チャの根におけるサイトカニン活性の変動とその分離

農林水産省茶業試験場

津志田藤二郎・竹尾 忠一

Separation of Cytokinin-like Substances from the Root of Tea and the Changes in the Content during Sprouting of Tea Shoots

By Tōjirō TSUSHIDA and Tadakazu TAKEO

National Research Institute of Tea

1 はじめに

¹⁾ 前報では茶芽における サイトカニン活性の検出と、その生育に伴う変動について報告した。しかし、サイトカニンを活発に合成する部位は根であるとする報告も多数あり、根における サイトカニン活性の変動と芽の生育との関係を明らかにすることは、重要であると考えた。そこで今回は茶芽の萌芽前後における 根のサイトカニン活性の変動を調査するとともに、その分離精製を試みた。

2 実験方法

2.1 サイトカニン活性の測定法

¹⁾ 前報に準じた。

2.2 サイトカニン様物質の抽出と精製

(1) サイトカニン様物質の抽出

当試験場のさし木圃場から1年生苗を2月20日から、4月20日まで計7回40~70本ずつ掘り取り、その根を洗浄した後水を充分ふき取り、メタノールを加えてミキサーで摩砕抽出した。なお、用いた根はすべて根幹部を除いたものである。得られた摩砕液を東洋 No. 2 ろ紙でろ過した後、前報の方法に準じて分画し、¹⁾ n-ブタノールで抽出されたA画分について、ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーを行い、溶出液のサイトカニン活性を測定した。サイトカニン様物質の分離精製には2年生苗の根を用い、同様にメタノール抽出した後A画分を調整した。

(2) セファデックス LH20 カラムクロマトグラフィー

2 cm×90 cm のカラムにセファデックス LH20を35%エタノール溶液にけん濁して詰めた後、同溶液でしばらく洗浄した。このカラムにA画分溶液を添加し、同溶液で溶出した。溶出流量は1.57 ml/minであり、20gずつ分画し、濃縮して、アルコールを除去した後、M/75

リン酸緩衝液で一定量にし、そのサイトカニン活性を測定した。

(3) シリカゲル薄層クロマトグラフィー

ワコーゲル B-10 を20 cm×20 cm のガラスプレートに0.50 mm の厚さで塗布し、常法どおり活性化させた後、n-ブタノール：酢酸：水(12:3:5)を溶媒として用い、室温で展開した。展開終了後充分乾燥し、各 Rf ごとにかき取り、80%メタノールで2回抽出し、減圧濃縮した後、M/75 リン酸緩衝液を加え、サイトカニン活性を測定した。

ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィー、¹⁾ パーパークロマトグラフィーは前報に準じた。

3 結果および考察

3.1 チャの根におけるサイトカニン活性の萌芽前後での活性変動

図1は萌芽前後におけるチャの根のメタノール抽出物のA画分のサイトカニン活性をポリビニールピロリドンカラムで分離した結果を示すものである。いずれの場合もフラクション番号3~4本に強い活性が検出された。この溶出位置は天然界に存在するサイトカニンであるゼアチン、リボシルゼアチンの溶出位置と一致していた。

表1にはベンジルアデニン相当量に換算した各時期の根におけるサイトカニン含量を生鮮重当りで示した。これによると3月14日頃に根におけるサイトカニン濃度が最高になり、以後減少していることがわかる。他方、苗1本当りのサイトカニン含量は4月4日に最も高くなり以後減少した。萌芽は4月4日であった。4月4日における根のサイトカニン含量はベンジルアデニン相当量で0.05 µg であり2月20日の2.6倍であった。またこの時期における根の生長も著しく、4月20日には11.4gとなり、2月20日の約2倍になった。

萌芽前における根のサイトカニンの増加、と萌芽後

図1 チャの根のA画分のポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーによる
溶出パターンの萌芽前後における変動

における減少はポプラにおいてもすでに観察されている。HEWETT 等は樹液のサイトカイニンの変動も同時に調査することにより、新芽へ根で合成されたサイトカイニンが移動することを推定している。

3.2 チャの根のサイトカイニン様物質の分離と精製

種々のクロマトグラフィーを用いてA画分のサイトカイニン様物質を分離精製した。図2にはセファデックス LH 20 カラムクロマトグラフィーの結果を示した。この方法ではA画分におけるサイトカイニン活性は三つのグループに分けることが出来た。図3にはポリビニールピ

表1 萌芽前後におけるチャの根の
サイトカイニン含量の変動

掘 取 日	本数 本	重 量 g/本	サイトカイニン*	
			μg/kg	μg/本
2月20日	55	5.64	2.23	0.0125
2月27日	56	5.36	4.37	0.0233
3月6日	54	8.89	4.79	0.0426
3月14日	50	8.00	5.46	0.0437
4月4日	46	11.24	5.03	0.0565
4月12日	40	11.36	3.39	0.0386
4月20日	65	11.40	2.83	0.0323

但し、萌芽期は、4月4日であった。

*：ベンジルアデニン相当量

図2 セファデックス LH20 カラムクロマトグラフィーによるA画分の分離とそのサイトカイニン活性
 ————：コントロール（緩衝液のみ）と、0.2μg ベンジルアデニン/10ml を用いて測定した場合のクロロフィル合成量
 - - - - -：260 nm 吸収 Z：ゼアチン RZ：リボシルゼアチン

図3 ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーによるA画分の分離とそのサイトカニン活性
 ----: 260 nm 吸収

ロリドンカラムクロマトグラフィーの結果を示した。この場合もやはりA画分のサイトカニン活性は三つのグループに分けることが出来た。双方のクロマトグラフィーで得られた最初の活性ピークは、いずれもゼアチンとリボシルゼアチンの溶出位置と一致していた。しかし、他の二つのピークは不明であった。次にペーパークロマトグラフィーにより分離した結果を図4に示した。n-ブタノール：酢酸：水（12：3：5）を展開溶媒にした場合は R_f 0.8 付近に強いサイトカニン活性が得られた純品のゼアチンを同様に展開した結果と R_f 値がほぼ一致した。また0.3M ホウ酸緩衝液（pH 8.3）を展開溶媒として用いたところ、 R_f 0.65 付近に強い活性が得られ、 R_f 0.8 以上には活性が得られなかった。 R_f 0.65 にはゼアチンが展開されることが明らかになっている。以上より根には主として各種クロマトグラフィーにおける挙動がゼアチンと類似した化合物が存在することが推定された。次にポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーで得られた活性画分（フランクシオン番号3～4）を濃縮して、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを行った結果を図5に示した。この場合も R_f 値はゼアチンとほぼ一致していた。この活性画分をかき取り、80%エタノールで抽出し、再びポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーで分離した結果を図6に示した。(b)はその溶出パターンを示したものであるが二つのピークに

図4 A画分のペーパークロマトグラフィーによる分離とそのサイトカニン活性の分布

(a): 展開溶媒, n-ブタノール：酢酸：水（12：3：5）
 (b): 展開溶媒, 0.3M ホウ酸緩衝液（pH 8.3）
 ----: コントロール（M/75 リン酸緩衝液）

Z: ゼアチン, RZ: リボシルゼアチン

図5 ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーで分離した活性画分のシリカゲル薄層クロマトグラフィーによる分離と、そのサイトカイニン活性

(a): ベンジルアデニン溶液 0.2 µg/10 ml

(b): ベンジルアデニン溶液 0.4 µg/10 ml

⋯: 紫外線吸収

分れた。最初のピークは 272 nm に極大吸収を持ち、カフェインと吸収スペクトラムが一致した。他方のピークは極大吸収が 268 nm にあり、市販のゼアチンと極大吸収が一致していた。しかし吸収スペクトラムは市販のものに比べ、極大吸収付近のピークがブロードであり、不純物の混入が予想された。(b) は市販のカフェインとゼアチンを混入して同様に溶出した結果であるが、(a) とよく一致した。

以上のことからチャの根における サイトカイニン様物質の主体は、ゼアチンであることが推定された。

4 要 約

チャの根における サイトカイニン活性の変動を萌芽前後に 7 回調査した。この結果萌芽前に根のサイトカイニン濃度が高くなり、萌芽後には減少すること、苗の根 1 本当りのサイトカイニン量は萌芽期に最も多く、以後減少することが明らかになった。

セファデックス LH 20, ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーの結果より、n-ブタノールに抽出される A 画分には、少なくとも三種のサイトカイニンが存在することが明らかになった。この中で最も活性量の高いフラクションは、ペーパークロマトグラフィー、薄

図6 薄層クロマトグラフィー分離した活性画分のポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーの溶出パターン

層クロマトグラフィーなどで、ゼアチンと類似した挙動を示すことが明らかになった。薄層クロマトグラフィーで分離した活性画分を再び、ポリビニールピロリドンカラムクロマトグラフィーで精製し、その吸収スペクトラムをゼアチンと比較したところ、極大吸収が 268 nm にあり一致した。

5 文 献

- 1) 津志田藤二郎, 竹尾忠一: 茶研報, No. 54. (1981).
- 2) HEWETT E. W., and P. F. WAREING: *Physiol. Plant.*, **28**, 393~399 (1973).
- 3) HEWETT E. W., and P. F. WAREING: *Physiol. Plant.*, **29**, 386~389 (1973).
- 4) 葭田隆治, 折谷隆志: 日記記, **43**, 47~51 (1974).

Summary

The concentration of cytokinin in the roots increased before sprouting of new shoots, and gradually decreased after sprouting. The amount of cytokinin in the roots reached to the highest value at the just sprouting stage.

It was clarified by sephadex LH 20 column

chromatography and polyvinyl-pyrrolidone column chromatography that the fraction A extracted by n-butanol from basic aqueous solution of the root homogenate had at least three kinds of cytokinin-like substances. Rfs of the main cytokinin-like substances found in the root extract

on paper chromatogram and thin-layer chromatogram were same as those of zeatin. The UV spectrum of the purified substance had a maximum absorption at 268 nm and coincided with that of zeatin.

(Sep. 29, 1981)