

植物培養細胞による有用赤色色素の生産

河邊誠一郎・伊藤 雅浩*・岡 豊司**・村上 一郎**

倉敷芸術科学大学教養学部

*岡山大学大学院 農業研究科

**岡山理科大学大学院 理学研究科総合理学専攻

(1997年9月30日 受理)

はじめに

今日、地球上には数多くの色が氾濫している。我々が、日常口にしていない食品や身につけている衣類にも、その他、あらゆる場所で使用されている。

以前は、天然色素の独壇場であったが、科学の発達に伴い、ここ100年ほどの間に、非常に多くの合成染料、色素が作り出された。これは、安価で、多様性に富むため、今日では、その主流を占めている。しかし、近年の高度成長に伴う生活の安定化、好みの多様化、そして、添加剤の安全性など¹⁾の多くの課題が生じ、ここに改めて、天然（主に植物）由来の色素が見直されるようになっている。

ところで、天然色素を安価に安定に供給するには様々な制約があり、その成長速度や含有量などを考えると問題も多い。その中で、赤色系天然色素に関してはベタシアニン系色素の使用量も多い。ベタシアニン色素は、サトウダイコン、アカザ、ハゲイトウ、マツバボタン、ヨウシュヤマゴボウなどに含まれ、これらの植物培養細胞における生産の研究報告²⁾も出始めている。本研究室においても、ヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の植物体からカルスを誘導し、ベタシアニン色素の検討³⁾を行っている。しかし、もともとヨウシュヤマゴボウの植物体には毒性物質が含まれ、食品、化粧品などへの使用には適さない。

そこで我々は、主に食用作物中の色素に着目し、安全な色素の生産について検討を始めている。これまでアントシアニン色素が培養細胞中で大量に生産された報告⁴⁾⁻⁷⁾は少ない。今回我々は、植物体としてサツマイモ (*Ipomoea batatas*) を用いて、その培養細胞のアントシアニン色素生産性について検討し、面白い結果が得られたので報告する。

材料および方法

1) 供試植物

Ipomoea batatas Lam. は、鹿児島、沖縄地方で紫イモと呼ばれている。カラフルな食品として、また芋からその色素を抽出するなどして利用されている。今回、この茎葉を用い、ホルモンを調整した培地で無菌培養を行った。

2) 実験方法

A) カルス誘導と培養

- (1) 試料(茎葉)を中性洗剤で洗い、水道水でよく水洗いした後、蒸留水で洗浄。
- (2) 70%アルコールと次亜塩素酸ソーダを用い、植物の状態、汚染度合に応じた殺菌を行った。
- (3) クリーンベンチ内で、殺菌剤を蒸留水でよく落とした後、滅菌したシャーレ上で1cmに切断し、植物片に軽く傷をつけた。
- (4) PRL-4C培地を基本とし、Auxinホルモンとして2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)を、炭素源として、3% sucroseを添加した寒天固体培地に植え付け、25℃、暗黒下で培養した。

B) カルスの増殖、色素生産の検討

(1) 明暗条件による検討

A)で誘導したカルスを用い、PRL-4C培地に2,4-Dホルモンを0.3ppmおよび3%濃度の sucrose を添加した液体培地で25℃の暗黒下および2000Lux連続照明下、80rpmで振とう培養を行った。

(2) 温度条件による検討

(1)と同様の組成培地を用いて、温度を30℃、27.5℃、25℃、22.5℃、20℃と設定し、それぞれの条件で培養を行った。

(3) 糖濃度による検討

同様の培地で sucrose 濃度を0~5%と変え、培養を行った。

(4) 植物ホルモンによる検討

Auxinホルモンとして2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α -Naphthalene acetic acid (NAA), Cytokininホルモンとして kinetin (Ki)を用い、AuxinとCytokininを組み合わせて、培養を行った。

(5) 金属元素の影響

培地中の金属元素 Cu, Ca, Mgの濃度を変えて培養を行った。

C) アントシアニン色素の抽出・定量

- (1) 新鮮細胞を少量の海砂を加えて乳鉢で磨砕する。これを60%メタノールを用いて色素を抽出し、プフナー漏斗で吸引濾過する。
- (2) 抽出液を濃縮乾固し、粗アントシアニン色素を得た。
- (3) 色素の定量は、60%メタノール溶液中アントシアニンの極大吸光を示す波長(530nm付近)において、濃度を変えて吸光度を測定し、検量線を作製して算出した。

結果および考察

1) カルス誘導

カルス誘導では、70%EtOHで1分、次亜塩元酸ソーダ（有効塩素：1%）で1～2分で殺菌した。植え付けた外植片から約30日ぐらいでカルスが生じた（写真1-1）。更にそれからアントシアニン色素[®]を持つとみられるカルスを選抜継代し、約4ヶ月で色素を持った細胞のみのカルス群を確立した（写真1-2）。

2) カルスの増殖、色素生産の検討

明暗条件による検討では摂取密度を0.1g/mlとして実験を開始し、5日毎に測定を行った。明暗条件のどちらにおいても細胞は良好に増殖し、約30日目に最大増殖に達した（図1-1）。色素生産に関しては明条件のほうが良く、暗条件は継代時の含有量と変わらない状態を維持する結果となった（図1-2、写真2）。また細胞の増殖と色素生産の相互関係をみると、増殖のピークに達した停滞期（25日以降）から、色素の生産が開始されることが示された。色素の生産は、細胞が増殖を終えて培地中の養分を使い果たした衰退期に現われる現象と考えられる。

温度による検討では、温度が高温になるにつれて高い増殖量を示した（図2-1）。サツマイモの植物体は、比較的暖かい地方で生産が盛んである。このことから、カルスにおいても温

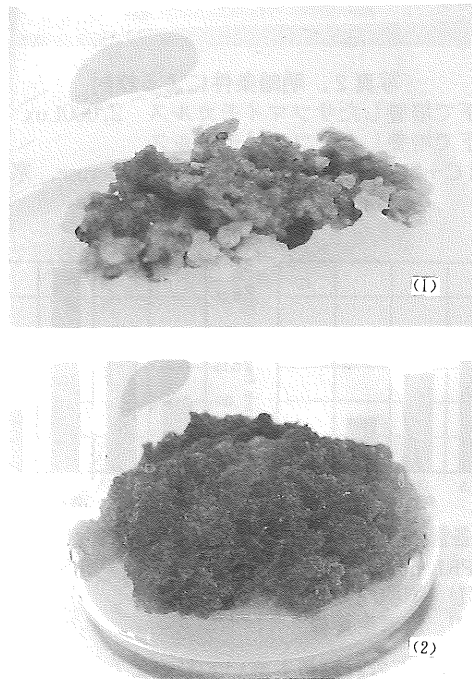


写真1. 茎葉からカルス誘導を行なったサツマイモカルス (*Ipomoea batatas L.*)
寒天静置培養

- (1)：PRL-4C+2, 4-D (3 ml/l), 暗条件：淡緑, 赤, 白色カルス
(2)：PRL-4C+2, 4-D (3 ml/l), 明条件：赤色カルス 2,000Lux

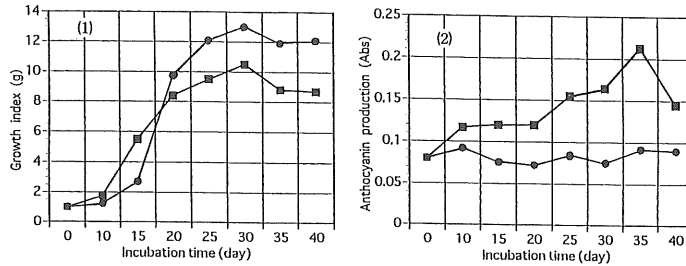


図1. 明暗条件下によるサツマイモの増殖・色素生産：PRL-4C+2, 4-D (3 ml/ℓ)
3% sucrose, 2,000Lux
(1) 細胞増殖量
(2) 色素生産量

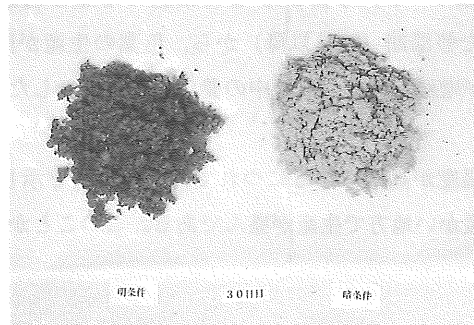


写真2. 明暗条件による検討

左：明条件下で培養したサツマイモカルス 2,000Lux
右：暗条件下で培養したサツマイモカルス
PRL-4C+2, 4-D (3 ml/ℓ) + 3% sucrose, 寒天静置培養

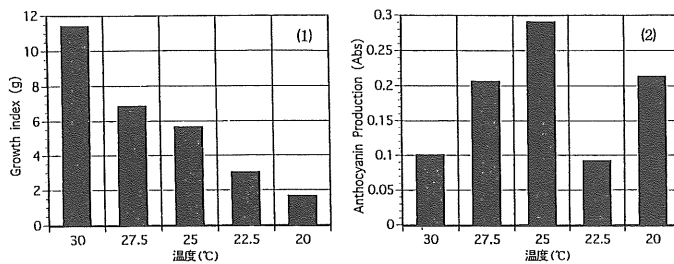


図2. 各温度条件下によるサツマイモの増殖・色素生産
PRL-4C+2, 4-D (3 ml/ℓ) + 3% sucrose
(1) 細胞増殖量
(2) 色素生産量

度を上げてやると、成長のみからみれば最も高い30℃がより適温であったといえる。しかし、色素含有量は極端に低い数値を示したため、高温での色素生産は抑制されてしまうと考えられる(図2-2)。結果的に増殖量×色素生産量の積からみれば、25℃条件が最適であると考えられた。また初期培養において高温で増殖させ、2次培養で色素生産培地での培養を試みるこ

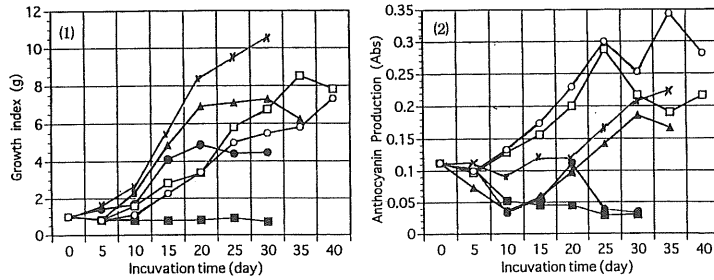


図 3. 炭素源濃度によるサツマイモの増殖・色素生産
 PRL-4C+2, 4-D (3 ml/l) + 3% sucrose
 (1) 細胞増殖量
 (2) 色素生産量

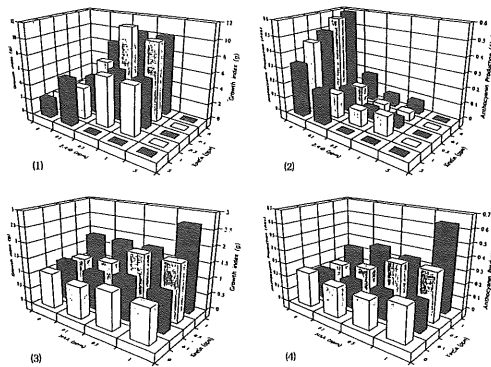


図 4. 植物ホルモンによるサツマイモの増殖・色素生産
 PRL-4C+2, 4-D (3 ml/l) + 3% sucrose
 (1) 2, 4-D と Ki の組合せ：細胞増殖量
 (2) 2, 4-D と Ki の組合せ：色素生産量
 (3) NAA と Ki の組合せ：細胞増殖量
 (4) NAA と Ki の組合せ：色素生産量

とも考えられた。

炭素源である糖は、細胞の成長率、色素生産の両方にとって大きく影響することがわかった (図 3-1)。糖濃度 0 の条件では増殖・色素生産ともに増えることはなかった。3%までの条件では細胞の増殖は上がっていったものの、4%以上になると抑制的な影響が働いているようであった。これは糖濃度の浸透圧の増大が細胞の増殖を抑えたのではないかと考えられる。高濃度の系では、糖を消費していくにつれて成長は良くなっていくのが見られ、また長期の培養が可能であることがわかった。

植物ホルモンは、2, 4-D と Ki の組合せにおいて、2, 4-D を 0.5ppm, Ki を 0.1ppm 添加した時が成長率では最も良好であった (図 4-1)。2, 4-D, Ki の両方とも高濃度での培養はできず、5.0ppm ともなると培養細胞は死滅することが明らかとなった。一方、成長を促進する 2, 4-D は、反対に色素生産を抑制する傾向があり、微量の濃度で激減するという結果となっ

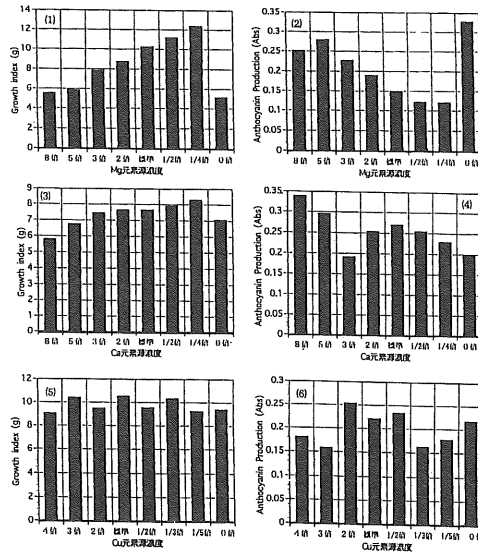


図5. 金属元素濃度によるサツマイモの増殖・色素生産

PRL-4C+2, 4-D (3 ml/ℓ) + 3% sucrose

(1) Mg 濃度：細胞増殖量 (2) Mg 濃度：色素生産

(3) Ca 濃度：細胞増殖量 (4) Ca 濃度：色素生産

(5) Cu 濃度：細胞増殖量 (6) Cu 濃度：色素生産

た(図4-2)。Kiによる影響は、高濃度につれて徐々に色素生産を抑制するようである。結果的に色素生産が最も高いのは、2, 4-D, Kiとも無添加の培地であった。現在、成育のよりよいホルモン添加培地でカルスの増殖を促し、次に無添加の培地で色素生産を試みることを検討中である。

金属元素の中でおもしろい結果となったのは、Mg元素である。標準濃度を基本に最高で8倍、最低で0倍の検討を行った(図5-1)ところ、Mgを無添加では、カルスの増殖量が低かった。また濃度が高すぎても増殖が抑制される傾向があり、1/4倍の濃度が最もよい結果となった。このことからMgはわずかな量で培養細胞の増殖を促進させることが示された。Mgの色素生産に対する影響では、Mg無添加のとき、最も色素の生産が良かった(図5-2)。無添加以外では、濃度が高くなるにつれて色素生産は促進された。ここでも細胞の増殖と色素生産は反比例する傾向が見られ、両者の兼合いを図ることが大切であることがわかった。

培養細胞は培地中の成分を摂取して増殖期をたどり、やがて養分を使い果たした培地中で衰退期を迎えるときに色素を生産する。様々な検討を試みたところ、色素生産は培地中の成分要素の欠落によって起こる現象であると考えられる。

摘 要

サツマイモの茎葉から、赤色色素アントシアニンを含む良好なカルスを誘導し増殖させることができた。茎葉から誘導したカルスは、選抜継代することによって鮮やかなアントシアニン

色素（赤色）のみを持つ細胞となった。アントシアニン色素には光が重要な因子の1つであった。温度効果は、増殖のみからみれば最も高温の30℃の処理区が最大であったが、色素の生産は乏しく、総色素生産量においては25℃処理区が最も良かった。炭素源は、基本的に糖濃度が高いほど色素の生産は良いと考えられた。しかし浸透圧と考えられる影響で、sucrose 4%以上の系で細胞の増殖量はかえって低い率を示した。植物ホルモンは2, 4-Dを0.5ppm, Kiを0.1ppmの組合せが最も高い成長率を示した。高濃度のホルモン処理ほど細胞増殖は少なく、2, 4-D, Kiとも5.0ppmになると細胞は死滅した。色素の生産では、ホルモン無添加で最大となった。テルペン^{9),10),11)}、アルカロイド^{12),13)}など、多くの二次代謝産物の生合成に際し、細胞の増殖と二次代謝産物の合成蓄積には背反的な現象が見られることが多い。サツマイモカルス培養においても、そのアントシアニン生合成は同様な傾向が見られた。植物ホルモンにおいても、まずホルモン添加培地で増殖させ、無添加培地において色素生産を促す2段階培養を試みる事が考えられた。培地中の金属元素であるMgは、細胞の増殖・色素生産に特異な反応を示した。Mg濃度に関しては細胞増殖と色素生産の兼合いを考える必要がある。

参考文献

- 1) K. Gihei, *Fragrance Journal*, 4, 27 (1991)
- 2) H. Bohm and E. Rink, "Cell culture and somatic cell genetics of plant", 5, 449 (1988), Academic Press, San Diego.
- 3) 河邊誠一郎, 遠藤晴彦, 沢田由佳, 佐藤玲子, 馬場志麻; 岡山理科大学紀要; 28, 85 (1993)
- 4) 坂本一央, 浅田善久, 日本食品工業学会誌, 40, 647 (1993)
- 5) K. Sakamoto, K. Ikeda, K. Sawamura, K. Hajiro, Y. Asada, T. Yoshikawa and T. Furuya, *Phytochemistry*, 33, 357 (1993)
- 6) H. Tamura, M. Fujiwara and H. Sugisawa, *Agric. Biolo. Chemi.*, 53, 1971 (1989)
- 7) C. M. Colijn, L. M. V. Jonsson, A. W. Schram and A. J. Kool, *Protoplasma*, 107, 63 (1981)
- 8) K. Otake, N. Terahara, N. Saito, K. Toki and T. Honda, *Phytochemistry*, 31 (6), 2127 (1992)
- 9) 河邊誠一郎; *Fragrance Journal*, 4, 70 (1991)
- 10) S. Kawabe, H. Fujiwara, K. Murakami and K. Hosomi, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57 (4), 657 (1993)
- 11) 河邊誠一郎, 渡邊明美, 渡瀬佳子, 細見和雄; *Plant Tissue Culture*, 10 (2), 184 (1993)
- 12) 河邊誠一郎; 両備櫻園財団研究報告; 10, 7 (1995)
- 13) 河邊誠一郎; 倉敷芸術科学大学紀要; 1, 117 (1996)

Callus Formation and Production of Red Colore Compounds of *Ipomoea batatas Lam.* by Plant Cell Culture

Seiichirou KAWABE, Masahiro ITOU*, Toyozumi OKA** , Ichiro MURAKAMI**

College of Liberal Arts and Science,

Kurashiki University of Science and the Arts,

2640 Nishinoura, Tsurajima-cho, Kurashiki-shi, Okayama 712, Japan

**Graduate Schools of Agriculture, Master's Program in Agriculture,*

Okayama University, 1-1 Tushima-naka, Okayama 700, Japan.

***Graduate Schools of Science, Master's Program in Applied Science,*

Okayama University of Science, Ridai-cho 1-1, Okayama 700, Japan.

(Received September 30, 1997)

The calls were induced from the plantlets of *Ipomoea batatas Lam.* by plant cell cultures. The calls produced anthocyanin pigments under the irradiation(2,000 lux.). For the production of anthocyanin pigments, PRL-4 C medium with the high conc. sucrose, hormones free and Mg²⁺ free under 25°C condition were the most effective. But, conflicting effects have been obtained about the pigments production as the calls growth. We describe the way to get the pigments more efficiently by two-step cultivation of the cells with growth culture medium and pigment producing culture one.