

氏 名	水 上 元 みず かみ はじめ
学位の種類	薬 学 博 士
学位記番号	薬 博 第 158 号
学位授与の日付	昭 和 52 年 9 月 24 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	ムラサキのカルス培養におけるシコニン系色素の生産とその調節に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 井上博之 教授 犬伏康夫 教授 藤田栄一

論 文 内 容 の 要 旨

近年、植物組織培養法を用いて植物の二次代謝産物の生合成に関する基礎的研究が進められるのに従って、培養植物細胞の増殖力ならびに生合成機能を利用した薬用植物成分の能率的生産法が検討されてきた。しかしながら、現在までのところ、まだ多数の植物の培養細胞では目的とする薬用成分の生合成の抑制、あるいは異常代謝が観察され、しかもほとんどの場合その原因が不明のまま残されている。

したがって、植物組織培養による薬用成分の能率的生産を実現するためには、二次代謝の制御要因ならびにその調節機構を解明し、培養細胞の二次代謝機能の合理的開発を計ることが重要な課題となっている。

著者は、上記の見地に立って、資源的に乏しく栽培も困難な邦産薬用植物ムラサキを研究材料として、その色素成分である shikonin 誘導体のカルスにおける生産とその調節要因について検討を行ない、以下の知見を得た。

1. カルスの誘導と色素生成

(1・1) ムラサキ *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. (Boraginaceae) の幼植物から 2,4-D 10^{-6} M, kinetin 10^{-6} M を添加した Linsmaier-Skoog の基本培地上でカルスを誘導することができた。このカルスは、同じ培地または、2,4-D の代りに IAA (10^{-6} M) を添加した培地上で継代培養することができる。

(1・2) 誘導されたカルスは黄白色を呈し、shikonin 系色素の生成は認められないが、2,4-D を含む培地から IAA を含む培地に移殖して培養すると赤紫色色素の生成が観察された。

(1・3) この赤紫色色素は、培養細胞においては主として油滴として細胞壁上に蓄積し、細胞質内にはほとんど存在しない。また、培地中にもほとんど排出されない。

(1・4) カルスの生成する赤紫色色素は、shikonin の誘導体より成り、deoxyshikonin, acetylshikonin, isobutylshikonin isovalerylshikonin, β , β -dimethylacrylshikonin, α -methyl-*n*-butylshikoin およ

び β -hydroxyisovalerylshikonin を含むことが明らかとなった。この色素組成は、shikonin そのものがほとんど検出されないことを除いて、植物体(根)のそれに類似している。

(1・5) カルスにおける shikonin 系色素の生成は、比較的長い誘導期(培養開始後約3週間)の後を開始され、組織の生長が定常期に入った後も直線的に増加を続ける。したがって、カルスの shikonin 系色素の合成は、細胞増殖の減退に伴って開始されるものと推定される。

2. 色素生成能の変異と色素高生産株の育成

(2・1) カルスの shikonin 系色素生成は、培養株間で大きな変異を示す。これらの培養株から選抜を繰り返すことによって、紫根(ムラサキの乾燥根)の1~2倍の色素含量を示す2つの色素高生産株(M231a, M18)を育成することに成功した。このことは、培養組織の成分含量を高めるためには、細胞の人為的選抜がきわめて有効であることを示している。

3. 植物生長調節物質による色素生成の調節

(3・1) 培地に添加する auxin の種類と濃度は、カルスにおける shikonin 系色素生合成の重要な調節要因であることが実証された。天然 auxin である IAA の存在下では色素生成は行なわれ、その最適濃度は 10^{-6} M である。一方、合成 auxin である 2,4-D は 5×10^{-8} M の低濃度でも色素生成を強く抑制する。

(3・2) 培地中の IAA 濃度を増加させるにつれて色素生成の立上りが遅延する。また、IAA の分解に関与する IAA oxidase の阻害剤である diphenol 類は、カルスの増殖を促進する一方で、色素生成を抑制する。したがって、細胞中の IAA 濃度が一定以下になると shikonin 系色素の生合成が開始されるものと推定される。このことは、IAA と 2,4-D との色素生成に対する作用の差異を、細胞内における分解の受け易さの差異として部分的に説明するものと思われる。

(3・3) Kinetin は IAA の存在下で色素生成を促進する。カルスの増殖と色素生成に対する IAA と kinetin の添加最適濃度はそれぞれ 10^{-6} M および 10^{-5} M である。

4. 栄養物質の色素生成に及ぼす効果

(4・1) 培地の sucrose 濃度を増加すると色素生成は著しく促進される。カルスの増殖と色素生成に対する sucrose の最適濃度は5%である。これに対して、glucose, fructose, maltose, lactose および raffinose は、色素生成に対してほとんど無効である。

(4・2) Ascorbic acid の添加は、 10^{-5} M 以上の濃度で色素生成を著しく促進する。

(4・3) 培地中の無機窒素源の増量または有機窒素源の添加は色素生成を抑制する。尿素の添加は色素生成の立上りを遅延させる。逆に streptomycin は色素生成を促進する。また、色素生成はカルス細胞におけるタンパク合成がほぼ停止してから開始される。以上のことから、カルスにおける shikonin 系色素の生合成はタンパク合成と拮抗的な関係にあるものと推定される。

(4・4) Shikonin の生合成前駆物質の中では L-phenylalanine が色素生成を促進した。

(4・5) ムラサキの植物体および生育環境中に、多量に存在する Fe^{2+} および Ca^{2+} は、むしろカルスの色素生成に抑制的に作用した。したがって、これらの無機イオンが多量に存在することが色素生成に必須であるとは考えられない。

5. 物理的環境要因の色素生成に及ぼす効果

(5・1) カルスの増殖および色素生成に対する最適温度は、20°C~25°C である。

(5・2) 光照射はカルスの色素生成を強く阻害する。この阻害作用は青色光に特異的で、その光受容体としては、flavin 系色素の関与がいくつかの実験的証拠から考えられる。Flavin 系色素の一つである FMN (flavin mononucleotide) は、青色光によって分解され、その分解物である lumichrome などが、shikonin 生合成における p-hydroxybenzoic acid 以後の酸化過程を阻害するものと推定される。

6. ムラサキカルスの抗菌性

(6・1) ムラサキカルスの CHCl_3 エキスは、グラム陽性菌に対して強い抗菌作用を示し、その活性は紫根の CHCl_3 エキスにほぼ匹敵する。このことは、ムラサキのカルスが shikonin 系色素の抽出材料としてだけでなく、抗菌性に関する限りエキスとしても紫根の代用となり得ることを示唆するものである。

7. 結論

(7・1) ムラサキの発芽種子から誘導したカルスは、選抜を繰り返すことによって、植物体を上回る shikonin 誘導体含量を示す。カルスにおけるこの色素生成は、種々の化学的要因および物理的要因によって調節されており、培地成分を調整することにより、カルスの色素含量をさらに高めることができる。

(7・2) 本研究で得られた知見を基礎に、今後大量液体培養法を確立すれば、ムラサキの培養細胞を用いた shikonin 系色素の能率的生産は可能であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

高等植物の二次代謝に関しては、特殊化合物の生成誘導条件、代謝調節要因など生物学的に不明な点が多い。最近これらの問題を究明するための実験系として組織培養法が利用されるようになり、さらにそこで得られる情報を大量細胞培養による有用成分の生産に応用する可能性が論じられている。申請者はこのような観点からムラサキ培養カルス組織におけるシコニン系色素の生成条件と代謝調節に関与する各種要因の解析を目的として研究を行なった。

申請者はまずムラサキの幼植物から誘導したカルスを IAA を含む培地に移植し、シコニン誘導体 6 種が生成すること、さらにこれら色素は主として油滴として細胞壁上に蓄積することを見出した。

次に著者は変異株の選抜を繰り返し、紫根の 1~2 倍の色素含量を示す二つの高生産株の育成に成功した。さらに著者は色素生成の調節に関与する諸要因の解析を行なった。

まず化学的要因を検討し、色素の生合成が天然オーキシシン IAA の存在下では行なわれるが合成オーキシシン 2,4-D によっては強く抑制されるという現象を見出した。著者はこの対照的な効果を両オーキシシンの細胞内における分解度の差異として部分的に説明した。栄養物質に関しては培地中の糖濃度、窒素源濃度の調節などから細胞中の C/N 比が重要な調節要因であることを推定し、また、色素の生合成がタンパク合成と拮抗的な関係にあることを示唆する結果を得た。

物理的環境要因として光がシコニン系色素の生成調節に決定的な役割を果すという発見とその機構の

解析は著者が得た成果の中でも特に注目される業績である。著者は光照射がカルスの色素生成を強く阻害すること、それが青色光に起因するものであることを確めた。さらにその作用機作として光受容体の FMN が青色光によってルミクロームに分解され、それがシコニン生合成における P-ヒドロキシ安息香酸以後の酵素的酸化過程を阻害するものと推定した。これは青色光が植物における特定の二次代謝産物の生成を特異的に阻害することを発見した最初の実例であろう。

以上の如く著者は着実に積み重ねた一連の実験により、シコニン誘導体の生合成に関与するいくつかの重要な調節要因を解明して二次代謝の生物学的理解に貢献するとともに、培養条件および培養株の改良によって培養細胞の生産性を高めシコニン系色素の能率的生産の可能性を期待せしめるに至った。

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。