

薬用系木本植物カギカズラの根の液体培養

Root suspension culture of a medical woody plant, *Uncaria rhynchophylla*

谷口亨*1・河村文郎*2

Toru TANIGUCHI*1 and Fumio KAWAMURA*2

* 1 森林総合研究所森林バイオ研究センター

FFPRI, Forest Bio-research Center, Ishi 3809-1, Juo, Hitachi, Ibaraki 319-1301

* 2 森林総合研究所

FFPRI, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687

要旨: カギカズラはアカネ科のつる性の薬用樹木である。カギカズラの根の培養による薬用成分アルカロイドの生産の可能性を探るため、液体培地での根の培養条件の検討と液体培養した根のアルカロイド含有率の調査を行った。培地中の IBA 濃度の影響を調べたところ 0.2 mg/l 添加の培地における増殖が最も効率的であり、培養 5 週間での増殖率は約 45 倍であった。また、光条件の影響を調べるために弱光と暗所で培養したところ、根の増殖率には差は認められなかった。液体培養した根のアルカロイド含有率を高速液体クロマトグラフィーで測定したところ、オキシインドールアルカロイドであるリンコフィリンとイソリンコフィリンの含有率は、自生個体の根の皮における含有率と同様に 0.01%以下と低含有率であった。一方、インドールアルカロイドであるヒルスチンの含有率は自生個体では 0.36%と高含有率であることが報告されているが、培養根では 0.01~0.02%と低含有率であった。液体培養によるアルカロイドの効率的生産のためには、アルカロイド含有率を高めるための処理が必要である。

キーワード: 組織培養、増殖、アルカロイド

Abstract: *Uncaria rhynchophylla* is a medical woody plant, belonging to the family Rubiaceae. In order to evaluate the possibility of alkaloid production by root suspension cultures in this species, we developed the methods for root suspension cultures, and then we analyzed alkaloid contents of suspension-cultured roots. IBA concentration in liquid medium significantly affected root growth. Optimal concentration of IBA was 0.2 mg/l, being 45-fold increase of root flesh weight after 5 weeks of culture. Light condition (under slight light or under darkness) was not influenced on the root growth. Alkaloid contents of cultured roots were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Contents of oxindole alkaloids (rhynchophylline and isorhynchophylline) were below 0.01 % in suspension-cultured roots, as reported for root barks of *U. rhynchophylla* grown at field. Contents of indole alkaloid (hirsutine) were 0.01-0.02 % in suspension-cultured roots, although hirsutine contents were 0.36 % in root barks of field-grown *U. rhynchophylla*. In order to produce alkaloids effectively by root suspension cultures, we need some induction treatments for alkaloid accumulation.

Keywords: tissue culture, root growth, alkaloid

I はじめに

カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla*) は中国南部と日本の房総半島以西~九州に自生するアカネ科のつる性の木本植物である。本種の枝の葉腋部には枝が変形したものとされる鈎 (カギ) 状の刺 (以下、鈎とする) があり、枝を付けた鈎を乾燥させた物は釣藤鈎 (チョウトウコウ) と称される生薬である。我が国の釣藤鈎の使用量は 200 トン程度あり、その全てを中国から輸入している (8)。国内に自生するカギカズラが生薬として利用されていない理由は明らかではないが、まとまった量の収穫が困難である

ことが一つの理由と考えられる。釣藤鈎の薬用成分はアルカロイドとされ、日本薬局方には乾燥物に対し総アルカロイド (リンコフィリン及びヒルスチン) 0.03%以上を含むと規定されている。釣藤鈎は神経過敏で興奮しやすい、イライラする、眠れないなど神経症状を訴える人に効果がある抑肝散などの漢方薬に配剤される (6)。また、認知症 (6) や高血圧症 (9) に効果があるとされている。

植物由来の薬用成分や色素などの有用物質を効率的に生産する方法として液体培養が知られている。液体培養では、栄養分や植物ホルモンなどを含む人工培地で植物の組

織や細胞を培養する。ムラサキ (*Lithospermum erythrorhizon*) の細胞培養によるシコニン色素の生産 (3) やオタネニンジン (*Panax ginseng*) の根の培養による薬用成分ジエンノイドの生産 (11) は実用化されている。

本研究では、カギカズラの根の培養による薬用成分アルカロイドの生産の可能性を探るため、液体培地での根の培養条件の検討と液体培養した根のアルカロイド含有率の調査を行った。

II 材料と方法

1. 植物材料

高知県内に自生するカギカズラ 1 個体を掘取り、温室で栽培し、伸長した枝より採取した鉤付きの枝を培養した。鉤より誘導したシュートを伸長させ、シュートの発根により無菌植物体を作製した (5)。無菌植物体の先端部 3~4 cm を切り取り、1/2 濃度の MS 無機塩に 1/2 濃度の B5 ビタミンを添加した基本培地にインドール-3-酪酸 (IBA) 0.02 mg/l と 15 g/l のショ糖、8 g/l の寒天を加えた発根培地で培養して発根させることを 4~6 週間間隔で繰り返して継代培養を行った。培養条件は 25°C、16 時間日長の明条件 (冷陰極蛍光灯による赤色光、45 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{PPFD}$) とした。

2. 根の液体培養

発根した無菌植物体の長さ 5 cm 程度の根 3 本 (約 40 mg) を液体培地に入れた。液体培地は、1/2 濃度の MS 無機塩に 1/2 濃度の B5 ビタミンを添加した基本培地に IBA と 15 g/l のショ糖を加えた培地である。IBA の根の増殖に及ぼす影響を調べるために IBA の添加量を 0、0.02、0.2 mg/l の 3 処理とした。容量 100 ml の培養瓶に液体培地 25 ml を入れ、旋回培養器 (120 rpm) で培養した。培養条件は、25°C、16 時間日長の弱光 (冷陰極蛍光灯による赤色光、1.7 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}\text{PPFD}$) とした。また、光環境の影響を調べるために、IBA を 0.2 mg/l 加えた液体培地での培養を暗所でも行った。

3. アルカロイド含有率の測定

液体培養した培養根、無菌植物体の葉と茎を凍結破碎した。即ち、生重量 1~2 g のサンプルを破碎容器に入れ、液体窒素で凍結した。その後、破碎容器を破碎機 (Retsch 社製、Mixer Mill MN300) にセットし、30 rpm で 30 秒間サンプルを破碎した。破碎したサンプルを 2 分割し、一方を含有率分析用に、もう一方を含水率測定用とした。破碎したサンプルは分析に供するまで凍結保存した。

分析に供するため、粉碎サンプルに 5 倍量の蒸留水を加え、30 分間放置後、20 倍量の 2-メトキシエタノールを添加して 10 分間の超音波処理を行った。その後、ドライバス中で加温 (80°C、10 分間) してアルカロイドを抽出し

た。遠心分離し、濾過した抽出液は高速液体クロマトグラフィ (HPLC) (日本分光、PU2080) で分析した。分析項目は、オキシインドールアルカロイド 2 種 (リンコフィリンとイソリンコフィリン) とインドールアルカロイド 1 種 (ヒルスチン) とした。

III 結果と考察

1. 根の液体培養

根の増殖に及ぼす IBA 濃度の影響を調べた。IBA 濃度の影響は顕著であり、IBA 濃度の増加に従い、根の増殖は有意に促進された (図-1、図-2)。光条件については、供試した弱光条件と暗条件の間では差は見られなかった (図-3)。弱光条件下で IBA を 0.2 mg/l 添加した液体培地で 5 週間培養した際の増殖曲線を図-4 に示す。培養 1 週間後から直線的に増殖を開始し、5 週間目には増殖速度が鈍化した。根の生重量の平均値は、5 週間で 40mg から 1.8g へと約 45 倍に増加した。

オタネニジンの場合は、根の液体培養にはサイトカインの添加も必要である (11)。これに対し、カギカズラの根の液体培養では、IBA を加えるのみという単純な方法で根は増殖する。また、増殖率に関する他の報告では、オタネニジンの根では 4 週間で 4.7 倍 (11)、カギカズラの固形培地でのカルス培養では 50 日間で 8 倍である (7)。また、カギカズラと同じ属のキャツクロー (*U. tomentosa*) の培養細胞の液体培養での増殖率は 5 倍程度である (2)。ムラサキの培養細胞では 20 倍程度である。これらと比較してもカギカズラの根の液体培地での増殖率は高いと考えられる。

2. 培養物のアルカロイド含有率

図-5 に無菌植物体の葉、茎、液体培養した根のリンコフィリンとイソリンコフィリンの含有率を示す。これらの含有率は部位における差が顕著であり、葉と茎では 0.3~0.9% と含有率が高く、根では弱光で培養した場合は 0.007%、暗所で培養した場合は 0.009% と低い。これに対し、ヒルスチンの含有率は、葉が 0.004% と最も低く、暗所培養の根が 0.02% と最も高い (図-6)。オキシインドールアルカロイドであるリンコフィリンとイソリンコフィリンの濃度とインドールアルカロイドであるヒルスチンの濃度を比較すると、葉と茎ではオキシインドールアルカロイドの濃度が高く、培養根ではインドールアルカロイドの濃度が高い (図-5、6)。

野外自生個体の部位別のアルカロイドの含有率を調査した報告 (10) によると地上部 (鉤、葉、枝) と地下部 (根の皮) ではアルカロイド含有率は異なる。最もアルカロイド含有率が高いのは根の皮であり、地上部の 2~3 倍

程度である。また、組成も異なり、地上部ではオキシインドールアルカロイドが全アルカロイドの 95%以上を占める。一方、地下部ではインドールアルカロイドが全アルカロイドの 95.7%である。本研究においても無菌植物体の地上部では、オキシインドールアルカロイドであるリンコフィリンとイソリンコフィリンの含有率が高く、インドールアルカロイドであるヒルスチンの含有率が低い。培養根では、野外自生個体と同様にオキシインドールアルカロイドの含有率が低い。しかし、インドールアルカロイドであるヒルスチンの含有率は野外自生個体と比べると弱光で液体培養した根で 30 分の 1、暗所で液体培養した根では 18 分の 1 といずれも低い値であった。

根の液体培養によるアルカロイドの生産のためには、アルカロイド含有率を高める処理が必要である。*U. tomentosa* では、過酸化水素添加による酸化ストレスが培養細胞や培養根のアルカロイド含有率を増加させる (4)。また、培地成分のうちアンモニウム塩、ショ糖、植物ホルモンが、培養細胞の二次代謝成分の含有率に関係するとされている (2, 3, 7, 12)。さらに紫外線も二次代謝成分の蓄積を促進するという報告もみられる (1)。これらのことより、培地成分、培養環境、ストレス処理によりカギカズラの培養根のアルカロイド含有率を高めることができる可能性がある。

IV まとめ

カギカズラの根の液体培養条件を検索し、5 週間で 45 倍という高い増殖率となる条件を開発した。しかし、液体培養した根のアルカロイド含有率は低い。薬用成分を効率的に生産するためには、培地成分の改変、培養環境の調整、ストレス処理などにより、培養根におけるアルカロイド含有率を高める必要がある。

引用文献

(1) 海老澤聖宗・庄子和博・加藤美恵子・下村講一郎・後藤文之・吉原利一 (2008) UV-B, UV-A および青色光の夜間補光がサニーレタスの成長と着色に及ぼす影響. 植物環境光学 **20** : 58-164
 (2) FERIA-ROMER, I., LAZO, E., PONCE-NOYOLA, T., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M. and ROMAS-VALDIVIA, A.C. (2005) Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. *Biotechnology letters* **27**: 839-843
 (3) 藤田泰宏・菅忠三・松原浩一・原康弘 (1986) 植物細胞培養によるシコニン系化合物の生産. 日本農芸化学会誌 **60** : 849-854

(4) HUERTA-HEREDIA, A.A., MARÍN-LÓPEZ, R., PONCE-NOYOLA, T., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., TREJO-TAPIN, G., and RAMOS-VALDIVIA, A.C. (2009) Oxidative stress induces alkaloid production in *Uncaria tomentosa* root and cell cultures in bioreactors. *Engineering in Life Sciences* **9**: 211-218
 (5) ISHII, K., TAKATA, N., KONGAYA, K., and TANIGUCHI, T. (2011) In vitro propagation of *Uncaria rhynchophylla* – a medical woody plant. *Proceedings of IUFRO Conference; Integration Vegetative Propagation, Biotechnologies and Genetic Improvement for Tree Production and Sustainable Forest Management. IUFRO Working Party 2.09.02, Brno, Czech Republic: 153-154*
 (6) 川上善治 (2013) 抑肝散の抗精神作用におけるグルタミン酸神経系の関与に関する研究. 福岡大学薬学集報 **13** : 121-130
 (7) KOHDA, H., NAMERA, A., KOUAMA, A., YAMASAKI, K. and TANI, T. (1996) Indole alkaloid production in callus cultures of *Uncaria rhynchophylla* (MIQ) MIQUEL. *Chemical and pharmaceutical bulletin* **44**: 352-357
 (8) 日本漢方生薬製剤協会 (2015) 原料生薬使用量等調査報告書 (3) -平成 23 年度および 24 年度の使用量-. 日本漢方生薬製剤協会, 東京 : 41pp
 (9) 尾崎幸紘 (1989) 本邦産植物カギカズラおよびチョウジソウに含有されるインドールアルカロイドの薬理研究. 日薬理誌 **94**: 17-25
 (10) 山中悦二・君塚ゆみ子・相見則郎・坂井進一郎・萩庭丈寿 (1983) Indole 系アルカロイド含有植物の検索 (第 9 報) 日本産カギカズラ (*Uncaria rhynchophylla* MIQ.) の各部位におけるアルカロイド分析. 薬学雑誌 **103**: 1028-1033
 (11) 吉川孝文 (2002) 植物組織培養による有用物質の生産. *ファルマシア* **38**: 846-850
 (12) YU, K.W., GAO, W.Y., SON, S.H. and PAEK, K.Y. (2000) Improvement of ginsenoside production by jasmonic acid and some other elicitors in hairy root culture of ginseng (*Panax ginseng* CA Meyer). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* **36**: 424-428

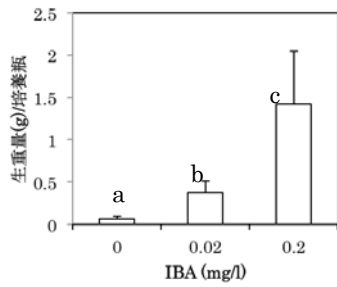


図-1. 根の液体培養における IBA 濃度の影響

Fig. 1 Effect of IBA concentration on growth of root suspension cultures

Data show mean of fresh weight with SD (n=5) after 24 days of culture. Different letters indicate significant difference (Tukey test, $p < 0.05$).

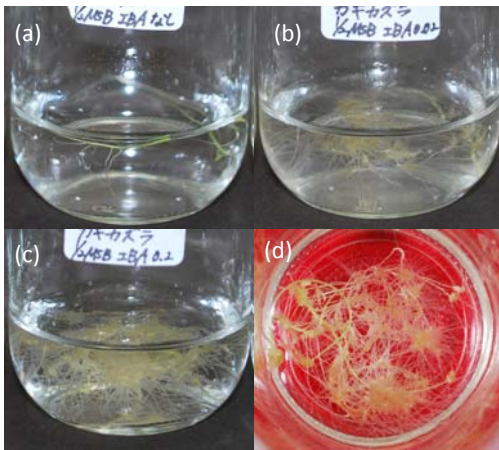


図-2. 液体培地で培養した根

Fig. 2 Root suspension cultures at liquid medium with different IBA concentration

a, IBA 0 mg/l, b: IBA 0.02 mg/l, c and d: IBA 0.2 mg/l.

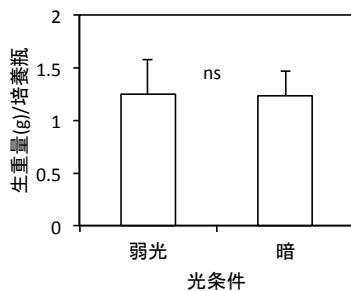


図-3. 根の液体培養における光条件の影響

Fig. 3 Effect of light condition on growth of root suspension cultures

Data show mean of fresh weight with SD (n=6) after 28 days of culture. ns: not significant difference (t-test, $p > 0.05$).

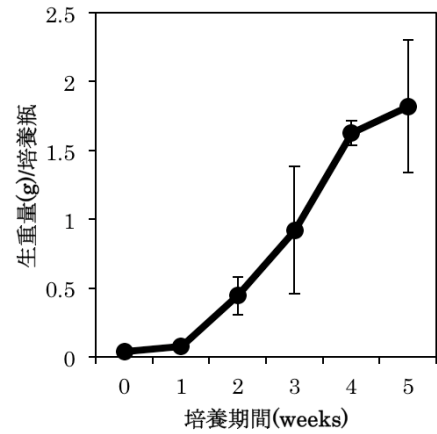


図-4. 液体培養における根の増殖曲線

Fig. 4 Growth curve of root suspension cultures

Data show mean of fresh weight with SD (n=3).

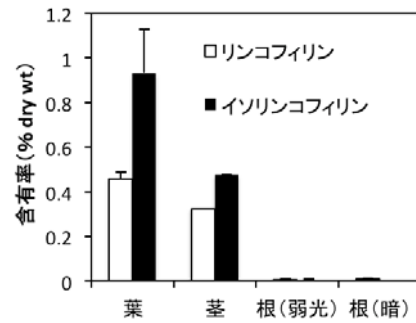


図-5. 培養物のリンコフィリンとイソリンコフィリンの含有率

Fig. 5 Contents of rhynchophylline and isorhynchophylline in tissue cultures

Data show mean of contents with SD of leaf, stem and root suspension cultures. Sample numbers were three, but sample number of stem was one.

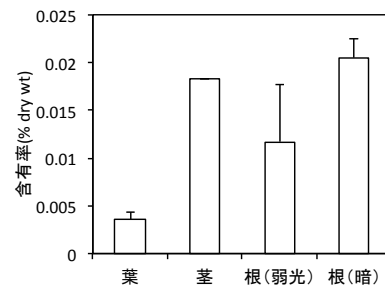


図-6. 培養物のヒルスチンの含有率

Fig. 6 Contents of hirsutine in tissue cultures

Data show mean of contents with SD of leaf, stem and root suspension cultures. Sample numbers were three, but sample number of stem was one.