

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：32639

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450373

研究課題名(和文)ニチニチソウアルカロイドを高効率に生産する光制御技術の探索と開発

研究課題名(英文) Research and development of the light controlling technique to produce periwinkle alkaloids high-efficiently

研究代表者

兼子 敬子(大橋敬子)(KANEKO, Keiko)

玉川大学・学術研究所・教授

研究者番号：50332599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ニチニチソウ葉に抗がん成分として知られるビンブラスチンをより高い濃度で蓄積させる光環境制御技術の開発を試みた。赤単色光は青単色光や赤青混合色光に比べてニチニチソウの成育を促進し、さらにビンブラスチンの前駆物質であるビンドリリンとカタランチンの濃度を向上させた。150 micro mol/m²/sの赤単色光で1か月栽培してから、10 W/m²のUV-A光を5日から7日間赤色光に加えて補光照射することで、株あたりのビンブラスチン収量を高めることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we cultivated *C. roseus* in an enclosed artificial lighting plant factory and tried to develop the light controlling technique to improve production of vinblastine which was widely used in cancer chemotherapy. Red light compared with blue light and a mixture of red light and blue light (red PPFD: blue PPFD = 1:1) promoted to the growth and the concentrations of the monomeric precursors of vindoline and catharanthine in leaves. Vinblastine was accumulated in the leaves of the plants irradiated with UV-A light for 5 d and its content was increased until UV-A light intensity reached 10 W/m². Vinblastine content in the younger leaves was greater than that in the older leaves. In conclusion, we constructed cultivation methods for efficient vinblastine production, as follows. Firstly, *C. roseus* plants are grown under 150 micro mol/m²/s red light only for one month, and then these plants are irradiated to red light supplemented with UV-A light of 10 W/m² for 7 d.

研究分野：生物環境工学、植物栄養学

キーワード：ニチニチソウ アルカロイド 植物工場 発光ダイオード 赤色光 UV-A光 光強度 環境制御

1. 研究開始当初の背景

安定・持続的な人工光植物工場の運用のために、収益性の高い植物を栽培することが求められており、薬草はその代表候補の一つである。ニチニチソウは、葉にモノテルペンアルカロイドであるビンブラスチン (以下、VLB) とビンクリスチン (以下、VCR) を含んでおり、悪性リンパ腫や絨毛がん、急性白血病や小児がんなどの抗がん剤の原料として全世界的に利用されている。近い将来、諸外国との購入をめぐる競争を考えると、国内での生産が望まれる。ところが、この VLB と VCR の葉内濃度は極めて低く、それぞれ 0.5~10 g/t と 0.5~1 g/t (乾物重あたり) でしかない。VLB と VCR の前駆物質であるカタランチン (CAT) とビンドリリン (VIN) の局在性が原因のようである。CAT は表皮組織のクチクラに、他方 VIN は葉肉組織の異形細胞や乳管と、離れて局在している (Roepke et al. 2010)。野生では昆虫や草食動物に植食されて組織が破壊されることで CAT と VIN の重合が始まると考えられている。

他方、研究分担者らは組織培養増殖系シュートカルチャーに UV-A 光 (380 nm) あるいは青色光を照射すると、CAT と VIN の重合反応が促進し、VLB の中間体であるアンヒドロビンブラスチン (以下、AVLB) が合成され、この AVLB から VLB が合成されることを報告した (Hirata et al. 1992, 1997)。本研究では、この反応を利用して VLB を植物工場において高効率に生産する可能性を探索した。

2. 研究の目的

VLB の収量を高めるにはシュートカルチャーよりも高度に分化し、かつ大きく成長させた植物体に生産させるべきであるがそのような例はまだ存在しない。また、UV-A 光のエネルギー量は高いため、植物への連続照射は枯死につながる。したがって適度な光酸化を受けつつも個体が生存し続け、かつ VLB が蓄積される短波長光の強度、照射時間あるいは

照射のタイミングを探索しなければならない。したがって、具体的な内容として、1) ニチニチソウ葉のバイオマス量を大きくさせ、VLB の材料である CAT と VIN 収量を最も高める照射条件を探索した。次に、2) CAT と VIN を集積させた個体に UV-A 光を照射して、VLB 合成を促す短波長光を照射した。このとき、VLB 収量が最も大となる短波長光の強度と照射時間を特定した。また、これらの解析には、アルカロイド合成反応に関連する遺伝子発現解析を行い、光照射と遺伝子発現、アルカロイド合成との因果関係について考察を行った。

3. 研究の方法

(1) 材料および栽培方法

園芸種 'タイタン' (エム&ビー・フローラ (株)) を用いた。タイタンの種子を、水道水を吸水させたウレタン上に播種して暗所発芽させた。発芽種子を白色蛍光灯下に移動し、播種後 6 日から循環型 DFT 水耕トレイ (640 mm × 414 mm × 92 mm) に移植して、光合成有効放射束密度 (PPFD) $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温 23°C とした。培養液は大塚ハウス A 処方を用い、電気伝導率 (EC) 1.0 dS m^{-1} 、pH 5.6 とした。この条件で 35 日育成したものを苗とした。これらの苗を LED パネルが備え付けられた 5 段式の NFT 水耕栽培装置に定植した。LED パネルには、赤色 LED、青色 LED および緑色 LED が装着しており、各色 LED への電流値を制御することにより光強度を制御した。栽培面と LED 光源までの距離は 300 mm とした。加えて白色蛍光灯区 (FL) をコントロール区として設置した。用いた光源の放射スペクトルを図 1 に示した。総 PPFD あるいは光質の条件は実験毎に適宜調整した。明期時間を 16 時間、気温は 23°C 一定とした。培養液は大塚ハウス A 処方を用い、さらに給液管理装置を用いて、EC 1.5 dS m^{-1} 、pH 5.6 となるよう自動制御を行った。これらの環境条件下で育った株について、成育調査とサンプリン

グを行った。

(2) サンプリングと分析方法

葉のアルカロイド分析のために、全葉あるいは一部の葉位の葉をすべてビニルパックに入れて -35°C で凍結保存した。この凍結葉を葉のアルカロイド測定に用いた。凍結葉を液体窒素中で粉砕後、アルカロイドをメタノールで抽出した。抽出、上清を回収する操作は2回繰り返した。減圧下で濃縮乾固して、1 mlのメタノールに再溶解後、 $0.45\ \mu\text{m}$ のPTFEシリンジフィルターでろ過したものをアルカロイド抽出試料液とした。この試料液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

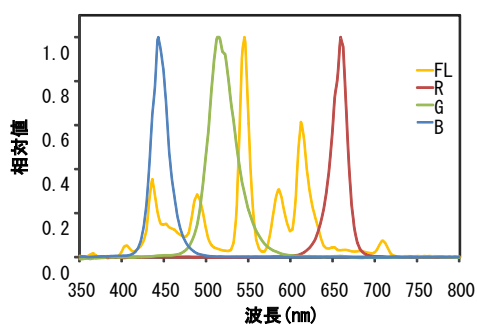


図1 各光源の相対放射エネルギー分布

4. 研究成果

(1) 光質環境が葉の VDL と CAT 濃度と個体成長に及ぼす影響

総 PPFD $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ 一定の下、赤単色光、青単色光および赤青混合色光 (赤 PPFD : 青 PPFD=1:1) でニチニチソウを栽培すると、赤単色光下で最も育成が大きくなる。そこで次に、葉の VDL と CAT 濃度あるいは個体成長が大となるような最適な赤色光強度を調査した。

赤色光強度を $75, 150, 300$ および $600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の4段階に設定し、タイタン苗を定植後28日間栽培した。地上部新鮮重と全葉新鮮重が最も大であったのは、 $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ であった (図2)。

$600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ で育った個体では他の光強度で育った個体と比べて中位から下位にかけて着生する葉の色が黄化した (図3)。赤単色

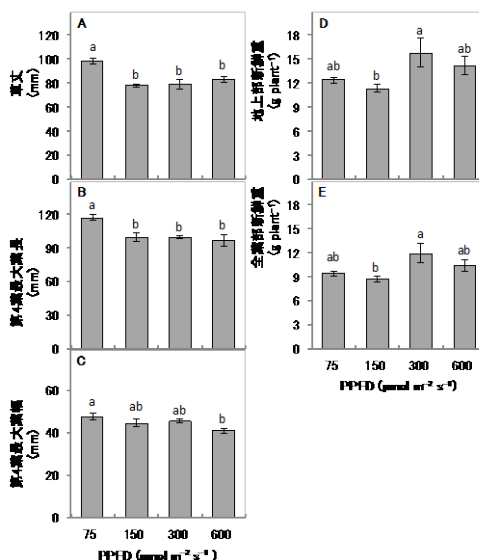


図2 定植後28日におけるタイタンの草丈 (A)、第4葉最大葉長 (B) と葉幅 (C)、地上部新鮮重 (D) および全葉新鮮重 (E)

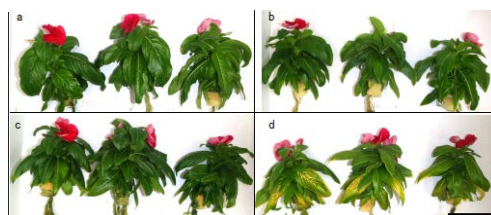


図3 定植後28日におけるタイタンの写真。 75 (a)、 150 (b)、 300 (c) および $600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ (d) の4段階の光強度を設定した。

光が強すぎた場合、クロロフィルの合成が阻害されるようである。あるいは既存のクロロフィルが分解されている可能性も考えられた。ニチニチソウにとって $600\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の赤色光はストレスであると判断した。

タイタン第4葉の VDL 濃度および CAT 濃度を最も高める光強度は $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ であり、続いて $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ であった (図4)。我々は既往の報告で (Ohashi-Kaneko et al. 2013)、最大展開葉のアルカロイド濃度が高い株ほど全葉アルカロイド濃度が高いことを示している。タイタン全葉の VDL 濃度および CAT 濃度を最も高める光強度は $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ と判断される。全葉新鮮重が最も大となるのは、 $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ であったことから、 150 から $300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ の間にニチニチソウ

株のアルカロイド収量を最も高める光強度が存在すると判断した。

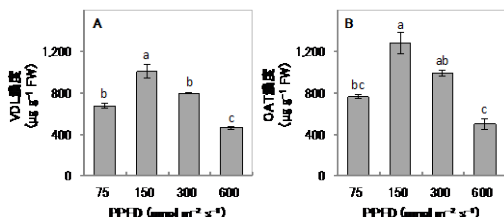


図4 定植後28日におけるタイタン第4葉のVDL濃度(A)およびCAT濃度(B)。

次に緑色光が成長に及ぼす影響についての調査を行った。緑色LEDの開発が進み、今では青色LEDと同等の光強度を放射できるが、実験開始当初では、緑色LEDの最大光強度で50 μmol m⁻² s⁻¹であった。したがって、総PPFD200 μmol m⁻² s⁻¹一定の下、赤単色光および赤緑混合色光(赤PPFD:緑PPFD=3:1)としてタイタンを2か月間栽培して生育調査を行った。地上部新鮮重および全葉新鮮重には有意差はなかったが(データは示さず)、赤緑混合色光で栽培された株ではやや茎新鮮重が小さく、全葉重/茎重比は赤単色光で1.95に対して赤緑混合色光では2.19であった。有用なニチニチソウアルカロイドはほぼ葉に局在する。したがって、全葉重/茎重比の高い赤緑混合色光のほうが効率的な栽培に向いていると考えられる。しかし、緑色LEDの設定などについて、とりわけ光強度についてはさらに改善が必要であると判断した。

(2) UV-A光あるいは青色光照射が葉のVBL濃度とAVLBに及ぼす影響

150 μmol m⁻² s⁻¹の赤単色光で28日間栽培を行い、成長と葉のVDL濃度およびCAT濃度を高めたタイタンを材料としてUV-A光あるいは青色光の照射実験を行った。対照として赤色光のみを照射する区を設けた。UV-A光はUV-A蛍光灯(XEFL340;ウシオ電機(株)、ピーク波長340nm)を用い、光強度は5 W m⁻²とした。さらにUV-A光のみでは光合成を駆動できないため、光合成を促すために150

μmol m⁻² s⁻¹の赤色光と混合して照射した。青色光区および赤色光区の光強度は150 μmol m⁻² s⁻¹とした。すべての光処理区について、7日間の照射を行い、光処理開始後1日から2日毎に異なる株を用いて第4葉のサンプリングを行い、アルカロイド濃度の測定を行った。

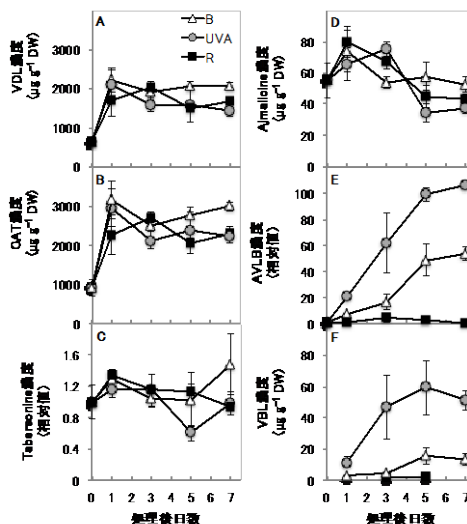


図5 定植後28日から7日間の短波長光処理を行ったタイタン第4葉のVDL濃度(A)、CAT濃度(B)、Tabersonine濃度(C)、Ajmalicine濃度(D)、AVLB相対濃度(E)およびVBL濃度(F;図中のVBLはVBLの誤り)。

UV-A光を照射した葉のVBL濃度およびAVLB濃度は日が経つにつれ向上し、光処理開始後5日から7日で最大であった(図5E、F)。青色光にもそれらの濃度を向上させる作用は認められたが、UV-A光を照射したときの濃度の半分以下であった。VBLの前駆物質であるVDLとCATの濃度は光処理開始後1日以降、減少する傾向にあった(図5A、B)。我々の既往研究において、露地栽培や白色蛍光灯あるいは各色LEDを用いた栽培ではVBLを検出することはできなかった。今回我々が用いたUV-A光を照射する方法によって、高濃度にVBLを生産させられることが明らかとなった。

次に、VBLを葉に集積させるための最適なUV-A光の強度を調査した。UV-A光を照射する際に、葉の角度が一定でないと再現性の高いデータを取得することができない。そのため、直径7mmのリーフディスクを作成し、それを水に浮かべたものにUV-A光150 μmol

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の赤色光と混合して5日間照射する実験を行った。

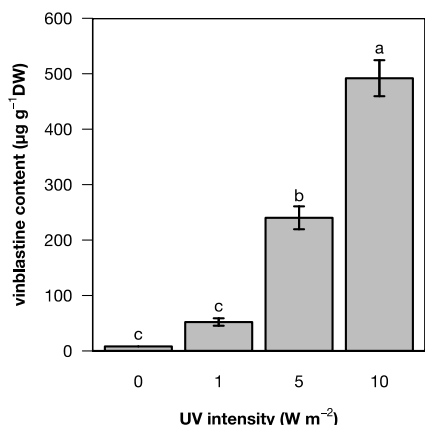


図6 定植後28日から5日間の短波長光処理を行ったタイタン第4葉から作成されたリーフディスクのVLB濃度。

10 W m^{-2} で照射しても、リーフディスクは枯死することではなく、 5 W m^{-2} で照射した場合の2倍以上のVLB濃度を示した(図6)。したがって、さらにVLBの収量を高められることが分かった。

ところが、第4葉よりも老化が進行した第2葉で同様の実験を行ったところ、第4葉の濃度のおよそ1/4程度であった(データは示さず)。したがって、例えば 5 W m^{-2} から 10 W m^{-2} へとUV-A光強度を2倍高めても株全体での収量が2倍となるとは限らない。今後は、ニチニチソウの成育ステージのどのようなタイミングで 10 W m^{-2} のUV-A光を照射するべきか検討する必要がある。

VDLとCATからのAVLBへの縮合にはパーオキシダーゼ1酵素が関与しているとの報告がある(Costa et al. 2008)が、直接的に酵素活性やその遺伝子発現の程度とAVLBおよびVLB生産との因果関係を議論した研究はこれまでに存在しなかった。本研究において、パーオキシダーゼ1酵素の遺伝子である*CrPrx1mRNA*の量についてUV-A光を照射した区と赤単色区で比較したところ、それらの間には有意差はなかった(データは示さず)。転写量による調節ではなく、*in vivo*での酵

素活性の大小によって制御されている可能性も存在する。ニチニチソウに大量に含まれるアルカロイドはタンパク質を抽出する際に、非常に邪魔な存在である。アルカロイドにタンパク質が吸着されたり、失活したりする。解析には様々な困難があるため、酵素活性の解析は今後の課題としている。

以上の結果から、我々はUV-A光を照射することにより、通常の栽培では検出されないVLBを、 $60 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ の濃度で葉に貯めることができることを明らかにした。 5 W m^{-2} のUV-A光を照射した場合の試算で、200株のニチニチソウから10mg(市販薬一瓶の内容量)のVLBが得られる。UV-A光を 10 W m^{-2} にした場合の試算はまだ出ていないが、十分に高められる可能性がある。さらにニチニチソウ株へのUV-A光の照射角度の工夫によってもさらに高効率でVLBを生産できる可能性ある。この3年間の成果を基にさらに生産効率を高めるための光照射技術を開発する予定である。

<引用文献>

- ①Ohashi, K. K., Fukuyama, T., Nakai, A., Usami, H., Ono, E., Watanabe, H. (2013) Growth and alkaloids production in Madagascar periwinkle plants grown under the red LED. The 2013 IFAC Bio-Robotics Conference, March 27-29, 2013, Osaka, Japan. Proceedings.
- ②Costa MMR, Hilliou F, Duarte P, Pereira LG, Almeida I, Leech M, Memelink J, Barceló AR, Sottomayor M (2008) Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 146:403-417.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ①Fukuyama, T., Ohashi-Kaneko, K., Watanabe, H., Estimation of optimal red light intensity for production of the pharmaceutical drug components, vindoline and catharanthine, contained in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Environmental Control in Biology, 査読有, 53(4), 2015, 217-220.
DOI: 10.2525/ecb.53.217
- ②福山太郎, 大橋(兼子)敬子, 大野英一, 渡邊博之, LEDを用いた赤色光と青色光照射下で栽培されたニチニチソウの成長とアルカロイド収量, 植物環境工学, 査読有, 25巻, 2013, 175-182.
<http://dx.doi.org/10.2525/shita.25.175>
- [学会発表] (計6件)
- ①Fukuyama, T., Ohashi-Kaneko, K., Hirata, K., Harada, K., Muraoka, M., Watanabe, H., Improvement of vinblastine production by controlling light conditions in *Catharanthus roseus*, 8th International symposium on light in horticulture. 22-26 May 2016, Michigan, USA.
- ②Fukuyama, T., Ohashi-Kaneko, K., Hirata, K., Harada, K., Muraoka, M., Watanabe, H., The effect of irradiation with red light supplemented with ultraviolet A on vinblastine accumulation in *Catharanthus roseus*, The GreenSys2015 International symposium on new technologies and management for greenhouses, 19-23 July 2015, Évora, Portugal
- ③福山太郎, 大橋(兼子)敬子, 平田收正, 原田和生, 村岡未彩, 渡邊博之, 二段階光質制御法によるニチニチソウ抗ガン剤成分蓄積量の解析, 日本生物環境工学会 2014

年大会, 2014年9月8日~9月11日, 明治大学駿河台キャンパス (東京都千代田区)

- ④Ohashi-Kaneko, K., Fukuyama, T., Ono, E., Watanabe, H., Determination of the optimal light quality condition for improving growth and alkaloid yields of *Catharanthus roseus*, The 29th International Horticultural Congress/Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes, 17-22 August 2014, Brisbane, Australia
- ⑤福山太郎, 大橋(兼子)敬子, 平田收正, 原田和生, 渡邊博之, ニチニチソウ二段階による光質制御は葉に抗ガン剤成分を蓄積させる, 日本生物環境工学会 2013年大会, 2013年9月2日~9月5日, 香川大学 (香川県高松市)

- ⑥福山太郎, 大橋(兼子)敬子, 平田收正, 原田和生, 渡邊博之, 光環境制御による効率的なニチニチソウ抗ガン剤成分の生産, 2013生態工学会年次大会, 2013年6月29日~6月30日, 玉川大学 (東京都町田市)

[その他]

報道関連情報

大橋敬子、解剖先端拠点：玉川大学生物機能開発センター 植物工場光の波長自在, 日経産業新聞、2015年6月17日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼子 敬子 (大橋敬子) (KANEKO, Keiko)
玉川大学・学術研究所・教授
研究者番号：50332599

(2) 研究分担者

平田 收正 (HIRATA, Kazumasa)
大阪大学大学院・薬学研究科・教授
研究者番号：30199062