

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06164

研究課題名(和文) クロモジ等低木類のテルペノイド成分の分析と産生条件の解明

研究課題名(英文) Analysis and characterization of terpenoid components in shrub trees such as *Lindera umbellata*

研究代表者

芦谷 竜矢 (Ashitani, Tatsuya)

山形大学・農学部・教授

研究者番号：20423486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：クロモジなどの低木類の葉と樹皮の低極性成分を分析し、成分の組成を明らかにした。葉と樹皮の成分組成は全ての樹種で異なっていたが、特にクロモジは主成分の linalool の光学異性体比を葉と樹皮で顕著に逆転させる傾向が特徴的に示された。オオバクロモジの培養細胞と無菌苗、および生木の成分分析から、linalool 等のテルペン類の産生は、葉、茎等に分化した後に各々の部位の生育段階によって産生されること、光学異性体比を障害等の外部刺激に応じて変化させていることが示唆された。また、linalool とその oxide の森林昆虫と糸状菌に対する生物活性を検討し、立体構造の違いによって活性が異なることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロモジなどの低木類は現在ほとんどが未利用であり、森林資源の有効利用のためにはこれらを活用していく必要がある。そこで、低木類に特徴的に含まれる芳香成分の詳細な分析を行い成分の組成を明らかにした。またクロモジに特徴的に含まれる linalool の森林昆虫と糸状菌に対する生物活性を検討し、立体構造の違いによって活性が異なることが示した。これらは樹木成分利用の基礎となる知見であり、かつ化学生態学的な成分の役割の解明につながる成果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The low-polar components of the leaves and bark of shrubs such as Kuromoji (*Lindera umbellata*) were analyzed to determine their composition. The composition of the leaf and bark components differed among all species. Especially, the bark and leaf of Kuromoji showed a marked tendency to invert the optical isomer ratio of the main component of linalool. The analysis of the constituents of cultured cells, sterile seedlings, and fresh trees of Oba-kuromoji (*L. umbellata* var. *membranacea*) suggested that terpenes such as linalool are produced at different growth stages after differentiation into leaves and stems, and that the optical isomer ratios are changed in response to external stimuli such as disturbance. The biological activities of linalool and its oxides against forest insects and fungi were also investigated, and it was shown that the activities differed depending on the steric structure.

研究分野：樹木化学

キーワード：樹木成分 テルペノイド 光学異性体 化学生態学 生物活性 低木類 クロモジ linalool

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、クロモジなどの芳香成分を有する低木類から精油生産が盛んになっている。しかし、精油成分の主成分である特定のテルペノイド成分は生物活性を異にする光学異性体の両方とも同一樹種内に含有されていることが多く、クロモジ精油において、その含有比は明らかにされていなかった。そこで、申請者らは、東北地方で見られるオオバクロモジの部位ごとの成分の相違や主成分の光学異性体比を検討し、葉と枝、樹皮での成分の相違と主成分である linalool の光学異性体比が葉と樹皮で極端に異なる(葉では(-)-linalool が、樹皮・枝では(+)-linalool が多い)ことを見出した。Linalool は各種香料原料や医薬品の原料として有用であるが、合成品のラセミ体または(-)体のみが市販供給されており、(+ )体の供給源は限られている。そのため、オオバクロモジの枝はこの(+)-linalool の供給源となりうる可能性を示している。クロモジ等の資源利用は、特に林業の施業で排出される資源であるため、効率的・永続的に得られる資源のため、林業に貢献することとなると思われる。また、この知見は付加価値の高い安定した精油生産という林業・林産業の産業的な価値に資するばかりではなく、樹木生理学、化学生態学的に重要な情報を与える可能性がある。低分子の抽出成分は、樹木の他生物に対する生体防御機構に用いられ、アレロパシー物質と呼ばれるが、その生合成機構や生物活性は不明なものも多い。特に、樹木は似た構造の物質を区別し産生しているが、それぞれの役割について解明されたものは少なく、オオバクロモジ成分についても同様である。特にオオバクロモジは構造異性のみではなく立体異性をも制御して部位ごとに光学異性体比を異にした成分を産生している。したがってそれがどのような意味があるか探ることで、学問上の問いである「なぜ樹木はその抽出成分を産生するのか?」に対する貴重な情報を得ることが可能となる。

### 2. 研究の目的

クロモジなどの低木類は、林業施業で多く排出される未利用資源であるが、有用な芳香成分等を含む樹種も存在する。申請者らの研究でオオバクロモジの部位ごとの成分の相違や主成分の linalool の光学異性体比が異なることを見出された。しかし、これらの成分変異の詳細な検討や他の低木類に対する検討は行われていない。そこで、クロモジ等の低木類の成分変異の詳細な検討と、培養細胞を用いた各種刺激による成分産生の相違を明らかにし、各成分の生物活性評価を行うことで、樹木成分の生合成、化学生態学的な成分の役割解明、成分利用についての基礎的知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料

クロモジの試料はオオバクロモジ(採取地:山形県)の他にクロモジ(静岡県)、ケクロモジ、ウスゲクロモジ、ヒメクロモジ(高知県)を用いた。クロモジ以外の低木類はアブラチャン(山形県、静岡県、高知県、宮崎県)、ダンコウバイ(静岡県)、シロモジ(宮崎県)、コシアブラ(山形県)、タムシバ(山形県)を試料として用いた。山形県で採集した試料は採集後すぐに抽出処理した。山形県以外の試料については、筑波大学井川演習林(静岡県)、高知大学演習林(高知県)、九州大学宮崎演習林(宮崎県)の協力を得、採集後すぐに冷凍し、山形大に送付後、抽出まで-20°Cで保存したものを使用した。

#### (2) 抽出と分析

試料を葉と枝に分離後、それぞれ裁断し、ヘキサンに浸漬して成分を抽出した。成分の分析には GCMS (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) を用いた。キャピラリーカラムは SH-Rtx-5Sil MS (30 m×0.32 mm; id 0.25 μm, SHIMADZU) と光学異性体分析用の CYCLOSIL-β (30 m×0.25 mm; id 0.32 μm, Agilent Technologies) を使用した。成分はピークの RT と MS スペクトルの研究室保有の標品または文献値との比較によって同定した。オオバクロモジ抽出物に含まれる linalool oxide については、標品を合成し、GC 分析の結果と比較することで同定した。

#### (3) オオバクロモジの培養細胞と無菌苗の調製と分析

オオバクロモジの種子を外植体として用い、殺菌後滅菌蒸留水で洗浄し MS 基礎培地上でカルスを誘導した。無菌苗は、滅菌した種子の種皮を除き MS 培地に播種して調製した。

#### (4) オオバクロモジ抽出成分の生物活性試験

クロモジヘキサン抽出物および主要成分である linalool 各光学異性体のヤマトシロアリ、糸状菌 (*Trametes versicolor*, *Gloeophyllum trabeum*, *Fomitopsis palustris*, *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum*, *Chaetomium globosum*, *Rhizopus oryzae*, *Trichoderma virens*), 森林昆虫(キクイムシ類, ハチ類)に対する活性を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 成分分析

各地の演習林等から依頼して集めたクロモジの成分分析では、オオバクロモジと同様に葉と樹皮で linalool の光学異性体比が葉では (-) 体が多く、樹皮では (+) 体が多いことが示され、この傾向はほぼ共通したものであることが示唆された。

また、オオバクロモジの樹皮・小枝、葉には linalool の酸化物である Furan 型の linalool oxide 類が含有されていることが示された(図1)ので、その立体異性体比について詳細に分析を行った。その結果、部位ごとに含有される主要な linalool oxide 類の異性体比は linalool と同様に異なり、葉では Furan 型(2R,5R)linalool oxide、(2R,5S)-linalool oxide が強く検出され、枝では Furan 型 (2S,5S)-linalool oxide が特に強く検出された(図1 および2)。この結果から、各部位で検出された linalool oxide は各部位に豊富に含まれる linalool の立体配置に由来することが明らかとなった。

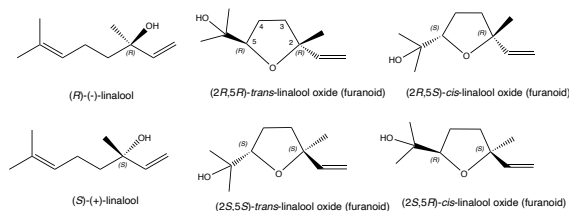


図1 オオバクロモジに含まれる linalool と linalool oxide の構造

クロモジ以外の低木類であるアブラチャン、ダンコウバイ、シロモジ、タムシバ、コシアブラの枝部と葉部についてテルペノイド成分を分析した結果、全ての樹種で、葉、枝間の成分組成は異なっており、また同じ部位でも個体によって含有割合に差がある成分が見られた。しかしながら、クロモジにおける linalool のように光学異性体を部位間で顕著に逆転して含有されている成分は検出されなかった。クロモジと同属のアブラチャンの試料は比較的多く入手できたため、アブラチャンについてさらに詳細な検討を行った。山形県で採取されたアブラチャン8個体、高知県で採取されたアブラチャン4個体、宮崎県で採取されたアブラチャン5個体、静岡県で採取されたアブラチャン1個体の計18個体の葉と枝の n-ヘキサン抽出を行った結果、収率はすべての試料において、葉の方が高いことが示された。成分組成の特徴として、葉では Z- $\beta$ -ocimene,  $\beta$  caryophyllene, elemol, germacrene D-4-ol,  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -eudesmol, 枝では 1,8-cineole, camphor の含有率が個体間で違うことが示唆された。葉のセスキテルペン成分組成を基にクラスター解析による分類を試みた結果、 $\beta$ -caryophyllene, germacrene D-4-ol, elemol,  $\beta$ -eudesmol,  $\alpha$ -eudesmol が分類の指標成分となることが示され、アブラチャンの成分について新たな知見を得ることができた。

(2) オオバクロモジの linalool 産生条件の検討  
種子からカルス誘導を行い、培養細胞を得た(図3)。MS培地上で誘導されたカルス細胞の最適培養条件を検討し、カルスが安定して培養できる条件を見出した。成分産生条件の解明のため、オオバクロモジから誘導したカルス細胞に、ジャスモン酸メチルをエリシターとして添加して培養し、テルペン成分の産生が見られるか検討した。しかしながら linalool 等の特徴的な成分は検出されなかった。そこで、殺菌したオオバクロモジ種子を無菌状態で発芽させた無菌苗を調製(図2)し、その葉、茎の成分分析を行った。無菌苗の葉の抽出物では成木の葉で主成分となる linalool や 1,8-cineole は検出されず、セスキテルペンの caryophyllene, germacrene D が検出された。茎では成木の樹皮や小枝と同様に linalool が主成分として検出され、(+ )体が

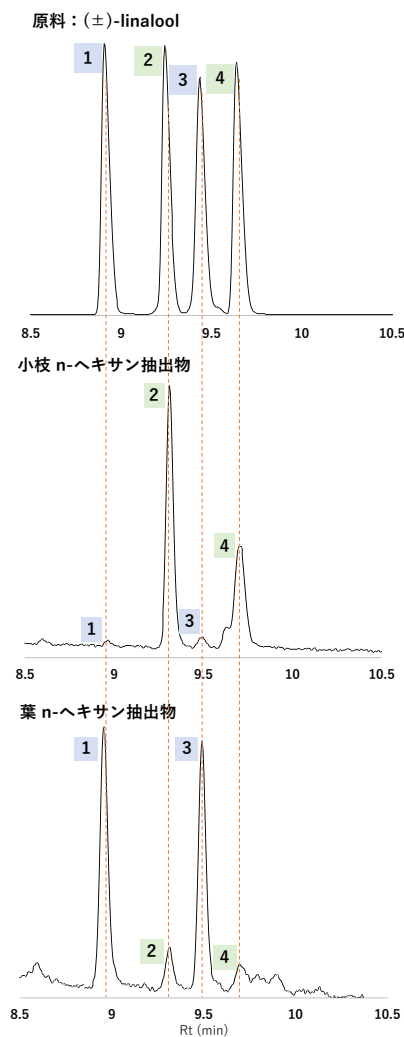


図2 合成した linalool oxide と小枝、葉抽出物の拡大クロマトグラム  
ピーク番号

- 1:(2R,5R)- Linalool oxide
- 2:(2S,5S)- Linalool oxide
- 3:(2R,5S)- Linalool oxide
- 4:(2S,5R)- Linalool oxide

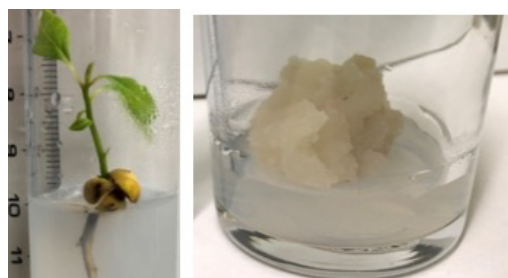


図3 オオバクロモジ種子から調製した無菌苗(左)と培養細胞(右)

セスキテルペンの caryophyllene, germacrene D が検出された。茎では成木の樹皮や小枝と同様に linalool が主成分として検出され、(+ )体が

(-)体より多く検出された。この結果から、linalool 等のテルペン類の産生は 葉、茎等に分化した後それぞれの部位で生育段階によって産生される可能性が示唆された。

一方、生木のオオバクロモジの幹および枝部を詳細に分析したところ、比較的細い径の幹の樹皮や表皮の linalool は+体の比率が大きく、大径の幹の樹皮は-体の比が増加することが示された。また、雪害等で傷害を受けた部位の回復部の樹皮では+体よりも-体の比率が多くなることが示された。そのため、オオバクロモジは linalool の光学異性体比を障害等の外部刺激に応じて変化させていることが示唆された。

### (3) オオバクロモジ抽出成分の生物活性試験

オオバクロモジの特徴成分の役割を解明するため、linalool と linalool oxide の昆虫類と糸状菌に対する成分の活性を検討した。生物活性試験結果の一例として、ヤマトシロアリに対する抗蟻活性試験の結果を図 4 に示す。抗蟻活性試験の結果、linalool では(-)体、(+)体共に比較的高濃度の場合に致死活性が示された。Linalool oxide は立体異性体ごとに濃度依存的な摂食阻害活性および致死活性を示した。特に、(2*R*,5*R*)-linalool oxide には強い致死活性が認められた。しかし、ラセミ体と単体とでは活性が異なり、ラセミ体では活性が弱くなる傾向が見られた。これらの結果から Linalool oxide の抗蟻活性は立体構造に大きく影響されることが示された。また、成分は顕著な忌避活性を示し、立体構造の違いによって活性様式が異なることも示された。

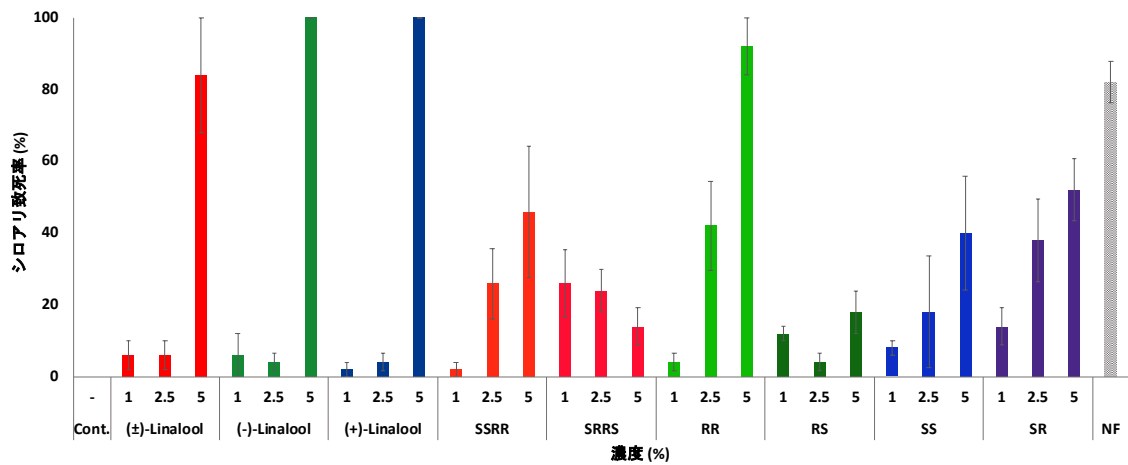


図 4 Linalool と linalool oxide のヤマトシロアリ強制接触試験結果 (試験期間 25 日)

Cont.: コントロール, SSRR : (2*S*,5*S*)- Linalool oxide と (2*R*,5*R*)- Linalool oxide のラセミ混合物, SRRS: (2*S*,5*R*)- Linalool oxide と (2*R*,5*S*)- Linalool oxide のラセミ混合物, RR: (2*R*,5*R*)- Linalool oxide, RS: (2*R*,5*S*)- Linalool oxide, SS: (2*S*,5*S*)- Linalool oxide, SR: (2*S*,5*R*)- Linalool oxide, NF:無給試験

抗菌試験では、linalool および linalool oxide の木材腐朽菌に対する抗菌活性はほとんど認められなかったが、特定の糸状菌に対して抗菌活性が示された。また、linalool および linalool oxide の立体異性の違いによる抗菌活性の差異についても明らかになった。

また、オオバクロモジの産生する成分の森林生物への活性について検討し、キクイムシ類に対する誘引活性が示唆された。さらに葉油成分にスズメバチ類に対する忌避効果も示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Manami, Kusumoto Norihisa, Matsui Naoyuki, Makino Rei, Hashida Koh, Arai Daisuke, Iiduka Yoshiaki, Ashitani Tatsuya	4. 巻 42
2. 論文標題 Antitermitic and antifungal properties of enantiopure linalool and furanoid linalool oxide confirmed in <i>Lindera umbellata</i> var. <i>membranacea</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Wood Chemistry and Technology	6. 最初と最後の頁 37 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02773813.2021.2004166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斉藤正一, 芦谷竜矢
2. 発表標題 オオバクロモジ抽出物の森林昆虫誘引/忌避活性評価 2
3. 学会等名 第4回 樹木抽出成分研究交流会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木瑠偉, 斉藤正一, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 森川卓哉
2. 発表標題 オオバクロモジ樹皮の成分変異
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤正一, 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光
2. 発表標題 オオバクロモジ抽出物の森林昆虫に対する誘引・忌避活性2
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斎藤正一, 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光
2. 発表標題 オオバクロモジ抽出物の森林昆虫誘引/忌避活性評価
3. 学会等名 第3回樹木抽出成分討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 斎藤正一, 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光
2. 発表標題 オオバクロモジ抽出物の森林昆虫に対する誘引・忌避活性
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光, 松井直之, 牧野礼
2. 発表標題 オオバクロモジ低極性成分の分析と生物活性
3. 学会等名 第2回樹木抽出成分討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春田黎暉, 佐藤愛美, 芦谷竜矢
2. 発表標題 オオバクロモジの培養細胞と無菌苗の調製
3. 学会等名 第24回東北森林科学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光, 松井直之, 牧野礼
2. 発表標題 オオバクロモジ(Lindera umbellate var. membranacea) 精油の調製 と成分分析
3. 学会等名 第63回 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 春田黎暉, 佐藤愛美, 芦谷竜矢
2. 発表標題 オオバクロモジの培養細胞と無菌苗の調製II
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤愛美, 芦谷竜矢, 楠本倫久, 橋田光, 牧野礼, 松井直之
2. 発表標題 オオバクロモジに含有される linalool, linalool oxide の抗菌・抗蟻活性
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------