

コガネバナ茎カルスの生長とフラボノイド生成に及ぼす培養期間の影響¹⁾山本久子*, 茶谷展安²⁾, 渡辺久女, 富森 毅
北陸大学薬学部Effects of Culture Periods on the Growth and Flavonoid Formation of
Scutellaria baicalensis Stem Callus Culture¹⁾HISAKO YAMAMOTO, NOBUYASU CHATANI, KUME WATANABE
and TSUYOSHI TOMIMORI

School of Pharmacy, Hokuriku University, Kanagawa-machi, Kanazawa 920-11

(Received May 17, 1985)

Time course changes in the callus growth and flavonoid content in St-20 line derived from *Scutellaria baicalensis* GEORGI stem callus cultures were determined on Linsmaier-Skoog's culture medium containing 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

When 3% sucrose was added to the medium, a logarithmic callus growth phase was observed after the lapse of 20–40 day-cultivation, and stationary and deceleration growth phases after 50–60 day-cultivation. Flavonoid content increased gradually during the stationary and deceleration growth phases and the content of the glucosides, baicalin and wogonin 7-O-glucuronide reached the highest values after 60 day-cultivation.

Among the carbon sources tested, 5% maltose accelerated the rate of growth of St-20 line most effectively. On the 5% maltose-containing medium, a logarithmic growth phase was observed after the lapse of 10 days and a stationary growth phase after 50 day-cultivation. The flavonoid content of St-20 cells, stationary cultured for 70 days in the dark, was found to be increased (baicalin, 16 mg/10 ml medium) by the addition of 5% maltose to the medium.

Brief light irradiation of the cells which had been cultured for 20 days in the dark effectively increased the rate of callus growth and the flavonoid content of the callus.

Keywords—*Scutellaria baicalensis*; Labiatae; IAA; kinetin; flavonoid content; callus growth; culture period; baicalin; baicalein; wogonin 7-O-glucuronide; wogonin

コガネバナ (*Scutellaria baicalensis* GEORGI) の茎カルスの実験株 St-20 におけるカルス生長とフラボノイド生成について、前報では植物生長調節物質の添加効果³⁾ および各種糖類 (1~8%) の添加効果⁴⁾ について検討し報告した。St-20 株の移植片を培養すると、カルス生長とともにフラボノイド含量が培養日数により大きく変動することが観測された。今回は、糖源として 5% D-glucose, 5% maltose, 3~5% sucrose に限定し、カルス生長とフラボノイド生成の経日変化を追跡し、長期培養により、フラボノイド含量がどの程度増加するか、またカルス培養時、カルス増殖のための培養とある程度増殖したカルスにおけるフラボノイドの蓄積の問題および光条件下の培養について検討したので報告する。

実 験 の 部

1. コガネバナ茎カルスの誘導と継代培養

前報^{3,4)}と同様、常法にしたがってカルス誘導し、Linsmaier-Skoog 基礎培地に 3% sucrose および 10^{-6} M IAA, 10^{-5} M kinetin を添加し、暗黒下 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 30日ごとに継代培養を繰り返し、10~19カ月経て安定した St-20 株を実験用移植片とした。一部光条件の培養は 2,500 lux 照射下12時間日長において培養した。

2. カルス生長とフラボノイド含量定量

カルス生長は各実験終了時のカルスの tube 当りの新鮮重量で示した。フラボノイド含量は前報⁴⁾と同様カルス乾

乾燥後約 200 mg の試料を精秤し、50% EtOH および EtOH で各 2 回抽出後内部標準を添加し定量用試料とした。定量は、前報と同様富森ら⁵⁾の高速液体クロマト (HPLC) 法にしたがった。Shimadzu LC-3A を用い逆相 ODS カラム使用。前報⁴⁾と同様 chrysin, baicalein, oroxylin A, wogonin, skull capflavone II, baicalein-glc., baicalin, oroxylin A-glcu A, wogonin glcu A の 9 種のフラボンと dihydrooroxylin A, 5, 7, 2', 6'-tetrahydroxyflavanone の 2 種のフラボノンの計 11 種について定量を行った。

3. Linsmaier-Skoog's 基礎寒天培地でのカルス生長とフラボノイド含量の経日変化実験

Scb-St-20 株 (10 month old) を用いて、Linsmaier-Skoog's basal (RM-1964) 培地に植物生長調節物質として 10^{-6} M IAA と 10^{-5} M kinetin を添加し糖源としては RM-1964 培地に通常用いる 3% sucrose を添加した静地培地に移植し、暗黒下、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で培養し、1 週間ごとにカルス生長測定と 11 種のフラボノイド含量の定量を行い、60 日までそれらを追跡検討した。0 日の数値はこの実験に用いたカルスの培養開始時のフラボノイド含量である。

4. 5% Maltose, 5% D-glucose, 5% sucrose 添加時のカルス生長とフラボノイドパターンの経日変化実験

植物生長調節物質として IAA 10^{-6} M, kinetin 10^{-5} M を添加した RM-1964 基礎培地の糖源である 3% sucrose の代わりに、それぞれ 5% maltose, 5% D-glucose, 5% sucrose を添加した培地でカルス生長とフラボノイド生成過程を検討した。19 月継代培養を繰り返した St-20 株を移植し、各実験培地に移植時を 0 日と数え 70 日間 10 日ごとにカルスの生長測定とフラボノイド含量を定量した。

5. 5% Maltose, 5% D-sucrose 添加時における光照射日数のカルス生長とフラボノイド生成における効果実験

(1) 短期培養における光照射実験

St-20 株を IAA 10^{-6} M と kinetin 10^{-5} M 濃度を添加した新しい RM-1964 寒天培地に 35 ± 5 mg のカルスを移植した。暗黒下、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ で 20 日間培養したカルスを光照射下培養に移した日を 0 日とし、1 日～5 日間までの短期間光照射すなわち、2,500 lux, 12 時間日長下培養を繰り返した後、カルス生長およびフラボノイド含量を測定した。

(2) 長期培養における光照射実験

RM-1964 基礎培地に 5% maltose, IAA 10^{-6} M, kinetin 10^{-5} M を添加して一定日数暗黒下培養後、明所 (2,500 lux) と暗所 12 hr ごとの条件下でそれぞれ 5～40 日培養後、カルス生長とフラボノイド含量を測定した。

結 果

1. 基礎培地 (3% sucrose) でのカルス生長とフラボノイド生成の経日変化

Fig. 1 (左) に示すように、コガネバナ茎カルス St-20 株の増殖率はよく、約 10 日間で培地に慣れ、その後 10～40

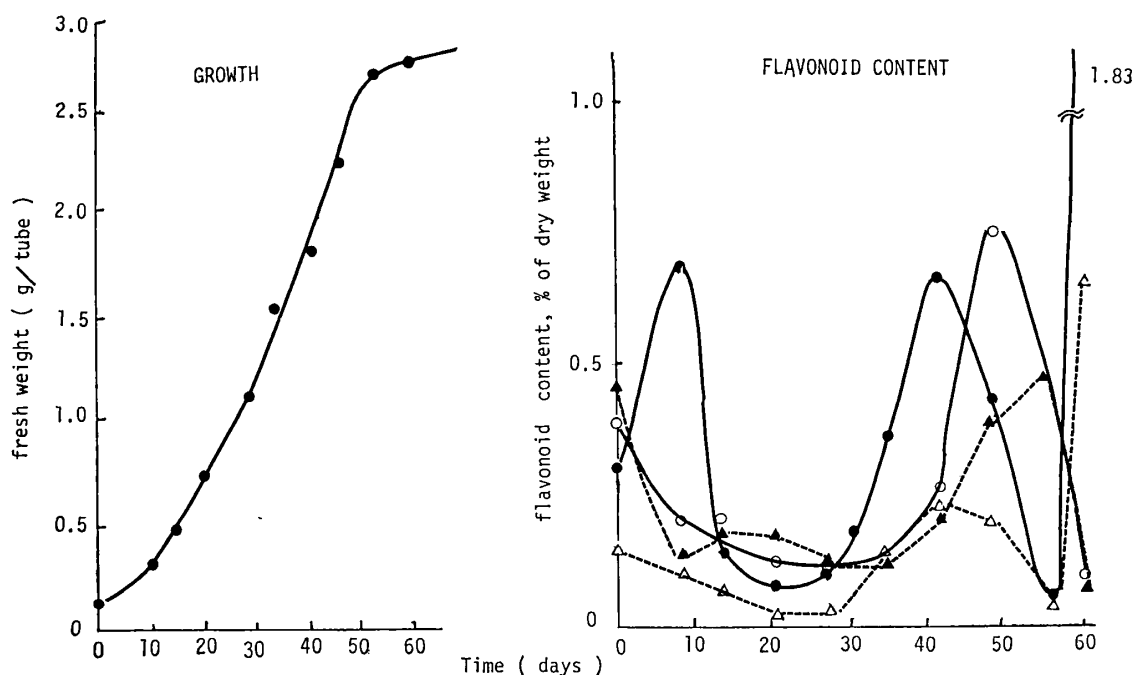


Fig. 1. Time Course of Growth and Flavonoid Content in *Scutellaria baicalensis* Callus Culture (St-20, 10 month old)

RM-1964 basal medium, 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin. Static culture in the dark at $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

● baicalin, ○ baicalein, △ wogonin-7-O-glcu A, ▲ wogonin

TABLE I. Flavonoid Content (% of dry wt.) of *Scutellaria baicalensis* Callus Culture (St-20, 10 month old)

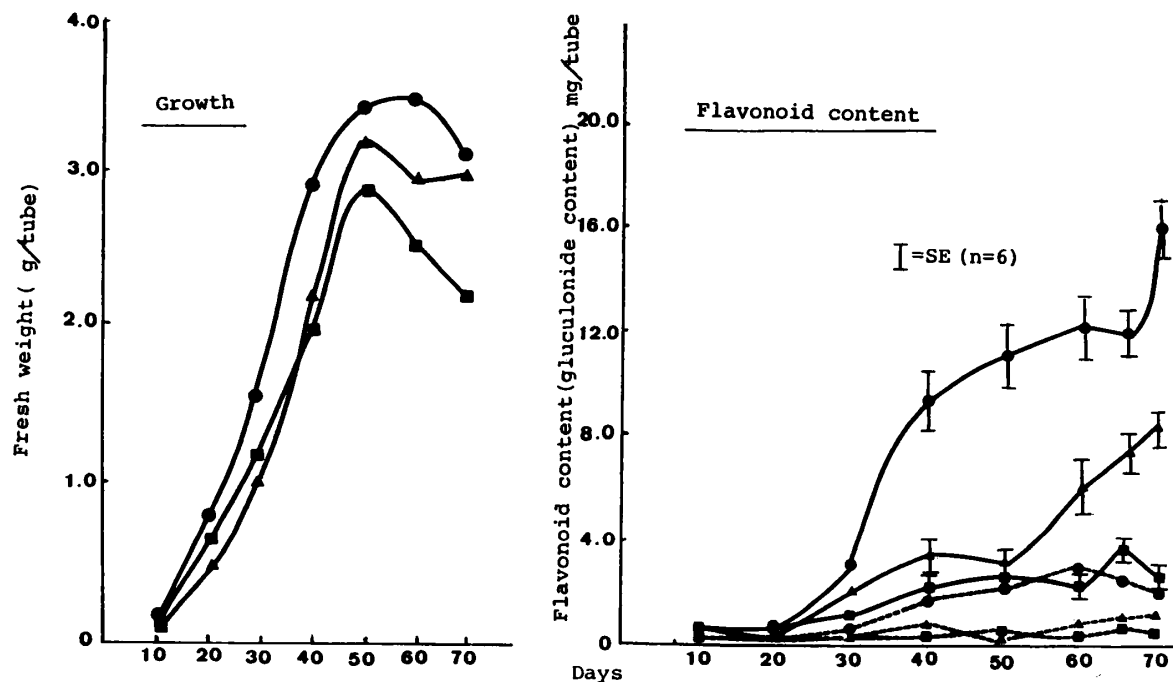
Flavonoid	Culture period (days)									
	0	9	13	20	27	34	41	48	55	60
Baicalin	0.26	0.68	0.14	0.07	0.08	0.33	0.67	0.42	0.04	1.83
Oroxylin-A-glucuronide	0.09	0.03	0.05	0.02	0.03	0.09	0.17	0.15	0.03	0.37
Wogonin-7-O-glucuronide	0.14	0.25	0.07	0.02	0.03	0.14	0.22	0.19	0.01	0.67
Baicalein	0.39	0.21	0.21	0.12	0.11	0.12	0.26	0.75	0.54	0.09
Skullcupflavone II	0.01	—	—	—	—	0.003	0.02	0.01	0.03	0.02
Wogonin	0.47	0.12	0.17	0.16	0.12	0.12	0.20	0.39	0.45	0.05
Chrysin	0.11	0.02	0.04	0.04	0.03	0.03	0.29	0.08	0.12	0.15

RM-1964 basal medium, 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

Static culture in the dark at 25°C.

日間の対数増殖期を示して著しく増殖し、50～60日以後ではカルス増殖は静止期に入った。このときのカルスのフラボノイド含量を経日的に観察すると対数増殖期と考えられる10～40日間は、Fig. 1 (右) に示すように baicalin を除く各種フラボノイド含量がいずれも低い値を示した。各種フラボノイドの含量は生長の増殖減速期に徐々に増加し、それぞれ高いピークを示した。40日目で配糖体である baicalin, wogonin-7-O-glucuronide が最高値を示し、少し遅れて50～55日でアグリコンである baicalein, wogonin が高い値を示す。このとき、配糖体の著しい減少が認められ、60日では逆に配糖体が著しい増加傾向を示し、反対に、アグリコン含量はいずれも減少傾向を示した。

その他のフラボノイド含量は TABLE I に示すように、baicalin, oroxylin A-glcu A, wogonin-glcu A はほぼ同じ変動傾向を示し、skullcupflavone II は培養初期にはその存在は認められないが、34～40日目以後は徐々にその含量の増加が認められた。また oroxylin A, baicalein-glc., dihydrooroxylin A, 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavanone は認められなかった。黄芩に比べると、カルスには chrysin を多く含有することが特徴的である。

Fig. 2. Effects of Carbon Sources on Callus Growth and Flavonoid Content in *Scutellaria baicalensis* Callus Culture (St-20, 19 month old)RM-1964 basal medium minus sucrose plus 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin. Static culture in the dark at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 70 days.

● 5% maltose, ▲ 5% D-glucose, ■ 5% sucrose, — baicalin, --- wogonin 7-O-glcu A

2. 5% 糖添加時のカルス生長とフラボノイド含量の経日変化

RM-1964 基礎培地中の糖源として, 3% sucrose の代りにそれぞれ 5% D-glucose, 5% maltose, 5% sucrose と IAA 10^{-6} M, kinetin 10^{-5} M を基礎培地に添加し, それぞれ10日ごとにカルスの生長とフラボノイド含量を定量した. Fig. 2 (左) に示すようにカルス生長においては maltose>D-glucose \geq sucrose の順に生長がよく, ほぼ同傾向の生長曲線を示した. Fig. 1 と同様に, 対数増殖期にはいる前の期間が短く, 10日目から対数増殖期に入り, 50日目には静止期に入った. また Fig. 2 (右) に示すように, 5% maltose 添加における baicalin 含量は, カルス生長に少し遅れて20日目から徐々に増加し, 70日目には 16 mg/tube と高含量を示した. 5% D-glucose 添加における baicalin の含量は maltose 添加時の約 1/2 の含量を示した. 5% sucrose 添加における baicalin 含量は低く, 経日的に著しい変化は認められなかった. wogonin-7-O-gluc A 含量は, 5% maltose 添加でのみ多少の増加を認めたが, sucrose, D-glucose 添加では, いずれも培養期間の影響をほとんど認めなかった.

TABLE II では 5% D-glucose, 5% maltose, 5% sucrose添加時の70日間の実験結果を10日ごとに集約したもので

TABLE II. Change in Flavonoid Contents of *Scutellaria baicalensis* Callus Culture (St-20, 17 month old)

Flavonoid	Carbon source	Days						
		0	20	40	50	60	65	70
Baicalein-glc.	M	—	—	0.10	0.23	0.28	0.23	0.44
	G		—	0.04	0.05	0.06	0.07	0.15
	S		—	0.01	0.03	±	±	±
Baicalin	M	1.87	0.18	9.42	10.90	12.80	12.00	16.1
	G		0.23	3.64	3.12	6.16	7.20	8.46
	S		0.73	2.38	2.77	2.20	3.90	2.65
OroxylinA-glcu A	M	—	—	0.15	0.19	0.19	0.23	0.31
	G		—	—	0.05	0.08	0.10	0.11
	S		—	—	—	0.04	0.05	0.06
Wogonin-glcu A	M	0.32	0.17	1.99	2.37	3.00	2.71	2.10
	G		0.04	0.47	0.22	0.87	1.03	1.03
	S		0.15	0.49	0.54	0.59	0.87	0.68
5, 7, 2', 6'-tetra-hydroxyflavanone	M	0.24	—	0.22	—	—	—	—
	G		—	—	0.01	—	—	—
	S		—	—	0.03	0.22	—	—
Baicalein	M	0.54	—	0.22	0.02	0.14	0.05	—
	G		—	—	—	—	—	—
	S		—	0.13	0.10	0.35	0.35	0.54
Skullcupflavone II	M	0.25	—	0.25	—	—	—	—
	G		—	—	0.01	—	—	0.01
	S		—	—	—	—	—	—
Wogonin	M	0.46	—	—	0.08	0.06	0.03	—
	G		—	—	0.03	—	—	0.01
	S		0.01	0.02	0.05	0.10	0.05	0.06
Chrysin	M	0.03	—	—	—	—	—	—
	G		—	—	—	—	—	—
	S		—	0.01	—	0.03	0.02	—

RM-1964 medium minus sucrose plus 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

Static culture in the dark at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 70 days.

M: 5% maltose, G: 5% glucose, S: 5% sucrose.

^{a)} flavonoid content, mg/tube (10 ml medium).

ある。全体的にアグリコン 5,7,2',6'-tetrahydroxyflavanone, baicalein, skullcupflavone II, wogonin, chrysin の含量は低くなっている。また、5% sucrose 添加時は baicalin が D-glucose, maltose添加時のそれに比べて低含量を示し、アグリコンである baicalein, wogonin は相対的に高い含量を示し40日目付近で baicalein, wogonin 等が検出されたが、oroxylin A, dihydrooroxylin A は認められなかった。3% sucrose 添加時のフラボノイド含量変化に比べ、5% maltose は高含量を示し、30日目頃より急速に baicalin 含量の増加を示し 16 mg/10 ml 培地となった。また、5% maltose 添加で培養したカルスの wogonin-7-O-gluc A 含量についてその経時変化を観察するとこれは 5% sucrose の baicalin 含量とほぼ同程度の変化曲線を示した。

3. カルス培養時の光 (2,500 lux) 条件下および暗黒下培養のカルス生長およびフラボノイド生成に対する培養日数の影響

Chart 1 に示すように RM-1964 基礎培地に sucrose の代りに 5% maltose を添加し、 10^{-6} M IAA, 10^{-5} M kinetin を添加して 10, 20, 30日などの一定日数暗黒下培養後、明所でそれぞれ 5～40日培養し、カルス生長とフラボノイド含量を定量した。カルス生長は暗所培養期間が、50日、60日などいずれも長い期間のほうが良好な結果を示した。40日間暗黒下培養後 5～20日間明所培養したものは、光照射の日数が増えるにつれてフラボノイド含量 (おもに baicalin 含量) の増加が認められた。一方、暗黒下で 50, 60日等の長期培養の結果は、5% maltose で 10.9～12.8 mg/tube (medium 10 ml) の baicalin 含量を認め、wogonin-glcu A も多く認められた。また、5% sucrose 添加による60日間の培養においては明所での培養のほうが、暗所での培養よりも baicalin 含量が高くなっている。したがってフラボノイド生成に対する光効果は糖の種類と濃度により微妙に影響されることが明らかとなった。

Chart 1 に示すように、20～30日間暗黒下で培養したカルスを光条件に移すと毎日少しずつカルスが可視的に黄色を呈することがわかった。そこで20日間暗黒下培養後、半数はそのまま 1日ごとに暗黒下培養のものを収穫し、半数は20日目より光条件下で培養した St-20 株を 1, 2, 3, 4, 5日間連続して収穫し、そのフラボノイド含量の変化を調べた (Fig. 3)。

この場合 baicalin 含量は当初 12 hr 光条件にさらすとき、やや含量が増加する。これをみると、光所培養 1日目のカルス組織の baicalin 含量が乾燥重当たり 0.48% と急上昇し、明らかに暗所より高くなっている。光照射時間が長くなるにつれ、光条件下の組織では 2～3日目でクロロフィル形成が開始される。wogonin-glcu A は暗明の逆転はあるものの含量が 0.1% 程度で大きな変動は認められない。5日間の培養過程で観察すると、明所に移した 1日目ですでに baicalin, wogonin-glcu A とともに同様のパターンでやや促進される傾向を示すが 5日後ではいずれのフラボ

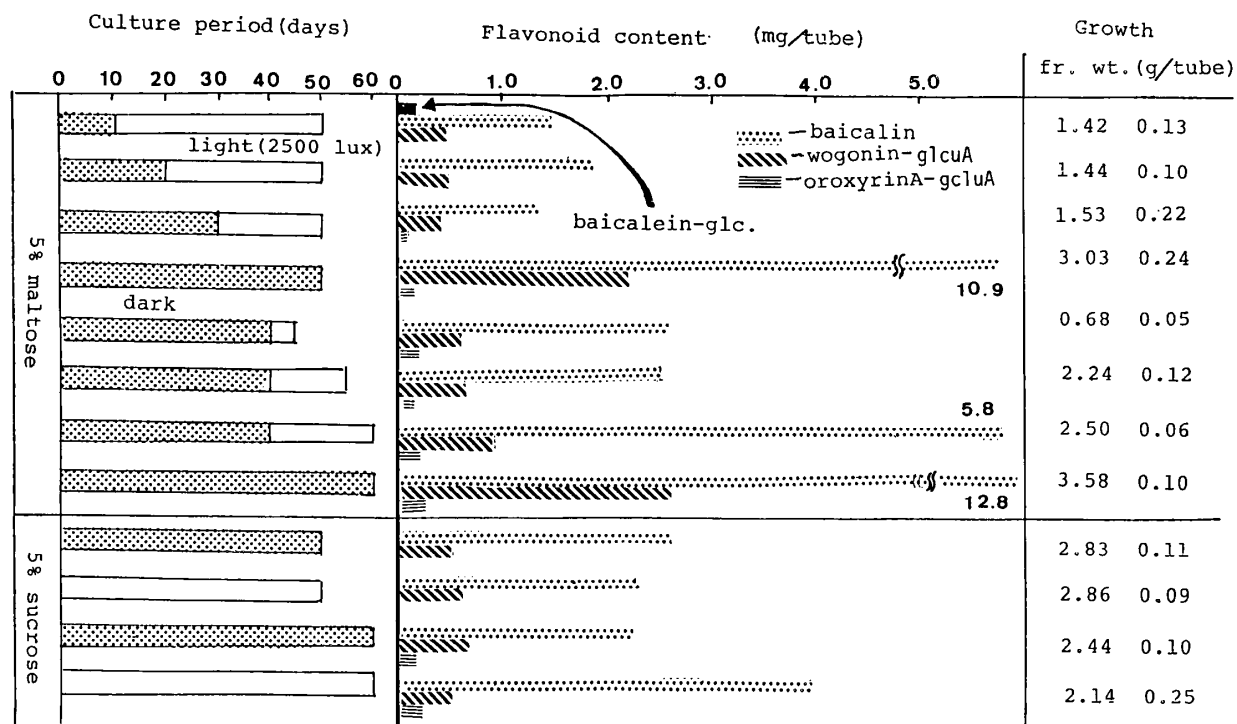


Chart 1. Relationship between Time of Dark or Light and Flavonoid Formation in *Scutellaria baicalensis* callus culture (St-20, 17 month old) RM-1964 (minus sucrose) medium with 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

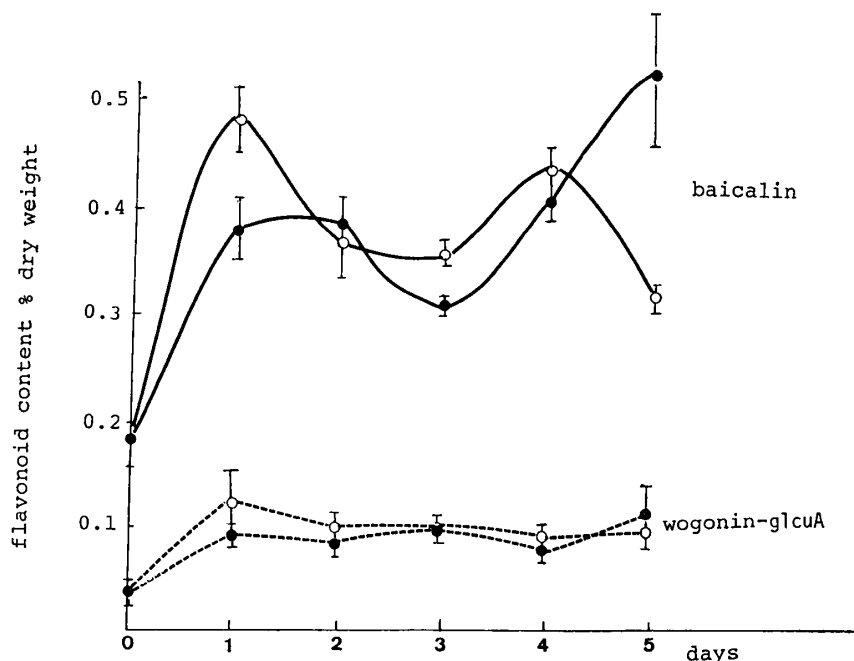


Fig. 3. Time Course of the Baicalin and Wogonin-glcuA Content of *Scutellaria baicalensis* Callus Culture (St-20, 25 month old)

RM-1964 basal medium, 10^{-6} M IAA and 10^{-5} M kinetin.

○ light, ● dark

ノイドも暗黒下のほうが含量が高くなっている。この点は、明所でクロロフィル形成が開始するためと推察し、目下検討中である。

考 察

タバコカサの scopoletin 含量は、培地に添加される IAA, NAA の濃度が高くなれば増加するが、2,4-D では影響されない。また kinetin を添加すると IAA による scopoletin の細胞外への放出を防ぎ、IAA が高濃度に存在しても scopolin (scopoletin の配糖体) が多量に保持されると Skoog ら⁶⁾ は報告している。また、kinetin と auxin の相対濃度比が、カルス細胞内の scopolin と scopoletin の平衡関係やそれらの細胞内への移行をも調節していると述べている。また通常オウレン⁷⁾ 等はカルス生長や二次代謝産物の出現はコガネバナカルスに比べておそく移植後 3 週間を必要とする。

今回の検討によれば、kinetin の添加がフラボノイドを 70 日間にわたって細胞外に放出せず細胞内に蓄積したものと考えられる。5% maltose の添加の場合、カルス生長はおよそ 50 日目に静止期に入ったが、フラボノイド生成は 50 日以後も増加し、70 日目には「生薬、黄芩」の baicalin 含量に匹敵する値を示したことも特記すべき点と考えられる。また、アグリコンは配糖体に比べて生成量が低く、baicalin の増加にともない、わずかに認められたにすぎなかった。D-glucose, sucrose 添加時の baicalin 含量は培養期間全般にわたって 5% maltose の baicalin 含量よりも低いものとなった。

以上のことから、 10^{-6} M IAA と 10^{-5} M kinetin 添加培地においては、糖源として 5% maltose の添加が良好で、他の糖に比べてフラボノイドを著しく細胞内に蓄積し、最適な糖源であると結論される。

一般に各種の物理的条件の中でフラボノイド生成には光の影響が重要である⁸⁾。フラボノイドの生産は暗黒中でもなされるが⁹⁾、光照射することにより生産性を高めることができる¹⁰⁾ との報告がみられる。

光の効果については、Chart 1 に示したように 5% maltose 添加では暗黒下培養が有効であり、光の照射がとくに有利とはいえない結果を得た。Heller ら¹¹⁾ はパセリの液体培養細胞に光を照射することによりフラボノイド配糖体の生合成が誘起され、また、Hahlbrock^{10,12,13)} の研究においても、パセリのカルスで光照射により phenylalanine-ammonialyase 活性や flavone synthase 活性が上昇すると述べている。しかしコガネバナカルス組織では暗黒下で母植物体に相当するフラボノイドが生成したことは意義深いものと考えられる。また光照射に間接的に微妙に変化するフラボノイド生成 (Fig. 3) については今後さらに検討する予定である。

結 論

1) 3% sucrose 添加 RM-1964 基礎培地ではカルスの生長曲線は20~40日に対数増殖期, 50~60日に静止期を示すが, フラボノイド含量は増殖減速期により徐々に増加し, 配糖体である baicalin, wogonin-7-O-glucuronide が最高値を示した. また50~55日目でアグリコンである baicalein, wogonin が高い値を示すがさらに60日では逆に配糖体が著しい増加傾向を示す. カルス中のフラボノイド baicalin, oroxylin A-glcu A, wogonin-7-O-glcu A はほぼ同様の傾向を示すが, skullcupflavone II は培養初期にはその存在は認められない. また, oroxylin A, baicalein-glc., dihydroorxylin A, 5, 7, 2', 6'-tetrahydroxyflavanone は認められないが, chrysin は(生薬の)黄芩に比べ含量が高いことが明らかになった.

2) 5%糖(maltose, D-glucose, sucrose) 添加の場合のカルス生長曲線は 5% maltose > 5% D-glucose \geq 5% sucrose の順に生長がよく, 生長時期に関しては, 10日目から, 対数増殖期に, 50日目には静止期に入った. 5% maltose 添加によって10日目頃からフラボノイドの増加がはじまり, 70日目には 16 mg/tube (10 ml medium) となった. 5% D-glucose 添加は maltose 添加の半分で, 5% sucrose 添加ではフラボノイド含量は低い. いずれの場合も 5, 7, 2', 6'-tetrahydroxyflavanone, baicalein, skullcupflavone II, wogonin, chrysin の含量は低い.

3) 5% sucrose 添加において, アグリコンである baicalein, wogonin が相対的に高い含量を示し, 40日目で baicalein, wogonin 等を検出した.

4) 20日間暗黒下培養を行い, その後明暗両条件下で培養すると短期間では光照射がやや有効であり, 可視的にもカルスの黄色化が認められた.

Abbreviations: Linsmaier-Skoog's medium: RM-1964 medium, IAA: indole-3-acetic acid, baicalein-glc.: baicalein-glucoside, oroxylin A-glcuA: oroxylin A-7-O-glucuronide, wogonin-glcuA: wogonin-7-O-glucuronide.

引用文献および注

- 1) 一部は日本生薬学会第31回大会(東京, 1984年10月)で発表.
- 2) 現在, 小城忠治商店(燐研究所勤務).
- 3) H. Yamamoto, N. Chatani, A. Kitayama, T. Tomimori, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, in press.
- 4) 山本久子, 茶谷展安, 渡辺久女, 富森 毅, 生薬, **40**, 19 (1986).
- 5) 富森 毅, 神 久徳, 宮一論起範, 豊福信吾, 難波恒雄, 薬誌, **105**, 154 (1985).
- 6) J. A. Sargent, F. Skoog, *Plant Physiol.*, **35**, 934 (1960).
- 7) 山本久子, 富森 毅, 生薬, **35**, 9 (1981).
- 8) M. Tabata, "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application," Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, p. 3.
- 9) S. Ayabe, M. Kobayashi, M. Hikichi, K. Matsumoto, T. Furuya, *Phytochemistry*, **19**, 2179 (1980).
- 10) K. Hahlbrock "Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Applications," Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1977, p. 95.
- 11) W. Heller, K. Hahlbrock, *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 617 (1980).
- 12) H. Hahlbrock, J. Ebel, R. Ortmann, A. Sutter, E. Wellmann, H. Grisebach, *Biochim. Biophys. Acta*, **244**, 7 (1971).
- 13) K. Hahlbrock, "The Biochemistry of Flavonoids of Plant," Vol. 7, Academic Press, New York, 1981, p. 425.