

植物組織培養法を用いたクチナシ植物 (*Gardenia jasminoides* Ellis) からの橙黄色色素 crocin と青色色素イリドイド配糖体の生成に関する研究

東京理科大学総合研究所 基礎科学研究部門

生 田 安 喜 良

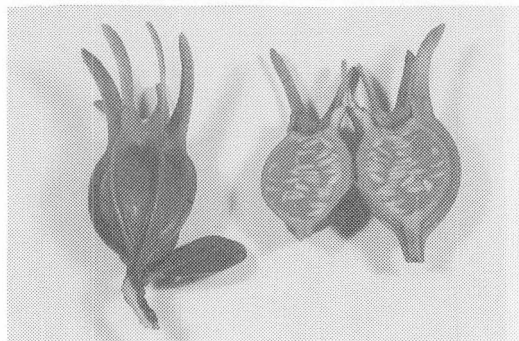
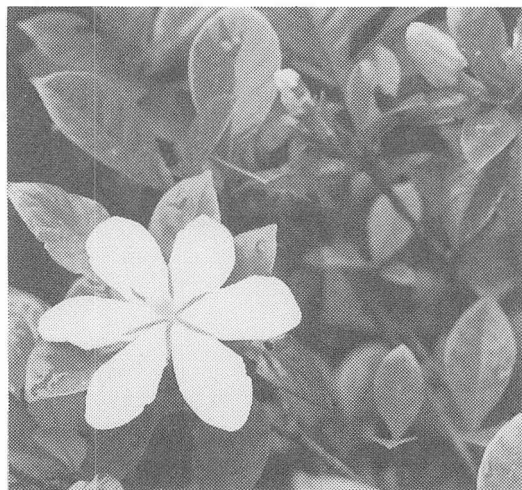
Callus tissues were induced from the fruit of *Gardenia jasminoides* Ellis on basal MS medium supplemented with 2,4-D (3 mg / ℓ) -K (0.1 mg / ℓ) and N (3 mg / ℓ) -K (0.1 mg / ℓ). Callus on subcultured onto MS medium supplemented with N (3 mg / ℓ) -K (0.1 mg / ℓ) induced yellowish pigmented callus. The MeOH extract of yellowish callus tissues showed the presence of crocin when analysed by HPLC. However, crocin was at low levels in callus as compared to fruit. It have maintained the crocin producibility through subcultures over 10month. Further, triterpene, phytosterol and their glycosides were also identified from the MeOH extract of the callus tissues.

1 目 的

化粧品あるいは食品の着色に用いられる色素素材は、現在化学合成品に依存している部分が多い。しかし、最近化学合成系色素に発ガン性などの副作用の危険が指摘されるようになり、それに代る危険性の少ない天然物由来の色素素材が再認識されてきた。植物天然色素は、色調が合成品に比べ鮮やかで、けばけばしさがなく、しかも人体への安全性が一般に高いと考えられている。しかし、植物を原料として製造する場合、自然環境による制約、或いは、資源の枯渇などの問題があり、原料確保の面からも不安定さがある。

この最近の天然物指向による消費者の要求に答えるべく、安定した供給法として最近注目されている植物組織培養法を用いて大量に供給が出来るようになれば、現在使われている天然色素は植物由来の色素が多いことから大きな期待がもたれる。現在これらの色素の内、代表的な橙黄色系色素はクチナシの果実から得られる crocin がある。(Plant、Fig. 1)、本研究は植物組織培養法を使

い、クチナシ (*Gardenia jasmonoides* Ellis、アカネ科)の植物から誘導したカルスを使い、色素生成の条件検討を行い、安定した水溶性のカロチノイド系橙黄色色素の crocin 及びイリドイド配糖体を植物組織培養法により、季節に関係なく供給



Plant and Fruit of *Gardenia jasmonoides* Ellis



Studies on pigments and monoterpene glucosides from cultured tissues of *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae)

Akira Ikuta

Research Institutes for science and technology, Institute Fundamental Science, Science University of Tokyo

する事を目的とする研究である。この方法により季節に関係なく植物色素の原料供給が容易になり化粧品、食品添加色素の分野で四季折々の自然の色が人工的に得られるようになるなら、色彩豊かな文化生活が約束されるであろう。

植物組織培養法による植物色素の生成の報告例は現在アントシアニン系、フラボノイド系化合物について生成した報告例はある。しかし、工業的なレベルでの色素生成の例はムラサキの培養組織からシコニンの生成の報告例以外にない¹⁾。クチナシのカルスから色素の生成の成功例は今のところ crocin 様化合物の生成、あるいは微量の crocin の生成が報告されている。^{2, 3, 4)} 又、微量成分として、青色色素を生成するモノテルペン系のイリドイド化合物の生成及びその構造解析についての報告はある。⁵⁾ (Fig. 1) このクチナシの果実は、生薬名山梔子と呼ばれ古来より飲食物の黄色着色料として使用され、貴重な黄色天然着色料として現在でも使用されている。クチナシ黄色色素は、色調が鮮やかで、耐熱、対光性に優れたため、その利用分野は広範囲である。又、漢方では重要な生薬として使われ、その薬効としては瀉下、解毒、消炎、解熱鎮痛、利胆作用などが知られ、特に充血、吐血、黄疸、不眠を治す目的で用いられている。日本では年間300tが中国、韓国から輸入されている。⁶⁾

2 結 果

2.1 黄色色素 crocin の同定及び定量

NAA (N)、IAA、Kinetin (K)、Benzyladenine

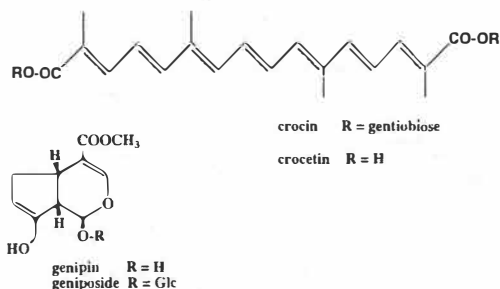


Fig. 1 Main Compounds from *Gardenia jasminoides*

の種々の植物生長調節物質の組み合わせて crocin の生成を目的に検討を行った。

その結果 N (3 mg/l) - K (0.1 mg/l) のホルモン組成を添加した M&S 培地で継代培養した所、一部に橙黄色に色づくカルスの生成が観察された。このカルス細胞が crocin を生成していることが推測され、色素生成の多い細胞部分を選抜して繰り返し継代培養を行った。その結果、濃い橙黄色 callus 細胞が得られた (Fig. 2)。しかし callus の成長が遅く、しかも約 10 カ月間繰り返し継代培養を行ったが急速に色素生成が減少し始めた。ために、その時点でカルスを収穫し (生重量 0.85g、乾燥重量 0.02g)、MeOH で徹底的に抽出を行った。その濃縮エキスについて HPLC (60% MeOH) を用いて crocin の標品との比較により crocin と同定した (t_R : 3.01min.)。さらに HPLC を用いて定量を行った結果 crocin は 0.22×10^{-6} g (Dry wt. 0.001%) を得た。原植物の果実では、最大乾燥重量あたり約 10% 程度の crocin が生成することが報告されており⁷⁾、それに比べると今回の定量結果は非常に低かった。

2.2 Triterpene, phytosterol 及びその配糖体の構造

monoterpene 系配糖体を検索のために callus の成長の良い 2, 4-D (1 mg/l) - K (0.1 mg/l) のホルモン組成を含む M&S 培地を用いて培養を行い生重量約 4 kg を MeOH 抽出を行い、そのエキスについて、CHCl₃、n-BuOH により分配を行い得られたそれぞれのエキスについて、カラムクロマトにより精製を繰り返し、CHCl₃ 層から 5 種 (compounds 1 ~ 5)、BuOH 層から 4 種 (compounds 6 ~ 9) の化合物が得られた (Fig. 3)。これらの化合物について機器 (¹H、¹³CNMR、MS) データをもとに構造を解析した。

2.2.1 Ulsolic acid.

Compound 1 は白色粉末、TLC 上で 10% H₂SO₄ を噴霧後加熱すると赤紫色を呈し Lieberman -

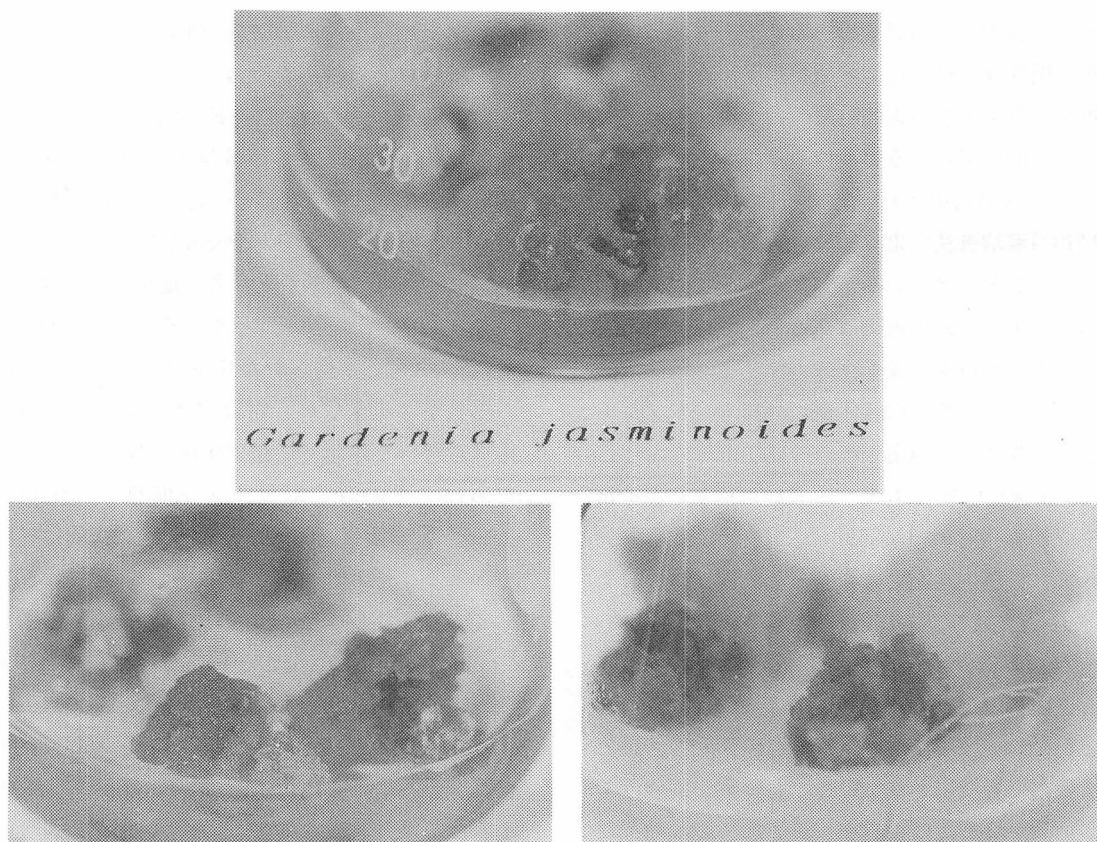


Fig. 2 Production of Crocin from Callus tissue

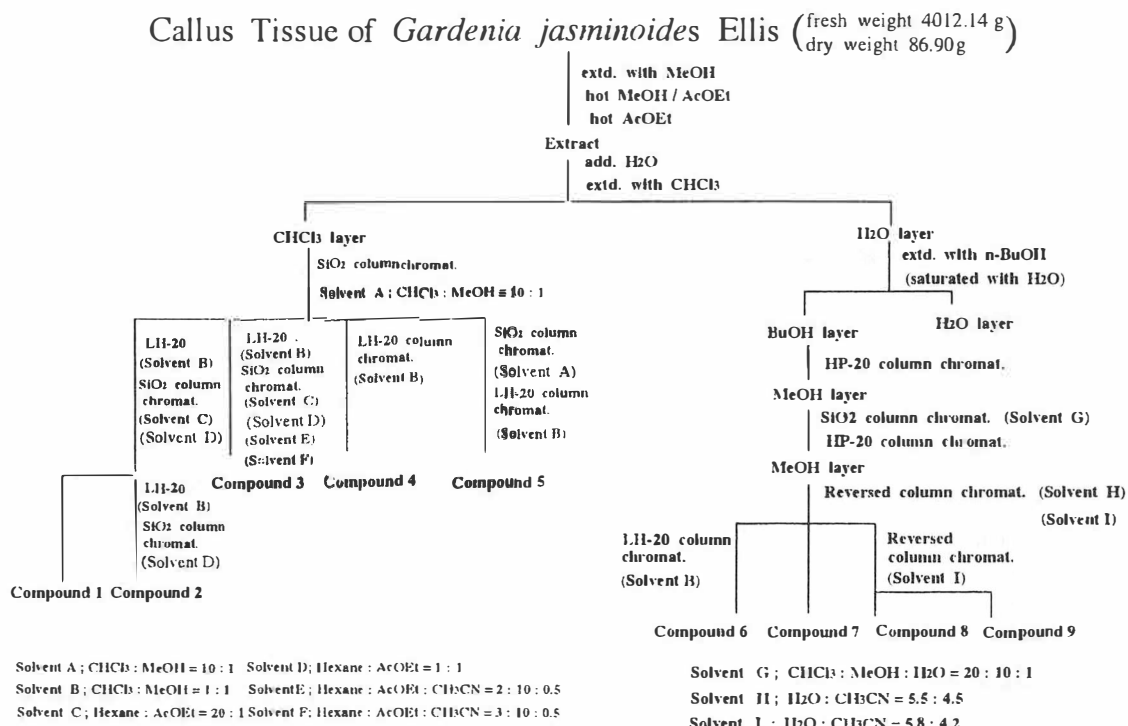


Fig. 3 Extraction of *Gardenia jasminoides* Ellis callus tissue

Burchard 反応により赤紫を呈する事から、triterpene化合物が推定され、MSより m/z 456に $[M^+]$ を示し、レトロディールスアルダー開裂によるD/E環由来のフラグメントイオン m/z 248, 203が更に、 m/z 207にA/B環由来のフラグメントが観察された。 ^1H NMRにより、2個分の2級Meを含む7個のMe基、更に、12位のオレフィニックプロトンが δ 5.47 (1H, t, $J=3.3\text{Hz}$)に観察される事から、ursolic acidが推定され、標品との比較により同定した (Fig. 4)。

2.2.2 Stigmasterol.

Compound 2は無色粉末でLiebermann-Burchard反応により深緑色を呈し、MSより、 m/z 412、 $[M^+]$ を示した。更に ^1H 、 ^{13}C NMRからstigmasterolが推定され、標品のデータとの比

較から同定した (Fig. 5)。⁸⁾

2.2.3 Brassica sterol, stigmasterol, β -sitosterol β -D-glycopyranoside.

Compound 4、5は淡黄色の粉末で、Liebermann-Burchard反応により深緑色を示し、MSより、糖鎖脱離のフラグメントイオン m/z 398、396、382 (Fig. 6~8)が観測され、3種の混合物と推定された。同時にsterol化合物に特徴的な側鎖と糖鎖の脱離によるフラグメントイオン m/z 255が観察された。又、文献値との比較から β -sitosterol β -D-glycopyranoside, stigmasterol β -D-glycopyranoside, brassicasterol β -D-glycopyranosideの混合物と同定した。⁸⁾

これらの化合物は原植物からまだ報告の無いtriterpeneあるいはphytosterol及びその配糖体で

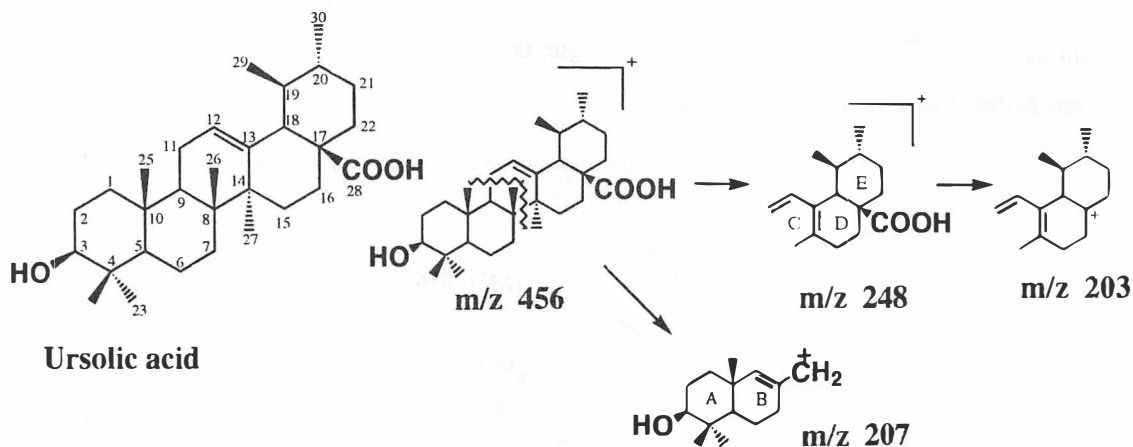


Fig. 4 Mass fragmentation of Ursolic acid

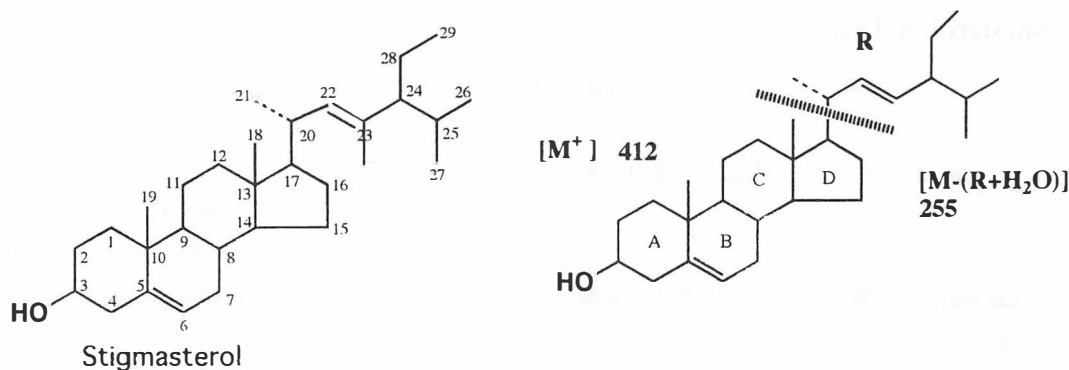
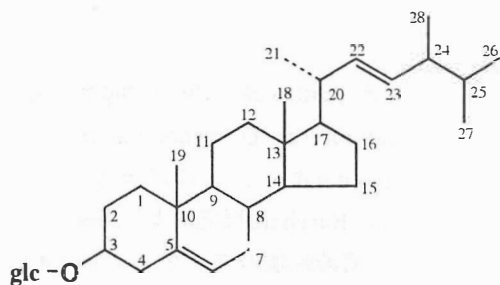


Fig. 5 Mass spectrum and fragmentation of stigmasterol



Brassicasterol β-D-glycopyranoside

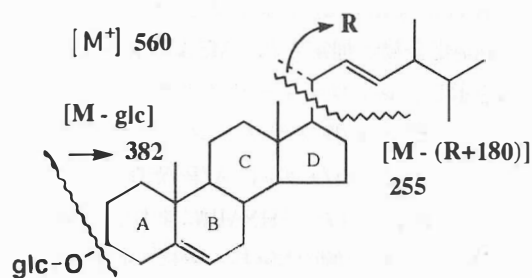
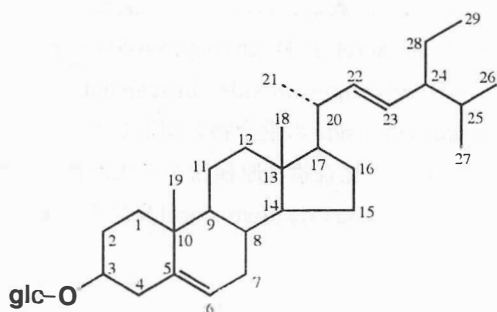


Fig. 6 Mass spectrum and fragmentation of Brassicasterol β-D-glycopyranoside



Stigmasterol β-D-glycopyranoside

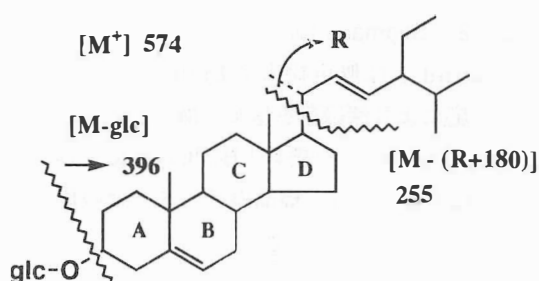
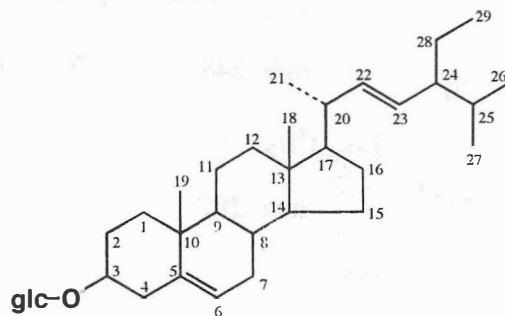


Fig. 7 Mass spectrum and fragmentation of β-D-glycopyranoside



β-Sitosterol β-D-glycopyranoside

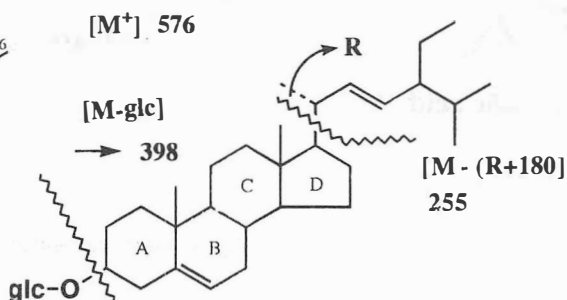


Fig. 8 Mass spectrum and fragmentation of β-Sitosterol β-D-glycopyranoside

あった。compounds 6～9 は構造は検討中である。

2.3 callus からの再分化による植物体の生成

N (3 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ) ホルモン組成で色素生成を検討中に色素生成と同時に、shootの

形成が観察され、その shoot の部分を光照射下 (12/12hr、6000L) 継代培養を行った所、葉が緑化して、地上部、及び地下部を形成した小植物が得られた (Fig. 9)。今回は移植は行なわなかったがこの再分化植物が種苗として使用出来る可能性を示した。

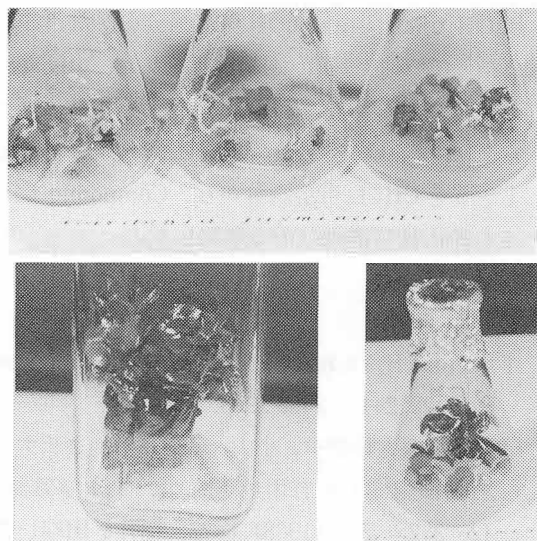


Fig. 9 Differentiation from *Gardenia jasminoides*
Callus Tissue

3 考 察

色素生成の少ない原因として、今回カルスの収穫時期を逸し、色が薄くなり始めた時期に抽出し、定量を行ったことが考えられる。現在、前回と同じ条件でクチナシの果実から N (3 mg/l) - K (0.1 mg/l) を用いてカルスを誘導したところ、callus 化の過程で特に色素生成細胞を選抜する事なく色素生成が観察された。そこで今後は、色素

生成について time course を取り、カルスの収穫時期を設定したい。しかしながら、クチナシのカルスから、カルス化後、約1年近く crocin を生成していたが、10 カ月目位から急激に色素形成能力が低下する事が観察された。この様に色素生成が継続しないため、カルスが crocin を生成する能力を持続及び生産性の向上する条件を検討する必要がある。この色素形成能力の維持が今後の課題となろう。現在、再度同じ条件でカルスを誘導して、色素形成株を大量に選択中である。

更に、一般的にカルス培養において酵母エキス、あるいは重金属などエリシター処理を行うことにより、二次代謝産物の生成量を増加する事が知られている。今後、このクチナシのカルスについても、このようなエリシター処理を加え、目的の色素化合物が生成されるかどうかについても検討を加える。一方、原植物で生成する monoterpene 系 iridoid 配糖体類が得られず、原植物から報告されていない triterpene あるいは phytosterol 類が得られた事は、著者等⁹⁾が既にボタン科のカルスの生成成分の検索の結果、原植物で主成分の monoterpene 配糖体の paeonifloin 類が生成されず、triterpene 類を主生成成分として生成した現象に類似しており、カルスにおける terpenene 合成の能力の観点から興味ある (Fig. 10)。

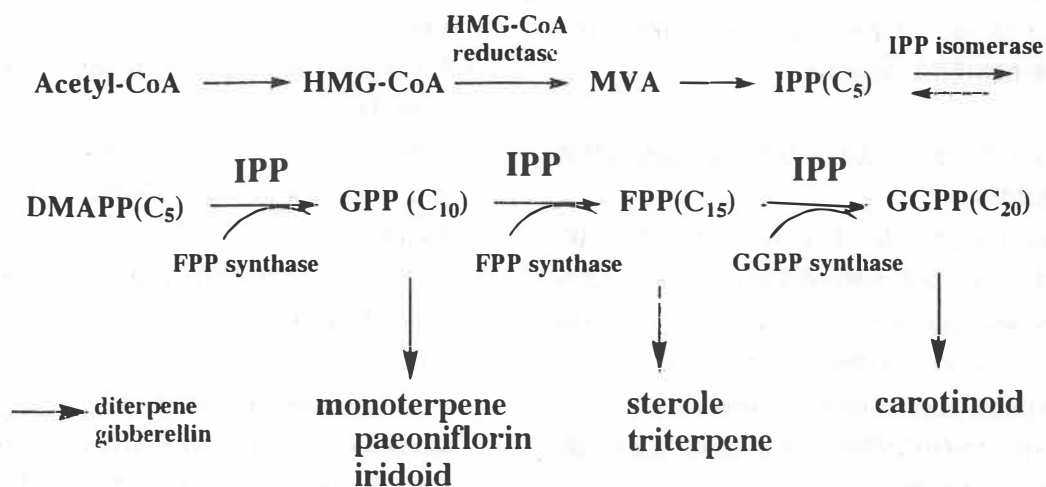


Fig. 10 Biosynthesis of Terpenoids

4 実験

4.1 カルス誘導及び継代培養

カルスは、結実後の果実及び茎を水道水で良く洗った後、Tween20を数滴たらした蒸留水中で、攪拌しながら徐菌後、20%NaOClにより数分間滅菌し洗浄した後、1~1.5cmに切り分けたものをM & S培地上に置床し、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、暗所下で2週間D (3 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ), N (3 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ) のホルモン組成のそれぞれの組み合わせを含むM&S培地を用いて培養を行いカルスを誘導した。継代培養はD (1 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ), N (3 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ) の組み合わせを用いて行った。

4.2 crocinの同定及び定量

3NKで培養したクチナシのカルスから橙黄色に色づいたものを特に選抜してメタノールで乳鉢を用いて抽出を行った。

(検量線の作製)

メタノールに溶かして0.125 mg/mlに調整したcrocinの標品を用いて、HPLCにより検量線を作製した。crocinを、2.5、5.0、10.0 μg の3種類の濃度について測定し、最小二乗法により回帰方程式を算出した。

《HPLCの条件》

(UV) 382nm、(流速) 1.0 ml/min、(温度) 30°C 、(移動相溶媒系) 60%MeOH

4.2 クチナシのカルスからの成分抽出及び構造決定

D (1 mg/ℓ) - K (0.1 mg/ℓ) のホルモン組成を用いてカルスの大量培養を行いクチナシのカルス(fr. wt. 4.1kg, dry, wt. 86.9g)を収穫し、MeOH中ポリトロンにより磨砕し、吸引ろ過後、残渣にMeOHを加え同様の操作を3回繰り返した。更にその後、MeOHで還流抽出を3回行い、その濃縮エキスを水に懸濁した後、 CHCl_3 で分配して CHCl_3 可溶画分を得た。水層は更に水飽和n-

BuOHで分配しn-BuOH可溶画分を得た。これら画分について、順相・逆相のオープン、中圧カラムクロマトグラフィーおよびセファデックスカラムクロマトグラフィーを繰り返し行い、Compound 1~5を CHCl_3 可溶画分から、Compound 6~9をBuOH可溶画分から単離した。

文献

- 1) Fukui H, Yoshikawa N, Tabata M, Phytochemistry, 22, 241 - 245, 1983.
- 2) 奈女良、田田中、小山、ほか1名、クチナシ培養細胞による有用色素生産、生薬学雑誌、42、252 - 255 (1988) 梅谷、福井、田端、薬誌、100、920 - 924、1980.
- 3) Nawa Y, Ohtani T.; Induction of callus from Flesh of *Gardenia jasminoides* ELIS Fruit and Formation of Yellow Pigment in the callus, Biosci. Biotech. Biochem., 56, 1732 - 1736, 1992.
- 4) George P. S, Ravishamkar G. A.; Induction of crocin and crocetins in callus cultures of *Gardenia jasminoides* ELLIS. Food Biotechnology, 9, 29 - 38, 1995.
- 5) Ueda S, Kobayashi K, Muramatsu T, 他1名: Studies on monoterpene glycosides and related natural products. Planta Medica, 41, 186 - 91, 1998.
- 6) 日本薬局方第二部広川書店、東京、1991、D - 389 - D - 392.
- 7) 梅谷、福井、田端、クチナシ果実の発育にともなう成分含量の変化、薬学雑誌、100, 920 - 924, 1980.
- 8) 児島: ウツボグサ (*Purunella vulgaris* L. var. lilacina Nakai) のトリテルペノイド及びステロイド成分に関する研究、博士論文 pp39 - 48, 1983.
- 9) Ikuta A, Kamiya K, Satake T, その他1名: Triterpenoids from callus tissue cultures of *Paeonia* species. Phytochemistry, 38, 1203 - 1207, 1995.