東京大学農学部演習林報告, 116, 253–265 (2006)

イチョウ細胞培養系におけるステロールと細胞増殖

井上広喜*1, *2・兼行民治郎*1, *3・寺田珠実*1・鴨田重裕*4

Relation of Cell Growth and Phytosterols in Cell Cultures of *Ginkgo biloba*

Hiroki INOUE*1, *2, Tamijiro KANEYUKI*1, *3, Tamami TERADA*1 and Shigehiro KAMODA*4

1. 緒　　言

シクロペンタノヒドロフェナントレン環（$C_{17}H_{28}$）を持つイソプレン化合物をステロイドと総称するが，そのうち特に3位に水酸基を持ち，炭素数27～30のものをステロールという。植物界ではイソプレノイド生合成には二つの経路の存在が知られている[1)]。すなわち，酵素系が細胞質に存在するメバロン酸（MVA）経路と色素体に存在する1-デオキシ-D-キシルロース-5-リン酸（1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate=DXPP）経路である。ステロールは植物において，ファルネシル化プロテイン，ユビキノンをふくむ数種のイソプレノイドと同様にMVA経路を経て生合成される化合物であると報告されている[2)]。スクアレンのエポキシ化，環化，メチル化，脱メチル化，不飽和化の反応により最終的にシトステロール，スチグマステロール，カンペステロールといったC_{29}の主要植物ステロールが生合成される。植物種によってこれらの主要ステロール量の構成比は異なっており，また同一種であっても組織によってその比率は異なるといわれている[3,4)]。

ステロールは細胞膜構成成分として膜の流動性や，それに伴う膜タンパク質の機能に影響を与えている可能性があり，細胞の様々な現象に関与していると思われる[1)]。

これまで，樹木培養細胞を用いた細胞増殖の研究を行ってきたが，ポプラ培養細胞中にβ-シトステロールを筆頭にスチグマステロール，カンペステロールの少なくとも3種のステロールが存在すること，生合成経路上の阻害剤処理によって増殖と培地成分取り込みの低下を誘導されたポプラ培養細胞は，ステロールやMVAの添加で増殖，取り込みを回復することを既に報告した[5)]。

このような過去のデータを踏まえ，本研究ではイチョウ培養細胞におけるステロールの存在とその役割，とくに細胞増殖との関係を明らかにすることを目的とした。

*1 東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻
Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
*2 元所属　理化学研究所植物科学研究センター
RIKEN Plant Science Center
*3 現所属　日本製紙(株)商品研究所
Product Development Research Laboratory, Nippon Paper Industries Co.,LTD
*4 東京大学農学部附属演習林樹芸研究所
Arboricultural Research Institute, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

2. 実　　験

2.1. イチョウ細胞培養と継代

本実験に用いた懸濁培養細胞は東京大学農学部構内のイチョウ（*Ginkgo biloba* L.）の胚から誘導したカルス由来[6]のもので，東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻森林化学研究室で継代維持している。

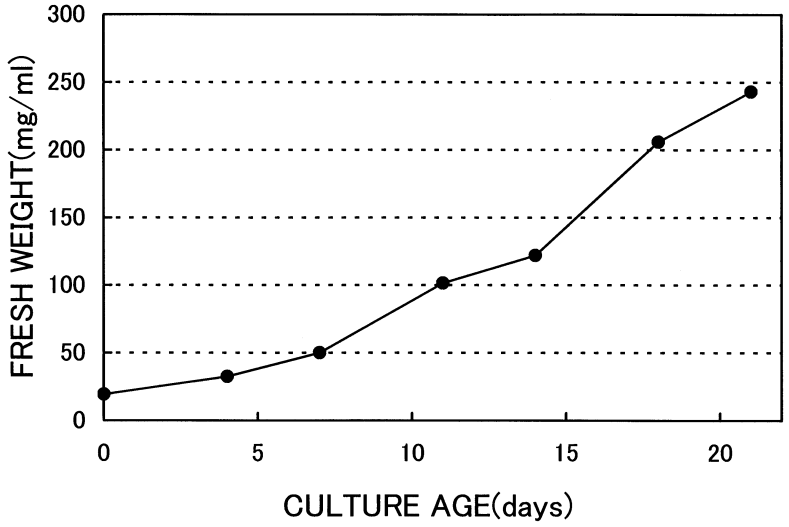


Fig. 1. Time course change in fresh weight of ginkgo cultured cells.

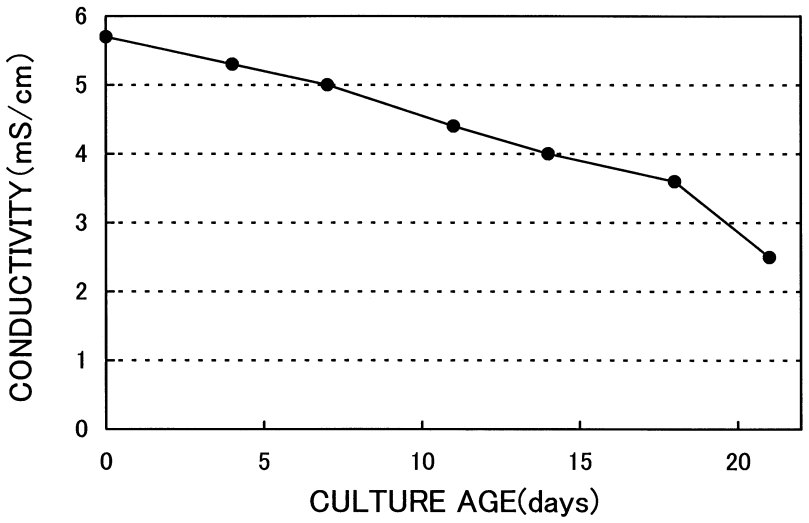


Fig. 2. Time course change in conductivity of culture medium of ginkgo.

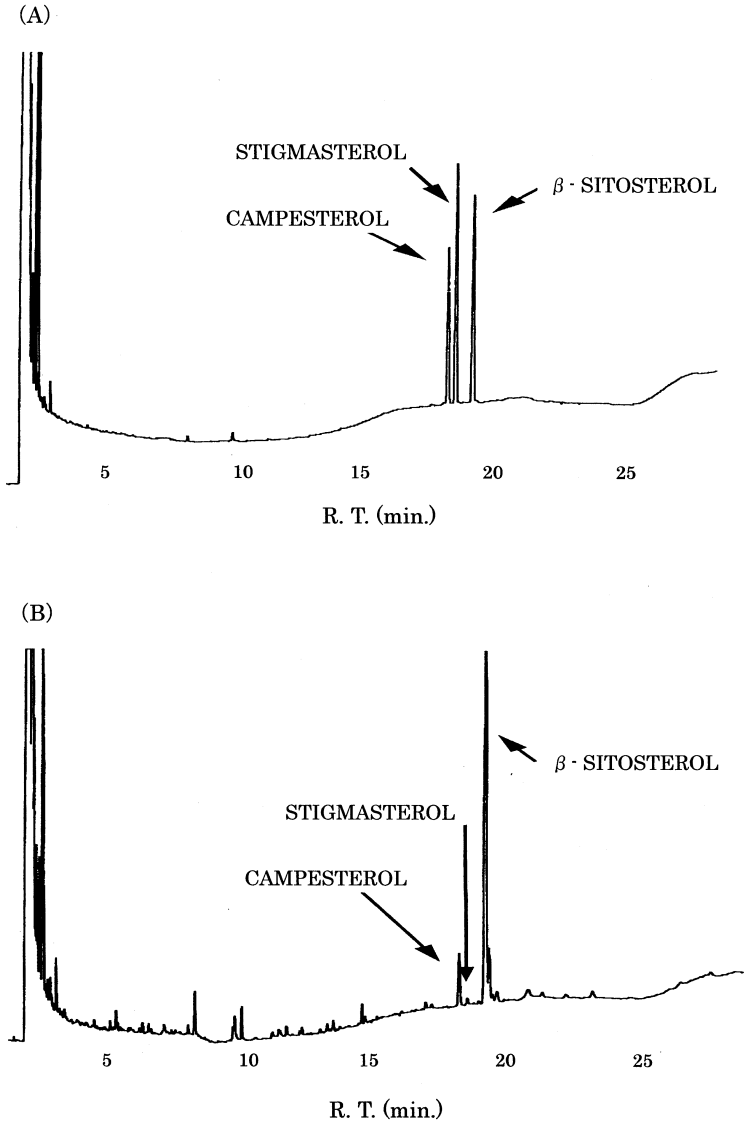


Fig. 3. GC profiles of trimethylsilylated cell extracts and authentic preparations.
(A) Authentic preparations of phytosterols (campesterol, stigmasterol, and β-sitosterol).
(B) Ginkgo cell extracts cultured for 4 days.

継代培養は定法に従い，500ml 容三角フラスコを用いて回転振とう培養（150rpm，26.5°C，暗所）を行った。三角フラスコに塩酸チアミン 0.1mg/l，イノシトール 100mg/l，シュークロース 30g/l，2,4-D 0.5mg/l，カイネチン 0.4mg/l を含む Linsmaier & Skoog[7] 改変培地（pH 5.8-6.0）90ml を入れ，初期細胞密度が約 20.0mg/ml となるように 3 週間毎に細胞を継代した。継代培養期間を通じて細胞の生重量，培地の導電率，細胞中と培地中のステロール量の経日変化を測

定した。

阻害・回復実験には試験管（径：18mm，長さ：150mm）による往復振とう培養法（300rpm, 26.5℃，暗所）を用いた。継代14日目の細胞を50mg/mlの濃度になるように継代培地と同じ培

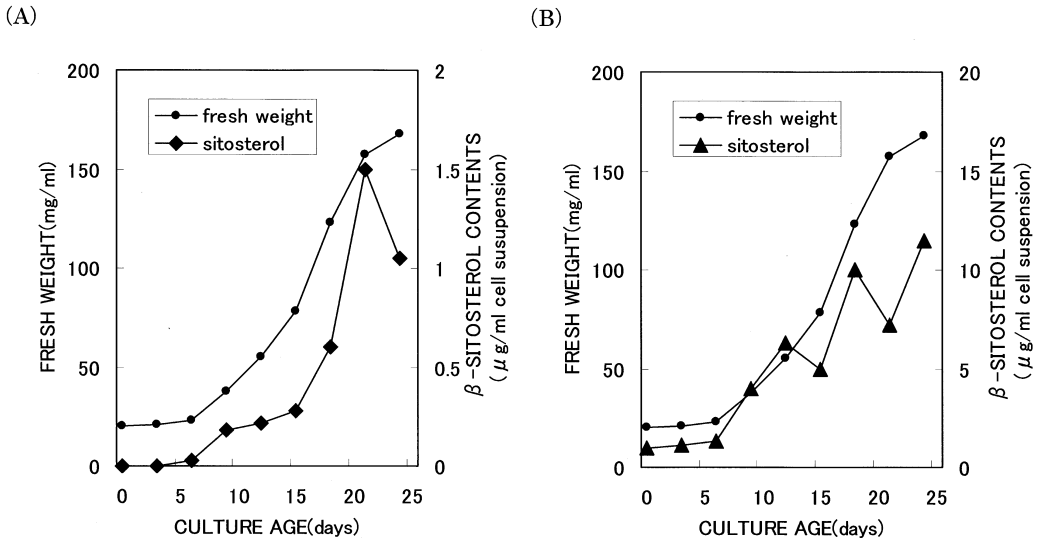


Fig. 4. Time course changes in cell growth and β-sitosterol contents of ginkgo cultured cells.
(A) Medium extracts
(B) Cell extracts

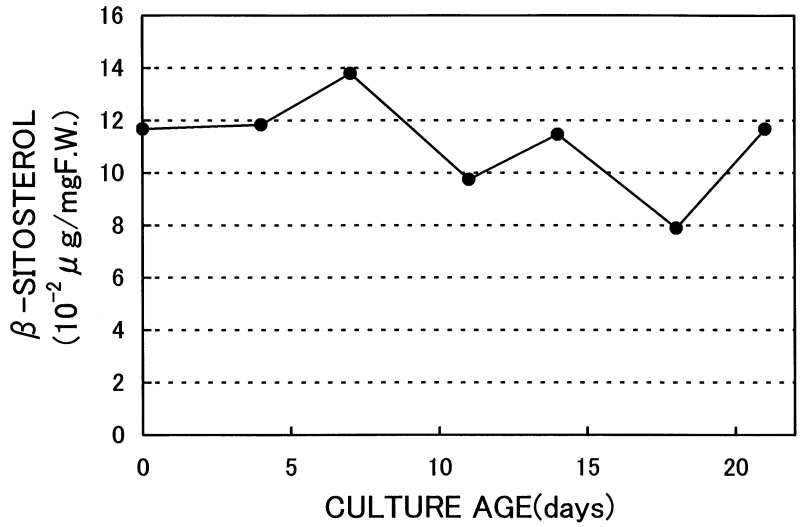


Fig. 5. Time course change in endogenous β-sitosterol contents of ginkgo cultured cells.

地で調製したあと，試験管に5mlずつ移植した。培養0日目にステロール生合成阻害剤のアンシミドール，MVA生合成特異的阻害剤のコンパクチン，またMVAおよびその代謝物である β-シトステロールを添加した。3日目，6日目に試験管中の細胞の生重量，培地の導電率を測定した。さらに細胞を約200mgずつ精秤して-80℃で保存し，ステロール量測定用サンプルとした。

2.2. 各種薬剤の調製

アンシミドール（和光純薬）25.6mgをアセトン2mlに溶解し，精製水で10mlに調製したあとクリーンベンチ内でフィルター滅菌して4℃で保存した。ラクトン型コンパクチン（三共（株）より譲渡）39mgにエタノール1mlを加え，50℃で溶解し，終濃度が0.1N　NaOHとなるように50℃で2時間けん化して酸型コンパクチンを調製した。1N　HClでpH7.5に調整後，精製水で10mlに調製して-20℃で保存した。DL-メバロラクトン（和光純薬）360mgを精製水で10mlに調製して，-20℃に保存し，MVA溶液として用いた。β-シトステロール（和光純薬）8.3mgを10mlのアセトンに溶かして 2×10^{-3}M とし，クリーンベンチ内でフィルター滅菌後に4℃に保存した。

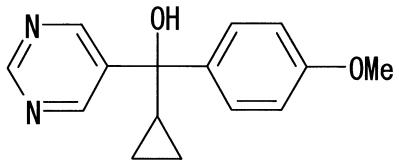


Fig. 6.　Structure of ancymidol.

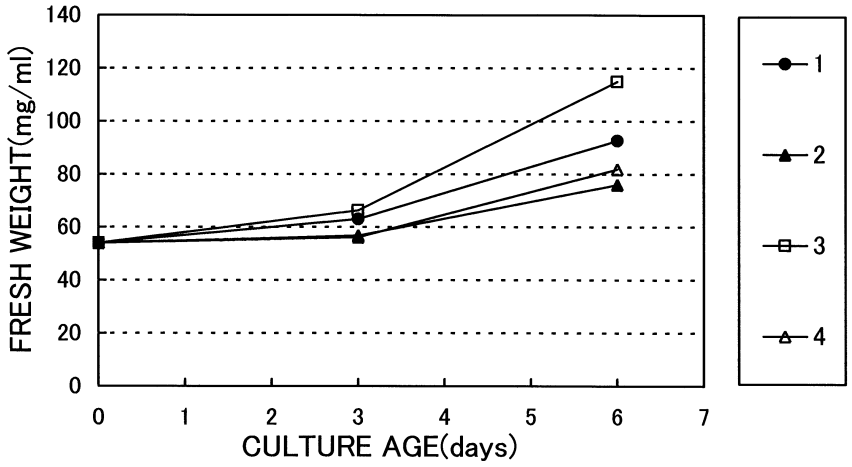


Fig. 7.　Effects of β-sitosterol addition on cell growth of ancymidol treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M ancymidol
3: 0.9×10^{-5}M β-sitosterol
4: 10^{-4}M ancymidol + 0.9×10^{-5}M β-sitosterol

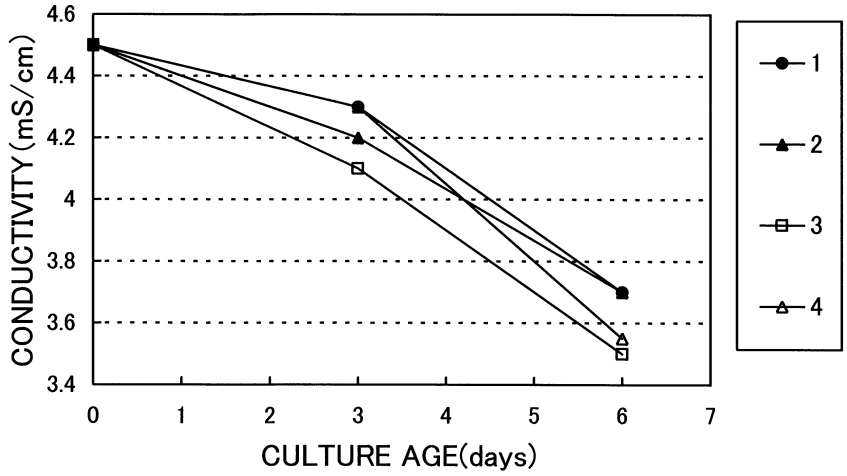


Fig. 8. Effects of β-sitosterol addition on conductivity of ancymidol treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M ancymidol
3: 0.9×10^{-5}M β-sitosterol
4: 10^{-4}M ancymidol + 0.9×10^{-5}M β-sitosterol

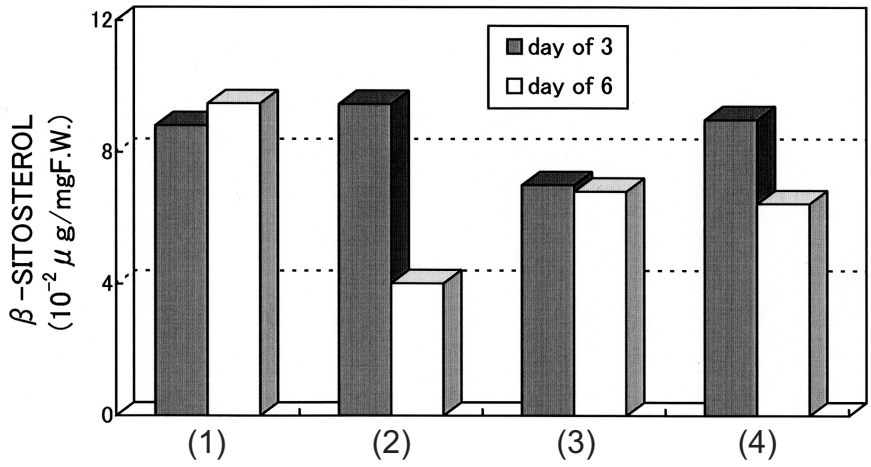


Fig. 9. Effects of β-sitosterol addition on endogenous sterol contents of ancymidol treatment cells.
(1): control
(2): 10^{-4}M ancymidol
(3): 0.9×10^{-5}M β-sitosterol
(4): 10^{-4}M ancymidol + 0.9×10^{-5}M β-sitosterol

2.3.　生重量と導電率の測定

細胞懸濁培養液を採取して桐山ロートでろ過し，ろ紙上に残った細胞を集めて培養液 1ml あたりの生重量を測定して増殖の指標とした。また培養ろ液中の導電率を Twin Cond B-173（堀場製作所）を用いて測定し，培地成分の取り込みを示した。

2.4.　β-シトステロールの定量方法

細胞中のステロールの抽出は，Bligh & Dyer[8] による方法を参考にした。培養細胞（生重量約 200mg）にメタノール 2ml，クロロホルム 1ml，水 0.62ml を添加（細胞中には水が 90％含まれると仮定し，全体としてメタノール：クロロホルム：水＝2：1：0.8 となるように添加。）して粉砕した。クロロホルムをさらに 1 容量（1ml）添加して攪拌することを 2 度繰り返したのち遠心

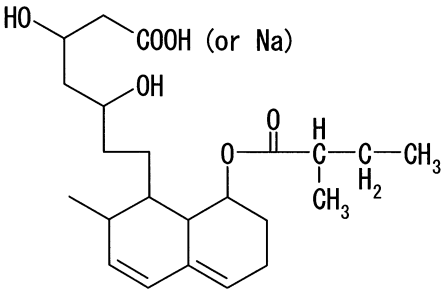


Fig. 10.　Structure of acid type compactin.

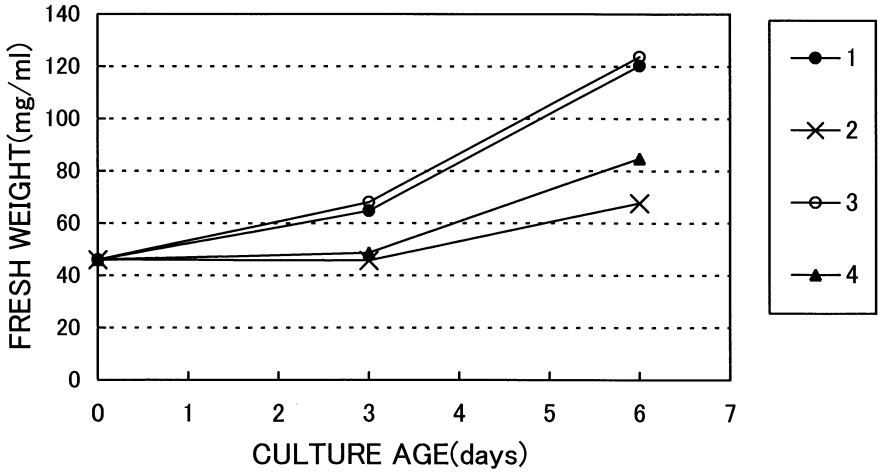


Fig. 11.　Effects of MVA addition on cell growth of compactin treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M compactin
3: 10^{-4}M MVA
4: 10^{-4}M compactin + 10^{-4}M MVA

管に移し, 2000rpmで10分間遠心分離して, クロロホルム層を回収し, GC分析用サンプルとした。

培地中のステロールの抽出は以下の通り行った。培養ろ液4mlにヘキサン2mlを加えて遠心管に回収し，ボルテックスで30秒攪拌後，2000rpmで約10分遠心分離してヘキサン層1mlを回収

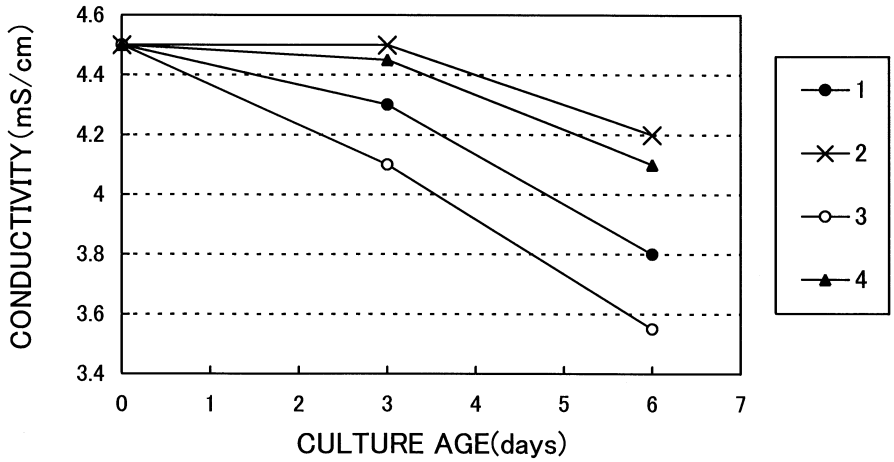


Fig. 12. Effects of MVA addition on conductivity of compactin treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M compactin
3: 10^{-4}M MVA
4: 10^{-4}M compactin + 10^{-4}M MVA

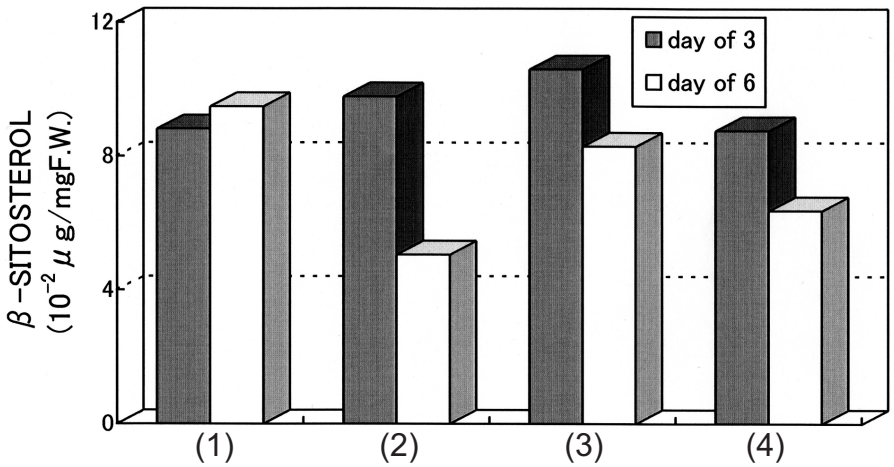


Fig. 13. Effects of MVA addition on β-sitosterol contents of compactin treatment cells.
(1): control
(2): 10^{-4}M compactin
(3): 10^{-4}M MVA
(4): 10^{-4}M compactin + 10^{-4}M MVA

し，GC分析用サンプルとした。

サンプルに適当量のアセトンを加え，同量の *N,O*-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide（東京化成）を用いてTMS化し，GC分析を行った。検量線は β-シトステロール標品を用いて作成した。GCの条件を以下に示した。

機種：GC-14A （島津製作所）
検出器：FID （H_2 0.6kg/cm^2, Air 0.5kg/cm^2）
カラム：Capillary TC-1 （ 0.25mm × 30m ）（ジーエルサイエンス株式会社）
キャリアガス：N_2（1.5kg/cm^2）（スプリット比　1:24）
カラム温度（昇温プログラム）：150°C to 300°C (10°C/min)
300°C constant (10min)
300°C to 315°C (15°C/min)
315°C constant (5min)
注入口温度：315°C

3. 結 果 と 考 察

3.1. 継代用培養細胞の増殖と β-シトステロール量

継代用培養細胞の生重量（Fig. 1）と培地の導電率（Fig. 2）の変化を示した。なお以下すべての実験は2回以上試行し，数値は3検体の平均値として表示した。細胞は21日間の培養で約12倍に増えた。また導電率は5.7から2.5まで変化した。Fig. 3に培養細胞から抽出したステロールのガスクロマトグラムと標品のガスクロマトグラムを示した。この測定結果から，イチョウ培養

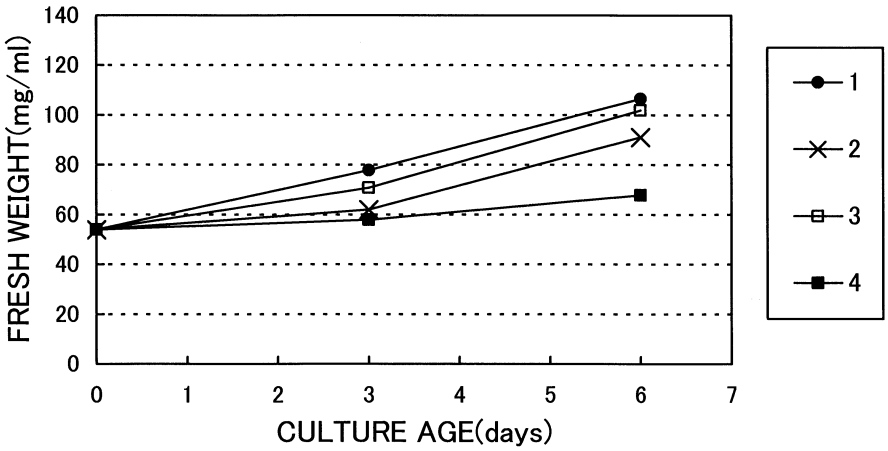


Fig. 14. Effects of β-sitosterol addition on cell growth of compactin treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M compactin
3: 0.9×10^{-5}M β-sitosterol
4: 10^{-4}M compactin + 0.9×10^{-5}M β-sitosterol

細胞において，β-シトステロール，カンペステロールとスチグマステロールの存在が確認された。カンペステロールとスチグマステロールはβ-シトステロールと比較して，微量であったので以後β-シトステロールのみ追うことにした。Fig. 4に培養液中（A）と細胞中（B）のβ-シトステロールの経日変化を示した。三角フラスコあたりのβ-シトステロール量は細胞増殖とともに増加しているのがわかった。またイチョウ培養細胞は，培養期間を通じてβ-シトステロールの約10%を培養液中に浸出させることがわかった。ポプラ細胞培養系ではこの現象が観察されなかった（未発表）。β-シトステロールの浸出がイチョウ細胞培養系の特徴だと考えると，非常に興味深い。今後その役割の検討を要する。ただ細胞内外のステロール量比が，ほぼ一定であったため（Fig. 4），今回の実験では細胞内のβ-シトステロール量に焦点を絞ることにした。増減はするものの培養期間を通じて生重量あたりほぼ同量のβ-シトステロールが生成されていた（Fig.5）。

3.2. アンシミドール処理細胞に対するβ-シトステロールの影響

アンシミドール（Fig.6）は，ヘテロサイクリック構造を持つ含窒素化合物のピリミジン型化合物の植物成長抑制剤として知られ，Cytochrome P450 monooxygenaseに依存する酸化反応の阻害を起こすといわれている[9]。このタイプの植物成長抑制剤は特にテルペノイド生合成，つまり，ジベレリン，アブシジン酸，サイトカイニンといったホルモンやステロールの生合成経路の酵素群をアタックする。ステロールの生合成を阻害することで細胞の増殖や伸長成長が阻害されることが多くの植物で報告されている[10-12]。

予備実験を行ったところ，阻害から回復可能なアンシミドールの添加量は10^{-4}M以下であったため10^{-4}Mのアンシミドールで処理した細胞に0.9×10^{-5}Mのβ-シトステロールを同時に添加することで細胞増殖にどのような影響が出てくるかを調べることにした。グラフに生重量

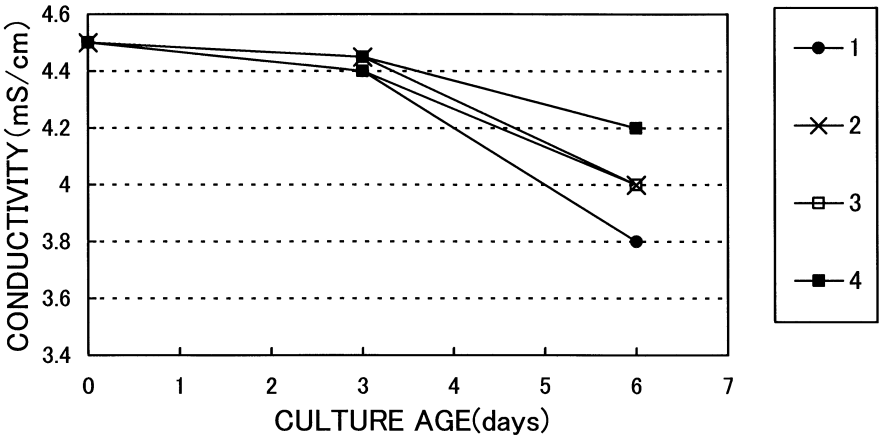


Fig. 15. Effects of β-sitosterol addition on conductivity of compactin treatment cells.
1: control
2: 10^{-4}M compactin
3: 0.9×10^{-5}M β-sitosterol
4: 10^{-4}M compactin + 0.9×10^{-5}M β-sitosterol

(Fig. 7)，培地の導電率（Fig. 8）とステロール量（Fig. 9）の変化を示した。アンシミドール処理細胞では，細胞中のステロール量が培養6日目に急激に減少していることがわかった。すなわちアンシミドールはステロール生合成の阻害剤として働いていることが確認された。このアンシミドール処理細胞に β-シトステロールを添加すると，細胞中の β-シトステロール量が回復することがわかった（Fig.9）。このとき培地成分の取り込みは培養後期に回復を見せた（Fig.8）。ステロールが，培地成分の取り込みを増加させていると考えられた。しかし細胞増殖は殆ど回復させることができなかった（Fig.7）。ポプラ，イネ，トウモロコシ，ダイズ懸濁培養細胞においてアンシミドール，もしくはその類似阻害剤に処理された細胞の増殖が，特定のステロールの添加により完全に回復するということ，ただし回復効果はステロールの種類によって異なるということが報告されている[10]。イチョウ培養細胞において，β-シトステロールが培地成分取り込みに関与しているらしいことは示唆された。しかし増殖回復に対しては，添加濃度，ステロールの種類も含めて，今後更なる検討が必要である。

3.3. コンパクチン処理細胞に対するメバロン酸，β-シトステロールの影響

コンパクチン（Fig.10）はステロール生合成の律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase(HMGR) の特異的阻害剤であり，基質である HMG-CoA に対して拮抗阻害をすることによって MVA への反応を阻害するといわれている[12]。コンパクチンには，ラクトン型と酸型とがあり，酸型の方が強く HMGR を阻害するといわれている[13]ので，今回ラクトン型の化合物をけん化して酸型にして用いた。コンパクチンの添加濃度を 10^{-5}M~10^{-2}M まで試した結果，10^{-4}M のときに培養後期に回復してくる程度に増殖を阻害することがわかった（データ未発表）。このとき細胞中のステロール量もコンパクチン処理細胞では減少が確認され，イチョウのステロールも MVA 経路で生成されているらしいことが示唆された。予備実験でコントロール細胞に対する MVA の影響を調べたところ，10^{-4}M の濃度では増殖がコントロールよりもよくなったが，10^{-2}M の濃度では増殖が阻害された（データ未発表）。

そこでコンパクチン処理細胞に対して 10^{-4}M の MVA を同時添加したところ細胞増殖（Fig.11），培地成分の取り込み（Fig.12），細胞中のステロール量（Fig.13）のすべてにおいて回復傾向が見られた。しかし，完全回復と言えるほどではなかった。次にコンパクチン処理細胞に対する β-シトステロールの影響について調べた。0.9×10^{-5}M の濃度で β-シトステロールを添加したところ，細胞増殖（Fig.14），培地成分の取りこみ（Fig.15）共に回復は見られず，むしろ阻害傾向が認められた。

以上まとめると，β-シトステロールは培地成分の取り込みや細胞増殖にとって重要な因子であると思われた。またステロールはイチョウ細胞培養系において MVA 経由で生合成されることが示唆された。しかし，β-シトステロールの添加で細胞増殖の回復が実現できなかったことを考え合わせると他の MVA 代謝物，たとえば β-シトステロール以外のステロール類やファルネシル化プロテインなどの影響も考慮しなければならないということがわかった。

要　　旨

イチョウ培養細胞中に含まれる植物ステロール類を分析し，その生合成経路と役割を調べた。イチョウからは β-シトステロールのほかにカンペステロールとスチグマステロールが検出さ

れた。β-シトステロールは細胞増殖とともに生成されることがわかった。

ステロールの生合成阻害剤のひとつであるアンシミドールを投与すると，細胞増殖が阻害され，細胞中のステロール量も減少した。アンシミドール処理細胞に β-シトステロールを添加すると，培地成分の取り込みでは回復傾向が見られたが細胞増殖の回復はほとんど確認できなかった。

メバロン酸生成の特異的阻害剤であるコンパクチンを投与すると細胞増殖が阻害され，細胞中のステロール量も減少した。イチョウにおいてステロールはメバロン酸経路で生成されると考えられた。また，コンパクチン処理細胞にメバロン酸を添加すると細胞増殖は回復する傾向を見せたが，β-シトステロールを添加した際にはむしろ阻害された。

これらのことからイチョウ培養細胞において，ステロールは細胞増殖における重要な因子の一つではあることがわかった。しかしステロールのみが細胞増殖に関わっているのではなく他のメバロン酸代謝物の影響も考え合わせなくてはいけないことがわかった。

キーワード： イチョウ培養細胞・ステロール・生合成阻害剤・細胞増殖・メバロン酸

引 用 文 献

1） HELDT, H.W.，金井龍二訳（2000）植物生化学. 502 pp, シュプリンガー・フェアラーク東京，東京.

2） DISCH, A., HEMMERLIN, A., BACH, T.J., ROHMER, M. (1998) Mevalonate-derived isopentenyl diphosphate is the biosynthetic precursor of ubiquinone prenyl side-chain in tobacco BY-2 cells. *Biochem. J.* **331**：615-621.

3） ROCHESTER, C.P., KJELLBOM, P., LARSSON, C. (1987) Lipid composition of plasma membranes from barley leaves and roots, spinach leaves and cauliflower inflorescences. *Physiol. Plant.* **71**：257-263.

4） 野田万次郎，奥千世，山下み佳，桧垣美緒，松田茂之 (1988) コレステロール - 植物の一主要ステロール． 脂質生化学研究 **30**：175-178.

5） 笠井秀憲，寺田珠実，佐分義正 (1994) ポプラ懸濁培養細胞における細胞増殖とメバロン酸代謝の関係 第４回植物組織培養シンポジウム要旨集：p67.

6） INOUE, H., SATO, S., KAMODA, S., TERADA, T., SABURI, Y. (1996) Hormonal Responses of Petioles and Embryos in *Ginkgo biloba* Cultures. *Bull. Tokyo. Univ. For.* **96**: 119-123.

7） LINSMAIER, E. M., SKOOG, F. (1965) Organic growth factors requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **18**: 100-127.

8） BLIGH, E.G. and DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**：911-917.

9） GROSSMANN, K. (1992) Plant growth retardants: Their mode of action and benefit for physiological research. *Current plant sci. and biotech. in agriculture* **13**: 788-797.

10） GROSSMANN, K., WEILER, E. W., JUNG, J. (1985) Effects of different sterols on the inhibition of cell culture growth caused by the growth retardant tetcyclacis. *Planta* **164**：370-375.

11） GROSSMANN, K., SCHMIDT, H. O., JUNG, J. (1986) Changes in membrane permeability and mineral, phytohormone and polypeptide composition in rice suspension cells during growth and under the influence of the growth retardant tetcyclacis. *Plant Cell Reports* **5**：315-318.

12） HAUGHAN, P.A., LENTON, J.R., GOAD, L.J. (1988) Sterol requirements and paclobutrazol inhibition of a celery cell culture. *Phytochemistry* **27**：2491-2500.

13） ENDO, A., KURODA, M. TANZAWA, K. (1976) Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* **72**：323-326.

（2006年6月30日受付）
（2006年9月11日受理）

Summary

The biosynthesis pathway and roles of phytosterols in suspension cell cultures of *Ginkgo biloba* were investigated. Three kinds of sterols (campesterol, stigmasterol and β-sitosterol) were detected in Ginkgo cells and β-sitosterol might be produced by cell growth. Treatment with ancymidol, one of the sterol synthesis inhibitors, reduced cell growth and sterol contents. Addition of β-sitosterol restored the incorporation of medium components, but not cell growth. Treatment with compactin, a specific inhibitor of mevalonic acid synthesis, reduced both cell growth and sterol amount. Addition of mevalonic acid to compactin-treated cells could induce cell growth, but the addition of β-sitosterol caused a decrease in cell growth. These results suggest that sterols might be one of the necessary factors for cell growth, while the other metabolites via the mevalonic acid pathway should be considered.

Key words: Cell cultures of *Ginkgo biloba*, Sterol, Biosynthesis inhibitor, Cell growth, Mevalonic acid