

Stevia rebaudiana 組織培養による stevioside、rebaudioside A の生産

岡崎光雄・重松典宏・島 嘉輝・重富博志・小野道之・下坂 誠

信州大学繊維学部応用生物科学科

(遺伝子工学講座)

ステビア (*Stevia rebaudiana* Bertoni) は南米パラグアイ原産のキク科の多年生草本であり、その茎葉にはグルコースの100~400倍の甘味をもつ甘味配糖体を含むことが知られている¹⁾。天然の甘味資源植物として注目され、栽培や甘味配糖体の定量について数多くの研究が行われてきた。しかし、本植物は育種改良が加えられていないこともあり、その生産性は向上していない²⁾。我が国では需要のほとんどを輸入に頼っているが、生産条件の安定化のためにも、大規模な培養プラント等による生産が望まれる。本研究は、ステビア甘味配糖体 (stevioside、rebaudioside A) の器官培養による生産を目指したものである。

現在実用化している植物の培養細胞による物質生産は、ほとんどが高生産カルス細胞によるものである。ステビアの場合にも甘味配糖体を高生産するカルス系統の樹立が望まれた。しかし、これまでのいくつかの研究は、カルスによる甘味配糖体の生産が困難であることを示唆している³⁻⁵⁾。ステビアの甘味配糖体は葉に多く含有されていることから、本研究では、シュートの器官培養による物質生産システムの確立を目指して以下の実験を行った。同様の器官培養による物質生産システムとしては、根に多く含有されるアルカロイド類を毛状根等で生産させた例があるが、シュートを用いた例は数少ない^{6,7)}、⁸⁾。

これまでのステビアの組織培養に関する研究の多くは、シュートの増殖 (クローン増殖) を目的として数多く行われてきた^{1,9-12)}。これは、ステビア種子のほとんどが発芽能力を欠き、また育種された培養品種が無いことから、効率のよい増殖方法の確立が望まれたためであった。その中で、マルチプルシュート (多分枝性のシュート) の形成条件として、YANGらは、6-benzyladenine⁹⁾ (10 mg/l)、TAMURAらは、kinetin (10 mg/l) を報告しているが、培養条件における甘味配糖体の高生産条件の検討は行っていない¹¹⁾。本実験では、数種の植物ホルモンを組合せた条件で、1節を含む茎切片を培養し、シュートの増殖と甘味配糖体の生産性の良い条件を検討した。

材料および方法

1. 材料

栽培株 (山陽国策パルプ岩国研究部より分譲) は、本学部付属農場内で鉢植えとして栽培した。

2. 茎切片の調整

茎頂から下方に第5節までを節ごとに切り取り、洗浄後、70%エタノールに10秒、10% H₂O₂水溶液に15分間攪拌して殺菌し、滅菌水で3回洗浄した。これを1節を含む茎切片(約1 cm)として植え込み材料とした。また、継代には、50日間培養したシュートから1節を含む茎切片(約1 cm)を調整して用いた。

3. 培地の調整

培地は、Murashige and Skoog 培地 (MS 培地)¹³⁾を用い、サッカロースを3% (w/v)、各濃度の植物ホルモンを添加し、pH 5.8に調整した。寒天(組織培養用寒天 TC-6、伊那食品㈱)の濃度は0.6% (w/v)を用いた。培地は、中型試験管(直径16.5×165 mm)、300ml三角フラスコ、または、500mlの坂口フラスコに分注、綿栓の後、オートクレーブ(120℃)中で15分間滅菌した。植物ホルモンは、kinetin (Kin)、6-benzyl-adenine (BA)、1-naphthaleneacetic acid (NAA)を少量のエタノールまたは KOH 溶液に溶解して培地に添加した。各実験区のホルモン濃度および組合せは Table I ~IVに示すとおりである。

4. 培養条件

温度は、24±2℃、照明は、約2,500 lux (ナショナル、FLR40S・W/M-X・36)で照明時間は18時間照明、30~60日間培養した。振盪培養では、70~100 rpmの旋回振盪で行った。詳細は Table I ~IIIに示した。

5. バイオリアクターによる培養

多目的連続式バイオリアクター (TBR-1 千代田製作所㈱)を使用した。設定条件は、回転数350 rpm、通気量0.5 vvm、温度27℃で行った。

6. 甘味配糖体の定量

TLC-デンシトメトリー法により測定した。^{14,15)}シュートより葉のみを採取、24℃で24時間乾燥させ、メタノールを添加、室温で24時間浸漬して抽出液とした。フィルター濾過 (Advantec TOYO, No. 1)した濾液を、遠心濃縮器で濃縮乾個し、メタノールに溶解して、試料溶液とした。試料溶液は、HPTLCプレート Kieselgel 60F254 (Merck 社製)に1~5 μlをスポットし、乾燥後、展開溶媒(酢酸エチル:イソプロパノール:n-ブタノール:蒸留水=100:60:35:30)により展開した。発色は、50%硫酸を TLCプレート面に噴霧し、120℃、10分間乾熱して行った。測定は、デンシトメーター(島津二波長フライングスポットスキャナー CS-9000)を用いて、反射リニアスキャンモード(波長395 nm)で行った。スポットの定性と定量には市販の標準品(stevioside 99.6%、rebaudioside A 99%和光純薬㈱)を用いた。

結果および考察

1. 寒天培地による培養

添加ホルモンとしては BA と NAA の組合わせを用いた。Table I に示すように、ホルモンの無添加培地、BA (10^{-4} ~ 10^{-7} M) および NAA (10^{-4} ~ 10^{-7} M) を添加した MS 培地を用いた。寒天濃度は、予備実験より、増殖阻害の少ない 0.6% とした。50 日間培養の結果を Table I に示す。ホルモン無添加培地、BA (10^{-4} M) および NAA (10^{-4} M) を単独または組み合わせ

Table I Effects of benzyladenine (BA) and/or naphthalene-acetic acid (NAA) on sweet diterpene glucoside contents and shoot morphology in shoot cultures of *S. rebaudiana*

Phytohormone (M)		Sweet diterpene glucoside content		Morphology of shoots ^{a)}
BA	NAA	Stevioside	Rebaudioside A	
0	0	— ^{b)}	—	—
10^{-6}	0	—	—	—
10^{-5}	0	$1.13 \pm 0.12^c)$	0.30 ± 0.01	M
10^{-4}	0	—	—	—
0	10^{-7}	1.46 ± 0.18	1.30 ± 0.36	M+S
10^{-6}	10^{-7}	1.74 ± 0.36	0.46 ± 0.11	M
10^{-5}	10^{-7}	2.19 ± 0.21	0.65 ± 0.26	M
10^{-4}	10^{-7}	0.24 ± 0.06	0.11 ± 0.01	M+S
0	10^{-6}	0.68 ± 0.24	0.40 ± 0.09	S
10^{-6}	10^{-6}	—	—	—
10^{-5}	10^{-6}	0.70 ± 0.04	0.25 ± 0.02	M
10^{-4}	10^{-6}	—	—	—
0	10^{-5}	0.57 ± 0.16	0.45 ± 0.15	S
10^{-6}	10^{-5}	—	—	—
10^{-5}	10^{-5}	0.48 ± 0.05	0.51 ± 0.06	S
10^{-4}	10^{-5}	—	—	—
0	10^{-4}	—	—	—
10^{-6}	10^{-4}	—	—	—
10^{-5}	10^{-4}	—	—	—
10^{-4}	10^{-4}	—	—	—

a) M ; multiple shoot, S ; single shoot

b) no growth

c) % of the dry weight of leaves

Stem cuttings were cultured on media containing 0.6% agar and various combinations of BA and/or NAA for 50 days.

Sweet diterpene glucosides were extracted from leaves.

Values are the averages of 10 replicates \pm S.D.

て含む培地では、シュートの伸長が、ほとんどないか、きわめて悪かった。例外的に、BA (10^{-4} M) と NAA (10^{-7} M) の組合せの場合のみある程度の伸長がみられた。伸長したシュー

トをその形態により分類した。分枝の著しいものをマルチプルシュート、分枝のないものをシングルシュートとして区別した。増殖の割合は、マルチプルシュートを形成する条件で良い傾向を示したが、はっきりとしなかった（不掲載）。甘味配糖体の含量は、マルチプルシュートを形成する条件で高い傾向を示した。steviosideはBA (10^{-4} M) とNAA (10^{-7} M) を含む条件で、rebaudioside Aは、NAA (10^{-7} M) 単独の条件でそれぞれ最高値を示し、両物質の生産にはNAA (10^{-7} M) の組合せの条件が良いことが示された。

2. 液体培地による培養

大規模プラントでの培養増殖のためには、液体培養が一般に有利であると考えられている。そこで液体培地での培養条件を検討した。まず、中型試験管で50日間培養を行った (Table II)。

Table II Effects of benzyladenine (BA) or kinetin (Kin) on sweet diterpene glucoside contents and shoot morphology in shoot cultures of *S. rebaudiana*

Phytohormone (M)	Stevioside	Rebaudioside A	Morphology of shoots ^{a)}
BA	10^{-7}	$1.51 \pm 0.06^b)$	S
	10^{-6}	2.71 ± 0.14	M
	10^{-5}	1.61 ± 0.03	M
	10^{-4}	0.01 ± 0.00	S
Kin	10^{-7}	1.49 ± 0.58	S
	10^{-6}	5.89 ± 0.85	M
	10^{-5}	1.49 ± 0.01	M
	10^{-4}	0.22 ± 0.06	M

a) M : multiple shoot, S ; single shoot

b) % of the dry weight of leaves

Stem cutting was cultured in liquid medium of 20 ml test tube, and was shaken at 70 rpm for 50 days.

Sweet diterpene glucosides were extracted from leaves.

Values are the averages of 10 replicates \pm S.D.

添加ホルモンは予備実験から、BA または Kin の単独で用いた。BA、Kin いずれの場合も 10^{-6} および 10^{-5} M で増殖と甘味配糖体の生産性が良かった。この条件ではマルチプルシュートを形成した。甘味配糖体含量は寒天培地に較べ高く、特に Kin (10^{-6} M) の条件では、栽培株の含量 (stevioside 6.14%、rebaudioside A 4.0%、岡崎ら未発表データ) に近いものであった。

つぎに、500mlの坂口フラスコにこれらのシュートの茎切片を継代し、60日間培養を行った (Table III)。シュートの形態は中型試験管の場合と同様であったが、Kin (10^{-6} M) 以外の条件では、茎葉が離散し、カルス化する傾向がみられた。また、葉の色調が淡く、20日間以上の培養では全ての条件で褐変した。これは、振盪により傷害によるものと考えられた。甘味配糖体の含量は依然として、寒天培地より高い傾向を示した。

Table III Effects of benzyladenine (BA) or kinetin (Kin) on sweet diterpene glucoside contents and shoot morphology in shoot cultures of *S. rebaudiana*

Phytohormone (M)		Stevioside	Rebaudioside A	Morphology of shoot ^{a)}
BA	10 ⁻⁶	0.13±0.03 ^{b)}	0.03±0.01	M
	10 ⁻⁵	2.34±0.10	0.17±0.04	M
Kin	10 ⁻⁶	4.33±0.17	0.82±0.05	M
	10 ⁻⁵	3.71±0.23	0.34±0.01	M

a) M ; multiple shoot, S ; single shoot

b) % of the dry weight of leaves

Stem cuttings were cultured in liquid media (120 ml) of 500 ml Sakaguchi flask, and were shaken at 100 rpm for 60 days.

Sweet diterpene glucosides were extracted from leaves.

Values are the averages of 5 replicates±S.D.

3. バイオリアクターによる培養

坂口フラスコによる培養では、振盪によるダメージが大きいと考えられたため、攪拌槽と培養槽を分離した培養液循環式バイオリアクター（千代田製作所バイオリアクター TBR-1、2ℓ）による培養を行った。試験の結果は、生育に関して大きなバラツキがあったが、最も良い生育を示した結果を Table IVに示す。添加ホルモンは Kin (10⁻⁶ M) とした。シュートは培養6日目

Table VI Contents of sweet diterpene glucosides in different region of shoot culture of *S. rebaudiana* cultured in a bioreactor

Region	Stevioside	Rebaudioside A
Upper	0.45±0.03 ^{a)}	0.33±0.08
Middle	0.10±0.02	0.30±0.07
Lower	0.11±0.06	0.16±0.04

a) % of the dry weight of leaves

Stem cuttings were cultured on liquid medium (1,300 ml) containing kinetin (10⁻⁶ M) for 20 days in a bioreactor.

Sweet diterpene glucosides were extracted from leaves.

Values are the averages of 5 different portion±S.D.

より顕著な伸長を示し、20日目にはシュート長が20 cm以上となって、リアクター内（実容積1.3ℓ）に一杯となった。シュートの形態はシングルシュートを示した。リアクターの上部（頂芽を含む部分）は、20日間の培養中に培養液が減少するため空気中に出ており、正常な形態を示した。一方、リアクターの下部は水膨れした大型の奇形葉を形成した。形態的に異なることから、リアクターの上部、中部、下部に分けて甘味配糖体含量を測定した。甘味配糖体含量は、上部において高い傾向を示したが、全体的に少なかった。

今後、添加ホルモンやショ糖濃度などの培地条件、光、温度、リアクターの回転数と通気量などの培養条件、植え込み材料の調整などの各条件を検討することにより、安定した生育と、高い甘味配糖体含量を示す培養条件の設定が可能であるものと考えられる。

謝 辞

本実験を手伝ってくれた北村（大久保）貴子氏・柿宏樹氏に感謝致します。材料植物の提供をいただきました山陽国策パルプ岩国研究部、バイオリクターを貸与いただきました千代田製作所へ、に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) FERREIRA, C.M. and HANDRO, W. (1988) : *Planta Med.*, **54**, 157-160.
- 2) 吉田重方 (1986) : 日作紀, **55**, 189-195.
- 3) HANDRO, W., HELL, K.G. and KERBAUY, G.B. (1977) : *Planta Med.*, **32**, 115-117.
- 4) SUZUKI, H., IKEDA, T., MATSUMOTO, T. and NOGUCHI, M. (1976) : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 819-820.
- 5) NABETA, K., KASAI, T. and SUGISAWA, H. (1976) : *Agric. Biol. Chem.*, **40**, 2103-2104.
- 6) MANO, Y., NABESHIMA, S., MATUI, C. and OHKAWA, H. (1986) : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2715-2722.
- 7) YOSHIKAWA, T. and FURUYA, T. (1987) : *Plant Cell Rep.*, **6**, 449-453.
- 8) HIRATA, K., YAMANAKA, A., KURANO, N., MIYAMOTO, K. and MIURA, Y. (1987) : *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1131-1317.
- 9) YANG, Y.W., HSING, Y.I. and CHANG, W.C. (1981) : *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **22**, 57-62.
- 10) TAMURA, Y., NAKAMURA, S., FUKUI, H. and TABATA, M. (1984) : *Plant Cell Rep.*, **3**, 180-182.
- 11) TAMURA, Y., NAKAMURA, S., FUKUI, H. and TABATA, M. (1984) : *Plant Cell Rep.*, **3**, 183-185.
- 12) MIYAGAWA, H., FUJIOKA, H., YAMASAKI, K., TANIGUCHI, K. and TANAKA, R. (1986) : *Planta Med.*, **52**, 321-323.
- 13) MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962) : *Physiol. Plant.*, **15**, 473-493.
- 14) 岩村淳一、木下了彦、石間紀男、片岡 修、守田豊重、平尾子之吉 (1981) : 農芸化学会誌, **56**, 87-91.
- 15) 中村重治、田村幸吉 (1985) : 熱帯農業, **29**, 109-115.