

植物の分化組織および器官培養用培養装置開発と その二次代謝物生産への利用

秋田 求^{1*}, 三輪敬之², 今泉 清²,
浦林竜太², 高山真策^{1**}

要 旨

植物の分化した組織および器官を培養するための装置を開発し、*Atropa belladonna* (ベラドンナ) の不定根培養系を用いて、その有用性を確かめた。

この新たに開発された10-L容の培養装置内では、ベラドンナ根は集塊を形成することなく良好に増殖した。一般的な通気型培養槽で培養した場合と比較し、この培養装置を用いた場合には、培養開始後72日目で、根量については約1.5倍、アルカロイド含量については約2倍に増大させることができた。

緒 言

医薬品、化粧品、色素、農薬などに利用される有用物質を生合成する植物は多い。しかし、これらの植物における有用物質生産性は一般に低くかつ不安定である。そこで、植物組織培養技術を利用してこれら有用な二次代謝物を大量に生産するための研究が盛んに行われている。

ある種の代謝物については、脱分化細胞の中から高生産株を選抜することが可能なので、そのような培養系を利用して大量生産できることが知られている¹⁾¹⁰⁾。一方で、トロパンアルカロイドやモルフィネアルカロイドなど重要な二次代謝物質の中には、脱分化状態では微量にしか生産されないか、全く生産されないものがある³⁾⁴⁾⁵⁾⁷⁾。そこで、そのような脱分化状態では生産されないような物質を生産するために、器官や組織を分化した状態のまま大量培養する技術が必要と考えられている⁶⁾。

分化組織や器官は一般に脱分化細胞よりも大きく、しかも、物理的ストレスに敏感なので、機械的攪拌による悪影響を受けやすい。植物組織や器官は、微生物よりも呼吸活性が低いので、高速度での攪拌は必要ないが、一方で、これらの培養物は、培養中にたがいに絡まりあって集塊を形成しやすい。そのため、培養槽内の一部に偏って分布しやすいうえ、いったん集

1. PCCテクノロジー筑波研究所

2. 早稲田大学理工学部機械工学科

現在 * 近畿大学生物理工学部生物工学科

** 東海大学開発工学部

塊が形成されると、集塊内部への基質の供給が著しく阻害されやすい。基質供給の阻害は、生育や代謝物生産性を著しく低下させると考えられ、さらに、集塊内部が枯死するに至ることもある。また、大型培養槽で培養する場合には、培養槽間の移送操作が必要となるが、集塊の形成は、その妨げとなる。そこで、培養物に機械的ストレスを与えずに培地中に均一に分布させる技術を開発することが、工業的に組織や器官の大量培養を行ううえで最も重要な課題の一つと考えられている。

この問題に関して我々は、植物の分化した組織や器官培養用の装置を新たに開発した。この培養装置は、ゆっくりと回転する攪拌翼と邪魔板とを有し、これを用いることにより、集塊形成を防止し培養物を培養液中に均一に分散させることが出来た。この方式の培養装置を利用することで、ベラドンナ不定根の増殖と二次代謝物生産性を高めることに成功した。

実験材料及び方法

1. 植物材料

Atropa belladonna (Solanaceae) の不定根培養系は、葉切片を改変 MS 固形培地 (30 g/l sucrose, 1 mg/l forchlorfenuron, 0.1mg/l NAA および 0.2g/l gelrite を含む) に移植して誘導した。得られた培養系は、200ml の MS 塩類、60g/l sucrose および 0.1mg/l NAA を含む液体培地を入れた 300ml のフラスコに移植し 125rpm で振盪培養して増殖させた。すべての培養物は、25°C、暗条件で培養した。

2. 培養装置

図 1 に培養装置の模式図を示した。この装置の全容量は 10-L である。この装置に取付けた邪魔板と攪拌翼の形状を図 2 に示した。この攪拌翼は、10rpm のように低速で回転させることが出来るようにした。

3. 特性解析法

本培養装置の特性解析は、液体振盪培養し集塊を形成させたベラドンナ根を材料とし、非無菌条件下で行った。根の集塊 (約 200g) を脱イオン水で洗浄したのち、8-L の脱イオン水を入れた培養装置内に入れた。これを 0.1vvm の通気条件下で、15、30、60、120rpm の各速度で攪拌した。攪拌翼の形状や攪拌翼と邪魔板との距離が根の分散に及ぼす影響については、攪拌後に集塊状のまま水中に残存した根の重量を測定することによって評価した。細

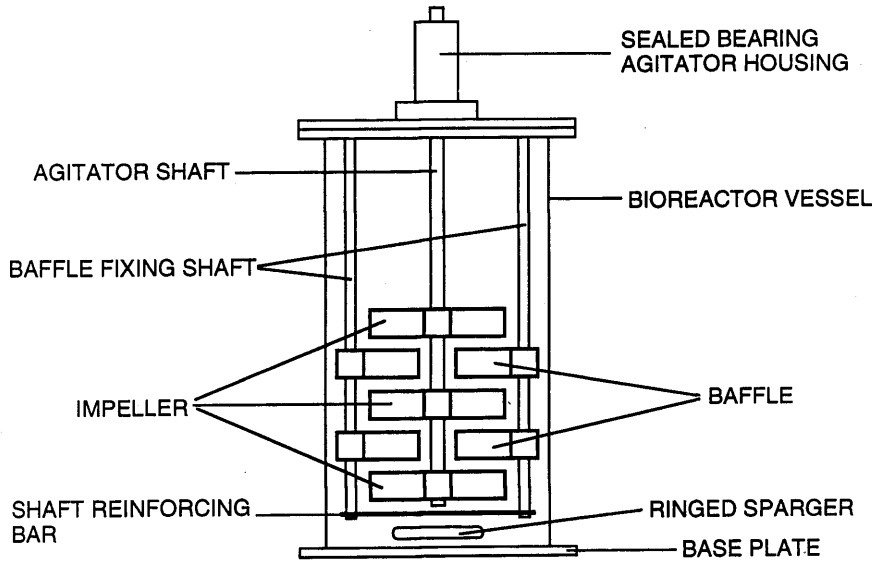


Fig. 1 Diagram of a bioreactor designed for the culture of differentiated plant tissue and organ.

Vessel volume was 10 liter and three impellers and two baffles were settled in a bioreactor. Distance between impeller end and baffle fixing shaft was 15mm.

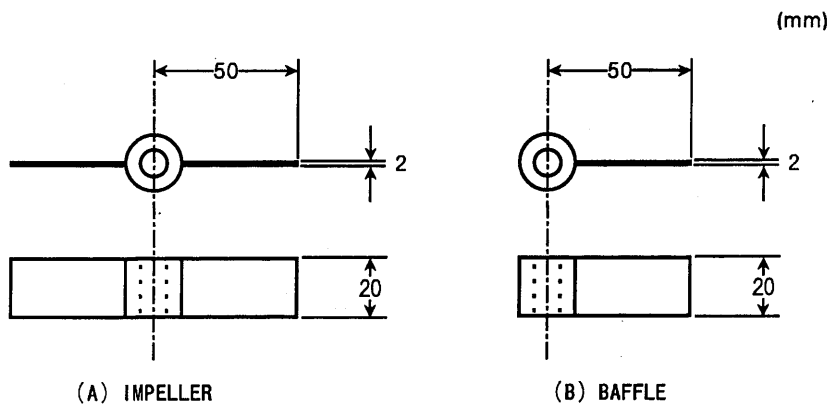


Fig. 2 Diagram of impeller and baffle.

胞の破壊程度は、電気伝導度計 (model SC51、横河北辰電気) を用いて、根を分散させた水の電気伝導度の変化を測定することによって評価した。

4. 不定根培養法

不定根は 8-L の液体 MS 培地 (60g/l sucrose および 0.1mg/l NAA を含む) を用いて

培養した。300ml 容のフラスコを用いてあらかじめ培養した約120g のベラドンナ根（フラスコ4本分）を培養装置に移植した。培養は30°Cで72日間行った。通気量は、42日目まで0.1vvmとし、以降は0.2vvmとした。培養期間中、攪拌翼を3日毎に40分間、30rpmで回転させた。邪魔板や攪拌翼のない通気型培養槽を対照として用いた。実験は3連で行った。

5. 培地分析法

培地中の糖濃度とアンモニウムイオン濃度は、HPLCで定量した。糖の定量にはNH₂タイプのカラム（Lichrosorb NH₂、Merck）を用い、示差屈折計（ERIC-7510、Erma）で検出した。アンモニウムイオンの定量には、カチオン分離カラム（IC-PAK、Waters）を用い、検出には電気伝導度計（Model 430、Waters）を用いた。測定は2連で行った。

6. 呼吸活性測定法

根の呼吸活性は、脱イオン水を満たした3ml容のガラス製の容器に根を入れた際の溶存酸素消費速度を利用して求めた。測定にはポーラログラフタイプの電極を使用した。大気中の酸素で飽和させた脱イオン水を容器にいれ、約0.2gの根を入れた直後から数分間にわたって溶存酸素濃度の変化を測定した。

7. アルカロイドとスコポレチンの定量法

約10gの根を100mlの50%エタノールに入れ、ポリトロン（LS10-35、Kinematica）を用いて破碎し、ろ過した。塩酸を用いてろ液のpHを3.5に合わせたのち、100mlのクロロホルムで3回洗い、その水相を集めた。これにアンモニア（28%）を加えてpHを9.5とし、100mlのクロロホルムで3回抽出しクロロホルム相を集めた。このクロロホルム相を合わせて、脱水後、濃縮乾固し再溶解してHPLCまたはTLCによって定量した。HPLCによる分析は、分離カラムとして逆相カラム（M&S Pack C₁₈、M&S Instruments）を用い、UV検出器（測定波長220nm、SPD-2A、島津）を用いて検出した。TLCによる分析には、TLCプレートとしてシリカゲルプレート（Kieselgel 60F₂₅₄、Merck）を用い、展開溶媒としてCHCl₃:EtOH:NH₄OH = 85:14:1を用いた。アルカロイドは、Dragendorff試薬で発色させたのち、TLCスキャナー（CS-920、島津）で定量した。

スコポレチン含量は、蛍光分光光度計（FP-770、日本分光）を用いて測定した。約1gの根を10mlの水にいれ、ポリトロンで破碎した後、遠心分離し、その上清を適宜希釈し、E_x=

350nm, $E_m=450\text{nm}$ の条件で測定した。

結果および考察

1. 培養装置特性

図3に、本培養装置内に集塊状のベラドンナ根を入れ、異なった速度で攪拌した際にも分散されずに液中に残存した根集塊重量の経時変化を示した。

予備実験の結果、攪拌翼と邪魔板間の距離は、集塊状となった根をほぐし、分散させる性能に影響し、最適距離は10mmと考えられることがわかった。攪拌速度も性能に大きく影響した。図3に示すように、40分間の攪拌でも、15% (120rpm) から30% (15rpm) の根が分散されずに集塊状となって残っていた。しかし、残存した集塊の大きさは、低速で攪拌した場合であっても、液中に均一に分散できる程度に十分に小さいものであった(図4)。

図5には、各々の速度で40分間攪拌した後に液中に分散された根の長さの分布を示した。より高速での攪拌は、短い根の割合を増加させたが、基本的に30rpm から60rpm での攪拌では根長の分布には大きな差は認められなかった。

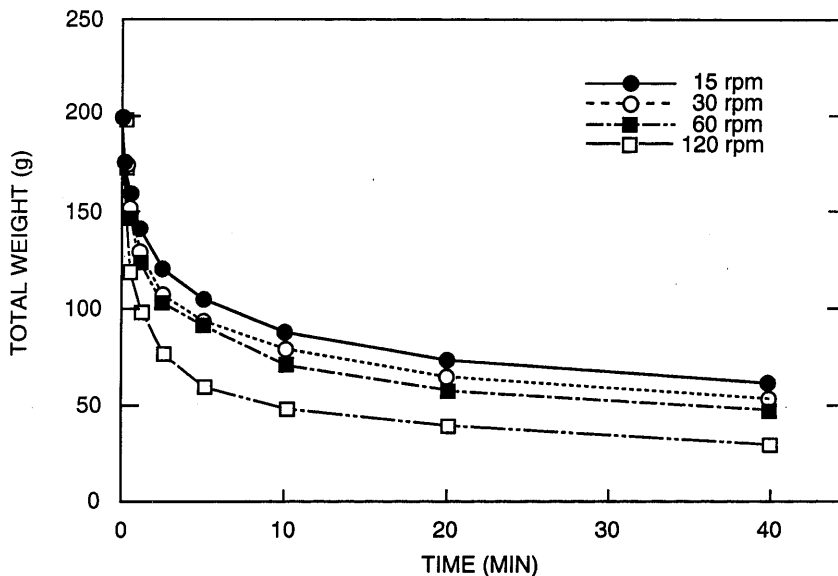


Fig. 3 Time course of the disentangling of root aggregates in the newly designed bioreactor.

Fresh weight of root aggregates remained in a bioreactor was measured.

About 200g of aggregated roots derived from liquid shaken culture was added in 8 liter of deionized water and the bioreactor was operated.

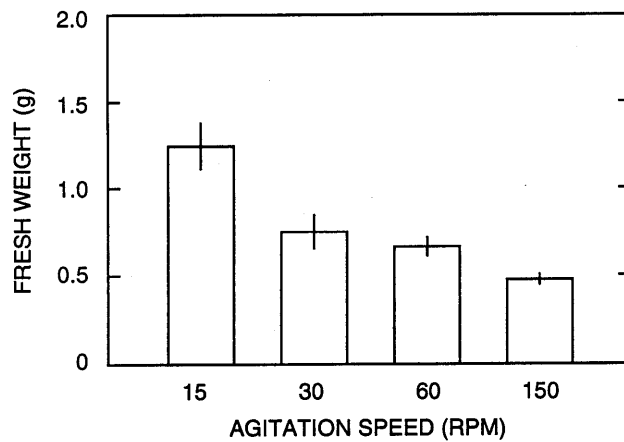


Fig. 4 Effect of agitation speed on mean weight of aggregates remained in deionized water.

About 200g of aggregated roots derived from liquid shaken culture were agitated and dispersed for 40min and the fresh weight of root aggregates remained in the bioreactor was measured. Bars represent mean \pm SE.

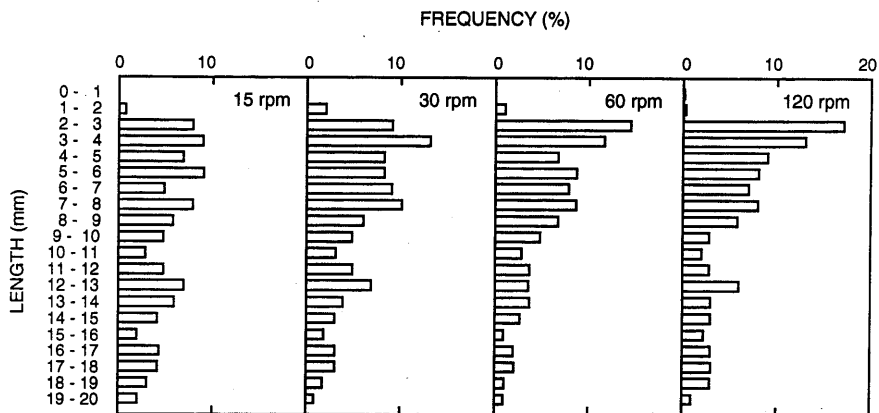


Fig. 5 Distribution of disentangled root length in the bioreactor under various speed of agitation for 40 min.

また、攪拌が細胞に与える機械的なストレスの程度を推定するため、細胞内容物の漏出の程度を水の電気伝導度によって測定した。図6に、水中で完全に破碎した根の重量と、その水の電気伝導度との関係を示したが、両者がよい比例関係にあることがわかる。そこで、本培養装置において同様に電気伝導度の変化を測定したところ、30rpm以下の攪拌速度ではほとんど差が現れないのかかわらず、60rpm以上で攪拌すると、明らかに電気伝導度が

高くなることがわかった。

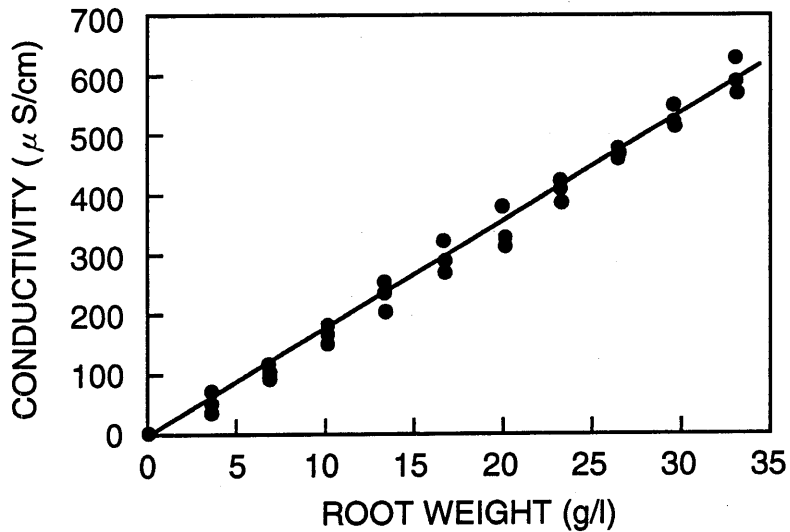


Fig. 6 Relationship between electric conductivity of the root homogenates and amount of root homogenized in a settled volume of water.

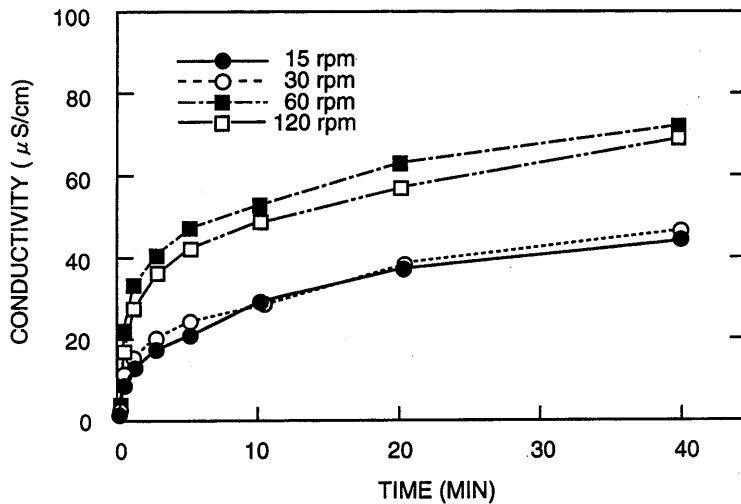


Fig. 7 Effect of agitation speed on cell destruction expressed by increase of electric conductivity of water in a bioreactor.

About 200g of aggregated roots derived from liquid shaken culture were agitated and dispersed.

以上の結果から、この10-L容の新規の培養装置の運転条件を、以下のように決定することができた。すなわち、攪拌翼と邪魔板間の距離を10mmとし、攪拌翼を30rpmで40分間、

3日おきに回転させた場合、最も効率良くかつ細胞に機械的損傷を与えないで根を分散させることができるものと考えられた。

2. 根の生育

ベラドンナ根は、本培養装置内で、集塊を形成せず培養液中によく分散した状態で培養された。10週間の培養期間内にも集塊の形成は認められなかった。培養開始後8週目には、培養液容量の90% (PCV) を根が占めるに至った。

一方、対照区では、培養初期から集塊の形成が認められた。培養が進行するにつれて集塊は大きくなり、培養終了時には直径100mm以上に達していた。培養槽内は、根の集塊が形成された部分と根が全く存在しない部分とに分かれた。すなわち、培養槽内の一部しか培養に利用されなかった。集塊の内部には褐変し枯死した部分が観察された。

図8および図9には、培地中の残存糖濃度およびアンモニウムイオン濃度の経時変化を示した。なお、全糖量は、別々に測定したシュクロース、グルコース、フルクトースの量を合計して求めた。これらの糖は植物細胞に効率良く利用され、その消費量は細胞の生育や代謝と強く関係している。新規に開発した培養装置では、培養終了時までに初発の糖量の約50%が消費されていた。これに対して、対照区では、その2/3が培地中に残存していた。アンモニウムイオンは、新規培養装置では、培養終了時にはほとんど消失していたが、対照区では、20日目以降、その消費速度が低下し、培養終了時にも1/3の量が消費されずに残存していた。以上の結果は、根によるこれら主要養分の利用が、集塊の形成によって阻害されており、ひいては、生育や種々の代謝活性も低下しているということを示唆している。実際に、対照区に比べて本培養装置では根の生育が1.5倍に増大していた(表1)。酸素消費速度を比較してみると、対照区においても、集塊の表面に分布した根では、新規に開発した培養装置を利用した場合とあまり変わらない値を示した。しかし、集塊内部の根では著しく呼吸活性が低いため、培養槽全体として考えれば、この新規培養装置を用いた場合には明らかに酸素消費速度が高くなるものと予想された。

3. 二次代謝物生産

トロパンアルカロイド (hyoscyamine、scopolamine) および scopoletin の含量を表2に示した。本培養装置を用いて培養した根では、対照区に比べ、含量がトロパンアルカロイドで約2倍、scopoletinで約1.5倍高かった。ただし、この対照区の値は集塊表面に分布し

た根について調べたものである。集塊内部に存在した根では、これらのトロパンアルカロイドは検出できず、scopoletin についても、集塊表面に存在した根の50%の含量で含まれているにすぎなかった。これらのアルカロイドや scopoletin の培養槽あたり生産量について

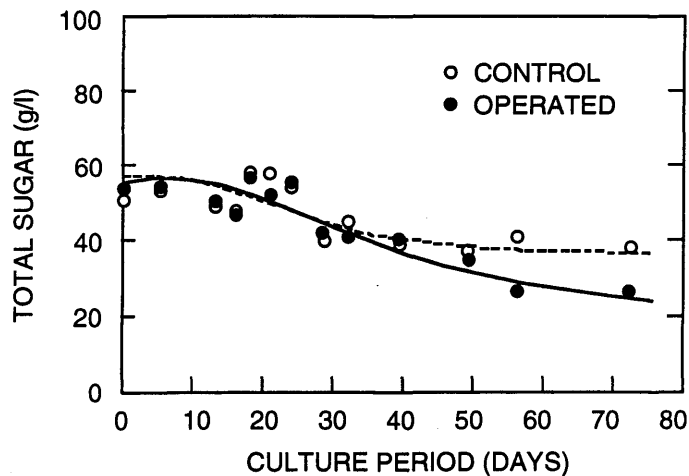


Fig. 8 Time course of total sugars in the culture medium during culture in a bioreactor.

Control is the values in a simple airlift bioreactor.

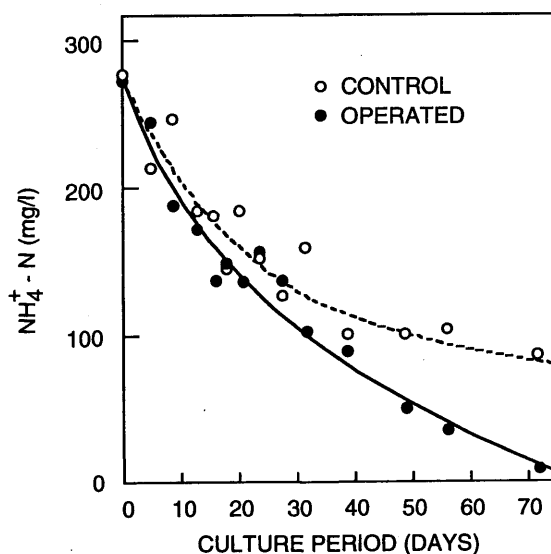


Fig. 9 Time course of NH_4^+ -N concentration in the culture medium in a bioreactor.

Control is the values in a simple airlift bioreactor.

Table 1. Effect of culture methods on growth and oxygen consumption activity of *A. belladonna* roots.

	TOTAL WEIGHT (FW g)	DW / FW (%)	O ₂ CONSUMPTION ACTIVITY (mg-O ₂ /DW g/hr)
CONTROL	802.5	6.38 (0.69)	5.44
OPERATED	1245.0	6.53	3.90

() : INNER AREA OF AGGREGATES

Table 2. Effect of the bioreactor types on the production of secondary metabolites.

	HYOSCYAMINE (μg/DW g)	SCOPOLAMINE (μg/DW g)	SCOPOLETIN (μg/DW g)
CONTROL	43.89 (ND)	97.96 (ND)	239.7 (108.5)
OPERATED	113.3	197.6	398.6

ND : NOT DETECTABLE

() : INNER AREA OF AGGREGATES

は測定しなかったが、この新規培養装置を用いて培養した場合には、明らかに生育が促進されることと、培養されたいずれの根にも均一にこれらの二次代謝物が含まれていることから、対照区に比べて少なくとも数倍高い生産性が期待できるものと考えられる。

総 括

我々が新規に開発した培養装置を利用することによって、ベラドンナ根の生育と、この植物に含まれる二次代謝物の生産性が高まることがわかった。この培養装置は、植物の様々な分化組織、特に不定根や毛状根の培養に利用できるものと考えられる^{8) 9)}。この培養装置の利点は、培養中の集塊形成を防止し、培養物を培養液中に均一に分散させることによって、生育や二次代謝物生産に必要な養分や酸素を十分に供給できることにある。

近年、いくつかの研究グループが毛状根培養に適した培養装置を提案しているが²⁾、それらの培養装置はいずれも複雑な構造を有している。これに対し、我々がここに報告した培養装置は簡単な構造をしており、スケールアップも容易である。また、既存の培養槽にわずか

な改良を加えるだけでよいという利点がある。

一方、多芽体など他の分化した器官の大量培養でも同様に集塊の形成が問題となるものの、本培養装置をそのまま利用することはできないものと考え。それは、これらの植物体の基本的な生育特性、例えば、機械的なストレス下で、切断された植物体切片から植物体が再生する可能性に関する知見などが得られていないためであり、この問題の解決が将来に残された重要な課題の一つと考える。

引用文献

- 1) Curtin, M.E. (1983) Harvesting profitable products from plant tissue culture, *Biotechnology*, **1**, 649-657
- 2) Curtis, W.R. (1993) Cultivation of roots in bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*, **4**, 205-210
- 3) Dhoot, G.K. and G.G. Henshaw (1977) Organization and alkaloid production in tissue cultures of *Hyoscyamus niger*. *Annals of Botany*, **41**, 934-949
- 4) Epapen, S., T.S. Rangan, M.S. Chadha and K.R. Heble (1978) Biosynthetic and cytological studies in tissue cultures and regenerated plants of haploid *Atropa belladonna*. *Canadian Journal of Botany*, **56**, 2781-2784
- 5) Hashimoto, T. and Y. Yamada (1983) Scopolamine production in suspension cultures and redifferentiated roots in *Hyoscyamus niger*. *Planta medica*, **47**, 195-199
- 6) Hashimoto T., Y. Yukimura and Y. Yamada (1986) Tropane alkaloid production in *Hyoscyamus* root culture. *Journal of Plant Physiology*, **124**, 61-75
- 7) Hiraoka, N. and M. Tabata (1974) Alkaloid production by plants regenerated from cultured cells of *Datura innoxia*. *Phytochemistry*, **13**, 1671-1675
- 8) Jung, G. and D. Tepfer (1987) Use of genetic transformation by Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Science*, **50**, 145-151
- 9) Kamada, H., N. Okawa, M. Satake, H. Harada and K. Shimomura (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell*

Reports. 5, 239-242

- 10) Reihard, E., W. Kreis, U. Barthlen and U. Helmbold (1988) Semicontinuous cultivation of *Digitalis lanata* cells : production of β -methyldigoxin in a 300-L airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 502-508