培地の浸透圧がベラドンナ不定根の培養における分化, 生育および トロパンアルカロイドの生産に及ぼす影響

高山真策・井上益男

東海大学開発工学部生物工学科 410-03 静岡県沼津市西野 317

Effects of Osmotic Potential of Culture Medium on Differentiation, Growth and Tropane
Alkaloid Production in Adventitious Root Cultures of *Atropa belladonna*

Shinsaku TAKAYAMA and Masuo INOUE

Department of Biological Science and Technology, Tokai University
317 Nishino, Numazu, Shizuoka 410-03, Japan

Abstract

Atropa belladonna is a rich source of tropane alkaloids such as hyoscyamine and scopolamine which are used as antispasmodic agents. The production of these alkaloids through large scale culture is an important method for establishing industrial processes. Although culture conditions affect the production of alkaloids, the effects of osmotic potential of culture medium on differentiation, growth and alkaloid production are still unclear. In this study, the effects of osmotic potential on differentiation, growth and alkaloid production were investigated.

The growth of roots and calli was inhibited as osmotic potential of culture medium was increased. Although the formation and growth of adventitious buds was not affected by osmotic changes by mannitol or by NaCl, their formation and growth were inhibited by increases in sucrose concentrations.

Tropane alkaloid production was inhibited by increasing the osmotic potential of culture medium.

緒 言

ナス科のベラドンナ(*Atropa belladonna*)は, 二次代謝物質として鎮痛剤や鎮痙剤の成分となるトロパンアルカロイド(ヒョスチアミン, スコポラミンなどのトロピンエステル類)を生産¹⁾し, 大量培養によるアルカロイド生産について試みられている²⁻⁷⁾. ベラドンナの大量培養におけるトロパンアルカロイドの生産性は, 脱分化した細胞の培養では著しく低下するが, 分化した不定根の培養では母植物並みの生産が報告されており²⁾, 分化組織の培養の重要性が伺われる.

ベラドンナ不定根の大量培養における二次代謝物質の生産効率を高める基礎研究として, 培地成分や培地環境などの培養条件を変化させ, 分化生育ならびに二次代謝を人為的に制御することが必要である. 現在までに, ベラドンナ不定根の大量培養におけるアミノ酸添加³⁾, カリウム塩の除去⁴⁾, 培地量, NAA 添加, 無機塩類⁵⁾, 剪断ストレス⁷⁾, 遺伝子操作による形質転換⁶⁾などの影響について検討されているが, 浸透圧の影響についてはシュート形成に対する影響^{9)~11)}などわ

1997 年 4 月 21 日受付

1997 年 6 月 9 日受理

ずかな報告がなされているのみであり、その影響は十分に解明されていない。そこで、本実験では分化生育およびアルカロイドの生産に対する浸透圧の影響について調べた。

材料および方法

1. 実験材料および無菌培養系の確立

ナス科植物ペラドンナ (*Atropa belladonna*) の葉切片を次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (有効塩素量 3%) で殺菌し、 1×1 cm に切断した切片をシュークロース 30 g/l, NAA 0.1 mg/l, 寒天 8 g/l を含むムラシゲ・スクーグ改変培地¹²⁾ (以下 MS 改変培地: MS 培地¹³⁾ 成分のうち NH_4NO_3 , KNO_3 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 1/2 に減量したもの) 10 ml を含む $25 \phi \times 125$ mm 試験管に移植し、23°C, 連続照明下 (光合成有効光量子量 PPFD: $30 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 光源: 蛍光灯 = 東芝 FL 40 SW) で 4 週間培養して不定根を形成させた。形成された不定根をメスで 8 分割し、同一組成の液体培地 100 ml を含む 300 ml 容の洋ラン用三角フラスコ (柴田ハリオ製) に移植し、1 ヶ月間培養して不定根を増殖した。この操作を繰り返すことによって継代増殖した不定根を本実験の材料に供した。

2. 培地の浸透圧の影響に関する実験

シュークロース 100 mM, NAA 0.1 mg/l 添加した MS 改変培地を基本培地とし、マニトール, NaCl のモル濃度を 0 から 500 mM まで変化させて浸透圧を調節した培地を用いた。また、シュークロースについては、0 から 500 mM まで濃度を変化させて浸透圧を調節した培地を用いた。培養開始時の浸透圧は、浸透圧計 (Osmometer, Vogel 社, ドイツ) を使用し、氷点降下法で測定した。培養は、300 ml 容三角フラスコに培地 100 ml を入れ、前項の方法で増殖した不定根 1 g (新鮮重) を移植して、25°C, 連続照明下 (光合成有効光量子量 PPFD: $6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), 毎分 120 回転で振とう培養した。40 日間培養した後に、分化生育とトロパンアルカロイドの生産について調べた。

3. アルカロイドの抽出と分析

- ① アルカロイドの抽出: 生育した新鮮組織 1 g (新鮮重) にエチルアルコール 4 ml を加えてポリトロン細胞破砕機 (ポリトロン製) でホモゲナイズした後、3500 rpm で遠心分離した。上清に 10 ml の純水を加え、アンモニアで pH を 9.5 に調節した後、ジクロロメタン 15 ml を加えて振とうし、ジクロロメタン層を回収した。ジクロロメタン層に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した後、蒸発乾固して得た粗アルカロイド区分をエチルアルコール 2 ml に溶解して分析サンプルとした。
- ② アルカロイドの分析: アルカロイドの分析は高速液体クロマトグラフ法で行った。使用したカラムは MS-パック C 18 (4.6×150 mm: MS 機器販売), 溶媒はアセトニトリル: 10 mM SDS (pH 3.3) = 2: 3, 流速 1.2 ml/min, 27°C, 検出は UV 検出器 (測定波長 220 nm) で行った。

結果および考察

1. 分化生育に対する浸透圧の影響 (図 1)

総生育量 (フラスコ当たり新鮮重) は、基本培地 (100 mM のシュークロースを添加した MS 改変培地) の生育 (約 20 g/l) と比較して浸透圧の上昇に伴い低下し、 $-15,000$ hPa 以上では全く生育しなかった (図 1A)。細胞の乾物比率 ($100 \times \text{DW}/\text{FW}$) は浸透圧の上昇に伴って高まった (図

図1 培地の浸透圧がペラドンナ不定根の生育，不定芽形成ならびにカルス形成におよぼす影響

*浸透圧は培養開始時の実測値。

**各実験は10反復行い，各データポイントは平均値±標準誤差で示した。

○：シュクロース，●：マニトール，▲：NaCl

Fig. 1 Effects of osmotic potential of culture medium on growth, adventitious bud formation and callus induction in adventitious root cultures of *Atropa belladonna*.

*osmotic potential values were measured at the start of culture.

**data points indicate the means of 10 replicates ± SE.

○: sucrose, ●: mannitol, ▲: NaCl

1B)。基本培地にシュクロース，マニトールおよびNaClを添加して浸透圧を上昇させると，カルスの重量はいずれの試験区も低下した(図1C)。しかし，総重量に対するカルス重量の比率は浸透圧に影響されなかった(図1D)。なお，高濃度NaCl(−20,000 hPa以上)で観察されたカルスの生育抑制はNaClによる枯死によるものである。

不定芽の重量および形成数(図1E, F)は，シュクロースの濃度を変更した場合には，基本培地(100 mMのシュクロースを添加したMS改変培地)と比較して浸透圧の上昇に伴い顕著に低下したが，マニトールおよびNaClの添加濃度を変えて浸透圧を調節した場合は約−10,000 hPaまでの広い範囲で基本培地と変わらなかった。なお，NaClを添加した場合には，−10,000 hPa以上で顕著に抑制された。このことから，不定芽の形成および生育はシュクロース濃度により影響され，浸透圧の影響は小さいと考えられた。なお，シュクロースは培養経過に伴い，グルコースとフラクトースとに分解するので，単純に計算すると分解後は初期値と比較してシュクロースの寄与分の浸透圧が倍加する。この事を考慮しても，基本培地へのシュクロース添加による浸透圧上昇に伴う分化抑制は顕著であることから，この現象はシュクロースの直接的な効果であると考えることができる。分化におよぼす浸透圧の影響について，根やシュートの形成に対するシュクロースやソルビトールの効果が，浸透圧の効果であるとは言えないことは

図 2 培地の浸透圧がペラドンナ不定根のアルカロイド生産におよぼす影響

*浸透圧は培養開始時の実測値。

**各実験は 10 反復行い、各データポイントは平均値±標準誤差で示した。

○：シュクロース，●：マニトール，▲：NaCl

Fig. 2 Effects of osmotic potential of culture medium on tropane alkaloid production in adventitious root cultures of *Atropa belladonna*.

*osmotic potential values were measured at the start of culture.

**data points indicate the means of 10 replicates ± SE.

○: sucrose, ●: mannitol, ▲: NaCl

Harvey ら¹⁰⁾ や Marino ら¹¹⁾ も述べており、本実験と類似した見解となっている。Brown ら⁹⁾ はタバコカルスを材料にして、3% シュクロース添加においてカルスの生育とシュートの形成が共に適していたが、シュクロース濃度を低減しても、非資化性の糖であるマニトールを添加してシュクロース 3% と同様な浸透圧にすると高い不定芽形成が得られ、この効果が浸透圧によるものであると報告している。本実験において、標準区(シュクロース 100 mM=34 g/l)が総重量、不定芽、カルス形成共に最も適しており、Brown ら⁹⁾ と同様な糖濃度域が分化には好適であったが、糖濃度を低下した場合の浸透圧効果については検討していないので、この点は今後

の検討課題である。

2. トロパンアルカロイドの生産に対する浸透圧の影響(図2)

ヒヨスチアミン、6 β -ヒドロキシヒヨスチアミン、スコポラミンの3種類のトロパンアルカロイドの生産は細胞の単位重量当たり(図2ADG)および単位培養容量当たり(図2BEH)共に、基本培地に100 mMのシュークロースを添加した-3,382 hPaの浸透圧下で生産が促進される傾向があった。基本培地にシュークロース、マニトールおよびNaClを添加して浸透圧を高めた場合、いずれの試験区も浸透圧の上昇に伴ってアルカロイドの生産が低下する傾向があった。シュークロース無添加(すなわちMS改変培地の塩類のみ)の場合、単位細胞当たりスコポラミン量が高まる結果が得られており(図2G)、トロパンアルカロイドの代謝制御の上から興味を持たれるが、その原因は本実験では明らかではない。培地中のアルカロイド(図2CFI)は、-20,000hPa以上のNaCl添加でヒヨスチアミンおよび6 β ヒドロキシヒヨスチアミンの量が高まったが、これらの条件では細胞内にこれらのアルカロイドはほとんど検出されていない(図2BEH)。これらの条件では、培養組織が高濃度のNaClによって死滅しているので、このことが細胞内成分が流出した原因となっていると判断される。

ま と め

ペラドンナ不定根およびカルスの生育は、浸透圧の上昇に伴い抑制された。不定芽の形成および生育に対するマニトールおよびNaCl添加による浸透圧の影響は顕著ではなく、シュークロース濃度の上昇に伴い顕著に抑制された。このことから、不定芽数およびカルスの形成率に対する浸透圧の影響は顕著ではなく、シュークロースの添加濃度の上昇に伴って抑制されることが考えられた。アルカロイドの生産は浸透圧の上昇に伴って抑制された。

謝 辞

本実験の遂行にあたって、多大なご協力を戴いた元東海大学開発工学部・滝沢直子氏に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Tyler, V.E., Brady, L.R. and Robbers, J.E.: Pharmacognosy, 9th Edition., Lea and Febiger, Washington, ISBN 0-8121-1071-4, pp. 1~519(1988)
- 2) Hartmann, T., Witte, L., Oprach, F. and Toppel, G.: Investigation of the alkaloid composition of *Atropa belladonna* plants, root cultures, and cell suspension cultures, *Planta Med.*, 52: 390~395 (1986)
- 3) Mitra, G.C.: Effects of amino acids on growth of excised belladonna root cultures and on their atropine synthesis. In: Rao, P.S., Heble, M.R. and Chadha, M.S.(Eds.), "Plant Tissue Culture, Genetic Manipulation and Somatic Hybridization of Plant Cells, Bhabha Atomic Research Centre, Bombay, India, pp. 380~387(1980)
- 4) Mitra, G.C.: Atropine production and growth of excised belladonna root cultures, *Indian J. Exp. Biol.*, 10(3): 217~218(1972)
- 5) 妻木直子・高山真策: ペラドンナ不定根の大量培養に関する研究, *SHITA Report*, 4: 95~104 (1992)
- 6) Khan, M.B. and Harbone, J.B.: Potassium deficiency increases tropane alkaloid synthesis in *Atropa acuminata* via arginine and ornithine decarboxylase levels, *Phytochem*, 30(11): 3559~3563(1991)

- 7) 高山真策・細矢敦子：強剪断ストレス下におけるベラドンナ不定根の生育とアルカロイド生産，「植物科学・産業技術への応用」，日本植物組織培養学会，pp. 110～111 (1990)
- 8) Hashimoto, T., Yun, D.J. and Yamada, Y. : Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures., *Phytochem*, 32 (3) : 713～718 (1993)
- 9) Brown, D.C.W., Leung, D.W.M. and Thorpe, T.A.: Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus, *Physiol. Plant*, 46 : 36～41 (1979)
- 10) Harvey, B. M. R., Bowden, G., Reavey, C. and Selby, C.: Stimulation of in vitro root and shoot growth of potato by increasing sucrose concentration in the presence of fluridone, an inhibitor of abscisic acid synthesis, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37 (3) : 271～276 (1994)
- 11) Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E and Altan, A. D. : Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 34 (3) : 235～244 (1993)
- 12) 妻木直子・高山真策：液体振とうおよびジャーファーマンターによるヤマユリの簡易大量増殖に関する研究，*植物工場学会誌*，3 (3) : 124～128 (1992)
- 13) Murashige, T. and Skoog, F. : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol. Plant*, 15 : 473～497 (1962)