細胞培養による植物色素の工業生産

藤 田 泰 宏*

Production of Plant Pigments by Plant Tissue and Cell Culture.

Yasuhiro FUJITA*

This review deals with a research trend regarding the production of plant pigments by plant tissue and cell culture. In addition, here is introduced the production technology of shikonin derivatives by the cell culture of *Lithospermum erythrorhizon*, which is the only example of industrialization achieved by the author *et al.*

1. はじめに

古来、人類は植物が生産する有用物質を日常生活の中で広く利用してきた。色素もその一つであり、植物の花、果実、根などに含まれる多様な色彩の成分が布の染色や食品の着色に用いられた。前世紀の後半、これら植物色素の構造を解明し、それを合成しようとする努力が重ねられ、西洋アカネ草の根に含まれる赤色色素アリザリン、アイの青色色素インジゴの合成法が相ついで開発された。そのような中で大きく進歩した有機合成化学は、単なる天然色素の模倣にとどまらず、その後、多数の合成色素を生み出し、徐々に天然色素にとって代るとともに、その種類、量ともにふやしていった。現在、世界の市場に流通している合成色素は2,000種類を越え、生産量も60万t/y以上と推定されている。その用途も繊維、紙、プラスチック、皮革から塗料、写真などきわめて多岐にわたり、最近では情報表示やエネルギー変換などの分野においても重要な役割を果たしている。また、人体に直接摂取される食品用色素や医薬品用色素、あるいは皮膚に接触する化粧品用色素などでも例外ではなく、合成色素が主流を占めるようになった。

一方、近年サリドマイドやキノホルムによる薬害の発生を機に、化学物質の安全性に対する関心が高まり、食用色素オーラミンの発ガン性問題も重なって、食用色素や化粧品色素の分野から合成品に対する危害意識が高まり、法的規制が強化されるとともに、長年月使用された

実績のある植物系天然色素を見直す傾向が消費者の間に広がってきた。事実、昭和56年の合成食品用色素生産量は昭和37年に比べて約1/3に減少しており、その分天然色素が増加していると推定される。

このように、植物系天然色素は消費者ニーズとその有用性が見直され、需要が増加しつつあるが、それに応えてゆくにはいくつかの問題がある。一つは資源となる植物が年々減少する傾向にあって、中には枯渇寸前のものまでであるということである。また、植物から抽出、分離して得られる植物色素は気候、風土によってその収量ばかりでなく組成まで非常に影響されるという点である。

Shikonin derivative

Table 1 Composition of shikonin derivatives of Ko-shikon.

	I ^{a)}	II ^{a)}	III ^{a)}
Content ^{b)} (%)	22	36	52
Composition (%)			
R : OCOCH ₃	30	63	26
OCOCH(CH ₃) ₂	22	14	33
OCOCH ₂ C(OH)(CH ₃) ₂	15	9	11
(OCOCH ₂ CH(CH ₃) ₂) OCOCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	26	11	26
OCOCH=C(CH ₃) ₂	3	1	3
Others	4	2	1

a) Lot number

b) Content of shikonin derivatives in Et₂O extract

* 三井石油化学工業株式会社生物工学研究所 ()

* Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.,
Bioscience Research Center ()

たとえば、表1に天然紫根から得られた紫根エキス中のシコニン系化合物の組成を示したが、市販品の含有量、組成は大幅に変動している。このように人為的なコントロールができない環境下で育つ植物を利用する以上、これはやむを得ないことである。この他にも植物の乾燥、保存時に有用成分が変化したり、微生物の繁殖によって有害物質が混入する恐れがある。さらに、栽培植物では多量に散布する農薬に基づく汚染の排除にも注意を払わねばならないという問題もある。

以上述べたように、植物色素の重要性が再認識されつつあるけれども、現状のままでは供給の不安や品質のバラツキなどの問題が常につきまとうのである。

この点、新しいバイオテクノロジーの一つである植物細胞培養技術は、完全に管理されたタンクの中で植物の細胞を培養し、細胞が持つ合成機能と増殖機能を活用することによって、短期間のうちに植物有用物質を量産するという技術で、換言すれば、植物と有機合成化学両者の長所を併せ持った技術であるといえることができる。本技術の実用化が進めば資源枯渇の問題が解決されるだけでなく、人体に対する安全性の高い植物色素など、植物有用物質を安定に生産することができる。

本稿では、植物細胞培養技術の概要を述べ、本技術による色素生産の研究動向ならびに筆者らの開発による工業化例を紹介するとともに、将来の可能性についても触れてみたい。

2. 植物細胞培養技術の概要

植物はひとつひとつの体細胞にもとの完全な植物の遺伝情報の全てがあり、植物のどの部分からでも細胞や組織片を切り出し適当な条件に保てば、植物体を再生することができるという考えで、今世紀初頭から多くの研究が行われてきた。これに関連して、親植物に含まれる二次代謝産物も、細胞には親植物のすべての遺伝情報が存在しているので、植物体を再生することなしに細胞に

作らせるという研究も40年近く前から始められてきた。1950年代の後半、Tlückeらが、植物細胞が液体培地中で懸濁した状態でも生育することを明らかにしたことから、植物細胞を微生物と同じように取り扱うことによって、植物の有用成分を生産しようとする植物細胞培養の研究が急速に進むようになった。植物細胞培養による物質生産は、タンクの中で行われるため、野生植物の採取や栽培に頼っている従来の生産法に比べて、

- 1) 天候、風土に影響されない
- 2) 病虫害の心配がない
- 3) 時間、面積当りの生産性が高い
- 4) 生産物の品質が安定している

など、多くの利点が期待できる。

しかし当初は、植物細胞培養技術を用いて増殖させた培養細胞中の有用物質含有量が親植物に比べて非常に低かったため、この技術の実用化に悲観的な見方も少なかつたが、最近になって研究者の努力が実り、表2に示すように、親植物よりはるかに多量の有用物質を生産する例が数多く見出され^{1,2)}、世間の注目を集めている。

以下に本技術の内容を概説する。

葉や根などの植物組織から小片を切り取り、栄養分と特定のホルモンを含んだ寒天培地上に置くと、その切り口からカルスと呼ばれる不定形の細胞集塊が生成してくる。このカルス細胞は、十分な栄養分が存在すると、きわめて活発に分裂するので植物体に比べてはるかに増殖速度が大きい。また、カルス細胞は、そのままではもとの植物が持つ物質生産能を示さないことが多いが、その遺伝情報は確実に持っている。従って、個々の細胞が持つ遺伝情報をうまく引き出してやることであれば、天然の植物に比べて格段に効率良く有用物質を生産できることになる。このカルスを細胞の生育と物質生産に適した液体培地に移し、完全にコントロールされたタンク内で培養して、増殖させるとともに有用物質を生産させる技術が植物細胞培養技術である。

Table 2 Examples of cultured cells having superior content of secondary products than original plants^{1,2)}.

植 物	生 産 物	用 途	含有量比(培養細胞 / 親 植 物)
日 々 草	アジマリシン	降 圧 剤	3.3
エ ニ シ ダ	ビ タ ミ ン B ₆	—	4
ニ シ キ ジ ソ	ロズマリン酸	消 炎 剤	5
朝 鮮 人 参	ジンセノサイド	強 壮 剤	6
ム ラ サ キ	シ コ ニ ン	色素, 肉芽形成剤	10
タ バ コ	ユビキノン-10	強 心 剤	12

Fig. 1 Culture of plant cells.

カルスの誘導から大量培養までの手順を図1に示した。この一連の培養は25～30℃の温度下で行われ、光は照射しない場合が多い。細胞の生育には酸素の供給が不可欠であるが、フラスコを用いる培養では、綿栓を通じて拡散する空気が必要量が補給できる。また、一旦誘導されたカルスは、2～4週間毎に新しい培地に植え継ぐことによっていつまでも生きの良い状態に維持できるから、以後カルスの誘導は不要である。

ところで、細胞培養によって有用物質を効率良く生産するためには、細胞が持っている生育能力と生産能力をフルに発揮させるように培養環境を整えてやらねばならない。培養環境の中で最も重要な因子は培地成分の組成と濃度、および酸素供給のための通気攪拌方法である。

植物細胞培養の培地に関しては、これまで多くの研究が行われ、リンスマイヤー・スクーグの培地、ガンボグのB5培地など、一般に広く用いられている標準的な培地がいくつか知られている。しかし、これらは主に細胞の生育を良くすることを目的として開発されたものである上に、どの植物細胞にも最適であるというものでもない。従って個々の植物細胞について、生育と生産の両方を考慮に入れた培地の最適化を図ることが必要である。培地最適化の例を、ムラサキの細胞培養によるシコニン生産の場合について、後章で紹介することにする。

植物細胞培養における通気・攪拌などの工学的な研究は、比較的少なく、しかもこれらは大部分が実験室規模であって、1 m³ 以上の大規模培養については、タバコ細胞の取得を目的とした日本専売公社グループの研究³⁾が、報告されているだけである。一般に植物培養細胞は、微生物に比べて単位重量当りの酸素需要量は非常に少ないが、細胞の形が50～100倍と大きいこともあって、機械的な力に弱いことが知られている。それ故、細胞に対

する衝撃を抑えながら、いかに効率良く酸素を供給してやるかということが重要なポイントになる。これまでに植物細胞培養に適した培養槽として、ハリクワ細胞培養での改変かい型攪拌翼付通気攪拌槽⁴⁾や、ヤエヤマアオキ細胞培養でのドラフトチューブ付エアリフト培養槽⁵⁾が報告されているが、これらはいずれも10 l以下の小スケールでの検討結果である。また、細胞の種類によって好ましい槽形状が異なることも考えられる。いずれにしても、植物細胞培養の工学的な研究はまだ緒についたばかりで、今後待つ所が多いといえよう。

上述の培養環境のほかに、植物細胞培養の生産性を左右する因子として、元となる細胞(株と呼ばれる)の性能がある。カルスを誘導して培養を始めた初期の段階では、生育能力、生産能力ともにまちまちの細胞が入り混った状態であり、全体としての物質生産能力は一般に非常に低い。この中から能力の高い部分を選んで培養を行うと、その割合が増えてくる。この操作は選抜と呼ばれるもので、これをくり返すことによって株の性能が飛躍的に向上する場合が少なくない。例えば山本らは、アントシアニン系色素を生産するハナキリンの培養細胞について、24回の選抜をくり返し、もとの株の7倍の生産能を持つ株を得ている⁶⁾。

3. 細胞培養による植物色素の生産

3.1. 研究の動向 細胞培養による植物色素の生産に関する研究は、1949年にCaplanがニンジンに含まれるカロチノイドを培養細胞で生産して以来、数多くの色素について行われてきている。色素が生成すると培養細胞が着色するので、その生成を肉眼で容易に確認することができ、研究対象として好都合であるため、おのずと研究例が多くなっているものと思われる。これらの中に

Table 3 Principal plant pigments used in Japan⁷⁾.

化学構造による分類		色 素 名	主 成 分	植 物	色 調
フラボノ イド系	アントシアニン	ブドウ果皮色素	エノシアニン	赤 ブ ド ウ	赤 ~ 紫 赤
		コーン色素	シアニジン	紫トウモロコシ	赤 ~ 紫 赤
		赤キャベツ色素	ルプロブラシン	赤 キ ャ ベ ツ	紫 赤 ~ 赤 紫
		シソ色素	シソニン	シ ソ	赤 ~ 紫 赤
フラボノ イド系	カルコン	ベニバナ赤色素	カーサミン	紅 花	赤
	フラボン	コーリヤン色素 カカオ色素	アビケニン ポリフェノール	コーリヤン カカオ豆	赤 褐 褐
	フラボノール	カロブ色素 甘草色素	フラボノール類 イソリキリチン	カ ロ ブ 甘 草	黄 黄
カロチノイド系		アナトー色素 パプリカ色素 ニンジン色素	ビキシニン カプサンチン カロチン	ベニノ木 赤トウガラシ ニンジン	黄 ~ 橙 黄 橙 ~ 赤 橙 黄 ~ 橙 黄
キノン系	アントラキノン ナフトキノン	アカネ色素 紫根色素	ルベルトリン酸 シコニン	西洋アカネ ムラサキ	赤 紫 赤 紫
ジケトン系		ウコン色素	クルクミン	ウ コ ン	黄
ポルフィリン系		クロロフィル	クロロフィル	緑 葉 植 物	緑

Table 4 Number of research papers on pigments production by plant cell culture in recent 5 years.

Classification	Number (%)
Flavonoids	28 (41)
Anthocyanins	17 (25)
Others	11 (16)
Carotenoids	5 (7)
Quinones	24 (35)
Others	12 (17)

は色素への応用をねらったものではないが、医薬などで有用な物質をターゲットとして選んだときに、その物質がたまたま着色物質であったという例も多い。また、生合成経路の解明やその制御などを目的とした研究にモデルとして取り上げられたものも少なくない。色素生産そのものを目的とした研究も、大部分がまだ実験室段階であり、実用化段階まで進んでいるのは次節で紹介するムラサキ細胞培養によるシコニン系色素の生産だけである。しかし、この分野の研究がますます盛んになってきているので、近いうちにつぎつぎとその成果が実ってくるものと期待される。

表3に現在使用されている主要な植物色素をまとめた⁷⁾。これからわかるように、植物色素の大部分はフラ

ボノイド、カロチノイドおよびキノンのいずれかに含まれる。最近5年間に報告された植物細胞培養による色素生産に関する文献の数を、対象色素の種類別に整理して表4に示した。これらは、BIOSISを用いて1981年以降の文献を検索した結果であり、すべてを網羅しているとは言いが、最近の傾向を知る上では充分と思われる。以下に各類についての研究動向を概観する。

3.1.1. フラボノイド

(1) アントシアニン 我々の目を楽しませてくれる植物の花、果実、葉などの鮮やかな色の中で、赤、紫、青の系統の色は、殆んどすべてがアントシアニンと呼ばれる色素によるものであり、このものはpHの違いや金属イオン、補助色素の存在で赤から青の間で変色する。

植物細胞培養でアントシアニンを生産しようとする研究の中で最も進んでいるのは、ブドウおよびハナキリンの細胞培養であろう。ブドウについては、山川らが精力的に研究を行っている⁸⁾。一般に細胞培養では、アントシアニンの生産に光の照射が必要とされているが、彼らの培養細胞は暗所においてもアントシアニンを生産する点が特徴的である。また、着色度の高い細胞塊の選抜をくり返すことによって、アントシアニン含有量が乾燥重量当り3%という高生産株を取得するとともに、培養条件の詳細な検討を行い、3l気泡培養槽による培養に成功している。一方ハナキリンの細胞培養に関しては、前述

したように、山本ら⁶⁾が優良株の選抜について検討し、生産能力の高い細胞の取得に成功している。

この他に、ニンジン⁷⁾の細胞培養によるアントシアニン生産に関する研究が比較的多く報告されている。しかし、これらは、ニンジンがカルス化し易く、しかも安定に培養できるという点を利用して二次代謝の制御機構研究などのモデル系として使っているもの⁸⁾が大部分で、アントシアニンの生産を目的としたものではない。

(2) アントシアニンを除くフラボノイド 黄色または橙色の植物色素の多くがこのフラボノイドに所属する。これらは、カンキツ類、ダリア、コスモス、菊、などに含まれ、古くから染料や生薬として使用されてきた。細胞培養によるフラボン誘導体の生産についての研究報告は数多く出されているが、その中で最近西独においてパセリの細胞培養の研究が多く行われているのが注目される。これをみると、フラボノイド生合成に関与する酵素に関する研究およびそれを用いた変換反応に関する研究に興味をもたれているようである。また、クズやダイズの培養によるイソフラボンの生産も研究されている。

3.1.2. カロチノイド カロチノイドは、最も広範囲の植物に分布している黄色から橙ないしは紅色までの色素で、食品や飼料の着色料として大量に使用されている。

細胞培養によるカロチノイドの生産については、ニンジン、トマト、タバコなどの培養が報告されているが、最近ではそれ程多くの発表はない。天然から容易に得られる上に、 β -カロチンのように工業的に合成されているものが多いために、細胞培養による生産には興味を持たれていないようである。

西ら¹⁰⁾は、キントキニンジンの培養細胞を変異剤で処理することにより、処理前に比べて数倍のカロチノイドを含む赤色細胞を得ているが、これは、培養細胞を変異処理することによって、色素などの有用物質生産能力を大幅に向上させ得ることを示した例として注目される。

3.1.3. キノン類 ナフトキノ、アントラキノ誘導体などの細胞培養による生産に関する研究は非常に多い。しかしこれは、色素としてのキノンの生産を目的とするよりもむしろ、これらが持つ生理活性に注目した研究が多いことによるものと思われる。例えば、ムラサキ細胞培養によるシコニン系化合物の生産、キササゲ¹¹⁾、ストレプトカーパス¹²⁾の細胞培養によるナフトキノ誘導体の生産、ヤエヤマアオキ細胞培養によるアントラキノ誘導体の生産¹³⁾などが報告されている。このうち、ムラサキ細胞培養によるシコニン系化合物の生産に関する研究は、この分野での先駆的な役割を果たしているので、細胞培養技術確立の例として後で詳しく述べることにす

る。

以上、細胞培養による植物色素の生産に関する研究の最近の動向をまとめたが、これらの多くは、生理活性に着目して生産した物質がたまたま色素であったというものが多く、はじめから植物色素の生産を目的とした研究が少ないのが現状である。これは、医薬などの生理活性物質に比べると、染料や食用色素などは価格が低く、現状の技術レベルでは、細胞培養のターゲットとして狙いにくいということと、食品などに培養物を用いるという意識がまだ高まっていないことによるものと思われる。

3.2. 工業化例

—ムラサキ細胞培養によるシコニン系色素の生産—

ムラサキ、*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et. Zucc. の根(紫根)にはナフトキノ骨格を持った赤紫色のシコニン系化合物が含まれていて、古来わが国で高級染料および生薬として用いられてきた。シコニン系化合物には、かなり強い抗菌作用、創傷治癒作用、抗潰瘍作用が認められ、現在でも外傷薬や痔疾の治療薬として広く用いられている。ムラサキは、古くは、わが国の山野に群生していたといわれるが、現在では殆んど見かけることがなく、幻の植物とさえいわれており、使用する紫根の全量を中国や韓国から輸入しているのが現状である。

筆者らは、このシコニン系化合物をムラサキの細胞培養によって生産することに成功し、現在、化粧品、染料向けに大量培養槽を用いて実生産を続けている。以下に筆者らが開発した生産技術について述べる。

3.2.1. 固体培養から液体培養へ 京都大学の田端教授らは、寒天培地上でムラサキの細胞にシコニン系色素を生産させることに成功していた¹⁴⁻¹⁶⁾。ところが、筆者らがその培養条件を液体培養に適用したところ、シコニン系色素の生産を全く認めることができなかった。そこで、固体培養と液体培養ではシコニンの生産に適した条件が異なるであろうとの考えに立って、液体培養における培養条件を詳しく検討した。その結果、液体培養でのシコニン系色素の生産に培地成分が決定的な影響を及ぼすことが明らかになった。

即ち、主栄養源である、N, P, K の濃度が大きく異なっているリンスマイヤー・スクーグ、ブレイデス、ニッチ・ニッチ、ガンボルグ B-5 およびホワイトの5種類の培地を用いて液体培養を行ったところ、これらの中でホワイトの培地を用いたときだけシコニン系色素が生産されることを見出した(表5)¹⁷⁾。これら5つの培地の組成を比較してみると、ホワイトの培地は NH_4^+ を含まず N源が NO_3^- のみから成るという点で他の4つの培地と著しく異なっている。また、ホワイト培地の NO_3^- の一

Table 5 Effects of the type of media on cell-growth and on the production of shikonin derivatives.

Medium	Conc. of principal components (mM)				Cell yield (g·DW/l)	Shikonin derivatives formed (mg/l)
	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	K ⁺		
Linsmaier & Skoog	21	39	1.3	20	16.8	0
Blaydes	13	25	2.2	13	4.0	0
Nitsch & Nitsch	9	18	0.5	9.9	4.6	0
Gamborg B-5	2	25	1.1	25	12.2	0
White	0	2.5	0.12	1.7	6.8	130

Table 6 Relation of NH₄⁺ content to the production of shikonin derivatives.

NH ₄ ⁺ /NH ₄ ⁺ +NO ₃ ⁻	Shikonin derivatives formed (mg/l)
0	130
1	60
3	0
5	0

部を NH₄⁺ にかえていくと、表 6 に示したように、わずか 3 % を NH₄⁺ で置換しただけでシコニン系色素は、全く生産されなくなった。これらの結果は、NH₄⁺ を含まない培地を用いれば、液体培養でもシコニンが生産されることを示している。

3.2.2 生産性の向上 ホワイト培地を用いた液体培養でのシコニン系化合物生産量は、14 日間ですべて 130 mg/l にすぎない。筆者らはさらに生産性を向上させるために検討を加えた。細胞培養で有用物質の生産性を向上させるには、細胞をできるだけたくさん増やすと同時に、個々の細胞の生産能力を高めることが必要である。ムラサキの細胞培養で、どうしたらこれを実現できるかを考えたとき、筆者らは表 5 の結果から大きいヒントを得た。即ち、ホワイトの培地は、シコニン系化合物を生産するが細胞の生育速度が非常に小さい。一方、リンスマイヤー・スコーグ (LS) の培地はシコニン系化合物を生産しないけれども細胞の生育速度が非常に大きい。このことから、細胞の増殖を目的とした培養と、シコニン系化合物の生産を目的とした培養を別々に行う、いわゆる二段培養法の適用が望ましいと判断し、両培地をもとに細胞増殖およびシコニン系化合物生産に最も適した培地を開発することにした。

LS 培地の全成分について細胞増殖に対する影響を調べ、表 7 に示した組成を持つ、ムラサキ細胞の増殖に最も適した MG-5 培地を開発した¹⁸⁾。この培地を用いる

Table 7 Compositions of LS medium and MG-5 medium.

Component	LS* (mg/l)	MG-5 (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1,650	500
KNO ₃	1,900	1,900
NaNO ₃	—	2,480
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	120
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	203
KH ₂ PO ₄	170	170
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8
Na ₃ ·EDTA	37.3	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	1.9
KI	0.83	—
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.025
Sucrose	30,000	30,000
Inositol	100	100
Thiamine·HCl	0.4	0.4

* Linsmaier & Skoog Medium

と細胞は 9 日間で 6～7 倍に増え、LS 培地に比べ生育速度は 10 % 向上した。更に、ホワイト培地の全成分について同様に最適化を行い色素生産に最も適した M-9 培地を開発した (表 8)¹⁹⁾。この培地を用いて、14 日間培養を行うとシコニン系化合物収量は 1,500 mg/l (ホワイト培地の約 7 倍) である。

培地の改良と並んで、株の選択もまた生産性向上のための有効な手段である。筆者らは、通常行われる細胞塊での選抜に加えて、一つ一つの細胞であるプロトプラストでの選抜を行い、親株の約 2 倍の生産性を持つ株の取得に成功した²⁰⁾。

筆者らの方式で得られた結果をムラサキの栽培と比較

Table 8 Compositions of white medium and M-9 medium.

Component	White (mg/l)	M-9 (mg/l)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300	694
KNO_3	80	80
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21	19
KCl	65	65
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	750	750
Na_2SO_4	200	1,480
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5	—
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3	3
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2.5	—
NaFe-EDTA	—	1.8
H_3BO_3	1.5	4.5
KI	0.75	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.3
MoO_3	0.001	—
sucrose	20,000	30,000
glycine	3	—
nicotinic acid	0.5	—
thiamine·HCl	0.1	—
pyridoxine·HCl	0.1	—

Table 9 Shikonin derivatives productivity.

	Cultivation	Cell culture
Culture period (M)	48	0.8
Contents (%)	1.4	20
Productivity	1	800

Fig. 2 Relation of k_{La} to the production of shikonin derivatives.

すると表9のようになり、筆者らのムラサキ細胞培養でのシコニン系化合物の生産性は栽培の800倍にも達する。

3.2.3. 大量培養 既に述べたように、植物細胞培養による有用物質の生産にとって酸素の供給は重要な因子である。ムラサキの細胞培養によるシコニン系化合物生産量と、培地への酸素供給能力の指標である酸素移動容量係数(k_{La})との関係は図2のようになる。 k_{La} が 10 hr^{-1} 以下では生産量は k_{La} に比例するが、それ以上ではほぼ一定になる。これは、タバコ細胞の培養で、増殖率と k_{La} との間に認められた関係²¹⁾によく似ている。この結果をもとに、 k_{La} を 10 hr^{-1} 以上の一定値に揃えて、各種形状の培養槽を比較検討したところ、シコニン系化合物が高収率で得られたのは図3に示す3種の培養槽であった。このうちの回転式円筒型培養槽は、筆者ら

Fig. 3 Fermenters suitable for the culture of *Lithospermum erythrorhizon*.

Fig. 4 Flow sheet of large-scale culture set up.

が新たに開発したものである²²⁾。スケールを上げた場合、出現すると予想される槽内不完全混合域の解消対策などは大量培養において今後検討しなければならない課題である。

ムラサキ細胞培養によるシコニン系化合物の生産設備のフローシートを図4に示した。細胞増殖用の第1培養槽、シコニン系化合物生産用の第2培養槽、培地を入れる換えるための細胞ろ過器、シコニン系化合物を含有する細胞のろ過器などから成り立っている。

3.2.4. 生産物の品質 ムラサキ培養細胞(20サンプル)と天然品である紫根(6サンプル)から得られたシコニン系化合物の組成を比較すると表10のようになる²³⁾。紫根では、産地や気候の影響を受けるため、シコニン系化合物の含量、組成ともに大きく変動するのに対

Table 10 Comparison of shikonin derivatives of cultured cells and Ko-shikon.

	Cultured cells ^{a)}	Ko-shikon ^{b)}
Content ^{c)} (%)	55~65	22~52
Composition (%)		
R: CH ₃ COO-	43~49	26~63
(CH ₃) ₂ CHCOO-	17~20	14~33
(CH ₃) ₂ C(OH)CH ₂ COO-	16~18	9~18
(CH ₃) ₂ CHCH ₂ COO- CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CHCOO-	11~14	11~26
Others	3~7	3~9

a) Results from 20 samples

b) Results from 6 samples

c) Content of shikonin derivatives in Et₂O extract

し、コントロールした環境下で培養して得られる細胞では、これらの変動幅は極めて小さい。しかも、培養細胞中のシコニン系化合物組成は、天然品のバラツキの範囲内にある。一方、抽出エキスとして利用する場合には、シコニン系化合物のほかに抽出溶剤に可溶性の物質も混入してくるが、エーテル抽出によって得られたムラサキ培養細胞エキスと天然紫根エキスについてそれらを比較

Table 11 Components of ether extract of cultured cells and Ko-shikon.

Compounds	Cultured cells	Ko-shikon
β -Sitosterol	○*	○*
Palmitic acid	○	○
Linoleic acid	○	○
Stearic acid	○	○
Behenic acid	○	○
Triglyceride of linoleic and linolenic acid	○	○
β -Sitosterol linolenate	○	○
β -Sitosterol linolenate	○	○
Compound A**	○	○
Compound B**	○	○

* ○ means to have been identified.

** Compound A

Compound B

したところ、表 11 に示すように、両エキスを全く同じ成分を含んでいることがわかった。即ち、培養細胞では紫根に比べてきわめて安定した品質を備えていると同時に、紫根と同等の生産物組成を持っている。換言すれば、ムラサキの培養細胞はムラサキの根と形態的には異なっているけれども、全く同じ物質生産機能を持っているわけである。

シコニン系化合物の含有量が高いことや、粒状で取り扱い易いことを考え合わせると、ムラサキ培養細胞は天然品である紫根より格段に優れた資源であるといえることができる。

なお、上記エキスをアルカリを加えて、シコニン系化合物のエステル基を加水分解するとシコニンが生成する。筆者らは、ムラサキ培養細胞から得られる高純度シコニンを化粧品原料などに、またエキスを染料として供給している。

(付)最近寺田らによってシコニンの全合成法が報告された²⁴⁾。1,5-dihydroxynaphthalene を出発原料とし、12 段階の反応で合成するもので、総合収率は 0.6 % である。得られるシコニンが、植物や培養細胞由来のものと違ってラセミ体であることは別にしても、合成経路の複雑さ、収率の低さからみて、細胞培養法に匹敵するような、経済的な製造手段となるにはまだ遠いと思われる。

4. 細胞培養による植物色素生産の将来

植物に含まれる有用物質を植物細胞の培養によって生産しようとする研究は今後ますます盛んになっていくと思われる。技術開発がまだ充分に進んでいない現時点では、付加価値の高い医薬品に研究のターゲットが集中しているが、後述するような技術革新が実現し、生産性が向上するにともなって、色素をはじめ香料や嗜好品などへの応用も活発になってくるに違いない。色素についていえば、人体への影響が大きい食品用色素、医薬品用色素、および化粧品用色素の分野で、安全性の高い植物色素を安定生産できる細胞培養技術によって得られる製品が次第に増え、それにともなって合成色素の割合が減少していくものと考えられる。また、培養細胞では親植物にはない生合成経路が発現する可能性があり、新しい天然系色素が見出されることが期待できるから、上記以外の分野でも、合成色素に代る優れた性能の色素を提供できるケースも出て来よう。

ところで植物細胞培養による有用物質の生産において、どのような技術の開発が期待されているだろうか。筆者の考えを表 12 にまとめた。

高生産株の産出に関しては、優良株をいかに迅速に選

Table 12 Technology of plant cell culture expected to be realized in the future.

項 目	望 ま れ る 技 術 開 発
高生産株の産出	選抜方法の効率化 変異処理, 細胞融合, 遺伝子組換えなどによる遺伝子操作 優良株の凍結保存
培 養 技 術	培養培地の改良 生長, 生産調節(促進)剤の開発 培養プロセス, 培養装置の高度化

抜するかが当面の課題であり、細胞中の微量成分定量的のための機器分析などを応用したハードウェアの開発が進むであろう。将来的には分子育種の応用が期待され、単なる変異処理にとどまらず、有用物質は多く生産するが生育が遅い植物細胞を生育の速い細胞と融合させたり、遺伝情報の解明が進めば、ある植物の有用物質の生産を司る遺伝子を他の植物細胞、更には微生物に移すことも実現しよう。またこれらと並行して、一旦取得した優良株を、その能力を低下させることなく、安全に保存するための凍結保存技術などが開発されるだろう。

培養技術においては、植物細胞の生育に最も適した培養プロセスなり、培養装置の開発が進み、大規模スケールでの培養が実現するのは間近なことと思われる。更に生合成経路や代謝調節の基礎的な解明が進み、それに応じて培地成分が見直されるとともに、新たに生育や生産を調節したり、促進させる化合物が見出される可能性もある。

このような技術の進歩を踏まえて、細胞培養による植物色素の生産が次々に実現することを信じている。

(昭和 60 年 8 月 29 日)

文 献

- 1) M. H. Zenk, "Frontiers of Plant Tissue Culture 1978" (T. A. Thorpe ed.), p. 1 (1978)
- 2) 西 荒介, 化学と生物, 22, 724 (1984)
- 3) 畦地昭二, 橋本寿夫, 湯山二男, 永塚 敏, 中静素子, 西山 告, 村田 章, 醸酵工学, 61, 117 (1983)
- 4) H. Tanaka, *Biotech. Bioeng.*, 23, 1203 (1981)
- 5) F. Wagner, H. Vogelmann, "Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application" (W. Barz, E. Reinhard, M. H. Zenk ed.), p. 245 (1977)
- 6) Y. Yamamoto, R. Mizuguchi, *Theor. Appl. Genet.*, 61, 113 (1982)

- 7) 安田 侃, 科学と工業, **57**, 16 (1983)
- 8) T. Yamakawa, S. Kato, K. Ishida, T. Kodama, Y. Minoda, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2185 (1983)
- 9) 小関良宏, 駒嶺 穆, 化学と生物, **20**, 683 (1982)
- 10) A. Nishi, A. Yoshida, M. Mori, N. Sugano, *Phytochemistry*, **13**, 1653 (1974)
- 11) S. Ueda, K. Inoue, Y. Shiobara, I. Kimura, H. Inoue, *Planta Med.*, **40**, 168 (1980)
- 12) K. Inoue, S. Ueda, H. Nayeshiro, H. Inoue, *Phytochemistry*, **22**, 737 (1983)
- 13) U. S. EL-Shagi, M. H. Zenk, *Naturwissenschaften*, **71**, 266 (1984)
- 14) M. Tabata, H. Mizukami, N. Hiraoka, M. Konoshima, *Phytochemistry*, **13**, 927 (1974)
- 15) H. Mizukami, M. Konoshima, M. Tabata, *ibid.*, **16**, 1183 (1977)
- 16) H. Mizukami, M. Konoshima, M. Tabata, *ibid.*, **17**, 95 (1978)
- 17) Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino, C. Suga, *Plant Cell Reports*, **1**, 59 (1981)
- 18) Y. Fujita, M. Tabata, A. Nishi, Y. Yamada, *Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, 399 (1982)
- 19) Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga, T. Morimoto, *Plant Cell Reports*, **1**, 61 (1981)
- 20) Y. Maeda, Y. Fujita, Y. Yamada, *ibid.*, **2**, 179 (1983)
- 21) 加藤 陽, 醸酵工学, **60**, 105 (1982)
- 22) 松原浩一, 菅 忠三, 日特開 昭 58-134, 989 (1983)
- 23) Y. Fujita, Y. Maeda, C. Suga, T. Morimoto, *Plant Cell Reports*, **2**, 192 (1983)
- 24) A. Terada, Y. Tanoue, A. Hatada, H. Sakamoto, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1983**, 987

書 評

現代化学増刊3

“有機合成の最前線” —高選択性を追究する—

向山光昭, 土橋源一 編
東京化学同人

B 5 判, 254 ページ, 3,800 円

有機化学という専門化された分野に限らず自然科学一般の領域に広げて考えてもその研究方法には二面性が伴うように思われる。ひとつは, ある作業仮説に基づき狙いすました結果の獲得でありテクノロジーとしての性格をもつ。他方は, 稀小な実験事実から出発し専ら研究者の興味をたよりにしてデータを蓄積し, その結果としての総合, 一般化された仮説・原理の獲得でありサイエンスとしての側面を色濃く映し出す。

有機合成は本来的にテクノロジーとしての性格を持つ領域に属すが, それを如何にサイエンスとして際立たせるかは研究者固有の“素質”に待つしかない。まただからこそ“面白い”と評価される研究には一般化できる原

理, 考え方を見出すことができるのも不思議なことではない。

最近になって, そうした研究者固有の思考過程を記述した化学書がいくつか出版されるようになってきたが, 本書もそうした狙いのもとにまとめられている。話題性のある物質の合成に致った経緯, 新しい反応の美しい展開が第一線の開発者自らの手で解き明かされ現代有機合成の現況がまとめられている。

これからの有機合成を担う若人に読んで欲しいと思うと同時に, 更に新規で独創的な展開をすることの大変さを感じさせる書である。

(富岡 清)