

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06324

研究課題名(和文) サフラン柱頭組織を分化誘導する培養条件の解明と分化組織の光透過選抜法の開発

研究課題名(英文) In vitro production of pistil-like structures differentiated from highly responsible explants prepared from the floral axes stem which performed light transmission of *Crocus sativus*

研究代表者

角谷 晃司 (Kakutani, Koji)

近畿大学・薬学総合研究所・教授

研究者番号：10257983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：サフランの柱頭組織(めしべ)は生薬・香料・染料・食品として多用されている。めしべを収穫するためには多大な労力が必要であり、植物個体から少量しか得ることができないため、本研究では、花茎組織から柱頭様組織を効率的に分化できる培養条件を明らかにした。また、柱頭様組織の分化に適した花茎組織部の光透過選抜法についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、サフランの柱頭組織(めしべ)を収穫するためには、広大な面積の栽培と多大な労力が必要であったが、今回明らかにした植物培養技術によって柱頭様組織を大量かつ安定かつ大量に供給できる可能性を示した。また、光透過選抜法は花茎組織から柱頭様組織の分化に必要な適切な部分を選抜するための技術となる。

研究成果の概要(英文)：The pistil tissue of the saffron are used many as a crude drug, fragrance, dye, food. Great labor is necessary to harvest a large quantity of pistils. The flowering plants with 15 cm-long floral axes were used to prepare explants for culture, the explants produced pistil-like structures (PLS) at the cut edge of the explant. Furthermore, the light transmission method enabled the selection of the part suitable for PLS production from a floral axes.

研究分野：植物細胞工学

キーワード：サフラン 柱頭様組織 光透過法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サフランは、西南アジア原産のアヤメ科の多年草で、乾燥させた柱頭組織(めしべ)を生薬・香料・染料として用いられている。柱頭組織に含まれる赤色成分クロシンには鎮静、鎮痛、抗腫瘍効果、動脈硬化症の予防効果、子宮収縮作用、通経作用の他、月経前症候群(PMS)の改善効果、さらに、記憶機能亢進効果、抗鬱作用等の様々な効果が報告されている。

サフランは、スペイン、イランおよび中国などの諸外国の輸入が大半を占めているが、わが国では大分県竹田市において伝統的な「かご栽培」により生産されている。近年、国際情勢上サフランの安定な供給が不可能になりつつあり、有用資源を安定供給するためにも、人工栽培や組織培養技術を活用したサフランの大量生産技術の開発が急務である。



サフラン植物 柱頭組織

一方、サフランについて、我々は人工栽培法の増殖法以外に、植物組織培養法について検証したところ、収穫後に不要となった花茎組織の培養により、高い濃度のクロシンを産生する柱頭様組織が分化することを見出した。この培養は、分割した花茎組織の培養温度がキープポイントであり、10~20℃で培養するとカルスが誘導されるのに対し、20~30℃に上昇させると、柱頭様組織が効率的に分化することを見出した。

しかしながら、これまでの柱頭様組織の誘導試験において、分割したすべての花茎組織切片から柱頭様組織の誘導は起こらず、限られた特定の部位で誘導する傾向があった。しかし、この誘導は、分割した花茎組織のどの部分が誘導に適しているのか、また、培養の温度を変化させることによって、カルスから柱頭様組織に分化するののかについては不明であり、これらの現象の変化の細胞レベルでの画像解析技術を開発することで、サフランの柱頭様組織の大量生産の可能性が考えられた。

2. 研究の目的

サフランの生育サイクルは、4月から9月頃が休眠期、9月中旬より萌芽、11月より出蕾、開花期となり、落花後、葉の繁茂による球根の肥大化の成長期、さらに2月から3月頃小球が分球する繁殖期である。サフランは限られた期間(2週間)に一斉に開花するため、柱頭組織の採取には多大な労力がかかり、生産者にとって最も大きな問題とされている。このような問題を克服し、柱頭組織を年間を通して安定に生産するためには、花茎組織を用いた柱頭組織誘導培養システムを確立する必要があると考えた。

3. 研究の方法

(1) 柱頭様組織誘導の植物ホルモンの影響解析

室内でサフランを栽培し、開花後の花茎組織を採取し、滅菌後、5mmの長さに分割し、0.3% gellan gum と 6% sucrose および植物ホルモンを含む 1/2 濃度の MS 改変培地 (pH:5.7) 上に置床し、10~20℃の人工気象器(日本医科機器:LH-241SP)で培養した(光非照射条件)。植物ホルモンとして、6-benzylaminopurine (BAP) と 1-naphthaleneacetic acid (NAA) を組み合わせ、培地に最終濃度が 0~5 mg/L となるようにそれぞれ添加した。分割した花茎組織の各部位について、

カルス誘導または柱頭様組織の再分化率を調査した。

(2) 柱頭様組織誘導の温度影響解析

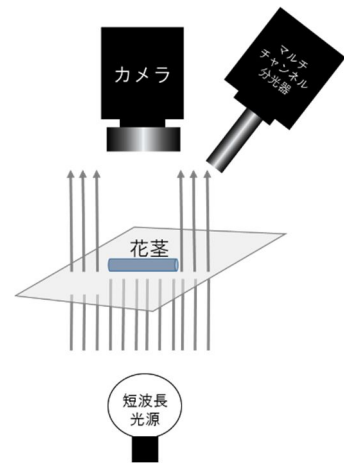
約1ヶ月間10~20℃で培養した花茎組織を20~30℃の培養条件に移し、柱頭様組織の誘導を調査した。分割した花茎組織の各部位について、カルス誘導または柱頭様組織の再分化率を調査した。

(3) 柱頭様組織誘導のクロシン含量の HPLC 分析

柱頭様組織誘導のクロシン含量は HPLC により分析する。クロシンの分析条件として、HPLC 装置：Shimadzu LC-20AT 型液体高速クロマトグラフ、カラム：TOSOH TSKgel ODS-120T (5 μm、150×4.6 mm I.D.)、移動相：メタノール/水 = 50/50 (v/v)、流速：1.0 ml/min、カラム温度 40℃、脱気装置：Shimadzu DGU-20A、検出器：Shimadzu SPD-20AV、測定波長：438 nm、で行った。

(4) 柱頭様誘導組織の光透過非破壊画像解析

光透過非破壊画像解析法として、実体顕微鏡（オリンパス社：SZX10）に接続したマイクロSCOPEカメラ（Visualix 社：Visualix Pro2）を用いたシステムを構築した。また、実体顕微鏡のステージに置かれた花茎組織には、400~500nm 波長の発光ダイオード（LED）ランプ（昭和電工社製）の光照射を行い、ファイバマルチチャンネル分光器（オーシャンオプティクス社製）を用いて、花茎組織の吸収波長と吸収値を算出した。光吸収値の統計解析を行うことにより、柱頭様組織に誘導する花茎組織の特定化のための適正吸収値を算出した。



4. 研究成果

(1) 花茎組織からの柱頭様組織の再分化

様々な植物ホルモンを組み合わせた培地で、植物組織を培養すると様々な組織を分化させることができる。今回、開花前後のサフラン花茎組織を用い、NAA および BAP を添加した MS 固形培地で培養を行った。各濃度区における培養1か月目の組織分化を観察した（図1）。

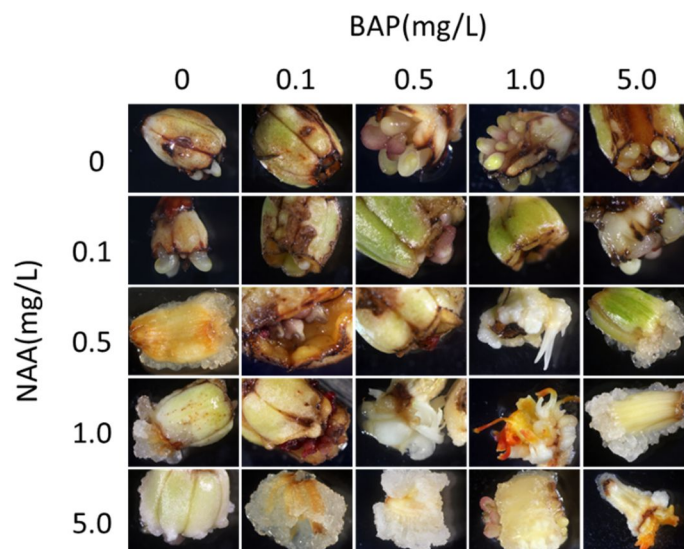


図1 植物ホルモン添加試験区ごとの分化組織

その結果、BAP の濃度が増加するに従い小球原基の形成率は増加し、また NAA を添加することにより小球原基は肥大化する傾向が認められた。また、NAA および BAP の高い濃度区においては、カルス誘導が顕著に認められた。一方で、花茎組織を NAA と BAP が等しい濃度区で培養したところ、柱頭様組織の形成が観察されたことから、BAP と NAA の濃度比率が等しいほど柱頭様組織を形成しやすいことがわかった。次に培養温度をそれぞれ変えて培養を行った。培養 2 か月目までの組織分化を観察した結果、18 度では柱頭様組織はほとんど見られず、25 度では柱頭様組織の形成は観察されたが、あまり形成率は高くなかった。一方、18 度 1 か月間の温度処理後 25 度に移したものであるものでは、花茎からの分化形成率は 22.2%まで増加した。このことから、18 度の温度処理から 25 度に移す温度条件が柱頭様組織を形成しやすいことが示された。また、花茎から分化形成された柱頭様組織数を調査したところ、一本の花茎あたりに柱頭様組織は 24 本まで形成された (図 2)。



図 2 花茎から分化した柱頭様組織

(2) 柱頭様組織の crocin 分析

サフランの各組織と柱頭様組織およびカルスに含有する crocin を HPLC により分析した。柱頭、花弁、葉、葯、柱頭様組織、カルスの crocin 産生について HPLC 分析したところ、花弁、葉、葯およびカルスでは検出されなかったものの、柱頭および柱頭様組織においてのみ crocin の産生が確認された(図 3)。

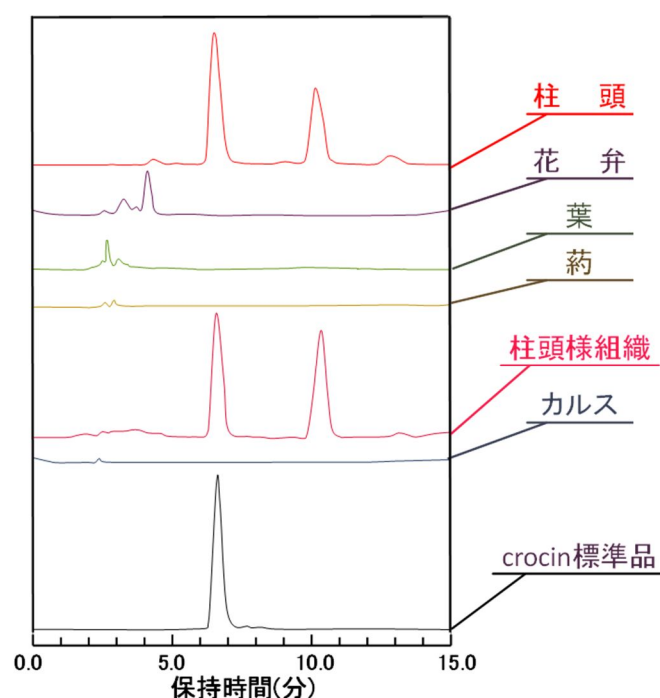


図 3 各組織の crocin の HPLC 分析

また、今回、花茎から分化形成された柱頭様組織から crocin を抽出し、その含量を定量した。サフラン 1 球根あたり採取できる花茎から形成される柱頭様組織の crocin 含量を算出したところ、およそ 120mg となった。これは露地栽培でのサフラン 1 個体あたりの crocin 含量である 60mg の 2 倍の量を生産できることが示された。

(3) 柱頭様誘導組織の光透過非破壊画像解析

本年度は、花茎切片に限られた部位を効率的に選抜するための光透過選抜法について調査した。今回、柱頭組織を分化する花茎組織切片に、300nm~700nm の光を照射したところ、400~480nm 付近で吸収がみられた。また、青(475nm)、緑(525nm)および赤(630nm)の単波長を照射したところ、緑および赤光は透過したが、青光において吸収が確認されたところから、特定の波長を照射することにより、分化誘導に適した切片部分を選抜することができた(図4)。

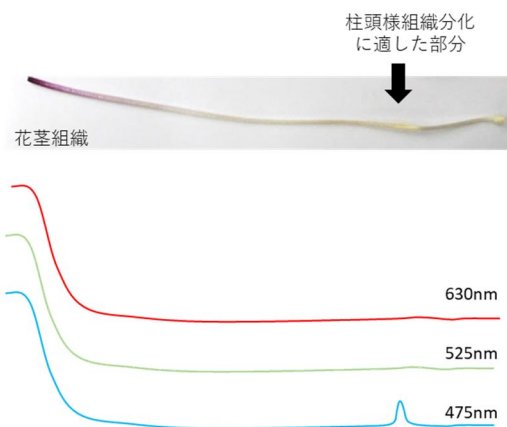


図4 光透過法による花茎組織の選抜

また、花茎組織切片の色素成分を分析したところ、微量のカロテノイド成分の生成が確認されたことから、カロテノイドの吸収波長である 430~480nm の青光が、柱頭組織を誘導する花茎組織の選抜に適していると考えられた。

今回明らかにした条件は、これまで、広大な栽培面積と収穫のための多大な労力が必要であった栽培と収穫作業を、植物培養技術ならびに光透過選抜法を活用することによって柱頭様組織を大量に生産することができると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 角谷 晃司
2. 発表標題 組織培養技術を用いたサフラン (Crocus sativus L.) 雌蕊様組織の分化・増殖に関する研究
3. 学会等名 日本生薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角谷晃司、西野恵理、金丸真也
2. 発表標題 廃棄素材を用いた carotenoid 開裂酸化酵素 2 による crocetin dialdehyde ならびに crocetin の効率的な産生
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 森川敏生、角谷晃司、他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 353
3. 書名 スパイス・ハーブの機能と応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学薬学総合研究所機能性植物工学研究室ホームページ
<https://www.phar.kindai.ac.jp/planteng/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------