

## 組織培養によるハナキリンの色素生産

生物資源科学部 生物生産科学科

2年 松嶋 晴香 2年 大西 真奈美

2年 工藤 そら 2年 片野 安沙子

2年 三浦 恵美子

指導教員 生物資源科学部 生物生産科学科

助教 川上 寛子

### 【背景及び目的】

近年、人体への影響が大きい食品用色素や医薬品用色素、化粧品用色素の分野で、安全性の高い植物色素を使用した製品の開発が期待されている。組織培養手法は閉鎖的環境で培養条件を効率化することで、将来的に目的成分を安定かつ大量生産させることが可能である点で、非常に有益であり、組織培養手法を用いた植物色素の生産が有効である。私たちはもともと植物体と色素の関係性に興味があり、色素の成分や性質を研究し、製品として利用できる色素に関係した研究をしたいと思った。

植物色素のアントシアニンは活性酸素を除去する抗酸化活性を有する。体内の活性酸素は血管や細胞を傷つけ、体の内側を酸化させ、動脈硬化などを引き起こし、生活習慣病を招く。そのため、抗酸化活性成分の食品や化粧品、医薬品への応用が期待できる。本研究では、ハナキリン (*Euphorbia milii*) を用いた。ハナキリンは培養すると、アントシアニンを含む赤い細胞を誘導する (Yamamoto et al., 1982)。この細胞を用いることで、植物由来の化粧品が開発できるのではないかと考えた。

以上より、本研究の目的は花色の異なる4色のハナキリンを用いて組織培養し、色素生産能及び抗酸化活性について明らかにすることとした。

### 【方法】

#### A) ハナキリンのアントシアニン生産培養株の確立

- ① ビーカーに蒸留水を 800 ml 入れ、スターラーで攪拌し、Gamborg B5 基本培地を 3.16 g、sucrose を 30 g 測り入れ、溶解させた。
- ② 寒天を 2 g 測り、300 ml 三角フラスコに入れ、これを 5 つ用意した。
- ③ B5 培地と sucrose が溶解したら、1000 ml にメスアップした。
- ④ 新しいビーカーに③を移し、 $10^{-2}$  M 2,4-D、 $10^{-5}$  M BA をそれぞれ 1 ml、抗生物質を 500  $\mu$  l を加え、攪拌した。pH を 5.7 ~ 5.8 の間に調整した。
- ⑤ ②の三角フラスコに④の培地を 200 ml ずつ加え、120  $^{\circ}$ C で 5 分間オートクレーブし、溶解させた。
- ⑥ 10 ml ずつ試験管に分注し、120  $^{\circ}$ C で 20 分間オートクレーブした。
- ⑦ 試験管立てを傾けて置くことで斜面培地にした。一晩ほど静置して培地を固めた。
- ⑧ 滅菌した植物片を植え付けし、明条件、20  $^{\circ}$ C で培養した。
- ⑨ 104 日後に同様の条件のシャーレ培地に植え替えた。その後、2 回同様に操作を行った。
- ⑩ 培養物を取り出して、メタノール (2% HCl) に 1 時間浸漬した。この色素の最大吸収波長 530 nm の吸光度を測定した。測定にはマイクロプレートリーダーを用いた。
- ⑪ この溶液を使用し、高速液体クロマトグラフィー (溶媒条件: 80% MeOH, 流量: 1 ml/min, 測定波長: 530 nm, カラム: YMC-Pack ODC-AS-5  $\mu$ m 150 $\times$ 4.6 mm I.D.) でアントシアニン特有の吸光度と吸収スペクトルを測定した。

#### B) 抗酸化活性試験

1. 培養物を回収し、1.5 ml チューブに入れた後、メタノール (2% HCl) を加え、2 時間室温で抽出した。
2. プレートリーダーの電源を入れ、励起波長・蛍光波長・温度などの測定条件を設定した。
  - カイネティクス測定条件
    - ・ 5分ごと、90分測定、37度
    - ・ 励起波長 485 nm、蛍光波長 535 nm
    - ・ 最初の測定前に混合 (10秒)
3. 分注用プレート (Microplate 96 well, 655001, greiner bio-one) に以下の図1に従って試薬を入れた。緑はブランク、青はTrolox (TL, 0.1 mM から3段階1/10希釈)、オレンジはサンプルで (SP, 濃度が濃い順に濃いオレンジ色で表記)。サンプルは原液をメタノールで1/10に

希釈したものを最初のウェルに入れ、その後3段階に1/10希釈した。ブランクはメタノールと0.2%塩酸を含むメタノールとし、TLは前者、サンプルは後者で値を補正した。数字は量(ul)を示した。

	180	180	180	180	200	200	180	180	180	180		
	180	180	180	180	180	200	200	200	200	200		
	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180		
	180	180	180	180	180	180	180	180	180	180		
	200	200	200	200	200	180	180	180	180	180		
	180	180	180	180	200	200	180	180	180	180		

図1 分注用プレート(透明)上の配置

表1 反応液組成

FL	50 ul
TL or Sample	50 ul
AAPH	50 ul
1 well	150 ul

- 測定用プレート(図2, Nunc F96 MicroWell 黒ポリスチレン製プレート, 237105, Thermo Fisher)へ78 μM Fluorescein sodium salt 溶液(FL)を50 ulずつ、すべてのウェルへ分注した。
- 分注用プレートから50 ulずつ測定用プレートにとり、混合した。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	BL	TL							TL	BL		
C	SP1	SP2	SP3	SP4	SP5	SP6	SP7	SP8	SP9	SP10		
D												
E												
F												
G	BL	TL							TL	BL		
H												

図2 測定用プレート(ブラック)上の配置

- 測定用プレートに蓋をし、37 °Cのインキュベータ内で15分間保温した。
- 各ウェルに50 μLの132 μM 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) 溶液を速やかに加えた。
- 10秒混合させた後、37 °C、励起波長485 nm、蛍光波長535 nmで、90分間5分毎に測定した。

### C) 化粧品を試作

- 試作のpH調整にはクエン酸を用いた。2%塩酸と同様のpH 2.6付近になるようなクエン酸量を測定した。
- ワセリンを湯煎で溶かし、オイルも同じように温めた。ワセリンとオイル割合を1:2、1:4、1:6にし、混合した。これらをクリアファイルに200 μLずつ置き、クリアファイルを傾けることで粘度を調べた。溶液が下がった位置に印を付け、原点からの距離を比較した。
- pH 2.6になるようにクエン酸50 mgをエタノール20 mLに溶解し、この溶媒を花色がピンクの植物体由来培養物に加えた。
- 1時間浸漬し、適宜振盪した。その後、ろ過した。
- 水蒸気蒸留装置で成分を濃縮した。
- 濃縮した液にエタノール500 μLと水400 μLを加え、超音波処理した。
- 温めたワセリンにオイルが1:2となるように加えた。これに⑥を加え、混合した。

### 【結果】

#### A) ハナキリンのアントシアニン生産

ハナキリンの組織培養を行い、吸光度と高速液体クロマトグラフィーでアントシアニンの生産量を測定した。吸光度では白ピンク、ピンク、白、赤の順でアントシアニン量が多く含まれていた。ただし、白は白濁していたため、吸光度の値が大きくなった。高速液体クロマトグラフィーでは吸収スペクトルからアントシアニンのピーク面積を出した。このときピーク面積は白ピンク、ピンクの順で大きくなった。

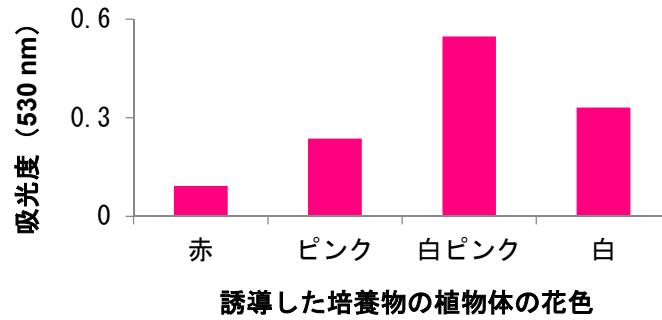


図1 アントシアニンの530 nmの吸光度

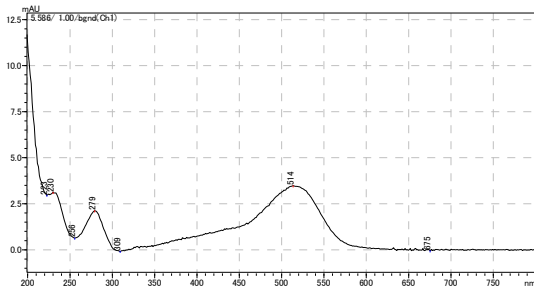


図2 アントシアニンの吸収スペクトル

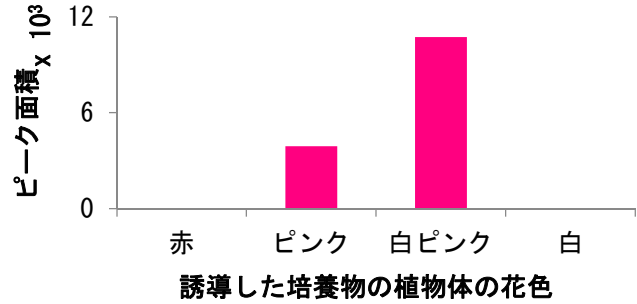


図3 アントシアニンのピーク面積

### B) 抗酸化活性試験

サンプルの抗酸化活性をトロロックス等量として比較した値を図4に示した。抗酸化活性が最も高いものがピンク、最も低いものが白ピンクというになった。

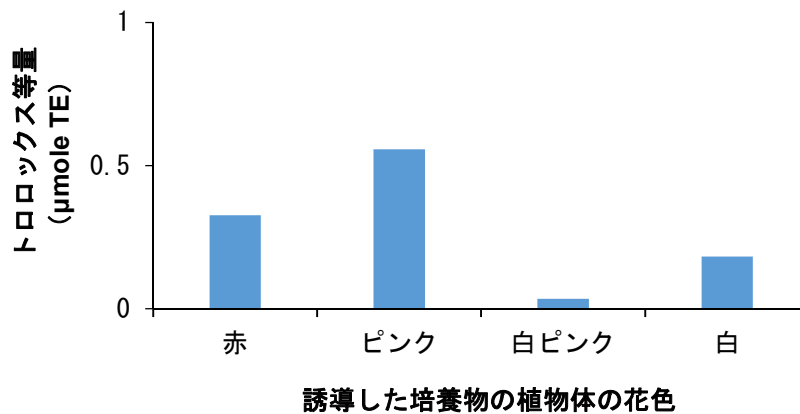


図4 3回目の活性試験の結果

### C) 試作

クエン酸量は0.05 gでpHが最も近くなった。ワセリンとオイルの割合では1:2が最も粘度が高いことが見て分かった。このことから、1:2での配合で試作を行った。線は混合物の粘度の程度を示した。グロスの試作には1:2のものを使用した。試作の結果、配合は表1のようにした。

表1 グロスの配合量

成分	配合量	最終濃度 (%)
オイル	33 g	66
ワセリン	16 g	32
水	400 μl	0.6
エタノール	500 l	1
アントシアニン	116 mg	0.2
クエン酸	10 mg	0.02

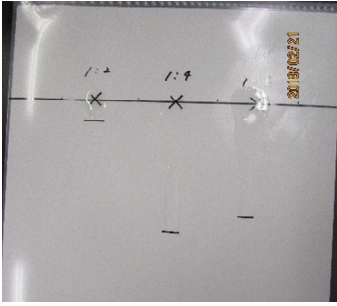


図5 粘度の違い

【考察】

アントシアニン生産の結果より、ハナキリンの花色の違いによるアントシアニン量は白ピンク、ピンクが多く生産し、赤、白はほとんど生産しないことが分かった。また、ハナキリンの花色により、カルスで生成されるアントシアニン量は異なることと、アントシアニンを生成する遺伝子は花色によって発現のしやすさが異なっていると考えられた。

アントシアニンは全体的に高い抗酸化活性を示すがアシル基をもつアシル化アントシアニンではアシル基自体も抗酸化活性を持っているためより高い抗酸化活性を示す。そのため、図3と図4の結果から、花色がピンクのハナキリンのアントシアニンの生産量に対して抗酸化活性の量が多くなったのは、今回分析しなかったアシル化アントシアニンなどの他の物質が抗酸化活性を示している可能性があると考えられた。また、白ピンクのアントシアニンの生産量に対して抗酸化活性が低いのは、活性をあまり示さないアントシアニンであった可能性が考えられる。

抗酸化活性試験においては3回試験を行ったが、今回の試験条件ではデータの再現性が得られなかった。そのため、今後は測定方法など検討を行う必要があると考えられる。

最後に、ピンクのハナキリンのカルスからエキスを抽出し、エバポレータで濃縮後、表1の組成に従ってグロスを試作した。



図6 試作の様子。水蒸気蒸留装置でのエキス調整（左）と試作したグロス（右）

【参考文献】

- Yamamoto Y, Mizuguchi R, & Yamada Y (1982) Selection of a high and stable pigment-producing strain in cultured *Euphorbia millii* cells, *Theoretical and Applied Genetics*, 61(2), 113-116.
- ハーブ活用百科事典, 平野陽三, 産調出版株式会社, 東京
- 全成分表示に対応した化粧品成分ガイド第4版, 津野田勲, フレグランスジャーナル社, 東京
- 植物色素フラボノイド, 武田幸作, 齋藤規夫, 岩科司, 文一総合出版, 東京