

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05718

研究課題名（和文）精油の酸化から紐解く自然環境を利用した針葉樹の化学的防御能

研究課題名（英文）Chemical defense of conifers using the natural environment unraveling from the oxidation of essential oils

研究代表者

楠本 倫久（Kusumoto, Norihisa）

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：80537168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：トドマツ樹皮に豊富に含まれる  $\alpha$ -フェランドレンが、可視光に近い近紫外域の紫外線と酸素・温度等の影響によってクリプトン等の酸化生成物へと効率良く変化し、一部のトドマツ病原菌類に対する抗菌性の増強に関与している可能性を初めて明らかにした。加えて、緩慢ではあるものの、同様の酸化反応が立木においても確認された。これらの結果は、“針葉樹は自然環境を利用して効率的に防御物質を生成している”という本研究の仮説を強く裏付けるものであり、針葉樹に含まれるテルペン類の生態的役割を明らかにするために非常に重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

針葉樹の樹皮に豊富な樹脂（松ヤニの類）には、かさぶたの様に傷害部を保護する役割が知られている。一方、樹脂を構成するテルペン類には、菌や昆虫などに対して生物活性を示す成分が多数報告されているが、混合状態にある樹脂の防御機能に着目した研究は極めて少ない。本研究で、“針葉樹は自然環境を利用して効率的に防御物質を生成している”という仮説を検証することで、針葉樹の生存戦略における樹脂の生態的役割の一端を明らかにすると同時に、針葉樹の化学的な防御能力を最大限に利用した精油の新規変換・利用技術の開発に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：This study reveals for the first time that  $\alpha$ -phellandrene, which is abundant in *Abies sachalinensis* bark, is efficiently transformed into oxidation products such as cryptone under the influence of near-ultraviolet light, oxygen, and temperature, and may be involved in enhancing the antifungal activity against *A. sachalinensis* hosted pathogens. In addition, slow but similar oxidation reactions were also observed in standing trees. These results strongly support the hypothesis that conifers efficiently produce defensive compounds using the natural environment, and are very important for elucidating the ecological role of terpenes abundant in *A. sachalinensis* bark. The findings are very important for clarifying the chemo-ecological role of terpenoids in conifers.

研究分野：樹木成分学

キーワード：トドマツ樹皮  $\alpha$ -フェランドレン 紫外線 酸化 化学的防御 病原菌 精油

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

樹脂(ヤニ)を多く含む針葉樹は、傷害部位を樹脂で覆い自己修復する能力を有している。その際、精油成分がロジンを運ぶ溶媒の役割を果たし、傷害部で揮発することで“かさぶた様”の防御能を発揮することが知られている。昨今の研究で、精油はロジンと混合することで揮発性が低下し、傷害部における化学的防御能に関与している可能性が示されているが、その詳細については未解明である。一方で、精油中には特定の化学構造を有する酸化し易い成分の存在が示唆されており、精油の新規利用技術の開発に向け諸条件について検討した結果、環境条件を模した条件下(紫外線+酸素)でトドマツ樹皮精油を促進酸化させると、作物害虫や腐朽菌類に対する活性が著しく向上することを見出している。

本研究において、“針葉樹は自然環境を利用して効率的に防御物質を生成している”という仮説を検証することで、針葉樹の生存戦略における樹脂の役割の一端を初めて明確化できると同時に、針葉樹の化学的防御能を最大限に発揮した精油の新規変換・利用技術の開発に大きく貢献できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、針葉樹精油に広く含まれている特定の化学構造を有するモノテルペン類が、環境条件(熱、紫外線、酸素)によって迅速に酸化物へと変化する現象に着目し、環境条件による精油の酸化が病原菌類に対する抗菌性に与える影響の解明を目的とした。全期間を通じた主な研究項目は、(1)精油成分の酸化反応に関わる環境条件の解明、(2)精油成分の反応挙動の解明と酸化生成物の同定、(3)トドマツ病原菌類に対する酸化精油の活性評価の3点である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 精油成分の酸化反応に関わる環境条件の解明

トドマツの樹脂成分にはクローン間差が報告されている。よって、本研究では森林総合研究所 林木育種センター北海道育種場(江別市)に植栽の60年生の個体の中から、本研究で鍵となるモノテルペン炭化水素類の $\alpha$ -フェランドレンを豊富に含むクローンの選別を行った。複数の個体から樹皮を採取し(図1)粉碎した後、保有するセミラージスケールの減圧式マイクロ波水蒸気蒸留(VMSD)装置(2kg/バッチ)を用いて温度・時間・圧力を最適化した上で樹皮精油を抽出した(図2)。次に、3つの環境条件(紫外線、酸素、熱)を個別にコントロール可能な精油の酸化処理方法を検討した。実験には、240-400nm付近の特定波長を照射可能な内部照射型(テクノシグマ製)と外部照射型(ウシオ電機製)の紫外線照射装置を用い、紫外線波長、酸素流量、反応温度を組み合わせた処理から、 $\alpha$ -フェランドレンが影響を受け易い環境条件を検討した。なお、反応温度の制御には、-100 ~ +50 まで $\pm 0.2$ の精度で制御可能な極低温反応機(テクノシグマ製)を用いた。



図1. 樹皮試料の採集



図2. VMSD精油の抽出

#### (2) 精油成分の反応挙動の解明と酸化生成物の同定

上記(1)で確立した処理方法を用いて、GC分析から $\alpha$ -フェランドレンの経時的变化を定量的に調べた。その際、一定の処理時間毎に精油をサンプリングして処理直後の反応挙動を分析した。 $\alpha$ -フェランドレンの主な酸化生成物としてはクリプトンが報告されているが、その生成過程で生じる過酸化物や重合体等、マススペクトルのみでは推定できない成分も多いことが予想された。本研究では傷害部で持続的に効果を発揮する成分が重要となることため、GC分析で検出可能な比較的安定した酸化生成物を中心に成分同定を進めることとした。

#### (3) トドマツ病原菌類に対する酸化精油の活性評価

上記(2)で得られた酸化精油を用いて、3種類のトドマツ病原菌類に対する抗菌性を評価した。具体的には、トドマツ癌腫病原菌(*Lachnellula calyciformis*: MAFFNo.410529)、トドマツ枝枯病原菌(*Gremmeniella abietina*: MAFFNo.410426)、暗色雪腐病原菌(*Racodium therryanum*: MAFFNo.410406)をPDA培地上で培養し、菌糸成長量の比較から統計的に抗菌性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 精油成分の酸化反応に関わる環境条件の解明

###### -フェランドレンを豊富に含むトドマツ樹皮精油の抽出

本研究に適したトドマツ樹皮精油を得るため、-フェランドレンを豊富に含む個体の選別を行った。精英樹 12 クローンの樹皮を原料とし、個体別に VMSD 装置にて精油を抽出した。各精油を GC-MS 分析に供した結果、特定のトドマツクローン（朝日 101 号、遠軽 1 号）の樹皮から -フェランドレンを 40-50% (v/v) 含む精油の抽出に成功した。

###### 紫外線を用いた精油の促進酸化処理の有効性

-フェランドレンを中心とした精油成分の酸化条件を明確化するため、紫外線による促進酸化処理の有効性について検証した。朝日 101 号の樹皮精油にウンデカン（内部標準）を加えた精油溶液を調製し、ピーク波長 405nm の LED ランプを内部照射方式で用いて、UV+N<sub>2</sub>、UV+O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub> のみの 3 条件下で精油溶液を処理し、主要 3 成分（-ピネン、-ピネン、-フェランドレン）の経時的変化を GC-MS 分析で調べた。その結果、再現性および酸化効率の点で内部照射方式が有効であること、紫外線と酸素が同時に存在する条件下でのみ -フェランドレンが著しく減少しクリプトン等の酸化生成物の含有量が増加すること等の知見を得た。

###### 環境条件（紫外線、酸素、熱）の制御と酸化処理方法の探索

環境条件の組合せによる成分変化を明確化するため、環境条件の制御による酸化処理の有効性について検討した。UV+O<sub>2</sub> 条件下、ピーク波長 405nm もしくは 365nm、試験温度 0±0.2 もしくは -20±0.2 で上記と同様の精油溶液を処理し、主要 3 成分に加え酸化生成物のクリプトンの経時的変化を GC-MS 分析で調べた結果、0 付近の温度域で可視光線に近いピーク波長を有する近紫外線波長による処理が酸化処理に効果的であることが示唆された。

##### (2) 精油成分の反応挙動の解明と酸化生成物の同定

###### 処理条件の違いによる精油含有成分の経時的変化

UC リアクター（低温反応装置）による 3 段階の温度制御（-20、0、20）の下で 3 波長（325nm、365nm、405nm）の LED ランプを用いた紫外線処理実験を行った。その結果、紫外線波長と処理温度によって含有成分の挙動が大きく異なること、-フェランドレンの主な酸化生成物であるクリプトンの含有量は 20、405nm で 4 時間処理した際に最大値を示すことが明らかとなった。なお、その際の変換効率は約 15%であった。

###### 主な酸化生成物の定量・定性分析

紫外線処理後のクリプトンを初めとした主な酸化生成物の同定および GC-MS 分析による定量を行った結果、クリプトン、ユーカマロール、クミンアルデヒド等が -フェランドレン由来の特徴的な酸化生成物であること、-ピネンと -ピネン由来の生成物も複数含まれることを明らかにした（図 3）。これら酸化生成物には高い抗菌・防虫能が報告されており、環境条件を制御することで樹体内には極微量にしか存在しないこれらの生成物を約 10%含む精油を得ることに成功した。

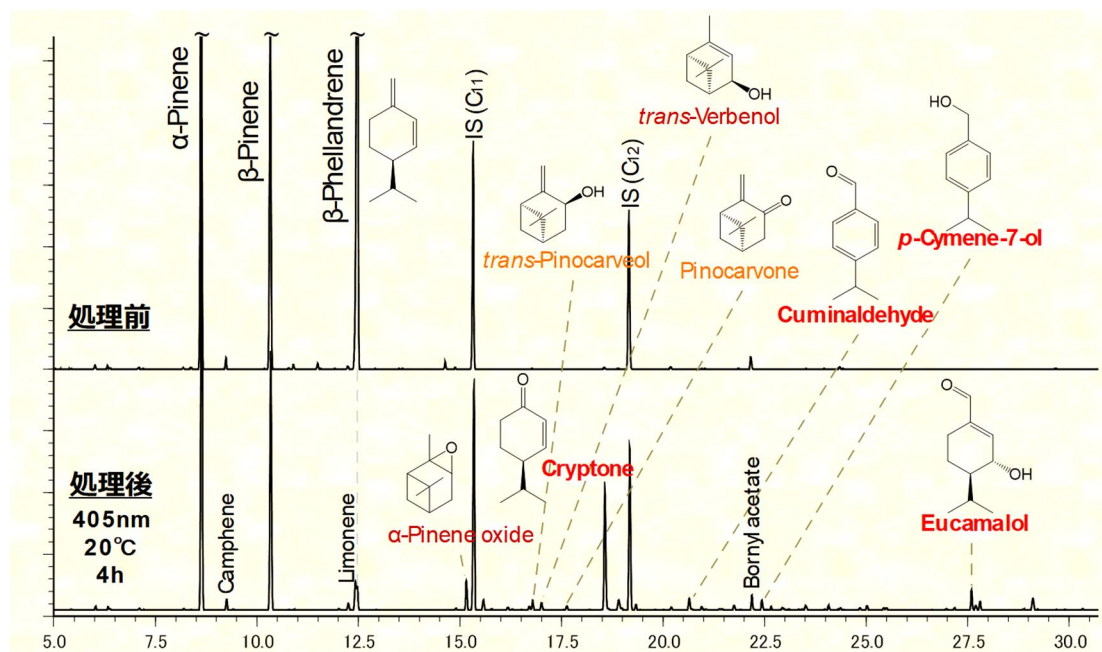


図 3 . 紫外線処理後のトドマツ樹皮 VMSD 精油の GC-MS クロマトグラム

### (3) トドマツ病原菌類に対する酸化精油の活性評価

#### トドマツ病原菌類に対する活性試験方法

上記で確立した効率的な紫外線処理方法(405nm、20℃、4時間)を用いて酸化処理したトドマツ樹皮精油を用いて、がん腫病原菌(モミノコザラタケ)、枝枯病原菌(グレメニエラ)、暗色雪腐病原菌(ラコディウム)の3種のトドマツ病原菌類に対する活性評価を行った。まず、各菌の培養条件について検討した結果、何れの菌も室温域、PDA培地上で良好な菌系生長を示したことから、同条件にて培養することとした。また、これらの菌は菌系成長が非常に緩慢であることから、 $\beta$ -シクロデキストリンに精油を包接し培地に添加する方法を選択した。その際、精油の添加濃度は培地中でトドマツ樹皮と同程度(5g/kgfw)となるように調製した。

環境条件による精油の酸化が化学的防御に果たす役割

コントロールに対する菌系成長阻害率から各菌に対する紫外線処理前と処理後の精油の抗菌性を評価した結果、がん腫病原菌および枝枯病原菌に対する抗菌性が有意に増加することを明らかにした(図4)。これらの結果から、樹皮精油の酸化物がトドマツ病原菌に対する防御物質として機能している可能性を初めて示すことができた。

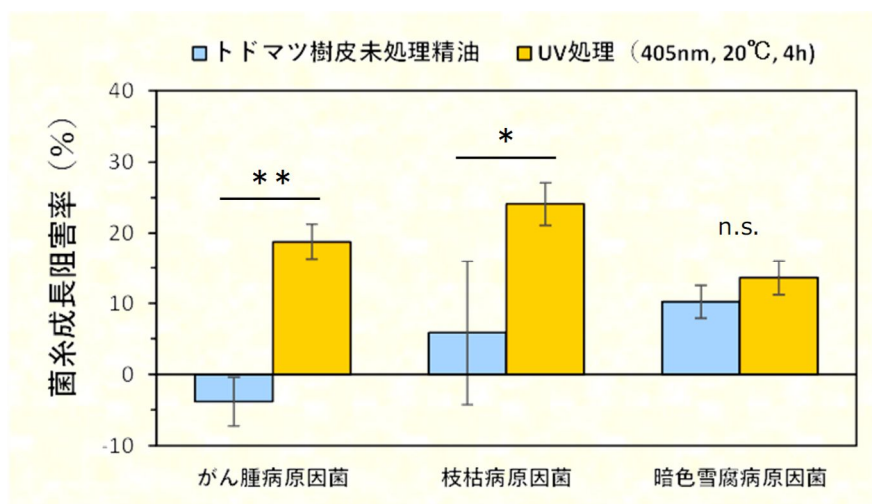


図4 . トドマツ病原菌3種に対する樹皮精油の菌系成長阻害率  
( $\pm$  SD, Welch's t-test: \*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ )

加えて、研究計画外の成果として、トドマツの樹皮に点在するヤニ袋付近に人為的な傷害を与え、6ヶ月間に渡り漏脂樹脂に含まれるテルペン類の経時変化を分析した。その結果、 $\beta$ -フェランドレンの減少に伴い傷害後にクリプトン含有量が徐々に増加する傾向を立木で初めて確認した。同実験を複数のヤニ袋で行った結果、酸化生成物の量にばらつきが見られたものの、すべてのヤニ袋で同様の現象が確認された。

以上の結果から、トドマツ樹皮に豊富に含まれる $\beta$ -フェランドレンが、可視光に近い近紫外線の紫外線と酸素・温度の影響によって効率的にクリプトン等の酸化生成物へと変化することで、一部のトドマツ病原菌類に対する抗菌性の向上に関与していることが初めて明らかとなった。また、緩慢ではあるが立木においても確認されたこれらの成分変化は、本研究の仮説を強く裏付けるものであると同時に、トドマツ樹皮に豊富なテルペン類の生態的役割を明らかにするために非常に重要な知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 楠本倫久	4. 巻 9(12)
2. 論文標題 樹木精油の特性を生かした未活用森林資源の高付加価値化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JATAFFジャーナル	6. 最初と最後の頁 12-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 楠本倫久、橋田光、松井直之、中田了五、大平辰朗
2. 発表標題 トドマツ病原菌類に対する酸化樹皮精油の抗菌性
3. 学会等名 第74回日本木材学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 楠本倫久、橋田光、松井直之、大平辰朗、中田了五
2. 発表標題 近紫外線によるトドマツ樹皮精油の成分変化
3. 学会等名 第73回日本木材学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Norihisa Kusumoto
2. 発表標題 Potential of coniferous terpenoids: Utilization of their functionality as defensive components.
3. 学会等名 Special Program for IUFRO World Day, Static Event: State-of-the-art Research Topics for the Future (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------