

<令和3年度助成>

シソ科ハーブ 2 次代謝成分のメタボローム解析 及び高機能化に関する研究

松原 陽一

(岐阜大学 応用生物科学部)

1. 緒言

ハーブはフェノール性化合物や配糖体、テルペノイド等の 2 次代謝成分による抗菌・抗酸化作用を有しており、香辛等の食品として一般に利用されるハーブはシソ科に属するものが多い。シソ科ハーブでは揮発性成分である精油が主体に検討されているが、水溶性 2 次代謝成分や、それら成分のシソ科ハーブ種間差異については明らかにされていない。ハーブではハーブティー等で水溶性成分が機能性成分となることが考えられ、ハーブにおける揮発性精油以外の機能性 2 次代謝成分を明らかにすることは食品利用としての観点において重要と考えられる。また、生物体では環境ストレス下でフリーラジカルである活性酸素種 (Reactive oxygen species : ROS) を発生し、その消去に抗酸化物質 (ポリフェノール、アスコルビン酸等) が関与している。この場合、ハーブ含有抗酸化物質の摂取を想定すると、ROS 消去による酸化ストレス軽減作用が機能性として考えられ、シソ科ハーブの食品としての利用面においても抗酸化物質含量は重要な機能性指標となる。しかし、シソ科ハーブにおける抗酸化物質含量の種間差異についても把握されていない点が多い。一方、ハーブ含有成分の増大法についても明らかにされていない点が多く、本研究では植物共生菌であるアーバスキュラー菌根菌によるシソ科ハーブの高機能化を検討した。菌根菌は植物根のみに定着し、主に土壌中のリン吸収を促し宿主生長を促進する共生菌で、1997 年に地力増進法により政令指定され、リン資源の有限性も背景としその利用が推奨されている。

本研究ではシソ科ハーブ 2 次代謝成分のメタボ

ローム解析、菌根菌接種によるシソ科ハーブの高機能化を検討した。

2. 材料及び方法

(1) シソ科ハーブ 2 次代謝成分のメタボローム解析

市販育苗土 [Super mix A, N : P : K = 180 : 120 : 220 (mg/l)、サカタのタネ] をオートクレーブ滅菌 (121°C、1.5 kPa、15 分) してバット (31.9 × 26.4 × 15.3 cm) に詰め、シソ科ハーブ 12 種 (図 1) を播種した。育苗は岐阜大学ガラス温室にて自然日長下で適宜灌水を行った。ハーブ個体数は 20 個体とし、8 週間栽培した。植物体の茎葉部凍結試料 1.2 g を粉碎後、超純水 6 ml を加えて混合した溶液を試料抽出液 (20%、w/v) とした。試料抽出液を高速遠心分離 (13,000 rpm、4°C、10 分) し、上清を滅菌フィルター (0.45 µm、DISMIC-25CS、アドバンテック東洋株式会社) に通し、Nanosep 10K (日本ポール株式会社) を限外ろ過フィルターとして利用し、上清を高速遠心分離 (13,000 rpm、4°C、15 分) してタンパク除去を行った。続いて試料を UPLC/MS (Waters 社) を用いて解析した。液体クロマトグラフ (ACQUITY UPLC、Waters 社) の条件は以下のようにした。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 (1.7 µm、2.1 × 100 mm、逆相カラム、Waters 社) を 25°C 条件で使用した。移動相は (A) 0.1% ギ酸水、(B) アセトニトリルを用い、グラジェント (0 分、95% A ; 6 分、95% A ; 12 分、75% A ; 30 分、65% A ; 32.5 分、5% A ; 35 分、95% A) を設定し、流速 0.4 ml/分 で 35 分間測定した。試料

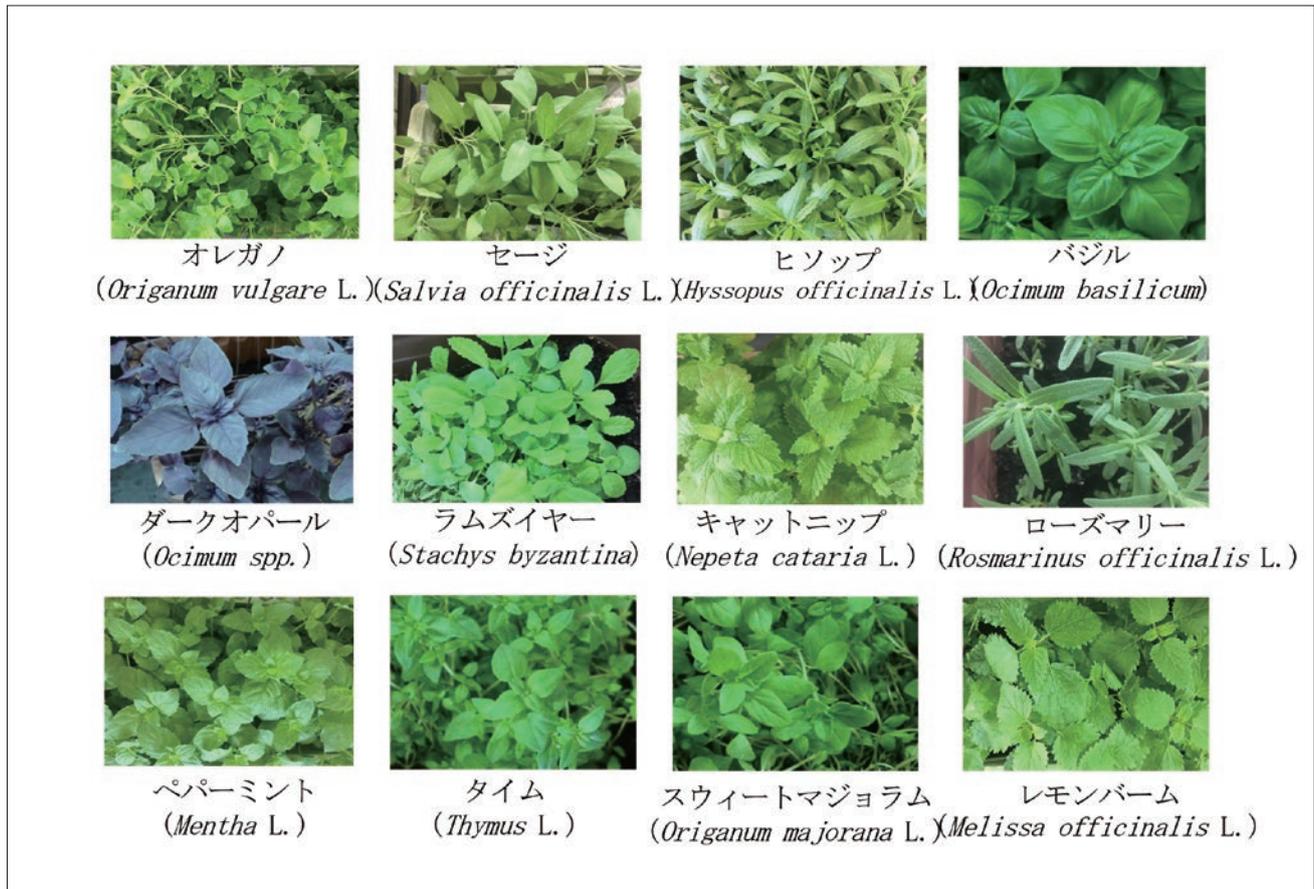


図1 シソ科ハーブ

注入量は 7.5 μ l とした。一方、質量分析計 (Xevo QT of MS、Waters 社) は ES (-) negative モードで解析質量範囲は 50 ~ 1,000 (m/z) で測定した。MS/MS でのコリジョン 30 V で行った。一方、ハーブ茎葉部における抗酸化能評価として、抗酸化物質の総合的指標である DPPH ラジカル捕捉能について分析を行った。

(2) シソ科ハーブへの菌根菌接種検定及び 2 次代謝成分変動解析

シソ科ハーブ 6 種 (レモンバーム、オレガノ、セージ、ヒソップ、バジル、ペパーミント) を播種する際、菌根菌 [*Gigaspora margarita* (GM)、*Glomus fasciculatum* (GF)] を接種 (3 g/ 個体) した。なお、対照区にはオートクレーブした菌根菌接種物を処理した。(1) と同様の条件で約 8 週間育苗し、成長調査、2 次代謝成分の解析を UPLC/MS により行った。

3. 結果及び考察

(1) シソ科ハーブ 2 次代謝成分のメタボローム解析

シソ科ハーブ 12 種茎葉部の 2 次代謝成分解析を行い、各ハーブのマスペクトルにより検出された上位 3 つのピークの m/z 値に該当する物質を Mass Bank データベースで同定した。茎葉部では相対的多量 2 次代謝成分として、ハーブ 12 種のうち 10 種でアピゲニン、7 種でケンフェロール、6 種でゲニポシド、5 種でシキミ酸、4 種でルテオリン、3 種でクマル酸が検出された (図 2)。また、1 種のハーブのみでオエニン、カンフェン、エピガロカテキン、ロスマリン酸が検出された。この場合、セージ及びスウィートマジョラムにおける 2 次代謝成分の相同性が高く、アピゲニン及びシキミ酸が相対的に多くのハーブ種で共通して含有されていた。また、検出された 2 次代謝成分については m/z 値 200 ~

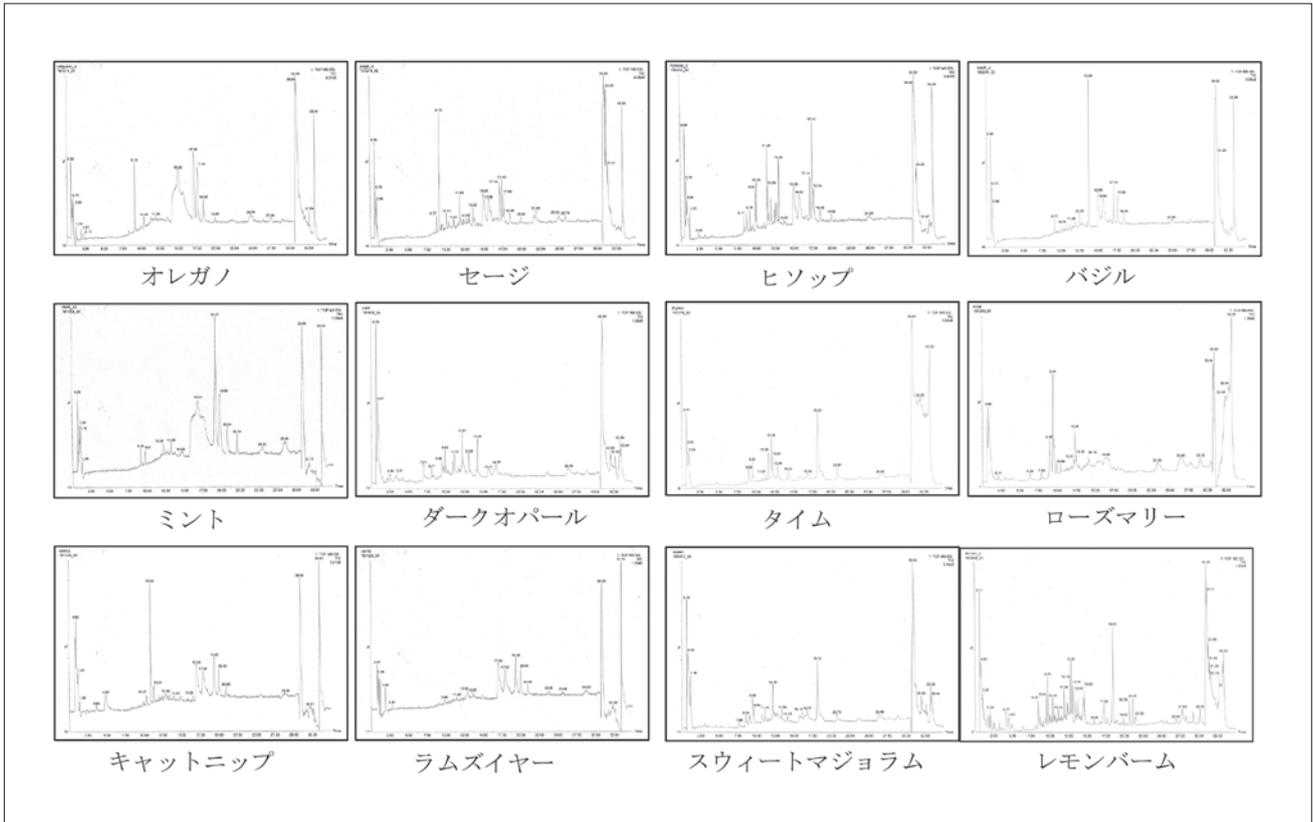


図2 シソ科ハーブ2次代謝成分のクロマトグラム

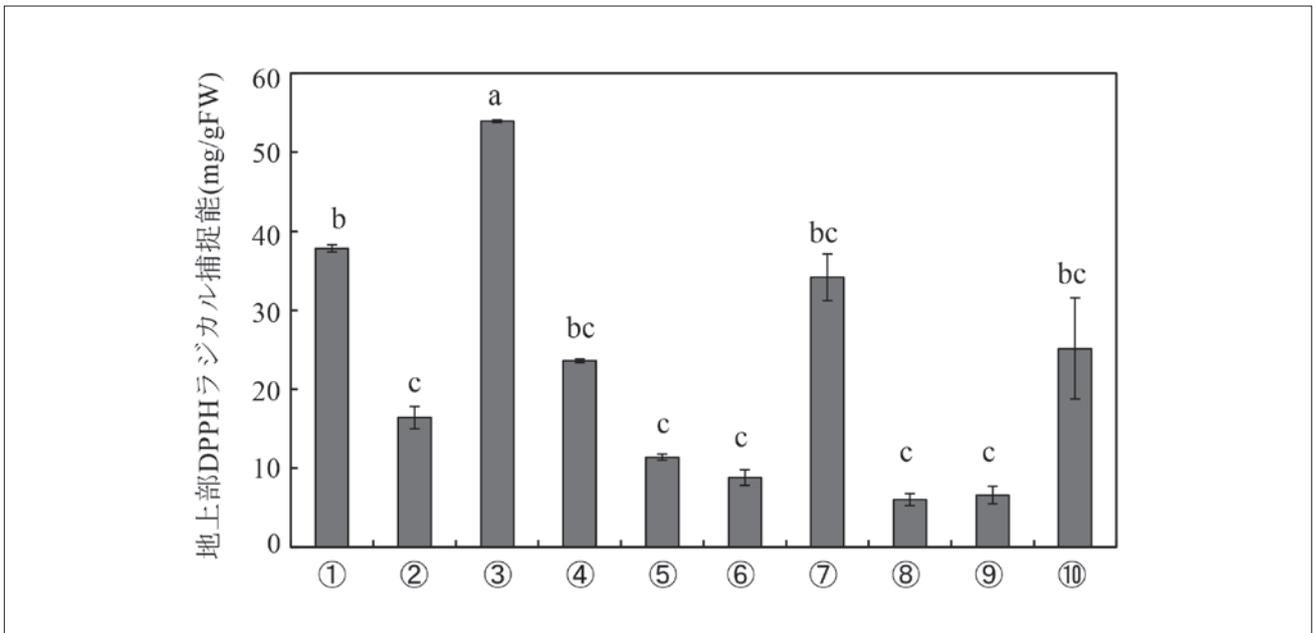


図3 シソ科ハーブ茎葉部のDPPHラジカル捕捉能
 ①オレガノ；②キャットニップ；③セージ；④ダークオパール；⑤タイム；⑥バジル；⑦ヒソップ；
 ⑧ペパーミント；⑨ラムズイヤー；⑩レモンバーム 異なるアルファベット間に有意差あり (p<0.05)

400の高極性物質が多かった。一方、シソ科ハーブ10種の茎葉部における抗酸化能評価の結果、DPPHラジカル捕捉能はオレガノ、セージ、ダークオパー

ル、ヒソップ、レモンバームで相対的に高い値を示した(図3)。

(2) シソ科ハーブへの菌根菌接種検定及び 2 次代謝成分変動解析

生育調査の結果、茎葉部ではレモンバームの Gf、GM 区、オレガノ、ヒソップ、バジルの GM 区、根部ではレモンバームの Gf 区、オレガノ、ヒソップの GM 区において対照区と比較し有意に成長促進効果が確認された (図 4)。Gf、GM 区ともに供試した全てのハーブで菌根菌の定着が確認され、菌根菌定着率は約 40% 程度であり、レモンバームの Gf 区で最も高く 52.7%、ヒソップの GM 区で最も低い 31.3%

であった。続いて生育調査の結果から、レモンバームでは Gf 区、その他の 5 種においては GM 区の 2 次代謝成分の解析を行った。LC/MS 解析により、対照区と比較して菌根菌処理区で増大した成分、対照区では検出されず菌根菌処理区でのみ検出された新たなピークが確認された (図 5)。ハーブ 6 種のうち 4 種でケンフェロール、3 種でゲニポシド、1 種でルテオリン、クマル酸、オエニン、カンフェンが増大した成分として検出された。また、対照区では検出されず菌根菌処理区のみで検出された成分とし

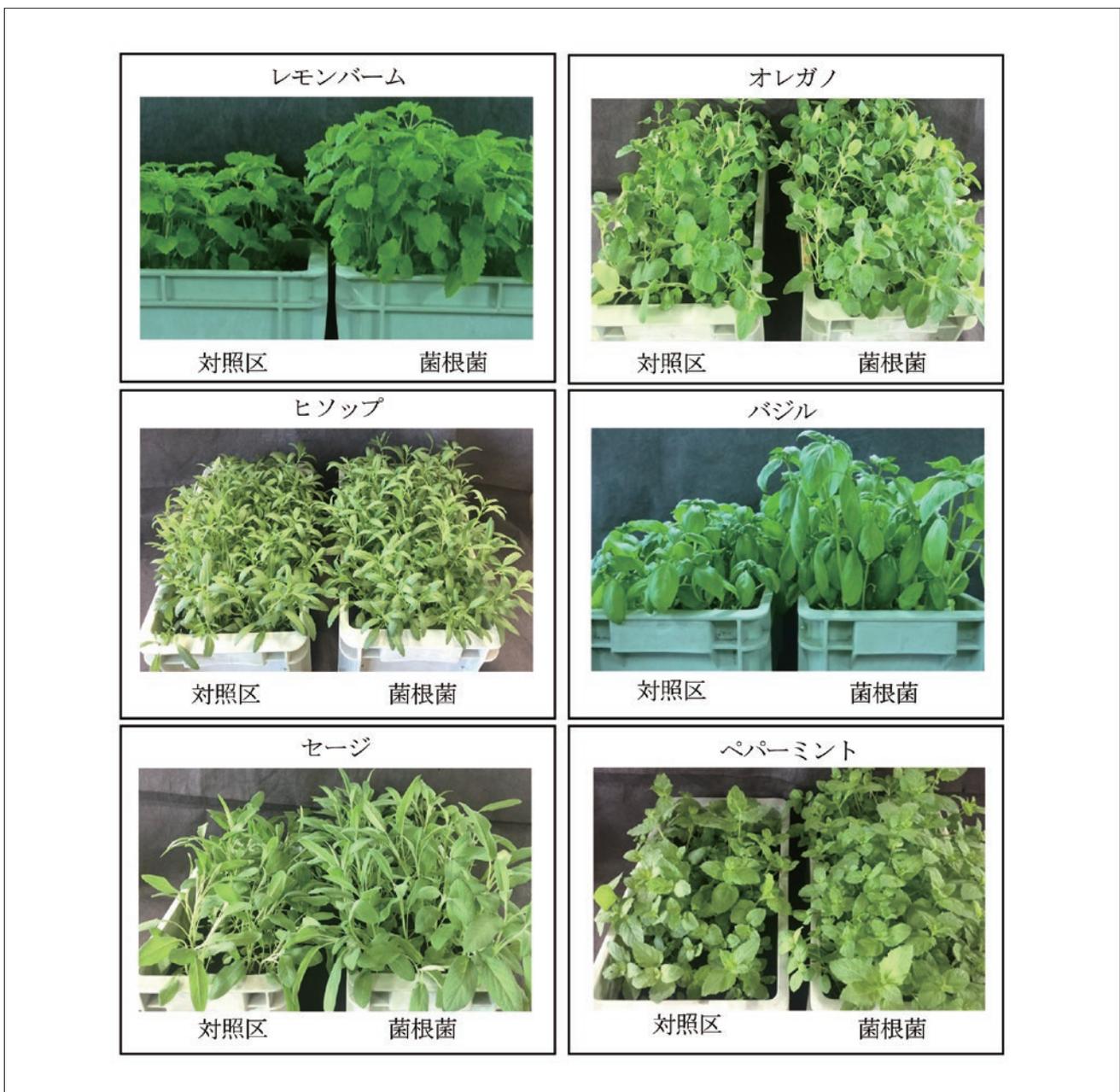


図 4 シソ科ハーブの成長に及ぼす菌根菌接種の影響

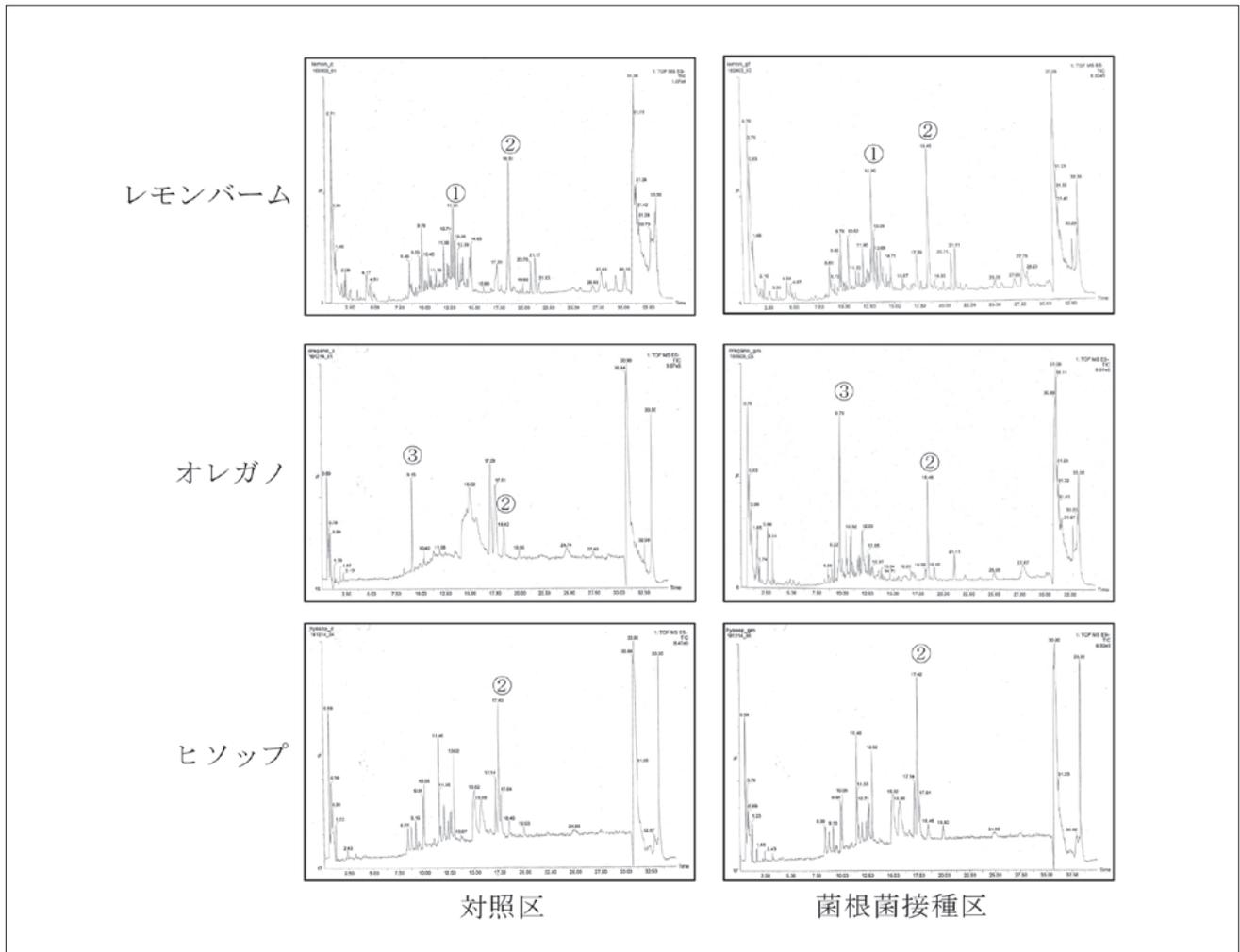


図5 シソ科ハーブ2次代謝成分に及ぼす菌根菌接種の影響
①、②、③；菌根菌区における増大成分

てバジルでカフェ酸及びカンフェン、ペパーミントでグルコシノレートが確認できた。

以上のことから、シソ科ハーブ12種における2次代謝成分については相同性が高い機能性成分が数種存在することが明らかになった。また、シソ科ハーブにおける菌根菌共生により植物体生長促進及び機能性2次代謝成分増大がみられ、菌根菌接種によるハーブの高機能化を図れることが示唆された。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼を申し上げます。

Metabolome analysis and mycorrhizal influence on secondary metabolites of *Lamiaceae* herbs

Yoichi MATSUBARA

Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University

Lamiaceae is well-known for including many medicinally important plants used in flavourings and preservatives, and especially for medicinal purposes due to having curative and preventive properties. However, information regarding the variation of secondary metabolites in different *Lamiaceae* herbs, especially in water extracts is a less explored area. As such, in the present study, the variation of major secondary metabolites in water extracts of 12 different *Lamiaceae* herbs was investigated using UPLC-MS/MS. Six flavonoids (apigenin, camphenol, luteolin, epigallocatechin, oenin, and limocitrin) and two compounds involved in flavonoid synthesis (shikimic acid and coumaric acid) were identified. Furthermore, some other phenolic compounds such as geniposide, rosmarininc acid, and camphene were also identified. Meanwhile, the effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and secondary metabolites in *Lamiaceae* herbs was also investigated. Eight weeks after mycorrhiza inoculation, significantly higher dry weights of shoots and roots compared to the control were observed in several herbs. Mycorrhizal colonization was recognized in all inoculated herbs, and increases in a number of secondary metabolites (such as kaempferol, apigenin, luteolin, and caffeic acid, etc.) were observed in most of the mycorrhizal herb plants compared to the control. In this case, the degree of the increase differed among the herb species. From these findings, it can be stated that the herbs in the *Lamiaceae* family contain a variety of secondary metabolites, and mycorrhizal symbiosis induces growth promotion and an increase in functional secondary metabolites, leading to an improvement in the quality of *Lamiaceae* herbs.