

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：32686

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21404009

研究課題名（和文） 中国横断山脈地域産植物の化学的・遺伝的多様性から迫る種分化のメカニズム

研究課題名（英文） Study on Speciation Mechanisms of Plants in the Hengduan Mountains of China -An Approach Examining Their Chemical and Genetic Diversities-

研究代表者

黒田 智明（KURODA CHIAKI）

立教大学・理学部・教授

研究者番号：4015887

研究成果の概要（和文）：横断山脈の *Ligularia* 属では多くの種で種内多様性の存在が認められた。形態的に類似した種では化学成分および ITS 領域塩基配列で区別できないものがあることがわかった。また、*Cremanthodium* 属や *Parasenecio* 属などの近縁属でも *Ligularia* 属と同様の成分構成が見られた。雑種形成が進化における重要な要素と推定された。一方、同地域に生育する *Iris delavayi* では成分に地域差が見られたが、*Eupatorium heterophyllum* では見られなかった。

研究成果の概要（英文）： Many *Ligularia* species in the Hengduan Mountains were found to harbor intra-specific diversity. Some morphologically similar *Ligularia* species were indistinguishable with respect to the chemical composition and the ITS sequences. The chemical compositions of *Cremanthodium* and *Parasenecio* were found to be similar to those in *Ligularia*. Hybridization was inferred to be an important factor in the evolution of *Ligularia*. *Iris delavayi* was found to harbor intra-specific chemical diversity, while *Eupatorium heterophyllum* was not.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |
| 2010年度 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |
| 2011年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2012年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,300,000 | 3,990,000 | 17,290,000 |

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：横断山脈、*Ligularia* 属、多様化、セスキテルペン、ITS

1. 研究開始当初の背景

研究の全体構想は、地理的要因などに起因する二次代謝産物の多様性の形成メカニズムを解明することであり、キク科 *Ligularia* 属を材料とし、化学成分のみならず、DNA や形態の解析をも組み合わせるアプローチによって、テルペン類の多様性を理解すること

である。

テルペン類は植物界に普遍的に見られる化合物であって、二次代謝産物の多様性の研究には適した材料である。本研究で題材としたキク科 *Ligularia* 属もセスキテルペンを産し、かつ中国横断山脈地域において進化が現在進行中とされるため、同地域の *Ligularia* 属のセスキテルペンは、本研究目的に適した

対象である。

我々は、これまでの研究において、中国雲南省北西部および四川省西南部において調査・採集した *Ligularia* 属植物を用い、多くの種に種内多様性（集団間の差異）が存在することを明らかにしてきた。また、同一種内でも特定化合物（フラノエレモフィラン類）を大量に生産するグループが生態的に優位であることが示唆された。さらには、成分の酸化段階から種内のグループ間に進化的な前後関係があることが推定できる種が見つかるなど、進化の過程に関しても一定の知見を得た。

2. 研究の目的

本研究は、上記成果を発展させ、*Ligularia* 属および近縁属の *Cremanthodium* 属等の調査・分析を行って、テルペンの種内多様性と生態・系統との関係を詳細に明らかにすることを目的とした。まず地理的観点からは、地理的条件と種内多様化との関係をより詳細に記述するため、調査範囲を広げることとした。また、これまでの研究から、比較的最近に交雑により形成されたと考えられる種が認められたことを踏まえ、数種の *Ligularia* 近縁種が混生している場所の精査も行うこととした。

横断山脈地域では植物は一般的に非常に多様である。調査地域の特性を理解するため、他の植物調査も行った。中でも、*Eupatorium* 属（キク科）、*Salvia* 属（シソ科）、*Iris* 属（アヤメ科）の植物は *Ligularia* 属と生育域が重なるため、同時に調査することが可能である。*Ligularia* 属を含め、これらの植物の中には漢方薬・民間薬として用いられているものもある。地域によって成分が異なるか否かは薬理研究のうえからも重要である。

3. 研究の方法

本研究においては、現地調査が重要な位置を占める。そのため、補助金は主として現地調査のための旅費として使用した。この地域の *Ligularia* 属植物は多様化が進んでおり、開花時期にしか種同定ができないことから、現地調査は7月下旬—8月中旬に設定し、交通事情を考慮して期間は3週間程度とした。

これまでの経験を踏まえ、試料（主として根）を乾燥させて抽出以降の操作を行った。また、乾燥過程での成分変化も考えられるため、野外採集時に一部の試料を未乾燥のままエタノールにて抽出し、TLC 分析に供するという方法を併用した。遺伝子解析用の試料は葉の一部をちぎって得た。

(1) 現地調査

平成 21 年度は中国雲南省中甸地区から四川省甘孜州甘孜県、石渠県を中心として、同省馬尔康県方面まで調査した。平成 22 年度は四川省阿壩州阿壩県、若尔蓋県方面から青海省久治県を調査したのち、甘肅省合作市まで北上して調査した。平成 23 年度は四川省西部の白玉県、および同省中部の宝興県方面を中心に調査した。平成 24 年度は *Ligularia* 属の分布域の東端にあたる四川省中部地域の康定県、美姑県、および塩辺県を中心に調査を行った。

(2) 成分分析および遺伝子解析

分析手法はこれまでの経験からほぼ確立されており、それに従った。テルペン成分の一次記述は TLC 上のエーリッヒ反応によってフラン化合物の有無を判別することで行った。続いて、必要に応じて NMR 等の機器分析法を用いて主成分の構造を決定した。遺伝子研究は葉緑体 *atpB-rbcL* 間の非コード領域および核 ITS 領域の解析を行った。

(3) 新しい成分分析法の開発

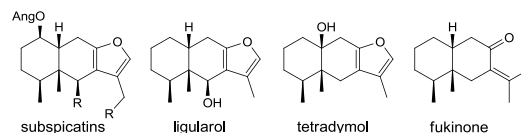
LC-MS を用いて成分構成を簡便に判別する方法の開発を行った。

4. 研究成果

まず、中心的課題である *Ligularia* 属について述べ、続いてそれ以外の植物について述べる。

(1) *L. lamarum* と *L. subspicata* の類似性

両種は分類上極めて近く、形態的な違いは舌状花の有無のみである。15 か所にて試料を得た。両種の生育環境は近く、5 か所では両種を同時に採集した。成分分析を行った結果、全部で 51 の化合物を単離した。そのうち、11 の新規化合物の構造を決定した。その中には C(6)-C(7)-seco-bakkane 骨格をもつ化合物の初めての例が含まれる。得られた化合物の多くはエレモフィラン型セスキテルペンであり、(1) subspicatin 類、(2) ligularol 誘導体、(3) tetradymol 誘導体、(4) fukinone 誘導体、(5) その他の化合物、の 5 つに大別された。このうち (1) はこれらの種に特徴的な物質である。



両種は成分構成において違いはなく、いずれもフラン生産型と非生産型に大別することができた。非フラン生産型の主成分はいずれの試料においても fukinone 誘導体であった。一方、フラン生産型では ligularol 誘導

体を主成分とするもの、subspicatin 類を主成分とするもの、などに大別されたが、違いは連続的であった。両種を同時に採集した 5 か所の試料では、それぞれの場所において成分がおおむね互いに類似しており、種の違いより場所の違いが成分差に影響していた。

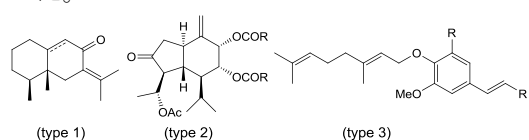
DNA 塩基配列の解析を行ったところ、試料ごとに異なる塩基数はこれまでに報告した同属他種の種内変異と比較して多いが、両種を区別することはできず、成分研究の結果を裏付けるものとなった。

以上、成分分析および DNA 解析の結果を総合し、*L. subspicata* と *L. lamarum* は形態的な区別は明確にできるものの、化学成分および ITS 領域塩基配列では区別できず、また、違いは連続的であるという結論が得られた。生合成経路を考慮すると、両種とも非フラン型が古いと考えられる。試料による違いが連続的であったことは、*L. subspicata* と *L. lamarum* では進化のさまざまな段階が見えていることが考えられる。

(2) *L. duciformis*, *L. kongkalingensis*, *L. nelumbifolia* の多様性

この 3 種は分類上非常に近く、形態は互いに非常によく似ている。生育環境も近く、分布域も重なっている。今回は、中国雲南省北西部～四川省西部にかけて調査を行い、28 試料を得た。

2 つの新物質を含む 24 の化合物を単離した。試料は化学成分で大きく 4 タイプに分類された。タイプ 1 (2 試料) からはエレモフィラン型セスキテルペンが、タイプ 2 (3 試料) からはオプロパン型セスキテルペンが、それぞれ単離された。これらのセスキテルペン類は他の試料には含まれておらず、セスキテルペン生産型は例外的と考えられる。一方、全試料の半数以上を占めるタイプ 3 からは桂皮アルコール誘導体が主成分として得られた。タイプ 4 ではセスキテルペン、桂皮アルコール誘導体ともに見られず、lupeol が共通成分として得られた。種同定につながる形態的な特徴と成分との関連性は認められなかった。



ITS 領域および *atpB-rbcl* 領域の塩基配列の解析の結果、いずれの試料でも複雑な配列が見られた。また、長さの異なるコピーの存在も多く試料で認められた。これは、本種が過去に頻繁に雑種形成を起こしたことを示しており、形態的な多様性および成分多様性とも一致する。しかし化学成分による 4 つのタイプとの対応はみられなかった。遺伝的

な違いは連続的で、試料による違いは雑種形成の相手の違いによると推定される。

以上の結果は、3 種は化学成分および ITS 塩基配列のいずれにおいても互いに区別できないことを示している。分布と成分の関係をみると、セスキテルペン生産型 (タイプ 1、2) はいずれも分布域の端 (南端或いは東端) に位置している。分布域の端では雑種形成が起りやすいと言われており、今回の結果はそれを裏付けるものとなった。

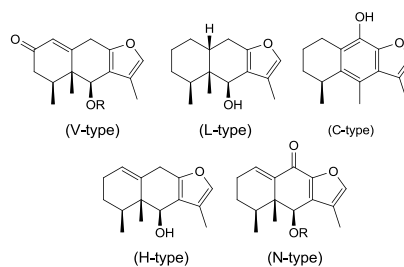
(3) *L. virgaurea* の多様性

四川省南西部に生育する本種は、virgaureones を主成分として生産するタイプ (以下 V 型と略す) と ligularol 誘導体を主成分として生産するタイプ (同 L 型) に分けられることを以前報告した (課題番号 16404008)。今回、四川省北部から甘粛省にかけての地域の調査を行い、得られた 38 試料を分析したところ、さらに 3 つのケモタイプの存在を見出した。

成分分析では 13 の新規化合物を含む 55 の化合物を単離した。新物質の一部は細胞毒性効果を示した。ユニークな骨格を有する二量体など、エレモフィランを基礎とするさまざまな骨格の化合物が得られ、それらの化合物の生合成についても考察した。

得られた化合物は、cacalol およびその誘導体、フラノエレモフィラン、フラン以外のエレモフィラン、テルペン二量体、およびその他の化合物、の 5 つに大きく分類された。さらに、フラノエレモフィラン化合物は全て 1(10)位に二重結合またはエポキシドを持っており、6 位が酸化されているという特徴があることがわかった。

今回見つかった 3 つの新たなケモタイプについてまとめると次のようになる。主成分から、2 試料は cacalol 生産型 (C 型)、2 試料は hydroxyeuryopsin 生産型 (H 型)、2 試料は neoadenostylone 生産型 (N 型) と判明した。C 型と H 型には共通成分が多く見られた。今回得られたフラノエレモフィラン化合物は互いに構造が近いので、これらのケモタイプは互いに近い関係にあると考えられる。



一方、核 ITS-領域の塩基配列の解析では、全試料は 3 つのクレードに分かれた。5 つのケモタイプと 3 つの遺伝クレードの関係に

ついてみると、L型はクレードA、V型はクレードBとよく対応していた。C型とH型は共にクレードCに属しており、成分分析の結果とよく対応している。N型はクレードBに含まれたが、クレードCとの共通成分も得られており、クレードBとCの関係は複雑である。

(4) *L. kanaitzensis*の複雑な多様性

前回の研究で、本種は雲南省中甸地区の同属他種と比較して多様化が進んでいることを報告した(課題番号16404008)。その後の現地調査において、3つの試料を新たに得たので、分析を行った。うち2試料は雲南省劍川県石鐘山で採集したもので、互いに形態的な差が認められ、山の東側で採集した試料は、var. *kanaitzensis*、西側で採集したものは var. *subnudicaulis*と同定した。

成分分析の結果、東側の試料からは9位に二重結合を持つフラノエレモフィランのみが主成分として得られた。西側の試料からは ligularol、tetradymol 誘導体のほか、新規桂皮アルコール誘導体を得られた。ITS領域の塩基配列の解析結果では、石鐘山の2試料は前回報告した2つのタイプのどちらとも距離が認められた。以上の結果は、本種では以前に報告した以上に種内多様化が進んでいることを示している。

我々は、フラノエレモフィラン生産種がエレモフィラン-8-オン生産種より生態的に有利であるとの仮説を提唱している。石鐘山の2試料を比較すると、いずれもフラノエレモフィランを生産するものの、tetradymol 生産型のほうが優勢である。また、雲南省香格里拉県安南地区でも本種は非常に勢力が強く、共通点は10位にヒドロキシ基を持つフラノエレモフィランを主成分として産することである。これらの事実はフラノエレモフィランの中でも生態的な有利さに差があることを示している。

(5) その他の *Ligularia* 種

雲南省北西部産 *L. cyathiceps* は主成分として cacalol および関連する誘導体を得られ、化学成分およびDNAにおいて多様性が小さいことがわかった。一方、*L. oligonema* の分析では、形態的類似種と比較すると、化学成分とITS領域の塩基配列では異なる結果を与え、進化過程の複雑さを示すものとなった。また、*L. lankongensis* ではビサボラン化合物の酸化様式に多様性が見られたが、核ITS領域では特に系統分離した試料はなく、DNAでは多様性が見られないと結論づけた。

L. hodgsonii は日本にも分布しており、中国雲南省産と日本北海道産との比較を行った。その結果、形態、化学成分、核ITS領域

の塩基配列ともに大きな差が認められた。

L. anoleuca と *L. veitchiana* は形態的に区別をつけにくいだが、成分では前者からはフラノエレモフィラン化合物が、後者からはベンゾフラン化合物が単離され、違いが明白となった。両種の間には距離があることはITS領域の塩基配列の解析結果からも示された。

(6) *Cremanthodium stenactinium*、*C. helianthus* および *C. rhodocephalum* の成分

キク科 *Cremanthodium* 属は横断山脈〜ヒマラヤ地域に特有の植物であり、4000m以上の高原地域によく見られる。*Ligularia* 属と分類上極めて近く、横断山脈地域における *Ligularia* 属植物の成分多様性を包括的に理解するうえで、*Cremanthodium* 属の研究は不可欠である。*Cremanthodium* 属植物は個体サイズが概して小さく、成分研究に必要な試料の収集が容易でないこともあって、同属植物の成分研究例は少ない。

四川省にて採集した *C. stenactinium* 2試料の根の成分分析を行い、4つの新規物質を含む9つの化合物を単離した。また、雲南省の2か所にて *C. helianthus* の試料を得、4つの新規化合物および4つの既知化合物を単離した。得られた化合物の多くはエレモフィラン型セスキテルペンであった。一方、雲南省産の *C. rhodocephalum* からは3つの新規ビサボラン化合物の他、オプロパン型セスキテルペンを単離した。

これまでに同じ地域の *Ligularia* 属からエレモフィラン型、ビサボラン型、およびオプロパン型化合物が極めて多数得られていることを合わせて考えると、*Cremanthodium* 属と *Ligularia* 属が分類上のみならず成分的にもきわめて近いことが明らかとなった。

(7) *Parasenecio petasitoides* の成分

キク科 *Parasenecio* 属も *Ligularia* 属に極めて近い。雲南省にて得た1試料の成分分析を行った結果、1位にアンゲリカ酸エステルを有する6つのエレモフィラン型新規セスキテルペンを得た。これらは *L. subspicata* および *L. lamarum* の特徴的成分である subspicatin 類と極めて類似しており、関連性に興味を持たれる。この他にも fukinone などが得られた反面、*Parasenecio* 属植物に多く見られる cacalol は得られなかった。

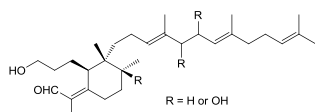
(8) *Iris delavayi* の成分

横断山脈地域はその地理的特徴により、植物の多様化が著しく進んでいると言われている。この地域の特性をより深く理解するには、*Ligularia* 近縁属以外の植物についても

調べる必要がある。そこで、*Ligularia* 属植物の採集時に、同時に採集が可能な植物をいくつか選び、研究を行った。

アヤメ科 *Iris* 属植物は横断山脈地域に幅広く分布する植物の1つである。アヤメは一般に *Ligularia* と比較して開花時期が早く、調査時期において一部はすでに花が終わっていて種同定が困難な場合が多かった。しかし、*I. delavayi* と同定ができた3つの試料について、成分を調べた。

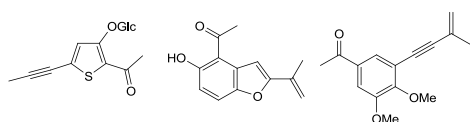
試料は雲南省の3か所で採集した。根の抽出エキスから3つの新物質を含む8つのイリダール型化合物(図に例を示す)を単離した。3つの試料のうち、地理的にやや離れた試料は他の2試料と比較して成分構成の違いが認められた。



(9) *Eupatorium heterophyllum* の成分

キク科 *Eupatorium* 属植物は世界中に分布する。日本産 *Eupatorium* 属の成分に多様性があることが知られており、横断山脈地域にも広く分布していることから研究対象として選んだ。

試料は雲南省の5か所で採集した。成分分析の結果、6つの新規化合物を含む15の化合物を単離した。代表的な化合物の構造式を示した。得られた化合物は生合成的に互いに関係が深いと考えられる。5つの試料を比較すると、成分多様性は小さいと考えられる。

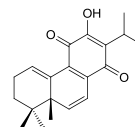


(10) *Salvia przewalskii* の成分

シソ科 *Salvia* 属植物は非常に種類が多く、中国植物志によると84種が中国に存在し、特に雲南省、四川省地域に生育する種については分類が未完成とされていることから研究対象として選んだ。

S. przewalskii は普通に見られる種のひとつで、薬理作用があることも知られている。試料は雲南省、四川省の7か所で得た。TLC分析を行ったところ、そのうち四川省雅江県で得た試料にはユニークな成分が含まれていることが判明した。その化合物を単離、構造決定したところ、転位アビエタン骨格を持つ新物質(図)であることがわかった。他に既知化合物 tanshinone IIA, salvinolone I, salvilenone、および cryptotanshinone を得

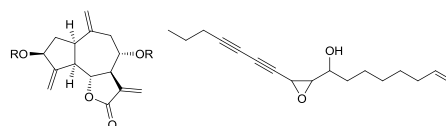
た。得られた物質の細胞毒性について調べたところ、salvinolone I、および salvilenone では HL-60 細胞に対して強い毒性が認められ、新規化合物にも弱い活性が認められた。



(11) その他の植物の成分

雲南省香格里拉県産マツムシソウ科 *Dipsacus chinensis* の根の抽出液から β -sitosterol などの他、2つの新規トリテルペン化合物を単離した。また、新規物質の細胞毒性について調べたところ、HeLa および HL-60 細胞に対して弱い活性が認められた。

キク科 *Saussurea katochaete* からは4つの新規グアイアン型セスキテルペンを葉から、新規エンジインアルコールを根から、それぞれ単離した。これ以外に、9つの既知化合物を単離した。



(12) LCMS 分析法の開発

L. virgaurea における V 型と L 型(上記(3)項参照)の2つのケモタイプ分類を迅速に行うために LC-MS を利用することとし、エキスを直接測定する方法とカラムを通して分離しつつ成分を比較する方法について検討した。その結果、両者を LC-MS で明確に区別できることを見出した。

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 67 件)

① H. Nagano, R. Hanai, H. Yamada, M. Matsushima, Y. Miura, T. Hoya, M. Ozawa, M. Fujiwara, H. Kodama, A. Torihata, H. Onuki, Y. Nezu, S. Kawai, M. Yamazaki, H. Hirota, Y. Saito, M. Tori, A. Ohsaki, X. Gong, C. Kuroda, Chemical and Genetic Study of *Ligularia duciformis* and Related Species in Sichuan and Yunnan Provinces of China, *Chem. Biodiversity* **2012**, *9*, 789-805. 査読有.

② Y. Saito, Y. Takashima, A. Kamada, Y.

Suzuki, M. Suenaga, Y. Okamoto, Y. Matsunaga, R. Hanai, T. Kawahara, X. Gong, M. Tori, C. Kuroda, Chemical and genetic diversity of *Ligularia virgaurea* collected in northern Sichuan and adjacent areas of China, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 10011-10029. 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2012.09.042

③ Y. Saito, M. Hattori, Y. Iwamoto, Y. Takashima, K. Mihara, Y. Sasaki, M. Fujiwara, M. Sakaoku, A. Shimizu, X. Chao, C. Kuroda, X. Gong, R. Hanai, M. Tori, Overlapping chemical and genetic diversity in *Ligularia lamarum* and *Ligularia subspicata*. Isolation of ten new eremophilanes and a new seco-bakkane compound, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 2220-2231. 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2011.01.082

[学会発表] (計 98 件)

① M. Tori, Recent Results in the Chemistry and Molecular Biology of Some *Ligularia* Species (Asteraceae), 8th International Symposium on Chromatography of Natural Products (18 May, 2012, Medical University of Lublin, Poland).

② C. Kuroda, R. Hanai, M. Tori, Y. Saito, H. Nagano, X. Gong, Furanorephilane as a new material for some *Ligularia* species in Yunnan and Sichuan, 7th IUPAC International Conference on Novel Materials and their Synthesis (NMS-VII) (20 October 2011, Shanghai 復旦大学 中国)

③ 永野 肇・花井 亮・山田ひろか・松嶋美佳・三浦 唯・藤原美保・大貫裕之・廣田 洋・齋藤義紀・通 元夫・大崎愛弓・龔 洵・黒田智明、キク科 *Ligularia duciformis* および関連種の化学的遺伝的多様性、第 53 回天然有機化合物討論会 (2011 年 9 月 27 日、大阪国際交流センター)

[図書] (計 5 件)

① 「薬学分析科学の最前線」高分解能 NMR を用いる植物成分の構造決定を通して植物の進化を探る、日本薬学会物理系薬学分会・分析化学担当教員会議編、通 元夫 (分担執筆、p22-23) (2009 年、株じほう)

[その他]

ホームページ

<http://www.rikkyo.ne.jp/web/kuroda/hengduan.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 智明 (KURODA CHIAKI)
立教大学・理学部・教授
研究者番号: 40158887

(2) 研究分担者

花井 亮 (HANAI RYO)
立教大学・理学部・教授
研究者番号: 30287916

通 元夫 (TORI MOTOO)
徳島文理大学・薬学部・教授
研究者番号: 90163956

齋藤 義紀 (SAITO YOSHINORI)
徳島文理大学・薬学部・助教
研究者番号: 30441588

永野 肇 (NAGANO HAJIME)
お茶の水女子大学・人間文化創成科学研究科・教授
研究者番号: 10114919
(平成 22 年度まで)

大崎 愛弓 (OHSAKI AYUMI)
東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教
研究者番号: 50161360

廣田 洋 (HIROTA HIROSHI)
独立行政法人理化学研究所・支援促進チーム・特任職員
研究者番号: 00126153

河原 孝行 (KAWAHARA TAKAYUKI)
独立行政法人森林総合研究所・四国支所・産学官連携推進調整監
研究者番号: 70353654

(3) 海外研究協力者

龔 洵 (GONG XUN)
昆明植物研究所・研究員

郝 小江 (HAO XIAOJIANG)
昆明植物研究所・元所長