

カラマツ類の枝樹皮組織における二次代謝物の集積

(北林産試) ○関 一人、折橋 健

1. 緒言

樹皮の基本的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外敵に対して、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¹⁾。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。マツ科樹種は、樹皮の二次師部においてテルペノイドやフラボノイドなどの二次代謝物を生合成して²⁾、外敵に対して自らを恒常的に化学的防御する³⁾。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きたが¹⁾、ごく最近、カラマツ類のグイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) の枝樹皮において、リチドームの形成機構によりジテルペノイドを最外側のリチドームに配置し、より強固な化学的防御を形成することが示唆されている⁴⁾。しかし、グイマツ以外の樹種や他の二次代謝物の樹皮における集積状況はいまだ把握されていない。

サハリンやクリル諸島南部から北海道へ導入された北方系カラマツ類であるグイマツは、本州中央部から導入されたカラマツ (*L. kaempferi*) と比較して、野ネズミによる樹皮被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^{5, 6)}で示唆されてきた。一方、カラマツ類は容易に種間雑種を形成する特徴があることから、林木育種により両樹種から初期成長性、材質、野ネズミ食害抵抗性、炭素固定能などの点で優れた形質を受け継いだグイマツ雑種 F₁ (♀グイマツ×♂カラマツ、以下 F₁ という) が創出されてきた⁷⁾。近年、F₁ の道内の年間造林面積は 500 ha 以上⁸⁾と年々増加してきており、将来的な主力造林樹種として期待されている。

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、カラマツ類のグイマツ、カラマツ、F₁ の枝樹皮組織における主要テルペノイドやフラボノイドの組成および集積分布について比較検討するとともに、その分布と生合成、樹皮形成との関係について考察した。

2. 実験方法

2.1 リチドームおよび二次師部における主要テルペノイドの定量

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、グイマツ、カラマツ、F₁ の各 12 個体 (30 年生) 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 3~5cm) を採取し、直ちに -20℃ の冷凍庫に保存して実験に供した。

枝の樹幹側の部位において、最内側の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。10ml 容スクリュウキャップ付き遠沈管において、200mg の各樹皮粉碎物を、内部標準物質として 200mg/ml の *n*-tridecane を含有する 4ml 酢酸エチルで超音波洗浄機を用いて 10℃ 以下で 1 時間抽出したのち、遠心分離した。抽出液は硫酸ナトリウムで 24 時間脱水したのち、ガスクロマト質量分析計 (GC-MS) およびガスクロマトグラフィー (GC-FID) を用いて、モノ-およびセスキテルペノイドを市販標準物質または MS スペクトルデータベースと比較することにより同定したのち定量し、乾燥試料中における含有量を算出した。

10ml 容遠沈管において、200mg の各樹皮粉碎物を、内部標準物質として 200μg/ml 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 GC-MS および GC-FID 分析に供し、8 種のジテルペノイド³⁾を標準物質として、乾燥試料中における含有量を算出した。

2.2 リチドームおよび二次師部におけるフェノール性成分および主要フラボノイドの定量

2.1 の試料を凍結乾燥したのち、10mL 容遠沈管において、100mg の粉碎物を 4mL のメタノール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。(+)catechin を標準物質として Folin-Ciocalteu 法および DMACA 法を用いて、得られた上清のそれぞれ総フェノールおよび総フラバノールを分析した。また、内部標準物質として 500 μ g/ml の phthalic acid を含む前記同様のメタノール抽出液を調製し、高速クロマトグラフィー (HPLC) とフラボノイド標準品を用いて、抽出液中のフラボノイドを同定・定量した。

3. 結果と考察

3 樹種の二次師部およびリチドームの樹皮組織の各抽出物から、いずれも 17 種のモノテルペノイド、9 種のセスキテルペノイド、8 種のジテルペノイドが同定された。テルペノイドの総量は、両樹皮組織ともにグイマツ>F₁>>カラマツの順に高かった。グイマツにおいてモノテルペノイドでは 3-carene、ジテルペノイドでは larixol が最多の化合物であり、同様にカラマツではそれぞれ α -pinene、abietic acid が最多の化合物であった。F₁ ではグイマツとカラマツの主要テルペノイドの量的組成の中庸よりややグイマツよりの傾向を示した。また、3 樹種ともに、主要テルペノイドの相対比は両樹皮組織で近似していたが、その含有量はリチドームの方が二次師部と比較して高かった (Figure 1)。

3 樹種の樹皮の各抽出物から、いずれも 3 種の flavan-3-ol 型のフラボノイド ((+)catechin、(-)epicatechin、(-)epiafzelechin) が同定された。総フェノール量、総フラバノール量、(+)-catechin および(-)epicatechin 量は、カラマツ>F₁>グイマツの順に高い傾向を示した。また、3 樹種ともに、総フェノール量、総フラバノール量、(+)-catechin および(-)epicatechin 量は、二次師部の方がリチドームと比較して高かった (Figure 2)。

一般にマツ科樹種の樹皮において、テルペノイドは二次師部のより細胞活性の高い内側 (conducting phloem) に存在するエピセリウム細胞において生合成されたのち、他の化合物群にほとんど再合成されることなく⁹⁾、それらを主要成分とするオレオレジンとして二次師部の外側 (non-conducting phloem) で肥大化傾向の高い水平樹脂道や樹脂囊などの内分泌構造に集積される²⁾。カラマツ類の樹皮はリチドームの形態から“うろこ状樹皮”に分類されている^{1,2)}。グイマツでは主要ジテルペノイドのリチドームへの偏在性が認められており、二次師部の外側からのリチドームの形成機構に起因することが示唆されている⁴⁾。したがって、カラマツや F₁ におけるテルペノイドのリチドームにおける偏在性は、同属であるグイマツと同様にリチドームの形成機構によることが推定された。

フラボノイドは生組織において生合成されたのち、さらに多種多様な配糖体や縮合型タンニンに再合成される¹⁰⁾。カラマツ類 3 樹種では、二次師部の内側の柔細胞で生合成された 3 種のフラボノイドが、さらに配糖体、プロシアニジン、縮合型タンニンなどに再合成されたのち、リチドームに取り込まれる二次師部の外側ではなく、内側にその多くが集積していることが推定された。

これまでに、カラマツ類の雑種 F₁ における葉のモノテルペノイド¹¹⁾および樹皮のジテルペノイド⁵⁾は、両親種から量的遺伝を受けることが認められている。今回検討した F₁ の樹皮における総フェ

ノール量、総フラバノール量、フラボノイド量も両親種から量的遺伝を受ける可能性のあることが示唆された。

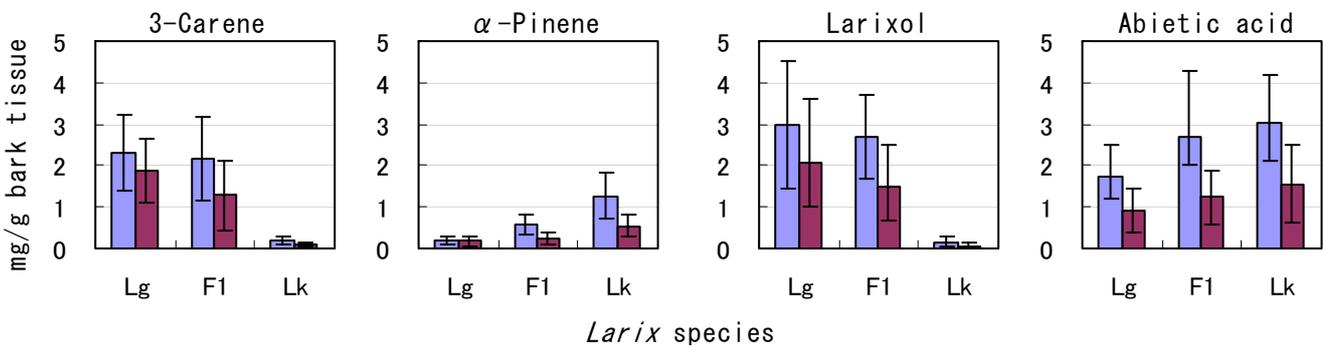


Figure 1. Contents of the constitutive mono- and diterpenoids in the rhytidome and secondary phloem in the branch bark of *Larix* species: Lg, *Larix gmelinii* var. *japonica*; F1, hybrid larch F₁ (*L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*); Lk, *L. kaempferi*.

n = 12, based on the dry weight of the bark tissues: ■, rhytidome; ■, secondary phloem

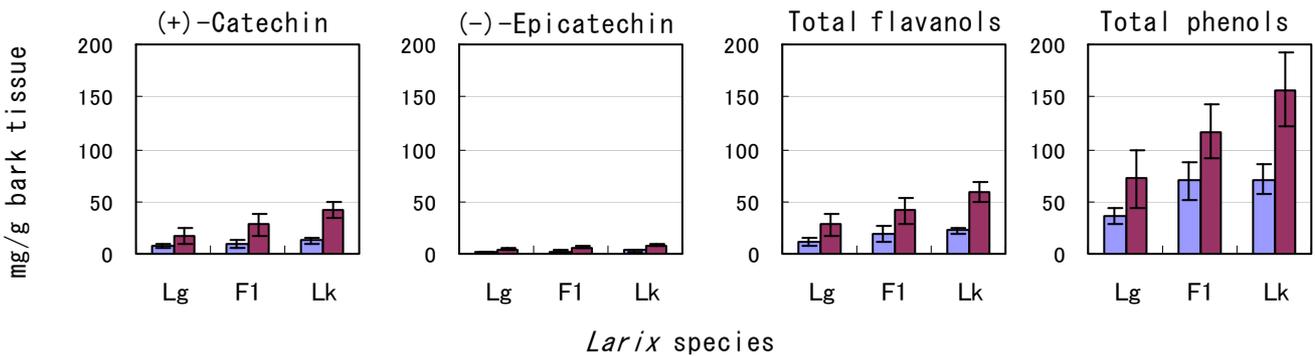


Figure 2. Contents of (+)-catechin, (-)-epicatechin, and total phenols and flavanols, in the rhytidome and secondary phloem in the branch bark of *Larix* species: Lg, *Larix gmelinii* var. *japonica*; F1, hybrid larch F₁; (*L. gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi*); Lk, *L. kaempferi*.

n = 12, based on the dry weight of the bark tissues: ■, rhytidome; ■, secondary phloem

参考文献

1. 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.
2. 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.
3. Gershenzon J (2006) Secondary metabolites and plant defense. In: Taiz L, Zeiger E (eds) *Plant physiology*, 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, pp 315–344.
4. Seki K, Orihashi K, Sato M, Kishino M, Saito N (2012) Accumulation of constitutive diterpenoids in rhytidome and secondary phloem of the branch bark of *Larix gmelinii* var. *japonica*. *J Wood Sci* 58: 437–445.

5. 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.
6. 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 F₁, *Larix gmelinii* var. *japonica* × *L. kaempferi* and their parent trees. *J Wood Sci* 55: 32–40.
7. 林業試験場 (2009) 種苗の品種にこだわる時代がやってきた, グイマツ雑種 F₁ の特定品種「クリーンラーチ」と「スーパーF₁」. 林業試験場, 美唄.
8. 北海道水産林務部 (2012) 平成 23 年度北海道林業統計. 北海道, 札幌.
9. Gershenzon J (1994) Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. *J Chem Ecol* 20: 1281–1328.
10. Harborne JB (1991) Flavonoid pigments. In: Rosenthal GA, Berenbaum MR (eds) *Herbivores: their interaction with secondary metabolites, I: the chemical participants*, 2nd ed. Academic Press, San Diego, pp 389–429.
11. Holm Y, Hiltunen R (1997) Variation and inheritance of monoterpenes in *Larix* species. *Flavour Fragr J* 12: 335–339.

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金（課題番号 20580166, 25450221）の助成を受けて実施された。