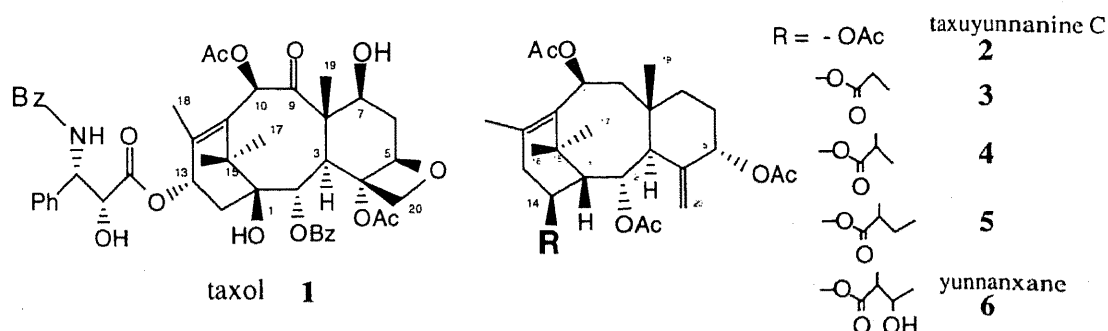


9. イチイカルスによるタキソール関連化合物の効率的生産

環境工学技術系 坂井 淳一

1. 筆者らは、医療現場から緊急に求められているタキソール **1** の大量供給を再生可能資源から安定して得ることを目的として研究を行っている。タキソール **1** は昨年、日本に於いても卵巣癌の新薬として承認され、さらに肺癌など他の固形癌についても臨床試験が現在も行われており、その作用機序が従来の抗癌剤とは全く異なることから薬剤耐性癌についての応用も試みられているが、その供給は生長の遅い太平洋イチイの樹皮からで絶対的に供給量が不足し、薬価簿にも記載されず、一刻も早い大量供給が望まれている。タキソールの化学的な全合成もすでにくつか報告されてはいるが、その大量合成は技術的ならびにコストの面から行われていないのが現状であり、イチイからの供給も樹皮を採取するとイチイそのものが枯れてしまうことから限界に達し、欧米では伐採禁止の状況にある。そこで、我々は、再生可能な資源として入手容易な日本イチイ (*taxus cuspidata*) の針葉部¹⁾、ならびにその針葉部から誘導したカルス培養細胞²⁾ をタキソールの供給源として検討し、比較的良い収率でタキソールを得ることができることを明らかにしてきた。そこで、今回は、イチイカルスの培養ならびにその生産物にしぼって報告する。増殖性に優れたイチイカルスを大量培養しタキソールならびにタキソール類縁体を生産させる研究は活発に行なわれているが、入手の困難な品種からの誘導や、スクリーニングにより一時的にタキソールの生産性の良いカルスが得られても、再現性が得られなかったりカルスの褐変化等により安定した生産は難しいことが報告されている。さらに、従来の報告の大部分はタキソールならびにタキソール類縁体の生産性のみに注目し、生合成ルートを加味したタキサン化合物全体の研究はまだ緒についたばかりである。そこで我々は入手容易な日本イチイ (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.) から、再現性のよいカルスの誘導と定常的に増殖可能なカルスの培養に主眼を置いて研究を始めた。さらに、その生産物についての検索をタキソール類縁体に限定せずに幅広く行なうと共に、生産物を制御するエリシエーターとしての種々の添加物の検討を行なった。さらに、このカルスが taxol **1** ならびにタキソール類縁体とともに、極めて高い収率で taxuyunnanin C **2** を始めとする低い酸化度の 4(20), 11-taxadiene- 2,5,10,14-tetraol-2,5,10-triacetate の 14 位水酸基が異なるアシル基でアシル化された同族体 **2** ~ **6** を生産していることを見出したので報告する。



2. 実験

日本イチイ (*Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc.) より切り出した切片を常法により洗浄、滅菌し、種々の濃度のオーキシンを添加し、通常の2倍量のビタミン類を加えた改変ガンボークB5培地に置床して、27℃、暗所で30~40日培養してイチイカルスを誘導した。このカルスを同一の培地、条件で40~50日毎に継代することにより、増殖性に優れたカルス系を選別した。生産物の分析、分取は凍結乾燥を行なったカルスを用い、イチイ針葉の例に準じて行ない¹⁾、生合成の初期段階と考えられる低い酸化度のタキサン化合物からタキソールならびにタキソール類縁体までを系統的に分析した。さらに、安定して増殖するカルス系に対して種々の添加物を加え、タキサン化合物の全体的な挙動を追跡した。

3. 結果

1) カルスの誘導

始めにカルスの外植体として用いる日本イチイ（仙台市において1996年4月採取）の植物部位ならびに殺菌条件の検討を、針葉、新芽、若茎、茎、樹皮、木質部等をから切り出した切片を用い、誘導のオーキシンとしてナフチル酢酸(NAA)を加え、27℃、暗所で30~40日培養して行った。この結果から、外植体部位としては新芽または若茎を用い、草本類よりやや強めの殺菌条件で再現性良くカルスを誘導できることを確かめた。以後の検討には年間を通じて試料が得られる直径2~3 mmの若い茎 (young stem) を外植体として用いた。続いて、NAA以外のオーキシン等の添加物による誘導を検討し、2,4-ジクロロ酢酸 (2,4-D)ならびに新規なインドール酢酸である4-クロロインドール酢酸 (4-Cl-IAA)、さらに培地にオリゴサッカライドの一種を加えた場合も高いカルス誘導率を示した。本実験の場合、これらのオーキシン類の濃度は、文献に報告されている値に比べいずれも低い濃度で誘導出来ることが認められた。また、これまでの実験から、冬、夏季に採取したイチイの方が秋、春に採取したものより高い誘導率を示す傾向が認められた。

2) 培養ならびに選抜

上記の方法により得られたカルスについて同一の培地、培養条件で40~50日毎に継代し、カルスの新鮮重量を測定して増殖性に優れたカルス系を選別した。例としてオーキシン (カルス誘導化剤：植物ホルモンの一種) としてナフチル酢酸(NAA)を異なる濃度で用いた場合の増殖率の継代毎の変化を図1に示した。

この結果から、NAAは低濃度のほうが安定した増殖を示し、高濃度になると継代を重ねるに連れ増殖性が低下することが認められた。このほかに、二次代謝物の生産を向上させることが知られている種々のエリシター類、オリゴサッカライド、褐変防止剤としてのポリビニルピロリドン (PVP) の添加等を検討した。このなかで比較的増殖性の良い (培養50日で平均重量倍率 2~3倍) NAA 0.5 mg/Lのみを用いたカルスの継代毎の増殖率を表2に示した。さらに、同条件で繰り返しカルスの誘導と培養を試み、再現性を検討した。このような増殖性の良いカルスをまず大量培養し、増殖した段階でタキサン類の生産を向上させるエリシター類を加え、taxol を生産することもひとつの手

法と考えられるので、このカルスについて生産物の検索をすでに報告したイチイ針葉¹⁾の例に準じて系統的に行った。

Table 1. NAA添加濃度によるカルス生重量倍率

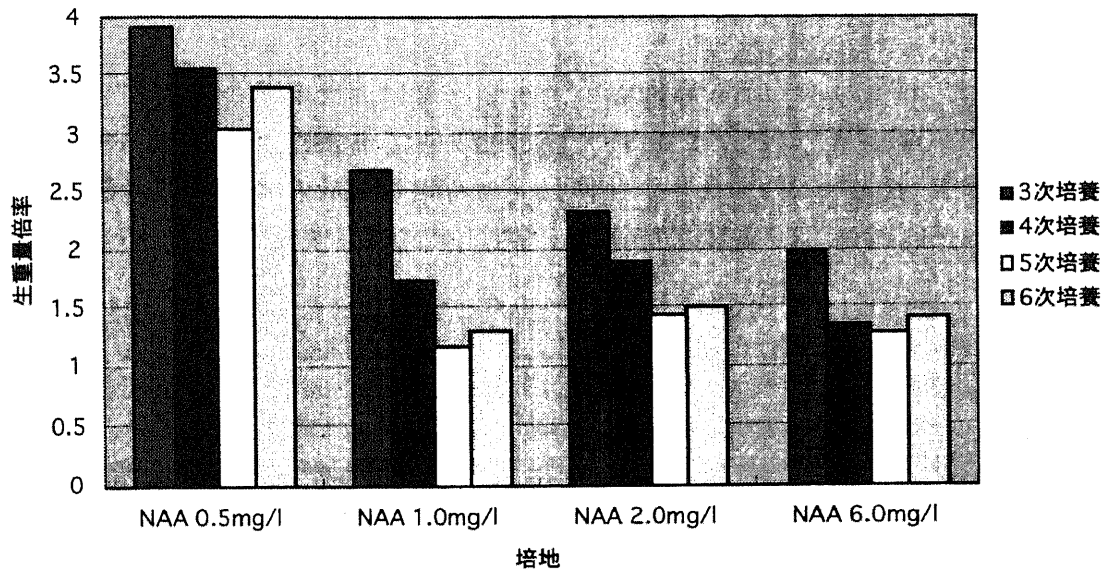


Table 2. Growth rate of the callus culture initiated from *Taxus cuspidata*

incubation (days)	Initial weight (g)	Final weight (g)	Growth rate Initial / Final weight
3 rd (50)	5.73	22.4	3.91
4 th (40)	18.36	65.16	3.55
5 th (40)	62.48	189.64	3.04
6 th (40)	178.75	609.18	3.41
7 th (50)	513.30	1,450	2.82
8 th (50)	1,330	3,843	2.89
9 th (50)	1,008	2,672	2.65

NAA 0.5 mg/L, modified Gamborg B5 medium, at 27°C in darkness

その結果、taxol 1 (0.01%, 乾燥カルス基準)ならびにタキソール類縁体と共に taxuyunnanin C 2 を始めとするタキソール生合成の初期段階にあると考えられる酸化度の低い14位アシル同族体 2 ~ 6 を極めて高い収率(合計で0.486%)で生産していることを確認した。この2 ~ 6 は、中国産のイチイ (*Taxus Chinensis* var. *Mairei*)より誘

導したカルスからの報告例³⁾があるが、本実験におけるその生産性は約4倍となり、タキソール類縁体への合成中間体として考えるとその生産性の挙動は興味深い。そこで、このカルスに種々の添加物を加えタキサン生産物全体の変化を検討しているが、これまでに、代表的なエリシター化合物であるジャスモン酸メチルを添加することにより、taxol 1 (0.026 %)のみならず、アシル同族体 2 ~ 6 (1.505 %)を含めタキサン生成物全体が顕著に増加することを認めた。

現在、さらなるタキソールの生産性向上と大量生産に向け実験を行っているが、限りある天然資源に依存することなく、また、低いコストで有害な排出物を出すこともない再生可能な植物培養細胞からのタキソールなどの有用生理活性物質の生産法の開発は意義あるものと考えられる。

謝辞

本研究は本学工学部 安藤政義 教授の御指導のもと行われたものであり、また、適切な御助言をいただいた本学農学部 内山武男 教授ならびに本学自然科学研究科 萩原久大 教授、鈴木敏夫 助教授に深く謝意を表します。本研究の実験を共同して担当して頂いた本学工学部安東研究室の学生諸氏に深く感謝いたします、

本研究の一部は平成10年度科研費 奨励研究(B) (課題番号 10915014)の援助により行われた。

<参考文献>

- 1) M. Ando, J. Sakai, et al., *J.Nat. Prod.*, **60**, 499 (1997).
- 2) 安東政義, 坂井淳一, 他, 第40回天然有機化合物討論会 (1998年10月, 福岡) 講演要旨集 p.353.
安東政義, 坂井淳一, 他, 第42回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (1998年10月, 福岡) 講演要旨集 p.272-280.
- 3) W. Ma, et al., *J.Nat. Prod.*, **57**, 1320 (1994).