

カトレヤの組織培養に関する研究：1. フェノール物質の分離同定および同物質の生物活性について

石井, 實
九州大学農学部園芸学教室

正山, 征洋
九州大学薬学部生薬学教室

上本, 俊平
九州大学農学部園芸学教室

西岡, 五夫
九州大学薬学部生薬学教室

他

<https://doi.org/10.15017/23230>

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 31 (2/3), pp.99-105, 1976-12. 九州大学農学部
バージョン：
権利関係：



カトレヤの組織培養に関する研究

1. フェノール物質の分離同定および 同物質の生物活性について

石井 實¹⁾・正山 征洋*・上本 俊平

西岡 五夫*・藤枝 國光

九州大学農学部園芸学教室

*九州大学薬学部生薬学教室

(1976年7月19日受理)

Studies on Tissue Culture in *Cattleya* Species

1. Separation, Identification and Biological Activity of Phenolics from *Cattleya*

MINORU ISHII, YUKIHIRO SHOYAMA*, SHUNPEI UEMOTO,
ITSUO NISHIOKA* and KUNIMITSU FUJIEDA

Horticultural Laboratory, Faculty of Agriculture, Kyushu University,
Fukuoka 812 *Laboratory of Pharmacognosy, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812

緒 言

現在栽培されているラン科植物の多くは、遺伝的に複雑なヘテロ接合体であり、有性的な種子繁殖法では形質分離が著しいため、期待される形質の組合せをもつ株の出現率は極めて低い。したがって、優れた遺伝形質をもつ系統、あるいは品種の増殖には株分けなどの無性的な栄養繁殖法が採用されてきた。Morel は1964年に合理的かつ能率的な栄養繁殖法として組織培養法を開発し、ラン科植物における増殖率を飛躍的に高める糸口をつくった。本法は、その後多数の研究によつて技術的に著しく進歩し、同一形質をもつ個体の増殖はもちろんのこと、ウィルス・フリー苗の生産をも容易にし、現在ではシンビジウムを中心に多くのラン科植物の増殖に不可欠のテクニックとなつている。カトレヤでは、Morel (1964) をはじめとしてScully (1967), Reinert and Mohr (1967) およびLindemann *et al.* (1970) によつて組織培養による無性的増殖の端緒がつくられ、その後も多数の研究者によつて実用化のための研究が進められてきた。しか

しながら、カトレヤにおける組織培養増殖は、季節により特異的に消長するポリフェノール物質および同オキシダーゼの存在のためか、その組織が褐変し、枯死に至る品種が多く、まだ完全な実用化に至っていないのが現状である。著者らは、カトレヤの茎頂組織培養に際しての褐変現象の生理的解明と、その防止法を確立するため、1971年より採芽の季節、採芽シュートの大きさ、芽の切断方法、培養温度、培地のpHなどについて検討を加え、褐変現象の実態解明のための研究を進めている。本報では、カトレヤの組織培養中に褐変現象を誘起すると考えられるフェノール類の検索ならびに単離されたフェノール物質の化学構造および生物活性に関して検討を加えたので、その結果について報告する。

材 料 と 方 法

成分検索には *Cattleya trianaei* "Mooreana" の新生シュートを、また生物活性試験には *Sophrolaeliocattleya* (Slc) Jane Miyoshi "Gertie" の幼苗を用いた。

¹⁾ 現在 久留米農芸高等学校

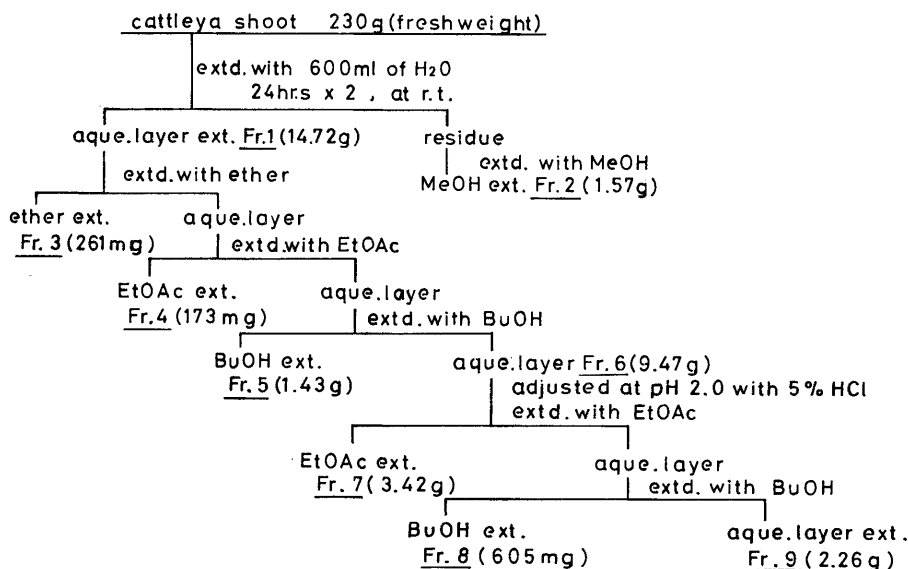


Fig. 1. Extraction and fractionation from cattleya shoots.

1. 分画法

抽出ならびに分離は Fig. 1 に示す方法によつて行なつた。すなわち、長さ約 15 cm に伸長したシュートを生重量で 230 g 細切し、蒸留水 600 ml を溶媒として室温下で、24 時間に 1 回の割合で 2 回抽出した。残渣はメタノール 600 ml で 24 時間室温で抽出し、メタノールエキス 1.57 g (Fr. 2) を得た。先の水抽出液 (Fr. 1) をエーテル 400 ml で 4 回振とう抽出し、エーテルエキス 261 mg (Fr. 3) を得た。水層は酢酸エチル 300 ml で 7 回振とう抽出し、酢酸エチルエキス 173 mg (Fr. 4) を得た。水層はさらにブタノール 300 ml で 4 回抽出し、ブタノールエキス 1.43 g (Fr. 5) を得た。水層 (Fr. 6) を 5% 塩酸で pH 2.0 とした後、酢酸エチル 200 ml で 6 回振とう抽出し、酢酸エチルエキス 3.42 g (Fr. 7) を得た。水層はブタノール 200 ml で 3 回振とう抽出し、ブタノールエキス 605 mg (Fr. 8) を得た。残りの水層をできるだけ低温減圧下で蒸発乾固させ、残渣 2.26 g (Fr. 9) を得た。

2. 生物活性試験法

Fr. 1 から 9 までのうち、Fr. 1 は 3.43 g を、Fr. 6 は 3.14 g を、それ以外は Fig. 1 に示したエキスの全量を RM 培地組成溶液 (Reinert and Mohr, 1967) 100 ml に溶解させ、0.1 N NaOH あるいは 0.1 N HCl で pH を 5.2 に調整した後、寒天 1.1% を加えて 100 ml 三角フラスコに 35 ml ずつ分注し、オートクレーブ (1.2 kg/cm²) で 20 分間滅菌して、こ

れを試験培地とした。一方、別に試験管で培養中のカトレヤ苗から本葉 2 枚、長さ 8 mm 程度に生長した幼苗 10 本ずつを試験用培地に無菌的に置床し、25°C、2000 ルックスの条件下で 14 週間培養しその生育調査を行なつた。また化合物 1 および 2 については、それぞれを RM 培地に 5, 10, 50, 100, 500 および 1000 ppm になるように添加し、上記と同様の方法で、化合物 1 添加区は 10 週間、化合物 2 添加区は 14 週間培養して、それぞれの幼苗の生育調査を行なつた。

実験結果

1. カトレヤ幼苗の生育におよぼす各フラクション物質添加の影響

各フラクションの抽出物質がカトレヤ幼苗の生育に与える影響を無菌培養により調査した結果を Fig. 2

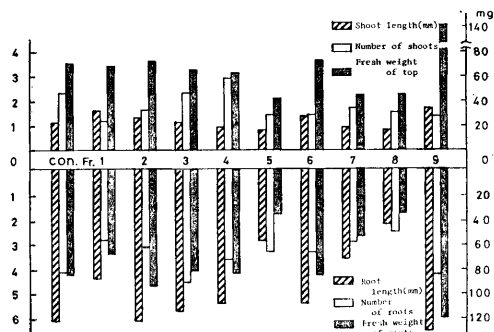
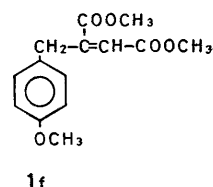
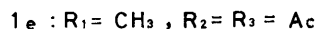
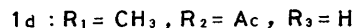
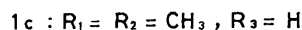
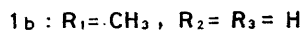
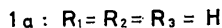
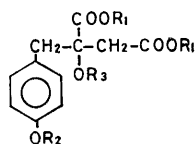


Fig. 2. Effect of each fraction on the growth of cattleya seedlings.

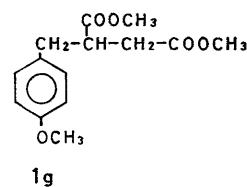
に示した。草丈の生長は Fr. 4, Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 の添加区で対照区に比べて抑制され, Fr. 9 の添加区では逆に生長の促進が認められた。根数および根長は Fr. 1, Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 の添加区で他区より劣ったが, Fr. 9 の添加区では逆に優れていた。また, 全体的な生育の指標となる茎葉ならびに根の生体重は対照区に比べて Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 の添加区で著しく劣り, Fr. 9 の添加区で優れていた。すなわち, 全体的な生育は Fr. 4, Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 の添加区で抑制されたといえよう。なお, Fr. 4 の添加区では茎葉が奇形化し, Fr. 7 および Fr. 8 の添加区では矮化現象も見られた。

2. カトレヤ幼苗生育の抑制ならびに促進物質の同定

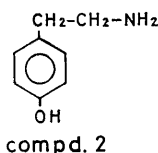
以上の結果から Fr. 4, Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 にはカトレヤの生育を抑制あるいは阻害する物質が含まれ, Fr. 9 には生育を促進する物質が含まれていることが推察された。Fr. 5, Fr. 7 および Fr. 8 を TLC で検索すると, 共通してジアゾ化ベンチジン試薬陽性の物質(フェノール)が認められ, 特に Fr. 7 ではこれが主成分であることが明らかとなった。そこで, Fr. 7 をエーテル・クロロホルムで再結晶し, 無色針状晶, 化合物 1 (1_a) を得た。 1_a は mp 182~184°, $[\alpha]_D^{20} -19.8^\circ$, $C_{11}H_{12}O_6$, ベンチジン試薬で橙色, Griess 試薬で赤色を示すことから, フェノールカルボン酸と推定された。紫外線吸収(UV)スペクトルは λ_{max} 278 ($\epsilon = 1800$), 284 ($\epsilon = 1500$) を示し, 赤外線吸収(IR)スペクトルでは 3200 cm^{-1} に水酸基の吸収, $1735, 1720\text{ cm}^{-1}$ にカルボニル, $1615, 1600\text{ cm}^{-1}$ にベンゼン環による吸収がみられた。核磁気共鳴(NMR)スペクトルで 6.74, 7.11 ppm (4H, $J = 8\text{ Hz}$) にそれぞれオルトカップリングした 4 個のアロマチックプロトンの存在が認められた。 1_a をエーテル中ジアゾメタンで処理し, 少量のエーテルから再結晶し, 無色針状晶 (1_b) を得た。 1_b は mp 92~94°, $[\alpha]_D^{20} -23^\circ$, $C_{13}H_{16}O_6$ で, NMR スペクトルにおいて 3.68, 3.76 ppm にそれぞれカルボメトキシ基のシグナルがみられた。また, 得られた 1_b を 2 N KOH で鹼化すると 1_a を生成することにより 1_b はジカルボン酸のメチルエステルであることが明らかとなった。 1_b の NMR スペクトルにおいては 2.72, 3.05 ppm (2H, dd, $J = 17\text{ Hz}$) と 2.90, 3.01 ppm (2H, dd, $J = 15\text{ Hz}$) にそれぞれ独立した 2 個のメチレンのシグナルがみられた。 1_b をさらにメタノール中ジアゾメタンで処理後, ヘキサン・ク



1f



1g



compd. 2

Fig. 3. Structures of eucomic acid and tyramine.

ロロホルムから再結晶し, 無色針状晶 (1_c) を得た。 1_c は mp 53~56°, $[\alpha]_D^{20} -31^\circ$, $C_{14}H_{18}O_6$ [MS: m/e 282 (M^+)] でベンチジン試薬では発色しないが, IR スペクトルで 3520 cm^{-1} に水酸基の吸収がみられた。NMR スペクトルにおいて新たにメトキシルのシグナルが現われることから, 1_a は 1 個のフェノール性水酸基と 1 個のアルコール性水酸基を有すると推定される。そこで 1_b を無水酢酸中 95°C でアセチル化すると無色油状のモノアセチル体 (1_d), $C_{15}H_{18}O_7$ を与え, IR スペクトルにおいて 3510 cm^{-1} に水酸基の吸収, 1745 cm^{-1} にアセチルカルボニルの吸収が認められた。 1_d をさらに無水酢酸中パラトルエンホルム酸の存在下でアセチル化し無色油状の 1_e を得た。 1_e の IR スペクトルではもはや水酸基の吸収は認められず, NMR スペクトルでは 2.10, 2.30 ppm にそれぞれアセトキシメチルのシグナル, 2.90, 3.20 ppm (2H, dd, $J = 15\text{ Hz}$) に一方のメチレンに帰属され

るシグナル, 3.29, 3.48 ppm (2H, dd, $J = 14$ Hz) にベンジルメチレンに帰属されるシグナルが認められた。

以上の知見から, 化合物1の構造として 1_a が推定された。さらに化合物1の構造を確認する目的で以下の反応を試みた。 1_c をピリジン中チオニルクロライドを加え 95°C で30分間反応すると無色油状の 1_f を与える。 1_f は $[\alpha]_D^{20}$, $C_{14}H_{16}O_5$ [MS: m/e 264 (M^+)] で 1_c の脱水体と考えられる。UVスペクトルは $\lambda_{\max}$ 277 nm ($\epsilon = 1700$), 283 nm ($\epsilon = 1560$) で共役系の延長は認められず, IRスペクトルにおいて3置換ビニールによる吸収が 1640 cm^{-1} に, NMRスペクトルで4.14 ppm に2H分のsingletが, 6.83 ppm (1H, s) に孤立したビニールプロトンがみられる。次に 1_f をパラジウム炭素上接触還元すると 1_g を与える。 1_g のIRスペクトルでは3置換ビニールの吸収は消失し, NMRスペクトルで2.26~3.20 ppm に5H分のmultipletがみられることから 1_g の二重結合が還元を受けたことが明らかとなり, 化合物1の構造は 1_a と確認された。なお, 化合物1は先に Heller und Tamm (1974) が *Eucomic punctata* L'Herit (*Liliaceae*) のりん茎から単離した eucomic acid と諸恒数が一致することから同一物質と確認した。

次に Fr. 9 をできる限り低温減圧下で乾燥し, エキスを酢酸エチル-メタノール (1:1 v/v) で再結晶を行ない淡褐色針状晶, 化合物2を得た (Fig. 3)。

化合物2は mp $265\sim 272^\circ$ で Beilstein 反応で緑色, ベンチジン試薬で橙色を呈し, フェノール性アミンの塩酸塩と推定された。化合物2のUVスペクトルは 278 nm に極大吸収をもち, IRスペクトルで 3100 cm^{-1} に水酸基, 1615 , 1590 cm^{-1} にベンゼン環の吸収が認められた。この物質のNMRスペクトルは 2.72~3.20 ppm に4H分のmultiplet, 4.60~5.00 ppm に4H分のbroad singletがみられ, また, 6.74, 7.08 ppm (4H, dd, $J = 8$ Hz) にそれぞれオルトカップリングした4個のアロマチックプロトンのシグナルが認められる。この物質における 2.72~3.20 および 4.60~5.00 ppm のシグナルの帰属が困難なため, この物質をピリジン中無水酢酸と加温しアセチル化後, ヘキサソクロロホルムより再結晶してジアセチル体, mp $99\sim 100^\circ$, $C_{12}H_{15}O_3N$ を得た。

この物質のNMRスペクトルは 1.94, 2.31 ppm にそれぞれアセトキシメチルのシグナル, 2.83 (2H, t, $J = 7$ Hz), 3.50 (2H, t, $J = 7$ Hz) にやや broad

なエチレンに帰属されるシグナルがみられた。重水置換で 5.5~5.8 ppm のNHに帰属される1H分のbroad singletは消失し, エチレンのシグナルはシャープなtripletに変わることから, この物質はチラミンのジアセタートと考えられる。そこで, 化合物2をアンモニアアルカリ性としてエーテル抽出し, ベンゼンより再結晶して無色針状品, mp $160\sim 161^\circ$ を得た。この物質は tyramine の標品と直接混融により同定した。Eucomic acid および tyramine がカトレヤから単離されたのは初めてである。

3. カトレヤ幼苗の生育におよぼす化合物1, 2の影響

化合物1 (eucomic acid) を添加したRM培地にカトレヤ幼苗を置床した時の生育結果を Fig. 4 に示す。濃度5 ppm 以上の添加では草丈, 根長, 茎葉重および根重ともに生育が抑制され, とくに 500 ppm 以上の高濃度区では茎葉および根の生体重増加に対する阻害が顕著であった。また, 化合物2 (tyramine) を添加した場合の生育結果を Fig. 5 に示す。すなわち, 草丈, 根長, 茎葉重および根重で示される生育調

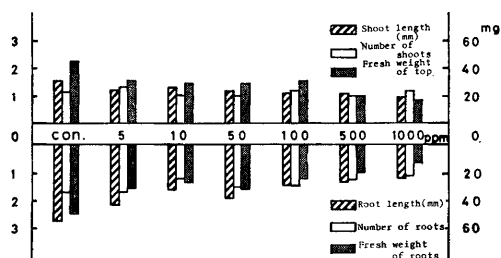


Fig. 4. Effect of eucomic acid on the growth of cattleya seedlings.

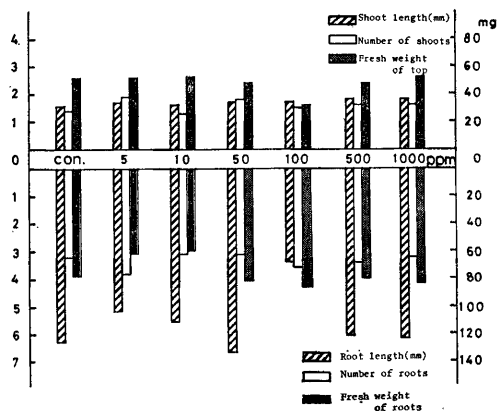


Fig. 5. Effect of tyramine on the growth of cattleya seedlings.

査では、いずれも対照区に比べて生育の抑制、促進に有意差は認められなかった。

考 察

季節的にカトレヤの茎頂培養を困難にしている組織の褐変現象は、その主要原因が茎頂培養中に生成されるポリフェノール物質にあり、しかもそれが茎頂組織の活着と生育を阻害することが知られている。

したがって、カトレヤ組織の褐変現象を生理的に解明し、その主因となる褐変物質の諸性質を明らかにすることは、最終的には同物質の影響を除去する方法を見出すことにもつながる重要なことである。褐変現象の季節的な消長については著者らによつて明らかにされており（未発表）、新芽の伸長生長の最も旺盛な6月から7月頃に最も著しく現われることから、生育期との関連が示唆される。

本研究ではカトレヤの茎葉に含まれている物質を、9フラクションに分画したが、それらのうち、カトレヤ幼苗の生育に影響を与えたのは Fr. 1, 5, 7, 8 および 9 であった。とくに Fr. 5, 7 および 8 の添加区では強い生育抑制が認められたのに対し、Fr. 9 添加区では旺盛な生育が認められ、極めて対照的であった。最初の水抽出液 (Fr. 1) の添加区がきほど著しい生育の抑制を示さないのは試験の実施時期も考慮されなければならないが、同区には阻害、促進の両物質

が共存していることに基づくものと考えられる。

Fr. 2 および Fr. 3 はカトレヤ幼苗の生育にほとんど影響を与えなかった。これに対して、Fr. 5, 7 および 8 は顕著な生育阻害が認められた。とくに Fr. 7 はフェノール物質が主成分で、著量の eucomic acid が単離された。しかも本物質の 5 ppm 以上の濃度で生育抑制作用が確認されたことから、カトレヤ生育抑制に対する同物質の関与が示唆されたといえよう。Fr. 7 にはこのほかに未固定のフェノール性物質が数種検出されており、それらが生育抑制に関連をもっているものと思われ、今後の詳細な成分研究を待ちたい。

Fr. 9 からは著量の tyramine を単離したが、本物質の添加試験では、生育促進ならびに阻害の両作用は示さなかった。しかし、Fr. 9 添加区では著しい生育促進が認められることから、同フラクションには tyramine 以外の未確認の物質が含まれているか、あるいは他の少量物質との共存で生育促進効果を示すに至るものと考えられる。

以上2つの物質は生合成的に極めて密接な関係があり、カトレヤから両物質が微量単離されたことは極めて興味深い。ちなみに、tyramine は tyrosine の脱炭酸により生成される。一方、Fig. 6 に示すように eucomic acid の生合成の経路は a, b 両経路の可能性が考えられるが、他のラン科植物から単離されてい

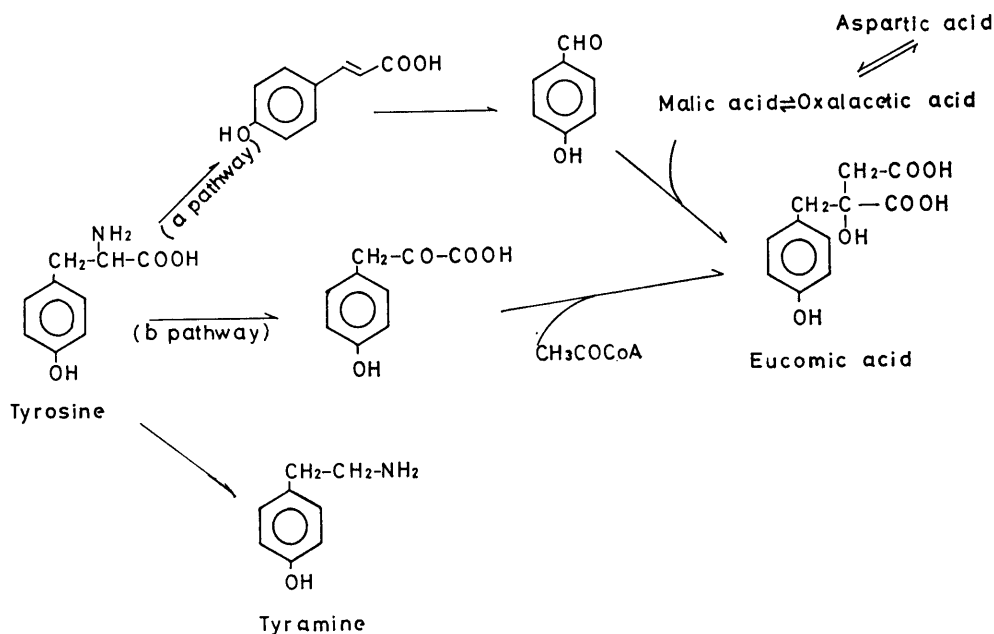


Fig. 6. Biogenetic pathways of eucomic acid and tyramine.

る同系統の化合物群の存在 (Brandänge and Luning, 1969) から, a 経路が妥当と考えられる。

カトレヤの組織培養の困難さは tyramine および eucomic acid がいずれもカトレヤ組織から多量に単離されることから, 茎頂培養時にこれら二つの成分が著量に生成され, 培地に溶出することにより, アミノ酸代謝, TCA サイクル等のバランスがくずれ, 生理的な不均衡をもたらすと同時に, 培地に溶出した eucomic acid のもつ生育抑制作用のため, 生育阻害が誘起されるものと思われる。また, カトレヤの組織培養時における褐変現象はカトレヤに著量含有されているこれらフェノール類の酸化縮合によるものと推測される。

摘出されたカトレヤの茎頂組織は最初の3週間程度は液体培養を行なうのが常法である。したがって, 褐変物質を含んだ培養液中に摘出した茎頂組織が長く浸り続けると褐変物質の影響を著しく受けて, 枯死する率が高くなるものと推測される。これらのことから培養液が褐変物質によって汚染されはじめたら, できる限りすみやかに新しい培地に移すことが大切である。

摘 要

カトレヤの無性繁殖の能率的な方法として, その実用化が期待されている茎頂培養において, 障害となっている茎頂組織の褐変現象を解明するために本研究を行なった。褐変現象を引き起こす主因とみなされるカトレヤ茎葉中のフェノール類の単離同定, ならびにこれらの物質がカトレヤ幼苗の生育におよぼす影響について検討を加え, 次の結果を得た。

1. カトレヤの組織から eucomic acid ($C_{11}H_{12}O_6$) と tyramine ($C_8H_{11}ON$) の二つのフェノール化合物を著量単離した。

2. Eucomic acid は 5 ppm 以上の高濃度において, カトレヤ幼苗の生育を著しく抑制した。tyramine は生育に対して直接的には関与しなかった。

3. カトレヤ茎葉からの抽出物中には上記の物質のほかに, カトレヤの生育を促進する物質が含まれているものと推定される。

4. 二つのフェノール物質が茎頂培養時に著量生成され, 培地に溶出することにより, アミノ酸代謝, TCA サイクル等の均衡がくずれ, 生理的な不均衡をもたらすと同時に, 培地に溶出した eucomic acid の生育阻害作用により褐変現象が引き起こされるものと思われる。

文 献

- Brandänge, S. and B. Luning 1969 Studies on Orchidaceae alkaloids. *Acta Chem. Scand.*, **23**: 1151-1154
- Heller, W. und C. Tamm 1974 Isolierung, Konstitution und Synthese der (R)-(-)-Eucominsäure. *Helvetica Chimica Acta*, **57**: 1766-1784
- Lindemann, E. G. P., J. E. Gunckel and O. W. Davidson 1970 Meristem culture of cattleya. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **39**: 1002-1004
- Morel, G. M. 1964 Tissue culture; a new means of clonal propagation of orchids. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **33**: 473-478
- Reinert, R. A. and H. C. Mohr 1967 Propagation of cattleya by tissue culture of lateral bud meristem. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **91**: 664-671
- Scully, R. M. 1967 Aspects of meristem culture in the *Cattleya alliance*. *Amer. Orchid Soc. Bull.*, **36**: 103-108

Summary

On the multiplication of *Cattleya* species by shoot tip culture, some phenomena in which the medium changes into reddish brown and the growth of shoot tip is inhibited have occurred. Although the participation of phenolic compound is suggested, the reason is still unclear.

In this study, eucomic acid and tyramine were isolated as major phenolics from *Cattleya trianaei* "Mooreana" and identified by spectrophotometric comparison. Eucomic acid was apparently effective at a concentration of 5 ppm for the assay of growth inhibition using the shoot tip culture of *Sophrolaeliocattleya* (Slc) Jane Miyoshi "Gertie." Tyramine had no effect for the same bioassay, whereas the original fraction was rather strongly stimulatory. It was suggested that some growth stimulator should be existent

in this fraction.

In the light of the present result, the formations of eucomic acid and tyramine may play an important role in the metabolism of amino acid and TCA cycle. The biogenetic pathways of eucomic acid including tyramine have been proposed.