

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14751

研究課題名(和文)紅葉木本植物からのクロモゲンの探索

研究課題名(英文)Identification of chromogen from autumn leaves of trees

研究代表者

小関 良宏(Ozeki, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50185592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：100年以上前から樹木の紅葉を誘導する要因は葉内のショ糖濃度の上昇によるという説と葉内において紅葉を誘導する化合物が合成されるためという説が掲げられ、後者のこのような性質を有する仮想化合物はクロモゲンと命名されたが、実体は未解明だった。当研究者これまで水生植物であるオオカナダモにおいてクロモゲン候補化合物を2種類見出した。本研究において、カキの紅葉からの抽出液、さらにそれを精製したものの中にオオカナダモ切断葉に紅葉を誘導する化合物が存在することを見出した。このことは樹木植物においてもクロモゲンが存在していて、これが紅葉を誘導する要因となっていることを示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been proposed for over a hundred years that autumn coloration is caused by increase of sucrose content in cells of plant leaves at lower temperature in fall. The other possible mechanism to induce autumn coloration has been assumed that the hypothetical substances, named to chromogens, may be synthesized in leaves at lower temperature in fall and may induce chlorophyll degradation and anthocyanin synthesis in leaves at lower temperature. Two putative chromogens were identified in aquatic plant, *Egeria densa*, to induce autumn coloration to detached leaves of *E. densa*. Two or more substances in the extract prepared from autumn leaves of persimmon can induce autumn coloration to the detached leaves of *E. densa*, indicating that chromogens may exist in autumn leaves of land tree plants to be able to induce autumn coloration in leaves.

研究分野：植物生理学

キーワード：紅葉 クロモゲン アントシアニン カキ オオカナダモ

1. 研究開始当初の背景

樹木の紅葉は秋の日本を代表する風物詩として広く親しまれているが、それがなぜ起こるのかについては未解明である。この紅葉が起こるメカニズムについては100年以上前にショ糖を含む液に樹木の葉をさすことで紅葉することが見いだされ、さらにその後、環状剥離によって、樹木の樹皮を環状に剥離して葉からの光合成産物が転流できないようにした上位の葉において紅葉が起こることから、葉内のショ糖濃度が高まることによって紅葉が誘導されることが示され、ショ糖が紅葉誘導を引き起こしていると考えられ、このことは高等学校の生物の教科書にも記載されている。一方で、このショ糖濃度が高まるのが直接の原因ではなく、紅葉を誘導する何らかの化学的な化合物が秋になると葉内で合成され、これにより紅葉が誘導されるという考えも100年以上前に出され、このような紅葉を誘導する化合物に対して「クロモゲン」と命名されたが、その実体としての化合物は見いだされておらず、仮想化合物のままであった。

百瀬は水生植物であるオオカナダモの葉を茎から切断した切断葉をショ糖を含む水溶液に入れて光照射することで紅葉を誘導できる実験系を確立した。さらにオオカナダモ茎にはショ糖を含まない培養液においてもオオカナダモ葉の紅葉を制御する化合物が含まれていることを百瀬らが見いだした。本研究者は、その化合物について、オオカナダモ切断葉をバイオアッセイ系としてオオカナダモ茎から精製を行ない、2種類の新規化合物として5-methoxy-7- β -D-glycosyl epicatechin および 3-(3-methyl-4-hydroxy-5- β -D-glycosyl phenyl) propyl acetate を見だし、さらにそれらを有機化学合成したものにおいてもオオカナダモ切断葉に紅葉誘導活性を示すことを明らかにし、これらが仮想物質として予言されていたクロモゲンの実体化合物であることを示した。しかし、このような紅葉誘導因子としてのクロモゲンが陸上植物、特に紅葉を引き起こす樹木植物種に存在していて、紅葉誘導を司っているのかについては未知のままであった。

2. 研究の目的

紅葉する樹木としてモミジは広く知られているが、カキにおいても紅葉する品種があり、古くから柿紅葉として室町時代から詠まれて鑑賞用に栽培されてきただけでなく、柿の葉すしや刺身のつまものとして使われている。そこで、紅葉するカキ品種において紅葉誘導因子が存在しているのか、また紅葉しないカキ品種においてはその化合物が存在しないのか、あるいはクロモゲン化合物を添加することによって紅葉するのかを明らかにするため、まず紅葉するカキ品種である「富有」からオオカナダモ切断葉をバイオアッセイ系として紅葉誘導因子の抽出・精製を

試みた。さらに野外に生育する植物材料を用いた植物生理学的研究において最も難しい環境・生理条件の均一化のために、同一のカキの台木に紅葉品種と非紅葉品種を接木した個体を作成し、これに紅葉誘導因子を添加することによって紅葉誘導活性を再現性よく調査するための実験材料を作成することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 紅葉カキ品種「富有」紅葉からの紅葉誘導因子の抽出と精製

冷凍保存していた「富有」紅葉(生重量 2.0 g)に 400 ml の 80% メタノールを加え、ミキサーで 30 秒間破砕し 15 秒間おいてさらに 30 秒間破砕した。この抽出液をろ紙でろ過し、エバポレータで濃縮してメタノールを蒸発させ濃縮後の水溶液を一晩冷蔵庫に静置した。これを 3,000 rpm で 10 分間遠心し抽出液を HP20 カラムにより精製した。HP20 樹脂 (Diaion HP20) を詰めたカラムに純水を 2 回流して洗浄し、これに紅葉からの抽出液を 2 回繰り返して通して吸着させた後に純水で洗浄し、その後メタノールで 2 回溶出し約 180 ml のメタノール溶液画分を回収した。これを濃縮乾固した後、3 ml の 70% エタノールに溶解させた。この 70% エタノール溶液を 10,000 rpm で 5 分間遠心し、上清 100 μ l を濃縮乾固した。これを 20% メタノール 1 ml に溶解させ、ODS セパック (Sep-Pak Plus C18 Cartridges) 2 個を連結してメタノール 10 ml を流した後に 20% メタノールを 10 ml 流して平衡化したカラムにロードし、20% メタノール、30% メタノール、50% メタノールをそれぞれ 10 ml ずつ流して分取し、20% メタノール画分、30% メタノール画分、50% メタノール画分を得た。それぞれの画分をエバポレータで濃縮乾固し 1 ml の 70% エタノールに溶解させ冷凍保存した。各メタノール画分 10 μ l について高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて解析した。HPLC には LaChromElite (L-2130 型ポンプ、L-2420 形 UV-Vis 検出器、Hitachi High-Technologies)、カラムには COSMOCIL 5C18-MS II Packed Column, i. d. 4.6 mm x 100 mm を用いた。溶媒に純水とアセトニトリルを用い、分離条件は流速 1.0 ml/min、アセトニトリルを 10% から 60% までの直線勾配を 8 分間で行った。

さらに大量の「富有」紅葉から紅葉誘導因子を精製して核磁気共鳴装置 (NMR) により化学構造を決定するため、HP20 に通した有機層を取得し、濃縮乾固した後、70% エタノールに溶解させ、これを中圧フラッシュクロマトグラフィー (YAMAZEN) にロードし、溶出時間の順に分画した。各画分を濃縮乾固して蒸留水に溶解し、各々の画分について、オオカナダモ切断葉によるバイオアッセイ系によって紅葉誘導活性を調べた。

(2) オオカナダモ切断葉による紅葉誘導活性の測定

オオカナダモは東京都東久留米市を流れる黒目川で採取したものを用いた。各抽出液を 10^{-3} ~ 10^{-8} 倍に希釈した水溶液をそれぞれ培養ビンに 10 ml 入れ、各 3 本ずつ用意した。コントロールとして蒸留水を用意した。4 個体のオオカナダモの葉を茎から切り離し、それぞれ 1 枚ずつ計 4 枚を培養ビンに入れた。これを培養室においてトレーシングペーパーで減光した白色光の下、約 1 週間常温で静置した。雑菌の繁殖を防ぐため 2~3 日に一回 0.45 μ m シリンジフィルターで溶液をろ過した。その後、切断葉を回収し乾燥させて重量を測定した。そのオオカナダモ切断葉を 2 枚ずつ微量遠心管に入れ、アントシアニンおよびクロロフィルを抽出した。アントシアニン抽出には 0.1% HCl-メタノールを 1.5 ml、クロロフィル抽出には 70% エタノールを 1.5 ml を使用し暗所で 1 日抽出した。各抽出液を分光光度計を用いて吸光度を測定し定量した。

(3) 紅葉カキ品種および非紅葉カキ品種幼植物体の葉への紅葉誘導因子類縁化合物エピカテキン溶液の散布

鉢植えのカキ品種「甲州百目」(高さ約 80 cm) を購入し、この上部約 60 cm を切断除去し、その上部に奈良県農業研究開発センターで得た紅葉カキ品種「富有」と非紅葉カキ品種「台湾正柿」の穂木を接木して育成した。穂木が台木に活着して十分に成長したことを確認した後、10 月に 10^{-9} M に調製したエピカテキン水溶液を接ぎ木したカキの葉に霧吹きで散布した。3~4 日に 1 回、1 ヶ月にわたり散布を行い葉の色の変化を観察した。

(4) 野外育成しているカキ同一個体への紅葉カキ品種および非紅葉カキ品種の接木

野外で生育しているカキを用いて研究を行うため、光・温度環境や水・栄養分吸収環境の生育環境要因を可能な限り同じにするため、東京農工大学構内に生育しているカキ(品種不明、樹高約 3 - 5 m) の主幹および脇枝を切断し、その切断部分の形成層付近に切れ込みを入れ、奈良県農業研究開発センターで得た紅葉カキ品種「富有」と非紅葉カキ品種「台湾正柿」の穂木を接木して育成した。

4. 研究成果

(1) カキの葉の紅葉誘導因子の紅葉誘導活性

HPLC で ODS セパックで分離した 20% メタノール画分、30% メタノール画分、50% MeOH 画分を分析したところ、図 1 に示すスペクトルが得られた。この中で 20% メタノール画分の保持時間 4.6 分にオオカナダモの紅葉誘導因子と類似した吸収スペクトルを持つピーク部分が見出された。そこで ODS セパック 20% メタノール画分につき、各々の画

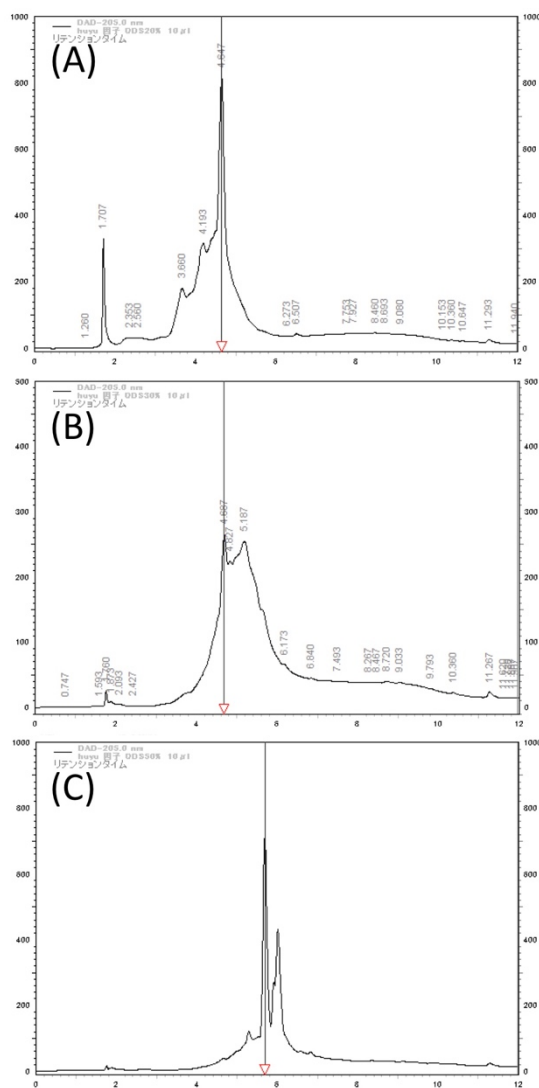


図 1. 図 1. ODS セパック 20% (A), 30% (B), 50% (C) エタノール溶出画分の HPLC による分析結果

分を濃縮乾固し水に溶解し、各画分について抽出原液に対して 10^{-8} から 10^{-3} の希釈系列に相当するように希釈し、これをオオカナダモ切断葉における紅葉誘導アッセイ系に供し、紅葉誘導活性を測定したところ、 10^{-7} の希釈域においてアントシアニンの合成とクロロフィルの減少が確認された (図 2(A)). さらにこれを HPLC によって分画した保持時間 4.6 分の画分につき、同様にオオカナダモ切断葉における紅葉誘導アッセイ系に供して紅葉誘導活性を測定しところ、図 2(B) のような紅葉誘導活性が確認された。このことから、20% メタノール画分においてオオカナダモにおける紅葉誘導活性が確認された。

しかし ODS セパックと HPLC を用いた方法では大量のサンプルを一度にロードできなかったため、次に 中圧クロマトグラフィーによる分離精製を試みた。まず抽出液を HP20 に通して有機層を取得し、濃縮乾固した後、70% エタノールに溶解させた。これを

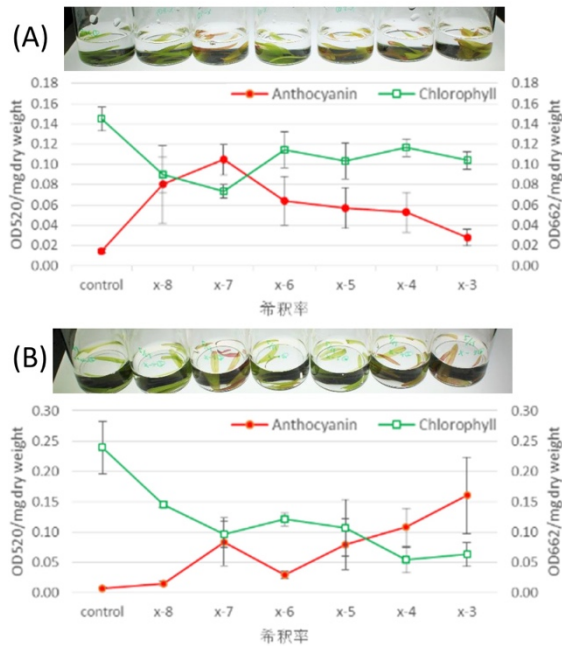


図 2. ODS セパック 20% エタノール溶出画分 (A) およびこの画分をさらに HPLC によって分画した保持時間 4.6 分のピーク (図 1(A) に見られる最大ピーク部分) におけるオオカナダモ切断葉に対する紅葉誘導活性。抽出原液に対して 10^{-8} から 10^{-3} の希釈系列に相当するように希釈した水溶液にオオカナダモ切断葉を入れて明所下で培養して紅葉誘導活性を調べた。上段は各希釈系列における紅葉誘導の様子、下段は培養後に葉を乾燥させて測定したアントシアニン量 (赤色) とクロロフィル量 (緑色) を乾燥重量当たりで示した。

中圧フラッシュクロマトグラフィーにロードし、溶出時間の順に F 1 から F 12 までの 12 の画分に分取した。各々の画分を濃縮乾固し水に溶解し、各画分について抽出原液に対して 10^{-8} から 10^{-3} の希釈系列に相当するように希釈し、これをオオカナダモ切断葉における紅葉誘導アッセイ系に供し、紅葉誘導活性を測定した。その結果、F8 において、投与濃度が高くなるにつれクロロフィル分解がおこり、これに対してアントシアニン合成は 10^{-5} の希釈濃度においてピークを示すことが明らかになった。一方でその他の画分において紅葉誘導活性はほとんど見られなかった。次にこの F7 および F8 を HPLC で分析したところ、オオカナダモの紅葉誘導因子の吸収スペクトルに似たピークが複数確認された。このことから、「富有」の紅葉においては複数種の紅葉誘導因子が存在するか、紅葉誘導因子が分解しやすく異なったピークとなって溶出されてくる可能性が示された。

(2) 紅葉カキ品種および非紅葉カキ品種幼植物体の葉への紅葉誘導因子類縁化合物エ



図 3. 紅葉カキ品種「富有」(A) と非紅葉品種「台湾正柿」に 10^{-9} M エピカテキンを噴霧して 1 ヶ月栽培した後の葉の変化。ビニールで仕切られた手前側が噴霧領域、向こう側の葉が非噴霧領域。左が噴霧前、右が噴霧後 1 ヶ月経過した時の状態。

ピカテキン溶液の散布

鉢植えの「甲州百目」を台木として接木した紅葉品種「富有」および非紅葉品種「台湾正柿」の穂木において展開した葉に対してエピカテキン溶液の散布を行ったが、「富有」では散布していた部分としていない部分とともに葉が同じように黄化し緑色の退行、すなわちクロロフィルの減退が見られたが、「台湾正柿」においては散布の有無に関わらず葉の色の変化はみられなかった (図 3)。このことからカキの葉は表皮からは紅葉誘導因子は作用しないか吸収しにくい可能性が考えられた。

(3) 野外育成しているカキ同一個体への紅葉カキ品種および非紅葉カキ品種の接木
東京農工大学構内において野外育成しているカキの主幹および脇枝に穂木として紅葉カキ品種「富有」と非紅葉カキ品種「台湾正柿」を接木した個体につき、初夏に接木して一冬を越させて次の夏まで約 7 割の穂木が活着して生き残り、1 本の木に両品種が生育するキメラ個体が作出できた。

以上の研究よりカキ「富有」の紅葉から ODS セパックカラムおよび HPLC により精製した画分に紅葉誘導活性が見られ、樹木においても紅葉誘導因子が存在していることが明らかになった。しかし、これを NMR による化学構造決定のために大量精製する目的で、分離精製法として中圧フラッシュクロマトグラフィーによる精製を試みたところ、複数の画分に紅葉誘導因子類縁化合物の存在が示唆された。このことから、複数種の紅葉誘導因子が存在するか、紅葉誘導因子が分解しやすい可能性があるため、抽出液の低温下あるいは酸素遮断下での紅葉誘導活性の安定性について明らかにし、その条件下での大量精製が必要とされた。さらにその精製に成功

し、その構造決定を行った後、有機化学合成により合成化合物を作り、これがオオカナダモ切断葉に対し、カキ紅葉より抽出・精製した天然物と同じ紅葉誘導活性を示すかを明らかにしていく必要がある。さらに同一台木に「富有」と「台湾正柿」を接木した個体に対し、両品種の枝部分にオオカナダモ由来紅葉誘導因子を展着材に混ぜて初秋にスプレーし、自然紅葉する「富有」の枝の葉において紅葉が誘導されるか、また本来なら紅葉しない「台湾正柿」の葉において紅葉が誘導されるかを明らかにする。これらの研究により、樹木植物の紅葉においても 100 年以上前に予言されたクロモゲンが化合物の実体として存在するかを明らかにしていくことができると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等：

<http://web.tuat.ac.jp/~ozeky/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小関良宏 (OZEKI, Yoshihiro)
東京農工大学・大学院工学研究院・教授
研究者番号：50185592

(2) 研究分担者

なし

(3) 研究協力者

百瀬忠征 (MOMOSE, Tadayuki)
元都立国立高校・教諭
東京農工大学・工学部・研究生
濱崎貞弘 (HAMASAKI, Sadahiro)
奈良県農業研究開発センター・総括研究員