

植物培養細胞・組織による活性成分の生産と薬用植物の育種に関する研究 —特にForskolin原料植物*Coleus forskohlii*について—

九州大学 薬学部

正 山 征 洋

The effective range of the competitive ELISA for detection of forskolin content in clonally propagated plant organs of *Coleus forskohlii* using monoclonal antibodies extends from 5ng/ml to 5 μ g/ml.

Shoot tips of *C. forskohlii* were cultured repeatedly on the MS medium supplemented with NAA(0.5mg/l) and BAP(0.5mg/l) at 25°C under the 16hr irradiation for 1 month to form multiple shoot complex. A correlation between the forskolin accumulation and the growth rate was investigated using the clonally propagated shoots. An increase of forskolin content was noted, beginning at week 6. Flowers, rachises, leaves, stem, tuberous roots and roots were analyzed. Tuberous root and the stem base contained a higher amounts of forskolin than other organs. The forskolin content in the stem decreased gradually towards the top of the shoot. Quantitative determination of forskolin content in the plants cultivated in different temperature was investigated by ELISA. The temperature clearly affected the production of forskolin, demonstrating that the contents of forskolin was highest at 20°C than at 15°C and 30°C.

An immunoaffinity column chromatography using anti-forskolin monoclonal antibodies appears to be far superior to previously published separations based on crystallization and chromatography. The capacity of the column is 9 μ g/ml of gels. Forskolin has been isolated directly from the crude extractives of tuberous roots and the callus culture of *C. forskohlii*.

1 緒 言

生薬の90%以上を輸入に依存し、その内の約80%は自生種により賄われているという。この現実は何を意味するのであろうか。一つには資源の枯渇が浮上してきている。それと同時に医薬品であるが故に品質に大きな差が生じ、製剤の力価に影響を及ぼす事が容易に想像出来る。我々は漢方処方に繁用される半夏、地黄、附子、朮類、人參類や竜胆、淫羊、当薬等の原植物に付いて、上記2点をクリアすべく、バイオテクノロジー的手法により、ウイルスフリー品種の育成、均質な品

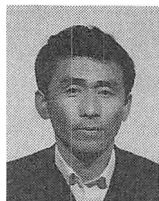
種の作出等の育種研究を行ってきた。これら研究の延長線上には各種耐性品種、例えば耐病性品種の育成がターゲットとなり、この目的を遂行するために溶菌酵素遺伝子の導入実験等を行っている。一方有効成分の高含有品種の育成も重要である。高含有品種の育成を達成するためには、簡便で高感度かつ再現性に優れたアッセイシステムの構築が要となることは周知の事で、このため種々の有用成分に対するモノクローナル抗体(MAb)の作成とそれを用いるEnzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)を確立すべく研究を行っている。

Forskolinはインド地方に自生する*Coleus forskohlii*(シソ科)の根茎に含有されるラブダノ型ジテルペンである。本植物はアユルベダにも収載され、心臓病、呼吸器疾患、不眠症等に適用されてきた。近年活性成分としてforskolinが単離された¹⁾。Forskolinはadenyl cyclaseを強力に活性化しcAMPを増加する作用メカニズムが明らかとなり²⁾、医薬品素材として注目されるに

Production of bioactive compound and breeding of medicinal plants by plant tissue-cell culture-Study on *Coleus forskohlii* that produces forskolin

Yukihiro Shoyama

Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Kyushu University



至っている。また、forskolinの著しい色素細胞化現象が知られているが、この現象をコスメトロロジーに応用しようとする試みは皆無である。

Forskolinは分子内にアシメ炭素を8ヶ有する事から光学活性体を合成することは極めて困難と考えられる。このため天然資源から抽出単離を行っている現状である。また、*C. forskohlii* の培養細胞からforskolinを生産する研究が行われているが、その含量の点から現状のままでは実用化の可能性は極めて小さいと目されている。かかる現状からforskolin高含有 *C. forskohlii* 品種育成を目的としたforskolinのアッセイ系を構築するための抗forskolin MAbの作成が必須となろう。本研究では抗forskolin MAbの作製とそれを用いたforskolinの高感度なアッセイ系としてELISAを確立した。また一方では *C. forskohlii* の培養系を検討し、高含有株選抜の手法を確立した。更に抗forskolin MAbを用いた抗体カラムを作製し、栽培株や培養細胞の粗エキスをダイレクトに精製出来る方法を開発した。

2 実 験

1. 抗forskolin MAbの作成^{3, 4)}

Forskolinは、免疫源とするためにsuccinateをリンカーとして牛血清アルブミン (BSA) と結合した。マウスに免疫後、常法により脾臓細胞とマ

ウスミエローマ細胞のハイブリドーマを調製した。ハイブリドーマのコロニーが成長した段階で

培養上清について、forskolin-ヒト血清アルブミン (HSA) を用いてELISAを行い、陽性コロニーを選抜し、タイプとサブタイプを決定した (Table. 1)。ハイブリドーマ1A9をスケールアップしproteineAアフィニティーカラムで精製し、MAbを得た。

2. ELISAの確立

96穴のイムノプレートに100ng/mlのforskolin HSAを100 μ lずつ添加し、インキュベート後、geratin-PBSでブロッキングした。本プレートに各種濃度のforskolin溶液100 μ lとMAb溶液 (0.7 μ g/ml) 50 μ lを加えてインキュベートした。洗浄後peroxidaseでラベルした抗マウス二次抗体の千倍希釈液を添加し、1時間インキュベートした。洗浄後基質を添加し15分後に発色をプレートリーダーで測定した。

3. アフィニティーカラムの作製

精製したMAb (10mg) のPBS溶液を活性化CNBr-Sephrose 4B (600mg) ゲルに加え、室温下2時間反応した。反応後未反応基をグリシンでブロッキングし、NaHCO₃-NaCl溶液で洗浄した。遠心してゲルを集めPBSで洗浄後カラムに充填し、アジトナトリウム溶液を加え保存した。

4. アフィニティーカラムによる粗抽出エキスをforskolinの単離

根茎、培養カルスの乾燥粉末 (10mg) をジエチルエーテルで5回抽出。溶媒を留去後メタノールに溶解し、PBSで16倍に希釈した。溶液をろ過後、アフィニティーカラムに添加し、4℃で90分放置後、洗浄液で繰り返し洗浄した。過剰のforskolinが流出しなくなったら溶出液 (45%メタノール含有PBS) でforskolinを溶出した。

Table. 1 List of monoclonal antibodies against forskolin.

MAbs	Isotype	Light chain
1A9	G1	κ
4G12	G2b	κ
9D12	M	κ
9E12	M	κ
11A9	M	κ
12F9	M	κ

5. *C. forskohlii* の培養

C. forskohlii の成長点を無菌的に摘出し、NAA, BAP (0.5mg/l) 添加MS培地へ置床し、25℃, 16時間日長、1か月培養した。増殖したシュート切片を同一条件下で繰り返し培養した。増殖シュートをホルモン無添加MS培地で同一条件にて培養し発根させてクローン植物を得た。

6. *C. forskohlii* の栽培

上記のクローン植物をバイオトロンの各温度室 (15、20、30℃) と圃場にて栽培した。

3 結果

1. Forskolin-BSAコンジュゲートをMALDIマススペクトルで分析したのがFig.1である。この結果、従来は間接的な測定手段でのみ確認されてきたハプテンー蛋白コンジュゲートであるforskolinとBSAの結合が極めてクリアーにされ、結合モル数を算定することが可能となった。

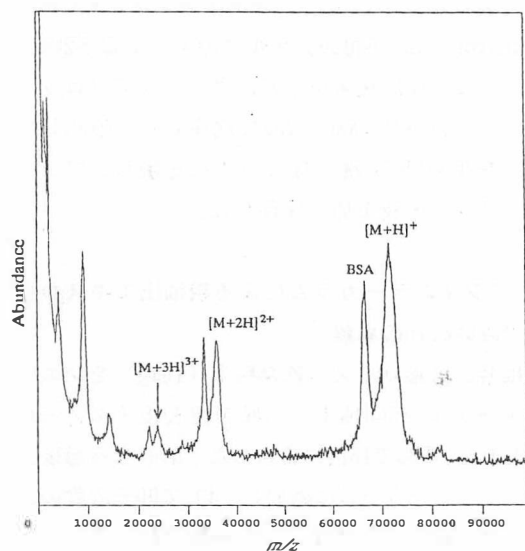


Fig.1 MALDI co-mass spectrum of forskolin BSA conjugate and BSA

2. 抗forskolin MAbの作成

直接ELISAでスクリーニングしたところ、ハイブリドーマ1A9が感度の点で最も優れている事が判明したのでスケールアップしproteineAアフィ

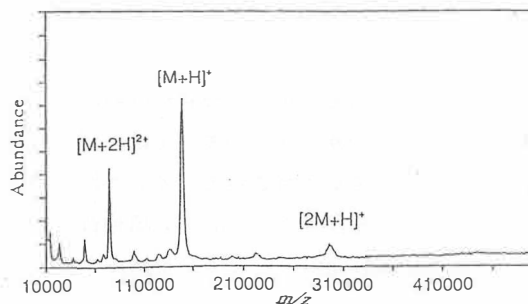


Fig.2 MALDI mass spectrum of monoclonal antibody against forskolin

ニティーカラムで精製した。Fig.2は精製したIgG (MAb) のMALDIマスで、ほぼ純粋な蛋白であることが窺える。

3. ELISAの確立^{4, 5)}

精製したIgGを用いて競合によるELISAから検量線を作成したのがFig.3である。5ng/ml-5μg/ml

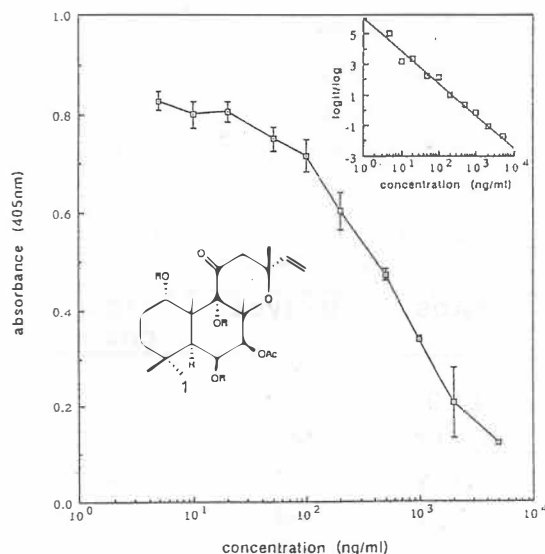


Fig.3 Calibration curve of forskolin

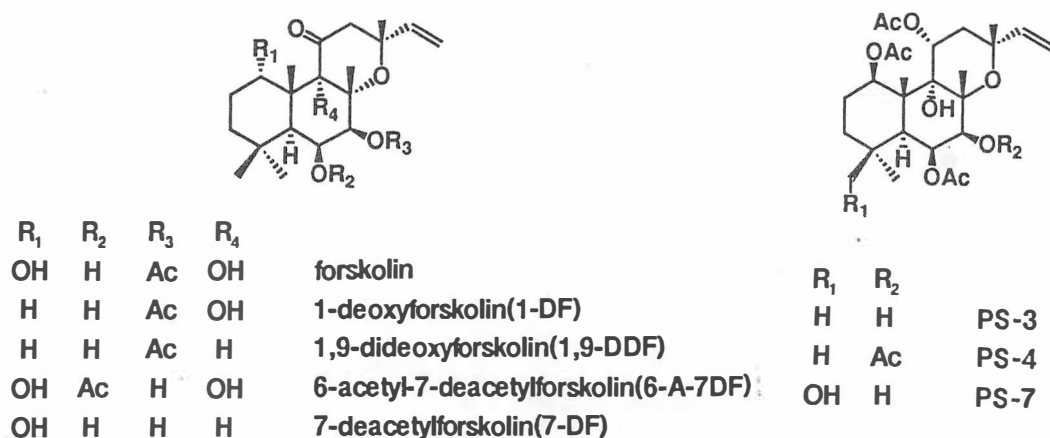


Fig.4 Structures of forskolin and related diterpenoids

の範囲内で良好な直線性が得られ十分に定量が可能である事が明らかとなった。Fig. 4にforskolinの類似化合物の構造とTable. 2にcrossreactionを示している。この結果7-deacetyl forskolinのcross-reactionが5.6%である他は殆ど問題にな

Table.2 Cross reactivities determined using forskolin analogs.

Analog	Cross reactivity(%)
1-DF	0.63
1,9-DDF	1.30
6-A-7-DF	1.13
7-DF	5.57
PS-3	0
PS-4	0
PS-7	0

らない程度低かった。このことから本ELISAはforskolinに特異的かつ高感度な定量法である事が判明した。

以上確立したELISAを用いて *C. forskohlii* におけるforskolinの挙動を詳細に検討した。

4. 成長過程におけるforskolinの消長

培養により得られたクローン植物を土壌に移植、栽培し、forskolin含量をELISAにより追跡した結

果をFig. 5に示す。2週目からforskolinが生合成されるが5週目までは0.01 μ g/mg dr. wt. 以下と、非常に低い値であった。根の成長が盛んとなる6週目から含量が暫時増加し、茎が急速に成長を始める11週から含量増加が著しく forskolin含量が0.5g/mg dr. wt. となり、12週では0.7g/mgdr. wt.

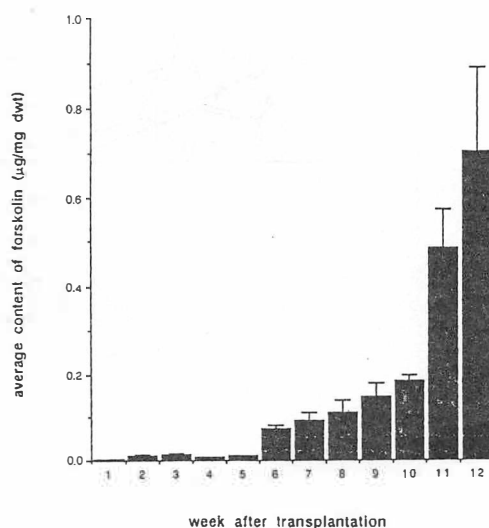


Fig.5 Average content of forskolin in the clonally propagated *Coleus forskohlii* plant according to growth stage

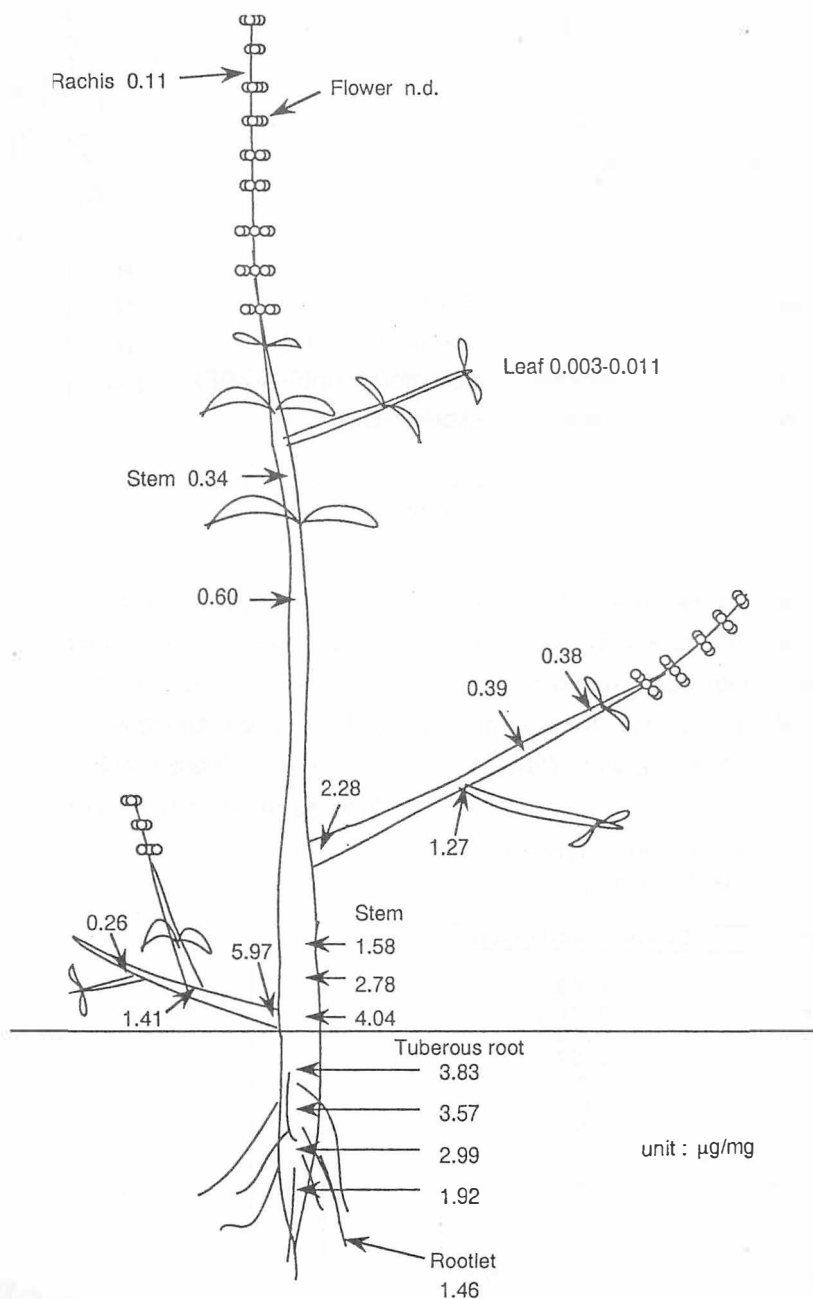


Fig. 6 Distribution of forskolin in one-year-old *Coleus forskohlii*

に達した。なお葉には forskolin を含有しないことが明らかとなった。

5. 部位による forskolin 含量の変動

20℃室でクローン植物を1年間栽培し、Fig. 6に

示す通りの各部位別にサンプリングし、凍結乾燥したものをELISAによりアッセイした。この結果花、花柄等には殆ど forskolinは含まれないことが明らかとなった。茎には0.3-4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ dr. wt. のマイクロ変動が認められた。茎においては根茎との境目が最も含量が高く、上部程低含量であった。一方根茎においては茎との境界部位が含量高く、下方程低下することが明らかとなった。また、枝についても同様に大きな変異が認められた。

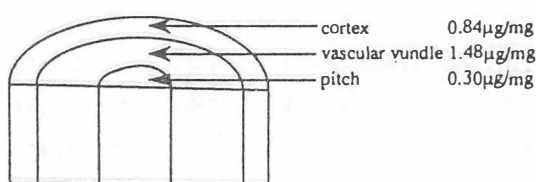


Fig. 7 Distribution of forskolin in tissues

茎を皮部、維管束部、柔組織に分けそれぞれに付いてアッセイしたのがFig. 7である。維管束部、皮部、柔組織の順に含量が低下している。

6. 生育環境と forskolin 含量⁶⁾

バイオトロンにおいて、15、20、30℃各温度室

Table. 3 Distribution pattern of forskolin in different tuberous root segment in clonally propagated *coleus forskohlii*¹⁾.

Temp.	Tuberous root section ¹⁾	Ave. contents ($\mu\text{g}/\text{mg}$ dw) ²⁾	Shape of tuberous root ⁴⁾
15±1℃	1	2.83±0.28	
	2	1.36±0.39	
	3	1.24±0.23	
	4	1.15±0.16	
20±1℃	1	7.87±0.35	
	2	6.24±0.49	
	3	6.55±1.25	
	4	5.73±0.61	
	5	4.49±0.49	
	6	5.49±0.34	
	7	5.06±0.65	
30±1℃	1	3.83±0.38	
	2	3.57±0.24	
	3	2.99±0.30	
	4	1.92±0.42	

1) Single clonally propagated plant as indicated in Table 1 was used for analysis.

2) The main tuberous roots cultivated at 15 and 30℃ were sectioned into pieces (10 mm each), and those at 20℃ were cut into pieces as indicated in the shape, respectively. Section No. 1 shows the base of tuberous root.

3) A single plant was tested individually, and the content was expressed by the average of 3 measurements.

4) Standardized tuberous root was selected and used for analysis.

で栽培し、成長度を調査し、また個体の根茎を Table 3に示す如く切断し、乾燥後 forskolin 含量をアッセイした結果が Table. 3である。

この結果、特に根茎の生育は20℃が最も良好で、30℃区がこれに続いている。Forskolin 含量についても20℃区が最も高く、30、15℃の順であった。

7. アフィニティーカラムの作製とその応用⁷⁾

Forskolinは殆ど水に不溶なのでアフィニティーカラムに付す場合、有機溶媒の添加が不可欠である。そこでアフィニティーカラムのタンパク部分にダメージが少ないメタノールを選び、適切なメタノール含量を設定したのがFig. 8である。Fig. 8から45%メタノール含有PBSにて forskolin が完全に溶出することが判明した。

次にアフィニティーカラムを用いて粗エキスから forskolin を直接精製することを検討した。

Fig. 9に示すように大過剰の forskolin が洗浄溶媒により流出してくる。充分洗浄し forskolin の溶出が認められなくなった後に、上記の溶出溶媒を添加すると吸着していた forskolin が溶出し、シャープなピークを示した。この溶出パターンを

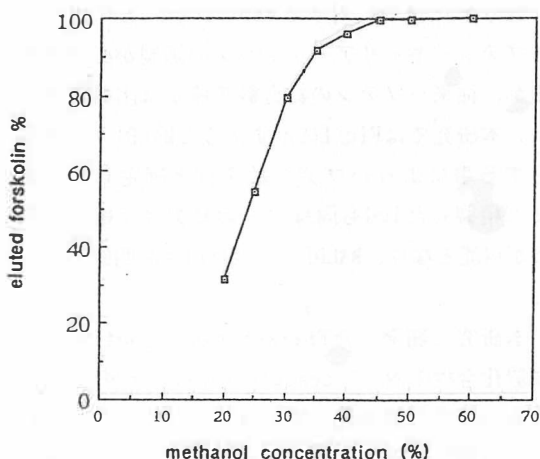


Fig. 8 Elution of forskolin by methanol solution

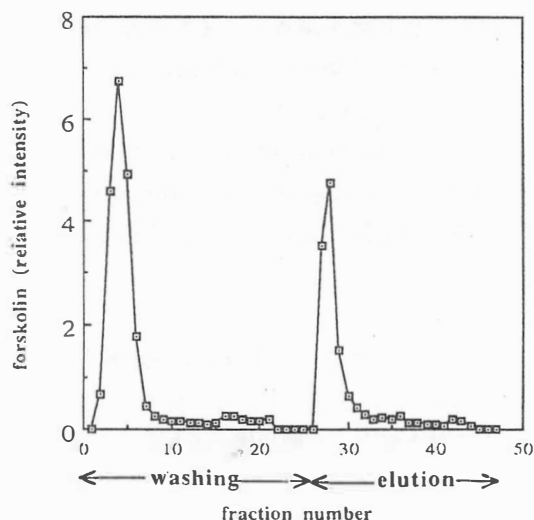


Fig. 9 Elution profile of forskolin

TLCにより検討したのがFig. 10である。この結果、大過剰のforskolinが洗浄溶媒で溶出すると共に関連ジテルペン類や未同定の化合物等が吸着することなく溶出していることが明らかとなった。

完全に洗浄後、溶出溶媒を添加することでforskolinが溶出していることが判明した。なお、微量の7-deacetylforskolinの溶出も認められた。

4 考 察

低分子化合物に対するMAbを作製するに当たりハプテン-キャリアタンパクの調製が必須であるが、従来ハプテンの結合数の確定は困難であった。本研究ではFig. 1に示すようなMALDIマスを測定する事によりハプテン数を10と確定した。また、精製したIgGも同様にその精製度を確認する事が可能となり、MALDIマスの有用性が明確となった。

本研究で開発したELISAのcross-reactivityは類似化合物の内、7-deacetylforskolinが5,6%であるのみで、他の化合物に対しては感作しておらず、特異性の高いアッセイ系である。また、測定感度も高く、再現性も高い優れたアッセイ系と言える。

培養系を用いて高含有株を作出する場合、選抜方法の選定は最も基本的な重要要件である。生薬の内、附子のアコニチン系アルカロイドは採取時期や栽培温度により大きく変動することを明らかにしてきたが、多くの植物において生育時期や生育環境、また植物の部位等により有効成分が大きく変動する事は容易に想像出来る。このため*C. forskohlii*に付いても育種研究をスタートするにあたり、かかる基礎的な研究が必須となろう。本植物をインビトロの系でマイクロプロパゲーションし育成した株を生育時期を追って定量した結果、根の成長が盛んとなる6週目から含量が暫時増加し、茎が急速に成長を始める11週から含量増加が著しくforskolin含量が $0.5 \mu\text{g}/\text{mg dr. wt.}$ となることが明らかとなったので、培養系で変異源を投与し、少なくとも11週間栽培し、ELISAでアッセイして、優良株を選抜するマニュアルを確立することが出来た。本プロトコールに沿って現在優良株の選抜を実施中である。

次にバイオトロンにて栽培した株に付きELISAで詳細な検討を行った結果、従来はforskolinは根茎に最も多量に含有すると信じられていたが、本研究結果から茎にも多量含有され、その量は根茎との接点辺りが最も高含量であることを明確にした。反対に根茎は上部程含量高く、茎との接点部位が最も含量が高いという新知見を得た。これらの発見は実用栽培において原料部位を拡大し、収量アップにつながる有益な知見と考える。

アフィニティークラムは極めて特異性が高いため、粗エキスから目的の化合物を一回のカラムで単離することが可能と考えられる。*C. forskohlii*の根茎や培養細胞・組織の抽出粗エキスを本アフィニティークラムに付す事により、forskolinを得る事が出来た。

しかし、本MAbが7-deacetylforskolinに対して約5%のcross-reactivityを持つ事から本化合物がforskolin画分に微量共存して溶出された。そこでこの混合物を 4°C 、ピリジン中無水酢酸と反応させることにより7-deacetylforskolinを

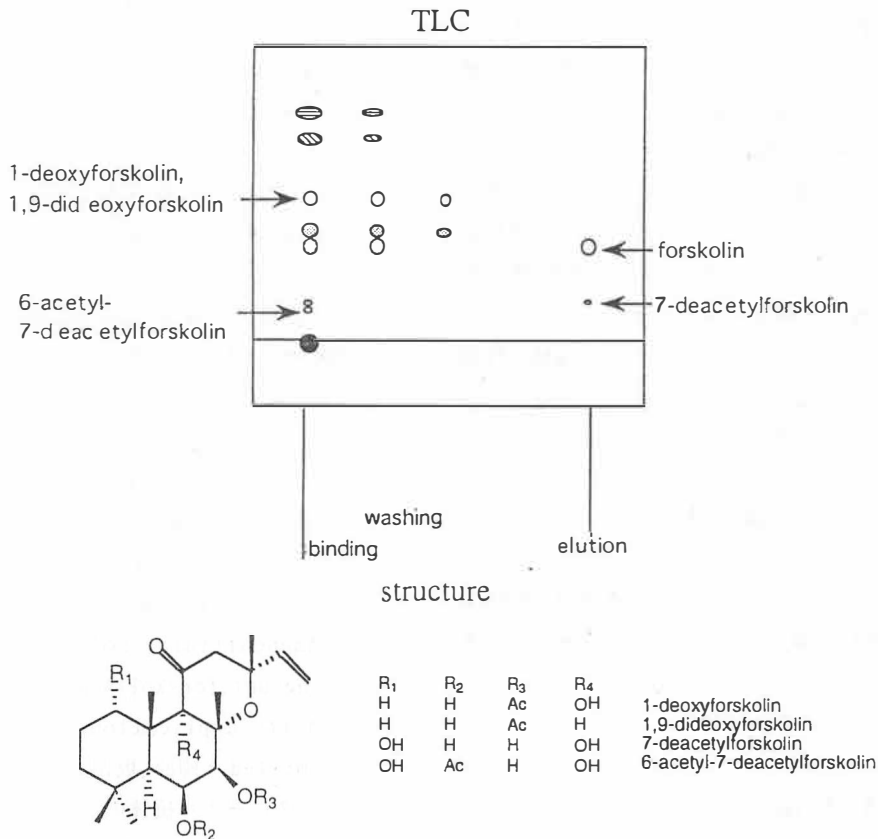


Fig. 10 Identification of forskolin and its derivatives

forskolinへと変換し、純粋なforskolinを得る事が出来た。本法はforskolinの吸着容量 $9 \mu\text{g}/\text{ml}$ ゲルで、回収率85%であった。キャパシティーは大きくないが、純粋なforskolinを必要とする場合、通常のカラムクロマトではかなりの回数繰り返し精製する必要があるが、本法を応用すれば一度のカラムで達成される。

また、forskolinは分子内にアシメ炭素を8個有する事から、光学活性体の合成は極めて困難と目されている。このため本アフィニティーカラムによる光学分割の応用も考えられ、この応用面も進行中である。

Forskolinはアデニールシクラーゼを活性化し、cAMPを増加することによりその生理作用は多岐にわたっており、医薬品開発のターゲットとなつて

いる事は自明である。しかし色素細胞化現象を促進する作用に付いては余り知られておらず、本研究の目的の一つがこの点にあることを述べた。この分野の研究に付いてもforskolinが比較的容易に得られる環境が出来たので、今後精力的に遂行し、コスメトロジーの領域に応用したいと念じている。

5 総括

植物組織・細胞培養技術を応用してforskolin高含有 *C. forskohlii* の育種研究を展開中である。本研究では選抜の基本となる高感度で特異的、再現性良好な、また、簡便なアッセイ法として、MAbを用いたELISAを開発した。これを基にミュー

タントの選抜タイミング等を明確にした。また、マイクロプロパゲーションで得られたクローン植物を栽培し、または培養細胞の抽出粗エキスをから forskolin を極めて簡便に単離する方法を確立したことから、forskolin の応用研究への道が開かれたと考えている。また、本研究結果から MAb が有用で多方面に応用が可能なことを認識することが出来た。現在アヘンアルカロイド⁸⁾、ステロイドアルカロイド⁹⁾、大麻成分¹⁰⁾等の MAb の作製へと進展中である。また、MAb の可変部分の cDNA をクローニング中で、この方面も進展中である。

謝 辞

本研究がコスメトロジー研究振興財団の助成金により成された事を記し、厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) Bhat SV, Bajwa BS, Dornauer H, et al. : Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus forskohlii* Briq., *Tetrahedron Lett.*, 19 1669-1672 1977.
- 2) Seamon KB, Kenneth B, Seamon HB, et al. : Forskolin : unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 3363-3367 1981.
- 3) Shoyama Y, Sakata R, Isobe R et al. : Direct determination of forskolin-bovine serum albumin conjugate by matrix assisted laser desorption ionization, *Org. Mass Spectr.*, 28 987-988 1993
- 4) Sakata R, Shoyama Y, Murakami H. : Production of monoclonal antibodies and enzyme immunoassay for typical adenylate cyclase activator, forskolin, *Cytotechnology*, 16 101-108 1994
- 5) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Rapid analysis of small samples containing forskolin using monoclonal antibodies, *Planta Med.*,
- 6) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Relationship between the content of forskolin and growth environments in clonally propagated *Coleus forskohlii* Briq.; *Biotronics*, 24 1-6 1995
- 7) Yanagihara H, Sakata R, Shoyama Y et al. : Immunoaffinity column chromatography using antiforskolin monoclonal antibody and its application, *Anal. Chim. Acta* submitted. : 柳原、坂田、正山ら : 抗forskolin モノクローナル抗体のアフィニティーカラムへの応用、日本薬学会大115年会講演要旨集、p. 252 1995
- 8) Shoyama Y, Fukada T, Murakami H : Production of monoclonal antibodies Anal. Chim. Acta and ELISA for thebaine and codeine, *Cytotechnology*; in press, 1996
- 9) Tanaka H, Goto Y, Shoyama Y, monoclonal antibodies based enzyme immunoassay for Marihuana (Cannaloinoid) compounds, *J. Immunoassay*; in press, 1996
- 10) Ishiyama M, Shoyama Y, Murakami H, et al : Production of monoclonal antibodies and development of an ELISA for solow-argine *Cytotechnology*, 18 153-158 1996