

群落の異なるクマイザサのフラボノイド組成

東京農業大学生物産業学部 松田 友彦・山崎 雅夫・冨塚 登・鈴木 悌司・西澤 信

北海道立林業試験場 錦織 正智

はじめに

植物体内で合成されるフラボノイドは、紫外線などに起因する障害を防御する機構に関与していることが報告されている(1)。カラマツ林床内のクマイザサを調査した報告では、フラボノイド含量が林内照度の季節的变化に伴って増減することを明らかにしている(2)。しかし、フラボノイド含量の群落間差異についての報告はない。一般的にクマイザサは葉や稈などの栄養器官の形態から群落の識別をおこなうことが困難であることから、本報では繁殖器官である種子の特徴に基づいて群落を区分し、群落間におけるフラボノイド組成の差異について比較をおこなった。

材料と方法

1. 調査地と材料

調査対象地は、藻琴山(網走郡大空町)の山火事跡に成立した無立木地のクマイザサ(*Sasa sp.*)地とした。南東斜面の植生内に4調査地点(写真-1)を設定し(以下、群落1~4と略記する)、各地点から種子とフラボノイド定量用に葉を採取した。採種は2008年8月におこない、種子のサイズ(粒長と粒径)と色彩差計を用いて種皮の色を測定した。また、葉は稈の最も上位に位置するものを2000年9月に採集し、収穫数は群落あたり10枚とした。なお調査地点は各地点が300m以上離れた位置に設定した。

2. 抽出および分画

葉(生重量10g)をハサミで細断し、メタノール500mlに1日浸漬(室温)抽出した。得られた抽出液を減圧下40℃にて濃縮乾燥し抽出物を得た。この抽出物に純水100mlを加えて溶解し、ジエチルエーテル(100ml×2)を加え、液液分配を行いクロロフィルを除去し、フラボノイドが移行した水画分を得た。この水画分をSephadex LH-20カラム(20φ×800mm)に供し、既報(3)に従い分画した。

3. フラボノイドの精製

既報(3)に従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分取精製を行った。移動相には水/メタノール/ギ酸(70:30:1)を用いた。分取した画分は減圧下で乾固させ、精製粉末とした。

4. フラボノイドの定量

液液分配によってフラボノイドが移行した水画分についてHPLC分析を行った。カラムにはWaters社製Atlantis® 3T(4.6φ×150mm, 3μm)、移動相はA液:水/メタノール/ギ酸(95:5:0.1)、B液:アセトニトリルによるグラジエント溶出を行い、流速は1ml/min、カラム温度は40℃で行った。装置は日本分光社製の高速液体クロマトグラフィーを用い、検出にはフォトダイオードアレイ検出器(MD-2010 Plus)を用いた。定量は、分離ビ

ークの波長350nmにおける吸光度を各精製フラボノイドにて作成した検量線に当てはめそれぞれ算出した。また、luteolin 6-C-glucoside(L6CG), luteolin 6-C-arabinoside(L6CA), luteolin 7-O-glucoside(L7OG)の3種は既報(3)にてクマイザサより精製、同定された標準品を用いて検量線を作成した。

5. フラボノイドの定性

精製フラボノイドをメタノールに溶解し、UV吸収スペクトル及び質量分析(MS)により定性を行った。質量分析はPerSeptive Biosystems社製のMarinerを用い、イオン化はESIにより行い、ポジティブモードで検出を行った。



写真-1 採取したクマイザサの生育環境

左上:群落1, 右上:群落2

左下:群落3, 右下:群落4

結果及び考察

1. 各群落における種子の差異

採取した4箇所における種子を写真-2に示した。種子の粒長は6.45-7.46mmの範囲であり、t-検定の結果、統計的に有意な差があった。また、粒径は3.00-3.25mmであり、統計的に有意な差があった。また、種子の形態の指標である粒長/粒径値は2.14-2.36の範囲であった。種皮の色調は、それぞれ明るさを示すL*値は75.0~81.0、赤色を示すa*値は0.50~1.26、青色を示すb*値は2.76~3.91の範囲にあり、群落間で違いがあった(表-1)。この結果から、調査群落は遺伝的、あるいは環境的に異なる背景の群落として区分できると考えられる。

2. 群落の異なるクマイザサのフラボノイド含有量

水画分のLCクロマトグラムを図-1に示した。クマイザサの

Tomohiko MATSUTA, Masao YAMAZAKI, Noboru TOMIDUKA, Teiji SUZUKI and Makoto NISHIZAWA (Tokyo University of Agriculture, Abashiri, 099-2493), Masatomo NISHIKOORI (Hokkaido For. Res. Inst. Higashiyama, Koshunai, Bibai 079-0198)

Flavonoid contents of Sasa leaf (*Sasa senanensis* Rehder.) in differing clumps

葉より主要なフラボノイドとして 7 種のフラボンに着目し, 3 種は LC 分析によって L6CG, L6CA, L7OG の各標準品と tR 及び吸収スペクトルが一致した。7 種の他に数種のフラボノイドが含まれていると考えられた。採取 4 地点のクマイザサのフラボノイド含量を表-2 に示し, 7 種のフラボノイドの合計を総フラボノイド含量とし算出した。総フラボノイド含量は, 1.824–4.280(mg/g D.W.)と群落間で最大 2.3 倍の差が見られた。このうち最も多いフラボノイドは L6CG であり, 群落間の差は大きいもので 3 倍以上の差があった。また, 最も少ないフラボノイドは L7OG であり, 0.033–0.078 mg/g D.W.と 2.3 倍の差があった。一方, 化合物 I, 化合物 II, 化合物 III, 化合物 IV の含量には大きな差はみられなかった。

3. フラボノイドの定性

4 種のフラボノイドを精製し, 精製フラボノイドの UV 吸収スペクトル, 質量分析の結果を表-3 に示した。これら 4 種フラボノイド全ての UV 吸収スペクトルは, フラボン類に特徴的な極大吸収を示した。

化合物 I は, O.D.331nm と 272nm に極大吸収が見られた。これまでにササ葉からは, ルテオリン, アピゲニン, トリシンの 3 種のアグリコン(図-2)を基本とするフラボン配糖体が報告されている(4-7)。この 3 種アグリコンはそれぞれ特有の吸収極大を示し, この化合物 I の極大吸収はアピゲニンアグリコンと類似し, m/z は 565 を示し, フラグメントイオンがなかったことから C-結合したアピゲニン C-配糖体であることが示唆された。また, m/z より結合している糖はペントースとヘキソースの可能性が考えられた。この事より, 化合物 I は, apigenin C-pentosyl-C-hexoside (ACPH)であると定性した。

化合物 II は, O.D.345nm と 269nm に極大吸収が見られた。この事より, アグリコンはトリシンであることが示唆された。この化合物の m/z は 493 であり, フラグメントイオンとして m/z 331 が確認された。このフラグメントイオンは, トリシンアグリコンと一致しており, この化合物はトリシン配糖体であることが確認された。化合物 II は, m/z よりヘキソースが O-結合したトリシン O-配糖体であることが示唆された。化合物 II は, tricin O-hexoside (TOH)であると定性した。

化合物 III は, O.D.332 と 272nm に極大吸収が見られた。この極大吸収は化合物 I と一致するため, 化合物 III のアグリコンはアピゲニンであることが示唆された。この化合物の m/z は 549 を示し, フラグメントイオンが無かったことより, 化合物 I と同様にアピゲニン C-配糖体であり, ペントースとデオキシヘキソースの 2 種類の糖類が C-結合していることが示唆された。この事より, 化合物 III は, apigenin C-pentosyl-C-deoxyhexoside (ACPD)であると定性した。

化合物 IV は, O.D.351nm と 269nm に極大吸収が見られた。この化合物の m/z は 639 であり, フラグメントイオンとして m/z 493, 331 が確認された。吸収スペクトル及び質量分析から, 化合物 II と同様にトリシン配糖体であることが示唆された。また, m/z よりデオキシヘキソースとヘキソースからなる糖類が O-結合していることが示唆された。化合物 IV は, tricin O-hexosyl-O-deoxyhexoside (TOHD)であると定性した。

定性された配糖体を表-2 にあてはめて考えるとルテオリン配糖体含量は, 2.4–3.2 倍と調査群落間で差が大きかったが, アピゲニン配糖体, トリシン配糖体は 1.5–1.9 倍と群落間の差が小さいことがわかった。ルテオリン, アピゲニン, トリシンは, 抗酸化活性を有すが, ルテオリンが最も強い活性を示す(4, 8)。活性

の強いルテオリン配糖体含量の群落差が大きく, 活性の低いアピゲニン, トリシン配糖体では含量差が小さいという興味深い結果が示された。抗酸化活性を示す多くの成分は, 植物の防御物質であり, 環境ストレスなどで含量に差が生じてくることが予想され, 群落によってストレス応答に差異があるかもしれない。

種子の a^* 値と葉の総フラボノイド含量との間に高い相関($R^2=0.9933$)がみられた。この相関は特にルテオリン配糖体含量と高い相関関係($R^2=0.9849$)を示し, 調査群落においては種子の色と総フラボン含量, 特にルテオリン配糖体含量との間に何らかの関係があることが推察された。

以上のことから, クマイザサ葉のフラボン類のうち, ルテオリン配糖体の含量は群落間で大きな差異が認められ遺伝あるいは環境上の要因による影響を受けると推察された。今後は定性したフラボンの同定を行い, その他のフラボノイドについても構造を明らかにしていくとともに遺伝的背景についても検討したいと考えている。

まとめ

繁殖器官(種子)の違いに基づいて区分した 4 群落を対象にフラボノイド組成を比較した。フラボノイドの知見の少ないクマイザサの葉について 4 種を定性するとともに既知フラボン 3 種を加えた 7 種のフラボノイド定量おこなった。フラボノイド組成は, ルテオリン配糖体量の変動が大きく, アピゲニン配糖体およびトリシン配糖体量の群落間差は小さかった。群落間でフラボン含量と組成に差異があることがわかった。また, 種子の色調(a^* 値)と葉のルテオリン含量とに高い相関関係が見られた。

引用文献

- (1) 趙 習コウ・李 進才・松井 鏗一郎・前澤 重禮 (2005) 近紫外線がラン葉の抗酸化機能の応答性に及ぼす影響. 植物環境工学 **17**(4): 192-198.
- (2) 山崎 雅夫・松田 友彦・西澤 信・富塚 登・鈴木 梯司 (2008) ササ葉フラボン含量に及ぼす環境要因の解析. 日林北支論 **56**: 141-143.
- (3) 松田 友彦・山崎 雅夫・西澤 信・富塚 登・鈴木 梯司 (2008) クマイザサの新葉と旧葉におけるフラボノイド含量の相違. 日林北支論 **56**: 137-139.
- (4) Matsuta T., Yamazaki M., Yajima A., Tomiduka N. and Nishizawa M. (2009) Flavonoids in *Sasa senanensis* and their antioxidative activities. Food Preservation Sci. **35**(1)(印刷中)
- (5) Nakajima Y., Young SY. and Kunugi A. (2003) Six new flavonolignans from *Sasa veitchii* (Carr.) Rehd. Tetrahedron **59**: 8011-8015.
- (6) Yoon KD., Kim CY. and Hoon H. (2000) The flavone glycosides of *Sasa borealis*. Kor. J. Pharmacogn. **31**(2): 224-227.
- (7) Park HS., Lim JH., Kim HJ., Choi HJ. and Ik-Soo Lee IS. (2007) Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Sasa borealis*. Archives of Pharmacal Research **30**(2): 161-166.
- (8) Rice-Evans CA., Miller NJ. and Paganga G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine **20**: 933-956.

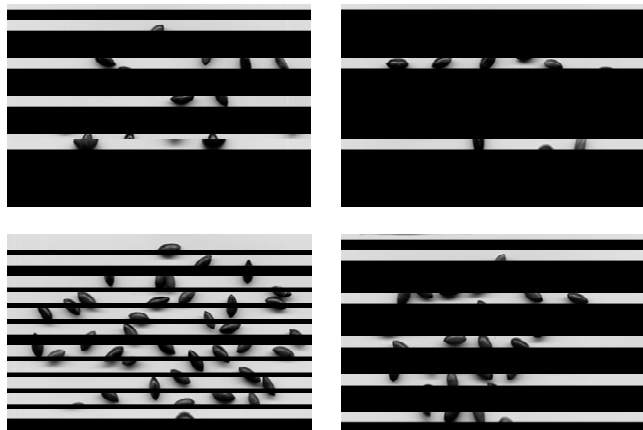


写真-2 各群落のクマイザサ種子
 左上: 群落 1, 右上: 群落 2
 左下: 群落 3, 右下: 群落 4

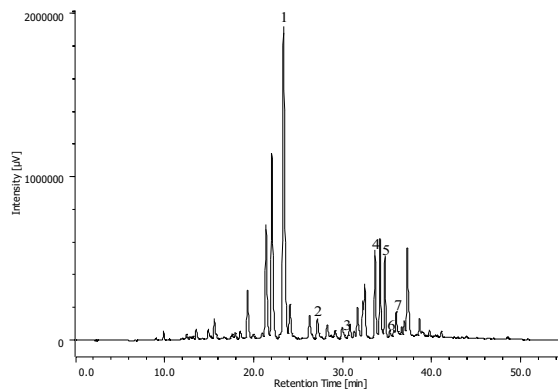


図-1 クマイザサ葉のクロマトグラム
 カラム: Atlants® 3T(4.6 φ × 150mm, 3 μ m)
 移動相 A: メタノール/水/ギ酸(95:5:0.1)
 B: アセトニトリル
 流速: 1.0ml/min, O.D.: 350nm, カラム温度: 40°C
 1: luteolin 6-C-glucoside, 2: 化合物 I, 3: luteolin 7-O-glucoside, 4: luteolin 6-C-arabinoside, 5: 化合物 II, 6: 化合物 III, 7: 化合物 IV

表-1 各群落のクマイザサ種子の形状と色

	粒長 (mm)	粒径 (mm)	粒長/粒径	色調		
				L*値	a*値	b*値
群落1	7.46 ± 0.08 ^{*a,*b}	3.25 ± 0.07 ^{*a}	2.32 ± 0.06 ^{*a,*b}	76.7 ± 1.37 ^{*a}	1.08 ± 0.16 ^{*a}	3.49 ± 0.34
群落2	6.45 ± 0.06 ^{*a,*c}	3.05 ± 0.08	2.14 ± 0.05 ^{*a,*c}	81.0 ± 0.78 ^{*a,*b,*c}	0.50 ± 0.13 ^{*a,*b,*c}	2.76 ± 0.21 ^{*a}
群落3	7.04 ± 0.11 ^{*a}	3.00 ± 0.07 ^{*a,*b}	2.36 ± 0.03 ^{*c,*d}	75.0 ± 1.08 ^{*b}	1.12 ± 0.13 ^{*b}	2.91 ± 0.03 ^{*b}
群落4	6.89 ± 0.08 ^{*b,*c}	3.19 ± 0.05 ^{*b}	2.17 ± 0.03 ^{*b,*d}	77.7 ± 1.21 ^{*c}	1.26 ± 0.16 ^{*c}	3.91 ± 0.28 ^{*a,*b}

(n=20)

*P<0.05 (同じアルファベット間では有意差あり)

表-2 各群落のフラボノイド含量

	tR(min)	ポイント1	ポイント2	ポイント3	ポイント4
Luteolin 6-C-glucoside	23.453	2.297 ± 0.200	0.710 ± 0.049	1.572 ± 0.277	2.190 ± 0.228
化合物 I	27.093	0.139 ± 0.009	0.115 ± 0.004	0.159 ± 0.013	0.171 ± 0.017
Luteolin 7-O-glucoside	31.293	0.067 ± 0.006	0.033 ± 0.003	0.071 ± 0.017	0.078 ± 0.012
Luteolin 6-C-arabinoside	33.640	0.725 ± 0.069	0.412 ± 0.036	1.240 ± 0.237	1.210 ± 0.129
化合物 II	34.720	0.306 ± 0.011	0.225 ± 0.006	0.352 ± 0.038	0.182 ± 0.016
化合物 III	35.267	0.132 ± 0.008	0.113 ± 0.004	0.188 ± 0.022	0.157 ± 0.022
化合物 IV	35.960	0.231 ± 0.012	0.216 ± 0.007	0.321 ± 0.026	0.292 ± 0.033
Total (mg/g D.W.)		3.897 ± 0.315	1.824 ± 0.109	3.903 ± 0.630	4.280 ± 0.457

D.W.=dry weight, tR=retention time (n=3)

表-3 各化合物のUV・VIS 吸収スペクトル
 および質量分析

	λ max (nm)	[M+H] ⁺ (m/z)	fragment ion (m/z)	定性結果
化合物 I	331, 272	565	n.d.	アピゲニン配糖体(ACPH)
化合物 II	345, 269	493	331	トリシン配糖体(TOH)
化合物 III	332, 272	549	n.d.	アピゲニン配糖体(ACPD)
化合物 IV	351, 269	639	493, 331	トリシン配糖体(TOHD)

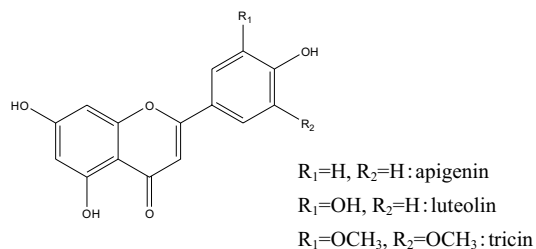


図-2 フラボノイドアグリコンの骨格(フラボン)