培養根と母植物根への金属の取り込みの比較 —セイヨウアカネ及びカンゾウについて—

(平成3年7月3日受理)

佐藤 恭子^{*1} 合田 幸広^{*1} 山 崎 壮^{*1}
米谷 民雄^{*1} 義平 邦利^{*1}

Comparative Uptakes of Metals into Cultured Roots and Mother Plants

Kyoko SATO, Yukihiro GODA, Takeshi YAMAZAKI, Tamio MAITANI
and Kunitoshi YOSHIHARA

(National Institute of Hygienic Sciences: 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan)

The comparative uptakes of metals by cultured roots and the roots of the corresponding mother plant were studied to estimate the transference of metals to food additives produced by means of tissue-culture techniques. The normal cultured roots of *Rubia tinctorum* and *Glycyrrhiza glabra* were induced in Murashige and Skoog (MS) medium containing phytohormones (indole-3-acetic acid and kinetin). The concentrations of various metals (Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Mo, Cu) in the normal cultured roots of *R. tinctorum* and *G. glabra*, the hairy roots of *R. tinctorum* and the roots of both mother plants were determined by ICP-AES. The concentrations of Mn, Zn, Mo in the cultured roots were one order of magnitude higher than those in the roots of the mother plants. The uptake ratio of Cu from the medium was the highest and those of Zn and Mo were also high among the metals in MS medium. On the other hand, the mother plants exhibited the greatest uptake of Ca from the soil, while the uptake of Fe was significantly low.

(Received July 3, 1991)

Key words: 天然食品添加物 natural food additives; 培養細胞 cultured cell; 金属 metal; 母植物 mother plant; セイヨウアカネ *Rubia tinctorum* L.; カンゾウ *Glycyrrhiza glabra* L.; 培養根 cultured roots; 植物ホルモン phytohormone; 高周波誘導結合プラズマ発光分光 inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES)

緒 言

自然環境に左右されない有用二次代謝産物の大量生産法として、食品分野でも組織培養法などバイオテクノロジーを利用した手法が注目を浴びているが、同時に、これらの手法で得られる生産物の、安全性についての知見を蓄積することが求められている。医薬品分野に比べ食品分野では、バイオテクノロジーにより得られた生産物が、十分な精製を受けることなく市場に出回る可能性があるため、目的二次代謝産物の副次生成物のような有機化合物に加えて、培地から移行する微量金属についても考慮する必要がある。著者らはバイオテクノロジーによ

る生産物の安全性評価の観点から、培養細胞中の微量金属含量¹⁾や毛状根による培地からのヒ素の取り込み²⁾を明らかにしてきた。本研究では、各種ホルモン条件下で培養された培養正常根と毛状根への7種の金属の取り込みを、母植物根のそれと比較し、両者の違いについて比較した。対象としては、根で有用物質が生産されるセイヨウアカネとカンゾウを選んだ。

実験方法

1. 母植物体及びその周辺の土壌

セイヨウアカネ (*Rubia tinctorum* L., アカネ科) とカンゾウ (*Glycyrrhiza glabra* L., マメ科)、及びそれらが栽培されていた圃場の土は、国立衛生試験所筑波薬用植物栽培試験場から分与された。

^{*1} 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

Table 1. Recoveries of Metals^{a)} from Hairy Roots of *Rubia tinctorum*

Added (mg/g)	Ca 2	Mg 1	Fe 0.5	Mn 0.5	Zn 0.5	Mo 0.05	Cu 0.005
Recovery (%)	92	94	110	96	105	102	108

^{a)} Each value shows the average of duplicate samples.

2. 培養根の誘導

1) セイヨウアカネ毛状根: 種子より発芽させた無菌植物体の茎切片と *Agrobacterium rhizogenes* との共存培養法³⁾により得⁴⁾, Murashige and Skoog (MS) 液体培地⁵⁾ (ショ糖濃度 3%, 植物ホルモン無添加) 中 25° で暗所振とう培養し, 1 か月ごとに継代し維持したものをを用いた。

2) セイヨウアカネ培養正常根: 植物体より樹立した無菌植物体を, MS 固形培地 (ゲランガム濃度 0.2%) で 1 か月ごとに継代し維持した。無菌植物の葉切片 (約 3 mm 角) を, 植物ホルモン (インドール酢酸 (IAA) 5 または 15 μ M, 及び, カイネチン 0 または 0.5 μ M) を添加した MS 固形培地に移し, 25° 暗所で 18 週間培養した。得られた不定根 (正常根) を同一組成の液体培地で 4 週間静置培養した後, 50 ml の MS 液体培地の入った 100 ml 容三角フラスコ中で振とう培養した。1 か月ごとに継代を繰り返すことにより, 安定して増殖する培養正常根を得た。

3) カンゾウ培養正常根: 植物体より樹立した無菌植物体を, MS 固形培地で 1 か月ごとに継代し維持した。無菌植物の葉切片 (約 5 mm 角) を, 植物ホルモン (IAA 15 μ M, 及び, カイネチン 0 または 0.5 μ M) を添加した MS 固形培地に移し, 25° 暗所で 10 週間培養した。不定根形成を伴ったカルスが得られたので, それを同一組成の液体培地に移植し, 6 週間振とう培養を行った。その後, 1 か月ごとに継代を繰り返すことにより, 安定して増殖する培養正常根を得た。

3. 金属測定用試料溶液の調製

金属の分析には, 50 ml の MS 培地の入った三角フラスコ中で, 1 か月間培養した培養根を用いた。なお, 必要に応じて, 三角フラスコ 1~3 個分の培養根を合わせて 1 検体とした。

培養根及び母植物根を蒸留水で洗浄し, 乾燥器 (80° 以下) で乾燥した。培養根及び母植物根の乾燥物 0.1~0.5 g を 30 ml 容ビーカーに入れ, 赤外線ランプとホットプレートにより炭化した。次に電気炉 (450°) で 2 日間灰化した。冷後, 過酸化水素水 0.5 ml, 及び濃塩酸 0.5 ml を加え, ホットプレートで乾固した後, 灰分を 0.1 N 硝酸 5 ml に溶解し, 金属測定用試料溶液とした。母植物が栽培されていた圃場の土壌についても, 同様の方法で灰化し, 分析した。

4. 金属の定量

金属の定量には, 真空多元素同時分析型 ICP 発光分析装置 (Thermo-Jarrell Ash 製 ICAP-61) を用いた。

結 果

1. 植物ホルモンの培養根の成長に与える影響

セイヨウアカネの場合, 5 μ M の IAA を添加した培地では, カイネチン添加の有無に関わらず, 培養根は黄色の細い根であった。また, 15 μ M の IAA を添加した培地では, 培養根は橙色の太い根であり, 15 μ M の IAA と 0.5 μ M のカイネチンを両方添加した培地では, 黄色の細く短い根が密集した培養根が得られた。

一方, カンゾウの場合には, 得られた培養根は, カイネチン添加の有無に関わらず, 短い根を持つ細胞塊の形態を有していた。

2. 灰化操作における金属の添加回収実験

ビーカーにセイヨウアカネ毛状根 0.1 g を量り採り, 各金属の標準溶液を添加し, 実験方法の 3 に従って, 試験溶液を調製した。なお添加量は, 予試験で得られた培養根中の金属含量を参考にして決めた。各金属の添加量と回収率を Table 1 に示す。回収率は 92~110% と良好であった。

3. セイヨウアカネの培養正常根, 毛状根及び母植物根への金属の取り込み

MS 液体培地で 1 か月間培養して収穫したセイヨウアカネ培養正常根と毛状根, 及び圃場で栽培した母植物の根中の金属濃度を, MS 液体培地中及び母植物が栽培されていた土壌中の金属濃度とともに, Table 2 に示す。Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Mo, Cu の 7 種の金属の分析を実施した。

植物ホルモンの IAA を 15 μ M 添加した場合には, Fe, Mn, Zn, Mo, Cu の濃度が低かった。植物ホルモンのカイネチンの影響は, 15 μ M IAA 添加時の Mn と Mo で顕著であり, 金属の取り込みに関しては, IAA の影響を打ち消す方向に作用した。毛状根の金属濃度は, 正常培養根の 5 μ M IAA 添加の場合に似ていた。

一方, MS 培地とは金属濃度が全く異なる土壌で栽培された母植物根中の金属含量は, 培養正常根及び毛状根の場合と異なり, Mn, Zn, Mo 濃度が低かった。

4. カンゾウの培養正常根及び母植物根への金属の取り込み

MS 液体培地で 1 か月間培養して収穫したカンゾウ培養正常根, 及び圃場で栽培した母植物の根中の金属濃度

Table 2. Concentrations of Metals in Cultured Roots of *Rubia tinctorum*^{a)}, MS Medium^{b)}, Mother Plant^{a)} and Soil^{a)}

Roots	IAA (μM)	Kinetin (μM)	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Mo	Cu
Hairy			5.7	1.1	0.26	0.81	0.43	0.020	0.003
Normal	5	0	4.1	0.81	0.30	0.54	0.78	0.031	0.005
	5	0.5	3.8	0.61	0.38	0.69	0.61	0.028	0.006
	15	0	3.0	0.58	0.17	0.15	0.14	0.002	0.002
	15	0.5	5.1	0.90	0.15	0.37	0.23	0.009	0.002
MS Medium			0.12	0.037	0.0056	0.0055	0.0020	1.0×10^{-4}	6.0×10^{-6}
Plant			8.3	2.1	0.34	0.039	0.031	0.002	0.010
Soil			2.2	2.6	45	0.87	0.060	0.066	0.060

The root cultures of *R. tinctorum* for hairy roots and normal roots were performed in MS medium for 1 month.

^{a)} Each value shows the average of duplicate samples (mg/g dry weight).

^{b)} mg/ml medium

Table 3. Concentrations of Metals in Cultured Roots of *Glycyrrhiza glabra*^{a)}, MS Medium^{b)}, Mother Plant^{a)} and Soil^{a)}

Roots	IAA (μM)	Kinetin (μM)	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Mo	Cu
Normal	15	0	2.2	2.0	0.36	0.29	0.40	0.038	0.005
	15	0.5	2.4	2.2	0.55	0.22	0.43	0.073	0.007
MS Medium			0.12	0.037	0.0056	0.0055	0.0020	1.0×10^{-4}	6.0×10^{-6}
Plant			9.0	2.6	0.11	0.033	0.011	0.001	0.015
Soil			1.0	3.8	62	1.2	0.090	0.086	0.093

The root cultures of *G. glabra* for normal roots were performed in MS medium for 1 month.

^{a)} Each value shows the average of duplicate samples (mg/g dry weight).

^{b)} mg/ml medium

Table 4. Uptake Ratios of Metals in Cultured Roots^{a)} and Mother Plants^{b)}

Roots	IAA (μM)	Kinetin (μM)	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn	Mo	Cu
<i>R. tinctorum</i>									
Hairy			48	31	46	147	215	200	500
Normal	5	0	34	22	54	98	390	310	833
	5	0.5	32	17	68	126	305	280	1000
	15	0	25	16	30	27	70	20	333
	15	0.5	43	25	27	67	115	90	333
Plant			3.8	0.81	0.0075	0.045	0.51	0.030	0.2
<i>G. glabra</i>									
Normal	15	0	18	56	64	53	200	380	833
	15	0.5	20	62	98	40	215	730	1167
Plant			9.0	0.68	0.0018	0.028	0.12	0.012	0.2

^{a)} Value shows the uptake ratio (concentration of metal in cultured roots (mg/g dry weight)/concentration of metal in MS medium (mg/ml liquid medium)).

^{b)} Value shows the uptake ratio (concentration of metal in mother plants (mg/g dry weight)/concentration of metal in soil (mg/g dry weight)).

を、MS 液体培地中及び母植物が栽培されていた土壤中の金属濃度とともに、Table 3 に示す。

15 μ M IAA 添加時のカイネチンの影響は、セイヨウアカネの場合よりも小さく、Fe と Mo においてのみ、大きな差が認められた。

母植物根中の金属含量は、培養正常根よりもセイヨウアカネ母植物根のそれに類似していた。

5. 培養正常根、毛状根、及び母植物根への金属の移行率

培地中あるいは土壤中の金属濃度が変われば、培養根や母植物中の金属濃度は変わると考えられる。そのため、金属の移行を調べるためには、移行率で表現した方が植物の特性がより明らかになると考え、培地から培養根への金属の移行率（培養根中の金属濃度 (mg/g 乾燥重量) / MS 培地中の金属濃度 (mg/ml)）及び土壌から母植物根への金属の移行率（母植物根中の金属濃度 (mg/g 乾燥重量) / 土壌中の金属濃度 (mg/g 乾燥重量)）を計算した。結果を Table 4 に示す。

培養根では、セイヨウアカネ及びカンゾウとも、Cu の移行率が最も高かった（約 300~1200）。また、セイヨウアカネ培養正常根の 15 μ M IAA 添加時を除き、Zn (200~400) と Mo (200~700) の移行率も高かった。このように MS 液体培地中濃度が低いものが、一般的に移行率が高かった。

一方、母植物根では、セイヨウアカネ及びカンゾウへの Fe の移行率が著しく低く、それぞれ、0.008 及び 0.002 であった。反対に Ca の移行率はそれぞれ 4 及び 9 と最高であった。培養根で高い移行率を示した Cu の移行率は、母植物根では高くはなかった。

考 察

セイヨウアカネの根で生産されるアントラキノン系色素を主色素とする色素は、天然着色料として用いられている。「化学的合成品以外の食品添加物リスト」⁶⁾ には、アカネ色素の名で登録されている。一方、カンゾウの根からもフラボノイド系色素を主色素とするカンゾウ色素が得られ、上記リストにも収載されているが、同じ根から得られるグリチルリチンが甘味料として広く用いられている。本研究ではバイオテクノロジーの一分野である組織培養法を用いて生産される食品添加物の、安全性についての知見を得る目的で、セイヨウアカネとカンゾウの培養根を誘導し、それぞれの金属の取り込みを母植物の場合と比較した。

MS 培地と土壌とは金属濃度に著しい差があるにもかかわらず、培養根中の Ca, Mg, Fe, Cu の濃度は、母植物根中のものと大差がなかった (Table 2, 3)。このことから、これら 4 種の金属については、培養根が母植物根から関係なく、植物が必要な一定レベルの量を周囲から取り込んでいるとも解釈される。一方、Mn, Zn, Mo は、培養根中に母植物根よりも 10 倍以上高濃度に含まれてい

た。このため、培養根から着色料や甘味料を抽出した場合には、母植物から抽出した場合に比べ、これらの重金属含量が高くなる可能性がある。製品化の際には、有害金属²⁾ばかりでなく、必須金属の含量についても配慮する必要があると思われる。

移行率という観点から結果を考察すると、培地中金属の培養根への移行率と、土壌中金属の母植物への移行率には、著しい相違がみられた。すなわち、培地中の金属では Cu の移行率が最も高く、Zn や Mo も高かったが、Ca, Mg, Fe の移行率は低かった。他方、土壌中の金属の場合は、Ca の移行率が最高で、全般的に低く、特に Fe の移行率が著しく低かった。

移行率は植物の種類により変わり、また培地や土壌中の金属濃度にも影響されると考えられる。圃場土壌には MS 培地と比べて Fe と Cu が著しく多い（1 万倍程度）ので、金属の移行率でみると母植物根では Fe と Cu の移行率が低くなったとも考えられる。しかしそれ以外に、培地と土壌中における金属の化学形も大きな要因と考えられる。植物が利用しやすい、すなわち、植物にとって bioavailability の高い化学形の場合は当然移行率が高く、逆の場合は低いであろう。

培地中の金属の多くは利用できる形で存在していると考えられる。その中で Cu が最も高い移行率を示した。第一遷移系列に属する金属のキレート化合物の安定度については、Irving-Williams の序列⁷⁾といわれる強さの序列があり、その中で Cu は最も強く配位子と結合する金属である。また SH 基とも強く結合する⁸⁾。そのため、植物では、根から吸収されても葉などにはそれほど移行せず、根に集積する傾向がある⁹⁾。今回の培養においても、その高い結合性が現われたと解釈される。この Cu の高い移行率は、著者らが既に報告した食用ニンジン及びアカネ培養細胞でも認められている¹⁾。

土壌中の金属では、Fe の移行率が最も低かった。土壌中には、微細化した岩石や、人工的な鉄粉などが存在するが、遊離したものは、不溶性の Fe (III) の塩を形成しやすい。従って、土壌中に多量に Fe が存在していても、そのほとんどは植物が容易に利用できる形態のものではないと推察される。そのため土壌中の Fe の移行率が極めて低かったとも解釈できる。

一方、土壌中の金属では Ca が最高の移行率を示した。我が国は火山国であり、大地中の Ca 濃度は低いが、土壌中の炭酸塩もほとんどないといわれている^{*2)}。そのため、Ca は少量しか含まれないが、可溶性の形で存在していると考えられ、植物が容易に取り込めたと解釈できる。

IAA などのオーキシン処理により細胞壁は伸びやす

*2) 丁子哲治, 平井英二, 宮崎元一, 早川和一, 能村京子, 中川千枝: 第 5 回金属の関与する生体関連反応シムポジウム講演要旨集, 109~111 (1991)。

くなり、その結果として植物細胞の吸水成長を促進すると考えられている^{10), 11)}。一方、カイネチンはオーキシン共存下では、細胞分裂促進作用の他に、根の成長阻害作用などを示す。今回、高濃度の IAA を添加した時には培養根中金属濃度が低かったが、このことは培養根の一次代謝の活発さの程度と関係づけられるかもしれない。

以上のように、MS 培地で培養したセイヨウアカネ及びカンゾウ培養根では、いくつかの金属濃度が母植物よりも 1 桁高かった。今後、組織培養を利用して得られる生産物を食品添加物として用いることを考える場合には、用いた培地からの金属の移行について、考慮する必要があると考えられた。

ま と め

植物としてセイヨウアカネ及びカンゾウを用い、植物ホルモンとして IAA 及びカイネチンを用いて誘導した培養根への培地中金属の取り込みを、母植物根への土壤中金属の取り込みと比較した。

培養根中の Mn, Zn, Mo 濃度は母植物根中よりも、1 桁高かった。一方、培地と圃場土壌ではその金属組成が大きく異なるにもかかわらず、培養根と母植物根中の、Ca, Mg, Fe, Cu 濃度には大きな差はなかった。

移行率については、培地中の金属では Cu が最も高く（約 300～1200）、Zn や Mo も高かった。一方、土壌中の金属の移行率では、Ca が最も高く（約 4～9）、Fe の移行率は 0.01 以下と著しく低かった。

以上の結果は、MS 培地と土壌中の金属の濃度及び存在形態の違いによるものと考えられる。

謝 辞

セイヨウアカネ及びカンゾウの植物体及び植物体の栽

培されていた圃場の土を分与くださった佐竹元吉前当所筑波薬用植物栽培試験場長（現生薬部長）に感謝します。

本研究は、ヒューマンサイエンス振興財団基礎研究事業費により行った。

文 献

- 1) 山崎 壮, 義平邦利: 植物組織培養 4, 95～96 (1987).
- 2) Sato, K., Maitani, T., Yoshihira, K.: J. Food Hyg. Soc. Japan 32, 414～419 (1991).
- 3) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S. G. Fraley, R. T.: Science 227, 1,229～1,231 (1985).
- 4) Sato, K., Yamazaki, T., Okuyama, E., Yoshihira, K., Shimomura, K.: Phytochemistry 30, 1,507～1,509 (1991).
- 5) Murashige, T., Skoog, F.: Physiologia Plantarum 15, 473～497 (1962).
- 6) 厚生省生活衛生局食品化学課編: “化学的合成品以外の食品添加物リスト第 1 版” p. 15 (1989), 社会保険出版社.
- 7) Irving, H., Williams, R. J. P.: J. Chem. Soc. 3, 192～3,210 (1953).
- 8) Suzuki, K. T., Maitani, T.: Biochem. J. 199, 289～295 (1981).
- 9) Fitter, A. H., Hay, R. K. M. 著, 大田安定, 森下豊昭, 橘泰憲, 岩橋 誠訳: “植物の環境と生理” p. 243 (1985) 学会出版センター.
- 10) 倉石 晋: “植物ホルモン (第 2 版)” (1988) 東京大学出版会.
- 11) Davies, P. J. ed.: “Auxin and Cell Elongation in Plant Hormones and Thier Role in Plant Growth and Development”, p. 132～148 (1987) Martinus Nijhoff Publishers.