

# ごまカルスによるリグナン性抗酸化物質の生産

大桑真由美, 星野 一宏, 赤壁 節子,  
諸橋 昭一, 笹倉 寿介

## 1. はじめに

植物は光合成能をはじめとする優れた合成能力を持ち、地球上の全生物の生存を支えている。この能力は我々が未だに化学合成できない反応をも可能であり、合成されるものには有用物質が極めて多い。このような能力を利用し、人為的に光合成等を行わせ有用物質の生産を行わせようとする技術が植物組織培養法である。近年、これらの研究が盛んになり、植物を材料とする物質生産技術が可能になってきた。植物組織培養法とは、無菌状態下において、植物体から生きている組織片を切り取り、栄養培地で無限に生育させるプロセスを指す。その中の1つであるカルス培養とは、植物組織を分化させず、未分化のままで細胞を成長・増殖させる増殖性細胞の培養であり、この細胞は遺伝子学的に同じ性質を持つという特徴がある。近年、このような培養細胞を大量に増殖させ、植物体に再分化させる栄養繁殖法は、すでに一般的な技術となっており、ランなどの植物で実用化されている。また、植物の栽培は季節などの影響のため栽培期間の限定、広大な栽培面積が必要である等の制限が多いが、カルスは四季を問わず培養でき、培養スペースについては培養器の詰みかさね可能等空間の有効利用ができるなど従来の植物栽培の難点を克服できる。このように、植物組織培養は、応用例も多く、近い将来有用物質生産についてめざましい成果をあげると期待されている<sup>1)</sup>。

本研究では、有用物質を含む植物としてごま (*Sesamum indicum* L.) に注目した。ごまは古くから食用、生薬として利用されてきた<sup>2)</sup>。例えば、ごま油は長期間、空気にさらしても酸化されにくいという性質をもつ。これは、ごま中に存在する抗酸化性物質であるリグナン物質が、油脂中または脂肪酸の酸化を防止しているためである<sup>3,4)</sup>。近年、これらの研究が盛んであり、その効力として老化防止、抗癌性があると報告されている<sup>5)</sup>。しかし、これらリグナン物質のごま中での存在場所、形、生合成過程などは未だ不明な部分が多く、現在も盛んに研究が進められている。また、ごまは、短期間で成長をとげ収穫できる植物であるが、高温高日照を必要とするため夏期の3か月間の栽培でしか収穫できず、年間収穫高は、この時の収量でしかない。

そこで、本研究では、ごまから培養条件等のコントロールを行い易い増殖性細胞（カルス）を誘導し、このカルスを用いて抗酸化性を有するリグナン物質を効率的に生産することを検討した。Fig. 1は、本研究で検討したリグ

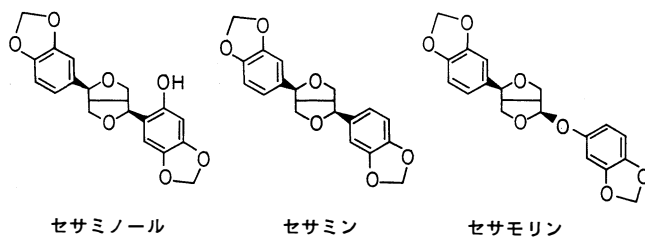


Fig. 1 ごまに含まれる抗酸化性リグナン物質の構造

ナン物質であるセサミノール、セサモリン、セサミンの構造である。ごま中のリグナン物質の大部分を占めるセサミンは、過酸化脂質中に発生するラジカルを捕捉する活性を有し、老化の原因となっている過酸化脂質の蓄積を防ぎ、また、 $\Delta 5$  不飽和酵素阻害活性や肝機能改善、降コレステロール、発癌誘発抑制などの生理活性作用を持つことが明らかになっている<sup>5-9)</sup>。

## 2. 方 法

### 2.1 実験材料および方法

ごまの種子は、サカタのタネ(株)より購入した白ごま *Sesamum indicum* L. (生産地：京都、1992年9月採種)を使用した。

実験を通じて、培地は、標準濃度のMS培地<sup>10)</sup>を使用した。炭素源としてショ糖 (30g/l) を添加した。植物ホルモン(成長調節物質)としてオーキシシンとサイトカイニンを用いた。培地のpHは、滅菌前に0.1N NaOHを用いて  $\text{pH} 5.6 \pm 0.1$  に調整した。固体培地の場合、上記MS培地に濃度が1%となるように寒天を添加した。培養器として、固体培地の場合は植物用試験管 (100mm  $\times$   $\phi$  40mm) に20mlの培地を入れ、また、液体培養の場合はメリクロン用三角フラスコ (100ml  $\times$   $\phi$  40mm) に25mlの培地を入れ、それぞれオートクレーブを用いて121℃、15分間滅菌した。培養は、温度を28℃と常に一定に保ち、6,000Luxの連続照射で行った。また、固体培養は静置、液体培養では120rpmの8の字旋回の振盪培養で行った。特にことわりがない限り、以上の培養条件で行った。

### 2.2 ごまからのカルス誘導

ごま種子から増殖性細胞、すなわちカルスを誘導する方法を以下に示す。まず、ごま種子を、無菌状態の下で、1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液で洗浄後、滅菌水で2回濯ぎ、植物用試験管に播種した。その後、恒温器中(暗所、28℃)で発芽するまで約4~5日静置培養した。発芽後、モヤシ状のごま(以下、ごまモヤシ)を1mmに切りぎみ、植物ホルモンとして2,4-ジクロロフェノキシ酢酸  $0.1 \mu\text{M}$  (以下、2,4-D)、およびカイネチン  $10 \mu\text{M}$  (以下、K) を添加した固体培地に植え、暗所恒温器中で静置培養を行った。約1週間後、カルス化した部分を植え継ぎ、その後、約1か月ごとに固体培地で継代培養を行った。

### 2.3 カルスの液体培養

誘導したカルスは、 $0.05 \mu\text{M}$  2,4-D、 $10 \mu\text{M}$  Kのホルモン濃度となるように調節したMS液体培地中で光照射下で振盪培養を行った。

### 2.4 サンプルの回収方法

増殖したカルスと培養液は、濾過することによって分離した。培養液は回収し、糖分析に供するまで冷凍庫(-30℃)中で保存した。また、濾紙に残ったカルスは、蒸留水で十分洗浄した後、濾紙(ADVANTEC, No. 131)上で軽く水分を吸収させ、湿潤状態でカルス重量を測定した。

### 2.5 リグナン物質の抽出と分析

ごまカルス中に含まれるリグナン物質の抽出および分析は以下の方法で行った。サンプリングしたカルスの重量を測定後、カルスを乳鉢ですりつぶし、一定量のメタノール(15ml)を添加し、一昼夜冷蔵庫(4℃)で放置した。このカルス-メタノール抽出液を濾過し、濾液を一定量分取した。この

メタノール画分を40℃減圧下で濃縮乾固した。ごま中に含まれるリグナン物質はグルコースが $\beta$ 結合した配糖体の形で存在していると報告されている<sup>11,12)</sup>。そこで、 $\beta$ -グルコシダーゼを利用して抽出画分を加水分解し、リグナン物質と糖を切断した。まず、残留分に0.1Nの酢酸緩衝液(pH5.0)に溶解した $\beta$ -グルコシダーゼ(メイセラーゼ, 明治製菓)を添加し、加水分解させ(30℃, 24時間), リグナン物質から配糖体を切断した。加水分解後, 酢酸エチルを用いてリグナン物質を抽出し, 酢酸エチル画分を40℃減圧下で濃縮乾固後, 一定量メタノール(1 ml)で再溶解し, これを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の試料とした。

リグナン物質の定性, 定量にはHPLCを用いた。標品のセサミノール, セサミンおよびセサモリンは, 福田ら<sup>13)</sup>およびBernt Carnmalmら<sup>14)</sup>の方法により, 市販ごま油から単離同定したものをを用いた。分析量中の3成分の同定は, Retention timeとともに標品とのCo-injectionによる方法で行った<sup>15)</sup>。成分の定量は各標品とのピーク高さより算出した。HPLC条件は, 紫外吸収計(SPD-10A), ポンプ(LC-9A)(島津製作所)を用い, カラムにはSTR ODS-IIを用い分離した。移動層は, メタノール: 水=7:3を使用し, 移動層流速は1 ml/min, また, 検出波長は290nmで室温で分離同定した。本測定法における各リグナン物質のRetention timeは, セサミノールが10min, セサミンが16min, セサモリンが23minであった。

## 2.6 リグナン物質含量に対するごまの形態の影響

ごまの形態によるリグナン物質含量は2.5に示した方法により行った。しかし,  $\beta$ -グルコシダーゼ処理は行わなかった。また, 種子, モヤシおよびカルスの含水率は, それぞれを湿潤状態の重量を測定後, 80℃で24時間乾燥させた重量を測定し, その割合を算出した。

## 2.7 リグナン物質前駆体添加の影響

培地成分にリグナン物質前駆体を添加し, リグナン物質の生産影響について検討した。選択した前駆体は, *L*-フェニルアラニン(以下, *L*-Phe), *L*-チロシン(以下, *L*-Tyr), *trans*-桂皮酸, *p*-クマル酸, カフェ酸, フェルラ酸, コニフェリルアルコール(和光純薬工業)である。各前駆体を培地調整時に1 mMとなるように培地中に添加し, 滅菌後, 無菌状態でpH5.6 $\pm$ 0.1に再調整した。その後, 液体振盪培養で30日間培養を行った。

## 2.8 リグナン物質の誘導

培地成分にフェノール系化合物を添加し, リグナン物質の生産影響について検討した。使用したフェノール系化合物として, バニリン, アセトバニロン, クロロゲン酸, ナリンギン, *p*-ヒドロキシアニソ酸(和光純薬工業)を用いた。各フェノール系化合物を1 mMとなるように培地中に添加し, 30日間液体振盪培養を行った。

# 3. 結果と考察

## 3.1 リグナン物質含量に対するごまの形態の影響

植物は, 根, 茎, 葉, 花, 種子のように生理活性の維持, 子孫繁栄などの目的のためそれぞれの細胞が異なった形態をとって形成しており, 各細胞が同一遺伝子を有しているものの, その機能, 能力は異なる。そのため, 同一植物体でも各細胞内成分, 生成物は異なってくる。そこで, ごまの形態による生成物の違いについて検討した。まず, ごまの種子, モヤシ, カルスの状態について調べた。ご

形態	セサミノール	セサモリン	セサミン	含水率 [%]
種子 <sup>a)</sup>	0	$4.30 \times 10^2$	$5.72 \times 10^3$	3.2
モヤシ <sup>b)</sup>	27.1	0	0.59	93
カルス <sup>c)</sup>	1.98	0.44	0.51	94

Table. 1 ごまの形態の違いによるリグナン物質含有量

- a) 種子 1 g 中に含まれるリグナン物質含有量 [ $\mu\text{g/g}$ ]  
b) モヤシ 1 g 中に含まれるリグナン物質含有量 [ $\mu\text{g/g}$ ]  
c) カルス 1 g 中に含まれるリグナン物質含有量 [ $\mu\text{g/g}$ ]

ま種子は、白色で長さ2.5mmの扁平な倒卵状であった。ごま種子を固体培地に播種後、培養6日目で大約6～7cm、双葉が黄色のモヤシとなった。また、ごまカルスは、液体培養30日目で直径2cmの緑色の塊となった。

Table. 1は、ごまの各形態の違いによる各リグナン物質含有量を示す。ごま種子中には、セサモリン、セサミンはそれぞれ種子1gあたり0.43, 5.72mg存在していたが、セサミノールは検出されなかった。ごまモヤシ中には、セサミノール、セサミンはそれぞれ27.1, 0.59 $\mu\text{g}$ 存在していたが、セサモリンは検出されなかった。また、ごまカルス中には、セサミノール、セサモリン、セサミンがそれぞれ1.98, 0.44, 0.51 $\mu\text{g}$ 存在していた。種子は後者の2つに比べて、含水率が3.2%と極めて少なく、また、これらリグナン物質は水よりも油に溶けやすいため、リグナン物質含有量が高くなったと考えられる。しかし、モヤシおよびカルスは、種子中には見られなかったセサミノールを多く含んでいた。これは、種子よりも水分が多く含んでいるため、代謝により生産されたセサミン、セサモリンが反応し、より極性の高いセサミノール、あるいはその配糖体を生成し、蓄積すると報告されている結果と一致する<sup>6,18)</sup>。さらに、このセサミノールは、セサミン、セサモリンよりも抗酸化性が高いと報告されており<sup>15)</sup>、セサミノールの効率的生産のためにごまカルスを用いることは極めて有効であると考えられる。そこで、リグナン物質の含量は少ないものの、増殖が速く、取扱いの容易なごまカルスを用いて、抗酸化性リグナン物質の生産について検討を行った。

### 3.2 ごまカルスの回分培養

ごまカルスの増殖とカルス中のリグナン物質生産の

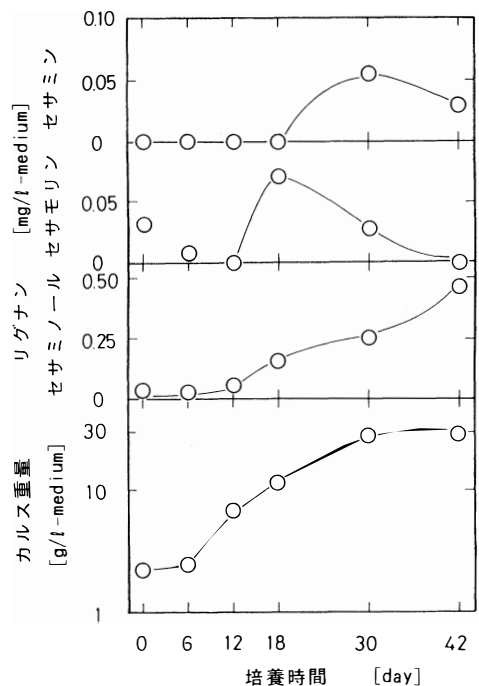


Fig. 2 ごまカルスの回分培養

関係について検討した。Fig. 2は、ごまカルスの液体振盪培養を42日間行った結果を示す。ごまカルスは、培養6日目から対数的に増殖が始まり、培養30日目ではほぼ増殖が停止し、カルス重量は約28 g/l-mediumとなった。ごまカルスに含まれるセサミノール、セサモリン、セサミンは、それぞれ最大0.47 (培養42日目)、0.07 (18日目)、0.06 (30日目) mg/l-medium生産され、抗酸化性の高いセサミノールを大量に生産できることがわかった。また、これらの物質は、増殖後期から定常期 (培養18日以降) の間で生産されていることから、リグナン物質の生合成は二次代謝の形で行われていると考えられる。

### 3.3 リグナン物質前駆体添加の影響

Fig. 3は一般に知られている植物による炭水化物からのリグナン物質生合成経路を示す<sup>17)</sup>。光合成によって得られた炭水化物は、シキミ酸経路を経て芳香族アミノ酸であるL-Phe, L-Tyrとなる。これらアミノ酸を脱アミノ化し、桂皮酸類を生合成する。この桂皮酸類が代謝されフェルラ酸が生じ、アルコールに還元された後、脱水素重合により二量化が起こりリグナン物質が生合成される。

また、Fig. 2に示したごまカルスの回分培養の結果より、セサミノール、セサモリン、セサミン等のリグナン物質生合成は二次代謝経路上にあると考えられる。そこで、この経路上に存在する二次代謝経路上のフェニルプロパン系化合物(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)の桂皮酸類、およびtrans-桂皮酸前駆体であるL-Phe, L-Tyrを培地中に添加することにより、二次代謝経路の存在確認ができ、さらに、リグナン物質生合成速度の向上に有利であると考えられる。Fig. 4は、各フェニルプロパン系化合物を培地中に1 mMとなるように添加し、30日間振盪培養したときの各リグナン物質の生産量を示す。Fig. 4より、カルスの増殖は、前駆体無添加の場合、36.4g/l-mediumも増殖したのに対して、trans-桂皮酸、p-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸などの桂皮酸類を添加した場合、1.26~10.7g/l-mediumであり、あまり増殖しないことがわかった。また、リグナン物質生産

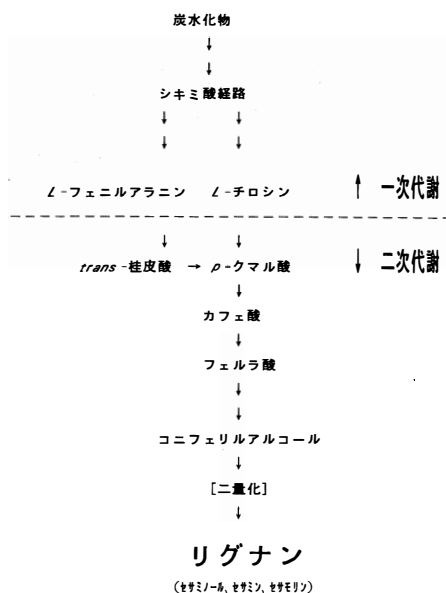


Fig. 3 リグナン物質生合成経路

添加物 [1mM]	カルス 重量 [g/l- medium]	セサミノール [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15	セサモリン [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15	セサミン [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15
無添加	36.4			
L-フェニル アラニン	31.0			
L-チロシン	18.9			
trans-桂皮酸	1.56			
p-クマル酸	1.26			
カフェ酸	10.7			
フェルラ酸	2.15			
コニフェリル アルコール	28.1			

Fig. 4 ごまカルスによるリグナン物質生産におけるリグナン物質前駆体の添加影響

は、無添加の場合、セサミノール0.07mg/l-medium, セサモリンおよびセサミンを各0.02mg/l-mediumと比較的良好に生産しているものの、桂皮酸類の添加はいずれの場合も少なく、セサモリンおよびセサミンは0.01mg/l-medium以下で、セサミノールは全く生産しなかった。しかし、これらの前駆体である*L*-Pheは、無添加と同等に増殖がよく、セサミノールの生産を無添加と比較して約2倍(0.14mg/l-medium)に高めることができた。また、*L*-Tyrは、増殖はあまりよくはなく無添加の場合の50%であったが、セサミノール、セサミンの生産をそれぞれ1.5, 4.5倍高めることができた。また、リグナン物質へ二量化する前の前駆体であるコニフェリルアルコールの添加は、セサモリン、セサミンの生産をそれぞれ約2倍高めることができた。したがって、カルボキシル基を存する桂皮酸類は、カルス増殖とリグナン物質生産に悪い影響を与えることがわかった。しかし、二次代謝経路の上流にある*L*-Phe, *L*-Tyrと二量化する前のコニフェリルアルコールの添加によりリグナン物質の生産量が向上することから、セサミノール、セサミンの生合成を効率的に行うためには、Fig. 3に示したリグナン生合成経路上の前駆体を選択し添加することが効果的であると考えられる。

### 3.4 リグナン物質の誘導

次に、さらに効率良くリグナン物質を生産するためにフェノール系化合物の添加効果について検討した。

Fig. 5は、フェノール系化合物を1mMとなるよう培地中に添加し、30日間振盪培養したときの各リグナン物質の生産量を示す。添加したフェノール系化合物の中でバニリンは、増殖に全く影響せず、セサミノール生産は0.19mg/l-mediumと無添加の場合と比較して約2.6倍と最も高めることができた。また、*p*-ヒドロキシ安息香酸の添加は、増殖には好ましくなく、無添加の場合の約25%と低くなったが、セサミノール、セサモリン、セサミン生産がそれぞれ0.10, 0.12, 0.07mg/l-mediumであり、無添加と比較して、それぞれ1.4, 7.5, 3.7倍高めることができた。したがって、フェノール系化合物の添加は、抗酸化性の高いセサミノール生産量を高めるのに有効であることがわかった。

添加物 [1mM]	カルス 重量 [g/l- medium]	セサミノール [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15	セサモリン [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15	セサミン [mg/l-medium] 0.05 0.10 0.15
無添加	36.4			
バニリン	36.4			
アセトバニロン	14.3			
クロロゲン酸	18.2			
ナリンギン	21.0			
<i>p</i> -ヒドロキシ 安息香酸	8.71			

Fig. 5 ごまカルスによるリグナン物質生産におけるフェノール系化合物の添加影響

## 4. ま と め

本研究では、植物組織培養法の1つであるカルス培養を用いて、ごま特有の抗酸化性物質であるリグナン物質の生産について検討した。その結果、ごまはカルス化することにより種子中には見られなかった抗酸化性の高いセサミノールを生合成し、カルス中に蓄積した。このときのセサミノール生産量は培養42日目0.47mg/l-mediumであった。また、芳香族アミノ酸である*L*-Phe, *L*-Tyrの添加、およびフェノール系化合物であるバニリンの添加はリグナン物質生産量を1.5~4.5倍に高めることが

できた。

#### 引用文献

- 1) 清水碩, 芦原坦, 作田正明: 植物組織培養入門, オーム社 (1992).
- 2) 並木満夫, 小林貞作: ごまの科学, 朝倉書店 (1989).
- 3) 福田靖子, 大澤俊彦, 並木満夫: 日本食品工業学会誌, **28**(8), 461-464 (1981).
- 4) Y.Fukuda, M.Nagata, T.Osawa and M.Namiki: *Agric.Biol.Chem.*, **50**, 857-862 (1986).
- 5) N.Hirose, F.Do, T.Ueki, K.Akazawa, K.Chijiwa, M.Sugano, K.Akimoto, S.Shimizu and H.Yamada: *ANTICANCER RESEARCH*, **12**, 1259-1266 (1992).
- 6) 栗山健一, 無類井建夫: 日本農芸化学会誌, **69**(6)703-705 (1995).
- 7) S.Shimizu, K.Akimoto, Y.Shinmen, H.Kawashima, M.Sugano and H.Yamada: *LIPIDS*, **26**(7) 512-516 (1991).
- 8) 浅見純生, 秋元健吾, 阿部圭一, 赤松剛, 小西恭子, 清水昌, 菅野道広, 山田秀明: 1993年度日本農芸化学会講演要旨集, **67**, 501 (1993).
- 9) R.Umeda-Sawada, Y.Fujiwara and O.Igarashi: *Biosci.Biotech.Biochem.*, **58**, 2114-2115 (1994).
- 10) T.Murashige and F.Skoog: *Physiol.Plant.*, **15**, 473-497 (1962).
- 11) 栗山健一, 土屋欣也, 無類井建夫: 日本農芸化学会誌, **67**(12), 1693-1700 (1993).
- 12) 栗山健一, 無類井建夫: 日本農芸化学会誌, **67**(12), 1701-1705 (1993).
- 13) 福田靖子, 大澤俊彦, 川岸舜朗, 並木満夫: 日本食品工業学会誌, **35**, 483-486 (1988).
- 14) B.Carntmalm, H.Erdyman and Z.Pelchowicz: *Acta Chem.Second.*, **9**, 1111-1118 (1955).
- 15) Y.Fukuda, M.Nagata, T.Osawa and M.Namiki: *JAOCs*, **63**, 1027-1031 (1986).
- 16) M.Nagata, T.Osawa, M.Namiki, Y.Fukuda and T.Ozaki: *Agric.Biol.Chem.*, **51**, 1285-1289 (1987).
- 17) 石倉成行: 植物代謝生理学, 森北出版, (1987).
- 18) 大桑真由美, 星野一宏, 笹倉寿介, 増田恭次郎, 山田恭司: 平成7年度日本生物工学会講演要旨集, p.91 (1995).

## Production of Lignan Antioxidant Materials by Cluster-Cultured Sesame Cells (*Sesamum indicum* L.)

Mayumi Okuwa, Kazuhiro Hoshino, Setuko Akakabe,  
Shoichi Morohashi, and Toshisuke Sasakura

For a long time, sesame seeds and oil have been used for foodstuffs and/or medicals, and it had been suggested that they have strong antioxidative activity. Recently, it was found that this activity attributed to lignan materials such as sesamin and sesamolin existed in sesame seed and/or oil. In this study, sesame callus was induced from sesame seed to effectively produce the useful lignan materials. In shaking culture of the induced callus for 42 days, sesaminol was produced in the callus at the level of 0.47 mg/l-medium, which unproduced in sesame seed and exhibited a higher antioxidant activity than sesamin and sesamolin. Moreover, by adding precursors (*L*-Phe, *L*-Tyr), or phenolic materials (vanillin) to medium, the amounts of lignan antioxidant materials produced can be 1.5~4.5-fold higher than those without.

〔英文和訳〕

## ごまカルスによるリグナン性抗酸化物質の生産

大桑真由美, 星野 一宏, 赤壁 節子,  
諸橋 昭一, 笹倉 寿介

ごまは、古くから、食用、生薬として利用され、酸化されにくいという性質があることがわかってきた。近年、この抗酸化作用は、ごま中に含まれるセサミン、セサモリンなどのリグナン性抗酸化物質であることが明らかになってきた。そこで、本研究ではこの有用なリグナン物質を効率よく生産するため、ごま種子からカルスを誘導した。ごまカルスは、振盪培養42日目で、ごま種子中には見られなかったセサミノールを0.47mg/l-medium生産した。このセサミノールはセサミン、セサモリンよりも抗酸化性が高い物質であると報告されている。また、前駆体 (*L*-フェニルアラニン, *L*-チロシン) や、フェノール系化合物 (バニリン) を培地中に添加することによってリグナン物質生産量を1.5~4.5倍高めることができた。