

十字科紅芯大根培養細胞による有用赤色色素生産

河辺誠一郎・西村 太地*・江口 剛史**

倉敷芸術科学大学国際教養学部

*倉敷芸術科学大学大学院人間文科研究科

**岡山大学大学院自然科学研究科 博士課程前期

(2002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。我々はそれらの色を日々口にし、身につける等、様々な場面で使用している。

かつて利用色素は天然色素が中心であったが、科学の発達に伴い、ここ100年程の間に非常に多くの合成染料、色素が作り出された。これらは、安価で安定かつ多様性に富む為、今日では、その主流を占めている。しかし、近年、高度経済成長に伴う生活の安定化、嗜好の多様化、本物指向、そして添加剤としての安全性¹⁾等から、天然物（主に植物）由来の色素が見直される様になっている。

ところで、天然色素を安価で安定に供給するには様々な制約が有る。個々の植物体の確保、増殖、色素の性質、色素含有量等の問題も多い。その様な中で、赤色天然色素に関しては、アントシアニン系色素の使用量が多く、これらは、近年、ポリフェノールとして、健康食品としても見直されている。

本研究室では以前から赤色色素生産の研究を行っており、アントラキノンを生産するアカネ (*Rubia aragyi*) をはじめ、ベタシアニンを生産するヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana.L.*)、アントシアニンを生産する紫サツマイモ (*Ipomoea batatas*) 等の培養細胞による色素大量生産について検討し、報告^{2)・4)}を行ってきた。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は少なく^{5)・8)}、本研究室が現在取り組んでいる紅芯大根 (*Raphanus sativus L.var.longinnatus Bailey*) を用いた報告は皆無である。

今回、良質な赤色色素を生産するとされる紅芯大根培養細胞のアントシアニン生産に関し、面白い結果が得られたので報告する。

材料及び方法

1) 供試植物体

紅芯大根 (*Raphanus sativus L. var.longnnatus.Bailey*) は中国産の十字科 (アブラナ科) 植物である。根茎中にアントシアニン系色素を含む食用丸大根として、食味に加え、見栄えも良い事から、近年、日本にも輸入され、栽培も行われ始めている。今回、この芽生え苗を用い、様々

な培養を行った。

2) 実験方法

a) カルス誘導と培養培地

- ① 試料（紅芯大根種子）を中性洗剤溶液中で攪拌し、汚れを除去した後、1%塩化ベンザルコニウム溶液で10分間、塩素濃度1%の次亜塩素ソーダで10分間、最後に70%エタノールで1分間、種子を攪拌しながら滅菌を行った。その後、クリーンベンチ内で殺菌剤を滅菌蒸留水で洗浄した後、充実した種子を選抜し培養実験に用いた。
- ② 培地はLS培地に各種濃度の植物ホルモン、即ち、オーキシシン類として2,4-Dichlorophenoxyacetic acid（以下、2,4-D）、サイトカイニン類として6-Benzylaminopurine（以下、BAP）を加え、炭素源として3%Sucroseを添加した0.5%ゲランガム固形培地を基本培地とし、25℃、5,000Luxで静置培養した。

b) 紅芯大根カルスの増殖・色素生産に関する検討

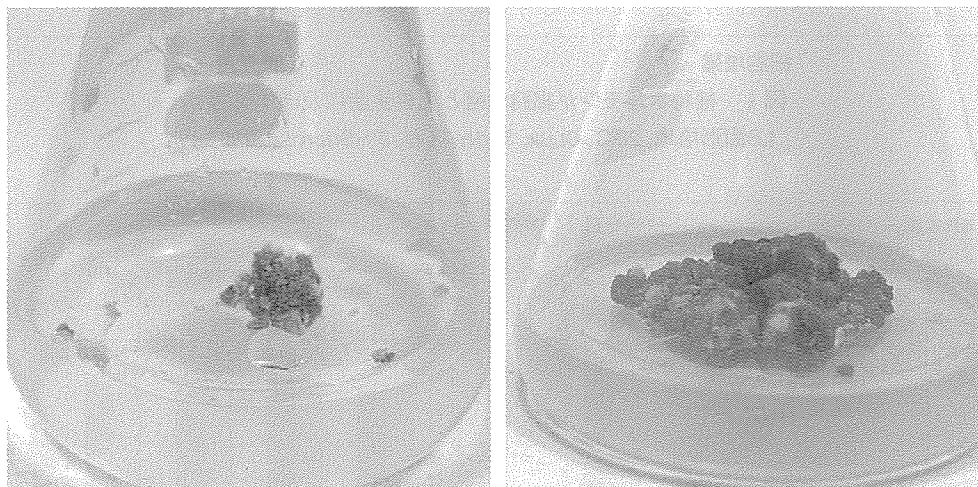
- ① 植物ホルモンによる影響
 - a) で誘導したカルスを用い、LS基本培地に各種濃度の2,4-D、及びBAPを添加し、最適ホルモン条件を検討した。
 - ② 明暗条件による影響

LS基本培地に2,4-D 1 ppm, BAP 3 ppmを添加したゲランガム固形培地上で、暗黒下及び3,000Lux連続照射下に静置し、培養を行った。
 - ③ 連続培養条件による影響
 - ②と同じ条件で暗黒下で、50日間連続培養を行った。
 - ④ BAPの濃度による影響
 - ②と同じ条件で暗黒下で、BAPの濃度を細かく濃度を変化させて培養を行った。
 - ⑤ 温度条件による影響
 - ②と同じ条件で暗黒下で、温度を15℃、20℃、25℃に設定し培養を行った。
 - ⑥ 前駆物質による影響
 - ②と同じ条件で暗黒下で、アントシアニン色素の前駆物質であるフェニルアラニンの各種濃度を添加して培養を行った。
- ### c) アントシアニン色素の抽出・測定方法
- ① 新鮮細胞1gを少量の海砂を加えて乳鉢で摩細する。これを60%メタノールを用いて色素を抽出し、ブフナー漏斗で吸引濾過する。
 - ② 抽出液を5mlに秤量し、60%メタノール溶液中アントシアニンの極大吸光（530nm）におけるの吸光度（O.D）を測定した。

結果及び考察

1) カルス誘導

カルス誘導にあたり、まず最適ホルモン濃度の検討を試みた。滅菌種子を用いて様々な植物ホルモンを組み合わせて培養を試みた。その結果、BAP7.5ppmを添加した場合、発芽種子は20日後、茎や葉の器官は正常に成長していたが、根の部位が赤色になり、クラウンゴールの様な形状を示した。この赤色度の強い細胞を取り、移植増殖させる事により赤色色素含有細胞（カルス）の安定培養に成功した。（写真1）



0日目

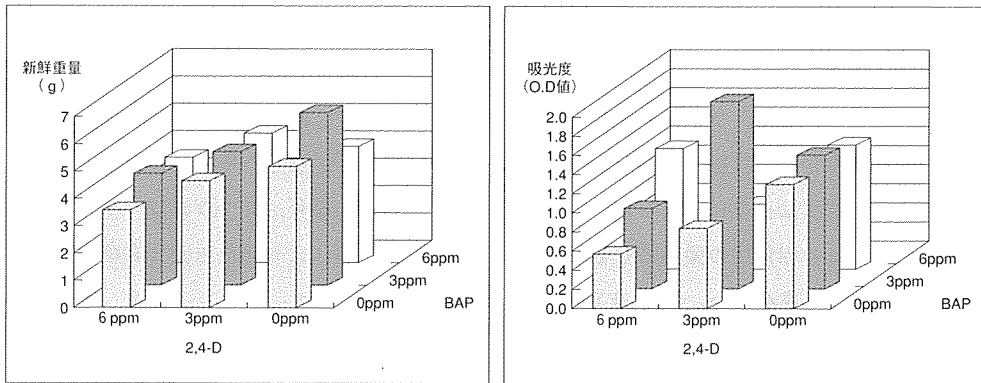
40日目

写真1 紅芯大根カルス (*Raphanus.sativus.L.var.longinnatus*) の赤色細胞増殖
LS固形培地(0.5%ゲランガム) +2,4-D1ppm, BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 20℃ 暗条件培養

2) カルスの増殖・色素生産

カルス誘導し、増殖させた培養細胞を用いて、増殖と色素生産に最適な植物ホルモン濃度を検討した。増殖カルスは30mlの培養液（固形）にあたり1gの培養密度で培養を始め30日間培養を行った。その結果、紅芯大根のカルスはサイトカイニン要求性の傾向にある事が判った（図1）。本来、サイトカイニン類は根で合成されるが、一定量のサイトカイニン類の補充により一層機能が促進されるものと推測された。増殖と色素生産量をバランスを考慮し、更に細かく、植物ホルモン濃度の組み合わせを検討した結果、植物ホルモン添加濃度を2,4-D 1ppm, BAP 3ppmが適当であると考えられた。

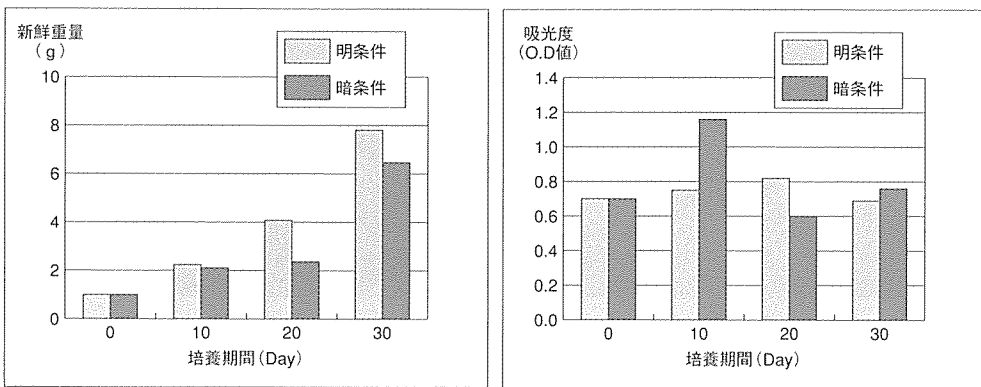
明暗条件による検討では、生長は明条件の方が暗条件に比較して若干良かった（図2）。しかし、暗条件でも充分成長し、かつ色素生産も殆ど変わり無く行っており、この紅芯大根は特異な植物と考えられる。同じく、アントシアニンを生産するサツマイモカルスの場合、暗条件では或程度成長はするが色素生産は殆どしない。通常光レセプターであるフィトクロムAが光



細胞増殖

吸光度

図1 植物ホルモンが細胞増殖と色素生産に及ぼす影響
LS固形培地, 20°C, 0Lux, 30day培養, 3%Sucrose添加

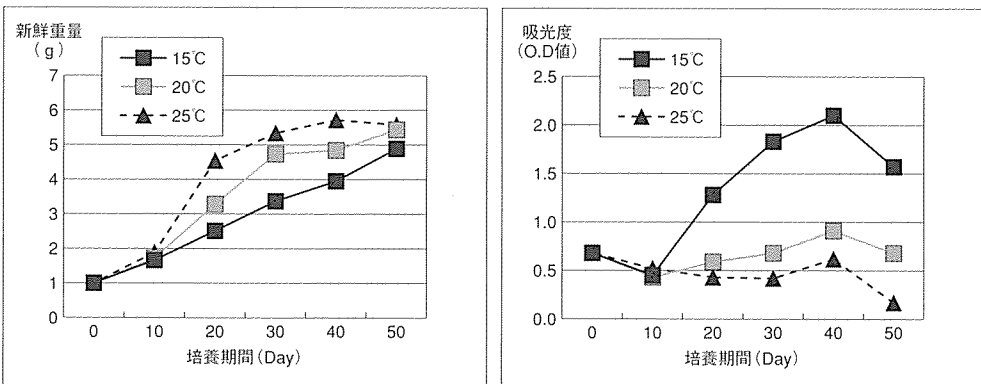


細胞増殖

吸光度

図2 光が細胞増殖と色素生産に及ぼす影響

LS固形培地, 2,4-D1ppm+BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 20°C, 暗条件(0Lux), 明条件(3,000Lux), 30day培養



細胞増殖

吸光度

図3 連続培養による細胞増殖と色素生産

LS固形培地, 2,4-D1ppm+BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 0Lux, 50day培養

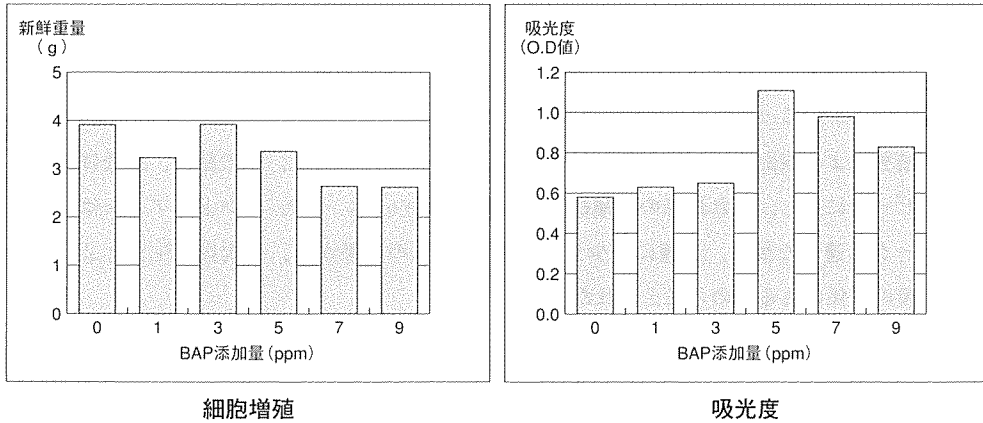


図4 BAP添加量による細胞増殖と色素生産

LS固形培地, 2,4-D1ppm+BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 20℃, 0Lux, 30day培養

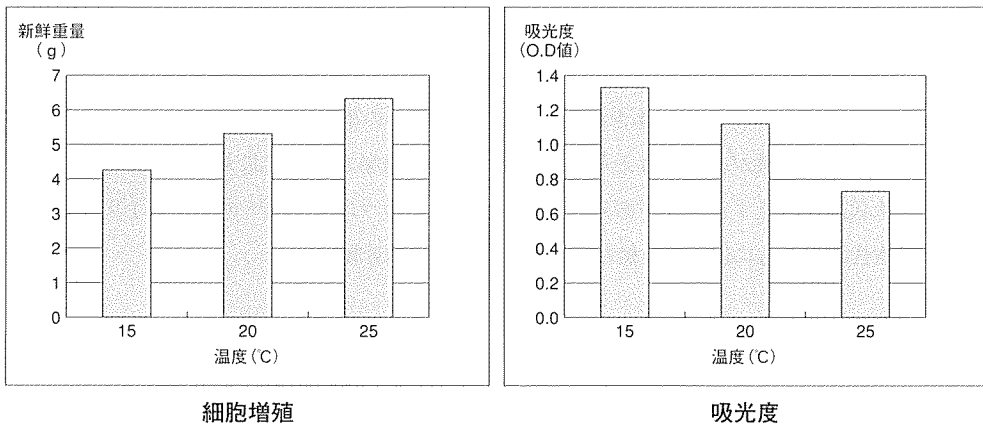


図5 温度が細胞増殖と色素生産に及ぼす影響

LS固形培地, 2,4-D1ppm+BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 0Lux, 30day培養

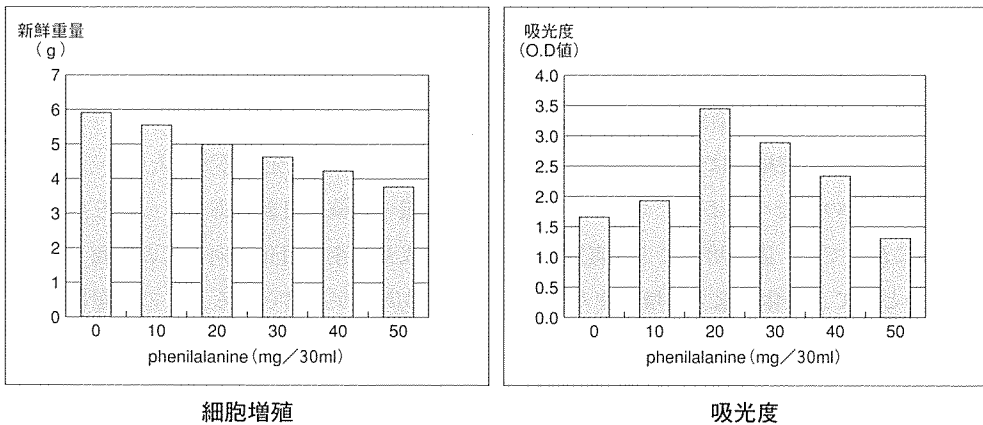


図6 前駆物質添加による細胞増殖と色素生産

LS固形培地, 2,4-D1ppm+BAP3ppm, 3%Sucrose添加, 20℃, 0Lux, 30day培養

を感知し、G蛋白質を経由して、アントシアニン合成が行われる³⁾。しかし、紅芯大根培養細胞は、暗条件下でもアントシアニンを合成する事から、光受容体經由関連遺伝子のカスケードの一部に変異が起こっている可能性が示唆される。

連続培養による検討では、10日毎に新鮮重量と吸光度を測定した。その結果、成長は約30日程度でピークに達し、それ以降の増殖は殆ど行われなかった。一方、アントシアニンは、約40日でピークに達した後に、急速に減少した(図3)。この結果から、1次代謝生育と2次代謝物質生産の関係にあるものと考えられた。

BAPの濃度は、3ppmまでは細胞の成長を促進したが、それ以上の濃度になると抑制が見られた。一方、アントシアニン合成は5ppmが最適であった(図4)。この結果から、BAPの濃度がアントシアニン合成に大きな影響を与える事が考えられた。

培養温度は、25℃で成長は最も速いが、色素生産は15℃の時に一番良好であった(図5)。これは、温度が紅芯大根カサの1次代謝と2次代謝に関係しているものなのか、或は、アントシアニンを多く合成する事で、細胞内活性を高く維持する事になる為なのかもしれない。

アントシアニンの前駆物質のフェニルアラニンを添加すると成長が多少抑制される代わりに、アントシアニンの合成は促進された(図6)。これらの事から、前駆物質も添加する事によって色素生産に効果があると考えられたが、いずれの結果からも紅芯大根培養細胞では1次代謝と2次代謝は背反する傾向があり、ヨウシュヤマゴボウ培養細胞¹⁾の様に、1次代謝しながら、2次代謝も同時に促進する様な培養細胞では無い事も判った。

摘 要

紅芯大根の芽生えから、赤色色素アントシアニンを含む培養細胞を誘導する事が出来た。これまで、有用物質を含む培養細胞を作るには、選抜継代を何代も行う必要があった。しかし、紅芯大根種子芽生え苗からは直接有用物質を含む培養細胞を誘導する事が出来た。塊茎や塊根に有用物質を蓄積する植物体の培養細胞の誘導方法として非常に有効な手段と考えられた。遺伝子組み替え植物体を危惧する消費者の要求からも、これまで行われてきたアグロバクテリウムのような土壌細菌を植物体に感染させて、アルカロイド等の有用物質を生産させる方法よりも効率的、安全性の高い培養法として応用出来る可能性がある。

また、通常の培養細胞は光が必要なものに対して、この培養細胞は光を必要としなかった。これは、実用化の面でバイオリクターのコスト面で費用の軽減が可能である。しかしながら、本実験においては、固形培地による実験のみで、より大量生産実用化に向けての課題も残る。その1つとして、液体培地での増殖率がまだ低く、その向上が挙げられる。この課題は現在、検討中である。

アントシアニン合成代謝経路の前駆物質と考えられているフェニルアラニンの添加実験から、他のテルペン^{11)・12)}やアルカロイド^{21)・22)}等の場合と同様に、細胞の増殖と色素蓄積には背反的な現象が見られた。フェニルアラニンの添加は、紅芯大根培養細胞の成長が抑制され、アン

トシアニン生合成は効果があった (図6)。

紅芯大根培養細胞の増殖最適条件は、基本培地はLS培地に3% Sucroseと2,4-D 1ppm BAP 3ppm を加えた0.5% ゲランガム固形培地の場合がその成長、赤色色素生産が効率的に行われる事が解った。この際、光照射は必要で無く、15℃~25℃程度の室温でも十分効果が有る事が解った。

参考文献

- 1) K.Gihei; *Fragrance Journal* **4**, 27 (1991)
- 2) 河邊誠一郎; 倉敷科学大学紀要, **1**, 117 (1996)
- 3) 河邊誠一郎; 両備てい園財団研究報告; **10**, 7 (1996)
- 4) 河邊誠一郎, 伊藤雅治, 岡豊司, 村上一郎; 倉敷芸術大学紀要, **3**, 105 (1998)
- 5) 坂本一央, 浅田善久; 日本食品工業学会, **40** 647 (1993)
- 6) K.Sakamoto, K.Ikeda, K.Sawamura, K.Hajiro, T.Yoshikawa and T..Fukuyama; *Phytochemistry*, **33** 357 (1993)
- 7) H.Tamura, M.Fujiwara and H.sugisawa; *Agric Biolo. Chemi.*, **53** 1971 (1989)
- 8) C.M. Colijin, L. M. V.Jonsson, A.W.Schram and A.J. Kool, ; *Protoplasma*, **107**, 63 (1981)
- 9) 奈良先端植物分子生理学入門, P194 (1999)
- 10) 岡豊司; 岡山理科大学大学院理学研究科総合理学専攻修士論文 (1999)
- 11) 河邊誠一郎; *Fragrance Journal*, **4**, 70, (1991)
- 12) S.Kawabe, S.Fujiwara, and K. Hosomi, ; *Boisci.Biotech. Biochem.*, **57**, (4) , 657 (1991)
- 13) 河邊誠一郎, 渡邊明美, 渡瀬佳子, 細見和彦; *Plant Tissue Culture*, **10** (2) , 184 (1993)

Callus Formation and Production of Red Color Compounds of *Raphanus.sativus.L var. longinnatus Bailey* by Plant Cell Culture

Seiichirou KAWABE, Taichi NISHIMURA*, Yoshifumi EGUCHI**

College of Liberal Arts and Science for International Studies

Kurashiki University of Science and the Arts,

2640 Nishinoura, Tsurajima-cho, Kurashiki-shi, Okayama 712-8505, Japan

** Graduate school of Humanities and Science college of Liberal Arts and Science,*

Kurashiki University of Science and the Arts.

*** Graduate school of Agriculture Master's Program in Agriculture, Okayama University.*

(Received September 30, 2002)

The red pure culture cells were induced from the plant of *Raphanus.sativus.L var. longinnatus Bailey* seeds directory, by the method of plant cell cultures. It is that interesting that these were no need to selection for the cells contain the red pigments as anthocyanin. And most culture cells need the lights but these should not it so that these produced anthocyanin pigments under the dark. For production of anthocyanin pigments, LS medium with 3% Sucrose, 2,4-D 1ppm, and BAP 3ppm under 20°C condition were the most effective.