

シャクヤクの組織培養細胞中のガロタンニン
およびペオニフロリンの含有量について

Contents of Gallotannins and Paeoniflorin
in Callus of Peony (*Paeonia lactiflora* PALL.)

加藤 芳伸 林 隆章

Yoshinobu Katoh and Takaaki Hayashi

芍薬は漢方で繁用されている重要な生薬のひとつであり、その鎮痛、鎮静、鎮痙作用は主にモノテルペン配糖体であるペオニフロリンによるとされている¹⁾。また最近芍薬は血中尿素窒素 (BUN) 減少作用を持つガロタンニン類を含むことが報告されている²⁾。さきに山本らはシャクヤクの薬から誘導されたカルスおよび不定根中のモノテルペン配糖体生成について検討し、不定根中のモノテルペン配糖体含有量は植物体の根と同程度であることを報告している³⁾。しかし、カルスのガロタンニン生成については検討されていない。そこで著者らは今回、シャクヤク種子より組織培養を試み、カルスの成長とガロタンニンおよびペオニフロリン生成について若干の知見を得たので報告する。

シャクヤク (*Paeonia lactiflora* PALL.) の種子は外皮を除いた後、エタノール-過酸化水素水 (1:1) により5分間、表面を殺菌した後、Murashige-Skoog 培地 (MS 培地)⁴⁾ に置床した。ホルモンのカルス形成および生育に対する効果を調べるために、2週間後に発芽した種子を2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) および Kinetin を Table 1 に示す濃度で加えた MS 培地に移し、カルス培養を行なった。カルスは2カ月ごとに新しい MS 培地に移し、23°C で暗室にて培養を行なった。カルスの生育試験には3回継代培養を行なったカルスを使用した。

ガロタンニンおよびペオニフロリン定量用のカルス培養は下記の条件で行なった。基本培地として MS 培地⁴⁾、White 培地⁴⁾、B5 培地⁵⁾、Linsmaier-Skoog 培地⁵⁾ を用い、添加ホルモンとして2,4-D を2 mg/l 加えた。これらの培地に MS 培地で3回継代培養を行なったカルスを置床し、2カ月培養後にカルスをガロタンニンおよびペオニフロリンの定量に供した。

また、カルスより不定根を形成させるため、2,4-D を2.0 mg/l 添加した MS 培地で2カ月間培養したカルスをホ

ルモン無添加の MS 培地に移し培養した。不定根を形成したカルスについてガロタンニンおよびペオニフロリンを定量した。

カルス中のガロタンニンおよびペオニフロリンは高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量した。まず、各培地で培養したカルス試料を30°C で温風乾燥後、50%含水アセトン5.0 ml を加え、30分間振とう抽出後、ろ過し、抽出液を得た。

ガロタンニンの定量には抽出液3.0 ml をとり、窒素気流下で溶媒を留去後、残渣に蒸留水0.2 ml、酢酸エチル0.2 ml を加えて攪拌後、静置し、酢酸エチル層をとり試料液とした。HPLC はすでに報告されている⁷⁾ 下記の条件を用いた。

機 器：日立635型高速液体クロマトグラフ (データー処理機付き)

カ ラ ム：Nucleosil 50-5 (4φ×250 mm)

移 動 相：A) n-Hexane

B) MeOH : THF : HCOOH = 30 : 10 : 1
(oxalic acid 1 g/l)

A : B = 55 : 45

流 速：1.0 ml/min

測定波長：280 nm

注 入 量：10μl

ペオニフロリンの定量には、抽出液1.0 ml をとり、窒素気流下で溶媒を留去後、残渣を50%エタノール0.1 ml に溶かして試料溶液とした。HPLC はすでに報告されている⁸⁾ 下記の条件を用いた。

機 器：日立635型高速液体クロマトグラフ (データー処理機付き)

カ ラ ム：Nucleosil 5C₁₈ (4φ×250 mm)

移 動 相：CH₃CN : H₂O : AcOH = 13 : 87 : 1

流 速：1.0 ml/min

測定波長：240 nm

注 入 量：15 μ l

MS 基本培養培地に置床したシャクヤクの種子の発芽率は62%であった。この発芽した種子を2,4-DおよびKinetinをTable 1に示す濃度で加えたMS培地に移し、培養を行なった。培養1ヵ月後に2,4-D-Kinetin；0-1.0 mg/l以外の培地においてはカルスを形成し、特に2,4-D-Kinetin；2.0-0 mg/lの場合は供試した種子のすべてがカルス化した。そこで培養条件として、2,4-D-Kinetin；2.0-0 mg/lを用いることとした。Fig. 1Aは2.0 mg/lの2,4-Dを添加したMS培地で培養を行ない6ヵ月経過したカルスを示している。

Table.1. Effects of 2,4-D and Kinetin on Peony Callus Production

2,4-D (mg/l)	Kinetin (mg/l)	No. of seeds	No. of seeds producing callus
2.0	0	5	5
2.0	0.1	5	4
2.0	0.5	5	1
2.0	1.0	5	1
0	1.0	5	0

The germinated seeds of Peony were cultivated on MS medium containing 2,4-D and kinetin in various concentration at 23°C for 30 days in the dark.

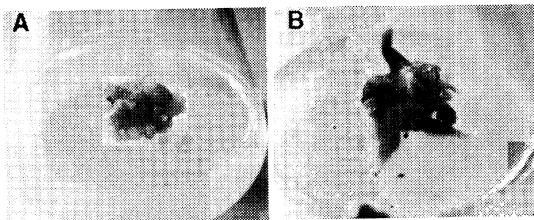


Fig. 1 A) Peony Callus after Cultivation for 6 Months at 23°C in the Dark. B) Peony Callus differentiated adventitious Roots for 2 Months of Cultivation on Murashige-Skoog's Medium without Hormones.

今回、植物組織培養培地としてよく利用されている4種類の培地についてシャクヤクカルスの生育に対する効果を調べた。カルスはFig. 2に示すようにB5培地を用いた場合が最も生育が良好で、培養2ヵ月目で新鮮重量が約5倍に増加した。

ホルモン無添加のMS培地において約8週間培養後に不定根が形成された (Fig. 1B)。

2,4-Dを添加した4種類の培地で2ヵ月間培養したカルスについてガロタンニンおよびペオニフロリンの含有量を測定したところガロタンニンは0.07~0.16%, ペオニフロリンは0.05~0.24%であり、植物体の根のガロタンニンおよびペオニフロリンの含有量(ガロタンニン約0.5~1.0%, ペオニフロリン約2~4%)^{6,8)}に比較して約1/10であった。

一方、ホルモン無添加の培地で6ヵ月間培養され不定根を形成したカルスのペオニフロリン含有量は1.24%であり、山本ら³⁾と同様の結果を得た (Table 2)。またガロタンニン含有量も1.60%と植物体の根の含有量と同程度であった (Table 2)。以上の結果より不定根を形成したカルスは植物体の根と同様のガロタンニンおよびペオニフロリン生成並びに含有量の維持能力を有することが示唆された。

本研究にあたり、シャクヤク種子を提供していただいた国立衛生試験所北海道薬用植物栽培試験場畠山好雄博士に深謝いたします。

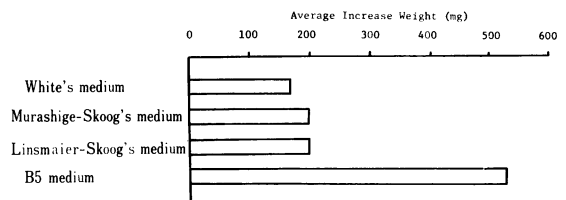


Fig. 2 Average Increase in Fresh Weight of Peony Callus in various Media

Four flasks were used for each treatment. Each flask was received 100mg of callus of the start of the culture period. The flasks were kept at 23°C for 60 days in the dark. The media contained 2 mg of 2,4-D per liter.

Table.2. Amounts of Paeoniflorin and Gallotannins in Peony Callus Cultivated on various Media

Callus	Medium	Paeoniflorin (%)	Gallotannins (%)
Callus*	White	0.05	0.09
	Murashige-Skoog	0.11	0.07
	Linsmaier-Skoog	0.24	0.16
	B5	0.12	0.13
Callus**	Murashige-Skoog	1.24	1.60

* Undifferentiated callus

** Differentiated callus (root formation)

文 献

- 1) 高木敬次郎他：薬学雑誌，89，879（1969）
- 2) M. Nishizawa et al.：Chem. Pharm. Bull.， 31，
2593（1983）
- 3) a. 山本久子他：日本生薬学会第29年会講演要旨集，
p 59（1982）
b. 山本久子他：日本薬学会第103年会講演要旨集，
p258（1983）
- 4) 竹内正幸，石原愛也，古谷力：植物組織培養（朝倉書店），p70～77（1977）
- 5) 山田康之：植物細胞培養マニュアル（講談社），
p21～26（1984）
- 6) 西澤信他：道衛研所報，32，61（1982）
- 7) 西澤信他：薬学雑誌，104，1244（1984）
- 8) 林隆章他：道衛研所報，31，23（1981）