



Title	ニチニチソウ ( <i>Catharanthus roseus</i> ) 組織培養によるインドールアルカロイドの生産
Author(s)	平田, 收正
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35350">https://hdl.handle.net/11094/35350</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 【4】

氏名・(本籍)	平	田	収	正
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	7704	号	
学位授与の日付	昭和	62年	3月	26日
学位授与の要件	薬学研究科応用薬学専攻			
	学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ニチニチソウ ( <i>Catharanthus roseus</i> ) 組織培養によるインドールアルカロイドの生産			
論文審査委員	(主査) 教授 三浦 喜温			
	(副査) 教授 近藤 雅臣 教授 岩田平太郎 教授 松田 治和			

## 論文内容の要旨

植物組織培養による有用二次代謝産物の生産に関する研究は、天然資源の枯渇が深刻な問題となり、資源確保のための生物生産が求められるようになって来た時代的背景と、細胞工学的技術の導入により、近年急速な発展を遂げた。この分野の研究の目的は、これまで野性植物からの抽出に依存してきた有用物質の供給を、植物細胞あるいは器官を *in vitro* で大量に培養することによって、より効率的に行なうことにある。本研究においては、ニチニチソウ (*Catharanthus roseus*) のカルス培養 (callus culture) 株および茎葉器官培養 (multiple shoot culture) 株を材料として、高い抗腫瘍活性を有する vinblastine を中心としたインドールアルカロイドの生産性について検討を行った。

Vinblastine は、急性白血病などの治療薬として臨床の場で広く用いられている二重体インドールアルカロイドであるが、植物体中の含量が低いことや、全化学合成が困難であることから非常に高価であり、植物組織培養による大量供給が期待されている代表的な物質である。しかし多くの研究にもかかわらず、これまで抗腫瘍性アルカロイドが培養細胞から検出されたという報告はない。この理由としては、培養細胞中では vinblastene の生合成能が低く抑えられているために生産量は極めて少なく、物理化学的方法では検出し得なかったということが考えられる。

そこでまず、vinblastine の生理活性に基づいた高感度定量法を確立するために、このアルカロイドの主作用である分裂中期阻害作用 (antimitotic effect) を指標としたバイオアッセイ法の開発を行った。その結果、vinblastine を 1-10ng/ml の範囲で定量できる高感度のバイオアッセイ法が確立された。この方法を用いて種々の植物ホルモン条件で誘導したカルス培養株の抗腫瘍活性を調べたところ、ナフタレン酢酸 1.0mg/l とカイネチン 0.1mg/l を添加した条件で誘導し継代培養した株において、高い抗腫

癌活性が認められた。さらに、TLCによって得たこの株の抽出物のvinblastineに相当する分画においても、同様の活性が認められた。

そこで、上記のホルモン条件で大量にカルスを誘導し、そのアルカロイド粗抽出物からのvinblastineの単離およびその同定を試みた。その結果、最終精製物のHPLC分析及び質量分析によってvinblastineの存在が確認された。これらの結果は、ニチニチソウのカルス培養株においてvinblastineが生産されていることを証明するものであり、組織培養においては抗腫瘍性アルカロイドは生産されないと定説を覆す重要な知見である。しかし、ここで用いたカルス中のvinblastine含量は、植物体と比較すると非常に低い値であった。

そこで次に、植物の二次代謝に大きな影響を与えることが知られている植物ホルモンの中から、代表的なオーキシンとサイトカイン各三種類を各々組合せた60の条件でカルス培養株を誘導し、高いvinblastine生産性を有する株のスクリーニングを行った。Vinblastineの定量は、バイオアッセイ法に代えラジオイムノアッセイ法を開発しこれを用いて行った。その結果、植物ホルモン条件によってカルス培養株のvinblastine含量に大きな差が認められ、誘導初期にはかなり高い含量を示す株もあった。しかし全体としては、比較的含量の高い株は増殖能が低く、増殖能が高い株では含量が低いという、vinblastineの安定生産をめざすためには極めて不利な現象が認められた。さらに高含量を示した株も継代培養を繰り返す毎に含量は徐々に低下し、誘導後約半年でほとんどの株で検出限界以下となった。以上カルス培養株においては、vinblastineは生産されるものの、その含量は極めて低くまた不安定であることが認められた。

次に、vinblastine及びその生合成系の中間体である vindoline と catharanthine が、植物体の葉部に多く含有されていることに着目し、多数の茎葉器官 (shoot) を有する茎葉器官培養株の獲得を試みた。その結果、ベンジルアデニン  $1.0\text{mg}/1$  存在下で、幼芽から多数の茎葉器官が高頻度に誘導された。これらの株は、同一条件下で形態的に再現良く継代培養することが可能であり、約 2 年間安定に維持された。また、茎葉器官からインドール酢酸を用いて根を誘導した器官を直接鉢植えすることにより、容易に植物体まで再生することができた。

そこで、上記の茎葉器官培養株からのインドールアルカロイドの単離及びその同定を試みたところ、vinblastine 及び vindoline, catharanthine, ajmalicine の存在が確認された。

最後に、上記のアルカロイドの茎葉器官培養における生産性について検討したところ、vinblastine についてはカルス培養株をはるかに上回り、親植物の  $1/30$  から  $1/10$  の含量が得られた。また、vindoline については親植物と同等、catharanthine については数倍高い含量が得られた。さらに、これらのアルカロイドの生産能は、継代培養によって安定に維持されることも確認された。植物ホルモンの影響については、培地中のベンジルアデニン濃度を  $1.0\text{mg}/1$  から  $0.1\text{mg}/1$  または無添加条件に下げるによって、Vinblastine 及び vindoline, catharanthine の含量が有意に上昇した。この場合、既存の茎葉の形態的な分化が促進されることから、アルカロイドの生産は、形態的な分化と密接な関連性を有すると考えられる。以上の検討から、茎葉器官培養は、vinblastine, vindoline, catharanthine の優れた生産系であることが明らかとなった。

## 論文の審査結果の要旨

ニチニチソウはビンプラスチン (V L B) 及びビンクリスチン等の抗腫瘍性アルカロイドの他、多くの生理活性アルカロイドを含むことが知られているが、本研究においてはニチニチソウの組織培養によってV L Bを中心としたそれらのインドールアルカロイドの生産について研究されている。先ず微量の抗腫瘍性物質の定量を可能にするためのHeLa細胞によるバイオアッセイ法確立し、これによってニチニチソウのカルス培養株に抗腫瘍性物質の存在することをつきとめ、さらにそのカルスよりH P L C及び質量分析によりV L Bを分離、固定した。しかしカルス培養によってはV L Bの安定生産が無理なことが明らかになったので、茎葉器官培養を行い、カルス培養によるよりはるかに高いV L Bの生産を得たさらにその茎葉器官培養に対する植物ホルモンの影響を調べ、V L B及びその生合成中間体ビンドリン、カサラントンの高濃度、安定生産条件を求めた。

以上の成果により本論文は十分博士論文に値することが認められた。