

氏名 平岡昇
ひら おか のぼる
 学位の種類 薬学博士
 学位記番号 論薬博第157号
 学位授与の日付 昭和51年3月23日
 学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
 学位論文題目 **Studies on Alkaloid Production in Datura Tissue Cultures**
 (Datura 属植物組織培養におけるアルカロイド生成に関する研究)

(主査)
 論文調査委員 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

植物組織培養技術は1950年代に急速に発達し、60年代に入ると第二次代謝産物の研究に応用され始めた。本技術は植物体を構成する諸器官・組織との係り合いなしに、1年を通じて制御可能な人工環境下で実験できるという長所を持っている。植物組織培養の薬学への応用としては、有用成分の生産、遺伝的に均一な植物の栄養繁殖、薬用植物の育種、さらに薬用植物に関する生物学的・化学的基礎知識の獲得などがあげられる。筆者は、天然物に由来する医薬品の確保が近年しだいに困難になりつつある現状に鑑み、薬用植物組織培養による有用成分生産に関する研究に着手した。材料として *Datura* 属植物を取り上げ、その薬用成分であるトロパンアルカロイドに着目して、培養組織の生長とアルカロイド生成に関する要因の解明を試み、以下の諸知見を得た。

1. *Datura* 組織培養における生長とアルカロイド生成

(1) 2,4-D(10^{-6} M)を添加した Linsmaier-Skoog の基本培地に組織片を無菌的に置床して培養することにより、*Datura innoxia* Mill., *D. stramonium* L. 他2種の各種器官よりカルス組織を誘導した。同じ培地でカルス組織の継代培養も可能であった。

(2) カルス組織の乾燥重量当り(以下同じ)のアルカロイド含量(0.002~0.04%)は親植物の諸器官(0.02~0.4%)に較べて低かった。継代培養初期のカルス組織中には hyoscyamine と scopolamine を含めて4~10個のアルカロイドを認めた。

(3) 一般に、継代培養を続けるとともに、アルカロイド構成は単純になり、含量も低下する傾向が強いが、その程度は培養株により異っていた。

(4) 振とう培養又はジャーファーメンター培養では静置培養より良好な生長を示したが、アルカロイド組成に関しては培養法による差異を認めなかった。

(5) *D. innoxia* 培養細胞から単離した22個のクローンは生長量、分化能、葉緑素生成能に差があったが、アルカロイドの点では均一で親株と類似していた。

このように、*Datura* 培養細胞は 2,4-D を添加した Linsmaier-Skoog の寒天ならびに液体培地で極めて良く生長するが、そのアルカロイド含量は植物体の 1/200~1/10 であり、さらにアルカロイド生成能は培養組織の年令とともに低下することを明らかにした。

II. *Datura* 培養組織の生長とアルカロイド生成に影響する要因

(1) 光はアルカロイド生成にほとんど影響しなかった。

(2) 炭素源として glucose を用いた時カルス組織は最も良く生長し、sucrose, mannose, maltose, fructose がそれに続いた。

(3) 植物生長調節物質の種類と濃度に依存して培養細胞のアルカロイド含量は 0.002~0.02% の範囲で変動するが、タバコ培養細胞中のニコチン生成に及ぼすような劇的效果は認められない。

(4) アルカロイド生成の促進に有効な前駆物質のスクリーニング試験の結果、phenylpyruvic acid および tropic acid が培養組織中の Vitali-Morin 反応陽性アルカロイド含量 (0.02~0.05%) を増加させることが判明した。

(5) 酵母エキス、ペプトン、カゼイン加水分解物を添加すると、アルカロイド含量は、それぞれ 0.04, 0.03, 0.02% (コントロール 0.01%) となり、酵田エキスならびにペプトンがアルカロイド含量を高める上で有効であった。

以上のように、培養組織中のアルカロイド生成を促進する要因として、植物生長調節物質の種類と濃度、アルカロイドの前駆物質 (phenylpyruvic acid, tropic acid) および栄養物 (酵母エキス、ペプトン) を確認した。

III. *Datura* 組織培養における異常アルカロイドの生成

前駆物質のスクリーニング試験中、tropine 添加培養物中に特異なアルカロイドが形成される現象を見出したので、この点についてさらに詳しく追究した。

(1) 培地に添加した tropine および scopine は *D. innoxia* 培養細胞により 8~9% の収率でそれぞれの acetate に変換されることを、細胞ならびに培地よりアルカロイドを単離・同定することにより証明した。pseudotropine 又は scopoline 添加培養物からは極く微量の acetate が TLC により検出された。

(2) tropine と各種有機酸を組み合わせて培地に添加して *D. innoxia* 細胞を培養した場合、いずれも acetyltropine のみが生成され、他の酸とのエステルは検出できなかった。

(3) tropine のアセチル化反応の種特異性を、*D. innoxia*, *D. stramonium* L. var. *tatula* (L.) Torrey, *Scopolia japonica* Maxim., *Nicotiana tabacum* L., *N. rustica* L., *Carthamus tinctorius* L., *Mallotus japonicus* Muell. Arg. のカルスを用いて検討した結果、*Datura* 培養細胞のみがこの機能を持っていることが明らかとなった。

このように、*Datura* 培養細胞はそれぞれ hyoscyamine および scopolamine の塩基部分である tropine および scopine を 8~9% の収率でアセチル化することを確認するとともに、本反応は種ならびに基質特異性がかなり高いことを明らかにした。

IV. 培養細胞より再分化した植物におけるアルカロイド生成

(1) Kinetin (10^{-4} M) を含む基本培地を用いて *D. innoxia* の未分化の培養組織に茎葉を分化させ、さ

らに得られた茎葉を基本培地に移植して根を発生させることにより、完全な植物体を復元する手法を確立した。しかし、この分化能は継代培養とともに失われた。一方、馴化培養細胞は5年以上の期間に渡って分化能を保持している。

(2) *D. innoxia* の胚由来の培養細胞の染色体を観察すると、32%は二倍性 ($2n=24$) であり、他のほとんどは四倍性レベルであった。一方、再分化植物の染色体構成は82%が正常な二倍性であり、残りは四倍性および異数性を示した。

(3) 実験に用いた未分化の培養細胞は2,3個の未同定アルカロイドを含み、含量は約0.005%であったが、器官の分化と生長に伴ってアルカロイドの組成と含量は漸進的に正常な植物体と同じになった。なお、scopolamine は根の発生段階ではじめて検出された。

(4) 再分化植物の数個体はアルカロイド代謝の面で異常を示した。

これらの結果は、一般に遺伝的能力の欠損のために培養細胞のアルカロイド含量が低いのではなく、その発現が何らかの生理的要因により抑制されていることを確証している。また、再分化の過程では二倍性細胞が優勢となること、形質発現の不安定性が再分化植物に持ち込まれる可能性をも示している。

ま と め

(1) *Datura* 培養細胞におけるアルカロイド生成を促すための必要条件としては次のような諸点があげられる。

a) 細胞増殖とアルカロイド生成能の高い優良株の選抜

b) 継代培養初期の細胞の利用

c) 植物生長調節物質の選択

2,4-D(10^{-6} M) + Kinetin(0~0.2ppm)

d) アルカロイド前駆物質の添加

Phenylpyruvic acid, tropic acid

e) 栄養物の添加

酵母エキス, ペプトン

(2) 天然化合物の構成要素としての出現頻度の高い tropine, scopine は *Datura* 培養細胞によりアセチル化され易いが、他の塩基の acetate 及び tropine と酢酸以外の有機酸とのエステルは全く形成されないか、形成されても極く微量である。又、本反応の種特異性は高い。

(3) 培養細胞から植物体を復元し、アルカロイドを分析することにより、培養細胞はアルカロイドを合成する遺伝的能力は持つがその発現が充分でないことを証明した。さらに、培養細胞とそれから再分化した植物における染色体構成の相違について明らかにした。

論文審査の結果の要旨

植物組織・細胞培養法は茎頂培養による無ウイルス植物育成や園芸植物の無性繁殖への利用面で一部実用に供されているが、有用成分、特に薬用成分生産に関しては未だ基礎研究の段階にある。一方天然医薬資源の窮乏化と品質一定の原料確保のために本技術を薬用植物に導入して医薬品あるいはその原料の生産

に利用することは重要、かつ急務となってきた。そのため広範な種類の植物の培養細胞について成分のスクリーニングを行う一方、それらの第二次代謝産物生成に関与する諸要因の詳細な解析、変異株の選抜、培養方法の改善等が要求されている。

本研究は医薬品原料として重要なトロパンアルカロイドを含有する数種の *Datura* 属植物の培養細胞の生長とアルカロイド生成に関係する諸要因の解明を試みたものである。すなわち、平岡は種々の生物学的要因を検討したが、そのうち、培養株の選抜、培養組織の継代培養期間が培養組織中のアルカロイドの組成と含量に大きい影響を与えること、また、その化学的環境要因として酵母エキス、ペプトン、アルカロイド前駆物質の添加がアルカロイド生成を促進することを解明した。また、*Datura* 属植物培養細胞の特異な代謝機能として外部から与えたトロパン塩基のアセチル化反応を見出し、*Datura* 属以外の植物についても追求した結果、本反応が種ならびに基質特異性が高いことを明らかにした。さらに、培養細胞の分化を誘導、完全な植物体を復元する手法を確立した。これにより培養細胞と再分化個体における染色体数の分布、および分化の諸段階にある植物のアルカロイド分析から器官分化とアルカロイド生成の関係を明らかにすることができた。また、再分化個体の多くはアルカロイドの正常な生成能を保持していることから培養細胞は遺伝的能力の欠損のためにアルカロイド含量が低いのではなく、その発現が何等かの生理的要因により抑制されていることを確認した。

以上の諸結果は、植物組織培養による有用第二次代謝産物の研究を進める上で示唆する点が多く、今後の研究に貴重な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。