

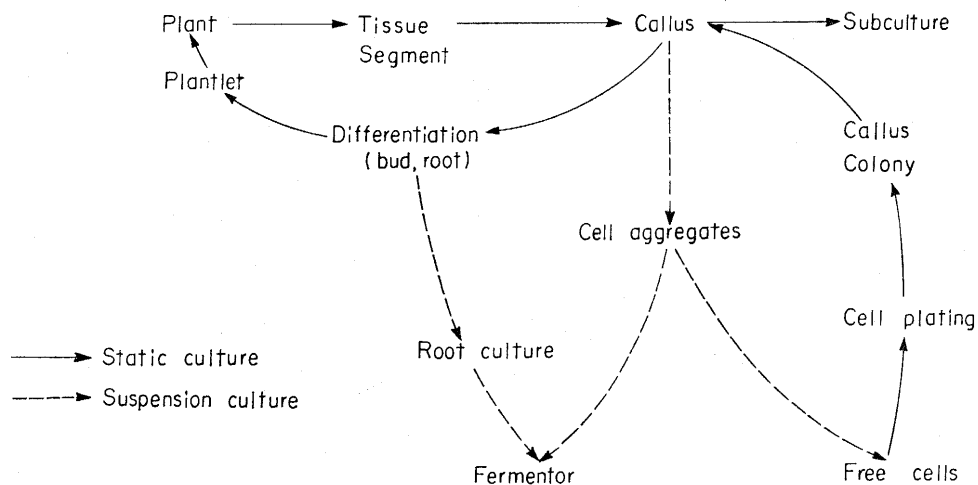
氏名	山 本 久 子 やま もと ひさ こ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 98 号
学位授与の日付	昭 和 48 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 薬 学 専 攻
学位論文題目	Scopolia 属植物の組織培養とアルカロイド生成に関する基礎研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 木 島 正 夫 教 授 井 上 博 之 教 授 藤 田 栄 一

論 文 内 容 の 要 旨

ハシリドコロ *Scopolia japonica* MAXIM. (Solanaceae) はその根茎および根をロートコンと称し、日本薬局方に第II改正以来収載され、鎮痛、鎮痙薬製造原料としてよく使用される重要な生薬である。しかし、その根茎の発育に長年月を要するため近年資源枯渇し、代用品として韓国から *S. parviflora* (DUNN) NAKAI, 中国から *Scopolia* sp., 東ヨーロッパから *S. carniolica* の根茎が輸入されているが、その輸入品も少なく、現在その資源、供給が緊急かつ重大な課題である。

著者は植物組織培養法の導入により、生薬学的見地から *Scopolia* 属植物の組織培養に着手し、トロパンアルカロイド生成調節機構の解明ならびに医薬品の経済的生産を目標に、培養細胞を用いてその基礎研究を行った。

培養システムはつぎのようである。



S. japonica, *S. parviflora*, *S. tangutica*, *S. stramonifolia* の各器官からカルス誘導を行い、まず培養組織の生長条件と器官形成能について検討した。

Scopolia 培養組織は Linsmaier & Skoog の基本培地が適し、カルス誘導および継代培養に auxin として 2, 4-D 10^{-6} M の添加が効果的でよく増殖するが、IAA, NAA は 2, 4-D に劣り kinetin の補足的添加は顕著な効果をもたらさない。特に、*S. japonica* カルスは 2, 4-D の存在が不可欠で IAA に置きかえられず、phenylpropane 化合物に対する感受性も強い。

S. parviflora カルスは auxin の添加により、よく根を形成し、さらにカルス誘導初期光条件培養で、茎カルスから植物体を得た。芽の分化能は継続培養により急速に消失するが、根の分化能は長期培養でよく維持される。*S. japonica*, *S. tangutica* の長期継続培養したカルスはほとんど分化能がないが、*S. stramonifolia* カルスは根を形成する。さらに、*S. japonica* 茎切片、やく(薬)および *S. parviflora* 茎切片から植物体を得た。以上のようにカルスおよび器官からの植物体形成は新しい栄養繁殖法や育種法として注目される。

つぎに、培養組織のアルカロイド生成について検討した。*S. japonica* および *S. parviflora* カルスは hyoscyamine, scopolamine を含めて 6~8 個のアルカロイドを生成し植物生長物質や前駆物質の添加や、器官形成により組成変動するものも認められる。

カルスのアルカロイド全量は乾燥重量当り、0.005~0.010% であり、母植物体の 4/1~40/1 であり、継代培養している間に漸次減少する傾向がある。カルス生長とアルカロイド含量の関係は *S. japonica* 根茎カルスではカルス増殖の著しい時にアルカロイド含量も増加をきたし、生長曲線と併行した関係を示す。植物生長物質の添加によりカルス生長とアルカロイド含量の間に何ら相関関係は認められないが、いずれも 2, 4-D 10^{-6} M が最適で、kinetin はアルカロイド含量に影響を与えない。

窒素源に関しては NH_4^+ または NO_3^- 態の単独ではコントロールより生長が劣り、peptone, yeast extract はアルカロイド含量を増加させた。

カルスの糖、TCA cycle 代謝物、遊離アミノ酸は基原器官とかなり相違するが、いずれのカルスも似た組成を示す。とりわけ、カルスでは総遊離アミノ酸含量が低く、分裂細胞では組織の生長に消費され、二次代謝産物であるアルカロイド生成がいくぶん抑制されていると考えられ、植物栄養的にバランスのとれた yeast extract や peptone の添加がアルカロイド生成に効果的であることと一致する。

前駆物質の添加実験によると、ornithine, proline, phenylalanine, phenylpyruvic acid および tropine は効果はなく、tropic acid の添加は著しいアルカロイド含量増加を示したが、生長阻害も大きい。特に、*S. japonica* 根茎カルスの振盪培養において培養 4 週間後に 500 μM の tropic acid を添加してさらに 2 週間培養したアルカロイド含量はコントロールの 14 倍 (858 $\mu\text{g}/250\text{ml}$) を示した。したがって、カルスでは phenylalanine から tropic acid への生成段階に何らかの障害があるものと考えられる。また tropic acid の添加はアルカロイド生成への直接の前駆物質となるのみならず、全体的にアルカロイド含量を促進している。

S. parviflora カルスを振盪培養して得た細胞けん濁液を寒天培地上にプレートして生じたコロニーから、形態、分化能、増殖度、アルカロイド含量に関してかなり差のあるクローンを分離した。アルカロイド含

量と他の形質の間に直接的な関係は認められないが、これらのクローンのアルカロイド生成能は継続培養による維持性が高く、したがって特にアルカロイド生成能が高く、遺伝的に安定な優良株の選択培養がカルスのアルカロイド生産の前提条件となる。

なお、*S. tangutica* カルスはアルカロイド含量も高く薬用資源として有用性が高いが、*S. stramonifolia* カルスは不適切であることがわかった。

また、*S. parviflora* カルスから分化した根は一次的にはカルスとアルカロイド含量差は認められないが、さらに根を継続培養することによりアルカロイド含量を約10倍増加し、その組成も母植物体の根に極めて類似する。Yeast extract や tropic acid の添加によりアルカロイド含量を乾燥重量当り0.08%にまで増加した。この再分化根の染色体数は2倍体でほぼ安定しており、カルスの根の分化能が長期間維持されるので、再分化根の培養はアルカロイド生産に極めて好都合な培養システムである。

論文審査の結果の要旨

ロートエキス原料とする生薬ロート根は極めて重要な天然植物資源であるが、その基原植物のハシリドコロ *Scopolia japonica* はわが国には1種のみ産し、近來の乱獲から資源枯渇している。しかも栽培には長年月を要し、かつ困難である。このような事態から韓国その他から輸入している現状である。

山本は原料植物の組織培養化による資源確保を目標に本研究に着手し、ハシリドコロをはじめ、韓国産の *S. parviflora* その他同属近縁の植物を数種輸入し、これらの各器官から種々の植物ホルモンなど (24-D, IAA, NAA, Kinetine) の添加することなど諸種の方法を試みて、組織培養化に成功し、さらにこれらの再分化、すなわち器官形成を試み、生薬学的見地からはその含有トロパンアルカロイドの組成と生成量とカルス生長の比較を行い、一方振盪培養による細胞けん濁液からプレート培養に移し、アルカロイド生成能の高い、優良種を選択に成功し、遺伝的に安定な優良種を選択培養がカルスのアルカロイド生産の前提条件であることを知った。その結果 *S. parviflora* から分化した根は2倍体で遺伝的に安定し、さらにこれを継続培養することによりアルカロイド含量はカルスから一次的に得たものの10倍量に増加し、しかもそのアルカロイド組成は母植物の根茎によく類似していることを明らかにした。

本研究は医薬品原料植物を将来培養組織により工業的に生産するための基礎資料を提供したものである。よって、本論文は薬学博士の学位論文として価値あるものと認める。