

## P-14 グイマツの枝樹皮組織における主要ジテルペノイドの集積

(北林産試) ○関 一人、折橋 健、佐藤真由美、岸野正典、斎藤直人

### 1. 緒言

樹木における樹皮の基本的な機能のひとつとして、病原菌、植食性昆虫および哺乳類などの天敵に対して、樹木自身を物理的および化学的に防御することが知られている。一般的に成熟した樹皮組織は、外側に死滅組織であるリチドーム、内側に生組織である二次師部からなる。マツ科の針葉樹は、樹皮の二次師部において、テルペノイドを主要成分とするオレオレジンを生産して、天敵に対して自らを恒常的に化学的防御する<sup>1)</sup>。これに対して、コルク層に被覆されているリチドームは専ら物理的防御を担当すると考えられており<sup>2)</sup>、化学的防御に関する知見は乏しい。

サハリンやクリル諸島南部から北海道へ林木樹種として導入されたグイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) は、本州中央部から導入されたニホンカラマツ (*L. kaempferi*) と比較して、北海道在来の野ネズミであるエゾヤチネズミ (*Myodes rufocanus bedfordiae*) の樹皮食害に対して高い抵抗性が認められるとともに、樹皮の化学的防御との関連性が多数の先行研究で示唆されてきた<sup>3,4)</sup>。一方、林木育種により両樹種から高鼠害抵抗性や高初期成長性などの優良形質を備えたグイマツ雑種 F<sub>1</sub> が創出されており、1990年代から実用化されている。また、両樹種の樹皮化学組成の違いを利用した当該雑種苗の高精度判別に関する技術<sup>5)</sup>も開発されている。

そこで本研究では、樹木の化学的性質を利用した新たな林木育種開発に関する基礎的情報の取得に向けて、グイマツの枝樹皮組織における主要ジテルペノイドの組成および集積分布について検討するとともに、その分布と樹皮形成過程との関係について考察した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 樹皮ジエチルエーテル抽出物からの主要ジテルペノイドの単離同定

北海道立総合研究機構 林業試験場 道東支場 (新得町) において、30年生グイマツよりリチドームの発達した生枝 (地上高約 8m、枝齢 10~15年、直径 3~4cm) を採取し、実験に供するまで直ちに -20°C の冷凍庫に保存した。枝樹皮を液体窒素存在下で粉碎したのち凍結乾燥し、乾燥粉碎物 300g をジエチルエーテルに浸せきして室温で抽出した (3L×2、各 1 日間)。得られた抽出物をアルカリ水溶液への可溶性に基づいて、中性画分と酸性画分に分けた。中性画分と酸性画分をシリカゲルカラム、分取高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などに供することにより化合物 **1-8** が得られた。単離精製した化合物 **1-8** は、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル、質量スペクトル (MS)、赤外線 (IR) スペクトル分析などにより同定した。

#### 2.2 リチドームおよび二次師部における主要ジテルペノイドの定量

12 個体のグイマツから 2.1 と同様に枝を採取し、最新に形成された周皮を境にしてリチドームと二次師部を正確に分離した。得られたリチドームと二次師部をそれぞれ液体窒素存在下で粉碎したのち凍結乾燥した。200mg の乾燥粉碎物を 10mL 容遠沈管に入れ、内部標準物質として 800μg の heptadecanoic acid を含む 4mL の石油エーテル-ジエチルエーテル (1:1, v/v) で超音波洗浄機を用いて 10°C 以下で 1 時間抽出したのち、遠心分離した。得られた上清のうち、1mL は乾燥機に入れて乾燥試料に対する抽出物含有量を測定し、他の 1mL は窒素気流下で乾燥させたのちジアゾメタン含有

ジエチルエーテルを添加してメチル化を図った。メチル化試料はガスクロマトグラフィー (GC) 分析に供し、グイマツ樹皮から単離同定した化合物 **1-8** を標準物質として検量線を作成して、化合物 **1-8** の乾燥試料中における含有量を算出した。

### 2.3 枝樹皮組織の顕微鏡観察

樹皮を含む枝の横断面を実体顕微鏡で観察した。

## 3. 結果と考察

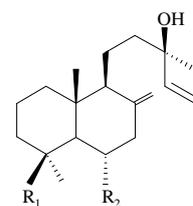
グイマツ樹皮のジエチルエーテル抽出物の中性画分よりラブダン型ジテルペノイド **1-4**、同酸性画分よりアビエチン型ジテルペノイド **5-7**、ピマラン型ジテルペノイド **8** が得られた。それらは、13-epimanol (**1**)、larixol (**2**)、larixyl acetate (**3**)、13-epitorulosyl acetate (**4**)、abietic acid (**5**)、neoabietic acid (**6**)、dehydroabietic acid (**7**)、isopimaric acid (**8**)と同定された (Figure 1)。これらのジテルペノイドは、グイマツの近縁変種で、シベリア東部、モンゴル北東部、中国北東部に広く分布するダフリアカラマツ (*L. gmelinii* var. *gmelinii*) の樹皮の石油エーテル抽出物中にも認められており<sup>5)</sup>、グイマツとダフリアカラマツとは、ジテルペノイド生合成に関してほぼ近似したプロセスを有することが示唆された。

グイマツ枝のリチドームにおける石油エーテル-ジエチルエーテル抽出物量は、二次師部のそれよりも有意に高かった (Table 1)。ジテルペノイド **1-8** はリチドームおよび二次師部ともに含有していたが、リチドームにおける各ジテルペノイドの含有量は、二次師部のそれよりも有意に高かった

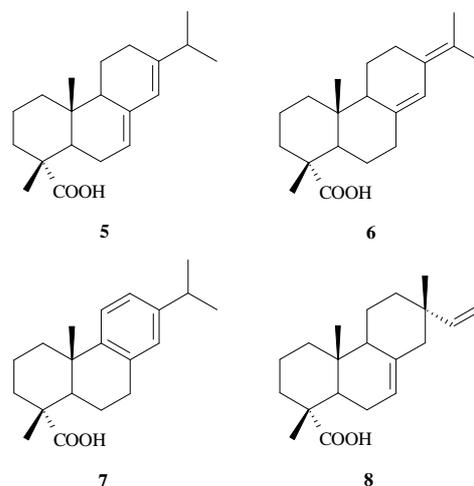
(Table 1)。また、グイマツ枝の断面を実体顕微鏡で観察したところ、オレオレジンを含む樹脂孔と見られる組織構造がリチドーム内に点在していることが認められた (Figure 2)。

一般にマツ科の針葉樹は、テルペノイドを主要成分とするオレオレジンを含む樹脂孔と見られる組織構造がリチドーム内に点在していることが認められた (Figure 2)。二次師部外側部では、木部の肥大成長に伴う接線応力により、柔細胞や樹脂道などは肥大化することが知られている<sup>7)</sup>。このことより、二次師部外側部において、オレオレジンの含有量が高いことが推定された。また、生組織である二次師部は形成層から分化する一方、リチドームは非透水性コルク層の周皮が二次師部外側部を取り込みながら形成され、取り込まれた二次師部は死滅する<sup>8)</sup>。したがって、グイマツの主要ジテルペノイドのリチドームへの偏在性 (Table 1) は、オレオレジンの二次師部外側部への偏在性およびリチドームの形成機構に起因することが示唆された。

これまでにテルペノイドによる化学的防御において、その集積に関するコスト-ベネフィットが議論されている<sup>9)</sup>。今回の結果では、グイマツの枝樹皮組織



- 1 R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H
- 2 R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OH
- 3 R<sub>1</sub> = CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = OCOCH<sub>3</sub>
- 4 R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OCOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = H



**Figure 1.** Labdane (**1-4**-), abietane (**5-7**-), and pimarane (**8**-)type diterpenoids isolated from the diethyl ether extract of *Larix gmelinii* var. *japonica* branch bark.

において、主要ジテルペノイドの樹体最外側部の死滅組織であるリチドームへの偏在性は、天敵に対して有効な化学的防御を配置可能であることが考えられた。また、スベリン化したコルク層で被覆された組織内に防御物質を集積することにより、潜在的細胞毒性を有する防御物質を自身に対して安全に、さらに光や空気による防御物質の酸化防止を図れるなど安定的に貯蔵可能であることが示唆された。

**Table 1.** Contents of the petroleum ether-diethyl ether extract and composition of the constitutive diterpenoids in the rhytidome and the secondary phloem in branch bark of *Larix gmelinii* var. *japonica*.

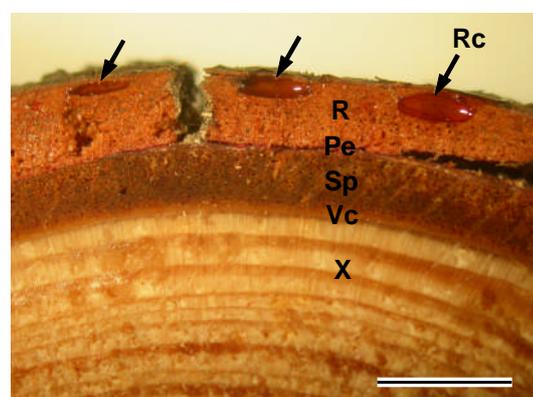
	Rhytidome			Secondary phloem			<i>P</i> <sup>c</sup>
	(mg/g) <sup>a</sup>			(mg/g) <sup>b</sup>			
	Mean	Range	SD	Mean	Range	SD	
Petroleum ether-diethyl ether extract	62.31	45.56 – 84.52	14.03	48.70	31.62 – 74.63	13.69	< 0.001
Diterpenoids							
13-Epimanol (1)	1.97	0.71 – 3.47	0.96	1.52	0.34 – 3.09	0.90	< 0.001
Larixol (2)	3.84	2.09 – 6.25	1.27	2.47	1.26 – 3.47	0.75	< 0.001
Larixyl acetate (3)	2.28	0.40 – 4.00	1.09	1.51	0.34 – 3.22	0.76	< 0.001
13-Epitorulosyl acetate (4)	1.87	0.96 – 3.24	0.66	1.20	0.49 – 2.25	0.57	< 0.001
Abietic acid (5)	1.86	0.91 – 3.09	0.67	1.07	0.40 – 1.95	0.43	< 0.001
Neoabietic acid (6)	0.27	0.12 – 0.44	0.11	0.24	0.11 – 0.41	0.11	0.001
Dehydroabietic acid (7)	0.60	0.32 – 1.03	0.26	0.39	0.20 – 0.64	0.13	0.001
Isopimaric acid (8)	2.17	1.44 – 3.31	0.59	1.37	0.62 – 2.84	0.65	< 0.001
Total of the diterpenoids	14.60	8.24 – 19.78	3.59	9.53	6.00 – 11.88	1.99	< 0.001

*n* = 12

<sup>a</sup> based on the dry weight of the rhytidome

<sup>b</sup> based on the dry weight of the secondary phloem

<sup>c</sup> *P* values are resulted by analysis of the differences in the ether extract and diterpenoid contents between the secondary phloem and the rhytidome in the branch bark of each individual tree using Wilcoxon's signed-ranks test



**Figure 2.** Transverse section of a partly circumference of *Larix gmelinii* var. *japonica* branch, which is including rhytidome (*R*), periderm (*Pe*), secondary phloem (*Sp*), vascular cambium (*Vc*), and secondary xylem (*X*). There are frequently some resin cavities (*Rc*) (arrows) filled with oleoresin in the rhytidome. *Bar* = 5 mm.

## 参考文献

1. Langenheim JH (2003) Plant resins: chemistry, evolution, ecology, and ethnobotany. Timber Press, Portland.
2. Kučera LJ, Bergamin L (2003) The structure, function and physical properties of bark. In: Vaucher E, Eckenwalder JE (eds) Tree bark: a color guide. Timber Press, Portland, pp 23-37.
3. Hayashi E, Iizuka K, Sukeno S, Kohno K (1998) Relationship between resistance to vole browsing and content of ether extract in bark of larch species and hybrids. J For Res 3: 119-122.
4. Sato M, Seki K, Kita K, Moriguchi Y, Hashimoto M, Yunoki K, Kofujita H, Onishi M (2009) Comparative analysis of diterpene composition in the bark of the hybrid larch F<sub>1</sub>, *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* and their parent trees. J Wood Sci 55: 32-40.
5. 関 一人, 佐藤真由美, 岸野正典, 来田和人, 内山和子, 大西正男 (2010) 雑種識別方法. 特開 2010-216993.
6. Chernenko GF, Ivanova EE, Demenkova LI, Shmidt ÉN (1991) Extractive substances in the bark of *Larix dahurica*. Khim Prir Soedin no 4: 580-582.
7. Srivastava LM (1964) Anatomy, chemistry, and physiology of bark. In: Romberger JA, Mikola P (eds) International review of forestry research, I. Academic Press, San Diego, pp 203-277.
8. Evert RF (2006) Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development, 3rd ed. John Wiley & Son, Hoboken.
9. Gershenzon J (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. J Chem Ecol 20: 1281-1328.

## 謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（課題番号 20580166）の助成を受けて実施された。