

サツマイモ“紅隼人”(*Ipomoea batatas* L. cv. Benihayato)からの培養細胞の誘導と高カロテノイド色素生産細胞の選抜

市 隆人^{a)}・多田幹郎
(生物機能・遺伝資源開発学講座)

Received June 15, 1992

Induction of Cultured Cells from Tuberos Root of Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L. cv. Benihayato) and Selection of a Stable and High Carotenoid-producing Strain

Takahito ICHI^{a)} and Mikiro TADA
(Department of Biological Function and Genetic Resources Science)

Cell cultures producing slightly carotenoid pigment (35 μ g/g-dry wt.) were induced from the tuberos root of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L. cv. Benihayato) on a Linsmaier-Skoog (LS) solid medium supplemented with 1 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3.0% sucrose and 0.2% GELRITE under an illumination cycle of 12h-light and 12h-dark.

A high carotenoid-producing cell culture was isolated by repetition of clonal selection from the induced cell cultures. The amount of carotenoid produced by the cell culture obtained after 22 selections about 8 times (265 μ g/g-dry wt.) that found in the original cell cultures and growth rate (final fresh weight/initial fresh weight) of the cell culture was about 3.5 times that of the first subculture.

The high carotenoid-producing cell culture was subjected to further studies for higher carotenoid production by suspension culture in liquid medium. When the cell culture selected was incubated by shaking (30rpm) for 4 weeks in LS liquid medium supplemented with 3.0% sucrose and 2 μ M 2,4-D under illumination with light intensity of 3,000lx, the yield of cell culture was approximately equal to that on the solid medium. The carotenoid content in cell culture grown in liquid medium was 385 μ g/g-dry weight that was higher than that of original plant tissue (200~300 μ g/g-dry wt.).

緒 言

カロテノイド色素はその鮮やかな色調から天然着色料として広く加工食品の着色に使用されてきた。近年、カロテノイド色素は、ビタミンA効果以外にも高い抗酸化能¹⁾や発癌抑制効果²⁾などの有益な機能を合わせ持つことが明らかにされ、単に着色料としてだけではなく食品の保存性を高め、食品に生理機能を付与するという観点からも、その食品添加物としての利用の拡大が予想されている。

現在、数種の植物から抽出されたカロテノイド色素が食品の着色を目的とした添加物とし

a) 岡山大学大学院自然科学研究科生物資源科学専攻 (Division of Bioresources Science, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University) 在学, 三栄化学工業株式会社 (SAN-EI Chemical Industries Co., Ltd.) 在職中.

て利用³⁾されているが、いずれの色素も原料の高価格と安定した供給に難がある。これらの問題点は、原料植物の生産が時期的に偏りがあること、その生産量とカロテノイド色素含有量が品種と自然環境に支配されることに起因しており、その解決策の一つとして植物培養細胞によるカロテノイド色素の工業的生産が期待されている。

本研究は、この期待に応えるための基礎的研究の一つであり、古くから広く食用に供されてきたサツマイモの一栽培品種で比較的多量のカロテノイド色素を含み「カロテンいも」と別称されている“紅隼人”を材料として、その塊根からのカルス誘導と高色素生産細胞の選抜の過程並びに培養条件の検討結果について報告する。

材 料 と 方 法

1. 植物材料

植物材料は、1988年、5月に九州農業試験場より供試を受けたサツマイモの一品種である“紅隼人”を用いた。南米を原産地とする“紅隼人”の塊根の外観は、Fig. 1に示したように、在来のサツマイモと変わりはないが、中身はかなり濃い赤黄色を呈している。5月中旬に、この塊根を2つに切断し、水耕栽培して発芽した茎葉をポットに定植した。その後、10月に成長した塊根を収穫し、この内部組織をカルスの誘導に用いた。

2. カルスの誘導

“紅隼人”の塊根の内部組織中の黄色色素を生産している部分から約1cmの立方体を切り出し、まず、エチルアルコールに30～60秒間、続いて0.2%塩化水銀水溶液に30秒間浸漬して殺菌処理を施した。次に、滅菌水にて3回洗浄し、5mm角の立方体に切断した。この切断した組織を標準固型培地に置床し、昼光色蛍光灯による光照射(3,000 lx, 12時間明/12時間暗)のもと、温度25℃の培養条件でカルス誘導を行った。標準固型培地は、Linsmaier-Skoog(LS培地)⁴⁾の基本固型培地に1 μ M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3.0% sucrose, 0.2% GELRITEを加えたものであり、過熱溶解させた40mlを100ml容三角フラスコに入れ、オートクレーブにより120℃, 15分間殺菌し、冷却後、固化したものを使用した。

3. 高色素生産株の選抜^{5,6)}

4週間の培養後、誘導された緑色あるいは白色のカルスを16個の細胞塊(約5mm角)に切断し、直径9cmのシャーレ中に入れた40mlの標準固型培地上に置床した。これらのカルス小塊は、誘導した時と同じ培養条件で4週間培養した。その後の継代培養時には、カルス塊中で黄色を呈し、より活発な色素生産を行っている部分を選別、分離し、その細胞小集塊を同様の条件で培養した。このような細胞小集塊選抜の操作を繰り返すことにより黄色色素を生産している細胞の密度を高め、高色素生産株を得ることを試みた。



Fig. 1 Tuberos root of sweet potato, (*Ipomoea batatas* L. cv. Benihayato).

4. 固型培養から液体培養への移行^{7,8)}

継代培養と選抜を重ねることによって得た高色素生産カルスを液体培養に供した。液体培地は、標準固型培地からゲル化剤であるGELRITEを除いたものを用い、10mlの液体培地を入れた100ml容三角フラスコ中で行った。まず、

懸濁細胞を得るために、カルスの一部が培地の水面上に出るように置床し、30 rpm で回転振盪培養した。培養4週間後、三角フラスコ中の培養液を、あらかじめ殺菌しておいた300 μm のナイロンメッシュで濾過した。濾液中には色素を生産している単細胞あるいは極めて小さくなった細胞小集塊が得られた。この懸濁液を更に新しい培地に移植し、30 rpm で回転振盪培養した。この操作を繰り返すことによって固型培養から液体培養へ移行させた。

5. カルスの増殖率の測定

培養4週間後に、全てのカルスを固型培地が付着しないように取り出し、乾いた濾紙上に広げて、表面に付着している水分を除去した後、化学天秤で新鮮重量 (fresh wt.) を秤量した。置床時の新鮮重量に対する培養後の新鮮重量の割合を増殖率 (growth rate = Final fresh wt./Initial fresh wt.) とした。また、乾燥重量 (dry wt.) は55~60°Cで一昼夜乾燥後、デシケーター中で30分間放冷し、化学天秤で測定した。

6. 色素の抽出及び色素含量の測定

4週間培養したカルスを集め20倍量のアセトンを加えて磨砕し、5°C、暗所で24時間浸漬した。その後、3,000 rpm で遠心分離し、上澄みを集め、沈澱部分は色素が見られなくなるまでアセトン抽出を繰り返した。得たアセトン溶液を集め、減圧下で溶媒を留去し、残渣を石油エーテルと水とで分配して、カロチノイドを石油エーテルに移した。なお“紅隼人”塊根中の色素も同様の方法で抽出した。

石油エーテル抽出液の吸光度 (OD_{450}) を自記分光光度計 (U-3200, HITACHI) で測定し、比吸光度係数 ($E^{1\%} = 2,500$) に基づいて色素含量 (%)⁹⁾を算出して、1フラスコ当たりを得られた量を $\mu\text{g}/\text{flask}$ 、乾燥重量1 g 当たりを得られた量を $\mu\text{g}/\text{g dry wt.}$ として換算した。

7. 植物ホルモンの添加

増殖と色素生産に及ぼす植物ホルモンの影響を調べる実験には、液体培養細胞を用いた。液体培養細胞を無菌的に集め、その約0.2 g を精秤し、各種植物ホルモンの入った液体培地 (20 ml/100ml容三角フラスコ) に移植し、3,000 lx の照明下で4週間培養した。使用した植物ホルモンは、2,4-D, 1-naphthaleneacetic acid (NAA), benzylaminopurine (BAP), 及び kinetin の4種であり、これらを単独あるいは組み合わせて用いた。

8. 色素成分の分析

“紅隼人”の塊根及びカルス中の色素の比較は、色素抽出液の吸収スペクトル及び HPLC パターンを対比することによって行った。HPLC 分析に用いた装置は日本分光製 HPLC (880 シリーズ) であり、カラムには nucleosil 5C18 (4.6mm×250mm) を用い、メタノールを移動相とし、検出波長は450 nm に設定した。

結果および考察

1. カルス誘導

植物の分化、細胞増殖等に植物ホルモンが大きな影響を与えることはよく知られており、多くの植物において種々の検討が行われている。しかし、カロテノイド色素生産を目的として、サツマイモ塊根の内部組織からカルス誘導した研究は見当たらない。そこで、まず、カルス誘導に対する植物ホルモンの影響について2種のオーキシン (2,4-D, NAA) 及び2種のサイトカイニン (BAP, kinetin) について、それぞれ単独あるいは併用した条件でカルス誘導への効果について調べた。その結果、オーキシンにはカルスの誘導効果が認められたが、サイトカイニンはカルス誘導には効果が無かった。そして、種々検討した結果、2,4-D 1 μM の時、最もカルス誘導の頻度が高く、得られるカルスの形態及び増殖も良好であった。従って、このようにして得られたカルスに“ID6”の略号をつけた。そして、この略号に末尾に数字

を付け加え、継代培養の世代を示した、ID6-1株、即ち、誘導培養によって得られたカルス(1世代目のカルス)は、Fig. 2に示したように、緑色を呈しており、非常に硬く、増殖及び色素生産性は極めて低いものであった。

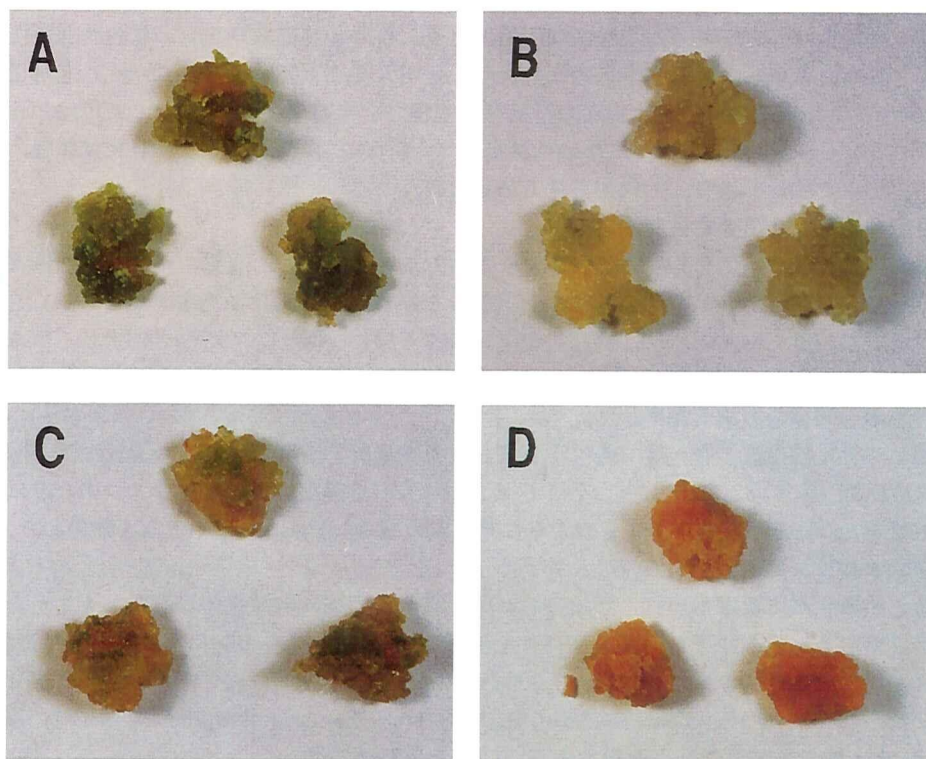


Fig. 2 Color tone of callus after various number of selections. (A : without selection, B : 5 selections, C : 13 selections, D : 22 selections).

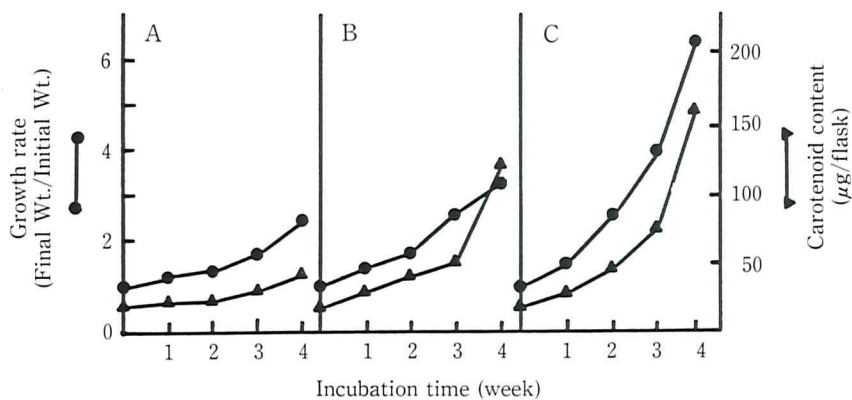


Fig. 3 Time course of growth and carotenoid production in callus after various number of selections. (A : 5 selections, B : 13 selections, C : 22 selections).

2. 高色素生産株の選抜

セリバオウレン^{10,11)}やハナキリン^{6,12)}の研究に用いられた小集塊選抜法を本研究にも採用した。選抜を繰り返すことによって、増殖率やカロテノイド色素生産量が増加する様子を Fig. 2 に写真で示し、Fig. 3 にそれらの測定結果を示した、4 週間の初代培養 (ID6-1株) におけるカルスの増殖率は1.8であり、色素生産量は10.5 μ g/flask (35 μ g/g dry wt.) であったのに対して、5 世代継代培養した (ID6-5株) は、増殖率2.7、色素生産量は39 μ g/flask (145 μ g/g dry wt.) で、13 世代目 (ID6-13株) のカルスは、増殖率が4.0で、色素生産量は130 μ g/flask (250 μ g/g dry wt.) と、著しい選抜効果がみられた。このような選抜効果は20 世代まで続き、その後は比較的安定してきた。そして、22 世代目の株 (ID6-22株) の増殖率は6.5、色素生産量は235 μ g/flask (265 μ g/g dry wt.) であった。選抜を繰り返していくに従って、Fig. 2 に示した写真が示すように、カルス中に占める黄色を呈する範囲は次第に拡大し、それに伴って少しずつカルスの黄色も濃くなっていった。

3. 液体懸濁培養系の確立

増殖率及びカロテノイド生産がほぼ安定し、カルスの形状もふっくらと膨潤し柔らかくなった20 世代以降のカルスを用いて懸濁培養へ移行を試みた。

液体培地へカルスを移し、軽い振とうを2 週間続けた結果、カルスよりこぼれ落ちて培養液中で増殖した種々の大きさの細胞小集塊が認められた。この段階でナイロンメッシュでろ過を行い、小さな小集塊の懸濁液を得た。この懸濁液を新たな液体培地に加えて培養を続けると、約1 週間の誘導期の後、細胞増殖とカロテノイド色素生産が始まり、それらの増加は約4 週間続いて定常期に達することが観察された。このようにして、サツマイモの懸濁培養系を得ることができた。

4. 培養細胞の増殖と色素生産に対する植物ホルモンの影響

植物細胞の生育、増殖及び色素生産性等に植物ホルモンの種類及び濃度が大きな影響を与えることはよく知られている。そこで、懸濁培養系を用いて植物ホルモンの種類及び濃度について検討した。その結果を Table 1 に示した。サイトカイニン単独の実験結果は示していないが、それらは増殖及びカロテノイド色素生産を著しく阻害した。オーキシンの場合は、10 μ M 以下の濃度では増殖率が比較的良好で、フラスコ当たりのカロテノイド色素生産量も

Table 1 Effects of Phytohormones on growth and carotenoid production

Phytohormone (μ M)	Initial fresh wt. (g/flask)	Final fresh wt. (g/flask)	Growth rate ^{a)}	Carotenoid content	
				(μ g/g-dry wt.)	(μ g/flask)
2,4-D 1	2.67	12.67	4.75	322	190
2,4-D 10	2.41	16.51	6.85	223	152
2,4-D 100	2.56	6.35	2.48	94	23
NAA 1	2.36	14.87	6.30	174	104
NAA 10	2.44	10.00	4.10	321	125
2,4-D 1					
BAP 1	2.35	25.28	10.76	20	21
2,4-D 10					
BAP 1	2.81	21.52	9.16	25	19
NAA 1					
Kinetin 1	2.52	19.52	7.75	26	21
NAA 10					
Kinetin 1	2.56	23.61	9.22	18	17

a) Growth rate : final fresh wt./initial fresh wt.

高い。オーキシシンとサイトカイニンを組み合わせた時、増殖率は飛躍的に増加したが、カロテノイド色素生産量は著しく抑制された。この結果は、増殖に関与している一次代謝が盛んな時、二次代謝産物の生産はほとんど行われなことを予想させる。

カロテノイド色素の生産を考える時、フラスコ当たりのカロテノイド色素生産量が高いものが望ましい。この観点から2,4-Dを単独で1 μ Mの濃度にして培養することが好ましいと判断されたので、以後の実験にはこの条件を利用した。

5. 培養細胞の増殖と色素生産に及ぼす光の影響

これまでの実験は、全て3,000 lxの光照射下で培養を行ったが、原料植物であるサツマイモは、光の到達しない組織で十分量のカロテノイド色素を生産していることから考えて、本培養細胞のカロテノイド生産は光に依存しないことが予想された。しかし、この予想に反して細胞培養のカロテノイド色素生産には光が必須であることが明らかとなった (Table 2)。調べた範囲内においては、カロテノイド色素生産の光強度依存性は明確にはならなかったが、3,000 lxの照射下でのフラスコ当たりのカロテノイド色素生産量が最も良好であった。

Table 2 Effects of light on growth and carotenoid production

Light intensity (lx)	Initial fresh wt. (g/flask)	Final fresh wt. (g/flask)	Growth rate ^{a)}	Carotenoid content	
				(μ g/g-dry wt.)	(μ g/flask)
0	2.52	11.53	4.58	63	31
1,000	2.67	14.52	5.50	273	154
2,000	2.82	10.11	3.59	337	147
3,000	2.51	12.33	4.91	345	181

a) Growth rate : final fresh wt./initial fresh wt.

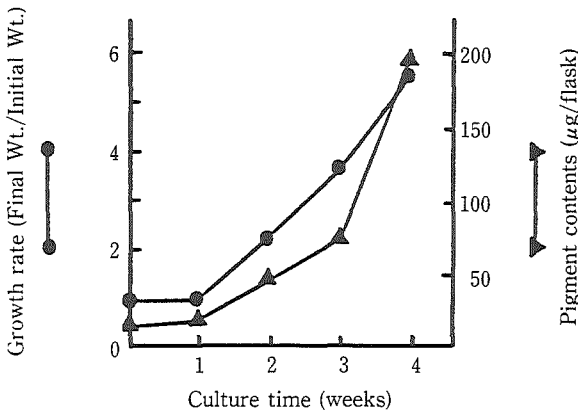


Fig. 4 Time course of growth and carotenoid production of cultured cells during suspension culture.

6. 懸濁培養による増殖と色素生産の経時的変化

上記の検討結果に基づいて設定した培養条件下での増殖とカロテノイド色素生産を調べた結果を Fig. 5 に示した。増殖及びカロテノイド色素生産の培養期間中の変化の様子は、固型培地でのパターンによく似ており、4週間後には1フラスコ (10ml培養液) 当たり約200 μ gのカロテノイド色素が生産された。この時点での細胞乾燥物1g当たりのカロテノイド含有量は385 μ gであった。この値は、原料植物である“紅隼人”の塊根組織乾燥物1g当たりの平均カロテノ

イド含有量 (約250 μ g) よりも50%増であり、かなり高い色素生産性が示された。

7. 培養細胞の生産するカロテノイド色素の分析

上記の実験で得た細胞から抽出したカロテノイド色素の石油エーテル溶液の吸収スペクトルを、原料植物である“紅隼人”の内部組織より抽出したカロテノイド色素溶液のそれと共

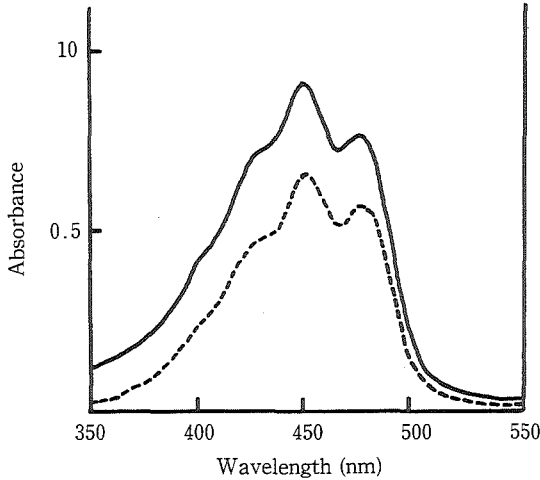


Fig. 5 Absorption spectra of carotenoid extracted from original plant tissue (*Ipomoea batatas*) and cultured cells in liquid medium. (full line: original plant tissue, dotted line: cultured cells).

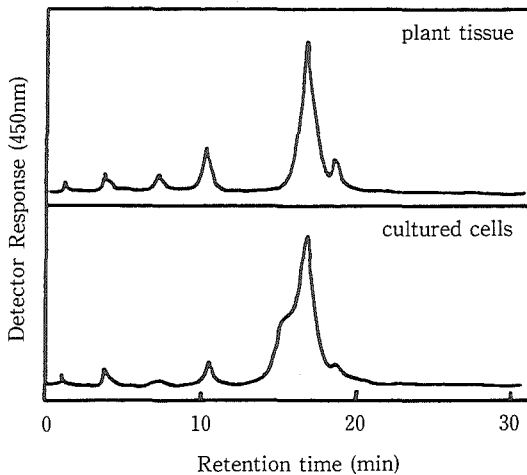


Fig. 6 HPLC patterns of carotenoid extracted from original plant tissue and cultured cells in liquid medium.

に Fig. 5 に示した. 両者のスペクトルはほぼ同じであり, 両者において生産されるカロテノイド色素の組成には, 大きな差がないことが推測された. Fig. 6 に示す HPLC パターンにおいても, 両者は極めて近似しており, その結果からも培養細胞と植物組織が生成するカロテノイドの組成がほぼ同じであることが示唆された. HPLC パターンにおけるメインピークは, 標品との比較から, β -カロテンであると同定した. なお, 培養細胞における HPLC パターンにのみ認められるメインピークの前にあるショルダーは α -カロテンと推測されるが, 他のピークについては今後の検討が必要である.

摘 要

サツマイモ(栽培品種名: 紅隼人)の塊根組織を, $1 \mu\text{M}$ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 3.0% sucrose と 0.2% GELRITE を加えた Linsmaier-Skoog (LS) の固体培地に置床し, 光照明 (12時間の明暗サイクル) の下で培養することにより, 少量のカロテノイド色素 ($35 \mu\text{g/g}$ -乾物) を生成する培養細胞を誘導することができた.

この誘導された培養細胞から, 小集塊選抜法を繰り返すことによって高カロテノイド色素生産株の選抜を行った. 22回の選抜と継代培養によって得られた培養細胞は, もとの誘導培養細胞の 8 倍に相当する $265 \mu\text{g/g}$ -乾物のカロテノイド色素を生産し, その増殖率 (収穫された新鮮物重量

と接種した新鮮重量の比) は選抜を行う前の培養時に比して約 3.5 倍に増加した.

選抜によって得た高カロテノイド色素生産株を液体懸濁培養に供し, より高いカロテノイド色素の生産条件の検討を行った. その結果, $1 \mu\text{M}$ 2,4-D と 3.0% Sucrose を添加した LS 液体培地を用い, 3,000 lx の照明下で振盪するのが最適であり, この条件で得られる培養細胞のカロテノイド色素含有量は, 材料に用いた植物組織の含有量 ($200 \sim 300 \mu\text{g/g}$ -乾物) よりも高い $385 \mu\text{g/g}$ -乾物であった.

謝 辞

この研究は、岡山大学学内特定研究「生物生産のための細胞選抜と細胞育腫」を分担して行ったものである。また、サツマイモ“紅隼人”は農林水産省九州試験場甘藷育種研究室の小巻克巳氏より供与されたものである。共に記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Schench, C. C., P. Mathis and M. lutz : Triplet formation and triplet decay in reaction centers from the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Photochem. Photobiol. **36**, 407—417 (1984)
- 2) Bertram, J. S., L. N. Kolonel and F. L. Frank : Rationale and strategies for chemoprevention of cancer in humans. Cancer Res. **47**, 3012—3031 (1987)
- 3) 谷村顕雄, 片山 修, 遠藤英美, 黒川和男, 吉積智司 : 天然着色料ハンドブック. 569—624, 光琳. 東京 (1979)
- 4) Murashige, T. and F. Skoog : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant., **15**, 473—497 (1962)
- 5) 京 正春 : 植物組織培養アトラス. 73—83, R & D プランニング. 東京 (1987)
- 6) Yamamoto, Y., R. Mizuguchi and Y. Yamada : Selection of high and stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cell. Theor. Appl. Genet. **61**, 111—116 (1982)
- 7) Tabata, M., H. Mizukami, N. Hirakoa and M. Konoshima : Pigment formation in callus cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. Phytochemistry, **13**, 927—932 (1974)
- 8) Mizukami, H., M. Konoshima and M. Tabata : Effect of nutritional factors on shikonin derivative formation in *Lithospermum* callus cultures. Phytochemistry, **16**, 1183—1186 (1977)
- 9) Tee, E. S. and C. L. Lim : Carotenoid composition and content of Malaysian vegetables and fruits by AOAC and HPLC methods. Food Chem., **41**, 309—339 (1991)
- 10) Yamada, Y. and F. Sato : Production of berberine in cultured cells of *Coptis japonica*. Phytochemistry, **20**, 545—547 (1981)
- 11) Sato, F. and Y. Yamasa : High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. Phytochemistry, **23**, 281—285 (1984)
- 12) Yamamoto, Y., R. Mizuguchi and Y. Yamada : Chemical constituents of cultured cells of *Euphorbia tirucalli* and *E. millii*. Plant Cell Rep., **1**, 29—30 (1981)