

## ブドウの細胞培養と代謝産物生産への応用

山川 隆\*

(1994 年 1 月 31 日受理)

## 1. はじめに

植物組織培養による二次代謝産物の生産に関する研究は枚挙にいとまがないが、筆者が微生物を扱う研究室で植物の細胞培養を始めたのは今から 20 年近く前のことである。その特徴は微生物を取り扱うように植物細胞を培養しようとしていたことである。物質生産という観点から植物特有の二次代謝産物を細胞培養で生産する対象としては、色素、配糖体、サポニン、アルカロイドなど化学合成でも発酵法でも生産できないものを中心となる。特に色素はその生成が肉眼でも確認できることから研究の対象となりやすく、これまでに報告が多い。

ブドウ細胞からのアントシアニンの生産については 1952 年に Slabecka-Szweykowska<sup>1)</sup> が組織培養でアントシアニンを生産した報告に始まる。その後、ハプロパップス<sup>2)</sup>、ポブラ<sup>3)</sup>等を用いた研究が報告され、我々のブドウの報告ではアントシアニンの蓄積量は細胞の乾燥重量当たり 16% とブドウの果皮のそれを上回っているが、最近ではハナキリン<sup>4)</sup>、リンゴ<sup>5)</sup>などでもアントシアニンを著量蓄積したと報告されている。このブドウ細胞の特徴は他の多くの報告とは異なり、暗所でもアントシアニンを生産することである。

最近では分子生物学的な技術の急速な進歩によって二次代謝産物の生合成に係わる個々の反応の遺伝子の解析が進められているが、それらの解析はまだ進行中であるといつてよい。

アントシアニンの生合成制御の研究については本誌に小関氏の総説<sup>6)</sup>があるので、ここではブドウの細胞培養を行なうにあたって、これまでどのようにして細胞培養系が確立されてきたかについて述べ、アントシアニンの

生産、生物変換による配糖体生産への応用、また、単細胞培養と細胞分裂促進因子の検索、そして今後の細胞培養研究の方向性について培養を中心に述べる。

## 2. アントシアニン生産細胞の選抜について

アントシアニン生産性の培養細胞のスクリーニングは、まず、アントシアニンを栄養器官でつくる植物を探し、赤カブ、赤シソ、ブドウ、ヤマブドウなどのカルスを常法により誘導したが、赤色色素を多量につくるのは、もともとアントシアニンを多量につくる赤ブドウ酒着色用のブドウの品種 Bailey Alicante A であった。この品種は生長の盛んな春先を除けば、茎葉部にも赤味が強く、果実は果肉まで赤味を呈しており、果皮ではその乾重量の 10.6% まだがアントシアニンである<sup>7)</sup>。

誘導されたカルスから赤い部分を選択的に植え継ぎ、アントシアニンを生産する赤色のカルスが得られた後に液体培養の可能な細胞を選抜した。この場合、一般の細胞培養用の振盪培養機と共に微生物用の激しい振盪条件 (300 rpm, 振幅 2 cm) の試験管振盪培養機も用いた。この激しい条件で生育が可能な細胞系を選抜することにより、集塊の小さな懸濁培養物を得ることができ、この後はフラスコ、ジャーファーメンターとスケールアップが可能となった。特に光がなくてもアントシアニンを生産する細胞系を選抜したのは、その後の培養を容易にするためである。

カルス誘導の際の植物体は茎葉部、蔓、薬を用いた。特に蔓と薬由来の培養細胞では赤色の細胞の選抜を繰り返すことにより、著量のアントシアニンを蓄積する細胞を得ることができた。

これらのアントシアニンは cyanidin-3-mono-glucoside, peonidin-3-monoglucoside, peonidin-3,5-diglucoside を主成分とし<sup>8)</sup>、微量の petunidin, delphinidin を含むアントシアニンの混合物でこのほかにも糖部分がクマル酸でアシル化した cyanidin と peonidin の glucose 配糖体が検出されている<sup>9)</sup>。アントシアニンのアグリコンの構造を図 1 に示した。

Takashi YAMAKAWA\*

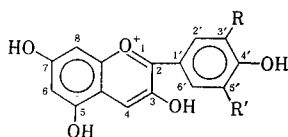
Grape Cell Culture and Application to the Metabolite Production.

\* 東京大学農学部農芸化学科

(〒113 東京都文京区弥生 1-1-1)

\* Department of Agricultural Chemistry, The University of Tokyo, 1-1, Yayoi 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

アントシアニンの生産パターンは図2に示すように培養の後期に生成される。これはヨウシュヤマゴボウの培養細胞が、ベタシアニンを生成する際に生育とともに代謝産物を生産するパターンと異なるので、その生理的な差異が Hirose らによって研究されている<sup>11)</sup>。また、このブドウのカルス、培養細胞集塊は見た目には全体が赤く見えるが、顕微鏡を用いて調べると赤い細胞と色のない細胞の混合であり、細胞が不均一であることが分る。全体としては安定して赤く見える細胞群が得られてはい



| アグリコン        | R                | R'               |
|--------------|------------------|------------------|
| Cyanidin     | OH               | H                |
| Delphinidin  | OH               | OH               |
| Peonidin     | OCH <sub>3</sub> | H                |
| Petunidin    | OH               | OCH <sub>3</sub> |
| Malvidin     | OCH <sub>3</sub> | OCH <sub>3</sub> |
| Pelargonidin | H                | H                |

図1 アントシアニンのアグリコンの構造<sup>10)</sup>。

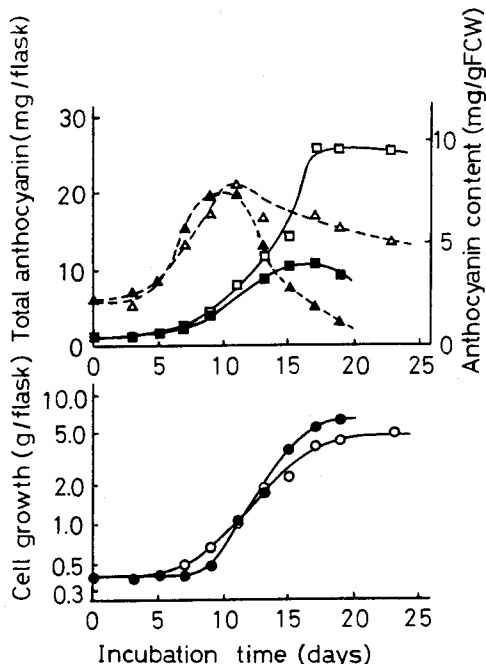


図2 明所と暗所におけるブドウ細胞によるアントシアニン生産のタイムコース<sup>10)</sup>。

暗所：■—■，全アントシアニン；▲—▲，アントシアニン含量；●—●，細胞量  
明所 (10,000 lux)：□—□，全アントシアニン；△—△，アントシアニン含量；○—○，細胞量

ても、赤い細胞は20%程度であり、必ずしも全細胞が同じ生理状態ではないことが分る。

酵素法で常法によりプロトプラストをつくり、赤い細胞を単細胞として拾うと赤い細胞集塊を比較的早く得ることができるため、プロトプラスト培養を行なって全細胞が色素を生産する細胞集塊を得ようと試みた<sup>12)</sup>。しかし、ここではブドウ細胞は単独でプロトプラストからカルスまで再生することは難しく、培養の途中で保護培養が必要となった。この場合、図3に示すフィーダー法によって単細胞由来のコロニーを得ることができた。なお、このとき一部にアントシアニン生産性、非生産性の細胞が依然として混在しているコロニーも見受けられたが、全細胞が赤いコロニーを選択的に拾うことにより全細胞がアントシアニンを生産する細胞集塊を得ることができた。この細胞塊はしばらくの間は赤い細胞のみの集団で、容易にはアントシアニン非生産性細胞は出現しなかった。

### 3. 単細胞培養と細胞分裂促進因子について

植物の培養細胞は一般に  $10^4 \sim 10^5$  cells/ml の細胞密度がないと分裂、増殖することができない。現在、植物への遺伝子導入などで単細胞培養が重要となっているが、ほとんどの場合は先に述べた保護培養で解決しているのが実情である。細胞育種という実用面ではこれで済むが、この保護培養でいわゆるフィーダー細胞から何か細胞分裂を促進する化学物質が単細胞に移動しているのではないかと以前から考えられており、筆者らもこの物質を追ってみた。それは細胞培養濾液中のいわゆるコンディショニングファクター (CF) と言われるものが、この細胞分裂促進因子であろうと考え、ブドウの細胞培養濾液からこの因子を単離しようと試みた。その結果、一部はオ

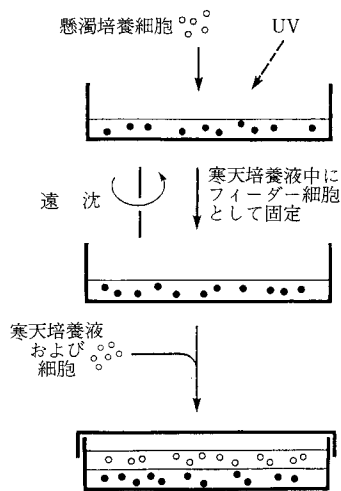


図3 フィーダー法の模式図<sup>10)</sup>。

ートクレープでも失活せず、Amberlite XAD-2に吸着する物質であることが分った<sup>12,13)</sup>。これらの効果は細胞分裂をする最小限の細胞密度（最小有効細胞密度）を低下させることであり、植物ホルモンではこの効果は代替できていない。そしてタバコの培養細胞をフィーダー細胞として使っても、また、その逆でも互いに細胞分裂を促進するので植物に普遍的な物質が何かあると思われる。しかし、今なおその詳細は分っていない。現在イタリアの Bellincampi らもニンジン<sup>14)</sup>の培養細胞を用いてこの細胞分裂促進因子の実体を追っている<sup>14)</sup>が、その実体はやはり明らかにはなっていない。

#### 4. 生物変換によるケルセチンの配糖化

一般に培養細胞は外から与えたフェノール性化合物を配糖化しやすいことが知られており、生理活性を有する新規物質発見の可能性を求めて多くの研究が進められている。このブドウ細胞はアントシアニン配糖体を著量蓄積するためにその配糖化力も強いと考えられた。事実、フラボノールの一種であるケルセチン (quercetin) をブ

ドウの培養細胞に与えると効率良く配糖化されることが分った。これはアントシアニン色素非生産性の細胞でも同様である。本来、ブドウ細胞はケルセチンを生産しないが、ブドウの培養細胞にケルセチンを与えると効率良く配糖化し (図4)、特に条件を検討すると1~2週間で細胞の乾燥重量の20%もの配糖体を細胞内に蓄積した。

配糖化された生成物は分析の結果、ケルセチンとイソラムネチンの各種グルコース配糖体であることが分り、配糖化の際に一部はメチル化も起こっていることが分った。配糖化変換を行なうと時間と共にケルセチンの配糖化が進み、三糖配糖体まで得られている。このケルセチンの三糖配糖体は初めて得られたものである (図5)<sup>15,16)</sup>。また、この配糖化能は高濃度の2,4-Dなどによって誘導されるが<sup>17)</sup>、その機構は明らかにはなっていない。この配糖化酵素 (glucosyltransferase) は古久保らによって電気泳動的に単一バンドになるまで精製されており、複数の酵素があることが分っている<sup>18)</sup>。

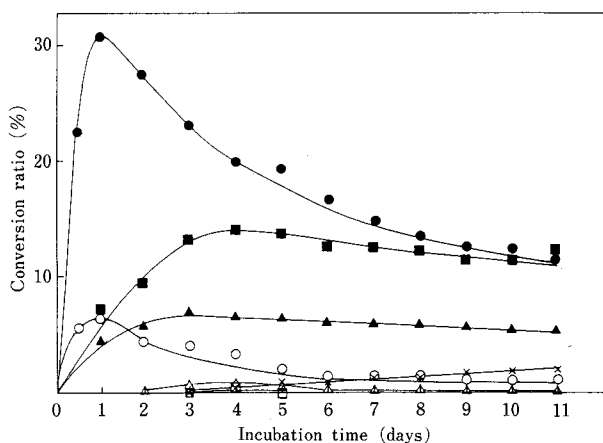
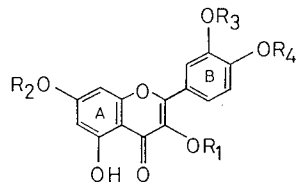


図4 ブドウ細胞によるケルセチンの配糖化変換のタイムコース<sup>15)</sup>より改変。  
Quercetin 3-O-glucoside (●), Quercetin 3,7-di-O-glucoside (▲), Quercetin 3,4'-di-O-glucoside (■), Isorhamnetin 3-O-glucoside (○), Isorhamnetin 3,7-di-O-glucoside (△), Isorhamnetin 3,4'-di-O-glucoside (□), Quercetin 3,7,4'-tri-O-glucoside (×)。



|   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | Glc            | Glc            | H              | H              |
| 2 | Glc            | Glc            | Me             | H              |
| 3 | Glc            | H              | H              | Glc            |
| 4 | Glc            | H              | Me             | Glc            |
| 5 | Glc            | H              | H              | H              |
| 6 | Glc            | H              | Me             | H              |
| 7 | Glc            | Glc            | H              | Glc            |

図5 ブドウ細胞によってケルセチンから生成された配糖化合物 (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H, ケルセチン; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>=H, R<sub>3</sub>=Me, イソラムネチン)<sup>15)</sup>より改変。

表1 アントシアニン生産と細胞増殖のための最適栄養条件とホルモン条件<sup>19)</sup>。

| Medium No. | Sucrose (M) | NH <sub>4</sub> Cl (M) | KNO <sub>3</sub> (M) | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mg/liter) | 2,4-D (mg/liter) | Kinetin (mg/liter) | Cell yield (g/flask) | Total anthocyanin (mg/flask) |
|------------|-------------|------------------------|----------------------|--------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|------------------------------|
| I          | 0.146       | 0.01                   | 0.05                 | 600                                        | 0.05             | 0.6                | 13.65                | 0.60                         |
| II         | 0.088       | 0.01                   | 0.01                 | 100                                        | 0.01             | 0.6                | 6.10                 | 7.58                         |
| III        | 0.146       | 0.01                   | 0.01                 | 100                                        | 0.01             | 0.6                | 8.90                 | 10.20                        |
| IV         | 0.292       | 0.03                   | 0.03                 | 200                                        | 0.01             | 0.6                | 11.90                | 12.30                        |
| V          | 0.292       | 0.03                   | 0.03                 | 100                                        | 0.01             | 0.6                | 4.80                 | 13.00                        |

培養は medium I が 12 日間, その他は 20 日間。

## 5. ブドウ細胞の培養条件と培養装置

ブドウ細胞の各種培養条件によるアントシアニン生産性の検討はフラスコレベルで行なわれた。その結果、高濃度のサッカロース、低濃度のリン酸塩、アンモニア態窒素などの条件のほか、ホルモン濃度などが決定され、表1にあるような条件で、細胞の増殖向きの培地とアントシアニンの生産向きの培地組成が明らかになり、2段階培養がアントシアニンの生産には適していることが分かった(図6)<sup>19)</sup>。

一方、培養装置は一般に用いられているような気泡塔型の培養装置が用いられたが、3 liter を越えてスケールアップすると細胞が生育して培養液が粘性を帯びてきて攪拌が十分できず、攪拌型のジャーフェーマンターが必要となった。アントシアニンの生産に対する通気の影響は大きく、図7に示すように、最適の通気条件がある<sup>19)</sup>。ブドウ細胞を培養中の培養液の酸素移動容量係数( $K_La$ )を測定すると、気泡塔型では図8に示すように、10-15/hr であり、これは細胞が必要とする酸素の最低限に近い<sup>20)</sup>。これ以上の酸素供給を通気でやるおうとするならば、一般の微生物用のジャーフェーマンターと同様の通気攪拌型の培養槽が必要になる。幸いな事にこのブドウ細胞は微生物用の振盪培養装置で選抜を重ねてきたために、微生物用の培養装置が、ほぼそのまま使用できた。振盪フラスコ、ジャーフェーマンターと植物細胞用のものをはじめ、微生物用のジャーフェーマンターでも攪拌速度を100~200 rpm に落とすことで済み、30 liter の培養タンクに20 liter の新鮮培地に対し2 liter の種培養

を接種すると、色素非生産性の細胞では10~12日間の培養で生重量で7~8 kg の細胞が得られた。このことは、ブドウの場合と同様、はじめにスケールアップを意識し

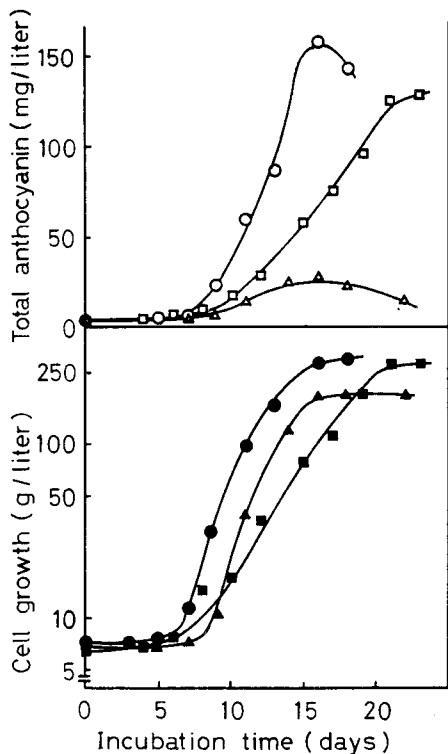


図7 ブドウ細胞によるアントシアニン生産に及ぼす通気の影響<sup>19)</sup>。

- 0.2 vvm : △-△, 全アントシアニン;  
 ▲-▲, 細胞量  
 0.4 vvm : ○-○, 全アントシアニン;  
 ●-●, 細胞量  
 0.8 vvm : □-□, 全アントシアニン;  
 ■-■, 細胞量

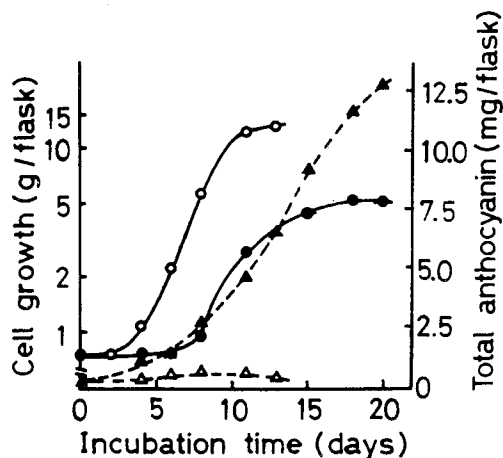


図6 最適培養条件によるブドウ細胞の増殖曲線<sup>19)</sup>。

- Medium I : △-△, 全アントシアニン;  
 ○-○, 細胞量  
 Medium II : ▲-▲, 全アントシアニン;  
 ●-●, 細胞量  
 (培地組成は表1を参照)

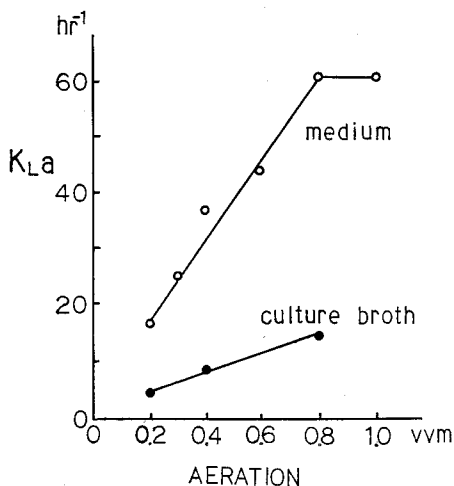


図8 気泡塔型3 liter 容の小型培養槽における新鮮培地と培養液の酸素移動容量係数( $K_La$ )<sup>20)</sup>。

て細胞を選抜する重要性を示している。なお、植物細胞の培養装置の一般的な内容については成書に記したので参考されたい<sup>21)</sup>。

## 6. 細胞・組織培養の今後

最近の遺伝子操作技術、分子生物学の進歩は目覚ましく、あっというまに昔の技術は使い古されてしまうこともある。特に PCR (polymerase chain reaction) 法が開発されてからは、研究のパターンそのものが変わってきた感もある。しかし、ここに述べてきた研究は 1970 年代から 80 年代のものであるが、細胞・組織を培養するというのが組織培養ならば、新しい分子生物学を支える技術として組織培養の重要性は変わらないであろう。むしろ、ソマクローナル変異、再分化と脱分化、二次代謝の発現、器官分化など組織培養の基本的な問題は解決されずにそのまま残っているのである。それは技術の進歩により実験材料の細胞・組織がこれまでよりも少量で済むことが多くなった半面、厳密に均質な細胞・組織の培養が要求される。同調培養、単細胞培養も必要である。これからの細胞培養ではこれまで発展してきたような大量培養は、経済性を考慮した企業での実用化の問題となり、一方では基礎的な生化学、生理学、分子生物学の研究に対して、厳密に均質な細胞・組織を培養する必要性が生じてきたといえよう。アントシアニンをはじめとしてフェニルプロパノイド代謝の流れの研究も、興味は遺伝子レベルに移っている。細胞培養による物質生産の研究は、実用化も一部で達成されたが、植物の細胞・組織を培養する「組織培養」の原点を振り返る時、分子生物学の発展とあいまって基礎的な研究の材料提供のために組織培養の新たな意義が見直されていると思われる。

このブドウ細胞培養の研究は東京大学農学部農芸化学科微生物利用学研究室で行なわれたものであり、ご指導頂いた故 蓑田泰治名誉教授、児玉 徹教授、ならびにご協力頂いた研究室の諸氏に感謝致します。

## 文 献

- 1) Slabecka - Szwejkowska, A., 1952. Acta Soc. Bot. Polon., **21**: 537-576.
- 2) Reinert, J., H. Claus, R. von Andenne, 1964. Naturwissenschaften, **51**: 87.
- 3) Matsumoto, T., K. Nishida, M. Noguchi, E. Tamaki, 1973. Agric. Biol. Chem., **37**: 561-567.
- 4) Yamamoto, Y., Y. Kinoshita, S. Watanabe, Y. Yamada, 1989. Agric. Biol. Chem., **53**: 417-423.
- 5) 小宮威弥, 1992. 植物組織培養, **9**: 69-73.
- 6) 小関良宏, 1987. 植物組織培養, **4**: 60-65.
- 7) 松富直利, 山村益士, 太田英明, 篠島 豊, 芥田三郎, 1977. 日本食品工業学会誌, **24**: 342-345.
- 8) Yamakawa, T., K. Ishida, S. Kato, T. Kodama, Y. Minoda, 1983. Agric. Biol. Chem., **47**: 997-1001.
- 9) 大塚浩史, 加藤重昭, 児玉 徹, 蓑田泰治, 1980. 日本農芸化学会昭和 55 年度大会講演要旨集, p. 292.
- 10) 児玉 徹, 山川 隆, 1984. 化学と生物, **22**: 536-540.
- 11) Hirose, M., T. Yamakawa, T. Kodama, A. Komamine, 1990. Plant Cell Physiol., **31**: 267-271.
- 12) Yamakawa, T., K. Onomichi, T. Kodama, Y. Minoda, 1985. Agric. Biol. Chem., **49**: 3583-3585.
- 13) 阿部真幸, 木下宏太郎, 山川 隆, 児玉 徹, 1988. 日本農芸化学会昭和 63 年度大会講演要旨集, p. 371.
- 14) Bellincampi, D., R. Morpurgo, G. Morpurgo, 1993. Physiol. Plant., **88**: 99-104.
- 15) Kodama, T., H. Ishida, T. Kokubo, T. Yamakawa, H. Noguchi, 1990. Agric. Biol. Chem., **54**: 3283-3288.
- 16) Kokubo, T., M. Nakamura, T. Yamakawa, H. Noguchi, T. Kodama, 1991. Phytochemistry, **30**: 829-831.
- 17) 古久保哲朗, 山川 隆, 児玉 徹, 1989. 日本農芸化学会 1989 年度大会講演要旨集, p. 172.
- 18) 古久保哲朗, 山川 隆, 児玉 徹, 1990. 日本農芸化学会 1990 年度大会講演要旨集, p. 316.
- 19) Yamakawa, T., S. Kato, K. Ishida, T. Kodama, Y. Minoda, 1983. Agric. Biol. Chem., **47**: 2185-2191.
- 20) 山川 隆, 児玉 徹, 1987. 発酵と工業, **45**: 848-853.
- 21) 児玉 徹, 山川 隆, 1993. 植物工学 (MARUZEN ADVANCED TECHNOLOGY 〈生物工学編〉) (魚住武司, 児玉 徹 編), p. 40-56, 丸善, 東京.