

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19780135
 研究課題名（和文）
 コルク組織形成に伴うスベリンの沈着機構と化学構造
 研究課題名（英文）
 Chemical structure and deposition mechanism of suberin in cork tissue
 研究代表者
 鈴木 利貞（SUZUKI TOSHISADA）
 香川大学・農学部・准教授・
 研究者番号：80346634

研究成果の概要（和文）：

外樹皮コルク組織に特異的に沈着するスベリンは、フェルラ酸等の *p*-ヒドロキシケイ皮酸類と、長鎖脂肪酸類やグリセロール等が架橋した構造である。そのスベリンの生合成はフェルラ酸等の *p*-ヒドロキシケイ皮酸類が長鎖脂肪酸類とエステル結合後、ペルオキシダーゼにより脱水素重合し、 $\cdot-0-4'$ エノールエーテル型等の結合様式で存在していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Suberin is specifically deposited in outer bark of woody plant. The biopolymer is composed of poly aliphatic domain and poly phenolic domain. In suberin biosynthesis, ferulic acid derivatives were esterification with long chain fatty acids and glycerol, and dehydrogenatively polymerized by peroxidase to give $\cdot-0-4'$ and various structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	270,000	3,870,000

研究分野：バイオマス化学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：スベリン、コルク、樹皮、化学構造、芳香族領域、フェルラ酸

1. 研究開始当初の背景

樹木において外樹皮コルク組織は、水分の蒸発防止、外敵侵入の防御、熱・紫外線の遮断、及び衝撃吸収等の生理機能を有しており、過酷な外部環境から身を守る重要な保護組織である。コルク組織は、空洞化した細胞が六角形に規則正しく配列し、肥厚化した細胞

壁に特異的な成分であるスベリンが沈着している。コルク組織の特徴的な生理機能は、このコルク細胞の独特な形態とスベリンの化学構造に起因すると言われているが、コルク組織の形態形成とスベリンの化学構造については不明な点が多く、特にスベリンの沈着機構については全く分かっていない。

スベリンは細胞壁の内側に局在し、脂肪族部分と芳香族部分が交互に重なり合ったラメラ構造体であることは知られている。脂肪族部分については長鎖脂肪酸、ヒドロキシ脂肪酸やグリセロール等が架橋した構造であることが解明されたが、芳香族部分については不明な点が多い。以前には、芳香族部分は*p*-ヒドロキシケイ皮アルコール類が結合したリグニン様の重合体であると考えられていたが、近年、フェルラ酸等の*p*-ヒドロキシケイ皮酸類がペルオキシダーゼによって重合した構造であることが示唆されている。

Bernards (2002) はジャガイモ癒傷組織におけるスベリンの芳香族部分の構造と生合成を検討し、フェルラ酸エステル等の重合体であることを示し、スベリンの化学構造について大幅な修正を行った。従来行われていたスベリンの分析法では、リグニンと*p*-ヒドロキシケイ皮酸類の重合体の区別ができなかったことが、予想構造の大幅な変更の要因であると言える。しかしながら、ジャガイモのスベリンと樹木外樹皮のスベリンが同じ構造であるのか、芳香族部分の詳細な結合様式と重合度、細胞壁多糖類との結合、特に、どのようにラメラ構造が形成されるのかについては全く分かっていない。

電子顕微鏡による観察では、スベリンは明るい層と暗い層からなるラメラ構造が観察される。これは電子密度が低い脂肪族領域が明るく、電子密度が高い芳香族領域が暗く観察されるためだと考えられている。Bernardsの予想構造では、芳香族領域よりも脂肪族領域の方が太く表現されているが、実際の顕微鏡写真では、明るい層よりも暗い層の方が太く観察されている。このことから、スベリンの芳香族部分の構造は、Bernardsが予想したフェルラ酸の単量体の配列という構造では矛盾しており、芳香族成分同士がより重合した縮合度の高い状態であることが予想される。

私達はこれまでに、アベマキ外樹皮におけるスベリンの芳香族部分はフェルラ酸等の*p*-ヒドロキシケイ皮酸類がペルオキシダーゼにより脱水素重合し、 $\cdot-0-4'$ エノールエーテル型等の結合様式で存在していることを示した。しかしながら、フェルラ酸はエステル化してから重合するのか、重合してからエステル化されるのか、重合度や分子量、スベリン芳香族部分とリグニンの生合成の相違はどのように制御されているのか、どのようにラメラ構造が形成されるのか等については不明であり、これらの問題の解明が、国内外の研究者から期待されている。

生合成の観点から見ると、リグニンはモノリグノールの重合体であるが、スベリン芳香族部分はモノリグノールの前駆体であるフェルラ酸等の重合体である。樹木組織におい

て、形成層から外側の樹皮ではケイ皮酸経路から生合成されたフェルラ酸等が重合してスベリン芳香族部分を形成するのに対し、形成層の内側の木部では、さらに還元されたモノリグノールが重合してリグニンを形成していることは、大変興味深い。スベリンの生合成経路及び重合過程を解明することは、樹木における二次代謝物質の調節機構を解明することにもつながり、学術的に重要な研究である。また、スベリンはリグニンと同様な高分子重合体であるが、スベリンは芳香族部分と脂肪族部分からなる複雑なヘテロポリマーであり、細胞壁と結合し、樹皮に存在するワックスと会合しているため、単離することがリグニン以上に難しく、解析が遅れている。樹木におけるスベリン芳香族部分の化学構造に関する研究は少なく、スベリンの生合成に関わるタンパク質や遺伝子レベルでの研究は世界的に見ても例が無く、本研究課題は独創的である。

さらに、コルクガシの樹皮(コルク)はコルク栓、コルクボード、断熱材等に用いられているが、一般に製材工場から排出される樹皮は、特に利用されずに燃料か堆肥に使われているにすぎない。日本国内で発生する廃樹皮は年間約400万トンであるが、中小企業のほとんどは、これを燃料とする以外には大量の利用方法が無く、この処理方法に苦慮している業者が多い。その化学成分も複雑で、木材と比較しても研究の進歩は一般的に困難なことから、木材化学者のうち特に樹皮に関心を持っている研究者も少ない。この事情は、木材廃材利用の向上の立場から言って好ましくなく、樹皮に含まれる多様な化学物質の特性を活かす有効利用法の開発が急務に必要と言える。本研究の進展により、樹皮の有効利用・高度利用、及びスベリンのラメラ構造を模倣した機能性素材の開発等が期待される。

また、樹木の樹皮は、昆虫や動物による食害、強い衝撃等により損傷を受けることがある。樹皮が剥離した樹木の保護方法には、防腐剤を数年間塗布し続け、樹皮の再生を待つしかない。本研究により樹皮形成機構が解明されれば、樹皮再生剤の開発等が期待され、森林保護の観点からも重要な研究であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、樹木の外樹皮に特異的に蓄積されるスベリンの化学構造を詳細に解明することを目的とする。特に、コルク組織形成に伴うスベリンの沈着機構に注目し、その生合成、重合過程、及びリグニン生合成との相違点を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、外樹皮からコルクが生産されるコルクガシと日本産の樹木中で最も樹皮が発達するアベマキを用いて、組織学的、化学的、生化学的手法によってコルク組織形成に伴うスベリンの沈着機構と化学構造を解明することを目的とした。

(1) コルク細胞形成過程の顕微鏡観察：コルク化過程が異なる組織を固定・包埋後、ウルトラマイクロームにより超薄切片を作成し、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡及び電子顕微鏡 (SEM, TEM) により観察した。コルク組織の形成過程と細胞壁におけるスベリンの沈着・分布状況について解析を行った。

(2) 細胞内生合成を模倣したモデル化合物の重合：スベリン芳香族部分の構造を予測するために、フェルラ酸長鎖アルキルエステル及びカフェ酸長鎖アルキルエステルを合成し、これをコルクガシ外樹皮に含まれる粗酵素を用いて脱水素重合を行い、生じる重合物の構造決定を行った。本研究では2量体以上の重合物の分析、特に重合の延長及び終了に関わる結合様式の解明を目的とした。

(3) 樹皮のメタノリシス生成物の分析：抽出成分を除いた外樹皮粉に、スベリンの高分子エステル結合を分解する塩基性メタノリシス処理を施し、分解物の解析を行った。コルク化過程が異なる組織や反応時間ごとに、メタノリシス分解生成物の蛍光スペクトル解析を行い、分解生成物をゲル濾過・蒸気圧式分子量測定法により測定し、芳香族スベリンの構成ユニットを探索した。また、長時間反応させた分解物から2量体成分を単離・同定し、スベリン芳香族部分の結合様式を考察した。

(4) ペルオキシダーゼ活性の比較：コルク化過程が異なる組織ごとに粗酵素試料を調製し、ペルオキシダーゼ活性を比較した。ペルオキシダーゼ活性は、グアイアコール及びフェルラ酸/H₂O₂による比色定量法により行った。また、酵素試料の一部をSDS-PAGEに供し、ペルオキシダーゼアイソザイムのコルク化に伴う変化を調べた。

(5) 固体¹³C NMR及びFT-IRによる解析：スベリン芳香族部分の構造を直接的に解析するために、アベマキ脱脂外樹皮粉を遊星型ボールミルで微粉碎し、その細胞壁多糖類を酵素分解し、メタノリシス処理で脂肪族部分を分解後、固体¹³C NMR及びFT-IR測定した。

4. 研究成果

(1) 樹木の断面をフロログルシノールで染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、スベリンが沈着している外樹皮は強い蛍光を発しているのに対し、木部のリグニンは蛍光を發せず、フロログルシノールで鮮紅色に着色された。このことから、樹木におけるスベリンは

外樹皮コルク組織に特異的に存在することが示された。

(2) スベリン芳香族部分の構造を予測するために、細胞内生合成を模倣したモデル化合物の重合実験を行った。基質であるフェルラ酸メチルと16-O-フェルロイルオキシヘキサデカン酸は、フェルラ酸とメタノール、フェルラ酸と16-ヒドロキシヘキサデカン酸をそれぞれエステル化して合成した。これらを西洋ワサビペルオキシダーゼにより脱水素重合し、生成物を各種クロマトグラフィーにより分離・精製し、MS及びNMRにより構造解析を行った。フェルラ酸メチル二量体のうち、最も収量の多い成分は、 \cdot -5'フェニルクマラン型2量体であった。また、16-O-フェルロイルオキシヘキサデカン酸の脱水素重合物にも \cdot -5'フェニルクマラン型2量体、縮合型三量体フェルラ酸重合物が含まれることが示された。このことからスベリン芳香族部分には、これまでの研究で示されたb-0-4'型以外にも、 \cdot -5'型も結合様式として存在することが示唆された。

(3) メタノリシス生成物の分析：アベマキ及びコルクガシ外樹皮は、ソックスレー抽出器を用いて抽出成分を除去し、塩基性メタノリシスを行った。メタノリシス生成物を各種クロマトグラフィーにより分離・精製し、NMRにより構造解析を行い、コルクガシ外樹皮のメタノリシス生成物からフェルラ酸メチル、フェルロイルオキシ脂肪酸メチルを単離・同定した。

また、アベマキ及びコルクのメタノリシス生成物をゲル浸透クロマトグラフィーにより分子量分布を測定した結果、両樹種ともにポリスチレン換算で、約2500、1200、1000、600、300の5つの物質の存在が示された。また、蛍光検出器によるクロマトグラムから、分子量約2500の物質は非常に強い蛍光を発する物質であることが示された。これまでに樹皮の分解物から、このような強い蛍光を発する物質の存在は報告されていない。この物質の解明は、樹皮に特異的に含まれるスベリンの化学構造の解明、及び樹皮の応用利用を確立する上で、重要な物質であると考えている。

(4) 樹皮ペルオキシダーゼ活性の生化学的性質を調べるために、樹皮粗酵素のNative PAGEを行い、ペルオキシダーゼ活性のグアイアコールによる染色を行なった。この結果、5つのペルオキシダーゼ活性を示すバンドが認められた。このことから、樹皮ペルオキシダーゼには少なくとも5種のアイソザイムが含まれることが分かった。また、これら樹皮ペルオキシダーゼの至適pHは4-6であり、4-23℃までは酵素活性はほとんど低下しないことが分かった。現在、これらのアイソザイムのクローニングを行なっている。

(5) 固体¹³C NMR及びFT-IRによる解析：スベリン芳香族部分の構造を直接的に解析するために、アベマキ脱脂外樹皮粉を遊星型ボールミルで微粉碎し、その細胞壁多糖類を酵素分解し、メタノリシス処理で脂肪族部分を分解後、固体¹³C NMR及びFT-IR測定した。酵素処理によって分解させなかった多糖類由来のピークがメタノリシス処理により消失したことから、外樹皮中で多糖類は、スベリン・リグニンの芳香族部分に結合しているものよりスベリンの脂肪族部分に結合しているものの方が多いと推定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Falah, S., Suzuki, T. and Katayama, T.: Chemical constituents from *Swietenia macrophylla* bark and their antioxidant activity. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11, 2007-2012 (2008). 査読有

② Falah, S., Katayama, T. and Suzuki, T.: Chemical constituents from *Gmelina arborea* bark and their antioxidant activity. *Journal of Wood Science* 54, 483-489 (2008). 査読有

[学会発表] (計12件)

① 鈴木利貞、中林亮太、伊藤彰伸、国方美晴、片山健至：アベマキ及びコルクガシ外樹皮におけるスベリン芳香族部分の構造解析—メタノリシス生成物の分析と前駆体の酵素的重合—。第60回日本木材学会大会研究発表要旨集，宮崎県宮崎観光ホテル，70 (2010, 3, 17)

② Falah, S., Suzuki, T. and Katayama, T.: New phenolic extractives from the bark of *Gmelina arborea* and *Swietenia macrophylla* and their antioxidant activity. International Symposium on Wood, Fibre, and Pulping Chemistry 2009 (ISWFPC 2009), SAS Plaza Hotel, Oslo, Norway, P-120 (2009, 6, 15).

③ 中林亮太，鈴木利貞，片山健至：アベマキ外樹皮におけるスベリン芳香族部分の構造解析と生合成—フェルロイルオキシ脂肪酸の酵素的重合—。日本木材学会中国・四国支部第21回研究発表会要旨集，松江市島根県立産業交流会館，30-31 (2009, 9, 15)。

④ 金子 亮，鈴木利貞，片山健至：コルクガシ外樹皮の液化とその利用。日本木材学会

中国・四国支部第21回研究発表会要旨集，松江市島根県立産業交流会館，32-33 (2009, 9, 15)。

⑤ 原田貴行，鈴木利貞，片山健至：Sengon (*Albizia falcataria*) 樹皮の抽出成分、特に抗酸化・抗菌活性物質の探索。日本木材学会中国・四国支部第21回研究発表会要旨集，松江市島根県立産業交流会館，80-81 (2009, 9, 15)。

⑥ Falah, S., Katayama, T. and Suzuki, T.: Phenolic compounds from *Swietenia macrophylla* and *Gmelina arborea* bark and their antioxidant activity. 第58回日本木材学会，つくば市つくば国際会議場，68 (2008, 3, 17)

⑦ Falah, S., Katayama, T. and Suzuki, T.: Chemical constituents from *Gmelina arborea* bark and their antioxidant activity. International Symposium on Wood Science and Technology (IAWPS 2008), Northeast Forestry University in Harbin, 317-318 (2008, 9, 27).

⑧ 中林亮太，鈴木利貞，片山健至：アベマキ外樹皮におけるスベリン芳香族部分の構造解析：フェルロイルオキシ脂肪酸の酵素的二量化。日本木材学会中国・四国支部第20回研究発表会要旨集，松山市愛媛大学工学部，32-33 (2008, 9, 12)。

⑨ 金子亮，鈴木利貞，片山健至：植繊械処理した木質バイオマスの吸着性能の解析。日本木材学会中国・四国支部第20回研究発表会要旨集，松山市愛媛大学工学部，58-59 (2008, 9, 12)。

⑩ Falah, S., Suzuki, T. and Katayama, T.: *Gmelina arborea*と*Swietenia macrophylla*の樹皮から新規フェニルプロパノイド関連成分の単離同定とそれらの抗酸化活性。第53回リグニン討論会講演要旨集，東京大学農学部，102-105 (2008, 10, 30)。

⑪ Syamsul Falah, Takeshi Katayama, Toshisada Suzuki: Chemical constituents from *Gmelina arborea* Roxb. Bark and their antioxidant activity II. 第57回日本木材学会大会，広島市安田女子大学，61. (2007, 8, 8)

⑫ 鈴木利貞：アベマキ外樹皮におけるスベリンの化学構造と生合成。日本植物学会第71回大会，野田市東京理科大学野田キャンパス，(2007, 9, 6)

〔その他〕 ホームページ等
香川大学農学部
<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
鈴木 利貞 (SUZUKI TOSHISADA)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号：80346634