東京大学農学部演習林報告, 119, 45–57 (2008)

イチョウ細胞培養系におけるステロールと細胞増殖（2）
―メバロン酸代謝物の影響―

寺田珠実*1・兼行民治郎*1, *2・井上広喜*1, *3・鴨田重裕*4

Relation between Cell Growth and Phytosterols in Cell Cultures of *Ginkgo biloba* (2)
― Effects of Mevalonic Acid Metabolites ―

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

1. 緒　　言

ステロールとは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のうち特に3位に水酸基を持ち，炭素数27～30のものをいう。また植物において，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，メバロン酸（MVA）経路を経て生合成されると報告されている[1)]。

これまで私たちは，樹木培養細胞を用いて細胞増殖の研究を行ってきた。その中でステロールが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るなど，細胞の様々な現象に関与するといわれている[2)]ことに着目した。そこで前報[3)]では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，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。MVA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。MVAを再添加すると細胞増殖は回復する傾向を見せたが，β-シトステロールの添加はむしろ阻害した[3)]。

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，MVAを経て生合成され，細胞増殖に関与するらしいことが示唆された。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MVA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。

そこで本研究では，イチョウ培養細胞におけるステロールの役割を明らかにするために，ステロール以外のMVA代謝物の関与を精査した上でステロールと細胞増殖との関係を知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
*1 Department of Biomaterial Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
*2 現所属　日本製紙(株)商品研究所
*2 Product Development Research Laboratory, Nippon Paper Industries Co.,LTD
*3 現所属　東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林
*3 The University Forest in Chiba, University Forests, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo
*4 東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林樹芸研究所
*4 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[4]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。

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℃，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[5]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。

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 MVA 生合成特異的阻害剤のコンパクチン，MVA 代謝物生成阻害剤の chaetomellic acid ナトリウム塩ならびにツニカマイシン，スクワレン生合成阻害剤のザラゴジン酸，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。5 日目，10 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。さらに随時細胞を約 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

コンパクチン（三共（株）より譲渡）は，前報と同様にラクトン型の化合物をけん化して酸型にして用いた。ツニカマイシン（BIOMOL）は DMSO に溶解させてから水溶液（1.0×10^{-3}M）を調製した。chaetomellic acid ナトリウム塩（BIOMOL）は水溶液（5×10^{-3}M）を調製した。ザラゴジン酸（SIGMA）は pH7.5 のリン酸カリウム緩衝液を用いて 0.4×10^{-3}M 溶液を調製した。

β-シトステロールはアセトンに溶かして 4×10^{-2}M に調製した。MVA はメバロノラクトンを精製水に溶解させて前報と同様に MVA 水溶液を調製した。すべての調製試薬はクリーンベンチ内で滅菌ろ過し，4℃で保存した。

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

細胞中のステロールの抽出は，Bligh & Dyer[6]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管に移し，2,000rpm（700 × g）で 10 分間遠心分離して，クロロホルム層を回収し，ガスクロマトグラフィー（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，2,000rpmで約10分遠心分離してヘキサン層1 mlを回収し，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製した。細胞中のβ-シトステロール量は生重量あたりの重量で求めた。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℃ to 300℃（10℃/min）
300℃ constant（10min）
300℃ to 315℃（15℃/min）
315℃ constant（5min）
注入口温度：315℃

3. 結果と考察

3.1. コンパクチン処理細胞に対するメバロン酸（MVA），β-シトステロールの影響

コンパクチンはMVA経路の律速酵素である3-hydroxy-3-methylglutaryl（HMG）-CoA reductase（HMGR）の代表的な特異的阻害剤[7]である。前回コンパクチンを用いた実験の結果からイチョウ細胞培養系においてステロールがMVA経由で合成されることが示唆されたが，薬剤の添加条件ほか検討の余地があった。前回は3，6日目にサンプリングを行ったが，これはまだ増殖初期でばらつきも大きかった。今回，他の試薬添加実験に合わせてサンプリング日程（5，10日目）と添加濃度を変化させさらに詳細なデータを得るために再実験を行った。

コンパクチンの添加濃度を再検討したところ，7.0×10^{-5}Mのときに細胞が死滅しない程度に増殖を阻害することがわかった。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た（データ未発表）。このコンパクチン処理細胞に対して3.0×10^{-4}MのMVAを添加したところ細胞増殖（Fig.1A），培地成分の取り込み（Fig.1B），細胞中のβ-シトステロール量（Fig.2）のすべてにおいて回復傾向が見られた。完全回復は実現できなかったもののコンパクチン処理によるイチョウ培養細胞の増殖阻害はMVAの添加により回復傾向を見せる，つまりMVA代謝物が細胞増殖に必須であることが再確認された。

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であるが，コンパクチン処理細胞に対して1.6×10^{-4}Mの濃度でβ-シトステロールを添加したところ，前報と同様に細胞増殖（Fig.3A），培地成分の取りこみ（Fig.3B）共に回復はほとんどみられなかった。

以上の結果からMVA経路における代謝物の中でβ-シトステロールのみが成長に関わっているわけではないことが再確認された。

3.2. ツニカマイシン，chaetomellic acidナトリウム塩の影響

ステロール以外のメバロン酸代謝物として，グリコシル化タンパク質とファルネシル化タンパク質を挙げることがことができる。ツニカマイシン（Fig.4）は，ファルネシルピロリン酸から

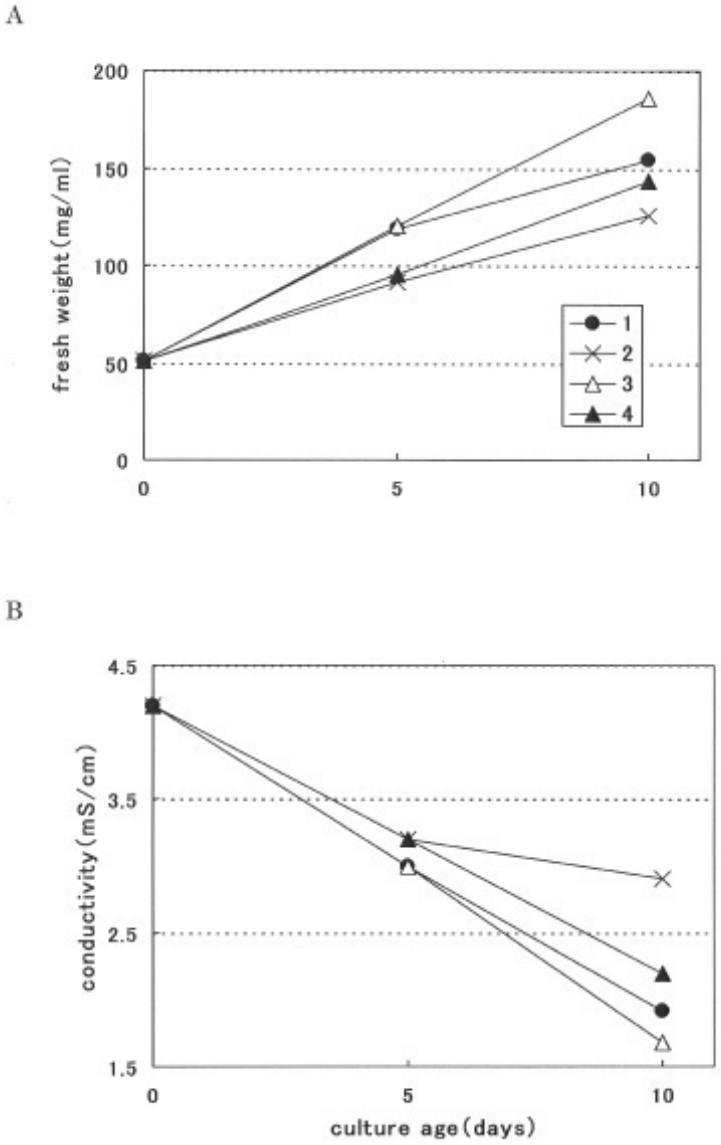


Fig. 1. Effects of MVA addition on growth of compactin- treated cells.

A: fresh weight. B: conductivity of supernatant of cultivation mixture.
1: control
2: 7×10^{-5}M compactin
3: 3×10^{-4}M MVA
4: 7×10^{-5}M compactin + 3×10^{-4}M MVA

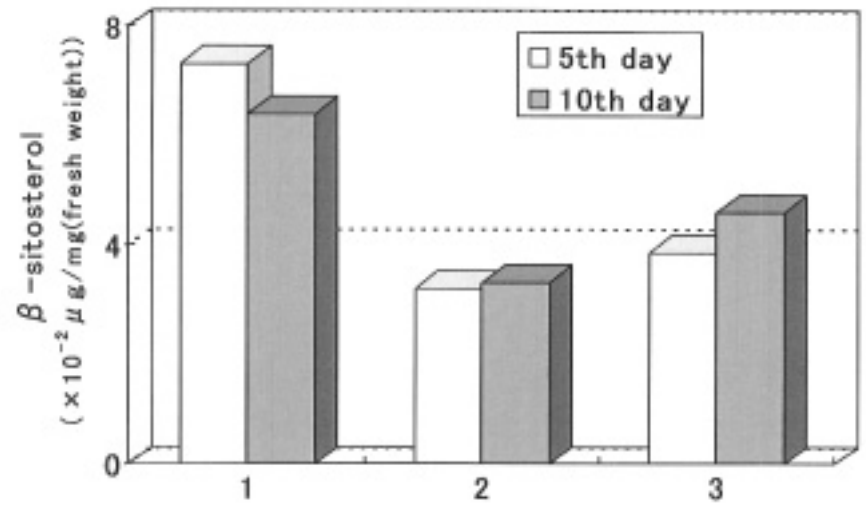


Fig. 2.　Effects of MVA addition on β-sitosterol contents in compactin- treated cells.

1: control
2: 7×10^{-5}M compactin
3: 7×10^{-5}M compactin + 3×10^{-4}M MVA

N-グリコシル化タンパク質を生合成するタンパク質N-グリコシルトランスフェラーゼの阻害剤として働く[8]といわれている。またchaetomellic acidナトリウム塩（Fig.5）はファルネシルピロリン酸からファルネシル化タンパク質が生合成される際に働く酵素プレニルトランスフェラーゼの特異的阻害剤である[9]。

メバロン酸経路におけるステロール以外の代謝物の影響を見るためにイチョウ培養細胞にツニカマイシン，あるいはchaetomellic acidナトリウム塩をそれぞれ4 × 10^{-5}M，2 × 10^{-4}Mの濃度で添加した。これらの生合成阻害剤の添加により細胞の増殖が阻害された（Fig.6）。このことから細胞増殖にはステロール以外のメバロン酸代謝物も関わっていることが確認された。

ところでこの2種類の阻害剤で処理した細胞中のステロール組成には興味深い傾向が見られた。Fig.7にツニカマイシン添加の結果を示したが，コントロールでは微量しか検出されなかった細胞中のスチグマステロールが，無視できないほど検出されたことである。さらに，同様にコントロールではごく微量であった培地中のβ-シトステロールが，これらの2種の阻害剤で処理した培養液ではコントロールと比較して多く検出された（データ未発表）。これはMVA経路におけるステロール以外の代謝物の生合成経路を阻害したため，コントロールと比較してより多くのファルネシルピロリン酸がステロールの生合成経路へ流れたためと考えられる。

3.3.　ザラゴジン酸処理細胞に対するβ-シトステロールの影響

ザラゴジン酸（Fig.8）はステロールの前駆体であるスクワレンを生合成するスクワレン合成酵素の阻害剤として働くと言われている[10]。コンパクチンはステロール生合成経路では非常に上流の阻害剤であること，前報で用いたアンシミドールがチトクローム P450 モノオキシゲナーゼ

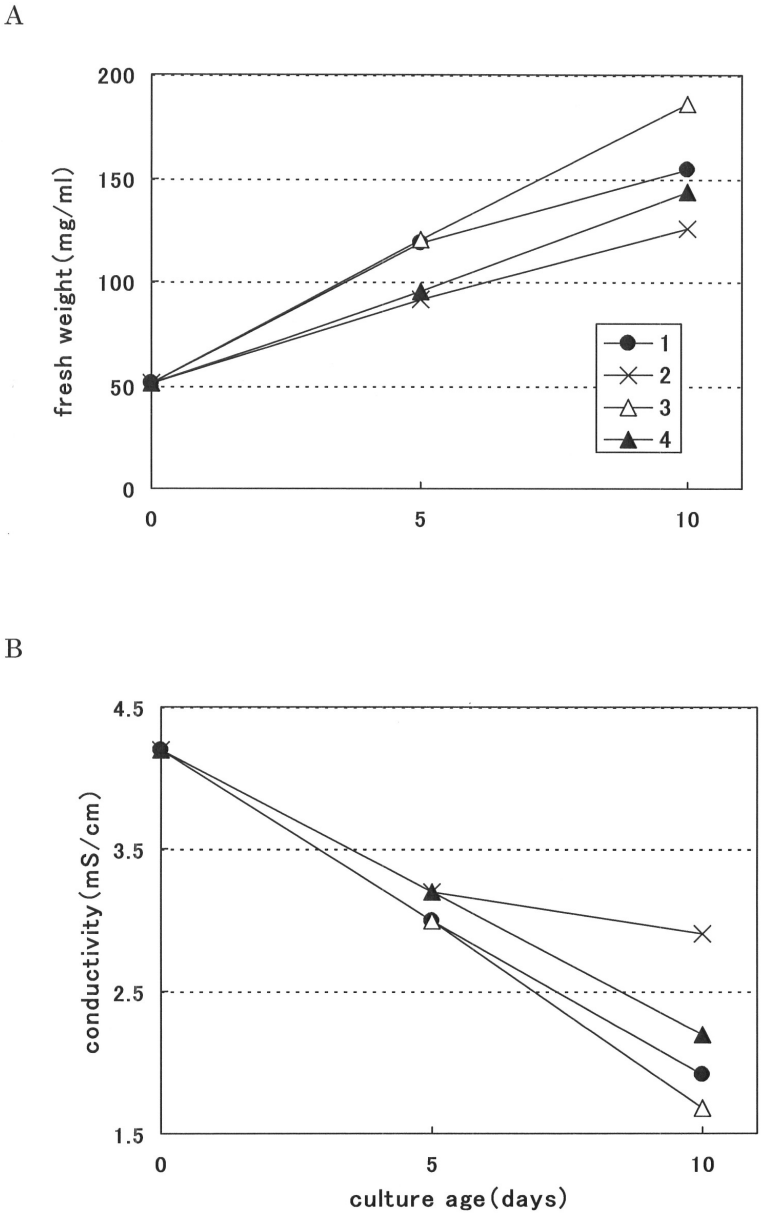


Fig. 3. Effects of β-sitosterol addition on growth of compactin- treated cells.

A: fresh weight. B: conductivity of supernatant of cultivation mixture.
1: control
2: 7.0×10^{-5}M compactin
3: 1.6×10^{-4}M β-sitosterol
4: 7.0×10^{-5}M compactin+1.6×10^{-4}M β-sitosterol

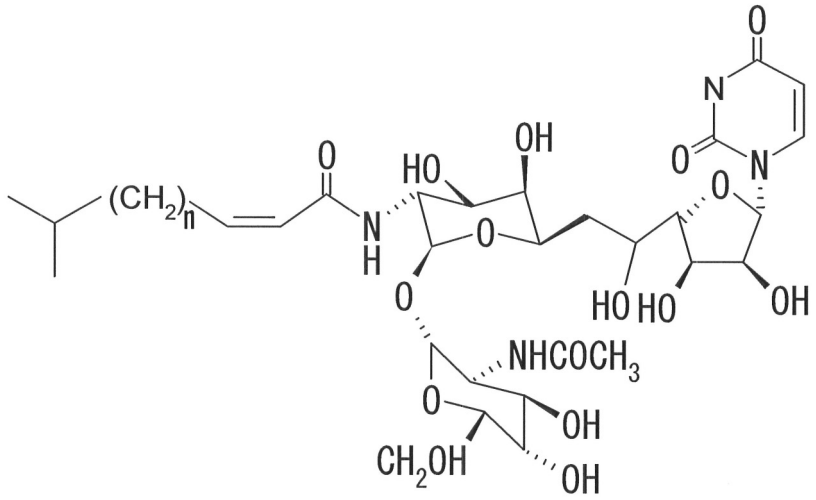


Fig. 4.　Structure of tunicamycin

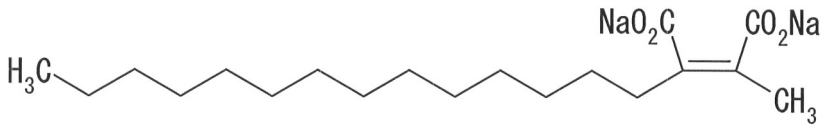


Fig. 5.　Structure of chaetomellic acid sodium salt.

に依存するさまざまな酸化反応の阻害を起すといわれている[11]ことから，ステロールに対する特異的阻害剤としてザラゴジン酸を選択した。

試験管培養0日目に2.4×10^{-6}Mの濃度でザラゴジン酸を培地中に加えると，細胞の増殖は細胞が死滅しない程度に抑えられた。このことからスクワレンの生合成阻害が細胞の増殖を阻害することがわかる。1.2×10^{-4}Mのβ-シトステロールでは細胞の増殖にはほとんど影響がないことを確認した上で，2.4×10^{-6}Mの濃度でザラゴジン酸を添加して細胞増殖を阻害した培養細胞に1.2×10^{-4}Mのβ-シトステロールを加え，細胞増殖に回復が起こるかどうかを調べた。ここには10日目の測定結果を示した。細胞増殖は高いレベルで回復をみせた（Fig.9）。ポプラ，イネ，トウモロコシ，ダイズ懸濁培養細胞においてもステロールの生合成を阻害するアンシミドールもしくはその類似阻害剤によって阻害された細胞増殖が，特定のステロールの添加により完全に回復することが報告されている[12]。同様にイチョウ培養細胞においてβ-シトステロールが細胞増殖に必要であることが示された。

また，細胞中のステロール量をみると，ザラゴジン酸を加えたものでは，コントロールと比べてその量が明らかに少なく（Fig.10），生合成が阻害されているのがわかる。また，β-シトステ

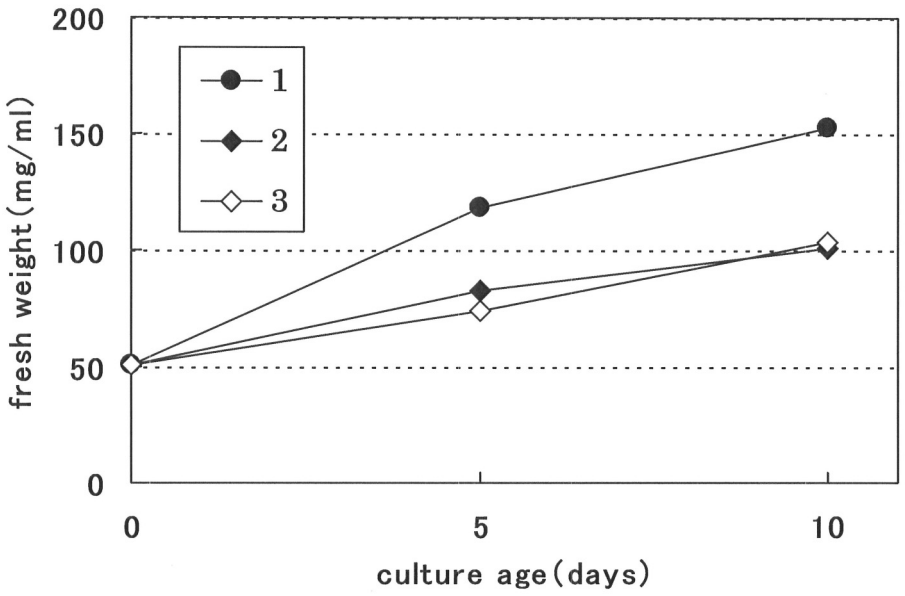


Fig. 6. Effect of addition of tunicamycin or chaetomellic acid sodium salt on cell growth.

1: control
2: 4×10^{-5}M tunicamycin
3: 2×10^{-4}M chaetomellic acid sodium salt

ロールを添加したものでは細胞中の β-シトステロール量はコントロールと比べても明らかに多い。ザラゴジン酸処理細胞に β-シトステロールを加えたものでも，細胞中にはコントロールよりも多量の β-シトステロールが確認された。このことから添加した β-シトステロールが細胞中にしっかりと取り込まれていることが確認できた。しかし，β-シトステロールのみを加えた細胞とコントロール細胞とを比較してみると，細胞中の β-シトステロール量は明らかな違いがあるのに細胞の増殖（Fig.9A）に明瞭な差異は認められない。また，培地の導電率（Fig.9B）を比べると β-シトステロールを添加した方が大きな値を示した。これは培地中の電解質濃度が高い，つまり培地成分の取り込みが悪いということを意味する。ポプラ培養細胞ではステロールが細胞膜の構造を変化させ，培地成分の取り込みを回復させていることが示唆されたが[13]，イチョウでは異なる様子がみられた。あるいは，取り込みが悪くなったのではなく，ステロールを加えることで培地成分の細胞内への取り込みよりも，細胞中の成分の培地中への放出のほうが活発になったことも考えられる。このことに関しては導電率の妥当性などいくつかの要因が関わってくるため，更なる検討を要する。

イチョウ培養細胞におけるステロールの機能についてはまだわからないが，ステロールが細胞増殖に必要であるらしいことは明らかになった。また，一定量あればよく，それ以上は必要ないことも予想された。

以上をまとめると，イチョウ培養細胞に生合成阻害剤としてザラゴジン酸，コンパクチンを添加することにより細胞増殖が阻害され，細胞中の β-シトステロール量も減少した。ザラゴジン

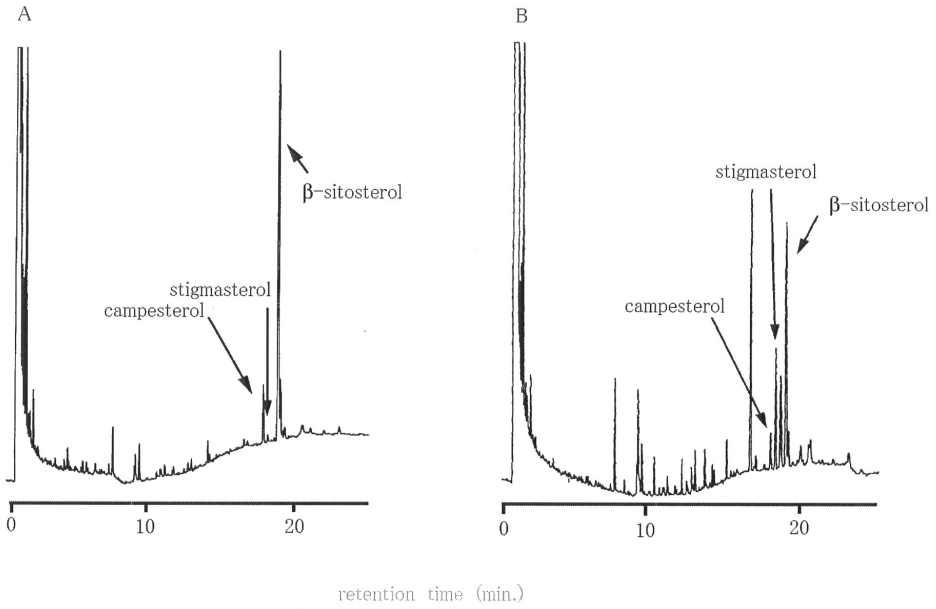


Fig. 7.　GC profiles of trimethylsilylated cell extracts after cultivation for 4 days.
A: control. B: tunicamycin addition.

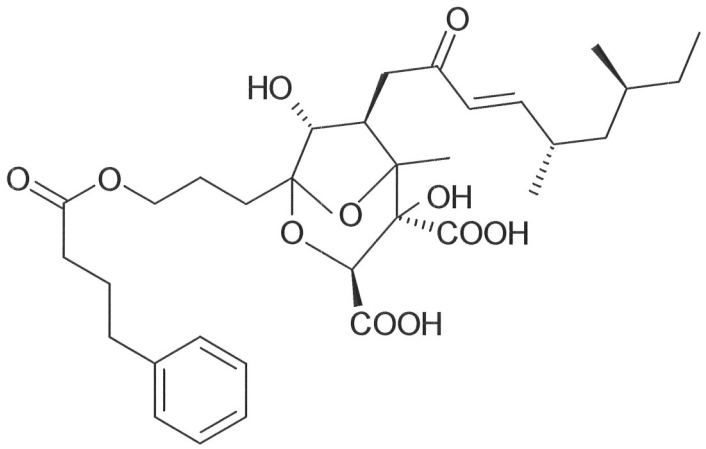
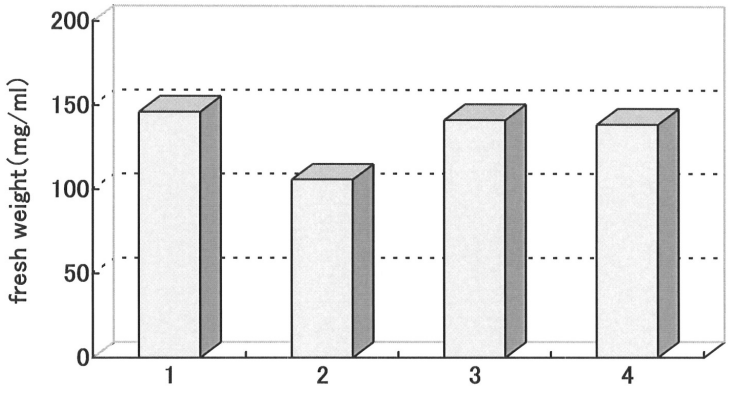


Fig. 8.　Structure of zaragozic acid

酸処理細胞に β-シトステロールを添加すると，細胞の増殖が回復した。また，コンパクチン処理細胞にメバロン酸を添加したときも細胞の増殖は回復する傾向をみせた。一方コンパクチン処理細胞に β-シトステロールを添加したときには細胞増殖に回復はみられなかった。また，ツニカマイシン，chaetomellic acid ナトリウム塩によっても細胞増殖は阻害された。これらのことからイチョウ培養細胞のメバロン酸代謝物の中で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が，他のメバロン酸代謝物も細胞増殖に関わる役割を担っていることがわかった。

A



B

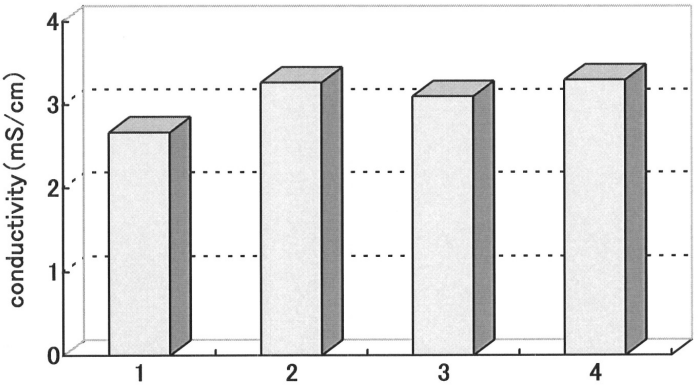


Fig. 9. Effects of β-sitosterol addition on growth of zaragozic acid-treated cells after cultivation for 10 days.

A: fresh weight. B: conductivity of supernatant of cultivation mixture.

1: control

2: 2.4×10^{-6}M zaragozic acid

3: 1.2×10^{-4}M β-sitosterol

4: 2.4×10^{-6}M zaragozic acid+1.2×10^{-4}M β-sitosterol

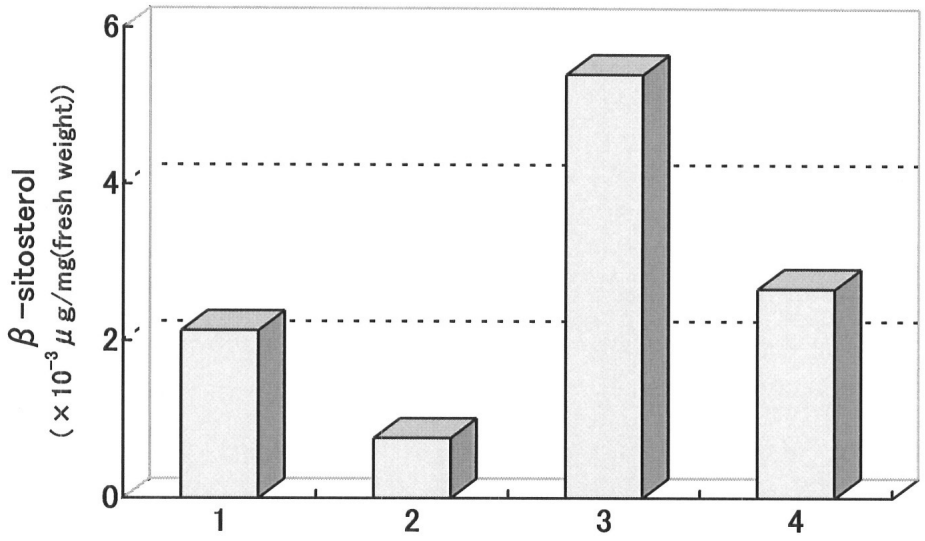


Fig. 10.　Effects of β-sitosterol addition on β-sitosterol contents in zaragozic acid-treated cells after cultivation for 10 days.

1: control
2: 2.4×10^{-6}M zaragozic acid
3: 1.2×10^{-4}M β-sitosterol
4: 2.4×10^{-6}M zaragozic acid+1.2×10^{-4}M β-sitosterol

引　用　文　献

1）DISCH, A., HEMMERLIN, A., BACH, T.J.,and 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.

2）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.

3）INOUE, H.，KANEYUKI, T., TERADA, T., and KAMODA, S.（2006）Relation of cell growth and phytosterols in cell cultures of *Ginkgo biloba, Bull. Tokyo. Univ. For.*, **116**, 253-265.

4）INOUE, H., SATO, S., KAMODA, S., TERADA, T., and SABURI, Y.（1996）Hormonal responses of petioles and embryos in *Ginkgo biloba* cultures. *Bull. Tokyo. Univ. For.* **96**: 119-123.

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

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

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

8）MATHERLY,L. H. and ANGELES S. M.（1994）Role of N-glycosylation in the structure and function of the methotrexate membrane transporter from CCRF-CEM human lymphoblastic leukemia cells. *Biochem.Pharmacol.* **47**：1094-1098.

9）GIBBS,J.B., POMPLIANO,D.L., MOSSER,S.D., RANDS, E., LINGHAM, R.B., SINGH,S.B., SCOLNICK,E.M., KOHL,N.E., and OLIFF, A.（1993）Selective inhibition of farnesyl-protein transferase blocks ras processing *in vivo. J. Biol. Chem.* **268**: 7617-7620.

10）PROCOPIAU, P.A., BAILEY, E.J., BAMFORD, M.J., CRAVEN, P., DYMOCK, B.W., HOUSTON, J.G., HUTSON, J.L., KIRK, B.E., MCCARTHY, A.D., SAREEN, M., SCICINSKI, J.J., SHARRATT, P.J., SNOWDEN, M.A., WATSON, N.S., and WILLIAMS, R.J.（1994）The squalestatins : novel inhibitors of squalene synthase. Enzyme inhibitory activities and *in vivo*. evaluation of C1-modified analogues. *J. Med. Chem.* **37**: 3274-3281.

11）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.

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

13）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.

要　　旨

イチョウ培養細胞中に含まれる植物ステロールの役割を明らかにするために，ステロール以外のメバロン酸代謝物も含めて細胞増殖との関係を検討した。ステロールの特異的生合成阻害剤のひとつであるザラゴジン酸を投与すると，細胞増殖が阻害され，細胞中の β-シトステロール量も減少した。ザラゴジン酸処理細胞に β-シトステロールを添加すると，培地成分の取り込み，細胞増殖とも回復がみられた。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 β-シトステロール量も減少した。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みせたが，β-シトステロールの添加は回復に効果がなかった。ツニカマイシン，chaetomellic acid ナトリウム塩の添加は細胞増殖を阻害した。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が，修飾化タンパク質等，他のメバロン酸代謝物も細胞増殖に関わっていることがわかった。

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・メバロン酸代謝物

（2008年7月17日受付）
（2008年9月19日受理）

Summary

The relationships between metabolites formed by the mevalonic acid pathway and cell growth in suspension cell cultures of *Ginkgo biloba* were investigated to clarify the roles of phytosterols.

The addition to the culture of zaragozic acid, which is one of the specific sterol synthesis inhibitors, resulted in a reduction of cell growth and β-sitosterol production. When β-sitosterol was added to the culture, the negative effect due to the zaragozic acid was, to some extent, reversed.

The addition of to the culture of compactin, which is a specific inhibitor of mevalonic acid synthesis, brought about decreases in cell growth and β-sitosterol production. The addition of mevalonic acid to compactin-treated cells induced cell growth, although that of β-sitosterol did not.

Reduction of cell growth was observed when tunicamycin or chaetomellic acid sodium salt was added to the culture. Both of these are inhibitors of the synthesis of modification proteins.

The results obtained indicate that β-sitosterol is one of the indispensable factors for cell growth, while other metabolites such as modification proteins formed by the mevalonic acid pathway might participate in cell growth.

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