

美容・健康機能性に優れた青森県ブランド素材に関する試験・研究開発

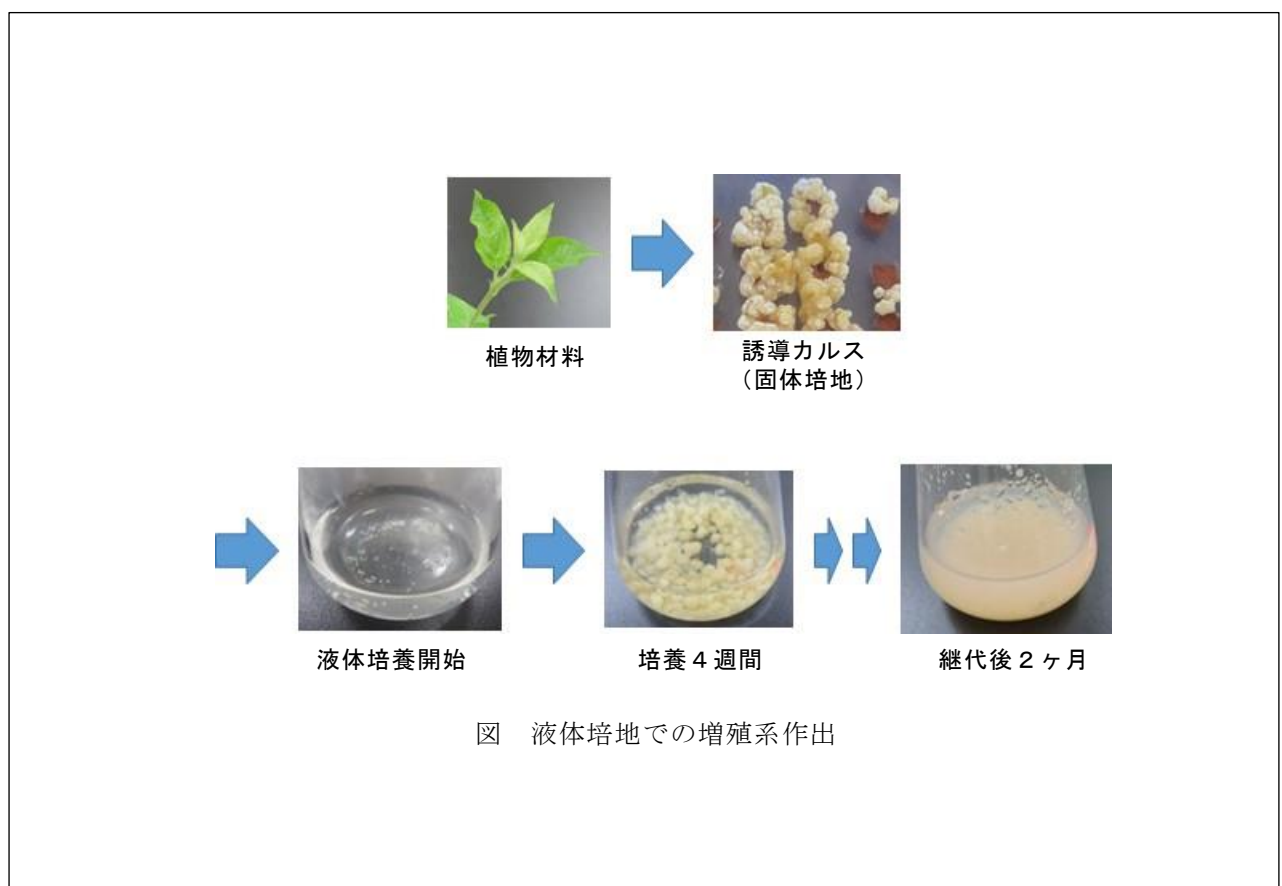
－培養による新たな県産機能性素材作出研究－

Research and development of Aomori brand materials with beauty and healthy functions

－Study on the production of new functional materials for beauty and health using plant tissue culture－

五十嵐 恵

美容・健康機能性に関わる素材開発は最近のトレンドであり、国内各地で競争が激化していることから独自性を持つ素材開発が重要である。更なる未知素材や独自素材作出の手法として、植物培養系の利用を検討した。青森県の特産果樹であるリンゴの果皮には美容健康機能性成分として期待されるトリテルペノイドが含まれており、これまでに特に果皮トリテルペノイドが多い県育成品種や、独特のトリテルペノイド成分比を示す野生種を見出している。そこで、これらを材料とした培養系を用いることで独自性のある素材開発に繋げることを目的とし、今年度は上記品種を用いて、培地成分の制御が容易な液体培養系を立ち上げた。培養物での予備的なトリテルペノイド分析を実施したところ、カルスや培地中に既知のトリテルペノイドが確認された。



1. 目的・背景

美容・健康機能性に関わる素材開発は最近のトレンドであり、国内各地で競争が激化していることから独自性を持つ素材開発が重要である。更なる未知素材や独自素材作出の手法として、植物培養系の利用を検討した。植物培養系を用いた物質生産については1980年代前後に二次代謝産物の生産系として有望と考えられ、多数の植物種において実用化が試みられたが、当時工業生産・商業レベルにまで達した例は極わずかであった。しかし、近年では新技術と組み合わせることにより実用化に繋げる試みも行われるなど、培養系の利用が再び着目されている。特に美容産業においては、培養植物由来の美容機能性素材製品を販売する企業も国内外に存在し、培養系は素材開発の有効手段の一つとして今後も期待されるものである (Georgiev et al. 2018、Kazmierski and Roszkowski 2019)。

青森県の特産果樹であるリンゴでは果皮に含まれるトリテルペノイドが美容健康機能性成分の一つとして期待されており、カルスなど培養組織においてもこれらの成分が生産されているという報告がある (Verardo et al. 2017)。これまでに特に果皮トリテルペノイドが多い県育成品種や、独特のトリテルペノイド成分比を示す野生種を見出しており、これらを材料とした培養系を用いることで独自性のある素材開発に繋がるのが期待される。今年度は上記品種を用いて、培地成分の制御がしやすい液体培養系の立ち上げと培養物での予備的なトリテルペノイド分析を実施した。

2. 実験方法

2. 1 カルス誘導

りんご研究所黒石ほ場又は藤崎ほ場に栽植されているリンゴ樹（ふじ、千雪他）から5月23日に新梢を採取した。若葉を切り離して70%エタノールに数秒、0.6%次亜塩素酸水（0.01% Tween20 含む）に15分浸すことにより表面殺菌を行い、滅菌水で3回洗浄したものからクリーンベンチ内でメスを用いて約5mm角の切片を切り出し、カルス誘導培地に置床した。カルス誘導はVerardoら(2017)が現在の一般的な品種リンゴに適していると報告した組成（MS medium、3g/l sucrose、2.0mg/l ベンジルアデニン、2.0mg/l ナフタレン酢酸（NAA）、pH5.8）の固体培地（0.8%バクトアガー）を用いた。23℃前後の暗所に静置し、極端に褐変した切片についてはNevereら(2012)の培地（10 μ m チジアズロン及び2.65 μ M NAA）に、0.05%のポリビニルピロリドン（PVP）を加えた固体培地に移植して培養を継続した。

2. 2 液体培養系作出

誘導開始から約1.5か月培養して増殖したカルスを、網サイズ約0.8mmの茶こしを用いて裏ごしした。1個の切片に由来する裏ごしカルスを100ml培養瓶中の液体培地（組成はカルス誘導培地と同じで固化剤を含まない）40mlに懸濁し、遮光した状態で23-25℃、90rpmの旋回培養を行った。液体培養開始から約1か月後に増殖したカルスを茶こしに通し、網上に残ったカルスを再度裏ごしして1/3ほどを新しい液体培地40mlに懸濁することにより継代した。カルス・培地サンプリングまでの期間で培地のみの交換を2回行った。

2. 3 カルス及び培養後培地のサンプリング

上記のように継代して2か月後の培養物を網サイズ約1.5mmのあくとり網に注ぎ、網上に残ったカルスを50mlチューブに回収した。回収カルスにMilliQ水を加えて除去する作業を3度繰り返すことにより表面の培地成分を洗浄した。更に、カルスを除いた培養後の培地についても50mlチューブに回収し、カルスサンプルと共に-30℃で保存した。

2. 4 成分抽出及び UPLC 分析

保存サンプルは凍結乾燥（東京理化工機・凍結乾燥機 FDU-2110）後、成分抽出に供した。凍結乾燥した培養後の培地（凍結前約 35ml）は 3ml のメタノール（99.5%）を加えて 10 分間超音波処理（ヤマト科学・BRANSON 2210）した後、遠心（2,000rpm、10 分）し、上清を回収して更に遠心濃縮（ThermoSavant・SPD1010 SpeedVac® System）したものを再度 1.5ml メタノールに溶解・懸濁した。カルスは凍結乾燥したサンプル 0.03-0.04g に 1ml のメタノールを加えて 10 分間超音波処理及びボルテックスで混合した。90rpm 室温で一晩振とうした後、遠心（14,000rpm、5 分）して上清を回収した。各サンプルはフィルターろ過後 UPLC によるトリテルペノイド分析に用いた。分析は ACQUITY UPLC H-Class System (Waters) により実施し、条件は以下のとおりである。

【分析条件】 使用カラム：BEH130C18、2.1x100mm、1.7 μ m

検出器：フォトダイオードアレイ（検出波長 210nm）

カラム温度：35°C、サンプル温度：8°C

移動相：メタノール：MilliQ=95:5、流速：0.12ml/min

サンプル注入量：1 μ l

リンゴ果皮における既知の機能性トリテルペノイド成分としてウルソール酸 (UA) 及びオレオノール酸 (OA) のメタノール溶液とリンゴ果皮抽出物（千雪由来クロロホルム・メタノール抽出物）も同じ条件で分析した。

3. 結果及び考察

3. 1 カルス誘導

培養開始から約 1 か月後、ふじでは 100 片中 94 片、千雪では 100 片中 72 片（ただし 21 片はカビ等のコンタミにより欠失）で葉の切り口からのカルスの発生が認められた（図 1）。

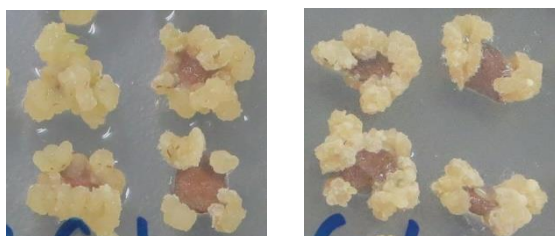


図 1 葉切片周囲から発生したカルス
（左：ふじ、右：千雪）

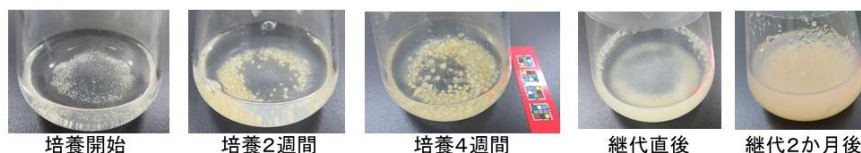
培養開始後 1 か月の葉切片。

左がふじ、右が千雪。

3. 2 液体培養系誘導

固体培地で誘導したカルスを裏ごしして液体培養したところ、ふじ・千雪共に 2 週間後には個々のカルス塊の生育が確認された。更に 2 週間生育したカルスを再度裏ごしし、途中で 2 回の培地交換を経て 2 か月培養したものでは、培地の濁りがあるもののカルスは増殖しており、継代増殖出来ているものと考えられた（図 2）。

A ふじ



B 千雪

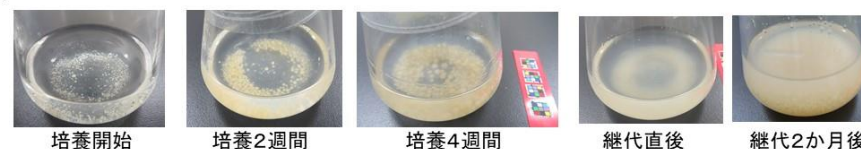


図 2 液体培地での培養経過

固体培地で誘導したカルスを液体培地に移植し、継代を経て増殖させたもの。

3. 3 培養物での機能性成分分析

継代2か月後のカルス及び培養後の培地（ただし期間内に2度の培地交換を経ているため、実質的な培養期間は回収前1週間程）を凍結乾燥し、メタノールに溶解してUPLC分析を実施したところ、培地からの抽出物に果皮で検出されるウルソール酸及びオレアノール酸と同じ保持時間（RT）のピークを検出した（図3上段）。カルス抽出物ではオレアノール酸に近いRTのピークが検出された（図3中段）。リンゴの果皮細胞ではウルソール酸やオレアノール酸は細胞外に分泌され、クチクラワックス中に存在することが知られている。液体培地で増殖したカルス細胞においても同物質が細胞外即ち培地中に放出されていると推定された。その他未同定のものも含めて検出されたピークのパターンは、果皮抽出物と類似しているものの成分比は異なっていた。培地及びカルスに共通で検出されて果皮では検出されないピークもあった。現時点ではカルスサンプルでの培地成分残留の可能性は排除できないが、ふじ及び千雪に共通に見られることから、ウルソール酸及びオレアノール酸同様にカルス細胞で作られて培地中に放出されている成分である可能性が考えられた。

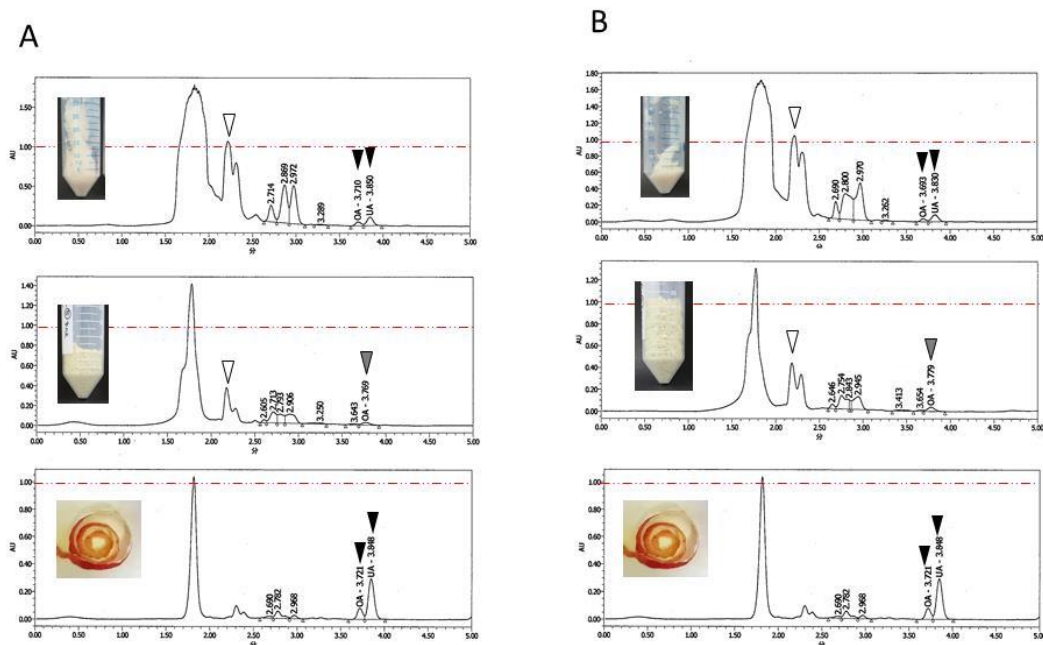


図3 培養物におけるメタノール抽出成分のクロマトグラム

A:ふじ、B:千雪。

上段は培養後培地、中段はカルスからのメタノール抽出物、下段はA・B共に千雪果皮からメタノール・クロロホルムによる抽出物。▼はウルソール酸（UA）及びオレアノール酸（OA）に相当するピーク、▽は培養後培地及びカルスに特異的なピークを示した。カルス（中段）でUA・OA付近に同定されたピーク（灰色▼）はどちらも問わずにRTがずれている。

4. まとめ

新たな機能性素材探索の一つの手段として、植物培養系の利用を検討するためにリンゴの液体増殖培養系を作出した。カルス細胞においても機能性成分であるトリテルペノイド類が合成されていることは既知であるが、今回作出したリンゴ液体培養系では当該成分の細胞外（培地中）への放出を示唆する結果が得られた。今後は特定の機能性成分についての定量を実施し、培養系における物質生産を検討することとしている。

5. 謝辞

本試験において植物材料を提供していただいたりんご研究所品種開発部各位に感謝します。

6. 参考文献

Georgiev et al. Eng. Life Sci. 2018, 18; 779-798

Kazmierski and Roszkowski Med Res J. 2019, 4(1); 52-57

Verardo et al. Phytochem. Anal. 2017, 28; 5-15.

Nevere et al. HORTSCIENCE 2012, 47(8):1117-1122.