

一般報文

コーヒーノキ (*Coffea arabica* L.) 培養細胞の成長およびプリンアルカロイド生産に及ぼすオーキシンおよび固定化処理の影響*

古谷 力・折原 裕・古家健二・津田由美子

北里大学薬学部

(〒108 東京都港区白金 5-9-1)

(1989年6月9日受付)

(1989年8月30日受理)

コーヒーノキ (*Coffea arabica* L.) 培養細胞は、プリンアルカロイドであるカフェインおよびテオブロミンを生産し、その 70~90% を培地中に放出した。カフェイン生産量はオーキシンの種類によって影響を受け、3-indole butyric acid; 2 mg/l, kinetin; 0.1 mg/l を含む MS 基本培地 (B2K 培地) において最大であり、全体で 43.1 mg/flask, 培地中の濃度は 131 mg/l であった。アルギン酸カルシウムゲルで包括固定化した細胞は4代目まで培養可能であり、この場合は成長培地として用いた 2,4-D; 1 mg/l, kinetin; 0.1 mg/l を含む MS 基本培地 (DK 培地) で4代目に最も高い生産量を示した。

1. 緒言

コーヒーノキ (*Coffea arabica* L.) は、アカネ科 (Rubiaceae) に属する灌木あるいは小高木の常緑樹であり、その種子から調製されるコーヒーは世界的に需要の高い嗜好飲料である。コーヒー中には生理活性成分としてプリンアルカロイドであるカフェインおよびテオブロミンが含まれ、カフェインは精神賦活、呼吸中枢興奮および強心の作用を、テオブロミンは強心、利尿の作用を示す。

コーヒーノキによる *in vitro* のカフェインの生産は 1972 年, Keller ら¹⁾ によって報告されたのを初めとして、培養期間中の培地成分とプリンアルカロイド生産量の変化²⁾、ストレス刺激による増産効果³⁾ 等が報告されている。

一方、微生物に比して成長が遅く、せん断力に弱い植物細胞によって物質生産を行う場合、固定化細胞による連続生産が有利である。植物培養細胞の固定化法としては、アルギン酸カルシウムのゲルビーズによる包括固定化法が多く研究されており、固定化ケシ培養細胞を用いたコデインからコデインへの連続変換反応^{4,5)}、固定化アキカラマツ培養細胞によるベルベリンの連続生産⁶⁾

等が報告されている。

コーヒーノキ培養細胞もまた、生産したプリンアルカロイドのほとんどを培地中に放出するため、生産物を細胞内部に蓄積するものが多い植物細胞の中で、固定化細胞による有用物質の連続生産の研究に適した細胞系である。また、アルギン酸による包括は、固定化細胞の調製時に加熱、有害な薬物の使用の必要がない温和な固定化法であり、固定化生体触媒の調製に多用されている。

しかし、ホルモンの種類の違いが培養細胞のカフェイン生産に及ぼす影響については 2,4-D と NAA との比較の例がある²⁾ が、他の各オーキシンとの比較について詳しく論じていない。さらに、固定化細胞の長期の培養についての検討もされていない。

本論文では、植物組織培養による物質生産のモデル構築のための基礎的研究の一環として、コーヒーノキ培養細胞のプリンアルカロイド生産に及ぼす各種オーキシンの影響、並びにアルギン酸カルシウムゲルによって包括固定化した細胞の長期継代培養の場合における同様の検討を行った。

2. 材料および方法

(1) 供試植物培養細胞

ハワイ産 *Coffea arabica* L. の種子を 10% サラシ粉懸濁液の濾液にて滅菌し、種皮を除いた後無菌的に切断した。この切片を Murashige and Skoog 基本培地⁷⁾

*1 本報を "Studies on Plant Tissue Cultures" 第 67 報とする。第 66 報: Kawaguchi, K., M. Hirotsani, T. Yoshikawa and T. Furuya, 1990. Phytochemistry, in press.

(MS 基本培地) に 2,4-D 1 mg/l, kinetin (K) 0.1 mg/l, ショ糖 3%, 寒天 0.9% を含む培地 (固形 DK 培地) に置床して 25°C, 暗所にてカルスを誘導した。以降, 同じ培養条件で 3 週間ごとに継代して得られた白色のカルスを用いた (CA-1 株)。

インドネシア産の本種の滅菌種子からの無菌芽生えの切片を同様の培地で誘導したカルス (CA-2 株) についても検討した。

本論文の実験では, CA-1 および CA-2 の各株はカルス誘導後, それぞれ約 3 年および 2 年経過したものである。

(2) 培養方法

培地は, 各種のオーキシン, ショ糖 3%, K 0.1 mg/l を含む MS 液体培地を用い, 容積 1 l の三角フラスコに 250 ml 分注した。オーキシンには, 1-naphthylacetic acid (NAA); 1 mg/l (NK 培地), 3-indolebutyric acid (IBA); 2 mg/l (B2 K 培地), 3-indoleacetic acid (IAA); 1 mg/l (IK 培地) および 2,4-D; 1 mg/l (DK 培地) を用いた。この培地に培養細胞を 15~20 g 接種し, 76 strokes/min のレシプロシェーカーにて 25°C, 暗所で 3 週間振盪培養を行った。タイムコース実験については, 培養開始後 3~4 日ごとに 3 ml ずつ培地をサンプリングした。

(3) 培養細胞の収穫

培養終了後, メッシュで細胞を濾取し新鮮重および培地容積を測定した。細胞は凍結乾燥し乾燥重を測定した。成長比については乾燥重について算出した。

(4) プリンアルカロイドの定量法

細胞内のプリンアルカロイドは以下の操作で抽出した。凍結乾燥した細胞を乾燥重 2.5 g 当り 100 ml の MeOH で 3 時間 3 回還流した。得られた抽出物を濃縮乾固し 100 ml の水に懸濁したのち, CH₂Cl₂ 100 ml で 1 回, 50 ml で 4 回抽出した。得られた CH₂Cl₂ 層を乾固したのち再び MeOH に溶解し, 内部標準としてテオフィリンを添加し HPLC にて定量した。

培地中のプリンアルカロイドについては, 濾紙濾過した培地 1 ml を採り内部標準を加えそのまま HPLC にチャージし定量した。

定量に使用したカラムは Unicil Q C 18 (ガスクロ工業 K. K., 5 μm, 7.6 φ × 300 mm), 移動相は流速 1.5 ml/min の 40% MeOH 水溶液を用いた。検出は U. V. 254 nm にて行い, CHROMATOPAC C-R3A (島津製作所 K. K.) を用い, 二点検量線法にて定量した。

(5) 細胞の固定化培養法⁴⁾

DK 液体培地で 1 週間前培養した細胞のうち 20~34

メッシュの大きさの細胞塊を計量スプーンにて 5 ml 採り, ショ糖 3 g を含む 4% アルギン酸ナトリウム水溶液 100 ml に懸濁した。同液を内径 2 mm の穴を通して 0.1 M CaCl₂ 水溶液中に滴下し, 直径約 3 mm のビーズ状の固定化細胞を得た。DK 培地にて固定化細胞の前培養を 40 日間行い, 各種培地にそれぞれ移植し以後 3 週間ごとに継代して 4 代目まで培養した。

固定化培養については, 前培養も含めて 147 rpm のロータリーシェーカーを用い液体培地 250 ml を入れた 500 ml 容の三角フラスコで行った。供試細胞株には CA-1 株を用いた。

3. 結果と考察

(1) オーキシンの種類が細胞の成長およびプリンアルカロイドの生産量に及ぼす影響

CA-1 株および CA-2 株の成長およびカフェイン生産量を各種オーキシンと kinetin 0.1 mg/l を含む MS 培地について検討した (Fig. 1)。

成長に及ぼす影響については, DK 培地では両細胞株において他のいずれの条件の培地よりも高い成長比を示した。DK 培地は高成長培地であると考えられ継代可能である。

B2 K 培地では DK 培地の次に成長比が高かった (CA-1) が, 本培地では継代が不可能であり成長培地ではない。上記 2 種の培地では CA-1 株の成長比が CA-2 株のそれより高いものであった。これについては単に株の差異だけでなく, カルス誘導時から継代してきた時間

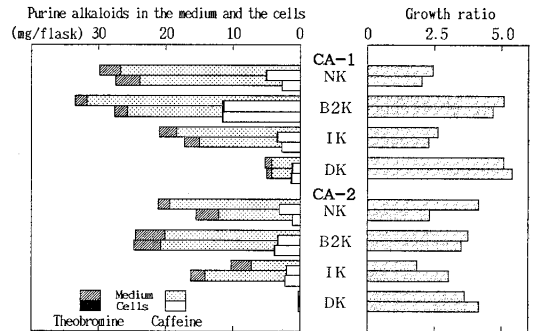


Fig. 1. Effects of auxins on the growth and the purine alkaloids production in *Coffea arabica* cells suspension culture.

Cells (15-20 g) were inoculated into 250 ml of the medium and cultured for 3 weeks at 25°C in the dark, shaking at 76 strokes/min.

Growth ratio

$$= \frac{\text{dry wt. of harvested cells}}{\text{dry wt. of inoculated cells}}$$

の違い (CA-1; 3年, CA-2; 2年) の影響も考えられる。

一方, NK 培地および IK 培地では CA-1 株の成長比が上記 2 種の培地より低かった。これらも継代不可能な培地であり, 細胞の褐変が培養終了時に顕著であった。

カフェイン生産量については, B2K 培地で特に多く CA-1 株で 43.1 mg/flask (培地中 31.7 mg/flask と細胞内 11.4 mg/flask の合計), 培地中の濃度 131 mg/l でそれぞれ最大を示した。これに次いで NK 培地で多く, DK 培地ではいずれも逆に 1/5 以下の値であった。テオブロミンの生産量がカフェインの生産量に比して極端に少ないのは本物質がカフェインの前駆体であり速やかに代謝されたためと思われる。

細胞内外のプリンアルカロイドの分布について比較するとカフェインは生産量の 70~90%, テオブロミンでは 90% 以上が細胞外に放出されていた。

カフェイン高生産培地である B2K 培地と NK 培地とのさらに詳細な比較を行うためにタイムコース実験を行った (Fig. 2)。

この結果から, 培養 17 日目にカフェイン生産量が逆転した。すなわち, NK 培地では培養前期で B2K 培地よりカフェイン生産量が多く, 後期の 21 日目以降で一定となったことに対し, B2K 培地では 25 日目頃まで生産が継続した。

カフェインの生産が急増する現象は, 培養後期に培地

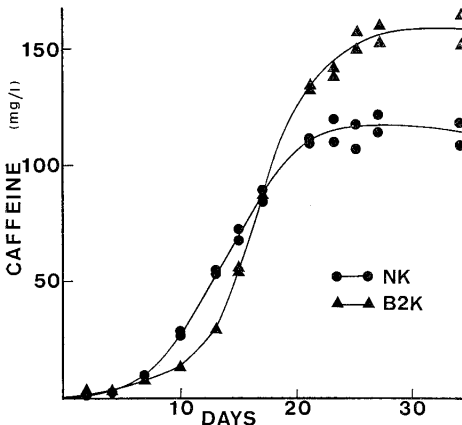


Fig. 2. The increase of caffeine production in NK and B2K media in *Coffea arabica* cell suspension culture.

Cells were cultured in 250 ml of NK (●) and B2K (▲) media for 34 days. Aliquot (3 ml) of each medium was sampled every 2 or 3 days.

中の糖の涸渇, 電解質の減少および細胞の対数増殖期の終了前後に観察されたと報告されている²⁾。Fig. 1 から, 細胞の成長比は IBA を含む B2K 培地では DK 培地に次いで高い値を示したが, これに対し NAA を含む NK 培地では, とくに CA-1 株の場合極めて低かった。したがって, B2K 培地では NK 培地よりも細胞の増殖の停止が遅くその間増殖した細胞がカフェインを生産したために, 生産の急増する時期が遅く生産量が多くなったと考えられる。

以上の結果から, 2,4-D から他のオーキシンに変えることで, 細胞の成長比およびカフェインの生産量に変化が起こり, 細胞の成長比は低くなる一方でカフェイン生産量が増加することが明かとなり, 生産量は B2K 培地で最大であった。この培地は継代が不可能であるが, 細胞の成長が比較的良好であり, カフェイン生産が培養後期に急増した。すなわち, カフェインの生産には, 2,4-D は細胞の成長が良好ではないが, 他のオーキシンよりは成長が良好な IBA が有効である。

一方, カフェインはストレス化合物であると報告されている³⁾。すなわち, 強光下あるいは培地中の高い塩濃度の過酷な条件でカフェインの生産が促進された。したがって, DK 培地で継代されてきた細胞が 2,4-D を含まない培地に移植されることが培養細胞にとって結果的にストレスとなり, 比較的早期に成長の停止およびカフェインの生産が起こると思われる。IBA は IAA, NAA よりも細胞の成長に比較的有効であり, 上記の現象に至る期間が長いと比較的良好な成長と大量のカフェイン生産がみられたと考えられる。

(2) 固定化培養におけるプリンアルカロイドの生産

固定化コーヒーノキ培養細胞による二次代謝産物の連続生産に及ぼすオーキシン類の影響についても調べた。

アルギン酸カルシウムゲル中に包括固定したコーヒーノキ培養細胞は, カルスと比較すると細胞塊が小さく, 細胞の周囲に金属を含む担体が存在しているため, 細胞自体の性質, 栄養条件, 培地成分の拡散などに差異が生じる可能性がある。

そこで固定化細胞を DK 培地で前培養後, 各種培地に移植し 4 代目まで継代し, 4 代目の細胞内および各代ごとの培地に放出されたプリンアルカロイド量を測定した。

NK, B2K, IK 培地で継代したものは 2 代目までカフェイン生産量が増加するが, 3 代目以降にいずれも減少した (Fig. 3)。

一方, 固定化していない細胞ではカフェイン生産量が少なかった DK 培地で継代した場合, 4 代目まで生産

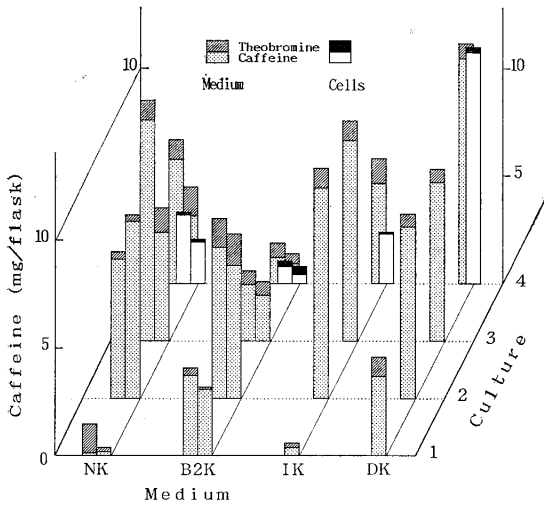


Fig. 3. Effects of auxins and subcultures on the purine alkaloids production in *Coffea arabica* immobilized cells.

The immobilized cells were subcultured every 3 weeks. Purine alkaloids in the medium after each subculture and in the immobilized cells after the 4th one were measured.

量が増加し続けた。カフェイン生産量の継代数による変化は、上述のような 2,4-D の欠如の他、とくに DK 培地においては細胞量の増加に伴うホルモンまたはその他の培地成分の不足が原因であると思われる。

4 代目におけるカフェインの放出率は、懸濁培養と比較すると 50~60% と低くなった。この原因として、固定化基材として用いたアルギン酸カルシウムゲルでは吸着、培地への拡散阻害の可能性が考えにくいので、固定化に伴う細胞の表面積の減少、固定化基材自体の体積の影響等が考えられる。

アルギン酸カルシウムゲルによって包括固定化したコーヒーノキ培養細胞は、DK 培地で継代可能であり、カフェイン生産量は 2 代目以降比較的高い値を示し、4 代目まで継代を重ねるごとに増加した。これは、培地組成の検討によるプリンアルカロイドの長期の連続生産の可能性を示唆している。

固定化コーヒーノキ培養細胞においてフラスコ当りのカフェイン生産量が少ないことは、細胞塊が小さかったことおよび 1 代目の細胞量が少なかったことに起因していると思われる。

アルギン酸カルシウムゲルによる包括固定化法は、温和な条件下で簡便かつ迅速に行うことができる利点があるが、培養が長期に及んだ場合に細胞の遊離が著しいだけでなく、細胞の成長または死滅などに起因する体積の変化によって固定化細胞が崩壊する。現在、さらに適切な固定化基材および培養条件を検討中である。

文 献

- 1) Keller, H., H. Wanner, T. W. Baumann, 1972. *Planta*, **108**: 339-350.
- 2) Prenosil, J. E., M. Hegglin, T. W. Baumann, P. M. Frischknecht, A. W. Kappeler, P. Brodelius, D. Haldimann, 1987. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 450-458.
- 3) Frischknecht, P. M., T. W. Baumann, 1985. *Phytochemistry*, **24**: 2255-2257.
- 4) Furuya, T., T. Yoshikawa, M. Taira, 1984. *Phytochemistry*, **23**: 999-1001.
- 5) Furusaki, S., T. Nozawa, T. Isohara, T. Furuya, 1988. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**: 437-441.
- 6) Kobayashi, Y., H. Fukui, M. Tabata, 1987. *Plant Cell Rep.*, **6**: 185-186.
- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-479.

Summary

Effects of Auxins and Immobilization on Growth and Purine Alkaloids Production in Coffee (*Coffea arabica* L.) Cell Suspension Culture

Tsutomu FURUYA, Yutaka ORIHARA, Kenji KOGE and Yumiko TSUDA

School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

Caffeine production of coffee (*Coffea arabica* L.) cell suspension culture was affected by auxins (IAA, IBA, NAA and 2,4-D) in the MS basal media supplemented with 0.1 mg/l kinetin and 3% sucrose, and the maximum production (131 mg/l) was observed in B2K medium (IBA; 2 mg/l), while theobromine was not affected. When the cells were entrapped with Ca-alginate and cultured in DK medium (2,4-D; 1 mg/l), the maximum caffeine production was observed in the 4th subculture.