両者の成分組成を比較した場合 callus の方がより簡単な alkaloids の組成を示した。

この両者の成分の差が誘導部位による差であるかどうか、果皮、茎についても callus を誘導して、それぞれの callus の成分の検索を行ったが、alkaloids 成分は上記の seedling callus の場合と大きな差は認められず²⁾、この様にケシ callus は植物の誘導部位によらず、しかも原植物の成分組成に比べ簡単な前述の三つの基本的合成経路が存在する事がわかった。この結果から他のケシ科植物の callus についても同様な結果を示すかどうか chemotaxonomy の観点から、11種類の植物について Table 1 に示す条件で callus を誘導した。これらの callus エキスをケシ callus の場合と同様に前処理し、TLC 上で数種類の展開溶媒を用いて成分を比較したところ、Table 2 に示した様な結果を得た²⁾。この Table 2 に示す様に11種類の植物の callus から得られた成分の基本骨格は先の三つの benzophenanthridine, protopine, aporphine 骨格で、それぞれの callus に共通に存在することが明らかになった。しかし、*Chelidonium*, *Macleaya* の callus において magnoflorine が同定されなかったが、これは意味がある事なのか不明である。magnoflorine はケシ科以外の植物に広く分布している

* Akira IKUTA: Callus Constituents and Chemotaxonomy

東京薬科大学第一生薬学教室 (〒192-03 八王子市堀之内 1432-1)

Tokyo College of Pharmacy (1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03).

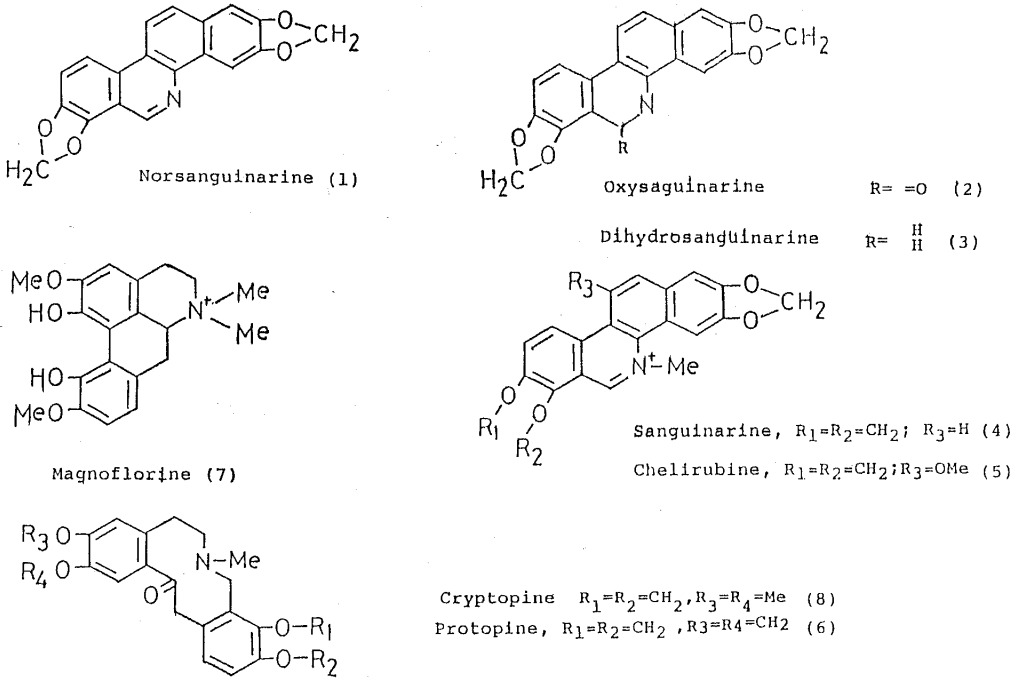


Fig. 1. Alkaloids from callus tissue of Papaveraceae.

Table 1. Derivation of Papaveraceae callus tissues.

Plants	Year	Basic medium+ (mg/l)	Origin
<i>Papaver somniferum</i>	1966.6	I 1, K 0.1	stem
	1967.4	D 1, K 0.1	seedling root
	1967.6	D 1, K 0.1	capsule
	1971.6	D 1, K 0.1, CM	capsule
<i>P. setigerum</i>	1969.3	D 1, K 0.1, CM	seedling
<i>P. bracteatum</i>	1968.4	D 1, K 0.1, CM	seedling
<i>P. orientale</i>	1969.3	D 1, K 0.1, CM	seedling
<i>P. rhoeas</i>	1969.3	D 1, K 0.1, CM	seedling
<i>Eschscholtzia californica</i>	1969.7	D 1, K 0.1, CM	root
	1969.7	D 0.1, K 0.1	stem
<i>Dicentra peregrina</i>	1969.7	D 0.1, K 0.1	stem
<i>Macleaya cordata</i>	1969.7	D 1, K 0.1, CM	stem
		D 0.1, K 0.1	stem
<i>Chelidonium japonicum</i>	1970.5	D 1, K 0.1, CM	hypocotyl
<i>Corydalis incisa</i>	1971.5	D 1, K 0.1	petiole
<i>C. pallida</i>	1971.5	D 1, K 0.1	stem

Key: I=3-indolylacetic acid; D=2,4-dichlorophenoxyacetic acid; K=kinetin; CM=coconut milk; basic medium=M & S inorganic solution and vitamin mixture.

ことから興味がある。また、原植物の *P. somniferum*, *P. setigerum*, *P. bracteatum* に含有する morphine 骨格の alkaloids が callus 化によっていずれも生合成されず、他のケシ科植物の callus 成分と同じ alkaloids 組成を示した。これらの共通に示す単純な callus の成分系は callus 化あるいは培養中に起る変異に

よる代謝系の異常による可能性も考えられるが、*Macleaya*, *Corydalis*, *Coptis* 等の callus の再分化植物が原植物と同じ alkaloids の生合成能力を回復することからも^{3,4)} callus は植物本来の遺伝情報を保持していると考えられる。以上のことからケシ科植物の callus には基本的に共通な代謝経路が存在すると考えられることか

Table 2. The alkaloids of Papaveraceae callus tissues.

Subfamily tribe	Original plants of callus tissues	Type of alkaloids							
		Benzophenanthridine					Protopine	Aporphine	Unknown
		1	2	3	4	5	6	7	CS QS
Papaveroideae									
Eschscholtzeae	<i>Eschscholtzia californica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+ -
Chelidoniaeae	<i>Chelidonium japonicum</i>	+	+	+	-	-	+	-	+ -
	<i>Macleaya cordata</i>	+	+	+	+	+	+	-	+ -
Papavereae	<i>Papaver somniferum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+ +
	<i>P. setigerum</i>	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>P. bracteatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+ +
	<i>P. orientale</i>	+	+	+	+	-	+	+	+ +
	<i>P. rhoeas</i>	+	+	+	+	-	+	+	+ +
Fumarioideae									
Corydalleae	<i>Dicentra peregrina</i>	+	+	+	+	-	++	+	+ +
	<i>Corydalis incisa</i>	+	+	+	+	-	+	+	+ -
	<i>C. pallida</i>	+	+	+	+	-	+	+	+ +
Hypecoideae	<i>Pteridophyllum racemosum</i> *	+	+	+	-	-	++	+	

Key: - absent; + present; ++ present (large amount); * original plants; CS had *Rf* 0.31 (yellow fluorescence) in $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (3:1); QS had *Rf* 0.3 (yellow fluorescence) in $\text{MeOH-H}_2\text{O-NH}_4\text{OH}$ (8:1:1).

ら, callus 成分による chemotaxonomy の議論の可能性を示唆している。一方, ケシ科の原植物の chemotaxonomy において指標となる alkaloids の基本骨格は benzophenanthridine, protopine, aporphine, morphine, protoberberine, phthalideisoquinoline 骨格等の多岐にわたる生合成経路からなっているが⁵⁾, callus 化により生成するおもな alkaloids の生合成経路は原植物に比べてより単純化され, 植物の系統との関係も考えられ興味深い。なお, 未分化のケシ callus から morphine 系 alkaloids が生成したという報告もあるが, chemotaxonomy を議論する場合には, ある程度安定して蓄積し, callus 化初期の数代に存在するが, 継代培養中に消滅したのでは意味がないと思う。これらの callus は再分化, あるいは再分化誘導条件下に培養すると morphine 骨格が生合成される事が報告されており⁴⁾, 先の *Macleaya*, *Corydalis*, *Coptis* 同様に, 二次代謝産物の生合成と分化の関係を示すものとして興味がある。

今回は他の研究者の成分研究の結果について特に取り上げていないが, 筆者等の発表以来多くの発表があるが, ケシ科の *Fumaria capreolata*⁶⁾ の callus 成分を除いて, 筆者の予想どおりこの基本的生合成経路にそった化合物である。なお, 他の研究者の結果を含めた chemotaxonomy の議論は別に発表を予定している。

3. キンボウゲ科 (Ranunculaceae) 植物

この科の植物の中には alkaloids 含有の属と非含有の属が存在し, isoquinoline 系 alkaloids を含有する植物の中に古くから重要な生薬 *Coptis* 属のオウレン (*Coptis*

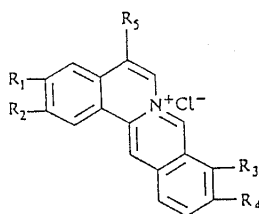
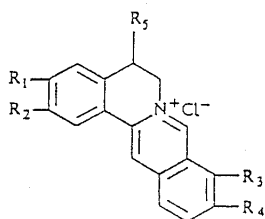
japonica) がある。オウレン中の berberine は重要な医薬品として有名であり, 筆者等はこの berberine の生成を目的として, オウレンから callus を誘導し, その callus 成分の検索の結果, 初めて berberine (1), palmatine (2), coptisine (3), jatrorrhizine (4), columbamine (5), 等の原植物に存在する protoberberine 系 alkaloids と magnoflorine を単離同定した^{3,7)}。callus は原植物に比べて berberine 含量が少なく, berberine と jatrorrhizine が同程度生成された。しかしその callus から再分化して得られた植物は原植物と同様に berberine を主成分として生成し, 生合成能力が完全に回復していることがわかった⁹⁾。一方, *Coptis* の代用品などとして民間で使用されている *Thalictrum* 属のアキカラマツ (*Thalictrum minus*) を callus 化し, その成分研究をしたところ, berberine, palmatine, jatrorrhizine, columbamine, thalifendine (6), thalidastine (7), desoxythalidastine (8), magnoflorine の 8 種の alkaloids が単離された⁸⁾。興味あることは, 原植物に微量にしか存在していない berberine が大量に生成され, その含有率は原植物に比べ 350 倍であった。これは berberine の供給源として有効な材料となることを示唆した⁹⁾。その後, 他の研究者によりアキカラマツ callus から berberine 生産の可能性について, 種々の条件検討について報告されている¹⁰⁾。

この様にキンボウゲ科植物の一部の属から得られる callus 成分は protoberberine, aporphine 骨格をもつ alkaloids を生成することがわかった。なお原植物のア

Table 3. Alkaloids of callus tissues.

Plants	Compounds	Type of alkaloids												Aporphine
		Protoberberine												
		1. berberine	2. palmatine	3. coptisine	4. jatrorrhizine	5. columbamine	6. thalifendine	7. thalidastine	9. berberastine	10. dehydro-discretamine	8. desoxy-thalidastine	11. epiberberine	12. groenlandicine	
Berberidaceae														
<i>Nandina domestica</i> THUNB.		+	++	+	++	+	+	+	+	+	—	+	+	+
<i>Mahonia japonica</i>		+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+
Rhanunculaceae														
<i>Thalictrum minus</i> L.		++	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+
<i>Coptis japonica</i>		++	+	+	++	+	—	—	+	—	—	+	+	+

— absent; + present; ++ present (large amount).



		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
Berberine	(1)			OMe	OMe	H
Palmatine	(2)	OMe	OMe	OMe	OMe	H
Coptisine	(3)					H
Jatrorrhizine	(4)	OH	OMe	OMe	OMe	H
Columbamine	(5)	OMe	OH	OMe	OMe	H
Thalifendine	(6)			OMe	OH	H
Thalidastine	(7)			OMe	OH	OH
Epiberberine	(11)	OMe	OMe			H
Berberastine	(9)			OMe	OMe	OH
Groenlandicine	(12)	OH	OMe			H
Dehydro-discretamine	(10)	OH	OMe	OMe	OH	H
Desoxythaldastine	(8)			OMe	OH	H

Fig. 2. Alkaloids from callus tissue of *Coptis*, *Thalictrum*, *Nandina* and *Mahonia*.

キカラマツは alkaloids として上記 protoberberine, aporphine 骨格以外に bisbenzylisoquinoline 型の alkaloids の報告があるが callus からは検出されていない。

4. メギ科 (Berberidaceae) 植物

この科の植物にはナンテン、ヒラギナンテン、メギ等の古くから生薬として重要な植物が多い。ナンテン (*Nandina domestica*) はアジア原産の1属1種の植物で、原植物は berberine 等の isoquinoline 系 alkaloids を含み、喘息、百日咳等の鎮咳薬として使用されている。この callus 成分の検索の結果、berberine, thalifendine, thalidastine, berberastine (9), dehydrodiscretamine (10), epiberberine (11), palmatine, coptisine, jatrorrhizine, columbamine, groenlandicine (12), の11種の protoberberine 骨格の alkaloids と magnoflorine を同定した。この callus は jatrorrhizine と palmatine が比較的多く、また alkaloids の種類も多いのが特徴であった¹²⁾。ヒラギナンテン (*Mahonia japonica*) も原植物に berberine 等の protoberberine alkaloids と berbamine 等の bis 体の alkaloids の報告があり、この植物も民間薬として使用されている。この植物の callus から alkaloids 成分として、berberine, palmatine, coptisine, jatrorrhizine, columbamine と magnoflorine が同定された¹¹⁾。ナンテンの callus に比べ alkaloids の種類は少なかったが、jatrorrhizine を約

0.9% (dry wt) 前後の含有率で生成した。Zenk らにより *Berberis stolonifera* の callus から同じ様に jatrorrhizine が大量に生成する事が報告されているが¹³⁾、Berberidaceae の一部の属、*Nandinna*, *Mahonia*, *Berberis* 等の callus の一つの特徴であることが予想される。

また、Zenk らの *Berberis* spp. の callus を用いた jatrorrhizine の生合成実験において¹⁴⁾、jatrorrhizine は berberine を前駆体とすることが報告されているが、この種の callus から将来 jatrorrhizine の生合成を阻害し、berberine を大量に生成できるのではないかと考えている。

5. アケビ科 (Lardizabalaceae) 植物

この科の植物は現在日本に3種類存在する。アケビ (*Akebia quinata*) の茎は生薬名木通として消炎利尿、通経に用いられ、原植物の成分は triterpene 系 saponin を主成分とすることが知られている。この植物の茎から callus を誘導し、その callus 成分を検索したところ、主成分は triterpene と少量の sterol を含有し、alkaloids, flavone 等の化合物は種々の TLC 条件で検索したが検出できなかった。この triterpene 化合物は oleanolic acid (1), 30-nor-oleanolic acid (2), 3 α -30-nor-oleanolic acid (3), mesembryanthemoidigenic acid (4), 3 β -hydroxy-29 (or 30)-al-28-oic acid (5), 3 α -30-nor-

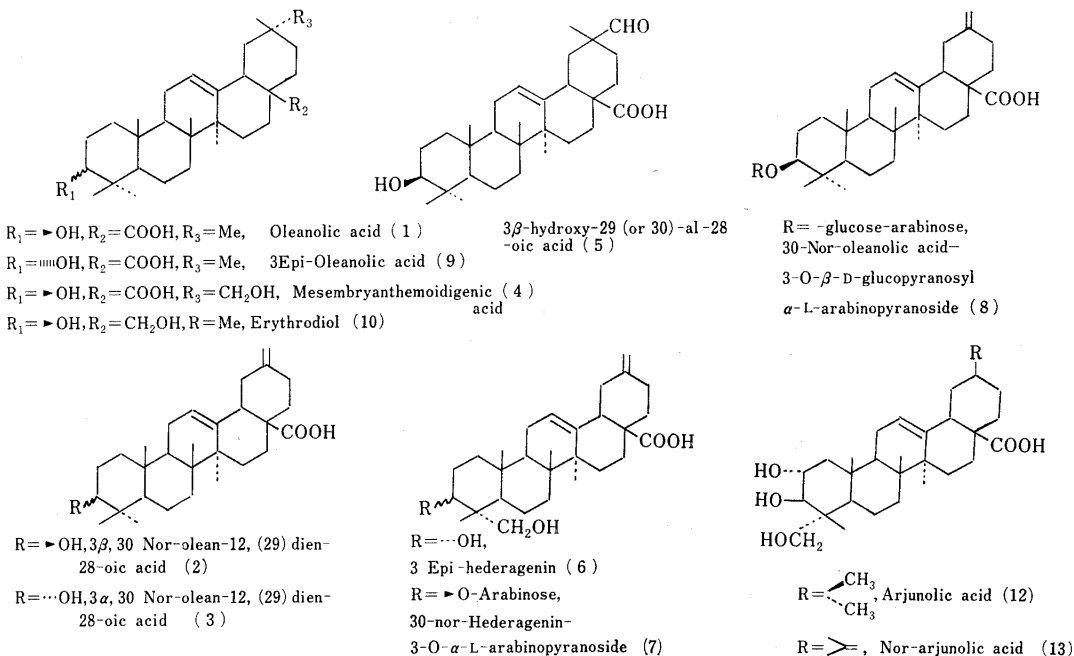


Fig. 3. Triterpenes from callus tissue of Lardizabalaceae.

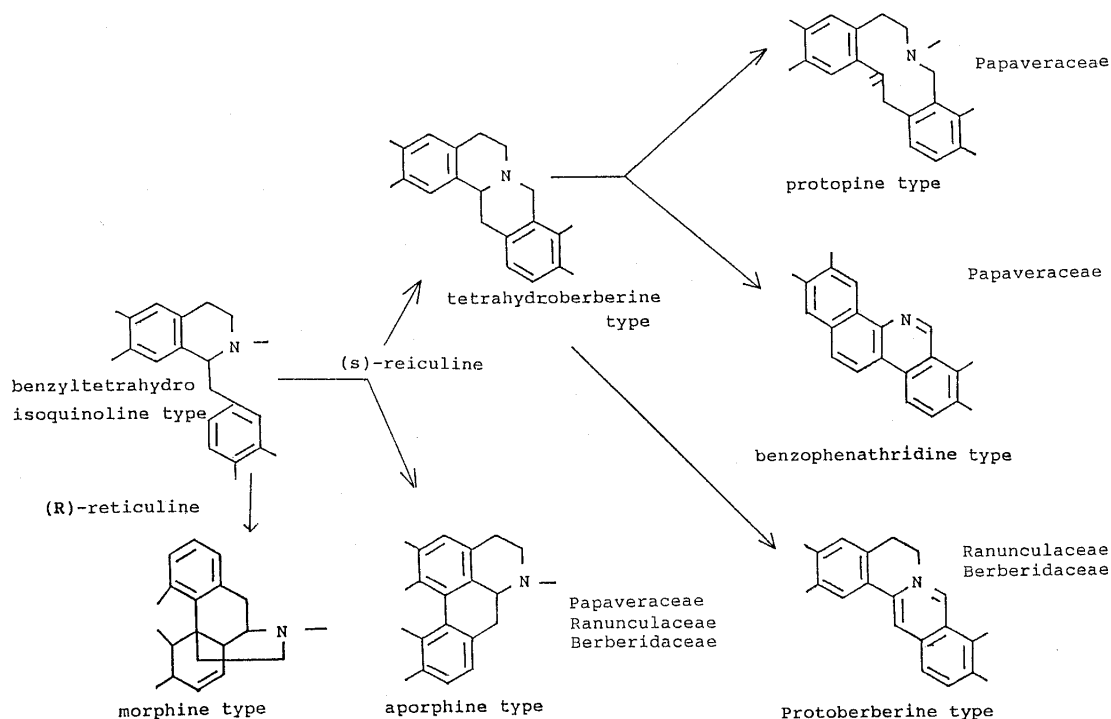
hederagenin (6), 30-nor-hederagenin 3-O- α -L-arabinopyranoside (7), 30-nor-oleanolic acid 3-O- β -D-glucopyranosyl- α -L-arabinopyranoside (8) とさらに sterol とその配糖体の daucosterin (11) を単離同定した¹⁶⁾。また同属のミツバアケビ (*A. trifoliata*) について, TLC 上同様な化合物の存在を確認した (Table 4)。一方, ムベ属のムベ (*Stauntonia hexaphylla*) の callus 成分の検索の結果, *Akebia* 属と同様な組成を示し, 30-nor-oleanane 系の triterpene が主成分として単離された¹⁵⁾。さらに上記 triterpene 以外に 3-epi-oleanolic acid (9), erythrodiol (10) が単離同定された。この2種の化合物は *Akebia* 属 callus には TLC 上検出されていない。この様に oleanolic acid と 30-nor-oleanolic acid のそれぞれの 3-epimer が callus の成分として, 同時に存在することは生合成上興味がある。ま

たアケビの callus 成分として, 20 位に生合成の中間体と考えられる, exo-methylene, -CH₃, -CH₂OH, -CHO 基の一連の置換基を持つ化合物が存在することは生合成の上で興味深い。上記3種の植物の callus 成分を比較しまとめたものが Table 4 である。これらの callus は共通に 30-nor-oleanolic acid と, その 3-epimer が存在していることが特徴的である。なお上記の 30-nor-oleanane 系の triterpene は原植物から報告されていない新規の化合物である。しかし, アケビの果皮成分の sapogenin として arjunolic acid (12) とその 30-nor 化合物 norarjunolic acid (13) が単離同定されている¹⁹⁾。

この様にアケビ科植物の callus 成分に 30-nor-oleanane 型の triterpene が共通に存在する事からこの種の化合物を指標に chemotaxonomy の議論が可能ではないかと考えている。現在類縁植物の callus 成分について検

Table 4. Comparison of triterpenes from Lardizabalaceae plant callus tissues.

Lardizabalaceae	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Akebia</i>									
<i>Akebia quinata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Akebia trifoliata</i>	+	+	+				+	+	-
<i>Stauntonia</i>									
<i>Stauntonia hexaphylla</i>	+	+	+	+	+	+			+



Scheme 1. The fundamental biosynthesis route.

索を続けている。

以上簡単に類縁植物の callus 成分を中心にして検索してきたが、Table 2~4 に示した様に、これらの callus 成分は類縁の植物、あるいは科に共通の基本骨格の成分が存在していることがわかる。すなわち、Papaveraceae 植物の callus 成分は (+)-(S)-reticuline から由来する、benzophenanthridine, protopine, aporphine 骨格の alkaloids が生成されるが、しかし、(-)-(R)-reticuline 由来の原植物 *P. somniferum*, *P. setigelum*, *P. bracteatum* に存在する morphine 骨格の alkaloids は生成されなかった。Bandoni らは Argemone の原植物の chemotaxonomy の研究の中で sanguinarine の有無によって Argemone を分類したが、callus から原植物にほとんど存在していない sanguinarine が生成することから、sanguinarine の有無によって分類する事に意味がなくなったと報告している¹⁷⁾。一方 Ranunculaceae 植物の *Coptis*, *Thalictrum*, Berberidaceae 植物の *Nandina*, *Mahonia*, あるいは *Berberis* の callus 成分は protoberberine, aporphine 骨格を共通に生成するが、Papaveraceae に生成した benzophenanthridine 骨格は今のところ生成していない。なお Berberidaceae 植物の callus は jatrorrhizine の蓄積が指標になる可能性がある。一方 Menispermaceae 植物の *Dioscoreophyllum cumminsii* の callus 成分も jatrorrhizine の蓄積することが報告されていることから¹⁸⁾、jatrorrhizine の蓄積はこれら近縁植物の callus 成分に共通した代謝経路が考えられ、この化合物も chemotaxonomy における一つの指標になり得る可能性があり、現在近縁植物の callus 成分の検索中である。

Lardizabalaceae の植物は日本に 2 属 3 種しか存在しないが、原植物の主成分はいずれも oleanolic acid あるいは hederagenin を genin とする saponin である。しかし callus は oleanolic acid を生成するが hederagenin は 3 種の callus 成分から検出されていない。また、原植物に比べて callus からの配糖体類の生成はわずかで、30-nor-oleanane 型の遊離の triterpene が主成分であった。

上記の alkaloid, triterpene 類がそれぞれ生成した以外の他の属、あるいは他の科の植物の callus 成分に存在していないことから、それぞれの属、科の植物間に共通な基本的二次代謝系の存在が予想され、系統との関連が考えられ興味深い。現在植物の検体数はまだわずかで

あるが、将来植物の検体数の増加によって、より正確な callus 成分を指標にした chemotaxonomy の議論の展開のできることを期待している。

本稿をまとめるにあたり種々の御助言をいただきました本学 糸川秀治先生、北里大学 古谷 力先生、東京大学 庄野邦彦先生に感謝いたします。

文 献

- 1) Furuya, T., A. Ikuta, K. Syōno, 1972. *Phytochemistry*, **11**: 3041-3044.
- 2) Ikuta, A., K. Syōno, T. Furuya, 1974. *Phytochemistry*, **13**: 2175-2179.
- 3) Ikuta, A., K. Syōno, T. Furuya, 1976. *Phytochemistry*, **14**, 1209-1210.
- 4) Yoshikawa, T., T. Furuya, 1985. *Planta Med.*, **44**: 110-113.
- 5) Preininger, V., 1985. *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids*, p. 23-37, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 6) Tanahashi, T., M. H. Zenk, 1985. *Plant Cell Rep.*, **4**: 96-99.
- 7) Furuya, T., K. Syōno, A. Ikuta, 1972. *Phytochemistry*, **11**: 175.
- 8) Ikuta, A., H. Itokawa, 1980. *Planta Med.*, **39**: 283.
- 9) Ikuta, A., H. Itokawa, 1982. *Phytochemistry*, **21**: 1419-1421.
- 10) Nagakura, K., A. Konagai, H. Fukui, M. Tabata, 1984. *Plant Cell Rep.*, **3**: 254-257.
- 11) Ikuta, A., H. Itokawa, 1982. *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture (Plant Tissue Culture 1982)*, p. 315-316.
- 12) Ikuta, A., H. Itokawa, 1986. *Phytochemistry*, in preparation.
- 13) Hinz, H., M. H. Zenk, 1981. *Naturwissenschaften*, **68**: 620-621.
- 14) Zenk, M. H., M. Rueffer, M. Amann, B. Deus-Neuman, N. Nagakura, 1985. *J. Nat. Prod.*, **48**: 725-738.
- 15) Ikuta, A., H. Itokawa, 1986. VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture (Minnesota), Abstract No. 373.
- 16) Ikuta, A., H. Itokawa, 1986. *Phytochemistry*, **25**: 1625-1628.
- 17) Bandoni, A. L., F. S. Stermitz, R. V. D. Rondina, J. D. Coussio, 1975. *Phytochemistry*, **14**: 1785-1788.
- 18) Furuya, T., T. Yoshikawa, H. Kiyohara, 1983. *Phytochemistry*, **22**: 1671-1673.
- 19) Higuchi, R., T. Kawasaki, 1976. *Chem. Pharm. Bull.*, **24**: 1314-1323.