

クマイザサのクローンにおけるフラボノイド含量と光環境

東京農業大学生物産業学部 山崎 雅夫・松田 友彦・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、紫外線に起因する障害への防御機能に関与していることが報告(1)されている。筆者らは、クマイザサの葉のフラボノイド含量について季節的推移を調査した結果、カラマツ林床に生育するクマイザサでは、カラマツの開葉が進み林床の照度の低下に並行してフラボノイド含量が減少し、また落葉に伴って照度が上昇すると増加することを報告(2)した。また、前報(3)では単層植生の複数のクマイザサ群落を対象とした調査結果から、調査群落間でフラボノイド含量に差異があることを明らかにした。これらの結果から、クマイザサのフラボノイド合成は光の強弱と関係があるだけでなく、遺伝的あるいは環境的な要因も背景としていることが推察できる。

そこで本報では、フラボノイド合成に関与する要因を明らかにすることを目的として、人工環境下で遺伝的バックグラウンドが共通であるクマイザサのクローンを材料にもちいて、光強度と温度に対するフラボノイド含量の応答反応について調査をおこなった。

材料と方法

1. 供試材料と試験区

材料のクマイザサ (*Sasa senanensis* (Franch. et Sav.) Rehd.) のクローンは、東京大学富良野演習林で2000年に採取した種子を外植体として、錦織らの方法(4)により増殖させた。供試クローンは培養ビン(200ml)にWoody Plant培地 30mlを入れた培養環境で養成した。

光強度とフラボノイド合成の関係解明を目的として、暗黒下(25°C)で2週間養成したクローンを3水準の光環境(暗黒、白色蛍光灯による弱光(200lux)、強光(8500lux)照射)で2週間養成し、その後、抽出をおこなった。この処理区を2週間処理区とした。また、気温とフラボノイド含量の関係解明を目的として、クローンを暗黒養成1週間(25°C)に続き白色光下(8500lux)で1週間(25°C)養成した後に、暗黒下で2水準の気温(25°Cおよび5°C)に移し1週間経過したものと暗黒養成1週間(25°C)後、白色光下(8500lux)で1週間(5°C)養成したものを対象に抽出をおこなった。この処理区を1週間処理区とした。各実験における供試数は、処理区あたり4個体以上を用い4反復おこなった。

2. 抽出操作

クローンの葉および稈(生重量 0.3g)をハサミで細断しメタノール(50ml)で1昼夜室温浸漬し抽出した。得られた抽出液を減圧下 40°Cにて濃縮乾固し、抽出物を得た。この抽出物にメ

タノール 200 μ l 加え、試料溶液とした。

3. クロロフィルの定量

得られた試料溶液についてクロロフィル含量の定量を行った。定量分析は島津社製 UV-VIS 吸光度計(UV-1700)を用いた。幅 1cm のセルに試料溶液を入れ、波長 665nm および 650nm における吸光度を測定した。得られた吸光度を既報(5)の計算式に代入し、算出した。

4. フラボノイドの定量

定量は、前報(3)に従い、luteolin 6-C-glucoside(L6CG), luteolin 6-C-arabinoside(L6CA), luteolin 7-O-glucoside(L7OG), apigenin C-pentosyl-C-hexoside(ACPH), triclin O-hexoside (TOH), apigenin C-pentosyl-C-deoxyhexoside(ACPD), triclin O-hexosyl-deoxyhexoside (TOHD)について高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて行った。これら7種フラボノイドの合計値を総フラボノイド含量とした。定量値は、前述のクロロフィル含量と共に水分測定(105°C加熱法)にて得られる固形分量より無水物換算した乾物量で示した。

結果及び考察

1. 光の強度とクロロフィル、フラボノイド含量

2週間暗黒養成後、3水準の光環境(暗黒、白色蛍光灯による弱光(200lux)、強光(8500lux)照射)処理を2週間行ったクローンの総クロロフィル含量ならびに総フラボノイド含量の結果をそれぞれ図-1、図-2に示した。この結果、総クロロフィル含量は光の強さとともに有意に増加を示し、暗黒に比べ弱光で33.3倍、強光で4.4倍に増加した。一方、総フラボノイド含量は、暗黒でも0.09mg/g程度検出され、暗黒に比べ強光では1.6倍高い値を示したものの、弱光では暗黒との差が見られなかった。弱光程度の光強度ではクロロフィルを産生するものの、フラボノイド含量は増加せず、クロロフィル産生とフラボノイド産生とで光に対する応答反応が異なり、フラボノイドを増加させるには、ある程度の光強度が必要であることが推察された。

2. 明暗と温度によるクロロフィル、フラボノイド含量

クローン強光養成後の暗黒放置(5, 25°C)および暗黒養成後の低温(5°C)光処理におけるクロロフィル含量とフラボノイド含量についてそれぞれ1週間処理した結果を表-1に示した。強光環境(25°C)から暗黒(25°C)となるとクロロフィル含量に大きな差はないものの、総フラボノイド含量は増加した。クロロフィル含量の暗黒から光環境への対応は素早くおこなわれるものの、

Masao YAMAZAKI, Tomohiko MATSUTA, 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)
Effect of photoenvironment on flavonoid contents in planted sasa leaf (*Sasa senanensis* Rehd.)

光環境から暗黒への対応は緩慢におこなわれることが推察された。一方、光環境から暗黒への環境変化を低温(5°C)でおこなうと総クロロフィル、総フラボノイド含量の両者で増加が見られた。暗黒処理によってクロロフィル含量が増加する例が同じイネ科のイネ(6)や大麦(7)の他タバコカルス(8)で報告されているが、ササでは低温によるクロロフィル代謝関連酵素の活性低下も関与するものと思われるが、詳細は不明である。

低温でのフラボノイド増加は赤色系フラボノイドであるアントシアニンが知られている。一般にアントシアニンの増加には、光環境が必要とされている(9)が、暗黒で合成が促進される報告(10)もみられる。黄色系フラボノイドであるフラボン類はアントシアニンと同様にカルコンを中間生成物としてフェニルアラニンから合成され、低温によってカルコン合成酵素等が誘導される(11)ことからササのフラボン類についても低温の影響が考えられるが、クロロフィルの増加とあわせて光環境よりも含量が増大する理由については、別途検討が必要であると考えている。

暗黒(25°C)から強光(5°C)への光環境では低温であっても、総クロロフィルは1.49から2.03に増加するものの、25°Cの強光2.31に比べて値が低く、総フラボノイド含量でも0.11から0.13に増加する一方、25°C強光の0.17に比べて値が低く、低温による光に対する応答反応の低下が示唆された。雪中のクマイザサを除雪し、日照環境に置くとフラボン含量が増加することを報告(2)している。今回、5°Cであっても暗黒から光環境へと環境を変えてやるとクロロフィルやフラボノイドが増加することがわかった。低温でも日照環境によってフラボノイドが産生することを確認できた。

クロロフィル含量とフラボノイド含量との関係を図-3に示した。クロロフィル含量が低く蓄積が進んでいない初期段階では、クロロフィル含量が高いほど、フラボノイド含量が高い傾向を示し、クロロフィルの合成代謝とフラボノイドの合成代謝には何らかの関連があると考えられた。

クローンのフラボノイドの組成については、ACPH や ACPD といったアピゲニン配糖体と TOH, TOHD のトリシン配糖体が主要フラボンであった。前報(3)で最も含量が高い L6CG をはじめとする群落間差の特徴であったルテオリン配糖体はまったく検出されず、むしろ群落間での差が小さいアピゲニンやトリシンの配糖体によって構成されていることが判った。クローンと自生するクマイザサ(3)とで組成に大きな差異が認められた。また、既報では、気温の低い4月であってもカラマツ林内の埋雪しているクマイザサを除雪した結果、除雪直後から2週間でフラボンが約6倍に増加した。自生しているクマイザサと今回の実験条件との大きな相違は、光質と照射周期にある。用いた白色蛍光灯はUVを含まないし、照射は常時行われ自然界における周期とは異なる。今後は照射の光質と周期に着目した実験を行うと共に、クローンと屋外に植栽されたクローンとのフラボノイド組成の比較や、クローンの起源である東大演習林のクマイザサとの比較を行いたいと考えている。

以上のことから、フラボノイド含量は光環境の影響を強く受けるとともに低温でもフラボノイドを蓄積することが判った。

まとめ

前報(3)で、クマイザサのフラボノイド含量には遺伝的・環境的要因が影響することが示唆された理由から、本報では遺伝的バックグラウンドが共通であるクマイザサのクローンを材料に

もちいて、人工環境下で光強度と温度に対するフラボノイド含量の応答反応について調査をおこなった。

光強度が強いほど葉の総クロロフィル含量、総フラボノイド含量は高まった。遮光によって両含量は減少するものの減少は緩慢であり、温度が低い場合はむしろ両含量は増加し、低温ストレス応答がフラボノイドやクロロフィル含量に影響すると思われた。フラボノイド含量は光環境の影響を受けるものの、遮光環境から光環境への変化と光環境から遮光環境へと環境が変化する場合とで応答に差が見られた。光環境においてフラボノイドは低温でも増加した。

クローンのフラボノイド組成は、屋外に自生するクマイザサとは異なり、ルテオリン配糖体は含まれずアピゲニン配糖体とトリシン配糖体で構成されていた。

引用文献

- (1) 趙 習コウ・李 進才・松井 鑄一郎・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 悌司(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・富塚 登・錦織 正智・鈴木 悌司・西澤 信(2009) 群落の異なるクマイザサのフラボノイド組成. 日林北支論 57:171-173.
- (4) 錦織 正智・山田 健四・清水 一・棚橋 生子. ササの増殖方法. 特許第 3893476 号
- (5) 林 孝三編(1991) 植物色素. 養賢堂, 235-238
- (6) 下坪 訓次・中山 治彦(1973) 水稻の窒素吸収に対する遮光の影響. 北陸作物学会報 8:27-28.
- (7) Adamson, H., Griffiths, T., Packer, N., and Sutherland, M. (1985) Light-independent accumulation of chlorophyll a and b and protochlorophyllide in green barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 64(3):345-352.
- (8) Ikegami, I., Kamiya, A. and Hase E. (1984) Dark Formation of Chlorophyll in Cultured Tobacco Cells. *Plant and Cell Physiology* 25(2):343-348.
- (9) 壇 和弘, 今田 成雄, (2002), 光照射が低温環境下におけるキャベツ幼植物のフェノール性物質含量と脂質過酸化に及ぼす影響, 園学誌, 71, 1:82-86.
- (10) 前川 進・中村 直彦(1979) 促成花木の花色発現に関する研究(第1報):モモ,ボケ,サクラ切花のアントシアニン生成に及ぼす温度と光の影響. 神大農研 13(2):181-184.
- (11) Christie, P.J., Alfenito, M.R. and Walbot, V. (1994) Impact of low-temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194(4):541-549.

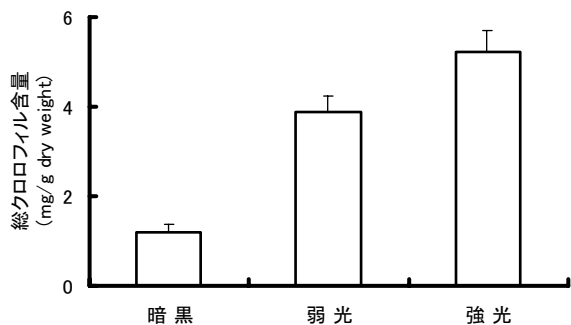


図-1.照度の違いがクロロフィルおよびフラボノイドの含量におよぼす影響(2週間処理区)

弱光: 200lux 強光: 8500lux (常時照射)

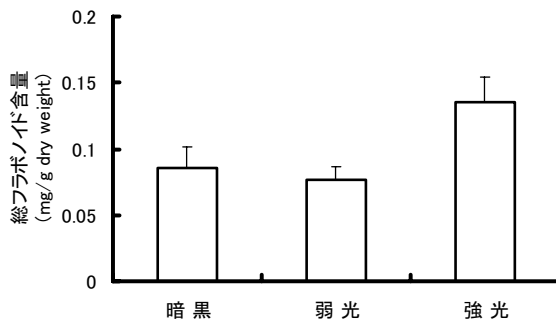


図-2.照度の違いがフラボノイドの含量におよぼす影響(2週間処理区)

弱光: 200lux 強光: 8500lux (常時照射)

表1 クローン強光養成後の暗黒放置(5, 25°C)および暗黒養成後の低温(5°C)光処理におけるクロロフィル含量とフラボノイド含量

	クロロフィル含量 (mg/g D.W.)		フラボノイド含量(mg/g D.W.)							
	total		L6CG	ACPH	L7OG	L6CA	TOH	ACPD	TOHD	total
強光(25°C)	2.31 ± 0.07	N.D.	0.047 ± 0.003	N.D.	N.D.	N.D.	0.040 ± 0.005	0.049 ± 0.005	0.033 ± 0.005	0.169 ± 0.018
└─>暗黒(25°C)	2.50 ± 0.23	N.D.	0.082 ± 0.014	N.D.	N.D.	N.D.	0.041 ± 0.006	0.081 ± 0.015	0.045 ± 0.008	0.249 ± 0.043
└─>暗黒(5°C)	3.37 ± 0.36	N.D.	0.096 ± 0.014	N.D.	N.D.	N.D.	0.080 ± 0.018	0.104 ± 0.013	0.057 ± 0.005	0.338 ± 0.050
暗黒(25°C)	1.49 ± 0.06	N.D.	0.031 ± 0.003	N.D.	N.D.	N.D.	0.012 ± 0.001	0.042 ± 0.002	0.024 ± 0.002	0.109 ± 0.008
└─>強光(5°C)	2.03 ± 0.05	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.018 ± 0.004	0.064 ± 0.008	0.045 ± 0.007	0.127 ± 0.019

強光: 8500lux
 養成温度: 25°C
 養成期間: 1週間
 D.W.: dry weight

L6CG: luteolin 6-C-glucoside
 ACPH: apigenin C-pentosyl-C-hexoside
 L7OG: luteolin 7-O-glucoside
 L6CA: luteolin 6-C-arabinoside
 TOH: triclin O-hexoside
 ACPD: apigenin C-pentosyl-C-deoxyhexoside
 TOHD: triclin O-hexosyl-deoxyhexoside

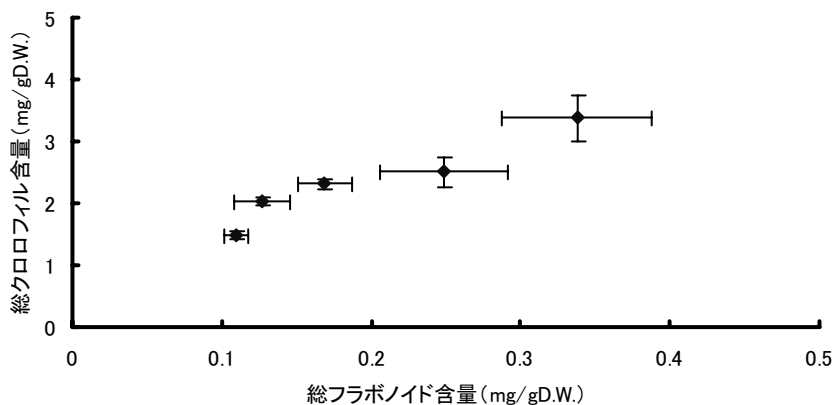


図-3 クロロフィル含量とフラボノイド含量の関係