

# 植物培養細胞固定化による 天然赤色色素 — ベタシアニン — の生産と細胞外放出

河邊誠一郎・遠藤 晴彦・沢田 由佳  
佐藤 玲子・馬場 志麻

岡山理科大学理学部基礎理学科

(1992年9月30日 受理)

## はじめに

酵素の有効利用の1手法として開発された固定化技術<sup>1)-2)</sup>は、その後その対象が微生物から動植物細胞へと広がり、生物のもつ酵素反応系全体を利用する複合連続反応系の開発<sup>3)-6)</sup>へと発展し始めている。

我々はこれまで酵素パパインの連続反応に関してその有効利用、応用のため、様々な固定化担体の開発と利用を検討<sup>7)-14)</sup>して来た。それら多くの担体のうちで、より安価・安定で温和な条件下で容易に調製出来、しかも安全性の高いものとして植物起源の天然多糖物質が最も優れていることを確認<sup>10)-14)</sup>している。

筆者らは、このような担体をもちいて植物細胞を固定化し、その有効性について検討し、より安定な培養系を確立すると共に、従来のカルス培養では見られなかった生合成色素・ベタシアニンの細胞外放出という非常に面白い結果を得たので報告する。

## 材料と方法

使用したヨウシュヤマゴボウ (*Phytolacca americana*) の植物体は1988年秋、岡山理科大学構内で採集したものである。この若葉を70%エタノールに10秒、続いて有効塩素1%の次亜塩素酸ナトリウムに10分間浸漬し、殺菌洗浄した後 Murashige-Skoog (MS) の基本培地<sup>15)</sup>に2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) 0.5ppm, サッカロース3%を加え、Ph5.7に調製したものをを用い、25°C, 2,500—5,000ルクスの培養条件下でカルスを誘導、培養した。得られたカルスは約2—3週間おきに継代培養を行った。

固定化細胞の調製は、無菌下、海藻由来の多糖・アルギン酸ナトリウム (4%, 5 ml) と細胞懸濁液 (5 ml) を分取し、均一に懸濁させる。この混合液を50mM 塩化カルシウム水溶液250ml 中に注射器を用いて滴下し、約45分間静置して固定化を完了させる。この方法で、径4—5 mm の球形ビーズが約130個得られる。その後吸引濾過し、3%サッカロース水溶液で十分洗浄し、余分な塩化カルシウムを除き、MS 基本培地50ml 中、25°C, 2,500—5,000ルクス, 80rpm の条件下で振盪培養を行った。

ベタシアニンの定量は、ヨウシュヤマゴボウの完熟果実より水抽出によって得た赤色ベタシアニン色素（複合物）を用い、ベタシアニンの極大吸収を示す波長、540nm で吸光度を測定して、検量線を作成して行った。

培養遊離細胞および固定化細胞は各々 0 - 5 週間培養した後、吸引濾過しその新鮮重量 (FW) を測定した。生成した赤色ベタシアニン色素の量については、それぞれの口液と遊離細胞、固定化細胞別に分析を行った。遊離細胞および固定化細胞中の色素はメタノールで抽出した。口液および抽出液はそれぞれ 50ml に定容し、その吸光度を測定した。

## 結果と考察

赤色色素ベタシアニンを含む安定増殖カルスを 2, 4-D 0.5ppm を含む MS 基本寒天培地より得た(写真 1)。この寒天固体培地で培養したカルスを用い、同条件下で懸濁液体培養を数回継代培養することによって遊離の培養細胞を得た。このカルスを用いて固定化細胞を作成し、MS 液体培地中、25°C、4,000ルクス、120rpm の振盪条件下でそれぞれの期間培養を行った。

写真 2-a は固定化細胞の培養開始直後のもの、写真 2-b は同 3 週間後のものであり、また写真 2-c および 2-d はそれぞれの固定化ビーズのみを示したものである。

これらの写真よりヨウシュヤマゴボウ懸濁細胞は固定化処理後も十分旺盛に成育していることが分かる。当初まばらな分布をしていた細胞も 3 週間後には溢れるばかりの成長を示し、事実、一部担体内に保持しきれず、遊離している様子が分かる。

これらの結果を表 1 にまとめた。すなわち、0 日（植え付け直後）から 1 週間毎の測定を行い、5 日目までのそれぞれの細胞の成長（新鮮重量）と細胞内および溶液部のベタシアニン含量を示している。

遊離培養細胞は初期の段階から成長は旺盛であるが、3 週間目頃までで、その成長は停止してしまう。一般に植物では、その生育・生存に直接関与しない、いわゆる 2 次代謝産物の生産は、その植物の成長と逆の相関を示すことが多い。そんな中、このヨウシュヤマ

表 1 *Phytolacca americana* L. 固定化培養細胞と遊離培養細胞が生産する betacyanin 色素と細胞増殖：固定化による色素の細胞外放出

培養期間 (週)	懸濁培養細胞			固定化培養細胞		
	細胞増殖生産量 (g)	細胞内色素 (mg/ml)	放出色素 (mg/ml)	細胞増殖生産量 (g)	担体内色素 (mg/ml)	放出色素 (mg/ml)
0	1.2	1.10	0	1.2	1.18	0
1	3.1	3.36	0	1.6	1.92	0.40
2	7.3	6.62	0	4.5	3.20	1.00
3	8.9	5.20	0	7.7	6.80	1.14
4	9.0	2.10	0	8.5	4.30	0.68
5	9.0	1.00	0	8.8	4.10	0.80



写真1 ベタシアニン含有 *Phytolacca americana* L. 安定増殖カルス  
MS 寒天培地+2,4-D 0.5ppm+3%サッカロース, 25°C, 5,000Lux, 28日間培養

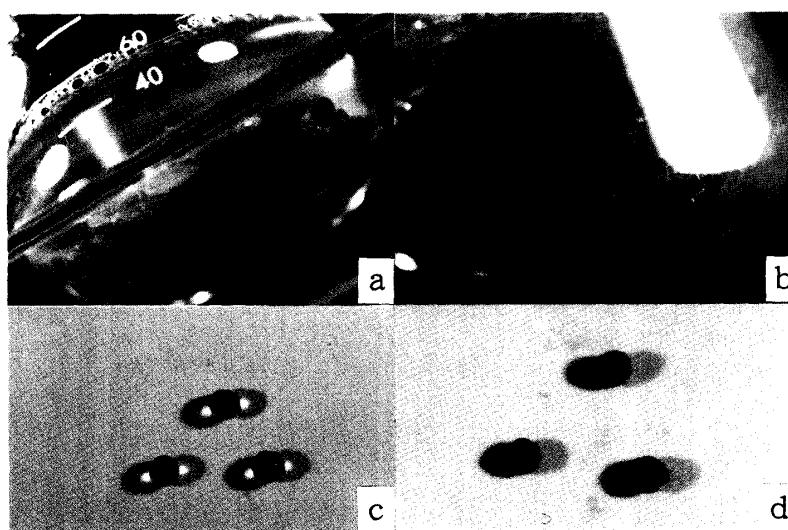


写真2 a: 固定化 *Phytolacca americana* L. 細胞培養; 移植直後  
b: 固定化 *Phytolacca americana* L. 細胞培養; 3週間後  
c: 固定化細胞ビーズ; 移植直後  
d: 固定化細胞ビーズ; 3週間後

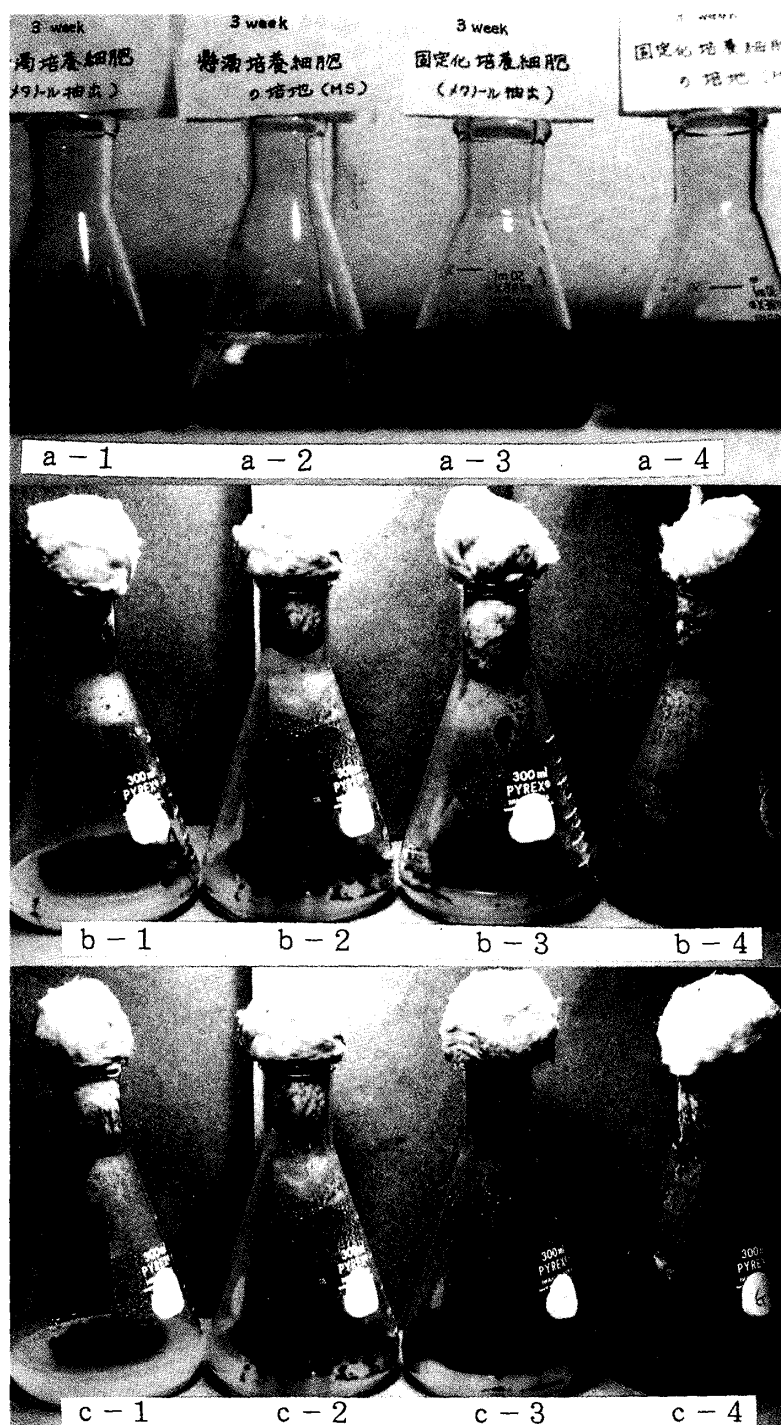


写真3 a : 培養3週間後のメタノール抽出および培養口液中のベタシアニン色素  
 a-1 : 遊離培養細胞メタノール抽出液  
 a-2 : 遊離培養細胞の培養液  
 a-3 : 固定化培養細胞メタノール抽出液  
 a-4 : 固定化培養細胞の培養液  
 b : *Phytolacca americana* L. カルスの成長と色素放出におよぼす塩化カルシウムの影響  
 b-1 :  $\text{Ca}^{2+}$  ; 0  
 b-2 :  $\text{Ca}^{2+}$  ; MS 培地基準量  
 b-3 :  $\text{Ca}^{2+}$  ; 2 倍量  
 b-4 :  $\text{Ca}^{2+}$  ; 4 倍量  
 MS 基本培地中の  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  量 :  $0.44\text{g}/\ell$   
 c : *Phytolacca americana* L. カルスの成長と色素放出におよぼす塩化マグネシウムの影響  
 c-1 :  $\text{Mg}^{2+}$  ; 0  
 c-2 :  $\text{Mg}^{2+}$  ; MS 培地基準量  
 c-3 :  $\text{Mg}^{2+}$  ; 2 倍量  
 c-4 :  $\text{Mg}^{2+}$  ; 4 倍量  
 MS 基本培地中の  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  量 :  $0.37\text{g}/\ell$

ゴボウの色素生産は特異な例として、その細胞の成長と色素生産に正の相関を示すことが知られている<sup>16)</sup>。本実験においても、やはり同様な傾向を示しており、遊離細胞において2—3週間目の色素の生産量の多いことが認められる。そして、2週間目以後、細胞の成長の鈍化と共に色素の生産は低下し始め、また色素の分解褪色が進むため、含有色素量は急激な低下を示した。遊離細胞の場合、全期間を通じて培地への色素の放出は認められない。

一方、固定化細胞では、その成長は遊離細胞の場合に比べ、固定化操作によるダメージのためか、約1週間の遅れが見られ、色素生産についても同様な傾向を示した。しかし、ここで注目すべき事実として、これまで細胞内のみでしか認められていなかった色素—ここではベタシアニン—が細胞外にもかなりの量出ていることが認められたことである。写真3-aに3週間後の各培養細胞抽出液とその口液の色素の様子を示した。

これまでシコニン色素<sup>17)</sup>をはじめ固定化ラベンダーによる色素生産<sup>18)</sup>においても、このような現象の報告はなく、生産された色素はその都度取り出してすり潰し、有機溶媒などを用いて抽出しなければならなかった。本実験で認められたこの現象を解明し、うまく利用することにより、連続培養をはじめ、回収容易で安全な色素生産システムが確立出来るものと考えられた。

これまで、シコニン紫色素の研究で田端ら<sup>19)</sup>は、寒天にふくまれる酸性多糖に発色効果があることを、またラベンダーの青色色素の研究で山田ら<sup>18)</sup>は、L-システインの効果を報告している。しかし、これらはいずれも細胞内での生産効果であり細胞外への放出の報告ではない。他にはせいぜい低濃度の有機溶媒や DMSO の添加による放出の試みが検討されているに過ぎず、しかもこれらの方法は細胞に多大のダメージを与えることがあった。

近年、エリシターによる植物培養細胞二次代謝の活性化、異常生理が知られるようになり、様々なエリシターの開発が試みられている。また、細胞壁の性質に影響することが考えられる物質として、カルシウム、マグネシウム、カリウム、ナトリウムなどの金属が挙げられている。

今回、我々はまず、固定化操作の中心的試薬となったカルシウムをはじめとする2価金属・塩化カルシウム、塩化マグネシウムについてその影響を検討した。

その結果、カルシウム、マグネシウムともに細胞外へのベタシアニン色素の放出がみられ、固定化の際に担体として使用する天然多糖アルギン酸のゲル化試薬である塩化カルシウムが、たまたまこの植物の細胞壁に何らかの影響を与え、その内容物であるベアシアニン色素を放出させることが分かった(このうち、カルシウムの影響についての報告<sup>20)</sup>は、“ヨウシュヤマゴボウ培養細胞による細胞外へのベタシアニン放出”として発表)。

ここでは、塩化カルシウム、硫酸マグネシウムを除いた MS 基本培地および基準量、2倍および4倍量の金属イオンをそれぞれ添加した場合の結果のみを写真3-b(カルシウム)、3-c(マグネシウム)で示した。

3週間後、いずれも金属イオンの添加量に従って細胞の増殖が認められ、また培地中へ

の色素の放出も認められた。この原因についてはカルシウムイオンによって特定の膜構造に変化がおきたためと考えられるが、詳細についてはなお不明であり、検討中である。

以上の結果より次のことが明らかとなった。

ヨウシュヤマゴボウの培養細胞は、天然多糖ゲル化物質；アルギン酸ナトリウムで容易に、安定固定化できた。この固定化細胞はその生産赤色色素；ベタシアニンを細胞外へ放出する特異性を示した。この要因にアルカリ土類金属；カルシウムイオンやマグネシウムイオンが関与しており、通常のMS培地濃度の4倍程度の量でも、この植物の細胞の成長および色素生産と細胞外放出増加に効果があることも分かった。

現在は、さらに固定化担体のエリシターとしての効果をはじめ、培養密度、培養培地濃度、炭素栄養源濃度、連続培養、細胞膜構造などについて検討中である。

本研究をまとめるに当たり、御助言、御援助いただいた株式会社ロッテ中央研究所の伊東禧男氏に深謝致します。また、主に基礎的実験に協力してもらった福井通雄君（ナリス化粧品KK）、青木里美さん（岡山県教員）および石井敏隆君（愛媛県教員）に感謝します。

#### 参考文献

- 1) L. Wingard, E. Katchalski and L. Goldstein : Applied Biochemistry and Bioengineering. Immobilized Enzyme Principles, Vol. 1~2, Academic press, New York (1976).
- 2) 千畑一郎 (編) : 固定化酵素, 講談社, 東京 (1975).
- 3) 千畑一郎 (編) : 固定化生体触媒, 講談社, 東京 (1986).
- 4) 田中渥夫 : 化学と生物, **23**, 112 (1985).
- 5) 古谷 力, 古家健二 : 遺伝, 別冊1, 103 (1988).
- 6) 小林義典, 田端 守 : 植物細胞工学, **2**, 39 (1990).
- 7) 河邊誠一郎 : 岡山理科大学紀要, **13**, 119 (1977).
- 8) 河邊誠一郎 : 岡山理科大学紀要, **14**, 97 (1978).
- 9) 河邊誠一郎 : 岡山理科大学紀要, **15**, 51 (1979).
- 10) 河邊誠一郎 : 岡山理科大学紀要, **18**, 71 (1982).
- 11) 河邊誠一郎, 宇佐美昭次 : 日食工誌, **30**, 140 (1983).
- 12) 河邊誠一郎, 宇佐美昭次 : 日食工誌, **30**, 501 (1983).
- 13) 河邊誠一郎, 河邊要太郎, 宇佐美昭次 : 岡山理科大学紀要, **20**, 43 (1985).
- 14) 河邊誠一郎, 浜田博喜, 桐村光太郎, 宇佐美昭次 : 日食工誌, **38**, 414 (1991).
- 15) T. Murashige and F. Skoog : Physiol. Plant., **15**, 473 (1962).
- 16) M. Sakuta, T. Takagi and A. Komamine : Pyhsiol. Plant., **71**, 455 (1987).
- 17) Y. Hata, T. Motimoto and Y. Fujita : Plant Cell Reports, **6**, 8 (1987).
- 18) H. Nakajima, F. Sato, Y. Yamada, A. Tanaka and S. Fukui : J. Biotechnol., **2**, 107 (1985).
- 19) H. Fukui, N. Yoshikawa and M. Tabata : Phytochemistry, **22**, 2451 (1983).
- 20) 浜田博喜, 長嶋美嘉, 竹西壮一郎, 河邊誠一郎 : 植物組織培養, **9**, 126 (1992).

## Production and release of Betacyanin by Plant Cell Immobilized in Calcium-alginate

Seiichiro KAWABE, Haruhiko ENDOH, Yuka SAWADA

Reiko SATOH and Shima BABA

*Department of Applied Science,*

*Okayama University of Science,*

*1-1 Ridai-cho, Okayama 700, Japan*

(Received September 30, 1992)

*Phytolacca americana* L. cultured cells were immobilized with calcium alginate.

The pigment (betacyanin) increased with an increase in the growth of the callus to 3 weeks. However, in the subsequent periods, the pigments decreased.

It was observed that a part of the pigment was released from immobilized cells.

It has become apparent that the calcium ion and magnesium ion had influence on the phenomenon.