ノ ー ト

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi

Vol. 71, No. 6, pp. 605~606, 1997]

ローズマリー培養細胞によるシソニンの生産

橋本 修, 水谷 裕, 中島路可

(墨総合研究所)

平成 8 年 12 月 10 日 受 理

Production of Shisonin in Rosemary

(Rosemarinus officinalis L.)

Tissue Culture.

Osamu HASHIMOTO, Hiroshi MIZUTANI,

and Ruka NAKASHIMA

Sumi Research & Development Center,

20 Minamikutan, Konobunakajima,

Bisai, Aichi, 494

Two rosemary cell lines that produce pigments only in the light, and even in the dark, respectively, were screened after repeatedly subculturing pigmented cell aggregates. The main pigment produced in the dark was identified as shisonin, 3-O-((E)-p-coumaryl-β-glucosyl)-5-O-(β-glucosyl) cyanidin, which is the main anthocyanin in the leaf of shiso (*Perilla ocimoides*).

(Received December 10, 1996)

Key words : rosemary ; anthocyanin ; shisonin

アントシアニンは比較的安定性に優れた天然色素であるため、収量や品質が自然条件によって影響されるという問題点が有りながら、最近の消費者の天然品志向もあって、多くの需要が有る⁽¹⁾。そのため、一定品質で安定供給することが可能であると考えられる植物組織培養によるアントシアニンの生産に関する研究が広く行われている⁽²⁻⁴⁾。

今回著者らは、地中海沿岸地方原産のシソ科に属するハーブ植物であるローズマリー(*Rosmarinus officinalis* L.)から培養細胞を誘導し、その培養によりアントシアニンを生産することに成功した。

新鮮なローズマリーの幼芽の表面殺菌を行った後、それを2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D) 0.2 ppm, カイネチン 0.2 ppm, ショ糖 3%を添加して寒天(0.8%)で固化した pH 5.8 の Murashige-Skoog (MS)

基本培地上に置床し、25°C, 蛍光灯照明下の明所(約3,000ルクス)で培養することによって白色カルスを誘導した。

得られた白色カルスから細胞小集塊選抜法⁽⁵⁾の繰り返しにより、明所においてのみ赤色色素を生産する光要求性株と、明所及び暗所において赤色色素を生産する光非要求性株を得た。

色素生産に関して、光要求性細胞が明所で生産した色素、光非要求性細胞が暗所で生産した色素、及びシソ科赤シソ(*Perilla ocimoides*)の葉に含まれる色素のHPLC分析の結果をFig.1に示した。

HPLC分析の結果から、光要求性細胞及び光非要求性細胞が生産したそれぞれの色素組成は異なり、光非要求性細胞が生産した主要色素のピークはシソ科赤シソ(*Perilla ocimoides*)の葉に含まれる主要色素のピークと保持時間が一致した。

そこで、光非要求性細胞(新鮮重量1.0 kg)から主要色素(25 mg)を単離し、酸加水分解、アルカリ加水分解、及び過酸化水素分解によって、アグリコン、糖、及び、有機酸を決定し、UV-VIS スペクトル、FAB-MS スペクトル、及び¹H-NMR スペクトルから構造を解析した。その結果、シソ科赤シソ(*Perilla ocimoides*)

Fig. 1 ローズマリー培養細胞が生産した色素、及び赤シソの葉に含まれる色素のHPLC分析

I : 光要求性ローズマリー培養細胞が明所で生産した色素

II : 光非要求性ローズマリー培養細胞が暗所で生産した色素

III : 赤シソの葉に含まれる色素

の葉に含まれるシソニン^(6,7), すなわち 3-O-((E)-p-coumaryl-β-glucosyl)-5-O-(β-glucosyl)cyanidin であると同定された。

実 験

1. 試料 シソ色素は食品添加物用の市販のものを使用した。
2. 色素精製及び単離 1%塩酸水溶液で抽出した赤色色素を合成吸着樹脂アンバーライト XAD-7 (ORGANO) を担体とするカラムクロマトグラフィー及び顆粒状純セルロース CC 31 (WHATMAN) を担体とするカラムクロマトグラフィーによる精製後, 分取セルロース TLC (MERCK) によって赤色色素を含むバンドを回収し, 暗赤色色素結晶を得た。
3. HPLC 分析 カラムは YMC J'sphere ODS-M 80 (4.6×150 mm) を用い, 移動相は 0.05%塩酸を含むメタノール/水 (0:100) から出発し, 70 分後に (95:5) となる直線グラジエントを用い, 流速は 0.5 ml/min で溶出し, 530 nm の可視光で検出した。
4. 機器分析 UV-VIS スペクトルは分光光度計 (JASCO Ubest-55) により, また, FAB-MS スペクトルは質量分析計 (JEOL SX 102 A) によって測定した。¹H-NMR スペクトル及び NOE スペクトルは 500 MHz の核磁気共鳴分光計 (JEOL A-5000) を用い, DMSO-d₆/TFA-d₁ (9:1) 溶媒で測定した。
5. 光非要求性細胞が生産した主要色素 3-O-((E)-p-coumaryl-β-glucosyl)-5-O-(β-glucosyl)cyanidin

UV-VIS spectrum $\lambda_{\text{VIS,max}}$: 526 nm ($\log \epsilon = 4.50$)

$\lambda_{\text{UV,max}}$: 313 nm, 293 nm, 279 nm

A_{440}/A_{526} : 10.3% A_{330}/A_{526} : 62.7%

AlCl₃shift: +

FAB-MS(matrix: glycerol)m/z 757[M]⁺

¹H-NMR: 8.78(s, Cya-H₄), 6.90(d, J=2 Hz, Cya-H₆)

6.96(d, J=2 Hz, Cya-H₈), 8.00(d, J=2.2 Hz, Cya-H₂)

7.03(d, J=8.8 Hz, Cya-H₅'), 8.22(dd, J=2.2 Hz, 8.8 Hz, Cya-H₆'), 5.48 (d, J=7.8 Hz, 3-Glu-H₁), 3.1~4.5(m, 3-Glu-H_{2,3,4,5,6}), 5.05(d, J=7.8 Hz, 5-Glu-H₁), 3.1~4.5(m, 5-Glu-H_{2,3,4,5,6}), 6.26(d, J=15.9 Hz, p-Cou-H α), 7.35(d, J=15.9 Hz, p-Cou-H β)

7.37(d, J=8.6 Hz, p-Cou-H₂ & ₆), 6.74(d, J=8.5 Hz, p-Cou-H₃ & ₅), NOE(3-Glu-H₁ to Cya-H₄)-53.7%

NOE(5-Glu-H₁ to Cya-H₆)-30.3%

- (1) 清水孝重, 中村幹雄: 概説 食用天然色素, 3-36 (1993).
- (2) Y. Yamamoto, Y. Kinoshita, S. Watanabe and Y. Yamada: *Agric. Biol. Chem.*, **53** (2), 417-423 (1989).
- (3) H. Mizukami, M. Nakamura, K. Tomita and K. Higuchi: *Plant Tissue Cult. Lett.*, **8** (1), 14-20 (1991).
- (4) 香田隆俊, 市隆人, 吉光稔, 二本木淑恵, 関谷次郎: 日本食品工業学会誌, **39** (10), 839-844 (1992).
- (5) 福井三郎, 山田康之: 植物培養細胞の変異と選抜, 57-110 (1985).
- (6) T. Kondo, H. Tamura, K. Yoshida and T. Goto: *Agric. Biol. Chem.*, **53** (3), 797-800 (1989).
- (7) K. Yoshida, T. Kondo, K. Kameda and T. Goto: *Agric. Biol. Chem.*, **54** (7), 1745-1751 (1990).