

精油の生合成

I 最終生産物としての Menthol

池 畑 勇 作

Yusaku IKEHATA: Biogenesis of essential oil

I Menthol is one of the endproducts

Received March 30, 1974

The essential oils found in the mint plant are menthol, menthone, isomenthone, piperitone, limonene, carvone, pulegone, menthofuran and the others. Some schemata have been made concerning biogenesis of these essential oils.

As the results of the following experiments I~V, the author attained to the conclusion that menthol must be one of the endproduct of these natural products.

緒 言

1950年代に radioisotope の利用が導入され、gas chromatography 等の微量分析法の急速な発展とともに、天然有機化合物の生合成経路が明確にされつつあり、現在では光合成による糖を出発点として、シキミ酸経路、酢酸経路、メバロン酸経路、アミノ酸経路の4つの主要経路に分類されるに至っている¹⁾。

ハッカ草に含まれる各種の精油は、メバロン酸を前駆物質とするイソプレノイド経路をへて生合成されるものと推察されるが、筆者は下記の各種実験結果から、menthol がその最終生産物の1つであるとの結論に達したので、ここにその概要を述べる。

実験材料と精油分析法

供試材料は日本ハッカ (*Mentha arvensis L. var. piperascens Mal.*) に属する数品種であるが、精油の移行実験には peppermint に属する *M. piperita L.* を供試した。

free menthol の定量は三井その他²⁾ により、menthone の定量は塩酸 hydroxylamine を用いる oxime法 (GUENTHER³⁾) により、ester menthol は鹼化価測定によって算出した。なお gas chromatography による分析も併用された。

実 験 結 果

実験1 節位別葉の精油成分の差異

また第I葉(発生順に初発葉からの葉位はI, II, IIIで示し、展開開始葉から下位に向っては1, 2, 3の数字で示す)が残っている幼植物について測定を行なった成績は第1表、第2

第1表 節位別葉の含油量

葉位	1葉当り 乾物重	対含 乾物率	1葉当り 含油量
	mg	%	mg
X (1)	9.3	0.86	0.08
IX (2)	11.2	2.85	0.32
VIII (3)	20.5	1.66	0.34
VII (4)	28.0	1.41	0.39
VI (5)	36.5	1.06	0.39
V (6)	34.9	0.77	0.27
IV (7)	26.6	0.40	0.11
III (8)	17.8	0.32	0.06
II (9)	10.1	0.10	0.01
I (10)	5.4	0.09	0.00

表に示すごとくである⁴⁾。

含油率は第I葉から発生順に上位に向かって次第に上昇するが、展開第1葉においては低下する。1葉当り含油量は完全な葉形を示す第V葉以後急激に増加する。精油成分含有率については、(-)-menthol (free menthol) 含有率は葉の展開後の日数経過にしたがって上昇するものと思われ、形態的には未完成の第III葉(第I, 第II葉は試料不足で成分量の測定不可能であった)についてもきわめ

第2表 節位別葉の精油成分含有率

葉位	(-)-limonene	(+)-3-octanol	(-)-menthone	(+)-iso-menthone	(+)-neo-menthol	(-)-menthol	piperitone
	%	%	%	%	%	%	%
X (1)	0.2	—	12.4	2.9	1.2	70.6	3.3
IX (2)	0.4	0.4	17.3	6.6	1.5	69.5	1.4
VIII (3)	—	0.3	9.5	3.3	1.4	80.4	1.2
VII (4)	—	0.4	6.8	3.2	1.7	84.0	0.8
VI (5)	—	0.5	7.0	3.2	1.9	83.4	0.9
V (6)	—	0.4	5.2	2.1	1.5	85.4	0.6
IV (7)	—	0.1	1.0	0.1	1.4	91.4	0.2
III (8)	—	0.1	0.7	0.1	1.3	91.8	0.1

註 neomenthol 中には menthylacetate も含まれる。

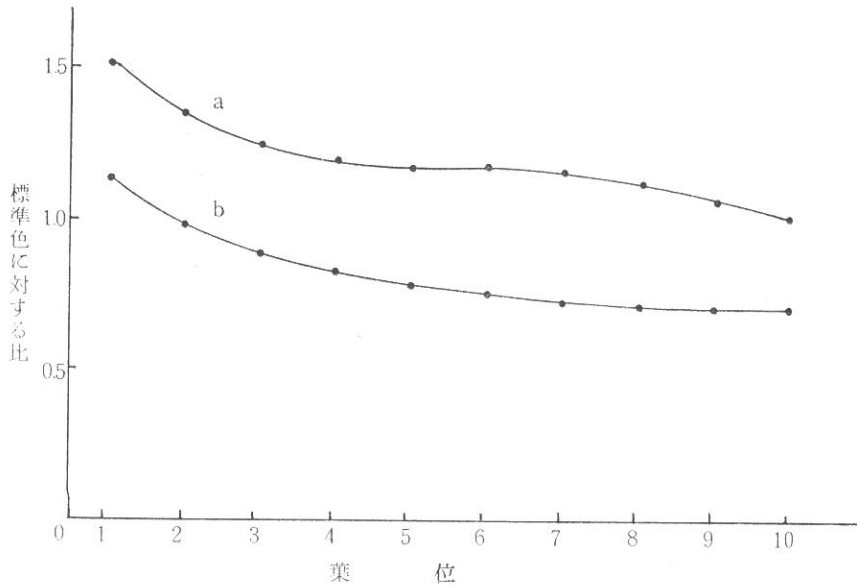
て高い。(-)-menthone, (+)-isomenthone, piperitone 含有率は展開第1葉から下位に向かって減少する。limonene は展開第2葉までは見出されるが、第3葉以下には出現しない。

free menthol, menthone の節位別葉における消長については、1番期, 2番期, 3番期において数回測定を行なったが^{5) 6)}, 各刈取期とも同様の傾向を示す。すなわち前者の含有率は下位葉に向かって漸増し、後者の含有率は反対に漸減する。1葉当り free menthol 含有量は含油量とはほぼ同様の傾向を示すが、最高の含有量を示す節位は、含油量が完成直後の葉においてももっとも多いのに対し、それよりさらに数節下位の老成葉において最大となり、以下下位に向かって漸減する。menthone 含有量は第1葉以下漸増し、未完成の第3~第4葉ですでに最高含有量に達し、以下下位に向かって漸減する。

実験2 節位別葉の dehydrogenase 活性度の相違

dehydrogenase 活性度は FAHMY⁷⁾ その他の方法を参照し、TTC により生じた赤色の formazan を酢酞エチルにより抽出し、標準色と比較した。

実験結果は第1図に示すごとく dehydrogenase 活性度は、展開開始葉においてもっとも高く、下位に向かって低下するが、第4葉以下はその差が比較的少ない。



第1図 節位別葉の脱水素酵素活性度

注：a 品種ハクビ b 品種サンビ

実験3 葉の生育に伴う精油成分の消長

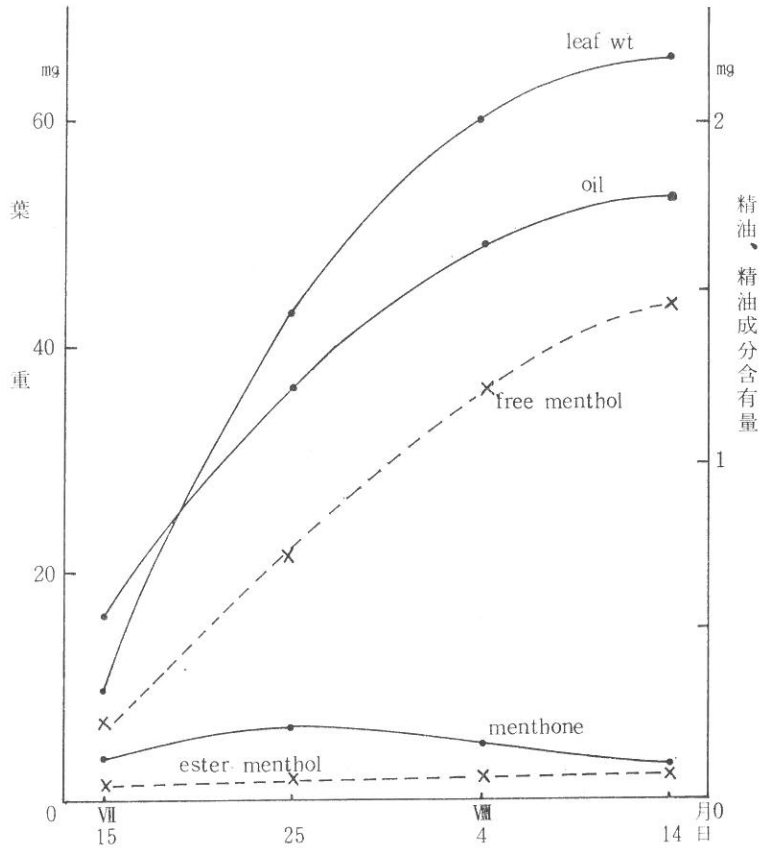
ハッカ草の出葉期は3.0日から5.2日におよぶので、実験1に供試した節位別葉は、かなり異なった気象条件下に生育することが推察される。また第1表でも認められるが、葉の機能は節位により異なり、第1葉（初発葉）はきわめて小型で機能も低く、第V葉以後本来の形を示す⁸⁾。さらにこの期間の油腺脱落、精油揮散の影響⁹⁾も考慮しなければならない。

これらの影響をできるだけのごくべく、同位葉について、その生育に伴う精油成分の消長を測定した^{10a)}。すなわち展開葉から数えて第3位葉にエナメルで標記しておき、当時の展開第1葉に相当する同位葉を、10日目ごとに採取し分析した。

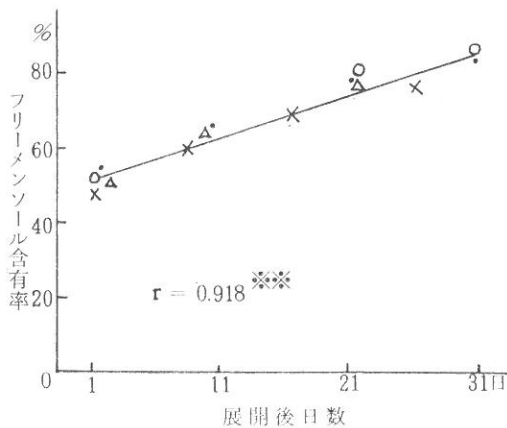
含油率は葉の生育に伴って低下するが、1葉当たり含油量は展開後30日間は継続して増加する。free menthol 含有率は生育に伴って上昇するが、menthone および ester menthol 含有率は低下する。free menthol 含有量は生育に伴って増加する。ester menthol 含有量の変動は少なく、生育に伴ってわずかに増加する。menthone 含有量は生育初期は増加するが、展開20日以後は明らかに減少する（第3表、第2図）。

第3表 葉の生育に伴う含油率、精油成分含有率の消長

調査月日	葉乾物重 mg	含油率 %	free menthol 含有率 %	ester menthol 含有率 %	menthone 含有率 %
7月15日	10	4.90	5.4	7	3.1
7月25日	4.5	2.85	5.8	4	1.4
8月4日	6.2	2.70	8.1	3	5
8月14日	6.7	2.71	8.3	3	6



第2図 葉の生育に伴う精油、精油成分含有量の消長



第3図 葉の生育に伴う free menthol 含有率の消長

生育条件の著しく異なる2番期および3番期について、葉展開後の日数経過と free menthol 含有率との関係は第3図に示すごとく、相関係数 $r=0.918^{**}$ となり、free menthol 含有率は環境条件とは無関係に、葉の生育日数の函数として考えられ、次の直線回帰方程式が得られた。

$$Y = 0.96X + 55.51$$

Y: 葉の free menthol 含有率

X: 葉の展開後日数

実験4 遮光下における精油の移行

長大な花穂をもち menthol と menthone を精油の主成分とする *M. piperita L.* を供試し、花穂のみを20日間完全に遮光し、この間に花穂中に生成される精油成分を測定した^{10b)}。遮光は直径10cm、長さ30cmのボール紙製二重円筒の内側を黒、外側を白とし、小孔を交互に配置して、光線を遮断しつつ通気をはかった。

試験成績は第4表に示すごとくである。完全遮光状態の花穂においても、精油の生成される

完全遮光状態の花穂においても、精油の生成される

ことが認められたが、その基質は葉の同化生産物の移行によるものと思われ、花穂遮光区の着葉の含油率、含油量は対照区より低下した。精油移行量としては1花穂当り1mg程度となり、対照区生成量の約30%に相当する。

第4表 遮光下における花穂の精油成分の変化

試験区	部分	乾物重 (1葉・1花穂当り) mg	含油量 (1葉・1花穂当り) mg	含油率 %	対精油含有率	
					menthol %	menthone %
試験開始時	花穂	47.4	0.96	2.02	11.9	30.0
	葉	33.1	0.55	1.66	55.5	34.0
対照区 (20日後)	花穂	173.2	4.09	2.36	26.5	38.6
	葉	39.8	0.46	1.15	70.5	17.2
花穂遮光 (20日後)	花穂	140.0	1.96	1.40	8.2	35.2
	葉	35.4	0.39	1.09	72.4	19.2

註 1. 葉は花穂の下位3対の平均
2. mentholはtotal menthol

遮光により花穂の total menthol 含有率が著しく低下し、試験開始時よりも減少した。試験開始時の total menthol 含有量は1花穂当り0.11mg、menthone 含有量は0.29mgであるが、遮光区では前者0.16mg、後者は0.69mgとなり、いずれも増加する。しかし増加したものはほとんど menthone であり、暗黒状態で伸長中の花穂において移行物質から生成される精油は menthone が主体であることが推定される。

実験5 日照制限の精油成分に及ぼす影響

寒冷紗を用いて一定期間遮光し、日照制限の影響を試験した結果は第5表に示すごとくである¹⁰⁾。遮光区の日照程度は、晴天、曇天で異なるが、対照区の15~40%程度である。

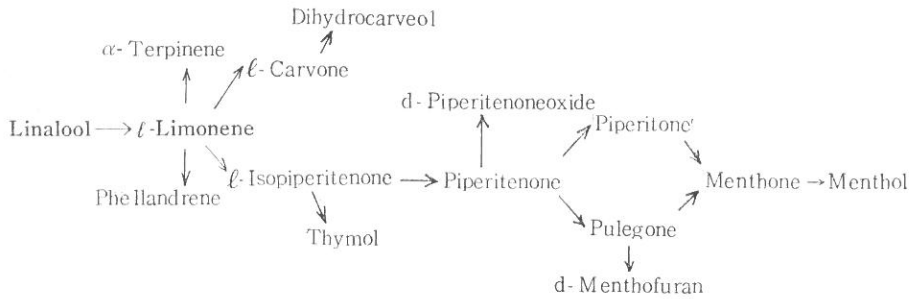
第5表 遮光の精油成分に及ぼす影響

遮光期間	区別	風乾重 g	収油率 %	free menthol 含有率 %	menthone 含有率 %	生育程度
8月27日~10月8日 (1957)	対照	134	0.93	85	4.5	開花
	遮光	26	0.62	83	9.2	未開花
8月15日~10月15日 (1958)	対照	590	0.97	85	10.0	開花
	遮光	253	0.66	86	8.0	開花

一般に日照不足により、free menthol 含有率は低下し、menthone 含有率は逆に上昇する。しかし気象条件良好で遮光区も開花に達した1958年度においては、日照制限の精油成分含有率に及ぼす影響は明らかでない。

考察と結論

藤田¹¹⁾は生体における精油の生成様式は、その属中に出現する同系成分をすべてとりあげ、生体の生育に伴う成分変化の生化学的研究および実験室内において可能な反応様式を基礎として構成すべきであるとし、ハッカ属については永年の研究成果をまとめて、第4図のごとき生成様式を述べている。



第4図 ハッカ属の精油生成様式 (藤田)

すなわちハッカ属における精油発現の根幹は linalool の異性化によって生ずる l-limonene が生体内で酵素的に酸化されて l-carvone または l-isopiperitenone を生ずることにあるとした。l-carvone は Spearmint 系に強く発現し、さらに還元されて carveol, dihydrocarveol となる。isopiperitenone は *M. Pulegium* 中に発現するが、このものは piperitenone に異性化後、還元されて piperitone または pulegone となり、さらに還元が進んでそのいずれから menthone, isomenthone を生じ、さらに還元がすすむと menthol を生ずると考えた。

REITSEMA¹²⁾ は Peppermint, Spearmint について、筆者と同じく節位別葉の精油成分の相違を調査し、ハッカ属の精油生成機構について述べている。藤田が中間生成物としてもっとも重要と考えた linalool, limonene を必ずしも必要としない点が相違しているが、その主要経路、最終生産物に関しては藤田とほぼ同じ結果を得ている。

池田・清水¹³⁾、池田¹⁴⁾ はハッカ属種間雑種のゲノム分析において、化学的な面の機能を考察し、精油生成機構について述べている。同氏等は基質としてメバロン酸を考えているが、生成機構は藤田と本質的に同一とみてよい。

HEFENDEHL その他¹⁵⁾ はメバロン酸が CO₂ に分解されることなく、モノテルペンにとりこまれることを立証するとともに REITSEMA の説を支持する結果を得ている。

中山・松川・安藤¹⁶⁾ はハッカ属を各成分含量により、5つの精油型に分類し、各精油型の遺伝様式を調査することにより、精油の生合成に関与する遺伝子を推定した。その成績によれば、メンソール系とメンソンの交雑 F₁ がすべてメンソール系であり、F₂ がメンソール系とメンソン系を 3:1 に分離すること、メンソール系の S₁ がメンソール系とメンソンを 3:1 に分離することは menthone を還元して menthol とする還元遺伝子の存在を示すとした。

また同氏等は menthylacetate を含まない品種の S₁ が、メンチルアセテート不含系と含有系を 3:1 に分離することから menthol をエステル化する遺伝子の存在も推定し、したがって menthylacetate を最終生産物としている。

実験1の成績によれば、limonene は展開第1葉、第2葉にのみ出現し、第3葉以下には見出されず、各精油成分中での前駆物質の1つと考えられる。piperitone, menthone, isomenthone 含有率は葉の成熟に伴って減少し、piperitone, isomenthone は成葉ではほとんど痕跡程度となるが、menthol 含有率は成葉となるに従って増加する。これら精油成分の消長は、精油生成過程に関し、前述の藤田説すなわち limonene→piperitone→menthone→menthol 経路を支持するものと考えられる。

飽和テルペンケトンである(-)-menthone (C₁₀H₁₈O) とテルペンアルコールの(-)-menthol (C₁₀H₂₀O) は化学構造式もよく似ており、menthone の還元により menthol を生ずるか、あるいは menthol の酸化により menthone を生成するかは議論の多いところであっ

た。先に述べたごとく藤田をはじめ最近の諸説は menthone→menthol の変化を推論するものであるが、実験1の成績からも menthol が最終生産物であることが推察される。

さらに実験2に示されたごとく、dehydrogenase 活性度が新葉において高く、menthone 含有率がきわめて低く、menthol 含有率の高い成葉においては低下することは menthone の還元による menthol の生成を強く支持するものとする。

節位別葉については、その生育環境が同一でないこと、各節位葉の機能の異なること、油腺脱落、精油揮散等の問題を含むことは前述のごとくであり、これらの影響をできるだけのごとく、同位葉の生育にしたがって、menthone, menthol の量的な消長を測定した結果(実験3)も menthone→menthol 経路を立証する。すなわち実験を行なった30日間は1葉当り free menthol 含有量は生育に伴って増加するが、menthone 含有量は生育初期は増加するが、展開20日以後は明らかに減少する。また free menthol 含有率は環境条件とは無関係に、葉の生育日数の函数として考えられた。

実験4において、暗黒状態で伸長中の花穂において主として menthone が生成されることをみた。この場合葉から基質が移行し、これを利用して精油が生成されるものと考えられるが、本成績も menthone が menthol の前駆物質であることを推察させるものである。

筆者は必須栄養素の欠除、過剰施用、あるいは酵素阻害剤加用等の極端な条件において、また日照、土壤水分、気温等の環境条件をいろいろに変化させて、これが menthone および menthol 生成に及ぼす影響を調査した^{10d)}。実験5にその1例を示したが、free menthol 含有率の低下は、これら諸条件の変化が生育の遅延として働いた場合のみ、menthone→menthol の化学的变化のおくれとして認められるが、処理区が対照区と同程度の成熟に達した場合、free menthol 含有率には影響はないことを認めた。このことは実験3に示されたごとく free menthol 含有率は出葉時の環境条件の相違と無関係に、出葉後の時間的経過にのみ支配されたことと一致するものである。

以上の諸実験はいずれもハッカ草生体内においては menthone→menthol の化学的变化が行なわれていることを示すものであり、menthol が最終生産物の1つであることを立証するに足るものとする。すなわち menthol はハッカ属植物において生成される carvone (REITSEMA, 池田, 清水), または dihydrocarveol (藤田), d-piperitenone oxide (藤田, 池田, 清水, 発見者清水の命名¹⁷⁾ によれば rotundifolone), menthofuran (藤田, REITSEMA) 等とならんで、安定度のきわめて高い最終生産物の位置を占めるものであり、日本ハッカにおいてはとくに menthol を多量に生成する能力、すなわち menthone を menthol まで還元する能力(遺伝子)が付与されたものと推察される。(一)-menthol と ester menthol (menthylacetate) と関連については、本実験結果からは明らかになし得なかった。

引用文献

- 1) 磯井広一郎：植物成分の生合成，広川書店，東京都（1970）
- 2) 三井哲夫・中山弘美・田中稔・藤原秀章：日農化誌，24，82（1950）
- 3) GUENTHER, E. : The essential oils, Vol 1, d. Van Nostrand Co., New York and London (1940)
- 4) 池畑勇作・上田博夫：日本化学会，第5回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨，4（1961）
- 5) 池畑勇作：日本化学会，第1回香料・テルペン及精油化学に関する討論会講演要旨，49（1957）

- 6) 池畑勇作・中山孟郎：日作紀, 27, 145 (1958)
- 7) FARMY, A. R. and E OF WALSH : Bioch. Jour. 51, 55 (1952)
- 8) 池畑勇作・坪井尚司：日作紀, 29, 365 (1961)
- 9) 池畑勇作・清水純夫：日本化学会, 第6回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会講演要旨, 91 (1962)
- 10) 池畑勇作：暖地における薄荷の生育並びに精油蓄積過程に関する研究, 岡山農試臨時報告, 62, a 63, b 78, c 129, d 144 (1966)
- 11) 藤田安二：香料, 48, 42 (1958)
- 12) REITSEMA, R. H : J. Am. Pharm. Assoc., 47, 267 (1958) (藤田安二：香料, 58, 15, 1960)
- 13) 池田長守・清水純夫：香料, 58, 25 (1960)
- 14) 池田長守：細胞遺伝学的方法によるハッカ属植物の育種学的基礎研究, 153, 岡山大農学作物第2研究室 (1961)
- 15) HEFENDEHL F. W., UNDERHILL E. W., von RUDLOFF E. : Phytochem., 6, 823 (1967) (磯井広一郎：植物成分の生合成, 72, 1970)
- 16) 中山孟郎・松川正行・安藤昭一：暖地ハッカに関する研究, 52, 農水産技術会議・岡山県農試 (1971)
- 17) 清水純夫：新テルペンケトン Rotundifolone の研究, 信州大学紀要, 61 (1956)