

## ハッカ培養細胞による各種モノテルペンの変換 シトロネラールのシトロネロールへの変換反応について

内山武夫, 鈴木雅義, 沼田益朗, 内藤聡之助, 星野 力

新潟大学農学部農芸化学科

(〒950-21 新潟市五十嵐二の町 8050)

(1990年8月20日受付)

(1990年10月19日受理)

ハッカ植物の茎頭から 2, 4-D, IAA を含む MS 培地でカルスを誘導し, さらにオーキシシンやカイネチンの濃度を変えた SH 培地で継代し, 形状を異にする 5 種類のカルスを得た. これらカルスのモノテルペン (9 種類) に対する変換反応を調べた. その結果試験したすべてのカルスがシトロネラールをシトロネロールに変換したが, その活性は生育の良好なカルスで高かった. この反応は, NADH を補酵素とするアルコール脱水素酵素によることが明らかとなった. しかし, プレゴンやメントン, メントールに対する酸化還元能は見られなかった. ハッカカルスをモノテルペンと反応させると, カルスは褐色となり壊死した. このことは油腺などの貯蔵器官を持たないカルス細胞にとって, モノテルペンが細胞毒性を持つことが推察された.

### 1. 緒 言

植物の生産する多くの有用二次代謝産物が培養細胞を用いて大量に生産されるようになった. しかし, モノテルペノイド, ジテルペノイドの成功例はほとんどない. Sugisawa 等<sup>1)</sup>や Nabeta 等<sup>2)</sup>は, 台湾青シソの稚葉から 2, 4-D, 1 ppm でカルスを誘導し, その懸濁培養細胞からリナロール, リモネン, ベリラケトンが得られたことを報告している. しかし, 清水等<sup>3)</sup>は, ハッカカルス中の生産物を調べ, 元植物の主生産物であるメントン, メントールの生産, 蓄積能がないことを明らかにし, その理由としてその貯蔵器官の形態的分化能がカルスでは欠如しているためと推察している. しかし, これらの点について多くの研究者により前駆体の生物学的変換能や<sup>4-6)</sup>, 生合成に関する酵素活性の面から<sup>7-10)</sup>種々検討されている.

モノテルペンの生合成経路はグラニールまたはネリールピロホスフェイトの閉環反応とそれに続く酸化, 還元反応からなると考えられる. そこで我々は, ハッカ植物よりカルスを誘導し, 外見的に形状を異にするハッカカルスによるモノテルペン類の生物学的変換能について酸化, 還元反応の面より調べた.

その結果, シトロネラールをシトロネロールに変換することを認めたので, この結果について報告する.

### 2. 実験方法

カルスの形成に用いたハッカ植物はあやなみ [日本ハッカ *Mentha arvensis* C. V. Sanbi × *M. spicata* var. *crispa* の F<sub>1</sub>] を用いた.

テルペン類の検出<sup>11)</sup>はベンゼン/酢酸エチル (19:1) および 10% 酢酸エチル含有 Skellsolve B (*n*-Hexane, b. p 60~80°C) を展開溶媒としてシリカゲルによる薄層クロマトグラフィー (Analytic Uni-plate GF) によった. また, その検出にはバニリン-硫酸液, 4% トリクロロ酢酸-クロロホルム溶液, 過マンガン酸カリ-硫酸溶液および 0.05% ローダミン B 水溶液を用いた.

GLC によるモノテルペンの分析は, 3% ポリエチレングリコール 20 M (クロモソルブ W. AW. DMCS, 80/100 メッシュ) を充填したガラスカラム (3 mm × 1.5 m) で, キャリヤーに N<sub>2</sub> ガス (35 ml/min.) を用い, FID 検出器付ガスクロマトグラフィー (島津, GC-8A 型) により, 昇温クロマト法 (カラム温度 110°C, 5°C/min.) により分析した. なお, 各モノテルペンの定量は絶対検量線 (2 点) 法によった.

GC-MS (日立, M-60 型) 分析には GLC と同条件で, またマススペクトルの測定はイオン化電圧 70 eV, イオン化室温度 180°C で行った.

### 3. 結 果

#### (1) カルスの誘導とその維持

カルスはハッカ植物の根、茎および茎頂を材料とし、70% アルコールやサラシ粉で殺菌後、オーキシシン (2, 4-D, IAA, NAA) とカイネチンの濃度を各種組み合わせ、Murashige-Skoog 改変培地 (チアミン 10 mg/l 含有以下 MS10T 培地と記す) から誘導を試みた。その結果 2, 4-D 濃度 2.0 mg/l 以上と IAA 濃度 50 mg/l を含む MS10T 培地に置床された茎頂のみからカルスが形成された。2, 4-D から誘導されたカルスは半透明の薄茶色で柔らかく、IAA からのものは黒色で硬く、不定根が多く見られた。これらカルスを同じ培地に継代を試みたが、生育不良のためオーキシシンの種類と濃度はそのまま Shenck-Hildebrandt (SH) 培地<sup>2)</sup>に変え、継代を試みたところ、2, 4-D 濃度が 2.0 mg/l 添加培地から薄茶色の成育良好な株をえた。また、IAA を 50 mg/l 添加した培地では白色の硬いカルスが得られたが、相変らず不定根の形成が多かった。

そこで、この 2 種類のカルスから、さらに SH 培地を基本培地としてオーキシシンの種類と濃度およびカイネチンの濃度を変えた各種培地 (12 種類) を作り、継代を繰り返し選別を行い、その内 8 種類の培地で、比較的成育良好な株を得た。これら株は種々の形状を示すがその中より色調など、外観的に状態の似ているもの、ま

**Table 1.** Compositions and Concentration of Supplemented Auxins and Kinetin in Shenck and Hildebrandt medium

Growth Regulators	Media Numbers			
	2	4	5	8
	Concentration (MG/L)			
IAA	25	25	0	0
2, 4-D	1	1	2	2
Kinetin	0.5	3	0	3

**Table 2.** Time Course of Callus Growth on Media Supplemented with Auxins and Kinetin

Days	Media Numbers			
	2	4	5	8
	Gr. Fr. Wt.			
0	0.58	0.57	0.68	0.57
7	1.02	1.07	1.22	1.21
14	1.52	1.55	2.02	1.49
20	2.21	3.74	3.18	1.82
28	3.49	21.2	5.80	2.40

Callus was cultured in a 100 ml volume erlenmeyer flask containing 50 ml Shenck and Hildebrandt agar medium at 25°C under a 12 hr light/12 hr dark (Fluorescent tube, 40Wx4).

た生育のよし悪しを基準として整理し、M-2 (白色で硬く、部分的に緑色を含む)、4 (白色半透明、水分多く柔らかい)、5 (緑色で水分多く柔らかい)、8 (白色で硬い) の各培地で培養したカルスを選択し以後の実験に供した。それらカルスの培養培地のオーキシシン組成を Table 1 に、生育量の経時変化を Table 2 に示した。なお、カルスは 25°C、明時 12 時間、暗時 12 時間で培養した。以後、便宜的に培地ナンバーをカルスの系統名とした。

Table 2 から明らかなように、M-4 培地で維持したカルスが最も生育がよく、M-2, 5, 8 培地培養のカルス間では生育速度に差は見られなかった。また M-4 培地で培養したカルスは生育は良好であるが、非常に黒化が激しかった。そのため、このカルスを M-5 培地に植え変えたところ、生育は良好でしかも培養途中で褐色に変化する割合が減じた。そこで、このカルスも M-5' として実験に供した。

#### (2) 培養培地を異にする各種ハッカカルス中のモノテルペンの分析

培地組成を異にし、外観的形状を異にする静置培養カルスについて、そのアルコール抽出物、凍結乾燥したカルスのクロロホルム抽出物、またそれらを培養した寒天培地のアルコール抽出物でモノテルペンの有無について調べた。その結果、TLC および GLC による分析から、メントン、メントールや、関連するモノテルペン類は全く検出されなかった。

#### (3) モノテルペンのカルスによる変換反応

ハッカカルスによるモノテルペンの変換能について、脂環ケトンとしてプレゴン、メントン、脂環アルコールとしてメントール、モノテルペンアルコールとしてリナロール、ゲラニオール、シトロネロール、およびアルデヒドとしてシトロネラール、シトラールを用いて検討した。

その方法は、SH 培地と同濃度の無機成分とグルコース (0.1%) を含んだ溶液 (pH 6.0 に調整) に各種モノテルペンを飽和させ、その 10 ml 中に静置培養したカルス (対数増殖期中期から後期) 塊を約生重 1.0 g を加え、30°C の水槽中で反応 (3 時間) した。後、反応液を濾過し、濾液をエキストレルート 3 (Merck) に保持させ、20 分後に約 15 ml の石油エーテルで溶出、無水硫酸ソーダで脱水後、石油エーテルを N<sub>2</sub> ガス気流中で除き、そこに 2 ml の石油エーテルを加え試料とした。これを GLC で分析した結果、カルスの種類を問わず試験したモノテルペンの内、シトロネラールでその量の減少と新たなピークの出現が見られたが、その他のモノテ

ルペンではその量的ならびに質的变化は見られなかった。シトロネラルの変換物質を GC-MS で調べたところ、標準物質のマスペクトルとの比較から、シトロネロール [m/z : 156 (M<sup>+</sup>), 138, 123, 109, 95, 81, 69, 41 (base peak)] であることを確認した。なお、モノテルペンの反応液中の濃度は平均値 (試料数 2~8) としてそれぞれメントール 143 mg/l, メントン 136, リナロール 493, シトラール 314, シトロネロール 133, シトロネラル 24.5, ゲラニオール 503, プレゴン 377 であった。

ここで興味あることは、この反応時にカルスが褐色に変化することである。特にシトロネラル以外のモノテルペンとの反応では、早いもので反応開始 5 分後、遅いものでも 15 分後から徐々に褐色に変化し、3 時間後には黒褐色になり壊死した。しかし、この反応は熱処理したカルスやモノテルペン未添加で反応した場合には見られないので、カルスの生理活性と密接に関わっているものと考えられる。

#### (4) カルスによるシトロネラルからシトロネロールへの変換反応

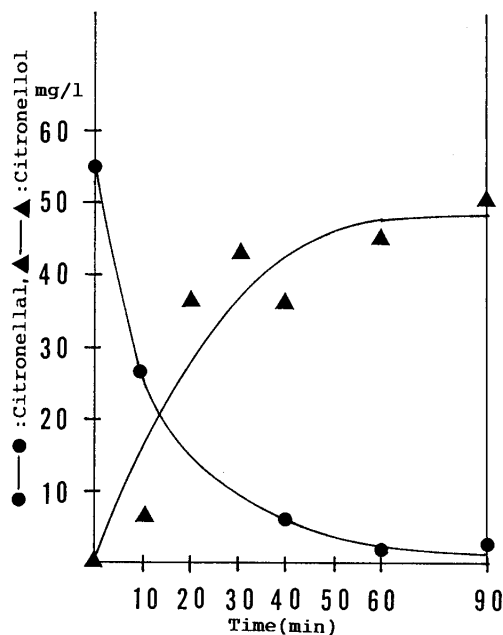
そこで、この還元反応について前記と同様の方法で、培養培地を異にする 4 種類のカルスでしらべた。その結果、Table 3 に示したように、カルスの種類を問わず変換能を持つが、特に M-4 および 5' 培地で培養したカルスで活性が高かった。これらのカルスは成育がよく、この活性はカルスの増殖力と関係のあることを推察させる。この反応の時間的変化を、M-5' 培地のカルスで調べたところ、Fig. 1 に示したように、約 60 分でシトロネラルを、ほぼ完全にシトロネロールに変換することが明らかになった。

**Table 3.** Conversion of citronellal to citronellol by *Mentha* callus grown on different media

formed citronellol (%)	Media Numbers			
	4	5	8	5'
	66.9	35.3	34.5	76.3

For assay of citronellol formation, callus cultures (1 g. fr. wt.) were incubated (30°C) with 10 ml of SH-medium (pH 6.0) containing citronellal and glucose (0.1%). The resultant solution was charged to Extrelut 3 (Merck) and extracted with petroleum ether. The solution was dried with sodium sulfate and evaporated to the volume of 2 ml in a stream of N<sub>2</sub> at 30°C.

The detection of citronellol was carried out using GLC equipped with flame ionization detector. The condition of GLC was as follows; Column: 3% PEG 20 M, 3 mm×1.5 m, Column temp.: 110°C, programmed 5°C/min., Carrier gas: N<sub>2</sub>, 35 ml/min..



**Fig. 1.** Time courses for reduction of citronellal to the corresponding alcohol by *Mentha* callus grown on medium 5'. See the note in table 3.

#### (5) シトロネラルの還元反応に関与する酵素活性について

次に、無細胞系での変換反応を調べた。カルスは変換能の高い M-5' 培地培養カルス (14 日間培養) を用いた。カルス (生重約 2 g) を少量の、10 mM の 2-メルカプトエタノールと 0.3 M のショ糖を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) と共にポッターのホモジナイザー中で水冷しながら磨砕した。これを 15000 xG で 10 分間冷却遠心機にかけ、その上澄を粗酵素液とした。また、その残渣についても、同緩衝液で 2 回洗浄し、活性の有無を調べた。基質の調整は 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中にシトロネラルを加え、湯浴中で良く振り混ぜ、室温まで冷却後、濾過し、過剰の基質を除いたものを用いた。

初めに、上記のように調整された粗酵素液 (0.1 ml) を、基質溶液 (2.9 ml) と反応 (30°C) させ、GLC でシトロネロールの生成を調べたが、全く検出されなかった。この結果よりアルコール脱水素酵素と考えられたので、補酵素として NADH (2 mM 溶液, 0.3 ml 添加) を用いて 25°C, 30 分間反応させ、340 nm でその酸化能の測定を行い、さらに GLC で生成物を調べた。その結果、NADH の消費量として、活性は蛋白質<sup>13)</sup> mg 当り 51.5 μmol/min で、さらにシトロネロールの生成 (Fig. 2) も確認した。しかし、逆反応は非常

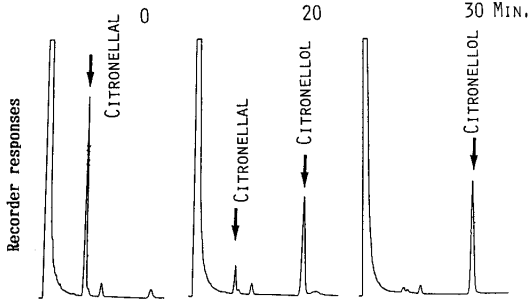


Fig. 2. Gas chromatogram of formed citronellol by cell-free extract of *Mentha callus*

に弱かった。

なお、細胞の抽出残渣には、この活性は見られなかった。また、この粗酵素による還元反応の最適 pH は 6.5、酸化反応は 9.0 付近にあった。これらの結果から、この反応は NADH を助酵素とするアルコール脱水素酵素によることが明らかとなった。

#### 4. 考 察

我々は、ハッカ植物の茎頂より形状の異なる 5 系統のカルスを得、これらカルスによるモノテルペンの蓄積と、それらの変換能を調べた。その結果、用いたカルスのすべてにモノテルペンの存在は認められないが、シトロネロールをシトロネロールに還元する酵素の存在が明らかになり、その反応はアルコール脱水素酵素によることが明らかとなった。

Aviv ら<sup>4)</sup>は 6 種類の系統の異なるハッカ植物よりカルスを誘導し、モノテルペンの変換能を調べた。その結果、いずれの株もモノテルペンの生産能は欠いているが、4 系統のカルスがプレグモンをイソメントンに、さらにすべての系統がメントンをネオメントールに変換する活性を有することを報告している。しかし、我々の用いたカルスはプレグモン、メントンの変換能は無く、元植物は同じでもカルスにより、その能力に差のあることが明らかになった。

また、我々の得た株は、反応に用いたモノテルペンがカルスにたいして細胞毒性を有するような反応を示した。即ち、それをカルスと反応させると、カルスは早いもので 5 分後に、遅いものでも約 15 分後に黒褐色に変わり細胞の壊死が見られ、細胞毒性を持つことが推察された。モノテルペンが細胞毒性を持つことは *Pelargonium* のカルスでも認められている<sup>14)</sup>。しかし、子葉より 2,4-D を含む SH 培地で誘導したレモンカルスで同様の試験を行ったところ、何ら変化はみられなかった。

このことは、上述の褐変化反応はハッカカルスに特有

なものと考えられ、完全植物体で見られる分泌器官（油腺）の必要性を裏付けているのかもしれない。

ハッカの元植物では、生成したテルペン類は葉の海绵状組織や柵状組織中にも油滴として存在するが、主として油腺という特殊な器官に蓄積<sup>15)</sup>する。しかし、精油の蓄積は若い稚葉ほど少なく、油腺の発達も少ないと言われている。これらのことから、正常なモノテルペンの代謝系を持たないカルスではそれらが細胞毒性を持つのかも知れない。

Banthorpe 等<sup>7)</sup>はバラの茎より 2,4-D を用いず、カイネチンやココナッツミルクを添加した Nash and Davis 培地よりカルスを誘導し、無細胞抽出系で IPP のゲラニオール、ネロールへの転換反応を調べたところ、モノテルペンの生産が全く見られないにもかかわらず、その活性は元植物のその約 300 倍もあり、さらにメバロン酸も効率良く IPP に転換されることを報告している。また彼ら<sup>8)</sup>はジャスミンの葉や茎の節間部より 2,4-D を用いずカルスを誘導し、その懸濁培養細胞でモノテルペンの酸化分解反応に関与するエポキシダーゼやヒドラターゼ活性を IPP、イソペンテノール、ゲラニオール、ネロールを基質として調べこれらの酵素活性は元植物の 100 倍も高いことを報告している。これらの結果より、培養細胞では特殊な貯蔵器官の形成が抑制されておりその結果、生成されたモノテルペンは蓄積されず、代謝分解されるものと推察している。先に述べたように、我々の得たハッカ培養細胞はモノテルペンと反応させると黒変する。この現象から、モノテルペンの酸化分解が推察されるが、反応液中のモノテルペン量の変化は全く無いことから、この種の反応の関与は無いものと考えられる。

ハッカ植物において、還元の進んだメントールは嫌氣的な過程で生成され、葉部裏面にある油腺に貯蔵<sup>15-17)</sup>される。電顕観察から、その油腺の構造は解糖系によるエネルギー供給から孤立した部位にあり、しかも嫌氣的状況に在るといふ<sup>16,17)</sup>。また、モノテルペンの生産は、低濃度酵素の環境に適応するためと考えられ、酵母におけるパスツール効果に類似の制御反応の存在が推察<sup>17)</sup>されている。この点にモノテルペンを培養細胞で生産させる鍵があるのかもしれない。

ハッカ植物を分譲くださいました北海道原子力環境センター、成田保三郎博士に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Sugisawa, H., Y. Ohnishi, 1976, *Agric. Biol. Chem.*, **40**: 231-232.
- 2) Nabeta, K., Y. Ohnishi, T. Hirose, H. Sugisawa, 1983.

- Phytochemistry, **22** : 423-425.
- 3) 清水純夫 生物生産機能の開発 文部省特定研究 研究成果報告書 1980. p. 320-321
  - 4) Aviv, D., E. Galun, 1978, *Planta Med.*, **33** : 70-77.
  - 5) Aviv, D., E. Krochmal, A. Dantes, E. Galun. 1981. *Planta Med.*, **42** : 236-243.
  - 6) Lappin, G. J., J. D. Stride, J. Tampion, 1987. *Phytochem.*, **26** : 995-997.
  - 7) Banthorpe, V. D., S. E. Barrow, 1983. *Phytochem.*, **22** : 2727-2728.
  - 8) Banthorpe, V. D., M. J. Osborne, 1984. *Phytochem.*, **23** : 905-907.
  - 9) Banthorpe, V. D., S. A. Branch, V. C. O. Njar, M. G. Osborne, D. G. Watson, 1986. *Phytochem.*, **25** : 629-636.
  - 10) Banthorpe, V. D., T. J. Grey, I. Poots W. D. Fordham, 1986. *Phytochem.*, **25** : 2321-2326
  - 11) Battail, J., R. L. Dunning, W. D. Loomis, 1961. *Biochim. Biophys. Acta*, **51** : 538-554
  - 12) Schenk, R. U., A. C. Hildebrandt, 1972. *Cand. J. Bot.*, **50** : 199-204
  - 13) Lowry, O. H., N. J. Rosenberg, A. L. Farr, R. J. Randall, 1951. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265
  - 14) Brown, J. T., 1987. *Plant Science*, **48** : 195-201
  - 15) 池田長守, 1952. 農学大系作物部門薄荷, 除虫菊編, p. 8-10, 養賢堂, 東京.
  - 16) 清水純夫, 1974. *化学と生物*, **12** : 659-666.
  - 17) Loomis, W. D., 1973, *Recent Advances Phytochem.*, **6** : 170-174

### Summary

#### Biotransformation of Citronellal to Citronellol by Cultured tissues of *Mentha* Plant

Takeo Uchiyama, Masayoshi Suzuki, Masuro Numata,  
Sounosuke Naitou Tsutomu Hoshino  
*Department of Agricultural chemistry, Faculty  
of Agriculture, Niigata University, Niigata 950-21, Japan*

Five types of cultured tissues were established from shoots of *Mentha* plant, 'AYANAMI' (F<sub>1</sub> of *Mentha arvensis* cv. Sandi x *Mentha spicata* var. Crispa) on Shenck and Hildebrandt medium with various plant growth regulators.

All the cultured tissues established converted citronellal into the corresponding alcohol but no other monoterpenes were converted to other substances. The cell-free extracts of these cultured tissues catalyzed the transformation and required NADH so the reaction probably was based upon an alcohol dehydrogenase.

Since the cultured tissues of *Mentha* plant gradually colored and became quite brown with the presence of monoterpenes in the cultured solution, monoterpenes may exhibit toxicity to the cultured tissues. This result in unorganized tissues might be attributed to the lack of specialized oil glands, which is considered to be the site of a store of monoterpenes in *Mentha* plant.