

.....
 一般報文

ワサビ培養組織の分化と辛味成分^{*1}

古谷 力・折原 裕・高木さつき・吉田淑子

北里大学薬学部

(〒108 東京都港区白金 5-9-1)

(1988年 1月 11日受理)

奥多摩産ワサビ (*Wasabia japonica* Matsum.) の根茎より6種の分化段階の異なる培養組織を得た。これらの sinigrin 含量, myrosinase 活性を比較し, 分化と辛味発現の関係を考察した。Myrosinase 活性は脱分化したカルスから幼苗にいたるまですべての培養株に認められたが, sinigrin は少なくとも幼根・子葉様組織を併せ持つまで分化が進まなければ検出できなかった。さらに分化段階が進むにつれ sinigrin 含量は増加した。ワサビ原植物では sinigrin は全草に認められるが, 特に根茎部に多い。このことから分化段階の進行による sinigrin 含量の増加は根茎部の肥大によるところが大きいと考えられる。

1. 緒 言

ワサビ (*Wasabia japonica* Matsum.) は数少ない日本原産の香辛料でありその独特な風味 (辛味) ゆえに, 日本料理には欠かせないものとなっている。この辛味の本体は, isothiocyanate (おもに allylisothiocyanate) であり, すりおろすことにより根茎中の glucosinolate (おもに sinigrin) が myrosinase により加水分解され生成する (Fig. 1) ことが知られている¹⁻³⁾。

アブラナ科植物については遺伝子導入, 細胞融合などの対象として多くの研究例があるが, ワサビに関する組織培養の研究は少ない。これまでにワサビのメリクロンカルチャーに関しては報告がある^{4,5)} もののワサビ培養細胞および組織の成分についての報告はない。著者らはワサビ根茎より数種の分化状態の違う培養組織を誘導し, その分化の度合と辛味成分発現に関して考察を行った。

2. 材料および方法

1980年3月奥多摩産ワサビの根茎を70% エタノール, 10% さらし粉溶液で順次滅菌し厚さ約5mmの切片としショ糖 3%, 寒天末 0.9%, α -naphthylacetic acid (NAA) 1 mg/l, kinetin 0.1 mg/l, カゼイン加水分解物 0.1% を含む修正タバコ寒天培地⁶⁾ (NC 培地) に

置床した。これを15°C 明所 (16 hr, light (600 lux), 8 hr, dark) にて培養し, 約4週間ごとに新鮮培地に継代した。約1年後, 切片より細根 (rootlet) が誘導され, これを選抜し継代したところ黄白色のカルス (NC callus) と胚様体組織 (embryoid) が生じた。さらにこの胚様体組織から子葉様組織が形成した分化 I (differentiated tissue I), 本葉様組織が成育した分化 II (differentiated tissue II) と分化段階の進んだ組織が現れた。分化 II を植物ホルモンを含まない Murashige and Skoog (MS) 培地⁷⁾ で培養すると, 根, 葉柄, 葉が明瞭に認められる幼苗 (plantlet) が得られた。

温度条件については, 以上のようにして得られた6種のうち, 分化 I, 分化 II, 幼苗を用い 5°C, 10°C, 15°C, 20°C の4段階を検討した。すべての培養株で 15°C が最も高い成長を示し, 以後の実験にはすべて 15°C で培養を行ったものを用いた。

<Sinigrin 含量測定方法> 実験に用いた各培養株は 15°C 明所 (12 hr, light (600 lux), 12 hr, dark) ローターシェーカー (140 rpm) で振とう培養を行い, 4週間後ナイロクロスで濾過後秤量し, 成長率を求めた。各培養株 fresh weight 25 g を 35 mm リン酸緩衝液 50 ml (pH 7) とともに氷冷下 Waring ブレンダーで粉碎した。これに酵素液として粉がらしから得た crude myrosinase⁸⁾ 7 mg を 4 ml の 35 mM リン酸緩衝液に溶かしたものを加え 30°C で 30 分間インキュベートし,

*1 本報を "Studies on Plant Tissue Cultures", 第56報とする。第55報: Furuya, T., K. Kawaguchi and M. Hirotsu, 1988. Phytochemistry, 27: 2129-2133.

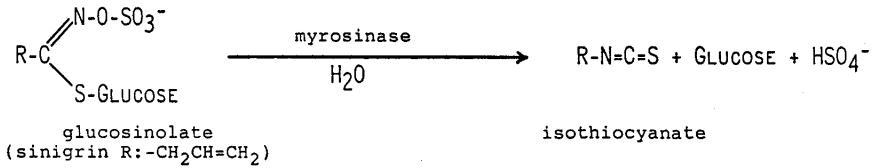


Fig. 1. Enzymatic degradation of glucosinolates.

培養株中の sinigrin を allylisothiocyanate に分解した。次に内部標準 (cyclohexanol) と CH_2Cl_2 100 ml ($\times 2$) を加えよく攪はんした後遠心分離し、得られた CH_2Cl_2 層を芒硝乾燥、常圧濃縮し、サンプルとした。Allylisothiocyanate の定量は、水素炎イオン化検出器 (FID) を装着したガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-9A) を用い、カラムには 5% PEG-HT (80/100 mesh Uniport HP, Gasukuro Kogyo Inc.) をガラスカラム ($\phi 3 \text{ mm} \times 2 \text{ m}$) に充填したものをを用いた。カラム恒温槽および検出器の温度はそれぞれ 80°C 、 120°C の定温、キャリアーガス (N_2) の流速は 50 ml/min とした。検出器の出力はデータ処理装置 Shimadzu クロマトパック C-R 3A に接続し、内部標準法、二点検量線法により定量し、sinigrin 量に換算した。この条件における retention time は allylisothiocyanate で 5.8 min 、cyclohexanol で 7.3 min であった。また対照として原植物の根茎、葉、葉柄についても同様に抽出し、定量した。

<Myrosinase 活性測定方法> 15°C 明所 (12 hr, light (600 lux), 12 hr, dark) の条件下静置培養した上記の培養株を用いた。各々の培養株 fresh weight 5 g を 35 mM リン酸緩衝液 10 ml に浸漬し氷冷下ポリトロンで粉碎後、遠心 ($11,000 \times g$, 10 min) して得られた上澄液を粗酵素液とした。この粗酵素液 0.5 ml に基質溶液

として sinigrin (東京化成工業(株)) 2 mg を 35 mM リン酸緩衝液 2 ml に溶かしたものを加え、 30°C で 30 分間インキュベートした。以下 sinigrin 含量測定法と同様に処理し、allylisothiocyanate を定量し、ミロシナーゼ活性を比較した。

3. 結果および考察

各培養株の液体培地での成長率、sinigrin 含量、myrosinase 活性、辛味について Table 1 に示した。

(1) 細根組織 (rootlet)

ワサビ根茎を培養系に移し 1 年後、まず、細根組織 (Fig. 2 a) が誘導された。これを分離し、光照射下継代することにより、後述するカルス、胚様体、分化組織などが誘導された。細根組織は NC 液体培地で 4 週間当たり 1.05 ± 0.05 倍程度と成長率はきわめて低かった。また、辛味成分については、myrosinase 活性は認められたものの、sinigrin はまったく検出できなかった。

(2) NC カルス (NC callus)

細根組織から誘導された NC カルスはその後 10 数代継代を続けても形態が変化することのない安定な培養株である (Fig. 2 b)。成長率はばらつきが大きいものの NC 培地で 3.9 ± 1.7 倍、kinetin 0.1 mg/l 、IBA 2 mg/l を含む MS 培地 (B2K 培地) で 5 倍前後 (fresh weight basis) と高い成長率を示した。辛味成分については、myrosinase 活性は認められたが sinigrin はま

Table 1. Estimation of callus and differentiated tissues of *Wasabia japonica* on growth, sinigrin content, myrosinase activity and pungency.

Material	Growth ratio in suspension (/4 weeks)	Sinigrin content (mg/25 g fw)	Myrosinase activity	Pungency
Rootlets	1.05 ± 0.05	0	卍	—
NC callus	3.9 ± 1.7	0	卍	—
Embryoids	2.5 ± 0.4	0	卍	—
Differentiated tissues I	2.9 ± 0.9	0.09 ± 0.09	卍	+
Differentiated tissues II	2.3 ± 0.8	0.78 ± 0.25	卍	+
Plantlets	3.8 ± 1.0	2.5 ± 0.58	卍	卍
Mother plant rhizome	---	12.3	NT	卍
Mother plant leaf and stalk	---	2.87	NT	卍

NT; Not tested.

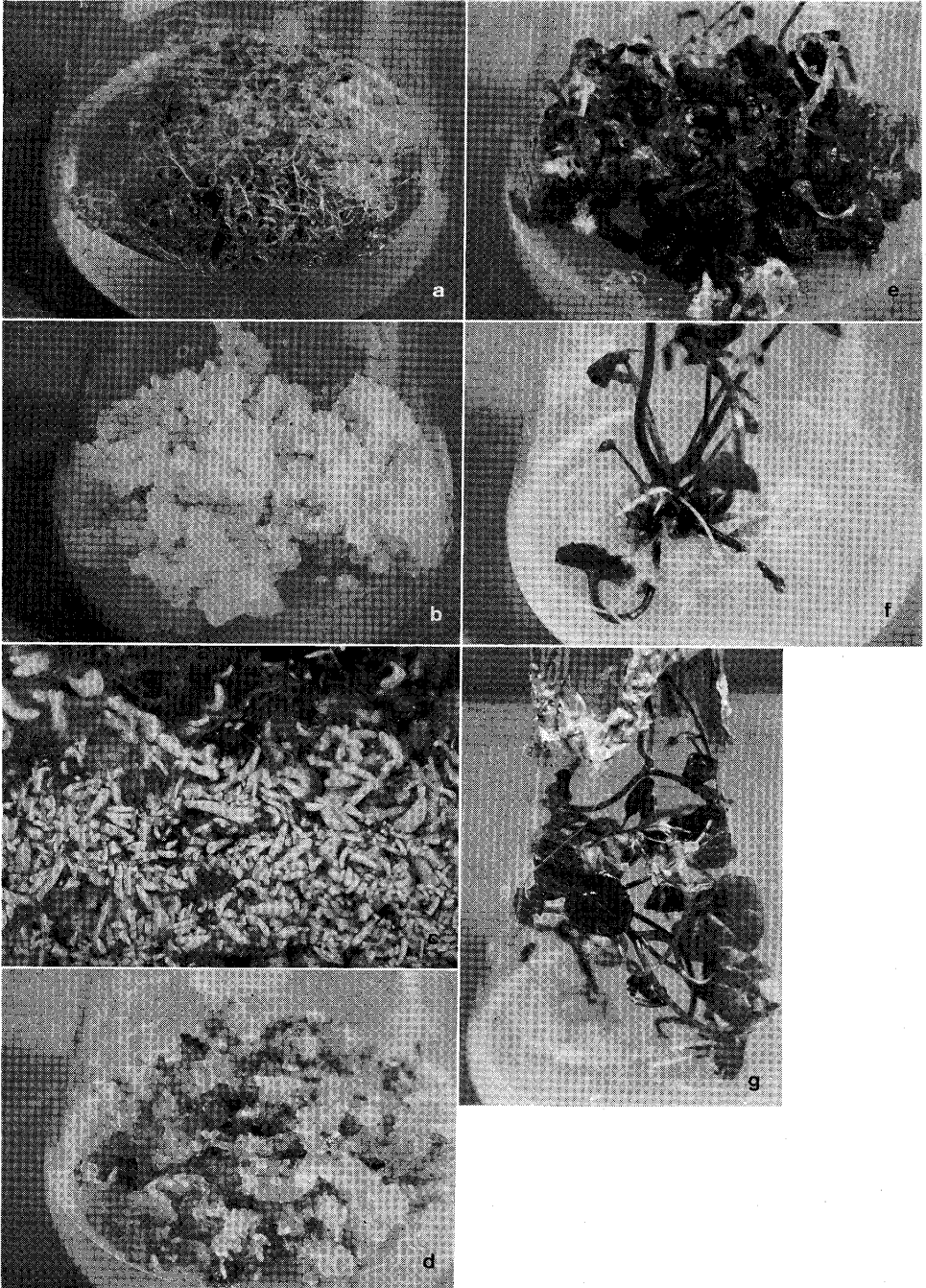


Fig. 2. Culture tissues of *Wasabia japonica* at various stages of differentiation.

a) Rootlets induced from rhizome segments, b) NC callus derived from rootlets, c) Embryoids cultured in suspension (heart and torpedo types), d) Differentiated tissues I, radicles and cotyledon-like body developed from embryoids, e) Differentiated tissues II, several leaves developed from differentiated tissues I, f) Plantlet developed from differentiated tissues II subcultured on hormone free MS medium, g) Plantlet flowered in Erlenmeyer flask.

まったく検出されなかった。

(3) 胚様体 (embryoid)

心臓型および魚雷型の白色の不定胚 (Fig. 2c) で、細根組織から分化組織が誘導される前に一時的に観察された。また、分化 I, II を液体振とう培養すると多量に得られる。胚様体は照射下で容易に分化し、緑色の分化組織を形成した。また、15°C 暗所で分化を抑え 3 種の培地 (NAA 10 mg/l + kinetin 0.1 mg/l, IBA 10 mg/l + kinetin 0.1 mg/l, IBA 20 mg/l + kinetin 0.1 mg/l を含む MS 培地) を用いて成長率を調べたところ、4 週間当り 2.5 ± 0.4 倍であった。なお、胚様体からは sinigrin は検出されなかった。

(4) 分化 I (differentiated tissue I)

分化 I は胚様体を照射下 (12 hr, light, 12 hr, dark) で培養した際に多量に生じ、胚様体の基部細胞からは透明で湾曲した幼根が、頂端細胞からは子葉様組織の分化が観察された (Fig. 2d)。分化段階の進んだものは子葉様組織の緑化がみられる。B2K 培地で培養を行った胚様体は幼根に短い根毛が密生した分化 I を生じその成長率は 4 週間で 2.9 ± 0.9 倍であった。Sinigrin 含量は 0.09 ± 0.09 mg/25 g fw と大きな幅が見られ、各個体間の微妙な分化段階の違いを反映して sinigrin 含量に差が生じると考えられる。Myrosinase 活性も認められ、組織をすりつぶすことにより、わずかながら辛味も感じられた。

(5) 分化 II (differentiated tissue II)

分化 II は分化 I の子葉様組織が緑化し、さらに本葉が数枚展開したものであり葉柄、葉がはっきりと判別できる点では幼苗と同じであるが、根が分化 I と同様に透明であり幼苗でみられる白色で長いものとは異なる (Fig. 2e)。このように分化 I と幼苗の中間の分化段階と考えられる分化 II では成長率は 2.3 ± 0.8 倍と分化 I よりもやや低い。sinigrin 含量は 0.78 ± 0.25 mg/25 g fw と分化 I より高い値を示した。Myrosinase 活性も認められ、辛味も感じられた。

(6) 幼苗 (plantlet)

幼苗は根、葉柄、葉がはっきりと判別でき原植物と同じ形の本葉を展開した培養株 (Fig. 2f) である。成長率は 4 週間で 3.8 ± 1.0 倍、多いもので 5.4 倍まで達したが、これは葉数の増加、葉、葉柄の成長によるもので、株数の増加は認められなかった。Myrosinase 活性は認められ、sinigrin 含量は原植物の葉、葉柄とはほぼ同等の値を示し、他の 5 種の培養株と比べるときわめて高い値を示した。また静置培養を続けたものでは培養器内で開花するものもあった (Fig. 2g)。

以上述べたように、ワサビ各培養組織の辛味成分について調べた結果、myrosinase 活性は脱分化したカルスから幼苗に至るまですべての培養株について認められたが、sinigrin は分化段階の進んだ分化 I, II, 幼苗からのみ検出された。

植物組織培養により二次代謝産物を生産しようとする場合、脱分化したカルスの状態では目的とする化合物を生産しないことが多い。この様な場合、カルスを再分化させることによりそれらの生産が回復する例は多く知られており、有用二次代謝産物生産調節の手段として利用されている。

たとえばケシ培養細胞の場合、カルスの状態では静置、液体培養ともアルカロイドは高感度の EIA (Enzyme Immuno Assay) をもってしても検出できないが、緑化、分化段階の進行に伴い thebaine, codeine, morphine の生産量が増加することが明らかにされ、乳管様組織の分化が同アルカロイドの生産に必須であることが示唆されている⁹⁾。

また、ニオイテンジクアオイ、ラベンダーの精油成分についても、脱分化したカルスの状態ではまったく検出されないものが、不定芽誘導 (ラベンダー)¹⁰⁾、不定芽組織のジャーファーメンター培養 (ニオイテンジクアオイ)¹¹⁾ により原植物の生葉に比較的近い組成の精油が得られ、モノテルペン生産についても精油生産組織の分化の必要性が示されている。

ワサビ原植物の場合、sinigrin は全草に認められるが、特に根茎部に茎葉の約 5 倍蓄積されている。ワサビ培養組織で sinigrin の生産は認められるものの、分化段階が進んだものほどその生産量が多いことから、根茎部分の大きさ (割合) が sinigrin 生産に大きく関わっているものと考えられる。

文 献

- 1) Underhill, E. W., 1980. In "Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Volume 8, Secondary Plant Products" (ed. by Bell, E. A. and B. V. Charlwood), p. 493-511, Springer-Verlag, Berlin.
- 2) Ohtsuru, M., H. Kawatani, 1979. Agric. Biol. Chem., **43**: 2249-2255.
- 3) 亀岡 弘, 1984. 香料, No. 142: 19-29.
- 4) 細木高志, 角田和美, 浜田守彦, 瀬尾光宏, 1986. 農業および園芸, **61**: 995-996.
- 5) 堀 秀隆, 1986. 現代化学・増刊 5, 植物バイオテクノロジー (山田康之, 岡田吉美編), p. 118-123, 東京化学同人, 東京.
- 6) Khanna, P., E. J. Staba, 1968. Lloydia, **31**: 180-189.

- 7) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- 8) Schwimmer, S., 1961. *Acta Chem. Scand.*, **15**: 535-544.
- 9) Yoshikawa, T., T. Furuya, 1985. *Planta Med.*, **110-113**.
- 10) 檜木博昭, 本田計一, 乾 全良, 渡辺克美, 山田康之, 1983. *日本農芸化学会誌*, **57**: 771-773.
- 11) 檜木博昭, 高橋越子, 中尾一夫, 乾 全良, 1986. *日本農芸化学会誌*, **60**: 15-17.

Summary

Differentiation and Production of Pungent Components in *Wasabia japonica* Tissue Culture

Tsutomu FURUYA, Yutaka ORIHARA, Satsuki TAKAGI and Toshiko YOSHIDA

*School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University
Minato-ku, Tokyo 108, Japan*

Six types of cultured tissues at various stages of differentiation were induced from rhizome segments of *Wasabia japonica* Matsum. (Japanese name: wa-sa-bi); NC callus, rootlets, embryoids, differentiated tissues I and II, and plantlets. Myrosinase activity was detected at all stages of differentiation, but sinigrin could not be detected from NC callus, rootlets and embryoids, so that pungency could be felt from differentiated tissues I, II and plantlets. It is supposed that the process of differentiation stages (the increase of the rhizome weight) is parallel to the sinigrin content in the tissues.