

# キク科植物培養細胞による新規紅色色素キノベオン A の生産

若山祥夫\*・金平 努\*・久坂一仁\*・小林昭雄\*\*

\* (株)紀文食品 研究開発室

〒103 東京都中央区銀座 7-14-13

\*\* 大阪大学工学部応用生物工学科

〒565 大阪府吹田市山田丘 2-1

(1995年2月18日受付)

(1995年9月2日受理)

キク科に属するペニバナ培養細胞から生産された、新規紅色色素キノベオン A が、他のキク科植物の培養細胞系でも生産されるか否かについて検討した。タンポポ、アザミ、ノゲシ、ゴボウ、ヤグルマギク、エゾギク、キンセンカ、ヒマワリ、シュンギク由来の外植片から、カルスを誘導し、懸濁培養系を確立してペニバナ培養細胞と同様の条件下で色素生産を行わせたと、これらすべての培養細胞が、紅色色素を生産することを明らかにした。これらの色素を薄層クロマトグラフィーで分析したところ、いずれのスポットも、*R<sub>f</sub>* 値が同じでありキノベオン A と同一色素であることが推察された。

次に、タンポポの培養細胞を大量に培養し、生産された大量の紅色色素を抽出精製し、各種機器分析を行った。その結果、紫外-可視吸収スペクトル、LC-MS による分子量が、キノベオン A と一致することがわかった。また、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの帰属もキノベオン A の帰属と一致した。従って、調べたすべてのキク科植物の培養細胞がキノベオン A を生産すると考えられた。

## 1. 緒 言

医薬品農薬等の生理活性物質、化粧品素材、食品素材、色素などの二次代謝産物の生産を植物培養細胞を用いて効率よく行わせようとする研究は、広く行われてきている<sup>1-3)</sup>。これらは、いずれも、母植物中の主要な有用成分を得ようとするものであり、中でも工業化まで結びついた例としてはシコニンの培養生産がよく知られている<sup>4)</sup>。我々は、ペニバナ培養細胞によって生産される新規紅色色素の化学構造を決定し、キノベオン A<sup>5-8)</sup>と命名した(Fig. 1)。本色素は母植物であるペニバナの地上部、根等のどの部位にもその存在は確認されなかった。現在までに、母植物に微量存在する物質が、培養細胞で

生産される例は多く見られるが、母植物の主成分(あるいは、その類縁体)として、また、微量にも存在し得ない新規物質が植物組織培養によって生産された例は調べた限り報告されていない。

本報告では、9種類のキク科植物の培養細胞を用い、ペニバナ培養細胞系においてキノベオン A を生産するのに採用した条件下での紅色色素生産の有無について調べた結果について述べる。さらに、その中で、最も細胞の増殖率の良いタンポポの培養細胞を用いて、紅色色素の生産条件について検討し、生産された色素を精製後、各種機器分析を行い、本紅色色素がキノベオン A であることを確認した結果についても述べる。

## 2. 材料および方法

### (1) 供試キク科植物

キク科植物の中から入手の容易な、タンポポ(*Taraxacum officinale* Weber), アザミ(*Cirsium japonicum* DC.), ノゲシ(*Sonchus oleraceus* L.), ゴボウ(*Arctium lappa* L.), ヤグルマギク(*Centaurea cyanus* L.), エゾ

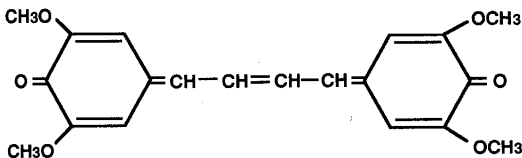


Fig. 1 The structure of kinobeon A.

ギク (*Callistephus chinensis* Nees), キンセンカ (*Calendula arvensis* L.), ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.), シュンギク (*Chrysanthemum coronarium* L.) の9種類の種子を選んだ。

## (2) カルス誘導

それぞれの種子を70%エタノール溶液中で30秒間攪拌した後、8%過酸化水素水溶液中で10分間殺菌を行った。これらの殺菌種子を、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  を0.5 g/l, ジェランガム0.2%を含む固体培地に播種し、25°C, 蛍光灯下(2000ルクス)で発芽させた。発芽した芽生えの子葉を5mm角に切り、 $\alpha$ -ナフトレン酢酸、N-ベンジルアデニンをそれぞれ $10^{-6}M$ , ジェランガムを0.2%含む、MS培地の主要要素を1/2に減じたpH5.7のKG(**Table 1**)固体培地に置床し、25°C, 暗黒下で培養することによりカルス誘導を行った。

## (3) キク科カルスによる紅色色素の生産

キク科植物から誘導したカルスを、それぞれKG固体培地で10世代以上の継代培養したものを本実験に供

した。新鮮培地に移植し7日目の、直径が約2cm程度に生育した細胞塊を、KG固体培地の表面に滅菌濾紙をのせた培地に無菌的にのせ、25°C, 暗黒下、4日間培養した。本培養によって、紅色色素生産能を有する細胞塊は紅色色素を生産する。紅色色素は、細胞塊が接している部分の濾紙に吸着された。

濾紙を回収し、4°Cで自然乾燥後、濾紙に吸着した紅色色素の520nmにおける吸光度を、フライングスポットスキャナー(DUAL WAVE LENGTH FLYING-SPOT SCANNER CS-9000, Shimadzu)によって測定し、ベニバナ由来のキノベオンAを標品とした検量線により紅色色素の生産量を算出した。

## (4) タンポポ培養細胞の増殖率

KG液体培地が25ml入った100ml容三角フラスコに、タンポポ培養細胞1gを植え込み25°C, 暗黒下75rpmで反復回転培養した。培養後、毎日、フラスコ毎にサンプリングし、プフナーロートで培地と細胞を分離して、細胞の湿重量を測定した。この値と植え込み時の湿重量との値の比より増殖率を算定した。

## (5) タンポポ培養細胞による紅色色素の生産

キノベオンAの生産培地(KP培地, **Table 1**)が25ml入った100ml容三角フラスコに、KG培地にて継代培養したタンポポ細胞(fresh wt.)を1g植え込み、25°C, 暗黒下、75rpmで反復回転培養を行った。毎日、フラスコ毎にサンプリングをし、ステンレスメッシュ(0.149mm)でセルロースパウダーと細胞とを分離し、4°Cで自然乾燥した。

乾燥したセルロースパウダー1gに対して5mlのピリジンを加え、1分間放置後、その上清の520nmにおける吸光度を分光光度計(島津UV-265)で測定し、紅色色素生産量を測定した。また、細胞の増殖率は、プフナーロートによって紅色色素生産後の細胞を回収し、細胞の重量を測定して、植え込み時の湿重量と比較することにより算出した。

## (6) タンポポ培養細胞による紅色色素の大量生産

300ml容三角フラスコに、75mlのKP培地を入れ、タンポポの培養細胞を3.5g植え込み、25°C, 暗黒下、75rpmで反復回転培養を行った。培養4日後に、培地から紅色色素が吸着したセルロースパウダーを回収し、得られたパウダーを4°Cで自然乾燥した。この操作を繰り返し、色素吸着セルロースパウダーを大量に得た。

## (7) タンポポ培養細胞由来の紅色色素の精製

紅色色素吸着セルロースパウダーを暗黒下、4°Cで自然乾燥した後、カラムに充填し( $\phi 3\text{cm} \times 50\text{cm}$ ), アセトン/メタノール(1:1, 500ml $\times$ 3)によって紅色色素を

**Table 1.** Cell growth and red pigment production media.

Material*1	Conc.(mg/l)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825
KNO <sub>3</sub>	950
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O*2	220[0]
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O*2	185[0]
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22.3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8.6
KI	0.83
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.25
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.025
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.025
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27.8
Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
myo-Inositol	100
Thiamine Hydrochloride	0.1
Pyridoxine Hydrochloride	0.5
Nicotinic Acid	0.5
Glycine	2.0
Sucrose	30000
$\alpha$ -Naphthaleneacetic Acid	0.186
N-6-Benzyladenine	0.225
D-Phenylalanine*2	0[165.19]
Cellulose Powder*2	0[40000]

\*1 0.2% gellan gum was used in the solid KG medium.

\*2 Contents were changed to [ ] in the KP medium.

溶離し、得られた溶離液を減圧下、ロータリーエバポレーターで濃縮乾固した。これに 10 ml のメタノールを加え、Sephadex LH-20 カラム ( $\phi 16$  mm  $\times$  50 cm, Bed vol. 100 cm<sup>3</sup>) に供し、メタノールを溶媒として流速 0.7 ml/min. で溶出した。溶離液は、フラクションコレクターによって、5 ml ずつ分画した。分画後、紅色色素を含むフラクションを合し、ロータリーエバポレーターによって濃縮した。濃縮物を 2 ml のメタノールに溶解して、TOYOPEARL HW-40S カラム ( $\phi 16$  mm  $\times$  50 cm, Bed vol. 100 cm<sup>3</sup>) にアプライし、メタノールを用い溶出し、フラクションコレクターによって分画した(流速 0.7 ml/min., 5 ml/fraction)。

紅色色素を含むフラクションを、Benzene/Acetone/MeOH (7:2:1) を展開溶媒としてシリカゲル TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) によって分析し純度検定を行った後、紅色スポット (*R<sub>f</sub>*, 0.39) を示す画分を回収した。本操作を繰り返し純度をあげ、TLC で単一物質であることを確認した後、メタノールを溶媒として、再結晶化を試みた。

#### (8) タンポポ培養細胞による紅色色素の機器分析

精製して得られた紅色物質の結晶を、メタノールに溶解し、分光光度計(島津 UV-265)で 200-600 nm の波長域の吸収スペクトルを測定し UV/VIS スペクトルを得た。

LC-MS スペクトルは、LC-MS 質量分析計(M-1000 型質量分析計、日立製)により、以下の条件で測定した、

イオン化法: Positive APCI

カラム: Inertsil ODS-2 4.0 mm I. D.  $\times$  150

mm 5  $\mu$ m

溶媒: MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10)

流速: 0.5 ml/min.

検出波長: 254 nm

試料注入量: 10  $\mu$ l (100 ppm)

カラム温度: 室温

噴霧器温度: 240°C

脱溶媒室温度: 399°C

ドリフト電圧: 30 V

また、紅色色素の結晶を CD<sub>3</sub>OD に溶解し、<sup>1</sup>H-NMR スペクトル (500 MHz, VXR-500 型, バリアン社製) 測定を行った。

それぞれの機器分析においては、同時にベニバナ由来のキノベオン A 標品を測定し、そのスペクトルを比較検討した。

### 3. 結果および考察

#### (1) キク科植物由来のカルスによる紅色色素の生産

キク科植物カルス由来の紅色色素の生産性について調べた結果を、Table 2 に示した。キク科植物由来の紅色色素生産性は、タンポポ、アザミでは、ベニバナと同等の生産量が見られた。ノゲシ、ゴボウにおける生産量は、ベニバナと比して低い値であった。ヤグルマギク、エゾギク、キンセンカ、ヒマワリ、シュンギクでは、わずかながらその生産を確認した。

調べたいずれのキク科由来のカルス塊も、ベニバナと同様に、培地上の濾紙に対して紅色色素を沈着することが確認できた。また、キク科植物の種類によって紅色色素の生産性が異なることも判明した。これらの種間にお

Table 2. Red pigment productivity by compositae cell cultures.

Plants	Red pigment	
	OD (520 nm)	Conc. ( $\mu$ g/ml)
Safflower ( <i>Carthamus tinctorius</i> L.) (ベニバナ)	1.52	2.8
Dandelion ( <i>Taraxacum officinale</i> Weber) (タンポポ)	1.49	2.75
Thistle ( <i>Cirsium japonicum</i> DC.) (ノアザミ)	1.45	2.67
Sow thistle ( <i>Sonchus oleraceus</i> L.) (ノゲシ)	1.0	1.84
Burdock ( <i>Arctium lappa</i> L.) (ゴボウ)	0.95	1.75
Crown daisy ( <i>Chrysanthemum coronarium</i> L.) (シュンギク)	0.47	0.87
Cornflower ( <i>Centaurea cyanus</i> L.) (ヤグルマギク)	0.47	0.87
Aster ( <i>Callistephus chinensis</i> Nees) (エゾギク)	0.33	0.61
Pot marigold ( <i>Calendula arvensis</i> L.) (キンセンカ)	0.3	0.55
Sunflower ( <i>Helianthus annuus</i> L.) (ヒマワリ)	0.29	0.52

Quantification of red pigment was carried out based on the calibration curve obtained by use of authentic kinobeon A.

Red pigment from each cell culture was identified as kinobeon A by TLC analysis.

(*R<sub>f</sub>*, 0.39, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, benzene/acetone/methanol; 7:2:1.)

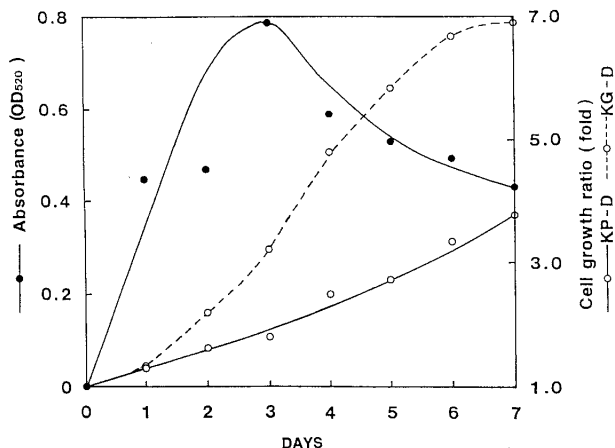


Fig. 2 Time course of growth rate and pigment production by dandelion cell culture.

- Cell growth ratio in KP medium,
- Cell growth ratio in KG medium,
- Absorbance at 520 nm.

けるキノベオン A 生産能の違いは、それぞれの種において紅色色素生産に適した培地組織が異なることも考えられる。

キク科植物によってそれぞれ生産された紅色色素を、Benzene/Acetone/MeOH (7:2:1) を展開溶媒としてシリカゲル TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) で展開すると、これらの紅色色素の R<sub>f</sub> 値はいずれも 0.39 となり、ベニバナ細胞で生産されたキノベオン A 標品の R<sub>f</sub> 値と一致した。従って、調べた限りのキク科植物の培養細胞が、すべてキノベオン A を生産している可能性が示唆された。

## (2) タンポポ培養細胞における増殖率および色素生産量の経時変化

増殖率および色素生産量の経時変化の結果を Fig. 2 に示した。タンポポ培養細胞の増殖培地 (KG 培地) における細胞増殖率は、3 日目で 3.2 倍に達しており、さらに 6 日目までほぼ直線的に増加した。一方、色素生産培地 KP 培地における細胞増殖率は、3 日目で約 1.5 倍であり、増殖培地での増殖率と比べ減少し約 1/2 であった。しかし培養時間が経過するに連れて紅色色素が生産され、セルロースパウダーへの蓄積が見られた。その蓄積は、培養 3 日目でピークに達した。ベニバナ培養細胞においても、色素生産培地 (KP 培地) 中では、紅色色素キノベオン A が生産され、セルロースパウダーに蓄積されるが、細胞の増殖はほとんど見られなかった。従って、キク科植物の培養細胞系でも、増殖培地および色素生産培地における傾向は、ベニバナ培養細胞のそれと同様であった。

## (3) タンポポ培養細胞によって生産される紅色色素の精製

乾燥した紅色色素吸着セルロースパウダー 140 g を、オープンカラム (φ3 cm×50 cm) に充填し、アセトン/メタノール (1:1) によって紅色色素を抽出した。この操作を 7 回繰り返すことによって、950 g のセルロースパウダーから 2.8 l の抽出液を得た。この抽出液をカラムクロマトグラフィーで繰り返し精製し、prep. TLC (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) によって紅色色素を含むバンドを回収した。さらに、メタノールを溶媒として、紅色色素の再結晶化を行ったところ、約 0.8 mg の紅色色素結晶 (mp., 224-226°C) が得られた。

## (4) タンポポ培養細胞により生産された紅色色素の機器分析

得られた紅色結晶およびキノベオン A 標品の機器分析値を Table 3 に示した。UV/VIS スペクトルにおける極大吸収波長は 490 nm, 520 nm であった。MS スペクトルの結果から、本紅色色素の分子量はキノベオン A と同じく、356 であることがわかった。さらに、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルの帰属は、キノベオン A の構造を支持するものであった。以上の結果および融点からタンポポ培養細胞由来の紅色色素は、キノベオン A であると同定した。

本研究では、ベニバナ培養細胞によって生産された新規紅色物質キノベオン A が、ベニバナの属するキク科植物の培養細胞をベニバナのそれと同じ条件で培養した場合、生産されるか否かを調べた。キク科植物のうち、タンポポ、アザミ、ノゲシ、ゴボウ、ヤグルマギク、エ

**Table 3.** Comparison of physicochemical properties of dandelion red pigment with those of authentic kinobeon A.

	Red pigment	Kinobeon A
Appearance	red rod	red rod (mp. 224-226°C)
Formula		C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
EI-MS m/z[M <sup>+</sup> ]	356	356
<sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ 3.74 (6H s) 3.81 (6 H s) 6.3-6.8 (6H, m) 7.06 (2H dd) 7.11 (2H s) 7.71 (2H dd)	$\delta$ 3.74 (6H s) 3.81 (6 H s) 6.63 (2H d) 7.06 (2H dd) 7.11 (2H s) 7.71 (2H dd)
UV-Vis $\lambda_{max}$ (MeOH) nm ( $\epsilon$ )	520 (63, 490)	520 (63, 490)

ゾギク、キンセンカ、ヒマワリ、シュンギクについて、今回、培養細胞系を確立し調べた結果、すべての培養細胞が、多少はあるものの、紅色色素を生産した。また、UV/VIS スペクトル、TLC 分析における特徴は標品であるキノベオン A のものと極めて酷似していた。

次に、タンポポ培養細胞を大量に培養し、紅色色素を得て、精製後、各種機器分析を行ったところ、この紅色色素はキノベオン A であることが判明した。また、TLC 分析、UV/VIS スペクトルから、調べた他のキク科植物由来の細胞が生産する紅色色素は、キノベオン A である可能性が極めて高いことが明らかとなった。

キノベオン A は、ベニバナ植物体、タンポポ植物体のどの部位からも現在のところ検出されていない。母植物に存在せず、構造的にもその母植物成分とは異なる新規な化合物が、培養細胞系において生産された例は見当たらない。今回調べたすべてのキク科由来の培養細胞がキノベオン A を生産することから、キノベオン A の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子が、キク科植物に共通に存在する可能性がある。また、今回の分析ではキノベオン A は母植物体からは見いだすことができなかった。このことは、カルス化あるいは、KP 培地中の成分などの外部刺激により遺伝子が発現したと予想できる。キク目は、モクレン目から進化したものとされ、近縁にはカリゲラ目、キキョウ目等が存在する。従って、キノベオン A の生合成に関与する酵素をコードする遺伝子は、キク目のみならず、カリゲラ目、キキョウ目、

またさらには、源流に位置しているモクレン目にも存在する可能性があり、今後の研究が待たれる。キノベオン A の生合成に関与する遺伝子群が解明され、その発現機構が明らかになれば、植物組織培養系における有用物質生産のみならず、植物を系統分類学的に分類することの一助となり得る。また、培養中の外部刺激によって、従来発見されていない新規物質を生産することが可能となると思われる。

#### 文 献

- 1) Fujita, Y., Y. Hara, C. Suga, T. Morimoto, 1981. *Plant Cell Rep.*, 1: 61-63.
- 2) Sauerwein, M., K. Yoshimatsu, K. Shimomura, 1992. *Plant Tissue Cult. Lett.*, 9: 1-9.
- 3) Ishimaru, K., M. Satake, K. Shimomura, 1990. *Plant Tissue Cult. Lett.*, 7: 153-163.
- 4) Fujita, Y., S. Takahashi, Y. Yamada, 1985. *Agric. Biol. Chem.*, 49(6): 1755-1759.
- 5) 小林昭雄, 坂本雄輝, 河津一儀, 若山祥夫, 久坂一仁, 金平 努, 工藤正昭, 秋田孝幸, 1992. 第 34 回天然有機化合物討論会講演要旨集, p. 626-633.
- 6) Kobayashi, A., K. Kawazu, S. Wakayama, K. Kusaka, 1993. 3rd workshop on primary and secondary metabolism, Leiden, Netherlands.
- 7) Wakayama, S., K. Kusaka, T. Kanehira, Y. Yamada, K. Kawazu, A. Kobayashi, 1993. 第 15 回国際植物会議, p. 368.
- 8) Wakayama, S., K. Kusaka, T. Kanehira, Y. Yamada, K. Kawazu, A. Kobayashi, 1994. *Z. Naturforsch.*, 49c: 1-5.

### Summary

A Nobel Red Pigment, Kinobeon A Produced by the Cell Culture of Composite Plants

Sachio WAKAYAMA\*, Tsutomu KANEHIRA\*, Kazuhito KUSAKA\* and Akio KOBAYASHI\*\*

\* *Kibun Foods Inc.*, 7-14-13, Ginza, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

\*\* *Osaka University*, 2-1, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Kinobeon A is a novel red pigment produced by Safflower tissue culture. This paper deals with the productivity of Kinobeon A by cell culture systems with *Compositae* plants such as dandelion, thistle, sow thistle, burdock, crown daisy, cornflower, aster, pot marigold and sunflower.

We found that all tissue cultures produced a red pigment, that showed the same  $R_f$  value on TLC as kinobeon A.

The red pigment was purified from Dandelion tissue culture and analysed for the UV-Vis spectrum, LC-MS spectrum and  $^1\text{H-NMR}$  spectrum. These results showed that the red pigment produced by Dandelion tissue culture was Kinobeon A. The red pigments produced by the other *Compositae* plants may also be kinobeon A.