

## カラマツカルスのステロール脂質クラスにおける メバロン酸添加の影響

佐藤真由美                      斎藤 直人 \*<sup>1</sup>                      関 一人  
錦織 正智 \*<sup>2</sup>                      得字 圭彦 \*<sup>3,4</sup>                      大西 正男 \*<sup>3,4</sup>

### Effects of Exogenous Mevalonic Acid on Sterol Lipid Classes in *Larix kaempferi* Callus

Mayumi SATO                      Naoto SAITO                      Kazuto SEKI  
Masatomo NISHIKOORI      Yoshihiko TOKUJI                      Masao OHNISHI

In Japanese larch (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) calli, free sterol (FS), acylsterol (AS) and glycosylsterol, including the acylated type, were found in the proportion of 1.0:0.1:0.8. When the calli were cultured in the presence of 10 mM mevalonic acid (MVA), the content of AS, but not FS and glycosylsterol, was increased remarkably. The major component sterol in each sterol lipid class was usually sitosterol (more than 90%) with campesterol as a minor one. There were no differences on the sterol compositions between the calli cultured with or without MVA. When the calli cultured with 10 mM MVA for 6 weeks were transferred to the control medium without exogenous MVA, AS contents decreased to the level of the control calli. Thus, it was shown that sterol lipids, such as FS and glycosylsterols, with the structural functions was maintained in the constant content and the excess sterol biosynthesized from exogenous MVA was esterified to form AS for storage of sterol components.

**Key words:** *Larix kaempferi* (Lamb.) Carr., sterol, mevalonic acid, biosynthesis, callus  
カラマツ, ステロール, メバロン酸, 生合成, カルス

カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) カルスにおいて、遊離ステロール (FS)、アシルステロール (AS) およびアシルタイプを含むグリコシルステロールが 1.0 : 0.1 : 0.8 の比で認められた。カルスを 10mM メバロン酸 (MVA) 存在下で培養すると、AS 含有量は著しく増加したが、FS とグリコシルステロールは増加しなかった。各ステロール脂質クラスの主要な構成ステロールはシトステロール (90% 以上) であり、少量のカンペステロールを伴っていた。MVA の存在の有無にかかわらず、カルスの構成ステロール組成には違いがなかった。カルスを 10mM MVA 培地で 6 週間培養後、

MVA 無添加培地に継代すると, AS 含有量は無添加培地のカルスのレベルまで減少した。このように, 細胞構造を担う FS およびグリコシルステロールのようなステロール脂質は一定の含有量に維持されており, 外因性 MVA から生成された過剰なステロールはエステル化ステロールである AS として貯蔵されることが示唆された。

## 1. はじめに

植物には, ステロール脂質として遊離ステロール (FS), アシルステロール (AS), ステリルグリコシド (SG) およびアシルステリルグリコシド (ASG) が広く存在している。AS は他のステロール脂質とともに多くの植物で研究されている<sup>1)</sup>。AS の機能については, 貯蔵<sup>2,3)</sup>, 膜透過性の制御<sup>4)</sup>, ステロール生合成<sup>5-9)</sup> に関して研究されている。しかしながら, その役割は明らかになっていない。Dyas ら<sup>10)</sup> はセロリ (*Apium graveolens*) 懸濁培養細胞の成長相における AS 含有量と組成の変化について研究し, 成長サイクルを通して AS 含有量は FS 含有量を上回っていることを見出した。また, Wilkinson ら<sup>11)</sup> はセロリ懸濁培養細胞における外因性メバロン酸 (MVA) のステロールと AS 生合成への影響を報告しており, 過剰量の外因性 MVA の添加は AS の増加を引き起こすが, FS 含有量や組成にはほとんど影響を与えないことを示している。しかし, これまでに裸子植物の組織におけるステロール脂質のステロール組成や機能に関する研究は十分に行われていない。

この研究では, カラマツ (*Larix kaempferi* (Lamb.) Carr.) カルスのステロール組成を分析し, MVA の添加によるステロール脂質含有量への影響について検討した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 細胞培養

カルス誘導と培養は錦織<sup>12)</sup> の方法に従って行った。カラマツの種子は北海道立林業試験場構内 (北海道美唄市) で採取した。成熟胚を種子から摘出し, カルス誘導に使用した。それら成熟胚を 2.0mg/L 6-benzylaminopurine を添加した SH 液体培地<sup>13)</sup> 中で連続照明下 25°C の条件で回転培養した。カルスは 3 週間ごとに継代した。DL-MVA lactone (Sigma Corp. 製) は蒸留水に溶解し, 滅菌ろ過後, 培地に添加した。MVA の添加濃度は 10mM および 20mM とした。カル

スの成長は新鮮重量 / 初期新鮮重量で評価した。

### 2.2 脂質抽出とステロールの分析

全脂質は凍結乾燥したカラマツカルスをクロロホルム - メタノール (2 : 1, v/v) とともにホモジナイズし, 抽出・ろ過した。抽出は 3 回行い, 合わせた抽出液を Folch ら<sup>14)</sup> の方法で水洗し, 有機溶媒可溶部を全脂質とした。

全ステロール含有量の測定のため, 内部標準としてコレステロールを添加した全脂質に 5% メタノール性塩酸を加え, 100°C で 3 時間分解した。遊離した構成ステロールをジエチルエーテルで抽出した。得られた抽出物をその後シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) に供し, ヘキサン - ジエチルエーテル (80 : 30, v/v) で展開した。TLC で分離された 4-デスメチルステロールをガスクロマトグラフィー (GC) で分析した。

全脂質を Sep-Pak シリカカートリッジ (Waters Corp. 製) に供し, クロロホルム, アセトンおよびメタノールで順に溶出し, それぞれ中性脂質, 糖脂質, リン脂質を分画した。中性ステロール組成と含有量の測定のため, 中性脂質の一部を調製用 TLC に供し, ヘキサン - ジエチルエーテル - 酢酸 (80 : 20 : 1, v/v) で展開して AS (*R<sub>f</sub>* 値 : 0.85) と FS (*R<sub>f</sub>* 値 : 0.17) をかきとった。AS には 1N メタノール性水酸化カリウムを加え, 100°C で 2 時間分解し, 精製した。遊離したステロールを上述のように抽出し, 分析した。糖脂質画分は 0.4N メタノール性水酸化カリウムで 37°C, 2 時間処理することにより, アルカリ安定脂質画分を得た。アルカリ安定脂質を TLC に供し, クロロホルム - メタノール (95 : 15, v/v) で展開し, SG (ASG を含む) (*R<sub>f</sub>* 値 : 0.21) を単離した。SG はその後, 5% メタノール性塩酸を加え 100°C で 2 時間分解した。遊離した構成ステロールはジエチルエーテルで抽出し, GC 分析に供した。

### 2.3 GC 分析

FS, AS および SG から分離した 4-デスメチルステ

ロールは *N, O*-bis (trimethylsilyl) acetamide でトリメチルシリル誘導体化し、水素炎イオン化検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC-14A, (株) 島津製作所製) で分析した。分析は以下の条件で行った。

カラム : DB-1 (30m×0.32mm i.d., Agilent Technologies, Inc. 製)

カラム温度 : 250°C

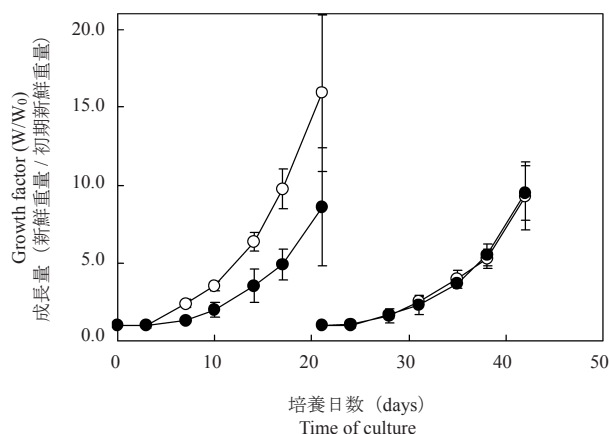
注入口および検出器温度 : 270°C

保持時間を標品 (カンペステロールおよびシトステロール : タマ生化学 (株) 製) と比較し、ピークを同定し、ピーク面積からステロール組成を算出した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 カサ成長における MVA の影響

MVA のカラマツカサの成長への影響を調べるために、MVA 添加培地および無添加培地 (コントロール) におけるカサの新鮮重量を測定した (第 1 図)。10mM MVA 培地で培養したカサの成長 (新鮮重量 / 初期新鮮重量) は、培養初期段階 (1-21 日) においてコントロールよりも 54% 劣った。しかしながら、継代後 (21-42 日) は MVA の影響は認められなかった。



第 1 図 カサ成長に対する MVA 添加の影響

凡例) ○ : コントロールで培養したカサ, ● : MVA10mM 添加培地で培養したカサ  
注) W および W<sub>0</sub> はそれぞれ新鮮重量および初期新鮮重量を示す  
エラーバーは標準偏差を示す

Fig. 1. Effects of MVA on growth of *Larix kaempferi* calli.

Legends) ○ : The calli cultured in the control medium, ● : The calli cultured in the MVA 10 mM medium.  
Note) W and W<sub>0</sub> indicate fresh weight and initial fresh weight, respectively. Error bars show standard deviation.

#### 3.2 ステロール含有量における MVA の影響

MVA 添加培地およびコントロールで培養したカラマツカサの全脂質の TLC から AS, FS および 2 つのグリコシルステロール (SG と ASG) が認められた。コントロールで培養したカサの全ステロール含有量は、培養開始 42 日後に 2.06mg/ 絶乾カサ g であり、FS:AS:SG (ASG を含む) 比は 1.0:0.1:0.8 であった。カサを 10mM MVA 添加培地で培養すると、全ステロール含有量はコントロールの 2 倍になった (第 1 表)。FS とグリコシルステロールの含有量 (それぞれ 1.0 および 0.8mg/ 絶乾カサ g) は MVA によって影響を受けなかったが (それぞれ 0.7 および 0.6mg/ 絶乾カサ g), AS 含有量は MVA 添加培地およびコントロールにおいて、著しい違いが認められた (それぞれ 1.8 および 0.1mg/ 絶乾カサ g)。このことから、MVA による全ステロール含有量の増加は、AS によるものであることが示された。培地に MVA を 20mM 添加した場合、ステロール脂質の含有量は 10mM 添加とほぼ同じであった (第 1 表)。

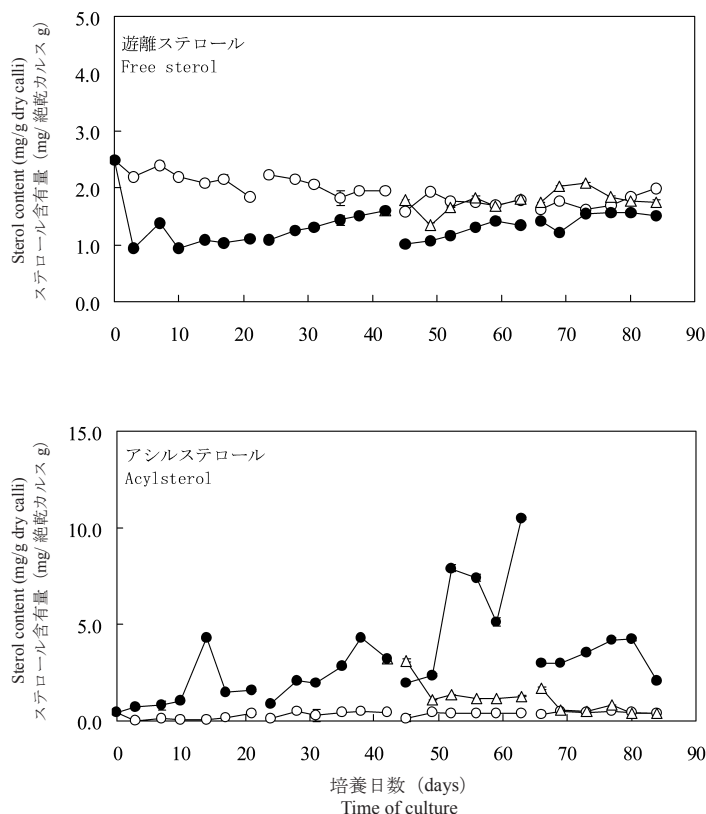
カサの成長に伴うステロール脂質含有量の変化を分析した (第 2 図)。培地への MVA の添加により、培養 3 日目には FS 含有量が減少した。この FS の減少は、コントロールと比較して培養初期段階の成長が劣ったことが原因と考えられる。培養 42 日目までには、FS 含有量は徐々にコントロールのレベルまで

第 1 表 MVA 無添加および添加培地で培養したカラマツカサの全ステロール含有量 (mg/ 絶乾カサ g) とステロール脂質クラス比  
Table 1. Total sterol contents (mg/g dry calli) and proportions of sterol lipid classes in *Larix kaempferi* calli cultured with and without mevalonic acid.

	メバロン酸濃度 Mevalonic acid concentration		
	0 mM	10 mM	20 mM
全ステロール Total sterols	2.06±0.22	4.23±0.06	4.53±0.09
遊離ステロール Free sterol	1.0	1.0	1.0
アシルステロール Acylsterol	0.1	2.6	3.1
グリコシルステロール Glycosylsterol	0.8	0.9	1.0

注) 平均 ± 標準偏差 (n=3)

Note) Values are means ± SD (n=3)



第2図 カラマツカルスの遊離ステロールおよびアシルステロール含有量に対する MVA 添加の影響

凡例 ○：コントロールで培養したカルス，●：MVA10mM 添加培地で培養したカルス，△：MVA10mM 添加培地で培養後 42 日目にコントロールへ継代したカルス

注) エラーバーは標準偏差を示す

Fig. 2. Effects of MVA on free sterol and acylsterol contents of *Larix kaempferi* calli.

○, ● and △ indicate the calli cultured in control, MVA 10 mM and the calli cultured in MVA 10 mM medium transferred to the control medium at 42 days, respectively.

Error bars show standard deviation.

増加した。コントロールでは、AS 含有量が培養期間を通して一定であった。一方、MVA 添加培地で培養したカルスの AS 含有量は、培養日数に伴い著しく増加した (10 倍)。この傾向はその後の継代後も繰り返し観察された。しかしながら、AS 含有量は 3 回目の継代培養を除いて、3 週間の継代ごとにその後期には 64% 減少する傾向を示し、これらは培地中の MVA の消費によるものと推察された。培養 42 日目にカルスを MVA 添加培地からコントロールに継代すると (第 2 図)、AS 含有量はコントロールのカルスのレベルまで減少した。この結果により、カルス中に貯蔵された AS は優先的に FS へ分解されて、成長に使われることが示唆された。

Dyas ら<sup>10)</sup> はセロリ懸濁培養細胞では、成長サイ

クルを通して AS 含有量が FS 含有量よりも高いことを見出している。しかしながら、この現象が植物懸濁培養細胞に共通の特徴か、セロリの特徴なのかはまだ明らかではない。コントロールのカラマツカルスでは、培養を通して FS が主要なステロール脂質であった。MVA 存在下では AS 含有量は著しく増加するが、FS は増加しない。Wilkinson ら<sup>11)</sup> は外因性 MVA の添加は AS 含有量の増加を引き起こすが、FS 含有量にはほとんど影響がないことを報告しており、このことは今回の結果と一致している。これらのことは MVA の添加は裸子植物と被子植物の両者において AS 含有量の増加を引き起こすことを示している。

2 つのグリコシルステロール (SG と ASG) などの極性ステロールは膜脂質として働くことが示されている<sup>15)</sup>。また、Kemp ら<sup>2)</sup> は発芽中のトウモロコシ実生において FS が膜の構造機能を担うことを示している。この研究では、MVA の添加によりステロール生合成における前駆物質が増加しても、カラマツカルスの極性ステロール脂質と FS は一定量に維持されていることを見出した。この結果は、AS を除くこれらのステロール脂質は、膜構造機能を持つことを示唆している。また、カラマツカルスでは、ステロール生合成において外因性 MVA の存在のようなある因子によって、構造機能

を持つ FS が過剰に生合成された場合に、AS がステロールの貯蔵の役割を果たしていると考えられる。

### 3.3 各脂質クラスのステロール組成における MVA の影響

カラマツカルスの構成ステロールの組成を分析した (第 2 表)。シトステロールとカンペステロールが認められ、前者は MVA 添加およびコントロールで生育したカルスにかかわらず、各脂質クラス (FS, AS, SG) において常に優先的 (90-100%) であった。コントロールではシトステロールの割合が 98% 以上であり、一方、MVA 添加培地ではシトステロールがわずかに少なく、カンペステロールは 2-11% であった。さらに、培養期間を通して構成ステロールの組成には違いがなかった (データは示していない)。

第2表 カラマツカルスにおける各ステロール脂質クラスの構成ステロール組成 (%) に及ぼす MVA 添加濃度の影響

Table 2. Effects of administered mevalonic acid concentration on sterol composition (%) of each sterol lipid classes in *Larix kaempferi* calli.

	メバロン酸濃度 Mevalonic acid concentration		
	0 mM	10 mM	20 mM
遊離ステロール Free sterol			
シトステロール Sitosterol	98.1±0.39	97.1±0.75	95.8±0.86
カンペステロール Campesterol	1.9±0.39	2.9±0.75	4.2±0.86
アシルステロール Acylsterol			
シトステロール Sitosterol	100.0±0.00	92.3±0.24	89.5±0.30
カンペステロール Campesterol	0.0±0.00	7.7±0.24	10.5±0.30
グリコステロール Glycosylsterol			
シトステロール Sitosterol	98.3±0.03	97.9±0.37	96.9±0.20
カンペステロール Campesterol	1.7±0.03	2.1±0.37	3.1±0.20

注) 平均±標準偏差 (n=3)  
Note) Values are means ± SD (n=3)

Wilkinson ら<sup>11)</sup> は MVA 処理した細胞の AS 画分では 4, 4-ジメチルステロールの割合が増加するが、これら細胞中の 4-モノメチルステロールと 4-デスメチルステロールの割合はコントロール細胞よりも低いことを報告している。今回の研究では、前駆体ステロールである 4, 4-ジメチルステロールと 4-モノメチルステロールは分析していない。また、Wilkinson ら<sup>11)</sup> は AS が過剰量の前駆体ステロール、特にシクロアルテノールの貯蔵の役割を果たすことも示している。それゆえ、カラマツカルスにおける脂質生合成の解明のためには、4, 4-ジメチルステロールと 4-モノメチルステロールの組成および含有量の検討は重要と考えられる。

今回の研究では、カラマツカルスの培地に過剰量の MVA を添加すると、カルスにはエステル化された 4-デスメチルステロールが多量に蓄積することが示された。膜の構成に寄与する遊離ステロールとグリコシルステロールなどの極性ステロール脂質は、カルスにおいては外因性 MVA の影響を受けなかった。

これらの結果は、裸子植物の細胞で生合成された過剰な FS は、ステロールの貯蔵のために AS へ変換されることを示唆している。

### 文 献

- 1) Dyas, L., Goad, L.J.: *Phytochemistry* **34**, 17-29 (1993).
- 2) Kemp, R.J., Goad, L.J., Mercer, E.I.: *Phytochemistry* **6**, 1609-1615 (1967).
- 3) Atallah, A.M., Aexel, R.T., Ramsey, R.B., Threlkeld, S., Nicholas, H.J.: *Phytochemistry* **14**, 1927-1932 (1975).
- 4) Atallah, A.M., Nicholas, H.J.: *Lipids* **9**, 613-622 (1973).
- 5) Kemp, R.J., Hammam, A.S.A., Goad, L.J., Goodwin, T.W.: *Phytochemistry* **7**, 447-450 (1968).
- 6) Schaller, H., Maillot-Vernier, P., Belliard, G., Benveniste, P.: *Planta* **187**, 315-321 (1992).
- 7) Whitaker, B.D.: *Phytochemistry* **27**, 3411-3416 (1988).
- 8) Lalaguna, F., Agudo, M.: *Phytochemistry* **28**, 2059-2062 (1989).
- 9) Baker, E.A., Bukovac, M.J., Flore, J.A.: *Phytochemistry* **18**, 781-784 (1979).
- 10) Dyas, L., Prescott, M.C., Evershed, R.P., Goad, L.J.: *Lipids* **26**, 536-541 (1991).
- 11) Wilkinson, S.C., Powls, R., Goad, L.J.: *Phytochemistry* **37**, 1031-1035 (1994).
- 12) 錦織正智：北海道林業試験場研究報告 第 36 号, 11-20 (1999).
- 13) Schenk, R.V., Hildebrandt, A.C.: *Can. J. Bot.* **50**, 199-204 (1972).
- 14) Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H.: *J. Biol. Chem.* **226**, 497-509 (1957).
- 15) Mudd, J.B., McManus, T.T.: *Plant Physiol.* **65**, 78-80 (1980).

— 利用部 成分利用科 —  
— \*1 : 企画指導部 企画課 —  
— \*2 : 道立林業試験場 —  
— \*3 : 帯広畜産大学 —  
— \*4 : 岩手大学大学院 —  
(原稿受理 : 07.6.20)